(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0082576
(43) 공개일자 2011년07월19일

(51) Int. Cl.
C12N 15/113 (2010.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7011326
(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년10월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2011년05월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/061960
(87) 국제공개번호 WO 2010/048586
국제공개일자 2010년04월29일
(30) 우선권주장
61/108,416 2008년10월24일 미국(US)

(71) 출원인
에이브이아이 바이오파마 인코포레이티드
미국 오리건 97333 코발리스 사우스웨스트 리서치 웨이 4575 스위트 200
(72) 발명자
사자니, 피터
미국 워싱턴 98011, 보셀, 12809 노스이스트 201. 피엘.
콜, 리자드
미국 워싱턴 98004, 벨뷰, 아파트 510, 909 112 애비뉴 노스웨스트
(74) 대리인
손민

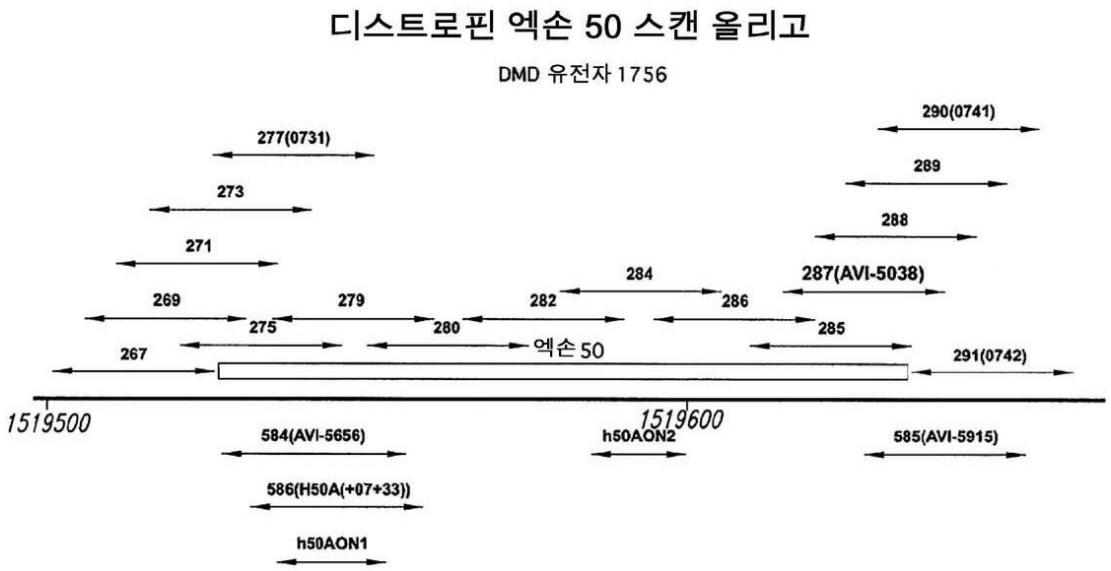
전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) DMD를 위한 다중 엑손 스키핑 조성물

(57) 요 약

본 발명은 인간 디스트로핀 유전자 내의 선택된 표적 부위에 결합하여 엑손 스키핑을 유도할 수 있는 안티센스 분자, 및 근위축증을 치료하기 위해서 이들을 사용하는 방법을 제공한다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 1-20으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 44 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 44의 스키핑(skipping)을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 8, 11 및 12로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 4

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 21-76 및 612 내지 624로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 45 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 45의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 27, 29, 34 및 39로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 29 및 34로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 8

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브

유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 77-125로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 46 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 46의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 77-105로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 82, 84-87, 90, 96, 98, 99 및 101로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 12

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 126-169로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 47 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 47의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 126-149로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 화합물이 서열번호 126, 128-130, 132, 144 및 146-149로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 16

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브

유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 170-224 및 634로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 48 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 48의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 170-201 및 634로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 176, 178, 181-183, 194 및 198-201로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 20

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 225-266으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 49 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 49의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 225-248로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 227, 229, 234, 236, 237 및 244-248로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 24

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 267-308로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 50 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 50의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 277, 287, 290 및 291로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 287로 구성된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 27

제24항에 있어서, 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 28

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 309-371로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 51 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 51의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 324, 326 및 327로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 327로 구성된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 31

제28항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 32

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 372-415로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 52 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 52의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 372-397로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 379-382, 384, 390 및 392-395로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 35

제32항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 36

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 416-475 및 625-633으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 53 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 53의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 428, 429 및 431로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 429로 구성된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 39

제36항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 40

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 476-519로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 54 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 54의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 476-499로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 479-482, 484, 489 및 491-493으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 43

제40항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 44

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 520-569 및 635로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 55 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물을 포함하는, 인간 디스트로핀 프리-프로세싱된 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 55의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 520-546 및 635로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 524-528, 537, 539, 540, 542 및 544로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 함유하는 조성물.

청구항 47

제44항에 있어서, 상기 화합물이 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 조성물.

청구항 48

하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 1 내지 569 및 612 내지 635로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 (여기에서, 엑손은 엑손 44-55로 구성된 그룹으로부터 선택된다) 내의 상보적 mRNA 서열에 의해서 적어도 45℃의 Tm을 갖는 mRNA와 상기 화합물 사이의 헤테로듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 근위축증을 치료하는 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 근위축증이 뒤시엔느 근위축증 (DMD)인 방법.

청구항 50

제48항에 있어서, 상기 근위축증이 베커 근위축증 (BMD)인 방법.

청구항 51

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 1-20으로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 44인 방법.

청구항 52

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 21-76 및 612 내지 624로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 45인 방법.

청구항 53

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 77-125로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 46인 방법.

청구항 54

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 126-169로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 47인 방법.

청구항 55

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 170-224 및 634로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 48인 방법.

청구항 56

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 225-266으로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 49인 방법.

청구항 57

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 267-308로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 50인 방법.

청구항 58

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 309-371로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 51인 방법.

청구항 59

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 372-415로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 52인 방법.

청구항 60

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 416-475 및 625-633으로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 53인 방법.

청구항 61

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 476-519로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 54인 방법.

청구항 62

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 520-569 및 635로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 상기 엑손이 엑손 55인 방법.

청구항 63

제48항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 287을 포함하는 방법.

청구항 64

제48항에 있어서, 상기 화합물이 아르기닌-풍부 펩타이드에 컨주게이트된 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 아르기닌-풍부 펩타이드가 서열번호 570-578로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 관련된 출원의 교차-참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에서, 본 발명에 온전히 참고로 포함된 것으로 2008년 10월 24일 출원된 미국 가특허출원 제61/108,416호를 우선권으로 하는 것이다.

[0003] 서열 목록에 관한 설명

[0004] 본 출원과 연관된 서열 목록은 서류사본 대신에 텍스트 형식으로 제공되며, 이에 의해서 본 명세서에 참고로 포함된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 120178_410PC_SEQUENCE_LISTING.txt이다. 텍스트 파일은 156 KB이며, 2009년 10월 23일에 작성되었고, EFS-Web을 통해서 전자적으로 제출된다.

[0005] 본 발명은 인간 디스트로핀 (dystrophin) 유전자에서 엑손 스키핑 (exon skipping)을 촉진시키는데 적합한 신규한 안티센스 화합물 및 조성물에 관한 것이다. 이것은 또한, 본 발명의 방법에서 사용하는데 적합한 안티센스 조성물을 사용하여 엑손 스키핑을 유도하는 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0006] 안티센스 기술은 다양한 상이한 레벨 (전사, 스플라이싱, 안정성, 번역)에서 유전자 발현에 영향을 미치도록 광범한 화학을 사용하여 개발되고 있다. 이러한 연구 중의 대부분은 광범한 적응증에서 비정상적이거나 질병-연관된 유전자를 교정하거나 보상하기 위한 안티센스 화합물의 사용에 집중되었다. 안티센스 분자는 특이성을 가지고 유전자 발현을 억제할 수 있으며, 이로 인해서 유전자 발현의 조절제로서 올리고뉴클레오타이드에 관한 다수의 연구 노력은 표적화된 유전자의 발현 또는 시스-작용성 요소의 기능을 억제하는데 집중되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로, 센스 가닥 (예를 들어, mRNA)이거나 일부의 바이러스 RNA 표적의 경우에는 마이너스 (minus)-가닥인 RNA에 대해서 유도된다. 특정한 유전자 하향-조절의 원하는 효과를 달성하기 위해서, 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 표적화 mRNA의 붕괴를 촉진시키거나, mRNA의 번역을 차단하거나, 시스-작용성 RNA 요소의 기능을 차단함으로써 표적 단백질의 새로운 합성 또는 바이러스 RNA의 복제를 효과적으로 방지한다.

[0007] 그러나, 이러한 기술은 천연 단백질의 생산을 상향-조절하거나 넌센스 (nonsense) 또는 프레임-이동 돌연변이 (frame-shifting mutation)와 같은 번역의 조기 종결을 유도하는 돌연변이에 대해 보상하는 것인 목적인 경우에는 유용하지 않다. 이들 경우에 결손 유전자 전사물은 표적화된 분해 또는 입체적 억제에 적용되지 않아야 하며, 따라서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화학은 표적 mRNA 붕괴를 촉진하거나 번역을 차단하지 않아야 한다.

[0008] 다양한 유전적 질병에서, 유전자의 최종적인 발현에 대한 돌연변이의 영향은 스플라이싱 과정 중의 표적화된 엑손 스키핑의 과정을 통해서 조절될 수 있다. 스플라이싱 과정은 pre-mRNA 내의 인접한 엑손-인트론 접합부를 매우 근접하게 유도하고, 함께 스플라이싱되는 엑손들 사이에서 이들의 후속 개량과 함께 인트론의 말단에서 포스포디에스테르결합의 절단을 수행하는 복잡한 다중-성분 기구에 의해서 지시된다. 이러한 복잡하고 매우 정확한 과정은 다음에 스플라이싱 반응에 포함되는 다양한 핵 스플라이싱 인자가 결합한 비교적 짧은 반-보존된 RNA 절편인 pre-mRNA 내의 서열 모티프에 의해서 매개된다. 스플라이싱 기구가 pre-mRNA 과정에 포함된 모티프를 판독하거나 인식하는 방식을 변화시킴으로써, 차등적으로 스플라이싱된 mRNA 분자를 생성시킬 수 있다. 이제, 대부분의 인간 유전자는 정상 유전자 발현 중에 선택적으로 스플라이싱되는 것으로 인식되었지만, 포함된 기전은 확인되지 않았다.

[0009] 정상적인 기능성의 단백질이 그 안의 돌연변이로 인하여 조기에 종결된 경우에, 안티센스 기술을 통해서 일부의 기능적 단백질 생산을 회복시키는 방법은 스플라이싱 과정 중에 개입함으로써 가능할 수 있는 것으로 나타났으며, 질병-야기 돌연변이와 연관된 엑손이 일부의 유전자로부터 특이적으로 결실될 수 있다면, 천연 단백질의 유사한 생물학적 특성을 갖거나, 엑손과 연관된 돌연변이에 의해서 야기된 질병을 개선시키는데 충분한 생물학적 활성을 갖는 단축된 단백질 생성물이 때때로 생산될 수 있다 [Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Aartsma-Rus, Janson et al. 2004]. Kole 등 [미국 특허 제5,627,274; 5,916,808; 5,976,879; 및 5,665,593호]은 표적화된 pre-mRNA의 붕괴를 촉진시키지 않는 변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체를 사용하여 이상 스플라이싱과 싸우는 방법을 기술하였다. Bennett 등 [미국 특허 제6,210,892호]은 또한 표적 RNA의 RNAse H-매개된 절단을 유도하지 않는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 유사체를 사용하는, 야생형 세포성 mRNA 처리의 안티센스 조절을

기술하였다.

[0010] 표적화된 엑손 스키핑의 방법은 다수의 엑손 및 인트론이 존재하거나, 엑손의 유전적 구성에 있어서 여분이 있거나, 단백질이 하나 또는 그 이상의 특정한 엑손이 없이 기능을 할 수 있는 긴 유전자에 특히 유용한 것으로 보인다. 다양한 유전자에서의 돌연변이에 의해서 야기된 돌연변이와 연관된 유전적 질병의 치료를 위해 유전자 처리를 재지시하기 위한 노력은 (1) 스플라이싱 과정에 포함된 요소와 완전히 또는 부분적으로 중복하거나; (2) 해당 요소에서 일어나는 특정한 스플라이싱 반응을 정상적으로 매개할 수 있는 스플라이싱 인자의 결합 및 기능을 분열시키는 요소에 충분히 근접한 위치에서 pre-mRNA에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 사용에 집중되었다.

[0011] 뒤시엔느 근위축증 (Duchenne muscular dystrophy; DMD)은 단백질 디스트로핀(dystrophin)의 발현에서의 결함에 의해서 야기된다. 단백질을 코드화한 유전자는 DNA의 200만 뉴클레오타이드 이상에 걸쳐서 펼쳐진 79 엑손을 함유한다. 엑손의 판독 프레임을 변화시키거나, 정지 코돈을 도입시키거나, 프레임 엑손 또는 엑손들 이외의 전체의 제거 또는 하나 또는 그 이상의 엑손의 중복에 의해서 특정화된 어떤 엑손 돌연변이라도 기능적 디스트로핀의 생산을 분열시킴으로써 DMD를 야기할 수 있는 잠재력을 갖는다.

[0012] 근위축증의 덜 심각한 형태인 베커 근위축증 (Becker muscular dystrophy; BMD)은, mRNA의 단백질로의 번역이 조기 종료되지 않도록 돌연변이, 대표적으로는 하나 또는 그 이상의 엑손의 결실이 전체 디스트로핀 전사물을 따라서 정확한 판독 프레임을 제공하는 경우에 일어나는 것으로 밝혀졌다. 돌연변이된 디스트로핀 전-mRNA의 처리 중에 상류 및 하류 엑손의 접합이 유전자의 정확한 판독 프레임을 유지한다면, 결과는 베커 표현형을 야기하는 일부의 활성을 보유하는 짧은 내부 결실을 갖는 단백질을 코딩하는 mRNA이다.

[0013] 디스트로핀 단백질의 판독 프레임을 변화시키지 않는 엑손 또는 엑손들의 결실은 BMD 표현형을 일으키지 않는 반면에, 프레임-이동을 야기하는 엑손 결실은 DMD를 야기할 수 있다 [Monaco, Bertelson et al. 1988]. 일반적으로, 판독 프레임을 변화시키고, 따라서 적절한 단백질 번역을 단절시키는 점돌연변이 및 엑손 결실을 포함하는 디스트로핀 돌연변이는 DMD를 야기한다. 또한, 일부의 BMD 및 DMD 환자는 다수의 엑손을 포함하는 엑손 결실을 갖는다는 것에 주의하여야 한다.

[0014] 안티센스 분자는 뒤시엔느 근위축증 (DMD)의 치료에 있어서의 도구를 제공할 수 있지만, 안티센스 분자를 사용하여 엑손 스키핑을 유도하고자 하는 시도는 혼합된 성공을 가져왔다. 디스트로핀 pre-mRNA로부터의 디스트로핀 엑손 19의 성공적인 스키핑은 문헌 Errington 등에 의해서 기술된 바와 같이, 엑손 정의에 포함된 엑손 내의 플랭킹 (flanking) 스플라이스 부위 또는 모티프에 대해 지시된 다양한 안티센스 분자를 사용하여 달성되었다 [Errington, Mann et al. 2003].

[0015] *mdx* 마우스 모델에서 특이적이고 재현가능한 엑손 스키핑의 첫 번째 예는 Wilton 등에 의해서 보고되었다 [Wilton, Lloyd et al. 1999]. 안티센스 분자를 공여체 스플라이스 부위로 유도함으로써 엑손 23 스키핑은 배양된 세포의 처리의 6 시간 이내에 디스트로핀 mRNA에서 유도되었다. Wilton 등은 마우스 디스트로핀 pre-mRNA의 수용체 부분을 더 긴 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 표적화하는 것을 기술한다. 비록 인트론 23 공여체 스플라이스 부위에 대해 지시된 첫 번째 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 일차 배양된 근아세포에서 엑손 스키핑을 유도하였지만, 이 화합물은 더 높은 레벨의 디스트로핀을 발현하는 불멸화된 세포 배양물에서는 훨씬 덜 효율적인 것으로 나타났다.

[0016] 이들 노력에도 불구하고, 다중 디스트로핀 엑손에 대해서 표적화된 개선된 안티센스 올리고머 및 DMD 치료학적 적용을 위한 개선된 근육 송달 조성물 및 방법에 대한 필요성은 여전하다.

발명의 내용

[0017] **발명의 간단한 요약**

[0018] 본 발명의 구체예는 일반적으로, 선택된 표적에 결합하여 엑손 스키핑을 유도할 수 있는 안티센스 화합물, 및 엑손 스키핑을 유도하기 위한 이들의 사용 방법에 관한 것이다. 특정의 구체예에서는, 본 발명의 2 개 또는 그 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함께 조합하여 단일 또는 다중 엑손 스키핑을 유도할 수 있다.

[0019] 특정의 구체예에서는, 2 개 또는 그 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자를 함께 공유적으로 결합시킴으로써 단일 또는 다중 엑손의 엑손 스키핑을 개선시킬 수 있다 [참조: 예를 들어, Aartsma-Rus, Janson et al.

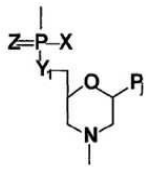
2004].

[0020] 특정의 구체예에서, 본 발명의 안티센스 화합물은 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 스키핑을 유도하며, 이에 의해서 근육 세포가 기능적 디스트로핀 단백질을 생산하도록 한다.

[0021] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화합물 (또한, 본 발명에서는 올리고머로 불림)은 전형적으로 (i) 모르폴리노 서브유니트 및 하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 (intersubunit) 결합을 포함하며, (ii) 10-40 뉴클레오타이드 염기, 바람직하게는 20-35 염기를 함유하고, (iii) 디스트로핀 pre-mRNA에서 표적 서열의 적어도 12 개의 인접한 염기에 대해 하이브리드화하고, 엑손 스키핑을 유도하는데 효과적인 염기 서열을 포함한다.

[0022] 특정의 구체예에서, 본 발명의 안티센스 화합물은 하기 화학식 (I)에 따르는, 하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합을 포함할 수 있다:

[0023] [화학식 I]

[0024] 

(I)

[0025] 상기 식에서,

[0026] Y_1은 -O-, -S-, -NH- 또는 $-CH_2-$이며;

[0027] Z는 O 또는 S이고;

[0028] Pj는 염기-특이적 수소 결합에 의해서 폴리뉴클레오타이드 내의 염기에 결합하는데 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기-짝짓기 (pairing) 부위이며;

[0029] X는 플루오로, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 임의로 치환된 티오알콕시, 아미노, 임의로 치환된 알킬아미노, 또는 임의로 치환된 헤테로사이클릴이다.

[0030] 특정의 구체예에서, 비하전된 상기의 서브유니트간 결합은 생리학적 pH에서 양으로 하전된 결합에 의해서 산재될 수 있으며, 여기에서 양으로 하전된 결합의 총수는 2와 결합의 총 수의 절반 이하 사이이다. 예를 들어, 양으로 하전된 결합은 X가 임의로 치환된 1-피페라지닐인 상기 구조를 가질 수 있다. 다른 구체예에서, 양으로 하전된 결합은 X가 치환된 1-피페라지닐인 상기 구조를 가질 수 있으며, 여기에서 1-피페라지닐은 4-위치에서 임의로 치환된 알킬 구아니디닐 부위에 의해 치환된다.

[0031] 투여된 안티센스 화합물이 프리-프로세싱된 인간 디스트로핀의 스플라이스 부위를 표적화하는데 효과적인 경우에, 이것은 프리-프로세싱된 메센저 (messenger) RNA (mRNA) 인간 디스트로핀 전사물 내의 적어도 12 개의 인접한 염기를 함유하는 표적 부분에 대해서 상보적인 염기 서열을 가질 수 있다. 예시적인 안티센스 서열은 서열번호 1 내지 569 및 612 내지 633으로 정의된 것을 포함한다.

[0032] 특정의 구체예에서, 본 발명의 안티센스 서열은 다음의 (a) 내지 (l)의 서열 내에 함유된다:

[0033] (a) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 44의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 1-20, 바람직하게는 서열번호 4, 8 및 12, 더욱 바람직하게는 서열번호 12로 정의된 서열 중의 어느 것;

[0034] (b) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 45의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 21-76 및 612-624, 바람직하게는 서열번호 27, 29, 34 및 39, 더욱 바람직하게는 서열번호 34로 정의된 서열 중의 어느 것;

[0035] (c) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 46의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 77-125, 바람직하게는 서열번호 77 내지 105, 더욱 바람직하게는 서열번호 82, 84-87, 90, 96, 98, 99

및 101로 정의된 서열 중의 어느 것;

[0036] (d) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 47의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 126-169, 바람직하게는 서열번호 126-149, 더욱 바람직하게는 서열번호 126, 128-130, 132, 144 및 146-149로 정의된 서열 중의 어느 것;

[0037] (e) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 48의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 170-224 및 634, 바람직하게는 서열번호 170-201 및 634, 더욱 바람직하게는 서열번호 176, 178, 181-183, 194 및 198-201로 정의된 서열 중의 어느 것;

[0038] (f) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 49의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 225-266, 바람직하게는 서열번호 225-248, 더욱 바람직하게는 서열번호 227, 229, 234, 236, 237 및 244-248로 정의된 서열 중의 어느 것;

[0039] (g) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 50의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 267-308, 바람직하게는 서열번호 277, 287 및 290, 더욱 바람직하게는 서열번호 287로 정의된 서열 중의 어느 것;

[0040] (h) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 51의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 309-371, 바람직하게는 서열번호 324, 326 및 327, 더욱 바람직하게는 서열번호 327로 정의된 서열 중의 어느 것;

[0041] (i) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 52의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 372-415, 바람직하게는 서열번호 372-397, 더욱 바람직하게는 서열번호 379-382, 384, 390 및 392-395로 정의된 서열 중의 어느 것;

[0042] (j) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 53의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 416-475 및 625-633, 바람직하게는 서열번호 428, 429 및 431, 더욱 바람직하게는 서열번호 429로 정의된 서열 중의 어느 것;

[0043] (k) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 54의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 476-519, 바람직하게는 서열번호 476-499, 더욱 바람직하게는 서열번호 479-482, 484, 489 및 491-493으로 정의된 서열 중의 어느 것; 및

[0044] (l) 인간 디스트로핀 프리-프로세싱 mRNA의 프로세싱 중에 엑손 55의 스키핑을 생성시키는데 사용하기 위한, 서열번호 520-569 및 635, 바람직하게는 서열번호 520-546 및 635, 더욱 바람직하게는 서열번호 524-528, 537, 539, 540, 542 및 544로 정의된 서열 중의 어느 것.

[0045] 특정의 구체예에서, 화합물은 화합물의 세포 내로의 흡수를 촉진시키는데 효과적인 아르기닌-풍부 폴리펩타이드에 컨주게이트될 수 있다. 예시적인 펩타이드는 본 발명에 기술된 다른 것들 중에서 특히 서열번호 570 내지 578로 정의된 것을 포함한다.

[0046] 한가지 예시적인 구체예에서, 아르기닌-풍부 폴리펩타이드는 그의 N-말단 또는 C-말단 잔기에서 안티센스 화합물의 3' 또는 5' 말단에 공유적으로 커플링된다. 또한, 예시적인 구체예에서 안티센스 화합물은 모르폴리노 서브유니트 및 하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합으로 구성된다.

[0047] 일반적으로, 펩타이드-올리고머 컨주게이트는 선택된 포유동물 조직, 즉 세포-침투성 펩타이드에 의해서 표적화된 동일한 조직에 대해 선택적인 귀소 (homing) 펩타이드를 더 포함할 수 있다. 컨주게이트는 세포 침투성 펩타이드 - 귀소 펩타이드 - 안티센스 올리고머의 형태, 더욱 바람직하게는 귀소 펩타이드 - 세포 침투성 펩타이드 - 안티센스 올리고머의 형태일 수 있다. 예를 들어, 상술한 바와 같이 뒤시엔느 근위축증을 치료하는데 사용하기 위한 펩타이드 컨주게이트 화합물은 세포 침투성 펩타이드에 대해 컨주게이트된 것으로, 서열번호 579로 정의되는 서열을 갖는 펩타이드와 같이 근육 조직에 대해 선택적인 귀소 펩타이드를 더 포함할 수 있다. 이러한 타입의 예시적인 컨주게이트는 본 발명에서 CP06062-MSP-PMO (세포 침투성 펩타이드 - 귀소 펩타이드 - 안티센스 올리고머)로서, 및 MSP-CP06062-PMO (귀소 펩타이드 - 세포 침투성 펩타이드 - 안티센스 올리고머)로서 나타낸 것을 포함한다 (참조: 서열번호 580-583).

[0048] 일부의 구체예에서, 펩타이드는 링커 부위를 통해서 올리고머에 컨주게이트된다. 특정의 구체예에서, 링커 부

위는 임의로 치환된 피페라지닐 부위를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 링커 부위는 베타 알라닌 및/또는 6-아미노헥사노산 서브유니트를 더 포함할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 펩타이드는 링커 부위가 없이 올리고머에 직접 컨주게이트된다.

[0049] 올리고머에 대한 펩타이드의 컨주게이션은 펩타이드와 올리고머 사이에서, 또는 링커 부위와 올리고머 사이에서 공유결합을 형성하는데 적합한 어떤 위치에서라도 일어날 수 있다. 예를 들어, 일부의 구체예에서 펩타이드의 컨주게이션은 올리고머의 3' 말단에서 일어날 수 있다. 다른 구체예에서, 펩타이드의 올리고머에 대한 컨주게이션은 올리고머의 5' 말단에서 일어날 수 있다. 또 다른 구체예에서, 펩타이드는 어떤 서브유니트간 결합을 통해서라도 올리고머에 컨주게이트될 수 있다.

[0050] 일부의 구체예에서, 펩타이드는 올리고머의 5' 말단에서 올리고머에 컨주게이트된다. 인-함유 서브유니트간 결합을 포함하는 구체예에서, 펩타이드는 말단 결합 그룹의 인에 대한 공유결합을 통해서 올리고머에 컨주게이트될 수 있다. 이러한 방식의 컨주게이션은 상술한 링커 부위가 있거나 없이 일어날 수 있다.

[0051] 또 다른 구체예에서, 펩타이드는 올리고머의 3' 말단에서 올리고머에 컨주게이트될 수 있다. 일부의 추가의 구체예에서, 펩타이드는 올리고머의 3' 말단 모르폴리노 그룹의 질소 원자에 컨주게이트될 수 있다. 이 점에 있어서, 펩타이드는 직접적으로, 또는 상술한 링커 부위를 통해서 올리고머에 컨주게이트될 수 있다.

[0052] 일부의 구체예에서, 올리고머는 수성 매질 내에서 올리고머의 용해도를 증진시키는 부위에 컨주게이트될 수 있다. 일부의 구체예에서, 수성 매질 내에서 올리고머의 용해도를 증진시키는 부위는 폴리에틸렌글리콜이다. 또 다른 추가의 구체예에서, 수성 매질 내에서 올리고머의 용해도를 증진시키는 부위는 트리에틸렌 글리콜이다. 예를 들어, 일부의 구체예에서 수성 매질 내에서 용해도를 증진시키는 부위는 올리고머의 5' 말단에서 올리고머에 컨주게이트될 수 있다. 수성 매질 내에서 올리고머의 용해도를 증진시키는 부위의 올리고머에 대한 컨주게이션은 직접적으로, 또는 상술한 링커 부위를 통해서 일어날 수 있다.

[0053] 본 발명의 특정한 구체예는 환자에게 송달하는데 적합한 형태로 적어도 안티센스 분자를 포함하는, 유전적 장애의 예방적 또는 치료학적 치료를 돕도록 선택되고/되거나 개조된 안티센스 분자를 제공한다.

[0054] 본 발명의 특정한 구체예는 (a) 본 발명에 기술된 방법에 따라 안티센스 분자를 선택하고; (b) 그 분자를 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하여, 특정한 단백질을 코드화한 유전자 내에 돌연변이가 있고, 돌연변이의 영향이 엑손 스키핑에 의해서 저지되는 유전적 질병을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 유전적 질병을 치료하는 의약의 제조를 위한 본 발명의 정제 및 분리된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 용도를 포함한다.

[0055] 특정의 구체예는 치료가 필요한 환자에게 그 환자의 특정한 유전적 병변에 적절한, 본 발명에 기술된 바와 같은 적절하게 디자인된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 유효량을 투여하는 것을 포함하여, 뒤시엔느 근위축증을 특징으로 하는 상태와 같은 근위축증을 치료하는 방법을 제공한다. 추가로, 특정의 구체예는 환자에게 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 또는 이들 생물학적 분자 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하여, 뒤시엔느 근위축증을 포함한 근위축증을 예방하거나 적어도 최소화하기 위하여 환자를 예방적으로 치료하는 방법을 제공한다.

[0056] 특정의 구체예는 대상체에게 하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 접합시키는 인-함유 서브유니트간 결합에 의해서 연결된 20-35 개의 모르폴리노 서브유니트를 함유하며, 서열번호 1 내지 569 및 612 내지 635로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하고, 디스트로핀-유전자 엑손 내의 상보적 mRNA 서열과 함께 적어도 45℃의 Tm을 갖는 상기 화합물과 mRNA 사이의 헤테로듀플렉스(heteroduplex) 구조를 형성시킬 수 있는 (여기에서, 엑손은 엑손 44-55로 구성된 그룹으로부터 선택된다), 실질적으로 비하전된 안티센스 화합물의 유효량을 투여하는 것을 포함하여, 대상체에서 근위축증을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0057] 특정의 구체예에서, 근위축증은 뒤시엔느 근위축증 (DMD)이다. 특정의 구체예에서, 근위축증은 베커 근위축증 (BMD)이다.

[0058] 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 1-20으로 구성된 그룹으로부터 선택되며, 엑손은 엑손 44이다. 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 21-76 및 612 내지 624로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 엑손은 엑손 45이다.

[0059] 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 77-125로 구성된 그룹으로부터 선택되며, 엑손은 엑손 46이다. 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 126-169로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 엑손은 엑손 47이다.

[0060] 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 170-224 및 634로 구성된 그룹으로부터 선택되며, 엑손은 엑손 48이다. 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 225-266으로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 엑손은 엑손 49이다.

[0061] 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 267-308로 구성된 그룹으로부터 선택되며, 엑손은 엑손 50이다. 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 309-371로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 엑손은 엑손 51이다.

[0062] 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 372-415로 구성된 그룹으로부터 선택되며, 엑손은 엑손 52이다. 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 416-475 및 625-633으로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 엑손은 엑손 53이다. 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 476-519로 구성된 그룹으로부터 선택되며, 엑손은 엑손 54이다. 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 520-569 및 635로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 엑손은 엑손 55이다. 특정의 구체예에서, 서열은 서열번호 287을 포함하거나, 본질적으로 이것으로 구성된다.

[0063] 특정의 구체예는 적합한 용기 내에 포장된 적어도 하나의 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 그의 사용을 위한 설명서를 포함하는, 유전적 질병을 치료하기 위한 키트를 제공한다.

[0064] 이들 및 그 밖의 다른 목적 및 특징은 도면과 함께 이하의 발명의 상세한 설명을 읽으면 더 충분히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1A는 포스포로디아미데이트 결합을 갖는 예시적 모르폴리노 올리고머 구조를 나타낸다.

도 1B는 본 발명의 구체예에 따르는, 아르기닌-풍부 펩타이드 및 안티센스 올리고머의 컨주게이트를 나타낸다.

도 1C는 골격 결합이 하나 또는 그 이상의 양으로 하전된 그룹을 함유하는 도 1B에서와 같은 컨주게이트를 나타낸다.

도 1D-G는 D 내지 G로 명시된 예시적인 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 반복 서브유니트 절편을 나타낸다.

도 2A는 인간 디스트로핀 엑손 51의 스키핑을 유도하도록 디자인된 안티센스 올리고머 엑손 51 스캔의 상대적 위치 및 결과를 나타낸다.

도 2B-C는 엑손 51 스키핑을 유도하는데 효과적인 서열 (AVI-5658; 서열번호 588 및 h51AON1; 서열번호 594)에 대비하여 엑손 51 스캔으로부터 선택된 3 개의 최상의 올리고머 (서열번호 324, 326 및 327)의 배양된 인간 횡문근육종 (RD) 세포 및 인간 일차 골격근 세포에서의 상대적 활성을 나타낸다. 도 2D는 특정의 서열과 비교한 3 개의 선택된 올리고머의 엑손 51 내에서의 상대적 위치를 나타낸다.

도 3A는 엑손 50 스키핑을 유도하는 다른 서열과 비교하여 인간 디스트로핀 엑손 50의 스키핑을 유도하도록 디자인된 안티센스 올리고머 엑손 50 스캔의 상대적 위치 및 결과를 나타낸다.

도 3B는 다른 서열 (서열번호 584 및 585)과 비교한 엑손 50 스캔으로부터 선택된 안티센스 서열 (서열번호 277, 287, 290 및 291)의 상대적 위치 및 활성을 나타낸다.

도 4A는 인간 디스트로핀 엑손 53의 스키핑을 유도하도록 디자인된 안티센스 올리고머 엑손 53 스캔의 상대적 위치 및 결과를 나타낸다. 도 4B는 엑손 53 스캔에서 가장 활성인 것으로 선택된 이들 올리고머의 엑손-스키핑 활성을 비교하기 위해서 사용된 특정 서열의 상대적 위치를 나타낸다.

도 4C-F는 엑손 53 스캔에서 가장 효과적인 것으로 선택된 올리고머 (서열번호 422, 428, 429 및 431)를 사용한, 도 4G에 요약된 용량-범위 시험 (dose-ranging studies)의 결과를 나타낸다.

도 4H 및 4I는 RD 세포 및 인간 일차 골격근 세포 둘 다에서 가장 활성인 엑손 53-스키핑 올리고머 (서열번호 429)의 활성과 비교한 특정 서열 (서열번호 608-611)의 상대적 활성을 나타낸다.

도 5A는 인간 디스트로핀 엑손 44의 스키핑을 유도하도록 디자인된 안티센스 올리고머 엑손 44 스캔의 상대적 위치 및 결과를 나타낸다. 도 5B는 엑손 44 스캔에서 가장 활성인 것으로 선택된 이들 올리고머의 엑손-스키핑 활성을 비교하기 위해서 사용된 특정 서열의 엑손 44 내에서의 상대적 위치를 나타낸다.

도 5C-G는 엑손 44 스캔에서 가장 효과적인 것으로 선택된 올리고머 (서열번호 4, 8, 11, 12 및 13)를 사용한, 도 5H에 요약된 용량-범위 시험의 결과를 나타낸다.

도 5I 및 5J는 RD 세포 및 인간 일차 골격근 세포 둘 다에서 가장 활성인 엑손 53-스키핑 올리고머 (서열번호 12)의 활성과 비교한 특정 서열 (서열번호 600-603)의 상대적 활성을 나타낸다.

도 6A는 인간 디스트로핀 엑손 45의 스키핑을 유도하도록 디자인된 안티센스 올리고머 엑손 45 스캔의 상대적 위치 및 결과를 나타낸다. 도 6B는 엑손 45 스캔에서 가장 활성인 것으로 선택된 이들 올리고머의 엑손-스키핑 활성을 비교하기 위해서 사용된 특정 서열의 엑손 45 내에서의 상대적 위치를 나타낸다.

도 6C-F는 엑손 45 스캔에서 가장 효과적인 것으로 선택된 올리고머 (서열번호 27, 29, 34 및 39)를 사용한, 도 6H에 요약된 용량-범위 시험의 결과를 나타낸다. 도 6G는 음성 대조군으로서 비교적 불활성인 올리고머 (서열번호 49)를 사용한다.

도 6I 및 6J는 RD 세포 및 인간 일차 골격근 세포 둘 다에서 가장 활성인 엑손 53-스키핑 올리고머 (서열번호 34)의 활성과 비교한 특정 서열 (서열번호 604-607)의 상대적 활성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] **발명의 상세한 설명**

[0067] 본 발명의 구체예는 일반적으로, 디스트로핀 유전자에서 엑손 스키핑을 유도하도록 특정적으로 디자인된 개선된 안티센스 화합물, 및 그의 사용 방법에 관한 것이다. 디스트로핀은 근육 기능에 중추적 역할을 하며, 다양한 근육-관련된 질병은 이 유전자의 돌연변이된 형태를 특징으로 한다. 따라서, 특정의 구체예에서, 본 발명에 기술된 개선된 안티센스 화합물은 뒤시엔느 근위축증 (DMD) 및 베커 근위축증 (BMD)에서 발견되는 돌연변이된 디스트로핀 유전자와 같은 인간 디스트로핀 유전자의 돌연변이된 형태에서 엑손 스키핑을 유도한다.

[0068] 돌연변이에 의해서 야기된 이상 mRNA 스플라이싱 이벤트로 인하여, 이들 돌연변이된 인간 디스트로핀 유전자는 결손 디스트로핀 단백질을 발현하거나, 측정가능한 디스트로핀을 전혀 발현하지 못하며, 이 상태는 근위축증의 다양한 형태를 유도한다. 이 상태를 치료하기 위해서, 본 발명의 안티센스 화합물은 전형적으로 돌연변이된 인간 디스트로핀 유전자의 프리-프로세싱된 RNA의 선택된 부분에 대해 하이브리드화하고, 다른 식으로는 디스트로핀 mRNA를 비정상적으로 스플라이싱하는 엑손 스키핑 및 차등 스플라이싱을 유도하며, 이렇게 함으로써 근육 세포가 기능적 디스트로핀 단백질을 코드화한 mRNA 전사물을 생산하도록 한다. 특정의 구체예에서, 생성된 디스트로핀 단백질은 반드시 디스트로핀의 "야생형" 형태는 아니며, 오히려 디스트로핀의 기능적이거나 반-기능적인 절단된 형태이다.

[0069] 근육 세포에서 기능적 디스트로핀 단백질의 레벨을 증가시킴으로써 이들 및 관련된 구체예는 이상 mRNA 스플라이싱에 기인한 결손 디스트로핀 단백질의 발현을 특징으로 하는 근위축증, 특히 DMD 및 BMD와 같은 근위축증의 이들 형태를 예방 및 치료하는데 유용할 수 있다. 본 발명에 기술된 특정의 올리고머는 추가로, 사용 시에 다른 올리고머에 비해 개선된 디스트로핀-엑손-특이적 표적화를 제공하며, 이에 의해서 근위축증의 관련된 형태를 치료하는 대체 방법에 비해서 중요하고 실질적인 이점을 제공한다.

[0070] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 발명에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 숙련된 전문가에 의해서 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에 기술된 것과 유사하거나 동등한 어떤 방법 및 물질이라도 본 발명을 실시하거나 시험하는데 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 기술된다. 본 발명의 목적에 따라, 다음의 용어들은 이하에서 정의된다.

[0071] 정의

[0072] 관사 "a" 및 "an"은 본 발명에서 이 관사의 문법적 대상이 하나이거나 하나보다 많은 (즉, 적어도 하나) 것을 나타내기 위해서 사용된다. 예를 들어, "요소 (an element)"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0073] "약 (about)"은 기준 양, 레벨, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수 (dimension), 크기, 총계, 중량 또는 길이에 대해서 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1%만큼 까지 변화하는 양, 레벨, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 총계, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0074] "코드화 서열"은 유전자의 폴리펩타이드 생성물에 대한 코드에 기여하는 모든 핵산 서열을 의미한다. 대조적으로, 용어 "비-코드화 서열"은 유전자의 폴리펩타이드 생성물에 대한 코드에 기여하지 않는 모든 핵산 서열을 나

타낸다.

[0075] 본 명세서 전체에 걸쳐서 문맥이 다른 식으로 요구하지 않는 한, 단어 "포함한다 (comprise)", "포함한다 (comprises)" 및 "포함하는 (comprising)"은 언급된 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 포함하지만, 어떤 다른 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 배제하지 않는 것을 의미하는 것으로 이해될 수 있다.

[0076] "~로 구성되는"은 문구 "~로 구성되는" 다음의 것이 무엇이든 포함하며, 이들로 제한되는 것을 의미한다. 따라서, 문구 "~로 구성되는"은 열거된 요소가 필요하거나 필수적이며, 다른 요소는 존재할 수 없음을 나타낸다. "본질적으로 ~로 구성되는"은 이 문구 다음에 열거되고, 열거된 요소에 대한 설명에 명시된 활성 또는 작용을 간섭하지 않거나 기여하지 않는 다른 요소로 제한된 모든 요소를 포함하는 것을 의미한다. 따라서, 문구 "본질적으로 ~로 구성되는"은 열거된 요소가 필요하거나 필수적이지만, 다른 요소는 임의의 것이며, 열거된 요소의 활성 또는 작용에 실질적으로 영향을 미치는지 미치지 않는지에 따라 존재할 수 있거나 없을 수 있음을 나타낸다.

[0077] 용어 "상보적" 및 "상보성"은 염기-짝짓기 규칙에 의해서 관련된 폴리뉴클레오타이드 (즉, 뉴클레오타이드의 서열)을 나타낸다. 예를 들어, 서열 "A-G-T"는 서열 "T-C-A"에 대해서 상보적이다. 상보성은 핵산 염기 중의 단지 일부만이 염기 짝짓기 규칙에 따라 매치되는 (matched) 것으로 "부분적"일 수 있다. 또는, 핵산들 사이에는 "완전"하거나 "전체" 적인 상보성이 있을 수 있다. 핵산 가닥 사이의 상보성의 정도는 핵산 가닥 사이의 하이브리드화의 효율 및 강도에 상당한 영향을 미친다. 완전한 상보성이 종종 바람직하지만, 일부의 구체예는 표적 RNA에 관해서 1 개 또는 그 이상, 바람직하게는 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 개의 미스매치 (mismatch)를 포함할 수 있다. 올리고머 내의 어떤 위치에서의 변이라도 포함된다. 특정의 구체예에서, 올리고머의 말단에 가까운 서열에서의 변이는 일반적으로 내부에서의 변이보다 바람직하며, 존재한다면, 전형적으로 5' 및/또는 3' 말단의 약 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 개의 뉴클레오타이드 내에서 이루어진다.

[0078] 용어 "세포 침투성 펩타이드 (cell penetrating peptide)" 또는 "CPP"는 상호 교환하여 사용되며, 수송 펩타이드, 담체 펩타이드 또는 펩타이드 형질도입 영역으로도 또한 불리는 양이온성 세포 침투성 펩타이드를 나타낸다. 본 발명에 나타낸 바와 같은 펩타이드는 소정의 세포 배양 집단의 세포의 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% (이들 사이의 모든 정수 포함) 내에서 세포 침투를 유도하는 능력을 가지며, 전신 투여하면 생체 내에서 다수의 조직 내에서 거대분자 전좌를 허용한다.

[0079] 용어 "안티센스 올리고머" 또는 "안티센스 화합물"은 상호 교환하여 사용되며, 염기-짝짓기 부위가 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 염기 짝짓기에 의해 핵산 (전형적으로, RNA) 내의 표적 서열에 하이브리드화하여 표적 서열 내에서 핵산:올리고머 헤테로듀플렉스를 형성하도록 하는 서브유니트간 결합에 의해서 연결된, 각각이 염기-짝짓기 부위를 보유하는 사이클릭 서브유니트의 서열을 나타낸다. 사이클릭 서브유니트는 리보즈 또는 또 다른 펜토즈 당, 또는 바람직한 구체예에서는, 모르폴리노 그룹을 기초로 한다 (참조: 이하의 모르폴리너 올리고머의 설명).

[0080] 이러한 안티센스 올리고머는 mRNA의 번역을 차단 또는 억제하거나, 천연 pre-mRNA 스플라이스 과정을 억제하도록 디자인될 수 있으며, 이것이 하이브리드화하는 표적 서열에 대해 "지시되거나" 그에 대해 "표적화"되는 것으로 말할 수 있다. 특정의 구체예에서, 표적 서열은 mRNA의 AUG 개시 코돈, 프리-프로세싱된 mRNA의 3' 또는 5' 스플라이스 부위, 또는 분기점을 포함하는 부분을 포함한다. 표적 서열은 엑손 내에, 또는 인트론 내에 존재할 수 있다. 스플라이스 부위에 대한 표적 서열은 프리-프로세싱된 mRNA 내의 표준 스플라이스 수용체 접합부의 하류에서 그의 5' 말단 1 내지 약 25 개의 염기쌍을 갖는 mRNA 서열을 포함할 수 있다. 스플라이스에 대한 바람직한 표적 서열은 스플라이스 부위를 포함하거나, 엑손 코드화 서열 내에 완전히 함유되거나, 스플라이스 수용체 또는 공여체 부위에 걸쳐진 프리-프로세싱된 mRNA의 어떤 부분이라도 된다. 올리고머는 이것이 상술한 방식으로 표적의 핵산에 대해서 표적화되는 경우에, 더 일반적으로는 단백질, 바이러스 또는 박테리아와 같은 생물학적으로 적절한 표적에 대해 "표적화"된다고 한다. 여기에는 서열번호 1 내지 569 및 612 내지 635 중의 하나 또는 그 이상을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 이들로 구성된 안티센스 올리고머가 포함된다. 또한, 서열번호 1 내지 569 및 612 내지 635 중의 어느 하나에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% (이들 사이의 모든 정수 포함) 서열 동일성 또는 서열 상동성을 갖는 변이체 올리고머, 및/또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 뉴클레오타이드가 이들 서열과 상이한 변이체, 바람직하게는 하나 또는 그 이상의 선택된 인간 디스트로핀 엑손의 엑손 스키핑을 유도한 변이체를 포함하는 이들 안티센스 올리고머의 변이체가 포함된다. 또한, 본 발명에 기술된 바와 같은 적합한 수의 하전된 결합, 예를 들어, 매 10 개의 비하전된 결합당 약 4 내지 5 개와 같이 매 2-5 개의 비하전된 결합당 약 1 개까지의 하전된 결합을 포함하고/하거나 본 발명

에 또한 기술된 바와 같이, 이들에 부착된 Arg-풍부 펩타이드를 포함하는 서열번호 584-611 및 634-635 중의 어느 하나 또는 그 이상의 올리고머가 포함된다.

[0081] 용어 "모르폴리노 올리고머" 또는 "PMO" (포스포르아미데이트- 또는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머)는 모르폴리노 서브유니트 구조로 구성된 올리고뉴클레오타이드 유사체를 나타내며, 여기에서 (i) 구조는 1 내지 3 개의 원자 길이, 바람직하게는 2 개의 원자 길이이며, 바람직하게는 비하전되거나 양이온성이며, 인접한 서브유니트의 5' 엑소사이클릭 탄소에 하나의 서브유니트의 모르폴리노 질소를 접합시키는 인-함유 결합에 의해서 함께 연결되며, (ii) 각각의 모르폴리노 고리는 염기 특이적 수소 결합에 의해서 폴리뉴클레오타이드 내의 염기에 결합시키는데 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기-짝짓기 부위를 갖는다. 예를 들어, 바람직한 포스포로디아미데이트 결합 타입을 나타내는 도 1A에서의 구조를 참고로 한다. 변이는 이들이 결합 또는 활성을 간섭하지 않는 한 이 결합에 대해서 만들어질 수 있다. 예를 들어, 인에 부착된 산소는 황으로 치환될 수 있다 (티오포스포로디아미데이트). 5' 산소는 아미노 또는 저급 알킬 치환된 아미노에 의해서 치환될 수 있다. 인에 부착된 펜던트 (pendant) 질소는 (임의로 치환된) 저급 알킬에 의해서 비치환, 일치환 또는 이치환될 수 있다. 또한, 이하의 양이온성 결합의 설명을 참고로 한다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조 및 결합 특징은 모두 본 발명에 온전히 참고로 포함된 미국 특허 제5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,521,063 및 5,506,337호 및 PCT 출원 제PCT/US07/11435호 (양이온성 결합)에 상세히 기술되어 있다.

[0082] 퓨린 또는 피리미딘 염기 짝짓기 부위는 전형적으로 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실, 티민 또는 이노신이다. 또한, 피리딘-4-온, 피리딘-2-온, 페닐, 슈도우라실, 2,4,6-트리메톡시 벤젠, 3-메틸 우라실, 디하이드로유리딘, 나프틸, 아미노페닐, 5-알킬시티딘 (예를 들어, 5-메틸시티딘), 5-알킬유리딘 (예를 들어, 리보티미딘), 5-할로유리딘 (예를 들어, 5-브로모유리딘) 또는 6-아자피리미딘 또는 6-알킬피리미딘 (예를 들어, 6-메틸유리딘), 프로핀, 큐에소신 (quesosine), 2-티오유리딘, 4-티오유리딘, 와이부토신 (wybutosine), 와이부톡소신 (wybutoxosine), 4-아세틸티딘, 5-(카복시하이드록시메틸)유리딘, 5'-카복시메틸아미노메틸-2-티오유리딘, 5-카복시메틸아미노메틸유리딘, β-D-갈락토실큐에오신, 1-메틸아데노신, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아노신, 3-메틸시티딘, 2-메틸아데노신, 2-메틸구아노신, N6-메틸아데노신, 7-메틸구아노신, 5-메톡시아미노메틸-2-티오유리딘, 5-메틸아미노메틸유리딘, 5-메틸카보닐메틸유리딘, 5-메틸옥시유리딘, 5-메틸-2-티오유리딘, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데노신, β-D-만노실큐에오신, 유리딘-5-옥시아세트산, 2-티오시티딘, 트레오닌 유도체 등과 같은 염기가 포함된다 [Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, supra]. 이러한 관점에서 "변형된 염기"는 상기 설명한 바와 같은 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C), 티민 (T) 및 우라실 (U)이외의 다른 뉴클레오타이드 염기를 의미하며; 이러한 염기는 안티센스 분자의 어떤 위치에서나 사용될 수 있다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가는 올리고머의 용도에 따라서 Ts 및 Us를 상호 교환할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 더 RNA-유사한 2'-O-메틸 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 안티센스 화학의 경우에 T 염기는 U로 나타낼 수 있다 (참조: 예를 들어, 서열목록).

[0083] "아미노산 서브유니트" 또는 "아미노산 잔기"는 α-아미노산 잔기 (예를 들어, -CO-CHR-NH-) 또는 β- 또는 다른 아미노산 잔기 (예를 들어, $-CO-(CH_2)_nCHR-NH-$)를 나타낼 수 있으며, 여기에서 R은 측쇄 (수소를 포함할 수 있다)이며, n은 1 내지 6, 바람직하게는 1 내지 4이다.

[0084] 용어 "천연적으로 존재하는 아미노산"은 단백질 생합성 중에 이용된 20 개의 (L)-아미노산뿐만 아니라 4-하이드록시프롤린, 하이드록시리신, 데스모신, 이소데스모신, 호모시스테인, 시트룰린 및 오르니틴과 같은 그 밖의 다른 것과 같이 자연에서 발견되는 단백질 내에 존재하는 아미노산을 나타낸다. 용어 "비-천연적 아미노산"은 자연에서 발견되는 단백질 내에 존재하지 않는 아미노산을 나타내며, 예로는 베타-알라닌 (β-Ala; 또는 B), 6-아미노헥사노산 (Ahx) 및 6-아미노펜타노산이 포함된다. "비-천연적 아미노산"의 추가의 예로는 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지된 (D)-아미노산, 노르류신, 노르발린, p-플루오로페닐알라닌, 에티오닌 등이 포함되나, 제한되지는 않는다.

[0085] "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 대상체에서 원하는 생리학적 반응 또는 치료학적 효과를 제공하는데 효과적인 것으로, 포유동물 대상체에게 단일 용량으로, 또는 일련의 용량의 일부분으로 투여되는 안티센스 올리고머와 같은 치료학적 화합물의 양을 나타낸다. 원하는 생리학적 반응의 한가지 예는 안티센스 올리고머가 없는 경우 또는 대조 올리고머에 비해, 주로 결손 디스트로핀 단백질을 함유하거나 디스트로핀을 함유하지 않는 근육 조직 또는 세포에서 디스트로핀 단백질의 비교적 기능적이거나 생물학적으로 활성인 형태의 증가된 발현을 포함한다. 원하는 치료학적 효과의 예로는 특히 근위축증의 증상 또는 병리학의 개선, 근위축증의 증상 또는 병리학의 진행의 감소, 및 근위축증의 증상 또는 병리학의 개시의 둔화가 포함되나, 제한되지는 않는다. 이러한 증상의 예

로는 피로, 정신 지체, 근육 약화, 운동 기술의 곤란성 (예를 들어, 달리기, 호핑 (hopping), 점핑 (jumping)), 빈번한 넘어짐 및 보행 곤란이 포함된다. 근위축증의 병리학은 예를 들어, 근섬유 손상 및 막 누출을 특징으로 할 수 있다. 안티센스 올리고머의 경우에, 이 효과는 전형적으로 엑손 스키핑을 유도하는 것과 같은 선택된 표적 서열 (예를 들어, 디스트로핀)의 스플라이스-과정을 변화시킴으로써 유도된다.

[0086] "엑손"은 단백질에 대해 코드화한 핵산의 규정된 구역, 또는 프리-프로세싱된 (또는 전구체) RNA의 어느 부분을 스플라이싱에 의해서 제거한 후의 RNA 분자의 성숙한 형태에서 나타나는 핵산 서열을 나타낸다. 성숙한 RNA 분자는 메센저 RNA (mRNA), 또는 비-코드화 RNA의 기능적 형태, 예를 들어, rRNA 또는 tRNA일 수 있다. 인간 디스트로핀 유전자는 약 75 개의 엑손을 갖는다.

[0087] "인트론"은 단백질로 번역되지 않는 (유전자 내의) 핵산 부분을 나타낸다. 인트론은 전구체 mRNA (pre-mRNA)로 전사되고, 이어서 성숙 RNA의 형성 중에 스플라이싱에 의해서 제거되는 비-코드화 구역이다.

[0088] "엑손 스키핑"은 일반적으로, 전체 엑손 또는 그의 일부분이 소정의 프리-프로세싱된 RNA로부터 제거되고, 이에 의해서 단백질로 번역되는 성숙 mRNA와 같은 성숙 RNA 내에 존재하는 것으로부터 제외되는 과정을 나타낸다. 따라서, 다른 경우에는 스키핑된 엑손에 의해서 코드화된 단백질의 부분은 단백질의 발현된 형태에 존재하지 않으며, 전형적으로 단백질의 변화되었지만, 여전히 기능적인 형태를 생성시킨다. 특정의 구체예에서, 스키핑되는 엑손은 그렇지 않은 경우에는 이상 스플라이싱을 야기하는 돌연변이 또는 다른 변화를 그의 서열 내에 함유할 수 있는 인간 디스트로핀 유전자로부터의 이상 엑손이다. 특정의 구체예에서, 스키핑되는 엑손은 디스트로핀 유전자의 엑손 1-75 중의 어느 하나 또는 그 이상이지만, 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 및/또는 55 중의 어느 하나 또는 그 이상이 바람직하다.

[0089] "디스트로핀"은 로드 (rod)-형 세포질 단백질이며, 근육 섬유의 세포골격을 세포막을 통해서 주변 세포외 매트릭스에 연결하는 단백질 컴플렉스의 중요한 부분이다. 디스트로핀은 다수의 기능적 영역을 함유한다. 예를 들어, 디스트로핀은 대략 아미노산 14-240에서 액틴 결합 영역 및 대략 아미노산 253-3040에서 중앙 로드 영역을 함유한다. 이러한 큰 중앙 영역은 알파-액틴 및 스펙트린에 대한 상동성을 갖는 약 109 개의 아미노산의 24 스펙트린-유사 삼중-나선 요소에 의해서 형성된다. 반복체 (repeats)는 전형적으로, 힌지 (hinge) 부분으로 또한 불리는 4 개의 프롤린-풍부 비-반복 절편에 의해서 단절된다. 반복체 15 및 16은 디스트로핀의 단백분해적 분열을 위해서 중요한 부위인 것으로 보이는 18 아미노산 스트레치 (stretch)에 의해서 분리된다. 대부분의 반복체들 사이의 서열 동일성은 10-25% 범위이다. 하나의 반복체는 3 개의 알파-나선 1, 2 및 3을 함유한다. 알파-나선 1 및 3은 각각, 대체로 소수성 계면을 통해서 2중 코일 (coiled-coil)로 상호작용하는 7 개의 나선 턴 (helix turn)에 의해서 형성된다. 알파-나선 2는 더 복잡한 구조를 가지며, 글리신 또는 프롤린 잔기에 의해서 분리된 4 및 3 개의 나선 턴의 절편에 의해서 형성된다. 각각의 반복체는 전형적으로 알파-나선 2의 첫 번째 부분에서 아미노산 47과 48 사이의 인트론에 의해서 단절된 2 개의 엑손에 의해서 코드화된다. 다른 인트론은 통상적으로 나선-3 상에 산재된 반복체의 상이한 위치에서 발견된다. 디스트로핀은 또한, 점균류 (*Dictyostelium discoideum*) 알파-액티닌의 C-말단 영역에 대한 상동성을 나타내는 시스테인-풍부 절편 (즉, 280 개의 아미노산에서 15 개의 시스테인)을 포함하는 시스테인-풍부 영역을 대략 아미노산 3080-3360에서 함유한다. 카복시-말단 영역은 대략 아미노산 3361-3685에 있다.

[0090] 디스트로핀의 아미노-말단은 F-액틴에 결합하고, 카복시-말단은 근섬유막에서 디스트로핀-연관된 단백질 컴플렉스 (DAPC)에 결합한다. DAPC는 디스트로글리칸, 사르코글리칸, 인테그린 및 카베올린을 포함하며, 이들 성분 중의 어떤 것에서의 돌연변이라도 상염색체적으로 유전된 근위축증을 야기한다. DAPC는 디스트로핀이 부재하는 경우에 불안정화되어 구성원 단백질의 감소된 레벨을 제공하며, 다시 점진적인 섬유 손상 및 막 누출을 유도한다. 뒤시엔느 근위축증 (DMD) 및 베커 근위축증 (BMD)과 같은 다양한 형태의 근위축증에서, 근육 세포는 주로 부정확한 스플라이싱을 유도하는 유전자 서열에서의 돌연변이에 기인하여 디스트로핀의 변화된 기능적 결손 형태를 생산하거나, 디스트로핀을 전혀 생산하지 않는다. 결손 디스트로핀 단백질의 우세한 발현 또는 디스트로핀 또는 디스트로핀-유사 단백질의 완전한 결여는 상기 나타낸 바와 같이 근육 변성의 빠른 진행을 유도한다. 이에 관해서, "결손" 디스트로핀 단백질은 본 기술분야에서 알려진 바와 같은, DMD 또는 BMD를 갖는 특정의 대상체에서 생산된 디스트로핀의 형태, 또는 검출 가능한 디스트로핀의 부재를 특징으로 할 수 있다.

[0091] 표 A는 다양한 디스트로핀 영역, 이들 영역을 포함하는 아미노산 잔기, 및 이들을 코드화한 엑손을 설명을 제공한다.

[0092] [표 A]

영역	서브 영역	잔기 번호	엑손
액틴 결합 영역		14-240	2-8
중앙 로드 영역		253-3040	8-61
	힌지 1	253-327	(8)-9
	반복체 1	337-447	10-11
	반복체 2	448-556	12-14
	반복체 3	557-667	14-16
	힌지 2	668-717	17
	반복체 4	718-828	(17)-20
	반복체 5	829-934	20-21
	반복체 6	935-1045	22-23
	반복체 7	1046-1154	(23)-(26)
	반복체 8	1155-1263	26-27
	반복체 9	1264-1367	28-(30)
	반복체 10	1368-1463	30-32
	반복체 11	1464-1568	32-(34)
	반복체 12	1569-1676	34-35
	반복체 13	1677-1778	36-37
	반복체 14	1779-1874	38-(40)
	반복체 15	1875-1973	40-41
	단절	1974-1991	42
	반복체 16	1992-2101	42-43
	반복체 17	2102-2208	44-45
	반복체 18	2209-2318	46-48
	반복체 19	2319-2423	48-50
	힌지 3	2424-2470	50-51
	반복체 20	2471-2577	51-53
	반복체 21	2578-2686	53-(55)
	반복체 22	2687-2802	55-(57)
	반복체 23	2803-2931	57-59
	반복체 24	2932-3040	59-(61)
	힌지 4	3041-3112	61-64
시스테인-풍부 영역		3080-3360	63-69
	디스트로글리칸 결합 부위	3080-3408	63-70
	WW 영역	3056-3092	62-63
	EF-핸드 1	3130-3157	65
	EF-핸드 2	3178-3206	65-66
	ZZ 영역	3307-3354	68-69
카복시-말단 영역		3361-3685	70-79
	알파 1-신트로핀 결합 부위	3444-3494	73-74
	β1-신트로핀 결합 부위	3495-3535	74-75
	(Leu)6-헵타드 반복체	3558-3593	75

[0093]

[0094] 본 발명에서 사용된 것으로서, 용어 "기능" 및 "기능적" 등은 생물학적, 효소적 또는 치료학적 기능을 나타낸다.

[0095] "기능적" 디스트로핀 단백질은 일반적으로, 전형적으로 DMD 또는 BMD를 갖는 특정의 대상체에 존재하는 변화되거나 "결손"된 형태의 디스트로핀 단백질에 비해서, 근위축증의 다른 특징인 근육 조직의 진행성 변성을 감소시키는 충분한 생물학적 활성을 갖는 디스트로핀 단백질을 나타낸다. 특정의 구체예에서, 기능적 디스트로핀 단백질은 본 기술분야에서의 일상적인 기술에 따라 측정된 것으로서 야생형 디스트로핀의 시험관내 또는 생체내 생물학적 활성의 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% (이들 사이의 모든 정수 포함)를 가질 수 있다. 한가지 예로서, 시험관내 근육 배양물에서 디스트로핀-관련된 활성은 근관 크기, 근원섬유 조직화 (또는 해체), 수축 활성, 및 아세틸콜린 수용체의 자발적 클러스터링 (spontaneous clustering)에 따라 측정될 수 있다 [참조: 예를 들어, Brown *et al., Journal of Cell Science*. 112:209-216, 1999]. 동물 모델은 또한 질병의 병인론을 시험하기 위한 유용한 자원이며, 디스트로핀-관련된 활성을 시험하는 수단을 제공한다.

DMD 연구를 위해서 가장 광범하게 사용된 동물 모델 중의 두 가지는 *mdx* 마우스 및 골든 리트리버 (golden retriever) 근위축증 (GRMD) 개이며, 이들 두 가지는 모두 디스트로핀 음성이다 [참조: 예를 들어, Collins & Morgan, *Int J Exp Pathol* 84: 165-172, 2003]. 이들 및 그 밖의 다른 동물 모델이 다양한 디스트로핀 단백질의 기능적 활성을 측정하기 위해서 사용될 수 있다. 본 발명의 엑손-스키핑 안티센스 화합물 중의 일부에 의해서 생산된 형태와 같은 디스트로핀의 절단된 형태가 포함된다.

[0096] "유전자"는 염색체 상의 특정한 유전자좌를 점유하며, 전사 및/또는 번역 조절 서열 및/또는 코드화 부분 및/또는 비-번역 서열 (즉, 인트론, 5' 및 3' 비번역 서열)로 구성되는 유전의 유니트를 의미한다.

[0097] "분리된"은 물질이 통상적으로 그의 자연적 상태에서 수반하는 성분들을 실질적으로 또는 본질적으로 함유하지 않는 물질을 의미한다. 예를 들어, 본 발명에서 사용된 것으로서 "분리된 폴리뉴클레오타이드"는 천연적으로-존재하는 상태에서 이것을 플랭킹하는 서열로부터 정제되거나 분리된 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 단편에 통상적으로 인접한 서열로부터 분리된 DNA 단편을 나타낼 수 있다.

[0098] "증진시키다" 또는 "증진시키는", 또는 "증가시키다" 또는 "증가시키는", 또는 "자극하다" 또는 "자극하는"은 일반적으로, 안티센스 화합물이 없는 경우나 대조 화합물에 의해서 야기된 반응에 비해서 세포 또는 대상체에서 더 큰 생리학적 반응 (즉, 하류 효과)을 제공하거나 야기하는 하나 또는 그 이상의 안티센스 화합물 또는 조성물의 능력을 나타낸다. 측정가능한 생리학적 반응은 본 기술분야에서의 이해 및 본 발명의 설명으로부터 명백한 다른 반응 중에서 특히 디스트로핀 단백질의 기능적 형태의 증가된 발현, 또는 근육 조직에서 증가한 디스트로핀-관련된 생물학적 활성을 포함할 수 있다. 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%만큼의 근육 기능에서의 증가 또는 개선을 포함하는 증가한 근육 기능이 또한 측정될 수 있다. 근섬유의 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%에서 증가한 디스트로핀 발현을 포함하여, 기능적 디스트로핀을 발현하는 근섬유의 백분율이 또한 측정될 수 있다. 예를 들어, 섬유의 25-30%가 디스트로핀을 발현한다면 대략 40%의 근육 기능 개선이 나타날 수 있는 것으로 나타났다 [참조: 예를 들어, DelloRusso *et al., Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12979-12984, 2002]. "증가"하거나 "증진"된 양은 전형적으로, "통계학적으로 유의적"인 양이며, 안티센스 화합물이 없는 경우 (약제의 부재) 또는 대조 화합물에 의해서 제공된 양의 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 배 또는 그 이상의 배수 (예를 들어, 500, 1000 배) (이들 사이 및 1 이상의 모든 정수 및 소수점 포함, 예를 들어, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등)인 증가를 포함할 수 있다.

[0099] 용어 "감소시키다" 또는 "억제하다"는 일반적으로, 진단 분야에서의 일상적인 기술에 따라 측정된 것으로서, 본 발명에 기술된 질병 또는 상태의 증상과 같은 관련된 생리학적 또는 세포성 반응을 "감소"시키는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 안티센스 화합물의 능력과 연관이 있을 수 있다. 관련된 생리학적 또는 세포성 반응 (생체내 또는 시험관내)은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 명백할 것이며, 근위축증의 증상 또는 병리학의 감소, 또는 DMD 또는 BMD가 있는 개체에서 발현된 디스트로핀의 변화된 형태와 같은 디스트로핀의 결손 형태의 발현에 있어서의 감소를 포함할 수 있다. 반응에 있어서의 "감소"는 안티센스 화합물이 없는 경우 또는 대조 조성물에 의해서 생산된 반응에 비해서 통계학적으로 유의적일 수 있으며, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 감소 (이들 사이의 모든 정수 포함)를 포함할 수 있다.

[0100] "상동성"은 동일하거나 보존된 치환으로 구성된 아미노산의 백분율 숫자를 나타낸다. 상동성은 GAP [Deveraux et al., 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395]와 같은 서열 비교 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명에 인용된 것과 유사하거나 실질적으로 상이한 길이의 서열은 정렬 내로 갭 (gaps)을 삽입함으로써 비교될 수 있으며, 이러한 갭은 예를 들어, GAP에 의해서 사용된 비교 알고리듬에 의해서 결정된다.

[0101] 본 발명에서 사용된 것으로서 설명 "서열 동일성" 또는 예를 들어, "~에 대해 50% 동일한 서열"을 포함하는 설명은 서열이 비교창에 걸쳐서 뉴클레오타이드-대-뉴클레오타이드 기준 또는 아미노산-대-아미노산 기준으로 동일한 정도를 나타낸다. 따라서, "서열 동일성의 백분율"은 2 개의 최적으로 정렬된 서열을 비교창에 걸쳐서 비교하고, 동일한 핵산 염기 (예를 들어, A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기 (예를 들어, Ala, Pro, Ser, Thr, GIy, VaI, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 양 서열에서 모두 나타나는 위치의 수를 결정하여 매치된 위치의 수를 얻고, 매치된 위치의 수를 비교창 내의 위치의

총수 (즉, 창 크기)로 나누어 주고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 수득함으로써 계산될 수 있다.

[0102] 2 개 또는 그 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 사이의 서열 관계를 기술하기 위해서 사용된 용어에는 "기준 서열", "비교창", "서열 동일성", "서열 동일성의 백분율" 및 "실질적인 동일성"이 포함된다. "기준 서열"은 길이가 적어도 8 또는 10개, 그러나 빈번하게는 15 내지 18 개, 종종 적어도 25 개의 뉴클레오타이드 및 아미노산 잔기를 포함한 모노머 유니트이다. 2 개의 폴리뉴클레오타이드는 각각 (1) 2 개의 폴리뉴클레오타이드 사이에서 유사한 서열 (즉, 단지 완전한 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부분), 및 (2) 2 개의 폴리뉴클레오타이드 사이에서 일치하지 않는 서열을 포함할 수 있기 때문에, 2 개 (또는 그 이상)의 폴리뉴클레오타이드 사이의 서열 비교는 전형적으로 "비교창"에 걸친 2 개의 폴리뉴클레오타이드의 서열을 비교하여 서열 유사성의 국소적인 부분을 확인하고 비교함으로써 수행된다. "비교창"은 적어도 6 개의 인접한 위치, 통상적으로는 약 50 내지 약 100 개, 더욱 통상적으로는 약 100 내지 약 150 개의 위치의 개념적 절편을 나타내며, 여기에서 서열은 2 개의 서열을 최적으로 정렬한 후에 동일한 수의 인접한 위치의 기준 서열과 비교된다. 비교창은 2 개의 서열의 최적 정렬을 위해서 기준 서열 (부가 또는 결실을 포함하지 않음)에 비해 약 20% 또는 그 미만의 부가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교창을 정렬하기 위한 서열의 최적 정렬은 알고리듬 (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 내의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA)의 컴퓨터화된 이행에 의해서, 또는 선택된 다양한 방법 중의 어느 것에 의해서 생성된 검사 및 최적 정렬 (즉, 비교창에 걸쳐 최고의 상동성 백분율을 제공함)에 의해서 수행될 수 있다. 기준은 또한, 예를 들어, 문헌 [Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389]에 기술된 것과 같은 프로그램의 BLAST 패밀리에 대해서 만들어질 수도 있다. 서열 분석의 상세한 검토는 문헌 [Unit 19.3 of Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15]에서 볼 수 있다.

[0103] 개체 (예를 들어, 인간과 같은 포유동물) 또는 세포의 "치료" 또는 "치료하는"은 개체 또는 세포의 자연적인 과정을 변화시키기 위한 시도에서 사용된 모든 타입의 개입을 포함한다. 치료는 약제학적 조성물의 투여를 포함하나, 이것으로 제한되지는 않으며, 예방적으로 또는 병리학적 이벤트의 개시 또는 병인제 (etiologic agent)와의 접촉 후에 수행될 수 있다. 치료는 근위축증의 특정한 형태에서와 같이 디스트로핀 단백질과 연관된 질병 또는 상태의 증상 또는 병리학에 대한 모든 바람직한 효과를 포함하며, 예를 들어, 치료될 질병 또는 상태의 하나 또는 그 이상의 측정가능한 마커에서의 최소 변화 또는 개선을 포함할 수 있다. 또한, 치료될 질병 또는 상태의 진행 속도를 감소시키거나, 해당 질병 또는 상태의 개시를 지연시키거나, 그의 개시의 중증도를 감소시키도록 지시될 수 있는 "예방적" 치료가 포함된다. "치료" 또는 "예방"은 반드시 질병 또는 상태, 또는 그의 연관된 증상의 완전한 근절, 치유 또는 예방을 나타내지는 않는다.

[0104] 따라서, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 안티센스 올리고머 (예를 들어, 서열번호 1 내지 569 및 612 내지 635, 및 이들의 변이체)를 임의로 약제학적 제제 또는 투약형의 일부분으로서 필요한 대상체에게 투여함으로써, DMD 및 BMD와 같은 근위축증을 치료하는 방법이 포함된다. 또한, 하나 또는 그 이상의 안티센스 올리고머를 투여함으로써 대상체에서 엑손-스키핑을 유도하는 방법이 포함되며, 여기에서 엑손은 디스트로핀 유전자, 바람직하게는 인간 디스트로핀 유전자로부터의 엑손 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 및/또는 55 중의 하나이다. 본 발명에서 사용된 것으로서 "대상체"는 DMD 또는 BMD, 또는 이들 상태와 연관된 증상 중의 어떤 것 (예를 들어, 근섬유 손실)을 갖거나, 가질 위험이 있는 대상체와 같이 본 발명의 안티센스 화합물로 치료될 수 있는 증상을 나타내거나 증상을 나타낼 위험이 있는 모든 동물을 포함한다. 적합한 대상체 (환자)에는 실험실 동물 (예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼 또는 기니아 피그), 농장 동물, 및 가정용 동물 또는 애완동물 (예를 들어, 고양이 또는 개)이 포함된다. 비-인간 영장류, 및 바람직하게는 인간 환자가 포함된다.

[0105] 또한, 본 발명에 기술된 바와 같은 서열번호 1 내지 569 및 612 내지 635, 또는 이들의 변이체 중의 어느 하나 또는 그 이상을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 발현하는 벡터와 같은, 본 발명의 올리고머성 디스트로핀-표적화 서열을 발현할 수 있는 벡터 송달 시스템이 포함된다. "벡터" 또는 "핵산 구조물"은 폴리뉴클레오타이드 분자, 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드가 삽입되거나 클로닝될 수 있는 플라스미드, 박테리오파지, 효모 또는 바이러스로부터 유도된 DNA 분자를 의미한다. 벡터는 바람직하게는 하나 또는 그 이상의 독특한 제한 부위를 함유하며, 표적 세포 또는 조상 세포 또는 그의 조직을 포함하는 규정된 숙주 세포 내에서 자발적 복제할 수 있거나, 클로닝된 서열이 재생될 수 있도록 규정된 숙주의 게놈 내로 통합될 수 있다. 따라서, 벡터는 자발적 복제성 벡터, 즉 염색체-외 실체로 존재하며 그의 복제가 염색체 복제와는 무관한 벡터, 예를 들어, 선형 또는 폐쇄된 원형 플라스미드, 염색체-외 요소, 미니-염색체, 또는 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 자가-복제를 보정

하기 위한 어떤 수단이라도 함유할 수 있다. 대신으로, 벡터는 숙주 세포 내로 도입되는 경우에 게놈 내로 통합되고 이것이 통합된 염색체(들)과 함께 복제하는 것일 수 있다.

[0106] 벡터 또는 핵산 구조물 시스템은 단일 벡터 또는 플라스미드, 숙주 세포의 게놈 내로 도입될 총 DNA를 함께 함유하는 2 개 또는 그 이상의 벡터 또는 플라스미드, 또는 트랜스포손 (transposon)을 포함할 수 있다. 벡터의 선택은 전형적으로 벡터가 도입될 숙주 세포와 벡터의 상화성에 따를 수 있다. 본 발명의 경우에, 벡터 또는 핵산 구조물은 바람직하게는 근육 세포와 같은 포유동물 세포에서 작동적으로 기능성인 것이다. 벡터는 또한, 적합한 형질전환체 또는 형질감염체의 선택 또는 확인을 위해서 사용될 수 있는 항생제 또는 약물 저항성 유전자, 또는 리포터 유전자 (즉, 녹색 형광성 단백질, 루시퍼라제)와 같은 선택 마커를 포함할 수도 있다. 예시적인 송달 시스템은 본 기술분야에서 공지된 것들 중에서 특히 레트로바이러스 (예를 들어, 렌티바이러스) 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관된 바이러스 벡터, 및 헤르페스 바이러스 벡터를 포함하는 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 바이러스 벡터 시스템 (즉, 바이러스-매개된 형질도입)을 포함할 수 있다.

[0107] 본 발명에서 사용된 것으로서 용어 "작동적으로 연결된"은 올리고머-코드화 서열을 프로모터의 조절 제어 하에 배치하는 것을 의미하며, 이것은 다음에 올리고머의 전사를 제어한다.

[0108] 야생형 유전자 또는 유전자 생성물은 집단에서 가장 빈번하게 관찰되는 것이며, 따라서 임의로 유전자의 "표준" 또는 "야생형" 형태로 지정된다.

[0109] "알킬" 또는 "알킬렌"은 둘 다 1 내지 18 개의 탄소를 함유하는 포화된 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 라디칼을 나타낸다. 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소-프로필, 부틸, 이소-부틸, tert-부틸, n-펜틸 및 n-헥실이 포함되나 제한되지는 않는다. 용어 "저급 알킬"은 1 내지 8 개의 탄소를 함유하는, 본 발명에서 정의된 바와 같은 알킬 그룹을 나타낸다.

[0110] "알케닐"은 2 내지 18 개의 탄소를 함유하며, 적어도 하나의 탄소-대-탄소 이중 결합을 포함하는 불포화된 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 라디칼을 나타낸다. 예로는 에테닐, 프로페닐, 이소-프로페닐, 부테닐, 이소-부테닐, tert-부테닐, n-펜테닐 및 n-헥세닐이 포함되나 제한되지는 않는다. 용어 "저급 알케닐"은 2 내지 8 개의 탄소를 함유하는, 본 발명에서 정의된 바와 같은 알케닐 그룹을 나타낸다.

[0111] "알키닐"은 2 내지 18 개의 탄소를 함유하며, 적어도 하나의 탄소-대-탄소 삼중 결합을 포함하는 불포화된 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 라디칼을 나타낸다. 예로는 에티닐, 프로피닐, 이소-프로피닐, 부티닐, 이소-부티닐, tert-부티닐, 펜티닐 및 헥시닐이 포함되나 제한되지는 않는다. 용어 "저급 알키닐"은 2 내지 8 개의 탄소를 함유하는, 본 발명에서 정의된 바와 같은 알키닐 그룹을 나타낸다.

[0112] "사이클로알킬"은 모노- 또는 폴리-사이클릭 알킬 라디칼을 나타낸다. 예로는 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸 및 사이클로옥틸이 포함되나 제한되지는 않는다.

[0113] "아릴"은 하나 또는 그 이상의 폐쇄된 고리(들)를 갖는 5 내지 18 개의 탄소를 함유하는 사이클릭 방향족 탄화수소 부위를 나타낸다. 예로는 페닐, 벤질, 나프틸, 안트라세닐, 페난트라세닐 및 비페닐이 포함되나 제한되지는 않는다.

[0114] "아르알킬"은 화학식 RaRb의 라디칼을 나타내며, 여기에서 Ra는 상기 정의한 바와 같은 알킬렌이고, Rb는 상기 정의한 바와 같은 하나 또는 그 이상의 아릴 라디칼, 예를 들어, 벤질, 디페닐메틸 등이다.

[0115] "티오알콕시"는 화학식 -SRc의 라디칼을 나타내며, 여기에서 Rc는 본 발명에서 정의한 바와 같은 알킬 라디칼이다. 용어 "저급 티오알콕시"는 1 내지 8 개의 탄소를 함유하는, 본 발명에서 정의한 바와 같은 티오알콕시 그룹을 나타낸다.

[0116] "알콕시"는 화학식 -ORda의 라디칼을 나타내며, 여기에서 Rd는 본 발명에서 정의한 바와 같은 알킬 라디칼이다. 용어 "저급 알콕시"는 1 내지 8 개의 탄소를 함유하는, 본 발명에서 정의한 바와 같은 알콕시 그룹을 나타낸다. 알콕시 그룹의 예로는 메톡시 및 에톡시가 포함되나 제한되지는 않는다.

[0117] "알콕시알킬"은 알콕시 그룹으로 치환된 알킬 그룹을 나타낸다.

[0118] "카보닐"은 -C(=O)- 라디칼을 나타낸다.

[0119] "구아니디닐"은 $H_2N(C=NH_2)-NH-$ 라디칼을 나타낸다.

[0120] "아미디닐"은 $H_2N(C=NH_2)CH-$ 라디칼을 나타낸다.

[0121] "아미노"는 $-NH_2$ 라디칼을 나타낸다.

[0122] "알킬아미노"는 화학식 -NHRd 또는 -NRdRd의 라디칼을 나타내며, 여기에서 각각의 Rd는 독립적으로 본 발명에서 정의한 바와 같은 알킬 라디칼이다. 용어 "저급 알킬아미노"는 1 내지 8 개의 탄소를 함유하는, 본 발명에서 정의한 바와 같은 알킬아미노 그룹을 나타낸다.

[0123] "헤테로사이클"은 이하의 헤테로사이클 중의 어떤 것이 벤젠 고리에 융합된 바이사이클릭 고리를 포함하는, 포화, 불포화 또는 방향족이며, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4 개의 헤테로원자를 함유하는 5- 내지 7-원 모노사이클릭, 또는 7- 내지 10-원 바이사이클릭 헤테로사이클릭 고리를 의미하며, 여기에서 질소 및 환 헤테로원자는 임의로 산화될 수 있고, 질소 헤테로원자는 임의로 4급화될 수 있다. 헤테로사이클은 어떤 헤테로원자 또는 탄소 원자를 통해서라도 부착될 수 있다. 헤테로사이클은 이하에 정의하는 바와 같은 헤테로아릴을 포함한다. 따라서, 이하에 열거된 헤테로아릴에 더하여 헤테로사이클은 또한 모르폴리닐, 피롤리디노닐, 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 히단토이닐, 발레로락타밀, 옥시라닐, 옥세타닐, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로피리디닐, 테트라하이드로티오페닐, 테트라하이드로티오피라닐, 테트라하이드로피리미디닐, 테트라하이드로티오피라닐 등을 포함한다.

[0124] "헤테로아릴"은 모노- 및 바이사이클릭 고리 시스템 모두를 포함하는, 5- 내지 10-원이며 질소, 산소 및 황으로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자 및 적어도 하나의 탄소 원자를 갖는 방향족 헤테로사이클 고리를 의미한다. 대표적인 헤테로아릴은 피리딜, 푸릴, 벤조푸라닐, 티오페닐, 벤조티오페닐, 퀴놀리닐, 피롤릴, 인돌릴, 옥사졸릴, 벤즈옥사졸릴, 이미다졸릴, 벤즈이미다졸릴, 티아졸릴, 벤조티아졸릴, 이소옥사졸릴, 피라졸릴, 이소티아졸릴, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 트리아지닐, 신놀리닐, 프탈라지닐 및 퀴나졸리닐이다.

[0125] 용어 "임의로 치환된 알킬", "임의로 치환된 알케닐", "임의로 치환된 알콕시", "임의로 치환된 티오알콕시", "임의로 치환된 알킬아미노", "임의로 치환된 저급 알킬", "임의로 치환된 저급 알케닐", "임의로 치환된 저급 알콕시", "임의로 치환된 저급 티오알콕시", "임의로 치환된 저급 알킬아미노" 및 "임의로 치환된 헤테로사이클릴"은 치환되는 경우에 적어도 하나의 수소 원자가 치환체로 대체되는 것을 의미한다. 옥소 치환체 (=O)의 경우에는 2 개의 수소 원자가 대체된다. 이에 관해서, 치환체는 다음을 포함한다: 중수소, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클, 임의로 치환된 사이클로알킬, 옥소, 할로겐, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, $NRxSO_2Ry$, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOmRx 및 -SOmNRxRy (여기에서, m은 0, 1 또는 2이며, Rx 및 Ry는 동일하거나 상이하고, 독립적으로 수소, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클 또는 임의로 치환된 사이클로알킬이며, 상기 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클 및 임의로 치환된 사이클로알킬 치환체는 각각 옥소, 할로겐, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO2Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOmRx 및 -SOmNRxRy 중의 하나 또는 그 이상에 의해서 더 치환될 수 있다).

[0126] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 구성

[0127] 인-함유 골격 결합을 갖는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 예는 도 1A-1C에 예시되어 있다. 특히 바람직한 것은 본 발명의 한 관점에 따라 그의 골격 결합의 바람직하게는 10%-50%에서 양으로 하전된 그룹을 함유하도록 변형된, 도 1C에 나타낸 바와 같은 포스포로디아미데이트-연결된 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 비하전된 골격 결합을 갖는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 제조방법은 예를 들어, 모두 명백히 본 발명에 참고로 포함된 문헌 [Summerton and Weller 1997] 및 공동-소유된 미국 특허 제5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,185,444, 5,521,063 및 5,506,337호에 상세히 설명되어 있다.

[0128] 모르폴리노-기본 서브유니트의 중요한 특성은 1) 안정한 비하전되거나 양으로 하전된 골격 결합에 의해서 올리고머 형태로 연결되는 능력; 2) 형성된 폴리머가 비교적 짧은 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 10-15 염기)에서 약 45℃ 이상의 Tm으로, 표적 RNA를 포함하는 상보적-염기 표적 핵산과 하이브리드화할 수 있도록 뉴클레오타이드 염기 (예를 들어, 아데닌, 시토신, 구아닌, 티미딘, 우라실 및 이노신)를 지지하는 능력; 3) 포유동물 세포 내로 능동적으로 또는 수동적으로 수송되는 올리고뉴클레오타이드의 능력; 및 4) 각각 RNAse 및 RNaseH 분해에 저항하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드:RNA 헤테로듀플렉스의 능력을 포함한다.

[0129] 청구된 대상인 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대한 골격 구조의 예에는 각각 비하전되거나 양으로 하전된 인-함유 서브유니트 결합에 의해서 연결된, 도 1D-G에 나타낸 모르폴리노 서브유니트 타입이 포함된다. 도 1D는 5 원자 반복-유니트 골격을 형성하는 인-함유 결합을 나타내며, 여기에서 모르폴리노 고리는 1-원자 포스포아미드 결합에 의해서 연결된다. 도 1E는 6-원자 반복-유니트 골격을 생성시키는 결합을 나타낸다. 이 구조에서, 5' 모르폴리노 탄소를 인 그룹에 연결시키는 원자 Y는 황, 질소, 탄소, 또는 바람직하게는 산소일 수 있다. 인으로부터 펜던트한 X 부위는 불소, 알킬 또는 치환된 알킬, 알콕시 또는 치환된 알콕시, 티오알콕시 또는 치환된 티오알콕시, 또는 모르폴린 또는 피페리딘과 같은 사이클릭 구조를 포함하는 비치환, 일치환 또는 이치환된 질소일 수 있다. 알킬, 알콕시 및 티오알콕시는 바람직하게는 1-6 개의 탄소 원자를 포함한다. Z 부위는 황 또는 산소이며, 바람직하게는 산소이다.

[0130] 도 1F 및 1G에 나타낸 결합은 7-원자 유니트-길이 골격을 위해서 디자인된다. 구조 1 F에서, X 부위는 구조 1E에서와 같으며, Y 부위는 메틸렌, 황, 또는 바람직하게는 산소일 수 있다. 구조 1G에서, X 및 Y 부위는 구조 1E에서와 같다. 특히 바람직한 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드에는 도 1E에 나타낸 형태의 모르폴리노 서브유니트 구조로 구성된 것이 포함되며, 여기에서 X는 NH_2, $N(CH_3)_2$, 임의로 치환된 1-피페라지닐, 또는 다른 하전된 그룹이며, Y는 O이고, Z는 O이다.

[0131] 상기 나타낸 바와 같이, 비하전되거나 실질적으로 비하전된 올리고뉴클레오타이드는 본 발명의 관점에 따라 하전된 결합, 예를 들어, 매 10 개의 비하전된 결합당 약 4-5 개와 같은 매 2-5 개의 비하전된 결합당 약 1 개의 하전된 결합을 포함하도록 변형될 수 있다. 안티센스 활성에서의 최적 개선은 약 20% 내지 약 30%를 포함한 약 25%의 골격 결합이 양이온성인 경우에 나타날 수 있다. 또한, 골격 결합의 약 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% (이들 사이의 모든 정수 포함), 또는 그 이상이 양이온성인 올리고머가 포함된다. 증진은 또한 소수, 예를 들어, 5% 또는 10-20%의 양이온성 결합에 의해서 나타난다.

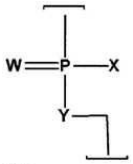
[0132] 올리고뉴클레오타이드 유사체 내의 실질적으로 비하전된 인-함유 골격은 전형적으로, 대부분의 서브유니트 결합, 예를 들어, 그의 결합의 50%-100%, 전형적으로는 적어도 60% 내지 100% 또는 75% 또는 80%가 생리학적 pH에서 비하전되고, 단일 인 원자를 함유하는 것이다.

[0133] 본 발명의 지지 하에서 수행된 추가의 실험은, 일부의 경우에, 부가된 양이온성 골격 전하에 의해서 나타나는 증진이 전하의 벌크를 10 개의 정중앙 (centermost) 결합 내에 국재화된 이들 하전된 결합의 적어도 70%를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, 8 개의 양이온성 골격 결합을 갖는 20mer 올리고뉴클레오타이드 내의 "중앙-부분" 골격 결합에 근접하게 분포시킴으로써 더 증진될 수 있음을 나타낸다.

[0134] 안티센스 화합물은 비하전 및 양이온성 골격 결합의 혼합물을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 합성에 관하여 상기 및 이하에서 인용된 문헌에 상세히 설명된 방법을 사용한 단계적 고체-상 합성에 의해서 제조될 수 있다. 일부의 경우에, 예를 들어, 약력학을 증진시키거나 화합물의 포착 또는 검출을 촉진시키기 위해서, 안티센스 화합물에 추가의 화학적 부위를 부가시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 부위는 표준 합성방법에 따라, 전형적으로는 올리고머의 말단에 공유적으로 부착될 수 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌 부위 또는 다른 친수성 폴리머, 예를 들어, 10-100 모노머 서브유니트를 갖는 것의 부가는 용해도를 증진시키는데 유용할 수 있다. 하나 또는 그 이상의 하전된 그룹, 예를 들어, 유기산과 같은 음이온성 하전된 그룹은 세포 흡수를 증진시킬 수 있다. 플루오레세인 또는 방사성표지된 그룹과 같은 리포터 부위는 검출의 목적으로 부착될 수 있다. 대신으로, 올리고머에 부착된 리포터 라벨은 표지된 항체 또는 스트렙타비딘을 결합시킬 수 있는, 항원 또는 비오틴과 같은 리간드일 수 있다. 안티센스 화합물의 부착 또는 변형을 위한 부위를 선택함에 있어서는, 일반적으로는 생체적합성이며, 바람직하지 않은 부작용이 없이 대상체에 의해서 허용될 것 같은 그룹의 화학적 화합물을 선택하는 것이 물론 바람직하다.

[0135] 상기 언급한 바와 같이, 안티센스 화합물은 상술한 타입의 비하전된 결합에 의해서 산재된 선택된 수의 양이온성 결합을 함유하도록 구성될 수 있다. 비하전 및 양이온성 서브유니트간 결합은 둘 다 바람직하게는 하기 화학식 (II)의 구조를 갖는 인-함유 결합이다:

[0136] [화학식 Ⅱ]



[0137] (II)

[0138] 여기에서,

[0139] W는 -S- 또는 -O-이며, 바람직하게는 -O-이고,

[0140] X는 $-NR^1R^2$ 또는 $-OR^6$이며,

[0141] Y는 -O- 또는 $-NR^7$이고,

[0142] 올리고머 내의 각각의 상기 결합은

[0143] (a) R^1, R^2, R^6 및 R^7의 각각이 수소 및 저급 알킬로부터 독립적으로 선택되는 비하전된 결합 (a);

[0144] (b1) X가 $-NR^1R^2$이며, Y는 -O-이고, $-NR^1R^2$는 R^1R^2가 $-CHRCHRN(R^3)(R^4)-CHRCHR-$이 되도록 임의로 치환된 피페라지닐 부위를 나타내는 양이온성 결합 (b1) (여기에서,

[0145] 각각의 R은 독립적으로 H 또는 $-CH_3$이고,

[0146] R^4는 H, $-CH_3$, 또는 전자쌍이며,

[0147] R^3는 H, 임의로 치환된 저급 알킬, $-C(=NH)NH_2$, $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$, 및 $[-C(=O)CHR'NH]_mH$로부터 선택되고, 여기에서 Z는 -C(=O)- 또는 직접 결합이며, L은 길이가 18 원자 이하, 바람직하게는 12 원자 이하, 더욱 바람직하게는 8 원자 이하의 길이이며, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시, 및 임의로 치환된 알킬아미노로부터 선택된 결합을 갖는 임의의 링커이고, R'는 천연적으로 존재하는 아미노산의 측쇄 또는 그의 1- 또는 2-탄소 동족체이며, m은 1 내지 6, 바람직하게는 1 내지 4이다);

[0148] (b2) X가 $-NR^1R^2$이고, Y가 -O-이며, R^1이 H 또는 $-CH_3$이고, R^2가 $LNR^3R^4R^5$인 양이온성 결합 (b2) (여기에서, L, R^3, 및 R^4는 상기 정의한 바와 같고, R^5는 H, 임의로 치환된 저급 알킬, 또는 임의로 치환된 저급 (알콕시)알킬이다); 및

[0149] (b3) Y가 $-NR^7$이고, X는 $-OR^6$이며, R^7은 $-LNR^3R^4R^5$ (여기에서, L, R^3, R^4 및 R^5는 상기 정의한 바와 같다)고, R^6은 H 또는 임의로 치환된 저급 알킬인 양이온성 결합 (b3)로부터 선택되며; 또한

[0150] 적어도 하나의 상기 결합은 양이온성 결합 (b1), (b2), 및 (b3)로부터 선택된다.

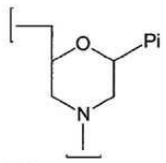
[0151] 바람직하게는, 올리고머는 타입 (a) (즉, 비하전된 결합)의 적어도 2 개의 연속적 결합을 포함한다. 추가의 구체예에서, 올리고머 내의 결합의 적어도 5%는 양이온성 결합 (즉, 타입 (b1), (b2), 또는 (b3))이며; 예를 들어, 10% 내지 60%, 바람직하게는 20-50%의 결합은 양이온성 결합일 수 있다.

[0152] 한가지 구체예에서, 적어도 하나의 결합은 타입 (b1)의 결합이며, 여기에서 바람직하게는 각각의 R은 H이고, R^4는 H, $-CH_3$, 또는 전자쌍이며, R^3은 H, 임의로 치환된 저급 알킬, $-C(=NH)NH_2$, 및 $-C(=O)-L-NHC(=NH)NH_2$로부터 선택된다. R^3의 후자의 두 가지 구체예는 각각 피페라진 고리에 직접 부착되거나, 링커 그룹 L에 펜던트된 구아니디노 부위를 제공한다. 합성의 용이성을 위해서, R^3 내의 변수 Z는 바람직하게는 나타낸 바와 같이 -C(=O)-이다.

[0153] 상기 언급한 바와 같은 링커 그룹 L은 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알콕시 및 임의로 치환된 알킬아미노로부터 선택된 골격 내에 결합을 함유하며, 여기에서 L 내의 말단 원자 (예를 들어, 카보닐 또는 질소에 인접한 것)는 탄소 원자이다. 분지된 결합이 가능할 수 있지만, 링커는 바람직하게는 분지되지 않는다. 한가지 구체예에서, 링커는 선형 알킬 링커이다. 이러한 링커는 화학식 $-(CH_2)_n-$의 구조를 가질 수 있으며, 여기에서 n은 1-12, 바람직하게는 2-8, 더욱 바람직하게는 2-6이다.

[0154] 모르폴리노 서브유니트는 하기 화학식 (III)의 구조를 갖는다:

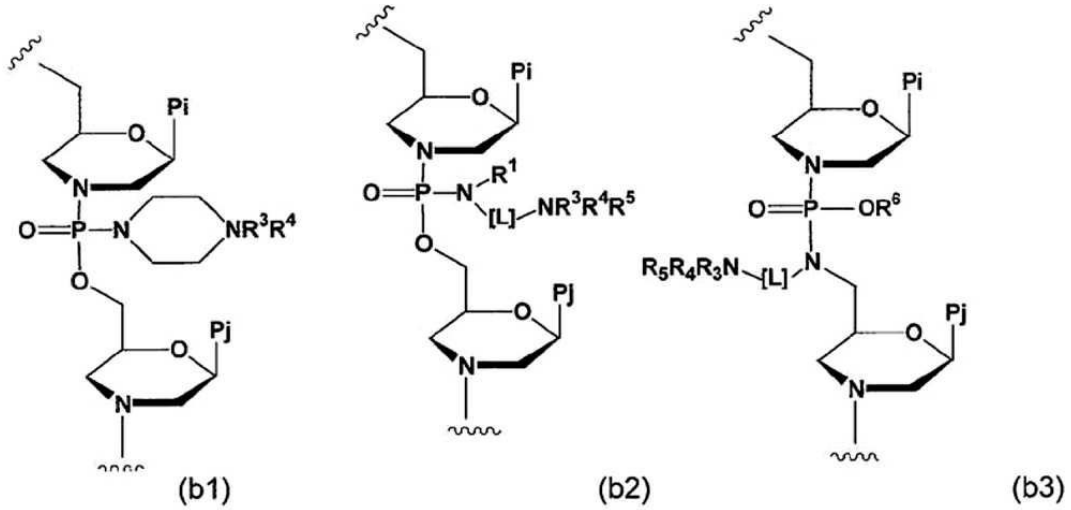
[0155] [화학식 Ⅲ]

[0156] 

(III)

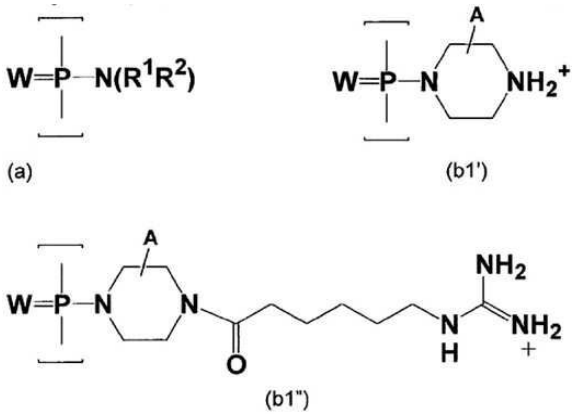
[0157] 여기에서, Pi는 염기-짝짓기 부위이며, 상기 도시된 결합은 화학식 (III)의 질소 원자를 인접한 서브유니트의 5' 탄소에 연결한다. 염기-짝짓기 부위 Pi는 동일하거나 상이할 수 있으며, 일반적으로 표적 핵산에 결합하는 서열을 제공하도록 디자인된다.

[0158] 모르폴리노 서브유니트 (III)을 연결시키기 위한 상기 결합 타입 (b1), (b2) 및 (b3)의 구체예의 사용은 다음과 같은 그래픽으로 예시될 수 있다:

[0159] 

[0160] 바람직하게는, 올리고머 내의 모든 양이온성 결합은 동일한 타입, 즉 모두 타입 (b1), 모두 타입 (b2), 또는 모두 타입 (b3)이다.

[0161] 추가의 구체예에서, 양이온성 결합은 이하에 나타낸 바와 같은 결합 (b1') 및 (b1")로부터 선택되며, 여기에서 (b1')는 본 발명에서 "Pip" 결합으로 불리고, (b1")는 본 발명에서 "GuX" 결합으로 불린다:

[0162] 

[0163] 상기 구조에서, W는 S 또는 O이며, 바람직하게는 O이고; 각각의 R^1 및 R^2는 수소 및 임의로 치환된 저급 알킬로부터 독립적으로 선택되며, 바람직하게는 메틸이고; A는 (b1') 및 (b1") 내의 하나 또는 그 이상의 탄소 원자상에서 수소 또는 비-간섭성 치환체 (즉, 올리고머가 그의 의도한 표적에 결합하는 능력에 역효과를 미치지 않는 치환체)를 나타낸다. 바람직하게는, 피페라진 고리 내의 고리 탄소는 비치환되지만; 피페라진 고리 내의 고리 탄소는 메틸 또는 불소와 같은 비-간섭성 치환체를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 기껏해야 1 또는 2 개의 탄소 원자가 이렇게 치환된다.

[0164] 추가의 구체예에서, 결합의 적어도 10%가 타입 (b1') 또는 (b1")의 결합이며; 예를 들어, 10%-60%, 바람직하게는 20% 내지 50%의 결합이 타입 (b1') 또는 (b1")일 수 있다.

[0165] 다른 구체예에서, 올리고머는 상기 타입 (b1')의 결합을 함유하지 않는다. 대신으로, 올리고머는 각각의 R이 H이고, R^3이 H 또는 $-CH_3$이며, R^4가 H, $-CH_3$, 또는 전자쌍인 타입 (b1)의 결합을 함유하지 않는다.

[0166] 모르폴리노 서브유니트는 또한, 적어도 하나의 결합이 상술한 바와 같은 펜단트 양이온성 그룹에 의해서 변형된, 이하에 더 기술되는 바와 같은 비-인-기본 서브유니트간 결합에 의해서 연결될 수도 있다.

[0167] 그들의 비변형된 상태에서는 비하전되지만, 펜던트 아민 치환체를 또한 보유할 수 있는 다른 올리고뉴클레오타이드 유사체 결합이 사용될 수 있다. 예를 들어, 모르폴리노 고리 상의 5' 질소 원자는 설프아미드 결합 또는 우레아 결합 (인이 각각 탄소 또는 황으로 대체된 경우)으로 사용될 수 있으며, 상기 구조 (b3)에서의 5'-질소 원자와 유사한 방식으로 변형된다.

[0168] 완전히 양이온성-연결된 올리고머를 포함한 모든 수의 양이온성 결합을 갖는 올리고머가 제공된다. 그러나, 바람직하게는 올리고머는 예를 들어, 10-80%로 부분적으로 하전된다. 바람직한 구체예에서는, 약 10% 내지 60%, 바람직하게는 20% 내지 50%의 결합이 양이온성이다.

[0169] 한가지 구체예에서, 양이온성 결합은 골격을 따라 산재된다. 부분적으로 하전된 올리고머는 바람직하게는 적어도 2 개의 연속적인 비하전된 결합을 함유하며; 즉 올리고머는 바람직하게는 그의 전체 길이를 따라서 엄격하게 교호하는 패턴을 갖지 않는다.

[0170] 또한, 양이온성 결합의 블럭 및 비하전된 결합의 블럭을 갖는 올리고머가 고려되며; 예를 들어, 비하전된 결합의 중앙 블럭은 양이온성 결합의 블럭에 의해서 플랭킹되거나 반대로도 될 수 있다. 한가지 구체예에서, 올리고머는 대략 동등한-길이의 5', 3' 및 중앙 부분을 가지며, 중앙 부분에서의 양이온성 결합의 백분율은 약 50% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상이다.

[0171] 안티센스 적용 시에 사용하기 위한 올리고머는 일반적으로 길이가 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40 염기를 갖는 것을 포함하는, 약 10 내지 약 40 서브유니트, 더욱 바람직하게는 약 10 내지 30 서브유니트, 전형적으로는 15-25 염기의 범위이다. 특정의 구체예에서, 안티센스 화합물의 유용한 길이인 19-20 서브유니트를 갖는 본 발명의 올리고머는 이상적으로 2 내지 10 개, 예를 들어, 4 내지 8 개의 양이온성 결합, 및 나머지로 비하전된 결합을 가질 수 있다. 14-15 서브유니트를 갖는 올리고머는 이상적으로 2 내지 7 개, 예를 들어, 3 내지 5 개의 양이

온성 결합, 및 나머지로 비하전된 결합을 가질 수 있다.

[0172] 각각의 모르폴리노 고리 구조는 염기 짝짓기 부위를 지지하여, 전형적으로는 세포에서 또는 치료할 대상체에서 선택된 안티센스 표적에 대해 하이브리드화하도록 디자인된 염기 짝짓기 부위의 서열을 형성한다. 염기 짝짓기 부위는 천연 DNA 또는 RNA (예를 들어, A, G, C, T 또는 U)에 존재하는 퓨린 또는 피리미딘, 또는 하이포크산틴 (뉴클레오사이드 이노신의 염기 성분) 또는 5-메틸 시토신과 같은 유사체일 수 있다.

[0173] 펩타이드 수송체 (transporters)

[0174] 본 발명의 안티센스 화합물은 세포 내로의 화합물의 수송을 증진시키는데 효과적인 아르기닌-풍부 펩타이드 수송 부위에 컨주게이트된 올리고뉴클레오타이드 부위를 포함할 수 있다. 수송 부위는 바람직하게는, 예를 들어, 도 1B 및 1C에 나타낸 바와 같이 올리고머의 말단에 부착된다. 펩타이드 수송 부위는 바람직하게는 X' 서브유니트, Y' 서브유니트, 및 Z' 서브유니트로부터 선택된 6 내지 16 개의 서브유니트를 포함하며, 여기에서

[0175] (a) 각각의 X' 서브유니트는 독립적으로 리신, 아르기닌 또는 아르기닌 유사체를 나타내며, 여기에서 상기 유사체는 구조 $R^1N=C(NH_2)R^2$의 측쇄 (여기에서 R^1은 H 또는 R이며; R^2는 R, $-NH_2$, -NHR, 또는 $-NR_2$이고, 여기에서 R은 임의로 치환된 저급 알킬 또는 임의로 치환된 저급 알케닐이며; R^1 및 R^2는 함께 결합하여 고리를 형성할 수 있고; 측쇄는 R^1 또는 R^2를 통해서 상기 아미노산에 연결된다)를 포함하는 양이온성 α-아미노산이고;

[0176] (b) 각각의 Y' 서브유니트는 독립적으로 중성 아미노산 $-C(=O)-(CHR)_n-NH-$ (여기에서, n은 2 내지 7이고, 각각의 R은 독립적으로 H 또는 메틸이다)를 나타내며;

[0177] (c) 각각의 Z' 서브유니트는 독립적으로 중성 아르알킬 측쇄를 갖는 α-아미노산을 나타내고;

[0178] 여기에서 펩타이드는 $(X'Y'X')_p$, $(X'Y')_m$, 및/또는 $(X'Z'Z')_p$ 중의 적어도 하나로 표시되는 서열을 포함하며, 여기에서 p는 2 내지 5이고, m은 2 내지 8이다. 특정의 구체예는 예를 들어, 서열 (X'Y'X')(X'Z'Z')(X'Y'X')(X'Z'Z') (서열번호 637)를 갖는 펩타이드를 포함한 $(X'Y'X')_p$, $(X'Y')_m$, 및/또는 $(X'Z'Z')_p$로부터 독립적으로 선택된 다양한 조합을 포함한다.

[0179] 선택된 구체예에서, 각각의 X'에 대해 측쇄 부위는 아미노산 서브유니트 아르기닌 (Arg)에서와 같이 구아니딜이다. 특정의 구체예에서, 각각의 Y'는 독립적으로 $-C(=O)-(CH2)_n-CHR-NH-$이며, 여기에서 n은 2 내지 7이고, R은 H이다. 예를 들어, n이 5이고 R이 H인 경우에, Y'는 본 발명에서 Ahx로 약칭하는 6-아미노헥사노산 서브유니트이며; n이 2이고 R이 H인 경우에, Y'는 본 발명에서 B로 약칭하는 β-알라닌 서브유니트이다. 특정의 구체예는 예를 들어, β-알라닌 및 6-아미노헥사노산 둘 다를 함유하는 서열 -RahxRRBRRAhxRRBRAhxB- (서열번호 578)를 포함하는 펩타이드를 포함한 상이한 중성 아미노산의 조합물을 갖는 담체 펩타이드에 관한 것이다.

[0180] 이러한 타입의 바람직한 펩타이드는 단일 Y' 서브유니트와 교호하는 아르기닌 다이머를 포함하는 것을 포함하며, 여기에서 Y'는 바람직하게는 Ahx 또는 B 또는 둘 다이다. 예로는 화학식 $(RY'R)_p$ 및/또는 화학식 $(RRY')_p$를 갖는 펩타이드가 포함되며, 여기에서 p는 1 내지 2 내지 5이고, Y'는 바람직하게는 Ahx이다. 한가지 구체예에서, Y'는 6-아미노헥사노산 서브유니트이며, R은 아르기닌이고, p는 4이다. 특정의 구체예는 예를 들어, 서열 (RY'R)(RRY')(RY'R)(RRY') (서열번호 638), 또는 (RRY')(RY'R)(RRY') (서열번호 639)를 갖는 예시적 펩타이드를 포함한, $(RY'R)_p$ 및 $(RRY')_p$ 중의 적어도 2 개의 다양한 선형 조합물을 포함한다. 다른 구체예도 고려된다. 추가의 예시적 구체예에서, 각각의 Z'는 페닐알라닌이며, m은 3 또는 4이다.

[0181] 컨주게이트된 펩타이드는 바람직하게는, 예를 들어, 도 1B 및 1C에 나타낸 바와 같이 링커 Ahx-B를 통해서 올리고머의 말단에 연결되며, 여기에서 Ahx는 6-아미노헥사노산 서브유니트이고, B는 β-알라닌 서브유니트이다.

[0182] 선택된 구체예에서, 각각의 X'에 대해 측쇄 부위는 독립적으로 구아니딜 $(HN=C(NH_2)NH-)$, 아미디닐 $(HN=C(NH_2)CH-)$, 2-아미노디하이드로피리미딜, 2-아미노테트라하이드로피리미딜, 2-아미노피리디닐, 및 2-아미노피리미도닐로 구성된 그룹으로부터 선택되며, 이것은 바람직하게는 구아니딜 및 아미디닐로부터 선택된다. 한가지 구체예에서, 측쇄 부위는 아미노산 서브유니트 아르기닌 (Arg)에서와 같이 구아니딜이다.

[0183] 특정의 구체예에서, Y' 서브유니트는 인접할 수 있으며, 즉 Y' 서브유니트 사이에 X' 서브유니트가 개입하지 않거나, X' 서브유니트 사이에 단독으로 산재될 수 있다. 특정의 구체예에서, 연결 서브유니트가 Y' 서브유니트 사이에 있을 수 있다. 한가지 구체예에서, Y' 서브유니트는 수송체의 말단에 존재하며; 다른 구체예에서 이들은 X' 서브유니트에 의해서 플랭킹된다. 추가의 바람직한 구체예에서, 각각의 Y'는 $-C(=O)-(CH_2)_n-CHR-NH-$이며, 여기에서 n은 2 내지 7이고, R은 H이다. 예를 들어, n이 5이고 R이 H인 경우에, Y'는 본 발명에서 Ahx로 약칭하는 6-아미노헥사노산 서브유니트이다. 이 그룹의 선택된 구체예에서, 각각의 X'는 아르기닌 서브유니트에서와 같은 구아니딜 측쇄 부위를 포함한다. 이러한 타입의 바람직한 펩타이드는 단일 Y' 서브유니트와 교호하는 아르기닌 다이머를 포함하는 것을 포함하며, 여기에서 Y'는 바람직하게는 Ahx이다. 예로는 화학식 $(RY'R)_4$ 또는 화학식 $(RRY')_4$를 갖는 펩타이드가 포함되며, 여기에서 Y'는 바람직하게는 Ahx이다. 후자의 경우에, 핵산 유사체는 바람직하게는, 예를 들어, 도 1B 및 1C에 나타낸 바와 같이, 바람직하게는 C-말단에서 말단 Y' 서브유니트에 연결된다. 바람직한 링커는 구조 AhxB의 링커이며, 여기에서 Ahx는 6-아미노헥사노산 서브유니트이고, B는 β-알라닌 서브유니트이다.

[0184] 상술한 바와 같은 수송 부위는 부착된 수송 부위의 부재 하에서의 올리고머의 흡수에 비해서, 및 소수성 서브유니트 Y'를 결여하는 부착된 수송 부위에 의한 흡수에 비해서 부착된 올리고머의 세포 유입을 크게 증진시키는 것으로 나타났다. 이러한 증진된 흡수는 바람직하게는, 소수성 서브유니트 Y'를 결여하는 부착된 수송 부위에 의한 약제의 흡수에 비해 포유동물 세포 내로의 화합물의 흡수에 있어서의 적어도 2-배 증가, 바람직하게는 4-배 증가에 의해 입증된다. 흡수는 바람직하게는 비컨주게이트된 화합물에 비해서 적어도 20 배, 더욱 바람직하게는 40 배로 증진된다.

[0185] 수송 부위의 추가의 이점은 아마도 양으로 하전된 수송 부위와 음으로 하전된 핵산 사이의 정전기적 상호작용에 의한, 안티센스 화합물과 그의 표적 핵산 서열 사이의 듀플렉스를 안정화시키는 그의 예상된 능력이다. 너무 많은 수의 하전된 서브유니트는 서열 특이성의 감소를 유도할 수 있기 때문에, 수송체에서 하전된 서브유니트의 수는 상기 언급한 바와 같이 14 미만이며, 바람직하게는 8 내지 11이다.

[0186] 아르기닌-풍부 펩타이드 수송체 (즉, 세포-침투성 펩타이드)의 사용이 본 발명을 실시하는데 특히 유용하다. 특정의 펩타이드 수송체는 안티센스 화합물을 근육 세포를 포함한 일차 세포 내로 송달하는데 매우 효과적인 것으로 나타났다 [Marshall, Oda et al. 2007; Jearawiriyapaisarn, Moulton et al. 2008; Wu, Moulton et al. 2008]. 더구나, 페네트라틴 (Penetratin) 및 Tat 펩타이드와 같은 다른 펩타이드 수송체에 비해, 본 발명에 기술된 펩타이드 수송체는 안티센스 PMO에 컨주게이트되는 경우에, 몇 가지 유전자 전사물의 스플라이싱을 변화시키는 증진된 능력을 나타낸다 [Marshall, Oda et al. 2007]. 특히 바람직한 것은 이하의 표 3에 열거된 P007, CP06062 및 CP04057 수송 펩타이드 (각각 서열번호 573, 578 및 577)이다.

[0187] 링커 (B 또는 AhxB)를 포함한 예시적인 펩타이드 수송체는 이하의 표 B에 제시된다. 바람직한 서열은 CP06062 (서열번호 578), P007 (서열번호 573) 및 CP04057 (서열번호 577)로 지정된 것이다.

[0188] [표 B]

표B. PMO의 세포내 송달을 위한 예시적인 펩타이드 수송체

펩타이드	서열 (N-말단에서 C-말단)	서열번호
rTAT	RRRQRRKKRC	570
R_9F_2	RRRRRRRRRFFC	571
$(RRAhx)_4B$	RRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	572
$(RAhxR)_4AhxB$; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB	573
$(AhxRR)_4AhxB$	AhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	574
$(RAhx)_6B$	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	575
$(RAhx)_8B$	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	576
$(RAhxR)_5AhxB$ (CP05057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB	577
$(RAhxRRBR)_2AhxB$; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	578
MSP	ASSLNIA	579

[0189]

[0190] 제제

[0191] 특정의 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 기술된 바와 같은 안티센스 올리고머의 치료학적 송달에 적합한 제제 또는 조성물을 제공한다. 따라서, 특정의 구체예에서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 (첨가제) 및/또는 희석제와 함께 제제화된, 본 발명에 기술된 하나 또는 그 이상의 올리고머의 치료학적 유효량을 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 제공한다. 본 발명의 올리고머는 단독으로 투여될 수 있지만, 화합물은 약제학적 제제 (조성물)로 투여하는 것이 바람직하다.

[0192] 핵산 분자의 송달을 위한 방법은 예를 들어, 문헌 [Akhtar *et al.*, 1992, *Trends Cell Bio.*, 2:139; 및 *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar; Sullivan *et al.*, PCT WO 94/02595]에 기술되어 있다. 이들 및 그 밖의 다른 프로토콜은 본 발명의 분리된 올리고머를 포함한 실질적으로 모든 핵산 분자의 송달을 위해서 이용될 수 있다.

[0193] 이하에 상술된 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물은 특히 다음에 적합한 것을 포함한 고체 또는 액체 형태로 투여하기 위해서 제제화될 수 있다: (1) 경구 투여, 예를 들어, 드렌치 (drenches) (수성 또는 비-수성 용액 또는 현탁액), 정제, 예를 들어, 협측, 설하, 및 전신 투여를 위해서 표적화된 것, 볼루스 (boluses), 분말, 과립, 혀에 적용하기 위한 페이스트; (2) 예를 들어, 멸균 용액 또는 현탁액 또는 서방성 제제로서, 예를 들어, 피하, 근육내, 정맥내 또는 경막외 주사에 의한 비경구 투여; (3) 예를 들어, 크림, 연고 또는 조절-방출 패치 또는 피부에 적용된 스프레이와 같은 국소 적용; (4) 예를 들어, 페서리 (pessary), 크림 또는 포말(foam)로서 질내 또는 직장내 투여; (5) 설하 투여; (6) 안내 투여; (7) 경피 투여; 또는 (8) 비내 투여.

[0194] 문구 "약제학적으로 허용되는"은 본 발명에서 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 합리적인 유익/위험비와 비례하여 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증이 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉시켜 사용하는데 적합한 이들 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투약형을 나타내기 위해서 사용된다.

[0195] 본 발명에서 사용된 것으로서, 문구 "약제학적으로 허용되는 담체"는 대상 화합물을 신체의 한 기관 또는 부분으로부터 신체의 또 다른 기관 또는 부분으로 운반하거나 수송하는데 포함되는 액체 또는 고체 충진제, 희석제, 부형제, 제조 보조제 (예를 들어, 윤활제, 탈크, 마그네슘, 칼슘 또는 아연 스테아레이트, 또는 스테아르산),

또는 용매 캅셀화 물질과 같은 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다. 각각의 담체는 제제의 다른 성분과 상화적이고, 환자에게 무해하여야 한다는 의미에서 반드시 "허용"되어야 한다.

[0196] 약제학적으로 허용되는 담체로 작용할 수 있는 물질의 일부의 예로는 다음이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다: (1) 락토즈, 글루코즈 및 슈크로즈와 같은 당류; (2) 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; (3) 셀룰로즈, 및 나트륨 카복시메틸 셀룰로즈, 에틸 셀룰로즈 및 셀룰로즈 아세테이트와 같은 그의 유도체; (4) 분말상 트라가칸트; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 탈크; (8) 코코아 버터 및 좌제 왁스와 같은 부형제; (9) 낙화생유, 면실유, 잇꽃유, 호마유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유와 같은 오일; (10) 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; (11) 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; (12) 에틸 올리에이트 및 에틸 라우레이트와 같은 에스테르; (13) 한천; (14) 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄과 같은 완충제; (15) 알긴산; (16) 발열성 물질이 없는 물; (17) 등장성 식염수; (18) 링거 (Ringer) 용액; (19) 에틸 알콜; (20) pH 완충 용액; (21) 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리안하이드라이드; 및 (22) 기타 약제학적 제제에 사용되는 비독성 상화성 물질.

[0197] 본 발명의 안티센스 올리고머와 함께 제제화하는데 적합한 약제의 추가의 비-제한적 예에는 다음이 포함된다: PEG 컨주게이트된 핵산, 인지질 컨주게이트된 핵산, 친유성 부위를 함유하는 핵산, 포스포로티오에이트, 다양한 조직 내로 약물의 유입을 증진시킬 수 있는 P-당단백질 억제제 (예를 들어, 플루로닉 (Pluronic) P85); 이식 후에 서방성 송달을 위한 폴리 (DL-락티드-코글리콜리드) 미립구 (microspheres)와 같은 생물분해성 폴리머 [Emerich, DF et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58; Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.]; 및 약물을 혈뇌장벽을 가로질러서 송달할 수 있고, 뉴론성 흡수 기전을 변화시킬 수 있는 폴리부틸시아노아크릴레이트로 만들어진 것과 같은 부하된 나노입자 [Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999].

[0198] 본 발명은 또한, 폴리 (에틸렌 글리콜) 지질을 함유하는 표면-변형된 리포좀 (PEG-변형, 분지 및 비분지 또는 이들의 조합, 또는 장 (long)-순환성 리포좀 또는 스텔스 (stealth) 리포좀)을 포함하는 조성물의 사용을 특징으로 한다. 본 발명의 올리고머는 또한, 다양한 분자량의 공유적으로 부착된 PEG 분자를 포함할 수 있다. 이들 제제는 표적 조직에서 약물의 축적을 증가시키는 방법을 제공한다. 이러한 부류의 약물 담체는 단핵성 식세포 시스템 (MPS 또는 RES)에 의한 옵소닌 작용 (opsonization) 및 제거에 저항함으로써 더 긴 혈액 순환시간 및 캅셀화된 약물에 대한 증진된 조직 노출을 가능하게 한다 [Lasic *et al. Chem. Rev.* 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata *et al., Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011]. 이러한 리포좀은 아마도 혈관신생된 표적 조직에서의 일혈 및 포착에 의해 종양 내에서 선택적으로 축적되는 것으로 나타났다 [Lasic *et al.*, Science 1995, 267, 1275-1276; Oku *et al.*, 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90]. 장-순환성 리포좀은 특히 MPS의 조직내에서 축적하는 것으로 알려진 통상적인 양이온성 리포좀에 비해서, DNA 및 RNA의 약력학 및 약동학을 증진시킨다 [Liu *et al.*, J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi *et al.*, PCT 국제공개 제WO 96/10391호; Ansell *et al.*, PCT 국제공개 제WO 96/10390호; Holland *et al.*, PCT 국제공개 제WO 96/10392호]. 장-순환성 리포좀은 또한, 간 및 비장과 같은 대사적으로 공격성인 MPS 조직 내에서의 축적을 피하는 그들의 능력을 기초로 하여, 양이온성 리포좀에 비해 더 큰 정도로 뉴클레아제 분해로부터 약물을 보호하는 것 같다.

[0199] 추가의 구체예에서, 본 발명은 미국 특허 제6,692,911, 7,163,695 및 7,070,807호에 기술된 바와 같이 송달을 위해서 제조된 올리고머 조성물을 포함한다. 이에 관해, 한가지 구체예에서 본 발명은 단독으로 또는 PEG (예를 들어, 분지되거나 분지되지 않은 PEG 또는 둘 다의 혼합물)과 함께, PEG 및 표적화 부위 또는 전술한 것 중의 어떤 것과 교차결합제와 함께, 미국 특허 제7,163,695, 7,070,807, 및 6,692,911호에 기술된 바와 같이 리신 및 히스티딘의 코폴리머 (HK)를 포함하는 조성물 내의 본 발명의 올리고머를 제공한다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 글루콘산-변형된 폴리히스티딘 또는 글루코닐화된-폴리히스티딘/트랜스페린-폴리리신을 포함하는 조성물 중의 안티센스 올리고머를 제공한다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가는 또한, His 및 Lys와 유사한 특성을 갖는 아미노산이 조성물 내에서 치환될 수 있음을 인지할 것이다.

[0200] 본 발명에 기술된 올리고머의 특정의 구체예는 아미노 또는 알킬아미노와 같은 염기성 기능적 그룹을 함유할 수 있으며, 따라서 약제학적으로 허용되는 산에 의해 약제학적으로 허용되는 염을 형성할 수 있다. 이점에 있어서, 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 비교적 비-독성인 무기 및 유기산 부가염을 나타낸다. 이들 염은 투여 비히클 또는 투약형 제조 공정에서 그대로, 또는 그의 유리 염기 형태인 본 발명의 정제된 화합물을 적합한 유기 또는 무기산과 별도로 반응시키고, 후속 정제 중에 이렇게 형성된 염을 분리시킴으로써 제조될 수 있다. 대표적인 염에는 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 설페이트, 바이설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 아세테이트, 발레레이트, 올리에이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 라우레이트, 벤조에이트, 락테이트, 포스페이트, 토실레이트, 시트레이트, 말리에이트, 푸마레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 나프

틸레이트, 메실레이트, 글루코헵토네이트, 락토비오네이트, 및 라우릴설포네이트 염 등이 포함된다 [참조: 예를 들어, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19].

[0201] 대상 올리고머의 약제학적으로 허용되는 염에는 예를 들어, 비독성 유기 또는 무기산으로부터의, 화합물의 통상적인 비독성 염 또는 4급 암모늄염이 포함된다. 예를 들어, 이러한 통상적인 비독성 염에는 염산, 브롬화수소산, 황산, 설팜산, 인산, 질산 등과 같은 무기산으로부터 유도된 것; 및 아세트산, 프로피온산, 석신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르빈산, 팔미트산, 말레산, 하이드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 설파닐산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔설폰산, 메탄설폰산, 에탄디설폰산, 옥살산, 이소티온산 등과 같은 유기산으로부터 제조된 염이 포함된다.

[0202] 특정의 구체예에서, 본 발명의 올리고머는 하나 또는 그 이상의 산성 기능적 그룹을 함유할 수 있으며, 따라서 약제학적으로 허용되는 염기에 의해서 약제학적으로 허용되는 염을 형성할 수 있다. 이들 경우에 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 비교적 비독성인 무기 및 유기 염기 부가염을 나타낸다. 이들 염은 마찬가지로, 투여 비히클 또는 투약형 제조 공정에서 그대로, 또는 그의 유리산 형태인 정제된 화합물을 약제학적으로 허용되는 금속 양이온의 하이드록사이드, 카보네이트 또는 바이카보네이트와 같은 적합한 염기와, 암모니아와, 또는 약제학적으로 허용되는 유기 일급, 이급 또는 삼급 아민과 별도로 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리토금속 염은 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄 염 등을 포함한다. 염기 부가염의 형성에 유용한 대표적인 유기 아민은 에틸아민, 디에틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진 등을 포함한다 [참조: 예를 들어, Berge et al., supra].

[0203] 나트륨 라우릴 설페이트 및 마그네슘 스테아레이트와 같은 습윤제, 유화제 및 윤활제뿐만 아니라 착색제, 이형제 (release agents), 코팅제, 감미제, 방향제, 보존제 및 항산화제가 조성물 내에 또한 존재할 수 있다.

[0204] 약제학적으로 허용되는 항산화제의 예로는 다음이 포함된다: (1) 아스코르빈산, 시스테인 하이드로클로라이드, 나트륨 바이설페이트, 나트륨 메타바이설페이트, 나트륨 설파이트 등과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화된 하이드록시아니솔 (BHA), 부틸화된 하이드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 유용성 항산화제; 및 (3) 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은 금속 킬레이트화제.

[0205] 본 발명의 제제에는 경구, 비내, 국소 (협측 및 설하 포함), 직장, 질내 및/또는 비경구 투여에 적합한 것이 포함된다. 제제는 편리하게는 단위 투약형으로 존재할 수 있으며, 약제학의 기술분야에서 잘 알려진 어떤 방법에 의해서라도 제조될 수 있다. 단일 투약형을 생산하기 위해서 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료할 숙주, 특정한 투여의 모드에 따라 달라질 수 있다. 단일 투약형을 생산하기 위해서 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료학적 효과를 제공하는 화합물의 양일 수 있다. 일반적으로, 100% 중에서 이 양은 약 0.1% 내지 약 99%의 활성 성분, 바람직하게는 약 5% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 10% 내지 약 30%의 범위일 수 있다.

[0206] 특정의 구체예에서, 본 발명의 제제는 사이클로덱스트린, 셀룰로즈, 리포좀, 미셀 형성제, 예를 들어, 담즙산, 및 폴리머성 담체, 예를 들어, 폴리에스테르 및 폴리안하이드라이드로부터 선택된 부형제; 및 본 발명의 올리고머를 포함한다. 특정의 구체예에서, 전술한 제제는 본 발명의 올리고머를 경구적으로 생체이용할 수 있도록 한다.

[0207] 이들 제제 또는 조성물을 제조하는 방법은 본 발명의 올리고머를 담체, 및 임의로, 하나 또는 그 이상의 보조성분과 회합하도록 유도하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제제는 본 발명의 화합물을 액체 담체 또는 미분된 고체 담체, 또는 둘 다와 균일하고 긴밀하게 회합하도록 유도한 다음에, 필요한 경우, 생성물을 성형시킴으로써 제조된다.

[0208] 경구 투여에 적합한 본 발명의 제제는 각각 활성 성분으로서 예정된 양의 본 발명의 화합물을 함유하는 캅셀제, 카세제, 환제, 정제, 로젠지 (lozenges) (방향성 기제, 통상적으로 슈크로즈 및 아카시아 또는 트라가칸트 사용), 분말, 과립의 형태, 또는 수성 또는 비수성 액체 중의 용액 또는 현탁액, 또는 수중유 또는 유중수 에멀션, 또는 엘릭서 또는 시럽, 또는 패스틸 (pastilles) (젤라틴 및 글리세린과 같은 불활성 기제, 또는 슈크로즈 및 아카시아를 사용) 및/또는 함수제 (mouth washes) 등일 수 있다. 본 발명의 올리고머는 또한 볼루스, 지제 (electuary) 또는 페이스트로 투여될 수 있다.

[0209] 경구 투여를 위한 본 발명의 고체 투약형 (캅셀제, 정제, 환제, 당제 (dragees), 분말, 과립, 트로치 (trouches) 등)에서, 활성 성분은 나트륨 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트와 같은 하나 또는 그 이상의 약제

학적으로 허용되는 담체, 및/또는 다음 중의 어떤 성분과 혼합될 수 있다: (1) 전분, 락토즈, 슈크로즈, 글루코즈, 만니톨 및/또는 규산과 같은 충진제 또는 증량제; (2) 예를 들어, 카복시메틸셀룰로즈, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 슈크로즈 및/또는 아카시아와 같은 결합제; (3) 글리세롤과 같은 보습제; (4) 한천, 칼슘 카보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정의 실리케이트, 및 나트륨 카보네이트와 같은 붕해제; (5) 파라핀과 같은 용해 지연제; (6) 4급 암모늄 화합물과 같은 흡수 촉진제 및 폴록사머 및 나트륨 라우릴 설페이트와 같은 계면활성제; (7) 예를 들어, 세틸 알콜, 글리세롤 모노스테아레이트 및 비-이온성 계면활성제와 같은 습윤제; (8) 카올린 및 벤토나이트 점토와 같은 흡수제; (9) 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 설페이트, 아연 스테아레이트, 나트륨 스테아레이트, 스테아르산, 및 이들의 혼합물과 같은 윤활제; (10) 착색제; 및 (11) 크로스포비돈 또는 에틸 셀룰로즈와 같은 조절방출제. 캡셀제, 정제 및 환제의 경우에, 약제학적 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 타입의 고체 조성물은 또한, 락토즈 또는 유당과 같은 부형제뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용한 연질 및 경질-외피 젤라틴 캅셀 내의 충진제로서 사용될 수 있다.

[0210] 정제는 임의로 하나 또는 그 이상의 보조 성분들과 함께 압착 또는 성형시킴으로써 제조될 수 있다. 압착된 정제는 결합제 (예를 들어, 젤라틴 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로즈), 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 붕해제 (예를 들어, 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 교차결합된 나트륨 카복시메틸 셀룰로즈), 계면활성 또는 분산제를 사용하여 제조될 수 있다. 성형된 정제는 불활성 액체 희석제로 습윤된 분말상 화합물의 혼합물을 적합한 기계 내에서 성형함으로써 제조될 수 있다.

[0211] 정제, 및 당제, 캅셀제, 환제 및 과립제와 같은 본 발명의 약제학적 조성물의 다른 고체 투약형은 임의로 스코어(score)하거나, 장용성 코팅 및 약제학적 제제화 기술분야에서 잘 알려진 다른 코팅과 같은 코팅 및 외피를 사용하여 제조될 수 있다. 이들은 또한, 예를 들어, 원하는 방출 프로필을 제공하는 다양한 비율의 하이드록시프로필메틸 셀룰로즈, 그 밖의 다른 폴리머 매트릭스, 리포좀 및/또는 미립구를 사용하여 그 안의 활성 성분의 서방출 또는 조절 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다. 이들은 속방출을 위해서 제제화될 수 있는데, 예를 들어, 동결-건조될 수 있다. 이들은 예를 들어, 박테리아-보유 필터를 통해서 여과하거나, 사용하기 직전에 멸균수 또는 일부의 다른 멸균 주사용 매질 내에 용해될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 멸균제를 혼입시킴으로써 멸균될 수 있다. 이들 조성물은 또한, 임의로 불투명화제를 함유할 수 있으며, 활성 성분(들)을, 임의로 지연된 방식으로, 위장관의 특정 부분에서만, 또는 특정 부분에서 선택적으로 방출하는 조성물의 형태일 수 있다. 사용될 수 있는 매립 조성물의 예로는 폴리머성 성분 및 왁스가 포함된다. 활성 성분은 또한, 적절한 경우에, 상술한 부형제 중의 하나 또는 그 이상과 함께 마이크로-캅셀화될 수 있다.

[0212] 본 발명의 화합물의 경구 투여를 위한 액체 투약형은 약제학적으로 허용되는 에멀션, 마이크로에멀션, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서를 포함한다. 활성 성분 이외에도, 액체 투약형은 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예를 들어, 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 호마유), 글리세롤, 테트라하이드로푸릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물과 같은 본 기술분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제를 함유할 수 있다.

[0213] 불활성 희석제 이외에도, 경구용 조성물은 또한 습윤제, 유화 및 현탁화제, 감미제, 방향제, 착색제, 향료 및 보존제와 같은 보조제를 포함할 수 있다.

[0214] 현탁액은 활성 성분 이외에, 예를 들어, 에톡실화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미세결정성 셀룰로즈, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 한천 및 트라가칸트, 및 이들의 혼합물과 같은 현탁화제를 함유할 수 있다.

[0215] 직장 또는 질내 투여를 위한 제제는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 화합물을 예를 들어, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌제 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 하나 또는 그 이상의 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합시킴으로써 제조될 수 있으며, 실온에서 고체이지만 체온에서는 액체이며, 따라서 직장 또는 질강에서 용융하여 활성 화합물을 방출할 수 있는 좌제로서 제공될 수 있다.

[0216] 본 발명에서 제공된 것으로서 올리고머의 국소 또는 경피 투여를 위한 제제 또는 투약형은 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로숀, 겔, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 올리고머는 멸균 조건 하에서 약제학적으로 허용되는 담체, 및 필요에 따라 모든 보존제, 완충제, 또는 추진제와 혼합시킬 수 있다. 연고, 페이스트, 크림 및 겔은 본 발명의 활성 화합물 이외에도 동물 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로즈 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연, 또는 이들의 혼합물과

같은 부형제를 함유할 수 있다.

[0217] 분말 및 스프레이는 본 발명의 올리고머 이외에도, 락토즈, 탈크, 규산, 알루미늄 하이드록사이드, 칼슘 실리케이트, 및 폴리아미드 분말, 또는 이들 물질의 혼합물과 같은 부형제를 함유할 수 있다. 스프레이는 추가로 통상적인 추진제, 예를 들어, 클로로플루오로하이드로카본, 및 부탄 및 프로판과 같은 휘발성 비치환 하이드로카본을 함유할 수 있다.

[0218] 경피용 패치는 신체에 대한 본 발명의 올리고머의 조절된 송달을 제공하는 추가의 이점을 갖는다. 이러한 투약형은 올리고머를 적절한 매질에 용해 또는 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 또한, 흡수 증진제를 사용하여 피부를 가로지르는 약제의 유동을 증가시킬 수도 있다. 이러한 유동의 속도는 본 기술분야에서 공지된 다른 방법들 중에서 특히, 속도 조절막을 제공하거나 약제를 폴리머 매트릭스 또는 겔에 분산시킴으로써 조절될 수 있다.

[0219] 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물은 당, 알콜, 항산화제, 완충제, 정균제, 제제가 목적으로 하는 수용주의 혈액과 등장성이 되도록 하는 용질, 또는 현탁화 또는 증점제를 함유할 수 있는 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀션, 또는 사용하기 직전에 멸균 주사용 용액 또는 분산액으로 재구성할 수 있는 멸균 분말과 함께 본 발명의 하나 또는 그 이상의 올리고머를 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 올리브유와 같은 식물유, 및 에틸 올리에이트와 같은 주사용 유기 에스테르가 포함된다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해서, 분산액의 경우에는 필요한 입자 크기의 유지에 의해서, 및 계면활성제의 사용에 의해서 유지될 수 있다.

[0220] 이들 조성물은 또한, 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수도 있다. 대상 올리고머에 대한 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함시킴으로써 보장될 수 있다. 또한, 당, 나트륨 클로라이드 등과 같은 등장화제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사용 약제학적 형태의 장기간 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 성분을 포함시킴으로써 유도될 수 있다.

[0221] 일부의 경우에, 약물의 효과를 연장시키기 위해서는 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 느리게 하는 것이 바람직하다. 이것은 본 기술분야에서 공지된 방법들 중에서 특히 열등한 수용성을 갖는 결정성 또는 무정형 물질의 액체 현탁액을 사용함으로써 성취될 수 있다. 그러면, 약물의 흡수율은 결정 크기 및 결정성 형태에 따라 좌우될 수 있다. 대신으로, 비경구로 투여된 약물 형태의 지연된 흡수는 약물을 오일 비히클 내에 용해 또는 현탁시킴으로써 성취될 수 있다.

[0222] 주사용 데포 (depot) 형태는 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생물분해성 폴리머 내의 대상 올리고머의 마이크로엔캡셀 매트릭스 (microencapsule matrices)를 형성시킴으로써 제조될 수 있다. 올리고머 대 폴리머의 비, 및 사용된 특정한 폴리머의 성질에 따라서, 올리고머 방출의 속도가 조절될 수 있다. 그 밖의 다른 생물분해성 폴리머의 예로는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(안하이드라이드)가 포함된다. 데포 주사용 제제는 또한, 약물을 신체 조직과 상화성인 리포좀 또는 마이크로에멀션 내에 엔트랩핑 (entrapping)함으로써 제조될 수도 있다.

[0223] 본 발명의 올리고머를 약제로서 인간 및 동물에게 투여하는 경우에, 이들은 그 자체로서, 또는 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 0.1 내지 99% (더욱 바람직하게는, 10 내지 30%)의 활성 성분을 함유하는 약제학적 조성물로서 제공될 수 있다.

[0224] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명의 제형 또는 제제는 경구로, 비경구로, 국소적으로 또는 직장으로 제공될 수 있다. 이들은 전형적으로 각각의 투여 경로에 적합한 형태로 제공된다. 예를 들어, 이들은 정제 또는 캅셀제 형태로, 주사, 주입 또는 흡입에 의한 주사, 흡입, 안 로션, 연고, 좌제 등의 투여로, 로션 또는 연고에 의해 국소적으로; 및 좌제에 의해서 직장으로 투여된다.

[0225] 본 발명에서 사용된 것으로서 문구 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여된"은 통상적으로 주사에 의한, 장내 및 국소 투여가 아닌 투여의 모드를 의미하며, 정맥내, 근육내, 동맥내, 초내, 낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관 (transtracheal), 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0226] 본 발명에서 사용된 것으로서 문구 "전신적 투여", "전신적으로 투여된", "말초 투여" 및 "말초로 투여된"은 화합물, 약물 또는 다른 물질이 환자의 전신에 들어가고, 따라서 대사 및 다른 유사 과정을 겪도록, 이들을 중추

신경계 내로 직접 투여하는 것이 아닌 투여, 예를 들어, 피하 투여하는 것을 의미한다.

[0227] 선택된 투여의 경로와 관계없이, 적합한 수화된 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 올리고머 및/또는 본 발명의 약제학적 조성물은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지된 통상적인 방법에 의해서 약제학적으로 허용되는 투약형으로 제제화될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물 내의 활성 성분의 실제 투약량 레벨은 환자에 대한 허용할 수 없는 독성이 없이, 개개 환자, 조성물 및 투여의 모드에 대해서 원하는 치료학적 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 수득하도록 변화될 수 있다.

[0228] 선택된 투약량 레벨은 사용된 본 발명의 특정 올리고머, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여의 경로, 투여의 시기, 사용된 특정 올리고머의 배설 또는 대사의 속도, 흡수의 속도 및 정도, 치료의 지속기간, 사용된 특정 올리고머와 함께 사용된 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적 건강 및 이전의 병력, 및 의료 기술분야에서 잘 알려진 유사 요인을 포함한 다양한 요인에 따라 좌우될 수 있다.

[0229] 본 기술분야에서 통상적인 기술을 갖는 의사 또는 수의사는 필요한 약제학적 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 약제학적 조성물 내에 사용된 본 발명의 화합물의 용량을 원하는 치료학적 효과를 달성하기 위해서 필요한 것보다 더 낮은 레벨에서 시작하여, 원하는 효과가 달성될 때까지 투약량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 화합물의 적합한 1일 용량은 치료학적 효과를 제공하는데 효과적인 최저 용량인 화합물의 양일 수 있다. 이러한 효과적인 용량은 일반적으로 상술한 요인들에 따라 좌우될 수 있다. 일반적으로, 표시된 효과를 위해서 사용되는 경우에 환자에 대한 본 발명의 화합물의 경구, 정맥내, 뇌실내 및 피하 용량은 1일에 체중 킬로그램당 약 0.0001 내지 약 100 ㎎의 범위일 수 있다.

[0230] 바람직하다면, 활성 화합물의 효과적인 1일 용량은 하루 전체에 걸쳐서 적절간 간격을 두고 별도로 투여되는 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 서브-용량으로, 임의로는 단위 투약형으로 투여될 수 있다. 특정의 상황에서, 투약은 1일에 1회 투여이다. 특정의 구체예에서, 투약은 필요에 따라, 매 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 일마다, 또는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 주일마다, 또는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 개월마다 1 회 또는 그 이상 투여하여 기능적 디스트로핀 단백질의 원하는 발현을 유지시킨다.

[0231] 핵산 분자는 본 발명에 기술되고, 본 기술분야에서 공지된 바와 같이, 이에 제한되지는 않으나, 리포좀 내에 캡셀화하거나, 이온영동법 (iontophoresis)에 의해서, 또는 하이드로겔, 사이클로덱스트린, 생물분해성 나노캡셀 및 생물접착성 미립구와 같은 다른 비히클 내로 혼입시키는 것을 포함하는 본 기술분야에 정통한 전문가에게 공지된 다양한 방법에 의해서 세포에 투여될 수 있다. 특정의 구체예에서, 마이크로에멀션화 기술을 이용하여 친유성 (불수용성) 약제학적 성분의 생체이용율을 개선시킬 수 있다. 예로는 트리메트린 (Trimetrine) [Dordunoo, S. K., *et al., Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(12), 1685-1713, 1991] 및 REV 5901 [Sheen, P. C., *et al., J Pharm Sci* 80(7), 712-714, 1991]이 포함된다. 다른 이점들 중에서, 마이크로에멀션화는 순환 시스템 대신에 림프 시스템에 대한 흡수를 선택적으로 지시하고, 이에 의해서 간을 우회하고 간담즙성 순환에서 화합물의 파괴를 방지함으로써 증진된 생체이용율을 제공한다.

[0232] 본 발명의 한가지 관점에서, 제제는 그 안에 제공된 것으로서의 올리고머 및 적어도 하나의 양친매성 담체로부터 형성된 미셀을 함유하며, 여기에서 미셀은 약 100 ㎚ 미만의 평균 직경을 갖는다. 더욱 바람직한 구체예는 약 50 ㎚ 미만의 평균 직경을 갖는 미셀을 제공하며, 더 더욱 바람직한 구체예는 약 30 ㎚ 미만, 또는 약 20 ㎚ 미만까지의 평균 직경을 갖는 미셀을 제공한다.

[0233] 모든 적합한 양친매성 담체가 고려되지만, 현재 바람직한 담체는 일반적으로 일반적으로 안전한 것으로 인정되는 (Generally-Recognized-as-Safe (GRAS)) 상황을 갖고, 용액이 컴플렉스 수성상 (인간 위장관에서 발견되는 것과 같음)과 접촉하게 되면, 본 발명의 화합물을 가용화시키고, 이것을 더 나중의 단계에서 마이크로에멀션화시키는 둘 다를 할 수 있는 것이다. 통상적으로, 이들 필요조건을 충족시키는 양친매성 성분은 2-20의 HLB (친수 대 친유 평형) 값을 가지며, 이들의 구조는 C-6 내지 C-20의 범위의 직쇄 지방족 라디칼을 함유한다. 예는 폴리에틸렌-글리콜화된 지방 글리세라이드 및 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0234] 양친매성 담체의 예로는 완전히 또는 부분적으로 수소화된 다양한 식물성 오일로부터 수득된 것과 같은 포화 및 모노불포화 폴리에틸렌글리콜화된 지방산 글리세라이드가 포함된다. 이러한 오일은 유리하게는 트리-, 디- 및 모노-지방산 글리세라이드 및 상응하는 지방산의 디- 및 모노-폴리에틸렌글리콜 에스테르로 구성될 수 있으며, 특히 바람직한 지방산 조성물은 카프르산 4-10, 카프르산 3-9, 라우르산 40-50, 미리스트산 14-24, 팔미트산 4-14 및 스테아르산 5-15%을 포함한다. 양친매성 담체의 또 다른 유용한 부류는 포화 또는 모노-불포화된 지방산

(PAN-계열) 또는 상응하는 에톡실화된 유사체 (TWEEN-계열)에 의한 부분적으로 에스테르화된 소르비탄 및/또는 소르비톨을 포함한다.

[0235] 겔루시르 (Gelucire)-계열, 라브라필 (Labrafil), 라브라솔 (Labrasol), 또는 라우로글리콜 (Lauroglycol) (이들은 모두 Gattefosse Corporation (Saint Priest, France)에 의해서 제조 및 배포됨), PEG-모노-올리에이트, PEG-디-올리에이트, PEG-모노-라우레이트 및 디-라우레이트, 레시틴, 폴리소르베이트 80 등 (미국 및 세계의 여러 회사에 의해서 생산 및 배포됨)을 포함하는 상업적으로 이용할 수 있는 양친매성 담체가 특히 유용할 수 있다.

[0236] 특정의 구체예에서, 송달은 적합한 숙주 세포 내로 본 발명의 조성물을 도입시키기 위한 리포좀, 나노캅셀, 마이크로입자, 미립구, 지질 입자, 소포체 등의 사용에 의해서 일어날 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 지질 입자, 리포좀, 소포체, 나노구체 (nanosphere), 나노입자 등 내에 캅셀화되어 송달을 위해서 제제화될 수 있다. 이러한 송달 비히클의 제제화 및 사용은 공지되고 통상적인 기술을 사용하여 수행될 수 있다.

[0237] 본 발명에서 사용하기에 적합한 친수성 폴리머는 용이하게 수용성이며, 소포-형성 지질에 공유적으로 부착될 수 있고, 독성 효과가 없이 허용되는 (즉, 생체적합성) 것이다. 적합한 폴리머에는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리락트산 (또한 폴리락티드로 칭함), 폴리글리콜산 (또한 폴리글리콜리드로 칭함), 폴리락트산-폴리글리콜산 코폴리머, 및 폴리비닐 알콜이 포함된다. 특정의 구체예에서, 폴리머는 약 100 또는 120 달톤부터 약 5,000 또는 10,000 달톤까지, 또는 약 300 달톤부터 약 5,000 달톤까지의 분자량을 갖는다. 다른 구체예에서, 폴리머는 약 100 내지 약 5,000 달톤의 분자량을 갖거나, 약 300 내지 약 5,000 달톤의 분자량을 갖는 폴리에틸렌글리콜이다. 특정의 구체예에서, 폴리머는 750 달톤의 폴리에틸렌글리콜 (PEG(750))이다. 폴리머는 또한, 그 안의 모노머의 수에 의해서 정의될 수 있으며; 본 발명의 바람직한 구체예는 3 개의 모노머로 구성된 PEG 폴리머 (약 150 달톤)와 같은 적어도 약 3 개의 모노머의 폴리머를 이용한다.

[0238] 본 발명에서 사용하기에 적합할 수 있는 그 밖의 다른 친수성 폴리머에는 폴리비닐피롤리돈, 폴리메톡사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리하이드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리디메틸아크릴아미드, 및 하이드록시메틸셀룰로즈 또는 하이드록시에틸셀룰로즈와 같은 유도체화된 셀룰로즈가 포함된다.

[0239] 특정의 구체예에서, 본 발명의 제제는 폴리아미드, 폴리카보네이트, 폴리알킬렌, 아크릴릭 및 메타크릴릭 에스테르의 폴리머, 폴리비닐 폴리머, 폴리글리콜리드, 폴리실옥산, 폴리우레탄 및 이들의 코폴리머, 셀룰로즈, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리스티렌, 락트산 및 글리콜산의 폴리머, 폴리안하이드라이드, 폴리(오르토)에스테르, 폴리(부트산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카프로락톤), 폴리사카라이드, 단백질, 폴리히알우론산, 폴리시아노아크릴레이트 및 이들의 블렌드, 혼합물 또는 코폴리머로 구성된 그룹으로부터 선택된 생체적합성 폴리머를 포함한다.

[0240] 사이클로덱스트린은 각각 그리스 문자 α, β 또는 γ로 지정된 6, 7 또는 8 개의 글루코즈 유니트로 구성된 사이클릭 올리고사카라이드이다. 글루코즈 유니트는 α-1,4-글루코시딕 결합에 의해서 연결된다. 당 유니트의 의자 배좌의 결과로, 모든 이차 하이드록실 그룹 (C-2, C-3에서)은 고리의 한쪽 면에 위치하는 반면에, C-6에서의 모든 일차 하이드록실 그룹은 다른 면에 배치된다. 결과적으로, 외부 표면은 친수성이어서 사이클로덱스트린을 수용성으로 만든다. 대조적으로, 사이클로덱스트린의 공동은 원자 C-3 및 C-5의 수소에 의해서, 및 에테르-양 산소에 의해서 라이닝되기 때문에 소수성이다. 이들 매트릭스는 예를 들어, 17α-에스트라디올과 같은 스테로이드 화합물을 포함하는 다양한 비교적 소수성인 화합물과의 복합물 형성 (complexation)을 가능하게 한다 [참조: 예를 들어, van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)]. 복합물 형성은 반데르 발스 (Van der Waals) 상호작용에 의해서, 및 수소 결합 형성에 의해서 일어난다. 사이클로덱스트린의 화학의 일반적 검토에 대해서는 문헌 [Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994)]을 참고로 한다.

[0241] 사이클로덱스트린 유도체의 물리-화학적 특성은 강력하게 치환의 종류 및 정도에 따라 좌우된다. 예를 들어, 물 중에서의 이들의 용해도는 불용성 (예를 들어, 트리아세틸-베타-사이클로덱스트린) 내지 147% 가용성 (w/v) (G-2-베타-사이클로덱스트린)의 범위이다. 또한, 이들은 다수의 유기 용매 중에서 가용성이다. 사이클로덱스트린의 특성은 이들의 용해도를 증가시키거나 감소시킴으로써 다양한 제제화 성분의 용해도에 대한 조절을 가능하게 한다.

[0242] 다수의 사이클로덱스트린 및 이들의 제조를 위한 방법은 설명되어 있다. 예를 들어, Parmeter (I) 등 [미국 특허 제3,453,259호] 및 Gramera 등 [미국 특허 제3,459,731호]은 전기적 중성 사이클로덱스트린을 기술하였다. 그 밖의 다른 유도체에는 양이온성 특성을 갖는 사이클로덱스트린 [Parmeter (II), 미국 특허 제3,453,257호],

불용성 교차결합된 사이클로덱스트린 [Solms, 미국 특허 제3,420,788호], 및 음이온성 특성을 갖는 사이클로덱스트린 [Parmeter (III), 미국 특허 제3,426,011호]이 포함된다. 음이온성 특성을 갖는 사이클로덱스트린 유도체 중에는 카복실산, 아인산, 포스피노우스산, 포스폰산, 인산, 티오포스폰산, 티오설핀산, 및 설폰산이 모 사이클로덱스트린에 붙여졌다 [참조: Parmeter (III), supra]. 더구나, 설포알킬 에테르 사이클로덱스트린 유도체는 Stella 등 [미국 특허 제5,134,127호]에 의해서 기술되었다.

[0243] 리포좀은 수성 내부 구획을 둘러싸는 적어도 하나의 지질 이중층 막으로 구성된다. 리포좀은 막의 타입에 의해서 및 크기에 의해서 특정화될 수 있다. 소형 단일라멜라 소포체 (small unilamellar vesicles; SUVs)는 단일막을 가지며, 전형적으로는 직경이 0.02 내지 0.05 ㎛의 범위이고; 대형 단일라멜라 소포체 (LUVS)는 전형적으로는 0.05 ㎛보다 더 크다. 올리고라멜라 (oligolamellar) 대형 소포체 및 다중라멜라 소포체는 다수의 통상적으로 동심원성인 막 층을 가지며, 전형적으로 0.1 ㎛보다 더 크다. 몇 개의 비동심원성 막, 즉 더 큰 소포체 내에 함유된 몇 개의 더 작은 소포체를 갖는 리포좀은 다중소포성 소포체 (multivesicular vesicles)라 칭한다.

[0244] 본 발명의 한가지 관점은 본 발명의 올리고머를 함유하는 리포좀을 포함하는 제제에 관한 것이며, 여기에서 리포좀 막은 증가된 수용능력을 갖는 리포좀을 제공하도록 제제화된다. 대신으로 또는 추가로, 본 발명의 화합물은 리포좀의 리포좀 이중층 내에 함유되거나, 리포좀 이중층 상에 흡착될 수 있다. 본 발명의 올리고머는 지질 계면활성제에 의해서 응집되고, 리포좀의 내부 공간 내에 수용될 수 있으며; 이들 경우에 리포좀 막은 활성 약제-계면활성제 응집체의 붕괴 효과에 저항하도록 제제화된다.

[0245] 본 발명의 한가지 구체예에 따르면, 리포좀의 지질 이중층은 PEG 쇄가 지질 이중층의 내부 표면으로부터 리포좀에 의해서 캅셀화된 내부 공간 내로 연장되고, 지질 이중층으로부터 주변 환경 내로 연장되도록 폴리에틸렌글리콜 (PEG)에 의해서 유도체화된 지질을 함유한다.

[0246] 본 발명의 리포좀 내에 함유된 활성 약제는 가용화된 형태이다. 계면활성제와 활성 약제의 응집체 (예를 들어, 관심이 있는 활성 약제를 함유하는 에멀션 또는 미셀)는 본 발명에 따르는 리포좀의 내부 공간 내에 엔트래핑될 수 있다. 계면활성제는 활성 약제를 분산 및 가용화시키는 작용을 하며, 다양한 쇄 길이 (예를 들어, 약 C14 내지 약 C20)의 생체적합성 라이소포스파티딜콜린 (LPCs)을 포함하는 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 모든 적합한 지방족, 사이클로지방족 또는 방향족 계면활성제로부터 선택될 수 있다. PEG-지질과 같은 폴리머-유도체화된 지질이 또한 미셀 형성을 위해서 이용될 수 있는데, 이는 이들이 미셀/막 융합을 억제하는 작용을 할 수 있고, 계면활성제 분자에 대한 폴리머의 첨가는 계면활성제의 CMC를 감소시키고 미셀 형성에 도움을 주기 때문이다. 바람직한 것은 마이크로몰 범위의 CMCs를 갖는 계면활성제이며; 더 높은 CMC 계면활성제가 본 발명의 리포좀 내에 엔트래핑된 미셀을 제조하기 위해서 이용될 수 있다.

[0247] 본 발명에 따르는 리포좀은 본 기술분야에서 공지된 다양한 기술 중의 어떤 것에 의해서라도 제조될 수 있다 [참조: 예를 들어, 미국 특허 제4,235,871호; 공개된 PCT 출원 제WO 96/14057호; New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104; Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993]. 예를 들어, 본 발명의 리포좀은 리포좀 내에서 바람직한 유도체화된 지질의 최종 몰 퍼센트에 상응하는 지질 농도에서 전형성된 리포좀을 지질-그래프트된 폴리머로 구성된 미셀에 노출시키는 것과 같은 방법에 의해서, 전형성된 리포좀 내로 친수성 폴리머로 유도체화된 지질을 확산시킴으로써 제조될 수 있다. 친수성 폴리머를 함유하는 리포좀은 또한, 본 기술분야에서 공지된 바와 같이 균질화, 지질-영역 수화, 또는 압출 기술에 의해서 형성될 수 있다.

[0248] 또 다른 예시적 제제화 방법에서, 활성 약제는 우선 소수성 분자를 쉽게 가용화하는 라이소포스파티딜콜린 또는 다른 낮은 CMC 계면활성제 (폴리머 그래프트된 지질을 포함) 중에서 초음파 처리함으로써 분산시킨다. 그 후, 생성된 활성 약제의 미셀 현탁액을 사용하여 적합한 몰 퍼센트의 폴리머-그래프트된 지질, 또는 콜레스테롤을 함유하는 건조된 지질 샘플을 재수화시킨다. 그 후, 지질 및 활성 약제 현탁액을 본 기술분야에서 공지된 바와 같은 압출기술을 사용하여 리포좀으로 형성시키고, 생성된 리포좀을 표준 칼럼 분리에 의해서 비캅셀화된 용액으로부터 분리시킨다.

[0249] 본 발명의 한가지 관점에서, 리포좀은 선택된 크기 범위 내의 실질적으로 균일한 크기를 갖도록 제조된다. 한가지 효과적인 크기 결정방법은 리포좀의 수성 현탁액을 선택된 균일한 공극 크기를 갖는 일련의 폴리카보네이트 막을 통해서 압출시키는 것을 포함하며; 막의 공극 크기는 해당 막을 통한 압출에 의해서 생산된 리포좀의 최대 크기와 대략적으로 상응할 것이다 [참조: 예를 들어, 미국 특허 제4,737,323호 (1988. 4. 12.)]. 특정의 구체예에서는 다르마펙트 (DharmaFECT®

) 및 리포펙타민 (Lipofectamine®

)과 같은 시약을 이용하여 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질을 세포 내로 도입시킬 수 있다.

[0250] 본 발명의 제제의 방출 특징은 캅셀화 물질, 캅셀화된 약물의 농도, 및 방출 변형제의 존재에 따라 좌우된다. 예를 들어, 방출은 예를 들어, 위 내와 같은 낮은 pH, 또는 장 내와 같은 높은 pH에서만 방출하는 pH 민감성 코팅을 사용하여 pH 의존적이 되도록 조작될 수 있다. 장용성 코팅을 사용하여 위를 통해서 통과한 후까지 방출이 일어나는 것을 방지할 수 있다. 다수의 코팅 또는 상이한 물질 내에 캅셀화된 시아나미드의 혼합물을 사용하여 위 내에서 초기 방출을 수득하고, 이어서 장 내에서의 후방출을 수득할 수 있다. 방출은 또한, 캅셀로부터의 확산에 의해 약물의 방출 또는 수분 흡수를 증가시킬 수 있는 염 또는 공극 형성제를 포함시킴으로써 조작될 수 있다. 약물의 용해도를 변형시키는 부형제를 또한 사용하여 방출율을 조절할 수도 있다. 매트릭스의 분해 또는 매트릭스로부터의 방출을 증진시키는 약제가 또한 혼입될 수 있다. 이들은 화합물에 따라서 약물에 첨가되거나, 별도의 상으로서 (즉, 미립자로서) 첨가되거나, 폴리머 상에 공동-용해될 수 있다. 대부분의 경우에, 양은 0.1 내지 30% (w/w 폴리머) 사이여야 한다. 분해 증진제의 타입은 암모늄 설페이트 및 암모늄 클로라이드와 같은 무기 염류, 시트르산, 벤조산 및 아스코르빈산과 같은 유기산, 나트륨 카보네이트, 칼륨 카보네이트, 칼슘 카보네이트, 아연 카보네이트 및 아연 하이드록사이드와 같은 무기 염기, 및 프로타민 설페이트, 스페르민, 콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민 및 트리에탄올아민과 같은 유기 염기, 및 트윈 (Tween®

) 및 플루로닉 (Pluronic®

)과 같은 계면활성제를 포함한다. 매트릭스에 미세구조를 부가하는 공극 형성제 (즉, 무기 염류 및 당과 같은 수용성 화합물)는 미립자로서 첨가된다. 범위는 전형적으로 1 내지 30% (w/w 폴리머) 사이이다.

[0251] 흡수는 또한 장 내에서의 입자의 체류시간을 변화시킴으로써 조작될 수 있다. 이것은 예를 들어, 입자를 점막 접착성 폴리머로 코팅하거나, 캅셀화 물질로서 점막 접착성 폴리머를 선택함으로써 달성될 수 있다. 예로는 키토산, 셀룰로즈, 및 특히 폴리아크릴레이트 (본 발명에서 사용된 것으로서, 폴리아크릴레이트는 아크릴레이트 그룹 및 시아노아크릴레이트 및 메타크릴레이트와 같은 변형된 아크릴레이트 그룹을 포함하는 폴리머를 나타낸다)와 같은 유리 카복실 그룹을 갖는 대부분의 폴리머가 포함된다.

[0252] 올리고머는 수술용 또는 의료용 장치 또는 이식물 내에 함유되거나, 이들에 의해서 방출하도록 조정될 수 있다. 특정의 관점에서, 이식물은 올리고머로 코팅되거나 다른 식으로 처리될 수 있다. 예를 들어, 하이드로겔, 또는 생체적합성 및/또는 생물분해성 폴리머와 같은 다른 폴리머를 사용하여 이식물을 본 발명의 조성물로 코팅할 수 있다 (즉, 조성물은 하이드로겔 또는 다른 폴리머를 사용함으로써 의료용 장치에 의해서 사용하도록 조정될 수 있다). 의료용 장치를 약제로 코팅하기 위한 폴리머 및 코폴리머는 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 이식물의 예로는 스텐트 (stents), 약물-용출성 스텐트, 봉합재, 보철, 혈관 카테터, 투석 카테터, 혈관 그래프트, 인공 심장판막, 심박 조율기, 이식형 심장제세동기, IV 니들, 핀, 스크류, 플레이트 및 다른 장치와 같은 뼈 고정 및 형성을 위한 장치, 및 창상 치유를 위한 인공 조직 매트릭스가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0253] 본 발명에 제공된 방법 이외에도, 본 발명에 따라 사용하기 위한 올리고머는 다른 약제와 유사하게, 인간 또는 수의과용 의약에서 사용하기 위하여 편리한 방식으로 투여하기 위해 제제화될 수 있다. 안티센스 올리고머 및 이들의 상응하는 제제는 단독으로, 또는 근아세포 이식, 줄기세포 요법, 아미노글리코사이드 항생제, 프로테아좀 억제제 및 상향-조절 (up-regulation) 요법 (예를 들어, 디스트로핀의 상염색체성 파파로그 (paralogue)인 유트로핀의 상향조절)과 같은 근위축증의 치료에 있어서의 다른 치료학적 전략과 조합하여 투여될 수 있다.

[0254] 본 명세서에 인용된 모든 문헌 및 특허출원은 마치 각각의 개개 문헌 또는 특허출원이 구체적이고 개별적으로 참고로 포함된 것처럼 본 발명에 참고로 포함된다.

[0255] 전술한 본 발명은 이해를 명확하게 할 목적으로 설명 및 예를 들어 어느 정도 상세히 기술되었지만, 첨부된 특허청구범위의 의의 또는 범주를 벗어남이 없이 이들에 대한 특정한 변화 및 변형이 이루어질 수 있다는 것은 본 발명의 내용에 비추어서 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 쉽게 명백할 것이다. 이하의 실시예는 제한하기 위한 것이 아닌 단지 설명을 위해서 제공된다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가는 본질적으로 유사한 결과를 수득하도록 변경 또는 변형될 수 있는 다양한 비임계적 파라메터를 쉽게 인식할 수 있을 것이다.

[0256] **참고문헌**

[0257] Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, et al. (2004). "Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense." Am J Hum Genet 74(1): 83-92.

[0258] Dunckley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997). "Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides." Nucleosides & Nucleotides 16(7-9): 1665-1668.

[0259] Dunckley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides." Hum Mol Genet 7(7): 1083-90.

[0260] Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene." J Gene Med 5(6): 518-27.

[0261] Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." Mol Ther.

[0262] Lu, Q. L., C. J. Mann, et al. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." Nat Med 9(8): 1009-14.

[0263] Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy." J Gene Med 4(6): 644-54.

[0264] Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Arginine-rich cell- penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." Journal of Immunological Methods 325(1-2): 114-126.

[0265] Matsuo, M., T. Masumura, et al. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe." J Clin Invest 87(6): 2127-31.

[0266] Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus." Genomics 2(1): 90-5.

[0267] Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence." Biochem Biophys Res Commun 226(2): 445-9.

[0268] Sazani, P., R. Kole, et al. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina

[0269] Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A 93(23): 12840-4.

[0270] Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7(3): 187-95.

[0271] Takeshima, Y., H. Nishio, et al. (1995). "Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe." J Clin Invest 95(2): 515-20.

[0272] van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout, et al. (2001). "Antisense- induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells." Hum Mol Genet 10(15): 1547-54.

[0273] van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). "Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051." N Engl J Med 357(26): 2677-86.

[0274] Wilton, S. D., A. M. Fall, et al. (2007). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript." Mol Ther 15(7): 1288-96.

[0275] Wilton, S. D., F. Lloyd, et al. (1999). "Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides." Neuromuscul Disord 9(5): 330-8.

[0276] Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in

dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." Proc Natl Acad Sci U S A 105(39): 14814-9.

[0277] Yin, H., H. M. Moulton, et al. (2008). "Cell-penetrating peptide- conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function." Hum Mol Genet 17(24): 3909-18.

[0278] **실시예**

[0279] 재료 및 방법

[0280] 세포 및 조직 배양 처리 조건

[0281] 낮은 계대 번호에서 5% DMSO 용액 (Sigma) 중에 보존된 인간 횡문근육종 세포 (ATCC, CCL-136; RD 세포)를 얼음 조각이 더 이상 눈에 띄지 않을 때까지 37℃ 물중탕에서 해동시켰다. 세포를 L-글루타민 (HyClone), 10% 우태아혈청(fetal bovine serum), 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 항생제 용액 (CelGro)을 함유하는 24 ㎖의 가온된 DMEM 중에서 조직 배양-처리된 T75 플라스크 (Nunc) 내에 1.5×10^{6} 세포/플라스크로 접종하고; 24 시간 후에, 배지를 흡인하고, 세포를 가온된 PBS 중에서 1 회 세척하고, 신선한 배지를 첨가하였다. 세포를 5.0% CO_2 하에 37℃ 배양기 내에서 80% 컨플루언스 (confluence)까지 성장시켰다.

[0282] 배지를 T75 플라스크로부터 흡인하고; 세포를 가온된 PBS 중에서 한번 세척하고, 흡인하였다. 37℃ 물중탕에서 가온한 3 ㎖의 트립신/EDTA를 각각의 T75에 첨가하였다. 온화하게 교반하면서 세포가 플라스크로부터 유리될 때까지 세포를 37℃에서 2-5 분 동안 배양하였다. 세포 현탁액을 15.0 ㎖ 원뿔형 튜브에 옮기고; 플라스크를 1.0 ㎖의 트립신/EDTA 용액으로 세정하여 나머지 세포를 모았다. 세포를 바이-셀 (Vi-Cell) XR 세포 계수기 (Beckman Coulter)를 사용하여 계수하였다. 세포를 조직 배양-처리된 12-웰 플레이트 (Falcon) 내에 1.0 ㎖ 배지 내의 웰당 2.0×10^{5} 생존 세포로 접종하였다. 세포를 5.0% CO_2 하의 37℃ 배양기 내에서 밤새 배양하였다.

[0283] 12-웰 접종된 플레이트를 균일한 세포 분포 및 플레이트 부착에 대해서 검사하였다. 동결건조된 펩타이드 컨주게이트된 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (PPMOs)를 뉴클레아제-부재 물 (Ambion) 중에 2.0 mM로 재현탁시키고, 세포 처리 중에 얼음 상에 유지시키고; 몰농도를 확인하기 위해서 PPMOs를 나노드롭 (NanoDrop) 2000 분광광도계 (Thermo Scientific)를 사용하여 측정하였다. PPMO 처리하기 직전에 배지를 흡인하고, 세포를 가온된 PBS로 세정하였다. PPMOs를 가온된 배지 내에서 원하는 몰농도로 희석하고; 세포를 웰당 총 1.0 ㎖ PPMO 중에서 처리하였다. PPMOs는 삼중으로 시험하였다. 비처리 대조를 위해서, 신선한 가온된 배지를 1.0 ㎖의 총용적으로 첨가하였다. 세포를 5.0% CO_2 하의 37℃ 배양기 내에서 48 시간 동안 배양하였다.

[0284] RNA 추출

[0285] 배지를 흡인하고, 세포를 가온된 PBS 중에서 세정하였다. RNA를 제조자의 권장 프로토콜을 사용하여 세라믹 비드 균질화에 의해서 퀵젠-미니80 (QuickGene-Mini80) 시스템, 퀵젠 RNA 배양 세포 HC 키트 S, 및 마그나라이저 (MagNAlyser)를 사용하여 추출하였다. 간략하면, 세포를 처리 플레이트 내에서 350 ㎕ LRP (100 ㎕ LRP당 10 ㎕ β-머캅토에탄올 첨가) 용해 완충액으로 용해시키고; 균질액을 온화하게 분쇄하여 완전한 용해를 확실하게 하고, 마그나라이저 (MagNAlyser) 튜브에 옮겼다. 튜브를 마그나라이저 내에서 30 초 동안 2800 rpm으로 회전시켜 완전한 균질화를 확실하게 하고, 잠시 냉장시켰다. 50 ㎕ SRP 가용화 완충액을 첨가하고, 균질액을 15 초 동안 소용돌이를 일으켰다. 170 ㎕의 >99% 에탄올을 각각의 튜브에 첨가하고, 균질액을 60 초 동안 볼텍스 (vortex)하였다. 균질액을 순간-회전시키고, 미니80 (Mini80) RNA 카트리지에 옮기고, 샘플을 가압하고, 관통액 (flow-through)은 버렸다. 카트리지를 750 ㎕ WRP 세척 완충액 중에서 세척하고, 가압하였다. 40 ㎕의 DNase 용액 (1.25 ㎕ 퀴아겐 (Qiagen) DNaseI, 35 ㎕ RDD 완충액, 3.75 ㎕ 뉴클레아제-부재 물)을 카트리지 막에 직접 첨가하고; 카트리지를 실온에서 4 분 동안 배양하였다. 카트리지를 각각의 세척 후에는 가압하면서 750 ㎕ WRP로 2 회 세척하였다. 카트리지를 뉴클레아제-부재 튜브 상에 배치하였다. 50 ㎕의 CRP 용출 완충액을 각각의 막에 첨가하고; 막을 실온에서 5 분 동안 배양하였다. 카트리지를 가압하고, 용출액을 수집하였다. RNA를 정량할 때까지 -80℃에서 저장하였다. RNA는 나노드롭 (NanoDrop™) 2000 분광광도계를 사용하여 정량하

였다.

[0286] 네스티드 (Nested) RT-PCR

[0287] 프라이머-특이적, 엑손-특이적, 최적화된 네스티드 RT-PCR 증폭은 이하의 표 1에 나타낸 바와 같은 각각의 디스트로핀 엑손에 대한 프라이머 쌍 세트를 사용하여 수행하였다.

표 1

표1. 엑손-스키핑을 검출하기 위하여 인간 디스트로핀 mRNA를 PCR 증폭시키기 위해서 사용된 프라이머쌍 세트

[0288]

명칭	F/R	I/O	서열 (5'-3')	엑손	목적	서열 번호
PS170	F	O	CCAGAGCTTTACCTGAGAAACAAG	48	인간 디스트로핀에서 엑손 50 및 51 스키핑의 검출	640
PS172	F	I	CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG	49		641
PS174	R	I	CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC	52		642
PS176	R	O	CATTTCATTCAACTGTTGCCTCCG	53		643
PS186	F	O	CAATGCTCCTGACCTCTGTGC	42	인간 디스트로핀에서 엑손 44 및 45 스키핑의 검출	644
PS187	F	I	GTCTACAACAAAGCTCAGGTCG	43		645
PS189	F	I	GCAATGTTATCTGCTTCCTCCAACC	46		646
PS190	R	O	GCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGG	46		647
PS192	F	O	CTTGGACAGAACTTACCGACTGG	51	인간 디스트로핀에서 엑손 53 스키핑의 검출	648
PS193	F	I	GCAGGATTTGGAACAGAGGCG	52		649
PS195	R	I	CATCTACATTTGTCTGCCACTGG	54		650
PS197	R	O	GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTCG	55		651

[0289] 표시된 프라이머 쌍은 각각 일차 또는 이차 증폭에 상응하는 정방향 또는 역방향 (F/R) 및 외부 또는 내부 프라이머 쌍 (I/O)으로 나타낸다. 프라이머 표적의 위치는 엑손 칼럼에 표시되며, 목적은 엑손-스키핑 이벤트가 검출될 수 있음을 나타낸다. 예를 들어, PS170 및 PS176 프라이머는 일차 증폭에서 엑손 48 내지 53의 부분을 증폭시킨다. 그 후, 프라이머 PS172 및 PS174는 이차 증폭에서 엑손 49 내지 52의 부분을 증폭시킨다. 이러한 네스티드 PCR 반응은 엑손 50 및/또는 엑손 51 둘 다의 엑손 스키핑을 검출할 수 있다. 구체적인 네스티드 RT-PCR 반응조건은 이하에 제공된다.

[0290] 처리된 세포 (상술한 바와 같음)로부터 추출된 RNA는 모든 샘플에 대해서 20 ng/㎕로 희석하였다.

표 2

[0291] RT-PCR 및 일차 증폭을 위한 반응 조직 (50 ㎕ 반응)

2× 반응 혼합물	25 ㎕
PS XXX 정방향 프라이머 (30 μM) (참조 표 1)	0.5 ㎕
PS XXX 역방향 프라이머 (30 μM) (참조 표 1)	0.5 ㎕

슈퍼스크립트 (Superscript) III 백금 Taq 혼합물	2 ㎕
주형 RNA (20 ng/㎕)	10 ㎕
뉴클레아제-부재 물 (총용적 50 ㎕)	12 ㎕

표 3

[0292] RT-PCR 및 일차 증폭 프로그램

	온도	시간	
역전사	55℃	30 분	
RT 불활성화	94℃	2 분	
변성	94℃	1 분	8 사이클
어니일링 (annealing)	59℃	1 분	
연장	68℃	1 분	
	4℃	∞	

표 4

[0293] 네스티드 이차 증폭을 위한 반응 조직 (50 ㎕ 반응)

10× PCR 완충액	5 ㎕
dNTP 용액 (10 mM)	0.5 ㎕
50 mM MgCl	1.5 ㎕
PS XXX 정방향 프라이머 (30 μM) (참조 표 1)	0.33 ㎕
PS XXX 역방향 프라이머 (30 μM) (참조 표 1)	0.33 ㎕
백금 Taq DNA 중합효소	0.2 ㎕
0.1 mM Cy5-dCTP	1 ㎕
RT-PCR 생성물 (단계 1로부터)	1 ㎕
뉴클레아제-부재 물 (총용적 50 ㎕)	40.15 ㎕

표 5

[0294] 네스티드 이차 증폭 프로그램

	온도	시간	
일차 변성	94℃	3 분	
변성	94℃	45 초	28-30 사이클
어니일링 (annealing)	59℃	30 초	
연장	68℃	1 분	
	4℃	∞	

[0295] 겔 전기영동 분석

[0296] 10 마이크로리터의 5× 피콜 (Ficoll) 부하 염료를 각각의 50 마이크로리터의 네스티드 RT-PCR 반응에 첨가하였다. 15 마이크로리터의 PCR/염료 혼합물을 10% TBE 겔 상에서 300 볼트로 30 분 동안 주행시켰다. 전기영동 후에, 겔을 디H2O 중에서, 매 30 분마다 물을 교환하면서 적어도 1 시간 동안 세척하였다. 그 후, 겔을 타이푼 트리오 버라이어블 모드 이메이저 (Typhoon Trio Variable Mode Imager; GE Healthcare) 상에서 스캐닝하였다. 엑손 44 스키핑의 경우에, 전체-길이 디스트로핀 전사물로부터의 네스티드 RT-PCR 생성물은 571 bp이고, 엑손 44-스키핑된 mRNA로부터는 423 bp이다 (엑손 44는 148 bp이다). 엑손 45의 경우에, 전체-길이 디스트로핀 전사물로부터의 네스티드 RT-PCR 생성물은 571 bp이고, 엑손 45-스키핑된 mRNA로부터는 395 bp이다 (엑손 45는 176 bp이다). 엑손 53의 경우에, 전체-길이 디스트로핀 전사물로부터의 PCR 생성물은 365 bp이고, 엑손 53-스키핑된 mRNA로부터는 153 bp이다 (엑손 53은 212 bp이다).

[0297] 겔 영상은 엑손-스키핑된 생성물에 비해서 전체-길이 PCR 생성물의 밴드 강도를 측정함으로써 정량적 분석에 적용하였다. 일부의 경우에, 고정된 PPMO 농도 (예를 들어, 3 마이크로몰)에서의 스키핑 퍼센트를 사용하여 소정의 엑손의 엑손 스키핑을 유도하는 일련의 PPMO의 상대적 활성을 결정하였다. 다른 상황에서, PPMO 용량-범위를 사용하여 세포를 치료하였으며 (예를 들어, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 및 10 마이크로몰), EC_{50}은 각각의 농도에서 유도된 스키핑 퍼센트를 기초로 계산하였다.

[0298] **실시예 1**

[0299] **엑손 51 스캔**

[0300] 인간 디스트로핀 엑손 51을 표적으로 하는 일련의 중복성 안티센스 PPMOs를 디자인하고, 합성하여 인간 횡문근육종 세포 (RD 세포) 또는 일차 인간 골격근 세포를 치료하기 위해서 사용하였다. 이 전략은 "엑손 스캔"이라 칭하며, 이하에 기술하는 바와 같이 몇 가지의 다른 디스트로핀 엑손에 대해서 유사하게 사용하였다. 모든 PPMOs는 CP06062 펩타이드 (서열번호 578) 및 3' 말단 PMO 결합을 사용하여 펩타이드-컨주게이트된 PMO (PPMO)로 합성하였다. 엑손 51의 경우에는, 도 2A에 나타낸 바와 같이 길이가 각각 26 염기인 일련의 26 개의 PPMOs를 제조하였다 (서열번호 309-311, 314, 316, 317, 319, 321, 323, 324, 326, 327, 329-331, 333, 335, 336, 338-345). PPMOs는 재료 및 방법에서 상술한 바와 같이 다양한 농도에서 RD 세포를 처리함으로써 엑손 스키핑 효능에 대해서 평가하였다. 3 개의 PPMOs (서열번호 324, 326 및 327)가 엑손-스키핑을 유도하는데 효과적인 것으로 확인하였으며, 추가의 평가를 위해서 선택하였다. RD 세포 및 일차 인간 골격근 세포에서의 용량-범위 실험을 사용하여 이들 3 개의 PPMO 서열의 상대적 효능을 확인하였다. 서열번호 327이 도 2B 및 2C에 나타낸 바와 같이 엑손 51 스키핑을 유도하는데 가장 효과적인 것으로 나타났다.

[0301] 다른 엑손 51-표적화된 안티센스 서열에 대한 서열번호 327의 상대적 유효성의 비교는 상술한 바와 같이 RD 세포 및 일차 인간 골격근 세포에서 수행하였다. 평가된 모든 서열은 CP06062 펩타이드 (서열번호 578)를 사용하여 펩타이드-컨주게이트된 PMOs로 제조하였다. 이것은 안티센스 화학 또는 세포 송달에 상관없이 안티센스 서열의 상대적 유효성의 직접적인 비교를 하였다. 서열번호 327과 비교한 특정의 엑손 51-표적화된 올리고머의 상대적 위치는 도 2D에 나타낸다. 도 2C에 나타낸 바와 같이 엑손-스키핑 유효성의 등급화된 계층이 존재하며, 여기에서는 서열번호 327이 다른 서열에 비해서 적어도 몇 배의 인수만큼 가장 효과적이었다.

[0302] **실시예 2**

[0303] **엑손 50 스캔**

[0304] 인간 디스트로핀 엑손 50을 표적으로 하는 일련의 중복성 안티센스 PPMOs를 디자인하고 합성하였다. 엑손 50의 경우에는, 도 3A에 나타낸 바와 같이 길이가 각각 25 염기인 일련의 17 개의 PPMOs를 제조하였다 (서열번호 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 280, 282 및 284-291). PPMOs는 재료 및 방법에서 상술한 바와 같이 다양한 농도에서 RD 세포를 처리함으로써 엑손 스키핑 효능에 대해서 평가하였다. 4 개의 PPMOs (서열번호 277, 287, 290 및 291)가 엑손-스키핑을 유도하는데 효과적인 것으로 확인하였으며, 추가의 평가를 위해서 선택하였다. RD 세포에서의 용량-범위 실험을 사용하여 이들 4 개의 PMO 서열의 상대적 효능을 확인하였다. 서열번호 584 (AVI-5656) 및 287 (AVI-5038)이 도 3B에 나타낸 바와 같이 엑손 50 스키핑을 유도하는데 가장 효과적인 것으로 나타났다. EC_{50} 값은 용량-범위 실험으로부터 유도하였으며, PCR 생성물의 50%가 엑손 50을 함유하는 mRNA로부터 생산된 PCR 생성물에 비해 엑손 50을 결여하는 mRNA로부터 유래하는 경우의 계산된 농도를 나타낸다. 다른 서열 (참조: 예를 들어, 서열번호 584 및 585는 각각 WO2006/000057에서의 서열번호 173 및 175에 상응한다)과 비교하여, AVI-5038 (서열번호 287)은 도 3B에 나타낸 바와 같이 RD 세포 시험에서 엑손-스키핑 활성을 유도하는데 동등하거나 더 우수하다.

[0305] **실시예 3**

[0306] **엑손 53 스캔**

[0307] 인간 디스트로핀 엑손 53을 표적으로 하는 일련의 중복성 안티센스 PPMOs를 디자인하고, 합성하였다. 엑손 53의 경우에는, 도 4A에 나타낸 바와 같이 길이가 각각 25 염기인 일련의 24 개의 PPMOs를 제조하였다 (서열번호

416, 418, 420, 422, 424, 426, 428, 429, 431, 433, 434, 436, 438-440 및 443-451). PPMOs는 재료 및 방법에서 상술한 바와 같이 다양한 농도에서 RD 세포 및 일차 인간 골격근 세포를 처리함으로써 엑손 스키핑 효능에 대해서 평가하였다. 3 개의 PPMOs (서열번호 428, 429 및 431)가 엑손-스키핑을 유도하는데 효과적인 것으로 확인하였으며, 추가의 평가를 위해서 선택하였다. RD 세포에서의 용량-범위 실험을 사용하여 이들 3 개의 PPMO 서열의 상대적 효능을 확인하였다. 서열번호 429가 도 4B-F에 나타낸 바와 같이 엑손 53 스키핑을 유도하는데 가장 효과적인 것으로 나타났다. 그러나, 다른 엑손 53 안티센스 서열과 비교하는 경우에, 서열번호 429는 WO2006/000057에서 서열번호 195 및 본 출원에서 서열번호 609로 열거된 H53A(+23+47)과 동일한 것으로 입증되었다. 본 출원에서 각각 서열번호 608, 611 및 610으로 열거된 H53A(+39+69) 및 H53A(-12+10) (각각 WO2006/000057에서 서열번호 193 및 199로 열거됨) 및 h53AON1 (미국 출원 제11/233,507호에서 서열번호 39로 열거됨)를 포함하는 다른 서열을 서열번호 429와 비교하였다. 평가된 모든 서열을 CP06062 펩타이드 (서열번호 578)를 사용하여 펩타이드-컨주게이트된 PMOs로 제조하였다. 이것은 안티센스 화학 또는 세포 송달에 상관없이 안티센스 서열의 상대적 유효성의 직접적인 비교를 하였다. 도 4I 및 4G-H에 나타낸 바와 같이, 서열번호 429가 이들 4 가지 서열 각각에 비해 탁월한 것으로 나타났다.

[0308] **실시예 4**

[0309] **엑손 44 스캔**

[0310] 인간 디스트로핀 엑손 44를 표적으로 하는 일련의 중복성 안티센스 PPMOs를 디자인하고, 합성하였다. 엑손 44의 경우에는, 도 5A에 나타낸 바와 같이 길이가 각각 25 염기인 일련의 PPMOs를 제조하였다 (서열번호 1-20). PPMOs는 재료 및 방법에서 상술한 바와 같이 다양한 농도에서 RD 세포를 처리함으로써 엑손 스키핑 효능에 대해서 평가하였다. 5 개의 PPMOs (서열번호 4, 8, 11, 12 및 13)가 엑손-스키핑을 유도하는데 효과적인 것으로 확인하였으며, 추가의 평가를 위해서 선택하였다. RD 세포에서의 용량-범위 실험을 사용하여 도 5C 내지 5H에 나타낸 바와 같이 이들 5 개의 PPMO 서열의 상대적 효능을 확인하였다. 도 5H에 나타낸 바와 같이 서열번호 8, 11 및 12가 엑손 44 스키핑을 유도하는데 가장 효과적인 것으로 나타났으며, 서열번호 12가 가장 효과적인 것으로 입증되었다.

[0311] 다른 엑손 44 안티센스 서열에 대한 서열번호 12의 비교는 RD 세포 및 인간 일차 골격근 세포 둘 다에서 수행하였다. 평가된 모든 서열은 CP06062 펩타이드 (서열번호 578)를 사용하여 펩타이드-컨주게이트된 PMOs로 제조하였다. 이것은 안티센스 화학 또는 세포 송달에 상관없이 안티센스 서열의 상대적 유효성의 직접적인 비교를 하였다.

[0312] 서열번호 4, 8, 11 및 12와의 서열 (서열번호S: 600, 601, 602 및 603)의 정렬은 도 5B에 나타낸다. 서열번호 601 및 603은 WO2006/000057에서 서열번호 165 및 167로 열거된다. 서열번호 602는 WO2004/083446에서 및 미국 출원 제11/233,507호에서 서열번호 21로 열거된다. 서열번호 600은 2007년에 공개되었다 [Wilton, Fall et al. 2007]. RD 세포에서의 비교는 서열번호 602 및 603 둘 다는 서열번호 12보다 탁월하였음을 나타내었다 (도 5I). 그러나, 도 5J에 나타낸 바와 같이, 인간 일차 골격근 세포에서는 서열번호 12가 서열번호 602 (6.42%)보다 탁월하였다 (8.86% 엑손 스키핑). 유사한 실험을 서열번호 603에 의해서 수행하였다.

[0313] **실시예 5**

[0314] **엑손 45 스캔**

[0315] 인간 디스트로핀 엑손 45를 표적으로 하는 일련의 중복성 안티센스 PPMOs를 디자인하고, 합성하였다. 엑손 45의 경우에는, 도 6A에 나타낸 바와 같이 길이가 각각 25 염기인 일련의 22 개의 PPMOs를 제조하였다 (서열번호 21, 23, 25, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 39, 41, 43 및 45-53). PPMOs는 재료 및 방법에서 상술한 바와 같이 다양한 농도에서 RD 세포 및 인간 일차 골격근 세포를 처리함으로써 엑손 스키핑 효능에 대해서 평가하였다. 4 개의 PPMOs (서열번호 27, 29, 34, 및 39)가 엑손-스키핑을 유도하는데 효과적인 것으로 확인하였으며, 추가의 평가를 위해서 선택하였다. RD 세포에서의 용량-범위 실험을 사용하여 도 6C-G에 나타낸 바와 같이 이들 4 개의 PMO 서열의 상대적 효능을 확인하였으며, 도 6H에서 요약하였다. 서열번호 49를 이들 실험에서 음성 대조군으로 사용하였다. 서열번호 29 및 34가 도 6H에 나타낸 바와 같이 엑손 45 스키핑을 유도하는데 가장 효과적인 것으로 나타났다.

[0316] 다른 엑손 45 안티센스 서열에 대한 서열번호 34의 비교는 RD 세포 및 인간 일차 골격근 세포 둘 다에서 수행하였다. 평가된 모든 서열은 CP06062 펩타이드 (서열번호 578)를 사용하여 펩타이드-컨주게이트된 PMOs로 제조하였다. 이것은 안티센스 화학 또는 세포 송달에 상관없이 안티센스 서열의 상대적 유효성의 직접적인 비교를 하였다. 서열번호 27, 29, 34 및 39와의 서열 (서열번호 604, 605, 606 및 607)의 정렬은 도 6B에 나타낸다. 서열번호 604 및 607은 각각 WO2006/000057에서 서열번호S: 211 및 207로 열거된다. 서열번호 605 및 606은 미국 출원 제11/233,507호에서 각각 서열번호 23 및 1로 열거된다. RD 세포에서의 비교는, 도 6I에서 나타낸 바와 같이 서열번호: 34가 평가된 4 개의 서열 모두에 비해 탁월하였음을 나타내었다. 인간 일차 골격근 세포의 상이한 집단에서의 이들 화합물의 시험은 상술한 바와 같이 수행된다.

[0317] 서열 ID 목록

[0318] 서열은 DNA에 대해서 공통적인 뉴클레오타이드 염기 심볼을 사용하여 나타낸다: A, G, C 및 T. 2'-O-메틸과 같은 다른 안티센스 화학은 T 대신에 U를 사용한다. 염기 중의 어떤 것이라도 특히 3 개 또는 그 이상의 G 잔기의 스트레치에서 이노신 (I)에 의해서 치환될 수 있다.

[0319]

명칭	서열	서열번호
올리고머 표적화 서열 (5'에서 3'으로)		
Hu.DMD.Exon44.25.001	CTGCAGGTAAAAGCATATGGATCAA	1
Hu.DMD.Exon44.25.002	ATCGCCTGCAGGTAAAAGCATATGG	2
Hu.DMD.Exon44.25.003	GTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGCA	3
Hu.DMD.Exon44.25.004	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	4
Hu.DMD.Exon44.25.005	CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCA	5
Hu.DMD.Exon44.25.006	TTTCTCAACAGATCTGTCAAATCGC	6
Hu.DMD.Exon44.25.007	CCATTTCTCAACAGATCTGTCAAAT	7
Hu.DMD.Exon44.25.008	ATAATGAAAACGCCGCCATTTCTCA	8
Hu.DMD.Exon44.25.009	AAATATCTTTATATCATAATGAAAA	9
Hu.DMD.Exon44.25.010	TGTTAGCCACTGATTAAATATCTTT	10
Hu.DMD.Exon44.25.011	AAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	11
Hu.DMD.Exon44.25.012	TTGTGTCTTTCTGAGAAACTGTTCA	12
Hu.DMD.Exon44.25.013	CCAATTCTCAGGAATTTGTGTCTTT	13
Hu.DMD.Exon44.25.014	GTATTTAGCATGTTCCCAATTCTCA	14
Hu.DMD.Exon44.25.015	CTTAAGATACCATTTGTATTTAGCA	15
Hu.DMD.Exon44.25.016	CTTACCTTAAGATACCATTTGTATT	16
Hu.DMD.Exon44.25.017	AAAGACTTACCTTAAGATACCATTT	17
Hu.DMD.Exon44.25.018	AAATCAAAGACTTACCTTAAGATAC	18
Hu.DMD.Exon44.25.019	AAAACAAATCAAAGACTTACCTTAA	19
Hu.DMD.Exon44.25.020	TCGAAAAAACAAATCAAAGACTTAC	20
Hu.DMD.Exon45.25.001	CTGTAAGATACCAAAAAGGCAAAAC	21

[0320]

Hu.DMD.Exon45.25.002	CCTGTAAGATACCAAAAAGGCAAAA	22
Hu.DMD.Exon45.25.002.2	AGTTCCTGTAAGATACCAAAAAGGC	23
Hu.DMD.Exon45.25.003	GAGTTCCTGTAAGATACCAAAAAGG	24
Hu.DMD.Exon45.25.003.2	CCTGGAGTTCCTGTAAGATACCAAA	25
Hu.DMD.Exon45.25.004	TCCTGGAGTTCCTGTAAGATACCAA	26
Hu.DMD.Exon45.25.004.2	GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATA	27
Hu.DMD.Exon45.25.005	TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	28
Hu.DMD.Exon45.25.005.2	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA	29
Hu.DMD.Exon45.25.006	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT	30
Hu.DMD.Exon45.25.006.2	GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	31
Hu.DMD.Exon45.25.007	CGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTT	32
Hu.DMD.Exon45.25.008	AACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCA	33
Hu.DMD.Exon45.25.008.2	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA	34
Hu.DMD.Exon45.25.009	GTTGCATTCAATGTTCTGACAACAG	35
Hu.DMD.Exon45.25.010	GCTGAATTATTTCTTCCCCAGTTGC	36
Hu.DMD.Exon45.25.010.2	ATTATTTCTTCCCCAGTTGCATTCA	37
Hu.DMD.Exon45.25.011	GGCATCTGTTTTTGAGGATTGCTGA	38
Hu.DMD.Exon45.25.011.2	TTTGAGGATTGCTGAATTATTTCTT	39
Hu.DMD.Exon45.25.012	AATTTTTCCTGTAGAATACTGGCAT	40
Hu.DMD.Exon45.25.012.2	ATACTGGCATCTGTTTTTGAGGATT	41
Hu.DMD.Exon45.25.013	ACCGCAGATTCAGGCTTCCCAATTT	42
Hu.DMD.Exon45.25.013.2	AATTTTTCCTGTAGAATACTGGCAT	43

[0321]

Hu.DMD.Exon45.25.014	CTGTTTGCAGACCTCCTGCCACCGC	44
Hu.DMD.Exon45.25.014.2	AGATTCAGGCTTCCCAATTTTTCCT	45
Hu.DMD.Exon45.25.015	CTCTTTTTTCTGTCTGACAGCTGTT	46
Hu.DMD.Exon45.25.015.2	ACCTCCTGCCACCGCAGATTCAGGC	47
Hu.DMD.Exon45.25.016	CCTACCTCTTTTTTCTGTCTGACAG	48
Hu.DMD.Exon45.25.016.2	GACAGCTGTTTGCAGACCTCCTGCC	49
Hu.DMD.Exon45.25.017	GTCGCCCTACCTCTTTTTTCTGTCT	50
Hu.DMD.Exon45.25.018	GATCTGTCGCCCTACCTCTTTTTTC	51
Hu.DMD.Exon45.25.019	TATTAGATCTGTCGCCCTACCTCTT	52
Hu.DMD.Exon45.25.020	ATTCCTATTAGATCTGTCGCCCTAC	53
Hu.DMD.Exon45.20.001	AGATACCAAAAAGGCAAAAC	54
Hu.DMD.Exon45.20.002	AAGATACCAAAAAGGCAAAA	55
Hu.DMD.Exon45.20.003	CCTGTAAGATACCAAAAAGG	56
Hu.DMD.Exon45.20.004	GAGTTCCTGTAAGATACCAA	57
Hu.DMD.Exon45.20.005	TCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	58
Hu.DMD.Exon45.20.006	TGCCATCCTGGAGTTCCTGT	59
Hu.DMD.Exon45.20.007	CCCAATGCCATCCTGGAGTT	60
Hu.DMD.Exon45.20.008	CGCTGCCCAATGCCATCCTG	61
Hu.DMD.Exon45.20.009	CTGACAACAGTTTGCCGCTG	62
Hu.DMD.Exon45.20.010	GTTGCATTCAATGTTCTGAC	63
Hu.DMD.Exon45.20.011	ATTATTTCTTCCCCAGTTGC	64
Hu.DMD.Exon45.20.012	TTTGAGGATTGCTGAATTAT	65
Hu.DMD.Exon45.20.013	ATACTGGCATCTGTTTTTGA	66
Hu.DMD.Exon45.20.014	AATTTTTCCTGTAGAATACT	67
Hu.DMD.Exon45.20.015	AGATTCAGGCTTCCCAATTT	68
Hu.DMD.Exon45.20.016	ACCTCCTGCCACCGCAGATT	69
Hu.DMD.Exon45.20.017	GACAGCTGTTTGCAGACCTC	70
Hu.DMD.Exon45.20.018	CTCTTTTTTCTGTCTGACAG	71
Hu.DMD.Exon45.20.019	CCTACCTCTTTTTTCTGTCT	72

[0322]

Hu.DMD.Exon45.20.020	GTCGCCCTACCTCTTTTTTC	73
Hu.DMD.Exon45.20.021	GATCTGTCGCCCTACCTCTT	74
Hu.DMD.Exon45.20.022	TATTAGATCTGTCGCCCTAC	75
Hu.DMD.Exon45.20.023	ATTCCTATTAGATCTGTCGC	76
Hu.DMD.Exon46.25.001	GGGGGATTTGAGAAAATAAAATTAC	77
Hu.DMD.Exon46.25.002	ATTTGAGAAAATAAAATTACCTTGA	78
Hu.DMD.Exon46.25.002.2	CTAGCCTGGAGAAAGAAGAATAAAA	79
Hu.DMD.Exon46.25.003	AGAAAATAAAATTACCTTGACTTGC	80
Hu.DMD.Exon46.25.003.2	TTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAA	81
Hu.DMD.Exon46.25.004	ATAAAATTACCTTGACTTGCTCAAG	82
Hu.DMD.Exon46.25.004.2	TTTTGTTCTTCTAGCCTGGAGAAAG	83
Hu.DMD.Exon46.25.005	ATTACCTTGACTTGCTCAAGCTTTT	84
Hu.DMD.Exon46.25.005.2	TATTCTTTTGTTCTTCTAGCCTGGA	85
Hu.DMD.Exon46.25.006	CTTGACTTGCTCAAGCTTTTCTTTT	86
Hu.DMD.Exon46.25.006.2	CAAGATATTCTTTTGTTCTTCTAGC	87
Hu.DMD.Exon46.25.007	CTTTTAGTTGCTGCTCTTTTCCAGG	88
Hu.DMD.Exon46.25.008	CCAGGTTCAAGTGGGATACTAGCAA	89
Hu.DMD.Exon46.25.008.2	ATCTCTTTGAAATTCTGACAAGATA	90
Hu.DMD.Exon46.25.009	AGCAATGTTATCTGCTTCCTCCAAC	91
Hu.DMD.Exon46.25.009.2	AACAAATTCATTTAAATCTCTTTGA	92
Hu.DMD.Exon46.25.010	CCAACCATAAAACAAATTCATTTAA	93
Hu.DMD.Exon46.25.010.2	TTCCTCCAACCATAAAACAAATTCA	94
Hu.DMD.Exon46.25.011	TTTAAATCTCTTTGAAATTCTGACA	95
Hu.DMD.Exon46.25.012	TGACAAGATATTCTTTTGTTCTTCT	96

[0323]

Hu.DMD.Exon46.25.012.2	TTCAAGTGGGATACTAGCAATGTTA	97
Hu.DMD.Exon46.25.013	AGATATTCTTTTGTTCTTCTAGCCT	98
Hu.DMD.Exon46.25.013.2	CTGCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGGG	99
Hu.DMD.Exon46.25.014	TTCTTTTGTTCTTCTAGCCTGGAGA	100
Hu.DMD.Exon46.25.014.2	CTTTTCTTTTAGTTGCTGCTCTTTT	101
Hu.DMD.Exon46.25.015	TTGTTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAA	102
Hu.DMD.Exon46.25.016	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAATA	103
Hu.DMD.Exon46.25.017	AGCCTGGAGAAAGAAGAATAAAATT	104
Hu.DMD.Exon46.25.018	CTGGAGAAAGAAGAATAAAATTGTT	105
Hu.DMD.Exon46.20.001	GAAAGAAGAATAAAATTGTT	106
Hu.DMD.Exon46.20.002	GGAGAAAGAAGAATAAAATT	107
Hu.DMD.Exon46.20.003	AGCCTGGAGAAAGAAGAATA	108
Hu.DMD.Exon46.20.004	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAA	109
Hu.DMD.Exon46.20.005	TTGTTCTTCTAGCCTGGAGA	110
Hu.DMD.Exon46.20.006	TTCTTTTGTTCTTCTAGCCT	111
Hu.DMD.Exon46.20.007	TGACAAGATATTCTTTTGTT	112
Hu.DMD.Exon46.20.008	ATCTCTTTGAAATTCTGACA	113
Hu.DMD.Exon46.20.009	AACAAATTCATTTAAATCTC	114
Hu.DMD.Exon46.20.010	TTCCTCCAACCATAAAACAA	115
Hu.DMD.Exon46.20.011	AGCAATGTTATCTGCTTCCT	116
Hu.DMD.Exon46.20.012	TTCAAGTGGGATACTAGCAA	117
Hu.DMD.Exon46.20.013	CTGCTCTTTTCCAGGTTCAA	118
Hu.DMD.Exon46.20.014	CTTTTCTTTTAGTTGCTGCT	119
Hu.DMD.Exon46.20.015	CTTGACTTGCTCAAGCTTTT	120
Hu.DMD.Exon46.20.016	ATTACCTTGACTTGCTCAAG	121
Hu.DMD.Exon46.20.017	ATAAAATTACCTTGACTTGC	122
Hu.DMD.Exon46.20.018	AGAAAATAAAATTACCTTGA	123
Hu.DMD.Exon46.20.019	ATTTGAGAAAATAAAATTAC	124
Hu.DMD.Exon46.20.020	GGGGGATTTGAGAAAATAAA	125

[0324]

Hu.DMD.Exon47.25.001	CTGAAACAGACAAATGCAACAACGT	126
Hu.DMD.Exon47.25.002	AGTAACTGAAACAGACAAATGCAAC	127
Hu.DMD.Exon47.25.003	CCACCAGTAACTGAAACAGACAAAT	128
Hu.DMD.Exon47.25.004	CTCTTCCACCAGTAACTGAAACAGA	129
Hu.DMD.Exon47.25.005	GGCAACTCTTCCACCAGTAACTGAA	130
Hu.DMD.Exon47.25.006	GCAGGGGCAACTCTTCCACCAGTAA	131
Hu.DMD.Exon47.25.007	CTGGCGCAGGGGCAACTCTTCCACC	132
Hu.DMD.Exon47.25.008	TTTAATTGTTTGAGAATTCCCTGGC	133
Hu.DMD.Exon47.25.008.2	TTGTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGG	134
Hu.DMD.Exon47.25.009	GCACGGGTCCTCCAGTTTCATTTAA	135
Hu.DMD.Exon47.25.009.2	TCCAGTTTCATTTAATTGTTTGAGA	136
Hu.DMD.Exon47.25.010	GCTTATGGGAGCACTTACAAGCACG	137
Hu.DMD.Exon47.25.010.2	TACAAGCACGGGTCCTCCAGTTTCA	138
Hu.DMD.Exon47.25.011	AGTTTATCTTGCTCTTCTGGGCTTA	139
Hu.DMD.Exon47.25.012	TCTGCTTGAGCTTATTTTCAAGTTT	140
Hu.DMD.Exon47.25.012.2	ATCTTGCTCTTCTGGGCTTATGGGA	141
Hu.DMD.Exon47.25.013	CTTTATCCACTGGAGATTTGTCTGC	142
Hu.DMD.Exon47.25.013.2	CTTATTTTCAAGTTTATCTTGCTCT	143
Hu.DMD.Exon47.25.014	CTAACCTTTATCCACTGGAGATTTG	144
Hu.DMD.Exon47.25.014.2	ATTTGTCTGCTTGAGCTTATTTTCA	145
Hu.DMD.Exon47.25.015	AATGTCTAACCTTTATCCACTGGAG	146
Hu.DMD.Exon47.25.016	TGGTTAATGTCTAACCTTTATCCAC	147
Hu.DMD.Exon47.25.017	AGAGATGGTTAATGTCTAACCTTTA	148
Hu.DMD.Exon47.25.018	ACGGAAGAGATGGTTAATGTCTAAC	149
Hu.DMD.Exon47.20.001	ACAGACAAATGCAACAACGT	150
Hu.DMD.Exon47.20.002	CTGAAACAGACAAATGCAAC	151

[0325]

Hu.DMD.Exon47.20.003	AGTAACTGAAACAGACAAAT	152
Hu.DMD.Exon47.20.004	CCACCAGTAACTGAAACAGA	153
Hu.DMD.Exon47.20.005	CTCTTCCACCAGTAACTGAA	154
Hu.DMD.Exon47.20.006	GGCAACTCTTCCACCAGTAA	155
Hu.DMD.Exon47.20.007	CTGGCGCAGGGGCAACTCTT	156
Hu.DMD.Exon47.20.008	TTGTTTGAGAATTCCCTGGC	157
Hu.DMD.Exon47.20.009	TCCAGTTTCATTTAATTGTT	158
Hu.DMD.Exon47.20.010	TACAAGCACGGGTCCTCCAG	159
Hu.DMD.Exon47.20.011	GCTTATGGGAGCACTTACAA	160
Hu.DMD.Exon47.20.012	ATCTTGCTCTTCTGGGCTTA	161
Hu.DMD.Exon47.20.013	CTTATTTTCAAGTTTATCTT	162
Hu.DMD.Exon47.20.014	ATTTGTCTGCTTGAGCTTAT	163
Hu.DMD.Exon47.20.015	CTTTATCCACTGGAGATTTG	164
Hu.DMD.Exon47.20.016	CTAACCTTTATCCACTGGAG	165
Hu.DMD.Exon47.20.017	AATGTCTAACCTTTATCCAC	166
Hu.DMD.Exon47.20.018	TGGTTAATGTCTAACCTTTA	167
Hu.DMD.Exon47.20.019	AGAGATGGTTAATGTCTAAC	168
Hu.DMD.Exon47.20.020	ACGGAAGAGATGGTTAATGT	169
Hu.DMD.Exon48.25.001	CTGAAAGGAAAATACATTTTAAAAA	170
Hu.DMD.Exon48.25.002	CCTGAAAGGAAAATACATTTTAAAA	171
Hu.DMD.Exon48.25.002.2	GAAACCTGAAAGGAAAATACATTTT	172
Hu.DMD.Exon48.25.003	GGAAACCTGAAAGGAAAATACATTT	173
Hu.DMD.Exon48.25.003.2	CTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATAC	174
Hu.DMD.Exon48.25.004	GCTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATA	175
Hu.DMD.Exon48.25.004.2	TAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGAA	634
Hu.DMD.Exon48.25.005	GTAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGA	176
Hu.DMD.Exon48.25.005.2	TCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGAA	177
Hu.DMD.Exon48.25.006	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGA	178

Hu.DMD.Exon48.25.006.2	GTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAAC	179
Hu.DMD.Exon48.25.007	TGTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	180
Hu.DMD.Exon48.25.007.2	AATTTCTCCTTGTTTCTCAGGTAAA	181
Hu.DMD.Exon48.25.008	TTTGAGCTTCAATTTCTCCTTGTTT	182
Hu.DMD.Exon48.25.008	TTTTATTTGAGCTTCAATTTCTCCT	183
Hu.DMD.Exon48.25.009	AAGCTGCCCAAGGTCTTTTATTTGA	184
Hu.DMD.Exon48.25.010	AGGTCTTCAAGCTTTTTTTCAAGCT	185
Hu.DMD.Exon48.25.010.2	TTCAAGCTTTTTTTCAAGCTGCCCA	186
Hu.DMD.Exon48.25.011	GATGATTTAACTGCTCTTCAAGGTC	187
Hu.DMD.Exon48.25.011.2	CTGCTCTTCAAGGTCTTCAAGCTTT	188
Hu.DMD.Exon48.25.012	AGGAGATAACCACAGCAGCAGATGA	189
Hu.DMD.Exon48.25.012.2	CAGCAGATGATTTAACTGCTCTTCA	190
Hu.DMD.Exon48.25.013	ATTTCCAACTGATTCCTAATAGGAG	191
Hu.DMD.Exon48.25.014	CTTGGTTTGGTTGGTTATAAATTTC	192
Hu.DMD.Exon48.25.014.2	CAACTGATTCCTAATAGGAGATAAC	193
Hu.DMD.Exon48.25.015	CTTAACGTCAAATGGTCCTTCTTGG	194
Hu.DMD.Exon48.25.015.2	TTGGTTATAAATTTCCAACTGATTC	195
Hu.DMD.Exon48.25.016	CCTACCTTAACGTCAAATGGTCCTT	196
Hu.DMD.Exon48.25.016.2	TCCTTCTTGGTTTGGTTGGTTATAA	197
Hu.DMD.Exon48.25.017	AGTTCCCTACCTTAACGTCAAATGG	198
Hu.DMD.Exon48.25.018	CAAAAAGTTCCCTACCTTAACGTCA	199
Hu.DMD.Exon48.25.019	TAAAGCAAAAAGTTCCCTACCTTAA	200
Hu.DMD.Exon48.25.020	ATATTTAAAGCAAAAAGTTCCCTAC	201
Hu.DMD.Exon48.20.001	AGGAAAATACATTTTAAAAA	202

[0326]

[0327]

Hu.DMD.Exon48.20.002	AAGGAAAATACATTTTAAAA	203
Hu.DMD.Exon48.20.003	CCTGAAAGGAAAATACATTT	204
Hu.DMD.Exon48.20.004	GGAAACCTGAAAGGAAAATA	205
Hu.DMD.Exon48.20.005	GCTCTGGAAACCTGAAAGGA	206
Hu.DMD.Exon48.20.006	GTAAAGCTCTGGAAACCTGA	207
Hu.DMD.Exon48.20.007	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	208
Hu.DMD.Exon48.20.008	AATTTCTCCTTGTTTCTCAG	209
Hu.DMD.Exon48.20.009	TTTTATTTGAGCTTCAATTT	210
Hu.DMD.Exon48.20.010	AAGCTGCCCAAGGTCTTTTA	211
Hu.DMD.Exon48.20.011	TTCAAGCTTTTTTTCAAGCT	212
Hu.DMD.Exon48.20.012	CTGCTCTTCAAGGTCTTCAA	213
Hu.DMD.Exon48.20.013	CAGCAGATGATTTAACTGCT	214
Hu.DMD.Exon48.20.014	AGGAGATAACCACAGCAGCA	215
Hu.DMD.Exon48.20.015	CAACTGATTCCTAATAGGAG	216
Hu.DMD.Exon48.20.016	TTGGTTATAAATTTCCAACT	217
Hu.DMD.Exon48.20.017	TCCTTCTTGGTTTGGTTGGT	218
Hu.DMD.Exon48.20.018	CTTAACGTCAAATGGTCCTT	219
Hu.DMD.Exon48.20.019	CCTACCTTAACGTCAAATGG	220
Hu.DMD.Exon48.20.020	AGTTCCCTACCTTAACGTCA	221
Hu.DMD.Exon48.20.021	CAAAAAGTTCCCTACCTTAA	222
Hu.DMD.Exon48.20.022	TAAAGCAAAAAGTTCCCTAC	223
Hu.DMD.Exon48.20.023	ATATTTAAAGCAAAAAGTTC	224
Hu.DMD.Exon49.25.001	CTGGGGAAAAGAACCCATATAGTGC	225
Hu.DMD.Exon49.25.002	TCCTGGGGAAAAGAACCCATATAGT	226
Hu.DMD.Exon49.25.002.2	GTTTCCTGGGGAAAAGAACCCATAT	227
Hu.DMD.Exon49.25.003	CAGTTTCCTGGGGAAAAGAACCCAT	228
Hu.DMD.Exon49.25.003.2	TTTCAGTTTCCTGGGGAAAAGAACC	229
Hu.DMD.Exon49.25.004	TATTTCAGTTTCCTGGGGAAAAGAA	230
Hu.DMD.Exon49.25.004.2	TGCTATTTCAGTTTCCTGGGGAAAA	231

Hu.DMD.Exon49.25.005	ACTGCTATTTCAGTTTCCTGGGGAA	232
Hu.DMD.Exon49.25.005.2	TGAACTGCTATTTCAGTTTCCTGGG	233
Hu.DMD.Exon49.25.006	CTTGAACTGCTATTTCAGTTTCCTG	234
Hu.DMD.Exon49.25.006.2	TAGCTTGAACTGCTATTTCAGTTTC	235
Hu.DMD.Exon49.25.007	TTTAGCTTGAACTGCTATTTCAGTT	236
Hu.DMD.Exon49.25.008	TTCCACATCCGGTTGTTTAGCTTGA	237
Hu.DMD.Exon49.25.009	TGCCCTTTAGACAAAATCTCTTCCA	238
Hu.DMD.Exon49.25.009.2	TTTAGACAAAATCTCTTCCACATCC	239
Hu.DMD.Exon49.25.010	GTTTTTCCTTGTACAAATGCTGCCC	240
Hu.DMD.Exon49.25.010.2	GTACAAATGCTGCCCTTTAGACAAA	241
Hu.DMD.Exon49.25.011	CTTCACTGGCTGAGTGGCTGGTTTT	242
Hu.DMD.Exon49.25.011.2	GGCTGGTTTTTCCTTGTACAAATGC	243
Hu.DMD.Exon49.25.012	ATTACCTTCACTGGCTGAGTGGCTG	244
Hu.DMD.Exon49.25.013	GCTTCATTACCTTCACTGGCTGAGT	245
Hu.DMD.Exon49.25.014	AGGTTGCTTCATTACCTTCACTGGC	246
Hu.DMD.Exon49.25.015	GCTAGAGGTTGCTTCATTACCTTCA	247
Hu.DMD.Exon49.25.016	ATATTGCTAGAGGTTGCTTCATTAC	248
Hu.DMD.Exon49.20.001	GAAAAGAACCCATATAGTGC	249
Hu.DMD.Exon49.20.002	GGGAAAAGAACCCATATAGT	250
Hu.DMD.Exon49.20.003	TCCTGGGGAAAAGAACCCAT	251
Hu.DMD.Exon49.20.004	CAGTTTCCTGGGGAAAAGAA	252
Hu.DMD.Exon49.20.005	TATTTCAGTTTCCTGGGGAA	253
Hu.DMD.Exon49.20.006	ACTGCTATTTCAGTTTCCTG	254
Hu.DMD.Exon49.20.007	CTTGAACTGCTATTTCAGTT	255
Hu.DMD.Exon49.20.008	TTTAGCTTGAACTGCTATTT	256
Hu.DMD.Exon49.20.009	TTCCACATCCGGTTGTTTAG	257
Hu.DMD.Exon49.20.010	TTTAGACAAAATCTCTTCCA	258

[0328]

[0329]

Hu.DMD.Exon49.20.011	GTACAAATGCTGCCCTTTAG	259
Hu.DMD.Exon49.20.012	GGCTGGTTTTTCCTTGTACA	260
Hu.DMD.Exon49.20.013	CTTCACTGGCTGAGTGGCTG	261
Hu.DMD.Exon49.20.014	ATTACCTTCACTGGCTGAGT	262
Hu.DMD.Exon49.20.015	GCTTCATTACCTTCACTGGC	263
Hu.DMD.Exon49.20.016	AGGTTGCTTCATTACCTTCA	264
Hu.DMD.Exon49.20.017	GCTAGAGGTTGCTTCATTAC	265
Hu.DMD.Exon49.20.018	ATATTGCTAGAGGTTGCTTC	266
Hu.DMD.Exon50.25.001	CTTTAACAGAAAAGCATACACATTA	267
Hu.DMD.Exon50.25.002	TCCTCTTTAACAGAAAAGCATACAC	268
Hu.DMD.Exon50.25.002.2	TTCCTCTTTAACAGAAAAGCATACA	269
Hu.DMD.Exon50.25.003	TAACTTCCTCTTTAACAGAAAAGCA	270
Hu.DMD.Exon50.25.003.2	CTAACTTCCTCTTTAACAGAAAAGC	271
Hu.DMD.Exon50.25.004	TCTTCTAACTTCCTCTTTAACAGAA	272
Hu.DMD.Exon50.25.004.2	ATCTTCTAACTTCCTCTTTAACAGA	273
Hu.DMD.Exon50.25.005	TCAGATCTTCTAACTTCCTCTTTAA	274
Hu.DMD.Exon50.25.005.2	CTCAGATCTTCTAACTTCCTCTTTA	275
Hu.DMD.Exon50.25.006	AGAGCTCAGATCTTCTAACTTCCTC	276
Hu.DMD.Exon50.25.006.2 NG-08-0731	CAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCCT	277
Hu.DMD.Exon50.25.007	CACTCAGAGCTCAGATCTTCTACT	278
Hu.DMD.Exon50.25.007.2	CCTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTC	279
Hu.DMD.Exon50.25.008	GTAAACGGTTTACCGCCTTCCACTC	280
Hu.DMD.Exon50.25.009	CTTTGCCCTCAGCTCTTGAAGTAAA	281
Hu.DMD.Exon50.25.009.2	CCCTCAGCTCTTGAAGTAAACGGTT	282

[0330]

Hu.DMD.Exon50.25.010	CCAGGAGCTAGGTCAGGCTGCTTTG	283
Hu.DMD.Exon50.25.010.2	GGTCAGGCTGCTTTGCCCTCAGCTC	284
Hu.DMD.Exon50.25.011	AGGCTCCAATAGTGGTCAGTCCAGG	285
Hu.DMD.Exon50.25.011.2	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCAGGCTG	286
Hu.DMD.Exon50.25.012 AVI-5038	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	287
Hu.DMD.Exon50.25.013	GTATACTTACAGGCTCCAATAGTGG	288
Hu.DMD.Exon50.25.014	ATCCAGTATACTTACAGGCTCCAAT	289
Hu.DMD.Exon50.25.015 NG-08-0741	ATGGGATCCAGTATACTTACAGGCT	290
Hu.DMD.Exon50.25.016 NG-08-0742	AGAGAATGGGATCCAGTATACTTAC	291
Hu.DMD.Exon50.20.001	ACAGAAAAGCATACACATTA	292
Hu.DMD.Exon50.20.002	TTTAACAGAAAAGCATACAC	293
Hu.DMD.Exon50.20.003	TCCTCTTTAACAGAAAAGCA	294
Hu.DMD.Exon50.20.004	TAACTTCCTCTTTAACAGAA	295
Hu.DMD.Exon50.20.005	TCTTCTAACTTCCTCTTTAA	296
Hu.DMD.Exon50.20.006	TCAGATCTTCTAACTTCCTC	297
Hu.DMD.Exon50.20.007	CCTTCCACTCAGAGCTCAGA	298
Hu.DMD.Exon50.20.008	GTAAACGGTTTACCGCCTTC	299
Hu.DMD.Exon50.20.009	CCCTCAGCTCTTGAAGTAAA	300
Hu.DMD.Exon50.20.010	GGTCAGGCTGCTTTGCCCTC	301
Hu.DMD.Exon50.20.011	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCA	302
Hu.DMD.Exon50.20.012	AGGCTCCAATAGTGGTCAGT	303
Hu.DMD.Exon50.20.013	CTTACAGGCTCCAATAGTGG	304
Hu.DMD.Exon50.20.014	GTATACTTACAGGCTCCAAT	305
Hu.DMD.Exon50.20.015	ATCCAGTATACTTACAGGCT	306
Hu.DMD.Exon50.20.016	ATGGGATCCAGTATACTTAC	307
Hu.DMD.Exon50.20.017	AGAGAATGGGATCCAGTATA	308
Hu.DMD.Exon51.25.001-	CTAAAATATTTTGGGTTTTTGCAAAA	309

44		
Hu.DMD.Exon51.25.002-45	GCTAAAATATTTTGGGTTTTTGCAAA	310
Hu.DMD.Exon51.25.002.2-46	TAGGAGCTAAAATATTTTGGGTTTTT	311
Hu.DMD.Exon51.25.003	AGTAGGAGCTAAAATATTTTGGGTT	312
Hu.DMD.Exon51.25.003.2	TGAGTAGGAGCTAAAATATTTTGGG	313
Hu.DMD.Exon51.25.004	CTGAGTAGGAGCTAAAATATTTTGGG	314
Hu.DMD.Exon51.25.004.2	CAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	315
Hu.DMD.Exon51.25.005	ACAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	316
Hu.DMD.Exon51.25.005.2	GAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCTAAA	317
Hu.DMD.Exon51.25.006	CAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCT	318
Hu.DMD.Exon51.25.006.2	CACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG	319
Hu.DMD.Exon51.25.007	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAG	320
Hu.DMD.Exon51.25.007.2	AACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAA	321
Hu.DMD.Exon51.25.008	GTTGTGTCACCAGAGTAACAGTCTG	322
Hu.DMD.Exon51.25.009	TGGCAGTTTCCTTAGTAACCACAGGT	323
Hu.DMD.Exon51.25.010	ATTTCTAGTTTGGAGATGGCAGTTTC	324
Hu.DMD.Exon51.25.010.2	GGAAGATGGCATTTCTAGTTTGGAG	325
Hu.DMD.Exon51.25.011	CATCAAGGAAGATGGCATTTCTAGTT	326
Hu.DMD.Exon51.25.011.2	GAGCAGGTACCTCCAACATCAAGGAA	327
Hu.DMD.Exon51.25.012	ATCTGCCAGAGCAGGTACCTCCAAC	328
Hu.DMD.Exon51.25.013	AAGTTCTGTCCAAGCCCGGTTGAAA	329

[0331]

	T	
Hu.DMD.Exon51.25.013.2	CGGTTGAAATCTGCCAGAGCAGGTAC	330
Hu.DMD.Exon51.25.014	GAGAAAGCCAGTCGGTAAGTTCTGTC	331
Hu.DMD.Exon51.25.014.2	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAGCCCGG	332
Hu.DMD.Exon51.25.015	ATAACTTGATCAAGCAGAGAAAGCCA	333
Hu.DMD.Exon51.25.015.2	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGGTAAGT	334
Hu.DMD.Exon51.25.016	CACCCTCTGTGATTTTATAACTTGAT	335
Hu.DMD.Exon51.25.017	CAAGGTCACCCACCATCACCCTCTGT	336
Hu.DMD.Exon51.25.017.2	CATCACCCTCTGTGATTTTATAACT	337
Hu.DMD.Exon51.25.018	CTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTGA	338
Hu.DMD.Exon51.25.019	CCTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTG	339
Hu.DMD.Exon51.25.019.2	ATCTCGTTGATATCCTCAAGGTCACC	340
Hu.DMD.Exon51.25.020	TCATACCTTCTGCTTGATGATCATCT	341
Hu.DMD.Exon51.25.020.2	TCATTTTTTCTCATACCTTCTGCTTG	342
Hu.DMD.Exon51.25.021	TTTTCTCATACCTTCTGCTTGATGAT	343
Hu.DMD.Exon51.25.022	TTTTATCATTTTTTCTCATACCTTCT	344
Hu.DMD.Exon51.25.023	CCAACTTTTATCATTTTTTCTCATAC	345
Hu.DMD.Exon51.20.001	ATATTTTGGGTTTTTGCAAA	346
Hu.DMD.Exon51.20.002	AAAATATTTTGGGTTTTTGC	347
Hu.DMD.Exon51.20.003	GAGCTAAAATATTTTGGGTT	348
Hu.DMD.Exon51.20.004	AGTAGGAGCTAAAATATTTT	349
Hu.DMD.Exon51.20.005	GTCTGAGTAGGAGCTAAAAT	350
Hu.DMD.Exon51.20.006	TAACAGTCTGAGTAGGAGCT	351

[0332]

[0333]

Hu.DMD.Exon51.20.007	CAGAGTAACAGTCTGAGTAG	352
Hu.DMD.Exon51.20.008	CACAGGTTGTGTCACCAGAG	353
Hu.DMD.Exon51.20.009	AGTTTCCTTAGTAACCACAG	354
Hu.DMD.Exon51.20.010	TAGTTTGGAGATGGCAGTTT	355
Hu.DMD.Exon51.20.011	GGAAGATGGCATTTCTAGTT	356
Hu.DMD.Exon51.20.012	TACCTCCAACATCAAGGAAG	357
Hu.DMD.Exon51.20.013	ATCTGCCAGAGCAGGTACCT	358
Hu.DMD.Exon51.20.014	CCAAGCCCGGTTGAAATCTG	359
Hu.DMD.Exon51.20.015	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAG	360
Hu.DMD.Exon51.20.016	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGG	361
Hu.DMD.Exon51.20.017	TTTTATAACTTGATCAAGCA	362
Hu.DMD.Exon51.20.018	CATCACCCTCTGTGATTTTA	363
Hu.DMD.Exon51.20.019	CTCAAGGTCACCCACCATCA	364
Hu.DMD.Exon51.20.020	CATCTCGTTGATATCCTCAA	365
Hu.DMD.Exon51.20.021	CTTCTGCTTGATGATCATCT	366
Hu.DMD.Exon51.20.022	CATACCTTCTGCTTGATGAT	367
Hu.DMD.Exon51.20.023	TTTCTCATACCTTCTGCTTG	368
Hu.DMD.Exon51.20.024	CATTTTTTCTCATACCTTCT	369
Hu.DMD.Exon51.20.025	TTTATCATTTTTTCTCATAC	370
Hu.DMD.Exon51.20.026	CAACTTTTATCATTTTTTCT	371
Hu.DMD.Exon52.25.001	CTGTAAGAACAAATATCCCTTAGTA	372
Hu.DMD.Exon52.25.002	TGCCTGTAAGAACAAATATCCCTTA	373
Hu.DMD.Exon52.25.002.2	GTTGCCTGTAAGAACAAATATCCCT	374
Hu.DMD.Exon52.25.003	ATTGTTGCCTGTAAGAACAAATATC	375
Hu.DMD.Exon52.25.003.2	GCATTGTTGCCTGTAAGAACAAATA	376
Hu.DMD.Exon52.25.004	CCTGCATTGTTGCCTGTAAGAACAA	377
Hu.DMD.Exon52.25.004.2	ATCCTGCATTGTTGCCTGTAAGAAC	378
Hu.DMD.Exon52.25.005	CAAATCCTGCATTGTTGCCTGTAAG	379
Hu.DMD.Exon52.25.005.	TCCAAATCCTGCATTGTTGCCTGTA	380

2		
Hu.DMD.Exon52.25.006	TGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCCT	381
Hu.DMD.Exon52.25.006.2	TCTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGC	382
Hu.DMD.Exon52.25.007	AACTGGGGACGCCTCTGTTCCAAAT	383
Hu.DMD.Exon52.25.007.2	GCCTCTGTTCCAAATCCTGCATTGT	384
Hu.DMD.Exon52.25.008	CAGCGGTAATGAGTTCTTCCAACTG	385
Hu.DMD.Exon52.25.008.2	CTTCCAACTGGGGACGCCTCTGTTC	386
Hu.DMD.Exon52.25.009	CTTGTTTTTCAAATTTTGGGCAGCG	387
Hu.DMD.Exon52.25.010	CTAGCCTCTTGATTGCTGGTCTTGT	388
Hu.DMD.Exon52.25.010.2	TTTTCAAATTTTGGGCAGCGGTAAT	389
Hu.DMD.Exon52.25.011	TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGC	390
Hu.DMD.Exon52.25.011.2	GATTGCTGGTCTTGTTTTTCAAATT	391
Hu.DMD.Exon52.25.012	CTTACTTCGATCCGTAATGATTGTT	392
Hu.DMD.Exon52.25.012.2	TTGTTCTAGCCTCTTGATTGCTGGT	393
Hu.DMD.Exon52.25.013	AAAAACTTACTTCGATCCGTAATGA	394
Hu.DMD.Exon52.25.014	TGTTAAAAAACTTACTTCGATCCGT	395
Hu.DMD.Exon52.25.015	ATGCTTGTTAAAAAACTTACTTCGA	396
Hu.DMD.Exon52.25.016	GTCCCATGCTTGTTAAAAAACTTAC	397
Hu.DMD.Exon52.20.001	AGAACAAATATCCCTTAGTA	398
Hu.DMD.Exon52.20.002	GTAAGAACAAATATCCCTTA	399
Hu.DMD.Exon52.20.003	TGCCTGTAAGAACAAATATC	400
Hu.DMD.Exon52.20.004	ATTGTTGCCTGTAAGAACAA	401
Hu.DMD.Exon52.20.005	CCTGCATTGTTGCCTGTAAG	402
Hu.DMD.Exon52.20.006	CAAATCCTGCATTGTTGCCT	403
Hu.DMD.Exon52.20.007	GCCTCTGTTCCAAATCCTGC	404
Hu.DMD.Exon52.20.008	CTTCCAACTGGGGACGCCTC	405

[0334]

[0335]

Hu.DMD.Exon52.20.009	CAGCGGTAATGAGTTCTTCC	406
Hu.DMD.Exon52.20.010	TTTTCAAATTTTGGGCAGCG	407
Hu.DMD.Exon52.20.011	GATTGCTGGTCTTGTTTTTC	408
Hu.DMD.Exon52.20.012	TTGTTCTAGCCTCTTGATTG	409
Hu.DMD.Exon52.20.013	TTCGATCCGTAATGATTGTT	410
Hu.DMD.Exon52.20.014	CTTACTTCGATCCGTAATGA	411
Hu.DMD.Exon52.20.015	AAAAACTTACTTCGATCCGT	412
Hu.DMD.Exon52.20.016	TGTTAAAAAACTTACTTCGA	413
Hu.DMD.Exon52.20.017	ATGCTTGTTAAAAAACTTAC	414
Hu.DMD.Exon52.20.018	GTCCCATGCTTGTTAAAAAA	415
Hu.DMD.Exon53.25.001	CTAGAATAAAAGGAAAAATAAATAT	416
Hu.DMD.Exon53.25.002	AACTAGAATAAAAGGAAAAATAAAT	417
Hu.DMD.Exon53.25.002.2	TTCAACTAGAATAAAAGGAAAAATA	418
Hu.DMD.Exon53.25.003	CTTTCAACTAGAATAAAAGGAAAAA	419
Hu.DMD.Exon53.25.003.2	ATTCTTTCAACTAGAATAAAAGGAA	420
Hu.DMD.Exon53.25.004	GAATTCTTTCAACTAGAATAAAAGG	421
Hu.DMD.Exon53.25.004.2	TCTGAATTCTTTCAACTAGAATAAA	422
Hu.DMD.Exon53.25.005	ATTCTGAATTCTTTCAACTAGAATA	423
Hu.DMD.Exon53.25.005.2	CTGATTCTGAATTCTTTCAACTAGA	424
Hu.DMD.Exon53.25.006	CACTGATTCTGAATTCTTTCAACTA	425
Hu.DMD.Exon53.25.006.2	TCCCACTGATTCTGAATTCTTTCAA	426
Hu.DMD.Exon53.25.007	CATCCCACTGATTCTGAATTCTTTC	427
Hu.DMD.Exon53.25.008	TACTTCATCCCACTGATTCTGAATT	428
Hu.DMD.Exon53.25.008.2	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	429
Hu.DMD.Exon53.25.009	CGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACT	430
Hu.DMD.Exon53.25.009.	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGT	431

2		
Hu.DMD.Exon53.25.010	TTTCATTCAACTGTTGCCTCCGGTT	432
Hu.DMD.Exon53.25.010.2	TAACATTTCATTCAACTGTTGCCTC	433
Hu.DMD.Exon53.25.011	TTGTGTTGAATCCTTTAACATTTCA	434
Hu.DMD.Exon53.25.012	TCTTCCTTAGCTTCCAGCCATTGTG	435
Hu.DMD.Exon53.25.012.2	CTTAGCTTCCAGCCATTGTGTTGAA	436
Hu.DMD.Exon53.25.013	GTCCTAAGACCTGCTCAGCTTCTTC	437
Hu.DMD.Exon53.25.013.2	CTGCTCAGCTTCTTCCTTAGCTTCC	438
Hu.DMD.Exon53.25.014	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCTGTCCT	439
Hu.DMD.Exon53.25.014.2	GGCCTGTCCTAAGACCTGCTCAGCT	440
Hu.DMD.Exon53.25.015	TAGGGACCCTCCTTCCATGACTCAA	441
Hu.DMD.Exon53.25.016	TTTGGATTGCATCTACTGTATAGGG	442
Hu.DMD.Exon53.25.016.2	ACCCTCCTTCCATGACTCAAGCTTG	443
Hu.DMD.Exon53.25.017	CTTGGTTTCTGTGATTTTCTTTTGG	444
Hu.DMD.Exon53.25.017.2	ATCTACTGTATAGGGACCCTCCTTC	445
Hu.DMD.Exon53.25.018	CTAACCTTGGTTTCTGTGATTTTCT	446
Hu.DMD.Exon53.25.018.2	TTTCTTTTGGATTGCATCTACTGTA	447
Hu.DMD.Exon53.25.019	TGATACTAACCTTGGTTTCTGTGAT	448
Hu.DMD.Exon53.25.020	ATCTTTGATACTAACCTTGGTTTCT	449
Hu.DMD.Exon53.25.021	AAGGTATCTTTGATACTAACCTTGG	450
Hu.DMD.Exon53.25.022	TTAAAAAGGTATCTTTGATACTAAC	451
Hu.DMD.Exon53.20.001	ATAAAAGGAAAAATAAATAT	452
Hu.DMD.Exon53.20.002	GAATAAAAGGAAAAATAAAT	453
Hu.DMD.Exon53.20.003	AACTAGAATAAAAGGAAAAA	454
Hu.DMD.Exon53.20.004	CTTTCAACTAGAATAAAAGG	455

[0336]

Hu.DMD.Exon53.20.005	GAATTCTTTCAACTAGAATA	456
Hu.DMD.Exon53.20.006	ATTCTGAATTCTTTCAACTA	457
Hu.DMD.Exon53.20.007	TACTTCATCCCACTGATTCT	458
Hu.DMD.Exon53.20.008	CTGAAGGTGTTCTTGTACT	459
Hu.DMD.Exon53.20.009	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAA	460
Hu.DMD.Exon53.20.010	TAACATTTCATTCAACTGTT	461
Hu.DMD.Exon53.20.011	TTGTGTTGAATCCTTTAACA	462
Hu.DMD.Exon53.20.012	CTTAGCTTCCAGCCATTGTG	463
Hu.DMD.Exon53.20.013	CTGCTCAGCTTCTTCCTTAG	464
Hu.DMD.Exon53.20.014	GGCCTGTCCTAAGACCTGCT	465
Hu.DMD.Exon53.20.015	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCT	466
Hu.DMD.Exon53.20.016	ACCCTCCTTCCATGACTCAA	467
Hu.DMD.Exon53.20.017	ATCTACTGTATAGGGACCCT	468
Hu.DMD.Exon53.20.018	TTTCTTTTGGATTGCATCTA	469
Hu.DMD.Exon53.20.019	CTTGGTTTCTGTGATTTTCT	470
Hu.DMD.Exon53.20.020	CTAACCTTGGTTTCTGTGAT	471
Hu.DMD.Exon53.20.021	TGATACTAACCTTGGTTTCT	472
Hu.DMD.Exon53.20.022	ATCTTTGATACTAACCTTGG	473
Hu.DMD.Exon53.20.023	AAGGTATCTTTGATACTAAC	474
Hu.DMD.Exon53.20.024	TTAAAAAGGTATCTTTGATA	475
Hu.DMD.Exon54.25.001	CTATAGATTTTTATGAGAAAGAGA	476
Hu.DMD.Exon54.25.002	AACTGCTATAGATTTTTATGAGAAA	477
Hu.DMD.Exon54.25.003	TGGCCAACTGCTATAGATTTTTATG	478
Hu.DMD.Exon54.25.004	GTCTTTGGCCAACTGCTATAGATTT	479
Hu.DMD.Exon54.25.005	CGGAGGTCTTTGGCCAACTGCTATA	480
Hu.DMD.Exon54.25.006	ACTGGCGGAGGTCTTTGGCCAACTG	481
Hu.DMD.Exon54.25.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAGGTCTT	482
Hu.DMD.Exon54.25.008	AGTCATTTGCCACATCTACATTTGT	483
Hu.DMD.Exon54.25.008.2	TTTGCCACATCTACATTTGTCTGCC	484
Hu.DMD.Exon54.25.009	CCGGAGAAGTTTCAGGGCCAAGTCA	485
Hu.DMD.Exon54.25.010	GTATCATCTGCAGAATAATCCCGGA	486

[0337]

[0338]

Hu.DMD.Exon54.25.010.2	TAATCCCGGAGAAGTTTCAGGGCCA	487
Hu.DMD.Exon54.25.011	TTATCATGTGGACTTTTCTGGTATC	488
Hu.DMD.Exon54.25.012	AGAGGCATTGATATTCTCTGTTATC	489
Hu.DMD.Exon54.25.012.2	ATGTGGACTTTTCTGGTATCATCTG	490
Hu.DMD.Exon54.25.013	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	491
Hu.DMD.Exon54.25.013.2	ATATTCTCTGTTATCATGTGGACTT	492
Hu.DMD.Exon54.25.014	CATACCTTTTATGAATGCTTCTCCA	493
Hu.DMD.Exon54.25.014.2	CTCCAAGAGGCATTGATATTCTCTG	494
Hu.DMD.Exon54.25.015	TAATTCATACCTTTTATGAATGCTT	495
Hu.DMD.Exon54.25.015.2	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	496
Hu.DMD.Exon54.25.016	TAATGTAATTCATACCTTTTATGAA	497
Hu.DMD.Exon54.25.017	AGAAATAATGTAATTCATACCTTTT	498
Hu.DMD.Exon54.25.018	GTTTTAGAAATAATGTAATTCATAC	499
Hu.DMD.Exon54.20.001	GATTTTTATGAGAAAGAGA	500
Hu.DMD.Exon54.20.002	CTATAGATTTTTATGAGAAA	501
Hu.DMD.Exon54.20.003	AACTGCTATAGATTTTTATG	502
Hu.DMD.Exon54.20.004	TGGCCAACTGCTATAGATTT	503
Hu.DMD.Exon54.20.005	GTCTTTGGCCAACTGCTATA	504
Hu.DMD.Exon54.20.006	CGGAGGTCTTTGGCCAACTG	505
Hu.DMD.Exon54.20.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAG	506
Hu.DMD.Exon54.20.008	TTTGCCACATCTACATTTGT	507
Hu.DMD.Exon54.20.009	TTCAGGGCCAAGTCATTTGC	508
Hu.DMD.Exon54.20.010	TAATCCCGGAGAAGTTTCAG	509
Hu.DMD.Exon54.20.011	GTATCATCTGCAGAATAATC	510
Hu.DMD.Exon54.20.012	ATGTGGACTTTTCTGGTATC	511
Hu.DMD.Exon54.20.013	ATATTCTCTGTTATCATGTG	512
Hu.DMD.Exon54.20.014	CTCCAAGAGGCATTGATATT	513

Hu.DMD.Exon54.20.015	CTTTTATGAATGCTTCTCCA	514
Hu.DMD.Exon54.20.016	CATACCTTTTATGAATGCTT	515
Hu.DMD.Exon54.20.017	TAATTCATACCTTTTATGAA	516
Hu.DMD.Exon54.20.018	TAATGTAATTCATACCTTTT	517
Hu.DMD.Exon54.20.019	AGAAATAATGTAATTCATAC	518
Hu.DMD.Exon54.20.020	GTTTTAGAAATAATGTAATT	519
Hu.DMD.Exon55.25.001	CTGCAAAGGACCAAATGTTCAGATG	520
Hu.DMD.Exon55.25.002	TCACCCTGCAAAGGACCAAATGTTC	521
Hu.DMD.Exon55.25.003	CTCACTCACCCTGCAAAGGACCAAA	522
Hu.DMD.Exon55.25.004	TCTCGCTCACTCACCCTGCAAAGGA	523
Hu.DMD.Exon55.25.005	CAGCCTCTCGCTCACTCACCCTGCA	524
Hu.DMD.Exon55.25.006	CAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC	525
Hu.DMD.Exon55.25.007	TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	526
Hu.DMD.Exon55.25.007.2	TCTATGAGTTTCTTCCAAAGCAGCC	527
Hu.DMD.Exon55.25.008	GTTGCAGTAATCTATGAGTTTCTTC	528
Hu.DMD.Exon55.25.008.2	GAACTGTTGCAGTAATCTATGAGTT	529
Hu.DMD.Exon55.25.009	TTCCAGGTCCAGGGGGAACTGTTGC	530
Hu.DMD.Exon55.25.010	GTAAGCCAGGCAAGAAACTTTTCCA	531
Hu.DMD.Exon55.25.010.2	CCAGGCAAGAAACTTTTCCAGGTCC	532
Hu.DMD.Exon55.25.011	TGGCAGTTGTTTCAGCTTCTGTAAG	533
Hu.DMD.Exon55.25.011.2	TTCAGCTTCTGTAAGCCAGGCAAGA	635
Hu.DMD.Exon55.25.012	GGTAGCATCCTGTAGGACATTGGCA	534
Hu.DMD.Exon55.25.012.2	GACATTGGCAGTTGTTTCAGCTTCT	535
Hu.DMD.Exon55.25.013	TCTAGGAGCCTTTCCTTACGGGTAG	536
Hu.DMD.Exon55.25.014	CTTTTACTCCCTTGGAGTCTTCTAG	537
Hu.DMD.Exon55.25.014.2	GAGCCTTTCCTTACGGGTAGCATCC	538

[0339]

[0340]

Hu.DMD.Exon55.25.015	TTGCCATTGTTTCATCAGCTCTTTT	539
Hu.DMD.Exon55.25.015.2	CTTGGAGTCTTCTAGGAGCCTTTCC	540
Hu.DMD.Exon55.25.016	CTTACTTGCCATTGTTTCATCAGCT	541
Hu.DMD.Exon55.25.016.2	CAGCTCTTTTACTCCCTTGGAGTCT	542
Hu.DMD.Exon55.25.017	CCTGACTTACTTGCCATTGTTTCAT	543
Hu.DMD.Exon55.25.018	AAATGCCTGACTTACTTGCCATTGT	544
Hu.DMD.Exon55.25.019	AGCGGAAATGCCTGACTTACTTGCC	545
Hu.DMD.Exon55.25.020	GCTAAAGCGGAAATGCCTGACTTAC	546
Hu.DMD.Exon55.20.001	AAGGACCAAATGTTCAGATG	547
Hu.DMD.Exon55.20.002	CTGCAAAGGACCAAATGTTC	548
Hu.DMD.Exon55.20.003	TCACCCTGCAAAGGACCAAA	549
Hu.DMD.Exon55.20.004	CTCACTCACCCTGCAAAGGA	550
Hu.DMD.Exon55.20.005	TCTCGCTCACTCACCCTGCA	551
Hu.DMD.Exon55.20.006	CAGCCTCTCGCTCACTCACC	552
Hu.DMD.Exon55.20.007	CAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	553
Hu.DMD.Exon55.20.008	TCTATGAGTTTCTTCCAAAG	554
Hu.DMD.Exon55.20.009	GAACTGTTGCAGTAATCTAT	555
Hu.DMD.Exon55.20.010	TTCCAGGTCCAGGGGGAACT	556
Hu.DMD.Exon55.20.011	CCAGGCAAGAAACTTTTCCA	557
Hu.DMD.Exon55.20.012	TTCAGCTTCTGTAAGCCAGG	558
Hu.DMD.Exon55.20.013	GACATTGGCAGTTGTTTCAG	559
Hu.DMD.Exon55.20.014	GGTAGCATCCTGTAGGACAT	560
Hu.DMD.Exon55.20.015	GAGCCTTTCCTTACGGGTAG	561
Hu.DMD.Exon55.20.016	CTTGGAGTCTTCTAGGAGCC	562
Hu.DMD.Exon55.20.017	CAGCTCTTTTACTCCCTTGG	563
Hu.DMD.Exon55.20.018	TTGCCATTGTTTCATCAGCT	564
Hu.DMD.Exon55.20.019	CTTACTTGCCATTGTTTCAT	565
Hu.DMD.Exon55.20.020	CCTGACTTACTTGCCATTGT	566
Hu.DMD.Exon55.20.021	AAATGCCTGACTTACTTGCC	567
Hu.DMD.Exon55.20.022	AGCGGAAATGCCTGACTTAC	568

Hu.DMD.Exon55.20.023	GCTAAAGCGGAAATGCCTGA	569
H50A(+02+30)-AVI-5656	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCC	584
H50D(+07-18)-AVI-5915	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	585
H50A(+07+33)	CTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAA	586
H51A(+61+90)-AVI-4657	ACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAGTTTGG	587
H51A(+66+95)-AVI-4658	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG	588
H51A(+111+134)	TTCTGTCCAAGCCCGGTTGAAATC	589
H51A(+175+195)	CACCCACCATCACCCTCYGTG	590
H51A(+199+220)	ATCATCTCGTTGATATCCTCAA	591
H51A(+66+90)	ACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG	592
H51A(-01+25)	ACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGC	593
h51AON1	TCAAGGAAGATGGCATTTCT	594
h51AON2	CCTCTGTGATTTTATAACTTGAT	595
H51D(+08-17)	ATCATTTTTTCTCATACCTTCTGCT	596
H51D(+16-07)	CTCATACCTTCTGCTTGATGATC	597
hAON#23	TGGCATTTCTAGTTTGG	598
hAON#24	CCAGAGCAGGTACCTCCAACATC	599
H44A(+61+84)	TGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGA	600
H44A(+85+104)	TTTGTGTCTTTCTGAGAAAC	601
h44AON1	CGCCGCCATTTCTCAACAG	602
H44A(-06+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAG	603
H45A(+71+90)	TGTTTTTGAGGATTGCTGAA	604
h45AON1	GCTGAATTATTTCTTCCCC	605
h45AON5	GCCCAATGCCATCCTGG	606
H45A(-06+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	607
H53A(+39+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTG	608

[0341]

H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	609
h53AON1	CTGTTGCCTCCGGTTCTG	610
H53A(-12+10)	ATTCTTTCAACTAGAATAAAAG	611
huEx45.30.66	GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATA CCAAA	612
huEx45.30.71	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA AGATA	613
huEx45.30.79	GCCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAG TTCCT	614
huEx45.30.83	GTTTGCCGCTGCCCAATGCCATCCT GGAGT	615
huEx45.30.88	CAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCC ATCCT	616
huEx45.30.92	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA TGCCA	617
huEx45.30.96	TGTTCTGACAACAGTTTGCCGCTGC CCAAT	618
huEx45.30.99	CAATGTTCTGACAACAGTTTGCCGCT GCCC	619
huEx45.30.103	CATTCAATGTTCTGACAACAGTTTGC CGCT	620
huEx45.30.120	TATTTCTTCCCCAGTTGCATTCAATG TTCT	621
huEx45.30.127	GCTGAATTATTTCTTCCCCAGTTGCA TTCA	622
huEx45.30.132	GGATTGCTGAATTATTTCTTCCCCAG TTGC	623
huEx45.30.137	TTTGAGGATTGCTGAATTATTTCTTC CCCA	624
huEx53.30.84	GTACTTCATCCCACTGATTCTGAATT CTTT	625
huEx53.30.88	TCTTGTACTTCATCCCACTGATTCTG AATT	626
huEx53.30.91	TGTTCTTGTACTTCATCCCACTGATT CTGA	627
huEx53.30.103	CGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTC ATCC	628
huEx53.30.106	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA CTTCA	629
huEx53.30.109	TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTT GTACT	630
huEx53.30.112	TGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTT CTTGT	631
huEx53.30.115	AACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGT GTTCT	632

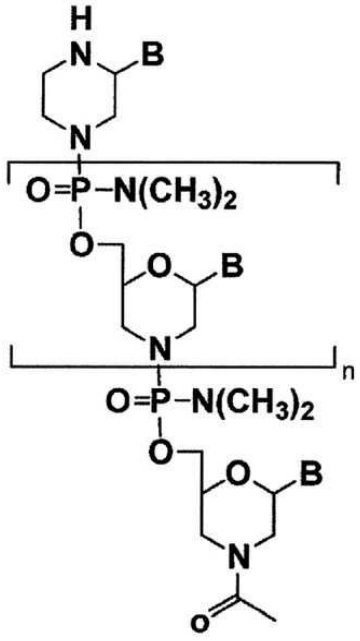
[0342]

huEx53.30.118	TTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGT	633
h50AON1		
h50AON2		
펩타이드 수송체 (NH_2에서 COOH로)*		
rTAT	RRRQRRKKRC	570
R_9F_2	RRRRRRRRRFFC	571
$(RRAhx)_4B$	RRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	572
$(RAhxR)_4AhxB$; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB	573
$(AhxRR)_4AhxB$	AhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	574
$(RAhx)_6B$	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	575
$(RAhx)_8B$	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	576
$(RAhxR)_5AhxB$	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB	577
$(RAhxRRBR)_2AhxB$; (CPO6062)	RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	578
MSP	ASSLNIA	579
세포 침투성 펩타이드 / 귀소 펩타이드 / PMO 컨주게이트 (NH_2에서 COOH로 및 5'에서 3'으로)		
MSP-PMO	ASSLNIA-XB-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	580 636
CP06062-MSP-PMO	RXRRBRRXRRBR-XB-ASSLNIA-X-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	581 636
MSP-CP06062-PMO	ASSLNIA-X-RXRRBRRXRRBR-B-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	582 636
CP06062-PMO	RXRRBRRXRRBR-XB-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	583 636

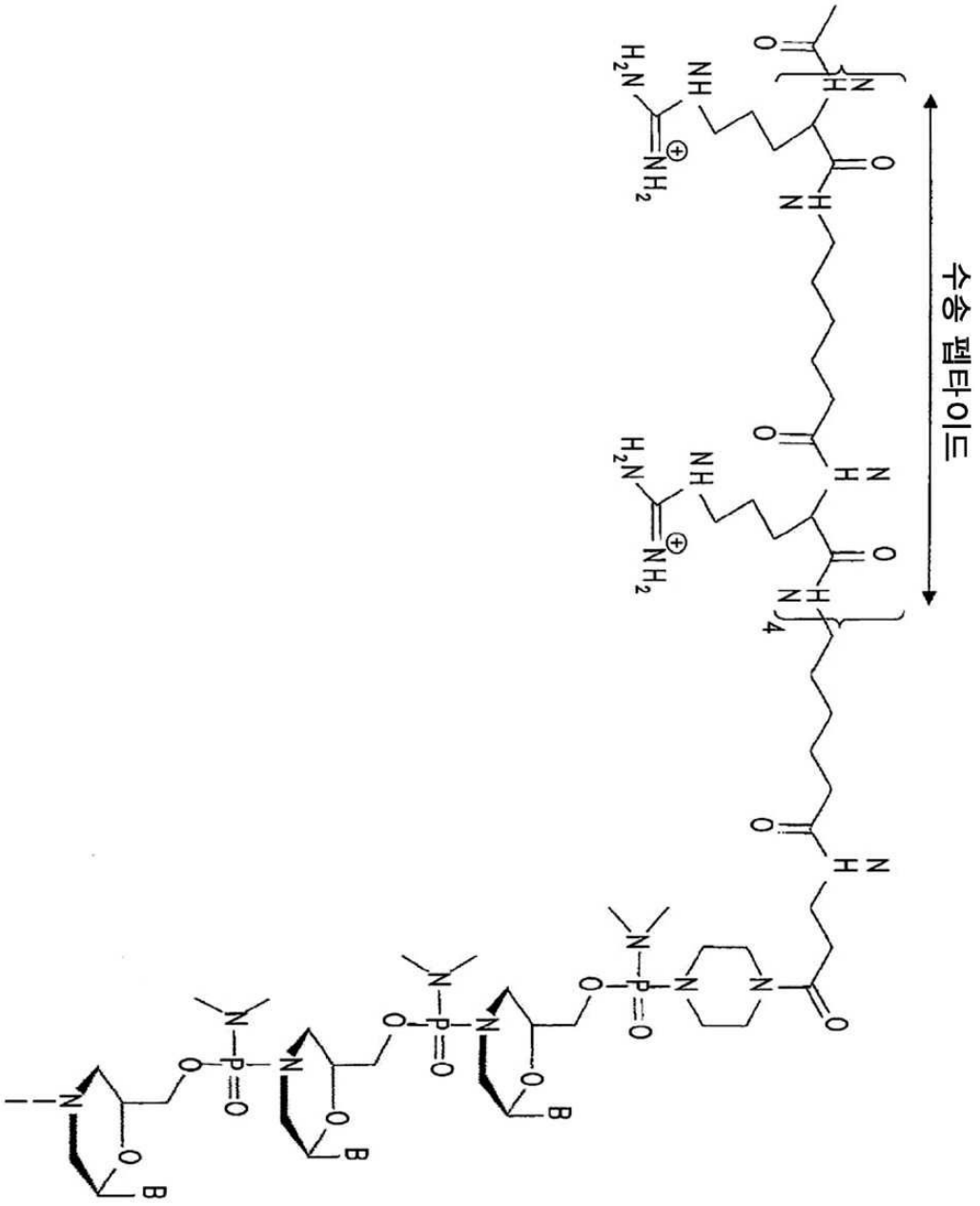
[0343] *Ahx는 6-아미노헥사노산이고, B는 베타-알라닌이다.

도면

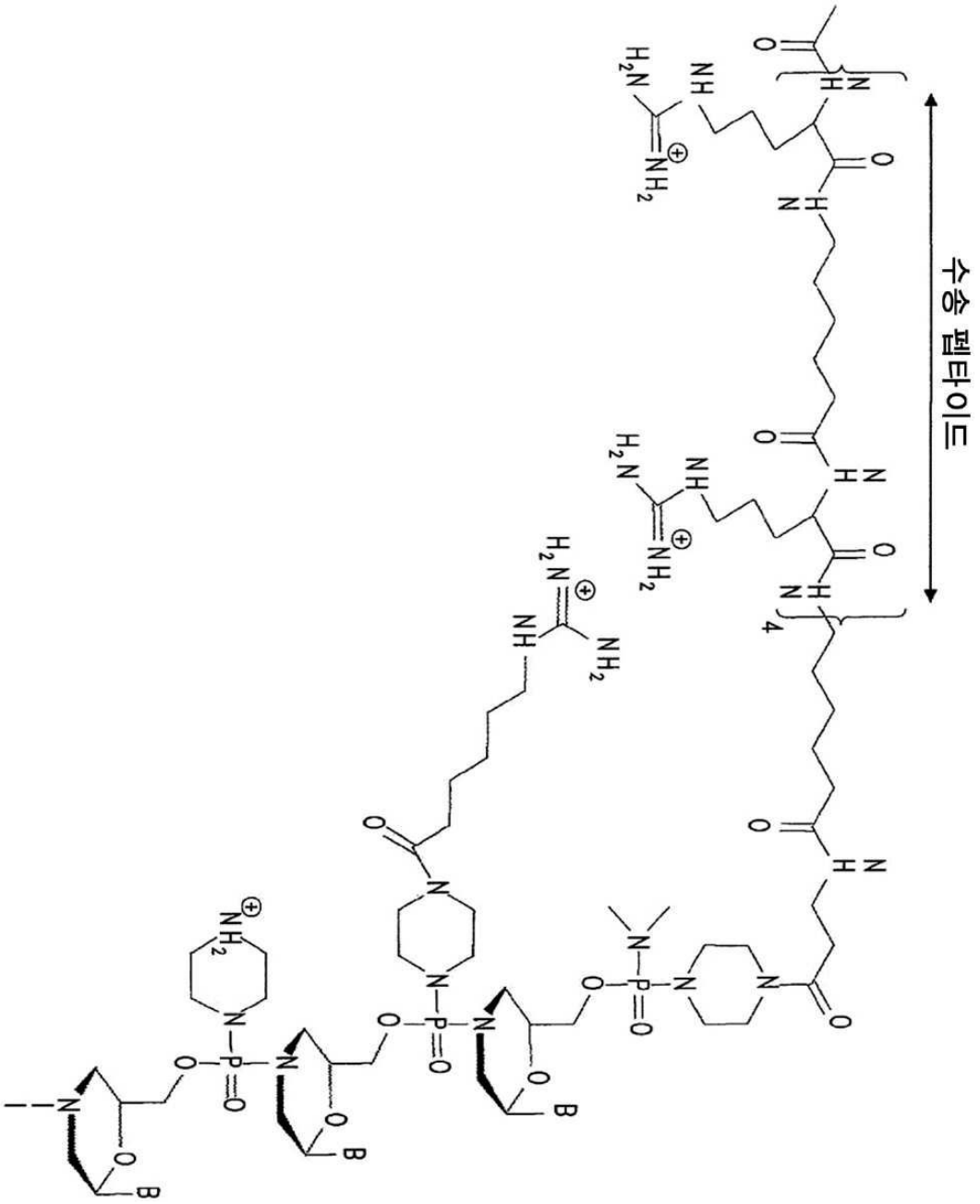
도면1a



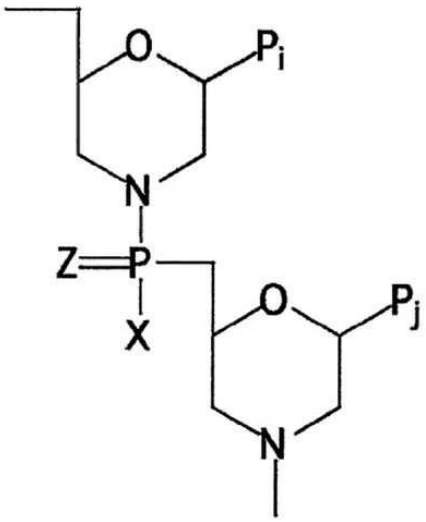
도면1b



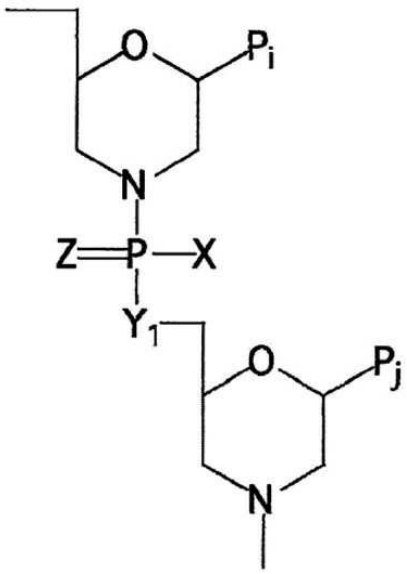
도면1c



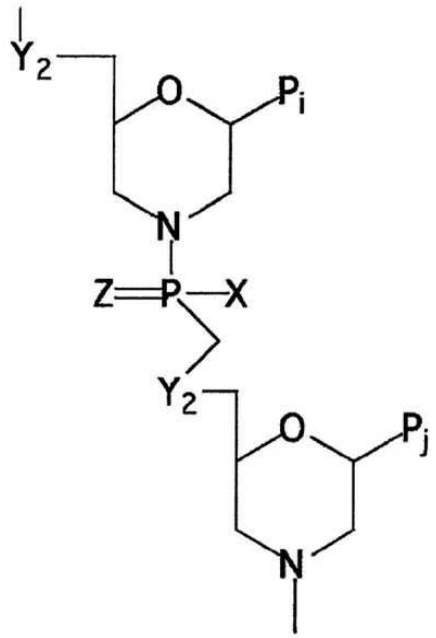
도면1d



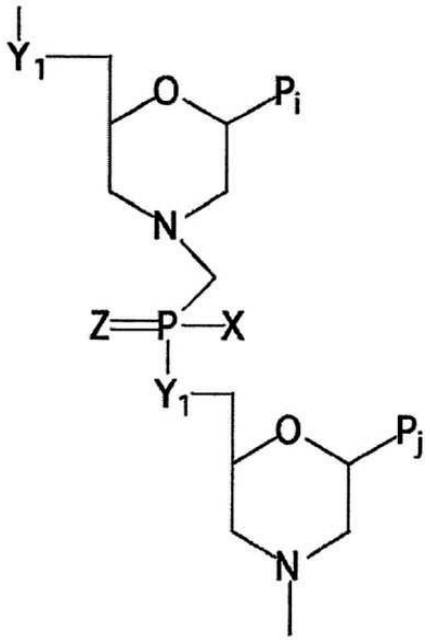
도면1e



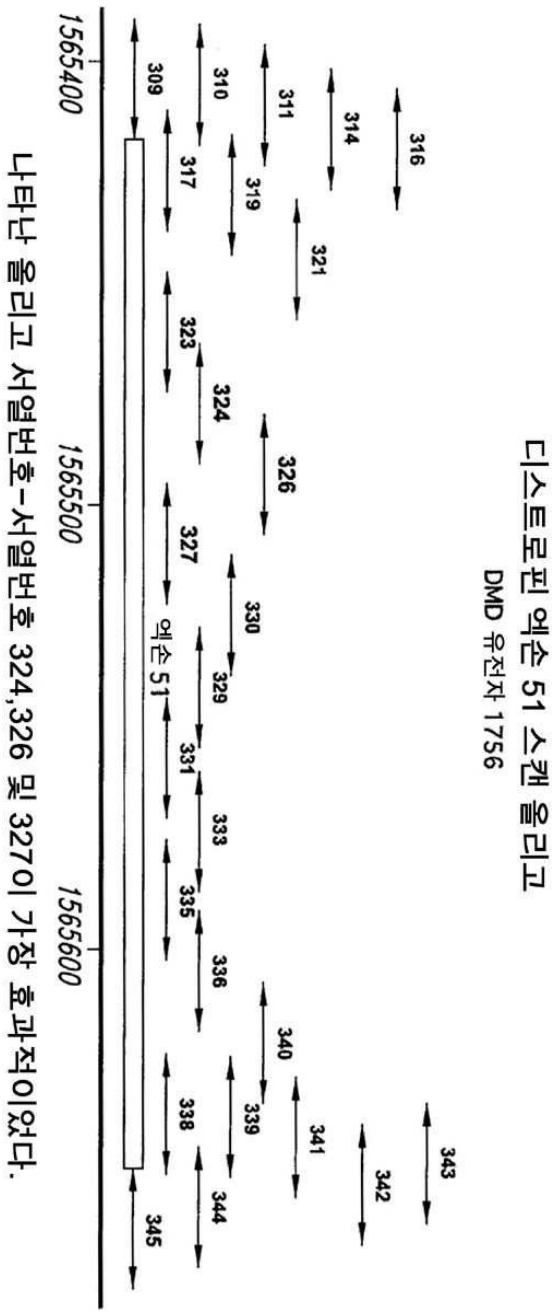
도면1f



도면1g



도면2a



나타난 올리고 서열번호-서열번호 324,326 및 327이 가장 효과적이었다.

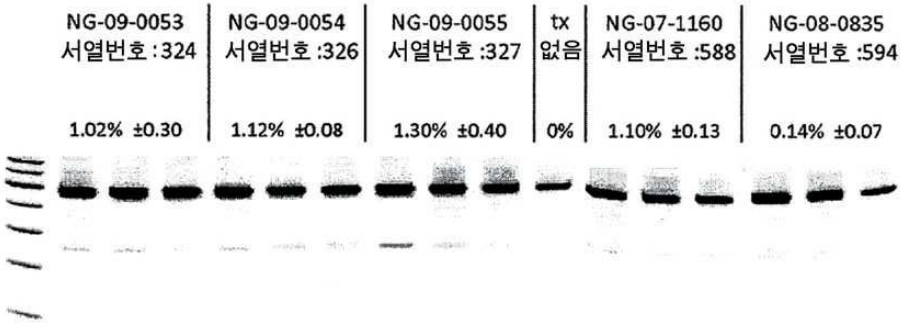
도면2b

엑손 51S.3 (RD)
고순도 합성, 3.0uM, RD 세포
올리고
명칭; 서열번호
랏트
NG-07-1160
AVI-5658; 588
09MY11-R(E4)
NG-09-0053
053; 324
09JNJ12-R(A4)
NG-09-0054
054; 326
09JNJ12-R(B4)
NG-09-0055
055; 327
09JNJ12-R(E4)
NG-09-0053 (서열번호:324)
4.65% ±1.89
NG-09-0054 (서열번호:326)
7.40% ±0.75
NG-09-0055 (서열번호:327)
9.89% ±1.37
NG-07-1160 (서열번호:588)
5.26% ±0.66

51MCS (근육세포 경쟁자 스크린)

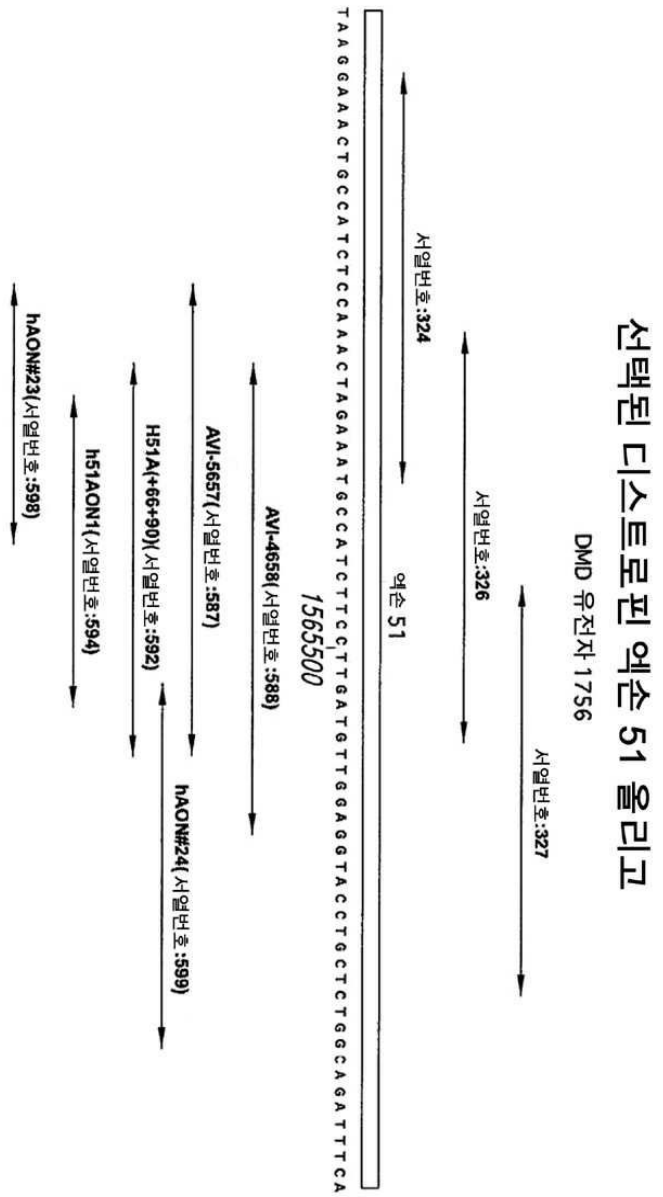
고순도 합성, 3.0uM, 인간 일차 골격근 세포

올리고	명칭; 서열번호	랏트
NG-07-1160	AVI-5658; 588	09MY11-R(E4)
NG-09-0053	053; 324	09JNJ12-R(A4)
NG-09-0054	054; 326	09JNJ12-R(B4)
NG-09-0055	055; 327	09JNJ12-R(E4)
NG-08-0835	h51AON1: 594	09JL07-R(A1)

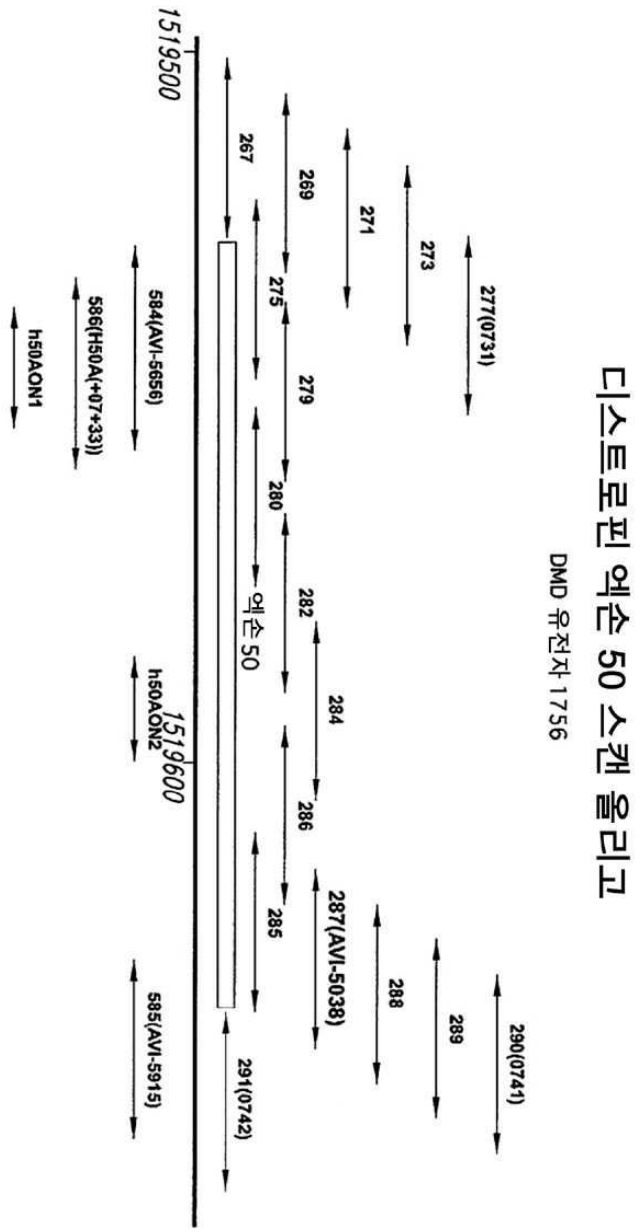


도면2c

도면2d

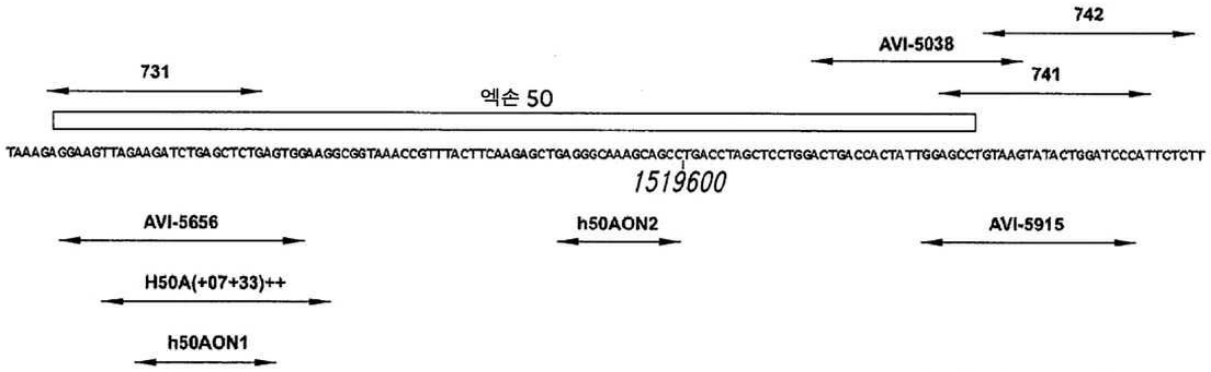

선택된 디스트로핀 엑손 51 올리고
DMD 유전자 1756
서열번호:327
서열번호:326
서열번호:324
엑손 51
TAAGGAAACTGCCATCTCCAAACTAGAAATGCCATCTTCCTTGATGTTGGAGGTACCTGCTCTGGCAGATTTCA
1565500
AVI-4658(서열번호:588)
AVI-5657(서열번호:587)
H51A(+66+90)(서열번호:592)
hAON#24(서열번호:599)
h51AON1(서열번호:594)
hAON#23(서열번호:598)

도면3a


디스트로핀 엑손 50 스캔 올리고
DMD 유전자 1756
15195000
15196000
267
269
271
273
275
277(0731)
279
280
282
284
286
285
287(AVI-5038)
288
289
290(0741)
291(0742)
엑손 50
584(AVI-5656)
585(AVI-5915)
586(H50A(+07+33))
h50AON1
h50AON2

선택된 디스트로핀 엑손 50 올리고

DMD 유전자 1756



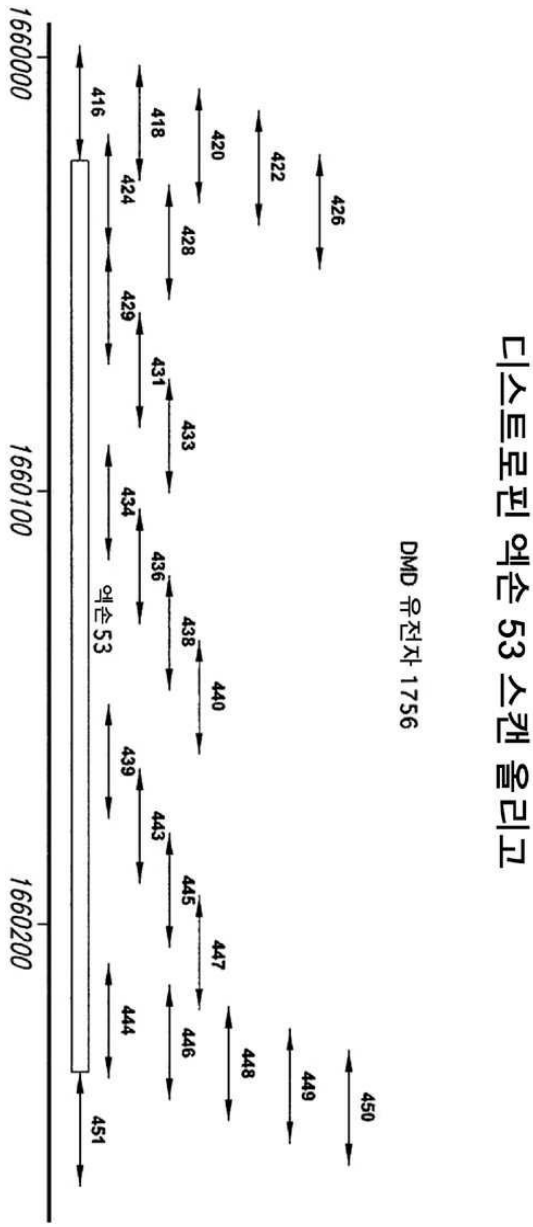
화합물	EC_{50} (마이크로몰)*
AVI-5656 (서열번호:584)	0.921
AVI-5915 (서열번호:585)	3.693
NG-08-0731 (서열번호:277)	1.741
AVI-5038 (서열번호:287)	0.966
NG-08-0741 (서열번호:290)	1.836
NG-08-0742 (서열번호:291)	2.402

*RD 세포에서 용량-범위 시험으로부터 결정됨

AVI #00453 - 02FEB2009

도면36

도면4a


디스트로핀 엑손 53 스캔 올리고
DMD 유전자 1756
엑손53
1660000
1660100
1660200
416
418
420
422
424
426
428
429
431
433
434
436
438
440
439
443
445
447
444
446
448
449
450
451

도면4b

선택된 디스트로핀 엑손 53 올리고
DMD 유전자 1756
428
429
431
엑손 53
611(H53A(-12+10))
608(H53A(+39+69))
609(H53A(+23+47))
610(h53AON1)
TTTCCTTTTATTCTAGTTGAAAGAATTCAGAATCAGTGGGATGAAGTACAAGAACACCTTCAGAACCGGAGGCAACACGTTGAATGAAATGTTAAAGGATTCAAC
1660100

도면4c

엑손 53 DR.2
고순도 합성, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD 세포
NG-0746 09AU11-R(E5) (서열번호: 422)
1.0uM
2.0uM
3.0uM
5.0uM
10.0uM
0
0% ±0
0% ±0
0% ±0
0.54% ±0.54
3.53% ±0.32
0%

도면4d

엑손 53 DR.2
고순도 합성, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD 세포
NG-0749 09AU11-R(A7) (서열번호 : 428)
1.0uM
2.0uM
3.0uM
5.0uM
10.0uM
0
1.05% ±0.43
1.72% ±0.24
2.40% ±0.70
2.62% ±0.15
4.63% ±0.73
0%

도면4e

엑손 53 DR.2
고순도 합성, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD 세포
NG-0750 09AU11-R(C7) (서열번호 : 429)
1.0uM
2.0uM
3.0uM
5.0uM
10.0uM
0
4.83% ±0.65
10.44% ±0.45
17.28% ±1.38
23.29% ±1.10
57.67% ±4.18
0%

도면4f

엑손 53 DR.2
고순도 합성, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD 세포
NG-0751 09AU11-J(E7) (서열번호 : 431)
1.0uM
2.0uM
3.0uM
5.0uM
10.0uM
0
0.79% ±0.12
1.98% ±0.43
2.74% ±0.38
4.18% ±0.39
13.89% ±0.54
0%

엑손 53 RD 세포 용량-범위 요약

스키핑된 엑손 퍼센트

처리 (uM)	746 (서열번호:422)	749 (서열번호:428)	750 (서열번호:429)	751 (서열번호:431)
1.0	0.00	1.05	4.83	0.79
2.0	0.00	1.72	10.44	1.98
3.0	0.00	2.40	17.28	2.74
5.0	0.54	2.62	23.29	4.18
10	3.53	4.63	57.67	13.89
EC_{50} (uM)	NA	72.2	9.3	25.3

도면4g

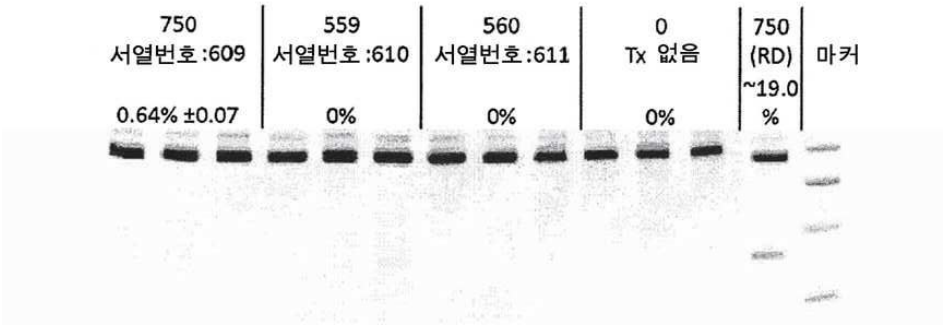
도면4h

엑손 53 CS (경쟁자 스크린)
고순도 합성, 3.0uM, RD 세포
올리고
NG-09-0490
NG-08-0750 (W)
NG-09-0559
NG-09-0560
NG-08-0750
명칭; 서열번호
H53A(+39+69); 608
H53A(+23+47); 609
h53AON1; 610
H53A(-12+10); 611
008; 429
랏트
09AU18-J(A1)
09-AU18-J(B1)
09AU18-J(C1)
09AU18-J(D1)
09AU11-R(C7)
490
서열번호:608
5.21% ±1.39
750 (W)
서열번호:609
20.09% ±1.00
750
서열번호:429
정량되지 않음
0
559
서열번호:610
1.03% ±0.10
560
서열번호:611
1.49% ±0.21
750
서열번호:429
16.49% ±1.35
0
0% ±0

엑손 53 MCS (근육세포 경쟁자 스크린)

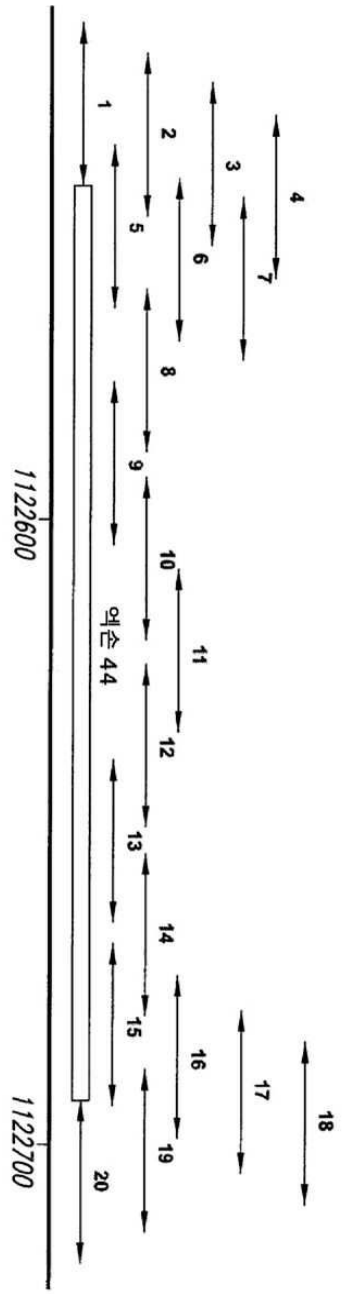
고순도 합성, 3.0uM, 인간 일차 골격근 세포

올리고	명칭; 서열번호	랏트
NG-09-0490	H53A(+39+69); 608	09AU18-J(A1)
NG-08-0750 (W)	H53A(+23+47); 609	09-AU18-J(B1)
NG-09-0559	h53AON1; 610	09AU18-J(C1)
NG-09-0560	H53A(-12+10); 611	09AU18-J(D1)
NG-08-0750	008; 429	09AU11-R(C7)

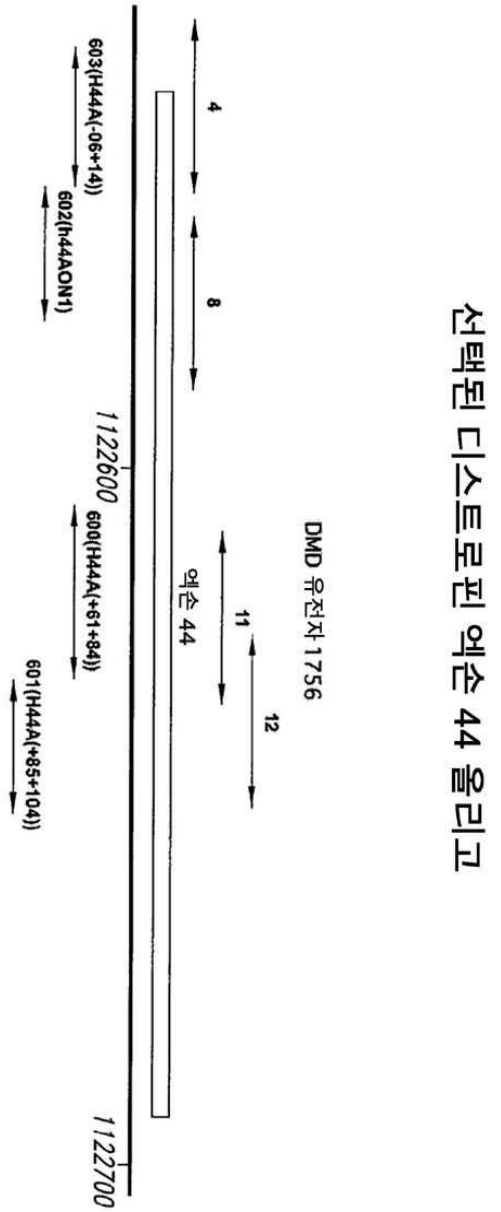


도면4i

도면5a


디스트로핀 엑손 44 스캔 올리고
DMD 유전자 1756
엑손 44
1122600
1122700
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

도면5b


선택된 디스트로핀 엑손 44 올리고
DMD 유전자 1756
4
8
11
12
엑손 44
603(H44A(-06+14))
602(h44AON1)
600(H44A(+61+84))
601(H44A(+85+104))
1122600
1122700

도면5c

엑손 44 DR.2 (용량-범위)
고순도 합성, (0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0uM) RD 세포
NG-08-0792 09AU11-J(A2) (서열번호 : 4)
0.1uM
0.3uM
1.0uM
3.0uM
10.0uM
0
3.14% ±0.86
4.66% ±0.85
7.56% ±0.54
21.64% ±3.03
64.94% ±2.02
0%

도면5d

엑손 44 DR.2
고순도 합성, (0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0uM) RD 세포
NG-08-0796 09AU11-J(B2) (서열번호 : 8)
0.1uM
0.3uM
1.0uM
3.0uM
10.0uM
0
4.14% ±0.72
6.69% ±0.95
17.41% ±0.27
39.74% ±5.00
97.39% ±0.12
0%

도면5e

엑손 44 DR.2
고순도 합성, (0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0uM) RD 세포
NG-08-0799 09AU11-J(C2) (시열번호 : 11)
0.1uM
0.3uM
1.0uM
3.0uM
10.0uM
0
3.00% ±0.65
8.41% ±0.98
21.48% ±2.44
32.92% ±1.47
88.47% ±2.73
0%

도면5f

엑손 44 DR.2
고순도 합성, (0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0uM) RD 세포
NG-08-0800 09AU11-J(D2) (서열번호 : 12)
0.1uM
0.3uM
1.0uM
3.0uM
10.0uM
0
7.49% ±1.10
16.01% ±2.77
18.81% ±1.13
46.71% ±0.85
96.52% ±0.28
0%

도면5g

엑손 44 DR.2
고순도 합성, (0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0uM) RD 세포
NG-0801 09AU11-J(E2) (서열번호 : 13)
0.1uM
0.3uM
1.0uM
3.0uM
10.0uM
0
2.10% ±0.28
4.06% ±0.81
9.01% ±0.56
22.50% ±1.94
69.38% ±5.85
0%

도면5h

엑손 44 RD 세포 용량-범위 요약

스키핑된 엑손 퍼센트

처리 (uM)	792 (서열번호:4)	796 (서열번호:8)	799 (서열번호:11)	800 (서열번호:12)	801 (서열번호:13)
0.1	3.14	4.14	3.00	7.49	2.10
0.3	4.66	6.69	8.41	16.01	4.06
1	7.56	17.41	21.48	18.81	9.01
3	21.64	39.74	32.92	46.71	22.50
10	64.94	97.39	88.47	96.52	69.38
EC_{50} (uM)	7.166	3.024	3.594	2.795	6.277

엑손 44 CS (경쟁자 스크린)

고순도 합성, 3.0uM, RD 세포

올리고	명칭; 서열번호	랏트
NG-09-0561	H44A(+61+84); 600	09AU18-J(E1)
NG-09-0562	H44A(+85+104); 601	09AU18-J(F1)
NG-09-0563	h44AON1; 602	09AU18-J(A2)
NG-09-0564	H44A(-06+14); 603	09AU18-J(B2)
NG-08-0800	012; 12	09AU11-J(D2)

561 서열번호: 600 — 44.4% ±4.22

562 서열번호: 601 — 20.4% ±0.84

800 서열번호: 12 — 정량되지 않음

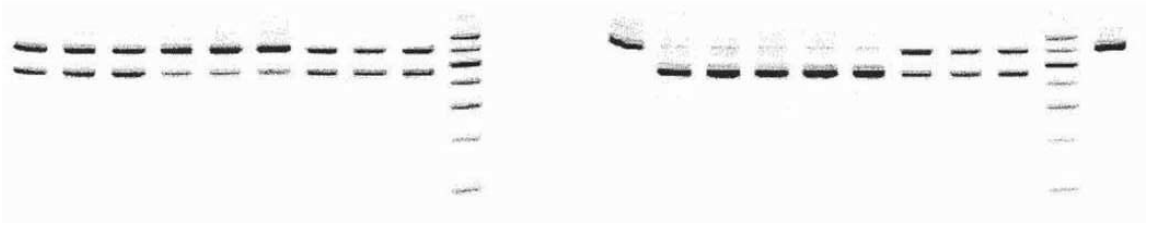
563 서열번호: 602 — 94.0% ±0.32

564 서열번호: 603 — 97.1% ±0.07

800 서열번호: 12 — 47.5% ±2.05

MW

0 — 0%



도면5

도면5j

엑손 44 MCS (근육세포 경쟁자 스크린)

고순도 합성, 3.0uM, 인간 일차 골격근 세포

올리고	명칭; 서열번호	랏트
NG-09-0562	H44A(+85+104); 601	09AU18-J(F1)
NG-09-0563	h44AON1; 602	09AU18-J(A2)
NG-09-0564	H44A(-06+14); 603	09AU18-J(B2)
NG-08-0800	012; 12	09AU11-J(D2)

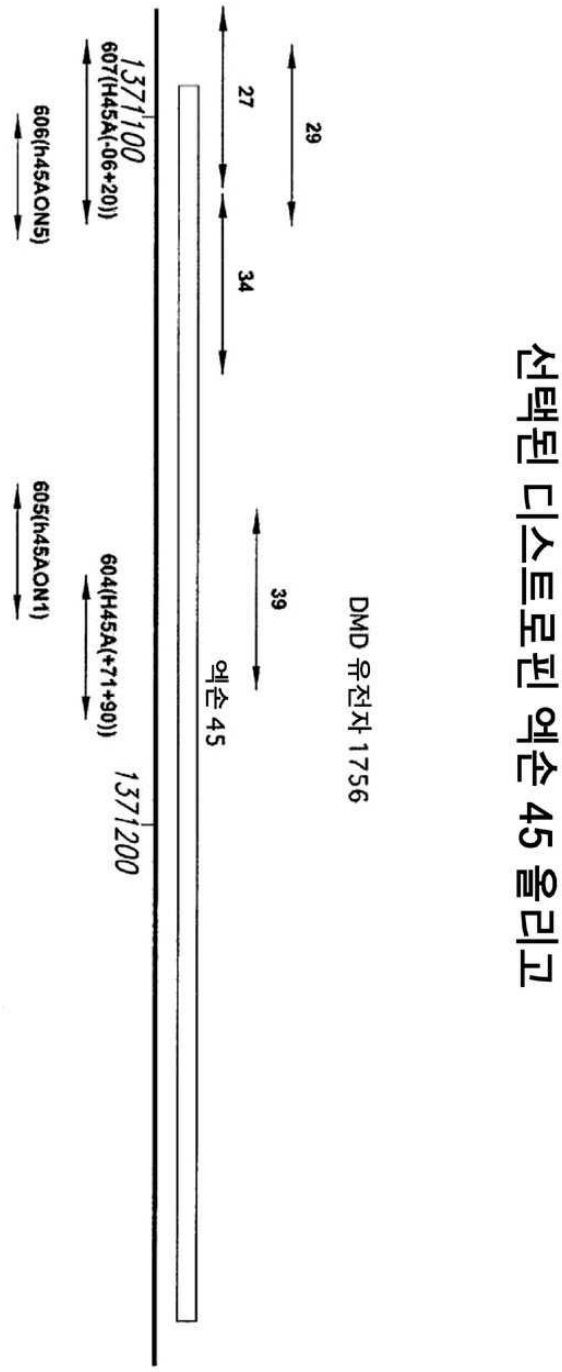
스크린에 포함시키는데 부적합한 NG-09-0564

800	561	562	563	800 정량되지 않음	tx 없음	800 (RD)
8.86% ±0.57	2.13% ±0.75	0%	6.42% ±0.54		0%	47.53% ±2.05

도면6a

디스트로핀 엑손 45 스캔 올리고
DMD 유전자1756
엑손 45
1371100
1371200
1371300
21
23
25
27
29
31
32
34
35
37
39
41
43
45
46
47
48
49
50
51
52
53

도면6b


선택된 디스트로핀 엑손 45 올리고
DMD 유전자 1756
29
27
34
39
엑손 45
1371100
607(H45A(-06+20))
606(h45AON5)
604(H45A(+71+90))
605(h45AON1)
1371200

도면6c

엑손 45 DR.2

고순도 합성, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD 세포

NG-0770 09AU11-J(F2) (서열번호 : 27)

도면6d

엑손 45 DR.2

고순도 합성, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD 세포

NG-0771 09AU11-J(A4) (서열번호 : 29)

도면6e

엑손 45 DR.2
고순도 합성, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD 세포
NG-0774 09AU11-J(서열번호 : 34)
1.0uM
2.0uM
3.0uM
5.0uM
10.0uM
0
3.05% ±1.21
13.33% ±0.99
31.12% ±3.36
79.20% ±2.32
97.68% ±0.32
0%

도면6f

엑손 45 DR.2
고순도 합성, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD 세포
NG-0777 09AU11-J(C4) (서열번호 : 39)
1.0uM
2.0uM
3.0uM
5.0uM
10.0uM
0
0% ±0
0% ±0
0.55% ±0.04
1.63% ±0.07
7.86% ±0.53
0%

도면6g

엑손 45 DR.2
고순도 합성, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD 세포
(음성 대조군)
NG-0782 09AU11-J(서열번호 : 49)
1.0uM
2.0uM
3.0uM
5.0uM
10.0uM
0
0% ±0
0% ±0
0% ±0
0.78% ±0.21
2.11% ±0.10
0%

도면6h

엑손 45 RD 세포 용량-범위 요약

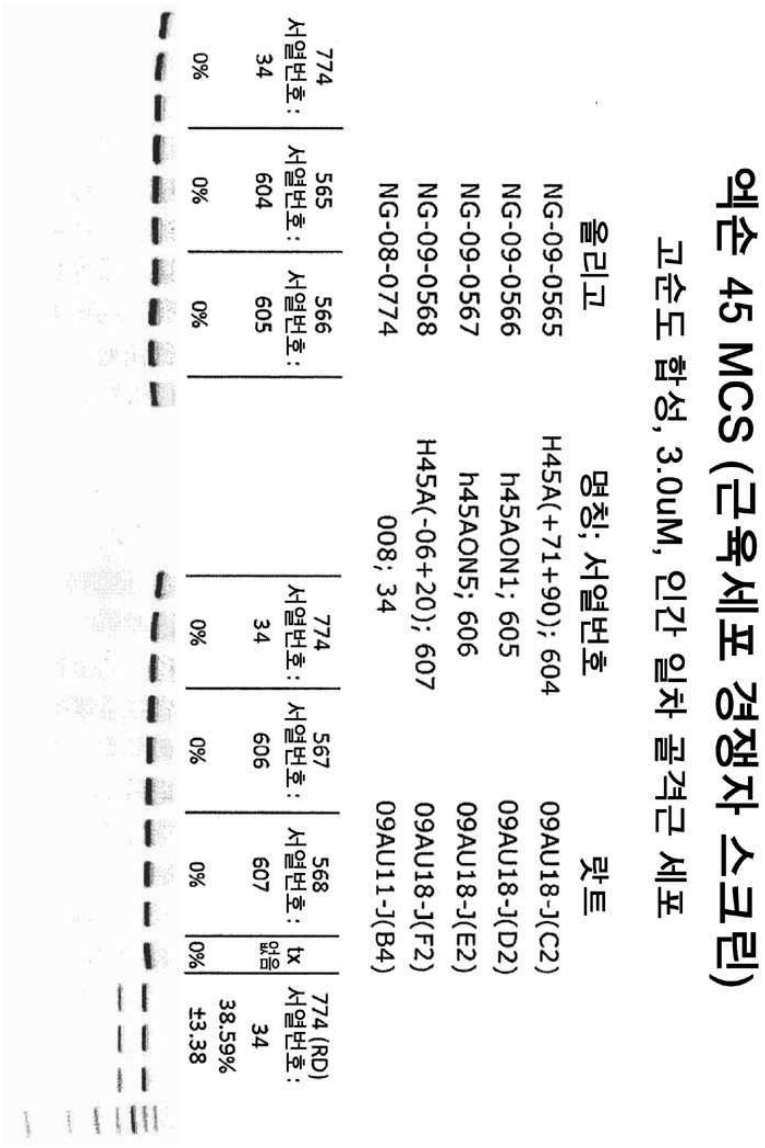
스키핑된 엑손 퍼센트

처리 (uM)	770 (서열번호:27)	771 (서열번호:29)	774 (서열번호:34)	777 (서열번호:39)	782 (서열번호:49)
1.0	0.00	0.53	3.05	0.00	0.00
2.0	0.43	1.99	13.33	0.00	0.00
3.0	0.60	4.91	31.12	0.55	0.00
5.0	1.15	14.25	79.20	1.63	0.78
10	4.17	84.37	97.68	7.86	2.11
EC_{50} (uM)	54.37	7.25	3.69	NA	NA

도면6i

엑손 45 CS (경쟁자 스크린)
고순도 합성, 3.0uM, RD 세포
올리고
명칭; 서열번호
랏트
NG-09-0565
H45A(+71+90); 604
09AU18-J(C2)
NG-09-0566
h45AON1; 605
09AU18-J(D2)
NG-09-0567
h45AON5; 606
09AU18-J(E2)
NG-09-0568
H45A(-06+20); 607
09AU18-J(F2)
NG-08-0774
008; 34
09AU11-J(B4)
565
서열번호:604
0.00% ±0.00
566
서열번호:605
0.00% ±0.00
774
서열번호:34
정량되지 않음
567
서열번호:606
0%
±0
568
서열번호:607
1.19% ±0.10
774
서열번호:34
4.34% ±0.88
38.59% ±3.38

도면6j



서 열 목 록

<110> AVI BioPharma, Inc.

<120> MULTIPLE EXON SKIPPING COMPOSITIONS FOR DMD

<130> IPA110252

<150> US 61/108,416

<151> 2008-10-24

<160> 651

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 1

ctgcaggtaa aagcatatgg atcaa 25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 2

atcgcctgca ggtaaaagca tatgg 25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 3

gtcaaatcgc ctgcaggtaa aagca 25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 4

gatctgtcaa atcgcctgca ggtaa 25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 5

caacagatct gtcaaatcgc ctgca 25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 6

tttctcaaca gatctgtcaa atcgc 25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 7

ccatttctca acagatctgt caaat 25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 8

ataatgaaaa cgccgccatt tctca 25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 9

aaatatcttt atatcataat gaaaa 25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 10

tgttagccac tgattaaata tcttt 25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 11

aaactgttca gcttctgtta gccac 25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 12

ttgtgtcttt ctgagaaact gttca 25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 13

ccaattctca ggaatttgtg tcttt 25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 14

gtatttagca tgttcccaat tctca 25

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 15

cttaagatac catttgtatt tagca 25

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 16

cttaccttaa gataccattt gtatt 25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 17

aaagacttac cttaagatac cattt 25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 18

aaatcaaaga cttaccttaa gatac 25

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 19

aaaacaaatc aaagacttac cttaa 25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 20

tcgaaaaaac aaatcaaaga cttac 25

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 21

ctgtaagata ccaaaaaggc aaaac 25

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 22

cctgtaagat accaaaaagg caaaa 25

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 23

agttcctgta agataccaaa aaggc 25

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 24

gagttcctgt aagataccaa aaagg 25

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 25

cctggagttc ctgtaagata ccaaa 25

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 26

tcctggagtt cctgtaagat accaa 25

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 27

gccatcctgg agttcctgta agata 25

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 28

tgccatcctg gagttcctgt aagat 25

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 29

ccaatgccat cctggagttc ctgta 25

<210> 30

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 30

cccaatgcca tcctggagtt cctgt 25

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 31

gctgcccaat gccatcctgg agttc 25

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 32

cgctgcccaa tgccatcctg gagtt 25

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 33

aacagtttgc cgctgcccaa tgcca 25

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 34

ctgacaacag tttgccgctg cccaa 25

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 35

gttgcattca atgttctgac aacag 25

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 36

gctgaattat ttcttcccca gttgc 25

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 37

attatttctt ccccagttgc attca 25

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 38

ggcatctgtt tttgaggatt gctga 25

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 39

tttgaggatt gctgaattat ttctt 25

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 40

aatttttcct gtagaatact ggcat 25

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 41

atactggcat ctgtttttga ggatt 25

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 42

accgcagatt caggcttccc aattt 25

<210> 43

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 43

aatttttcct gtagaatact ggcat 25

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 44

ctgtttgcag acctcctgcc accgc 25

<210> 45

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 45

agattcaggc ttcccaattt ttcct 25

<210> 46

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 46

ctctttttc tgtctgacag ctgtt 25

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 47

acctcctgcc accgcagatt caggc 25

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 48

cctacctctt ttttctgtct gacag 25

<210> 49

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 49

gacagctgtt tgcagacctc ctgcc 25

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 50

gtcgccctac ctctttttc tgtct 25

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 51

gatctgtcgc cctacctctt ttttc 25

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 52

tattagatct gtcgccctac ctctt 25

<210> 53

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 53

attcctatta gatctgtcgc cctac 25

<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 54
agataccaaa aaggcaaaac 20

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 55
aagataccaa aaaggcaaaa 20

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 56
cctgtaagat accaaaaagg 20

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 57

gagttcctgt aagataccaa 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 58

tcctggagtt cctgtaagat 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 59

tgccatcctg gagttcctgt 20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 60

cccaatgcca tcctggagtt 20

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 61

cgctgcccaa tgccatcctg 20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 62

ctgacaacag tttgccgctg 20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 63

gttgcattca atgttctgac 20

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 64

attatttctt ccccagttgc 20

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 65

tttgaggatt gctgaattat 20

<210> 66
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 66
atactggcat ctgtttttga 20

<210> 67
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 67
aatttttcct gtagaatact 20

<210> 68
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 68
agattcaggc ttcccaattt 20

<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 69

acctcctgcc accgcagatt 20

<210> 70
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 70
gacagctgtt tgcagacctc 20

<210> 71
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 71
ctctttttttc tgtctgacag 20

<210> 72
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 72
cctacctctt ttttctgtct 20

<210> 73
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 73

gtcgccctac ctctttttc 20

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 74

gatctgtcgc cctacctctt 20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 75

tattagatct gtcgccctac 20

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 76

attcctatta gatctgtcgc 20

<210> 77

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 77

gggggatttg agaaaataaa attac 25

<210> 78
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 78
atttgagaaa ataaaattac cttga 25

<210> 79
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 79
ctagcctgga gaaagaagaa taaaa 25

<210> 80
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 80
agaaaataaa attaccttga cttgc 25

<210> 81
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 81

ttcttctagc ctggagaaag aagaa 25

<210> 82

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 82

ataaaattac cttgacttgc tcaag 25

<210> 83

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 83

ttttgttctt ctagcctgga gaaag 25

<210> 84

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 84

attaccttga cttgctcaag ctttt 25

<210> 85

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 85

tattcttttg ttcttctagc ctgga 25

<210> 86
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 86
cttgacttgc tcaagctttt ctttt 25

<210> 87
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 87
caagatattc ttttgttctt ctagc 25

<210> 88
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 88
cttttagttg ctgctctttt ccagg 25

<210> 89
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 89

ccaggttcaa gtgggatact agcaa 25

<210> 90
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 90
atctctttga aattctgaca agata 25

<210> 91
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 91
agcaatgtta tctgcttcct ccaac 25

<210> 92
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 92
aacaaattca tttaaatctc tttga 25

<210> 93
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 93

ccaaccataa aacaaattca tttaa 25

<210> 94
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 94
ttcctccaac cataaaacaa attca 25

<210> 95
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 95
tttaaatctc tttgaaattc tgaca 25

<210> 96
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 96
tgacaagata ttcttttgtt cttct 25

<210> 97
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 97

ttcaagtggg atactagcaa tgtta 25

<210> 98

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 98

agatattctt ttgttcttct agcct 25

<210> 99

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 99

ctgctctttt ccaggttcaa gtggg 25

<210> 100

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 100

ttcttttgtt cttctagcct ggaga 25

<210> 101

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 101

cttttctttt agttgctgct ctttt 25

<210> 102

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 102

ttgttcttct agcctggaga aagaa 25

<210> 103

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 103

cttctagcct ggagaaagaa gaata 25

<210> 104

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 104

agcctggaga aagaagaata aaatt 25

<210> 105

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 105

ctggagaaag aagaataaaa ttgtt 25

<210> 106
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 106
gaaagaagaa taaaattgtt 20

<210> 107
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 107
ggagaaagaa gaataaaatt 20

<210> 108
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 108
agcctggaga aagaagaata 20

<210> 109
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 109

cttctagcct ggagaaagaa 20

<210> 110
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 110
ttgttcttct agcctggaga 20

<210> 111
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 111
ttcttttgtt cttctagcct 20

<210> 112
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 112
tgacaagata ttcttttgtt 20

<210> 113
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 113

atctctttga aattctgaca 20

<210> 114
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 114
aacaaattca tttaaatctc 20

<210> 115
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 115
ttcctccaac cataaaacaa 20

<210> 116
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 116
agcaatgtta tctgcttcct 20

<210> 117
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 117

ttcaagtggg atactagcaa 20

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 118

ctgctctttt ccaggttcaa 20

<210> 119

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 119

cttttctttt agttgctgct 20

<210> 120

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 120

cttgacttgc tcaagctttt 20

<210> 121

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 121

attaccttga cttgctcaag 20

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 122

ataaaattac cttgacttgc 20

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 123

agaaaataaa attaccttga 20

<210> 124

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 124

atttgagaaa ataaaattac 20

<210> 125

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 125

gggggatttg agaaaataaa 20

<210> 126

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 126

ctgaaacaga caaatgcaac aacgt 25

<210> 127

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 127

agtaactgaa acagacaaat gcaac 25

<210> 128

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 128

ccaccagtaa ctgaaacaga caaat 25

<210> 129

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 129

ctcttccacc agtaactgaa acaga 25

<210> 130
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 130
ggcaactctt ccaccagtaa ctgaa 25

<210> 131
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 131
gcaggggcaa ctcttccacc agtaa 25

<210> 132
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 132
ctggcgcagg ggcaactctt ccacc 25

<210> 133
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 133

tttaattgtt tgagaattcc ctggc 25

<210> 134

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 134

ttgtttgaga attccctggc gcagg 25

<210> 135

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 135

gcacgggtcc tccagtttca tttaa 25

<210> 136

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 136

tccagtttca tttaattgtt tgaga 25

<210> 137

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 137

gcttatggga gcacttacaa gcacg 25

<210> 138

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 138

tacaagcacg ggtcctccag tttca 25

<210> 139

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 139

agtttatctt gctcttctgg gctta 25

<210> 140

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 140

tctgcttgag cttattttca agttt 25

<210> 141

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 141

atcttgctct tctgggctta tggga 25

<210> 142

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 142

ctttatccac tggagatttg tctgc 25

<210> 143

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 143

cttattttca agtttatctt gctct 25

<210> 144

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 144

ctaaccttta tccactggag atttg 25

<210> 145

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 145

atttgtctgc ttgagcttat tttca 25

<210> 146
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 146
aatgtctaac ctttatccac tggag 25

<210> 147
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 147
tggttaatgt ctaaccttta tccac 25

<210> 148
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 148
agagatggtt aatgtctaac cttta 25

<210> 149
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 149

acggaagaga tggttaatgt ctaac 25

<210> 150
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 150
acagacaaat gcaacaacgt 20

<210> 151
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 151
ctgaaacaga caaatgcaac 20

<210> 152
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 152
agtaactgaa acagacaaat 20

<210> 153
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 153

ccaccagtaa ctgaaacaga 20

<210> 154

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 154

ctcttccacc agtaactgaa 20

<210> 155

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 155

ggcaactctt ccaccagtaa 20

<210> 156

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 156

ctggcgcagg ggcaactctt 20

<210> 157

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 157

ttgtttgaga attccctggc 20

<210> 158

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 158

tccagtttca tttaattgtt 20

<210> 159

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 159

tacaagcacg ggtcctccag 20

<210> 160

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 160

gcttatggga gcacttacaa 20

<210> 161

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 161

atcttgctct tctgggctta 20

<210> 162
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 162
cttattttca agtttatctt 20

<210> 163
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 163
atttgtctgc ttgagcttat 20

<210> 164
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 164
ctttatccac tggagatttg 20

<210> 165
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 165

ctaaccttta tccactggag 20

<210> 166

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 166

aatgtctaac ctttatccac 20

<210> 167

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 167

tggttaatgt ctaaccttta 20

<210> 168

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 168

agagatggtt aatgtctaac 20

<210> 169

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 169

acggaagaga tggttaatgt 20

<210> 170
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 170
ctgaaaggaa aatacatttt aaaaa 25

<210> 171
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 171
cctgaaagga aaatacattt taaaa 25

<210> 172
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 172
gaaacctgaa aggaaaatac atttt 25

<210> 173
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 173

ggaaacctga aaggaaaata cattt 25

<210> 174

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 174

ctctggaaac ctgaaaggaa aatac 25

<210> 175

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 175

gctctggaaa cctgaaagga aaata 25

<210> 176

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 176

gtaaagctct ggaaacctga aagga 25

<210> 177

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 177

tcaggtaaag ctctggaaac ctgaa 25

<210> 178

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 178

ctcaggtaaa gctctggaaa cctga 25

<210> 179

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 179

gtttctcagg taaagctctg gaaac 25

<210> 180

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 180

tgtttctcag gtaaagctct ggaaa 25

<210> 181

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 181

aatttctcct tgtttctcag gtaaa 25

<210> 182

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 182

tttgagcttc aatttctcct tgttt 25

<210> 183

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 183

ttttatttga gcttcaattt ctcct 25

<210> 184

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 184

aagctgccca aggtctttta tttga 25

<210> 185

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 185

aggtcttcaa gctttttttc aagct 25

<210> 186

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 186

ttcaagcttt ttttcaagct gccca 25

<210> 187

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 187

gatgatttaa ctgctcttca aggtc 25

<210> 188

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 188

ctgctcttca aggtcttcaa gcttt 25

<210> 189

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 189

aggagataac cacagcagca gatga 25

<210> 190
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 190
cagcagatga tttaactgct cttca 25

<210> 191
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 191
atttccaact gattcctaat aggag 25

<210> 192
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 192
cttggtttgg ttggttataa atttc 25

<210> 193
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 193

caactgattc ctaataggag ataac 25

<210> 194

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 194

cttaacgtca aatggtcctt cttgg 25

<210> 195

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 195

ttggttataa atttccaact gattc 25

<210> 196

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 196

cctaccttaa cgtcaaatgg tcctt 25

<210> 197

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 197

tccttcttgg tttggttggt tataa 25

<210> 198

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 198

agttccctac cttaacgtca aatgg 25

<210> 199

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 199

caaaaagttc cctaccttaa cgtca 25

<210> 200

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 200

taaagcaaaa agttccctac cttaa 25

<210> 201

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 201

atatttaaag caaaaagttc cctac 25

<210> 202

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 202

aggaaaatac attttaaaaa 20

<210> 203

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 203

aaggaaaata cattttaaaa 20

<210> 204

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 204

cctgaaagga aaatacattt 20

<210> 205

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 205

ggaaacctga aaggaaaata 20

<210> 206

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 206

gctctggaaa cctgaaagga 20

<210> 207

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 207

gtaaagctct ggaaacctga 20

<210> 208

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 208

ctcaggtaaa gctctggaaa 20

<210> 209

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 209

aatttctcct tgtttctcag 20

<210> 210
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 210
ttttatttga gcttcaattt 20

<210> 211
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 211
aagctgccca aggtctttta 20

<210> 212
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 212
ttcaagcttt ttttcaagct 20

<210> 213
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 213

ctgctcttca aggtcttcaa 20

<210> 214
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 214
cagcagatga tttaactgct 20

<210> 215
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 215
aggagataac cacagcagca 20

<210> 216
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 216
caactgattc ctaataggag 20

<210> 217
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 217

ttggttataa atttccaact 20

<210> 218

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 218

tccttcttgg tttggttggt 20

<210> 219

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 219

cttaacgtca aatggtcctt 20

<210> 220

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 220

cctaccttaa cgtcaaatgg 20

<210> 221

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 221

agttccctac cttaacgtca 20

<210> 222
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 222
caaaaagttc cctaccttaa 20

<210> 223
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 223
taaagcaaaa agttccctac 20

<210> 224
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 224
atatttaaag caaaaagttc 20

<210> 225
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 225

ctggggaaaa gaacccatat agtgc 25

<210> 226

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 226

tcctggggaa aagaacccat atagt 25

<210> 227

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 227

gtttcctggg gaaaagaacc catat 25

<210> 228

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 228

cagtttcctg gggaaaagaa cccat 25

<210> 229

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 229

tttcagtttc ctggggaaaa gaacc 25

<210> 230

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 230

tatttcagtt tcctggggaa aagaa 25

<210> 231

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 231

tgctatttca gtttcctggg gaaaa 25

<210> 232

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 232

actgctattt cagtttcctg gggaa 25

<210> 233

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 233

tgaactgcta tttcagtttc ctggg 25

<210> 234
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 234
cttgaactgc tatttcagtt tcctg 25

<210> 235
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 235
tagcttgaac tgctatttca gtttc 25

<210> 236
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 236
tttagcttga actgctattt cagtt 25

<210> 237
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 237

ttccacatcc ggttgtttag cttga 25

<210> 238

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 238

tgcccttag acaaaatctc ttcca 25

<210> 239

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 239

tttagacaaa atctcttcca catcc 25

<210> 240

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 240

gtttttcctt gtacaaatgc tgccc 25

<210> 241

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 241

gtacaaatgc tgccctttag acaaa 25

<210> 242
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 242
cttcactggc tgagtggctg gtttt 25
<210> 243
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 243
ggctggtttt tccttgtaca aatgc 25

<210> 244
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 244
attaccttca ctggctgagt ggctg 25
<210> 245
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 245

gcttcattac cttcactggc tgagt 25

<210> 246

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 246

aggttgcttc attaccttca ctggc 25

<210> 247

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 247

gctagaggtt gcttcattac cttca 25

<210> 248

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 248

atattgctag aggttgcttc attac 25

<210> 249

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 249

gaaaagaacc catatagtgc 20

<210> 250

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 250

gggaaaagaa cccatatagt 20

<210> 251

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 251

tcctggggaa aagaacccat 20

<210> 252

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 252

cagtttcctg gggaaaagaa 20

<210> 253

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 253

tatttcagtt tcctggggaa 20

<210> 254
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 254
actgctattt cagtttcctg 20

<210> 255
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 255
cttgaactgc tatttcagtt 20

<210> 256
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 256
tttagcttga actgctattt 20

<210> 257
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 257

ttccacatcc ggttgtttag 20

<210> 258

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 258

tttagacaaa atctcttcca 20

<210> 259

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 259

gtacaaatgc tgccctttag 20

<210> 260

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 260

ggctggtttt tccttgtaca 20

<210> 261

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 261

cttcactggc tgagtggctg 20

<210> 262
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 262
attaccttca ctggctgagt 20

<210> 263
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 263
gcttcattac cttcactggc 20

<210> 264
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 264
aggttgcttc attaccttca 20

<210> 265
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 265

gctagaggtt gcttcattac 20

<210> 266
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 266
atattgctag aggttgcttc 20

<210> 267
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 267
ctttaacaga aaagcataca catta 25

<210> 268
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 268
tcctctttaa cagaaaagca tacac 25

<210> 269
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 269

ttcctcttta acagaaaagc ataca 25

<210> 270
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 270
taacttcctc tttaacagaa aagca 25

<210> 271
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 271
ctaacttcct ctttaacaga aaagc 25

<210> 272
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 272
tcttctaact tcctctttaa cagaa 25

<210> 273
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 273

atcttctaac ttcctcttta acaga 25

<210> 274
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 274
tcagatcttc taacttcctc tttaa 25

<210> 275
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 275
ctcagatctt ctaacttcct cttta 25

<210> 276
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 276
agagctcaga tcttctaact tcctc 25

<210> 277
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 277

cagagctcag atcttctaac ttcct 25

<210> 278

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 278

cactcagagc tcagatcttc tact 24

<210> 279

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 279

ccttccactc agagctcaga tcttc 25

<210> 280

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 280

gtaaacggtt taccgccttc cactc 25

<210> 281

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 281

ctttgccctc agctcttgaa gtaaa 25

<210> 282

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 282

ccctcagctc ttgaagtaaa cggtt 25

<210> 283

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 283

ccaggagcta ggtcaggctg ctttg 25

<210> 284

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 284

ggtcaggctg ctttgccctc agctc 25

<210> 285

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 285

aggctccaat agtggtcagt ccagg 25

<210> 286

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 286

tcagtccagg agctaggtca ggctg 25

<210> 287

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 287

cttacaggct ccaatagtgg tcagt 25

<210> 288

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 288

gtatacttac aggctccaat agtgg 25

<210> 289

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 289

atccagtata cttacaggct ccaat 25

<210> 290
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 290
atgggatcca gtatacttac aggct 25

<210> 291
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 291
agagaatggg atccagtata cttac 25

<210> 292
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 292
acagaaaagc atacacatta 20

<210> 293
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 293

tttaacagaa aagcatacac 20

<210> 294
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 294
tcctctttaa cagaaaagca 20

<210> 295
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 295
taacttcctc tttaacagaa 20

<210> 296
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 296
tcttctaact tcctctttaa 20

<210> 297
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 297

tcagatcttc taacttcctc 20

<210> 298

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 298

ccttccactc agagctcaga 20

<210> 299

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 299

gtaaacggtt taccgccttc 20

<210> 300

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 300

ccctcagctc ttgaagtaaa 20

<210> 301

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 301

ggtcaggctg ctttgccctc 20

<210> 302

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 302

tcagtccagg agctaggtca 20

<210> 303

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 303

aggctccaat agtggtcagt 20

<210> 304

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 304

cttacaggct ccaatagtgg 20

<210> 305

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 305

gtatacttac aggctccaat 20

<210> 306

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 306

atccagtata cttacaggct 20

<210> 307

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 307

atgggatcca gtatacttac 20

<210> 308

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 308

agagaatggg atccagtata 20

<210> 309

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 309

ctaaaatatt ttgggttttt gcaaaa 26

<210> 310

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 310

gctaaaatat tttgggtttt tgcaaa 26

<210> 311

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 311

taggagctaa aatattttgg gttttt 26

<210> 312

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 312

agtaggagct aaaatatttt gggtt 25

<210> 313

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 313

tgagtaggag ctaaaatatt ttggg 25

<210> 314

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 314

ctgagtagga gctaaaatat tttggg 26

<210> 315

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 315

cagtctgagt aggagctaaa atatt 25

<210> 316

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 316

acagtctgag taggagctaa aatatt 26

<210> 317

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 317

gagtaacagt ctgagtagga gctaaa 26

<210> 318

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 318

cagagtaaca gtctgagtag gagct 25

<210> 319

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 319

caccagagta acagtctgag taggag 26

<210> 320

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 320

gtcaccagag taacagtctg agtag 25

<210> 321

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 321

aaccacaggt tgtgtcacca gagtaa 26

<210> 322

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 322

gttgtgtcac cagagtaaca gtctg 25

<210> 323

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 323

tggcagtttc cttagtaacc acaggt 26

<210> 324

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 324

atttctagtt tggagatggc agtttc 26

<210> 325

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 325

ggaagatggc atttctagtt tggag 25

<210> 326

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 326

catcaaggaa gatggcattt ctagtt 26

<210> 327

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 327

gagcaggtac ctccaacatc aaggaa 26

<210> 328

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 328

atctgccaga gcaggtacct ccaac 25

<210> 329

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 329

aagttctgtc caagcccggt tgaaat 26

<210> 330

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 330

cggttgaaat ctgccagagc aggtac 26

<210> 331

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 331

gagaaagcca gtcggtaagt tctgtc 26

<210> 332

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 332

gtcggtaagt tctgtccaag cccgg 25

<210> 333

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 333

ataacttgat caagcagaga aagcca 26

<210> 334

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 334

aagcagagaa agccagtcgg taagt 25

<210> 335

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 335

caccctctgt gattttataa cttgat 26

<210> 336

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 336

caaggtcacc caccatcacc ctctgt 26

<210> 337

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 337

catcaccctc tgtgatttta taact 25

<210> 338

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 338

cttctgcttg atgatcatct cgttga 26

<210> 339

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 339

ccttctgctt gatgatcatc tcgttg 26

<210> 340

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 340

atctcgttga tatcctcaag gtcacc 26

<210> 341

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 341

tcataccttc tgcttgatga tcatct 26

<210> 342
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 342
tcatttttc tcataccttc tgcttg 26

<210> 343
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 343
ttttctcata ccttctgctt gatgat 26

<210> 344
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 344
ttttatcatt ttttctcata ccttct 26

<210> 345
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 345

ccaactttta tcatttttc tcatac 26

<210> 346

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 346

atattttggg tttttgcaaa 20

<210> 347

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 347

aaaatatttt gggtttttgc 20

<210> 348

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 348

gagctaaaat attttgggtt 20

<210> 349

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 349

agtaggagct aaaatatttt 20

<210> 350

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 350

gtctgagtag gagctaaaat 20

<210> 351

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 351

taacagtctg agtaggagct 20

<210> 352

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 352

cagagtaaca gtctgagtag 20

<210> 353

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 353

cacaggttgt gtcaccagag 20

<210> 354

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 354

agtttcctta gtaaccacag 20

<210> 355

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 355

tagtttggag atggcagttt 20

<210> 356

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 356

ggaagatggc atttctagtt 20

<210> 357

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 357

tacctccaac atcaaggaag 20

<210> 358

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 358

atctgccaga gcaggtacct 20

<210> 359

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 359

ccaagcccgg ttgaaatctg 20

<210> 360

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 360

gtcggtaagt tctgtccaag 20

<210> 361

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 361

aagcagagaa agccagtcgg 20

<210> 362
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 362
ttttataact tgatcaagca 20

<210> 363
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 363
catcaccctc tgtgatttta 20

<210> 364
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 364
ctcaaggtca cccaccatca 20

<210> 365
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 365

catctcgttg atatcctcaa 20

<210> 366

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 366

cttctgcttg atgatcatct 20

<210> 367

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 367

catacctttct gcttgatgat 20

<210> 368

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 368

tttctcatac cttctgcttg 20

<210> 369

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 369

catttttct cataccttct 20

<210> 370
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 370
tttatcattt tttctcatac 20

<210> 371
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 371
caacttttat catttttct 20

<210> 372
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 372
ctgtaagaac aaatatccct tagta 25

<210> 373
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 373

tgcctgtaag aacaaatatc cctta 25

<210> 374

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 374

gttgcctgta agaacaaata tccct 25

<210> 375

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 375

attgttgcct gtaagaacaa atatc 25

<210> 376

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 376

gcattgttgc ctgtaagaac aaata 25

<210> 377

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 377

cctgcattgt tgcctgtaag aacaa 25

<210> 378

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 378

atcctgcatt gttgcctgta agaac 25

<210> 379

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 379

caaatcctgc attgttgcct gtaag 25

<210> 380

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 380

tccaaatcct gcattgttgc ctgta 25

<210> 381

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 381

tgttccaaat cctgcattgt tgcct 25

<210> 382

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 382

tctgttccaa atcctgcatt gttgc 25

<210> 383

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 383

aactggggac gcctctgttc caaat 25

<210> 384

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 384

gcctctgttc caaatcctgc attgt 25

<210> 385

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 385

cagcggtaat gagttcttcc aactg 25

<210> 386

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 386

cttccaactg gggacgcctc tgttc 25

<210> 387

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 387

cttgtttttc aaattttggg cagcg 25

<210> 388

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 388

ctagcctctt gattgctggt cttgt 25

<210> 389

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 389

ttttcaaatt ttgggcagcg gtaat 25

<210> 390

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 390

ttcgatccgt aatgattgtt ctagc 25

<210> 391

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 391

gattgctggt cttgtttttc aaatt 25

<210> 392

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 392

cttacttcga tccgtaatga ttgtt 25

<210> 393

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 393

ttgttctagc ctcttgattg ctggt 25

<210> 394

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 394

aaaaacttac ttcgatccgt aatga 25

<210> 395

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 395

tgttaaaaaa cttacttcga tccgt 25

<210> 396

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 396

atgcttgtta aaaaacttac ttcga 25

<210> 397

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 397

gtcccatgct tgttaaaaaa cttac 25

<210> 398
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 398
agaacaaata tcccttagta 20

<210> 399
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 399
gtaagaacaa atatccctta 20

<210> 400
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 400
tgcctgtaag aacaaatatc 20

<210> 401
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 401

attgttgcct gtaagaacaa 20

<210> 402
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 402
cctgcattgt tgcctgtaag 20
<210> 403
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 403
caaatcctgc attgttgcct 20

<210> 404
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 404
gcctctgttc caaatcctgc 20
<210> 405
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 405

cttccaactg gggacgcctc 20

<210> 406

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 406

cagcggtaat gagttcttcc 20

<210> 407

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 407

ttttcaaatt ttgggcagcg 20

<210> 408

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 408

gattgctggt cttgtttttc 20

<210> 409

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 409

ttgttctagc ctcttgattg 20

<210> 410
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 410
ttcgatccgt aatgattgtt 20

<210> 411
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 411
cttacttcga tccgtaatga 20

<210> 412
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 412
aaaaacttac ttcgatccgt 20

<210> 413
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 413

tgttaaaaaa cttacttcga 20

<210> 414
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 414
atgcttgtta aaaaacttac 20

<210> 415
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 415
gtcccatgct tgttaaaaaa 20

<210> 416
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 416
ctagaataaa aggaaaaata aatat 25

<210> 417
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 417

aactagaata aaaggaaaaa taaat 25

<210> 418

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 418

ttcaactaga ataaaaggaa aaata 25

<210> 419

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 419

ctttcaacta gaataaaagg aaaaa 25

<210> 420

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 420

attctttcaa ctagaataaa aggaa 25

<210> 421

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 421

gaattctttc aactagaata aaagg 25

<210> 422
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 422
tctgaattct ttcaactaga ataaa 25
<210> 423
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 423
attctgaatt ctttcaacta gaata 25

<210> 424
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 424
ctgattctga attctttcaa ctaga 25
<210> 425
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 425

cactgattct gaattctttc aacta 25

<210> 426
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 426
tcccactgat tctgaattct ttcaa 25
<210> 427
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 427
catcccactg attctgaatt ctttc 25

<210> 428
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 428
tacttcatcc cactgattct gaatt 25
<210> 429
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 429

ctgaaggtgt tcttgtactt catcc 25

<210> 430

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 430

cggttctgaa ggtgttcttg tact 24

<210> 431

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 431

ctgttgcctc cggttctgaa ggtgt 25

<210> 432

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 432

tttcattcaa ctgttgcctc cggtt 25

<210> 433

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 433

taacatttca ttcaactgtt gcctc 25

<210> 434
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 434
ttgtgttgaa tcctttaaca tttca 25

<210> 435
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 435
tcttccttag cttccagcca ttgtg 25

<210> 436
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 436
cttagcttcc agccattgtg ttgaa 25

<210> 437
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 437

gtcctaagac ctgctcagct tcttc 25

<210> 438

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 438

ctgctcagct tcttccttag cttcc 25

<210> 439

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 439

ctcaagcttg gctctggcct gtcct 25

<210> 440

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 440

ggcctgtcct aagacctgct cagct 25

<210> 441

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 441

tagggaccct ccttccatga ctcaa 25

<210> 442
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 442
tttggattgc atctactgta taggg 25

<210> 443
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 443
accctccttc catgactcaa gcttg 25

<210> 444
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 444
cttggtttct gtgattttct tttgg 25

<210> 445
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 445

atctactgta tagggaccct ccttc 25

<210> 446
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 446
ctaaccttgg tttctgtgat tttct 25

<210> 447
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 447
tttcttttgg attgcatcta ctgta 25

<210> 448
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 448
tgatactaac cttggtttct gtgat 25

<210> 449
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 449

atctttgata ctaaccttgg tttct 25

<210> 450
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 450
aaggtatctt tgatactaac cttgg 25
<210> 451
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 451
ttaaaaaggt atctttgata ctaac 25

<210> 452
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 452
ataaaaggaa aaataaatat 20
<210> 453
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 453

gaataaaagg aaaaataaat 20

<210> 454
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 454
aactagaata aaaggaaaaa 20

<210> 455
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 455
ctttcaacta gaataaaagg 20

<210> 456
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 456
gaattctttc aactagaata 20

<210> 457
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 457

attctgaatt ctttcaacta 20

<210> 458
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 458
tacttcatcc cactgattct 20

<210> 459
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 459
ctgaaggtgt tcttgtact 19

<210> 460
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 460
ctgttgcctc cggttctgaa 20

<210> 461
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 461

taacatttca ttcaactgtt 20

<210> 462
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 462
ttgtgttgaa tcctttaaca 20

<210> 463
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 463
cttagcttcc agccattgtg 20

<210> 464
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 464
ctgctcagct tcttccttag 20

<210> 465
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 465

ggcctgtcct aagacctgct 20

<210> 466

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 466

ctcaagcttg gctctggcct 20

<210> 467

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 467

accctccttc catgactcaa 20

<210> 468

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 468

atctactgta tagggaccct 20

<210> 469

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 469

tttcttttgg attgcatcta 20

<210> 470
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 470
cttggtttct gtgattttct 20

<210> 471
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 471
ctaaccttgg tttctgtgat 20

<210> 472
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 472
tgatactaac cttggtttct 20

<210> 473
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 473

atctttgata ctaaccttgg 20

<210> 474
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 474
aaggtatctt tgatactaac 20

<210> 475
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 475
ttaaaaaggt atctttgata 20

<210> 476
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 476
ctatagattt ttatgagaaa gaga 24

<210> 477
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 477

aactgctata gatttttatg agaaa 25

<210> 478

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 478

tggccaactg ctatagattt ttatg 25

<210> 479

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 479

gtctttggcc aactgctata gattt 25

<210> 480

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 480

cggaggtctt tggccaactg ctata 25

<210> 481

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 481

actggcggag gtctttggcc aactg 25

<210> 482

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 482

tttgtctgcc actggcggag gtctt 25

<210> 483

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 483

agtcatttgc cacatctaca tttgt 25

<210> 484

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 484

tttgccacat ctacatttgt ctgcc 25

<210> 485

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 485

ccggagaagt ttcagggcca agtca 25

<210> 486

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 486

gtatcatctg cagaataatc ccgga 25

<210> 487

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 487

taatcccgga gaagtttcag ggcca 25

<210> 488

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 488

ttatcatgtg gacttttctg gtatc 25

<210> 489

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 489

agaggcattg atattctctg ttatc 25

<210> 490

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 490

atgtggactt ttctggtatc atctg 25

<210> 491

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 491

cttttatgaa tgcttctcca agagg 25

<210> 492

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 492

atattctctg ttatcatgtg gactt 25

<210> 493

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 493

cataccttt atgaatgctt ctcca 25

<210> 494
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 494
ctccaagagg cattgatatt ctctg 25

<210> 495
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 495
taattcatac cttttatgaa tgctt 25

<210> 496
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 496
cttttatgaa tgcttctcca agagg 25

<210> 497
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 497

taatgtaatt catacctttt atgaa 25

<210> 498

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 498

agaaataatg taattcatac ctttt 25

<210> 499

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 499

gttttagaaa taatgtaatt catac 25

<210> 500

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 500

gatttttatg agaaagaga 19

<210> 501

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 501

ctatagattt ttatgagaaa 20

<210> 502

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 502

aactgctata gatttttatg 20

<210> 503

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 503

tggccaactg ctatagattt 20

<210> 504

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 504

gtctttggcc aactgctata 20

<210> 505

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 505

cggaggtctt tggccaactg 20

<210> 506

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 506

tttgtctgcc actggcggag 20

<210> 507

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 507

tttgccacat ctacatttgt 20

<210> 508

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 508

ttcagggcca agtcatttgc 20

<210> 509

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 509

taatcccgga gaagtttcag 20

<210> 510
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 510
gtatcatctg cagaataatc 20

<210> 511
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 511
atgtggactt ttctggtatc 20

<210> 512
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 512
atattctctg ttatcatgtg 20

<210> 513
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 513

ctccaagagg cattgatatt 20

<210> 514

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 514

cttttatgaa tgcttctcca 20

<210> 515

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 515

catacctttt atgaatgctt 20

<210> 516

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 516

taattcatac cttttatgaa 20

<210> 517

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 517

taatgtaatt catacctttt 20

<210> 518

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 518

agaaataatg taattcatac 20

<210> 519

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 519

gttttagaaa taatgtaatt 20

<210> 520

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 520

ctgcaaagga ccaaatgttc agatg 25

<210> 521

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 521

tcaccctgca aaggaccaaa tgttc 25

<210> 522
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 522
ctcactcacc ctgcaaagga ccaaa 25

<210> 523
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 523
tctcgctcac tcaccctgca aagga 25

<210> 524
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 524
cagcctctcg ctcactcacc ctgca 25

<210> 525
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 525

caaagcagcc tctcgctcac tcacc 25

<210> 526
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 526
tcttccaaag cagcctctcg ctcac 25

<210> 527
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 527
tctatgagtt tcttccaaag cagcc 25

<210> 528
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 528
gttgcagtaa tctatgagtt tcttc 25

<210> 529
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 529

gaactgttgc agtaatctat gagtt 25

<210> 530
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 530
ttccaggtcc agggggaact gttgc 25

<210> 531
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 531
gtaagccagg caagaaactt ttcca 25

<210> 532
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 532
ccaggcaaga aacttttcca ggtcc 25

<210> 533
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 533

tggcagttgt ttcagcttct gtaag 25

<210> 534
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 534
ggtagcatcc tgtaggacat tggca 25

<210> 535
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 535
gacattggca gttgtttcag cttct 25

<210> 536
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 536
tctaggagcc tttccttacg ggtag 25

<210> 537
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 537

cttttactcc cttggagtct tctag 25

<210> 538

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 538

gagcctttcc ttacgggtag catcc 25

<210> 539

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 539

ttgccattgt ttcatcagct ctttt 25

<210> 540

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 540

cttggagtct tctaggagcc tttcc 25

<210> 541

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 541

cttacttgcc attgtttcat cagct 25

<210> 542
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 542
cagctctttt actcccttgg agtct 25

<210> 543
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 543
cctgacttac ttgccattgt ttcat 25

<210> 544
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 544
aaatgcctga cttacttgcc attgt 25

<210> 545
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 545

agcggaaatg cctgacttac ttgcc 25

<210> 546

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 546

gctaaagcgg aaatgcctga cttac 25

<210> 547

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 547

aaggaccaaa tgttcagatg 20

<210> 548

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 548

ctgcaaagga ccaaatgttc 20

<210> 549

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 549

tcaccctgca aaggaccaaa 20

<210> 550
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 550
ctcactcacc ctgcaaagga 20

<210> 551
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 551
tctcgctcac tcaccctgca 20

<210> 552
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 552
cagcctctcg ctcactcacc 20

<210> 553
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 553

caaagcagcc tctcgctcac 20

<210> 554

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 554

tctatgagtt tcttccaaag 20

<210> 555

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 555

gaactgttgc agtaatctat 20

<210> 556

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 556

ttccaggtcc agggggaact 20

<210> 557

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 557

ccaggcaaga aacttttcca 20

<210> 558

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 558

ttcagcttct gtaagccagg 20

<210> 559

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 559

gacattggca gttgtttcag 20

<210> 560

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 560

ggtagcatcc tgtaggacat 20

<210> 561

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 561

gagcctttcc ttacgggtag 20

<210> 562

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 562

cttggagtct tctaggagcc 20

<210> 563

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 563

cagctctttt actcccttgg 20

<210> 564

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 564

ttgccattgt ttcatcagct 20

<210> 565

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 565

cttacttgcc attgtttcat 20

<210> 566
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 566
cctgacttac ttgccattgt 20

<210> 567
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 567
aaatgcctga cttacttgcc 20

<210> 568
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 568
agcggaaatg cctgacttac 20

<210> 569
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin
<400> 569

gctaaagcgg aaatgcctga 20

<210> 570

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Transporter for Intracellular Delivery of PMO

<400> 570

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Cys

1 5 10

<210> 571

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Transporter for Intracellular Delivery of PMO

<400> 571

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Cys

1 5 10

<210> 572

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Transporter for Intracellular Delivery of PMO

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(6)

<223> X = 6-aminohexanoic acid

<220><221> MOD_RES

<222> (13)

<223> X = beta alanine

<400> 572

Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa

1 5 10

<210> 573

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Transporter for Intracellular Delivery of PMO

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(5)

<223> X = 6-aminohexanoic acid

<220><221> MOD_RES

<222> (14)

<223> X = beta alanine

<400> 573

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa

1 5 10

<210> 574

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Transporter for Intracellular Delivery of PMO

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(4)

<223> X = 6-aminohexanoic acid

<220><221

> MOD_RES

<222> (14)

<223> X = beta alanine

<400> 574

Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa

1 5 10

<210> 575

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Transporter for Intracellular Delivery of PMO

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(4)

<223> X = 6-aminohexanoic acid

<220><221> MOD_RES

<222> (13)

<223> X = beta alanine

<400> 575

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa

1 5 10

<210> 576

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Transporter for Intracellular Delivery of PMO

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(4)

<223> X = 6-aminohexanoic acid

<220><221> MOD_RES

<222> (17)

<223> X = beta alanine

<400> 576

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 577

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Transporter for Intracellular Delivery of PMO

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(5)

<223> X = 6-aminohexanoic acid

<220><221> MOD_RES

<222> (17)

<223> X = beta alanine

<400> 577

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 578

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide Transporter for Intracellular Delivery of PMO

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(8)

<223> X = 6-aminohexanoic acid

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(11)

<223> X = beta alanine

<400> 578

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa

1 5 10

<210> 579

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Transporter for Intracellular Delivery of PMO

<400> 579

Ala Ser Ser Leu Asn Ile Ala

1 5

<210> 580

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cell Penetrating Peptide / Homing Peptide / PMO Conjugates

<220><221> MOD_RES

<222> (8)

<223> X = a neutral amino acid C(=O) (CHR)n NH-, where n is 2 to 7 and each R is independently H or methyl

<220><221> MOD_RES

<222> (9)

<223> X = Beta alanine

<400> 580

Ala Ser Ser Leu Asn Ile Ala Xaa Xaa

1 5

<210> 581

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cell Penetrating Peptide / Homing Peptide / PMO Conjugates

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(8)

<223> X = a neutral amino acid C(=O) (CHR)n NH-, where n is 2 to 7 and each R is independently H or methyl

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(11)

<223> X = beta alanine

<400> 581

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa Ala Ser

1 5 10 15

Ser Leu Asn Ile Ala Xaa

20

<210> 582

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cell Penetrating Peptide / Homing Peptide / PMO Conjugates

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(10)

<223> X = a neutral amino acid C(=O) (CHR)n NH-, where n is 2 to 7 and each R is independently H or methyl

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(19)

<223> Xaa = beta alanine

<400> 582

Ala Ser Ser Leu Asn Ile Ala Xaa Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa

1 5 10 15

Arg Arg Xaa Arg Xaa

20

<210> 583

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cell Penetrating Peptide / Homing Peptide / PMO Conjugates

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(8)

<223> X = a neutral amino acid C(=O) (CHR)n NH-, where n is 2 to 7 and each R is independently H or methyl

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(11)

<223> X = beta alanine

<400> 583

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa

1 5 10

<210> 584

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 584

ccactcagag ctcagatctt ctaacttcc 29

<210> 585

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 585

gggatccagt atacttacag gctcc 25

<210> 586

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 586

cttccactca gagctcagat cttctaa 27

<210> 587

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 587

acatcaagga agatggcatt tctagtttgg 30

<210> 588

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human dystrophin

<400> 588

ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag 30

<210> 589

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 589

ttctgtccaa gcccggttga aatc 24

<210> 590

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 590

cacccaccat caccctcygt g 21

<210> 591

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 591

atcatctcgt tgatatcctc aa 22

<210> 592

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 592

acatcaagga agatggcatt tctag 25

<210> 593

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 593

accagagtaa cagtctgagt aggagc 26

<210> 594

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 594

tcaaggaaga tggcatttct 20

<210> 595

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 595

cctctgtgat tttataactt gat 23

<210> 596

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 596

atcatttttt ctcatacctt ctgct 25

<210> 597

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 597

ctcatacctt ctgcttgatg atc 23

<210> 598

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 598

tggcatttct agtttgg 17

<210> 599

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 599

ccagagcagg tacctccaac atc 23

<210> 600

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 600

tgttcagctt ctgttagcca ctga 24

<210> 601

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 601

tttgtgtctt tctgagaaac 20

<210> 602

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 602

cgccgccatt tctcaacag 19

<210> 603

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 603

atctgtcaaa tcgcctgcag 20

<210> 604

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 604

tgtttttgag gattgctgaa 20

<210> 605

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 605

gctgaattat ttcttcccc 19

<210> 606

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 606

gcccaatgcc atcctgg 17

<210> 607

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 607

ccaatgccat cctggagttc ctgtaa 26

<210> 608

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 608

cattcaactg ttgcctccgg ttctgaaggt g 31

<210> 609

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 609

ctgaaggtgt tcttgtactt catcc 25

<210> 610

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 610

ctgttgcctc cggttctg 18

<210> 611

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 611

attctttcaa ctagaataaa ag 22

<210> 612

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 612

gccatcctgg agttcctgta agataccaaa 30

<210> 613

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 613

ccaatgccat cctggagttc ctgtaagata 30

<210> 614

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 614

gccgctgccc aatgccatcc tggagttcct 30

<210> 615

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 615

gtttgccgct gcccaatgcc atcctggagt 30

<210> 616

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 616

caacagtttg ccgctgccca atgccatcct 30

<210> 617

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 617

ctgacaacag tttgccgctg cccaatgcca 30

<210> 618

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 618

tgttctgaca acagtttgcc gctgcccaat 30

<210> 619

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 619

caatgttctg acaacagttt gccgctgccc 30

<210> 620

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 620

cattcaatgt tctgacaaca gtttgccgct 30

<210> 621

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 621

tatttcttcc ccagttgcat tcaatgttct 30

<210> 622

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 622

gctgaattat ttcttcccca gttgcattca 30

<210> 623

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 623

ggattgctga attatttctt ccccagttgc 30

<210> 624

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 624

tttgaggatt gctgaattat ttcttcccca 30

<210> 625

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 625

gtacttcatc ccactgattc tgaattcttt 30

<210> 626

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 626

tcttgtactt catcccactg attctgaatt 30

<210> 627

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 627

tgttcttgta cttcatccca ctgattctga 30

<210> 628

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 628

cggttctgaa ggtgttcttg tacttcatcc 30

<210> 629

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 629

ctccggttct gaaggtgttc ttgtacttca 30

<210> 630

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 630

tgcctccggt tctgaaggtg ttcttgtact 30

<210> 631

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 631

tgttgcctcc ggttctgaag gtgttcttgt 30

<210> 632

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 632

aactgttgcc tccggttctg aaggtgttct 30

<210> 633

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 633

ttcaactgtt gcctccggtt ctgaaggtgt 30

<210> 634

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 634

taaagctctg gaaacctgaa aggaa 25

<210> 635

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense sequence to target splice site of proprocessed human

dystrophin

<400> 635

ttcagcttct gtaagccagg caaga 25

<210> 636

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer

<400> 636

ggccaaacct cggcttacct gaaat 25

<210> 637

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> arginine-rich peptide transport

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(3)

<223> Xaa = K, R or arginine analog

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(8)

<223> Xaa = a neutral amino acid C(=O) (CHR)n NH-, where n is 2 to 7
and each R is independently H or methyl

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(6)

<223> Xaa = an alpha-amino acid having a neutral aralkyl side chain

<400> 637

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 638

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> arginine-rich peptide transport

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(6)

<223> Xaa = a neutral amino acid C(=O) (CHR)n NH-, where n is 2 to 7
and each R is independently H or methyl

<400> 638

Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa
1 5 10

<210> 639

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> arginine-rich peptide transport

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(5)

<223> Xaa = a neutral amino acid C(=O) (CHR)n NH-, where n is 2 to 7

and each R is independently H or methyl

<400> 639

Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa

1 5

<210> 640

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 640

ccagagcttt acctgagaaa caag 24

<210> 641

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 641

ccagccactc agccagtgaa g 21

<210> 642

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 642

cgatccgtaa tgattgttct agcc 24

<210> 643

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 643

catttcattc aactgttgcc tccg 24

<210> 644

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 644

caatgctcct gacctctgtg c 21

<210> 645

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 645

gtctacaaca aagctcaggt cg 22

<210> 646

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 646

gcaatgttat ctgcttcctc caacc 25

<210> 647

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 647

gctcttttcc aggttcaagt gg 22

<210> 648

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 648

cttggacaga acttaccgac tgg 23

<210> 649

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 649

gcaggatttg gaacagaggc g 21

<210> 650

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 650

catctacatt tgtctgccac tgg 23

<210> 651

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 651

gtttcttcca aagcagcctc tcg 23