



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월15일

(11) 등록번호 10-1839177

(24) 등록일자 2018년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7029690

(22) 출원일자(국제) 2012년04월13일

심사청구일자 2014년02월06일

(85) 번역문제출일자 2013년11월08일

(65) 공개번호 10-2014-0023344

(43) 공개일자 2014년02월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/033588

(87) 국제공개번호 WO 2012/142458

국제공개일자 2012년10월18일

(30) 우선권주장

61/474,981 2011년04월13일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

JP2004535179 A*

GenBank Accession Number NM_002827

(2011.03.27.)*

US06261840 B1

US20080015162 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

아이오니스 파마수티컬즈, 임코포레이티드

미합중국 캘리포니아주 92010 칼스바드 2855 가젤
코트

(72) 발명자

바노트, 산제이

미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트
2855

프라이어, 수잔, 엠.

미국 92010 캘리포니아주 칼스바드 가젤 코트
2855

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 P T P I B 발현의 안티센스 조절

(57) 요약

동물에서 PTPIB mRNA 및 단백질의 발현을 감소시키는 방법, 화합물, 및 조성물이 본 명세서에 제공된다. 그와 같은 방법, 화합물, 및 조성물은 대사 질환, 예를 들면, 당뇨병, 또는 그의 증상을 치료, 예방, 치료 또는 개선하는데 유용하다.

명세서

청구범위

청구항 1

단일-가닥 변형 올리고뉴클레오타이드로서, 상기 변형 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 26으로 이루어진 뉴클레오베이스 서열을 갖는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지며,

10개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 캡 분절;

5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 윙 분절; 및

5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 윙 분절을 포함하고;

여기서 상기 캡 분절은 5' 윙 분절과 3' 윙 분절 사이에 위치하고, 상기 각 윙 분절의 각 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 상기 변형 올리고뉴클레오타이드의 각 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이며, 상기 변형 올리고뉴클레오타이드의 각 시토신 잔기는 5-메틸시토신인, 단일-가닥 변형 올리고뉴클레오타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 콘주게이트화된 것인 단일-가닥 변형 올리고뉴클레오타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 염인 것인 단일-가닥 변형 올리고뉴클레오타이드.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 염이 나트륨 염 또는 칼륨 염인 단일-가닥 변형 올리고뉴클레오타이드.

청구항 5

치료적으로 또는 예방적으로 효과적인 양의 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단일-가닥 변형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 당뇨병 또는 비만증으로부터 선택되는 대사 질환 또는 장애를 예방, 치료, 경감시키거나, 그의 진행을 느리게 하거나, 또는 그의 개시를 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 인간에 사용되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 대사 질환 또는 장애가 제2형 당뇨병인 약제학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

치료적으로 또는 예방적으로 효과적인 양의 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단일-가닥 변형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 동물에서 혈액 글루코오스 수준의 증가를 예방하거나 또는 그의 개시를 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 동물은 인간인 약제학적 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 동물은 당뇨병 동물인 약제학적 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 서열 목록

[0002] 본원은 전자 형태로 서열 목록과 함께 출원되었다. 서열 목록은 111 Kb의 크기로 2012년 4월 12일에 제작된 BIOL0149WOSEQ.txt의 파일명으로 제공된다. 서열 목록의 전자 형태로의 정보는 그것의 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0003]

분야

[0004]

동물에서 PTPIB mRNA 및 단백질의 발현을 감소시키는 방법, 화합물, 및 조성물이 본원에 제공된다. 그와 같은 방법, 화합물, 및 조성물은, 예를 들면, 대사 장애, 특히 당뇨병과 연관된 장애와 연관된 질환을 치료, 예방, 치연 또는 경감시키는데 유용하다.

배경기술

[0005]

단백질 티로신 포스파타아제 IB (PTPIB)는 PTP 패밀리의 멤버이며 (Barford, 등, *Science* 1994. 263: 1397-1404), 세포질 효소이다 (Neel 및 Tonks, *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997. 9: 193-204). 인슐린 대사의 주요 조절물질인 PTPIB는 간, 근육 및 지방과 같은 조직을 포함하여 편재되게 발현되며 (Goldstein, *Receptor* 1993. 3: 1-15), 여기서 PTPIB는 주요 PTP 효소이다.

[0006]

PTPIB는 인슐린 시그널링의 음성 조절물질인 것으로 여겨진다. PTPIB는 인슐린 수용체와 상호작용하고 인슐린 수용체를 탈인산화하고, 따라서 인슐린 시그널링 전달을 약화시키고 잠재적으로 종결시킨다 (Goldstein 등, *J. Biol. Chem.* 2000. 275: 4383-4389). 인슐린 시그널링에서 PTPIB의 생리학적 역할은 녹아웃 마우스 모델에서 실증되었다. PTPIB 유전자가 결여된 마우스를 인슐린 내성 및 비만증에 대해 보호했다 (Elchebly 등, *Science* 1999. 283: 1544-1548). PTPIB-결핍된 마우스는 낮은 지방축적, 증가된 기초대사율 뿐만 아니라 총 에너지 소모를 가졌으며 식이-유도 비만증으로부터 보호되었다. 인슐린-자극된 글루코오스 흡수는 골격 근육에서 상승되었던 반면, 지방 조직에는, PTPIB-결핍된 마우스에서 증가된 인슐린 민감도가 조직-특이적이었다는 증거를 제공하면서 영향을 미치지 않았다 (Klaman 등, *Mol. Cell. Biol.* 2000. 20: 5479-5489). 이들 마우스는 표현형으로 정상이고, 또한 식이-유도 비만증, 인슐린 내성이었고, 고 지방 식이에 대해 유의미하게 낮은 트리글라이세라이드 수준을 가졌다. 따라서, 유형 II 당뇨병, 대사 증후군, 당뇨병 이상지질혈증, 또는 관련된 대사 질환을 앓고 있는 환자에서 PTPIB의 억제는 유익할 것이다.

[0007]

PTPIB의 안티센스 억제는, 안티센스 억제제가 단백질에 대한 화합물의 경쟁적 결합에 의존하지 않고 PTPIB의 발현을 감소시킴으로써 직접 활성을 억제한다는 점에서 종래의 작은 분자 억제제에 비해 특특한 이점을 제공한다. 안티센스 기술은 어떤 유전자 생성물의 발현을 감소시키기 위한 효과적인 수단으로서 출현했고 따라서 PTPIB의 조절을 위한 다수의 치료, 진단, 및 연구 적용에 독특하게 유용함을 입증할 수 있다.

[0008]

현재, 대사 장애를 치료하기 위한 허용가능한 선택권이 부족하다. 따라서, 그와 같은 질환 및 장애의 치료를 위한 화합물 및 방법을 제공하는 것이 본원의 목적이다.

[0009]

비제한적으로, 특히, 특허 출원, 기사, 서적 및 논문을 포함하는, 본원에 인용된 모든 문서, 또는 문서의 일부는 그의 전체 뿐만 아니라 본원에 논의된 문서의 일부에 대해 명백히 본원에 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0010]

요약

[0011]

PTPIB의 발현을 조절하고 대사 장애, 특히 당뇨병 및/또는 그의 증상과 연관된 장애와 연관된 질환을 치료, 예방, 치연 또는 경감시키기 위한 방법, 화합물, 및 조성물이 본원에 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0012]

본 발명의 수많은 목적 및 이점은 수반되는 도면을 참조하여 당해분야의 숙련가에게 더 잘 이해될 수 있으며, 여기서:

도 1은 PTPIB 안티센스 올리고뉴클레오타이드, ISIS 404173 및 ISIS 142082의 웨스턴 블랏을 보여주며, 8mgk/주에서 PTPIB 단백질 발현의 감소는 상기 화합물의 효능을 입증한다. 표 47 참조.

도 2는 사이노몽구스 원숭이에서의 주요 내성 연구의 요약 표이다 (실시예 17 참고).

도 3은 용량 반응 전임상 연구에서 인간 PTPIB mRNA의 그래프로 나타낸 감소이다. ISIS 404173으로의 치료를 이전의 임상 후보물질인 ISIS 113715로의 치료와 비교했다. 본원에서 보여주는 바와 같이, ISIS 404173으로의 투여는 ISIS 113715로의 투여와 비교할 때 더 강력하며 PTPIB mRNA 수준에서 유의미한 감소를 유발했다. 특히, 0.3 μ M 용량에서, ISIS 113715와 비교할 때 ISIS 404173을 사용하여 PTPIB mRNA 수준에서 5배 감소가 나타났다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 상세한 설명

[0014] 상기 일반적인 설명 및 하기 상세한 설명 둘 모두는 예시적이고 단지 설명하기 위한 것이며 청구된 대로 본 발명을 제한하는 것은 아님을 이해해야 한다. 본원에서, 단수형의 사용은 구체적으로 달리 언급되지 않는 한 복수형을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 추가로, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라 "포함하다" 및 "포함된"과 같은 다른 형태의 사용은 제한하지 않는다. 또한, "요소" 또는 "성분"과 같은 용어들은, 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 하나의 단위를 포함하는 요소들 및 성분들, 및 1 초과의 하위단위를 포함하는 요소들 및 성분들 둘 모두를 포함한다.

[0015] 본원에 사용된 섹션 제목은 단지 조직상 목적이며 기재된 주제를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 비제한적으로 특허, 특허 출원, 기사, 서적 및 논문을 포함하는, 본원에 인용된 모든 문서, 또는 문서의 일부는 그의 전체 뿐만 아니라 본원에 논의된 문서의 일부에 대해 명백히 본원에 참조로 포함된다.

정의

[0017] 구체적인 정의가 제공되지 않는 경우, 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의약 화학 및 약화학과 관련되고 이들의 절차와 기술을 이용한 명명법이 당해분야에 익히 공지되고 통상 사용되는 것들이다. 화학적 합성, 및 화학적 분석을 위한 표준 기술을 사용할 수 있다. 허용된다면, 비제한적으로, 모든 특허, 출원, 공개된 출원 및 기타 잡지 간행물, 미국 국립생물공학정보센터 (NCBI)와 같은 데이터베이스를 통해 얻을 수 있는 유전자은행 수탁 번호 및 연관된 서열 정보, 및 본원의 개시내용을 통해 언급된 기타 데이터를 포함하는, 본원에 인용된 모든 문서, 또는 문서의 일부는 그의 전체 뿐만 아니라 본원에 논의된 문서의 일부에 대해 참조로 포함된다.

[0018] 구체적인 정의가 제공되지 않는 경우, 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의약 화학 및 약화학과 관련되고 이들의 절차와 기술을 이용한 명명법이 당해분야에 익히 공지되고 통상 사용되는 것들이다. 화학적 합성, 및 화학적 분석을 위한 표준 기술을 사용할 수 있다. 허용된다면, 모든 특허, 출원, 공개된 출원 및 기타 간행물, 미국 국립생물공학정보센터 (NCBI)와 같은 데이터베이스를 통해 얻을 수 있는 유전자은행 수탁 번호 및 연관된 서열 정보, 및 본원의 개시내용을 통해 언급된 기타 데이터는 그의 전체 뿐만 아니라 본원에 논의된 문서의 일부에 대해 참조로 포함된다.

[0019] 달리 표시되지 않는 한, 하기 용어들은 하기 의미들을 갖는다:

[0020] "2'-0-메톡시에틸" (또한 2'-MOE 및 2'-O(CH₂)₂-OCH₃)은 푸로실 고리의 2' 위치의 0-메톡시-에틸 변형을 나타낸다. 2'-0-메톡시에틸 변형된 당이 변형된 당이다.

[0021] "2'-0-메톡시에틸 뉴클레오타이드"는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드를 의미한다.

[0022] "3' 표적 부위"는 특정 안티센스 화합물의 3'-최대(most) 뉴클레오타이드에 상보적인 표적 핵산의 뉴클레오타이드를 나타낸다.

[0023] "5' 표적 부위"는 특정 안티센스 화합물의 5'-최대 뉴클레오타이드에 상보적인 표적 핵산의 뉴클레오타이드를 나타낸다.

[0024] "5-메틸시토신"은 5' 위치에 부착된 메틸 그룹으로 변형된 시토신을 의미한다. 5-메틸시토신은 변형된 뉴클레오베이스이다.

[0025] "약"은 값의 ± 10% 이내를 의미한다. 예를 들면, "마커는 약 50%만큼 증가될 수 있다"라고 언급된 경우, 그것은 마커가 45%-55% 사이에서 증가될 수 있음을 의미한다.

[0026] "활성 약제학적 제제"는 개인에게 투여될 때 치료 이점을 제공하는 약제학적 조성을 중의 물질 또는 물질들을 의미한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서 PTPIB에 표적된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 활성 약제학적 제제이다.

[0027] "활성 표적 영역" 또는 "표적 영역"은 1 이상의 활성 안티센스 화합물이 표적된 영역을 의미한다. "활성 안티센스 화합물"은 표적 핵산 수준 또는 단백질 수준을 감소시키는 안티센스 화합물을 의미한다.

- [0028] "지방세포분화"는 지방전구세포(preadipocyte)로부터의 지방 세포의 발달을 의미한다. "지방형성"은 지방 변성 혹은 지방 침윤이든, 지방의 생성 또는 형성을 의미한다.
- [0029] "비만" 또는 "비만증"은 비만이거나 또는 제지방량과 관련하여 과다하게 높은 양의 체지방 또는 지방 조직이 존재하는 상태를 나타낸다. 체지방의 양은 신체 전반에 걸친 지방의 분포 및 지방 조직 침착물의 크기 및 질량 둘 모두에 대한 관계를 포함한다. 체지방 분포는 피하지방 두께 측정법, 허리-대-엉덩이 둘레 비, 또는 초음파, 컴퓨터 단층촬영, 또는 자기공명 이미지화와 같은 기술에 의해 추측될 수 있다. 질병통제예방센터에 따르면, 30 또는 그 초과의 체질량 지수 (BMI)를 갖는 개인은 비만인 것으로 간주된다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "비만증"은 신체 내에 지방 조직의 과잉 축적의 결과로서 신체적 요구량을 넘어서는 체지방의 증가가 나타나는 상태를 포함한다. 용어 "비만증"은, 비제한적으로, 하기 상태를 포함한다: 성인형 비만증; 영양 비만증; 내인성 또는 염증성 비만증; 내분비 비만증; 가족성 비만증; 고인슐린 비만증; 과형성-비대성 비만증; 성기능저하 비만증; 갑상선기능부전 비만증; 평생 동안 비만증; 병적인 비만증 및 외인성 비만증.
- [0030] "부수적으로 투여되는"은 2 제제들을 둘 모두의 약리학적 효과가 환자에게 동시에 발현되는 임의의 방식으로 공-투여되는 것을 나타낸다. 부수적 투여는 모든 제제들이 단일 약제학적 조성물로, 동일한 복용량 형태로, 또는 동일한 투여 경로에 의해 투여되는 것을 필요로 하지 않는다. 모든 제제들의 효과는 동시에 그들 자체가 발현될 필요가 없다. 상기 효과는 단지 일정 기간 동안 중복되는 것이 필요하며 동일한 시간에 존재할 필요는 없다.
- [0031] "투여하는"은 동물에게 제제를 제공함을 의미하고, 비제한적으로, 의료 전문가에 의한 투여 및 자가-투여를 포함한다.
- [0032] "제제"는 동물에게 투여될 때 치료 이점을 제공할 수 있는 활성 물질을 의미한다. "제1 제제"는 본원에 제공된 치료 화합물을 의미한다. 예를 들면, 제1 제제는 PTPIB를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. "제2 제제"는 본 발명의 제2 치료 화합물 (예를 들면 PTPIB를 표적으로 하는 제2 안티센스 올리고뉴클레오타이드) 및/또는 비-PTPIB 치료 화합물을 의미한다.
- [0033] "개선"은 연관된 질환, 장애, 또는 상태의 적어도 1 인디케이터, 징후 또는 증상의 감소를 나타낸다. 인디케이터의 중증도는 당해분야의 숙련가에게 공지된 주관적 또는 객관적 측정법에 의해 결정될 수 있다.
- [0034] "동물"은, 비제한적으로, 마우스, 랫트, 토끼, 개, 고양이, 돼지, 및 비-인간 영장류 (비제한적으로, 원숭이 및 침팬지를 포함함)를 포함하는 인간 또는 비-인간 동물을 나타낸다.
- [0035] "안티센스 활성"은 안티센스 화합물의 그것의 표적 핵산에 대한 하이브리드화에 기인하는 임의 검출 가능한 또는 측정 가능한 활성을 의미한다. 어떤 구현예에서, 안티센스 활성은 표적 핵산 또는 그와 같은 표적 핵산에 의해 암호화된 단백질의 양 또는 발현에서의 감소이다.
- [0036] "안티센스 화합물"은 수소 결합을 통해 표적 핵산에 하이브리드화 할 수 있는 올리고머 화합물을 의미한다.
- [0037] "안티센스 억제"는 안티센스 화합물의 부재하의 표적 핵산 수준 또는 표적 단백질 수준과 비교하여 표적 핵산에 상보적인 안티센스 화합물의 존재하의 표적 핵산 수준 또는 표적 단백질 수준의 감소를 의미한다.
- [0038] "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 표적 핵산의 상응하는 영역 또는 분절로의 하이브리드를 가능하게 하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0039] "바이사이클릭 당"은 2 비-제미날(non-geminal) 고리 원자의 브릿징에 의해 변형된 푸로실 고리를 의미한다. 바이사이클릭 당은 변형된 당이다.
- [0040] "바이사이클릭 핵산" 또는 "BNA"는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드의 푸라노스 부분이 푸라노스 고리 상의 2 탄소 원자들을 연결하는 브릿지를 포함하여 바이사이클릭 고리 시스템을 형성하는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 나타낸다.
- [0041] "캡 구조" 또는 "말단 캡 모이어티"는 안티센스 화합물의 양쪽 말단에 도입된 화학적 변형을 의미한다.
- [0042] "화학적으로 뚜렷한 영역"은 동일한 안티센스 화합물의 또 하나 영역과 어느 정도 화학적으로 상이한 안티센스 화합물의 영역을 나타낸다. 예를 들면, 2'-0-메톡시에틸 뉴클레오타이드를 갖는 영역은 2'-0-메톡시에틸 변형이 없는 뉴클레오타이드를 갖는 영역과 화학적으로 구별된다.
- [0043] "키메라 안티센스 화합물"은 적어도 2 화학적으로 뚜렷한 영역을 갖는 안티센스 화합물을 의미한다.
- [0044] "공-투여"는 개인에게 2 또는 그 초과 제제들의 투여를 의미한다. 2 또는 그 초과 제제들은 단일 약제학적 조성

물로 존재할 수 있거나, 또는 별도의 약제학적 조성물들로 존재할 수 있다. 각각의 2 또는 그 초과 제제들은 동일한 또는 상이한 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 공-투여는 병행 또는 순차적 투여를 포함한다.

- [0045] "콜레스테롤"은 모든 동물 조직의 세포막에서 발견되는 스테롤 분자이다. 콜레스테롤은 초저밀도 지방단백질 (VLDL), 중간 밀도 지방단백질 (IDL), 저밀도 지방단백질 (LDL), 및 고밀도 지방단백질 (HDL)을 포함하는 지방단백질에 의해 동물의 혈액 혈장으로 운반되어야 한다. "혈장 콜레스테롤"은 혈장 또는 혈청에 존재하는 모든 지방단백질 (VLDL, IDL, LDL, HDL) 에스테르화된 및/또는 비-에스테르화된 콜레스테롤의 합을 나타낸다.
- [0046] "콜레스테롤 흡수 억제제"는 식사로부터 얻어지는 외인성 콜레스테롤의 흡수를 억제하는 제제를 의미한다.
- [0047] "상보성"은 제1 핵산 및 제2 핵산의 뉴클레오베이스들 사이의 짹짓기(pairing)를 위한 용량을 의미한다.
- [0048] "인접 뉴클레오베이스"는 서로 가까이에 인접한 뉴클레오베이스들을 의미한다.
- [0049] "데옥시리보뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드의 당 부분의 2' 위치에서 수소를 갖는 뉴클레오타이드를 의미한다. 데옥시리보뉴클레오타이드는 다양한 치환체들 중의 어느 것으로 변형될 수 있다.
- [0050] "진성 당뇨병" 또는 "당뇨병"은 불충분한 수준의 인슐린 또는 감소된 인슐린 민감도로부터 초래하는 장애가 있는 대사 및 비정상적으로 높은 혈당 (고혈당증)을 특징으로 하는 증후군이다. 특징적인 증상은 높은 혈액 글루코오스 수준으로 인한 과잉 소변 생산 (다뇨증), 증가된 배뇨를 보충하려는 과잉 갈증 및 증가된 유체 섭취 (다음다갈증), 눈의 광학에 대한 높은 혈액 글루코오스 효과로 인한 흐릿한 시력, 설명되지 않은 체중 감소, 및 무기력이다.
- [0051] "당뇨병 이상지질혈증" 또는 "이상지질혈증을 수반하는 유형 2 당뇨병"은 유형 2 당뇨병, 감소된 HDL-C, 상승된 트리글라이세라이드, 및 상승된 작은, 고밀도 LDL 입자를 특징으로 하는 상태를 의미한다.
- [0052] "희석제"는 약리학적 활성이 없지만 약제학적으로 필요한 또는 바람직한 조성물 중의 성분을 의미한다. 예를 들면, 주사되는 조성물 중의 희석제는 액체, 예를 들면 식염수 용액일 수 있다.
- [0053] "이상지질혈증"은 지질 및/또는 지방단백질 과잉생산 또는 결핍을 포함하는, 지질 및/또는 지방단백질 대사의 장애를 나타낸다. 이상지질혈증은 콜레스테롤 및 트리글라이세라이드 뿐만 아니라 저-밀도 지방단백질 (LDL) 콜레스테롤과 같은 지방단백질과 같은 지질의 상승으로 발현될 수 있다.
- [0054] "복용량 단위"는 약제학적 제제, 예를 들면 알약, 정제, 또는 당해분야에 공지된 다른 복용량 단위가 제공되는 형태를 의미한다. 어떤 구현예에서, 복용량 단위는 동결건조된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 바이알이다. 어떤 구현예에서, 복용량 단위는 재구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 바이알이다.
- [0055] "용량"은 단일 투여에 또는 명시된 기간 내에 제공되는 약제학적 제제의 명시된 양을 의미한다. 어떤 구현예에서, 용량은 1, 2, 또는 그 초과의 볼루스, 정제 또는 주사액으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 피하 투여를 원하는 어떤 구현예에서, 원하는 용량은 단일 주사에 의해 용이하게 수용되지 않는 용적을 필요로 하고, 따라서, 2 또는 그 초과 주사가 원하는 용량을 달성하는데 사용될 수 있다. 어떤 구현예에서, 약제학적 제제는 연장된 기간에 걸쳐 또는 연속적으로 주입에 의해 투여되다. 용량은 1시간, 1일, 1주 또는 1개월에 대한 약제학적 제제의 양으로서 언급될 수 있다.
- [0056] "효과적인 양" 또는 "치료적으로 효과적인 양"은 제제가 필요한 개인에서 원하는 생리학적 결과를 유발하기에 충분한 활성 약제학적 제제의 양을 의미한다. 효과적인 양은 치료될 개인의 건강 및 신체적 상태, 치료될 개인의 분류 집단, 조성물의 제형, 개인의 의료 상태의 평가, 및 다른 관련된 인자들에 의존하여 개인들에 따라 가변적일 수 있다.
- [0057] "완전히 상보적인" 또는 "100% 상보적인"은 제1 핵산의 뉴클레오베이스 서열의 각각의 뉴클레오베이스가 제2 핵산의 제2 뉴클레오베이스 서열에 상보적인 뉴클레오베이스를 가짐을 의미한다. 어떤 구현예에서, 제1 핵산은 안티센스 화합물이고 표적 핵산은 제2 핵산이다.
- [0058] "캡머"는 RNase H 절단을 유지하는 다수의 뉴클레오사이드를 갖는 내부 영역이 1 이상의 뉴클레오사이드를 갖는 외부 영역들 사이에 위치해 있는 키메라 안티센스 화합물을 의미하며, 여기서 내부 영역을 포함하는 뉴클레오사이드들은 외부 영역을 포함하는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오사이드들과 화학적으로 구별된다. 내부 영역은 "캡 분절"로서 통칭될 수 있고 외부 영역은 "윙 분절"로서 통칭될 수 있다.
- [0059] "캡-확대된"은 1 내지 6 뉴클레오사이드를 갖는 5' 및 3' 윙 분절들 사이에 위치하거나 상기 5' 및 3' 윙 분절

들에 가까이에 인접한 12 또는 그 초과의 인접 2'-데옥시리보뉴클레오사이드의 갭 분절을 갖는 키메라 안티센스 화합물을 의미한다.

- [0060] "글루코스"는 에너지 공급원 및 염증성 중간체로서 세포에 의해 사용되는 모노사카라이드이다. "혈장 글루코오스"는 혈장에 존재하는 글루코오스를 나타낸다.
- [0061] "HMG-CoA 환원효소 억제제"는 아토르바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴, 및 심바스타틴과 같이 효소 HMG-CoA 환원효소의 억제를 통해 작용하는 제제를 의미한다.
- [0062] "하이브리드화"는 상보적인 핵산 분자들의 어널링을 의미한다. 어떤 구현예에서, 상보적인 핵산 분자는 안티센스 화합물 및 표적 핵산을 포함한다.
- [0063] "고지혈증" 또는 "고지방혈증"은 상승된 혈청 지질 또는 순환 (혈장) 지질을 특징으로 하는 상태이다. 이 상태는 비정상적으로 고농도의 지방을 나타낸다. 순환 혈액 중의 지질 분획은 콜레스테롤, 저밀도 지방단백질, 초저밀도 지방단백질 및 트리글라이세라이드이다.
- [0064] "하이퍼트리글리세라이드혈증"은 상승된 트리글라이세라이드 수준을 특징으로 하는 상태를 의미한다.
- [0065] "대사작용(metabolic)"을 갖는 동물을 확인하는 또는 선택하는"은 대사 질환, 또는 대사 장애로 진단된 대상체를 확인 또는 선택하거나; 비제한적으로, 대사 증후군, 고혈당증, 고트리글라이세라이드 혈증, 고혈압 증가된 인슐린 내성, 감소된 인슐린 민감도, 상기 정상 체중, 및/또는 상기 정상 체지방 또는 이들의 임의 조합을 포함하는 대사질환 중의 임의 증상을 갖는 대상체를 확인 또는 선택함을 의미한다. 그와 같은 확인은, 비제한적으로, 표준 임상 시험 또는 평가, 예를 들면, 혈청 또는 순환 (혈장) 혈액-글루코오스의 측정, 혈청 또는 순환 (혈장) 트리글라이세라이드의 측정, 혈압 측정, 체지방 측정, 체중 측정 등을 포함하는 임의 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0066] "가까이에 인접한"은 가까이에 인접한 원소들 사이에 간섭하는 원소들이 존재하지 않음을 의미한다.
- [0067] "개인" 또는 "대상체" 또는 "동물"은 치료 또는 요법을 위해 선택되는 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다.
- [0068] "발현 또는 활성을 억제하는"은 RNA 또는 단백질의 발현 또는 활성의 감소 또는 봉쇄를 나타내고 반드시 발현 또는 활성의 모든 제거를 나타내지는 않는다.
- [0069] "인슐린 내성"은 인슐린의 정상 양이 지방, 근육 및 간 세포로부터 정상 인슐린 반응을 생성하는데 부적절한 상태로서 규정된다. 지방 세포에서의 인슐린 내성은 저장된 트리글라이세라이드의 가수분해를 유발하여 혈액 혈장 중에 유리 지방산을 상승시킨다. 근육에서의 인슐린 내성은 글루코오스 흡수를 감소시키는 반면, 간에서의 인슐린 내성은 글루코오스 보관을 감소시키고, 두 가지 모든 효과는 혈액 글루코오스를 상승시키는 역할을 한다. 인슐린 내성에 기인한 인슐린 및 글루코오스의 높은 혈장 수준은 종종 대사 증후군 및 유형 2 당뇨병을 유도한다.
- [0070] "인슐린 민감도"는 얼마나 효과적으로 개인이 글루코오스를 처리하는지의 척도이다. 높은 인슐린 민감도를 갖는 개인은 글루코오스를 효과적으로 처리하는 반면, 낮은 인슐린 민감도를 갖는 개인은 글루코오스를 효과적으로 처리하지 못한다.
- [0071] "뉴클레오사이드간 결합"은 뉴클레오사이드들 사이의 화학 결합을 나타낸다.
- [0072] "정맥내 투여"는 정맥 내로 투여함을 의미한다.
- [0073] "연결된 뉴클레오사이드"는 함께 결합된 인접한 뉴클레오사이드를 의미한다.
- [0074] "지질-저하 요법" 또는 "지질 저하제"는 대상체에서 1 이상의 지질을 감소시키기 위해 대상체에게 제공된 치료 처방계획을 의미한다. 어떤 구현예에서, 지질-저하 요법은 대상체에서 1 이상의 ApoB, 총 콜레스테롤, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, 비-HDL-C, 트리글라이세라이드, 작은 고밀도 LDL 입자, 및 Lp(a)를 감소시키기 위해 제공된다. 지질-저하 요법의 예는 스타틴, 피브레이트, 및 MTP 억제제를 포함한다.
- [0075] "주요 위험 인자"는 특정 질환 또는 상태에 대한 높은 위험의 원인이 되는 인자를 나타낸다. 어떤 구현예에서, 관상동맥 심장 질환에 대한 주요 위험 인자는, 제한 없이, 담배 흡연, 고혈압, 저 HDL-C, 관상동맥 심장 질환의 가족 이력, 연령, 및 본원에 개시된 다른 인자들을 포함한다.
- [0076] "대사 질환" 또는 "대사 장애"는 대사 기능에서의 변경 또는 교란을 특징으로 하는 상태를 나타낸다. "대사작용 (metabolic)" 및 "대사(metabolism)"는 당해분야에 익히 공지된 용어들이고 일반적으로 살아있는 유기체 내에서 일어나는 모든 범위의 생화학적 공정을 포함한다. 대사 질환 또는 장애는, 비제한적으로, 비만증, 당뇨병, 고혈

당증, 전당뇨병, 비-알코올성 지방 간 질환 (NAFLD), 대사 증후군, 인슐린 내성, 당뇨병 이상지질혈증, 또는 고트리글라이세라이드 혈증 또는 이들의 조합을 포함한다.

- [0077] "대사 증후군"은 대사 기원의 지질 및 비-지질 심혈관 위험 인자의 클러스터링(clustering)을 특징으로 하는 상태를 의미한다. 어떤 구현예에서, 대사 증후군은 하기 인자들 중의 어느 3개의 존재에 의해 확인된다: 남성의 경우 102 cm 초과의 허리 둘레 또는 여성의 경우 88 cm 초과의 허리 둘레; 적어도 150 mg/dL의 혈청 트리글라이세라이드; 남성의 경우 40 mg/dL 미만의 HDL-C 또는 여성의 경우 50 mg/dL 미만의 HDL-C; 적어도 130/85 mmHg의 혈압; 및 적어도 110 mg/dL의 공복 글루코오스. 이들 결정요인은 임상 실행시 쉽게 측정될 수 있다 (JAMA, 2001, 285: 2486-2497).
- [0078] "불일치" 또는 "비-상보적인 뉴클레오베이스"는 제1 핵산의 뉴클레오베이스가 제2 또는 표적 핵산의 상응하는 뉴클레오베이스와 짹지를 수 없는 경우를 나타낸다.
- [0079] "혼합된 이상지질혈증"은 상승된 콜레스테롤 및 상승된 트리글라이세라이드를 특징으로 하는 상태를 의미한다.
- [0080] "변형된 뉴클레오사이드간 결합"은 천연 생성 뉴클레오사이드간 결합 (즉, 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 결합)으로부터 치환 또는 임의 변화를 나타낸다.
- [0081] "변형된 뉴클레오베이스"는 아데닌, 시토신, 구아닌, 티미딘, 또는 우라실이 아닌 임의 뉴클레오베이스를 나타낸다. "비변형된 뉴클레오베이스"는 퓨린 염기들 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘 염기 티민 (T), 시토신 (C), 및 우라실 (U)을 의미한다.
- [0082] "변형된 뉴클레오사이드"는, 독립적으로, 변형된 당 모이어티 또는 변형된 뉴클레오베이스를 갖는 뉴클레오사이드를 의미한다.
- [0083] "변형된 뉴클레오타이드"는, 독립적으로, 변형된 당 모이어티, 변형된 뉴클레오사이드간 결합, 또는 변형된 뉴클레오베이스를 갖는 뉴클레오타이드를 의미한다. "변형된 뉴클레오사이드"는, 독립적으로, 변형된 당 모이어티 또는 변형된 뉴클레오베이스를 갖는 뉴클레오사이드를 의미한다.
- [0084] "변형된 올리고뉴클레오타이드"는 적어도 1 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0085] "변형된 당"은 천연 당으로부터의 치환 또는 변화를 나타낸다.
- [0086] "모티프"는 안티센스 화합물에서의 화학적으로 뚜렷한 영역의 패턴을 의미한다.
- [0087] "MTP 억제제"는 효소, 마이크로솜 트리글라이세라이드 전달 단백질을 억제하는 제제를 의미한다.
- [0088] "천연 생성 뉴클레오사이드간 결합"은 3' 내지 5' 포스포디에스테르 결합을 의미한다.
- [0089] "천연 당 모이어티"는 DNA (2'-H) 또는 RNA (2'-OH)에서 발견되는 당을 의미한다.
- [0090] "비-알코올성 지방 간 질환" 또는 "NAFLD"는 과잉 알코올 사용 (예를 들면, 20 g/1일을 초과하는 알코올 소비)에 기인하지 않은 간의 지방 염증을 특징으로 하는 상태를 의미한다. 어떤 구현예에서, NAFLD는 인슐린 내성 및 대사 증후군과 관련된다. NAFLD는 간세포에서의 단순 트리글라이세라이드 축적 (간 지방증)으로부터 염증을 수반하는 간 지방증 (지방간염), 섬유화, 및 간경변까지 범위의 질환 스펙트럼을 포함한다.
- [0091] "비알코올성 지방간염" (NASH)은 트리글라이세라이드의 침적을 넘어서 NAFLD의 진행으로 일어난다. 괴사, 염증, 및 섬유화를 유도할 수 있는 "제2 히트(hit)"는 NASH의 발달을 위해 필요하다. 제2-히트에 대한 후보물질은 넓은 카테고리 내에서 분류될 수 있다: 산화 스트레스에서 증가를 유발하는 인자, 및 전염증성 시토카인의 발현을 촉진하는 인자.
- [0092] "핵산"은 모노머 뉴클레오타이드로 이루어진 문자를 나타낸다. 핵산은 리보핵산 (RNA), 테옥시리보핵산 (DNA), 단일-가닥 핵산, 이중-가닥 핵산, 작은 개재 리보핵산 (siRNA), 및 마이크로RNA (miRNA)를 포함한다. 핵산은 또한 단일 문자에서 이들 원소들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0093] "뉴클레오베이스"는 또 하나의 핵산의 염기와 짹을 지을 수 있는 헤테로사이클릭 모이어티를 의미한다.
- [0094] "뉴클레오베이스 서열"은 임의 당, 결합, 또는 뉴클레오베이스 변형과는 독립적인 인접 뉴클레오베이스의 순서를 의미한다.
- [0095] "뉴클레오사이드"는 당에 연결된 뉴클레오베이스를 의미한다.

- [0096] "뉴클레오사이드 모방체"는 당 또는 당과 염기 및, 반드시 필수적이진 않지만, 올리고머 화합물, 예를 들면, 모폴리노를 갖는 뉴클레오사이드 모방체, 사이클로헥세닐, 사이클로헥실, 테트라하이드로파라닐, 바이사이클로 또는 트리사이클로 당 모방체 예를 들면, 비푸라노스 당 단위의 1 이상의 위치에서의 결합을 대체하는데 사용되는 구조를 포함한다.
- [0097] "뉴클레오타이드"는 뉴클레오사이드의 당 부분에 공유결합으로 연결된 포스페이트 그룹을 갖는 뉴클레오사이드를 의미한다.
- [0098] "뉴클레오타이드 모방체"는 뉴클레오사이드, 및 올리고머 화합물, 예를 들면, 웨타이드 핵산 또는 모폴리노 (-N(H)-C(=O)-O- 또는 다른 비-포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 모폴리노)의 1 이상의 위치에서의 결합을 대체하는데 사용되는 구조를 포함한다.
- [0099] "올리고머 화합물" 또는 "올리고머"는 2 또는 그 초파의 하위-구조를 포함하고 핵산 분자의 영역에 하이브리드 할 수 있는 폴리머 구조를 나타낸다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 안티센스 화합물이다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 어떤 구현예에서, 올리고머 화합물은 키메라 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0100] "올리고뉴클레오타이드"는 각각이 서로 독립적으로 변형되거나 비변형될 수 있는 연결된 뉴클레오사이드의 폴리머를 의미한다.
- [0101] "비경구 투여"는 주사 또는 주입을 통한 투여를 의미한다. 비경구 투여는 피하 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 동맥내 투여, 비강내 투여, 또는 두개내 투여, 예를 들면 경막내 또는 뇌심실내 투여를 포함한다. 투여는 연속적, 또는 만성, 또는 단기간 또는 간헐적일 수 있다.
- [0102] "웨타이드"는 아마이드 결합에 의해 적어도 2 아미노산을 연결함으로써 형성된 분자를 의미한다. 웨타이드는 폴리웨타이드 및 단백질을 나타낸다.
- [0103] "약제학적 제제"는 개인에게 투여될 때 치료 이점을 제공하는 물질을 의미한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, PTPIB에 대해 표적된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 약제학적 제제이다.
- [0104] "약제학적 조성물"은 개인에게 투여하기에 적합한 물질의 혼합물을 의미한다. 예를 들면, 약제학적 조성물은 1 이상의 활성제 및 멸균 수용액을 포함할 수 있다.
- [0105] "약제학적으로 허용가능한 담체"는 올리고뉴클레오타이드의 구조를 간섭하지 않는 매질 또는 희석제를 의미한다. 그와 같은 담체들 중의 일부는 약제학적 조성물을, 예를 들면, 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 서스펜션 및 대상체에 의한 경우 섭취용 로젠지로 제형화시킬 수 있다. 예를 들면, 약제학적으로 허용가능한 담체는 멸균 수용액일 수 있다.
- [0106] "약제학적으로 허용가능한 유도체"는 본원에 기재된 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염, 콘주게이트, 전구약물 또는 이성질체를 포함한다.
- [0107] "약제학적으로 허용가능한 염"은 안티센스 화합물의 생리적으로 및 약제학적으로 허용가능한 염, 즉, 모 올리고뉴클레오타이드의 원하는 생물학적 활성을 유지하고 그것에 원하지 않는 독성효과를 부여하지 않는 염을 의미한다.
- [0108] "포스포로티오에이트 결합"은 포스포디에스테르 결합이 비-브릿징 산소 원자들 중의 하나를 황 원자로 대체함으로써 변형되는 뉴클레오사이드들 사이의 결합을 의미한다. 포스포로티오에이트 결합은 변형된 뉴클레오사이드간 결합이다.
- [0109] "부분(portion)"은 규정된 수의 핵산의 인접 (즉, 연결된) 뉴클레오베이스를 의미한다. 어떤 구현예에서, 부분은 규정된 수의 표적 핵산의 인접 뉴클레오베이스이다. 어떤 구현예에서, 부분은 규정된 수의 안티센스 화합물의 인접 뉴클레오베이스이다.
- [0110] "예방하다"는 수분 내지 무기한의 기간 동안 질환, 장애, 또는 상태의 개시 또는 발달을 지연시키거나 미연에 방지하는 것을 나타낸다. 예방은 또한 질환, 장애, 또는 상태가 발생할 위험을 감소시키는 것을 의미한다.
- [0111] "전구약물"은 불활성 형태로 제조되어 신체 또는 세포 내에서 내인성 효소 또는 다른 화학물질 또는 조건의 작용에 의해 활성 형태로 전환되는 치료제를 의미한다.

- [0112] "단백질 티로신 포스파타아제 1B" 또는 "PTPIB" (또한 PTPN1; 단백질 티로신 포스파타아제, 비-수용체 유형 1; PTP-1B; RKPTP로도 공지됨)는 PTPIB의 임의 핵산 또는 단백질을 의미한다.
- [0113] "PTPIB 발현"은 PTPIB를 암호화하는 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준 또는 mRNA로부터 번역된 단백질의 수준을 의미한다. PTPIB 발현은 노던 또는 웨스턴 블랏과 같은 당해분야 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0114] "PTPIB 핵산"은 PTPIB를 암호화하는 임의 핵산을 의미한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, PTPIB 핵산은 PTPIB를 암호화하는 DNA 서열, PTPIB를 암호화하는 RNA 서열 (인트론 및 엑손을 포함하는 게놈 DNA 포함), 및 PTPIB를 암호화하는 mRNA 서열을 포함한다. "PTPIB mRNA"는 PTPIB 단백질을 암호화하는 mRNA를 의미한다.
- [0115] "부작용"은 원하는 효과 이외에 치료에서 기인하는 생리 반응을 의미한다. 어떤 구현예에서, 부작용은 주사 부위 반응, 간 기능 시험 이상, 신장 기능 이상, 간독성, 신장 독성, 중추 신경계 이상, 근병증, 및 권태감을 포함한다. 예를 들면, 혈청에서 증가된 아미노트랜스페라제 수준은 간독성 또는 간 기능 이상을 나타낸다. 예를 들면, 증가된 빌리루빈은 간독성 또는 간 기능 이상을 나타낸다.
- [0116] "단일-가닥 올리고뉴클레오타이드"는 상보적인 가닥에 하이브리드되지 않은 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0117] "특이적으로 하이브리드 가능한"은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 표적 핵산 사이에 충분한 정도의 상보성을 가져 원하는 효과를 유도하는 반면, 특이적 결합을 원하는 조건하에, 즉, 생체내 검정 및 치료학적 처치의 경우에 생리 조건하에 비-표적 핵산에 대해 최소 효과를 나타내거나 효과가 없는 안티센스 화합물을 나타낸다.
- [0118] "스타틴"은 HMG-CoA 환원효소의 활성을 억제하는 제제를 의미한다.
- [0119] "피하 투여"는 피부 바로 아래 투여를 의미한다.
- [0120] "표적으로 하는" 또는 "표적된"은 표적 핵산에 특이적으로 하이브리드하여 원하는 효과를 유도할 안티센스 화합물의 디자인 및 선택의 과정을 의미한다.
- [0121] "표적 핵산", "표적 RNA", 및 "표적 RNA 전사체" 모두는 안티센스 화합물에 의해 표적될 수 있는 핵산을 나타낸다.
- [0122] "표적 분절"은 안티센스 화합물에 의해 표적된 표적 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. "5' 표적 부위"는 표적 분절의 5'-최대 뉴클레오타이드를 나타낸다. "3' 표적 부위"는 표적 분절의 3'-최대 뉴클레오타이드를 나타낸다.
- [0123] "치료적으로 효과적인 양"은 개인에게 치료 이점을 제공하는 제제의 양을 의미한다.
- [0124] "치료 생활방식 변화"는 저 지방/지방 조직 질량 및/또는 콜레스테롤로 의도된 식이 및 생활방식 변화를 의미한다. 그와 같은 변화는 심장 질환 발병 위험을 감소시킬 수 있고, 총 1일 칼로리, 총 지방, 포화 지방, 다중불포화된 지방, 모노불포화된 지방, 카보하이드레이트, 단백질, 콜레스테롤, 불용성 섬유질의 식이 섭취에 대한 권고, 뿐만 아니라 신체 활동에 대한 권고를 포함할 수 있다.
- [0125] "트리글라이세라이드" 또는 "TG"는 3 지방산 분자로 조합된 글리세롤로 이루어진 지질 또는 중성 지방을 의미한다.
- [0126] "유형 2 당뇨병" (또한 "유형 2 진성 당뇨병" 또는 "진성 당뇨병, 유형 2", 그리고 "진성 당뇨병 유형 2", "비-인슐린-의존적 당뇨병 (NIDDM)", "비만증 관련된 당뇨병", 또는 "성인형 당뇨병"이라고 이전에 통칭됨)은 인슐린 내성, 상대적 인슐린 결핍, 및 고혈당증을 주로 특징으로 하는 대사 장애이다.
- [0127] "치료하다"는 질환, 장애, 또는 상태를 변경시키거나 개선시키기 위해 동물에게 약제학적 조성물을 투여함을 의미한다.
- [0128] "비변형된 뉴클레오타이드"는 천연 생성 뉴클레오베이스, 당 모이어티, 및 뉴클레오사이드간 결합으로 구성된 뉴클레오타이드를 의미한다. 어떤 구현예에서, 비변형된 뉴클레오타이드는 RNA 뉴클레오타이드 (즉, β -D-리보 뉴클레오사이드) 또는 DNA 뉴클레오타이드 (즉, β -D-데옥시리보뉴클레오사이드)이다.
- [0129] 어떤 구현예
- [0130] 어떤 구현예는 PTPIB 발현을 억제하는 방법, 화합물, 및 조성물을 제공한다.
- [0131] 어떤 구현예는 PTPIB 핵산에 표적화된 안티센스 화합물을 제공한다. 어떤 구현예에서, PTPIB 핵산은 하기에서

제시된 서열 중 어떤 것이다: 유전자은행 승인 번호 NM_002827.2 (서열번호: 1로서 본 명세서에 포함됨), 뉴클레오타이드 14178000 내지 14256000로부터 끝이 잘린 유전자은행 승인 번호 NT_011362.9 (서열번호: 2로서 본 명세서에 포함됨); 및 붉은털원숭이 PTPIB 스캐폴드의 엑손 1-9, 인트론 9 및 엑손 10로부터의 서열의 연속 (서열번호: 3으로서 본 명세서에 포함됨).

- [0132] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 10 내지 30개의 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0133] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0134] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32 또는 100-111의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 가질 수 있다.
- [0135] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26 또는 44의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 가질 수 있다.
- [0136] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 가질 수 있다.
- [0137] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 가질 수 있다.
- [0138] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 15 내지 30개의 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0139] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 15 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0140] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 15 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32 또는 100-111의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 가질 수 있다.
- [0141] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 15 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26 또는 44의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 가질 수 있다.
- [0142] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 15 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 가질 수 있다.
- [0143] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 15 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 가질 수 있다.
- [0144] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해

상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 18 내지 21개의 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0145] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 18 내지 21개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 21개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0146] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 18 내지 21개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32 또는 39-49의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0147] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 18 내지 21개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26 또는 44의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0148] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 18 내지 21개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0149] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 18 내지 21개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0150] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 20 내지 35개의 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0151] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0152] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32 또는 50의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0153] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0154] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0155] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0156] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 30개의 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0157] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이

스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0158] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32 또는 50의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0159] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0160] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 어떤 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0161] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 가질 수 있다.

[0162] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 25개의 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0163] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 25개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0164] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 25개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0165] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 25개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0166] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 25개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 어떤 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0167] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 25개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0168] 어떤 구현예에서, 본 발명의 화합물 또는 조성물은 20 내지 24개의 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0169] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 24개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0170] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 24개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0171] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 24개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지

고 서열번호: 26의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0172] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 24개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0173] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 24개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다

[0174] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 23개의 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열 번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0175] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 23개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 또는 23 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0176] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 23개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0177] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 23개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0178] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 23개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0179] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 23개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0180] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 22개의 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열 번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0181] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 22개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0182] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 22개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0183] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 22개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0184] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 22개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스

서열을 갖는다.

- [0185] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 22개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.
- [0186] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 21개의 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열 번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0187] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 21개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 21 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0188] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 21개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.
- [0189] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 21개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.
- [0190] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 21개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 임의의 것의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.
- [0191] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20 내지 21개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.
- [0192] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20개의 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0193] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열 번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0194] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열 번호: 4-32의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.
- [0195] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열 번호: 26의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.
- [0196] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 ISIS 번호: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 임의의 것으로 이루어진다.
- [0197] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 ISIS 번호: 404173으로 이루어진다.
- [0198] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 26으로 이루어진다.
- [0199] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 변형된 올리고뉴클레오타이드의 염 으로 이루어진다.
- [0200] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제

를 포함한다.

- [0201] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오베이스 서열은 변형된 올리고뉴클레오타이드의 전체에 걸쳐 측정된 바와 같이 서열번호: 1-3의 어느 하나에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 상보적이다.
- [0202] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오베이스 서열은 변형된 올리고뉴클레오타이드의 전체에 걸쳐 측정된 바와 같이 서열번호: 4-32 또는 39-50의 어느 하나에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0203] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오베이스 서열은 변형된 올리고뉴클레오타이드의 전체에 걸쳐 측정된 바와 같이 서열번호: 26 또는 44의 어느 하나에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0204] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오베이스 서열은 변형된 올리고뉴클레오타이드의 전체에 걸쳐 측정된 바와 같이 ISIS 번호: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472의 어느 하나에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0205] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오베이스 서열은 변형된 올리고뉴클레오타이드의 전체에 걸쳐 측정된 바와 같이 ISIS 번호: 404173에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0206] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물은 단일-가닥 변형된 올리고뉴클레오타이드로 이루어진다.
- [0207] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 화합물. 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 18개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진다.
- [0208] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드의 적어도 하나의 뉴클레오사이드간 결합은 변형된 뉴클레오사이드간 결합이다. 어떤 구현예에서, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 결합이다.
- [0209] 어떤 구현예에서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 적어도 하나의 뉴클레오사이드는 변형된 뉴클레오베이스를 포함한다. 어떤 구현예에서, 변형된 뉴클레오베이스는 5-메틸시토신이다.
- [0210] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: a) 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 캡 분절; b) 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 왕 분절; 및 c) 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 왕 분절. 캡 분절은 5' 왕 분절과 3' 왕 분절 사이에 위치하고 각 왕 분절의 각 뉴클레오사이드는 변형된 당을 포함한다.
- [0211] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 캡 분절은 10개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어지고, 5' 왕 분절은 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 3' 왕 분절은 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신은 5-메틸시토신이다.
- [0212] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 캡 분절은 8개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어지고, 5' 왕 분절은 6개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 3' 왕 분절은 6개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신은 5-메틸시토신이다.
- [0213] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 캡 분절은 13개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어지고, 5' 왕 분절은 2개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 3' 왕 분절은 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신은 5-메틸시토신이다.

- [0214] 어떤 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 18개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 캡 분절은 8개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어지고, 5' 왕 분절은 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 3' 왕 분절은 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신은 5-메틸시토신이다.
- [0215] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: a) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 캡 분절; b) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 왕 분절; 및 c) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 왕 분절. 캡 분절은 5' 왕 분절과 3' 왕 분절 사이에 위치하고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다.
- [0216] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 1-3의 임의의 것의 동등 길이부에 대해 상보적인 적어도 8개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 18개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: a) 8개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 캡 분절; b) 6개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 왕 분절; 및 c) 6개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 왕 분절. 캡 분절은 5' 왕 분절과 3' 왕 분절 사이에 위치하고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다.
- [0217] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 4-32의 적어도 19개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: a) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 캡 분절; b) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 왕 분절; 및 c) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 왕 분절. 캡 분절은 5' 왕 분절과 3' 왕 분절 사이에 위치하고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다.
- [0218] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 26의 적어도 19개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: a) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 캡 분절; b) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 왕 분절; 및 c) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 왕 분절. 캡 분절은 5' 왕 분절과 3' 왕 분절 사이에 위치하고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다.
- [0219] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 26의 뉴클레오베이스 서열을 갖는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: a) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 캡 분절; b) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 왕 분절; 및 c) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 왕 분절. 캡 분절은 5' 왕 분절과 3' 왕 분절 사이에 위치하고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다.
- [0220] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 26 또는 44의 적어도 19개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: a) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 캡 분절; b) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 왕 분절; 및 c) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 왕 분절. 캡 분절은 5' 왕 분절과 3' 왕 분절 사이에 위치하고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다. 어떤 구현예에서, 화합물 또는 조성물은 ISIS 번호: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472 중 어느 하나의 화합물을 포함한다.
- [0221] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 4-32의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베

이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: a) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 캡 분절; b) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 왕 분절; 및 c) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 왕 분절. 캡 분절은 5' 왕 분절과 3' 왕 분절 사이에 위치하고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다.

[0222] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 26의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스을 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: a) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 캡 분절; b) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 왕 분절; 및 c) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 왕 분절. 캡 분절은 5' 왕 분절과 3' 왕 분절 사이에 위치하고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다.

[0223] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 서열번호: 26의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스을 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다, 여기서 변형된 올리고뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: a) 10개의 연결된 데옥시뉴클레오사이드로 이루어진 캡 분절; b) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 5' 왕 분절; 및 c) 5개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 3' 왕 분절. 캡 분절은 5' 왕 분절과 3' 왕 분절 사이에 위치하고, 각 왕 분절의 각각의 뉴클레오사이드는 2'-0-메톡시에틸 변형된 당을 포함하고, 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고 각 시토신 잔기는 5-메틸시토신이다. 어떤 구현예에서, 화합물 또는 조성물은 화합물은 IS 번호: 404173을 포함한다.

[0224] 어떤 구현예는 PTPIB 발현을 억제하는 방법, 화합물, 및 조성물을 제공한다.

[0225] 어떤 구현예는 동물에서 PTPIB 발현을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 동물에게 본 명세서에 기재된 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 20 내지 25개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 20 내지 22개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 20 내지 23개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 20 내지 21개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 20 내지 22개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 20개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 대사 질환 또는 장애의 예는 비제한적으로 비만증, 당뇨병, 고혈당증, 전당뇨병, 비-알코올성 지방 간 질환 (NAFLD), 대사 증후군, 인슐린 내성, 당뇨병 이상지질혈증, 또는 하이퍼트리글리세라이드혈증 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0226] 어떤 구현예는 동물에서 대사 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 동물에게 본 명세서에 기재된 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 20개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 대사 질환 또는 장애의 예는 비제한적으로 비만증, 당뇨병, 고혈당증, 전당뇨병, 비-알코올성 지방 간 질환 (NAFLD), 대사 증후군, 인슐린 내성, 당뇨병 이상지질혈증, 또는 하이퍼트리글리세라이드혈증 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0227] 어떤 구현예는 동물에서 글루코오스 수준을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 동물에게 본 명세서에 기재된 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 화합물은 PTPIB로 표적화된 길이에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 20개의 연결된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 동물에서 글루코오스 수준의 감소는 대사 질환을 예방, 개선 또는 치료한다. 어떤 구현예에서, 동물에서 글루코오스 수준의 감소는 당뇨병을 예방, 개선 또는 치료한다. 어떤 구현예에서, 동물에서 글루코오스 수준의 감소는 비만증을 예방, 개선 또는 치료한다. 어떤 구현예에서, 동물에서 글루코오스 수준의 감소는 대사 증후군을 예방, 개선 또는 치료한다. 어떤 구현예에서, 동물에서 글루코오스 수준의 감소는 인슐린 내성을 예방, 개선 또

는 치료한다. 어떤 구현예에서, 동물에서 글루코오스 수준의 감소는 고혈당증을 예방, 개선 또는 치료한다. 어떤 구현예에서, 동물에서 글루코오스 수준의 감소는 NAFLD를 예방, 개선 또는 치료한다. 어떤 구현예에서, 동물에서 글루코오스 수준의 감소는 당뇨병 이상지질증을 예방, 개선 또는 치료한다. 어떤 구현예에서, 글루코오스 수준은 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%까지 감소된다.

[0228] 어떤 구현예에서, PTPIB는 하기중 어떤 것에서 제시된 서열을 갖는다: 유전자은행 수탁 번호 유전자은행 승인 번호 NM_002827.2 (서열번호: 1로서 본 명세서에 포함됨), 뉴클레오타이드 14178000 내지 14256000로부터 끝이 잘린 유전자은행 승인 번호 NT_011362.9 (서열번호: 2로서 본 명세서에 포함됨); 및 붉은털원숭이 PTPIB 스캐폴드의 엑손 1-9, 인트론 9 및 엑손 10로부터의 서열의 연속 (서열번호: 3으로서 본 명세서에 포함됨). 어떤 구현예에서, PTPIB는 서열번호: 1-2에서 제시된 인간 서열을 갖는다. 어떤 구현예에서, PTPIB는 서열번호: 3에서 제시된 붉은털원숭이 서열을 갖는다).

[0229] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 그의 염, 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32, 50에서 인용된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20 내지 25개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32, 50에서 인용된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32, 50에서 인용된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.

[0230] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 화합물 또는 조성물은 그의 염, 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26에서 인용된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20 내지 25개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26에서 인용된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26에서 인용된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.

[0231] 어떤 구현예에서, 본 발명의 화합물 또는 조성물은 그의 염, 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472에서 인용된 뉴클레오베이스 서열 중에서부터 선택된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20 내지 25개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472에서 인용된 뉴클레오베이스 서열 중에서부터 선택된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472에서 인용된 뉴클레오베이스 서열 중에서부터 선택된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.

[0232] 어떤 구현예에서, 본 발명의 화합물 또는 조성물은 그의 염, 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173에서 인용된 뉴클레오베이스 서열 중에서부터 선택된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20 내지 25개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.

어지고 ISIS 번호: 404173에서 인용된 뉴클레오베이스 서열 중에서부터 선택된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조성물은 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173에서 인용된 뉴클레오베이스 서열 중에서부터 선택된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.

[0233] 어떤 구현예는 하기를 포함하는, PTPIB 관련된 질환 또는 상태에 있는 동물을 치료하는 방법을 제공한다: a) PTPIB 관련된 질환 또는 상태에 있는 상기 동물을 확인하는 단계, 및 b) 상기 동물에게, 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 전체에 걸쳐 측정된 바와 같이 서열번호: 1-3의 어떤 것에 대해 적어도 90% 상보적인 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 치료적으로 효과적인 양으로 투여하는 단계. 어떤 구현예에서, 동물에게 투여된 화합물의 치료적으로 효과적인 양은 동물에서 PTPIB 관련된 질환 또는 상태, 또는 그의 증상을 치료 또는 감소시킨다. 어떤 구현예에서, PTPIB 관련된 질환 또는 상태는 당뇨병이다.

[0234] 어떤 구현예는 하기를 포함하는, PTPIB 관련된 질환 또는 상태에 있는 동물을 치료하는 방법을 제공한다: a) PTPIB 관련된 질환 또는 상태에 있는 상기 동물을 확인하는 단계, 및 b) 상기 동물에게, 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드의 전체에 걸쳐 측정된 바와 같이 서열번호: 1-3의 어떤 것에 대해 적어도 100% 상보적인 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 치료적으로 효과적인 양으로 투여하는 단계. 어떤 구현예에서, 동물에게 투여된 화합물의 치료적으로 효과적인 양은 동물에서 PTPIB 관련된 질환 또는 상태, 또는 그의 증상을 치료 또는 감소시킨다. 어떤 구현예에서, PTPIB 관련된 질환 또는 상태는 당뇨병이다.

[0235] 어떤 구현예는 대사 질환을 치료, 예방, 또는 개선하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서 대사 질환은 비만증, 당뇨병, 고혈당증, 전당뇨병, 비-알코올성 지방 간 질환 (NAFLD), 대사 증후군, 인슐린 내성, 당뇨병 이상지질 혈증, 또는 하이퍼트리글리세라이드혈증 또는 이들의 조합이다.

[0236] 어떤 구현예는 과증식성 장애를 치료, 예방, 또는 개선하는 방법을 제공한다.

[0237] 어떤 구현예는 동물에게 본 명세서에 기재된 화합물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 방법은 동물에게, 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 4-32 또는 50에서 인용된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 것을 포함한다. 어떤 구현예는 동물에게 본 명세서에 기재된 화합물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 방법은 동물에게, 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 서열번호: 26에서 인용된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 것을 포함한다.

[0238] 어떤 구현예는 동물에게 본 명세서에 기재된 화합물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 방법은 동물에게, 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, 또는 438472에서 인용된 뉴클레오베이스 서열 중에서부터 선택된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 것을 포함한다.

[0239] 어떤 구현예는 동물에게 본 명세서에 기재된 화합물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 방법은 동물에게, 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어지고 ISIS 번호: 404173에서 인용된 뉴클레오베이스 서열 중에서부터 선택된 뉴클레오베이스 서열의 적어도 20개의 인접 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 것을 포함한다.

[0240] 어떤 구현예에서, 동물은 인간이다.

[0241] 어떤 구현예에서, 투여는 본 명세서에 기재된 대사 질환을 예방, 치료, 개선하거나 그 진행을 느리게 한다.

[0242] 어떤 구현예에서, 투여는 본 명세서에 기재된 당뇨병을 예방, 치료, 개선하거나 그 진행을 느리게 한다.

[0243] 어떤 구현예에서, 화합물은 제2 제제와 공투여된다.

[0244] 어떤 구현예에서, 화합물 및 제2 제제는 수반하여 투여된다.

- [0245] 어떤 구현예에서, 투여는 비경구 투여이다.
- [0246] 어떤 구현예는 추가로, 동물에서 PTPIB mRNA 또는 단백질 발현을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 동물에게 본 명세서에 기재된 화합물 또는 조성물을 투여하여 동물에서 PTPIB mRNA 또는 단백질 발현을 감소시키는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서, 동물은 인간이다. 어떤 구현예에서, PTPIB mRNA 또는 단백질 발현의 감소는 대사 질환을 예방, 치료, 개선하거나 그 진행을 느리게 한다. 어떤 구현예에서, 대사 질환 또는 상태는 당뇨병이다.
- [0247] 어떤 구현예는 대사 질환이 있는 인간을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 질환이 있는 인간을 확인하는 단계 및 상기 인간에게, 본 명세서에 기재된 화합물 또는 조성물을 치료적으로 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함한다. 어떤 구현예에서, 치료는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 증상을 감소시킨다: 대사 증후군, 고혈당증, 하이퍼트리글리세라이드혈증, 고혈압, 증가된 글루코오스 수준, 증가된 인슐린 내성, 감소된 인슐린 민감도, 상기 정상 체중, 및/또는 상기 정상 체지방 또는 그의 임의의 조합.
- [0248] 어떤 구현예는 당뇨병이 있는 인간을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 질환이 있는 인간을 확인하는 단계 및 상기 인간에게, 본 명세서에 기재된 화합물 또는 조성물을 치료적으로 효과적인 양으로 투여하는 단계. 어떤 구현예에서, 치료는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 증상을 감소시킨다: 대사 증후군, 고혈당증, 하이퍼트리글리세라이드혈증, 고혈압, 증가된 글루코오스 수준, 증가된 인슐린 내성, 감소된 인슐린 민감도, 상기 정상 체중, 및/또는 상기 정상 체지방 또는 그의 임의의 조합.
- [0249] 대사 질환을 감소 또는 예방하는 방법이 추가로 제공되고, 상기 방법은 인간에게 본 명세서에 기재된 화합물 또는 조성물을 치료적으로 효과적인 양으로 투여하고, 그렇게 함으로써 대사 질환을 감소 또는 예방하는 것을 포함한다.
- [0250] 당뇨병을 감소 또는 예방하는 방법이 추가로 제공되고, 상기 방법은 인간에게 본 명세서에 기재된 화합물 또는 조성물을 치료적으로 효과적인 양으로 투여하고, 그렇게 함으로써 당뇨병을 감소 또는 예방하는 것을 포함한다.
- [0251] 대사 질환의 증상을 개선하는 방법이 추가로 제공되고, 상기 방법은 그것이 필요한 인간에게 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 1, 2, 또는 3에 특이적으로 하이브리드화되고, 그렇게 함으로써 인간의 대사 질환의 증상을 개선한.
- [0252] 당뇨병을 개선하는 방법이 추가로 제공되고, 상기 방법은 그것이 필요한 인간에게 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 투여하고, 여기서 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 1, 2, 또는 3에 특이적으로 하이브리드화되고, 그렇게 함으로써 인간의 당뇨병의 증상을 개선한다.
- [0253] 당뇨병의 증상을 개선하는 방법이 추가로 제공되고, 상기 방법은 그것이 필요한 인간에게 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 1, 2, 또는 3에 특이적으로 하이브리드화되고, 그렇게 함으로써 인간의 당뇨병의 증상을 개선한다.
- [0254] 대사 질환과 연관된 증상의 진행 속도를 감소시키는 방법이 추가로 제공되고, 상기 방법은 그것이 필요한 인간에게 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 투여하고, 여기서 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 1, 2, 또는 3에 특이적으로 하이브리드화되고, 그렇게 함으로써 인간의 대사 질환의 증상의 진행 속도를 감소시킨다.
- [0255] 당뇨병과 연관된 증상의 진행 속도를 감소시키는 방법이 추가로 제공되고, 상기 방법은 그것이 필요한 인간에게 20 내지 35개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 1, 2, 또는 3에 특이적으로 하이브리드화되고, 그렇게 함으로써 인간의 당뇨병의 증상의 진행 속도를 감소시킨다.
- [0256] 당뇨병과 연관된 증상의 진행 속도를 감소시키는 방법이 추가로 제공되고, 상기 방법은 그것이 필요한 인간에게 20개의 연결된 뉴클레오사이드로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 1, 2, 또는 3에 특이적으로 하이브리드화되고, 그렇게 함으로써 인간의 당뇨병의 증상의 진행 속도를 감소시킨다.

- [0257] 대사 질환의 치료, 예방, 또는 개선용 약제의 제조를 위한 방법 및 화합물이 또한 제공된다.
- [0258] 당뇨병의 치료, 예방, 또는 개선용 약제의 제조를 위한 방법 및 화합물이 또한 제공된다.
- [0259] 어떤 구현예는 대사 질환을 치료, 개선, 또는 예방하기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 화합물의 용도를 제공한다.
- [0260] 어떤 구현예는 당뇨병을 치료, 개선, 또는 예방하기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 화합물의 용도를 제공한다.
- [0261] 어떤 구현예는 본 명세서에 기재된 부가적 제제 또는 요법과 함께 병용 요법에 의해 본 명세서에 기재된 대사 질환을 치료, 예방, 또는 개선에 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 화합물을 제공한다. 제제 또는 요법은 공투여 또는 수반하여 투여될 수 있다.
- [0262] 어떤 구현예는 본 명세서에 기재된 부가적 제제 또는 요법과 함께 병용 요법에 의해 본 명세서에 기재된 당뇨병을 치료, 예방, 또는 개선에 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 화합물을 제공한다. 제제 또는 요법은 공투여 또는 수반하여 투여될 수 있다.
- [0263] 어떤 구현예는 본 명세서에 기재된 부가적 제제 또는 요법과 함께 병용 요법에 의해 본 명세서에 기재된 대사 질환을 치료, 예방, 또는 개선하기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 화합물의 용도를 제공한다. 제제 또는 요법은 공투여 또는 수반하여 투여될 수 있다.
- [0264] 어떤 구현예는 본 명세서에 기재된 부가적 제제 또는 요법과 함께 병용 요법에 의해 본 명세서에 기재된 당뇨병을 치료, 예방, 또는 개선하기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 화합물의 용도를 제공한다. 제제 또는 요법은 공투여 또는 수반하여 투여될 수 있다.
- [0265] 어떤 구현예는 본 명세서에 기재된 부가적 제제 또는 요법이 그 뒤에 투여된 환자에서 본 명세서에 기재된 대사 질환을 치료, 예방, 또는 개선하기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 화합물의 용도를 제공한다.
- [0266] 어떤 구현예는 본 명세서에 기재된 부가적 제제 또는 요법이 그 뒤에 투여된 환자에서 본 명세서에 기재된 당뇨병을 치료, 예방, 또는 개선하기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 화합물의 용도를 제공한다.
- [0267] 어떤 구현예는 본 명세서에 기재된 대사 질환을 치료, 예방, 또는 개선하기 위한 키트를 제공하고, 여기서 상기 키트는 하기를 포함한다:
- [0268] (i) 본 명세서에 기재된 화합물; 및 대안적으로
 - [0269] (ii) 본 명세서에 기재된 부가적 제제 또는 요법.
- [0270] 어떤 구현예는 본 명세서에 기재된 당뇨병을 치료, 예방, 또는 개선하기 위한 키트를 제공하고, 여기서 상기 키트는 하기를 포함한다:
- [0271] (i) 본 명세서에 기재된 화합물; 및 대안적으로
 - [0272] (ii) 본 명세서에 기재된 부가적 제제 또는 요법.
- [0273] 본 명세서에 기재된 키트는 본 명세서에 기재된 병용 요법에 의해 본 명세서에 기재된 대사 질환을 치료, 예방, 또는 개선하기 위해 키트를 사용하는 지침을 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 대사 질환은 당뇨병이다.
- [0274] **안티센스 화합물**
- [0275] 올리고머 화합물은 비제한적으로 하기를 포함한다: 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오사이드, 올리고뉴클레오타이드 유사체, 올리고뉴클레오타이드 모방체, 안티센스 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 siRNAs. 올리고머 화합물은, 수소 결합을 통해 표적 핵산에 대한 하이브리드화를 경험할 수 있다는 것을 의미하면서 표적 핵산에 대한 "안티센스"일 수 있다.
- [0276] 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은, 5' 내지 3' 방향으로 기재될 때, 표적화된 표적 핵산의 표적 분절의 역 보체를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는, 5' 내지 3' 방향으로 기재될 때, 표적화된 표적 핵산의 표적 분절의 역 보체를 포함하는 뉴클레오베이스 서열을 갖는다.

[0277]

어떤 구현예에서, PTPIB 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 그 길이가 10 내지 30개의 뉴클레오타이드이다. 환연하면, 안티센스 화합물은 10 내지 30개의 연결된 뉴클레오베이스이다. 다른 구현예에서, 안티센스 화합물은 8 내지 80, 10 내지 50, 15 내지 30, 18 내지 21, 20 내지 80, 20 내지 35, 20 내지 30, 20 내지 29, 20 내지 28, 20 내지 27, 20 내지 26, 20 내지 25, 20 내지 24, 20 내지 23, 20 내지 22, 20 내지 21 또는 20개의 연결된 뉴클레오베이스로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 안티센스 화합물은 그 길이가 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 또는 80개의 연결된 뉴클레오베이스, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 한정된 범위로 이루어진 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0278]

어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 단축된 또는 끝이 잘린 변형된 올리고뉴클레오타이드. 단축된 또는 끝이 잘린 변형된 올리고뉴클레오타이드는 5' 말단 (5' 절단), 또는 대안적으로 3' 말단 (3' 절단)으로부터 결실된 단일 뉴클레오사이드를 가질 수 있다. 단축된 또는 끝이 잘린 올리고뉴클레오타이드는 5' 말단으로부터 결실된 2개의 뉴클레오사이드를 가질 수 있고, 또는 대안적으로 3' 말단으로부터 결실된 2개의 서브유닛을 가질 수 있다. 대안적으로, 결실된 뉴클레오사이드는, 예를 들면, 5' 말단으로부터 결실된 하나의 뉴클레오사이드 및 3' 말단으로부터 결실된 하나의 뉴클레오사이드를 갖는 안티센스 화합물에서 변형된 올리고뉴클레오타이드 도처에 분산될 수 있다.

[0279]

단일 부가적 뉴클레오사이드가 길어진 올리고뉴클레오타이드에서 존재할 때, 부가적 뉴클레오사이드는 올리고뉴클레오타이드의 5' 또는 3' 말단에서 위치할 수 있다. 2 또는 그 초과의 부가적 뉴클레오사이드가 존재할 때, 부가된 뉴클레오사이드는 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 (5' 부가), 또는 대안적으로 3' 말단 (3' 부가)에 부가된 2개의 뉴클레오사이드를 갖는 올리고뉴클레오타이드에서 서로 것에 인접할 수 있다. 대안적으로, 부가된 뉴클레오사이드는, 예를 들면, 5' 말단에 부가된 하나의 뉴클레오사이드 및 3' 말단에 부가된 하나의 서브유닛을 갖는 올리고뉴클레오타이드에서 안티센스 화합물 도처에 분산될 수 있다.

[0280]

안티센스 화합물, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이를 증가 또는 감소시키고/거나 활성의 제거 없이 미스매치 염기를 도입할 수 있다. 예를 들면, Woolf 등 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992)에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 13-25개의 뉴클레오베이스의 길이의 시리즈는 난모세포 주사 모델에서 표적 RNA의 절단을 도입하기 위한 그의 능력에 대해 시험되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 말단 근처의 8 또는 11 미스매치 염기를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 25개 길이의 뉴클레오베이스는, 미스매치를 함유하지 않는 안티센스 올리고뉴클레오타이드보다 더 적기는 하지만 표적 mRNA의 특이적 절단을 지도할 수 있었다. 유사하게, 표적 특이적 절단은 1 또는 3 미스매치를 갖는 것을 포함하는 13개의 뉴클레오베이스 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 달성되었다.

[0281]

Gautschi 등 (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, March 2001)는 시험관내 및 생체내 bcl-2 및 bcl-xL 모두의의 발현을 감소시키고 위해 bcl-2 mRNA에 대해 100% 상보성을 갖지며 bcl-xL mRNA에 대한 3 미스매치를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 능력을 실증했다. 뿐만 아니라, 이러한 올리고뉴클레오타이드는 생체내 강력한 항-종양 활성을 실증했다.

[0282]

Maher 및 Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988)는 토끼 망상적혈구 검정에서 인간 DHFR의 번역을 저지하기 위한 그의 능력에 대해 텐덤 14개의 뉴클레오베이스 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 시리즈, 및 텐덤 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 2 또는 3의 서열을 포함하는 28 및 42개의 뉴클레오베이스 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 각각을 시험했다. 각각의 3 내기 14개의 뉴클레오베이스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 단독은 28 또는 42개의 뉴클레오베이스 안티센스 올리고뉴클레오타이드보다 더 보통인 수준에서도 번역을 억제할 수 있었다.

[0283]

안티센스 화합물 모티프

[0284]

어떤 구현예에서, PTPIB 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물은, 안티센스 화합물에, 증대된 억제제 활성, 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화도, 또는 생체내 뉴클레아제에 의한 분해에 대한 내성과 같은 특성들을 제공하기 위해, 패턴, 또는 모티프에 배열된 화학적으로 변형된 서브유닛을 갖는다.

[0285]

키메라 안티센스 화합물은 전형적으로 적어도 1 변형된 영역을 함유하여서, 뉴클레아제 분해에 대한 증가된 내성, 증가된 세포 흡수, 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화도, 및/또는 증가된 억제제 활성을 제공한다. 키메라

안티센스 화합물의 제2 영역은 RNA:DNA 이중 가닥의 RNA 가닥을 절단하는 세포 엔도뉴클레아제 RNase H에 대한 기질로서 임의로 작용할 수 있다.

[0286] 캡머 모티프를 갖는 안티센스 화합물은 키메라 안티센스 화합물로 고려된다. 캡머에서, RNaseH 절단을 제공하는 다수의 뉴클레오타이드를 갖는 내부 영역은 내부 영역의 뉴클레오사이드와 화학적으로 구별되는 다수의 뉴클레오타이드를 갖는 외부 영역들 사이에 위치된다. 캡머 모티프를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우에, 캡 분절은 일반적으로 엔도뉴클레아제 절단을 위한 기질로서 작용하는 한편, 왕 분절은 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 캡머의 영역은 각각의 뚜렷한 영역을 포함하는 당 모이어티의 유형에 의해 구별된다. 캡머의 영역을 구별하는데 사용되는 당 모이어티의 유형은 일부 구현예에서 β -D-리보뉴클레오사이드, β -D-데옥시리보뉴클레오사이드, 2'-변형된 뉴클레오사이드 (그와 같은 2'-변형된 뉴클레오사이드는 그 중에서 2'-MOE 및 2'-O-CH₃을 포함할 수 있다), 및 바이사이클릭 당 변형된 뉴클레오사이드 (그와 같은 바이사이클릭 당 변형된 뉴클레오사이드는 속박된(constrained) 에틸을 갖는 것들을 포함할 수 있다)을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 왕은, 예를 들면, 2'-MOE 및 속박된 에틸을 포함하는 몇 개의 변형된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 왕은 몇 개의 변형된 및 비변형된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 왕은 2'-MOE 뉴클레오사이드, 속박된 에틸 뉴클레오사이드, 및 2'-데옥시뉴클레오사이드의 다양한 조합을 포함할 수 있다.

[0287] 각각의 뚜렷한 영역은 균일한 당 모이어티, 변이체, 또는 교차하는 당 모이어티를 포함할 수 있다. 왕-캡-왕 모티프는 "X-Y-Z"로서 빈번히 기재되며, 여기서, "X"는 5'-왕의 길이를 나타내고, "Y"는 캡의 길이를 나타내고, "Z"는 3'-왕의 길이를 나타낸다. "X" 및 "Z"는 균일한, 상이한 또는 교차하는 당 모이어티를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, "X" 및 "Y"는 1 이상의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함할 수 있다. "Y"는 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "X-Y-Z"로 기재된 캡머는 각각의 5'-왕 및 3' 왕에 가까이에 인접하게 위치되도록 하는 배치를 갖는다. 따라서, 5'-왕과 캡 또는 캡과 3'-왕 사이에 간섭하는 뉴클레오타이드가 존재하지 않는다. 본원에 기재된 안티센스 화합물들 중의 어느 것은 캡머 모티프를 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, "X" 및 "Z"는 동일하고, 다른 구현예에서 "X" 및 "Z"는 상이하다. 어떤 구현예에서, "Y"는 8 내지 15 뉴클레오사이드이다. X, Y, 또는 Z는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 또는 그 초과 뉴클레오사이드들 중의 어느 것일 수 있다.

[0288] 어떤 구현예에서, PTPIB 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물은 5-10-5 캡머 모티프를 갖는다.

[0289] 어떤 구현예에서, PTPIB 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물은 6-8-6 캡머 모티프를 갖는다.

[0290] 어떤 구현예에서, PTPIB 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물은 5-8-5 캡머 모티프를 갖는다.

[0291] 어떤 구현예에서, PTPIB 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물은 캡-확대된 모티프를 갖는다.

[0292] 어떤 구현예에서, PTPIB 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물은 2-13-5 캡-확대된 모티프를 갖는다.

표적 핵산, 표적 영역 및 뉴클레오타이드 서열

[0294] 어떤 구현예에서, PTPIB 핵산은 유전자은행 수납 번호 NM_002827.2 (서열번호: 1로서 본원에 포함됨), 뉴클레오타이드 14178000부터 14256000까지 끝이 잘린 유전자은행 수납 번호 NT_011362.9 (서열번호: 2로서 본원에 포함됨); 및 붉은털원숭이 PTPIB 스캐폴드의 액손 1-9, 인트론 9 및 액손 10으로부터의 서열 연쇄 (서열번호: 3으로서 본원에 포함됨)에 제시된 서열들 중의 어느 것이다.

[0295] 본원에 함유된 실시예에서 각각의 서열번호로 제시된 서열은 당 모이어티, 뉴클레오사이드간 결합, 또는 뉴클레오베이스에 대한 임의 변형과는 독립적이다. 그와 같이, 서열번호로 규정된 안티센스 화합물을, 독립적으로, 당 모이어티, 뉴클레오사이드간 결합, 또는 뉴클레오베이스에 대한 1 이상의 변형을 포함할 수 있다. ISIS 번호 (ISIS No)로 기재된 안티센스 화합물은 뉴클레오베이스 서열 및 모티프의 조합을 나타낸다.

[0296] 어떤 구현예에서, 표적 영역은 표적 핵산의 구조적으로 규정된 영역이다. 예를 들면, 표적 영역은 3' UTR, 5' UTR, 액손, 인트론, 액손/인트론 접합, 코딩 영역, 번역 개시 영역, 번역 종료 영역, 또는 다른 규정된 핵산 영역을 포함할 수 있다. PTPIB에 대한 구조적으로 규정된 영역은 NCBI와 같은 서열 데이터베이스로부터 수납 번호에 의해 얻을 수 있으며, 그와 같은 정보는 본원에 참조로 포함되어 있다. 어떤 구현예에서, 표적 영역은 표적 영역 내의 1 표적 분절의 5' 표적 부위로부터 동일한 표적 영역 내의 또 하나의 표적 분절의 3' 표적 부위까지의 서열을 포함할 수 있다.

- [0297] 표적화는 원하는 효과가 발생하도록 안티센스 화합물을 하이브리드시키는 적어도 1 표적 분절의 결정을 포함한다. 어떤 구현예에서, 원하는 효과는 mRNA 표적 핵산 수준의 감소이다. 어떤 구현예에서, 원하는 효과는 표적 핵산 또는 표적 핵산과 연관된 표현형 변화에 의해 암호화된 단백질 수준의 감소이다.
- [0298] 표적 영역은 1 이상의 표적 분절을 함유할 수 있다. 표적 영역 내의 다중 표적 분절은 중복될 수 있다. 대안적으로, 표적 영역 내의 다중 표적 분절은 비-중복될 수 있다. 어떤 구현예에서, 표적 영역 내의 표적 분절은 단지 약 300 뉴클레오타이드만큼 떨어져 있다. 어떤 구현예에서, 표적 영역 내의 표적 분절은, 표적 핵산에 대해 약, 단지, 단지 약 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10 뉴클레오타이드인 다수의 뉴클레오타이드들 만큼 떨어져 있거나, 또는 상기 값들 중의 어느 2에 의해 규정된 범위이다. 어떤 구현예에서, 표적 영역 내의 표적 분절은 표적 핵산에 대해 단지, 또는 단지 약 5 뉴클레오타이드만큼 떨어져 있다. 어떤 구현예에서, 표적 분절은 인접하다. 본원에 기재된 5' 표적 부위 또는 3' 표적 부위 중의 어느 것인 개시 핵산을 갖는 범위로 규정된 표적 영역이 고려된다.
- [0299] 적합한 표적 분절은 5' UTR, 코딩 영역, 3' UTR, 인트론, 엑손, 또는 엑손/인트론 접합 내에서 발견될 수 있다. 개시 코돈 또는 중단 코돈을 함유하는 표적 분절이 또한 적합한 표적 분절이다. 적합한 표적 분절은 특이적으로 개시 코돈 또는 중단 코돈과 같은 어떤 구조적으로 규정된 영역을 제외할 수 있다.
- [0300] 적합한 표적 분절의 결정은 표적 핵산의 서열을 다른 서열과 계획을 통해 비교하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들면, BLAST 알고리즘은 상이한 핵산들 중에서 유사성 영역을 확인하는데 사용될 수 있다. 이러한 비교는 선택된 표적 핵산 이외의 서열 (즉, 비-표적 또는 탈-표적 서열)에 비-특이적 방식으로 하이브리드할 수 있는 안티센스 화합물 서열의 선택을 방지할 수 있다.
- [0301] 활성 표적 영역 내에서 안티센스 화합물의 활성에서의 변화 (예를 들면, 표적 핵산 수준의 퍼센트 감소에 의해 규정된 바와 같음)가 존재할 수 있다. 어떤 구현예에서, PTPIB mRNA 수준의 감소는 PTPIB 발현의 억제를 나타낸다. PTPIB 단백질 수준의 감소는 또한 표적 mRNA 발현의 억제를 나타낸다. 추가로, 표현형 변화는 PTPIB 발현의 억제를 나타낸다. 어떤 구현예에서, 감소된 글루코오스 수준, 감소된 지질 수준, 및 감소된 체중은 PTPIB 발현의 억제를 나타낸다. 어떤 구현예에서, 대사 질환과 연관된 증상의 개선은 PTPIB 발현의 억제를 나타낸다. 어떤 구현예에서, 당뇨병과 연관된 증상의 개선은 PTPIB 발현의 억제를 나타낸다. 어떤 구현예에서, 인슐린 내성의 감소는 PTPIB 발현의 억제를 나타낸다. 어떤 구현예에서, 당뇨병 바이오마커의 감소는 PTPIB 발현의 억제를 나타낼 수 있다.
- [0302] **하이브리드화**
- [0303] 일부 구현예에서, 하이브리드화는 본원에 개시된 안티센스 화합물 및 PTPIB 핵산 사이에서 일어난다. 가장 통상적 하이브리드화 기전은 핵산 분자들의 상보적인 뉴클레오베이스들 사이의 수소 결합 (예를 들면, 왓슨-크릭, 후그스틴 또는 역 후그스틴(reversed Hoogsteen) 수소 결합)을 수반한다.
- [0304] 하이브리드화는 다양한 조건하에 일어날 수 있다. 엄격한 조건은 서열-의존적이고 하이브리드될 핵산 분자의 특징 및 조성에 의해 결정된다.
- [0305] 서열이 표적 핵산에 대해 특이적으로 하이브리드 가능한지를 결정하는 방법은 당해분야에 의해 공지되어 있다. 어떤 구현예에서, 본원에 제공된 안티센스 화합물은 PTPIB 핵산과 특이적으로 하이브리드 가능하다.
- [0306] **상보성**
- [0307] 안티센스 화합물 및 표적 핵산은 충분한 수의 안티센스 화합물의 뉴클레오베이스가 표적 핵산의 상응하는 뉴클레오베이스와 수소 결합할 수 있어서 원하는 효과 (예를 들면, PTPIB 핵산과 같은 표적 핵산의 안티센스 억제)가 발생할 경우 서로 상보적이다.
- [0308] 안티센스 화합물은, 간접하는 또는 인접한 분절이 하이브리드화 사건 (예를 들면, 루프 구조, 불일치 또는 머리 편 구조)에 관여하지 않도록 PTPIB 핵산의 1 이상의 분절에 걸쳐 하이브리드할 수 있다.
- [0309] 어떤 구현예에서, 본원에 제공된 안티센스 화합물 또는 그것의 명시된 부분은 PTPIB 핵산, 표적 영역, 표적 분절, 또는 그것의 명시된 부분에 대해 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 상보적이거나 적어도 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 상보적이다. 안티센스 화합물의 표적 핵산과의 퍼센트 상보성은 일상적인 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

- [0310] 예를 들면, 안티센스 화합물의 20 뉴클레오베이스 중 18이 표적 영역에 상보적이어서 특이적으로 하이브리드할 것인 안티센스 화합물은 90 퍼센트 상보성을 나타낼 것이다. 이 예에서, 잔여 비상보적인 뉴클레오베이스는 클러스터를 형성하거나 상보적인 뉴클레오베이스들 사이에 배치될 수 있고 서로 또는 상보적인 뉴클레오베이스에 인접할 필요는 없다. 그와 같이, 표적 핵산과 완전한 상보성을 갖는 2 영역의 옆에 위치한 4 비상보적인 뉴클레오베이스를 갖는 길이가 18 뉴클레오베이스인 안티센스 화합물은 표적 핵산과 77.8% 전반적 상보성을 가질 것이고 따라서 본 발명의 범위 내에 속할 것이다. 안티센스 화합물의 표적 핵산의 영역과의 퍼센트 상보성은 당해분야에 공지된 BLAST 프로그램 (기본적 국소 정렬 검색 도구) 및 PowerBLAST 프로그램을 사용하여 일상적으로 결정될 수 있다 (Altschul 등, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang 및 Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). 퍼센트 동종성, 서열 동일성 또는 상보성은, 예를 들면, 스미스 및 워터맨 (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)의 알고리즘을 사용한 디폴트 세팅을 사용하여, 캡 스포그램 (위스콘신 서열 분석 패키지, 유닉스를 위한 버전 8, 제네티克斯 컴퓨터 그룹, 위스콘신주 매디슨 유니버시티리서치 파크)에 의해 결정될 수 있다.
- [0311] 어떤 구현예에서, 본원에 제공된 안티센스 화합물, 또는 그것의 명시된 부분은 표적 핵산, 또는 그것의 명시된 부분에 대해 완전히 상보적 (즉, 100% 상보적)이다. 예를 들면, 안티센스 화합물은 PTPIB 핵산, 또는 표적 영역, 또는 그것의 표적 분절 또는 표적 서열에 완전히 상보적일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "완전히 상보적인"은 안티센스 화합물의 각각의 뉴클레오베이스가 표적 핵산의 상응하는 뉴클레오베이스와 정확한 염기 짹짓기를 할 수 있음을 의미한다. 예를 들면, 20 뉴클레오베이스 안티센스 화합물은, 안티센스 화합물에 완전히 상보적인 표적 핵산의 상응하는 20 뉴클레오베이스 부분이 존재하는 한, 400 뉴클레오베이스 길이의 표적 서열과 완전히 상보적이다. 완전히 상보적인은 또한 제1 및/또는 제2 핵산의 명시된 부분과 관련하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 30 뉴클레오베이스 안티센스 화합물 중의 20 뉴클레오베이스 부분은 400 뉴클레오베이스 길이의 표적 서열과 "완전히 상보적"일 수 있다. 30 뉴클레오베이스 올리고뉴클레오타이드 중의 20 뉴클레오베이스 부분은, 표적 서열이 상응하는 20 뉴클레오베이스 부분(여기서, 각각의 뉴클레오베이스는 안티센스 화합물의 20 뉴클레오베이스 부분에 상보적이다)을 갖는 경우 표적 서열에 완전히 상보적이다. 동시에, 전체 30 뉴클레오베이스 안티센스 화합물은, 안티센스 화합물의 잔여 10 뉴클레오베이스가 또한 표적 서열에 상보적인지 여부에 따라 표적 서열에 완전히 상보적일 수 있거나 완전히 상보적이지 않을 수 있다.
- [0312] 비-상보적인 뉴클레오베이스의 위치는 안티센스 화합물의 5' 말단 또는 3' 말단에 존재할 수 있다. 대안적으로, 비-상보적인 뉴클레오베이스 또는 뉴클레오베이스들은 안티센스 화합물의 내부 위치에 존재할 수 있다. 2 또는 그 초과의 비-상보적인 뉴클레오베이스가 존재할 때, 그들은 인접하거나 (즉, 연결되거나) 또는 인접하지 않을 수 있다. 일 구현예에서, 비-상보적인 뉴클레오베이스는 캡과 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 윙 분절에 위치한다.
- [0313] 어떤 구현예에서, 길이가 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 뉴클레오베이스이거나, 최대 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 뉴클레오베이스인 안티센스 화합물은 표적 핵산, 예를 들면, PTPIB 핵산, 또는 그것의 명시된 부분에 대해 단지 4, 단지 3, 단지 2, 또는 단지 1 비-상보적인 뉴클레오베이스(들)를 포함한다.
- [0314] 어떤 구현예에서, 길이가 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 뉴클레오베이스이거나, 최대 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 뉴클레오베이스인 안티센스 화합물은 표적 핵산, 예를 들면, PTPIB 핵산, 또는 그것의 명시된 부분에 대해 단지 6, 단지 5, 단지 4, 단지 3, 단지 2, 또는 단지 1 비-상보적인 뉴클레오베이스(들)를 포함한다.
- [0315] 본원에 제공된 안티센스 화합물은 또한 표적 핵산의 일부분에 상보적인 것들을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "부분"은 표적 핵산의 영역 또는 분절 내의 규정된 수의 인접 (즉, 연결된) 뉴클레오베이스를 나타낸다. "부분"은 또한 규정된 수의 안티센스 화합물의 인접 뉴클레오베이스를 나타낼 수 있다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 8 뉴클레오베이스 부분에 상보적이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 12 뉴클레오베이스 부분에 상보적이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 13 뉴클레오베이스 부분에 상보적이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 14 뉴클레오베이스 부분에 상보적이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 15 뉴클레오베이스 부분에 상보적이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 16 뉴클레오베이스 부분에 상보적이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 17 뉴클레오베이스 부분에 상보적이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 18 뉴클레오베이스 부분에 상보적이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 19 뉴클레오베이스 부분에 상보적이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 표적 분절의 적어도 20 뉴클레오베이스 부분에 상보적이다. 적어도 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19, 20, 또는 그 초과의 표적 분절의 뉴클레오베이스 부분, 또는 이를 값들 중의 어느 2에 의해 규정된 범위에 상보적인 안티센스 화합물이 또한 고려된다.

[0316] 동일성

본원에 제공된 안티센스 화합물은 또한 구체적 ISIS 번호로 표시되는 특정 뉴클레오타이드 서열, 서열번호, 또는 화합물, 또는 그것의 부분에 대해 규정된 퍼센트 동일성을 가질 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 안티센스 화합물은, 그것이 동일한 뉴클레오베이스 짹짓기 능력을 갖는다면 본원에 개시된 서열과 동일하다. 예를 들면, 개시된 DNA 서열에서 티미딘 대신에 우라실을 함유하는 RNA는 우리실 및 티미딘 둘 모두가 아데닌과 쌍을 이루기 때문에 DNA 서열과 동일한 것으로 고려될 것이다. 본원에 기재된 안티센스 화합물의 단축된 그리고 연장된 버전 뿐만 아니라 본원에 제공된 안티센스 화합물과 비교하여 동일하지 않은 염기를 갖는 화합물도 또한 고려된다. 동일하지 않은 염기들은 서로 인접하거나 안티센스 화합물 전반에 걸쳐 분산될 수 있다. 안티센스 화합물의 퍼센트 동일성은 그것이 비교될 서열과 비교하여 동일한 염기 짹짓기를 갖는 염기들의 수에 따라 계산된다.

[0318] 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물, 또는 그것의 부분은 본원에 개시된 1 이상의 안티센스 화합물 또는 서열번호, 또는 그것의 부분과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하다.

[0319] 변형

뉴클레오사이드는 염기-당 조합이다. 뉴클레오사이드의 뉴클레오베이스 (또한 염기로도 공지됨) 부분은 보통 헤테로사이클릭 염기 모이어티이다. 뉴클레오타이드는 뉴클레오사이드의 당 부분에 공유결합으로 연결된 포스페이트 그룹을 추가로 포함하는 뉴클레오사이드이다. 펜토푸라노실 당을 포함하는 뉴클레오사이드에 대해, 포스페이트 그룹은 당의 2', 3' 또는 5' 하이드록실 모이어티에 연결될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 서로 인접한 뉴클레오사이드들의 공유 결합을 통해 형성되어 선형 폴리머 올리고뉴클레오타이드 형성한다. 올리고뉴클레오타이드 구조 내에서, 포스페이트 그룹은 통상 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오사이드간 결합을 형성하도록 지시된다.

[0321] 안티센스 화합물에 대한 변형은 뉴클레오사이드간 결합, 당 모이어티, 또는 뉴클레오베이스에 대한 치환 또는 변화를 포함한다. 변형된 안티센스 화합물은 종종, 바람직한 특성, 예를 들면, 증대된 세포 흡수, 핵산 표적에 대한 증대된 친화도, 뉴클레아제의 존재하에 증가된 안정성, 또는 증가된 억제 활성 때문에 원상태 형태보다 바람직하다.

[0322] 화학적으로 변형된 뉴클레오사이드는 또한 단축된 또는 끝이 잘린 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 그것의 표적 핵산에 대한 결합 친화도를 증가시키는데 이용될 수 있다. 결과적으로, 필적하는 결과는 종종 그와 같은 화학적으로 변형된 뉴클레오사이드를 갖는 더 짧은 안티센스 화합물로 얻을 수 있다.

[0323] 변형된 뉴클레오사이드간 결합

[0324] RNA 및 DNA의 천연 생성 뉴클레오사이드간 결합은 3' 내지 5' 포스포디에스테르 결합이다. 1 이상의 변형된, 즉 비-천연 생성 뉴클레오사이드간 결합을 갖는 안티센스 화합물은 종종, 바람직한 특성, 예를 들면, 증대된 세포 흡수, 표적 핵산에 대한 증대된 친화도, 및 뉴클레아제의 존재하에 증가된 안정성 때문에 천연 생성 뉴클레오사이드간 결합을 갖는 안티센스 화합물에 우선하여 선택된다.

[0325] 변형된 뉴클레오사이드간 결합을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 인 원자를 보유하는 뉴클레오사이드간 결합뿐만 아니라 인 원자를 갖지 않는 뉴클레오사이드간 결합을 포함한다. 대표적인 인 함유 뉴클레오사이드간 결합은, 비제한적으로, 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 및 포스포로티오에이트를 포함한다. 인-함유 및 인-비함유 결합의 제조 방법은 익히 공지되어 있다.

[0326] 어떤 구현예에서, PTPIB 핵산에 대해 안티센스 화합물은 1 이상의 변형된 뉴클레오사이드간 결합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 변형된 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물의 각각의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 결합이다.

[0327] 변형된 당 모이어티

[0328] 본원에 제공된 안티센스 화합물은 당 그룹이 변형된 1 이상의 뉴클레오사이드를 임의로 함유할 수 있다. 그와 같은 당 변형된 뉴클레오사이드는 안티센스 화합물에 대해 증대된 뉴클레아제 안정성, 증가된 결합 친화도, 또

는 일부 다른 유익한 생물학적 특성을 부여할 수 있다. 어떤 구현예에서, 뉴클레오사이드는 화학적으로 변형된 리보푸라노스 고리 모이어티를 포함한다. 화학적으로 변형된 리보푸라노스 고리의 예는, 제한 없이, 치환체 그룹의 부가 (5' 및 2' 치환체 그룹 포함); 바이사이클릭 핵산 (BNA)의 형성을 위한 비-제미날 고리 원자의 브릿징; 리보실 고리 산소 원자의 S, N(R), 또는 C(R₁)(R₂) (R = H, C₁-C₁₂ 알킬 또는 보호 그룹)로의 교체; 및 이들의 조합을 포함한다. 화학적으로 변형된 당의 예는 2'-F-5'-메틸 치환된 뉴클레오사이드 (참고, 다른 개시된 5', 2'-비스 치환된 뉴클레오사이드에 대해 8/21/08에 발행된 PCT 국제 출원 WO 2008/101157), 2'-위치에서의 추가 치환으로 리보실 고리 산소 원자의 S로의 교체 (참고, 2005년 6월 16일에 발행된 공개된 미국 특허 출원 US2005/0130923), 또는, 대안적으로, BNA의 5'-치환 (참고, 11/22/07에 발행된 PCT 국제 출원 WO 2007/134181, 여기서 LNA는 예를 들면, 5'-메틸 또는 5'-비닐 그룹으로 치환된다)을 포함한다.

[0329] 변형된 당 모이어티를 갖는 뉴클레오사이드의 예는, 제한 없이, 5'-비닐, 5'-메틸 (R 또는 S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃, 및 2'-O(CH₂)₂OCH₃ 치환체 그룹을 포함하는 뉴클레오사이드를 포함한다. 2' 위치에서의 치환체는 또한 알릴, 아미노, 아지도, 티오, O-알릴, O-C₁-C₁₀ 알킬, OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), 및 O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)으로부터 선택될 수 있고, 여기서 각각의 R_m 및 R_n은, 독립적으로, H 또는 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬이다.

[0330] 본원에 사용된 바와 같이, "바이사이클릭 뉴클레오사이드"는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 변형된 뉴클레오사이드를 나타낸다. 바이사이클릭 뉴클레오사이드의 예는, 제한 없이, 4' 및 2' 리보실 고리 원자들 사이의 브릿지를 포함하는 뉴클레오사이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본원에 제공된 안티센스 화합물은 브릿지가 4' 내지 2' 바이사이클릭 뉴클레오사이드를 포함하는 1 이상의 바이사이클릭 뉴클레오사이드를 포함한다. 그와 같은 4' 내지 2' 바이사이클릭 뉴클레오사이드의 예는, 비제한적으로, 식: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' 및 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2', 및 이들의 유사체 (참고, 2008년 7월 15일에 발행된 미국 특허 7,399,845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2', 및 그것의 유사체 (참고, 2009년 1월 8일에 발행된 공개된 PCT 국제 출원 WO2009/006478); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2', 및 그것의 유사체 (참고, 2008년 12월 11일에 발행된 공개된 PCT 국제 출원 WO2008/150729); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (참고, 2004년 9월 2일에 발행된 공개된 미국 특허 출원 US2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2' (여기서 R은 H, C₁-C₁₂ 알킬, 또는 보호 그룹이다) (참고, 2008년 9월 23일에 발행된 미국 특허 7,427,672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (참고, Chattopadhyaya, 등, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); 및 4'-CH₂-C(=CH₂)-2', 및 그것의 유사체 (참고, 2008년 12월 8일에 발행된 공개된 PCT 국제 출원 WO 2008/154401) 중의 하나를 포함한다. 또한, 예를 들면: Singh 등, *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin 등, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 5633-5638; Kumar 등, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh 등, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava 등, *J. Am. Chem. Soc.*, 129(26) 8362-8379 (Jul. 4, 2007); Elayadi 등, *Curr. Opinion Invens. Drugs*, 2001, 2, 558-561; Braasch 등, *Chem. Biol.*, 2001, 8, 1-7; Orum 등, *Curr. Opinion Mol. Ther.*, 2001, 3, 239-243; 미국 특허 번호 미국 6,670,461, 7,053,207, 6,268,490, 6,770,748, 6,794,499, 7,034,133, 6,525,191, 7,399,845; 공개된 PCT 국제 출원 WO 2004/106356, WO 94/14226, WO 2005/021570, 및 WO 2007/134181; 미국 특허 공보 번호 US2004/0171570, US2007/0287831, 및 US2008/0039618; 및 미국 특허 시리즈 번호 12/129,154, 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787, 및 61/099,844; 및 PCT 국제 출원 번호 PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154, 및 PCT/US2008/068922를 참고한다. 예를 들면, α-L-리보푸라노스 및 β-D-리보푸라노스를 포함하는 1 이상의 입체화학적 당 배치를 갖는, 각각의 상기 바이사이클릭 뉴클레오사이드가 제조될 수 있다 (참고, WO 99/14226으로서 1999년 3월 25일에 발행된 PCT 국제 출원 PCT/DK98/00393).

[0331] 어떤 구현예에서, BNA 뉴클레오사이드의 바이사이클릭 당 모이어티는 웬토푸라노실 당 모이어티의 4' 및 2' 위치 사이에 적어도 1의 브릿지를 갖는 화합물을 비제한적으로 포함하고, 그와 같은 브릿지는 -[C(R_a)(R_b)]_n-,-C(R_a)=C(R_b)-,-C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-,-S(=O)_x- 및 -N(R_a)-로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2 내지 4개의 연결된 그룹을 포함하고;

[0332] 여기서:

[0333] x는 0, 1, 또는 2이고;

[0334] n은 1, 2, 3, 또는 4이고;

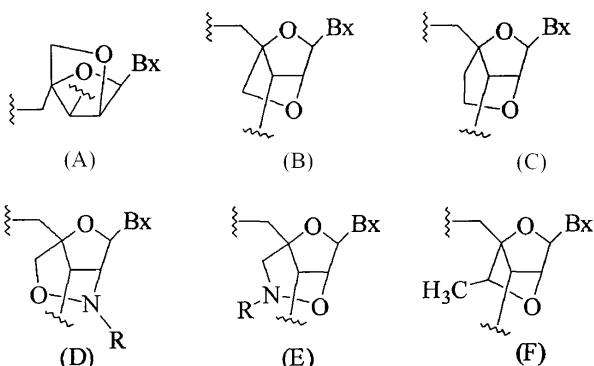
[0335] 각 R_a 및 R_b는, 독립적으로, H, 보호 그룹, 하이드록실, C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알키닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알키닐, C₅-C₂₀ 아릴, 치환된 C₅-C₂₀ 아릴, 헤테로사이클 라디칼, 치환된 헤�테로사이클 라디칼, 치환된 헤�테로아릴, 치환된 헤�테로아릴, C₅-C₇알리사이클릭 라디칼, 치환된 C₅-C₇알리사이클릭 라디칼, 할로겐, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, 아실 (C(=O)-H), 치환된 아실, CN, 설포닐 (S(=O)₂-J₁), 또는 설포실 (S(=O)-J₁)이고;

[0336] 각 J₁ 및 J₂는, 독립적으로, H, C₁-C₁₂ 알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알키닐, 치환된 C₂-C₁₂ 알키닐, C₅-C₂₀ 아릴, 치환된 C₅-C₂₀ 아릴, 아실 (C(=O)-H), 치환된 아실, 헤�테로사이클 라디칼, 치환된 헤�테로사이클 라디칼, C₁-C₁₂ 아미노알킬, 치환된 C₁-C₁₂ 아미노알킬, 또는 보호 그룹이다.

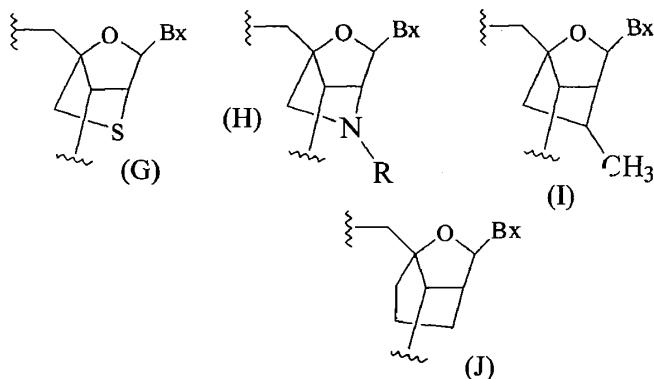
[0337] 어떤 구현예에서, 바이사이클릭 당 모이어티의 브릿지는, -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_aR_b)-N(R)-O-, 또는 C(R_aR_b)-O-N(R)-이다. 어떤 구현예에서, 브릿지는 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2', 및 4'-CH₂-N(R)-O-2'-이고, 여기서 각 R은, 독립적으로, H, 보호 그룹, 또는 C₁-C₁₂ 알킬이다.

[0338] 어떤 구현예에서, 바이사이클릭 뉴클레오사이드는 이성질체 배치에 의해 추가로 정의된다. 예를 들면, 4'-2' 메틸렌-옥시 브릿지를 포함하는 뉴클레오사이드는, α-L 배치 또는 β-D 배치일 수 있다. 이전에, α-L-메틸렌 옥시 (4'-CH₂-O-2') BNA는 안티센스 활성을 보여준 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 통합되었다 (Frieden 등, *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372).

[0339] 어떤 구현예에서, 바이사이클릭 뉴클레오사이드는, 비제한적으로, (A) α-L-메틸렌옥시 (4'-CH₂-O-2') BNA, (B) β-D-메틸렌옥시 (4'-CH₂-O-2') BNA, (C) 에틸렌옥시 (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, (D) 아미노옥시 (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA, (E) 옥시아미노 (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA, (F) 메틸(메틸렌옥시) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA, (G) 메틸렌-티오 (4'-CH₂-S-2') BNA, (H) 메틸렌-아미노 (4'-CH₂-N(R)-2') BNA, (I) 메틸 카보사이클릭 (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA, 및 (J) 프로필렌 카보사이클릭 (4'-(CH₂)₃-2') BNA를 포함하고, 이는 이하에서 묘사되어 있다.



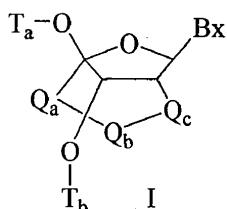
[0340]



[0341]

[0342] 여기서 Bx는 염기 모이어티이고 R은, 독립적으로, H, 보호 그룹 또는 C₁-C₁₂알킬이다.

[0343] 어떤 구현 예에서, 식 I로 표시되는 바이사이클릭 뉴클레오사이드:



[0344]

[0345] 여기서:

[0346]

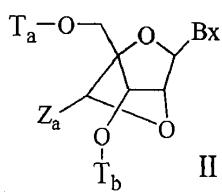
[0347] $-Q_a-Q_b-Q_c-\cdots -CH_2-N(R_c)-CH_2-, -C(=O)-N(R_c)-CH_2-, -CH_2-O-N(R_c)-, -CH_2-N(R_c)-O-, \text{ 또는 } -N(R_c)-O-CH_2\circ]$ 고;

[0348]

[0349] T_a 및 T_b 각각은, 독립적으로, H, 하이드록실 보호 그룹, 콘주게이트 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티, 또는 매질을 지지하기 위한 공유 결합이다.

[0350]

T-0-
S



[0351]

[0352] 여기서 :

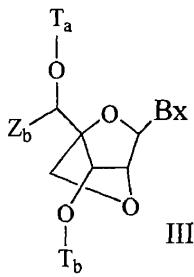
[0353]

[0354] T_a 및 T_b 각각은, 독립적으로, H, 하이드록실 보호 그룹, 콘주게이트 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티, 또는 매질을 지지하기 위한 공유 결합이다.

[0355] Z_a 는 C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, 치환된 C_1-C_6 알킬, 치환된 C_2-C_6 알케닐, 치환된 C_2-C_6 알키닐, 아실, 치환된 아실, 치환된 아마이드, 티올, 또는 치환된 티오이다.

[0356] 일 구현예에서, 각각의 치환된 그룹은, 독립적으로, 할로겐, 옥소, 하이드록실, OJ_c, NJ_cJ_d, SJ_c, N₃, OC(=X)J_c, 및 NJ_cC(=X)NJ_cJ_d로부터 독립적으로 선택된 치환체 그룹으로 모노 또는 폴리 치환되고, 여기서 각 J_c, J_d, 및 J_e는, 독립적으로, H, C₁-C₆ 알킬, 또는 치환된 C₁-C₆ 알킬이고 X는 O 또는 NJ_c이다.

[0357] 어떤 구현 예에서, 식 III로 표시되는 바이사이클릭 뉴클레오사이드:



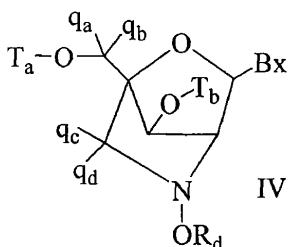
[0358]

여기서:

[0359] Bx는 혜테로사이클릭 염기 모이어티이고;

[0360] T_a 및 T_b 각각은, 독립적으로, H, 하이드록실 보호 그룹, 콘주게이트 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티, 또는 매질을 지지하기 위한 공유 결합이다.[0361] Z_b는 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알키닐, 치환된 C₁-C₆알킬, 치환된 C₂-C₆ 알케닐, 치환된 C₂-C₆ 알키닐, 또는 치환된 아실 (C(=O)-)이다.

[0362] 어떤 구현예에서, 식 IV로 표시되는 바이사이클릭 뉴클레오사이드:



[0363]

여기서:

[0364] Bx는 혜테로사이클릭 염기 모이어티이고;

[0365] T_a 및 T_b 각각은, 독립적으로, H, 하이드록실 보호 그룹, 콘주게이트 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티, 또는 매질을 지지하기 위한 공유 결합이다.[0366] R_d는 C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, 치환된 C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆알키닐, 또는 치환된 C₂-C₆ 알키닐이고;[0367] 각 q_a, q_b, q_c 및 q_d는, 독립적으로, H, 할로겐, C₁-C₆알킬, 치환된 C₁-C₆알킬, C₂-C₆알케닐, 치환된 C₂-C₆알케닐, C₂-C₆알키닐, 또는 치환된 C₂-C₆알키닐, C₁-C₆알콕실, 치환된 C₁-C₆알콕실, 아실, 치환된 아실, C₁-C₆아미노알킬, 또는 치환된 C₁-C₆아미노알킬이고;

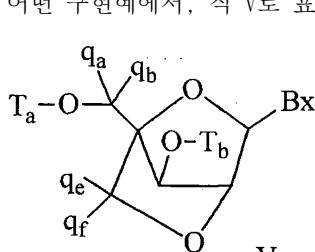
[0368]

[0369]

[0370]

[0371]

어떤 구현예에서, 식 V로 표시되는 바이사이클릭 뉴클레오사이드:



[0372]

여기서:

[0373] Bx는 혜테로사이클릭 염기 모이어티이고;

[0374] T_a 및 T_b 각각은, 독립적으로, H, 하이드록실 보호 그룹, 콘주게이트 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티, 또는

매질을 지지하기 위한 공유 결합이다.

[0375] q_a, q_b, q_e 및 q_f 각각은, 독립적으로, 수소, 할로겐, C_1-C_{12} 알킬, 치환된 C_1-C_{12} 알킬, C_2-C_{12} 알케닐, 치환된 C_2-C_{12} 알케닐, 치환된 C_2-C_{12} 알카닐, 치환된 C_1-C_{12} 알콕시, 치환된 C_1-C_{12} 알콕시, $OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO_2J_j, NJ_jJ_k, N_3, CN, C(=O)OJ_jJ_k, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)-NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)-NJ_jJ_k$ 또는 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$ 이고;

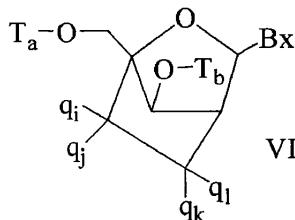
[0376] 또는 q_e 및 q_f 는 함께 $=C(q_g)(q_h)$ 이고;

[0377] q_g 및 q_h 각각은, 독립적으로, H, 할로겐, C_1-C_{12} 알킬, 또는 치환된 C_1-C_{12} 알킬이다.

[0378] 그의 올리고머화, 및 핵산 인지 특성과 함께 메틸렌옥시 ($4'-CH_2-O-2'$) BNA 모노머 아데닌, 시토신, gua9, 5-메틸-시토신, 티민, 및 우라실의 합성 및 제조는 기재되었다 (참고, 예를 들면, Koshkin 등, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630). BNAs 및 그의 제조는 WO 98/39352 및 WO 99/14226에 또한 기재되어 있다.

[0379] 메틸렌옥시 ($4'-CH_2-O-2'$) BNA, 메틸렌옥시 ($4'-CH_2-O-2'$) BNA, 및 2'-티오-BNAs의 유사체가 또한 제조되었다 (참고, 예를 들면, Kumar 등, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222). 핵산 폴리머라제에 대한 기질로서 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 듀플렉스를 포함하는 짜맞춘 뉴클레오사이드 유사체의 제조가 또한 기재되었다 (참고, 예를 들면, Wengel 등, WO 99/14226). 뿐만 아니라, 2'-아미노-BNA, 신규의 구조적으로 제한된 높은-친화도 올리고뉴클레오타이드 유사체의 합성이, 당해 기술에 기재되었다 (참고, 예를 들면, Singh 등, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039). 또한, 2'-아미노- 및 2'-메틸아미노-BNA가 제조되었고 상보적인 RNA 및 DNA 가닥을 갖는 그의 듀플렉스의 열 안정성은 이전에 보고되었다.

[0380] 어떤 구현예에서, 식 VI로 표시되는 바이사이클릭 뉴클레오사이드:



[0381]

여기서:

[0383] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이고;

[0384] T_a 및 T_b 각각은, 독립적으로, H, 하이드록실 보호 그룹, 콘주케이트 그룹, 반응성 인 그룹, 인 모이어티, 또는 매질을 지지하기 위한 공유 결합이다.

[0385] 각 q_i, q_j, q_k 및 q_l 는, 독립적으로, H, 할로겐, C_1-C_{12} 알킬, 치환된 C_1-C_{12} 알킬, C_2-C_{12} 알케닐, 치환된 C_2-C_{12} 알케닐, C_2-C_{12} 알카닐, 치환된 C_2-C_{12} 알카닐, C_1-C_{12} 알콕실, 치환된 C_1-C_{12} 알콕실, $OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO_2J_j, NJ_jJ_k, N_3, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)-NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)-NJ_jJ_k$ 또는 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$ 이고;

[0386] q_i 및 q_j 또는 q_l 및 q_k 는 함께 $=C(q_g)(q_h)$ 이고, 여기서 q_g 및 q_h 각각은, 독립적으로, H, 할로겐, C_1-C_{12} 알킬, 또는 치환된 C_1-C_{12} 알킬이다.

[0387] $4'-(CH_2)_3-2'$ 브릿지를 갖는 하나의 카보사이클릭 바이사이클릭 뉴클레오사이드 및 알케닐 유사체, 브릿지 $4'-CH=CH-CH_2-2'$ 가 기재되었다 (참고, 예를 들면, Freier 등, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443 및 Albaek 등, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740). 그의 올리고머화 및 생화학적 연구와 함께 카보사이클릭 바이사이클릭 뉴클레오사이드의 합성 및 제조는 또한 기재되었다 (참고, 예를 들면, Srivastava 등, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129(26), 8362-8379).

[0388] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "4'-2' 바이사이클릭 뉴클레오사이드" 또는 "4' 내지 2' 바이사이클릭 뉴클레

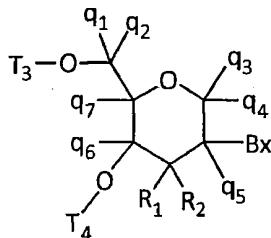
"오사이드"는 2' 탄소 원자 및 4' 탄소 원자를 연결하는 브릿지를 포함하는 푸라노스 고리를 포함하는 바이사이클릭 뉴클레오사이드를 의미한다.

[0389] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "모노사이클릭 뉴클레오사이드"는 바이사이클릭 당 모이어티가 아닌 변형된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다. 어떤 구현예에서, 뉴클레오사이드의 당 모이어티, 또는 당 모이어티 유사체는 임의의 위치에서 변형 또는 치환될 수 있다.

[0390] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "2'-변형된 당"은 2' 위치에서 변형된 푸라노실 당을 의미한다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 변형은 하기로부터 선택된 치환체를 포함한다: 치환된 및 비치환된 알콕시, 치환된 및 비치환된 티오알킬, 치환된 및 비치환된 아미노 알킬, 치환된 및 비치환된 알킬, 치환된 및 비치환된 알릴, 및 치환된 및 비치환된 알키닐을 비제한적으로 포함하는 할라이다. 어떤 구현예에서, 2' 변형은 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$, 및 $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ 를 비제한적으로 포함하는 치환체로부터 선택되고, 여기서 n 및 m은 1 내지 약 10이다. 다른 2'- 치환체 그룹은 하기로부터 또한 선택될 수 있다: C₁-C₁₂ 알킬; 치환된 알킬; 알케닐; 알키닐; 알카릴; 아르알킬; O-알카릴 또는 O-아르알킬; SH; SCH₃; OCN; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; 헤테로사이클로알킬이고; 헤�테로사이클로알카릴; 아미노알킬아미노; 폴리알킬아미노; 치환된 실릴; RNA 절단 그룹; 리포터 그룹; 삼입체; 약력학적 특성을 개선하기 위함 그룹; 및 안티센스 화합물의 약동학적 특성을 개선하기 위한 그룹, 및 유사한 특성을 갖는 다른 치환체. 어떤 구현예에서, 변형된 뉴클레오사이드는 2'-MOE 측쇄를 포함한다 (참고, 예를 들면, Baker 등, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 11944-12000). 그와 같은 2'-MOE 치환은 비변형된 뉴클레오사이드 및 다른 변형된 뉴클레오사이드, 예컨대 2'- O-메틸, O-프로필, 및 O-아미노프로필과 비교된 개선된 결합 친화도를 갖는 것으로 기재되었다. 2'-MOE 치환체를 갖는 올리고뉴클레오타이드는 생체내 용도를 위한 유만한 특징과 함께 유전자 발현의 안티센스 억제제인 것으로 또한 보여졌다 (참고, 예를 들면, Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Altmann 등, *Chimia*, 1996, 50, 168-176; Altmann 등, *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 630-637; 및 Altmann 등, *Nucleosides Nucleotides*, 1997, 16, 917-926).

[0391] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "변형된 테트라하이드로피란 뉴클레오사이드" 또는 "변형된 THP 뉴클레오사이드"는 노말 뉴클레오사이드 (당 대용물)에서 펜토푸라노실 잔기에 대해서 치환된 6-원 테트라하이드로피란 "당"을 갖는 뉴클레오사이드를 의미한다. 변형된 TUP 뉴클레오사이드는, 비제한적으로, 헥시톨 핵산 (HNA), 아니톨 핵산 (ANA), 마니톨 핵산 (MNA)으로서 당해기술에 언급된 것 (참고 Leumann, CJ. *Bioorg. & Med. Chem.* (2002) 10:841-854), 플루오로 HNA (F-HNA), 또는 식 X으로 표시되는 화합물을 포함한다:

[0392] 식 X:



[0393] 여기서 식 X의 각각의 상기 적어도 1 테트라하이드로피란 뉴클레오사이드 유사체에 대해 독립적임:

[0394] 여기서 식 X의 각각의 상기 적어도 1 테트라하이드로피란 뉴클레오사이드 유사체에 대해 독립적임:

[0395] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이고;

[0396] T₃ 및 T₄ 각각은, 독립적으로, 테트라하이드로피란 뉴클레오사이드 유사체를 안티센스 화합물에 연결하는 뉴클레오사이드간 연결 그룹이거나 T₃ 및 T₄ 중 하나는 테트라하이드로피란 뉴클레오사이드 유사체를 안티센스 화합물에 연결하는 뉴클레오사이드간 연결 그룹이고, T₃ 및 T₄ 중 다른 것은 H, 하이드록실 보호 그룹, 연결된 콘주게이트 그룹, 또는 5' 또는 3'-말단 그룹이고;

[0397] q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ 및 q₇ 각각은, 독립적으로, H, C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, 치환된 C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알키닐, 또는 치환된 C₂-C₆ 알키닐이고;

- [0398] R_1 및 R_2 중 하나는 수소이고 다른 것은 할로겐, 치환된 또는 비치환된 알콕시, NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $OC(=X)J_1$, $OC(=X)NJ_1J_2$, $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$, 및 CN로부터 선택되고, 여기서 X는 O, S, 또는 NJ_1 이고, 각 J_1 , J_2 , 및 J_3 은, 독립적으로, H 또는 C₁-C₆ 알킬이다.
- [0399] 어떤 구현예에서, 식 X의 변형된 THP 뉴클레오사이드가 제공되고 여기서 q_m , q_n , q_p , q_r , q_s , q_t , 및 q_u 각각은 H이다. 어떤 구현예에서, q_m , q_n , q_p , q_r , q_s , q_t , 및 q_u 중 적어도 하나는 H 이외의 것이다. 어떤 구현예에서, q_m , q_n , q_p , q_r , q_s , q_t 및 q_u 중 적어도 하나는 메틸이다. 어떤 구현예에서, 식 X의 THP 뉴클레오사이드가 제공되고 여기서 R_1 및 R_2 중 하나는 F이다. 어떤 구현예에서, R_1 은 플루오로이고 R_2 은 H이고, R_1 은 메톡시이고 R_2 은 H이고, R_1 은 메톡시에톡시이고 R_2 는 H이다.
- [0400] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "2'-변형된" 또는 "2'-치환된"은 H 또는 OH 이외의 2' 위치에서 치환체를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다. 2'-변형된 뉴클레오사이드는, 비제한적으로, 바이사이클릭 뉴클레오사이드를 포함하고 여기서 당 고리의 2개의 탄소 원자를 연결하는 상기 브릿지는 2' 탄소, 및 비-브릿징 2'치환체, 예컨대 알릴, 아미노, 아지도, 티오, O-알릴, O-C₁-C₁₀알킬, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), 또는 O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)를 갖는 뉴클레오사이드 및 당고리의 다른 탄소를 연결하고, 여기서 각 R_m 및 R_n은, 독립적으로, H 또는 치환된 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬이다. 2'-변형된 뉴클레오사이드는 예를 들면, 당의 다른 위치 및/또는 뉴클레오베이스에서 다른 변형을 추가로 포함할 수 있다.
- [0401] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "2'-F"는 2' 위치에서 플루오로 그룹을 포함하는 당을 의미한다.
- [0402] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "2'-OMe" 또는 "2'-OCH₃" 또는 "2'-O-메틸" 각각은 당 고리의 2' 위치에서 -OCH₃ 그룹을 포함하는 당을 의미한다.
- [0403] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "올리고뉴클레오타이드"는 복수의 연결된 뉴클레오사이드를 포함하는 화합물을 의미한다. 어떤 구현예에서, 복수의 뉴클레오사이드 중 하나 이상은 변형된다. 어떤 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 리보뉴클레오사이드 (RNA) 및/또는 데옥시리보뉴클레오사이드 (DNA)를 포함한다.
- [0404] 많은 다른 바이사이클로 및 트리사이클로 당 대용물 고리 시스템은 안티센스 화합물에 통합시키기 위해 뉴클레오사이드를 변형시키기 위해 사용될 수 있는 당해기술에 또한 공지되어 있다 (참고, 예를 들면, 검토 항목: Leumann, J. C., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, 10, 841-854).
- [0405] 그와 같은 고리 시스템은 활성을 향상시키기 위해 다양한 부가적 치환을 경험할 수 있다.
- [0406] 변형된 당의 제조 방법은 당해분야의 숙련가에게 공지되어 있다.
- [0407] 변형된 당 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드에서, 뉴클레오베이스 모이어티 (천연, 변형된, 또는 이들의 조합)는 적절한 핵산 표적에 의해 하이브리드화를 위해 유지된다.
- [0408] 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 변형된 당 모이어티를 갖는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 변형된 당 모이어티는 2'-MOE이다. 어떤 구현예에서, 2'-MOE 변형된 뉴클레오타이드는 캡머 모티프에서 배열된다. 어떤 구현예에서, 변형된 당 모이어티는 cEt이다. 어떤 구현예에서, cEt 변형된 뉴클레오타이드는 캡머 모티프의 왕 도처에 배열된다.
- [0409] **변형된 뉴클레오베이스**
- [0410] 뉴클레오베이스 (또는 염기) 변형 또는 치환은 천연 생성 또는 합성 비변형된 뉴클레오베이스로부터 구조적으로 구별가능하고, 또한 기능적으로 교환가능하다. 천연 및 변형 모두 뉴클레오베이스는 수소 결합에 참여할 수 있다. 그와 같은 뉴클레오베이스 변형은 뉴클레아제 안정성, 결합 친화도 또는 일부 다른 유익한 생물학적 특성을 안티센스 화합물에 부여할 수 있다. 변형된 뉴클레오베이스는 합성 및 천연 뉴클레오베이스 예컨대, 예를 들면, 5-메틸시토신 (5-me-C)를 포함한다. 5-메틸시토신 치환을 포함하는 어떤 뉴클레오베이스 치환은, 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 예를 들면, 5-메틸시토신 치환은 0.6-1.2 °C까지 핵산 듀플렉스 안정성을 증가시키는 것으로 보였다 (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. 및 Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, 페이지 276-278).
- [0411] 부가적 비변형된 뉴클레오베이스를 하기를 포함한다: 5-하이드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아

데닌, 6-메틸 및 아데닌 및 gua9의 다른 알킬 유도체, 2-프로필 및 아데닌 및 gua9의 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오타민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 (-CsC-C^{3/4})우라실 및 시토신 및 피리미딘 염기의 다른 알키닐 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌.

[0412] 헤테로사이클릭 염기 모이어티는, 상기 퓨린 또는 피리미딘 염기가 다른 헤테로사이클, 예를 들면 7-데아자-아데닌, 7-데아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈으로 치환된 것을 또한 포함할 수 있다. 안티센스 화합물의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용한 뉴클레오베이스는 2 아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함하는 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린을 포함한다.

[0413] 어떤 구현예에서, PTPIB 핵산에 표적화된 안티센스 화합물은 하나 이상의 변형된 뉴클레오베이스를 포함한다. 어떤 구현예에서, PTPIB 핵산에 대해 표적화된 캡 넓개된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오베이스. 어떤 구현예에서, 변형된 뉴클레오베이스는 5-메틸시토신을 포함한다. 어떤 구현예에서, 각각의 시토신은 5-메틸시토신이다.

약제학적 조성물을 세형화하기 위한 조성 및 방법

[0415] 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 약제학적 조성물 또는 제형을 제조하기 위해 약제학적으로 허용가능한 활성 또는 불활성 물질과 혼합할 수 있다. 약제학적 조성물의 제형화를 위한 조성 및 방법은, 비제한적으로, 투여 경로, 질환의 정도, 또는 투여될 용량을 포함하는 다수의 기준에 의존적이다.

[0416] PTPIB 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물은, 안티센스 화합물을 적합한 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체와 배합함으로써 약제학적 조성물로 이용될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 희석제는 포스페이트-완충된 식염수 (PBS)를 포함한다. PBS는 비경구로 전달되는 조성물에 사용하기에 적합한 희석제이다. 따라서, 일 구현 예에서, PTPIB 핵산에 대해 표적된 안티센스 화합물 및 약제학적으로 허용가능한 희석제를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 기재된 방법에 이용된다. 어떤 구현예에서, 약제학적으로 허용가능한 희석제는 PBS이다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.

[0417] 안티센스 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 임의의 약제학적으로 허용가능한 염, 에스테르, 또는 그와 같은 에스테르의 염, 또는, 인간을 포함하는 동물에게 투여시, 생물학적으로 활성 대사물 또는 그것의 잔사를 (직접적으로 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 임의 다른 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, 예를 들면, 본 개시내용은 또한 안티센스 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염, 전구약물, 그와 같은 전구약물의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 다른 생물학적 동등물을 포함한다. 적합한 약제학적으로 허용가능한 염은, 비제한적으로, 나트륨염 및 칼륨염을 포함한다.

[0418] 본원에 기재된 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염은 당해분야에 익히-공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염의 검토를 위해, Stahl 및 Wermuth, 약제학적 염들의 핸드북: 특성, 선택 및 사용 (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)을 참조한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 나트륨염은 인간에게 치료적 투여에 유용하고 잘 수용된다. 따라서, 일 구현예에서 본원에 기재된 화합물은 나트륨염의 형태로 존재한다.

[0419] 전구약물은, 활성 안티센스 화합물을 형성하도록 신체 내에서 내인성 뉴클레아제에 의해 절단되는, 안티센스 화합물의 한쪽 또는 양쪽 말단에서 부가적 뉴클레오사이드의 도입을 포함할 수 있다.

콘주게이트화 안티센스 화합물

[0421] 안티센스 화합물은 수득한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 활성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증진시키는 1 이상의 모이어티 또는 콘주게이트에 공유결합으로 연결될 수 있다. 전형적인 콘주게이트 그룹은 콜레스테롤 모이어티 및 지질 모이어티를 포함한다. 부가적 콘주게이트 그룹은 카보히드레이트, 인지질, 바이오텐, 웬아진, 폴레이트, 폐난트리딘, 안트라퀴논, 아크리딘, 플루오레세인, 로다민, 쿠마린, 및 염료를 포함한다.

[0422] 안티센스 화합물은 또한, 예를 들면, 뉴클레아제 안정성과 같은 특성을 증진시키기 위해 안티센스 화합물의 한쪽 또는 양쪽 말단에 일반적으로 부착되는 1 이상의 안정화 그룹을 갖도록 변형될 수 있다. 캡 구조가 안정화 그룹에 포함된다. 이를 말단 변형은 말단 핵산을 갖는 안티센스 화합물을 엑소뉴클레아제 분해로부터 보호하고,

세포 내로의 전달 및/또는 국소화를 도울 수 있다. 캡은 5'-말단 (5'-캡), 또는 3'-말단 (3'-캡)에 존재할 수 있거나, 또는 양쪽 말단에 존재할 수 있다. 캡 구조는 당해분야에 익히 공지되어 있으며, 예를 들면, 역 데옥시어베이직(abasic) 캡을 포함한다. 뉴클레아제 안정성을 부여하기 위해 안티센스 화합물의 한쪽 또는 양쪽 말단을 캡핑하는데 사용될 수 있는 추가 3' 및 5'-안정화 그룹은 2003년 1월 16일에 발행된 WO 03/004602에 개시된 것들을 포함한다.

[0423] 세포 배양 및 안티센스 화합물 치료

PTPIB 핵산의 수준, 활성 또는 발현에 대한 안티센스 화합물의 효과는 다양한 세포 유형에서 시험관내 시험될 수 있다. 그와 같은 분석에 사용되는 세포 유형은 상업적 판매처 (예를 들면 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection), 버지니아주 마나서스; 젠-바이오, 인코포레이티드 (Zen-Bio, Inc.), 노스캐롤라이나주 리서치 트라이앵글 파크; 클로네틱스 코포레이션 (Clonetics Corporation), 메릴랜드주 워커스빌)로부터 입수가능하고, 세포는 상업적으로 이용가능한 시약 (예를 들면, 인비트로겐 라이프 테크놀로지스 (Invitrogen Life Technologies), 캘리포니아주 칼즈배드)을 사용하여 판매자의 지침에 따라서 배양된다. 예시적인 세포 유형은, 비제한적으로, HepG2 세포, Hep3B 세포, 일차 간세포, A549 세포, GM04281 섬유아세포 및 LLC-MK2 세포를 포함한다.

[0425] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 시험관내 시험

다른 안티센스 화합물로의 치료를 위해 적절하게 변형될 수 있는, 세포의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로의 치료 방법이 본원에 기재된다.

일반적으로, 세포는, 세포가 배양시 대략 60~80% 융합(confluence)에 도달할 때 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 치료된다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드를 배양된 세포 내로 도입하는데 통상 사용되는 하나의 시약은 양이온성 지질 전달감염 시약 LIPOFECTIN® (인비트로겐, 캘리포니아주 칼즈배드)을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 OPTI-MEM® 1 (인비트로겐, 캘리포니아주 칼즈배드) 중의 LIPOFECTIN®과 혼합하여 원하는 최종 농도의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 LIPOFECTIN® 농도 (전형적으로 100 nM 안티센스 올리고뉴클레오타이드당 2 내지 12 ug/mL 범위임)를 달성한다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드를 배양된 세포 내로 도입하는데 사용되는 또 하나의 시약은 LipofectAMINE 2000® (인비트로겐, 캘리포니아주 칼즈배드)을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 OPTI-MEM® 1 감소된 혈청 매질 (인비트로겐, 캘리포니아주 칼즈배드) 중의 LipofectAMINE 2000®과 혼합하여 원하는 농도의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 LipofectAMINE® 농도 (전형적으로 100 nM 안티센스 올리고뉴클레오타이드당 2 내지 12 ug/mL 범위임)를 달성한다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드를 배양된 세포 내로 도입하는데 사용되는 또 하나의 시약은 Cytofectin® (인비트로겐, 캘리포니아주 칼즈배드)을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 OPTI-MEM® 1 감소된 혈청 매질 (인비트로겐, 캘리포니아주 칼즈배드) 중의 Cytofectin®과 혼합하여 원하는 농도의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 Cytofectin® 농도 (전형적으로 100 nM 안티센스 올리고뉴클레오타이드당 2 내지 12 ug/mL 범위임)를 달성한다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드를 배양된 세포 내로 도입하는데 사용되는 또 하나의 기술은 전기천공을 포함한다.

세포는 일상적인 방법에 의해 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 치료된다. 세포는 전형적으로 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료 16-24 시간 후에 수확되고, 이때, 표적 핵산의 RNA 또는 단백질 수준은 당해분야에 공지되고 본원에 기재된 방법에 의해 측정된다. 일반적으로, 치료가 다수 반복으로 수행될 때, 데이터는 반복 치료의 평균으로서 주어진다.

사용된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 농도는 세포주 별로 다양하다. 특정 세포주에 대한 최적의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 농도를 결정하는 방법은 당해분야에 익히 공지되어 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 LipofectAMINE 2000®, 리포펙틴 또는 사이토펙틴으로 전달감염될 때 1 nM 내지 300 nM 범위의 농도로 사용된다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 전기천공을 사용하여 전달감염될 때 625 내지 20,000 nM 범위의 더 높은 농도에서 사용된다.

[0434] RNA 단리

RNA 분석을 총 세포 RNA 또는 폴리(A)+ mRNA에 대해 수행할 수 있다. RNA 단리 방법은 당해분야에 익히 공지되어 있다. RNA는 당해분야에 익히 공지된 방법, 예를 들면, 제조자의 추천된 프로토콜에 따라서 TRIZOL® 시약 (인비트로겐, 캘리포니아주 칼즈베드)을 사용하여 제조된다.

[0436] 표적 수준 또는 발현의 억제 분석

PTPIB 핵산의 수준 또는 발현의 억제를 당해분야에 공지된 다양한 방식으로 검정할 수 있다. 예를 들면, 표적 핵산 수준을, 예를 들면, 노던 블랏 분석, 경쟁적 폴리머라제 사슬 반응 (PCR), 또는 정량적 실시간 PCR로 정량화할 수 있다. RNA 분석을 총 세포 RNA 또는 폴리(A)+ mRNA에 대해 수행할 수 있다. RNA 단리 방법은 당해분야에 익히 공지되어 있다. 노던 블랏 분석은 또한 당해분야에 일상적이다. 정량적 실시간 PCR은 PE-어플라이드 바이오시스템즈 (PE-Applied Biosystems, 캘리포니아주 포스터 시티)로부터 입수 가능하고, 제조자의 지침에 따라서 사용되는 상업적으로 이용 가능한 ABI 프리즘® 7600, 7700, 또는 7900 서열 검출 시스템을 사용하여 편리하게 수행될 수 있다.

[0438] 표적 RNA 수준의 정량적 실시간 PCR 분석

표적 RNA 수준의 정량화를 제조자의 지침에 따라 ABI 프리즘® 7600, 7700, 또는 7900 서열 검출 시스템 (PE-어플라이드 바이오시스템즈, 캘리포니아주 포스터 시티)을 사용한 정량적 실시간 PCR로 수행할 수 있다. 정량적 실시간 PCR의 방법은 당해분야에 익히 공지되어 있다.

실시간 PCR 전에, 단리된 RNA는, 이후 기질로서 실시간 PCR 증폭에 사용되는 상보적인 DNA (cDNA)를 생성하는, 역전사효소 (RT) 반응에 적용된다. RT 및 실시간 PCR 반응은 동일한 샘플에서 순차적으로 잘 수행된다. RT 및 실시간 PCR 시약은 인비트로겐 (캘리포니아주 칼즈베드)으로부터 입수된다. RT, 실시간-PCR 반응을 당해분야의 숙련가에게 익히 공지된 방법으로 수행한다.

실시간 PCR에 의해 얻어진 유전자 (또는 RNA) 표적 양은 사이클로필린 A와 같이 발현이 일정한 유전자의 발현 수준을 사용하거나, 또는 RIBOGREENEN® (인비트로겐, 인코포레이티드, 캘리포니아주 칼즈베드)을 사용하여 총 RNA를 정량함으로써 표준화된다. 사이클로필린 A 발현은 표적과 동시에 수행하거나, 멀티플렉싱하거나, 또는 별도로 수행함으로써 실시간 PCR에 의해 정량화된다. 총 RNA를 RIBOGREENEN® RNA 정량화 시약 (인비트로겐, 인코포레이티드, 오레곤 유진)을 사용하여 정량화한다. RIBOGREENEN®에 의한 RNA 정량화 방법은 Jones, L.J., 등 (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374)에 교시되어 있다. CYTOFLUOR® 4000 기기 (PE 어플라이드 바이오시스템즈)를 RIBOGREENEN® 형광을 측정하는데 사용한다.

프로브 및 프라이머는 PTPIB 핵산에 하이브리드하도록 디자인된다. 실시간 PCR 프로브 및 프라이머를 디자인하는 방법은 당해분야에 익히 공지되어 있고, PRIMER EXPRESS® 소프트웨어 (어플라이드 바이오시스템, 캘리포니아주 포스터 시티)와 같은 소프트웨어를 사용함을 포함할 수 있다.

[0443] 단백질 수준의 분석

PTPIB 핵산의 암티센스 억제를 PTPIB 단백질 수준을 측정함으로써 평가할 수 있다. PTPIB의 단백질 수준을 당해분야에 익히 공지된 다양한 방식, 예를 들면, 면역침전, 웨스턴 블랏 분석 (면역블랏팅), 효소-연결된 면역흡수 검정 (ELISA), 정량적 단백질 검정, 단백질 활성 검정 (예를 들면, 카스파제 활성 검정), 면역조직화학, 면역세포화학 또는 형광-활성화 세포 분류 (FACS)로 평가하거나 정량화할 수 있다. 표적으로 향하는 항체는 다양한 공급원, 예를 들면, 항체의 MSRS 카탈로그 (에어리 코포레이션 (Aerie Corporation), 미시간주 베밍엄)로부터 확인되고 입수될 수 있거나, 또는 당해분야에 익히 공지된 종래의 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 생성 방법을 통해 제조될 수 있다. 인간 및 랫 PTPIB의 검출에 유용한 항체가 상업적으로 이용 가능하다.

[0445] 암티센스 화합물의 생체내 시험

암티센스 화합물, 예를 들면, 암티센스 올리고뉴클레오타이드를 PTPIB의 발현을 억제하고 표현형 변화를 산출하는 그의 능력을 평가하기 위해 동물에서 시험했다. 시험을 정상 동물 또는 실험적 질환 모델에서 수행할 수 있다. 동물로의 투여를 위해, 암티센스 올리고뉴클레오타이드를 포스페이트-완충된 식염수와 같은 약제학적으로 허용 가능한 희석제로 제형화한다. 투여는 비경구 투여 경로를 포함한다. 암티센스 올리고뉴클레오타이드로의 치료기간 후, RNA를 조직으로부터 단리하고 PTPIB 핵산 발현의 변화를 측정한다. PTPIB 단백질 수준의 변화도 또한 측정한다.

[0447]

어떤 정후

[0448]

어떤 구현예에서, 본원에 기재된 1 이상의 약제학적 조성물을 투여함을 포함하는, 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 어떤 구현예에서, 개인은 대사 관련된 질환을 갖는다.

[0449]

하기 실시예에서 보여주는 바와 같이, 본원에 기재된 PTPIB에 대해 표적된 화합물은 대사 증후군, 진성 당뇨병, 인슐린 내성, 당뇨병 이상지질혈증, 고트리글라이세라이드 혈증, 비만증 및 체중 증가를 포함하는 대사 관련된 질환의 생리 증상의 중증도를 감소시키는 것으로 나타났다. 어떤 실험에서, 화합물은 혈액 글루코오스 수준을 감소시켰고, 예를 들면, 동물은 증상을 계속 경험하였으나, 증상이 미처리된 동물에 비해 덜 심각했다. 그러나, 다른 실험에서, 화합물은 당뇨병의 증상을 감소시키는 것으로 나타났다; 예를 들면, 장기간 동안 치료된 동물은 단기간 동안 화합물을 투여한 경우보다 덜 심각한 증상을 경험했다. 그러나, 다른 실험에서, 화합물은 체중 증가를 억제하는 것으로 나타났다; 예를 들면, 장기간 동안 치료된 동물은 단기간 동안 화합물을 투여한 경우보다 덜 심각한 증상을 경험했다. 그러나, 다른 실험에서, 화합물은 고트리글라이세라이드 혈증을 억제하는 것으로 나타났다; 예를 들면, 장기간 동안 치료된 동물은 단기간 동안 화합물을 투여한 경우보다 덜 심각한 증상을 경험했다. 기능을 회복하려는 화합물의 능력은 하기 예시되어 있고, 따라서 이것은 질환의 증상이 본원에 기재된 화합물로의 치료에 의해 역전될 수 있음을 실증한다.

[0450]

진성 당뇨병은 수많은 신체적 및 생리 증상을 특징으로 한다. 유형 2 당뇨병과 연관된 당해분야의 숙련가에게 공지된 임의의 증상은 경감되거나, 그렇지 않다면 상기 기재된 방법에서 상기 제시된 바와 같이 조절될 수 있다. 어떤 구현예에서, 증상은 증가된 글루코오스 수준, 증가된 체중 증가, 빈번한 배뇨, 비정상적 갈증, 극도의 배고픔, 극도의 피로, 흐릿한 시력, 빈번한 감염, 사지의 따끔거림 또는 저림, 건조하고 가려운 피부, 체중 감소, 늦은 상처 치유, 및 잇몸 부어오름으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 신체적 증상이다.

[0451]

어떤 구현예에서, 증상은 증가된 인슐린 내성, 증가된 글루코오스 수준, 증가된 지방 질량, 감소된 대사율, 감소된 글루코오스 소거, 감소된 글루코오스 내성, 감소된 인슐린 민감도, 감소된 간 인슐린 민감도, 증가된 지방 조직 크기 및 중량, 증가된 체지방, 및 증가된 체중으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 생리 증상이다.

[0452]

어떤 구현예에서, 신체적 증상은 증가된 체중 증가이다. 어떤 구현예에서, 증상은 빈번한 배뇨이다. 어떤 구현예에서, 증상은 비정상적 갈증이다. 어떤 구현예에서, 증상은 극도의 배고픔이다. 어떤 구현예에서, 증상은 극도의 피로이다. 어떤 구현예에서, 증상은 흐릿한 시력이다. 어떤 구현예에서, 증상은 빈번한 감염이다. 어떤 구현예에서, 증상은 사지의 따끔거림 또는 저림이다. 어떤 구현예에서, 증상은 건조하고 가려운 피부이다. 어떤 구현예에서, 증상은 체중 감소이다. 어떤 구현예에서, 증상은 늦은 상처 치유이다. 어떤 구현예에서, 증상은 잇몸의 부어오름이다. 어떤 구현예에서, 증상은 증가된 인슐린 내성이다. 어떤 구현예에서, 증상은 증가된 지방 질량이다. 어떤 구현예에서, 증상은 감소된 대사율이다. 어떤 구현예에서, 증상은 감소된 글루코오스 소거이다. 어떤 구현예에서, 증상은 감소된 글루코오스 내성이다. 어떤 구현예에서, 증상은 감소된 인슐린 민감도이다. 어떤 구현예에서, 증상은 감소된 간 인슐린 민감도이다. 어떤 구현예에서, 증상은 증가된 지방 조직 크기 및 중량이다. 어떤 구현예에서, 증상은 증가된 체지방이다. 어떤 구현예에서, 증상은 증가된 체중이다.

[0453]

Liu 및 Chernoff는 PTPIB가 상피 성장 인자 수용체 (EGFR)에 결합하고 상피 성장 인자 수용체 (EGFR)의 기질로서 제공된다고 보여주었다 (Liu 및 Chernoff, *Biochem. J.*, 1997, 327, 139-145). 추가로, A431 인간 표피모양암종 세포에서, PT1B는 EGF의 부가에 의해 발생된 H₂O₂의 존재에 의해 불활성화되는 것으로 발견되었다. 이들 연구는 PTPIB가, 종양발생 동안 종종 탈조절되는, 세포의 산화 상태에 의해 음성적으로 조절될 수 있음을 나타낸다 (Lee 등, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 15366-15372).

[0454]

PTPIB의 과발현은 악성 난소암에서 실증되었고, 이러한 상관관계는 연관된 성장 인자 수용체 발현의 부수적 증가를 동반했다 (Wiener 등, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, 170, 1177-1183).

[0455]

PTPIB는 neu 종양유전자에 의해 유도된 NIH3T3 세포 (Brown-Shimer 등, *Cancer Res.*, 1992, 52, 478-482) 뿐만 아니라 v-srk, v-src, 및 v-ras에 의해 유도된 랫트 3Y1 섬유아세포 (Liu 등, *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 250-259) 및 bcr-abl에 의해 유도된 랫트-1 섬유아세포 (LaMontagne 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, 95, 14094-14099)에서의 변형을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, PTPIB가 bcr-abl 종양단백질의 억제제가 하는 바와 유사한 방식으로, 만성 골수성 백혈병 세포주, K562 세포의 분화를 촉진하는 것을 보여주었다. 이들 연구는 만성 골수 백혈병의 발병을 제어하는데 PTPIB의 가능한 역할을 기재하고 있다 (LaMontagne 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, 95, 14094-14099).

[0456]

따라서, 그 필요한 대상체 과증식성 장애와 연관된 증상을 개선하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 어떤 구현예

에서, 과증식성 장애는 암이다. 어떤 구현예에서, 암과 연관된 증상을 개선하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 어떤 구현예에서, 과증식성 장애와 연관된 증상의 개시 속도를 감소시키는 방법이 제공된다. 어떤 구현예에서, 암과 연관된 증상의 개시 속도를 감소시키는 방법이 제공된다. 어떤 구현예에서, 과증식성 장애와 연관된 증상의 중증도를 감소시키는 방법이 제공된다. 어떤 구현예에서, 암과 연관된 증상의 중증도를 감소시키는 방법이 제공된다. 그와 같은 구현예에서, 본 방법은 그 필요한 개인에게 PTPIB 혁산에 표적화된 화합물을 치료적으로 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.

[0457] 어떤 구현예에서, 개인에게 본 명세서에 기재된 하나 이상의 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 치료 방법이 제공된다. 어떤 구현예에서, 개인은 대사 관련된 질환을 갖는다.

[0458] 어떤 구현예에서, PTPIB 혁산에 표적화된 안티센스 화합물의 투여로 적어도 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99%, 또는 이들 값의 임의의 2개에 의해 한정된 범위까지 PTPIB 발현을 감소시킨다.

[0459] 어떤 구현예에서, 트랜스티레틴에 표적화된 안티센스 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 대사 관련된 질환을 앓고 있거나 그것에 민감한 환자를 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하는데 유용하다.

[0460] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 서열번호: 26에서 인용된 서열 (ISIS 404173)의 본 명세서에 기재된 인접 뉴클레오베이스 부를 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 투여하는 것을 포함한다.

투여

[0462] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 화합물 및 조성물은 국소 또는 전신 치료가 원하는 지 및 치료 면적에 따라 수많은 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 국소, 폐, 예를 들면, 네뷸라이저에 의한 것을 포함하는 분말의 흡입 또는 흡입제 또는 에어로졸에 의해; 기관내, 비강내, 상피 및 경피, 경구 또는 비경구일 수 있다. 본 명세서에 기재된 화합물 및 조성물은 직접적으로 조직 또는 장기에 투여될 수 있다.

[0463] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 화합물 및 조성물은 비경구로 투여된다. "비경구 투여"는 주사 또는 주입에 의한 투여를 의미한다. 비경구 투여는 피하 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 동맥내 투여, 비강내 투여, 또는 두개내 투여, 예를 들면 뇌내 투여, 척추강내 투여, 뇌실내 투여, 심실 투여, 뇌심실내 투여, 뇌 뇌실내 투여 또는 뇌 심실 투여를 포함한다. 투여는 연속적, 또는 만성, 또는 짧은 또는 간헐적일 수 있다.

[0464] 어떤 구현예에서, 비경구 투여는 주사에 의해서이다. 주사는 주사기 또는 펌프로 전달될 수 있다. 어떤 구현예에서, 주사는 볼러스 주사이다. 어떤 구현예에서, 주사는 조직 또는 장기이 직접적으로 투여된다.

[0465] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 화합물 및 조성물은 비경구로 투여된다.

[0466] 어떤 구현예에서, 비경구 투여는 피하이다.

[0467] 추가 구현예에서, 투여 제형은 본 명세서에 기재된 화합물 및 식염수.

[0468] 어떤 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 주사로 또는 주입 매월 1회, 매 2 개월, 매 90 일, 매 3 개월, 매 6 개월, 1년에 2회 또는 1년에 1회 전달된다.

어떤 병용 요법

[0470] 어떤 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 약제학적 조성물은 하나 이상의 다른 약제학적 제제와 함께 공투여된다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 하나 이상의 다른 약제학적 제제는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 약제학적 조성물로서 동일한 질환, 장애, 또는 상태를 치료하기 위해 디자인된다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 하나 이상의 다른 약제학적 제제는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 약제학적 조성물로서 상이한 질환, 장애, 또는 상태를 치료하기 위해 디자인된다. 어떤 구현예에서, 그와 같은 하나 이상의 다른 약제학적 제제는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 약제학적 조성물의 원하지 않는 부작용을 치료하기 위해 디자인된다. 어떤 구현예에서, 하나 이상의 약제학적 조성물은 다른 약제학적 제제의 원하는 않는 효과를 치료하기 위해 다른 약제학적 제조와 공투여된다. 어떤 구현예에서, 하나 이상의 약제학적 조성물은 조합 효과를 얻기 위해 다른 약제학적 제제와 함께 공투여된다. 어떤 구현예에서, 하나 이상의 약제학적 조성물은 상승작용 효과를 얻기 위해 다른 약제학적 제제와 함께 공투여된다.

[0471] 어떤 구현예에서, 제1 제제 및 하나 이상의 제2 제제는 동시에 투여된다. 어떤 구현예에서, 제1 제제 및 하나 이상의 제2 제제는 상이한 시간에 투여된다. 어떤 구현예에서, 제1 제제 및 하나 이상의 제2 제제는 단일 약제

학적 제형에서 함께 제조된다. 어떤 구현예에서, 제1 제제 및 하나 이상의 제2 제제는 별도로 제조된다.

[0472] 어떤 구현예에서, 제2 화합물은 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 전에 투여된다. 어떤 구현예에서, 제2 화합물은 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 다음에 투여된다. 어떤 구현예에서, 제2 화합물은 본 발명의 약제학적 조성물과 동시에 투여된다. 어떤 구현예에서, 공투여된 제2 화합물의 용량은, 제2 화합물이 단독으로 투여된다면 투여되는 용량과 동일하다. 어떤 구현예에서, 공투여된 제2 화합물의 용량은, 제2 화합물이 단독으로 투여된다면 투여되는 용량 미만이다. 어떤 구현예에서, 공투여된 제2 화합물의 용량은, 제2 화합물이 단독으로 투여된다면 투여되는 용량 초과이다.

[0473] 어떤 구현예에서, 제2 화합물의 공투여는 제1 화합물의 효과를 개선하고, 이로써 화합물의 공투여로 제1 화합물을 단독으로 투여하는 효과보다 더 큰 효과가 생긴다. 어떤 구현예에서, 공투여로 단독으로 투여될 때 화합물의 효과에 부가적인 효과가 생긴다. 어떤 구현예에서, 공투여로 단독으로 투여될 때 화합물의 효과에 초부자적인 효과가 생긴다. 어떤 구현예에서, 제1 화합물은 안티센스 화합물이다. 어떤 구현예에서, 제2 화합물은 안티센스 화합물이다.

[0474] 어떤 구현예에서, 제2 제제는, 비제한적으로, 글루코오스-저하제를 포함한다. 글루코오스 저하제는 비제한적으로 하기를 포함할 수 있다: 치료 생활방식 변화, PPAR 작용제, 디펩티딜 펩티다아제 (IV) 억제제, GLP-1 유사체, 인슐린 또는 인슐린 유사체, 인슐린 분비촉진제, SGLT2 억제제, 인간 아밀린 유사체, 바이구아나이드, 알파-글루코시다제 억제제, 또는 이들의 조합. 글루코오스-저하제는 비제한적으로 하기를 포함할 수 있다: 메트포르민, 설포닐우레아, 로시글리타존, 메글리티나이드, 티아졸리딘디온, 알파-글루코시다제 억제제 또는 이들의 조합. 설포닐우레아은 하기일 수 있다: 아세토헥사마이드, 클로르프로파마이드, 톨부타마이드, 톤라자마이드, 글리메피라이드, 글리피자이드, 클라이부라이드, 또는 글라이클라자이드. 메글리티나이드는 나테글리나이드 또는 레파글리나이드일 수 있다. 티아졸리딘디온은 피오글리타존 또는 로시글리타존일 수 있다. 알파-글루코시다제는 아카보스 또는 미글리톨일 수 있다.

[0475] 일부 구현예에서, 글루코오스-저하 치료제는 GLP-1 유사체이다. 일부 구현예에서, GLP-1 유사체는 엑센틴-4 또는 리라글루타이드이다.

[0476] 다른 구현예에서, 글루코오스-저하 치료제는 설포닐우레아이다. 일부 구현예에서, 설포닐우레아는 아세토헥사마이드, 클로르프로파마이드, 톤부타마이드, 톤라자마이드, 글리메피라이드, 글리피자이드, 클라이부라이드, 또는 글라이클라자이드이다.

[0477] 일부 구현예에서, 글루코오스-저하 약물은 바이구아나이드이다. 일부 구현예에서, 바이구아나이드는 메트포르민이고, 일부 구현예에서, 혈액 글루코오스 수준은 메트포르민 단독에 의한 치료 후에 관찰된 락트산증과 비교하여 증가된 락트산증없이 감소된다.

[0478] 일부 구현예에서, 글루코오스-저하 약물은 메글리티나이드이다. 일부 구현예에서, 메글리티나이드는 나테글리나이드 또는 레파글리나이드이다.

[0479] 일부 구현예에서, 글루코오스-저하 약물은 티아졸리딘디온이다. 일부 구현예에서, 티아졸리딘디온은 피오글리타존, 로시글리타존, 또는 트로글리타존이다. 일부 구현예에서, 혈액 글루코오스 수준은 로시글리타존 치료 단독으로 관찰된 더 큰 체중 증가 없이 감소된다.

[0480] 일부 구현예에서, 글루코오스-저하 약물은 알파-글루코시다제 억제제이다. 일부 구현예에서, 알파-글루코시다제 억제제는 아카보스 또는 미글리톨이다.

[0481] 어떤 구현예에서, 공투여된 글루코오스-저하제는 ISIS 113715이다.

[0482] 어떤 구현예에서, 글루코오스-저하 요법은 치료 생활방식 변화이다.

[0483] 어떤 구현예에서, 제2 제제는, 비제한적으로, 지질-저하제를 포함한다. 지질-저하제는 비제한적으로 아토르바스타틴, 심바스타틴, 로수마스타틴, 및 에제티마이브를 포함할 수 있다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 지질-저하제는 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 전에 투여된다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 지질-저하제는 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 다음에 투여된다. 어떤 그와 같은 구현예에서 지질-저하제는 본 발명의 약제학적 조성물과 동시에 투여된다. 어떤 그와 같은 구현예에서 공투여된 지질-저하제의 용량은 지질-저하제가 단독으로 투여되었다면 투여되는 용량과 동일하다. 어떤 그와 같은 구현예에서 공투여된 지질-저하제의 용량은 지질-저하제가 단독으로 투여되었다면 투여되는 용량 미만이다. 어떤 그와 같은 구현예에서 공투여된 지질-저하제의 용량은 지

질-저하제가 단독으로 투여되었다면 투여되는 용량 초과이다.

[0484] 어떤 구현예에서, 공투여된 지질-저하제는 HMG-CoA 환원효소 억제제이다. 어떤 그와 같은 구현예에서 HMG-CoA 환원효소 억제제는 스타틴이다. 어떤 그와 같은 구현예에서 스타틴은 아토르바스타틴, 심바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴, 및 로수바스타틴으로부터 선택된다.

[0485] 어떤 구현예에서, 공투여된 지질-저하제는 콜레스테롤 흡수 억제제이다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 콜레스테롤 흡수 억제제는 에제티마이브이다.

[0486] 어떤 구현예에서, 공투여된 지질-저하제는 공제형된 HMG-CoA 환원효소 억제제 및 콜레스테롤 흡수 억제제이다. 어떤 그와 같은 구현예에서 공제형된 지질-저하제는 에제티마이브/심바스타틴이다.

[0487] 어떤 구현예에서, 공투여된 지질-저하제는 마이크로솜 트리글라이세라이드 전이 단백질 억제제 (MTP 억제제)이다.

[0488] 어떤 구현예에서, 공투여된 지질-저하제는 ApoB에 표적화된 올리고뉴클레오타이드이다.

[0489] 어떤 구현예에서, 제2 제제는, 비제한적으로 항-비만증 약물 또는 제제를 포함한다. 그와 같은 항-비만증 제제는 비제한적으로 오를리스타트, 시부트라민, 또는 리모나반트를 포함하고, 지방질 또는 체중 저하제로서 상기에 기재된 바와 같이 투여될 수 있다. 어떤 구현예에서, 안티센스 화합물은 식욕 억제제와 함께 공투여될 수 있다. 그와 같은 식욕 억제제는 비제한적으로 디에틸프로페온 테누네이트, 마진돌, 오를리스타트, 펜디메트라진, 펜테르민, 및 시부트라민을 포함하고 본 명세서에 기재된 바와 같이 투여될 수 있다. 어떤 구현예에서, 항-비만증 제제는 CNS 기반 예컨대, 비제한적으로, 시부트라민 또는 GLP-1 기반 예컨대, 비제한적으로, 리라글루타이드이다.

제형

[0491] 본 명세서에 제공된 화합물은 섭취, 분포 및/또는 흡수를 돋기 위해 예를 들면, 리포솜, 수용체-표적화된 분자, 또는 다른 제형으로서 화합물의 다른 분자, 분자 구조 또는 혼합물과 또한 혼합, 콘주게이트화 또는 달리 연관될 수 있다. 그와 같은 흡수, 분포 및/또는 흡수-보조 제형의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 비제한적으로 하기를 포함한다: 미국: 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; 및 5,595,756, 이들 각각은 참고로 본 명세서에 포함되어 있다.

[0492] 본 명세서에 제공된 안티센스 화합물은 임의의 약제학적으로 허용가능한 염, 에스테르, 또는 그와 같은 에스테르의 염을 포함하거나, 인간을 포함하는 동물에 투여시 임의의 다른 화합물은 (직접적으로 또는 간접적으로) 생물학적으로 활성 대사물 또는 그의 잔기를 제공할 수 있다.

[0493] 용어 "약제학적으로 허용가능한 염"은 본 명세서에 제공된 화합물 생리적으로 및 약제학적으로 허용가능한 염을 의미한다: 즉, 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 유지하고 원하지 않는 독물학적 효과를 그것에 부여하지 않는 염. 용어 "약제학적으로 허용가능한 염"은 무기 또는 유기 산 및 염기를 포함하는, 약제학적으로 허용가능한 비독성 산 또는 염기로부터 제조된 염을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드에 대해, 약제학적으로 허용가능한 염 및 그의 용도의 바람직한 예는 그 전체가 본원에 포함되어 있는 미국 특허 6,287,860에 추가로 기재되어 있다. 나트륨 염은 적당한 형태의 올리고뉴클레오타이드 약물인 것으로 보여졌다.

[0494] 용어 "약제학적으로 허용가능한 유도체"는, 비제한적으로, 본 명세서에 기재된 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 히드레이트, 에스테르, 전구약물, 다형체, 이성질체, 동위원소로 표지된 변이체를 포함한다.

[0495] 본 발명은 본 명세서에 제공된 안티센스 화합물을 포함하는 약제학적 조성물 및 제형을 또한 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 국소 또는 전신 치료제가 원하는 지에 따라 그리고 치료될 면적에 따라 수많은 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 비경구일 수 있다. 비경구 투여는 하기를 포함한다: 정맥내, 동맥내, 피하, 비강내 또는 근육내 주사 또는 주입; 또는 두개내, 예를 들면, 뇌내 투여, 척추강내 투여, 뇌실내 투여, 심실 투여, 뇌심실내 투여, 뇌 뇌실내 투여 또는 뇌 심실 투여.

[0496] 비경구 투여는 간 및 혈장에서 PTPIB 발현을 표적으로 하는 것이 바람직하다. 적어도 1 2'-0-메톡시에틸 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 경구 투여에 특히 유용한 것으로 믿는다. 약제학적 조성물 및 국소 투여용 제형은 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 물약, 좌약, 스프레이, 액체 및 분말을 포함할 수 있다. 종래의 약제학적 담체, 수성, 분말 또는 오일성 베이스, 중점제 등을 필요한 또는 바람직할 수 있다. 코팅된 콘돔, 글러브 등이 또

한 유용할 수 있다.

[0497] 단위 복용량 형태로 편리하게 제공될 수 있는 본 발명의 약제학적 제형은 약제학적 산업에서 공지된 종래의 기술에 따라 제조될 수 있다. 그와 같은 기술은 활성 성분을 약제학적 담체(들) 또는 부형제(들)와 회합하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 균일하게 및 친밀하게 활성 성분을 액체 담체 또는 미분된 고형 담체 또는 둘 모두와 회합하고, 그 다음, 필요하면, 생성물을 형성화하여 제조된다.

[0498] 본 발명의 조성물은 임의의 많은 가능한 복용 형태 예컨대, 비제한적으로, 정제, 캡슐, 젤 캡슐, 액체 시럽, 연질 젤, 좌약, 및 관장으로 제형될 수 있다. 본 발명의 조성물은 수성, 비-수성 또는 혼합된 매질에서 서스펜션으로서 또한 제형될 수 있다. 수성 서스펜션은 예를 들면, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 소르비톨 및/또는 텍스트란을 포함하는 서스펜션의 정도를 증가시키는 물질을 추가로 함유할 수 있다. 서스펜션은 안정제를 또한 함유할 수 있다.

[0499] 본 발명의 약제학적 조성물은, 비제한적으로, 용액, 에멀젼, 폼 및 리포솜-함유 제형을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물 및 제형은 하나 이상의 침투 인해서, 담체, 부형제 또는 다른 활성 또는 불활성 성분을 포함할 수 있다.

[0500] 에멀션은, 직경이 $0.1 \mu\text{m}$ 를 통상 초과하는 소적의 형태로 또 다른 것에서 분산된 하나의 액체의 전형적으로 이질적 시스템이다. 에멀션은 분산된 상, 및 수성상, 오일상 또는 별개의 상으로서 자체 중 용액으로서 존재할 수 있는 활성 약물 외에 부가적 성분을 함유할 수 있다. 마이크로에멀션은 본 발명의 구현예로서 포함된다. 에멀션 및 그의 용도는 당해 기술에 공지되어 있고 그 전체가 본원에 포함되어 있는 미국 특허 6,287,860에 추가로 기재되어 있다.

[0501] 본 발명의 제형은 리포솜 제형을 포함한다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "리포솜"은 구형 이중층 또는 이중층으로 배현된 친양쪽성의 지질로 구성된 소포를 의미한다. 리포솜은 친지질성 물질 및 전달될 조성물을 함유하는 수성 내부로부터 형성된 막을 가지고 있는 단일라멜라 또는 다중라멜라 소포이다. 양이온성 리포솜은 음으로 하전된 DNA 문자과 상호반응하여 안정된 복합물을 형성하는 것으로 믿어지는 양으로 하전된 리포솜이다. pH-감수성 또는 음으로 하전된 리포솜은 그와 복합되기 보다는 DNA를 포획하는 것으로 믿어진다. 양이온성 및 비양이온성 리포솜 모두는 DNA를 세포에 전달하기 위해 사용되었다.

[0502] 리포솜은 "입체적으로 안정된" 리포솜을 또한 포함하고, 이 리포솜은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 하나 이상의 특화된 지질을 포함하는 리포솜을 의미하고, 상기 지질은 리포솜에 통합될 때, 그와 같은 특화된 지질이 부족한 리포솜에 대한 순환 수명을 증대시킨다. 리포솜 및 그의 용도는 그 전체가 본원에 포함되어 있는 미국 특허 6,287,860에 추가로 기재되어 있다.

[0503] 또 하나의 구현예에서, 본 발명의 제형은 식염수 제형을 포함한다. 어떤 구현예에서, 제형은 본 명세서에 기재된 화합물 및 식염수로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 제형은 본 명세서에 기재된 화합물 및 식염수로 본질적으로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 식염수는 약제학적으로 허용가능한 등급 식염수이다. 어떤 구현예에서, 식염수는 완충 식염수이다. 어떤 구현예에서, 식염수는 포스페이트 완충 식염수 (PBS)이다.

[0504] 어떤 구현예에서, 제형은 리포솜을 제외한다. 어떤 구현예에서, 제형은 입체적으로 안정된 리포솜을 제외한다. 어떤 구현예에서, 제형은 포스포지질을 제외한다. 어떤 구현예에서, 제형은 본 명세서에 기재된 화합물 및 식염수로 본질적으로 이루어지고 리포솜을 제외한다.

[0505] 본 발명의 약제학적 제형 및 조성물은 표면활성제를 또한 포함할 수 있다. 표면활성제 및 그의 용도는 그 전체가 본원에 포함되어 있는 미국 특허 6,287,860에 추가로 기재되어 있다.

[0506] 일 구현예에서, 본 발명은 핵산, 특히 올리고뉴클레오타이드의 효율적인 전달에 영향을 미치기 위해 다양한 침투 인해서를 이용한다. 침투 인해서 및 그의 용도는 그 전체가 본원에 포함되어 있는 미국 특허 6,287,860에 추가로 기재되어 있다.

[0507] 당해분야의 숙련가는 제형이 그의 의도한 용도, 즉 투여 경로에 따라 일상적으로 디자인된다는 것을 인식할 것이다.

[0508] 국소 투여용 제형은, 상기 올리고뉴클레오타이드 가 국소 전달제 예컨대 지질, 리포솜, 지방 산, 지방산 에스테르, 스테로이드, 킬레이트제 및 표면활성제와 혼합하여 제공되는 것을 포함한다. 바람직한 지질 및 리포솜은 하기를 포함한다: 천연 (예를 들면 디올레오일포스파티딜 DOPE 에탄올아민, 디미리스토일포스파티딜 콜린 DMPC, 디스테아로일포스파티딜 콜린) 음성 (예를 들면 디미리스토일포스파티딜 글리세롤 DMPG) 및 양이온성 (예를 들

면 디올레오일테트라메틸아미노프로필 DOTAP 및 디올레오일포스파티딜 에탄올아민 DOTMA).

[0509] 정맥내, 동맥내, 피하, 비강내, 근육내 주사 또는 주입, 또는 두개내를 포함하는 비경구 투여용 조성물 및 제형은 완충액, 희석제 및 다른 적당한 첨가물 예컨대, 비제한적으로, 침투 인핸서, 담체 화합물 및 다른 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 또한 함유할 수 있는 멸균 수용액을 포함할 수 있다.

[0510] 본 명세서에 제공된 어떤 구현예는 하나 이상의 올리고머 화합물 및 비-안티센스 기전에 의해 기능하는 하나 이상의 다른 화학치료제를 함유하는 약제학적 조성물을 제공한다. 그와 같은 화학치료제의 예는 비제한적으로 하기를 포함한다: 암 화학치료 약물 예컨대 다우노루비신, 다우노마이신, 닉티노마이신, 독소루비신, 에피루비신, 아이다루비신, 에소루비신, 블레오마이신, 마포스파마이드, 이포스파마이드, 시토신 아라바이노사이드, 비스-클로로에틸나이트로수레아, 부설판, 미토마이신 C, 악티노마이신 D, 미트라마이신, 프레드니손, 하이드록시프로게스테론, 테스토스테론, 타목시펜, 다카르바진, 프로카르바진, 헥사메틸 - 멜라민, 웬타메틸멜라민, 미톡산트론, 암사크린, 클로르암부실, 메틸사이클로헥실나이트로수레아, 질소 머스타드, 멜팔란, 사이클로포스파마이드, 6-머캅토퓨린, 6-티오gua9, 사이타라빈, 5-아자시티딘, 하이드록시우레아, 데옥시코포르마이신, 4-하이드록시페옥시사이클로포스포르아마이드, 5-플루오로우라실 (5-FU), 5-플루오로데옥시우리딘 (5-FUDR), 메토트랙세이트 (MTX), 콜히친, 탁솔, 빙크리스틴, 빈블라스틴, 에토포사이드 (VP-16), 트리메트렉세이트, 이리노테칸, 토포테칸, 쟈시타빈, 테니포사이드, 시스플라틴 및 디에틸스틸베스트롤(DES). 본 명세서에 제공된 화합물과 함께 사용될 때, 그와 같은 화학치료제는 별도로 (예를 들면, 5-FU 및 올리고뉴클레오타이드), 순차적으로 (예를 들면, 일정 기간 동안 5-FU 및 올리고뉴클레오타이드, 그 다음 MTX 및 올리고뉴클레오타이드), 또는 하나 이상의 다른 그와 같은 화학치료제 (예를 들면, 5-FU, MTX 및 올리고뉴클레오타이드, 또는 5-FU, 방사선요법 및 올리고뉴클레오타이드)와 병용하여 사용될 수 있다. 비스테로이드 항-염증성 약물 및 코르티코스테로이드를 비제한적으로 포함하는 항-염증성 약물, 및 리비비린, 비다라빈, 아사이클로비르 및 간시클로비르를 비제한적으로 포함하는 항바이러스 약물은 본 명세서에서 제공된 조성물에서 또한 조합될 수 있다. 안티센스 화합물 및 다른 비-안티센스 약물의 조합은 또한 발명 본 발명의 범위 내에 있다. 2 또는 그 초과 조합된 화합물은 함께 또는 순차적으로 사용될 수 있다.

[0511] 또 하나의 관련된 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 조성물은 하나 이상의 안티센스 화합물, 특히 제1 핵산에 표적화된 올리고뉴클레오타이드 및 제2 핵산 표적에 표적화된 하나 이상의 부가적 안티센스 화합물을 함유할 수 있다. 대안적으로, 본 명세서에서 제공된 조성물은 동일한 핵산 표적의 상이한 영역에 표적화된 2 또는 그 초과의 안티센스 화합물을 함유할 수 있다. 안티센스 화합물의 수많은 예는 당해기술에 공지되어 있다. 2 또는 그 초과 조합된 화합물은 함께 또는 순차적으로 사용될 수 있다.

5.2. 복용

[0513] 치료 조성물 및 그의 차후 투여 (복용)의 제형은 당해분야의 숙련가의 기술 내에서 전달된다. 투여는, 며칠 내지 몇 개월 지속되는 치료 과정과 함께, 또는 치료가 효과적이거나 질환 상태의 축소가 달성될 때까지, 치료될 질환 상태의 중증도 및 반응성에 의존적이다. 최적의 투여 계획은 환자의 신체의 약물 축적의 측정으로부터 계산될 수 있다. 최적 복용량은 개별적인 올리고뉴클레오타이드의 상태 효능에 따라 변할 수 있고, 시험관내 및 생체내 동물 모델에서 효과적인 것으로 발견된 EC₅₀을 기준으로 일반적으로 추정될 수 있다. 일반적으로, 복용량은 0.01 μg 내지 100 g / 체중 kg이고, 1일 1회 초과, 매주, 매달 또는 매년, 또는 원하는 간격으로 1회 초과로 주어질 수 있다. 성공적인 치료 다음에, 환자가 질환 상태의 재발을 방지하기 위해 유지 요법을 경험하는 것이 바람직할 수 있고, 여기서 상기 올리고뉴클레오타이드는 0.01 μg 내지 100 g / 체중 kg 범위의 유지 용량으로 1일 1회 초과 투여된다.

[0514] 본 발명이 그의 바람직한 구현예의 어떤 것에 따라 특이성과 함께 기재되었지만, 하기 실시예는 본 발명을 단지 설명하기 위해 쓰이고 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본원에서 인용된 각각의 참조, 유전자은행 수탁 번호, 등은 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함되어 있다.

5.3. 어떤 화합물

[0516] 다양한 길이의 약 276개의 새로 디자인된 안티센스 화합물, 모티프 및 뼈대 조성물을, 몇 개의 세포 유형에서 시험관내에서 인간 PTPIB mRNA에 대한 그의 효과에 대해 시험했다. 신규 화합물을, 대부분의 강력한 안티센스 화합물의 일부인 것으로 시험관내에서 이전에 결정된 ISIS 107772, ISIS 107831, ISIS 142025, ISIS 142026, ISIS 142027, ISIS 142028, ISIS 142082, ISIS 146908, 및 ISIS 146909를 포함하는 약 500개의 이전에 디자인된 화합물과 비교했다 (참고 예를 들면, 미국 특허 공보 번호 US 2003/0220282 공개일 11/27/2003 및 PCT 특허

공보 번호 WO2007/131237 공개일 11/15/2007). 약 285개의 새로 디자인된 및 이전에 디자인된 안티센스 화합물 중에서, 약 11개의 화합물을, 시험관내 효능을 기반으로 한 추가 연구를 위해 선택했다. 선택된 화합물을, HuVEC, HepG2, HuVEC, LLC-MK2, 및 사이노몽구스 일차 간세포에서 용량 의존적 억제에 대해 시험했다. 부가적 올리고뉴클레오타이드는, 시험된 모든 세포주에서 PTPIB mRNA의 유의미한 감소를 실증한 선택된 화합물 중의 하나인 ISIS 409826의 마이크로워크를 기반으로 디자인되었다. 올리고뉴클레오타이드는 조기 스크린(실시예 1)으로부터 캡머와 함께 HuVEC 세포 (실시예 5)에서 시험되었다. 실시예 5의 스트린으로부터의 몇 개의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 선택했고 HuVEC 세포 (실시예 6) 및 HepG2 세포 (실시예 7)에서 용량-의존적 억제에 대해 시험했다. 부가적으로, 2개의 올리고뉴클레오타이드는 선택된 화합물 중의 하나인 ISIS 1428082에 대한 쇼트머로서 디자인되었다. 이들 2개의 쇼트머 (ISIS 446431 및 ISIS 446432), 뿐만 아니라 실시예 6 및 7에서 기재된 연구로부터 선택된 5개의 ISIS 올리고뉴클레오타이드는 HepG2 세포, LLC-MK2 세포, HuVEC 세포, 및 사이노몽구스 일차 간세포에서 시험되었다 (실시예 8-11). 모든 세포주에서 PTPIB mRNA의 용량-의존적 감소를 실증한 ISIS 올리고뉴클레오타이드는 생체내 내성에 대해 시험되었다. ISIS 409826에 대해 쇼트머로서 디자인된 2개 초과의 올리고뉴클레오타이드 ISIS 446433 및 ISIS 446434는 생체내 내성 연구에 또한 포함되었다.

[0517]

선택된 12개의 캡머는 마우스 모델 (참고 실시예 12) 및 랫 모델 (실시예 13)에서 시험되었다. 그의 상보적인 서열 덕분에, 화합물은 서열번호: 1의 영역 3291-3310, 989-1008, 3290-3309, 3287-3306, 3291-3310, 3288-3307, 3292-3309, 3293-3308, 3288-3305, 및 3289-3304에 대해 상보적이다. 생체내 모델에서, 체중 및 장기 중량, 간 대사 마커, 예컨대 알라닌 트랜스아미나제, 아스파르테이트 트랜스아미나제 및 빌리루빈, 신장 대사 마커, 예컨대 BUN 및 creati9, 혈장 글루코오스 수준, 콜레스테롤 및 트리글라이세라이드 수준, 및 염증성 시토카인 수준이 측정되었다. 시험된 12개의 화합물 중에서, 5개의 화합물, ISIS 142082, ISIS 404173, ISIS 410003, ISIS 446431, 및 ISIS 446432이 선택되었고 그의 점도가 측정되었다 (실시예 14). 모든 5개의 올리고뉴클레오타이드는 연구에 대해 언급된 기준에 따라 그의 점에서 최적인 것으로 간주되었다.

[0518]

이들 연구의 최종 평가 (실시예 12-14)로, 서열번호: 27 (ISIS 142082), 46 (ISIS 446431), 26 (ISIS 404173), 및 23 (ISIS 409826)에서 인용된 서열의 뉴클레오베이스 서열을 갖는 4개의 화합물이 선택되었다. 그의 상보적인 서열 덕분에, 화합물은 서열번호: 1의 영역 3291-3310, 3292-3309, 3290-3309, 3287-3306에 상보적이다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이 열거된 영역을 표적으로 하는 화합물은 본 명세서에 추가로 기재된 서열번호에서 인용된 서열의 일부 뉴클레오베이스 부분을 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 어떤 구현예에서, 열거된 영역을 표적으로 하거나 열거된 서열번호에서 인용된 서열의 뉴클레오베이스 부분을 갖는 화합물은 본 명세서에서 추가로 기재된 바와 같이 그 길이가 다양할 수 있고 본 명세서에서 추가로 기재된 바와 같이 다양한 모티프 중의 하나를 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 영역을 표적으로 하거나 열거된 서열번호에서 인용된 서열의 뉴클레오베이스 부분을 갖는 화합물은 ISIS 번호: ISIS 142082, ISIS 446431, ISIS 404173, 및 ISIS 409826에 의해 나타낸 바와 같이 특정 길이 및 모티프를 갖는다.

[0519]

서열번호: 27 (ISIS 142082), 23 (ISIS 404173), 및 46 (ISIS 446431)에서 인용된 서열의 뉴클레오베이스 서열을 갖는 2개의 화합물을, 마우스 모델에서 장기간, 6 개월 내성 연구에서 추가 시험했다 (참고 실시예 15). 서열번호: 53 (ISIS 409826), 27 (ISIS 142082), 26 (ISIS 404173), 및 46 (ISIS 446431)에서 인용된 서열의 뉴클레오베이스 서열을 갖는 모두 4개의 화합물의 CD1 마우스의 간에서의 반감기를 또한 평가했다 (실시예 16).

[0520]

이들 4개의 화합물을, 사이노몽구스 원숭이에서 효능, 약력학적 프로파일 및 내성에 대해 시험했다 (실시예 17). 이들 원숭이에서의 억제 연구는, 이들 화합물의 일부에 의한 치료가 간 및 지방 조직에서의 PTPIB mRNA의 감소를 야기했다는 것을 나타내었다. 구체적으로, ISIS 409826, ISIS 142082, ISIS 446431 및 ISIS 404173에 의한 치료는 PBS 대조군과 비교하여 간 조직에서 45%, 48%, 18 및 22% PTPIB mRNA의 감소 각각을 야기했다. ISIS 409826, ISIS 142082, ISIS 446431 및 ISIS 404173에 의한 치료는 PBS 대조군과 비교하여 지방 조직에서 21%, 28%, 12% 및 31% PTPIB mRNA의 감소 각각을 야기했다. ISIS 404173가, 2개의 올리고뉴클레오타이드가 서열번호: 1의 그의 표적 영역의 단일 염기쌍 이동에 의해 서로 상이할지라도 ISIS 142082와 비교하여 PTPIB mRNA의 유사한 감소를 야기했다는 것이 주목했다. 간 조직의 단백질 분석은 웨스턴 븍릿 분석으로 또한 수행되었다. ISIS 409826, ISIS 142082, ISIS 446431 및 ISIS 404173를 사용하는 PTPIB mRNA 감소를, 효능에 대해 40 mgk/주의 최대 용량 및 효능에 대해 8mgk/주의 저 용량에서 측정했다 (참고 표 45). 8 mgk/주의 낮은 용량에서의 단백질 분석은, ISIS 404173가 ISIS 142082보다 더 강력하다는 것을 실증하는 ISIS 142082 (20 %) 보다 PTPIB 단백질의 더 큰 감소 (33 %)를 야기했다는 것을 실증했다 (참고 표 47 및 도 1). 40 mg/주의 더 높은 용량에서의 단백질 분석은, ISIS 404173 (60% 단백질 감소)가 ISIS 142082 (65% 단백질 감소) 만큼 유효하다는 것을 실증했다. 마지막으로, ISIS 409826 및 ISIS 142082에 의한 치료로 트리글라이세라이드 수준이 22% 감

소되었고 한편 ISIS 404173에 의한 치료로 PBS 대조군과 비교하여 트리글라이세라이드 수준이 37% 감소되었다.

[0521] 사이노몽구스 원숭이에서의 내성 연구(실시예 17)는, ISIS 142082에 의한 치료가 ISIS 404173에 의한 치료 만큼 영장류에서 내성이 있는 것은 아니라는 것을 나타내었다. 간에서 합성되고 염증의 마커로서 쓰이는 C-반응성 단백질의 수준은 93일째에 측정되었다. 40 mg/주의 더 높은 용량에서, ISIS 142082에 의한 치료는 1.2 mg/L의 대조군 수준과 비교하여 12 mg/L의 CRP 수준의 유의미한 증가를 야기했다. 40 mg/L에서의 ISIS 404173에 의한 치료는 1.6 mg/L로의 CRP 수준의 증가를 야기했다. 시험된 다른 화합물, ISIS 409826 및 ISIS 446431은 4.8 mg/L 및 6.7 mg/L로의 CRP 수준의 증가를 야기했다. 따라서, ISIS 404173은, ISIS 404173이 극도의로 내성 및 비-전 염증성인 것을 나타내는 CRP 수준의 적은 증가를 야기했다. 장기 중량은 원숭이에 의한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 내성을 평가하기 위해 또한 측정되었다. 40 mg/L의 용량에서의 ISIS 142082에 의한 치료는 21 g 및 18 g 각각의 신장 및 간 중량의 증가를 야기했는데, 이는 대조군에 대해 2-배 증가였다 (신장 10 g 및 간 10.5 g). ISIS 409826에 의한 치료는 간 중량에서의 2-배 증가 (대조군의 18.5 g 대 10.5 g) 및 비장 중량에서의 3-배 증가 (대조군 6.0 g 대 2.3 g)를 야기했다. ISIS 446431에 의한 치료는 비장 중량에서의 4-배 증가를 야기했다 (9.6 g 대 2.3 g 대조군). ISIS 404173에 의한 치료는 모든 장기에서의 1-배 미만 증가를 야기했다 (신장 14.8g; 간 15.5 g; 비장 3.7 g). 참고 (도 2). 그러므로, ISIS 142082, ISIS 409826, 및 ISIS 446431에 의한 치료는 원숭이에서 내성이 있는 것으로 간주되지 않았고, 반면에 ISIS 404173에 의한 치료는 내성이 있었다.

[0522] ISIS 142082에 의한 치료는 장기 중량 및 높은 수준의 CRP의 증가를 야기했는데, 이는 염증 상태를 나타낸다. ISIS 409826에 의한 치료는 높은 수준의 CRP 및 낮은 보체 C3 수준을 또한 야기했는데, 이는 병이 있는 상태를 나타낸다. ISIS 404173 및 ISIS 446431에 의한 치료는 사이노몽구스 원숭이에서 그의 내성 프로파일의 관점에서 최적인 것으로 간주되었다. 그러나, ISIS 446431은 ISIS 404173와 비교하여 더 적은 효능을 실증했다.

[0523] 간 및 신장에서 올리고뉴클레오타이드의 약력학적 프로파일 연구의 경우에, ISIS 올리고뉴클레오타이드의 어떤 것도 간 대 신장에서의 농도의 임의의 비정상 비를 실증하지 못했다. ISIS 404173는 결과에서 표시된 바와 같이 ISIS 142082와 비교하여 더 나은 신장 누적기였다.

[0524] 그러므로, 특히 사이노몽구스 원숭이에서의 생체내 연구는, ISIS 404173이 다른 화합물과 비교하여 강력하고 상당히 더 내성이 있었다는 것을 나타낸다. 연구는, ISIS 142082가, 단지 하나의 뉴클레오베이스에 의해 ISIS 407173로부터 이동될지도, 유효하지만 대사 및 염증성 마커에 대한 검정에 의해 실증된 바와 같이 ISIS 404173보다 덜 강력하고 내성이 있다는 것을 실증한다. 전체적으로, ISIS 404173는 임의의 다른 화합물과 비교하여 더 강력하고 내성이 있었다.

[0525] 따라서, 개선된 특징의 어느 하나 또는 그 초과를 갖는 안티센스 화합물이 제공된다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1의 뉴클레오타이드의 영역에 표적화되거나 그것과 특이적으로 하이브리드화된 본 명세서에 추가로 기재된 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물이 제공된다.

[0526] 따라서, 개선된 특징의 어느 하나 또는 그 초과를 갖는 안티센스 화합물이 제공된다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 2의 뉴클레오타이드의 영역에 표적화되거나 그것과 특이적으로 하이브리드화된 본 명세서에 추가로 기재된 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물이 제공된다.

[0527] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 화합물은, 실시예 11에 기재된 전기천공을 사용하여 사이노몽구스 원숭이 간세포 세포주에 전달될 때 0.4 μM 미만, 0.35 μM 미만, 0.3 μM 미만, 2.5 μM 미만, 2.0 μM 미만, 1.5 μM 미만, 1.0 μM 미만의 시험관내 IC_{50} 중 적어도 하나를 갖는 것에 의해 유효하다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 화합물은 죽염수 처리된 동물에 대해 4 배, 3 배, 또는 2 배 이하의 ALT 또는 AST 핵의 증가; 또는 30%, 20%, 15%, 12%, 10%, 5% 또는 2% 초과의 간, 비장 또는 신장 중량의 증가 중 적어도 하나를 갖는 것으로 실증된 바와 같이 크게 내성이 있다.

실시예

비-제한 개시내용 및 참조에 의한 포함

[0530] 본원에 기재된 어떤 화합물, 조성물 및 방법이 어떤 구현예에 따라 구체적으로 기재되는 반면, 하기 실시예는 단지 본원에 기재된 화합물을 설명하기 위해 제공되고 본원에 기재된 화합물을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본원에 인용된 각각의 참조, 유전자은행 수탁 번호, 등은 그것의 전체가 참조로 본원에 포함된다.

실시예 1: HuVEC 세포에서 인간 PTPIB mRNA의 안티센스 억제

[0532] 인간 PTPIB 핵산에 대해 표적된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 디자인하고 시험관내에서 PTPIB RNA 전사체에 대한 그의 효과에 대해 시험했다. 이전의 특허 (B10L001USP2)에 청구된, ISIS 107772, ISIS 107831, ISIS 142025, ISIS 142026, ISIS 142027, ISIS 142028, ISIS 142082, ISIS 146908, 및 ISIS 146909를 비교를 위해 본 검정에 포함시켰다. 5,000 세포/웰 밀도의 배양된 HuVEC 세포를 LipofectAMINE 2000®을 사용하여 2 nM 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 전달감염시켰다. 대략 24 시간 후, RNA를 세포로부터 단리하고 PTPIB mRNA 수준을 정량적 실시간 PCR로 측정했다. PTPIB mRNA 수준을 RTBOGREEN®으로 측정함으로써, 총 RNA 함량에 따라 조정했다. 결과는 미처리된 대조군 세포과 비교하여 PTPIB mRNA 수준의 퍼센트 억제로서 주어진다.

[0533] 표 1에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 5'-10-5 MOE 캡머 또는 2'-13-5 MOE 캡머이다. 5'-10-5 MOE 캡머는 10의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함하는 캡 분절 및 5의 2'-MOE 뉴클레오사이드를 포함하는 2의 왕 분절을 갖는다. 2'-13-5 MOE 캡머는 13의 2'-데옥시뉴클레오사이드를 포함하는 캡 분절, 2의 2'-MOE 뉴클레오사이드를 포함하는 5' 왕 분절, 및 3의 2'-MOE 뉴클레오사이드를 포함하는 3' 왕 분절을 갖는다. 각각의 캡머 전반에 걸친 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 (P=S) 결합이다. 각각의 캡머 전반에 걸친 모든 시토신 잔기는 5'-메틸시토신이다. '표적 개시 부위'는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 인간 유전자 서열에서 표적으로 하는 5'-최대 뉴클레오타이드를 나타낸다. '표적 중단 부위'는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 인간 유전자 서열에서 표적되는 3'-최대 뉴클레오타이드를 나타낸다. 표 1에 기재된 모든 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 1 (유전자은행 수납 번호 NM_002827.2)로서 본원에 지정된 mRNA 서열 또는 서열번호: 2 (뉴클레오타이드 14178000부터 14256000까지 끝이 잘린 유전자은행 수납 번호 NT_011362.9)로서 본원에 지정된 게놈 서열, 또는 둘 모두를 표적한다.

[0534] 표 1의 인간 올리고뉴클레오타이드들 중 일부는 또한 붉은털원숭이 유전자 서열과 완전히 교차-반응성이다. 'n/a'는 인간 올리고뉴클레오타이드 및 붉은털원숭이 유전자 서열 사이에 3 초파의 염기 불일치가 존재했음을 나타낸다. 인간 올리고뉴클레오타이드 및 붉은털원숭이 서열 사이의 상보성이 더 클수록 인간 올리고뉴클레오타이드는 붉은털원숭이 서열과 더 교차-반응성일 수 있을 것 같아 보인다. 표 1의 인간 올리고뉴클레오타이드를 서열번호: 3 (붉은털원숭이 PTPIB 스캐폴드로부터 엑손 1-9, 인트론 9 및 엑손 10)과 비교했다. "붉은털원숭이 표적 개시 부위"는 캡머를 붉은털원숭이 유전자 서열에서 표적으로 하는 5'-최대 뉴클레오타이드를 나타낸다. "붉은털원숭이 표적 중단 부위"는 캡머를 붉은털원숭이 유전자 서열에서 표적으로 하는 3'-최대 뉴클레오타이드를 나타낸다.

표 1

[0536] 서열번호: 1, 서열번호: 2, 및 서열번호: 3을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 HuVEC 세포에서의 인간 PTPIB RNA 전사체의 억제

ISIS 번호	서열	도티프	억제율 %	서열번호: 1에서 개시 부위	서열번호: 2에서 개시 부위	서열번호: 3에서 개시 부위	서열번호
142025	TTGTCGATCTGCTCGAACTC	5-10-5	43	190	1989	197	4
142026	GACTTGTGATCTGCTCGAA	5-10-5	59	193	1992	989	5
107772	CCCGGACTTGTGATCTGCT	5-10-5	66	197	1996	3754	6
142027	GCTCCCGGACTTGTGATCT	5-10-5	55	200	1999	3759	7
142028	CCAGCTCCGGACTTGTGCA	5-10-5	60	203	2002	4498	8
373125	GGCACCTTCGATCACAGCCA	5-10-5	55	989	70726	4487	9
113715	GCTCCTTCACTGATCCTGC	5-10-5	50	1035	n/a	4500	10
107831	GGTCATGCACAGGCAGGTTG	5-10-5	70	2360	75039	3753	11
409988	AGGTATGCACAGGCAGGTT	2-13-5	83	2361	75040	3759	12
409821	GATCAGGTATGCACAGGCA	5-10-5	86	2365	75044	3575	13
404176	TGATCAGGTATGCACAGGC	5-10-5	87	2366	75045	4493	14
146908	ACCCTTGGAATGTCTGAGTT	5-10-5	56	2544	75223	3746	15
404169	CCCATACCCATTGGAATGTCT	5-10-5	77	2549	75228	3756	16
409815	TCCCCATACCCTTGGAAATGTC	5-10-5	72	2550	75229	3566	17
146909	TTCCCATACCCTTGGAAATGT	5-10-5	43	2551	75230	3569	18
409845	TATTCCATGGCCATTGTAAA	5-10-5	23	3283	75962	4485	19
410030	TTATTCCATGGCCATTGTAA	2-13-5	24	3284	75963	4486	20
409825	TTTATTCCATGGCCATTGTAA	5-10-5	34	3285	75964	192	21
409883	GTTTATTCCATGCCATTGT	3-14-3	36	3286	75965	198	22
409999	GGTTTATTCCATGCCATTG	2-13-5	54	3287	75966	190	23
409826	GGTTTATTCCATGCCATTG	5-10-5	73	3287	75966	201	23
410000	TGGTTTATTCCATGCCATT	2-13-5	55	3288	75967	194	24
404172	TGGTTTATTCCATGCCATT	5-10-5	61	3288	75967	192	24
410001	ATGGTTTATTCCATGCCAT	2-13-5	51	3289	75968	198	25
409827	ATGGTTTATTCCATGCCAT	5-10-5	44	3289	75968	195	25
410002	AATGGTTTATTCCATGCCA	2-13-5	0	3290	75969	204	26
404173	AATGGTTTATTCCATGCCA	5-10-5	48	3290	75969	201	26
410003	AAATGGTTTATTCCATGCC	2-13-5	64	3291	75970	193	27
142082	AAATGGTTTATTCCATGCC	5-10-5	52	3291	75970	190	27
410004	AAAATGGTTTATTCCATGGC	2-13-5	46	3292	75971	196	28
409828	AAAATGGTTTATTCCATGGC	5-10-5	44	3292	75971	194	28
409829	AAAAATGGTTTATTCCATGG	5-10-5	36	3293	75972	198	29
404161	GGTCATTTCCATGGCCAGAG	2-13-5	78	n/a	73855	3746	31

409975	GGAGGTCAATTCCATGCCA	2-13-5	85	n/a	73858	n/a	32
409976	AGGAGGTCAATTCCATGCC	2-13-5	85	n/a	73859	2379	30

0539] 실시예 2: HuVEC 세포에서 인간 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

0540] 실시예 1에 기재된 연구에서 PTPIB mRNA의 유의미한 안티센스 억제를 보여주었던 몇 개의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 다양한 용량으로 HuVEC 세포에서 추가로 시험했다. 세포를 5,000 세포/웰 밀도로 평판배양하고, LipofectAMENE 2000®을 사용하여 0.9375 nM, 1.875 nM, 3.75 nM, 7.5 nM, 15 nM, 및 30 nM 농도의 각각의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 전달감염시켰다. 대략 16 시간 후, RNA를 세포로부터 단리하고 PTPIB mRNA 전사체 수준을 프라이머 프로브 세트 RTS3000 (서열번호: 33으로서 본원에 지정된 순방향 서열 CTGGTTAACCTCCTATCCTGG; 서열번호: 34로서 본원에 지정된 역방향 서열 CAGAGCAGCTCGCTACCTCTCT, 서열번호: 35로서 본원에 지정된 프로브 서열 CAGCTGGCTCTCCACCTTGTTACACATTATGT)를 사용한 정량적 실시간 PCR로 측정했다. PTPIB mRNA 수준을 RIBOGREEN®으로 측정함으로써 총 RNA 함량에 대해 표준화했다. 결과는 미처리된 대조군 세포와 비교하여 PTPIB mRNA의 퍼센트 억제로서 표 2에 주어진다.

표 2

[0542] HuVEC 세포에서 인간 PTPIB의 용량-의존적 안티센스 억제

ISIS 번호	0.9375 nM	1.875 nM	3.75 nM	7.5 nM	15.0 nM	30.0 nM	IC ₅₀ (nM)
113715	0	0	2	11	23	33	>30
404161	1	0	7	29	42	57	17
404169	0	6	17	37	57	72	7
404176	0	0	20	38	68	79	6
409815	0	0	7	30	48	65	12
409821	0	1	17	41	68	82	5
409826	0	0	10	30	47	64	12
409975	0	0	23	50	74	86	4
409976	0	0	21	46	65	82	5
409988	0	0	23	49	70	83	5
410003	0	0	4	16	28	46	>30

[0543]

[0544] 실시예 3: LLC-MK2 세포에서 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

[0545]

실시예 2에 기재된 연구로부터의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 또한 붉은털원숭이 유전자 서열 (서열번호: 3)과 교차-반응성이고 다양한 용량으로 붉은털원숭이 LLC-MK2 세포에서 추가로 시험되었다. 세포를 3,000 세포/웰 밀도로 평판배양하고, 리포팩틴을 사용하여 3.125 nM, 6.25 nM, 12.5 nM, 25 nM, 50 nM, 및 100 nM 농도의 각각의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 전달감염시켰다. 대략 16 시간 후, RNA를 세포로부터 단리하고 PTPIB mRNA 수준을 프라이머 프로브 세트 RTS198 (서열번호: 36으로서 본원에 지정된 순방향 서열 GGAGTCGAGCAGATCGACAA; 서열번호: 37로서 본원에 지정된 역방향 서열 GGCACTCTACATGGGAAGTC, 서열번호: 38로서 본원에 지정된 프로브 서열 AGCTGGCGGCCATTACAGGAT)을 사용한 정량적 실시간 PCR로 측정했다. PTPIB mRNA 수준을 RIBOGREEN®으로 측정함으로써 총 RNA 함량에 대해 표준화했다. 결과는 미처리된 대조군 세포와 비교하여 PTPIB mRNA의 퍼센트 억제로서 표 3에 주어진다. 붉은털원숭이 서열번호: 3 (붉은털원숭이 PTPIB 스캐폴드 (유전자 스캐폴드 240)로부터의 엑손 1-9, 인트론 9 및 엑손 10 연쇄) 상의 각각의 올리고뉴클레오타이드의 개시 및 중단 부위가 표 4에 주어진다.

[0546]

표 3

[0547] LLC-MK2 세포에서 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

ISIS 번호	3.125 nM	6.25 nM	12.5 nM	25.0 nM	50.0 nM	100.0 nM	IC ₅₀ (nM)
113715	9	18	18	42	71	88	12
404161	18	26	37	49	67	79	9
404169	9	33	36	52	70	85	8
404176	4	21	28	52	73	85	10
409815	19	27	32	51	67	83	9
409821	4	20	37	53	74	85	9
409826	7	31	63	46	62	78	8
409975	13	20	28	43	62	74	15
409976	12	20	37	42	65	77	12
409988	3	20	39	56	73	86	8
410003	16	24	36	43	65	80	11

[0548]

표 4

[0550] 붉은털원숭이 유전자 서열 (서열번호: 3) 상의 PTPIB를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적 부위

ISIS 번호	개시 부위	중단 부위
113715	1035	1054
404161	2385	2404
409975	2388	2407
409976	2389	2408
409988	3566	3585
409821	3570	3589
404176	3571	3590
404169	3754	3773
409815	3755	3774
409826	4491	4510
410003	4495	4514

[0551]

실시예 4: 사이노몽구스 일차 간세포에서 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

[0552]

실시예 1, 2 및 3에 기재된 연구로부터의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 중 일부를 다양한 용량으로 사이노몽구스 일차 간세포에서 추가로 시험했다. 세포를 35,000 세포/웰 밀도로 평판배양하고, 리포펙틴을 사용하여 6.25 nM, 12.5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 및 200 nM 농도의 각각의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 전달감염시켰다. 대략 16 시간 후, RNA를 세포로부터 단리하고 PTPIB mRNA 수준을 프라이머 프로브 세트 RTS198을 사용한 정량적 실시간 PCR로 측정했다. PTPIB mRNA 수준을 RIBOGREEN®으로 측정함으로써 총 RNA 함량에 대해 표준화했다. 결과는 미처리된 대조군 세포와 비교하여 PTPIB mRNA의 퍼센트 억제로서 표 5에 주어진다.

[0553]

표 5

[0554]

사이노몽구스 일차 간세포에서 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

ISIS 번호	6.25 nM	12.5 nM	25.0 nM	50.0 nM	100.0 nM	200.0 nM	IC ₅₀ (nM)
373125	16	4	13	32	48	67	104
404161	7	3	24	40	56	77	72
404169	0	13	27	44	57	77	67
404176	16	17	27	42	64	76	59
409815	0	24	26	40	57	75	69
409821	0	9	25	37	60	73	73
409826	8	28	10	37	56	71	82
409975	13	19	29	38	57	75	67
409976	2	18	13	35	60	80	70
409988	16	22	28	41	59	77	61
410003	17	10	37	46	60	78	56

[0555]

실시예 5: 마이크로워크에 의해 디자인된 올리고뉴클레오타이드에 의한 HuVEC 세포에서의 인간 PTPIB mRNA의 안티센스 억제

[0556]

부가적 캡머를 시험된 모든 세포주에서 PTPIB의 유의미한 억제가 실증된 ISIS 409826를 기초로 디자인했다. 이를 캡머를, ISIS 409826의 약간 업스트림 및 다운스트림 이동된 캡머를 생성함 (즉, "마이크로워크")으로써 디자인했다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 다양한 모티프, 예를 들면 5-10-5 MOE, 5-8-5 MOE, 2-13-5 MOE, 6-8-6 MOE 모티프로 생성되거나, 또는 데옥시 및 MOE 단위를 포함하는 균일한 올리고뉴클레오타이드이다. 이를 캡머를 시험관내에서 시험했다. ISIS 올리고뉴클레오타이드 ISIS 142082, ISIS 113715, ISIS 373125, ISIS 404161, ISIS 404172, ISIS 404173, ISIS 404176, ISIS 409825, ISIS 409827, ISIS 409828, ISIS 409829, ISIS 409845, ISIS 409998, ISIS 409999, ISIS 410000, ISIS 410001, ISIS 410002, ISIS 410003, ISIS 410004, 및 ISIS 410030 (실시예 1로부터), 뿐만 아니라 ISIS 399038, ISIS 404159, 및 ISIS 404174 (이전의 출원 (CORE0061W015)으로부터)를 또한 비교를 위한 검정에 포함시켰다. 20,000 세포/웰 밀도로 배양된 HuVEC 세포를 전기천공을 사용하여 2,000 nM 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 전달감염시켰다. 대략 24 시간의 치료기간 후,

RNA를 세포로부터 단리하고 PTPIB mRNA 수준을 정량적 실시간 PCR로 측정했다. 인간 프라이머 프로브 세트 RTS3000을 PTPIB mRNA 수준을 측정하는데 사용했다. PTPIB mRNA 수준을 RIBOGREEN®으로 측정함으로써 총 RNA 함량에 따라 조정했다. 결과는 미처리된 대조군 세포와 비교하여 PTPIB mRNA의 퍼센트 억제로서 주어진다. 결과는 표 6 및 7에 주어진다.

- [0559] 5-10-5 MOE 캡머는 길이가 20 뉴클레오타이드이고, 중심 캡 분절이 10의 2'-데옥시뉴클레오타이드로 구성되고 각각 5의 뉴클레오타이드를 포함하는 왕들이 양 측면에 (5' 및 3' 방향에) 배치된다. 5-8-5 MOE 캡머는 길이가 18 뉴클레오타이드이고, 중심 캡 분절이 8의 2'-데옥시뉴클레오타이드로 구성되고 각각 5의 뉴클레오타이드를 포함하는 왕들이 양 측면에 (5' 및 3' 방향에) 배치된다. 2-13-5 MOE 캡머는 길이가 20 뉴클레오타이드이고, 중심 캡 분절이 13의 2'-데옥시뉴클레오타이드로 구성되고 각각 2 및 5의 뉴클레오타이드를 포함하는 왕들로 5' 및 3' 방향에 배치된다. 6-8-6 MOE 캡머는 길이가 18 뉴클레오타이드이고, 중심 캡 분절이 8의 2'-데옥시뉴클레오타이드로 구성되고 각각 6의 뉴클레오타이드를 포함하는 왕들로 양 측면에 (5' 및 3' 방향에) 배치된다. 각각의 모티프 (5-10-5, 5-8-5, 2-13-5, 및 6-8-6)에 대해, 5' 왕 분절에서의 각각의 뉴클레오타이드 및 3' 왕 분절에서의 각각의 뉴클레오타이드는 2'-MOE 변형을 갖는다. 균일한 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드의 길이 전반에 걸쳐 분포된 데옥시 및 MOE 단위를 갖는다. 균일한 올리고뉴클레오타이드 서열에서 다양한 단위 화학에 대한 기호는 하기와 같다: 'd' = 2'-데옥시리보오스; 'e' = 2'-0-메톡시에틸 리보오스. 각각의 캡머 전반에 걸친 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 (P=S) 결합이다. 각각의 캡머 전반에 걸친 모든 시티딘 잔기는 5-메틸시티딘이다. "표적 개시 부위"는 캡머를 표적으로 하는 5'-최대 뉴클레오타이드를 나타낸다. "표적 중단 부위"는 캡머를 표적으로 하는 3'-최대 뉴클레오타이드를 나타낸다. 표 6에 기재된 각각의 캡머는 서열번호: 1 (유전자은행 수납 번호 NM_002827.2)을 표적한다. 표 7에 기재된 모든 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 2 (뉴클레오타이드 14178000부터 14256000까지 끝이 잘린 유전자은행 수납 번호 NT_011362. 9)를 표적한다.
- [0560] 표 6 및 7에서 보여주는 바와 같이, ISIS 번호: 113715, 142082, 373125, 399038, 404159, 404161, 404172, 404173, 404176, 409826, 409827, 409999, 410000, 410001, 410002, 410003, 438373, 438374, 438375, 438377, 438379, 438380, 438381, 438382, 438383, 438384, 438439, 438442, 438443, 438444, 438445, 438450, 438451, 438452, 438453, 438459, 438460, 438461, 438462, 438464, 438465, 438468, 438469, 438472, 438473, 및 438474를 포함하는 몇 개의 캡머는 적어도 50% 억제율을 나타냈다.
- [0561] ISIS 번호: 113715, 142082, 373125, 399038, 404161, 404172, 404173, 404176, 409826, 409827, 409999, 410000, 410001, 410002, 410003, 438373, 438374, 438380, 438381, 438382, 438442, 438444, 438445, 438450, 438451, 438452, 438453, 438459, 438460, 438461, 438462, 438468, 438469, 438472, 및 438474를 포함하는 몇 개의 캡머는 적어도 60% 억제율을 나타냈다.
- [0562] ISIS 번호: 142082, 373125, 399038, 404161, 404172, 404173, 404176, 409826, 409827, 409999, 410000, 410001, 410002, 410003, 438373, 438374, 438444, 438451, 438452, 438453, 438460, 438461, 438462, 438468, 438469, 438472, 및 438474를 포함하는 몇 개의 캡머는 적어도 70% 억제율을 나타냈다.
- [0563] ISIS 번호: 142082, 404161, 404173, 404176, 409826, 410000, 410001, 410002, 410003, 438451, 438452, 438460, 438461, 및 438474를 포함하는 몇 개의 캡머는 적어도 80% 억제율을 나타냈다.
- [0564] ISIS 번호: 142082, 404161, 404173, 404176, 409826, 410001, 410002, 및 410003을 포함하는 몇 개의 캡머는 적어도 85% 억제율을 나타냈다.
- [0565] ISIS 번호: 142082, 404161, 및 409826을 포함하는 몇 개의 캡머는 적어도 90% 억제율을 나타냈다.

[0567]

서열번호: 1에 대해 표적된 키메라 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 인간 PTPIB mRNA 수준의 억제

개시부위	중단부위	ISIS번호	서열	모티프	억제율 %	서열번호
989	1008	373125	GGCACCTTCGATCACAGCCA	5-10-5 MOE	72	9
1035	1054	113715	GCTCCTTCACTGATCCTGC	5-10-5 MOE	68	10
2366	2385	404176	TGATCAGGTCATGCACAGGC	5-10-5 MOE	89	14
3283	3302	409845	TATTCCATGGCCATTGTAAA	5-10-5 MOE	32	19
3284	3303	404174	TTATTCCATGGCCATTGTAA	5-10-5 MOE	47	20
3284	3303	410030	TTATTCCATGGCCATTGTAA	2-13-5 MOE	47	20
3284	3303	438377	T _e T _e A _d T _d T _d C _e C _e A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _d T _d A _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	52	20
3284	3303	438439	T _e T _e A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _e G _e C _d C _d A _d T _d T _d G _d T _d A _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	53	20
3284	3303	438448	T _e T _e A _e T _d T _d C _e C _e A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _d T _e A _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	34	20
3284	3303	438457	T _e T _e A _e T _d T _d C _d C _d A _e T _e G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _d T _e A _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	35	20
3284	3303	438466	TTATTCCATGGCCATTGTAA	6-8-6 MOE	25	20
3285	3304	409825	TTTATTCCATGGCCATTGTA	5-10-5 MOE	47	21
3285	3304	409998	TTTATTCCATGGCCATTGTA	2-13-5 MOE	49	21
3285	3302	438368	TATTCCATGGCCATTGTA	5-8-5 MOE	32	39
3285	3304	438378	T _e T _e T _d A _d T _d T _e C _e C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _d T _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	46	21
3285	3304	438440	T _e T _e T _d A _d T _d C _d C _d A _d T _e G _e G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _d T _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	30	21

[0568]

3285	3304	438449	T _e T _e A _d T _d T _e C _e C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _e T _e A _e	데우시 및 MOE 단위	43	21
3285	3304	438458	T _e T _e A _d T _d T _d C _d C _e A _e T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _e T _e A _e	데우시 및 MOE 단위	53	21
3285	3304	438467	TTTATTCCATGCCATTGTA	6-8-6 MOE	33	21
3286	3305	399038	GTTTATTCCATGCCATTGT	5-10-5 MOE	74	22
3286	3305	404159	GTTTATTCCATGCCATTGT	2-13-5 MOE	54	22
3286	3303	438369	TTATTCCATGCCATTGT	5-8-5 MOE	33	40
3286	3305	438379	G _e T _e T _d A _d T _e T _e C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _e T _e	데우시 및 MOE 단위	51	22
3286	3305	438441	G _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _e T _e G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _e T _e	데우시 및 MOE 단위	40	22
3286	3305	438450	G _e T _e T _d A _d T _e T _e C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _e G _e T _e	데우시 및 MOE 단위	64	22
3286	3305	438459	G _e T _e T _d A _d T _d T _d C _e C _e A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _e G _e T _e	데우시 및 MOE 단위	68	22
3286	3305	438468	GTTTATTCCATGCCATTGT	6-8-6 MOE	76	22
3287	3306	409826	GGTTTATTCCATGCCATTG	5-10-5 MOE	93	23
3287	3306	409999	GGTTTATTCCATGCCATTG	2-13-5 MOE	75	23
3287	3304	438370	TTTATTCCATGCCATTG	5-8-5 MOE	33	41
3287	3306	438380	G _e G _e T _d T _d A _d T _e T _e T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _e G _e	데우시 및 MOE 단위	63	23
3287	3306	438442	G _e G _e T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _e A _e T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _e G _e	데우시 및 MOE 단위	67	23
3287	3306	438451	G _e G _e T _e T _d A _d T _e T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _e T _e G _e	데우시 및 MOE 단위	83	23
3287	3306	438460	G _e G _e T _e T _d A _d T _d C _e C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _e T _e G _e	데우시 및 MOE 단위	82	23
3287	3306	438469	GGTTTATTCCATGCCATTG	6-8-6 MOE	71	23

[0569]

3288	3307	404172	TGGTTTATTCCATGGCCATT	5-10-5 MOE	76	24
3288	3307	410000	TGGTTTATTCCATGGCCATT	2-13-5 MOE	83	24
3288	3305	438371	GTTTATTCCATGGCCATT	5-8-5 MOE	54	42
3288	3307	438381	T _e G _e G _d T _d T _d A _e T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d AT _e T _e	데우시 및 MOE 단위	69	24
3288	3307	438443	T _e G _e G _d T _d T _d A _d T _d T _d C _e C _e A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _e	데우시 및 MOE 단위	50	24
3288	3307	438452	T _e G _e G _e T _d T _d A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	82	24
3288	3307	438461	T _e G _e G _e T _d T _d A _d T _e T _e C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	81	24
3288	3307	438470	TGGTTTATTCCATGGCCATT	6-8-6 MOE	46	24
3289	3308	409827	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	5-10-5 MOE	74	25
3289	3308	410001	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	2-13-5 MOE	85	25
3289	3306	438372	GGTTTATTCCATGGCCAT	5-8-5 MOE	52	43
3289	3308	438382	A _e T _e G _d G _d T _d T _e A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	65	25
3289	3308	438444	A _e T _e G _d G _d T _d T _d A _d T _d T _e C _e C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	72	25
3289	3308	438453	A _e T _e G _e G _d T _d T _e A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _e A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	72	25
3289	3308	438462	A _e T _e G _e G _d T _d T _d A _e T _e T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	70	25
3289	3308	438471	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	6-8-6 MOE	45	25
3290	3309	404173	AATGGTTTATTCCATGGCCA	5-10-5 MOE	85	26
3290	3309	410002	AATGGTTTATTCCATGGCCA	2-13-5 MOE	85	26
3290	3307	438373	TGGTTTATTCCATGGCCA	5-8-5 MOE	70	44

[0570]

3290	3309	438383	A _e A _e T _d G _d G _d T _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _e A _e	데우시 및 MOE 단위	54	26
3290	3309	438445	A _e A _e T _d G _d G _d T _d T _d A _d T _d T _e C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _e A _e	데우시 및 MOE 단위	66	26
3290	3309	438454	A _e A _e T _e G _d G _d T _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _e C _e A _e	데우시 및 MOE 단위	52	26
3290	3309	438463	A _e A _e T _e G _d G _d T _d T _d T _e A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _e C _e A _e	데우시 및 MOE 단위	39	26
3290	3309	438472	AATGGTTTATTCCATGGCCA	6-8-6 MOE	73	26
3291	3310	142082	AAATGGTTTATTCCATGGCC	5-10-5 MOE	90	27
3291	3310	410003	AAATGGTTTATTCCATGGCC	2-13-5 MOE	86	27
3291	3308	438374	ATGGTTTATTCCATGGCC	5-8-5 MOE	79	45
3291	3310	438384	A _e A _e A _d T _d G _d G _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _e C _e	데우시 및 MOE 단위	53	27
3291	3310	438446	A _e A _e A _d T _d G _d G _d T _d T _d A _e T _e T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _e C _e	데우시 및 MOE 단위	38	27
3291	3310	438455	A _e A _e A _e T _d G _d G _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _e C _e	데우시 및 MOE 단위	58	27
3291	3310	438464	A _e A _e A _e T _d G _d G _d T _d T _e A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _e C _e	데우시 및 MOE 단위	58	27
3291	3310	438473	AAATGGTTTATTCCATGGCC	6-8-6 MOE	57	27
3292	3311	409828	AAAATGGTTTATTCCATGGC	5-10-5 MOE	43	28
3292	3311	410004	AAAATGGTTTATTCCATGGC	2-13-5 MOE	58	28
3292	3309	438375	AATGGTTTATTCCATGGC	5-8-5 MOE	55	46
3292	3311	438385	A _e A _e A _d A _d T _d G _e G _e T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _e	데우시 및 MOE 단위	36	28
3292	3311	438447	A _e A _e A _d A _d T _d G _d G _d T _d T _e A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _e	데우시 및 MOE 단위	35	28
3292	3311	438456	A _e A _e A _e A _d T _d G _e G _e T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _e	데우시 및 MOE 단위	58	28

[0571]

3292	3311	438465	A _e A _e A _e A _d T _d G _d GT _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _e G _e C _e	데우시 및 MOE 단위	51	28
3292	3311	438474	AAAATGGTTTATTCCATGGC	6-8-6 MOE	82	28
3293	3312	409829	AAAAATGGTTTATTCCATGG	5-10-5 MOE	42	29
3293	3310	438376	AAATGGTTTATTCCATGG	5-8-5 MOE	36	47

[0572]

[0573]

[0574]

서열번호: 2에 대해 표적된 키메라 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 인간 PTPIB mRNA 수준의 억제

개시부위	중단부위	ISIS 번호	서열	모티프	억제율 %	서열번호
70726	70745	373125	GGCACCTTCGATCACAGCCA	5-10-5 MOE	72	9
73855	73874	404161	GGTCATTCCATGCCAGAG	2-13-5 MOE	93	31
75045	75064	404176	TGATCAGGTATGCACAGGC	5-10-5 MOE	89	14
75962	75981	409845	TATTCCATGCCATTGTAAA	5-10-5 MOE	32	19
75963	75982	404174	TTATTCCATGCCATTGTAA	5-10-5 MOE	47	20
75963	75982	410030	TTATTCCATGCCATTGTAA	2-13-5 MOE	47	20
75963	75982	438377	T _e T _c A _d T _d C _e C _e A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d G _d T _d A _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	52	20
75963	75982	438439	T _e T _c A _d T _d C _d C _d A _d T _d G _e G _e C _d C _d A _d T _d G _d T _d A _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	53	20
75963	75982	438448	T _e T _c A _e T _d T _d C _e C _e A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d G _d T _d A _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	34	20
75963	75982	438457	T _e T _c A _e T _d T _d C _d C _d A _e T _e G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _d T _e A _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	35	20
75963	75982	438466	TTATTCCATGCCATTGTAA	6-8-6 MOE	25	20
75964	75983	409825	TTTATTCCATGCCATTGTAA	5-10-5 MOE	47	21
75964	75983	409998	TTTATTCCATGCCATTGTAA	2-13-5 MOE	49	21
75964	75981	438368	TATTCCATGCCATTGTAA	5-8-5 MOE	32	39
75964	75983	438378	T _e T _c T _d A _d T _d C _e C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d G _d T _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	46	21
75964	75983	438440	T _e T _c T _d A _d T _d C _d C _d A _d T _e G _e G _d C _d C _d A _d T _d G _d T _e A _e	데옥시 및 MOE 단위	30	21

[0575]

75964	75983	438449	T _e T _e A _d T _d T _e C _e C _d A _d T _d G _d C _d C _d A _d T _d G _e T _e A _e	데우시 및 MOE 단위	43	21
75964	75983	438458	T _e T _e A _d T _d T _d C _d C _e A _e T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _e T _e A _e	데우시 및 MOE 단위	53	21
75964	75983	438467	TTTATTCCATGCCATTGTA	6-8-6 MOE	33	21
75965	75984	399038	GGTTTATTCCATGCCATTGT	5-10-5 MOE	74	22
75965	75984	404159	GGTTTATTCCATGCCATTGT	2-13-5 MOE	54	22
75965	75982	438369	TTTATTCCATGCCATTGT	5-8-5 MOE	33	40
75965	75984	438379	G _c T _e T _d A _d T _e T _e C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _e T _e	데우시 및 MOE 단위	51	22
75965	75984	438441	G _c T _e T _d A _d T _d C _d C _d A _e T _e G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _e T _e	데우시 및 MOE 단위	40	22
75965	75984	438450	G _c T _e T _d A _d T _e T _e C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _e G _e T _e	데우시 및 MOE 단위	64	22
75965	75984	438459	G _c T _e T _d A _d T _d T _e C _e C _e A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _e G _e T _e	데우시 및 MOE 단위	68	22
75965	75984	438468	GGTTTATTCCATGCCATTGT	6-8-6 MOE	76	22
75966	75985	409826	GGTTTATTCCATGCCATTG	5-10-5 MOE	93	23
75966	75985	409999	GGTTTATTCCATGCCATTG	2-13-5 MOE	75	23
75966	75983	438370	GGTTTATTCCATGCCATTG	5-8-5 MOE	33	41
75966	75985	438380	G _c G _e T _d T _d A _e T _e T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _e G _e	데우시 및 MOE 단위	63	23
75966	75985	438442	G _c G _e T _d T _d A _d T _d C _d C _e A _e T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _e G _e	데우시 및 MOE 단위	67	23
75966	75985	438451	G _c G _e T _d T _d A _e T _e T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _e T _e G _e	데우시 및 MOE 단위	83	23
75966	75985	438460	G _c G _e T _d T _d A _d T _d T _e C _e C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _e T _e G _e	데우시 및 MOE 단위	82	23

75966	75985	438469	GGTTTATTCCATGGCCATTG	6-8-6 MOE	71	23
75967	75986	404172	TGGTTTATTCCATGGCCATT	5-10-5 MOE	76	24
75967	75986	410000	TGGTTTATTCCATGGCCATT	2-13-5 MOE	83	24
75967	75984	438371	GTTTATTCCATGGCCATT	5-8-5 MOE	54	42
75967	75986	438381	T _e G _e G _d T _d T _d A _e T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _e	데우시 및 MOE 단위	69	24
75967	75986	438443	T _e G _e G _d T _d T _d A _d T _d C _e C _e A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _e	데우시 및 MOE 단위	50	24
75967	75986	438452	T _e G _e G _e T _d T _d A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	82	24
75967	75986	438461	T _e G _e G _e T _d T _d A _d T _e T _e C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	81	24
75967	75986	438470	TGGTTTATTCCATGGCCATT	6-8-6 MOE	46	24
75968	75987	409827	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	5-10-5 MOE	74	25
75968	75987	410001	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	2-13-5 MOE	85	25
75968	75985	438372	GGTTTATTCCATGGCCAT	5-8-5 MOE	52	43
75968	75987	438382	A _e T _e G _d G _d T _d T _e A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	65	25
75968	75987	438444	A _e T _e G _d G _d T _d T _d A _d T _d T _e C _e C _e A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	72	25
75968	75987	438453	A _e T _e G _e G _d T _d T _e A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	72	25
75968	75987	438462	A _e T _e G _e G _d T _d T _d A _e T _e T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e T _e	데우시 및 MOE 단위	70	25
75968	75987	438471	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	6-8-6 MOE	45	25
75969	75988	404173	AATGGTTTATTCCATGGCCA	5-10-5 MOE	85	26
75969	75988	410002	AATGGTTTATTCCATGGCCA	2-13-5 MOE	85	26

75969	75986	438373	TGGTTTATTCCATGGCCA	5-8-5 MOE	70	44
75969	75988	438383	A _e A _e T _d G _d G _d T _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _e A _e	태옥시 및 MOE 단위	54	26
75969	75988	438445	A _e A _e T _d G _d G _d T _d T _d A _d T _e T _e C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _e A _e	태옥시 및 MOE 단위	66	26
75969	75988	438454	A _e A _e T _e G _d G _d T _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _e C _e A _e	태옥시 및 MOE 단위	52	26
75969	75988	438463	A _e A _e T _e G _d G _d T _d T _d T _e A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _e C _e A _e	태옥시 및 MOE 단위	39	26
75969	75988	438472	AATGGTTTATTCCATGGCCA	6-8-6 MOE	73	26
75970	75989	142082	AAATGGTTTATTCCATGGCC	5-10-5 MOE	90	27
75970	75989	410003	AAATGGTTTATTCCATGGCC	2-13-5 MOE	86	27
75970	75987	438374	ATGGTTTATTCCATGGCC	5-8-5 MOE	79	45
75970	75989	438384	A _e A _e A _d T _d G _d G _e T _e T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _e C _e	태옥시 및 MOE 단위	53	27
75970	75989	438446	A _e A _e A _d T _d G _d G _d T _d T _d A _e T _e T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _e C _e	태옥시 및 MOE 단위	38	27
75970	75989	438455	A _e A _e A _e T _d G _d G _e T _e T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _e C _e	태옥시 및 MOE 단위	58	27
75970	75989	438464	A _e A _e A _e T _d G _d G _d T _e A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _e C _e	태옥시 및 MOE 단위	58	27
75970	75989	438473	AAATGGTTTATTCCATGGCC	6-8-6 MOE	57	27
75971	75990	409828	AAAATGGTTTATTCCATGGC	5-10-5 MOE	43	28
75971	75990	410004	AAAATGGTTTATTCCATGGC	2-13-5 MOE	58	28
75971	75988	438375	AATGGTTTATTCCATGGC	5-8-5 MOE	55	46
75971	75990	438385	A _e A _e A _d A _d T _d G _e G _e T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _e	태옥시 및 MOE 단위	36	28
75971	75990	438447	A _e A _e A _d A _d T _d G _d G _d T _d T _e A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _e	태옥시 및 MOE 단위	35	28
75971	75990	438456	A _e A _e A _e A _d T _d G _e G _e T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _e	태옥시 및 MOE 단위	58	28

[0578]

75971	75990	438465	A _e A _e A _d T _d G _d G _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _e G _e C _e	태옥시 및 MOE 단위	51	28
75971	75990	438474	AAAATGGTTTATTCCATGGC	6-8-6 MOE	82	28
75972	75991	409829	AAAAATGGTTTATTCCATGG	5-10-5 MOE	42	29
75972	75989	438376	AAATGGTTTATTCCATGG	5-8-5 MOE	36	47

[0579]

[0580] 실시예 6: HuVEC 세포에서 인간 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

[0581] 실시예 5에 기재된 연구에서 PTPIB mRNA의 유의미한 안티센스 억제를 나타냈던 몇 개의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 다양한 용량으로 HuVEC 세포에서 추가로 시험했다. 세포를 2,000 세포/웰 밀도로 평판배양하고, 전기천공에 의해 31.25 nM, 62.5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM, 2000 nM 및 4000 nM 농도의 각각의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 전달감염시켰다. 대략 16 시간 후, RNA를 세포로부터 단리하고 PTPIB mRNA 수준을

프라이머 프로브 세트 RTS3000을 사용한 정량적 실시간 PCR로 측정했다. PTPIB mRNA 수준을 RIBOGREEN®으로 측정함으로써 총 RNA 함량에 대해 표준화했다. 결과는 미처리된 대조군 세포와 비교하여 PTPIB mRNA의 퍼센트 억제로서 표 8에 주어진다.

[0582] 표 8

HuVEC 세포에서 인간 PTPIB의 용량-의존적 안티센스 억제

ISIS 번호	31.25 nM	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	2000.0 nM	4000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
142082	15	30	40	42	71	84	90	94	0.2
404173	15	19	33	54	69	81	86	93	0.2
404176	9	26	34	34	67	80	88	94	0.3
409826	17	16	28	44	60	73	85	95	0.3
410002	0	0	24	52	54	77	90	96	0.4
410003	9	7	19	46	60	80	91	95	0.4
438374	20	22	40	44	59	70	79	85	0.3
438460	14	21	23	42	62	78	85	95	0.3
438474	27	0	13	34	42	68	74	86	0.6

[0585] 실시예 7: HepG2 세포에서 인간 mRNA PTPIB의 용량-의존적 안티센스 억제

실시예 6에 기재된 연구에서 시험된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 다양한 용량으로 HepG2 세포에서 추가로 시험했다. 세포를 20,000 세포/웰 밀도로 평판배양하고, 전기천공에 의해 31.25 nM, 62.5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM, 2000 nM 및 4000 nM 농도의 각각의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 전달감염시켰다. 대략 16 시간 후, RNA를 세포로부터 단리하고 PTPIB mRNA 수준을 프라이머 프로브 세트 RTS3000을 사용한 정량적 실시간 PCR로 측정했다. PTPIB mRNA 수준을 RIBOGREEN®으로 측정함으로써 총 RNA 함량에 대해 표준화했다. 결과는 미처리된 대조군 세포와 비교하여 PTPIB mRNA의 퍼센트 억제로서 표 9에 주어진다. mRNA 수준을 또한 붉은털원숭이 프라이머 프로브 세트 RTS198을 사용하여 분석했고, 결과는 표 10에 주어진다. 붉은털원숭이 서열번호: 3 상의 각각의 올리고뉴클레오타이드의 개시 및 중단 부위는 표 11에 주어진다.

[0587] 표 9

RTS3000을 사용한 HepG2 세포에서의 인간 PTPIB의 용량-의존적 안티센스 억제의 분석

ISIS 번호	31.25 nM	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	2000.0 nM	4000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
142082	0	0	7	0	26	38	60	82	1.4
404173	2	0	1	19	0	29	47	80	1.9
404176	0	0	5	13	2	33	62	79	1.7
409826	0	0	0	2	15	29	46	76	1.9
410002	13	6	0	11	8	28	44	75	2.0
410003	0	0	9	11	22	33	30	83	1.9
438374	0	0	17	11	23	38	33	61	2.9
438460	4	0	10	11	9	26	52	79	1.8
438474	0	0	2	11	6	20	52	54	2.8

[0590] 표 10

[0591]

RTS198을 사용한 HepG2 세포에서의 인간 PTPIB의 용량-의존적 안티센스 억제의 분석

ISIS 번호	31.25 nM	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	2000.0 nM	4000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
142082	14	19	2	0	80	41	63	80	1.5
404173	0	0	2	0	16	26	60	83	1.6
404176	0	0	0	5	0	31	59	80	1.9
409826	0	0	0	16	23	10	49	72	2.3
410002	0	0	0	0	0	0	40	100	>4.0
410003	0	1	12	0	10	41	51	82	1.6
438374	0	0	0	9	43	22	49	55	2.8
438460	0	0	0	9	30	42	47	81	1.4
438474	2	0	9	38	19	31	49	60	2.5

[0592]

표 11

[0594]

붉은털원숭이 유전자 서열 (서열번호: 3) 상의 PTPIB를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적 부위

올리고 ID	개시 부위	중단 부위	서열번호
142082	4495	4514	27
404173	4494	4513	26
404176	3571	3590	14
409826	4491	4510	23
410002	4494	4513	26
410003	4495	4514	27
438374	4495	4512	45
438460	4491	4510	23
438474	4496	4515	28

[0595]

실시예 8: HepG2 세포에서 인간 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

[0596]

ISIS 142082의 표적 부위에 대한 짧은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 디자인했다. 이를 쇼트머(shortmer)들의 표적 부위, 모티프 및 서열 세부사항은 표 12에 주어진다. 이를 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 다양한 용량으로 HepG2 세포에서 시험했다. 실시예 7에 기재된 연구로부터의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 중 일부를 비교를 위한 검정에 포함시켰다. 세포를 20,000 세포/웰 밀도로 평판배양하고, 전기천공에 의해 78.125 nM, 156.25 nM, 312.5 nM, 625 nM, 1,250 nM, 2,500 nM, 5,000 nM 및 10,000 nM 농도의 각각의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 전달감염시켰다. 대략 16 시간 후, RNA를 세포로부터 단리하고 PTPIB mRNA 수준을 프라이머 프로브 세트 RTS3000을 사용한 정량적 실시간 PCR로 측정했다. PTPIB mRNA 수준을 RIBOGREEN®으로 측정함으로써 총 RNA 함량에 대해 표준화했다. 결과는 미처리된 대조군 세포와 비교하여 PTPIB mRNA의 퍼센트 억제로서 표 13에 주어진다.

[0597]

표 12

[0598]

서열번호: 1을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적 부위

ISIS 번호	개시 부위	중단 부위	서열	모티프	서열번호
142082	3291	3310	AAATGGTTTATTCCATGGCC	5-10-5	27
446431	3292	3309	AATGGTTTATTCCATGGC	4-10-4	46
446432	3293	3308	ATGGTTTATTCCATGG	3-10-3	48

[0599]

표 13

[0602] HepG2 세포에서 인간 PTPIB의 용량-의존적 안티센스 억제

ISIS 번호	78.125 nM	156.25 nM	312.5 nM	625.0 nM	1250.0 nM	2500.0 nM	5000.0 nM	10000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
113715	6	12	17	17	16	45	61	86	3.3
142082	14	34	23	47	60	81	86	90	0.8
404173	8	22	29	45	60	73	83	88	0.8
409826	19	18	41	56	75	84	89	91	0.5
410003	0	0	19	39	55	81	91	92	1.0
446431	10	24	26	38	57	74	85	92	1.0
446432	0	8	10	10	10	26	40	67	6.0

[0603]

[0604] 실시예 9: LLC-MK2 세포에서 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

[0605]

실시예 8에 기재된 연구로부터의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 또한 붉은털원숭이 PTPIB 유전자 서열 (서열 번호: 3)과 교차-반응성이고 다양한 용량으로 붉은털원숭이 LLC-MK2 세포에서 추가로 시험되었다. 세포를 25,000 세포/웰 밀도로 평판배양하고, 전기천공을 사용하여 78.125 nM, 156.25 nM, 312.5 nM, 625 nM, 1250 nM, 2500 nM, 5,000 nM, 및 10,000 nM 농도의 각각의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 전달감염시켰다. 대략 16시간 후, RNA를 세포로부터 단리하고 PTPIB mRNA 수준을 프라이머 프로브 세트 RTS198을 사용한 정량적 실시간 PCR로 측정했다. PTPIB mRNA 수준을 RIBOGREEN®으로 측정함으로써 총 RNA 함량에 대해 표준화했다. 결과는 미처리된 대조군 세포와 비교하여 PTPIB mRNA의 페센트 억제로서 표 14에 주어진다. 붉은털원숭이 서열번호: 3 상의 각각의 올리고뉴클레오타이드의 개시 및 중단 부위는 표 15에 주어진다.

[0606]

표 14

LLC-MK2 세포에서 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

ISIS 번호	78.125 nM	156.25 nM	312.5 nM	625.0 nM	1250.0 nM	2500.0 nM	5000.0 nM	10000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
113715	0	0	4	13	27	53	57	70	3.3
142082	2	12	31	41	69	74	80	92	0.9
404173	2	0	22	29	36	61	78	84	1.6
409826	12	0	19	38	66	66	82	92	1.2
410003	0	0	0	26	32	65	81	91	1.8
446431	0	0	9	32	45	70	79	58	1.4
446432	0	0	7	16	10	20	26	43	37.0

[0608]

표 15

서열번호: 3을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적 부위

ISIS 번호	개시 부위	중단 부위	서열	서열번호
113715	1035	1054	GCTCCTTCCACTGATCCTGC	10
142082	4495	4514	AAATGGTTTATTCCATGGCC	27
404173	4494	4513	AATGGTTTATTCCATGGCCA	26
409826	4491	4510	GGTTTATTCCATGGCCATTG	23
410003	4495	4514	AAATGGTTTATTCCATGGCC	27
446431	4496	4513	AATGGTTTATTCCATGGC	46
446432	4497	4512	ATGGTTTATTCCATGG	48

[0611]

[0612] 실시예 10: HuVEC 세포에서 인간 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

[0613]

실시예 8 및 9에 기재된 연구에서 시험된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 다양한 용량으로 HuVEC 세포에서 추가로 시험했다. 세포를 20,000 세포/웰 밀도로 평판배양하고, 전기천공에 의해 31.25 nM, 62.5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM, 2000 nM 및 4000 nM 농도의 각각의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 전달감염시켰다. 대략 16 시간 후, RNA를 세포로부터 단리하고 PTPIB mRNA 수준을 프라이머 프로브 세트 RTS3000을 사용한 정량적 실시간 PCR로 측정했다. 결과는 미처리된 대조군 세포와 비교하여 PTPIB mRNA의 페센트 억제로서 표 16에 주어진다. 올리고뉴클레오타이드의 개시 및 중단 부위는 표 15에 주어진다.

정량적 실시간 PCR로 측정했다. PTPIB mRNA 수준을 Rff iOGREEN®으로 측정함으로써 총 RNA 함량에 대해 표준화 했다. 결과는 미처리된 대조군 세포와 비교하여 PTPIB mRNA의 퍼센트 억제로서 표 16에 주어진다.

[0614] 표 16

HuVEC 세포에서의 인간 PTPIB의 용량-의존적 안티센스 억제

ISIS 번호	31.25 nM	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	2000.0 nM	4000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
113715	10	0	22	24	65	86	92	98	0.2
142082	52	78	89	93	95	96	98	98	<0.3
404173	35	66	80	89	95	98	97	97	0.05
409826	57	72	82	64	97	98	98	98	<0.3
410003	43	47	75	84	48	95	96	91	0.05
446431	33	63	75	87	96	97	98	98	0.05
446432	0	11	30	45	66	79	85	76	0.3

[0616]

[0617] 실시예 11: 사이노몽구스 일차 간세포에서 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

실시예 8-10에서 기재된 연구로부터의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 다양한 용량으로 사이노몽구스 일차 간세포에서 추가로 시험했다. 세포를 35,000 세포/웰 밀도로 평판배양하고, 전기천공을 사용하여 31.25 nM, 62.5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1,000 nM, 2,000 nM, 및 4,000 nM 농도의 각각의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 전달감염시켰다. 대략 16 시간 후, RNA를 세포로부터 단리하고 PTPIB mRNA 수준을 프라이머 프로브 세트 RTS198을 사용한 정량적 실시간 PCR로 측정했다. PTPIB mRNA 수준을 RJBOGREENEN®으로 측정함으로써 총 RNA 함량에 대해 표준화했다. 결과는 미처리된 대조군 세포와 비교하여 PTPIB mRNA의 퍼센트 억제로서 표 17에 주어진다.

[0619]

표 17

사이노몽구스 일차 간세포에서 PTPIB mRNA의 용량-의존적 안티센스 억제

ISIS 번호	31.25 nM	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	2000.0 nM	4000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
113715	4	26	25	43	46	73	82	95	0.4
142082	25	37	50	67	74	87	86	88	0.1
404173	18	20	43	54	67	82	85	89	0.2
409826	34	47	51	65	76	87	88	90	0.1
410003	8	20	44	53	68	79	80	83	0.2
446431	9	14	35	54	57	79	79	88	0.3
446432	4	0	1	3	0	11	6	37	>4.0

[0621]

[0622] 실시예 12: 마우스 모델에서 인간 PTPIB를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 내성

실시예 8-11에 기재된 연구에서 용량-의존적 억제를 실증한 ISIS 올리고뉴클레오타이드를 CD1 마우스에서 다양한 대사 마커 수준의 변화를 모니터링함으로써 마우스 모델에서 내성에 대해 평가했다. 2개 더 ISIS 올리고뉴클레오타이드, ISIS 446433 (4-10-4 MOE; 5'- GTTTATTCCATGGCCATT -3' (서열번호: 42); 서열번호: 1에서 표적 개시 부위는 3288이다) 및 ISIS 446434 (3-10-3; 5'- TTTATTCCATGGCCAT -3' (서열번호: 49); 서열번호: 1에서 표적 개시 부위는 3289이다)를 ISIS 409826 (서열번호: 1에서 표적 개시 부위는 3287이다)에 대한 쇼트미로서 디자인했고 또한 이 연구에서 평가했다.

[0624]

치료

[0625]

CD1 마우스 (잭슨 랩으로부터 입수가능함, 메인주 바 하버)를 12시간 광/암 사이클에 유지시키고 정상 실험식 음식 (할런 레보러토리즈 (Harlan Laboratories), 인디애나주 인디아나폴리스)을 임의로 공급했다. 동물을 실험 개시 전에 연구 시설에서 적어도 7일 동안 순응시켰다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 PBS 중에서 제조하고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과함으로써 멀균했다. 올리고뉴클레오타이드를 주사용 0.9% PBS에 용해시켰다.

[0626]

5 CD1 마우스의 그룹들 각각을 4주 동안 100 mg/kg의 ISIS 142082, ISIS 373125, ISIS 404173, ISIS 409826, ISIS 410002, ISIS 410003, ISIS 438452, ISIS 438460, ISIS 446431, ISIS 446432, ISIS 446433, 또는 ISIS

446434로 주당 2회 피하로 주사했다. 5 CD1 마우스 중의 1 그룹을 4주 동안 PBS로 주당 2회 피하로 주사했다. 이 PBS 그룹을 대조군 그룹으로서 제공했다. 혈액 샘플을 꼬리 절단을 통해 수집했다. 마지막 용량 투여 2일 후, 체중을 측정하고, 마우스를 안락사시키고 장기 및 혈장을 추가 분석을 위해 수확했다.

[0627] 체중 및 장기 중량

[0628] 마우스의 체중을 매주 측정했다. 체중은 표 18에 주어진다. 간, 비장 및 신장 중량을 연구 종료시 측정했고, 표 19에 주어진다. 결과는 ISIS 올리고뉴클레오타이드들 중의 어느 것도 마우스의 전반적 건강에 어떠한 불리한 효과도 갖지 않았음을 실증한다.

[0629] 표 18

[0630] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료 동안 CD1 마우스의 매주 체중 (g)

	1주째	2주째	3주째	4주째
PBS	29	31	32	34
ISIS 142082	31	34	34	36
ISIS 373125	29	31	32	35
ISIS 404173	31	33	34	36
ISIS 409826	31	34	34	37
ISIS 410002	32	35	35	36
ISIS 410003	31	34	34	37
ISIS 438452	32	35	36	39
ISIS 438460	31	34	34	37
ISIS 446431	30	33	33	36
ISIS 446432	27	30	30	33
ISIS 446433	30	33	33	37
ISIS 446434	30	33	34	37

[0631]

[0632] 표 19

[0633] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료 후 CD1 마우스의 장기 중량 (g)

	간	지방	비장	신장
PBS	1.7	0.45	0.11	0.53
ISIS 142082	2.3	0.33	0.18	0.52
ISIS 373125	1.9	0.38	0.16	0.53
ISIS 404173	2.3	0.41	0.23	0.59
ISIS 409826	2.2	0.37	0.17	0.54
ISIS 410002	1.9	0.22	0.30	0.76
ISIS 410003	2.1	0.44	0.22	0.60
ISIS 438452	2.2	0.42	0.18	0.55
ISIS 438460	2.2	0.34	0.17	0.52
ISIS 446431	2.1	0.34	0.19	0.53
ISIS 446432	1.7	0.31	0.13	0.46
ISIS 446433	2.2	0.35	0.17	0.53
ISIS 446434	2.2	0.36	0.18	0.56

[0634]

[0635] 간 기능

[0636] 간 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 혈장 수준의 트랜스아미나제를 자동 임상화학 분석기 (히타치 올림푸스 (Hitachi Olympus) AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. ALT (알라닌 트랜스아미나제) 및 AST (아스파르테이트 트랜스아미나제)의 혈장 수준을 격주로 측정했다. 결과는 표 20 및 21에 주어지고, 대부분의 ISIS 올리고뉴클레오타이드들이, 이들의 간 트랜스아미나제 프로파일에 의해 실증됨으로써,

마우스에서 허용되는 것으로 간주되었음을 나타낸다.

[0637] 표 20

CD1 마우스의 ALT (IU/L)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째
PBS	27	26	20
ISIS 142082	38	35	105
ISIS 373125	30	27	51
ISIS 404173	30	31	124
ISIS 409826	26	34	236
ISIS 410002	27	203	219
ISIS 410003	31	29	99
ISIS 438452	32	40	217
ISIS 438460	30	40	216
ISIS 446431	29	38	114
ISIS 446432	26	27	35
ISIS 446433	25	76	115
ISIS 446434	23	44	146

[0639]

[0640] 표 21

CD1 마우스의 AST (IU/L)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째
PBS	54	62	50
ISIS 142082	75	59	103
ISIS 373125	55	57	97
ISIS 404173	52	61	117
ISIS 409826	49	59	192
ISIS 410002	51	151	417
ISIS 410003	64	47	122
ISIS 438452	59	56	157
ISIS 438460	65	56	217
ISIS 446431	56	66	140
ISIS 446432	50	51	74
ISIS 446433	54	87	121
ISIS 446434	42	64	132

[0642]

[0643] 혈장 글루코오스 수준

글루코오스 대사에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 글루코오스의 혈장 수준을 자동 임상 화학 분석기 (히타치 올림푸스 AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. 결과는 표 22에 주어지고, mg/dL 단위로 표시된다. ISIS 올리고뉴클레오타이드들 중의 어느 것도 마우스의 글루코오스 대사에 어떠한 불리한 효과도 갖지 않았다.

[0645]

표 22

[0646]

CD1 마우스에서 혈장 글루코오스 수준에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째
PBS	175	188	182
ISIS 142082	195	178	161
ISIS 373125	187	201	177
ISIS 404173	185	213	168
ISIS 409826	183	187	187
ISIS 410002	183	164	137
ISIS 410003	198	218	168
ISIS 438452	168	197	175
ISIS 438460	212	203	169
ISIS 446431	192	188	148
ISIS 446432	194	193	175
ISIS 446433	216	198	151
ISIS 446434	199	189	159

[0647]

혈장 지질 및 트리글라이세라이드 수준

[0649]

콜레스테롤 및 트리글라이세라이드 대사에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 각각의 혈장 수준을 자동 임상 화학 분석기 (히타치 올립푸스 AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. 결과는 표 23 및 24에 주어지고, mg/dL 단위로 표시된다. 대부분의 ISIS 올리고뉴클레오타이드들은 마우스의 지질 대사에 어떠한 불리한 효과도 갖지 않았다.

[0650]

표 23

[0651]

CD1 마우스에서 혈장 콜레스테롤 수준에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째
PBS	162	145	153
ISIS 142082	156	136	126
ISIS 373125	137	106	104
ISIS 404173	162	124	154
ISIS 409826	153	142	146
ISIS 410002	136	63	47
ISIS 410003	160	131	96
ISIS 438452	143	128	121
ISIS 438460	146	140	129
ISIS 446431	139	124	116
ISIS 446432	146	135	137
ISIS 446433	152	144	145
ISIS 446434	147	147	144

[0652]

표 24

[0654]

CD1 마우스에서 혈장 트리글라이세라이드 수준에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째
PBS	153	153	162
ISIS 142082	170	153	114
ISIS 373125	142	116	112
ISIS 404173	195	140	107
ISIS 409826	182	120	80
ISIS 410002	137	99	51
ISIS 410003	152	138	102
ISIS 438452	123	134	93
ISIS 438460	165	146	85
ISIS 446431	131	160	123
ISIS 446432	168	194	136
ISIS 446433	186	117	133
ISIS 446434	145	101	84

[0655]

시토카인 수준

[0657]

염증에 관여된 인자에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 혈액을 시토카인 수준의 측정을 위한 치료기간의 종료 후에 수집했다. 샘플을 분석을 위해 오손 바이오시스템즈 (Aushon Biosystems, 매사추세츠주 우번)에 보냈다. 젖과 EL-6, JE, MIP-1 α , 및 TNF- α 의 수준을 젖과 항체를 사용하여 측정했다. 결과는 표 25에 주어진다. 대부분의 ISIS 올리고뉴클레오타이드들은 마우스의 시토카인 수준에 어떠한 불리한 효과도 갖지 않았다.

[0658]

표 25

[0659]

CD1 마우스에서 혈장 시토카인 수준에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	mIL-6	mJE	mMIP-1 α	mTNF- α
PBS	250	20	1	4
ISIS 142082	225	145	4	23
ISIS 373125	77	91	3	17
ISIS 404173	88	155	1	24
ISIS 409826	33	112	3	15
ISIS 410002	113	225	28	84
ISIS 410003	111	138	4	24
ISIS 438452	62	148	1	15
ISIS 438460	64	184	2	9
ISIS 446431	52	170	1	15
ISIS 446432	57	75	1	3
ISIS 446433	64	138	3	61
ISIS 446434	59	127	0	21

[0660]

실시예 13: 랫트 모델에서 인간 PTPIB를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 내성

[0662]

실시예 12에 기재된 연구로부터의 ISIS 올리고뉴클레오타이드를 스프래그 다우리 랫트에서 다양한 대사 마커의 수준의 변화를 모니터링함으로써 랫트 모델에서의 내성에 대해 추가로 평가했다.

[0663]

치료

[0664]

스프래그 다우리 랫트는 12시간 광/암 사이클에 유지시키고 정상 실험식 음식 (할런 레보러토리즈, 인디애나주 인디아나폴리스)을 임의로 공급했다. 동물을 실험 개시 전에 연구 시설에서 적어도 7일 동안 순응시켰다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 PBS 중에서 제조하고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과함으로써 멸균했다. 올리고뉴

클레오타이드를 주사용 0.9% PBS에 용해시켰다.

[0665] 4 랫트의 그룹들 각각을 4주 동안 주당 2회 50 mg/kg의 용량으로, 이후 8주 동안 주당 2회 30 mg/kg의 용량으로 ISIS 142082, ISIS 373125, ISIS 404173, ISIS 409826, ISIS 410002, ISIS 410003, ISIS 438452, ISIS 438460, ISIS 446431, ISIS 446432, ISIS 446433, 또는 ISIS 446434로 주당 2회 피하로 주사했다. 4 랫트 중의 1 그룹을 12주 동안 PBS로 주당 2회 피하로 주사했다. 이 PBS 그룹을 대조군 그룹으로서 제공했다. 혈액 샘플을 꼬리 절단을 통해 수집했다. 마지막 용량 투여 2일 후, 체중을 측정하고, 랫트를 안락사시키고 장기 및 혈장을 추가 분석을 위해 수확했다.

[0666] 체중 및 장기 중량

[0667] 랫트의 체중을 매주 측정했다. 체중은 표 26에 주어진다. 간, 비장 및 신장 중량을 연구 종료시 측정했고, 표 27에 주어진다. 'n/a'는 특정 그룹에서의 모든 랫트가 특정 시점 전에 안락사되었기 때문에 특정 시점에서 특정 그룹에 대해 이용가능한 데이터가 없음을 나타낸다.

[0668] 표 26

[0669] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료 동안 스프래그 다우리 랫트의 격주 체중 (g)

	0 주째	2 주째	4 주째	6 주째	8 주째	10 주째	12 주째
PBS	288	369	405	442	463	500	495
ISIS 142082	295	348	318	345	337	347	345
ISIS 373125	304	385	399	419	427	421	448
ISIS 404173	294	346	352	377	384	391	401
ISIS 409826	292	346	350	355	356	373	356
ISIS 410002	297	333	323	324	306	335	n/a
ISIS 410003	299	341	328	320	307	305	301
ISIS 438452	301	327	335	333	327	347	332
ISIS 438460	304	345	346	347	356	377	n/a
ISIS 446431	307	376	340	357	353	357	349
ISIS 446432	287	340	344	363	372	399	404
ISIS 446433	298	331	318	354	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	303	366	356	n/a	n/a	n/a	n/a

[0670]

표 27

[0672] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료 동안 스프래그 다우리 랫트의 장기 중량 (g)

	간	지방	비장	신장
PBS	15.9	2.1	0.8	3.6
ISIS 142082	21.8	0.7	4.5	5.2
ISIS 373125	17.9	1.1	1.9	3.4
ISIS 404173	17.7	1.1	2.3	4.3
ISIS 409826	19.8	0.5	3.6	4.4
ISIS 410003	18.7	0.5	3.8	3.5
ISIS 438452	17.3	0.6	3.1	3.8
ISIS 446431	22.1	0.4	6.1	5.3
ISIS 446432	18.1	1.2	3.3	3.8

[0673]

간 기능

[0674] 간 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 트랜스아미나제의 혈장 수준을 자동 임상화학 분석기 (히타치 올림푸스 AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. ALT (알라닌 트랜스아미나제) 및 AST (아스파르테이트 트랜스아미나제)의 혈장 수준을 격주로 측정했다. 빌리루빈의 혈장 수준 (mg/dL)을 또한 동일한 임상 화학 분석기를 사용하여 측정했다. 결과는 표 28, 29, 30에 주어진다. 'n/a'는 특정 그룹에서의 모든 랫트가 특정 시점 전에 안락사되었기 때문에 특정 시점에서 특정 그룹에 대해 이용가능한 데이터가 없음을

나타낸다.

[0676] 표 28

[0677] 스프래그 다우리 랫트의 ALT (IU/L)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째	6 주째	8 주째	10 주째	12 주째
PBS	58	68	54	48	48	46	46
ISIS 142082	54	75	40	44	49	62	57
ISIS 373125	57	61	60	48	48	45	38
ISIS 404173	49	52	53	41	51	53	42
ISIS 409826	51	59	56	50	42	37	40
ISIS 410002	46	65	75	73	103	126	n/a
ISIS 410003	49	78	62	49	61	59	66
ISIS 438452	46	57	58	53	51	52	50
ISIS 438460	49	88	162	96	114	91	n/a
ISIS 446431	51	57	45	45	40	55	49
ISIS 446432	52	59	48	43	44	49	46
ISIS 446433	53	120	65	86	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	53	76	161	n/a	n/a	n/a	n/a

[0678]

[0679] 표 29

[0680] 스프래그 다우리 랫트의 AST (IU/L)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째	6 주째	8 주째	10 주째	12 주째
PBS	84	92	86	79	91	74	81
ISIS 142082	87	89	86	126	136	154	149
ISIS 373125	79	72	93	124	111	95	81
ISIS 404173	75	69	88	75	89	96	83
ISIS 409826	75	74	96	112	108	90	106
ISIS 410002	67	87	155	173	229	245	n/a
ISIS 410003	71	95	106	136	161	160	186
ISIS 438452	70	84	104	157	164	174	167
ISIS 438460	79	122	214	287	216	172	n/a
ISIS 446431	73	79	93	137	129	158	153
ISIS 446432	80	76	86	99	96	105	102
ISIS 446433	77	151	128	234	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	81	137	359	n/a	n/a	n/a	n/a

[0681]

[0682] 표 30

[0683]

스프래그 다우리 팬트의 빌리루빈 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째	6 주째	8 주째	10 주째	12 주째
PBS	0.11	0.15	0.14	0.16	0.25	0.16	0.13
ISIS 142082	0.12	0.11	0.18	0.12	0.12	0.15	0.15
ISIS 373125	0.13	0.13	0.15	0.36	0.14	0.15	0.13
ISIS 404173	0.11	0.13	0.14	0.13	0.13	0.14	0.10
ISIS 409826	0.12	0.12	0.15	0.12	0.11	0.10	0.10
ISIS 410002	0.11	0.13	0.18	0.13	0.19	0.54	n/a
ISIS 410003	0.12	0.12	0.14	0.16	0.14	0.17	0.14
ISIS 438452	0.12	0.13	0.15	0.13	0.14	0.13	0.13
ISIS 438460	0.11	0.14	0.22	0.28	0.15	0.17	n/a
ISIS 446431	0.14	0.17	0.19	0.13	0.10	0.16	0.16
ISIS 446432	0.12	0.14	0.13	0.12	0.11	0.14	0.13
ISIS 446433	0.12	0.12	0.18	0.20	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	0.12	0.17	0.20	n/a	n/a	n/a	n/a

[0684]

신장 기능

[0685]

신장 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 혈액 우레아 질소 (BUN) 및 크레아티닌의 혈장 수준을 자동 임상 화학 분석기 (히타치 올립푸스 AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. 결과는 표 31 및 32에 주어지고, mg/dL 단위로 표시된다. 총 소변 단백질 대 크레아티닌 비율을 또한 계산했고 결과는 표 33에 주어진다.

[0687]

표 31

[0688]

스프래그 다우리 팬트의 BUN (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째	6 주째	8 주째	10 주째	12 주째
PBS	17	20	20	18	26	18	16
ISIS 142082	21	23	31	23	31	24	29
ISIS 373125	21	21	24	19	31	21	21
ISIS 404173	18	19	21	19	25	21	20
ISIS 409826	20	21	24	23	28	22	26
ISIS 410002	19	22	25	23	29	32	n/a
ISIS 410003	18	20	23	23	30	29	26
ISIS 438452	19	22	27	25	29	22	24
ISIS 438460	20	23	25	26	31	24	n/a
ISIS 446431	19	21	24	23	29	24	23
ISIS 446432	20	21	24	20	29	23	19
ISIS 446433	18	21	25	53	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	18	23	120	n/a	n/a	n/a	n/a

[0689]

표 32

[0690]

[0691]

스프래그 다우리 랫트의 크레아티닌 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째	6 주째	8 주째	10 주째	12 주째
PBS	0.2	0.3	0.4	0.3	0.5	0.4	0.3
ISIS 142082	0.3	0.3	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4
ISIS 373125	0.3	0.3	0.6	0.4	0.6	0.6	0.4
ISIS 404173	0.3	0.3	0.5	0.4	0.5	0.6	0.4
ISIS 409826	0.3	0.4	0.6	0.4	0.5	0.5	0.4
ISIS 410002	0.3	0.3	0.6	0.4	0.5	0.5	n/a
ISIS 410003	0.3	0.3	0.6	0.4	0.6	0.6	0.4
ISIS 438452	0.3	0.3	0.6	0.4	0.5	0.5	0.4
ISIS 438460	0.3	0.4	0.5	0.3	0.5	0.5	n/a
ISIS 446431	0.3	0.3	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4
ISIS 446432	0.3	0.3	0.6	0.4	0.5	0.5	0.4
ISIS 446433	0.3	0.3	0.5	0.4	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	0.3	0.4	0.8	n/a	n/a	n/a	n/a

[0692]

표 33

[0694]

스프래그 다우리 랫트의 총 소변 단백질 대 소변 크레아티닌 비율에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째	6 주째	8 주째	10 주째	12 주째
PBS	1.5	1.4	1.2	1.6	1.3	1.2	1.2
ISIS 142082	1.2	4.3	4.0	7.7	6.6	7.5	7.4
ISIS 373125	1.3	3.9	3.8	6.7	6.2	8.8	9.7
ISIS 404173	1.1	4.8	5.5	6.4	7.4	10.2	11.9
ISIS 409826	1.2	3.7	3.8	5.9	9.8	28.8	37.6
ISIS 410002	1.2	3.9	4.1	6.0	9.7	26.3	n/a
ISIS 410003	1.3	4.5	5.3	5.9	7.6	10.8	18.0
ISIS 438452	1.4	3.3	3.1	5.1	8.0	9.2	10.5
ISIS 438460	1.3	4.0	4.5	7.3	16.0	53.9	n/a
ISIS 446431	1.2	4.5	5.0	5.3	7.2	8.0	8.8
ISIS 446432	1.3	4.2	4.4	6.2	9.1	7.6	9.2
ISIS 446433	1.1	3.4	5.7	81.5	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	1.1	3.7	25.8	n/a	n/a	n/a	n/a

[0695]

혈장 글루코오스 수준

[0696]

글루코오스 대사에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 글루코오스의 혈장 수준을 자동 임상 화학 분석기 (히타치 올림푸스 AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. 결과는 표 34에 주어지고, mg/dL 단위로 표시된다.

[0698]

표 34

[0699]

스프래그 다우리 랫트에서의 혈장 글루코오스 수준에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째	6 주째	8 주째	10 주째	12 주째
PBS	150	140	155	152	163	138	144
ISIS 142082	153	137	155	145	142	130	135
ISIS 373125	153	135	136	143	133	106	135
ISIS 404173	162	138	149	152	145	144	154
ISIS 409826	155	141	150	145	143	132	135
ISIS 410002	152	139	148	151	130	124	n/a
ISIS 410003	152	138	146	140	132	126	143
ISIS 438452	166	134	162	153	135	143	147
ISIS 438460	166	140	151	156	150	130	n/a
ISIS 446431	154	143	155	147	153	139	145
ISIS 446432	159	141	155	152	152	138	153
ISIS 446433	158	138	141	118	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	166	149	124	n/a	n/a	n/a	n/a

[0700]

혈장 지질 및 트리글라이세라이드 수준

[0701]

총 콜레스테롤 및 트리글라이세라이드 수준에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 각각의 혈장 수준을 자동 임상 화학 분석기 (히타치 올림푸스 AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. 결과는 표 35 및 36에 주어지고, mg/dL 단위로 표시된다.

[0702]

표 35

[0703]

스프래그 다우리 랫트에서 혈장 콜레스테롤 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째	6 주째	8 주째	10 주째	12 주째
PBS	55	57	64	51	73	64	53
ISIS 142082	62	41	54	62	70	64	62
ISIS 373125	73	59	66	51	66	61	39
ISIS 404173	57	41	68	62	87	85	75
ISIS 409826	57	42	79	65	86	122	110
ISIS 410002	69	57	75	65	73	96	n/a
ISIS 410003	72	44	70	67	89	76	73
ISIS 438452	63	33	53	51	71	70	61
ISIS 438460	64	40	98	81	94	146	n/a
ISIS 446431	64	41	56	54	63	68	59
ISIS 446432	62	44	70	50	80	80	65
ISIS 446433	59	63	95	139	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	63	48	91	n/a	n/a	n/a	n/a

[0704]

표 36

[0705]

스프래그 다우리 랫트에서 혈장 트리글라이세라이드 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	0 주째	2 주째	4 주째	6 주째	8 주째	12 주째
PBS	66	73	82	80	98	106
ISIS 142082	92	30	71	44	25	28
ISIS 373125	66	28	20	24	24	28
ISIS 404173	48	28	28	35	31	49
ISIS 409826	68	29	28	25	31	68
ISIS 410002	71	23	23	27	71	n/a
ISIS 410003	78	22	22	37	30	64
ISIS 438452	89	33	39	34	50	35
ISIS 438460	98	20	34	35	33	n/a
ISIS 446431	72	29	38	36	35	48
ISIS 446432	n/a	41	37	31	37	53
ISIS 446433	68	21	29	129	n/a	n/a
ISIS 446434	60	27	103	n/a	n/a	n/a

[0708]

시토카인 수준

[0710]

염증에 관여된 인자에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 혈액을 시토카인 수준의 측정을 위한 치료기간의 종료 후에 수집했다. 샘플을 분석을 위해 오순 바이오시스템즈 (매사추세츠주 우번)로 보냈다. 랫트 IL-6, MCP-1, MIP-1 α , 및 TNF- α 의 수준을 이들의 각각의 항체로 측정했다. 결과는 표 37에 주어진다.

[0711]

표 37

[0712]

스프래그 다우리 랫트에서 혈장 시토카인 수준에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	rIL-6	rMCP-1	rMIP-1 α	rTNF- α
PBS	315	403	6	77
ISIS 142082	74	3082	38	697
ISIS 373125	<25	2215	7	15
ISIS 404173	125	2244	60	499
ISIS 409826	<25	6041	52	100
ISIS 410003	245	3315	40	444
ISIS 438452	105	4513	26	519
ISIS 446431	924	3104	54	402
ISIS 446432	29	2007	46	610

[0713]

실시예 14: 인간 PTPIB를 표적으로 하는 ISIS 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 점도 측정

[0715]

실시예 12 및 13에 기재된 연구로부터 선택된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 점도를, 165-185 mg/mL 농도에서 40 cP 초파의 점도를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 스크리닝하기 위해 측정했다. 40 cP 초파의 점도를 갖는 올리고뉴클레오타이드는 너무 점성이어서 임의의 대상체에게 투여될 수 없을 것이다.

[0716]

ISIS 올리고뉴클레오타이드 (32-35 mg)를 유리 바이알 내에서 중량을 재고, 물 120 μ L를 부가하고 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 50°C에서 바이알을 가열함으로써 용액에 용해시켰다. 미리 가열된 샘플의 일부 (75 μ L)를 마이크로-점도계 (캠브리지 (Cambridge))로 피펫팅했다. 마이크로-점도계의 온도를 25°C로 설정하고 샘플의 점도를 측정했다. 미리 가열된 샘플의 또 하나의 부분 (20 μ L)을 85°C에서 260 nM에서의 UV 판독 (캐리 (Cary) UV 기기)을 위해 10 mL의 물에 피펫팅했다. 결과는 표 38에 주어지고, 모든 안티센스 올리고뉴클레오타이드 용액이 상기 언급된 기준하에 그의 점도에서 최적이었음을 나타낸다.

[0717]

표 38

[0718] 인간 PTPIB를 표적으로 하는 ISIS 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 점도 및 농도

ISIS 번호.	점도 (cP)	농도 (mg/mL)
142082	3.8	188
404173	3.8	163
410003	4.5	176
446431	3.2	180
446432	2.4	175

[0719]

[0720] 실시예 15: 마우스 모델에서 인간 PTPIB를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 6개월 내성 연구

[0721]

실시예 12-14에 기재된 연구로부터 선택된 ISIS 올리고뉴클레오타이드를 CD1 마우스에서 다양한 대사 마커 수준의 변화를 모니터링함으로써 마우스 모델에서 장기간 내성에 대해 평가했다.

[0722]

치료

[0723]

수컷 CD1 마우스를 12시간 광/암 사이클에 유지시키고 정상 실험식 음식 (할런 레보러토리즈, 인디애나주 인디아나폴리스)을 임의로 공급했다. 동물을 실험 개시 전에 연구 시설에서 적어도 7일 동안 순응시켰다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 PBS 중에서 제조하고 0.2 마이크론 필터를 통해 여과함으로써 멸균했다. 올리고뉴클레오타이드를 주사용 0.9% PBS에 용해시켰다.

[0724]

10 CD1 마우스의 그룹들 각각을 24주 동안 25 mg/kg의 ISIS 142082, ISIS 404173, 또는 ISIS 446431로 주당 2회 피하로 주사했다. 10 CD1 마우스 중의 1 그룹을 24주 동안 PBS로 주당 2회 피하로 주사했다. 이 PBS 그룹은 대조군 그룹으로서 제공했다. 혈액 샘플을 140일에 하약 출혈을 통해 수집했다. 168일에, 혈액을 CO₂ 마취하에 말단 심장 천자를 통해 수집하고, 마우스를 안락사시키고 장기를 추가 분석을 위해 수확했다.

[0725]

혈장 글루코오스 수준

[0726]

글루코오스 대사에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 글루코오스의 혈장 수준을 자동 임상 화학 분석기 (히타치 올림푸스 AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. 결과는 표 39에 주어지고, mg/dL 단위로 표시된다.

[0727]

표 39

[0728]

168일에 혈장 글루코오스 수준에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	글루코스
PBS	214
ISIS 142082	177
ISIS 404173	204
ISIS 446431	191

[0729]

간 기능

[0730]

간 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 트랜스아미나제의 혈장 수준을 자동 임상 화학 분석기 (히타치 올림푸스 AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. 168일에 ALT (알라닌 트랜스아미나제) 및 AST (아스파르테이트 트랜스아미나제)의 혈장 수준을 측정했다. 빌리루빈의 혈장 수준 (mg/dL)을 또한 동일한 임상 화학 분석기를 사용하여 측정했다. 손상된 간 세포에 의해 증가된 양으로 합성된 알칼리성 포스파타제는 또한 간 질환의 마커이고 (Narayanan, S. Ann. Clin. Lab. Sci. 21: 12-8, 1991) 상기 알칼리성 포스파타제를 유사하게 측정했다. 간 질환에서 전형적으로 감소된 알부민 (Oettl, K. 등, Biochim. Biophys. Acta. 1782: 469-73, 2008)을 또한 유사하게 측정했다. 결과는 표 40에 주어진다.

[0732]

표 40

[0733] 168일에 간 대사 마커에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	밸리루빈 (mg/dL)	알칼리성 포스파타제 (IU/L)	알부민 (g/dL)
PBS	50	82	0.2	44	2.5
ISIS 142082	148	197	0.1	56	2.3
ISIS 404173	68	137	0.1	57	2.5
ISIS 446431	115	173	0.1	42	2.4

[0734] 심장 기능

[0736] 심장 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 크레아틴 포스포카나아제 (CPK)의 혈장 수준을 168일에 자동 임상 화학 분석기 (히타치 올림푸스 AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. 이 마커의 증가된 수준은 심장 근육 손상을 나타낸다 (Barohn, R.J. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine*. 제23판 Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007: chapter 447). 결과는 표 41에 주어진다.

[0737] 표 41

[0738] 168일에 심장 마커 CPK에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	CPK (IU/L)
PBS	98
ISIS 142082	120
ISIS 404173	107
ISIS 446431	159

[0740] 췌장 기능

[0741] 췌장 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 아밀라아제의 혈장 수준을 168일에 자동 임상 화학 분석기 (히타치 올림푸스 AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. 이 마커의 증가된 수준은 급성 췌장염을 나타낸다 (Sternby, B. 등, Mayo Clin. Proc. 71: 1138-44, 1996). 결과는 표 42에 주어진다.

[0742] 표 42

[0743] 168일에 췌장 마커 아밀라아제에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	아밀라아제 (IU/L)
PBS	1101
ISIS 142082	1374
ISIS 404173	1280
ISIS 446431	1232

[0745] 신장 기능

[0746] 신장 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 혈액 우레아 질소 (BUN) 및 크레아티닌의 혈장 수준을 자동 임상 화학 분석기 (히타치 올림푸스 AU400e, 뉴욕주 멜빌)를 사용하여 측정했다. 결과는 표 43에 주어지고, mg/dL 단위로 표시된다.

[0747] 표 43

[0748] 168일에 신장 대사 마커에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	BUN	크레아티닌
PBS	20	0.3
ISIS 142082	24	0.2
ISIS 404173	21	0.2
ISIS 446431	19	0.3

[0750] 실시예 16: CD1 마우스 간에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 반감기 측정

[0751] CD1 마우스를 실시예 14에 기재된 연구로부터 선택된 ISIS 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 치료하고, 올리고뉴클레오타이드 반감기 뿐만 아니라 간으로부터 올리고뉴클레오타이드 분해 및 제거에 대한 소요 시간을 평가했다.

[0752] 치료

[0753] 10 CD1 마우스의 그룹들 각각을 50 mg/kg의 ISIS 142082, ISIS 446431, ISIS 404173, 또는 ISIS 409826으로 2주 동안 주당 2회 피하로 주사했다. 각각의 그룹으로부터 5 마우스를 최종 용량 투여 3일 및 56일 후에 희생시켰다. 간을 분석을 위해 수확했다.

올리고뉴클레오타이드 농도의 측정

[0755] 전체길이 올리고뉴클레오타이드의 농도를 측정했다. 사용된 방법은 폐놀-클로로포름 (액체-액체) 추출 후 고체상 추출로 이루어진 이전에 공개된 방법 (Leeds 등, 1996; Geary 등, 1999)의 변형이다. 내부 표준 (ISIS 355868, 27-합체 2'-0-메톡시에틸 변형된 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드, GCGTTTGCTCTTCTTGCGTTTTT, 서열번호: 50으로서 본원에 지정됨)을 추출 전에 부가했다. 조직 샘플 농도를 정량화 하한치 (lower limit of quantitation: LLOQ)가 대략 1.14 µg/g인 교정 곡선을 사용하여 계산했다. 그 다음, 반감기를 윈논린 (WinNonlin) 소프트웨어 (PHARSIGHT)를 사용하여 계산했다.

[0756] 결과는 표 44에 주어진다. 11-34일 내의 반감기를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 추가 연구를 위해 선택했다.

표 44

[0758] CD1 마우스 간에서 전체길이 올리고뉴클레오타이드 농도 (µg/g) 및 올리고뉴클레오타이드의 반감기 (일수)

	일수	전체 길이 농도 (mg/g)	반감기 (일수)
142082	3	265	19.8
	56	42	
446431	3	293	19.6
	56	45	
404173	3	281	14.8
	56	24	
409826	3	304	18.4
	56	41	

[0759]

실시예 17: 사이노몽구스 원숭이에서 인간 PTPIB를 표적으로 하는 ISIS 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 효과

[0761] 사이노몽구스 원숭이를 실시예 15 및 16에 기재된 연구로부터의 ISIS 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 치료했다. 간 및 신장에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 효능 및 내성, 뿐만 아니라 그의 약력학적 프로파일을 평가했다.

[0762] 치료

[0763] 연구 전에, 원숭이를 30일 기간 동안 격리를 유지했고, 이 기간 동안, 혈청 화학 및 혈액학의 표준 폐널, 배설물 샘플의 알 및 기생충에 대한 시험, 및 결핵 시험을 비정상 또는 병든 원숭이를 스크리닝하기 위해 수행했다. 6 그룹의 무작위로 배치된 3 수컷 및 2 암컷 사이노몽구스 원숭이 각각을 제1주 동안 주당 3회, 그 뒤에 그 다음 12주 동안 주당 1회 8 mg/kg 또는 40 mg/kg의 ISIS 142082, ISIS 446431, 또는 ISIS 404173으로 피하로 주사했다. 1 그룹의 3 수컷 및 2 암컷 사이노몽구스 원숭이를 제1주 동안 주당 3회, 그 뒤에 그 다음 12주 동안 주당 1회 40 mg/kg의 ISIS 409826으로 피하로 주사했다. 대조군 그룹의 3 수컷 및 2 암컷 사이노몽구스 원숭이를 제1주 동안 주당 3회, 그 뒤에 그 다음 12주 동안 주당 1회 PBS로 피하로 주사했다. 모든 그룹의 최종 희생을 93일에 마지막 용량 투여 48시간 후에 수행했다.

[0764] 연구 기간 동안, 원숭이를 병 또는 고통의 징후에 대해 매일 관찰했다. 치료에 대해 불리한 효과를 보여주는 임의의 동물을 제외하고 수의사 및 연구 지도자에게 언급했다.

역제 연구

[0766] RNA 분석

RNA를, 각각 상이한 영역의 PTPIB mRNA를 표적으로 하는 프라이머 프로브 세트 1 (서열번호: 51로 본원에 지정된 정방향 서열 GACCAGCTGCGCTTCTCCTA; 서열번호: 52로 본원에 지정된 역방향 서열 CAGAGGAGTCCCCATGATG; 서열번호: 53으로 본원에 지정된 프로브 서열 TTGGCTGTGATCGAAGGTGCCAAA) 또는 프라이머 프로브 세트 2 (서열번호: 54로 본원에 지정된 정방향 서열 GGGCCCTTGCTAACACA; 서열번호: 55로 본원에 지정된 역방향 서열 CGACACCCCTGCTTTCTG; 서열번호: 56으로 본원에 지정된 프로브 서열 CGGTCACCTTGGGAGATGGTGTGG)를 사용한 PTPIB의 실시간 PCR 분석을 위해 간 및 복부 지방 조직으로부터 추출했다. 결과는 RJB GREENEN®으로 표준화되는, PBS 대조군과 비교된, PTPIB mRNA의 퍼센트 감소로서 주어진다. 표 45에서 보여주는 바와 같이, ISIS 앤티센스 올리고뉴클레오파이드로의 치료는 PBS 대조군과 비교하여 PTPIB mRNA의 유의미한 감소를 초래했다. ISIS 404173으로의 치료는 ISIS 142082로의 치료와 유사한 PTPIB mRNA 수준의 감소를 유발했다.

[0768] 표 45

PBS 대조군과 비교한 사이노몽구스 원숭이 간 및 지방 조직에서의 PTPIB mRNA의 억제

ISIS 번호.	복용량 (mg/kg)	간에서의 억제율 % (프로브 세트 1)	간에서의 억제율 % (프로브 세트 2)	지방에서의 억제율 % (프로브 세트 1)	지방에서의 억제율 % (프로브 세트 2)
409826	40	38	45	17	21
142082	8	12	14	13	16
	40	46	48	34	28
446831	8	0	8	6	1
	40	8	18	14	12
404173	8	4	13	8	4
	40	26	22	38	31

[0770]

단백질 분석

조직을 웨스턴 블랏 분석에 의해 PTPIB 단백질 수준을 측정하기 위해 간으로부터 추출했다. 구체적으로, ISIS 404173으로 치료된 원숭이로부터의 PTPIB 단백질 샘플을 ISIS 142082로 치료된 것들과 비교했다. 결과는 대조군 수준과 비교된 백분율 감소로서 표시되어 표 46, 47 및 48에 주어진다. PTPIB 수준을 총 단백질 수준, 뿐만 아니라 구성적으로 발현된 단백질, IR-β에 대해 표준화했다. ISIS 404173으로의 치료는 8 mg/kg의 더 낮은 용량에서 ISIS 142082로 치료된 것보다 PTPIB 간 단백질의 더 큰 감소를 유발했다 (표 47).

[0773] 표 46

사이노몽구스 원숭이 간에서 ISIS 404173으로의 치료 후 PTPIB 단백질 수준 감소

복용량 (mg/kg)	(총 단백질로 정규화된) 억제율 %	(IR-β로 정규화된) 억제율 %
8	49	42
40	67	66

[0775]

표 47

[0777] 사이노몽구스 원숭이 간에서 8 mg/kg의 ISIS 404173 또는 ISIS 142082로의 치료 후 PTPIB 단백질 수준 감소

ISIS 번호	(총 단백질로 정규화된) 억제율 %	(IR-β로 정규화된) 억제율 %
142082	20	4
404173	33	27

[0778]

표 48

[0780]

사이노몽구스 원숭이 간에서 40 mg/kg의 ISIS 404173 또는 ISIS 142082로의 치료 후 PTPIB 단백질 수준 감소

ISIS 번호	(총 단백질로 정규화된) 억제율 %	(IR-β로 정규화된) 억제율 %
142082	65	63
404173	60	56

[0781]

내성 연구

[0783]

체중 및 장기 중량 측정

[0784]

동물의 전반적 건강에 대한 ISIS 올리고뉴클레오파이드의 효과를 평가하기 위해, 체중 및 장기 중량을 최종 희생 후 측정했다. 체중을 측정하고 PBS 대조군 동물의 체중과 비교했다. 장기 중량을 측정하고 치료 그룹 중량을 상응하는 PBS 대조군 중량과 비교했다. 데이터는 표 49에 주어진다. ISIS 142082로의 치료는 더 높은 용량에서 간 및 신장 중량의 증가를 유발하지 않았다.

[0785]

표 49

[0786]

대조군과 비교한 사이노몽구스 원숭이에서의 최종 체중 및 장기 중량

	복용량 (mg/kg)	체중 (kg)	신장 (g)	간 (g)	비장 (g)	비복근 (g)
PBS	-	2.2	9.6	10.5	2.3	10.6
409826	40	2.3	14.0	18.5	6.0	8.8
	8	2.3	10.6	13.0	3.7	9.5
142082	40	2.2	20.9	17.7	7.0	9.0
	8	2.3	11.6	12.7	4.8	10.2
446431	40	2.3	15.9	16.1	9.6	7.7
	8	2.3	11.6	12.8	4.8	11.1
404173	40	2.2	14.8	15.5	3.7	8.7
	8	2.3	11.6	12.8	4.8	11.1

[0787]

간 기능

[0789]

간 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오파이드의 효과를 평가하기 위해, 혈액 샘플을, 치료 개시 7일 전, 뿐만 아니라 치료기간 30, 58, 및 93일에 모든 연구 그룹으로부터 수집했다. 혈액 샘플을 혈청 분리를 위한 어떠한 항응고제도 사용하지 않고 투브에서 수집했다. 투브를 실온에서 90분 동안 유지시키고 그 다음 혈청을 얻기 위해 원심분리했다 (실온에서 10분 동안 3000 rpm).

[0790]

트랜스아미나제의 수준을 도시바 (Toshiba) 200FR NEO 화학 분석기 (도시바 코포레이션, 일본)를 사용하여 측정했다. ALT (알라닌 트랜스아미나제) 및 AST (아스파르테이트 트랜스아미나제)의 혈장 수준을 측정했고 결과는 표 50 및 51에 주어지고, IU/L 단위로 표시된다. 손상된 간 세포에 의해 증가된 양으로 합성되고 또한 간 질환의 마커인 알칼리성 포스파타제를 유사하게 측정했고, 데이터는 표 52에 주어진다. 모든 치료 그룹에서의 AST,

ALT 및 알칼리성 포스파타아제의 수준은 PBS 대조군 그룹에서의 수준과 유사했다.

[0791] 간에서 합성되고 염증의 마커로서 제공되는 C-반응성 단백질 (CRP)도 또한 유사하게 측정했고, 데이터는 표 53에 주어진다. 더 높은 용량의 ISIS 142082 및 ISIS 409826으로의 치료는 간 염증을 시사하는 높은 수준의 CRP를 초래했다.

[0792] 빌리루빈은 또한 간 대사 마커이고, 유사하게 측정되었고, 표 54에 주어지고 mg/dL 단위로 표시된다. 모든 치료 그룹의 빌리루빈 수준은 PBS 대조군 그룹의 수준과 유사한 것으로 발견되었다. 감마-글루타밀트랜스페라제 (GGT)는 간에서 생산된 효소이고 초기 간 손상 또는 담즙정체성 질환에 대한 유용한 실험실 마커이다 (Betro, M.G. 등, Am. J. Clin. Pathol. 60: 672-8, 1973). GGT 수준을 측정했고 결과는 표 55에 주어지고 PBS 대조군 및 치료 그룹 사이의 차이가 없음을 실증한다.

표 50

사이노몽구스 원숭이 혈청 중의 ALT (IU/L)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	37	44	42	35
409826	40	39	51	86	74
142082	8	37	39	45	36
	40	49	62	59	69
446431	8	52	54	67	86
	40	38	58	87	99
404173	8	34	50	41	45
	40	44	50	63	73

[0795]

표 51

사이노몽구스 원숭이 혈청 중의 AST (IU/L)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS		40	49	55	44
409826	40	48	53	73	59
142082	8	44	45	49	42
	40	54	70	72	69
446431	8	57	43	48	50
	40	41	60	63	81
404173	8	44	53	57	59
	40	46	65	71	74

[0798]

표 52

[0800] 사이노몽구스 원숭이에서 알칼리성 포스파타아제 (IU/L)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	784	834	1021	838
409826	40	728	883	1178	981
142082	8	718	739	788	688
	40	666	656	711	774
446431	8	742	745	885	908
	40	778	759	768	735
404173	8	888	957	1135	1155
	40	931	958	1135	1263

[0801]

표 53

[0802]

사이노몽구스 원숭이 혈장 중의 CRP (mg/L)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS		1.0	1.8	1.4	1.2
409826	40	1.0	4.3	4.8	4.8
142082	8	0.8	1.2	0.9	1.0
	40	0.8	2.6	3.4	12.1
446431	8	1.4	1.4	0.9	1.1
	40	0.8	2.4	2.2	6.7
404173	8	1.4	1.9	1.5	1.8
	40	3.1	1.6	1.2	1.6

[0803]

표 54

[0804]

사이노몽구스 원숭이 혈장 중의 빌리루빈 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	0.19	0.20	0.20	0.17
409826	40	0.17	0.13	0.13	0.10
142082	8	0.17	0.18	0.16	0.14
	40	0.16	0.13	0.13	0.08
446431	8	0.21	0.17	0.18	0.15
	40	0.19	0.18	0.15	0.12
404173	8	0.23	0.19	0.20	0.16
	40	0.22	0.15	0.14	0.13

[0805]

표 55

[0809]

사이노몽구스 원숭이 혈장 중의 GGT (IU/L)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	65	74	79	71
409826	40	84	86	94	87
142082	8	63	67	68	62
	40	67	72	71	61
446431	8	60	62	62	63
	40	61	58	62	60
404173	8	57	66	66	68
	40	56	63	69	79

[0810]

신장 기능

[0811]

신장 기능에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 혈액 샘플을 모든 연구 그룹으로부터 수집했다. 혈액 샘플을 혈청 분리를 위한 어떠한 항응고제도 사용하지 않고 투브에서 수집했다. 투브를 90분 동안 실온에서 유지시키고 그 다음 혈청을 얻기 위해 원심분리했다 (실온에서 10분 동안 3000 rpm). BUN 및 크레아티닌의 수준을, 치료 개시 7일 전, 뿐만 아니라 치료기간 30, 58, 및 93일에 도시바 200FR NEO 화학 분석기 (도시바 코포레이션, 일본)를 사용하여 측정했다. 결과는 표 56 및 57에 주어지고 mg/dL 단위로 표시된다. ISIS 올리고뉴클레오타이드로의 치료는 BUN 또는 크레아티닌 수준에 어떠한 불리한 효과도 갖지 않았다.

[0812]

표 56

[0813]

사이노몽구스 원숭이에서 혈청 BUN 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	28	28	25	28
409826	40	32	30	28	32
142082	8	26	25	24	26
	40	28	28	25	25
446431	8	28	27	25	26
	40	28	27	25	28
404173	8	28	30	24	27
	40	28	24	25	23

[0814]

표 57

[0815]

사이노몽구스 원숭이에서 혈청 크레아티닌 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS		0.83	0.88	0.94	0.78
409826	40	0.77	0.84	0.92	0.82
142082	8	0.74	0.78	0.79	0.71
	40	0.72	0.80	0.86	0.73
446431	8	0.79	0.75	0.83	0.71
	40	0.76	0.83	0.88	0.77
404173	8	0.81	0.91	0.87	0.82
	40	0.76	0.84	0.92	0.76

[0816]

[0819] 콜레스테롤 및 트리글라이세라이드 수준

[0820] 지질 대사에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 혈액 샘플을 모든 연구 그룹으로부터 수집했다. 혈청 샘플을 혈청 분리를 위한 어떠한 항응고제도 사용하지 않고 투브에서 수집했다. 투브를 실온에서 90분 동안 유지시키고 그 다음 혈청을 얻기 위해 원심분리했다 (실온에서 10분 동안 3000 rpm). 콜레스테롤 및 트리글라이세라이드의 농도를 치료 개시 7일 전, 뿐만 아니라 치료기간 30, 58, 및 93일에 도시바 200FR NEO 화학 분석기 (도시바 코포레이션, 일본)를 사용하여 측정했다. 결과는 표 58 및 59에 주어지고, mg/dL 단위로 표시된다. ISIS 올리고뉴클레오타이드로의 치료는 콜레스테롤 또는 트리글라이세라이드 수준에 어떠한 불리한 효과도 갖지 않았다.

표 58

[0822] 사이노몽구스 원숭이에서 혈청 콜레스테롤 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	135	163	162	143
409826	40	153	150	140	116
142082	8	116	151	159	141
	40	110	140	138	128
446431	8	125	144	141	133
	40	93	99	95	81
404173	8	123	147	149	136
	40	135	135	125	124

표 59

[0825] 사이노몽구스 원숭이에서 혈청 트리글라이세라이드 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	47	55	45	54
409826	40	30	29	33	42
142082	8	23	31	37	32
	40	28	28	35	42
446431	8	24	46	34	33
	40	31	44	47	56
404173	8	28	38	25	28
	40	30	38	45	34

[0827] 혈액학

[0828] 사이노몽구스 원숭이에서 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 임의의 염증 효과를 평가하기 위해, 혈액 샘플을, EDTA 칼륨염을 함유하는 투브 중에서 각각의 이용가능한 연구 동물로부터 수집된 대략 0.5 mL의 혈액이었다. 샘플을 ADVIA120 혈액학 분석기 (바이엘 (Bayer), 미국)를 사용하여 적혈구 (RBC) 수, 백혈구 (WBC) 수, 혈소판 수 및 혈모글로빈 함량에 대해 분석했다. 데이터는 표 60-63에 주어진다. ISIS 올리고뉴클레오타이드로의 치료는 혈구 수 또는 혈모글로빈 수준을 대조군과 비교하여 유의미하게 변경시키지 않았다.

표 60

[0830] 사이노몽구스 원숭이에서 WBC ($\times 10^3/\mu\ell$)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	11.6	12.6	11.1	8.9
409826	40	12.4	12.7	15.3	10.8
142082	8	11.3	15.2	12.8	9.7
	40	11.9	13.2	12.5	8.5
446431	8	9.7	13.4	12.7	9.3
	40	10.7	11.5	11.9	10.2
404173	8	14.9	18.9	14.9	11.8
	40	11.1	14.2	12.9	10.8

[0831]

표 61

[0833] 사이노몽구스 원숭이에서 RBC ($\times 10^6/\mu\ell$)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	5.5	5.6	5.8	5.1
409826	40	5.6	5.8	6.1	5.6
142082	8	5.4	5.4	5.6	5.2
	40	5.7	5.6	5.8	5.5
446431	8	5.5	5.3	5.5	5.4
	40	5.5	5.4	5.8	5.3
404173	8	5.9	5.9	6.1	5.7
	40	5.1	5.4	5.5	5.5

[0834]

표 62

[0836] 사이노몽구스 원숭이에서 혈소판 ($\times 10^3/\mu\ell$)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	592	555	571	516
409826	40	536	493	400	338
142082	8	439	477	349	284
	40	461	454	401	263
446431	8	438	397	359	282
	40	516	337	369	323
404173	8	489	491	420	355
	40	520	470	389	316

[0837]

표 63

[0839] 사이노몽구스 원숭이에서 혜모글로빈 수준 (g/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	12.5	12.8	13.1	11.9
409826	40	12.6	12.8	13.3	12.5
142082	8	12.3	12.5	13.0	12.2
	40	12.1	12.0	12.1	11.5
446431	8	12.3	12.1	12.4	12.6
	40	12.7	12.6	13.3	12.4
404173	8	12.7	13.0	13.3	12.7
	40	11.6	12.3	12.4	12.6

[0840]

염증 인자의 분석

[0842]

염증 인자로서 보체 C3 분석에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 혈액을, 혈청 분리를 위한 항응고제를 사용하지 않고 튜브에서 모든 이용 가능한 동물로부터 수집했다. 튜브를 실온에서 90분 동안 유지시키고 그 다음 혈청을 얻기 위해 원심분리했다 (실온에서 10분 동안 3000 rpm). 보체 C3을 자동 분석기 (도시바 200 FR NEO 화학 분석기, 도시바 코포레이션, 일본)를 사용하여 측정했다. 데이터는 표 64에 주어지고 mg/dL 단위로 표시된다. ISIS 409826으로의 치료는 병이 있는 상태를 나타내는 낮은 보체 C3 수준을 초래했다.

[0843]

표 64

[0844]

사이노몽구스 원숭이에서 혈청 C3 수준 (mg/dL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	7 일째	1 일째	30 일째	58 일째	93 일째
PBS	-	136	138	148	149	129
409826	40	129	131	101	101	90
142082	8	126	135	126	127	111
	40	133	134	106	121	111
446431	8	130	144	128	132	125
	40	129	130	111	117	114
404173	8	127	136	137	136	127
	40	125	134	101	103	102

[0845]

인슐린 수준의 분석

[0847]

갑상선에 대한 ISIS 올리고뉴클레오타이드의 효과를 평가하기 위해, 혈액을, EDTA로 처리된 튜브에서 밤새 단식한 동물로부터 42, 84 및 91일에 수집했다. 튜브를 열음 위에서 유지시키고 혈장을 혈액 수집 30분 내에 원심분리 (4°C에서 10분 동안 3000 rpm) 후에 얻었다. 인슐린 수준을 자동 분석기 (도시바 200 FR NEO 화학 분석기, 도시바 코포레이션, 일본)를 사용하여 측정했다. 데이터는 표 65에 주어지고, ng/mL 단위로 표시된다.

[0848]

표 65

[0849]

사이노몽구스 원숭이에서 혈장 인슐린 수준 (ng/mL)에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료의 효과

	복용량 (mg/kg)	42 일째	84 일째	91 일째
PBS	-	29	26	26
409826	40	14	22	15
	8	8	4	8
142082	40	8	10	10
	8	9	10	7
404173	40	6	3	2

[0850]

[0851] 약력학적 연구

[0852] 올리고뉴클레오타이드 농도의 측정

[0853] 전체길이 올리고뉴클레오타이드의 농도 뿐만 아니라 총 올리고뉴클레오타이드 농도 (분해된 형태 포함)를 측정했다. 사용된 방법은 페놀-클로로포름 (액체-액체) 추출 후 고체상 추출로 이루어진 이전에 공개된 방법 (Leeds 등, 1996; Geary 등, 1999)의 변형이다. 내부 표준 (ISIS 355868, 27-합체 2'-0-메톡시에틸 변형된 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드, GCGTTGCTCTTCTTGCGTTTTT, 서열번호: 50으로서 본원에 지정됨)을 추출 전에 부가했다. 조직 샘플 농도를 정량화 하한치 (LLOQ)가 대략 $1.14 \mu\text{g/g}$ 인 교정 곡선을 사용하여 계산했다. 결과는 표 66 및 67에 주어지고, $\mu\text{g/g}$ 조직으로서 표시된다. 신장 대 간에서의 농도의 비를 계산했다. ISIS 올리고뉴클레오타이드로의 치료는 상기 비에 어떠한 이상도 초래하지 않았다. 상기 결과는 ISIS 404173이 더 높은 용량에서 ISIS 142082보다 더 나은 신장 축적자 (accumulator)임을 나타낸다.

[0854] 표 66

[0855] 사이노몽구스 원송이의 간에서 총 올리고뉴클레오타이드 농도 ($\mu\text{g/g}$)

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	신장	간	신장/간 비
409826	40	4424	954	4.64
142082	8	1688	1044	1.62
	40	6385	1774	3.60
446431	8	1323	641	2.06
	40	6662	1159	5.75
404173	8	971	712	1.36
	40	7180	1464	4.90

[0856]

표 67

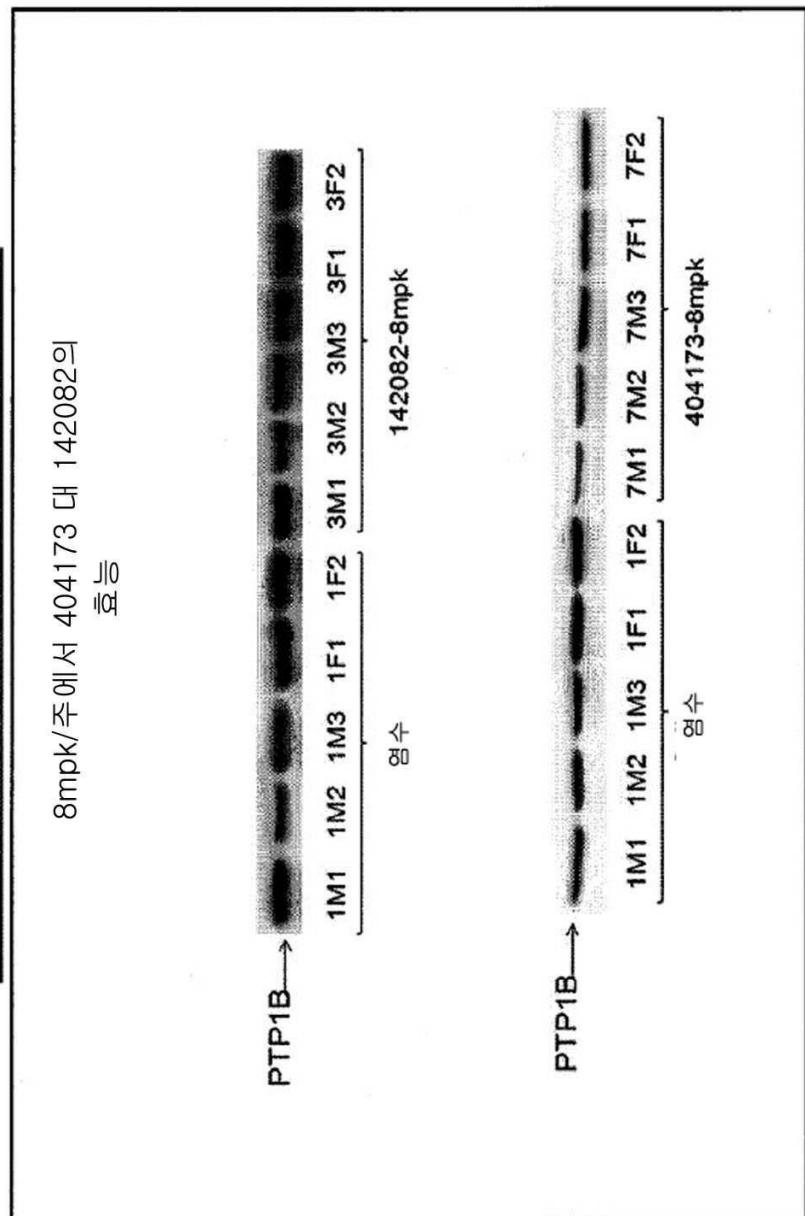
[0858] 사이노몽구스 원송이의 간에서 전체길이 올리고뉴클레오타이드 농도 ($\mu\text{g/g}$)

ISIS 번호	복용량 (mg/kg)	신장	간	신장/간 비
409826	40	3472	728	4.77
142082	8	1232	653	1.89
	40	4103	1244	3.30
446431	8	1204	416	2.89
	40	5645	846	6.67
404173	8	650	424	1.53
	40	5039	1094	4.61

[0859]

도면

도면1



도면2

409826, 404173 및 142082에 대한 주요 내성
파라미터의 비교

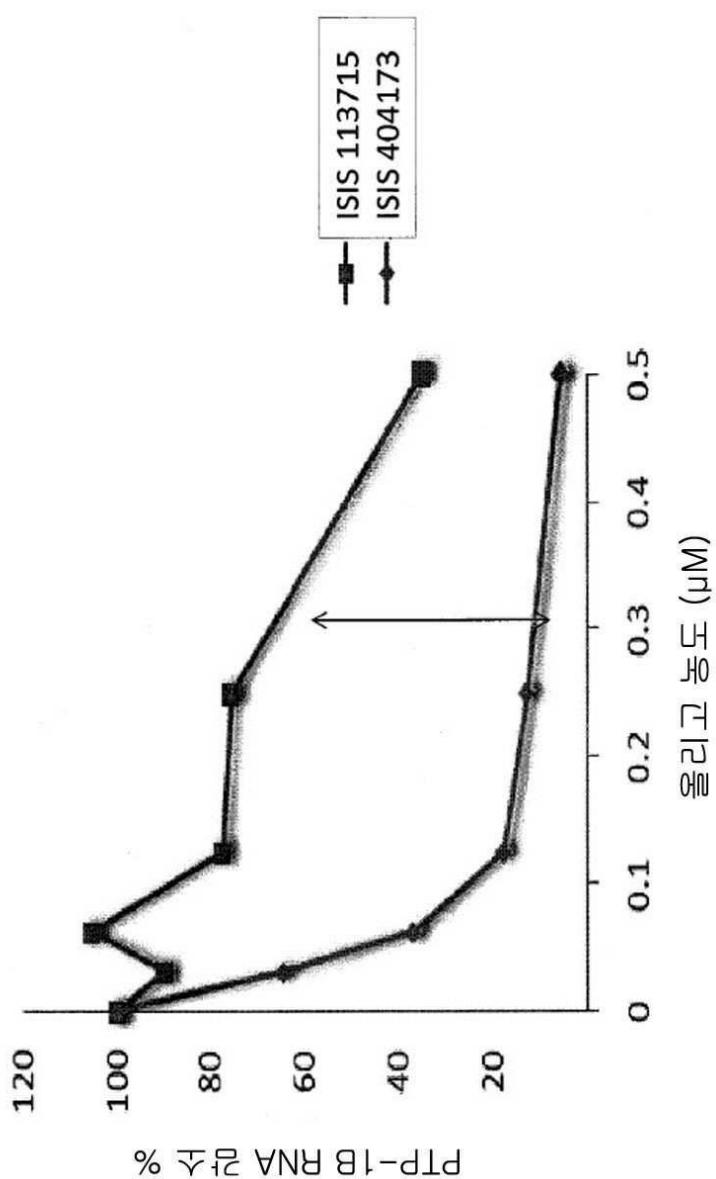
40 mpk/주		영수에 대한 배수			
ISIS #	호학 위치	걸기		신장 중량	간 중량
		위치	비장 중량		
409826	5-10-5	4518	2.5	1.4	1.7
142082	5-10-5	4522	3.0	2.1	1.7
404173	5-10-5	4521	1.6	1.5	1.5

40 mpk/주		변화 대 기준선 배수			
ISIS #	C3	CRP	MCP1	IL-1	
				영수	-0.05
409826				-0.30	3.90
142082				-0.16	14.52
404173				-0.18	-0.48
					0.82
					0.09

*1 0리는 93 일째에 아주 높았고; 따르기는 증가 배수는 ~3-4배였다.

도면3

ISIS-404173 - 더 강력한 억제제
 전임상 연구는 최대 5배 더 큰 효능을 실증한다



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

Sanjay Bhanot

Susan M. Freier

<120> ANTISENSE MODULATION OF PTP1B EXPRESSION

<130> BIOL0149WO

<150> 61/474,981

<151> 2011-04-13

<160> 56

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gtgatgcgta gttccggctg ccgggttgcata tgaagaagca gcagcggcta gggcggcggt 60
 agctgcaggg gtccccggatt gcagcgggcc tcggggctaa gagcgcgacg cggcttagag 120
 cggcagacgg cgcaactggc cgagaaggag ggcgcggc cgcgcggcc cgtcatggag 180

atggaaaagg agttcgagca gatcgacaag tccgggagct gggcgccat ttaccaggat 240
 atccgacatg aagccagtga cttccatgt agagtggcca agttcctaa gaacaaaaac 300
 cggaaataggt acagagacgt cagtcctt gaccatagtc ggattaaact acatcaagaa 360
 gataatgact atatcaacgc tagtttgata aaaatggaag aagccaaag gagttacatt 420
 cttacccagg gcccttgc taacacatgc ggtcacttt gggagatggt gtgggagcag 480
 aaaagcaggg gtgtcgcat gctcaacaga gtgatggaga aaggttcgtt aaaatgcga 540
 caatactggc cacaaaaaga agaaaaagag atgatcttg aagacacaaa tttgaaatta 600
 acatgtatct ctgaagatata caagtcatat tatacagtgc gacagctaga attgaaaac 660

cattacaaccc aagaaaactcg agagatctta catttcact ataccacatg gcctgacttt 720
 ggagtcctg aatcaccagc ctcattctt aacttctt tcaaagtccg agagtcaagg 780
 tcactcagcc cgaggcacgg gcccgttg gtgcactgca gtgcaggcat cggcaggct 840
 ggaaccttct gtctggctga tacctgcctc ttgctgatgg acaagaggaa agacccttct 900
 tccgttgata tcaagaaagt gctgttagaa atgaggaagt ttccggatgg gctgatccag 960
 acagccgacc agtgcgcctt ctcctacctg gctgtgatcg aagggtccaa attcatcatg 1020
 ggggactctt ccgtgcagga tcaatggaaag gagcttccc acgaggacct ggagccccca 1080
 cccgagcata tccccccacc tccccggcca cccaaacgaa tcctggagcc acacaatggg 1140

aatgcaggg agttcttccc aaatcaccag tgggtgaagg aagagaccca ggaggataaa 1200
 gactgccccca tcaaggaaga aaaaggaagc cccttaaatg ccgcacccta cggcatcgaa 1260
 agcatgagtc aagacactga agttagaagt cgggtcggtgg ggggaagtct tcgaggtgcc 1320
 caggctgcct ccccgccaa aggggagccg tcactgcccgg agaaggacga ggaccatgca 1380
 ctgagttact ggaagccctt cctggtaac atgtgcgtgg ctacggctt cacggccggc 1440
 gcttacctct gctacaggtt cctgtcaac agcaacacat agcctgaccc tcctccactc 1500
 cacctccacc cactgtccgc ctctgccccgc agagccacg cccgactagc aggcatgccc 1560

cggttagtaa gggccgccc accgcgtaga gagccggcc ccggacggac gttggttctg 1620

cactaaaacc catttcccc ggatgtgtgt ctcacccctc atcctttac ttttgc 1680
 ttccactttg agtaccaaata ccacaagcca tttttgagg agagtgaag agagtaccat 1740
 gctggcggcg cagagggaag gggctacac ccgtcttgg gctgc 1800
 cctcctggag catccagac gggcggc ac ccaacagccc ccccttgaa tctgcaggga 1860
 gcaactctcc actccatatt tattaaaca atttttccc caaaggcatc catagtgcac 1920
 tagcatttc ttgaaccaat aatgtattaa aatttttga tgtcaggctt gcatcaagg 1980
 ctatcaaa aagtacaata ataaatcctc aggtact ggaaatggaa ggcttgcca 2040
 tggccctgct gcgtcagacc agtactggga aggaggacgg ttgttaa 2100

gtgatattgt gggtaacgtg agaagataga acaatgctat aatataataat gaacacgtgg 2160
 gtatataata agaaacatga tgtgagatta ctttgc 2220
 ctgctagatc tagtctcaa tcaactgctcc cccgtgtta ttgaatgca tgtaaggct 2280
 tcttgtcc tcatgaaaaa tatgtgttg aaatgaaaaa cttgatctc tgctactaa 2340
 tggcccat gtccaaatgccc aacctgcctg tgcatgacct gatcattaca tggctgtgg 2400
 tcctaaggct gttgctgaag tcattgtcgc tcagcaatag ggtgcagttt tccaggaata 2460
 ggcatttgcc taattcctgg catgacactc tagtgactc ctggtgaggc ccagcctg 2520
 ctgtacagc aggtcttgc tgtaacttag acattccaag ggtatggaa gccatattca 2580

cacccacgc tctggacatg atttagggaa gcagggacac cccccc cccaccc 2640
 gatcagcctc cgccattcca agtcaacact ctttgc gacccgtat ttggaaagaga 2700
 ggcacctgct gggaaaccaca ctttgc aagcctgggt gacggcctt taggcagcct 2760
 gcccggctc ctgtccggc tcaaccccttgc gagaaggcg cgtctggcc accctaaac 2820
 cctgtgggc ctgtggc tcaacgttgc tcaacttgc tcaacttgc ggaactgaag acctccacat 2880
 taagtggc tttaacatga aaaacacggc agctgtatgtt cccgagctac tcttttgcca 2940
 gcatttcac atttgcctt tctgtggta gaagccagta cagagaaatt ctgtgggg 3000
 aacattcgag gtgtcacccct gcagagctat ggtgagggtt ggataaggct taggtgccag 3060

gctgttaagca ttctgagctg ggcttgggtt ttttaagtcc tgtatgtatgtt 3120
 tgggtgtta tataatgtatgtt catttcaaaa tggacgtact ggttaaccc cctatcctt 3180
 gagagcagct ggcttcac cttgttacac attatgttag agaggtacg agctgctctg 3240
 ctatgtcc taagccaata ttactcatc aggtcattat ttttacaat ggccatggaa 3300
 taaaccattt ttacaaaa 3318
 <210> 2

<211> 78001

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cagattccgg gtctcatccc tagaccaaag atatctaat catttggcga tgggtccagg 60
 aacctgcatt attcaacaca cttcccaggt gaccgtaaat gtcaaaaagac aaaattacaa 120

caaacttaaa catcttaatt ggcttcattc atgattctag aatcgccaa gacttcattc 180
 ctcaaaatag cacaagtgtc ccaatgagct gagcagagga ggttgggttt atagacagaa 240
 aaggcgtgaa aaaaggcagaa acaaagaaca aaaaggcagat tggtcatttc aaagttactt 300
 tccttgtaag gcaggaacag ggaaacagaa caagagagaa ataactgatt ggtcgcatcg 360
 ggttacttca gtttactttt ttttgtaagg attaaagcaa agggaaacttc attatgtta 420
 tttaaacggc ctgcttggga aatcagggtg tgtatcttc ttctgatttt gtgaaagggtt 480
 atcagtcgtga ttagttagaa cttagcatg agtgactcca ttttgatttt tagtctagtc 540
 ttttgagacc ctaatgccag aactttttt gtttgggtt ttcgctctt tgccccagggc 600

tggagtgcag tggagctatc ttggctcaact gcaacctctg cctccagggt tcaagcgatt 660
 ctccgcctc agectccaa gtagctggga ttacaggcat gcccaccac gcccggctaa 720
 tttttttt tttttttt ttagcagaa accgagttc accatgttgg tcaggctgg 780
 ctgcgactct tgacctcagg tgatccacct gcgtcggtct cccaaagtgc tgggattaca 840
 ggttgagcc accacaccca gccctttt ttcaagacag ggtctcttc tgccacccaa 900
 ggtggagtgc agtggcgcca aaacagctca ctgcagcttc cacctcctgg gctcaggta 960
 tcttcctgcc tcagcctccc cagcagctgg gcccaccac accggctaat ttttaactt 1020
 ttagttagtga cgaggcttga ttctgttacc caggctggc tggaaactctt ggcctcaaga 1080

catccgcctg cctctgcctc ccaaagtgc gggattacag atgtaaagcca ccgcgcctgg 1140
 gctcctatga ttttattta acataatgca ccatggatt tggctctgc tttagttcgt 1200
 ctgagcagga gttccttgat acttcggaa acactgaaaa tcattccatc cccatccatt 1260
 cattcctgca gcacccaagt gggattctg cggtttagac agggacacta cccttagaga 1320
 gcagtggttct tccccagcag cgtatgtaaa catgataactc ctgagttca tgaaaaagg 1380
 gcagacatct gcccagagct gggaggcagg aaatagagca cggcccttc ctcccatact 1440
 ccagcttggaa ttactgaggc tggggccctt gcccgcagg aaaggagggtt catgactact 1500
 ttaaggccac tcactctgtg actcaacggg ccgggtcggtt gctggaaactc aatgccctcc 1560

cgggcctgga gageccacgc gccgtggcg gggctccgg ggtcgcttag gcaacaggcg 1620

cgcggccgcg 1680
ccgagccccag agccccaaag cgaggagggg aacgcgcgtt attagatata
tcgcgggtgt 1740
ggggccactt cccctagcac cgccccccgc tcctccccgc ggaagtgtttt
gtcgaaattc 1800
tcgatcgctg attggccctt ctgcttcagg ggcggagccc ctggcaggcc
tgatgcgttag 1860
ttccggctgc cggttgacat gaagaagcag cagcggctag ggcggcggta
gctcgagg 1920
tcggggatttgc cagcggccctt cggggctaag agcgcgacgc ggccttagagc
ggcagacggc 1980
gcagtgggcc gagaaggagg cgcaagcagcc gccctggccc gtcatggaga
tgaaaagga 2040
gttcgagcag atcgacaagt ccgggagctg ggcggccatt taccagggtgc

gggagcgccc cgaggcgtgg cggcccttc gcttaggcgg cttaaacatc ccctcagacc 2100
tccaggcccc agactccctc tgggtttgc cctctgcctc gctctactg cttgaggatt 2160
cgatgggaca gcgacgcact gcgtcccccc accctttgtc cccggggcgg gcgtgtttct 2220
cgccgcagcg tcggagcccc ctgcataccc ccacccctc tctgttctcc agctcgggtg 2280
atctctcaag cgggggacc gccggctgt gctctcaacg cgaatccctc gcaccccgac 2340
cccgccccct gcctgtccac tctttgtccc ctggggtgat ttagcaccccc cactattcc 2400
ttttctggag tggaccacct cagactctc tcctttgtct ccctggggaa aaaggttact 2460
ccccccgtcc ctcttcaca ttcccttcc cctagtctca gtgtgcgtcg agtcccagag 2520

atgacagttcc ccttccccct ttctgttcat tcatttattt gataggagtt ggcaagctta 2580
ttctgtgcta ggcaccgcctt aggcatggaa ggtgggtttt gctaattcagg acaggcaaga 2640
tccttagcctt agtggggcctt agagtcaat aggcaatca aacacaaaaag caaataattt 2700
cagatagtga caggtgttgtt gaagagaacg acttcctaac ggggtacagg gtgactgtat 2760
agaaggccgg ctgtcttaga gaaggggatc agggaaaggcc tgtcaaagga ggagacattt 2820
gttttgtgag ctgaaccaag aggagcagaa agccgtgaga atatgggctt aaagaacattt 2880
ctagccagga ggcctgcgggtt acccactcca ttggggccat gatatttttc tttcaggcag 2940
ggactcagga aggttaacgtt ttaacccttc tctaaaaatag catctttctt caatgagcag 3000

cttagtcttt ggtcggtggca gagatgaccc tgtcttagga gtcataccttgtgtgttaa 3060
aaagtttagga aaggagggtt tctcatatat ctataaaaaca agtagttaaa aacacaaaga 3120
gctttcctt tcacaaggcag ctgaaaaaga tacataactcc caattaaatgtcattgcggg 3180
ggttgtaaagg attaactaaa accacacttg cacagtatct taaataagcgtatatacagaa 3240
tagagagatt ttgttacttg tgtaaaggga gacagcagat gattctgttt tcagcttata 3300
ggctcaaaag gcaaattgtg agatccatca gctgttagtat taaaatctat tttgagctcc 3360
gcttagaaag gaaaaaaaggt ttaaggcagtt cttggtagtgcgtactaac aaaagccttt 3420
ttttttggca gccttgattt tcaitggat ttacatcaag ctatatttgcaggattcttt 3480

ttatggac ttagtgtgt atattagtt ctgctagact aatattcta accactgtaa 3540
tctataact aataagtatg attgatcaat atataaaatt tgtatccat atctggctc 3600
tgaattagct gaatgaattc cataaggac tttgagactg ttagacaaa tttctgc 3660
cagttiaatg cagtagagtc taaaatgtct taaaatgaaa atgttggtc tgaagtttg 3720
gagttgatta tgatacaccc catcacagtg gaagcattgt ggagagaagt ctttccact 3780
gaaattgact gagttgacaa caagaaatac gtattgtaac ttatgttta gttgaatttt 3840
atttctaca atttaaagcc agagtgggtt gacctgtcac ccaagcatgg taaaattgt 3900
attcagcatg caactagcat ggagtgtgc agtctcaat tcatttcattt cattttttt 3960

aagttttct gccacaatta aacccacaa gttgtcaag gtgttgagat tttcactgct 4020
tcttaatgga ttgccacatt ccctgaggta gtttctttg gtcttagaga attgtcaggg 4080
ccagctttc tcacctccac tgtatggata ttttcttt ctaagatctt gaaatcgaa 4140
gctttctcc taagtgtaaa agtagcttt tgcatacaa ctgtacgtt ttctgaaaca 4200
gagttcagat gacccgtt gtaaagtggc taacttcca aggtgtgtat cgctttacca 4260
aaaccattat tttcaagga ttcaaagaat gtgttacaa ttgatagaaa atgaaagttt 4320
aaaaaaatata atactttata gcatgttcaa atgagggcag cttatacaa agtcatactt 4380
tgagcttgcc tagcctattt tgatcagaga ataatgtat tttgcttac aacttgtaa 4440

gcaggtcagt tattctaact tatttctga tttagacaaa aagatgtaaa aacttgaaaa 4500
ctattggaa aagaacaaag agtgaagagg actttttagt gctgaggaat gtggcagctt 4560
ggaaaacaaa cttttaggc agagatttt tgcttaggtca gttgtataaa gtgagcataa 4620
ccgtatcccc aatcttaat gtaatgaat agcatagatg ctaataagca tctaggtcta 4680
taaaaagtca gcttgatag tgcataataga tggctttaaa cattgtttc tagcattaa 4740
acacttcaa atcatccggt tgcttgattt ggcctagctg tctaagagga gagaatgagc 4800
ccagatgagg aaaagagatt gatttactg agctagaatg agaggagaga gggttgatgt 4860
aatgaaaaga atagctcatg tgctcccctc catctgtatg ttaagagggg ttgggtccgg 4920

tgtttgctt gtttctcggt ctgtaaattt tttgatttgc tgacaccact cactatattt 4980
cattgtgaat gatttgattt tttcagataa aggggactgc aataatacct tgtgacatga 5040
aggcaagatt tattcatgtt agagggcaggc tttgtaaaat gggccactct tccaatttgc 5100
atttttttt atagctgttt tcattatgaa atacaatcta atgcctgact aggttaaaac 5160
catgttgtaa caatagttca ctaaaattcc ttactgatat acagcttgc ttgttatatt 5220
ccaaaaagat gaatattaaa atttgcaat aatgtttatt taaatactat tttcttcaga 5280
ggaaaaaaaaa ctatttatg caaaggagaa agatctatac actatgactc acttcactta 5340

aaaaaaaaaa gactaacgga aatgacatgg agagactggg aagtcttagt catcttgagt 5400

gaccatttag atctaattgt tcttgtag ccctggttt agtgaactaa atttaggtgt 5460
ctgatcagta ctggaaat ggtgtaaatg cctttgtaat tgtctggact gatatttagat 5520
taactggag cacaagtata aatagtgaag gaaagaactt tttgttattt ttatttgaca 5580
tcactggcat atttatagga atacttttgtt gttttggaa gtaagtaaac caaccagtgg 5640
ttctaaaaag tcagctgggg gataatggta atgccgttgt ttcttagctg caagttatct 5700
gccgttactt ctcctccatt ttgcattttt tcttgaatag ctcccaaaaa cctattaaaa 5760
tacctggtat tgaataatgt aattgtatgt gtactgaatt tcacagtggaa aatgaataag 5820
aaatttcctg tggagggtttt ttgactttagc tactgaaata acggccctttt gttgtgtgtat 5880

tctttccctt ttctcttgt taaagaaaac tgtcttgat tacagaatcc 5940
tttggcaat ttctgttctt agcactgctt ttctttttt ctttttttt aaatagaaaat 6000
ggggtttgc tgtgttgcctt aggttggct tgaactcctg gctcaagcg atcctccac 6060
cttggcctcc tgaagtggg attgcaggcg tgagcaggta cttttctga ggcctgcctg 6120
agcctataata tatttgcac aatttggcat tcctccctac agtgtttatg ctgatttgtt 6180
tctggtaaca actaataactg gcaaatcgcc tgcccattttt actttatgct gccccatattc 6240
aggaaaatttgg aatttcttagc tgggtcatttggatc atgttagtttgc acccaggcca 6300
ttccatgttc acatttttagt tatccaggag ggctggggac ttggatgttgc ttggatgttcc 6360

cctctgccac atttcactgg ttggtcacta tggcatacctt tccaccacac tagtagtcta 6420
ggttctcaga ttttgcttat gagcctgcaa tggttctag tttcacactg cagaaatgag 6480
tgaagccggt taccgcgttaa tatggtccc tcatacttag agtaattcat tggtctaaaa 6540
ccagatctga gtctctact cctctgcaac tacttctgat tcttcataa cacttgtaaa 6600
gtccaaactc ctcttagca tggcagccag cttccagtcc ttccctccta tgtggcttcc 6660
attctagcca gacaagaaag ggcagcggtc tccaaactca tcctcgccct tcattcctct 6720
ataccattgc tgagcacttt gttgaggatg cctctccgt tcaatcttagc ttgcatcttc 6780
cagtcgaat gtgtgcttcc ttgcaccaga gttttgttcc gtcacactgt tgtttcata 6840

caagctggca catabtcattt ctaaaaggccct gctgtcattt tagctgcgtc tttacaaaca 6900
ttttttttt aaattttat aaagtcaagg tctcactata ttgcccgaggc tggctcaaa 6960
ctcctgggct caagtgtatcc tcctgccttg gcctcccaga gtgctggat tataggtatg 7020
agacactgtg cccagctgtt gctgtacttt tatacccag gtctatctcc aatggagccc 7080
aagcttccctg aggccacactg ttgtatcttt ctcatcattc ttgaagtctt ctgctccctgg 7140
cacagagtag gtacctaaca agagttggga ttgaattgtt ggtcgtactt ttgcttagctt 7200

gatggataa agatgtacaa aacatgttcc tggctccac tctaggggg caatgatgga 7260
aacaaataga tttagccaca ttagtacca tagtagaggt cactctggga gaaggcccc 7320

accacattt gagtcatggc ctaatgaggt aatttagtat tgccctgctgc agtggcttg 7380
gaagaaaaggc tggcattctt agccagttaga agctgatacc actgatttgt ttcacagaag 7440
ctttaaat aacaataat ttgtgcttg cctacggta actttacagg caacttggag 7500
gtatatgtt tgtctctcta agaattgtt aattccttt ccctcatccc tcctgactgg 7560
ttctcacaag cctagcgggc ctttgcgtt gggtggttca taaaatactt tttgatttg 7620
ggatataaaa tatagttctc cataaaataa cgactgttac caagtcttg atttttttt 7680
tcaaactata aaiggtaatg acattcttg gccttgcgtt acaccaccc tagggcaag 7740
agagtagttt catgtttgc ttttctgtt gtccctgtt tctgggtata gttgcgtt 7800

cagctgtcat actaacagtg ctgagtgagt cccttacttt cttgggttt tggttctcc 7860
cttggaaaaa tggatcttgc ctaactgatc attaaggtaa ggtcaagtaa taaaatcct 7920
taatgtactc acaaatacaa ttaatgttc ctgaataatc ctgtggaaaa ctgcagcgt 7980
tactcagttt tggatgtgtt gggtgggtac tattaggctc aaaagtttat aggagcttg 8040
tgagtagttaa taacaactca aaagaatggg gtgtttttc ccgaggggca taaaatgttt 8100
ttgataataa gagttcattt gacttggtaa tggggaaaat gagtagccct gacacgtacg 8160
ctatgtttt gcagtttttc tctcaagtag caattgggtt gctttcctg taaaagatag 8220
aggaactgtat ttttggaaaat ttacgaaagc ttcaacccta actaggatg caaagaatag 8280

ttggccctta tggatgttatt ttaggaagaa acctacatct ggtctaaat ttcatgtt 8340
aatatgtatg tttacacatc tgccatattt gagaagaaag tacctaagtc tccagcattt 8400
tagaaataat gctttactt gttggaaaat ggtctttttt gtttaatagc tgctgccctc 8460
tcctttca aagcagctt acataatcat ggtatctt ctgacagctt gtaaattttt 8520
attgtatgaa aactgaaaat aagaccattt cacatggaaat attcccttcc gcccgtaaac 8580
agccaaagaa aactgttagcc atcaaatactt ttgtatctt gggtttggta caagtcacac 8640
tactacaat aaaataatac caagtactta taaatgattt tcaatgtttt taaagtttat 8700
tttttaataa ttttttttga gatggggtct tgctgtgttccaggctgg agtgcgttgg 8760

cacaatctt gctcactgca acctccacctt cctggctca agtgcgttcc ccacccagg 8820
ctcccaagta gctgagacta caggcatgtt ccacacgccc cagcttaattt ttgtatTTT 8880
ttggagtaga gatgggattt tgctgtgttccaggctgg tcttgcgttcc ctggcttaa 8940
gccccatgttcc tgcctcaggc tccaaatgtt ttgggatttcc aggtgtgagc cactgtgtccc 9000
ggcccgcccc ttttttaag agaaaaacgt atgacatgt tcgattttt ggtgtttttt 9060

```
ggtttacta aggcaacta gtttatgga taccctatgg taatttagata gaatttagtgc 9120  
tctgaagtca gctctgtat atggactcg agtaaacatg gcaaaggac acttaaggtc 9180  
tgcattttct ctggaaata aacgtattct ttactactct gaatctagtg ctggaaatt 9240
```

ctaaatcctt cttgaggatt aaccacttga agtaaagttt tgggtcccaa gtaggcttgt 9300
gtccctgtct ccttctctt actttcaga tgtttcttcc tagagactga ggtatatttt 9360
acttttacag atgaagaagg aagcctcgcc tgtgttgtg gctttgtgg gtgagcaaca 9420
tcacttgcaa agataagatg agcatagcaa aactaggctt tcaaaaataat ttttaaaaat 9480
ttcttagtga tttagaaaagg aaaactcttc ccttgtctct gttaagaaac gtttttcgac 9540
tttttcctt tcttaatgga tctttatttgcacttcttgcataatcttact 9600
taaaagtac tacgttacat tacagcaaac agcttagcta attttatcc agatgggcc 9660
cggttacagg attgtacact attgcaatt tcttacagga aagtgaacat caagtaatta 9720

tccaaatag agttcttta agaacgttag ttacttaaaa atgtctaagg atgaagtac 9780
ttctgaatat aacttcactc aagagaacaa ataagcaaac tgcatttagc ataacatgg 9840
aaatttagctt taacttcctc tgatgttga acattgtcg ctgttaacta ctgtttcact 9900
tttcaaatag tcagggctt gtttgcttct gtaaggataa agggaaaata cgccttcact 9960
gagtcataaa tatttttgtg gctaactttt gcacagagaa aagaggcctc taagaaggt 10020
cccagtgaat tttttttcg gggcaggagg agaatatgtc attttttgtt ttgttgtt 10080
tgttgcatt gttttgtttt ctgtgaactg aactgttatct tgacagcact 10140

tttgaattaa gagcattact ctatgttc tctactacct ggacgccacc tccctgtgc 10200
catagtgtta aggatcatgc tccgaggtgg ggtgaggcag aatggggcca agatcagaaa 10260
gttacattaa gctacatcag gtttatacaa gcataaaacc aaattttgg agcagtcccc 10320
agaataacaac ctggtttagc cacacctaa gtttgcttt gaatattcct tgagaatcca 10380
catccctaga atgctgggtt tcaatggcc ctttatgtac ctatcatggt gtcattctg 10440
agcatttcta aatattcct catgtttac tgacagttt tcttgaataa atcttagaa 10500
tattagtgcc attatcagta ttgttgg tctgttcaca ccacaataa ctacccaggt 10560

ctgtacttg ccccttatttc tctacctgct aatgaaaatg cttttggaaag tttagttaac 10620
agtattggag tgtgcacagt ggtattggta ggttctgtac tcattccttaa ccacttgttt 10680
tcattccttg tgagctgaa gtttctcaa aaaatttatac acaaaaactta tcagacatag 10740
ttaatacact cagagagaga atcactgaaa aagtagatgt agttaacaa acccagtgcc 10800
ttttttttac ccatgaatac atattgtca actaaacctc attttgcac acgtttccact 10860
actcgaaatgg taacaaactt ttgggttccc aatagatttg gaagatgttg cttttggaaag 10920

taggaaatag atggcttag aagatggaag aatatttgt ttgaagtggc agcgtggat 10980

gtccttagct gtcgtgaaa tgcagctgaa gatgggtgtg ggccttcata tcgattccc 11040
 atcttcagtt tgaggaggtt gttacccttc taaccactta agaactgcat ggtacatgt 11100
 gtttattta cagggcaaaa ctgtgctccg gtagttccc tggtgcttgc cttcacgtta 11160
 acacagtgtc atcggttggc agtgttatg tgccagggtc catgttagaa ggaggaaagg 11220
 tatacgcaag ttaaagggtg cagttggct cccacctta gtttgtaag tgccttaaa 11280
 gtttgattt ttaggttga tcataaggaa gtgataagta ttttaggtt ttttggtt 11340
 gagctaattt tagtctctt ttacagctt cttgtatcc ttggcattt aaacatgctt 11400

tctagaaaga caactttga atgtaggaca cagtcataat tctatacttgc 11460
 aaaaaatatt ttctcagtttac ttggaagtt ggacagttgg aagcatagt acagtattt 11520
 aaaatcttg attccggccg ggcattgtgg ctcacgcctg taatcccagc actttggag 11580
 gccgagggtgg gtggatcaact tggatccgg agttcaggac cagcctgacc aacatggta 11640
 aaccctgtct ctactaaaaa tacaaaatta gccgaggctg gtggatcatg cctgtatcc 11700
 cagctactca ggaggcttag gcaggagaat cgcttgaatc tggaggcgg aggtgcatt 11760
 gagccgagat cataccattt cactacagcc tggggacaa gagtgaact ctgtctcaaa 11820

aaaaaaaaaa aaattaagt atttcttgc ttgtgacac ttctacttt ccagcaagta 11880
 aattatattt ttcatacag gtagaaatt ttgttccaa gctagtggtt aaaaaggcac 11940
 agttgatatt agaggattt taaaagatta tgaccacgcc tgaatgtac tgaagcaagg 12000
 ctttgcgtgg ctgtgtatag gaaaccttcc ccagcctgtg ccctgttgc atagaacatt 12060
 ttgcctcaa gggtaggtgc ctgtatctgt ctccagact gtttagttt acacagaaca 12120
 gttgttttca agagctttag tctcaagctg ccctgtccc ctgaaggcgc caccctgagc 12180
 atgtgcactc acaggagggg acatgtgagg tcatggaaga agacgactca ggaagaagaa 12240

gacttgggtt tgggttctga ctctgcctt gactgttgc ggatttttag gagttgcata 12300
 caggatctgt aaaatgtgtt cattagacta gactagacag ccatatagca ttaccttagat 12360
 gtaactttct acaaagacat ggtcacagga gaagaccaga gggtgggtg atcttctgg 12420
 aaaaattggg gcttcatgcc ttactcatgc tagatatgtt agcattatat ggctgtgcct 12480
 gatcccccta atctaaaagt gggacagaac tttaaaatttt catattaact caaataaaaa 12540
 cttgaaaaaa acccattattt tccttaaaaaa taataaaatg ccctgtgggg gcataagtc 12600
 cattatattt taaaatttctt gaatgccaca tggatgaatg tagttcctt taaaattttt 12660

cttttgtcta aagaggaatg ttggatttg taattggact aaaaaatctt ccatttgcaga 12720
 gagaaacagt ctgctgcata ttctaccctt gttcaggata aaacccacta atagctaaca 12780
 tttattgaat tctgtgttgt gcctcaggca ctgtcataag tccttacat gcaatgctgt 12840
 ttattatata ctgtcaattt gtcataaca gcagggaaatg ttccaggagg acaatgaggt 12900
 cccagaccct cagtttctc ctgtgtctg gattcagctt cacaatagca ctatggcagt 12960
 gtggccactg cttcagcttc cacatacatg gctgtgaaga gagacagggg attgtgctaa 13020
 gcctccccga ttatttagga cataggagga gagagtttgt agttttgac ctggcttag 13080

ttttctaacc tcttcctag atgtcacaaa ttggccaccc acagtcataat tttgcttgct 13140
 tcacgcaatg ctitttaaaa aagagaagag tttaatttgt gccattgttt ataaatgaat 13200
 caggagaat gacatgcaac tctggattct ggcctctttt gaaaaatctg aaaatcacac 13260
 cgtctgagct tacactggca gtggctgtgt ggactgaggg acacaactcc tttggatgt 13320
 acatgtgtgc gttcagactt accacatgtt cccacagtgg gtcacactgt cttgtcggt 13380
 gtacactacc tagcacttga gtttgcacc cctacccaa gctgagttt ctcgtcaagc 13440
 ttgatgttaa tggatgtga tgcttggct tggatgtt tggatattt tcgttagata 13500

aaattgaagc aaaggctaa agggttggtg gcctgaggga gtgcccttga cagtaagtc 13560
 taggataaaa tcattggcca ggtactcctt ccctccgc cttccctttt ttctctttat 13620
 cctcagcctc cttctgctat ttggaggaag tttagaagcca ccaccatttt ttcccacctc 13680
 aggcaactga gtgtggctgt atttctgtcc catgttcaatg tatttcagg aactatttt 13740
 gatgaccaac ttgaagttt accgggtggg cctaatgggg gctgataaaa gaatgaggtg 13800
 accaaatatg ctgcactga gacggctacg aagtaagggtt ttatgtact tgcttgc 13860
 ctggcagg agtgatacca ttgtcatgt gtccaaacttc atgactaaat ggttgctcta 13920

ccttatcctc atagctataa taaaataaaa taaatacata cattgcaggagg aggaatgtat 13980
 cttgttaaag gtcctccct tttagcaaca aaagtacata ttatgtgtta gaacatgctt 14040
 ttctttgtat cttcttgaa cacattttt tctatagagg tatgttgtt atggcaattt 14100
 agaacaagca atagataagg atgattctt accattataa cccagtcacg gtctttgtcc 14160
 taagtttgtt acctttctcc agagggaaag gtatttgtat ttatgttattt attttgagg 14220
 cagagtttg ctctgttgc ccaggctggg gtgcaatggc acgttcacg ctcactgtaa 14280
 catccgcctc ccgagttcaa gtgattctcc tgcctcagcc tcccgagtag ctgggattac 14340

aggtgcctgc cacgatgccg ggctaattttt tttttttttt tttgtatattt tagtagagat 14400
 ggggtttcat catgttggcc aggctggct tgaactcctg acctcagggtg atccatccac 14460
 ctcggcctcc caaagtgttg ggattacagg catcagccac tgcctccggc caggtattt 14520

tatttttagt ctctatgcct taccgtctca gatcaggagg attgggtat ttatcgatg 14580
 tggggaaagg ggaagaagag gaaacgggag gaatgtcca gattaggaa atagctagat 14640
 ggaagatgca gccctcatc aaggtggga cacagaaaa ggaacgtgtg caaagaagat 14700
 ggtgatctgg ttgtgaccat ttgttagag gacgtccagg gaagcatctg gtaggttgt 14760

gggtgttaa atatagaaca ttcgagaat gctccgaagc ttcatggaaac cttcccaa 14820
 aggacaaaac cagctcagtg ttttagact ccggatcat atggcatgac agcatggctg 14880
 ctttatactt tttgtgtat gtgaaattaa accaaaccac tcaggaccaa tttctctaa 14940
 gcttttgc aatcttcattt ttgctttct cgtctagatt gtaagctct tgccagg 15000
 gtctgtatc tcagtcattt aaaaaataat acatgaacag ctactaggtt ccaggcttg 15060
 tgctggcag ttggatatg ttgtgaggaa gacaaacttgc tccctgccccc ttagaaagtt 15120
 cagtagtcca gcagacaaag tggctgaata aagataatct cagttcacag tgataagagc 15180

tcttacagc ctaggctcca ggtgctgtgg ggatgctcag gaaaaggat ctaattggaa 15240
 ttgggagcag gcaaaacaaa taaaggatag tgtataaagg taatatctg ttgaagtct 15300
 gaagggcaag gaggagttag cctgtatatt ctctgagct ctccctaattc tggattgac 15360
 ttctgtccg tctctgttca tattaagtgt cacctaggct taaaagggtg agatcatatt 15420
 tcacttcctt cctctttgtt cttAACCTT ctctgttacc ccctcacaca atgcatatgc 15480
 attattctt tattgtatattt ttttccttc ttttccttt catgtttctt ctgcattac 15540
 ttttaacctc gactgcccata tggctctaa acgttccag aaggtagcc tagtgaggt 15600

tattccatca tggcttgag ctcatgcac cagatagtga aggcatctgt gtaggtgtct 15660
 tctccaggag ggtgatattt gtttcatgtt aaattttgtt gcccataaac accaacaaca 15720
 gtgcacagta atttagtaggc aggcagtaca ggattcatg aagtgaagtg ataactttt 15780
 tccaagtatg tatgcagata atcttgatt tgtacaaaaaa aaatttatatt ttaatatgt 15840
 aagatTTTTT aaaagaatct tcaagtttgc gcctccac taggaatata ttgaaaacat 15900
 gtgcctagtt cactgacttg cagctgccac tatgagaata aaggtctcat ttgttgtt 15960
 tgaatTTTTT gggatattttt caatgtatggt ggctggttt tccattatg tggcttttt 16020

ttttttttttttt tttttttttt gaggtggagt ctgcgttgtt cacccaggct ggagtgcagt 16080
 ggcgcataatct cgactcactg caacctccgc ctccgggtt caagcgattc tgctgtctca 16140
 gcctcttaag tagctggat tacaggcgc tgccactacg cccagcttaat ttttgttatt 16200
 tttggtagag aagggtttca ccatgttgtt caggctggc tgcacttgc gacctcatga 16260
 tccactcact tcaagcctccc aaagtgcgtgg gattacagc gtgagccacc atgcccagcc 16320
 tatgtgtctt tattagcaat tctcagtaca cagatagctt tgagtgattc tttcaagtca 16380

agtacctat taaaaaactc aagtgtactg ataattatct tactttaaa tggctaagt 16440

ataagactga attttaggt actgtaacac ttcaagattac agattctgat attttatgg 16500
 ttatttatat ttatttattt ttgagatgga gtttgctct tgctgcctag gctggagtgc 16560
 aatggcacga tctcggtca ctgcaaccc cgcctccag gttcaagcga ttctccgtcc 16620
 tcagcctct gagtagctgg gattacagtc acccgccact acagccgct aattttgtt 16680
 attttaata gagacaatgt ttcaccatgt tggccaggg ggtctgcac ttctgaccc 16740
 tggcgatccg cccgcctcg cctccaaag tgctggatt acaggcgtga gccaccgcac 16800
 ctggcctggt tacttaatt taaataaaaa aattatgtt attaattctg aatgattcc 16860

tgattgtcc ccgttacca ttcacacatt tattaaattc ttgcgttgcc atatagaagc 16920
 agtctctcg ccatatatgc catatagata acagaactag ctgtctgca accactgaaa 16980
 ttgtgaaaac atctccctt tttcctgtt tctaattcta gctatgagga ttatatacag 17040
 aagtagtcct ggatttgatt tttttttt tttgatgatt gtttttgat agtttgtac 17100
 tacaaatcat ttaaacgtct gaaagggaa aggtttcct taaaatgga tgacaaagga 17160
 gaataaaaaag gtatttgac tttttttt aatgatgagt tttttttt ctttctgt 17220
 tttctttgg agtcattat gtgtcactga gtggatacca tggaaatgt ggcagaagta 17280

gatatatggg gtaaaagaac catagttcat aagtccttg acagaatcac tgaagtgtac 17340
 ccgttatatg gccactgtcg cagggggagg cagcagttt gaagaagggg atgagtaata 17400
 atgagtgata aaaaggcatc ctggatagaa gaccaaactc tgcagaagac cccagttga 17460
 ttatgtttt gtttctgtat ttgcggagga gagtgaaaat gcctggggg tgcggggag 17520
 cacatagggt gtatgtgtgt gtgtgtgcgc gtgcagatc tctttcac tgtatgtatt 17580
 tgtatgcatg tatgtatctt aggacttaag ctttctgtc aataaattgc catagtgggg 17640
 aattgcttaa ttgcttgct tctgttgg tatttaattt aatttttattt ttaatgattt 17700

ttttgggtggg gtacagggtc ttaactatgt tgcgttgcgtt ggtcttgcac tcctaaactc 17760
 aagtgtatctt cccgcctcg gtcctccaaa tgctggatt acagggtgtga gccaccatgc 17820
 ccagcttagt tgtatttaa atgggcctgt ttgcagcatt ccctactccc cttagttac 17880
 ctggctaca acctgtctt ccatatcaag gcttctgtca cccctggccc atgtcagtgc 17940
 atttggcag cccacccagc atcatcacat catgtcccag ggaacttcct gttcctctct 18000
 tccagctatt tcctccctg gcgttgcgtt tagtctctac ctttgcgtt cttgttgcgtt 18060
 cagacccctt gctctctgt tacagccctt gtgtgcgtt atccctcgcc tcagttgtt 18120

tctcttagttt gggtttctc ctttatttcag attccagct gtttctcc tccccccacc 18180
gcagccctct cacttccctc cttatgcata tgagactgtg gtcaactact ttagatgtg 18240
ccttccact gtacttgtt ccatcttctt acctaccacc tctagccctg gagcaggctc 18300
ttccccctgtc tttgtcttcc tggggccagg ctccataagcg ctgctggaaa aaaaatcccc 18360
cagtttttagg ccccttagaaa tccagtttt aatccaaat ctgtctcccc cagcatctgg 18420
ccatcagatc taaagcttac ctgccatctt ttccacccca tttctctcac aggggaaaaag 18480
gaggcttgc tccttagatgc tgccgtcttg accccctccc atctcacctg ttcaaggcat 18540

cttgcataaa ggggttgtg actctcgagg aatggatccc aggccctccc tattatcatc 18600
ttatgtatgc cagttcaacg ttctcagctt cctccagccg agacggcccc tccagccact 18660
gtttaatact ctccctctct ggttgaaatt tttaaagtaa ataggtcaact ctgccatcg 18720
ttcatcttcc agtcactctg tgtgtttatc ttccaggaa gtgaggctct atgctaccaa 18780
ggcactgaaa taatttttt tttttccag actgagtctt gctctgtcac ccaggctgga 18840
gtgcagtgcc gcagtcgtgg ctcactgcaa cctctgcctc ccggcttcag gcgattctcc 18900
tgcggccagcc tcctgagtag ctgggattac aggtgcctgt catcacgcgt ggctaattt 18960

tgttattttt ggttagagatg gggcttcacc atgttgccca ggcttgttgg catgttgacc 19020
atgttgccca ggcttagcctc aagtgtatcca cccgtcagcc tcccaaagtgc tgagattac 19080
agggtgtgagc caccgcacct ggcctgaaat aattcttgac aagatctgct tccttgttac 19140
taatacagtg gatattttgc atccaaattt taatgcagtt cagtgtggta gacctgtatt 19200
tgcatattga atattccctt ccctgtttta ataactctat ttttccctt tcttttatat 19260
ctccctgcttc tctagctagt cctagacctt actcatcggt gtcttctctg tttgttcctc 19320
aacttgagga gttcctacag gggttaccca atctgctgtt ttcatttgc cctttgttc 19380

tttttgagcc atctcattca ctcacccagg atgttagcatc ggcccttgaa ttcaagtgtgc 19440
acacatacac tgtgcactat gggacagcc tcaaggcac tttgttccctg aaatttgtggt 19500
ggtctttgcc tctcatggag ccttgcataat gctgttccct ctgcctggaa tatcctacct 19560
tttacttaac tgattctcgat tcttcttcc agtcacattt tgtacattt tcctggaaag 19620
ctttctctga ttcccctt ccacaggtcc aagttaactg cttgtctag gtccctccat 19680
ggccctctga aggccctctt tcatagcacc atgtctgagt atactgtaat aacacgcatt 19740
gctctgttaat agcctgttta cttacacctt gcagaagtaat ctatcaagtc ttataaaaggg 19800

```
cggggctgctttgttctagtcatttgtatctcttagtacccaatatagtgttggata 19860  
tagaaaatacccaacaaggc cagtcgcagtggctcatacc tgtaatccga gcactttgg 19920  
aggctgaggtgggcggatca cttggaggta cggagtttgag accagcctgg ccaacatgg 19980
```

gaaaccctgt ctctactaaa aatacaaaaa tttagccaggc gtggtggcgg gtgcctgtag 20040
 tcccaagctac ttgggaggct gagggcaggag aatcacttga actggggagg tggaggttc 20100
 agtgagctga gatcactcca ctgcactcca gcctgggtga cagagtgaga ctccatctta 20160
 aaaaaaaaaa agactccatc taaaaaaaaa aaaaaaagaa aaaagaaaga aaataccaa 20220

taagtagttc ctgaatgaat agatgagaat gctgtttaga aggttcatga attgaaacc 20280
 gtgattgcta gggaggctt gagttgatgg tattgtgtt aaccatgtt tacccaggat 20340
 caatttagat ttacacttt gtttctcg ttccctttta tagtaattt ctgtatgtgg 20400
 tgtttcccc ccatgagatt gtataccatt tctcagcgag aactgtgtt aatgcttgtt 20460
 ggctccctca tggtgcccttg catgaaatig gacttcgtt cagtgatct gatcccagt 20520
 atgttaatgc tcgatggagc taagtcttat ctcgaagcag tccatgtctt catcagctgg 20580
 ccctgectcc atgccctgca cagaccatgc cactctggag aggtagttc cctgtggctt 20640

attagtctta tggccagtg tgctggccaa gtagagaga catcagtgtt atgagagagt 20700
 ctctctcatt caaaacttcgt aggtttgtt gctggactg accagtgtt acagggaaata 20760
 gaggcattta taaaagcca gagattttc aagttgcagg aagcaaagct cttgttagct 20820
 atgatttgt ggtgggttg gtagtccat ataaaagtaa aaactggatg acaatggag 20880
 gagcatgctt gggctccaa agttagatca ttttcctaa gtaattgtc tttaaacttt 20940
 tactggtttgc agatttgtt cttgccagaa agttatagc aaaagttctg 21000
 agcagatgac actttgcgt ctgaaaccaa atcattgtt ttgttttaa ctttttctt 21060

aatatattat ccttagttca gccctgaaga ttattctgtt atttggat ctcaacttc 21120
 ccccatctc ctggatctt tgaaatgaa tggattttat tgaatagaga aggaagat 21180
 aaacataaac ttatcaaaa acttgcgtt gactaggcaa gttggctt atagcttga 21240
 gctgatgaca tgtctattct tgtaaaaag ggattttag tgggtttg gcttctgtt 21300
 atattttttt tattttttt atcattatca ttattttga gacagatct tgctctgtc 21360
 cccaggctgg agtgcgtt ctaatctcg gtcagtgc acctccgc cccaggttca 21420
 agcgattctc gtgcctcagc ctctggatgta gctggatc caggcgggtg ccactacacc 21480

tggctaataat ttgtatTTT agtagagaca ggtttcacca tgggtttag gctggcttg 21540
 aactccgtac ctcaaggatccat ccacctgcct tggcctccaa aagtgcgttggg attacaggcc 21600
 ttatccactg tggctggctg atttttttt tttttttttt tttaggtttg tttaactgg 21660
 aactttacgt gaatgtatTTT gaatTTGAA taaaagcact taatTCACA gtgtgcgtt 21720
 aactttctgt tacttattttt aacagtaaaa ccccttgca gaaatgactt ggagcaaaaga 21780
 ttgtttttt aaaaaatgtt ttaatttggat tttttttttt tgagatggag tcttgcttg 21840

tcaccaggct ggagtatgg tggctactg cagcctcccc gcctcctagg 21900

ttcaagcgaa tctcctgcct cagcctccgt agtagctggg actacaggca catgccacca 21960
 tgcccagcta attttgtat ttttagtaga gacagggtt caccatgtt gtcaggatgg 22020
 tcttgatctc ttgaccgggt gatccacccct cctcggccctc ccaaagtgtc gggattaca 22080
 ctgctggat tacaagtgtc gggattacaa gcgtgagcca ccacgcctgg ccaatttttt 22140
 tttttttttt cttttgaga cagagtttca ctctgtcacc caggctggag tgcagtgtca 22200
 cagtc当地 ctaactggcag ccttaacccct ctggctcga atgatcctcc tgcctcagcc 22260
 tcccaagtaa ctgagactac aggcatgtac cactgtgccc agctaattgt ttttttattt 22320

tttattttt gttagggacag ggtctcgcta ttttgcctag gctagctac aactttggg 22380
 ctcaagcgt cctcctgcct tgcacccca aaatgttggg attacaggga caagccactg 22440
 cacctggcca aggattgtt ttaagtgaa ctgagaccca gccttattag tggtcccaga 22500
 gcagacctgg gacctgaagg gaaccctttt cttctggtcc agcgtcttc ctctgtggg 22560
 ctactttcct ggagccttg attgcctgtc atcagagtaa ctgagttga acagagtagg 22620
 tagttctct ccagaccacc acactcacca gcttcattt tcgttcttc gtttagactg 22680
 tggttctgaa tcctcagttc tatattactga gtgttttaa acataaaaat gccttttaat 22740

gagattgaag gccagaggtg ggacagttaa ggacaaagta gaaataaaac cttcaaggcg 22800
 gggttgttgg tggagtcctt tttttgtttt tttgtttttt gagactgagt ctcgtctgt 22860
 cacccaggct ggagtgcagt ggcacaatct cagctactg caaccccgcc ctcccgagtt 22920
 caagctattt tcctgcctca gcctccttag tagctggat ttcaggctcc cgccaccatg 22980
 cccagctaat ttttgttattt ttggtagaaa cggggtttca ccatgttggc caggctggc 23040
 tcaaactctt gacctcaggt gatctgtctg cctcagccctc ccaaagtgtc gggattacag 23100
 gcgtgagcca ctgtgcctgg cagggagtct tatagaagct gtctggaca atgtggaaag 23160

tagtgagcct ttgttatttca gtatgttgg ctccactgtg ctgtctgtt ccccccgtcg 23220
 ctctctgtgt gtattgttgc ccccatccac ggccataactc ttctgtctgc ttctctt 23280
 accatccctt ccccgctagt ggtaccacgg ctaccactag caattactga catgtggat 23340
 cttagggctta ctccctata aggctgcagg gcatgtggg ttggctacgc gcatggtaac 23400
 catggtagcc ctgtgggtct ccacatgtgc gcctgtgac ctggattgg ctgcagacta 23460
 gtaataaaact gctgtttctg gtatggaaatc tgtctgttagt tgtactttt acctctgtat 23520
 ttaaggggag atctgttaacc taccaatgcc agttgaagag gatggatgtat agagatgtta 23580

acaaacagct gaaaaactaa ctacaatggc ctgcaaata gaacagcagg ttttgtgc 23640
 aaaacttgt gtccatgagt ttgtttta aatatccta tataatctgt tttaatcga 23700
 gagggcttgg gtaaaagcca tggctagtct tacatgtcat ggagtaccta gcttgtgagg 23760
 ttcacagttt atiatttaca gagtgcccc tttaatcttc ttgggtcggt ttcagcgaat 23820
 gttgctcaga tggactttt tggctgacat agagtcaaaa tggtaatcaa gcatgaaagt 23880
 acagacagtc cttAACGcac aaatgtgtca tgctgaaaa gttggaaagt tggtctctg 23940
 gagctctgat tgtattgtcc tgtagaatcc gtgttgtaa tggtggttaa atccaaatg 24000

agtccgtaga acctatataa tctgcaatat acctgcagta ttccaattaa tatgttaattc 24060
 ccccatagaa ctatgttaat gatttgtatg tatgttattt aatattatac ataataatga 24120
 ttgtatgaat aaaaaacatt ctgggctcca tgtggatgat ggggtgtgt tgggtgtctg 24180
 tctatgtgtg ggtgggtgtg tggataga tccctttcc tgcaatcctg gcaactgaaat 24240
 tggtttatac atttccaatt aagtttcatt cccatgaatt ttggagtgaca gactgggtcc 24300
 aggtatgcag ggcatacgatt agagccctga gaaataggat taggctggaa ttgctgggtt 24360
 ggagatcagt agttccagg aacactttt gggcctggct gtcttcatta tcccctttg 24420

ttttctcctg gggctgcag gtattgcct gttttgttcc tctaataatca ctttttttt 24480
 ttttctgctt ttgaccaggg ttttgcctc tggctacaa ctgaataatcc tatcagactc 24540
 tcctgattt gaaataaata tatagtttt ttgaggtgtt ctgcgaaatt tctaataatcta 24600
 aatgttgtgg cagagttatt acatactaat ttgcataatgaggttgttag aatcccgat 24660
 gactaatctt gtaaaccata cacgcatttc catctaattc tccattgtat atcatgttgc 24720
 agaaaataaac agcctctaga gtttacattt ctccttgcataatatttct tatttaatgat 24780
 tagtttcag ataagacattt ttcattggcag tacataactg tacagaggc ttccaacttg 24840

tcttgggagc tctcatctc gggagacatc acattacca ctgccccctg ccccccccc 24900
 ccagccctgga tgcactcagc ctgtacccca ttctgtctc cagccaaaca ctgctgaaat 24960
 gcaagagctt tcaattgcta gccagtgaag atgcagacta agggatttcc atgtagaagc 25020
 ccgcctttt cagctggctc gtcgagagct ggaggccct tgcttgtca catgaggctt 25080
 tttgtccctg acttgggtgc tgctgttca cttctcagca gaaagggaca cccttgc 25140
 cccccagaaa ggaagatttgc atgtaccact tccgaaaggt tcagtcggc atcactgtaa 25200
 ccaagaagat aggtcaggtg aggctggagg tggaacaggg ctgctcgcta gaactccaga 25260

ttgttccaca agtgccttct ggcagagaat gatggaagct tccgtgattt tttttctcc 25320
 ttaatagtttta tgagcacaga agaggagcag attgtctggc tatagaagct gtcttatttt 25380
 ttatTTTGT ttttgagatg gagtctttct ctcttgcctt ggctaaagtgc caatggcg 25440

atctcggtc actgcaacct ccgcctccg agttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc 25500
 tgagtagctg ggaattacag gcatgcgcca ccatgccaga ctgattttt tattagagac 25560
 agggttcac catgttggtc agtctggttt cgaactcctg acctcaagat ctgcccacct 25620
 cagccitcca aagtgttggg attacaggig tttagccactg cacccggccg aagctgtcat 25680

attaaatagc actttctgct ttagcaaat ttaatccaaa tgagacttta gattttttt 25740
 ctctgactta ccagcagttc cttgaaacac atttaattat ttttgcaga aaatcactca 25800
 agcacttacg ccattttttt accgtgaaaa tatgctgcat tattttaaaa tatattagaa 25860
 gtcagtaacc ataagatttt atatgtttc taatgtattc tgtaagctt ctgctgctt 25920
 tggtttggaaag gtgttattttt taacgttagag gacigttta tctgcttgta agcttgattt 25980
 ttgtttttac tgaattttt ttttctttt ctgtatttagaa aatacattt agtaattata 26040
 aagtcaagtgg catgttata agttaatatt tgtatctatt ccttagttac tctaactcaa 26100

aacctaaagt aatcttcaac tctaatttac tctgacatcc agttgactgc caagtcctcc 26160
 aacttaatcc ttatcctttt ttttttaaag agatgcagtc ttgcttgc acccaggctg 26220
 gagtgcaatgtt gtcattttt aaccaat tctgggtc aaatgatcc 26280
 cccacgtcag cctctggagt agctggggct acaggcttt gctaccatgc ccagctaact 26340
 ttttattttt atttttata gagacagagt ctcactgtt ctcaggctgg ctttgaactc 26400
 ctgccttcag gcggaaactcc tgccttcagg cggtccctt gcattggctt cccaaagtgc 26460
 tggaattaca ggcccaattt tattttttt atgtatgtt gaaactctt ctttacttc 26520

cttcccaagc cttagttcag gcccttcata tctgtggct tcaaagtgc cttcagctgg 26580
 ttcaggtcct tccttcgtc tttatcttc atggaggac atgttatgtt tcaactgtcct 26640
 acttgaaaac ttccattttt cattgtatgtt ggtgttacctt ccagatttcc aacacagggt 26700
 ctgaaggcat gcctggataa aggcactccc ttgatcttgc ggccagggtcc ccgtacaccc 26760
 gcagcgcattt ctccacattt tttttttttt gatgtatgtt cttctggctt cggagccacc 26820
 caccatttcta ttacagcccc ctgccttcagg ggagcacgtt cttccctt ctttacttgc 26880
 gctgtccctt ctattgaatc ccctttttt tttttttttt tttttttttt attatgaata 26940

ctctttctc ttttgcctcc gtgaccacgt taactttgcc ctaattgcctt ttaggactcc 27000
 atctgcttag gggaaagttt ggattttggt acagaaagca agctgctaga aagaacagt 27060
 ttttagcttctt gacaggcaaa ataggatttt gcaacatgtt ttttctttt ttttagctt 27120
 cattttatataat ttttattttttt ttttattttttt tttttagctt 27180
 aatgtgaacc ctataggaac atggggattt ctttcacat ctttgcatttcc tcagtttac 27240
 atgttcagtc accctgtggt cttgtgtcgtt atatacattt agccttcctt aattaaacca 27300

tatgtactgg tccccgtccc ccaccccaa atagagagaa agaaattcct tgaatactac 27360

attgccagta tcaaaccaca ccttgatatac ctctgggaa agggaggtat cagtgaaaa 27420
 gagaaaagag gttaaatct aggcataaa atgtgtagg cttagatgt gcataattaa 27480
 ggtatgttt cctgaggta atttgattt tgtcaattt ttacctata tctaactgt 27540
 ggatttagtc accacataag atgggatacc tccataatc ctgcagaat gtttgtaaaa 27600
 ttaaataaaag ctttattgaa gactcagtc ttgagagtca tctacctacc taacagttat 27660
 tcctgaacag aagagtctta ctttcccta taaggcagtg tgatagccat ctgtatattc 27720
 atataaatttta tggcgct tacttcattt aaaaatgtat tccgtgaatg cagtgccag 27780

gcgggtgtgct gatcagaaac gtgtaccaat ggcctttt ataattataa gaggaagacc 27840
 aacctgaaac agtcacacaa atgattaatt ttaattgtgg aggagtgcgt gggaaagaaaa 27900
 ataaaagatg caatgcaagt gtttacaaag gagcttgag ctgtttgaa gtggccttg 27960
 ggcacttaag caaggcttaa agaatgtat gattagaagt ggcttagcaa ttctaaagaa 28020
 cacagggaaag gcgtgtggcc agaacattgg tccctagagc acatcgccctc ctgacatacc 28080
 atttccttaa gtaatgttt taccactata catagccct ccccttgtt taccagatt 28140
 ttttaattt taaggatgtt ttaataact tagatcctg taatttgtt aacagtctg 28200

tattccctt acttatattc cttaggattt tataaaatat ttttacatg tcccaagtct 28260
 tgattatatac ttttacctc ttgttaagaa atacttactt ttctatttt atgctatatt 28320
 tcatgtttac ttagaaaaac aaaaaaaagta aaattttct ttattctat cactgcagct 28380
 tataagcact ctaaacattt tgatctat tttgccaatc atatattttt gttaaaattt 28440
 ttgttgacat aattttagat tcctgtgcag ttgaaagaaa taatacagag ctgagcgcgg 28500
 tggctcacgc ctgtaatccc agcactttgg gaggccgagg caggcagatc atgaggtcag 28560
 gagtttgaga ccagactggc caacatggcg aaaccctgtc tctactaaaa atacaaaaat 28620

tagctgggtg tggtggcgccc cacctgtaat cccagctgt tggtgggctg aggccaggaga 28680
 atcgttgaa ctccggagggc agaggttgca gtgagccgag atggtaccat tccactccag 28740
 cctggcaac aagagcaaga ctgcatctca aaaataataa taataataat aaataaaactt 28800
 taaaaataaa acagagagat cccatgtgcg ctttgcctag ttccccatc cactgcccatt 28860
 aacatttgc agaactgcag tacagtatca caaccacaat actgacattt atacagtctg 28920
 ctcatctt tcatatttcc ccagtgttac tcgtatccac gtgtgtatgc attgtttttt 28980
 caatactttt ttattataaa gctgtttta atgtgttca attcttaggtt gttttgttct 29040

gccctaaaa agcattccct ctcctaata tatctccgtc atacccttgt atgtttctt 29100
 taaacctgtt ttaagaaaagc agctaacctgt aagagaaaatg agattgaaaaa cagaattgcc 29160
 aatctgcttg tactttataa gcctgtttagt tgtagata cggttagcc agtttatagt 29220
 taccctgggt gcigaaaggt atgctggatg atacctaacc aacagagaac cattgaatgc 29280
 cgttcaaat ggactgaagc atcagcaatg tctgaaaaag gcctgacagt aatgtacatg 29340
 tcaaataatggcc cgtaaattaa gcagagtaga gtaagtagaa gaataaacat gggaaaagtt 29400
 ccagcaacag aggaggctt gagctttgc tcttcatctt gagtgatgt tggtctcagg 29460

tggttaatagg ccatcgagct ttctccactg gctgccttc tgggaaacaa ataaccgaaa 29520
 agataactcag caccctgggtt ggtacatagg tggtagttt atttataactt cctggtttc 29580
 agtggttgtt gaattttcta aatggaaaca cagtacctt ataatcagaa aacaatcccg 29640
 agtttgatt tgagggtgtt gtaaaaaagtt aaaaaaaaaa aaacagaaaat gtgaaaagga 29700
 agttgtgtta gagtatttg agttgagaaa gcatgaaaag gacagaagag aagctggttg 29760
 tcaggttgca tgggttagct acaagcacac tgaccagaaa gtcagctgga aaaaaatgt 29820
 agaaacagga gataaaacgg ccaagggct atacaagcaa acagcaagga cctgagaaga 29880

aaaactagtt aggtgtgact gtcagagtga tgtgtacagt gtgtacctt ctgtgtaaaa 29940
 acaagcagta agaattcgct gtttacgttt gcgtgtgtt ggagaagagt gggaaagagt 30000
 aggcaactgcc agactgtgaa cactggtagt gttattgttata ttttttttttataacac 30060
 tggacatgtt atttgtataa tatgagaaga aattttataa atcattaaat cttttggcat 30120
 ttaggaacat ttgtgttttc taatagttgc ttctataacta ttatctttat tatatgcct 30180
 tcatcttcctc agtggggc ttgtgtgtt attccctttt gtgagcagtgtt gttttttttt 30240
 ctaatattca ttcttcctcc ttcttcac ctcctccag agtctgattt gaagtattcc 30300

tagctgctac ctataaaagc aataagcaag attgtttac tttcacaaa ctcgtcctgt 30360
 tctgtgcctc tgcctcgac atagctgttag tatagaggtt tttttttttt acatccctt 30420
 atcttagacc tactagtaaa tattaatgt cactctaattt tttttttttt 30480
 tttttttttt ttttttttga gaaagagttt cgctttgtt gcccaggctg gagtgcaacg 30540
 gcacgatttc ggctcacccgc aacccaccacc ttctgggttt aagcgactct cctgcctcag 30600
 ctcctctgat agtgggattt acgtcacgt gcccaccacc ctggcaattt ttgtat 30660
 agtagagaca agtttcttc catgtggcc aggctggctt caaaactcccg acctcaggtg 30720

atccacacgtc ctcagcccttc caaagtgtcg ggattccagg cgtgagccac cgcgccccagc 30780
 ctcttcctc aattttcttctt gaagctctt ctgcactaga ttcttcagga agggcttgc 30840
 ggaacaatct tctgtgaatc aacagtacat attcataata gtttgcacgc agcctattat 30900

ttaaggcca ttggctgt atataaaaat gtttggatca cattttctt cttaaggta 30960
 aatatgttat tctgttgtct tctggataa agcattgctg taaatgttt acagtctaat 31020
 tatctttgc ttataagtga cttagggttt ttgtctatg tgcccaaagg atttttccc 31080
 tccttcctc ttttttttt tttttttttt ttttaaaca gacaggatct caccctttg 31140

cccaggctt agtgcagtga ggcagtcaga gcttactgaa gtttgaact cctgggctt 31200
 aggaacaaag gatttttta accttttaat tcaaagtctc atcattttag caaccatgtc 31260
 ttgggttgg ctgtttggg ttgttctccc taaaaatcc atgtgctctt tcaatatgta 31320
 gttttaatc tttttttttt aatttcagga aaatctgaa ttagagttt cgtttttcg 31380
 tctggatcat tgcgtgggtt tccttctica ggaactcagc ctgttatgtt tatgtttagt 31440
 ctctttgcc tgcgtctgt ttcttcact tcctctact ttttaaact tcatttatta 31500
 aaaaaaaaaatt ttttttcga gacagagttt cgctttgtt gcccaggctg gagtgcaatg 31560

cggtgatctc ggctcaactgc aaccccgcc tcccagggtc aagtgattct cctgcctcag 31620
 tctcccaagt agctggattt acaggcatgc gccaccacgc ccagctaatt tttgttattt 31680
 ttagtagaga cagggtttctt ccatgttggt caggctggc ttgaactctt gacctgtga 31740
 tctggccccc tcagcctccc aaagtgctgg gattacaggc gtgagccact gtgcccagcc 31800
 ttattaaaaa tttaaaaac atacatttaa acttaacaga aaaattatga gagagaagg 31860
 ggtggtgcca ggcttttaa aacaaccaggc tcttacatga actcatagag tgataactca 31920
 ttaccatgag gacggcatca agccgttcat gaaggatctg gccccgtgac ccagacacct 31980

cctacttaggt ccattttaa cattggggat cacattcaa cgtgagattt ggagggggca 32040
 aaactacaaa ccatgtcaact cagggattgg aggagcaagt accacctata ctggactc 32100
 aggttagaaag gcaaaatatac cagaaataa gctgctaccg tccagggttc agcagaggtg 32160
 cccatcagcc tgccaagttac tcaagagtcc agcctctagg gagctaatca tcatggtgag 32220
 ctctcgagg cacagggagc tggaaagaca gtgcttgcca cccctgctt aatagttt 32280
 gcacagagag ttctgttgg tcttgattgg gtcctctgc cactggaaat gctgtggatt 32340
 atacttaggtc tctatctggc ttgtttcagg gctccatgtg aaaaccttct tggatatccta 32400

gccatccacc tgctcagttcc ctagtttgcaggaggctgt ggggagccata gattctgtt 32460
 cagatagaat gtactacatt ccgtctcagg aatgtaccac atcagaaaac agtgcgacct 32520
 gcaggagaag tagaggtgaa gaggcacatt ctccgagaa atgtttctt caacacccag 32580
 cattccctgg atatcagcag gaaattactc actgctagaa aatgccccat gaggcttctg 32640
 ttaaggaggtt caagggagag aacagagaaa gttctcaagttt gactgttggt cactggact 32700
 ttcttatgctt gtttttattt tggatgttgc gtcgtatgtc atgctatgtc tattttctca 32760

atccaaatcc actgcttca cttgggtct ttctgaccgg tttggcacac tcattcagta 32820

aatccttatg gagagccaa tgtctgcata atttgctgt gctgatgacc aagctagacc 32880
 tacgagtgtc ggccctttg agatgtacgg gacagcttt ctgtcatctc ttctggaaag 32940
 cctccagg ctggtaac agtggcaaga tgtaacag ttgtacatgt gtccatgtt 33000
 ccttctaag agcctggca aaccagaccc ggtcgaggt catcgtaga tggcgtgagc 33060
 ttccctctc cttctgacc ttttgtga tggcaagaac ctgcagatg acacaagcag 33120
 caggctctg aggttgctct agcctcagaa tggcgccc ttctccaccc tggccctcat 33180
 tgctgaggta tccttgaag caacagtgc ggaacagact agggaaagca gcttggacat 33240

agctgtatga ttattacca cccattgagg ccaaccaaag tcggcaagga gagtagcag 33300
 gtcagtggtg cctggagct tcctcttcc ttgcaccag atgtactgc tctcaatta 33360
 ctccaaatt tgctactctc gttttacta gccaacctt atgttttcc ttcttcctg 33420
 tagaatagac ttccctctg atcagtaact tctactcaac actatttgt gcccacgtgg 33480
 gaactcattt aggacaggga ccatgacatt actacctgac ccatcaacac ttggcataac 33540
 ttgaaatgca aggacaaaaa ttggctgcaa gtacaatgt gtcttactc tgaaggtat 33600
 ccttaaaact tggcttgcc atcatattgc cttaatatac cttagggatt gggtaaaacc 33660

agttacttta aaagagttt acaattctgg cttcttagt atttgtctt cttaaacaag 33720
 agcacaagat gaatgtatct tagtgaattt ttatatgggt tgcttgagt aatcttgcga 33780
 agattgattt ttagcacagt aggaagaca cattctaata gtgattttt tccccgagtt 33840
 tatgtactgc ttgtcatga aatctgact agattnatg ttcttaaagt tcttgcata 33900
 tcctgattt tgcaggctt agggaaagct ttgtttccct cttaacctaa ctttagatgtt 33960
 gtcatttcat gagcttgga ggaagagtgt atagccatt gtgtatgtc tttaaggat 34020
 attatctctg caatagttt ttataaggcc taagttattc atgtataat agtggcccg 34080

gatctgttcc tagcaatagg tatatggatt ttggcccta tataatgtt gttgtggctt 34140
 tgagatattt agcaaggccct ttaagaag gattggcat ccctcagcc tcaaaagctt 34200
 ctcaaaattt atcatatgtt attagcaag gtttactgcc tgcttcatt gtatagacaa 34260
 ttatattttt atgtattccg ttctagaag gcagatgacc aaaagatctt gcatctgtt 34320
 cccaaggctt gtgacttagag aggaagaga taagaatact ttttaaaaat cccatttac 34380
 taaaatgtt gaggaagtgg taagatatac taatttgtt agattttctt gttatgccta 34440
 ttatatgaaa taggtactctt gaacatggct tcttaattaa atatatttga taaaatacaa 34500

cttgcttccc ctggagttta gaagtcagat aactgccatg gagagctatg ctttcttgt 34560
 tttaaagatc tgcttatgaa catgataaac aggaacaatt taatgtttc aatatttct 34620
 tgtatttac tgcaagttta tacacaacat aaatatgggg gaagggggaa atgttatac 34680
 cagagccatc ctgcccatc ttcccttaca gaaggacaaa ggagcagtat ttattitaac 34740
 tacaaaaata ctattgttagg tttaaaaat tcgatattt ttgatatctt gtgtcctct 34800
 tgaccttaa ttgctaaat agtgcaaag aatgaaggta acctgcatca tcttctaaa 34860
 aaccaactct atctaattat aatagttgt ctatctctga aaaatagtga tgtgttcatt 34920

ctgaaatcag aactaccgga tgcagctgca ttttgttact atttgaattt cgggagaggg 34980
 aggaggatgc agccttcga gctgctgaaa tacacaaca caaagaagac accaagcata 35040
 gtagaactgt gttaaagctga ccaagccaga agaagcacct attctcagca tagtatgaga 35100
 cgtaaaggca atataatggg catagttcaa gatggtagaa ggaaaataga ctctgatgg 35160
 ttaatgttaa atgcttttt taaaaaaatgt gtattccaat atcgaagaag aagactttct 35220
 acttttagaa gcaataaagg aaattgcaga ggaaagggtc aataggttgg aatacataaa 35280
 aattaaaaac tttaaactt tttttttt agacagagtc tcactctgac acccaggctg 35340

gagtgcaatg gtgcaatctc ggctcgctac aacctccgct tcctgagttc aagcaattct 35400
 cctgcctcag cctcccgagt agctgggatt acaggcatgg gccaccactc ctggctaata 35460
 tttgtattt tagtagagac agggtttac catgttgtcc aggctgatct caaactctg 35520
 acctcgtgat ccgcctgcct cggcctccca aagtgtggg attacaggca tgagccaccg 35580
 cgcctggact aaattgttc agtattaatt tttttaaaa caagatctt ctgtgcccc 35640
 ggctgaagta cagtggccca atcatggcta actgcgcct tgacttctgg gcctcaagg 35700
 atcctccac ctcaagctcc cgagtagctg ggaccacaga catgtaccac cacacccagc 35760

tactgtttt attttattt ttgttagagat gaggtttcac catgttgccc aggctggct 35820
 cgaactcctg ggcccaagca atcctcctcc ctggccctcc caaagtgcgt gtattacagg 35880
 tgtaagccat tgccgcctgc ctgatTTTaaatgtgcaa acagataagt tggaaaatgt 35940
 atttccaata aagataaaga gttgatggtt taaaatacg taaagagctt atatgaatga 36000
 gaaaaacact aacattccaa aagattagaa ggcaaaggac agaaagaaac aaatcactat 36060
 gtctgggaag ggacatgaag gagcaggttc ccactggcc agcggggctc aaacccactg 36120
 gggacgtccg agagactgca agggccatgc cttcacatg ccgtacctga gaagcaagga 36180

gctgggtat ttatctctt cacactttgg gaggctgagg tggcggtac acctgagg 36240
 aggagttcga gactagcctg gccaacacag tggaaaccccg tctctactaa aactagaat 36300
 aattagctgg gtgtggtggc acacacctgt aatcccagct acttggagg ctgaggcatg 36360

agaattgctt gagcccagga ggttagggct gcagttagca taaattgcac cactgcactc 36420
 cagcctgggt gaaactctgt ctcaaaaagt aataataatc atgataaata aaataaacatt 36480
 agattgttag cagaagtagc cacaggttc tcccacctct ctgcaagttt ctgagtgta 36540
 ttcccatcaa gaggtaaat gtcttttat ttttattttt ttttattttt ttatattgcc 36600

tatgttgtct aggctggttc caaactcctg agctcaagtg atccttctac gtcagcccc 36660
 caaagtgttg ggattacagg catcagccac tgcacctggc ccagataactt tttcttgagt 36720
 aggaatttcg agtcaccctg aacattgcat gccttcgtag tgggaagac aataggaac 36780
 cacaggctgt aggctaaaat ggggtgtt tcttgcatacg tcatgacaag gcataaccca 36840
 tcttggcata gtaaatagta agcactcact gaactgatga tttaaatct ttgcgttta 36900
 ttcagcaata tcctaaatattt ggcctatgtt agtggagttt catctccctc atggattagt 36960
 ctgaaaaaga tgagaaatct gtatgttagac caagttatcc ttaaactgtct cataatgtat 37020

gatgcacgtg gtttacgtg tacagcctgg taccattttt cttaggcaca tttcagtgcc 37080
 agaactctta atacccagga agaagcaaaa agaaagatgg aggtgcagct agaggttgt 37140
 gccttgaac gattcattct gccttaataa gagtggtctg gctgagctcg gtggctaca 37200
 cctgtaatcc cagcactttg ggaggccaag gcaggcagat cgcttgagcc caggagtca 37260
 agaccagccc aggccgcata gcgagacccc ccctcccccc gtctctacaa aaaaatagaa 37320
 acaatgagcc aggcattgtt gAACGTAGTG CGTGGTCCT GTAGTCTCAG CTACCCAGTT 37380
 ggctgaggtg ggaggatcac ctgagcccta gaagtcgagg cttagtgag cccttattgt 37440

gccactgcac tccactctag gtgacagagc gagacaggc ctgtctcgaa aagaaagaag 37500
 aagaattaaa aaaagtgtt agatccctt tggttggac acttggcgc agcaggatg 37560
 gtagcgttta tgagggttgc atgtaacatc gcctagctca gacatctttt tgactgtctt 37620
 ccccccgttgc ggcaggcgc tggggca ggtctttgt cttctgtt aatcttcata 37680
 tgcttagtgc ttgcacata gttgtgttc agtcgtatattt tggatgaaattt gaagggatta 37740
 atgcattgttgc tctgaacattt gcttctttaa tgcataatggg gagttctttt gaaagccaca 37800
 cagaggagct tggttgcctt ctccctctt tcccccaggattt gtctttttt tgggtggct 37860

tcactgaagc actctactt caaataattt tggcattgg tctatattttt ttctttgttc 37920
 ctttttcattt cttaaccctt agatggatg tagaaaagta cactacatct agaaagtact 37980
 ttataaaactt atttgggttga taataataca tatgcctttt cttggctt ggttagcagaa 38040
 tcttggcca ctcttggat acaaacgaaa ttcttaacca aagccagttt cattttgtatg 38100
 ttcttattttt ctcccatca cactccaaat tggccacaa agtacatcc tagtttgg 38160
 aggtgggttcc tccatacttc aggtaggat tatcatgtgg attcctatga taccttc 38220

cctgggacca tggagggcag cagctggta ttgatagtct gattcccggt gagaaagct 38280

gtgagccttc cactgcaga tgtctgccaa ctacatgtgt ctttagtcaa ctgtaccact 38340
 gtcctccggc aaacagcaga agcccaggc ctgaagttct taagctgtca ttatggaaag 38400
 cagaaggtaa acaaaacaga agtggaaagta gatctaattt tttagactgt tctttacag 38460
 gaatggttt gtgggtctca gcatttaaaa aaaaatagt gttccaatat gtttattga 38520
 catcaattac tgaagtctg attcatttc tgcctattga ttctaccca aggtgaaatt 38580
 catgacattt aacagaaagc ataagtgatt tttaaaaagc agacactatt agggacggta 38640
 aaaataagat ttaaagtccg gacacttcaa aaagcaattt ttatacctt ggtaacgatt 38700

ctattctgat tcttgata aataatataa acaaaggctc tagaagctta ctataatgaa 38760
 gttgggtgc tggtaaaa ttctggttt aggccaaat tcattttatc tgcatthaact 38820
 ttttttttt tgagagtctc gctctgtcac ccaggctaga gtcaatggg atgatctcg 38880
 ctcaactgcaa cctctgcctc ccgggttcaa gcgattctcc tgcctcagcc tcccgagtag 38940
 ctgggattat aggtgtgcgc caccacgccc ggctaatttt tggattttta gtagagacgg 39000
 ggtttcaacta tgctggtcag gctggctca aactcctgac cttgtatcc gcctgcctcg 39060
 gcctccaaa gtgtggat tacaggcgtg agccactgca cccggccgtg taaaatttt 39120

tcaagtggtag accactatgt caaatgttg ctttactga caacagtatt ttctaaaga 39180
 taggatacc cattctaga tgaatctcat tctagctgga aaataatttt tcagttctga 39240
 aactacatca ggcctcaggg aatcaaaact agctattagc cacacacata taaagtggct 39300
 ttgccttata aacgatttag ggtcaccatc aatgacaatg gtccctttt attgtatTTT 39360
 taagagtttca ttatctaaa tggctgcata actgttagat tttaaaaaaa ttaagtaaat 39420
 gaccatgtta atgcttattt aagcttccaa acaatattgt aatttacttt gaagatTTT 39480
 ttttattctc aacatcctgc agcttgaccg ttgcctccg tgtctcagtg ctgcttattt 39540

tgaggtgtgg actggagtc atctgtcccc ctgcctctg aactgctccg ttttgtgttt 39600
 cgtaattctt catgtgcatt cctggcgca ttctctgtta gtagcttca atttgcatt 39660
 gcttgactg ggcttagtct agcgtttac ctatcttta aggtttttt aaaaattttc 39720
 atgattatttcc attatttcc aggatttctc atttcttag tcacatctcc ttgttctgg 39780
 ttacttctt cctgtttta ttcataacat ctttttata cacgatcc tcatgtattt 39840
 ctaatcttaa gtatattaa ttgcttattt gattttttt tttttttt gagacagggt 39900
 cttactctgc caccaggccg gagtgcagtg acatagtcatt agtcactgc agcctcaact 39960

acttggactc aagcgaccc cccacctcg cctcccagg agcttagaat acagggtgta 40020
 gagccgccac acccagctga ttgtcttac tatgttgccc aggctggct tgaattcctg 40080
 ggctcatgtg atctgccctt ctggcctcc tgaagtgcgt agattatagg tgtgaaccac 40140
 tgcacctggc caagtatgtt tatttattia ttctaatttg agagggagtc tcgctctg 40200
 gtgcccaggc tgttagtgcag tggcacaatc ccagctca gcaacctctg cctctgggt 40260
 tcatgcgatt ctctgcctc agcctcctga gtacctgggg ttacagttgc gtgcaccac 40320
 acctagctaa ttttgtgtt ttttagtacag gcggggttt accctgttgg ccaggctggt 40380

cttgaacttg tgacctgaag tgatccgccc gccttggcct cccaaagtgc tgggattaca 40440
 gcatgagcc accacgcttg gcccaagtat gtttatttt aaagtcccc acaagctata 40500
 caataaattg catatggaat ggattttgt tctagttgat ttgttggtt tcattttag 40560
 aactaactag ttgtttctg tggatac ctgtttcta ggtcatttg agttggagc 40620
 cttttttt gtttttattc tcatgctgtt ttgagccctt gctgtgcctt tatggtttc 40680
 tctaaatttta attgaccatt gtttatatt tggagcagt ggtgtacatc agagtgtgaa 40740
 agcagccccca ccctctccac cagaaggctt ccatgccagt ttcacgaagc attttcatg 40800

ccctcattcc tgcccttatac ctttgatttg tggggagttt gtaaaggcgt tgattgtttt 40860
 ttttccacgt agtttccaa gtgcacataa ttgttctgtt agtgacttgt agctccatta 40920
 tctattaacc ttgccccaga ccactgtaca agcggaccca acgtttctc cagctgtggc 40980
 agggacagtt acttggatc ctgctgcctt ttcaatgcgt accagtttg ccccttcctc 41040
 ccctcaaccc ctgtcttca ttcaactatc accaaaccaa aagattctgg tttgtttttt 41100
 agtatgtgtt ctatttgcgt acatagtcattttt aaacaaaac agacttggta 41160
 ctgatttagct taatttaag ctttttttt attattaaac agttagttt atcttagcat 41220

ttcatattaa gtatatgatt tatttcatat tgcttatatg aatgtacaca taaatataat 41280
 aaaaatattt tcctaagggtt ttgttagtaa attatatgtt ttcattaact ttcatatata 41340
 gcattgtttt tgacctggaa gacattgaac ctctgtatgtt ttgttatattc ctggaggat 41400
 actttgttac atagaaatattt tctcattat aatgagatttt gtgattaaca aaatttttc 41460
 aacatgcattt acatttgaaga tctggtttctt aaaattttt gctagttacc ccacccccc 41520
 ttctatataat atctccctat tcagcgacta ctgcaagagt tccagggaaat gtacactgt 41580
 tgttcactta ctgcatttttta aatcattgcc ttactatattt ttctgcattt ccctcaatc 41640

tagctctgtc tgtacatttc tgaaagccag tagcttcctt gaagaaccag gtaacaaccc 41700
 gaacaatcaa attagataac cattttaga atggaggatc cgggagatct tagaagatgt 41760
 gatgggtgct aaggactttt gtagttccctt gaagttccag tgagtaaaag gtacccttgg 41820

aatttttat tccttcagac tttaaaaca gagatcaactt tcaaaaatta ctcttcgtc 41880
 tttgaatcca tggttagta actatggta cactgttgg tcagaaggct gtgtgggtca 41940
 actgcaaata aataaaataa atgtgattc agtaattcc atttgtaac aagtaattga 42000
 gaaaatagga ttggatcaga tatttgctta tacacattcc ctttcaggag cacttcgtt 42060

ctataaagaa tgggtata ttgttaagga cactcaagc ttgggaacc tttgaagtat 42120
 ccattgattc agttaacaaa attatgttga gtgcctaccc tggcctggg cctgtgttag 42180
 gaggggacac taagatgaga gtccaaagca cttctctca gactcctggc tgctaatggg 42240
 ttgcgcctc tacttcttca cttagcagat agcttaaaa ttagtaatgc attttaccat 42300
 ggagccccgt aagacatc acccagttt ggaccgagga gaagggtgtt aaaccagat 42360
 tgtgtatgtt cacttgcgtt agtgcattt ataaacatgg aaatattcc gcaaggataa 42420
 actgctttt atgcgttgtt gtttcagga gaaatagaaa tctctaataa aatattgcca 42480

gccttcacc caagtttgcattttgccta attgagtttggaggtgtct gaataatgg 42540
 taatgagctt tcctgaataa atataaaaat taattaactc caggctctaa ttcattctgt 42600
 taccagagtt ttgttaagcat gttaccctt tttgttcatt gggagatcat ctgttacctt 42660
 cttaaatgag tgggaaagga tggaaatga ggaagagcta taaaaactat tcaggtgaag 42720
 aaggttctg cccctccttgc cccctttaa aatctccagc tcagcagatg ctgtttaa 42780
 acttgcatttca gtgcgtgttgc atcttccttag cctagctaaa tcataactttt ggaaggactt 42840
 gctttttctt ctcatgacaa tggtttacca cagaaatgtt tcagatcaactt ttgtgtgcct 42900

gatgcctatg taaaatgata cagtggaaatg gaaaccattt acctgttgc ttgggcaca 42960
 cccaaagcctg cttcaggagc acatgtatcg gcgtgcactc tgggagagcc gtacacattt 43020
 gacatctatg atgtgtggcg ttttattctta tcacattttt gaaatctaca ctaagagaaa 43080
 ggaggctttt aaaaaaccac tgaggtgtgg actgggggaa ggagagatcc gtaaagaacc 43140
 tgggttttac ctgttgcatac tatttccat tggtaaaattt tctaattttt tttgtgtccag 43200
 ccctgaaatgc ctgaggcaca cactgaatgc ctccgtacat ctttagtgc tttgttgcagg 43260
 ggactttctt gggaaatctgtt ttcattggca gtttatttcccttttgc ttggctcattt 43320

agtttaccca gcagtcatct taatcggttt taaaggctt tatttttattt tggtttctt 43380
 gtggaaattt tacacattca gtagatttgc agtagttattt taatcttgg ttagcataat 43440
 aaaagatctt cttagggacat ttttgcttgc cagtggaaagg ctgtttaat gtgttcattt 43500
 gtcattgtatc tgcttttctt atagctgttgc gaaacgttgc tccctgttgc tacagttgtt 43560
 gaatacagaa atctcggtttt gctgttgcgg tacggtagtgc tacttactttt cttccaaacc 43620
 attaatgtta tagttacctt taattgcgtt ggtcctatca cccctcaattt ttaagactct 43680

aagcctggca ttttatctta caaaatgaaa tataaagact tgtactcaga gtatgttgt 43740

gttttccata taccattcta aagttagagaa agatgaggga ttgcgccagaa actgattct 43800
 aataaaattt ccagaaactg accccttctc acctttctg ttactgtcac tgtggttca 43860
 gccacagcat ccttgctgc attgttacct tagttccctg actgtatcct tccttacacc 43920
 attgatecct gcaatcccattt ctgcgcgttag cagccagaag ggatccactt actgctgtga 43980
 tcagaaatcc tcagccaggt gcagtggttc atgcctgtaa tctcagcact atgggaggct 44040
 gagactggag aattatttga gcccaggagt ttgagaccag cctcaaactg ggtaatataa 44100
 tgagacctca tctctacaaa cagaaaaaaa aaaattttt tttttttt aactagccag 44160

gtatagtgt aataaacctg ttctgggatc cagcatgctc tccctgaccc gcaacttcat 44220
 ctccaccact ttgccctca ctccccaccac aatggcttc ttctcttc cagacatgcc 44280
 gtgcgtctc ctacctggaa tattccctc caaacattcc catggctcac tccctcacct 44340
 tcatcagatc tctgttccag tgcactttt actggaaggt cttttgtac catcctactt 44400
 attataaaaa aataatctgc ccaaccttct ccttttattt cctctacttg attttcaat 44460
 ttagtactta tcagctgaca tatattttgt ctctctgtct ctctctgtct ctcatagaag 44520
 gtaaattctta taaaggaagg aattttatg tttggttctt tgctgtagct ccaatattca 44580

aaacagtgcc tgacacacag taggccctt atattgtt aataaatgtt gacactctga 44640
 tatctaattt ttgtctgggt actaatacga aaactataga gtgataataa aagcattacc 44700
 ttagtagact gggaaaggat gagcgctagg atgaacttgc tgcctggcga tcttgctgaa 44760
 ttttaggaggc agattgggt tcaaaggagg ctgaaatggc taggatttgc agagcagggt 44820
 actaaggatg agcaggctat gacagaaaga actccagaaa tctgcaaagg gatcacctt 44880
 agtctggctg gatacagtgt acactttgtt ggggtctct tcatgagctt ggataaagaa 44940
 caactgttgg ggagtggata attcccagca ctcattcaag ctgcattcgcc ccagaacgga 45000

gagagacaga cctctgtat acgtaggata tttggtagaa acattcaacc gaaaaccatc 45060
 agatatgcaa aaagtaataa taataagtta acaatgtat gcatagctg aagaaaaatc 45120
 agacattaga agcaagccca gaaatgacag atgataaattt agcagataag gacattaaaa 45180
 cagtttattt aaataactta gcagatTTT agaaaaacaa cataatgagg ataatggaag 45240
 aaaaacaacc gaataccatt tctaaagaag aaaaatcaa tatctgaaat gagaatttag 45300
 ctggatagga ttaatagttt aggcaactgca gaagaaaaaa acagcatcta tatgagaata 45360
 tacccaagg aagtacagag agaaaaaaa tgtggattgg ggggtgcctc agtgacatata 45420

ggaacaatat taaaacaagtc tgccccc当地 atacttgaag gaataagggtt caagttttt 45480
 ccaggtttaa tgaaaactat aagcctacag attcaagcat ttcaacaaac cttagcaaa 45540
 ataaacaaaa ccacagttagg cctggcacac tgtctcatgc ctgcaatccc agcacttgg 45600
 gagccigagt caggaggatt gctttagatc tgcttggca acatagccag accctgtctc 45660
 tacaaaaat aaaatgaaat aaattagctg gatgtggagg tccacacctg taactctagc 45720
 tagcctggag gctaagaagg gaggattgcc tgagccagt agtcaaggc tggagtgagc 45780
 taggactgca tcactgcact ccagcctagg caacagcaag accacatctc tctctctc 45840

tctctctc tctcaaagg cagtgaataa acgacttatt tggggaaaaa ataaaggcag 45900
 agaatttgtt gccagcagac tagcataaaa aaaaggaaatg cttgaaaca gaagagaat 45960
 gataaaagat gggaaatttg atatatacta aagaatgagg attgctaaaa gtgacataca 46020
 tagataataa tgaatataat ttttatataa aaatttattt aaagcaaaaa taaaaataca 46080
 tcatattt aacatagaaa taaaaatgt atgataatag cataaaggat aagtggacaa 46140
 atgcgttgtt cgtattttg gtaaatgca ctattattt aaagtagacc atcgtaatt 46200
 cgatgcataa tgtaaaccaa atagaacact aaaaaatgaa aataaagaga tatggctaat 46260

gtgccaatgg tggagataag atagatgca aaaaagaaaa acattcaaaa gaaggcagag 46320
 acagaggaaa aaaggaccaa agatcaaattt agtcaaattt aaagcagcta aacttagcaat 46380
 atggcagatt taaatctagc catgtcaata gttatattaa atgtaatgt tctaaatacc 46440
 tgaattaaag gatgaagatt gtcagattt attgaaaaag catgacccaa ctacatgctg 46500
 tctgtaaagaa attaaaaaaa gaacaaattt aatccaaatg aagaagaaag gaaatagagt 46560
 agaagtttagt gaagtataaa acaaagagca aagaaaatca attaaatgaa aagctggttc 46620
 tttgtaaaga tcagtaaaat tgataaattt ctgtaaac tggccaagaa aaaagaaaag 46680

acatacaaat taacagtatc aggaagaaaa acagagaatt caaaggagtg taatgcaac 46740
 tttatgttag taaatgcaat aagtttagatg gtatggaaaa aaatgtgaac aatacaaaagc 46800
 agactgtgtt tgccttgggtt ggcagtagcg ggggtggagt ggaagggttga attgactgga 46860
 accagaagca caagtgaact tttggggtg atggaaatgt tttgtatctt ggtgcattt 46920
 atagttaaat ggtttagac attgcttaaa actcactgaa cacttaagt ggtatgttt 46980
 attattttaa aaatataacct caaaagcagt tttaaaaatg tattcaagta catacttaag 47040
 atcttgcattt tactctga gtataccctt attttttttaaaaatg tttttttttaaaaatg 47100

tgttagataacc ttttattttc ccaatgtctt tattaaatga catctccacg ttttgcttct 47160
 tacctctatt tttttttttt tatttctctg tctctcaggc atgcacacac acacacaaaa 47220
 aaaagtacat atgcataatc cttttggctg aataaaatca gttgcaactg ttatttcggc 47280

ccttatttgc tccggtaaa tattcgtag ctgagtggtt tatctgtatc agatatttct 47340
tatcatcttca tccagtcaca ccagctggac tgaccagatt gttttcact tcaaggcag 47400
aatttgtact cactgctgaa tgcttccaaa tgatacgtag aataacaat ttaagactta 47460
gattttact tttcaggc ttttttttt ttctgtgt gtatagcatt tccctgaaag 47520

cttaatctca tctgttaagtg atgcagtgga tgtgttacta ttggattaaat ttatTTTactc 47580
tttaggttaggt ttgttaatctg tcatacatgct gttttttttt tgtgtgggtt tgTTTTgggt 47640
tttgagacag ggtctcactc tgctgccag gctggagagg ctagagtgcA gtgtatgttt 47700
tatgggtcac tgcagattca atctccTggg ctcaagtgtat cttccTgcct caaccCttg 47760
tgttagatgga agcacaggtg cacgccacca caccggctt ttttttaaa tgtattgttag 47820
agacgaggca tcattttttt gcccaaggct gatcttgaac tcctgggctc aaacaatcct 47880
ccccacttcgg ctcccaaagt gctgggatta cagatgtgaa ccaccactcg agctccatca 47940

ttctgttatt agttgtctc tagtatgagt caaaaactct tacctgccct tttacagttt 48000
tataaataag taaggcagaat agcagaatgt ggacatttt taaatccaaa ttgaatatgc 48060
acatgactca aggagtcaaa tagtaccgta atcggtttat gataaaatcc agtggtttgg 48120
ctgggtgtcg tggctcacac ttgtaatccc agcaccttgg gaggctgagg caggtggatc 48180
acctgaagtc aggagtttga gaccagtctg acctacatgg taaaaactact aaaataaaaa 48240
attagctggg catgggttgtc catgcctgtatcccgacta cttgggaggc tgagggcagga 48300
gaattgcttc aacccggggag gcagagggttg tggtgagccg atatgcatt atttcagaac 48360

aatttccac aagatcagtg agtgcgtcc aatagacata taatacaacc cacatacatg 48420
actttacatt ttcttgtagc catagtagaa aaggtaaaaa gaagcagatg aaattaatag 48480
cctggcaac aagagcaaaa ccccatctt taaaaataa aataaaatat ggtggttgc 48540
tgtccccacc tcagaccatt tctctggct ttctcattga ccaccactcc caatcttgt 48600
tctgctgatt gattacagct tgtatatac tccatattc taagcaaaa gtttatctt 48660
tttaaattta taaattctt ttattattt tcagagacag ggtcttaact ctgtcgcca 48720
ggctggagta cagtggcacc atcgttagctc actgttagct cgaactctg ggctcaagca 48780

gttttcctgc ctccgcctc caggttagctg agactacgct acaggcacat accaccatgc 48840
ccagctcaaa atgtttatct tttgatacat tattcgagac cattattaag gtggatgatt 48900
tagtttctt aaacagccat ccccttctt ttccctccct ctgcttcacc gccccattt 48960
tcccaatgtt ttacctttg gttaatcag tactcattgt ttacattatt tgcccttgca 49020
catagtcaca gatagtattg tactgtactg tactgtgtt ctttttaaa cattatttct 49080
gttgttaata attgacttt taatttttt cctatttgt ttttaaaga gatgggtct 49140

tactatattg cccaggctag agttcagtgg ctcttcgcgg gcatgatccc actgctgatc 49200

agtacaggaa ttcccacctg ctccattcc aacctggacc agttcacccc ttcttaggca 49260
 acctgggtt cccccattcc cgggaggta gcatattgtat gccaactta gtggcacac 49320
 ccgatcgca taacgcattgc agccaggac tcctggcctc aagcagtctt cccgggctca 49380
 agcagtcctc ccacctaagc ctccgcgtta gctgagacta cagacacttg ccaccacacc 49440
 aggttaattt ttgtgtttt tgttagaggtg gggtttgcc atgttgtcca gactcatctc 49500
 aaaccttca gctcaagtga gcctcctgcc tcagttccc aagtagctgg gattatagac 49560
 gcatgccacc acacccatg ataattgcct ttttttaa ttgcataat tttcttgta 49620

gctttgcta atttccat atcttcttat agccttacag aatgatttc cacaagatca 49680
 gtgagtgctg tccagtagac atataataca acccacatac atgattttac cttttttgt 49740
 agccatagta aaaaaggtca aaagaagcag atgaaattaa tagtatctt tacttaaccc 49800
 agttcattca aaatgttatt tcaataatg gtcaatattt aaaatacttg agatatttg 49860
 ctttattta ttctttgt tactaagtct tcaaatcca atgtgttatt tacacttaca 49920
 gaacatctt ttttagactg gccacatgtta gctcagggtt actgtattgg acagagtggt 49980
 ttcagttca agttttctt tggagacatc ctactgaaa ttccattct ccatgtatct 50040

gggtgggtgg tctatagact tgccactcac agctgtcatc ttgagacttt ctttgcttt 50100
 cttcttattt ggttatttcag ttccctggat ttcaaggctt ctcattttcc tctagtagtt 50160
 ttgttaggtc atgggtggta tggcatggtt gggatagcgt gttcacacag ctatctcg 50220
 agtcataactc ctccaatcca gcctgctcg ttccctgtc tgcattgttgc ttgtcaccc 50280
 gctatcttc ctcctcaggat ttgcagaaat ttcccttgc ttcactcttgc tcttcctct 50340
 cccatcccc atgtatccat tatcttctt tttcttggtt tatttcatca ctcaggtgaa 50400
 aaagatgctc cagtggatta ctggggaaaag ggggagcatg gatgataaag gtattgagac 50460

cttacacgatc aggaaatttt tttttttt ttttttgag acggagttt gctttgtcc 50520
 aggttggagt gcagtggcgc caactcggt cactgcaacc tccacccctt ggggtcaagt 50580
 gattctctg ctcctcaggatctc ctgagtagct gggattacag gtggccgcac ccaccccac 50640
 ctaatttttt gtattttaa tagagacgag gtttactgt gttggccagg ctggcttgc 50700
 actcctactt caggcaatcc acccacctcg gaatgtttt attgtccctt ctcatttcat 50760
 gactgctggg cttaggtatag aattcccgaa tcattgttct tagaatctcg aaggcattgc 50820
 ttcattgctg gccagtttc agtgttcttgc caaagtctga agctgtgcta atcacctcat 50880

ccttgaaag tgaactgtt tttttccca gaaacttaca gaacattctc tttgtccgca 50940
 gaattctggg attcaatta ctgtgccta gaatgggtct gtttttatca ttatgaagag 51000
 tactggatgg gtcgggaggt tttcttgaat tacttcttga tggtttctt ccttgttattt 51060
 ttttgitgc taatttcta ttttttttc ttggtttact tcttggca ggggatttc 51120
 ttctacttat atttgattct tcagttgagc ttgtcatttt tgctatctg ttttaagtt 51180
 tcgagagaca tcttgaaaa atataacatt ctgttcttaa tacatagatg caagatctt 51240
 tcttctgag tatattaata tgtatggaa atcttctat tctctgcagt ttgtttcccc 51300

caagggtttt ttttttttc tggttttgt ttttgggtt tatgttagag acttccgt 51360
 tataatctggt catcagtggt acctgcattt ggtggagagt aggggcttat tggagatga 51420
 gaaccctgag caggtgtaag gaggcgtca acactgcgtt ggcctcaggc cctctaggga 51480
 ggctgccagt tgcatttctt gaggataacct ttgggtgtc cttttgtct ggtcagatta 51540
 tcttagagatg ctctgcctcc tacctggagg agaagggtct agctgccagc ggtgtgagtg 51600
 tctttgggg aaaaggactc gagttctgg tggttgctt gtgtatggcc gcttaccca 51660
 ttttgggtgg agcgtcaca tcttccactg tgccaaacagt ctgcgtgcag ttcataagacc 51720

ttctgggta cattttcca gaaagtatgt cttagattt ctgcagaagt ctgaggagca 51780
 tggaggagc ttggggaatg agatggcaat ccaggcttc ccagatggct ctacctttat 51840
 cccctgcagg gaatcccact cctccttctt gactgggagc acagccagag ctttgggagg 51900
 aatctggagt gaaaatctcg ggccgtctgg ctttcttact gttcacttgt aattttgctt 51960
 tctcacaact gccaaccact aatcagccctg atttccagct tccagaattt tattgtgtt 52020
 gtctgctctc ctatccccac cgtagggat gggcgtctt tttttttt ttttaatttt 52080
 ggtaaaacat acaaaacata aagtgttcca ttttagccat ttttaggtac acagttcagt 52140

ggcagtaagt acattcacgt tgcgtgttatt tttttttta gtaataaaca atataaaatt 52200
 ttttaagtaa taaaacacaa ataaaagatt gtttaatgtt attatctgg aatttttaggt 52260
 gtgtacagga gccatgggtt agtcttctgt tgaaacaggg tgataggatt tgtttaccac 52320
 ctcctaggaa agcagttgga tagttgttgc gcataaaagt acattttac tatttttaat 52380
 aatcgttagct ttatagaaat tgcagttgga actcccagc ctggcattca aggctctgt 52440
 agatctgggc tacccaccca tgcctccag ccgtctgtc cacctctac tgcccactca 52500
 ctgttccctgg catgagatgt gatctccagc ccccatgcct ttgctgtca ggggttcca 52560

gagtgaattt tccctctgt ctgtctctt gccccttcc tgcgtttcc atcttctgc 52620
 cccacatcac tgcctctac ccaaggcctg tgctcattcc tccctgggtt tccccatgg 52680
 cctggtagat acctctgaat tatcaccttgc cattttccat attgcccggc tctcttgat 52740

gtctgtttct ttgctggc ttcctcagtg tctgacggc agttaaatgt ctttattctt 52800
 tttttagga tatccgacat gaagccagtg acttccatg tagagtggcc aagtttccta 52860
 agaacaaaaa ccgaaatagg tacagagacg tcagtcctg taagtatcca cgtggccgt 52920
 accagtcgg ctttcctt gctgcaggcc ttttagtca agactccctt cgcctcaggg 52980

tttagtataa taataaatca atgttagcaga ggtttatgac gcgattgttt cctatagtaa 53040
 aggcataga gacttatagt aatagctat tttccacca ttatagaagg gctcaggttt 53100
 cagttctgg aaaattcagt gaagttcaaa gcactttct taagtttga ctgttttgt 53160
 gatgaatcat ttcctacca gctgaagcag agtatacgag gcataataaa acctttctg 53220
 gatgactcag cagcagcgtc attagggcat gagcactgtg tccgcgtta atgaagcccc 53280
 gcacaggcat tcggggtggg cactgtcgcc ccctgcgtg aatatgcaag gcagctctgt 53340
 ctggagtccc caccgcctcc accccgeca acctcatat tttctccct ctttcctgct 53400

gttagttctt cctaggattt tcaagtgtgcc tgctggctg tggcagccct gtccgccttc 53460
 tgagtgattt gctgtcagtc tgccggtagc tgaaaagtaa ataacttaac atgttagaat 53520
 ttgcataaaag taaggaaaac tggagcttag tacaggactt gaactgcgcc atctccctta 53580
 ggccacagag gccttttga ccccttcca ggtctttaga cattgtcagg cagtgagggg 53640
 tcgtagctgc cagtgtctcc atggtagcgt gctctgcag ggatgcagaa gattctccag 53700
 tcattccctcc agtgggcact tcctgcaggt cctgtgccca tggctggag tggctgt 53760
 cattttctc tggcagaagg gtttagcgtt catcctgacc tgacttatgt ggcgcggcaga 53820

ttcctgaaag gggctaaaaa atggacctag acttggtgta gaacgtgtc ctctggcct 53880
 gccaccatgg ttccctgcct ggtttgtgt gtcagctctg ccgccttaaga actgagtggc 53940
 ttcggcaag ttgttctctc tcataggat gtgtgaagat gaagcaacat aagctgctta 54000
 gcccagcgc cagtagctca cgcagacata agtgctcagt aaatgtgtc tgtgggggg 54060
 atggttgtca ccaacatctg aagtgcactt ctaggtcatc aggtgacatg attggcgc 54120
 acacatggta ctcttgattt agcacatctc agctgaggca cctcatgtat attgtttaa 54180
 aaacaaaaaa aaaaaacctt ggtgattctg ctgtgaagtc ctggccagaa acctccagac 54240

cgctgatcaa caegcaacag aaccatcacc gttcacctt ttgacatggt gccaggatac 54300
 cctggatctc tagctttgc tatagttgtc ctaatttaggg aataatcttgc tcttaatata 54360
 tccttgcata catttttaa catttcttata ctaaatgggtt ttatgaatca gttttacaga 54420
 gaaaaaaaaa cagtatttaa aatattctt caggggctgg tccaaatgtaca gtatgttta 54480
 caactatgtg atcacaacca gttacagatt tctttgtcc ttctccatcc ccactgtttt 54540
 acttgacttag ccaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agttattcca gggaaacaat tctccaactt 54600

tttcactccc aatctcaactc ctcttatctt cctccgtac tcctatcctc ctcccgta 54660

cctatcctcc tcccctactc ctatcctcca gtagaaacag tcatttgctg tgaaggttat 54720
 gggggagaat gagtcaaggt agaaggcac ctcgtgccca gtcacagtg ctgctggta 54780
 tgacacgact ccacagttac aggcaactgc tgaacgaggg gctctgtata cacctcagct 54840
 cattgactct tccccacaacc ctcttgtac ctaccattt gcaaataaaa aaaccaaggc 54900
 tctgaggta gttgttgcc cagagtacc cagtgtt gtaaccact cacataacca 54960
 accaatacca ttatgttaatt ttgaggctt ttatctctg tgatccactt aaaaattatc 55020
 caagtatctt tattgtact aagcctccat aatgagaaac agtgtccag atggtggtca 55080

gttttcaaag acatctctt ttgaaattt tctttagaac aaaaaggcccc agaccactt 55140
 tccccattca tatcccttt ggaccttaggg agaaggtaact atttataagg gatcacctga 55200
 gtttattgtc ctttgtctg tgccagaaat aaaggcccc acctgctctt attagctcta 55260
 ctaacaggat aaggaaagtg gccctcagag agctactgt tttgtgacaa acaaatagtata 55320
 caagaaaaaa aaagtggctt tttaattttt gtgacctggg gcaggacttc caaatgaaag 55380
 ttttatttcta aaaaactaaaaa ggttaattttt atatactttc agtgtttggg cttaaattct 55440
 ctttcaagtg tctttgtat atgctctgaa ttttaaaaat tttagaatcat tgaagttcat 55500

tataactgaa cttaaaaaaa aaaaaacaaa aacctcgat aaaggtaag gtatgactt 55560
 atgctgtgt gtacttaggt catttatct tcaaaccact ggatagaggt taggttgaag 55620
 ttcgatcttta aatcttacct actgttagtc attgtaccag caacagctgt agggactagg 55680
 tggaattcat ggtggggtttt gttccctttt aaagattgaa gccaccatat tttctgcct 55740
 ctaaaagttt atgtcagcca ggcattgggtg gctcacactt gtaatcccag cactttgggg 55800
 aggctgaggt gggtgatca cttgaggcca ggagttcgag accagcctgg ccaacatgg 55860
 gaaaccccat ctctactaaa aatagaaaaa ttaggtgagc atggtgccct ggcctgtaa 55920

tcccgactac tcgggaggct gaggcaggag aaacattga atccgggaga tggaggctgc 55980
 agtgagctga gaacatgcca ctgcactcca gcctgggtga cagagtgaga ctctgtactc 56040
 aaaaaaaaaaa gttatgcattc agagaacaga tccttgatg ccctcctctg ccctgaaagg 56100
 ttttggggg agagaataa gtatcacaac aagatatgac ctgagaacag atttccaga 56160
 taggacatga tccatgtttt aatatggctt actgtgttg ctcatagtg tgaagcttca 56220
 gacactctg aaaacccctt cagaaaaatcc cagtcgcccc atactgatga ctaatctcaa 56280
 ctaaaacagg gttcagcca gtgtgaatgc cactaatgcc accaactcac ctttgctttt 56340

ctgttagggtg tgcacctgta tgtacacatt cagtttcc gggattaacc tctgagttct 56400
 gttttgtct tcagttgacc atagtcggat taaactacat caagaagata atgactatat 56460
 caacgcgtat ttgataaaaa tggagaaggc ccaaaggagt tacattctt cccaggtaa 56520
 cagatigtct gaattttcta ttaatgtca atttaagagt ttagagatgc tgtagatcc 56580
 acctcaaata aaatctgcca catccttag aaggtcagga tttcagcata ccaaaaagca 56640
 gcaaggaagg gggaaaaatc atccttcaaa gttttagttt gtttataagg aacgtaatc 56700
 ttttctggga agcataagat gacattgctg gaaatgagag cttatagaaa acaacattaa 56760

aatgccagag ttgcctgtgt ggtctgttgg cagagacagc agagccatgg ctggaggagg 56820
 gtctgtacct gtgtgtcttc cagaagtatt tgcgttagag cacttgtat ggcaaatcta 56880
 agaacgttag cagtagacca ggaatctcg tccagagcca ttcagatgt ctcagcatgg 56940
 ttctcattct ttggccagaa gaaaggcatc attggatcat gtgaaacaage atgaaaaatg 57000
 acttaaaatt tctgtggct ttggcatct ttatggaaac aaaatcctga aagtggttt 57060
 ataattgagc ctcttgaaa acactcagtg gcatgtgacc aaaagggtat ctggaaaga 57120
 ggataaaaaag agtttcttt taattaatct tctcaagtct taacttgtt cctgtta 57180

ggtctaaaaa gactgggttt cttatgggtt ttttcatcat aattttgtt tctcattcca 57240
 tgtcagctt cagtcattata tggctttagg ccacaggcg atttgaaca tttgtat 57300
 tgcttaataa ttagggaaatt aaaattctgg ggaagacaga atgctctatg aagaaaggct 57360
 gctttagca aggagctagg tcagggcgcc ttcaactgag gccttcttc actgccttt 57420
 tgtcttgtcc cagttccctcc ccatttatga ctaaaatcag cccagatgt tctcgatc 57480
 tggatgcag agcatcagcc cagtcgttt cagtcctatg gggcattga gtaagtttt 57540
 ggtgcatttga tacagggcag gccttacca ggcctgagc ccctggctt cccagcacct 57600

ctgggttatt taggggaggc tgatggggga ggggggtttagt aaggcgggag atgtctggg 57660
 atgaggttga gccaaaagtgc acttcttgc gactttgtt tttggagaag tcaatttcc 57720
 tacttcttga ttccatccct tcaactctgg tatggatgtca ggaagccctt taaatacctg 57780
 ttgtcgggtt tatcatgtca agtgttgc gatgatgttcc ccatgtatcc ttgtgtact 57840
 gtcctgccta cccgcattcc tagcgcttcc ttggacatg agaagctctg tctggttgt 57900
 gaggtggcac tggggatgtt gagaaactgt ttacacatttcc tcccttgcc ctggggattt 57960
 actaaaggag tcgaggcagc ctgaccccaa agcatcaccc ctggacacta tgaccgaaac 58020

atttccccag tgcccaaacc aagaacaccc ttcccatttt ttttcagtg gtgttcatta 58080
 tgtaataata caagtctctc ttctcatttt ttaaaatgtca gaagtacaga agagcagaga 58140
 ataatgtcca agggccctc cttcacctcc cccgtgcagt gtcagctaag tgtggcgt 58200

gtccttcag atcttagggg attgtatcc ttcagaccat tctaaactgg ggtggctg 58260
 ggaggtaggg aaggcatgaa gggagtagtg gagagctgca gtgactggg tcttcatgcc 58320
 agggtgtgaga atgcaaggcc caggtggcca gccatgtgcc acgggatttc tggctgcca 58380
 gagctgttta tcgttcaact ggggagggaa gagttaaatg tggctgcit ttctccgagt 58440

cccttcagca cagggagtgc tgacttgtct tggtcaggta gtaagttcaa gatgagctca 58500
 ggaaagaaag tgagaggaca ctgaggcta gtgggtgagc caagtgtat gggacttaaa 58560
 gggagaagat taaaagaata aggagcttat gggccggga cggtggctta cgcctgtat 58620
 cccagcaccc tggaggctg aagcagggtgg atcacttggg tcaggagttc gaggccagcc 58680
 tggccaacat ggtgaaaccc cgtctctact aaaaatacag aaattagctg ggtgtggtag 58740
 tgtgcacctg taatcccagc tacttggag gctgagacag gagaatcgct tgagcccagg 58800
 aggtaggat tgcgtgagc caggattgcg cccctgtact ccagcctggg tgatggagcg 58860

agactctgcc tcaaaaaaaaaa taaaaaaaaa ataaagaggt taggtaaaaa tagatgagaa 58920
 tggaaaccat gagaagaagt gatgctggcc aaggacatga cagttctga tgtggagtg 58980
 ataggcaatg tctttccag ccactgctaa taattgagac aaaactcaagg cattcatacc 59040
 ctgtgtccag taaacatctg tgccattgc caggtgagct ggattgaaat gggccagctg 59100
 ctcagcagac accctcatgc cccagtgact ctgttccct tgggccacct cattgaccat 59160
 ttatgttct acatctcta agttgtgg gccaaggatg gaggctgtct gccgtcaggg 59220
 tcctcattgc tgatggtagg aatagttgt gatgtttcat tggatgttgc tgtattctag 59280

ggactgtgct aagtacttta tagaaatgaa catacttcat tttcacagtt ttatgaatag 59340
 ggactattat tagtcaagta agcgatgggg aaactggggc agggagcgat gaagtgactt 59400
 gcgcgaaggc acaagatgtat gtgattggaa ccaagagaag tttgtgggtt ggccacgccc 59460
 ccacactgcc tctcatctgc accaaggagt tttgtcccat agcccaaggg ctttgggac 59520
 gaatctcagt ggaggccctt agcggccctg cctgagccag aaagcagaat cggcattttt 59580
 ctgtccttgg ttggcccagc cctgaactga gatgcggaaa tcgccttgc ctgcctggta 59640
 gaaaatggag ctgcagttac tgaccaccag gcagagagag gtgggtccct gtcccagcc 59700

cagccaccac tctgcctaag ctgtggggac tgagggcgct gtcgttagct gactgcagaa 59760
 ggtgagcaca cgcgttagca ttttatgttt cagatgtcac atgttgtt attgtgtctt 59820
 tgcagggccc ttgccttaac acatgcggtc actttggaa gatgggtgtgg gagcagaaaa 59880
 gcaggggtgt cgtcatgctc aacagagtga tggagaaagg ttcgtaagt ctgcgttca 59940
 tttgtgtgt atgtgtatcat gcataaccact ccatatagtt accattttcg tccagatttt 60000
 taaatttattt ttcttgcctt tgtatttcct ttacgttagta tttttattha aaaaattaa 60060

aacagcagca tataaatgca tggtgggtgt caaccagtta atgaagtcaa taaaaggag 60120

gaggcggaag aactgcacgg acctcttcgc cccgccttc tccgtgtgg tgcgtgtggc 60180
 gctccgcaca cctgtgctgc ctgtcggtc ctcatcacag tgtggagttt tgtgtggagt 60240
 tatggagacc tgctttatc ttgaaaagca agttcttagt gcatcttcat ggtgtctgat 60300
 ttttggctg gtgagagtgt ggctacctt gcggagctgt gggagcggct gactagatga 60360
 gatttgctc cattcagttc ctagactttt gccctgccac acctcttcgg agtgagcatt 60420
 gacttcagga tggtgtcat tctaagttcc tgcaactttt caaacacccc tcgggctagc 60480
 gtgtggctgc acgggttcca ttgtgcagg ccaccactcc tcttgcattt gggcttagcc 60540

acctctcctt ctgtacttac catagttcat ttgttaccat gtttcagaa tgagtttct 60600
 caaatccaag tctcaccacg gtttccca gctgaaaacc ttgtcggt tcccttgcc 60660
 tcacaggata atacatggtg tggcttacgg aaccctgcag gtctggccct aggccccctgg 60720
 acacagacct ctaccaactt ttgaaactt agccaggaca aagtttctg ttttagttt 60780
 cttaccatgt tctctggcc gaggagtccc agtgcacccat ttcatccac ttgcaggcac 60840
 ccctggacgg ctgccccag ctcccaact gcctgcattt tccctgccc tcctcactct 60900
 gttgaaatag ctgagaatag ccgattctg ggcagccggc ctctgttta gactgtctg 60960

tgttagactgt cctgtgtaga ttgtctgtgt agactgtcct gtgttagattt tctgtgtaga 61020
 ctgtccctgtg tagactgtcc atgtaaactg tccgtgttag attgtctgtg tagactgtcc 61080
 tgttagact gtcctgtta gattgtctgt gtagactgtc tctgttagacc gtcgtgtata 61140
 gactgtctg tgttagactgt ctctgttagac cgctgttat agactgtcct gtgttagactg 61200
 tctctgtaga ccgtccctgtg tagattgtct gtgttagacca tccgtgttag accatcccat 61260
 ttagaccatc tgcctgtca ggcgcaggcc agtgttcage agggccacag gctctcgcc 61320
 ctccctgccc tcgctgtcc ccaacactgc caaccctgct gcggttcca ggaggagatg 61380

ggctgaggat cgtggagacc agcaggagcg tggggccag gagcaggaa ctgggtgtcc 61440
 ttgggccttg ccaggtccag gtcagactg gacacggctc tcaacagctgt cctgggttgc 61500
 tccggccaca gaagaaggtg agggctccag agaggccacc ttccaaaaaa aagcacagtc 61560
 atggccctag aatgtaaaaa atccaagtgt taagaaggaa cacatcaaag gaaacttcag 61620
 cagtgaaaac ttgaagcatt aaccacgaag cctctgcctc caccacacac aaagaaacgg 61680
 cttagtttac tcgcagaag tcttcctt aggacagcgc gtgtttaaaaa tcataggggt 61740
 ttggtttgggtt ttgtttggg gttgggggtt ttgggggtt tttaccctt gcctactttt 61800

taaaaaatga aagtgttat ttgcccaaca ataacagaca gggagcttgc ctaagtgttc 61860
 tggtgatgat ataatgtatc ttgtcttaga aaaaacttt ttcagtgaaa ggtggtttt 61920
 aaatttttc ttccctcctt agtagctga ttagtaaaat gtgaagttac aaatgtgaag 61980
 caaacccca cccttcacca ctatcgca atttgagta aagaaacaaa gcatcaggta 62040
 ctcacagcac acactgtttt agagggagg ggaagcctgg tggcctgtgg aagccttcag 62100
 catagctcca tctgcaggct tctgaccctc agcactactg acacttggc tggatcattg 62160
 tctgctaggg atccggcag ggagtggctg tgctggcgc tgttaggaagt ttagcagcat 62220

ctctggcctc tatccaccag atgccagtag cacccctcc ccagatgtgg cagtcagatg 62280
 tgttctgtc tagactccag actttgtcca acgtccccgt gtggccaaa ttgccccgg 62340
 ttgagaacca ccgctctaga tggattttag ggttggaaat tttaatcaa gacatttatt 62400
 cagaaattac cagatatagtt agcatttgc tcttattttt ttcttttgtt ctaagtgttt 62460
 ggcaaaacctt ctttgctgtg agcacaagg ttagctttagc aattgtgtc acattacagc 62520
 aaggagtggt gtccagcgc gtagttatgt attttagcag tggccagtgc tggatttatg 62580
 tgttccagcc tcaccaggcc ctgtgctca ttgtctccca ctcaagactg accacaaatg 62640

gcccacagat ccactgtgac aaccttccc tttgggttac tgggtggca tcgagaacat 62700
 ggctgggtgg ctggctgta gtttactgtt ataactgtgc cagcagtccc tgcttcctt 62760
 tgttaagtat cccattccac tggaggatta ctggggcgtg cagattggca tggaaagcaa 62820
 tgtatggttt gagattgtt aagtttctt gggatcaaca tttcaattt tggatcagca 62880
 ttatccctcc cagaggcgtg gctggagaa atcatgagaa gttacagtat ctttttgc 62940
 cagctaattt aattataat gatccacaca gcttggta aaaccagctt ttggggagtt 63000
 ttcatttaat gcatacttgtt cttctgattt cttcccttca ccaaatagtg taggtgctc 63060

ccttttattt ttggcaaaca tgcctgttat ctttgggac cctgggcttc ctggaaacca 63120
 gttatgcaga agatgattgt gtgtgttaga ctggggcat ccagatggct agatgtctca 63180
 ctgggtctgt ttaaggattt accttagaca ctcagtgtt ggtgcacca tggcgtaagg 63240
 gttgggattt ttgttttagaa gggggaaatgtt agcaagggtt gtttaattgg ccattgcaga 63300
 atctcacccg tatctccctc ctgaaatctt cactaaatgtt ggcgtttgtt ttcaggtgt 63360
 ttcatgcaca agacactgca ttttgtatca cagggtccat ataatttattt tttctctgt 63420
 acttagttctt ctgtgttaag aattacttac ttagttctt cttttggcga 63480

aaccaaattt cccgtcacag gtttactgtt gatgttttc atagttttc caaacaccac 63540
 ttggccactt gtttggaaat gcccacaggat ctgttttaca tctgccttca tgggtggaaac 63600
 agcaactatg agagatgcta gcatgttggc actgcccattt tccctgttca ccagcccaag 63660

ataggactca atttgaggcc tggtaagta ctgtttcta ataaaaatcc atctacttt 63720
catggccgta tatataatg taataggta actggaaatg tgatcttgc cctttaaaa 63780
attttgtgtg tttaaaaacaa aaatttcata tggaaatgac agagcatgc ttgttgctgt 63840
agacacctga gagtccttaa aaataaatat tgggttattg acacttagtt gcatgacaga 63900

attcctcaact tgtacagttt caaagtctta gtctttaccc agattacaga gggttattaa 63960
gcatttaggtt tggtttgaa agtgagtgtc tgctgtctgg aggtgagctt taagactcgt 64020
ctgccctgct tatgagatga ggaagggtgg cctttccctc ctgcatttct gttttcgct 64080
tccttctctg tctgctcaact ctgtggaatg cccaccccaag cacgggtggg gtggAACCTG 64140
tcagatcagt ctcttgttgc tgggtcttg aggcatata agatcttagtt gtttagaagtg 64200
tgggattaat tcatctttc acattttct aagttccctgc ttttagctgc cacacccact 64260
ttggctaaat gggggcttg ccatgttattt agccgcctcca tgcccaagtgg cagaattgct 64320

tcaatggtga cagattgtcc ccattcaaga gttcacttt ggcaactcat cattgatcca 64380
ggaaggtgac atggatgaaa ctggctaaga cttcagacag gcttgtgtcc agactcttga 64440
gaaagctctg ttggctctg gtctggcact gtgaagtttgc tgatgc 64500
cctgggtgttt cctaatttgt ttctcccaca ttttgcttg gtttgc 64560
tccagctcca gtagagcagg accaataggc atttgtggtt ctatattcac cctcctcacg 64620
tgcttcctgg ctccattg cccccagatg atgccacagg tccctgggcc tgctgccagt 64680
cgctctgtat ctgggcctct gctggccct tctccagatg ctcttttcag cctcttattt 64740

gcagtcactg cctaggaat cctagtcac cttcaaaacc tgcccttgac acagagctt 64800
ctctgatctc tctttctgt aaccttggt gacctgaaac attccctct tctgaattcc 64860
tgctgcatgt ccgttagcatt tcccccttag ccctccccca tagtccacct tgtcactgt 64920
gggcacagca gtgtctctg acagacagct gcccctgaag tggtccctt cacccacacc 64980
atccttgcc ccagaggagg tattgagtgg gtcatgtcac gtgaactgcc agtgtcattt 65040
gccaagagc tggacaca cgctgacatt tctttgtcg aaaatcataa gggcttgag 65100
cttccctctg tccaggcaca tggtcaggct gaccggtag ctctgccccct gctgacactgc 65160

cattttgtc cacaacagtt atccatgagc agaaacattt gtgttaactga ggcagaaaact 65220
tagttcaagt aaaatgtcac taaattcgag tcagttttg tcttagaccc taaatgaaac 65280
caaattttca taaattttct tgttttaaag aaaaatttaa ttagctacat tttaactgag 65340
aacatcagat agtgtctgag attatcaaaa tagaacatca aaagtatTT tctgaatgaa 65400
ctgaacccaa ccagaatgaa agggcaagcc ctggggagcc tgtctccaag ccttctctga 65460
aagggagatct gtatttggtg ataactgctc acgctctcca aagggcctca cctgctgtct 65520

ctcccagttt tatttttaat tgccgtgag tttctgtgc agggtaaggc acctacattc 65580

tatgccagca gcctgatcg gtcctggta atgttgaaa tggctacaca gaggagttc 65640
 aaaggctttt gtcaatctg gttcacccgtagacgggtg agaaagcgtc agagccctgc 65700
 agatccccgt tgccacgttt gaccggggag ccgatgggtt tggaagtctg agccctgtct 65760
 gcacaacctg ccccggtcg cagttcgta ccccccaccc catctcccc tgaggcaggc 65820
 atctgtgctg accatggctt ccatgttcag aaaccccccag gccttgagt tatcatgaag 65880
 cttgtggat gtgctccaag ctcctgcca tagaaaaact gccatattgc tcacaataat 65940
 tcactattat ttgttcccc agttaaaaatg cgccacaatac tggccacaaa aagaagaaaa 66000

agagatgatc ttgttggaca caaatggaa attaacattg atctctgaag atatcaagtc 66060
 atattataca gtgcgacagc tagaatttggaa aaacccatca gtgagtagat cacacacttc 66120
 agcacttcag gggctactg gttcacatgc ctcccttt atcccttgg tggatattacc 66180
 taatgtcagt gttccctggct ttgttatacc ccgagcaaga tgggtttgg gcactgtgg 66240
 gagcggagct tacttgtta cctaccaagt gcccaggag gggtggaggcc acagtgtct 66300
 ctctgacctt taacaacagt taacaccagt tcttagggaa aggagagttt cttacccaaa 66360
 agactggttc ctgttgtgc agtgcagag ggactggagc ggcagcctgc aagtccca 66420

gaagcatgct gcctctttg tggccctcg tcttcagtc tgaagagagg gaagaagggg 66480
 tatagggct cactccagtt tcatacgtag tgaaagttt ctggccagg tcttggttt 66540
 ttttgttg ggaagagttt ataacaccag ctacttgctt ggtaaaagtt ggtcttggaa 66600
 catggcaagg cattgtggca agcagcactg ccgctgaacg cgctgcctt gggcittgg 66660
 aataattccc ctggatccgt aacttgggg tggtcatgtc attctgggg acaatggagg 66720
 gagtgcgccgg cagcacctgg gggcaccagt gaagagtggc cagccaccaa cctctagaac 66780
 ctaactgggg tgaatcctg gccccacatt actagctcat cacagtgtct ccgtttcctc 66840

ttctgtcaaa ctcaaggttt gcgagggttc tgggagggtcc tatacggaa gggttagcag 66900
 ttacatggg tggtagcac gggctttatc tgaaggaaag gtggagccgt agggagacca 66960
 tgtggagtgg ggctccaggctt ctgtgtgggtt ggggaggat ctgcttcgg tttacccat 67020
 gcctccctt ctcaagtact acttttaat catcatggct cctgccattc atttcatagt 67080
 tggatgtaaac cagggtcggtt ggctcacgtc ttatccca gcacttgggg aggctgagcc 67140
 caggaggatc actcgaggcc aggagttcaaa gaccagcttggc ggcacacatag tgagaccc 67200
 gtctctacaa aaaaacaaaaa acagtttagtc agacatcggtt gtgtccctt atagtcac 67260

tactcaggag gctgaggcag gaggattgtc tgtgccggg agttcaaggc tgcagtgac 67320
tatgttgcac ccactgcact ctagcctggg tgacagagca agaccctgtc tcaaaaataa 67380
ataaataaaaa aaaatagtag aagtaagatc tagaatgttag cacaggttac caggacgtag 67440
gcaagggggtt cgggctgcct ggcttttagat gatggtagca gtgcagctga tgtgagtgtc 67500
ttctgccttc tggtggtgac cgccggggat tcaccagccc tgccatagcc ctgatggggc 67560
agagggttct gagtacggtg gatggaggtg cttctggaa gattctcagg agtaaacatgg 67620
gcagtgtgtt ggaatgtgtc agaggattta tgcatgttcc tttaaaaaga atgcttttta 67680

gcatttgcaa gcctgacatt aagagtgact tctggaaac tatttgcgtt ttgaggaaaa 67740
ctgaatttca acagagcaga agagctgtgc gcttttgct tggcagagtg aatacagcca 67800
gctcagaggt tttgatgtta ggatctgttt gctccaaacag actttgtttt taaaaggctt 67860
ttctcagccca tagctgtctg ttcttagcaca aggctggaat gagttccttg tgaaagaggt 67920
gagcaggtgt gagggagggt gtcagtgccc ggttaaccac acttcaagg attaaaggaa 67980
aacttcattt tggcatgctt gcttcttattt caatttaaa atacatttt aacggccgggc 68040
acggtgttgcata acacactgtaa tccccagcaact ttgaggggctt gaggtgggtt gttcacgagg 68100

ccaggggttc aagaccagcc tggccaagat ggtgaaaccc catctctact aaaaatacaa 68160
aaaaaaaaaa aattagccgg gcgtggtggc gggcacctgt aatcccagct actcgggagg 68220
ctgaggcaga gaattgttg aaccaggag gcggaggttg cattgagccg agatcatgcc 68280
actgcattcc agcctggcg gcagagcaag actctgtctc aaaataataa taataatttt 68340
ttaaaaatac attttaagtc ct当地tcc ccacctgcct ccacccacca aatagaagag 68400
gtatattctc ttcttaatg tcattaaagt tatatggata ccattttcta gagaggaaag 68460
aatatggaa ttgccttagt tgagtttagc aattatccta acatacacaa atttctctt 68520

gttctgtgcc aagatactgt atttaatatt taatgaacat taaatattat ttactagtgt 68580
atttaatggc tgaggcaggg ttaaatatgt attatttca tcccagcaga gttgggggag 68640
gtcctagtaa ctatgccatg agctctgtga gggtgaggtg gtgtcttgc ccccgctcc 68700
ctggcacagt gactggcaca tgattggcat agtgtggaca ttctcaagt gaaggaaggc 68760
atcatgagca gatctctggc ctgaatcctt ctgccatcag ctgtcgcca ggtggccctg 68820
gcactggccc acagggaaac tctccaggct ggtatggtc ctgtctgtgg ctgtcttccc 68880
gggccccatgt taggagactt tcacttccag agcccttcc ctctcaggcc cttgtttacc 68940

aagtgactgg ttcccat tta ctaggagctc ttaggtcatt gaagatgttgcgtactcccc 69000
ccagtgaggg ctgcctttt atcacagccg ccagaaggct caaggaagggcagagctgg 69060
aaacagacgc caggccattt gttctgttcc tctggggcag acccagccac ggaagagaca 69120

ttctggaca agggctggg tccacccatc aaacgtgt gcagcaggct ctcagcatgg 69180
 actctctgcc tccaaacatc cacccctca tcggaaaatg gatggagtg cctgcctgg 69240
 gcagctggtg ggagagcgca gcccagcac gtaggacaca ctcggttcat gggctgtgc 69300
 cgttcgatt gactgcctt tcagctgggt gttgagccac accttggagt caccagtctt 69360

tggagaccaa gtctgctact ttttctcta aagtgacaat cctctgaaac ctccagatca 69420
 tcttgaagcc cccgtctgaa agttgcccag agccagtgc tcacctgctg ttccctgttc 69480
 acttttac gggaggcctt gcagggctt atgacaagat ttatgggt gctgcccagc 69540
 atcattgtga ctcgtgagac agagagaaac cagttgtaac catgtagaca gtgaaagtga 69600
 tagggagaaa agaggtgagg ggactctica atccgaaggg aatgaagtc taagcaggcg 69660
 caccctgcag gttcagtgta aagcccaggg cctggcccca gggtgtggta ttttgtact 69720
 gggtgtgtgg accctggag aaagtctgag aatgaatgtt cctcttagag gtagagatg 69780

gaaggtgact ctgtgtgtac ttgaaattag tgattctgt acagatgatt cttttagaat 69840
 catcatgagt attttctct ttcagaccca agaaaactcga gagatcttac atttccacta 69900
 taccacatgg cctgactttg gagtcctga atcaccagcc tcattttga actttcttt 69960
 caaagtccga gagtcagggt cactcagccc ggagcacggg cccgttgtgg tgcaactgcag 70020
 tgcaggcattt ggcaggcttg gaaccttctg tctggctgtat acctgcctt tgctggtaag 70080
 gagggccctcg cgggtgcctt ggggagctcc tctacctgtct ctgctgtgat gtttttctt 70140
 aagtagaaac tgaagcgtc ctcttccaaa atacagagac tcactgtgtt agtctgttt 70200

tgcgtaacta ataaaggcgt acctgagact cggttaattt taaagaaaag aggttaact 70260
 ggctcccggt tctgcaggct gtacaagcat ggcaccagca tctgctggc tcctgggag 70320
 gcctcaggga gcttccagtc atggtggaaat gtgaagggga gcaggagcaa gagatggggg 70380
 aggtcccaaga ctcttaacca gctctttgtt gaatgcattt cctcaggagg ggcaccaagc 70440
 ctttcatgag ggacctgtcc ccctgaccca gacacctccc acccagcccc acctccaaca 70500
 cttagggatca catttcagca ttagattggg aggggacaga catctaacgg ttttattaaac 70560
 gttgccctt agaattggac ctggctgact tatatctctt ctctggctt cagatggaca 70620

agagggaaaga cccttcttcc gttgatataca agaaagtgt gtttagaaatg aggaagtttc 70680
 ggtatgggct gatccagaca gcccggcaggc tgcgttctc ctacctggct gtgatcgaag 70740
 gtgccaattt catcatgggg gactcttccg tgcaggctcag cattgcctt gtttgaatcc 70800
 aggtgtgacc atttaactt tttgtctt gaaggaggct gtcagttgtt aaagttaaaa 70860
 caccgtctgg tgcaggggaa atagctacc cttcatgttt aaaatagcta gaaagttgtc 70920
 aaaatgttca ccatgttgca ctttgcctt ttgaagtgtt cacatagaga gcatgtttag 70980

gaagacgaga ctttatttc aaaagattc atcttccaag tacatggctg cagccctgag 71040

aggccgagag cccctcgcca agccgtcacc tctgctcatg caaaggatt tcctgacaaa 71100
 ccagccgaag tgaacactaa taggacttcc tcttgcgtct cttcaagga tcagtggaaag 71160
 gagcttccc acgaggacct ggagccccca cccgagcata tccccccacc tccccggcca 71220
 cccaaacgaa tcctggagcc acacaatggg aaatgcaggg agttctccc aaatcaccag 71280
 tgggtgaagg aagagaccca ggaggataaa gactgccccca tcaaggaaga aaaaggaagc 71340
 ccctaataatg ccgcacccta cgccatcgaa aggtaatatg attgggtccc agctgttgg 71400
 ggtgagggga aatgacttcc tggtagaa acacacgctg gtactgaaac cctgtggatg 71460

cagcctcctg ttggcaagca ggcgttccgc atcctgggg aacagggcgc gtggaccaca 71520
 gccactccac tcctggctgc tggaggtcg gtattggca cagggtgcc gcaggacatg 71580
 agccacttct gtgggcttct agtgcacact tgtggtgc ttggaaatga ggggctcgga 71640
 gccaccgagt agggttttc tgccccccct gacgacagcg ccctccccca gtttccgga 71700
 cagtcctgaa atgtgatgtc caggctttag tgccctcagt ccccacagt gtccttggg 71760
 gaatgttaacc tttttatgt ggtcttgatt aaatccatt ttacttcctt gcaggttaac 71820
 aaccattatt gagtacctat tgatatgtgt ggtgtactga gttaactaga acatgtcccc 71880

tggctgtgt tctagaccat ctgtggga aaaaggcaga cccaaagcat atttgggtgg 71940
 gggcccatgg acagtgtatgt gatagaggtg tccgctgagg tggtcagggaa aggctgcitg 72000
 cagtaggtgg ccgtgcacgg aaagtttgcga gaatgagcag gtgttagttc cagctggaga 72060
 tgactgccgg ctgtgccctt ggtacctgtt ttctggaggg aagtttaag acgtgtgcat 72120
 acttgaccca gcagttgtat acatggagaa atttactttc cagcaactct caaaacaagc 72180
 gtgttaagat gtgtataggt agttgtgtt gttgtggcat ttttttagt agtaaaaat 72240
 tagagacagg ccaatgatata acccaggac ctgtatcaatt atgttctctc ccgggttgg 72300

gatattctgt agctttaaa gaatgagatc tgggtgtact gatgtggcca gacattgca 72360
 ttgcagtaca tgagaaggca aatcatacag tagtgtgtac accagtgagt cctccagcca 72420
 gataaatcct cacagtgacc agtcgcccag gcaccttgc aaccctaccc tgggtgtggg 72480
 tgctatctga agtacctggg ggaggggggtg acaagtggac ttcaggctga tgtggccct 72540
 ggcctggccc tccctccaag cagagggggc tggctcgctg gaaggttaac atcatccaac 72600
 tctgtctaca cgtggcttgtt ttttcttag aattctgcc acaatagcag catccttgc 72660
 attcatttc tccaaagtga gtaaccatc tctgcctct gattcctcag catgagtcaa 72720

gacactgaag ttagaagtcg ggctcggtttt ggaagtcttc gaggtgccca ggctgcctcc 72780
 ccagccaaag gggagccgtc actgcccag aaggacgagg accatgcact gagttactgg 72840
 aagcccttcc tggtaacat gtgcgtggc acggtcctca cggccggcgc ttacctctgc 72900
 tacagggtat gtitccactg acagacgcgc tggcagatg ctctgtgca gagagcactg 72960
 gccgcttagcc cgatggtagg attcagttct gtggtgcatc tgagccagtc tcagaagaaa 73020
 cagatcaaag gttttaaag tctgaaactg tggaaggct aacaagagaa ttaaggatcg 73080
 atgcactggg gtttaagga gccctctggc cccaagaata taagagtcta atctcaggc 73140

cttaacctat tcaggagtaa gtagagaaaa tgccaaatac gtctgtttct ctctctttt 73200
 tttttttat tcctttttt ttggaaaaaa atagagttac aacacattgt tgtttttaac 73260
 ctttataaaa agcagcttt ttttatttct ggaacaaaaaa aaaacaaagt aggacttat 73320
 gaaactttct cataccctta ggtgatgtaa tcageccatat aatttatatt tgattccca 73380
 ggaaaggaat cccaaacttt tacgaatgt aactccctt gagaagaggg ttaggacgt 73440
 gttgcgtca agccccctc agctgtgtc acactgagcc aggacagggt ctttgagct 73500
 tccactata agaagaacag caacaaaagg ccgtctagaa aaacagaacc tgcccttgct 73560

tctgctcagg gtgtccccgc tgggttcca ttgtccttcc tccattgctc cctcctgtga 73620
 cagccatctt gctcatgtac cagccctcat caccccatcc ccataaatgg gtgcctcga 73680
 ggcctctgcc tgggggtcag aggtcaccac agggtggcca ttggcatgtc aaccgcgt 73740
 taattcagag aagtggcgc cacctatttgg gagaagatgc catttcagca gaaattcaca 73800
 cgtagacgt gtgttgctgt taagtaaggg gaagagagag gactgcctc agagctctgg 73860
 ccatggaaat gacctctaa gacttttgc tggtttaaa tatttacct cttccaggt 73920
 ggcacatctgag tacatcagat gttttgcaaa aatgcaaaaca atttttct tgggatgt 73980

ttttgggag agggggctac tgtaaaaat aaaacaaaaa cccctttgc tccctcgag 74040
 gttgaagtttgc cgggggggtt tggccgggt catgcatttgc ggcacagctc tgcagggtc 74100
 ggtctggct catctgaact gttggtttgc attccagttc ctgttcaaca gcaacacata 74160
 gcctgaccct cctccactcc acctccaccc actgtccgccc tctgcccgc gagcccacgc 74220
 ccgactagca ggcacatgcgc ggttagttaag ggccgcggca ccgcgttagag agccggcccc 74280
 cggacggacg ttggttctgc actaaaaccc atttttcccg gatgtgtgc tcacccctca 74340
 tcctttact ttttggccct tccactttga gtaccaaatac cacaagccat ttttggagga 74400

gagtgaaaga gagtaccatg ctggcgccgc agagggaaagg ggcctacacc cgtttgggg 74460
 ctcgccccac ccaggctcc ctcctggcgc atcccgaggc ggccggcacgc caacagcccc 74520
 ccccttgaat ctgcaggagca aactctcca ctccatattt atttaaacaa tttttcccc 74580

aaaggcatcc atagtgcact agcatttct tgaaccaata atgtattaaa atttttgat 74640
 gtcagcctg catcaaggc ttatcaaaa agtacaataa taaatccta ggtagactg 74700
 ggaatggaag gcttgccat gggcctgctg cgtcagacca gtactggaa ggaggacgt 74760
 tgtaacagt tggatatttg tggatatttg ggtaacgtga gaagatagaa caatgctata 74820

atatataatg aacacgtggg tatttaataa gaaacatgat gtgagattac tttgtcccg 74880
 ttatctcct ccctgttatac tgctagatct agttctaat cactgctccc ccgtgttat 74940
 tagaatgcat gtaaggctt ctgtgtcct gatgaaaaat atgtgcttga aatgagaac 75000
 tttgatctct gcttactaat gtgccccatg tccaagtcca acctgcctgt gcatgacctg 75060
 atcatiacaat ggcgtgtgtt cctaagccctg ttgcgtgaat cattgtcgct cagcaatagg 75120
 gtgcagttt ccaggaatag gcatttgccct aattcctggc atgacactct agtgaactcc 75180
 tggtgaggcc cagcctgtcc tggcacagca gggctttgtt gtaactcaga cattccaagg 75240

gtatgggaag ccataattcac acctcacgt ctggacatga tttaggaaag cagggacacc 75300
 ccccgcccc caccttggg atcagcctcc gccattccaa gtcaacactc ttcttgagca 75360
 gaccgtgatt tggaaagagag gcacctgtcg gaaaccacac ttcttggaaac agcctgggt 75420
 acggccctt aggccgcctg ccgcgtctc tgtccgggtt cacctgccc agagaggcgc 75480
 gtctgcccc caactcaaacc ctgtggggcc tgatgggtct cacgactctt cctgcaagg 75540
 gaactgaaga cctccacatt aagtggctt ttaacatgaa aaacacggca gctgtagctc 75600
 ccgagctact ctcttgcag cattttcaca ttttgcctt ctgtggtag aagccagttac 75660

agagaaaattc tgggtggga acattcgagg tgcacccctg cagagctatg gtgagggtgt 75720
 gataaggctt aggtgccagg ctgtaagcat tctgagctgg gcttgggttt ttaagtctt 75780
 gtatatgtat gttagtagttt ggggtgttat atatagtagc atttcaaaaat ggacgtactg 75840
 gtttaacctc ctatccttgg agagcagctg gctctccacc ttgttacaca ttatgttaga 75900
 gaggttagcga gctgctctgc tatatgcctt aagccaatat ttactcatca ggtcattatt 75960
 ttttacaatg gccatgaaat aaaccattt tacaaaaata aaaacaaaaa aagcaaggtg 76020
 ttttggata ataccccttcc aggtgtgtt ggatacgtgg ctgcattgacc gggtggtgg 76080

gggggagtgt ctcaagggtct tctgtgaccc cacagaactg tcagactgta cagtttcca 76140
 acttgcata ttcatgatgg gtttgcattt tagctgcaac aataaaattt ttttctaaag 76200
 aacatgaatt tgggtgtctt cccatttttt tctttgttta atagagctaa accaggatga 76260
 gtaactcctg ttctttcttcc tccctgtga tggaaacag atgttgtcaa tcagctgggg 76320
 ttagagttt ccacttctaa gaattaaacct cagcatccct gcattgcccag caccctcagg 76380
 ctggagcgct ttcccttgact gtgagctgtt tgaacacctt aggccctcagc ccatttcctt 76440

cccaaattga cgcttgctt gtgttagggcc ctcagataac ttaacaaact taccagtgtt 76500

gtttgaagaa cagtgtttt agttgtaatc tcaaaaaccat atcccttacc caattacctg 76560
 taagacacaa tggttaccac atctcagttac gtaaaagtcca ctgtatag aattgactta 76620
 gaaataagac agattgtat agttttcat ttgtgtacaa aattaaacaa tgtaattcc 76680
 ccccaaagtg attttttga cttttgaag taatttgga ctgcggaaat gttgcca 76740
 tagtacgaag agttccccag taccctcgaa gtttcctcgaa ctgtttcaaa gctggctgca 76800
 ggcccaggct catgagactg ggaagaggac aggctgttgtt catgtggacc cacagggcc 76860
 tggggctgca gaagtcagtg tggcttccac catttcaggt ataaaaaagg gcatctaagc 76920

tttcaagaag agggaggatg ctctagggca gcgggtccca acctttctg gcaccaggaa 76980
 ccgggtccat ggaagacaat ttttcacag gcctgggggt ggtgagggtt ggtttggga 77040
 tagaaacttc cacctcagat catcaggcat cagattctca taaggagctt gcaacctgat 77100
 ctcttgaca cattcagttc acaatagggt tcacgctct aagagaacct gatgtgcag 77160
 ctgatctaac agagatgga gtcaggtgg tcatgctcag tcgctcgcca ctcacctct 77220
 gccatgcagt ccagttccta acaggcctca gaccagtacc ggtctgtggc ctggggttt 77280
 aggacccctg ctctaggctg gtactgctga tgctaaaaa gagagggttt gccagaaatc 77340

agatggaca aaaggcataa ggccgtgcca cagagtgcctt atataggga gagcacgcct 77400
 ggagccctcg agagcatgca gagaagcctg gagactgcattt accggagc tgctgcciga 77460
 ggccaccctc caagtgtccc cacagcgcac cacaagacca caggagtgcac ctcctactg 77520
 gcaggtatggggaaacaa ctgctgtcta ctctttggg taaaaagtga aacaccaata 77580
 gtttaattga aatttcagaa aattgaacat atgaacaagg caaataaata ctaagtaagt 77640
 taaaaacaca aaatatgtcc aggaagtatc gatgagaatg ttcaagttaa agttctccaa 77700
 tgccattgct acagcaacctt caaacccctg gttctctcg cactattaac acagacatct 77760

caggacatgg ttgtttttt ttaagactt aaataggaaa ctaatttttcc tttctttaaa 77820
 gcaattgcgt tttcagttga actctttttt taggcaggat gatggcttct tagcagttta 77880
 ttgacgagat cctagggttag cttccgaagc tgggttgatt gattgcattt gggtgccgat 77940
 ggccaaagtg agtggcccta ctgcctgtgc tgctcaggc tcctggctg atgtgggtggc 78000
 t 78001

<210> 3

<211> 4522

<212> DNA

<213> Macaca mulatta

<400> 3

gcgggtcgta gttccggctg ccgggttgaca tgaagaagcc gcggcggcta gggcggcggt 60
 agcggcagga gtcggtgctt gctgcggacc tcagggctaa gagcgcgacg cggcctagag 120

cggcggactg cgcaatggc cgagaaggag gcgcagcagc cgccctggcc cgtcatggag 180
 atggaaaagg agttcgagca gatcgacaag tccggagct gggcggccat ttaccaggat 240
 atccgacacg aagccagtga ctccccatgt agagtggcca agcttcctaa gaacaaaaac 300
 cgaataggt acagagacgt cagtcctt gaccatagtc ggattaaact acatcaagaa 360
 gataacgact atatcaacgc tagtttgata aaaatggaag aagccaaag gagttacatc 420
 cttacccagg gcccttgcc taacacatgc ggtcacttt gggagatggt gtggaaacag 480
 aaaagcaggg gtgtcgcat gctcaacaga gtgatggaga aaggttcgtt aaaatgcgca 540
 cagttactggc cacaaaaaga agaaaaaggaa atgatcttg aagacacaaa cttgaaatta 600

acattgatct ctgaagatata caaatcatat tatacagtgc gacagctaga attggaaac 660
 cttacaaccc aagaaaactcg agagatctta cattccact ataccacatg gcctgactt 720
 ggagtccccg aatcgccagc ctcattctg aacttctt tcaaagtccg agagttaggg 780
 tcactcagcc cggagcatgg gccgtcggt gtgcactgca gtgcgggtat cggcaggct 840
 gggaccttct gtctggctga tacctgcctc ttgctgtatgg acaagagggaa agaccctt 900
 tccgttata tcaagaaagt gctatttagaa atgaggaagt ttcggatggg gctgatccag 960
 acagcagacc agctgcgcctt ctcctacttg gctgtgatcg aaggtgccaa attcatcatg 1020
 ggggactcct ctgtgcagga tcagtggaaag gagcttccc acgaggacct ggagccccca 1080

cccgagcacg tccccccacc tccccggcca cccaaacgaa tcctggagcc acacaatggg 1140
 aaatgcaggg agttttccc aaatcaccag tgggtgaagg atgagaccca ggaggataaa 1200
 gactgccccca tcaaggaaga aacaggaagc cccttaatg ccgcacccta cagcatggaa 1260
 agcatgagtc aagacactga agttagaagt cgggtcggtt gggaaagtct tcgaggtgcc 1320
 caggctgcct ccttagccaa aggggagccg tcaccgccta agaaggagga ggaccatgca 1380
 ctgagtcact ggaagccctt cctggtcaac atgtgtgtgg ctacggctt cacggccggc 1440
 gcgtacctct gctacagggt atgtttccac tgacagacgc gctggcgaga tgctcgatgg 1500
 cagagagcac tggccgctag cccgatggta ggattcagg tctggcgca tctgagccag 1560

tctcagaaga aacagatcaa aggttttaa agtctggAAC tggaaagg ctaacgagaa 1620
 ttaaggatcg atgcactggg gtttaagga gccctcttgtt cccaaagata taagagtcta 1680
 atctcaggc cttaaacctat tcaggagtaa gtagagaaaa tgccaaatac gtctgtct 1740
 ctctctctt cttttttta tccctttgtt ttggaaaaaa aatagaatta caacacattg 1800

ttgttttaa ccttataaa aagcagctt ttgttatttc tgaaaaaaa acaaactagg 1860
 cacttaatga aacttctcg tacccttagg tcatgttaatt agctatataa ttatatttg 1920
 atttcccagg gaaggaatcc caaacttta cgaatgtaaa ctcccttgga gaagagggtt 1980
 aggacgcitc tgcgtcaag cccccctag ctgtgtcac actgagccag gacagggtct 2040

ttgagcttc ccactgtaag aacagcaaca caaggccgtc tagagaaaca gaacctgcct 2100
 ctgctctgc tcaggggtgc cggtgtcctt tctccattgc tccctcctgt gacagccatc 2160
 ttgctcatgt accagccctc atcacccat tccctataaaa gagtgcctc gaggccctc 2220
 cctgggggtc agaggtcacc acaggggtgc cctcagcatg tcagccctc gttaattcag 2280
 aggagtggtc tccacctcat tggagaagt gccattcag cagaaatcca cacgttagac 2340
 gtgtgttgct gttaagtaag gggaaagagag gactgcctc agagctctgg ccatggaaat 2400
 gacccctcga gacttttca tcgtttaaa tatttactt ctccatgtt ggccatctga 2460
 gtacatcaga tggtttgca aaatgcaaac aattttcc ttgggggtga ttttgggga 2520

gaaggggcta ctgtaaaaaa taaaacccaaa acccccttg ctccctcgga gttgaagtt 2580
 ggcgggggtt gtggccgggg tcgtcatga ggcacagct ctgcgggtgc ggtctggc 2640
 tcatctgaac tgggggttt cattccagg tctgtcaac agcaacacat agcctgaccc 2700
 tcctccactc caectccacc cactgtccgc ctgtccgc agagccacg cccgactagc 2760
 aggcattcccg cggttagtaa gggccgcgg accgcgtaga gagccggcc cggacggac 2820
 gttgttctg cactaaaacc catttcccc ggatgtgtt ctccatgtt atccctttac 2880
 ttttgcctt ttccactttg agtaccaat ccacaagcca tttttgagg agagtgaaag 2940
 agtaccatgc tggccgcga gagggagggg gcctgcacct gtctggagc tcgccccacc 3000

cagggtccc tcctggagca tcccaaggcag gtggtacacc aacagcccc ttgactcgca 3060
 gggagcaact ctccactcca tatttattta aacaattttt cccaaaggt gtccatagtg 3120
 cactagcatt ttcttgaacc aataatgtat taaaattttt tcatgtcagc ctgtcatcaa 3180
 gggctttatc aaaaagtaca ataataatc ctgcgttgtt actggaaatg gaagactttg 3240
 ccatggccct gctgcgtcag accgtactg ggaaggagga cggttgcgttgc 3300
 ttttagtgcata ttgtggtaa cgtgagaaga tagaacaatg ctataatata taatgaacac 3360
 gtgggttattt aataagaaac atgatgtgag attactttgtt cccgttattt ctccctcctg 3420
 ttatctgcata gatctagttc tcaaatcact gctcccccgt gtgtactaga atgcatgtaa 3480

ggtcttcttgc tgcctgtatg aaaaatatgt gcttgaatg agaaactttg atctctgttt 3540
 actaatgtgc cccatgtcca agtccaaacct gcctgtcgtt gacccatgtca ttatcggtt 3600
 gtgggttccata agcctgttgc tgaagtcgtt gtcactcagc aatagggtgc agtttccag 3660

gaataggcat ttgcctcatt cctggcctga cactctagt acttccttgt gagacccggc 3720
 ctgtccttgt gcagcagggt ctgcgtgtaa ctcagacatt ccaagggtat gggaaagccat 3780
 attcacacct cacgctctgg acattattta ggcaaggcagg gacacccccc gccccccacc 3840
 tttgggatca gcctctgcca ttccaagtca gcactttct tgagcagact gtgatitgga 3900
 agagaggcaa ctgctggaaa ccacacttct taaaaacagcc tgggtgacgg tccttaggc 3960

agcctgccgc cgctccgtc tgggttcacc ttgccgagag aggccgcgtct gccccaccct 4020
 cgaaccctgt gggccctgat ggtgctcagc actcttcctg caaagggAAC tgaagaccc 4080
 cacattaagt ggcttttaa caagaaaaac acggcagctg tagctcccga gctactct 4140
 tgccacgattt ttcacat tttt gccttcctcg tggtaagaagc cagtagcagaa aattctgtc 4200
 gtggAACat tcgaggcattc accccataga gctgtggta ggtgtggata aggcttaggt 4260
 gccaggctgt aagcattctg agctgggtt gttttttt agtcctgtat atgtatgttag 4320
 tagttgggt gtgtatatat agtagcattt caaaatggac gtactggttt aaccccttat 4380
 cctcgagag cagctggctc tccaccttgt tacacgtatg ttagagaggtt agcgagctgc 4440

tctgctatat gccttaagcc aatatttact catcaggtca ttatTTTA caatggccat 4500
 ggaataaacc attttacaa aa 4522

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 4

ttgtcgatct gctcgaaactc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 5

gacttgtcga tctgctcgaa 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 6

cccgacttg tcgatctgct

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 7

gctccggac ttgtcgatct

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 8

ccagctcccg gacttgtcga

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 9

ggcaccttcg atcacagcca

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 10

gctccttcca ctgatcctgc	20
-----------------------	----

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 11

ggtcatgcac aggcaggttg	20
-----------------------	----

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 12

aggtcatgca caggcaggtt	20
-----------------------	----

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 13

gatcaggta tgcacaggca	20
----------------------	----

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 14

tgatcaggtc atgcacaggc

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 15

acccttggaa tgtctgagtt

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 16

cccataccct tggaatgtct

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 17

tcccataccc ttggatatgtc

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 18

ttcccatacc ctggatgt 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 19

tattccatgg ccattgtaaa 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 20

ttattccatg gccattgtaa 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 21

tttattccat ggcattgt 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 22

gtttattcca tggcattgt 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic oligonucleotide
<400> 23
ggtttattcc atggccattg 20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic oligonucleotide
<400> 24
tggtttattc catggccatt 20
<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic oligonucleotide
<400> 25
atggtttatt ccatggccat 20
<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic oligonucleotide
<400> 26
aatggtttat tccatggcca 20
<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 27

aaatggtaa ttccatggcc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 28

aaaatggttt attccatggc

20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 29

aaaaatggtt tattccatgg

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 30

aggaggtcat ttccatggcc

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 31

ggtcatttcc atggccagag

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 32

ggagggtcatt tccatggcca

20

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

ctgggttaac ctccatatct tgga

24

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

cagagcagct cgctacctct ct

22

<210> 35

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe
<400> 35
cagctggctc tccacattgt tacacattat gt 32
<210> 36

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 36
ggagttcgag cagatcgaca a 21
<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 37
ggccactcta catggaaagt c 21
<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Probe
<400> 38
agctggcgcc ccatattacca ggat 24
<210> 39
<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 39

tattccatgg ccatggta 18

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 40

tttattccatg gccattgt 18

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 41

tttattccat ggcatttg 18

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 42

gtttattcca tggcatt 18

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 43

ggtttattcc atggccat 18

<210> 44	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 44	
tggttattc catggca	18
<210> 45	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 45	
atggttatt ccatggcc	18
<210> 46	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 46	
aatggttat tccatggc	18
<210> 47	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 47	
aaatggttta ttccatgg	18
<210> 48	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 48	
atggtttatt ccatgg	16
<210> 49	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 49	
tttattccat ggccat	16
<210> 50	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic oligonucleotide	
<400> 50	
gcgttgctc ttcttcttgc gttttt	27
<210> 51	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 51	
gaccagctgc gcttctccta	20
<210> 52	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer

<400> 52

cagaggagtc ccccatgatg

20

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 53

ttggctgtga tcgaaggtgc caaa

24

<210> 54

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 54

gggccttgc cctaacaaca

19

<210> 55

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 55

cgacaccct gctttctg

19

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 56

cggtaactt tgggagatgg tgtgg

25