



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월01일
(11) 등록번호 10-2539587
(24) 등록일자 2023년05월30일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/711 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01) A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01) A61K 47/54 (2017.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
A61K 31/711 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7030957</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년04월04일
심사청구일자 2021년04월02일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년10월26일</p> <p>(65) 공개번호 10-2017-0129263</p> <p>(43) 공개일자 2017년11월24일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/025883</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/161429
국제공개일자 2016년10월06일</p> <p>(30) 우선권주장
62/142,986 2015년04월03일 미국(US)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
WO2012135246 A2
WO2014190157 A1
KR1020140031877 A</p> | <p>(73) 특허권자
아이오니스 파마수티컬즈, 인코포레이티드
미합중국 캘리포니아주 92010 칼스바드 2855 가젤 코트</p> <p>(72) 발명자
구오, 슐링
미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트 2855
아그하잔, 마리암
미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트 2855
스웨이지, 에릭, 이.
미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트 2855</p> <p>(74) 대리인
양영준, 김영</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **TMPRSS6 발현을 조절하기 위한 화합물 및 방법들**

(57) 요약

본 출원은 필요로 하는 개체에서 TMPRSS6을 조절하고 철 축적 질환, 장애 및/또는 병태를 조절하기 위한, 변형된 올리고뉴클레오티드들을 포함하는 조성물 및 화합물들을 개시한다. 개체에서 철 축적 질환들, 가령, 적혈구증가증, 혈색소증 또는 β-지중해빈혈은 TMPRSS6에 대해 표적되는 안티센스 화합물들의 투여로 치료, 개선, 지연 또는 예방될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/7115 (2013.01)
A61K 31/712 (2013.01)
A61K 31/7125 (2013.01)
A61K 47/549 (2017.08)
C12N 15/1138 (2013.01)
C12Y 304/21 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/351 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다음 화학식에 따른 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물: mCes Teo Teo Teo Aeo Tds Tds mCds mCds Ads Ads Ads Gds Gds Gds mCeo Aeo Ges mCes Te (서열 번호: 36)이며,

상기 식에서,

A = 아데닌 핵염기,

mC = 5-메틸시토신 핵염기,

G = 구아닌 핵염기,

T = 티민 핵염기,

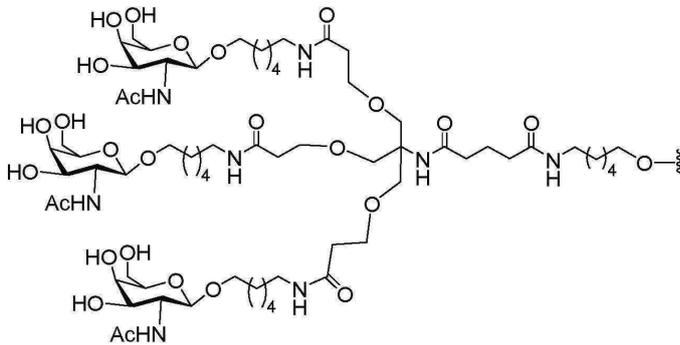
e = 2'-O(CH₂)₂-OCH₃ 퓨라노실 변형된 당 모이어티,

d = 2'-데옥시퓨라노실 당 모이어티,

s = 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결, 및

o = 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결이고,

상기 화합물은 5'-트리스헥실아미노-(THA)-C6 Ga1Nac₃ 공액체를 추가로 포함하며, 부착점은 5'-말단 뉴클레오시드에 있고, 5'-트리스헥실아미노-(THA)-C6 Ga1Nac₃ 공액체는 하기 화학식을 갖고:



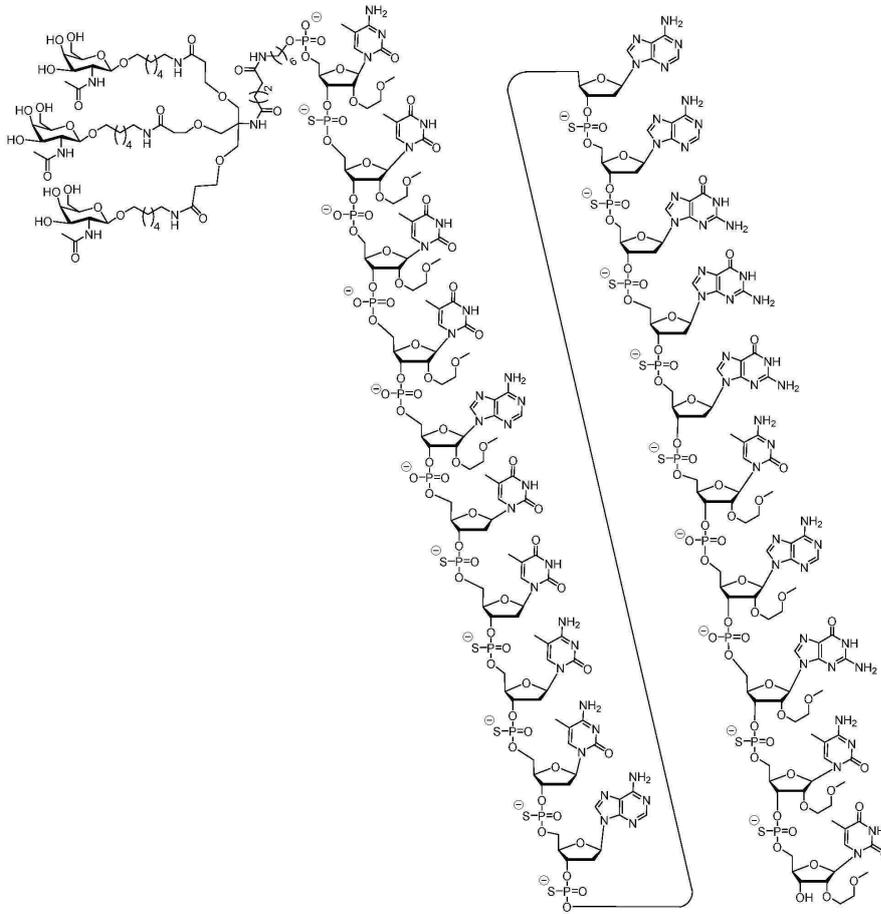
여기서 변형된 올리고뉴클레오티드는 절단가능한 모이어티에 의해 5'-트리스헥실아미노-(THA)-C6 Ga1Nac₃ 공액체에 연결되고, 절단가능한 모이어티는 5'-P(OH)(=O)-O-3'인 화합물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 부착점이 5'-말단 뉴클레오시드의 5'-하이드록실 그룹의 5'-산소 원자인 화합물.

청구항 3

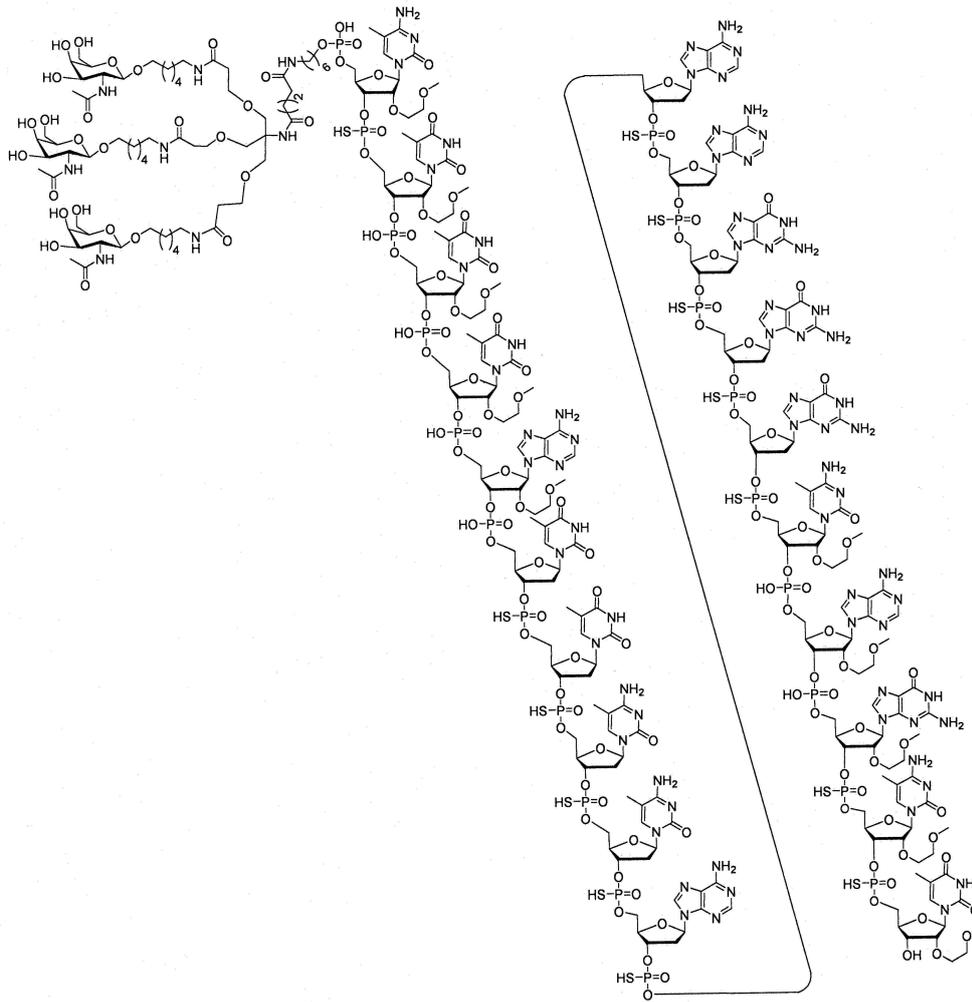
화합물의 음이온 형태가 다음 화학 구조를 갖는 것인 화합물:



(서열 번호: 36).

청구항 4

다음 화학 구조에 따른 화합물 또는 그의 염:



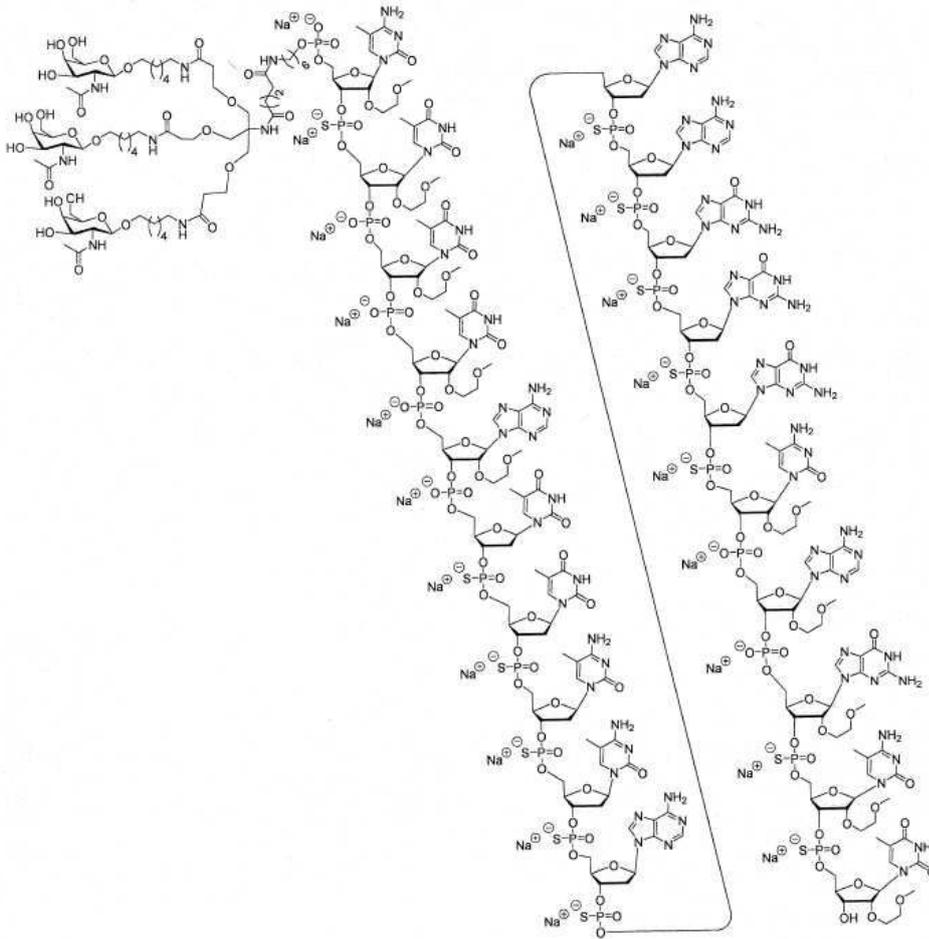
(서열 번호: 36).

청구항 5

청구항 4에 있어서, 염이 소듐 염 또는 포타슘 염인 화합물.

청구항 6

다음 화학 구조에 따른 화합물:



(서열 번호: 36).

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는, 적혈구증가증, 혈색소증 및 빈혈증으로부터 선택되는 질환, 장애 또는 병태의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 제약학적 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는, 적혈구증가증의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 제약학적 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 적혈구증가증이 진성 적혈구증가증인 제약학적 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는, 유전성 빈혈증, 골수형성이상 증후군 및 중증도의 만성 용혈로부터 선택되는 질환, 장애 또는 병태의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 제약학적 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 유전성 빈혈증은 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia), 지중해빈혈(thalassemia), 판코니 빈혈증(Fanconi anemia), 다이아몬드 블랙판 빈혈증(Diamond Blackfan anemia), 슈바크만 다이아몬드 증후군(Shwachman Diamond syndrome), 적혈구막 장애(red cell membrane disorder), 6-인산 포도당 탈수소효소

결핍(glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency), 및 유전성 출혈 모세혈관확장증(hereditary hemorrhagic telangiectasia)으로부터 선택된 것인 제약학적 조성물.

청구항 12

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는, 지중해빈혈의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 제약학적 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 지중해빈혈은 α -지중해빈혈, β -지중해빈혈 및 δ -지중해빈혈로부터 선택된 것인 제약학적 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, β -지중해빈혈이 경증성, 중간성 또는 중증성인 제약학적 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 서열 목록

[0002] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록은 2016년 3월 23에 생성된, 148 Kb 크기의 파일명 BIOL0271WOSEQ_ST25.txt로 제공된다. 전자 형식의 서열 목록에 있는 정보는 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 동물에서 철 축적을 감소시키기 위해 TMPRSS6 발현을 조절하는 방법들, 화합물들 및 조성물들을 제공한다.

배경 기술

[0005] 발명의 배경

[0006] 인간에서 철 균형의 유지는 인간 생리학의 제한된 철 흡수 및 배출 성능으로 인해 무너지기 쉽다 (Finch, C.A. and Huebers, H. N. Engl. J. Med. 1982. 306: 1520-1528). 철 결핍은 광범위한 장애이며 철의 식이 섭취가 신체의 요구량을 충족시키지 못하는 임의의 상태로부터 생긴다. 종종, 병리학적 혈액 손실은 좋지않은 철 균형으로 인한 것이다. 철 과잉 또한 통상적인 병태이며, 유전적 원인, 예를 들면, 상이한 철 대사 유전자들의 돌연변

이로부터 생길 수 있다(Camaschella, C. Blood. 2005. 106: 3710-3717). 간 펩티드 호르몬인, 헵시딘은 철 흡수 및 재생을 조절하므로 신체의 철 대사에서 중요한 역할을 한다 (Ganz, T. Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2006. 507: 29-35; Kemna, E. H. 등의, Clin. Chem. 2007. 53: 620-628). HFE (혈색소증 단백질) (Ahmad, K.A. 등의, Blood Cells Mol Dis. 2002. 29: 361), 트랜스페린 수용체 2 (Kawabata, H. 등의, Blood 2005. 105: 376), 및 헤모주벨린 (Papanikolaou, G. 등의, Nat. Genet. 2004. 36: 77)을 비롯한 몇가지 단백질들 또한 신체의 철 수준을 조절한다.

[0007] 막횡단 프로테아제인, 세린 6 (TMPRSS6)은 제2형 막횡단 세린 프로테아제이며 주로 간에서 발현된다 (Velasco, G. 등의, J. Biol. Chem. 2002. 277: 37637-37646). TMPRSS6에서의 돌연변이는 철 결핍 빈혈증에 관여되어 왔는데 (Finberg, K. E. 등의, Nat. Genet. 2008. 40: 569-571), 이 때 헵시딘 수준은 유난히 상승되어 있는 것으로 밝혀졌다. 소적혈구성 빈혈증을 보유한 인간 모집단에 관한 연구는 TMPRSS6 유전자에서의 기능소실 돌연변이가 헵시딘의 과생성을 초래하고, 이는 순차적으로 철 흡수 및 이용의 결함을 초래함을 밝혀냈다 (Melis, M.A. 등의, Hematologica 2008. 93: 1473-1479). TMPRSS6은 철 결핍에 의해 촉발되는 막횡단 신호전달 경로에 관여하며 헵시딘을 인코딩하는 유전자인 *Hamp* 활성화에 관한 다양한 경로들을 억제한다 (Du, X. 등의, Science 2008. 320: 1088-1092). HFE^{-/-} 마우스에서 TMPRSS6의 이형접합 소실은 전신의 철 과잉을 감소시키는 반면, HFE^{-/-} 마우스에서 TMPRSS6의 동형접합 소실은 전신의 철 결핍 및 헵시딘의 상승된 간 발현을 유발한다 (Finberg, K.E. 등의, Blood 2011. 117: 4590-4599).

[0008] 철 과잉 장애의 한 예는 혈색소증이다. 혈색소증 (예컨대, 1형 혈색소증 또는 유전성 혈색소증)은 위장관으로부터 식이 철을 과량 장흡수시키는 장애이다 (Allen, K.J. 등의, N. Engl. J. Med. 2008. 358: 221-230). 이는 신체의 총 철 저장량의 병리학적 증가를 가져온다. 과량의 철은 조직 및 장기들, 특히, 간, 부신, 심장, 피부, 생식샘, 관절 및 이자에 축적되어, 정상 기능을 방해한다. 2차 합병증들, 가령, 경화증 (Ramm, G.A. and Ruddell, R.G. Semin. Liver Dis. 2010. 30: 271-287), 다발성관절염(Carroll, G.J. 등의, Arthritis Rheum. 2011. 63: 286-294), 부신 기능부전, 심부전 및 당뇨 (Huang, J. 등의, Diabetes 2011. 60: 80-87)가 통상적이다. 철 과잉 장애의 또다른 예는 β-지중해빈혈인데, 이 때 환자들은 β-지중해빈혈을 치료하기 위한 수혈 또는 비효율적 적혈구생성에 의해 유발되는 철 과잉을 발달시킬 수 있다.

[0009] 현재까지, 철 과잉 장애들을 치료하기 위한 치료 전략들은 한정되어 있었다. 핵산 억제제, 가령, siRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드가 제시되고 개발되어 왔으나, TMPRSS6을 직접 표적하는 화합물들 (PCT 공개출원 WO2014/076195, WO2012/135246, WO2014/190157, WO2005/0032733, WO 2013/070786 및 WO2013/173635; 미국 특허 제 8,090,542; Schmidt 등의 2013, 121(7):1200-8) 중 어떠한 것도 철 과잉 장애의 치료에 관해 승인받지 못했다. 따라서 TMPRSS6를 억제하기 위한 매우 효능있고 내약성(tolerable)인 화합물들에 대한 충족되지 않은 수요가 존재한다. 본 출원에 개시된 발명은 TMPRSS6 발현에 관한 신규하고 매우 효능있는 억제제 및 치료에 있어서 이의 용도 발견에 관한 것이다.

[0010] 본 명세서에서 인용되는 특허, 특허 출원, 논문, 서적, 및 저작물을 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 모든 문헌들, 또는 문헌들의 일부들은 본 출원에서 논의된 문헌의 그 일부들에 대해 뿐만 아니라 전체로 참고문헌으로 본 출원에 명확히 포함된다.

발명의 내용

[0011] **발명의 요약**

[0012] 동물에서 TMPRSS6 mRNA 및/또는 단백질의 수준을 조절하기 위한 조성물, 화합물 및 방법들이 본 출원에 제공된다. TMPRSS6 수준을 저하시키기 위한 조성물, 화합물 및 방법들이 본 출원에서 제공된다.

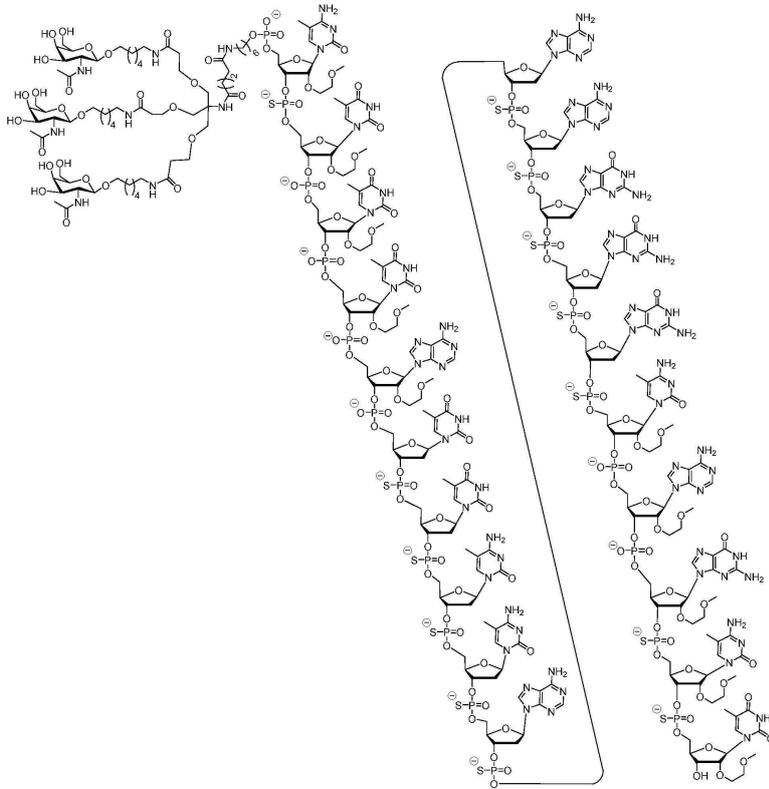
[0013] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 TMPRSS6을 인코딩하는 핵산 서열을 표적하는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공한다. 특정 구체예들에서, 화합물은 서열 번호: 1-6 중 임의의 핵염기 서열들에 나타난 바와 같은 TMPRSS6 서열을 표적한다.

[0014] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고, 서열 번호: 1의 핵염기들 3162 내지 3184와 동일한 길이의 부분에 상보적인 최소한 8개의 인접 핵염기의 일 부분을 포함한 핵염기 서열을 포함하는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공하며, 여기서 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 서열 번호: 1에 최소한 80% 상보적이다.

[0015] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고, 서열 번호: 23, 36, 37,

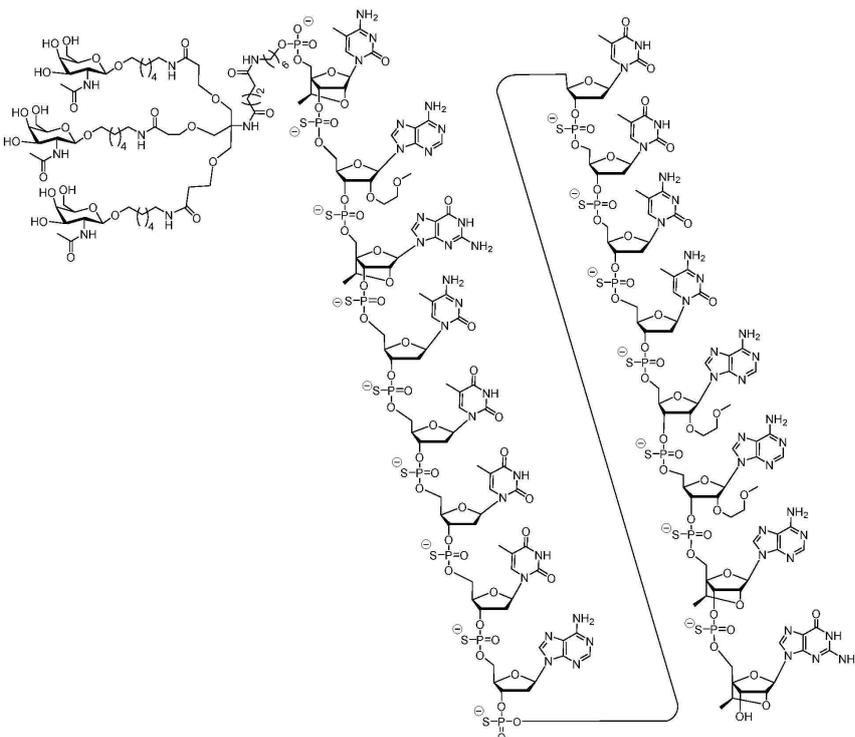
63, 77 중 임의의 핵염기 서열들의 최소한 8개 인접 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 제공한다.

[0016] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 다음 화학식을 가지는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 제공한다:



[0017]

[0018] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 다음 화학식을 가지는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 제공한다:



[0019]

[0020] **발명의 상세한 설명**

[0021] 기술한 일반적인 설명 및 하기 상세한 설명은 모두 오직 예시적이고 설명적인 것이며 본 발명을 청구범위와 같이 제한하지 않음을 이해하여야 한다. 본 출원에서, 단수형의 사용은 달리 특별한 언급이 없는 한 복수형을 포함한다. 본 출원에서 사용되는 "또는"은 달리 언급이 없는 한 "및/또는"을 의미한다. 더욱이, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라 그 외 형태들, 가령, "포함하다" 및 "포함된"의 사용은 제한적인 것이 아니다. 또한, 용어, 가령, "요소" 또는 "성분"은 달리 특별한 언급이 없는 한, 하나의 단위를 포함하는 요소들 및 성분들 그리고 하나 이상의 아단위를 포함하는 요소들 및 성분들 모두를 포함한다.

[0022] 본 출원에서 사용되는 구획 제목은 단지 구조화를 위한 것이며 기재된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서에서 인용되는 특허, 특허 출원, 논문, 서적, 및 저작물을 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 모든 문헌들, 또는 문헌들의 일부들은 본 출원에서 논의된 문헌의 그 일부들에 대해 뿐만 아니라 전체로 참고문헌으로 본 출원에 명확히 포함된다.

[0023] 정의

[0024] 특정한 정의가 제공되지 않는 한, 본 출원에 기재된 내용과 관련하여 사용되는 명명법, 본 출원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학 및 약물 및 제약학적 화학의 절차 및 기술들은 해당 기술 분야에서 널리 공지되어 있고 통상적으로 사용되는 것들이다. 화학적 합성 및 화학 분석을 위한 표준 기술들이 사용될 수 있다. 허용되는 한, 모든 특허, 출원, 공개 출원 및 그 외 간행물들, GENBANK 등록 번호 및 미국 국립생물공학 정보센터 (NCBI)와 같은 데이터베이스를 통해 얻을 수 있는 관련 서열 정보 및 본 출원에 기재된 내용 전반에 걸쳐 언급되는 그 외 데이터는 본 출원에서 논의되는 문헌의 해당 부분 뿐만 아니라 전체로도 본 출원에 참고문헌으로 포함된다.

[0025] 달리 언급이 없는 한, 하기 용어들은 하기 의미를 가진다:

[0026] "2'-O-메톡시에틸" (또한 2'-MOE 및 2'-O(CH₂)₂OCH₃)은 퓨로실 고리의 2' 위치의 O-메톡시-에틸 변형을 의미한다. 2'-O-메톡시에틸 변형 당(modified sugar)은 변형된 당이다.

[0027] "2'-O-메톡시에틸 뉴클레오티드"는 2'-O-메톡시에틸 변형 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오티드를 의미한다.

[0028] "5-메틸시토신"은 5 위치에 부착된 메틸 그룹으로 변형된 시토신을 의미한다. 5-메틸시토신은 변형된 핵염기이다.

[0029] "약"은 수치의 ±10% 이내를 의미한다. 예를 들면, "표지자는 약 50% 만큼 증가될 수 있다"라고 언급되는 경우, 표지자는 45%-55% 증가될 수 있음을 나타낸다.

[0030] "활성 제약학적 제제" 또는 "제약학적 제제"는 개체에 투여될 때 치료적 이점을 제공하는 제약학적 조성물 내 물질 또는 물질들을 의미한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서 TMPRSS6에 대해 표적된 안티센스 올리고뉴클레오티드는 활성 제약학적 제제이다.

[0031] "활성 표적 부위" 또는 "표적 부위"는 하나 또는 그 이상의 활성 안티센스 화합물을 표적시키는 부위를 의미한다.

[0032] "활성 안티센스 화합물"은 표적 핵산 수준 또는 단백질 수준을 감소시키는 안티센스 화합물을 의미한다.

[0033] "동시에 투여되는"은 두개의 제제 모두의 약리학적 효과들이 환자에서 동시에 나타나는 임의의 방식으로 이들 제제들을 공동-투여하는 것을 의미한다. 동시 투여는 두개 제제들 모두가 단일 제약학적 조성물로, 동일한 투여 형태로, 또는 동일한 투여 경로에 의해 투여됨을 필요로 하지 않는다. 두개 제제들 모두의 효과가 동시에 분명하게 나타날 필요는 없다. 효과는 일정 시기 동안 중첩되지만 하면 되고 동일한 시간에 걸쳐 존재할 필요는 없다.

[0034] "투여(Administering)"는 개체에게 제약학적 제제를 제공하는 것을 의미하며, 의학 전문가에 의한 투여 및 자가-투여를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] "제제"는 동물에 투여될 때 치료적 이점을 제공할 수 있는 활성 물질을 의미한다. "제 1 제제"는 본 출원에 제공된 치료적 화합물을 의미한다. 예를 들면, 제 1 제제는 TMPRSS6을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. "제 2 제제"는 본 출원에 기재된 제 2의 치료적 화합물을 의미한다. 예를 들면, 제 2 제제는 TMPRSS6 또는 비-TMPRSS6 표적을 표적하는 제 2의 안티센스 올리고뉴클레오티드 일 수 있다. 대안적으로, 제 2 제제는 안티센

스 올리고뉴클레오티드 이외의 화합물일 수 있다.

- [0036] "개선" 또는 "개선하다"는 관련 질환, 장애, 또는 병태의 최소한 하나의 지표, 표지자, 징후, 또는 증상의 약화를 의미한다. 특정 구체예들에서, 개선은 병태, 장애 및/또는 질환의 하나 또는 그 이상의 지표들의 진행을 지연 또는 감속을 포함한다. 지표들의 중증도는 해당 기술분야의 숙련된 기술자들에게 공지된 주관적 또는 객관적 측정치들에 의해 결정될 수 있다.
- [0037] "빈혈증"은 혈액에서 정상 수보다 적은 적혈구 세포들 (적혈구들, erythrocytes)로 특징지어지는 질환이며, 통상적으로 헤모글로빈 양의 감소에 의해 측정된다. 빈혈증의 원인은 만성 염증, 만성 신장 질환, 신장 투석 치료, 유전 (유전성) 장애, 만성 감염, 급성 감염, 암 및 암 치료를 포함할 수 있다. 이들 질환, 장애 및/또는 병태들에서 변형된 철 항상성 및/또는 적혈구생성은 또한 적혈구 생성을 감소시킬 수도 있다. 빈혈증의 임상 징후에는 낮은 혈청 철 (저철혈증), 낮은 헤모글로빈 수준, 낮은 적혈구용적률 수준, 감소된 적혈구 세포들, 감소된 망상적혈구, 증가된 가용성 트랜스페린 수용체 및 철 제한된 적혈구생성이 포함된다. 빈혈증의 예들에는 지중해빈혈 (즉, α -지중해빈혈, β -지중해빈혈 (경증성, 중간성 및 중증성) 및 δ -지중해빈혈), 겸상적혈구 빈혈증, 재생불량성 빈혈증, 판코니(Fanconi) 빈혈증, 다이아몬드 블랙판(Diamond Blackfan) 빈혈증, 슈마크만 다이아몬드 증후군(Shwachman Diamond syndrome), 적혈구막 장애, 6-인산 포도당 탈수소효소 결핍증, 유전성 출혈 모세혈관확장증, 용혈성 빈혈증, 만성 질환의 빈혈증 등이 포함된다.
- [0038] "동물"은 마우스, 랫트, 토끼, 개, 고양이, 돼지 및 비-인간 영장류를 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 인간 또는 비-인간 동물을 의미하며, 비-인간 영장류에는 원숭이 및 침팬지가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] "항체"는 항원과 일부 방식으로 특이적으로 반응하는 것으로 특징지어지는 분자를 의미하며, 여기서 항체 및 항원은 다른 하나에 대하여 각각 정의된다. 항체는 완전 항체 분자 또는 이의 임의의 절편 또는 부위, 가령, 중쇄, 경쇄, Fab 부위, 및 Fc 부위를 의미할 수 있다.
- [0040] "안티센스 활성화"은 안티센스 화합물의 해당 표적 핵산에 대한 혼성화에 기인한 임의의 검출가능한 또는 측정가능한 활성을 의미한다. 특정 구체예들에서, 안티센스 활성화는 이러한 표적 핵산에 의하여 인코딩되는 표적 핵산 또는 단백질의 양 또는 발현의 감소이다.
- [0041] "안티센스 화합물"은 수소 결합을 통해 표적 핵산에 대한 혼성화가 이루어질 수 있는 올리고머 화합물을 의미한다.
- [0042] "안티센스 억제"는 안티센스 화합물 부재시의 표적 핵산 수준 또는 표적 단백질 수준에 비해 표적 핵산에 상보적인 안티센스 화합물 존재시의 표적 핵산 수준 또는 표적 단백질 수준이 감소함을 의미한다.
- [0043] "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 표적 핵산의 해당 부위 또는 분절에 대한 혼성화를 가능하게 하는 핵염기 서열을 가지는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [0044] "바이시클릭 당(bicyclic sugar)"은 두개의 비-제미날 고리(non-geminal ring) 원자들의 가교에 의해 변형된 퓨로실 고리를 의미한다. 바이시클릭 당은 변형된 당이다.
- [0045] "바이시클릭 핵산" 또는 "BNA"는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드의 퓨라노스 부분이 퓨라노스 고리 상의 두개의 탄소 원자들을 연결하는 가교를 포함함으로써, 바이시클릭 고리계를 형성하는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 의미한다.
- [0046] "혈액 수혈"은 혈액 제제를 사람의 순환계로 정맥내 제공받는 과정을 의미한다. 수혈은 소실된 혈액 성분들을 대체하기 위하여 다양한 의학적 질환, 장애 및/또는 병태들에서 사용된다.
- [0047] "캡 구조" 또는 "말단 캡 모이어티"는 안티센스 화합물의 어느 한 쪽 말단부에 포함되어 있는 화학적 변형부를 의미한다.
- [0048] "cEt" 또는 "속박된 에틸"은 4'-탄소와 2'-탄소를 연결하는 가교를 포함하는 바이시클릭 당 모이어티를 의미하며, 이 때 가교는 화학식: 4'-CH(CH₃)-O-2'을 가진다.
- [0049] "속박된 에틸 뉴클레오시드" (또는 cEt 뉴클레오시드)는 4'-CH(CH₃)-O-2' 가교를 포함하는 바이시클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0050] "화학적으로 구별되는 부위(Chemically distinct region)"는 동일한 안티센스 화합물의 또다른 부위와 일부 방

식에서 화학적으로 상이한 안티센스 화합물의 부위를 의미한다. 예를 들면, 2'-O-메톡시에틸 뉴클레오티드를 가지는 부위는 2'-O-메톡시에틸 변형이 없는 뉴클레오티드를 가지는 부위와 화학적으로 구별된다.

- [0051] "키메라(Chimeric) 안티센스 화합물"은 최소한 두개의 화학적으로 구별되는 부위들을 가지는 안티센스 화합물을 의미한다.
- [0052] "병용-투여(Co-administration)"는 개체에 둘 또는 그 이상의 제약학적 제제들을 투여하는 것을 의미한다. 둘 또는 그 이상의 제약학적 제제들은 단일 제약학적 조성물로 투여될 수 있거나, 별도의 제약학적 조성물들로 투여될 수 있다. 둘 또는 그 이상의 제약학적 제제들 각각은 동일하거나 상이한 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 병용-투여는 동시, 병행 또는 순차 투여를 포함한다.
- [0053] "상보성"은 제 1 핵산 및 제 2 핵산의 핵염기들 간의 페어링(pairing) 능력을 의미한다. 특정 구체예들에서, 제 1 핵산은 안티센스 화합물이고 제 2 핵산은 표적 핵산이다.
- [0054] "인접 핵염기"는 서로에 바로 인접한 핵염기를 의미한다.
- [0055] "데옥시리보뉴클레오티드"는 뉴클레오티드의 당 부분의 2' 위치에 수소를 가지는 뉴클레오티드를 의미한다. 데옥시리보뉴클레오티드는 여러가지의 임의의 치환체들로 변형될 수 있다.
- [0056] "회석제"는 약리학적 활성은 없으나, 제약상 필요하거나 바람직한, 조성물 내 성분을 의미한다. 예를 들면, 주사 조성물에서 회석제는 액체, 예컨대, 인산염 완충 식염수 (PBS) 일 수 있다.
- [0057] "투여 단위"는 제약학적 제제가 제공되는 형태, 예컨대, 알약, 정제, 또는 해당 기술분야에 공지된 그 외 투여 단위를 의미한다. 특정 구체예들에서, 투여 단위는 동결건조된 안티센스 올리고뉴클레오티드를 내포하는 바이얼이다. 특정 구체예들에서, 투여 단위는 재구성된 안티센스 올리고뉴클레오티드를 내포하는 바이얼이다.
- [0058] "투여량(dosage)"은 단위 투여로, 또는 특정 시기에 제공되는 제약학적 제제의 특정량을 의미한다. 특정 구체예들에서, 투여량은 1회, 2회 또는 그 이상의 볼러스, 정제, 또는 주사로 투여될 수 있다. 예를 들면, 피하 투여가 바람직한 특정 구체예들에서, 바람직한 투여량이 단위 주사로 용이하게 수용될 수 없는 용적을 요구하는 경우, 바람직한 투여량에 도달하기 위해 2회 또는 그 이상의 주사가 사용될 수 있다. 특정 구체예들에서, 제약학적 제제는 연장된 시기에 걸쳐 또는 연속적으로 주입에 의해 투여된다. 투여량은 1시간, 1일, 1주 또는 1개월 당 제약학적 제제의 양으로서 나타낼 수 있다.
- [0059] "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 상기 제제를 필요로하는 개체에서 바람직한 생리학적 결과를 유발하기에 충분한 활성 제약학적 제제의 양을 의미한다. 이러한 유효량은 치료될 개체의 건강 및 신체적 상태, 치료될 개체의 분류군, 조성물의 제형, 개체의 의학적 병태에 관한 평가, 및 그 외 관련 인자들에 따라 개체들에 있어 달라질 수 있다.
- [0060] "완전히 상보적인" 또는 "100% 상보적인"은 제 1 핵산의 핵염기 서열의 각각의 핵염기가 제 2 핵산의 제 2 핵염기 서열에서 상보적인 핵염기를 가짐을 의미한다. 특정 구체예들에서, 제 1 핵산은 안티센스 화합물이고 제 2 핵산은 표적 핵산이다.
- [0061] "갭머(Gapmer)"는 RNase H 절단을 보조하는 복수의 뉴클레오시드를 가지는 내부 부위가 하나 또는 그 이상의 뉴클레오시드를 가지는 외부 부위들 사이에 위치되어 있는 키메라 안티센스 화합물을 의미하며, 여기서 내부 부위를 포함하는 뉴클레오시드들은 외부 부위들을 포함하는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드들과 화학적으로 구별된다. 내부 부위는 "갭 분절"으로 언급될 수 있으며 외부 부위들은 "윙 분절들"로 언급될 수 있다.
- [0062] "확장-갭(Gap-widened)"은 1 내지 6개 뉴클레오시드를 가지는 5' 및 3' 윙 분절들 사이에 바로 인접하여 위치한 12개 또는 그 이상의 인접 2'-데옥시뉴클레오시드의 갭 분절을 가지는 키메라 안티센스 화합물을 의미한다.
- [0063] "혈색소증(Hemochromatosis)"은 위장관으로부터 과량의 철을 흡수시켜, 다양한 신체 조직들에서의 과량의 철 축적 및 침전을 초래하는 철 대사 장애이다. 원발성 또는 유전성 또는 전형적 혈색소증은 예를 들면, HFE 유전자에서의 유전적 돌연변이에 의해 유발된다. 이러한 질환을 보유한 피험체들은 과량의 철을 가지는데, 이는 위장관에서 흡수되어 신체 조직들, 특히 간에 축적된다. 속발성 또는 후천성 혈색소증은 빈번한 혈액 수혈, 철 보충제의 높은 경구 또는 비경구 섭취량, 또는 그 외 질환들의 2차적 효과에 의해 유발될 수 있다.
- [0064] "조혈(Hematopoiesis)"은 조혈모세포로부터 유래되는, 혈액의 세포 성분들의 형성을 의미한다. 이들 모세포들은 골수의 속질 내 상주하며 모든 상이한 성숙 혈액 세포 유형들을 생기게 하는 독특한 능력을 가진다.

- [0065] "용혈(Hemolysis)"은 적혈구들 또는 적혈구 세포들의 파열 및 이들의 내용물의 주변 체액으로의 방출을 의미한다. 동물에서 용혈은 세균 감염, 기생충 감염, 자가면역 장애 및 유전성 장애들을 비롯한 다수의 의학적 병태들로 인해 발생할 수 있다.
- [0066] "헵시딘"은 혈액에서의 염증 또는 상승된 철 수준에 대한 반응으로 간세포에 의해 생성되는 mRNA 뿐만 아니라 이러한 mRNA에 의해 인코딩된 단백질 모두를 의미한다. 헵시딘의 1차적 역할은 이러한 혈액내 철 수준의 감소를 촉진시킴으로써 혈액 철 수준을 조절하는 것이다. 헵시딘 발현은 급성 및 만성 염증 상태에서 증가되어 적혈구 생성을 위한 철 가용성을 감소시킨다. "헵시딘"은 또한 헵시딘 항균 펩티드; HAMP; HAMP1; HEPC; HFE2; LEAP-1; LEAP1; 및 간-발현된 항균 펩티드로서 언급된다.
- [0067] "유전성 빈혈증"은 신체의 적혈구 세포들로 하여금 정상적인 것 보다 더 급속하게 사멸하도록 하거나, 폐로부터 신체의 다른 부위들로 산소를 운반함에 있어 비효율적이 되게 하거나, 또는 전혀 생성되지 않게 하는 유전성 병태에 의해 유발되는 빈혈증을 의미한다. 예들에는, 겸상적혈구 빈혈증, 지중해빈혈, 판코니 빈혈증, 다이아몬드 블랙판 빈혈증, 슈바크만 다이아몬드 증후군, 적혈구막 장애, 6-인산 포도당 탈수소효소 결핍, 또는 유전성 출혈 모세혈관확장증이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] "HFE"는 인간 혈색소증 유전자 또는 단백질을 의미한다.
- [0069] "HFE 유전자 돌연변이"는 HFE 유전자에서의 돌연변이를 의미하며, 이는 유전성 혈색소증을 초래할 수 있다.
- [0070] "혼성화"는 상보적인 핵산 분자들의 어닐링(annealing)을 의미한다. 특정 구체예들에서, 상보적인 핵산 분자들은 안티센스 화합물 및 표적 핵산을 포함한다.
- [0071] "철의 과량 축적 위험이 있는 또는 철의 과량 축적과 관련된 질환, 장애 및/또는 병태를 가지는 동물을 식별하는 것"은 철의 과량 축적과 관련된 질환, 장애 및/또는 병태를 진단받은 바 있는 동물을 식별하는 것 또는 철의 과량 축적과 관련된 질환, 장애 및/또는 병태를 발달시키는 체질인 동물을 식별하는 것을 의미한다. 예를 들면, 동물은 해당 동물이 혈색소증 가족력을 가진 경우 과량의 철 축적과 관련된 질환, 장애 및/또는 병태를 발달시키는 체질일 수 있다. 이러한 식별은 동물의 병력을 평가하는 것 및 표준 임상 테스트 또는 평가를 비롯한 임의의 방법에 의해 구현될 수 있다.
- [0072] "바로 인접한"은 바로 인접한 요소들 사이에 간섭 요소들이 없음을 의미한다.
- [0073] "개체" 또는 "피험체" 또는 "동물"은 치료 또는 치료법에 있어 선택된 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다.
- [0074] "발현 또는 활성을 억제하는 것"은 RNA 또는 단백질의 발현 또는 활성의 감소 또는 차단을 의미하며 반드시 발현 또는 활성의 총 제거를 의미하는 것은 아니다.
- [0075] "뉴클레오시드간 연결(Internucleoside linkage)"는 뉴클레오시드들 사이의 화학적 결합을 의미한다.
- [0076] "정맥내 투여"는 정맥 내로의 투여를 의미한다.
- [0077] "철 축적" 또는 "철 과잉"은 임의의 원인으로인한 신체내 철의 축적 및 침전을 나타낸다. 가장 공통적인 원인은 유전적 원인, 반복된 혈액 수혈로부터 생길 수 있는 수혈상의 철 과잉, 또는 과량의 철 식이 섭취이다.
- [0078] "철 보충제"는 환자의 철 결핍을 치료하기 위한 의학적 이유로 인해 처방된 보충제를 의미한다. 철은 경구 경로에 의해 보충되거나 비경구적으로 제공될 수 있다.
- [0079] "연결된 뉴클레오시드(Linked nucleosides)"는 서로 결합되어 있는 인접한 뉴클레오시드들을 의미한다.
- [0080] "표지자" 또는 "생물표지자"는 건강- 또는 생리학-관련 평가를 위한 지수로서 기능하는 임의의 측정가능한 그리고 정량가능한 생물학적 매개변수이다. 예를 들면, 트랜스페린의 포화 백분율 증가, 철 수준 증가, 또는 헵시딘 수준 감소는 철 과잉 질환, 장애 및/또는 병태의 표지자들로 고려될 수 있다.
- [0081] "MCH"는 한 혈액 샘플에서 1개 당 평균 (Hb) 질량을 표현하는 수치인 "평균 적혈구 헤모글로빈(mean corpuscular hemoglobin)" 또는 "평균 적혈구세포 헤모글로빈량(mean cell hemoglobin)"을 의미한다.
- [0082] "MCV"는 평균 크기를 표현하는 수치인 "평균 적혈구 용적(mean corpuscular volume)" 또는 "평균 적혈구세포 용적(mean cell volume)"을 의미한다.
- [0083] "미스매치(Mismatch)" 또는 "비-상보적인 핵염기" 또는 "MM"은 제 1 핵산의 핵염기가 상응하는 제 2 또는 표적 핵산의 핵염기와 페어링 할 수 없는 경우를 의미한다.

- [0084] "변형된 뉴클레오시드간 연결"은 자연 발생 뉴클레오시드간 결합 (즉, 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 결합) 으로부터의 치환 또는 임의의 변화를 의미한다.
- [0085] "변형된 핵염기"는 아데닌, 시토신, 구아닌, 티미딘, 또는 우라실 이외의 임의의 핵염기를 의미한다. 예를 들면, 변형된 핵염기는 5-메틸시토신일 수 있다. "비변형된 핵염기"는 퓨린 염기, 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 그리고 피리미딘 염기, 티민 (T), 시토신 (C), 및 우라실 (U)을 의미한다.
- [0086] "변형된 뉴클레오시드"는, 독립적으로, 변형된 당 모이어티, 및/또는 변형된 핵염기를 가지는 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0087] "변형된 뉴클레오티드"는, 독립적으로, 변형된 당 모이어티, 변형된 뉴클레오시드간 연결 및/또는 변형된 핵염기를 가지는 뉴클레오티드를 의미한다.
- [0088] "변형된 올리고뉴클레오티드"는 변형된 뉴클레오시드간 연결, 변형 당, 및/또는 변형된 핵염기를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [0089] "변형 당"은 천연 당으로부터의 치환 또는 변화를 의미한다. 예를 들면, 변형 당은 2'-MOE일 수 있다.
- [0090] "조절하는 것"은 세포, 조직, 장기 또는 유기체에서의 특징을 변화 또는 조정하는 것을 의미한다. 예를 들면, TMPRSS6 수준을 조절하는 것은 세포, 조직, 장기 또는 유기체에서의 TMPRSS6 mRNA 또는 TMPRSS6 단백질 수준을 증가 또는 감소시키는 것을 의미할 수 있다. "조절인자"는 세포, 조직, 장기 또는 유기체에서의 변화를 일으킨다. 예를 들면, TMPRSS6 안티센스 올리고뉴클레오티드는 세포, 조직, 장기 또는 유기체에서의 TMPRSS6 mRNA 또는 TMPRSS6 단백질의 양을 증가 또는 감소시키는 조절인자가 될 수 있다.
- [0091] "모노머"는 한 올리고머의 단일 단위를 의미한다. 모노머들에는, 자연발생이든 변형된 것이든 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드들이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0092] "모티프(Motif)"는 안티센스 화합물 내 화학적으로 구별되는 부위들의 패턴을 의미한다.
- [0093] "돌연변이"는 핵산 서열에서의 변화를 의미한다. 돌연변이는 방사선, 바이러스, 트랜스포존 및 돌연변이유발 화학물질, 뿐만 아니라 감수분열, DNA 복제, RNA 전사 및 전사후 가공 동안 발생하는 오류를 포함한 다양한 방식들에서 유발될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 돌연변이는 서열에서의 몇가지 상이한 변화들을 일으킬 수 있으며; 이들은 유전자 산물에 전혀 영향을 주지 않거나 유전자 산물을 변화시키거나, 또는 유전자가 적절하게 또는 완벽하게 기능하지 못하게 할 수 있다. 예를 들면, HFE 돌연변이는 유전자 산물의 부적절한 기능을 초래하여, 장에서 과량의 철을 흡수하게 할 수 있다.
- [0094] "골수형성이상 증후군(Myelodysplastic syndrome)"은 골수성 혈액 세포들 군의 비효율적 생성에 관계하는 혈액 의학 질환, 장애 및/또는 병태들의 다양한 집합을 의미한다. 이 증후군은 골수 내 줄기 세포들의 장애에 의해 유발된다. 골수형성이상 증후군에서, 조혈은 비효율적이며 혈액 세포들의 수 및 질은 비가역적으로 하락하고, 또한 혈액 생성을 손상시킨다. 결과적으로, 골수형성이상 증후군을 가진 환자들은 중증도의 빈혈증을 발달시키며 빈번한 혈액 수혈을 필요로 한다.
- [0095] "자연 발생 뉴클레오시드간 연결"은 3'에서 5' 포스포디에스테르 연결을 의미한다.
- [0096] "천연 당 모이어티"는 DNA (2'-H) 또는 RNA (2'-OH)에서 발견되는 당을 의미한다.
- [0097] "핵산"은 모노머 뉴클레오티드들로 이루어진 분자들을 의미한다. 핵산은 리보핵산 (RNA), 데옥시리보핵산 (DNA), 단일-가닥 핵산, 이중-가닥 핵산, 짧은 간섭 리보핵산 (siRNA), 및 마이크로RNA (miRNA)를 포함한다.
- [0098] "핵염기"는 또다른 핵산의 염기와 페어링 할 수 있는 헤테로시클릭 모이어티를 의미한다.
- [0099] "핵염기 서열"은 임의의 당, 연결, 또는 핵염기 변형에 무관하게, 인접 핵염기의 순서를 의미한다.
- [0100] "뉴클레오시드"는 당에 연결된 핵염기를 의미한다.
- [0101] "뉴클레오시드 모방체(Nucleoside mimetic)"에는 올리고머 화합물의 하나 또는 그 이상의 위치들에 있는 당 또는 당과 염기를 대체하기 위해 사용되는 구조들이 포함되는데 반드시 연결이어야 하는 것은 아니며; 가령, 예를 들면, 뉴클레오시드 모방체는 모르폴리노, 시클로핵세닐, 시클로핵실, 테트라하이드로피라닐, 바이시클로 또는 트리시클로 당 모방체들, 예컨대, 비 퓨라노스 당 단위들을 가진다.
- [0102] "뉴클레오티드"는 뉴클레오시드의 당 부분에 공유적으로 연결된 포스페이트 그룹을 가지는 뉴클레오시드를 의미

한다.

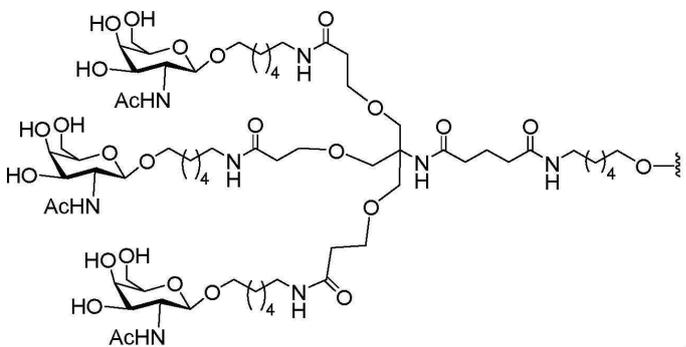
- [0103] "뉴클레오타이드 모방체"에는 올리고머 화합물의 하나 또는 그 이상의 위치들에서 뉴클레오시드 및 연결을 대체하기 위해 사용되는 구조들, 가령, 예를 들면, 펩티드 핵산 또는 모르폴리노 (-N(H)-C(=O)-O- 또는 그 외 비-포스포디에스테르 연결에 의해 연결된 모르폴리노)가 포함된다.
- [0104] "올리고머 화합물" 또는 "올리고머"는 둘 또는 그 이상의 하위-구조들 (모노머)을 포함하며 핵산 분자의 한 부위에 혼성화할 수 있는 폴리머 구조를 의미한다. 특정 구체예들에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오타이드이다. 특정 구체예들에서, 올리고머 화합물은 안티센스 화합물이다. 특정 구체예들에서, 올리고머 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 특정 구체예들에서, 올리고머 화합물은 키메릭 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0105] "올리고뉴클레오타이드"는 연결된 뉴클레오시드들의 폴리머를 의미하며, 뉴클레오시드 각각은 변형되거나 비변형될 수 있고 서로 독립적이다.
- [0106] "비경구 투여"는 주사 또는 주입을 통한 투여를 의미한다. 비경구 투여에는 피하 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 동맥내 투여, 복강내 투여, 또는 두개내 투여, 예컨대, 경막내 또는 뇌혈관내실 투여가 포함된다. 투여는 연속적, 또는 만성적, 또는 단기 또는 간헐적일 수 있다.
- [0107] "펩티드"는 최소한 두개의 아미노산이 아미드 결합에 의하여 결합됨으로써 형성된 분자를 의미한다. 펩티드는 폴리펩티드 및 단백질을 의미한다.
- [0108] "트랜스페린의 포화 백분율"은 전체 철 결합능에 대한 혈청 철의 비율에 100을 곱한 것을 의미한다. 철을 결합시킬 수 있는 트랜스페린 분자들에 관하여, 이 수치는 얼마나 많은 혈청 철이 실제 결합되어 있는지를 임상에게 말해준다.
- [0109] "제약학적 조성물"은 개체에 투여하기 적합한 물질들의 혼합물을 의미한다. 예를 들면, 제약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 활성 제약학적 제제들 및 멸균 수용액을 포함할 수 있다.
- [0110] "제약상 허용가능한 담체"는 화합물의 구조를 방해하지 않는 매질 또는 희석제를 의미한다. 이러한 담체들 중 일부는 제약학적 조성물을 피험체의 경구 섭취를 위해, 예를 들면, 정제, 알약, 드라제(dragees), 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 및 로젠지로서 제형화 가능하게 한다. 예를 들면, 제약상 허용가능한 담체는 멸균 수용액, 가령, PBS일 수 있다.
- [0111] "제약상 허용가능한 유도체"는 본 출원에 기재된 화합물들의 제약상 허용가능한 염, 공액체, 전구약물 또는 이성질체들을 포함한다.
- [0112] "제약상 허용가능한 염"은 안티센스 화합물의 생리학상 및 제약상 허용가능한 염, 즉, 모 올리고뉴클레오타이드의 바람직한 생물학적 활성을 보유하며 바람직하지 않은 독물학적 효과들을 그에 제공하지 않는 염을 의미한다.
- [0113] "포스포로티오에이트 연결"은 비-가교 산소 원자들 중 하나가 황 원자로 대체됨으로써 포스포디에스테르 결합이 변형된, 뉴클레오시드들 간 연결을 의미한다. 포스포로티오에이트 연결은 변형된 뉴클레오시드간 연결이다.
- [0114] "적혈구증가증(Polycythemia)"은 적혈구세포 수의 증가 (절대 적혈구증가증) 또는 혈장 용적의 감소 (상대 적혈구증가증)로 인해, 비 용적(specified volume)에서 적혈구 세포들 (RBCs)이 증가된 병태를 의미한다. 적혈구세포에 대한 혈액 용적 비율은 적혈구용적률 (Hct) 수준으로 측정될 수 있다. 증가된 RBC 비율은 혈액을 점성이 되게 만들 수 있으며, 이는 순환계를 통하는 혈류의 저속화 및 혈액 덩이들의 잠재적 형성을 초래할 수 있다. 혈류의 저속화는 세포들, 조직 및/또는 장기들로의 산소 운반을 감소시켜 질환, 장애 또는 병태들, 가령, 협심증 또는 심부전을 초래할 수 있다. 순환계에서 혈액 덩이들의 형성은 세포, 조직 및/또는 장기 손상을 가져와서, 질환, 장애 또는 병태들, 가령, 심근경색증 또는 뇌졸중을 초래할 수 있다. 적혈구증가증을 위한 치료에는 정맥절개술 또는 RBC 생성을 감소시키기 위한 약물들 (예컨대, INF- α , 하이드록시우레아, 아나그렐리드)이 포함된다. 적혈구증가증의 예들에는, (polycythemia vera, PCV), 진성 적혈구증가증 (polycythemia rubra vera, PRV) 및 적혈병(erythremia)이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 예들에서, 적혈구증가증은 피험체에서 적백혈병(erythroid leukemia)으로 진행할 수 있다.
- [0115] "부분(portion)"은 하나의 핵산 중 정의된 수의 인접 (즉, 연결된) 핵염기들을 의미한다. 특정 구체예들에서, 부분은 하나의 표적 핵산 중 정의된 수의 인접 핵염기이다. 특정 구체예들에서, 부분은 하나의 안티센스 화합물 중 정의된 수의 인접 핵염기이다.

- [0116] "예방하다"는 질환, 장애, 또는 병태의 발병, 발생 또는 진행을 수분 내지 무기한으로 일정 시기동안 지연시키는 것 또는 미연에 방지하는 것을 의미한다. 예방하다는 또한 질환, 장애, 또는 병태의 발생 위험을 감소시키는 것을 의미한다.
- [0117] "전구약물"은 내인성 효소들 또는 그 외 화학물질들 또는 조건들의 작용에 의해 신체 또는 신체의 세포들 내부에서 활성 형태로 전환되는, 비활성 형태로 제조되는 치료 제제를 의미한다.
- [0118] "부작용"은 치료로 인한, 바람직한 효과들 이외의 생리학적 반응들을 의미한다. 특정 구체예들에서, 부작용에는 주사 부위 반응들, 간기능 검사 이상, 신장 기능 이상, 간 독성, 신장 독성, 중추신경계 이상, 근질환, 및 불안이 포함된다. 예를 들면, 혈청 중의 증가된 아미노전달효소 수준은 간 독성 또는 간 기능 이상을 나타낼 수 있다.
- [0119] "단일-가닥 올리고뉴클레오티드"는 상보적인 가닥에 혼성화되지 않는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [0120] "특이적으로 혼성화가능한"은 특이적 결합이 바람직한 조건하에서, 즉, 생체내 분석 및 치료적 처리를 하는 경우 생리학적 조건하에서, 바람직한 효과를 유도하기에 충분한 정도의 표적 핵산과 상보성을 가지는 반면 비-표적 핵산들에 대해 최소의 효과를 보이거나 효과를 전혀 보이지 않는 안티센스 화합물을 의미한다.
- [0121] "피하 투여"는 피부 바로 아래 투여를 의미한다.
- [0122] "표적하는" 또는 "표적된"은 표적 핵산에 특이적으로 혼성화하여 바람직한 효과를 유도하게 되는 안티센스 화합물의 설계 및 선택 과정을 의미한다.
- [0123] "표적 핵산", "표적 RNA" 및 "표적 RNA 전사물"은 모두 안티센스 화합물에 의해 표적될 수 있는 핵산을 의미한다.
- [0124] "표적 분절"은 하나의 안티센스 화합물이 표적되는 표적 핵산의 뉴클레오티드들의 서열을 의미한다. "5' 표적 부위"는 표적 분절의 5'에 가장 가까운 뉴클레오티드를 의미한다. "3' 표적 부위"는 표적 분절의 3'에 가장 가까운 뉴클레오티드를 의미한다.
- [0125] "지중해빈혈(Thalassemia)"은 적혈구들의 파괴 또는 분해를 초래하는 이상 헤모글로빈 분자들의 형성에 의해 유발되는 하위그룹의 빈혈증들(예컨대, α -지중해빈혈, β -지중해빈혈, δ -지중해빈혈, 비-수혈 의존성 지중해빈혈 (NTDT))을 의미한다. 지중해빈혈의 합병증들에는 과량의 철 (즉, 지중해빈혈 자체로 인한 또는 지중해빈혈을 치료하기 위한 빈번한 수혈로 인한 혈액내 철 과잉), 감염 위험 증가, 골 변형, 비대 비장 (즉, 지라비대), 성장 속도 저하 및 심장 문제들 (예컨대, 울혈성 심부전 및 부정맥)이 포함된다.
- [0126] "치료적 유효량"은 동물에게 치료적 이점을 제공하는 제약학적 제제의 양을 의미한다.
- [0127] "TMPRSS6" (또한 "마트립타제-2"로도 공지됨)은 TMPRSS6의 임의의 핵산 또는 단백질을 의미한다.
- [0128] "TMPRSS6 핵산"은 TMPRSS6을 인코딩하는 임의의 핵산을 의미한다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, TMPRSS6 핵산은 TMPRSS6을 인코딩하는 DNA 서열, TMPRSS6을 인코딩하는 DNA (인트론 및 엑손을 포함하는 유전체 DNA 포함)로부터 전사된 RNA 서열, 및 TMPRSS6을 인코딩하는 mRNA 서열을 포함한다. "TMPRSS6 mRNA"는 TMPRSS6 단백질을 인코딩하는 mRNA를 의미한다.
- [0129] "TMPRSS6 특이적 억제제"는 분자 수준에서 TMPRSS6 유전자, TMPRSS6 RNA 및/또는 TMPRSS6 단백질의 발현을 특이적으로 억제할 수 있는 임의의 제제를 의미한다. 예를 들면, TMPRSS6 특이적 억제제에는 TMPRSS6 수준을 억제할 수 있는 핵산 (안티센스 화합물 포함), 펩티드, 항체, 소분자, 및 그 외 제제가 포함된다. 특정 구체예들에서, TMPRSS6을 특이적으로 조절함으로써, TMPRSS6 특이적 억제제는 철 축적 경로의 성분들에 영향을 줄 수 있다.
- [0130] "처리하다"는 동물에서 질환, 장애, 또는 병태의 변화 또는 향상을 가져오기 위해 동물에게 제약학적 조성물을 투여하는 것을 의미한다. 특정 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 제약학적 조성물들이 동물에게 투여될 수 있다.
- [0131] "비변형된 뉴클레오티드"는 자연 발생 핵염기, 당 모이어티, 및 뉴클레오시드간 연결들로 이루어진 뉴클레오티드를 의미한다. 특정 구체예들에서, 비변형된 뉴클레오티드는 RNA 뉴클레오티드 (즉, β -D-리보뉴클레오티드) 또는 DNA 뉴클레오티드 (즉, β -D-데옥시리보뉴클레오티드)이다.
- [0132] 특정 구체예들

- [0133] 본 출원에 개시된 특정 구체예들에서, TMRSS6은 다음에 제시된 서열을 가진다: GenBank 등록 번호 NM_153609.2 (본 출원에서 서열 번호: 1로 포함됨); 16850000으로부터 16897000까지 절단된 GENBANK 등록번호 NT_011520.12의 보체 (본 출원에서 서열 번호: 2로 포함됨); GENBANK 등록 번호 CR456446.1 (본 출원에서 서열 번호: 3으로 포함됨); GENBANK 등록 번호 BC039082.1 (본 출원에서 서열 번호: 4로 포함됨); GENBANK 등록 번호 AY358398.1 (본 출원에서 서열 번호: 5로 포함됨); 및 GENBANK 등록 번호 DB081153.1 (본 출원에서 서열 번호: 6으로 포함됨).
- [0134] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 TMRSS6을 인코딩하는 핵산 서열을 표적하는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공한다. 특정 구체예들에서, 화합물은 서열 번호: 1-6 중 임의의 핵염기 서열들에 나타난 바와 같은 TMRSS6 서열을 표적한다.
- [0135] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 서열 번호: 1-6의 동일한 길이 부분에 상보적인 최소한 8, 최소한 9, 최소한 10, 최소한 11, 최소한 12, 최소한 13, 최소한 14, 최소한 15, 최소한 16, 최소한 17, 최소한 18, 최소한 19, 또는 20개의 인접 핵염기들을 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공한다.
- [0136] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 서열 번호: 1의 핵염기들 3162 내지 3184의 동일 길이 부분에 상보적인 최소한 8개의 인접 핵염기들의 한 부분을 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공하며, 여기서 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 서열 번호: 1에 최소한 80% 상보적이다.
- [0137] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 서열 번호: 1의 핵염기들 1286 내지 1305의 동일 길이 부분에 상보적인 최소한 8개의 인접 핵염기들의 한 부분을 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공하며, 여기서 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 서열 번호: 1에 최소한 80% 상보적이다.
- [0138] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 서열 번호: 1의 핵염기들 3162 내지 3184의 동일 길이 부분에 상보적인 최소한 8, 최소한 9, 최소한 10, 최소한 11, 최소한 12, 최소한 13, 최소한 14, 최소한 15, 최소한 16, 최소한 17, 최소한 18, 최소한 19, 또는 최소한 20개의 인접 핵염기들의 한 부분을 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공하며, 여기서 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 서열 번호: 1에 최소한 80% 상보적이다.
- [0139] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 서열 번호: 1의 핵염기들 1286 내지 1305의 동일 길이 부분에 상보적인 최소한 8, 최소한 9, 최소한 10, 최소한 11, 최소한 12, 최소한 13, 최소한 14, 최소한 15, 최소한 16, 최소한 17, 최소한 18, 최소한 19, 또는 최소한 20개의 인접 핵염기들의 한 부분을 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공하며, 여기서 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 서열 번호: 1에 최소한 80% 상보적이다.
- [0140] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 서열 번호: 7-85의 임의의 핵염기 서열들의 최소한 8, 최소한 9, 최소한 10, 최소한 11, 최소한 12, 최소한 13, 최소한 14, 최소한 15, 최소한 16, 최소한 17, 최소한 18, 최소한 19, 또는 20개의 인접 핵염기들을 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공한다.
- [0141] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 서열 번호: 23, 36, 37, 63, 77의 임의의 핵염기 서열들의 최소한 8, 최소한 9, 최소한 10, 최소한 11, 최소한 12, 최소한 13, 최소한 14, 최소한 15, 최소한 16, 최소한 17, 최소한 18, 최소한 19, 또는 20개의 인접 핵염기들을 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공한다.
- [0142] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 서열 번호: 36의 최소한 8, 최소한 9, 최소한 10, 최소한 11, 최소한 12, 최소한 13, 최소한 14, 최소한 15, 최소한 16, 최소한 17, 최소한 18, 최소한 19, 또는 20개의 인접 핵염기들을 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공한다.
- [0143] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 서열 번호: 77의 최소한 8, 최소한 9, 최소한 10, 최소한 11, 최소한 12, 최소한 13, 최소한 14, 최소한 15, 최소한 16, 최소한 17, 최소한 18, 최소한 19, 또는 20개의 인접 핵염기들을 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포

합하는 화합물을 제공한다.

- [0144] 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드의 핵염기 서열은 서열 번호: 1-6 중 임의의 동일한 길이 부분에 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 96%, 최소한 97%, 최소한 98%, 또는 최소한 99% 상보적이다. 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호: 1-6 중 임의의 동일한 길이 부분에 100% 상보적인 핵염기 서열을 포함한다.
- [0145] 특정 구체예들에서, 화합물은 8 내지 80, 20 내지 80, 10 내지 50, 20 내지 35, 10 내지 30, 12 내지 30, 15 내지 30, 16 내지 30, 20 내지 30, 20 내지 29, 20 내지 28, 20 내지 27, 20 내지 26, 20 내지 25, 20 내지 24, 20 내지 23, 20 내지 22, 20 내지 21, 15 내지 25, 16 내지 25, 15 내지 24, 16 내지 24, 17 내지 24, 18 내지 24, 19 내지 24, 19 내지 22, 16 내지 21, 18 내지 21 또는 16 내지 20개 연결된 핵염기들로 구성된 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 특정 구체예들에서, 화합물은 16개의 연결된 뉴클레오티드로 구성된 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 특정 구체예들에서, 화합물은 20개의 연결된 뉴클레오티드로 구성된 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다.
- [0146] 특정 구체예들에서, 화합물은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 또는 80개 연결된 핵염기 길이 또는 상기 수치들 중 임의의 두 개로 정의된 범위 길이로 구성된 변형 올리고뉴클레오티드를 포함한다.
- [0147] 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥이다.
- [0148] 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 최소한 하나의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 특정 구체예들에서, 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결이다. 특정 구체예들에서, 최소한 하나의 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결이다. 특정 구체예들에서, 각각의 변형된 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결이다.
- [0149] 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 변형된 당을 포함하는 최소한 하나의 뉴클레오티드를 포함한다. 특정 구체예들에서, 최소한 하나의 변형 당은 바이시클릭 당을 포함한다. 특정 구체예들에서, 최소한 하나의 변형 당은 2'-O-메톡시에틸, 숙박된 에틸, 3'-플루오로-HNA 또는 4'-(CH₂)_n-O-2' 가교를 포함하며, 이 때 n 은 1 또는 2이다.
- [0150] 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 변형된 핵염기를 포함하는 최소한 하나의 뉴클레오티드를 포함한다. 특정 구체예들에서, 변형된 핵염기는 5-메틸시토신이다.
- [0151] 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 공액체 그룹을 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체는 탄수화물 모이어티이다. 특정 구체예들에서, 공액체는 GalNAc 모이어티이다. 특정 구체예들에서, GalNAc는 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GalNAc₃이다. 특정 구체예들에서, 공액체는 다음 화학식을 가진다.



- [0152]
- [0153] 특정 구체예들에서, 화합물은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오티드로 구성되고 서열 번호: 1의 부위 3162 내지 3184의 동일한 길이 부분에 표적되거나 이에 상보적인 변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 이 때 변형된 올리고뉴클레오티드는 다음을 포함한다: (a) 연결된 테옥시뉴클레오티드들로 구성된 겹 분절; (b) 연결된 뉴클레오티드들로 구성된 5' 윙 분절; 및 (c) 연결된 뉴클레오티드들로 구성된 3' 윙 분절, 여기서 겹 분절은 5' 윙 분절과 3' 윙 분절 사이에 이들에 바로 인접하여 위치되고 각 윙 분절의 각각의 뉴클레오티드는 변형 당을 포함한다. 특정

구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 최소한 하나의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 GalNAc 공액체를 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체는 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GalNAc₃공액체이다.

[0154] 특정 구체예들에서, 화합물은 12 내지 30개의 연결된 뉴클레오시드로 구성되고 서열 번호: 1의 부위 1286 내지 1305의 동일 길이 부분에 표적되거나 이에 상보적인 변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 이 때 변형된 올리고뉴클레오티드는 다음을 포함한다: (a) 연결된 데옥시뉴클레오시드들로 구성된 갭 분절; (b) 연결된 뉴클레오시드들로 구성된 5' 윙 분절; 및 (c) 연결된 뉴클레오시드들로 구성된 3' 윙 분절, 여기서 갭 분절은 5' 윙 분절과 3' 윙 분절 사이에 이들에 바로 인접하여 위치되고 각 윙 분절의 각각의 뉴클레오시드는 변형 당을 포함한다. 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 최소한 하나의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 GalNAc 공액체를 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체는 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GalNAc₃공액체이다.

[0155] 특정 구체예들에서, 화합물은 20개의 연결된 뉴클레오시드로 구성되고 서열 번호: 1의 부위 3162 내지 3181의 동일 길이 부분에 표적되거나 이에 상보적인 변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 이 때 변형된 올리고뉴클레오티드는 다음을 포함한다: (a) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오시드들로 구성된 갭 분절; (b) 5개의 연결된 뉴클레오시드들로 구성된 5' 윙 분절; 및 (c) 5개의 연결된 뉴클레오시드들로 구성된 3' 윙 분절, 여기서 갭 분절은 5' 윙 분절과 3' 윙 분절 사이에 이들에 바로 인접하여 위치되고 각 윙 분절의 각각의 뉴클레오시드는 2'-O-메톡시 에틸 당을 포함하고, 최소한 하나의 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고 각각의 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다. 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 GalNAc 공액체를 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체는 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GalNAc₃공액체이다.

[0156] 특정 구체예들에서, 화합물은 16개의 연결된 뉴클레오시드로 구성되고 서열 번호: 1의 부위 3169 내지 3184의 동일 길이 부분에 표적되거나 이에 상보적인 변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 이 때 변형된 올리고뉴클레오티드는 다음을 포함한다: (a) 9개의 연결된 데옥시뉴클레오시드들로 구성된 갭 분절; (b) 3개의 연결된 뉴클레오시드들로 구성된 5' 윙 분절; 및 (c) 4개의 연결된 뉴클레오시드들로 구성된 3' 윙 분절, 여기서 갭 분절은 5' 윙 분절과 3' 윙 분절 사이에 이들에 바로 인접하여 위치되고 각 윙 분절의 각각의 뉴클레오시드는 변형 당을 포함하고, 각 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고 각각의 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다. 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 GalNAc 공액체를 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체는 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GalNAc₃공액체이다.

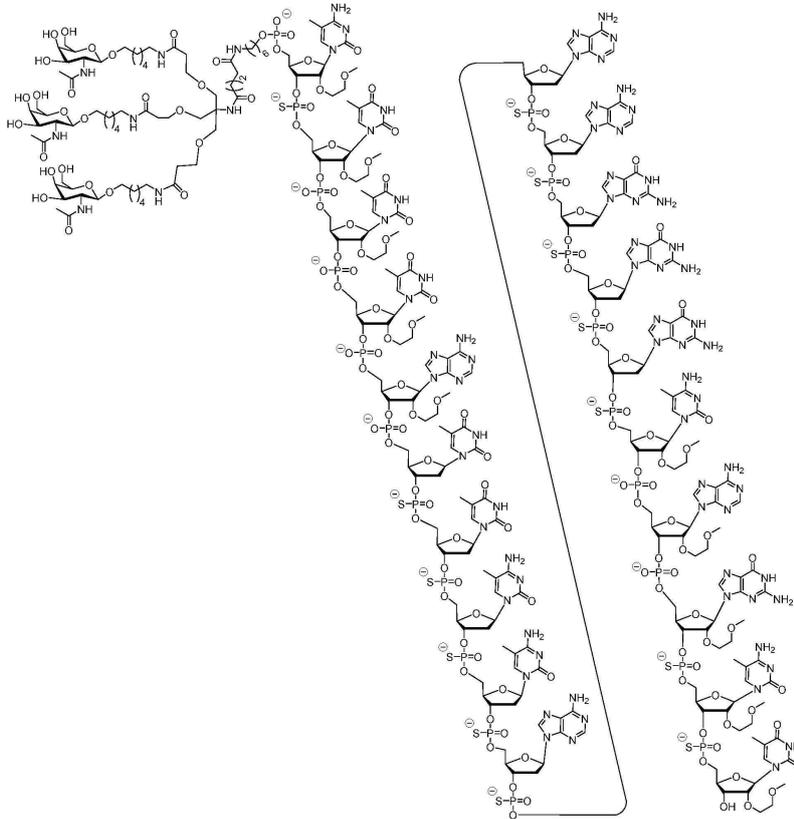
[0157] 특정 구체예들에서, 화합물은 20개의 연결된 뉴클레오시드로 구성되고 서열 번호: 36의 최소한 8개의 인접 핵염기들을 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 이 때 변형된 올리고뉴클레오티드는 다음을 포함한다: (a) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오시드들로 구성된 갭 분절; (b) 5개의 연결된 뉴클레오시드들로 구성된 5' 윙 분절; 및 (c) 5개의 연결된 뉴클레오시드들로 구성된 3' 윙 분절, 여기서 갭 분절은 5' 윙 분절과 3' 윙 분절 사이에 이들에 바로 인접하여 위치되고 각 윙 분절의 각각의 뉴클레오시드는 2'-O-메톡시 에틸 당을 포함하고, 최소한 하나의 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고 각각의 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다. 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 GalNAc 공액체를 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체는 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GalNAc₃공액체이다.

[0158] 특정 구체예들에서, 화합물은 16개의 연결된 뉴클레오시드로 구성되고 서열 번호: 77의 최소한 8개의 인접 핵염기들을 포함하는 핵염기 서열을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 이 때 변형된 올리고뉴클레오티드는 다음을 포함한다: (a) 9개의 연결된 데옥시뉴클레오시드들로 구성된 갭 분절; (b) 3개의 연결된 뉴클레오시드들로 구성된 5' 윙 분절; 및 (c) 4개의 연결된 뉴클레오시드들로 구성된 3' 윙 분절, 여기서 갭 분절은 5' 윙 분절과 3' 윙 분절 사이에 이들에 바로 인접하여 위치되고 각 윙 분절의 각각의 뉴클레오시드는 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고 각각의 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다. 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 GalNAc 공액체를 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체는 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GalNAc₃공액체이다.

[0159] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 다음 화학식에 따른 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공한다: mCes Teo Teo Teo AeO Tds Tds mCds mCds Ads Ads Ads Gds Gds Gds mCeO AeO Ges mCes Te(서열 번호: 36); 여기서, A는 아데닌 핵염기이고, mC는 5-메틸시토신 핵염기이고, G는 구아닌 핵염기이고, T는 티민 핵염기

이고, e는 2'-O(CH₂)₂-OCH₃ 퓨라노실 변형된 당 모이어티이고, d는 2'-데옥시퓨라노실 당 모이어티이고, s는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이고, o는 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결이다. 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 GaINAc 공액체를 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체는 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GaINAc₃공액체이다.

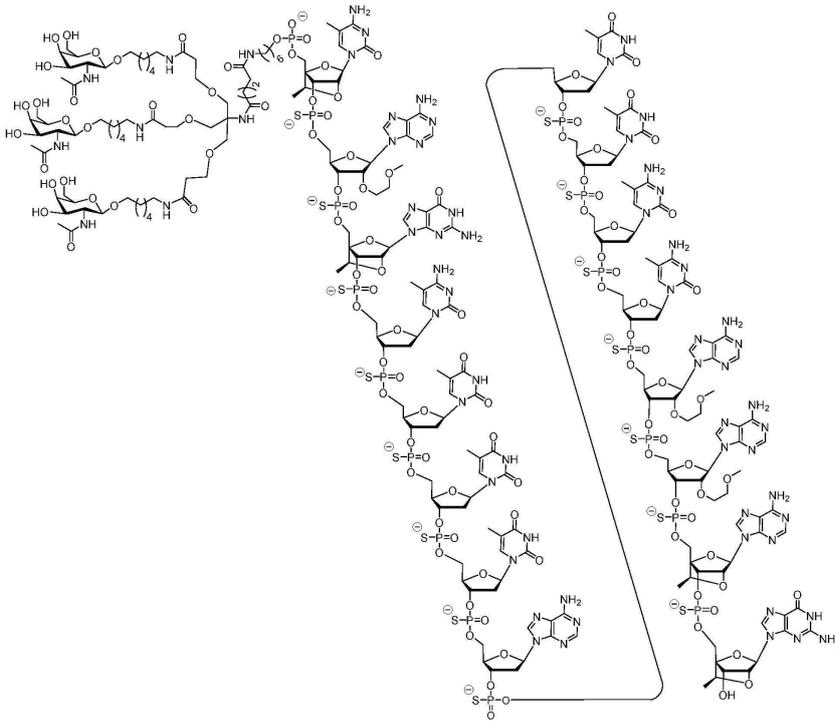
[0160] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 다음 화학식을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공한다:



[0161]

[0162] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 다음 화학식에 따른 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공한다: mCks Aes Gks mCds Tds Tds Tds Ads Tds Tds mCds mCds Aes Aes Aks Gk (서열 번호: 77); 여기서, A는 아데닌 핵염기이고, mC는 5-메틸시토신 핵염기이고, G는 구아닌 핵염기이고, T는 티민 핵염기이고, e는 2'-O(CH₂)₂-OCH₃ 퓨라노실 변형된 당 모이어티이고, d는 2'-데옥시퓨라노실 당 모이어티이고, s는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이고, 그리고 k는 cEt이다. 특정 구체예들에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 GaINAc 공액체를 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체는 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GaINAc₃공액체이다.

[0163] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 다음 화학식을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 제공한다:



- [0164]
- [0165] 특정 구체예들에서, 본 출원에 개시된 화합물 또는 조성물들은 변형된 올리고뉴클레오타이드의 염을 포함한다.
- [0166] 특정 구체예들에서, 본 출원에 개시된 화합물 또는 조성물들은 제약상 허용가능한 담체 또는 희석제를 추가로 포함한다.
- [0167] 특정 구체예들에서, 동물은 인간이다.
- [0168] 특정 구체예들은 본 출원에 개시된 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 조성물 또는 화합물을 제공하는데, 이 때 점성도 수준은 40 cP 미만이다. 특정 구체예들에서, 조성물은 15 cP 미만의 점성도 수준을 가진다. 특정 구체예들에서, 조성물은 12 cP 미만의 점성도 수준을 가진다. 특정 구체예들에서, 조성물은 10 cP 미만의 점성도 수준을 가진다.
- [0169] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 세포, 조직, 장기 또는 동물에서 TMPRSS6을 감소시킴에 사용하기 위한, TMPRSS6을 표적하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물 및 조성물들을 제공한다.
- [0170] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 세포, 조직, 장기 또는 동물에서 철 수준을 감소시킴에 사용하기 위한, TMPRSS6을 표적하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물 및 조성물들을 제공한다. 특정 구체예들에서, 화합물 및 조성물들은 혈청 철 수준을 감소시킨다. 특정 구체예들에서, 화합물 및 조성물들은 간의 철 수준을 감소시킨다. 특정 구체예들에서, 화합물 및 조성물들은 철 흡수를 감소시킨다. 특정 구체예들에서, 화합물 및 조성물들은 철 과잉 또는 축적을 감소시킨다. 특정 구체예들에서, 철 과잉/축적을 감소시키는 것은 철 과잉과 관련된 질환, 장애 또는 병태를 개선, 치료, 예방 또는 지연시킨다.
- [0171] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 동물에서 헵시딘 수준, 가령, mRNA 또는 단백질 발현 수준을 증가시킴에 사용하기 위한, TMPRSS6을 표적하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물 및 조성물들을 제공한다.
- [0172] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 동물에서 트랜스페린의 포화 백분율을 감소시킴에 사용하기 위한, TMPRSS6을 표적하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물 및 조성물들을 제공한다. 특정 구체예들에서, 트랜스페린 포화도를 감소시키는 것은 적혈구생성을 위한 철 공급의 감소를 초래한다. 특정 구체예들에서, 적혈구생성의 감소는 동물에서 적혈구증가증, 또는 이의 증상을 치료, 예방, 이의 발병을 지연, 개선 및/또는 감소시킨다. 특정 구체예들에서, 적혈구증가증은 진성 적혈구증가증이다. 특정 구체예들에서, TMPRSS6을 표적하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 이용한 치료는 적혈구증가증의 적백혈병으로의 진행을 예방 또는 지연시킨다.
- [0173] 본 출원에 개시된 특정 구체예들은 동물에서 철 축적을 감소시키기 위한, TMPRSS6을 표적하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물 및 조성물들을 제공한다. 특정 구체예들에서, TMPRSS6을 표적하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물 및 조성물들은 동물에서의 철의 과량 축적과 관련된 질환, 장애 및/또는 병태

또는 이의 증상을 치료, 예방, 이의 진행 감속, 이의 발병 지연, 개선 및/또는 감소시키기 위해 사용된다.

- [0174] 특정 구체예들에서, 철 축적은 동물에서의 질환, 장애 또는 병태의 결과 또는 원인이다. 특정 구체예들에서, 질환, 장애 또는 병태는 비효율적 적혈구생성, 적혈구증가증, 혈색소증 또는 빈혈증이다. 특정 구체예들에서, 혈색소증은 유전성 혈색소증이다. 특정 구체예들에서, 빈혈증은 유전성 빈혈증, 골수형성이상 증후군 또는 중증도의 만성 용혈이다. 특정 구체예들에서, 유전성 빈혈증은 겸상적혈구 빈혈증, 지중해빈혈, 판코니 빈혈증, 다이아몬드 블랙판 빈혈증, 슈바르만 다이아몬드 증후군, 적혈구막 장애, 6-인산 포도당 탈수소효소 결핍, 또는 유전성 출혈 모세혈관확장증이다. 특정 구체예들에서, 지중해빈혈은 β -지중해빈혈이다. 특정 구체예들에서, β -지중해빈혈은 중증성 β -지중해빈혈, 중간성 β -지중해빈혈 또는 경증성 β -지중해빈혈이다. 특정 구체예들에서, 질환, 장애 또는 병태는 HFE 유전자에서의 돌연변이와 관련된다. 그 외 구체예들에서, 질환은 헤모주벨린 유전자에서의 돌연변이와 관련된다. 그 외 구체예들에서, 질환은 헵시딘 유전자에서의 돌연변이와 관련된다.
- [0175] 특정 구체예들에서, 철 축적은 동물에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위한 치료법의 결과이다. 특정 구체예들에서, 치료법은 정맥절개술 또는 수혈 치료법이다. 특정 구체예들에서, 질환, 장애 및/또는 병태는 다수의 혈액 수혈로 인한 것일 수 있다. 특정 구체예들에서, 다수의 수혈은 적혈구증가증을 초래할 수 있다. 특정 구체예들에서, 다수의 혈액 수혈은 빈혈증을 가진 동물과 관련된다. 다수의 혈액 수혈을 필요로 하는 빈혈증의 예들은 유전성 빈혈증, 골수형성이상 증후군 및 중증도의 만성 용혈이 있다.
- [0176] 특정 구체예들에서, 질환, 장애 및/또는 병태는 과량의 비경구 철 보충제 섭취 또는 과량의 식이 철 섭취와 관련된다.
- [0177] 특정 구체예들에서, 치료법에서 사용하기 위한, TMPRSS6를 표적하는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물 및 조성물들이 제공된다. 특정 구체예들에서, TMPRSS6를 표적하는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물 및 조성물들은 치료적 유효량으로 동물에게 투여된다.
- [0178] 특정 구체예들에서, 약제의 제조에서 사용하기 위한, TMPRSS6를 표적하는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물 및 조성물들이 제공된다. 특정 구체예들에서, 약제는 동물에서 철의 과량 축적과 관련된, 질환, 장애 및/또는 병태 또는 증상을 치료, 예방, 진행 감속, 이의 발병 지연, 및/또는 감소시키기 위하여 사용된다.
- [0179] 특정 구체예들에서, TMPRSS6를 표적하는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물 또는 화합물은 하나 또는 그 이상의 제 2 제제(들)과 병용-투여된다. 특정 구체예들에서 제 2 제제는 철 킬레이트제(chelator) 또는 헵시딘 작용제이다. 또다른 구체예들에서, 철 킬레이트제는 FBS0701 (FerroKin), 엑스자이드(Exjade), 데스페랄(Desferal) 또는 데페리프론(Deferiprone, DFP)을 포함한다. 특정 구체예들에서, 제 2 제제는 제 2 안티센스 화합물이다. 또다른 구체예들에서, 제 2 안티센스 화합물은 TMPRSS6를 표적한다. 그 외 구체예들에서, 제 2 안티센스 화합물은 비-TMPRSS6 화합물을 표적한다. 그 외 구체예들에서, TMPRSS6를 표적하는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물 또는 화합물은 정맥절개술 또는 수혈 치료법 이전, 동안 또는 이후에 투여된다.
- [0180] *안티센스 화합물*
- [0181] 올리고머 화합물에는 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오시드, 올리고뉴클레오티드 유사체, 올리고뉴클레오티드 모방체, 안티센스 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 siRNA가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 올리고머 화합물은 표적 핵산에 대한 "안티센스" 일 수 있으며, 수소 결합을 통해 표적 핵산에 대한 혼성화가 이루어질 수 있음을 의미한다.
- [0182] 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 5' 에서 3' 방향으로 기재될 때, 표적되는 표적 핵산의 표적 분절의 역보체를 포함하는 핵염기 서열을 가진다. 이러한 특정 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5' 에서 3' 방향으로 기재될 때 표적되는 표적 핵산의 표적 분절의 역보체를 포함하는 핵염기 서열을 가진다.
- [0183] 특정 구체예들에서, TMPRSS6 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물은 10 내지 30개 뉴클레오티드 길이이다. 달리 말하면, 안티센스 화합물은 10 내지 30개 연결된 핵염기이다. 다른 구체예들에서, 안티센스 화합물은 8 내지 80, 10 내지 80, 12 내지 50, 15 내지 30, 18 내지 24, 19 내지 22, 또는 20개 연결된 핵염기로 구성된 변형 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 이러한 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 또는 80개 연결된 핵염기 길이 또는 상기 수치

들 중 임의의 두 개로 정의된 범위 길이로 구성된 변형 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, 안티센스 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오티드이다.

[0184] 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 단축형 또는 절단형 변형 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 단축형 또는 절단형 변형된 올리고뉴클레오티드는 5' 단부로부터 결실된 (5' 절단), 중심 부분으로부터 결실된 또는 대안적으로 3' 단부로부터 결실된(3' 절단) 단일 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 단축형 또는 절단형 올리고뉴클레오티드는 5' 단부로부터 결실된 둘 또는 그 이상의 뉴클레오티드, 중심 부분으로부터 결실된 둘 또는 그 이상의 뉴클레오티드를 가질 수 있거나 대안적으로 3' 단부로부터 결실된 둘 또는 그 이상의 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 대안적으로, 결실된 뉴클레오티드는 변형된 올리고뉴클레오티드 전반에 걸쳐, 예를 들면, 5' 단부로부터 결실된 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드, 중심 부분으로부터 결실된 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 및/또는 3' 단부로부터 결실된 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드를 가지는 안티센스 화합물에서 분산될 수 있다.

[0185] 추가 단일 뉴클레오티드가 연장된 올리고뉴클레오티드 내 존재하는 경우, 이러한 추가 뉴클레오티드는 상기 올리고뉴클레오티드의 5' 단부, 3' 단부 또는 중심 부분에 배치될 수 있다. 둘 또는 그 이상의 추가 뉴클레오티드가 존재하는 경우, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드의 5' 단부에 (5' 부가), 3' 단부에 (3' 부가) 또는 중심 부분에 부가된 두개의 뉴클레오티드를 가지는 올리고뉴클레오티드에서, 추가 뉴클레오티드들은 서로 인접할 수 있다. 대안적으로, 상기 부가된 뉴클레오티드는 안티센스 화합물 전반에 걸쳐, 예를 들면, 5' 단부에 부가된 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드, 3' 단부에 부가된 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드, 및/또는 중심 부분에 부가된 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드를 가지는 올리고뉴클레오티드에서 분산될 수 있다.

[0186] 활성을 제거하지 않고 안티센스 화합물, 가령, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 길이를 증가 또는 감소시키는 것, 및/또는 미스매치된 염기들을 도입시키는 것이 가능하다. 예를 들면, Woolf 등은 문헌 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992)에서, 13-25개 핵염기 길이의 일련의 안티센스 올리고뉴클레오티드들을 난자 주입 모델에서 표적 RNA의 절단을 유도하는 이들의 능력에 대해 테스트하였다. 안티센스 올리고뉴클레오티드들의 단부들 근처에 8 또는 11개 미스매치된 염기들을 가지는 25개 핵염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오티드들은, 미스매치를 전혀 내포하지 않은 안티센스 올리고뉴클레오티드들 보다 적은 정도 일지라도, 표적 mRNA의 특이적 절단을 지시할 수 있었다. 유사하게, 1 또는 3개 미스매치를 가지는 안티센스 올리고뉴클레오티드들을 비롯한, 13개 핵염기 안티센스 올리고뉴클레오티드들을 사용하여 표적 특이적 절단이 이루어졌다.

[0187] Gautschi 등은 문헌 (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, 2001년 3월)에서 bcl-2 mRNA에 100% 상보성을 가지며 bcl-xL mRNA에 대해 3개 미스매치를 가지는 올리고뉴클레오티드가 시험관내 및 생체내에서 bcl-2 및 bcl-xL 모두의 발현을 감소시키는 능력을 입증하였다. 더욱이, 이러한 올리고뉴클레오티드는 효능있는 생체내 항-종양 활성을 나타내었다.

[0188] Maher 및 Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358,1988)는 일련의 연쇄(tandem) 14개 핵염기 안티센스 올리고뉴클레오티드들, 및 상기 연쇄 안티센스 올리고뉴클레오티드의 둘 또는 세개의 서열을 각각 포함하는 28 및 42개 핵염기 안티센스 올리고뉴클레오티드들을, 토끼 망상적혈구 분석에서 인간 DHFR의 번역을 정지시키는 이들의 능력에 대해 테스트하였다. 각 세가지에 있어, 14개 핵염기 안티센스 올리고뉴클레오티드만이 28 또는 42개 핵염기 안티센스 올리고뉴클레오티드들보다 더 적절한 수준으로(a more modest level) 번역을 억제할 수 있었다.

[0189] 특정 안티센스 화합물 모티프 및 기전

[0190] 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 안티센스 화합물에 성질, 가령, 증강된 억제 활성, 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화도, 또는 생체내 뉴클레아제에 의한 분해에 대한 내성을 부여하는 패턴 또는 모티프로 배열된, 화학적으로 변형된 아단위들을 가진다.

[0191] 키메라 안티센스 화합물은 전형적으로 뉴클레아제 분해에 대한 증가된 내성, 증가된 세포 흡수, 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화도, 및/또는 증가된 억제 활성을 부여하기 위해 변형된 최소한 하나의 부위를 내포한다. 키메라 안티센스 화합물의 제 2 부위는 또다른 바람직한 성질을 부여할 수 있는데, 예컨대, RNA: DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단시키는 세포 엔도뉴클레아제 RNase H에 대한 기질로서 기능할 수 있다.

[0192] 안티센스 활성은 안티센스 화합물 (예컨대, 올리고뉴클레오티드)의 표적 핵산과의 혼성화를 포함하는 임의의 기전으로부터 생길 수 있으며, 이 때 혼성화는 궁극적으로 생물학적 효과를 생성한다. 특정 구체예들에서, 표적 핵산의 양 및/또는 활성은 조절된다. 특정 구체예들에서, 표적 핵산의 양 및/또는 활성은 감소된다. 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물의 표적 핵산에 대한 혼성화는 궁극적으로 표적 핵산 분해를 일으킨다. 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물의 표적 핵산에 대한 혼성화는 표적 핵산 분해를 일으키지 않는다. 이러한 특

정 구체예들에서, 표적 핵산과 혼성화된 안티센스 화합물의 존재 (점유)는 안티센스 활성의 조절을 생성한다. 특정 구체예들에서, 특정 화학적 모티프 또는 화학적 변형 패턴을 가지는 안티센스 화합물은 하나 또는 그 이상의 기전을 이용하기에 특히 적합하다. 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물들은 하나 이상의 기전을 통해 및/또는 밝혀진 바 없는 기전들을 통해 기능한다. 따라서 본 출원에 기재된 안티센스 화합물은 특정 기전에 의해 제한되지 않는다.

[0193] 안티센스 기전들에는, 제한 없이, RNase H 매개된 안티센스; 제한없이, siRNA, ssRNA 및 마이크로RNA 기전들이 포함되는, RISC 경로를 이용하는 RNAi 기전들; 그리고 점유 기반 기전들이 포함된다. 특정 안티센스 화합물은 이러한 하나 이상의 기전을 통해 및/또는 또다른 기전들을 통해 작용할 수 있다.

[0194] *RNase H-매개된 안티센스*

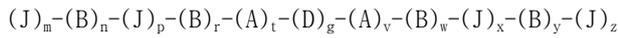
[0195] 특정 구체예들에서, 안티센스 활성은 적어도 일부는 RNase H에 의한 표적 RNA의 분해로 인한 것이다. RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포 엔도뉴클레아제이다. "DNA-유사"인 단일-가닥 안티센스 화합물이 포유동물 세포들에서 RNase H 활성을 유도해냄은 해당 분야에 공지이다. 따라서 DNA 또는 DNA-유사 뉴클레오시드들의 적어도 일부를 포함하는 안티센스 화합물은 RNase H를 활성화시켜, 표적 핵산을 절단시킬 수 있다. 특정 구체예들에서, RNase H를 이용하는 안티센스 화합물은 하나 또는 그 이상의 변형된 뉴클레오시드들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 이러한 안티센스 화합물은 1-8개 변형된 뉴클레오시드들의 최소한 하나의 블록을 포함한다. 이러한 특정 구체예들에서, 변형된 뉴클레오시드들은 RNase H 활성을 보조하지 못한다. 특정 구체예들에서, 이러한 안티센스 화합물은 본 출원에 기재된 갭머이다. 이러한 특정 구체예들에서, 갭머의 갭은 DNA 뉴클레오시드들을 포함한다. 이러한 특정 구체예들에서, 갭머의 갭은 DNA-유사 뉴클레오시드들을 포함한다. 이러한 특정 구체예들에서, 갭머의 갭은 DNA 뉴클레오시드 및 DNA-유사 뉴클레오시드들을 포함한다.

[0196] 갭머 모티프를 가지는 특정 안티센스 화합물은 키메릭 안티센스 화합물로 고려된다. 갭머에서 RNaseH 절단을 보조하는 복수의 뉴클레오티드들을 가지는 내부 부위는 내부 부위의 뉴클레오시드들과 화학적으로 구별되는 복수의 뉴클레오티드들을 가지는 외부 부위들 사이에 위치된다. 갭머 모티프를 가지는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 경우에서, 갭 분절은 일반적으로 엔도뉴클레아제 절단을 위한 기질로서 기능하는 반면, 윙 분절은 변형된 뉴클레오시드들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 갭머 부위들은 각 구별되는 부위를 포함하는 유형의 당 모이어티에 의해 분화된다. 상기 갭머 부위들을 분화시키기 위해 사용되는 당 모이어티의 유형들은, 일부 구체예들에서, β-D-리보뉴클레오시드, β-D-데옥시리보뉴클레오시드, 2'-변형된 뉴클레오시드 (이러한 2'-변형된 뉴클레오시드는 그중에서도 2'-MOE, 및 2'-O-CH₃를 포함할 수 있다), 및 바이시클릭 당 변형된 뉴클레오시드 (이러한 바이시클릭 당 변형된 뉴클레오시드는 속박된 에틸을 가지는 것들을 포함할 수 있다)를 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 윙 내의 뉴클레오시드들은, 예를 들면, 2'-MOE 및 바이시클릭 당 모이어티, 가령, 속박된 에틸 (cEt) 또는 LNA를 비롯한 몇몇 변형된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 윙은 몇몇 변형된 그리고 비변형된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 윙은 2'-MOE 뉴클레오시드, 바이시클릭 당 모이어티, 가령, 속박된 에틸 뉴클레오시드들 또는 LNA 뉴클레오시드들, 및 2'-데옥시뉴클레오시드들의 다양한 조합을 포함할 수 있다.

[0197] 각각의 구별되는 부위는 균일한 당 모이어티, 이형(variant), 또는 교대(alternating) 당 모이어티를 포함할 수 있다. 윙-갭-윙 모티프는 흔히 "X-Y-Z"로 기재되는데, 여기서 "X"는 5'-윙의 길이를 나타내고, "Y"는 갭의 길이를 나타내며, "Z"는 3'-윙의 길이를 나타낸다. "X" 및 "Z"는 균일한, 이형, 또는 교대 당 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, "X" 및 "Y"는 하나 또는 그 이상의 2'-데옥시뉴클레오시드들을 포함할 수 있다. "Y"는 2'-데옥시뉴클레오시드들을 포함할 수 있다. 본 출원에서 사용되는, "X-Y-Z"로 기재된 갭머는 5'-윙과 3' 윙 각각에 바로 인접하여 위치되도록 하는 배열을 가진다. 그러므로 5' 윙과 갭 사이, 또는 갭과 3' 윙 사이에 개입 뉴클레오티드(intervening nucleotide)들은 전혀 존재하지 않는다. 본 출원에 기재된 임의의 안티센스 화합물은 갭머 모티프를 가질 수 있다. 특정 구체예들에서, "X" 및 "Z"는 동일하고; 다른 구체예들에서 이들은 상이하다. 특정 구체예들에서, "Y"는 8 내지 15개 뉴클레오시드들이다. X, Y, 또는 Z는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30개 또는 그 이상의 임의의 뉴클레오시드들 일 수 있다.

[0198] 특정 구체예들에서, TMPRSS6 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물은 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개 연결된 뉴클레오시드들로 구성되어 있는 갭머 모티프를 가진다.

[0199] 특정 구체예들에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 다음과 같은 구조식 A로 기재되는 당 모티프를 가진다:



[0200] 여기서:

[0201] 각각의 A는 독립적으로 2'-치환된 뉴클레오시드이고;

[0202] 각각의 B는 독립적으로 바이시클릭 뉴클레오시드이고;

[0203] 각각의 J는 독립적으로 2'-치환된 뉴클레오시드 또는 2'-데옥시뉴클레오시드이고;

[0204] 각각의 D는 2'-데옥시뉴클레오시드이고;

[0205] m은 0-4이고; n은 0-2이고; p는 0-2이고; r은 0-2이고; t는 0-2이고; v는 0-2이고; w는 0-4이고; x는 0-2이고; y는 0-2이고; z는 0-4이고; g는 6-14이며;

[0206] 다음을 조건으로 한다:

[0207] m, n, 및 r 중 최소한 하나는 0이 아니고;

[0208] w 및 y 중 최소한 하나는 0이 아니고;

[0209] m, n, p, r, 및 t의 총합은 2 내지 5이고; 그리고

[0210] v, w, x, y, 및 z의 총합은 2 내지 5이다.

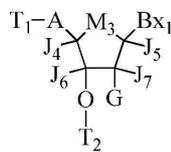
[0211] RNAi 화합물

[0212] 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 간섭 RNA 화합물 (RNAi)이며, 이는 이중-가닥 RNA 화합물 (짧은-간섭 RNA 또는 siRNA로도 언급됨) 및 단일-가닥 RNAi 화합물 (또는 ssRNA)을 포함한다. 이러한 화합물들은 표적 핵산을 분해 및/또는 격리시키기 위한 RISC 경로를 통해 적어도 부분적으로 작용한다 (그러므로, 마이크로RNA/마이크로RNA-모방 화합물을 포함한다). 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 이러한 기전들에 특히 적합하게 만드는 변형들을 포함한다.

[0213] i. ssRNA 화합물

[0214] 특정 구체예들에서, 단일-가닥 RNAi 화합물 (ssRNA)로서 사용하기에 특히 적합한 화합물들을 포함하는 안티센스 화합물은 변형된 5'-말단 단부를 포함한다. 이러한 특정 구체예들에서, 5'-말단 단부는 변형된 포스페이트 모이어티를 포함한다. 특정 구체예들에서, 이러한 변형된 포스페이트는 안정화된다 (예컨대, 비변형된 5'-포스페이트에 비해 분해/절단에 대해 내성을 띤다). 특정 구체예들에서, 이러한 5'-말단 뉴클레오시드들은 5'-인 모이어티를 안정화시킨다. 특정한 변형된 5'-말단 뉴클레오시드들은, 해당 기술 분야에서, 예를 들면 WO 2011/139702에서 찾을 수 있다.

[0215] 특정 구체예들에서, ssRNA 화합물의 5'-뉴클레오시드는 화학식 IIc를 가진다:



[0216]

IIc

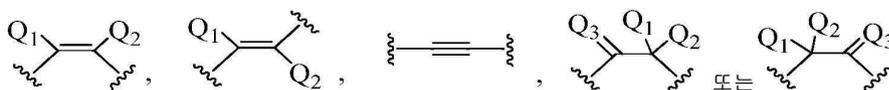
[0217]

[0218] 여기서:

[0219] T₁은 선택적으로 보호된 인 모이어티이고;

[0220] T₂는 화학식 IIc의 화합물을 올리고머 화합물에 연결하는 뉴클레오시드간 연결 그룹이고;

[0221] A는 다음 화학식들 중 하나를 가지며:



- [0222] Q_1 및 Q_2 는 각각, 독립적으로, H, 할로젠, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_2-C_6 알케닐, 치환된 C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, 치환된 C_2-C_6 알키닐 또는 $N(R_3)(R_4)$ 이고;
- [0223] Q_3 는 O, S, $N(R_5)$ 또는 $C(R_6)(R_7)$ 이고;
- [0224] 각각의 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 및 R_7 은, 독립적으로, H, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬 또는 C_1-C_6 알콕시이고;
- [0225] M_3 는 O, S, NR_{14} , $C(R_{15})(R_{16})$, $C(R_{15})(R_{16})C(R_{17})(R_{18})$, $C(R_{15})=C(R_{17})$, $OC(R_{15})(R_{16})$ 또는 $OC(R_{15})(B_{X2})$ 이고;
- [0226] R_{14} 는 H, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_2-C_6 알케닐, 치환된 C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐이고;
- [0227] R_{15} , R_{16} , R_{17} 및 R_{18} 은 각각, 독립적으로, H, 할로젠, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_2-C_6 알케닐, 치환된 C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐이고;
- [0228] B_{X1} 은 헤테로시클릭 염기 모이어티이고;
- [0229] 또는 B_{X2} 가 존재하는 경우 B_{X2} 는 헤테로시클릭 염기 모이어티이고 B_{X1} 은 H, 할로젠, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_2-C_6 알케닐, 치환된 C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐이고;
- [0230] J_4 , J_5 , J_6 및 J_7 은 각각, 독립적으로, H, 할로젠, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_2-C_6 알케닐, 치환된 C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐이고;
- [0231] 또는 J_4 는 J_5 또는 J_7 중 하나와 가교를 형성하고, 이 때 상기 가교는 O, S, NR_{19} , $C(R_{20})(R_{21})$, $C(R_{20})=C(R_{21})$, $C[=C(R_{20})(R_{21})]$ 및 $C(=O)$ 에서 선택된 1 내지 3개 연결된 바이라디칼 그룹을 포함하며 J_5 , J_6 및 J_7 중 다른 두 개는 각각, 독립적으로, H, 할로젠, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_2-C_6 알케닐, 치환된 C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐이고;
- [0232] 각각의 R_{19} , R_{20} 및 R_{21} 은, 독립적으로, H, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_2-C_6 알케닐, 치환된 C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐이고;
- [0233] G는 H, OH, 할로젠 또는 $O-[C(R_8)(R_9)]_n-[(C=O)_m-X_1]_j-Z$ 이고;
- [0234] 각각의 R_8 및 R_9 는, 독립적으로, H, 할로젠, C_1-C_6 알킬 또는 치환된 C_1-C_6 알킬이고;
- [0235] X_1 은 O, S 또는 $N(E_1)$ 이고;
- [0236] Z는 H, 할로젠, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, 치환된 C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, 치환된 C_2-C_6 알키닐 또는 $N(E_2)(E_3)$ 이고;
- [0237] E_1 , E_2 및 E_3 는 각각, 독립적으로, H, C_1-C_6 알킬 또는 치환된 C_1-C_6 알킬이고;
- [0238] n은 1 내지 약 6이고;
- [0239] m은 0 또는 1이고;
- [0240] j는 0 또는 1이고;
- [0241] 각각의 치환 그룹은 할로젠, OJ_1 , $N(J_1)(J_2)$, $=NJ_1$, SJ_1 , N_3 , CN, $OC(=X_2)J_1$, $OC(=X_2)N(J_1)(J_2)$ 및 $C(=X_2)N(J_1)(J_2)$ 에서 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 선택적으로 보호된 치환 그룹들을 포함하고;
- [0242] X_2 는 O, S 또는 NJ_3 이고;

[0243] 각각의 J_1 , J_2 및 J_3 는, 독립적으로, H 또는 C_1 - C_6 알킬이고;

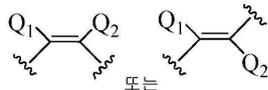
[0244] j 가 1이면 Z 는 할로젠 또는 $N(E_2)(E_3)$ 이 아니고; 그리고

[0245] 여기서 상기 올리고머 화합물은 8 내지 40개 모노머 아단위들을 포함하고 표적 핵산의 적어도 일부분에 혼성화가능하다.

[0246] 특정 구체예들에서, M_3 는 O, CH=CH, OCH₂ 또는 OC(H)(Bx₂)이다. 특정 구체예들에서, M_3 는 O이다.

[0247] 특정 구체예들에서, J_4 , J_5 , J_6 및 J_7 은 각각 H이다. 특정 구체예들에서, J_4 는 J_5 또는 J_7 중 하나와 가교를 형성한다.

[0248] 특정 구체예들에서, A는 다음 화학식들 중 하나를 가진다:

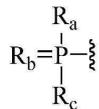


[0249]

[0250] 여기서:

[0251] Q_1 및 Q_2 는 각각, 독립적으로, H, 할로젠, C_1 - C_6 알킬, 치환된 C_1 - C_6 알킬, C_1 - C_6 알콕시 또는 치환된 C_1 - C_6 알콕시이다. 특정 구체예들에서, Q_1 및 Q_2 는 각각 H이다. 특정 구체예들에서, Q_1 및 Q_2 는 독립적으로, H 또는 할로젠이다. 특정 구체예들에서, Q_1 및 Q_2 는 H이고 Q_1 및 Q_2 중 다른 하나는 F, CH₃ 또는 OCH₃이다.

[0252] 특정 구체예들에서, T₁은 다음 화학식을 가진다:



[0253]

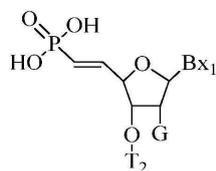
[0254] 여기서:

[0255] R_a 및 R_c 는 각각, 독립적으로, 보호된 하이드록실, 보호된 티올, C_1 - C_6 알킬, 치환된 C_1 - C_6 알킬, C_1 - C_6 알콕시, 치환된 C_1 - C_6 알콕시, 보호된 아미노 또는 치환된 아미노이고; 그리고

[0256] R_b 는 O 또는 S이다. 특정 구체예들에서, R_b 는 O이고 R_a 및 R_c 는 각각, 독립적으로, OCH₃, OCH₂CH₃ 또는 CH(CH₃)₂이다.

[0257] 특정 구체예들에서, G는 할로젠, OCH₃, OCH₂F, OCHF₂, OCF₃, OCH₂CH₃, O(CH₂)₂F, OCH₂CHF₂, OCH₂CF₃, OCH₂-CH=CH₂, O(CH₂)₂-OCH₃, O(CH₂)₂-SCH₃, O(CH₂)₂-OCF₃, O(CH₂)₃-N(R₁₀)(R₁₁), O(CH₂)₂-ON(R₁₀)(R₁₁), O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(R₁₀)(R₁₁), OCH₂C(=O)-N(R₁₀)(R₁₁), OCH₂C(=O)-N(R₁₂)-(CH₂)₂-N(R₁₀)(R₁₁) 또는 O(CH₂)₂-N(R₁₂)-C(=NR₁₃)[N(R₁₀)(R₁₁)]이고 여기서 R₁₀, R₁₁, R₁₂ 및 R₁₃은 각각, 독립적으로, H 또는 C_1 - C_6 알킬이다. 특정 구체예들에서, G는 할로젠, OCH₃, OCF₃, OCH₂CH₃, OCH₂CF₃, OCH₂-CH=CH₂, O(CH₂)₂-OCH₃, O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(CH₃)₂, OCH₂C(=O)-N(H)CH₃, OCH₂C(=O)-N(H)-(CH₂)₂-N(CH₃)₂ 또는 OCH₂-N(H)-C(=NH)NH₂이다. 특정 구체예들에서, G는 F, OCH₃ 또는 O(CH₂)₂-OCH₃이다. 특정 구체예들에서, G는 O(CH₂)₂-OCH₃이다.

[0258] 특정 구체예들에서, 5'-말단 뉴클레오시드는 다음 화학식 IIe를 가진다:



[0259]

[0260]

IIf

[0261]

특정 구체예들에서, ssRNA에 특히 적합한 화합물들을 포함하는 안티센스 화합물은 정의된 패턴 또는 당 변형 모티프로 배열된 하나 또는 그 이상의 유형의 변형된 당 모이어티 및/또는 자연 발생 당 모이어티를 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 부위와 함께 포함한다. 이러한 모티프들은 임의의, 본 출원에서 논의되는 당 변형들 및/또는 그 외 공지된 당 변형들을 포함할 수 있다.

[0262]

특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오타이드들은 균일한 당 변형들을 가지는 부위를 포함하거나 이러한 부위로 구성된다. 이러한 특정 구체예들에서, 상기 부위의 각각의 뉴클레오시드는 동일한 RNA-유사 당 변형을 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 부위의 각각의 뉴클레오시드는 2'-F 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, 상기 부위의 각각의 뉴클레오시드는 2'-OMe 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, 상기 부위의 각각의 뉴클레오시드는 2'-MOE 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, 상기 부위의 각각의 뉴클레오시드는 cEt 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, 상기 부위의 각각의 뉴클레오시드는 LNA 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, 균일한 부위는 모든 또는 실질적으로 모든 올리고뉴클레오타이드를 구성한다. 특정 구체예들에서, 상기 부위는 1-4개 말단 뉴클레오시드들을 제외한 전체 올리고뉴클레오타이드를 구성한다.

[0263]

특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오타이드들은 하나 또는 그 이상의 당 변형 교대 부위들을 포함하며, 여기서 뉴클레오시드들은 제 1 유형의 당 변형을 가지는 뉴클레오타이드들과 제 2 유형의 당 변형을 가지는 뉴클레오타이드들 사이에서 교대로 나타난다. 특정 구체예들에서, 두 유형의 뉴클레오시드들 모두 RNA-유사 뉴클레오시드들이다. 특정 구체예들에서 교대 뉴클레오시드들은 다음에서 선택된다: 2'-OMe, 2'-F, 2'-MOE, LNA, 및 cEt. 특정 구체예들에서, 교대 변형은 2'-F 및 2'-OMe이다. 이러한 부위들은 인접할 수 있거나 상이하게 변형된 뉴클레오시드들 또는 공역된 뉴클레오시드들에 의해 단절될 수 있다.

[0264]

특정 구체예들에서, 교대 변형들의 교대 부위 각각은 단일 뉴클레오시드로 구성된다 (즉, 패턴은 $(AB)_x A_y$ 이고, 여기서 A는 제 1 유형의 당 변형을 가지는 뉴클레오시드이고 B는 제 2 유형의 당 변형을 가지는 뉴클레오시드이며; x는 1-20이고 y는 0 또는 1이다). 특정 구체예들에서, 교대 모티프 내 하나 또는 그 이상의 교대 부위들은 한 유형의 하나 이상의 뉴클레오시드를 포함한다. 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드들은 다음 중 임의의 뉴클레오시드 모티프들의 하나 또는 그 이상의 부위들을 포함할 수 있다:

[0265]

AABBAA;

[0266]

ABBABB;

[0267]

AABAAB;

[0268]

ABBABAABB;

[0269]

ABABAA;

[0270]

AABABAB;

[0271]

ABABAA;

[0272]

ABBAABBABABAA;

[0273]

BABBAABBABABAA; 또는

[0274]

ABABBAABBABABAA;

[0275]

여기서 A는 제 1 유형의 뉴클레오시드이고 B는 제 2 유형의 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, A 및 B는 각각 2'-F, 2'-OMe, BNA, 및 MOE에서 선택된다.

[0276]

특정 구체예들에서, 이러한 교대 모티프를 가지는 올리고뉴클레오타이드들은 또한 변형된 5' 말단 뉴클레오시드, 가령, 화학식 IIc 또는 IIe의 뉴클레오시드들을 포함한다.

[0277]

특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오타이드들은 2-2-3 모티프를 가지는 부위를 포함한다. 이러한 부위들은 다음 모티프를 포함한다:

[0278]

$-(A)_2-(B)_x-(A)_2-(C)_y-(A)_3-$

[0279]

여기서: A는 제 1 유형의 변형된 뉴클레오시드이고;

- [0280] B 및 C는, A와 상이하게 변형된 뉴클레오시드들이지만, B 및 C는 서로 동일하거나 상이한 변형들을 가질 수 있으며;
- [0281] x 및 y는 1 내지 15이다.
- [0282] 특정 구체예들에서, A는 2'-OMe 변형된 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, B 및 C는 모두 2'-F 변형된 뉴클레오시드들이다. 특정 구체예들에서, A는 2'-OMe 변형된 뉴클레오시드이고 B 및 C는 모두 2'-F 변형된 뉴클레오시드들이다.
- [0283] 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오시드들은 다음 당 모티프를 가지며:
- [0284] $5'-(Q)-(AB)_x A_y-(D)_z$
- [0285] 여기서:
- [0286] Q는 안정화된 포스페이트 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, Q는 화학식 IIc 또는 IIe를 가지는 뉴클레오시드이고;
- [0287] A는 제 1 유형의 변형된 뉴클레오시드이고;
- [0288] B는 제 2 유형의 변형된 뉴클레오시드이고;
- [0289] D는 인접한 뉴클레오시드와 상이한 변형을 포함하는 변형된 뉴클레오시드이다. 그러므로 y가 0이면, D는 B와 상이하게 변형되어야 하고 y가 1이면, D는 A와 상이하게 변형되어야 한다. 특정 구체예들에서, D는 A 및 B 모두와 다르다.
- [0290] X는 5-15이고;
- [0291] Y는 0 또는 1이고;
- [0292] Z는 0-4이다.
- [0293] 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오시드들은 다음 당 모티프를 가지며:
- [0294] $5'-(Q)-(A)_x-(D)_z$
- [0295] 여기서:
- [0296] Q는 안정화된 포스페이트 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, Q는 화학식 IIc 또는 IIe를 가지는 뉴클레오시드이고;
- [0297] A는 제 1 유형의 변형된 뉴클레오시드이고;
- [0298] D는 A와 상이한 변형을 포함하는 변형된 뉴클레오시드이다.
- [0299] X는 11-30이고;
- [0300] Z는 0-4이다.
- [0301] 특정 구체예들에서 상기 모티프들의 A, B, C, 및 D는 다음에서 선택된다: 2'-OMe, 2'-F, 2'-MOE, LNA, 및 cEt. 특정 구체예들에서, D는 말단 뉴클레오시드들을 나타낸다. 특정 구체예들에서, 이러한 말단 뉴클레오시드들은 표적 핵산에 혼성화하도록 설계되지 않는다 (그럼에도 불구하고 하나 또는 그 이상은 우연히 혼성화할 수도 있다). 특정 구체예들에서, 각각의 D 뉴클레오시드의 핵염기는 표적 핵산의 상응하는 위치에 있는 핵염기의 동일성과 무관하게 아데닌이다. 특정 구체예들에서 각각의 D 뉴클레오시드의 핵염기는 티민이다.
- [0302] 특정 구체예들에서, ssRNA로서 사용하기에 특히 적합한 화합물들을 포함한 안티센스 화합물은 정의된 패턴 또는 변형된 뉴클레오시드간 연결 모티프로 배열된 변형된 뉴클레오시드간 연결들을 이의 올리고뉴클레오티드 또는 부위와 함께 포함한다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 교대 뉴클레오시드간 연결 모티프를 가지는 부위를 포함한다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 균일하게 변형된 뉴클레오시드간 연결 부위를 포함한다. 이러한 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결에 의해 균일하게 연결된 부위를 포함한다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결에 의해 균일하게 연결된다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드의 각각의 뉴클레오시드간 연결은 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드의 각각의 뉴클레오

시드간 연결은 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트에서 선택되고 최소한 하나의 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트이다.

[0303] 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 최소한 6개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 최소한 8개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 최소한 10개의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 최소한 6개의 연속(consecutive) 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결의 최소한 하나의 블록을 포함한다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 최소한 8개의 연속 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결의 최소한 하나의 블록을 포함한다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 최소한 10개의 연속 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결의 최소한 하나의 블록을 포함한다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 최소한 12개의 연속 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결의 최소한 하나의 블록을 포함한다. 이러한 특정 구체예들에서, 최소한 하나의 이러한 블록은 올리고뉴클레오티드의 3' 단부에 배치된다. 이러한 특정 구체예들에서, 최소한 하나의 이러한 블록은 올리고뉴클레오티드의 3' 단부의 3개 뉴클레오시드들 내부에 배치된다.

[0304] 본 출원에 기재된 임의의 다양한 당 모티프들을 가지는 올리고뉴클레오티드들은 임의의 연결 모티프를 가질 수 있다. 예를 들면, 상기 기재된 것들을 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 올리고뉴클레오티드들은, 하기 비-제한적 표에서 선택된 연결 모티프를 가질 수 있다:

5' 에 가장 가까운 연결(5' most linkage)	중심 부위	3'-부위
PS	교대 PO/PS	6 PS
PS	교대 PO/PS	7 PS
PS	교대 PO/PS	8 PS

[0305]

[0306] ii. *siRNA 화합물*

[0307] 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 이중-가닥 RNAi 화합물 (siRNA)이다. 이러한 구체예들에서, 하나 또는 두 개의 가닥들은 ssRNA에 관해 상기 기재된 임의의 변형 모티프를 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, ssRNA 화합물은 비변형된 RNA 일 수 있다. 특정 구체예들에서, siRNA 화합물은 비변형된 RNA 뉴클레오시드들을 포함할 수 있으나, 변형된 뉴클레오시드간 연결들은 포함하지 않는다.

[0308] 몇몇 구체예들은 각 가닥이 하나 또는 그 이상의 변형된 또는 비변형된 뉴클레오시드들의 배치에 의해 정의되는 모티프를 포함하는 이중-가닥 조성물들에 관한 것이다. 특정 구체예들에서, 완전히 또는 적어도 부분적으로 혼성화하여 듀플렉스 부위를 형성하는 제 1 및 제 2 올리고머 화합물을 포함하고 핵산 표적에 상보적이고 이에 혼성화하는 부위를 추가로 포함하는 조성물들이 제공된다. 이러한 조성물은 핵산 표적에 완전한 또는 부분적 상보성을 가지는 안티센스 가닥인 제 1 올리고머 화합물 및 제 1 올리고머 화합물에 상보성인 하나 또는 그 이상의 부위들을 가져서 제 1 올리고머 화합물과 최소한 하나의 듀플렉스 부위를 형성하는 센스 가닥인 제 2 올리고머 화합물을 포함하는 것이 적절하다.

[0309] 몇몇 구체예들의 조성물들은 핵산 표적에 혼성화함으로써 정상적인 기능을 손실하게 하여 유전자 발현을 조절한다. 일부 구체예들에서, 표적 핵산은 TMPRSS6이다. 특정 구체예에서, 표적된 TMPRSS6의 분해는 본 발명의 조성물들로 형성되는 활성화 RISC 복합체에 의해 용이해진다.

[0310] 몇몇 구체예들은 가닥들 중 하나가, 예를 들면, 반대쪽 가닥의 RISC (또는 절단) 복합체로의 우선적 부하에 영향을 미치게 하는데 유용한 이중-가닥 조성물들에 관한 것이다. 이 조성물들은 선택된 핵산 분자들을 표적하여 하나 또는 그 이상의 유전자들의 발현을 조절함에 유용하다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물들은 표적 RNA의 한 부분에 혼성화하여 표적 RNA의 정상적 기능 손실을 가져온다.

[0311] 특정 구체예들은 두 가닥들 모두가 헤미머(hemimer) 모티프, 완전 변형된 모티프, 위치 변형된 모티프 또는 교대 모티프를 포함하는 이중-가닥 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물들의 각 가닥은 특정 역할, 예를 들

면, siRNA 경로를 이행하도록 변형될 수 있다. 각 가닥에서 상이한 모티프 또는 각 가닥에서 상이한 화학적 변형들을 가지는 동일한 모티프를 사용하는 것은 안티센스 가닥을 RISC 복합체에 대해 표적하는 것을 가능하게 하는 반면 센스 가닥의 혼입을 억제한다. 이러한 모델에서, 각 가닥은 독립적으로 변형되어 특정 역할에 대해 증강될 수 있다. 안티센스 가닥은 RISC의 한 부위에서 그 역할을 증강시키기 위해 5'-단부에서 변형될 수 있는 반면, 3'-단부는 RISC의 다른 부위에서 그 역할을 증강시키기 위해 상이하게 변형될 수 있다.

[0312] 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 분자들은 자기-상보적 센스 및 안티센스 부위들을 포함하는 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드 분자일 수 있으며, 여기서 안티센스 부위는 표적 핵산 분자 또는 이의 부분 내 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 센스 부위는 표적 핵산 서열 또는 이의 부분에 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 가진다. 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 분자는 2개의 별도의 올리고뉴클레오타이드들로부터 조합된 것일 수 있으며, 여기서 하나의 가닥은 센스 가닥이고 다른 하나의 가닥은 안티센스 가닥이며, 안티센스 및 센스 가닥들은 자기-상보적이고 (즉, 각각의 가닥은 다른 하나의 가닥 내 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는데; 가령, 안티센스 가닥과 센스 가닥은 듀플렉스 또는 이중-가닥 구조를 형성하고, 예를 들면, 이러한 이중-가닥 부위는 약 15 내지 약 30개, 예컨대, 약 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 염기쌍들이 존재하며; 안티센스 가닥은 표적 핵산 분자 또는 이의 부분 내 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 센스 가닥은 표적 핵산 서열 또는 이의 부분에 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다 (예컨대, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 분자의 약 15 내지 약 25개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드들은 표적 핵산 또는 이의 부분에 상보적이다). 대안적으로, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 단일 올리고뉴클레오타이드로부터 조합된 것이며, 여기서 siRNA의 자기-상보적 센스 및 안티센스 부위들은 핵산계 또는 비-핵산-계 연결기(들)에 의해 연결된다.

[0313] 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 듀플렉스, 비대칭 듀플렉스, 헤어핀 또는 비대칭 헤어핀 이차 구조를 가지며, 자기-상보적 센스 및 안티센스 부위들을 가지는 폴리뉴클레오타이드 일 수 있으며, 여기서 안티센스 부위는 별도의 표적 핵산 분자 또는 이의 부분 내 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 센스 부위는 표적 핵산 서열 또는 이의 부분에 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 가진다. 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 둘 또는 그 이상의 루프 구조들 및 자기-상보적 센스 및 안티센스 부위들을 포함하는 스템(stem)을 가지는 환형의 단일-가닥 폴리뉴클레오타이드 일 수 있고, 여기서 안티센스 부위는 표적 핵산 분자 또는 이의 부분 내 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 센스 부위는 표적 핵산 분자 또는 이의 부분에 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 환형 폴리뉴클레오타이드는 생체내 또는 시험관내에서 가공되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성 siRNA 분자를 생성할 수 있다.

[0314] 특정 구체예들에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 별도의 센스 및 안티센스 서열들 또는 부위들을 포함하고, 센스 및 안티센스 부위들은 해당 분야에 공지된 뉴클레오타이드 또는 비-뉴클레오타이드 연결기 분자들에 의해 공유적으로 연결되며, 또는 대안적으로 이온 상호작용, 수소 결합, 반 데르 발스 상호작용, 소수성 상호작용, 및/또는 적층 상호작용에 의해 비-공유적으로 연결된다. 특정 구체예들에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 표적 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또다른 구체예에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 표적 유전자의 발현 억제를 유발하도록 표적 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 상호작용한다.

[0315] 본 출원에서 사용되는, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드들은 오직 RNA만을 내포하는 분자들에 제한될 필요는 없으나, 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드 및 비-뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 특정 구체예들에서, 짧은 간섭 핵산 분자들은 2'-하이드록시 (2'-OH) 내포 뉴클레오타이드가 없다. 특정 구체예들에서 짧은 간섭 핵산들은 선택적으로 임의의 리보뉴클레오타이드들(예컨대, 2'-OH 그룹을 가지는 뉴클레오타이드들)을 포함하지 않는다. 그러나 RNAi를 보조하기 위해 분자 내 리보뉴클레오타이드들의 존재를 필요로하지 않는 이러한 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드들은 2'-OH 그룹을 가지는 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드들을 내포하는 부착 연결기 또는 또는 연결기들 또는 그 외 부착 또는 관련 그룹들, 모이어티, 또는 사슬들을 가질 수 있다. 선택적으로, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드들은 뉴클레오타이드 위치들의 약 5, 10, 20, 30, 40, 또는 50%에 리보뉴클레오타이드들을 포함할 수 있다. 본 출원에서 사용되는, 용어 siRNA는 서열 특이적 RNAi를 매개할 수 있는 핵산 분자들을 기재하기 위하여 사용되는 다른 용어들, 예를 들면, 짧은 간섭 RNA (siRNA), 이중-가닥 RNA (dsRNA), 마이크로-RNA (miRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 짧은 간섭 올리고뉴클레오타이드, 짧은 간섭 핵산, 짧은 간섭 변형 올리고뉴클레오타이드, 화학적으로 변형된 siRNA, 전사후 유전자 침묵 RNA (ptgsRNA), 및 기타와 균등한 의미를 가진다. 또한, 본 출원에서 사용되는 용어 RNAi는 서열 특이적 RNA 간섭을 기재하기 위해 사용되는 그 외 용어들, 가령, 전사후 유전자 침묵, 번역 억제, 또는 후성유전학과 균등한 의미를 가진다. 예를 들면, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드들은

전사후 수준 및 전사전 수준 모두에서 유전자들을 후성유전학적으로 침묵시키기 위해 사용될 수 있다. 한 비-제한적 예에서, 본 발명의 siRNA 분자들에 의한 유전자 발현의 후성유전학적 조절은 유전자 발현을 변화시키기 위한 염색질 구조 또는 메틸화 패턴의 siRNA 매개 변형으로부터 일어날 수 있다 (예를 들면, Verdel 등, 2004, Science, 303, 672-676; Pal-Bhadra 등, 2004, Science, 303, 669-672; Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe 등, 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; 및 Hall 등, 2002, Science, 297, 2232-2237 참고).

[0316] 본 출원에서 제공되는 몇몇 구체예들의 화합물 및 조성물들은 예컨대, "헤어핀" 또는 스템-루프 이중-가닥 RNA 이펙터 분자들을 포함한 dsRNA-매개된 유전자 침묵 또는 RNAi 기전에 의해 TMPRSS6를 표적할 수 있는 것으로 생각되는데, 여기서 자기-상보적 서열을 가진 단일 RNA 가닥은 이중-가닥 입체형태, 또는 듀플렉스 dsRNA 이펙터 분자들이 2개의 별도의 RNA 가닥들을 포함하는 것으로 가정할 수 있다. 다양한 구체예들에서, dsRNA는 전부 리보뉴클레오티드들로 구성되거나 리보뉴클레오티드와 데옥시뉴클레오티드의 혼합물, 가령, 예를 들면, 2000년 4월 19일에 출원된 WO 00/63364, 또는 1999년 4월 21일에 출원된 미국 가출원 60/130,377에 개시된 RNA/DNA 혼성체로 구성된다. dsRNA 또는 dsRNA 이펙터 분자는 자기-상보성 부위를 가지는 단일 분자여서, 이러한 분자의 한 분절 내 뉴클레오티드들이 분자의 또다른 분절 내 뉴클레오티드들과 염기 페어링 할 수 있다. 다양한 구체예들에서, 단일 분자로 이루어진 dsRNA는 전부 리보뉴클레오티드들로 구성되거나 데옥시리보뉴클레오티드들의 한 부위에 상보적인 리보뉴클레오티드들의 한 부위를 포함한다 대안적으로, dsRNA는 서로에 대해 상보적인 부위를 가지는 두 개의 상이한 가닥들을 포함할 수 있다.

[0317] 다양한 구체예들에서, 두 가닥들 모두가 전부 리보뉴클레오티드들로 구성되거나, 하나의 가닥이 전부 리보뉴클레오티드들로 구성되고 하나의 가닥이 전부 데옥시리보뉴클레오티드들로 구성되거나, 또는 하나 또는 두 가닥들 모두가 리보뉴클레오티드와 데옥시리보뉴클레오티드의 혼합물을 내포할 수 있다. 특정 구체예들에서, 상보성 부위들은 서로에 대해 그리고 표적 핵산 서열에 대해 최소한 70, 80, 90, 95, 98, 또는 100% 상보적이다. 특정 구체예들에서, 이중-가닥 입체형태에 존재하는 dsRNA 부위는 최소한 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 50, 75, 100, 200, 500, 1000, 2000 또는 5000개 뉴클레오티드들을 포함하거나 dsRNA에 나타나있는 cDNA 또는 그 외 표적 핵산 서열의 모든 뉴클레오티드들을 포함한다. 일부 구체예들에서, dsRNA는 임의의 단일 가닥 부위들, 가령, 단일 가닥 단부들을 내포하지 않거나, dsRNA는 헤어핀이다. 다른 구체예들에서, dsRNA는 하나 또는 그 이상의 단일 가닥 부위들 또는 오버행(overhang)들을 가진다. 특정 구체예들에서, RNA/DNA 혼성체는 (예컨대, 표적 핵산에 최소한 70, 80, 90, 95, 98, 또는 100% 상보성을 가지는) 안티센스 가닥 또는 부위인 DNA 가닥 또는 부위 그리고 (예컨대, 표적 핵산에 최소한 70, 80, 90, 95, 98, 또는 100% 동일성을 가지는) 센스 가닥 또는 부위인 RNA 가닥 또는 부위를 포함하며, 그 역도 가능하다.

[0318] 다양한 구체예들에서, RNA/DNA 혼성체는 효소적 또는 화학적 합성법들, 가령, 본 출원에 기재된 합성법들 또는 2000년 4월 19일 출원된 WO 00/63364, 또는 1999년 4월 21일 출원된 미국 가출원 60/130,377에 기재된 합성법들을 사용하여 시험관내 제조된다. 다른 구체예들에서, 시험관내 합성된 DNA 가닥은 DNA 가닥의 세포 내부로의 형질전환 이전, 이후 또는 형질전환과 동시에 생체내 또는 시험관내 제조된 RNA 가닥과 복합체를 이룬다. 또한 다른 구체예들에서, dsRNA는 센스 및 안티센스 부위를 내포하는 환형의 단일 핵산이거나, dsRNA는 제 2의 환형 핵산 또는 선형 핵산 중 하나와 하나의 환형 핵산을 포함한다 (예를 들면, 2000년 4월 19일 출원된 WO 00/63364, 또는 1999년 4월 21일 출원된 미국 가출원 60/130,377 참고). 예시적인 환형 핵산들은 뉴클레오티드의 유리 5' 포스포릴 그룹이 또다른 뉴클레오티드의 2' 하이드록실 그룹에 루프 백 방식(loop back fashion)으로 연결되는 라리아트(lariat) 구조들을 포함한다.

[0319] 다른 구체예들에서, dsRNA는 당의 2' 위치에 할로젠 (가령, 플루오린 그룹)을 내포하거나 알콕시 그룹 (가령, 메톡시 그룹)을 내포하는 하나 또는 그 이상의 변형된 뉴클레오티드들을 포함하는데, 이는 상응하는 2' 위치에 수소 또는 하이드록실 그룹을 내포하는 상응하는 dsRNA에 비해 시험관내 또는 생체내 dsRNA의 반감기를 증가시킨다. 또한 다른 구체예들에서, dsRNA는 인접 뉴클레오티드들 간에 자연-발생 포스포디에스테르 연결 이외의 하나 또는 그 이상의 연결들을 포함한다. 이러한 연결들의 예에는 포스포라미드, 포스포티오에이트, 및 포스포로티오에이트 연결들이 포함된다. dsRNA는 또한 미국 특허 6,673,661에 개시된 바와 같은 화학적으로 변형된 핵산 분자들 일 수 있다. 다른 구체예들에서, dsRNA는 예를 들면, 2000년 4월 19일에 출원된 WO 00/63364, 또는 1999년 4월 21일에 출원된 미국 가출원 60/130,377에 개시된 하나 또는 두 개의 캡핑된 가닥들을 내포한다.

[0320] 다른 구체예들에서, dsRNA는 적어도 부분적으로 WO 00/63364에 개시된 임의의 dsRNA 분자들, 및 미국 가출원 60/399,998; 및 미국 가출원 60/419,532, 및 PCT/US2003/033466에 기재된 임의의 dsRNA 분자들일 수 있으며,

상기 문헌의 개시내용은 본 출원에 참고문헌으로 포함된다. 임의의 dsRNA는 본 출원에 기재된 방법들 또는 표준 방법들, 가령, WO 00/63364에 기재된 방법들을 사용하여 시험관내 또는 생체내 발현될 수 있다.

- [0321]
- [0322] *점유*
- [0323] 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 RNase H를 통한 절단 또는 표적 핵산을 유도하거나 RISC 경로를 통한 절단 또는 격리를 유도할 것으로 예상되지 않는다. 이러한 특정 구체예들에서, 안티센스 활성은 점유로 인한 것일 수 있으며, 이 때 혼성화된 안티센스 화합물의 존재는 표적 핵산의 활성을 붕괴시킨다. 이러한 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 균일하게 변형될 수 있거나 변형들의 혼합 및/또는 변형된 그리고 비변형된 뉴클레오시드들을 포함할 수 있다.
- [0324] *표적 핵산, 표적 부위 및 뉴클레오티드 서열*
- [0325] TMPRSS6을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열들은, 제한없이, 다음을 포함한다 : GENBANK 등록 번호 NM_153609.2 (본 출원에서 서열 번호: 1로 포함됨), 16850000으로부터 16897000까지 절단된 GENBANK 등록번호 NT_011520.12의 보체 (본 출원에서 서열 번호: 2로 포함됨), GENBANK 등록 번호 CR456446.1 (본 출원에서 서열 번호: 3으로 포함됨), GENBANK 등록 번호 BC039082.1 (본 출원에서 서열 번호: 4로 포함됨), GENBANK 등록 번호 AY358398.1 (본 출원에서 서열 번호: 5로 포함됨), 또는 GENBANK 등록 번호 DB081153.1 (본 출원에서 서열 번호: 6으로 포함됨). 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 안티센스 화합물은 TMPRSS6을 인코딩하는 핵산 서열을 표적한다. 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 안티센스 화합물은 서열 번호: 1-6 중 임의의 서열을 표적한다.
- [0326] 본 출원에 포함된 실시예들에서 각 서열 번호에 제시된 서열은 당 모이어티, 뉴클레오시드간 연결, 또는 핵염기에 대한 임의의 변형과 무관함을 이해하여야 한다. 이렇게, 하나의 서열 번호에 의해 정의된 안티센스 화합물은 독립적으로, 당 모이어티, 뉴클레오시드간 연결, 또는 핵염기에 대한 하나 또는 그 이상의 변형들을 포함할 수 있다. Isis 번호 (Isis No)로 기재된 안티센스 화합물은 핵염기 서열 및 모티프의 조합을 표시한다.
- [0327] 특정 구체예들에서, 표적 부위는 표적 핵산 중 구조적으로 정의된 부위이다. 예를 들면, 표적 부위는 3' UTR, 5' UTR, 엑손, 인트론, 엑손/인트론 접합부, 코딩 부위, 번역 개시 부위, 번역 종결 부위, 또는 그 외 정의된 핵산 부위를 포함할 수 있다. TMPRSS6에 관해 구조적으로 정의된 부위들은 서열 데이터베이스, 가령, NCBI의 등록 번호에 의해 얻을 수 있으며 이러한 정보는 본 출원에 참고문헌으로 포함된다. 특정 구체예들에서, 표적 부위는 그 표적 부위 내 하나의 표적 분절의 5' 표적 부위로부터 그 표적 부위 내 또다른 표적 분절의 3' 표적 부위까지의 서열을 포함할 수 있다.
- [0328] 특정 구체예들에서, "표적 분절"은 핵산 내 표적 부위의 보다 작은 하위-부분이다. 예를 들면, 표적 분절은 하나 또는 그 이상의 안티센스 화합물이 표적되는 표적 핵산의 뉴클레오티드들의 서열일 수 있다. "5' 표적 부위"는 표적 분절의 5'에 가장 가까운 뉴클레오티드를 의미한다. "3' 표적 부위"는 표적 분절의 3'에 가장 가까운 뉴클레오티드를 의미한다.
- [0329] 표적화는 안티센스 화합물이 혼성화하여 바람직한 효과가 발생하는 최소한 하나의 표적 분절의 결정을 포함한다. 특정 구체예들에서, 바람직한 효과는 mRNA 표적 핵산 수준의 감소이다. 특정 구체예들에서, 바람직한 효과는 표적 핵산에 의해 인코딩되는 단백질 수준의 감소 또는 표적 핵산과 관련된 표현형 변화이다.
- [0330] 표적 부위는 하나 또는 그 이상의 표적 분절들을 내포할 수 있다. 표적 부위 내 복수의 표적 분절들은 중첩될 수 있다. 대안적으로, 이들은 비-중첩될 수 있다. 특정 구체예들에서, 표적 부위 내 표적 분절들은 약 300 개 이하의 뉴클레오티드들에 의해 분리될 수 있다. 특정 구체예들에서, 표적 부위 내 표적 분절들은 수많은 뉴클레오티드들에 의해 분리되는데, 이들 뉴클레오티드들은 표적 핵산 상의 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10개 뉴클레오티드들이거나, 대략 이러한 수치이거나, 그 이하이거나, 대략 그 이하이거나, 이들 수치들 중 임의의 2개에 의해 정의되는 범위이다. 특정 구체예들에서, 표적 부위 내 표적 분절들은 표적 핵산 상의 5개 이하, 또는 대략 5개 이하의 뉴클레오티드들에 의해 분리된다. 특정 구체예들에서, 표적 분절들은 인접해있다. 본 출원에서 열거된 5' 표적 부위들 또는 3' 표적 부위들 중 임의의 개시 핵산을 가지는 범위에 의해 정의된 표적 부위들이 고려된다.
- [0331] 적합한 표적 분절들은 5' UTR, 코딩 부위, 3' UTR, 인트론, 엑손, 또는 엑손/인트론 접합부 내에서 찾을 수 있다. 개시 코돈 또는 종결 코돈을 내포하는 표적 분절들 또한 적합한 표적 분절들이다. 적합한 표적 분절은 구조적으로 정의된 특정 부위, 가령, 개시 코돈 또는 종결 코돈을 특이적으로 배제시킬 수 있다.

- [0332] 적합한 표적 분절들의 결정은 유전체 전반에 걸친 다른 서열들에 대한 표적 핵산 서열의 비교를 포함할 수 있다. 예를 들면, BLAST 알고리즘은 상이한 핵산들간의 유사성 부위들을 식별하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 비교는 선택된 표적 핵산 이외의 서열 (즉, 비-표적 또는 오프-타겟 서열들)에 비-특이적 방식으로 혼성화할 수 있는 안티센스 화합물 서열들의 선택을 방지할 수 있다.
- [0333] 활성 표적 부위 내에서 안티센스 화합물의 활성 (예컨대, 표적 핵산 수준의 감소 백분율로 정의되는 바와 같은)의 변화가 존재할 수 있다. 특정 구체예들에서, TMPRSS6 mRNA 수준의 감소는 TMPRSS6 발현의 억제에 대한 지표이다. TMPRSS6 단백질 수준의 감소는 TMPRSS6 발현의 억제에 대한 지표이다. 더욱이, 표현형 변화는 TMPRSS6 발현의 억제에 관한 지표이다. 예를 들면, 헵시딘 발현 수준의 증가는 TMPRSS6 발현의 억제에 관한 지표가 될 수 있다. 또다른 예에서, 조직에서의 철 축적 감소는 TMPRSS6 발현의 억제에 관한 지표가 될 수 있다. 또다른 예에서, 트랜스페린의 포화 백분율 증가는 TMPRSS6 발현의 억제에 관한 지표가 될 수 있다.
- [0334] 혼성화
- [0335] 일부 구체예들에서, 혼성화는 본 출원에 개시된 안티센스 화합물과 TMPRSS6 핵산간에 발생한다. 가장 통상적인 혼성화 기전은 핵산 분자들의 상보적 핵염기 간의 수소 결합 (예컨대, 왓슨-크릭(Watson-Crick), 후그스틴(Hoogsteen) 또는 역 후그스틴(reversed Hoogsteen) 수소 결합)과 관련된다.
- [0336] 혼성화는 다양한 조건들하에 발생할 수 있다. 엄격한 조건들은 서열-의존적이며 혼성화되는 핵산 분자들의 성질 및 조성에 의해 결정된다.
- [0337] 서열이 표적 핵산에 특이적으로 혼성화가능한지 여부의 결정 방법은 해당 분야에 널리 공지되어 있다 (Sambrook 및 Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., 2001). 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 안티센스 화합물은 TMPRSS6 핵산과 특이적으로 혼성화가능하다.
- [0338] 상보성
- [0339] 안티센스 화합물 및 표적 핵산은 안티센스 화합물의 충분한 수의 핵염기들이 표적 핵산의 상응하는 핵염기와 수소 결합하여, 바람직한 효과(예컨대, 표적 핵산, 가령, TMPRSS6 핵산의 안티센스 억제)가 발생하게 될 경우 서로 상보적이다.
- [0340] 안티센스 화합물과 TMPRSS6 핵산 간 비-상보적인 핵염기들은 안티센스 화합물이 TMPRSS6 핵산에 대해 특이적으로 혼성화할 수 있게 유지됨을 조건으로 내약성을 떨 수 있다. 더욱이, 안티센스 화합물은 개입 또는 인접 분절들이 혼성화 발생시 관여되지 않도록 TMPRSS6 핵산의 하나 또는 그 이상의 분절들에 걸쳐 혼성화될 수 있다 (예컨대, 루프 구조, 미스매치 또는 헤어핀 구조).
- [0341] 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 안티센스 화합물 또는 이의 특정 부분은, TMPRSS6 핵산, 표적 부위, 표적 분절, 또는 이의 특정 부분에 대해 최소한 70%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 86%, 최소한 87%, 최소한 88%, 최소한 89%, 최소한 90%, 최소한 91%, 최소한 92%, 최소한 93%, 최소한 94%, 최소한 95%, 최소한 96%, 최소한 97%, 최소한 98%, 최소한 99%, 또는 100% 상보적이거나, 또는 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 상보적이다. 안티센스 화합물의 표적 핵산과의 상보성 백분율은 통상의 방법들을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들면, 안티센스 화합물의 20개 핵염기 중 18개가 표적 부위에 상보적이고 그에 따라 특이적으로 혼성화하게 되는 안티센스 화합물은 90 퍼센트 상보성을 나타낸다. 이 예에서, 비상보적인 잔여 핵염기는 상보적인 핵염기와 집락을 형성하거나 상보적인 핵염기들 사이에 배치될 수 있으며 서로에 또는 상보적인 핵염기에 인접할 필요가 없다. 이와 같이, 표적 핵산과 완전히 상보성인 두 개 부위들에 의해 플랭크된 4 개(네개)의 비-상보적인 핵염기를 가지는 18개 핵염기 길이의 안티센스 화합물은 표적 핵산과 총 77.8% 상보성을 가질 것이므로, 본 발명의 범위에 속하게 된다.
- [0342] 표적 핵산의 한 부위와 안티센스 화합물의 상보성 백분율은 해당 분야에 공지된 BLAST 프로그램 (기본적인 국소 정렬 조사 도구) 및 PowerBLAST 프로그램 (Altschul 등, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403 410; Zhang 및 Madden, Genome Res., 1997, 7, 649 656)을 사용하여 통상적으로 결정될 수 있다. 백분율 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은, 예를 들면, 디폴트 세팅을 이용하는 Gap 프로그램 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)을 사용하여 결정될 수 있는데, 이 프로그램은 Smith와 Waterman 알고리즘을 사용한다 (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482 489).
- [0343] 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 안티센스 화합물 또는 이의 특정 부분들은 표적 핵산 또는 이의 특정 부분에 대해 완전히 상보적이다 (즉, 100% 상보적이다). 예를 들면, 안티센스 화합물은 TMPRSS6 핵산, 또는 이

의 표적 부위, 또는 표적 분절 또는 표적 서열에 대해 완전히 상보적 일 수 있다. 본 출원에서 사용되는, "완전히 상보적"은 안티센스 화합물의 각각의 핵염기가 표적 핵산의 상응하는 핵염기와 정확히 염기 페어링 할 수 있음을 의미한다. 예를 들면, 20개 핵염기 안티센스 화합물은, 표적 핵산 중 이러한 안티센스 화합물에 완전히 상보적인 상응하는 20개 핵염기 부분이 존재하는 한 400개 핵염기 길이의 표적 서열에 대해 완전히 상보적이다. 완전히 상보적은 또한 제 1 및/또는 제 2 핵산의 특정 부분과 관련하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 30개 핵염기 안티센스 화합물 중 20개 핵염기 부분은 400개 핵염기 길이인 표적 서열에 "완전히 상보적"일 수 있다. 표적 서열이 상응하는 20개 핵염기 부분을 가지고 이 때 각각의 핵염기가 상기 안티센스 화합물의 20개 핵염기 부분에 상보적인 경우, 30개 핵염기 올리고뉴클레오티드 중 20개 핵염기 부분은 표적 서열에 완전히 상보적이다. 동시에, 상기 전체 30개 핵염기 안티센스 화합물은 안티센스 화합물의 나머지 10개 핵염기 또한 표적 서열에 상보적인지 여부에 따라 표적 서열에 완전히 상보적이거나 완전히 상보적이지는 않을 수도 있다.

[0344] 비-상보적인 핵염기의 배치는 안티센스 화합물의 5' 단부 또는 3' 단부에 있을 수 있다. 대안적으로, 비-상보적인 핵염기 또는 핵염기들은 안티센스 화합물의 내부 위치에 있을 수 있다. 둘 또는 그 이상의 비-상보적인 핵염기가 존재할 경우, 이들은 인접 (즉, 연결)하거나 인접하지 않을 수 있다. 한 구체예에서, 비-상보적인 핵염기는 겹머 안티센스 올리고뉴클레오티드의 텡 분절에 배치된다.

[0345] 특정 구체예들에서, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 핵염기 길이인 또는 최대 이러한 길이인 안티센스 화합물은 표적 핵산, 가령, TMRSS6 핵산, 또는 이의 특정 부분에 대해 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 비-상보적인 핵염기(들)을 포함한다.

[0346] 특정 구체예들에서, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 핵염기 길이인 또는 최대 이러한 길이인 안티센스 화합물은 표적 핵산, 가령, TMRSS6 핵산, 또는 이의 특정 부분에 대해 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 비-상보적인 핵염기(들)을 포함한다.

[0347] 본 출원에서 제공되는 안티센스 화합물은 또한 표적 핵산의 한 부분에 상보적인 화합물들을 포함한다. 본 출원에서 사용되는, "부분(portion)"은 표적 핵산의 부위 또는 분절 내에서 인접 (즉, 연결)된 핵염기의 정의된 수를 의미한다. "부분"은 또한 안티센스 화합물의 인접 핵염기의 정의된 수를 의미할 수도 있다. 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 최소한 8개 핵염기 부분에 상보적이다. 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 최소한 12개 핵염기 부분에 상보적이다. 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 최소한 15개 핵염기 부분에 상보적이다. 표적 분절의 최소한 9, 최소한 10, 최소한 11, 최소한 12, 최소한 13, 최소한 14, 최소한 15, 최소한 16, 최소한 17, 최소한 18, 최소한 19, 최소한 20개 또는 그 이상, 또는 이들 수치들 중 임의의 2개로 정의되는 범위의 핵염기 부분에 상보적인 안티센스 화합물 또한 고려된다.

[0348] 동일성

[0349] 본 출원에서 제공되는 안티센스 화합물은 명시된 Isis 번호로 나타내어지는 특정 뉴클레오티드 서열, 서열 번호, 또는 화합물 또는 이의 부분에 대해 정의된 동일성 백분율을 가질 수도 있다. 본 출원에서 사용될 때, 안티센스 화합물은 이것이 동일한 핵염기 페어링 능력을 가지는 경우 본 출원에 개시된 서열과 동일하다. 예를 들면, 개시된 DNA 서열에서 티미딘 대신 우라실을 내포하는 RNA는 우라실과 티미딘 모두가 아데닌과 페어링하기 때문에 DNA 서열과 동일한 것으로 고려될 것이다. 본 출원에 기재된 안티센스 화합물 뿐만 아니라 본 출원에서 제공되는 안티센스 화합물에 대해 비-동일성인 염기들을 가지는 화합물의 단축형 및 연장형 형태들 또한 고려된다. 비-동일성 염기들은 서로 인접하거나 안티센스 화합물 전체에 걸쳐 분산될 수 있다. 안티센스 화합물의 동일성 백분율은 비교되는 서열에 대해 동일한 염기 페어링을 가지는 염기들의 수에 따라 계산된다.

[0350] 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물, 또는 이의 부분들은, 본 출원에 개시된 하나 또는 그 이상의 안티센스 화합물 또는 서열 번호, 또는 이의 부분과 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 96%, 최소한 97%, 최소한 98%, 최소한 99% 또는 최소한 100% 동일하다.

[0351] 변형들

[0352] 뉴클레오시드는 염기-당 조합이다. 뉴클레오시드의 핵염기 (염기로도 공지됨) 부분은 보통 헤테로시클릭 염기 모이어티이다. 뉴클레오티드는 뉴클레오시드의 당 부분에 공유적으로 연결된 포스페이트 그룹을 추가로 포함하는 뉴클레오시드이다. 펜토피라노실 당을 포함하는 뉴클레오시드들에 있어서, 포스페이트 그룹은 당의 2', 3' 또는 5' 하이드록실 모이어티에 연결될 수 있다. 인접 뉴클레오시드들의 서로에 대한 공유 연결을 통해 올리고뉴클레오티드가 형성되어, 선형 폴리머 올리고뉴클레오티드를 형성한다. 올리고뉴클레오티드 구조 내에서, 포스

페이트 그룹들은 통상적으로 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오시드간 연결들을 형성하는 것으로 언급된다.

- [0353] 안티센스 화합물에 대한 변형은 뉴클레오시드간 연결, 당 모이어티, 또는 핵염기에 대한 치환 또는 변화를 포함한다. 변형된 안티센스 화합물은 흔히 바람직한 성질들, 가령, 예를 들면, 증강된 세포 흡수, 증강된 핵산 표적에 대한 친화도, 뉴클레아제 존재시 증가된 안정성, 또는 증가된 억제 활성으로 인해 고유 형태들 보다 바람직하다.
- [0354] 화학적으로 변형된 뉴클레오시드들은 또한 표적 핵산에 대한 단축형 또는 절단형 안티센스 올리고뉴클레오티드의 결합 친화도를 증가시키기 위하여 사용될 수 있다. 결과적으로, 이러한 화학적으로 변형된 뉴클레오시드들을 가지는 보다 짧은 안티센스 화합물을 이용하여 비슷한 결과들을 얻을 수 있다.
- [0355] 변형된 뉴클레오시드간 연결
- [0356] RNA와 DNA의 자연 발생 뉴클레오시드간 연결은 3' 에서 5' 포스포디에스테르 연결이다. 하나 또는 그 이상의 변형된, 즉, 비-자연 발생의, 뉴클레오시드간 연결들을 가지는 안티센스 화합물은 바람직한 성질, 가령, 예를 들면, 증강된 세포 흡수, 표적 핵산들에 대한 증강된 친화도, 및 뉴클레아제의 존재시 증가된 안정성으로 인해 자연 발생 뉴클레오시드간 연결들을 가지는 안티센스 화합물보다 더 흔히 선택된다.
- [0357] 변형된 뉴클레오시드간 연결들을 가지는 올리고뉴클레오티드는 인 원자를 보유하는 뉴클레오시드간 연결들 뿐만 아니라 인 원자를 가지지 않는 뉴클레오시드간 연결들을 포함한다. 대표적인 인 내포 뉴클레오시드간 연결들에는, 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 및 포스포로티오에이트가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 인-내포 및 비-인-내포 연결들의 제조방법들은 널리 공지되어 있다.
- [0358] 특정 구체예들에서, TMPRSS6 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물은 하나 또는 그 이상의 변형된 뉴클레오시드간 연결들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 변형된 뉴클레오시드간 연결들 중 최소한 하나는 포스포로티오에이트 연결들이다. 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물의 각각의 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결이다.
- [0359] 변형 당 모이어티
- [0360] 본 발명의 안티센스 화합물은 당 그룹이 변형되어 있는 하나 또는 그 이상의 뉴클레오시드들을 선택적으로 내포할 수 있다. 이러한 당 변형된 뉴클레오시드들은 증강된 뉴클레아제 안정성, 증가된 결합 친화도, 또는 일부 그 외 유익한 생물학적 성질들 안티센스 화합물에 부여할 수 있다. 특정 구체예들에서, 뉴클레오시드들은 화학적으로 변형된 리보퓨라노스 고리 모이어티를 포함한다. 화학적으로 변형된 리보퓨라노스 고리들의 예들에는, 치환 그룹들 (5' 및 2' 치환 그룹들 포함)의 부가, 바이시클릭 핵산 (BNA)을 형성하기 위한 비-제미날 고리 원자들의 가교, 리보실 고리 산소 원자의 S, N(R), 또는 C(R₁)(R₂) (R, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 H, C₁-C₁₂ 알킬 또는 보호 그룹임)로의 대체 및 이의 조합이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 화학적으로 변형된 당들의 예들에는 2'-F-5'-메틸 치환된 뉴클레오시드 (그 외 개시된 5', 2'-비스 치환된 뉴클레오시드들에 관하여 8/21/08에 공개된 PCT 국제출원 WO 2008/101157 참고) 또는 2'-위치에서 S로 추가 치환된 리보실 고리 산소 원자의 대체 (2005년 6월 16일에 공개된 미국 공개 특허 출원 US2005-0130923 참고) 또는 대안적으로 BNA의 5'-치환 (11/22/07에 공개된 PCT 국제출원 WO 2007/134181 참고, 여기서 LNA는 예를 들면, 5'-메틸 또는 5'-비닐 그룹으로 치환됨)이 포함된다.
- [0361] 변형된 당 모이어티를 가지는 뉴클레오시드들의 예에는 제한없이, 5'-비닐, 5'-메틸 (R 또는 S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃, 2'-OCH₂CH₃, 2'-OCH₂CH₂F 및 2'-O(CH₂)₂OCH₃ 치환 그룹들을 포함하는 뉴클레오시드들이 포함된다. 2' 위치에서의 치환체는 또한 알릴, 아미노, 아지도, 티오, O-알릴, O-C₁-C₁₀ 알킬, OCF₃, OCH₂F, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), 및 O-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n)에서 선택될 수 있으며, 여기서 각각의 R₁, R_m 및 R_n는, 독립적으로, H 또는 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬이다.
- [0362] 본 출원에서 사용되는, "바이시클릭 뉴클레오시드"는 바이시클릭 당 모이어티를 포함하는 변형된 뉴클레오시드들을 의미한다. 바이시클릭 핵산 (BNAs)의 예에는 4'과 2' 리보실 고리 원자들간의 가교를 포함하는 뉴클레오시드들이 제한없이 포함된다. 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 안티센스 화합물은 가교가 다음 화학식 중 하나를 포함하는 하나 또는 그 이상의 BNA 뉴클레오시드들을 포함한다: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (cEt) 및 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (그리고 이의 유사체들, 2008년 7

월 15일 등록된 미국 특허 7,399,845 참고); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (및 이의 유사체들, 2009년 1월 8일, WO/2009/006478로 공개된 PCT/US2008/068922 참고); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (및 이의 유사체들, 2008년 12월 11일 WO/2008/150729로 공개된 PCT/US2008/064591 참고); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (2004년 9월 2일 공개된 미국 공개 특허출원 US2004-0171570 참고); 4'-CH₂-N(R)-O-2', 여기서 R은 H, C₁-C₁₂ 알킬, 또는 보호 그룹임 (2008년 9월 23일 등록된 미국 특허 7,427,672 참고); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (Zhou 등의 문헌, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134 참고); 및 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (및 이의 유사체들, 2008년 12월 8일 WO 2008/154401로 공개된 PCT/US2008/066154 참고).

[0363] 또다른 바이시클릭 뉴클레오시드들이 공개된 문헌들에 기록되어 있다 (예를 들면: Srivastava 등, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129(26) 8362-8379; Frieden 등, *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372; Elayadi 등, *Curr. Opinion Invens. Drugs*, 2001, 2, 558-561; Braasch 등, *Chem. Biol.*, 2001, 8, 1-7; Orum 등, *Curr. Opinion Mol. Ther.*, 2001, 3, 239-243; Wahlestedt 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 5633-5638; Singh 등, *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin 등, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Kumar 등, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh 등, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; 미국 특허 제: 7,399,845; 7,053,207; 7,034,133; 6,794,499; 6,770,748; 6,670,461; 6,525,191; 6,268,490; 미국 공개 특허 제: US2008-0039618; US2007-0287831; US2004-0171570; 미국 특허 출원 번호: 12/129,154; 61/099,844; 61/097,787; 61/086,231; 61/056,564; 61/026,998; 61/026,995; 60/989,574; 국제 출원 WO 2007/134181; WO 2005/021570; WO 2004/106356; WO 99/14226; 및 PCT 국제 출원 제: PCT/US2008/068922; PCT/US2008/066154; 및 PCT/US2008/064591 참고). 전술한 바이시클릭 뉴클레오시드들 각각은, 예를 들면, α-L-리보푸라노스 및 β-D-리보푸라노스를 비롯한 하나 또는 그 이상의 입체화학적 당 구조를 가지도록 제조될 수 있다 (1999년 3월 25일 WO 99/14226로 공개된 PCT 국제 출원 PCT/DK98/00393 참고).

[0364] 본 출원에서 사용되는, "모노시클릭 뉴클레오시드"는 바이시클릭 당 모이어티가 아닌 변형 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드들을 의미한다. 특정 구체예들에서, 뉴클레오시드의 당 모이어티, 또는 당 모이어티 유사체는 임의의 위치에서 변형 또는 치환될 수 있다.

[0365] 본 출원에서 사용되는, "4'-2' 바이시클릭 뉴클레오시드" 또는 "4' 에서 2' 바이시클릭 뉴클레오시드"는 당 고리의 2' 탄소 원자와 4' 탄소 원자를 연결하는 푸라노스 고리의 2개의 탄소 원자들을 연결하는 가교를 포함하는, 푸라노스 고리를 포함하는 바이시클릭 뉴클레오시드를 의미한다.

[0366] 특정 구체예들에서, BNA 뉴클레오시드들의 바이시클릭 당 모이어티에는, $-\text{C}(\text{R}_a)(\text{R}_b)_n-$, $-\text{C}(\text{R}_a)=\text{C}(\text{R}_b)-$, $-\text{C}(\text{R}_a)=\text{N}-$, $-\text{C}(=\text{NR}_a)-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{O}-$, $-\text{Si}(\text{R}_a)_2-$, $-\text{S}(=\text{O})_x-$, 및 $-\text{N}(\text{R}_a)-$ 에서 독립적으로 선택된 1 또는 1 내지 4개 연결 그룹들을 포함하는 가교를 포함하는 (이에 제한되지 않음), 펜토푸라노실 당 모이어티의 4' 및 2' 탄소 원자들 간에 최소한 하나의 가교를 가지는 화합물이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니며; 여기서: x는 0, 1, 또는 2이고; n은 1, 2, 3, 또는 4이고; R_a 및 R_b 각각은 독립적으로, H, 보호 그룹, 하이드록실, C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알키닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알키닐, C₅-C₂₀ 아릴, 치환된 C₅-C₂₀ 아릴, 헤테로시클 라디칼, 치환된 헤테로시클 라디칼, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, C₅-C₇ 알리시클릭 라디칼, 치환된 C₅-C₇ 알리시클릭 라디칼, 할로젠, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, 아실 (C(=O)-H), 치환된 아실, CN, 설포닐 (S(=O)₂-J₁), 또는 설포실 (S(=O)-J₁)이고; 그리고

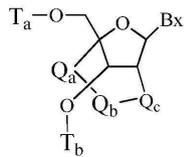
[0367] 각각의 J₁ 및 J₂는, 독립적으로, H, C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알키닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알키닐, C₅-C₂₀ 아릴, 치환된 C₅-C₂₀ 아릴, 아실 (C(=O)-H), 치환된 아실, 헤테로시클 라디칼, 치환된 헤테로시클 라디칼, C₁-C₁₂ 아미노알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 아미노알킬 또는 보호 그룹이다.

[0368] 특정 구체예들에서, 바이시클릭 당 모이어티의 가교는 $-\text{C}(\text{R}_a)(\text{R}_b)_n-$, $-\text{C}(\text{R}_a)(\text{R}_b)_n\text{O}-$, $-\text{C}(\text{R}_a\text{R}_b)-\text{N}(\text{R})-\text{O}-$ 또는 $??\text{C}(\text{R}_a\text{R}_b)-\text{O}-\text{N}(\text{R})-$ 이다. 특정 구체예들에서, 가교는 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2' 및 4'-CH₂-N(R)-O-2'-이고, 여기서 각각의 R은, 독립적으로, H, 보호 그룹 또는 C₁-C₁₂ 알킬이다.

[0369] 특정 구체예들에서, 바이시클릭 뉴클레오시드들은 이성질체 배열에 의해 추가로 정의된다. 예를 들면, 4'-(CH₂)-O-2' 가교를 포함하는 뉴클레오시드는 α-L 배열 또는 β-D 배열로 존재할 수 있다. 종래에, α-L-메틸렌옥시 (4'-CH₂-O-2') BNA는 안티센스 활성을 보였던 안티센스 올리고뉴클레오티드들로 혼입되었다 (Frieden 등, *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372).

[0370] 특정 구체예들에서, 바이시클릭 뉴클레오시드들은 4' 에서 2' 가교를 가지는 것들을 포함하며, 여기서 이러한 가교들은, α-L-4'-(CH₂)-O-2', β-D-4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2', 4'-CH₂-N(R)-O-2', 4'-CH(CH₃)-O-2', 4'-CH₂-S-2', 4'-CH₂-N(R)-2', 4'-CH₂-CH(CH₃)-2', 및 4'-(CH₂)₃-2'를 제한없이 포함하고, R은 H, 보호 그룹 또는 C₁-C₁₂ 알킬이다.

[0371] 특정 구체예에서, 바이시클릭 뉴클레오시드들은 다음 화학식을 가진다:



[0372]

[0373] 여기서:

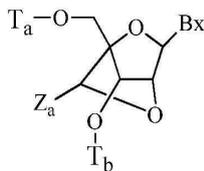
[0374] Bx는 헤테로시클릭 염기 모이어티이고;

[0375] -Q_a-Q_b-Q_c-는 -CH₂-N(R_c)-CH₂-, -C(=O)-N(R_c)-CH₂-, -CH₂-O-N(R_c)-, -CH₂-N(R_c)-O- 또는 -N(R_c)-O-CH₂이고;

[0376] R_c는 C₁-C₁₂ 알킬 또는 아미노 보호 그룹이고; 그리고

[0377] T_a 및 T_b는 각각, 독립적으로 H, 하이드록실 보호 그룹, 공액체 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티 또는 지지 매질(support medium)에 대한 공유 부착이다.

[0378] 특정 구체예들에서, 바이시클릭 뉴클레오시드들은 다음 화학식을 가진다:



[0379]

[0380] 여기서:

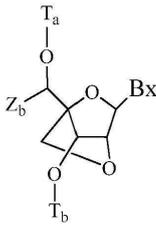
[0381] Bx는 헤테로시클릭 염기 모이어티이고;

[0382] T_a 및 T_b는 각각, 독립적으로 H, 하이드록실 보호 그룹, 공액체 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티 또는 지지 매질(support medium)에 대한 공유 부착이고;

[0383] Z_a는 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알키닐, 치환된 C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₂-C₆ 알케닐, 치환된 C₂-C₆ 알키닐, 아실, 치환된 아실, 치환된 아미드, 티올 또는 치환된 티올이다.

[0384] 한 구체예에서, 각각의 치환 그룹들은, 독립적으로, 할로겐, 옥소, 하이드록실, OJ_c, NJ_cJ_d, SJ_c, N₃, OC(=X)J_c, 및 NJ_cC(=X)NJ_cJ_d에서 독립적으로 선택된 치환 그룹들로 단일 또는 다중치환되며, 여기서 각각의 J_c, J_d 및 J_e는, 독립적으로, H, C₁-C₆ 알킬, 또는 치환된 C₁-C₆ 알킬이고 X는 O 또는 NJ_c이다.

[0385] 특정 구체예들에서, 바이시클릭 뉴클레오시드들은 다음 화학식을 가진다:



[0386]

[0387] 여기서:

[0388]

Bx는 헤테로시클릭 염기 모이어티이고;

[0389]

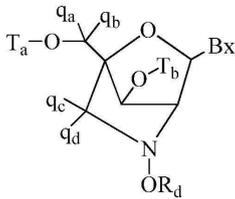
T_a 및 T_b는 각각, 독립적으로 H, 하이드록실 보호 그룹, 공액체 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티 또는 지지 매질(support medium)에 대한 공유 부착이고;

[0390]

Z_b는 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알키닐, 치환된 C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₂-C₆ 알케닐, 치환된 C₂-C₆ 알키닐 또는 치환된 아실 (C(=O)-)이다.

[0391]

특정 구체예들에서, 바이시클릭 뉴클레오시드들은 다음 화학식을 가진다:



[0392]

[0393] 여기서:

[0394]

Bx는 헤테로시클릭 염기 모이어티이고;

[0395]

T_a 및 T_b는 각각, 독립적으로 H, 하이드록실 보호 그룹, 공액체 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티 또는 지지 매질(support medium)에 대한 공유 부착이고;

[0396]

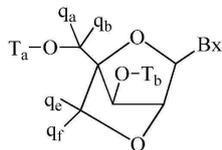
R_d는 C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, 치환된 C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알키닐 또는 치환된 C₂-C₆ 알키닐이고;

[0397]

각각의 q_a, q_b, q_c 및 q_d는, 독립적으로, H, 할로젠, C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, 치환된 C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알키닐 또는 치환된 C₂-C₆ 알키닐, C₁-C₆ 알콕실, 치환된 C₁-C₆ 알콕실, 아실, 치환된 아실, C₁-C₆ 아미노알킬 또는 치환된 C₁-C₆ 아미노알킬이다;

[0398]

특정 구체예들에서, 바이시클릭 뉴클레오시드들은 다음 화학식을 가진다:



[0399]

[0400] 여기서:

[0401]

Bx는 헤테로시클릭 염기 모이어티이고;

[0402]

T_a 및 T_b는 각각, 독립적으로 H, 하이드록실 보호 그룹, 공액체 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티 또는 지지 매질(support medium)에 대한 공유 부착이고;

[0403]

q_a, q_b, q_c 및 q_d는 각각, 독립적으로, 수소, 할로젠, C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알키닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알키닐, C₁-C₁₂ 알콕시, 치환된 C₁-C₁₂ 알콕시, OJ_j, SJ_j, SOJ_j,

SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k 또는 N(H)C(=S)NJ_jJ_k이고;

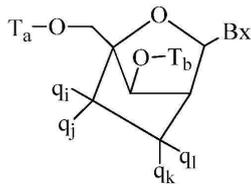
[0404] 또는 q_e 및 q_r는 함께 =C(q_e)(q_h)이고;

[0405] q_e 및 q_h는 각각, 독립적으로, H, 할로젠, C₁-C₁₂ 알킬 또는 치환된 C₁-C₁₂ 알킬이다.

[0406] 4'-CH₂-O-2' 가교를 가지는 아데닌, 시토신, 구아닌, 5-메틸-시토신, 티민 및 우라실 바이시클릭 뉴클레오시드들의 합성 및 제조 및 올리고머화, 및 핵산 인식 성질은 이미 기재된 바 있다 (Koshkin 등, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630). 바이시클릭 뉴클레오시드들의 합성은 또한 WO 98/39352 및 WO 99/14226에서 설명된 바 있다.

[0407] 4'에서 2' 가교 그룹, 가령, 4'-CH₂-O-2' 및 4'-CH₂-S-2'을 가지는 다양한 바이시클릭 뉴클레오시드들의 유사체들 또한 이미 제조된 바 있다 (Kumar 등, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222). 핵산 중합효소들에 대한 기질로서 사용하기 위한 바이시클릭 뉴클레오시드들을 포함하는 올리고데옥시리보뉴클레오티드 듀플렉스들의 제조 또한 설명된 바 있다 (Wengel 등, WO 99/14226). 더욱이, 입체적으로 제한된 높은-친화도의 신규한 올리고뉴클레오티드 유사체인 2'-아미노-BNA의 합성은 해당 분야에서 이미 기재된 바 있다 (Singh 등, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039). 또한, 2'-아미노- 및 2'-메틸아미노-BNA가 제조된 바 있으며, 상보적인 RNA 및 DNA 가닥들을 가지는 이들의 듀플렉스의 열 안정성이 이미 보고된 바 있다.

[0408] 특정 구체예들에서, 바이시클릭 뉴클레오시드들은 다음 화학식을 가진다:



[0409]

[0410] 여기서:

[0411] Bx는 헤테로시클릭 염기 모이어티이고;

[0412] T_a 및 T_b는 각각, 독립적으로 H, 하이드록실 보호 그룹, 공액체 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티 또는 지지 매질(support medium)에 대한 공유 부착이고;

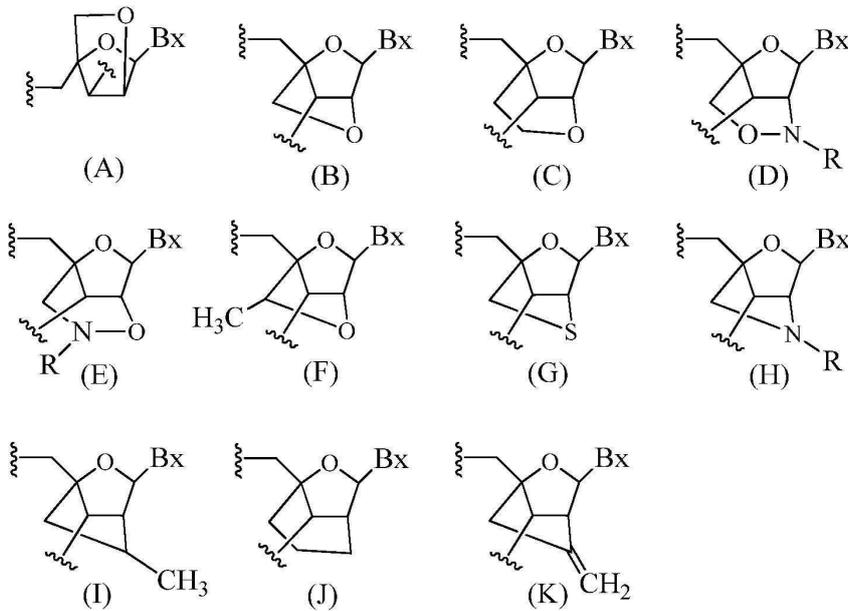
[0413] 각각의 q_i, q_j, q_k 및 q_l은, 독립적으로, H, 할로젠, C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알키닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알키닐, C₁-C₁₂ 알콕실, 치환된 C₁-C₁₂ 알콕실, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k 또는 N(H)C(=S)NJ_jJ_k이고; 그리고

[0414] q_i와 q_j 또는 q_l과 q_k는 함께 =C(q_e)(q_h)이고, 여기서 q_e 및 q_h 각각은 독립적으로, H, 할로젠, C₁-C₁₂ 알킬 또는 치환된 C₁-C₁₂ 알킬이다.

[0415] 4'-(CH₂)₃-2' 가교 및 알케닐 유사체 가교 4'-CH=CH-CH₂-2'를 가지는 하나의 카르보시클릭 바이시클릭 뉴클레오시드가 기재된 바 있다 (Frier 등, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443 및 Albaek 등, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740). 카르보시클릭 바이시클릭 뉴클레오시드들의 합성 및 제조 및 이들의 올리고머화 및 생화학적 연구가 기재된 바 있다 (Srivastava 등, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129(26), 8362-8379).

[0416] 특정 구체예들에서, 바이시클릭 뉴클레오시드들에는, 아래 도시된 바와 같은 (A) α-L-메틸렌옥시 (4'-CH₂-O-2') BNA, (B) β-D-메틸렌옥시 (4'-CH₂-O-2') BNA, (C) 에틸렌옥시 (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, (D) 아미노옥시 (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA, (E) 옥시아미노 (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA, (F) 메틸(메틸렌옥시) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (속박된 에틸 또는 cEt로도 언급됨), (G) 메틸렌-티오 (4'-CH₂-S-2') BNA, (H) 메틸렌-아미노 (4'-CH₂-

N(R)-2') BNA, (I) 메틸 카르보시클릭 (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA, (J) 프로필렌 카르보시클릭 (4'-(CH₂)₃-2') BNA, 및 (K) 비닐 BNA가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.



[0417]

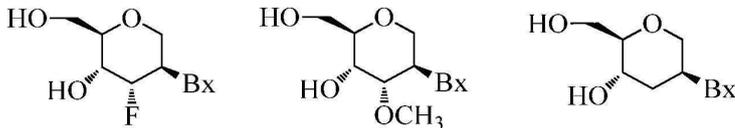
[0418]

여기서 Bx는 염기 모이어티이고 R은, 독립적으로, H, 보호 그룹, C₁-C₆ 알킬 또는 C₁-C₆ 알콕시이다.

[0419]

본 출원에서 사용되는 용어 "변형된 테트라히드로피란 뉴클레오시드" 또는 "변형된 THP 뉴클레오시드" 는 정상 뉴클레오시드에서 펜토퓨라노실 잔기에 대해 치환된 6원의 테트라히드로피란 "당"을 가지는 뉴클레오시드를 의미하며 당 대응체로 언급될 수 있다. 변형된 THP 뉴클레오시드들에는, 헥시톨 핵산 (HNA), 아니톨 핵산 (ANA), 마니톨 핵산 (manitol nucleic acid, MNA) (Leumann, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, 10, 841-854 참고) 또는 아래 도시된 테트라하이드로피라닐 고리계를 가지는 플루오로 HNA (F-HNA)로 해당 분야에서 언급되는 것이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

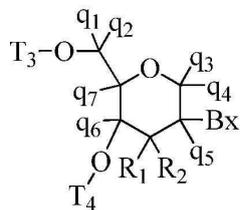
[0420]



[0421]

특정 구체예에서, 다음 화학식을 가지는 당 대응체들이 선택된다:

[0422]



[0423]

여기서:

[0424]

Bx는 헤테로시클릭 염기 모이어티이고;

[0425]

T₃ 및 T₄는 각각, 독립적으로, 테트라히드로피란 뉴클레오시드 유사체를 올리고머 화합물에 연결하는 뉴클레오시드간 연결 그룹이거나 T₃ 및 T₄ 중 하나는 테트라히드로피란 뉴클레오시드 유사체를 올리고머 화합물 또는 올리고뉴클레오티드에 연결하는 뉴클레오시드간 연결 그룹이고 T₃ 및 T₄ 중 다른 하나는 H, a 하이드록실 보호 그룹, 연결된 공액체 그룹 또는 5' 또는 3'-말단 그룹이고;

[0426]

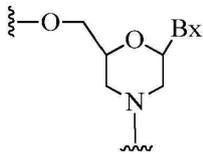
q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ 및 q₇은 각각 독립적으로, H, C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, 치환

된 C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알킬닐 또는 치환된 C₂-C₆ 알킬닐이고; 그리고

[0427] R₁ 및 R₂ 중 하나는 수소이고 다른 하나는 할로젠, 치환된 또는 비치환된 알콕시, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ 및 CN에서 선택되며, 여기서 X는 O, S 또는 NJ₁이고 각각의 J₁, J₂ 및 J₃는, 독립적으로, H 또는 C₁-C₆ 알킬이다.

[0428] 특정 구체예들에서, q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ 및 q₇은 각각 H이다. 특정 구체예들에서, q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ 및 q₇ 중 최소한 하나는 H가 아니다. 특정 구체예들에서, q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ 및 q₇ 중 최소한 하나는 메틸이다. 특정 구체예들에서, R₁ 및 R₂ 중 하나가 F인 THP 뉴클레오시드들이 제공된다. 특정 구체예들에서, R₁은 플루오로이고 R₂는 H이며; R₁은 메톡시이고 R₂는 H이며, 그리고 R₁은 메톡시에톡시이고 R₂는 H이다.

[0429] 특정 구체예들에서, 당 대용체들은 5개 초과와 1개 초과와 헤테로원자를 가지는 고리를 포함한다. 예를 들면, 모르폴리노 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드들 및 이들의 올리고머 화합물에서의 용도가 보고된 바 있다 (예를 들면: Braasch 등, *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510; 및 미국 특허 5,698,685; 5,166,315; 5,185,444; 및 5,034,506 참고). 본 출원에서 사용되는 용어 "모르폴리노"는 다음 화학식을 가지는 당 대용체를 의미한다:

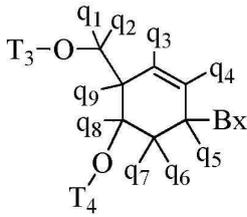


[0430]

[0431] 특정 구체예들에서, 모르폴리노는, 예를 들면, 상기 모르폴리노 구조에서 다양한 치환 그룹들을 부가 또는 변화 시킴으로써 변형될 수 있다. 이러한 당 대용체들은 본 출원에서 "변형된 모르폴리노"로 언급된다.

[0432] 또한 변형들의 조합, 가령, 2'-F-5'-메틸 치환된 뉴클레오시드 (그 외 5', 2'-비스 치환된 뉴클레오시드들도 개시에 관하여, 8/21/08에 공개된 PCT 국제 출원 WO 2008/101157 참고) 및 리보실 고리 산소 원자의 S로의 대체와 2'-위치에서의 추가 치환 (2005년 6월 16일 공개된 미국 공개 특허 출원 US2005-0130923 참고) 또는 대안적으로 바이시클릭 핵산의 5'-치환 (11/22/07 공개된 PCT 국제 출원 WO 2007/134181 참고, 여기서 4'-CH₂-O-2' 바이시클릭 뉴클레오시드는 5' 위치에서 5'-메틸 또는 5'-비닐 그룹으로 추가 치환됨)도 제한없이 제공된다. 카르보시클릭 바이시클릭 뉴클레오시드들의 합성 및 제조 및 이들의 올리고머화 및 생화학적 연구가 기재된 바 있다 (예컨대, Srivastava 등, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129(26), 8362-8379 참고).

[0433] 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 하나 또는 그 이상의 변형된 시클로헥세닐 뉴클레오시드들을 포함하는데, 이는 자연 발생 뉴클레오시드에서 펜토피라노실 잔기 대신 6원의 시클로헥세닐을 가지는 뉴클레오시드이다. 변형된 시클로헥세닐 뉴클레오시드들에는, 해당 분야에서 기재된 것들이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다 (예를 들면, 통상적으로, 2010년 4월 10일 공개된 PCT 공개 출원 WO 2010/036696, Robeyns 등, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130(6), 1979-1984; Horvath 등, *Tetrahedron Letters*, 2007, 48, 3621-3623; Nauwelaerts 등, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129(30), 9340-9348; Gu 등, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2005, 24(5-7), 993-998; Nauwelaerts 등, *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(8), 2452-2463; Robeyns 등, *Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2005, F61(6), 585-586; Gu 등, *Tetrahedron*, 2004, 60(9), 2111-2123; Gu 등, *Oligonucleotides*, 2003, 13(6), 479-489; Wang 등, *J. Org. Chem.*, 2003, 68, 4499-4505; Verbeure 등, *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(24), 4941-4947; Wang 등, *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 8478-82; Wang 등, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2001, 20(4-7), 785-788; Wang 등, *J. Am. Chem.*, 2000, 122, 8595-8602; PCT 공개 출원, WO 06/047842; 및 PCT 공개 출원 WO 01/049687 참고; 각 내용은 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다). 특정한 변형된 시클로헥세닐 뉴클레오시드들은 다음 화학식 X를 가진다.



[0434]

[0435]

[0436]

[0437]

[0438]

[0439]

[0440]

[0441]

[0442]

[0443]

X

여기서 화학식 X의 상기 최소한 하나의 시클로헥세닐 뉴클레오시드 유사체 각각은 독립적으로:

Bx는 헤테로시클릭 염기 모이어티이고;

T₃ 및 T₄는 각각, 독립적으로, 시클로헥세닐 뉴클레오시드 유사체를 안티센스 화합물에 연결시키는 뉴클레오시드간 연결 그룹이거나 T₃ 및 T₄ 중 하나는 테트라히드로피란 뉴클레오시드 유사체를 안티센스 화합물에 연결시키는 뉴클레오시드간 연결 그룹이고 T₃ 및 T₄ 중 다른 하나는 H, 하이드록실 보호 그룹, 연결된 공액체 그룹, 또는 5'- 또는 3'-말단 그룹이고; 그리고

q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆, q₇, q₈ 및 q₉는 각각, 독립적으로, H, C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, 치환된 C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알키닐, 치환된 C₂-C₆ 알키닐 또는 그 외 당 치환 그룹이다.

본 출원에서 제공되는 올리고머 화합물로의 혼입을 위해 뉴클레오시드들을 변형시키는데 사용될 수 있는 그 외 많은 모노시클릭, 바이시클릭 및 트리시클릭 고리계는 해당 분야에 공지이며 당 대응체로 적합하다 (예를 들면, 논문: Leumann, Christian J. *Bioorg. & Med. Chem.*, 2002, 10, 841-854 참고). 이러한 고리계는 이들의 활성을 더욱 증강시키기 위해 다양한 추가 치환을 거칠 수 있다.

본 출원에서 사용되는, "2'-변형된 당"은 2' 위치에서 변형된 퓨라노실 당을 의미한다. 특정 구체예들에서, 이러한 변형들은 다음에서 선택된 치환체들을 포함한다: 치환된 및 비치환된 알콕시, 치환된 및 비치환된 티오알킬, 치환된 및 비치환된 아미노 알킬, 치환된 및 비치환된 알킬, 치환된 및 비치환된 알릴, 그리고 치환된 및 비치환된 알키닐을 포함한 할라이드 (그러나 이에 제한되는 것은 아님). 특정 구체예들에서, 2' 변형들은 다음을 포함하는 치환체들에서 선택되거나 이에 제한되는 것은 아니다: O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nF, O(CH₂)_nONH₂, OCH₂C(=O)N(H)CH₃, 및 O(CH₂)_nN[(CH₂)_nCH₃]₂, 여기서 n 및 m은 1 내지 약 10이다. 그 외 2'- 치환 그룹들은 또한 다음에서 선택될 수 있다: C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 알키닐, 알카릴, 아랄킬, O-알카릴 또는 O-아랄킬, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, F, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 헤테로시클로알킬, 헤테로시클로알카릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단 그룹(cleaving group), 리포터 그룹(reporter group), 인터칼레이터, 약동학적 성질을 향상시키는 그룹, 또는 안티센스 화합물의 약력학적 성질을 향상시키는 그룹, 및 유사한 성질을 가지는 그 외 치환체들. 특정 구체예들에서, 변형된 뉴클레오시드들은 2'-MOE 측쇄를 포함한다 (Baker 등, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 11944-12000). 이러한 2'-MOE 치환은 비변형된 뉴클레오시드 및 그 외 변형된 뉴클레오시드들, 가령, 2'- O-메틸, O-프로필, 및 O-아미노 프로필에 비해 향상된 결합 친화도를 가지는 것으로 기재된 바 있다. 2'-MOE 치환체를 가지는 올리고뉴클레오티드들은 또한 생체내 사용에 유망한 특징들을 가지는 유전자 발현의 안티센스 억제제임이 밝혀진 바 있다 (Martin, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Altmann 등, *Chimia*, 1996, 50, 168-176; Altmann 등, *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 630-637; 및 Altmann 등, *Nucleosides Nucleotides*, 1997, 16, 917-926).

본 출원에서 사용되는, "2'-변형된" 또는 "2'-치환된"은 2' 위치에 H 또는 OH 이외의 치환체를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오시드들을 의미한다. 2'-변형된 뉴클레오시드들에는, 비-가교 2' 치환체들, 가령, 알릴, 아미노, 아지도, 티오, O-알릴, O-C₁-C₁₀ 알킬, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), 또는 O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)을 가지며, 여기서 각각의 R_m 및 R_n은, 독립적으로, H 또는 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬인 뉴클레오시드들이 포함되거나 이에 제한되는 것은 아니다. 2'-변형된 뉴클레오시드들은 당의 다른 위치들에서 및/또는 핵염기에서 다른 변형들을 추가로 포함할 수 있다.

본 출원에서 사용되는, "2'-F"는 당 고리의 2' 위치에 플루오로 그룹을 포함하는 당을 포함한 뉴클레오시드들을

의미한다.

- [0444] 본 출원에서 사용되는, "2'-OMe" 또는 "2'-OCH₃", "2'-O-메틸" 또는 "2'-메톡시" 각각은 당 고리의 2' 위치에 -OCH₃ 그룹을 포함하는 당을 포함한 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0445] 본 출원에서 사용되는, "MOE" 또는 "2'-MOE" 또는 "2'-OCH₂CH₂OCH₃" 또는 "2'-O-메톡시에틸" 각각은 당 고리의 2' 위치에 -OCH₂CH₂OCH₃ 그룹을 포함하는 당을 포함한 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0446] 변형된 당들의 제조 방법들은 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 널리 공지되어 있다. 이러한 변형된 당의 제조를 개시하는 몇몇 대표적인 미국 특허들에는 U.S.: 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,670,633; 5,700,920; 5,792,847 및 6,600,032, 그리고 2005년 12월 22일 WO 2005/121371로 공개된, 2005년 6월 2일 출원된 국제 출원 PCT/US2005/019219가 포함되나 이에 제한되지 않으며, 이들 각각은 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다.
- [0447] 본 출원에서 사용되는, "올리고뉴클레오티드"는 복수의 연결된 뉴클레오시드들을 포함하는 화합물을 의미한다. 특정 구체예들에서, 복수의 뉴클레오시드들 중 하나 또는 그 이상은 변형된다. 특정 구체예들에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 또는 그 이상의 리보뉴클레오시드 (RNA) 및/또는 데옥시리보뉴클레오시드 (DNA)를 포함한다.
- [0448] 변형된 당 모이어티를 가지는 뉴클레오티드들에서, 핵염기 모이어티 (자연, 변형된 또는 이의 조합)는 적절한 핵산 표적과의 혼성화를 위해 유지된다.
- [0449] 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 변형된 당 모이어티를 가지는 하나 또는 그 이상의 뉴클레오시드들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 변형된 당 모이어티는 2'-MOE이다. 특정 구체예들에서, 2'-MOE 변형된 뉴클레오시드들은 깎머 모티프에 배열된다. 특정 구체예들에서, 변형된 당 모이어티는 (4'-CH(CH₃)-O-2') 가교 그룹 (bridging group)를 가지는 바이시클릭 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, (4'-CH(CH₃)-O-2') 변형된 뉴클레오시드들은 깎머 모티프의 링 전반에 걸쳐 배열된다.
- [0450] 변형된 핵염기
- [0451] 핵염기 (또는 염기) 변형 또는 치환은 자연 발생 또는 합성의 비변형된 핵염기와 구조적으로 구별가능하나 기능적으로는 교환가능하다. 자연 및 변형된 핵염기 모두는 수소 결합에 참여할 수 있다. 이러한 핵염기 변형들은 뉴클레아제 안정성, 결합 친화도 또는 몇몇 그 외 유익한 생물학적 성질을 안티센스 화합물에 부여할 수 있다. 변형된 핵염기에는, 합성 및 자연 핵염기, 가령, 예를 들면, 5-메틸시토신 (5-me-C)이 포함된다. 5-메틸시토신 치환을 비롯한 특정 핵염기 치환들은 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 예를 들면, 5-메틸시토신 치환은 핵산 듀플렉스 안정성을 0.6-1.2°C만큼 증가시키는 것으로 밝혀진 바 있다 (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278).
- [0452] 또다른 비변형된 핵염기들에는 5-하이드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌과 구아닌의 6-메틸 및 그 외 알킬 유도체들, 아데닌과 구아닌의 2-프로필 및 그 외 알킬 유도체들, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 (-C≡C-CH₃) 우라실 및 시토신 및 피리미딘 염기의 그 외 알킬닐 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (수도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 그 외 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히, 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 그 외 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 그리고 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌이 포함된다.
- [0453] 헤테로시클릭 염기 모이어티는 퓨린 또는 피리미딘 염기가 그 외 헤테로시클, 예를 들면, 7-데아자-아데닌, 7-데아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈으로 대체되어 있는 모이어티들을 또한 포함할 수 있다. 안티센스 화합물의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용한 핵염기들에는 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 비롯한 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린이 포함된다.
- [0454] 특정 구체예들에서, TMPRSS6 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물은 하나 또는 그 이상의 변형된 핵염기들을 포

함한다. 특정 구체예들에서, TMPRSS6 핵산에 대해 표적된 확장-갭 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 또는 그 이상의 변형된 핵염기들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 변형된 핵염기들 중 최소한 하나는 5-메틸시토신이다. 특정 구체예들에서, 각각의 시토신은 5-메틸시토신이다.

[0455] *제약학적 조성물을 제제화하기 위한 조성물 및 방법*

[0456] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 제약학적 조성물 또는 제제들의 제조를 위해 제약상 허용가능한 활성 또는 불활성 물질과 혼합될 수 있다. 제약학적 조성물들의 제제화를 위한 조성물 및 방법들은 투여 경로, 질환 정도, 또는 투여될 투여량을 비롯한 (그러나 이에 제한되지 않음) 수많은 기준에 따라 달라진다.

[0457] TMPRSS6 핵산에 대하여 표적된 안티센스 화합물은 제약학적 조성물에서 안티센스 화합물을 적합한 제약상 허용가능한 희석제 또는 담체와 조합함으로써 이용될 수 있다. 제약상 허용가능한 희석제에는 물, 예컨대, 주사용수(WFI)가 포함된다. 제약상 허용가능한 희석제에는 식염수, 예컨대, 포스페이트-완충 식염수 (PBS)가 포함된다. 물 또는 식염수는 비경구적으로 전달되는 조성물에 사용하기에 적합한 희석제이다. 따라서, 한 구체예에서, TMPRSS6 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물 및 제약상 허용가능한 희석제를 포함하는 제약학적 조성물이 본 출원에 기재된 방법들에서 사용된다. 특정 구체예들에서, 제약상 허용가능한 희석제는 물 또는 식염수이다. 특정 구체예들에서, 안티센스 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오티드이다.

[0458] 안티센스 화합물을 포함하는 제약학적 조성물들은 인간을 비롯한 동물에 투여시 생물학적 활성 대사산물 또는 이의 잔기를 (직접적으로 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 임의의 제약상 허용가능한 염, 에스테르, 또는 이러한 에스테르의 염, 또는 임의의 그 외 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 따라서, 예를 들면, 본 출원은 또한 안티센스 화합물의 제약상 허용가능한 염, 전구약물, 이러한 전구약물의 제약상 허용가능한 염, 및 그 외 생물학적 균등물에 관한 것이다. 적합한 제약상 허용가능한 염에는, 소듐 및 포타슘 염이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0459] 본 출원에 기재된 화합물의 제약상 허용가능한 염은 해당 분야에 널리 공지된 방법들에 의해 제조될 수 있다. 제약상 허용가능한 염의 검토를 위해, Stahl and Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)를 참고하라. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 소듐염은 인간에 대한 치료적 투여에 유용하며 잘 받아들여진다. 따라서, 한 구체예에서 본 출원에 기재된 화합물은 소듐염의 형태로 존재한다.

[0460] 전구약물은 안티센스 화합물의 한쪽 또는 양쪽 단부에 추가 뉴클레오시드들의 혼입을 포함할 수 있는데, 이러한 뉴클레오시드들은 신체 내에서 내인성 뉴클레아제에 의해 절단되어 활성 안티센스 화합물을 형성한다.

[0461] *투여량(dosing)*

[0462] 특정 구체예들에서, 제약학적 조성물들은 투약법 (예컨대, 투여량, 투여 빈도, 및 기간)에 따라 투여되며, 이 때 투약법은 바람직한 효과를 구현하도록 선택될 수 있다. 바람직한 효과는 예를 들면, TMPRSS6의 감소 또는 TMPRSS6 관련 질환 또는 병태의 예방, 감소, 개선 또는 진행의 감속일 수 있다.

[0463] 특정 구체예들에서, 투약법의 변수들은 피험체에서 바람직한 제약학적 조성물 농도를 생성하도록 조정된다. 투여 요법에 관련되어 사용되는 "제약학적 조성물의 농도" 화합물, 올리고뉴클레오티드, 또는 제약학적 조성물의 활성 성분을 의미할 수 있다. 예를 들면, 특정 구체예들에서, 투여량 및 투여 빈도는 바람직한 효과를 구현하기에 충분한 양의 제약학적 조성물의 조직 농도 또는 혈장 농도를 제공하도록 조정된다.

[0464] 투여량은 치료될 질환 상태의 중증도 및 민감성에 따라 달라지며, 치료 과정은 수일 내지 수개월, 또는 치유 효과가 나타날 때까지 또는 질환 상태가 약화될 때까지 지속된다. 투여량은 또한 약물 효능 및 대사에 의존적이다. 특정 구체예들에서, 투여량은 체중 1 kg 당 0.01 µg 내지 100mg 또는 0.001mg 내지 1000mg 범위 이내의 투약량이며, 1일, 1주, 2주, 1개월, 1분기, 1년, 또는 1년에 1회 또는 그 이상, 또는 심지어 매 2 내지 20년에 1회 제공될 수 있다. 성공적인 치료 후, 환자에게 질환 상태의 재발을 예방하기 위한 유지 요법을 받도록 하는 것이 바람직할 수 있는데, 이 때 올리고뉴클레오티드는 1일 1회 또는 그 이상 내지 매 20년 마다 1회로, 체중 1 kg 당 0.01 µg 내지 100mg 범위 또는 0.001mg 내지 1000mg 투여량 범위의 유지량으로 투여된다.

[0465] *투여*

[0466] 본 발명의 화합물 또는 제약학적 조성물은 국소 또는 전신 치료가 바람직한지 여부 및 치료될 부위에 따라 수많은 방법으로 투여될 수 있다. 투여는 흡입식 (즉, 폐), 장관식 (즉, 장), 비경구식 또는 국소식일 수 있다.

[0467] 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 화합물 및 조성물들은 비경구적으로 투여된다. 비경구 투여에는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내, 안구내, 근육내, 두개내, 경막내, 척수내, 심실내 또는 종양내 주사 또는 주입이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여는 또한 비강내 투여를 포함한다.

[0468] 특정 구체예들에서, 비경구 투여는 주입에 의한다. 주입은 만성 또는 연속적 또는 단기 또는 간헐적일 수 있다. 특정 구체예들에서, 주입된 제약학적 제제들은 펌프를 이용하여 전달된다.

[0469] 특정 구체예들에서, 비경구 투여는 주사에 의한다. 주사는 주사기 또는 펌프를 이용하여 전달될 수 있다. 특정 구체예들에서, 주사는 볼러스 주사이다. 특정 구체예들에서, 주사는 조직 또는 장기에 직접 투여된다.

[0470] 특정 구체예들에서, 비경구 투여용 제제는 멸균 수용액을 포함할 수 있으며, 이는 또한 완충제, 희석제 및 그 외 적합한 첨가제들, 가령, 침투 증강제, 담체 화합물 및 그 외 제약상 허용가능한 담체 또는 부형제들도 내포할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

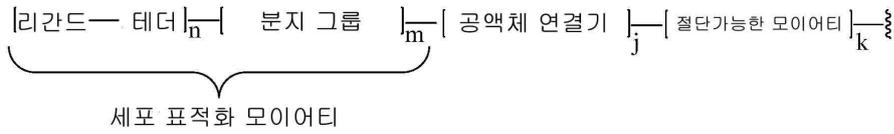
[0471] 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 화합물 및 조성물들은 장관 투여된다. 장관 투여에는 경구, 점막경유, 장 또는 직장 (예컨대, 좌약, 관장)이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 구체예들에서, 화합물 또는 조성물들의 장관 투여를 위한 제제들에는 제약학적 담체, 부형제, 분말 또는 과립, 미립자, 나노입자, 현탁액 또는 수용액 또는 비-수성 매질 내 용액, 캡슐, 겔 캡슐, 포장봉지(sachets), 정제 또는 미니정제가 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 증점제, 착향제, 희석제, 유효제, 분산 보조제 또는 결합제가 바람직할 수 있다. 특정 구체예들에서, 장관 제제들은 본 출원에 제공된 화합물들이 하나 또는 그 이상의 침투 증강제, 계면활성제 및 킬레이트제와 병용하여 투여되는 제제들이다.

[0472] 특정 구체예에서, 투여는 폐 투여를 포함한다. 특정 구체예들에서, 폐 투여는 에어로졸화된 올리고뉴클레오티드의 흡입에 의한 피험체 폐로의 전달을 포함한다. 피험체의 에어로졸화된 올리고뉴클레오티드 흡입 후, 올리고뉴클레오티드는 폐포대식세포, 호산구, 상피, 혈관 내피, 및 세기관지 상피를 비롯한 정상 및 염증성인 폐 조직 모두의 세포들에 분포한다. 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제약학적 조성물의 전달에 적합한 장치에는 표준 분무기 장치가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 또다른 적합한 장치들에는 건조 분말 흡입기 또는 정량 분무식 흡입기(metered dose inhalers)가 포함된다.

[0473] 특정 구체예들에서, 제약학적 조성물들은 전신 노출 보다는 국소 노출을 구현하기 위해 투여된다. 예를 들면, 폐 투여는 최소한의 전신 노출로 폐에 제약학적 조성물을 전달한다.

[0474] 공액된 안티센스 화합물

[0475] 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고머 화합물들은 하나 또는 그 이상의 공액체 그룹들의 공유 부착에 의해 변형된다. 일반적으로, 공액체 그룹들은 약리학, 약동학, 안정성, 결합, 흡수, 세포 분포, 세포 흡수, 전하 및 제거율을 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님), 부착되는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고머 화합물의 하나 또는 그 이상의 성질을 변형시킨다. 본 출원에서 사용되는, "공액체 그룹"은 올리고뉴클레오티드 또는 올리고머 화합물에 부착되는 원자들의 그룹을 포함하는 라디칼 그룹을 의미한다. 일반적으로, 공액체 그룹은 약력학적, 약동학적, 결합, 흡수, 세포 분포, 세포 흡수, 전하 및/또는 제거율 성질을 비롯하여 (그러나 이에 제한되는 것은 아님), 공액체 그룹이 부착되는 화합물의 하나 또는 그 이상의 성질을 변형시킨다. 공액체 그룹은 화학 분야에서 일반적으로 사용되며, 공액체 그룹을 올리고뉴클레오티드 또는 올리고머 화합물에 공유적으로 연결하는 공액체 연결기를 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 공액체 그룹은 공액체 그룹을 올리고뉴클레오티드 또는 올리고머 화합물에 공유적으로 연결하는 절단가능한 모이어티를 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체 그룹은 공액체 그룹을 올리고뉴클레오티드 또는 올리고머 화합물에 공유적으로 연결하는 공액체 연결기 및 절단가능한 모이어티를 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체 그룹은 다음 일반식을 가진다:



[0476] 여기서 n은 1 내지 약 3이거나, n이 1일 때 m은 0이거나, n이 2 또는 3인 경우 m은 1이고, j는 1 또는 0이고, k는 1 또는 0이고 그리고 j와 k의 합은 최소한 1이다.

- [0478] 특정 구체예들에서, n은 1이고, j는 1이고 그리고 k는 0이다. 특정 구체예들에서, n은 1이고, j는 0이고 그리고 k는 1이다. 특정 구체예들에서, n은 1이고, j는 1이고 그리고 k는 1이다. 특정 구체예들에서, n은 2이고, j는 1이고 그리고 k는 0이다. 특정 구체예들에서, n은 2이고, j는 0이고 그리고 k는 1이다. 특정 구체예들에서, n은 2이고, j는 1이고 그리고 k는 1이다. 특정 구체예들에서, n은 3이고, j는 1이고 그리고 k는 0이다. 특정 구체예들에서, n은 3이고, j는 0이고 그리고 k는 1이다. 특정 구체예들에서, n은 3이고, j는 1이고 그리고 k는 1이다.
- [0479] 공액체 그룹들은 본 출원에서 라디칼로 나타내어지며, 올리고머 화합물, 가령, 올리고뉴클레오티드에 대한 공유 부착을 형성하기 위한 결합을 제공한다. 특정 구체예들에서, 올리고머 화합물 상의 부착점은 3'-말단 뉴클레오시드 또는 변형된 뉴클레오시드에 있다. 특정 구체예들에서, 올리고머 화합물 상의 부착점은 3' 말단 뉴클레오시드 또는 변형된 뉴클레오시드의 3'-하이드록실 그룹의 3'-산소 원자이다. 특정 구체예들에서, 올리고머 화합물 상의 부착점은 5'-말단 뉴클레오시드 또는 변형된 뉴클레오시드에 있다. 특정 구체예들에서, 올리고머 화합물 상의 부착점은 5' 말단 뉴클레오시드 또는 변형된 뉴클레오시드의 5'-하이드록실 그룹의 5'-산소 원자이다. 특정 구체예들에서, 올리고머 화합물 상의 부착점은 뉴클레오시드, 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드간 연결 상의 임의의 반응 부위에 있다.
- [0480] 본 출원에서 사용되는, "절단가능한 모이어티" 및 "절단가능한 결합"은 특정 생리학적 상태들 하에서 분할되거나 절단될 수 있는, 원자들의 절단가능한 결합 또는 그룹을 의미한다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 절단가능한 결합이다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 절단가능한 결합을 포함한다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 원자들의 그룹이다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 세포 또는 하위-세포 구획, 가령, 리소좀 내부에서 선택적으로 절단된다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 내인성 효소들, 가령, 뉴클레아제에 의해 선택적으로 절단된다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 하나, 둘, 셋, 넷 또는 넷 보다 많은 절단가능한 결합들을 가지는 원자들의 그룹을 포함한다.
- [0481] 특정 구체예들에서, 공액체 그룹은 절단가능한 모이어티를 포함한다. 이러한 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 올리고머 화합물을 공액체 연결기에 공유적으로 부착시킨다. 이러한 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 올리고머 화합물을 세포-표적화 모이어티에 공유적으로 부착시킨다.
- [0482] 특정 구체예들에서, 절단가능한 결합은 다음 중에서 선택된다: 아마이드, 폴리아마이드, 에스테르, 에테르, 포스포디에스테르의 에스테르들 중 하나 또는 둘 모두, 포스페이트 에스테르, 카르바메이트, 디-설파이드, 또는 펩티드. 특정 구체예들에서, 절단가능한 결합은 포스포디에스테르의 에스테르들 중 하나이다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 결합은 포스포디에스테르의 에스테르들 중 하나 또는 둘 모두이다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 올리고머 화합물과 공액체 그룹 잔부 사이의 포스포디에스테르 연결이다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 올리고머 화합물과 공액체 그룹 잔부 사이에 배치된 포스포디에스테르 연결을 포함한다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 포스페이트 또는 포스포디에스테르를 포함한다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 연결 중 하나에 의해 공액체 연결기에 부착된다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 공액체 연결기에 부착된다. 특정 구체예들에서, 공액체 그룹은 절단가능한 모이어티를 포함하지 않는다.
- [0483] 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 절단가능한 뉴클레오시드 또는 변형된 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, 뉴클레오시드 또는 변형된 뉴클레오시드는 퓨린, 치환된 퓨린, 피리미딘 또는 치환된 피리미딘에서 선택된, 선택적으로 보호된 헤테로시클릭 염기를 포함한다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 우라실, 티민, 시토신, 4-N-벤조일시토신, 5-메틸시토신, 4-N-벤조일-5-메틸시토신, 아데닌, 6-N-벤조일아데닌, 구아닌 및 2-N-이소부틸릴구아닌에서 선택된 뉴클레오시드이다.
- [0484] 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 올리고머 화합물의 3' 또는 5'-말단 뉴클레오시드 중 하나에 부착되고 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 연결에 의해 공액체 그룹 잔부에 공유적으로 부착된 2'-데옥시 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 올리고머 화합물의 3' 또는 5'-말단 아데노신 중 하나에 부착되고 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 연결에 의해 공액체 그룹 잔부에 공유적으로 부착된 2'-데옥시 뉴클레오시드이다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 3'-말단 뉴클레오시드 또는 변형된 뉴클레오시드의 3'-하이드록실 그룹의 3'-산소 원자에 부착된 2'-데옥시 아데노신이다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 포스포디에스테르 연결에 의해 5'-말단 뉴클레오시드 또는 변형된 뉴클레오시드의 5'-하이드록실 그룹의 5'-산소 원자에 부착된 2'-데옥시 아데노신이다. 특정 구체예들에서, 절단가능한 모이어티는 올리고머 화합물

의 뉴클레오시드 또는 변형된 뉴클레오시드의 2'-위치에 부착된다.

- [0485] 본 출원에서 사용되는, 공액체 그룹에 관한 내용에 있어서 "공액체 연결기"는 세포-표적화 모이어티를 직접 또는 절단가능한 모이어티를 통해 올리고머 화합물에 공유적으로 연결시키는, 임의의 원자 또는 원자들의 그룹을 포함하는 하나의 공액체 그룹의 한 부분을 의미한다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 알킬, 아미노, 옥소, 아마이드, 디설파이드, 폴리에틸렌 글리콜, 에테르, 티오에테르 (-S-) 및 하이드록실아미노 (-O-N(H)-)에서 선택된 그룹들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 알킬, 아미노, 옥소, 아마이드 및 에테르 그룹들에서 선택된 그룹들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 알킬 및 아마이드 그룹들에서 선택된 그룹들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 최소한 하나의 인 연결 그룹을 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 최소한 하나의 포스포디에스테르 그룹을 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 최소한 하나의 중성 연결 그룹을 포함한다.
- [0486] 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 올리고머 화합물에 공유적으로 부착된다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 올리고머 화합물 및 분지 그룹(branching group)에 공유적으로 부착된다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 올리고머 화합물 및 테더링된 리간드에 공유적으로 부착된다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 절단가능한 모이어티에 공유적으로 부착된다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 절단가능한 모이어티 및 분지 그룹에 공유적으로 부착된다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 절단가능한 모이어티 및 테더링된 리간드에 공유적으로 부착된다. 특정 구체예들에서, 공액체 연결기는 하나 또는 그 이상의 절단가능한 결합들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체 그룹은 공액체 연결기를 포함하지 않는다.
- [0487] 본 출원에서 사용되는, "분지 그룹"은 둘 또는 그 이상의 테더-리간드들과 공액체 그룹 잔부에 대해 공유 연결을 형성할 수 있는 최소한 3개의 위치들을 가지는 원자들의 그룹을 의미한다. 일반적으로 분지 그룹은 공액체 연결기 및/또는 절단가능한 모이어티를 통해 테더링된 리간드들을 올리고머 화합물에 연결시키기 위한 복수의 반응 부위들을 제공한다. 특정 구체예들에서, 분지 그룹은 알킬, 아미노, 옥소, 아마이드, 디설파이드, 폴리에틸렌 글리콜, 에테르, 티오에테르 및 하이드록실아미노 그룹들에서 선택된 그룹들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 분지 그룹은 알킬, 아미노, 옥소, 아마이드, 디설파이드, 폴리에틸렌 글리콜, 에테르, 티오에테르 및 하이드록실아미노 그룹들에서 선택된 그룹들을 포함하는 분지형 지방족 그룹을 포함한다. 이러한 특정 구체예들에서, 분지형 지방족 그룹은 알킬, 아미노, 옥소, 아마이드 및 에테르 그룹들에서 선택된 그룹들을 포함한다. 이러한 특정 구체예들에서, 분지형 지방족 그룹은 알킬, 아미노 및 에테르 그룹들에서 선택된 그룹들을 포함한다. 이러한 특정 구체예들에서, 분지형 지방족 그룹은 알킬 및 에테르 그룹들에서 선택된 그룹들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 분지 그룹은 모노 또는 폴리시클릭 고리계를 포함한다.
- [0488] 특정 구체예들에서, 분지 그룹은 공액체 연결기에 공유적으로 부착된다. 특정 구체예들에서, 분지 그룹은 절단가능한 모이어티에 공유적으로 부착된다. 특정 구체예들에서, 분지 그룹은 공액체 연결기 및 테더링된 리간드들 각각에 공유적으로 부착된다. 특정 구체예들에서, 분지 그룹은 하나 또는 그 이상의 절단가능한 결합을 포함한다. 특정 구체예들에서, 공액체 그룹은 분지 그룹을 포함하지 않는다.
- [0489] 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 공액체 그룹들은 최소한 하나의 테더링된 리간드를 가지는 세포-표적화 모이어티를 포함한다. 특정 구체예들에서, 세포-표적화 모이어티는 분지 그룹에 공유적으로 부착되는 두 개의 테더링된 리간드들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 세포-표적화 모이어티는 분지 그룹에 공유적으로 부착되는 세 개의 테더링된 리간드들을 포함한다.
- [0490] 본 출원에서 사용되는, "테더(tether)"는 리간드를 공액체 그룹의 잔부에 연결시키는 원자들의 그룹을 의미한다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 알킬, 치환된 알킬, 에테르, 티오에테르, 디설파이드, 아미노, 옥소, 아마이드, 포스포디에스테르 및 폴리에틸렌 글리콜 그룹들에서 선택된 하나 또는 그 이상의 그룹들을 임의의 조합으로 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 알킬, 에테르, 티오에테르, 디설파이드, 아미노, 옥소, 아마이드 및 폴리에틸렌 글리콜 그룹들에서 선택된 하나 또는 그 이상의 그룹들을 임의의 조합으로 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 알킬, 치환된 알킬, 포스포디에스테르, 에테르 및 아미노, 옥소, 아마이드 그룹들에서 선택된 하나 또는 그 이상의 그룹들을 임의의 조합으로 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 알킬, 에테르 및 아미노, 옥소, 아마이드 그룹들에서 선택된 하나 또는 그 이상의 그룹들을 임의의 조합으로 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 알킬 및 옥소 그룹들에서 선택된

하나 또는 그 이상의 그룹들을 임의의 조합으로 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 알킬 및 포스포디에스테르에서 선택된 하나 또는 그 이상의 그룹들을 임의의 조합으로 포함하는 선형 지방족 그룹이다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 최소한 하나의 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹을 포함한다.

[0491] 특정 구체예들에서, 테더는 하나 또는 그 이상의 절단가능한 결합을 포함한다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더링된 리간드는 분지 그룹에 부착된다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더링된 리간드는 아미드 그룹을 통해 분지 그룹에 부착된다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더링된 리간드는 에테르 그룹을 통해 분지 그룹에 부착된다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더링된 리간드는 인 연결 그룹 또는 중성 연결 그룹을 통해 분지 그룹에 부착된다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더링된 리간드는 포스포디에스테르 그룹을 통해 분지 그룹에 부착된다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 아미드 또는 에테르 그룹 중 하나를 통해 리간드에 부착된다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 에테르 그룹을 통해 리간드에 부착된다.

[0492] 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 리간드와 분지 그룹 사이에 약 8 내지 약 20개 원자의 사슬 길이를 포함한다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 리간드와 분지 그룹 사이에 약 10 내지 약 18개 원자의 사슬 길이를 포함한다. 특정 구체예들에서, 각각의 테더는 약 13개 원자의 사슬 길이를 포함한다.

[0493] 특정 구체예들에서, 본 출원은 테더를 통해 공액체 그룹 잔부에 공유적으로 부착되는 리간드들을 제공한다. 특정 구체예들에서, 각각의 리간드는 표적 세포 상의 수용체 중 최소한 하나의 유형에 대한 친화도를 가지도록 선택된다. 특정 구체예들에서, 리간드들은 포유동물 간 세포 표면 상의 수용체 중 최소한 하나의 유형에 대한 친화도를 가지도록 선택된다. 특정 구체예들에서, 간 아시알로당단백질 수용체 (ASGP-R)에 대한 친화도를 가지는 리간드들이 선택된다. 특정 구체예들에서, 각각의 리간드는 탄수화물이다. 특정 구체예들에서, 각각의 리간드는, 독립적으로 갈락토스, N-아세틸 갈락토스아민, 만노스, 포도당, 글루코사민 및 푸코스에서 선택된다. 특정 구체예들에서, 각각의 리간드는 N-아세틸 갈락토스아민 (GalNAc)이다. 특정 구체예들에서, 표적화 모이어티는 1 내지 3개 리간드들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 표적화 모이어티는 3개의 리간드들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 표적화 모이어티는 2개의 리간드들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 표적화 모이어티는 1개의 리간드를 포함한다. 특정 구체예들에서, 표적화 모이어티는 3개의 N-아세틸 갈락토스아민 리간드들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 표적화 모이어티는 2개의 N-아세틸 갈락토스아민 리간드들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 표적화 모이어티는 1개의 N-아세틸 갈락토스아민 리간드를 포함한다.

[0494] 특정 구체예들에서, 각각의 리간드는 탄수화물, 탄수화물 유도체, 변형된 탄수화물, 다가 탄수화물 클러스터 (cluster), 다당류, 변형된 다당류, 또는 다당류 유도체이다. 특정 구체예들에서, 각각의 리간드는 아미노 당 또는 티오 당이다. 예를 들면, 아미노 당들은 해당 분야에 공지된 임의의 수의 화합물들, 예를 들면, 글루코사민, 시알릭 애시드, α-D-갈락토사민, N-아세틸갈락토사민, 2-아세트아미도-2-데옥시-D-갈락토피라노스 (GalNAc), 2-아미노-3-O-[(R)-1-카복시에틸]-2-데옥시-β-D-글루코피라노스 (β-뮤라믹 애시드), 2-데옥시-2-메틸아미노-L-글루코피라노스, 4,6-디데옥시-4-포름아미도-2,3-디-O-메틸-D-만노피라노스, 2-데옥시-2-설포아미노-D-글루코피라노스 및 N-설포-D-글루코사민, 및 N-글리콜로일-α-뉴라미닉 애시드에서 선택될 수 있다. 예를 들면, 티오 당들은 5-티오-β-D-글루코피라노스, 메틸 2,3,4-트리-O-아세틸-1-티오-6-O-트리틸-α-D-글루코피라노시드, 4-티오-β-D-갈락토피라노스, 및 에틸 3,4,6,7-테트라-O-아세틸-2-데옥시-1,5-디티오-α-D-글루코-헵토피라노시드로 구성된 그룹에서 선택될 수 있다.

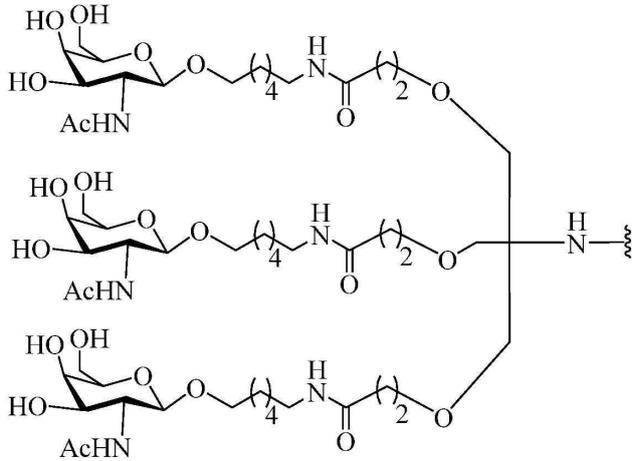
[0495] 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 공액체 그룹들은 탄수화물 클러스터를 포함한다. 본 출원에서 사용되는, "탄수화물 클러스터"는 둘 또는 그 이상의 탄수화물 잔기들이 테더 그룹들을 통해 분지 그룹에 부착되어 있는 공액체 그룹의 한 부분을 의미한다 (예컨대, 탄수화물 공액체 클러스터의 예로, Maier 등의, "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting," *Bioconjugate Chemistry*, 2003, (14): 18-29, 이 문헌은 온전히 본 출원에 참고문헌으로 포함됨, 또는 Rensen 등의, "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipid for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor," *J. Med. Chem.* 2004, (47): 5798-5808 참고).

[0496] 본 출원에서 사용되는, "변형된 탄수화물"은 자연 발생 탄수화물들에 비해 하나 또는 그 이상의 화학적 변형들을 가지는 임의의 탄수화물을 의미한다.

[0497] 본 출원에서 사용되는, "탄수화물 유도체"는 출발 물질 또는 중간물로서 탄수화물을 사용하여 합성될 수 있는 임의의 화합물을 의미한다.

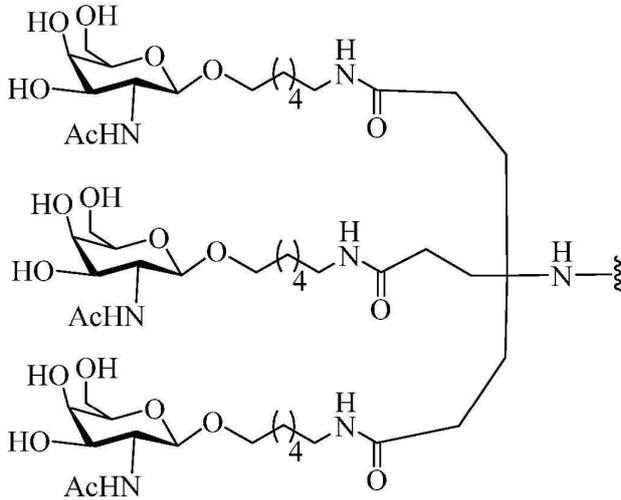
[0498] 본 출원에서 사용되는, "탄수화물"은 자연 발생 탄수화물, 변형된 탄수화물, 또는 탄수화물 유도체를 의미한다.

[0499] 특정 구체예들에서, 세포-표적화 모이어티가 다음 화학식을 가지는 공액체 그룹이 제공된다:



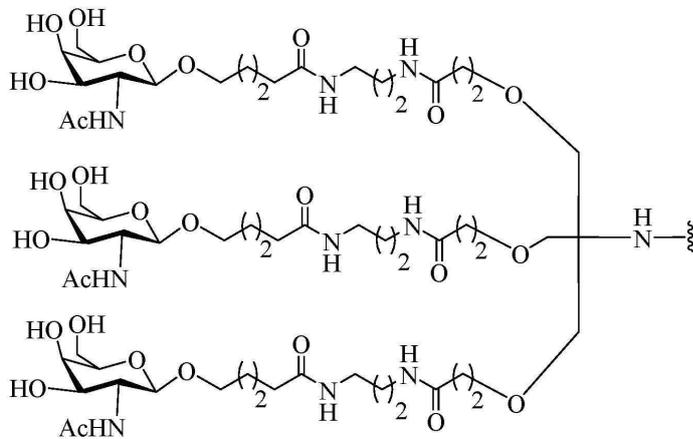
[0500]

[0501] 특정 구체예들에서, 세포-표적화 모이어티가 다음 화학식을 가지는 공액체 그룹이 제공된다:



[0502]

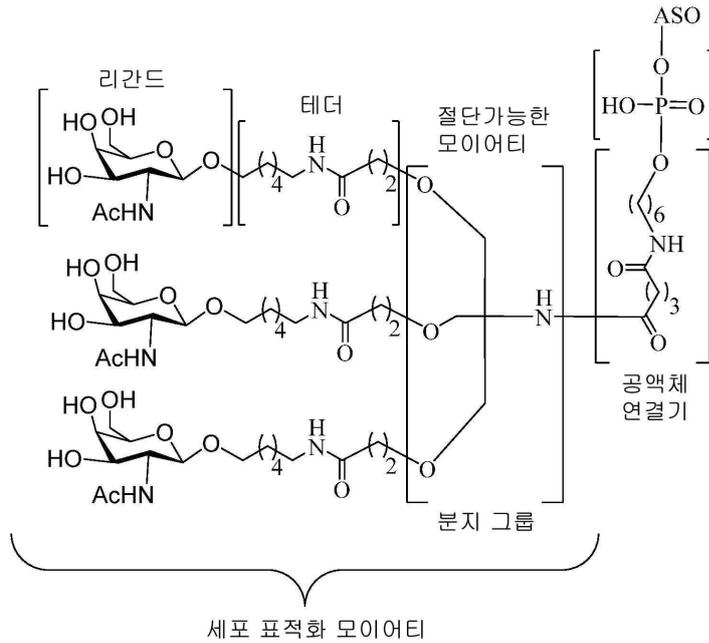
[0503] 특정 구체예들에서, 세포-표적화 모이어티가 다음 화학식을 가지는 공액체 그룹이 제공된다:



[0504]

[0505]

[0506] 특정 구체예들에서, 공액체 그룹은 다음 화학식을 가진다:



[0507]

[0508] 상기 언급된 특정 공액체 그룹, 공액된 올리고머 화합물, 가령, 공액체 그룹, 테더(tethers), 공액체 연결기, 측쇄기, 리간드, 절단가능 모이어티 및 그 외 변형들을 포함하는 안티센스 화합물의 제조를 개시하는 대표적인 미국 특허, 미국 공개 특허 출원, 및 국제 공개 특허출원들에는, 제한 없이, US 5,994,517, US 6,300,319, US 6,660,720, US 6,906,182, US 7,262,177, US 7,491,805, US 8,106,022, US 7,723,509, US 2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230 및 WO 2012/037254가 포함되며, 이들 각각은 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0509]

상기 언급된 특정 공액체 그룹, 공액된 올리고머 화합물, 가령, 공액체 그룹을 포함하는 안티센스 화합물, 테더, 공액체 연결기, 측쇄기, 리간드, 절단가능 모이어티 및 그 외 변형들의 제조를 개시하는 대표적인 간행물들에는, 제한없이, BIESSEN 등의, "The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a Potent Cholesterol Lowering Agent" J. Med. Chem. (1995) 38:1846-1852, BIESSEN 등의, "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1995) 38:1538-1546, LEE 등의, "New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein Receptor of mammalian hepatocytes" Bioorganic & Medicinal Chemistry (2011) 19:2494-2500, RENSEN 등의, "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" J. Biol. Chem. (2001) 276(40):37577-37584, RENSEN 등의, "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipid for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (2004) 47:5798-5808, SLIEDREGT 등의, "Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1999) 42:609-618 및 Valentijn 등의, "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" Tetrahedron, 1997, 53(2), 759-770이 포함되며, 이들 각각은 본 출원에 온전히 참고문헌으로 포함된다.

[0510]

특정 구체예들에서, 공액체 그룹에는, 인터칼레이터, 리포터 분자, 폴리아민, 폴리아미드, 폴리에틸렌 글리콜, 티오에테르, 폴리에테르, 콜레스테롤, 티오콜레스테롤, 콜릭 애시드 모이어티, 염산염, 지질, 인지질, 비오틴, 페나진, 페난트리딘, 안트라퀴논, 아다만탄, 아크리딘, 형광물질, 로다민, 쿠마린 및 염료가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들면 다음과 같은 특정 공액체 그룹들이 이미 기술된 바 있다: 콜레스테롤 모이어티 (Letsinger 등의, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), 콜릭 애시드 (Manoharan 등의, Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060), 티오에테르, 예컨대, 헥실-S-트리틸티올 (Manoharan 등의, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan 등의, Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), 티오콜레스테롤 (Oberhauser 등의, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), 지방족 사슬, 예컨대, 도-

데칸-디올 또는 운데실 잔기들 (Saison-Behmoaras 등의, EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov 등의, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk 등의, Biochimie, 1993, 75, 49-54), 인지질, 예컨대, 디-핵사데실-락-글리세롤 또는 트리에틸 - 암모늄 1,2-디-O-핵사데실-락-글리세로-3-H-포스포네이트 (Manoharan 등의, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea 등의, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬 (Manoharan 등의, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), 또는 아다만탄 아세트릭 애시드 (Manoharan 등의, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), 팔미틸 모이어티 (Mishra 등의, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), 또는 옥타데실아민 또는 핵실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 (Crooke 등의, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

[0511] 특정 구체예들에서, 공액체 그룹은 활성 약물 물질, 예를 들면, 아스피린, 와파린, 페닐부타존, 이부프로펜, 수프로펜, 펜-부펜, 케토프로펜, (S)-(+)-프라노프로펜, 카르프로펜, 단실사르코신, 2,3,5-트리아이오도벤조익 애시드, 플루페나믹 애시드, 폴리닉 애시드, 벤조티아디아지드, 클로로티아지드, 디아제핀, 인도-메티신, 바르비투레이트, 세팔로스포린, 설파제, 항당뇨제, 항균제 또는 항생제를 포함한다.

[0512] 공액체 연결기들의 일부 비제한적 예들에는 피롤리딘, 8-아미노-3,6-디옥사옥타노익 애시드 (ADO), 석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC) 및 6-아미노헥사노익 애시드 (AHX 또는 AHA)가 포함된다. 그 외 공액체 연결기들에는, 치환된 C₁-C₁₀ 알킬, 치환된 또는 비치환된 C₂-C₁₀ 알케닐 또는 치환된 또는 비치환된 C₂-C₁₀ 알킬닐이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니며, 여기서 바람직한 치환 그룹들의 비제한적 목록에는 하이드록실, 아미노, 알콕시, 카르복시, 벤질, 페닐, 니트로, 티올, 티오알콕시, 할로젠, 알킬, 아릴, 알케닐 및 알킬닐이 포함된다.

[0513] 공액체 그룹들은 올리고뉴클레오티드의 한쪽 또는 양쪽 단부들 모두 (말단 공액체 그룹들)에 및/또는 임의의 내부 위치에 부착될 수 있다.

[0514] 특정 구체예들에서, 공액체 그룹들은 올리고머 화합물의 올리고뉴클레오티드의 3'-단부에 존재한다. 특정 구체예들에서, 공액체 그룹들은 3'-단부 근처에 존재한다. 특정 구체예들에서, 공액체들은 올리고머 화합물의 3' 단부에, 그러나 하나 또는 그 이상의 말단 그룹 뉴클레오티드 앞에 부착된다. 특정 구체예들에서, 공액체 그룹들은 말단 그룹 내부에 위치된다.

[0515] *세포 배양 및 안티센스 화합물 처리*

[0516] TMPRSS6 핵산의 수준, 활성 또는 발현에 대한 안티센스 화합물의 효과들은 여러가지의 세포 유형들에서 시험관 내 테스트 될 수 있다. 이러한 분석에 사용되는 세포 유형들은 상업적 공급업체들 (예컨대 American Type Culture Collection, Manassas, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD)로부터 구입가능하며 세포들은 공급업체들의 지시에 따라 상업적으로 구입가능한 시약들 (예컨대 Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)을 사용하여 배양된다. 예시적인 세포 유형들에는, HepG2 세포, Hep3B 세포, Huh7 (간세포암종) 세포, 일차 간세포, A549 세포, GM04281 섬유모세포 및 LLC-MK2 세포가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0517] *안티센스 올리고뉴클레오티드들의 시험관내 테스트*

[0518] 그 외 다른 안티센스 화합물로 처리하기에 적절하게 변형될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드들을 이용한 세포 처리 방법들이 본 출원에 기재된다.

[0519] 일반적으로, 세포들은 배양시 세포가 대략 60-80% 밀집도(confluence)에 도달할 때 안티센스 올리고뉴클레오티드들로 처리된다.

[0520] 배양된 세포들에 안티센스 올리고뉴클레오티드들을 도입하기 위해 통상적으로 사용되는 하나의 시약에는 양이온성 지질 형질감염 시약 LIPOFECTIN® (Invitrogen, Carlsbad, CA)이 포함된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 OPTI-MEM®1 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 LIPOFECTIN®과 혼합되어, 100 nM 안티센스 올리고뉴클레오티드 당 2 내지 12 ug/mL 범위의 바람직한 최종 안티센스 올리고뉴클레오티드 농도 및 LIPOFECTIN® 농도가 된다.

[0521] 안티센스 올리고뉴클레오티드들을 배양된 세포들에 도입하기 위하여 사용되는 또다른 시약에는 LIPOFECTAMINE 2000® (Invitrogen, Carlsbad, CA)이 포함된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 OPTI-MEM®1 환원 혈청 배지 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 LIPOFECTAMINE 2000®과 혼합되어, 전형적으로 100 nM 안티센스 올리고뉴클레오티드 당 2 내지 12 ug/mL 범위의 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오티드 농도 및 LIPOFECTAMINE® 농도가 된다.

다.

- [0522] 안티센스 올리고뉴클레오티드들을 배양된 세포 내 도입하기 위해 사용되는 또다른 시약에는 Cytofectin® (Invitrogen, Carlsbad, CA)이 포함된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 OPTI-MEM® 1 환원 혈청 배지 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 Cytofectin®과 혼합되어, 전형적으로 100 nM 안티센스 올리고뉴클레오티드 당 2 내지 12 ug/mL 범위의 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 농도 및 Cytofectin® 농도가 된다.
- [0523] 안티센스 올리고뉴클레오티드들을 배양된 세포들에 도입하기 위하여 사용되는 또다른 시약에는 Oligofectamine™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)이 포함된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 Opti-MEM -1 환원 혈청 배지 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)에서 Oligofectamine™과 혼합되어, 올리고뉴클레오티드 100 nM 당 대략 0.2 내지 0.8 µL의 Oligofectamine™ 대 올리고뉴클레오티드 비율의 바람직한 올리고뉴클레오티드 농도가 된다.
- [0524] 안티센스 올리고뉴클레오티드들을 배양된 세포 내 도입하기 위해 사용되는 또다른 시약에는 FuGENE 6 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN)가 포함된다. 안티센스 올리고머 화합물은 1 mL의 무혈청 RPMI에서 FuGENE 6와 혼합되어, 올리고머 화합물 100 nM 당 1 내지 4 µL의 FuGENE 6 대 올리고머 화합물 비율의 바람직한 올리고뉴클레오티드 농도가 된다.
- [0525] 안티센스 올리고뉴클레오티드들을 배양된 세포 내 도입하기 위해 사용되는 또다른 기법에는 전기천공이 포함된다 (Sambrook and Russell in *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001).
- [0526] 세포들은 관례적인 방법들에 의해 안티센스 올리고뉴클레오티드들로 처리된다. 세포들은 전형적으로 안티센스 올리고뉴클레오티드 처리 16-24시간 후에 수집되며, 이 시점에서 표적 핵산들의 RNA 또는 단백질 수준은, 해당 분야에 공지되고 본 출원에 기재된 방법들에 의해 측정된다 (Sambrook and Russell in *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001). 일반적으로, 처리가 여러번 반복하여 실시될 경우, 데이터는 반복 처리들의 평균으로 나타난다.
- [0527] 사용되는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 농도는 세포주에 따라 달라진다. 특정 세포주에 대한 최적의 안티센스 올리고뉴클레오티드 농도를 결정하는 방법들은 해당 분야에 널리 공지되어 있다 (Sambrook and Russell in *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001). 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 LIPOFECTAMINE2000®, Lipofectin 또는 Cytofectin으로 형질감염시 전형적으로 1 nM 내지 300 nM 범위의 농도로 사용된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 전기천공을 이용한 형질감염시 625 내지 20,000 nM 범위의 높은 농도로 사용된다.
- [0528] *RNA 단리*
- [0529] RNA 분석은 총 세포 RNA 또는 폴리(A)+ mRNA에 대해 실시될 수 있다. RNA 단리 방법은 해당 분야에 널리 공지되어 있다 (Sambrook 및 Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., 2001). RNA는 제조업체의 권고 프로토콜에 따라 해당 분야에 널리 공지된 방법들, 예를 들면, TRIZOL® 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 제조된다.
- [0530] *표적 수준 또는 발현의 억제 분석*
- [0531] TMPRSS6 핵산의 수준 또는 발현 억제는 해당 분야에 공지된 여러가지 방법들로 분석될 수 있다 (Sambrook and Russell, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2001). 예를 들면, 표적 핵산 수준은, 예컨대, 노던 블롯 분석 (Northern blot analysis), 경쟁적 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 또는 정량적 실시간 PCR에 의해 정량화될 수 있다. RNA 분석은 총 세포 RNA 또는 폴리(A)+ mRNA에 대해 실시될 수 있다. RNA 단리 방법들은 해당 분야에 널리 공지이다. 노던 블롯 분석은 또한 해당 분야에서 관례적이다. 정량적 실시간 PCR은 제조업체의 지시에 따라 PE-Applied Biosystems, Foster City, CA로부터 구입가능하고 상업적으로 구입가능한 ABI PRISM® 7600, 7700, 또는 7900 서열 검출 시스템을 사용하여 편리하게 이루어질 수 있다.
- [0532] *표적 RNA 수준의 정량적 실시간 PCR 분석*
- [0533] 표적 RNA 수준의 정량화는 제조업체의 지시에 따라 ABI PRISM® 7600, 7700, 또는 7900 서열 검출 시스템 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA)을 사용한 정량적 실시간 PCR에 의해 이루어질 수 있다. 정량적 실시간 PCR 방법들은 해당 분야에 널리 공지이다.

- [0534] 실시시간 PCR에 앞서, 단리된 RNA는 역전사효소 (RT) 반응을 거치게 되고, 이러한 반응은 상보적인 DNA (cDNA)를 생성하며 이는 그 후 실시시간 PCR 증폭을 위한 기질로서 사용된다. RT 및 실시시간 PCR 반응들은 동일한 샘플 웰에서 순차적으로 수행된다. RT 및 실시시간 PCR 시약들은 Invitrogen사 (Carlsbad, CA)로부터 취득된다. RT, 실시시간-PCR 반응들은 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 널리 공지된 방법들에 의해 실시된다.
- [0535] 실시시간 PCR에 의해 취득된 유전자 (또는 RNA) 표적량은 그 발현이 일정한 발현 수준의 유전자, 가령, 시클로필린 A를 사용하거나, RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA)을 사용하여 총 RNA를 정량화함으로써 정규화된다. 시클로필린 A 발현은 표적과 동시에, 다중적으로, 또는 별도로 실시시간 PCR을 가동함으로써 정량화된다. 총 RNA는 RIBOGREEN® RNA 정량화 시약 (Invitrogen, Inc. Eugene, OR)을 사용하여 정량화된다. RIBOGREEN®에 의한 RNA 정량화 방법들은 Jones, L.J., 등의, 문헌 (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374)에 개시되어 있다. CYTOFLUOR® 4000 기기 (PE Applied Biosystems)는 RIBOGREEN® 형광을 측정하기 위하여 사용된다.
- [0536] 프로브 및 프라이머들은 TMPRSS6 핵산에 혼성화하도록 설계된다. 실시시간 PCR 프로브 및 프라이머를 설계하는 방법들은 해당 분야에 널리 공지이며, 소프트웨어, 가령, 프라이머 EXPRESS® 소프트웨어 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 사용을 포함할 수 있다.
- [0537] 단백질 수준 분석
- [0538] TMPRSS6 핵산의 안티센스 억제제는 TMPRSS6 단백질 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다. TMPRSS6의 단백질 수준은 해당 분야에 널리 공지된 여러가지 방법들, 가령, 면역침강법, 웨스턴 블롯 분석 (면역탁본법), 효소-결합 면역흡착 측정법 (ELISA), 정량적 단백질 분석법, 단백질 활성 분석법 (예를 들면, 카스파제 활성 분석), 면역조직화학, 면역세포화학 또는 형광-활성화 세포 분류법 (FACS)으로 평가 또는 정량화될 수 있다 (Sambrook and Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2001). 표적을 겨냥하는 항체들은 여러 공급업체들, 가령, MSRS 항체 카탈로그 (Aerie Corporation, Birmingham, MI)로부터 확인 및 취득될 수 있으며, 또는 해당 분야에 널리 공지된 종래의 단클론 또는 다클론 항체 생성 방법들을 통해 제조될 수 있다.
- [0539] 안티센스 화합물의 생체내 테스트
- [0540] 안티센스 화합물, 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 TMPRSS6의 발현을 억제하고 표현형 변화, 가령, 신체 내 철 축적 감소를 생성하는 이들의 능력을 평가하기 위해 동물에서 테스트된다. 테스트는 정상 동물들에서, 또는 실험 질환 모델에서 실시될 수 있다. 동물에 투여하기 위해, 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 제약상 허용가능한 희석제, 가령, 멸균 주사용수 또는 포스페이트-완충 식염수에서 제제화된다. 투여에는 비경구 투여 경로, 가령, 복강내, 정맥내, 및 피하가 포함된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 투여량 및 투여 빈도의 계산은 인자들, 가령, 투여 경로 및 동물의 체중에 따라 달라진다. 한 구체예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드로 일정 기간 처리 후, RNA가 간 조직으로부터 단리되고 TMPRSS6 핵산 발현의 변화가 측정된다. TMPRSS6 단백질 수준의 변화 또한 측정될 수 있다. TMPRSS6 발현의 변화는 동물에 존재하는 헵시딘 발현 수준, 철의 혈장 수준 및 트랜스페린의 포화 백분율을 결정함으로써 측정될 수 있다.
- [0541] 특정 징후들
- [0542] 개체를 치료하기 위한 조성물들, 화합물들, 및 하나 또는 그 이상의 본 출원에 개시된 조성물 또는 화합물들을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 치료방법들이 제공된다. 특정 구체예들에서, 개체에서 TMPRSS6 발현을 감소시키기 위한 조성물, 화합물 및 방법들이 제공된다. 특정 구체예들에서, TMPRSS6 핵산에 대해 표적된 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물 또는 화합물의 치료적 유효량을 개체에 투여하여, 개체를 치료하기 위한 조성물, 화합물 및 치료방법들이 제공된다. 특정 구체예들에서, TMPRSS6에 대해 표적된 안티센스 화합물은 TMPRSS6을 감소시킨다. 특정 구체예들에서, TMPRSS6 감소를 필요로 하는 개체는 철 축적 질환, 장애 또는 병태를 가지거나 이러한 위험이 있다. 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 조성물, 화합물 및 방법들은 개체에서의 철 수준을 감소시키기 위하여 본 출원에 제공된다.
- [0543] 특정 구체예들에서, 철 축적은 개체에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위한 치료법의 결과이다. 특정 구체예들에서, 치료법은 수혈 치료법이다. 특정 구체예들에서, 다수의 수혈은 적혈구증가를 초래할 수 있다. 또다른 구체예들에서, 다수의 혈액 수혈은 빈혈증을 가진 동물과 관련된다. 다수의 혈액 수혈을 필요로 하는 빈혈증의 예들은 유전성 빈혈증, 골수형성이상 증후군 및 중증도의 만성 용혈이 있다. 유전성 빈혈증의 예들에는, 겸상적혈구 빈혈증, 지중해빈혈, 판코니 빈혈증, 다이아몬드 블랙판 빈혈증, 슈바크만 다이아몬드 증후군, 적혈구막 장애, 6-인산 포도당 탈수소효소 결핍, 또는 유전성 출혈 모세혈관확장증이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 구체예들에서, 지중해빈혈은 β -지중해빈혈이다. 특정 구체예들에서, β -지중해빈혈은 HbE/ β -지중

해빈혈, 중증성 β -지중해빈혈, 중간성 β -지중해빈혈 또는 경증성 β -지중해빈혈이다.

- [0544] 특정 구체예들에서, 철 축적은 개체에서의 질환, 장애 또는 병태로 인한 것이다. 특정 구체예들에서, 질환, 장애 또는 병태는 유전성 혈색소증 또는 지중해빈혈이다. 특정 구체예들에서, 지중해빈혈은 비-수혈 의존성 지중해빈혈 (NTDT) 또는 β -지중해빈혈이다. 특정 구체예들에서, β -지중해빈혈은 HbE/ β -지중해빈혈, 중증성 β -지중해빈혈, 중간성 β -지중해빈혈 또는 경증성 β -지중해빈혈이다.
- [0545] 특정 구체예들에서, 질환, 장애 및/또는 병태는 과량의 비경구 철 보충제 섭취 또는 과량의 식이 철 섭취와 관련된다.
- [0546] 헵시딘 수준, 가령, mRNA 또는 단백질 발현 수준을 증가시키기 위한 조성물, 화합물 및 방법들이 본 출원에서 제공된다. 특정 구체예들에서, 헵시딘 수준, 가령, mRNA 또는 단백질 발현 수준을 증가시키기 위해 본 출원에 기재된 TMPRSS6을 표적하는 안티센스 화합물들이 제공된다.
- [0547] 동물에서 트랜스페린의 포화 백분율을 감소시키기 위한 조성물, 화합물 및 방법들이 제공된다. 특정 구체예들에서, 동물에서 트랜스페린의 포화 백분율을 감소시키기 위해 본 출원에 기재된 TMPRSS6을 표적하는 안티센스 화합물들이 제공된다. 특정 구체예들에서, 트랜스페린 포화도를 감소시키는 것은 적혈구생성을 위한 철 공급의 감소를 초래한다. 특정 구체예들에서, 적혈구생성의 감소는 동물에서 적혈구증가증, 또는 이의 증상을 치료, 예방, 이의 발병을 지연, 개선 및/또는 감소시킨다. 특정 구체예들에서, 동물에서 적혈구증가증 또는 이의 증상을 치료, 예방, 이의 발병 지연, 개선 및/또는 감소시키기 위해 본 출원에 기재된 TMPRSS6을 표적하는 안티센스 화합물들이 제공된다. 특정 구체예들에서, 적혈구증가증은 진성 적혈구증가증이다. 특정 구체예들에서, TMPRSS6을 표적하는 안티센스 화합물을 이용한 치료는 적혈구증가증의 적백혈병으로의 진행을 예방 또는 지연시킨다.
- [0548] 특정 구체예들에서, 개체에서 TMPRSS6 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물의 치료적 유효량의 투여는 TMPRSS6 수준을 모니터링하여 안티센스 화합물에 대한 개체의 반응을 결정하는 것을 수반한다. 특정 구체예들에서, 개체에서 TMPRSS6 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물의 치료적 유효량의 투여는 개체 내 헵시딘 수준을 모니터링하는 것을 수반한다. 특정 구체예들에서, 개체에서 TMPRSS6 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물의 치료적 유효량의 투여는 개체 내 철 수준을 모니터링하는 것을 수반한다. 특정 구체예들에서, 개체에서 TMPRSS6 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물의 치료적 유효량의 투여는 개체 내 트랜스페린의 포화 백분율을 평가하는 것을 수반한다. 안티센스 화합물의 투여에 대한 개체의 반응은 의사가 치료적 개입의 양 및 기간을 결정하는데 사용된다.
- [0549] 철 축적 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 또는 이에 취약한 환자 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한 TMPRSS6에 표적된 안티센스 화합물을 포함하는 제약학적 조성물들이 본 출원에 제공된다.
- [0550] 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 방법들은 TMPRSS6 핵산에 대해 상보적인 최소한 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 인접 핵염기 부분을 가지는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0551] 특정 병용 요법들
- [0552] 특정 구체예들에서, 본 출원에 제공된 조성물 또는 화합물을 포함하는 제 1 제제는 하나 또는 그 이상의 2차 제제들과 병용-투여된다. 특정 구체예들에서, 이러한 제 2 제제들은 본 출원에 기재된 제 1 제제와 동일한 철 축적 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위해 설계된다. 특정 구체예들에서, 이러한 제 2 제제들은 본 출원에 기재된 제 1 제제와 상이한 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위해 설계된다. 특정 구체예들에서, 이러한 제 2 제제들은 본 출원에 기재된 하나 또는 그 이상의 조성물 또는 화합물의 바람직하지 않은 부작용을 치료하기 위하여 설계된다. 특정 구체예들에서, 이러한 제 1 제제는 제 2 제제의 바람직하지 않은 부작용을 치료하기 위해 설계된다. 특정 구체예들에서, 제 2 제제들은 제 1 제제의 바람직하지 않은 효과를 치료하기 위해 제 1 제제와 함께 병용-투여된다. 특정 구체예들에서, 제 2 제제들은 병용 효과를 생성하기 위하여 제 1 제제와 병용-투여된다. 특정 구체예들에서, 제 2 제제들은 상승 효과를 생성하기 위하여 제 1 제제와 함께 병용-투여된다. 특정 구체예들에서, 제 1 및 제 2 제제들의 병용-투여는 이들 제제들이 독립 치료법으로 투여되었을 경우 치료적 또는 예방적 효과를 구현하는데 필요한 양 보다 적은 투여량의 사용을 가능하게 한다. 특정 구체예들에서, 병용-투여되는 제 2 제제의 투여량은 제 2 제제가 단독으로 투여되었을 경우 투여되게 될 투여량과 동일하다. 특정 구체예들에서, 병용-투여되는 제 2 제제의 투여량은 제 2 제제가 단독으로 투여되었을 경우 투여되게 될 투여량 보다 많다.

- [0553] 특정 구체예들에서, 제 1 제제 및 하나 또는 그 이상의 제 2 제제들은 동시에 투여된다. 특정 구체예들에서, 제 1 제제 및 하나 또는 그 이상의 제 2 제제들은 상이한 시기에 투여된다. 특정 구체예들에서, 제 2 제제는 제 1 제제의 투여 이전에 투여된다. 특정 구체예들에서, 제 2 제제는 제 1 제제의 투여 이후에 투여된다. 특정 구체예들에서, 제 1 제제 및 하나 또는 그 이상의 제 2 제제들은 함께 단일 제약학적 제제로 제조된다. 특정 구체예들에서, 제 1 제제 및 하나 또는 그 이상의 제 2 제제들은 별도로 제조된다.
- [0554] 특정 구체예들에서, 제 2 제제들은 핵산 화합물들을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 핵산 화합물들은 TMPRSS6 또는 또다른 표적을 표적하는 siRNA, 리보자임 또는 안티센스 화합물들을 포함할 수 있다.
- [0555] 특정 구체예들에서, 제 2 제제들은 비-안티센스 화합물, 가령, 철 킬레이트제, 트랜스페린, 골 형태발생 단백질 6 (BMP6), 헵시딘 작용제, 줄기 세포, TMPRSS6을 표적하는 항체 또는 태아 헤모글로빈 (HbF)-상승 제제를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 또다른 구체예들에서, 철 킬레이트제들은 FBS0701 (FerroKin), 엑스자이드, 데스페랄, 및 데페리프론에서 선택되나 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 구체예들에서, HbF-상승 제제는 5-하이드록실 우레아, 단쇄 지방산 (SCFA) 유도체 (예컨대, HQK1001), DNA 메틸전이효소 억제제 (예컨대, 데시타빈) 또는 히스톤 탈아세틸화효소 (histone deacetylase, HDAC) 억제제 (예컨대, 졸리나(Zolina), 파노비노스타트 (Panobinostat))를 포함한다.
- [0556] 특정 구체예들에서, 제 2 제제는 정맥절개술 또는 수혈 치료법을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 구체예들에서, 제 1 제제는 정맥절개술 또는 수혈 치료법과 동시에 투여된다. 특정 구체예들에서, 제 1 제제는 정맥절개술 또는 수혈 치료법 이전에 투여된다. 특정 구체예들에서, 제 1 제제는 정맥절개술 또는 수혈 치료법 이후에 투여된다. 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 조성물 또는 화합물의 투여는 개체의 정맥절개술 또는 수혈의 빈도를 감소시킨다. 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 조성물 또는 화합물의 투여는 개체의 정맥절개술 또는 수혈의 빈도를 증가시킨다. 특정 구체예들에서, 본 출원에서 제공되는 조성물 또는 화합물의 투여는 정맥절개술 또는 수혈에 필요한 시간의 길이를 단축시킨다.
- [0557] *특정 화합물들*
- [0558] 인간에서 치료적 처리제로서의 용도를 높이는 유익한 성질을 가진 바람직한 안티센스 화합물들이 본 출원의 실시예에서 설명된다. 간결히 하기 위해, 바람직한 안티센스 화합물들의 선택을 돕는 연구들만을 기재한다. 참고를 용이하게 하기 위하여 실시예들에 관한 간략한 요약이 아래에서 제공된다.
- [0559] 인간 TMPRSS6을 표적하는 MOE 깎머 모티프 또는 cEt 내포 모티프를 가지는 약 2200개의 안티센스 화합물들이 설계되었으며 단회 투여량을 Hep3B 세포들에 투여한 후 이들 세포들에서 인간 TMPRSS6 mRNA에 대한 이 화합물들의 효과에 관해 선별되었다. 실시예 1은 추가 연구를 위해 선택되었던 100개 이상의 효능있는 안티센스 화합물들에 관한 대표적인 단회 투여량 선별 데이터를 보여준다.
- [0560] 단회 투여로 시험관내 테스트된 대략 2200개의 안티센스 화합물 중에서, 약 100개의 안티센스 화합물들이 Hep3B 세포들에서의 반수 최대 억제 농도 (IC₅₀)를 결정하기 위한 투여량-의존적 억제 연구에서 테스트하기 위해 선택되었다 (실시예 2).
- [0561] 투여량 반응 및/또는 단회 투여량 연구에서의 이들의 효능에 기초하여, 약 77개의 안티센스 화합물들이 마우스에서 안티센스 화합물의 내약성 (예컨대, 혈장 화학 표지자들, 체중 및 장기 중량)을 결정하기 위한 CD-1 마우스 연구 (실시예 3-4)를 위해 또다시 선택되었다.
- [0562] CD-1 마우스에서 내약성에 관해 테스트된 대략 77개의 안티센스 화합물들 중, 약 48개의 안티센스 화합물들이 래트에서의 내약성을 결정하기 위한 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 래트 연구 (실시예 5)를 위해 선택되었다.
- [0563] 래트 내약성 연구에 기초하여, 약 32개의 안티센스 화합물들이 인간 TMPRSS6 유전자삽입 (huTMPRSS6 tg) 마우스에서의 생체내 효능 테스트 (실시예 6)를 위해 선택되었다.
- [0564] 마우스 연구에서 효능있고 내약성을 띠는 것으로 식별된 안티센스 화합물들을 레서스 원숭이(rhesus monkey) TMPRSS6 유전자 서열에 대한 교차-반응성에 관해 평가하였다 (실시예 7). 본 출원에 기재된 연구들에서 안티센스 화합물들은 시노물구스 원숭이(cynomolgus monkeys)에서 테스트되었으나 (실시예 11), 시노물구스 원숭이 TMPRSS6 서열은 안티센스 화합물들의 서열들과의 비교에 이용할 수 없었으므로, 안티센스 화합물들의 서열들은 가까운 관계에 있는 레서스 원숭이의 서열과 비교되었다. 약 7개의 안티센스 화합물들이 레서스 TMPRSS6 유전자 서열과 전혀 미스매치가 없는 것으로 밝혀졌다.

- [0565] 마우스 효능과 내약성 연구 결과 및 레서스 원숭이 서열에 대한 상동성에 기초하여, 앞선 연구들로부터 7개의 안티센스 화합물들 (585774, 585683, 585775, 630718, 647477, 647449, 647420)의 서열들이 TMPRSS6 수준을 감소시키는 데 있어 이들 화합물들을 보다 효능있게 만드는 추가 화학적 변형을 위해 선택되었다. GalNAc 공액체를 가지는 8개의 새로운 안티센스 화합물들 (702843, 705051, 705052, 705053, 706940, 706941, 706942, 706943)이 7개의 원래 안티센스 화합물들에 기초하여 설계되었다 (실시예 7).
- [0566] 상기 8개의 GalNAc 공액된 안티센스 화합물들은 마우스에서 다음에 관해 테스트되었다: CD-1 마우스에서의 내약성 (예컨대, 체중, 장기 중량, 간 대사 표지자 (예컨대, ALT, AST 및 빌리루빈), 신장 대사 표지자 (예컨대, BUN 및 크레아티닌), 조직학, 혈액학 매개변수들 (예컨대, 혈액 세포 수 및 적혈구용적률), 등을 측정하였으며 (실시예 8); 그리고, 인간 TMPRSS6 유전자삽입 마우스에서의 효능에 관해 측정하였다 (실시예 9).
- [0567] 8개의 GalNAc 공액된 안티센스 화합물들은 또한 점성도에 관해 평가되었으며 8개 중 7개가 우수한 점성도 수준을 가지는 것으로 밝혀졌으나 1개는 경계 허용성 점성도 수준을 가지는 것으로 밝혀졌다 (실시예 10).
- [0568] 마우스에서 나타난 우수한 프로파일 및 시험관내 점성도 연구에 기초하여, 8개의 GalNAc 공액된 안티센스 화합물들은 시노물구스 원숭이에서 TMPRSS6 감소 효능, 내약성 및 철 매개변수들 (예컨대, 헵시딘 수준, 혈청 철 및 트랜스페린 포화도)에 대한 이 화합물들의 효과에 관해 추가로 테스트되었다 (실시예 11). 8개의 GalNAc 공액된 안티센스 화합물들은 일반적으로 시노물구스 원숭이에서 효능있고 내약성을 띠는 것으로 밝혀졌다. 안티센스 화합물 705051, 702843, 706942 및 706943은 TMPRSS6, 혈청 철 및 트랜스페린 포화도 감소에 특히 효능있는 것으로 밝혀졌다.
- [0569] 따라서, 치료 제제로서의 용도로 유익한 하나 또는 그 이상의 임의의 특성들을 가지는 안티센스 화합물들이 본 출원에 제공된다. 특정 구체예들에서, 서열 번호: 1-6 중 어느 하나에서 선택된 뉴클레오티드들의 부위에 표적된 또는 이 부위에 특이적으로 혼성화가능한, 본 출원에 기재된 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물들이 본 출원에서 제공된다.
- [0570] 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 특정 안티센스 화합물들은 TMPRSS6 발현을 억제함에 있어서 이들의 효능으로 인해 효과적이다. 특정 구체예들에서, 화합물 또는 조성물들은 TMPRSS6을 최소한 40%, 최소한 45%, 최소한 50%, 최소한 55%, 최소한 60%, 최소한 65%, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90% 또는 최소한 95%만큼 억제한다.
- [0571] 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 특정 안티센스 화합물들은 인간 세포, 예를 들면, Hep3B 세포주에서 테스트하는 경우(실시예 2에 기재) 20 μM 미만, 10 μM 미만, 8 μM 미만, 5 μM 미만, 2 μM 미만, 1 μM 미만, 0.9 μM 미만, 0.8 μM 미만, 0.7 μM 미만, 0.6 μM 미만, 또는 0.5 μM 미만의 시험관내 IC₅₀에 의해 효과적이다.
- [0572] 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 특정 안티센스 화합물들은 ≤ 5 mpk/wk, ≤ 4 mpk/wk, ≤ 3 mpk/wk, ≤ 2 mpk/wk 또는 ≤ 1 mpk/wk의 생체내 중간 유효 용량 (ED₅₀)에 의해 효과적이다. 특정 구체예들에서, ED₅₀ ≤ 1 mpk/wk을 가지는 바람직한 안티센스 화합물들은 실시예 8에 기재된 안티센스 화합물들 702843, 706940, 706942 및 706943을 포함한다.
- [0573] 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 특정 안티센스 화합물들은 실시예 9에 기재된 바와 같이 40 cP 미만, 35 cP 미만, 30 cP 미만, 25 cP 미만, 20 cP 미만, 15 cP 미만, 또는 10 cP 미만의 점성도를 가짐에 의해 효과적이다. 40 cP 초과인 점성도를 가지는 올리고뉴클레오티드들은 최적 미만의 점성도를 가질 것이다.
- [0574] 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 특정 안티센스 화합물들은 실시예에 기재된 생체내 내약성 측정치에 의해 입증되는 바와 같이 매우 내약성을 띤다. 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 특정 안티센스 화합물들은 식염수 처리된 동물들에 비해 3 배, 2 배 또는 1.5 배 이하의 ALT 및/또는 AST 값 증가를 가지는 것에 의해 입증되는 바와 같이 매우 내약성을 띤다.
- [0575] 특정 구체예들에서, 본 출원에 기재된 특정 안티센스 화합물들은 유전자삽입 마우스에서 50% 초과인 억제 효능, ED₅₀ ≤ 1 mpk/wk, 40 cP 미만의 점성도, 및 3배 이하의 ALT 및/또는 AST 증가 중 하나 또는 그 이상을 가짐으로 인해 효과적이다.
- [0576] 특정 구체예들에서, ISIS 702843 (서열 번호: 36)이 바람직하다. 이 화합물은 TMPRSS6 유전자삽입 마우스에서 효능있는 억제제이며 CD-1 마우스에서 매우 내약성인 안티센스 화합물인 것으로 밝혀졌다. 마우스에서 이 화합

물은 식염수 처리된 동물들에 비해 3배 미만의 ALT 및/또는 AST 수준 증가를 가졌다. 이 화합물은 huTMPRSS6 유전자삽입 마우스에서 약 33 cP의 허용가능한 점성도 및 ED₅₀ ≤ 1 mpk/wk를 가졌다. 또한 원숭이들에서, 이 화합물은 TMPRSS6 억제에 있어 가장 효능있는 화합물들 중 하나였다.

[0577] 특정 구체예들에서, ISIS 705051 (서열 번호: 36)이 바람직하다. 이 화합물은 TMPRSS6 유전자삽입 마우스에서 효능있는 억제제이며 CD-1 마우스에서 매우 내약성인 안티센스 화합물인 것으로 밝혀졌다. 마우스에서 이 화합물은 식염수 처리된 동물들에 비해 3배 미만의 ALT 및/또는 AST 수준 증가를 가졌다. 이 화합물은 huTMPRSS6 유전자삽입 마우스에서 약 23 cP의 허용가능한 점성도 및 ED₅₀ ≤ 3 mpk/wk를 가졌다. 또한 원숭이들에서, 이 화합물은 TMPRSS6 억제에 있어 가장 효능있는 화합물들 중 하나였다.

[0578] 특정 구체예들에서, ISIS 706942 (서열 번호: 77)가 바람직하다. 이 화합물은 TMPRSS6 유전자삽입 마우스에서 효능있는 억제제이며 CD-1 마우스에서 매우 내약성인 안티센스 화합물인 것으로 밝혀졌다. 마우스에서 이 화합물은 식염수 처리된 동물들에 비해 3배 미만의 ALT 및/또는 AST 수준 증가를 가졌다. 이 화합물은 huTMPRSS6 유전자삽입 마우스에서 약 20 cP의 허용가능한 점성도 및 ED₅₀ ≤ 1 mpk/wk를 가졌다. 또한 원숭이들에서, 이 화합물은 TMPRSS6 억제에 있어 가장 효능있는 화합물들 중 하나였다.

[0579] 특정 구체예들에서, ISIS 706943 (서열 번호: 77)이 바람직하다. 이 화합물은 TMPRSS6 유전자삽입 마우스에서 효능있는 억제제이며 CD-1 마우스에서 매우 내약성인 안티센스 화합물인 것으로 밝혀졌다. huTMPRSS6 유전자삽입 마우스에서 이 화합물은 식염수 처리된 동물들에 비해 3배 미만의 ALT 및/또는 AST 수준 증가를 가졌다. huTMPRSS6 유전자삽입 마우스에서 이 화합물은 약 19 cP의 허용가능한 점성도 및 ED₅₀ ≤ 1 mpk/wk를 가졌다. 또한 원숭이들에서, 이 화합물은 TMPRSS6 억제에 있어 가장 효능있는 화합물들 중 하나였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0580] 실시예

[0581] 비-제한적 개시 및 참고문헌으로 포함

[0582] 본 출원에 기재된 특정 화합물, 조성물 및 방법들을 특정 구체예들에 따라 특이적으로 기재하였으나, 다음 실시예들은 본 출원에 기재된 화합물을 설명하기 위한 것일 뿐이며 이를 제한하고자 하는 것이 아니다. 본 출원에서 인용된 문헌들 각각은 온전히 참고문헌으로 본 출원에 포함된다.

[0583] 실시예 1: 인간 제2형 막횡단 세린 프로테아제 6 (TMPRSS6)을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오티드

[0584] 대략 2200개의 새로 설계된 키메라 안티센스 올리고뉴클레오티드가 5-10-5 MOE 갭머 또는 cET 내포 갭머들로서 설계되었다.

[0585] 5-10-5 MOE 갭머들은 20개 뉴클레오시드 길이의 올리고뉴클레오티드들로서 설계되었으며, 여기서 중심 갭 분절은 10개의 2'-데옥시뉴클레오시드를 포함하고 5' 방향 및 3' 방향 상에서 각각 5개의 뉴클레오시드를 포함하는 윙 분절들에 의해 플랭크된다. 5' 윙 분절에서의 각각의 뉴클레오시드 및 3' 윙 분절에서의 각각의 뉴클레오시드는 2'-MOE 변형을 가진다. 각각의 갭머 전반에 걸친 뉴클레오시드간 연결들은 포스포로티오에이트 (P=S) 연결들이다. 각각의 갭머 전반에 걸친 모든 시토신 잔기들은 5-메틸시토신이다.

[0586] cET 내포 갭머들은 다양한 데옥시, MOE, 및 (S)-cEt 갭머 모티프들을 이용하여 설계되었다. 데옥시, MOE 및 (S)-cEt 올리고뉴클레오티드들은 16개 뉴클레오시드 길이이며 여기서 뉴클레오시드는 MOE 당 변형, (S)-cEt 당 변형, 또는 데옥시리보오스 중 하나를 가진다. 표 3의 '화학' 컬럼은 각각의 올리고뉴클레오티드의 당 변형들을 기재한다. 'k'는 (S)-cEt 당 변형을 나타내고; 'd'는 데옥시리보오스를 나타내며; 그리고 'e'는 MOE 변형을 나타낸다. 달리 구체적인 언급이 없는 한, 각각의 갭머 전반에 걸친 뉴클레오시드간 연결들은 포스포로티오에이트 (P=S) 연결들이다. 각각의 갭머 전반에 걸친 모든 시토신 잔기들은 5-메틸시토신이다.

[0587] "개시 부위"는 인간 유전자 서열에서 갭머를 표적시키는 5'에 가장 가까운 뉴클레오시드를 나타낸다. "종결 부위"는 인간 유전자 서열에서 갭머를 표적시키는 3'에 가장 가까운 뉴클레오시드를 나타낸다. 아래 표에 열거된 각각의 갭머는 본 출원에서 서열 번호: 1로 명시된 인간 TMPRSS6 mRNA (GENBANK 등록 번호 NM_153609.2) 또는 본 출원에서 서열 번호: 2로 명시된 인간 TMPRSS6 유전체 서열 (뉴클레오티드 16850000 내지 16897000로부터 절단된 GENBANK 등록 번호 NT_011520.12의 보체) 중 하나에 표적된다. 아래 표들에서, 'n/a'는 안티센스 올리고뉴클레오티드가 해당 특정 유전자 서열을 100% 상보적으로 표적하지 않음을 나타낸다.

- [0588] 2200개의 키메라 항이센스 올리고뉴클레오티드들은 TMPRSS6 mRNA에 대한 이들의 단위 투여량 효과에 대해 시험 관내 테스트되었다. 항이센스 올리고뉴클레오티드들은 유사한 배양 조건들을 가졌던 일련의 실험들에서 최소한 1회 테스트되었다.
- [0589] 테스트된 2200개 중 약 110개의 효능있는 항이센스 올리고뉴클레오티드에 관한 대표적인 결과가 아래 나타난 표 1-3에서 제공된다. 이들 효능있는 항이센스 올리고뉴클레오티드들은 아래 기재된 바와 같은 추가 연구들을 위해 선택되었다.
- [0590] 표 1은 5-10⁻⁵ MOE 값들에 의한 TMPRSS6 mRNA의 억제 백분율을 보여준다. 각 웰 당 약 20,000개 세포들의 밀도로 배양된 Hep3B 세포들은 전기천공을 이용하여 4,500 nM 항이센스 올리고뉴클레오티드로 형질감염되었다. 대략 24 시간의 처리 기간 후, RNA가 세포들로부터 단리되고 TMPRSS6 mRNA 수준이 정량적 실시간 PCR에 의해 측정되었다. 인간 프라이머 프로브 세트 RTS3840 (정방향 서열 CAAAGCCCAGAAGATGCTCAA, 본 출원에서 서열 번호: 92로 명시됨; 역방향 서열 GGAATAGACGGAGCTGGAGTTG, 본 출원에서 서열 번호: 93으로 명시됨; 프로브 서열 ACCAGCACCCGCTGGGAAGCTT, 본 출원에서 서열 번호: 94로 명시됨)이 mRNA 수준을 측정하기 위해 사용되었다. TMPRSS6 mRNA 수준은 RIBOGREEN[®]에 의해 측정된 총 RNA 함량에 따라 조정되었다. 결과들은 처리되지 않은 대조군 세포들에 대한, TMPRSS6의 억제 백분율로 제공된다.

[0591] 표 1

[0592]

서열 번호: 1 및/또는 2를 표적하는 5-10-5 MOE 캡머들에 의한 TMPRSS6 mRNA의 억제

ISIS 번호	서열	서열 번호: 1 개시 부위	서열 번호: 1 종결 부위	서열 번호: 2 개시 부위	서열 번호: 2 종결 부위	% 억제	서열 번호
585604	CCATCACCTCCGTC CCCCTG	178	197	7011	7030	58	7
585606	TCCGCTTCCTCGCCATCACC	190	209	7023	7042	51	8
585608	TTTTCTCTGGAGTCTCAC	233	252	7066	7085	52	9
585609	GCTTTTCTCTGGAGTCTC	235	254	7068	7087	79	10
585611	CCGGGCTTTTCTCTGGAGT	239	258	7072	7091	58	11
585626	GGCTTTGGCGTTTCACTGC	449	468	11948	11967	79	12
585629	GAGCATCTTCTGGGCTTGG	461	480	N/A	N/A	80	13
585631	CCTTGAGCATCTTCTGGGCT	465	484	N/A	N/A	84	14
585649	AGTGCCTGCACCACCTCGGG	616	635	14372	14391	79	15
585651	CAGCAGTGCTGCACCACCT	620	639	14376	14395	70	16
585653	TCCTCCACCAGCAGTGCCCTG	628	647	14384	14403	49	17
585654	AGTCCTCCACCAGCAGTGC	631	650	14387	14406	64	18
585655	CAGCAGTCTCCACCAGCA	635	654	14391	14410	66	19
585667	GCTGTGCAGGCCCTTCTTCC	1049	1068	24044	24063	52	20
585668	GTAGTAGCTGTGCAGGCCCT	1055	1074	24050	24069	61	21
585682	ACGGCAAATCATACTTCTGC	1284	1303	26044	26063	60	22
585683	GCACGGCAAATCATACTTCT	1286	1305	26046	26065	58	23
585684	CCCTGGGTGCACGGCAAATC	1294	1313	26054	26073	58	24
585698	CAAACGCAGTTTCTCTCATC	1567	1586	N/A	N/A	52	25
585699	TGCAAACGCAGTTTCTCTCA	1569	1588	N/A	N/A	52	26
585752	GATCACACCTGTGATCGGGG	2504	2523	44266	44285	48	27
585757	CTCCTGCCACCACAGGGCCT	2656	2675	44418	44437	70	28
585758	ACCTCCTGCCACCACAGGGC	2658	2677	44420	44439	69	29
585761	TGCCATCACTGGAGCAGACA	2699	2718	44461	44480	60	30
585762	ATCCTCCTGCCATCACTGGA	2706	2725	44468	44487	38	31
585768	TCCATTCCAGATCCCAAGT	2978	2997	44740	44759	64	32
585769	CTTCCATTCCAGATCCCAA	2980	2999	44742	44761	62	33
585770	ACCTTCCATTCCAGATCCC	2982	3001	44744	44763	52	34
585772	CAAAGGGCAGCTGAGCTCAC	3154	3173	44916	44935	47	35
585774	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	3162	3181	44924	44943	67	36
585775	AGCTTTATTCCAAAGGGCAG	3164	3183	44926	44945	68	37
585776	AGGCAGCTTATTCCAAAGG	3168	3187	44930	44949	59	38
585777	GATCAGGCAGCTTATTCCA	3172	3191	44934	44953	65	39

[0593]

585831	AGGAGCGGCCACCGTCTGT	N/A	N/A	12340	12359	45	40
				12371	12390		
				12562	12581		
585834	GGCAGGAGCGGCCACCGTCC	N/A	N/A	12343	12362	42	41
				12374	12393		
				12565	12584		
585863	TCCCCCTGAGGCTCTCAGGA	N/A	N/A	16233	16252	32	42
				18737	18756		
585864	TAAGTCCCCCTGAGGCTCTC	N/A	N/A	16237	16256	39	43
				18741	18760		
585906	AAGACTGTTCCTTCTCCTTT	N/A	N/A	27990	28009	44	44
585912	CAGCTTGTGCCTGCCAGAG	N/A	N/A	29208	29227	45	45
585932	AGTCTATCTGGCCACAGTGA	N/A	N/A	32981	33000	34	46
585937	GGTCCTTCTTTGAGCCTCAC	N/A	N/A	34800	34819	35	47

[0594] 표 2는 추가 5-10-5 MOE 캡머들에 의한 TMPRSS6 mRNA의 억제 백분율을 보여준다. 각 웰 당 약 20,000개 세포들의 밀도로 배양된 Hep3B 세포들은 전기천공을 이용하여 5,000 nM 안티센스 올리고뉴클레오티드로 형질감염되었다. 대략 24 시간의 처리 기간 후, RNA가 세포들로부터 단리되고 TMPRSS6 mRNA 수준이 정량적 실시간 PCR에 의해 측정되었다. 인간 프라이머 프로브 세트 RTS3840이 mRNA 수준을 측정하는데 사용되었다. TMPRSS6 mRNA 수준은 RIBOGREEN[®]에 의해 측정된 총 RNA 함량에 따라 조정되었다. 결과들은 처리되지 않은 대조군 세포들에 대한, TMPRSS6의 억제 백분율로 제공된다.

[0595] 표 2

[0596] 서열 번호: 1 및/또는 2를 표적하는 5-10-5 MOE 캡머들에 의한 TMPRSS6 mRNA의 억제

ISIS 번호	서열	서열 번호: 1	서열 번호: 1	서열 번호: 2	서열 번호: 2	% 억제	서열 번호
		개시 부위	종결 부위	개시 부위	종결 부위		
591466	CCTCAGGTCACCACTTGCTG	2533	2552	44295	44314	63	48
591491	GCCACCTCCTGCCACCACAG	2661	2680	44423	44442	72	49
591492	ATGCCACCTCCTGCCACCAC	2663	2682	44425	44444	59	50
591514	CTCCATCCTCCTGCCATCAC	2710	2729	44472	44491	59	51
591536	GCAGCTGAGCTCACCTCCA	3148	3167	44910	44929	68	52
591537	GGCAGCTGAGCTCACCTCCC	3149	3168	44911	44930	75	53
591549	GGCAGCTTTATTCCAAGGG	3167	3186	44929	44948	69	54
591550	CAGGCAGCTTTATTCCAAG	3169	3188	44931	44950	76	55
591552	ATCAGGCAGCTTTATTCCAA	3171	3190	44933	44952	66	56
591578	CCACTGGCCCTGGGTGCACG	1301	1320	26061	26080	65	57
591579	TCCACTGGCCCTGGGTGCAC	1302	1321	26062	26081	68	58

[0597]

[0598] 표 3은 일련의 실험들로부터 얻은, cEt 내포 캡머들에 의한 TMPRSS6 mRNA 억제 백분율을 보여준다. 각 웰 당 약 20,000개 세포들의 밀도로 배양된 Hep3B 세포들은 전기천공을 이용하여 2,000 nM 안티센스 올리고뉴클레오티드로 형질감염되었다. 대략 24 시간의 처리 기간 후, RNA가 세포들로부터 단리되고 TMPRSS6 mRNA 수준이 정량적 실시간 PCR에 의해 측정되었다. 인간 프라이머 프로브 세트 RTS3840이 mRNA 수준을 측정하는데 사용되었다. TMPRSS6 mRNA 수준은 RIBOGREEN[®]에 의해 측정된 총 RNA 함량에 따라 조정되었다. 결과들은 처리되지 않은 대조군 세포들에 대한, TMPRSS6의 억제 백분율로 제공된다.

[0599] 표 3

[0600] 서열 번호: 1 및/또는 2를 표적하는 cEt 내포 캡머들에 의한 TMRSS6 mRNA의 억제

ISIS 번호	서열	서열 번호: 1 개시 부위	서열 번호: 1 종결 부위	서열 번호: 2 개시 부위	서열 번호: 2 종결 부위	화학	% 억제	서열 번호
615840	CTTTGGCTTACAGTG	3057	3072	44819	44834	ekk-d10-kke	59	59
615884	GCTGAGCTCACCTCCC	3149	3164	44911	44926	ekk-d10-kke	70	60
615898	TATCCAAAGGGCAGC	3163	3178	44925	44940	ekk-d10-kke	69	61
615901	CTTTATTCCAAAGGGC	3166	3181	44928	44943	ekk-d10-kke	68	62
615903	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	ekk-d10-kke	70	63
615909	TCAGGCAGCTTTATTC	3174	3189	44936	44951	ekk-d10-kke	69	64
615910	ATCAGGCAGCTTTATT	3175	3190	44937	44952	ekk-d10-kke	69	65
615911	GATCAGGCAGCTTTAT	3176	3191	44938	44953	ekk-d10-kke	69	66
630497	ATTCCAAAGGGCAGCT	3162	3177	44924	44939	kkk-d10-kkk	80	67
630689	CTTACAGTGGCAGCAG	3050	3065	44812	44827	kkk-d10-kkk	71	68
630692	TGGCTTACAGTGGCAG	3053	3068	44815	44830	kkk-d10-kkk	75	69
630693	TTGGCTTACAGTGGCA	3054	3069	44816	44831	kkk-d10-kkk	75	70
630696	CTTTGGCTTACAGTG	3057	3072	44819	44834	kkk-d10-kkk	66	59
630716	CTTTATTCCAAAGGGC	3166	3181	44928	44943	kkk-d10-kkk	63	62
630717	GCTTTATTCCAAAGGG	3167	3182	44929	44944	kkk-d10-kkk	81	71
630718	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	kkk-d10-kkk	84	63
630719	CAGGCAGCTTTATTCC	3173	3188	44935	44950	kkk-d10-kkk	80	72
630722	GATCAGGCAGCTTTAT	3176	3191	44938	44953	kkk-d10-kkk	72	66
630725	TTTGATCAGGCAGCTT	3179	3194	N/A	N/A	kkk-d10-kkk	61	73
630726	TTTTGATCAGGCAGCT	3180	3195	N/A	N/A	kkk-d10-kkk	72	74
630727	TTTTGATCAGGCAGC	3181	3196	N/A	N/A	kkk-d10-kkk	73	75
630794	ACATCAGGGACGAGAC	2686	2701	44448	44463	kk-d8-kekeke	72	76
647393	TTATTCCAAAGGGCAG	3164	3179	44926	44941	kkk-d10-kkk	78	83
647394	TTTATTCCAAAGGGCA	3165	3180	44927	44942	kkk-d10-kkk	77	84
647395	CAGCTTTATTCCAAAG	3169	3184	44931	44946	kkk-d10-kkk	86	77
647396	GCAGCTTTATTCCAAA	3170	3185	44932	44947	kkk-d10-kkk	86	78
647397	GGCAGCTTTATTCCAA	3171	3186	44933	44948	kkk-d10-kkk	85	82
647398	AGGCAGCTTTATTCCA	3172	3187	44934	44949	kkk-d10-kkk	82	79
647404	GGCAGCTGAGCTCACC	3153	3168	44915	44930	kek-d9-eekk	76	85
647414	TATCCAAAGGGCAGC	3163	3178	44925	44940	kek-d9-eekk	86	61
647419	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	kek-d9-eekk	87	63
647420	CAGCTTTATTCCAAAG	3169	3184	44931	44946	kek-d9-eekk	83	77
647421	GCAGCTTTATTCCAAA	3170	3185	44932	44947	kek-d9-eekk	83	78

[0601]

647423	AGGCAGCTTTATTCCA	3172	3187	44934	44949	kek-d9-eekk	84	79
647424	CAGGCAGCTTTATTCC	3173	3188	44935	44950	kek-d9-eekk	78	72
647426	ATCAGGCAGCTTTATT	3175	3190	44937	44952	kek-d9-eekk	81	65
647428	TGATCAGGCAGCTTTA	3177	3192	N/A	N/A	kek-d9-eekk	76	80
647429	TTGATCAGGCAGCTTT	3178	3193	N/A	N/A	kek-d9-eekk	78	81
647442	ATCCAAAGGGCAGCT	3162	3177	44924	44939	kk-d9-eeekk	81	67
647446	CTTTATTCCAAAGGGC	3166	3181	44928	44943	kk-d9-eeekk	79	62
647447	GCTTTATTCCAAAGGG	3167	3182	44929	44944	kk-d9-eeekk	87	71
647448	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	kk-d9-eeekk	86	63
647449	CAGCTTTATTCCAAAG	3169	3184	44931	44946	kk-d9-eeekk	89	77
647450	GCAGCTTTATTCCAAA	3170	3185	44932	44947	kk-d9-eeekk	88	78
647451	GGCAGCTTTATTCCAA	3171	3186	44933	44948	kk-d9-eeekk	88	82
647453	CAGGCAGCTTTATTCC	3173	3188	44935	44950	kk-d9-eeekk	77	72
647454	TCAGGCAGCTTTATTC	3174	3189	44936	44951	kk-d9-eeekk	82	64
647457	TGATCAGGCAGCTTTA	3177	3192	N/A	N/A	kk-d9-eeekk	78	80
647475	CTTTATTCCAAAGGGC	3166	3181	44928	44943	kk-d8- eeekk	77	62
647476	GCTTTATTCCAAAGGG	3167	3182	44929	44944	kk-d8- eeekk	83	71
647477	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	kk-d8- eeekk	84	63
647478	CAGCTTTATTCCAAAG	3169	3184	44931	44946	kk-d8- eeekk	79	77
647482	CAGGCAGCTTTATTCC	3173	3188	44935	44950	kk-d8- eeekk	76	72
647506	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	k-d9-kekeke	89	63
647508	GCAGCTTTATTCCAAA	3170	3185	44932	44947	k-d9-kekeke	77	78
647514	GATCAGGCAGCTTTAT	3176	3191	44938	44953	k-d9-kekeke	78	66
647531	CAGCTTTATTCCAAAG	3169	3184	44931	44946	kk-d8- kekeke	88	77
647532	GCAGCTTTATTCCAAA	3170	3185	44932	44947	kk-d8- kekeke	77	78

[0602]

[0603]

실시예 2: Hep3B 세포에서 인간 TMPRSS6을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 투여량 반응

[0604]

실시예 1에 기재된 단회 투여량 실험들에서 테스트된 약 2200개의 안티센스 올리고뉴클레오티드로부터 선택된 약 100개의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 또한 인간 TMPRSS6 mRNA의 시험관내 억제 연구에서 Hep3B 세포들에서 다양한 투여량으로 테스트되었다.

[0605]

아래 표 4의 실험을 위해, 세포들은 각 웰 당 12,000개의 세포 밀도로 플레이팅되고 전기천공을 이용하여 0.15 μ M, 0.44 μ M, 1.33 μ M, 4.00 μ M 및 12.00 μ M 농도의 안티센스 올리고뉴클레오티드로 형질감염되었다. 대략 16 시간의 처리 기간 후, RNA가 세포들로부터 단리되고 TMPRSS6 mRNA 수준이 정량적 실시간 PCR에 의해 측정되었다. 인간 프라이머 프로브 세트 RTS3840이 mRNA 수준을 측정하는데 사용되었다. TMPRSS6 mRNA 수준은 RIBOGREEN[®]에 의해 측정된 총 RNA 함량에 따라 조정되었다. 결과들은 처리되지 않은 대조군 세포들에 대한, TMPRSS6의 억제 백분율로 제공된다. "0"은 안티센스 올리고뉴클레오티드가 TMPRSS6 mRNA 수준을 감소시키지 않았음을 나타낸다.

[0606]

또한 각각의 올리고뉴클레오티드의 반수 최대 억제 농도 (IC₅₀)가 제공된다. TMPRSS6 mRNA 수준은 안티센스 올리고뉴클레오티드 처리된 세포들에서 투여량-의존 방식으로 현저히 감소되었다.

[0607]

표 4

[0608]

5-10-5 MOE 값머들을 이용한 투여량 반응 분석

ISIS 번호	0.15 μM	0.44 μM	1.33 μM	4.00 μM	12.00 μM	IC ₅₀ (μM)
585604	0	0	17	36	63	7
585606	0	0	0	0	35	>12
585608	0	13	6	8	50	>12
585609	0	10	24	44	68	5
585611	0	0	9	33	67	8
585626	3	21	27	55	82	3
585629	37	45	56	71	83	1
585631	29	56	63	70	84	1
585649	0	9	35	46	74	4
585651	0	18	1	39	75	6
585653	10	15	18	42	63	7
585654	0	0	25	33	65	8
585655	0	12	15	34	65	8
585667	0	0	2	30	52	>12
585668	11	6	0	43	70	8
585682	0	0	0	30	63	11
585683	1	9	19	39	77	5
585684	6	1	13	21	57	>12
585698	13	11	37	39	78	4
585699	0	8	25	25	65	8
585752	0	12	37	34	69	5
585757	0	7	16	53	79	4
585758	6	0	25	49	71	5
585761	2	12	13	39	66	7
585762	2	15	26	44	75	4
585768	4	0	20	52	76	4
585769	0	0	0	42	70	7
585770	12	12	42	50	68	3
585772	12	12	23	34	56	12
585774	15	28	58	68	84	1
585775	0	7	28	60	82	3
585776	36	24	56	69	86	1
585777	15	39	63	76	88	1
585831	0	8	3	19	31	>12
585834	0	10	3	6	32	>12
585863	7	7	3	0	51	>12
585864	5	9	19	31	34	>12

[0609]

585906	13	2	16	11	29	>12
585912	20	0	30	33	32	>12
585932	15	11	25	4	37	>12
585937	20	33	30	30	43	>12
591466	0	14	26	39	71	5
591491	0	11	23	45	68	5
591492	0	0	22	27	64	9
591514	0	0	1	41	75	6
591536	13	22	34	64	81	2
591537	17	44	57	81	88	1
591549	21	26	51	72	87	1
591550	19	34	65	76	89	1
591552	23	49	65	86	90	1
591578	0	17	28	45	55	7
591579	3	13	47	40	58	6

[0610] 아래 표 5의 실험을 위해, 세포들은 각 웰 당 5,000개의 세포 밀도로 플레이팅되고 전기천공을 이용하여 0.19 μM , 0.56 μM , 1.67 μM 및 5.0 μM 농도의 안티센스 올리고뉴클레오티드로 형질감염되었다. 대략 16 시간의 치료 기간 후, RNA가 세포들로부터 단리되고 TMPRSS6 mRNA 수준이 정량적 실시간 PCR에 의해 측정되었다. 인간 프라이머 프로브 세트 RTS3840이 mRNA 수준을 측정하기 위해 다시 사용되었다. TMPRSS6 mRNA 수준은 RIBOGREEN[®]에 의해 측정된 총 RNA 함량에 따라 조정되었다. 결과들은 처리되지 않은 대조군 세포들에 대한, TMPRSS6의 억제 백분율로 제공된다.

[0611] 또한 각각의 올리고뉴클레오티드의 반수 최대 억제 농도 (IC₅₀)가 제공된다. TMPRSS6 mRNA 수준은 안티센스 올리고뉴클레오티드 처리된 세포들에서 투여량-의존 방식으로 현저히 감소되었다.

[0612] 표 5

[0613] cEt 내포 올리고뉴클레오티드들을 이용한 투여량 반응 분석

ISIS 번호	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC ₅₀ (μM)
630497	28	49	69	86	0.6
647393	28	42	69	84	0.7
647394	43	59	67	83	0.3
647395	11	41	67	83	0.9
647396	25	47	73	79	0.7
647397	27	42	70	83	0.7
647398	27	49	61	84	0.7
647404	23	47	63	79	0.8
647414	38	52	72	87	0.4
647419	45	60	74	84	0.3
647420	28	52	69	82	0.6
647421	23	47	68	85	0.7
647423	23	50	74	81	0.7
647424	20	48	72	83	0.7
647426	26	37	67	76	0.9
647428	25	33	61	83	0.9
647429	20	32	59	83	1
647442	32	51	66	78	0.6
647446	32	48	73	81	0.6
647447	29	52	70	81	0.6
647448	30	56	72	79	0.5
647449	31	45	71	83	0.6
647450	32	54	70	82	0.5
647451	40	62	74	83	0.3
647453	28	52	68	84	0.6
647454	32	45	62	84	0.7
647457	28	46	69	80	0.7
647475	9	52	63	77	1
647476	43	59	70	79	0.3
647477	48	62	77	83	0.2
647478	16	41	68	82	0.9
647482	14	37	73	79	0.9
647506	37	60	75	83	0.4
647508	21	39	52	79	1.1
647514	32	42	63	81	0.7
647531	25	53	73	80	0.6
647532	26	49	61	82	0.7

[0614]

[0615] 아래 표 6의 실험을 위해, 세포들은 각 웰 당 20,000개의 세포 밀도로 플레이팅되고 전기천공을 이용하여 0.22 μM , 0.67 μM , 2.00 μM 및 6.0 μM 농도의 안티센스 올리고뉴클레오티드로 형질감염되었다. 대략 16 시간의 처리 기간 후, RNA가 세포들로부터 단리되고 TMPRSS6 mRNA 수준이 정량적 실시간 PCR에 의해 측정되었다. 인간 프라이머 프로브 세트 RTS3840이 mRNA 수준을 측정하는데 사용되었다. TMPRSS6 mRNA 수준은 RIBOGREEN[®]에 의해

측정된 총 RNA 함량에 따라 조정되었다. 결과들은 처리되지 않은 대조군 세포들에 대한, TMPRSS6의 억제 백분율로 제공된다.

[0616] 또한 각각의 올리고뉴클레오티드의 반수 최대 억제 농도 (IC₅₀)가 제공된다. TMPRSS6 mRNA 수준은 안티센스 올리고뉴클레오티드 처리된 세포들에서 투여량-의존 방식으로 현저히 감소되었다.

[0617] 표 6

[0618] cEt 내포 올리고뉴클레오티드들을 이용한 투여량 반응 분석

ISIS 번호	0.22 μM	0.67 μM	2.00 μM	6.00 μM	IC ₅₀ (μM)
630497	34	54	81	89	0.5
630689	43	61	77	87	0.3
630692	54	64	85	95	0.2
630693	42	66	75	86	0.3
630696	20	37	66	82	1.1
630717	48	73	84	83	0.1
630718	49	81	88	89	0.1
630719	42	69	83	95	0.3
630722	40	56	70	90	0.4
630726	24	45	64	82	0.9
630727	36	57	73	82	0.5
630794	25	46	71	84	0.8

[0619]

[0620] 실시예 3: CD1 마우스에서 인간 TMPRSS6을 표적하는 5-10-5 MOE 캡머들의 내약성

[0621] CD1® 마우스 (Charles River, MA)는 안정성 및 효능 테스트에 빈번히 사용되는 다목적 마우스 모델이다. 마우스들을 상기 표들에서 선택된 약 26개의 ISIS 5-10-5 MOE 캡머 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리하고 다양한 혈장 화학 표지자들의 수준 변화에 대해 평가하였다.

[0622] 처리

[0623] 6주령 수컷 CD1 마우스 그룹들에게 ISIS 올리고뉴클레오티드들 50 mg/kg을 6주간 주 2회 피하 주사하였다 (100 mg/kg/주 투여량). 수컷 CD1 마우스의 한 그룹에게 PBS를 6주간 주 2회 피하 주사하였다. 마지막 투여 48시간 후에 마우스를 안락사시키고, 추가 분석을 위해 장기 및 혈장을 수집하였다.

[0624] 혈장 화학 표지자

[0625] 간 및 신장 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오티드들의 효과를 평가하기 위하여, 아미노전달효소 (ALT 및 AST), 총 빌리루빈 (Tbil), 알부민 (Alb), 크레아티닌 (Creat), 및 BUN의 혈장 수준들을 자동화 임상 화학 분석기 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)를 사용하여 측정하였다. 결과는 표 7에 제공된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관해 예상되는 범위를 벗어난 임의의 간 또는 신장 기능 표지자들의 수준 변화를 유발한 ISIS 올리고뉴클레오티드들은 추가 연구에서 제외되었다.

[0626] 표 7

[0627] 6주시 CD1 마우스에서의 혈장 화학 표지자들

ISIS 번호	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	24	51	27	0.17	0.17	2.9
585626	167	155	30	0.18	0.15	2.9
585649	263	157	28	0.17	0.15	3.0
585653	147	89	28	0.18	0.39	3.4
585654	778	300	26	0.15	0.17	3.0
585655	1709	1353	29	0.16	0.35	3.0
585683	45	63	31	0.18	0.20	3.0
585698	53	73	34	0.21	0.19	3.0
585752	90	99	29	0.16	0.17	2.9
585757	246	180	30	0.16	0.15	2.8
585758	212	305	28	0.18	0.28	2.9
585761	659	439	28	0.16	0.43	2.7
585762	597	551	27	0.17	0.64	3.0
585768	483	387	26	0.18	0.19	2.7
585774	109	126	31	0.16	0.14	2.6
585775	60	70	28	0.17	0.15	2.9
585776	654	388	27	0.17	0.13	2.9
585777	159	200	24	0.16	0.17	2.7
591466	46	53	27	0.15	0.12	3.0
591491	761	729	28	0.18	0.25	3.2
591514	230	215	33	0.15	0.14	2.5
591536	540	416	26	0.16	0.13	3.0
591537	552	346	27	0.17	0.16	3.0
591549	708	488	30	0.14	0.14	2.7
591550	294	225	31	0.17	0.12	2.9
591552	1098	680	24	0.17	0.17	3.0
591579	135	85	25	0.16	0.12	2.8

[0628]

[0629] 체중 및 장기 중량

[0630] 모든 마우스 그룹들의 체중들은 실험 시작시 그리고 연구 종료시까지 매주 측정되었다. 연구 종료시 간, 비장 및 신장 중량 또한 측정하였으며, 기준선의 PBS 대조군 그룹에 대한 체중 및 장기 중량의 변화가 표 8에 제공된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관해 예상되는 범위를 벗어난 임의의 장기 중량 변화를 유발한 ISIS 올리고뉴클레오티드들은 추가 연구에서 제외되었다.

[0631] 표 8

[0632] 6주시 CD1 마우스의 체중 및 상대 장기 중량 (그램)

ISIS 번호	BW 변화 (g)	상대 간 중량 (g)	상대 신장 중량 (g)	상대 비장 중량 (g)
PBS	1.4	1.0	1.0	1.0
585626	1.4	1.2	0.9	1.1
585649	1.3	1.2	1.0	1.1
585653	1.4	1.1	1.0	0.9
585654	1.2	1.2	1.0	1.1
585655	1.3	1.4	1.0	1.3
585683	1.4	1.0	0.9	1.1
585698	1.5	1.2	1.0	1.4
585752	1.3	1.1	1.0	1.3
585757	1.4	1.5	1.0	1.1
585758	1.4	1.4	0.9	1.0
585761	1.1	1.4	1.0	1.3
585762	1.2	2.1	1.0	0.8
585768	1.5	1.1	1.1	1.3
585774	1.5	1.1	1.0	1.1
585775	1.5	0.9	1.0	1.2
585776	1.4	1.3	1.1	1.5
585777	1.4	1.2	1.1	1.5
591466	1.5	1.0	1.0	1.0
591491	1.3	1.2	1.0	1.1
591514	1.4	1.1	0.9	1.5
591536	1.4	1.3	1.0	1.1
591537	1.3	1.3	0.9	1.3
591549	1.4	1.2	1.0	1.5
591550	1.4	1.1	0.9	1.5
591552	1.4	1.5	1.1	1.5
591579	1.5	1.0	0.9	1.1

[0633]

[0634] 이들 내약성 연구로부터, 대부분의 5-10-5 MOE 캡머 안티센스 올리고뉴클레오티드들이 6주간의 투약 후 우수한 내약성을 보였음이 관찰되었다.

[0635] **실시예 4: CD1 마우스에서 인간 TMPRSS6을 표적하는 cEt 내포 올리고뉴클레오티드들의 내약성**

[0636] CD1® 마우스 (Charles River, MA)는 안정성 및 효능 테스트에 빈번히 사용되는 다목적 마우스 모델이다. 마우스들을 상기 표들에서 선택된 약 51개의 cEt 내포 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리하고 다양한 혈장 화학 표지자들의 수준 변화에 대해 평가하였다.

[0637] 처리

[0638] 5 내지 6주령 수컷 CD1 마우스 그룹들 (각 치료 그룹 당 n=4)에게 ISIS 올리고뉴클레오티드들 25 mg/kg을 6주간 주 2회 피하 주사하였다 (50 mg/kg/주 투여량). 수컷 CD1 마우스의 한 그룹에게 PBS를 6주간 주 2회 피하 주사하였다. 마지막 투여 48시간 후에 마우스를 안락사시키고, 추가 분석을 위해 장기 및 혈장을 수집하였다. 간, 신장 및 비장을 조직학을 위해 수집하였고, 그리고 혈장은 특정 혈장 화학 표지자들의 수준을 측정하기 위하여 수집하였다.

[0639] 올리고뉴클레오티드들을 동일한 조건을 가진 2개의 테스트 그룹들로 나누었으며 결과를 아래 표들에 제공한다.

[0640] **혈장 화학 표지자**

[0641] 간 및 신장 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오티드들의 효과를 평가하기 위하여, 아미노전달효소, 빌리루빈, 알부민, 크레아티닌, 및 BUN의 혈장 수준들을 자동화 임상 화학 분석기 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)를 사용하여 측정하였다. 결과가 표 9-10에 제공된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관해 예상되는 범위를 벗어난 임의의 간 또는 신장 기능 표지자의 수준 변화를 유발하는 ISIS 올리고뉴클레오티드들은 추가 연구로부터 제외되었다.

[0642] **표 9**

[0643] 6주시 CD1 마우스에서의 혈장 화학 표지자들

ISIS 번호	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	55	53	24	0.1	0.2	2.7
615840	752	636	26	0.15	0.23	2.5
615884	1039	664	25	0.17	0.17	2.8
615898	754	420	25	0.17	0.14	2.5
615901	118	120	22	0.11	0.18	2.5
615903	33	46	22	0.12	0.18	2.5
615909	2042	2464	49	0.16	1.19	2.7
615910	978	1058	22	0.15	1.24	2.4
615911	474	366	23	0.14	0.34	2.4
630696	1117	853	26	0.15	0.21	2.3
630716	41	67	25	0.13	0.14	2.4
630717	1005	483	23	0.13	0.19	2.3
630718	57	86	25	0.13	0.13	2.4
630722	207	168	21	0.13	0.16	2.2
630725	1729	897	20	0.12	0.15	2.2
630726	1330	774	22	0.10	0.10	2.1
630727	614	653	23	0.10	0.13	1.6
630794	39	78	24	0.12	0.16	2.6

[0644]

[0645] **표 10:**

[0646] 6주시 CD1 마우스에서의 혈장 화학 표지자들

ISIS 번호	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	31.3	54.8	32.3	0.14	0.19	3.0
630497	429.0	297.5	31.0	0.18	0.11	2.8
630689	2088.3	1306.0	34.7	0.10	0.22	2.2
630692	1634.8	1402.5	30.9	0.16	0.25	3.4
630693	1247.5	1193.8	33.6	0.19	0.68	2.8
630719	2553.0	2594.7	28.6	0.12	2.55	3.8
647414	718.5	444.0	32.7	0.13	0.12	3.0
647419	39.3	66.5	27.0	0.13	0.15	2.9
647420	90.3	100.8	30.8	0.13	0.19	3.1
647421	613.3	607.3	15.5	0.09	1.61	2.6
647423	1290.3	807.5	29.8	0.28	0.30	3.7
647424	1451.0	1198.3	25.2	0.16	0.37	3.7
647426	548.5	393.0	23.7	0.12	0.16	2.7
647428	2658.8	2232.8	24.8	0.21	0.52	3.0
647429	1306.3	725.3	23.2	0.12	0.21	2.8
647442	564.8	371.5	29.7	0.08	0.13	3.0
647446	69.0	91.3	27.6	0.10	0.14	2.9
647447	61.5	76.3	27.2	0.11	0.13	2.8
647448	100.8	110.5	24.4	0.10	0.14	2.9
647449	61.3	88.0	27.7	0.10	0.13	3.1
647450	1850.8	1512.0	18.3	0.09	0.47	2.9
647451	1376.3	588.3	26.0	0.15	0.29	3.7
647453	1774.3	1674.5	28.8	0.16	1.24	3.7
647454	324.3	409.3	27.0	0.11	0.15	2.7
647457	1609.0	1194.8	25.6	0.12	0.21	2.6
647475	40.0	80.5	25.1	0.10	0.12	2.6
647476	62.0	81.0	26.1	0.11	0.14	2.8
647477	74.8	94.0	26.5	0.11	0.15	2.9
647478	62.0	88.0	28.2	0.11	0.13	3.1
647482	959.8	975.8	25.8	0.11	0.19	2.9
647506	36.3	65.3	25.8	0.10	0.14	2.9
647508	49.8	93.3	26.3	0.11	0.14	3.1
647514	276.0	221.8	28.3	0.11	0.17	2.9
647531	248.5	175.0	28.7	0.11	0.16	3.2
647532	156.8	180.0	21.3	0.09	0.10	3.0

[0647]

[0648] 체중 및 장기 중량

[0649] 모든 마우스 그룹들의 체중들은 실험 시작시 그리고 연구 종료시까지 매주 측정되었다. 연구 종료시 간, 비장 및 신장 중량 또한 측정하였으며, 기준선의 PBS 대조군 그룹에 대한 체중 및 장기 중량의 변화가 표 11-12에 제공된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관해 예상되는 범위를 벗어난 임의의 장기 중량 변화를 유발한 ISIS 올리고뉴클레오티드들은 추가 연구에서 제외되었다.

[0650] 표 11:

[0651] 6주시 CD1 마우스의 체중 및 상대 장기 중량 (그램)

ISIS 번호	BW 변화 (g)	상대 간 중량 (g)	상대 신장 중량 (g)	상대 비장 중량 (g)
PBS	1.5	1	1	1
615840	1.2	1.1	1.0	0.8
615884	1.4	1.5	1.1	1.2
615898	1.5	1.3	1.1	1.4
615901	1.5	1.3	1.1	2.0
615903	1.4	1.1	1.1	1.2
615909	0.8	1.6	1.2	0.7
615910	1.2	1.9	1.0	2.3
615911	1.5	1.4	1.1	1.6
630696	1.1	1.2	0.9	1.2
630716	1.4	1.2	1.2	1.2
630717	1.2	1.4	1.0	1.7
630718	1.4	1.2	1.1	1.4
630722	1.6	1.2	1.1	1.6
630725	1.3	1.2	1.1	1.8
630726	1.4	1.1	1.2	1.9
630727	1.3	1.2	1.2	3.5
630794	1.4	1.0	1.1	1.1

[0652]

[0653] 표 12:

[0654] 6주시 CD1 마우스의 체중 및 상대 장기 중량 (그램)

ISIS 번호	BW 변화 (g)	상대 간 중량 (g)	상대 신장 중량 (g)	상대 비장 중량 (g)
PBS	1.5	1	1	1
630497	1.3	1.2	1.0	1.1
630689	1.6	1.3	1.0	1.4
630692	1.5	1.9	0.9	1.2
630693	1.2	1.3	0.8	0.9
630719	0.8	1.4	1.1	0.4
647414	1.4	1.2	1.1	1.0
647419	1.5	1.0	1.1	1.2
647420	1.4	1.1	1.0	1.4
647421	1.2	1.1	1.1	1.3
647423	1.4	1.7	1.1	1.3
647424	1.1	1.8	1.2	0.6
647426	1.4	1.5	1.1	1.8
647428	1.3	1.4	1.1	1.9
647429	1.4	1.2	1.0	1.6
647442	1.3	1.1	1.1	1.1
647446	1.4	1.2	1.2	1.4
647447	1.5	1.3	1.2	1.4
647448	1.5	1.1	1.1	1.5
647449	1.5	1.1	1.1	1.6
647450	1.4	1.3	1.1	1.9
647451	1.4	1.6	1.0	1.8
647453	1.2	1.8	1.4	1.5
647454	1.5	1.6	1.0	2.2
647457	1.4	1.3	1.0	1.8
647475	1.4	1.2	1.1	1.5
647476	1.5	1.1	1.2	1.8
647477	1.5	1.2	1.0	1.5
647478	1.6	1.1	1.0	1.2
647482	1.4	1.7	1.2	1.5
647506	1.5	1.1	1.0	1.2
647508	1.6	1.0	1.0	1.2
647514	1.5	1.0	1.0	1.5
647531	1.4	1.0	1.0	1.4
647532	1.5	1.3	1.1	1.4

[0655]

[0656] 실시예 5: 스프라그-돌리 래트에서 인간 TMPRSS6을 표적하는 올리고뉴클레오티드들의 내약성

[0657] 스프라그-돌리 래트들은 안정성 및 효능 평가에 사용되는 다목적 모델이다. 래트들을 상기 실시예들에 기재된 연구들로부터, 마우스에서 시험관내 효능있고 내약성있는 것으로 밝혀진 약 48개의 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리하고, 다양한 혈장 화학 표지자들의 수준 변화에 관하여 평가하였다.

[0658] 처리

[0659] 수컷 스프라그-돌리 래트들 (대략 8주령)을 12-시간 명/암 주기로 유지시키고 Purina 정상 래트 사료(normal rat chow), diet 5001로 임의 급식하였다. 4개의 스프라그-돌리 래트 그룹들 각각을 100 mg/kg의 MOE 캡머; 또는 50 mg/kg의 cEt 내포 안티센스 올리고뉴클레오티드로 6주간 주 1회 피하 주사하였다. 아래 기재하는 혈액학적 평가를 위하여 최종 투여 1 내지 2일 후, 소변 단백질/크레아티닌 (P/C) 비율을 분석하고 마지막 투여 후 3일에 혈액을 채취하였다. 마지막 투여 후 3일에, 래트들을 안락사시키고 추가 분석을 위해 장기 및 혈장을 수집하였다.

[0660] 혈장 화학 표지자

[0661] 간 및 신장 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오티드들의 효과를 평가하기 위하여, 아미노전달효소 (알라닌 아미노

전달효소 (ALT) 및 아스파르테이트 아미노전달효소 (AST), 총 빌리루빈 (Tbil), 알부민 (Alb), 크레아티닌 (Creat), 및 BUN의 혈장 수준들을 자동화 임상 화학 분석기 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)를 사용하여 측정하였다. 결과는 표 13에 제공된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관해 예상되는 범위를 벗어난 임의의 값 또는 신장 기능 표지자들의 수준 변화를 유발한 ISIS 올리고뉴클레오티드들은 추가 연구에서 제외되었다.

표 13:

스프라그-돌리 래트에서의 혈장 화학 표지자

ISIS 번호	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	60	92	18	0.3	0.1	3.7
585626	66	139	25	0.4	0.1	3.2
585653	92	154	26	0.4	0.1	3.9
585683	73	109	19	0.4	0.1	3.3
585698	66	104	22	0.4	0.1	3.4
585752	64	145	21	0.4	0.1	3.0
585758	113	669	21	0.3	0.2	2.8
585774	125	220	25	0.4	0.2	3.2
585775	66	117	24	0.4	0.1	3.2
585777	302	321	25	0.4	0.2	3.4
591466	368	444	22	0.4	0.2	3.1
591514	91	218	22	0.3	0.2	3.3
591579	484	655	20	0.4	0.2	3.8
614954	146	132	26	0.1	0.2	2.8
615895	291	383	26	0.4	0.2	3.4
615897	1946	1467	26	0.5	0.2	4.0
615899	70	113	25	0.4	0.1	3.4
615900	93	131	26	0.4	0.1	3.1
615903	59	70	22	0.4	0.1	3.5
630716	57	86	26	0.5	0.1	3.1
630718	61	72	23	0.4	0.1	3.4
630722	117	153	24	0.4	0.1	3.2
630794	90	113	29	0.5	0.1	3.4
630800	92	133	25	0.4	0.1	3.6
630948	48	77	21	0.4	0.1	3.3
630950	79	83	25	0.4	0.1	3.3
630952	208	243	31	0.4	0.2	2.9
630953	87	135	22	0.4	0.1	3.0
630957	110	115	26	0.4	0.1	3.6
637749	63	102	25	0.1	0.2	3.2
647384	135	158	24	0.4	0.1	3.7
647389	243	272	25	0.2	0.2	3.6
647391	205	520	27	0.0	1.1	2.1
647393	142	172	27	0.2	0.1	3.4
647394	391	340	29	0.1	0.2	2.8
647395	68	95	24	0.1	0.1	3.2
647419	53	66	23	0.4	0.1	3.5

647420	56	80	23	0.1	0.1	3.3
647446	66	110	23	0.2	0.1	3.4
647447	54	67	22	0.1	0.1	3.1
647448	55	73	26	0.4	0.1	3.3
647449	46	81	24	0.4	0.1	3.2
647475	45	78	26	0.4	0.1	3.5
647476	52	85	20	0.4	0.1	3.2
647477	58	89	24	0.5	0.1	3.5
647478	50	82.8	22.8	0.4	0.1	3.2
647506	45	95.3	22.9	0.4	0.1	3.2
647508	73	183.3	33.3	0.3	0.1	2.5
647532	108	179.5	47.8	0.5	0.1	1.8

표 14

[0666] 스프라그-돌리 래트의 소변에서 P/C 비율

PBS	1.0
585626	6.7
585653	9.4
585683	7.0
585698	6.2
585752	13.4
585758	11.5
585774	7.5
585775	6.7
585777	7.6
591466	8.0
591514	8.0
591579	7.3
614954	5.2
615895	2.9
615897	4.7
615899	4.2
615900	4.5
615903	5.7
630716	3.9
630718	4.5
630722	4.3
630794	2.3
630800	5.1
630948	2.4
630950	6.3
630952	6.6
630953	4.4
630957	3.8
637749	3.0
647384	2.2
647389	2.4
647391	3.4
647393	3.7
647394	9.9
647395	5.2
647419	5.0
647420	4.9
647446	3.8

[0667]

647447	3.9
647448	5.6
647449	5.0
647475	4.1
647476	4.6
647477	5.8
647478	4.6
647506	4.7
647508	9.2
647532	49.4

[0668]

[0669] 혈액학 분석

[0670] 적혈구세포 (RBC) 수, 백혈구 세포 (WBC) 수, 개체의 백혈구 세포 수 -- 가령, 단핵구, 호중구, 림프구의 수-- 뿐만 아니라 혈소판 수, 총 헤모글로빈 함량 및 적혈구용적률 (HCT)의 측정 및 분석을 위하여, 이용가능한 연구 동물들 각각으로부터 대략 1.3 mL의 혈액의 혈액 샘플들을 K₂-EDTA를 내포하는 시험관에 수집하고 IDEXX 연구소 (IDEXX Laboratories, Inc)(Fremont, CA)로 보냈다. 결과는 표 15에 제공된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드에

관해 예상되는 범위를 벗어난 임의의 혈액학 표지자들의 수준 변화를 유발한 ISIS 올리고뉴클레오티드들은 추가 연구에서 제외되었다.

[0671] 표 15

[0672] 스프라그-돌리 래트에서의 혈액학 표지자

ISIS 번호	WBC (x 10 ³ /μL)	RBC (x 10 ⁶ /μL)	HCT (%)	림프구 (/mm ³)	단핵구 (/mm ³)	혈소판 (x 10 ³ /μL)
PBS	4.8	8.5	52.7	3567	93	812
585626	10.1	8.3	46.9	8969	252	1237
585653	13.8	8.2	48.3	11190	359	1305
585683	17.8	7.9	45.7	15773	557	826
585698	16.9	7.9	46.0	15380	344	761
585752	15.3	8.0	46.0	11396	585	1158
585758	18.4	7.9	44.0	6369	61	1548
585774	14.7	8.5	48.6	12818	552	873
585775	7.3	8.4	48.4	6218	219	1161
585777	11.2	8.1	47.1	9548	175	982
591466	14.3	8.1	45.6	12519	226	812
591514	14.9	8.5	48.2	10993	169	1157
591579	12.5	9.1	51.1	8540	222	1080
614954	13.6	5.2	29.9	12186	441	511
615895	15.2	8.0	45.9	11868	603	926
615897	14.5	7.5	43.3	10920	786	902
615899	19.8	7.8	43.7	17319	525	566
615900	14.0	7.1	41.0	12167	267	770
615903	9.4	8.5	51.3	7113	268	687
630716	21.1	7.8	45.3	18994	449	601
630718	8.9	8.9	52.5	7071	269	657
630722	17.0	9.1	51.6	13397	721	693
630794	8.8	8.7	50.5	7098	137	529
630800	16.6	8.0	45.3	13210	478	695
630948	7.2	8.5	50.2	5359	158	670
630950	11.0	8.8	52.4	8833	307	544
630952	24.2	7.7	42.8	17991	798	958
630953	25.0	6.9	42.4	20205	713	662
630957	11.7	8.7	50.5	8913	340	684
637749	12.8	7.5	44.7	10837	765	661
647384	14.8	9.0	54.5	11682	354	642
647389	12.8	8.2	51.0	10621	534	1075
647391	16.8	2.3	20.3	13574	807	240
647393	14.5	6.9	40.8	12467	423	1112
647394	24.9	6.5	39.6	21847	1070	990
647395	10.4	7.4	45.2	8685	515	1092
647419	13.8	8.3	48.5	11866	257	939

[0673]

647420	11.1	8.0	47.3	9350	521	1079
647446	5.9	7.5	44.8	4805	258	1076
647447	10.2	7.8	47.3	8542	260	1019
647448	10.7	7.9	45.3	9050	260	933
647449	21.1	7.7	45.5	18809	479	630
647475	17.4	8.3	49.0	14951	562	776
647476	14.2	8.3	47.7	12336	339	979
647477	16.8	8.3	46.3	14089	726	697
647478	23.7	7.4	42.9	22039	440	762
647506	12.9	7.9	45.4	11679	268	711
647508	12.2	6.8	38.8	9800	431	647
647532	33.1	5.3	31.0	27732	963	844

[0674] 체중 및 장기 중량

[0675] 모든 래트 그룹들의 체중들은 실험 시작시 그리고 연구 종료시까지 매주 측정되었다. 연구 종료시 간, 비장 및 신장 중량 또한 측정하였으며, 기준선의 PBS 대조군 그룹에 대한 체중 및 장기 중량의 변화가 표 16에 제공된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관해 예상되는 범위를 벗어난 임의의 장기 중량 변화를 유발한 ISIS 올리고

뉴클레오티드들은 추가 연구에서 제외되었다.

표 16

6주시 스프라그-돌리 래트의 체중 및 상대 장기 중량 (그램)

ISIS 번호	간 (g)	신장 (g)	비장 (g)	체중 (g)					
PBS	1.0	1.0	1.0	1.8					
585626	1.1	0.9	2.3	1.4					
585653	1.1	1.0	2.1	1.5					
585683	1.1	0.9	3.3	1.4					
585698	1.1	0.9	2.8	1.4					
585752	1.1	0.9	2.5	1.3					
585758	1.5	0.9	2.3	1.2					
585774	1.1	0.9	2.2	1.4					
585775	1.0	0.9	1.7	1.3					
585777	1.0	0.9	2.3	1.4					
591466	1.0	0.9	2.7	1.3					
591514	1.1	1.0	2.4	1.1					
591579	1.0	0.8	1.9	1.3					
614954	1.4	1.3	4.1	1.4					
615895	1.0	1.1	1.7	1.5					
615897	1.3	1.1	2.1	1.7					
615899	1.1	1.1	2.0	1.6					
615900	1.2	1.2	2.1	1.8					
615903	1.2	1.0	1.5	1.9					
630716	1.1	1.1	2.8	1.6					
630718	1.1	1.0	2.1	1.8					
630722	1.2	1.2	1.6	1.5					
630794	0.9	1.0	1.6	1.8					
630800	1.3	1.3	2.4	1.6					
630948	1.0	1.1	1.7	1.9					
630950	1.2	1.0	2.3	1.8					
630952	1.4	1.3	2.6	1.2					
630953	1.4	1.2	4.2	1.6	647446	1.3	1.2	2.3	1.8
630957	1.2	1.0	1.7	1.6	647447	1.1	1.1	1.9	1.7
637749	1.4	1.3	4.4	1.4	647448	1.2	1.2	1.6	1.7
647384	1.0	1.0	1.1	1.7	647449	1.2	1.2	1.7	1.7
647389	1.0	1.1	1.8	1.7	647475	1.2	1.1	1.5	1.7
647391	1.8	1.5	13.1	1.4	647476	1.1	1.1	1.5	1.5
647393	1.3	1.1	1.8	1.6	647477	1.2	1.1	1.7	1.6
647394	1.2	1.2	2.8	1.6	647478	1.2	1.3	1.8	1.7
647395	1.3	1.3	1.8	1.7	647506	1.2	1.3	2.0	1.6
647419	1.3	1.1	1.6	1.8	647508	1.7	2.1	2.9	1.3
647420	1.2	1.1	2.1	1.6	647532	2.0	1.7	3.7	1.3

실시예 6: 유전자삽입 마우스 모델에서 TMPRSS6의 안티센스 억제 효과

상기 래트 연구에서 내약성을 띠는 것으로 밝혀진 약 32개의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 인간 TMPRSS6 전이 유전자를 가진 마우스 ("huTMPRSS6" 또는 "Tg" 마우스)에서 인간 TMPRSS6 mRNA 전사물을 감소시키는 이들의 능력에 관해 추가로 평가하였다.

처리

8 내지 16주령 수컷 및 암컷 huTMPRSS6 유전자삽입 마우스에 TMPRSS6을 표적하는 ISIS 안티센스 올리고뉴클레오티드를 피하주사 하였는데, 매 투여 당 6 mg/kg으로 5회 투여로, 2주의 기간에 걸쳐 투여하거나 (총 30 mg/kg), 또는 대조군으로 PBS를 투여하였다. 각 처리 그룹은 4마리의 동물들로 구성되었다. 마지막 투여량을 투여하고 48시간 후, 각 마우스에서 혈액을 채취하고 마우스를 희생시키고 조직들을 수집하였다.

RNA 분석

연구 종료시, 간 TMPRSS6 mRNA 발현의 실시간 PCR 분석을 위해 간으로부터 RNA를 추출하였다. 결과들은 PBS 처리된 동물들에 대한 억제 백분율로 표 17에 제공된다. 인간 프라이머 프로브 세트 RTS4586 (정방향 서열

TGATAACAGCTGCCCACTG, 본 출원에서 서열 번호: 86으로 명시됨; 역방향 서열 TCACCTGAAGGACACCTCT, 본 출원에서 서열 번호: 87로 명시됨; 프로브 서열 AGTTCTGCCACACCTTGCCCA, 본 출원에서 서열 번호: 88로 명시됨)이 mRNA 수준을 측정하기 위해 사용되었다. mRNA 수준은 항존 유전자인 시클로필린 A의 수준으로 정규화되었는데, mRNA 수준은 프라이머 프로브 세트 mCYCLO_24 (정방향 프라이머 TCGCCGCTTGCTGCA, 본 출원에서 서열 번호: 89로 명시됨; 역방향 프라이머 ATCGGCCGTGATGTCGA, 본 출원에서 서열 번호: 90으로 명시됨; 프로브 CCATGGTCAACCCCACCGTGTC, 본 출원에서 서열 번호: 91로 명시됨)를 사용하여 결정되었다.

[0685] 표 17

[0686] PBS 발현에 대해 정규화된 유전자삽입 마우스 간에서의 TMPRSS6 mRNA의 억제%

ISIS 번호	% 억제
585626	57
585653	74
585683	81
585698	59
585698	59
585774	69
585775	81
591514	73
615899	88
615900	88
615903	97
630716	82
630718	99
630722	92
630794	71
630800	81
630948	65
630950	81
630957	70
647384	66
647393	95
647395	100
647419	99
647420	96
647446	84
647447	89
647448	96
647449	88
647475	84
647476	84
647477	96
647478	91
647506	91

[0687] 실시예 7: TMPRSS6을 표적하는 Ga1NAc₃에 대해 공액된 안티센스 화합물

[0689] 상기 실시예에서 효능있고 내약성을 띠는 것으로 밝혀진, TMPRSS6을 표적하는 선택된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열들이 인간 TMPRSS6을 표적하는 새로운 Ga1NAc₃ 공액된 안티센스 화합물들을 설계하기 위한 모 서열로서 선택되었다.

[0690] 표 18에 요약되어 있는 바와 같이, 본 실시예에 기재된 새로이 설계된 안티센스 화합물 각각은 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 Ga1NAc₃ 단부캡을 가졌다. ISIS 702843은 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 Ga1NAc₃ 단부캡을 가지는 혼합 (포스포로티오에이트 및 포스포디에스테르) 골격 ("MBB")을 보유한 5-10-5 MOE 캡머였다. ISIS 705051,

705052 및 705053은 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GalNAc₃ 단부캡을 가지는 포스포로티오에이트 골격을 보유한 5-10-5 MOE 캡머였다. ISIS 706940은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 및 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GalNAc₃ 단부캡을 모두 가지는 3-10-3 cEt 캡머였고; ISIS 706941, 706942 및 706943은 5'-트리스핵실아미노-(THA)-C6 GalNAc₃ 단부캡을 가지는 포스포로티오에이트 골격을 보유한 데옥시, MOE, 및 (S)-cEt 내포 캡머이다.

[0691] 표 18

[0692] TMPRSS6 mRNA을 표적하는 8개의 공역되지 않은 안티센스 화합물 및 해당 GalNAc₃ 공역체 안티센스 화합물

모 서열 ISIS#	GalNAc 공역된 ISIS#	골격	길이	서열	화학	서열 번호
585774	702843	MBB	20	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	36
585774	705051	PS	20	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	36
585683	705052	PS	20	GCACGGCAAATCATACTTCT	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	23
585775	705053	PS	20	AGCTTTATTCCAAAGGGCAG	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	37
630718	706940	PS	16	AGCTTTATTCCAAAGG	5'-THA GalNAc ₃ kkk-d10-kkk	63
647477	706941	PS	16	AGCTTTATTCCAAAGG	5'-THA GalNAc ₃ kk-d8-eeeekk	63
647449	706942	PS	16	CAGCTTTATTCCAAAG	5'-THA GalNAc ₃ kk-d9-eeekk	77
647420	706943	PS	16	CAGCTTTATTCCAAAG	5'-THA GalNAc ₃ kek-d9-eeekk	77

[0693]

[0694] 표 18에 기재된 모든 올리고뉴클레오티드 서열들은 인간 및 레서스 원숭이 서열들 모두에 상보적이었다. 본 출원에 기재된 연구들을 진행했을 때, TMPRSS6에 관한 시노몰구스 원숭이 유전체 서열은 미국 국립생물공학정보센터 (NCBI) 데이터베이스에서 구할 수 없었으므로; 시노몰구스 원숭이 유전자 서열을 가진 인간 TMPRSS6을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 교차-반응성은 확인할 수 없었다. 대신, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 서열들을 상동성에 관해 레서스 원숭이 서열과 비교하였다. 레서스 원숭이 서열에 대하여 상동성을 가지는 ISIS 올리고뉴클레오티드들은 시노몰구스 원숭이 서열과도 또한 완전히 교차-반응성인 것으로 예상된다.

[0695] GalNAc 접합을 위해 선택된 안티센스 올리고뉴클레오티드는 레서스 유전체 서열에 대해 완전히 상보적이다 (GENBANK 등록 번호 NW_001095180.1의 보체, 380000 내지 422000의 뉴클레오티드로부터 절단됨, 본 출원에서 서열 번호: 95로 명시됨). 레서스 서열에 대한 각 올리고뉴클레오티드의 개시 및 종결 부위들은 표 19에 제공되며 인간 서열에 대한 각 올리고뉴클레오티드의 개시 및 종결 부위들은 표 20에 제공된다. "개시 부위"는 레서스 원숭이 또는 인간 서열들에서 캡머를 표적시키는 5'에 가장 가까운 뉴클레오티드를 나타낸다.

[0696] 표 19

[0697] 레서스 TMPRSS6 유전체 서열에 상보적인 ASO (서열 번호: 95)

ISIS 번호	레서스 개시 부위	레서스 종결 부위	화학	서열	서열 번호
585774	40518	40537	5-10-5 MOE	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	36
702843	40518	40537	5'-THA GalNAc3 5-10-5 MOE	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	36
705051	40518	40537	5'-THA GalNAc3 5-10-5 MOE	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	36
705052	22499	22518	5'-THA GalNAc3 5-10-5 MOE	GCACGGCAAATCATACTTCT	23
705053	40520	40539	5'-THA GalNAc3 5-10-5 MOE	AGCTTTATTCCAAAGGGCAG	37
630718	40524	40539	kkk-10-kkk	AGCTTTATTCCAAAGG	63
706940	40524	40539	5'-THA GalNAc3 kkk-10-kkk	AGCTTTATTCCAAAGG	63
706941	40524	40539	5'-THA GalNAc3 kk-8-eeeekk	AGCTTTATTCCAAAGG	63
706942	40525	40540	5'-THA GalNAc3 kk-9-eeekk	CAGCTTTATTCCAAAG	77
706943	40525	40540	5'-THA GalNAc3 kk-9-eeekk	CAGCTTTATTCCAAAG	77

[0698]

[0699] 표 20

[0700] GalNAc₃-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의해 표적되는 TMPRSS6 mRNA (서열 번호: 1) 및/또는 유전체 (서열 번호: 2) 서열들 상의 부위들

ISIS 번호	서열 번호: 1 개시 부위	서열 번호: 1 종결 부위	서열 번호: 2 개시 부위	서열 번호: 2 종결 부위	서열 번호
702843	3162	3181	44924	44943	36
705051	3162	3181	44924	44943	36
705052	1286	1305	26046	26065	23
705053	3164	3183	44926	44945	37
706940	3168	3183	44930	44945	63
706941	3168	3183	44930	44945	63
706942	3169	3184	44931	44946	77
706943	3169	3184	44931	44946	77

[0701]

[0702] 실시예 8: CD-1 마우스에서 인간 TMPRSS6에 표적되는 GalNAc₃-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 내약성

[0703] CD1[®] 마우스 (Charles River, MA)를 상기 표 18에 기재된 ISIS GalNAc₃-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리하였으며, 다양한 혈장 화학 표지자들의 수준 변화에 관해 평가하였다.

[0704] 처리

[0705] 6주령의 수컷 CD1 마우스의 그룹들 (각 처리 그룹 당 n=4)에게 주 2회 6주간 40 mg/kg의 ISIS MOE 캡머 GalNAc₃-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드로 (80 mg/kg/주 투여량) 또는 상기 표 14에 기재된 20 mg/kg의 ISIS (S)-cEt 내포 캡머 GalNAc₃-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드로 (40 mg/kg/주 투여량) 피하

주사하였다. 수컷 CD1 마우스의 한 그룹에게 PBS를 6주간 주 2회 피하 주사하였다. 마지막 투여 48시간 후에 마우스를 안락사시키고, 추가 분석을 위해 장기 및 혈장을 수집하였다. 간, 신장, 비장, 심장 및 폐를 조직학을 위해 수집하였고, 그리고 혈장은 특정 혈장 화학 표지자들의 수준을 측정하기 위하여 수집하였다.

[0706] *혈장 화학 표지자*

[0707] 간 및 신장 기능에 대한 ISIS GaINAc₃-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드들의 효과를 평가하기 위하여, 아미노전달효소, 빌리루빈, 알부민, 크레아티닌, 및 BUN의 혈장 수준들을 자동화 임상 화학 분석기 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)를 사용하여 측정하였다. 결과는 표 21에 제공된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관해 예상되는 범위를 벗어난 임의의 간 또는 신장 기능 표지자의 수준 변화를 유발하는 ISIS 올리고뉴클레오티드들은 추가 연구로부터 제외되었다.

[0708] **표 21**

[0709] 6주시 CD1 마우스에서의 혈장 화학 표지자들

ISIS 번호	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	32	70	27.3	0.12	0.17	2.8
702843	59	72	28	0.17	0.16	2.9
705051	47	73	26.6	0.16	0.17	2.8
705052	81	94	26.3	0.16	0.17	2.8
705053	139	129	28.2	0.17	0.18	2.9
706940	46	66	28.1	0.18	0.14	3.0
706941	40	57	25.5	0.18	0.16	2.9
706942	195	145	27	0.16	0.14	3.0
706943	178	144	26.1	0.16	0.16	3.9

[0710]

[0711] *체중 및 장기 중량*

[0712] 모든 마우스 그룹들의 체중들은 실험 시작시 그리고 연구 종료시까지 매주 측정되었다. 연구 종료시 간, 신장 및 비장 중량 또한 측정하였으며, 기준선의 PBS 대조군 그룹에 대한 체중 및 장기 중량의 변화가 표 22에 제공된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관해 예상되는 범위를 벗어난 임의의 장기 중량 변화를 유발한 ISIS 올리고뉴클레오티드들은 추가 연구에서 제외되었다.

[0713] **표 22**

[0714] 6주시 CD1 마우스의 체중 및 상대 장기 중량 변화 (그램)

ISIS 번호	BW 변화 (g)	상대 간 중량 (g)	상대 신장 중량 (g)	상대 비장 중량 (g)
PBS	1.41	1.00	1.00	1.00
702843	1.39	1.05	1.00	1.08
705051	1.38	0.98	1.00	1.05
705052	1.39	1.02	0.96	1.32
705053	1.37	1.03	0.98	1.22
706940	1.31	0.97	1.01	1.16
706941	1.39	0.90	0.98	1.12
706942	1.39	1.09	1.09	1.40
706943	1.44	1.06	1.02	1.08

[0715]

[0716] 혈액학

[0717] 혈액학적 매개변수들에 대한 CD1 마우스에서의 ISIS GaINAc₃-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 효과를 평가하기 위하여, 이용가능한 연구 동물들 각각으로부터 대략 1.3 mL 혈액의 혈액 샘플들을 K₂-EDTA를 내포하는 시험관들에 수집하였다. 적혈구세포 (RBC) 수, 백혈구 세포 (WBC) 수, 개체의 백혈구 세포 수, 가령, 단핵구, 호중구, 림프구의 수, 뿐만 아니라 혈소판 수, 헤모글로빈 함량 및 적혈구용적률에 관하여, ADVIA120 혈액학 분석장치 (Bayer, USA)를 사용하여 샘플들을 분석하였다. 데이터는 표 23에 제공된다.

[0718] 데이터는 올리고뉴클레오티드들이 혈액학적 매개변수들에 있어서 이러한 투여량의 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관해 예상되는 범위를 벗어난 현저한 변화를 유발하지 않았음을 나타낸다. 일반적으로, ISIS GaINAc-공액된 안티센스 올리고뉴클레오티드들은 마우스의 혈액학적 매개변수들 면에서 매우 내약성을 띠었다.

[0719] 표 23

[0720] CD1 마우스에서의 혈액 세포 수

ISIS 번호	WBC (x 10 ³ /μL)	RBC (x 10 ⁶ /μL)	HCT (%)	림프구 (/mm ³)	단핵구 (/mm ³)	혈소판 (x 10 ³ /μL)
PBS	2.9	8.9	49.9	1916.5	38.8	659.0
702843	4.9	8.9	48.5	3630.0	90.3	700.5
705051	4.0	8.5	47.8	2961.0	80.7	781.3
705052	3.2	9.3	50.7	2553.7	146.0	750.7
705053	5.3	9.1	49.8	3856.0	179.5	913.3
706940	3.7	8.5	46.7	2591.3	154.0	935.3
706941	5.5	8.8	49.9	3940.3	177.5	911.8
706942	5.7	9.4	51.8	4126.3	155.3	955.7
706943	3.4	8.9	48.2	3067.0	0.0	1021.3

[0721]

[0722] CD-1 마우스의 간, 비장, 신장, 심장 및 폐에서 GaINAc-공액된 TMPRSS6 안티센스 화합물에 관한 조직학적 평가가 수행되었다. 전반적으로, 공액되지 않은 올리고뉴클레오티드들에 비해 간에서 대략 8-배 더 많은 활성을 가지는 투여량으로 GaINAc₃-공액된 안티센스 올리고뉴클레오티드를 투여하였음에도 불구하고, 이들은 TMPRSS6을 억제함에 우수한 내약성을 띠는 유용한 화합물이었으며 철 축적 질환, 장애 또는 병태의 치료를 위한 중요한 후

보가 된다.

- [0723] **실시예 9: huTMPRSS6 유전자삽입 마우스에서 TMPRSS6을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 투여량-반응**
- [0724] TMPRSS6을 표적하는 8개의 ISIS Ga1NAc₃-변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ISIS 번호 702843, 705051, 705052, 705053, 706940, 706941, 706942 및 706943) 뿐만 아니라 2개의 모 화합물들 (ISIS 585774 및 ISIS 630718)을 huTMPRSS6 유전자삽입 마우스에서 인간 TMPRSS6 mRNA 발현을 억제하는 이들의 능력에 관해 투여량-반응 연구에서 테스트하고 평가하였다.
- [0725] *처리*
- [0726] huTMPRSS6 Tg 마우스를 12-시간 명/암 주기로 유지시키고 정상 마우스 사료로 임의 급식하였다. 실험 개시 전 연구 설비에서 동물들을 최소한 7일간 적응시켰다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)를 완충 식염수 (PBS)에서 제조하고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과시켜 멸균시켰다. 올리고뉴클레오티드들을 주사용 0.9% PBS에 용해시켰다.
- [0727] 대략 3.5 내지 4.5 개월령의 수컷 및 암컷 huTMPRSS6 마우스를, 각각 네 마리 마우스의 4개 그룹들로 나누었다 (각 그룹에 2마리 수컷 및 2마리 암컷). 마우스는 ISIS 올리고뉴클레오티드 피하 주사제를 주 2회 3주간 맞았다. 한 마우스 그룹은 PBS 피하 주사제를 주 2회 3주간 맞았다. 마지막 투여량을 투여하고 48시간 후, 각 마우스에서 혈액을 채취하고 마우스를 희생시키고 조직들을 수집하였다.
- [0728] *RNA 분석*
- [0729] 처리 기간 종료시, 정량적 실시간 PCR 분석 및 인간 TMPRSS6 mRNA 발현의 측정을 위해 유전자삽입 마우스의 간으로부터 총 RNA를 추출하였다. TMPRSS6 mRNA 수준들을 항존 유전자인 시클로필린 A 수준으로 정규화하였으며, TMPRSS6 mRNA 수준은 표준 프로토콜에 따라 mCYCLO_24 프라이머 프로브 세트를 사용하여 결정되었다. 결과들은 각 처리 그룹 당 TMPRSS6 mRNA 수준의 평균 백분율로 아래 표 24에 제공되며, PBS-처리된 대조군에 대해 정규화된 것은 "% PBS"로 표시된다. 100을 넘는 수치들은 간단히 "100"으로 표기하였다. 음의 수치들은 간단히 "0"으로 표기하였다.
- [0730] 인간 프라이머 프로브 세트 RTS4586 (정방향 서열 TGATAACAGCTGCCACTG, 본 출원에서 서열 번호: 86으로 명시됨; 역방향 서열 TCACCTGAAGGACCTCT, 본 출원에서 서열 번호: 87로 명시됨; 프로브 서열 AGTTCTGCCACCTTGCCA, 본 출원에서 서열 번호: 88로 명시됨)이 mRNA 수준을 측정하기 위해 사용되었다.
- [0731] **표 24**
- [0732] Tg 마우스에서 TMPRSS6을 표적하는

[0733] 8개의 ISIS GaINAc₃-공액된 및 2개의 공액되지 않은 화합물에 대한 반응

처리	투여량 (mpk/wk)	TMPRSS6 % PBS	TMPRSS6 % 억제
585774	100	4	96
	30	35	65
	10	99	1
	3	100	0
702843	10	0	100
	3	16	84
	1	55	45
	0.3	100	0
705051	10	1	99
	3	68	32
	1	72	28
	0.3	100	0
705052	10	28	72
	3	23	77
	1	100	0
	0.3	100	0
705053	10	7	93
	3	30	70
	1	100	0
	0.3	100	0
630718	30	0	100
	10	37	63
	3	100	0
	1	100	0
706940	3	0	100
	1	4	96
	0.3	52	48
	0.1	100	0
706941	3	8	92
	1	71	29
	0.3	100	0
	0.1	100	0
706942	3	2	98
	1	47	53
	0.3	82	18
	0.1	100	0
706943	3	2	98

[0734]

	1	15	85
	0.3	100	0
	0.1	100	0

[0735]

[0736] 혈장 화학 표지자

[0737] 간 및 신장 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오티드들의 효과를 평가하기 위하여, 아미노전달효소, 빌리루빈, 및 BUN의 혈청 수준들을 자동화 임상 화학 분석기 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)를 사용하여 측정하고 아래 표 25에 제공하였다. 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관해 예상되는 범위를 벗어난 임의의 간 또는 신장 기능 표지자의 수준 변화를 유발하는 ISIS 올리고뉴클레오티드들은 추가 연구로부터 제외되었다.

[0738] 표 25

[0739] 유전자삽입 마우스에서 TMPRSS6를 표적하는 8개의 ISIS GaINAc₃-변형된 ASO 및 2개의 공액되지 않은 화합물들의 혈청 화학

	투여량 (mg/kg/w k)	ALT	AST	BUN
PBS	n/a	39.5	64.8	40.4
58577 4	100	40.8	68.5	42.5
	30	36.5	70.8	37.2
	10	38.5	59.0	38.9
	3	39.8	59.5	41.6
70284 3	10	38.3	57.3	35.6
	3	41.8	65.5	38.9
	1	41.8	100.3	34.7
	0.3	43.3	65.3	38.8
70505 1	10	47.3	79.8	35.4
	3	37.0	58.5	34.9
	1	33.0	57.0	35.7
	0.3	42.0	67.5	34.6
70505 2	10	34.8	61.5	33.9
	3	37.0	62.5	32.8
	1	35.8	57.8	35.1
	0.3	35.0	65.0	34.1
70505 3	10	39.0	55.8	32.4
	3	35.3	62.8	38.6
	1	39.8	73.5	36.6
	0.3	39.5	73.3	37.9
63071 8	30	58.8	160.8	37.7
	10	38.3	73.0	33.8
	3	39.3	92.3	32.8
	1	38.0	67.8	35.0
70694 0	3	36.3	54.8	33.7
	1	39.8	65.0	35.7
	0.3	38.3	66.8	34.9
	0.1	36.8	52.8	31.8
70694 1	3	37.5	59.0	31.6
	1	34.3	75.8	32.3
	0.3	40.5	72.8	34.9
	0.1	45.3	63.8	31.3
70694 2	3	34.3	90.5	35.8
	1	36.8	58.3	32.8
	0.3	46.8	270.0	39.8

[0740]

	0.1	35.5	76.5	31.0
70694 3	3	35.5	81.3	34.6
	1	33.3	71.8	31.0
	0.3	35.0	54.5	32.2
	0.1	42.3	60.0	33.1

[0741]

[0742] 모든 GalNAc 공액된 ASO들은 장기 및 체중에 있어서도 혈청 아미노전달효소 수준에 있어서도 전혀 큰 변화없이 우수한 내약성을 띠었다.

[0743] 각 ASO에 관한 반수 최대 유효 투여량 (ED₅₀)을 평가하고 아래 표 26에 제공한다.

[0744] **표 26**

[0745] TMRSS6을 표적하는 8개의 ISIS GalNAc₃-변형된 ASO들

[0746] 및 2개의 공액되지 않은 화합물들의 효능

ISIS #	ED ₅₀ (mpk/wk)
585774	26.0
702843	~ 1.0
705051	3.7
705052	~ 2.7
705053	~ 2.8
630718	~ 9.7
706940	~ 0.3
706941	1.3
706942	0.9
706943	~ 0.9

[0747]

[0748] ED₅₀ 계산값들은 GalNAc-공액된 ASO들이 공액되지 않은 ASO들에 비해 대략 10-배 더 효능있음을 보여주었다. ISIS 702843이 가장 효능있는 GalNAc 공액된 5-10-5 MOE 겹머 화합물이었다.

[0749] 실시예 10: TMRSS6을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 점성도 평가

[0750] 40 cP 보다 큰 점성도를 가지는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 선별해내기 위해 안티센스 올리고뉴클레오티드의 점성도를 측정하였다. 40 cP 보다 큰 점성도를 가지는 올리고뉴클레오티드들은 피험체에 대한 투여에 최적이지 않을 것이다.

[0751] ISIS 올리고뉴클레오티드들 (32-35 mg)을 유리 바이얼에 계량하여 넣고, 120 μL의 물을 추가하고 50°C에서 바이얼을 가열함으로써 안티센스 올리고뉴클레오티드를 용액에 용해시켰다. 예비-가열된 샘플 중 일부 (75 μL)를 피펫으로 마이크로-점도계 (Cambridge)에 넣었다. 마이크로-점도계의 온도를 25°C로 설정하고 샘플의 점성도를 측정하였다. 85°C의 260 nM에서 UV 관독(Cary UV 기기)을 위해 예비-가열된 샘플 중 일부 (20 μL)를 또다시 피펫으로 10 mL의 물에 넣었다. 결과들은 표 27에 제공되는데 이러한 결과는 대부분의 GalNAc 안티센스 올리고뉴클레오티드 용액들이 상기 언급한 기준하에서 이들의 점성도에 있어 최적임을 나타낸다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 706941은 40 cP가 넘는 점성도 수준을 가졌던, 테스트된 유일한 안티센스 올리고뉴클레오티드였다.

[0752] 표 27

[0753] GalNAc-공액된 ASO들에 대한 점성도 데이터

ISIS #	화학	cP
702843	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE (MBB)	33
705051	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE (PS)	23
705052	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE (PS)	16
705053	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE (PS)	26
706940	5'-THA GalNAc ₃ kkk-10-kkk (PS)	39
706941	5'-THA GalNAc ₃ kk-8-eeeekk (PS)	54
706942	5'-THA GalNAc ₃ kk-9-eeekk (PS)	20
706943	5'-THA GalNAc ₃ kek-9-eeekk (PS)	19

[0754]

[0755] 실시예 11: 시노몰구스 원숭이에서 GalNAc₃ 공액체를 포함하는 TMRSS6을 표적하는 올리고뉴클레오티드에 의한 생체내 안티센스 억제

[0756] 본 연구를 진행했을 때, Tmprss6에 관한 시노물구스 원숭이 유전체 서열은 미국 국립 생물공학 정보센터 (NCBI) 데이터베이스에서 구할 수 없었으므로; 시노물구스 원숭이 유전자 서열을 가진 인간 Tmprss6을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 교차-반응성은 확인할 수 없었다. 대신, 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 서열들을 상기 실시예 6에 기재한 바와 같이 상동성에 관해 레서스 원숭이 서열과 비교하였다. 레서스 원숭이 서열에 대하여 상동성을 가지는 ISIS 올리고뉴클레오타이드들은 시노물구스 원숭이 서열과도 또한 완전히 교차-반응성이 있는 것으로 예상된다.

[0757] 시노물구스 원숭이에서 테스트를 위해 선택된 10개의 인간 Tmprss6 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상기 실시예 6에 기재한 바와 같이 레서스 유전체 서열 (서열 번호: 95)과 0개의 미스매치를 가졌다.

[0758] 연구 설계

[0759] 수컷 시노물구스 원숭이에서의 Tmprss6 mRNA의 안티센스 억제에 관한 13-주 연구에서 10개의 안티센스 올리고뉴클레오타이드들을 효능 및 내약성, 및 간과 신장에서의 이들의 약동학적 프로파일에 관해 평가하였다. 표 28에 나타난 바와 같이 원숭이들에게 Tmprss6을 표적하는 8개의 ISIS GalNAc₃-변형된 ASO 및 2개의 공액되지 않은 모 안티센스 올리고뉴클레오타이드 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 피하 투여 처리하였다.

[0760] 표 28

[0761] 시노물구스 원숭이 연구에서 ASO 비교

그룹	ISIS#	투여량
1	PBS 대조군	n/a
2	585774	25 mpk
3	705051	30 mpk
4	705052	30 mpk
5	705053	30 mpk
6	702843	30 mpk
7	705051	5 mpk
8	702843	5 mpk
9	630718	23 mpk
10	706940	30 mpk
11	706941	30 mpk
12	706942	30 mpk
13	706943	30 mpk
14	706940	5 mpk

[0762]

[0763] GalNAc-공액된 ASO들에 대한 높은 -투여량 (30mpk) 그룹들을 독성 평가하였다. GalNAc-공액된 ASO들에 대한 낮은-투여량 (5 mpk) 그룹들을 공액되지 않은 상응하는 모 서열과 비교하여 활성을 평가하였다. 그룹 2, 3, 6, 7 및 8은 동일한 서열이며, 혼합된 골격 (MBB) 화합물 ISIS 번호 702843을 낮은 그리고 높은 투여량 모두에서 테스트하고, 또한 완전 포스포로티오에이트 화합물 ISIS 번호 705051 (또한 낮은 그리고 높은 투여량 모두에서 테스트함)과 비교한다. 그룹 9, 10, 11 및 14는 동일한 서열이며, ISIS 번호 706940은 낮은 및 높은 투여량 모두에서 테스트한다.

[0764] 처리

[0765] 연구에 앞서, 원숭이들을 격리 조치시키고 그 동안 동물들을 일반 건강에 관해 관찰하였다. 원숭이들은 2 내지 4년령이었으며 2 내지 4 kg 중량이었다. 56마리의 수컷 시노물구스 원숭이들을 각 그룹 당 4마리 원숭이를 보유한 14개의 처리 그룹들로 무작위 할당하였다. 원숭이들 각각에게 적절한 크기의 스테인리스 스틸 투여 주사 바늘 및 주사기를 사용하여 ISIS 올리고뉴클레오타이드 또는 PBS를 찌투 동안은 매 격일마다, 그리고 그 후 11주간

은 주 1회로 총 15회 투여로 피하 주사하였다. 제 1 투여 1주 전, 그 다음 9, 16, 30, 44, 58, 72 및 86일에 다시 꼬리 채혈을 수행하였다.

[0766] 연구 기간 동안, 질병 또는 고통의 징후에 관해 원숭이들을 매일 2회 관찰하였다. 치료, 부상 또는 질병으로 인해 순간적인 또는 약한 통증 또는 고통 이상을 경험하는 임의의 동물은 통증을 경감시키기 위한 승인된 진통제 또는 제제를 수의학 관련 직원이 연구 책임자와 의논 후 처리하였다. 추가 모니터링 및 안락사 가능성을 위해 불량한 건강상태에 있는 또는 빈사 상태가 있을 수 있는 임의의 동물을 식별하였다. 이러한 동물들에 대해 예정된 안락사는 86일에 수행되었다. 본 실시예에 기재된 프로토콜은 기관 동물 실험 윤리 위원회 (IACUC)에 의해 승인받았다.

[0767] 제 1 투여에 앞서 그리고 그 후 다양한 시점에서, 임상 병리학 평가변수들 (혈액학, 임상 화학, 응고, 보체 Bb 및 C3, 시토카인 및 케모카인 분석)을 위해 혈액 채취를 실시하였으며, 소변 화학 또한 측정하였다. 기준선에서 그리고 실험 기간 종료시, 특정 약리학 평가변수들, 가령, 간 TMPRSS6 mRNA 발현, 혈청 헵시딘 (Intrinsic LifeSciences, San Diego, CA), 혈청 철 및 혈청 트랜스페린 포화도를 측정하였다. 연구 종료시, 체중 및 장기 중량, 조직들의 조직병리학 및 간과 신장의 PK 분석을 측정하였다. 체중, 시토카인 또는 알부민 수준의 현저한 변화는 전혀 관찰되지 않았다.

[0768] *TMPRSS6 RNA 분석*

[0769] 연구 종료시, 다양한 프라이머-프로브 세트들을 사용한, TMPRSS6의 mRNA 발현 측정에 관한 실시간 PCR 분석을 위해 RNA를 간에서 추출하였다. 프라이머 프로브 세트 RTS3840을 사용한 대표적인 데이터가 아래 표에 제공된다. 표 29의 결과들은 시클로필린 (mCYCLO_24 프라이머 프로브 세트)으로 정규화된, 식염수 대조군에 대한 TMPRSS6 mRNA의 억제 백분율로 제공된다.

[0770] **표 29**

[0771] 12-주 ASO 투여 후 원숭이 간 TMPRSS6 mRNA의 감소

처리	투여량 (mg/kg)	% 억제	그룹
585774	25	76	2
705051	30	90	3
705052	30	64	4
705053	30	49	5
702843	30	89	6
705051	5	77	7
702843	5	82	8
630718	23	65	9
706940	30	71	10
706941	30	72	11
706942	30	93	12
706943	30	91	13
706940	5	61	14

[0772]

[0773] ISIS 번호 705051, 702843, 706942 및 706943은 13-주간의 투여 후 30 mpk에서 $\geq 89\%$ 표적 감소를 나타내므로, 꽤 효능이 있었다.

[0774] *헵시딘 분석*

[0775] 아래 표 30에 나타난 시점들에서 혈청 헵시딘 수준을 측정하였다. 결과들은 식염수 대조군 백분율로 제공된다. "-7 일"은 제 1 투여량의 투여 1주 전을 나타낸다.

[0776] **표 30**

[0777] 원숭이 혈청 헵시딘 수준

	투여량 (mg/kg)	-7 일	9 일	16 일	44 일	86 일
식염수	n/a	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
585774	25	0.9	1.3	1.4	1.1	1.4
705051	30	0.9	1.1	1.5	1.5	1.8
702843	30	0.9	1.2	1.2	1.3	1.9
706942	30	0.7	1.0	1.5	1.3	1.9
706943	30	0.8	0.9	1.5	1.2	1.6

[0778] 상기 표는 연구 과정 전반에 걸쳐 혈청 헵시딘 수준이 증가했음을 보여준다.
 [0779]

[0780] 혈청 철 및 트랜스페린 포화도 분석

[0781] 14개 처리 그룹들 각각으로부터의 4마리 피험체들의 평균이 아래 표 31에 제공된다. 표 31에 나타난 바와 같이, 혈청 철 수준 및 트랜스페린 포화도 ("Tf sat")는 대조군에 비해 처리된 그룹들에서 86일에 감소되었다.

[0782] 표 31

[0783] 86일에서 원숭이 혈청 철 및 트랜스페린 포화도 수준

그룹 #	처리	투여량 (mg/kg)	철	Tf sat
1	식염수	n/a	125.7	38.8
2	585774	25	55.2	15.7
3	705051	30	36.6	10.0
4	705052	30	61.9	15.8
5	705053	30	96.0	27.0
6	702843	30	42.3	13.3
7	705051	5	63.7	20.0
8	702843	5	51.7	16.5
9	630718	23	61.4	17.7
10	706940	30	71.6	20.5
11	706941	30	55.7	15.8
12	706942	30	25.9	6.9
13	706943	30	30.3	7.4
14	706940	5	82.8	23.7

[0784] **서열목록**
 SEQUENCE LISTING

- <110> Ionis Pharmaceuticals, Inc.
- <120> COMPOUNDS AND METHODS FOR MODULATING Tmprss6 EXPRESSION
- <130> BIOL0271W0
- <150> 62/142,986
- <151> 2015-04-03
- <160> 95
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 3212
- <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cttgagccag acccagtcca gctctgggtgc ctgccctctg gtgcgagctg acctgagatg 60
 cacttccctc ctctgtgagc tgtctcggca cccacttgca gtcactgccg cctgatgttg 120
 ttactcttcc actccaaaag gatgccctg gccgaggccc cccaggtggc tggcgggcag 180

ggggacggag gtgatggcga ggaagcggag ccggagggga tgttcaagc ctgtgaggac 240
 tccaagagaa aagccccggg ctacctccgc ctggtgcccc tgtttgtgct gctggccctg 300
 ctctgtctgg ctccggcggg ggtgctactc tggtatttcc tagggtacaa ggccggaggtg 360
 atggtcagcc aggtgtactc aggcagtctg cgtgtactca atcgccactt ctcccaggat 420
 cttaccgcc ggaatctag tgccttccgc agtgaacccg ccaaagccca gaagatgctc 480
 aaggagctca tcaccagcac ccgctgggga acttactaca actccagctc cgtctattec 540
 tttggggagg gacccctcac ctgcttcttc tggttcattc tccaaatccc cgagcaccgc 600

cggtgatgc tgagccccga ggtggtgcag gcaactgctgg tggaggagct gctgtccaca 660
 gtcaacagct cggtgccgt cccctacagg gccgagtacg aagtggacce cgagggccta 720
 gtgatcctgg aagccagigt gaaagacata gctgcattga attccacgct gggttgttac 780
 cgctacagct acgtgggcca gggccaggtc ctccgctga aggggctga ccacctggcc 840
 tccagctgcc tigtggcact gcagggcccc aaggacctca tgctcaaact ccggtggag 900
 tggacgctgg cagagtgccg ggaccgactg gccatgatg acgtggccgg gccctggag 960
 aagaggtca tcacctcgtt gtacggctgc agccgccagg agccctggtt ggaggttctg 1020

gcgtcggggg ccatcatggc ggtcgtctgg aagaaggcc tgcacagcta ctacacccc 1080
 ttcgtgctct ccgtgcagcc ggtggtcttc caggcctgtg aagtgaacct gacgctggac 1140
 aacaggctcg actcccaggg cgtctcagc acccctact tcccagcta ctactgccc 1200
 caaacccact gctcctggca cctcaggtg ccctctctgg actacggtt ggccctctgg 1260
 tttgatgctt atgcaactgag gaggcagaag tatgatttgc cgtgcacca gggccagtgg 1320
 acgatccaga acaggaggct gtgtggcttg cgcactctgc agccctacgc cgagaggatc 1380
 cccgtggtgg ccacggccgg gatcaccatc aacttcacct cccagatctc cctcaccggg 1440

cccgtgtgc ggggtgacta tggcttgtac aaccagtcgg acccctgccc tggagagttc 1500
 ctctgttctg tgaatggact ctgtgtccct gcctgtgatg gggtaagga ctgccccaac 1560
 ggctggatg agagaaactg cgtttgcaga gccacattcc agtgcaaaga ggacagcaca 1620
 tgcactcac tgccaaggt ctgtgatggg cagcctgatt gtctcaacgg cagcgacgaa 1680
 gagcagtgcc aggaaggggt gccatgtggg acattcacct tccagtgtga ggaccggagc 1740

tgcgtgaaga agcccaacc gcagtgat gggcgcccg actgcagga cggctcggat 1800
 gaggagcact gtgactgtgg cctccaggc cctccagcc gcatgttgg tggagctgtg 1860

 tcctccagg gtgagtggc atggcaggc agcctcagg ttcgggtcg acacatctgt 1920
 gggggggccc tcatcgctga ccgctgggtg ataacagctg cccactgctt ccaggaggac 1980
 agcatggcct ccacggtgct gtggaccgtg ttctgggca aggtgtggca gaactcgcgc 2040
 tggcctggag aggtgtcctt caaggtgagc cgcctgctcc tgcaccgta ccacgaagag 2100
 gacagccatg actacgacgt ggcgctgctg cagctcgacc acccgggtgt gcgctcggcc 2160
 gccgtgcgc ccgtctgct gcccgcgcgc tcccacttct tcgagcccgg cctgcaactg 2220
 tggattacgg gctggggcgc cttgcgcgag ggcggcccca tcagcaacgc tctgcagaaa 2280

 gttgatgtgc agttgatccc acaggacctg tgcagcagg tctatcgcta ccaggtgacg 2340
 ccacgcatgc tgtgtgccg ctaccgcaag ggcaagaagg atgcctgtca ggggtactca 2400
 ggtgggccgc tgggtgtcaa ggcactcagt ggcgctgggt tctggcggg gctggtcagc 2460
 tggggcctgg gctgtggccg gcctaactac ttggcgtct acaccgcat cacaggtgtg 2520
 atcagctgga tcagcaagt ggtgacctga ggaactgccc cctgcaaag cagggccccac 2580
 ctctggact cagagagccc agggcaactg ccaagcagg ggacaagtat tctggcgggg 2640
 ggtgggggag agagcaggcc ctgtgtggc aggaggtggc atctgtctc gtccctgatg 2700

 tctgctccag tgatggcagg aggatggaga agtccagca gctgggggtc aagacgtccc 2760
 ctgaggacce agccccac ccagccctt tgcctccaa ttctctctcc tccgtccct 2820
 tcctccactg ctgcctaag caaggcagt gctcagcagc aagaatgtg gttctacatc 2880
 ccgaggagt tctgaggtgc gcccactct gtacagaggc tgtttgggca gccttgctc 2940
 cagagagcag attccagctt cggaagcccc tggcttaact tgggatctgg gaatggaagg 3000
 tgctccate ggaggggacc ctcagagccc tggagactgc caggtgggcc tgctgccaact 3060
 gtaagccaaa aggtggggaa gtctgactc cagggtcctt gcccacccc tgctgccac 3120

 ctgggcctc acagcccaga cctcactgg gaggtgagct cagctgcct ttggaataaa 3180
 gctgctgat caaaaaaaaa aaaaaaaaa aa 3212

 <210> 2
 <211> 47001
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 tgggtggaat cacttgaggt caggagtctg agaccagcct ggctaacatg gtgaaacccc 60

atctcttcta aaattatgaa aattagccgg gcatgggtgtt gggcgctgta atcccagcta 120
 cctgggaggc tgaggcagga gaattgcttg aacccgggag gcggaggttg cagtgagccg 180
 aaatcacacc actgcactct agcctgggtg acggagtgag actccatctt aaaaaaaaaa 240

 aaaaaaaaaa aaaagaacga ggtaggaatt caataattc ccagctaac agaaaatagc 300
 atcaaacccc acccctgctc cccctttctc ctctccagtc cccagagtat atgggccagc 360
 cctccttttc tctctctcag gccagcagct cctttagtct cgectgtcca ggtaagcacc 420
 tggactcacc ctigtgagcc cctgcactca cctgcaccgg cctctgcaca gtccccagtc 480
 ctggctgtc cctacctcat gctctcgggg accaggggct gtaaccaggc aggcattgca 540
 ccaggcaacg ggctcgggg gagagctcag atctcccga cctgcctgcc agcctctggg 600
 gtgccatgc gggggtgggg gaagatgggg cggggcaggc actgccttct cctacctct 660

 gcctgtttac ctgtacttag tcacagtgtc gtccaggacc cagcaggagg agttccatgg 720
 agcctgaggc cacaggccac aggggacaag ggccagacac cctggtcatg gctctaggcc 780
 attgatccag cctgggctgg ctgggtgggg gtggggaggc cttggcctgg acaaacagag 840
 gctcctgagg cctgtgtgca ggccccgcac ctatctgccg ctcccaaagg taagcggggg 900
 cctccaggac aggggaccgg gatctataaa tgacctagtg acagtgtcca ccctaagagc 960
 tggcctgge tcctgcagc ctgagccacc tacctgtctc cgaggccagg cctgcagggc 1020
 ctcatcgcc agagggtgat cagtgagcag aaggtagggg gccacagag ctggggaggg 1080

 gagggaccac gcagggtgac accaggtgtg tggacaggca cagcatcagt gctgggtggt 1140
 tgggtgcctg ggattcaggt ggcagggaca ggaggaaggg agaggccacc ctaccctgc 1200
 ctgcaggac tggacatgct gccccctca cacccgtac cccacctggg ccttctggtg 1260
 taggagacag gcccgagcc ccacattgca cctatgtact gacttaagcc caggaccctg 1320
 ggctcacagg ctcagagtg gcatgtatgt gtatgtgtgt tcgtgtgtgt gtctgtgtag 1380
 gaaggcgctg catctatgaa tttttgtgtc atgaatagat gtgcgtatat cctccgcgt 1440
 gtctccatct gtgtacatct gtgggtctgt gagtgtgttt atatgtgtgg aagggacccc 1500

 caccagtc cccacactct caggactcta gggcctaag gtttactga aagatgcccc 1560
 tatggccta gccagagtc cctgctctgc tctgctctgc cctggctgag ggacctcggg 1620
 taagtcatgt tacctctctc tacctcagtt tccccagcca ttaaatagag tcagcaaagt 1680
 aggcacccca ggctgttga ggctgcagtg gattttgcag cactgccag cacagggtg 1740
 gcacatggtg ggagttcata cgcagtggtt gaatccgat ctgcattgct gggggagtgc 1800
 cggccccgc ccaaggagct cagctccag caggcagacc cgagaccctc caatggccag 1860

aagggcagga gggagtgagg agcaggtgcc aggggtgggt ccatggtgct cagagctggg 1920

ggactgcttc aggccctgt ggcaattgga gcacagtccc cgcttccagg agttcaatgt 1980
gaggggcaaa gagagagtgc ccacaggtaa gctgcacatc gcgaggggca gccgccctt 2040
ctagggcact ctgggagagc tgcgaagagg tgaggctga actgaggtga caggggctgc 2100
ataagagctg gccaggttgg gaggtggggg ccacaggcaga aggaagagtg tggggacgcc 2160
tggccgtgaa caagcactga cagggtcaa ggtccacgag ggctcttggg gccggctggc 2220
tgctcttaat ccataaatgt ttgctacat ccattgtta aaatttctca ccaatggaag 2280
tccagtgtcc ttgggtgcg acggggaaaa gagaggtgg gaaaaagga ggcaggagaa 2340

gttggccagg ccacatatgc acacagcacc ttggacttct gtagggagga aggagctggg 2400
accttgtcat tcattcattt aacaattact gagtgtccgc tgagtaccag actctgctct 2460
catgcagctt acagacaggg aggaggcaga taaatgacat atttgcata caggcaattt 2520
aggcctctgt aattgctata aagaaaaatg caggagagac gggagtgcc agggaaggcc 2580
tctctggaga ggtgacatct gacccttgg aggaggtaaa ggaggagacc acgaggccag 2640
cagaaaggaa aacatcccag gccagcaag gagcaaacct cccattcagc aaaggagaca 2700
ggaaaactga gaccctgggt ctttagggac tgtgttctag gtggatgaa gccgtgcgag 2760

gcttgtgggc agggcacatg gtgacaacac gcagtggcca ttgttgaga actcactggg 2820
taggggggtg ggtgattggc tattgcagga gtcgaggtga cagatgacgg tggcctggat 2880
gatggtggga gtcatggggg gccaaagagg ggctggcttt ggggggcatt tggaaagtag 2940
ggccacagge ttttcaaag gtgctggacc ctgggaatgg gggagccgtt gtattataag 3000
atagtaaaga caagagtggc accgtcatct tcacaactgt ccaactgccc tcctcctgct 3060
gggcaggaaa ccaagagga tgggaatgag gtctcttaga gtcacatgt gccaccctgt 3120
cgccaccaca gagcctggca ccaagcaggt gctagacaaa gataggtga ctgagcattg 3180

aacctgggac cccacaggcc cacaccattg tccatgccc agtgccagge ctcaaaagtc 3240
ctcttctgaggcagcaa gatagaaagc cctgtaccag gggcctagag acttggcagt 3300
ttcattcact cattcttct gatccttac tcatgtgacg ggctgtcgg cgttccatgg 3360
ggaaccccag aggtgagcaa gatgctggcc ctgcctgttc tgtaggggac agaggcaaga 3420
cccaaagcca aggcataatc ttgatctgat caagggtgc ccaggggagg gggcagctta 3480
actagccagg ggcccagaac ccagtgcctg gcaggtgcc tggtaagagt tccccacagt 3540
ccaggcaggg ggactcagct gcacaaagge aggtctcgt gggcctgggg caccatgtgc 3600

atgatggaag ttatagccac gaggaggggtg gacagcagcc tggccatgga gggctttgga 3660
 tgtcgcagca aggggtttgg atgataagtg gctgggagct gtgaaaggat cctgagcagg 3720
 tgagcgattg agctggggag ggaggatgcg ctggaagacg caatggaggc aggggaccta 3780
 gtgaggaggc cgccccaggg gtttgggtgg gaagttaatga tgagccccggg ggaattaatt 3840
 tcccactact gccatttggg ccatggcttg ggtttttaca gaggtgtcc tgaatatgag 3900
 cctctctgtg ctgctcaaag tctcccaga tggatgagag gggcatttag agggaggcaa 3960
 aatctgcata gagaaggacg cctggcttgg aggatgagag gggaggggag gccaccaag 4020

 caccaccaca tgagctgcc ctcttcgggc ttctctaat ggaccacga cctgctccga 4080
 gcctcagttt cctctcttt acactgatta tctgagaggt agtagggctc agtgatcagg 4140
 gcgtcactct gaagtcaatc tgcctgactt tgcagcctgg ctgtgctgct gaccagctgt 4200
 gtgaccttag ccaagctgct caacctctct gtgccttgac tctccatct gtaaagtagg 4260
 agtgatcaga gtacctgcc ccacaggatc tgtgtaaggc ttacatgaga aagtgcacat 4320
 aaagcaacag agacaattga aataaatgct acctgttacc acctctatgc ccccagatcc 4380
 ccatggctct atgactcacc ccaaaaatagc tcctttgtga tccagactca agagtaaac 4440

 agggccaggt atggtggctc acatctgtaa tctcaacact tcaggaggcc aaggtgaggg 4500
 gatcgcttga gggcaggtgt ttgagacctg gtctctacaa aaaataaac tataaatta 4560
 gccaggtgtg ctggtgcacc tgtagtccca gctacttggg aggctgaggt gggaggatca 4620
 ctgaaacca ggagttggag gctgggggtga gctatgatcg tgctaccata ctccagcctg 4680
 ggtgacagag tgagatcctg tccttaaac aaaaggggtg cgacgggaat atggtgtcct 4740
 cctctggcag agggagggga cgagggactg aaagaagggc aaggagccaa cccatcacct 4800
 gggatcttcc caatccagca aaccttctca gatthttagg acagccacct cagttagagg 4860

 tggccagccc aggacagaca ggcagctctg cgtgggggac tcaaacctgc catgtggcct 4920
 catgcaagag tctcagcacc ctgttactgg tctgtttctt gcctgtttct cactagggat 4980
 gctgtgaaca tttgaggaag tgggcggggc tgtcccacc gttgccggac gtttaccatt 5040
 taccattccc tggccttggc ccataaaaag ccagttaggc cactccaca tgcaggaatg 5100
 tctagctta gtgtggagg gggatgtcat gccagtgag ggtcccctgc agtccctccc 5160
 ttcttgtat ctgatggggg ccgctcaaca gactactgt ggcttgacac caaagacct 5220
 tagctgggaa cgatgccaag gggagctgga gggagccagg aagctgggag aagggccagg 5280

 gcccttca tccacctggg aggacttga gcattactaa agagccccgt ttttgaaac 5340
 ccgctgtgta aaatccaag atacagccca aaggaagccc cgctgcac tggggtgcat 5400
 tttatttatt tttttatgtt ttttttttc tcaagcagag tcttctctg tcaccaggc 5460

tggagtacaa tggcatgata tcagctcact gcaacctccc ctgaccaggt tcaagtgatt 5520
 ctctgcctc agcctcccga gtagctggga ttacaggtgc ccaccaccac agccggctaa 5580
 tttttgtatt tttcatagtg acagggtttc accatatgg ccaggctgat ctggaactcc 5640
 tgacctcagg tgatccactc acctcagcct cccaaagtgt tgggattaca ggcgtgagcc 5700

 acggcaccgg gccctggggt gcattttaaa gctacacggt atttatggat atagtaagag 5760
 gagatgaact tcgcagtagt ctggagcctt tgctctcccg gtgggtgggt caaaggcttt 5820
 ctctgtactg tggggaaacc tgcgtcaaag gccaaataca ttgggatggt tgcttgaaag 5880
 ggtctcaaaa tagagtggga acctgggagc gtggagaggg gcgacattca gttgctattt 5940
 aatcatgatt tgtaattaa cagctcattt atgggaggca tcttagattc gtggaaaag 6000
 cagggagtca gacatctaga ctcaacctcc acttccctgc tgtgtgatct tgggcaagcg 6060
 gcttagcctc tctgggcttc agggtttttt taatctgtaa aatgcgtctg ggagtgaatg 6120

 tcaggtattc aaatcacact gggaaaatgg ggctaggaaa agccctagac tgagttagt 6180
 ctagaacct ctgggtctca gtttccttat ctgttcaatg ggtgcagaac tggaggttta 6240
 agtgagataa agcagggtgaa gtaccacagt ggtgtgggct ggaggaagaa aacatgggac 6300
 aatggttcca catccctggg tgacctgaaa attaagtgtg agatgtctca tgagggcacg 6360
 aatgaatat tagttttgt tcccttctc tgccacaaga ctttgagagc agaaaggatga 6420
 gagagacggt actctgtgaa ggaaggcagg tccccggccc agcgcagtgc cagctcaggg 6480
 gattctgggg cgggggctaa gtgcatggac tgtgtgggcg tgggggaag ctccgtgaac 6540

 cagaaccagg agcaagaaac agcattcctt gcgtggacgg gaaatgaggg caagaggtea 6600
 gatgtctaca gaagtctgca cccatgtac ttcagttctg tctgtgggtg cagcctctag 6660
 ggaggtgggt gtttagtacc tgagacctcc gctgtctctc tgaccatagg gaagccagtg 6720
 ggaagcaaag gtgggttct tgagccagac ccagtccagc tctggtgctt gcctctggt 6780
 gcgagctgac ctgagatgca cttccctcct ctgtgagctg tctcggcacc cacttgagct 6840
 cactgccgc tgatgttgtt actcttccac tccaaaaggc aggggaagtcc tgcttccgtg 6900
 ccccaccggt gctcagcaga ggctcccttg caaatgcgag gctgtttcca actttggtct 6960

 gtttccctgg caggatgccc gtggccgagg cccccagggt ggctggcggg cagggggacg 7020
 gaggtgatgg cgaggaagcg gagccggagg ggatgttcaa ggctgtgag gactccaaga 7080
 gaaaagcccc gggctacctc cgcctggtgc ccctgtttgt gctgctggcc ctgctctgctc 7140
 tggcttcggc gggggtgcta ctctggtatt tctaggtaa cgttgtggga ccgctggga 7200
 gaggcacctg gggaggactt ggggtgactg tagcaggcac agcaggacag gactgggttc 7260
 caggctcagc cgtgcttagc atattgctgt gtgacctgg gcaagtcact tctgttctct 7320

ggggtctccct ccctgtcctt ccagctggag atgctgtcag accctggctc caggctctat 7380

 ggctcgggtc tgcttcctgc ttgggcaaag tgcccaaaag ctccccacca ggtggggaaa 7440
 gtgggcctc ctagcaccca gttcttgtga gccagccagc ccacagagca taaacatgc 7500
 ctcccttgc ctgcagtct cctgggttgc cctgaggct tggagccaac ccagccctaa 7560
 agaaggagge ccagaggcac caatggtacc tggtagcaat tagtgctct gctcacttga 7620
 gcctagccta ggttctctc taggetgggg accacagctc tatcccctct gggctcctcag 7680
 ggtccagcat gaatggggga cggagcaggc agctggagag cagccagcct tggggcctc 7740
 tgccatgtcc ttaattatgg ctggccctc cctgatgtca cagccctcag tcagtccct 7800

 ggtgccccggg gagcaattgg cctgtgctct gggccattc atccaggcct cgttcattc 7860
 attcatgga taaatgctct tgagcatcta ttatcttct ctaagattga tggagtctct 7920
 cctcttctt ctgccttga cagtgggaag taatggagaa accaaatcgg actgtgctc 7980
 tacactgtac actgtagaag gccattcat ttgttcattt actcagtgc aagcacctcc 8040
 tgtgtgccag gttctggga tagcccctgt ccttgtgatt tagccaagc atcagacctg 8100
 acatttacg taaagcatag catgtgatg gacagaggaa gctgaggct ggggaagccac 8160
 aggagggaca acccagatgc ctgctgatc agaagcatcc cattaacat cctgcaaagg 8220

 atagctagtg ctcttactgg ctgaatctcc tgggtgaatt ccaggcctgt taaaagcaac 8280
 ctggggacca actttgtagc agtggagaga aatccatgta ggcctagatc caaggggtca 8340
 gggttgggag tgtctggaac cagcatctgg gactgacact attgggaacc ccaggtctga 8400
 cacggcctg ctgcaatga cttatagtga ttctaccag agttgagcaa cgcaggcagt 8460
 agacgccatg tgcattcac caccagcagg aagccagtgc cccagatagc acaggcctgt 8520
 gggggcctcc tcaggtagc ggctaattag tctacagggt aaaccacggg gcaactggct 8580
 ggagggccag gaactcact gccattatt tctcttga gaggagtta attcccctg 8640

 attatgctcc tgggtaaat cacccccac ccaggagag gtgctccatg gggctgagga 8700
 cccaaggggt gactgctccc aagcctctgc tgggggaagc caactcccc acagagggat 8760
 taagggttga aggaggcact ttgggagctg ttgaaagac tcctcccgc ttgaccaggc 8820
 tgtgctcctg ggactggcg ctggcaagg aagtggatca gagacagcc ctgccctgtc 8880
 tggaaagga ggtgcacaag tgaccagtga cactggagca ggacagccc caagcgagga 8940
 ggacagcctg gcccaggag aggggtgtgc tgcttctta aggatggtag caggaccctt 9000
 aataccacca accatattc ctgggtcctt tccttctct gctctcccag gcaagagttt 9060

tatgtgttct caagccccca gcaccgcct gccctgtct cctgcttcag tgagaaaaca 9120
 aaacagctta gaagagaagc cccatataatg ttggcccacc tgcctccca gctgcatcac 9180
 gtgcaactct cctgggacc cgateccgcc cctctgccc acacaatggc ccagcaccag 9240
 caaggatgcc ctctctcccc cagtgtccct tggggtgcct ccccatttc tctgctcctt 9300
 gaaagagctg tcaagccaca caccagctct ctctgtgccc ttccaacct ggctccctct 9360
 gcccccaac tccaatggcc attgtcaagc tcgccaacat cccaggttgc taaatccaat 9420
 gtccacttct cagtcatcat tgcacttgac ccgggggctc acccccact ccagaagccc 9480

tttctccct agactttggg cgcaccgg gtcctttccg ctcaagcaggt tgctttttct 9540
 gtgtccctgc tgatgggtgg ggcctctctt ttctctctcc acccgcttct ttcgtgatct 9600
 catctgctac cctagcttc aagtgcctt tataacctga taacaccac atttgattt 9660
 ctacccctgg cctctccctt gagcttgtct cttagagctgc cctgctctt cctcttaatg 9720
 tctaaggagc atctcggacc ctatgctttc agaccatgag gtctctgcat aatttcccc 9780
 agacctgtac ctccaacac ccagtccaag accacttctt tctggcacct tcccctact 9840
 cttttctttc tttccacc agccccactt tgcagcaaaa cctggctatc tctaactcca 9900

aaacacatca aaagcagctg acgccaatca ctccacc cctcctctgc cacagctggg 9960
 gccagctct gtcacctgg acatctctcc cctggagccc tgcaggcgtg tctctgatgc 10020
 tctcctgcc tctgacctgc ctcttagag cttttctcaa cagcagaggg accatttgat 10080
 aaagcaaacg aaatcctcta acttcgctgc ttaaaacctc gcttggggcc aggcgcgtgg 10140
 ctacgcccc taatcccagc actttgggag gccgaggcag atggatcacc tgaggtcagg 10200
 agttcgagac cagcctgacc aatatgcaga aacctgtct ctactaaaa taaaaatta 10260
 accggcgtg gtggtgcatg cctgtaatcc cagctacttg cgaggctgag gcaggagaat 10320

cgcttgaacc cgggaggcag aggttgtggt gagcggagat tgagccattg cactccaagc 10380
 taggcaaca gagcgaaact ctgtctcaa aaaaaaca aaaaaaca aaaagaaac 10440
 aaaaaacca ctcccattc ctccatctt acccagggtg aaagcccag tctcccagg 10500
 cctggaage ctaccagc ctctccctt cccatctca taccctctg ctgtctgtt 10560
 gctcactctt tgctgctct gaaacacacc aggcctttgc acttgcccct gcctgggaca 10620
 ttctttccac agatgtacat cactttctc cctgacctcc atatcgagc ccgtccatg 10680
 ccctgatcc caccgactg accaactctt acctgttata cagatgtgt ggtttaccgt 10740

ctgattcctt gctagctac aagctattaa gggcagttt ttcttgatag ttctgtccgt 10800
 tgttttgctc atatagtcac aagtactttg gctcagttcc tacacatagc aggctctcaa 10860
 gaggtattta ctgagtaaat ggataggggt gtaaacagg gctgtgagtc taccctctc 10920

acttcagcca aaatagcctt tgcaaaacag aagtctgatg acatcattcc tgattttaaa 10980
cttttcatgg ttacccttgt tcatcgggta aagaccaat gggccctgcc ctgcgaggcc 11040
cccagctcct tgccgccctt ccccatctct gactgctcca gccaaacagg ctttcagccc 11100
gggtcctcac catggcccc gtgctaccgg ccccgctccc catgctgctc cctctgctgg 11160

aaggtacttc cctccctctt ctcttacc aa tttacagttt ccccatcctt acatctcagc 11220
tggagggtca ctccactctg gcccaggctg agtgtcctcg tcacatcccc tcaacagcac 11280
catgtggcac tgctccctga tggcactgcc cacagacaga tgccacatgc tgtgtggttg 11340
ccagagccac gcctttctta cccaccactg tcagcttcac aaggggaggc acatctgtct 11400
tggttaactg gcgtacccca tgtagtaggt ggttagcaca cactgtggga tcctgggtg 11460
acctcacgag tggaaagatg cctagtgggt ctgacccatg acctggcct cctgggccta 11520
tgtggatttc ctggccttca tgtcattggt gtctctggact ggtcactgtg tcagcctctc 11580

cctgggaacc tglaggacac catccatctg ggagcctttc acctccctgg taccttcagc 11640
ccagtttgtc atccaataaa ctttagatga ccatgatgac aatgggagtg acaaagatga 11700
tgatgatgac attgatggtg ccatggagac ccaagacact gaggctgagc tgagggtgtg 11760
ggtggcagga gaaggcatgg aagagacagg agactttccc acctgcttcc tccactaacc 11820
ctgctggttc cttcctgggc agggtaacaag gcggaggtga tggtcagcca ggtgtactca 11880
ggcagctcgc gtgtactcaa tcgccacttc tcccaggatc ttaccgcccg ggaatctagt 11940
gccttccgca gtgaaaccgc caaagcccag aagatggtag gaaaggatct gggggatgag 12000

agggagggaa tatgggggtg aaaagagagg ggtggggtct gatcacatgg agccagtgg 12060
tcaaccatc tggagcattc acagggacca cagccctgct ccaggcacca tggaaagcaga 12120
tgaggttagg ggtcatggga aagttagtgg atgtttgggt caatagcact cggattagat 12180
cctgatcatg cctcttacc ggggtggagc atgaccttgg gaaaggtccc acagtgcagc 12240
tgacactatt gagggcccc tctgcccct ccgttacagg acggtggccc gtcctcccc 12300
ctccgttaca ggacggtggc ccgctcctcc cctccgtta caggacggtg gccgctcctg 12360
cccctccgtt acaggacggt ggccgctcct gccctcctg tacaggacgg tggccccctc 12420

ctccccctcc gttacaggac ggtggccctc tctccccct ccgttacagg acggtggccc 12480
tctctcccc ctccgtaaca ggacggtggc cctctctcc cctccgtta caggacggtg 12540
gccccctctt cccctccgt tacaggacgg tggccgctcc tgccccctcg ttacaggacg 12600
gtggccccact cctgccccct cgttacagga cagtggccgc tctgccccct ccgttacagg 12660
acggtggccc gtcctcctcc ctctgttaca agacggtggc ccgctcctgc cctccgtta 12720
caggacggtg gccactcctg cccctctgtt acaggatggt ggctcactgc acggaggctg 12780

gtctactgcc tgccactctc aggtctcagg accactgccc agcaaggcag gccagaagtg 12840

 ccggggagt attcccagga gcaaccctga accatgagcg ctggagtggg tggatcaata 12900
 ccgcagcttc ttggccctg gcaggggaa tagttcacag aatgttccag getgtctccc 12960
 agagatgccc tttcggctg agctcagatg ctctcagctc tacactgcmc attcatggcc 13020
 ctgtgttggg tgcaccttt ccagctctc cctcccaact actgtttccc agaatacct 13080
 ccaaataaac cacttgcccc acctgtcaa tggagggtct gcttctgagg gacccagcct 13140
 gaggctgccc gtttctct ccatgaggta ggggtgataa caacaggacc cggctgcaga 13200
 tttgttggg gttgcagtga agttgagata acacgaacac tattcccacg ctgcgcaaat 13260

 gcttaagagc ctgtaatcct gccagcagcg ctgtagtgg agatgcgcaa aaactaccca 13320
 tcagagctgc tggcttgctc caggccatgg gaggaggtgc agaggggacc caggagccga 13380
 gtggggtttc tcagagtga ggagtactt ttggcaaggg gcagaggggt catcagcagt 13440
 gcagggtggag gtgagagtc ggtgtagtgg aacagaaag aaggggatgg ggtgtgagat 13500
 tcatgcatgc cccggcccgg ccaactcagca ctgtgtgacc gtgatcaagc ctgtccacct 13560
 tggagaatca tgcattgagc ggggtgcca gtaggagcaa agggcacctc caggtaggaa 13620
 gtgggctgt ctgccctgca gagggtcca ggggtgttg tcttccctc tcacagctca 13680

 aggagctcat caccagcacc cgctgggaa ctactacaa ctccagctcc gtctattct 13740
 ttgggtgagt tgccttgcc cctgaccagc tctgcaaga agctgagatt caaagaatgg 13800
 gagggcctc ttaggtctc tgatgcaatg ccttcatgt tcaaatggg aactaagc 13860
 atagagaggg aacttgctt cctgcatgc acctccctt cactggctc atctgtagaa 13920
 tggaaacatg ggigtgatg gtttcacca gacaatgact gtgatggctg atcaagggcc 13980
 tgacaccatc aggcgagcg atgttgagg ggcattgggt taaaagcatt ggctccaggg 14040
 cccgactgcc ccgtccat ctggttctgc tacttgcggc atagtttatg agacacaagt 14100

 tcacctctca tgcctcagtt ttctattcg taaaataagg attatgagag cgctccttc 14160
 agaggtcgt aggagcttc tgcgtgaaga cggacagcaa tggctgaggt gcgaaagt 14220
 ctcgatgtgc atgagcagg gtggagctgg gccagacct cagaatcctt ccctggcctc 14280
 tctacttct gcctgcctta gggagggacc cctcacctgc tcttctgtt tcattctcca 14340
 aatccccgag caccgccgc tgatgctgag ccccgagtg gtgcaggcac tgctggtgga 14400
 ggagctgctg tccacagta acagctcggc tgccgtccc tacagggccg agtacgaagt 14460
 ggaccccgag ggcctagta tctgggtca gtactgcgag tggaaactg gggttgcct 14520

catgaggttg ggggaaacaa gctgtggtgt ggccccggga ggctgcctgc caggcctggg 14580
 gtgctgtcag ggtgggcccc ccaggagagc cccccagggt aggtagcagt gccattgcat 14640
 tcaaggagcc aggaaagaag ggtgggatgg gggcatttag ggtaaatctc agacaaggct 14700
 ggctccaagg gtctcctcta attttatttt cattgtattt tcttttcttt tttttttttt 14760
 ttgttcttgt ttatttgttt gttcatttcc ttttatcaga agccagtgtg aaagacatag 14820
 ctgcattgaa ttccacgctg ggtacgctat ttttttttcc cctccccatt ttccttttga 14880
 gttggcattt gtcttgactt tgttgtgtat cagggggaca catggcttct gttgtgtgtg 14940

 cagggagccc tggccaagag tcaccaggg gatgcatgg tggactcagc gatgtgtccc 15000
 aagcaagtct tggagcctgt agggggagag gaggtggcga cgtgcatgcg tgtatttgtg 15060
 tgtgtcttgt agacgggtgt gcatgcgttc ctgtgtgggt gtgaggatga gtcaggttta 15120
 gtggtccacg aacgtgactc tctctatca ttcacttcaa cctgccaca agctagtttc 15180
 cactgatggt agaaaatcat cttgccaatt cacggtttgt cagtcacgtt ggttttaaaa 15240
 cttggtcttt tggaggtagc ggtgccattg cattcaagaa cgtccttcc ctcttttctt 15300
 ttcttccca gtcaggctca tcagccctcc ctcctacct ggtgccgtat tgctagagtc 15360

 accttgcat tctccaagcg gaccacaat cttcagctg accagcacag tcaccagct 15420
 gcacaaggca ggaggtgctg tccaagttgt agtttgtgtg agttgtgcag tgcaccaact 15480
 ggctgctgga ctctatggcc cctaaattct cagattctc ccacactatc tagtgttgc 15540
 acccagagcc aaggtggggg tgagcgtctc aacccttct cagggagga ggcagagttt 15600
 aaatccttgt tataccttc cttacctcc cgtcttccca tctgctggt caaatgcttg 15660
 cttctttgtt ggatggaggt gatgaggtca aagtacagtt ttcaaagagg tgaatcatg 15720
 attctcatic aaagatagag tgaccatgtg tcaaatattt atttggctga ttaatggggg 15780

 aacgagtaga atggtaaaga atgcaagaaa ctgatctatt tgtctatcta tetatctatc 15840
 tatctatcat ctctgttgat atctgtctgc ttgtctatct agttatctaa ctagctagct 15900
 gtctattate tatctgtctg tctctctgtc tctgtctgtc tagctagcta gctgtctgtt 15960
 tatactate tatctatcta tctatctatc tatctatcta tctatctate atcaatcatt 16020
 aatggaaaaa gagaattgct agaataagat taccaagtta gatacaaacc tggttaaggt 16080
 cctaccagge aagaaaactc aaaccttgg agttgtcttt tctagtgaat taaaatcatt 16140
 gacagcttat tacagtcttc tgaaggttaa catctacctc tacagagtct gaggttgata 16200

 atctacaacc aatagtaagt cagagatatt actcctgaga gcctcagggg gacttaatca 16260
 gatgatgctt ggagacagag actggctcat tgcagcctgg acaccgaatc tggteaattg 16320
 ctgcctgatt ttgtatagcc catgagccaa gaatgacata tataatata taacagagtc 16380

tcactctgtc atccaggctg gagtgcagtg ccgcgatctt ggctcattgc aacctccacc 16440
 tcccaggttc aagcaattct cctgcttcag cctcctgagt agctgggact acagggtcct 16500
 gccaccatgc ctggctaatt tgtatatttt tagaagagat gaggttttgc cgtgttggcc 16560
 aggctggtct cgagctcctg acctcaggig atccacctgc ctccacctcc caaagtgctg 16620

 ggattacagg tgtgagccac cacgcctggc tccataggcc atttttcaat tattaaaaa 16680
 tataaaagtc agccaggcat ggtggctcat gcctgtaacc cagcactttg ggaggcagag 16740
 gcaggcagat cacctgaggt caggagtttg agaccagcct ggccaagaag gcgaaacccc 16800
 gtctcttcta aaaaataaaa aattagccgg gcatggtggt gcgcacctgt agtcctaacc 16860
 agtcaggagg ctgaggcagg agaatcactt gaacccggaa gatggagctt gcagtgagct 16920
 gagattgtga ggttgtgcca ctgtactcca gcctgggcca cagagtgaga ctccatctca 16980
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaa agaaagaaag gaaaggaaaa ggtcctatgg 17040

 aaagtatttt tttctcctgc aatagaagtg ctatgtaata gcctcatgtt gcctcgtgcc 17100
 tctgtgtccc catgttcctg gcagttgttc tgaattatc tgtgctcagt ggggtttcgt 17160
 ttcatgaatg aatgattgaa caaatgaatg aaagcatgaa tgaggagact ggttcagtgc 17220
 atgtccagag cacagagtct cagggggcag agataacaac tcaaatcctt gaagtcgact 17280
 ttatgagcac ttcttcatg ccaggcccca ttctgcgct gaggacacca ggatgaccgt 17340
 gtctcaccce ctgcctcgg aggagcttta agcccatga gggagacaga cacataaaca 17400
 gatttcata acaccagggt ccagtgtgag aatagaggcc ccagaggcag tggagagagg 17460

 gaattgttcg ttccaaagca gaagaggggg caaatcaaga gcctcacaca gagtccaga 17520
 tctacaggag ggaggggttg ctctgactg ggggatcctg gaagacttca tggagggggc 17580
 atcagatttg ggcattggcc gggcgtggtg gcacaagcct gtaatccag cactttggga 17640
 ggccaagtig agcggatcac ctgaggtcag gatttcgagg ccagcctggc caacatgcea 17700
 aaacccatc tctactgaaa atacaaaatt agctggtcat ggtggccat gcctgtaatc 17760
 ccagctactt gggaggctga ggcaggagaa ttgcttgaac ccaggaggtg gaggttgcag 17820
 tgagccaaga ttgcaccatt gcactccagc ctgggcagca agagcaaatt ccattaaaa 17880

 aaaaattagc tggacatggt ggtgtgcacc tgtagtcta gctactcggg ggtgggggtg 17940
 gggggctaag gtggaggat caccgagct caggaggtcg aggctgcaat gagctgttgt 18000
 gatcgcatca ctgcctcca gcctgagtga caggctgtct caacaataaa ataaaataat 18060
 tttcaaaga aaaagaaatt caggcatggg gtaggcagg aatttgcag ggcgagaaga 18120
 agaaagggtt cctgagcag agggaatgac aggggcaaag gctgggggag gggaacaccc 18180
 aaggcgtgtt cagtaattc ctcccagccc cgagaggtgc caggctcct gaaggtgttt 18240

ctgattaaca agaggtagc acacacctct ccacggaatt cgtctcaaaa aaaaaaaaaa 18300

gggtaattat taaagtggca agagcaaaga atctgcttgg agcaagattt aaagaacaca 18360

aaacctagg aagagccagc catcttcc cagctgetgg tggaggccct gtccttccc 18420

taggcagaca ttgttgttct ctctctgggg aggtcagctc cccactgcag tcagcatggc 18480

caggggtcag ggagaagggg ctgagccaca ggtggcagca tcagagcaaa gtgtattcac 18540

ctccattccc ttctgggtcc tcagcactgc ccagaggagg tcataggaca gggattatta 18600

ttacatccat ttgacagaac ttggaatggc taagccactg gccagactc agttaactac 18660

ccagaggtag tgaacatcta cctctacaga gtctgaggtt gataatctgc aaccaatagt 18720

aagtcagagt tattactcct gagagcctca gggggactta atcagacaat gattggggac 18780

agagactggc tcaactgcagc ctggacaccg aatctgggtcc actgctgcct gatthttgat 18840

ggcccatgag ccaagaatga catcatcaca cagctgatga gtgttgggtc taggtgggga 18900

gggtagtgcc cctccctcct tctctccagt tcctcccca tatacccct ccctggggg 18960

cccagcagat ggcactagcc tggggggcct gccctcagc tgaccaagct gacaggggga 19020

cttttgcttg cctgtggcct tccaaagaag acgatttaaa gcagagaaaa cagactgaaa 19080

actcaggttt tataatttca tgtcaccagg ctgcctccca catcccaggt tcattcctaa 19140

atccccactg gctcctggaa gaacaccagg ctctctggcga ggtttaaatg agatactgga 19200

tgctccacgg gagagaacat gttcactggc agaccctggg gcctagatcg aacacacagt 19260

cgggtgcagac tcaactgtttt gaatgaatga atgaatgaat gaatgatgca ggtgggtactg 19320

ctttgtaagt tctagcagtg catcagagct tacggattag atggaagagc agagactcac 19380

tggtgtgtgg ggtagggggg tggggtatga tggtgaaaca gttgtgaagt gaggcagccg 19440

tgagatgggc taggtctgag cctcagggcg gccagctgc aggatgaaaa gtcacaggcc 19500

tttctccca gccctacctg ctccgtctcc ctcacacca cctgaggaac caggcactgc 19560

ctttattgag ccctactgt gcaaggtgct gtgctgggca ttcaaactg tatcatccta 19620

cagcctctgc tggcggccct gcaaggggtg tgttatcgtc ccattctata gatgaggaaa 19680

gcaaggccca ggaagatta ggtggtggct gggcaaacc agatgtgtct ggcccaggtc 19740

tgtgcaatgg acacaatcat tgaagatc tcatacagct gttgtgggca ttgagcgaga 19800

cagtgagga aggcattcag ttcagtttct ggectgtagc aatgcttga taagcacctg 19860

ttttattctg atggcttcac catcattagc tcaaagctca tgtcctcccc ccagggcagc 19920

ctcccagact cctccttagg gcactccctt ctctctaccg gaagtgaagc cctcatccct 19980

tctttctctc attgcctgtg gcctcgctgg tctccacagc agccagagga gtgtgtggtc 20040
 caagccagcc catgtccagc cttgcccaac cttctgtggc tcctatggc tgcaggagaa 20100
 agcagcgccc atcctcgaa tggcctgggc caggcctccc tgccttcagc ttgtcctcta 20160
 gatacacgtg ccctgtgtgt acttttctca aagctgcccg gctcgcccga gcctctttgc 20220
 tcacgcaggg acccccagga tgccccagc ccacaggccg ggtttgaagc cgtcacctcc 20280
 tgagctattc ttgcctgttc tgtgtctgtc tgtccccgt gtcattccatg tccccagga 20340
 gcgactggat tttacctgg gcactgagaa ggcgtgaagc tcagtgtgtg tccattccat 20400

 gagtgaatga ctgaaccaat gaacaaatgc atgaatgagg aactgacag gaaagagaa 20460
 ggatgggta gagcatgtct ggctatcccc acccgctcc cctgcccagc ccatcctgcc 20520
 tggatggagga ccttgagga cctggctccc cagggtcccc tccttctggc tcacaggaat 20580
 cagggtctgt gccctctcc ccgctccagg ttgttaccgc tacagctacg tggccaggg 20640
 ccaggctctc cggtgaagg ggcctgacca cctggcctcc agctgcctgt ggcacctgca 20700
 gggcccaag gacctatgc tcaaacctcg gctggagtgg acgctggcag agtgccggga 20760
 ccgactggcc atgatgacg tggccgggccc cctggagaag agctcatca cctcgtgagt 20820

 ccctgggaag gagggcagga gggaggctg gaaaaggag tggatgatgg gggagttaa 20880
 agtcacacac agcattctta gacaaggag gtaggacct tggcctggg tatctgggag 20940
 acaggacggc tagcttagag gggatagggg agaggaggct ggagatggtt gtgtactggg 21000
 ggcgcttccc ctccgcgagc ctgagttcc ccatctgtaa caaacctgtt gttgtagatg 21060
 actcctgaag tcagctctgg gaggcacct ggcttgttgg gatgtttcag agtctggctg 21120
 cagcctggac ttcaacctc tgggctcgtt cctaaatcct gactgcttcc tggtagaaca 21180
 cccacctct ctgcttccca ggcttctggt ggggtttaa tgagatacta gattcccat 21240

 gggaggggat gtcttactg ccgggcccctc gtgcctagac caaacgcaca gtaggtgtgc 21300
 agtatctatt ttgagtgaac gaatgaatga ttaggtggt actgctttgc aagtctagc 21360
 aatgcatcag agctcacgga ttaaatgtaa gacagagag gcttactggt gtgtgggagc 21420
 ggggtgtggg gatgtgacgg ggaacccct gtctcctagc tgcgtgccct aaggcaagtt 21480
 actttgcctc ttagaacctg cttaccttgc cggatcattg gaggattaa atcagactat 21540
 ctgtgccatg atccttacac atagtgtg cctagcactt acacgctagc cattattgtt 21600
 atcattatat atgctctaac tgggactggg ccgcaaaagg cattgagtgc caggagccat 21660

 ttggactttg atatttgta agtggggagc tattgaaagt tcttgagcac agaagtaggg 21720
 ctttagggca taagatatgg agtggagtac agaagtgatc aggatcagag ggcaggtggt 21780
 tgggggtggg gaggaggac tggaaatgac cttgacctc gggagcctgg tcctcccaca 21840

ggatggggag atgggtgta gcctacaaag cactgcagga ggtggggaag atgctctggg 21900
 ctgggcagtt ctcagcatt gtttattgag cacttacttt gtgctgggag tcaggctgat 21960
 gcctcttctg tctcacttgg gctgtggcca gcctccaggc agatggggat gggaccagtg 22020
 tgttcagatc aagcgcagtc tttgaatgig agctggcaga ggttcttgcc acaccctcc 22080

 cccaggcct ctccaagctg ctctctcctt gtcaccctc ctgctgtcct gctgggtgtg 22140
 acctcgatct gggcatgtg cgtgggctga gtttctggag ggctctggga agtgcagaga 22200
 agccagacac catctgactt ccaggctcaa aaagggtggg gacacttagg ggtttccct 22260
 ggggcttctc caggctcctc tcagcctggg aggggacctg actgccaggc ccagctctgt 22320
 tctactcac tigtgctcct ggtggctctc tcateccaga cccttgaga agctctaaaa 22380
 tgacaggtca gacaacattt ggggttctca agcttgtacc ccagacacct gctaggaat 22440
 gggggtgagg gggactttgg tggatgagg aagacagagc aggtggcccc ttgctcagtt 22500

 tcaacatgt gctttgattc tgcgttccat attcattta taagaaggc tctgccgcta 22560
 ggtaaataaa ataaaacccc ccaacaatga aagctaaagc cccattaaa ggtgacctcc 22620
 aggtctcttc catcctaata tcgtatctcc cacctcccag ggaagatgag ccgtaaggc 22680
 caaaaaggac gtggctglat gggagggtgg ggggcaccgg tgtggttggg gagacttggg 22740
 tgctgcagca ggaagatcaa gctggaatgg taggaagaag ggacgaggc ctggggggtg 22800
 aggggggtgg tgctgtctac tggaggccac ctccctcccc tggcaagagg ccaggggaaa 22860
 tgccccatcc ccggacctg ggcaccaaga ccctcccagg gagaccttg gggttatgcc 22920

 cacatgcct ccagctggct gcaggctgct tgggtgcat gtgtagcagat tttaggctg 22980
 tgcttggagg agctcaggtc ctgcttgcc aaggctgctg aaatccctcc agcagcacc 23040
 ctctctctg tcaaggccca ggtgccacg cacagtctgc aggcaggag gctattgggt 23100
 tgccattca gagggaggtg gggccgttag tttcttataa attgacctat cagatgcgct 23160
 ggactccaga gagtgttgcc attgacctg ggaagtgtg gggagggttg tgagagggtg 23220
 aaggggagct ggggaacccc tgtctgagac aggcagacca ggggcacctc catatgtggg 23280
 aggttaccag ccatacaga cagtgcctag cgcaggccta tctctgcat ggactgccgg 23340

 tagggcctca gtttcctat ctggaatca agcagctgac cccaacagtg tcaccagtct 23400
 tttcagggtc gacattccag atttctaaaa gccagaagt ctaagatacg gttatttgtt 23460
 ccgagcctcc caggcgcaca gctctgggca gatttctggg gcacctggg ggtcacgaga 23520
 ccacacctgc ctctcctg cctatccttg agcacagcca ggagtcgagg tgccagaaac 23580
 ggtggctcct gcagatgcca gtctagtctt cctgccaggg acgctagggg tcacagatga 23640
 ttctgtagca ggggtggagg gtctggggag ggagcatggg actcagcca gccgtcatca 23700

tcaaactgta agctccagaa gtctggggaa cctcctggcc tctctcacc gaggagctag 23760

cctggtcctt ggagggcctt cagtctgtcc tctggggctg gggagacaca gaattctccc 23820

cacagacaca cagtggcttc tggtaggaga cccggacceca gaaccagat gtccagactc 23880

ccgtccacc tccccagca gccgcctgcc gcctcctctg ccactccct cccagacccc 23940

agcccagcct tgccacctt ctgttctgcc aggggtgtacg gctgcagccg ccaggagccc 24000

gtggtggagg ttctggcgtc gggggccatc atggcggtcg tctggaagaa gggcctgcac 24060

agctactacg accccttctg gctctccgtg cagccggtgg tcttccaggg tgagaggtca 24120

ggggtccctg gggcagggga ggggtggtgg tagaatcaa gggcctcca ctgggctcac 24180

tgctcacctt tttgccc aa attgaggatg ggatggggag agggaagatt ctggaagctc 24240

ctgctgtctt ccactccca ccccgcccc cctcttctt ccgtcgtttg cacttccacc 24300

ccctcttcc ccttgaccgt cctaccattc gcagtctctg tcttctggc atcgtcctt 24360

tgcttccctc ctctttctt gtcttctct cctctcctt ttctctttc tgtgctgacc 24420

gcctctctc cctctcact cgctggacc tgtgtccct cccctctgcc cctcacccc 24480

tccctgccct ctccccctgg caccaccgg tggctgggcc tggaacacgg gtctgtttgc 24540

agcaggacta agaactcctt ggattccgcc ctagacagtc cgcttacagc caagaggcgc 24600

cagggagctt ggggaggtgt gatggcagca cagccaggcc atggccactg gtgtggcagg 24660

tctcccactg ccttcccage cccaccctc ctctgtctt gggacctccc tctttgcccc 24720

cttcccagga agggcacgtc ccacccgca tgggacagct gtcttgggcc tggaccagcc 24780

atacttctgc gcaggaggcc caaactttgc ctttctgga gctcaggagg ggaggatggc 24840

agagaggagg ccatagagtg ttggcagctg ctctctctc acctctctc ccaacttct 24900

ccctcccact cagggctcca gccctctct cggtttatcc ccaaactgtc tggcatagac 24960

ctgggtcccc agctggccaa actggagcgc taaatgggta gcagagctgt tccttggga 25020

gtctgacaca ggctcgaggc gggagggaaac aaaggcctt gggggccctg gcccaatgga 25080

gagatggcca gggcaggtga gcatgtctt gtctgacce ctggaccct cagcctctca 25140

cggtgtagcc tcaaccaagc cactccttt ctccgaacct catcttgaa aagggaaca 25200

gctctctc cccagccac caccgtgagg cctgtgcagg tgtgaatgca ttttgtaaac 25260

tggcgagtgc tgtcccga atatcaataa ctaacacgga tcgagcactt actacatgcc 25320

aggctgtttg aatgtttatg tcttttaat ccaacttact accctatgag gtgtgtgcta 25380

ttactgtctt cttttacag atgaggaaac tgagaccag attcacaca tcacattca 25440

ccacagcaat ttgctggcag aggtggtagg ggtggggggg ttacaagctg cgccagcctg 25500
 ctgggaggtg cagccagggg acccctgtgt aacagctgct ctcttggtcc agcctgtgaa 25560
 gtgaacctga cgctggacaa caggtctgac tcccagggcg tectcagcac cccgtacttc 25620
 cccagctact actcgcacca aaccactgc tcttggcacc tcacggtgag accccacct 25680
 gcctgccac ctgccctctg cgcgaagcac actacagtc cctggtgacc cgggatgaga 25740
 gggggcagtg tcccgcctct gctgaagcgc ccacagctg agccctgggt acacatcctg 25800
 ccagggtgga gagggctgtg ggcgaggtct ccctctgtgg gtcacagcaa tgctgtttg 25860

 ttgagtgact gacagacttt agccccacct gggattctgt gtttccttct ctttgttgtt 25920
 agggaggtgg gttaccaaac ctggccacac cccatgggcc acctgatggc cgcctctcc 25980
 ctcccaggtg ccctctctgg actacggctt ggccctctgg tttgatgcct atgactgag 26040
 gaggcagaag tatgatttcg cgtgcacca gggccagtgg acgatccaga acaggaggtg 26100
 ccacttctc tctccctct ggcttcttt cctccctccc cctccctctc tccctctc 26160
 aatagtacc ccctcattgg aagcccaagt cccaatctc agaggggcag caaggggagc 26220
 gagcagaggg tggggctggg gtcaggcctg ttgcccttga ccttgcctc gtcccagcct 26280

 cgcctctggc cccggcttcc cctctggcta cccagaggt ctgacacag tttggcatc 26340
 agacacctg gatgtttatt ctaattacag caaaattgac tcacttctt ggggtctgta 26400
 acccctctg gcacctcaa tcttcaata aatgtttcc agagccaaag gactcatggg 26460
 cactttggg ccttccctc aaaccaagg cgtaccatca gaggtgcctc tccttatca 26520
 cgaaccctg ctgcacagcc aggcaccaatc ccattgcaca gggtaacatg gaaatcatgg 26580
 gtgccctgga tccccgaat cccaacggg gcacttggcc tcttccctgc tcttgcctt 26640
 gctccctctg gtaactaagt tccgacaaa gaagtgagtc cttacagaga tgtgagcaag 26700

 agacagtggg gttaggetaa gcgactaccg ttgccagggt cactatggca tgaggccagt 26760
 aggtgcccac tgggcctggc caccaggaag ccatgggtgg tgccgacagc ttcagaggcc 26820
 tgggctgggc aaggaggcag ggaaacagag acaggggtgta tggacaggtt ttcatttgc 26880
 tgggaagaaa agagaactag gaaattcaag gaaggggaca ttttaagacgg gagaggttcc 26940
 atatctcaa tigtggatc atcccagcat cccagaggg agagaaggag gctcaggtgc 27000
 aggtaatatt gtttagagt gggagggtgg gcaaggggag agggaggccc tcccatggct 27060
 ccattgttg ggagcagagg tttggggaga gagaagagga atattgaagc agcgatggca 27120

 gagccaggga gacccttcc ctgggaatcc ggggtgaaaa cggtcacgt gtcagctca 27180
 ggaaagagga gactctatc ttcctgcag gttgggctc tgcctccct tccaacctg 27240
 gaattctggg ggcctaagtg gttcagagtc tagtatgaaa gatttgcac tcttgattt 27300

cacagagttt gaatatctaa gatgccagtc ttggaagatg ccaaaattgg aaggctctgg 27360
ggctctagaa ttcttgatt tctggggtgt gtgttcccaa tcaccaacac ttgtaatttg 27420
cttgttggt gatcctattc aaaaggatca tccagacaaa aggtgacgaa gaatgacaag 27480
gtttgcttga ctctttttg caatttatct gggactagga ttaaaagaaa ggagaagaaa 27540

tactcatggc atgatctagg gctatgctgt tggggtaac atggggagtg actttgggcc 27600
tgtgctgttg ggggtgatat ggccaagcag tgccttcagg gctttgcatt tgggtggtgat 27660
atgctgatgg agtgtgacat caggcctgtg ctgctggggt gacatgctgg ttcagtgatg 27720
tcaggcctgt gctgtctgga gacgagaagg ctctctgtagc atgatggggg cacctctggg 27780
aacggctgcc ctgaccctc atggagctca cttgaacct ccttgctact cacctaggct 27840
ggggatggct ggcttcacc cgcctcacag gaaccgcag ggtgaccctg agatggatcc 27900
atgattcaca gttctgcgaa tgatgagaac atgttttctt gcctcctcc ctaccgcaga 27960

gctgaacttt atgtctcagg gaggcccaca aaggagaagg aacagtcttg ggtctgacac 28020
tcctgtctc atcctcacc ccttggcga ctccatttc cagaggcggg gccccagcat 28080
tcagggttg tgggggttc ggtggcctgg agttaggtgc taagacaggc gttcagtgea 28140
ttggcccaac aacttgtgtg gtcattggcg ccgttctgt tcccagaga aggaaatcaa 28200
ggctcagcag gattaggtgg cacgcagatg ggtccacaga tgggtctct cccatacccc 28260
caacagccac aaacagcagg ccaaaggatg ctccaccca tgcctctgt ggggaagccc 28320
tcctcctcc ctgatgcagt tgggcaaggg tctgggtact ggggagacag ggacttctgt 28380

agctaccctt gggtaatgac agagagagtg tggaacacgg atgggagagt cttttcccta 28440
atccaaagga atgatgcctt gatggtgaat ttgaggcact aggacagctt ccaacagggt 28500
ggagggatct cgccagagtc tgagaccac tgagctatag aatgtgtggg ctgaactggt 28560
cctagcacce aacctatggt acaggtgggg aaactgggac cagcagggc taaggacttg 28620
gcctcttgtc ccigtcttt ctgcctttca gtggtggaga tgggcttcag ggtgtagcca 28680
agcggtggtt ggggtgtgag gatgaggcct gacagctccc tgtgccccca tagctcccc 28740
tctctctgtt cagtctccc tcgccacacg ggggtggaag tgctcagcag gggctggcat 28800

cagggtttgc atggatcctt agatgcacc ccttcttgt ctgtgaaacg aggggttcag 28860
gccagccag ggccccaatc ttgtattgct taccatcag gaagctattg tctcccatac 28920
aagttgtgtt tattaattcc tggccaaacg ccattccaag tcaggctggt gaggtggaaa 28980
gcgcttaagt gtcgaagcca gacaggccag ggctcagcac ctgtctctc tgcttctac 29040
ctgggcgagg acttacatct cccaacctca ggttaactcat ctgaaaaaag ggcgtgaaag 29100
agacccccac cctgggaaga ctaagtgaga caacgcgtgg agaacattgc acacgcgggc 29160

ttaggtcaag tgcaacaaac ctgcttcat caccggctct cactctgctc tgggcaggca 29220

 caagctgagg ggtttatggt gctggctctt tcagcctcaa caaccagcg aggaagcagg 29280
 tgctgtact gccttcacag accagtgaga cacccaagac acagagagat gaagtaattt 29340
 gcacaaagtc acccagctct ttgagccaga gttaaggcca ggcagcctga tctggagtgc 29400
 acgtgggtgc acagatgcat gtctgtgtgc gtgcgtacat ccatgcatgt ctgtgcacgt 29460
 gtacgtgcat gtgtgtgtgg tccacgtgtg cgattcttcc ctctgagcct ctageggccc 29520
 atgccagctg gtgactcctt cagccaaggc atccccagcc aaccactgg catctgggtg 29580
 ggggatcga cagtttctgt ggctgtccca ccagttccag agcggcctgg gaagtccag 29640

 cctttcttc tcagacttcc attaagggtc cagggtcccc aggggcagac tcttgtcccc 29700
 tccccgcaga ctctctgt gtgaatgaat gtggaaggga aggcagaggt ggcgcctgca 29760
 aacctccgc actgggccac tgtgcctct agttatgac atgggcgata gtgatcatec 29820
 catgtagatg ctgagaaatt cttagaatga gcatttgtt gaaatctgct tgtgtgggtg 29880
 gcaaagacat gagaggctca gggaagagca gattttcaga caaggcactt tagggagggg 29940
 gaggtagacg cctttggccc agaatgccc ttgatggaga gggcgggtca ggggagaggg 30000
 tatcttaacc ctcaagtgcc agcgtagtga tgaggaaagg ctggcctggt gggccccca 30060

 tggactaagc atccttaggc acttcactg actcctctga gactgtggtg cctccttac 30120
 ccctgacctg cctgcttctt acctagcttc tcccgtgcc cacttgagcc cagctgaggc 30180
 ctcagccct tgagtggctt ggggtggta gagggacttg gccctgaga tctggccatg 30240
 gctgctccat ttcgcagaag ccactctcac gggctgccac cgaagcacgg gcttcccct 30300
 ttccgggaac ctgctcctg ccagcttctt ctctgtgac atcacttctc ttgtgattcg 30360
 cccaccatt tccactact cccagccagt ggggacaggc agaaccatgg gttccctagg 30420
 ccagctggag ccacccccga cccggcctgg cctggctatg ggggtggcct tgtgttctec 30480

 ggagcgtag tggccagcac aggcggcagc cacagacact tagtagaac ttcagtgtgg 30540
 ctgacctgag ctgggctggc cgtgcaggag agtgaagct gcttctcca tgagctcaca 30600
 gcctgacgtc agcaagtgt tcaaagaagt ctttctat gcatgcctta aacctgcca 30660
 caaggagat acgatcacc ctgttttaca aatgtgaaa ctaaagcttg ctgagggtga 30720
 cccaagtcac cacagcttgt tcttggggca aagccaggct gccaattcag ctctgcagcc 30780
 ccaggtctag agctctggca atgccagggt ctgctctct cccctcttca gcaattgcct 30840
 tctgtgacce tcttcccct ttaatctgtc ttaggtaag ggcacggggg tgtgcattca 30900

tccaccacag cacccttctt tcttcttcc ttcttgtgtt ctccccacc tccatccat 30960
ccatccatcc atccatgcat ctatccctcc aggcagtaca tcttgacagg gtcctgtct 31020
acctcctgga tgaggcaaga aggaaatatt ccccatatcc agagaggtga ggaagcaagg 31080
caggccacac ggtgcaaaaa tgtgccttca gacactcagt actttgtagc caagatgaac 31140
tggcaggcat cgcagcagtc aggtctctgg tgcttcttgg agagggttag aggggagcac 31200
ttgttggacg ggaggcactg gagagccaga gaatgtgac cctccccag agagtctgc 31260
agcagaaaca gaaaactcag atgggccaag gggccaggcc agggctagag tctatgatgg 31320

ggggtagggt agtccagtgg tgttttcggg gcttttcttt ctttctctct ttctctttct 31380
ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt ctttcttttt ctttctttct ttctcttttt 31440
ctcttctctc ttctcttctt tctcttctt tctctttctt ctttcttctt ccttattctc 31500
cttttccctt cttctccctt cctcttctct ttcttctct tctcttctt ctctctctc 31560
tctttctctt tcttctctt ctctctctc tctctctct tcttctctc ctctctctc 31620
tcctcattct ctttctctt tcttctctt catctttct tcttctctc ctccgcctc 31680
tcttctctt tcttctctt ctctctctc tcttctctc ggagcaggaa tctggattat 31740

tatgtgaaat tagctcgcga ctcaatgaag caatttctac atgggtgcata aacagattgt 31800
ctttacgtg agtgactccg cttgggccac tagattcag ccgtgcctt gaattctct 31860
ctggcgcttt ctaagcagac gcttgttcca gggattccac cacctctacc cgtgctccag 31920
gcctccagag tgagaaccaa acactgccca gacagacagg ttcccgggta cacggtgagg 31980
ccctggggaa aggttgctgc cagctacaga ctggttctag gactctcct ggaggttgag 32040
agaacttctt gtagcaggca cagggtctt tgccttacag cccctgccca aggcttgggt 32100
gacactacag gtctcaacg cagttgctt tagggtgaaa cgttccactc cctccaacc 32160

ccggcttggg ttcttctct gtctccccc aatctcctg tgactgtggg aaggacacc 32220
ccaaggccca tgggatgcgc ttgactctc attccccga ctagtcttc ccaaccctg 32280
gctcccctgt ctacttctg aggtcttct gtgaggaaaa caatccatga taactttata 32340
gacaaacaga caccaaaacc tgcgttctt gggttttaca agagcaagag ggccaggctt 32400
gctcaggggc gccccctggc ggtgcctct cccccaccg ccctgctggg ctgggggaac 32460
catggtcggg ggtggcgct cccaacctg tctgcctcag gaccagtca ctctccgaa 32520
aatgactgag tacctaag agtttttct tatacaggt atagatctat acttgcagca 32580

ttagaaattg aaacaaaatt ttaaaatgtt tattaattct ttaataataa ttataagccc 32640
attacacatt tgaataataa taacattcta tgaaaattag ttgcatctc caaaagtaaa 32700
aacatttagt gacaagagt ctgtcatttt acattttgt acatttctt aacaactggc 32760

ttcacagact acaggcggga ccttcgaatc tgctccgag ttcaatcagt cccgatgtca 32820
 cacatcagtc tctggaaaac tcgctgtca ccttatgaga gaatgaggc aaaaaaggca 32880
 aatgatatct gagtgttact ataaacatga cttttggacc cccaggggtc ccctgactgt 32940
 gctttgagaa ctgctggttg gtgtaagggt aagatcgtgg tcaactgtggc cagatagact 33000

 taggggggtg ccagagtcta ggccaggcgt gtggaggaca tggggcatgt agggggctca 33060
 gacctcagag ctctgttgc agtgggaatt cggagccctc ccctcaagca agctaggtga 33120
 gctcttctgg gtctgaggc aagattctgg ctccaccttg gctcctgcac tcttgacct 33180
 catctgtaaa atgggatgag agcaattcct ccctccctgg gtggaggtgc tgettgaacc 33240
 tcagaatccc cgtgcaatga ggccttgtga tgccatagcc aatgaggctc agccccagcc 33300
 acacacctgg agatgttaaa acagcctcaa agctcatctt cagctgttcg gtggctaagg 33360
 aattgattaa cttattgaac ggttaagtgc ttaccacatt ctagaagttc tggggaagtg 33420

 cctggccctt gggaatcatg gccggctccg cagggtgttg gatttgctgt gggatgtccc 33480
 cactggcctt caggggcatt cctgatgtc tctggatttc catctgcttt ctctgccagg 33540
 ggcattttca gctctcctg cagattttca acctgcacce tgagtgtgtt teccccatct 33600
 gcaaagcact ctgatttctt ctgtggaggg cttttctatg agctgatgaa gctgtcccca 33660
 tctgttctgc aagggtgtcc cacctgggat gaaaaggaac ccccggctgc tgtggaggga 33720
 ggggtcccact gtctggggg agtggctgca cccactctgt gaagtcatgc cgctgccac 33780
 ttgctctgtg gggtaggtg caccggactc tctgcaggag gaaccctgg gcccatgccc 33840

 tggagatggg agggctccta cctgttctct gtaggagag aaagactcag cctctctgga 33900
 gattccccca ctgctctgt ttgaacaacg gtatcttctt ggtggtggtg tggcaggggt 33960
 gcagggcggt tgtgtccag cagggatgtg aggggtgtcc cacagctggg ggtggtccca 34020
 cccctgtggt ccatgcacag agaaggtgct gcccatcagc actaagctac tggteatggg 34080
 agaaggactg gtcttcct caagcccaca gtgtcacagg gagcaggag ggttggtgcc 34140
 taaatgggga gcaactgtgc ccctctgccc cacaccaagc tcaaggcaga tgacctgca 34200
 catctgtgga cagtggggca gtcaagggt tttgcctcaa ctgacacatt gaagccttt 34260

 gtcagattca agatcaacag aaataatfff tctttcttt ctttctttt ctttctttt 34320
 ttttctttt ttttccctc cctctctccc ttttttctt tcttttctc ttttctttt 34380
 ctttctttt tctttcttt ctctttcttt ctttctttt ccttccctcc cttcttctt 34440
 tctttccctc cctcttctt tcttacctt tctctcttt tttcttttt tgactactt 34500
 tcttctttt tgcccaggct ggagtgcaat ggcacgatct cggtcaccg caacctctgc 34560
 ttctgggtt caagcgattc tctgtctca gcctcccag tagctgggat tacaagcatg 34620

tgccaccatg cctggctaata tttgtatctt tagtagcaac ggggtttctc catgttggtc 34680

 agtctggctc cgaactcccg acttcaggctg atccaccac ctcagcctcc caaagtgctg 34740
 ggattatagg tgtgagccac tgcgccacc caatcttctc tgtttataa gggaggaagg 34800
 tgaggctcaa agaaggacc tgacttgctc gaacctcaca gttcacaggt gactgtgact 34860
 agaattgagt tttttatctg gcagccaatg gggagccatt gaagatctt gaggaggca 34920
 gtggcatagc caggctagtt tctagaagat gactctgggg gtgcactcat ctaagggaga 34980
 aatcagggca gaggaggcac agcgggctg cagctcccc tgcccctctg gctgcctgtc 35040
 cttgctctgt ctgtgcacgg gaccaggag accagccagt gcagccctga gtcgtctctg 35100

 actccccca ggctgtgagg ctgtgcctc ctgcagcct acgccagag gatccccgtg 35160
 gtggccacgg ccgggatcac catcaactc acctccaga tctcctcac cgggcccggt 35220
 gtgcccgtgc actatgctt gtacaaccag tcggaccgtg agtatgggca gccgggggaa 35280
 ccccctgcag tgactcgtc cctcttgcc atccctgaa ccaccaagg ggctgtgggc 35340
 agctgcttat gaggctgaac aaaaggagag agagagtgtg tgtgtgtgtg tatgtcttg 35400
 cacaaatita tgcagcttg tgtgccacc tgtgcaagg agccacaagg gtttcagga 35460
 atacacactc atacatatcc acgtgtgtgt tgtgtattct gtgtgtgtgt ctggatatgt 35520

 atgtctgctt ggactgtgta cacagggtcc caggaccag tctgtgggtg cctgtccatg 35580
 cgcgtgtgag tgaacagggt catgcgtgtc tttgtgcgc ttcgcccga cgcattgcct 35640
 aatggcgcce tcctgcctc cacgtcccc tttggtttg cagcctgcc tggagagttc 35700
 ctctgttctg tgaatggact ctgtgtccct gccctgtatg gggtaagga ctgcccac 35760
 ggctggatg agagaaactg cggtagtaa ccccccgcg catcctcct ctccctgcc 35820
 atccctctc ctccctacc tttctgtc tgagctgagt ggagaccca ctctacatg 35880
 cagcttccat tatgagcacc caggaagtgg gttctctca ctgtgccggg gtggcaaat 35940

 gagacagacc agcaatgcag cctccccgag accacctct gggacagtgg cagggagaag 36000
 tggggagcca ggtctctga ctccagctc agggccatca ccccagccc ctgtcccagc 36060
 cagccttcca ggaaggaaca gaatgggtga gggagatgtc cccctcctc gccctgtcaa 36120
 aggtttaaat atgtgggaag agggaagcga gatgttcatg gtgggggat gatcctgcca 36180
 cggctgtggg ggaggtacct catattcaga aactgaacat ctggcttcaa gttctggctc 36240
 agccaagtga ccttgacaa gtcacctcat ctgtttccac cagtgaatg gggatatctca 36300
 cagggttctg gtgaaacttt ggggtgtaaaa tagcagagaa agaggccggg cgcagtggct 36360

catgcctgta atcctagcac tttgggaggc ggagtcgagc ggatcacctg aggtcaggag 36420
 ttcaagatca gcctggccaa catggtgaaa ccccgctctt actaaaaata caataattag 36480
 ctgggcgtgg tagcaggagc ctgtaattaa tctcagctac tcgggagtct gaggcaggag 36540
 aatcgcttgg acctgggagg ttgcagtgag atcatgccat cgcactccag ccttcgtgac 36600
 aagagcgaga cataaaaaata aagtagcaga gaaagagatt tgtgatggg aacgtgcaat 36660
 acagcacacc ttctacaggc atcgccaagc cccggctggc tctctggct tcttcccacc 36720
 tgtcccctct ctgtgtcccc acacagtttg cagagccaca ttccagtgca aagaggacag 36780

 cacatgcate tcaactgcca aggtctgtga tgggcagcct gattgtctca acggcagcga 36840
 cgaagagcag tgccaggaag gtagggcagg cctagccgag tgtctggagg gacaccaaag 36900
 gcagtctagg cctgctacat gcttcagcaa aagtttctag cttctcctct caacacccac 36960
 caacccctct gtatttacat ctgtatgtct gtccattcat ccatccatcc atccatccat 37020
 ccatccatcc atccatccat ccatctctg gtctccaatc accgtctgtc cattgattca 37080
 tacagctacc catttatcta tgcactact gacctgtgca accatcaatc tcctatcat 37140
 caaactgtea atctacccat ttattgggtt ggctgactac tggctatata ggccactgtt 37200

 ccatccatcc atccatccat ccatccatcc acccaccat ctaccaccc accatccac 37260
 ccatccatca tccatccgtc catcatccat ccatccatca tccgtctatc catccatcca 37320
 tccatccate atccatccat ccaaccatcg tccatccgtc catcatccat ccatccatcc 37380
 atcatccate catcatccat ctatccatcc atcatccttc caccatccg tcatccaccc 37440
 atcgatcate catctgtcca tcatccatcc atacatcate catctatcca tccatccatt 37500
 catccatcca tcatccatgc atcatccate catcatccat ccatccatcc atcatccgtc 37560
 tatccatcca tccatccatcc atccatccat ccatccatcca tccgtccatc atccatccat 37620

 ccatccatcca tctatecate catccatecg tccatccatcc atccatccat catccatcca 37680
 tcatccatcc gtccatcacc catccatcca tcatccatcc atccatcate catccatcca 37740
 tcatccatcc gtccatcate catccatcca tegtccatca tccatccate catccatcat 37800
 ccatccatcc atcatccate catccateca tcatccatcc attcatccat catccatcca 37860
 ttcatccate atccatctgt ccatcgtcta tccatccatc atccatcate catccatcca 37920
 tccatccate catccatcat ccatccatcc atcatccate aatccatcaa tccatccatcc 37980
 atccatccat catccatcga tccatccatcc atccatccat gcaccatcc atcatccate 38040

 catccatcca tcatccatcc attcatccat catccatcca tccatccatcc atccatccat 38100
 catccatcca tccatgcaac catccatcat ccatccatcc atcatccate catccatcat 38160
 ccatccatcc atccatcate catccatcca ttcatccate atccatccat ccatccatccg 38220

ttcacccatc atccatccat tcacccatca tccatccatc catcatccat ccatcatccg 38280
 tccatccatc atctgtccat catccatcca tccatcatcc atccaacccat ccatcatcca 38340
 tccatccacc atccatccat tcatccgtca gccatccatc catccatgca cccatccatc 38400
 atccatccat ccatccatcc atcatccatc catcatccat ccatcatcca cccatccatc 38460

 atccatccat ccatctacc atccatccac ccatccatcc acccatccac tgatctccct 38520
 agccccctgt ctgtccactg gtccttatac ccacacgttt atccaacctt ctagctgtct 38580
 gtcagtctcc ctaatggacc accactccac ccattggctt gtctgctcag tcttctgtct 38640
 gggctctattt atccatccat ccatctacc atccaactga ccaactgacc aacacttgca 38700
 ggctaccag cgataggcaa ggtgcagtaa ggaagtgaga ataaaacagc agagatgcag 38760
 gccctgcctt ccaaggctca tctgttagta ggaggatag atgggtgact ctctgcctt 38820
 gtaggaagat tggagggcag ggaggaggtc agacatgaaa agcttctgg aggagtagg 38880

 tgtttggccc ttggtgagag ctaaaactta aataggcagg aggaaaggag agaggcaaag 38940
 accaagtggg ggagtggaaa gttctttaca gtgaagagca gggaggaaaa tgtggacaac 39000
 cgggcagggc cagagcctgg gagattgcca ggctaggtgc ggaccctggt ctaaaagtgg 39060
 aggcacagtt ctgccttcaa gttccacact ggagggggag gcatgatctt gtggtcagga 39120
 tctccagtct gagaatggag acaccacttt gtgctcaata ggccagtctg agtggagggg 39180
 ctgtgggggg cggggggaca tggcctgctt ttaggagacc ctaaaggaga ctgagaaaa 39240
 gactctctag tcacctctg gctcttctgg ctccatcgtt cctgcacccc actttggaag 39300

 gtttcttgg ggetcagaga cccaccttct gtgccctgcc cccatccct ctgteccagg 39360
 ggtgccatgt gggacattca ccttccagtg tgaggaccgg agctgcgtga agaagcccaa 39420
 cccgagtgat gatggggcgc ccgactgcag ggaccgctcg gatgaggagc actgtggtga 39480
 gccctgcctg gctgcccggg ccctggagct tgggagggag ggggtgccca cagcaggaag 39540
 ctggagggaa atctcactgt tgtccctgg tctctctta tctcatctc tgcccccttg 39600
 cctgggtcct gatggtctct cccctccat cattctctg ttctctgtct ctccatctct 39660
 ttctttgce ctctctctct gtctgcttct cccctteccc tctctctctg tecacccac 39720

 cacctgcccc catccccaga ctgtggcctc cagggccct ccagccgat tgttgggtgga 39780
 gctgtgtcct ccgagggtag gtggccatgg cagggcagcc tccaggttcg gggtcgacac 39840
 atctgtgggg gggccctcat cgctgaccgc tgggtgataa cagctgccca ctgcttcag 39900
 gaggacaggt gagcgggagg gtgtgggggc ctaggcagta agagacaagg gcaggaagg 39960
 cccgggggga ggtgcaactgt gtctgagctc ttgagagata gaggaagggg tgggtgaccc 40020
 ccagacagg ctactgtgat gtgagttcta gtctggctc caccaggacc ttctgggtcc 40080

ccggacacat tgitccacct ctctgccatc tacttttggg atcttgcttt aagttgggcc 40140

 agtaattcat tcattcatct ctttactca ttacagcaaca cttgtgctcc tactatgtgc 40200
 cagggtctg ctatagctg gggattcagt aaaggacaga actgcccaac ctggtcataa 40260
 gctatgacac tccccgaggt gtgacacgag gtagcaggtg gggctgggga gccccaggg 40320
 gacatctcat caggcctcat ggccatcttt cccatctgct tgggtgggctg aaacctcccc 40380
 caatccacce ccagacagat ctgggcteca gatccccccc ccaggccctg cacagggatc 40440
 cccttttcta tcctctctgg gacgcagggc gctctgacca cctagctctc tttaaccca 40500
 tctcaggctc cccactgcc tcaggtagag gtagagacc cgaaggctgc ccatctgcca 40560

 cccaggcagc tgactgccgc agtccaattc ctccacgctc aactcccacc cgctccccac 40620
 taggaccac cagcctcagg gaattcagag cagcctgggt ctgtaaagca cacaggaaaa 40680
 aagaaatctg tgcggggggc ctggcactgt gctacatctt ttagatacac ggtcttattg 40740
 gattctctca agaacattcg agtagaaaat gccattcca ttgacagatg aggtggcaga 40800
 ggcttagaga ggcacacca tgtctagga gggatgaagc tggggcgtgg aaccaggca 40860
 ggccgagtgg gtgaaggctg aacgctgtac caccagctag gcgacctca gggaggaag 40920
 ggagggtggt gtgtggaggg cactgtcccg ggcggggatc tggctatctt gagggtcct 40980

 ggatggggag aggcagcttc ctcccactc acctacccc accccacccc accccacccc 41040
 accccagcat ggctccacg gtgctgtgga ccgtgttctt gggcaagggtg tggcagaact 41100
 cgcgctggcc tggagaggtg tcttcaagg tgagccgctt gctctgcac ccgtaccacg 41160
 aagaggacag ccatgaactc gacgtggcgc tctgcagct cgaccaccg gtggtgcgct 41220
 cggcccccgt gcgccccgtc tgctgcccc gcgctccca ctctctgag cccggcctgc 41280
 actgctggat tacgggtctg ggcgccttgc gcgagggcgg tgagcagcgg ggacttgcgg 41340
 cgggaggggg agggagaccg tgcggtctg gcgctaaca cctggcctgg agaagggcgg 41400

 ggctgggggt cccggggctc caccatag gcctctagt gctgggattc aaattgggct 41460
 gaattttac gtagaaaacc acctttaat gcggcctgta ggccctgcc cctcccctc 41520
 tagctcttc ctctctctg gaaggcgtt atgtgtggg caaagggca ggtctgggac 41580
 gccactgcc acgtgcaagc tccactgct gttccttggg ctgcaagggt ggaagctct 41640
 taattactag cactttccac atccaggtg gatcttaggg gaactgact tcatataatc 41700
 caccaacag ccctacgggc ggatgctgtg gcctatctt atggatggag aaaccaaggc 41760
 tcagagacat gttgctgtaa gtcacacagc cagagaggac tggagcaaag attagaacce 41820

agggctggct gcctccagag cccctgctct tctgctact gctctcagaa acagggtctc 41880
 tcccccttct acgttactg accagagtcc ctggcgcca ccgcacagtt ttggggacac 41940
 agaccagct ggcaaaccta cagacatgcc ctgcagcgtt agtgttggg gcttcaaaaa 42000
 tgtgtacagt gacttacaat ctggaagcag gcggggccgc agagatattt taaggatggg 42060
 gaaactgagg ctcagaggaa cagtgactta cccaagggga tggcagtgg catggcaaag 42120
 caaaggctgg ttcatctact attccttcaac tcattcagtc actcaatgac actttctgag 42180
 caccaagtac gtaccaggcg tggggttagg ggaagggtac ataaggatga agagagaaca 42240

 ttctcggggg agacagacag tggtaagagc tgacatggat ggggagatgc agaacagtg 42300
 gagacacaga ggaggctcct gccagctag ggtcagggga ggcttccagg ggagggttgt 42360
 ttaagctgag gcctggaaga tgagttggca acattcagac aaaggggaaa gacattcagg 42420
 tgaagacaca ggtgccaaaga caggaagatg tgagaacatc cgcagcctgc cagaggggct 42480
 gaggtggggg gcaggcgtgc ctggcgagg agcaaccaga atggcagaca gggccttggg 42540
 cgaggagcaa ccagaatggc agacagggcc ttgccgcca gcataaggat cttagccag 42600
 gagttctccc tctacctgc accttagaac catacgggga gtttcaagaa aaactgcgta 42660

 tcaaggctcc ccgggggact gtgatatgca gcctctgtgg agaagcgcta gggcagactg 42720
 cagagttggg gcactgcaga gttctaagga aaccatgaag ggatcagatg tgggcttcgg 42780
 agacatctgc aggtgctgta acagagcagc gaggagccag ccagagccca gaggtgcctc 42840
 agcagacaga ggtgggggac aagaagctgg aggaagacac tcatccacac gggctttttt 42900
 ctttttctt tttttgttt ttttgagaca gattttcgt cttgttccc aggctggagt 42960
 gcaatggcgc gatctcggct cggatcccc tctcccggg ttcaagcggg tctcctgcct 43020
 cagcctcctg agtaactggg attacaggca tgtgccacca caccagcta atttgtatt 43080

 tttagtacag acagggttcc tccatgttgg tcaagctggg ctcaaactct tgacctcagg 43140
 tgttccgtcc gcctcagcct cccaaagtgc tgggattaca ggcatgagcc accgtgcccg 43200
 gcctccaca tgggctttgg tcgggggctg tcacatgaa ccccacagag aaagagctag 43260
 aataaagtga cagggaggca gaggggcagg tgcgacctc gcaggggtaa gggtagggcag 43320
 agcaggagag aagtaggctc ctgagatgca aaggaataa tgttagggag aatagagaac 43380
 aggggctcca ggctcctgag atctcacttc tgcccttgac cacggacagg ccccatcagc 43440
 aacgctctgc agaaagtgga tgtgcagttg atcccacagg acctgtgcag cgaggctat 43500

 cgctaccagg tgacgccag catgctgtgt gccggctacc gcaagggcaa gaaggatgcc 43560
 tgtcaggtga gtccccggg catgggaggg agagaggagg gagaaaggat gctgccca 43620
 tcaccagggt ctggcccttt gctcacatca gcctgctgaa gcctccatc ctcccagca 43680

ggtggatgat gccacccta ctttacagaa gaggagactg gggcttagaa aggttgagga 43740
 gcttgcccaa ggttgcagag ccacagatca gaagagatgc tgtgatgggc aggtgttagg 43800
 ctcaaacca gttctgctcc ttgcccacca caaggcacta ggcccagggt cccacagtga 43860
 ggtggatgca tggaagaaga aaggggtgtc agccacagaa gggaggcggg ggcagagtgg 43920

 gggcgtgggg acacagccac agttccagga ggtcccaggc tggctggagg cggggagggg 43980
 ctggcttggg ctctctccat ttagcaggcg aggggaaagc agagctttaa gactgaacgt 44040
 gactctggca ccagtcaat tccaacagt caggacttaa tccctatggc tcttcacctg 44100
 gaaaaggggg tgccttacc ctgcttcagt cttttctct tccccctt cagggtgact 44160
 caggtgtcc gctgggtgic aaggcactca gtggccgctg gttcctggcg gggctgtca 44220
 gctggggcct gggctgtggc cggcctaact acttcggcgt ctacaccgc atcacaggtg 44280
 tgatcagctg gatccagcaa gtgggtgacct gaggaactgc ccccctgcaa agcagggccc 44340

 acctcctgga ctcagagagc ccagggaac tgccaagcag ggggacaagt attctggcgg 44400
 ggggtggggg agagagcagg ccctgtgggtg gcaggagggt gcatcttgc tcgtccctga 44460
 tgtctgctcc agtgatggca ggaggatgga gaagtgccag cagctggggg tcaagacgtc 44520
 ccctgaggac ccaggcccac acccagccct tctgcctccc aattctctct cctccgtccc 44580
 ctctctccac tctgcctaa tgcaaggcag tggctcagca gcaagaatgc tggttctaca 44640
 tcccaggag tgctgaggt gcgcccact ctgtacagag gctgtttggg cagccttgcc 44700
 tccagagagc agattccagc ttcggaagcc cctggtctaa cttgggatct gggaatggaa 44760

 ggtgctccca tcggagggga ccctcagagc cctggagact gccaggtggg cctgctgcca 44820
 ctgtaagcca aaaggtgggg aagtctgac tccagggtcc ttgcccacc cctgcctgcc 44880
 acctgggccc tcacagccca gacctcact gggagggtgag ctcagctgcc ctttgaata 44940
 aagctgcctg atccaagccc cgctgctgga gtttgaatgg gaccaggca ccagcctcat 45000
 gcccttgact ggagcagccc ctgcttctg ctcagcctgt ttgacaagt tccagaaggc 45060
 caaggtgggc tcagtggcag tgggcgtggc cactgagggc tggggcctgc agggcagctg 45120
 cccaggtccc agaagaaatg ccaggaaggc aatcatttgg ggaccctcag gtcagaggga 45180

 tgtgaggagc aatcgtctcc ttttgaacc ttaggaggaa actgaggctc agagaggcgg 45240
 ttaagacatc ctcatagtgg cactgggggt taggagtgga ggtggcatag actcctgtct 45300
 cccagctccc tgctgccaa ggccccctcc agtgcgacac tcccttctt tgcattctt 45360
 gagccactga ataaagcctt gggctccaac catgtgccag cactatgctg gggccacagg 45420
 ggtgaaggac ctggctctg accccaggag cagtggggat gatccagtgg gaaggggccc 45480
 gaggggagcg tggactgggc aagtcaaggc aagctgcctg gaggctgtga gacttgagct 45540

ggggttcaga ggtggtccag gtgggaatat ccgggaagga tattccaggc agggaagagc 45600

 acgtgcaaag gcacagtccc ggaagaatga ggcacgctag gaccagcaa gccgagtgag 45660
 tgttagaaca gagctcgaga ggatgactca agaattcaga ggggcgaact gaggcgggat 45720
 agcagagcct ggggttgagc caaggatttg atcttgaag ctctggggag ccacggtggg 45780
 ctctatagca taggagtgac atgagaggat tcacattttg gaaccagcct tggcaccagt 45840
 gtgcaggag cggcaggcag ggaggctggt taggaggcca ccgcaggatt ccaggatgga 45900
 gaggatgggc cgggactgag cagcgcctat ggatggactg gaggatgatt ttagaccct 45960
 gggggcagtt gtgatggagg cagggggctc gctggagtg agggtggacg gtcaagtgtg 46020

 gacaactctt tciagaccc taactgggag cggaaggag agaggagct tcagaggggc 46080
 ccagactga agaggggttt ttccaacatg ggcgctgctg ccaggtctgt gggatgaatga 46140
 ggcagaaggg gaaccaggga cggggagcac ccacctgggt cctgccagga cgagccggag 46200
 cagctgggtg ggcagggagc gtctccagag caggtgggca gaacacatgc agaatacctt 46260
 gggatgatctg gaatcacctt gggccctacc tcagtcttca tcggaatcct ggagggcggg 46320
 ggacgtgtca tctgttctcc taacaagcct cctggtgact cttttgcaag gatagtggga 46380
 ccctaaaaat gagtccagct ttggagtgga gtgtcctcag gggaagtggc gaggccctcc 46440

 aggcttgagc tggcaagagg gtgccccgc cccagcctgt ggaaggcctg cgccttaggg 46500
 gctcactgcc cggcaggatt tcctcgagca gcggggagga ctgaggagt gaaggaactg 46560
 gccagggtgg gtggagggtc tggggtctgg gctgggtcca gcagggtcag agaagggaga 46620
 gggcggggtg tttatatttc ctaggatttt gggcagaggg gtggcagcaa tagggaggga 46680
 tggcgggtgg ccagggtgca gtagtagaagt ggagggggcg cgctgagagg tttaggatgt 46740
 ggcagaggca gccagggtc ctccctagag ttctgttttc tggtccccg ccaggtaggg 46800
 caggtgctct ggtatecggc cccagggcaa aggatatagc cagttcccga agccctccct 46860

 gcaacacaca caggaaaatg acaacagggc agcgtcctg ggcttttggg acaaagccgc 46920
 gttcctttgg accagactac cacaccttta gtttagcccc gtccccaaaa gtggcccaga 46980
 gaaagagggc aacagccagg c 47001

 <210> 3
 <211> 2691
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

 ggacaaacag aggctcctga ggcctgtgtg caggcccggc acctatctgc cactcccaaa 60

ggatgcccg ggccgagggc ccccaggtgg ctggcgggca gggggacgga ggtgatggcg 120
 aggaagcggg gccagagggg atgttcaagg cctgtgagga ctccaagaga aaagcccggg 180

 gctacctccg cctggtgccc ctgtttgtgc tgetggecct gctcgtgctg gettcggcgg 240
 ggggtgctact ctggtatttc ctagggtaca aggcggaggt gatggtcagc caggtgtact 300
 caggcagtct gcgtgtactc aatcgccact tctcccagga tcttaccgc cgggaatcta 360
 gtgccttccg cagtgaaac gccaaagccc agaagatgct caaggagctc atcaccagca 420
 cccgcctggg aacttactac aactccagct ccgtctattc ctttggggag ggaccctca 480
 cctgcttctt ctggttcatt ctccaaatcc ccgagcaccg ccggctgatg ctgagccccg 540
 aggtggtgca ggcactgctg gtggaggagc tgetgtccac agtcaacagc tcggctgccg 600

 tcccctacag ggccgagtac gaagtggacc ccgaggcct agtgatcctg gaagccagtg 660
 tgaaagacat agctgcattg aattccacgc tgggttgtta ccgctacagc tacgtgggcc 720
 agggccaggt cctccggctg aagggccctg accacctggc ctccagctgc ctgtggcacc 780
 tgcagggccc caaggacctc atgctcaaac tccggctgga gtggacgctg gcagagtgcc 840
 gggaccgact ggccatgat gacgtggccg ggccccctgga gaagaggctc atcacctcgg 900
 tgtacggctg cagccgccc gagcccgtgg tggaggttct ggcgtcgggg gccatcatgg 960
 cggctgctg gaagaagggc ctgcacagct actacgacc cttcgtgctc tccgtgcagc 1020

 cgggtgctt ccaggcctgt gaagtgaacc tgacgctgga caacaggctc gactcccagg 1080
 gcgtcctcag cacccegtac tccccagct actactgcc ccaaaccac tgctcctggc 1140
 acctcacggt gccctctctg gactacgget tggccctctg gtttgatgcc tatgcaactga 1200
 ggaggcagaa gtatgatttg ccgtgcacc agggccagtg gacgatccag aacaggaggc 1260
 tgtgtggctt gcgcatcctg cagccctacg ccgagaggat ccccggtgtg gccacggccg 1320
 ggatcacat caacttcacc tcccagatct cctcaccgg gcccggtgtg cgggtgcaact 1380
 atggcttcta caaccagtgc gaccctgcc ctggagagtt cctctgttct gtgaatggac 1440

 tctgtgtccc tgctgtgat ggggtcaagg actgccccaa cggcctggat gagagaaact 1500
 gcgtttgcag agccacattc cagtcaaag aggacagcac atgcatctca ctgcccaagg 1560
 tctgtgatgg gcagcctgat tgtctcaac gcagcgacga agagcagtgc caggaagggg 1620
 tgccatgtgg gacattcacc ttccagtgtg aggaccggag ctgctgaag aagcccaacc 1680
 cgcagtgtga tggcgggccc gactgcaggg acggctcgga tgaggagcac tgtgactgtg 1740
 gcctccaggg cccctccagc cgcatgtgtg gtggagctgt gtcctccag ggtgagtggc 1800

catggcaggc cagcctccag gttcggggtc gacacatctg tgggggggccc ctcatcgctg 1860

accgctgggt gataacagct gcccaactgct tccaggagga cagcatggcc tccacggtgc 1920

tgtggaccgt gttcctgggc aagggtgtggc agaactcgcg ctggcctgga gaggtgtcct 1980

tcaaggtgag ccgcctgctc ctgcacccgt accacgaaga ggacagccat gactacgacg 2040

tggcgtctgt gcagctcgac caccgggtgg tgcgctcggc cgccgtgcgc cccgtctgcc 2100

tgcccgcgcg ctcccacttc ttcgagcccg gcctgcactg ctggattacg ggctggggcg 2160

ccttgcgcga gggcgccta cgggaggatg ctgtggccct attttatgga tggagaaacc 2220

aaggctcaga gacatgttgc tgccccatca gcaacgctct gcagaaagtg gatgtgcagt 2280

tgatcccaca ggacctgtgc agcgaggtct atcgctacca ggtgacgcca cgcattctgt 2340

gtgccggcta ccgcaagggc aagaaggatg cctgtcaggg tgactcaggt ggtccgctgg 2400

tgtgcaagge actcagtggc cgctggttcc tggcggggct ggtcagctgg ggctgggct 2460

gtggccggcc taactacttc ggcgtctaca cccgcatcac aggtgtgatc agctggatcc 2520

agcaagtggg gacctgagga actgcccc tgcaaagcag ggcccacctc ctggactcag 2580

agagcccagg gcaactgcca agcaggggga caagtattct ggcggggggt gggggagaga 2640

gcaggccctg tggtagcagg aggtggcatc ttgtctcgtc cctgatgtct g 2691

<210> 4

<211> 1732

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gttcttgage cagaccagct ccagctctgg tgctgcct ctggtagcag ctgacctgag 60

atgcacttcc ctctctgtg agctgtctcg gcaccactt gcagtcactg ccgctgatg 120

ttgttactct tccactcaa aaggatgcc gtggccgagg cccccaggt ggctggcggg 180

cagggggacg gaggtgatgg cgaggaagcg gagccagagg ggatgttcaa ggctgtgag 240

gactccaaga gaaaagcccc gggctacctc cgctggtgc cctgtttgt getgtgccc 300

ctgctcgtgc tggcttcggc gggggtgcta ctctggtatt tcctagggta caaggcggag 360

gtgatggtea gccagggtga ctcaggcagt ctgcgtgtac tcaatcgcca ctctcccag 420

gatcttacc gccgggaate tagtgccttc cgcagtgaaa ccgccaagc ccagaagatg 480

ctcaaggage tcatcaccag caccgcctg ggaacttact acaactccag ctccgtctat 540

tcctttgggg agggaccct cacctgcttc ttctggttca ttctccaaat ccccagcac 600

cgccggctga tgctgagccc cgaggtgggt caggcactgc tggtaggaga gctgctgtcc 660

acagtcaaca gctcggctgc cgtccctac agggccgagt acgaagtgga ccccaggggc 720
ctagtgatcc tggaagccag tgtgaaagac atagctgcat tgaattccac gctgggttgt 780

taccgetaca gctacgtggg ccagggccag gtccctccggc tgaaggggcc tgaccacctg 840
gcctccagct gcctgtggca cctgcagggc cccaaggacc tcatgctcaa actccggctg 900
gagtggacgc tggcagagtg ccgggaccga ctggccatgt atgacgtggc cgggcccctg 960
gagaagagge teatcacctc ggtgtacggc tgcagccgcc aggagcccgt ggtggaggtt 1020
ctggcgtcgg gggccatcat ggcggtcgtc tggaagaagg gcctgcacag ctactacgac 1080
cccttcgtgc tctccgtgca gccggtggtc ttccaggcct gtgaagtgaa cctgacgtg 1140
gacaacagge tcgactccca gggcgtcctc agcaccctgt acttccccag ctactactcg 1200

ccccaaacce actgctcctg gcacctcag gtgccctctc tggactacgg ctggccctc 1260
tggtttgatg cctatgcact gaggaggcag aagtatgatt tgcctgac ccagggccag 1320
tggacgatcc agaacaggag gtaccacttc ctctcctccc tctggcttcc tttcctcct 1380
ccccctcct ctcttcctc ctcaacagtg acccctcat tggaagcca agtccccaat 1440
ctcagagggg cagcaagggg agcgagcaga ggcctgggct ggtgtcaggc ctgctgcct 1500
tgacctgtc ctctcccaa cctccgccct ggccccggct tcccctctgg ctaccacaga 1560
ggtctcagac acgtttggc atcagacacc ttggatgttt attctaatta cagcaaaatt 1620

gtctcatctt ctigggtgct gtaaccccct ctggcacct caatccttca ataaaatgtt 1680
tccagagcca aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1732

<210> 5
<211> 3143
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5

gagccaccta cctgctccg aggccaggcc tgcaggcct catcgccag agggatgatca 60
gtgagcagaa ggatgccct ggccgaggcc cccaggtgg ctggcgggca gggggacgga 120
ggtgatggcg aggaagcgga gccagagggg atgttcaagg cctgtgagga ctccaagaga 180
aaagccccgg gctacctcc cctggtgccc ctgtttgtgc tgetggccct gctcgtgctg 240

gcttcggcgg ggggtgctact ctggtatttc ctagggtaca aggcggaggt gatggtcagc 300
caggtgtact caggcagctc gcgtgtactc aatcgccact tctcccagga tcttaccgc 360
cgggaatcta gtgccttccg cagtgaacc gccaaagccc agaagatgct caaggagctc 420
atcaccagca cccgcctggg aacttactac aactccagct ccgtctattc ctttggggag 480

ggacccctca cctgcttctt ctggttcatt ctccaaatcc ccgagcaccc cggctgatg 540
 ctgagccccg aggtggtgca ggcactgctg gtggaggagc tgctgtccac agtcaacagc 600
 tcggctgccg tcccctacag ggccgagtac gaagtggacc ccgagggcct agtgatcctg 660

 gaagccagtg tgaagacat agctgcattg aattccacgc tgggttgta ccgtacagc 720
 tacgtgggcc agggccaggt cctccggctg aaggggctg accacctggc ctccagctgc 780
 ctgtggcacc tgcagggccc caaggacctc atgctcaaac tccggctgga gtggacgctg 840
 gcagagtgcc gggaccgact ggccatgtat gacgtggccg ggcccctgga gaagaggctc 900
 atcacctcgg tgtacggctg cagccgccag gagcccgtgg tggaggttct ggcgtcgggg 960
 gccatcatgg cggtcgtctg gaagaagggc ctgcacagct actacgacc ctctgtgctc 1020
 tccgtgcagc cggtggtctt ccaggcctgt gaagtgaacc tgacgtgga caacaggctc 1080

 gactcccagg gcgtcctcag caccctgtac ttcccagct actactcgcc ccaaaccac 1140
 tgctcctggc acctcacggt gccctctctg gactacggct tggccctctg gtttgatgcc 1200
 tatgcaactga ggaggcagaa gtatgatttg cgtgcaccc agggccagtg gacgatccag 1260
 aacaggagge tgtgtgctt gcgcatcctg cagccctacg ccgagaggat ccccggtggtg 1320
 gccacggccc ggatcaccat caacttcacc tcccagatct cctcaccgg gcccggtgtg 1380
 cgggtgcact atggcttgta caaccagtgc gaccctgcc ctggagagtt cctctgttct 1440
 gtgaatggac tctgtgtccc tgctgtgat ggggtcaagg actgccccaa cggcctggat 1500

 gagagaaact gcgtttgcag agccacattc cagtgcaaag aggacagcac atgcatctca 1560
 ctgccaagg tctgtgatgg gcagcctgat tctctcaacg gcagcgaatga agagcagtgc 1620
 caggaagggg tgccatgtgg gacattcacc ttccagtgtg aggaccggag ctgcgtgaag 1680
 aagccaacc cgcagtgtga tgggcggccc gactgcaggg acggctcgga tgaggagcac 1740
 tgtgactgtg gcctccaggg cccctccagc cgcattgttg gtggagctgt gtccctccgag 1800
 ggtgagtggc catggcaggc cagcctccag gttcggggtc gacacatctg tgggggggcc 1860
 ctcatcgctg accgctgggt gataacagct gcccaactgt tccaggagga cagcatggcc 1920

 tccacggtgc tgggaccgt gttcctgggc aaggtgtggc agaactcgcg ctggcctgga 1980
 gaggtgtcct tcaaggtgag ccgctgctc ctgcaccctg accacgaaga ggacagccat 2040
 gactacgacg tggcctgct gcagctcgac caccgggtgg tgcgctcggc cggcgtgccc 2100
 cccgtctgcc tgcccgcgct ctcccacttc ttcgagcccg gcctgcaactg ctggattacg 2160
 ggctggggcg ccttgccgca gggcggcccc atcagcaacg ctctgcagaa agtggatgtg 2220
 cagttgatcc cacaggacct gtgcagcgag gcctatcgct accaggtgac gccacgcatg 2280

ctgtgtgccg gctaccgcaa gggcaagaag gatgcctgtc aggggtgactc aggtggtccg 2340

ctgggtgtgca aggcactcag tggcccgctgg ttcttgccgg ggctggtcag ctggggcctg 2400

ggctgtggcc ggcctaacta cttcggcgtc tacaccgca tcacaggtgt gatcagctgg 2460

atccagcaag tggtagacctg aggaactgcc ccctgcaaa gcagggccca cctcctggac 2520

tcagagagcc cagggaact gcccaagcagg gggacaagta ttctggcggg gggtagggga 2580

gagagcagge cctgtggtag caggaggtgg catcttgtct cgtccctgat gctgctcca 2640

gtgatggcag gaggatggag aagtgccagc agctgggggt caagacgtcc cctgaggacc 2700

caggcccaca cccagccctt ctgcctccca attctctctc ctccgtcccc ttctctcaact 2760

gctgcctaat gcaaggcagt ggctcagcag caagaatgct ggttctacat cccgaggagt 2820

gtctgaggtg cgccccactc tgtacagagg ctgtttgggc agccttgctt ccagagagca 2880

gattccagct tcggaagccc ctggctaac ttgggatctg ggaatggaag gtgctcccat 2940

cggaggggac cctcagagcc ctggagactg ccaggtaggc ctgctgccac tgtaagccaa 3000

aaggtgggga agtctgact ccagggtcct tgccccacc ctgcctgcca cctgggcctt 3060

cacagcccag acctcactg ggaggtgagc tcagctgccc tttggaataa agctgcctga 3120

tcaaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa 3143

<210> 6

<211> 528

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (168)..(168)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (433)..(433)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 6

aaaaaggcag ggaagtctg cttccgtgcc ccaccgtgc tcagcagagg ctcccttga 60

aatgcgagge tgittcaac ttgggtctgt ttccctggca ggatgccctg ggccgaggec 120

ccccaggtgg ctggcgggca gggggacgga ggtgatggcg aggaagcngg agccggaggg 180

gatgttcaag gcctgtgagg actccaagag aaaagcccgg ggctacctcc gcctggtgcc 240

cctgtttgtg ctgctggccc tgctcgtgct ggcttcggcg ggggtgctac tctggtattt 300

cctagggtac aaggcggagg tgatggtcag ccaggtgtac tcaggcagtc tgcgtgtact 360
 caatgccac ttctcccagg atcttaccg cgggaatct agtgccttcc gcagtgaaac 420
 cgccaaagcc canaagatgc tcaaggagct catcaccagc accgcctgg gaacttacta 480
 caactccagc tccgtctatt cctttgggga gggaccctc acctgctt 528

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 7

ccatcacctc cgtccccctg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 8

tccgcttctt cgccatcacc 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 9

ttttctcttg gagtctcac 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 10

gcttttctct tggagtctc 20

<210> 11

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 11
 ccgggctttt ctcttgagt 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 12
 ggctttggcg gttcactgc 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 13
 gagcatcttc tgggctttgg 20

 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 14
 ccttgagcat ctctgggct 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 15
 agtgctgca ccacctcggg 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 16
 cagcagtgcc tgcaccacct 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 17
 tcctccacca gcagtgcctg 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 18
 agctcctcca ccagcagtgc 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 19
 cagcagctcc tccaccagca 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 20
 gctgtgcagg cccttcttcc 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 21
 gtagtagctg tgcaggccct 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 22
 acggcaaatc atacttctgc 20

 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 23
 gcacggcaaa tcatacttct 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 24
 ccctgggtgc acggcaaatc 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 25
 caaacgcagt ttctctcatc 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 26
 tgcaaacgca gtttctctca 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 27
 gatcacacct gtgatgcggg 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 28
 ctctgccac cacaggcct 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 29
 acctctgcc accacagggc 20

<210> 30
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 30
 tgccatcact ggagcagaca 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 31
 atcctcctgc catcactgga 20

 <210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 32
 tcattcca gatccaagt 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 33
 ctccattcc cagateccaa 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 34
 accttcatt cccagatccc 20

<210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 35
 caaagggcag ctgagctcac 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 36
 ctttattcca aagggcagct 20
 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 37
 agctttattc caaagggcag 20

 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 38
 aggcagcttt attccaaagg 20
 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 39

gatcaggcag ctttattcca 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 40

aggagcggcc accgtcctgt 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 41

ggcaggagcg gccaccgtcc 20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 42

tccccctgag gctctcagga 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 43

taagtcccc tgaggctctc 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 44
 aagactgttc cttctccttt 20
 <210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 45
 cagcttgtgc ctgcccagag 20
 <210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 46
 agtctatctg gccacagtga 20

 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 47
 ggtccttctt tgagcctcac 20
 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 48
 cctcaggtca ccacttgetg 20
 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 49
 gccacctcct gccaccacag 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 50
 atgccacctc ctgccaccac 20

<210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 51
 ctccatcctc ctgccatcac 20

<210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 52
 gcagctgagc tcacctccca 20

<210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 53
 ggcagctgag ctccactccc 20

<210> 54

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 54
 ggcagcttta ttccaaaggg 20
 <210> 55
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 55
 caggcagctt tattccaag 20

 <210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 56
 atcaggcagc tttattccaa 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 57
 ccactggccc tgggtgcacg 20
 <210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 58

tccactggcc ctgggtgcac 20

<210> 59
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 59

cttttgctt acagtg 16

<210> 60
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 60

gctgagctca cctccc 16

<210> 61
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 61

tattccaaag ggcagc 16

<210> 62
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 62

ctttattcca aagggc 16

<210> 63
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 63
 agctttattc caaagg 16
 <210> 64
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 64
 tcaggcagct ttattc 16

 <210> 65
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 65
 atcaggcagc tttatt 16
 <210> 66
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 66
 gatcaggcag ctttat 16
 <210> 67
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 67
 attccaaagg gcagct 16

 <210> 68
 <211> 16

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 68
 cttacagtgg cagcag 16
 <210> 69
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 69
 tggcttacag tggcag 16
 <210> 70
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 70
 ttggcttaca gtggca 16

 <210> 71
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 71
 gctttattcc aaaggg 16
 <210> 72
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 72
 caggcagctt tattcc 16
 <210> 73

<211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 73
 tttgatcagg cagctt 16

<210> 74
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 74
 ttttgatcag gcagct 16

<210> 75
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 75
 tttttgatca ggcagc 16

<210> 76
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 76
 acatcagga cgagac 16

<210> 77
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 77

cagctttatt ccaaag 16
 <210> 78
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 78
 gcagctttat tccaaa 16
 <210> 79
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 79
 aggcagcttt attcca 16

 <210> 80
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 80
 tgatcaggca gcttta 16
 <210> 81
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 81
 ttgatcaggc agcttt 16
 <210> 82
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 82
 ggcagcttta ttccaa 16

<210> 83
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 83
 ttattcaaaa gggcag 16
 <210> 84
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 84
 tttattccaa agggca 16
 <210> 85
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 85
 ggcagctgag ctccacc 16

<210> 86
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 86
 tgataacagc tgcccactg 19
 <210> 87
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 87
 tcaccttgaa ggacacctct 20
 <210> 88
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Probe
 <400> 88
 agttctgccacaccttgccc a 21

 <210> 89
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 89
 tcgccgcttg ctgca 15
 <210> 90
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 90
 atcggccgtg atgtcga 17
 <210> 91
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Probe
 <400> 91
 ccatggtcaa cccaccgtg ttc 23

 <210> 92

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 92
 caaagcccag aagatgctca a 21
 <210> 93
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 93
 ggaatagacg gagctggagt tg 22
 <210> 94
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Probe
 <400> 94
 accagcacc gcctgggaac tt 22

 <210> 95
 <211> 42001
 <212> DNA
 <213> Macaca mulatta
 <220><221> misc_feature
 <222> (26913)..(27448)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (31066)..(31221)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 95
 acttggcctt ggaacctct tgtgctctt ccctatgcag cttttctcag ttcagactgg 60
 ctcaggagct gcgggtgacc agcggctacc gtcatggaca gcacaggct acggaaccag 120
 gtaggaattc atgctgcgta tgggtgtaat catgcctgta atcctagcat ttiggaaggc 180

cgaggtgggt gggatcacct gaggtcatga gttcgagacc aggctggcca acatggtgaa 240

 acccgtctc tactaaaaat ataaaattta gccaggcatg gtggtgggca cctgtaatcc 300
 cagttactca ggagactgag gcaagagaat tgcttgaacc tggggaagtg gaggttgcag 360
 tgagctgaaa tcgtaccact gcactctagc ctggttaaca gagtgagact ctatcccca 420
 cccccgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaag aaaaaaagga acaaggtagg aattcaata 480
 aacagaaaat agcatcaaac cccaccctg cctctcctt ctcctctcca gtccccagag 540
 tacatgggcc cagcctcctt tactctctct caggcctgta gctcctttag tttctcccgt 600
 ccaggtgaagc acctggcctt acctgtgtga gccctgcac tcacctgcac tgggctctgc 660

 atagtcccca gtcttgacc cccccacc tcattgctctt ggggaccagg ggctgiaacc 720
 aggcaggcat gtcaccaggc aacaggcctt gggggagagc tcagatctcc cgcacctgcc 780
 tgccagcctc tggggtgcc atgggcgggg ggtgggaca ggccggcctt gccttctct 840
 gcctcctgcc tgtttacctg tactcagtca cagtgtgtc ctgggccag caggaggagc 900
 cccatggagc ctggggccac aggccacagg ggacaagggc cagacacct ggccatggct 960
 ctaggccatt gatccaggcc gggctggcac ggtgggggta gggaggcctt ggcctggaca 1020
 aacaaaggct tctgaggcct gcgtgcaggc ccagcaccta tccgccactc ccaaaggtaa 1080

 gccggggcct ccagaacagg ggaccaggat ctataaatga cttagtgaca gtgtccacc 1140
 taagagctgg gcctggctcc ctggggcctg agtcacctac cctgctcaa ggccaggcct 1200
 gcaggcctc atcgccaga gggatgatcag tgagcagaag gtgaggggcc cacagagctg 1260
 gggaggggag ggacatgca gggtagacc aggtgtgtg acaggcacag catcagtgt 1320
 gggtaggttg tggcctggga ttcaggcggc agggacagga ggaaggcaga ggccacccta 1380
 gcctgcctc gcaggactgg acgtgtgcc cctccatac ccggtaccc acctggcct 1440
 tctggtgtag gagacaggcc cagagcccca cattgcacct gtgtactgac ttaagcacgg 1500

 gaccctgggc tcgaaggctc agagtggcg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt cgtgtgtgtg 1560
 ttctgtgtg tggggaagg gcatgcatct gtgaattttt gtgtcatgaa tatccctcgc 1620
 gtgtctccac ctgtgtacat ctgtgggtct gtgaatgtgt ttatatgtgt ggaagggagc 1680
 cccgccagc ctccacact cgcaggtctc taggcctaa tgacttact gaaagatgca 1740
 cctacaacc tagccagag tcccgcctc gctctgctc gccctggcta agggacctcg 1800
 ggtaagtcat gtiactgctc tctacctcag tttccccagc cattaaacag agttagcaaa 1860
 gcacacacc caggctgtg gagctgcag tggagtctgc agcggccccc agcgcagggc 1920

tggcacatgg taggagtcca cacgcagtgg ttgaatacag atctgcattg ccggggagtg 1980
 gcggccccgc cccaaggagc tcagcctcca gcgggcagac tccagaccgc ccaatggcca 2040
 gaagggcagg agggagtga gagcaggtgc caggggtgggg tccaggtgct cagagctgcg 2100
 ggactgcttc aggccccgtg ggcaattgca gcacagtccc cgcttccagg agctcaatgt 2160
 gaggggcaga gaggggtgcc ataggtgaac cgcacatcgc gaggcacagc tgctccttct 2220
 agggcactct gggagagctg caaagaggtg aggtctgagt ggaggtgaca gaggctgcat 2280
 aagagctggc caggctggga ggtgggggtc caggcagaag gaagagtgtg gggatgcctg 2340

 gccgtgaaca agcactgaca gggctcaagg tccaggaggg ctcttgggtc tggttgctg 2400
 ctcttaatcc gtaaatgttt gccaccatcc cattgttaaa atttcttacc aagggaagga 2460
 agtccagtgt ccccggggtg tgacggggag aagagagggg gaaaaaaag gaggcaggag 2520
 aaggtggcca ggccacatat gcacacagca ccttggagtt ccgtggggag gaaggagctg 2580
 ggacctgtc attcatttgt tcaacaatta ctgagtgtcc gctgagtacc agactctgct 2640
 ctcacgcagc ttagacaggg aggagacaga taacaacgt atttgcata caggcaattt 2700
 aggcctcagt cattgctata aagaaaaaag caggagagac aggggagtgc ccagggaagg 2760

 cctctctgga aagtgacat gtgacacct ggaggaggt aaggaggag ctatgaggca 2820
 agcagaaagg aaagcatccc aggcctcagca aggagcaaac tcccattcag cgaagaggac 2880
 agaaaaccta gccctgggc cttgtgggac tgagtcttag ttggatggaa gccgtgggag 2940
 gctcgtggac agggcacata gtgacaacac gcagtgttt ttttgtattt ttagtagaga 3000
 cggggtttca ccttgttagc caggatggtc tctatctct gacctggtga tccgccgcc 3060
 tcggcctccc aaagtgtg gattacagc ttgagccacc gcgccccgc ctgggtggga 3120
 agttatgatg agcctggggg agttaattc ctactaccac catttgact atggcttggg 3180

 tttttacaga gggtttctg aaaacgaacc cctctgtgct gctcaagtcc tccagatgg 3240
 atgcaggggg tattgagagg gaggcaaat ctgcatagag aaggaggcct ggcttggagg 3300
 atgagagggg aggggaggcc cacgaagcac ttcacctga gctgccctc ttcggggctc 3360
 ctctaataga cccatgacct tctctgagcc tcagtttccc tctctttaca ctgattatct 3420
 gagaggtagt agggcaccag ggatactgtg aacatttgag gaagtgggca ggctctccc 3480
 acccattgcc cattgccga catttateat ttaccattcc ctggccttgg ccccataaaa 3540
 gccagtaggg cccatcccac atgtgggaat atcctagctt aggggtgtgga ggggggtgcc 3600

 atgcctaata aggttcccct gcagtccctc ccttcttgt atctgatggg gaccgctcaa 3660
 cagagtcact gtggctggac accaaagacc cttagctggg aaggatgcca aggggagctg 3720
 gagggagccg ggaagctggg agaaggcca ggaccctca tatccacctg ggaggathtt 3780

gagcgtcact aaagagccgc atttttggaa acccactttg taaaatccta agacacagcc 3840
 caaagggagc ccccgctgc atctggggtg ctttttattt ttttaacgg ttgtttgtt 3900
 tgtttttat cagagtcttg ctctgtcacc caggctggag tataatggca tgatcttggc 3960
 tcactgcaac ctcccttgcc caggttcaag tgattctcct gcctcagcct cccgagtagc 4020

 tgggattaca ggcgcccacc accatgcccg gctaattttt gtatttttca tagtgacagg 4080
 gtttcacat attggccagg ctgatctega actcctgacc tcaggtgatc cacccacctg 4140
 aggtgttggg attacaggcg tgagccaccg cgcccggccc tggggtgcat tttaaagcta 4200
 ctcagatatt gtggatacag taagagaaga tgagcttccc agtagtgtgg agcccttgc 4260
 ctctgggtgg gcgggcaaaa ggctttctct gtactgtcgg gaaacctgcc tgaaaggcca 4320
 catacattgg gatatttgc tcaaagcctc tcaaataga gttggaacc tggaacatgg 4380
 agaggggtga cattcagttg ctatttaac atgatttgtt aatcaacagc tcagttatgg 4440

 gaggcacatt agattagtg aaaaagcagg gagtcagaca tccagactca acctccgctt 4500
 tcctgctgtg tgaccttggg caagtggctt agcctctctg ggcttcatgg ttttttttt 4560
 tttaatctgt aaaaatgcatc tgagagtga tgccaggtat tcaactcaca atggaaaaat 4620
 gcagctagga aaagccctag actgcgttat tgctagaaca ctctgggtct cagtttcctc 4680
 atctgttcaa tgggtacaga actggagggt taagtgagat aatcggggtg aagtacccat 4740
 gtggtgtggg cttagagaa aaaacatggg acaatggttc cacatccctg ggtgacctga 4800
 agattaagtg tgaatgtct catgagggca cgaatgaat attagttttt gttcccttcc 4860

 tctgctgtga gattttgaga gtagaaaggt gagagagacg gtactctgtg aaggaagga 4920
 ggtccctggc ccagcacagt gccagctcag gggattctgg ggcaggggct aagtgcattg 4980
 gctgtgtggg cgtgggtgga agctctgcga accagaacca ggagcaagaa acagatttcc 5040
 ttgctgtgaa gggaaatgag ggcaaaaggt ccgatgecta cagaagtcta caccccatgt 5100
 acttcagttc tgtctgtggg tgcagcctct agggagggtg gtgttcaggc actgagacct 5160
 ccatctgtcc tctgaccaca gggaagccag cgggaagcaa aggtggggtt cttagaccac 5220
 acccagtcca gctctgggtc ctgcccctct gggtgagctg ccttgagatg cacttcgctc 5280

 ctctgtgaac tgtctcgga cccacttccg gtcactgccg cctgatgttg ttactcttcc 5340
 actctgaaag gcaggaagt cctgcttctg taccaccca gtgctcagca gaggtccct 5400
 tgcaaatgcg aggtctgatt caactcgggt ctgtttctct ggcaggatgc ctgtggccaa 5460
 ggccccccag gtggctggtg ggcaggggga cggaggtgat ggcaggaag cggagccaga 5520
 ggggatgttc gaggccctg aggaactcaa gagaaaagcc cggggctacc tccgctggc 5580
 gccctgtgg ctgaccctgg ttgtgctgac ttcagtgggg gtgctactct ggtatttct 5640

aggtaatgtc gtgggactgc ctgggagagg cacctgggga ggacttagta gcaggcacag 5700

 caggacagaa cggggttcca ggctcagcca tgcttagcat gttgctgtgt gatcttgggc 5760
 aagtcacttc tectctetgg gtctecctcc ctgtcctgcc agctggagac getgtcagag 5820
 cctggctcca ggtcctatgg ctcaggcctg ctccccgtt gggcaaagt ccccaaggct 5880
 ccctaccagg tggggaaaaa gggctctctc agcagtcagt tcttgtgaac cagcattccc 5940
 cagagcataa acattgcctt cccttgccca cagtcctcct gggttgcccc tgaggettgg 6000
 agccaacca ggctgaaga aggaggccca gaggcactca tggcctgg taccaattag 6060
 tgctctgct cacttgagcc cagcctgcat tctcctctag ggtggggacc acagctctat 6120

 cccttctggg tctccagggt ccagcatgaa tgggggatgg agcgggcagc tggagagcag 6180
 ctacgcttag gggcctctcc catgtcctta attatggctg gcacacaacc ctcagtcagt 6240
 gtcttggtgc ttggggagca actggcctgt gctctgggtc catccatcca ggcttccatt 6300
 cattcattca ttgaataaat gctcttgagc atctattatc tttctctaag attgatggag 6360
 tctatcttct tcttctgcc tttgacagtg ggaagtaacg gaaaaacca actagactgt 6420
 gcctatacac tgtacactgt agaagcccca ttcattcgtt cattattca gtgccaagca 6480
 cctcctgtgt gccaggtact ggggtcagcc cctgtccttg tgattagcca aggcgtcaga 6540

 cctgacactt acgctaaagc acggcatgtg ctgggacaga gaaagctgag ggctgggagg 6600
 ccacggcagg gacaatccag ctgcctgcgt gatcagaggc atcccattaa acatcctgca 6660
 aaggttagct agtgctttta ctggccgaat ctctgtgtgg aattccaggc ctgttgaaag 6720
 caacctgggg accaaccttg cagcagtgga gcgaaatcca cgtaggccta gatccaaggg 6780
 ggtcagggtt ggigtgtct ggaaccagcc tctgggagtg acgctgttgg gaaccccagg 6840
 tctgacatgg gcctgcttgc aatgacttac agtgattcta cccagagtg agcaacgcag 6900
 gcagtagacg ctgtgtgcat ttcaccaccg gcaagaagcc agtgcctcag atagcacagg 6960

 gctgtggggg cctcctcagg tttcgggcta atgagtctta agggtaaacc atggggcact 7020
 gggctggagg ggcaggaact cacctgcaa ttatttctct ttgcagagga gtttaattcc 7080
 ccctgattat gctcctgggg taaatcatcc ccaccccagg agaggtgctc catggggctg 7140
 aggaccaag ggtgagtg cccaagcca actccccac agagggatta agggttggag 7200
 gaggcacttc gggagctgtt tgaagactc ctcccctg gaccaggctg tgctcctgag 7260
 actgggtgct gggcaaggag gtggatcaga gacatgcccc gccctgtctc gaagaggagg 7320
 tacacaagtg gccggtgaca ctggtgcaca ggccccaaagc gaggagggca gcctgccccg 7380

aggagagggt ggggccgact tctcaaggag gatggtagca gagcccttaa taccaccaac 7440
 cgtatttctt gggtcctttt cctttcctgc tctcccaggc aggagttttg tatgttctca 7500
 agccccagc acccgctgc cctgtgtct tgcctcagtg agaaaacaga atggcttaga 7560
 agagaagccc cacacatgtc ggccccactg cctcccagc tgcacacgt gcactcctcc 7620
 ggagccccg atccccccc ctctgcgcac acaatggccc ggcaccagca aggggtgcct 7680
 ctttcccaca gcagcagct ctatcagtg ccttggggg gcctcccaca tttctctgt 7740
 cctgaagga gctgtcagtc cacacacctt gtctctctgt gccctttcca acctggttcc 7800

ccctgcccc caactccaac ggccattgtc aagctcacca ggttgctaaa tccaatgtcc 7860
 agttctcagt cticattgca cttagccgg gggctcactc ccacctccag aagccctttg 7920
 ctctctgac ttggggccgc cactgggtcc tttttgctca gcgggttttg ctttttctgt 7980
 gtccctgctg atgggggggg gggcctctcc tttctctctc caccattct ttcgtgatct 8040
 catctgctac ccttagcttc gagtgccctt tataacctga tgacaccac atttgcat 8100
 ctgacctggg cctctcctt gagcttgact ctgagctgc cctgctctt cctctcatat 8160
 gtctaaggag catctcaaac cccaggagt cagaccgtga ggtctctgca taatttcccc 8220

cagacctgca cctcccacat cccagtcca gaccattct tctggcacc tccccctac 8280
 tcctctctt ctttccacc ccagcccaa ttggccagca aacctggtca tctctgactc 8340
 caaaatacat caaaaacggc tgaagccaat cacttccac cctctctct gccgcagccg 8400
 gggccaggct ctgtcccctt ggacatctct gcctggagc cctgcaggtg tgcctcgat 8460
 gctctgctg cctctgtcca gcgttcttag agcctttctc aacgtaacag cagagggacc 8520
 atttgatgaa gcaaaccaaa tcctctaatt tcctgctta aaatctcag tggggccagg 8580
 cacgtggctc acgcccgtaa tcccagcact ttgggaggcc gaggtggatg gatcacctga 8640

ggtcgggagt tcgagaccag cctgaccaac agggagaaac cctgtcteta ctaaaaatgc 8700
 aaaattaaca gggcgtggtg gcacatgcct gtaatcccag ctactcgaga ggctgaggca 8760
 ggagaatcac ttgaaccgg gaggcagagg ttgtggtgag ccaacgtcgc accattgcac 8820
 tccagcctgg gcaacaagag cgaaactccg tctcaaaacc aaaccaaaaca aaaccaaac 8880
 aaaacaaaat acctccggtt cctccatct taccagggt gaaagcccag gtctcccag 8940
 gcctgacaag cctaccgg cctctccct tccaatctc atacctctct gctgtccct 9000
 tccaatctc atacctctct gctgtccct tccaatctc atacctctct gctgtccct 9060

tccaatctc atacctctct gctgtccct tccaatctc atacctctct gctgtccct 9120
 tccaatctc atacctctct gctgtcctgt tctcaactct ttgtgctcc tgaaccacac 9180
 caggccttg cacttgcctc tgcctgtgat actctttcca cagatgtaca tcacctctt 9240

ccctgacctc catactgcag cccgccccac gccttggttt ccaccgact gatcacctct 9300
 aacctgttat acgctatgtg tggtttactg tctgattcct tgctagtctg caagctatta 9360
 agggcagttt tttcttgatt gttctgttcg ttgttttgct catatagtcc caagtgtttt 9420
 ggctcagttc ctacacatag caggctctca ggaagtatth gttgagtgga taaatagggg 9480

 tgtaaaccag ggctatgagt ctaccctctt cacttcagcc aaaatagtct ttgcaaaaca 9540
 gaagtatgat ggcatcactc ctgattttaa acctttcacg gtttctcttg ttcttcgggt 9600
 aaagaccag tgggcccctgc cctgcggagg ccccagctcc ttgccacccc tccccatccc 9660
 tgattgtcc agtcaaacag gctttcagcc cgggtcctca ccatggctcc cgtgccacca 9720
 gtctgtgcc ccatgtctct ccctctgttt gaaggctactt ctcttctct tctcttacca 9780
 atttacggtt tccccatccc tacataccag ctggagggtc actccactct ggcccagcct 9840
 gagtgtcctc gtcacgtccc ctcaacagca ccgagtggca ctgctccctg atggcactgc 9900

 ttacagatgg gtgccgctg ctgtgtgttt gccagcgcca cgcctttctt atccaccgtc 9960
 agcttcatga ggggagacac atctgtcttg gttactagc gtaccccatg tagttggtgc 10020
 ttagcacaca cctgtgggat ccctggatga gctcacgaat ggaaggatgc ctagtgtgct 10080
 tgaccacag ccttggcctc ctgggcctat gtggatttcc tggccttct gtcgttgggtg 10140
 tcttgactg ctgctgtgt cagcctctcc ctgggaacct gtaggacacc atccatctgg 10200
 gagcctctca cctccctggc accgtgcaac cagtttgtca tccaataaac tttagatgac 10260
 catgatgaca atggcagtaa caaagatgat gatgatgagg atgatggtgc tgtggagacc 10320

 caagacactg aggctgagcg gagggtgtgg gtggcaggag aaggcatgga agagacaggg 10380
 gcctttccca tccgcttctt ccattaaacc tgctggttcc ttcctgggca ggttacaagg 10440
 cggaggtgac ggtcagccag gtgtactcag gcagcctgcg cgtgctcaat cgccacttct 10500
 cccaggatct taccgcgagg gaatecagtg ccttccgag tgaaacgcc aaagcccaga 10560
 agatggtagg aaaggatttg ggggatgaga gggagggaat gtgagggtga aaagagagca 10620
 gtgggtctg atcacatgga gccagttggt caaccatct ggagcactca cggggaccac 10680
 agccctgctc caggcacat ggaagcagat gaggttgagg gtgatggaa agttagcggg 10740

 cgcttgagtc aatcgactc ggattagatc ctgatcctgc ctcttaccag ggttgagca 10800
 tgaccttggg aaagctcccg cagtgcagct gacactgtca agggcccgat cctgccttc 10860
 cattacagga cgtggcctgc tctgcctct ccgttacagg acggtggttc actgcacaga 10920
 ggctggtcta ctgcctgcca ctctcaggct gcaggatcag tgcccagcaa ggcagccag 10980
 aagtgccagg gatttatcc caggaacacc cctgagccat gagcgtgga gtgggtggat 11040
 caataccaca gcttctttgg ccctggctgg ggaacggtt cagagagtgt tccaggctgt 11100

ctcccagaga tgccttctg ggctaagctc agaagctctc agctttacac tgcacattca 11160

tggccccgtg ttggttacc actttccagt ctctccctcc caactactgt ttcccgaat 11220

cacctccaaa taaaccactt gccccactt gtcaatggag ggtctgcttc tgggggacce 11280

agcctgaggc tgctgtttc ctctccatg aagtgggagt gataacaaca ggacccggct 11340

gcagatttgt tgcgggttg agtgaagttg agataacacg aacctattc ccacgcccg 11400

caaatgcttg agagcctgta atcctgccag cagcgctgta gttggagatg tgcaaaaaat 11460

ccagccagct gtgctaccca tcagagctgc tggcttgtcc caggccacgg gaggaggtgc 11520

ggaggggacc caggagctga gtggggtttt tcagagtga ggagtgactt ttggcaaggc 11580

gcagaggggt catcggcagt gcgggtggag gtgagagtca ggtatagggg aaagggaaag 11640

atggggaggt tcatgcatgc cccggcctgg cactcagca ctgtgtgact gtgatcaagc 11700

ctgtccacct tggagctcc tgcattggagc ggggctgccg ggaggagcaa agggcacct 11760

gaagtaggaa gtggccctcc ttgcagaggg tcccaggagc tctgtcttc ctttttaca 11820

gctcaaggag ctcatcgcca gcaccgcct gggaacttat tacaactcca gctccgtcta 11880

ttcctttggg tgagttgct ttgccctga caagctctg caagaagctg agacacaag 11940

agtgggaggg gactctatag gcttctgat caatgccttc atgtttcaa tgggaaaact 12000

aaggcacgga gagggaactt ggcttctgc atgtcacct cccttactg ggctcatctg 12060

tagaatggaa acatgggtgt gataggtttg caccaggcaa tgactgtgat gggatgacaa 12120

gggcttgaca ccatcaggcg aggccatgtt ggagggcgat ggggttacga gcattggctc 12180

cagggcctgg ctgccctgtt cgcatctgtt tctgctgctt gccttgaagc atagtctatg 12240

aggcacaagt tcaactctcg tgcctcagtt ttctcattca taaaataagg atgatgagag 12300

gcctcttc agaggttct aggaggttc tgttgaaga cggacagcaa tggctggggt 12360

gtggaaagtg ctcaatgtc atgagcaggg gcggggcagg ggccagacct cagaatcctt 12420

ccctggcccc tctcatttct gcctgcctta gggagggacc gctcacctgc ttcttctggt 12480

tcattctcca aatccccgag caccgccgctc tgatgctgag ccccaggtg gtgcaggcac 12540

tgctggtgga ggagctgctg tccacagtca acagctcggc ggctgtcccc tacagggccg 12600

agtacgaagt ggaccccgag ggcctagtga tcctagctg gtactgggag tggaaactg 12660

gggttggcct cgtgaggtg ggagaaacaa gctgtggtgt ggctgggga ggctgcctgc 12720

cagggtggg gtgccctcag ggtgggcccc ccaggaggc ccccaggtga ggtagcagag 12780

ccattgcatt caaggagcca ggaaggaaag gtgggtagg ggtgcttagg gtcaatctca 12840

gacaaggctg gctccaagag tctcctctaa ttttattttc attgtatttt cttttattta 12900
ttttgtcctt gtttattttg ttattcattt ccttttatca gaagccagtg tgaaagacat 12960
agctgcactg aattccacgc tgggtacgct acttttttcc cctccccact ttccttttga 13020
gttgggtgtt gtattgactt tgttgtgtgt cagggggaca catggcctct gtcgtgggtg 13080
cagagagccc tggcccagag tccccaggg gatgcatgg tggactcagt gatgtgtccc 13140
cagcaagtct tggaaactgt agggggagag gaggtggctt tgtgcacgca tgtattttgt 13200
gtgtgtcttg tagacaagtg tgcattgtgt cctgtgtggg tgtgagaatg agtcagattt 13260

agtgggccac aaactgact ctcttctct atcattgact tcaacctgcc cacaagccat 13320
ttttccactg atggtagaaa atcacctcgc caattcacgg tgtgtcaggt cttttggagg 13380
tagcgggtgcc attgcattca aaaactcctc tccaccttt tctttcctt cccagtcagg 13440
ctcatcagcc ctccctccct acctgggtgcc atattgctag agtcacctg catttctcca 13500
agtggacca caatctttca gctgaccagc agagtcaccg cgctgcacaa ggcaggaggt 13560
gctgtccaag ttgtagtttg tgtgagttgt gcagtgacc aactgggctg ctggactgta 13620
cggcccctaa attctcagat tctccttaca gtatctagca ttgtcacca gagccaaggt 13680

gggggtgagc gtctcaacc cttctcaggg agggaggcag agtttaaact cttgttatac 13740
ttttccttaa ctccccctt tcccatctg ctggtcaaat gtttgccttg ttggatggag 13800
gtgatgagct caaagtacag ttttcaaaga ggtgaaatca tgattctcat acaaagatag 13860
agtgaccacg tgtcaaatat gtatttaact gattaacagg ggaaccagcg gaatggtaaa 13920
gaatgcaaga aactgatctg tctgtctgtc tatctatcta tctatctatc tatctatcta 13980
tctatctatc tatctttcta tctgtctatc atccctctct tgatatctgt ctgtctacag 14040
ttgttctgta attatctgtg ctacagtgggt gttcgtttca tgagtgaatg atttaacaaa 14100

tgaatgaaag catgaatgag gagactgggt cagtgtgcgt ccagggcaga gtctcaggga 14160
gcagcggtaa caacttaac ccttgaagtg gactttctga gcacttcctt tatgccaggc 14220
cccatctctg tctgaggac accaggacga ccgtgtctc accctgccc tcggaggagc 14280
ttcaagcccc atgagggaga cagagcacat aaacagactc tcataacatc aagtgccagt 14340
tgaaaaatag agggcccaga ggcagtggag agaggaatt gtttgttcca aagcagagga 14400
ggggtaaatc aagagcctca cacagagtcc cagatctaca ggaggaaggg gtgctcctga 14460
ctgggggatc ctggaagact tcatggaggg ggcattcagat ttgggcatgg gctgggcgtg 14520

gtggcacacg cctgtaatcc cggcactttg ggaggccgag ttgagcagat cacctgaggt 14580
caagagtctg aggccagcct ggccaacatg acaaaatccc gtctctacta aaaatacaaa 14640
attagtgggg cgtgggtggc catgcctgta atcccaggta cttgggaggc tgaggcagga 14700

gaatttcttg aaccaggaa gtgtaggttg cagttagctg agattacacc attgcattcc 14760
 agcctggcgc acaagagcaa actccattta aaaaaaaaaa aaaaaattag cgggcatgg 14820
 tgggtgacac ctgcagtcct agctactcgg gggtaggagga ggggaggcta aggtgggagg 14880
 atcacccgag ctcaggaggt tgaggctgca atgagctggt gtgatcacia cactgcactc 14940

 cagcctgggt gacaggctgt ctcaacaata aaataaata attttataa gaaaagaaa 15000
 ttcaggcgtg gggtaggca gggatttgc agggtgagaa ggagaaaggg ttcctgggc 15060
 agagagaatg gcaggggcaa aggccaaggg agagcaacac ccaaggcatg ttcagtact 15120
 tcctcccage cccgagaggt gccaggctcc ctgacggtac ttctgattaa caagaggtta 15180
 gcacacacct ctccactgaa ttcactaaa aaaaaaaaaa aagagtaatt attaaagtgg 15240
 caagaacaaa gaatctgctt agagcaagat ttaaagaaca caaaccccta ggaagagcca 15300
 ggcatctttc cccagctgct ggtggaggct ctgtcccttc cctaggcaga tactgttgg 15360

 ctctccctgg ggagctcggc tccccactgc agtcagcaca gccaggggtc agggagaagg 15420
 agctgagcca caggcggcag catcagagca aagtgtattc accttcattc ccttctggt 15480
 cctcagcact gcccgaggga ggtcatagga cagggtattat tatcacatcc atttgacaga 15540
 acttggaatg gctaaagccac tggcccagac tcagttaact acccagaggt agtgaacatc 15600
 tacctctaca gactccaggg ttgataatct acaatcaata gtaagtcaga gttattattc 15660
 ctgagagcct cgggggact taatcagacg atgcctgggg acagagactg gctcactgca 15720
 gcctggacac cgaatctggt ccactgctgc ctgaccaaga atgacatcat cacacagctg 15780

 atgagtgttg gtgctaggtg gggagggtag tgccccctct tccttctctc cagttttctc 15840
 cccctcccc ctccccggg ggcccagcag atggctagcc tagggagctg ccctcagtct 15900
 gtccaagctg aaagggggac ctttcttgt cggtagcctt ccaaataaga cgatttaag 15960
 cagagaaaat agactgaaaa ctcaggtttt ataatttcat gtcaccaggc tgcctccac 16020
 atcccaggtt cattcctaaa tccccactgg ctctggaag aacaccaggc ttctagttag 16080
 gtttaaatga gatactggat gctccatggg agagaatag ttcactgcca gaccctggtg 16140
 cctagatgga acacacagta ggtgcacagt cactgttttg aatgaatgaa tgaatgaatg 16200

 aatgatgcag gtggtactgc tttgtaagt ctgacagtgc atcagagctt atggattaga 16260
 tggagagca gaggctcact ggtgtgtggg gtaggggtgt aggggtgtaat ggtgaaggag 16320
 ttgtgaagcg aggcagccgt gagatgggct aggtctgagc ctgagcggg gccagcggca 16380
 ggatgacaag tcacaggcct ttcttcccag cctacctgc tccgtttccg tcacaccac 16440
 ctgaggaaca ggcaatgtct ttactgagcc cctactgtgc aaggcgcctg gctgggcaact 16500
 caaatgtgcg tcatgtcaca acctgctgat gaccctgcaa gggtaggtgt attgtccat 16560

tctacagatg aggaaaccaa ggcccaggaa agattaggtg gtggctgggc aaacctagat 16620

gigtccggcc caggtctgtg caatgggcac aatcattgaa cgtatctcat agagctgttg 16680

tgggcattca gtgagacact gagggaaggc attcagctcg gtttctggcc tntagcaaat 16740

gcttgataag cacctgtttt attctgacga cttcacatg attagctcaa agctcacgtc 16800

ctccctcaa ggcagcctcc cagactctc ctggggcag tcccttctct ctaccagaag 16860

tgaagccctc atccccctgc ctctcattg cgtgtggaat cgctgttctc cacagtgttg 16920

ctcgcagcag ccagaggagt gtgtggcca agccagccca tgtctagcct tgctcaacct 16980

tctgtggctc cctatggctg caggagaaag cagcgtcggc cctgggagtg gcctggtccg 17040

ggcctccctg ccttcagctt gtccctctaga cacatgtgcc ctgtgtgtac ttttctcaaa 17100

gctgcctggc tcgccccagc ctctttgtc acgcggggac ccccaggacg cccccagcct 17160

atagctggg tttggaacca tcacctctg agctattctt gcctgttctg tgtctgtttg 17220

tctccctgt catccatgtc cccagcgagt gactgtatct ttacctgggc actgagaaac 17280

catgaagctc agtgggtgtc cgttccatga gtgaatgact gaaccaatga acaaatgcgt 17340

gaatgaggat actggcaggg aaagagaagg atcgggtaga gcgtgtctgg ctgtccccc 17400

ctggctcccc tgccccggcc atcctgcctc gggaaggacc ttgaggaacc tggtcccca 17460

gggtccctc ctctgggtc acaggaatca ggggctttgc cctcttccc gctccaggtt 17520

gttaccgcta cagctacgtg ggccagggtc aggtcctccg gctgaaggga cccgaccacc 17580

tggcctccag ctgcctgtgg cacctgcagg gccccgaaga cctcatgtg aaactccgce 17640

tggagtggac gctggccgag tgccgggacc gactggccat gtatgacgtg gctgggcccc 17700

tggagaagag gctcatcacc tcgtgagtcc ctgggaagga gggcgggagg gagggctgga 17760

aaggggaatg gctgattagg gggttaaaag tcacacaaa cattcttaga caagtggggg 17820

taggaccttg ggctgggta tctgggagac aggacggcta gtctagaggg gataggagag 17880

aggagctgg agatggttgt gtagtgcgag cgcttcccct ccccgaccct cggttttccc 17940

atgttaaca aagctgttgt tctagatgac ccgtacagac agctctggga ggcaactgtg 18000

cttgttggga tatttcagag cctggctgca gcctggacgt tcaacctctg ggctcattcc 18060

taaatcctga ctgcttctg gcagagcacc caccctcct gcttccaggt tgctggtggg 18120

gtttaaata gaactagat tcgcaatggg aggggatatc ttcactgccg ggccctggtg 18180

cctagatcaa acgcacagtt ggtgtgcagc atctattttg agtgaaccaa tgaatgatgt 18240

aggtgtact gctttgcaag ctctagcaat gcatcagagc tcatgatta aatgtaagag 18300

cagagagggt tactggtgtg tggggtgggg gtgtgggggt gtgatgggga accccctgcc 18360
 tcctagctgt gtgccctaag ttactttgcc tctcagaacc ttcttacctt gcattctgcg 18420
 ggatcattgg aggatttaaa tcagactatc tgtacatga tccttacaca tagtgagtgc 18480
 ccagtaaatg ctagccatta ttgttatcat tatatatagt ctaactggga ctgggccaca 18540
 aaagcgcttg agtaccaggc gccgtttgga atttgataag tggggagcta ttgaaagttc 18600
 tgagatctgc ggcattgtcg tgagctgagt tcctggaggg ctctgggaag cacagagaag 18660
 ccagacacca tctgacttcc aggtccaaaa agggtgggga cacttagggg cttccctgg 18720

 ggcttctcca ggtgccctc agcttgggag gggacctgac tgccaggccc aactctgttc 18780
 ctagtactg tggctcctgg tggctccctc atcccagacc cttggagaag ctctaaaatg 18840
 acaggtcaga caacatttgg ggttctcaag ctctgacccc agaaacctgc tagggaatgg 18900
 gagtgagggg gcctttggtg gtgacaggaa gacagagcag gtggccctc gtccaggttc 18960
 aacctgtgc tttgtttctg cgttccatgt ttcattgaca agggctctgc tgctaggtaa 19020
 ataaaataac ccccccaac aatgaaagca aaagcccct ttaaaggtga cccccaggtc 19080
 ttttccatcc tgatatcgta tctcccacct cccaggaag atgagccagt aaggcccaaa 19140

 aggacatggc tigtgggag ggtggggggg ggcgcggtct ggctggggag actagagcac 19200
 tgcaggaaga ccaagctgga atggtaggaa gaagggacga gggcctgggg ggcgagcggg 19260
 tgggtgcctg ctactggagg ccacctcct cctctggcga gaggccaggg gaactgcccc 19320
 atctccggac tctgggcacc aagaccttc cagggagacc ccctgggctt atgcacacca 19380
 cgcttcaac cggctgcagg ctgctcggat gccacgtgtg gtgattttgc ggctgtcctg 19440
 ggaggagctc aggtactcgc ttgccaaggt gcccctaatc cctccagcgg cacccttcc 19500
 tcctgtcaag gccaggtgc ccacgcacag tcagcaggca gggaggctat tgggttacc 19560

 actcaggggc aggcagggt gttagtttct tataaattgg cccatcagat gcgctgggcc 19620
 tcagaggggt atgtcattg aactgggaa gtttgggtgga ggttggtag agggtaagg 19680
 ggcgctgggg aaccctgtc tgagacagga agaccagggg catctgtgta tgtgggaggg 19740
 taccagtcat cacaggcaat gcctagcga ggcctgtctc tgccatggac tgccggtgag 19800
 gcctcagttt cccatctgg gaatcaagaa gctgacttca acagtgtcac tggagtcttt 19860
 tccggctga cattccagac ttctaaaagc ccagaagtct aagatcaggt tatttgttcc 19920
 gagccccca ggcaccaagc tctgggcaga tttctggggc accctggggg tcaccagacc 19980

 acacctgct tctccctgtc gcctccttga acacggccag gattgcagt gcaggcagcc 20040
 agaaggggtg gccctgcag atgccagtct agtcttctg ccagggatgc taggggccac 20100
 aggtgatcc gtagcagggt ggaggaggct ggggagggag catgagactt gagccagcca 20160

tcatcattga acigtaagct ccagaagtct ggggaacctc caggcctctc tcaccaagg 20220
 agctggcctg gtctttggag ggccttcagt ctgtcctctg aggccagga gatacagact 20280
 ccccatggac acacagcggc ctctagtagc agacctgggt ccagaacca gatataccaga 20340
 ctctcatcca ccatcccga gcagctgcct gccacctcc ctgccactcc cctcccagac 20400

 cccggcccag ccttgccgt tttctgttct gccaggtgt atggctgcag ccgccaggag 20460
 cctgtgggag aagtctggc atcgggggccc atcatggcgg tggctctgaa gaaggcctg 20520
 cacagctact acgaccctt tatgtctctc gtgcagtcgg tggctctcca gggtagggg 20580
 tgaggggact ctggggcagg ggaggggtgg tggtagaacc ccagggcct cactgggct 20640
 cactgctcac cttttgccc aacttgggga cgggatggag agggaagggt ctggaagctc 20700
 ctgctgctct cactcccca ccctggcccc actcttctt cggcatttg cacttcacc 20760
 ccgctctgcc ccttgacct tctaccgtt cgcagctctt gtcttcccgg catcgtccc 20820

 tcacttctct cctcttccc tctccatct tcttctctt tttctcttt ctgtgctgac 20880
 tgctctctct cctctctcac cctctggac ctgtgtccc tcccctctgc cctcctgc 20940
 cctcttccc cgcaaccac cagtggctgg gctggaaca ccggtctgtt tgcagcagga 21000
 ctcaaacct ctggattct gccctagaca gtccgcttac ggccaagagg gcacaggag 21060
 cttggggagg catgatggca gcacagccag gccagggcca ccggtgtgac aggtcccca 21120
 ctgcctccc agccccacc ctctctctgc ttcaggacct cccccctgc ccccttcta 21180
 ggaagggcac gtcccactct gcactggaca gctgtcctgg gccggggcca gccatactc 21240

 tgggcaggaa gctcaaactt tgccatttct ggagcttggg aggggaagat ggcagagagg 21300
 aagccacaga gtattggcag ctgcttctcc cccgacctt gtccccagtc tgctccctcc 21360
 cactcagggt cctgcccctc ttctcagttt atccctaac tctctggcag ggaccagggt 21420
 ccccagctgg ccaagctgga gctctaaatg ggtagcagag ctgttctctt gggagtctga 21480
 cacaggctca aggcaggagg gaacaaacgg ctttgggggc cctggcccc tggagagatg 21540
 gccagggcag ctgagcgtgc tctgtctctg accctggac cctcagctt ctcaactgtt 21600
 agcctcaacc aagccactcc ttttctcaa acctatctt ggaaaagggg aacagctctc 21660

 tctctcccag ccgccaccgt gaggcctgcg caggtgtgaa tgcattttgt aaactggcgg 21720
 gtgctgtccc gcaaatgtca ataactaaca cggatcgaac acttactaca tgccaggctg 21780
 tttgaatgtt ttatgtcttt ttaatcctct ttactacct atgaggtgtg tgctattatt 21840
 gtccccattt tacagatgag gaaactgaga ccaagtca cacagttaca cttaccaca 21900
 gcactttgct ggcagaggtg gtaggggtgg tggggttaca agctgcgctc gctgctggg 21960
 aggtgcagcc aggggacccc gtgtaacggc tgctctctc gtccagcctg cgaggtaac 22020

ctgacgctgg atgacaggct ggactcccag ggcgtcctca gcaccccgta cttccccagc 22080

tactactcgc cccgaaccca ctgctcctgg cacctcacgg tgagaccca cctgcctgc 22140

ccacctgtcc tctgcccaca gcacagcacc ggtccctggt aaccgggat gagagcgggc 22200

agtgtcctgc ttctgctgaa gcgcccacag gctgagccct gggtaccaat cctgctaggt 22260

ggagaggggt atgggcgagg tctccctctg tggatcacag caatgctgt ttgttagtg 22320

actgacagac tttagcccca cctgggattc tatgtctcct tctctttgtt gttaggagg 22380

tgggttcacc aatctggcca caccatgg gccacctgat ggcccgtcc tcctcccag 22440

gtgccctctc tggactacgg cttggccctc tggtttgacg cctacgact gcggaggcag 22500

aagtatgatt tgccgtgcac ccagggccag tggacgatcc agaacaggag gtactacttc 22560

ctctctccc tccagcttc tttctcct cccctcct ctctcctc ccctacaggt 22620

gacccctca ttggaagccc aagtccccag cctcagagg acagcaggga gagccagcag 22680

aggctggggc tgggtgtggg cctgttgtcc tcgtcccgt ccccctgt ggccccagct 22740

tcctctctag ctaccccagc agtctcagac actcttggtc atcagacacc ttggatgttg 22800

gttctaatta cagcaaaata gtctcatctc cttgggtgct gtaaccctct ctggcacct 22860

caattcttca ataaaatgat tccagagcca aaggactcat gggcacttcg gtgccttccc 22920

cctaaaccca aggtgtacaa tccaaggac ctctccctta ttatgacccc ctgatgcaca 22980

gccaggtcca atcccattgc acagggtaac atggaaatca cgggtgcct ggatccccg 23040

aatccccaac agggcacttg cctcttccc tgccttgcc cttgcccct ctggtacta 23100

agtttctgac aaagaagtga gtcttccag ggatgtgagc aagagacagc agagttaggc 23160

tgagcgacca ccgtcaccag ggtcactatg gcatgaggcc aataagtgcc ccctggcct 23220

ggccaccagg aggccaagg tgttccagc agcttcagag gcctgggtg ggcaggagg 23280

cagggaaca gagacagcgt atatggacag ttttcttt gtctgggaag aaaagagaac 23340

taggcaattc aaggaagggg catttaagac aggagaggtt ccgtatctca aatgtgtgga 23400

tcatcccagc atccccagag ggagagaagg aggctcaggt acaghtaata ttgttagag 23460

ggtggagggt gggcaagagg agaggaggc cctcccacgg ctccattgtt ggggagcaga 23520

ggtttgggga gagagaagag gaatattgaa gcagcgatgg cagagccagg gagaccctc 23580

ccctgggaat ccagggtgaa aacggtcctc gtgtcagcgt caggaaagag gagactacc 23640

ctcatcacag actgggctct gccctcctt ccaaccccag aattctgggg gcctaagg 23700

ttgagagtct agtacgaag attcatcatt tcttggttc acagagttg aatatcaag 23760

atgccagtct tggaaatgac caaaattgga aggctctggg gctctagaat tcttggattt 23820
 ctggggtctg agtccccatt caccaacact tgtaatttgc ttgttggttg atcctattca 23880
 aaaggatcat ccagacaaaa ggtgacagag aatgacaagg tttgcttgac tccctttttg 23940
 caatttatct gggactagga ttaaaggaaa ggagaagaat tacccatggt atgatttagg 24000
 actatgctgt tgggggtgac atgggaagtg actttgggcc tgtgctgctg ggggtgacat 24060
 ggggtgtgac ttcaggcctg tgctgttggg ggtgacatgg ggtgtgactt caggcctgtg 24120
 ctgttggggg tgacatggtg aagcagtggc ttcagggtt tgcatttggg gatgatatgc 24180

 tgatggagtg tgacatcagg cctgtgctgc tggggtgaca tgctggtccg gtgacatcag 24240
 gtctgtgctg tctggagaga aggcatctgt agcatgatgg gggcacctct gggaatggct 24300
 gccctgacct tcatggagct cccttggggc tgcttctgct ctcacttagg ctgaggatgg 24360
 ctggcctcac ccccctcac aggaaccgc aggggtgacct tgagatggat ccatgattca 24420
 cagttctgcg aatgatgaga acatgttttc ctgcctcccg ccctacccca gagctgaact 24480
 ttatgtctca gggaggctca gaaaggagaa ggaacagtct tgggtctgac accccatct 24540
 catccctcac ccccatggca attccatttg ccagaggtgg ggccccagca ttcagggtt 24600

 gtggggagt t agtggcctg gagttagggg ctaagacagg tgttcagtgc attggcccaa 24660
 caacctgtgt ggtcattggc accgttcca tttcccagag aagaaaatca aggctcgga 24720
 ggattaggt aacacagat aggtccacag ttggggctc tccataacc caccagccac 24780
 aaacggcagg ccaaggatg ctccaccca tgcttctgg gggagggcc tctcctctc 24840
 ctgatgcagt cgggcaagg tctgggtact ggggacacag ggacttctg agctaccctt 24900
 ggtaaatgac agagagagt tggaacacgg atgggagaat cttttcccta atccaaagga 24960
 atgatgcctc aatggtgaat ttgaggcgtc aggacagctt ccaatggggg ggagggatct 25020

 ccccagagtc tctgagcacc attgagctat agaacgtgtg ggctggactg gtccatgac 25080
 ccaacctatg gtacagggtg ggaactggg atcagcagat gttaaaagga cttggccttt 25140
 tgtccctgct ttttctgct ttcagtgtg gagatggacg tcagggtgta gctaagcgg 25200
 ggctgggtg tgaggatgag gcctggcagt tccccgtcc cccacagctc cectctctct 25260
 gtccaggcct cccttgccat atgggggtg aagtgtcag tggaatctgg cgtcagggtt 25320
 tgcattgctc tctagatgct ctcccttct tgtctgtgaa acaagggtt caggccagcc 25380
 ccaaccttg attacttacc catcaggag atgctgtctc ccatacaagt tgcgtttatt 25440

 aattcctggc caaggccat tccaagtcag gctggtgagg cagaaagtgc tttagtgtcg 25500
 aaaccagaca ggccaaggct cagcacctgt ctctctgct tctacctgg gcgaggactt 25560
 agatctccca gcctcaggta actcatctga aaaaaggtcg tgaaagagac cccgcctg 25620

ggaagactaa gtgagacagt gcatggagaa cactgcacac gtgggtgtgg gtcaagtgca 25680
 gcgacctgc gttcctcacc ggccgtcact ccgctctggg caggcacaag ctgaggggtt 25740
 tacggtgctg gctctttcag cctcaacaac ccagcgagga atcacgtgcc tgtacagact 25800
 tcatagacca gtgagacacc caagacagag acacgaagta atttgacaa agtcaccag 25860

 cttgttgage cagacctaa gccaggcagc ctgatccgga gtgcacgtgg gtgcacagat 25920
 gcatgtctgt gtgcgtgcgt ccatgcatgt ctgtgcacgt gtgtgtgcat gtgtgtgtgg 25980
 tccacgtgtg cgattcttcc ctctgggcct ctagtggccc atgccagctg gtgactcct 26040
 cagccatccc cagccaacc accgcatcc ggatgggggg atggatggtt tctgtggctg 26100
 tcccaccagc tgcagagtgg cctgggaagt cccagccctt tcttctcaga ctttcattaa 26160
 ggggtccagga tccccagggg cagactcttg tcccctccc gcagactcct cctgtgcgaa 26220
 tgactgtgga agggaaggca gaggtggtac ctgcgaacca tctgcactgg gacaccgtgc 26280

 cctctagtta tgatcatggg cgatagtgat catcccatgt agatgctgag aaattcttag 26340
 aatgagcgat gttggaatc tgcttgtgtg ggtggcaaag acatgagagg tctaggaag 26400
 agcagatfff cagacaaggc actttaggga gggggagggtg cagtctttg gccagaatg 26460
 cccattgatg gagagggtgt gtcaggggag aggggtatctt aacctcaag tgccagcgt 26520
 gtgatgagga aaggctggcc tgggcctccc acgggctgag catccttagg cacctcacct 26580
 gactcctctg agcccgtggt gcctccttca ccccgaccta cctgctgtct acctagcttc 26640
 tcctggtgcc cacttgacc cagctgaggc ctcatgcct tgagaggcct gagggtggt 26700

 gaaggacttg gctgtgaga tctgacctg gctgctcctg ttcgcagaag cactctcac 26760
 gggctgccac caaagcacag gcttccccct ttctgggaac ctgcctcctg ccagcttct 26820
 ctctgtgac atacttctc ttgtgagagg ccccaccatt tccactcact cccagccagt 26880
 ggggacagge agaateatgg gttccttagg ccccccccc nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 26940
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 27000
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 27060
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 27120

 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 27180
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 27240
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 27300
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 27360
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 27420
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngg tcacacagct tgttctctgg gcaaagt 27480

gctgtcagtt cagctctgca gccccaggtc cagagctctg gccatgctgg gtgatgctct 27540

cctccccctc tcagcaactg ccttctgtga cctcctttc cctttaacct gttttagat 27600
aaggcatgg tgggtgtcac tcatecacc atgcaccctt ccttccttat tecttctgt 27660
gttctccca cccttccatc catccacca tccatgcatt tatccctcca ggcagtactt 27720
cctgacaggt cccttctga cagggtacct cctggatgag gcaagaagga aatattcccc 27780
atattcaacg aggtgaggaa gcaaggcagg ccacacggtg caaaaatgtg ccttcagaca 27840
ctcagtactt tgiagccgag atgaattggc aggcacgca gcagtcaggc ttctggtgct 27900
tcttgagag ggctagagag gagcacttga tggacaggag gccctggaga gccagagaat 27960

gtgcaccctc tcccagaaag ctctgcagca gaaacagaaa actcagatgc gccaaaggggc 28020
caggccaggg ctagagccta tgacgggggt agttttccag gctcttttct ttctttcctt 28080
ccttccttct ttcttctctt ccttctttct tttttcttcc tttcttttct ttcttttctt 28140
tccctttctt tctttcttcc ctctctctct tctttcttcc tttctcttct tcttctctct 28200
ccttctctc ctcaccatc acctctctct tctctctctt ctcttttcc ctcttctctc 28260
ttttctctc tecttctctc ttctctgtt tctctctctc ctcttcttcc ttcttctttt 28320
tcttctctct ctcttctctc ttctctctct ccttctctct tcttctctct catcttctct 28380

ctctctctc ctcttcttcc ctctcttctc tctcttctct ctctctctc tcttctctc 28440
ggagcaagaa tcigattat tatgtgaaat tagctcgaga ctcaatgaag caatttctac 28500
acgtgcata aacacattgt ctttatgctg agtgactccc cctgggccac tagatttcag 28560
ccccgcctt gaattctct ctgggtcttt ctaagcagaa gcttgccta ggggtccacc 28620
accactacc ctgctccagg cctccagagt gagaacaaa tgccaccag gcagacagtt 28680
tccccggtac gcggtgaagc cttggggaaa ggttgcctcc agctacaggc tggttctagg 28740
actctcccgg gaggttaata gagagaactt cctgtagcag gcacaggtgc ctttgcctta 28800

cagccccctc ccaaggcttg ggtgacactg cagccctcca cgcagttgct tctagggtga 28860
aacgttccac tcccctcaa ccccggcttg ggttcttct ctgtctctcc acaatctccc 28920
tgtgactgtg ggagggacac cccaaggccc atgggatgtg cttgactctc cattccccgg 28980
accagtctt tgcaaccctt ggctccccctg tctacttct gaggtcttcc tgtgaggaaa 29040
acaatccatg ataactttat aaacagacat caaaaccagg gtttcttggg ttttacgagg 29100
gcaagagggc cgggtttgct caggggcgcc ccctggcggg gcctcatccc ccaccggccc 29160
tgctgggctg ggggaaccac ggtgggaggc agcgactccc aacctgctct gtctcaggac 29220

ccagttactc tctgcaaaa gagcacccta aagagttggt gcttatacag gttatagatc 29280
 tatacctgta gcattagaaa ttggaacaaa attttaaaat gtttattaat tcctttaatg 29340
 taattatcag cccattacac atttgaatat aaataatatt ctatgcaaat tagttgcatt 29400
 ctccaaaagt aaaaacattt agtggcaaga gtactgtcct tttacatttt tgtacatttc 29460
 tttacaact ggcttcacag accacagcgc ggaccttcca atctgcctcc gagttccatc 29520
 agtcccgatg tcacacatca cgtagtctct ggaaaactcg tctgtcacct tatgagagaa 29580
 tgagggcaaa aaaggcaaat gacatctgaa tgttactaaa aaaaaatgac ttttgaccc 29640

 caggggtcc cctgactgtg ctctgagaac tgctggttgg tgtaagggtg agatcgtgat 29700
 cactgtggcc agatagactt atgggggtgc cagagtctag gccaaagtctg tggagacat 29760
 ggggatgta ggggctcag acctcagagc tactggtgca gtgggaatca ggatccctcc 29820
 cgccaagcaa gctaggtgag ctcttctggg cctgaggcc agatctgac gacaccttgg 29880
 ctctgcgct catgagcctc atctgtaaaa tgggatgaga gcaattcctc cctccctggg 29940
 cggaggtgct gcttgaact cagaatccc atgcaacgag gccttgtgat gccatagctg 30000
 atgaggctca gcccagcca cacaccttga gatgttaaaa cagcctcaa gctcatcttc 30060

 agctgttcag tggctggtga attgattaac ttattgaacg gttaagtgtc taccacgttc 30120
 tagaagtctt ggggaagtgc ctggccctg ggaatcatgg ctggctcaa ggggtttgga 30180
 tttgtgtgg ggtatctcca tcggccctca ggggtattcc tgatgctctc tggatttct 30240
 tctgctttct ctgccagggg cattttcagc tctccctgca gattttcagc ctgcgcctg 30300
 tgtgtgtttt ccccatctgc aaagcgtctt gatttctctt gtggcaggca tttctatgag 30360
 ctgaggaagc tgcctccctc tgttctgcaa gcgtgtccca cctgggatga aaaggaacct 30420
 ccggcggctg tggaggagg gttccactgt tctcaggag tggttacacc cactctgtga 30480

 aggcacgccg ctgcccactt actctggggg acgaggtgcg ccggactctc tacaggagga 30540
 gccctggac ctatgaccta gagatgggag ggctcctacc tgttctctgg taggagagaa 30600
 agactcagcc tctctggagg ttccccacc tgctctgttt aaacaagtgt atcttcttgg 30660
 tgggtgtgtg gcaggggagc agggcggtg ttgtccagca gggatgtgag ggtgctcca 30720
 cagctggggg tggccccacc ccgtgaggcc atgcacggag aaggtgctgc ccatcagcac 30780
 taagtactg gtcatgggag aaggactggt ccttccctca aaccacagt gtcacaagga 30840
 ggcaggaagg atggtgcta aacggggagc actgctgccc cctcgtccca caccaacctc 30900

 aaggcgaata acctgcaca tctgtggaca gtaggccagt caaggctttt tgctcagact 30960
 gacacattga agccttttgt cagattcaag gtcaacagaa ataatttttc ctccctccc 31020
 tccctccctc cctccctccc tctctctc tctctctc tcccnnnnn nnnnnnnnn 31080

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 31140
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 31200
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ntccctgcctc agcctccaga gtagctagga ttacaggcat 31260
 gcgccaccac accccggcta attttgtatt tttagtagcg acgggggttc tccatgttgg 31320

 tcaggctggt ctcaactcc tgacctcagg tgatccacc acctcggcct ctcaaatgc 31380
 tgggattaca ggtgtgagcc actgetcctg gccaatttt cttgttttat gagggaggaa 31440
 agtgaggctc aaagaaggac cctgacttgc tagaacctca cagttcacag gtcactgtga 31500
 ctagaattga gttttatctg gcaggcaatg ggaagccatt gaagaatttt gagcagggga 31560
 gtgatatagc caggctactt tctagaagat aactctgggg gtgaacagtc acccaaggga 31620
 gaaatcaggg cagaggaggc gcagtggggg tgcagctccc cctgccctc tggctgcctt 31680
 gtccctgctc tgtgcacggg acccaggaga ccagccagtg cagccctgag ttgtgtctga 31740

 tttccccag gctgtgtggc ctgcgcatcc tgcagcctta cgccgagagg atccccgtgg 31800
 tggccacggc cggcatcacc atcaatttca cctcccagat ctcctcaca gggcctggtg 31860
 tgcgggtgca ctatggcttg tacaaccagt cggaccgtga gtatgggcag cggggggaac 31920
 ccctgcagt gactctctgc ctcttggcca tccttggaa caccaagggg gctgtaggca 31980
 gctgcttatg aggccgaaca aaaggagaga gagagagaga gagagagaga gagagagtgt 32040
 ttgtgcttgc acaaatttat gcagctttgt gtgtgcccac gtgtgcaagg cagccacacg 32100
 ggtttgcaag aatacacact catacatagc ctgtgcgtgt gtctggatat gtatgtgtgt 32160

 tctgtgcgtg tgtctggata tgtatgtctg cttggaatgt gtacacgggt gcccggaac 32220
 acatggcgcc tgcctatgtg tgtgtgagtg aacagggtga ttcatgtctt tgtgcgctt 32280
 tggggctatg catggcctaa cggcgcctc cctgcctcca cggctccctg tggtttcgca 32340
 gcctgcctg gagagtctct ctgctctgtg aacggactct gcgtccctgc ctgtgatggg 32400
 gtcaaggact gcccaacgg cctggatgag agaaactgcg gtgagcaacc cggccgcga 32460
 tcctctctc ccccgaat cctctctccc tctcacctt cctgctctg agctgagtgg 32520
 agacccact cctacatgta gcttcatta tcaacacca ggaagtgggg ttctctcact 32580

 gtgcgggggt ggcaagaiga caccacctg tgggacagtg gcagggacaa gtggggagcc 32640
 aggtctcctg acttccagct cagggtatc aceccaccc ctgtcccagc cagccttcca 32700
 ataaaggaa agaatgggtg agggagatgt cccctctc tgcctgtca aaggtttaa 32760
 tatgtgtttt tccaaaggaa gcaagatgtt catggccggg gggatgatcc tgccacggtg 32820
 ctgggggagg tgctgatat tgggaaactg aacatctggc tcaagttct ggctcagcca 32880
 agtgacctg gacaagtcac ctcatctgtt tccaccaatg aaatgggta tctcacagg 32940

gcagggagga aaaggtggca accgggcagg gccagagcct gggagactgc caggctaggt 34740
 ggggactctg gtctgaaagt ggagccatag ttctgctttg aagtccaca ccagaggggg 34800
 aggcatgata ttgtggtcag gagctccagt ctgagaatgg agacactgct ttgcaactca 34860
 cagaccagtc tcagtggagg ggctgggggt gcgggggaca tggcctgctt ttaggaaacc 34920
 ctaaaggaga ctcaggaaaa gactctccag tcacctctg gatctttctg ctccatcgtt 34980
 cctgcacct actttggaag tctcttttg ggctcagaga cccaccttct gtgccctgtc 35040
 cccatccct ctgtcccagg ggtgccctgc gggacattca ccttccagtg tgaggaccag 35100

agctgctga agaagccca cccacagtgt gatgggcggc ccgactgcag ggacggctca 35160
 gacgagcagc actgtggga gccctgccc gctgcctggg gccctggagc ttgggagga 35220
 ggggggtgcc cacagcagga cgctggaggg aaatctacc cctgttcct ggtctctctc 35280
 tatcccacc tctgcccct cacacctggg tctttatgat ctctcccct ccattgttct 35340
 cctgttctct gtctctccat ctctttcct tgccttctct ctctgtctgt ctgcttctcc 35400
 ccttcccctc ctctctgtc caccaccaca cctgcccc atccccagac tgtggcctcc 35460
 agggcccctc cagtgcatt gttggtgggg ccgtgtctc cgagggtgag tggccatggc 35520

aggccagcct ccaggttcgg ggtcgacaca tctgtggggg cgccctcctc gctgaccgct 35580
 gggtgataac agctgccat tgcttccagg aggacagga agggggaggg tgtgggggcc 35640
 taggccataa gaggcaaggg caggaaggc tgggtggggc gtgcaactgt tctgagctct 35700
 ttgcagatag agggaaggtt ggtgaacccc tcagacaggc tactgtgatg tgggttctag 35760
 ttctggctcc accaggacct actgggtccc tggacacatt gttctacctc tctgccatct 35820
 actttcggta tcttgcitta agttgggcca gtgattcatt cattcatctc attcaactcat 35880
 tcagcaacac ttgtgtgct cttactatgt gccagggct atggtagatg ctggggatac 35940

agtaaaggac agaactgccc tacctggtca taagctatga cactccccca ggtgtgacat 36000
 gaagtagcag ggagccccca ggggacatct catcaggcct catggccatc tttccatct 36060
 gcttgggtgg ctgaaacctc ccccaatcca ccgcagaca gatctgggct ccagatcctg 36120
 cccccagaa ctgcacaggg atcctctttt gtatectctc tggggcacag gttgctctga 36180
 ccacctagct ctctttaacc ccatcccagg ctccgactg ccctcagga gagagaccg 36240
 aaggctgccc gcctgccag caggcagctg actgcggcag tccaattcct ccacggtcaa 36300
 cgccccccc ctccccaca ggaccacca acctcgggga actcagagca gcctgggtcc 36360

gtaaagtgct aaggaaaaa gaaatttggtg tcgaggcct ggcctgtgc tacatTTTT 36420
 agataaccg tcttactgga ttctctcaag aacagtcgag tagaaaatgc cgttccatt 36480
 ttgcagatga ggtggcagag gcttagagag gcacacacat gtctaggag ggataaagct 36540

ggggcctgga acccaggcag gccgaggggg tgaaggctga aagctgtacc accagctagg 36600
 cggccttcag ggaggaagg gagggctggg tgtggagggc actgtcccag gcggcagttg 36660
 gctatcctga gggtcctgg atggggagag gcagcttccc cccacccac cccacccac 36720
 cccacccac cccagcatgg cctccccggc gctgtggacg gtgttcctgg gcaaggtgtg 36780

 gcagaactcg cgctggcctg gagaggtgtc cttcaagtg agccgctac tctgcatcc 36840
 gtatcacgaa gaggacagcc acgactacga cgtggcgtg ttgcagctcg accaccggg 36900
 ggtgcgtcg gcccccgtgc gtccagtctg cctgcccgg cgctcccact tcttgaacc 36960
 cggcctgcac tctggatca ctggctgggg cgccctgcgc gaaggcggta agcggccggc 37020
 acgtacggcg ggaggcggag ggagaccgtg cggagccaga ccgtgcggag ccgcttcgcc 37080
 acaccggcc tggagaagg cgggctggg ggtcccggg gctccaccc acagccctt 37140
 tactcctggg attcaaattg ggctgaattt tacggtacaa aaccaccctt taatgcggcc 37200

 catagcccc cgcccctgcc ctctagctc ttgccttcat tctggaagg cattatgtgt 37260
 ggggcaaagg ggcaggtctg gggggccact gccacgtgc aagctccacc tgctgctcct 37320
 tggcctgcaa gggcggaggc tcttaattat tagcacttcc cacatccagg ctgaatttta 37380
 ggggaacatg acttcacgta atccatcaa tagccctggg gcggaagctg tggccccatt 37440
 ttatggatgg agaaccaag gctccacaca cagccagaga ggactggagc agagattaga 37500
 acccaggact ggctgcctcc agagcccccg ctcttctgc tactgcttc agaaacaggg 37560
 tcttcccct ttctacctc actaaccaga gctggctgtc cctggcggcc accgtacagt 37620

 ttggggaca cagaccagc tggcaaacct acagacatgc cctgcagcct tagtgttgg 37680
 ggcttcacaa atgtgtacag tgacttacia tctggaggca ggcagggctg cagagatatt 37740
 ttaaggatgg gaaaactgag gctcagagga acagtgactt acccaagggg atggcagaag 37800
 tcatggcaaa gcaaaggctg gttcattcac tattccttca ctcatcagt cactcaatga 37860
 cactttctga gcaccagcta tgtaccaggt atggggttaa gggaaggta catcaggatg 37920
 gagagagaac attctcgggg gagacagtga taagagctgg catggatggg gaggttagg 37980
 gacagtggag acacagaggc ggctcctgcc taggtagggt caagggagc ttctagggga 38040

 gggttgttta agctgaggcc tggaaatga gttggcaaca tccagacaaa gggaaaagac 38100
 attcagtgta agacacaggt gcccaagacag gaagacctga gaacatccgc agcctgccag 38160
 agggccaag gtgggggca ggtgtgcctg ggcaaggagc agccagtgtg aggatcttgg 38220
 gccaggagt tccctccta cctgcacctt agaaccatgc gtggttcaag aaaaaccctt 38280
 gtatcaagc ttcccagggg actgtgatat gctgccctcc tggagaagca ttggggtgga 38340
 ctgcagagtt ggggctctgc agagtgtta gaaacgggtg aagggtcag atgtggcctt 38400

tggaaacatc cccaggtgct ataacatagc agcgaagagc cagccagagc ccagaggtgc 38460

 ctgaacagac agaggtgggg gacaagacgc tggagtaaga cactcatcca cacgggcttc 38520
 tttttttttt gagatggagt ttcactcttg ttgccaggc tggagtgcaa tggatgatc 38580
 ttggctcact acaacctctg cctcctgggt tcaagcgatt ctctgcctc aacctctga 38640
 gtaactggga ttacagcat gcaccaccac acacagctaa ttttgatatt ttagtagaga 38700
 cagggtttct ccatgttggc caggetggc ttgaactctt gacctcaggt gatctgtccg 38760
 ccttggccac ccaaagtgt gggattacag gcgtgagcca cttcgcctgg ctctccacat 38820
 gggctttggc caggggctct gtctccatga accccacaga gaaagagcta gaataaagtg 38880

 acagggaggc agaggggagc gtgcaacccc agcagaggta aggggtggca gagcaggaga 38940
 gaagcaggct cctgagatgc aaaggagcgt tagggagaac aggtgctcca ggttccttag 39000
 atctcacttc tgccttgac cacggacagg ccccaccagc aatgctctgc agaaagtgga 39060
 cgtgcagtgc atcccacagg acctgtgcag cgaggcctat cgctaccagg tgacgccacg 39120
 catgctgtgt gccggctacc gcaagggcaa gaaggatgcc tgccaggtga gtacccccag 39180
 tgtgggaggg agaaagaaa gatgetgctc acatcatcag ggtctggccc tatgctcaca 39240
 tcagcctgct gaagcctccc atcctcccag aaaggtggcg atggccgccc tcaattaca 39300

 gaagaggaga ctgggggttg gaaggttga ggagcttgc caaggttga gagccatgga 39360
 tcagaagaaa tgctgtgacg ggcaggtgtt aggtcaaac ccagttctgc tccttgccca 39420
 tcacaaggca ctaggccag ggtcccacag tgaggtggat gcaaggaaga agaaaggcgt 39480
 gtcagccaca gaagggcgtt ggagacagag tgggggtgtg gggacacagc cacagttcca 39540
 ggagggcccc ggctggctgg aggacaaaga gggttgctt ggactctctc catttagcag 39600
 gcgagaaaa agcagagctt taagactgaa cgtgagtctc tggcaccag tcaattcca 39660
 acagttagga cttaatcccc atggcccctc gcctggaaag ggggtgcctt taccctgctt 39720

 cagtccttcc tcctttccc ctttcagggt gactcgggtg gtccgctggt atgcaaggca 39780
 ctgagtgccc gctggttctt ggcagggtct gtgagctggg gcctgggctg tggccggcct 39840
 aactacttgc gcgtctacac ccgcatcaca ggtgtgatcg gctggatcca gcaagtggcg 39900
 acctgaggaa ctgccccct gcagagcagg tcccacctct tggactcaga gagcccaggg 39960
 caattgcaa gcagggggac aagtattctg gggggagggg ggcgagca ggcctgtgg 40020
 tggcaggagg tggcatcttg tcttgcct gatgtctgct ccagtgatgg caggagatg 40080
 gaggagtgcc agcagctggg ggtcaagacg tcccctaggg acccagccc acaccagcc 40140

cttctgcctc ccgattctct ctccctctgc cccttctcc actgctgcct attgcaagga 40200
 agtggctcag cagcaagaat gctggctcta cgtcccagg agtgtctgag ctgtgcccc 40260
 ctctgtacag aggctgcttg ggcagccttg cctctagaga gcagatgcca gcttcggaag 40320
 cccctggtct aacttgggat ctgggaatgg aagggtgcccc cataggaggg gaccctcaca 40380
 gccccgggga ctgccaggtg ggccggctgc caccgtaagc caaaaaaggt ggggaagccc 40440
 tgactccaag gtccttgcc caccctgcc tgccacctgg cccctcacag cccagacct 40500
 caccggcagg tgagctcagc tgcccttgg aataaagctg cctgatccaa gccctctgc 40560

 tggagttaga atggggacc gggcaccagc cttacgcct tgactgaagc agtccctgct 40620
 tccagctcag cctgattgac aagtgtccag aaggccaagg tgggctcagt ggcagcaggc 40680
 gtggccactg agggccactg agggctggga cctctggggc agctgccag gtcttaggag 40740
 aatgctggg aaggcaatg tttggggacc ctcaggtcac agggagggat gtgaggagca 40800
 atggtctcct ttggaacct taaaggaaac aggctcagag aggcggttaa gacatcctca 40860
 tggtagcact gggggttagg agtggaggtg gcatagactc cggctccca gttcccctc 40920
 tgccatggcc cctccagcg cgacactcat tccctttaa ttcttgaat cattgagtag 40980

 gcactgtgct ggcgccacag gggtaagga cctggctcct gacccagaa gcaatgggga 41040
 tgatccagtg ggaaggggat ggaggggagc gcagaccggg caagtcaagg caagctgcct 41100
 ggagctgtg agacttgagc tggggttcag aggtagtcaa ggtgggaata tccgggaggg 41160
 atattccagg cagggaaga gcatgtgcaa aggcacagag tcccgaaga atgagacaca 41220
 ctaggacca gcaagccgag tgagtgttac aacagagctt gagaggggaa ggactgaaga 41280
 attcagagg gcaaaccgag gcgggatagc agagcctgga gttgagccaa ggatttgacc 41340
 ctgcaagttc tgtggagcca tggtaggctc tatagcatag gggtagatg agtggactca 41400

 cattttgaa ccagccttgg caccagtgtg caggagtgagg caggcagga ggctggtag 41460
 gccactgcag gattccggga aggagaggat gggccgggac tgagcggcgc cacgggatgt 41520
 actggaggat gatttcggac cctgagggc agttgtgacg gagccggggg acccgtgga 41580
 ggtgagggtg ggtgctcaag tgtggacaac tctttctgga agcctaactg ggagcggag 41640
 ggacagagg cgcttcagag gggccctaga ctgaagagg gttttccag catgggcgct 41700
 gctgccaggt ctgtgggtga atgaggcaga aggggaacca gggacgggaa gcacccacct 41760
 gggctctgcc aggaggagcc ggggcagctg ggcgagcagg gggcgtctcc agagcaggtg 41820

 ggcagaacac atgcagaatc cttgggtga tctggaatca ccgtgggccc taccacgtc 41880
 ttcgtcgaa tctggaggg gtgggggatg tcatctgttc tctaacaag cctcctggcg 41940
 actctttgc aaggatagtt ggacccaaa agtgaggcca gctttgaagt ggagctcct 42000

c

42001

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 5

【변경전】

청구항 4에 있어서, 소듐 염 또는 포타슘 염인 화합물.

【변경후】

청구항 4에 있어서, 염이 소듐 염 또는 포타슘 염인 화합물.

【직권보정 2】

【보정항목】 발명(고안)의 설명

【보정세부항목】 식별번호 0451

【변경전】

핵염기 (또는 염기) 변형 또는 치환은 자연 발생 또는 합성의 비변형된 핵염기와 구조적으로 구별가능하나 기능적으로는 교환가능하다. 자연 및 변형된 핵염기 모두는 수소 결합에 참여할 수 있다. 이러한 핵염기 변형들은 뉴클레아제 안정성, 결합 친화도 또는 몇몇 그 외 유익한 생물학적 성질을 안티센스 화합물에 부여할 수 있다. 변형된 핵염기에는, 합성 및 자연 핵염기, 가령, 예를 들면, 5-메틸시토신 (5-me-C)이 포함된다. 5-메틸시토신 치환을 비롯한 특정 핵염기 치환들은 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 예를 들면, 5-메틸시토신 치환은 핵산 듀플렉스 안정성을 0.6-1.2°C만큼 증가시키는 것으로 밝혀진 바 있다 (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278).

【변경후】

핵염기 (또는 염기) 변형 또는 치환은 자연 발생 또는 합성의 비변형된 핵염기와 구조적으로 구별가능하나 기능적으로는 교환가능하다. 자연 및 변형된 핵염기 모두는 수소 결합에 참여할 수 있다. 이러한 핵염기 변형들은 뉴클레아제 안정성, 결합 친화도 또는 몇몇 그 외 유익한 생물학적 성질을 안티센스 화합물에 부여할 수 있다. 변형된 핵염기에는, 합성 및 자연 핵염기, 가령, 예를 들면, 5-메틸시토신 (5-me-C)이 포함된다. 5-메틸시토신 치환을 비롯한 특정 핵염기 치환들은 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 예를 들면, 5-메틸시토신 치환은 핵산 듀플렉스 안정성을 0.6-1.2°C만큼 증가시키는 것으로 밝혀진 바 있다 (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278).