



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0145865
(43) 공개일자 2022년10월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 21/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7032708
- (22) 출원일자(국제) 2021년02월26일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년09월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2021/007286
- (87) 국제공개번호 WO 2021/172498
국제공개일자 2021년09월02일
- (30) 우선권주장
JP-P-2020-033483 2020년02월28일 일본(JP)

- (71) 출원인
니뽀 신야쿠 가부시키키가이샤
일본 교토후 6018550 교토시 미나미쿠 잇쇼인니시
노쇼몬구치쵸 14
고쿠리쯔겐꾸가이하쯔호징 고히리쯔 세이신·신께
이 이료겐꾸센타
일본 도쿄도 코다이라시 오가와히가시쵸 4-1-1
- (72) 발명자
혼다 유
일본 이바라키 츠쿠바시 사쿠라 3쵸메 14-1 니뽀
신야쿠 가부시키키가이샤 동부 창약연구소 내
무치마 가나메
일본 이바라키 츠쿠바시 사쿠라 3쵸메 14-1 니뽀
신야쿠 가부시키키가이샤 동부 창약연구소 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
서종완

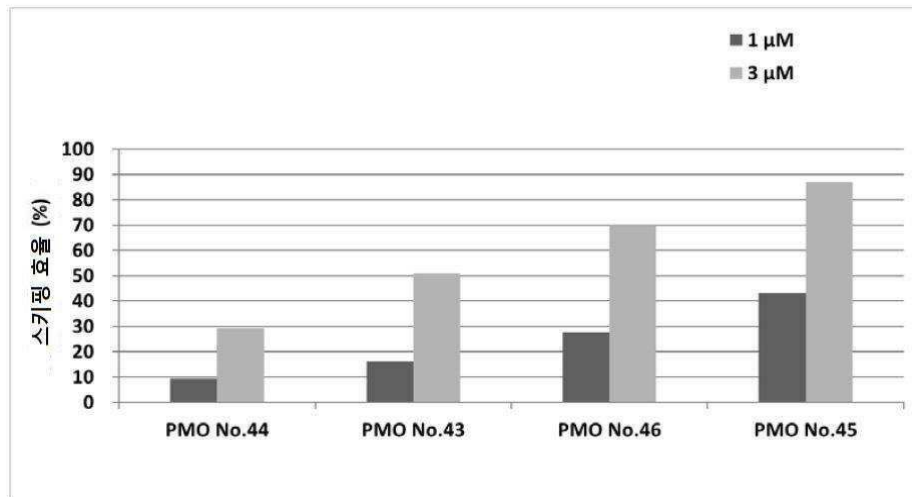
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 엑손 51의 스키핑을 유도하는 안티센스 핵산

(57) 요약

본 명세서에 있어서, 인간 디스트로핀 유전자의 제51번째 엑손을 고효율로 스키핑시키는 약제가 제공된다. 또한, 본 명세서에 있어서, 인간 디스트로핀 유전자의 제51번째 엑손의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61P 21/04 (2018.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/31 (2013.01)

(72) 발명자

후쿠이 다카히로

일본 이바라키 츠클바시 사쿠라 3초메 14-1 니뿐
신야쿠 가부시키키가이샤 동부 창약연구소 내

하세가와 사키

일본 이바라키 츠클바시 사쿠라 3초메 14-1 니뿐
신야쿠 가부시키키가이샤 동부 창약연구소 내

다케다 신이치

일본 도쿄도 코다이라시 오가와히가시쵸 4-1-1 고
쿠리쯔겐꾸가이하쯔호징 고크리쯔 세이신·신케이
이료겐꾸센따 내

아오키 요시츠구

일본 도쿄도 코다이라시 오가와히가시쵸 4-1-1 고
쿠리쯔겐꾸가이하쯔호징 고크리쯔 세이신·신케이
이료겐꾸센따 내

명세서

청구범위

청구항 1

아래 (a1)~(d1) :

(a1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 안티센스 올리고머 ;

(b1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해 1~5개의 염기가 결실, 치환, 삽입 및 / 또는 부가된 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픝을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ;

(c1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해, 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픝을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ; 및

(d1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드와 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 안티센스 올리고머로서, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픝을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머

로 이루어진 군으로부터 선택되는 안티센스 올리고머(단, 서열번호 90 및 97~126 중 어느 하나의 염기서열로 이루어지는 안티센스 올리고머를 제외함) 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

청구항 2

아래의 (e)~(h) :

(e) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열로 이루어지는 안티센스 올리고머 ;

(f) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해 1~5개의 염기가 결실 및 / 또는 치환된 염기서열로 이루어지고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픝을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ;

(g) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해, 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열로 이루어지고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픝을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ; 및

(h) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드와 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 안티센스 올리고머로서, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픝을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머

로 이루어진 군으로부터 선택되는 안티센스 올리고머(단, 서열번호 90 및 97~126 중 어느 하나의 염기서열로 이루어지는 안티센스 올리고머를 제외함) 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 안티센스 올리고머가,

서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해, 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 갖고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픝을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머

인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 안티센스 올리고머가,

(a2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 안티센스 올리고머 ;

(b2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열에 대해 1~5개의 염기가 결실, 치환, 삽입 및 / 또는 부가된 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스킵핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ;

(c2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열에 대해, 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스킵핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ; 및

(d2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오타이드와 스트랜젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 안티센스 올리고머로서, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스킵핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머

로 이루어진 군으로부터 선택되는 안티센스 올리고머

인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

올리고뉴클레오타이드인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 당부분 및 / 또는 인산 결합 부분이 수식되어 있는, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 당부분은, 2' 위치의 -OH기가 OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 기(상기 R은 알킬 또는 아릴을 나타내고, 상기 R'는 알킬렌을 나타낸다.)로 치환된 리보오스인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 인산 결합 부분이 포스포로티오에이트 결합, 포스포로디티오에이트 결합, 알킬포스포네이트 결합, 포스포로아미데이트 결합 및 보라노포스페이트 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

모르폴리노 올리고머인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

청구항 10

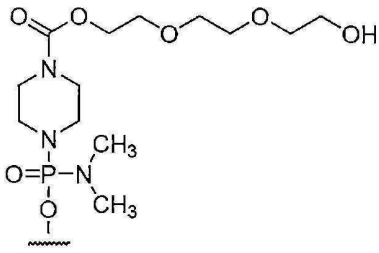
제9항에 있어서,

포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

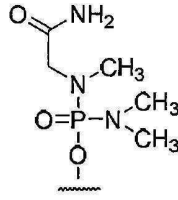
청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서,

5' 말단이 하기 화학식 (1)~(3) :



(1)



(2)



(3)

중 어느 하나의 기인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물을 포함하는, 근이영양증 치료용 의약 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

추가로 의약적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 의약 조성물.

청구항 14

근이영양증 환자에게 투여하기 위한 제12항 또는 제13항에 기재된 의약 조성물로서, 상기 환자가 디스트로핀 유전자에 엑손 51의 스키픽의 대상이 되는 변이를 갖는 환자인, 의약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 환자가 적어도 엑손 51 근방의 엑손의 결실에 의한 프레임 시프트 돌연변이를 갖는 동시에 엑손 51의 스키픽에 의해 아미노산의 리딩 프레임이 수정되는 디스트로핀 유전자를 갖는, 의약 조성물.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서,

상기 환자가 디스트로핀 유전자에 엑손 13-50, 29-50, 40-50, 43-50, 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63의 결실에 의한 프레임 시프트 돌연변이를 갖는, 의약 조성물.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 환자가 인간인, 의약 조성물.

청구항 18

근이영양증 치료용 의약의 제조에 있어서 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물의 사용.

청구항 19

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들

의 수화물의 유효량, 또는 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 기재된 의약 조성물을, 근이영양증 환자에게 투여하는 공정을 포함하는, 근이영양증의 치료방법.

청구항 20

제19항에 있어서,
상기 환자가 인간인, 치료방법.

청구항 21

제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,
근이영양증의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물, 또는 의약 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서,
상기 치료에 있어서, 근이영양증 환자가 인간인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물, 또는 의약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 디스트로핀 유전자의 제51번째 엑손의 스킵핑을 유도하는 안티센스 올리고머 및 그 안티센스 올리고머를 포함하는 의약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뒤시엔느형 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy ; DMD)은 출생 남자 약 3,500명에 1명이 발증하는 가장 빈도가 높은 심각한 유전성 진행성 근위축증이다. 유아기에는 건강한 정상인 인간과 거의 다른 수준의 운동기능을 나타내지만, 만 4~5세경부터 근력 저하가 보인다. 그 후, DMD 환자의 근력 저하는 진행되어 DMD 환자는 만 12세경까지 보행 불능이 되고, 20대에서 심부전 또는 호흡기 부전에 의해 사망에 이른다. 현재 DMD에 대한 충분한 치료법은 없어, 유효한 치료약의 개발이 강하게 요구되고 있다.

[0003] DMD의 원인은 디스트로핀 유전자의 변이인 것이 알려져 있다. 디스트로핀 유전자는 X염색체에 존재하며, 220만 염기쌍의 DNA로 이루어지는 거대한 유전자이다. DNA로부터 mRNA 전구체로 전사되고, 또한 스플라이싱에 의해 인트론이 제거되어 79개의 엑손이 결합하여 번역영역에 대응하는 mRNA는 11,058 염기가 된다. 이 mRNA로부터 3,685의 아미노산으로 번역되어 디스트로핀 단백질이 생성된다. 디스트로핀 단백질은 근세포의 막 안정성 유지에 관여하고 있어, 근세포를 파손되기 어렵게 하기 위해 필요하다. DMD 환자의 디스트로핀 유전자는 변이를 갖기 때문에 근세포에 있어서 기능을 갖는 디스트로핀 단백질이 거의 발현되지 않는다. 그 때문에 DMD 환자 체내에서는 근세포의 구조를 유지할 수 없게 되어 다량의 칼슘 이온이 근세포 내로 흘러들어간다. 그 결과, 염증과 유사한 반응이 생겨 섬유화가 진행되기 때문에 근세포가 재생되기 어려워진다.

[0004] 베커형 근이영양증(Becker's muscular dystrophy ; BMD)도 디스트로핀 유전자의 변이가 원인인데, 그 증상은 근위축에 의한 근력 저하를 나타내지만 일반적으로 DMD와 비교하여 가볍고, 근력 저하의 진행도 느리며, 대부분의 경우 성인기에 발증한다. DMD와 BMD의 임상증상의 차이는 변이에 의해 디스트로핀의 mRNA가 디스트로핀 단백질로 번역될 때의 아미노산 리딩 프레임이 파괴되는지 또는 유지되는지에 따른 것으로 생각되고 있다(비특허문헌 1). 즉, DMD의 경우는 아미노산 리딩 프레임이 어긋나는 변이를 가짐으로써 기능을 갖는 디스트로핀 단백질이 거의 발현하지 않는데, BMD의 경우는 변이에 의해 엑손의 일부는 결실되어 있으나, 아미노산 리딩 프레임은 유지되어 있기 때문에 불완전하게나마 기능을 갖는 디스트로핀 단백질이 생산된다.

[0005] DMD의 치료법으로서 엑손 스킵핑법이 기대되고 있다. 이 방법은 스플라이싱을 개변함으로써 디스트로핀의 mRNA의 아미노산 리딩 프레임을 수복하여, 부분적으로 기능을 회복한 디스트로핀 단백질의 발현을 유도하는 방법이다(비특허문헌 2). 엑손 스킵핑의 대상이 되는 아미노산 서열 부분은 상실되게 된다. 그 때문에 이 치료에서 발현되는 디스트로핀 단백질은 정상 것보다 짧아지지만, 아미노산 리딩 프레임이 유지되기 때문에 근세포를 안

정화하는 기능이 부분적으로 유지된다. 따라서, 엑손 스킵핑에 의해 DMD는 보다 경증의 BMD와 동일한 증상을 나타내게 될 것으로 기대되고 있다. 엑손 스킵핑법은 마우스나 개에 의한 동물실험을 거쳐 인간 DMD 환자에 대한 임상시험이 행해지고 있다.

[0006] 엑손 스킵핑은 5' 또는 3' 스플라이스 부위 중 어느 하나 또는 양쪽, 또는 엑손의 내부를 표적으로 하는 안티센스 핵산의 결합에 의해 유도할 수 있다. 엑손은 양쪽의 스플라이스 부위가 스플라이소좀(spliceosome) 복합체에 의해 인식된 경우만 mRNA에 포함된다. 따라서, 스플라이스 부위를 안티센스 핵산으로 타겟팅함으로써 엑손 스킵핑을 유도할 수 있다. 또한 엑손이 스플라이싱의 기구에 인식되기 위해서는 엑손 스플라이싱 인핸서(ESE)로의 SR 단백질의 결합이 필요할 것으로 생각되고 있어, ESE를 타겟팅하는 것으로도 엑손의 스킵핑을 유도할 수 있다.

[0007] 디스트로핀 유전자의 변이는 DMD 환자에 따라 상이하기 때문에, 유전자 변이의 장소나 종류에 따른 안티센스 핵산이 필요해진다. 지금까지, 서오스트레일리아 대학의 스티브 윌튼(Steve Wilton) 등에 의해 79개 모든 엑손에 대해 엑손 스킵핑을 유도하는 안티센스 핵산이 제작되어 있고(비특허문헌 3), 네덜란드의 안네미케 아츠마-러스(Annemieke Aartsma-Rus) 등에 의해 39종류의 엑손에 대해 엑손 스킵핑을 유도하는 안티센스 핵산이 제작되어 있다(비특허문헌 4).

[0008] 전체 DMD 환자의 13% 정도는 제51번째 엑손(이하, 「엑손 51」이라 함)을 스킵핑함으로써 치료 가능할 것으로 생각되고 있다. 최근 들어서는, 디스트로핀 유전자의 엑손 51을 엑손 스킵핑의 타겟으로 한 연구에 대해서, 복수의 보고가 이루어져 있다(특허문헌 1~10 및 비특허문헌 3~7).

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 국제공개 제2015 / 137409호
- (특허문헌 0002) 국제공개 제2019 / 241385호
- (특허문헌 0003) 국제공개 제2002 / 024906호
- (특허문헌 0004) 국제공개 제2004 / 048570호
- (특허문헌 0005) 국제공개 제2004 / 083432호
- (특허문헌 0006) 국제공개 제2006 / 000057호
- (특허문헌 0007) 국제공개 제2010 / 048586호
- (특허문헌 0008) 국제공개 제2009 / 054725호
- (특허문헌 0009) 국제공개 제2010 / 050801호
- (특허문헌 0010) 국제공개 제2010 / 050802호

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Monaco A. P. et al., Genomics 2:90-95 (1988)
- (비특허문헌 0002) Matsuo M., Brain and Development 18:167-172 (1996)
- (비특허문헌 0003) Wilton S. D. et al., Molecular Therapy 15:1288-1296 (2007)
- (비특허문헌 0004) Annemieke Aartsma-Rus et al., Neuromuscular Disorders 12:S71-S77 (2002)
- (비특허문헌 0005) Aoki Y. et al., Molecular Therapy 18:1995-2005 (2010)
- (비특허문헌 0006) Nakano S. et al., Pediatrics International 53:524-529 (2011)
- (비특허문헌 0007) Echigoya Y et al., Molecular Therapy 25:2561-2572 (2017)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 상기와 같은 상황에 있어서, 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 고효율로 유도하는 신규 안티센스 올리고머가 요망된다. 또한, 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 고효율로 유도하는 활성을 유지하면서, 또한 의약으로서 우수한 성질(예를 들면, 용해성, 안전성)을 갖는 안티센스 올리고머가 요망된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 상기 문헌에 기재된 기술내용 및 디스트로핀 유전자의 구조 등을 상세하게 연구한 결과, 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나에 나타내는 염기서열을 갖는 안티센스 올리고머를 투여함으로써, 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 고효율로 유도하는 것을 발견하였다. 또한, 연구결과, 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 고효율로 유도하면서, 또한 우수한 용해성 및 안전성을 갖는 안티센스 올리고머를 발견하였다. 본 발명자들은 이 지견(知見)을 토대로 본 발명을 완성시켰다.

[0013] 즉, 본 발명은 아래와 같다.

[0014] [1]

[0015] 아래 (a1)~(d1) :

[0016] (a1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 안티센스 올리고머 ;

[0017] (b1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해 1~5개의 염기가 결실, 치환, 삽입 및 / 또는 부가된 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ;

[0018] (c1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해, 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ; 및

[0019] (d1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드와 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 안티센스 올리고머로서, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머

[0020] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 안티센스 올리고머(단, 서열번호 90 및 97~126 중 어느 하나의 염기서열로 이루어지는 안티센스 올리고머를 제외함) 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

[0021] [2]

[0022] 아래의 (e)~(h) :

[0023] (e) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열로 이루어지는 안티센스 올리고머 ;

[0024] (f) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해 1~5개의 염기가 결실 및 / 또는 치환된 염기서열로 이루어지고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ;

[0025] (g) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해, 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열로 이루어지고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ; 및

[0026] (h) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드와 고스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 안티센스 올리고머로서, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머

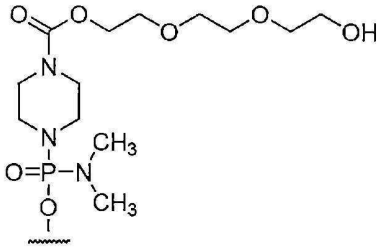
[0027] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 안티센스 올리고머(단, 서열번호 90 및 97~126 중 어느 하나의 염기서열로 이루어지는 안티센스 올리고머를 제외함) 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

[0028] [3]

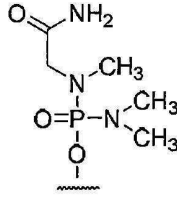
[0029] 상기 안티센스 올리고머가,

- [0030] 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해, 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 갖고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키피를 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머
- [0031] 인, 상기 [1] 또는 [2]에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.
- [0032] [4]
- [0033] 상기 안티센스 올리고머가,
- [0034] (a2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 안티센스 올리고머 ;
- [0035] (b2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열에 대해 1~5개의 염기가 결실, 치환, 삽입 및 / 또는 부가된 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키피를 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ;
- [0036] (c2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열에 대해, 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키피를 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ; 및
- [0037] (d2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드와 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 안티센스 올리고머로서, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키피를 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머
- [0038] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 안티센스 올리고머
- [0039] 인, 상기 [1]에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.
- [0040] [5]
- [0041] 올리고뉴클레오티드인, 상기 [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.
- [0042] [6]
- [0043] 상기 올리고뉴클레오티드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오티드의 당부분 및 / 또는 인산 결합 부분이 수식되어 있는, 상기 [5]에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.
- [0044] [7]
- [0045] 상기 올리고뉴클레오티드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오티드의 당부분은, 2' 위치의 -OH기가 OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 기(상기 R은 알킬 또는 아릴을 나타내고, 상기 R'는 알킬렌을 나타낸다.)로 치환된 리보오스인, 상기 [5] 또는 [6]에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.
- [0046] [8]
- [0047] 상기 올리고뉴클레오티드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오티드의 인산 결합 부분이 포스포로티오에이트 결합, 포스포로디티오에이트 결합, 알킬포스포네이트 결합, 포스포로아미데이트 결합 및 보라노포스페이트 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것인, 상기 [5] 내지 [7] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.
- [0048] [9]
- [0049] 모르폴리노 올리고머인, 상기 [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.
- [0050] [10]
- [0051] 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머인, 상기 [9]에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.
- [0052] [11]

[0053] 5' 말단이 하기 화학식 (1)~(3) :



(1)



(2)



(3)

[0054]

[0055] 중 어느 하나의 기인, 상기 [9] 또는 [10]에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물.

[0056] [12]

[0057] 상기 [1] 내지 [11] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물을 포함하는, 근이영양증 치료용 의약 조성물.

[0058] [13]

[0059] 추가로 의약적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 상기 [12]에 기재된 의약 조성물.

[0060] [14]

[0061] 근이영양증 환자에게 투여하기 위한 상기 [12] 또는 [13]에 기재된 의약 조성물로서, 상기 환자가 디스트로핀 유전자에 엑손 51의 스킵핑의 대상이 되는 변이를 갖는 환자인, 의약 조성물.

[0062] [15]

[0063] 상기 환자가 적어도 엑손 51 근방의 엑손의 결실에 의한 프레임 시프트 돌연변이를 갖는 동시에 엑손 51의 스킵핑에 의해 아미노산의 리딩 프레임이 수정되는 디스트로핀 유전자를 갖는, 상기 [14]에 기재된 의약 조성물.

[0064] [16]

[0065] 상기 환자가 디스트로핀 유전자에 엑손 13-50, 29-50, 40-50, 43-50, 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63의 결실에 의한 프레임 시프트 돌연변이를 갖는, 상기 [14] 또는 [15]에 기재된 의약 조성물.

[0066] [17]

[0067] 상기 환자가 인간인, 상기 [14] 내지 [16] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0068] [18]

[0069] 근이영양증 치료용 의약의 제조에 있어서 상기 [1] 내지 [11] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물의 사용.

[0070] [19]

[0071] 상기 [1] 내지 [11] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물의 유효량, 또는 상기 [12] 내지 [16] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물을, 근이영양증 환자에게 투여하는 공정을 포함하는, 근이영양증의 치료방법.

[0072] [20]

[0073] 상기 환자가 인간인, 상기 [19]에 기재된 치료방법.

[0074] [21]

[0075] 근이영양증의 치료에 사용하기 위한, 상기 [1] 내지 [11] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물, 또는 상기 [12] 내지 [16] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0076] [22]

[0077] 상기 치료에 있어서, 근이영양증 환자가 인간인, 상기 [21]에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 그들의 수화물, 또는 의약 조성물.

발명의 효과

[0078] 본 발명에 의해, 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽을 고효율로 유도하는 안티센스 올리고머를 제공할 수 있다. 또한, 본 발명에 의해, 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽을 고효율로 유도하는 활성을 유지하면서, 또한 우수한 용해성을 갖는 안티센스 올리고머를 제공할 수 있다. 또한, 본 발명에 의해, 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽을 고효율로 유도하는 활성을 유지하면서, 또한 우수한 용해성 및 안전성을 갖는(예를 들면, 신장 및 간장의 기능에 대한 영향이 없거나, 영향을 줄 가능성이 매우 낮은) 안티센스 올리고머를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0079] 도 1은 PMO No. 43, 44, 45, 46의 안티센스 올리고머의, 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 2는 PMO No. 42, 45, 47, 48, 49, 50의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 3은 PMO No. 42, 62, 63, 89의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 4는 PMO No. 83, 85의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 5는 PMO No. 33, 34, 35, 36, 37, 38의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 6은 PMO No. 83, 85, 90의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 7은 PMO No. 82, 84, 86, 87의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 8은 PMO No. 45, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 9는 PMO No. 42, 64, 65, 66, 85의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 10은 PMO No. 1, 2, 42, 66, 67, 85, 88, 92, 93의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 11은 PMO No. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 42, 68, 69, 70, 85의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 12는 PMO No. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 42, 71, 72, 73, 91의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 13은 PMO No. 8, 15, 16, 17, 42, 74, 75, 76의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 14는 PMO No. 8, 18, 19, 20, 42, 63, 75, 76, 77의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 15는 PMO No. 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 42, 77, 78의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키픽 효율을 나타낸다.

도 16은 PMO No. 8, 21, 27, 28, 29, 30, 42, 79, 80, 81의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스킵핑 효율을 나타낸다.

도 17은 PMO No. 8, 16, 21, 31, 32, 67의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스킵핑 효율을 나타낸다.

도 18은 PMO No. 16, 21, 94의 안티센스 올리고머의, RD세포에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스킵핑 효율을 나타낸다.

도 19는 PMO No. 42의 안티센스 올리고머의, 마우스에 있어서의 안전성 시험의 결과를 나타낸다. 왼쪽부터 아스파라긴산 아미노트랜스페라아제(AST)값, 알라닌 아미노트랜스페라아제(ALT)값, 요소질소량(BUN)값, 크레아티닌값을 평균값±표준편차로 나타낸다(Student의 t 검정에 의한 유의 수준 : $p < 0.05$).

도 20은 PMO No. 16 및 90의 안티센스 올리고머의, 마우스에 있어서의 안전성 시험의 결과를 나타낸다. 왼쪽부터 AST값, ALT값, BUN값, 크레아티닌값을 평균값±표준편차로 나타내고, 유의하게 상승이 보인 값에 p값을 나타낸다(Dunnett의 검정에 의한 유의 수준 : $p < 0.05$).

도 21은 PMO No. 21의 안티센스 올리고머의, 마우스에 있어서의 안전성 시험의 결과를 나타낸다. 왼쪽부터 AST값, ALT값, BUN값, 크레아티닌값을 평균값±표준편차로 나타낸다(Student의 t 검정에 의한 유의 수준 : $p < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0080] 아래에 본 발명을 상세하게 설명한다. 아래의 실시형태는 본 발명을 설명하기 위한 예시이며, 본 발명을 이 실시형태로만 한정하는 취지는 아니다. 본 발명은 그 요지를 일탈하지 않는 한 다양한 형태로 실시할 수 있다.
- [0081] 1. 안티센스 올리고머
- [0082] 본 발명은 인간 디스트로핀 유전자의 제51번째 엑손을 고효율로 스킵핑하는 안티센스 올리고머(이하, 「본 발명의 안티센스 올리고머」라 함)를 제공한다.
- [0083] [인간 디스트로핀 유전자의 제51번째 엑손]
- [0084] 본 발명에 있어서 「유전자」에는 게놈 유전자 이외에 cDNA, mRNA 전구체 및 mRNA도 포함된다. 바람직하게는 유전자는 mRNA 전구체, 즉 pre-mRNA이다.
- [0085] 인간 게놈에 있어서 인간 디스트로핀 유전자는 유전자좌 Xp21.2에 존재한다. 인간 디스트로핀 유전자는 220만 염기쌍의 사이즈를 가지고 있어 기지의 인간 유전자로서는 최대 유전자이다. 단, 인간 디스트로핀 유전자의 코딩영역은 겨우 14 kb에 불과하고, 그 코딩영역은 79개의 엑손으로서 디스트로핀 유전자 내에 분산되어 있다(Roberts, RG., et al., Genomics, 16: 536-538 (1993); Koenig, M., et al., Cell 53: 219-228 (1988)). 인간 디스트로핀 유전자의 전사물인 pre-mRNA는 스플라이싱을 받아서 14 kb의 성숙 mRNA를 생성한다. 인간의 야생형 디스트로핀 유전자의 염기서열은 공지이다(GenBank Accession No. NM_004006).
- [0086] 인간의 야생형 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 염기서열을 서열번호 127에 나타낸다.
- [0087] [안티센스 올리고머]
- [0088] 본 발명의 안티센스 올리고머는 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스킵핑에 의해, DMD형 디스트로핀 유전자로 코드되는 단백질을 BMD형 디스트로핀 단백질로 개변하는 것을 목적으로 제작된 것이다. 따라서, 안티센스 올리고머의 엑손 스킵핑의 대상이 되는 디스트로핀 유전자의 엑손 51에는 야생형뿐만 아니라 변이형도 포함된다.
- [0089] 본 발명의 안티센스 올리고머는, 구체적으로는 아래의 (a1)~(d1)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머이다.
- [0090] (a1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 안티센스 올리고머 ;
- [0091] (b1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해 1~5개, 1~4개, 1~3개, 1~2개, 또는 1개의 염기가 결실, 치환, 삽입 및 / 또는 부가된 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스킵핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ;
- [0092] (c1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해, 80% 이상, 84% 이상, 85% 이상, 89% 이상,

90% 이상, 94% 이상, 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ; 및

- [0093] (d1) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드와 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 안티센스 올리고머로서, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머
- [0094] 다른 태양으로서, 본 발명의 안티센스 올리고머는, 구체적으로는 아래의 (e)~(h)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머이다.
- [0095] (e) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열로 이루어지는 안티센스 올리고머 ;
- [0096] (f) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해 1~5개, 1~4개, 1~3개, 1~2개, 또는 1개의 염기가 결실 및 / 또는 치환된 염기서열로 이루어지고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ;
- [0097] (g) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열에 대해, 80% 이상, 84% 이상, 85% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 94% 이상, 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열로 이루어지고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ; 및
- [0098] (h) 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드와 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 안티센스 올리고머로서, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머
- [0099] 본 발명의 안티센스 올리고머로서는, 아래의 (a2)~(d2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머가 보다 바람직하다.
- [0100] (a2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 안티센스 올리고머 ;
- [0101] (b2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열에 대해 1~5개의 염기가 결실, 치환, 삽입 및 / 또는 부가된 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ;
- [0102] (c2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열에 대해, 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 포함하고, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머 ; 및
- [0103] (d2) 서열번호 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76 중 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드와 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 안티센스 올리고머로서, 또한 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키핑을 유도하는 활성을 갖는 안티센스 올리고머
- [0104] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 안티센스 올리고머.
- [0105] 상기 (b1)~(d1), (f)~(h), 및 (b2)~(d2)의 안티센스 올리고머는, 구체적으로는 각각 (a1), (e) 및 (a2)의 안티센스 올리고머의 변이체로, 환자의 디스트로핀 유전자의 변이(예를 들면, 다형) 등에 대응하는 것을 염두에 둔 것이다.
- [0106] 단, 본 발명의 안티센스 올리고머는, 국제공개 제2015 / 137409호에 기재된 아래의 염기서열로 이루어지는 안티센스 올리고머를 제외하는(포함하지 않는) 것이다.

서열	서열번호
CGGTAAGTTCTGTCTCAAGGAAGATGGCA	9 0
CTCATACCTTCTGCTTCAAGGAAGATGGCA	9 7
CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	9 8
AACATCAAGGAAGATGGCATT	9 9
TCCAACATCAAGGAAGATGGC	1 0 0
ACCTCCAACATCAAGGAAGAT	1 0 1
GAGUAACAGUCUGAGUAGGAG	1 0 2
UGUGUCACCAGAGUACAGUC	1 0 3
AACCACAGGUUGUCACCAG	1 0 4
UUUCCUUAGUAACCACAGGUU	1 0 5
GAGAUGGCAGUUUCCUUAGUA	1 0 6
UUCUAGUUUGGAGAUGGCAGU	1 0 7
AAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG	1 0 8
AACAUCAAGGAAGAUGGCAUU	1 0 9
AGGUACCUCCAACAUCAAGGA	1 1 0
CUGCCAGAGCAGGUACCUCCA	1 1 1
CGGUUGAAAUCUGCCAGAGCA	1 1 2
UGUCCAAGCCCGUUGAAAUC	1 1 3
CGGUAAGUUCUGUCCAAGCCC	1 1 4
GAAAGCCAGUCGGUAAGUUCU	1 1 5
AUCAAGCAGAGAAAGCCAGUC	1 1 6
UUUAUAACUUGAUAAGCAGAG	1 1 7
CUCUGUGAUUUUAUAACUUGA	1 1 8
CACCAUCACCCUCUGUGAUUU	1 1 9
CAAGGUCACCCACCAUCACCC	1 2 0
UUGAUAUCCUCAAGGUCACCC	1 2 1
GAUCAUCUCGUUGAUUCCUC	1 2 2
UCUGCUUGAUGAUAUCUCGU	1 2 3
GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUG	1 2 4
CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	1 2 5
CCUCCAACAUCAAGGAAGAUG	1 2 6

[0107]

[0108]

본 명세서 중 「스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 안티센스 올리고머」란, 예를 들면, 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드의 전부 또는 일부를 프로브로 하여, 콜로니 하이브리다이제이션법, 플라크 하이브리다이제이션법 또는 서던 하이브리다이제이션법 등을 사용함으로써 얻어지는 안티센스 올리고머를 말한다. 하이브리다이제이션의 방법으로서, 예를 들면, "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001" 및 "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997" 등에 기재되어 있는 방법을 이용할 수 있다.

[0109]

본 명세서 중 「스트린젠트한 조건」이란, 저스트린젠트한 조건, 중스트린젠트한 조건 및 고스트린젠트한 조건 중 어느 것이어도 된다. 「저스트린젠트한 조건」이란, 예를 들면 5×SSC, 5×텐하르트 용액, 0.5% SDS, 50% 포름아미드, 32℃의 조건이다. 또한 「중스트린젠트한 조건」이란, 예를 들면 5×SSC, 5×텐하르트 용액, 0.5% SDS, 50% 포름아미드, 42℃ 또는 5×SSC, 1% SDS, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 50% 포름아미드, 42℃의 조건이다. 「고스트린젠트한 조건」이란, 예를 들면 (1) 5×SSC, 5×텐하르트 용액, 0.5% SDS, 50% 포름아미드, 50℃, (2) 0.2×SSC, 0.1% SDS, 60℃, (3) 0.2×SSC, 0.1% SDS, 62℃, (4) 0.2×SSC, 0.1% SDS, 65℃, 또는 (5) 0.1×SSC, 0.1% SDS, 65℃의 조건인데, 이것에 한정되는 것은 아니다. 이들 조건에 있어서 온도를 올릴수록 높은 서열 동일성을 갖는 안티센스 올리고머가 효율적으로 얻어지는 것을 기대할 수 있다. 단, 하이브리다이제이션의 스트린젠스에 영향을 미치는 요소로서는 온도, 프로브 농도, 프로브의 길이, 이온 강도, 시간, 염농도 등의 복수의 요소를 생각할 수 있고, 당업자라면 이들 요소를 적절히 선택함으로써 동일한 스트린젠스를 실현하는 것이 가능하다. 여기서, 「서열 동일성」이란, 어느 2개의 핵산의 쌍에 대해서, 비교대상으로 하는 염기서열의 전체 범위에 있어서의 동일성을 말하고, 본 발명의 기술분야에 있어서 공지된 수학적 알고리즘을 사용하여 작성된 염기서열의 최적의 얼라인먼트에 있어서 일치하는 염기의 비율(%)에 의해 표시된다. 예를 들면, 어느 20 염기의

염기서열로 이루어지는 안티센스 올리고머에 대해, 「80%의 서열 동일성」을 갖는 염기서열로 이루어지는 안티센스 올리고머란, 상기 20 염기의 안티센스 올리고머에 대해, 16 염기 이상의 동일 염기를 갖는 안티센스 올리고머를 의미한다.

[0110] 서열 동일성은 FASTA(Science 227 (4693): 1435-1441, (1985))나 칼린 및 알취일에 의한 알고리즘 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 872264-2268, 1990 ; Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993)를 사용하여 결정할 수 있다. BLAST의 알고리즘에 기초한 blastn, blastx, tblastn이나 tblastx로 불리는 프로그램이 개발되어 있다(Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990). blastn을 사용하여 염기서열을 해석하는 경우는, 파라미터는 예를 들면 score=100, wordlength=12로 한다. BLAST와 Gapped BLAST 프로그램을 사용하는 경우는, 각 프로그램의 디폴트 파라미터를 사용한다.

[0111] 하이브리다이제이션에 시판의 키트를 사용하는 경우는, 예를 들면 Alkphos Direct Labelling and Detection System(GE Healthcare)을 사용할 수 있다. 이 경우는 키트에 첨부된 프로토콜에 따라 표지된 프로브와의 인큐베이션을 하룻밤 행한 후, 멤브레인을 55℃의 조건하에서 0.1%(w/v) SDS를 포함하는 1차 세정 버퍼로 세정 후, 하이브리다이제이션 안티센스 올리고머를 검출할 수 있다. 또는 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열의 전부 또는 일부를 토대로 프로브를 제작할 때, 시판의 시약(예를 들면, PCR 라벨링 믹스(로슈·다이어그노스틱사) 등)을 사용하여 그 프로브를 디곡시게닌(DIG) 라벨한 경우에는, DIG 핵산 검출 키트(로슈·다이어그노스틱사)를 사용하여 하이브리다이제이션을 검출할 수 있다.

[0112] 상기 이외에 하이브리다이제이션 가능한 안티센스 올리고머로서는, FASTA, BLAST 등의 상동성 검색 소프트웨어에 의해, 디폴트의 파라미터를 사용하여 계산하였을 때, 서열번호 1~89 및 91~93 중 어느 하나의 염기서열과 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상, 또는 99.9% 이상의 서열 동일성을 갖는 안티센스 올리고머를 들 수 있다.

[0113] 「인간 디스트로핀 유전자의 제51번째 엑손의 스킵핑을 유도한다」는 것은, 인간 디스트로핀 유전자의 전사물(예를 들면, pre-mRNA)의 엑손 51 및 / 또는 그 인접 인트론에 상당하는 부위에 본 발명의 안티센스 올리고머가 결합함으로써, 그 전사물이 스플라이싱을 받을 때 엑손 51의 제외가 일어나, 예를 들면 엑손 52가 결실된 DMD 환자의 경우, 엑손 50의 3' 말단에 상당하는 염기서열에 엑손 53의 5' 말단에 상당하는 염기서열이 연결되어, 코돈의 프레임 시프트가 일어나지 않은 성숙 mRNA가 형성되는 것을 의미한다.

[0114] 따라서, 디스트로핀 유전자에 엑손 51의 스킵핑의 대상이 되는 변이를 갖는 DMD 환자의 경우, 엑손 51의 스킵핑에 의해 치료가 가능하다. 그러한 DMD 환자로서는, 예를 들면, 적어도 엑손 51 근방의 엑손의 결실에 의한 프레임 시프트 돌연변이를 갖는 동시에 엑손 51의 스킵핑에 의해 아미노산의 리딩 프레임이 수정되는 디스트로핀 유전자를 갖는 DMD 환자를 들 수 있고, 보다 구체적으로는, 예를 들면, 디스트로핀 유전자의 엑손 13-50, 29-50, 40-50, 43-50, 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63 등의 결실을 갖는 것에 따른 프레임 시프트 돌연변이를 갖는 DMD 환자를 들 수 있다.

[0115] 여기서, 상기 「결합」은, 본 발명의 안티센스 올리고머와 인간 디스트로핀 유전자의 전사물을 혼합한 경우에, 생리적 조건하에서 양자가 하이브리다이제이션하여 이중 가닥을 형성하는 것을 의미한다. 상기 「생리적 조건하」란, 생체 내와 유사한 pH, 염 조성, 온도로 조절된 조건을 의미한다. 예를 들면 25~40℃, 바람직하게는 37℃, pH 5~8, 바람직하게는 pH 7.4이며, 염화나트륨 농도가 150 mM인 조건을 들 수 있다.

[0116] 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스킵핑 발생 여부는, 디스트로핀 발현세포(예를 들면, 인간 횡문근육종 세포)에 본 발명의 안티센스 올리고머를 도입하고, 상기 디스트로핀 발현세포의 total RNA로부터, 인간 디스트로핀 유전자 mRNA의 엑손 51의 주변영역을 RT-PCR 증폭하고, 그 PCR 증폭산물에 대해 nested PCR 또는 시퀀스 해석을 행함으로써 확인할 수 있다.

[0117] 스킵핑 효율 ES(단위 :%)는 인간 디스트로핀 유전자의 mRNA를 피검세포로부터 회수하여, 그 mRNA 중 엑손 51이 스킵한 밴드의 폴리뉴클레오티드량 「A」와, 엑손 51이 스킵하지 않은 밴드의 폴리뉴클레오티드량 「B」를 측정하고, 이들 「A」 및 「B」의 측정값을 토대로 아래의 식(1)에 따라 계산할 수 있다. 스킵핑 효율의 계산에 대해서는, 국제공개 제2012/029986호를 참조할 수 있다.

[0118]
$$E S = 100 \times A / (A + B) \cdots (1)$$

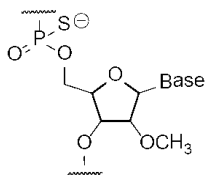
[0119] 바람직하게는 본 발명의 안티센스 올리고머는 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상,

70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 효율로 엑손 51을 스킵한다.

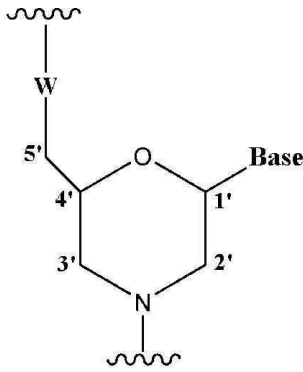
- [0120] 본 발명의 안티센스 올리고머는 또한 생리식염수에 대한 용해성이 높은 것이 바람직하다. 생리식염수에 대한 용해성이 높은 안티센스 올리고머는, 용해성이 낮은 것과 달리, 제제 보존 시에 석출되어 사용할 수 없게 될 가능성이 매우 낮고, 또한, 염을 포함하는 수액을 이용하였을 때 석출되어 사용할 수 없게 될 가능성도 매우 낮다. 또한, 생리식염수에 대한 용해성이 높은 안티센스 올리고머는 석출되기 어렵기 때문에, 투여 시에 독성을 나타낼 가능성(Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences 1, 91-99 (2007))도 매우 낮다. 따라서, 생리식염수에 대한 용해성이 높은 안티센스 올리고머는, 의약의 유효성분으로서 매우 이용 가치가 높다.
- [0121] 생리식염수에 대한 용해성은 20 mg/mL 이상인 것이 바람직하고, 30 mg/mL 이상인 것이 보다 바람직하며, 40 mg/mL 이상인 것이 더욱 바람직하고, 50 mg/mL 이상인 것이 특히 바람직하다. 안티센스 올리고머의 생리식염수에 대한 용해성은, 안티센스 올리고머를 목적의 농도로 생리식염수에 용해하고, 일정 시간 후에 침전 유무를 육안 관찰로 확인함으로써 평가할 수 있다.
- [0122] 또한, 안티센스 올리고머는 의약의 유효성분으로서 안전성이 높은 것이 바람직하다. 안전성은, 예를 들면, 안티센스 올리고머 투여 후의 혈중 아스파라긴산 아미노트랜스페라아제(AST)값, 알라닌 아미노트랜스페라아제(ALT)값, 요소질소(BUN)값 및 크레아티닌값을 지표로 하여 평가할 수 있다. AST값은 간장에 장애가 일어나면 높아지고, ALT값은 간장에 문제가 있으면 높아지며, BUN값은 신장의 기능이 저하되면 높아지고, 크레아티닌값은 신장의 사구체의 여과기능이 저하되면 높아지는 경향이 있는 것으로부터, 이들 값을 지표로 하여 안티센스 올리고머가 신장 및 간장의 기능에 주는 영향을 평가할 수 있다.
- [0123] 구체적으로는, 예를 들면, 건강한 정상 마우스에 안티센스 올리고머를 투여한 후, 혈중 AST값, ALT값, BUN값 및 크레아티닌값을 측정하여 통계학적 유의차 검정을 행하여, 대조군(용매 투여 또는 무처리)의 측정값과 비교하여 유의하게 상승이 보인 경우에 이상값으로 판정하고, 투여한 안티센스 올리고머는 신장 및 간장의 기능으로 영향을 주거나, 영향을 줄 가능성이 높다고 판단할 수 있다. 반대로, 유의하게 상승이 보이지 않은 경우에는, 신장 및 간장의 기능에 대한 영향이 없거나, 영향을 줄 가능성이 낮다고 판단할 수 있다. 또한, 대조군의 측정값과 비교하여 특정 상승률, 구체적으로는, 예를 들면 30% 이상의 상승률이 보인 경우에 이상값으로 판정해도 된다.
- [0124] 본 발명의 안티센스 올리고머로서는, 예를 들면, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35 염기의 길이를 갖는, 올리고뉴클레오타이드, 모르폴리노 올리고머, 또는 펩티드 핵산(Peptide Nucleic Acid: PNA) 올리고머를 들 수 있다. 안티센스 올리고머의 길이로서는, 20~30 염기, 20~29 염기, 22~30 염기, 22~29 염기 또는 25~29 염기의 길이가 바람직하고, 22~30 염기, 22~29 염기 또는 25~29 염기의 길이가 보다 바람직하며, 모르폴리노 올리고머가 바람직하다.
- [0125] 상기 올리고뉴클레오타이드(이하, 「본 발명의 올리고뉴클레오타이드」라 함)는 뉴클레오타이드를 구성 단위로 하는 본 발명의 안티센스 올리고머로서, 이러한 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 수식 뉴클레오타이드 중 어느 것이어도 된다.
- [0126] 수식 뉴클레오타이드란, 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드를 구성하는 핵산 염기, 당부분 및 인산 결합 부분의 전부 또는 일부가 수식되어 있는 것을 말한다.
- [0127] 본 발명에 있어서, 핵산 염기로서는, 예를 들면 아데닌, 구아닌, 히포크산틴, 시토신, 티민, 우라실 또는 그들의 수식 염기를 들 수 있다. 이러한 수식 염기로서는, 예를 들면 슈도우라실, 3-메틸우라실, 디히드로우라실, 5-알킬시토신(예를 들면, 5-메틸시토신), 5-알킬우라실(예를 들면, 5-에틸우라실), 5-할로우라실(5-브로모우라실), 6-아자피리미딘, 6-알킬피리미딘(6-메틸우라실), 2-티오우라실, 4-티오우라실, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록시메틸)우라실, 5'-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 1-메틸아데닌, 1-메틸히포크산틴, 2,2-디메틸구아닌, 3-메틸시토신, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, N6-메틸아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메틸카르보닐메틸우라실, 5-메틸옥시우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜데닐아데닌, 우라실-5-옥시초산, 2-티오시토신, 퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 이소구아닌, 인돌, 이미다졸, 크산틴 등을 들 수 있는데, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0128] 당부분의 수식으로서, 예를 들면, 리보오스의 2' 위치의 수식 및 당의 기타 부분의 수식을 들 수 있다. 리보오스의 2' 위치의 수식으로서, 예를 들면, 리보오스의 2' 위치의 -OH기를 OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br, I로 치환하는 수식을 들 수 있다. 여기서 R은 알킬 또는 아릴을 나타낸다. R'는 알킬

렌을 나타낸다.

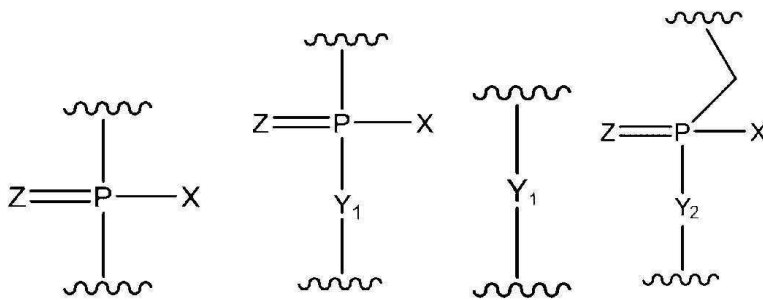
- [0129] 당의 기타 부분의 수식으로서, 예를 들면, 리보오스 또는 데옥시리보오스의 4' 위치의 O를 S로 치환한 것, 당의 2' 위치와 4' 위치를 가교한 것, 예를 들면, LNA(Locked Nucleic Acid) 또는 ENA(2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids) 등을 들 수 있는데, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0130] 인산 결합 부분의 수식으로서, 예를 들면, 포스포디에스테르 결합을 포스포로티오에이트 결합, 포스포로디티오에이트 결합, 알킬포스포네이트 결합, 포스포로아미데이트 결합, 보라노포스페이트 결합(Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160)으로 치환하는 수식을 들 수 있다(예를 들면, 일본국 특허 재공표 공보 제2006 / 129594호 및 제2006 / 038608호를 참조).
- [0131] 본 발명에 있어서, 알킬로서는 직쇄상 또는 분지쇄상의 탄소수 1~6의 알킬이 바람직하다. 구체적으로는, 예를 들면 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, tert-펜틸, n-헥실, 이소헥실을 들 수 있다. 당해 알킬은 치환되어 있어도 되고, 이러한 치환기로서는, 예를 들면 할로젠, 알콕시, 시아노, 니트로를 들 수 있으며, 이들이 1~3개 치환되어 있어도 된다.
- [0132] 본 발명에 있어서, 시클로알킬로서는 탄소수 5~12의 시클로알킬이 바람직하다. 구체적으로는, 예를 들면 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸, 시클로데실, 시클로도데실을 들 수 있다.
- [0133] 본 발명에 있어서, 할로젠으로서는 불소, 염소, 브롬, 요오드를 들 수 있다.
- [0134] 알콕시로서는 직쇄상 또는 분지쇄상의 탄소수 1~6의 알콕시, 예를 들면 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, 이소부톡시, sec-부톡시, tert-부톡시, n-펜틸옥시, 이소펜틸옥시, n-헥실옥시, 이소헥실옥시 등을 들 수 있다. 특히 탄소수 1~3의 알콕시가 바람직하다.
- [0135] 본 발명에 있어서, 아릴로서는 탄소수 6~10의 아릴이 바람직하다. 구체적으로는, 예를 들면 페닐, α-나프틸, β-나프틸을 들 수 있다. 특히 페닐이 바람직하다. 당해 아릴은 치환되어 있어도 되고, 이러한 치환기로서는, 예를 들면 알킬, 할로젠, 알콕시, 시아노, 니트로를 들 수 있으며, 이들이 1~3개 치환되어 있어도 된다.
- [0136] 본 발명에 있어서, 알킬렌으로서는 직쇄상 또는 분지쇄상의 탄소수 1~6의 알킬렌이 바람직하다. 구체적으로는, 예를 들면 메틸렌, 에틸렌, 트리메틸렌, 테트라메틸렌, 펜타메틸렌, 헥사메틸렌, 2-(에틸)트리메틸렌, 1-(메틸)테트라메틸렌을 들 수 있다.
- [0137] 본 발명에 있어서, 알킬로서는 직쇄상 또는 분지쇄상의 알카노일 또는 알로일을 들 수 있다. 알카노일로서는, 예를 들면 포르밀, 아세틸, 2-메틸아세틸, 2,2-디메틸아세틸, 프로피오닐, 부티릴, 이소부티릴, 펜타노일, 2,2-디메틸프로피오닐, 헥사노일 등을 들 수 있다. 알로일로서는, 예를 들면 벤조일, 톨루오일, 나프토일을 들 수 있다. 이러한 알로일은 치환 가능한 위치에 있어서 치환되어 있어도 되고, 알킬로 치환되어 있어도 된다.
- [0138] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 리보오스의 2' 위치의 -OH기가 메톡시로 치환되고, 인산 결합 부분이 포스포로티오에이트 결합인, 하기 화학식으로 표시되는 기를 구성 단위로 하는 본 발명의 안티센스 올리고머이다.



- [0139] (식중 Base는 핵산 염기를 나타낸다.)
- [0141] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 각종 자동합성장치(예를 들면, AKTA oligopilot plus 10/100(GE Healthcare))를 사용하여 용이하게 합성하는 것이 가능하고, 또는 제3자 기관(예를 들면, Promega사, Takara사, 또는 일본 바이오 서비스사) 등에 위탁하여 제작하는 것도 가능하다.
- [0142] 본 발명의 모르폴리노 올리고머는 하기 화학식으로 표시되는 기를 구성 단위로 하는 본 발명의 안티센스 올리고머이다.



- [0143]
- [0144] (식중 Base는 상기와 동일한 정의이고 ;
- [0145] W는 다음 중 어느 하나의 식으로 표시되는 기를 나타낸다.

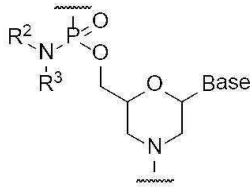


- [0146]
- [0147] (식중 X는 $-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{NR}^2\text{R}^3$ 또는 F를 나타내고 ;
- [0148] R^1 은 H, 알킬을 나타내며 ;
- [0149] R^2 및 R^3 는 동일 또는 상이하여 H, 알킬, 시클로알킬 또는 아릴을 나타내고 ;
- [0150] Y_1 은 O, S, CH_2 또는 NR^1 을 나타내며 ;
- [0151] Y_2 는 O, S 또는 NR^1 을 나타내고 ;
- [0152] Z는 O 또는 S를 나타낸다.)

[0153] 본 발명의 모르폴리노 올리고머의 합성에 사용하는 모르폴리노 모노머 화합물의 예로서는, 아래의 모르폴리노 모노머 화합물(A), 모르폴리노 모노머 화합물(C), 모르폴리노 모노머 화합물(T), 및 모르폴리노 모노머 화합물(G)를 들 수 있는데 이들에 한정되는 것은 아니다.

모르폴리노 모노머 화합물 (A)	모르폴리노 모노머 화합물 (C)	모르폴리노 모노머 화합물 (T)	모르폴리노 모노머 화합물 (G)

- [0154]
- [0155] 모르폴리노 올리고머는, 바람직하게는 아래의 식으로 표시되는 기를 구성 단위로 하는 올리고머(포스포로디아미레이트 모르폴리노 올리고머(이하, 「PMO」라고 함))이다.



[0156]

[0157] (식중 Base, R², R³는 상기와 동일한 정의이다.)

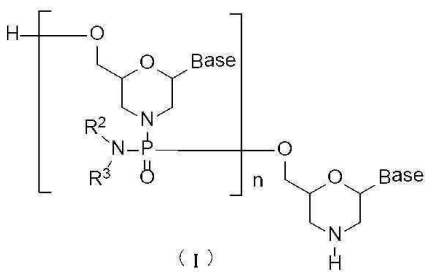
[0158] 본 발명의 모르폴리노 올리고머는 이러한 올리고머를 구성하는 핵산 염기, 모르폴리노 고리 부분, 인산 결합 부분, 3' 말단 및 / 또는 5' 말단의 전부 또는 일부가 수식되어 있는 것을 포함한다.

[0159] 인산 결합 부분의 수식으로서, 예를 들면 포스포로디아미데이트 결합, 포스포로티오에이트 결합, 포스포로디티오에이트 결합, 알킬포스포네이트 결합, 포스포로아미데이트 결합, 보라노포스페이트 결합(Enya et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160)으로 치환하는 수식을 들 수 있다(예를 들면, 일본국 특허 재공표 공보 제2006/129594호 및 제2006/038608호를 참조).

[0160] 모르폴리노 올리고머는, 예를 들면 국제공개 제1991/009033호 또는 국제공개 제2009/064471호에 따라 제조할 수 있다. 특히, PMO는 국제공개 제2009/064471호에 기재된 방법에 따라 제조하거나, 또는 아래에 나타내는 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0161] [PMO의 제법]

[0162] PMO의 일태양으로서, 예를 들면 다음의 화학식(I)으로 표시되는 화합물(이하, PMO(I)이라 한다.)을 들 수 있다.



[0163]

[0164] [식중 각 Base, R², R³는 상기와 동일한 정의이고 ;

[0165] n은 1~99의 범위 내에 있는 임의의 정수이며, 바람직하게는 19~29, 19~28, 21~29, 21~28 또는 24~28의 범위 내에 있는 임의의 정수이고, 보다 바람직하게는 21~29, 21~28 또는 24~28이다.]

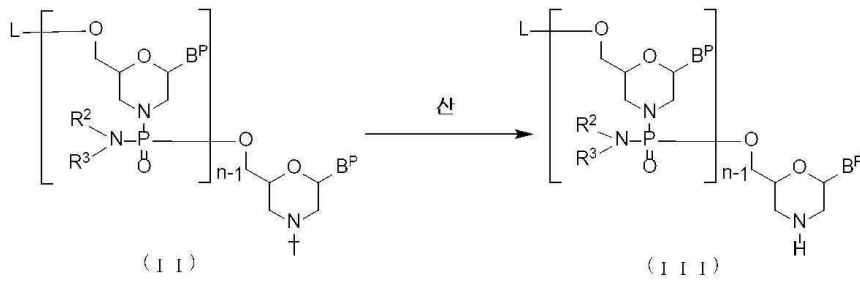
[0166] PMO(I)은 공지의 방법에 따라 제조할 수 있는데, 예를 들면 하기 공정의 조작을 실시함으로써 제조할 수 있다.

[0167] 하기 공정에 사용되고 있는 화합물 및 시약은 PMO의 제조에 일반적으로 사용되고 있는 것이라면 특별히 한정되지 않는다.

[0168] 또한, 하기의 모든 공정은 액상법 또는 고상법(매뉴얼 또는 시판의 고상 자동합성기를 사용함)으로 실시할 수 있다. 고상법으로 PMO를 제조하는 경우, 조작 절차의 간편화 및 합성의 정확성 측면에서 자동합성기를 사용하는 방법이 바람직하다.

[0169] (1) 공정 A :

[0170] 다음의 화학식(II)로 표시되는 화합물(이하, 화합물(II)라 한다.)에 산을 작용시킴으로써 다음의 화학식(III)로 표시되는 화합물(이하, 화합물(III)라 한다.)을 제조하는 공정.



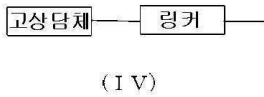
[0171]

[0172] [식중 n, R², R³는 상기와 동일한 정의이고 ;

[0173] 각 B^p는 독립적으로 보호되어 있어도 되는 핵산 염기를 나타내며 ;

[0174] T는 트리틸기, 모노메톡시트리틸기 또는 디메톡시트리틸기를 나타내고 ;

[0175] L은 수소, 아실 또는 다음의 화학식(IV)로 표시되는 기(이하, 기(IV)라 한다.)를 나타낸다.]



[0176]

[0177] B^p에 관계되는 「핵산 염기」로서는 Base와 동일한 「핵산 염기」를 들 수 있다. 단, B^p에 관계되는 핵산 염기의 아미노기 또는 수산기는 보호되어 있어도 된다.

[0178] 이러한 아미노기의 보호기로서는 핵산의 보호기로서 사용되는 것이라면 특별히 제한되지 않고, 구체적으로는, 예를 들면 벤조일, 4-메톡시벤조일, 아세틸, 프로피오닐, 부틸릴, 이소부틸릴, 페닐아세틸, 페녹시아세틸, 4-tert-부틸페녹시아세틸, 4-이소프로필페녹시아세틸, (디메틸아미노)메틸렌을 들 수 있다. 수산기의 보호기로서는, 예를 들면 2-시아노에틸, 4-니트로페네틸, 페닐설폰닐에틸, 메틸설폰닐에틸, 트리메틸실릴에틸, 치환 가능한 임의의 위치에서 1~5개의 전자 흡인성기로 치환되어 있어도 되는 페닐, 디페닐카르바모일, 디메틸카르바모일, 디에틸카르바모일, 메틸페닐카르바모일, 1-피롤리디닐카르바모일, 모르폴리노카르바모일, 4-(tert-부틸카르복시)벤질, 4-[(디메틸아미노)카르복시]벤질, 4-(페닐카르복시)벤질을 들 수 있다(예를 들면, 국제공개 제 2009/064471호 공보 참조).

[0179] 「고상 담체」로서는 핵산의 고상반응에 사용 가능한 담체라면 특별히 제한되지 않는데, 예를 들면 (i) 모르폴리노 핵산 유도체의 합성에 사용 가능한 시약(예를 들면, 디클로로메탄, 아세트니트릴, 테트라졸, N-메틸이미다졸, 피리딘, 무수 초산, 루티딘, 트리플루오로초산)에 거의 용해되지 않고, (ii) 모르폴리노 핵산 유도체의 합성에 사용 가능한 시약에 대해 화학적으로 안정하며, (iii) 화학 수식이 가능하고, (iv) 바람직한 모르폴리노 핵산 유도체의 장전이 가능하며, (v) 처리 중에 가해지는 고압에 견디는 충분한 강도를 갖고, (vi) 일정 입경 범위와 분포인 것이 바람직하다. 구체적으로는, 팽윤성 폴리스티렌(예를 들면, 아미노메틸폴리스티렌 수지 1% 디비닐벤젠 가교(200~400 메시)(2.4~3.0 mmol/g)(도쿄 화학사 제조), Aminomethylated Polystyrene Resin · HCl [디비닐벤젠 1%, 100~200 메시] (웍티드 연구조사 제조)), 비팽윤성 폴리스티렌(예를 들면, Primer Support(GE Healthcare사 제조)), PEG 사슬 결합형 폴리스티렌(예를 들면, NH₂-PEG resin(와타나베 화학사 제조), TentaGel resin), 정공 유리(controlled pore glass ; CPG)(예를 들면, CPG사 제조), 옥살릴화-정공 유리(예를 들면, Alul 등, Nucleic Acids Research, Vol.19, 1527(1991)을 참조), TentaGel 지지체-아미노폴리에틸렌글리콜 유도체화 지지체(예를 들면, Wright 등, Tetrahedron Letters, Vol.34, 3373(1993)을 참조), Poros-폴리스티렌/디비닐벤젠의 코폴리머를 들 수 있다.

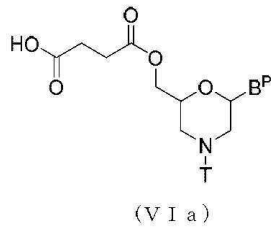
[0180] 「링커」로서는 통상 핵산이나 모르폴리노 핵산 유도체를 연결하기 위해 사용되는 공지의 것을 사용할 수 있는데, 예를 들면 3-아미노프로필, 숙시닐, 2,2'-디에탄올설폰일, 장쇄 알킬 아미노(LCAA)를 들 수 있다.

[0181] 본 공정은 화합물(II)에 산을 작용시킴으로써 실시할 수 있다.

[0182] 본 공정에 사용 가능한 「산」으로서, 예를 들면 트리플루오로초산, 디클로로초산 또는 트리클로로초산을 들 수 있다. 산의 사용량으로서는, 예를 들면 화합물(II) 1 몰에 대해 0.1 몰 당량~1,000 몰 당량의 범위 내가 적

[0199] 본 공정은 화합물(V)를 출발원료로 하여 공지의 링커 도입반응에 의해 실시할 수 있다.

[0200] 특히 다음의 화학식(VIa)로 표시되는 화합물은, 화합물(V)와 무수 숙신산을 사용하여 에스테르화 반응으로서 알려진 방법을 실시함으로써 제조할 수 있다.

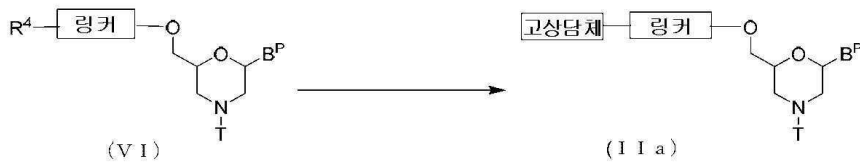


[0201]

[0202] [식중 B^P, T는 상기와 동일한 정의이다.]

[0203] 공정 2 :

[0204] 화합물(VI)에 축합제 등을 작용시킴으로써 고상 담체와 반응시켜 화합물(IIa)를 제조하는 공정.

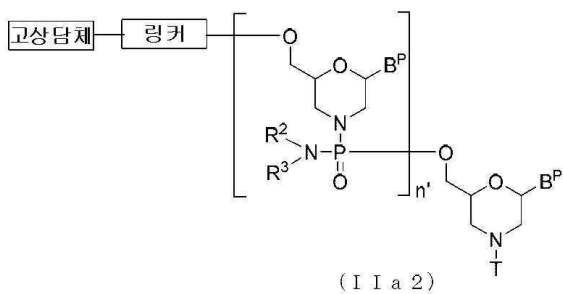


[0205]

[0206] [식중 B^P, R⁴, T, 링커, 고상 담체는 상기와 동일한 정의이다.]

[0207] 본 공정은 화합물(VI)와 고상 담체를 사용하여 축합반응으로서 알려진 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0208] 화합물(II)에 있어서 n=1~99(특정 태양에서는 n은, 예를 들면, 2~29, 2~28, 2~27, 2~26, 2~25, 2~24, 2~23, 2~22, 2~21 또는 2~20이고, 바람직하게는 19~29, 19~28, 21~29, 21~28 또는 24~28의 범위 내에 있는 임의의 정수이며, 보다 바람직하게는 21~29, 21~28 또는 24~28이다)이고, L이 기(IV)인 다음의 화학식(IIa2)로 표시되는 화합물은 화합물(IIa)를 출발원료로 하여, 본 명세서에 기재된 PMO의 제법에 관계되는 공정 A 및 공정 B를 목적하는 횟수 반복 실시함으로써 제조할 수 있다.

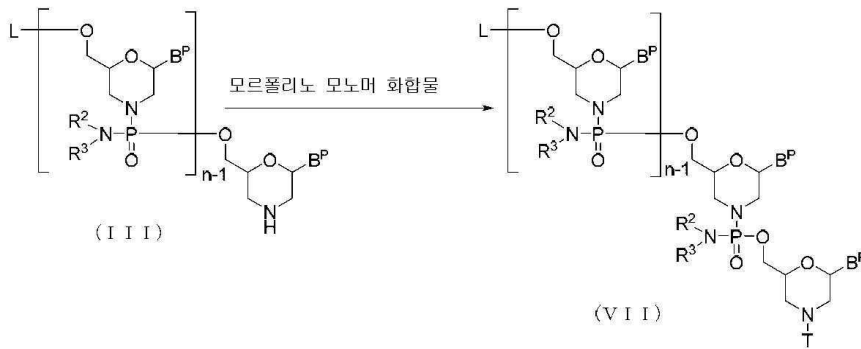


[0209]

[0210] [식중 B^P, n, R², R³, T, 링커, 고상 담체는 상기와 동일한 정의이다.]

[0211] (2) 공정 B :

[0212] 화합물(III)에 염기 존재하에 모르폴리노 모노머 화합물을 작용시킴으로써 다음의 화학식(VII)으로 표시되는 화합물(이하, 화합물(VII)이라 한다.)을 제조하는 공정.



[0213]

[0214]

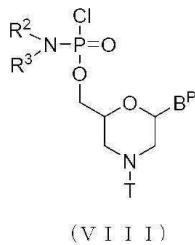
[식중 각 B^p, L, n, R², R³, T는 상기와 동일한 정의이다.]

[0215]

본 공정은 화합물(III)에 염기 존재하에 모르폴리노 모노머 화합물을 작용시킴으로써 실시할 수 있다.

[0216]

모르폴리노 모노머 화합물로서는, 예를 들면 다음의 화학식(VIII)으로 표시되는 화합물을 들 수 있다.



[0217]

[0218]

[식중 B^p, R², R³, T는 상기와 동일한 정의이다.]

[0219]

본 공정에 사용 가능한 「염기」로서는, 예를 들면 디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민 또는 N-에틸모르폴린을 들 수 있다. 염기의 사용량으로서는, 예를 들면 화합물(III) 1 몰에 대해 1 몰 당량~1,000 몰 당량의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 10 몰 당량~100 몰 당량의 범위 내이다.

[0220]

본 공정에 사용 가능한 모르폴리노 모노머 화합물 및 염기는 0.1%~30%의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석하여 사용하는 것도 가능하다. 용매로서는 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 N,N-디메틸이미다졸리돈, N-메틸피페리돈, DMF, 디클로로메탄, 아세트니트릴, 테트라히드로푸란 또는 이들의 혼합물을 들 수 있다.

[0221]

반응온도는 예를 들면 0℃~100℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 10℃~50℃의 범위 내이다.

[0222]

반응시간은 사용하는 염기의 종류, 반응온도에 따라 상이하나, 통상 1분~48시간의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 30분~24시간의 범위 내이다.

[0223]

또한 본 공정의 종료 후, 필요에 따라 아실화제를 첨가할 수 있다. 「아실화제」로서는, 예를 들면 무수 초산, 초산 클로라이드, 폐녹시초산 무수물을 들 수 있다. 아실화제는 예를 들면 0.1%~30% 범위 내의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석하여 사용하는 것도 가능하다. 용매로서는 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 디클로로메탄, 아세트니트릴, 테트라히드로푸란, 알코올류(에탄올, 이소프로판올, 트리플루오로에탄올 등), 물 또는 이들의 혼합물을 들 수 있다.

[0224]

또한, 필요하다면 아실화제와 함께, 예를 들면 피리딘, 루티딘, 콜리딘, 트리에틸아민, 디이소프로필에틸아민, N-에틸모르폴린 등의 염기를 사용할 수 있다. 아실화제의 사용량으로서는 0.1 몰 당량~10,000 몰 당량의 범위 내가 바람직하고, 1 몰 당량~1,000 몰 당량의 범위 내가 보다 바람직하다. 염기의 사용량으로서는, 예를 들면 아실화제 1 몰에 대해 0.1 몰 당량~100 몰 당량의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 1 몰 당량~10 몰 당량의 범위 내이다.

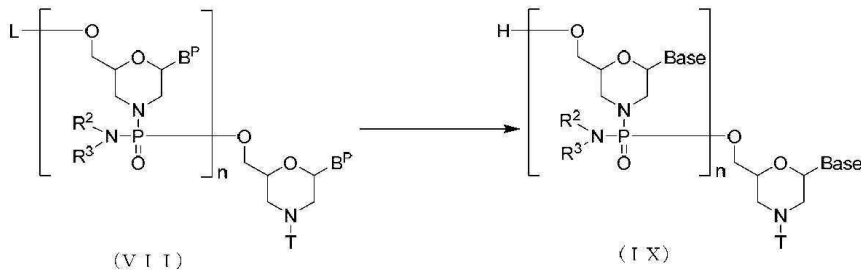
[0225]

본 반응의 반응온도는 10℃~50℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 10℃~50℃의 범위 내가 바람직하며, 보다 바람직하게는 20℃~40℃의 범위 내이고, 더욱 바람직하게는 25℃~35℃의 범위 내이다. 반응시간은 예를 들면 사용하는 아실화제의 종류, 반응온도에 따라 상이하나, 통상 0.1분~24시간의 범위 내가 적당하고,

바람직하게는 1분~5시간의 범위 내이다.

(3) 공정 C :

공정 B에 있어서 제조되는 화합물(VII)에 있어서 탈보호제를 사용하여 보호기를 탈리해서, 화학식(IX)로 표시되는 화합물을 제조하는 공정.



[식중 Base, B^P, L, n, R², R³, T는 상기와 동일한 정의이다.]

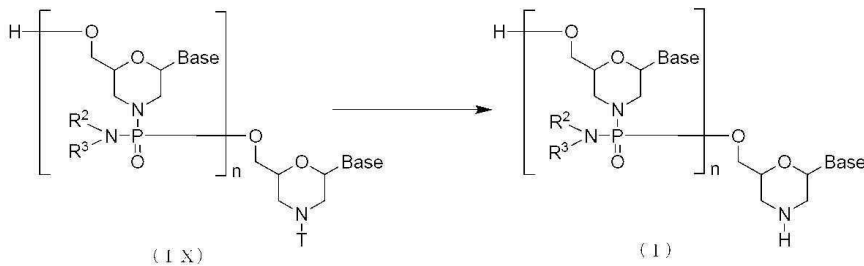
본 공정은 화합물(VII)에 탈보호제를 작용시킴으로써 실시할 수 있다.

「탈보호제」로서는, 예를 들면 농암모니아수, 메틸아민을 들 수 있다. 본 공정에 사용 가능한 「탈보호제」는, 예를 들면 물, 메탄올, 에탄올, 이소프로필알코올, 아세트니트릴, 테트라히드로푸란, DMF, N,N-디메틸이미다졸리돈, N-메틸피페리돈 또는 이들의 혼합용매로 희석해서 사용하는 것도 가능하다. 그중에서도 에탄올이 바람직하다. 탈보호제의 사용량으로서는, 예를 들면 화합물(VII) 1 몰에 대해 예를 들면 1 몰 당량~100,000 몰 당량의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 10 몰 당량~1,000 몰 당량의 범위 내이다.

반응온도는 예를 들면 15℃~75℃의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 40℃~70℃의 범위 내이며, 보다 바람직하게는 50℃~60℃의 범위 내이다. 탈보호 반응시간은 화합물(VII)의 종류, 반응온도 등에 따라 상이하나, 10분~30시간의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 30분~24시간의 범위 내이며, 보다 바람직하게는 5시간~20시간의 범위 내이다.

(4) 공정 D :

공정 C에 있어서 제조되는 화합물(IX)에 산을 작용시킴으로써 PMO(I)을 제조하는 공정.



[식중 Base, n, R², R³, T는 상기와 동일한 정의이다.]

본 공정은 화합물(IX)에 산을 첨가함으로써 실시할 수 있다.

본 공정에 있어서 사용 가능한 「산」으로서는, 예를 들면 트리클로로초산, 디클로로초산, 초산, 인산 및 염산 등을 들 수 있다. 산의 사용량으로서는, 예를 들면 용액의 pH가 0.1~4.0의 범위 내가 되도록 사용하는 것이 적당하고, 보다 바람직하게는 1.0~3.0의 범위 내가 되도록 사용한다. 용매로서는 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 아세트니트릴, 물 또는 이들의 혼합용매를 들 수 있다.

반응온도는 10℃~50℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 20℃~40℃의 범위 내이며, 더욱 바람직하게는 25℃~35℃의 범위 내이다. 탈보호 반응시간은 화합물(IX)의 종류, 반응온도 등에 따라 상이하나, 0.1분~5시간의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 1분~1시간의 범위 내이며, 보다 바람직하게는 1분~30분의 범위 내이다.

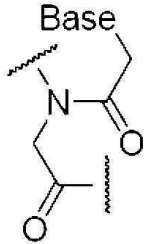
PMO(I)은 본 공정에서 얻어진 반응 혼합물로부터 통상의 분리정제 수단, 예를 들면 추출, 농축, 중화, 여과, 원

심분리, 재결정, C₈~C₁₈의 역상 칼럼크로마토그래피, 양이온 교환 칼럼크로마토그래피, 음이온 교환 칼럼크로마토그래피, 겔 여과 칼럼크로마토그래피, 고속 액체 크로마토그래피, 투석, 한계여과 등의 수단을 단독 또는 조합해서 사용함으로써 얻을 수 있어, 목적하는 PMO(I)을 단리 정제할 수 있다(예를 들면, 국제공개 제1991/09033호를 참조).

[0241] 역상 크로마토그래피를 사용하여 PMO(I)을 정제하는 경우에는 용출 용매로서, 예를 들면 20 mM의 트리에틸아민/초산 완충액과 아세토니트릴의 혼합용액을 사용할 수 있다.

[0242] 또한, 이온교환 크로마토그래피를 사용하여 PMO(I)을 정제하는 경우에는, 예를 들면 1 M의 식염수와 10 mM의 수산화나트륨 수용액의 혼합용액을 사용할 수 있다.

[0243] 펩티드 핵산은 하기 화학식으로 표시되는 기를 구성 단위로 하는 본 발명의 안티센스 올리고머이다.



[0244] (식중 Base는 상기와 동일한 정의이다.)

[0246] 펩티드 핵산은, 예를 들면 아래의 문헌에 따라 제조할 수 있다.

[0247] 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Science, 254, 1497 (1991)

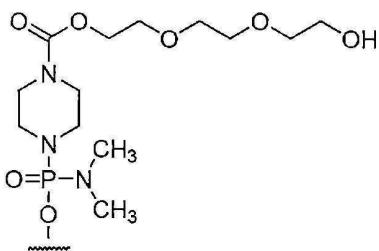
[0248] 2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, Jacs., 114, 1895 (1992)

[0249] 3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, J. Org. Chem., 59, 5767 (1994)

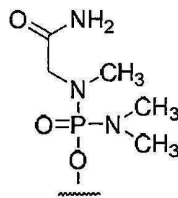
[0250] 4) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, J. Pept. Sci., 1, 175 (1995)

[0251] 5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, J. Pept. Res., 49, 80 (1997)

[0252] 또한, 본 발명의 안티센스 올리고머는 5' 말단이 하기 화학식 (1)~(3) 중 어느 하나의 기여도 된다. 바람직하게는 (3) -OH이다.



(1)



(2)



(3)

[0253] 이하, 상기 (1), (2) 및 (3)으로 나타내어지는 기를 각각 「기(1)」, 「기(2)」 및 「기(3)」이라 부른다.

[0255] 본 발명의 안티센스 올리고머는, 인산 결합 부분의 인원자가 비대칭 중심이 되기 때문에, 인원자의 입체화학이 광학적으로 순수한 화합물을 포함하는 것이어도 된다. 당업자라면 순수한 광학 활성체를 이성체의 혼합물로부터 얻을 수 있다(국제공개 제2017 / 024264호). 또한, 본 발명의 안티센스 올리고머는 순수한 광학 활성체로서 합성할 것이어도 된다. 당업자라면 합성반응을 제어하여 순수한 광학 활성체를 얻을 수 있다(일본국 공표특허공보 제2018-537952호).

[0256] 2. 펩티드 결합형 안티센스 올리고머

[0257] 본 발명의 안티센스 올리고머는 유효성의 향상을 목적으로 한 기능성 펩티드(예를 들면, 표적 세포로의 수송효율의 향상을 목적으로 한 막투과성 펩티드)와의 복합체를 형성하고 있는 것이어도 된다(국제공개 제2008/036127호, 국제공개 제2009/005793호, 국제공개 제2012/150960호, 국제공개 제2016/187425호, 국제공개 제2018/118662호, 국제공개 제2018/118599호, 국제공개 제2018/118627호, J. D. Ramsey, N. H. Flynn, Pharmacology & Therapeutics 154, 78-86 (2015), M. K. Tsoumpra et al., EBioMedicine, 45, 630-645 (2019)). 결합 부위는 특별히 한정되지 않으나, 안티센스 올리고머의 5' 말단 또는 3' 말단과 기능성 펩티드의 아미노 말단 또는 카르복실 말단이 결합되어 있는 것이 바람직하다.

[0258] 또한, 다른 태양으로서, 본 발명의 안티센스 올리고머와 기능성 펩티드는, 링커를 매개로 복합체를 형성하고 있어도 된다. 링커는 특별히 한정되지 않으나, 안티센스 올리고머의 5' 말단 또는 3' 말단과 링커의 한쪽 말단이 결합되어, 기능성 펩티드의 아미노 말단 또는 카르복실 말단과 링커의 다른 한쪽 말단이 결합되어 있는 것이 바람직하다. 또한, 기능성 펩티드와 링커 사이에는, 부가적인 아미노산이 존재하고 있어도 된다.

[0259] 3. 의약 조성물

[0260] 본 발명의 안티센스 올리고머는 종래기술의 안티센스 올리고머와 비교하여 그 길이가 짧은 경우라도, 엑손 51의 스킵핑을 고효율로 유도할 수 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 올리고머는 엑손 51의 스킵핑을 고효율로 유도하는 활성을 유지하면서, 또한 우수한 용해성을 갖는다. 또한, 본 발명의 안티센스 올리고머는 엑손 51의 스킵핑을 고효율로 유도하는 활성을 유지하면서, 또한 우수한 용해성 및 안전성을 갖는다. 따라서, 디스트로핀 유전자에 엑손 51의 스킵핑의 대상이 되는 변이(예를 들면, 프레임 시프트 돌연변이, 엑손 51 중에서의 미스센스 돌연변이 / 년센스 돌연변이 등)를 갖는 DMD 환자의 경우, 본 발명의 안티센스 올리고머를 투여함으로써, 고효율로 근이영양증의 증상을 완화시킬 수 있는 것으로 예측된다. 예를 들면, 적어도 엑손 51 근방의 엑손을 결실한 소정의 변이 디스트로핀 유전자를 갖는 DMD 환자에게 본 발명의 안티센스 올리고머를 투여함으로써, 고효율로 근이영양증의 증상을 완화시킬 수 있는 것으로 예측된다. 또한, 소정의 변이 디스트로핀 유전자란, 적어도 엑손 51 근방의 엑손을 결실하여 프레임 시프트 돌연변이를 갖는 동시에 엑손 51을 생략한 경우(스킵한 경우)에 아미노산의 리딩 프레임이 수정되는 디스트로핀 유전자를 의미한다. DMD 환자로서는, 예를 들면 엑손 13-50, 29-50, 40-50, 43-50, 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63 등의 결실을 갖는 것에 따른 프레임 시프트 돌연변이를 갖는 DMD 환자를 들 수 있다.

[0261] 보다 구체적으로 기술하자면, 본 발명의 안티센스 올리고머를 포함하는 의약 조성물을 DMD 환자(엑손 51 스킵핑으로 인프레임(in-frame)화하는 변이를 갖는 환자, 예를 들면 엑손 13-50 결실 환자, 엑손 29-50 결실 환자, 엑손 40-50 결실 환자, 엑손 43-50 결실 환자, 엑손 45-50 결실 환자, 엑손 47-50 결실 환자, 엑손 48-50 결실 환자, 엑손 49-50 결실 환자, 엑손 50 결실 환자, 엑손 52 결실 환자, 엑손 52-63 결실 환자 등)에게 투여함으로써, 고효율로 근이영양증의 증상을 완화시킬 수 있는 것으로 예측된다. 예를 들면, 본 발명의 안티센스 올리고머를 포함하는 의약 조성물을 사용하는 경우, 종래기술의 올리고머와 비교하여 소량의 투여량으로도 같은 정도의 치료효과를 얻을 수 있기 때문에, 부작용을 경감시킬 수 있고, 또한 경제적이다.

[0262] 또한, 본 발명의 안티센스 올리고머는, 엑손 51의 스킵핑을 고효율로 유도하는 활성을 유지하면서, 또한 우수한 용해성을 갖기 때문에, 의약 조성물의 조제에 있어서 유용하다. 또한, 본 발명의 안티센스 올리고머는, 엑손 51의 스킵핑을 고효율로 유도하는 활성을 유지하면서, 또한 우수한 용해성 및 안전성을 갖기 때문에, 의약 조성물로서 유용하다.

[0263] 이에 다른 실시태양으로서 본 발명의 안티센스 올리고머, 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물을 유효 성분으로 하는, 근이영양증 치료용 의약 조성물(이하, 「본 발명의 조성물」이라 함)을 제공한다.

[0264] 또한, 본 발명은 본 발명의 안티센스 올리고머를 DMD 환자에게 투여하는 공정을 포함하는, 근이영양증의 치료방법을 제공한다.

[0265] 당해 치료방법에 있어서, 본 발명의 안티센스 올리고머는 상기 근이영양증 치료용 의약 조성물로서 투여해도 된다.

[0266] 또한, 본 발명은 근이영양증 치료용 의약 조성물의 제조에 있어서의 본 발명의 안티센스 올리고머의 사용, 및 근이영양증 치료에 사용하기 위한 본 발명의 안티센스 올리고머를 제공한다.

[0267] 본 발명의 조성물에 포함되는 본 발명의 안티센스 올리고머의 의약적으로 허용 가능한 염의 예로서는,

나트륨염, 칼륨염, 리튬염과 같은 알칼리금속염, 칼슘염, 마그네슘염과 같은 알칼리토류금속염; 알루미늄염, 철염, 아연염, 구리염, 니켈염, 코발트염 등의 금속염; 암모늄염; t-옥틸아민염, 디벤질아민염, 모르폴린염, 글루코사민염, 페닐글리신알킬에스테르염, 에틸렌디아민염, N-메틸글루카민염, 구아니딘염, 디에틸아민염, 트리에틸아민염, 디시클로헥실아민염, N,N'-디벤질에틸렌디아민염, 클로로프로카인염, 프로카인염, 디에탄올아민염, N-벤질-페네틸아민염, 피페라진염, 테트라메틸암모늄염, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄염과 같은 유기 아민염; 플루오르화 수소산염, 염산염, 브롬화 수소산염, 요오드화 수소산염과 같은 할로젠화 수소산염; 질산염, 과염소산염, 황산염, 인산염 등의 무기산염; 메탄설폰산염, 트리플루오로메탄설폰산염, 에탄설폰산염과 같은 저급 알칸설폰산염; 벤젠설폰산염, p-톨루엔설폰산염과 같은 아릴설폰산염; 초산염, 말산염, 푸마르산염, 숙신산염, 구연산염, 타르타르산염, 옥살산염, 말레산염 등의 유기산염; 글리신염, 리신염, 아르기닌염, 오르니틴염, 글루타민산염, 아스파라긴산염과 같은 아미노산염 등을 들 수 있다. 이들 염은 공지의 방법으로 제조할 수 있다. 또는 본 발명의 조성물에 포함되는 본 발명의 안티센스 올리고머는 그의 수화물의 형태로 있어도 된다.

[0268] 본 발명의 조성물의 투여형태는 의약적으로 허용 가능한 투여형태라면 특별히 제한되지 않고 치료방법에 따라 선택할 수 있으나, 근조직으로의 송달 용이성의 관점에서 정맥내 투여, 동맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 경구 투여, 조직내 투여, 경피 투여 등이 바람직하다. 또한 본 발명의 조성물이 취할 수 있는 제형으로서는 특별히 제한되지 않으나, 예를 들면 각종 주사제, 경구제, 점적제, 흡입제, 연고제, 로션제 등을 들 수 있다.

[0269] 본 발명의 안티센스 올리고머를 근이영양증 환자에게 투여하는 경우, 본 발명의 조성물은 그 올리고머의 근조직으로의 송달을 촉진하는 담체를 포함할 수 있다. 이러한 담체는 의약적으로 허용 가능한 것이라면 특별히 제한되지 않고, 그 예로서 양이온성 리포솜, 양이온성 폴리머 등의 양이온성 담체 또는 바이러스 엔벨로프를 이용한 담체를 들 수 있다. 양이온성 리포솜으로서는, 예를 들면 2-O-(2-디에틸아미노에틸)카르바모일-1,3-O-디올레오일글리세롤과 인지질을 필수 구성성분으로서 형성되는 리포솜(이하, 「리포솜 A」라 함), 올리고펙트아민(등록상표)(Invitrogen사 제조), 리포펙틴(등록상표)(Invitrogen사 제조), 리포펙트아민(등록상표)(Invitrogen사 제조), Lipofectamine 2000(등록상표)(Invitrogen사 제조), DMRIE-C(등록상표)(Invitrogen사 제조), GeneSilencer(등록상표)(Gene Therapy Systems사 제조), TransMessenger(등록상표)(QIAGEN사 제조), TransIT TKO(등록상표)(Mirus사 제조), Nucleofector II(Lonza)를 들 수 있다. 그들 중에서 리포솜 A가 바람직하다. 양이온성 폴리머로서는, 예를 들면 JetSI(등록상표)(Qbiogene사 제조), Jet-PEI(등록상표)(폴리에틸렌이민, Qbiogene사 제조)를 들 수 있다. 바이러스 엔벨로프를 이용한 담체로서는, 예를 들면 GenomeOne(등록상표)(HVJ-E 리포솜, 이시하라 산교사 제조)을 들 수 있다. 또는 일본국 특허 제2924179호에 기재된 의약 디바이스, 일본국 특허 제공표 공보 제2006/129594호 및 일본국 특허 제공표 공보 제2008/096690호에 기재된 양이온성 담체를 사용하는 것도 가능하다.

[0270] 상세에 대해서는 미국 특허 제4,235,871호, 동 제4,737,323호, 국제공개 제96/14057호, “New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990) pages 33-104” 등을 참조할 수 있다.

[0271] 본 발명의 조성물에 포함되는 본 발명의 안티센스 올리고머의 농도는 담체의 종류 등에 따라 상이하나, 일태양에 있어서 0.1 nM~100 μM의 범위 내가 적당하고, 100 nM~10 μM의 범위 내가 바람직하다. 또한 본 발명의 조성물에 포함되는 본 발명의 안티센스 올리고머와 담체의 중량비(담체/본 발명의 안티센스 올리고머)는 그 올리고머의 성질 및 그 담체의 종류 등에 따라 상이하나, 0.1~100의 범위 내가 적당하고, 0.1~10의 범위 내가 바람직하다.

[0272] 본 발명의 조성물은 수용액의 형태여도 된다. 그 경우, 본 발명의 조성물은 본 발명의 안티센스 올리고머를 2.5~500 mg/mL, 5~450 mg/mL, 10~400 mg/mL, 15~350 mg/mL, 20~300 mg/mL, 20~250 mg/mL, 20~200 mg/mL, 20~150 mg/mL, 20~100 mg/mL, 20~50 mg/mL, 20~40 mg/mL, 20~30 mg/mL, 23~27 mg/mL, 24~26 mg/mL, 또는 25 mg/mL의 농도로 포함하고 있어도 된다. 또는, 본 발명의 조성물은 본 발명의 안티센스 올리고머를 10~100 mg/mL, 15~95 mg/mL, 20~80 mg/mL, 25~75 mg/mL, 30~70 mg/mL, 35~65 mg/mL, 40~60 mg/mL, 45~55 mg/mL, 47~53 mg/mL, 48~52 mg/mL, 49~51 mg/mL, 또는 50 mg/mL의 농도로 포함하고 있어도 된다.

[0273] 본 발명의 조성물은 건조 형태여도 된다. 그 경우, 수용액 형태의 본 발명의 조성물을 조제하기 위해, 예를 들면 125 mg 또는 250 mg의 건조 형태의 본 발명의 안티센스 올리고머를 포함하는 건조 형태의 본 발명의 조성물을, 0.5 mL~100 mL의 물과 혼합하여(1.25 mg/mL~250 mg/mL 또는 2.5 mg/mL~500 mg/mL의 본 발명의 안티센스 올리고머 농도에 상당한다), 바람직하게는 1 mL~50 mL의 물과 혼합하여(2.5 mg/mL~125 mg/mL 또는 5 mg/mL~250 mg/mL의 본 발명의 안티센스 올리고머 농도에 상당한다), 보다 바람직하게는 5 mL~10 mL의 물과

혼합하여(12.5 mg/mL~25 mg/mL 또는 25 mg/mL~50 mg/mL의 본 발명의 안티센스 올리고머 농도에 상당한다) 사용해도 된다.

- [0274] 본 발명의 조성물에는 본 발명의 안티센스 올리고머와 전술한 담체 이외에 임의로 의약적으로 허용 가능한 첨가제를 배합할 수 있다. 이러한 첨가제로서, 예를 들면 유화 보조제(예를 들면, 탄소수 6~22의 지방산이나 그의 의약적으로 허용 가능한 염, 알부민, 텍스트란), 안정화제(예를 들면, 콜레스테롤, 포스파티딘산, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 크실리톨), 등장화제(예를 들면, 염화나트륨, 글루코오스, 말토오스, 락토오스, 수크로오스, 트레할로오스, 만니톨, 소르비톨, 크실리톨), pH 조정제(예를 들면, 염산, 황산, 인산, 초산, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 트리에탄올아민)를 들 수 있다. 이들을 1종 또는 2종 이상 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물 중 당해 첨가제의 함유량은 90 중량% 이하가 적당하고, 70 중량% 이하가 바람직하며, 50 중량% 이하가 보다 바람직하다.
- [0275] 본 발명의 조성물은 담체의 분산액에 본 발명의 안티센스 올리고머를 첨가하고 적당히 교반함으로써 조제할 수 있다. 또한 첨가제는 본 발명의 안티센스 올리고머의 첨가 전에도 첨가 후에도 적당한 공정에서 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물이 수용액의 형태인 경우, 본 발명의 올리고머를 첨가할 때 사용할 수 있는 수성 용매로서는, 의약적으로 허용 가능한 것이라면 특별히 제한되지 않고, 예를 들면 주사용수, 주사용 증류수, 생리식염수 등의 전해질액, 포도당액, 말토오스액 등의 당액을 들 수 있다. 또한 이러한 경우의 pH 및 온도 등의 조건은 당업자가 적절히 선택할 수 있다.
- [0276] 본 발명의 조성물은 예를 들면 액체나 그의 동결건조제제로 할 수 있다. 본 발명의 조성물의 건조 형태의 일태양으로서, 당해 동결건조제제는 통상의 방법으로 액체의 형태를 가지고 있는 본 발명의 조성물을 동결건조처리함으로써 조제할 수 있다. 예를 들면, 액체의 형태를 가지고 있는 본 발명의 조성물을 적당한 멸균을 행한 후 소정량을 바이알병에 분주하고, 약 -40~-20℃의 조건에서 예비 동결을 2시간 정도 행하여, 약 0~10℃에서 감압하에 1차 건조를 행하고, 이어서 약 15~25℃에서 감압하에 2차 건조하여 동결건조할 수 있다. 그리고 일반적으로는 바이알 내부를 질소가스로 치환하고, 타전(打栓)하여 본 발명의 조성물의 동결건조제제를 얻을 수 있다.
- [0277] 본 발명의 조성물의 동결건조제제는 일반적으로는 임의의 적당한 용액(재용해액)의 첨가에 의해 재용해해서 사용할 수 있다. 이러한 재용해액으로서는 주사용수, 생리식염수, 기타 일반 수액을 들 수 있다. 이 재용해액의 액량은 용도 등에 따라 상이하어 특별히 제한되지 않으나, 동결건조 전 액량의 0.5~2배량 또는 500 mL 이하가 적당하다.
- [0278] 본 발명의 조성물을 투여할 때의 용량으로서의 함유되는 본 발명의 안티센스 올리고머의 종류, 제형, 연령이나 체중 등의 환자의 상태, 투여 경로, 질환의 성질과 정도를 고려하여 조제하는 것이 바람직하나, 성인에 대해 본 발명의 안티센스 올리고머의 양으로서 1일당 0.1 mg~10 g/인간의 범위 내가, 바람직하게는 1 mg~1 g/인간의 범위 내가 일반적이다. 이 수치는 표적으로 하는 질환의 종류, 투여형태, 표적 분자에 따라서도 상이한 경우가 있다. 따라서, 경우에 따라서는 이 이하여도 충분하고, 또한 반대로 이 이상의 용량을 필요로 할 때도 있다. 또한 1일 1회 내지 수회의 투여 또는 1일 내지 수일 간의 간격으로 투여할 수 있다.
- [0279] 본 발명의 조성물의 다른 태양으로서 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 발현할 수 있는 벡터와 전술한 담체를 포함하는 의약 조성물을 들 수 있다. 이러한 발현 벡터는 복수의 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 발현 가능한 것 이어도 된다. 당해 조성물에는 본 발명의 올리고머를 함유하는 본 발명의 조성물과 마찬가지로 의약적으로 허용 가능한 첨가제를 첨가할 수 있다. 당해 조성물 중에 포함되는 발현 벡터의 농도는 담체의 종류 등에 따라 상이하나, 일태양에 있어서 0.1 nM~100 μM의 범위 내가 적당하고, 100 nM~10 μM의 범위 내가 바람직하다. 당해 조성물 중에 포함되는 발현 벡터와 담체의 중량비(담체/발현 벡터)는 발현 벡터의 성질, 담체의 종류 등에 따라 상이하나, 0.1~100의 범위 내가 적당하고, 0.1~10의 범위 내가 바람직하다. 또한 당해 조성물 중에 포함되는 담체의 함유량은 본 발명의 안티센스 올리고머를 함유하는 본 발명의 조성물의 경우와 동일하고, 그의 조제방법 등에 관해서도 본 발명의 조성물의 경우와 동일하다.
- [0280] 아래에 실시예 및 시험예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하나, 본 발명은 실시예에 나타내어지는 범위에 한정되는 것은 아니다.
- [0281] **실시예**
- [0282] [실시예 1 : 안티센스 올리고머의 합성]
- [0283] 국제공개 제2015 / 137409호에 기재된 방법에 따라, 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51 및 / 또는 그의 5' 측 인접 인트론인 인트론 50의 일부 염기서열을 표적으로 하는, 표 1에 나타내는 안티센스 올리고머(PMO No. 1~93

(서열번호 1~93))를 합성하였다. 표 중에는, 각 안티센스 올리고머의 분자량의 이론값 및 ESI-TOF-MS에 의한 실측값도 나타낸다.

[0284]

표 1 중에 있어서, 예를 들면 「H51_67-81_131-142」는, 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 5' 말단의 염기를 1번째 염기로 하고, 3' 측에 계속되는 염기에 순서대로 번호를 부여한 경우에, 안티센스 올리고머가 67번째~81번째 염기의 서열 및 131번째~142번째 염기의 서열을 표적으로 하는 것인 것을 나타낸다. 또한, 표적 염기서열 중 -1번째 이전의 염기의 서열은, 인트론 50 중의 염기서열이다. 인간의 야생형 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 서열과 인트론 50의 3' 말단 부근의 서열을 포함하는 염기서열을 서열번호 128에 나타낸다.

표 1

표 1 합성한 안티센스 올리고머 (PMO No. 1 ~93)

PMO No.	표적 염기서열	전장	PMO의 염기서열	분자량		서열 번호
				이론값	실측값	
1	H51_67-81_131-142	27	TCGGTAAGTTCTAAGATGGCATTCTA	8977.10	8977.68	1
2	H51_68-81_131-142	26	TCGGTAAGTTCTAAGATGGCATTCT	8637.98	8637.42	2
3	H51_74-89_132-142	27	TCGGTAAGTTCCATCAAGGAAGATGGC	9021.13	9021.40	3
4	H51_73-89_132-141	27	CGGTAAGTTCCATCAAGGAAGATGGCA	9030.14	9030.55	4
5	H51_69-81_128-142	28	TCGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATTTC	9308.21	9308.75	5
6	H51_66-79_131-142	26	TCGGTAAGTTCTGATGGCATTCTAG	8653.98	8653.47	6
7	H51_67-79_134-146	26	CCAGTCGGTAAGTATGGCATTCTA	8647.99	8647.86	7
8	H51_68-80_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGAGATGGCATTCT	8653.98	8654.05	8
9	H51_70-81_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAAGATGGCATT	8677.99	8677.82	9
10	H51_70-81_128-141	26	CGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATT	8662.99	8663.07	10
11	H51_68-80_131-142	25	TCGGTAAGTTCTAGATGGCATTCT	8298.86	8298.84	11
12	H51_67-78_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTATGGCATTCTA	8628.97	8628.97	12
13	H51_67-79_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGGATGGCATTCTA	8653.98	8653.04	13
14	H51_68-79_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTGATGGCATTCT	8644.97	8644.45	14
15	H51_68-79_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGGATGGCATTCT	8314.86	8315.29	15
16	H51_69-80_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAGATGGCATTTC	8653.98	8653.51	16
17	H51_70-81_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGAAGATGGCATT	8347.88	8348.16	17
18	H51_69-80_131-143	25	GTCGGTAAGTTCTAGATGGCATTTC	8323.87	8324.63	18
19	H51_69-79_131-142	23	TCGGTAAGTTCTGATGGCATTTC	7629.63	7629.47	19
20	H51_68-80_130-141	25	CGGTAAGTTCTGAGATGGCATTCT	8323.87	8323.29	20
21	H51_69-80_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGAGATGGCATTTC	8323.87	8323.51	21
22	H51_72-82_130-142	24	TCGGTAAGTTCTGGAAGATGGCAT	8042.78	8042.42	22
23	H51_69-80_129-141	25	CGGTAAGTTCTGTAGATGGCATTTC	8323.87	8324.17	23
24	H51_70-80_130-141	23	CGGTAAGTTCTGAGATGGCATT	7678.65	7678.31	24
25	H51_69-79_130-141	23	CGGTAAGTTCTGGATGGCATTTC	7654.64	7654.67	25
26	H51_68-78_130-141	23	CGGTAAGTTCTGATGGCATTCT	7629.63	7629.34	26
27	H51_68-78_129-141	24	CGGTAAGTTCTGTATGGCATTCT	7959.74	7959.98	27
28	H51_69-79_131-141	22	CGGTAAGTTCTGATGGCATTTC	7299.52	7299.75	28
29	H51_68-78_132-145	25	CAGTCGGTAAGTTCTATGGCATTCT	8283.86	8283.22	29
30	H51_73-82_127-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCGAAGATGGCA	8342.89	8342.97	30

[0285]

31	H51_68-79_129-141	25	CGGTAAGTTCTGTGATGGCATTCT	8314.86	8314.76	31
32	H51_68-78_128-141	25	CGGTAAGTTCTGTCATGGCATTCT	8274.85	8274.92	32
33	H51_77-89_132-145	27	CAGTCGGTAAGTTCCATCAAGGAAGAT	9005.13	9005.19	33
34	H51_74-88_131-142	27	TCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGC	9036.13	9035.95	34
35	H51_69-82_133-145	27	CAGTCGGTAAGTTGAAGATGGCATTTC	9027.12	9026.95	35
36	H51_77-90_137-150	28	AAAGCCAGTCGGTAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.13	36
37	H51_74-88_131-145	30	CAGTCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGC	10045.48	10045.48	37
38	H51_77-91_134-148	30	AGCCAGTCGGTAAGTAACATCAAGGAAGAT	10047.50	10047.18	38
39	H51_77-91_139-150	27	AAAGCCAGTCGGAACATCAAGGAAGAT	9032.16	9032.47	39
40	H51_69-82_132-145	28	CAGTCGGTAAGTTCGAAGATGGCATTTC	9342.23	9342.41	40
41	H51_77-89_137-150	27	AAAGCCAGTCGGTACATCAAGGAAGAT	9023.15	9023.88	41
42	H51_70-81_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATT	8993.10	8993.92	42
43	H51_68-81_134-146	27	CCAGTCGGTAAGTAAGATGGCATTCT	8987.11	8987.53	43
44	H51_77-88_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTCATCAAGGAAGAT	9011.12	9011.04	44
45	H51_72-86-131-142	27	TCGGTAAGTTCTCAAGGAAGATGGCAT	9036.13	9036.50	45
46	H51_73-87_131-143	28	GTCGGTAAGTTCTTCAAGGAAGATGGCA	9391.25	9391.64	46
47	H51_73-88_131-142	28	TCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGCA	9375.25	9375.16	47
48	H51_78-90_132-145	27	CAGTCGGTAAGTTACATCAAGGAAGA	9014.14	9014.43	48
49	H51_77-92_131-141	27	CGGTAAGTTCTCAACATCAAGGAAGAT	8989.13	8988.67	49
50	H51_77-89_131-143	26	GTCGGTAAGTTCTCATCAAGGAAGAT	8681.01	8680.23	50
51	H51_77-91_135-146	27	CCAGTCGGTAAGAACATCAAGGAAGAT	9023.15	9022.73	51
52	H51_77-91_137-149	28	AAGCCAGTCGGTAAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.60	52
53	H51_76-89_130-142	27	TCGGTAAGTTCTGCATCAAGGAAGATG	9036.13	9036.49	53
54	H51_71-85_131-142	27	TCGGTAAGTTCTAAGGAAGATGGCATT	9051.13	9051.24	54
55	H51_71-87_131-142	29	TCGGTAAGTTCTTCAAGGAAGATGGCATT	9696.35	9696.96	55
56	H51_74-89_141-152	28	AGAAAGCCAGTCCATCAAGGAAGATGGC	9363.26	9363.78	56
57	H51_77-91_132-144	28	AGTCGGTAAGTTCAACATCAAGGAAGAT	9368.26	9368.63	57
58	H51_77-91_133-146	29	CCAGTCGGTAAGTTAACATCAAGGAAGAT	9683.37	9683.05	58
59	H51_77-91_131-144	29	AGTCGGTAAGTTCTAACATCAAGGAAGAT	9698.37	9698.22	59
60	H51_77-91_134-146	28	CCAGTCGGTAAGTAACATCAAGGAAGAT	9353.26	9353.46	60
61	H51_74-89_131-142	28	TCGGTAAGTTCTCATCAAGGAAGATGGC	9351.24	9351.27	61
62	H51_77-91_136-148	28	AGCCAGTCGGTAAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.95	62
63	H51_-2-12_127-142	30	TCGGTAAGTTCTGTCTCTGAGTAGGAGCT	9994.43	9995.15	63
64	H51_128-141_6-18	27	TAACAGTCTGAGTCGGTAAGTTCTGTC	8978.10	8978.67	64
65	H51_8-20_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTGTCAGTAACAGTCTGA	8987.11	8987.52	65

[0286]

66	H51_4-16_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCCAGTCTGAGTAG	9003.11	9003.22	66
67	H51_6-17_127-141	27	CGGTAAGTTCTGTCCAACAGTCTGAGT	8963.09	8963.28	67
68	H51_5-15_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCCAGTCTGAGTA	8638.98	8638.76	68
69	H51_5-16_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTACAGTCTGAGTA	8663.99	8633.39	69
70	H51_6-16_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCCAGTCTGAGT	8638.98	8638.34	70
71	H51_5-17_129-142	27	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGTA	9002.11	9002.21	71
72	H51_6-17_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTCAACAGTCTGAGT	8978.10	8978.75	72
73	H51_6-18_129-142	27	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGT	8993.10	8993.63	73
74	H51_2-12_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCTCTGAGTAGGA	8678.99	8679.82	74
75	H51_2-11_128-142	25	TCGGTAAGTTCTGTCTCTGAGTAGGA	8348.74	8348.88	75
76	H51_-1-13_131-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGC	8704.00	8703.95	76
77	H51_5-15_128-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCAGTCTGAGTA	8308.87	8308.76	77
78	H51_4-13_131-142	22	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAG	7339.53	7339.90	78
79	H51_-3-7_128-142	25	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGCTA	8348.88	8348.60	79
80	H51_-2-9_129-142	25	TCGGTAAGTTCTGTGAGTAGGAGCT	8388.89	8388.22	80
81	H51_2-11_127-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCCTGAGTAGGA	8333.88	8333.90	81
82	H51_-2-13_127-138	27	TAAGTTCTGTCCGTCTGAGTAGGAGCT	8994.10	8994.30	82
83	H51_-7-7_128-141	28	CGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGCTAAAAT	9366.24	9366.55	83
84	H51_-3-11_120-133	28	TCTGTCCAAGCCCGTCTGAGTAGGAGCTA	9288.21	9288.36	84
85	H51_6-18_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCTAACAGTCTGAGT	8978.10	8978.58	85
86	H51_-1-15_125-136	28	AGTTCTGTCCAACAGTCTGAGTAGGAGC	9327.22	9326.72	86
87	H51_-1-12_125-138	27	TAAGTTCTGTCCAATCTGAGTAGGAGC	8987.11	8987.28	87
88	H51_6-17_128-141	26	CGGTAAGTTCTGTCAACAGTCTGAGT	8647.99	8648.53	88
89	H51_6-18_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGT	8662.99	8663.19	89
90	H51_73-87_127-141	30	CGGTAAGTTCTGTCTCAAGGAAGATGGCA	10021.94	10021.47	90
91	H51_70-82_128-142	28	TCGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATT	9348.22	9348.21	91
92	H51_69-81_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATTTC	8978.10	8978.55	92
93	H51_70-82_127-141	28	CGGTAAGTTCTGTCCAAGATGGCATT	9333.22	9333.36	93

[0287]

[0288]

[실시에 2 : 안티센스 올리고머의 엑손 스킵핑 활성 시험]

[0289]

인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51 스킵핑의 생체외(In vitro) 시험

[0290]

(1) 시험방법

[0291]

RD세포(인간 횡문근육종 세포주, CCL-136, ATCC로부터 구입) 3.5×10^5 개에 대해, 표 1, 2의 각 안티센스 올리고머 0.3~120 μ M를 Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L을 사용하여 Nucleofector II(Lonza)에 의해 도입하였다. 도입을 위한 펄스 프로그램은 T-030을 사용하였다.

[0292]

도입 후의 RD세포를 10% 소태아 혈청(FBS)(인비트로젠사 제조)을 포함하는 EMEM(Eagle's minimal essential medium) 배지(시그마사 제조, 이하 동일) 2 mL 중 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 3일밤 배양하였다.

[0293]

도입 후의 RD세포를 PBS(닛스이사 제조, 이하 동일)로 1회 세정한 후, 1%의 2-메르캅토에탄올(나칼라이 테스크사 제조)을 포함하는 Buffer RA1(다카라 바이오사 제조)을 350 μ L 세포에 첨가하고, 수 분간 실온에 방치하여 세포를 용해시켜 NucleoSpin(등록상표) Filter(다카라 바이오사 제조) 상에 회수하였다. 11,000 \times g으로 1분간 원심하고, 호모지네이트를 제작하였다. NucleoSpin(등록상표) RNA(다카라 바이오사 제조)에 첨부된 프로토콜에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA의 농도는 NanoDrop ONE(Thermo Fisher사 제조)을 사용해서 측정하였다.

[0294]

추출한 total RNA 400 ng에 대해 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit(퀴아젠사 제조) 및 서멀 사이클러를 사용하여 One-Step RT-PCR을 행하였다. 상기 키트에 첨부된 프로토콜에 따라 반응액을 조제하였다. 서멀 사이클러는 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch(다카라 바이오사 제조)를 사용하였다. 사용한 RT-PCR의 프로그램은 아

래와 같다.

- [0295] 50℃, 30분간 : 역전사반응
- [0296] 95℃, 15분간 : 폴리머라아제 활성화, 역전사 효소 불활성화, cDNA 열변성
- [0297] [94℃, 30초간 ; 60℃, 30초간 ; 72℃, 1분간] ×35사이클 : PCR 증폭
- [0298] 72℃, 10분간 : 최종 신장반응
- [0299] RT-PCR에 사용한 포워드 프라이머와 리버스 프라이머의 염기서열은 아래와 같다.

포워드 프라이머 : 5' - CTGAGTGGGAAGGCGGTAAC -3' (서열번호 9 5)
리버스 프라이머 : 5' - GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA -3' (서열번호 9 6)

- [0300]
- [0301] 상기 PCR의 반응산물 1 μL를 Bioanalyzer(아질렌트사 제조) 또는 MultiNA(시마즈 제작소 제조)를 사용해서 해석하였다.
- [0302] 엑손 51이 스킵한 밴드의 폴리뉴클레오티드량 「A」와, 엑손 51이 스킵하지 않은 밴드의 폴리뉴클레오티드량 「B」를 밴드의 시그널 강도로서 측정하였다. 이들 「A」 및 「B」의 측정값을 토대로 전술한 식(1)에 따라 스킵핑 효율을 구하였다.
- [0303] (2) 시험결과
- [0304] 각 안티센스 올리고머에 대해서 얻어진 엑손 51의 스킵핑 효율의 결과를 도 1~18에 나타낸다. 또한, 직접적 또는 간접적인 비교 대조로서, 엑손 51의 스킵핑약인 에테플러센(etelplirsene)(WHO Drug Information 24, 2, 137-139 (2010), Proposed INN List 103)과 동일 염기서열을 갖고, 또한 동일 5' 말단 수식 : 즉 5' 말단이 상기 기(1)을 가지고 있고, 이 때문에 전체 구조가 동일한 표 2에 나타내는 안티센스 올리고머(PMO No. 94(서열번호 94))를, 일본국 특허공개 제2015-91229호 공보에 기재된 방법에 따라 합성하여 사용하였다.
- [0305] 표 1의 본 발명의 안티센스 올리고머는, 에테플러센(etelplirsene)과 전체 구조가 동일한 표 2의 안티센스 올리고머와 비교하여 스킵핑 효율이 현저히 높아, 엑손 51을 매우 유효하게 스킵핑시켰다.

표 2

표 2 합성한 에테플러센 (etelplirsene)과 동일 염기서열 및 5' 말단 수식을 갖는 안티센스 올리고머 (PMO No. 94)

PMO No.	표적 염기서열	진 장	PMO의 염기서열	분자량		서열 번호
				이론값	실측값	
94	H51_66-95	30	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	10300.59	10300.43	94

- [0306]
- [0307] [실시에 3 : 안티센스 올리고머의 용해성 시험]
- [0308] 안티센스 올리고머의 생리식염수에 대한 용해성 시험
- [0309] 실시예 2에서 스킵핑 효율이 매우 높았던 PMO No. 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67, 76 및 90의 각 안티센스 올리고머에 대해서, 의약 용도로의 유용성을 더욱 검증하기 위해, 생리식염수에 대한 용해성 시험을 행하였다.
- [0310] (1) 시험방법
- [0311] 5.7 mg의 상기 각 안티센스 올리고머가 든 샘플병에 주사용수 57 μL를 첨가하여, 초음파와 볼텍스를 사용하여 용해시킨 후, 2배 농도 생리식염수 57 μL를 첨가하여, 볼텍스를 사용하여 교반하고, 50 mg/mL의 생리식염수 용액으로 하였다. 실온에서 24시간 정치하고, 정치 후에 침전 유무를 육안 관찰로 확인하여, 침전이 보이지 않은 것을 용해성이 높은 안티센스 올리고머로 평가하였다.
- [0312] (2) 시험결과
- [0313] 시험한 각 안티센스 올리고머 중, PMO No. 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 및 76의 각 안티센스 올리고머는 생리식염수에 대해 50 mg/mL 이상의 용해성을 나타내었다.

[0314] 이 결과로부터, 이들 안티센스 올리고머는 엑손 51의 스키피нг 효율이 현저히 높고, 생리식염수에 대한 용해성도 높기 때문에, 의약으로서 이용가치가 높은 안티센스 올리고머인 것을 알 수 있었다.

[0315] [실시예 4 : 안티센스 올리고머의 안전성 평가]

[0316] 실시예 3에서 생리식염수에 대한 용해성 시험을 실시한 각 안티센스 올리고머 중, PMO No. 16, 21, 42, 90에 대해서 의약 용도에서의 안전성을 검증하기 위해, 안전성 평가를 행하였다.

[0317] (1) 평가방법

[0318] 각 안티센스 올리고머를 생리식염수에 용해하고, C57BL / 6N 웅성 6주령 마우스의 꼬리정맥 내로 투여하였다. 다음날, 마우스로부터 혈청을 회수하고, 혈중 아스파라긴산 아미노트랜스페라아제(AST)값, 알라닌 아미노트랜스페라아제(ALT)값, 요소질소량(BUN)값 및 크레아티닌값을 측정하였다. 촉매로서 사용한 생리식염수만을 투여한 마우스 또는 무처리 마우스의 대조군에서의 측정값을 정상값으로 하여, 통계학적 유의차 검정(Student의 t 검정 또는 Dunnett의 검정)을 행하여 각 안티센스 올리고머의 투여군에서 $p < 0.05$ 의 유의 수준에서 값에 유의하게 상승이 보인 경우, 이상값으로 판정하였다. 각 검정에는 통계 해석 시스템 SAS(등록상표, SAS Institute사) 버전 9.3을 사용하였다. 1,000 mg / kg의 용량에 있어서 AST값, ALT값, BUN값 및 크레아티닌값 어느 것에도 이상값이 보이지 않는 경우, 안전성이 높은 안티센스 올리고머라고 판단하였다.

[0319] (2) 평가결과

[0320] PMO No. 16, 21, 42의 각 안티센스 올리고머에 대해서는, 1,000 mg / kg의 용량에 있어서 AST값, ALT값, BUN값 및 크레아티닌값 어느 것에도 이상값이 보이지 않고, 안전성이 높은(구체적으로는, 신장 및 간장의 기능에 대한 영향이 없거나, 영향을 줄 가능성이 매우 낮은) 안티센스 올리고머인 것을 확인하였다. 각각의 결과에 대해서, 도 19~21에 나타낸다. 또한, $p < 0.05$ 의 유의 수준에서 유의하게 상승이 보인 값(이상값)에는 p값을 나타낸다.

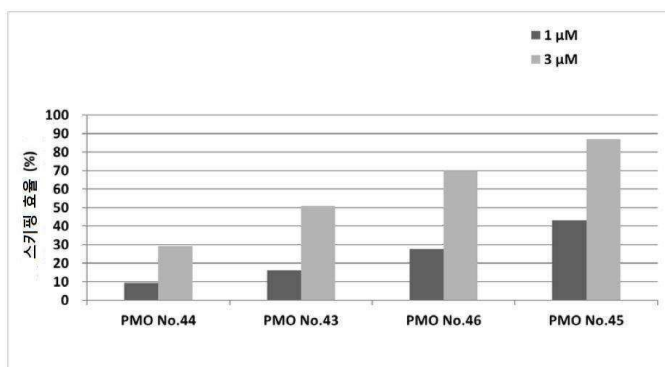
[0321] 이상의 결과로부터, 본 발명의 안티센스 올리고머는 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 스키피нг을 고효율로 유도하는 활성을 유지하면서, 또한 의약으로서 우수한 물성 및 안전성을 갖는 것이 나타내어졌다.

[0322] **서열표 프리텍스트**

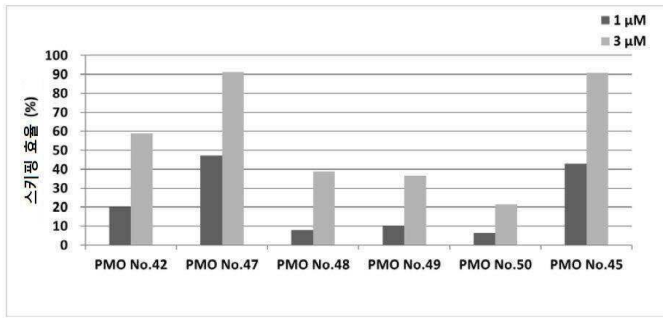
[0323] 서열번호 1~126 : 합성 핵산

도면

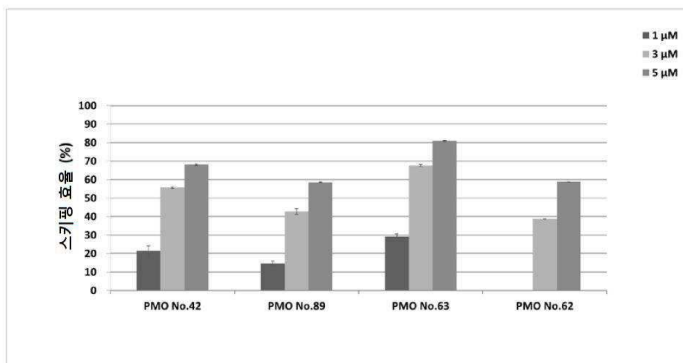
도면1



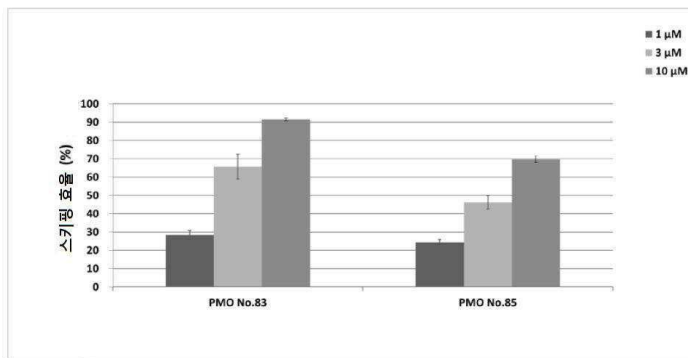
도면2



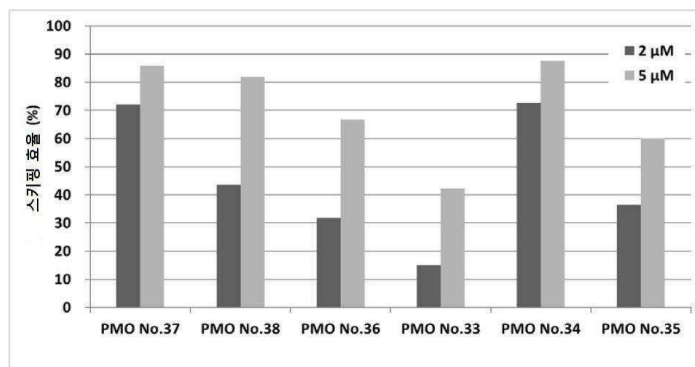
도면3



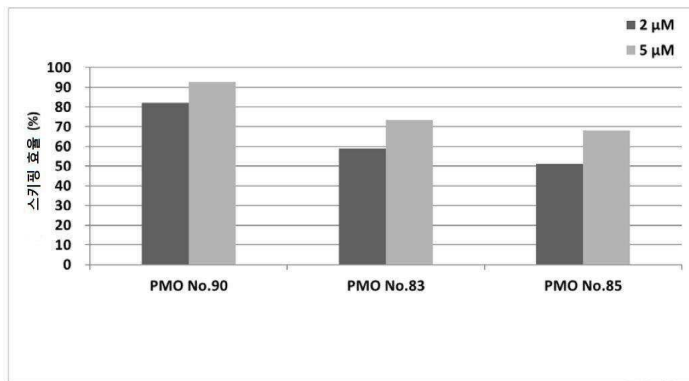
도면4



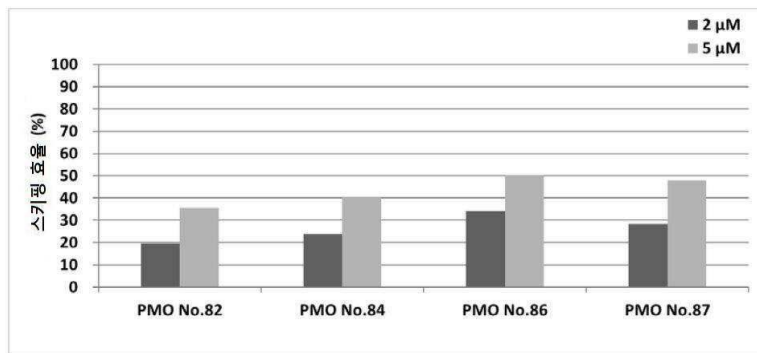
도면5



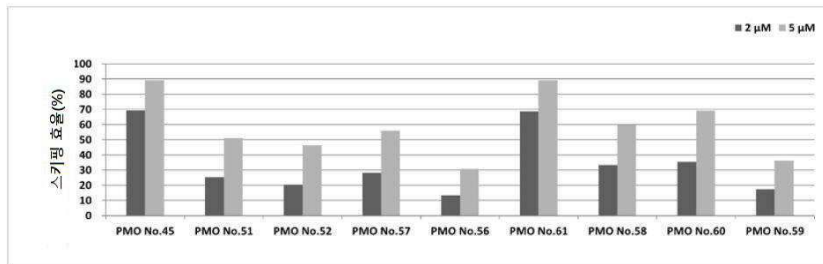
도면6



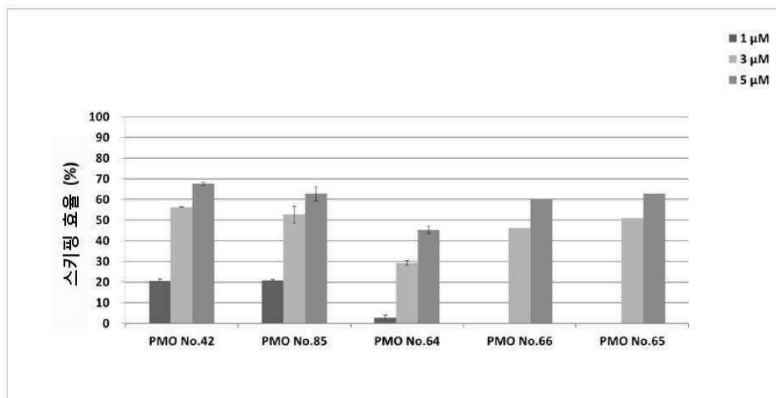
도면7



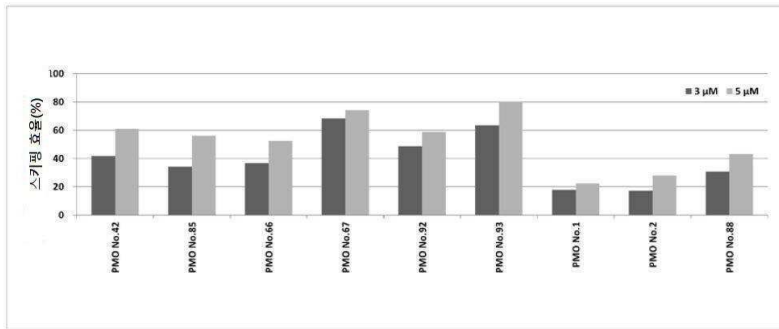
도면8



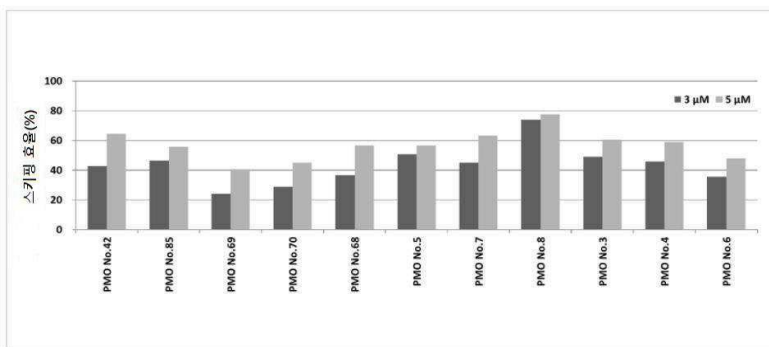
도면9



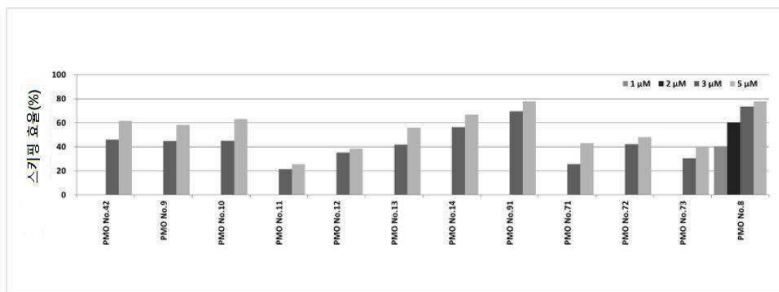
도면10



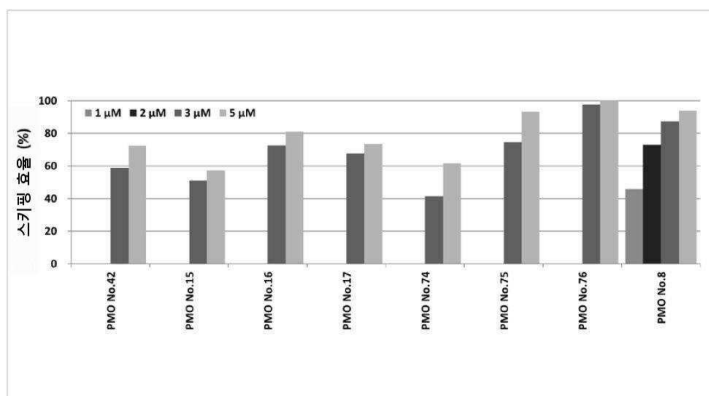
도면11



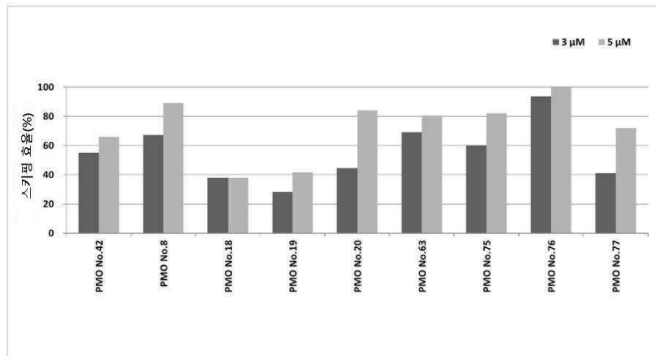
도면12



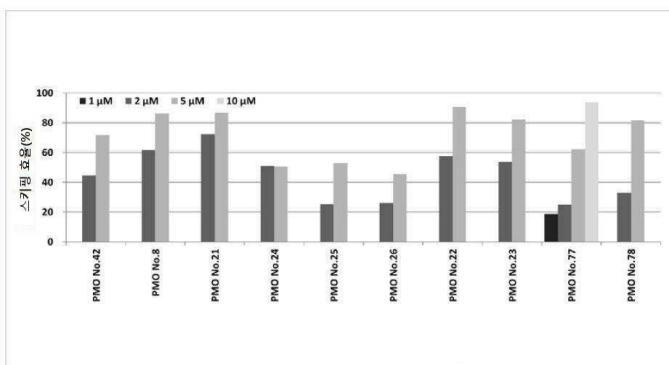
도면13



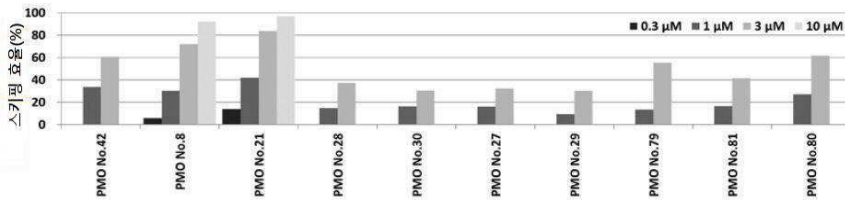
도면14



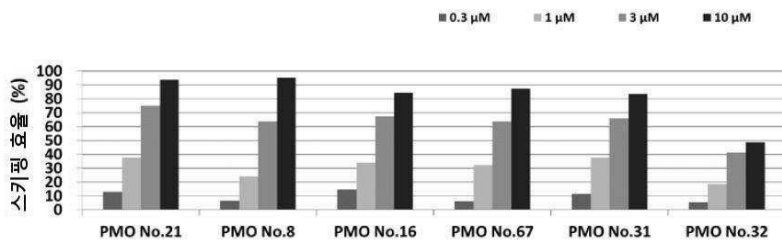
도면15



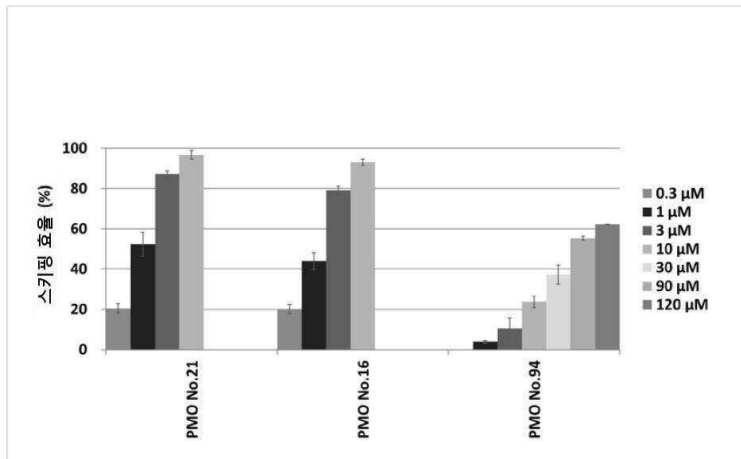
도면16



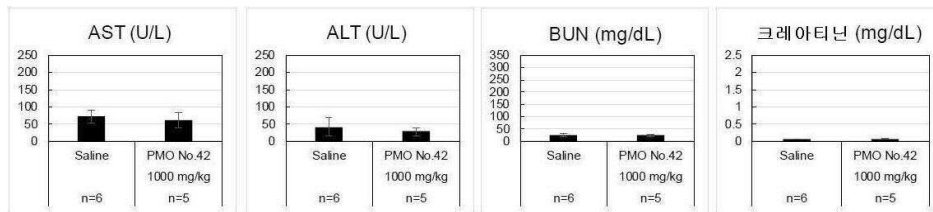
도면17



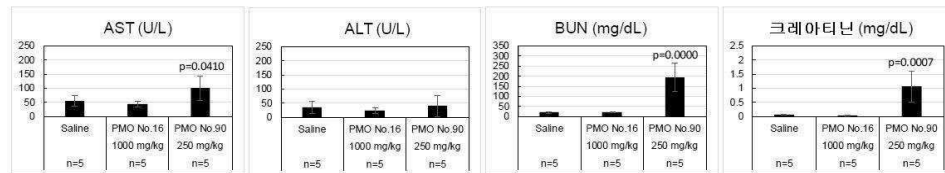
도면18



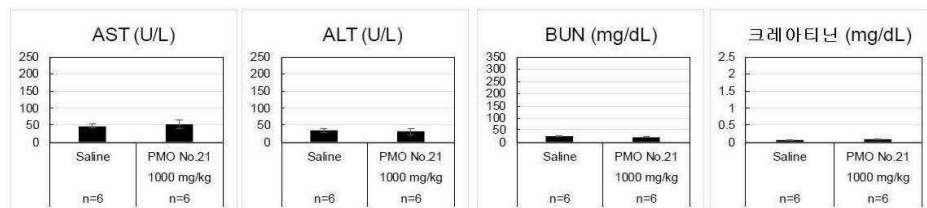
도면19



도면20



도면21



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Nippon Shinyaku Co., Ltd.

National Center of Neurology and Psychiatry

<120> Antisense nucleic acids that induce exon 51 skipping

<130> G2505W0

<150> JP2020-033483
 <151> 2020-02-28
 <160> 128
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 1
 tcggttaagtt ctaagatggc atttcta 27
 <210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 2
 tcggttaagtt ctaagatggc atttct 26
 <210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 3
 tcggttaagtt ccatcaagga agatggc 27
 <210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 4
 cggttaagttc catcaaggaa gatggca 27
 <210> 5
 <211> 28

<212
 > DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 5
 tcggtaaagt ctgtcaagat ggcatttc 28
 <210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 6
 tcggtaaagt ctgatggcat ttctag 26
 <210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 7
 ccagtcggta agtgatggca tttcta 26

 <210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 8
 tcggtaaagt ctgagatggc atttct 26
 <210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 9
 tcggtaaagt ctgtaagatg gcattt 26

<210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 10
 cggtaagttc tgtcaagatg gcattt 26

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 11
 tcggtaagtt ctagatggca tttct 25

<210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 12
 tcggtaagtt ctgtatggca tttcta 26

<210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 13
 tcggtaagtt ctggatggca tttcta 26

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 14	
tcggtaagtt ctgtgatggc atttct	26
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 15	
tcggtaagtt ctggatggca tttct	25
<210> 16	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 16	
tcggtaagtt ctgtagatgg catttc	26
<210> 17	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 17	
tcggtaagtt ctgaagatgg cattt	25
<210> 18	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 18	
gtcggtaagt tctagatggc atttc	25
<210> 19	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 19
 tcggtaaagt ctgatggcat ttc 23

 <210> 20
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 20
 cggtaaagttc tgagatggca tttct 25
 <210> 21
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 21
 tcggtaaagt ctgagatggc atttc 25
 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 22
 tcggtaaagt ctggaagatg gcat 24

 <210> 23
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 23
 cggtaaagttc tgtagatggc atttc 25
 <210> 24
 <211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 24
 cggtaagttc tgagatggca ttt 23
 <210> 25
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 25
 cggtaagttc tggatggcat ttc 23

 <210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 26
 cggtaagttc tgatggcatt tct 23
 <210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 27
 cggtaagttc tgtatggcat ttct 24
 <210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 28
 cggtaagttc tgatggcatt tc 22

<210> 29
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 29
 cagtcggtaa gttcatggca tttct 25
 <210> 30
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 30
 cgtaagttc tgtccaaga tggca 25
 <210> 31
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 31
 cgtaagttc tgtgatggca tttct 25

 <210> 32
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 32
 cgtaagttc tgtcatggca tttct 25
 <210> 33
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 33

cagtcggtaa gttccatcaa ggaagat 27

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 34

tcggtaagtt ctatcaagga agatggc 27

<210> 35

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 35

cagtcggtaa gttgaagatg gcatttc 27

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 36

aaagccagtc ggtaacatca aggaagat 28

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 37

cagtcggtaa gttctatcaa ggaagatggc 30

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 38
 agccagtcgg taagtaacat caaggaagat 30
 <210> 39
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 39
 aaagccagtc ggaacatcaa ggaagat 27
 <210> 40
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 40
 cagtcggtaa gttcgaagat ggcatttc 28

 <210> 41
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 41
 aaagccagtc ggtacatcaa ggaagat 27
 <210> 42
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 42
 tcggtaaagtt ctgtcaagat ggcattt 27
 <210> 43
 <211> 27
 <212> DNA

<213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 43
 ccagtcggtgta agtaagatgg catttct 27

<210> 44
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 44
 tcggttaagtt ctgtcatcaa ggaagat 27

<210> 45
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 45
 tcggttaagtt ctcaaggaag atggcat 27

<210> 46
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 46
 gtcggttaagt tcttcaagga agatggca 28

<210> 47
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 47
 tcggttaagtt ctatcaagga agatggca 28

<210> 48

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 48
 cagtcggtaa gttcacatca aggaaga 27
 <210> 49
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 49
 cgtaagttc tcaacatcaa ggaagat 27

 <210> 50
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 50
 gtcggtaagt tctcatcaag gaagat 26
 <210> 51
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 51
 ccagtcggta agaacatcaa ggaagat 27
 <210> 52
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 52

aagccagtcg gtaaacaatca aggaagat	28
<210> 53	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 53	
tcggttaagtt ctgcatcaag gaagatg	27
<210> 54	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 54	
tcggttaagtt ctaaggaaga tggcatt	27
<210> 55	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 55	
tcggttaagtt cttcaaggaa gatggcatt	29
<210> 56	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 56	
agaaagccag tccatcaagg aagatggc	28
<210> 57	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 57
 agtcggtaag ttcaacatca aggaagat 28
 <210> 58
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 58
 ccagtcggta agttaacatc aaggaagat 29
 <210> 59
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 59
 agtcggtaag ttctaacatc aaggaagat 29
 <210> 60
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 60
 ccagtcggta agtaacatca aggaagat 28
 <210> 61
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 61
 tcggtaagtt ctcatcaagg aagatggc 28
 <210> 62
 <211> 28

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 62
 agccagtcgg taaacatca aggaagat 28
 <210> 63
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 63
 tcggtaagtt ctgtcctctg agtaggagct 30
 <210> 64
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 64
 taacagtctg agtcggtaag ttctgtc 27

 <210> 65
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 65
 cggtaagttc tgcagtaac agtctga 27
 <210> 66
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 66
 cggtaagttc tgcacagtc tgagtag 27
 <210> 67

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 67
 cggtaagttc tgtccaacag tctgagt 27

<210> 68
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 68
 tcggtaagtt ctgtccagtc tgagta 26

<210> 69
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 69
 tcggtaagtt ctgtacagtc tgagta 26

<210> 70
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 70
 tcggtaagtt ctgtcacagt ctgagt 26

<210> 71
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 71

tcggtaagtt ctgtaacagt ctgagta 27
 <210> 72
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 72
 tcggtaagtt ctgtcaacag tctgagt 27
 <210> 73
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 73
 tcggtaagtt ctgttaacag tctgagt 27
 <210> 74
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 74
 tcggtaagtt ctgtctctga gtagga 26
 <210> 75
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 75
 tcggtaagtt ctgtcctgag tagga 25
 <210> 76
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 76	
tcggttaagtt ctgtctgagt aggagc	26
<210> 77	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 77	
cggtaagttc tgcctcagtct gagta	25
<210> 78	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 78	
tcggttaagtt ctgtctgagt ag	22
<210> 79	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 79	
tcggttaagtt ctgtcgtagg agcta	25
<210> 80	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 80	
tcggttaagtt ctgtgagtag gagct	25
<210> 81	
<211> 25	
<212> DNA	

<213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 81
 cggtaagttc tgcacctgag tagga 25
 <210> 82
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 82
 taagttctgt ccgtctgagt aggagct 27

 <210> 83
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 83
 cggtaagttc tgccttagga gctaaaat 28
 <210> 84
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 84
 tctgtccaag cccgctgagt aggagcta 28
 <210> 85
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 85
 cggtaagttc tgctaacag tctgagt 27

 <210> 86

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 86
 agttctgtcc aacagtctga gtaggagc 28
 <210> 87
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 87
 taagttctgt ccaatctgag taggagc 27
 <210> 88
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 88
 cggtaagttc tgtcaacagt ctgagt 26

 <210> 89
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 89
 tcggtaagtt ctgtaacagt ctgagt 26
 <210> 90
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 90
 cggtaagttc tgtcctcaag gaagatggca 30

<210> 91
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 91
 tcggtaaagt ctgtcgaaga tggcattt 28

<210> 92
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 92
 cggtaaagttc tgtcaagatg gcatttc 27

<210> 93
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 93
 cggtaaagttc tgtccgaaga tggcattt 28

<210> 94
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 94
 ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag 30

<210> 95
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 95	
ctgagtggaa ggcggtaac	20
<210> 96	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 96	
gaagtttcag ggccaagtca	20
<210> 97	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 97	
ctcatacctt ctgcttcaag gaagatggca	30
<210> 98	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 98	
ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag	30
<210> 99	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 99	
aacatcaagg aagatggcat t	21
<210> 100	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 100
 tccaacatca aggaagatgg c 21

<210> 101
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 101
 acctccaaca tcaaggaaga t 21

<210> 102
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 102
 gaguaacagu cugaguagga g 21

<210> 103
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 103
 ugugucacca gaguaacagu c 21

<210> 104
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 104
 aaccacaggu ugugucacca g 21

<210> 105
 <211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 105
 uuuccuuagu aaccacaggu u 21
 <210> 106
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 106
 gagauggcag uuuccuuagu a 21

 <210> 107
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 107
 uucuaguuug gagauggcag u 21
 <210> 108
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 108
 aagauggcau uucuaguuug g 21
 <210> 109
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 109
 aacaucaagg aagauggcau u 21

<210> 110
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 110
 agguaccucc aacaucaagg a 21
 <210> 111
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 111
 cugccagagc agguaccucc a 21
 <210> 112
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 112
 cgguugaaau cugccagagc a 21

 <210> 113
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 113
 uguccaagcc cgguugaaau c 21
 <210> 114
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 114

cgguaaguuc uguccaagcc c	21
<210> 115	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 115	
gaaagccagu cgguaaguuc u	21
<210> 116	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 116	
aucaagcaga gaaagccagu c	21
<210> 117	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 117	
uuauaacuug aucaagcaga g	21
<210> 118	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 118	
cucugugauu uuauaacuug a	21
<210> 119	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial	

<220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 119
 caccaucacc cucugugauu u 21
 <210> 120
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 120
 caaggucacc caccaucacc c 21
 <210> 121
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 121
 uugauauccu caaggucacc c 21
 <210> 122
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 122
 gaucaucucg uugauauccu c 21
 <210> 123
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 123
 ucugcuugau gaucaucucg u 21
 <210> 124
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 124
 ggcauuucua guuuggagau g 21

<210> 125
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 125
 caaggaagau ggcauuucua g 21

<210> 126
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 126
 ccuccaacau caaggaagau g 21

<210> 127
 <211> 233
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 127
 ctctactca gactgttact ctggtagac aacctgtggt tactaaggaa actgcatct 60

ccaaactaga aatgcatct tccttgatgt tggaggtacc tgctctggca gatttcaacc 120
 gggttgtagc agaacttacc gactggcttt ctctgcttga tcaagttata aatcacaga 180
 ggtgatggt ggtgacctt gaggatatca acgagatgat catcaagcag aag 233

<210> 128
 <211> 251
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 128
 aaacccaaaa tattttagct cctactcaga ctgttactct ggtgacacaa cctgtggtta 60

ctaaggaaac tgccatctcc aaactagaaa tgccatcttc cttgatgttg gaggtacctg	120
ctctggcaga ttcaaccgg gcttggacag aacttacga ctggctttct ctgcttgatc	180
aagttataaa atcacagagg gtgatggtgg gtgacctga ggatatcaac gagatgatca	240
tcaagcagaa g	251