



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0049663
(43) 공개일자 2023년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7006996
(22) 출원일자(국제) 2021년07월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년02월27일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/109146
(87) 국제공개번호 WO 2022/022617
국제공개일자 2022년02월03일
(30) 우선권주장
PCT/CN2020/106200 2020년07월31일 중국(CN)

(71) 출원인
락티젠 세러퓨틱스
중국 226400 장쑤 난통 뤼동 카운티 쉹강 스트리트
주장 로드 넘버 888 뤼동 가오신 디스트릭트
라이프 앤드 헬스 인더스트리 파크 빌딩 18
(72) 발명자
리, 룡첵
중국 226400 지양수 난통 루동 주에강 애비뉴 주
지양 로드 888 루동 라이프 & 헬스 인더스트리
파크 빌딩18
강, 무립
중국 226400 지양수 난통 루동 주에강 애비뉴 주
지양 로드 888 루동 라이프 & 헬스 인더스트리
파크 빌딩18
우, 지안첵
중국 226400 지양수 난통 루동 주에강 애비뉴 주
지양 로드 888 루동 라이프 & 헬스 인더스트리
파크 빌딩18
(74) 대리인
양영준, 이상영

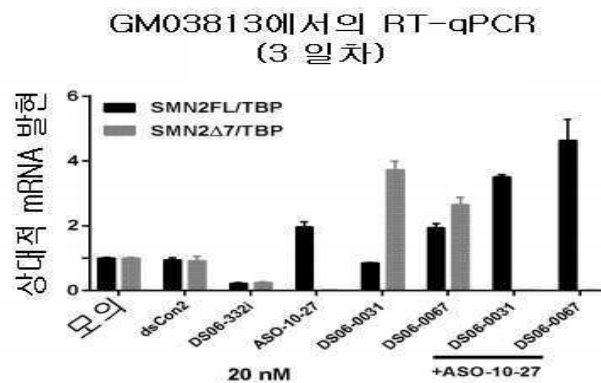
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 saRNA 및 mRNA 조절제들에 의한 SMA의 조합 치료

(57) 요약

(a) SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 제제들과 (b) 기능성 SMN2 mRNA 및 SMN 단백질의 생산을 증가시키는 SMN2 mRNA 스플라이싱 또는 안정성의 조절제들의 조합에 관한 방법들 및 조성물들, 및 SMA 및 관련 병태들 또는 질환들을 치료하는데 있어서 이들의 용도가 본 출원에서 제공된다. 특정 실시 형태들에서, 상기 방법들은 SMA의 증상들을 감소시키기 위해 SMN2 saRNA 및 SMN2 mRNA 조절제들을 사용하는 것에 관한 것이다.

대표도 - 도12a



(52) CPC특허분류

A61P 21/00 (2018.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/3341 (2013.01)

C12N 2320/31 (2013.01)

C12N 2320/33 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 조합을 포함하는 억제학적 조성물:

- (a) SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 하나 이상의 제제들, 및
- (b) SMN2 mRNA 스플라이싱 (splicing) 또는 안정성을 조절하여 기능성 SMN 단백질의 생산을 증가시키는 하나 이상의 제제들 (SMN2 mRNA 조절제들).

청구항 2

제1 항에 있어서,

상기 SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 하나 이상의 제제들 중 적어도 하나가 saRNA, 상기 saRNA를 인코딩 (encoding) 하는 재조합 벡터, 및 소분자 화합물로부터 선택되는, 억제학적 조성물.

청구항 3

제2 항에 있어서,

상기 SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 하나 이상의 작용제들 중 적어도 하나가 saRNA이고, 상기 saRNA가 센스 (sense) 가닥 및 안티센스 (antisense) 가닥을 포함하거나 단일 가닥 또는 또는 이의 혼합물들을 포함하는, 억제학적 조성물.

청구항 4

제1 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SMN2 mRNA 조절제들이 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (antisense oligonucleotide: ASO) 또는 소분자 화합물인, 억제학적 조성물.

청구항 5

제4 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SMN2 mRNA 조절제들 중 적어도 하나가 뉴시너센 (Nusinersen), 리스디플람 (Risdiplam) 및 브라나플람 (Branaplam)으로부터 선택되는, 억제학적 조성물.

청구항 6

제2 항 또는 제3 항에 있어서,

적어도 하나의 saRNA가 하기의 단편과 서열에서 적어도 90% 동일한 제1 가닥을 포함하는, 억제학적 조성물:

- (a) -1639 내지 -1481의 SMN2 유전자 프로모터 (promoter)의 영역 (서열 번호 472),
- (b) -1090 내지 -1008의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 473),
- (c) -994 내지 -180 영역들의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 474), 또는
- (d) -144 내지 -37의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 475).

청구항 7

제6 항에 있어서,

상기 saRNA의 제1 가닥이 16~35 개 뉴클레오타이드 길이인 SMN2 유전자의 프로모터 영역의 단편과 적어도 75%의 서열 상동성 또는 상보성을 갖는, 억제학적 조성물.

청구항 8

제6 항에 있어서,

상기 제1 가닥이 16~35 개 뉴클레오타이드 길이이고, 최적으로 정렬될 때, (a), (b), (c) 또는 (d) 중 하나와 서열에서 적어도 75% 동일한, 약제학적 조성물.

청구항 9

제6 항 또는 제7 항에 있어서,

상기 saRNA의 제1 가닥이 서열 번호들 315~471로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 75%의 서열 상동성 또는 상보성을 갖는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제6 항 또는 제7 항에 있어서,

상기 saRNA의 센스 가닥이 서열 번호들 1~157로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열들 중 임의의 서열과 적어도 75%의 서열 상동성을 가지며, 상기 saRNA의 안티센스 가닥이 서열 번호들 158~314로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열들 중 임의의 서열과 적어도 75%의 서열 상동성을 갖는, 약제학적 조성물.

청구항 11

제10 항에 있어서,

상기 saRNA의 센스 가닥이 서열 번호들 1~157 중 어느 하나로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 상기 saRNA의 안티센스 가닥이 서열 번호들 158~314 중 어느 하나로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 12

제6 항 내지 제11 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 saRNA의 적어도 하나의 뉴클레오타이드가 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드인, 약제학적 조성물.

청구항 13

제1 항에 있어서,

상기 조성물이 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 14

제13 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체가 수성 담체, 리포솜, 중합체성 중합체 및 폴리펩타이드로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 15

제1 항 또는 제13 항에 있어서,

상기 조성물이 하기의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물:

- a) 1~150 nM의 상기 saRNA, 및
- b) 1~50 nM의 상기 SMN2 mRNA 조절제.

청구항 16

개체에서 SMN 결핍 관련 병태들을 치료하거나 이의 발병 또는 진행을 지연시키는 방법으로서,

상기 방법이 유효량의 제1 항의 약제학적 조성물을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

제16 항에 있어서,

상기 약제학적 조성물이,

(a) SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 하나 이상의 제제들, 및

(b) SMN2 mRNA 스플라이싱 또는 안정성을 조절하여 기능성 SMN 단백질의 생산을 증가시키는 하나 이상의 제제들 (SMN2 mRNA 조절제들)

을 포함하고;

상기 SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 하나 이상의 제제들 중 적어도 하나가 saRNA이고, 상기 하나 이상의 SMN2 mRNA 조절제들 중 적어도 하나가 안티센스 올리고 뉴클레오타이드 (ASO)인, 방법.

청구항 18

제17 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SMN2 mRNA 조절제들 중 적어도 하나가 뉴시너센, 리스디플람 및 브라나플람으로부터 선택되는, 방법.

청구항 19

제16 항에 있어서,

상기 개체가 SMA의 병태를 갖는, 방법.

청구항 20

제19 항에 있어서,

상기 SMA를 갖는 개체가 감소되거나 비정상적인 SMN 전장 단백질 발현을 갖는, 방법.

청구항 21

제17 항에 있어서,

적어도 하나의 saRNA가 하기의 단편과 서열에서 적어도 90% 동일한 제1 가닥을 포함하는, 방법:

(a) -1639 내지 -1481의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 472),

(b) -1090 내지 -1008의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 473),

(c) -994 내지 -180 영역들의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 474), 또는

(d) -144 내지 -37의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 475).

청구항 22

제21 항에 있어서,

상기 saRNA의 제1 가닥이 서열 번호들 315~471로 이루어진 그룹으로부터 선택된 임의의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 75%의 서열 상동성 또는 상보성을 갖는, 방법.

청구항 23

제21 항 또는 제22 항에 있어서,

상기 saRNA의 센스 가닥이 서열 번호들 1~157로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열들 중 임의의 서열과 적어도 75%의 상동성을 가지며, 상기 saRNA의 안티센스 가닥이 서열 번호들 158~314로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열들 중 임의의 서열과 적어도 75%의 상동성을 갖는, 방법.

청구항 24

제23 항에 있어서,

상기 saRNA의 센스 가닥이 서열 번호들 1~157 중 어느 하나로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 상기 saRNA의 안티센스 가닥이 서열 번호들 158~314 중 어느 하나로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 25

제21 항 내지 제24 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 saRNA의 적어도 하나의 뉴클레오타이드가 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

발명의 내용

1. 교차-참조

[0001] 본 출원은 2020년 7월 31일자로 출원된 PCT 특허 출원 번호 PCT/CN2020/106200의 이익을 주장하며, 상기 출원은 그 전문이 본 출원에 참조로 포함된다.

2. 텍스트 파일로 제공된 서열 목록의 참조에 의한 포함

[0002] 서열 목록은 2021년 7월 30일자로 생성되고 81 KB의 크기를 갖는 "SMN2-Combo Sequence Listing_ST25 Final"의 텍스트 파일로 제공된다. 상기 텍스트 파일의 내용은 그 전체가 본 출원에 참조로 포함된다.

3. 발명의 배경

[0003] 척수 근육 위축증 (spinal muscular atrophy: SMA)은 6000~8000 명의 신생아들 중 약 1 명이 걸리는 상염색체 열성 장애이며, 영아 사망률의 가장 중요한 유전적인 원인이다. SMA는 염색체 5q13.4 상에서 운동 뉴런 유전자 (SMN1)의 생존의 텔로머 카피 (telomeric copy)의 동형 접합 결실 또는 돌연변이의 결과로서 생존 운동 뉴런 (SMN) 단백질의 감소된 수준에 기인한다.

[0004] SMN 단백질은 2 개의 SMN 유전자들 (SMN1 및 SMN2)에 의해 인코딩되는데 (encoded), 이들 유전자들은 사이토신 (C)이 SMN2 유전자에서 티민 (T)으로 변경된다는 점에서 엑손 7에서 하나의 뉴클레오타이드에 의해 코딩 (coding) 서열에서 본질적으로 상이하다 (문헌 [Covert, D. D., et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Human Mol Genet* (1997)]). 이러한 중요한 차이는 잠재 스플라이싱 (splicing) 부위를 생성하며, SMN2 유전자로부터 전사된 성숙 SMN mRNA의 약 90%에서 엑손 7 도약 (skipping)을 초래한다. 엑손 7이 결여된 SMN2 mRNA (SMN2 Δ 7)는 불안정하고 신속하게 분해되는 절단된 SMN 단백질을 생산한다. SMA 환자에서, SMN1 유전자는 더 이상 어떠한 SMN 단백질도 생산하지 않으며, SMN2에 의해 생산된 전장 SMN 단백질의 양은 SMN1의 손실을 보상하기에 충분하지 않으므로, 척수 전각에서의 운동 뉴런의 아포토시스 사멸, 골격근들의 위축 및 결과적으로 쇠약을 초래한다 (문헌 [Monani, U. R., et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Human Mol Genet* (2000)]). SMA 환자들에 대한 증상들의 중증도는 환자의 세포들에서 SMN2 유전자의 카피 수에 좌우된다 - 보다 많은 카피 수는 중증 증상들을 초래한다 (문헌 [Harada, Y., et al. Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J Neurol* (2002)]).

[0005] SMA에 대한 치료제를 개발하기 위해, 하나의 전략은 스플라이싱 조절제 (splicing modulator: SMS)들을 사용하여 스플라이싱 과정 동안 엑손 7 포함 (exon 7 inclusion)을 자극하는 것이다. 이와 관련하여, 안티센스

올리고뉴클레오타이드 (antisense oligonucleotide: ASO) 약물인 스피라자 (Spinraza)®는 이미 미국 식품 의약품국 (Food and Drug Administration: FDA)에 의해 판매 승인을 받았다 (문헌 [Hua, Y. and A. R. Krainer. Antisense-mediated exon inclusion. *Methods Mol Biol* (2012)] 및 [Stein, C. A. and D. Castanotto. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol Thera* (2017)]). 또 다른 약물인 임상 시험용 경구 투여 소분자 약물 리스디플람 (Risdiplam) (RG7916)은 FDA에 신약 허가 신청 (New Drug Application: NDA) 중에 있다 (문헌 [Ramdas, S. and L. Servais. New treatments in spinal muscular atrophy: an overview of currently available data. *Expert Opin Pharmacol* (2020)]). 이들 두 약물들은 환자의 생존을 유의하게 연장시키고 운동 이정표들을 개선함으로써 SMA의 치료를 변화시켰다. 이러한 개선들에도 불구하고, 치료받은 환자들, 특히, 아동들은 정상적인 삶과는 거리가 멀다. 몇 가지 타당한 이유들은 SM들의 부적절한 효능을 설명할 수 있다. 하나는 치료들에 의해 회복되는 최대 달성 가능한 수준의 전장 SMN 단백질질을 제한하는 전장 효과이다. SMS들은 SMN2 전사에 영향을 미치지 않으므로, 이용 가능한 SMN2 pre-mRNA의 양을 증가시키지 않는다. SMN 단백질질을 정상적인 생리학적 수준으로 회복시키기 위해, SM들은 현실에서 일어날 것 같지 않은 이상적인 효과인 SMN2Δ7 mRNA를 전장 mRNA로 전환시키는데 있어서 100% 생체내 효율을 최적으로 달성할 것이다. 따라서, 환자들에게 제공할 수 있는 최대 효능 SM들은 SMN2 pre-mRNA의 이용 가능성에 의해 제한된다.

[0009] [0006] SMA를 치료하기 위한 또 다른 치료학적 접근법은 SMN2 전사를 자극하여 전장 SMN 단백질질의 수준들을 증가시키는 것을 포함한다. 이전에, 히스톤 데아세틸라아제 (histone deacetylase: HDAC) 억제제들 (예를 들어, 나트륨 부티레이트, 발프로산) 및 비-HDAC 억제제들 (예를 들어, 하이드록시우레아, 세레록시브, 알부테롤 등)과 같은 다양한 후생 유전학적 변형제들은 시험관내 및 마우스 SMA 모델들에서 테스트되었지만, 이들은 뚜렷한 임상 효능을 보여주는데 실패하였다 (문헌 [Lunke, S. and A. El-Osta. The emerging role of epigenetic modifications and chromatin remodeling in spinal muscular atrophy. *J Neurochem* (2009)]). 상기 실패에 대한 설명은 후생 유전학적 변형제들의 표적 특이성의 결여이다. 척수 근육 위축증과 같은 SMN 결핍 관련 병태들을 치료하기 위한 개선된 방법들 및 조성물들에 대한 필요성이 존재한다.

[0010] 4. 발명의 개요

[0011] [0007] 프로모터 (promoter)들을 포함하는 이중 가닥 RNA (dsRNA)들 표적화 유전자 조절 서열들은 RNA 활성화 (RNA activation: RNAa)로 공지된 기전을 통해 전사 수준에서 서열 특이적 방식으로 표적 유전자들을 상향 조절하는 것으로 나타났다 (문헌 [Li, L. C., et al. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *PNAS* (2006)]). 이러한 dsRNA들은 소형 활성화 RNA (small activating RNA: saRNA)들이라고 한다. 그 전문이 본 출원에 참조로 포함된 선행 특허 공보 (PCT/CN2019/129025)는 SMN2 프로모터를 표적화하는 기능성 saRNA들의 식별을 기재하고 있으며 정상적인 사람 세포들 및 SMA 환자들로부터 유래된 일차 세포들 모두에서 SMN2 mRNA 발현을 유도하는데 있어서 이들의 활성을 기재하고 있다.

[0012] [0008] 본 개시 내용의 실시 형태들은 부분적으로 (a) 세포에서 SMN2 유전자의 발현을 활성화 또는 상향 조절하는 하나 이상의 소형 활성화 리보핵산 (small activating ribonucleic acid: saRNA)들 (본 출원에서는 "SMN2 saRNA들"로도 또한 지칭됨)과 (b) 기능성 SMN2 mRNA의 생산을 증가시키는 SMN2 mRNA 스플라이싱 또는 안정성의 하나 이상의 조절제들 (본 출원에서는 "SMN2 mRNA 조절제들"로도 또한 지칭됨)의 조합이 전장 SMN2 mRNA 및 전장 SMN 단백질질의 수준의 유의한 증가를 달성할 수 있다는 놀라운 발견에 기초한다. 이러한 조합 치료 전략은 단일 요법과 비교하여 증진된 치료학적 이점을 제공할 수 있으므로, 예를 들어, SMA 환자들에 대해 치료 결과들을 최대화할 수 있다.

[0013] [0009] 특정 양태들에서, 개체에서 SMA와 같은 SMN 결핍 관련 병태를 치료하거나 이의 발병 또는 진행을 지연시키기 위한 약제학적 조성물이 제공되며, 상기 조성물은,

[0014] (a) SMN2 유전자 또는 단백질질의 발현을 증가시키는 하나 이상의 제제들과,

[0015] (b) 기능성 SMN2 mRNA의 생산을 증가시키는 SMN2 mRNA 스플라이싱 또는 안정성의 하나 이상의 조절제들

[0016] 의 조합을 포함한다.

[0017] [0010] 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 유전자 또는 단백질질의 발현을 증가시키는 제제들은 거대 분자들 및 소분자들을 포함하여 이러한 활성을 갖는 임의의 적합한 제제들을 포함할 수 있다. 거대 분자들의 예에는 단백질들, 단백질 복합체들 및 당단백질들, 핵산들, 예를 들어, DNA, RNA 및 PNA (펩타이드 핵산)이 있다. 소분자들의 예에는 펩타이드들, 펩타이드 모방체 (peptidomimetic)들 (예를 들어, 펩토이드 (peptoid)들), 아미노산들, 아미노산 유사체들, 폴리뉴클레오타이드들, 폴리뉴클레오타이드 유사체들, 뉴클레오타이드들, 뉴클레오타이드

유사체들, 유기 또는 무기 화합물들, 예를 들어, 헤테로 유기 또는 유기 금속 화합물들이 있다. 이들 제제들 중 임의의 제제는 본 출원에서 기재된 방법들에 의해 연속적으로 또는 동시에 조합으로 사용될 수 있다.

- [0018] [0011] 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 제제는 적어도 하나의 saRNA (본 출원에서는 "SMN2 saRNA"로서 지칭됨) 또는 이의 재조합 벡터, 또는 적어도 하나의 소분자 화합물이다. 특별한 실시 형태들에서, 상기 SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 제제는 적어도 하나의 SMN2 saRNA이다. 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 saRNA는 센스 (sense) 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하거나, 단일 가닥 또는 이의 혼합물들을 포함한다.
- [0019] [0012] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 mRNA 조절제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO) 또는 소분자, 예를 들어, 피리다진 유도체이다. 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 mRNA 조절제는 뉴시너센 (Nusinersen) (스핀라자®, 본 출원에서는 ASO-10-27로도 또한 지칭됨), 리스디플람, 리고세르티브 (Rigosertib) 및 브라나플람 (Branaplam)으로부터 선택된다.
- [0020] [0013] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 saRNA는 (a) -1639 내지 -1481의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 472), (b) -1090 내지 -1008의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 473), (c) -994 내지 -180 영역들의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 474), 또는 (d) -144 내지 -37의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 475)과 적어도 90% 동일한 제1 가닥을 포함한다.
- [0021] [0014] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 saRNA의 제1 가닥은 16~35 개 뉴클레오타이드 길이인 SMN2 유전자의 프로모터 영역의 단편과 적어도 75%의 상동성 또는 상보성을 갖는다.
- [0022] [0015] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 saRNA 분자의 제1 가닥은 서열 번호들 315~471로 이루어진 그룹으로부터 선택된 임의의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 75%의 상동성 또는 상보성을 갖는다.
- [0023] [0016] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 센스 가닥은 서열 번호들 1~157로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열들 중 임의의 서열과 적어도 75%의 상동성을 가지며, 상기 안티센스 가닥은 서열 번호들 158~314로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열들 중 임의의 서열과 적어도 75%의 상동성을 갖는다.
- [0024] [0017] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 센스 가닥은 서열 번호들 1~157 중 어느 하나로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 안티센스 가닥은 서열 번호들 158~314 중 어느 하나로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0025] [0018] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드이다.
- [0026] [0019] 특정 실시 형태들에서, 본 출원에서 제공된 조성물은 수성 담체, 리포솜, 중합체성 중합체 또는 폴리펩타이드와 같은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체를 더 포함한다.
- [0027] [0020] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 조성물은 1~150 nM의 상기 SMN2 saRNA 및 1~50 nM의 ASO SMN2 mRNA 조절제를 포함한다.
- [0028] [0021] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 조성물은 1~150 nM의 상기 SMN2 saRNA 및 1~3000 nM의 소분자 피리다진 유도체 SMN2 mRNA 조절제, 예를 들어, 리스디플람을 포함한다. 특정 실시 형태들에서, 상기 조성물은 300~2000 nM 리스디플람을 포함하고, 상기 조성물은 처리 전에 수행된 기준선 측정치와 비교하거나 미처리된 세포 집단과 비교하여 처리된 세포에서 전장 SMN 단백질의 양을 적어도 10%까지 증가시킨다. 추가의 실시 형태들에서, 본 개시 내용의 조성물은 처리 전에 수행된 기준선 측정치와 비교하여 처리된 세포에서 SMN2Δ7의 양을 감소시킨다.
- [0029] [0022] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 saRNA는 DS06-0004 (RAG6-281로도 또한 지칭됨), DS06-0031 (RAG6-1266으로도 또한 지칭됨) 또는 DS06-0067 (RAG6-293으로도 또한 지칭됨)이다.
- [0030] [0023] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들은 개체에서 SMN 결핍 관련 병태를 치료하거나 이의 발병 또는 진행을 지연시키는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 (a) SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 하나 이상의 제제들, 및 (b) 기능성 SMN2 mRNA의 생산을 증가시키는 SMN2 mRNA 스플라이싱 또는 안정성의 하나 이상의 조절제들을 포함하는 유효량의 약제학적 조성물을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 출원에서 제공된 방법의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 제제는 saRNA (본 출원에서

는 "SMN2 saRNA"로서 지칭됨) 또는 이의 재조합 벡터이거나 소분자 화합물이다. 본 출원에서 제공된 방법의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 mRNA 조절제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO) 또는 소분자 화합물, 예를 들어, 피리다진 유도체이다. 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 mRNA 조절제는 뉴시너센 (스핀라자®, 본 출원에서는 ASO-10-27로도 또한 지칭됨), 리스디플람, 리고세르티프 및 브라나플람으로부터 선택된다.

[0031] [0024] 본 출원에서 제공된 방법의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 saRNA는 -1639 내지 -1481의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 472), -1090 내지 -1008의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 473), -994 내지 -180 영역들의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 474), 또는 -144 내지 -37의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 475)과 적어도 90% 동일한 하나의 가닥을 포함한다.

[0032] [0025] 본 출원에서 제공된 방법의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 saRNA의 하나의 가닥은 16~35 개 뉴클레오타이드 길이인 SMN2 유전자의 프로모터 영역의 단편과 적어도 75%의 상동성 또는 상보성을 갖는다.

[0033] [0026] 본 출원에서 제공된 실시 형태들 중 임의의 실시 형태에서, 상기 개체는 SMA의 병태를 갖는다. 추가의 실시 형태들에서, 상기 SMA를 갖는 개체는 감소되거나 비정상적인 SMN 전장 단백질 발현을 갖는다.

[0034] 5.도면의 간단한설명

[0035] [0027] 도 1은 SMN2 유전자 구조, saRNA 표적 위치 및 PCR 프라이머 (primer) 위치를 도시한 것이다. 도 1a는 SMN2 유전자 구조 및 이의 2 kb 프로모터 영역을 도시한 것이다. saRNA DS06-0004, DS06-0067 및 DS06-0031의 표적 부위는 SMN2의 전사 개시 부위 (transcription start site: TSS)에 대해 각각 -281, -293 및 -1266의 위치에 표시되어 있다. 도 1b는 RT-qPCR (SMN2FL F + SMN2FL R, SMNΔ7 F + SMNΔ7 R) 및 반정량적 RT-PCR (SMN-엑손6-F + SMN-엑손8-R)에 사용된 PCR 프라이머의 위치를 도시한 것이다.

[0036] [0028] 도 2는 SMN1 및 SMN2 유전자들 사이의 차이 및 반정량적 RT-PCR/DdeI 분해 검정의 개략도를 도시한 것이다. SMN2의 엑손 8에서의 G→A 변이체는 DdeI 제한 효소에 대한 인식 부위를 생성한다 (도 2a). PCR 프라이머 쌍 SMN-엑손6-F 및 SMN-엑손8-R은 507 bp 산물 (SMN2FL) 및 453 bp 산물 (SMN2Δ7)을 증폭시킨다. SMN1 및 SMN2 산물을 구별하기 위해, DdeI 분해는 SMN2FL 산물을 392 bp 및 115 bp 단편으로 절단시키고 (도 2b), SMN2 Δ7 산물을 338 bp 및 115 bp 단편으로 절단시킨다 (도 2c).

[0037] [0029] 도 3a~3g는 GM03813 세포들에서 전장 (SMN2FL) 및 엑손 7 도약 (SMN2Δ7) SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004), ASO-10-27 및 리스디플람의 효과를 도시한 것이다. GM03813 세포들을 표시된 농도의 ASO-10-27, saRNA (DS06-0004) 및 리스디플람으로 72 시간 동안 처리하였다. 대조군 처리로서의 모의 샘플들을 올리고뉴클레오타이드의 부재하에 형질 감염시켰다. 별도의 PCR 반응들에서 두 쌍의 프라이머를 사용하여 RT-qPCR에 의해 SMN2FL 및 SMNΔ7의 mRNA 수준들을 결정하였다. 도 3a~3c는 RT-qPCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMNΔ7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. 도 3d는 반정량적 PCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMNΔ7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. SMN2의 PCR 산물들을 DdeI 효소로 분해하고, 2% 아가로오스 겔 상에서 분리하였다. TBP 유전자를 또한 RNA 로딩에 대한 대조군으로서 증폭시켰다. 도 3e~3g는 도 3d에서의 PCR 산물 밴드 강도를 정량화하여 유도된 SMN2FL 및 SMN2Δ7 수준들을 도시한 것이다. 상기 값들 (y 축)은 TBP의 밴드 강도로 정규화한 후 모의 처리에 대한 상대적 SMN2 밴드 강도이다. SMN2FL, 분해 후 SMN2 전장 PCR 산물 (392 bp); SMNΔ7, 분해 후 SMN 엑손 7 도약 PCR 산물 (338 bp); 래더 (Ladder): 100 bp DNA 마커.

[0038] [0030] 도 4a~4e는 GM00232 세포들에서 SMN2FL 및 SMN2Δ7 SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 ASO-10-27의 조합 효과를 도시한 것이다. ASO-10-27 및 DS06-0004를 표시된 농도들에서 72 시간 동안 GM00232 세포들에 개별적으로 또는 조합으로 형질 감염시켰다. 대조군 처리로서의 모의 샘플들을 올리고뉴클레오타이드들의 부재하에 형질 감염시켰다. 역전사를 위해 Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 상기 처리된 세포들로부터 전체 세포 RNA를 추출하여 cDNA를 수득한 다음, RT-qPCR에 의해 SMN2FL 및 SMNΔ7의 mRNA 수준을 결정하였다. 도 4a 및 4d는 RT-qPCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMNΔ7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. 도 4b는 반정량적 PCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMNΔ7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. SMN2의 PCR 산물들을 DdeI 효소로 분해하고, 2% 아가로오스 겔 상에서 분리하였다. TBP 유전자를 또한 RNA 로딩에 대한 대조군으로서 증폭시켰다. 도 4c 및 4e는 도 4b에서의 PCR 산물 밴드 강도를 정량화하여 유도된 SMN2FL 및 SMN2Δ7 수준들을 도시한 것이다. 상기 값들 (y 축)은 TBP의 밴드 강도로 정규화한 후 모의 처리에 대한 상대적 SMN2FL 및 SMN2Δ7의 밴드 강도이다. SMN2FL, 분해 후 SMN2 전장 PCR 산물 (392 bp); SMNΔ7, 분해 후 SMN 엑손 7 도약 PCR 산물 (338 bp), ASO, ASO-10-27.

[0039] [0031] 도 5a~5c는 제I 형 SMA 세포 GM00232에서 전장 SMN 단백질의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 ASO-10-

27의 조합 효과를 도시한 것이다. ASO-10-27 및 DS06-0004를 표시된 농도들에서 72 시간 동안 GM00232 세포들에 개별적으로 또는 조합으로 형질 감염시켰다. 대조군 처리로서의 모의 샘플들을 올리고뉴클레오타이드들의 부재하에 형질 감염시켰다. 처리된 세포들로부터 단백질을 수확하고, 사람 SMN 단백질에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅 (western blotting) 검정에 의해 면역 블롯팅하였다. 단백질 로딩에 대한 대조군의 역할을 하도록 α/β -튜불린에 대한 항체를 또한 블롯팅하였다. 도 5a는 모의 처리 및 ASO-10-27 단독 또는 이와 DS06-0004의 조합으로 처리된 세포들로부터의 SMN 단백질 발현을 도시한 것이다. 도 5b는 모의 처리 및 DS06-0004 단독 또는 이와 ASO-10-27의 조합으로 처리된 세포들로부터의 SMN 단백질 발현을 도시한 것이다. 도 5c는 도 5a 및 5b의 밴드 강도를 정량화하여 유도된 SMN 단백질 수준들의 상대적 배수 변화들을 도시한 것이다. 값들 (y 축)은 α/β -튜불린의 밴드 강도로 정규화한 후 SMN 단백질의 상대적 밴드 강도이다. ASO, ASO-10-27.

[0040]

[0032] 도 6a~6e는 GM03813 세포들에서 SMN2FL 및 SMN Δ 7 SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 ASO-10-27의 조합 효과를 도시한 것이다. ASO-10-27 및 DS06-0004를 표시된 농도들에서 72 시간 동안 GM03813 세포들에 개별적으로 또는 조합으로 형질 감염시켰다. 대조군 처리로서의 모의 샘플들을 올리고뉴클레오타이드들의 부재하에 형질 감염시켰다. 역전사를 위해 Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 상기 처리된 세포들로부터 전체 세포 RNA를 추출하여 cDNA를 수득한 다음, RT-qPCR에 의해 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 결정하였다. 도 6a 및 6d는 RT-qPCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. 도 6b는 반정량적 PCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. SMN2의 PCR 산물들을 *DdeI* 효소로 분해하고, 2% 아가로오스 겔 상에서 분리하였다. TBP 유전자를 또한 RNA 로딩에 대한 대조군으로서 증폭시켰다. 도 6c 및 6e는 도 6b에서의 PCR 산물 밴드 강도를 정량화하여 유도된 SMN2FL 및 SMN Δ 7 수준들을 도시한 것이다. 상기 값들 (y 축)은 TBP의 밴드 강도로 정규화한 후 모의 처리에 대한 상대적 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 밴드 강도이다. SMN2FL, 분해 후 SMN2 전장 PCR 산물 (392 bp); SMN Δ 7, 분해 후 SMN 엑손 7 도약 PCR 산물 (338 bp), ASO, ASO-10-27.

[0041]

[0033] 도 7a~7c는 제II 형 SMA 세포 GM03813에서 전장 SMN 단백질의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 ASO-10-27의 조합 효과를 도시한 것이다. ASO-10-27 및 DS06-0004를 표시된 농도들에서 72 시간 동안 GM00232 세포들에 개별적으로 또는 조합으로 형질 감염시켰다. 대조군 처리로서의 모의 샘플들을 올리고뉴클레오타이드들의 부재하에 형질 감염시켰다. 처리된 세포들로부터 단백질을 수확하고, 사람 SMN 단백질에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅 검정에 의해 면역 블롯팅하였다. 단백질 로딩에 대한 대조군의 역할을 하도록 α/β -튜불린에 대한 항체를 또한 블롯팅하였다. 도 7a는 모의 처리 및 ASO-10-27 단독 또는 이와 DS06-0004의 조합으로 처리된 세포들로부터의 SMN 단백질 발현을 도시한 것이다. 도 7b는 모의 처리 및 DS06-0004 단독 또는 이와 ASO-10-27의 조합으로 처리된 세포들로부터의 SMN 단백질 발현을 도시한 것이다. 도 7c는 도 7a 및 7b의 밴드 강도를 정량화하여 유도된 SMN 단백질 수준들의 상대적 배수 변화들을 도시한 것이다. 값들 (y 축)은 α/β -튜불린의 밴드 강도로 정규화한 후 SMN 단백질의 상대적 밴드 강도이다. ASO, ASO-10-27.

[0042]

[0034] 도 8a~8f는 GM00232 세포들에서 SMN2FL 및 SMN Δ 7 SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 리스디플람의 조합 효과를 도시한 것이다. 리스디플람 및 DS06-0004를 표시된 농도들에서 72 시간 동안 GM00232 세포들에 개별적으로 또는 조합으로 형질 감염시켰다. DMSO 샘플들은 리스디플람에 대한 비히클 대조군의 역할을 하며, saRNA 형질 감염에 대한 대조군으로서의 모의 처리를 올리고뉴클레오타이드의 부재하에 형질 감염시켰다. 역전사를 위해 Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 상기 처리된 세포들로부터 전체 세포 RNA를 추출하여 cDNA를 수득한 다음, RT-qPCR에 의해 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 결정하였다. 도 8a는 RT-qPCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. 도 8b 및 8c는 상이한 농도들의 DS06-0004 및 리스디플람으로 조합 치료된 세포들에서의 상대적 SMN2FL mRNA 수준들을 도시한 것이다. 도 8d는 반정량적 PCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. SMN2의 PCR 산물들을 *DdeI* 효소로 분해하고, 2% 아가로오스 겔 상에서 분리하였다. TBP 유전자를 또한 RNA 로딩에 대한 대조군으로서 증폭시켰다. 도 8e 및 8f는 도 8d에서의 PCR 산물 밴드 강도를 정량화하여 유도된 SMN2FL 수준들을 도시한 것이다. 상기 값들 (y 축)은 TBP의 밴드 강도로 정규화한 후 모의 또는 DMSO 처리에 대한 상대적 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 밴드 강도이다. SMN2FL, 분해 후 SMN2 전장 PCR 산물 (392 bp); SMN Δ 7, 분해 후 SMN 엑손 7 도약 PCR 산물 (338 bp).

[0043]

[0035] 도 9a~9b는 제I 형 SMA 세포 GM00232에서 전장 SMN 단백질의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 리스디플람의 조합 효과를 도시한 것이다. 리스디플람 및 DS06-0004를 표시된 농도들에서 72 시간 동안 GM00232 세포들에 개별적으로 또는 조합으로 형질 감염시켰다. DMSO 샘플들은 리스디플람에 대한 비히클 대조군의 역할을 하며, saRNA 형질 감염에 대한 대조군으로서의 모의 처리를 올리고뉴클레오타이드의 부재하에 형질 감염시켰다. 처리된 세포들로부터 단백질을 수확하고, 사람 SMN 단백질에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅 검정에 의

해 면역 블롯팅하였다. 단백질 로딩에 대한 대조군의 역할을 하도록 α/β -튜불린에 대한 항체를 또한 블롯팅 하였다. 도 9a는 DMSO 처리 및 리스디플람 단독 또는 이와 DS06-0004의 조합으로 처리된 세포들로부터의 SMN 단백질 발현을 도시한 것이다. 도 9b는 도 9a의 밴드 강도를 정량화하여 유도된 SMN 단백질 수준들의 상대적 배수 변화들을 도시한 것이다. 값들 (y 축)은 α/β -튜불린의 밴드 강도로 정규화한 후 SMN 단백질의 상대적 밴드 강도이다.

[0044] [0036] 도 10a~10f는 GM03813 세포들에서 SMN2FL 및 SMN Δ 7 SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 리스디플람의 조합 효과를 도시한 것이다. 리스디플람 및 DS06-0004를 표시된 농도들에서 72 시간 동안 GM03813 세포들에 개별적으로 또는 조합으로 형질 감염시켰다. DMSO 샘플들은 리스디플람에 대한 비히클 대조군의 역할을 하며, saRNA 형질 감염에 대한 대조군으로서의 모의 처리를 올리고뉴클레오타이드의 부재하에 형질 감염시켰다. 역전사를 위해 Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 상기 처리된 세포들로부터 전체 세포 RNA를 추출하여 cDNA를 수득한 다음, RT-qPCR에 의해 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 결정하였다. 도 10a는 RT-qPCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. 도 10b 및 10c는 상이한 농도들의 DS06-0004 및 리스디플람으로 조합 치료된 세포들에서의 상대적 SMN2FL mRNA 수준들을 도시한 것이다. 도 10d는 반정량적 PCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. SMN2의 PCR 산물들을 *Dde*I 효소로 분해하고, 2% 아가로오스 겔 상에서 분리하였다. TBP 유전자를 또한 RNA 로딩에 대한 대조군으로서 증폭시켰다. 도 10e 및 10f는 도 10d에서의 PCR 산물 밴드 강도를 정량화하여 유도된 SMN2FL 수준들을 도시한 것이다. 상기 값들 (y 축)은 TBP의 밴드 강도로 정규화한 후 모의 또는 DMSO 처리에 대한 상대적 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 밴드 강도이다. SMN2FL, 분해 후 SMN2 전장 PCR 산물 (392 bp); SMN Δ 7, 분해 후 SMN 엑손 7 도약 PCR 산물 (338 bp).

[0045] [0037] 도 11a~11b는 제II 형 SMA 세포 GM03813에서 전장 SMN 단백질의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 리스디플람의 조합 효과를 도시한 것이다. 리스디플람 및 DS06-0004를 표시된 농도들에서 72 시간 동안 GM03813 세포들에 개별적으로 또는 조합으로 형질 감염시켰다. DMSO 샘플들은 리스디플람에 대한 비히클 대조군의 역할을 하며, saRNA 형질 감염에 대한 대조군으로서의 모의 처리를 올리고뉴클레오타이드의 부재하에 형질 감염시켰다. 처리된 세포들로부터 단백질들을 수확하고, 사람 SMN 단백질에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅 검정에 의해 면역 블롯팅하였다. 단백질 로딩에 대한 대조군의 역할을 하도록 α/β -튜불린에 대한 항체를 또한 블롯팅 하였다. 도 11a는 모의 처리 및 리스디플람 단독 또는 이와 DS06-0004의 조합으로 처리된 세포들로부터의 SMN 단백질 발현을 도시한 것이다. 도 11b는 도 11a의 밴드 강도를 정량화하여 유도된 SMN 단백질 수준들의 상대적 배수 변화들을 도시한 것이다. 값들 (y 축)은 α/β -튜불린의 밴드 강도로 정규화한 후 SMN 단백질의 상대적 밴드 강도이다.

[0046] [0038] 도 12a~12e는 GM03813 세포들에서 SMN2FL 및 SMN Δ 7 SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA들 (DS06-0031 및 DS06-0067)과 ASO-10-27의 조합 효과를 도시한 것이다. DS06-0031 또는 DS06-0067을 개별적으로 또는 ASO-10-27과의 조합으로 GM03813 세포들에 10 nM에서 72 시간 동안 형질 감염시켰다. 대조군 처리로서의 모의 샘플들을 올리고뉴클레오타이드들의 부재하에 형질 감염시켰다. dsCon2를 관련 없는 올리고뉴클레오타이드 대조군으로서 형질 감염시켰다. DS06-332i는 SMN2를 위한 siRNA이며, 대조군 치료로서 형질 감염되었다. 역전사를 위해 Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 상기 처리된 세포들로부터 전체 세포 RNA를 추출하여 cDNA를 수득한 다음, RT-qPCR 및 반정량적 RT-PCR에 의해 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 결정하였다. 처리된 세포들로부터 단백질들을 수확하고, 사람 SMN 단백질에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅 검정에 의해 면역 블롯팅하였다. 단백질 로딩에 대한 대조군의 역할을 하도록 α/β -튜불린에 대한 항체를 또한 블롯팅하였다. 도 12a는 RT-qPCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. 도 12b는 반정량적 PCR에 의해 결정되고 2% 아가로오스 겔 상에서 분리된 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. TBP 유전자를 또한 RNA 로딩에 대한 대조군으로서 증폭시켰다. 도 12c는 도 12b에서의 PCR 산물 밴드 강도를 정량화하여 유도된 SMN2FL 및 SMN Δ 7 mRNA 수준들을 도시한 것이다. 상기 값들 (y 축)은 TBP의 밴드 강도로 정규화한 후 모의 처리에 대한 상대적 SMN2FL 및 SMN Δ 7의 밴드 강도이다. SMN2FL, SMN2 전장 PCR 산물 (507 bp); SMN Δ 7, SMN 엑손 7 도약 PCR 산물 (453 bp). 도 12d는 SMN 단백질 발현의 웨스턴 블롯을 도시한 것이다. 도 12e는 도 12d의 밴드 강도를 정량화하여 유도된 SMN 단백질 수준들의 상대적 배수 변화들을 도시한 것이다. 값들 (y 축)은 α/β -튜불린의 밴드 강도로 정규화한 후 SMN 단백질의 상대적 밴드 강도이다.

[0047] [0039] 도 13a~13c는 SMA 제III 형 마우스들 (PND7)에서 전장 (SMN2FL) 및 엑손 7 도약 (SMN Δ 7) SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA (LNP-R6-04M1)와 LNP-ASO-10-27 또는 리스디플람의 조합 효과를 도시한 것이다. 표시된 농도들로 측뇌실 주사 (lateral ventricle injection: ICV)에 의해 처리 그룹 1 (n = 3) (생후 1 일차 (P1, 10 μ g) 및 생후 3 일차 (P3, 10 μ g)에 LNP-R6-04M1 단독으로 투여됨), 처리 그룹 2 (n = 3) (LNP-ASO-10-27

(P1, 10 µg 및 P3, 10 µg)과 조합하여 LNP-R6-04M1로 투여됨) 및 처리 그룹 3 (n = 3) (LNP-R6-04M1 및 리스디플람 (0.3 mg/kg, 1 mg/kg 및 3 mg/kg)으로 투여됨)으로 SMA 제III 형 마우스들의 3개 그룹을 처리하였다. 식염수로 처리된 마우스들은 비처리 대조군의 역할을 하였다. 처리 후, 역전사를 위해 Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 두 조직 (뇌 및 간)으로부터 RNA를 분리하여 cDNA를 수득한 다음, RT-qPCR에 의해 SMN2FL 및 SMNΔ7의 mRNA 수준을 결정하였다. 도 13a는 SMA 제III 형 마우스들의 뇌에서 RT-qPCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMNΔ7의 mRNA 수준을 도시한 것이다. 도 13b는 SMA 제III 형 마우스들의 간에서 RT-qPCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMNΔ7의 SMN2FL mRNA 수준을 도시한 것이다. 도 13c는 SMA 제III 형 마우스들의 척수에서 RT-qPCR에 의해 결정된 SMN2FL 및 SMNΔ7의 SMN2FL mRNA 수준을 도시한 것이다. SMN2FL 및 SMNΔ7 mRNA 수준들은 Tbp 참조 수준들로 정규화한 후 식염수 처리에 대한 3 마리 동물/그룹 (n = 3~7)의 평균값들로 도시된다.

6. 발명의 상세한 설명

[0040] 본 발명은 SMN 결핍 관련 병태들에 대한 치료학적 효과를 개선하기 위해 SMN2 유전자 발현을 활성화/상향 조절하고 전장 SMN2의 발현량을 증가시키는 방법들에 관한 연구에 기초한다.

[0041] 본 개시 내용에서, 본 발명자들은 SMN2 saRNA 및 SMN2 mRNA 조절제, 예를 들어, 뉴시너센과 같은 ASO, 또는 리스디플람 및 브라나플람을 포함하는 (그러나, 이에 제한되지 않음) 소형 피리다진 유도체에 의한 SMA 환자 세포들의 조합 치료가 단독으로 사용된 화합물들 중 어느 하나에 의해 달성될 수 있는 양보다 유의하게 보다 높은 수준들의 전장 SMN2 mRNA 및 SMN 단백질을 달성할 수 있다는 것을 추가로 나타낸다. 이러한 조합 치료 전략은, 예를 들어, SMN 결핍 관련 병태로 진단된 환자의 임상 증상들을 개선하거나 단일 요법과 관련하여 원치 않는 부작용들을 감소시켜 SMA 환자들과 같은 환자들의 치료 결과를 최대화함으로써 단일 요법과 비교하여 증진된 치료학적 이점을 제공할 수 있다.

[0042] 달리 정의되지 않는다면, 본 출원에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어들은 본 발명을 포함하는 기술 분야의 통상의 기술자들에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0043] 본 출원에서, "한" 및 "이러한"과 같은 단수형들은 문맥상 명백하게 달리 명시되지 않는 한 복수 대상들을 포함한다.

6.1. 정의

[0044] 본 출원에서, "SMN 결핍 관련 병태들"이라는 용어는 임의의 원인으로 인한 SMN 전장 단백질의 결핍에 기인하는 질환을 지칭한다. "SMN 결핍 관련 병태들"에는 척수 근육 위축증 (SMA), 신경성 유형 선천 다발성 관절만곡증 (neurogenic-type arthrogryposis multiplex congenita) (선천성 AMC) 및 근 위축성 측삭 경화증 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS)이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. SMN1 (사람)의 경우, GenBank 유전자 참조는 Gene ID: 6606이다.

[0045] "척수 근육 위축증" 또는 "SMA"라는 용어에는 척수 근육 위축증 (SMA) 제1 형 내지 제4 형; 근위 척수 근육 위축증; 아동기 발병 SMA 제I 형 (베르드니히-호프만병 (Werdnig-Hoffmann disease)); 제II 형 (중간형, 만성형), 제III 형 (쿠겔베르그-웰란더병 (Kugelberg-Welander disease) 또는 청소년 척수 근육 위축증) 및 비교적 최근에 분류된 성인 발병형 제IV 형이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 회의 보고서: 국제 SMA 컨소시엄 회의. 신경근 장애; 2: 423-428. SMA라는 용어에는 또한 후기 발병 SMA (SMA 제3 형 및 제4 형, 경증 SMA, 성인 발병 SMA 및 쿠겔베르그-웰란더병으로도 또한 공지됨)가 포함된다. SMA라는 용어에는 또한 X-연관 질환, 호흡 곤란을 동반한 척수 근육 위축증 (spinal muscular atrophy with respiratory distress: SMARD), 척수 및 연수 근육 위축증 (케네디병 (Kennedy's disease) 또는 연수-척수 근육 위축증) 및 원위 척수 근육 위축증을 비롯한 다른 형태의 SMA가 포함된다. SMA라는 용어는 문헌 [Arnold, W. D., Kassar, D. & Kissel, J. T. Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle and Nerve* (2015)]; [Buttchbach, M. E. R. Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Front. Mol. Biosci.* (2016)]에 기재된 모든 형태의 SMA를 포함한다.

[0046] SMA 증상들이 출생 시에 또는 생후 6 개월까지 존재할 때, 상기 질환을 SMA 제1 형 (영아 발병 또는 베르드니히-호프만병으로도 또한 호칭됨)으로 호칭한다. 아기들은 전형적으로 전반적인 근력 저하, 약한 울음 및 호흡 곤란을 갖는다. 이들은 종종 연하 및 포유에 어려움을 겪으며, 도움 없이 앉을 수 있는 발달 이정표에 도달하지 못한다. 이들 아기들은 흡인 및 성장 장애의 증가된 위험을 갖는다. 전형적으로, 이들 아기들은 2 또는 3 개 카피의 SMN2 유전자를 갖는다. (그 전문이 본 출원에 포함되는 문헌 [Buttchbach, M. E. R. Copy

Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Front. Mol. Biosci.* (2016))]

- [0057] [0047] SMA가 생후 3 내지 15 개월에 그리고 소아가 독립적으로 일어서거나 걸을 수 있기 전에 발병할 때, 이를 SMA 제2 형, 또는 중등 SMA 또는 두보위츠병이라고 호칭한다. SMA 제2 형을 갖는 아동들은 일반적으로 3개 카피의 SMN2 유전자를 가지고 있다 (그 전문이 본 출원에 포함되는 문헌 [Arnold, W. D., Kassar, D. & Kissel, J. T. Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle and Nerve* (2015)]). 근력 저하는 대부분 근위성 (신체 중심에 가까움)이며, 상지들보다 하지들에 더 많이 관련된다. 일반적으로, 안면 및 눈 근육은 병에 걸리지 않는다. (그 전문이 본 출원에 포함되는 문헌 [Butchbach, M. E. R. Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Front. Mol. Biosci.* (2016)]).
- [0058] [0048] 후기 발병 SMA (SMA 제3 형 및 제4 형, 경증 SMA, 성인 발병 SMA 및 쿠젤베르그-웰란더병으로도 또한 공지됨)는 다양한 수준들의 쇠약을 초래한다. 제 3형 SMA 환자는 3 내지 4 개 카피의 SMN2 유전자를 가지고 있다. SMA 제3 형 (청소년 발병)은 전체 SMA 사례들 중 30%를 차지한다 (문헌 [Arnold, W. D., Kassar, D. & Kissel, J. T. Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle and Nerve* (2015)]). 증상들은 일반적으로 생후 18 개월 내지 성인기에 나타난다. 병에 걸린 개체들은 독립적인 이동성을 달성한다. 그러나, 이들 환자들의 근위 쇠약은 낙상 및 계단 오르기 어려움을 유발할 수 있다. 시간이 경과에 따라, 다수는 일어서고 걸을 수 있는 능력을 상실하므로 대신 휠체어를 사용하여 이동한다. 이들 환자들의 대부분은 발 기형, 척추 측만증 및 호흡기 근력 저하를 나타낸다.
- [0059] [0049] SMA 제4 형은 후기 발병하며, 전체 SMA 사례들 중 5% 미만을 차지한다. 이들 환자들은 4 내지 8 개 카피의 SMN2 유전자를 가지고 있다 (문헌 [Butchbach, M. E. R. Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Front. Mol. Biosci.* (2016)]). 발병 연령은 정의되어 있지 않지만 일반적으로 30세 이후이다. 제4 형은 경증 형태의 SMA이므로, 수명은 정상적으로 유지된다. 환자들은 운동 이정표를 달성하고 평생 동안 이동성을 유지할 수 있다.
- [0060] [0050] 본 출원에서 사용되는 "대상체" 및 "개체"라는 용어들은 본 개시 내용의 화합물들로 치료될 수 있는 임의의 생물체를 의미하기 위해 본 출원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다. "환자"라는 용어는 유아들, 아동들 및 성인들을 비롯한 사람 대상체 또는 개체를 의미한다.
- [0061] [0051] 조성물의 "치료학적 유효량"은 목적하는 치료학적 효과를 달성하기에 충분한 양이므로, 치유 또는 완전 관해를 요구하지 않는다. 본 개시 내용의 실시 형태들에서, 치료학적 효능은 질환 지표들 중 임의의 지표의 개선이며, 치료학적 유효량은 치료받은 개체에서 임상적으로 유의한 병태/증상의 개선을 유발하기에 충분하다. "치료학적 유효량" 및 "유효량"이라는 문구들은 치료 중인 개체의 활동, 기능 및 반응에서의 임상적으로 유의한 결핍을 적어도 약 15%, 바람직하게는 적어도 50%, 보다 바람직하게는 적어도 90%까지 감소시키고, 가장 바람직하게는 예방하기에 충분한 양을 의미하기 위해 본 출원에서 사용된다.
- [0062] [0052] 상기 유효량은 대상체의 신장 및 체중, 질환의 유형 또는 본 발명의 특정 화합물들과 같은 요인들에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물의 선택은 "유효량"을 구성하는 것에 영향을 미칠 수 있다. 당해 분야의 통상의 기술자는 본 출원에 포함된 요인들을 연구하고 과도한 실험 없이 본 발명의 화합물들의 유효량에 관한 결정을 내릴 수 있을 것이다.
- [0063] [0053] 투여 요법은 유효량을 구성하는 것에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명의 화합물은 SMN 결핍 관련 병태의 발병 전 또는 후에 대상체에게 투여될 수 있다. 추가로, 시차를 둔 투약량 뿐만 아니라 수회의 분할된 투약량이 매일 또는 순차적으로 투여될 수 있거나, 용량이 연속적으로 주입될 수 있거나, 볼루스 (bolus) 주사될 수 있다. 추가로, 본 발명의 화합물(들)의 투약량은 치료학적 또는 예방적 상황의 긴급성들에 의해 표시되는 바와 같이 비례적으로 증가되거나 감소될 수 있다. 본 출원의 조성물들이 투여될 수 있는 투약량은 넓은 범위 내에서 다양할 수 있으며, 물론 각각의 경우에서 개별 요구 조건에 맞추어 질 것이다.
- [0064] [0054] 본 출원에서 사용되는 "치료하다", "치료되는", "치료하는" 또는 "치료"라는 용어들은 의학 분야에서 통상적으로 이해되는 의미를 가지므로, 치유 또는 완전 관해를 요구하지 않으며, 임의의 유익하거나 목적하는 임상 결과들을 포함한다. 이러한 유익하거나 목적하는 임상 결과들의 비제한적 예에는 치료 없이 예상되는 생존과 비교한 생존 연장, 다음 중 하나 이상을 포함하는 증상 감소가 있다: 근위 골격근의 약화 및 위축, 독립적으

로 앉거나 걷기 불능, 연하, 호흡 등의 어려움.

- [0065] [0055] 본 출원에서 사용되는 질환을 "예방하는" 또는 "지연시키는"은 질환의 완전한 발생을 억제하는 것을 지칭한다.
- [0066] [0056] "생물학적 샘플"이라는 용어는 유기체 (예를 들어, 사람 대상체)로부터 유래된 임의의 조직, 세포, 체액 또는 기타 물질을 지칭한다. 특정 실시 형태들에서, 상기 생물학적 샘플은 혈청 또는 혈액이다.
- [0067] [0057] 본 출원에서 사용되는 "서열 동일성" 또는 "서열 상동성"이라는 용어는 saRNA의 하나의 올리고뉴클레오타이드 가닥 (센스 또는 안티센스)이 표적 유전자의 프로모터 서열의 코딩 가닥 또는 주형 가닥 상의 영역과 적어도 80%의 유사성을 갖는다는 것을 의미한다.
- [0068] [0058] 본 발명의 실시 형태들에서, 상기 표적 유전자는 SMN2이다. "표적 서열"이란, SMN2 saRNA의 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 표적 유전자의 프로모터 서열에서 상동성이거나 상보적인 서열 단편을 의미한다. "표적 유전자 프로모터 서열"은 표적 유전자의 비-코딩 서열을 지칭하고, 본 개시 내용의 맥락에서, "표적 유전자의 프로모터 서열에 상보적인"은 상기 서열의 코딩 가닥을 지칭하며, 비-주형 가닥, 즉, 상기 유전자의 코딩 서열과 동일한 서열인 핵산 서열로도 또한 지칭된다.
- [0069] [0059] 본 출원에서 사용되는 "센스 가닥" 및 "센스 올리고뉴클레오타이드 가닥"이라는 용어들은 상호 교환 가능하며, 소형 활성화 리보핵산 (saRNA) 분자의 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 saRNA의 듀플렉스 (duplex)에 표적 유전자의 프로모터 서열의 코딩 가닥을 포함하는 제1 핵산 가닥을 지칭한다.
- [0070] [0060] 본 출원에서 사용되는 "안티센스 가닥" 및 "안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥"이라는 용어들은 상호 교환 가능하며, saRNA 분자의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 가닥은 센스 올리고뉴클레오타이드 가닥에 상보적인 saRNA의 듀플렉스 내의 제2 핵산 가닥을 지칭한다.
- [0071] [0061] 본 출원에서 사용되는 "제1 올리고뉴클레오타이드 가닥"이라는 용어는 센스 가닥 또는 안티센스 가닥일 수 있다. saRNA의 센스 가닥은 saRNA 듀플렉스에서 표적 유전자의 프로모터 DNA 서열의 코딩 가닥과 상동성을 갖는 올리고뉴클레오타이드 가닥을 지칭한다. 상기 안티센스 가닥은 saRNA 듀플렉스에서 센스 가닥과 상보적인 올리고뉴클레오타이드 가닥을 지칭한다.
- [0072] [0062] 본 출원에서 사용되는 "제2 올리고뉴클레오타이드 가닥"이라는 용어는 또한 센스 가닥 또는 안티센스 가닥일 수 있다. 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 가닥이 센스 가닥인 경우, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥은 안티센스 가닥이고; 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 가닥이 안티센스 가닥인 경우, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥은 센스 가닥이다.
- [0073] [0063] 본 출원에서 사용되는 "프로모터"라는 용어는, 단백질을 인코딩하지 않고 단백질 코딩 또는 RNA 코딩 핵산 서열과 공간적으로 연합하여 이들의 전사에 대한 조절 역할을 하는 핵산 서열을 지칭한다. 일반적으로, 진핵 프로모터는 100 내지 5,000 개의 염기 쌍을 포함하지만, 이러한 길이 범위는 본 출원에서 사용되는 바와 같은 "프로모터"라는 용어를 제한하려는 의도가 아니다. 상기 프로모터 서열이 일반적으로 단백질 코딩 또는 RNA 코딩 서열의 5' 말단에 위치하지만, 이는 또한 엑손 및 인트론 서열들에 존재한다.
- [0074] [0064] 본 출원에서 사용되는 "코딩 가닥"이라는 용어는 전사될 수 없는 표적 유전자 내의 DNA 가닥을 지칭하며, 이의 뉴클레오타이드 서열은 전사에 의해 생성된 RNA의 서열과 동일하다 (RNA에서, DNA 내의 T는 U로 대체됨). 본 개시 내용에서 기재된 표적 유전자 프로모터의 이중 가닥 DNA 서열의 코딩 가닥은 표적 유전자의 DNA 코딩 가닥과 동일한 DNA 가닥 상의 프로모터 서열을 지칭한다.
- [0075] [0065] 본 출원에서 사용되는 "주형 가닥"이라는 용어는, 코딩 가닥에 상보적이고 전사된 RNA 염기에 상보적인 RNA (A-U, G-C)에 주형으로 전사될 수 있는 표적 유전자의 이중 가닥 DNA의 또 다른 가닥을 지칭한다. 전사 동안, RNA 폴리머라아제는 주형 가닥에 결합하고 주형 가닥의 3'→5' 방향을 따라 이동하여 5'→3' 방향으로 RNA 합성을 촉매한다. 본 개시 내용에서 기재된 표적 유전자 프로모터의 이중 가닥 DNA 서열의 주형 가닥은 표적 유전자의 DNA 주형 가닥과 동일한 DNA 가닥 상의 프로모터 서열을 지칭한다.
- [0076] [0066] 본 출원에서 사용되는 "전사 개시 부위" 또는 TSS라는 용어는 유전자의 주형 가닥 상에서 전사 개시를 표시하는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 상기 전사 개시 부위는 프로모터 영역의 주형 가닥 상에 존재할 수 있다. 유전자는 1 개 초과인 전사 개시 부위를 가질 수 있다.
- [0077] [0067] 본 출원에서 사용되는 "오버행 (overhang)"이라는 용어는, 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 내의 가닥들

중 하나를 초과하여 연장되는 또 다른 가닥으로부터 생성된 비-염기 쌍 뉴클레오타이드(들)를 갖는 올리고뉴클레오타이드 가닥 말단 (5' 또는 3')을 지칭한다. 듀플렉스들의 3' 및/또는 5' 말단을 초과하여 연장되는 단일 가닥 영역은 오버행으로 지칭된다. 특정 실시 형태들에서, 상기 오버행은 0 내지 6 개 뉴클레오타이드 길이다. 0개 뉴클레오타이드의 오버행은 오버행이 없다는 것을 의미하는 것으로 이해된다.

[0078] [0068] 본 출원에서 사용되는 "유전자 활성화", "유전자 발현을 활성화하는", "유전자 상향 조절" 및 "유전자 발현을 상향 조절하는"이라는 용어들은 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 전사 수준, mRNA 수준, 단백질 수준, 효소 활성, 메틸화 상태, 염색질 상태 또는 배열 형태, 번역 수준 또는 유전자의 세포 또는 생물학적 시스템에서의 활성 또는 상태를 측정하여 결정될 때 특정 핵산 서열의 전사, 번역, 발현 또는 활성의 증가 또는 상향 조절을 의미한다. 이러한 활성들 또는 상태들은 직접적으로 또는 간접적으로 결정될 수 있다. 또한, "유전자 활성화" 또는 "유전자 발현을 활성화하는"은 이러한 활성화 이전에 관계 없이 핵산 서열과 관련된 활성의 증가를 지칭한다. 예를 들어, 유전자 활성화가 전사 수준에서 일어나서 RNA로의 전사를 증가시키고, RNA가 단백질로 번역되어 단백질의 발현을 증가시킨다.

[0079] [0069] 본 출원에서 사용되는 "소형 활성화 RNA", "saRNA" 및 "소형 활성화 리보핵산"이라는 용어들은 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 표적 유전자 발현을 상향 조절할 수 있는 리보핵산 분자를 지칭한다. 이는 표적 유전자의 비-코딩 핵산 서열 (예를 들어, 프로모터 및 인핸서)과 서열 상동성을 갖는 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 핵산 가닥 및 상기 제1 가닥과 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 핵산 가닥으로 구성된 이중 가닥 핵산 분자일 수 있다. 상기 saRNA는 또한 상기 분자 내의 2개의 상보적 영역들에 의해 헤어핀 (hairpin) 구조를 형성할 수 있는 합성 또는 벡터 발현 단일 가닥 RNA 분자로 구성될 수 있으며, 여기서, 제1 영역은 유전자의 프로모터의 표적 서열과 서열 상동성을 갖는 리보뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제2 영역에 포함된 리보뉴클레오타이드 서열은 상기 제1 영역과 상보적이다. 상기 saRNA 분자의 듀플렉스 영역의 길이는 전형적으로는 약 10 내지 약 50, 약 12 내지 약 48, 약 14 내지 약 46, 약 16 내지 약 44, 약 18 내지 약 42, 약 20 내지 약 40, 약 22 내지 약 38, 약 24 내지 약 36, 약 26 내지 약 34, 및 약 28 내지 약 32 개의 염기쌍, 전형적으로는 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 45 또는 약 50 개의 염기 쌍이다. 또한, "소형 활성화 RNA", "saRNA" 및 "소형 활성화 리보핵산"이라는 용어들은 또한 변형된 뉴클레오타이드들 또는 유사체들을 포함하는 (그러나, 이에 제한되지 않음) 리보뉴클레오타이드 이외의 핵산들을 포함한다.

[0080] [0070] 본 출원에서 사용되는 "합성"이라는 용어는, RNA를 합성하거나 화학적으로 변형시킬 수 있는 임의의 수단, 예를 들어, 화학적 합성, 시험관내 전사, 벡터 발현 등을 비롯하여, 올리고뉴클레오타이드들이 합성되는 방식을 지칭한다.

[0081] 6.2. saRNA들과 mRNA 조절제들의 조합 조성물들

[0082] [0071] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들은 (a) SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 하나 이상의 제제들과 (b) 기능성 SMN2 mRNA의 생산을 증가시키는 SMN2 mRNA 스플라이싱 또는 안정성의 하나 이상의 조절제의 조합을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0083] [0072] 환자에 대한 이러한 조합의 투여는 척수 근육 위축증과 같은 SMN 결핍 관련 병태의 발병을 치료하거나 지연시킨다. 특정 실시 형태들에서, 상기 기재된 조합은, 예를 들어, 엑손 7 포함을 위한 스플라이싱 조절과 함께 SMN2 전사를 활성화/상향 조절하여 전장 SMN2 mRNA의 양을 증가시킴으로써 전장 SMN 단백질의 양을 증가시킨다. 특정 실시 형태들에서, 전장 SMN 단백질은 SMN 결핍 관련 병태와 관련된 증상들을 감소시키기에 충분한 양으로 증가된다. 특정 실시 형태들에서, 전장 SMN 단백질은 적어도 10%까지 증가된다.

[0084] 6.2.1. SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 제제들

[0085] [0073] 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 하나 이상의 제제들 중 적어도 하나는 saRNA이다. 상기 SMN2 saRNA는, SMN2 유전자가 정상적으로 발현되는 세포에서 SMN2 유전자의 발현을 활성화시키거나 상향 조절한다.

[0086] [0074] 전형적인 실시 형태들에서, 상기 SMN2 saRNA의 제1 가닥은 SMN2 유전자의 프로모터 영역의 16~35 개 뉴클레오타이드 단편과 적어도 75%의 서열 동일성 또는 서열 상보성을 갖는 분절을 포함함으로써 유전자 발현의 활성화 또는 상향 조절을 초래한다.

[0087] [0075] 특히, 상기 SMN2 saRNA의 제1 가닥은 -1639 내지 -1481의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 472), -1090 내지 -1008의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 473), -994 내지 -180 영역들의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 474), 또는 -144 내지 -37의 SMN2 유전자 프로모터의 영역 (서열 번호 475)과

상동성 또는 상보성을 가지며, 적어도 75%, 예를 들어, 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 약 99%의 상동성 또는 상보성을 갖는다. 보다 구체적으로, 상기 SMN2 saRNA의 하나의 가닥은 서열 번호 315~471로 이루어진 그룹으로부터 선택된 임의의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 75%, 예를 들어, 적어도 약 79% 또는 약 99%의 상동성 또는 상보성을 갖는다.

[0088] [0076] 본 개시 내용에서, 상기 SMN2 saRNA는 센스 핵산 단편 및 안티센스 핵산 단편을 포함한다. 상기 센스 핵산 단편 및 상기 안티센스 핵산 단편은 RNA 활성화 기전에 의해 세포에서 SMN2 유전자의 발현을 용이하게 하는 이중 가닥 핵산 구조를 형성할 수 있는 상보적 영역들을 포함한다. saRNA들의 센스 핵산 단편들 및 안티센스 핵산 단편들은 2개의 상이한 핵산 가닥들 상에 존재할 수 있거나 동일한 핵산 가닥 상에 존재할 수 있다. 상기 센스 및 안티센스 핵산 단편들이 두 가닥들 상에 존재할 때, 상기 saRNA의 적어도 하나의 가닥은 0~6 개 뉴클레오타이드 길이의 3' 오버행을 갖고, 바람직하게는 두 가닥들 모두는 2 또는 3 개 뉴클레오타이드 길이의 3' 오버행을 갖고, 바람직하게는 상기 오버행의 뉴클레오타이드들은 데옥시티민 (dT)이다. saRNA의 센스 핵산 단편 및 안티센스 핵산 단편이 동일한 핵산 가닥 상에 존재할 때, 바람직하게는 상기 saRNA는 단일 가닥 헤어핀 구조의 핵산 분자이며, 여기서, 상기 센스 핵산 단편 및 상기 안티센스 핵산 단편의 상보적 영역들은 이중 가닥 핵산 구조를 형성한다. 이러한 saRNA에서, 상기 센스 핵산 단편 및 안티센스 핵산 단편은 길이가 16~35 개 뉴클레오타이드이고, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35 개 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0089] [0077] 하나의 실시 형태에서, 본 개시 내용의 SMN2 saRNA의 센스 가닥은 서열 번호들 1~157로 이루어진 그룹으로부터 선택된 임의의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 75%, 예를 들어, 적어도 약 79%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 약 99%의 상동성을 가지며, 이의 안티센스 가닥은 서열 번호들 158~314로 이루어진 그룹으로부터 선택된 임의의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 75% 또는 약 99%의 상동성을 갖는다. 구체적으로, 본 개시 내용의 SMN2 saRNA의 센스 가닥은 서열 번호들 1~157로 이루어진 그룹으로부터 선택된 임의의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 그렇지 않으면 서열 번호들 1~157로 이루어진 그룹으로부터 선택된 임의의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지며; 본 개시 내용의 SMN2 saRNA의 안티센스 가닥은 서열 번호들 158~314로부터 선택된 임의의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 그렇지 않으면 서열 번호들 158~314로부터 선택된 임의의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다.

[0090] [0078] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 saRNA는 센스 핵산 가닥 및 안티센스 핵산 가닥을 포함하며, 상기 센스 핵산 가닥은 세포에서 SMN2 유전자의 발현을 활성화할 수 있는 이중 가닥 핵산 구조를 형성하기 위해 상기 안티센스 핵산 가닥 상의 적어도 하나의 영역에 상보적인 적어도 하나의 영역을 포함한다.

[0091] [0079] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 센스 핵산 가닥 및 상기 안티센스 핵산 가닥은 2개의 상이한 핵산 가닥들 상에 위치한다.

[0092] [0080] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 센스 핵산 단편 및 상기 안티센스 핵산 단편은 동일한 핵산 가닥 상에 위치하여 헤어핀 단일 가닥 핵산 분자를 형성하며, 여기서, 상기 센스 핵산 단편 및 상기 안티센스 핵산 단편의 상보적 영역들은 이중 가닥 핵산 구조를 형성한다.

[0093] [0081] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 핵산 가닥들 중 적어도 하나는 0 내지 6 개 뉴클레오타이드 길이의 3' 오버행을 갖는다.

[0094] [0082] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 핵산 가닥들 둘 모두는 2~3 개 뉴클레오타이드 길이의 3' 오버행을 갖는다.

[0095] [0083] 본 개시 내용의 특정 실시 형태들에서, 상기 센스 및 안티센스 핵산 가닥들은 각각 16 내지 35개 뉴클레오타이드 길이이다.

[0096] [0084] 본 출원에서 기재된 SMN2 saRNA의 모든 뉴클레오타이드들은 천연, 즉, 화학적으로 변형되지 않은 뉴클레오타이드들일 수 있거나, 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드들일 수 있으며, 상기 화학적 변형은 하기 변형들 중 하나 또는 조합이다:

[0097] (1) SMN2 saRNA의 뉴클레오타이드 서열에서 뉴클레오타이드들의 포스포디에스테르 결합들에 대한 변형들;

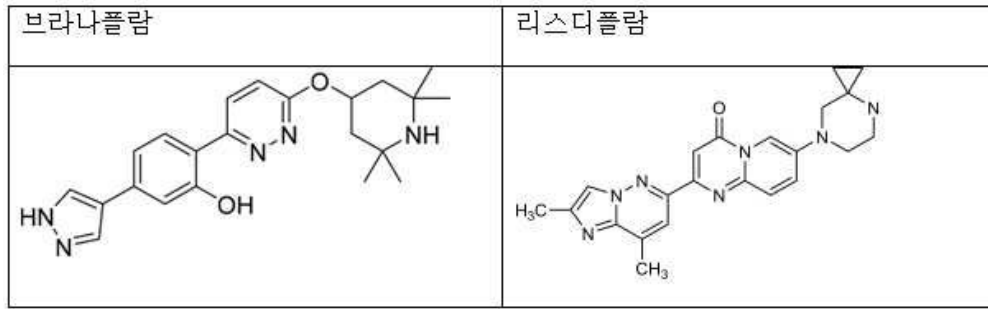
[0098] (2) SMN2 saRNA의 뉴클레오타이드 서열에서 리보오스의 2'-OH의 변형;

[0099] (3) SMN2 saRNA의 뉴클레오타이드 서열에서 염기들에 대한 변형들.

- [0100] [0085] 본 개시 내용의 뉴클레오타이드들 또는 saRNA의 화학적 변형들은 당해 분야의 통상의 기술자들에게 널리 공지되어 있으며, 상기 포스포디에스테르 결합의 변형들은 포스포로티오에이트 변형들 및 보론화 포스페이트 변형들을 비롯하여 포스포디에스테르 결합 내의 산소의 변형들을 지칭한다. 두 변형들 모두는 SMN2 saRNA 구조를 안정화하여 염기 쌍 형성에 대한 높은 특이성과 높은 친화성을 유지한다.
- [0101] [0086] 상기 리보오스 변형은 뉴클레오타이드 5탄당에서 2'-OH의 변형, 즉, 리보오스의 하이드록실 위치에서의 특정 치환기들의 도입, 예를 들어, 2'-플루오로 변형, 2'-옥소메틸 변형, 2'-옥시에틸렌메톡시 변형, 2,4'-디니트로페놀 변형, 잠금 핵산 (locked nucleic acid: LNA), 2'-아미노 변형, 2'-데옥시 변형을 지칭한다.
- [0102] [0087] 염기 변형이란, 뉴클레오타이드의 염기의 변형, 예를 들어, 5'-브로모우라실 변형, 5'-요오도우라실 변형, N-메틸우라실 변형, 2,6-디아미노퓨린 변형을 의미한다.
- [0103] [0088] 이들 변형들은 SMN2 saRNA의 생체 이용률을 증가시키고, 표적 서열에 대한 친화성을 증가시키고, 세포에서 뉴클레아제 가수 분해에 대한 내성을 증진시킬 수 있다.
- [0104] [0089] 또한, SMN2 saRNA의 세포 내로의 진입을 용이하게 하기 위해, 콜레스테롤과 같은 친유성 기들이 상기 변형들에 기초하여 SMN2 saRNA의 센스 또는 안티센스 가닥들의 말단들에 도입되어 지질 이중층들과 핵막 및 핵 내의 유전자 프로모터 영역들로 구성된 세포막을 통한 작용을 용이하게 할 수 있다.
- [0105] [0090] 본 개시 내용의 SMN2 saRNA는 세포와 접촉시 세포에서 SMN2 유전자의 발현을 바람직하게는 적어도 10%까지 활성화하거나 상향 조절하는데 효과적이다.
- [0106] [0091] 본 개시 내용의 하나의 양태는 본 개시 내용의 SMN2 saRNA 또는 본 개시 내용의 SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 제공한다. 하나의 실시 형태에서, 상기 세포는 포유 동물 세포, 바람직하게는 사람 세포이다. 이러한 세포들은 생체외, 예를 들어, 세포주들 또는 세포주들 동일 수 있거나, 유아들, 아동들 또는 성인들을 비롯한 사람들과 같은 포유 동물 신체들에 존재할 수 있다.
- [0107] [0092] 본 발명의 또 다른 양태는 상기에서 기재된 바와 같은 SMN2 saRNA 또는 본 발명에 따른 SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산, SMN2 mRNA 조절제 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 하나의 실시 형태에서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 수성 담체, 리포솜, 중합체성 중합체 및 폴리펩타이드 중 하나 이상을 포함한다. 하나의 실시 형태에서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 수성 담체들, 리포솜들, 중합체성 중합체들 또는 폴리펩타이드들 중 하나 이상을 포함한다. 하나의 실시 형태에서, 상기 수성 담체는, 예를 들어, RNase 무함유 물 또는 RNase 무함유 완충액일 수 있다. 상기 조성물은 1~150 nM, 예를 들어, 1~100 nM, 예를 들어, 1~50 nM, 예를 들어, 1~20 nM, 예를 들어, 10~100 nM, 10~50 nM, 20~50 nM, 20~100 nM, 예를 들어, 50 nM의 전술한 SMN2 saRNA 또는 본 발명에 따른 SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다.
- [0108] [0093] 본 개시 내용의 또 다른 양태는 세포에 의해 발현되는 전장 SMN 단백질의 양을 증가시키기 위한 하나 이상의 조성물들의 제조를 위한, SMN2 mRNA 조절제와 조합된, 본 출원에서 기재된 바와 같은 SMN2 saRNA, 본 출원에서 기재된 바와 같은 SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산, 또는 이러한 SMN2 saRNA 또는 본 출원에서 기재된 바와 같은 SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0109] [0094] 또 다른 양태에서, 본 발명은 SMN2 유전자의 프로모터 영역 상의 임의의 연속 16~35 개 뉴클레오타이드 서열, 바람직하게는 서열 번호들 472~475로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열들 중 어느 하나 상의 임의의 연속 16~35 개 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단리된 SMN2 유전자 saRNA 표적화 부위를 제공한다. 특히, 작용 부위는 서열 번호들 315~471의 뉴클레오타이드 서열들 중 임의의 서열에 나타난 서열을 포함하거나 이로부터 선택된다.
- [0110] [0095] 또 다른 실시 형태는 본 발명의 화합물들 및 치료학적 불활성 담체, 희석제 또는 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물들 또는 약제들 뿐만 아니라 이러한 조성물들 및 약제들을 제조하기 위해 본 발명의 화합물들을 사용하는 방법들을 제공한다. 특정 실시 형태들에서, 본 발명의 SMN2 saRNA 및 SMN2 mRNA 조절제는 별개의 약제학적 조성물 중에 있다. 다른 실시 형태들에서, 상기 SMN2 saRNA 및 SMN2 mRNA 조절제는 동일한 약제학적 조성물 중에 있다.
- [0111] [0096] 본 개시 내용의 조성물은 양질의 의료 행위와 일치하는 방식으로 제형화되고, 투약되고, 투여된다. 이러한 맥락에서 고려해야 할 요인들에는 치료 중인 구체적인 장애, 치료 중인 구체적인 포유 동물, 개별 환자의 임상 조건, 장애의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 계획, 및 진료 의사에게 공지된 기타 요인들이 포

함된다.

- [0112] [0097] 본 출원에서 기재된 소분자 화합물들 중 임의의 화합물, 예를 들어, 리스디플람 또는 브라나플람을 포함하는 조성물들은 경구, 국소 (흡착 및 설하 포함), 직장, 질, 경피, 비경구, 피하, 복강내, 폐내, 진피내, 경막내 및 경막의 및 비강내, 및 국부 치료가 필요한 경우, 병변내 투여를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 SMN2 saRNA 조성물과는 별개로 투여될 수 있다. SMN2 saRNA 조성물들의 경우, 상기 전달은 경막내, 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 비롯한 비경구 주입들을 통해 이루어질 수 있다. 일부 실시 형태들에서, 본 개시 내용의 조성물들의 투여는 임의로 경막내, 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 방광내, 뇌실내, 유리체내 또는 피하 투여를 비롯한 비경구 주입들을 통해; 또는 경구 투여, 비강내 투여, 흡입 투여, 질내 투여 또는 직장 투여를 통해 이루어질 수 있다.
- [0113] [0098] 리스디플람 및 브라나플람과 같은 본 출원에서 기재된 소분자 화합물들은 임의의 편리한 투여 형태, 예를 들어, 정제들, 분말들, 캡슐들, 용액들, 분산액들, 현탁액들, 시럽들, 스프레이들, 좌제들, 겔들, 에멀전들, 패치들 등으로 투여될 수 있다. 이러한 조성물들은 약제학적 제제들에 통상적인 성분들, 예를 들어, 희석제들, 담체들, pH 조절제들, 보존제들, 가용화제들, 안정화제들, 습윤제들, 유화제들, 감미료들, 착색제들, 향미제들, 삼투압을 변화시키기 위한 염들, 완충제들, 차폐제들, 항산화제들 및 추가의 활성제를 포함할 수 있다. 이러한 조성물들은 또한 다른 치료학적으로 가치 있는 물질들을 포함할 수 있다.
- [0114] [0099] 전형적인 제형은 본 발명의 화합물과 담체 또는 부형제를 혼합하여 제조된다. 적합한 담체들 및 부형제들은 당해 분야의 통상의 기술자들에게 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [Ansel H. C. et al., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (2004) Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia]; [Gennaro A. R. et al., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia]; 및 [Rowe R. C., Handbook of Pharmaceutical Excipients (2005) Pharmaceutical Press, Chicago]에 상세하게 기재되어 있다. 상기 제형들은 또한 하나 이상의 완충제들, 안정화제들, 계면 활성제들, 습윤제들, 윤활제들, 유화제들, 현탁제들, 보존제들, 항산화제들, 불투명화제들, 활택제들, 가공 보조제들, 착색제들, 감미료들, 향료들, 향미제들, 희석제들, 및 약물 (즉, 본 발명의 화합물 또는 이의 약제학적 조성물)의 우아한 외관을 제공하거나 약제학적 제품 (즉, 약제)의 제조를 보조하기 위한 다른 공지된 첨가제들을 포함할 수 있다.
- [0115] [0100] 또 다른 양태에서, 본 발명은 개체에서 SMN 결핍 관련 병태의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 출원에서 기재된 실시 형태들 중 어느 하나에 따른 조합물 또는 본 출원에서 기재된 실시 형태들 중 어느 하나에 따른 조성물의 용도를 제공한다. 특정 실시 형태들에 따른 용도에서, SMN 결핍 관련 병태는 유전성 신경근 질환, 바람직하게는 척수 근육 위축증을 포함한다. 상기 개체가 포유 동물, 바람직하게는 사람인 특정 실시 형태들에 따른 용도가 또한 제공된다.
- [0116] **6.2.2. SMN2 mRNA 조절제들**
- [0117] [0101] 본 출원에서 사용되는 "SMN2 mRNA 조절제"라는 용어는 기능성 SMN2 mRNA 및 기능성 SMN 단백질의 생산을 증가시키는 SMN2 mRNA 스플라이싱 또는 안정성의 조절제를 지칭한다. "SMN2 mRNA 조절제"라는 용어는, 예를 들어, SMN2 유전자의 인트론 7의 영역의 인트론 역제 스플라이싱의 효과를 차단함으로써 기능성 전장 SMN 단백질을 제조하는데 필요한 모든 정보를 포함하도록 SMN2 pre-mRNA가 스플라이싱되는 방식을 변경하는 제제를 포함한다. SMN2 mRNA 조절제는 스플라이시오솜 (spliceosome)과 SMN2 pre-mRNA 사이의 상호 작용을 안정화시켜 목적하는 스플라이싱 및 후속적인 단백질 생산을 증가시키는 제제들 (문헌 [J Med Chem, 2018 Dec 27; 61(24): 11021-11036]), 및 SMN2 pre-mRNA와 U1 소형 핵 리보핵 단백질 (snRNP) 복합체에 의해 형성된 일시적 이중 가닥 RNA 구조의 안정화를 증진시키는 제제들 (문헌 [Nat Chem Biol, 2015 Jul; 11(7):511-7])을 포함한다. 특정 예에서, SMN2 mRNA 조절제는 가공된 전사물에 엑손 7을 포함하도록 SMN2 pre-mRNA의 스플라이싱을 조절할 것이다. 대안으로, 본 개시 내용의 SMN2 mRNA 조절제들은 엑손7이 스플라이싱 동안 성숙 SMN mRNA로부터 스플라이싱되는 것을 방지함으로써 기능성 SMN 단백질 수준들을 증가시키는 능력을 갖는 제제들을 포함한다. 본 개시 내용에 따른 SMN2 mRNA 조절제는 또한 미국 특허 US 10,436,802 및 미국 특허 US 10,420,753에 기재된 것들을 포함하며, 이들 각각은 그 전체가 본 출원에 참조로 포함된다.
- [0118] [0102] 본 개시 내용에 따른 SMN2 mRNA 조절제들의 예들에는 피리다진 유도체들, 예를 들어, 국제공개공보 WO 2014/028459 A1에 기재된 것들이 포함되며, 이의 전체 내용은 본 출원에 참조로 포함된다. SMN2 mRNA 조절제들의 구체적인 예들에는 브라나플람 (LMI070으로도 또한 공지됨) 및 리스디플람 (RG7916 또는 R07034067로도 또한 공지됨)이 포함된다.



본 개시 내용에 따른 SMN2 mRNA 조절제들의 추가의 예들에는 스플라이싱 동안 SMN2 전장 (SMN2FL) 전사물들 (엑손 7을 포함하는 전사물들)의 생산을 증진시키기 위해 SMN2 유전자에서 인트론 서열의 안티센스 표적화, 치환 및/또는 파괴를 가능하게 하는 것들과 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 포함된다. 특정 실시 형태들에서, 스프린라자®로 판매되는 뉴시너센은 상기 개시된 조합들에 따라 사용하기에 적합하다.

6.3. SMA 및 관련 병태들의 치료 방법

[0103] 본 발명의 또 다른 양태는 치료학적 유효량의 본 출원에서 기재된 바와 같은 SMN2 saRNA, 본 출원에서 기재된 바와 같은 SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산, 또는 본 발명의 SMN2 saRNA 또는 본 출원에서 기재된 바와 같은 SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 SMN 결핍 관련 병태를 치료하거나 이의 발병을 지연시키는 방법에 관한 것이다. 상기 대상체는 사람과 같은 포유 동물일 수 있다. 상기 대상체는 유아, 아동 또는 성인일 수 있다. 하나의 실시 형태에서, 불충분한 SMN 전장 단백질 발현 또는 SMN1 유전자 돌연 변이에 기인하는 질환은, 예를 들어, SMA를 포함할 수 있다. 하나의 실시 형태에서, 상기 SMN 전장 단백질의 불충분한 발현, SMN1 유전자의 돌연 변이 또는 결실, 및/또는 전장 SMN 단백질의 불충분한 발현에 기인하는 질환은 SMA이다. 하나의 실시 형태에서, 본 발명의 SMA는 SMA 제I 형, SMA 제II 형, SMA 제III 형 및 SMA 제IV 형을 포함한다.

[0104] 본 발명의 또 다른 양태는 SMN 결핍 관련 병태를 치료하거나 이의 발병을 지연시키기 위한 약제의 제조를 위한, 본 개시 내용의 SMN2 mRNA 조절제와 조합된, 본 개시 내용의 SMN2 saRNA, 본 개시 내용의 SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산, 또는 본 개시 내용의 SMN2 saRNA를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 상기 대상체는 사람과 같은 포유 동물일 수 있다. 상기 대상체는 유아, 아동 또는 성인일 수 있다. 하나의 실시 형태에서, SMN 결핍 관련 병태는, 예를 들어, SMA를 포함할 수 있다. 하나의 실시 형태에서, 본 발명의 SMA는 SMA 제I 형, SMA 제II 형, SMA 제III 형 및 SMA 제IV 형을 포함한다.

[0105] 세포에서 전장 SMN 단백질의 양을 증가시키기 위한 제제의 제조에서 본 출원에서 기재된 SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합물들 중 어느 하나, 또는 본 출원에서 기재된 SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합물들 중 어느 하나에 따른 조성물에 따른 용도가 또한 제공된다. 특정 실시 형태들에서, 상기 세포는 포유 동물 세포, 바람직하게는 사람 세포이다. 특정 실시 형태들에서, 상기 세포는 사람에 존재한다. 특정 실시 형태들에서, 상기 사람은 SMN 결핍 관련 병태에 기인하는 증상들을 앓고 있는 환자이다. 특정 실시 형태들에서, 이의 조합물들 또는 조성물들은 SMN 결핍 관련 병태를 치료하기에 유효한 양으로 투여된다. 특정 실시 형태들에서, SMN 결핍 관련 병태에 기인하는 증상들은 유전성 신경근 질환, 바람직하게는 척수 근육 위축증과 관련된 것들이다.

[0106] 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합은 독성 또는 원치 않는 부작용들의 감소와 함께, 개별적으로 사용되는 동일한 양의 각각의 물질의 투여에 의해 달성되는 양보다 더 큰 전장 SMN 단백질의 증가를 달성한다. 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합은 개별적으로 사용되는 동일한 양의 각각의 물질에 의한 치료의 상가 효과보다 더 큰 전장 SMN 단백질의 증가를 달성한다. 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA 또는 SMN2 mRNA 조절제의 양은 본 출원에서 기재된 조합의 실시 형태에서 사용될 때 통상적인 치료에 사용되는 양보다 적은 양으로 투여된다.

[0107] 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합 효과는 개별적으로 사용되는 동일한 양의 각각의 물질의 효과와 비교하여 보다 큰 임상 개선을 달성한다. 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합 효과는 개별적으로 사용되는 동일한 양의 각각의 물질의 효과와 비교하여 상가적 임상 개선 초과를 달성한다.

[0108] 본 개시 내용은 또한 1) SMN2 mRNA 조절제 및 2) 본 출원에서 기재된 바와 같은 SMN2 saRNA, 본 출원에

서 기재된 바와 같은 SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산, 또는 상기 SMN2 saRNA 또는 본 출원에서 기재된 바와 같은 SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 조성물 중 적어도 하나의 조합물을 세포에 투여하는 단계를 포함하는, 세포에서 전장 SMN 단백질의 양을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0128] [0109] 본 출원에서 제공된 실시 형태들 중 임의의 실시 형태에서, 이러한 SMN2 saRNA들, 본 개시 내용의 SMN2 saRNA들을 인코딩하는 핵산들, 또는 이러한 SMN2 saRNA들 또는 본 개시 내용의 SMN2 saRNA들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 조성물은 세포 내로 직접 도입될 수 있거나, SMN2 saRNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 세포, 바람직하게는 포유 동물 세포, 보다 바람직하게는 사람 세포 내로 도입할 때 세포내에서 생성될 수 있다. 이러한 세포들은 생체외, 예를 들어, 세포주들 등일 수 있거나, 사람들과 같은 포유 동물 신체들에 존재할 수 있다. 일부 실시 형태들에서, 상기 사람은 SMN 결핍 관련 병태를 앓고 있는 환자 또는 개체이다. 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산, 또는 전술한 saRNA 또는 본 발명의 SMN2 saRNA를 인코딩하는 핵산을 포함하는 조성물은 적어도 하나의 SMN2 mRNA 조절제를 포함하는 조성물과 조합하여 SMN 결핍 관련 병태의 치료를 초래하기에 충분한 각각의 양으로 투여된다. 하나의 실시 형태에서, 상기 SMN 결핍 관련 병태는 SMA이다. 하나의 실시 형태에서, 본 개시 내용의 SMA는 SMA 제I 형, SMA 제II 형, SMA 제III 형 및 SMA 제IV 형을 포함한다.

[0129] [0110] 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합은 개별적으로 사용되는 동일한 양의 각각의 물질의 투여에 의해 달성되는 양보다 더 큰 전장 SMN 단백질의 증가를 달성한다. 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합은 단일 요법에 의한 치료와 비교하여 감소된 독성 및/또는 감소된 원치 않는 부작용들을 갖는다. 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합은 개별적으로 사용되는 동일한 양의 각각의 물질에 의한 치료의 상가 효과보다 더 큰 전장 SMN 단백질의 증가를 달성한다. 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA 또는 SMN2 mRNA 조절제, 또는 둘 모두는 통상적인 단일 요법 치료에 사용될 양보다 적은 양으로 투여된다.

[0130] [0111] 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합은 개별적으로 사용되는 동일한 양의 각각의 물질의 효과와 비교하여 보다 큰 임상 개선을 달성한다. 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합은 개별적으로 사용되는 동일한 양의 각각의 물질의 효과와 비교하여 상가적 임상 개선 초과를 달성한다.

[0131] [0112] 특정 실시 형태들에서, 기준선 측정치는 본 출원에서 기재된 요법을 투여하기 전에 개체로부터 취득되는 본 출원에서 정의된 바와 같은 생물학적 샘플로부터 취득된다. 특정 실시 형태들에서, 상기 생물학적 샘플은 말초 혈액 단핵 세포, 혈장, 혈청, 피부 조직, 뇌척수액 (cerebrospinal fluid: CSF)이다. 특정 실시 형태들에서, 말초 혈액 단핵 세포들 및 피부 중의 SMN 단백질 수준들의 증가는 중추 신경계 (central nervous system: CNS)의 뉴런들 중의 것들과 상관 관계가 있으며, 이는 혈액 또는 피부 중의 이들 수준들의 변화가 CNS에서 SMN 단백질 수준들의 변화들을 결정하기 위해 비침습성 대용물로서 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. 추가의 실시 형태들에서, 본 출원에서 제공된 조합은 기준선 측정치와 비교하여 전장 SMN 단백질의 양을 적어도 15%까지, 적어도 20%까지, 적어도 25%까지, 적어도 30%까지, 적어도 35%까지, 적어도 40%까지, 적어도 45%까지, 적어도 50%까지, 적어도 55%까지, 적어도 60%까지, 적어도 65%까지, 적어도 70%까지, 적어도 75%까지, 적어도 80%까지, 적어도 85%까지, 적어도 90%까지, 적어도 95%까지, 적어도 100%까지, 적어도 110%까지, 적어도 115%까지, 적어도 120%까지, 적어도 125%까지, 적어도 130%까지, 적어도 135%까지, 적어도 140%까지, 적어도 145%까지, 적어도 150%까지, 적어도 155%까지, 적어도 160%까지, 적어도 165%까지, 적어도 170%까지, 적어도 175%까지, 적어도 180%까지, 적어도 185%까지, 적어도 190%까지, 적어도 195%까지, 적어도 200%까지, 적어도 210%까지, 적어도 215%까지, 적어도 220%까지, 적어도 225%까지, 적어도 230%까지, 적어도 235%까지, 적어도 240%까지, 적어도 245%까지, 적어도 250%까지, 적어도 255%까지, 적어도 260%까지, 적어도 265%까지, 적어도 270%까지, 적어도 275%까지, 적어도 280%까지, 적어도 285%까지, 적어도 290%까지, 적어도 295%까지, 적어도 300%까지, 적어도 310%까지, 적어도 315%까지, 적어도 320%까지, 적어도 325%까지, 적어도 330%까지, 적어도 335%까지, 적어도 340%까지, 적어도 345%까지, 적어도 350%까지, 적어도 355%까지, 적어도 360%까지, 적어도 365%까지, 적어도 370%까지, 적어도 375%까지, 적어도 380%까지, 적어도 385%까지, 적어도 390%까지, 적어도 395%까지, 적어도 400%까지 증가시킨다.

[0132] [0113] 본 개시 내용의 맥락에서, 상기 하나 이상의 SMN2 saRNA들과 상기 하나 이상의 SMN2 mRNA 조절제들의 "공동 투여"라는 용어는 동시에 (즉, 15 분 이내에, 30 분 이내에 또는 1 시간 이내에), 거의 동시에 (즉, 2 시간 이내에, 4 시간 이내에, 6 시간 이내에, 8 시간 이내에, 10 시간 이내에 또는 12 시간 이내에, 24 시간 이내

예) 이루어질 수 있거나, 시간에 있어서 수일 또는 수주, 예를 들어, 최대 4 주 또는 5 주까지 지연될 수 있다.

- [0133] [0114] 본 개시 내용의 맥락에서, 상기 하나 이상의 SMN2 saRNA들을 포함하는 조성물과 상기 하나 이상의 SMN2 mRNA 조절제들을 포함하는 조성물의 "공동 투여"라는 용어는 동시에 또는 동일한 시간에 (즉, 15 분 이내에, 30 분 이내에 또는 1 시간 이내에), 거의 동시에 또는 대략 동일한 시간에 (즉, 2 시간 이내에, 4 시간 이내에, 6 시간 이내에, 8 시간 이내에, 10 시간 이내에, 12 시간 이내에, 24 시간 이내에) 이루어질 수 있거나, 시간에 있어서 수일 또는 수주, 예를 들어, 최대 4 주 또는 5 주까지 지연될 수 있다.
- [0134] [0115] 본 개시 내용의 조성물들이 투여될 수 있는 투약량은 넓은 범위 내에서 다양할 수 있으며, 물론 각각의 경우에서 개별 요구 조건에 맞추어 질 것이다.
- [0135] [0116] 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA와 SMN2 mRNA 조절제의 조합은 SMN1 유전자에서의 불활성화 돌연 변이 또는 결실에 기인하고/하거나 SMN1 유전자 기능의 손실 또는 결함과 관련된 질환들의 치료, 예방, 진행 지연 및/또는 개선에서 및 추가적으로 질환의 병태 생리에 연루된 세포들의 보호에 대해, 특히, 척수 근육 위축증 (SMA)의 치료, 예방, 진행 지연 및/또는 개선에 대해 상가 효과 초과 또는 상승 효과를 나타낸다.
- [0136] [0117] 특정 실시 형태들에서, 본 개시 내용에 따른 약제학적 조성물의 1차 용량은 대상체가 생후 1 주 미만, 1 개월 미만, 3 개월 미만, 6 개월 미만, 1 세 미만, 2 세 미만, 15 세 미만 또는 15 세 초과일 때 투여된다.
- [0137] [0118] 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 saRNA를 포함하는 적어도 하나의 약제학적 조성물과 상기 SMN2 mRNA 조절제를 포함하는 적어도 하나의 다른 약제학적 조성물은 동시에, 거의 동시에 공동 투여되거나 상이한 시간에 공동 투여된다. 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 mRNA 조절제를 포함하는 약제학적 조성물과 상기 SMN2 saRNA를 포함하는 약제학적 조성물은 서로 1 시간 이내에, 서로 2 시간 이내에, 서로 3 시간 이내에, 서로 4 시간 이내에, 서로 5 시간 이내에, 서로 6 시간 이내에, 서로 7 시간 이내에, 서로 8 시간 이내에, 서로 9 시간 이내에, 서로 10 시간 이내에, 서로 11 시간 이내에, 서로 12 시간 이내에, 서로 1 일 이내에, 서로 2 일 이내에, 서로 3 일 이내에, 서로 4 일 이내에, 서로 5 일 이내에, 서로 6 일 이내에, 서로 1 주일 이내에, 서로 2 주일 이내에, 서로 3 주일 이내에, 서로 4 주일 이내에 또는 서로 5 주일 이내에 동시 투여된다. 상기 단일 용량은 SMN2 saRNA의 단일 용량일 수 있으며, 단일 0.1 내지 15 밀리그램 용량, 단일 1 밀리그램 용량, 단일 2 밀리그램 용량, 단일 3 밀리그램 용량, 단일 4 밀리그램 용량, 단일 5 밀리그램 용량, 단일 6 밀리그램 용량, 단일 7 밀리그램 용량, 단일 8 밀리그램 용량, 단일 9 밀리그램 용량, 단일 10 밀리그램 용량, 단일 11 밀리그램 용량, 단일 12 밀리그램 용량, 단일 13 밀리그램 용량, 단일 14 밀리그램 용량 또는 단일 15 밀리그램 용량일 수 있다. 상기 단일 용량은 SMN2 mRNA 조절제의 단일 용량일 수 있으며, 단일 0.1 내지 15 밀리그램 용량, 단일 1 밀리그램 용량, 단일 2 밀리그램 용량, 단일 3 밀리그램 용량, 단일 4 밀리그램 용량, 단일 5 밀리그램 용량, 단일 6 밀리그램 용량, 단일 7 밀리그램 용량, 단일 8 밀리그램 용량, 단일 9 밀리그램 용량, 단일 10 밀리그램 용량, 단일 11 밀리그램 용량, 단일 12 밀리그램 용량, 단일 13 밀리그램 용량, 단일 14 밀리그램 용량 또는 단일 15 밀리그램 용량일 수 있다.
- [0138] [0119] 특정 실시 형태들에서, 단일 4.8 밀리그램 용량의 SMN2 mRNA 조절제는 ASO이며, 요추 천자에 의해 경막 내 주사로서 투여된다. 특정 실시 형태들에서, 상기 SMN2 mRNA 조절제는 뉴시너젠이다. 특정 실시 형태들에서, 이는 단일 5.16 밀리그램 용량, 단일 5.40 밀리그램 용량, 단일 7.2 밀리그램 용량, 단일 7.74 밀리그램 용량, 단일 8.10 밀리그램 용량, 단일 9.6 밀리그램 용량, 단일 10.32 밀리그램 용량, 단일 10.80 밀리그램 용량, 단일 11.30 밀리그램 용량, 단일 12 밀리그램 용량, 단일 12.88 밀리그램 용량, 단일 13.5 밀리그램 용량, 단일 14.13 밀리그램 용량, 단일 10 밀리그램 용량, 단일 11 밀리그램 용량, 단일 12 밀리그램 용량, 단일 13 밀리그램 용량, 단일 14 밀리그램 용량, 단일 15 밀리그램 용량, 단일 16 밀리그램 용량, 단일 17 밀리그램 용량, 단일 18 밀리그램 용량, 단일 19 밀리그램 용량 또는 단일 20 밀리그램 용량일 수 있다.
- [0139] [0120] 특정 실시 형태들에서, SMN2 saRNA 및/또는 SMN2 mRNA의 용량이 요추 천자에 의해 경막내 주사로서 투여되는 경우, 보다 작은 게이지 바늘의 사용은 요추 천자 절차와 관련된 하나 이상의 증상들을 감소시키거나 개선시킬 수 있다. 특정 실시 형태들에서, 요추 천자와 관련된 증상들에는 요추 천자후 증후군, 두통, 요통, 발열, 변비, 오심, 구토 및 천자 부위 통증이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 특정 실시 형태들에서, 요추 천자를 위한 24 또는 25 게이지 바늘의 사용은 하나 이상의 요추 천자후 증후군을 감소시키거나 개선시킨다. 특정 실시 형태들에서, 요추 천자를 위한 21, 22, 23, 24 또는 25 게이지 바늘의 사용은 요추 천자후 증후군, 두통, 요통, 발열, 변비, 오심, 구토 및/또는 천자 부위 통증을 감소시키거나 개선시킨다.
- [0140] [0121] 제안된 투여 빈도는 근사치이며, 예를 들어, 특정 실시 형태들에서, 상기 제안된 투여 빈도가 1 일차에

서의 투여 및 29 일차에서의 2차 투여인 경우, SMA 환자는 1차 투여를 받은 후 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 또는 34 일에 2차 투여를 받을 수 있다. 특정 실시 형태들에서, 제안된 투여 빈도가 1 일차에서의 투여 및 15 일차에서의 2차 투여인 경우, SMA 환자는 1차 투여를 받은 후 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 일에 2차 투여를 받을 수 있다. 특정 실시 형태들에서, 제안된 투여 빈도가 1 일차에서의 투여 및 85 일차에서의 2차 투여인 경우, SMA 환자는 1차 투여를 받은 후 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 또는 90 일에 2차 투여를 받을 수 있다.

[0141] [0122] 특정 실시 형태들에서, 상기 주사 용량 및/또는 부피는 환자의 연령, 환자의 CSF 부피, 또는 환자의 연령 및/또는 추정 CSF 부피에 따라 조정될 것이다. (예를 들어, 그 전문이 본 출원에 참조로 포함되는 문헌 [Matsuzawa J, Matsui M, Konishi T, Noguchi K, Gur R C, Bilker W, Miyawaki T. Age-related volumetric changes of brain gray and white matter in healthy infants and children. Cereb Cortex 2001 April; 11(4):335-342] 참조).

[0142] 7. 실시예들

[0143] [0123] 본 발명은 하기 실시예들에 의해 추가로 예시된다. 이들 실시예들은 단지 예시 목적으로만 제공되며, 본 발명의 범위 또는 내용을 어떠한 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0144] 7.1. 실시예 1: GM03813 세포들에서 전장 및 엑손 7 도약 SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004), ASO (뉴시너센) 및 리스디플람의 효과

[0145] [0124] 세포 처리를 위한 saRNA (DS06-0004), 뉴시너센 (ASO-10-27) 및 리스디플람의 최적 농도를 결정하기 위해, saRNA 및 ASO를 다양한 농도들로 GM03813 세포들에 개별적으로 형질 감염시켰다. 리스디플람을 DMSO 중에 용해시키고, 배양된 GM03813 세포들에 다양한 농도들로 첨가하였다.

[0146] [0125] "GM03813 세포들"은 코리엘 의학 연구소 (Coriell Institute for Medical Research)에 의해 제공되는 섬유 아세포 세포들을 지칭한다. 이러한 세포주는 척수 근육 위축증 제II 형; 운동 뉴런 1의 SMA2 생존, 텔로머; SMN1로 기재된다. 관련 유전자는 SMN1이고; 염색체 위치는 5q12.2-q13.3이고, 대립 유전자 변이체는 엑손들 7 및 8 결실됨, 척수 근육 위축증 제I 형으로 기재되고; 확인된 돌연 변이는 EX7-8DEL이다. 다음 대상체의 피부 (팔)로부터 유래된 표현형 데이터는 다음과 같이 특징지어진다: 임상적으로 병에 걸림; 만기 단순 임신 후 출생; 생후 6 개월에 뒤집기; 생후 9 개월에 웅얼이 시작; 생후 12 개월에, 현저한 근육 위축과 쇠약이 나타남; 심건 반사 결여; 변비; 공여자 대상체는 3개 카피의 SMN2 유전자를 가짐; PCR 분석은 이러한 공여자 대상체가 SMN1 유전자에서 엑손들 7 및 8의 결실에 대해 동형 접합임을 나타냄; 유사하게 병에 걸린 형제 (리포지토리 (repository)에 없음); 어머니는 GM03814 (섬유 아세포)/GM24474 (iPSC)임; 아버지는 GM03815 (섬유 아세포)임; GM23240 (iPSC - 렌티바이러스) 및 GM24468 (iPSC - 에피솜) 참조; 이전에는 SMA I로 분류되었지만, 게놈 발단자의 발병 특징들 및 SMN2 투약량과 같은 데이터는 SMA II로의 재분류를 지원함.

[0147] [0126] 72 시간 후, 처리된 세포들로부터 전체 세포 RNA를 단리하고, cDNA로 역전사시켰다. SMN2FL 또는 SMN2 Δ7에 대해 특이적인 프라이머 쌍들을 사용하여 RT-qPCR로 SMN2 mRNA 발현을 평가하였다. SMN2FL과 SMN2 Δ7 둘 다를 증폭시킨 후 DdeI 분해 (PCR/분해)하는 프라이머 쌍을 사용하여 반정량적 RT-PCR에 의해 SMN2 mRNA 발현을 또한 평가하였다. PCR은 2 개의 산물 밴드들을 생성하였다: 507 bp (SMN2FL) 및 453 bp (SMN2 Δ7). 분해 후, 두 밴드들 모두는 115 bp까지 감소하여 2 개의 산물들을 생성하였다: 도 3d의 겔 상에 도시된 바와 같은 392 bp (SMN2FL) 및 338 bp (SMN2 Δ7). 도 3a-3d는 각각 RT-qPCR 및 PCR/분해에 의해 평가된 SMN2FL 및 SMN2 Δ7 mRNA의 용량 의존적 변화들을 도시한 것이다. 도 3e-3g는 도 3d에서의 밴드들의 강도를 정량화한 데이터의 그래프 플롯들이다.

[0148] [0127] 도 3a에서 도시된 바와 같이, 1 nM의 ASO-10-27 처리는 SMN2FL을 1.5 배까지 증가시키고 5 nM에서 SMN2 Δ7의 동시 감소와 함께 2.0 배의 피크 증가를 유발한 반면, 보다 높은 용량들은 SMN2FL의 추가 유도 또는 SMN2 Δ7의 감소를 유발하지 않았다. 유사하게, PCR/분해 분석은 세포들이 10 nM의 ASO로 처리되었을 때 SMN2FL의 발현이 피크에 도달하고, SMN2 Δ7의 발현이 5 nM에서 거의 가장 낮은 값에 접근하였다는 것을 나타낸다 (도 3e). 100 nM 및 1000 nM의 리스디플람 처리는 SMN2FL의 mRNA 수준을 1.2 배 및 1.8 배까지 증가시키고, SMN2 Δ7을 각각 36% 및 98%까지 감소시켰다 (도 3c 및 3g). ASO-10-27 및 리스디플람을 포함하는 SMN2 mRNA 조절제들은 보다 많은 엑손 7을 포함하도록 SMN2 스플라이싱을 조절하여 SMN2FL mRNA를 증가시키기 때문에, 이들이 유도할 수 있는 SMN2FL의 최대량은 SMN2 mRNA 조절제들에 의해 변경되지 않는 SMN2 pre-mRNA의 이용 가능한 양에 좌우된다. 이러한 견해와 일치하게, 데이터는 ASO-10-27 및 리스디플람에 의한 스플라이싱 조절제 유발 SMN2FL 증

가 (약 2 배의 최대 증가)에 대한 천장 효과를 나타낸다.

- [0149] [0128] 대조적으로, saRNA (DS06-0004)는 SMN2FL과 SMN2Δ7 둘 다의 발현을 SMN2 mRNA 조절제들보다 더 높은 수준까지 1 nM 내지 50 nM 범위의 농도들에서 용량 의존적 방식으로 유도하였으며, 가장 높은 배수 변화는 각각 2.9 배 및 2.7 배이다. 100 nM의 DS06-0004는 SMN2 mRNA 발현을 추가로 증가시키지 않았다 (도 3b 및 3f). PCR/분해 분석에 의해 일관된 결과를 획득하였다 (도 3d 및 도 3f).
- [0150] [0129] SMN2Δ7 수준들을 전환 (감소)시켜 SMN2FL의 수준들을 증가시킨 SMN2 mRNA 조절제들 (ASO-10-27 및 리스디플람)과 달리, 본 개시 내용의 SMN2 saRNA들은 SMN2 전사에 작용하여 SMN2 mRNA 수준들을 증가시킴으로써 SMN2FL과 SMN2Δ7 둘 다의 동시 증가를 초래하였다. 도 3에 나타난 데이터는 SMN2 mRNA 조절제들과 SMN2 saRNA들 사이의 기계론적 차이들을 명확하게 입증한다.
- [0151] 7.2. 실시예 2: GM00232 세포들에서 전장 및 엑손 7 도약 SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 ASO-10-27의 조합 효과
- [0152] [0130] saRNA (DS06-0004)와 ASO-10-27의 조합이 제I 형 SMA 세포들에서 SMN2FL 유도에 대해 증진 효과를 갖는지 여부를 결정하기 위해, GM00232 세포들을 DS06-0004 및 ASO-10-27 단독 또는 조합으로 72 시간 동안 다양한 농도들에서 형질 감염시켰다. 상기 처리된 세포들에서 SMN2 발현을 RT-qPCR (도 4a 및 4d) 및 PCR/분해 (도 4b, 4c 및 4e)에 의해 평가하였다.
- [0153] [0131] "GM00232 세포들"은 코리엘 의학 연구소 (Coriell Institute for Medical Research)에 의해 제공되는 섬유 아세포 세포들을 지칭한다. 이러한 세포주는 척수 근육 위축증 I; SMA1로 기재된다. 공여자 대상체는 2개 카피의 SMN2 유전자 (문헌 [Stabley et al. 2015, PMID 26247043]을 포함하는 여러 출처들로부터의 데이터)를 가지고 있으며, SMN1 유전자의 엑손들 7 및 8의 결실에 대해 동형 접합이다. 관련 유전자는 SMN1이고; 염색체 위치는 5q12.2-q13.3이고, 대립 유전자 변이체는 엑손들 7 및 8 결실됨; 척수 근육 위축증 제I 형으로 기재되고; 확인된 돌연 변이는 EX7-8DEL이다. 다음 대상체의 피부 (팔)로부터 유래된 표현형 데이터는 다음과 같이 특징지어진다: 진행성 근육 위축증; 심진 반사 결여; 비정상적인 EMG; 공여자 대상체는 2개 카피의 SMN2 유전자 (문헌 [Stabley et al. 2015, PMID 26247043]을 포함하는 여러 출처들로부터의 데이터)를 가지고 있으며, SMN1 유전자의 엑손들 7 및 8의 결실에 대해 동형 접합임.
- [0154] [0132] 도 4a에 도시된 바와 같이, 1 nM, 5 nM 및 25 nM의 ASO-10-27은 SMN2Δ7의 동시 감소와 함께 각각 SMN2FL의 1.3 배, 1.8 배 및 1.9 배 증가를 유발하였다. 1 nM, 5 nM 및 25 nM의 DS06-0004는 SMN2FL을 각각 1.7, 2.4 및 2.4 배까지 증가시키고, SMN2Δ7을 각각 1.5, 1.9 및 2.1 배까지 증가시켰다.
- [0155] [0133] 1 nM의 ASO-10-27이 세포 형질 감염에서 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합되었을 때, SMN2FL은 각각 2.2 배, 2.6 배 및 2.9 배까지 유도된 반면, SMN2Δ7은 각각 1.1 배, 0.7 배 및 0.4 배까지 변화시켰다. 추가로, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 5 nM의 ASO-10-27에 의한 세포들의 처리는 SMN2FL을 각각 2.8 배, 3.4 배 및 3.7 배까지 유도하고, SMN2Δ7을 각각 0.09 배, 0.05 배 및 0.04 배까지 변화시켰다. 더욱이, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 25 nM의 ASO-10-27에 의한 세포들의 처리는 SMN2FL을 각각 3.1 배, 4.0 배 및 4.0 배까지 유도하고, SMN2Δ7 발현을 완전히 제거하였다. SMN2FL을 1.9 배까지 유도한 25 nM ASO-10-27 단독 처리와 비교하여, ASO-10-27과 DS06-0004의 조합 치료는 SMN2FL을 4 배까지 증가시켰는데, 이는 단독으로 사용될 때의 ASO-10-27의 효과의 2 배이다.
- [0156] [0134] 도 4a에 제시된 RT-qPCR 결과를 PCR/DdeI 분해에 의해 추가로 입증하였다. RT-qPCR 결과와 일치하게, ASO-10-27 단독은 25 nM에서 SMN2FL mRNA의 2.3 배 증가를 유발하고, ASO-10-27 (25 nM)과 DS06-0004 (25 nM)의 조합은 SMN2FL의 최고 유도 (4.1 배) 및 SMN2Δ7의 동시 감소 (0.14 배)를 유발하였다 (도 4b, 4c 및 4e).
- [0157] [0135] 종합하면, 도 4에 제시된 데이터는 saRNA DS06-0004 단독이 SMN2 mRNA 발현, 특히, 2개 카피의 SMN2 유전자를 갖는 제I 형 SMA 세포들에서 SMN2FL의 발현을 유도하는데 있어서 강력한 활성을 가졌다는 것을 입증한다. SMN2 saRNA가 ASO-10-27과 조합되었을 때, SMN2FL의 최대 유도가 달성될 수 있었다.
- [0158] 7.3. 실시예 3: GM00232 세포들에서 SMN 단백질 수준들에 대한 saRNA (DS06-0004)와 ASO-10-27의 조합 효과
- [0159] [0136] SMN2 유전자 발현에 대한 ASO-10-27 및 DS06-0004 단독 또는 조합의 효과를 추가로 입증하기 위해, 형질 감염된 GM00232 세포들에서 개별적으로 또는 ASO-10-27 및 DS06-0004와 조합하여 웨스턴 블롯팅 검정들을 수행하였다. 도 5a 및 5c에 도시된 바와 같이, 1 nM, 5 nM 및 25 nM의 ASO-10-27은 각각 SMN 단백질의 1.4 배,

2.3 배 및 2.9 배 증가를 유발하였다. 1 nM, 5 nM 및 25 nM의 DS06-0004는 SMN2FL을 각각 1.2, 1.3 및 1.7 배까지 증가시켰다 (도 5b 및 5c). 35 kDa의 예상 크기를 갖는 단백질 밴드들은 전장 SMN 단백질 (도 5a 및 5b)인 반면, SMN Δ 7 단백질은 신속하게 분해되기 때문에 웨스턴 블롯 상에 나타나지 않는다 (문헌 [Le, T. T., et al. SMN Δ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Human Mol Genet* (2005)]).

[0160] [0137] 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 1 nM의 ASO-10-27에 의한 세포들의 처리는 SMN 단백질을 각각 2.4 배, 2.6 배 및 2.9 배까지 유도하였다 (도 5a~5c, 도 5a 및 5b는 조합 치료들의 중복을 포함함).

[0161] [0138] 추가로, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 5 nM의 ASO-10-27에 의한 세포들의 처리는 SMN 단백질을 각각 3.1 배, 3.0 배 및 3.3 배까지 유도하였다 (도 5a~5c, 도 5a 및 5b는 조합 치료들의 중복을 포함함).

[0162] [0139] 더욱이, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 25 nM의 ASO-10-27에 의한 세포들의 처리는 SMN 단백질을 각각 3.1 배, 3.3 배 및 2.6 배까지 유도하였다 (도 5a~5c, 도 5a 및 5b는 조합 치료들의 중복을 포함함).

[0163] [0140] 종합하면, 이들 데이터는 ASO-10-27과 DS06-0004의 조합이 개별적으로 사용되는 것들 중 어느 하나보다 더 높은 수준들의 SMN 단백질을 유도할 수 있다는 것을 확인시켜 준다.

[0164] 7.4. 실시예 4: GM03813 세포들에서 전장 및 엑손 7 도약 SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 ASO-10-27의 조합 효과

[0165] [0141] saRNA (DS06-0004)와 ASO-10-27의 조합이 제II 형 SMA 세포들에서 SMN2FL 유도에 대해 증진 효과를 갖는지 여부를 결정하기 위해, GM03813 세포들을 DS06-0004 및 ASO-10-27 단독 또는 조합으로 72 시간 동안 다양한 농도들에서 형질 감염시키고, RT-qPCR (도 6a 및 6d) 및 PCR/분해 (도 6b, 6c 및 6e)에 의해 상기 처리된 세포들에서 SMN2 발현을 평가하였다. 도 6a 및 6d에 도시된 바와 같이, 1 nM, 5 nM 및 25 nM의 ASO-10-27은 SMN2 Δ 7의 동시 감소와 함께 각각 SMN2FL의 1.2 배, 2.1 배 및 2.1 배 증가를 유발하였다. 1 nM, 5 nM 및 25 nM의 DS06-0004는 SMN2FL을 각각 2.1, 2.6 및 2.2 배까지, SMN2 Δ 7을 각각 2.5, 2.5 및 2.1 배까지 증가시켰다.

[0166] [0142] 도 6a 및 6d에 도시된 바와 같이, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 1 nM의 ASO-10-27에 의한 세포들의 처리는 SMN2FL을 각각 2.6 배, 2.8 배 및 3.0 배까지, SMN2 Δ 7을 각각 1.7 배, 1.4 배 및 0.8 배까지 유도하였다. 추가로, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 5 nM의 ASO-10-27에 의한 세포들의 처리는 SMN2FL을 각각 3.3 배, 4.2 배 및 4.8 배까지, SMN2 Δ 7을 각각 0.2 배, 0.2 배 및 0.1 배까지 유도하였다. 더욱이, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 25 nM의 ASO-10-27에 의한 세포들의 처리는 SMN2FL을 각각 3.8 배, 4.7 배 및 4.0 배까지 유도하고, SMN2 Δ 7 발현을 완전히 제거하였다. SMN2FL을 2.1 배까지 유도한 25 nM ASO-10-27 단독 처리와 비교하여, ASO-10-27과 DS06-0004에 의한 조합 치료는 SMN2FL을 4.7 배까지 증가시켰는데, 이는 단독으로 사용될 때의 ASO-10-27의 효과의 2 배 초과이다.

[0167] [0143] 도 6a에 제시된 RT-qPCR 결과를 반정량적 RT-PCR에 이어서 DdeI 분해에 의해 추가로 입증하였다. RT-qPCR 결과와 일치하게, ASO-10-27 단독은 25 nM에서 SMN2FL mRNA의 2.1 배 증가를 유발하고, ASO-10-27 (25 nM)과 DS06-0004 (5 nM)의 조합은 SMN2FL의 최고 유도 (2.7 배) 및 SMN2 Δ 7의 동시 감소 (0.18 배)를 유발하였다 (도 6b, 6c 및 6e).

[0168] [0144] 종합하면, 도 6에 제시된 데이터는 SMN2 saRNA DS06-0004 단독이 SMN2 mRNA 발현, 특히, 3개 카피의 SMN2 유전자를 갖는 제II 형 SMA 세포들에서 SMN2FL의 발현을 유도하는데 있어서 강력한 활성을 가졌다는 것을 입증한다. SMN2 saRNA가 ASO-10-27과 조합되었을 때, SMN2FL의 최대 유도가 달성되었다. 이러한 데이터는 ASO-10-27과 DS06-0004의 조합이 개별적으로 각각의 제제에 의한 처리에 의해 유도된 동일한 제II 형 SMA 세포들 (GM03813 세포들)에서의 SMN 단백질의 수준들과 비교하여 제II 형 SMA 세포들 (GM03813 세포들)에서 보다 높은 수준의 SMN 단백질을 유도한다는 것을 확인시켜 준다. 이러한 데이터는 또한 미처리된 GM03813 세포들의 집단과 비교하여 본 개시 내용에 따른 조합으로 처리된 세포들에서 유도된 SMN 단백질의 수준을 확립시켜 준다. 본 출원에서 기재된 바와 같이, GM03813 세포들은 2개 카피의 SMN2를 가지며, SMA에 대한 모델로서 이용된다.

- [0169] 7.5. 실시예 5: GM03813 세포들에서 SMN 단백질 수준들에 대한 saRNA (DS06-0004)와 ASO-10-27의 조합 효과
- [0170] [0145] SMN2 유전자 발현에 대한 ASO-10-27 및 DS06-0004 단독 또는 조합의 효과를 추가로 입증하기 위해, 형질 감염된 GM03813 세포들에서 개별적으로 또는 ASO-10-27 및 DS06-0004와 조합하여 웨스턴 블롯팅 검정들을 수행하였다. 도 7a 및 7c에 도시된 바와 같이, 1 nM, 5 nM 및 25 nM의 ASO-10-27은 각각 SMN 단백질의 1.2 배, 1.5 배 및 1.9 배 증가를 유발하였다. 1 nM, 5 nM 및 25 nM의 DS06-0004는 SMN2FL을 각각 1.5 배, 1.5 배 및 1.6 배까지 증가시켰다 (도 7b 및 7c).
- [0171] [0146] 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 1 nM의 ASO-10-27에 의한 세포들의 처리는 SMN 단백질을 각각 1.4 배, 1.6 배 및 1.8 배까지 유도하였다 (도 7a~7c, 도 7a 및 7b는 조합 치료들의 중복을 포함함).
- [0172] [0147] 추가로, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 5 nM의 ASO-10-27에 의한 세포들의 처리는 SMN 단백질을 각각 2.0 배, 2.2 배 및 2.4 배까지 증가시켰다 (도 7a~7c, 도 7a 및 7b는 조합 치료들의 중복을 포함함).
- [0173] [0148] 더욱이, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 25 nM의 ASO-10-27에 의한 세포들의 처리는 SMN 단백질을 각각 2.2 배, 2.9 배 및 2.8 배까지 증가시켰다 (도 7a~7c, 도 7a 및 7b는 조합 치료들의 중복을 포함함).
- [0174] [0149] 종합하면, 이러한 데이터는 ASO-10-27과 DS06-0004의 조합이 제II 형 SMA 세포들에서 보다 높은 수준의 SMN 단백질을 유도한다는 것을 확인시켜 준다. 이러한 데이터는 ASO-10-27과 DS06-0004의 조합이 개별적으로 각각의 제제에 의한 처리에 의해 유도된 동일한 제II 형 SMA 세포들 (GM03813 세포들)에서의 SMN 단백질의 수준들과 비교하여 제II 형 SMA 세포들 (GM03813 세포들)에서 보다 높은 수준의 SMN 단백질을 유도한다는 것을 확인시켜 준다. 이러한 데이터는 또한 미처리된 GM03813 세포들의 집단과 비교하여 본 개시 내용에 따른 조합으로 처리된 세포들에서 유도된 SMN 단백질의 수준을 확립시켜 준다. 본 출원에서 기재된 바와 같이, GM03813 세포들은 2개 카피의 SMN2를 가지며, SMA에 대한 모델로서 이용된다.
- [0175] 7.6. 실시예 6: 제I 형 SMA GM00232 세포들에서 전장 및 엑손 7 도약 SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 리스디플람의 조합 효과
- [0176] [0150] SMN2 saRNA와 소분자 SMN2 saRNA 조절제 리스디플람의 조합이 제I 형 SMA 세포들에서 SMN2FL 유도에 대해 증진 효과를 갖는지 여부를 결정하기 위해, GM00232 세포들을 DS06-0004 및 리스디플람으로 개별적으로 또는 조합으로 72 시간 동안 다양한 농도들에서 처리하였다. 상기 처리된 세포들에서 SMN2 mRNA 발현을 RT-qPCR (도 8a~8c) 및 PCR/분해 (도 8d~8f)에 의해 평가하였다. 도 8a~8c에 도시된 바와 같이, 50 nM, 250 nM 및 1250 nM의 리스디플람은 SMN2Δ7의 동시 감소와 함께 각각 SMN2FL의 1.2 배, 1.8 배 및 1.9 배 증가를 유발하였다. 1 nM, 5 nM 및 25 nM의 DS06-0004는 SMN2FL을 각각 1.8 배, 2.1 배 및 2.0 배까지 증가시키고, SMN2Δ7을 각각 1.6 배, 1.6 배 및 1.7 배까지 증가시켰다.
- [0177] [0151] 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 50 nM의 리스디플람에 의한 세포들의 처리는 SMN2FL을 각각 2.2 배, 2.6 배 및 2.5 배까지 증가시키고, SMN2Δ7을 각각 1.3 배, 1.3 배 및 1.2 배까지 증가시켰다. 추가로, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 250 nM의 리스디플람에 의한 세포들의 처리는 SMN2FL을 각각 3.0 배, 3.4 배 및 3.4 배까지 증가시키고, SMN2Δ7을 각각 0.3 배, 0.3 배 및 0.3 배까지 변화시켰다. 더욱이, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 1250 nM의 리스디플람에 의한 세포들의 처리는 SMN2FL을 각각 3.6 배, 3.9 배 및 4.0 배까지 증가시키고, SMN2Δ7 발현을 완전히 제거하였다. SMN2FL을 1.9 배까지 유도한 1250 nM 리스디플람 단독 처리와 비교하여, 리스디플람과 DS06-0004에 의한 조합 치료는 SMN2FL을 4 배까지 증가시켰는데, 이는 단독으로 사용될 때의 리스디플람의 효과의 2 배 초과이다.
- [0178] [0152] 도 8a에 제시된 RT-qPCR 결과를 PCR/DdeI 분해에 의해 추가로 입증하였다. RT-qPCR 결과와 일치하게, 리스디플람 단독은 1250 nM에서 SMN2FL mRNA의 2.3 배 증가를 유발하고, 리스디플람 (1250 nM)과 DS06-0004 (1 nM)의 조합은 SMN2FL의 최대 관찰 유도 (3.2 배)를 유발하였다 (도 8d~8f).
- [0179] [0153] 종합하면, 도 8에 제시된 데이터는 saRNA DS06-0004 단독이 SMN2 mRNA 발현, 특히, 제I 형 SMA 세포들에서 SMN2FL 발현을 유도하는데 있어서 강력한 활성을 갖는다는 것을 입증한다. SMN2 saRNA가 리스디플람과 조합되었을 때, SMN2FL의 최대 유도가 달성되었다.

- [0180] **7.7. 실시예 7: GM00232 세포들에서 SMN 단백질 수준들에 대한 saRNA (DS06-0004)와 리스디플람의 조합 효과**
- [0181] [0154] 제I 형 SMA 세포들 GM00232에서 SMN2 유전자 발현에 대한 리스디플람 및 DS06-0004 단독 또는 조합의 효과를 추가로 입증하기 위해, 리스디플람 단독 및 saRNA DS06-0004와의 조합으로 형질 감염된 GM00232 세포들에서 웨스턴 블롯팅 검정들을 수행하였다. 도 9a 및 9b에 도시된 바와 같이, 50 nM, 250 nM 및 1250 nM의 리스디플람은 각각 SMN 단백질의 1.7 배, 1.9 배 및 2.6 배 증가를 유발하였다.
- [0182] [0155] 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 50 nM의 리스디플람에 의한 세포들의 처리는 SMN 단백질을 각각 2.3 배, 2.9 배 및 3.3 배까지 유도하였다 (도 9a 및 9b).
- [0183] [0156] 추가로, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 250 nM의 리스디플람에 의한 세포들의 처리는 SMN 단백질을 각각 2.6 배, 2.9 배 및 2.7 배까지 유도하였다 (도 9a 및 9b).
- [0184] [0157] 더욱이, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 1250 nM의 리스디플람에 의한 세포들의 처리는 SMN 단백질을 각각 2.4 배, 2.7 배 및 2.7 배까지 유도하였다 (도 9a 및 9b).
- [0185] [0158] 종합하면, 이들 데이터는 SMN2 발현을 증가시키는데 있어서의 saRNA와 리스디플람의 조합 효과가 단백질 수준에서 입증될 수 있다는 것을 확인시켜 준다.
- [0186] **7.8. 실시예 8: 제II 형 SMA GM03813 세포들에서 전장 및 엑손 7 도약 SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA (DS06-0004)와 리스디플람의 조합 효과**
- [0187] [0159] saRNA와 리스디플람의 조합이 제II 형 SMA 세포들에서 SMN2FL 유도에 대해 증진 효과를 갖는지 여부를 결정하기 위해, GM03813 세포들을 DS06-0004 및 리스디플람 단독 또는 조합으로 72 시간 동안 다양한 농도들에서 형질 감염시키고, RT-qPCR (도 10a~10c) 및 PCR/분해 (도 10d~10f)에 의해 상기 처리된 세포들에서 SMN2 mRNA 발현을 평가하였다. 도 10a~10c에 도시된 바와 같이, 50 nM, 250 nM 및 1250 nM의 리스디플람은 SMN2Δ7의 동시 감소와 함께 각각 SMN2FL의 1.0 배, 1.4 배 및 2.1 배 증가를 유발하였다. 1 nM, 5 nM 및 25 nM의 DS06-0004는 SMN2FL을 각각 1.7 배, 2.2 배 및 2.3 배까지 증가시키고, SMN2Δ7을 각각 1.8 배, 2.3 배 및 2.3 배까지 증가시켰다.
- [0188] [0160] 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 50 nM의 리스디플람에 의한 세포들의 처리는 SMN2FL을 각각 1.9 배, 2.5 배 및 2.3 배까지, SMN2Δ7을 각각 1.2 배, 1.7 배 및 1.4 배까지 유도하였다. 추가로, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 250 nM의 리스디플람에 의한 세포들의 처리는 SMN2FL을 각각 2.5 배, 3.1 배 및 3.4 배까지, SMN2Δ7을 각각 0.4 배, 0.6 배 및 0.6 배까지 유도하였다. 더욱이, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 1250 nM의 리스디플람에 의한 세포들의 처리는 SMN2FL을 각각 3.2 배, 3.6 배 및 3.3 배까지 유도하고, SMN2Δ7 발현을 완전히 제거하였다. SMN2FL을 2.1 배까지 유도한 1250 nM 리스디플람 단독 처리와 비교하여, 리스디플람과 DS06-0004에 의한 조합 치료는 SMN2FL을 3.6 배까지 증가시켰는데, 이는 단독으로 사용될 때의 리스디플람의 효과의 거의 2 배이다.
- [0189] [0161] 도 10a에 제시된 RT-qPCR 결과를 PCR/DdeI 분해에 의해 추가로 입증하였다. RT-qPCR 결과와 일치하게, 리스디플람 단독은 1250 nM에서 SMN2FL mRNA의 2.1 배 증가를 유발하고, 리스디플람 (1250 nM)과 DS06-0004 (25 nM)의 조합은 SMN2FL의 최고 유도 (3.8 배)를 유발하였다 (도 10d~10f).
- [0190] [0162] 종합하면, 도 10에 제시된 데이터는 saRNA DS06-0004 단독이 SMN2 mRNA 발현, 특히, 제II 형 SMA 세포들에서 SMN2FL을 유도하는데 있어서 강력한 활성을 갖는다는 것을 입증한다. SMN2 saRNA가 리스디플람과 조합되었을 때, SMN2FL의 최대 관찰 증가가 달성될 수 있었다.
- [0191] **7.9. 실시예 9: 제II 형 SMA GM03813 세포들에서 SMN 단백질 수준들에 대한 saRNA (DS06-0004)와 리스디플람의 조합 효과**
- [0192] [0163] 제II 형 SMA 세포들 GM03813에서 SMN2 유전자 발현에 대한 리스디플람 및 DS06-0004 단독 또는 조합의 효과를 추가로 입증하기 위해, 리스디플람 및 DS06-0004 단독 또는 조합으로 처리된 GM03813 세포들에서 웨스턴 블롯팅 검정들을 수행하였다. 도 11a 및 11b에 도시된 바와 같이, 50 nM 및 250 nM의 리스디플람은 각각 SMN 단백질의 1.1 배 및 1.7 배 증가를 유발하였다.
- [0193] [0164] 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 50 nM의 리스디플람에 의한 세포들의 처리는 SMN 단백질을 각각 1.3 배, 1.4 배 및 1.8 배까지 유도하였다 (도 11a 및 11b).

- [0194] [0165] 추가로, 증가하는 농도들 (1 nM, 5 nM 및 25 nM)의 DS06-0004와 조합된 250 nM의 리스디플람에 의한 세포들의 처리는 SMN 단백질들을 각각 2.1 배, 2.3 배 및 2.0 배까지 유도하였다 (도 11a 및 11b).
- [0195] [0166] 종합하면, 이러한 데이터는 SMN2 발현을 유도하는데 있어서의 saRNA와 리스디플람의 조합 효과가 단백질 수준에서 입증될 수 있었다는 것을 확인시켜 준다.
- [0196] **7.10. 실시예 10: GM03813 세포들에서 전장 및 엑손 7 도약 SMN2 mRNA의 발현에 대한 saRNA들 (DS06-0031 및 DS06-0067)과 ASO-10-27의 조합 효과**
- [0197] [0167] 추정상 전사 커플링된 스플라이싱 조절 기전으로 인해 제II 형 SMA 세포들에서 SMN2FL mRNA 발현보다 더 많은 SMN2Δ7 발현을 유도한 ASO-10-27과 2개의 saRNA들 (DS06-0031 및 DS06-0067)의 조합 효과들을 결정하기 위해 (도 12a 및 12b), GM03813 세포들을 DS06-0031 또는 DS06-0067 및 ASO-10-27 단독 또는 조합으로 10 nM에서 72 시간 동안 형질 감염시켰다. 상기 처리된 세포들에서 SMN2 발현을 RT-qPCR (도 12a) 및 반정량적 RT-PCR (도 12b 및 12c)에 의해 평가하였다. 도 12a에 도시된 바와 같이, 10 nM의 DS06-0031 및 DS06-0067은 SMN2FL을 각각 0.9 배 및 1.3 배까지, SMN2Δ7을 각각 1.9 배 및 2.4 배까지 변화시킨 반면, ASO-10-27은 SMN2FL 및 SMN2Δ7을 각각 1.4 배 및 0.3 배까지 변화시켰다.
- [0198] [0168] DS06-0031 또는 DS06-0067이 세포 형질 감염에서 10 nM로 ASO-10-27과 조합되었을 때, SMN2FL은 2.0 배 및 3.2 배까지 유도되고, SMN2Δ7은 각각 0.3 배 및 0.05 배까지 감소되었다.
- [0199] [0169] 도 12a에 제시된 RT-qPCR 결과를 반정량적 RT-PCR에 의해 추가로 입증하였다. RT-qPCR 결과와 일치하게, ASO-10-27 단독은 10 nM에서 SMN2FL mRNA의 1.4 배 증가를 유발하고, DS06-0031 및 DS06-0067과의 조합은 SMN2FL의 1.8 배 및 2.3 배 증가, 및 0.3 배 및 0.02 배까지의 SMN2Δ7의 동시 감소를 유발하였다 (도 12b 및 12c).
- [0200] [0170] 더욱이, SMN 단백질 수준들을 웨스턴 블롯팅 검정에 의해 평가하였다. SMN2FL 발현과 일관되게, DS06-0031 및 DS06-0067의 존재하에, ASO-10-27은 단독으로 사용될 때의 2.3 배 증가와 비교하여 SMN 단백질 수준들의 3.6 배 및 3.3 배 증가를 유발하였다 (도 12d 및 12e).
- [0201] [0171] 종합하면, 도 12에 제시된 데이터는 saRNA들 (DS06-0031 및 DS06-0067) 단독이 SMN2 발현, 특히, SMN2Δ7을 유도하는데 있어서 강력한 활성을 가졌다는 것을 입증한다. 이들이 ASO-10-27과 조합되었을 때, SMN2FL의 최대 유도 및 SMN2Δ7의 감소가 달성될 수 있었다. 이러한 데이터는 또한 특정 saRNA들에 의해 유도된 pre-mRNA의 전사 활성화 및 후속적인 증가가 주로 SMN2Δ7의 증가에 의해 반영되지만, pre-mRNA의 증가가 엑손 7 포함에 대한 추가의 기질들과 함께 SMN2 mRNA 조절제들, 예를 들어, ASO들을 공급함으로써 보다 증진된 SMN2FL mRNA 및 단백질 발현을 초래한다는 것을 시사한다.
- [0202] **7.11. 실시예 11: SMA 제III 형 마우스들에서 SMN2FL 및 SMN2Δ7의 발현에 대한 saRNA (LNP-R6-04M1)와 LNP-ASO-10-27 또는 리스디플람의 조합 효과**
- [0203] [0172] LNP-R6-04M1과 LNP-ASO-10-27 또는 리스디플람의 조합 효과를 생체 내에서, SMA 제III 형 마우스들에서 평가하였다. 신생 마우스들을 10 개의 처리 그룹으로 나누었다:
- [0204] [0173] 처리 그룹 1: ICV 주사를 통한 LNP-R6-04M1의 투여 (P1 및 P3에 각각 2 회 주사됨, 각각은 10 ug의 LNP-R6-04M1을 포함함);
- [0205] [0174] 처리 그룹 2: ICV 주사를 통한 LNP-ASO-10-27의 투여 (P1 및 P3에 각각 2 회 주사됨, 각각은 10 ug의 LNP-ASO-10-27을 포함함);
- [0206] [0175] 처리 그룹 3: 0.3 mg/kg의 농도로 P1에 IP 주사를 통한 리스디플람의 투여;
- [0207] [0176] 처리 그룹 4: 1 mg/kg의 농도로 P1에 IP 주사를 통한 리스디플람의 투여;
- [0208] [0177] 처리 그룹 5: 3 mg/kg의 농도로 P1에 IP 주사를 통한 리스디플람의 투여;
- [0209] [0178] 처리 그룹 6: LNP-R6-04M1과 LNP-ASO-10-27의 투여를 통한 조합 치료. LNP-R6-04M1은 P1 (10 ug)에 ICV 주사를 통해 투여된 반면, LNP-ASO-10-27은 P3 (10 ug)에 ICV 주사를 통해 투여되었다.
- [0210] [0179] 처리 그룹 7: LNP-ASO-10-27과 LNP-R6-04M1의 투여를 통한 조합 치료. LNP-ASO-10-27은 P1 (10 ug)에 ICV 주사를 통해 투여된 반면, LNP-R6-04M1은 P3 (10 ug)에 ICV 주사를 통해 투여되었다.

- [0211] [0180]
- [0212] [0181] 처리 그룹 8: LNP-R6-04M1과 리스디플람의 조합 치료. LNP-R6-04M1은 ICV 주사를 통해 P1 (10 ug)에 주사되고, 리스디플람은 0.3 mg/kg의 농도로 P3에 IP 주사를 통해 주사되었다.
- [0213] [0182] 처리 그룹 9: LNP-R6-04M1과 리스디플람의 조합 치료. LNP-R6-04M1은 ICV 주사를 통해 P1 (10 ug)에 주사되고, 리스디플람은 1 mg/kg의 농도로 P3에 IP 주사를 통해 주사되었다.
- [0214] [0183] SMA 제III 형 마우스들을 피하 (SC) 주사를 통해 P1 (5 μ L) 및 P3 (5 μ L)에 식염수로 2 회 처리하였다. P1 및 P3은 생후 1 일차 및 3 일차를 의미한다.
- [0215] [0184] 처리 그룹 10: 식염수에 의한 마우스의 처리, 뇌, 간 및 척수의 조직들에서 SMN2FL 및 SMN2 Δ 7 mRNA 수준들을 RT-qPCR에 의해 정량화하였다.
- [0216] P1 및 P3은 생후 1 일차 및 3 일차를 의미한다.
- [0217] **결과**
- [0218] [0185] 도 13a에 도시된 바와 같이, LNP-R6-04M1 (처리 그룹 1)은 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 뇌에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현에 대한 증가를 1.2 배까지 유도하고, 뇌에서 SMN2FL mRNA의 발현을 상향 조절하지 않았다. LNP-ASO-10-27 (처리 그룹 2)은 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 뇌에서 SMN2FL mRNA 발현에 대한 증가를 1.6 배까지 유도하고, 뇌에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현에 대한 감소를 0.7 배까지 유도하였다. 0.3 mg/kg (처리 그룹 3), 1 mg/kg (처리 그룹 4) 및 3 mg/kg (처리 그룹 5)의 농도들의 리스디플람은 모두 대조군에 비해 뇌에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 1.1, 1.3 및 1.0 배까지 유발하고, 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 뇌에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현의 증가를 각각 1.0 배까지 유발하였다.
- [0219] [0186] P1 (10 ug)의 LNP-R6-04M1과 P3 (10 ug)의 LNP-ASO-10-27의 조합 치료 (처리 그룹 6)는 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 뇌에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 1.8 배까지 유도하고, 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 뇌에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현을 0.8 배까지 감소시켰다.
- [0220] [0187] P1 (10 ug)의 LNP-ASO-10-27과 P3 (10 ug)의 LNP-R6-04M1의 조합 치료 (처리 그룹 7)는 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 뇌에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 2.0 배까지 유도하고, 뇌에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현을 0.6 배까지 감소시켰다.
- [0221] [0188] P1 (10 ug)에 처리된 LNP-R6-04M1과 0.3 mg/kg의 농도의 리스디플람의 조합 치료 (처리 그룹 8)는 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 각각 뇌에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 1.2 배까지, 뇌에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현의 증가를 1.0 배까지 유도하였다.
- [0222] [0189] P1 (10 ug)에 처리된 LNP-R6-04M1과 1 mg/kg의 농도의 리스디플람의 조합 치료 (처리 그룹 9)는 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 각각 뇌에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 1.3 배까지, 뇌에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현의 증가를 1.0 배까지 유도하였다.
- [0223] [0190] 도 13b에 도시된 바와 같이, LNP-R6-04M1 (처리 그룹 1)은 간에서 SMN2FL mRNA 발현에 대한 증가를 유도하지 않았다. LNP-ASO-10-27 (처리 그룹 2)은 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 간에서 SMN2FL mRNA 발현에 대한 증가를 1.7 배까지 유도하고, 간에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현에 대한 감소를 0.9 배까지 유도하였다. 0.3 mg/kg (처리 그룹 3), 1 mg/kg (처리 그룹 4) 및 3 mg/kg (처리 그룹 5)의 농도들의 리스디플람은 모두 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 간에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 각각 1.1, 1.5 및 1.0 배까지 유발하고, 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 간에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현의 증가를 각각 1.0, 0.9, 1.0 배까지 유발하였다.
- [0224] [0191] P1 (10 ug)의 LNP-R6-04M1과 P3 (10 ug)의 LNP-ASO-10-27의 조합 치료 (처리 그룹 6)는 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 간에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 1.0 배까지 유도하고, 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 간에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현을 0.9 배까지 감소시켰다.
- [0225] [0192] P1 (10 ug)의 LNP-ASO-10-27과 P3 (10 ug)의 LNP-R6-04M1의 조합 치료 (처리 그룹 7)는 대조군 (처리 그룹 10)에 비해 간에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 1.6 배까지, 간에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현의 증가를 1.0 배까지 유도하였다.
- [0226] [0193] P1 (10 ug)에 처리된 LNP-R6-04M1과 0.3 mg/kg의 농도의 리스디플람의 조합 치료 (처리 그룹 8)는 각각 간에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 1.6 배까지 유도하고, 간에서 SMN2 Δ 7 mRNA 발현을 1.1 배까지 증가시켰다.

- [0227] [0194] P1 (10 ug)에 처리된 LNP-R6-04M1과 1 mg/kg의 농도의 리스디플람의 조합 치료 (처리 그룹 9)는 각각 간에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 1.5 배까지 유도하고, 간에서 SMN2Δ7 mRNA 발현을 1.1 배까지 증가시켰다.
- [0228] [0195] 도 13c에 도시된 바와 같이, LNP-R6-04M1 (처리 그룹 1)은 척수에서 SMN2FL mRNA 발현에 대한 증가를 유도하지 않았다. LNP-ASO-10-27 (처리 그룹 2)은 대조군에 비해 척수에서 SMN2FL mRNA 발현에 대한 증가를 1.3 배까지 유도하고, 척수에서 SMN2Δ7 mRNA 발현에 대한 감소를 0.8 배까지 유도하였다.
- [0229] [0196] P1 (10 ug)의 LNP-R6-04M1과 P3 (10 ug)의 LNP-ASO-10-27의 조합 치료 (처리 그룹 6)는 대조군에 비해 척수에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 1.8 배까지 유도하고, 대조군에 비해 척수에서 SMN2Δ7 mRNA 발현을 1.2 배까지 증가시켰다.
- [0230] [0197] P1 (10 ug)의 LNP-ASO-10-27과 P3 (10 ug)의 LNP-R6-04M1의 조합 치료 (처리 그룹 7)는 대조군에 비해 척수에서 SMN2FL mRNA 발현의 증가를 2.2 배까지 유도하고, 척수에서 SMN2Δ7 mRNA 발현을 1.1 배까지 증가시켰다.
- [0231] [0198] 도 13a~13c에 도시된 바와 같이, SMN2 saRNA들과 SMN2 mRNA 조절제들에 의한 조합 치료는 SMN2FL mRNA 발현 및 SMN2Δ7 mRNA 발현의 증가를 초래한다.
- [0232] 7.12. 재료들 및 방법들
- [0233] [0199] 올리고뉴클레오타이드 설계 및 합성
- [0234] [0200] DS06-0004 (RAG6-281로도 또한 공지됨), DS06-0031 (RAG6-1266으로도 또한 공지됨) 및 DS06-0067 (RAG6-293으로도 또한 공지됨)을 포함하는 SMN2를 위한 saRNA들은 SMN2의 전사 개시 부위에 대해 각각 -281, -1266 및 -293 위치들에서 SMN2 유전자 프로모터를 표적화하도록 설계되었다 (도 1). 고상 기법을 사용하여 K&A DNA 합성기 (K&A Laborgeraete GbR, Schaafeheim, Germany) 상에서 SMN2 saRNA들을 합성하였다. 간단히 말하자면, 포스포로아미다이트 단량체들을 고체 지지체에 순차적으로 첨가하여 목적하는 전장 올리고뉴클레오타이드를 생성한다. 염기 첨가의 각각의 주기는 4 개의 화학 반응들인 탈트리틸화, 커플링, 산화/티올화 및 캡핑 (capping)을 포함한다. 합성 후, 고체 지지체를 스크류 캡 마이크로 원심 분리기 튜브로 옮겼다. 1 μM 합성 규모의 경우, 에탄올 중의 33% 메틸아민과 1 ml의 수산화 암모늄의 혼합물을 첨가하였다. 그 다음, 고체 지지체를 함유하는 튜브를 60℃ 내지 65℃의 오븐에서 2 시간 동안 가열한 다음, 실온으로 냉각시켰다. 절단 용액을 수집하고, 스피드백 (speedvac)에서 증발 건조시켰다. 여전히 2'-TBDMS 기를 보유하고 있는 조약한 RNA 올리고뉴클레오타이드를 0.1 ml의 DMSO 중에 용해시켰다. 1 ml의 트리에틸아민 3HF를 첨가한 후, 튜브를 마개로 막고, 혼합물을 격렬하게 진탕시켜 완전한 용해를 보장하였다. 병을 60℃ 내지 65℃의 오븐에서 3 내지 3.5 시간 동안 가열하였다. 튜브를 오븐으로부터 제거하고, 실온으로 냉각시켰다. 완전히 탈실릴화된 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 용액을 드라이아이스 상에서 냉각시켰다. 2 ml의 빙냉 n-부탄올 (-20℃)을 0.5 ml로 조심스럽게 분할 첨가하여 올리고뉴클레오타이드를 침전시켰다. 침전물을 여과하고, 1 ml의 빙냉 n-부탄올로 세척한 다음, 침전물을 1 M TEAA (트리에틸암모늄 아세테이트) 중에 용해시켰다. 그 다음, 소스 (Source) 15Q 컬럼을 사용하여 교환 (IEX) HPLC에 의해 조약한 올리고뉴클레오타이드를 정제하였다. 그리고, 컬럼 DNA Pac™ PA100을 사용하여 IEX (이온 교환) HPLC로 분획들의 순도를 분석하였다. 탈염된 정제 단일 가닥 용액들의 생성 후, 2 개의 상보성 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드들을 어닐링 (annealing)하여 듀플렉스를 제조하고, 분말로 동결 건조하였다.
- [0235] [0201] ASO-10-27: 최종 어닐링 단계의 생략을 제외하고는 상기에서 기재된 동일한 기법을 사용하여 뉴시너센 (스핀라자®)으로도 또한 공지된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO) ASO-10-27을 합성하였다. ASO-10-27은 단일 가닥의 2'-O-2-메톡시에틸 (MOE) 변형된 ASO이며, SMN2 유전자의 인트론 7에서 인트론 스플라이싱 사일런서 (intronic splicing silencer: ISS)를 표적화하여 엑손 7 포함을 유도한다 (문헌 [Hua, Y, et al. Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice." *Am J Human Genet* (2008)]). ASO-10-27에 대한 서열은 다음과 같다: meU*meC*meA*meC*meU*meU*meC*meA*meU*meA*meA*meU*meG*meC*meU*meG*meG, 여기서, me는 2'MOE이고, *은 포스포로티오에이트 (PS) 백본 변형이고, 모든 사이토신(C)들은 5' 메틸 사이토신이다. 동결 건조된 올리고뉴클레오타이드들을 세포 형질 감염을 위해 RNase 무함유 물 중에 현탁시키거나 생체내 주사를 위해 적절한 농도로 식염수로 희석하였다.
- [0236] [0202] 세포 배양 및 처리

[0237] [0203] GM00232 (2 개 카피의 SMN2 유전자를 갖는 SMA 제I 형) 및 GM03813 (3 개 카피의 SMN2 유전자를 갖는 SMA 제II 형)을 포함하는 SMA 환자 유래된 섬유 아세포들을 코리엘 연구소 (Camden, NJ, USA)로부터 입수하였다. 이들 세포들을 15% 우아 혈청 (Sigma-Aldrich), 1% NEAA (Gibco) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco)으로 보충된 변형 MEM 배지 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) 중에서 5% CO₂ 및 37℃에 배양하였다. saRNA들, siRNA 및 ASO를 포함하는 올리고뉴클레오타이드들을 형질 감염시키기 위해, 세포들을 6웰 플레이트에 1 x 10⁵ 개 세포/웰의 밀도로 씨딩하고, 제조업체에서 제공된 역방향 형질 감염 프로토콜에 따라 RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 다양한 농도의 올리고뉴클레오타이드들로 72 시간 동안 (달리 명시되지 않은 경우) 형질 감염시켰다. saRNA들, SMN2 siRNA (DS06-332i), 대조군 dsRNA (dsCon2) 및 ASO에 대한 서열은 표 1에 열거되어 있다. 세포들의 리스디플람 처리를 위해, DMSO 중에 용해된 리스디플람 (HY-109101, MedChem Express Company, Monmouth Junction, NJ, USA)을 달리 명시되지 않는다면 72 시간 동안 목적하는 농도로 세포들에 직접 첨가하였다.

[0238] [0204] [표 1]

[0239] 올리고뉴클레오타이드 가닥 서열들 및 듀플렉스 조성물들

명칭	서열 번호	서열 (5'-3')	길이
DS06-0004	서열 번호 476	AGACGAGGCCUAAGCAACATT	21 nt
	서열 번호 477	UGUUGCUUAGGCCUCGUCUTT	21 nt
DS06-0031	서열 번호 478	UUGUACACUUGGUCAACAUTT	21 nt
	서열 번호 479	AUGUUGACCAAGUGUACAATT	21 nt
DS06-0067	서열 번호 480	CACUGGAGUUCGAGACGAGTT	21 nt
	서열 번호 481	CUCGUCUCGAACUCCAGUGTT	21 nt
DS06-332i	서열 번호 482	GGUGACAUUUGUGAAACUUTT	21 nt
	서열 번호 483	AAGUUUCACAAAUGUCACCTT	21 nt
dsCon2	서열 번호 484	ACUACUGAGUGACAGUAGATT	21 nt
	서열 번호 485	UCUACUGUCACUCAGUAGUTT	21 nt
ASO-10-27	서열 번호 486	meU*meC*meA*meC*meU*meU*meU*meC*meA*meU*meA*meA*meU*meG*meC*meU*meG*meG	18 nt
LNP-R6-04M1	서열 번호 488	mG*fA*mCfGmAfGmGfCfCfUfAfAmGfCmAfA*mC*fA	18 nt
	서열 번호 496	VpmU*fG*mUfUmGfCmUfUmAfGmGfCmC*fU*mC*fG*mU*fC*mU*fC	20 nt
LNP-ASO-10-27	서열 번호 486	meU*meC*meA*meC*meU*meU*meU*meC*meA*meU*meA*meA*meU*meG*meC*meU*meG*meG	18 nt

[0240]

[0241] 주의: m, 2'-O-메틸 (2'-OMe); me, 2'-O-메톡시에틸 (2'MOE); f, 2'-플루오로; *, 포스포로티오에이트 (PS) 백본 변형; 밑줄친 C, 5' 메틸 사이토신; Vp, 5'- (E)-비닐포스포네이트

[0242] [0205] RNA 단리 및 역전사-정량적 폴리머라아제 연쇄 반응 (RT-qPCR)

[0243] [0206] 배양된 세포들로부터의 RNA 단리를 위해, RNeasy Plus Mini 키트 (Qiagen, Hilden, Germany)를 이의 매뉴얼에 따라 사용하여 처리된 세포들로부터 전체 세포 RNA를 단리하였다. 동물 조직들로부터 RNA를 단리하기 위해, 조직들을 수확하고, 나중에 RNA (AM7021, Thermo Fisher)로 보관하였다. 그 다음, Auto-Pure96 기계 (ALLSHENG, China)에 의해 MagPure 전체 RNA Micro LQ 키트 (Magen, R6621, China)를 사용하여 전체 RNA를 단리하였다. gDNA 이레이저 (Eraser) (Takara, Shiga, Japan)를 함유하는 프라임스크립트 (PrimeScript) RT 키트를 사용하여, 생성된 RNA (1 µg)를 cDNA로 역전사시켰다. 전장 (SMN2FL) 또는 Δ7 SMN2 mRNA (SMN2Δ7)를 특이적으로 증폭시키는 SYBR 프리믹스 (Premix) Ex Taq II (Takara, Shiga, Japan) 시약들 및 프라이머들을 사용하여, 생성된 cDNA를 ABI 7500 고속 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems, Foster City, CA)에서 증폭시켰다 (도 1). 반응 조건들은 다음과 같았다: 3 초 동안 95℃ (1회 주기), 30 초 동안 60℃ (40회 주기들). TBP 유전자의 증폭은 내부 대조군의 역할을 하였다. 모든 프라이머 서열들은 표 2에 열거되어 있다. RT 및 RT-qPCR 반응들은 표 3 및 표 4에 나타나 있다.

[0244] [0207] [표 2]

[0245] RT-qPCR 검정을 위한 프라이머 서열들

프라이머 명칭	서열 번호	서열 (5'-3')	산물 크기
SMN2FL F SMN2FL R	서열 번호 487 서열 번호 489	TCATACTGGCTATTATATGGGTTTT TGCTCTATGCCAGCATTTCTC	95 bp
SMNΔ7 F SMNΔ7 R	서열 번호 490 서열 번호 491	GCTATTATATGGAAATGCTGGCATAG TTCCAGATCTGTCTGATCGTTTCT	73 bp
TBP F TBP R	서열 번호 492 서열 번호 493	TGCTCACCCACCAACAATTTAG TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG	139 bp
Tbp F Tbp R	서열 번호 497 서열 번호 498	GCTCTGGAATTGTACCGCAG CTGCAGCAAATCGCTTGGA	126 bp

[0246]

[0247] [0208] [표 3]

[0248] RT 반응

RT 반응-1 (Takara, RR047A)	부피 (μl)
5×gDNA 이레이저 완충액	2
gDNA 이레이저	1
전체 RNA (1 μg) + RNase 무함유 dH ₂ O	7
총	10
42°C 5 분, 4°C 보관	

[0249]

시약-2 (Takara, RR047A)	부피 (μl)
5 × 프라임스크립트 완충액 2 (PrimeScript Buffer2)	4
프라임스크립트 RT 효소 믹스 I	1
RT 프라임 믹스	1
RNase 무함유 dH ₂ O	4
RT 반응-1	10
총	20
37°C 15 분, 85°C 5 초, 4°C 보관	

[0250] [표 4]

[0251] RT-qPCR 반응

시약 (Takara, RR820A)	부피 (μl)
SYBR 프리믹스 Ex Taq II (2 ×)	5
PCR 프라이머 (F+R) 5 μM	1
cDNA (RT 산물)	4
총	10

[0252]

[0253] [0209] 반정량적 RT-PCR/DdeI 분해 검정

[0210] 하나의 반응에서 SMN2FL과 SMN2Δ7 둘 다를 증폭시키기 위해, SMN2의 엑손 7에 걸쳐 있는 프라이머들 (표 5)을 사용하여 반정량적 RT-PCR에 의해 cDNA를 증폭시켰다 (도 2). PCR 반응 조건들은 다음과 같았다: 2 분 동안 94°C (1회 주기), 10 초 동안 98°C, 15 초 동안 60°C, 32 초 동안 72°C, 72°C에서 최종 5 분 연장으로 30 회 동안 순환됨. PCR 반응은 표 6에 열거되어 있다. SMN2로부터 SMN1 mRNA를 추가로 구별하기 위해, SMN의 생성된 PCR 산물들을 DdeI 제한 효소 (R0175L, NEB)로 분해한 다음, 2% 아가로오스 겔에 의해 분리하였다. SMN2의 엑손 8 상의 뉴클레오타이드 변이체로 인해, DdeI 인식 부위는 SMN2 유전자로부터 증폭된 PCR 산물들에 존재하지만, SMN1 유전자로부터는 그렇지 않으며, DdeI 분해는 SMN2FL과 SMN2Δ7 둘 다로부터 115 bp 단편을 방

[0254]

출하여 3 개의 단편을 생성한다: 507 (SMN1FL), 338 (SMN2Δ7), 392 (SMN2FL) 및 115 bp (도 2). TBP 유전자를 또한 RNA 로딩 대조군으로서 증폭시켰다. DdeI 분해 반응 조건들은 다음과 같았다: 60 분 동안 37°C 및 20 분 동안 65°C, 1회 주기. DdeI 분해 반응들은 표 7에 열거되어 있다.

[0211] [표 5]

반정량적 RT-PCR 검정을 위한 프라이머 서열들

프라이머 명칭	서열 번호	서열 (5'-3')	산물 크기
SMN-엑손 6 F SMN-엑손 8 R	서열 번호 494 서열 번호 495	CCCCCACCACCTCCCATATG CCCTTCTCACAGCTCATAAAATTAC	507 bp 및 453 bp

[0212] [표 6]

반정량적 RT-PCR 반응

시약들 (Takara, R010A)	부피 (μl)
5×프라임 스타 완충액 (prime STAR Buffer)	5
dNTP 혼합물	2
프라임 F+R (5 μM)	1
주형	2
프라임스타 HS DNA 폴리머라아제	0.25
DD 수	14.75
총	25

[0213] [표 7]

DdeI 분해 반응

시약들 (NEB, R0175L)	부피 (μl)
제한 효소	1
10 × NEB 완충액	1
cDNA	6
DD 수	2
총	10

[0214] 웨스턴 블롯팅

[0215] 프로테아제 억제제들을 포함하는 1X RIPA 완충액을 사용하여 형질 감염된 세포들로부터 단백질을 수확하고, BCA 단백질 검정 키트들 (Beyotime, P0010, China)에 의해 단백질 농도를 검출하였다. 동물 조직들로부터 단백질을 단리하기 위해, 조직들을 수확하고, 1X RIPA 완충액을 사용하여 용해시켰다. BCA 단백질 검정 키트들을 사용하여 단백질 농도들을 측정하였다. 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 (polyacrylamide gel electrophoresis: PAGE) 겔을 사용하여 단백질 전기 영동 (10 ug 단백질/웰)을 수행한 다음, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 (0.45 μm PVDF) 막으로 옮겼다. 막들을 4°C에서 밤새 1 차 항-SMN (CST, 19276, USA) 또는 항-α/β-튜불린 (CST, 2148s, USA) 항체들로 블롯팅하였다. TBST 완충액에 의한 3 회 세척 후, 막들을 항-IgG, 서양 고추냉이 퍼옥시다아제 컨쥬게이트된 2 차 항체들 (CST, 7074s 및 7076s, USA)과 함께 실온 (RT)에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 막들을 TBST 완충액으로 10 분씩 3 회 세척하고, Image Lab (BIO-RAD, Chemistry Doctm MP Imaging System)에 의해 분석하였다. SMN 단백질 및 α/β-튜불린의 밴드 밀도들을 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

[0216] 동물 절차

[0217] 인증된 실험실 직원이 지역 및 주 규정들과 일치하고 동물 실험 윤리 위원회의 승인을 받은 프로토콜을

사용하여 모든 동물 절차를 수행하였다. Hsieh-Li 등 (문헌 [Hsieh-Li, H. M., et al. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nature Genet* (2000)])에 의해 이전에 기재된 바와 같이 사람 SMN2 (Snn^{-/-} SMN2^{+/-})의 이식 유전자를 갖는 마우스 Snn 엑손 7의 동형 접합 녹아웃 (knock-out)에 의해 생성된 SMA 유사 마우스들을 Jackson Laboratories로부터 입수하였다. 생후 0 일차 (P0)에 꼬리 절단물들을 수집하고, 각각의 새끼를 앞발 문신으로 식별하고, 3 개의 특이적 프라이머들의 세트를 사용하여 PCR 분석에 의해 유전자형 분석하였다: S1, 5'-ATAACACCACCTCTTACTC-3', 및 S2, 5'-GTAGCCGTGATGCCATTGTCA-3' (야생형 대립 유전자들에 대해 1,150 bp 밴드), 및 S1 및 H1, 5'-AGCCTGAAGAACGATCAGC-3' (돌연 변이체 대립 유전자들에 대해 950 bp 밴드). PCR 산물들을 1% 아가로스 겔에 의해 검출하였다. 중증 SMA 마우스들 (Snn^{-/-}, SMN^{+/-})을 생성하였다. 마우스 Snn (Snn1^{+/-}, SMN2^{+/-})에 대해 이형 접합인 한배새끼들을 대조군들로서 사용하였다.

[0218] 지질 나노 입자 (lipid nanoparticle: LNP) 제조

[0219] 100% 에탄올 중에 용해된 Dlin-KC2-DMA (50 mg/mL), 콜레스테롤 (10 mg/mL), DSPC (7.5 mg/mL) 및 PEG2000-DMPE (20 mg/mL)를 포함하는 지질 스톱을 올리고뉴클레오타이드 스톱 (20 mg/mL, 0.05 mM 시트르산 완충액, pH 4.0)과 12 mL/분의 유속으로 1:3 부피비로 마이크로플루이딕 칩에 의해 신속하게 혼합한다. Dlin-KC2-DMA, 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2000-DMPE의 몰비는 50:38.5:10:1.5이다. 그 다음, 이러한 미리 형성된 소포를 1X PBS (pH 7.4)에서 투석 튜브를 사용하여 12 시간 동안 투석하였다. LNP의 입자 크기를 Brookhaven NanoBrook 90Plus Zeta를 사용하여 동적 광 산란법에 의해 테스트하였다. RNA 농도를 NanoPhotometer N50을 사용하여 A260에 의해 테스트한다.

[0220] 뇌실 (intracerebral ventricle: ICV) 주사

PCR에 의한 유전자형 분석을 위해 꼬리 절단물들을 생후 0 일차 (PND0)에 수집하고, 제I 형 SMA 마우스들 (Snn^{-/-}, SMN2^{+/-}), 제III 형 SMA 마우스들 (Snn^{-/-}, SMN2^{+/-}) 및 이형 접합 (Het) 대조군 (Snn1^{+/-}, SMN2^{+/-})으로 그룹화하였다. 각각 P1 및 P3에 새끼용 29-게이지 주사기 (각 측면에 대해 2 µL, 5 mg/ml)를 사용하여 1.5 mm 또는 3.6 mm의 깊이에서 2% 이소플루란을 통해 마취하에 양측 뇌실내 (ICV) 주사를 수행하였다. 복강내 (IP) 주사들을 신생 마우스들의 하복부 부위에 놓았다. saRNA (LNP-R6-04M1) 및 LNP-ASO-10-27에 대한 서열들은 표 1에 열거되어 있다.

[표 8]

[0273] SMN2 프로모터 표적화 saRNA들의 서열들 및 이들의 표적 DNA 서열들

RA G6-1763	ATCTGTGAGATGTACCTTT (서열 번호 315)	AUCUGUGAGAUGUACCUUU[dT][dT] (서열 번호 1)	AAAGGUACAUCUCACAGAU[dT][dT] (서열 번호 158)
RA G6-1634	CACCTGTCTACTCAGGCTG (서열 번호 316)	CACUCUGACACUCAGGCU[dT][dT] (서열 번호 2)	CAGCCUGAGUGACAGAGU[dT][dT] (서열 번호 159)
RA G6-1633	ACTCTGTCTACTCAGGCTGG (서열 번호 317)	ACUCUGUCACUCAGGCU[dT][dT] (서열 번호 3)	CCAGCCUGAGUGACAGAGU[dT][dT] (서열 번호 160)
RA G6-1631	TCTGTCTACTCAGGCTGGAG (서열 번호 318)	UCUGUCACUCAGGCUGGAG[dT][dT] (서열 번호 4)	CUCCAGCCUGAGUGACAGAGU[dT][dT] (서열 번호 161)
RA G6-1623	TCAGGCTGGAGTGCAGTGG (서열 번호 319)	UCAGGCUGGAGUGCAGUGG[dT][dT] (서열 번호 5)	CCACUGCACUCACAGCCU[dT][dT] (서열 번호 162)
RA G6-1615	GAGTGCAGTGGCGTGATCT (서열 번호 320)	GAGUGCAGUGGCGUGAUCU[dT][dT] (서열 번호 6)	AGAUCACGCCACUGCACUCU[dT][dT] (서열 번호 163)
RA G6-1612	TGCAGTGGCGTGATCTTGG (서열 번호 321)	UGCAGUGGCGUGAUCUUGG[dT][dT] (서열 번호 7)	CCAAGAUACAGCCACU[dT][dT] (서열 번호 164)
RA G6-1611	GCAGTGGCGTGATCTTGGC (서열 번호 322)	GCAGUGGCGUGAUCUUGG[dT][dT] (서열 번호 8)	GCCAAGAUACAGCCACU[dT][dT] (서열 번호 165)
RA G6-1606	GGCGTGATCTTGGCTCACT (서열 번호 323)	GGCGUGAUCUUGGCUACU[dT][dT] (서열 번호 9)	AGUGAGCCAAGAUACAGCC[dT][dT] (서열 번호 166)
RA G6-1603	GTGATCTTGGCTCACTGCA (서열 번호 324)	GUCAUCUUGGCUACUGCA[dT][dT] (서열 번호 10)	UGCAGUGAGCCAAGAUACAC[dT][dT] (서열 번호 167)
RA G6-1602	TGATCTTGGCTCACTGCAA (서열 번호 325)	UGAUCUUGGCUACUGCAA[dT][dT] (서열 번호 11)	UUGCAGUGAGCCAAGAUCA[dT][dT] (서열 번호 168)
RA G6-1600	ATCTTGGCTCACTGCAACC (서열 번호 326)	AUCUUGGCUACUGCAACC[dT][dT] (서열 번호 12)	GGUUGCAGUGAGGCCAAGAU[dT][dT] (서열 번호 169)

[0274]

RAG6-1598	CTTGGCTCACTGCAACCTC (서열 번호 327)	CUUGGCUACUCUGCAACCUC[dt][dt]	GAGGUUGCAGUGAGCCAAg[dt][dt]
RAG6-1597	TTGGCTCACTGCAACCTCC (서열 번호 328)	UUGGCUACUCUGCAACCUC[dt][dt]	GGAGGUUGCAGUGAGCCAA[dt][dt]
RAG6-1578	GCCTCCCGAGTTCAGTGA (서열 번호 329)	GCCUCCCGAGUUCAGUGA[dt][dt]	UCACUUGAACUCGGGAGGc[dt][dt]
RAG6-1577	CTCCCGAGTTCAGTGAT (서열 번호 330)	CCUCCCGAGUUCAGUGAU[dt][dt]	AUCACUUGAACUCGGGAGG[dt][dt]
RAG6-1576	CTCCCGAGTTCAGTGATT (서열 번호 331)	CUCCCGAGUUCAGUGAU[dt][dt]	AAUCACUUGAACUCGGGAG[dt][dt]
RAG6-1575	TCCCGAGTTCAGTGATT (서열 번호 332)	UCCCGAGUUCAGUGAU[dt][dt]	GAUCACUUGAACUCGGGA[dt][dt]
RAG6-1567	TCAAGTGATTCTCCTGGCT (서열 번호 333)	UCAAGUGAUUCUCCUGGC[dt][dt]	AGCCAGGAGAAUCACUUGA[dt][dt]
RAG6-1565	AAGTGATTCTCCTGGCTCA (서열 번호 334)	AAGUGAUUCUCCUGGCUC[dt][dt]	UGAGCCAGGAGAAUCACUU[dt][dt]
RAG6-1564	AGTGAATTCTCCTGGCTCAG (서열 번호 335)	AGUGAUUCUCCUGGCUCAG[dt][dt]	CUGAGCCAGGAGAAUCACU[dt][dt]
RAG6-1563	GTGATTCTCCTGGCTCAGC (서열 번호 336)	GUGAUUCUCCUGGCUCAGC[dt][dt]	GCUGAGCCAGGAGAAUCAC[dt][dt]
RAG6-1548	CAGCTCCCAAGCAGCTGT (서열 번호 337)	CAGCCUCCCAAGCAGCUGU[dt][dt]	ACAGCUGCUUGGGAGGCUG[dt][dt]
RAG6-1545	CCTCCCAAGCAGCTGTGAT (서열 번호 338)	CCUCCCAAGCAGCUGUCAU[dt][dt]	AUGACAGCUGCUUGGGAGG[dt][dt]
RAG6-1543	TCCCAAGCAGCTGTGATTA (서열 번호 339)	UCCCAAGCAGCUGUCAUUA[dt][dt]	UAUAGACAGCUGCUUGGGA[dt][dt]
RAG6-1535	AGCTGTCAATACAGGCTG (서열 번호 340)	AGCUGUCAUUAACAGGCCUG[dt][dt]	CAGGCCUGUAAUGACAGCU[dt][dt]
RAG6-1534	GCTGTCAATACAGGCTGC (서열 번호 341)	GCUGUCAUUAACAGGCCUGC[dt][dt]	GCAGGCCUGUAAUGACAGC[dt][dt]

[0275]

RAG6-1533	CTGTCAATTACAGGCTGCA (서열 번호 342)	CUGUCAUUACAGGCCUGCA[dT][dT] (서열 번호 28)	UGCAGGCCUGUAUUGACAG[dT][dT] (서열 번호 185)
RAG6-1483	GGAGAAACAGGGTTTCACC (서열 번호 343)	GGAGAAACAGGGUUUCACC[dT][dT] (서열 번호 29)	GGUGAAACCCUGUUUCUCC[dT][dT] (서열 번호 186)
RAG6-1481	AGAAACAGGGTTTCACCAT (서열 번호 344)	AGAAACAGGGUUUCACCAU[dT][dT] (서열 번호 30)	AUGGUGAAACCCUGUUUCU[dT][dT] (서열 번호 187)
RAG6-1403	AAGTGTGGGATTATAGGC (서열 번호 345)	AAGUGCUGGGAUUAUAGGC[dT][dT] (서열 번호 31)	GCCUAUAUCCAGCACAUU[dT][dT] (서열 번호 188)
RAG6-1392	TTATAGGCATGAGCCACCG (서열 번호 346)	UUAUAGGCAUGAGCCACCG[dT][dT] (서열 번호 32)	CGGUGGCUCAUGCCUAUAA[dT][dT] (서열 번호 189)
RAG6-1241	ATTCTCCCCTTCCTCCACA (서열 번호 347)	AUUCUCCCUUCCUCCACA[dT][dT] (서열 번호 33)	UGUGGAGGAAGGGGAGAAU[dT][dT] (서열 번호 190)
RAG6-1239	TCTCCCCTTCCTCCACAGA (서열 번호 348)	UCUCCCUUCCUCCACAGA[dT][dT] (서열 번호 34)	UCUGUGGAGGAAGGGGAG[dT][dT] (서열 번호 191)
RAG6-1119	CATTAGCAACCCCTAGATG (서열 번호 349)	CAUUAGCAACCCUAGAU[G][dT] (서열 번호 35)	CAUCUAGGGUUGCUAAAU[G][dT] (서열 번호 192)
RAG6-1118	ATTAGCAACCCCTAGATGC (서열 번호 350)	AUUUAGCAACCCUAGAU[G][dT] (서열 번호 36)	GC AUCUAGGGUUGCUAAAU[dT][dT] (서열 번호 193)
RAG6-1117	TTTAGCAACCCCTAGATGCT (서열 번호 351)	UUUAGCAACCCUAGAU[G][dT] (서열 번호 37)	AGCAUCUAGGGUUGCUAAAU[dT][dT] (서열 번호 194)
RAG6-1116	TTAGCAACCCCTAGATGCTT (서열 번호 352)	UUAGCAACCCUAGAU[G][dT] (서열 번호 38)	AAGCAUCUAGGGUUGCUAAAU[dT][dT] (서열 번호 195)
RAG6-1115	TAGCAACCCCTAGATGCTTA (서열 번호 353)	UAGCAACCCUAGAU[G][dT] (서열 번호 39)	UAAGCAUCUAGGGUUGCUA[dT][dT] (서열 번호 196)
RAG6-1089	ATACTGGAGGCCCGGTGTG (서열 번호 354)	AUACUGGAGGCCCGGUGUG[dT][dT] (서열 번호 40)	CACACCGGCCUCCAGUAU[dT][dT] (서열 번호 197)
RAG6-1075	GTGTGGTGGCTCACACCTG (서열 번호 355)	GUGUGGUGGCTCACACCU[G][dT] (서열 번호 41)	CAGGUGAGGCCACCACAC[dT][dT] (서열 번호 198)
RAG6-1072	TGGTGGCTCACACCTGTAA (서열 번호 356)	UGGUGGCTCACACCUGUA[dT][dT] (서열 번호 42)	UUAACAGGUGAGGCCACCA[dT][dT] (서열 번호 199)

RAG6-1071	GGTGGCTCACACCTGTAAAT (서열 번호 357)	GGUGCUCACACCCUGUAAU[dT][dT] (서열 번호 43)	AUUACAGGUGUGAGCCACC[dT][dT] (서열 번호 200)
RAG6-1070	GTGGCTCACACCTGTAAATC (서열 번호 358)	GUGGUCACACCCUGUAAU[dT][dT] (서열 번호 44)	GAUACAGGUGUGAGCCAC[dT][dT] (서열 번호 201)
RAG6-1068	GGCTCACACCTGTAAATCCC (서열 번호 359)	GGCUCACACCCUGUAAUCCC[dT][dT] (서열 번호 45)	GGGAUACAGGUGUGAGCC[dT][dT] (서열 번호 202)
RAG6-1064	CACACCTGTAAATCCAGCA (서열 번호 360)	CACACUGUAAUCCCAGCA[dT][dT] (서열 번호 46)	UGCUGGGAUACAGGUGUG[dT][dT] (서열 번호 203)
RAG6-1063	ACACCTGTAAATCCAGCAC (서열 번호 361)	ACACUGUAAUCCCAGCAC[dT][dT] (서열 번호 47)	GUGCUGGGAUACAGGUG[dT][dT] (서열 번호 204)
RAG6-1061	ACCTGTAAATCCAGCACTT (서열 번호 362)	ACCUGUAAUCCCAGCACUU[dT][dT] (서열 번호 48)	AAGUCUGGGAUACAGG[dT][dT] (서열 번호 205)
RAG6-1057	GTAATCCAGCACCTTTGGG (서열 번호 363)	GUAAUCCCAGCACUUUGGG[dT][dT] (서열 번호 49)	CCCAAAGUCUGGGAUAC[dT][dT] (서열 번호 206)
RAG6-1056	TAATCCAGCACCTTTGGGA (서열 번호 364)	UAAUCCCAGCACUUUGGGA[dT][dT] (서열 번호 50)	UCCCAAAGUCUGGGAUUA[dT][dT] (서열 번호 207)
RAG6-1055	AATCCAGCACCTTTGGGAG (서열 번호 365)	AAUCCCAGCACUUUGGGAG[dT][dT] (서열 번호 51)	CUCCCAAAGUCUGGGAUU[dT][dT] (서열 번호 208)
RAG6-1050	CAGCACTTTGGGAGGCCGA (서열 번호 366)	CAGCACUUUGGGAGGCCGA[dT][dT] (서열 번호 52)	UCGGCCUCCCAAAGUCUG[dT][dT] (서열 번호 209)
RAG6-1033	GAGGCGTTCGGATTACGAG (서열 번호 367)	GAGGCGGUCGGGAUACGAG[dT][dT] (서열 번호 53)	CUCGUAAUCCGACCCGCCUC[dT][dT] (서열 번호 210)
RAG6-1031	GGCGTTCGGATTACGAGGT (서열 번호 368)	GGCGGUCGGGAUACGAGGU[dT][dT] (서열 번호 54)	ACCUCGUAAUCCGACCCGCC[dT][dT] (서열 번호 211)
RAG6-1030	GCGGTCGGATTACGAGGTC (서열 번호 369)	GCGGUCGGGAUACGAGGUC[dT][dT] (서열 번호 55)	GACCUCGUAAUCCGACCCGCC[dT][dT] (서열 번호 212)
RAG6-1029	CGGTCGGATTACGAGGTCA (서열 번호 370)	CGGUCGGGAUACGAGGUCA[dT][dT] (서열 번호 56)	UGACCUCGUAAUCCGACCCGCC[dT][dT] (서열 번호 213)
RAG6-1028	GGTCGGATTACGAGGTCA (서열 번호 371)	GGUCGGGAUACGAGGUCAG[dT][dT] (서열 번호 57)	CUGACCUCGUAAUCCGACCC[dT][dT] (서열 번호 214)

[0277]

RAG6-1027	GTCGGATTACGAGGTCAGG (서열 번호 372)	GUCGGAUACGAGGUCAGG[dT][dT] (서열 번호 58)	CCUGACCUUGUAUCCGAC[dT][dT] (서열 번호 215)
RAG6-1026	TCGGATTACGAGGTCAGGA (서열 번호 373)	UCGGAUACGAGGUCAGGA[dT][dT] (서열 번호 59)	UCCUGACCUUGUAUCCGA[dT][dT] (서열 번호 216)
RAG6-1025	CGGATTACGAGGTCAGGAG (서열 번호 374)	CGGAUACGAGGUCAGGAG[dT][dT] (서열 번호 60)	CUCUGACCUUGUAUCCG[dT][dT] (서열 번호 217)
RAG6-1022	ATTACGAGGTCAGGAGTTC (서열 번호 375)	AUACGAGGUCAGGAGUUC[dT][dT] (서열 번호 61)	GAACUCCUGACCUUGUAU[dT][dT] (서열 번호 218)
RAG6-1021	TTACGAGGTCAGGAGTTCA (서열 번호 376)	UUACGAGGUCAGGAGUUC[dT][dT] (서열 번호 62)	UGAACUCCUGACCUUGUAU[dT][dT] (서열 번호 219)
RAG6-1020	TACGAGGTCAGGAGTTCAA (서열 번호 377)	UACGAGGUCAGGAGUUCAA[dT][dT] (서열 번호 63)	UUGAACUCCUGACCUUGUAU[dT][dT] (서열 번호 220)
RAG6-1019	ACGAGGTCAGGAGTTCAAG (서열 번호 378)	ACGAGGUCAGGAGUUCAAAG[dT][dT] (서열 번호 64)	CUUGAACUCCUGACCUUGUAU[dT][dT] (서열 번호 221)
RAG6-1016	AGGTCAGGAGTTCAAGACC (서열 번호 379)	AGGUCAGGAGUUCAAAGACC[dT][dT] (서열 번호 65)	GGUCUUGAACUCCUGACCU[dT][dT] (서열 번호 222)
RAG6-1008	AGTTCAAGACCAGCCTGGC (서열 번호 380)	AGUUCAGACCAGCCTGGG[dT][dT] (서열 번호 66)	GCCAGGCUUGUUCUUGAAU[dT][dT] (서열 번호 223)
RAG6-980	GAAACCCATCTTTACTAA (서열 번호 381)	GAAACCCAUUUUACUAA[dT][dT] (서열 번호 67)	UUAGUAAAGAUUGGGUUC[dT][dT] (서열 번호 224)
RAG6-951	ATTAGCCGGTGTTGGT (서열 번호 382)	AUAGCCGGUGUGGUGU[dT][dT] (서열 번호 68)	ACCACACACCCGGCUAAU[dT][dT] (서열 번호 225)
RAG6-937	GTTGGTGGGCGCTGTAAATC (서열 번호 383)	GUGGUGGCGCCUGUAAUUC[dT][dT] (서열 번호 69)	GAUACAGGCGCCACAC[dT][dT] (서열 번호 226)
RAG6-931	GGCGCTGTAAATCCAGCT (서열 번호 384)	GGCGCUUUAUCCAGCU[dT][dT] (서열 번호 70)	AGCUGGGAUACAGGCGCC[dT][dT] (서열 번호 227)
RAG6-923	TAAATCCCAGTACTCGGGG (서열 번호 385)	UAAUCCAGCUACUCGGG[dT][dT] (서열 번호 71)	CCCAGAGUAGCUGGGAUUA[dT][dT] (서열 번호 228)
RAG6-905	GGGCTGAGGCAGAAATTGCT (서열 번호 386)	GGGUCAGGCAGAAUUGCU[dT][dT] (서열 번호 72)	AGCAAUUCUUGCCUCAGCCC[dT][dT] (서열 번호 229)

RAG6-898	GGCAGAAATGCTTGAAACCT (서열 번호 387)	GGCAGAAUUGCUUGAAACCU[dT][dT] (서열 번호 73)	AGGUUCAAGCAAUUCUGCC[dT][dT] (서열 번호 230)
RAG6-896	CAGAAATGCTTGAAACCTGG (서열 번호 388)	CAGAAUUGCUUGAACCUGG[dT][dT] (서열 번호 74)	CCAGGUUCAAGCAAUUCUG[dT][dT] (서열 번호 231)
RAG6-886	TGAACCTGGGAGGCAGAGG (서열 번호 389)	UGAACUUGGAGGCAGAGG[dT][dT] (서열 번호 75)	CCUUGCCUCCAGGUUCA[dT][dT] (서열 번호 232)
RAG6-885	GAACTGGGAGGCAGAGGT (서열 번호 390)	GAACCUUGGAGGCAGAGGU[dT][dT] (서열 번호 76)	ACCUCUGCCUCCAGGUUC[dT][dT] (서열 번호 233)
RAG6-883	ACCTGGGAGGCAGAGGTG (서열 번호 391)	ACCUUGGAGGCAGAGGUUG[dT][dT] (서열 번호 77)	CAACCUUGCCUCCAGGU[dT][dT] (서열 번호 234)
RAG6-866	TGAGTGAGCTGAGATCAC (서열 번호 392)	UGCAGUGAGCUGAGAUAC[dT][dT] (서열 번호 78)	GUGAUUCAGGCUACUGCA[dT][dT] (서열 번호 235)
RAG6-857	CTGAGATCACGCCACTGCA (서열 번호 393)	CUGAGAUACGCCACUGCA[dT][dT] (서열 번호 79)	UGCAGUGGCGUGAUCAG[dT][dT] (서열 번호 236)
RAG6-852	ATCACGCCACTGCAATCCA (서열 번호 394)	AUCACGCCACUGCAUUCCA[dT][dT] (서열 번호 80)	UGGAAUUGCAGUGGCGUGAU[dT][dT] (서열 번호 237)
RAG6-829	GGGTGACAGAGCAATACTC (서열 번호 395)	GGUGACAGAGCAAUACUC[dT][dT] (서열 번호 81)	GAGUUAUUGCUCUGUCACCC[dT][dT] (서열 번호 238)
RAG6-826	TGACAGAGCAATACTCTGT (서열 번호 396)	UGACAGAGCAAUACUCUGU[dT][dT] (서열 번호 82)	ACAGAGUAUUGCUCUGUCA[dT][dT] (서열 번호 239)
RAG6-822	AGAGCAATACTCTGTGCA (서열 번호 397)	AGAGCAAUACUCUGUCGCA[dT][dT] (서열 번호 83)	UGCGACAGAUUUGCUCU[dT][dT] (서열 번호 240)
RAG6-796	AAAGAAATACTGGAGGCTG (서열 번호 398)	AAAAGAAUACUGGAGGCGU[dT][dT] (서열 번호 84)	CAGCCUCCAGUAUUCUUUU[dT][dT] (서열 번호 241)
RAG6-795	AAAGAATACTGGAGGCTGG (서열 번호 399)	AAAGAAUACUGGAGGCGUG[dT][dT] (서열 번호 85)	CCAGCCUCCAGUAUUCUUU[dT][dT] (서열 번호 242)
RAG6-790	ATACTGGAGGCTGGGCGAG (서열 번호 400)	AUACUGGAGGCGUGGCGAG[dT][dT] (서열 번호 86)	CUCGCCAGCCUCCAGUAU[dT][dT] (서열 번호 243)
RAG6-775	CGAGGTGGCTCACACCTGT (서열 번호 401)	CGAGGUGGCUACACACCUGU[dT][dT] (서열 번호 87)	ACAGGUGAGGCCACCUUCG[dT][dT] (서열 번호 244)

RAG6-772	GGTGGCTCACACCTGTGTAAT (서열 번호 402)	GGUGGCUACACCCUGUAAU[dT][dT] (서열 번호 88)	AUUACAGGUGUGAGCCACC[dT][dT] (서열 번호 245)
RAG6-769	GGCTCACACCTGTAAATCCC (서열 번호 403)	GGCUCACACCUUGUAAUCCCC[dT][dT] (서열 번호 89)	GGGAUUACAGGUGUGAGCC[dT][dT] (서열 번호 246)
RAG6-768	GCTCACACCTGTAAATCCCA (서열 번호 404)	GCUCACACCUUGUAAUCCCA[dT][dT] (서열 번호 90)	UGGGAUUACAGGUGUGAGC[dT][dT] (서열 번호 247)
RAG6-765	CACACCTGTAAATCCAGCA (서열 번호 405)	CACACCUUGUAAUCCAGCA[dT][dT] (서열 번호 91)	UGCUGGGAUUACAGGUGUG[dT][dT] (서열 번호 248)
RAG6-757	TAAATCCAGCAATTTGGGA (서열 번호 406)	UAAUCCAGCAUUUUGGA[dT][dT] (서열 번호 92)	UCCCAAAUUGCUGGGGAUA[dT][dT] (서열 번호 249)
RAG6-728	GGCGGAATATCTTGAGCT (서열 번호 407)	GGCGGAUUAUUCUUGAGCU[dT][dT] (서열 번호 93)	AGCUC AAGAUUAUUC CGCCCC[dT][dT] (서열 번호 250)
RAG6-722	AATATCTTGAGCTCAGGAG (서열 번호 408)	AUAUCUUGAGCUCAGGAG[dT][dT] (서열 번호 94)	CUCCUGAGCUC AAGAUUU[dT][dT] (서열 번호 251)
RAG6-703	TTCGAGACCAGCCTACACA (서열 번호 409)	UUCGAGACCAGCCUACACA[dT][dT] (서열 번호 95)	UGUGUAGGCUUGGUCUCGAA[dT][dT] (서열 번호 252)
RAG6-696	CCAGCCTACACAATATGCT (서열 번호 410)	CCAGCUCACACAUAUUGCU[dT][dT] (서열 번호 96)	AGCAUUAUUGUGUAGGCUGG[dT][dT] (서열 번호 253)
RAG6-689	ACACAATATGCTCCAAACG (서열 번호 411)	ACACAUAUUGCUCCAAACG[dT][dT] (서열 번호 97)	CGUUGGAGCAUAUUGUGU[dT][dT] (서열 번호 254)
RAG6-688	CACAATATGCTCCAAACGC (서열 번호 412)	CACAUAUUGCUCCAAACGC[dT][dT] (서열 번호 98)	GGUUGGAGCAUAUUGUG[dT][dT] (서열 번호 255)
RAG6-687	ACAATATGCTCCAAACGCC (서열 번호 413)	ACAUAUUGCUCCAAACGCC[dT][dT] (서열 번호 99)	GGCGUUGGAGCAUAUUGU[dT][dT] (서열 번호 256)
RAG6-676	CAACGCCGCCCTCTACAAA (서열 번호 414)	CAACGCCGCCUACAAA[dT][dT] (서열 번호 100)	UUUGUAGAGGGCGGCUUUG[dT][dT] (서열 번호 257)
RAG6-622	CTGTGGTCTAGCTACTTG (서열 번호 415)	CUGUGGCUUAGCUACUUG[dT][dT] (서열 번호 101)	CAAGUAGCUAGGACACAG[dT][dT] (서열 번호 258)
RAG6-591	GGGAGGATCGCTTGAGCTC (서열 번호 416)	GGGAGGAUCGCUUGAGCUC[dT][dT] (서열 번호 102)	GAGCUCAAGCGAUCCUCCCC[dT][dT] (서열 번호 259)

RAG6-589	GAGATCGCTTGAGCTCGG (서열 번호 417)	GAGGUCGCUUGAGCUCGG[dT][dT] (서열 번호 103)	COGAGCUCAAGCGAUCCUC[dT][dT] (서열 번호 260)
RAG6-571	GGAGTCGAGGCTGCAATG (서열 번호 418)	GGAGGUCGAGGCGCAUAG[dT][dT] (서열 번호 104)	CAUUGCAGCCUUGACCUCC[dT][dT] (서열 번호 261)
RAG6-568	GGTCGAGGCTGCAATGAGC (서열 번호 419)	GGUCGAGGCGCAUAGAGC[dT][dT] (서열 번호 105)	GCUCAUUGCAGCCUUGACCC[dT][dT] (서열 번호 262)
RAG6-557	CAATGAGCCGAGATGGTGC (서열 번호 420)	CAUUGAGCCGAGUUGGUC[dT][dT] (서열 번호 106)	GCACCAUCUCGGGCUCAUUG[dT][dT] (서열 번호 263)
RAG6-556	AATGAGCCGAGATGGTGCC (서열 번호 421)	AUUGAGGCGGAGUUGGCGC[dT][dT] (서열 번호 107)	GGCACCAUCUCGGGCUCAUUG[dT][dT] (서열 번호 264)
RAG6-550	CCGAGATGGTGCCACTGCA (서열 번호 422)	CCGAGUUGGCGCACUGCA[dT][dT] (서열 번호 108)	UGCAGUGGGCACCAUCUCGGG[dT][dT] (서열 번호 265)
RAG6-548	GAGATGGTGCCACTGCACT (서열 번호 423)	GAGUUGGUGCCACUGCACU[dT][dT] (서열 번호 109)	AGUGCAGUGGCACCAUCUC[dT][dT] (서열 번호 266)
RAG6-547	AGATGGTGCCACTGCACTC (서열 번호 424)	AGAUGGUGCCACUGCACUC[dT][dT] (서열 번호 110)	GAGUGCAGUGGCACCAUCUC[dT][dT] (서열 번호 267)
RAG6-545	ATGGTGCCACTGCACTCTG (서열 번호 425)	AUGGUGCCACUGCACUCU[dT][dT] (서열 번호 111)	CAGAGUGCAGUGGCACCAU[dT][dT] (서열 번호 268)
RAG6-539	CCACTGCACTCTGACGACA (서열 번호 426)	CCACUGCACUCUGACGACA[dT][dT] (서열 번호 112)	UGUCGUCAGAGUGCAGUGG[dT][dT] (서열 번호 269)
RAG6-538	CACTGCACTCTGACGACAG (서열 번호 427)	CACUGCACUCUGACGACAG[dT][dT] (서열 번호 113)	CUGUCGUCAGAGUGCAGUG[dT][dT] (서열 번호 270)
RAG6-530	TCTGAGACAGAGCGAGAC (서열 번호 428)	UCUGACGACAGAGCGAGAC[dT][dT] (서열 번호 114)	GUCUCGUCUGUCGUCAGAG[dT][dT] (서열 번호 271)
RAG6-529	CTGACGACAGAGCGAGACT (서열 번호 429)	CUGACGACAGAGCGAGACU[dT][dT] (서열 번호 115)	AGUCUGGUCUCUGUCGUCAG[dT][dT] (서열 번호 272)
RAG6-516	GAGACTCCGTCTCAAAACA (서열 번호 430)	GAGACUCCGUCUCAAAACA[dT][dT] (서열 번호 116)	UGUUUUGAGACGGAGUCUC[dT][dT] (서열 번호 273)
RAG6-515	AGACTCCGTCTCAAAACA (서열 번호 431)	AGACUCCGUCUCAAAACA[dT][dT] (서열 번호 117)	UUGUUUUGAGACGGAGUCUC[dT][dT] (서열 번호 274)

[0281]

RAG6-465	TCTAGTGTAAAGGATCTG (서열 번호 432)	UCUAGUGUUUAAAGGAUCUG[dT][dT] (서열 번호 118)	CAGAUCUUUAAACACUAGA[dT][dT] (서열 번호 275)
RAG6-463	TAGTGTTTAAGGATCTGCC (서열 번호 433)	UAGUGUUU/AAGGAUCUGCC[dT][dT] (서열 번호 119)	GGCAGAUCCUUAAAACACUA[dT][dT] (서열 번호 276)
RAG6-460	TGTTAAAGGATCTGCCTTC (서열 번호 434)	UGUUUAAAGGAUCUGCCUUC[dT][dT] (서열 번호 120)	GAAGGCAGAUCCUUAAAACA[dT][dT] (서열 번호 277)
RAG6-453	GGATCTGCCTTCCTTCCTG (서열 번호 435)	GGAUCUGCCUUCCUCCUG[dT][dT] (서열 번호 121)	CAGGAAGGAAGGCAGAUCC[dT][dT] (서열 번호 278)
RAG6-425	TTGTCTTCCTTGTTGTC (서열 번호 436)	UUGUCUUUCCUUGUUUUGUC[dT][dT] (서열 번호 122)	GACAAACAAGGAAGACAA[dT][dT] (서열 번호 279)
RAG6-423	GTCTTTCCTTGTTGCTT (서열 번호 437)	GUCUUUCUUUGUUUGUCUU[dT][dT] (서열 번호 123)	AAGACAAACAAGGAAAGAC[dT][dT] (서열 번호 280)
RAG6-395	CAAGCAGGTTTAAATTC (서열 번호 438)	CAAGCAGGUUUAAAUUC[dT][dT] (서열 번호 124)	GGAAUUUAAAACCUCGUUG[dT][dT] (서열 번호 281)
RAG6-392	GCAGGTTTAAATTCCTAG (서열 번호 439)	GCAGGUUUUAAAUCCUAG[dT][dT] (서열 번호 125)	CUAGGAUUUAAAACCUCGC[dT][dT] (서열 번호 282)
RAG6-364	ACATTTACTTTTCCAGGG (서열 번호 440)	ACAUUUACUUUUCCAAGGG[dT][dT] (서열 번호 126)	CCUUUGGAAAAGUAAAUGU[dT][dT] (서열 번호 283)
RAG6-294	ACACTGGAGTTCGAGACGA (서열 번호 441)	ACACUGGAGUUCGAGACGA[dT][dT] (서열 번호 127)	UCGUCUCGAACUCCAGUGU[dT][dT] (서열 번호 284)
RAG6-291	CTGGAGTTCGAGACGAGGC (서열 번호 442)	CUGGAGUUCGAGACGAGGC[dT][dT] (서열 번호 128)	GCCUCGUCUCGAACUCCAG[dT][dT] (서열 번호 285)
RAG6-285	TTCGAGACGAGGCCTAAGC (서열 번호 443)	UUCGAGACGAGGCCUAAAGC[dT][dT] (서열 번호 129)	GCUUAGGCCUCGUCUGAA[dT][dT] (서열 번호 286)
RAG6-282	GAGACGAGGCCTAAGCAAC (서열 번호 444)	GAGACGAGGCCUAAAGCAAC[dT][dT] (서열 번호 130)	GUUGCUUAGGCCUCGUCUC[dT][dT] (서열 번호 287)
RAG6-281	AGACGAGGCCTAAGCAACA (서열 번호 445)	AGACGAGGCCUAAAGCAACA[dT][dT] (서열 번호 131)	UGUUGCUUAGGCCUCGUCU[dT][dT] (서열 번호 288)
RAG6-280	GACGAGGCCTAAGCAACAT (서열 번호 446)	GACGAGGCCUAAAGCAACAU[dT][dT] (서열 번호 132)	AUGUUGCUUAGGCCUCGUC[dT][dT] (서열 번호 289)

[0282]

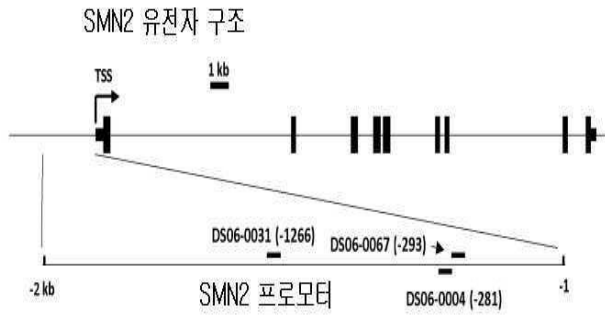
RAG6-273	CCTAAGCAACATGCCGAAA (서열 번호 447)	CCUAGCAACAUGCCGAAA[dT][dT] (서열 번호 133)	UUUCGGCAUGUUGCUUAGG[dT][dT] (서열 번호 290)
RAG6-272	CTAAGCAACATGCCGAAAC (서열 번호 448)	CUAAGCAACAUGCCGAAAC[dT][dT] (서열 번호 134)	GUUCGGCAUGUUGCUUAG[dT][dT] (서열 번호 291)
RAG6-271	TAAGCAACATGCCGAAACC (서열 번호 449)	UAGCAACAUGCCGAAACC[dT][dT] (서열 번호 135)	GGUUCGGCAUGUUGCUUA[dT][dT] (서열 번호 292)
RAG6-219	TGGTGGCGCACGCCCTATAG (서열 번호 450)	UGGTGGCGCACGCCCUAAG[dT][dT] (서열 번호 136)	CUAAGGGGUGGCGCCACCA[dT][dT] (서열 번호 293)
RAG6-218	GGTGGCGCACGCCCTATAGT (서열 번호 451)	GGUGGCGCACGCCCUAAGU[dT][dT] (서열 번호 137)	ACUUAAGGCGUGGCGCCACC[dT][dT] (서열 번호 294)
RAG6-206	CTATAGTCCTAGCTACTGG (서열 번호 452)	CUAAGUCCUAGCUACUGG[dT][dT] (서열 번호 138)	CCAGUAGGUAGGACUUAUAG[dT][dT] (서열 번호 295)
RAG6-205	TATAGTCCTAGCTACTGGG (서열 번호 453)	UAUAGUCCUAGCUACUGGG[dT][dT] (서열 번호 139)	CCCAGUAGCUAGGACUUAU[dT][dT] (서열 번호 296)
RAG6-181	TGAGGTGGGAGGATCGCTT (서열 번호 454)	UGAGGUGGGAGGAGCGCUU[dT][dT] (서열 번호 140)	AAGCGAUCCUCCCACCUCUA[dT][dT] (서열 번호 297)
RAG6-144	CTGCAGTGAGCCGAGATCG (서열 번호 455)	CUGCAGUGAGCCGAGAUCC[dT][dT] (서열 번호 141)	CGAUCUGGCGCUCACUAGCAG[dT][dT] (서열 번호 298)
RAG6-143	TGCAGTGAGCCGAGATCGC (서열 번호 456)	UGCAGUGAGCCGAGAUCCG[dT][dT] (서열 번호 142)	GCGAUCUGGCGCUCACUGCA[dT][dT] (서열 번호 299)
RAG6-119	TGCACTCCAGCCTGAGCGA (서열 번호 457)	UGCACUCCAGCCUGAGCGA[dT][dT] (서열 번호 143)	UCGCUACAGGCUGGAGUGCA[dT][dT] (서열 번호 300)
RAG6-117	CACCTCCAGCCTGAGCGACA (서열 번호 458)	CACUCCAGCCUGAGCGACA[dT][dT] (서열 번호 144)	UGUCGCUACAGGCUGGAGUG[dT][dT] (서열 번호 301)
RAG6-101	ACAGGGCGAGGCTCTGTCT (서열 번호 459)	ACAGGGCGAGGCUUGUCU[dT][dT] (서열 번호 145)	AGACAGAGCCUCGCCUCGU[dT][dT] (서열 번호 302)
RAG6-98	GGCGAGGCTCTGTCTCAA (서열 번호 460)	GGCGAGGCUUGUCUCAA[dT][dT] (서열 번호 146)	UUAGACAGAGCCUCGCC[dT][dT] (서열 번호 303)
RAG6-97	GGCGAGGCTCTGTCTCAA (서열 번호 461)	GGCGAGGCUUGUCUCAA[dT][dT] (서열 번호 147)	UUUGAGACAGAGCCUCGCC[dT][dT] (서열 번호 304)

RAG6-96	GCGAGGCTCTGTCACAAA (서열 번호 462)	GCGAGGCUCUGUCUCAAAA[dt][dt] (서열 번호 148)	UUUUGAGACAGGCCUCGC[dt][dt] (서열 번호 305)
RAG6-93	AGGCTCTGTCACAAACAA (서열 번호 463)	AGGCUCUGUCUCAAAACA[dt][dt] (서열 번호 149)	UUUUUUGAGACAGAGCCU[dt][dt] (서열 번호 306)
RAG6-92	GGCTCTGTCACAAACAAA (서열 번호 464)	GGCUCUGUCUCAAAACA[dt][dt] (서열 번호 150)	UUUGUUUGAGACAGAGCC[dt][dt] (서열 번호 307)
RAG6-91	GCTCTGTCACAAACAAAC (서열 번호 465)	GCUCUGUCUCAAAACA[dt][dt] (서열 번호 151)	GUUUGUUUGAGACAGAGC[dt][dt] (서열 번호 308)
RAG6-90	CTCTGTCACAAACAAACA (서열 번호 466)	CUCUGUCUCAAAACA[dt][dt] (서열 번호 152)	UGUUUGUUUGAGACAGAG[dt][dt] (서열 번호 309)
RAG6-45	AACACAGTGAAATGAAAGG (서열 번호 467)	AACACAGUGAAUUGAAAG[dt][dt] (서열 번호 153)	CCUUUCAUUUCACUGUGUU[dt][dt] (서열 번호 310)
RAG6-44	ACACAGTGAAATGAAAGGA (서열 번호 468)	ACACAGUGAAUUGAAAG[dt][dt] (서열 번호 154)	UCCUUUCAUUUCACUGUGU[dt][dt] (서열 번호 311)
RAG6-41	CAGTGAAATGAAAGGATTG (서열 번호 469)	CAGUGAAUUGAAAGGAUUG[dt][dt] (서열 번호 155)	CAUCCUUUCAUUUCACUG[dt][dt] (서열 번호 312)
RAG6-39	GTGAAATGAAAGGATTGAG (서열 번호 470)	GUGAAUUGAAAGGAUUGAG[dt][dt] (서열 번호 156)	CUCAUCCUUUCAUUUCAC[dt][dt] (서열 번호 313)
RAG6-37	GAAATGAAAGGATTGAGAG (서열 번호 471)	GAAUUGAAAGGAUUGAGAG[dt][dt] (서열 번호 157)	CUCUCAUCCUUUCAUUUC[dt][dt] (서열 번호 314)

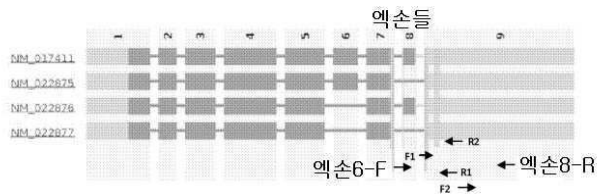
[표 9]

도면

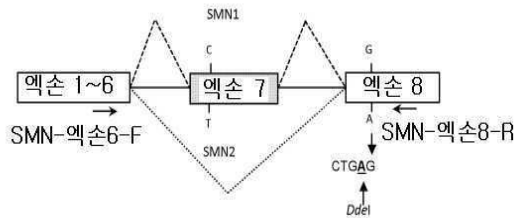
도면1a



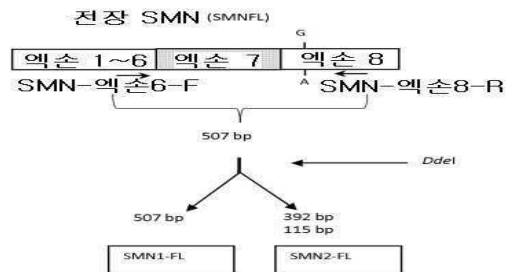
도면1b



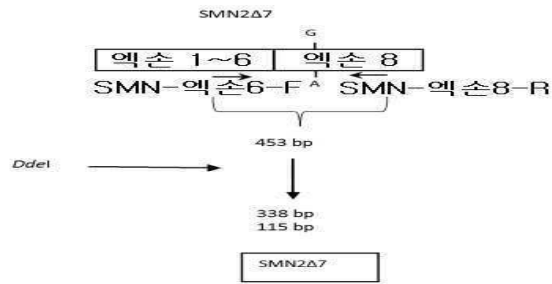
도면2a



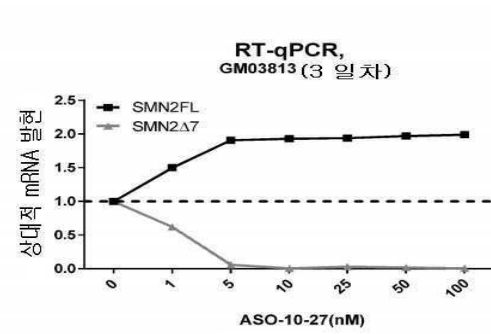
도면2b



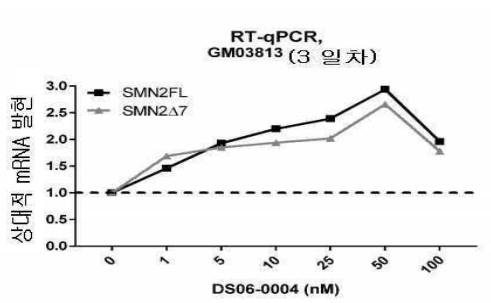
도면2c



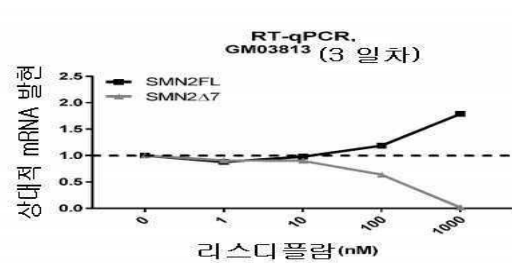
도면3a



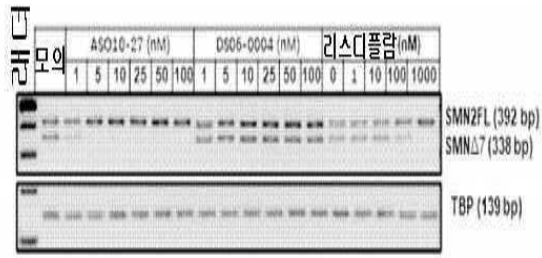
도면3b



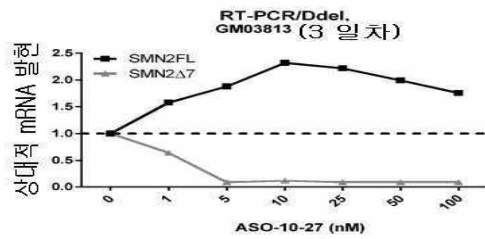
도면3c



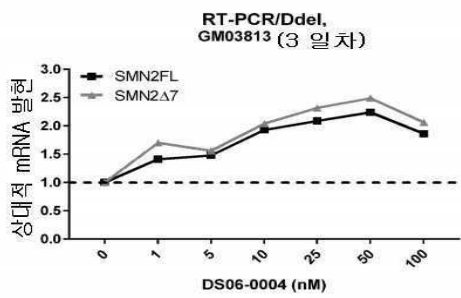
도면3d



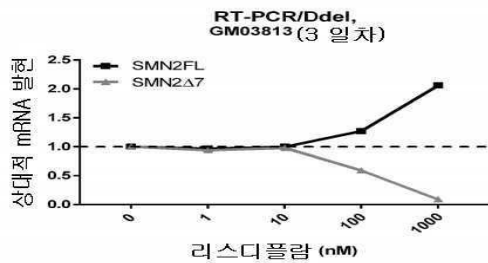
도면3e



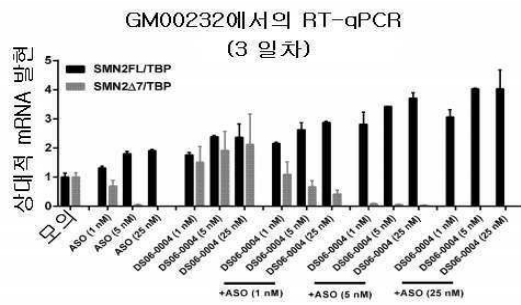
도면3f



도면3g



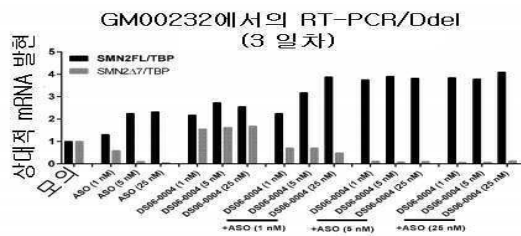
도면4a



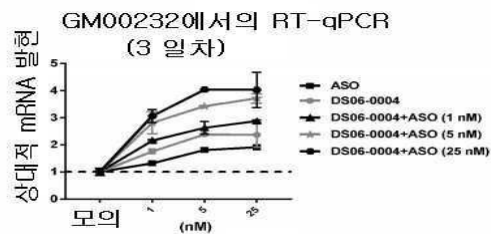
도면4b

GM00232 (nM)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
모의	+															
ASO (1)		+							+	+						
ASO (5)			+								+	+	+			
ASO (25)				+										+	+	+
DS06-0004 (1)					+			+						+		
DS06-0004 (5)						+			+			+			+	
DS06-0004 (25)							+			+			+			+
SMN2FL (392 bp)																
SMNΔ7 (338 bp)																
TBP (139 bp)																

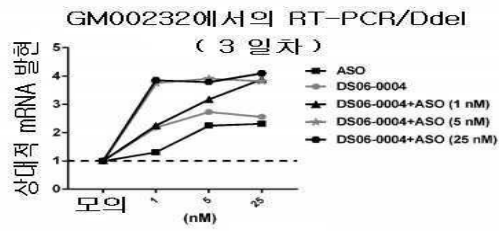
도면4c



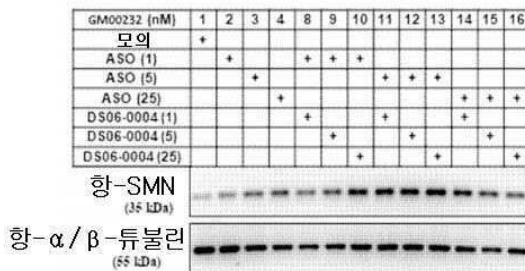
도면4d



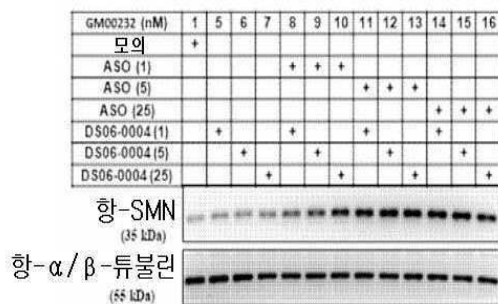
도면4e



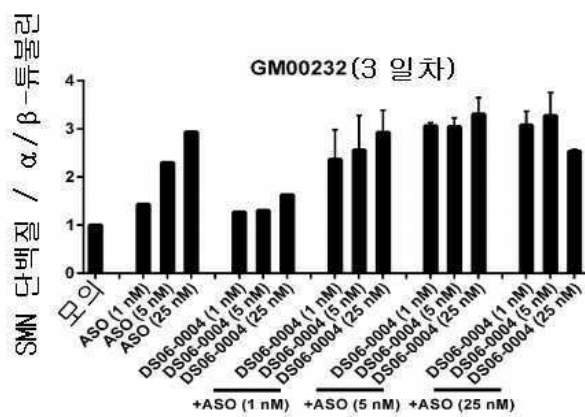
도면5a



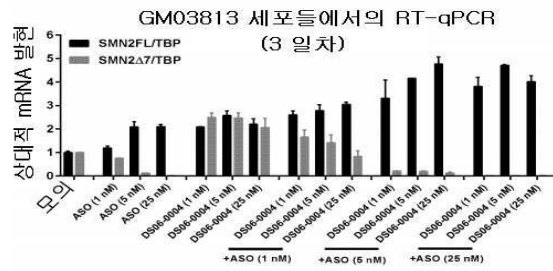
도면5b



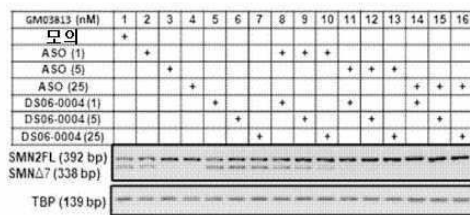
도면5c



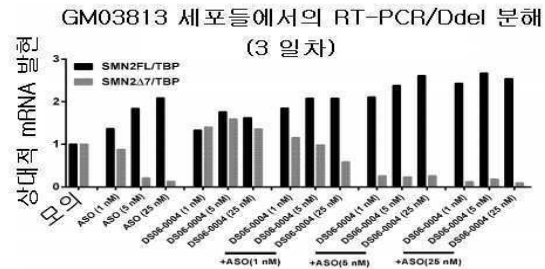
도면6a



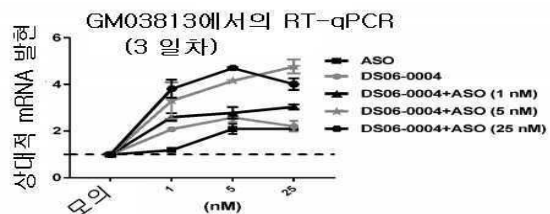
도면6b



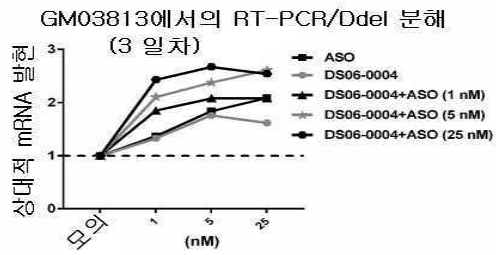
도면6c



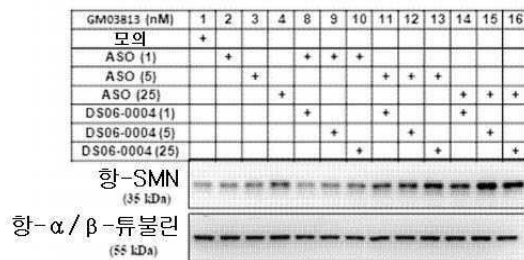
도면6d



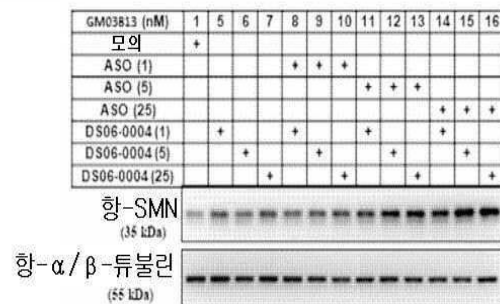
도면6e



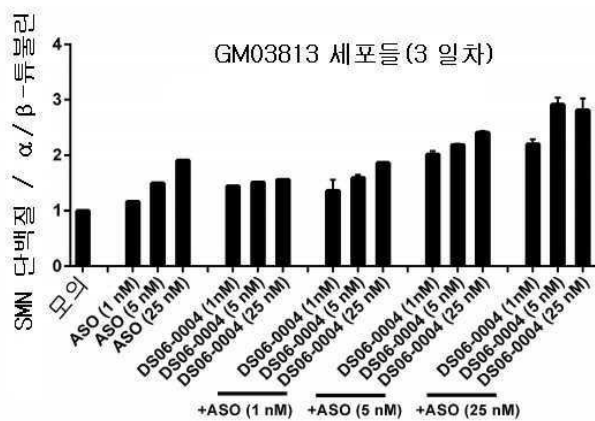
도면7a



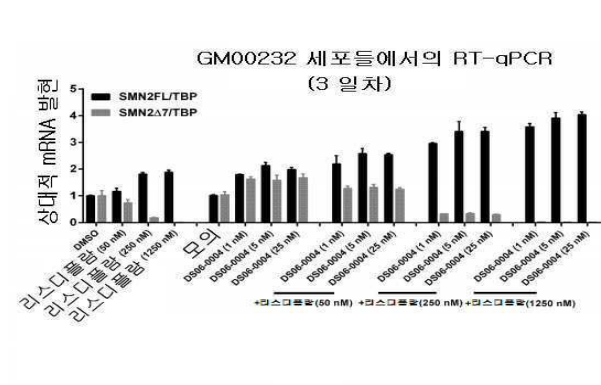
도면7b



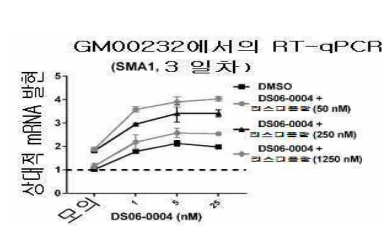
도면7c



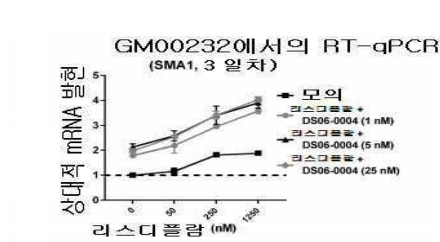
도면8a



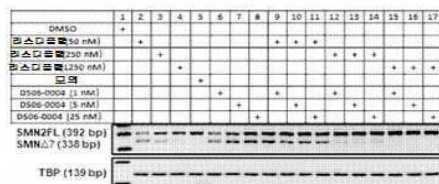
도면8b



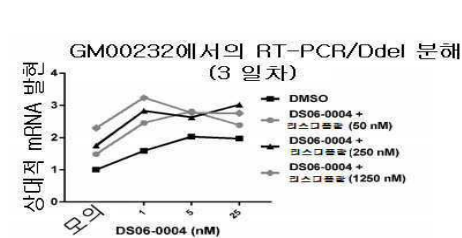
도면8c



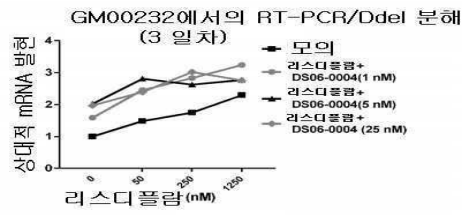
도면8d



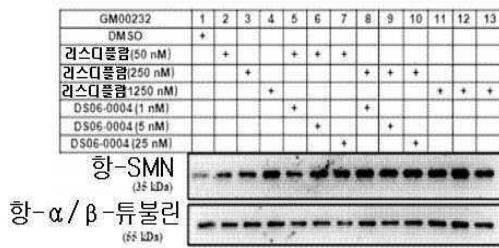
도면8e



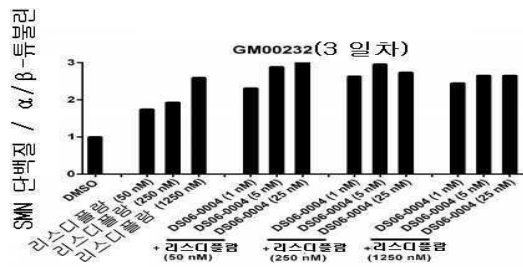
도면8f



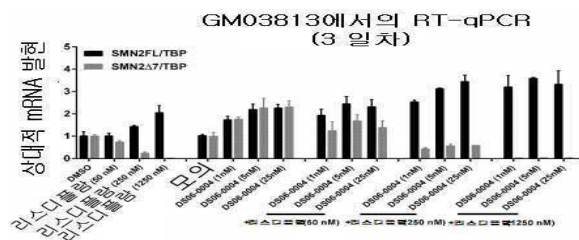
도면9a



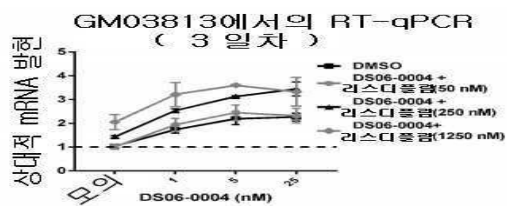
도면9b



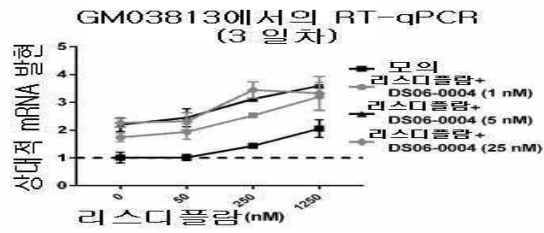
도면10a



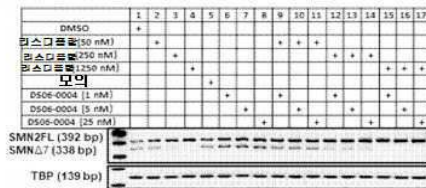
도면10b



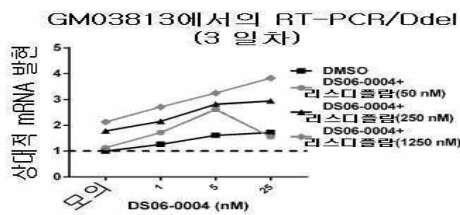
도면10c



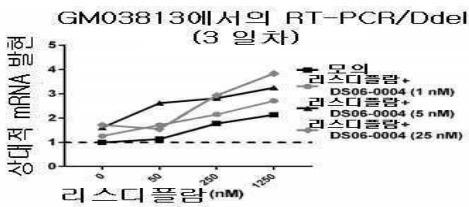
도면10d



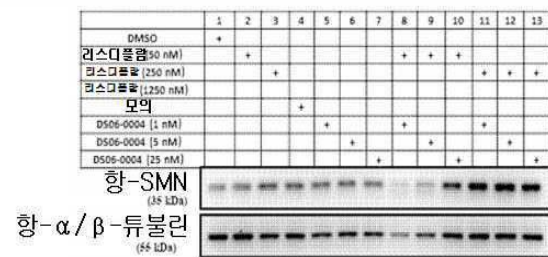
도면10e



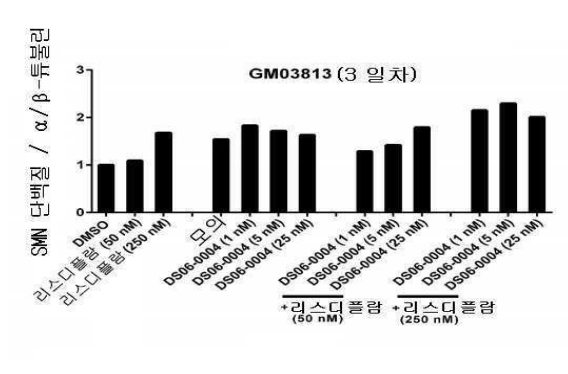
도면10f



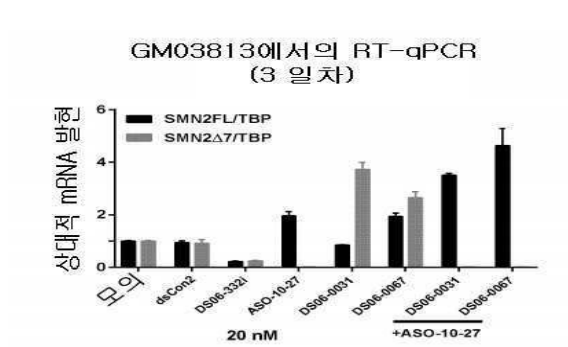
도면11a



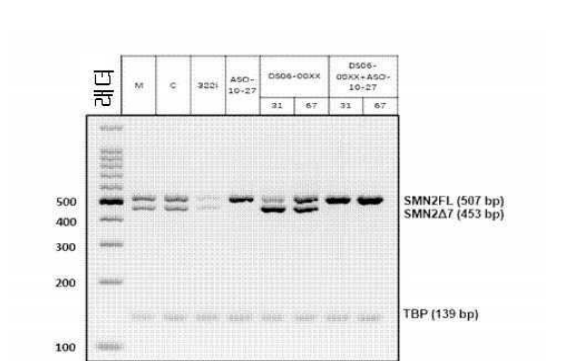
도면11b



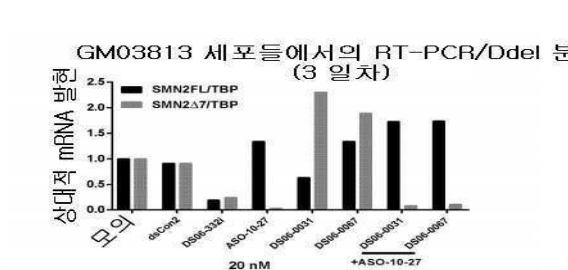
도면12a



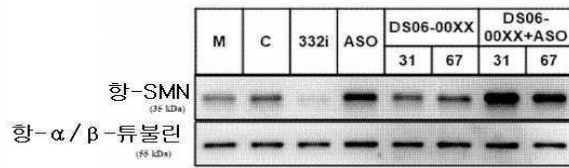
도면12b



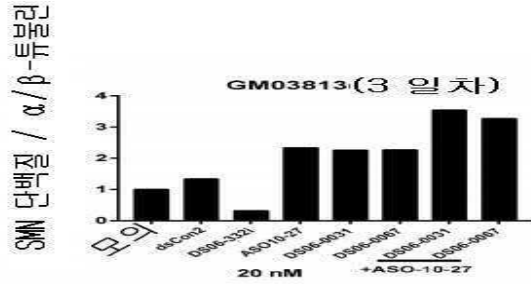
도면12c



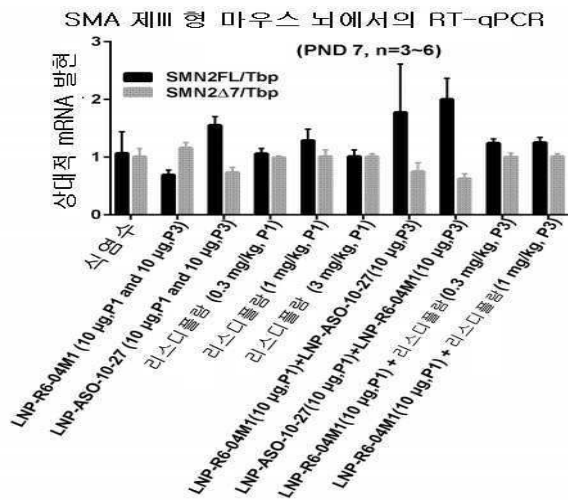
도면12d



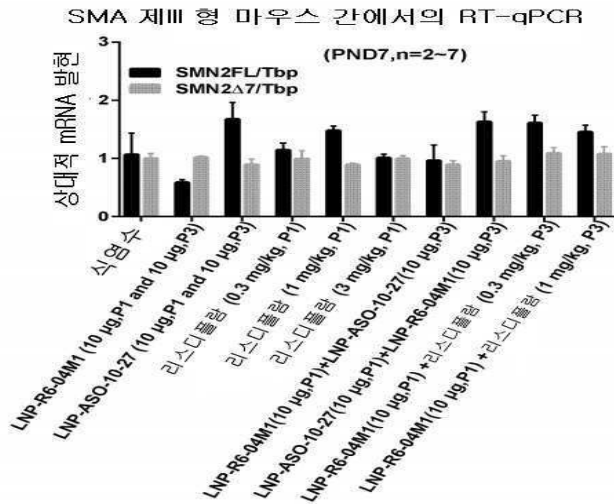
도면12e



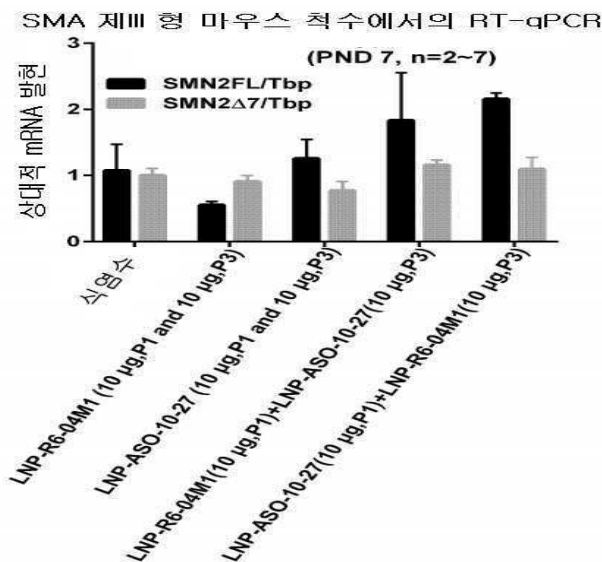
도면13a



도면13b



도면13c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Ractigen Therapeutics

<120> COMBINATORY TREATMENT OF SMA WITH SARNA AND MRNA MODULATORS

<130> RAG-ZL-202006-01

<150> PCT/CN2020/106200

<151> 2020-07-31

<160> 498

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 1
 aucugugaga uguaccuuut t 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 2
 cacucuguca cucaggcugt t 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 3
 acucugucac ucaggcuggt t 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 4
 ucugucacuc aggcuggagt t 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 5
 ucaggcugga gugcaguggt t 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213>
 > Artificial Sequence

<400> 6	
gagugcagug gcgugaucut t	21
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 7	
ugcaguggcg ugaucuuggt t	21
<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 8	
gcaguggcgu gaucuuggt t	21
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 9	
ggcgugaucu uggcucacut t	21
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 10	
gugaucuugg cucacugcat t	21
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 11	
ugaucuuggc ucacugcaat t	21
<210> 12	
<211> 21	

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

aucuuggcuc acugcaacct t 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

cuuggcucac ugcaaccuct t 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

uuggcucacu gcaaccuct t 21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

gccucccgag uucaagugat t 21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

ccucccgagu ucaagugaut t 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

cucccgaguu caagugauut t	21
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 18	
ucccgaguuc aagugauuct t	21
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 19	
ucaagugauu cuccuggcut t	21
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 20	
aagugauucu ccuggcucat t	21
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 21	
agugauucuc cuggcucagt t	21
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 22	
gugauucucc uggcucagct t	21
<210> 23	
<211> 21	

<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 23	
cagccuccca agcagcugut t	21
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 24	
ccucccaagc agcugucaut t	21
<210> 25	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 25	
ucccaagcag cugucauuat t	21
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 26	
agcugucauu acaggccugt t	21
<210> 27	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 27	
gcugucauua caggccugct t	21
<210> 28	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 28	

cugucauuac aggccugcat t	21
<210> 29	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 29	
ggagaaacag gguuucacct t	21
<210> 30	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 30	
agaaacaggg uuucaccat t	21
<210> 31	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 31	
aagugcuggg auuauaggct t	21
<210> 32	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 32	
uuauaggcau gagccaccgt t	21
<210> 33	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 33	
auucucccu uccuccacat t	21
<210> 34	
<211> 21	

<212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 34
 ucucuccuuc cuccacagat t 21
 <210> 35
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 35
 cauuuagcaa ccuagaugt t 21
 <210> 36
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 36

 auuuagcaac ccuagaugct t 21
 <210> 37
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 37
 uuuagcaacc cuagaugcut t 21
 <210> 38
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 38
 uuagcaaccc uagaugcuut t 21
 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 39

uagcaacccu agaugcuuat t	21
<210> 40	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 40	
auacuggagg cccggugugt t	21
<210> 41	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 41	
gugugguggc ucacaccugt t	21
<210> 42	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 42	
ugguggcuca caccuguaat t	21
<210> 43	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 43	
gguggcucac accuguaaut t	21
<210> 44	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 44	
guggcucaca ccuguaauct t	21
<210> 45	
<211> 21	

<212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 45
 ggcucacacc uguaaucct t 21
 <210> 46
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 46

 cacaccugua auccagcat t 21
 <210> 47
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 47
 acaccuguaa uccagcact t 21
 <210> 48
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 48
 accuguaauc ccagcacuut t 21
 <210> 49
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 49
 guaaucccag cacuuuggt t 21

 <210> 50
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 50

uaaucccagc acuuugggat t	21
<210> 51	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 51	
aaucccagca cuuugggagt t	21
<210> 52	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 52	
cagcacuuug ggaggccgat t	21
<210> 53	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 53	
gaggcggucg gauuacgagt t	21
<210> 54	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 54	
ggcggucgga uuacgaggut t	21
<210> 55	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 55	
gcggucggau uacgagguct t	21
<210> 56	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	

<213> Artificial Sequence

<400> 56

cggucggauu acgaggucat t

21

<210> 57

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 57

ggucggauua cgaggucagt t

21

<210> 58

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 58

gucggauuac gaggucaggt t

21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 59

ucggauuacg aggucaggat t

21

<210> 60

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 60

cggauuacga ggucaggagt t

21

<210> 61

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 61

auuacgaggu caggaguuct t

21

<210>	62	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	62	
uuacgagguc	aggaguucat t	21
<210>	63	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	63	
uacgagguca	ggaguucaat t	21
<210>	64	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	64	
acgaggucag	gaguucaagt t	21
<210>	65	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	65	
aggucaggag	uucaagacct t	21
<210>	66	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	66	
aguucaagac	cagccugget t	21
<210>	67	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	

<213> Artificial Sequence

<400> 67

gaaaccccau cuuuacuaat t 21

<210> 68

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 68

auuagccggg uguggugut t 21

<210> 69

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 69

guggugggcg ccuguaauct t 21

<210> 70

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 70

ggcgccugua auccagcut t 21

<210> 71

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 71

uaauccagc uacucgggt t 21

<210> 72

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 72

gggcugaggc agaauugcut t 21

<210> 73

<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	73	
	ggcagaaug cuugaacut t	21
<210>	74	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	74	
	cagaaugcu ugaaccuggt t	21
<210>	75	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	75	
	ugaaccuggg aggcagaggt t	21
<210>	76	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	76	
	gaaccuggga ggcagaggut t	21
<210>	77	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	77	
	accugggagg cagaggugt t	21
<210>	78	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	

<400> 78	
ugcagugagc ugagaucact t	21
<210> 79	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 79	
cugagaucac gccacugcat t	21
<210> 80	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 80	
aucacgccac ugcauuccat t	21
<210> 81	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 81	
gggugacaga gcaauacuct t	21
<210> 82	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 82	
ugacagagca auacucugut t	21
<210> 83	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 83	
agagcaauac ucugucgcat t	21
<210> 84	

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 84

aaaagaauac uggaggcugt t 21

<210> 85

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 85

aaagaauacu ggaggcuggt t 21

<210> 86

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 86

auacuggagg cugggcgagt t 21

<210> 87

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 87

cgagguggcu cacaccugut t 21

<210> 88

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 88

gguggcucac accugaaat t 21

<210> 89

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 89

ggcucacacc uguaaucct t	21
<210> 90	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 90	
gcucacaccu guaauccat t	21
<210> 91	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 91	
cacaccugua auccagcat t	21
<210> 92	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 92	
uaauccagc auuuuggat t	21
<210> 93	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 93	
gggcggaaua ucuugagct t	21
<210> 94	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 94	
aaauucuuga gcucaggagt t	21
<210> 95	
<211> 21	

<212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 95
 uucgagacca gccuacacat t 21
 <210> 96
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 96

 ccagccuaca caauaugcut t 21
 <210> 97
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 97
 acacaauaug cuccaaacgt t 21
 <210> 98
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 98
 cacaauaugc uccaaacgt t 21
 <210> 99
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 99
 acaauaugcu ccaaacgcct t 21

 <210> 100
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 100

caaacgccgc cucuacaaat t	21
<210> 101	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 101	
cugugguccu agcuacuugt t	21
<210> 102	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 102	
gggaggau cg cuugagcuct t	21
<210> 103	
<211> 21	
<212>	
DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 103	
gaggau cgcu ugagcucggt t	21
<210> 104	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 104	
ggaggucgag gcugcaaugt t	21
<210> 105	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 105	
ggucgaggcu gcaaugagct t	21
<210> 106	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	

<213> Artificial Sequence	
<400> 106	
caaugagccg agauggugct t	21
<210> 107	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 107	
aaugagccga gauggugcct t	21
<210> 108	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 108	
ccgagauggu gccacugcat t	21
<210> 109	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 109	
gagauggugc cacugcacut t	21
<210> 110	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 110	
agauggugcc acugcacuct t	21
<210> 111	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 111	
auggugccac ugcacucugt t	21

<210> 112
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 112
 ccacugcacu cugacgacat t 21
 <210> 113
 <211> 21
 <212>
 DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 113
 cacugcacuc ugacgacagt t 21
 <210> 114
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 114
 ucugacgaca gagcgagact t 21
 <210> 115
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 115
 cugacgacag agcgagacut t 21
 <210> 116
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 116
 gagacuccgu cucaaaacat t 21
 <210> 117
 <211> 21
 <212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 117

agacuccguc ucaaaacaat t 21

<210> 118

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 118

ucuaguguuu aaggaucugt t 21

<210> 119

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 119

uaguguuuua ggaucugcct t 21

<210> 120

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 120

uguuuaagga ucugccuuct t 21

<210> 121

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 121

ggaucugccu uccuuccugt t 21

<210> 122

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 122

uugucuuucc uuguuguct t 21

<210> 123

<211> 21

<212>

DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 123

gucuuuccuu guuugucuut t 21

<210> 124

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 124

caagcagguu uuaaaauuct t 21

<210> 125

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 125

gcagguuuua aaauccuagt t 21

<210> 126

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 126

acauuuacuu uucaagggt t 21

<210> 127

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 127

acacuggagu ucgagacgat t 21

<210> 128

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 128
cuggaguucg agacgaggct t 21

<210> 129
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence

<400> 129
uucgagacga ggccuaagct t 21

<210> 130
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence

<400> 130
gagacgaggc cuaagcaact t 21

<210> 131
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence

<400> 131
agacgaggcc uaagcaacat t 21

<210> 132
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence

<400> 132
gacgaggccu aagcaacaut t 21

<210> 133
<211> 21
<212>
DNA/RNA
<213> Artificial Sequence

<400> 133
ccuaagcaac augccgaaat t 21

<210> 134

<211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 134
 cuaagcaaca ugccgaaact t 21
 <210> 135
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 135
 uaagcaacau gccgaaacct t 21
 <210> 136
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence

 <400> 136
 ugguggcgca cgccuauagt t 21
 <210> 137
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 137
 gguggcgcac gccuauagut t 21
 <210> 138
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 138
 cuauaguccu agcuacuggt t 21
 <210> 139
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 139

uauaguccua gcuacugggt t	21
<210> 140	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 140	
ugagguggga ggaucgcuut t	21
<210> 141	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 141	
cugcagugag ccgagaucgt t	21
<210> 142	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 142	
ugcagugagc cgagaucgt t	21
<210> 143	
<211> 21	
<212>	
DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 143	
ugcacuccag ccugagcgat t	21
<210> 144	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 144	
cacuccagcc ugagcgacat t	21
<210> 145	
<211> 21	

<212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 145
 acagggcgag gcucugucut t 21
 <210> 146
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 146
 gggcgaggcu cugucucaat t 21
 <210> 147
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 147
 ggcgaggcuc ugucucuaat t 21
 <210> 148
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 148
 gcgaggcucu gucucuaaat t 21
 <210> 149
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 149
 aggcucuguc ucaaaacaat t 21
 <210> 150
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 150

ggcucugucu caaaacaaat t 21

<210> 151

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 151

gcucugucuc aaaacaaact t 21

<210> 152

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 152

cucugucuca aaacaaacat t 21

<210> 153

<211> 21

<212>

DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 153

aacacaguga aaugaaaggt t 21

<210> 154

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 154

acacagugaa augaaaggat t 21

<210> 155

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 155

cagugaaaug aaaggauugt t 21

<210> 156

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence	
<400> 156	
gugaaaugaa aggauugagt t	21
<210> 157	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 157	
gaaaugaaag gauugagagt t	21
<210> 158	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 158	
aaagguacau cucacagaut t	21
<210> 159	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 159	
cagccugagu gacagagugt t	21
<210> 160	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 160	
ccagccugag ugacagagut t	21
<210> 161	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 161	
cuccagccug agugacagat t	21

<210> 162
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 162
 ccacugcacu ccagccugat t 21
 <210> 163
 <211> 21
 <212>
 DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 163
 agaucacgcc acugcacuct t 21
 <210> 164
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 164
 ccaagaucac gccacugcat t 21
 <210> 165
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 165
 gccaaagauca cgccacugct t 21
 <210> 166
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 166
 agugagccaa gaucacgcct t 21
 <210> 167
 <211> 21
 <212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence	
<400> 167	
ugcagugagc caagaucact t	21
<210> 168	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 168	
uugcagugag ccaagaucat t	21
<210> 169	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 169	
gguugcagug agccaagaut t	21
<210> 170	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 170	
gagguugcag ugagccaagt t	21
<210> 171	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 171	
ggagguugca gugagccaat t	21
<210> 172	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 172	
ucacuugaac ucgggaggct t	21
<210> 173	

<211> 21

<212>

DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 173

aucacuugaa cucgggaggt t 21

<210> 174

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 174

aaucacuuga acucgggagt t 21

<210> 175

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 175

gaaucacuug aacucgggat t 21

<210> 176

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 176

agccaggaga aucacuugat t 21

<210> 177

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 177

ugagccagga gaaucacuut t 21

<210> 178

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 178
cugagccagg agaauca cut t 21

<210> 179
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence
<400> 179
gcugagccag gagaucact t 21

<210> 180
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence
<400> 180
acagcugcuu gggaggcugt t 21

<210> 181
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence
<400> 181
augacagcug cuugggaggt t 21

<210> 182
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence
<400> 182
uaaugacagc ugcugggat t 21

<210> 183
<211> 21
<212>
DNA/RNA
<213> Artificial Sequence
<400> 183
caggccugua augacagcut t 21

<210> 184

<211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 184
 gcaggccugu aaugacagt t 21
 <210> 185
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 185
 ugcaggccug uaaugacagt t 21
 <210> 186
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 186
 ggugaaaccc uguuucuct t 21
 <210> 187
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 187
 auggugaaac ccuguuucut t 21
 <210> 188
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 188
 gccuauaauc ccagcacuut t 21
 <210> 189
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 189

cgguggcuca ugccuauaat t	21
<210> 190	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 190	
uguggaggaa ggggagaaut t	21
<210> 191	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 191	
ucuguggagg aaggggagat t	21
<210> 192	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 192	
caucuagggg ugcuaaaugt t	21
<210> 193	
<211> 21	
<212>	
DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 193	
gcaucuaggg uugcuaaaat t	21
<210> 194	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 194	
agcaucuagg guugcuaaat t	21
<210> 195	
<211> 21	

<212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 195
 aagcaucuag gguugcuaat t 21
 <210> 196
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 196
 uaagcaucua gguugcuat t 21
 <210> 197
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 197
 cacaccgggc cuccaguaut t 21
 <210> 198
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 198
 caggugugag ccaccacact t 21
 <210> 199
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 199
 uuacaggugu gagccacat t 21
 <210> 200
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 200

auuacaggug ugagccacct t	21
<210> 201	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 201	
gauuacaggu gugagccact t	21
<210> 202	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 202	
gggauuacag gugugagcct t	21
<210> 203	
<211> 21	
<212>	
DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 203	
ugcugggauu acaggugut t	21
<210> 204	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 204	
gugcugggau uacaggut t	21
<210> 205	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 205	
aagugcuggg auuacaggut t	21
<210> 206	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	

<213> Artificial Sequence	
<400> 206	
cccaaagugc uggaauact t	21
<210> 207	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 207	
ucccaaagug cuggauuat t	21
<210> 208	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 208	
cucccaaagu gcuggauut t	21
<210> 209	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 209	
ucggccuccc aaagucugt t	21
<210> 210	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 210	
cucguaaucc gaccgcuct t	21
<210> 211	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 211	
accucguaau ccgaccgct t	21

<210> 212
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 212
 gaccucguaa uccgaccgt t 21
 <210> 213
 <211> 21
 <212>
 DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 213
 ugaccucgua auccgaccgt t 21
 <210> 214
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 214
 cugaccucgu aauccgacct t 21
 <210> 215
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 215
 ccugaccucg uaauccgact t 21
 <210> 216
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 216
 uccugaccuc guaauccgat t 21
 <210> 217
 <211> 21
 <212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence	
<400> 217	
cuccugaccu cguaauccgt t	21
<210> 218	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 218	
gaacuccuga ccucguaaut t	21
<210> 219	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 219	
ugaacuccug accucguaat t	21
<210> 220	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 220	
uugaacuccu gaccucguat t	21
<210> 221	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 221	
cuugaacucc ugaccucgut t	21
<210> 222	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 222	
ggucuugaac uccugaccut t	21
<210> 223	

<211> 21

<212>

DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 223

gccaggcugg ucuugaacut t 21

<210> 224

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 224

uuaguaaaga ugggguuuct t 21

<210> 225

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 225

accaccacac ccggcuaaut t 21

<210> 226

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 226

gauuacaggc gccaccact t 21

<210> 227

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 227

agcugggauu acaggcgct t 21

<210> 228

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 228	
ccccgaguag cugggauuat t	21
<210> 229	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 229	
agcaauucug ccucagccct t	21
<210> 230	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 230	
agguucaagc aaucugcct t	21
<210> 231	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 231	
ccagguuca gcaauucugt t	21
<210> 232	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 232	
ccucugccuc ccagguucat t	21
<210> 233	
<211> 21	
<212>	
DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 233	
accucugccu ccagguuct t	21
<210> 234	

<211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 234
 caaccucugc cuccaggut t 21
 <210> 235
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 235
 gugaucucag cucacugcat t 21
 <210> 236
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 236
 ugcaguggcg ugaucucagt t 21
 <210> 237
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 237
 uggaauugcag uggcgugaut t 21
 <210> 238
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 238
 gaguauugcu cugcacccct t 21
 <210> 239
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 239

acagaguauu gcucugucat t	21
<210> 240	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 240	
ugcgacagag uauugcucut t	21
<210> 241	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 241	
cagccuccag uauucuuuut t	21
<210> 242	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 242	
ccagccucca guauucuuut t	21
<210> 243	
<211> 21	
<212>	
DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 243	
cucgcccagc cuccaguaut t	21
<210> 244	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 244	
acagguguga gccaccucgt t	21
<210> 245	
<211> 21	

<212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 245
 auuacaggug ugagccacct t 21
 <210> 246
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence

 <400> 246
 gggauuacag gugugagcct t 21
 <210> 247
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 247
 ugggauuaca ggugugagct t 21
 <210> 248
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 248
 ugcugggauu acaggugugt t 21
 <210> 249
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 249
 ucccaaaaug cugggauuat t 21

 <210> 250
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 250

agcucaagau auuccgcct t	21
<210> 251	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 251	
cuccugagcu caagauauut t	21
<210> 252	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 252	
uguguaggcu ggucucgaat t	21
<210> 253	
<211> 21	
<212>	
DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 253	
agcauauugu guaggcuggt t	21
<210> 254	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 254	
cguuuggagc auauugugt t	21
<210> 255	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 255	
gcguuuggag cauauugugt t	21
<210> 256	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	

<213> Artificial Sequence	
<400> 256	
ggcguuugga gcauauugut t	21
<210> 257	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 257	
uuuguagagg cggcguuugt t	21
<210> 258	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 258	
caaguagcua ggaccacagt t	21
<210> 259	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 259	
gagcucaagc gauccucct t	21
<210> 260	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 260	
ccgagcucaa gcgauccuct t	21
<210> 261	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 261	
cauugcagcc ucgaccucct t	21

<210> 262
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 262
 gcucuuugca gccucgacct t 21
 <210> 263
 <211> 21
 <212>
 DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 263
 gcaccaucuc ggcucauugt t 21
 <210> 264
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 264
 ggcaccaucu cggcucauut t 21
 <210> 265
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 265
 ugcaguggca ccaucucggt t 21
 <210> 266
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 266
 agugcagugg caccaucuct t 21
 <210> 267
 <211> 21
 <212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence	
<400> 267	
gagugcagug gcaccaucut t	21
<210> 268	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 268	
cagagucgag uggcaccat t	21
<210> 269	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 269	
ugucgucaga gucgagugt t	21
<210> 270	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 270	
cugucgucag agucgagut t	21
<210> 271	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 271	
gucucgcucu gucucagat t	21
<210> 272	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 272	
agucucguc ugucgucagt t	21
<210> 273	

<211> 21

<212>

DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 273

uguuuugaga cggagucuct t 21

<210> 274

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 274

uuguuuugag acggagucut t 21

<210> 275

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 275

cagauccuua aacacuagat t 21

<210> 276

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 276

ggcagauccu uaaacacuat t 21

<210> 277

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 277

gaaggcagau ccuuaaacat t 21

<210> 278

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 278
caggaaggaa ggcagaucct t 21
<210> 279
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence
<400> 279
gacaaacaag gaaagacaat t 21
<210> 280
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence
<400> 280
aagacaaaca aggaaagact t 21
<210> 281
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence
<400> 281
ggaauuuuuu accugcuugt t 21
<210> 282
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> Artificial Sequence
<400> 282
cuaggaauuu aaaaccugct t 21
<210> 283
<211> 21
<212>
DNA/RNA
<213> Artificial Sequence
<400> 283
cccuuggaaa aguaaaugut t 21
<210> 284

<211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 284
 ucgucucgaa cuccagugut t 21
 <210> 285
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 285
 gccucgucuc gaacuccagt t 21
 <210> 286
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 286
 gcuuaggccu cgucucgaat t 21
 <210> 287
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 287
 guugcuuagg ccucgucut t 21
 <210> 288
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 288
 uguugcuuag gccucgucut t 21
 <210> 289
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 289

auguugcuua ggccucguct t	21
<210> 290	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 290	
uuucggcaug uugcuuaggt t	21
<210> 291	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 291	
guuucggcau guugcuuagt t	21
<210> 292	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 292	
gguuucggca uguugcuuat t	21
<210> 293	
<211> 21	
<212>	
DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 293	
cuauaggcgu ggcaccat t	21
<210> 294	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 294	
acuauaggcg ugcgccacct t	21
<210> 295	
<211> 21	

<212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 295
 ccaguagcua ggacuauagt t 21
 <210> 296
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence

 <400> 296
 cccaguagcu aggacuauat t 21
 <210> 297
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 297
 aagcgauccu cccaccucat t 21
 <210> 298
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 298
 cgaucucggc ucacugcagt t 21
 <210> 299
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 299
 gcgaucucgg cucacugcat t 21

 <210> 300
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 300

ucgcucaggc uggagugcat t	21
<210> 301	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 301	
ugucgcucag gcuggagugt t	21
<210> 302	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 302	
agacagagcc ucgcccugut t	21
<210> 303	
<211> 21	
<212>	
DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 303	
uugagacaga gccucgcct t	21
<210> 304	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 304	
uuugagacag agccucgcct t	21
<210> 305	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 305	
uuuugagaca gagccucgct t	21
<210> 306	
<211> 21	
<212> DNA/RNA	

<213> Artificial Sequence

<400> 306

uuguuuugag acagagccut t 21

<210> 307

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 307

uuuguuuuga gacagagcct t 21

<210> 308

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 308

guuuguuuug agacagagct t 21

<210> 309

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 309

uguuuguuuu gagacagagt t 21

<210> 310

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 310

ccuuucauuu cacuguguut t 21

<210> 311

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 311

uccuuucauu ucacugugut t 21

<210>	312	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	312	
	caauccuuuc auuucacugt t	21
<210>	313	
<211>	21	
<212>		
	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	313	
	cucaauccuu ucauuucact t	21
<210>	314	
<211>	21	
<212>	DNA/RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	314	
	cucucaaucc uuucauuuct t	21
<210>	315	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	315	
	atctgtgaga tgtaccttt	19
<210>	316	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	316	
	cactctgtca ctcaggctg	19
<210>	317	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <400> 317
 actctgtcac tcaggctgg 19
 <210> 318
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 318
 tctgtcactc aggctggag 19
 <210> 319
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 319
 tcaggctgga gtgcagtgg 19
 <210> 320
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 320
 gagtgcagtg gcgtgatct 19
 <210> 321
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 321
 tgcagtggcg tgatcttgg 19
 <210> 322
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 322
 gcagtggcgt gatcttggc 19
 <210> 323

<211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <400> 323
 ggcgtgatct tggctcact 19
 <210> 324
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 324
 gtgatcttgg ctactgca 19
 <210> 325
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 325
 tgatcttggc tcaactgaa 19
 <210> 326
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 326
 atcttggctc actgcaacc 19

 <210> 327
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 327
 cttggctcac tgcaacctc 19
 <210> 328
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 328
 ttggctcact gcaacctcc 19

<210> 329
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 329
 gcctcccagag ttcaagtga 19

<210> 330
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence

<400> 330
 cctcccagagt tcaagtgat 19

<210> 331
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 331
 ctcccagatt caagtgatt 19

<210> 332
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 332
 tcccagattc aagtgattc 19

<210> 333
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 333
 tcaagtgatt ctctggct 19

<210> 334

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 334
 aagtgattct cctggctca 19
 <210> 335
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 335
 agtgattctc ctggctcag 19
 <210> 336
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 336
 gtgattctcc tggctcagc 19
 <210> 337
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <400> 337
 cagcctccca agcagctgt 19
 <210> 338
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 338
 cctcccaagc agctgtcat 19
 <210> 339
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 339

tcccaagcag ctgtcatta	19
<210> 340	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 340	
agctgtcatt acaggcctg	19
<210> 341	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 341	
gctgtcatta caggcctgc	19
<210> 342	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 342	
ctgtcattac aggctgca	19
<210> 343	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 343	
ggagaaacag ggtttcacc	19
<210> 344	
<211> 19	
<212> DNA	
<213>	
> Artificial Sequence	
<400> 344	
agaaacaggg tttcaccat	19
<210> 345	
<211> 19	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 345
 aagtgcctggg attataggc 19
 <210> 346
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 346
 ttataggcat gagccaccg 19
 <210> 347
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 347
 attctcccct tcctccaca 19

 <210> 348
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 348
 tctccccttc ctccacaga 19
 <210> 349
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 349
 catttagcaa ccctagatg 19
 <210> 350
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 350
 atttagcaac cctagatgc 19

<210> 351
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <400> 351
 ttttagcaacc ctagatgct 19
 <210> 352
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 352
 ttagcaaccc tagatgctt 19
 <210> 353
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 353
 tagcaaccct agatgctta 19
 <210> 354
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 354
 atactggagg cccggtgtg 19
 <210> 355
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 355
 gtgtggtggc tcacacctg 19
 <210> 356
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 356

tggtggctca cacctgtaa 19

<210> 357

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 357

ggtggctcac acctgtaat 19

<210> 358

<211> 19

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<400> 358

gtggctcaca cctgtaatc 19

<210> 359

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 359

ggctcacacc tgtaatccc 19

<210> 360

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 360

cacacctgta atcccagca 19

<210> 361

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 361

acacctgtaa tcccagcac 19

<210> 362
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 362
 acctgtaatc ccagcactt 19
 <210> 363
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 363
 gtaatcccag cactttggg 19
 <210> 364
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 364
 taatcccagc actttggga 19
 <210> 365
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <400> 365
 aatcccagca ctttgggag 19
 <210> 366
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 366
 cagcactttg ggaggccga 19
 <210> 367
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 367
gaggcggtcg gattacgag 19

<210> 368
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 368
ggcggtcgga ttacgaggt 19

<210> 369
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 369
gcggtcggat tacgaggtc 19

<210> 370
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 370
cggtcggatt acgaggtca 19

<210> 371
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 371
ggtcggatta cgaggtcag 19

<210> 372
<211> 19
<212> DNA
<213>
> Artificial Sequence

<400> 372
gtcggattac gaggtcagg 19

<210> 373

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 373
 tcgattacg aggtcagga 19
 <210> 374
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 374
 cggattacga ggtcaggag 19
 <210> 375
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 375
 attacgaggt caggagttc 19
 <210> 376
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 376
 ttacgaggtc aggagttca 19
 <210> 377
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 377
 tacgaggta ggagttcaa 19
 <210> 378
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 378

acgaggtcag gaggttcaag 19

<210> 379

<211> 19

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<400> 379

aggtcaggag ttcaagacc 19

<210> 380

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 380

agttcaagac cagcctggc 19

<210> 381

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 381

gaaaccccat cttactaa 19

<210> 382

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 382

attagccggg tgtggtggt 19

<210> 383

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 383

gtggtggcg cctgtaatc 19

<210> 384

<211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 384
 ggcgctgtga atcccagct 19
 <210> 385
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 385
 taatcccagc tactcgggg 19
 <210> 386
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <400> 386
 gggctgaggc agaattgct 19
 <210> 387
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 387
 ggcagaattg cttgaacct 19
 <210> 388
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 388
 cagaattgct tgaacctgg 19
 <210> 389
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 389

tgaacctggg aggcagagg	19
<210> 390	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 390	
gaacctggga ggcagaggt	19
<210> 391	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 391	
acctgggagg cagaggttg	19
<210> 392	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 392	
tgcaagtgcac tgagatcac	19
<210> 393	
<211> 19	
<212> DNA	
<213>	
> Artificial Sequence	
<400> 393	
ctgagatcac gccactgca	19
<210> 394	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 394	
atcacgccac tgcattcca	19
<210> 395	
<211> 19	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 395
 gggtgacaga gcaatactc 19
 <210> 396
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 396
 tgacagagca atactctgt 19
 <210> 397
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 397
 agagcaatac tctgtcgca 19
 <210> 398
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 398
 aaaagaatac tggaggctg 19
 <210> 399
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 399
 aaagaatact ggaggctgg 19
 <210> 400
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <400> 400

atactggagg ctggcgag	19
<210> 401	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 401	
cgaggtggct cacacctgt	19
<210> 402	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 402	
ggtggctcac acctgtaat	19
<210> 403	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 403	
ggctcacacc tgtaatccc	19
<210> 404	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 404	
gctcacacct gtaatccca	19
<210> 405	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 405	
cacacctgta atcccagca	19
<210> 406	
<211> 19	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<400> 406

taatcccagc attttgga 19

<210> 407

<211> 19

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<400> 407

gggcggaata tcttgagct 19

<210> 408

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 408

aatatcttga gctcaggag 19

<210> 409

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 409

ttcgagacca gcctacaca 19

<210> 410

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 410

ccagcctaca caatatgct 19

<210> 411

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 411

acacaatatg ctccaaacg 19

<210> 412
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 412
 cacaatatgc tccaaacgc 19
 <210> 413
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 413
 acaatatgct ccaaacgcc 19
 <210> 414
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <400> 414
 caaacgccgc ctctacaaa 19
 <210> 415
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 415
 ctgtggctcct agctacttg 19
 <210> 416
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 416
 gggaggatcg cttagctc 19
 <210> 417
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 417
gaggatcgct tgagctcgg 19

<210> 418
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 418
ggaggtcgag gctgcaatg 19
<210> 419
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 419
ggtcgaggct gcaatgagc 19
<210> 420
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 420
caatgagccg agatggtgc 19
<210> 421
<211> 19
<212> DNA
<213>
> Artificial Sequence
<400> 421
aatgagccga gatggtgcc 19
<210> 422
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 422
ccgagatggt gccactgca 19
<210> 423

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 423
 gagatggtgc cactgcact 19
 <210> 424
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 424
 agatggtgcc actgcactc 19

 <210> 425
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 425
 atggtgccac tgcactctg 19
 <210> 426
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 426
 ccactgcact ctgacgaca 19
 <210> 427
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 427
 cactgcactc tgacgacag 19
 <210> 428
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence

<400> 428	
tctgacgaca gagcgagac	19
<210> 429	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 429	
ctgacgacag agcgagact	19
<210> 430	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 430	
gagactccgt ctcaaaaca	19
<210> 431	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 431	
agactccgtc tcaaaacaa	19
<210> 432	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 432	
tctagtgttt aaggatctg	19
<210> 433	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 433	
tagtggttaa ggatctgcc	19
<210> 434	
<211> 19	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 434
 tgtttaagga tctgccttc 19
 <210> 435
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <400> 435
 ggatctgcct tccttcctg 19
 <210> 436
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 436
 ttgtctttcc ttgtttgtc 19
 <210> 437
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 437
 gtctttcctt gtttgtctt 19
 <210> 438
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 438
 caagcagggtt ttaaattcc 19

 <210> 439
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 439

gcaggtttta aattcctag	19
<210> 440	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 440	
acatttactt ttccaaggg	19
<210> 441	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 441	
acactggagt tcgagacga	19
<210> 442	
<211> 19	
<212> DNA	
<213>	
> Artificial Sequence	
<400> 442	
ctggagttcg agacgaggc	19
<210> 443	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 443	
ttcgagacga ggcctaagc	19
<210> 444	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 444	
gagacgaggc ctaagcaac	19
<210> 445	
<211> 19	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence
 <400> 445
 agacgaggcc taagcaaca 19

 <210> 446
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 446
 gacgaggcct aagcaacat 19
 <210> 447
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 447
 cctaagcaac atgccgaaa 19
 <210> 448
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 448
 ctaagcaaca tgccgaaac 19
 <210> 449
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <400> 449
 taagcaacat gccgaaacc 19
 <210> 450
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 450
 tgggtggcgca cgcctatag 19

<210> 451
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 451
 ggtggcgcac gcctatagt 19
 <210> 452
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 452
 ctatagtcct agctactgg 19
 <210> 453
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 453
 tatagtccta gctactggg 19
 <210> 454
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 454
 tgaggtggga ggatcgctt 19
 <210> 455
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 455
 ctgcagtgag ccgagatcg 19
 <210> 456
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>

> Artificial Sequence

<400> 456

tgcaagtgcgc cgagatcgc

19

<210> 457

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 457

tgcaactccag cctgagcga

19

<210> 458

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 458

cactccagcc tgagcgaca

19

<210> 459

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 459

acagggcgag gctctgtct

19

<210> 460

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 460

gggcgaggct ctgtctcaa

19

<210> 461

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 461

ggcgaggctc tgtctcaaa

19

<210> 462

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 462

gcgaggctct gtctcaaaa 19

<210> 463

<211> 19

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<400> 463

aggctctgtc tcaaacaa 19

<210> 464

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 464

ggctctgtct caaaacaaa 19

<210> 465

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 465

gctctgtctc aaaacaaac 19

<210> 466

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 466

ctctgtctca aaacaaaca 19

<210> 467

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 467
aacacagtga aatgaaagg 19
<210> 468
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 468
acacagtga atgaaagga 19
<210> 469
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 469
cagtgaatg aaaggattg 19
<210> 470
<211> 19
<212> DNA
<213>
> Artificial Sequence
<400> 470
gtgaaatgaa aggattgag 19
<210> 471
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 471
gaaatgaaag gattgagag 19
<210> 472
<211> 159
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 472
agtcgcactc tgcactcag gctggagtgc agtggcgtga tcttggctca ctgcaacctc 60
cgcctcccga gttcaagtga ttctcctggc tcagcctccc aagcagctgt cattacaggc 120

ctgcaccacc acacccggct gatttttgta ttttagga 159

<210> 473

<211> 82

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 473

aatactggag gcccggtgtg gtggctcaca cctgtaatcc cagcactttg ggaggccgag 60

gcggtcggat tacgaggtca gg 82

<210> 474

<211> 815

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 474

ctggccaaca tggtgaaacc ccatttttac taaaaataca aaaattagcc ggggtgtggtg 60

gtgggcgcct gtaatccag ctactcgggg ggctgaggca gaattgcttg aacctgggag 120

gcagaggttg cagtgagctg agatcacgcc actgcattcc agcctgggtg acagagcaat 180

actctgtcgc aaaaaaaaaa aagaatactg gaggtgggc gaggtggctc acacctgtaa 240

tcccagcatt ttgggatgcc agaggcgggc ggaatatctt gagctcagga gttcgagacc 300

agcctacaca atatgtcca aacgccgcct ctacaaaaca tacagaaact agccgggtgt 360

ggtggcgtgc cctgtggtc ctactactt gggaggttga ggccgggagga tcgcttgagc 420

tcgggaggtc gaggtgcaa tgagccgaga tggtgccact gcactctgac gacagagcga 480

gactccgtct caaaacaaac aacaaataag gttgggggat caaatatctt ctagtgttta 540

aggatctgcc ttcttctctg ccccatgtt tgccttctt tgtttgtctt tatatagatc 600

aagcaggttt taaattccta gtaggagctt acatttactt ttccaagggg gagggggaat 660

aaatatctac acacacacac acacacacac acacacacac aactggagt tcgagacgag 720

gcctaagcaa catgccgaaa cccgtctct actaaataca aaaaatagct gagcttggtg 780

gcgcacgcct atagtcttag ctactgggga ggctg 815

<210> 475

<211> 108

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 475

ctgcagtgag ccgagatcgc gccgctgcac tccagcctga gcgacagggc gaggctctgt 60

ctcaaaacaa acaaacacaaa aaaaaaggaa aggaaatata acacagtg 108

<210> 476

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 476

agacgaggcc uaagcaacat t 21

<210> 477

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 477

uguugcuuag gccucgucut t 21

<210> 478

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 478

uuguacacuu ggucaacaut t 21

<210> 479

<211> 21

<212>

DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 479

auguugacca aguguacaat t 21

<210> 480

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 480

cacuggaguu cgagacgagt t 21

<210> 481

<211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 481
 cucgucucga acuccagugt t 21
 <210> 482
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence

 <400> 482
 ggugacauuu gugaacuut t 21
 <210> 483
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 483
 aaguuucaca aaugucacct t 21
 <210> 484
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 484
 acuacugagu gacaguagat t 21
 <210> 485
 <211> 21
 <212> DNA/RNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 485
 ucuacuguca cucaguagut t 21

 <210> 486
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> modified_base
 <222> (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18)
 <223> 2'-O-methoxyethyl
 <220><221> modified_base
 <222> (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17)
 <223> phosphorothioate backbone modification
 <220><221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 5' methyl cytosine
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> 5' methyl cytosine
 <220><221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 5' methyl cytosine

<220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 5' methyl cytosine
 <400> 486

ucacuuuau aaucugg

18

<210> 487
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 487

tcatactggc tattatatgg gtttt

25

<210> 488
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> modified_base
 <222> (1,3,5,7,13,15,17)
 <223> 2'-O-methyl
 <220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate backbone modification

<220><221> modified_base

<222> (2,4,6,8,9,10,11,12,14,16,18)

<223> 2'-fluoro

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> phosphorothioate backbone modification

<400> 488

gacgaggccu aagcaaca

18

<210> 489

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 489

tgctctatgc cagcatttct c

21

<210> 490

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 490

gctattatat ggaaatgctg gcatag

26

<210> 491

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 491

ttccagatct gtctgatcgt ttct

24

<210> 492

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 492

tgctcaccca ccaacaattt ag 22

<210> 493

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 493

tctgctctga ctttagcacc tg 22

<210> 494

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 494

ccccaccac ctcccatatg 20

<210> 495

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 495

cccttctcac agtcataaa attac 25

<210> 496

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> modified_base

<222> (1,3,5,7,9,11,13,15,17,19)

<223> 2'-O-methyl

<220><221> modified_base

<222> (1,2,13,14,15,16,17,18,19)

<223> phosphorothioate backbone modification

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 5▽? (E)?vinylphosphonate

<220><221> modified_base

<222> (2,4,6,8,10,12,14,16,18,20)

<223> 2'-fluoro

<400> 496

uguugcuuag gccucgucuc

20

<210> 497

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 497

gctctggaat tgtaccgcag

20

<210> 498

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 498

ctgcagcaaa tcgcttgga

20