



등록특허 10-2306797



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월05일
(11) 등록번호 10-2306797
(24) 등록일자 2021년09월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) *A61P 33/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/1138 (2013.01)
A61K 38/1709 (2020.05)
- (21) 출원번호 10-2018-7026546
- (22) 출원일자(국제) 2017년03월14일
심사청구일자 2020년02월11일
- (85) 번역문제출일자 2018년09월13일
- (65) 공개번호 10-2018-0120702
- (43) 공개일자 2018년11월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/055925
- (87) 국제공개번호 WO 2017/157899
국제공개일자 2017년09월21일
- (30) 우선권주장
16160149.7 2016년03월14일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (56) 선행기술조사문현
JP2013523162 A
JP2014210793 A
US20110251259 A1
WO2011127180 A1

전체 청구항 수 : 총 37 항

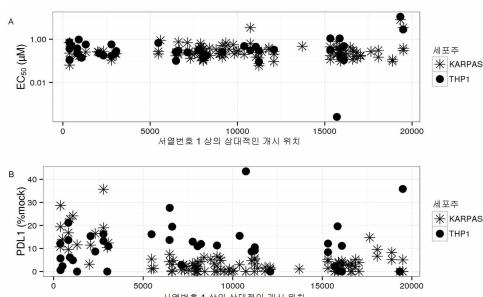
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 PD-L1 발현의 감소를 위한 올리고뉴클레오티드

(57) 요약

본 발명은 표적 세포에서 PD-L1의 발현을 감소시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 상기 올리고뉴클레오티드는 PD-L1 mRNA에 혼성화한다. 본 발명은 또한 올리고뉴클레오티드의 접합체, 및 약학 조성물, 및 상기 올리고뉴클레오티드를 사용하는, 바이러스성 간 감염, 예컨대 HBV, HCV 및 HDV; 기생충 감염,

(뒷면에 계속)

대 표 도

예컨대 말라리아, 톡소플라즈마증, 리슈마니아증 및 트리파노소마증, 또는 간암 또는 간에서의 전이의 치료 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 31/12 (2018.01)

A61P 33/00 (2018.01)

C07K 16/28 (2013.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/3231 (2013.01)

(72) 발명자

야케로트 말레네

덴마크 2970 희르스홀름 프램티스바이 3 로슈 이노
베이션 센터 코펜하겐 에이/에스

오토센 쇠렌

덴마크 2970 희르스홀름 프램티스바이 3 로슈 이노
베이션 센터 코펜하겐 에이/에스

루양세 수팔론

스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호
프만-라 로슈 아개

명세서

청구범위

청구항 1

화학식 CCtatttaacatcAGAC의 안티센스 올리고뉴클레오티드로서,

대문자가 베타-D-옥시 LNA 뉴클레오시드를 나타내고, 소문자가 DNA 뉴클레오시드를 나타내고, 모든 LNA C가 5-메틸 사이토신이고, 모든 뉴클레오시드간 연결기가 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기인, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드에 공유 결합으로 부착된 접합체 모이어티를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체로서,

연결기가 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드와 상기 접합체 모이어티 사이에 존재하는, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.

청구항 3

제2항에 있어서,

접합체 모이어티가, 3-가 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티인 아시알로당단백질 수용체 표적화 모이어티를 포함하는, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 연결기가 생리학적으로 불안정한 연결기인, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 생리학적으로 불안정한 연결기가 뉴클레아제 민감성 연결기인, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.

청구항 6

◆청구항 6은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제2항에 있어서,

화학식 GN2-C6_oC_oa_oCCtatttaacatcAGAC의 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체로서,

C6_oi 6개의 탄소를 갖는 아미노 알킬 기를 나타내고, 대문자가 베타-D-옥시 LNA 뉴클레오시드를 나타내고, 소문자가 DNA 뉴클레오시드를 나타내고, 모든 LNA C가 5-메틸 사이토신이고, 아래첨자 o가 포스포다이에스터 뉴클레오시드 연결기를 나타내고, 뉴클레오시드간 연결기가 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기이고, GN2가 도 3에 도시된 3-가 GalNAc 클러스터를 나타내고, 도 3의 물결선이 C6 아미노 연결기로의 상기 클러스터의 접합 부위를 나타내는, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.

청구항 7

제1항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체, 및 약학적으로 허용되는 희석제, 용매, 담체, 염, 항원보강제, 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 바이러스에 대한 면역 반응의 회복에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체, 및 약학적으로 허용되는 희석제, 용매, 담체, 염, 항원보강제, 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 기생충에 대한 면역 반응의 회복에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체, 및 약학적으로 허용되는 희석제, 용매, 담체, 염, 항원보강제, 또는 이들의 혼합물을 포함하는, B형 간염 바이러스(HBV) 감염의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 약학적으로 허용되는 희석제가 멸균 포스페이트-완충된 염수인, 약학 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 약학적으로 허용되는 염이 나트륨인, 약학 조성물.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 약학적으로 허용되는 염이 칼륨인, 약학 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 약학적으로 허용되는 희석제가 멸균 포스페이트-완충된 염수인, 약학 조성물.

청구항 14

제8항에 있어서,

상기 약학적으로 허용되는 염이 나트륨인, 약학 조성물.

청구항 15

제8항에 있어서,

상기 약학적으로 허용되는 염이 칼륨인, 약학 조성물.

청구항 16

제9항에 있어서,

상기 약학적으로 허용되는 희석제가 멸균 포스페이트-완충된 염수인, 약학 조성물.

청구항 17

제9항에 있어서,

상기 약학적으로 허용되는 염이 나트륨인, 약학 조성물.

청구항 18

제9항에 있어서,

상기 약학적으로 허용되는 염이 칼륨인, 약학 조성물.

청구항 19

제1항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드, 제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체, 또는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체, 및 약학적으로 허용되는 희석제, 용매, 담체, 염, 항원보강제, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 약학 조성물을 효과량으로 프로그래밍된 사멸 리간드-1(PD-L1)을 발현하는 표적 세포에 투여함을 포함하는, 상기 표적 세포에서 PD-L1 발현을 조절하는 시험관내 방법.

청구항 20

제1항에 있어서,

바이러스에 대한 면역 반응의 회복에 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 바이러스가 B형 간염 바이러스(HBV)인, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 22

제1항에 있어서,

기생충에 대한 면역 반응의 회복에 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

면역 반응의 회복이, 대조군과 비교될 때, 하나 이상의 HBV 항원에 특이적인 CD8+ T-세포의 간에서의 증가인, 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 24

제1항에 있어서,

약제로서 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 25

제1항에 있어서,

HBV 감염의 치료에 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드.

청구항 26

제2항에 있어서,

바이러스에 대한 면역 반응의 회복에 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 바이러스가 HBV인, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.

청구항 28

제2항에 있어서,

기생충에 대한 면역 반응의 회복에 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역 반응의 회복이, 대조군과 비교될 때, 하나 이상의 HBV 항원에 특이적인 CD8+ T-세포의 간에서의 증가인, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.

청구항 30

제2항에 있어서,

약제로서 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.

청구항 31

제2항에 있어서,

HBV 감염의 치료에 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.

청구항 32

제7항에 있어서,

상기 면역 반응의 회복이, 대조군과 비교될 때, 하나 이상의 HBV 항원에 특이적인 CD8+ T-세포의 간에서의 증가인, 약학 조성물.

청구항 33

제7항에 있어서,

약제로서 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 34

제8항에 있어서,

약제로서 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 35

제9항에 있어서,

약제로서 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 36

제1항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 37

제1항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체의 약학적으로 허용되는 나트륨 염.

청구항 38

제1항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체의 약학적으로 허용되는 칼륨 염.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 프로그래밍(programming)된 사멸 리간드-1(PD-L1)에 상보적이고 간에서 PD-L1의 감소를 야기하는 올리고뉴클레오티드(올리고머)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 간의 감염 또는 간의 암에 의해 야기된 T-세포 배출을 완화시키는 방법에 관한 것이다. 관련된 감염은 만성 B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV)

및 D형 간염 바이러스(HDV), 및 기생충 감염, 예컨대 말라리아 및 톡소플라즈마증(예컨대, 플라스모듐 (*Plasmodium*)의 원생동물, 특히 종 플라스모듐 비박스(*Plasmodium vivax*), 플라스모듐 말라리아에(*Plasmodium Malariae*) 및 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*)에 의해 야기됨)이다.

배경기술

[0002]

프로그래밍된 사멸-1(PD-1) 수용체 및 이의 리간드, PD-L1(또는 B7-H1 또는 CD274)로 이루어진 공자극성 경로는 간의 만성 감염 중에 바이러스 제어의 결핍을 야기하는 T-세포 배출에 직접 기여하는 것으로 공지되어 있다. PD-1 경로는 또한, 이러한 경로가 혼란한 마우스가 자가면역 질병을 발병하므로, 자가면역에서 중요한 역할을 한다.

[0003]

PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 차단하는 항체가 T-세포 반응, 특히 CD8+ 세포독성 T-세포의 반응을 강화시킴이 밝혀졌다[문헌[Barber et al 2006 Nature Vol 439 p682] 및 문헌[Maier et al 2007 J. Immunol. Vol 178 p 2714] 참고].

[0004]

국제 공개공보 제2006/042237호는 종양에서 PD-L1(B7-H1) 발현을 평가함으로써 암을 진단하는 방법을 기술하고, PD-1/PD-L1 상호작용을 간섭하는 제제를 환자에게 전달함을 시사한다. 간섭제는 항체, 항체 단편, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 이러한 간섭제에 대한 구체적인 예는 존재하지 않고, 만성 간 감염에 대한 어떠한 언급도 존재하지 않는다.

[0005]

이중 가닥 RNA(dsRNA, RNAi 또는 siRNA) 분자를 사용하는 PD-L1의 RNA 간섭 매개된 억제는 또한, 예를 들어 국제 공개공보 제2005/007855호, 국제 공개공보 제2007/084865호 및 미국 특허공보 제8,507,663호에 개시되어 있다. 이들 중 어느 것도 간으로의 표적화된 전달을 기술하지 않는다.

[0006]

문헌[Dolina et al. 2013 Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2 e72]은 MCMV 감염된 마우스에서 NK 및 CD8+ T-세포 청소(clearance)를 강화시키는 쿠퍼(Kupffer) 세포로의 PD-L1 표적화 siRNA 분자의 생체내 전달을 기술한다. 이러한 논문은 간세포로 전달된 PD-L1 표적화 siRNA 분자가 CD8+ T-세포 효과기 기능의 강화와 관련하여 효과적이지 않는 것으로 결론지어진다.

[0007]

siRNA 접근은, 생체분포 및 작용 방식이 아주 상이하므로, 단일 가닥 안티센스 올리고뉴클레오티드 접근과 상당히 상이하다. 문헌[Xu et al 2003 Biochem. Biophys. Res .Comm. Vol 306 page 712-717]에 기술된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 siRNA는 mRNA 내의 표적 부위에 대한 상이한 선호도를 갖는다.

[0008]

국제 공개공보 제2016/138278호는 5' 말단에서 연결된 2개 이상의 단일 가닥 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하는, PD-L1을 비롯한 면역 체크포인트의 억제를 기술한다. 이러한 문헌은 HBV 또는 간으로의 표적화된 전달을 언급하지 않는다.

발명의 내용

[0009]

발명의 목적

[0010]

본 발명은 간 세포(실질 세포(예컨대, 간세포) 및 비-실질 세포, 예컨대 쿠퍼 세포 및 간 정현 내피 세포(LSEC) 둘 다)에서 PD-L1 mRNA를 매우 효율적으로 감소시키는 신규한 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드 접합체를 동정한다. PD-L1을 감소시키거나 침묵화시킴으로써, 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드 접합체는 PD-1-매개된 억제를 감소시키고, 이에 의해 소실된 T-세포의 면역자극을 촉진한다. 간의 만성 병원성 감염에서 T-세포 배출의 완화는 간의 만성 병원성 감염 중에 혈액 내의 바이러스 항원의 감소된 수준 및 회복된 면역 조절을 야기할 것이다. 자연 살해(NK) 세포 및 자연 살해 T(NKT) 세포는 또한 본 발명의 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드 접합체에 의해 활성될 수 있다.

[0011]

올리고뉴클레오티드 접합체는 간 세포 내의 PD-L1의 국소적인 감소를 보장하고, 이에 따라 자가면역 부작용, 예컨대 PD-L1의 전신 고갈과 연관된 대장염, 비-바이러스성 간염 및 폐렴의 위험을 감소시킨다.

[0012]

발명의 요약

[0013]

본 발명은 PD-L1의 발현을 조절할 수 있는 핵산을 표적화하는 올리고뉴클레오티드 또는 접합체, 및 PD-L1의 작용화와 관련된 질병의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는 특히 감염성 제제에 대한 면역 반응이 소실된 질병의 치료에 사용될 수 있다.

[0014]

따라서, 제1 양상에서, 본 발명은 PD-L1 표적 핵산에 90% 이상 상보적인, 10 내지 30개의 뉴클레오티드 길이의

인접한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 올리고뉴클레오티드는, 바람직하게는 갭머(gapmer) 디자인을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드는 표적 핵산의 절단에 의해 PD-L1의 발현을 억제할 수 있다. 상기 절단은 바람직하게는 뉴클레아제 모집에 의해 달성된다.

- [0015] 추가 양상에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티, 예컨대 하나 이상의 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티를 포함하는 접합체 모이어티에 접합된다. 접합 모이어티 및 올리고뉴클레오티드는 연결기, 특히 생체절단성 연결기에 의해 함께 연결될 수 있다.
- [0016] 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체, 및 약학적으로 허용되는 희석제, 담체, 염 및/또는 항원보강제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0017] 추가 양상에서, 본 발명은 PD-L1을 발현하는 표적 세포에 올리고뉴클레오티드 또는 본 발명의 조성물을 효과량으로 투여함으로써, 상기 표적 세포에서 PD-L1 발현의 감소를 위한 생체내 또는 시험관내 방법을 위한 방법을 제공한다.
- [0018] 추가 양상에서, 본 발명은 바이러스 또는 기생충에 대한 면역성의 회복에 사용하기 위한 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물을 제공한다.
- [0019] 추가 양상에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물을 제공한다.
- [0020] 추가 양상에서, 본 발명은 치료 또는 예방 효과량의 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 질병, 질환 또는 기능장애, 특히 특히 바이러스성 간 감염 및 기생충 감염으로부터 선택되는 질병을 앓거나 이에 걸리기 쉬운 대상에게 투여함을 포함하는, 질병, 질환 또는 기능장애의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0021] 추가 양상에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물을 바이러스성 간 감염, 예컨대 HBV, HCV 및 HDV, 또는 기생충 감염, 예컨대 말라리아, 특소플라즈마증, 리슈마니아증 및 트리파노소마증, 또는 간암 또는 간에서의 전이의 치료 또는 예방에 사용된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 올리고뉴클레오티드가 물결선(A 내지 D) 또는 "올리고뉴클레오티드"(E 내지 H) 또는 T₂(I)로 표시되고 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티가 3-가 N-아세틸갈락토사민 모이어티인, 예시적인 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체를 도시한다. 화합물 A 내지 D는 다이-리신 분지(brancher) 분자 PEG3 스페이서 및 3개의 말단 GalNAc 탄수화물 모이어티를 포함한다. 화합물 A 및 B에서, 올리고뉴클레오티드는 연결기 없이 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티에 직접 부착된다. 화합물 C 및 D에서, 올리고뉴클레오티드는 C6 연결기를 통해 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티에 직접 부착된다. 화합물 E 내지 I는 트레블리 분자(trebler brancher molecule) 및 길이 및 구조가 변하는 스페이서 및 3개의 말단 GalNAc 탄수화물 모이어티를 포함한다.

도 2는 표적 핵산 상의 위치를 기준으로, 실시예 2에서 시험된 화합물에 대한 EC50(A) 및 PD-L1 농다운(knock down)(염수의 %)(B)을 나타내는 그래프이다. 화합물이 시험된 세포주는 THP1(●) 및 카르파스(Karpas)(■)이다.

도 3은 3-가 GalNAc 클러스터(GN2)의 화학식을 도시한다. GN2는 본 발명에서 접합 모이어티로서 유용하다. 물결선은, 예컨대 C6 아미노 연결기로의 또는 직접적으로 올리고뉴클레오티드로의 클러스터의 접합 부위를 나타낸다.

도 4는 화합물 번호 766_2의 화학식을 도시한다.

도 5는 화합물 번호 767_2의 화학식을 도시한다.

도 6은 화합물 번호 768_2의 화학식을 도시한다.

도 7은 화합물 번호 769_2의 화학식을 도시한다.

도 8은 화합물 번호 770_2의 화학식을 도시한다.

도 9는 염수 및 표시된 화합물 번호를 사용하는 처리 후, 폴리(IC) 유도된 동물로부터 간에서의 PD-L1 단백질

발현을 검출하는 웨스턴 블롯을 도시한다. 각각의 블롯은 네이키드 올리고뉴클레오티드 대 동일한 올리고뉴클레오티드의 GaINAc 접합된 베전을 나타낸다: 블롯 A) 화합물 번호 744_1 및 755_2, B) 화합물 번호 747_1 및 758_2, C) 화합물 번호 748_1 및 759_2, D) 화합물 번호 752_1 및 763_2, 및 E) 화합물 번호 753_1 및 764_2. 상부 밴드는 빈쿨린 로딩 대조군이고, 하부 밴드는 PD-L1 단백질이다. 각각의 블롯의 첫 번째 선은 폴리(IC) 유도 없이 염수 처리된 마우스를 나타낸다. 이러한 마우스는 매우 적은 PD-L 단백질을 발현한다.

도 10은 ● 비히클(군 10 및 1), ◆ DNA 백신(군 11 및 2), ○ 항-PD-L1 항체(군 12), ▲ 네이키드 PD-L1 ASO + DNA 백신(군 7) 또는 △ GaINAc 접합된 PD-L1 ASO + DNA 백신(군 8)을 사용하는 처리 후, 간의 단핵 세포 집단을 도시한다(각각의 군을 위하여, 개별 동물이 표시되고, 평균은 각각의 군에 대한 수직선에 의해 표시됨)(표 18 참조). DNA 백신 군과 3개의 처리 군 사이의 통계학적 유의성이 평가되었고, 존재하는 경우 군 사이에 *로 표시된다(* = P < 0.05, ** = P < 0.001 및 *** = P < 0.0001). A는 처리 후 간에서의 T-세포의 수를 나타낸다. B는 CD4+ T-세포의 분율을 나타내고, C는 CD8+ T-세포의 분율을 나타낸다.

도 11은 ● 비히클(군 10 및 1), ◆ DNA 백신(군 11 및 2), ○ 항-PD-L1 항체(군 12), ▲ 네이키드 PD-L1 ASO + DNA 백신(군 7) 또는 △ GaINAc 접합된 PD-L1 ASO + DNA 백신(군 8)을 사용하는 처리 후, 간의 PD-L1 양성 세포의 조절을 도시한다(각각의 군을 위하여, 개별 동물이 표시되고, 평균은 각각의 군에 대한 수직선에 의해 표시됨)(표 19 참조). DNA 백신 군과 3개의 처리 군 사이의 통계학적 유의성이 평가되었고, 존재하는 경우 군 사이에 *로 표시된다(* = P < 0.05 및 *** = P < 0.0001). A는 치료 후 간에서 PD-L1을 발현하는 CD8+ T-세포의 %를 나타낸다. B는 처리 후 간에서 PD-L1을 발현하는 CD4+ T-세포를 나타내고, C는 처리 후 간에서 PD-L1을 발현하는 B 세포를 나타낸다.

도 12는 ● 비히클(군 10 및 1), ◆ DNA 백신(군 11 및 2), ○ 항-PD-L1 항체(군 12), ▲ 네이키드 PD-L1 ASO + DNA 백신(군 7) 또는 △ GaINAc 접합된 PD-L1 ASO + DNA 백신(군 8)을 사용하는 처리 후, 간 내의 HBV 항원 특이적 CD8+ 사이토킨 분비 세포를 도시한다(각각의 군을 위하여, 개별 동물이 표시되고, 평균은 각각의 군에 대한 수직선에 의해 표시됨)(표 20 참조). DNA 백신 군과 3개의 처리 군 사이의 통계학적 유의성이 평가되었고, 존재하는 경우 군 사이에 *로 표시된다(* = P < 0.05). A는 치료 후 HBV PreS2+S 항원에 특이적인 간 내의 IFN-γ 분비 CD8+ T-세포의 %를 나타낸다. B는 치료 후 IHBV 코어 항원에 특이적인 간 내의 IFN-γ 분비 CD8+ T-세포의 %를 나타내고 C는 치료 후 HBV PreS2+S 항원에 특이적인 간 내의 IFN-γ 및 TNF-α 분비 CD8+ T-세포의 %를 나타낸다.

도 13은 비히클(■)과 비교되는, GaINAc 접합된 PD-L1 안티센스 화합물 번호 759_2(▼)에 의한 처리 후 AAV/HBV 마우스 내의 HBV-DNA, HBsAg 및 HBeAg를 도시한다. 수직선은 처리의 종료를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

정의

[0024]

올리고뉴클레오티드

[0025]

본원에 사용된 용어 "올리고뉴클레오티드"는 2개 이상의 공유 결합으로 연결된 뉴클레오시드를 포함하는 문자로서 당업자에게 일반적으로 이해되는 바와 같이 정의된다. 이러한 공유 결합된 뉴클레오시드는 또한 핵산 분자 또는 올리고머로서 지칭될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 고체-상 화학 합성 및 정제에 의해 실험실에서 통상적으로 제조된다. 올리고뉴클레오티드의 서열을 언급하는 경우, 공유 결합으로 연결된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 핵염기 모이어티 또는 이의 변형의 서열 또는 순서를 지칭한다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 인공적이고, 화학적으로 합성되고, 전형적으로 정제되거나 단리된다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0026]

안티센스 올리고뉴클레오티드

[0027]

본원에 사용된 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 표적 핵산, 특히 표적 핵산 상의 인접한 서열에 혼성화함으로써 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있는 올리고뉴클레오티드로서 정의된다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 본질적으로 이중 가닥이 아니고, 이에 따라 siRNA가 아니다. 바람직하게는, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥이다.

[0028]

인접한 뉴클레오티드 서열

[0029]

용어 "인접한 뉴클레오티드 서열"은 표적 핵산에 상보적인 올리고뉴클레오티드의 영역을 지칭한다. 이러한 용

어는 본원에서 용어 "인접한 핵염기 서열" 및 용어 "올리고뉴클레오티드 모티프 서열"과 상호교환적으로 사용된다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드는 인접한 뉴클레오티드 서열을 구성한다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 추가의 뉴클레오티드, 예를 들어 작용기를 인접한 뉴클레오티드 서열에 부착하는데 사용될 수 있는 뉴클레오티드 연결기 영역을 임의적으로 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 연결기 영역은 표적 핵산에 상보적이거나 상보적이지 않을 수 있다.

[0030] 뉴클레오티드

뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드의 빌딩 블록이고, 본 발명의 목적을 위하여 천연 발생 및 비-천연 발생 뉴클레오티드를 둘 다 포함한다. 천연적으로, 뉴클레오티드, 예컨대 DNA 및 RNA 뉴클레오티드는 리보스 당 모이어티, 핵염기 모이어티 및 하나 이상의 포스페이트 기(뉴클레오시드에는 부재함)를 포함한다. 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드는 또한 "단위" 또는 "단량체"와 상호교환적으로 지칭될 수 있다.

[0032] 변형된 뉴클레오시드

본원에 사용된 용어 "변형된 뉴클레오시드" 또는 "뉴클레오시드 변형"은 당 모이어티 또는 (핵)염기 모이어티의 하나 이상의 변형을 도입함으로써, 균등한 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드와 비교하여 변형된 뉴클레오시드를 지칭한다. 바람직한 양태에서, 변형된 뉴클레오시드는 변형된 당 모이어티를 포함한다. 용어 "변형된 뉴클레오시드"는 또한 본원에서 용어 "뉴클레오시드 유사체" 또는 변형된 "단위" 또는 변형된 "단량체"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0034] 변형된 뉴클레오시드간 연결기

용어 "변형된 뉴클레오시드간 연결기"는 2개의 뉴클레오시드를 함께 공유 결합으로 커플링시키는, 포스포다이에스터(PO) 이외의 연결기로서 당업자에게 일반적으로 이해되는 바와 같이 정의된다. 변형된 뉴클레오시드간 연결기를 갖는 뉴클레오티드는 또한 "변형된 뉴클레오티드"로 지칭된다. 일부 양태에서, 변형된 뉴클레오시드간 연결기는 포스포다이에스터 연결기와 비교하여, 올리고뉴클레오티드의 뉴클레아제 내성을 증가시킨다. 천연 발생 올리고뉴클레오티드의 경우, 뉴클레오시드간 연결기는 인근 뉴클레오시드 사이에 포스포다이에스터 결합을 생산하는 포스페이트 기를 포함한다. 변형된 뉴클레오시드간 연결기는 생체내 사용을 위해 올리고뉴클레오티드를 안정화시키는데 특히 유용하고, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 중 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드의 영역에서, 예를 들어 변형된 뉴클레오시드의 영역뿐만 아니라 캡머 올리고뉴클레오티드의 캡 영역 내에서 뉴클레아제 절단에 대해 보호하는 역할을 할 수 있다.

한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 천연 포스포다이에스터로부터, 예를 들어 뉴클레아제 공격에 대해 더욱 내성인 연결기로 변형된 하나 이상의 뉴클레오시드간 연결기를 포함한다. 뉴클레아제 내성은 혈청 중 올리고뉴클레오티드를 항온처리함으로써 또는 뉴클레아제 내성 검정(예컨대, 뼘 독액 포스포다이에스터라제(SVPD))(둘 다 당해 분야에 널리 공지됨)을 사용함으로써 측정될 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 뉴클레아제 내성을 강화시킬 수 있는 뉴클레오시드간 연결기는 뉴클레아제 내성 뉴클레오시드간 연결기로 지칭된다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 이의 인접한 뉴클레오티드 서열 중 뉴클레오시드간 연결기의 50% 이상은 변형되고, 예컨대 올리고뉴클레오티드 또는 이의 인접한 뉴클레오티드 서열 중 뉴클레오시드간 연결기의 60% 이상, 예컨대 70% 이상, 예컨대 80% 이상, 또는, 예컨대 90% 이상은 변형된다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 이의 인접한 뉴클레오티드 서열의 모든 뉴클레오시드간 연결기는 변형된다. 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 비-뉴클레오티드 작용기, 예컨대 접합체에 연결하는 뉴클레오시드가 포스포다이에스터일 수 있음이 인정될 것이다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 이의 인접한 뉴클레오티드 서열의 모든 뉴클레오시드간 연결기는 뉴클레아제 내성 뉴클레오시드간 연결기이다.

[0037] 변형된 뉴클레오시드간 연결기는 포스포로티오에이트, 다이포스포로티오에이트 및 보라노포스페이트를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 양태에서, 변형된 뉴클레오시드간 연결기는 본 발명의 올리고뉴클레오티드, 예를 들어 포스포로티오에이트, 다이포스포로티오에이트 또는 보라노포스페이트의 RNase H 모집과 상용성이다.

[0038] 일부 양태에서, 뉴클레오시드간 연결기는 황(S)을 포함한다(예컨대, 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기).

[0039] 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기는 뉴클레아제 내성, 이로운 약동학 및 제조 용이성에 기인하여 특히 유용하다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 이의 인접한 뉴클레오티드 서열 중 뉴클레오시드간 연결기의 50% 이상은 포스포로티오에이트이고, 예컨대 올리고뉴클레오티드 또는 이의 인접한 뉴클레오티드 서열 중 뉴클레오시드간 연결기의 60% 이상, 예컨대 70% 이상, 예컨대 80% 이상 또는 90% 이상은 포스포로티오에이트이다.

일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 이의 인접한 뉴클레오티드 서열의 모든 뉴클레오시드간 연결기는 포스포로티오에이트이다.

[0040] 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 중성 뉴클레오시드간 연결기, 특히 포스포트라이에스터, 메틸포스폰에이트, MMI, 아미드-3, 폼아세탈 및 티오피아세탈로부터 선택되는 뉴클레오시드간 연결기를 포함한다.

[0041] 추가의 뉴클레오시드간 연결기는 국제 공개공보 제2009/124238호(참고로서 본원에 혼입됨)에 개시되어 있다. 한 양태에서, 뉴클레오시드간 연결기는 국제 공개공보 제2007/031091호(참고로서 본원에 혼입됨)에 개시된 연결기로부터 선택된다. 특히, 뉴클레오시드간 연결기는 $-O-P(O)_2-O-$, $-O-P(O,S)-O-$, $-O-P(S)_2-O-$, $-S-P(O)_2-O-$, $-S-P(O,S)-O-$, $-S-P(S)_2-O-$, $-O-P(O)_2-S-$, $-O-P(O,S)-S-$, $-S-P(O)_2-S-$, $-O-PO(R^H)-O-$, $O-PO(OCH_3)-O-$, $-O-PO(NR^H)-O-$, $-O-PO(OCH_2CH_2S-R)-O-$, $-O-PO(BH_3)-O-$, $-O-PO(NHR^H)-O-$, $-O-P(O)_2-NR^H-$, $-NR^H-P(O)_2-O-$, $-NR^H-CO-O-$, $-NR^H-CO-NR^H$ -로부터 선택될 수 있고/거나 뉴클레오시드간 연결기는 $O-CO-O-$, $-O-CO-NR^H-$, $-NR^H-CO-CH_2-$, $-O-CH_2-CO-NR^H-$, $-O-CH_2-CH_2-NR^H-$, $-CO-NR^H-CH_2-$, $-CH_2-NR^H-CO-$, $-O-CH_2-CH_2-S-$, $-S-CH_2-CH_2-O-$, $-S-CH_2-CH_2-S-$, $-CH_2-SO_2-CH_2-$, $-CH_2-CO-NR^H-$, $-O-CH_2-CH_2-NR^H-CO-$, $-CH_2-NCH_3-O-CH_2-$ (이때, R^H 는 수소 및 C_{1-4} -알킬로부터 선택됨)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0042] 뉴클레아제 내성 연결기, 예컨대 포스포티오에이트 연결기는 표적 핵산, 예컨대 캡머에 대한 영역 G, 또는 헤드머(headmer) 및 테일머의 비-변형된 뉴클레오시드 영역과 함께 듀플렉스(duplex)를 형성할 때 뉴클레아제를 모집할 수 있는 올리고뉴클레오티드 영역에 특히 유용하다. 그러나, 포스포로티에이트 연결기는 또한 비-뉴클레아제 모집 영역 및/또는 친화성 강화 영역, 예컨대 캡머에 대한 영역 F 및 F', 또는 헤드머 및 테일머의 변형된 뉴클레오시드 영역에 유용할 수 있다.

[0043] 그러나, 각각의 디자인 영역은 특히 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 LNA가 뉴클레아제 분해에 대해 연결기를 보호하는 영역에서 포스포로티오에이트 이외의 뉴클레오시드간 연결기, 예컨대 포스포다이에스터 연결기를 포함할 수 있다. 특히 변형된 뉴클레오시드 단위(전형적으로 비-뉴클레아제 모집 영역에서) 사이 또는 이의 인근의 포스포다이에스터 연결기, 예컨대 1 또는 2개의 연결기를 포함하는 것은 올리고뉴클레오티드의 생체이용 효능 및/또는 생체분포를 변형시킬 수 있다(참고로서 본원에 혼입된 국제 공개공보 제2008/113832호 참고).

[0044] 한 양태에서, 올리고뉴클레오티드 내의 모든 뉴클레오시드간 연결기는 포스포로티오에이트 및/또는 보라노포스페이트 연결기이다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드 내의 모든 뉴클레오시드간 연결기는 포스포로티오에이트 연결기이다.

핵염기

[0045] 용어 "핵염기"는 핵산 혼성화에서 수소 결합을 형성하는 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드에 존재하는 퓨린(예컨대, 아데닌 및 구아닌) 및 피리미딘(예컨대, 우라실, 티민 및 사이토신) 모이어티를 포함한다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "핵염기"는 또한 천연 발생 핵염기와 상이할 수 있지만 핵산 혼성화 동안 작용성인 변형된 핵염기를 포함한다. 이러한 맥락에서, "핵염기"는 천연 발생 핵염기, 예컨대 아데닌, 구아닌, 사이토신, 티미딘, 우라실, 잔틴 및 하이포잔틴, 및 비-천연 발생 변이체를 둘 다 지칭한다. 이러한 변이체는, 예를 들어 문헌[Hirao et al (2012) Accounts of Chemical Research vol 45 page 2055] 및 문헌[Bergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1.4.1]에 기술되어 있다.

[0047] 일부 양태에서, 핵염기 모이어티는 퓨린 또는 피리미딘을 변형된 퓨린 또는 피리미딘, 예컨대 치환된 퓨린 또는 치환된 피리미딘, 예컨대 이소사이토신, 슈도이소사이토신, 5-메틸-사이토신, 5-티아졸로-사이토신, 5-프로핀일-사이토신, 5-프로핀일-우라실, 5-브로모-우라실, 5-티아졸로-우라실, 2'-티오-우라실, 2'-티오-티민, 이노신, 다이아미노퓨린, 6-아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 2,6-다이아미노퓨린 및 2-클로로-6-아미노퓨린으로부터 선택되는 핵염기로 바꿈으로써 변형된다.

[0048] 핵염기 모이어티는 각각의 상응하는 핵염기에 대한 문자 부호, 예컨대 A, T, G, C 또는 U로 표시될 수 있고, 이때 각각의 문자는 임의적으로 균등한 기능의 변형된 핵염기를 포함한다. 예를 들어, 예시적인 올리고뉴클레오티드에서, 핵염기 모이어티는 A, T, G, C 및 5-메틸-사이토신으로부터 선택된다. 임의적으로, LNA 캡머의 경우, 5-메틸-사이토신 LNA 뉴클레오시드가 사용될 수 있다.

[0049] 변형된 올리고뉴클레오티드

[0050] 용어 "변형된 올리고뉴클레오티드"는 하나 이상의 당-변형된 뉴클레오시드 및/또는 변형된 뉴클레오시드간 연결기를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 기술한다. 용어 "키메라" 올리고뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오시드를 갖는 올리고뉴클레오티드를 기술하기 위해 문헌에서 사용되는 용어이다.

[0051] 상보성

[0052] 용어 "상보성"은 뉴클레오시드/뉴클레오티드의 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기-대합을 위한 자격을 기술한다. 왓슨-크릭 염기 쌍은 구아닌(G)-사이토신(C) 및 아데닌(A)-티민(T)/우라실(U)이다. 올리고뉴클레오티드가 변형된 핵염기를 갖는 뉴클레오시드를 포함할 수 있고, 예를 들어 5'-메틸 사이토신이 종종 사이토신 대신에 사용되고, 상기 용어 "상보성"은 비-변형된 및 변형된 핵염기 사이의 왓슨-크릭 염기 대합을 포괄함이 이해될 것이다 (예를 들어, 문헌[Hirao et al (2012) Accounts of Chemical Research vol 45 page 2055] 및 문헌[Bergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1.4.1] 참고).

[0053] 본원에 사용된 용어 "% 상보성"은 소정 위치에서, 별개의 핵산 분자(예컨대, 표적 핵산)의 소정 위치의 인접한 뉴클레오티드 서열에 상보적인(즉, 왓슨-크릭 염기 쌍을 형성하는) 핵산 분자(예컨대, 올리고뉴클레오티드) 내의 인접한 뉴클레오티드 서열의 %인 뉴클레오티드의 수를 지칭한다. %는 2개의 서열 사이에 쌍을 형성하는 정렬된 염기의 수를 계수하고(표적 서열 5'-3' 및 올리고뉴클레오티드 서열 3'-5'로 정렬될 때), 올리고뉴클레오티드 내의 뉴클레오티드의 총 수로 나누고, 100을 곱함으로써 계산된다. 이러한 비교에서, 정렬(염기 쌍을 형성)되지 않는 핵염기/뉴클레오티드는 미스매치(mismatch)로 지칭된다.

[0054] 용어 "완전히 상보성"은 100% 상보성을 지칭한다.

[0055] 하기 서열은 표적 핵산(서열번호 772)에 완전히 상보성인 올리고뉴클레오티드(서열번호 5)의 예이다.

[0056] 5'gcagtagagccaatta3'(서열번호 772)

[0057] 3'cgtcatctcggttaat5'(서열번호 5)

[0058] 동일성

[0059] 본원에 사용된 용어 "동일성"은 소정 위치에서, 별개 핵산 분자(예컨대, 표적 핵산)의 소정 위치에서 인접한 뉴클레오티드 서열과 동일한(즉, 상보성 뉴클레오시드와 왓슨-크릭 염기 쌍을 형성하는 이들의 능력의 면에서) 핵산 분자(예컨대, 올리고뉴클레오티드) 내의 인접한 뉴클레오티드 서열의 %인 뉴클레오티드의 수를 지칭한다. %는 캡을 비롯하여 2개의 서열 사이에 동일한 정렬된 염기의 수를 계수하고, 올리고뉴클레오티드 내의 뉴클레오티드의 총 수로 나누고, 100을 곱함으로써 계산된다. % 동일성 = (매치 x 100)/정렬된 영역의 길이(캡을 포함함).

[0060] 혼성화

[0061] 본원에 사용된 용어 "혼성화하는" 또는 "혼성화하다"는 대향하는 가닥 상의 염기 쌍 사이에 수소 결합을 형성하고 이에 의해 듀플렉스를 형성하는 2개의 핵산 가닥(예컨대, 올리고뉴클레오티드 및 표적 핵산)으로 이해되어야 한다. 2개의 핵산 가닥 사이의 결합의 친화도는 혼성화의 강도이다. 이것은 종종 올리고뉴클레오티드의 절반이 표적 핵산과 듀플렉싱된 온도로서 정의되는 용융 온도(T_m)에 의하여 기술된다. 생리학적 조건 T_m 은 친화도에 엄격히 비례하지는 않는다(문헌[Mergny and Lacroix, 2003, *Oligonucleotides* 13:515-537]). 표준 상태 갑스(Gibbs) 자유 에너지 ΔG° 는 결합 친화도의 더욱 정확한 표현이고, $\Delta G^\circ = -RT\ln(K_d)$ (이때, R은 기체 상수이고, T는 절대 온도임)에 의해 반응의 해리 상수(K_d)와 관련된다. 따라서, 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산 사이의 반응의 매우 낮은 ΔG° 는 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산 사이의 강한 혼성화를 반영한다. ΔG° 는 수성 농도가 1 M이고, pH가 7이고, 온도가 37°C인 반응과 연관된 에너지이다. 표적 핵산으로의 올리고뉴클레오티드의 혼성화는 자발적인 반응이고, 자발적인 반응의 경우, ΔG° 는 0 미만이다. ΔG° 는, 예를 들어, 문헌[Hansen et al., 1965, *Chem. Comm.* 36-38] 및 문헌[Holdgate et al., 2005, *Drug Discov Today*]에 기술된 등온 적정 열량계(ITC) 방법을 사용함으로써, 실험적으로 측정될 수 있다. 당업자는 시판 중인 장비가 ΔG° 측정에 이용가능함을 알 것이다. ΔG° 는 또한 문헌[Sugimoto et al., 1995, *Biochemistry* 34:11211-11216] 및 문헌[McTigue et al., 2004, *Biochemistry* 43:5388-5405]에 기술된 대략적으로 유도된 열역학 파라미터를 사용하는 문헌[SantaLucia, 1998, *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 1460-1465]에 기술된 최근접 이웃 모델(nearest neighbor model)을 사용함으로써, 수치적으로 추정될 수 있다. 혼성화에 의해 의도된 핵산 표적을 조

절할 가능성을 갖기 위하여, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 10 내지 30개의 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드에 대해 -10 kcal 미만의 추정된 ΔG° 값을 갖는 표적 핵산에 혼성화한다. 일부 양태에서, 혼성화의 정도 또는 강도는 표준 상태 깁스 자유 에너지 ΔG° 에 의해 측정된다. 올리고뉴클레오티드는 8 내지 30개의 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드에 대해 -10 kcal 미만, 예컨대 -15 kcal 미만, 예컨대 -20 kcal 미만, 예컨대 -25 kcal 미만의 추정된 ΔG° 값을 갖는 표적 핵산에 혼성화할 수 있다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 -10 내지 -60 kcal, 예컨대 -12 내지 -40 kcal, 예컨대 -15 내지 -30 kcal 또는 -16 내지 -27 kcal, 예컨대 -18 내지 -25 kcal의 추정된 ΔG° 값을 갖는 표적 핵산에 혼성화한다.

[0062] 표적 핵산

본 발명에 따라서, 표적 핵산은 포유동물 PD-L1을 코딩하고, 예를 들어 유전자, RNA, mRNA 및 미성숙 mRNA(pre-mRNA), 성숙 mRNA 또는 cDNA 서열일 수 있는 핵산이다. 따라서, 표적은 PD-L1 표적 핵산으로서 지칭될 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어 포유동물 PD-L1의 표적 엑손 영역일 수 있거나, 예를 들어 PD-L1 미성숙 mRNA의 표적 인트론 영역일 수 있다(표 1 참고).

[0064] [표 1]

[0065] 인간 PD-L1 엑손 및 인트론

인간 PD-L1 pre-mRNA (서열번호 1)의 엑손 영역			인간 PD-L1 pre-mRNA (서열번호 1) 인트론 영역		
ID	개시	종결	ID	개시	종결
e1	1	94	i1	95	5597
e2	5598	5663	i2	5664	6576
e3	6577	6918	i3	6919	12331
e4	12332	12736	i4	12737	14996
e5	14997	15410	i5	15411	16267
e6	16268	16327	i6	16328	17337
e7	17338	20064			

[0066]

적합하게는, 표적 핵산은 PD-L1 단백질, 특히 포유동물 PD-L1, 예컨대 인간 PD-L1을 코팅한다(예를 들어, 인간, 원숭이 및 마우스 PD-L1에 대한 RNA 및 미성숙 mRNA 서열에 대한 참고를 제공하는 표 2 및 3 참고). 본 발명의 맥락에서, 미성숙 mRNA는 또한 단백질을 코딩하는 핵산으로 간주된다.

[0067]

일부 양태에서, 표적 핵산은 서열번호 1, 2 및 3 또는 이의 천연 발생 변이체(예컨대, 포유동물 PD-L1 단백질을 코딩하는 서열)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0068]

연구 또는 진단에서 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 사용하는 경우, 표적 핵산은 cDNA, 또는 DNA 또는 RNA로부터 유도된 합성 핵산일 수 있다.

[0069]

생체내 또는 시험관내 적용의 경우, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 PD-L1 표적 핵산을 발현하는 세포에서 PD-L1 표적 핵산의 발현을 억제할 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 핵염기의 인접한 서열은 전형적으로 1 또는 2개의 미스매치를 임의적으로 제외하고, 올리고뉴클레오티드를 임의적인 작용기, 예컨대 접합체, 또는 다른 비-상보성 종결 뉴클레오티드(예컨대, 영역 D' 또는 D")에 연결할 수 있는 뉴클레오티드 기반 연결기 영역을 임의적으로 제외하면서 올리고뉴클레오티드의 길이에 따라 측정된 바와 같이, PD-L1 표적 핵산에 상보성이다. 표적 핵산은, 일부 양태에서, RNA 또는 DNA, 예컨대 메신저 RNA, 예컨대 성숙 mRNA 또는 미성숙 mRNA일 수 있다. 일부 양태에서, 표적 핵산은 포유동물 PD-L1 단백질, 예컨대 인간 PD-L1, 예컨대 인간 PD-L1 미성숙 mRNA 서열, 예컨대 서열번호 1로 개시된 서열 또는 NCBI 참조 번호 NM_014143을 갖는 인간 mRNA 서열을 코딩하는 RNA 또는 DNA이다. 예시적인 표적 핵산에 대한 추가 정보는 표 2 및 3에 제공된다.

[0071] [표 2]

[0072] PD-L1 어크로스 종에 대한 게놈 및 어셈블리 정보

종	Chr.	가닥	게놈 좌표 개시 종결		어셈블리	mRNA에 대한 NCBI 기준 서열* 수탁번호
인간	9	fwd	5450503	5470566	GRCh38:CM000671.2	NM_014143
사이노 몰거스 원숭이	15		73560846	73581371	GCF_000364345.1	XM_005581779
마우스	19	fwd	29367455	29388095	GRCm38:CM001012.2	NM_021893

[0073]

[0074] Fwd = 전방 가닥. 게놈 좌표는 미성숙 mRNA 서열(게놈 서열)을 제공한다. NCBI 기준은 mRNA 서열(cDNA 서열)이다.

[0075]

*미국 국립 생물정보센터(The National Center for Biotechnology Information) 기준 서열 데이터베이스는 게놈, 전사체 및 단백질을 비롯한 포괄적이고 통합되고 중복되지 않고 주석이 잘 달린 기준 서열의 집합이다. 이는 웹사이트[www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq]에서 호스팅된다.

[0076]

[표 3]

[0077]

PD-L1 어크로스 종에 대한 서열 세부사항

종	RNA 유형	길이 (nt)	서열번호
인간	prem-RNA	20064	1
사이노몰거스 원숭이	prem-RNA GCF 기준	20261	2
사이노몰거스 원숭이	prem-RNA 내부	20340	3
마우스	prem-RNA	20641	4

[0078]

표적 서열

[0080]

본원에 사용된 용어 "표적 서열"은 본 발명의 올리고뉴클레오티드에 상보적인 핵염기 서열을 포함하는 표적 핵산에 존재하는 뉴클레오티드의 서열을 지칭한다. 일부 양태에서, 표적 서열은 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 인접한 뉴클레오티드 서열에 상보적인 표적 핵산 상의 영역으로 이루어진다. 일부 양태에서, 표적 서열은 단일 올리고뉴클레오티드의 상보성 서열보다 길고, 예를 들어 다수의 본 발명의 올리고뉴클레오티드에 의해 표적화될 수 있는 표적 핵산의 바람직한 영역을 나타낼 수 있다.

[0081]

표적 서열은 표적 핵산의 하위-서열일 수 있다.

[0082]

일부 양태에서, 하위-서열은 a1 내지 a149로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열이다(표 4 참고). 일부 양태에서, 하위-서열은 인간 PD-L1 mRNA 엑손, 예컨대 e1, e2, e3, e4, e5, e6 및 e7로 이루어진 군으로부터 선택되는 PD-L1 인간 mRNA 엑손으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열이다(상기 표 1 참고).

[0083]

일부 양태에서, 하위-서열은 인간 PD-L1 mRNA 인트론, 예컨대 i1, i2, i3, i4, i5 및 i6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 PD-L1 인간 mRNA 인트론으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열이다(상기 표 1 참고).

[0084]

본 발명의 올리고뉴클레오티드는 표적 핵산, 예컨대 표적 핵산의 하위-서열, 예컨대 본원에 기술된 표적 서열에 상보성이거나 이로 혼성화되는 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0085]

올리고뉴클레오티드는 표적 핵산 분자에 존재하는 표적 서열에 상보적이거나 이로 혼성화되는 8개 이상의 뉴클레오티드의 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 인접한 뉴클레오티드 서열(및, 이에 따라 표적 서열)은 8개 이상의 인접한 뉴클레오티드, 예컨대 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 인접한 뉴클레오티드, 예컨대 12 내지 25개, 예컨대 14 내지 18개의 인접한 뉴클레오티드를 포함한다.

[0086]

표적 세포

- [0087] 본원에 사용된 용어 "표적 세포"는 표적 핵산을 발현하는 세포를 지칭한다. 일부 양태에서, 표적 세포는 생체 내 또는 시험관내일 수 있다. 일부 양태에서, 표적 세포는 포유동물 세포, 예컨대 설치류 세포, 예컨대 마우스 세포 또는 래트 세포, 또는 영장류 세포, 예컨대 원숭이 세포 또는 인간 세포이다.
- [0088] 바람직한 양태에서, 표적 세포는 PD-L1 mRNA, 예컨대 PD-L1 미성숙 mRNA 또는 PD-L1 성숙 mRNA를 발현한다. PD-L1 mRNA의 폴리 A 꼬리는 전형적으로 안티센스 올리고뉴클레오티드 표적화를 위해 분해된다.
- [0089] **천연 발생 변이체**
- [0090] 용어 "천연 발생 변이체"는 표적 핵산과 동일한 유전자 자리로부터 유래하지만, 예를 들어, 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈의 다양성을 야기하는 유전자 코드의 퇴화에 기인하여, 또는 미성숙 mRNA의 대체적인 스플라이싱 (splicing), 또는 다형태, 예컨대 단일 뉴클레오티드 다형태, 및 대립형질 변이체의 존재에 기인하여 상이할 수 있는 PD-L1 유전자 또는 전사체의 변이체를 지칭한다. 따라서, 올리고뉴클레오티드에 대한 충분한 상보성 서열의 존재에 근거하여, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 표적 핵산 및 이의 천연 발생 변이체를 표적화할 수 있다.
- [0091] 일부 양태에서, 천연 발생 변이체는 포유동물 PD-L1 표적 핵산, 예컨대 서열번호 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적 핵산에 대해 95% 이상, 예컨대 98% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 갖는다.
- [0092] 수많은 단일 뉴클레오티드 다형태는 PD-L1 유전자, 예를 들어 하기 표에 개시된 것들에서 공지되어 있다(인간 미성숙 mRNA 개시/기준 서열은 서열번호 2임).

변이체 명칭	변이체 대립 유전자	소수 대립 유전자	소수 대립 유전자 빈도	서열번호 1 상의 개시
rs73397192	G/A	A	0.10	2591
rs12342381	A/G	G	0.12	308
rs16923173	G/A	A	0.13	14760
rs2890658	C/A	A	0.16	14628
rs2890657	G/C	C	0.21	2058
rs3780395	A/G	A	0.21	14050
rs147367592	AG/-	-	0.21	13425
rs7023227	T/C	T	0.22	6048
rs2297137	G/A	A	0.23	15230
rs1329946	G/A	A	0.23	2910
rs5896124	-/G	G	0.23	2420
rs61061063	T/C	C	0.23	11709
rs1411263	T/C	C	0.23	8601
rs59906468	A/G	G	0.23	15583
rs6476976	T/C	T	0.24	21012
rs35744625	C/A	A	0.24	3557
rs17804441	T/C	C	0.24	7231
rs148602745	C/T	T	0.25	22548
rs4742099	G/A	A	0.25	20311
rs10815228	T/C	C	0.25	21877
rs58817806	A/G	G	0.26	20769
rs822342	T/C	T	0.27	3471
rs10481593	G/A	A	0.27	7593
rs822339	A/G	A	0.28	2670
rs860290	A/C	A	0.28	2696
rs822340	A/G	A	0.28	2758
rs822341	T/C	T	0.28	2894
rs12002985	C/G	C	0.28	6085
rs822338	C/T	C	0.28	1055
rs866066	C/T	T	0.28	451
rs6651524	A/T	T	0.28	8073
rs6415794	A/T	A	0.28	8200
rs4143815	G/C	C	0.28	17755
rs111423622	G/A	A	0.28	24096
rs6651525	C/A	A	0.29	8345
rs4742098	A/G	G	0.29	19995
rs10975123	C/T	T	0.30	10877
rs2282055	T/G	G	0.30	5230
rs4742100	A/C	C	0.30	20452
rs60520638	-/TC	TC	0.30	9502
rs17742278	T/C	C	0.30	6021
rs7048841	T/C	T	0.30	10299

[0093]

변이체 명칭	변이체 대립 유전자	소수 대립 유전자	소수 대립 유전자 빈도	서열번호 1 상의 개시
rs10815229	T/G	G	0.31	22143
rs10122089	C/T	C	0.32	13278
rs1970000	C/A	C	0.32	14534
rs112071324	AGAGAG/-	AGAGAG	0.33	16701
rs2297136	G/A	G	0.33	17453
rs10815226	A/T	T	0.33	9203
rs10123377	A/G	A	0.36	10892
rs10123444	A/G	A	0.36	11139
rs7042084	G/T	G	0.36	7533
rs10114060	G/A	A	0.36	11227
rs7028894	G/A	G	0.36	10408
rs4742097	C/T	C	0.37	5130
rs1536926	G/T	G	0.37	13486
rs1411262	C/T	T	0.39	8917
rs7041009	G/A	A	0.45	12741

[0094]

발현의 조절

[0095]

본원에 사용된 용어 "발현의 조절"은 올리고뉴클레오티드의 투여 전의 PD-L1의 양과 비교될 때 PD-L1의 양을 변화시키는 올리고뉴클레오티드 능력에 대한 전반적인 용어로서 이해되어야 한다. 발현의 대안적인 조절은 대조군 실험을 참고하여 결정될 수 있다. 대조군이 염수 조성물로 처리된 개체 또는 표적 세포, 또는 비-표적화 올리고뉴클레오티드(모의군)로 처리된 개체 또는 표적 세포임이 일반적으로 이해된다. 그러나, 이는 또한 관리 기준으로 처리된 개체일 수 있다.

[0096]

조절의 하나의 유형은, 예컨대 mRNA의 분해 또는 전사의 봉쇄에 의해, PD-L1의 발현을 억제하거나, 하향조절하거나, 감소시키거나, 저해시키거나, 제거하거나, 중단시키거나, 차단시키거나, 예방하거나, 줄이거나, 저하시키거나, 회피하거나, 종결하는 올리고뉴클레오티드의 능력이다. 조절의 다른 유형은, 예컨대 슬라이스 부위의 수선 또는 슬라이싱의 방지, 또는 억제 기전의 제거 또는 봉쇄, 예컨대 마이크로RNA 억제에 의해, PD-L1의 발현을 회복하거나, 증가시키거나, 강화시키는 올리고뉴클레오티드의 능력이다.

[0097]

고친화도 변형된 뉴클레오시드

[0098]

고친화도 변형된 뉴클레오시드는, 예를 들어 용융 온도(T°)에 의해 측정되는 바와 같이 올리고뉴클레오티드 내로 혼입될 때, 상보성 표적에 대한 올리고뉴클레오티드의 친화도를 강화시키는 변형된 뉴클레오티드이다. 본 발명의 고친화도 변형된 뉴클레오시드는 바람직하게는 변형된 뉴클레오시드 당 +0.5 내지 +12°C, 더욱 바람직하게는 +1.5 내지 +10°C, 가장 바람직하게는 +3 내지 +8°C의 용융 온도 증가를 야기한다. 수많은 고친화도 변형된 뉴클레오시드가 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 많은 2' 치환된 뉴클레오시드 및 잠금 핵산(LNA)을 포함한다(예컨대, 문헌[Freier & Altman; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443] 및 문헌[Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213] 참고).

[0099]

당 변형

[0100]

본 발명의 올리고머는 변형된 당 모이어티, 즉 DNA 및 RNA에서 발견되는 리보스 당 모이어티와 비교되는 경우 당 모이어티의 변형을 갖는 하나 이상의 뉴클레오시드를 포함할 수 있다.

[0101]

리보스 당 모이어티의 변형을 갖는 수많은 뉴클레오시드는 주로 올리고뉴클레오티드의 특정 특성, 예컨대 친화도 및/또는 뉴클레아제 내성을 개선할 목적으로 제조되었다.

[0102]

이러한 변형은, 예컨대, 핵소스 고리(HNA), 리보스 고리 상의 C2와 C4 탄소 사이에 바이라디칼 가교를 전형적으로 갖는 이환형 고리(LNA), 또는 C2와 C3 탄소 사이에 결합이 전형적으로 결핍된 비연결된 리보스 고리(예컨대, UNA)에 의한 치환에 의해, 리보스 고리 구조가 변형된 것들을 포함한다. 다른 당 변형된 뉴클레오시드는, 예를 들어, 바이사이클로핵소스 핵산(국제 공개공보 제2011/017521호) 또는 삼환형 핵산(국제 공개공보 제2013/154798호)을 포함한다. 변형된 뉴클레오시드는 또한, 예를 들어 웨티드 핵산(PNA) 또는 모폴리노 핵산의 경우, 당 모이어티가 비-당 모이어티로 대체되는 뉴클레오시드를 포함한다.

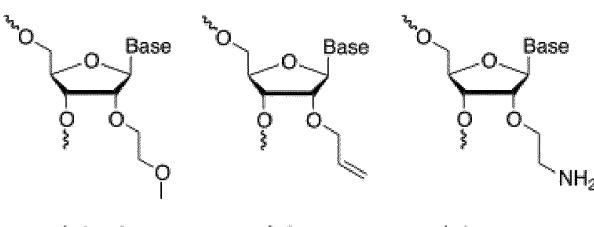
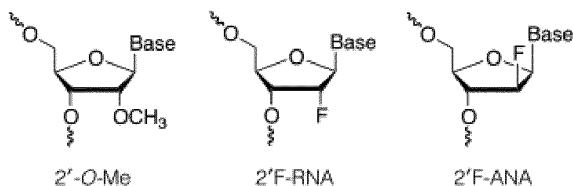
[0103]

당 변형은 또한 리보스 고리 상의 치환기를 수소 이외의 기, 또는 DNA 및 RNA 뉴클레오시드에서 천연 발견되는

2'-OH 기로 변경함으로써 제조된 변형을 포함한다. 치환기는 예를 들어 2', 3', 4' 또는 5' 위치에서 도입될 수 있다. 변형된 당 모이어티를 갖는 뉴클레오시드는 또한 2' 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2' 치환된 뉴클레오시드를 포함한다. 실제로, 2' 치환된 뉴클레오시드를 개발하는데 많은 초점이 맞춰졌고, 올리고뉴클레오티드 내로 혼입될 때, 강화된 뉴클레오시드 내성 및 강화된 친화도를 갖는 수많은 2' 치환된 뉴클레오시드가 발견되었다.

[0105] 2' 변형된 뉴클레오시드

2' 당 변형된 뉴클레오시드는 2' 위치에서 H 또는 -OH 이외의 치환기를 갖거나(2' 치환된 뉴클레오시드) 2' 연결된 바이라디칼을 포함하는 뉴클레오시드이고, 2' 치환된 뉴클레오시드 및 LNA(2'-4' 바이라디칼 가교된) 뉴클레오시드를 포함한다. 예를 들어, 2' 변형된 당은 강화된 결합 친화도 및/또는 증가된 뉴클레아제 내성을 올리고뉴클레오티드에 제공할 수 있다. 2' 치환된 변형된 뉴클레오시드의 예는 2'-O-알킬-RNA, 2'-O-메틸-RNA, 2'-알콕시-RNA, 2'-O-메톡시에틸-RNA(MOE), 2'-아미노-DNA, 2'-플루오로-RNA 및 2'-F-ANA 뉴클레오시드이다. 추가 예의 경우, 문헌[Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443], 문헌[Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213], 및 문헌[Deleavy and Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937]을 참고한다. 일부 2' 치환된 변형된 뉴클레오시드가 하기 제시된다:



[0107]

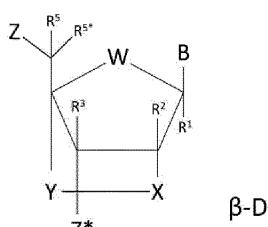
[0108] 잠금 핵산(LNA) 뉴클레오시드

LNA 뉴클레오시드는 뉴클레오티드의 리보스 당 고리의 C2'와 C4' 사이에 연결기(바이라디칼 또는 가료로서 지칭됨)를 포함하는 변형된 뉴클레오시드이다. 이러한 뉴클레오시드는 또한 문헌에서 가교된 핵산 또는 이환형 핵산(BNA)으로 지칭된다.

[0110]

일부 양태에서, 본 발명의 올리고머의 변형된 뉴클레오시드 또는 LNA 뉴클레오시드는 하기 화학식 I 또는 II의 일반적인 구조를 갖는다:

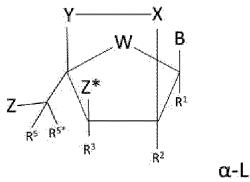
[0111] [화학식 I]



[0112]

[0113]

[화학식 II]



[0114]

상기 식에서,

[0116]

W는 $-O-$, $-S-$, $-N(R^a)-$, $-C(R^aR^b)$ -로부터 선택되고, 예컨대, 일부 양태에서 $-O-$ 이고;

[0117]

B는 핵염기 또는 변형된 핵염기 모이아티이고;

[0118]

Z는 인근 뉴클레오시드, 또는 5'-말단 기로의 뉴클레오시드간 연결기이고;

[0119]

 Z^* 는 인근 뉴클레오시드 또는 3'-말단 기로의 뉴클레오시드간 연결기이고;

[0120]

X는 $-C(R^aR^b)$ -, $-C(R^a)=C(R^b)-$, $-C(R^a)=N-$, $-O-$, $-Si(R^a)_2-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-N(R^a)-$ 및 $>C=Z$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 기이고(일부 양태에서, X는 $-O-$, $-S-$, $NH-$, NR^aR^b , $-CH_2-$, CR^aR^b , $-C(=CH_2)-$ 및 $-C(=CR^aR^b)-$ 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, X는 $-O-$ 이다),

[0121]

Y는 $-C(R^aR^b)$ -, $-C(R^a)=C(R^b)-$, $-C(R^a)=N-$, $-O-$, $-Si(R^a)_2-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-N(R^a)-$ 및 $>C=Z$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 기이거나(일부 양태에서, Y는 $-CH_2-$, $-C(R^aR^b)-$, $-CH_2CH_2-$, $-C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-C(R^aR^b)C(R^aR^b)C(R^aR^b)-$, $-C(R^a)=C(R^b)-$ 및 $-C(R^a)=N-$ 으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, Y는 $-CH_2-$, $-CHR^a-$, $-CHCH_3-$ 및 CR^aR^b- 로 이루어진 군으로부터 선택된다),

[0122]

 $-X-Y-$ 는 함께 2가 연결기(또한 라디칼로 지칭됨)이거나, $-C(R^aR^b)$ -, $-C(R^a)=C(R^b)-$, $-C(R^a)=N-$, $-O-$, $-Si(R^a)_2-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-N(R^a)-$ 및 $>C=Z$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 1, 2, 3 또는 4개의 기/원자로 이루어진 2가 연결기이고(일부 양태에서, $-X-Y-$ 는 $-X-CH_2-$, $-X-CR^aR^b-$, $-X-CHR^a-$, $-X-C(HCH_3)-$, $-O-Y-$, $-O-CH_2-$, $-S-CH_2-$, $-NH-CH_2-$, $-O-CHCH_3-$, $-CH_2-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3CH_3)-$, $-O-CH_2-CH_2-$, $OCH_2-CH_2-CH_2-$, $-O-CH_2OCH_2-$, $-O-NCH_2-$, $-C(=CH_2)-CH_2-$, $-NR^a-CH_2-$, $N-O-CH_2-$, $-S-CR^aR^b-$ 및 $-S-CHR^a-$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 바이라디칼이다. 일부 양태에서, $-X-Y-$ 는 $-O-CH_2-$ 또는 $-O-CH(CH_3)-$ 이다. 이때 Z는 $-O-$, $-S-$ 및 $-N(R^a)-$ 로부터 선택된다);

[0123]

 R^a , 및 존재하는 경우 R^b 는 각각 수소, 임의적으로 치환된 C_{1-6} -알킬, 임의적으로 치환된 C_{2-6} -알켄일, 임의적으로 치환된 C_{2-6} -알킬일, 하이드록시, 임의적으로 치환된 C_{1-6} -알콕시, C_{2-6} -알콕시알킬, C_{2-6} -알켄일옥시, 카복시, C_{1-6} -알콕시카보닐, C_{1-6} -알킬카보닐, 폴일, 아릴, 아릴옥시-카보닐, 아릴옥시, 아릴카보닐, 헤테로아릴, 헤�테로아릴옥시-카보닐, 헤�테로아릴옥시, 헤테로아릴카보닐, 아미노, 모노- 및 다이(C_{1-6} -알킬)아미노, 카바모일, 모노- 및 다이(C_{1-6} -알킬)-아미노카보닐, 아미노- C_{1-6} -알킬-아미노카보닐, 모노- 및 다이(C_{1-6} -알킬)아미노- C_{1-6} -알킬-아미노카보닐, C_{1-6} -알킬-카보닐아미노, 카브아미도, C_{1-6} -알카노일옥시, 설포노, C_{1-6} -알킬설포닐옥시, 니트로, 아지도, 설파닐, C_{1-6} -알킬티오, 할로겐으로부터 독립적으로 선택되고, 이때 아릴 및 헤�테로아릴은 임의적으로 치환될 수 있고, 2개의 같은자리 치환기 R^a 및 R^b 는 함께 임의적으로 치환된 메틸렌($=CH_2$)을 나타낼 수 있고, 모든 키랄 중심에 대하여, 비대칭 기는 R 또는 S 배향으로 발견될 수 있고;

[0124]

 R^1 , R^2 , R^3 , R^5 및 R^{5*} 는 수소, 임의적으로 치환된 C_{1-6} -알킬, 임의적으로 치환된 C_{2-6} -알켄일, 임의적으로 치환된

C_{2-6} -알킬일, 하이드록시, C_{1-6} -알콕시, C_{2-6} -알콕시알킬, C_{2-6} -알켄일옥시, 카복시, C_{1-6} -알콕시카보닐, C_{1-6} -알킬카보닐, 품일, 아릴, 아릴옥시-카보닐, 아릴옥시, 아릴카보닐, 헤테로아릴, 헤테로아릴옥시-카보닐, 헤테로아릴옥시, 헤테로아릴카보닐, 아미노, 모노- 및 다이(C_{1-6} -알킬)아미노, 카바모일, 모노- 및 다이(C_{1-6} -알킬)-아미노카보닐, 아미노- C_{1-6} -알킬-아미노카보닐, 모노- 및 다이(C_{1-6} -알킬)아미노- C_{1-6} -알킬-아미노카보닐, C_{1-6} -알킬-카보닐아미노, 카브아미도, C_{1-6} -알카노일옥시, 설포노, C_{1-6} -알킬설포닐옥시, 니트로, 아지도, 설파닐, C_{1-6} -알킬티오 및 할로겐으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 이때 아릴 및 헤테로아릴은 임의적으로 치환될 수 있고, 2개의 같은자리 치환기는 함께 옥소, 티오옥소, 이미노 또는 임의적으로 치환된 메틸렌을 나타낼 수 있다.

[0125] 일부 양태에서, R^1 , R^2 , R^3 , R^5 및 R^{5*} 는 C_{1-6} 알킬, 예컨대 메틸 및 수소로부터 독립적으로 선택된다.

[0126] 일부 양태에서, R^1 , R^2 , R^3 , R^5 및 R^{5*} 는 모두 수소이다.

[0127] 일부 양태에서 R^1 , R^2 및 R^3 은 모두 수소이고, R^5 또는 R^{5*} 는 또한 수소이고, R^5 및 R^{5*} 중 나머지 하나는 수소가 아니 것, 예컨대 C_{1-6} 알킬, 예컨대 메틸이다.

[0128] 일부 양태에서, R^a 는 수소 또는 메틸이다. 일부 양태에서, 존재하는 경우, R^b 는 수소 또는 메틸이다.

[0129] 일부 양태에서, R^a 및 R^b 중 하나 또는 둘 다는 수소이다.

[0130] 일부 양태에서, R^a 및 R^b 중 하나는 수소이고, 다른 하나는 수소가 아니다.

[0131] 일부 양태에서, R^a 및 R^b 중 하나는 메틸이고, 다른 하나는 수소이다.

[0132] 일부 양태에서, R^a 및 R^b 는 둘 다 메틸이다.

[0133] 일부 양태에서, 바이라디칼 $-X-Y-$ 는 $-O-CH_2-$ 이고, W 는 0이고, R^1 , R^2 , R^3 , R^5 및 R^{5*} 는 모두 수소이다. 이러한 LNA 뉴클레오시드는 국제 공개공보 제99/014226호, 국제 공개공보 제00/66604호, 국제 공개공보 제98/039352호 및 국제 공개공보 제2004/046160호(모두 본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있고, 베타-D-옥시 LNA 및 알파-1-옥시 LNA 뉴클레오시드로서 공지된 것들을 포함한다.

[0134] 일부 양태에서, 바이라디칼 $-X-Y-$ 는 $-S-CH_2-$ 이고, W 는 0이고, R^1 , R^2 , R^3 , R^5 및 R^{5*} 는 모두 수소이다. 이러한 티오 LNA 뉴클레오시드는 국제 공개공보 제99/014226호 및 국제 공개공보 제2004/046160호(본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있다.

[0135] 일부 양태에서, 바이라디칼 $-X-Y-$ 는 $-NH-CH_2-$ 이고, W 는 0이고, R^1 , R^2 , R^3 , R^5 및 R^{5*} 는 모두 수소이다. 이러한 아미노 LNA 뉴클레오시드는 국제 공개공보 제99/014226호 및 국제 공개공보 제2004/046160호(본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있다.

[0136] 일부 양태에서, 바이라디칼 $-X-Y-$ 는 $-O-CH_2-CH_2-$ 또는 $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$ 이고, W 는 0이고, R^1 , R^2 , R^3 , R^5 및 R^{5*} 는 모두 수소이다. 이러한 LNA 뉴클레오시드는 국제 공개공보 제00/047599호 및 문헌[Morita et al, Bioorganic & Med.Chem. Lett. 12 73-76](본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있고, 2'-O-4'C-메틸렌 가교 핵산(ENA)으로 통상적으로 공지된 것들을 포함한다.

[0137] 일부 양태에서, 바이라디칼 $-X-Y-$ 는 $-O-CH_2-$ 이고, W 는 0이고, R^1 , R^2 및 R^3 모두 및 R^5 및 R^{5*} 중 하나는 수소이고, R^5 및 R^{5*} 중 다른 하나는 수소가 아닌 것, 예컨대 C_{1-6} 알킬, 예컨대 메틸이다. 이러한 5' 치환된 LNA 뉴클레오시드는 국제 공개공보 제2007/134181호(본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있다.

[0138] 일부 양태에서, 바이라디칼 $-X-Y-$ 는 $-O-CR^aR^b-$ 이고, 이때 R^a 및 R^b 중 하나 또는 둘 다는 수소가 아닌 것, 예컨대 메틸이고, W 는 0이고, R^1 , R^2 및 R^3 모두 및 R^5 및 R^{5*} 중 하나는 수소이고, R^5 및 R^{5*} 중 다른 하나는 수소가 아닌 것, 예컨대 C_{1-6} 알킬, 예컨대 메틸이다. 이러한 비스 변형된 LNA 뉴클레오시드는 국제 공개공보 제

2010/077578호(본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있다.

- [0139] 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 2가 연결기 -O-CH(CH₂OCH₃)-(2' O-메톡시에틸 이환형 핵산, 문헌[Seth at al., 2010, J. Org. Chem. Vol 75(5) pp. 1569-81])을 나타낸다. 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 2가 연결기 -O-CH(CH₂CH₃)-(2' O-에틸 이환형 핵산, 문헌[Seth at al., 2010, J. Org. Chem. Vol 75(5) pp. 1569-81])을 나타낸다. 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 -O-CHR^a-이고, W는 0이고, R¹, R², R³, R⁵ 및 R^{5*}는 모두 수소이다. 이러한 6' 치환된 LNA 뉴클레오시드는 국제 공개공보 제10/036698호 및 국제 공개공보 제07/090071호(둘 다 본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있다.
- [0140] 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 -O-CH(CH₂OCH₃)-이고, W는 0이고, R¹, R², R³, R⁵ 및 R^{5*}는 모두 수소이다. 이러한 LNA 뉴클레오시드는 또한 당해 분야에서 환형 MOE(cMOE)로 공지되어 있고, 국제 공개공보 제07/090071호에 개시되어 있다.
- [0141] 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 2가 연결기 -O-CH(CH₃)-을 나타낸다(R- 또는 S-배열). 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 함께 2가 연결기 -O-CH₂-O-CH₂-를 나타낸다(문헌[Seth at al., 2010, J. Org. Chem.]). 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 -O-CH(CH₃)-이고, W는 0이고, R¹, R², R³, R⁵ 및 R^{5*}는 모두 수소이다. 이러한 6' 메틸 LNA 뉴클레오시드는 당해 분야에서 cET 뉴클레오시드로 공지되어 있고, 국제 공개공보 제07/090071호(베타-D) 및 국제 공개공보 제2010/036698호(알파-L)(둘 다 본원에 참고로서 혼입됨)에 개시된 바와 같이, (S)cET 또는 (R)cET 입체 이성질체일 수 있다.
- [0142] 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 -O-CR^aR^b-이고, 이때 R^a 및 R^b는 모두 수소가 아니고, W는 0이고, R¹, R², R³, R⁵ 및 R^{5*}는 모두 수소이다. 일부 양태에서, R^a 및 R^b는 둘 다 메틸이다. 이러한 6' 다이-치환된 LNA 뉴클레오시드는 국제 공개공보 제2009/006478호(본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있다.
- [0143] 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 -S-CHR^a-이고, W는 0이고, R¹, R², R³, R⁵ 및 R^{5*}는 모두 수소이다. 이러한 6' 치환된 티오 LNA 뉴클레오시드는 국제 공개공보 제11/156202호(본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있다. 일부 6' 치환된 티오 LNA 양태에서, R^a는 메틸이다.
- [0144] 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 -C(=CH₂)-C(R^aR^b)-, 예컨대 -C(=CH₂)-CH₂- 또는 -C(=CH₂)-CH(CH₃)-이고, W는 0이고, R¹, R², R³, R⁵ 및 R^{5*}는 모두 수소이다. 비닐 카보 LNA 뉴클레오시드는 국제 공개공보 제08/154401호 및 국제 공개공보 제09/067647호(둘 다 본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있다.
- [0145] 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 -N(-OR^a)-이고, W는 0이고, R¹, R², R³, R⁵ 및 R^{5*}는 모두 수소이다. 일부 양태에서, R^a는 C₁₋₆ 알킬, 예컨대 메틸이다. 이러한 LNA 뉴클레오시드는 또한 N 치환된 LNA로 공지되어 있고, 국제 공개공보 제2008/150729호(본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있다. 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 함께 2가 연결기 -O-NR^a-CH₃-을 나타낸다(문헌[Seth at al., 2010, J. Org. Chem.]). 일부 양태에서, 바이라디칼 -X-Y-는 -N(R^a)-이고, W는 0이고, R¹, R², R³, R⁵ 및 R^{5*}는 모두 수소이다. 일부 양태에서, R^a는 C₁₋₆ 알킬, 예컨대 메틸이다.
- [0146] 일부 양태에서, R⁵ 및 R^{5*} 중 하나 또는 둘 다는 수소이고, 치환되는 경우, R⁵ 및 R^{5*} 중 다른 하나는 C₁₋₆ 알킬, 예컨대 메틸이다. 이러한 양태에서, R¹, R² 및 R³은 모두 수소일 수 있고, 바이라디칼 -X-Y-는 -O-CH₂- 및 -O-C(HCR^a)-, 예컨대 -O-C(HCH₃)-으로부터 선택될 수 있다.
- [0147] 일부 양태에서, 바이라디칼은 -CR^aR^b-O-CR^aR^b-, 예컨대 CH₂-O-CH₂-이고, W는 0이고, R¹, R², R³, R⁵ 및 R^{5*}는 모두 수소이다. 일부 양태에서, R^a는 C₁₋₆ 알킬, 예컨대 메틸이다. 이러한 LNA 뉴클레오시드는 또한 형태적으로 제한

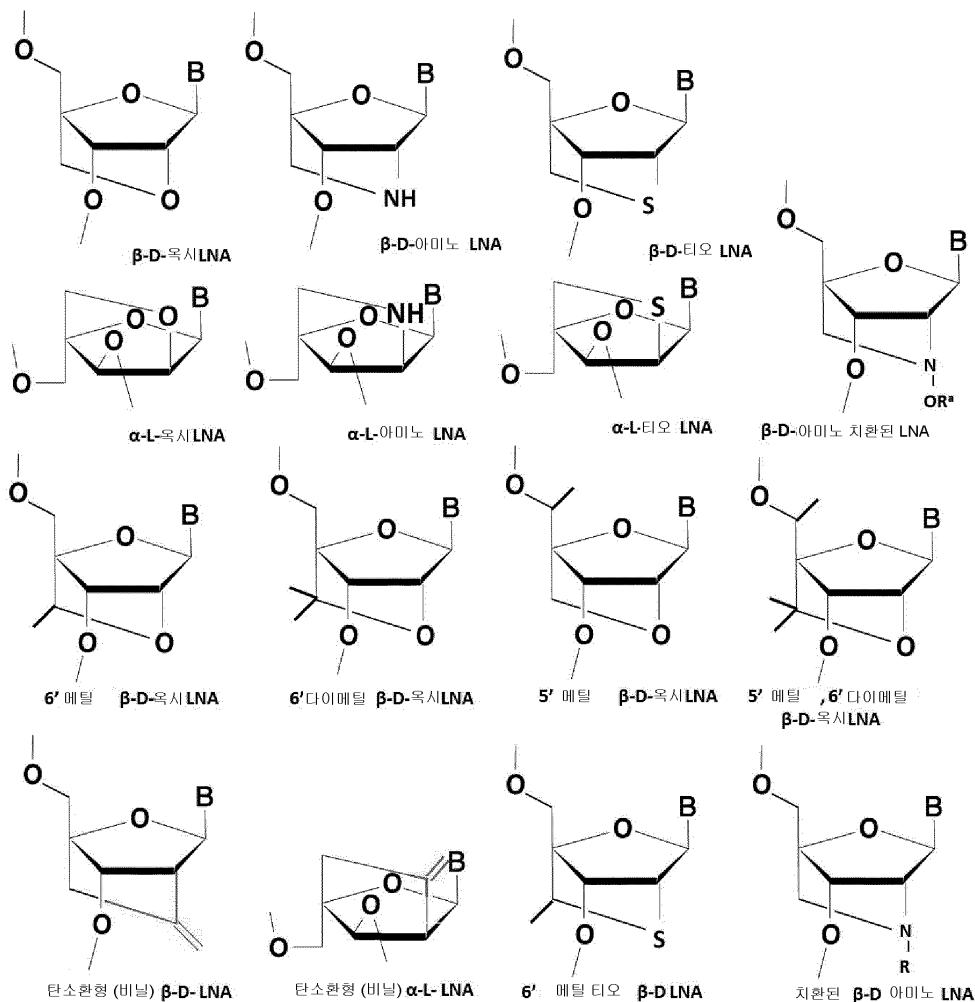
된 뉴클레오티드(CRN)로 공지되어 있고, 국제 공개공보 제2013/036868호(본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있다.

[0148] 일부 양태에서, 바이라디칼은 $-O-CR^a R^b-O-CR^a R^b-$, 예컨대 $O-CH_2-O-CH_2-$ 이고, W는 O이고, R^1 , R^2 , R^3 , R^5 및 R^{5*} 는 모두 수소이다. 일부 양태에서, R^3 는 C_{1-6} 알킬, 예컨대 메틸이다. 이러한 LNA 뉴클레오시드는 또한 COC 뉴클레오티드로 공지되어 있고, 문헌[Mitsuoka et al., Nucleic Acids Research 2009 37(4), 1225-1238](본원에 참고로서 혼입됨)에 개시되어 있다.

[0149] 달리 지시되지 않는 한, LNA 뉴클레오시드가 베타-D 또는 알파-L 입체 이성질형일 수 있음이 인정될 것이다.

[0150] LNA 뉴클레오시드의 특정 예는 하기 도식 1에 지시된다.

[도식 1]



[0152]

[0153] 상기 예에 예시된 바와 같이, 본 발명의 일부 양태에서, 오리고뉴클레오티드 중 LNA 뉴클레오시드는 베타-D-옥시-LNA 뉴클레오시드이다.

뉴클레아제 매개된 분해

[0155]

뉴클레아제 매개된 분해는 상보성 뉴클레오티드 서열과 듀플렉스를 형성할 때, 상보성 뉴클레오티드 서열의 분해를 매개할 수 있는 오리고뉴클레오티드를 지칭한다.

[0156]

일부 양태에서, 오리고뉴클레오티드는 표적 핵산의 뉴클레아제 매개된 분해를 통해 작용할 수 있고, 본 발명의 오리고뉴클레오티드는 뉴클레아제, 특히 엔도뉴클레아제, 바람직하게는 엔도리보뉴클레아제(RNase), 예컨대 RNase H를 모집할 수 있다. 뉴클레아제 매개된 기전을 통해 작동하는 오리고뉴클레오티드 디자인의 예는 전형적으로 5 또는 6개 이상의 DNA 뉴클레오시드의 영역을 포함하고 친화성 강화 뉴클레오시드, 예를 들어 캡머, 해

드며 및 테일머에 의해 한 측면 또는 양 측면 상에 접하는 올리고뉴클레오티드이다.

[0157] RNase H 활성 및 모집

안티센스 올리고뉴클레오티드의 RNase H 활성은 상보성 RNA 분자와의 듀플렉스에서 RNase H를 모집하는 이의 능력을 지칭한다. 국제 공개공보 제01/23613호는 RNase H를 모집하는 능력을 측정하는데 사용될 수 있는 RNase H 활성을 측정하기 위한 시험관내 방법을 제공한다. 전형적으로, 상보성 표적 핵산 서열과 함께 제공될 때, 시험되는 변형된 올리고뉴클레오티드와 동일한 염기 서열을 갖지만, 올리고뉴클레오티드 내의 모든 단량체 사이에 포스포로티오에이트 연결기를 갖는 DNA 단량체만을 함유하는 올리고뉴클레오티드를 사용하고, 국제 공개공보 제01/23613호(본원에 참고에 의해 혼입됨)의 실시예 91 내지 95에 제공된 방법을 사용하여 측정된 초기 속도의 5% 이상, 예컨대 10% 이상 또는 20% 초과의 초기 속도(pmol/L/분으로 측정됨)를 갖는다면, 올리고뉴클레오티드는 RNase H를 모집할 수 있는 것으로 간주된다.

[0159] 캡머

본원에 사용된 용어 "캡머"는 하나 이상의 친화성 강화 변형된 뉴클레오시드를 포함하는 영역에 의해 5' 및 3' 측면(플랭크 또는 왕)에 위치하는 RNase H 모집 올리고뉴클레오티드의 영역(캡)을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 다양한 캡 머 디자인이 본원에 기술되어 있고, RNase H를 모집하는 이들의 능력에 의해 특징지어진다. 헤드머 및 테일머는 하나의 플랭크가 소실되는, 즉 올리고뉴클레오티드의 단부 중 1개만이 친화성 강화 변형된 뉴클레오시드를 포함하는 RNase H를 모집할 수 있는 올리고뉴클레오티드이다. 헤드머의 경우, 3' 플랭크가 소실되고(즉, 5' 플랭크는 친화성 강화 변형된 뉴클레오시드를 포함함), 테일머의 경우, 5' 플랭크가 소실된다(즉, 3' 플랭크는 친화성 강화 변형된 뉴클레오시드를 포함함).

[0161] LNA 캡머

용어 "LNA 캡머"는 하나 이상의 친화성 강화 변형된 뉴클레오시드가 LNA 뉴클레오시드인 캡 머 올리고뉴클레오티드이다.

[0163] 혼합된 왕 캡머

용어 "혼합된 왕 캡머" 또는 "혼합된 플랭크 캡머"는 하나 이상의 플랭크 영역이 하나 이상의 LNA 뉴클레오시드 및 하나 이상의 비-LNA 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 하나 이상의 2' 치환된 변형된 뉴클레오시드, 예컨대, 예를 들어, 2'-O-알킬-RNA, 2'-O-메틸-RNA, 2'-알록시-RNA, 2'-O-메톡시에틸-RNA(MOE), 2'-아미노-DNA, 2'-플루오로-RNA 및 2'-F-ANA 뉴클레오시드를 포함하는 LNA 캡머를 지칭한다. 일부 양태에서, 혼합된 왕 캡머는 LNA 뉴클레오시드만을 포함하는 하나의 플랭크(예컨대, 5' 또는 3')를 갖고, 다른 플랭크(각각 3' 또는 5')는 2' 치환된 변형된 뉴클레오시드 및 임의적으로 LNA 뉴클레오시드를 포함한다.

[0165] 캡브레이커(Gapbreaker)

용어 "캡브레이커 올리고뉴클레오티드"는 캡 영역이 5개 미만의 연속적인 DNA 뉴클레오시드를 포함하도록, 캡 영역 비-RNase H 모집 뉴클레오시드(캡브레이커 뉴클레오시드, E)에 의해 파괴되더라고 RNase H 모집을 유지할 수 있는 캡 머에 관하여 사용된다. 비-RNase H 모집 뉴클레오시드는, 예를 들어 뉴클레오시드의 리보스 당 고리의 C2'와 C4' 사이의 가교가 베타 형태인 3' 엔도 형태, 예컨대 LNA의 3' 엔도 형태의 뉴클레오시드, 예컨대 베타-D-옥시 LNA 또는 ScET 뉴클레오시드이다. RNase H를 모집하는 캡브레이커 올리고뉴클레오티드의 능력은 전형적으로 서열이거나 심지어 화합물 특이적이다(일부 경우에, 표적 RNA의 더욱 특이적인 절단을 제공하는 RNase H를 모집하는 "캡브레이커" 올리고뉴클레오티드를 개시하는 문헌[Rukov et al. 2015 Nucl. Acids Res. Vol. 43 pp. 8476-8487] 참고).

일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 캡브레이커 올리고뉴클레오티드이다. 일부 양태에서, 캡브레이커 올리고뉴클레오티드는 5'-플랭크(F), 캡(G) 및 3'-플랭크(F')를 포함하고, 이때 캡은 캡이 3 또는 4개의 연속적인 DNA 뉴클레오시드를 함유하도록 비-RNase H 모집 뉴클레오시드(캡브레이커 뉴클레오시드, E)에 의해 분열된다. 일부 양태에서, 캡브레이커 뉴클레오시드(E)는 뉴클레오시드의 리보스 당 고리의 C2'와 C4' 사이의 가교가 베타 형태이고, 캡브레이커 LNA 뉴클레오시드가 적어도 3(5') 및 3(3') 또는 적어도 3(5') 및 4(3') 또는 적어도 4(5') 및 3(3') DNA 뉴클레오시드만큼 5' 및 3' 플랭크에 위치하도록 캡 영역 내에 위치하고, 올리고뉴클레오티드가 RNase H를 모집할 수 있는 LNA 뉴클레오시드이다.

[0168] 캡브레이커 올리고뉴클레오티드는 하기 구조식으로 표시될 수 있다:

- [0169] F-G-E-G-F', 특히 F₁₋₇-G₃₋₄-E₁-G₃₋₄-F' ₁₋₇
- [0170] D'-F-G-F', 특히 D'₁₋₃-F₁₋₇-G₃₋₄-E₁-G₃₋₄-F' ₁₋₇
- [0171] F-G-F'-D", 특히 F₁₋₇-G₃₋₄-E₁-G₃₋₄-F' ₁₋₇-D" ₁₋₃
- [0172] D'-F-G-F'-D", 특히 D'₁₋₃-F₁₋₇-G₃₋₄-E₁-G₃₋₄-F' ₁₋₇-D" ₁₋₃
- [0173] 이때, 영역 D' 및 D"는 섹션 "캡머 디자인"에 기술된 바와 같다.
- [0174] 일부 양태에서, 캡브레이커 뉴클레오시드(E)는 베타-D-옥시 LNA 또는 ScET이거나 도식 1에 제시된 다른 베타-LNA 뉴클레오시드이다.
- [0175] **접합체**
- [0176] 본원에 사용된 용어 "접합체"는 비-뉴클레오티드 모이어티(접합체 모이어티 또는 영역 C 또는 제3 영역)에 공유 결합으로 연결되는 올리고뉴클레오티드를 지칭하고, 올리고뉴클레오티드 접합체로도 지칭된다.
- [0177] 하나 이상의 비-뉴클레오티드 모이어티로의 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 접합은, 예컨대, 올리고뉴클레오티드의 활성, 세포 분포, 세포 흡수 또는 안정성에 영향을 줌으로써, 올리고뉴클레오티드의 약리학을 개선할 수 있다. 일부 양태에서, 접합체 모이어티는 올리고뉴클레오티드를 간으로 표적화시킨다. 동시에, 접합체는 비-표적-세포 유형, 조직 또는 기관의 올리고뉴클레오티드의 활성, 예컨대 비-표적-세포 유형, 조직 또는 기관의 오프 표적(off target) 활성 또는 활성을 감소시키는 역할을 한다. 본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 접합체는 비접합된 올리고뉴클레오티드와 비교하여, 표적 세포에서 PD-L1의 개선된 억제를 나타낸다. 다른 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 접합체는 비접합된 올리고뉴클레오티드와 비교될 때, 간과 다른 기관, 예컨대 비장 또는 신장 사이의 세포 분포를 개선하였다(즉, 더욱 접합된 올리고뉴클레오티드는 비장 또는 신장보다 간을 향함). 다른 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 접합체는 비접합된 올리고뉴클레오티드와 비교될 때, 접합체 올리고뉴클레오티드의 간으로의 개선된 세포 흡수를 나타낸다.
- [0178] 국제 공개공보 제93/07883호 및 국제 공개공보 제2013/033230호(본원에 참고로서 혼입됨)는 적합한 접합체 모이어티를 제공한다. 더욱 적합한 접합체 모이어티는 아시알로당단백질 수용체(ASGPr)로 결합할 수 있는 것이다. 특히, 3-가 N-아세틸갈اكت오사민 접합체 모이어티는 ASGPr로의 결합에 적합하다(예를 들어, 국제 공개공보 제2014/076196호, 국제 공개공보 제2014/207232호 및 국제 공개공보 제2014/179620호(본원에 참고에 의해 혼입됨) 참고). 접합체 모이어티는 본질적으로 핵산으로 구성되지 않는 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체의 부분이다.
- [0179] 올리고뉴클레오티드 접합체 및 합성은 또한 문헌[Manoharan in Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S.T. Crooke, ed., Ch. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001] 및 문헌[Manoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103](이들은 각각 이의 전체 내용이 참고로서 본원에 혼입됨)에 의해 포괄적인 검토로서 보고되었다.
- [0180] 한 양태에서, 비-뉴클레오티드 모이어티(접합체 모이어티)는 탄수화물, 세포 표면 수용체 리간드, 약물 물질, 호르몬, 친유성 물질, 중합체, 단백질, 펩티드, 독소(예컨대, 세균성 독소), 비타민, 바이러스성 단백질(예컨대, 캡시드) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0181] **연결기**
- [0182] 연결기 또는 연결자는 하나의 해당 화학적 기 또는 분절을 하나 이상의 공유 결합을 통해 다른 해당 화학적 기 또는 분절로 연결하는 2개의 원자 사이의 결합이다. 접합체 모이어티는 직접적으로 또는 연결 모이어티(예컨대, 연결기 또는 테더)를 통해 올리고뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 연결기는 제3 영역, 예컨대 접합체 모이어티(영역 C)를 제1 영역, 예컨대 올리고뉴클레오티드 또는 표적 핵산에 상보적인 인접한 뉴클레오티드 서열(영역 A)에 공유 결합으로 결합시키는 역할을 한다.
- [0183] 본 발명의 일부 양태에서, 본 발명의 접합체 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는 올리고뉴클레오티드 또는 표적 핵산에 상보적인 인접한 뉴클레오티드 서열(영역 A 또는 제1 영역)과 접합체 모이어티(영역 C 또는 제3 영역) 사이에 위치하는 연결기 영역(제2 영역 또는 영역 B 및/또는 영역 Y)을 임의적으로 포함할 수 있다.
- [0184] 영역 B는 포유동물 신체 내에서 통상적으로 만나거나 만나는 것과 유사한 조건 하에 절단성 생리학

적으로 불안정한 결합을 포함하거나 이로 이루어진 생체절단성 연결기를 지칭한다. 생리학적으로 불안정한 연결기가 화학적 변형(예컨대, 절단)을 겪는 조건은 포유동물 세포에서 발견되거나 포유동물 세포에서 만나는 바와 유사한 pH, 온도, 산화 또는 환원 조건 또는 약품, 및 염 농도와 같은 화학적 조건을 포함한다. 포유동물 세포내 조건은 또한 포유동물 세포에 통상적으로 존재하는 효소적 활성, 예컨대 단백질 분해 효소 또는 가수분해 효소 또는 뉴클레아제로부터의 효소적 활성의 존재를 포함한다. 한 양태에서, 생체절단성 연결기는 S1 뉴클레아제 절단에 민감하다. 바람직한 양태에서, 뉴클레아제 민감성 연결기는 2개 이상의 연속적인 포스포다이에스터 연결기, 예컨대 3개 이상 또는 4 또는 5개의 연속적인 포스포다이에스터 연결기를 포함하는 1 내지 10개의 뉴클레오시드, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오시드, 더욱 바람직하게는 2 내지 6개의 뉴클레오시드, 가장 바람직하게는 2 내지 4개의 연결된 뉴클레오시드를 포함한다. 바람직하게는, 뉴클레오시드는 DNA 또는 RNA이다. 생체절단성 연결기를 함유하는 포스포다이에스터는 국제 공개공보 제2014/076195호(본원에 참고에 의해 혼입됨)에 더욱 상세히 기술되어 있다.

[0185]

영역 Y는 필수적으로 생체절단성이지는 않지만, 주로 접합체 모이어티(영역 C 또는 제3 영역)를, 표적 핵산에 상보적인 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열(영역 A 또는 제1 영역)에 공유 결합으로 연결하는 역할을 한다. 영역 Y 연결기는 쇄 구조, 또는 에틸렌 글리콜, 아미노산 단위 또는 아미노 알킬 기와 같은 반복 단위의 올리고머를 포함할 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드 접합체는 하기 영역 요소로 구성될 수 있다: A-C, A-B-C, A-B-Y-C, A-Y-B-C 또는 A-Y-C. 일부 양태에서, 연결기(영역 Y)는 아미노 알킬, 예컨대 C₂-C₃₆ 아미노 알킬 기, 예를 들어 C₆-C₁₂ 아미노 알킬 기를 포함한다. 바람직한 양태에서, 연결기(영역 Y)는 C₆ 아미노 알킬 기이다.

[0186]

치료

[0187]

본원에 사용된 용어 "치료"는 존재하는 질병(예컨대, 본원에서 질병 또는 질환으로 지칭됨)의 치료, 및 질병의 방지, 즉 예방 둘 다를 지칭한다. 따라서, 본원에 언급된 치료는, 일부 양태에서, 예방적일 수 있다.

[0188]

병원균에 대한 면역 반응의 회복

[0189]

면역 반응은 내재 및 적응 면역 반응으로 분류된다. 내재 면역계는 즉각적이지만 비-특이적인 반응을 제공한다. 적응 면역 반응은 내재 면역 반응에 의해 활성화되고, 특정 병원균에 고도로 특이적이다. 항원-제시 세포의 표면 상의 병원균-유래 항원의 제시 시, 적응 면역 반응의 면역 세포(즉, T 및 B 림프구)는 이들의 항원-특이적 수용체를 통해 활성화되어 병원성-특이적 면역 반응 및 면역 기억의 발생을 야기한다. 만성 바이러스성 감염, 예컨대 HBV 및 HCV는 바이러스성-특이적 T-세포의 비반응성에 의해 특징지어지는 T-세포 배출과 연관된다. T-세포 배출은 잘 연구되었고, 검토를 위해, 예를 들어 문헌[Yi et al 2010 Immunology129, 474-481]을 참고한다. 만성 바이러스성 감염은 또한 내재 면역 세포인 NK 세포의 감소된 기능과 연관된다. 바이러스성 면역 반응의 강화는 만성 감염의 제거를 위해 중요하다. T-세포 및 NK 세포에 의해 매개된 병원균에 대한 면역 반응의 회복은 중식, 사이토kin 분비 및 세포용해 기능의 측정에 의해 평가될 수 있다(문헌[Dolina et al. 2013 Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2 e72] 및 본원의 실시예 6).

[0190]

발명의 상세한 설명

[0191]

본 발명은 동물, 특히 인간을 감염시킨 병원균에 대한 면역 반응을 회복하기 위한, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 이의 접합체 및 이들을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체는 간을 감염시킨 병원균, 특히 만성 간 감염, 예컨대 HBV에 대해 특히 유용하다. 접합체는 올리고뉴클레오티드의 표적화된 분포를 가능하게 하고 표적 핵산의 시스템 농다운(systemic knockdown)을 방지한다.

[0192]

본 발명의 올리고뉴클레오티드

[0193]

본 발명은 PD-L1의 발현을 조절할 수 있는 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 조절은 PD-L1을 코딩하거나 PD-L1의 조절과 관련된 표적 핵산으로 혼성화시킴으로써 달성될 수 있다. 표적 핵산은 포유동물 PD-L1 서열, 예컨대 서열번호 1, 서열번호 2 및/또는 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열일 수 있다. 표적 핵산은 PD-L1의 발현 또는 조절을 지지하는 포유동물 세포로부터 발현된 미성숙 mRNA, mRNA 또는 임의의 RNA 서열일 수 있다.

[0194]

본 발명의 올리고뉴클레오티드는 PD-L1을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다.

[0195]

본 발명의 한 양상에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 접합체 모이어티, 특히 아시알로당단백질 수용체 표적

화 접합체 모이어티에 접합된다.

[0196] 일부 양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 표적의 발현을 억제하거나 하향-조절함으로써 이를 조절할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 조절은 표적의 정상 발현 수준과 비교하여 20% 이상의 발현의 억제, 더욱 바람직하게는 표적의 정상 발현 수준과 비교하여 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상의 억제를 제공한다. 바람직하게는, 이러한 조절은 세포 또는 유기체가 감염성 제제에 의해 공격받거나 감염성 제제에 의한 공격을 자극하는 제제(예컨대, 폴리 I:C 또는 LPS)로 처리될 때의 발현 수준과 비교하여 20% 이상의 발현의 억제, 더욱 바람직하게는 세포 또는 유기체가 감염성 제제에 의해 공격받거나 감염성 제제에 의한 공격을 자극하는 제제(예컨대, 폴리 I:C 또는 LPS)로 처리될 때의 발현 수준과 비교하여 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상의 억제를 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 카르파스-299 또는 THP1 세포를 시험관내 사용하여 60 또는 70% 이상만큼 PD-L1 mRNA의 발현 수준을 억제할 수 있다. 일부 양태에서, 본 발명의 화합물은 카르파스-299 또는 THP1 세포를 시험관내 사용하여 50% 이상만큼 PD-L1 단백질의 발현 수준을 억제할 수 있다. 적합하게는, 실시예는 PD-L1 RNA를 측정하는데 사용될 수 있는 검정을 제공한다(예컨대, 실시예 1). 표적 조절은 올리고뉴클레오티드 및 표적 핵산의 인접한 뉴클레오티드 서열 사이의 혼성화에 의해 유발될 수 있다. 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산 사이의 미스매치를 포함한다. 미스매치에도 불구하고, 표적 핵산에 대한 혼성화는 PD-L1 발현의 목적 조절을 나타내기에 여전히 충분할 수 있다. 미스매치로부터 야기되는 감소된 결합 친화도는 올리고뉴클레오티드 내의 뉴클레오티드의 증가된 수 및/또는 표적에 대한 결합 친화도를 증가시킬 수 있는 변형된 뉴클레오시드(예컨대, 올리고뉴클레오티드 서열 내에 존재하는 2' 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 LNA)의 증가된 수에 의해 유리하게 보충될 수 있다.

[0197] 일부 양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 병원균-특이적 T-세포를 회복할 수 있다. 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 비처리된 대조군 또는 치료 기준으로 처리된 대조군과 비교될 때 40%, 50%, 60% 또는 70% 이상만큼 병원균-특이적 T-세포를 증가시킬 수 있다. 한 양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 접합체는 비처리된 대조군 또는 치료 기준으로 처리된 대조군과 비교될 때 HBV-특이적 T-세포를 증가시킬 수 있다. 적합하게는, 실시예는 HBV-특이적 T-세포를 측정하는데 사용할 수 있는 검정을 제공한다(예컨대, T-세포 증식, 사이토kin 분비 및 세포용해 활성). 다른 양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 접합체는 비처리된 대조군 또는 치료 기준으로 처리된 대조군과 비교될 때 HCV-특이적 T-세포를 증가시킬 수 있다. 다른 양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 접합체는 비처리된 대조군 또는 치료 기준으로 처리된 대조군과 비교될 때 HDV-특이적 T-세포를 증가시킬 수 있다.

[0198] 일부 양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 동물 또는 인간에서 HBsAg 수준을 감소시킬 수 있다. 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 치료 전의 수준과 비교할 때 40%, 50%, 60% 또는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80%, 90% 또는 95% 이상만큼 HBsAg 수준을 감소시킬 수 있다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 HBV에 의해 감염된 동물 또는 인간에서 HBsAg의 혈청전환을 달성할 수 있다.

[0199] 본 발명의 한 양상은 PD-L1 표적 핵산에 90% 이상 상보적인, 0 내지 30개의 뉴클레오티드 길이인 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다.

[0200] 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 표적 핵산의 영역과 90% 이상, 예컨대 91% 이상, 예컨대 92% 이상, 예컨대 93% 이상, 예컨대 94% 이상, 예컨대 95% 이상, 예컨대 96% 이상, 예컨대 97% 이상, 예컨대 98% 이상 또는 100% 상보적인 인접한 서열을 포함한다.

[0201] 바람직한 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 이의 인접한 뉴클레오티드 서열은 표적 핵산의 영역에 완전히 상보적이거나(100% 상보성), 일부 양태에서 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산 사이에 1 또는 2개의 미스매치를 포함할 수 있다.

[0202] 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2에 존재하는 표적 핵산 영역에 대해 90% 이상의 상보성, 예컨대 완전한(또는 100%) 상보성을 갖는, 10 내지 30개의 뉴클레오티드 길이의 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 서열번호 1 및 서열번호 2에 존재하는 상응하는 표적 핵산 영역에 대해 100% 상보적이다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 서열번호 1 및 서열번호 2에 존재하는 상응하는 표적 핵산 영역에 대해 100% 상보적이다.

[0203] 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는 상응하는 표적 핵산 영역에 대한 90% 이상의 상보성, 예컨대 100%의 상보성을 갖는, 10 내지 30개의 뉴클레오티드 길이의 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 이때 인접한 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1의 위치 371 내지 3068, 5467 내지 12107 및 15317 내지

19511로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적 핵산의 하위-서열에 상보적이다. 추가 양태에서, 표적 핵산의 하위-서열은 서열번호 1의 위치 371 내지 510, 822 내지 1090, 1992 내지 3068, 5467 내지 5606, 6470 내지 12107, 15317 내지 15720, 15317 내지 18083, 18881 내지 19494 및 1881 내지 19494로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 양태에서, 표적 핵산의 하위-서열은 서열번호 1의 위치 7300 내지 7333, 8028 내지 8072, 9812 내지 9859, 11787 내지 11873 및 15690 내지 15735로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0204] 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는 서열번호 1에 존재하는 상응하는 표적 핵산 영역에 대한 90% 이상의 상보성, 예컨대 100% 상보성을 갖는, 10 내지 30개의 뉴클레오티드 길이의 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 표적 핵산 영역은 표 4의 영역 a1 내지 a449로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0205] [표 4]

[0206] 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 사용하여 표적화될 수 있는 서열번호 1의 영역

영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이	영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이	영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이
	개시	종결			개시	종결			개시	종결	
a1	51	82	32	a151	6994	7020	27	a301	13092	13115	24
a2	87	116	30	a152	7033	7048	16	a302	13117	13134	18
a3	118	133	16	a153	7050	7066	17	a303	13136	13169	34
a4	173	206	34	a154	7078	7094	17	a304	13229	13249	21
a5	221	287	67	a155	7106	7122	17	a305	13295	13328	34
a6	304	350	47	a156	7123	7144	22	a306	13330	13372	43
a7	354	387	34	a157	7146	7166	21	a307	13388	13406	19
a8	389	423	35	a158	7173	7193	21	a308	13408	13426	19
a9	425	440	16	a159	7233	7291	59	a309	13437	13453	17
a10	452	468	17	a160	7300	7333	34	a310	13455	13471	17
a11	470	484	15	a161	7336	7351	16	a311	13518	13547	30
a12	486	500	15	a162	7353	7373	21	a312	13565	13597	33
a13	503	529	27	a163	7375	7412	38	a313	13603	13620	18
a14	540	574	35	a164	7414	7429	16	a314	13630	13663	34
a15	576	649	74	a165	7431	7451	21	a315	13665	13679	15
a16	652	698	47	a166	7453	7472	20	a316	13706	13725	20
a17	700	750	51	a167	7474	7497	24	a317	13727	13774	48
a18	744	758	15	a168	7517	7532	16	a318	13784	13821	38
a19	774	801	28	a169	7547	7601	55	a319	13831	13878	48
a20	805	820	16	a170	7603	7617	15	a320	13881	13940	60
a21	827	891	65	a171	7632	7647	16	a321	13959	14013	55
a22	915	943	29	a172	7649	7666	18	a322	14015	14031	17
a23	950	982	33	a173	7668	7729	62	a323	14034	14049	16
a24	984	1000	17	a174	7731	7764	34	a324	14064	14114	51
a25	1002	1054	53	a175	7767	7817	51	a325	14116	14226	111
a26	1060	1118	59	a176	7838	7860	23	a326	14229	14276	48
a27	1124	1205	82	a177	7862	7876	15	a327	14292	14306	15
a28	1207	1255	49	a178	7880	7944	65	a328	14313	14384	72
a29	1334	1349	16	a179	7964	8012	49	a329	14386	14408	23
a30	1399	1425	27	a180	8028	8072	45	a330	14462	14481	20
a31	1437	1458	22	a181	8086	8100	15	a331	14494	14519	26
a32	1460	1504	45	a182	8102	8123	22	a332	14557	14577	21
a33	1548	1567	20	a183	8125	8149	25	a333	14608	14628	21
a34	1569	1586	18	a184	8151	8199	49	a334	14646	14668	23
a35	1608	1662	55	a185	8218	8235	18	a335	14680	14767	88

[0207]

영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이	영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이	영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이
	개시	종결			개시	종결			개시	종결	
a36	1677	1700	24	a186	8237	8276	40	a336	14765	14779	15
a37	1702	1721	20	a187	8299	8344	46	a337	14815	14844	30
a38	1723	1745	23	a188	8346	8436	91	a338	14848	14925	78
a39	1768	1794	27	a189	8438	8470	33	a339	14934	14976	43
a40	1820	1835	16	a190	8472	8499	28	a340	14978	15009	32
a41	1842	1874	33	a191	8505	8529	25	a341	15013	15057	45
a42	1889	1979	91	a192	8538	8559	22	a342	15064	15091	28
a43	1991	2011	21	a193	8562	8579	18	a343	15094	15140	47
a44	2013	2038	26	a194	8581	8685	105	a344	15149	15165	17
a45	2044	2073	30	a195	8688	8729	42	a345	15162	15182	21
a46	2075	2155	81	a196	8730	8751	22	a346	15184	15198	15
a47	2205	2228	24	a197	8777	8800	24	a347	15200	15221	22
a48	2253	2273	21	a198	8825	8865	41	a348	15232	15247	16
a49	2275	2303	29	a199	8862	8894	33	a349	15250	15271	22
a50	2302	2333	32	a200	8896	8911	16	a350	15290	15334	45
a51	2335	2366	32	a201	8938	8982	45	a351	15336	15369	34
a52	2368	2392	25	a202	8996	9045	50	a352	15394	15416	23
a53	2394	2431	38	a203	9048	9070	23	a353	15433	15451	19
a54	2441	2455	15	a204	9072	9139	68	a354	15453	15491	39
a55	2457	2494	38	a205	9150	9168	19	a355	15496	15511	16
a56	2531	2579	49	a206	9170	9186	17	a356	15520	15553	34
a57	2711	2732	22	a207	9188	9202	15	a357	15555	15626	72
a58	2734	2757	24	a208	9204	9236	33	a358	15634	15652	19
a59	2772	2786	15	a209	9252	9283	32	a359	15655	15688	34
a60	2788	2819	32	a210	9300	9331	32	a360	15690	15735	46
a61	2835	2851	17	a211	9339	9354	16	a361	15734	15764	31
a62	2851	2879	29	a212	9370	9398	29	a362	15766	15787	22
a63	2896	2912	17	a213	9400	9488	89	a363	15803	15819	17
a64	2915	2940	26	a214	9490	9537	48	a364	15846	15899	54
a65	2944	2973	30	a215	9611	9695	85	a365	15901	15934	34
a66	2973	2992	20	a216	9706	9721	16	a366	15936	15962	27
a67	2998	3016	19	a217	9723	9746	24	a367	15964	15985	22
a68	3018	3033	16	a218	9748	9765	18	a368	15987	16023	37
a69	3036	3051	16	a219	9767	9788	22	a369	16025	16061	37
a70	3114	3139	26	a220	9794	9808	15	a370	16102	16122	21
a71	3152	3173	22	a221	9812	9859	48	a371	16134	16183	50
a72	3181	3203	23	a222	9880	9913	34	a372	16185	16281	97

[0208]

영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이	영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이	영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이
	개시	종결			개시	종결			개시	종결	
a73	3250	3271	22	a223	9923	9955	33	a373	16283	16298	16
a74	3305	3335	31	a224	9966	10007	42	a374	16305	16323	19
a75	3346	3363	18	a225	10009	10051	43	a375	16325	16356	32
a76	3391	3446	56	a226	10053	10088	36	a376	16362	16404	43
a77	3448	3470	23	a227	10098	10119	22	a377	16406	16456	51
a78	3479	3497	19	a228	10133	10163	31	a378	16494	16523	30
a79	3538	3554	17	a229	10214	10240	27	a379	16536	16562	27
a80	3576	3597	22	a230	10257	10272	16	a380	16564	16580	17
a81	3603	3639	37	a231	10281	10298	18	a381	16582	16637	56
a82	3663	3679	17	a232	10300	10318	19	a382	16631	16649	19
a83	3727	3812	86	a233	10339	10363	25	a383	16655	16701	47
a84	3843	3869	27	a234	10409	10426	18	a384	16737	16781	45
a85	3874	3904	31	a235	10447	10497	51	a385	16783	16804	22
a86	3926	3955	30	a236	10499	10529	31	a386	16832	16907	76
a87	3974	3993	20	a237	10531	10546	16	a387	16934	16965	32
a88	3995	4042	48	a238	10560	10580	21	a388	16972	17035	64
a89	4053	4073	21	a239	10582	10596	15	a389	17039	17069	31
a90	4075	4123	49	a240	10600	10621	22	a390	17072	17109	38
a91	4133	4157	25	a241	10623	10664	42	a391	17135	17150	16
a92	4158	4188	31	a242	10666	10685	20	a392	17167	17209	43
a93	4218	4250	33	a243	10717	10773	57	a393	17211	17242	32
a94	4277	4336	60	a244	10775	10792	18	a394	17244	17299	56
a95	4353	4375	23	a245	10794	10858	65	a395	17304	17344	41
a96	4383	4398	16	a246	10874	10888	15	a396	17346	17400	55
a97	4405	4446	42	a247	10893	10972	80	a397	17447	17466	20
a98	4448	4464	17	a248	10974	10994	21	a398	17474	17539	66
a99	4466	4493	28	a249	10996	11012	17	a399	17561	17604	44
a100	4495	4558	64	a250	11075	11097	23	a400	17610	17663	54
a101	4571	4613	43	a251	11099	11124	26	a401	17681	17763	83
a102	4624	4683	60	a252	11140	11157	18	a402	17793	17810	18
a103	4743	4759	17	a253	11159	11192	34	a403	17812	17852	41
a104	4761	4785	25	a254	11195	11226	32	a404	17854	17928	75
a105	4811	4858	48	a255	11235	11261	27	a405	17941	18005	65
a106	4873	4932	60	a256	11279	11337	59	a406	18007	18035	29
a107	4934	4948	15	a257	11344	11381	38	a407	18041	18077	37
a108	4955	4974	20	a258	11387	11411	25	a408	18085	18146	62
a109	4979	5010	32	a259	11427	11494	68	a409	18163	18177	15

[0209]

영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이	영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이	영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이
	개시	종결			개시	종결			개시	종결	
a110	5012	5052	41	a260	11496	11510	15	a410	18179	18207	29
a111	5055	5115	61	a261	11512	11526	15	a411	18209	18228	20
a112	5138	5166	29	a262	11528	11551	24	a412	18230	18266	37
a113	5168	5198	31	a263	11570	11592	23	a413	18268	18285	18
a114	5200	5222	23	a264	11594	11634	41	a414	18287	18351	65
a115	5224	5284	61	a265	11664	11684	21	a415	18365	18395	31
a116	5286	5302	17	a266	11699	11719	21	a416	18402	18432	31
a117	5317	5332	16	a267	11721	11746	26	a417	18434	18456	23
a118	5349	5436	88	a268	11753	11771	19	a418	18502	18530	29
a119	5460	5512	53	a269	11787	11873	87	a419	18545	18590	46
a120	5514	5534	21	a270	11873	11905	33	a420	18603	18621	19
a121	5548	5563	16	a271	11927	11942	16	a421	18623	18645	23
a122	5565	5579	15	a272	11946	11973	28	a422	18651	18708	58
a123	5581	5597	17	a273	11975	11993	19	a423	18710	18729	20
a124	5600	5639	40	a274	12019	12114	96	a424	18731	18758	28
a125	5644	5661	18	a275	12116	12135	20	a425	18760	18788	29
a126	5663	5735	73	a276	12137	12158	22	a426	18799	18859	61
a127	5737	5770	34	a277	12165	12192	28	a427	18861	18926	66
a128	5778	5801	24	a278	12194	12216	23	a428	18928	18980	53
a129	5852	5958	107	a279	12218	12246	29	a429	19001	19018	18
a130	6007	6041	35	a280	12262	12277	16	a430	19034	19054	21
a131	6049	6063	15	a281	12283	12319	37	a431	19070	19092	23
a132	6065	6084	20	a282	12334	12368	35	a432	19111	19154	44
a133	6086	6101	16	a283	12370	12395	26	a433	19191	19213	23
a134	6119	6186	68	a284	12397	12434	38	a434	19215	19240	26
a135	6189	6234	46	a285	12436	12509	74	a435	19255	19356	102
a136	6236	6278	43	a286	12511	12543	33	a436	19358	19446	89
a137	6291	6312	22	a287	12545	12565	21	a437	19450	19468	19
a138	6314	6373	60	a288	12567	12675	109	a438	19470	19512	43
a139	6404	6447	44	a289	12677	12706	30	a439	19514	19541	28
a140	6449	6482	34	a290	12708	12724	17	a440	19543	19568	26
a141	6533	6555	23	a291	12753	12768	16	a441	19570	19586	17
a142	6562	6622	61	a292	12785	12809	25	a442	19588	19619	32
a143	6624	6674	51	a293	12830	12859	30	a443	19683	19739	57
a144	6679	6762	84	a294	12864	12885	22	a444	19741	19777	37
a145	6764	6780	17	a295	12886	12916	31	a445	19779	19820	42
a146	6782	6822	41	a296	12922	12946	25	a446	19822	19836	15

영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이	영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이	영역 a	서열번호 1에서의 위치		길이
	개시	종결			개시	종결			개시	종결	
a147	6824	6856	33	a297	12948	12970	23	a447	19838	19911	74
a148	6858	6898	41	a298	12983	13003	21	a448	19913	19966	54
a149	6906	6954	49	a299	13018	13051	34	a449	19968	20026	59
a150	6969	6992	24	a300	13070	13090	21				

[0210]

[0211]

[0212]

일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 표적 핵산의 영역에 상보적이고, 이때 표적 핵산 영역은 a7, a26, a43, a119, a142, a159, a160, a163, a169, a178, a179, a180, a189, a201, a202, a204, a214, a221, a224, a226, a243, a254, a258, 269, a274, a350, a360, a364, a365, a370, a372, a381, a383, a386, a389, a400, a427, a435 및 a438로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0213] 바람직한 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 표적 핵산의 영역에 상보적이고, 이 때 표적 핵산 영역은 a160, a180, a221, a269 및 a360으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0214] 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 8 내지 35개의 뉴클레오티드 길이, 예컨대 9 내지 30개, 예컨대 10 내지 22개, 예컨대 11 내지 20개, 예컨대 12 내지 18개, 예컨대 13 내지 17개 또는 14 내지 16개 길이의 인접한 뉴클레오티드를 포함하거나 이들로 이루어진다. 바람직한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 16 내지 20개 길이의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다. 본원에 제공된 임의의 범위는 범위 종말점을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 올리고뉴클레오티드가 10 내지 30개의 뉴클레오티드를 포함하는 것으로 언급되면, 10개 및 30개의 뉴클레오티드가 둘 다 포함된다.
- [0215] 일부 양태에서, 인접한 뉴클레오티드 서열은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 길이의 인접한 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다. 바람직한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 16, 17, 18, 19 또는 20개 길이의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0216] 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 표 5에 열거된 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0217] 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 서열번호 5 내지 743으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열에 대한 90% 이상의 동일성, 바람직하게는 100% 동일성을 갖는 10 내지 30개 길이의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다(표 5에 열거된 모티프 서열).
- [0218] 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 서열번호 5 내지 743 및 771로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열에 대한 90% 이상의 동일성, 바람직하게는 100% 동일성을 갖는 10 내지 30개 길이의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0219] 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 서열번호 6, 8, 9, 13, 41, 42, 58, 77, 92, 111, 128, 151, 164, 166, 169, 171, 222, 233, 245, 246, 250, 251, 252, 256, 272, 273, 287, 292, 303, 314, 318, 320, 324, 336, 342, 343, 344, 345, 346, 349, 359, 360, 374, 408, 409, 415, 417, 424, 429, 430, 458, 464, 466, 474, 490, 493, 512, 519, 519, 529, 533, 534, 547, 566, 567, 578, 582, 601, 619, 620, 636, 637, 638, 640, 645, 650, 651, 652, 653, 658, 659, 660, 665, 678, 679, 680, 682, 683, 684, 687, 694, 706, 716, 728, 733, 734 및 735로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열에 대한 90% 이상의 동일성, 바람직하게는 100% 동일성을 갖는 10 내지 30개 길이의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0220] 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 서열번호 287에 대한 90% 이상의 동일성, 바람직하게는 100% 동일성을 갖는 10 내지 30개 길이의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0221] 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 서열번호 342에 대한 90% 이상의 동일성, 바람직하게는 100% 동일성을 갖는 10 내지 30개 길이의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0222] 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 서열번호 640에 대한 90% 이상의 동일성, 바람직하게는 100% 동일성을 갖는 10 내지 30개 길이의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0223] 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 서열번호 466에 대한 90% 이상의 동일성, 바람직하게는 100% 동일성을 갖는 10 내지 30개 길이의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0224] 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 서열번호 566에 대한 90% 이상의 동일성, 바람직하게는 100% 동일성을 갖는 10 내지 30개 길이의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0225] 올리고뉴클레오티드가 인접한 뉴클레오티드 서열(표적 핵산에 상보적임)보다 긴 양태에서, 표 5의 모티프 서열은 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 인접한 뉴클레오티드 서열 부분을 형성한다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드의 서열은 인접한 뉴클레오티드 서열과 동등하다(예컨대, 어떠한 생체절단성 연결기도 첨가되

지 않은 경우).

- [0226] 인접한 핵염기 서열(모티프 서열)이 변형되어, 예를 들어 뉴클레아제 내성 및/또는 표적 핵산에 대한 친화도를 증가시킬 수 있음이 이해된다. 변형은 정의 및 "올리고뉴클레오티드 디자인" 섹션에 기술되어 있다. 표 5는 각각의 모티프 서열의 바람직한 디자인을 열거한다.
- [0227] **올리고뉴클레오티드 디자인**
- [0228] 올리고뉴클레오티드 디자인은 올리고뉴클레오티드 서열에서 뉴클레오시드 당 변형의 패턴을 지칭한다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 당-변형된 뉴클레오시드를 포함하고, DNA 또는 RNA 뉴클레오시드를 또한 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 당-변형된 뉴클레오시드 및 DNA 뉴클레오시드를 포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드로의 변형된 뉴클레오시드의 혼입은 표적 핵산에 대한 올리고뉴클레오티드의 친화도를 강화시킬 수 있다. 이러한 경우, 변형된 뉴클레오시드는 친화성 강화 변형된 뉴클레오티드로 언급될 수 있고, 변형된 뉴클레오시드는 또한 단위로 지칭될 수 있다.
- [0229] 한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 1개 이상의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상 또는 16개 이상의 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 1 내지 10개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2 내지 8개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 3 내지 7개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 4 내지 6개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 3, 4, 5, 6 또는 7개의 변형된 뉴클레오시드를 포함한다.
- [0230] 한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 당 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2' 당 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 2'-0-알킬-RNA, 2'-0-메틸-RNA, 2'-알콕시-RNA, 2'-0-메톡시에틸-RNA, 2'-아미노-DNA, 2'-플루오로-DNA, 아라비노 핵산(ANA), 2'-플루오로-ANA 및 LNA 뉴클레오시드로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 2' 당 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 더욱 더 바람직하게는, 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드는 잠금 핵산(LNA)이다.
- [0231] 추가 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드간 연결기를 포함한다. 바람직한 양태에서, 인접한 뉴클레오티드 서열 내의 뉴클레오시드간 연결기는 포스포로티오에이트 또는 보라노포스페이트 뉴클레오시드간 연결기이다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드의 인접한 서열 내의 모든 뉴클레오티드간 연결기는 포스포로티오에이트 연결기이다.
- [0232] 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 LNA 뉴클레오시드, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 LNA 뉴클레오시드, 예컨대 2 내지 6개의 LNA 뉴클레오시드, 예컨대 3 내지 7개의 LNA 뉴클레오시드, 4 내지 6개의 LNA 뉴클레오시드, 또는 3, 4, 5, 6 또는 7개의 LNA 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 내의 75% 이상의 변형된 뉴클레오시드는 LNA 뉴클레오시드이고, 예컨대 80%, 예컨대 85%, 예컨대 90%의 변형된 뉴클레오시드는 LNA 뉴클레오시드이다. 또 다른 양태에서, 올리고뉴클레오티드 내의 모든 변형된 뉴클레오시드는 LNA 뉴클레오시드이다. 추가 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 베타-D-옥시-LNA, 및 하기 LNA 뉴클레오시드 중 하나 이상을 모두 포함할 수 있다: 티오-LNA, 아미노-LNA, 옥시-LNA, 및/또는 베타-D 또는 알파-L 배열 또는 이들의 조합인 ENA. 추가 양태에서, 모든 LNA 사이토신 단위는 5-메틸-사이토신이다. 바람직한 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 뉴클레오티드 서열의 5' 말단의 1개 이상의 LNA 뉴클레오시드 및 3' 말단의 2개 이상의 LNA 뉴클레오시드를 갖는다.
- [0233] 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 2'-MOE-RNA 뉴클레오시드인 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 2'-MOE-RNA 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 양태에서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드는 2'-플루오로-DNA, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 2'-플루오로-DNA 뉴클레오시드이다.
- [0234] 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 LNA 뉴클레오시드 및 하나 이상의 2' 치환된 변형된 뉴클레오시드를 포함한다.
- [0235] 본 발명의 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 2' 당 변형된 뉴클레오시드 및 DNA 단위를 둘 다 포함한다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드는 LNA 및 DNA 뉴클레오시드(단위)를 둘 다 포함한다. 바람직하게는, LNA 및 DNA 단위의 합한 총계는 8 내지 30, 예컨대 10 내지 25, 바람직하게는 12 내지 22, 예컨대 12 내지 18, 더욱 더 바람직하게는 11 내지 16이다. 본 발명의 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열, 예컨대 인접한 뉴클레오티드 서열은 1 또는 2개 이상의 LNA 뉴클레오시드로 이루어지고, 나머지 뉴클레오시드는 DNA 단위

이다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 단지 LNA 뉴클레오시드 및 천연 발생 뉴클레오시드(예컨대, RNA 또는 DNA, 가장 바람직하게는 DNA 뉴클레오시드)를, 임의적으로 변형된 뉴클레오시드간 연결기, 예컨대 포스프로토오에이트와 함께 포함한다.

[0236] 본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 RNase H를 모집할 수 있다.

[0237] 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 구조 디자인은 캡머, 캡브레이커, 헤드머 및 테일머로부터 선택될 수 있다.

캡머 디자인

[0239] 바람직한 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 본원에서 단지 "캡머"로도 지칭되는 캡머 디자인 또는 구조를 갖는다. 캡머 구조에서, 올리고뉴클레오티드는 3개 이상의 별개의 구조 영역 5'-플랭크, 캡 및 3'-플랭크, F-G-F'를 '5' → '3' 방향으로 포함한다. 이러한 디자인에서, 플랭킹 영역 F 및 F'(또한 왕 영역으로 지칭됨)는 PD-L1 표적 핵산에 상보적인 변형된 뉴클레오시드의 인접한 스트레치를 포함하는 한편, 캡 영역(G)은 뉴클레아제, 바람직하게는 엔도뉴클레아제, 예컨대 RNase, 예를 들어 RNase H를 모집할 수 있는 뉴클레오티드의 인접한 스트레치를 포함하고, 이때 올리고뉴클레오티드는 표적 핵산과 듀플렉스로 존재한다. 뉴클레아제, 특히 RNase H를 모집할 수 있는 뉴클레오시드는 DNA, 알파-1-옥시-LNA, 2'-플루오로-ANA 및 UNA로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 영역 G의 5' 및 3' 말단을 플랭킹하는 영역 F 및 F'는, 바람직하게는 비-뉴클레아제 모집 뉴클레오시드(3' 엔도 구조를 갖는 뉴클레오시드), 더욱 바람직하게는 하나 이상의 친화성 강화 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 양태에서, 3' 플랭크는 하나 이상의 LNA 뉴클레오시드, 바람직하게는 2개 이상의 LNA 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 양태에서, 5' 플랭크는 하나 이상의 LNA 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 양태에서, 5' 및 3' 플랭킹 영역 둘 다는 LNA 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 양태에서, 플랭킹 영역 내의 모든 뉴클레오시드는 LNA 뉴클레오시드이다. 다른 양태에서, 플랭킹 영역은 LNA 뉴클레오시드 및 다른 뉴클레오시드를 둘 다(예컨대, DNA 뉴클레오시드 및/또는 비-LNA 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2' 치환된 뉴클레오시드) 포함할 수 있다(혼합된 플랭크). 이러한 경우, 캡은 친화성 강화 변형된 뉴클레오시드, 바람직하게는 LNA, 예컨대 베타-D-옥시-LNA에 의해 5' 및 3' 말단에서 플랭킹된 5개 이상의 RNase H 모집 뉴클레오시드(2' 엔도 구조를 갖는 뉴클레오시드, 바람직하게는 DNA)의 인접한 서열로 정의된다. 결과적으로, 캡 영역의 인근에 존재하는 5' 플랭킹 영역 및 3' 플랭킹 영역의 뉴클레오시드는 변형된 뉴클레오시드, 바람직하게는 비-뉴클레아제 모집 뉴클레오시드이다.

영역 F

[0241] 영역 G의 5' 말단에 부착된 영역 F(5' 플랭크 또는 5' 왕)는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상의 변형된 뉴클레오시드를 포함하거나 함유하거나 이로 이루어진다. 한 양태에서, 영역 F는 1 내지 7개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2 내지 6개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2 내지 5개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2 내지 4개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 1 내지 3 개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 1, 2, 3 또는 4개의 변형된 뉴클레오시드를 포함하거나 이로 이루어진다. F 영역은 영역의 5' 말단 및 3' 말단에 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 가짐으로써 정의된다.

[0242] 일부 양태에서, 영역 F의 변형된 뉴클레오시드는 3' 엔도 구조를 갖는다.

[0243] 한 양태에서, 영역 F의 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드는 2' 변형된 뉴클레오시드이다. 한 양태에서, 영역 F의 모든 뉴클레오시드는 2' 변형된 뉴클레오시드이다.

[0244] 다른 양태에서, 영역 F는 2' 변형된 뉴클레오시드 이외에 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. DNA 및/또는 RNA를 포함하는 플랭크는 F 영역의 5' 말단 및 3' 말단(G 영역의 인근임)에 2' 변형된 뉴클레오시드를 갖는 것으로 특징지어진다. 한 양태에서, 영역 F는 DNA 뉴클레오시드, 예컨대 1 내지 3개의 인접한 DNA 뉴클레오시드, 예컨대 1 내지 3개 또는 1 또는 2개의 인접한 DNA 뉴클레오시드를 포함한다. 플랭크의 DNA 뉴클레오시드는 바람직하게는 RNase H를 모집할 수 없어야 한다. 일부 양태에서, F 영역의 2' 변형된 뉴클레오시드 및 DNA 및/또는 RNA 뉴클레오시드는 1 내지 3개의 2' 변형된 뉴클레오시드 및 1 내지 3개의 DNA 및/또는 RNA 뉴클레오시드와 교호한다. 이러한 플랭크는 또한 교호하는 플랭크로 지정될 수 있다. 교호하는 플랭크를 갖는 올리고뉴클레오티드 내의 5' 플랭크(영역 F)의 길이는 4 내지 10개의 뉴클레오시드, 예컨대 4 내지 8개, 예컨대 4 내지 6개 뉴클레오시드, 예컨대 4, 5, 6 또는 7개의 변형된 뉴클레오시드일 수 있다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드의 5' 플랭크만이 교호한다. 교호하는 뉴클레오시드를 갖는 영역 F의 특정 예는 다음과 같다:

2' ₁₋₃-N' ₁₋₄-2' ₁₋₃

[0246] $2'_{1-2}N'_{1-2}-2'_{1-2}N'_{1-2}-2'_{1-2}$

[0247] 이때, 2'는 변형된 뉴클레오시드를 나타내고, N'는 RNA 또는 DNA이다. 일부 양태에서, 교호하는 플랭크 내의 모든 변형된 뉴클레오시드는 LNA이고, N'은 DNA이다. 추가 양태에서, 영역 F 내의 하나 이상의 2' 변형된 뉴클레오시드는 2'-0-알킬-RNA 단위, 2'-0-메틸-RNA, 2'-아미노-DNA 단위, 2'-플루오로-DNA 단위, 2'-알콕시-RNA, MOE 단위, LNA 단위, 아라비노 핵산(ANA) 단위 및 2'-플루오로-ANA 단위로부터 선택된다.

[0248] 일부 양태에서, F 영역은 LNA 및 2' 치환된 변형된 뉴클레오시드를 둘 다 포함한다. 이들은 종종 혼합된 왕 또는 혼합된 플랭크 올리고뉴클레오티드로 지칭된다.

[0249] 본 발명의 한 양태에서, 영역 F 내의 모든 변형된 뉴클레오시드는 LNA 뉴클레오시드이다. 추가 양태에서, 영역 F 내의 모든 뉴클레오시드는 LNA 뉴클레오시드이다. 추가 양태에서, 영역 F 내의 LNA 뉴클레오시드는 독립적으로 옥시-LNA, 티오-LNA, 아미노-LNA, cET 및/또는 ENA(베타-D 또는 알파-L 배열 또는 이들의 조합임)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 양태에서, 영역 F는 인접한 서열의 5' 말단에서 1개 이상의 베타-D-옥시 LNA 단위를 포함한다.

[0250] 영역 G

[0251] 영역 G(캡 영역)는 바람직하게는 상기 뉴클레아제, 특히 RNase H를 모집할 수 있는 4개 이상, 예컨대 5개 이상, 예컨대 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상 또는 16개 이상의 연속적인 뉴클레오시드를 포함하거나 모집하거나 이로 이루어진다. 추가 양태에서, 영역 G는 상기 뉴클레아제를 모집할 수 있는 5 내지 12개, 또는 6 내지 10개 또는 7 내지 9개, 예컨대 8개의 연속적인 뉴클레오티드 단위를 포함하거나 모집하거나 이로 이루어진다.

[0252] 뉴클레아제를 모집할 수 있는 영역 G의 뉴클레오시드 단위는 한 양태에서 DNA, 알파-1-LNA, C4' 알킬화된 DNA (국제 특허출원 제PCT/EP2009/050349호 및 문헌[Vester et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 2296 - 2300], 둘 다 참고로서 본원에 혼입됨), 아라비노스 유래 뉴클레오시드, 예컨대 ANA 및 2'F-ANA(문헌[Mangos et al. 2003 J. AM. CHEM. SOC. 125, 654-661]), UNA(비잠금 핵산)(문헌[Fluitter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039]에 기술됨, 참고로서 본원에 혼입됨)로 이루어진 군으로부터 선택된다. UNA는, 전형적으로 리보스의 C2와 C3 사이의 결합이 제거되어 비잠금 "당" 잔사를 형성하는 비잠금 핵산이다.

[0253] 또 다른 양태에서, 영역 G 내의 하나 이상의 뉴클레오시드 단위는 DNA 뉴클레오시드 단위, 예컨대 1 내지 18개의 DNA 단위, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개의 DNA 단위, 바람직하게는 2 내지 17개의 DNA 단위, 예컨대 3 내지 16개의 DNA 단위, 예컨대 4 내지 15개의 DNA 단위, 예컨대 5 내지 14개의 DNA 단위, 예컨대 6 내지 13개의 DNA 단위, 예컨대 7 내지 12개의 DNA 단위, 예컨대 8 내지 11개의 DNA 단위, 더욱 바람직하게는 8 내지 17개의 DNA 단위, 또는 9 내지 16개의 DNA 단위, 10 내지 15개의 DNA 단위 또는 11 내지 13개의 DNA 단위, 예컨대 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17개의 DNA 단위이다. 일부 양태에서, 영역 G는 100% DNA 단위로 이루어진다.

[0254] 추가 양태에서, 영역 G는 DNA, 및 RNase H 절단을 매개할 수 있는 다른 뉴클레오시드의 혼합물로 이루어질 수 있다. 영역 G는 50% 이상의 DNA, 더욱 바람직하게는 60%, 70% 또는 80%의 DNA, 더욱 더 바람직하게는 90% 또는 95%의 DNA로 이루어질 수 있다.

[0255] 또 다른 양태에서, 영역 G 내의 하나 이상의 뉴클레오시드 단위는 알파-1-LNA 뉴클레오시드 단위, 예컨대 하나 이상의 알파-1-LNA, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 알파-1-LNA이다. 추가 양태에서, 영역 G는 하나 이상의 알파-1-LNA 또는 알파-1-옥시-LNA를 포함한다. 추가 양태에서, 영역 G는 DNA 및 알파-1-LNA 뉴클레오시드 단위의 조합을 포함한다.

[0256] 일부 양태에서, 영역 G 내의 뉴클레오시드는 2' 엔도 구조를 갖는다.

[0257] 일부 양태에서, 영역 G는 캡브레이커 뉴클레오시드를 포함하여, RNase H를 모집할 수 있는 캡브레이커 올리고뉴클레오티드를 야기할 수 있다.

[0258] 영역 F'

[0259] 영역 G의 3' 말단에 부착된 영역 F'(3' 플랭크 또는 3' 왕)는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상의 변형된 뉴클레오시드를 포함하거나 함유하거나 이로 이루어진다. 한 양태에서, 영역 F'는 1 내지 7개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2 내지 6개의 변형된 뉴클레

오시드, 예컨대 2 내지 4개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 1 내지 3개의 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 1, 2, 3 또는 4개의 변형된 뉴클레오시드를 포함하거나 이로 이루어진다. F' 영역은 영역의 5' 말단 및 3' 말단에 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 갖는 것에 의해 정의된다.

[0260] 일부 양태에서, 영역 F' 내의 변형된 뉴클레오시드는 3' 엔도 구조를 갖는다.

[0261] 한 양태에서, 영역 F' 내의 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드는 2' 변형된 뉴클레오시드이다. 한 양태에서, 영역 F' 내의 모든 뉴클레오시드는 2' 변형된 뉴클레오시드이다.

[0262] 한 양태에서, 영역 F' 내의 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드는 2' 변형된 뉴클레오시드이다.

[0263] 한 양태에서, 영역 F' 내의 모든 뉴클레오시드는 2' 변형된 뉴클레오시드이다. 다른 양태에서, 영역 F'는 2' 변형된 뉴클레오시드 이외에 DNA 또는 RNA를 포함한다. DNA 또는 RNA를 포함하는 플랭크는 F' 영역의 5' 말단 (G 영역의 인근) 및 3' 말단 내의 2' 변형된 뉴클레오시드를 갖는 것에 의해 특징지어질 수 있다. 한 양태에서, 영역 F'는 DNA 뉴클레오시드, 예컨대 1 내지 4개의 인접한 DNA 뉴클레오시드, 예컨대 1 내지 3개 또는 1 또는 2개의 인접한 DNA 뉴클레오시드를 포함한다. 플랭크 내의 DNA 뉴클레오시드는 바람직하게는 RNase H를 모집할 수 없어야 한다. 일부 양태에서, F' 영역 내의 2' 변형된 뉴클레오시드 및 DNA 및/또는 RNA 뉴클레오시드는 1 내지 3개의 2' 변형된 뉴클레오시드 및 1 내지 3개의 DNA 및/또는 RNA 뉴클레오시드와 교호하고, 이러한 플랭크는 또한 교호하는 플랭크로 지칭될 수 있다. 교호하는 플랭크를 갖는 올리고뉴클레오티드 내의 3' 플랭크(영역 F')의 길이는 4 내지 10개의 뉴클레오시드, 예컨대 4 내지 8개, 예컨대 4 내지 6개 뉴클레오시드, 예컨대 4, 5, 6 또는 7개의 변형된 뉴클레오시드일 수 있다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드의 3' 플랭크만이 교호한다. 교호하는 뉴클레오시드를 갖는 영역 F'의 특정 예는 다음과 같다:

[0264] $2'_{1-2}-N'_{1-4}-2'_{1-4}$

[0265] $2'_{1-2}-N'_{1-2}-2'_{1-2}-N'_{1-2}-2'_{1-2}$

[0266] 이때, 2'는 변형된 뉴클레오시드를 나타내고, N'는 RNA 또는 DNA이다. 일부 양태에서, 교호하는 플랭크 내의 모든 변형된 뉴클레오시드는 LNA이고, N'는 DNA이다. 추가 양태에서, 영역 F' 내의 변형된 뉴클레오시드는 2'-O-알킬-RNA 단위, 2'-O-메틸-RNA, 2'-아미노-DNA 단위, 2'-플루오로-DNA 단위, 2'-알콕시-RNA, MOE 단위, LNA 단위, 아라비노 핵산(ANA) 단위 및 2'-플루오로-ANA 단위로부터 선택된다.

[0267] 일부 양태에서, F' 영역은 LNA 및 2' 치환된 변형된 뉴클레오시드를 둘 다 포함한다. 이들은 종종 혼합된 융 또는 혼합된 플랭크 올리고뉴클레오티드로 지칭된다.

[0268] 본 발명의 한 양태에서, 영역 F' 내의 모든 변형된 뉴클레오시드는 LNA 뉴클레오시드이다. 추가 양태에서, 영역 F' 내의 모든 뉴클레오시드는 LNA 뉴클레오시드이다. 추가 양태에서, 영역 F' 내의 LNA 뉴클레오시드는 독립적으로 옥시-LNA, 티오-LNA, 아미노-LNA, cET 및/또는 ENA(베타-D 또는 알파-L 배열 또는 이들의 조합)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 양태에서, 영역 F'는 인접한 서열의 3' 말단에서 2개 이상의 베타-D-옥시 LNA 단위를 갖는다.

[0269] 영역 D' 및 D"

[0270] 영역 D' 및 D"는 각각 영역 F의 5' 말단 또는 영역 F'의 3' 말단에 부착될 수 있다. 영역 D' 또는 D"는 임의적이다.

[0271] 영역 D' 또는 D"는 독립적으로 표적 핵산에 상보적이거나 비-상보적일 수 있는 0 내지 5개, 예컨대 1 내지 5개, 예컨대 2 내지 4개, 예컨대 0, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 추가적인 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 이러한 관점에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 일부 양태에서 추가적인 뉴클레오티드에 의해 5' 및/또는 3' 말단에서 플랭킹된 표적을 조절할 수 있는 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 이러한 추가적인 뉴클레오티드는 생체결단성 연결기에 민감한 뉴클레아제로서 역할을 할 수 있다(연결기의 정의 참고). 일부 양태에서, 추가적인 5' 및/또는 3' 말단 뉴클레오시드는 포스포다이에스터 연결기와 연결되고, DNA 또는 RNA일 수 있다. 다른 양태에서, 추가적인 5' 및/또는 3' 말단 뉴클레오시드는, 예를 들어 뉴클레아제 안정성을 강화시키기 위해 또는 합성의 용이함을 위해 포함될 수 있는 변형된 뉴클레오시드이다. 한 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 인접한 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단에서 영역 D' 및/또는 D"를 포함한다. 추가 양태에서, D' 및/또는 D" 영역은 표적 핵산에 상보적이지 않은 1 내지 5개의 포스포다이에스터 연결된 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드로 구성된다.

- [0272] 본 발명의 캡머 올리고뉴클레오티드는 하기 구조식으로 표시될 수 있다:
- [0273] 5'-F-G-F'-3', 특히 F₁₋₇-G₄₋₁₂-F'₁₋₇
- [0274] 5'-D'-F-G-F'-3', 특히 D'₁₋₃-F₁₋₇-G₄₋₁₂-F'₁₋₇
- [0275] 5'-F-G-F'-D"-3', 특히 F₁₋₇-G₄₋₁₂-F'₁₋₇-D"₁₋₃
- [0276] 5'-D'-F-G-F'-D'-3", 특히 D'₁₋₃-F₁₋₇-G₄₋₁₂-F'₁₋₇-D"₁₋₃
- [0277] 영역 F, G 및 F', D' 및 D" 내의 바람직한 수 및 유형은 상기 기술되어 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드 접합체는 올리고뉴클레오티드, 특히 상기 제시된 캡머 올리고뉴클레오티드의 5' 또는 3' 말단에 공유 결합으로 부착된 영역 C를 갖는다.
- [0278] 한 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 접합체는 구조식 5'-D'-F-G-F'-3' 또는 5'-F-G-F'-D"-3'(이때, 영역 F 및 F'는 독립적으로 1 내지 7개의 변형된 뉴클레오시드를 포함하고, G는 RNase H를 모집할 수 있는 6 내지 16개의 뉴클레오시드의 영역이고, 영역 D' 또는 D"는 1 내지 5개의 포스포다이에스터 연결된 뉴클레오시드를 포함함)의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게는, 영역 D' 또는 D"는 접합체 모이어티로의 접합이 고려되는 올리고뉴클레오티드의 말단에 존재한다.
- [0279] 교호하는 플랭크를 갖는 올리고뉴클레오티드의 예는 하기 구조식에 의해 표시될 수 있다:
- [0280] 2'₁₋₃-N'₁₋₄-2'₁₋₃-G₆₋₁₂-2'₁₋₂-N'₁₋₄-2'₁₋₄
- [0281] 2'₁₋₂-N'₁₋₂-2'₁₋₂-N'₁₋₂-2'₁₋₂-G₆₋₁₂-2'₁₋₂-N'₁₋₂-2'₁₋₂-N'₁₋₂-2'₁₋₂
- [0282] F-G₆₋₁₂-2'₁₋₂-N'₁₋₄-2'₁₋₄
- [0283] F-G₆₋₁₂-2'₁₋₂-N'₁₋₂-2'₁₋₂-N'₁₋₂-2'₁₋₂
- [0284] 2'₁₋₃-N'₁₋₄-2'₁₋₃-G₆₋₁₂-F'
- [0285] 2'₁₋₂-N'₁₋₂-2'₁₋₂-N₁₋₂-2'₁₋₂-G₆₋₁₂-F'
- [0286] 이때, 플랭크는 F 또는 F'에 의해 표시되고, 단지 2' 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 LNA 뉴클레오시드를 함유한다. 교호하는 영역, 및 영역 F, G 및 F', D' 및 D" 내의 뉴클레오시드의 바람직한 수 및 유형은 상기 기술되어 있다.
- [0287] 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22개 길이의 뉴클레오티드로 이루어진 캡머이고, 이때 각각의 영역 F 및 F'는 독립적으로 PD-L1 표적 핵산에 상보적인 1, 2, 3 또는 4개의 변형된 뉴클레오시드 단위로 이루어지고, 영역 G는 PD-L1 표적 핵산과의 듀플렉스일 때 뉴클레아제를 모집할 수 있는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17개의 뉴클레오시드 단위로 이루어지고, 영역 D'는 2개의 포스포다이에스터 연결된 DNA로 이루어진다.
- [0288] 추가 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 각각의 영역 F 및 F'가 독립적으로 3, 4, 5 또는 6개의 변형된 뉴클레오시드 단위, 예컨대 2'-O-메톡시에틸-리보스 당을 함유하는 뉴클레오시드 단위(2'-MOE) 또는 2'-플루오로-데옥시리보스 당 및/또는 LNA 단위를 함유하는 뉴클레오시드 단위로 이루어지고, 영역 G가 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개의 뉴클레오시드 단위, 예컨대 DNA 단위 또는 다른 뉴클레아제 모집 뉴클레오시드, 예컨대 알파-1-LNA 또는 DNA 및 뉴클레아제 모집 뉴클레오시드의 혼합물로 이루어진 캡머이다.
- [0289] 추가의 특이적 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 각각의 영역 F 및 F' 영역이 각각 2개의 LNA 단위로 이루어지고, 영역 G가 12, 13, 14개의 뉴클레오시드 단위, 바람직하게는 DNA 단위로 이루어진 캡머이다. 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 2-12-2, 2-13-2 및 2-14-2를 포함한다.
- [0290] 추가의 특이적 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 각각의 영역 F 및 F'가 독립적으로 3개의 LNA 단위로 이루어지고, 영역 G가 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개의 뉴클레오시드 단위, 바람직하게는 DNA 단위로 이루어진 캡머이다. 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 3-8-3, 3-9-3, 3-10-3, 3-11-3, 3-12-3, 3-13-3 및 3-14-3을 포함한다.

- [0291] 추가의 특이적 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 각각의 영역 F 및 F'가 각각 4개의 LNA 단위로 이루어지고, 영역 G가 8, 9, 10, 11 또는 12개의 뉴클레오시드 단위, 바람직하게는 DNA 단위로 이루어진 캡머이다. 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 4-8-4, 4-9-4, 4-10-4, 4-11-4 및 4-12-4를 포함한다.
- [0292] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 왕 내에서 6개의 뉴클레오시드 및 독립적으로 1 내지 4개의 변형된 뉴클레오시드를 갖는 캡으로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-6-1, 1-6-2, 2-6-1, 1-6-3, 3-6-1, 1-6-4, 4-6-1, 2-6-2, 2-6-3, 3-6-2, 2-6-4, 4-6-2, 3-6-3, 3-6-4 및 4-6-3 캡머를 포함한다.
- [0293] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 왕 내에서 7개의 뉴클레오시드 및 독립적으로 1 내지 4개의 변형된 뉴클레오시드를 갖는 캡으로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-7-1, 2-7-1, 1-7-2, 1-7-3, 3-7-1, 1-7-4, 4-7-1, 2-7-2, 2-7-3, 3-7-2, 2-7-4, 4-7-2, 3-7-3, 3-7-4, 4-7-3 및 4-7-4 캡머를 포함한다.
- [0294] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 왕 내에서 8개의 뉴클레오시드 및 독립적으로 1 내지 4개의 변형된 뉴클레오시드를 갖는 캡으로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-8-1, 1-8-2, 1-8-3, 3-8-1, 1-8-4, 4-8-1, 2-8-1, 2-8-2, 2-8-3, 3-8-2, 2-8-4, 4-8-2, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3 및 4-8-4 캡머를 포함한다.
- [0295] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 왕 내에서 9개의 뉴클레오시드 및 독립적으로 1 내지 4개의 변형된 뉴클레오시드를 갖는 캡으로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-9-1, 2-9-1, 1-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 1-9-4, 4-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 2-9-4, 4-9-2, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3 및 4-9-4 캡머를 포함한다.
- [0296] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 10개의 뉴클레오시드를 갖는 캡으로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-10-1, 2-10-1, 1-10-2, 1-10-3, 3-10-1, 1-10-4, 4-10-1, 2-10-2, 2-10-3, 3-10-2, 2-10-4, 4-10-2, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3 및 4-10-4 캡머를 포함한다.
- [0297] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 11개의 뉴클레오시드를 갖는 캡으로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-11-1, 2-11-1, 1-11-2, 1-11-3, 3-11-1, 1-11-4, 4-11-1, 2-11-2, 2-11-3, 3-11-2, 2-11-4, 4-11-2, 3-11-3, 3-11-4, 4-11-3 및 4-11-4 캡머를 포함한다.
- [0298] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 12개의 뉴클레오시드를 갖는 캡으로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-12-1, 2-12-1, 1-12-2, 1-12-3, 3-12-1, 1-12-4, 4-12-1, 2-12-2, 2-12-3, 3-12-2, 2-12-4, 4-12-2, 3-12-3, 3-12-4, 4-12-3 및 4-12-4 캡머를 포함한다.
- [0299] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 13개의 뉴클레오시드를 갖는 캡으로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-13-1, 2-13-1, 1-13-2, 1-13-3, 3-13-1, 1-13-4, 4-13-1, 2-13-2, 2-13-3, 3-13-2, 2-13-4, 4-13-2, 3-13-3, 3-13-4, 4-13-3 및 4-13-4 캡머를 포함한다.
- [0300] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 14개의 뉴클레오시드로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-14-1, 2-14-1, 1-14-2, 1-14-3, 3-14-1, 1-14-4, 4-14-1, 2-14-2, 2-14-3, 3-14-2, 2-14-4, 4-14-2, 3-14-3, 3-14-4, 4-14-3 및 4-14-4 캡머를 포함한다.
- [0301] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 15개의 뉴클레오시드를 갖는 캡으로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-15-1, 2-15-1, 1-15-2, 1-15-3, 3-15-1, 1-15-4, 4-15-1, 2-15-2, 2-15-3, 3-15-2, 2-15-4, 4-15-2 및 3-15-3 캡머를 포함한다.
- [0302] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 16개의 뉴클레오시드를 갖는 캡으로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-16-1, 2-16-1, 1-16-2, 1-16-3, 3-16-1, 1-16-4, 4-16-1, 2-16-2, 2-16-3, 3-16-2, 2-16-4, 4-16-2 및 3-16-3 캡머를 포함한다.
- [0303] 이러한 성질의 특이적 캡머 디자인은 17개의 뉴클레오시드를 갖는 캡으로 이루어진 군으로부터 선택되는 F-G-F' 디자인, 예컨대 1-17-1, 2-17-1, 1-17-2, 1-17-3, 3-17-1, 1-17-4, 4-17-1, 2-17-2, 2-17-3 및 3-17-2 캡머를 포함한다.
- [0304] 모든 경우에, F-G-F' 디자인은 1, 2 또는 3개의 뉴클레오시드 단위, 예컨대 DNA 단위, 예컨대 2 포스포다이에스터 연결된 DNA 단위를 가질 수 있는 영역 D' 및/또는 D"를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 영역 F 및 F' 내의 뉴클레오시드는 변형된 뉴클레오시드인 반면, 영역 G 내의 뉴클레오티드는 바람직하게는 비변형된 뉴클레오시드이다.
- [0305] 각각의 디자인에서, 바람직한 변형된 뉴클레오시드는 LNA이다.

- [0306] 다른 양태에서, 캡머 내의 캡 내의 모든 뉴클레오시드간 연결기는 포스포로티오에이트 및/또는 보라노포스페이트 연결기이다. 다른 양태에서, 캡머 내의 플랭크(F 및 F' 영역) 내의 모든 뉴클레오시드간 연결기는 포스포로티오에이트 및/또는 보라노포스페이트 연결기이다. 다른 바람직한 양태에서, 캡머 내의 D' 및 D" 영역 내의 모든 뉴클레오시드간 연결기는 포스포다이에스터 연결기이다.
- [0307] 본원에 개시된 특정 캡머의 경우, 사이토신(C) 잔사가 5-메틸-사이토신으로 주석이 달릴 때, 다양한 양태에서, 올리고뉴클레오티드에 존재하는 하나 이상의 Cs는 비변형된 C 잔사일 수 있다.
- [0308] 특정 양태에서, 캡머는 소위 국제 공개공보 제2008/113832호(참고로서 본원에 흔입됨)에 기술된 소위 쇼트머(shortmer)이다.
- [0309] 추가 캡머 디자인은 국제 공개공보 제2004/046160호, 국제 공개공보 제2007/146511호에 개시되어 있고 참고로서 흔입된다.
- [0310] 본 발명의 특정 양태의 경우, 올리고뉴클레오티드는 화합물 번호 5_1 내지 743_1 및 771_1을 갖는 올리고뉴클레오티드 화합물의 군으로부터 선택된다.
- [0311] 본 발명의 특정 양태의 경우, 올리고뉴클레오티드는 화합물 번호 6_1, 8_1, 9_1, 13_1, 41_1, 42_1, 58_1, 77_1, 92_1, 111_1, 128_1, 151_1, 164_1, 166_1, 169_1, 171_1, 222_1, 233_1, 245_1, 246_1, 250_1, 251_1, 252_1, 256_1, 272_1, 273_1, 287_1, 292_1, 303_1, 314_1, 318_1, 320_1, 324_1, 336_1, 342_1, 343_1, 344_1, 345_1, 346_1, 349_1, 359_1, 360_1, 374_1, 408_1, 409_1, 415_1, 417_1, 424_1, 429_1, 430_1, 458_1, 464_1, 466_1, 474_1, 490_1, 493_1, 512_1, 519_1, 519_1, 529_1, 533_1, 534_1, 547_1, 566_1, 567_1, 578_1, 582_1, 601_1, 619_1, 620_1, 636_1, 637_1, 638_1, 640_1, 645_1, 650_1, 651_1, 652_1, 653_1, 658_1, 659_1, 660_1, 665_1, 678_1, 679_1, 680_1, 682_1, 683_1, 684_1, 687_1, 694_1, 706_1, 716_1, 728_1, 733_1, 734_1 및 735_1을 갖는 올리고뉴클레오티드 화합물의 군으로부터 선택된다.
- [0312] 본 발명의 한 바람직한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 화합물 번호 287_1이다.
- [0313] 본 발명의 다른 바람직한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 화합물 번호 342_1이다.
- [0314] 본 발명의 다른 바람직한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 화합물 번호 640_1이다.
- [0315] 본 발명의 다른 바람직한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 화합물 번호 466_1이다.
- [0316] 본 발명의 다른 바람직한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 화합물 번호 566_1이다.
- [0317] 본 발명의 추가 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 모티프 및 올리고뉴클레오티드 화합물의 인접한 뉴클레오티드 서열은 인접한 뉴클레오티드 서열(예컨대, 영역 D')의 5' 말단에 2 내지 4개의 추가적인 포스포다이에스터 연결된 뉴클레오시드를 포함한다. 한 양태에서, 뉴클레오시드는 생체절단성 연결기로서 역할을 한다(생체절단성 연결기에 대한 섹션 참고). 바람직한 양태에서, ca(시티딘-아데노신) 다이뉴클레오티드는 포스포다이에스터 연결기를 통해 인접한 뉴클레오티드 서열(즉, 표 5에 열거된 어느 한 모티프 서열 또는 올리고뉴클레오티드 화합물)의 5' 말단에 연결된다. 바람직한 양태에서, ca 다이뉴클레오티드는 인접한 뉴클레오티드의 나머지가 상보적인 위치에서 표적 서열에 상보적이지 않다.
- [0318] 본 발명의 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 서열번호 766, 767, 768, 769 및 770을 갖는 뉴클레오티드 모티프 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0319] 본 발명의 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 화합물 번호 766_1, 767_1, 768_1, 769_1 및 770_1을 갖는 올리고뉴클레오티드 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0320] **탄수화물 접합체 모이어티**
- [0321] 탄수화물 접합체 모이어티는 비제한적으로 갈락토스, 락토스, n-아세틸갈락토사민, 만노스 및 만노스-6-포스페이트를 포함한다. 탄수화물 접합체는 조직, 예컨대 간 및/또는 근육의 범위 내의 전달 또는 활성을 강화시키는데 사용될 수 있다(예를 들어, 유럽 특허공보 제1495769호, 국제 공개공보 제99/65925호, 문헌[Yang et al., Bioconjug Chem (2009) 20(2): 213-21] 및 문헌[Zatsepin & Oretskaya Chem Biodivers. (2004) 1(10): 1401-17] 참고).
- [0322] 일부 양태에서, 탄수화물 접합체 모이어티는 다가이고, 예컨대, 예를 들어 2, 3 또는 4개의 동일한 또는 비-동일한 탄수화물 모이어티는, 임의적으로 연결기를 통해 올리고뉴클레오티드에 공유 결합으로 결합될 수 있다.

일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 및 탄수화물 접합체 모이어티를 포함하는 접합체를 제공한다.

[0323] 일부 양태에서, 접합체 모이어티는 만노스 또는 만노스-6-포스페이트이거나 이를 포함할 수 있다. 이는 표적화 근육 세포를 표적화하는데 특히 유용하다(예를 들어, 미국 출원공개공보 제2012/122801호 참고).

[0324] 아시알로당단백질 수용체(ASGPr)에 결합할 수 있는 접합체 모이어티는 간 내의 간세포를 표적화하는데 특히 유용하다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 및 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오티드 접합체를 제공한다. 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티는 갈락토스의 친화도 이상의 친화도를 갖고 아시알로당단백질 수용체에 결합할 수 있는 하나 이상의 탄수화물 모이어티(ASPGr 결합 탄수화물 모이어티)를 포함한다. 아시알로당단백질 수용체에 대한 수많은 갈락토스 유도체의 친화도는 연구되어 있거나(예를 들어, 문헌[Jobst, S.T. and Drickamer, K. J.B.C. 1996, 271, 6686] 참고), 당해 분야에 전형적인 방법을 사용하여 즉시 측정된다.

[0325] 본 발명의 한 양상은 PD-L1 표적 핵산에 대해 90% 이상의 상보성을 갖고 10 내지 30개의 뉴클레오티드 길이의 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드(영역 A); 및 b) a)의 올리고뉴클레오티드에 공유 결합으로 부착된 하나 이상의 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티(영역 C)를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체이다. 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열은 섹션 "본 발명의 올리고뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드 디자인" 및 "캡머 디자인" 중 어느 하나에 기술될 수 있다.

[0326] 일부 양태에서, 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티는 갈락토스, 갈락토사민, N-폼일-갈락토사민, N-아세틸갈락토사민, N-프로피오닐-갈락토사민, N-n-부타노일-갈락토사민 및 N-이소부타노일갈락토사민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 ASPGr 결합 탄수화물 모이어티를 포함한다. 일부 양태에서, 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티는 1-가, 2-가, 3-가 또는 4-가이다(즉, 아시알로당단백질 수용체에 결합할 수 있는 1, 2, 3 또는 4개의 말단 탄수화물 모이어티를 함유한다). 바람직하게는, 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티는 2-가이고, 더욱 더 바람직하게는 3-가이다. 바람직한 양태에서, 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티는 1 내지 3개의 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티(또한 GalNAc 접합체로 지칭됨)를 포함한다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드 접합체는 3-가 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티인 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티를 포함한다. GalNAc 접합체는 포스포다이에스터, 메틸포스폰에이트 및 PNA 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 미국 특허공보 제5,994,517호 및 문헌[Hangeland et al., Bioconjug Chem. 1995 Nov-Dec;6(6):695-701], 문헌[Biessen et al 1999 Biochem J. 340, 783-792] 및 문헌[Maier et al 2003 Bioconjug Chem 14, 18-29]) 및 siRNAs(예컨대, 국제 공개공보 제2009/126933호, 국제 공개공보 제2012/089352호 및 국제 공개공보 제2012/083046호) 및 LNA 및 2'-MOE 변형된 뉴클레오시드(국제 공개공보 제2014/076196호, 국제 공개공보 제2014/207232호 및 국제 공개공보 제2014/179620호, 본원에 참고에 의해 흔입됨)와 함께 사용되었다.

[0327] 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티를 생산하기 위하여, ASPGr 결합 탄수화물 모이어티(바람직하게는 GalNAc)는 당류의 C-1 탄소를 통해 분자 문자에 부착된다. ASPGr 결합 탄수화물 모이어티는 바람직하게는 스페이서를 통해 분자 문자에 연결된다. 바람직한 스페이서는 가요성 친수성 스페이서이다(미국 특허공보 제5,885,968호; 문헌[Biessen et al. J. Med. Chern. 1995 Vol. 39 p. 1538-1546]). 바람직한 가요성 친수성 스페이서는 PEG 스페이서이다. 바람직한 PEG 스페이서는 PEG3 스페이서(3개의 에틸렌 단위)이다. 문자 문자는 2 또는 3개의 말단 ASPGr 결합 탄수화물 모이어티의 부착을 가능하게 하고 또한 올리고뉴클레오티드로의 분자점의 부착을 가능하게 하는 임의의 작은 문자일 수 있다. 예시적인 문자 문자는 다이-리신이다. 다이-리신 문자는 3개의 ASPGr 결합 탄수화물 모이어티를 부착할 수 있는 3개의 아민 기 및 다이-리신을 올리고뉴클레오티드에 부착할 수 있는 카복실 반응기를 함유한다. 대안적인 문자 문자는 글렌 리서치(Glen Research)에 의해 공급되는 더블러(doubler) 또는 트레블러(treblor)일 수 있다. 일부 양태에서, 문자는 1,3-비스-[5-(4,4'-다이메톡시트라이틸옥시)펜틸아미도]프로필-2-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이이소프로필)] 포스포라미다이트(글렌 리서치 카탈로그 번호 10-1920-xx), 트리스-2,2,2-[3-(4,4'-다이메톡시트라이틸옥시)프로필옥시메틸]에틸-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이이소프로필)]-포스포라미다이트(글렌 리서치 카탈로그 번호 10-1922-xx), 트리스-2,2,2-[3-(4,4'-다이메톡시트라이틸옥시)프로필옥시메틸]메틸렌옥시프로필-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이이소프로필)]-포스포라미다이트 및 1-[5-(4,4'-다이메톡시-트라이틸옥시)펜틸아미도]-3-[5-플루오레노메톡시-카보닐-옥시-펜틸아미도]-프로필-2-[(2-시아노에틸)-(N,N-다이이소프로필)]-포스포라미다이트(글렌 리서치 카탈로그 번호 10-1925-xx)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 국제 공개공보 제2014/179620호 및 국제 출원번호 제PCT/EP2015/073331호는 다양한 GalNAc 접합체 모이어티의 생산을 기술한다(본원에 의해 흔입됨). 하나 이상의 연결기는 문자

분자와 올리고뉴클레오티드 사이에 삽입될 수 있다. 바람직한 양태에서, 연결기는 생체절단성 연결기이다. 연결기는 섹션 "연결기" 및 이의 하위섹션에 기술된 연결기로부터 선택될 수 있다.

[0328] 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티, 특히 GaINAc 접합체 모이어티는 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 올리고뉴클레오티드의 3'- 또는 5'-말단에 부착될 수 있다. 바람직한 양태에서, 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티는 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에 연결된다.

[0329] siRNA 전달에 관한 약동학 조절자는 국제 공개공보 제2012/083046호에 기술되어 있다(본원에 참고에 의해 혼입됨). 일부 양태에서, 탄수화물 접합체 모이어티는 16개의 이상의 탄소 원자를 갖는 소수성 기, 16 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 소수성 기, 팔미토일, 헥사테크-8-에노일, 올레일, (9E,12E)-옥타테카-9,12-다이에노일, 다이옥타노일 및 C₁₆-C₂₀ 아실 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 약동학 조절자를 포함한다. 바람직한 양태에서, 탄수화물 접합체 모이어티를 함유하는 약동학 조절자는 GaINAc 접합체이다.

[0330] 바람직한 탄수화물 접합체 모이어티는 1 내지 3개의 말단 ASPGr 결합 탄수화물 모이어티, 바람직하게는 N-아세틸갈락토사민 모이어티를 포함한다. 일부 양태에서, 탄수화물 접합체 모이어티는 스페이서를 통해 분자에 연결된 3개의 ASPGr 결합 탄수화물 모이어티, 바람직하게는 N-아세틸갈락토사민 모이어티를 포함한다. 스페이서 분자는 8 내지 30개 원자의 길이일 수 있다. 바람직한 탄수화물 접합체 모이어티는 PEG 스페이서를 통해 다이-리신 분자에 연결된 3개의 말단 GaINAc 모이어티를 포함한다. 바람직하게는, PEG 스페이서는 3PEG 스페이서이다. 적합한 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티는 도 1에 제시된다. 바람직한 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티는 도 3에 제시된다.

[0331] 다른 GaINAc 접합체 모이어티는, 예를 들어, 부착된 GaINAc 모이어티를 갖는 작은 펩티드, 예컨대 Tyr-Glu-Glu-(아미노헥실 GaINAc)3(YEE(ahGaINAc)3; 간세포 상의 아시알로당단백질 수용체에 결합하는 글리코트라이펩티드, 예컨대, 문헌[Duff, et al., Methods Enzymol, 2000, 313, 297] 참고); 리신-기반 갈락토스 클러스터(예컨대, L3G4; 문헌[Biessen, et al., Cardovasc. Med., 1999, 214]); 및 콜란-기반 갈락토스 클러스터(예컨대, 아시알로당단백질 수용체에 대한 탄수화물 인식 모티프)를 포함할 수 있다.

[0332] 본 발명의 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체는 화합물 번호 766_2, 767_2, 768_2, 769_2 및 770_2로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0333] 바람직한 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체는 도 4에 제시된 화합물에 상응하다.

[0334] 다른 바람직한 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체는 도 5에 제시된 화합물에 상응하다.

[0335] 다른 바람직한 양태에서 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체는 도 6에 제시된 화합물에 상응하다.

[0336] 다른 바람직한 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체는 도 7에 제시된 화합물에 상응하다.

[0337] 다른 바람직한 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체는 도 8에 제시된 화합물에 상응하다.

연결기

생체절단성 연결기(영역 B)

[0340] 접합체의 사용은 종종 강화된 약동학 또는 약동학적 동적 특성과 연관된다. 그러나, 접합체 모이어티의 존재는 목적 표적에 대한 올리고뉴클레오티드의 활성을, 예를 들어 혼성화 또는 뉴클레아제 모집(예컨대, RNase H)을 방해하는 입체 장애를 통해 방해할 수 있다. 올리고뉴클레오티드(영역 A 또는 제1 영역)와 접합체 모이어티(영역 C 또는 제3 영역) 사이의 생리학적으로 불안정한 결합(생체절단성 연결기)의 사용은 접합체 모이어티의 존재에 기인한 개선된 특성을 가능하게 하는 반면, 표적 조직에서는 접합체 기가 올리고뉴클레오티드의 효과적인 활성을 방해하지 않도록 한다.

[0341] 생리학적으로 불안정한 결합의 절단은 불안정한 결합을 함유하는 분자가 적절한 세포내 및/또는 세포외 환경에 도달할 때 자발적으로 발생한다. 예를 들어, pH 불안정한 결합은 분자가 산성화 엔도좀에 도입할 때 절단될 수 있다. 따라서, pH 불안정한 결합은 엔도좀 절단성 결합인 것으로 간주될 수 있다. 효소 절단성 결합은 엔도좀 또는 리소좀 또는 세포질에 존재하는 효소에 노출될 때 절단될 수 있다. 다이설파이드 결합은 분자가 세포 세포질의 더욱 환원적인 환경에 도입될 때 절단될 수 있다. 따라서, 다이설파이드는 세포질 절단성 결합으로 간주될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, pH-불안정한 결합은 산성 조건(pH 7 미만) 하에 선택적으로 파괴되는 불안정한 결합이다. 이러한 결합은 또한 세포 엔도좀 및 리소좀이 7 미만의 pH를 가지므로, 엔도좀 불안정한

결합으로 지칭될 수 있다.

[0342] 표적화된 전달을 위해 접합체 모이어티에 연관된 생체절단성 연결기의 경우, 표적 조직(예를 들어 근육, 간, 신장 또는 종양)에서 보여지는 절단 속도는 혈청에서 발견되는 것보다 크다. 표적 조직 대 혈청의 절단 또는 S1 뉴클레아제에 의한 절단의 수준(%)을 측정하기 위한 적합한 방법은 "재료 및 방법" 섹션에 기술되어 있다. 일부 양태에서, 생체절단성 연결기(또한 생리학적으로 불안정한 연결기, 또는 뉴클레아제 민감성 연결기 또는 영역 B로 지칭됨)는, 본 발명의 접합체에서, 표준에 대해 비교될 때, 약 20% 이상, 예컨대 약 30% 이상, 예컨대 약 40% 이상, 예컨대 약 50% 이상, 예컨대 약 60% 이상, 예컨대 약 70% 이상, 예컨대 약 75% 이상 절단된다.

[0343] 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 접합체는 하기 3개의 영역을 포함한다: i) 표적 핵산에 상보적인 10 내지 25개의 인접한 뉴클레오티드를 포함하는 제1 영역(영역 A); ii) 생체절단성 연결기를 포함하는 제2 영역(영역 B); 및 iii) 접합체 모이어티, 예컨대 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티를 포함하는 제3 영역(영역 C)(이때, 제3 영역은 제1 영역에 공유 결합으로 연결된 제2 영역에 공유 결합으로 연결됨).

[0344] 본 발명의 한 양태에서, 올리고뉴클레오티드 접합체는 인접한 뉴클레오티드 서열(영역 A)과 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티(영역 C) 사이에 생체절단성 연결기(영역 B)를 포함한다.

[0345] 일부 양태에서, 생체절단성 연결기는 표적 핵산에 상보적인 인접한 뉴클레오티드의 5'-말단 및/또는 3'-말단(영역 A)에 적합할 수 있다. 바람직한 양태에서, 생체절단성 연결기는 5'-말단에 존재한다.

[0346] 일부 양태에서, 절단성 연결기는, 예를 들어 표적 세포에서 발현될 수 있는 뉴클레아제에 민감하다. 일부 양태에서, 생체절단성 연결기는 2 내지 5개의 연속적인 포스포다이에스터 연결기로 구성된다. 연결기는 짧은 영역(예컨대, 연결기의 정의에서 상술된 바와 같이 1 내지 10개) 포스포다이에스터 연결된 뉴클레오시드일 수 있다. 일부 양태에서, 생체절단성 연결기 영역 B 내의 뉴클레오시드는 (임의적으로 독립적으로) 뉴클레아제 절단을 방해하지 않는 DNA 및 RNA 또는 이들의 변형으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 뉴클레아제 절단을 방해하지 않는 DNA 및 RNA 뉴클레오시드의 변형은 비-천연 발생 핵염기일 수 있다. 특정 당-변형된 뉴클레오시드는 또한 알파-1-옥시-LNA와 같은 뉴클레아제 절단을 가능하게 할 수 있다. 일부 양태에서, 영역 B의 모든 뉴클레오시드는 (임의적으로 독립적으로) 2'-OH 리보스 당(RNA) 또는 2'-H 당(즉, RNA 또는 DNA)을 포함한다. 바람직한 양태에서, 영역 B의 2개 이상의 연속적인 뉴클레오시드는 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드(예컨대, 3, 4 또는 5개 이상의 연속적인 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드)이다. 더욱 더 바람직한 양태에서, 영역 B의 뉴클레오시드는 DNA 뉴클레오시드이고, 바람직하게는 영역 B는 1 내지 5개, 또는 1 내지 4개, 예컨대 2, 3, 4개의 연속적인 포스포다이에스터 연결된 DNA 뉴클레오시드로 이루어진다. 바람직한 양태에서, 영역 B는 작아서 RNase H를 모집하지 않는다. 일부 양태에서, 영역 B는 3개 이하 또는 4개 이하의 연속적인 포스포다이에스터 연결된 DNA 및/또는 RNA 뉴클레오시드(예컨대, DNA 뉴클레오시드)를 포함한다.

[0347] 영역 B가 포스포다이에스터 연결된 뉴클레오시드로 구성되는 경우, 영역 A 및 B는 영역 C에 연결된 올리고뉴클레오티드를 형성할 수 있다. 이러한 맥락에서, 영역 A는 영역 B로부터 분화될 수 있고, 이때 영역 A는 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화도를 갖는 하나 이상, 바람직하게는 2개 이상의 변형된 뉴클레오시드(예컨대, 2' 치환된 당 모이어티를 갖는 LNA 또는 뉴클레오시드)에 의해 개시되고, 영역 A는 스스로 관련 세포주에서 표적 핵산의 발현을 조절할 수 있다. 또한, 영역 A가 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드를 포함하는 경우, 이들은 뉴클레아제 내성 뉴클레오시드간 연결기, 예컨대 포스포로티오에이트 또는 보라노포스페이트와 연결된다. 한편, 영역 B는 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드 사이에 포스포다이에스터 연결기를 포함한다. 일부 양태에서, 영역 B는 표적 핵산에 상보적이지 않거나, 이에 대한 50% 이상의 미스매치를 포함한다.

[0348] 일부 양태에서, 영역 B는 표적 핵산 서열, 또는 영역 A의 표적 핵산에 상보적인 인접한 뉴클레오티드에 상보적이지 않다.

[0349] 일부 양태에서, 영역 B는 표적 핵산 서열에 상보적이다. 이에 관하여, 영역 A 및 B는 함께 표적 서열에 상보적인 단일의 인접한 서열을 형성할 수 있다.

[0350] 본 발명의 일부 양태에서, 제1 영역(영역 A)과 제2 영역(영역 B) 사이의 뉴클레오시드간 연결기는 제2 영역의 일부로 간주될 수 있다.

[0351] 일부 양태에서, 영역 B 내의 염기의 서열은 표적 조직 또는 세포 또는 하위-세포 구획에 존재하는 우세한 엔도뉴클레아제 절단 효소에 근거하여, 최적 엔도뉴클레아제 절단 부위를 제공하도록 선택된다. 이에 관하여, 표적 조직 및 비-표적 조직으로부터 세포 추출물을 단리함으로써, 영역 B에 사용하기 위한 엔도뉴클레아제 절단 서열은 비-표적 세포(예컨대, 신장)와 비교되는 목적 표적 세포(예컨대, 간/간세포)의 바람직한 절단 활성에 근거하

여 선택될 수 있다. 이에 관하여, 표적 하향-조절을 위한 화합물의 효능은 목적 조작/세포를 위해 최적화될 수 있다.

[0352]

일부 양태에서, 영역 B는 서열 AA, AT, AC, AG, TA, TT, TC, TG, CA, CT, CC, CG, GA, GT, GC 또는 GG의 다이뉴클레오티드를 포함하고, 이때 C는 5-메틸사이토신일 수 있고/거나 T는 U로 대체될 수 있다. 바람직하게는, 뉴클레오시드간 연결기는 포스포다이에스터 연결기이다. 일부 양태에서, 영역 B는 서열 AAA, AAT, AAC, AAG, ATA, ATT, ATC, ATG, ACA, ACT, ACC, ACG, AGA, AGT, AGC, AGG, TAA, TAT, TAC, TAG, TTA, TTT, TTC, TAG, TCA, TCT, TCC, TCG, TGA, TGT, TGC, TGG, CAA, CAT, CAC, CAG, CTA, CTG, CTC, CTT, CCA, CCT, CCC, CCG, CGA, CGT, CGC, CGG, GAA, GAT, GAC, CAG, GTA, GTT, GTC, GTG, GCA, GCT, GCC, GCG, GGA, GGT, GGC 및 GGG의 트라이뉴클레오티드를 포함하고, 이때 C는 5-메틸사이토신일 수 있고/거나 T는 U로 대체될 수 있다. 바람직하게는, 뉴클레오시드간 연결기는 포스포다이에스터 연결기이다. 일부 양태에서, 영역 B는 서열 AAAX, AATX, AACX, AAGX, ATAX, ATTX, ATCX, ATGX, ACAX, ACTX, ACCX, ACGX, AGAX, AGTX, AGCX, AGGX, TAAAX, TATX, TACX, TAGX, TTAX, TTTX, TTCX, TAGX, TCAX, TCTX, TCCX, TCGX, TGAX, TGTG, TGCG, TGGX, CAAAX, CATX, CACX, CAGX, CTAX, CTGX, CTCX, CTTX, CCAX, CCTX, CCCX, CCGX, CGAX, CGTX, CGCX, CGGX, GAAX, GATX, GACX, CAGX, GTAX, GTTX, GTCX, GTGX, GCAX, GCTX, GCCX, GCGX, GGAX, GGTX, GGCX 및 GGGX의 트라이뉴클레오티드를 포함하고, 이때 X는 A, T, U, G, C 및 이들의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, C는 5-메틸사이토신일 수 있고/거나 T는 U로 대체될 수 있다. 바람직하게는, 뉴클레오시드간 연결기는 포스포다이에스터 연결기이다. (천연 발생) 핵염기 A, T, U, G, C를 지칭할 때, 이들이 균등한 천연 핵염기로서 작용하는 핵염기 유사체(예컨대, 상보성 뉴클레오시드와의 염기 쌍)로 치환될 수 있음이 인정될 것이다.

[0353]

다른 연결기(영역 Y)

[0354]

연결기는 2개 이상의 작용기(올리고뉴클레오티드에 부착하기 위한 하나 및 접합체 모이어티에 부착하기 위한 다른 하나)를 가질 수 있다. 예시적인 연결기 작용기는 올리고뉴클레오티드 또는 접합체 모이어티 상의 친핵성 기와의 반응을 위해 친전자성일 수 있거나, 친전자성 기와의 반응을 위해 친핵성일 수 있다. 일부 양태에서, 연결기 작용기는 아미노, 하이드록실, 카복실산, 티올, 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스페이트, 포스파이트, 불포화(예컨대, 이중 또는 삼중 결합) 등을 포함한다. 일부 예시적인 연결기(영역 Y)는 8-아미노-3,6-다이옥사옥탄산(ADO), 석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC), 6-아미노헥산산(AHEX 또는 AHA), 6-아미노헥실옥시, 4-아미노부티르산, 4-아미노사이클로헥실카복실산, 석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복시-(6-아미도-카프로에이트)(LCSMCC), 석신이미딜 m-말레이미도-벤조일레이트(MBS), 석신이미딜 N-e-말레이미도-카프로일레이트(EMCS), 석신이미딜 6-(베타-말레이미도-프로피온아미도)헥사노에이트(SMPH), 석신이미딜 N-(a-말레이미도 아세테이트)(AMAS), 석신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(SMPB), 베타-알라닌(베타-ALA), 폐닐글리신(PHG), 4-아미노사이클로헥산산(ACHC), 베타-(사이클로프로필) 알라닌(베타-CYPR), 아미노 도데칸산(ADC), 알릴렌 다이올, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 등을 포함한다. 일부 양태에서, 연결기(영역 Y)는 아미노 알킬, 예컨대 C₂-C₃₆ 아미노 알킬 기, 예컨대, 예를 들어 C₆-C₁₂ 아미노 알킬 기이다. 바람직한 양태에서, 연결기(영역 Y)는 C₆ 아미노 알킬 기이다. 아미노 알킬 기는, 예를 들어 (예컨대, 보호된) 아미노 알킬 포스포라미다이트를 사용하는 표준 올리고뉴클레오티드 합성의 일부로서 올리고뉴클레오티드(영역 A 또는 영역 A-B)에 첨가될 수 있다. 아미노 알킬과 올리고뉴클레오티드 사이의 연결기는, 예를 들어 포스포로티오에이트 또는 포스포다이에스터, 또는 본원에 언급된 다른 뉴클레오시드 연결기 중 하나일 수 있다. 아미노 알킬 기는 올리고뉴클레오티드의 5'- 또는 3'-말단에 공유 결합으로 연결된다. 시판 중인 아미노 알킬 연결기는, 예를 들어 올리고뉴클레오티드의 3'-말단에서의 연결기를 위한 3'-아미노-변형자 시약이고, 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에서의 연결기의 경우, 5'-아미노-변형자 C6이 이용가능하다. 이러한 시약은 글렌 리서치 코퍼레이션(미국 버지니아주 스텔링 소재)로부터 이용가능하다. 이러한 화합물 또는 유사한 화합물은 플루오레세인을 올리고뉴클레오티드의 5'-말단으로 연결하기 위해 문헌[Krieg, et al., Antisense Research and Development 1991, 1, 161]에 의해 이용된다. 광범위한 추가 연결기가 당해 분야에 공지되어 있고, 올리고뉴클레오티드로의 접합체 모이어티의 부착에 유용할 수 있다. 많은 유용한 연결기의 검토는, 예를 들어, 문헌 [Antisense Research and Applications, S. T. Crooke and B. Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, p. 303-350]에서 발견될 수 있다. 아크리딘과 같은 다른 화합물은 폴리메틸렌 연결기를 통해 올리고뉴클레오티드의 3'-말단 포스페이트 기에 부착되었다(문헌[Asseline, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, 81, 3297]). 임의의 상기 기는 단일 연결기(영역 Y)로서 또는 하나 이상의 추가 연결기와의 조합(영역 Y-Y' 또는 영역 Y-B 또는 B-Y)으로 사용될 수 있다.

[0355]

연결기 및 올리고뉴클레오티드의 접합체의 제조에서 이의 용도는 국제 공개공보 제96/11205호 및 국제 공개공보

제98/52614호 및 미국 특허공보 제4,948,882호; 제5,525,465호; 제5,541,313호; 제5,545,730호; 제5,552,538호; 제5,580,731호; 제5,486,603호; 제5,608,046호; 제4,587,044호; 제4,667,025호; 제5,254,469호; 제5,245,022호; 제5,112,963호; 제5,391,723호; 제5,510,475호; 제5,512,667호; 제5,574,142호; 제5,684,142호; 제5,770,716호; 제6,096,875호; 제6,335,432호; 및 제6,335,437호, 국제 공개 공보 제2012/083046호(이들 각각은 이의 전체내용이 참고로서 혼입됨)와 같은 당해 분야 전반에 걸쳐 제공된다.

[0356] 제조 방법

추가 양상에서, 본 발명은 뉴클레오티드 단위를 반응시키고, 이에 의해 올리고뉴클레오티드에 포함된 공유 결합으로 연결된 인접한 뉴클레오티드 단위를 형성하는 단계를 포함하는 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 제조 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 방법은 포스포라미다이트 화학을 사용한다(예를 들어, 문헌[Caruthers et al, 1987, Methods in Enzymology vol. 154, pages 287-313]). 추가 양태에서, 상기 방법은 인접한 뉴클레오티드 서열을 접합 모이어티(리간드)와 반응시키는 단계를 추가로 포함한다. 추가 양상에서, 상기 방법은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 접합된 올리고뉴클레오티드와 약학적으로 허용되는 희석제, 용매, 담체, 염 및/또는 항원보강제를 혼합하는 단계를 포함하는 본 발명의 조성물의 제조를 위해 제공된다.

[0358] 약학 조성물

추가 양상에서, 본 발명은 임의의 상기 올리고뉴클레오티드 및/또는 올리고뉴클레오티드 접합체 및 약학적으로 허용되는 희석제, 용매, 담체, 염 및/또는 항원보강제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 약학적으로 허용되는 희석제는 포스페이트-완충된 염수(PBS)를 포함하고, 약학적으로 허용되는 염은, 비제한적으로, 나트륨 및 칼륨 염을 포함한다. 일부 양태에서, 약학적으로 허용되는 희석제는 멸균 포스페이트 완충된 염수이다. 일부 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 약학적으로 허용되는 희석제에 50 내지 300 μM 용액의 농도로 사용된다.

[0360] 본 발명에 사용하는데 적합한 제형은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985]에서 발견된다. 약물 전달을 위한 방법은 간단한 검토를 위해, 예컨대 문헌[Langer, Science 249:1527-1533, 1990]을 참고한다. 국제 공개공보 제2007/031091호는 약학적으로 허용되는 희석제, 담체 및 항원보강제의 더욱 적합하고 바람직한 예를 제공한다(본원에 참고에 의해 혼입됨). 적합한 투여량, 제형, 투여 경로, 조성물, 투여 형태, 다른 치료제와의 조합, 전구약물 제형은 또한 국제 공개공보 제2007/031091호에 제공된다.

[0361] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는 약학 조성물 또는 제형의 제조를 위한 약학적으로 허용되는 활성 또는 불활성 물질과 혼합될 수 있다. 약학 조성물의 제형화를 위한 조성물 및 방법은, 비제한적으로 투여 경로, 질병의 정도 또는 투여되는 투여량을 비롯한 기준의 수에 따라 변한다.

[0362] 이러한 조성물은 통상적인 멸균화 기술에 의해 멸균화될 수 있거나, 멸균 여과될 수 있다. 생산된 수용액은 그대로 사용하기 위해 포장되거나 동결건조될 수 있고, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 수성 담체와 조합된다. 제제의 pH는 전형적으로 3 내지 11, 더욱 바람직하게는 5 내지 9 또는 6 내지 8, 가장 바람직하게는 7 내지 8, 예컨대 7 내지 7.5일 수 있다. 고체 형태의 생산된 조성물은, 예컨대 각각 정제 또는 캡슐의 밀봉된 포장 중에 고정된 양의 상기 약제를 함유하는 다수의 단일 투여량 단위로 포장될 수 있다. 고체 형태의 조성물은 또한 가요성 양을 위한 용기, 예컨대 국소 적용가능한 크림 또는 연고용으로 디자인된 압착가능한 튜브로 포장될 수 있다.

[0363] 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는 전구약물이다. 특히, 올리고뉴클레오티드 접합체에 관하여, 접합체 모이어티는 전구약물이 작용 부위, 예컨대 표적 세포에 전달되면 올리고뉴클레오티드로 절단된다.

[0364] 적용례

[0365] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는, 예를 들어 진단, 치료 및 예방을 위한 연구 시약으로서 이용될 수 있다.

[0366] 연구에서, 이러한 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는 세포(예컨대, 시험관내 세포 배양물) 및 실험 동물에서 PD-L1 단백질의 합성을 특이적으로 조절하는데 사용될 수 있고, 이에 의해 표적의 기능적 분석 또는 치료 중재를 위한 표적으로서의 유용성의 사정을 용이하게 한다. 전형적으로, 표적 조절은 단백질을 생산하는 mRNA를 분해시키거나 억제하고, 이에 의해 단백질 형성을 방지함으로써, 또는 단백질을 생산하는 유전자 또는 mRNA의 조절자를 분해시키거나 억제함으로써 달성된다.

- [0367] 연구 또는 진단에서 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 사용하는 경우, 표적 핵산은 cDNA, 또는 DNA 또는 RNA로부터 유래하는 합성 핵산일 수 있다.
- [0368] 본 발명은 PD-L1을 발현하는 표적 세포에서 PD-L1 발현을 조절하는 생체내 또는 시험관내 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체를 상기 세포에 효과량으로 투여함을 포함한다.
- [0369] 일부 양태에서, 표적 세포는 포유동물 세포, 특히 인간 세포이다. 표적 세포는 포유동물 조직의 시험관내 세포 배양물 또는 생체내 세포 형성 부분일 수 있다. 바람직한 양태에서, 표적 세포는 간에 존재한다. 간 표적 세포는 실질 세포(예컨대, 간세포) 및 비-실질 세포, 예컨대 쿠퍼 세포, LSEC, 성상 세포(또는 Ito 세포), 담관세포 및 간-연관된 백혈구(예컨대, T-세포 및 NK 세포)로부터 선택될 수 있다. 일부 양태에서, 표적 세포는 항원-제시 세포이다. 항원-제시 세포는 이의 표면 상에서 주조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II와 복합체화된 외래 항원을 나타낸다. 일부 양태에서, 항원-제시 세포는 MHC 클래스 II(즉, 전문 항원-제시 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포 및 B 세포)를 발현한다.
- [0370] 진단에서, 올리고뉴클레오티드는 노턴 블로팅, 제자리 혼성화 또는 유사한 기술에 의해 세포 및 조직에서 PD-L1 발현을 검출하고 정량화시키는데 사용될 수 있다.
- [0371] 치료를 위해, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 이의 약학 조성물은 PD-L1의 발현의 감소, 특히 간 표적-세포에서 PD-L1의 발현의 감소에 의해 완화되거나 치료될 수 있는 질병 또는 질환을 갖는 것으로 의심되는 동물 또는 인간에게 투여될 수 있다.
- [0372] 본 발명은 치료적 또는 예방적 효과량의 본 발명의 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물을 질병을 앓거나 앓기 쉬운 대상에게 투여함을 포함하는, 질병의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0373] 본 발명은 또한 약제로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0374] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물은 전형적으로 효과량으로 투여된다.
- [0375] 본 발명은 또한 본원에 언급된 질병 또는 질환의 치료용 약제의 제조에 기술된 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물의 용도를 제공한다. 한 양태에서, 질병은 a) 바이러스성 간 감염, 예컨대 HBV, HCV 및 HDV; b) 기생충 감염, 예컨대 말라리아, 톡소플라즈마증, 리슈마니아증 및 트리파노소마증; 및 c) 간암 또는 간에서의 전이로부터 선택된다.
- [0376] 한 양태에서, 본 발명은 바이러스성 또는 기생충 감염으로부터 선택되는 질병 또는 질환의 치료에 사용하기 위한 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 추가 양태에서, 질병은 a) 바이러스성 간 감염, 예컨대 HBV, HCV 및 HDV; b) 기생충 감염, 예컨대 말라리아, 톡소플라즈마증, 리슈마니아증 및 트리파노소마증; 및 c) 간암 또는 간에서의 전이로부터 선택된다.
- [0377] 본원에 언급된 질병 또는 질환은 면역 소실과 연관된다. 특히, 질병 또는 질환은 바이러스-특이적 T-세포 반응의 소실관 연관된다. 일부 양태에서, 질병 또는 질환은 PD-L1 발현의 감소에 의해 완화되거나 처리될 수 있다.
- [0378] 본 발명의 방법은 바람직하게는 면역 소실과 연관된 질병에 대한 치료 또는 예방에 사용된다.
- [0379] 본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물은 간암 또는 간에서의 전이에 대한 면역 반응의 회복에 사용된다.
- [0380] 본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물은 병원균에 대한 면역 반응의 회복에 사용된다. 일부 양태에서, 병원균은 간에서 발견될 수 있다. 병원균은 바이러스 또는 기생충, 특히 본원에 기술된 것들일 수 있다. 바람직한 양태에서, 병원균은 HBV이다.
- [0381] 본 발명은 또한 본원에 언급된 바이러스성 또는 기생충 감염의 회복용 약제의 제조를 위한, 본원에 정의된 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0382] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물은 바이러스성 감염, 특히 PD-1 경로가 영향을 받는 간에서의 바이러스성 감염의 치료에 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Kapoor and Kottilil 2014 Future Virol Vol. 9 pp. 565-585] 및 문헌[Salem and El-Badawy 2015 World J Hepatol Vol. 7

pp. 2449-2458] 참고). 바이러스성 간 감염은 간염 바이러스, 특히 HBV, HCV 및 HDV, 특히 이러한 감염의 만성 형태로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 한 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물은 HBV, 특히 만성 HBV를 치료하는데 사용된다. 만성 HBV 감염의 지시자는 순환되는 높은 수준의 바이러스성 로드(load)(HBV DNA) 및 더욱 높은 수준의 빈 HBsAg 입자(100-배 초과의 과량의 비리온)이다.

[0383] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는 또한 HIV와의 동시감염으로 발생하는 바이러스성 간 감염을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물로 치료될 수 있는 다른 바이러스성 감염은 1cmv(림프구성 맥락수막염 바이러스), 및 단일 감염으로서 HIV, HSV-1 및 -2, 및 다른 헤르페스바이러스이다. 이러한 바이러스는 간천화성이 아니지만, 이들은 PD-L1 하향-조절에 민감할 수 있다.

[0384] 일부 양태에서, 면역성 또는 면역 반응의 회복은 T-세포 및/또는 NK 세포 반응의 개선 및/또는 T-세포 소실의 완화와 관련되고, 특히 HBV-특이적 T-세포 반응, HCV-특이적 T-세포 반응 및/또는 HDV-특이적 T-세포 반응이 회복된다. T-세포 반응의 개선은, 예를 들어 간에서의 T-세포의 증가, 특히 대조군(예컨대, 치료 전의 수준 또는 비히를 처리된 대상에서의 수준)과 비교될 때 CD8+ 및/또는 CD4+ T-세포의 증가로서 평가될 수 있다. 추가 양태에서, 이것은 대조군과 비교될 때 회복되거나 증가되는 바이러스 특이적 CD8+ T-세포이고, 특히 HBV 특이적 CD8+ T-세포 또는 HCV 특이적 CD8+ T-세포 또는 HDV 특이적 CD8+ T-세포는 대조군과 비교될 때 회복되거나 증가된다. 바람직한 양태에서, HBV s 항원(HBsAg)에 특이적인 CD8+ T-세포 및/또는 HBV e 항원(HBeAg)에 특이적인 CD8+ T-세포 및/또는 HBV 코어 항원(HBcAg)에 특이적인 CD8+ T-세포는 대조군에 비해 본 발명의 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물로 처리된 대상에서 증가된다. 바람직하게는, HBV 항원 특이적 CD8+ T-세포는 하나 이상의 사이토kin, 예컨대 인터페론-감마(IFN- γ) 또는 중양 괴사 인자 알파(TNF- α)를 생산한다. 상기 CD8+ T-세포의 증가는 특히 간에서 관찰된다. 본원에 기술된 증가는 대조군과 비교될 때 통계학적으로 유의하여야 한다. 바람직하게는, 증가는 대조군과 비교될 때, 적어도 20%, 예컨대 25%, 예컨대 50%, 예컨대 75%이다. 다른 양태에서, 자연 살해(NK) 세포 및/또는 자연 살해 T(NKT) 세포는 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체에 의해 활성화된다.

[0385] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물은 치료 기생충 감염, 특히 PD-1 경로가 영향을 받는 기생충 감염의 치료에 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Bhadra et al. 2012 J Infect Dis vol 206 pp. 125-134]; 문헌[Bhadra et al. 2011 Proc Natl Acad Sci U S A Vol. 108 pp. 9196-9201]; 문헌[Esch et al. J Immunol vol 191 pp 5542-5550]; 문헌[Freeman and Sharpe 2012 Nat Immunol Vol 13 pp. 113-115]; 문헌[Gutierrez et al. 2011 Infect Immun Vol 79 pp. 1873-1881]; 문헌[Joshi et al. 2009 PLoS Pathog Vol 5 e1000431]; 문헌[Liang et al. 2006 Eur J Immunol Vol. 36 pp 58-64]; 문헌[Wykes et al. 2014 Front Microbiol Vol 5 pp 249] 참고). 기생충 감염은 말라리아, 톡소플라즈마증, 리슈마니아증 및 트리파노소마증으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 말라리아 감염은 플라스모듐(*Plasmodium*) 속, 특히 플라스모듐 비박스(*Plasmodium vivax*), 플라스모듐 말라리아에(*Plasmodium Malariae*) 및 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*) 종의 원생동물에 의해 유발된다. 톡소플라즈마증은 톡소플라즈마 곤디(*Toxoplasma gondii*)에 의해 유발된 기생충 질병이다. 리슈마니아증은 리슈마니아(*Leishmania*) 속의 원생동물 기생충에 의해 유발된 질병이다. 트리파노소마증은 트리파노소마(*Trypanosoma*) 속의 원생동물에 의해 유발된다. 샤카스병은 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*) 종에 의해 유발된 열대 형태이고, 수면병은 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*) 종에 의해 유발된다.

[0386] 일부 양태에서, 면역성의 회복은 기생충-특이적 T-세포 및 NK 세포 반응, 특히 플라스모듐-특이적 T-세포 반응, 톡소플라즈마 곤디-특이적 T-세포 및 NK 세포 반응, 리슈마니아-특이적 T-세포 및 NK 세포 반응, 트리파노소마 크루지-특이적 T-세포 및 NK 세포 반응 또는 트리파노소마 브루세이-특이적 T-세포 및 NK 세포 반응의 회복과 관련된다. 추가 양태에서, 이것은 회복되는 기생충-특이적 CD8+ T-세포 및 NK 세포 반응이다.

투여

[0388] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 약학 조성물은 국소(예컨대, 피부, 흡입, 안구 또는 귀) 또는 장(예컨대, 경구 또는 위장관) 또는 비경구(예컨대, 정맥내, 피하, 근육내, 대뇌내, 뇌실내 또는 척추강내) 투여될 수 있다.

[0389] 바람직한 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 피하, 복장내 또는 근육내 주사 또는 주입, 척추강내 또는 두개골내, 예컨대 대뇌내 또는 뇌실내, 유리체내 투여를 비롯한 비경구 경

로에 의해 투여된다. 한 양태에서, 활성 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는 정맥내 투여된다. 다른 양태에서, 활성 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는 피하 투여된다.

[0390] 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물은 0.1 내지 15 mg/kg, 예컨대 0.1 내지 10 mg/kg, 예컨대 0.2 내지 10 mg/kg, 예컨대 0.25 내지 10 mg/kg, 예컨대 0.1 내지 5 mg/kg, 예컨대 0.2 내지 5 mg/kg, 예컨대 0.25 내지 5 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 투여는 1주에 1회, 2주에 1회, 3주에 1회 또는 1개월에 1회 수행될 수 있다.

병용 요법

[0392] 일부 양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 접합체 또는 약학 조성물은 다른 치료제와의 병용 치료에 사용하기 위한 것이다. 치료제는, 예를 들어 상기 질병 또는 질환을 위한 치료 표준일 수 있다.

[0393] 만성 HBV 감염의 치료의 경우, 항바이러스성 약물 및 면역 시스템 조절자의 병용이 치료 표준으로서 추천된다. HBV에 효과적인 항바이러스성 약물은, 예를 들어 뉴클레오시(티)드 유사체이다. HBV의 치료법에 대해 승인된 5 개의 뉴클레오시(티)드 유사체, 즉 라미부딘(에피비르(Epivir)), 아데포비르(헵세라(Hepsera)), 테노포비르(비리드(Viread)), 텔비부딘(타이제카(Tyzeka)), 엔테카비르(바라클루드(Baraclude))(이들은 바이러스성 복제(HBV DNA)를 억제하는데 효과적이지만, HBsAg 수준에 대한 효과가 없음)가 존재한다. 다른 항바이러스성 약물은 리바비린 및 HBV 항체 치료법(단클론성 또는 다클론성)을 포함한다. 면역 시스템 조절자는, 예를 들어 인터페론 알파-2a 및 PEG화된 인터페론 알파-2a(페가시스(Pegasys)) 또는 TLR7 작용제(예컨대, GS-9620) 또는 치료적 백신일 수 있다. IFN- α 치료는 바이러스성 로드를 감소시키는데 매우 알맞은 효과만을 나타내지만, 매우 비효율적임에도 불구하고 약간은 HBsAg 감소를 야기한다(48주 치료 후 10% 미만).

[0394] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체는 또한 HBV에 대해 효과적인 다른 항바이러스성 약물, 예컨대 국제 공개공보 제2012/145697호 및 국제 공개공보 제2014/179629호에 기술된 안티센스 올리고뉴클레오티드, 또는 국제 공개공보 제2005/014806호, 국제 공개공보 제2012/024170호, 국제 공개공보 제2012/2055362호, 국제 공개공보 제2013/003520호 및 국제 공개공보 제2013/159109호에 기술된 siRNA 분자와 병용될 수 있다.

[0395] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체가 다른 약제와의 병용 요법으로 투여될 때, 이들은 순차적으로 또는 동시에 또는 개별적으로 투여될 수 있다. 다르게는, 본 발명에 따른 약학 조성물은 본원에 기술된 약학적으로 허용되는 부형제와 결합된 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 접합체, 및 당해 분야에 공지된 다른 치료제 또는 예방제의 조합으로 구성될 수 있다.

양태

[0397] 본 발명의 하기 양태는 본원에 기술된 임의의 다른 양태와 조합으로 사용될 수 있다.

[0398] 1. PD-L1의 발현을 감소시킬 수 있고 10 내지 30개의 뉴클레오티드 길이의 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이로 이루어진 안티센스 올리고뉴클레오티드.

[0399] 2. 양태 1에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 PD-L1 표적 핵산에 90% 이상 상보적인, 올리고뉴클레오티드.

[0400] 3. 양태 1 또는 2에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 서열번호 1, 서열번호 2 및/또는 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적 핵산에 상보적인, 올리고뉴클레오티드.

[0401] 4. 양태 1 내지 3 중 어느 한 양태에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 서열번호 1의 위치 1 및 15720 내의 영역에 상보적인, 올리고뉴클레오티드.

[0402] 5. 양태 1 내지 4 중 어느 한 양태에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 -10 kcal 미만의 ΔG° 를 갖고, 서열번호 1, 서열번호 2 및/또는 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적 핵산으로 혼성화될 수 있는, 올리고뉴클레오티드.

[0403] 6. 양태 1 내지 5 중 어느 한 양태에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 표적 핵산의 하위-서열에 상보적이고, 하위-서열이 서열번호 1의 위치 371 내지 3068, 5467 내지 12107, 15317 내지 15720, 15317 내지 18083, 15317 내지 19511 및 18881 내지 19494로 이루어진 군으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드.

[0404] 7. 양태 6에 있어서, 하위-서열이 서열번호 1의 위치 7300 내지 7333, 8028 내지 8072, 9812 내지 9859,

11787 내지 11873 및 15690 내지 15735로 이루어진 군으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드.

[0405] 8. 양태 2 내지 7 중 어느 한 양태에 있어서, 표적 핵산이 RNA인, 올리고뉴클레오티드.

[0406] 9. 양태 8에 있어서, RNA가 mRNA인, 올리고뉴클레오티드.

[0407] 10. 양태 9에 있어서, mRNA가 미성숙 mRNA 또는 성숙 mRNA인, 올리고뉴클레오티드.

[0408] 11. 양태 1 내지 10 중 어느 한 양태에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 14개 이상의 인접한 뉴클레오티드, 특히 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 인접한 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진, 올리고뉴클레오티드.

[0409] 12. 양태 1 내지 10 중 어느 한 양태에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 16 내지 20개의 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 이루어진, 올리고뉴클레오티드.

[0410] 13. 양태 1 내지 10 중 어느 한 양태에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 14 내지 35개의 뉴클레오티드(길이)를 포함하거나 이로 이루어진, 올리고뉴클레오티드.

[0411] 14. 양태 13에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 18 내지 22개의 뉴클레오티드(길이)를 포함하거나 이로 이루어진, 올리고뉴클레오티드.

[0412] 15. 양태 1 내지 14 중 어느 한 양태에 있어서, 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 뉴클레오티드 서열이 단일 가닥인, 올리고뉴클레오티드.

[0413] 16. 양태 1 내지 15 중 어느 한 양태에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 표적 핵산의 하위-서열에 상보적이고, 하위-서열이 A7, A26, A43, A119, A142, A159, A160, A163, A169, A178, A179, A180, A189, A201, A202, A204, A214, A221, A224, A226, A243, A254, A258, 269, A274, A350, A360, A364, A365, A370, A372, A381, A383, A386, A389, A400, A427, A435 및 A438로 이루어진 군으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드.

[0414] 17. 양태 16에 있어서, 하위-서열이 A221, A360, A180, A160 및 A269로 이루어진 군으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드.

[0415] 18. 양태 1 내지 17 중 어느 한 양태에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 siRNA가 아니고 자가-상보적이지 않은, 올리고뉴클레오티드.

[0416] 19. 양태 1 내지 18 중 어느 한 양태에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 서열번호 5 내지 743 및 771로부터 선택되는 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 올리고뉴클레오티드.

[0417] 20. 양태 1 내지 19 중 어느 한 양태에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 서열번호 6, 8, 9, 13, 41, 42, 58, 77, 92, 111, 128, 151, 164, 166, 169, 171, 222, 233, 245, 246, 250, 251, 252, 256, 272, 273, 287, 292, 303, 314, 318, 320, 324, 336, 342, 343, 344, 345, 346, 349, 359, 360, 374, 408, 409, 415, 417, 424, 429, 430, 458, 464, 466, 474, 490, 493, 512, 519, 519, 529, 533, 534, 547, 566, 567, 578, 582, 601, 619, 620, 636, 637, 638, 640, 645, 650, 651, 652, 653, 658, 659, 660, 665, 678, 679, 680, 682, 683, 684, 687, 694, 706, 716, 728, 733, 734 및 735로부터 선택되는 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 올리고뉴클레오티드.

[0418] 21. 양태 1 내지 20 중 어느 한 양태에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 서열번호 466, 640, 342, 287 및 566로부터 선택되는 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 올리고뉴클레오티드.

[0419] 22. 양태 1 내지 21 중 어느 한 양태에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 상보적인 표적 핵산과 비교하여 0 내지 3개의 미스매치를 갖는, 올리고뉴클레오티드.

[0420] 23. 양태 22에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 표적 핵산과 비교되는 하나의 미스매치를 갖는, 올리고뉴클레오티드.

[0421] 24. 양태 22에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 표적 핵산과 비교되는 2개의 미스매치를 갖는, 올리고뉴클레오티드.

[0422] 25. 양태 22에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열이 표적 핵산 서열에 완전히 상보적인, 올리고뉴클레오티드.

[0423] 26. 양태 1 내지 25 중 어느 한 양태에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드를 포함하는 올리고뉴클레오티드.

- [0424] 27. 양태 26에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드가 고-친화도 변형된 뉴클레오시드를 포함하는, 올리고뉴클레오티드.
- [0425] 28. 양태 26 또는 27에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드가 2' 당 변형된 뉴클레오시드인, 올리고뉴클레오티드.
- [0426] 29. 양태 28에 있어서, 하나 이상의 2' 당 변형된 뉴클레오시드가 독립적으로 2'-0-알킬-RNA, 2'-0-메틸-RNA, 2'-알콕시-RNA, 2'-0-메톡시에틸-RNA, 2'-아미노-DNA, 2'-플루오로-DNA, 2'-플루오로-ANA 및 LNA 뉴클레오시드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드.
- [0427] 30. 양태 28에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드가 LNA 뉴클레오시드인, 올리고뉴클레오티드.
- [0428] 31. 양태 30에 있어서, 변형된 LNA 뉴클레오시드가 옥시-LNA인, 올리고뉴클레오티드.
- [0429] 32. 양태 31에 있어서, 변형된 뉴클레오시드가 베타-D-옥시-LNA인, 올리고뉴클레오티드.
- [0430] 33. 양태 30에 있어서, 변형된 뉴클레오시드가 티오-LNA인, 올리고뉴클레오티드.
- [0431] 34. 양태 30에 있어서, 변형된 뉴클레오시드가 아미노-LNA인, 올리고뉴클레오티드.
- [0432] 35. 양태 30에 있어서, 변형된 뉴클레오시드가 cET인, 올리고뉴클레오티드.
- [0433] 36. 양태 30에 있어서, 변형된 뉴클레오시드가 ENA인, 올리고뉴클레오티드.
- [0434] 37. 양태 30에 있어서, 변형된 뉴클레오시드가 베타-D-옥시-LNA, 알파-1-옥시-LNA, 베타-D-아미노-LNA, 알파-1-아미노-LNA, 베타-D-티오-LNA, 알파-1-티오-LNA, (S)cET, (R)cET 베타-D-ENA 및 알파-1-ENA로 이루어진 군으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드.
- [0435] 38. 양태 30 내지 37 중 어느 한 양태에 있어서, 변형된 LNA 뉴클레오시드 이외에 하나 이상의 2' 치환된 변형된 뉴클레오시드가 존재하는, 올리고뉴클레오티드.
- [0436] 39. 양태 38에 있어서, 2' 치환된 변형된 뉴클레오시드가 2'-0-알킬-RNA, 2'-0-메틸-RNA, 2'-알콕시-RNA, 2'-0-메톡시에틸-RNA(MOE), 2'-아미노-DNA, 2'-플루오로-DNA, 2'-플루오로-ANA로 이루어진 군으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드.
- [0437] 40. 양태 1 내지 39 중 어느 한 양태에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드간 연결기를 포함하는, 올리고뉴클레오티드.
- [0438] 41. 양태 40에 있어서, 변형된 뉴클레오시드간 연결기가 뉴클레이제 내성인, 올리고뉴클레오티드.
- [0439] 42. 양태 40 또는 41에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열 내의 뉴클레오시드간 연결기의 50% 이상이 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기 또는 보라노포스페이트 뉴클레오시드간 연결기인, 올리고뉴클레오티드.
- [0440] 43. 양태 40 또는 41에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열 내의 모든 뉴클레오시드간 연결기가 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기인, 올리고뉴클레오티드.
- [0441] 44. 양태 1 내지 43 중 어느 한 양태에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 RNase H를 모집할 수 있는, 올리고뉴클레오티드.
- [0442] 45. 양태 44에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 캡머인, 올리고뉴클레오티드.
- [0443] 46. 양태 44 또는 45에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 구조식 5'-F-G-F'-3'의 캡머이고, 이때 영역 F 및 F'가 독립적으로 1 내지 7개의 변형된 뉴클레오시드를 포함하거나 이로 이루어지고, G가 RNase H를 모집할 수 있는 6 내지 16개의 뉴클레오시드의 영역인, 올리고뉴클레오티드.
- [0444] 47. 양태 44 또는 45에 있어서, 캡머가 구조식 5'-D'-F-G-F'-3' 또는 5'-F-G-F'-D"-3'를 갖고, 이때 영역 F 및 F'가 독립적으로 1 내지 7개의 변형된 뉴클레오시드를 포함하고, G가 RNase H를 모집할 수 있는 6 내지 16개의 뉴클레오시드의 영역이고, 영역 D' 또는 D"가 1 내지 5개의 포스포다이에스터 연결된 뉴클레오시드를 포함하는, 올리고뉴클레오티드.
- [0445] 48. 양태 47에 있어서, D' 또는 D"가 임의적인, 올리고뉴클레오티드.
- [0446] 49. 양태 47에 있어서, 영역 D'가 2개의 포스포다이에스터 연결된 뉴클레오시드로 이루어진, 올리고뉴클레오티드

드.

- [0447] 50. 양태 49에 있어서, 포스포다이에스터 연결된 뉴클레오시드가 ca(시티딘-아데노신)인, 올리고뉴클레오티드.
- [0448] 51. 양태 46 또는 47에 있어서, 변형된 뉴클레오시드가 독립적으로 2'-0-알킬-RNA, 2'-0-메틸-RNA, 2'-알콕시-RNA, 2'-0-메톡시에틸-RNA, 2'-아미노-DNA, 2'-플루오로-DNA, 아라비노 핵산(ANA), 2'-플루오로-ANA 및 LNA 뉴클레오시드로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 2' 당 변형된 뉴클레오시드인, 올리고뉴클레오티드.
- [0449] 52. 양태 46 내지 51 중 어느 한 양태에 있어서, 영역 F 및 F' 내의 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드가 LNA 뉴클레오시드인, 올리고뉴클레오티드.
- [0450] 53. 양태 52에 있어서, 영역 F 및 F' 내의 모든 변형된 뉴클레오시드가 LNA 뉴클레오시드인, 올리고뉴클레오티드.
- [0451] 54. 양태 53에 있어서, 영역 F 및 F'가 LNA 뉴클레오시드로 이루어진, 올리고뉴클레오티드.
- [0452] 55. 양태 52 내지 54 중 어느 한 양태에 있어서, 영역 F 및 F' 내의 변형된 뉴클레오시드가 옥시-LNA 뉴클레오시드인, 올리고뉴클레오티드.
- [0453] 56. 양태 52에 있어서, 하나 이상의 영역 F 또는 F'가 2'-0-알킬-RNA, 2'-0-메틸-RNA, 2'-알콕시-RNA, 2'-0-메톡시에틸-RNA, 2'-아미노-DNA 및 2'-플루오로-DNA로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 2' 치환된 변형된 뉴클레오시드를 추가로 포함하는, 올리고뉴클레오티드.
- [0454] 57. 양태 46 내지 56 중 어느 한 양태에 있어서, 영역 G 내의 RNase H 모집 뉴클레오시드가 DNA, 알파-1-LNA, C4' 알킬화된 DNA, ANA, 2'F-ANA 및 UNA로부터 독립적으로 선택되는, 올리고뉴클레오티드.
- [0455] 58. 양태 57에 있어서, 영역 G 내의 뉴클레오시드가 DNA 및/또는 알파-1-LNA 뉴클레오시드인, 올리고뉴클레오티드.
- [0456] 59. 양태 57 또는 58에 있어서, 영역 G가 75% 이상의 DNA 뉴클레오시드로 이루어진, 올리고뉴클레오티드.
- [0457] 60. 양태 1 내지 59 중 어느 한 양태에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 화합물 번호 5_1 내지 743_1 및 771_1 (표 5) 중 어느 하나로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드.
- [0458] 61. 양태 1 내지 60 중 어느 한 양태에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 화합물 번호 6_1, 8_1, 9_1, 13_1, 41_1, 42_1, 58_1, 77_1, 92_1, 111_1, 128_1, 151_1, 164_1, 166_1, 169_1, 171_1, 222_1, 233_1, 245_1, 246_1, 250_1, 251_1, 252_1, 256_1, 272_1, 273_1, 287_1, 292_1, 303_1, 314_1, 318_1, 320_1, 324_1, 336_1, 342_1, 343_1, 344_1, 345_1, 346_1, 349_1, 359_1, 360_1, 374_1, 408_1, 409_1, 415_1, 417_1, 424_1, 429_1, 430_1, 458_1, 464_1, 466_1, 474_1, 490_1, 493_1, 512_1, 519_1, 519_1, 529_1, 533_1, 534_1, 547_1, 566_1, 567_1, 578_1, 582_1, 601_1, 619_1, 620_1, 636_1, 637_1, 638_1, 640_1, 645_1, 650_1, 651_1, 652_1, 653_1, 658_1, 659_1, 660_1, 665_1, 678_1, 679_1, 680_1, 682_1, 683_1, 684_1, 687_1, 694_1, 706_1, 716_1, 728_1, 733_1, 734_1 및 735_1로 이루어진 군으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드.
- [0459] 62. 양태 1 내지 60 중 어느 한 양태에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 화합물 번호 287_1, 342_1, 466_1, 640_1, 566_1, 766_1, 767_1, 768_1, 769_1 및 770_1로 이루어진 군으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드.
- [0460] 63. 양태 1 내지 62 중 어느 한 양태에 따른 올리고뉴클레오티드(영역 A); 및 상기 올리고뉴클레오티드에 공유 결합으로 부착되는 하나 이상의 접합체 모이어티(영역 C)를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체.
- [0461] 64. 양태 63에 있어서, 접합체 모이어티가 탄수화물, 세포 표면 수용체 리간드, 약물 물질, 호르몬, 친유성 물질, 중합체, 단백질, 웹티드, 독소, 비타민, 바이러스성 단백질 및 이들의 조합으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드 접합체.
- [0462] 65. 양태 63 또는 64에 있어서, 접합체 모이어티가 탄수화물 함유 모이어티인, 올리고뉴클레오티드 접합체.
- [0463] 66. 양태 65에 있어서, 탄수화물 접합체 모이어티가 양태 1 내지 62 중 어느 한 양태에 따른 올리고뉴클레오티드에 공유 결합으로 부착된 하나 이상의 아시알로당단백질 수용체 표적화 모이어티를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 접합체.
- [0464] 67. 양태 66에 있어서, 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티가 갈락토스, 갈락토사민, N-폼일-갈

락토사민, N-아세틸갈락토사민, N-프로피오닐-갈락토사민, N-n-부타노일-갈락토사민 및 N-이소부타노일갈락토사민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0465] 68. 양태 66 또는 67에 있어서, 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티가 1-가, 2-가, 3-가 또는 4-가인, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0466] 69. 양태 68에 있어서, 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티가 2 내지 4개의 말단 GalNAc 모이어티, 각각의 GalNAc 모이어티를 분자 분자에 연결하는 PEG 스페이서로 이루어진, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0467] 70. 양태 66 내지 69 중 어느 한 양태에 있어서, 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티가 3-가 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 모이어티인, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0468] 71. 양태 1 내지 70 중 어느 한 양태에 있어서, 접합체 모이어티가 도 1의 하나의 3-가 GalNAc 모이어티로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0469] 72. 양태 71에 있어서, 접합체 모이어티가 도 3의 3-가 GalNAc 모이어티인, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0470] 73. 양태 63 내지 72 중 어느 한 양태에 있어서, 연결기가 올리고뉴클레오티드 또는 인접한 올리고뉴클레오티드 서열과 접합체 모이어티 사이에 존재하는, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0471] 74. 양태 73에 있어서, 연결기가 생리학적으로 불안정한 연결기(영역 B)인, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0472] 75. 양태 74에 있어서, 생리학적으로 불안정한 연결기가 뉴클레아제 민감성 연결기인, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0473] 76. 양태 74 또는 75에 있어서, 생리학적으로 불안정한 연결기가 2 내지 5개의 연속적인 포스포다이에스터 연결기로 이루어진, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0474] 77. 양태 76에 있어서, 생리학적으로 불안정한 연결기가 양태 47 내지 50에 존재하는 영역 D' 또는 D''와 동등한, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0475] 78. 양태 63 내지 77 중 어느 한 양태에 있어서, 올리고뉴클레오티드 접합체가 화합물 번호 766_2, 767_2, 768_2, 769_2 및 770_2로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0476] 79. 양태 78에 있어서, 올리고뉴클레오티드 접합체가 도 4, 5, 6, 7 및 8에 표시된 올리고뉴클레오티드 접합체로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0477] 80. 양태 63 내지 76 중 어느 한 양태에 있어서, 비접합된 올리고뉴클레오티드와 비교하여, 표적 세포 내의 PD-L1의 개선된 억제, 또는 간과 비장 사이의 개선된 세포 분포 또는 접합체 올리고뉴클레오티드의 간으로의 개선된 세포 흡수를 나타내는 올리고뉴클레오티드 접합체.

[0478] 81. 양태 1 내지 62 중 어느 한 양태에 따른 올리고뉴클레오티드 또는 양태 63 내지 80 중 어느 한 양태에 따른 접합체 및 약학적으로 허용되는 희석제, 담체, 염 및/또는 항원보강제를 포함하는 약학 조성물.

[0479] 82. 뉴클레오티드 단위를 반응시켜 올리고뉴클레오티드 내에 포함된 공유 결합으로 연결된 인접한 뉴클레오티드 단위를 형성하는, 양태 1 내지 62 중 어느 한 양태에 따른 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0480] 83. 양태 82에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 서열을 비-뉴클레오티드 접합 모이어티와 반응시킴을 추가로 포함하는, 제조 방법.

[0481] 84. 올리고뉴클레오티드를 약학적으로 허용되는 희석제, 담체, 염 및/또는 항원보강제와 혼합함을 포함하는, 양태 81에 따른 약학 조성물의 제조 방법.

[0482] 85. PD-L1을 발현하는 표적 세포에서 PD-L1 발현을 조절하는 생체내 또는 시험관내 방법으로서, 효과량의 양태 1 내지 62 중 어느 한 양태에 따른 올리고뉴클레오티드, 양태 63 내지 80 중 어느 한 양태에 따른 접합체 또는 양태 81에 따른 약학 조성물을 상기 세포에 투여함을 포함하는 방법.

[0483] 86. 치료 또는 예방 효과량의 양태 1 내지 62 중 어느 한 양태에 따른 올리고뉴클레오티드, 양태 63 내지 80 중 어느 한 양태에 따른 접합체 또는 양태 81에 따른 약학 조성물을 질병을 앓고 있거나 질병에 걸리기 쉬운 대상에게 투여함을 포함하는, 질병의 치료 또는 예방 방법.

[0484] 87. 치료 또는 예방 효과량의 양태 1 내지 62 중 어느 한 양태에 따른 올리고뉴클레오티드, 양태 63 내지 80

중 어느 한 양태에 따른 접합체 또는 양태 81에 따른 약학 조성물을 바이러스 또는 기생충에 감염된 대상에게 투여함을 포함하는, 바이러스 또는 기생충에 대한 면역성을 회복하는 방법.

- [0485] 88. 양태 87에 있어서, 면역성의 회복이, 대조군과 비교될 때, 하나 이상의 HBV 항원에 특이적인 CD8+ T-세포의 간에서의 증가인, 방법.
- [0486] 89. 대상에서 질병의 치료 또는 예방용 약제로서 사용하기 위한 양태 1 내지 62 중 어느 한 양태에 따른 올리고뉴클레오티드, 양태 63 내지 80 중 어느 한 양태에 따른 접합체 또는 양태 81에 따른 약학 조성물.
- [0487] 90. 대상에서 질병의 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한, 양태 1 내지 62 중 어느 한 양태에 따른 올리고뉴클레오티드 또는 양태 63 내지 80 중 어느 한 양태에 따른 접합체 중 올리고뉴클레오티드의 용도.
- [0488] 91. 바이러스 또는 기생충에 대한 면역성의 회복에 있어서, 양태 1 내지 62 중 어느 한 양태에 따른 올리고뉴클레오티드, 양태 63 내지 80 중 어느 한 양태에 따른 접합체 또는 양태 81에 따른 약학 조성물의 용도.
- [0489] 92. 양태 91에 있어서, 면역성의 회복이, 대조군과 비교될 때, 하나 이상의 HBV 항원에 특이적인 CD8+ T-세포의 간에서의 증가인, 용도.
- [0490] 93. 양태 92에 있어서, HBsAg인, 용도.
- [0491] 94. 양태 86 내지 93 중 어느 한 양태에 있어서, 질병이 PD-L1의 생체내 활성화 연관된, 방법, 올리고뉴클레오티드 또는 용도.
- [0492] 95. 양태 86 내지 93 중 어느 한 양태에 있어서, 질병이 항원-제시 세포에서 PD-L1의 증가된 발현과 연관된, 방법, 올리고뉴클레오티드 또는 용도.
- [0493] 96. 양태 95에 있어서, PD-L1이, 양태 1 내지 62 중 어느 한 양태에 따른 올리고뉴클레오티드, 양태 63 내지 80 중 어느 한 양태에 따른 접합체 또는 양태 81에 따른 약학 조성물에 의한 치료 부재 하의 또는 치료 전의 발현과 비교하여 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상만큼 감소하는, 방법, 올리고뉴클레오티드 또는 용도.
- [0494] 97. 양태 86 내지 95 중 어느 한 양태에 있어서, 질병이 바이러스성 간 감염 및 기생충 감염로부터 선택되는, 방법, 올리고뉴클레오티드 또는 용도.
- [0495] 98. 양태 97에 있어서, 바이러스성 감염이 HBV, HCV 또는 HDV인, 방법, 올리고뉴클레오티드 또는 용도.
- [0496] 99. 양태 86 내지 95 중 어느 한 양태에 있어서, 질병이 만성 HBV인, 방법, 올리고뉴클레오티드 또는 용도.
- [0497] 100. 양태 98에 있어서, 기생충 감염이 말라리아, 톡소플라즈마증, 리슈마니아증 또는 트리파노소마증인, 방법, 올리고뉴클레오티드 또는 용도.
- [0498] 101. 양태 86 내지 95 중 어느 한 양태에 있어서, 대상이 포유동물인, 방법, 올리고뉴클레오티드 또는 용도.
- [0499] 102. 양태 101에 있어서, 포유동물이 인간인, 방법, 올리고뉴클레오티드 또는 용도.
- [0500] 실시예
- [0501] 재료 및 방법
- [0502] 모티프 서열 및 올리고뉴클레오티드 화합물
- [0503] [표 5]
- [0504] 인간 PD-L1 전사체(서열번호 1)를 표적으로 하는 올리고뉴클레오티드 모티프 서열(서열번호로 표시됨), 이들의 디자인, 및 모티프 서열을 기준으로 디자인된 특이적 안티센스 올리고뉴클레오티드 화합물(화합물 번호로 표시됨)의 목록.

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
5	taattggctactgc	2-11-3	TAattggctctacTGC	5_1	236	-20
6	tgcataagaatgact	4-10-2	TCGataagaatgaCT	6_1	371	-19
7	tgaacacacagtgc	2-12-2	TGaacacacagtgcA	7_1	382	-19
8	ctgaacacacagtgc	3-10-3	CTGaacacacagtCGC	8_1	383	-22
9	tctgaacacacagtgc	3-11-2	TCTgaacacacagtCG	9_1	384	-19
10	ttctgaacacacagtgc	3-11-2	TTCTgaacacacagTC	10_1	385	-17
11	acaagtcatgttacta	2-11-3	ACaaagtcatgttaCTA	11_1	463	-16
12	acacaagtcatgttac	2-12-2	ACacaagtcatgttAC	12_1	465	-14
13	cttacttagatgtgc	2-11-3	CTtacttagatgTGC	13_1	495	-20
14	acttacttagatgtgc	2-11-3	ACttacttagatgCTG	14_1	496	-18
15	gacttacttagatgtc	3-11-2	GACttacttagatgCT	15_1	497	-19
16	agacttacttagatgc	2-11-3	AGacttacttagaTGC	16_1	498	-18
17	gcaggaagagacttac	3-10-3	GCAggaagagactTAC	17_1	506	-20
18	aataattccgttcagg	4-9-4	AATAattccgttCAGG	18_1	541	-22
19	gcaaataattccgtt	3-10-3	GCAaataattccGTt	19_2	545	-18
19	gcaaataattccgtt	4-8-4	GCAAataatttCGTT	19_1	545	-20
20	agcaaataattccgt	4-9-3	AGCAaataatttCGT	20_1	546	-20
21	cagagcaaataattcc	4-10-3	CAGAgcaaataatTCC	21_1	548	-21
22	tggacagagcaaataat	4-11-3	TGGAcagagcaaataAAT	22_1	551	-19
23	atggacagagcaaata	4-8-4	ATGGAcagagcaAAATA	23_1	554	-20
24	cagaatggacagagca	2-11-3	CAgaatggacagagaGCA	24_1	558	-21
25	ttctcagaatggacag	3-11-2	TTCTcagaatggacAG	25_1	562	-17
26	ctgaaacttgacatag	4-8-4	CTGAacttgacATAG	26_1	663	-20
27	aagacaacccagactga	2-13-3	AAgacaacccagacTGA	27_1	675	-21
28	tataagacaacccagac	4-10-4	TATAagacaacccAGAC	28_1	678	-22
29	ttataagacaacccaga	4-10-4	TTATAagacaacccCAGA	29_1	679	-23
30	tgttataagacaacccc	4-10-3	TGTtataagacaacccCCC	30_1	682	-22
31	tagaacaatggacttt	4-9-4	TAGAacaatggtaCTTT	31_1	708	-20
32	gtagaacaatggtaact	4-10-2	GTAGAacaatggtaCT	32_1	710	-19
33	aggtagaacaatggta	3-10-3	AGGtagaacaatgTA	33_1	712	-19
34	aagaggtagaacaatgg	4-9-4	AAGAggtagaacaATGG	34_1	714	-21
35	gcatccacagtaatt	2-12-2	GCatccacagtaaaTT	35_1	749	-17
36	gaaggttatttaatc	2-11-3	GAaggttatttaaTTC	36_1	773	-13
37	ctaatcgaaatgcagca	4-9-3	CTAAtcgaaatgcaGCA	37_1	805	-22
38	tacccaatctaattcga	3-10-3	TACccaatctaattCGA	38_1	813	-20
39	tagttacccaatctaa	3-10-3	TAGttacccaatcTAA	39_1	817	-19
40	catttagttacccaat	3-10-3	CATttagttacccAAT	40_1	821	-18

[0505]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
41	tcatttagttaccaa	3-10-3	TCAtttagttaccAA	41_1	822	-19
42	ttcatttagttacca	2-10-4	TTcatttagttacCCAA	42_1	823	-22
43	gaattaaatccatttgt	4-10-4	GAATtaatttcatTTAGT	43_1	829	-19
44	cagtggaaatattt	4-9-4	CAGTggggaaatttATT	44_1	837	-20
45	ccaaacagtggaaatt	4-8-4	CCAAcagtggggAATT	45_1	842	-21
46	ccaaacagtggaaat	3-10-3	CCCaacagtggggAAT	46_1	843	-22
47	tatacccaacagtgagg	2-12-3	TAtacccaaacagtgAGG	47_1	846	-21
48	ttatacccaacagtgag	2-11-4	TTatacccaacagTGAG	48_1	847	-21
49	tttatacccaacagtga	3-11-3	TTTatacccaacagTGA	49_1	848	-21
50	cctttatacccaacag	3-10-3	CCTttatacccaacAG	50_1	851	-23
51	taacctttataccaa	4-8-4	TAACctttatacCCAA	51_1	854	-22
52	aataacctttataccaa	3-10-4	AATAacctttataCCCCA	52_1	855	-23
53	gtaaataacctttata	3-11-2	GTAataaacctttaTA	53_1	859	-14
54	actgtaaataacctttat	4-10-4	ACTGtaataacctTTAT	54_1	860	-20
55	atatatatgcattgag	3-11-2	ATAtatatatgcattAG	55_1	903	-14
56	agatatatatgcattg	2-12-2	AGatatatatgcattTG	56_1	905	-12
57	gagatatatatgcatt	3-10-3	GAGatatatatgcattAAT	57_1	906	-15
58	ccagagatatatatgc	2-11-3	CCagagatatatatGC	58_1	909	-19
59	caatattccagagat	4-9-4	CAATattccagagATAT	59_1	915	-20
60	gcaatattccagagata	4-10-3	GCAAtattccagagATA	60_1	916	-22
61	agcaatattccagagat	3-11-3	AGCaatattccagaGAT	61_1	917	-22
62	cagcaatattccagag	3-9-4	CAGcaatattccAGAG	62_1	919	-22
63	aatcagcaatattccag	4-9-4	AATCagcaatattCCAG	63_1	921	-23
64	acaatcagcaatattcc	4-9-4	ACAAtcagcaataTTCC	64_1	923	-21
65	actaagtagttacacttct	2-14-3	ACtaagtagttacactTCT	65_1	957	-20
66	ctaagtagttacacttc	4-11-2	CTAAgttagttacactTC	66_1	958	-18
67	gactaagtagttacactt	3-12-3	GACtaagtagttacaCTT	67_1	959	-20
68	tgactaagtagttaca	3-9-4	TGActaagtagtTACA	68_1	962	-19
69	ctttgactaagtagtt	4-10-3	CTTtgactaagtagTTA	69_1	964	-19
70	ctcttgactaagtag	3-10-3	CTCtttgactaagTAG	70_1	967	-19
71	gctcttgactaagta	4-10-2	GCTCtttgactaagTA	71_1	968	-21
72	ccttaaatactgttac	2-11-4	CCtttaaatactgtTGAC	72_1	1060	-20
73	cttaaatactgttgac	2-12-2	CTtaaatactgttgAC	73_1	1060	-13
74	tccttaaatactgttg	3-10-3	TCCtttaaatactgtTG	74_1	1062	-18
75	tctccttaaatactgtt	4-11-2	TCTCtttaaatactgtTT	75_1	1063	-19
76	tatcatagttctcc	2-10-4	TAtcatagttctCCCT	76_1	1073	-21
77	agtatcatagttctcc	3-10-3	AGTatcatagttcTCC	77_1	1075	-22
78	gagtatcatagttctc	2-11-3	GAgtatcatagttCTC	78_1	1076	-18
79	agagtatcatagttct	2-10-4	AGagtatcatagTTCT	79_1	1077	-18
79	agagtatcatagttct	3-10-3	AGAgtatcatagttCT	79_2	1077	-19

[0506]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
80	cagagtatcatagttc	3-10-3	CAGagtatcatagTTC	80_1	1078	-18
81	ttcagagtatcatagt	4-10-2	TTCAgagtatcataGT	81_1	1080	-18
82	cttcagagtatcatag	3-9-4	CTTcagagtatcATAG	82_1	1081	-19
83	tttccagagtatcata	4-11-2	TTCTttagagtatcaTA	83_1	1082	-19
84	tttccagagtatcat	3-10-4	TTTctttagagtatCAT	84_1	1083	-20
85	gagaaggctaagttt	4-9-3	GAGAAaggctaagTTT	85_1	1099	-19
86	gacacttgcattacatt	2-10-4	GAacacttgcattCATT	86_1	1213	-19
87	ttagacacttgcata	2-13-2	TGagacacttgcataCA	87_1	1215	-18
88	ttagacacttgcgtac	2-11-3	TGagacacttgcgtTAC	88_1	1216	-18
89	ctttattaaactccat	2-10-4	CTttattaaactCCAT	89_1	1266	-18
90	accaaactttataaa	4-10-2	ACCAaaactttatA	90_1	1272	-14
91	aaacctctactaagtg	4-10-2	AAACctctactaagTG	91_1	1288	-16
92	agattaagacagtta	2-11-3	AGattaagacagtGA	92_1	1310	-16
93	aagttaggacaagaggc	2-12-3	AAgttaggacaagaGGC	93_1	1475	-22
94	aaagttaggacaagagg	4-10-3	AAAGttaggacaagAGG	94_1	1476	-20
95	gttaagcagccaggag	2-12-2	GTtaagcagccaggAG	95_1	1806	-20
96	agggttaggatggtag	2-12-2	AGggtaggatggTAG	96_1	1842	-20
97	aaggtaggatggta	3-11-2	AAGggtaggatggTA	97_1	1843	-20
98	caaggtaggatgggt	2-12-2	CAaggtaggatggGT	98_2	1844	-20
98	caaggtaggatgggt	3-11-2	CAAgggtaggatggGT	98_1	1844	-21
99	ccaaggtaggatggg	2-12-2	CCAaggtaggatggG	99_1	1845	-22
100	tccaaggtaggatgg	2-12-2	TCcaaggtaggatGG	100_1	1846	-20
101	cttccaagggttaggat	4-10-2	CTTCCAagggttagAT	101_1	1848	-21
102	atcttccaagggttagga	3-12-2	ATCtttccaagggttagGA	102_1	1849	-22
103	agaagtgtatggctatt	2-11-4	AGAagtgatggctATT	103_1	1936	-21
104	aagaagtgtatggctat	3-10-4	AAGaagtgtatggcTCAT	104_1	1937	-21
105	gaagaagtgtatggctca	3-11-3	GAAGaaagtgtatggcTCA	105_1	1938	-21
106	atgaaatgtaaactggg	4-9-4	ATGAatgtaaacTGGG	106_1	1955	-21
107	caatgaaatgtaaactgg	4-10-4	CAATgaaatgtaaacTGG	107_1	1956	-20
108	gcaatgaaatgtaaactg	4-10-4	GCAAtgaaatgtaaACTG	108_1	1957	-20
109	agcaatgaaatgtaaact	4-10-4	AGCAatgaaatgtaaACT	109_1	1958	-20
110	gagcaatgaaatgtaac	4-10-4	GAGCaatgaaatgtAAAC	110_1	1959	-19
111	tgaattccatatcgat	2-12-3	TGaaattccatatcCGA	111_1	1992	-22
112	agaattatgaccatat	2-11-3	AGaattatgaccatAT	112_1	2010	-15
113	aggtaagaattatgacc	3-10-4	AGGtaagaattatGACC	113_1	2014	-21
114	tcaggtaagaattatgac	4-10-4	TCAAGgttaagaattTGAC	114_1	2015	-22
115	cttcaggtaagaattatg	4-10-4	CTTCAGgttaagaattTATG	115_1	2017	-21
116	tcttcaggtaagaatta	4-9-4	TCTTcaggtaagaATT	116_1	2019	-20
117	cttcttcaggtaagaat	4-9-4	CTTCTtcaggtaaaGAAT	117_1	2021	-21
118	tcttcttcaggtaagaa	4-10-3	TCTTcttcaggtaaGAA	118_1	2022	-20

[0507]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
119	tcttcttcaggtaaga	3-10-3	TCTtcttcaggtaAGA	119_1	2023	-20
120	tggctctaagagaagaag	3-10-4	TGGctctaagagaAGAAG	120_1	2046	-20
121	gttgttctaagagaag	4-9-3	GTGgtctaagagAAG	121_1	2049	-19
123	cagttggtctaagagaa	2-11-4	CAggtggtctaAGAA	123_1	2050	-20
124	gcagttggtctaagagaa	3-13-2	GCAggtggtctaAGAA	124_1	2050	-22
122	agtggtctaagagaa	3-9-4	AGTtggtctaAGAA	122_1	2050	-20
126	gcagttggtctaagaga	2-13-2	GCagttggtctaAGA	126_1	2051	-21
125	cagttggtctaagaga	4-10-2	CAGTtggtctaAGA	125_1	2051	-21
127	gcagttggtctaagag	2-11-3	GCagttggtctaAGAG	127_1	2052	-21
128	ctcatatcagggcagt	2-10-4	CTcatatcagggCAGT	128_1	2063	-24
129	cacacatgttcttaac	4-11-2	CACAcatgttcttaAC	129_1	2087	-18
130	taaatacacacatgttct	3-11-4	TAAatacacacatgTTCT	130_1	2092	-19
131	gttaatacacacatgttc	4-11-3	GTAAtacacacatgTTC	131_1	2093	-19
132	tgttaatacacacatgtt	4-10-4	TGTAatacacacatGT	132_1	2094	-22
133	gatcatgttaatacacac	4-10-4	GATCatgttaataACAC	133_1	2099	-20
134	agatcatgttaatacaca	4-10-4	AGATcatgttaataCACA	134_1	2100	-21
135	caaagatcatgttaataca c	4-12-4	CAAAGatcatgttaatACAC	135_1	2101	-19
136	acaagatcatgttaatac a	4-12-4	ACAAAGatcatgtaaaTACA	136_1	2102	-20
137	gaatacacaagatcatgt	4-10-4	GAATacaacaaagatcaTGTA	137_1	2108	-20
138	agaatacacaagatcatgt	4-10-4	AGAAtacaacaaagatcATGT	138_1	2109	-20
139	cagaatacacaagatcatg	4-10-4	CAGAatacacaagatCATG	139_1	2110	-21
140	gcagaatacacaagatca	4-9-4	GCAGAatacacaagATCA	140_1	2112	-22
141	aggcagaatacacaagat	4-11-2	AGGCagaatacacaagAT	141_1	2114	-19
142	aaggcagaatacacaaga	4-10-3	AAGGCagaatacacaAGA	142_1	2115	-19
143	attagtgggacgaa	3-10-3	ATTagtgggacGAA	143_1	2132	-18
144	cattagtgggacgaa	2-11-3	CAAttagtgggacCGA	144_1	2133	-20
145	gagggtgatggattag	2-11-3	GAgggtgatggatTAG	145_1	2218	-19
146	ttaggagtaataaagg	2-10-4	TTaggagtaataAAGG	146_1	2241	-14
147	ttaatgaatttgggt	3-11-2	TTAatgaatttggTG	147_1	2263	-13
148	cttaatgaatttgggt	2-12-2	CTttaatgaatttgGT	148_1	2265	-14
149	catggattacaactaa	4-10-2	CATGgattacaactAA	149_1	2322	-16
150	tcatggattacaacta	2-11-3	TCatggattacaCTA	150_1	2323	-16
151	gtcatggattacaact	3-11-2	GTCatggattacaCT	151_1	2324	-18
152	cattaaatctagtcat	2-10-4	CAttaaatctagTCAT	152_1	2335	-16
153	gacattaaatctagtc	4-10-3	GACAttaaatctagTCA	153_1	2336	-19
154	agggacattaaatcta	4-10-2	AGGGGacattaaatcTA	154_1	2340	-18
155	caaaggcattataacca	4-9-3	CAAAGcattataaCCA	155_1	2372	-18
156	acttacttaggcagaag	2-10-4	ACTtacttaggcGAAG	156_1	2415	-19

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
157	cagagttaactgtaca	4-10-2	CAGAgttaactgtAC	157_1	2545	-20
158	ccagagttaactgtac	4-10-2	CCAGagttaactgtAC	158_1	2546	-20
159	gccagagttaactgtta	2-12-2	GCCagagttaactgtTA	159_1	2547	-20
160	tggccagagttaact	2-12-2	TGggccagagttaaCT	160_1	2550	-21
161	cagcatctatcagact	2-12-2	CAgcatctatcagaCT	161_1	2576	-19
162	tgaataaacatgagtcat	3-11-4	TGAaataaacatgagTCAT	162_1	2711	-19
163	gtgaaataaacatgagtc	3-10-4	GTGaaataaacatgAGTC	163_1	2713	-19
164	tctgttatgtcactg	4-10-2	TCTGtttatgtcacTG	164_1	2781	-20
165	gtctgttatgtcaact	4-10-2	GTCTgttatgtcaCT	165_1	2782	-22
166	tggctgttatgtca	2-10-4	TGgtctgttatGTCA	166_1	2784	-21
167	ttggctgttatgtc	4-10-2	TTGGctgttatgtTC	167_1	2785	-20
168	tcacccattgtttaaa	2-12-2	TCacccattgtttaAA	168_1	2842	-15
169	ttcagcaaatttcgt	2-10-4	TTcagcaaattTCGT	169_1	2995	-17
170	gtgtgttcagcaaatat	3-10-4	GTGtgttcagcaaATAT	170_1	2999	-21
171	tctattgttaggtatc	3-10-3	TCTattgttaggtATC	171_1	3053	-18
172	attgccccatcttactg	2-12-2	ATtgccccatcttacTG	172_1	3118	-19
173	tattgccccatcttact	3-11-2	TATtgccccatcttaCT	173_1	3119	-21
174	aaatattgccccatctt	2-11-3	AAatattgccccatCTT	174_1	3122	-17
175	ataacccatcttataca	3-11-2	ATAacccatcttataCA	175_1	3174	-16
176	tataacccatcttatac	2-11-3	TAAtacccatcttatacA	176_1	3175	-14
177	ttataacccatcttata	3-11-2	TTAtacccatcttataTA	177_1	3176	-14
178	tttataacccatcttata	3-10-3	TTTAtacccatcttCAT	178_1	3177	-16
179	actgttattgttatct	2-11-3	ACtgttattgtctaTCT	179_1	3375	-19
180	aggactgttattgtca	2-11-3	AGgactgttattgtCTA	180_1	3378	-21
181	gaggactgttattgtc	3-11-2	GAGgactgttattgtCT	181_1	3379	-22
182	acgtagaataataaca	2-12-2	ACgtagaataataaCA	182_1	3561	-11
183	ccaagtgtatataatgg	2-10-4	CCAagtgtatataATGG	183_1	3613	-19
184	tttagcagaccaagtga	2-10-4	TTTagcagaccaGTGA	184_1	3621	-21
185	gtttagcagaccaagt	2-12-2	GTttagcagaccaGT	185_1	3623	-19
186	tgacagtgttatatt	2-12-2	TGacagtgttatataTT	186_1	3856	-13
187	tgtccaagatattgac	4-10-2	TGTCcaagatattgAC	187_1	3868	-18
188	gaatatcctagattgt	3-10-3	GAAtatcctagatTGT	188_1	4066	-18
189	caaactgagaatatacc	2-11-3	CAaaactgagaataTCC	189_1	4074	-16
190	gcaaactgagaatatac	3-11-2	GCAaaactgagaataTC	190_1	4075	-16
191	tccttattacaatcgta	3-11-2	TCCtattacaatcgTA	191_1	4214	-19
192	ttccttattacaatcg	4-10-2	TTCCtattacaatcGT	192_1	4215	-19
193	actaatggggaggatt	2-12-2	ACtaatggggaggatTT	193_1	4256	-15
194	tagttcagagaataag	2-12-2	TAgtttcagagaataAG	194_1	4429	-13
195	taacatatagttcaga	2-11-3	TAacatatagttcAGA	195_1	4436	-15
196	ataacatatagttcag	3-11-2	ATAacatatagttcAG	196_1	4437	-14

[0509]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
197	cataacatatagttca	2-12-2	CAtaacatatagttCA	197_1	4438	-13
198	tcataacatatagttcc	2-12-2	TCataaacatatagtTC	198_1	4439	-12
199	tagctcctaacaatca	4-10-2	TAGCtcctaacaatCA	199_1	4507	-22
200	ctccaatcttgata	4-10-2	CTCCaatcttgtaTA	200_1	4602	-20
201	tctccaatcttgat	4-10-2	TCTCcaatcttgAT	201_1	4603	-19
202	tcttattcagccaatc	2-12-2	TCtattcagccaaTC	202_1	4708	-17
203	cggaaagtcaagtgaa	3-10-3	CGGaagtcaagtgAA	203_1	4782	-19
204	ttaagcatgaggaata	4-10-2	TTAAgcatgaggaTA	204_1	4798	-16
205	tgaitgagcacctt	3-10-3	TGAttgagcacctCTT	205_1	4831	-22
206	gacttaattttcggt	3-11-2	GACtaattttcgTT	206_1	4857	-15
207	tgacttaattttcggt	3-10-3	TGActaattttCGT	207_1	4858	-17
208	gtgacttaattttcg	3-10-3	GTGactaattttTCG	208_1	4859	-17
209	ctgcttggaaatgtgac	4-10-2	CTGCttggaaatgtgAC	209_1	4870	-20
210	cctgcttggaaatgtga	2-11-3	CCTgcttggaaatgTGA	210_1	4871	-21
211	atcctgcttggaaatgt	2-10-4	ATcctgcttggaaATGT	211_1	4873	-20
212	attataaaatctattct	3-10-3	ATTataaaatctatTCT	212_1	5027	-13
213	gcttaaaatcttcatc	2-11-3	GCTtaaaatcttcATC	213_1	5151	-16
214	cattgtAACATACTTA	2-10-4	CAttgtAACATACTTA	214_1	5251	-19
215	gcattgtAACACACT	2-12-2	GCattgtAACACACT	215_1	5252	-18
216	taatattgcaccaaAT	2-12-2	TAatattgcaccaaAT	216_1	5295	-13
217	gataaatattgcaccaa	2-11-3	GAataatattgcacCAA	217_1	5297	-16
218	agataaatattgcacca	2-12-2	AGataatattgcacCA	218_1	5298	-16
219	gccaaagaagataatat	2-10-4	GCCaaagaagataATAT	219_1	5305	-17
220	cacagccacataaaact	4-10-2	CACAgccacataaaCT	220_1	5406	-21
221	ttgttaatttgccaaac	2-12-2	TTgttaatttgccaaAC	221_1	5463	-12
222	tgacttggaaatgtgg	2-11-3	TGacttggaaatgtGG	222_1	5467	-18
223	tcttaactgaaatagtc	2-12-2	TCTtaactgaaatagTC	223_1	5503	-13
224	gtggttctaaactgaaa	3-11-2	GTGgttctaaactgAA	224_1	5508	-16
225	caatatggacttgtt	2-12-2	CAatatggacttgtGT	225_1	5522	-18
226	atgacaatatggact	3-11-2	ATGacaatatggact	226_1	5526	-17
227	tatgacaatatgggac	4-10-2	TATGacaatatgggAC	227_1	5527	-17
228	atatgacaatatggga	4-10-2	ATATGacaatatggGA	228_1	5528	-17
229	cttcacttaataatta	2-11-3	CTtcacttaataaaTTA	229_1	5552	-13
230	ctgcttcacttaataaa	4-10-2	CTGCttcacttaataAA	230_1	5555	-18
231	aagactgcttcactta	2-11-3	AAgactgcttcactTA	231_1	5559	-17
232	gaatgccctaattatg	4-10-2	GAATgccctaattTG	232_1	5589	-19
233	tggaatgccctaatta	3-11-2	TGGaatgccctaattTA	233_1	5591	-19
234	gcaaatgccaggatgt	3-11-2	GCAaatgccaggatGT	234_1	5642	-23
235	ctaatttggaggatgt	3-11-2	CTAatttggaggatTG	235_1	5673	-15
236	aatatagaacctaata	2-12-2	AAtatagaacctaataTG	236_1	5683	-10

[0510]

서열 번호	보터프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
237	gaaagaatagaatgtt	3-10-3	GAAagaatagaatGTT	237_1	5769	-12
238	atggtaatagattat	3-11-2	ATGgtaatagattAT	238_1	5893	-15
239	gaaagagcacagggtg	2-12-2	GAaagagcacaggGTG	239_1	6103	-18
240	ctacatagagggaatg	4-10-2	CTACatagagggaATG	240_1	6202	-18
241	gcttcctacatagagg	2-10-4	GCttcctacataGAGG	241_1	6207	-24
242	tgccttcacatagag	4-10-2	TGCTtcacatagAG	242_1	6208	-22
243	tggcgttgaatatgt	2-11-3	TGggcgttgaataTGT	243_1	6417	-19
244	cattatatttaagaac	3-11-2	CATtatatttaagaAC	244_1	6457	-11
245	tcggttatgttatcat	2-10-4	TCggttatgttaTCAT	245_1	6470	-19
246	cacttatctggcgg	2-10-4	CActtatctggTCGG	246_1	6482	-22
247	aaattggcacagcgtt	3-10-3	AAAttggcacagcGTT	247_1	6505	-18
248	accgtgacagtaatg	4-9-3	ACCGtgacagtaaATG	248_1	6577	-20
249	tgggaaccgtgacagta	2-13-2	TGggAACCGTgacagTA	249_1	6581	-22
250	ccacatataggcctt	2-11-3	CCacatataggcCTT	250_1	6597	-21
251	catattgttacccat	2-11-3	CAatttgttaccaTAC	251_1	6617	-18
252	tcatattgttaccata	3-10-3	TCAtattgttaccATA	252_1	6618	-19
253	caatttgtcatattgt	4-8-4	CAATtgtcatatTGCT	253_1	6624	-21
254	cattcaatttgtcatattg	3-12-3	CATtcaatttgtcatATTG	254_1	6626	-18
255	tttctactggaaatgg	4-9-4	TTTCTactggaaTTTG	255_1	6644	-20
256	caatttagtgcagccag	3-10-3	CAAtttagtgcageCAG	256_1	6672	-21
257	gaataatgttcttatcc	4-10-3	GAATAatgttcttaTCC	257_1	6704	-20
258	cacaattgaataatgttc	4-13-3	CACAAattgaataatgtTCT	258_1	6709	-20
259	catgcacaaattgaataat	4-11-4	CATGcacaaaattgaaTAAT	259_1	6714	-20
260	atccgtcaatttcacat	3-11-3	ATCctgtcaatttcACAT	260_1	6832	-22
261	ccaccatagctgtatca	2-12-2	CCaccatagctgtatCA	261_1	6868	-22
262	accaccatagctgtatca	2-12-3	ACcaccatagctgtatCA	262_1	6868	-23
263	caccaccatagctgtatca	2-13-2	CAccaccatagctgtatCA	263_1	6869	-21
264	tagtcggcaccacat	2-12-2	TAgttcggcaccacAT	264_1	6877	-22
265	cttgttagtcggcaccac	1-14-2	CtttgttagtcggcaccAC	265_1	6880	-21
266	cttgttagtcggcaccac	1-13-2	CtttgttagtcggcaccCA	266_1	6881	-21
267	cgccttgttagtcggcaccac	2-12-2	CGcttgttagtcggcAC	267_1	6883	-21
268	tcaataaagatcaggc	3-11-2	TCAataaagatcagGC	268_1	6942	-17
269	tggacttacaagaatg	2-12-2	TGgacttacaagaATG	269_1	6986	-14
270	atggacttacaagaatg	3-11-2	ATGgacttacaagaAT	270_1	6987	-15
271	gctcaagaatggat	4-10-2	GCTCaagaatggAT	271_1	7073	-19
272	tactgttagacatggc	4-10-2	TACTgttagacatgGC	272_1	7133	-21
273	gcaattcattgtatct	4-9-3	GCAAttcatgtatGA	273_1	7239	-20
274	tgaaggaggaggacac	2-14-2	TGaaggaggaggacAC	274_1	7259	-20
275	agtggtaaggaggag	2-13-2	AGtggtaaggaggAG	275_1	7265	-21

[0511]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
276	tagtggtaagggaggag	2-14-2	TAGtgtgaagggaggAG	276_1	7265	-21
277	atagtggtaagggaggag	1-16-2	AtagtggtaagggaggAG	277_1	7265	-20
278	tagtggtaagggaggag	2-13-2	TAGtgtgaagggaggGA	278_1	7266	-21
279	atagtggtaagggaggag	2-14-2	ATagtggtaagggaggGA	279_1	7266	-21
280	tagtggtaagggaggag	3-11-2	TAGtgtgaagggaggGG	280_1	7267	-21
281	atagtggtaagggaggag	3-12-2	ATAgtgtgaagggaggGG	281_1	7267	-22
282	gatagtggtaagggaggag	2-14-2	GAtagtggtaagggaggGG	282_1	7267	-21
283	atagtggtaagggaggag	4-10-2	ATAAGtgtgaagggaggAG	283_1	7268	-20
284	gatagtggtaagggaggag	2-12-3	GAtagtggtaagggaggGAG	284_1	7268	-21
285	gagatagtggtaagggaggag	2-10-4	GAAGatagtggtaAGG	285_1	7271	-20
286	catggagatagtggta	4-10-2	CATGggagatagtggGT	286_1	7276	-22
287	acaataaatggtaactct	4-10-4	ACAAataatggtaCTCT	287_1	7302	-20
288	acacacaataatggta	4-10-4	ACACacaataatgttTA	288_1	7306	-20
289	gagggacacacaataat	3-11-4	GAGggacacacaataATAT	289_1	7311	-21
290	atatagagaggctcaa	4-8-4	ATATagagaggcTCAA	290_1	7390	-21
291	tttgatatagagaggct	2-10-4	TTtgtatagagaGGCT	291_1	7393	-20
292	gcatttgtatagaga	4-9-3	GCATTtgtatagAGA	292_1	7397	-20
293	tttgcatttgtatag	2-11-3	TTTgcatttgtatAG	293_1	7400	-15
294	ctggaaagaataggttc	3-11-2	CTGgaagaataggTC	294_1	7512	-17
295	actggaaagaataggtt	4-10-2	ACTGgaagaataggTT	295_1	7513	-18
296	tactggaaagaatagg	4-10-2	TACTGgaagaataggGT	296_1	7514	-18
297	tggcttatcctgtact	4-10-2	TGGCttatcctgtatCT	297_1	7526	-25
298	atggcttatcctgtac	2-10-4	ATggcttatcctGTAC	298_1	7527	-22
299	tatggcttatcctgtat	4-10-2	TATGgcttatcctgTA	299_1	7528	-22
300	gtatggcttatcctgt	3-10-3	GTATggcttatccTGT	300_1	7529	-23
301	atgaatatatgccagt	2-11-4	ATgaatatatgccCAGT	301_1	7547	-22
302	gatgaatatatgccca	2-10-4	GAtgaatatatgCCCA	302_1	7549	-22
303	caagatgaatatatgcc	3-10-4	CAAGatgaatataTGCC	303_1	7551	-21
304	gacaacatcgtataga	4-9-4	GACAacatcgtatAGA	304_1	7572	-22
305	caagacaacatcgtat	4-8-4	CAAGacaacatcAGTA	305_1	7576	-20
306	cactccttagttccctt	3-10-3	CACtcttagttccTTT	306_1	7601	-22
307	aacactccttagttcc	3-10-3	AACactccttagttCCT	307_1	7603	-22
308	taacactccttagttcc	2-11-3	TAacactccttagtTCC	308_1	7604	-20
309	ctaacactccttagttc	2-12-2	CTaacactccttagtTC	309_1	7605	-18
310	tgataaacataactgtg	2-12-2	TGataaacataactgTG	310_1	7637	-13
311	ctgataaacataactgt	2-10-4	CTgataaacataCTGT	311_1	7638	-18
312	tttgaactcaagtgac	4-10-2	TTTGAactcaagtgAC	312_1	7654	-16
313	tcctttacttagctag	4-9-3	TCTTtacttagcTAG	313_1	7684	-23
314	gagtttgatttagctg	2-11-3	GAgttttgatttagCTG	314_1	7764	-20
315	tggatatgacaggga	2-11-3	TGggatatgacaggGGA	315_1	7838	-21

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열변 호 1 상의 개시	dG
316	tgtggatatgacagg	4-10-2	TGTGggatatgacaGG	316_1	7840	-22
317	atatggaaggatatac	4-10-2	ATATggaaggatataC	317_1	7875	-17
318	acaggatatggaaggg	3-10-3	ACAggatatgaaGGG	318_1	7880	-21
319	atttcaacaggatatgg	4-9-4	ATTtcaacaggatATGG	319_1	7885	-20
320	gagtaattcaacagg	2-11-3	GAgttaattcaacAGG	320_1	7891	-17
321	aggaggtaattcaaca	4-9-4	AGGGaggtaatttACA	321_1	7893	-22
322	attagggaggtaatttca	4-9-4	ATTAgggaggtaattTC	322_1	7896	-21
323	cttactatttagggagt	2-10-4	CTtactatttagGAGT	323_1	7903	-20
324	cagcttactatttaggg	2-11-3	CAgcttactattaGGG	324_1	7906	-20
326	atttcagcttactattag	3-11-4	ATTtcagcttactaTTAG	326_1	7908	-20
325	tcagcttactatttagg	3-10-3	TCAgcttactattAGG	325_1	7907	-20
327	ttcagcttactatttag	2-10-4	TTcagcttactaTTAG	327_1	7908	-17
328	cagatttcagttact	4-10-2	CAGAtttcagtttCT	328_1	7913	-21
329	gactacaactagaggg	3-11-2	GACTacaactagaggG	329_1	7930	-19
330	agactacaactagagg	4-10-2	AGACTacaactagaGG	330_1	7931	-19
331	aagactacaactagag	2-12-2	AAgactacaactagAG	331_1	7932	-13
332	atgatttaattctagcaa	4-12-4	ATGAttaattctagtCAA	332_1	7982	-20
	a					
333	tttaattctagtcaaa	3-10-3	TTTaattctagtcaAA	333_1	7982	-12
334	gatttaattctagtc	4-8-4	GATTtaattctaGTCA	334_1	7984	-20
771	tgatttaattctagtc	3-10-4	TGAttaattctaGTCA	771_1	7984	-20
335	atgatttaattctagtc	4-11-3	ATGAttaattctagTCA	335_1	7984	-20
336	gatgatttaattctagtc	4-13-2	GATGatttaattctagtCA	336_1	7984	-20
337	gatttaattctagtc	2-10-4	GATtaattctaGTCA	337_1	7984	-18
338	gatgatttaattctagtc	4-11-3	GATGatttaattctaGTC	338_1	7985	-20
339	tgatttaattctagtc	2-12-2	TGatttaattctagTC	339_1	7985	-13
340	gagatgatttaattcta	4-9-4	GAGATgatttaatTCTA	340_1	7988	-20
341	gagatgatttaattct	3-10-3	GAGAtgatttaatTCT	341_1	7989	-16
342	cagattgtatggtagt	4-10-2	CAGAttgtatggtagTT	342_1	8030	-19
343	ctcagattgtatggtag	2-10-4	CTcagattgtatGTTAG	343_1	8032	-20
344	gttagccctcagattg	3-10-3	GTTagccctcagaTTG	344_1	8039	-23
345	tgtatgttagccctc	2-10-4	TGtattgttagCCCTC	345_1	8045	-24
346	acttgtatgttagcc	2-10-4	ACtgtatgtatAGCC	346_1	8048	-22
347	agccagtatcaggac	3-11-2	AGCcagtatcagggAC	347_1	8191	-23
348	ttgacaatatgtggcat	2-10-4	TTgacaatatgtGCAT	348_1	8213	-20
349	acaagtggtatcttct	3-10-3	ACAagtggtatctTCT	349_1	8228	-19
350	aatctactttacaagt	4-10-2	AATCtactttacaAGT	350_1	8238	-16
351	cacagtagatgcctgata	2-12-4	CAcagtagatgcctGATA	351_1	8351	-24
352	gaacacagtagatgcc	2-11-3	GAacacagtagatGCC	352_1	8356	-21
353	cttggAACACAGTAGAT	4-11-2	CTTGGaaCACAGTAGAT	353_1	8359	-20

서열 번호	보티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
354	atatcttggAACACAG	3-10-3	ATAtcttggAACACAG	354_1	8364	-18
355	tctttaatatcttggAAC	3-11-4	TCTtaataatcttggAAC	355_1	8368	-19
356	tgattcttaataatcttG	2-13-4	TGatttcttaataatcttG	356_1	8372	-19
357	tgatgattcttaataatC	2-13-4	TGatgattcttaataatC	357_1	8375	-18
358	aggctaagtcatgt	3-11-2	AGGctaagtcatgt	358_1	8389	-19
359	ttgatgaggctaaGTC	4-10-2	TTGAtgaggctaaGTC	359_1	8395	-19
360	ccaggattatacttt	3-11-2	CCAggattatacttt	360_1	8439	-20
361	gccaggattatactt	2-10-4	GCcaggattataCTCT	361_1	8440	-23
362	ctgccaggattataact	3-11-2	CTGccaggattataCT	362_1	8442	-21
363	cagaaaacttatactttatG	4-13-2	CAGAAacttatactttatG	363_1	8473	-19
364	aagcagaaaacttatact	4-9-4	AAGCagaaaacttataCT	364_1	8478	-20
365	gaagcagaaaacttatact	3-11-4	GAAGcagaaaacttataCT	365_1	8478	-20
366	tggaaagcagaaaacttatac t	3-15-2	TGGaaagcagaaaacttataCT	366_1	8478	-21
367	tggaaagcagaaaacttatac	3-13-3	TGGaaagcagaaaacttataTAC	367_1	8479	-20
368	aagcagaaaacttatac	2-11-3	AAgcagaaaacttataTAC	368_1	8479	-13
369	tggaaagcagaaaacttata	3-11-4	TGGaaagcagaaaactTATA	369_1	8480	-21
370	aaggatattatggag	4-10-2	AAGGatattatggAG	370_1	8587	-18
371	tgccggaagattcct	2-12-2	TGCCGGAAGATTCT	371_1	8641	-21
372	atggatggggataga	4-10-2	ATGGatggggataga	372_1	8772	-21
373	agatggatggggat	2-12-2	AGatggatggggat	373_1	8774	-18
374	aagatggatggggat	3-11-2	AAGatggatggggat	374_1	8775	-18
375	acaagatggatggga	2-10-4	ACAAGatggatGGGA	375_1	8777	-20
375	acaagatggatggga	2-12-2	ACAAGatggatggGA	375_2	8777	-17
376	agaagggtcagactt	3-9-4	AGAagggtcagaCTTT	376_1	8835	-20
377	gcagaagggtcagact	2-11-3	GCagaagggtcagACT	377_1	8837	-21
377	gcagaagggtcagact	3-11-2	GCAGAagggtcagaCT	377_2	8837	-22
378	tgcagaagggtcagac	4-10-2	TGCAgggtcagAC	378_1	8838	-22
379	agtgcagaagggttcag	2-11-3	AGTgcagaagggttcAG	379_1	8840	-20
379	agtgcagaagggttcag	4-10-2	AGTGcagaagggttcAG	379_2	8840	-21
380	aagtgcagaagggtca	4-10-2	AAGTgcagaagggtCA	380_1	8841	-20
381	taagtgcagaagggtc	2-10-4	TAagtgcagaAGGT	381_1	8842	-19
382	tctaagtgcagaagggt	2-10-4	TCtaagtgcagaAGGT	382_1	8844	-21
383	ctcaggaggttctacttc	3-12-2	CTCaggaggttctactTC	383_1	8948	-20
384	ctcaggaggttctactt	3-10-3	CTCaggaggttctactTT	384_1	8949	-21
385	atggagggtgactcaggag	1-15-2	AtggagggtgactcaggAG	385_1	8957	-20
386	atggagggtgactcaggaa	2-13-2	ATggagggtgactcAGA	386_1	8958	-21
387	atggagggtgactcagg	2-11-3	ATggagggtgactcAGG	387_1	8959	-21
388	tatggagggtgactcagg	2-12-3	TAtggagggtgactcAGG	388_1	8959	-21
389	atatggagggtgactcagg	2-14-2	ATatggagggtgactcAGG	389_1	8959	-21

[0514]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
390	tatggaggtgactcag	4-10-2	TATGaggtgactcAG	390_1	8960	-21
391	atatggaggtgactcag	2-11-4	ATatggaggtgactCAG	391_1	8960	-22
392	catatggaggtgactcag	2-14-2	CAtatggaggtgactcAG	392_1	8960	-20
393	atatggaggtgactca	3-10-3	ATATggagggtgacTCA	393_1	8961	-20
394	catatggaggtgactca	2-12-3	CAtatggaggtgacTCA	394_1	8961	-21
395	catatggaggtgactc	2-10-4	CAtatggaggtgACTC	395_1	8962	-20
396	gcatatggaggtgactc	2-13-2	GCatatggagggtgacTC	396_1	8962	-21
397	tgcataatggaggtgactc	2-14-2	TGcatatggagggtgacTC	397_1	8962	-21
398	ttgcataatggaggtgactc	1-16-2	TtgcatatggagggtgacTC	398_1	8962	-20
399	tttgcataatggaggtgact c	1-17-2	TttgcataatggagggtgacTC	399_1	8962	-21
400	gcataatggaggtgact	2-12-2	GCataatggagggtgact	400_1	8963	-20
401	tgcataatggaggtgact	2-13-2	TGcatatggagggtgact	401_1	8963	-20
402	ttgcataatggaggtgact	3-13-2	TTGcatatggagggtgact	402_1	8963	-22
403	tttgcataatggaggtgact	1-16-2	Tttgcataatggagggtgact	403_1	8963	-20
404	tgcataatggaggtgac	3-11-2	TGCataatggagggtgAC	404_1	8964	-20
405	ttgcataatggagggtgac	3-11-3	TTGcatatggagggtGAC	405_1	8964	-21
406	tttgcataatggagggtgac	4-12-2	TTTGcatatggagggtgAC	406_1	8964	-21
407	tttgcataatggagggtga	4-11-2	TTTGcatatggagggtGA	407_1	8965	-21
408	tttgcataatggagggtg	2-10-4	TTtgcatatggaGGTG	408_1	8966	-21
409	aagtgaagttaaacgc	2-11-4	AAgtgaagttaaaCAGC	409_1	8997	-20
410	tgggaagtgaagtta	2-10-4	TGggaagtgaagTTCA	410_1	9002	-20
411	atgggaagtgaagttc	2-11-3	ATgggaagtgaagTTC	411_1	9003	-17
412	gatgggaagtgaagtt	4-9-3	GATGgaaagtgaagTT	412_1	9004	-21
413	ctgtgatggaaagtgaa	3-11-3	CTGtgatggaaagtGAA	413_1	9007	-20
414	atttgagtgaatccaa	3-10-3	ATTgagtgaatccAAA	414_1	9119	-14
415	aatttgagtgaatccaa	2-10-4	AAttgagtgaatCCAA	415_1	9120	-16
416	gataatttgagtgaatcc	4-10-3	GATAatttgagtgaatTCC	416_1	9122	-20
417	gtgataatttgagtgaa	3-10-3	GTGataatttgagtGAA	417_1	9125	-16
418	aagaaaagggtcaataa	3-10-3	AAGaaagggtcaaaTAA	418_1	9155	-14
419	caagaaaagggtcaata	2-10-4	CAAgaaaagggtgcAATA	419_1	9156	-15
420	acaagaaaagggtcaat	4-10-2	ACAAGaaagggtcaAT	420_1	9157	-16
421	atttaaactcacaaac	2-12-2	ATttaaactcacaaAC	421_1	9171	-10
422	ctgttaggttcagcga	2-10-4	CTgttaggttcagcga	422_1	9235	-24
423	tctgaatgaacatcc	4-9-4	TCTGaatgaacatTCG	423_1	9260	-20
424	ctcattgaagggtctg	2-10-4	CTcattgaagggtCTG	424_1	9281	-20
425	ctaatctcattgaagg	3-11-2	CTAatctcattgaagg	425_1	9286	-17
426	cctaatctcattgaag	2-12-2	CCtaatctcattgaAG	426_1	9287	-16
427	actttgatcttcagc	3-10-3	ACTttgatcttcAGC	427_1	9305	-20
428	actatgcaacactttg	2-12-2	ACtatgcaacactttG	428_1	9315	-15

[0515]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
429	caaatacgcttatcgg	3-10-3	CAAatagcttatCGG	429_1	9335	-17
430	ccaaatagcttacg	2-10-4	CCaaatagcttATCG	430_1	9336	-19
431	tccaaatagcttatac	4-10-2	TCCAaatagcttATC	431_1	9337	-18
432	gatccaaatagctta	4-10-2	GATCcaaatagctTA	432_1	9339	-18
433	atgatccaaatagctt	2-10-4	ATgatccaaataGCCT	433_1	9341	-19
434	tatgatccaaatagct	4-10-2	TATGatccaaatAGCT	434_1	9342	-18
435	taaacaggcgtggaat	4-9-4	TAAACaggcgtggGAAT	435_1	9408	-22
436	acttaaacaggcgtgg	2-10-4	ACTtaaacaggCTGG	436_1	9412	-21
437	acacttaaacaggcgt	2-10-4	ACacttaaacagGGCT	437_1	9414	-22
438	gaacacttaaacagggg	4-8-4	GAACacttaaacAGGG	438_1	9416	-20
439	agagaacacttaaacag	4-9-4	AGAGAacacttaaACAG	439_1	9418	-20
440	ctacagagaacactta	4-8-4	CTACagagaacaCTTA	440_1	9423	-20
441	atgctacagagaacact	3-10-4	ATGctacagagaacACT	441_1	9425	-22
442	ataaatgctacagagaaca	4-11-4	ATAAatgctacagagAAC	442_1	9427	-20
443	agataaatgctacagaga	2-12-4	AGataaatgctacaGAGA	443_1	9430	-20
444	tagagataatgtacata	4-9-4	TAGAgataatgcTACA	444_1	9434	-21
445	tagatagagataaatgtc	4-11-3	TAGAtagagataaatGCT	445_1	9437	-20
446	caatatacttagatagaga	4-10-4	CAATatacttagataGAGA	446_1	9445	-21
447	tacacaatatactagatag	4-11-4	TACacaatatactagATAG	447_1	9448	-21
448	ctacacaatatactatag	3-10-3	CTAcacaatatacTAG	448_1	9452	-16
449	gctacacaatatacta	4-8-4	GCTAcacaatataCTA	449_1	9453	-21
450	atatgctacacaatatac	4-10-4	ATATgctacacaatATAC	450_1	9455	-20
451	tgatatgctacacaat	4-8-4	TGATatgctacaCAT	451_1	9459	-20
452	atgatatgatatgctac	4-9-4	ATGATatgatatgCTAC	452_1	9464	-21
453	gaggagagagacaataaa	4-10-4	GAGGAGAGAGACAataAA	453_1	9495	-20
454	ctaggaggagagagaca	3-11-3	CTAggaggagagAGACA	454_1	9500	-22
455	tattctaggaggagaga	4-10-3	TATTctaggaggAGA	455_1	9504	-21
456	ttatattctaggaggag	4-10-3	TTATtattctaggagGAG	456_1	9507	-21
457	gtttatattcttaggag	3-9-4	GTTtatattctaGGAG	457_1	9510	-20
458	tggagtttatattcttagg	2-12-4	TGgagtttatattcTAGG	458_1	9512	-22
459	cgtaccaccactctgc	2-11-3	CGtaccaccactcTGC	459_1	9590	-25
460	tgaggaaatcatccatc	4-10-4	TGAGGaaatcatTCATC	460_1	9641	-22
461	tttgaggaaatcatccat	4-10-4	TTTGaggaaatcatTCAT	461_1	9643	-20
462	aggctaattctatTTG	4-10-2	AGGCtaatcctattTG	462_1	9657	-22
463	tttaggctaattccat	4-8-4	TTTAggctaattCTAT	463_1	9660	-22
464	tgctccagtgtaacct	3-11-2	TGCtccagtgtaacct	464_1	9755	-27
465	tagtagtactcgatag	2-10-4	TAgttagtactcgATAG	465_1	9813	-18
466	ctaattgttagtactc	3-12-3	CTAattgttagtactCTC	466_1	9818	-20
467	tgctaattgttagt	2-10-4	TGctaattgttagTAGT	467_1	9822	-19
468	agtgctaattgttagta	4-10-2	AGTGctaattgttagTA	468_1	9824	-19

[0516]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
469	gcaagtgtctaattgtta	4-10-2	GCAAGtgtctaatttGA	469_1	9827	-20
470	gaggaaatgaactaattta	4-13-2	GAGGaaatgaactaattTA	470_1	9881	-18
471	caggagggaaatgaacta	4-11-2	CAGGaggaaaatgaacTA	471_1	9886	-19
472	cccttagagtcatattcc	2-11-3	CCcttagagtcatTTCC	472_1	9902	-24
473	atcttacatgtgaagc	3-11-3	ATCttacatgtatgaAGC	473_1	9925	-20
475	agacacactcagatttcag	2-15-2	AGacacactcagatttAG	475_1	9967	-20
474	gacacacactcagatttcag	3-13-2	GAcacacactcagatttAG	474_1	9967	-20
476	aagacacactcagattca g	3-15-2	AAGacacacactcagatttAG	476_1	9967	-21
477	agacacacactcagattca	2-13-3	AGacacacactcagattTCA	477_1	9968	-20
478	aagacacacactcagattca	3-13-3	AAGacacacactcagattTCA	478_1	9968	-21
479	aaagacacacactcagattc a	2-14-4	AAagacacacactcagatTTCA	479_1	9968	-20
480	gaaagacacacactcagatt c	3-14-3	GAAGAGACACACTCAGATTC	480_1	9969	-20
481	aagacacacactcagattc	4-11-3	AAGAcacacactcagatTTC	481_1	9969	-21
482	aaagacacacactcagattc	4-11-4	AAAGAcacacactcagaTTTC	482_1	9969	-20
483	tgaaagagacacacactcagatt t	4-14-2	TGAAGAGACACACTCAGATTT	483_1	9970	-20
484	tgaaagagacacacactcagatt	2-13-4	TGAAAGAGACACACTCA GATT	484_1	9971	-21
485	tgaaagagacacacactcagat	3-12-3	TGAAGAGACACACTCA GAT	485_1	9972	-20
486	attgaaagagacacactca	4-10-3	ATTGAAAGAGACACACTCA	486_1	9975	-19
487	tcattgaaagagacacact	2-11-4	TCattgaaagagacaACT	487_1	9977	-18
488	ttccatcattgaaaga	3-9-4	TTCCatcatgtAAAGA	488_1	9983	-18
489	ataataccacttatcat	4-9-4	ATAAtaccacttaTCAT	489_1	10010	-20
490	ttacttaatttttttggta	2-12-4	TTacttaattttttTGGA	490_1	10055	-20
491	ttagaactagcttttatca	3-12-3	TTAGaactagcttaTCA	491_1	10101	-20
492	gaggtacaaatatagg	3-10-3	GAGgtacaaatatAGG	492_1	10171	-18
493	cttatgtacaaactta	3-10-3	CTTatgtacaaacTTA	493_1	10384	-15
494	tcttatgtacaaacctt	2-11-3	TCttatgtacaaacTT	494_1	10385	-15
495	ttcttatgtacaaact	3-11-2	TTCTtatgtacaaCT	495_1	10386	-15
496	cagtttcttatgtatc	2-11-3	CAgTTtcttatgtatc	496_1	10390	-16
497	gcagtttcttatgtata	3-11-2	GCAGTTtcttatgtatA	497_1	10391	-19
498	tacaatgtctattagtt	4-12-3	TACAatgtctatttGTT	498_1	10457	-21
499	tgtacaaatgtctattag	4-11-3	TGTAcacaaatgtctatTA	499_1	10460	-20
500	agcatcacaatttagta	3-11-2	AGCatcacaatttagTA	500_1	10535	-18
501	ctaatgtatgtgaagc	3-11-2	CTAatgtatgtgaaGC	501_1	10548	-17
502	agctaatgtatgtgaa	3-11-2	AGCtaatgtatgtgAA	502_1	10550	-16
503	atgccttgacatatta	4-10-2	ATGCCTtgacatataTA	503_1	10565	-20
504	ctcaagattattgacac	4-9-4	CTCAAGatatttACAC	504_1	10623	-20
505	acctaagattattgtta	2-10-4	ACCTcaagattaTTGA	505_2	10626	-18

[0517]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
505	acctcaagattattga	3-9-4	ACCTcaagattaTTGA	505_1	10626	-20
506	aacctcaagattattg	4-10-2	AACCTcaagattatTG	506_1	10627	-17
507	cacaacacctcaagattatt	4-13-2	CACAAacacctcaagattaTT	507_1	10628	-20
508	gtacttaatttagacct	3-9-4	GTACTtaatttagACCT	508_1	10667	-21
509	agtacttaatttagacc	4-9-3	AGTActtaatttagACC	509_1	10668	-20
510	gtatgagggtgttaaac	4-10-2	GTATgagggtgttaAC	510_1	10688	-18
511	aggaaacacgcagaagtg	2-11-4	AGgaaacacgcagaAGTG	511_1	10723	-21
512	gcacaacccagaggaa	2-12-2	GCacaacccagaggAA	512_1	10735	-20
513	caagcacaacccagag	3-11-2	CAAGcacaacccagAG	513_1	10738	-20
514	ttcaaggcacaacccag	3-10-3	TTCaaggcacaaccCAG	514_1	10740	-21
515	aattcaaggcacaaccc	2-10-4	AAAttcaaggcacaACCC	515_1	10742	-20
516	taataattcaagcacaacc	4-13-2	TAATAattcaagcacaCC	516_1	10743	-20
517	actaataattcaagcac	4-9-4	ACTAataattcaaGCAC	517_1	10747	-20
518	ataatactaataattcaag c	4-12-4	ATAAtactaataattcAAGC	518_1	10749	-19
519	tagatttgtgaggtaa	2-10-4	TAGatttgtgagGTAA	519_1	11055	-18
520	agccctttaatctccat	4-10-2	AGCCtttaatctccAT	520_1	11091	-24
521	aatgatcttagcccta	4-9-4	AATGatcttagccCTTA	521_1	11100	-22
522	ctaatgatcttaggcc	3-10-3	CTAatgatcttagaGCC	522_1	11103	-22
523	actaatgatcttagage	3-9-4	ACTAatgatctaGAGC	523_1	11104	-21
524	cattAACatgttcttatt	3-11-4	CATtaacatgttctTATT	524_1	11165	-19
525	acaagttacattaaacatgtt c	4-12-4	ACAAGttacattaaacatGTTC	525_1	11170	-22
526	ttacaaggtaacattaaacatg	4-11-4	TTACAggtacattaaCATG	526_1	11173	-20
527	gcttttattcatgtttat	4-9-4	GCTTtttattcatgtTTAT	527_1	11195	-22
528	gcttttattcatgttta	3-11-2	GCTTtttattcatgtTTA	528_1	11196	-18
529	agagcttttattcatgttt	3-13-2	AGAgcttttattcatgtTT	529_1	11197	-20
530	ataagagctttattcatg	4-10-4	ATAAGagctttattCATG	530_1	11200	-21
531	cataagagctttattca	4-9-4	CATAagagcttaTTCA	531_1	11202	-21
532	agcataagagctttat	4-8-4	AGCAtaagagctTTAT	532_1	11205	-22
533	tagattgtttagtgca	3-10-3	TAGattgtttagtGCA	533_1	11228	-20
534	gtagattgtttagtgc	2-10-4	GTagattgtttaGTGC	534_1	11229	-21
535	gacaattcttagtagatt	4-9-4	GACAattcttagtaGATT	535_1	11238	-21
536	ctgacaattcttagtag	3-9-4	CTGacaattctaGTAG	536_1	11241	-20
537	gctgacaattcttagta	4-10-2	GCTGacaattcttagTA	537_1	11242	-21
538	aggattaaagatacgta	2-12-2	AGgattaaagatacgTA	538_1	11262	-15
539	caggattaaagatacg	2-11-3	CAggattaaagataCGT	539_1	11263	-17
540	tcaggattaaagatacg	3-11-2	TCAggattaaagataCG	540_1	11264	-16
541	ttcaggattaaagataac	2-10-4	TTcaggattaaagATAC	541_1	11265	-15
542	aggaagaaagtttgattc	4-10-4	AGGAAGaaagtggATTC	542_1	11308	-21

[0518]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
543	tcaaggagaagaaagt ttga	4-10-4	TCAAggaagaaagt TTGA	543_1	11311	-20
544	ctcaaggagaagaaagt ttg	4-10-4	CTCAAggaagaaagTTG	544_1	11312	-20
545	tgctcaaggagaagaagt	3-10-4	TGctcaaggagaAAAGT	545_1	11315	-21
546	aattatgctcaaggaga	4-11-3	AATTatgctcaaggaaAGA	546_1	11319	-20
547	taggataccacattatga	4-12-2	TAGGataccacattatGA	547_1	11389	-22
548	cataatttattccatcct c	2-15-3	CAtaatttattccatcCTC	548_1	11449	-22
549	tgcataatttattccat	4-10-3	TGCAtaatttattcCAT	549_1	11454	-22
550	actgcataatttattcc	4-10-3	ACTGcataatttatTCC	550_1	11456	-21
551	ctaaactgcataatttatt	4-11-4	CTAAactgcataattTATT	551_1	11458	-20
552	ataactaaactgcata	2-10-4	ATAactaaactgCATA	552_1	11465	-16
553	ttattaataactaaactgc	3-12-4	TTAttaataactaaaCTGC	553_1	11468	-19
554	tagtacattatataact	4-13-2	TAGTAcattatataaaCT	554_1	11475	-18
555	cataactaaggacgtt	4-10-2	CATAactaaggacgTT	555_1	11493	-17
556	tcataactaaggacgt	2-11-3	TCataactaaggaaCGT	556_1	11494	-16
557	cgtcataactaaggac	4-10-2	CGTCataactaaggAC	557_1	11496	-17
558	tcgtcataactaaggaa	2-12-2	TCgtcataactaaggGA	558_1	11497	-16
559	atcgtcataactaagg	2-10-4	ATcgtcataactAAGG	559_1	11498	-17
560	gttagtatcttacatt	2-11-3	GTtagtatcttacATT	560_1	11525	-15
561	ctctattgttagtac	3-10-3	CTCtattgttagtATC	561_1	11532	-17
562	agtatagagttaactgt	3-10-3	AGTatagagttaactTGT	562_1	11567	-19
563	ttccctggtgatacttt	4-10-2	TTCCtggtgatactTT	563_1	11644	-21
564	gttcctggtgatactt	4-10-2	GTTCCtggtgatactTT	564_1	11645	-21
565	tgttcctggtgataact	2-12-2	TGttccctggtgataCT	565_1	11646	-20
566	ataaacatgaatctctcc	2-12-4	ATaaacatgaatctCTCC	566_1	11801	-20
567	ctttataaaacatgaatctc	3-12-4	CTTtataaaacatgaaTCTC	567_1	11804	-19
568	ctgtcttataaaacatg	3-10-4	CTGtcttataaaCATG	568_1	11810	-19
569	ttgttataaaatctgttt	2-12-4	TTgttataaaatctgTCTT	569_1	11820	-18
570	ttaaaatttattcttgata	3-12-4	TTAaatttattcttgGATA	570_1	11849	-19
571	cttaaatttattcttgga	2-12-4	CTtaaatttattctTGGA	571_1	11851	-19
572	cttcttaaaatttattcttg	4-13-2	CTTCTtaaaatttattctTG	572_1	11853	-18
573	tatgtttctcagtaaag	4-9-4	TATGtttctcagtaAAAG	573_1	11877	-19
574	gaatttatcttaaacc	3-10-4	GAAttatcttaaACCA	574_1	11947	-18
575	cccttaaatttctaca	3-11-2	CCCTtaaatttctcaCA	575_1	11980	-20
576	acactgccttgtacc	4-10-2	ACACtgcttgtacc	576_1	11995	-23
577	tgacaacactgcttct	3-10-3	TGAcacaactgctCTT	577_1	12000	-21
578	tacatttattggcctc	4-10-2	TACAttattggcTC	578_1	12081	-19
579	gtacatttattgggct	2-10-4	GTacatttatttgGGCT	579_1	12082	-23
580	ttggiacatttattgg	3-10-3	TTGgtacatttattTGG	580_1	12085	-18
581	catgttggtacatttat	4-10-3	CATGttggtacattTAT	581_1	12088	-21

[0519]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
582	aatcatgttggtacat	4-10-2	AATCatgttggtacAT	582_1	12092	-16
583	aaatcatgttggtaca	2-12-2	AAatcatgttggtacaA	583_1	12093	-14
584	gacaagttggattaa	3-11-2	GACaaagtggattAA	584_1	12132	-14
585	aatgttcagatgcctc	2-10-4	AAtgttcagatgcCTC	585_1	12197	-21
586	gcttaatgttcagatg	2-12-2	GCttaatgttcagatG	586_1	12201	-17
587	cgtacatagtttgatg	4-10-2	CGTAcatagtttgatG	587_1	12267	-20
588	gtgaggaatttaggata	3-11-2	GTGaggaatttaggata	588_1	12753	-17
589	gtacaatatggtttg	3-11-2	GTAacaatatggttTG	589_1	12780	-15
590	gaaatattgttagacta	2-11-3	GAatattgttagacta	590_1	13151	-14
591	ttgaaatattgttagac	3-11-2	TTGaaatattgttagAC	591_1	13153	-12
592	aagtcttagtaattgc	2-10-4	AAgtcttagtaattGC	592_1	13217	-17
593	gctcagtagattataa	4-10-2	GCTcagtagattataA	593_1	13259	-17
594	catacactgttgtaa	3-10-3	CATacactgttgtAA	594_1	13296	-19
595	atggctcaatcatt	3-10-3	ATGgctcaatcATT	595_1	13314	-17
596	caatggctcaatca	4-10-2	CAATggctcaatCA	596_1	13316	-18
597	ttccatttattgtact	4-10-2	TTCCatttattgtact	597_1	13568	-20
598	tttcgttccacaacac	4-10-2	TTTCgttccacaacAC	598_1	13600	-17
599	aggAACCCactaatct	2-11-3	AGGAAACCCactaaTCT	599_1	13702	-20
600	taaatggcaggAACCC	3-11-2	TAAtggcaggAACCC	600_1	13710	-19
601	gtaaatggcaggAACCC	4-10-2	GTAAtggcaggAACCC	601_1	13711	-20
602	ttgttaaatggcaggaa	2-11-3	TTgttaaatggcagGAA	602_1	13713	-16
603	ttatgagtttaggcatt	2-10-4	TTatgagtttaggcATTG	603_1	13835	-19
604	ccaggtaaaactttaa	3-11-2	CCAggttaaaactttAA	604_1	13935	-17
605	cccttagtcagctct	3-10-3	CCCTtagtcagctCCT	605_1	13997	-30
606	acccttagtcagctcc	2-10-4	ACcccttagtcagCTCC	606_1	13998	-27
607	cacccttagtcagctc	2-11-3	CAcccttagtcagCTC	607_1	13999	-24
608	tctttacttaggcctc	3-10-3	TCTttacttaggcTCC	608_1	14091	-24
609	cctatctgtcatcat	2-11-3	CCtatactgtcatcATG	609_1	14178	-20
610	tcctatctgtcatcat	3-11-2	TCCTatctgtcatcAT	610_1	14179	-20
611	gagaagtgtgagaagc	3-11-2	GAGAagtgtgagaAGC	611_1	14808	-19
612	catccitgaagtttag	4-10-2	CATCcttgaagttAG	612_1	14908	-19
613	taataagatggctccc	3-10-3	TAAtaagatggctCCC	613_1	15046	-21
614	caaggcataataagat	3-11-2	CAAaggcataataAGAT	614_1	15053	-14
615	ccaaggcataataaga	2-10-4	CCAggcataatAAGA	615_1	15054	-18
616	tgateccaatttcaccc	2-12-2	TGatccaatttcacCC	616_1	15151	-19
617	atgateccaatttcac	3-10-3	ATGatccaatttcAC	617_1	15152	-19
618	cgccttcatcttaccc	3-11-2	CGCttcatcttacCC	618_1	15260	-26
619	tatgacactgcattt	2-10-4	TAtgacactgcaTCTT	619_1	15317	-19
620	gtatgacactgcattt	3-10-3	GTAtgacactgcaTCT	620_1	15318	-21
621	tgtatgacactgcattt	2-10-4	TGtatgacactgCATC	621_1	15319	-20

[0520]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
622	ttcttctgttaagtc	4-10-2	TTCTtttctgttaagTC	622_1	15363	-19
623	ttctacagaggaaacta	2-10-4	TTctacagaggAACTA	623_1	15467	-17
624	actacagtctacaga	3-10-3	ACTacagtctacAGA	624_1	15474	-19
625	ttcccacaggtaatg	4-10-2	TTCCcacaggtaatG	625_1	15561	-21
626	attatttaataactcat t	4-12-4	ATTAtttaataactCATT	626_1	15594	-20
627	tggggaggaaattatttg	4-10-3	TGGGaggaaattatTTG	627_1	15606	-20
628	tgactcatcttaatg	4-10-2	TGACtcatcttaaaTG	628_1	15621	-17
629	cgtgactcatcttaat	3-11-2	CTGactcatcttaaAT	629_1	15622	-16
630	tttactctgactcata	3-10-3	TTTactctgactcATC	630_1	15628	-17
631	tattggaggaaattatt	3-11-2	TATTggaggaaattAT	631_1	15642	-14
632	gtatggaggaaattat	3-11-2	GTATggaggaaattAT	632_1	15643	-16
633	tgttatactctcaagta t	2-15-3	TGgtatactctcaagTAT	633_1	15655	-22
634	gatcttttgtatact	4-10-2	GATCtttttgtataCT	634_1	15666	-20
635	cagacaactctatacc	2-12-2	CAgacaactctataCC	635_1	15689	-18
636	aacatcagacaactcta	4-9-4	AAACatcagacaacTCTA	636_1	15693	-21
637	taacatcagacaactc	4-10-2	TAACatcagacaactC	637_1	15695	-16
638	tttaacatcagacaactc	4-10-4	TTTAacatcagacaACTC	638_1	15695	-20
639	attnaacatcagacaa	2-12-2	ATtnaacatcagacAA	639_1	15698	-11
640	cctatttaacatcagac	2-11-4	CCtatttaacatcAGAC	640_1	15700	-20
641	tccttatttaacatca	3-10-3	TCCtatttaacaTCA	641_1	15703	-21
642	tcaacgactattggaa	4-9-4	TCAAcgactattgGAAT	642_1	15737	-20
643	cttatattctggatat	4-9-3	CTTAtattctggTAT	643_1	15850	-20
644	atccattataattctgg	4-10-2	ATCCttatattctgGC	644_1	15853	-23
645	gatccttatattctgg	2-10-4	GAtccttatattCTGG	645_1	15854	-21
646	tgatccttatattctg	3-10-3	TGAtccttatattCTG	646_1	15855	-19
647	atggaaaacttgatct	4-8-4	ATTGaaaacttgATCT	647_1	15864	-21
648	actgtcattgaaactt	2-10-4	ACTgtcattgaaACTT	648_1	15870	-16
649	tcttactgtcattgaa	3-11-2	TCTtactgtcattgAA	649_1	15874	-16
650	aggatcttactgtcatt	2-11-4	AGgatcttactgtCATT	650_1	15877	-21
651	gcaaatcaactccatc	3-10-3	GCAaatcaactccATC	651_1	15896	-20
652	gtgcaaatcaactcca	3-10-3	GTGcaaatcaactCCA	652_1	15898	-22
653	caatttttctttgtgc	4-10-3	CAATtattttttTGC	653_1	15910	-21
654	tggcaacaattttttt	3-11-4	TGGcaacaattttTCTT	654_1	15915	-21
655	gctggcaacaatttt	3-9-4	GCTggcaacaatTATT	655_1	15919	-21
656	atccatttctactgcc	4-10-2	ATCCatttctactgCC	656_1	15973	-24
657	taatatctattgattcta	4-11-4	TAATatctattgattCTA	657_1	15988	-20
658	tcaatagtgttagggca	2-12-2	TCaatagtgttagggCA	658_1	16093	-18
659	ttcaatagtgttagggc	3-11-2	TTCaatagtgttagggGC	659_1	16094	-19

[0521]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
660	aggtaattaaattcaatag	4-11-4	AGGTtaattaaattcaATAG	660_1	16102	-21
661	cattgtaatccctag	3-10-3	CATTgtaatcccTAG	661_2	16163	-20
661	cattgtaatccctag	3-9-4	CATTgtaatccCTAG	661_1	16163	-22
662	acatttgtaatcccta	3-10-3	ACAtttgtaatccCTA	662_1	16164	-20
663	aacatttgtaatccct	2-10-4	AAcatttgtaatCCCT	663_2	16165	-21
663	aacatttgtaatccct	3-9-4	AACatttgtaatCCCT	663_1	16165	-22
664	taaatttcaaggctcg	2-11-3	TAaatttcaaggTTG	664_1	16184	-14
665	gtttaaatttcaagttct	3-11-4	GTTtaatttcaagTTCT	665_1	16185	-19
666	ccaagttaaatttcaag	4-10-4	CCAAGttaaatttCAAG	666_1	16189	-21
667	acccaagttaaatttc	4-9-4	ACCCaagttaaaTTTC	667_1	16192	-22
668	catacagtgacccaagttt	2-14-3	CAtacagtgacccaagTTT	668_1	16199	-23
669	acatccccatacagtga	2-11-3	ACatccccatacagTGA	669_1	16208	-21
670	agcacagctctacatc	2-10-4	AGcacagcttaCATC	670_1	16219	-22
671	atatagcacagctcta	3-9-4	ATATagcacagcTCTA	671_1	16223	-21
672	tccatatagcacagct	3-11-2	TCCatatacgacagCT	672_1	16226	-22
673	attccatatagcaca	3-9-4	ATTccatatagCACA	673_1	16229	-20
674	tttatttccatatagca	4-9-4	TTTAttccatatAGCA	674_1	16231	-22
675	tttatttccatatagc	3-10-3	TTTAttccatatAGC	675_1	16232	-18
676	aaggagaggagattatg	4-9-4	AAGGagaggagatTATG	676_1	16409	-21
677	agttcttgtttagct	3-11-2	AGTtcttgtttagCT	677_1	16456	-21
678	gagttcttgtttagc	2-12-2	GAgttcttgtttagC	678_1	16457	-20
679	attaattatccatccac	3-10-4	ATTaattatccatCCAC	679_1	16590	-21
680	atcaattaattatccatc	3-11-4	ATCaattaattatcCATC	680_1	16593	-19
681	agaatcaattaattatcc	3-12-3	AGAatcaattaattatCC	681_1	16596	-18
682	tgagataccgtgcatg	2-12-2	TGagataccgtgcATG	682_1	16656	-18
683	aatgagataccgtgca	2-10-4	AAAtgagataccgTGCA	683_1	16658	-21
684	ctgtggtttaggctaat	3-11-2	CTGtggttaggctAT	684_1	16834	-19
685	aagagaaggctgtgg t	1-17-2	AagagaaggctgtggTT	685_1	16842	-21
686	gatgggttaagagtaa	4-9-3	GATGggtaagagTAA	686_1	16854	-19
687	agcagaagggttaaga	3-11-2	AGCagatgggttaaGA	687_1	16858	-20
688	tgttaaacatttgttagc	2-10-4	TGtaaacatttgTAGC	688_1	16886	-19
689	cctgcttataaatgta	3-11-2	CCTgcttataatgTA	689_1	16898	-19
690	tgcctgcttataaat	4-10-2	TGCCtgcttataaAT	690_1	16901	-23
691	tcttcttagtcaata	2-12-2	TCTtcttagtcaATA	691_1	16935	-15
692	tggttctactacat	2-10-4	TGgttctactACAT	692_1	16980	-18
693	agtttggttctacta	2-12-3	AGtttggttctactA	693_1	16983	-19
694	gaatgaaacttgccctg	3-10-3	GAATgaaacttgceCTG	694_1	17047	-18
695	attatccttacatgat	3-10-3	ATTatccttacatGAT	695_1	17173	-17
696	gtacccaattatcctt	2-11-3	GTacccaattatcCTT	696_1	17180	-21

[0522]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
697	tgtacccaattatcct	3-10-3	TGTacccaattatCCT	697_1	17181	-24
698	ttgtacccaattatcc	2-11-3	TTgtacccaattatCC	698_1	17182	-20
699	tttgtacccaattatcc	3-11-2	TTTgtacccaattatTC	699_1	17183	-17
700	agcagcagggttatatt	4-10-2	AGCAgcagggttatATT	700_1	17197	-22
701	tggaaagtggctggg	3-10-3	TGGaaagtggctGGG	701_1	17292	-25
702	cggagagtgataata	3-11-2	CTGgagagtgataATA	702_1	17322	-17
703	aatgctggattacgtc	4-10-2	AATGctggattacGTC	703_1	17354	-19
704	caatgctggattacgt	2-11-3	CAatgctggattacGT	704_1	17355	-19
705	ttgttcagaagttatcc	2-10-4	TTgttcagaagtATCC	705_1	17625	-19
706	gatgattgttggag	2-10-4	GAtgattgttGGAG	706_1	17646	-21
707	gaaatcatcacaacc	3-10-3	GAAatcatcacaACC	707_1	17860	-17
708	ttgttaacatctactac	3-10-3	TTGtaacatctactAC	708_1	17891	-16
709	cattaaggcagcaagt	3-11-2	CATAaggcagcaagTT	709_1	17923	-17
710	ttactatagatgtgagca	3-11-2	TTActatagatgtgAGC	710_1	17942	-18
711	tttactatagatgtgagc	2-11-3	TTtactatagatgtgAGC	711_1	17943	-18
712	gaccaaggcaccttaca	3-11-2	GACcaaggcaccttACA	712_1	17971	-22
713	agaccaaggcaccttac	3-10-3	AGAccaaggcacctTAC	713_1	17972	-22
714	atgggttaataaaagg	2-10-4	ATgggttaataAAAGG	714_1	18052	-15
715	tcaaccagagtattaa	2-12-2	TCaaccagagtattAA	715_1	18067	-13
716	gtcaaccagagtattaa	3-11-2	GTCaaccagagtattTA	716_1	18068	-18
717	attgttaaagctgatata	2-11-3	ATtgtaaagctgatAT	717_1	18135	-14
718	cacataattgttaaage	2-10-4	CAcataattgtAAAGC	718_1	18141	-16
719	gaggctgtcttattac	2-11-3	GAggtctgtcttTAC	719_1	18274	-19
720	tgttagattcaatgcct	2-11-3	TGtagattcaatgCCT	720_1	18404	-20
721	cctcattatactatga	2-11-3	CCTcattatactaTGA	721_1	18456	-19
722	cctttagctatgacac	2-12-2	CCttatgctatgacAC	722_1	18509	-18
723	tccttatgctatgaca	4-10-2	TCCTtatgctatgACA	723_1	18510	-22
724	aagatgttaagtata	3-10-3	AAGatgttaagtATA	724_1	18598	-13
725	cgtattatagatgt	2-10-4	CTgattatagatGT	725_1	18607	-17
726	tggaaaggatgtgaatt	2-12-2	TGgaaaggatgtgaATT	726_1	18808	-13
727	acttgaatggcttggaa	2-12-2	ACTtgaatggcttGGA	727_1	18880	-18
728	aacttgaatggcttgg	3-10-3	AACTtgaatggctTGG	728_1	18881	-19
729	caatgtttactattt	4-10-2	CAATgtttactattT	729_1	19004	-16
730	acaatgtttactattt	3-10-3	ACAatgtttactATT	730_1	19005	-15
731	catctgttatataaga	4-10-2	CATCtgctatataAGA	731_1	19063	-18
732	ccttagagcaaataactt	4-10-2	CCTAAGAGCAAATACTT	732_1	19223	-20
733	cagagttataataaag	3-10-3	CAGAGttataataAAG	733_1	19327	-13
734	gttcaaggcacaacgaa	4-10-2	GTTCAGGcacaacgAA	734_1	19493	-18
735	agggttcaaggcacaac	2-11-3	AGggttcaaggcacaAC	735_1	19496	-18
736	tgttggagacactgtt	2-12-2	TGtttggagacactgTT	736_1	19677	-17

[0523]

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번 호 1 상의 개시	dG
737	aaggaggaggtaggac	3-11-2	AAAGgaggaggtaggAC	737_1	19821	-18
738	ctatgccatttacgt	4-10-2	CTATGCCATTACGAT	738_1	19884	-21
739	tcaaatgcagaattag	2-12-2	TCaaatgcagaattAG	739_1	19913	-12
740	agtgacaatcaaatgc	2-10-4	AGtgacaatcaaATGC	740_1	19921	-18
741	aagtgacaatcaaatg	2-11-3	AAgtgacaatcaaATG	741_1	19922	-12
742	gtgttaccaagtaacaa	3-11-2	GTGtaccaagtaacAA	742_1	19978	-16
743	tggatgttaaaactga	3-10-3	TGGatgttaaaACTGA	743_1	20037	-20

[0524]

모티프 서열은 올리고뉴클레오티드에 존재하는 핵염기의 인접한 서열을 나타낸다.

[0525]

디자인은 캡퍼 디자인 F-G-F'를 나타내고, 이때 각각의 수는, 임의적으로 표적 핵산에 상보적인 인접한 서열의 필수적인 부분이 아닌 DNA 및 LNA의 추가 반복 영역을 선행하거나 후행하는, 연속적인 변형된 뉴클레오시드, 예

컨대 2' 변형된 뉴클레오시드의 수(첫 번째 수 = 5' 플랭크), 이어서 DNA 뉴클레오시드의 수(두 번째 수 = 캡 영역), 이어서 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2' 변형된 뉴클레오시드의 수(세 번째 수 = 3' 플랭크).

[0527] 올리고뉴클레오티드 화합물은 모티프 서열의 특정 디자인을 나타낸다. 대문자는 베타-D-옥시 LNA 뉴클레오시드를 나타내고, 소문자는 DNA 뉴클레오시드를 나타내고, 모든 LNA C는 5-메틸 사이토신이고, 모든 뉴클레오시드간 연결기는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기이다.

[표 6]

[0529] 마우스 PD-L1 전사체(서열번호 4)를 표적으로 하는 올리고뉴클레오티드, 이의 디자인, 및 모티프 서열을 기준으로 디자인된 특정 올리고뉴클레오티드 화합물(화합물 번호로 표시됨).

서열 번호	모티프 서열	디자인	올리고뉴클레오티드 화합물	화합 물 번호	서열번호 4 상의 개시	dG
744	agtttacatttctgc	3-10-3	AGTttacatttcTGC	744_1	4189	-20
745	tatgtgaaggaggagag	3-10-3	TATgtgaaggaggagaGAG	745_1	7797	-19
746	cacctttaaaacccca	3-10-3	CACctttaaaaccCCA	746_1	9221	-23
747	tcctttataatcacac	3-10-3	TCCtttataatcaCAC	747_1	10386	-19
748	acggtatttcacagg	3-10-3	ACGgtatttcacAGG	748_1	12389	-21
749	gacactacaatgagga	3-10-3	GACactacaatgaGGA	749_1	15088	-20
750	tggtttttaggactgt	3-10-3	TGGtttttaggacTGT	750_1	16410	-21
751	cgacaaaatctatcct	3-10-3	CGAcaaattctatCCT	751_1	18688	-20
752	tgatataacaatgctac	3-10-3	TGAtataacaatgcTAC	752_1	18735	-16
753	tcgttggttaattta	3-10-3	TCGttggtaaatTTA	753_1	19495	-17
754	tgcttataaatggtg	3-10-3	TGCtttataaatgGTG	754_1	19880	-19

[0530] 모티프 서열은 올리고뉴클레오티드에 존재하는 핵염기의 인접한 서열을 나타낸다.

[0531] 디자인은 캡머 디자인 F-G-F'를 지칭하고, 이때 각각의 수는, 임의적으로 표적 핵산에 상보적인 인접한 서열의 필수적인 부분이 아닌 DNA 및 RNA의 추가 반복 영역을 선형하거나 후행하는 연속적인 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2' 변형된 뉴클레오시드의 수(첫 번째 수 = 5' 플랭크), 이어서 DNA 뉴클레오시드의 수(두 번째 수= 캡 영역), 이어서 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 2' 변형된 뉴클레오시드의 수(세 번째 수=3' 플랭크)를 나타낸다.

[0532] 올리고뉴클레오티드 화합물은 모티프 서열의 특정 디자인을 나타낸다. 대문자는 베타-D-옥시 LNA 뉴클레오시드를 나타내고, 소문자는 DNA 뉴클레오시드를 나타내고, 모든 LNA C는 5-메틸 사이토신이고, 모든 뉴클레오시드간 연결기는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기를 나타낸다.

[0533] [표 7]

[0535]

5' ca 생체절단성 연결기를 갖는 올리고뉴클레오티드 모티프 서열 및 안티센스 화합물

서열번호	모티프 서열	ca 연결기를 갖는 올리고뉴클레오티드 화합물	화합물 번호
755	caagtttacatttctgc	c _o a _o AGTttacatttcTGC	755_1
756	catatgtgaagaggagag	c _o a _o TATgtgaagaggaGAG	756_1
757	cacctttaaaaccca	c _o a _o CACctttaaaaccCCA	757_1
758	catcctttataatcacac	c _o a _o TCCtttataatcaCAC	758_1
759	caacggtatttcacagg	c _o a _o ACGgtatttcacAGG	759_1
760	cagacactacaatgagga	c _o a _o GACactacaatgaGGA	760_1
761	catggttttaggactgt	c _o a _o TGGttttaggacTGT	761_1
762	cacgacaaattctatct	c _o a _o CGAcaaattctatCCT	762_1
763	catgatatacaatgctac	c _o a _o TGAtatacaatgcTAC	763_1
764	catcgttggtaattttta	c _o a _o TCGttggtaatTTA	764_1
765	catgcttataaatggtg	c _o a _o TGCtttataatggGTG	765_1
766	caacaataatggttactct	c _o a _o ACAAataatggtaCTCT	766_1
767	cacagattgtatggtagtt	c _o a _o CAGAttgtatggtagTT	767_1
768	cacctttaacatcagac	c _o a _o CCttttaacatcAGAC	768_1
769	cactaattttagtagtactc	c _o a _o CTAattttagtagtactCTC	769_1
770	caataaacatgaatctctcc	c _o a _o ATAaacatgaatctCTCC	770_1

[0536]

[0537]

대문자는 베타-D-옥시 LNA 뉴클레오시드를 나타내고, 소문자는 DNA 뉴클레오시드를 나타내고, 모든 LNA C는 5-메틸 사이토신이고, 아래첨자 o는 포스포다이에스터 뉴클레오시드간 연결기를 나타내고, 달리 지시되지 않는 한, 다른 뉴클레오시드간 연결기는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기이다.

[0538]

[표 8]

[0539]

GalNAc 접합된 안티센스 올리고뉴클레오티드 화합물.

안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체	화합물 번호
GN2-C6 _o c _o a _o AGTttacatttcTGC	755_2
GN2-C6 _o c _o a _o TATgtgaagaggagaGAG	756_2
GN2-C6 _o c _o a _o CACctttaaaaccCCA	757_2
GN2-C6 _o c _o a _o TCCttataatcaCAC	758_2
GN2-C6 _o c _o a _o ACGgtatttcacAGG	759_2
GN2-C6 _o c _o a _o GACactacaatgaGGA	760_2
GN2-C6 _o c _o a _o TGGtttttaggacTGT	761_2
GN2-C6 _o c _o a _o CGAcaaattctatCCT	762_2
GN2-C6 _o c _o a _o TGAtatacatgcTAC	763_2
GN2-C6 _o c _o a _o TCGttgggtaaatTTA	764_2
GN2-C6 _o c _o a _o TGCttataaatgGTG	765_2
GN2-C6 _o c _o a _o ACAAataatggtaCTCT	766_2
GN2-C6 _o c _o a _o CAGAttgtatggtagTT	767_2
GN2-C6 _o c _o a _o CCtatttaacatcAGAC	768_2
GN2-C6 _o c _o a _o CTAattgttagtagtaCTC	769_2
GN2-C6 _o c _o a _o ATaaacatgaatctCTCC	770_2

[0540]

GN2는 도 3에 제시된 3-가 GalNAc 클러스터를 나타내고, C6은 6개의 탄소를 갖는 아미노 알킬 기를 나타내고, 대문자는 베타-D-옥시 LNA 뉴클레오시드를 나타내고, 소문자는 DNA 뉴클레오시드를 나타내고, 모든 LNA C는 5-메틸 사이토신이고, 아래첨자 o는 포스포다이에스터 뉴클레오시드 연결기를 나타내고, 달리 지시되지 않는 한, 뉴클레오시드간 연결기는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결기이다. 일부 분자를 나타내는 화학 도면은 도 4 내지 8에 제시된다.

[0542]

AAV/HBV 마우스 모델

[0543]

파스퇴르 모델:

[0544]

HLA-A2.1-/HLA-DR1-유전자이식 H-2 클래스 I-/클래스 II-녹아웃(본원에 hHLA-A2/DR1로 언급됨) 마우스를 생산하고, 인스티튜트 파스퇴르(Institut Pasteur)에서 사용하였다. 이러한 마우스는 마우스 MHC 반응에 의한 어떠한 간접 없이 인간 면역 기능 연구를 위한 생체내 실험 모델을 나타낸다(문헌[Pajot et al 2004 Eur J Immunol. 34(11):3060-9]).

[0545]

아데노-연관된 바이러스(AAV) 벡터, 복제 경쟁적인 HBV DNA 계놈을 갖는 AAV 혈청형 2/8을 본 연구에 사용하였다. AAV-HBV 벡터(배치 GVPN #6163)를 멸균 포스페이트-완충된 염수(PBS)에서 희석하여 5×10^{11} vg/mL의 역가에 도달하였다. 100 μ L의 이러한 희석 용액(투여량/마우스: 5×10^{10} vg)을 마우스의 꼬리 정맥에 정맥내(i.v.) 주사하였다. HBV DNA를 함유하는 완전한 바이러스성 입자를 HBV-담체 마우스의 혈액에서 검출하였다. HBcAg는 혈액 내의 HBV 순환 단백질 HBeAg 및 HBsAg와 함께 간에서 1년 이하 동안 검출되었다. 모든 AAV2/8-HBV-형질도입된 마우스에서, HBsAg, HBeAg 및 HBV DNA는 1년 이상 동안 혈청 내에서 지속되었다(문헌[Dion et al 2013 J Virol. 87:5554-5563]).

[0546]

상하이 모델:

[0547]

이러한 모델에서, IHBV 계놈(AAV/HBV)을 갖는 재조합 아데노-연관된 바이러스(AAV)에 감염된 마우스는 30주 초과 동안 안정한 바이러스혈증 및 항원혈증을 유지한다(문헌[Dan Yang, et al. 2014 Cellular & Molecular Immunology 11, 71-78]).

- [0548] 수컷 C57BL/6 마우스(4 내지 6주령)(특정 병원균 부재)를 SLAC(Shanghai Laboratory Animal Center of Chinese Academy of Sciences; 중국 과학원의 상하이 실험 동물 센터)로부터 구입하였고, 동물 관리 시설에서 개별적으로 환기되는 우리에서 사육하였다. 우시(WuXi) IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee; 협회 동물 관리 및 사용 위원회, 우시 IACUC 프로토콜 번호 R20131126-마우스)에 의해 지시된 바와 같은 동물의 관리 및 사용을 위한 지침을 따랐다. 3일 동안 마우스가 새로운 환경에 익숙하게 하고, 실험 디자인에 따라 분류하였다.
- [0549] 재조합 AAV-HBV를 PBS(주사 당 200 μ L)에서 희석하였다. 이러한 재조합 바이러스는 1.3 카피의 HBV 계놈(유전자형 D, 혈청형 ayw)을 갖는다.
- [0550] 0일 째에, 모든 마우스에 200 μ L AAV-HBV를 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. AAV 주사 후 6, 13 및 20일 째에, 모든 마우스를 혈청 수집을 위해 하악하 채혈하였다(0.1 mL 혈액/마우스). 주사 후 22일 째에, 안정한 바이러스혈증을 갖는 마우스가 올리고뉴클레오티드 치료를 위해 준비되었다. 올리고뉴클레오티드는 비접합되거나 GaINAc 접합될 수 있다.
- [0551] **DNA 백신**
- [0552] 플라스미드 DNA는 내독소-부재였고, 플라스미드-팩토리(Plasmid-Factory, 독일)에 의해 제조되었다. pCMV-S2.S ayw는 HBsAg(유전자형 D)의 preS2 및 S 도메인을 코딩하고, 이의 발현은 사이토메갈로바이러스 전초기 유전자 프로모터에 의해 조절된다(문헌[Michel et al 1995 Proc Natl Acad Sci U S A 92:5307-5311]). pCMV-HBc는 간염 코어(HBc) Ag를 갖는 HBV 캡시드를 코딩한다(문헌[Dion et al 2013 J Virol 87:5554-5563]).
- [0553] DNA 백신에 의한 치료를 본원에 기술된 바와 같이 수행하였다. 백신접종 5일 전에, 심장독(CaTx, 라토산(Latoxan) refL81-02, 50 μ L/ 근육)을 마우스의 근육 내에 주사하였다. CaTx는 근육 섬유를 감극시켜 세포 퇴화를 유도하고, 주사 5일 후, 신규한 근육 섬유가 나타나고 형질감염에 대한 양호한 효능을 위해 DNA 백신을 수용할 것이다. 각각 1 mg/mL의 pCMV-S2.S ayw 및 pCMV코어를 동량으로 혼합하고, 각각의 마우스는 마취(100 μ L의 12.5 mg/mL 케타민, 1.25 mg/mL 자일라진) 하에 문헌[Michel et al 1995 Proc Natl Acad Sci U S A 92:5307-5311]에 종래 기술된 바와 같이, 심장독-처리된 전경골근으로의 양측 근육내 주사에 의해 총 100 μ g을 수용하였다.
- [0554] **항-PD-L1 항체**
- [0555] 이것은 제넨테크(Genentech)에서 내부 생산된 마우스 항-마우스 PD-L1 IgG1 항체 클론 6E11이다. 이것은 아테졸리주맙을 크로스 블로킹(cross blocking)하고 로슈(Roche)에서 내부 생산된 아테졸리주맙의 유사한 시험관내 블로킹 활성을 갖는 대용 항체이다. 항체는 12.5 μ g/g의 투여량으로 복강내(i.p.) 주사에 의해 투여된다.
- [0556] **올리고뉴클레오티드 합성**
- [0557] 올리고뉴클레오티드 합성은 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있다. 적용될 수 있는 프로토콜이 후술된다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 사용된 장치, 지지체 및 농도의 면에서 방법을 약간 바꿈으로써 생산될 수 있다.
- [0558] 올리고뉴클레오티드는 올리고메이커(Oligomaker) 48에 대한 포스포라미다이트 접근법을 1 μ mol 스케일로 사용하여 우리던 유니버셜 지지체 상에서 합성된다. 합성의 종료시, 올리고뉴클레오티드는 60°C에서 5 내지 16시간 동안 수성 암모니아를 사용하여 고체 지지체로부터 절단된다. 올리고뉴클레오티드는 역상 HPLC(RP-HPLC) 또는 고체 상 추출에 의해 정제되고, UPLC에 의해 특징규명되고, 분자 질량은 또한 ESI-MS에 의해 확인된다.
- [0559] 올리고뉴클레오티드의 신장:
- [0560] β -시아노에틸-포스포라미다이트(DNA-A(Bz), DNA-G(ibu), DNA-C(Bz), DNA-T, LNA-5-메틸-C(Bz), LNA-A(Bz), LNA-G(dmf) 또는 LNA-T)의 커플링은 활성화제로서 아세토니트릴 중 DCI(4,5-다이시아노이미다졸)(0.25 M) 및 아세토니트릴 중 5'-O-DMT-보호된 아미다이트(0.1 M)의 용액을 사용하여 수행된다. 최종 사이클을 위하여, 목적 변형을 갖는 포스포라미다이트, 예컨대 접합체 기를 부착하기 위한 C₆ 연결기 또는 접합체 기 자체가 사용될 수 있다. 포스포르티오에이트 연결기의 도입을 위한 티올화가 잔탄 하이드라이드(아세토니트릴/퍼리딘 9:1 중 0.01 M)를 사용함으로써 수행된다. 포스포르다이에스터 연결기는 THF/퍼리딘/물 7:2:1 중 0.02 M 요오드를 사용하여 도입될 수 있다. 나머지 시약은 올리고뉴클레오티드 합성에 전형적으로 사용되는 것들이다.
- [0561] 고체 상 합성 후 접합을 위하여, 시판 중인 C₆ 아미노 연결기 포스포라미다이트가 고체 상 합성의 마지막 사이클에 사용될 수 있고, 탈보호 및 고체 지지체로부터의 절단 후, 아미노연결되고 탈보호된 올리고뉴클레오티드가

단리된다. 접합체는 표준 합성 방법을 사용하는 작용기의 활성화에 의해 도입된다.

[0562] 다른게는, 접합체 모이어티는, 국제 특허출원 제PCT/EP2015/073331호 또는 유럽 특허출원 제15194811.4호에 기술된 GaINAc- 또는 GaINAc-클러스터 포스포라미다이트를 사용함으로써, 고체 지지체 상에 고정하면서 올리고뉴클레오티드에 참가될 수 있다.

[0563] RP-HPLC에 의한 정제:

[0564] 조절 화합물을 폐노메넥스 주피터(Phenomenex Jupiter) C18 10 μ 150 x 10 mm 컬럼 상에서 제조용 RP-HPLC에 의해 정제한다. 0.1 M 암모늄 아세테이트 pH 8 및 아세토니트릴을 완충액으로서 5 mL/분의 유량으로 사용한다. 수집된 분획을 동결건조하여 정제된 화합물을 전형적으로 백색 고체로서 수득한다.

[0565] 약어:

[0566] DCI: 4,5-다이시아노이미다졸

[0567] DCM: 디이클로로메탄

[0568] DMF: 다이메틸포름아미드

[0569] DMT: 4,4'-다이메톡시트라이틸

[0570] THF: 테트라하이드로퓨란

[0571] Bz: 벤조일

[0572] Ibu: 이소부티릴

[0573] RP-HPLC: 역상 고성능 액체 크로마토그래피

T_m 검정

[0575] 올리고뉴클레오티드 및 RNA 표적(포스페이트 연결된, PO) 듀플렉스를 500 mL RNase-부재 물 중에서 3 mM까지 희석하고, 500 mL 2x T_m-완충액(200 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 20 mM Na 포스페이트, pH 7.0)과 혼합한다. 용액을 3분 동안 95°C까지 가열하고, 이어서 30분 동안 실온에서 어닐링(annealing)하였다. 듀플렉스 용융온도(T_m)를, 펠티어(Peltier) 온도 프로그래머 PTP6이 장착된 람다(Lambda) 40 UV/VIS 분광광도계 상에서 PE 템프랩(TempLab) 소프트웨어(펄킨 엘머(Perkin Elmer))를 사용하여 측정하였다. 온도는 20°C에서 95°C까지 상승하고, 이어서 25°C까지 하락한다(260 nm에서 흡광도를 기록한다). 용융 및 어닐링 둘 다의 제1 미분계수 및 국소 최대치를 사용하여 듀플렉스 T_m을 평가하였다.

조직 특이적 시험관내 연결기 절단 검정

[0577] 시험될 생체절단성 연결기(예컨대, DNA 포스포다이에스터 연결기(PO 연결기))를 갖는 FAM-표지된 올리고뉴클레오티드에 관련 조직(예컨대, 간 또는 신장) 및 혈청의 균질 혼탁액을 사용하는 시험관내 절단을 수행하였다.

[0578] 조직 및 혈청 샘플을 적합한 동물(예컨대, 마우스, 원숭이, 돼지 또는 래트)로부터 수집하고, 균질화 완충액(0.5% 이게팔(Igepal) CA-630, 25 mM 트리스(Tris) pH 8.0, 100 mM NaCl, pH 8.0(1 N NaOH로 조정됨) 중에서 균질화시킨다. 조직 균질 혼탁액 및 혈청 올리고뉴클레오티드로 하여 200 μ g/g 조직의 농도까지 스파이킹(spiking)한다. 샘플을 37°C에서 24시간 동안 항온처리하고, 이어서 샘플을 폐놀-클로로폼으로 추출한다. 다이오넥스(Dionex) DNAPAC p-100 컬럼 및 10 mM로부터 1 M까지의 나트륨 피클로레이트(pH 7.5) 구배를 사용하는 다이오넥스 얼티메이트(Ultimate) 3000 상에서 AIE HPLC 분석을 상기 용액에 수행하였다. 615 nm에서의 형광 검출기 및 260 nm에서의 uv 검출기를 둘 다 사용하여 절단되거나 비-절단된 올리고뉴클레오티드의 함량을 표준에 대해 측정하였다.

S1 뉴클레아제 절단 검정

[0580] S1 뉴클레아제 민감성 연결기(예컨대, DNA 포스포다이에스터 연결기(PO 연결기))를 갖는 FAM-표지된 올리고뉴클레오티드에 S1 뉴클레아제 추출물 또는 혈청 중에서 시험관내 절단을 수행하였다.

[0581] 100 μ M의 올리고뉴클레오티드에 뉴클레아제 완충액 중 S1 뉴클레아제(100 μ L 당 60 U)를 사용하여 20 및 120 분 동안 시험관내 절단을 수행하였다. EDTA를 완충액 용액에 참가함으로써, 효소적 활성화를 중단시킨다. 다

이오넥스 얼티메이트 3000 상에서 다이오넥스 DNAPAC p-100 컬럼 및 10 mM로부터 1 M까지의 나트륨 퍼클로레이트(pH 7.5)의 구배를 사용하여 상기 용액에 AIE HPLC 분석을 수행하였다. 615 nm에서의 형광 검출기 및 260 nm에서의 UV 검출기를 둘 다 사용하여 절단되거나 비-절단된 올리고뉴클레오티드의 함량을 표준에 대해 측정하였다.

[0582] 간 단핵 세포의 제조

AAV/HBV 마우스로부터 간 세포를 문헌[Tupin et al 2006 Methods Enzymol 417:185-201]에 기술된 방법에 따라 (작은 변형을 가짐) 후술된 바와 같이 준비하였다. 마우스 안락사 후, G25 바늘을 갖는 주사기를 사용하여 간 문맥을 통해 10 mL의 멸균 PBS를 간에 관류하였다. 기관이 잃어질 때, 기관을 햄크 균형 염 용액(HBSS)(깁코(GIBCO: 등록상표) HBSS, 24020) + 5% 보체제거된 우태 혈청(FCS)에서 수화하였다. 수화된 간을 100 μm 세포-여과기(cell-strainer)(비디 팔콘(BD Falcon), 352360)에 천천히 통과시키고, 세포를 30 mL의 HBSS + 5% FCS에 혼탁하였다. 세포 혼탁액을 50 g로 5분 동안 원심분리하였다. 이어서, 상청액을 289 g로 4°C에서 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 상청액을 폐기하고, 펠렛을 실온에서 15 mL의 35% 등장성 퍼콜(퍼콜) 용액(RPMI 1640(깁코, 31870)으로 희석된 지이 헬스케어(GE Healthcare) 퍼콜 #17-0891-01)에 재현탁하고, 15 mL 튜브에 옮겼다. 세포를 1,360 g로 실온에서 25분 동안 더욱 원심분리하였다. 상청액을 흡기기에 의해 폐기하고, 단핵 세포를 함유하는 펠렛을 HBSS + 5% FCS로 2회 세척하였다.

[0584] 세포를 완전 매질(10% FCS(하이클론(Hyclon), # SH30066, 로트 APG21570), 100 U/mL 폐니실린 + 100 μg/mL 스트렙토마이신 + 0.3 mg/mL L-글루타민(깁코, 10378), 1X 비-필수 아미노산(깁코, 11140), 10 mM 헤페스(Hepes)(깁코, 15630), 1 mM 나트륨 피루베이트(깁코, 11360) 및 50 μM β-мер캅토에탄올(LKB, 1830)이 보충된 α-최소 필수 매질(깁코, 22571))에서 배양하였다.

[0585] 세포의 표면 표지

[0586] 세포를 U-저부 96-웰 플레이트에 시딩하고, PBS FACS(1% 소 혈청 알부민 및 0.01% 나트륨 아자이드를 함유하는 PBS)로 세척하였다. 래트 항-마우스 CD16/CD32 항체 및 생존력 마커 LD 픽서블 옐로우(fixable yellow), 씨모피셔, L34959를 함유하는 5 μL의 PBS FACS와 함께 세포를 4°C에서 어둠 하에 10분 동안 항온처리하였다. 이어서, 세포를 어둠에서 4°C에서 20분 동안 NK P46 BV421에 대한 단클론성 항체(Mab)(래트 Mab 항-마우스 NK P46, 바이오레전드(Biolegend), 137612) 및 F4/80(래트 Mab 항-마우스 F4/80 FITC, 비디 바이오레전드, 123108)을 함유하는 25 μL의 PBS FACS로 염색하고, 2개의 추가적인 표면 마커 PD1(래트 Mab 항-마우스 PD1 PE, 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences), 551892) 및 PD-L1(래트 Mab 항-마우스 PD-L1 BV711, 바이오레전드, 124319)을 또한 첨가하였다.

[0587] 세포내 사이토킨 염색(ICS) 검정

[0588] ICS 검정을 비장세포 및 간 단핵 세포 둘 다 상에서 수행하였다. 세포를 U-저부 96-웰 플레이트에 시팅하였다. 세포를 갖는 플레이트를 음성 대조군으로 완전한 매질 단독에서, 또는 2 μg/mL의 농도로 표 9에 기술된 웹티드를 갖는 매질에서 37°C에서 밤새 항온처리하였다. 2 μg/mL의 브레펠딘(Brefeldin) A(시그마(Sigma), B6542)를 항온처리 1시간 후에 첨가하였다.

[0589] 밤새 배양 후, 세포를 PBS FACS로 세척하고, 래트 항-마우스 CD16/CD32 항체 및 생존력 마커 LD 픽서블 옐로우, 씨모피셔, L34959를 함유하는 5 μL의 PBS FACS와 함께 4°C에서 어둠에서 10분 동안 항온처리하였다. 이어서, Mab를 함유하는 25 μL의 PBS FACS로 세포를 4°C에서 어둠에서 20분 동안 염색하였다. 혼합물은 CD3에 대한 단클론성 항체(햄스터 Mab 항-마우스 CD3-PerCP, 비디 바이오사이언시스, 553067), CD8(래트 Mab 항-마우스 CD8-APC-H7, 비디 바이오사이언시스, 560182), CD4(래트 Mab 항-마우스 CD4-PE-Cy7, 비디 바이오사이언시스, 552775) 및 NK 세포(래트 Mab 항-마우스 NK P46 BV421, 바이오레전드, 137612)로 구성된다. 세포를 수차례 세척한 후에 고정하고, 사이토фикс/사이토펌(Cytofix/Cytoperm)으로 실온에서 어둠에서 20분 동안 투과시키고, 4°C의 펌/워쉬(Perm/Wash) 용액(비디 바이오사이언시스, 554714)으로 세척하였다.

[0590] IFN γ에 대한 항체(래트 Mab 항-마우스 IFN γ-APC, 클론 XMG1.2, 비디 바이오사이언시스, 554413) 및 종양 괴사인자 알파(TNF α)(래트 Mab 항-마우스 TNF α-FITC, 클론 MP6-XT22; 1/250(비디 바이오사이언시스 554418))에 의한 세포내 사이토킨 염색을 4°C에서 어둠에서 30분 동안 수행하였다. MACSQuant 분석기를 사용하는 유동 세포분석에 의한 분석 전에, 세포를 펌/워쉬로 세척하고, 1% 폼알데하이드를 함유하는 PBS FACS에서 재현탁하였다.

[0591] 살아있는 CD3+CD8+CD4- 및 세포 CD3+CD8-CD4+를 게이팅(gating)하고, 점 도표 상에 제시한다. 2개의 영역은

각각의 사이토킨에 대한 양성 세포를 위한 게이트로 정의된다. 이러한 게이트에서 발견되는 경우의 수를 모집단 내의 경우의 총 수로 나누어 반응하는 T-세포의 백분율을 산출한다. 각각의 마우스의 경우, 단독의 매질에서 수득되는 백분율은 배경으로서 간주되었고, 펩티드 자극에 의해 수득된 백분율에서 차감되었다.

[0592] 가능성의 역치를 실험 배경에 따라 정의하였다(즉, 매질 단독 조건에서 각각의 군으로부터 수득된 염색된 세포의 평균 백분율 + 2의 표준 편차). 5개 이상의 경우에 나타낸 사이토킨의 백분율만이 양성으로서 간주되었다.

[표 9]

[0594] HBsAg(S2+S)의 HBV 코어 단백질 및 외피 도메인(Envelope domain)에 함유된 HLA-A2/DR1 제한된 에피토프.

단백질	개시 위치	종결 위치	서열	HLA 제한	참고문헌
코어	18	27	FLPSDFFPSS (서열번호 773)	A2	Bertoletti et al Gastroenterology 1997;112:193-199
	111	125	GRETIVLEYLVSFGVW (서열번호 774)	DR1	(Bertoletti et al Gastroenterology 1997;112:193-199
외피 (S2+S)	114	128	TTFHQTLQDPRVRGL (서열번호 775)	DR1	Pajot et al Microbes Infect 2006;8:2783-2790.
	179	194	QAGFFLLTRILTIPQS (서열번호 776)	A2 + DR1	Pajot et al Microbes Infect 2006;8:2783-2790.
	183	191	FLLTRILTI (서열번호 777)	A2	Sette et al J Immunol 1994;153:5586-5592.
	200	214	TSLNFLGGTTVCLGQ (서열번호 778)	A2 + DR1	Pajot et al Microbes Infect 2006;8:2783-2790.
	204	212	FLGGTTVCL (서열번호 779)	A2	Rehermann et al J Exp Med 1995;181:1047-1058.
	335	343	WLSLLVPFV (서열번호 780)	A2	Nayersina et al J Immunol 1993;150:4659-4671.
	337	357	SLLVPFVQWFVGLSPTVWLSV (서열번호 781)	A2 + DR1	Loirat et al J Immunol 2000;165:4748-4755
	348	357	GLSPTVWLSV (서열번호 782)	A2	Loirat et al J Immunol 2000;165:4748-4755
	370	379	SILSPFLPLL (서열번호 783)	A2	Mizukoshi et al J Immunol 2004;173:5863-5871.

[0595]

실시예 1 - 시험관내 효능 시험

[0596]

유전자 워크(gene walk)를 주로 16 내지 20량체 캡머를 사용하는 인간 PD-L1 전사체를 가로질러 수행하였다. 효능 시험을 인간 백혈병 단핵구 세포주 THP1 및 인간 비-호지킨 K 림프종 세포주(카르파스-299)에서 시험관내 실험으로 수행하였다.

[0597]

세포주

[0598]

THP1 및 카르파스(Karpas)-299 세포주를 인증된 세포 배양을 위한 유럽 컬렉션(European Collection of Authenticated Cell Cultures: ECACC)으로부터 원래 구입하였고, 5% CO₂를 갖는 37°C의 가습된 인큐베이터에서 공급자에 의해 추천된 바와 같이 유지하였다.

[0599]

올리고뉴클레오티드 효능

[0600]

THP-1 세포(RPMI-글루타맥스(GLutamax) 중 3.104, 10% FBS, 1% 펜-스트렙(Pen-Strep)(써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))를 96-웰 환저 플레이트 내로 올리고뉴클레오티드(4 내지 5 μL)에 첨가하고, 100

μL /웰의 최종 부피로 6일 동안 배양하였다. 올리고뉴클레오티드를 하나의 단일 농도($20 \mu\text{M}$) 및 25 내지 $0.004 \mu\text{M}$ (물 중 1:3 희석)의 투여량-범위 농도에서 선별하였다. 제조사의 지시에 따라 MagNA 퓨어(Pure) 96 시스템(로슈 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics)) 상에서 MagNA 퓨어 96 세포 RNA 대용량 키트를 사용하여 전체 mRNA를 추출하였다. 유전자 발현 분석을 위하여, 표적화 내생 대조군으로서 사용된 인간 PD-L1 및 ACTB를 표적화하는 사전-디자인된 타크만(Taqman) 프라이머(써모 피셔 사이언티픽)를 갖는 콘트스튜디오(Quant Studio) 머신(어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems)) 상에서 타크만 RNA-to-ct 1-단계 키트(써모 피셔 사이언티픽)를 사용하여 RT-qPCR을 수행하였다. 2(-델타 델타 C(T)) 방법 및 대조군 샘플(비-처리된 세포)과 비교되는 %인 억제율을 사용하여 상대적인 PD-L1 mRNA 발현 수준을 계산하였다.

[0602]

카르파스-299 세포를 RPMI 1640, 2 mM 글루타민 및 20% FBS(시그마)에서 배양하였다. PBS에 용해된 올리고뉴클레오티드 접합체의 첨가 전에 24시간 동안 항온처리된 96 웰 플레이트 중에서 세포를 10,000 세포/웰로 평판배양하였다. 올리고뉴클레오티드의 최종 농도는 $100 \mu\text{L}$ /웰의 최종 부피에서 $5 \mu\text{M}$ 의 단일 투여량이거나, $100 \mu\text{L}$ 배양 부피에서 $50 \mu\text{M}$, $15.8 \mu\text{M}$, $5.0 \mu\text{M}$, $1.58 \mu\text{M}$, $0.5 \mu\text{M}$, $0.158 \mu\text{M}$, $0.05 \mu\text{M}$ 로부터 $0.0158 \mu\text{M}$ 까지의 범위의 투여 반응으로 첨가되었다. 올리고뉴클레오티드 화합물의 첨가 후 3일에 세포를 수확하였고, 제조사의 지시에 따라 퓨어링크 프로(PureLink Pro) 96 RNA 정제 키트(암바이온(Ambion))를 사용하여 RNA를 추출하였다. 제조사의 지시에 따라 M-MLT 억전사효소, 랜덤 10량체 레트로스크립트(RETROscript), RNase 억제제(암바이온) 및 100 mM dNTP 세트(인비트로겐(Invitrogen), PCR 등급)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자 발현 분석을 위하여, PD-L1(어플라이드 바이오시스템스; Hs01125299_m1) 및 TBP(어플라이드 바이오시스템스; 4325803)를 위한 타크만 프라이머 검정으로 설정된 듀플렉스에서 타크만 패스트 어드밴스드 마스터 믹스(Taqman Fast Advanced Master Mix)(2X)(암바이온)를 사용하여 qPCR을 수행하였다. 상대적인 PD-L1 mRNA 발현 수준은 대조군 샘플(PBS-처리된 세포)의 %로서 표 10에 제시된다.

[0603]

[표 10]

[0604]

THP1 및 카르파스-299 세포주에서 항-PD-L1 화합물의 시험관내 효능($n=3$ 실험으로부터의 평균). PD-L1 mRNA 수준은 카르파스-299 세포 중 TBP 또는 THP1 세포 중 ACTB로 정규화되고, 대조군(PBS-처리된 세포)의 %로서 제시된다.

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
4_1	50	1	32	11	TAattggctctacTGC	236
5_1	25	5	9	6	TCCGataagaatgaCT	371
6_1	29	2	15	5	TGaacacacagtcgCA	382
7_1	27	7	3	1	CTGaacacacagTCG	383
8_1	23	4	11	3	TCTgaacacacagTCG	384
9_1	32	3	19	6	TTCTgaacacacagTC	385
10_1	57	5	39	16	ACaaagtcatgttaCTA	463
11_1	75	5	37	12	ACacaagtcatgttAC	465
12_1	22	2	10	3	CTtacttagatgcTGC	495
13_1	33	4	23	11	ACttacttagatgCTG	496
14_1	33	7	21	6	GACttacttagatgCT	497
15_1	41	6	18	10	AGacttacttagaTGC	498
16_1	96	14	40	7	GCAggaagagactTAC	506
17_1	22	2	9	3	AATAaattccgttCAGG	541
18_1	34	6	21	9	GCAAAataattcCGTT	545
18_2	51	4	27	11	GCAaataaaattccGTT	545
19_1	38	5	23	7	AGCAaaaatttcCGT	546
20_1	73	8	56	15	CAGAgcaaaaatTCC	548
21_1	83	8	65	10	TGGAcagagcaaataAAT	551
22_1	86	6	80	8	ATGGacagagcaAATA	554
23_1	44	4	30	2	CAgaatggacagaGCA	558
24_1	63	10	40	11	TTCTcagaatggacAG	562
25_1	31	1	39	5	CTGAactttgacATAG	663
26_1	60	4	56	19	AAgacaaccccagacTGA	675
27_1	36	4	34	10	TATAagacaaacccAGAC	678
28_1	40	4	28	13	TTATAagacaaaccCAGA	679
29_1	30	2	18	6	TGTTataagacaaaCCC	682
30_1	77	3	67	10	TAGAacaatggtaCTTT	708
31_1	81	17	20	14	GTAGaacaatggtaCT	710
32_1	29	5	14	8	AGGtagaacaatgTGA	712
33_1	32	1	43	20	AAGAggtagaacaATGG	714
34_1	70	4	35	13	GCatccacagtaaaTT	749
35_1	83	2	66	21	GAaggttattnaaTTC	773
36_1	18	2	15	5	CTAAAtcgaatgcaGCA	805
37_1	64	7	35	10	TACccaatctaCGA	813
38_1	69	1	49	13	TAGttacccaatcTAA	817
39_1	49	5	26	9	CATtagttacccAAT	821

[0605]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
40_1	23	7	8	2	TCAtttagttaccCAA	822
41_1	24	6	12	3	TTcatttagttacCCA	823
42_1	51	7	40	5	GAATtaatttcatTTAGT	829
43_1	71	9	45	3	CAGTgaggaatttATT	837
44_1	60	5	45	17	CCAAcagtggaggAATT	842
45_1	63	1	37	15	CCCaacagtggaggAAT	843
46_1	31	3	29	12	TAtacccaacagtGAG	846
47_1	44	3	27	0	TTatacccaacagTGAG	847
48_1	38	3	26	6	TTTatacccaacagTGA	848
49_1	20	4	7	1	CCTttatacccaaCAG	851
50_1	22	3	6	2	TAACctttatacCCAA	854
51_1	28	1	29	16	AATAaacctttataCCCA	855
52_1	80	11	48	10	GTAataaacctttTA	859
53_1	54	4	37	14	ACTGtaataaacctTTAT	860
54_1	81	4	53	15	ATAtatatgcattGAG	903
55_1	86	12	70	15	AGatatatatgcattTG	905
56_1	56	8	27	7	GAGatatatatgcAAT	906
57_1	28	7	13	5	CCagagatatacTGC	909
58_1	88	13	69	23	CAATattccagagATAT	915
59_1	29	3	14	6	GCAAtattccagagATA	916
60_1	25	3	14	3	AGCaatattccagaGAT	917
61_1	29	4	17	2	CAGcaatattccAGAG	919
62_1	27	3	14	3	AATCagcaatattCCAG	921
63_1	23	6	12	6	ACAAtcagcaataTTCC	923
64_1	53	9	43	15	ACtaagttagttacactTCT	957
65_1	32	5	14	6	CTAAgttagttacactTC	958
66_1	35	4	31	6	GACtaagttagttacaCTT	959
67_1	64	10	55	14	TGActaagttagtTACA	962
68_1	62	11	57	16	CTTTgactaagttagTTA	964
69_1	42	9	59	13	CTCtttgactaagTAG	967
70_1	81	6	56	12	GCTCtttgactaagTA	968
71_1	27	3	39	9	CCtttaaatactgtTGAC	1060
72_1	75	5	36	7	CTtaataactgttgAC	1060
73_1	35	6	43	13	TCCtttaataactgTTG	1062
74_1	57	4	79	25	TCTCtttaataactgTT	1063
75_1	53	6	28	6	TAtcatagttctCCTT	1073
76_1	26	4	9	2	AGTatcatagttcTCC	1075
77_1	74	5	39	12	AGtgtatcatagttCTC	1076
78_1	49	5	35	6	AGagtatcatagTTCT	1077
78_2	74	6	36	8	AGAgatcatagttTCT	1077

[0606]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
79_1	19	2	19	13	CAGagtatcatagTTC	1078
80_1	23	2	26	2	TTCAGagtatcatagT	1080
81_1	35	3	36	11	CTTcagagtatcATAG	1081
82_1	24	6	20	7	TTCTtcagagtatcATA	1082
83_1	20	2	16	2	TTTcttcagagtaTCAT	1083
84_1	33	4	37	10	GAGAaggctaagTTT	1099
85_1	42	2	35	18	GAactttgttCATT	1213
86_1	50	4	54	8	TGagacactttgttCA	1215
87_1	50	8	28	8	TGagacacttttgTAC	1216
88_1	61	4	33	6	CTtattaaactCCAT	1266
89_1	71	8	43	12	ACCAactttattaAA	1272
90_1	62	5	42	9	AAACctctactaagTG	1288
91_1	22	3	12	5	AGattaagacagtTGA	1310
92_1	46	3	ND	ND	AAgttaggacaagaGGC	1475
93_1	42	4	60	24	AAAGtaggacaagAGG	1476
94_1	86	15	46	10	GTtaagcagccaggAG	1806
95_1	66	6	82	27	AGgttaggatgggTA	1842
96_1	83	19	62	36	AAGgttaggatgggTA	1843
97_1	60	9	69	5	CAAggttaggatggGT	1844
97_2	76	13	34	7	CAaggttaggatggGT	1844
98_1	65	8	76	28	CCAaggtaggatgg	1845
99_1	61	2	75	17	TCcaaggtaggatGG	1846
100_1	83	4	82	13	CTTCcaaggtaggAT	1848
101_1	45	3	52	14	ATCtccaaggtagGA	1849
102_1	29	2	17	7	AGaagtgtatggcTATT	1936
103_1	26	3	22	1	AAGaagtgtatggTCAT	1937
104_1	34	6	22	2	GAAGaagtgtatggTCA	1938
105_1	41	5	21	5	ATGAaatgtaaacTGGG	1955
106_1	40	8	29	6	CAATgaaatgtaaaCTGG	1956
107_1	24	3	16	4	GCAAtgaaatgtaaACTG	1957
108_1	30	4	20	6	AGCAatgaaatgtAACT	1958
109_1	44	4	34	14	GAGCaatgaaatgtAAC	1959
110_1	18	1	13	3	TGaatccccatataCGA	1992
111_1	69	8	35	8	AGaattatgaccaTAT	2010
112_1	77	7	38	10	AGGtaagaatttatGACC	2014
113_1	97	10	56	13	TCAGgtagaatTTTGAC	2015
114_1	69	8	54	21	CTTCaggtaagaatTATG	2017
115_1	91	7	115	42	TCTTcaggtaaAGATA	2019
116_1	88	6	104	36	CTTCTtcaggtaaGAAT	2021
117_1	85	6	118	17	TCTTcttcaggtaaGAA	2022

[0607]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
118_1	105	14	102	9	TCTtcttcaggtaAGA	2023
119_1	37	2	76	18	TGGtctaaggaaGAAG	2046
120_1	46	6	81	11	GTTGgtctaagagAAG	2049
121_1	74	11	64	4	AGTtggtctaagAGAA	2050
122_1	74	9	55	21	CAgttggtctaagAGAA	2050
123_1	65	9	95	21	GCAGttggtctaagagAA	2050
124_1	63	7	ND	ND	CAGTtggtctaagaGA	2051
125_1	65	6	ND	ND	GCagtggtctaagagaGA	2051
126_1	67	14	104	34	GCagttggtctaaGAG	2052
127_1	22	6	10	3	CTcatatcagggCAGT	2063
128_1	50	4	46	9	CACAcattttttttttaAC	2087
129_1	22	4	12	12	TAAatacacacatgTTCT	2092
130_1	24	2	43	28	GTAAatacacacatgTTC	2093
131_1	33	3	20	12	TGTAAatacacacaTGTT	2094
132_1	73	17	57	21	GATCatgttaatacACAC	2099
133_1	47	5	28	14	AGATCatgttaataCACA	2100
134_1	35	6	26	11	CAAAGatcatgttaataACAC	2101
135_1	30	2	14	3	ACAAAGatcatgttaaaTACA	2102
136_1	52	6	24	18	GAATacaaagatcaTGTA	2108
137_1	33	5	20	6	AGAAtacaaagatcATGT	2109
138_1	37	1	22	15	CAGAatacaaagatCATG	2110
139_1	85	6	53	8	GCAGAatacaaagATCA	2112
140_1	79	4	40	6	AGGCagaatacaaAGAT	2114
141_1	56	2	53	20	AAGGcagaatacaaAGA	2115
142_1	28	5	20	5	ATTtgtgaggacGAA	2132
143_1	26	2	22	10	CAtttgtgaggacCGA	2133
144_1	29	6	16	4	GAgggtgtggatTAG	2218
145_1	45	6	22	5	TTaggagtaataAAGG	2241
146_1	65	7	44	9	TTAatgaatttgtTG	2263
147_1	84	8	43	10	CTttatgttgtGT	2265
148_1	32	0	15	3	CATGgattacaactAA	2322
149_1	33	2	20	4	TCatggattacaactTA	2323
150_1	29	1	11	3	GTCatggattacaact	2324
151_1	64	2	40	9	CAttaatcttagTCAT	2335
152_1	97	8	63	22	GACATttaatcttagTCA	2336
153_1	92	7	ND	ND	AGGGacattaaatCTA	2340
154_1	35	4	25	15	CAAAGcattataaaCCA	2372
155_1	34	3	24	6	ACTtactaggcaGAAG	2415
156_1	102	6	113	18	CAGAgttaactgtACA	2545
157_1	102	10	103	15	CCAGagttaactgtAC	2546

[0608]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
158_1	88	7	95	18	GCCagagtttaactgTA	2547
159_1	78	10	ND	ND	TGggccagaggtaaCT	2550
160_1	59	5	26	5	CAgcatactatcagaACT	2576
161_1	78	8	42	10	TGAataaacatgagTCAT	2711
162_1	31	6	ND	ND	GTGaaataaacatgAGTC	2713
163_1	18	2	11	3	TCTGtttatgtcacTG	2781
164_1	56	5	29	9	GTCTgtttatgtcaCT	2782
165_1	37	8	12	5	TGgtctgttatGTCA	2784
166_1	39	1	19	3	TTGGtctgttatgtTC	2785
167_1	41	3	35	14	TCaccattgtttaAA	2842
168_1	18	3	14	4	TTcagcaaataatTCGT	2995
169_1	36	8	13	2	GTGtgttcagcaaATAT	2999
170_1	18	2	11	4	TCTattgttaggtATC	3053
171_1	67	4	26	12	ATtgcccatcttacTG	3118
172_1	71	2	33	9	TATtgcccatcttacCT	3119
173_1	47	4	20	5	AAatattgccccatCTT	3122
174_1	74	4	34	7	ATAaccttatcataCA	3174
175_1	98	19	44	12	TATAaaccttatcaTAC	3175
176_1	100	10	64	11	TTATAaaccttatcATA	3176
177_1	72	38	28	5	TTTataaccttatCAT	3177
178_1	47	6	34	6	ACtgcattgtctaTCT	3375
179_1	41	3	23	6	AGgactgctattgCTA	3378
180_1	32	6	27	7	GAGgactgctattgCT	3379
181_1	83	1	46	20	ACgtagaataataaCA	3561
182_1	94	4	52	9	CCaaagtatataATGG	3613
183_1	49	2	16	3	TTAGcagaccaaGTGA	3621
184_1	96	3	26	5	GTtttagcagaccaAGT	3623
185_1	78	3	46	10	TGacagtgttataATT	3856
186_1	88	5	45	21	TGTCcaagatattGAC	3868
187_1	46	6	23	6	GAAtatccatgtatTGT	4066
188_1	79	3	45	14	CAaactgagaataTCC	4074
189_1	63	5	27	8	GCAaactgagaataTC	4075
190_1	77	9	37	11	TCCtattacaatcgTA	4214
191_1	74	10	36	9	TTCCtattacaatcGT	4215
192_1	91	8	51	28	ACtaatggaggatTT	4256
193_1	95	14	67	24	TAGttcagagaataAG	4429
194_1	86	5	47	16	TAacatatagttcAGA	4436
195_1	87	4	81	20	ATAacatatagttcAG	4437
196_1	101	6	67	20	CAtaacatatagttCA	4438
197_1	91	6	60	13	TCataaacatatagtTC	4439

[0609]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
198_1	61	3	31	10	TAGCtcctaacaatCA	4507
199_1	79	12	49	11	CTCCaatcttgtAT	4602
200_1	74	2	58	13	TCTCcaatcttgtAT	4603
201_1	53	3	33	10	TCtattcagecaaTC	4708
202_1	25	4	30	9	CGGaagt cagagtGAA	4782
203_1	32	5	21	7	TTAAGcatgaggaaTA	4798
204_1	34	10	26	11	TGAttgaggactCTT	4831
205_1	81	12	62	12	GACtaattatTCGTT	4857
206_1	57	7	37	7	TGActaattatTCGTT	4858
207_1	26	5	21	6	GTGactaattatTCG	4859
208_1	48	3	33	13	CTGCttgaaatgtGAC	4870
209_1	32	1	34	13	CCtgcgtgaaatgTGA	4871
210_1	60	5	50	19	ATccgtcgaaATGT	4873
211_1	111	8	110	26	ATTataatctatTCT	5027
212_1	107	1	67	12	GCTaaaatcttcATC	5151
213_1	26	3	19	6	CAttgtaacataCTTA	5251
214_1	33	2	20	4	GCattgtAACATACT	5252
215_1	89	8	53	16	TAatattgcaccaaAT	5295
216_1	25	2	29	9	GATAatattgcacCAA	5297
217_1	27	1	27	6	AGataatattgcacCA	5298
218_1	79	6	45	11	GCcaagaagataATAT	5305
219_1	159	16	68	14	CACAgccacataaaCT	5406
220_1	90	2	72	12	TTgttaattgtggaaAC	5463
221_1	10	2	11	5	TGacttgttaattTG	5467
222_1	82	1	67	18	TCtaactgaaatagTC	5503
223_1	30	1	32	9	GTGgttctaactgaAA	5508
224_1	53	7	53	15	CAatatgggacttggGT	5522
225_1	44	1	33	10	ATGacaatatgggACT	5526
226_1	49	1	41	14	TATGacaatatgggAC	5527
227_1	77	1	54	15	ATATGacaatatggGA	5528
228_1	100	3	98	29	CTtcaactaataTTA	5552
229_1	90	12	80	19	CTGCttcaacttaatAA	5555
230_1	91	0	79	23	AAgactgtttcacTTA	5559
231_1	49	8	77	34	GAATGCCCTaattATG	5589
232_1	17	7	88	33	TGGaatGCCCTaatTA	5591
233_1	40	5	35	10	GCAtatGCCCTagtGT	5642
234_1	81	6	72	25	CTAatggaggattTG	5673
235_1	97	17	87	25	AAtatagaacctaATG	5683
236_1	98	4	83	21	GAAGaaatagaatGTT	5769
237_1	93	2	102	26	ATGgtaatagattAT	5893

[0610]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
238_1	110	24	44	14	GAaagagcacagggTG	6103
239_1	66	5	36	10	CTACatagaggaaTG	6202
240_1	70	4	34	8	GCTtctacataGAGG	6207
241_1	64	NA	33	6	TGCTtctacatAG	6208
242_1	30	NA	19	7	TGgcttgaataTGT	6417
243_1	88	6	69	15	CATtatattaagaAC	6457
244_1	8	2	5	2	TCggttatgttaTCAT	6470
245_1	18	9	12	4	CActtatctggTCGG	6482
246_1	37	2	19	5	AAAttggcacagcGTT	6505
247_1	46	12	29	8	ACCGtgacagttaATG	6577
248_1	31	2	25	2	TGgaaaccgtgacagTA	6581
249_1	17	2	23	9	CCacatataggtcCTT	6597
250_1	15	6	23	7	CAtattgttaccaTAC	6617
251_1	4	2	9	2	TCAatttgttaccATA	6618
252_1	65	12	85	14	CAATtgtcatatTGCT	6624
253_1	20	2	51	7	CATtcaattgttataTTG	6626
254_1	48	8	91	41	TTTCtactggaaTTG	6644
255_1	11	5	23	8	CAAtttagtgtgcagcCAG	6672
256_1	43	7	62	13	GAATAatgttcttaTCC	6704
257_1	28	2	36	19	CACAAattgaataatgtTCT	6709
258_1	64	4	78	22	CATGcacaaattgaaTAAT	6714
259_1	53	8	104	73	ATCctgtcaatttcCAT	6832
260_1	54	5	59	14	CCaccatagctgatCA	6868
261_1	42	8	52	22	ACcaccatagctgatCA	6868
262_1	68	5	118	66	CAccaccatagctgatTC	6869
263_1	40	2	73	20	TAgtcgaccaccAT	6877
264_1	64	6	72	35	CttgttagtcggcacAC	6880
265_1	56	4	82	35	CttgttagtcggcacCA	6881
266_1	41	5	46	21	CGcttgttagtcggcAC	6883
267_1	51	4	33	14	TCAataaagatcagGC	6942
268_1	61	2	49	10	TGgacttacaagaaTG	6986
269_1	45	7	40	9	ATGgacttacaagaAT	6987
270_1	51	12	36	12	GCTCaagaaaattggAT	7073
271_1	17	0	14	5	TACTgttagaacatgGC	7133
272_1	15	3	11	3	GCAATTcatTTgaTCT	7239
273_1	64	11	ND	ND	TGaggggaggaggacAC	7259
274_1	52	6	50	28	AGtgtgtgaaggaggAG	7265
275_1	79	7	ND	ND	TAgttgtgaaggaggAG	7265
276_1	81	6	ND	ND	AtagtgtgtgaaggaggAG	7265
277_1	70	9	ND	ND	TAgttgtgtgaaggaggGA	7266

[0611]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
278_1	84	9	ND	ND	ATagtggtaaggagGA	7266
279_1	40	6	64	53	TAGtggtaaggagGG	7267
280_1	42	10	ND	ND	ATAtggtaaggagGG	7267
281_1	63	7	ND	ND	GAtgtggtaaggagGG	7267
282_1	27	7	38	11	ATAGtggtaaggagAG	7268
283_1	60	22	ND	ND	GAtgtggtaaggagAG	7268
284_1	23	3	97	54	GAgatgtggtaAGG	7271
285_1	51	6	72	19	CATGggagatgtgGT	7276
286_1	7	1	21	9	ACAAataatggtaCTCT	7302
287_1	66	8	48	20	ACACacaataatgTTA	7306
288_1	67	6	58	20	GAGggacacacaaaTAAT	7311
289_1	46	2	50	21	ATATagagaggCTAA	7390
290_1	22	6	ND	ND	TTgatatagagaGGCT	7393
291_1	11	2	17	3	GCATttgatatagAGA	7397
292_1	70	18	44	8	TTtgttatgtataTAG	7400
293_1	30	1	30	9	CTGaaagaataggTC	7512
294_1	53	5	42	10	ACTGgaagaataggTT	7513
295_1	56	2	41	15	TACTGgaagaataggGT	7514
296_1	80	8	53	13	TGGCttatcctgtact	7526
297_1	73	6	52	14	ATggcttatcctGTAC	7527
298_1	75	7	89	25	TATGgcttatcctgTA	7528
299_1	52	5	50	11	GTAtggcttatccTGT	7529
300_1	27	3	31	6	ATgaatatatgccCAGT	7547
301_1	41	8	33	9	GAtgaatatatgCCCA	7549
302_1	8	2	ND	ND	CAAgtgaatataTGCC	7551
303_1	32	5	37	14	GACAacatcagtaTAGA	7572
304_1	28	5	30	23	CAAGacaacatcAGTA	7576
305_1	47	5	41	9	CACctcttagttccTTT	7601
306_1	39	6	33	7	AAActccttagtCCT	7603
307_1	68	3	42	14	TAacactccttagtTCC	7604
308_1	115	5	69	22	CTaacactccttagtTC	7605
309_1	97	16	57	14	TGataacataactgTG	7637
310_1	36	1	23	10	CTgataacataaCTGT	7638
311_1	38	5	24	5	TTTGAactcaagtgAC	7654
312_1	42	3	39	5	TCCTtaacttagcTAG	7684
313_1	15	2	14	3	GAgttgatttagCTG	7764
314_1	49	28	ND	ND	TGggatatgacagGGA	7838
315_1	34	6	ND	ND	TGTGggatatgacagGG	7840
316_1	47	3	37	8	ATATggaaggataTC	7875
317_1	11	3	ND	ND	ACAggatatggaaGGG	7880

[0612]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
318_1	48	4	ND	ND	ATTTcaacaggatATGG	7885
319_1	18	2	16	4	GAgtaatttcaacAGG	7891
320_1	74	6	44	5	AGGGagtaatttcACAA	7893
321_1	38	5	56	28	ATTAgggagtaatTTCA	7896
322_1	66	9	32	11	CTtactattaggGAGT	7903
323_1	13	1	15	5	CAgcttactattaGGG	7906
324_1	26	4	20	9	TCAgcttactattAGG	7907
325_1	43	4	17	2	ATTttagcttactaTTAG	7908
326_1	54	5	57	16	TTcagcttactaTTAG	7908
327_1	28	3	8	2	CAGAtttcagcttaCT	7913
328_1	43	4	37	16	GACTacaacttagagGG	7930
329_1	45	12	36	10	AGACtacaactagaGG	7931
330_1	99	8	94	32	AAgactacaactagAG	7932
331_1	59	4	52	19	ATGAttaattctagtCAAA	7982
332_1	100	2	84	23	TTTaattctagtCAAA	7982
333_1	91	9	60	19	GATTtaattctaGTCA	7984
771_1	74	6	50	5	TGAttaattctaGTCA	7984
334_1	73	5	54	12	ATGAttaattctagtCA	7984
335_1	15	1	26	3	GATGattnaattctagtCA	7984
336_1	71	22	49	16	GAttaattctaGTCA	7984
337_1	43	5	30	11	GATGattnaattctaGTC	7985
338_1	98	5	90	27	TGattnaattctagtTC	7985
339_1	87	21	86	2	GAGATgattnaatTCTA	7988
340_1	92	5	85	27	GAGAtgattnaatTCT	7989
341_1	7	1	7	1	CAGAttgatgttagTT	8030
342_1	7	2	24	11	CTcagattgtatgGTAG	8032
343_1	3	1	14	9	GTGatccctcagatTTG	8039
344_1	14	5	20	7	TGtattgttagCCTC	8045
345_1	10	2	11	5	ACttgtattgttAGCC	8048
346_1	52	4	52	17	AGCcagtatcaggGC	8191
347_1	33	3	18	8	TTgacaatagtGGCAT	8213
348_1	7	2	13	5	ACAagtggatctTCT	8228
349_1	63	8	44	15	AATCtactttacaAGT	8238
350_1	36	2	ND	ND	CAcagttagatgcctGATA	8351
351_1	24	2	30	9	GAacacagttagatGCC	8356
352_1	23	4	103	14	CTTGgaacacagttagAT	8359
353_1	20	2	45	2	ATAttttgaacaCAG	8364
354_1	25	3	24	6	TCTttaatatcttgAAC	8368
355_1	39	2	41	10	TGattttataatCTTG	8372
356_1	54	5	88	43	TGatgattttaaTATC	8375

[0613]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
357_1	31	4	45	27	AGGctaagtcatgaTG	8389
358_1	18	3	43	20	TTGATgaggctaaTC	8395
359_1	6	2	11	2	CCAggattataactcTT	8439
360_1	43	5	40	14	GCCaggattataCTCT	8440
361_1	56	8	73	13	CTGccaggattataCT	8442
362_1	23	1	33	7	CAGAacttataacttaTG	8473
363_1	49	8	45	14	AAGCagaaaacttaTACT	8478
364_1	39	6	37	4	GAAGcagaaaacttaTACT	8478
365_1	26	4	45	13	TGGAagcagaaaacttataCT	8478
366_1	21	4	44	5	TGGAagcagaaaacttataTAC	8479
367_1	97	4	70	22	AAgcagaaaacttaTAC	8479
368_1	34	3	32	11	TGGAagcagaaaactTATA	8480
369_1	71	7	46	19	AAGGatatatggAG	8587
370_1	51	9	79	38	TGccgaagatttcCT	8641
371_1	45	6	52	25	ATGGattttggagtaGA	8772
372_1	27	7	30	8	AGatggattttggagTA	8774
373_1	13	3	28	6	AAAGatggattttggAG	8775
374_1	42	10	44	11	ACAagatggattttGGGA	8777
374_2	41	3	45	14	ACAagatggattttGGGA	8777
375_1	83	9	88	32	AGAagggttcagaCTTT	8835
376_1	40	5	33	3	GCAGaagggttcagaCT	8837
376_2	28	5	20	4	GCAGaagggttcagACT	8837
377_1	70	2	43	8	TGCAAGAGGTTcAGAC	8838
378_1	23	3	55	17	AGtgccagggttCAG	8840
378_2	51	6	41	8	AGTGCAGAAGGTTAG	8840
379_1	34	6	35	7	AAGTGCAGAAGGTTCA	8841
380_1	44	11	24	6	TAagtgcagaagGTTC	8842
381_1	37	5	45	9	TCtaggtttttttttTC	8844
382_1	75	5	147	26	CTCaggagttttttttTC	8948
383_1	90	10	141	55	CTCaggagttttttttTT	8949
384_1	73	8	234	116	ATggagggtgacttcaggAG	8957
385_1	33	4	42	7	ATggagggtgacttcaggGA	8958
386_1	24	3	29	14	ATggagggtgacttcAGG	8959
387_1	37	2	65	15	TATggagggtgacttcAGG	8959
388_1	50	10	81	19	ATatggagggtgacttcAGG	8959
389_1	42	5	61	10	TATGggagggtgactcAG	8960
390_1	36	2	76	50	ATatggagggtgactTCAG	8960
391_1	52	6	64	6	CAtatggagggtgactcAG	8960
392_1	63	5	57	6	ATAtggagggtgactTCAG	8961
393_1	53	7	64	12	CAtatggagggtgactTCAG	8961

[0614]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
394_1	51	5	56	24	CAtatggagggtgACTC	8962
395_1	23	3	41	34	GCatatggagggtgacTC	8962
396_1	34	3	54	10	TGcatatggagggtgacTC	8962
397_1	54	5	71	24	TtgcataatggagggtgacTC	8962
398_1	61	11	59	13	TttgcataatggagggtgacTC	8962
399_1	25	2	30	6	GCatatggagggtgaCT	8963
400_1	34	4	25	9	TGcatatggagggtgaCT	8963
401_1	25	4	31	20	TTGcatatggagggtgaCT	8963
402_1	51	6	37	11	TttgcataatggagggtgaCT	8963
403_1	26	1	33	5	TGCatatggagggtgAC	8964
404_1	25	2	69	19	TTGcatatggagggtGAC	8964
405_1	26	4	24	4	TTTGCatatggagggtgAC	8964
406_1	19	3	20	7	TTTGCatatggagggtGA	8965
407_1	16	5	46	16	TTtgcataatgaaGGTG	8966
408_1	9	2	9	6	AAgtgaagtccaaCAGC	8997
409_1	26	8	109	52	TGgaaagtgaagTTCA	9002
410_1	31	5	24	5	ATggaaagtgaagTTC	9003
411_1	49	9	19	10	GATGgaaagtgaaGTT	9004
412_1	28	10	17	9	CTGtgcataatggagggtGAA	9007
413_1	54	4	34	8	ATTgagtgaatccAAA	9119
414_1	11	1	14	2	AAttgagtgaatCCAA	9120
415_1	58	6	14	2	GATAattgagtgaaTCC	9122
416_1	5	1	16	3	GTGataattgagtGAA	9125
417_1	73	5	61	14	AAGaaagggtgcaaTAA	9155
418_1	86	6	64	13	CAagaaaagggtgcAATA	9156
419_1	75	19	64	14	ACAAAgaaaagggtgcaAT	9157
420_1	75	8	50	13	ATtttaactcacaaAC	9171
421_1	21	8	23	6	CTgttaggttcaGCGA	9235
422_1	54	10	30	5	TCTGaatgaaatTTCG	9260
423_1	11	4	15	5	CTCatttgcataatggagggtTCTG	9281
424_1	87	3	52	8	CTAatcttcatttgcataatGG	9286
425_1	95	1	85	13	CCtaatcttcatttgcataatAG	9287
426_1	31	7	22	7	ACTttgcataatggagggttG	9305
427_1	64	7	49	16	ACtgcataatggagggtTG	9315
428_1	18	6	21	3	CAAatagctttatCCG	9335
429_1	19	6	17	4	CCaaatagctttatATCG	9336
430_1	35	4	27	8	TCCAAatagctttatTC	9337
431_1	75	8	43	7	GATCaaatagctttatTA	9339
432_1	67	11	32	8	ATgatccaaataGCTT	9341
433_1	53	5	43	6	TATGatccaaatagCT	9342

[0615]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
434_1	97	9	66	29	TAAAcaggcgtggGAAT	9408
435_1	58	12	44	17	ACtttaaacagggCTGG	9412
436_1	58	10	30	12	ACacttaaacagGGCT	9414
437_1	87	38	41	3	GAACacttaaacAGGG	9416
438_1	70	4	59	33	AGAGAACacttaaACAG	9418
439_1	83	17	28	9	CTACagagaacaCTTA	9423
440_1	49	12	27	4	ATGctacagagaaCACT	9425
441_1	53	10	24	13	ATAAatgtacagagaACA	9427
442_1	23	6	20	10	AGataaatgtacacaGAGA	9430
443_1	48	6	27	7	TAGAGataaatgcTACA	9434
444_1	51	3	32	8	TAGAtagagataaatGCT	9437
445_1	38	5	ND	ND	CAATatactagataGAGA	9445
446_1	52	3	31	1	TACAcataatactactAG	9448
447_1	65	6	48	11	CTAcacaatatacTAG	9452
448_1	67	9	29	2	GCTAcacaatataCTA	9453
449_1	103	17	65	15	ATATgtcacaaatATAC	9455
450_1	71	13	129	22	TGATATgtacaaCAT	9459
451_1	19	4	9	1	ATGATATgtatgCTAC	9464
452_1	75	10	45	21	GAGGagagagacaaAAA	9495
453_1	68	6	43	10	CTAgaggagagagACA	9500
454_1	72	7	79	25	TATTcttaggaggAGA	9504
455_1	31	3	29	9	TTATattcttaggGAG	9507
456_1	38	5	62	17	GTTtatattctaGGAG	9510
457_1	15	6	15	8	TGgagtttatattcTAGG	9512
458_1	34	3	21	3	CGtaccaccactcTGC	9590
459_1	41	5	55	22	TGAGgaaatcatTCAT	9641
460_1	81	8	47	22	TTTGaggaaatcatTCAT	9643
461_1	76	8	39	5	AGGCtaatcctattTG	9657
462_1	93	12	216	12	TTTAggctaateCTAT	9660
463_1	15	6	30	9	TGCccagtgtagcCT	9755
464_1	27	3	25	6	TAGtagtactcgATAG	9813
465_1	9	2	7	3	CTAatttgttagtactC	9818
466_1	52	3	32	6	TGctaattgttagTAGT	9822
467_1	68	11	36	16	AGTGctaattgttagTA	9824
468_1	35	6	32	3	GCAAGtgctaattgTA	9827
469_1	91	9	ND	ND	GAGGaaatgaactaattTA	9881
470_1	92	5	ND	ND	CAGGaggaaatgaacTA	9886
471_1	67	5	42	6	CCcttaggtcattTCC	9902
472_1	35	5	20	8	ATCttacatgtgaAGC	9925
473_1	13	1	20	5	GACacactcagattcAG	9967

[0616]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
474_1	24	4	20	2	AGacacactcgatttcAG	9967
475_1	25	4	24	7	AAAGacacactcgatttcAG	9967
476_1	26	6	19	4	AGacacactcgatTTCA	9968
477_1	28	4	32	13	AAGacacactcgatTTCA	9968
478_1	31	8	37	6	AAagacacactcgatTTCA	9968
479_1	63	7	51	26	GAAagacacactcgatTTC	9969
480_1	37	10	ND	ND	AAGAcacactcgatTTC	9969
481_1	41	4	ND	ND	AAAAGacacactcgatTTTC	9969
482_1	19	5	48	14	TGAAagacacactcgatTT	9970
483_1	60	8	68	10	TGaaagacacactcaGATT	9971
484_1	42	8	63	22	TGAaagacacactcaGAT	9972
485_1	48	9	41	20	ATTGaaagacacacTCA	9975
486_1	27	6	27	12	TCatgaaagacaCACT	9977
487_1	88	13	121	33	TTCatcatgtgaAGA	9983
488_1	80	12	ND	ND	ATAAtaccacttaTCAT	10010
489_1	13	4	27	15	TTacttaattcttTGGA	10055
490_1	32	5	60	24	TTAgaaacttagcttaTCA	10101
491_1	58	10	55	17	GAGgtacaatataAGG	10171
492_1	4	1	12	3	CTTatgatacaacTTA	10384
493_1	37	6	35	5	TCtttatgatacaacTT	10385
494_1	30	0	27	6	TTCTtatgatacaacACT	10386
495_1	27	8	18	3	CAgttcttatgatTAC	10390
496_1	25	10	25	6	GCAGtttcttatgatTA	10391
497_1	77	6	72	29	TACAaatgtctattagGTT	10457
498_1	66	5	69	17	TGTACAaatgtctatTAG	10460
499_1	27	10	20	4	AGCatacataattagTA	10535
500_1	31	10	25	5	CTAAtgatagtgaagGC	10548
501_1	21	7	30	8	AGCtaatgatagtgAA	10550
502_1	35	5	39	8	ATGCcttgacatatTA	10565
503_1	64	11	79	26	CTCAagattattgACAC	10623
504_2	25	4	83	32	ACctcaaggatTTGA	10626
504_1	94	7	22	6	ACCtcaaggatTTGA	10626
505_1	31	6	34	10	AACCTcaaggatTTG	10627
506_1	55	6	62	17	CACAAacctaaggatTT	10628
507_1	66	12	40	4	GTActtaatttagACCT	10667
508_1	78	5	80	10	AGTActtaatttagACC	10668
509_1	36	5	42	15	GTATgagggtggtaAAC	10688
510_1	40	4	48	22	AGgaaacagcagaAGTG	10723
511_1	27	7	13	6	GCacaacccagaggAA	10735
512_1	54	5	ND	ND	CAAgcacaacccagAG	10738

[0617]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
513_1	35	7	ND	ND	TTCaaggcacaaccCAG	10740
514_1	49	6	52	15	AAttcaaggcacACC	10742
515_1	72	4	106	49	TAATAattcaagcacaaCC	10743
516_1	43	4	57	21	ACTAataattcaaGCAC	10747
517_1	37	3	60	12	ATAAtactaataatcAAGC	10749
518_1	9	3	6	1	TAgatttgtgagGTAA	11055
519_1	59	10	31	5	AGCCTtaattctccAT	11091
520_1	41	4	34	9	AATGatcttagagcCTTA	11100
521_1	34	6	34	7	CTAatgatctagaGCC	11103
522_1	52	6	52	17	ACTaatgtctaGAGC	11104
523_1	60	4	54	10	CATtaacatgttctTATT	11165
524_1	57	4	55	8	ACAAgtacattaacatGTTC	11170
525_1	53	6	44	5	TTACAagtacattaaCATG	11173
526_1	54	11	49	17	GCTTtattcatgtTTAT	11195
527_1	34	7	17	5	GCTtattcatgttTA	11196
528_1	11	2	21	4	AGAgcttattcatgtTT	11197
529_1	22	4	33	7	ATAAgagctttattCATG	11200
530_1	30	5	32	15	CATAagagcttaTTCA	11202
531_1	77	8	24	4	AGCAtaagagctTTAT	11205
532_1	8	3	15	6	TAGattgttagtGCA	11228
533_1	4	2	10	2	GTagattgttaGTGC	11229
534_1	41	6	33	11	GACAattctagtaGATT	11238
535_1	50	1	37	7	CTGacaattctaGTAG	11241
536_1	49	7	36	6	GCTGacaattctagTA	11242
537_1	59	2	42	11	AGgattaaagatacgTA	11262
538_1	28	11	28	4	CAggattaagataCGT	11263
539_1	96	5	20	6	TCAggattaagataCG	11264
540_1	70	11	59	11	TTcaggattaaagATAC	11265
541_1	53	5	28	4	AGGAagaaaagtttgATTC	11308
542_1	92	13	59	12	TCAAggaagaaaagtTTGA	11311
543_1	44	3	67	7	CTCAaggaagaaaagtTTG	11312
544_1	43	4	32	4	TGCTcaaggaagaAGT	11315
545_1	41	7	44	20	AATTatgctcaaggaAGA	11319
546_1	11	4	26	8	TAGGataccacatttatGA	11389
547_1	25	4	26	12	CAataatttttcatttcCTC	11449
548_1	64	6	ND	ND	TGCATAatttttttCAT	11454
549_1	48	17	49	7	ACTGcataattttatTCC	11456
550_1	91	10	92	15	CTAAactgcataattTATT	11458
551_1	85	8	38	9	ATaactaaactgCATA	11465
552_1	86	4	ND	ND	TTAttaataactaaaCTGC	11468

[0618]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
553_1	91	13	92	21	TAGTacattattaataaaCT	11475
554_1	50	4	37	7	CATAactaaggacgTT	11493
555_1	41	5	30	7	TCataactaaggacGT	11494
556_1	80	7	55	13	CGTCataactaaggAC	11496
557_1	86	3	59	11	TCgtcataactaaggGA	11497
558_1	51	9	33	12	ATcgtcataactAAGG	11498
559_1	91	6	65	26	GTtagtatcttacATT	11525
560_1	30	3	41	8	CTCtatttttagtATC	11532
561_1	59	8	18	6	AGTatagagttaacTGT	11567
562_1	65	11	41	11	TTCCtggtgatacTT	11644
563_1	57	13	45	13	GTTCCttggtgatacTT	11645
564_1	57	15	30	7	TGttccctggtgatacCT	11646
565_1	17	4	35	4	ATaaacatgaatctCTCC	11801
566_1	16	3	30	4	CTTtataaacatgaaTCTC	11804
567_1	60	5	45	11	CTGtctttataaaCATG	11810
568_1	20	2	19	5	TTgttataaatctgTCTT	11820
569_1	68	9	44	4	TTAAattttatcttgGATA	11849
570_1	76	8	48	12	CTtaaattttatctTGGA	11851
571_1	62	5	66	5	CTTCttaaattttatctTG	11853
572_1	28	4	44	10	TATGttctcagtAAAG	11877
573_1	29	6	36	11	GAAttatcttaaACCA	11947
574_1	74	6	34	7	CCCttaaatttctaCA	11980
575_1	37	8	30	9	ACACTgtcttgtaCC	11995
576_1	45	14	27	6	TGAcacaactgctCTT	12000
577_1	2	1	12	5	TACAtttattggcTC	12081
578_1	65	14	39	9	GTacattttatGGCT	12082
579_1	34	4	53	12	TTGgtacatttatTGG	12085
580_1	41	7	35	6	CATGttggtacattTAT	12088
581_1	11	4	12	5	AATCatgttggtaAT	12092
582_1	96	16	48	9	AAatcatgttggtaCA	12093
583_1	71	15	42	13	GACaaatggattAA	12132
584_1	46	34	39	6	AAtgttcaatgttCCTC	12197
585_1	37	26	28	12	GCTtaatgttcagaTG	12201
586_1	75	8	43	12	CGTACatagcttgtaTG	12267
587_1	41	10	28	5	GTGaggaatttaggaTA	12753
588_1	41	5	27	9	GTAacaatatgttTG	12780
589_1	67	10	37	7	GAaatatgtttagaCTA	13151
590_1	97	10	80	12	TTGaaatattgttagAC	13153
591_1	64	10	47	9	AAgtcttagtaatTTGC	13217
592_1	84	7	60	9	GCTcagtagattatAA	13259

[0619]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
593_1	42	8	32	9	CATacactgttgcTAA	13296
594_1	101	6	79	17	ATGgtctcaaatcATT	13314
595_1	53	14	46	7	CAATgggtctcaaatCA	13316
596_1	47	6	36	6	TTCCtattgattgaCT	13568
597_1	97	12	41	6	TTTCtgttcacaacAC	13600
598_1	85	1	49	11	AGgaaccccactaaTCT	13702
599_1	56	3	34	7	TAAatggcaggaacCC	13710
600_1	15	4	24	8	GTAAtggcaggaaCC	13711
601_1	40	6	26	8	TTgttaaatggcagGAA	13713
602_1	59	12	26	6	TTatgagtttaggCATG	13835
603_1	62	2	42	10	CCAggtgaaacttAA	13935
604_1	77	9	55	18	CCCttagtcaagctCCT	13997
605_1	82	13	42	11	ACcccttagtcagCTCC	13998
606_1	74	1	39	10	CAcccttagtcagCTC	13999
607_1	76	9	30	8	TCTcttacttaggcTCC	14091
608_1	82	5	50	13	CCtatactgtcatcATG	14178
609_1	82	1	48	12	TCCtatctgtcatcAT	14179
610_1	41	6	50	13	GAGAagtgtgagaAGC	14808
611_1	70	5	84	19	CATCtttgaagttAG	14908
612_1	64	14	61	16	TAAtaagatggctCCC	15046
613_1	85	2	51	14	CAAggcataataaAGAT	15053
614_1	47	1	35	10	CCAaggcataatAAGA	15054
615_1	74	8	53	11	TGatccaatttcaCC	15151
616_1	63	4	41	11	ATGatccaatttctCAC	15152
617_1	46	7	42	9	CGCttcatcttacCC	15260
618_1	104	4	15	4	TAtgacactgcaTCTT	15317
619_1	8	3	8	5	GTAtgacactgcaTCT	15318
620_1	21	3	27	10	TGtatgacactgCATC	15319
621_1	37	7	38	11	TTCTtttctgttaagTC	15363
622_1	49	7	36	11	TTcttacagaggaACTA	15467
623_1	47	1	32	10	ACTacagtctacAGA	15474
624_1	78	8	69	6	TTCCcacaggtaaaTG	15561
625_1	70	7	ND	ND	ATTAtttgaatatactCATT	15594
626_1	73	7	49	25	TGGGaggaaatttatTTG	15606
627_1	80	5	64	11	TGACtcatcttaaaTG	15621
628_1	71	6	66	19	CTGactcatcttaaAT	15622
629_1	31	6	41	6	TTTactctgactcATC	15628
630_1	88	2	68	18	TATtgaggaaattATT	15642
631_1	53	2	27	6	GTAttggaggaaattAT	15643
632_1	23	3	39	7	TGgtatacttctctaagTAT	15655

[0620]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
633_1	42	9	33	3	GATCtttgtataCT	15666
634_1	38	1	30	16	CAgacaactctataCC	15689
635_1	10	2	19	3	AACATcagacaacTCTA	15693
636_1	13	1	11	3	TAACatcagacaacTC	15695
637_1	14	2	27	2	TTTAacatcagacaACTC	15695
638_1	101	14	81	16	ATtttaacatcagacAA	15698
639_1	14	1	17	1	CCtatttaacatcAGAC	15700
640_1	65	2	ND	ND	TCCctatttaacaTCA	15703
641_1	41	6	42	12	TCAAcgactattgGAAT	15737
642_1	37	2	29	5	CTTAtattctggcTAT	15850
643_1	31	7	35	4	ATCCtttatattctGC	15853
644_1	13	3	8	1	GAtcttatattCTGG	15854
645_1	25	5	20	4	TGAtcttatattCTG	15855
646_1	33	6	54	10	ATTGaaacttgaTCCT	15864
647_1	43	3	27	6	ACtgtcattgaaACTT	15870
648_1	54	7	32	12	TCTtactgtcattgAA	15874
649_1	12	1	25	2	AGgatcttactgtCATTT	15877
650_1	13	4	11	3	GCAaatcaactccATC	15896
651_1	10	5	16	3	GTGcaaataactCCA	15898
652_1	7	0	36	18	CAATTatttttttgTGC	15910
653_1	21	3	31	7	TGGcaacaatttattTCTT	15915
654_1	75	9	73	24	GCTggcaacaatTATT	15919
655_1	21	6	39	6	ATCCattttctactGCC	15973
656_1	25	3	38	8	TAATatctattgattTCTA	15988
657_1	14	2	11	5	TCaatagtgttagggCA	16093
658_1	11	4	10	3	TTCaatagtgttagggC	16094
659_1	18	1	32	12	AGGTtaattaattcaATAG	16102
660_1	33	7	25	10	CATtgtaatccCTAG	16163
660_2	64	14	31	8	CATtgtaatccTAG	16163
661_1	48	6	34	6	ACAtttgtaatccCTA	16164
662_2	29	6	23	5	AAcatttgtaatCCCT	16165
662_1	30	6	18	6	AAcatttgtaatCCCT	16165
663_1	49	1	26	6	TAaatttcaaggttCTG	16184
664_1	17	3	30	10	GTttaatttcaagTTCT	16185
665_1	22	7	40	9	CCAAgtttaaatttCAAG	16189
666_1	89	11	ND	ND	ACCCaagttaaaaTTTC	16192
667_1	60	16	87	8	CAtagtgcaccaagTTT	16199
668_1	65	9	50	12	ACatcccatacagTGA	16208
669_1	83	8	103	4	AGcacagtcataCATC	16219
670_1	80	9	150	36	ATAtagcacacgcTCTA	16223

[0621]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
671_1	57	14	ND	ND	TCCatatacgacagCT	16226
672_1	53	10	106	8	ATTtccatatAGCA	16229
673_1	78	3	96	14	TTTAttccatatAGCA	16231
674_1	77	9	31	7	TTTAttccatatAGC	16232
675_1	32	6	ND	ND	AAGGagaggagaTATG	16409
676_1	32	5	24	6	AGTcttgtgttagCT	16456
677_1	19	4	17	4	GAGtttgtgttaGC	16457
678_1	14	3	25	3	ATTaattatccatCCAC	16590
679_1	11	2	20	6	ATCaattaattatcCATC	16593
680_1	31	5	40	11	AGAatcaattaattaTCC	16596
681_1	8	3	30	10	TGagataccgtgcATG	16656
682_1	11	3	ND	ND	AAtgagataccTGCA	16658
683_1	15	3	33	10	CTGtggttagctaAT	16834
684_1	45	7	38	7	AagagtaagggtctgtggTT	16842
685_1	24	5	ND	ND	GATGggttaagagTAA	16854
686_1	11	2	ND	ND	AGCagatgggtaaGA	16858
687_1	ND	ND	51	7	TGtaaacatggTAGC	16886
688_1	83	1	54	11	CCTgcttataatgTA	16898
689_1	103	4	73	14	TGCCtgcgtataaAT	16901
690_1	104	2	64	22	TCttcttagttcaaTA	16935
691_1	ND	ND	60	9	TGgttctactACAT	16980
692_1	ND	ND	94	22	AGtttgtttctaaCTA	16983
693_1	8	2	17	5	GAAtgaaacttgcCTG	17047
694_1	98	6	51	9	ATTatccttacatGAT	17173
695_1	48	4	18	4	GTacccaattatcCTT	17180
696_1	94	2	48	9	TGTacccaattatCCT	17181
697_1	31	5	42	13	TTgtacccaattatTCC	17182
698_1	41	4	39	6	TTTgtacccaattatTC	17183
699_1	63	0	28	12	AGCAGcagggtataTT	17197
700_1	99	6	43	12	TGGaaagtggctGGG	17292
701_1	103	2	28	5	CTGgagagtgataaTA	17322
702_1	52	6	27	9	AATGctggattacgTC	17354
703_1	67	3	37	7	CAatgcgtggattacGT	17355
704_1	36	10	80	12	TTgttcagaagtATCC	17625
705_1	19	9	47	9	GAAtgattgcGGAG	17646
706_1	44	NA	60	9	GAAtcatcacaACC	17860
707_1	46	9	32	9	TTGtaacatctacTAC	17891
708_1	56	0	79	17	CATtaaggcagcaagTT	17923
709_1	30	9	46	7	TTActagatgtgagCA	17942
710_1	29	4	36	6	TTtactagatgtgAGC	17943

[0622]

화합물 번호	KARPAS-299 세포 5 μM CMP		THP1 세포 20 μM CMP		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	대조군의 % mRNA	sd	대조군의 % mRNA	sd		
711_1	41	13	41	6	GACcaaggcaccttaCA	17971
712_1	36	19	49	11	AGAccaaggcacctTAC	17972
713_1	30	6	34	7	ATgggttaataAAGG	18052
714_1	70	2	24	8	TCaaccagagtattAA	18067
715_1	11	4	26	8	GTCaaccagagtatTA	18068
716_1	126	56	26	6	ATtgtaaagctgaTAT	18135
717_1	73	1	42	10	CAcataatgttaAAGC	18141
718_1	23	9	55	18	GAggtctgttattTAC	18274
719_1	50	1	42	11	TGtagattcaatgCCT	18404
720_1	79	3	39	10	CCtattataactaTGA	18456
721_1	27	6	30	8	CCttatgttatgacAC	18509
722_1	26	7	50	13	TCCTtatgttatgaCA	18510
723_1	59	1	48	12	AAGatgttaagtATA	18598
724_1	54	2	50	13	CTgattattaaggATGT	18607
725_1	92	10	84	19	TGgaaaggatgaaTT	18808
726_1	24	8	61	16	ACTtgaatggcttgGA	18880
727_1	8	4	51	14	AACTtgaatggctTGG	18881
728_1	35	4	35	10	CAATgtttactatTT	19004
729_1	36	9	53	11	ACAatgtgtactATT	19005
730_1	70	2	41	11	CATCtgcataataGA	19063
731_1	38	NA	42	9	CCTAgagcaaatacTT	19223
732_1	102	15	15	4	CAGagttataatAAG	19327
733_1	37	10	8	5	GTTCaaggcacaaacgAA	19493
734_1	13	1	38	11	AGggttcaaggcacAAC	19496
735_1	49	NA	36	11	TGttggagactgTT	19677
736_1	48	NA	32	10	AAGgaggagttaggAC	19821
737_1	36	NA	64	11	CTATgccatttacgAT	19884
738_1	105	19	66	19	TCaaatgcagaattAG	19913
739_1	44	NA	41	6	AGtgacaatcaaATGC	19921
740_1	107	NA	68	18	AAgtgacaatcaaATG	19922
741_1	102	4	27	6	GTGtaccaagtaaacAA	19978
742_1	110	10	30	16	TGGgatgttaaacTGA	20037

[0623]

실시예 2 - 투여량 반응 곡선에서 시험관내 효능 시험

[0625]

표 10으로부터의 올리고뉴클레오티드의 선택을 실시예 1에 기술된 시험관내 효능 검정에서 PBS 중 반-로그 연속 희석(50 μM, 15.8 μM, 5.0 μM, 1.58 μM, 0.5 μM, 0.158 μM, 0.05 μM로부터 0.0158 μM까지의 올리고뉴클레오티드)을 사용하여 카르파스-299 세포에서 시험하였다. IC50 및 최대 억제(% 잔류 PD-L1 발현)를 올리고뉴클레오티드에 대해 평가하였다.

[0626]

EC50 계산을 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 6에서 수행하였다. IC50 및 최대 PD-L1 녹다운 수준은 대조군(PBS-처리된 세포)의 %로서 표 11에 제시된다.

[0627]

[표 11]

[0628] 염수의 %인 최대 억제 및 카르파스-299 세포주에서의 EC50.

화합물 번호	최대 억제 (% 잔류 PD-L1 발현; % 차리된 염수)		EC50 (μM)		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	Avg	SD	Avg	SD		
6_1	11	3.3	0.69	0.11	TCGCataagaatgaCT	371
8_1	29	1.7	0.06	0.01	CTGaacacacacagtCGC	383
9_1	19	1.7	0.23	0.02	TCTgaacacacacagtCG	384
13_1	14	4.7	0.45	0.12	CTtacttagatgcTGC	495
41_1	10	1.8	0.19	0.02	TCAtttagttaccCAA	822
42_1	17	1.3	0.19	0.02	TTcatttagttaCCCA	823
58_1	23	1.5	0.17	0.01	CCagagatatataTGC	909
77_1	24	2.4	0.16	0.02	AGTatcatagttcTCC	1075
92_1	12	2.4	0.25	0.03	AGattaaggacagtTGA	1310
111_1	3	2.0	0.27	0.03	TGaattcccatatcCGA	1992
128_1	11	1.8	0.25	0.03	CTcatatcagggCAGT	2063
151_1	16	2.7	0.28	0.05	GTCatggattacaaCT	2324
164_1	19	1.6	0.15	0.01	TCTGtttatgtcacTG	2781
166_1	36	1.7	0.11	0.02	TGgtctgttatGTCA	2784
169_1	10	1.6	0.22	0.02	TTcagcaaatatTCGT	2995
171_1	12	2.0	0.21	0.02	TCTattgttaggtATC	3053
222_1	1	2.0	0.21	0.02	TGacttgtaattgTGG	5467
233_1	1	4.3	0.89	0.17	TGGaatgccctaATA	5591
245_1	4	2.0	0.17	0.02	TCggttatgttaTCAT	6470
246_1	7	2.1	0.25	0.03	CActttatctggTCGG	6482
250_1	0	2.5	0.23	0.03	CCacatataggtcCTT	6597
251_1	0	2.8	0.75	0.10	CAtattgttaccaTAC	6617
252_1	3	2.2	0.19	0.02	TCAattgttaccaATA	6618
256_1	5	2.2	0.32	0.03	CAAttgtgcagcCAG	6672
272_1	1	3.2	0.69	0.10	TACTgtagaacatgGC	7133
273_1	3	2.8	0.28	0.04	GCAAttcatattgaTCT	7239
287_1	1	1.4	0.13	0.01	ACAAataatggtaCTCT	7302
292_1	2	2.1	0.21	0.02	GCATttgatataAGA	7397
303_1	0	1.2	0.21	0.01	CAAgatgaatataTGCC	7551
314_1	3	2.1	0.39	0.04	GAgtttggatttagCTG	7764
318_1	3	1.4	0.14	0.01	ACAggatatggaaGGG	7880
320_1	2	2.4	0.22	0.03	GAgttaattcaacAGG	7891
324_1	0	2.4	0.44	0.05	CAgcttactattaGGG	7906
336_1	0	2.5	0.21	0.03	GATGatttaattctagtCA	7984
342_1	1	2.2	0.12	0.01	CAGAttgtatggtagTT	8030
343_1	4	1.8	0.11	0.01	CTcagatgtatGTAG	8032
344_1	0	0.9	0.12	0.01	GTTagccctcagaTTG	8039

[0629]

화합물 번호	최대 억제 (% 잔류 PD-L1 발현; % 처리된 염수)		EC50 (μM)		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	Avg	SD	Avg	SD		
345_1	0	2.3	0.36	0.04	TGtattgttagcCCTC	8045
346_1	1	2.1	0.22	0.02	ACttgtattgttAGCC	8048
349_1	4	2.9	0.21	0.03	ACAagtggtatctTCT	8228
359_1	6	2.9	0.39	0.05	TTGAtgaggctaagTC	8395
360_1	0	1.7	0.18	0.02	CCAggatataactcTT	8439
374_1	5	1.7	0.33	0.03	AAGatggattggaaGT	8775
408_1	3	1.8	0.21	0.02	TTtgcataatgaaGGTG	8966
409_1	0	1.8	0.21	0.02	AAgtgaagtcaaCAGC	8997
415_1	0	1.4	0.23	0.02	AAttgagtgaatCAA	9120
417_1	7	0.9	0.15	0.01	GTGataattgagtGAA	9125
424_1	6	3.2	0.19	0.03	CTcattgaaggdTCTG	9281
429_1	5	2.5	0.48	0.05	CAAatagcttatCGG	9335
430_1	1	2.7	0.68	0.09	CCaaatagcttATCG	9336
458_1	0	4.1	0.35	0.07	TGgagtttatattcTAGG	9512
464_1	0	4.1	0.56	0.10	TGCtccagtgtaaccCT	9755
466_1	1	2.1	0.21	0.02	CTAattgttagtaCTC	9818
474_1	0	2.4	0.27	0.03	GACacactcagattcAG	9967
490_1	0	1.9	0.29	0.03	TTActtaattcttTGGA	10055
493_1	3	1.8	0.20	0.02	CTTatgataacaacTTA	10384
512_1	0	3.3	0.63	0.10	GCacaacccagaggAA	10735
519_1	5	1.5	0.15	0.01	TAgatttgtgagGTAA	11055
529_1	0	2.7	0.24	0.03	AGAgctttattcatgtTT	11197
533_1	6	1.5	0.14	0.01	TAGattgttttagtGCA	11228
534_1	5	0.9	0.06	0.00	GTagattgtttaGTGC	11229
547_1	1	1.6	0.26	0.02	TAGGataccacattatGA	11389
566_1	0	3.0	0.40	0.06	ATaaacatgaatctCTCC	11801
567_1	2	2.5	0.34	0.04	CTTtataaacatgaaTCT C	11804
578_1	2	1.3	0.09	0.01	TACAttatttggcTC	12081
582_1	1	1.6	0.20	0.02	AATCatgttgttacAT	12092
601_1	1	2.1	0.47	0.05	GTAAatggcaggaaCC	13711
619_1	4	3.4	0.44	0.08	TAtgacactgcaTCTT	15317
620_1	1	1.2	0.12	0.01	GTAtgacactgcaTCT	15318
636_1	0	1.3	0.19	0.01	AACAtcagacaacTCTA	15693
638_1	0	2.2	0.36	0.04	TAACatcagacaacTC	15695
637_1	0	2.1	0.21	0.02	TTTAacatcagacaACTC	15695
640_1	2	3.3	0.42	0.06	CCTtattaacatcAGAC	15700
645_1	1	2.9	0.34	0.04	GAtccttatattCTGG	15854
650_1	0	2.4	0.24	0.03	AGgatcttactgtCATT	15877
651_1	4	3.4	0.33	0.05	GCAaatcaactccATC	15896

[0630]

화합물 번호	최대 억제 (% 잔류 PD-L1 발현; % 처리된 염수)		EC50 (μM)		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	Avg	SD	Avg	SD		
652_1	0	1.3	0.16	0.01	GTGcaaatcaactCCA	15898
653_1	4	2.0	0.09	0.01	CAATtattttttgTGC	15910
658_1	3	1.6	0.32	0.02	TCaatagtgttagggCA	16093
659_1	5	1.4	0.20	0.01	TTCaatagtgttagggGC	16094
660_1	4	2.1	0.22	0.02	AGGTtaatttaattcaATA G	16102
665_1	3	1.8	0.18	0.02	GTTtaaatttcaagTTCT	16185
678_1	3	2.1	0.43	0.04	GAgttcttggttaGC	16457
679_1	0	3.5	0.31	0.05	ATTaatttatccatCCAC	16590
680_1	4	1.6	0.12	0.01	ATCaattaatttatcCATC	16593
682_1	3	2.4	0.27	0.03	TGagataccgtgcTG	16656
683_1	0	3.2	0.16	0.03	AAtgtgataccgTGCA	16658
684_1	2	2.3	0.25	0.03	CTGtggtaggctaAT	16834
687_1	5	1.3	0.13	0.01	AGCagatgggttaaGA	16858
694_1	0	1.7	0.16	0.02	GAAtgaaacttgcCTG	17047
706_1	15	3.6	0.27	0.06	GAtgtttgttGGAG	17646
716_1	10	2.1	0.15	0.02	GTCaaccagagtatTA	18068
728_1	5	1.2	0.09	0.01	AACttgaatggctTGG	18881
733_1	0	12.7	8.01	3.62	CAGagttataataAAG	19327
734_1	0	14.6	3.49	2.39	GTTCaaggcacaacgAA	19493
735_1	0	2.5	0.30	0.04	AGggttcaaggcacAAC	19496

[0631]

[0632] 실시예 1에 기술된 시험관내 효능 검정에서 25 μM로부터 0.004 μM까지의 1:3 연속물을 사용하여 표 6으로부터의 올리고뉴클레오티드의 선택을 THP-1 세포에서 시험하였다. IC50 및 최대 억제(% 잔류 PD-L1 발현)를 올리고뉴클레오티드에 대해 평가하였다.

[0633]

EC50 계산을 그래프패드 프리즘 6에서 수행하였다. IC50 및 최대 PD-L1 녹다운 수준은 대조군(PBS-처리된 세포)의 %로서 표 12에 제시된다.

[0634]

[표 12]

[0635]

염수의 %인 최대 억제 및 THP1 세포주에서의 EC50.

화합물 번호	최대 억제 (% 잔류 PD-L1 발현; % 염수)		EC50 (μM)		화합물 (CMP)	서열번호 1 상의 개시
	Avg	SD	Avg	SD		
6_1	12	11.5	0.73	0.38	TCGCataagaatgaCT	371
8_1	6	5.6	0.11	0.04	CTGaacacacagtCGC	383
9_1	1	14.3	0.36	0.27	TCTgaacacacagtCG	384
13_1	2	12.4	0.49	0.31	CTtacttagatgcTGC	495
41_1	14	14.6	0.38	0.27	TCAtttagttaccCAA	822
42_1	21	10.4	0.22	0.10	TTcatttagttacCCA	823
58_1	6	19.8	0.97	0.81	CCagagatataaTGC	909
77_1	5	4.8	0.14	0.04	AGTatcatagttcTCC	1075
92_1	0	12.9	0.57	0.39	AGattaagacagtTGA	1310
128_1	15	10.1	0.23	0.13	CTcatatcagggCAGT	2063
151_1	9	14.4	0.18	0.15	GTCatggattacaCT	2324
164_1	16	22.0	0.57	0.60	TCTGtttatgtcacTG	2781
166_1	13	11.9	0.17	0.11	TGgtctgttatGTCA	2784
169_1	0	9.3	0.22	0.11	TTcagcaaatatTCGT	2995
171_1	11	12.9	0.28	0.20	TCTattgttaggtATC	3053
222_1	16	19.7	0.68	0.64	TGacttgttaatgTGG	5467
245_1	14	6.1	0.26	0.08	TCggatatgttaTCAT	6470
246_1	28	7.3	0.10	0.20	CActtatctggTCGG	6482
252_1	19	8.0	0.29	0.12	TCAtattgttaccATA	6618
272_1	3	9.7	0.25	0.14	TACTgttagaacatgGC	7133
314_1	13	9.6	0.31	0.15	GAgtttggattagCTG	7764
344_1	11	8.0	0.14	0.06	GTTagccctcagaTTG	8039
349_1	12	12.5	0.18	0.14	ACAagtggatctTCT	8228
415_1	11	9.6	0.26	0.12	AAttgagtgaatCCAA	9120
493_1	15	16.5	0.48	0.34	CTTatgataacaacTTA	10384
512_1	43	14.1	0.31	0.68	GCacaacccagaggAA	10735
519_1	9	12.2	0.45	0.26	TAgatttgttagtGCA	11055
533_1	11	13.6	0.29	0.21	TAGatttgttagtGCA	11228
534_1	9	6.5	0.09	0.03	GTagattgttaGTGC	11229
582_1	0	12.3	0.33	0.23	AATCatgttggtacAT	12092
619_1	8	10.4	0.32	0.18	TAtgacactgcaTCTT	15317
620_1	12	24.6	1.10	1.08	GTAtgacactgcaTCT	15318
638_1	2	5.4	0.00	0.00	TAACatcagacaacTC	15695
645_1	20	29.6	1.10	1.50	GATccttatattCTGG	15854
651_1	0	11.2	0.14	0.09	GCAaatcaactccATC	15896
658_1	11	13.8	0.48	0.32	TCaatagtgttaggCA	16093
659_1	0	8.2	0.11	0.06	TTCAatagtgttaggGC	16094
733_1	0	69.6	11.03	26.95	CAGagttaataatAAG	19327
734_1	36	16.8	2.84	2.12	GTTCaagcacaacgAA	19493

[0636]

표 7 및 8의 결과는 또한 서열번호 1의 PD-L1 미성숙 mRNA를 표적으로 하는 이들의 위치에 관하여 도 2에 도시된다.

[0637]

이것으로부터, 거의 모든 화합물이 1 μM 미만의 EC50 값 및 대조군 세포(염수로 처리됨)에서 PD-L1 발현 수준의 25% 미만의 표적 녹다운을 가짐이 보여질 수 있다.

[0638]

실시예 3 - 네이키드 및 GalNAc 접합된 PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하는 폴리(I:C) 유도된 마우스에서 시험관내 효력 및 효능 및 생체내 PD-L1 감소.

[0640]

표 6의 올리고뉴클레오티드 접합체를 사용하는 MCP-11 세포에서의 투여량-반응 연구에서 효능 및 효력 시험을 시험관내 실험으로 수행하였다. 동일한 올리고뉴클레오티드 및 GalNAc 접합된 베픽(표 8 화합물 번호 755_2 내지 765_2)을 PD-L1 mRNA 및 단백질 발현을 감소시키는 이들의 능력에 대해 폴리(I:C) 유도된 C57BL/6J 암컷 마우스에서 생체내 시험하였다.

[0641]

시험관내 검정

[0642]

10% 말 혈청, 2 mM L-글루타민, 0.025 mg/mL 젠타미신 및 1 mM 나트륨 피루베이트가 보충된 DMEM(시그마 카탈로 그 번호 D0819)에 혼탁된 MCP-11 세포(원래 ATCC로부터 구입함)를 8,000 세포/웰의 밀도로 96-웰 환저 플레이트 내의 올리고뉴클레오티드(10 μL)에 첨가하였고, 5% CO₂를 갖는 37°C의 가습된 인큐베이터에서 200 μL/웰의 최종 부피로 3일 동안 배양하였다. 올리고뉴클레오티드는 투여량-범위 농도(50 μM, 15.8 μM, 5.0 μM, 1.58 μM, 0.5 μM, 0.158 μM, 0.05 μM 및 0.0158 μM)로 선별되었다.

[0643]

제조사의 지시에 따라 퓨어링크 프로 96 RNA 정제 키트(암바이온)를 사용하여 전체 mRNA를 추출하였다. 제조사의 지시에 따라서 M-MLT 역전사효소, 랜덤 10량체 레트로스크립트, RNase 억제제(암바이온) 및 100 mM dNTP 세트(인비트로겐, PCR 등급)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자 발현 분석을 위하여, PD-L1(써모 피셔 사이언티픽; FAM-MGB Mm00452054-m1) 및 Gusb(써모 피셔 사이언티픽; VIC-MGB-PL Mm01197698-m1)에 대한 타크만 프라이머 검정으로 설정된 듀플렉스에서 타크만 패스트 어드밴스드 마스터 믹스(2X)(암바이온)를 사용하여 qPCR을 수행하였다. 상대적인 PD-L1 mRNA 발현 수준은 PBS 대조군 샘플(PBS-처리된 세포)의 %에서 잔류 PD-L1 발현의 %로서 표 9에 제시된다. EC50 계산을 그래프패드 프리즘 6에서 수행하였다. EC50 및 최대 PD-L1 녹다운 수준은 대조군(PBS) 세포의 %로서 표 13에 제시된다.

[0644]

생체내 검정

[0645]

C57BL/6J 암컷 마우스(20 내지 23 g; 군 당 5 마리 마우스)에 마우스 PD-L1에 대한 5 mg/kg 비접합된 올리고뉴클레오티드 또는 마우스 PD-L1에 대한 2.8 mg/kg Ga1NAc-접합된 올리고뉴클레오티드를 s.c. 주사하였다. 3일 후, 마우스에 10 mg/kg 폴리(I:C)(LWM, 인비보젠)를 i.v. 주사하였다. 마우스를 폴리(I:C) 주사 후 5시간에 희생시켰고, 간 샘플을 RNA 추출 동안 RNAlater(써모 피셔 사이언티픽)에 위치시키거나 단백질 추출 동안 드라이 아이스에 냉동하였다.

[0646]

전체 mRNA를 제조사의 지시에 따라 퓨어링크 프로 96 RNA 정제 키트(암바이온)를 사용하여 균질화된 간 샘플로부터 추출하였다. cDNA를, 제조사의 지시에 따라 M-MLT 역전사효소, 랜덤 10량체 레트로스크립트, RNase 억제제(암바이온) 및 100 mM dNTP 세트(인비트로겐, PCR 등급)를 사용하여 합성하였다. 유전자 발현 분석을 위해, PD-L1 mRNA(써모 피셔 사이언티픽; FAM-MGB Mm00452054-m1) 및 TBP(써모 피셔 사이언티픽; VIC-MGB-PL Mm00446971_m1)에 대한 타크만 프라이머 검정으로 설정된 듀플렉스에서 타크만(등록상표) 패스트 어드밴스드 마스터 믹스 타크만 패스트 어드밴스드 마스터 믹스(2X)(암바이온)를 사용하여 qPCR을 수행하였다. 상대적인 PD-L1 mRNA 발현 수준은 염수 및 폴리(I:C)가 주사된 마우스로부터의 대조군 샘플의 %로서 표 13에 제시된다.

[0647]

1x 홀트(Halt) 프로테아제 억제제 캐테일(EDTA-부재)(써모 피셔 사이언티픽)과 혼합된 100 mg 조직 T-PER(등록상표) 조직 단백질 추출 시약(써모 피셔 사이언티픽)에 대해 2 mL로 간 샘플을 균질화시킴으로써 간 균질 혼탁액을 제조하였다. 제조사의 지시에 따라 쿠마시 플러스(Coomassie Plus)(브래드포드(Bradford)) 검정 시약(써모 사이언티픽(Thermo Scientific))을 사용하여 간 균질 혼탁액 중 단백질 농도를 측정하였다. 간 균질 혼탁액(40 μg 단백질)을 1x MOPS 실행 완충액 중에서 4 내지 12% 비스-트리스 폴리아크릴아미드 겔(써모 피셔 사이언티픽) 상에서 분리하고, 제조사의 지시에 따라 아디블롯 드라이(iBLOT Dry) 블로팅 시스템(써모 피셔 사이언티픽)을 사용하여 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 각각의 블롯을 64 kDa 밴드에 수평적으로 2개의 부분으로 절단하였다. 5% 탈지유 및 0.05% 트윈(Tween)20을 함유하는 TBS 중에서 차단한 후, 5% 탈지유 및 0.05% 트윈20을 함유하는 TBS 중에서 1:10,000 희석된 토끼 단클론성 항-빈콜린(암캡(Abcam) 카탈로그 번호 ab129002) (상부 막) 또는 1:1,000 희석된 염소 다클론성 항-mPD-L1(알앤디 시스템스(R&D Systems) 카탈로그 번호 AF1019)과 함께 막을 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 0.05% 트윈20을 함유하는 TBS에서 세척하였고, 5% 탈지유 및 0.05% 트윈20을 함유하는 TBS 중에서 1:3,000 희석된 HRP-접합된 돼지 항-토끼 IgG(다코(DAKO))(상부 막) 또는 1:2,000 희석된 HRP-접합된 토끼 항-염소 IgG(다코)에 실온에서 1시간 동안 노출시켰다. 막의 세척 후, ECL 실렉트(select)(아머샴(Amersham) 지이 헬스케어)를 사용하여 반응성을 검출하였다. 올리고뉴클레오티드로 처리된 각각의 마우스 군의 경우, 빈콜린 밴드에 관한 PD-L1 밴드의 강도를 염수 및 폴리(I:C)(대조군)가 주사된 마우스의 PD-L1/빈콜린 밴드 강도와 비교함으로써 평가하였다. 결과를 표 13에 제시하고, 네이키드 및 접합된 올리고뉴클레오티드의 쌍에 의한 웨스턴블롯을 도 9의 A 내지 E에 도시한다.

[0648]

[표 13]

[0649]

마우스 PD-L1에 대한 올리고뉴클레오티드 접합체의 시험관내 및 생체내 효능.

화합물 번호	화합물 (CMP)	최대 억제(PBS 의 %)	EC50 (μM)	PD-L1 mRNA (대조군의 %)	PD-L1 단백질 (대조군을 기준으로)
744_1	AGTttacatttcTGC	9.1	0.56	86	++
746_1	CACcttaaaaccCCA	5.0	0.46	181	nd
747_1	TCCttataatcaCAC	4.4	0.52	104	++
748_1	ACGgtatccacAGG	1.8	0.26	102	+++
749_1	GACactacaatgaGGA	7.6	1.21	104	nd
750_1	TGGtttttaggacTGT	12.4	0.74	84	nd
751_1	CGAcaaattctatCCT	9.9	0.69	112	nd
752_1	TGAtatacaatgcTAC	10.5	1.11	142	+++
753_1	TCGttgggtaaatTTA	5.7	0.53	116	+++
754_1	TGCTtataaatgGTG	5.2	0.35	98	nd
755_2	5'-GN2-C6-caAGTttacatttcTGC	nd	nd	58	+
757_2	5'-GN2-C6-caCACcttaaaaccCCA	nd	nd	62	nd
758_2	5'-GN2-C6-caTCCTtataatcaCAC	nd	nd	53	+
759_2	5'-GN2-C6-caACGgtatccacAGG	nd	nd	66	+
760_2	5'-GN2-C6-caGACactacaatgaGGA	nd	nd	101	nd
761_2	5'-GN2-C6-caTGGtttttaggacTGT	nd	nd	99	nd
762_2	5'-GN2-C6-caCGAcaaattctatCCT	nd	nd	84	nd
763_2	5'-GN2-C6-caTGAtatacaatgcTAC	nd	nd	93	+++
764_2	5'-GN2-C6-caTCGttgggtaaatTTA	nd	nd	53	+
765_2	5'-GN2-C6-caTGCTtataaatgGTG	nd	nd	106	nd

[0650]

+++ : 대조군의 PD-L1/빈콜린 밴드 강도와 유사함; ++ : 대조군의 PD-L1/빈콜린 밴드 강도보다 약함; + : 대조군의 PD-L1/빈콜린 밴드 강도보다 훨씬 약함; nd = 측정되지 않음.

[0652]

표 13의 데이터로부터, 올리고뉴클레오티드의 GalNAc 접합이 생체내 PD-L1 감소를 명백히 개선함을 알 수 있다. mRNA의 감소는 일반적으로 PD-L1 단백질의 감소와 관련된다. 화합물 번호 754_1을 제외하고는, 낮은 시험관내 EC50 값은 일반적으로 올리고뉴클레오티드가 GalNAc에 접합되는 경우 양호한 생체내 PD-L1 mRNA 감소를 반영한다.

[0653]

실시예 4 - 폴리(I:C) 유도된 마우스로부터 분류된 간세포 및 비-실질 세포에서의 생체내 PK/PD

네이키드 및 GalNAc 접합된 올리고뉴클레오티드의 분포 및 PD-L1 mRNA 감소를 폴리(I:C) 유도된 마우스로부터 단리된 간세포 및 비-실질 세포에서 조사하였다.

[0655]

C57BL/6J 암컷 마우스(군 당 n = 3)에 마우스 PD-L1 mRNA를 표적으로 하는 5 mg/kg 비접합된 올리고뉴클레오티드(748_1) 또는 7 mg/kg GalNAc-접합된 올리고뉴클레오티드(759_2)를 s.c. 주사하였다. 2일 후, 마우스에 15 mg/kg 폴리(I:C)(LWM, 인비보겐)를 i.p. 주사하였다. 폴리(I:C) 주사 후 18 내지 20시간에 마우스를 마취하였고, 5분 동안 15 mM 혜페스 및 0.38 mM EGTA를 함유하는 행크 균형 염 용액 및 이어서 12분 동안 콜라게나제 용액(0.17 mg/mL 콜라게나제 유형 2(Worthington) 4176), 0.03% BSA, 3.2 mM CaCl₂ 및 1.6 g/L NaHCO₃을 함유하는 행크 균형 염 용액(을 사용하여 대정맥을 통해 1분 당 7 mL의 유량으로 간을 관류하였다. 관류 후, 간을 제거하고, 간 캡슐을 개봉하고, 간 혼탁액을, 윌리암(William) E 매질을 사용하여 70 μm 세포-여과기를 통해 여과하였고, 세포 혼탁액의 분획(혼합된 간 세포)을 추후 분석을 위해 제거하였다. 세포 혼탁액의 나머지를 50 xg로 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 비-실질 세포의 추후 정체를 위해 수집하였다. 웰렛을 25 mL 윌리암 E 매질(1x 펜/스트렙(Pen/Strep), 2 mM L-글루타민 및 10% FBS(ATCC #30-2030)가 보충된 시그마 카탈로그 번호 W1878)에 재현탁하였고, 90% 퍼콜을 함유하는 25 mL 윌리암 E 매질과 혼합하였고, 간세포를 10분 동안 50 xg의 원심분리에 의해 침전시켰다. 윌리암 E 매질 중에서의 2회 세척에 이어서, 침전된 간세포를 윌리암 E 매질에 재현탁하였다. 비-실질 세포를 함유하는 상청액을 7분 동안 500 xg로 원심분리하고, 세포를 4 mL RPMI 매질에 재현탁하였고, 1,800 xg로 30분 동안 퍼콜의 2개의 층(25% 및 50% 퍼콜)을 통해 원심분리하였다. 2개의 퍼콜 층 사이의 비-실질 세포의 수집 후, 세포를 세척하고, RPMI 매질에 재현탁하였다.

[0656]

전체 mRNA를, 제조사의 지시에 따라 퓨어링크 프로 96 RNA 정제 키트(암바이온)를 사용하여 정제된 간세포, 비-실질 세포 및 전체 간 혼탁액(비-분별된 간 세포)으로부터 추출하였다. M-MLT 역전자효소, 랜덤 10량체 레트로

스크립트, RNase 억제제(암바이온) 및 100 mM dNTP 세트(인비트로겐, PCR 등급)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자 발현 분석을 위해, PD-L1(씨모 피셔 사이언티픽; FAM-MGB Mm00452054-m1) 및 TBP(씨모 피셔 사이언티픽; VIC-MGB-PL Mm00446971_m1)에 대한 타크만 프라이머 검정으로 설정된 듀플렉스에서 타크만 패스트 어드밴스드 마스터 믹스(2X)(암바이온)를 사용하여 qPCR을 수행하였다. 상대적인 PD-L1 mRNA 발현 수준을 염수 및 폴리(I:C)가 주사된 마우스로부터의 대조군 샘플의 %로서 표 10에 제시한다.

[0657]

서열 5'-TACCGT-s-Bio-3'를 갖는 바이오티닐화된 캡쳐 프로브 및 서열 5'-DIG-C12-S1-CCTGTG-3'를 갖는 다이呱 시제닌 접합된 검출 프로브를 사용하는 ELISA를 사용하여 올리고뉴클레오티드 함량 분석을 수행하였다. 상기 프로브는 포스포다이에스터 골격을 갖는 LNA만으로 이루어졌다. 간 샘플(약 50 mg)을, 1개의 5 mm 스테인레스 강 비드를 함유하는 2 mL 에펜도르프(Eppendorf) 투브 중에서 1.4 mL MagNa 순수한 용해 완충액(로슈 카탈로그 번호 03604721001)에서 균질화시켰다. 균질한 용해물이 수득될 때까지, 샘플을 레취(Retsch) MM400 균질화기(메르크 유로랩(Merck Eurolab)) 상에서 균질화시켰다. 샘플을 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 정의된 농도의 비접합된 안티센스 올리고뉴클레오티드 화합물(화합물 번호 748_1)을 비처리된 간으로 스파이킹하고, 이들을 샘플로서 가공함으로써, 표준을 생산하였다. 기대되는 샘플 올리고 함량(약 10배 이내)에 부합하도록 스파이크(Spike-in) 농도를 선택한다.

[0658]

균질화된 샘플을 5 x SSCT 완충액(0.05%(v/v) 트윈-20을 함유하는 750 mM NaCl 및 75 mM 나트륨 시트레이트, pH 7.0) 중에서 최소 10배로 희석하였고, 캡쳐-검출 용액(5x SSCT 완충액 중 35 nM 캡쳐 프로브 및 35 nM 검출 프로브)을 사용하는 6회 2배 희석의 희석 시리즈를 수행하였고, 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 각각의 웰에 100 μL를 갖는 96 웰 스트렙타비딘 코팅된 플레이트(눈크(Nunc) 카탈로그 번호 436014)에 샘플을 옮겼다. 플레이트를 천천히 교반하면서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 2x SSCT 완충액으로 3회 세척하고, PBST(0.05%(v/v) 트윈-20을 함유하는 포스페이트 완충된 염수, pH 7.2, 새로이 제조됨)에 1:4,000으로 희석된 100 μL 항-DIG-AP Fab 단편(로슈 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science), 카탈로그 번호 11 093 274 910)을 각각의 웰에 첨가하였고, 천천히 교반하면서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 2x SSCT 완충액으로 3회 세척하고, 100 μL의 알칼리성 포스파타제(AP) 기질 용액(블루 포스(Blue Phos) 기질, KPL 제품 코드 50-88-00, 새로이 제조됨)을 첨가하였다. 색 강도를 천천히 교반하면서 30분 동안 항온처리한 후 615 nm에서 분광광도계로 측정하였다. 원 데이터를 판독기(Gen5 2.0 소프트웨어)로부터 엑셀 형식으로 보내고, 엑셀에서 추가로 분석하였다. 그래프패드 프리즘 6 소프트웨어를 사용하여 표준 곡선 및 로지스틱 4PL 회귀 모델을 생산하였다.

[0659]

[표 14]

[0660]

비-접합된 및 GaINAc-접합된 올리고뉴클레오티드로 처리된 폴리(I:C) 마우스로부터의 전체 간 혼탁액, 간세포 및 비-실질 세포에서의 PD-L1 발현 및 올리고 함량, n=3.

세포 유형	화합물 번호	PD-L1 발현 (염수-폴리(I:C)의 %)		올리고 함량 (ng/10 ⁵ 세포)	
		Avg	SD	Avg	SD
간 전체	748_1	31	12.4	2.3	0.3
	759_2	28	5.3	8.3	1.1
간세포	748_1	33	8.0	5.1	3.7
	759_2	7	1.0	43.8	18.9
비-실질 세포	748_1	31	10.1	2.2	0.7
	759_2	66	1.6	1.7	0.9

[0661]

상기 결과는 네이키드(화합물 번호 748_1) 및 접합된(화합물 번호 759_2) 올리고뉴클레오티드가 전체 간 세포에서 PD-L1 mRNA를 동등하게 잘 감소시킴을 나타낸다. 단리된 간세포에서, 접합된 올리고뉴클레오티드의 효과는 네이키드 올리고뉴클레오티드의 효과보다 거의 5배 강하지만, 네이키드 올리고뉴클레오티드는 비-실질 세포에서 GaINAc-접합된 올리고뉴클레오티드보다 2배 강한 효과를 나타냈다. 간세포 및 비-실질 세포에서, PD-L1 mRNA 발현의 감소는 이러한 세포 유형에서 올리고뉴클레오티드 함량과 일부 정도까지 관련된다.

[0663]

실시예 5 - 네이키드 및 GaINAc 접합된 PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하는 AAV/HBV 마우스에서의 생체내 PD-L1 녹다운

[0664]

본 연구에서, AAV/HBV 마우스를 네이키드로 처리하거나 GaINAc PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드에 접합하고,

PD-L1 mRNA 발현 및 HBV 유전자 발현을 간에서 평가하였다.

[0665] 암컷 HLA-A2/DR1 마우스(5 내지 8주령)(군 당 5 마리의 동물)를 -1주에 비히클(염수), 네이키드 PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드(5 mg/kg s.c.로 화합물 번호 752_1) 및 GalNAc PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드(7 mg/kg s.c.로 화합물 번호 763_2)로 사전처리하였고, 이러한 투여량은 동물 농도의 올리고뉴클레오티드에 상응 한다. 마우스에 5×10^{10} vg AAV-HBV를 0주에 형질도입하였다(더욱 상세한 내용에 대하여 재료 및 방법 섹션의 AAV/HBV 마우스 모델의 기재내용을 참고함). AAV-HBV 형질 도입 후 W1부터 W4까지, 마우스는 1주 떨어져 제공된 PD-L1 올리고뉴클레오티드 또는 비히클(염수 용액)의 4회의 부가적인 s.c. 주사를 수용하였다.

[0666] 혈액 샘플을 형질도입 전 1주 및 각각의 주사 후 1주에 채취하였다.

[0667] 마지막 주사 후 1주에 마우스를 희생시키고, 이의 간을 PBS 관류에 따라서 제거하였다. 간을 더욱 작은 조각으로 절단하였고, 바로 냉동시켰다.

[0668] HBV 유전자 발현을 측정하기 위하여, 모든 핵산 키트 카탈로그 번호 965672에 대하여 키아앰프 원(QIAamp One)을 사용하여 키아젠 바이오로봇(Qiagen Biorobot)으로 DNA를 혈청으로부터 추출하였고, 혈청을 PBS에서 1:20 희석으로 희석하였고, 총 100 μL를 200 μL 완충액 AL에 용해시켰다. DNA를 키트로부터 100 μL로 용리하였다.

[0669] 실시간 qPCR을 위하여 타크만 유전자 발현 마스터 믹스(카탈로그 번호 4369016, 어플라이드 바이오시스템스)를 1:1:0.5의 하기 프라이머 F3_코어, R3_코어, P3_코어(인터그레이티드 디엔에이 테크놀로지스(Integrated DNA Technologies), 모두 각각 100 μM로 재구성됨)를 첨가함으로써 제조된 프라이머 믹스와 함께 사용하였다:

[0670] 정방향 (F3_코어): CTG TGC CTT GGG TGG CTT T(서열번호 784)

[0671] 역방향 (R3_코어): AAG GAA AGA AGT CAG AAG GCA AAA(서열번호 785)

[0672] 프로브 (P3_코어): 56-FAM-AGC TCC AAA/ZEN/TTC TTT ATA AGG GTC GAT GTC CAT G-3IABkFQ(서열번호 786)

[0673] HBV 플라스미드(유전자형 D, GTD)를 사용하는 표준 곡선을 1×10^9 카피/μL에서 개시하여 1 카피/μL로 하향되는 10배 희석을 사용하여 준비하였고, 반응 당 5 μL로 사용하였다.

[0674] 각각의 반응을 위하여, 10 μL 유전자 발현 마스터 믹스, 4.5 μL 물, 0.5 μL 프라이머 믹스 및 5 μL 샘플 또는 표준을 첨가하였고, qPCR을 실행시켰다.

[0675] 분석을 위하여, 표준 곡선을 사용하여 카피 수/mL/웰을 계산하였다. 결과는 표 15에 제시된다.

[0676] qPCR을 사용하여 PD-L1 mRNA 발현을 측정하였다.

[0677] 세라믹 비드 및 1 mL의 트라이졸을 함유하는 2 mL 투브(라이징 매트릭스(Lysing Matrix) D 투브, 116913500, 앰피바이오(ampbio))에 첨가된 냉동된 간 조각으로부터 mRNA를 추출하였다.

[0678] 프리셀리스 티슈 디스럽터(Precellys Tissue Disruptor)를 사용하여 간 조각을 균질화시켰다. 200 μL 클로로폼을 균질화물에 첨가하였고, 와동시켰고, 10,000 rpm으로 4°C에서 20분 동안 원심분리시켰다. RNA 함유 투명상(약 500 μL)을 새로운 투브에 옮겼고, 동일한 부피의 70% EtOH를 첨가하였다. 잘 혼합한 후, 용액을 RNeasy 스펌 컬럼 상으로 옮겼고, RNeasy 키트 매뉴얼 RNeasy 미니 카탈로그 번호 74104(키아젠)(RNA 분해 RNase-부재 DNase 세트, 카탈로그 번호 79254를 포함함)에 따라 RNA를 추가로 추출하였다. 50 μL H₂O에서 용리하였다. 최종 RNA 농도를 측정하였고, 모든 샘플에 대해 100 ng/μL로 조정하였다.

[0679] 제조사의 지시에 따라서 타크만 RNA-to-ct 1-단계 키트(카탈로그 번호 4392938, 써모 피셔)를 사용하여 7.5 μL RNA 상에서 qPCR을 수행하였다. 혼합된 프라이머는 함유된 PD-L1_1-3(프라이머 번호 Mm00452054_m1, Mm03048247_m1 및 Mm03048248_m1) 및 내인성 대조군(ATCB Mm00607939_s1, CANX Mm00500330_m1, YWHAZ Mm03950126_s1 및 GUSB Mm01197698_m1)을 사용하였다.

[0680] 2^-ddct 방법을 사용하여 데이터를 분석하였다. 4개의 모든 내인성 대조군의 평균을 사용하여 ddct 값을 계산하였다. PD-L1 발현은 내인성 대조군의 평균 및 염수의 %와 관련된다.

[표 15]

[0682] 비접합된 및 GalNAc-접합된 올리고뉴클레오티드로 처리된 AAV/HBV 마우스에서의 PD-L1 mRNA 발현 및 HBV DNA, n=5.

	화합물 번호	PD-L1 mRNA 발현 (염수의 %)		HBV DNA 발현 (염수의 %)		
		Avg	SD	Avg	SD	
[0683]	네이키드	752_1	55	35	72	16
	GalNAc 접합된	763_2	34	3	79	9

[0684] 이러한 결과로부터, 네이키드 및 GalNAc 접합된 올리고뉴클레오티드가 둘 다 AAV/HBV 마우스의 간에서 PD-L1 mRNA 발현을 감소시킬 수 있고, GalNAc 접합된 올리고뉴클레오티드가 약간 양호함을 알 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 둘 다 또한 혈청에서 HBV DNA의 약간의 감소를 야기하였다.

실시예 6 - AAV/HBV 마우스에서 T-세포 반응의 생체내 효과

[0685] 본 연구에서, 파스퇴르로부터의 AAV/HBV 마우스를, PD-L1을 표적으로 하는 항체 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드로 처리하였다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 네이키드이거나 GalNAc에 접합되었다. 치료 중에, 동물을 HBs 및 HBc 항원에 대한 DNA 백신으로 면역화시켜(재료 및 방법 섹션 참고) 항원 제시 세포에 의한 효율적인 T-세포 프라이밍을 보장하였다. 치료가 간 및 비장에서의 세포 집단 및 이러한 집단에 대한 PD-L1 발현에 영향을 주는 법, 및 HBV 특이적 T-세포 반응이 확인될 수 있는지 여부를 평가하였다.

치료 프로토콜:

[0686] 암컷 HLA-A2/DR1 마우스를 하기 프로토콜에 따라 처리하였다. 연구를, 하기 표 16 및 17에 나타낸 바와 같이 투여 섭생법에 약간의 차이를 갖는 2개의 별개의 하위-연구로 수행하였다.

[0687] [표 16]

[0688] DNA 백신 및 항-PD-L1 항체를 재료 및 방법 섹션에 기술된 바와 같이 투여하였다. 사용된 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5 mg/kg의 화합물 번호 748_1(네이키드) 및 7 mg/kg의 화합물 번호 759_2(GalNAc 접합된)였고, 둘 다 피하 주사(s.c.)로서 투여되었다.

[표 16]

[0689] DNA 백신, 및 DNA 백신 + 항-PD-L1 항체에 의한 AAV/HBV 마우스 치료 프로토콜, 각각의 군 당 6 마리의 마우스.

일	비 히클 (그룹 10)	DNA 백신 (그룹 11)	DNA 백신 + 항-PD-L1 Ab (그룹 13)
AAV/HBV			
동물 무작위화			
0		-	Ab
34	염수+이소타입	-	Ab
41	염수+이소타입	-	Ab
48	염수+이소타입	-	Ab
50	-	CaTx	CaTx
55*	PBS+이소타입	DNA	DNA+Ab
62	염수+이소타입	-	Ab
69	PBS+이소타입	DNA	DNA+Ab
76*	염수+이소타입	-	Ab
83	염수+이소타입	-	Ab
97*	희생		

[0690] 이소타입 = 마우스 IgG 대조군 Ab, CaTx = 심장독, DNA = DNA 백신, Ab = 항-PD-L1 Ab, 및 * = 혈청 수집

[표 17]

[0691] DNA 백신 및 DNA 백신 + 네이키드 또는 접합된 PD-L1 올리고뉴클레오티드(ASO)에 의한 AAV/HBV 마우스 치료 프로토콜, 각각의 군 당 7 마리의 마우스.

Day	비히클 (그룹 1)	DNA 백신 (그룹 2)	DNA 백신 + PDL-1 ASO (그룹 7)	DNA 백신 + GN-PDL-1 ASO (그룹 8)
0	AAV/HBV			
29*	동물 무작위화			
39	염수	염수		
41		염수	ASO	GN-ASO
46	염수	염수		
49		염수	ASO	GN-ASO
53	염수	염수		
55	CaTx	CaTx	CaTx	CaTx
56		염수	ASO	GN-ASO
59	PBS+ 염수	DNA+PBS	DNA	DNA
62*		염수	ASO	GN-ASO
67	염수	염수		
70		염수	ASO	GN-ASO
74	PBS+ 염수	DNA+PBS	DNA	DNA
77		염수	ASO	GN-ASO
81	염수	염수		
84*		염수	ASO	GN-ASO
88	염수	염수		
91		염수	ASO	GN-ASO
102	희생			

[0696]

[0697] DNA = DNA 백신, CaTx = 심장독, Ab = 항-PD-L1 Ab, ASO = 네이키드 PDL-1 올리고뉴클레오티드, GN-ASO = GaINAc-PDL-1 올리고뉴클레오티드, 및 * = 혈청 수집

[0698]

희생 시, 각각의 군으로부터의 각각의 마우스의 혈액, 비장 및 간 단핵 세포를 수집하고, 적혈구를 고갈시켰다 (용해 완충액, 비디 바이오사이언시스, 555899). 간 단핵 세포는 재료 및 방법 섹션에 기술된 바와 같은 특정 제법을 요구하였다.

[0699]

세포 집단:

[0700]

간에서, 세포계수를 사용하는 간 단핵 세포 상의 표면 표지(재료 및 방법 참고)에 의해 세포 집단을 분석하였다.

[0701]

대조군(즉, 비히클 및 DNA-면역화된 군)과 비교하여 처리된 마우스의 비장 및 간에서의 NK 세포의 빈도에서 어떠한 유의한 변화도 나타나지 않았다. 표 18은, 네이키드 PD-L1 올리고뉴클레오티드(화합물 번호 748_1) 및 GaINAc 접합된 PD-L1 올리고뉴클레오티드(화합물 번호 759_2)로 처리된 군이 도 10A에 또한 제시된 각각의 대조 군(즉, 비히클 및 DNA-면역화된 군)과 비교하여 T-세포에서의 유의한 증가를 가짐을 나타낸다. 이러한 증가는 CD4+ 및 CD8+ T-세포 집단(각각 표 18 및 도 10B 및 10C) 둘 다의 증가에 기인하였다.

[0702]

[표 18]

[0703]

백만의 세포에서 치료에 따른 간의 T-세포.

	T-세포 (백만)		CD4+ T-세포 (백만)		CD8+ T-세포 (백만)	
	Avg	Std	Avg	Std	Avg	Std
비히클 (그룹 1)	0.77	0.44	0.51	0.35	0.11	0.05
DNA 백신 (그룹 2)	0.90	0.24	0.58	0.16	0.16	0.08
DNA 백신 + 항-PD-L1 Ab (그룹 13)	1.98	0.90	1.40	0.81	0.41	0.23
비히클 (그룹 10)	1.73	0.87	1.13	0.55	0.40	0.25
DNA 백신 (그룹 11)	1.27	0.97	0.79	0.58	0.32	0.32
DNA 백신 + PD-L1 ASO (그룹 7)	3.78	1.31	2.46	0.72	0.79	0.39
DNA 백신 + GN-PD-L1 ASO (그룹 8)	3.33	0.66	2.18	0.40	0.67	0.17

[0704]

PD-L1 발현:

[0705]

PD-L1 단백질의 발현을 희생 시 비장 및 간으로부터의 대식세포, B 및 T-세포 상에서 평가하였다. 표면 표지 항체 믹스(치료 및 방법 참고)에서 PD-L1 항체의 존재는 세포계수에 의한 PD-L1 발현 세포의 정량화를 가능하게 하였다.

[0706]

비장에서, PD-L1을 발현하는 대식세포, B 세포 및 CD4+ T-세포의 %에서, 치료 사이에 어떠한 유의적인 차이도 관찰되지 않았다. PD-L1을 발현하는 CD8+ T-세포의 %는, 다른 치료(데이터는 제시되지 않음)와 비교될 때, 네이키드 PD-L1 올리고뉴클레오티드(화합물 번호 748_1) 및 GaINAc 접합된 PD-L1 올리고뉴클레오티드(화합물 번호 759_2)로 처리된 마우스에서 더욱 낮았다.

[0707]

간에서, PD-L1은 주로 대조군(각각 조합된 2개의 비히클 및 DNA 백신접종 군, 도 11A)에서 32% 및 41%의 평균 빈도를 갖는 CD8+ T-세포 상에서 발현되었다. 네이키드 PD-L1 올리고뉴클레오티드 또는 GaINAc PD-L1 올리고뉴클레오티드에 의한 처리는 PD-L1을 발현하는 CD8+ T-세포의 빈도의 감소를 야기하였다(표 19 및 도 11A 참고). PD-L1을 발현하는 세포의 %의 유의한 차이는 또한, 이들 세포 유형이 CD8+ T-세포보다 PD-L1을 상당히 덜 발현 하지만, ASO 치료 후 B 세포 및 CD4+ T-세포에 대해 나타났다(표 19 및 도 11B 및 11C 참고). 항-PD-L1 Ab에 의한 처리는 또한, 모든 세포 유형에서 PD-L1 발현의 명백한 감소를 야기하였다. 그러나, 이러한 감소가 치료에 사용된 항-PD-L1 항체에 의한 PD-L1 에피토프의 부분적인 봉쇄에 기인하여 표면 표지 항체 믹스 내의 PD-L1 검출 항체가 PD-L1에 결합하는 것을 방해하는 것이 가능하다. 따라서, 치료에 사용된 항-PD-L1 항체에 의한 PD-L1 하향 조절인 것으로 나타나는 것은 치료 항체와 검출 항체 사이의 에피토프 경쟁의 결과일 수 있다.

[0708]

[표 19]

[0709]

PD-L1 발현을 갖는 간 세포 집단의 %.

	CD8+ T-세포의 %		CD4+ T-세포의 %		B-세포의 %	
	Avg	Std	Avg	Std	Avg	Std
비히클 (그룹 10)	35.5	4.7	0.75	0.52	5.9	1.5
DNA 백신 (그룹 11)	36.8	7.7	0.61	0.08	5.5	1.1
DNA 백신 + 항-PD-L1 Ab (그룹 13)	18.6	12.3	0.33	0.10	2.9	1.7
비히클 (그룹 1)	28.5	11.5	0.64	0.21	5.9	1.7
DNA 백신 (그룹 2)	44.9	14.4	1.43	0.69	8.7	3.1
DNA 백신 + PD-L1 ASO (그룹 7)	9.6	2.4	0.37	0.21	2.9	0.8
DNA 백신 + GN-PD-L1 ASO (그룹 8)	14.6	3.3	0.31	0.11	2.8	0.8

[0710]

[0712] HBV 특이적 T-세포 반응:

[0713] 전염증성 사이토kin을 생산하는 CD4+ 및 CD8+ T-세포 및 NK 세포를, IFN γ 및 TNF α 생산을 검출하는 세포내 사이토kin 염색 검정(재료 및 방법 섹션 참고)을 사용하여 검출하였다.

[0714] 비장에서, 희생 시 어떠한 NK 세포도 검출가능하지 않았고, IFN γ 및 TNF α를 분비하는 소수의 CD4+ T-세포가 검출가능하였다(빈도 < 0.1%). 2개의 HBV 항원을 표적으로 하는 IFN γ-생산 CD8+ T-세포는 네이키드 PD-L1 올리고뉴클레오티드 또는 GaINAc PD-L1 올리고뉴클레오티드로 처리된 마우스 및 DNA 백신만을 수용하는 본 연구로부터의 마우스(데이터는 제시되지 않음)에서 검출되었다.

[0715] DNA-면역화된 HBV-담체 마우스의 간에서, 희생 시 어떠한 IFN γ-생산 NK 세포도 검출되지 않은 반면, 코어 또는 S2+S에 특이적인 IFN γ-분비 CD4+ T-세포는 소수의 DNA-면역화된 마우스의 간에서 낮은 빈도로 검출되었다(0.4% 미만, 데이터는 제시되지 않음). IFN γ를 생산하는 HBV S2+S-특이적 CD8+ T-세포는 다수의 DNA-면역화된 마우스에서 검출되었다. IFN γ-분비 CD8+ T-세포의 빈도는 DNA 백신 및 네이키드 PD-L1 올리고뉴클레오티드 또는 GaINAc PD-L1 올리고뉴클레오티드의 조합으로 처리된 마우스에서 증가한 반면, 항-PD-L1 항체에 의한 처리는 DNA 백신 접종에 어떠한 명백한 추가적인 효과도 부가하지 않았다(도 12). 외피 및 코어 항원을 표적으로 하는 IFN γ-생산 CD8+ T-세포는 대부분의 DNA-면역화된 군(항-PD-L1 항체를 제외함)에서 검출되었다(도 12B). 대부분의 S2-S 특이적 T-세포는 IFN γ 및 TNF α를 둘 다 생산하였다(도 12C). 결과는 또한 표 20에 제시된다.

[표 20]

[0717] 전체 IFN γ 또는 IFN γ + TNF α 세포 집단으로부터의 HBV 항원(S2-S 또는 코어) 특이적 CD8+ T-세포의 %.

	PreS2-S 특이적 T-세포 (IFN γ 세포의 %)		코어 특이적 T-세포 (IFN γ 세포의 %)		S2-S 특이적 T-세포 (IFN γ + TNF α의 %)	
	Avg	Std	Avg	Std	Avg	Std
비히클 (그룹 10)	0.15	0.37	0.18	0.43	0.00	0.00
DNA 백신 (그룹 11)	1.48	1.10	0.47	0.53	0.42	1.02
DNA 백신 + 항-PDL-1 Ab	1.18	0.95	0	0	0.38	0.49
비히클 (그룹 1)	0.17	0.45	0.11	0.28	0.00	0.00
DNA 백신 (그룹 2)	1.70	1.02	0.27	0.51	0.98	0.90
DNA 백신 + PDL-1 ASO	2.56	1.60	0.78	0.80	1.44	1.55
DNA 백신 + GN-PDL-1 ASO	3.83	2.18	0.68	1.16	2.62	1.62

[0718]

[0719] 실시예 7 - AAV/HBV 마우스의 혈청에서 HBV 항원 및 HBV DNA에 대한 생체내 효과

[0720] 본 연구에서, 상하이로부터의 AAV/HBV 마우스(재료 및 방법 섹션 참고)를 GaINAc 접합된 PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드 화합물 번호 759_2로 처리하였다.

[0721] 치료가 비히클 처리된 동물과 비교하여 혈청내 HBe 및 HBs 항원 및 HBV DNA 수준에 영향을 주는 방법이 평가되었따.

[0722] 치료 프로토콜:

[0723] 재료 및 방법 섹션의 상하이 모델 하에 기술된 HBV 계놈(AAV/HBV)을 갖는 재조합 아데노-연관된 바이러스(AAV)로 감염된 수컷 C57BL/6 마우스를 본 연구에 사용하였다. 마우스(군 당 6 마리의 마우스)에 5 mg/kg의 안티센스 올리고뉴클레오티드 화합물 번호 759_2 또는 비히클(염수)(둘 다 피하 주사(s.c.)에 의해 투여됨)을 8주 동안 1주에 1회 주사하였다. 혈액 샘플을 치료 동안 매주 및 치료 후 6주에 수집하였다. HBV DNA, HBsAg 및 HBeAg 수준을 하기 기술된 혈청 샘플에서 측정하였다. 첫 번째 10주 동안의 결과를 표 21 및 도 13에 제시한다. 연구는 본원의 출원 시에 여전히 진행 중이었고, 이에 따라 남아있는 4주 동안의 데이터는 수득되지 않았다.

[0724] HBsAg 및 HBeAg 검출:

[0725] 혈청 HBsAg 및 HBeAg 수준을 제조사의 프로토콜에 따라 HBsAg 화학발광 면역검정(CLIA) 및 HBeAg 클리아 키트(CLIA kit)(오토바이오 다이아그노스틱스 컴파니 리미티드, 중국 정저우 소재, 각각 카탈로그 번호 CL0310-2 및 CL0312-2)를 사용하여 감염된 AAV-HBV 마우스의 혈청에서 측정하였다. 간략하게, 50 mL의 혈청을 각각의 항체 코팅된 마이크로티터 플레이트로 옮겼고, 50 mL의 효소 접합체 시약을 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 진탕 기상에서 60분 동안 항온처리한 후, 모든 웰을 자동 세척기를 사용하여 세척 완충액으로 6회 세척하였다. 25 mL의 기질 A 및 이어서 25 mL의 기질 B를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 10분 동안 항온처리한 후, 엔비젼(Envision) 발광 판독기를 사용하여 발광을 측정하였다. HBsAg는 단위 IU/mL로 제공되고; 이때 1 ng HBsAg = 1.14 IU이다. HBeAg는 단위 NCU/mL 혈청으로 제공된다.

[0726] HBV DNA 추출 및 qPCR:

[0727] 초기에, 마우스 혈청을 포스페이트-완충된 염수(PBS)로 10(1:10)의 인자만큼 희석하였다. MagNA 퓨어 96(로슈)로봇을 사용하여 DNA를 추출하였다. 50 mL의 희석된 혈청을 200 μ L MagNA 퓨어 96 외부 용해 완충액(로슈, 카탈로그 번호 06374913001)을 갖는 가공 카트리지에서 혼합하였고, 10분 동안 항온처리하였다. 이어서, "MagNA 퓨어 96 DNA 및 바이러스성 핵산 소용량 키트"(로슈, 카탈로그 번호 06543588001) 및 "바이러스성 NA 플라즈마 SV 외부 용해 2.0" 프로토콜을 사용하여 DNA를 추출하였다. DNA 용리 부피는 50 mL였다.

[0728] 타크만 qPCR 머신(ViiA7, 라이프 테크놀로지스(life technologies))을 사용하여 추출된 HBV DNA의 정량화를 수행하였다. 각각의 DNA 샘플을 PCR에서 2회 시험하였다. 5 mL의 DNA 샘플을 384 웰 플레이트에 10 mL 타크만 유전자 발현 마스터 믹스(어플라이드 바이오시스템스, 카탈로그 번호 4369016), 0.5 mL 프라임타임(PrimeTime) XL qPCR 프라이머/프로브(IDT) 및 4.5 mL 중류수를 함유하는 15 mL의 PCR 마스터 믹스에 첨가하였고, 하기 설정을 사용하여 PCR을 수행하였다: UDG 항온처리(2분, 50°C), 효소 활성화(10분, 95°C) 및 PCR(변성을 위한 15초, 95°C 및 어닐링 및 신장을 위한 1분, 60°C를 갖는 40회 사이클). DNA 카피 수를, ViiA7 소프트웨어에 의한 HBV 플라스미드 DNA 표준 곡선을 기준으로 C_t 값으로부터 계산하였다.

[0729] 타크만 프라이머 및 프로브에 대한 서열(IDT):

[0730] 정방향 코어 프라이머 (F3_코어): CTG TGC CTT GGG TGG CTT T(서열번호 784)

[0731] 역방향 프라이머 (R3_코어): AAG GAA AGA AGT CAG AAG GCA AAA(서열번호 785)

[0732] 타크만 프로브 (P3_코어): 56-FAM/AGC TCC AAA/ZEN/TTC TTT ATA AGG GTC GAT GTC CAT G/3IABkFQ 서열번호 786).

[0733] [표 21]

[0734] GaINAc 접합된 PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의한 처리 후 AAV/HBV 마우스로부터의 혈청 내 HBV-DNA, HBsAg 및 HBeAg 수준.

일	염수				화합물 번호 759_2 (5 mg/kg)							
	HBV-DNA		HBsAg		HBeAg		HBV-DNA		HBsAg		HBeAg	
	Avg	Std	Avg	Std	Avg	Std	Avg	Std	Avg	Std	Avg	Std
0	7.46	0.35	3.96	0.48	3.23	0.14	7.44	0.29	3.87	0.40	3.17	0.13
7	7.53	0.23	4.17	0.45	3.35	0.10	7.53	0.20	3.91	0.42	3.19	0.18
14	7.57	0.24	4.12	0.49	3.19	0.11	7.45	0.22	3.90	0.50	2.99	0.27
21	7.47	0.27	3.93	0.51	3.12	0.05	7.33	0.47	3.71	0.76	2.78	0.26
28	7.68	0.26	3.88	0.67	3.18	0.13	7.45	0.46	3.65	0.93	2.67	0.38
35	7.69	0.21	4.03	0.54	2.95	0.08	7.13	0.75	2.98	1.05	2.04	0.38
42	7.58	0.23	3.89	0.65	3.34	0.10	6.69	0.89	2.60	1.05	1.98	0.45
49	7.77	0.17	3.54	1.06	3.08	0.26	6.56	1.26	2.19	0.70	1.47	0.37
56	7.71	0.24	3.99	0.86	3.28	0.05	6.21	1.48	2.28	0.84	1.38	0.30
63	7.59	0.28	3.67	1.07	3.25	0.13	6.08	1.39	2.08	0.71	1.35	0.30

[0735]

[0736] 본 연구로부터, GaINAc 접합된 PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드 화합물 번호 759_2가 6주의 치료 후 혈청내 HBV-DNA, HBsAg 및 HBeAg 수준의 감소에 대한 상당한 효과 및 치료가 종료된 후 2주 이상 동안 지속되는 효과를 가짐을 알 수 있다.

- [0737] 실시예 8 - GaINAc 접합된 PD-L1 올리고뉴클레오티드를 사용하는 인간 1차 간세포에서의 시험관내 PD-L1 녹다운
 [0738] 계놈을 사용하여 1차 인간 간세포에서 PD-L1 전사체를 감소시키는 GaINAc 접합된 PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드 화합물의 능력을 조사하였다.
- [0739] 세포 배양물
- [0740] 저온보존된 인간 간세포를 10% 우태 혈청, 페니실린(100 U/mL), 스트렙토마이신(0.1 mg/mL) 및 L-글루타민(0.292 mg/mL)이 보충된 WME에 약 5×10^6 세포/mL의 밀도로 혼탁하고, 콜라겐-코팅된 24-웰 플레이트(벤톤 디 칸슨 아게(Becton Dickinson AG), 스위스 알슈빌 소재)로 2×10^5 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 세포를 4시간 동안 사전-배양하여 세포 배양물 플레이트로의 부착을 가능하게 한 후, 100 μM의 최종 농도의 올리고뉴클레오티드에 의한 처리를 개시하였다. 사용된 올리고뉴클레오티드는 표 21 및 표 8에 제시되고, 비히클은 PBS였다. 시딩 매질을 315 μL의 혈청 부재 WME(페니실린(100 U/mL), 스트렙토마이신(0.1 mg/mL), L-글루타민(0.292 mg/mL)이 보충됨)로 대체하였고, PBS 중 35 μL의 1 mM 올리고뉴클레오티드 저장 용액을 세포 배양물에 첨가하였고, 세포 상에 24 또는 66시간 동안 방치하였다.
- [0741] 라이브러리 준비
- [0742] 전사체 발현 프로파일링을, 2 x 51 bp 페어링된 엔드 리드(paired end read) 및 견본 당 30 M의 최소 리드 깊이(Q 스퀘어드(squared) EA)를 갖는 시퀀싱 전량을 사용하는 일루미나(Illumina) 시퀀싱 플랫폼 상에서의 일루미나 가닥 mRNA 화학을 사용하여 수행하였다. 350 μL의 퀴아젠 RLT 완충액을 첨가함으로써 세포를 용해시키고, 무작위화 계획으로 기재하였다.
- [0743] 퀴아젠 RNeasy 미니 키트를 사용하여 mRNA를 정제하였다. mRNA를 정량화시키고, 아길런트 바이오애널라이저(Agilent Bioanalyzer)를 사용하여 완전성을 평가하였다. 단리된 RNA의 초기량 평가 시, 모든 샘플이 7.0 초파의 RIN 점수를 갖고 100 ng의 입력 품질 메트릭을 충족시킴을 관찰하였다.
- [0744] 시퀀싱 라이브러리를 100 ng의 전체 RNA로 시작하는 일루미나 TruSeq 가닥 mRNA 라이브러리 준비를 사용하여 모든 샘플에 대해 생성하였다. 최종 cDNA 라이브러리를 크기 분포에 대해 아길런트 바이오애널라이저(DNA 1000 키트)를 사용하여 분석하였고, qPCR(카파 라이브러리 콘트 키트(KAPA Library Quant Kit))에 의해 정량화시키고, 시퀀싱을 위한 준비에서 2 nM로 정규화시켰다. 표준 클러스터 생성 키트 v5를 사용하여 cDNA 라이브러리를 유동 세포 표면 및 cBot에 등온적으로 결합시켜 부착된 cDNA 구축물을 각각 약 1,000 카피의 클론성 클러스터까지 증폭시켰다. TruSeq SBS 키트를 사용하는 시퀀싱-바이-신태시스(sequencing-by-synthesis) 방법에 의해 DNA 서열을 측정하였다.
- [0745] 데이터 가공
- [0746] 길이 2 x 51 bp의 일루미나 페어링된-말단 시퀀싱 리드를, GS-NAP 짧은 리드 정렬 프로그램(short read alignment program)을 사용하여 인간 기준 게놈 hg19 상에 매핑하였다. 삼툴스(SAMTOOLS) 프로그램을 사용하여 SAM-포맷 정렬을 분류된 정렬 BAM-포맷 파일로 전환하였다. hg19에 대한 상응하는 GTF 파일에 의해 특정된 NCBI RefSeq로부터의 엑손 주석에 근거하여 유전자 리드 수를 PD-L1에 대해 추정하였다. 각각의 샘플의 상이한 라이브러리 크기를 설명하는 정규화 단계를 DESeq2 R 패키지를 사용하여 적용하였다.
- [0747] GaINAc 접합된 PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드 화합물과의 항온처리 후 PD-L1 전사체의 감소를 표 22에 제시한다.
- [표 22]

[0749] GaINAc 접합된 올리고뉴클레오티드와의 치료에 따른 인간 1차 간세포에서의 PD-L1 전사체 감소, n=4.

화합물	PD-L1 발현 수준 24 시간 (라이브러리 크기 조정된 수)	PD-L1 발현 수준 66 시간 (라이브러리 크기 조정된 수)
비히클	259	156
	159	168
	192	136
	202	211
767_2	7	7
	11	14
	22	9
	28	15
766_2	16	13
	15	10
	17	11
	29	13
769_2	15	21
	18	18
	25	18
	26	25
768_2	41	25
	27	48
	31	25
	34	22
770_2	21	16
	44	62
	67	51
	38	63

[0750]

[0751] 모든 5개의 GaINAc 접합된 안티센스 화합물은 비히클로 처리된 샘플과 비교될 때, 24 및 66시간 항온처리 후 유의한 PD-L1 전사체 감소를 나타냈다.

[0752] 실시예 9 - HBV 감염된 ASGPR-HepaRG 세포에서 접합된 및 네이키드 PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드의 EC50

[0753] 2개의 네이키드 및 균등한 GaINAc 접합된 PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드의 효력을 HBV 감염된 ASGPR-HepaRG 세포와 비교하였다.

[0754] 세포주

[0755] HepaRG 세포(바이오프레딕 인터내셔널(Biopredic International), 프랑스 생-그레고리 소재)를 월리암 E 매질(10% HepaRG 성장 보충제(바이오프레딕)가 보충됨)에서 배양하였다. 이러한 세포주로부터 인간 ASGPR1 및 ASGPR2를 안정적으로 과발현하는 HepaRG 세포주를, 렌티바이러스성 방법을 사용하여 생성하였다. 증식하는 HepaRG 세포를 CMV 프로모터 및 퓨로마이신 내성 유전자의 제어 하에 인간 ASGPR1 및 2를 코딩하는, 시리온 바이오텍(Sirion biotech)에 의해 주문 생산된 렌티바이러스(CLV-CMV-ASGPR1-T2a_ASGPR2-IRES-Puro)와 함께 MOI 300에서 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 1 μ g/mL 퓨로마이신과 함께 11일 동안 선택하였고, 이어서 이식 유전자의 안정한 발현을 보장하기 위해 동일한 농도의 항생제에서 유지하였다. ASGPR1/2 과발현을 RT-qPCR에 의해 mRNA 수준에서(ASGPR1: 8,560배 대 비-형질도입된, ASGPR2: 2,389 배 대 비-형질도입된) 및 유동 세포분석 분석에 의해 단백질 수준에서 모두 확인하였다.

[0756] 감염 전에 2주 이상 동안 1.8% DMSO를 사용하여 세포를 분화시켰다. HBV 유전자형 D를 HepG2.2.15 세포 배양물 상청액으로부터 유도하였고, PEG 침전을 사용하여 농축시켰다. HBV에 대한 시험 화합물의 활성을 평가하기 위하여, 96 웨 플레이트에서 분화된 ASGPR-HepaRG 세포를 20 내지 30의 MOI로 20시간 동안 HBV로 감염시킨 후, 세포를 PBS로 4회 세척하여 HBV 접종원을 제거하였다.

[0757] 올리고뉴클레오티드 효력

[0758] 하기 올리고뉴클레오티드를 25 μ M로부터 0.4 nM(PBS 중 1:4 회석)까지의 연속적인 회석을 사용하여, 감염 후 7 및 10일에 HBV 감염된 ASGPR-HepaRG 세포에 첨가하였다. 세포를 감염 후 31일에 수확하였다:

네이키드 PD-L1 ASO	균등한 GaINAc 접합된 PD-L1 ASO
화합물 번호 640_1	화합물 번호 768_2
화합물 번호 466_1	화합물 번호 769_2

[0759]

[0760] 제조사의 지시에 따라 MagNA 퓨어 96 시스템 상에서 MagNA 퓨어 96 세포 RNA 대용량 키트(로슈 다이아그노스틱스)를 사용하여 전체 mRNA를 추출하였다. 유전자 발현 분석을 위하여, RT-qPCR을 실시해 5에 기술된 바와 같이 수행하였다.

[0761]

2nd-ddct 방법을 사용하여 데이터를 분석하였다. 액틴B를 내인성 대조군으로서 사용하여 ddct 값을 계산하였다. PD-L1 발현은 내인성 대조군 및 염수 비히클과 관련된다.

[0762]

EC50 계산을 그래프페드 프리즘 6에서 수행하고, 표 23에 제시한다.

[0763]

[표 23]

[0764]

ASGPR-HepaRG HBV 감염된 세포에서의 EC50, n=4.

화합물 번호	EC50 (μ M)
640_1	2.25
768_2	0.10
466_1	5.82
769_2	0.13

[0765]

[0766] 이러한 데이터는 PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드의 GaINAc 접합이 EC50 값을 상당히 개선함을 명백히 나타낸다.

[0767]

실시예 10 - 만성 HBV 환자로부터 유래하는 PBMC에서의 자극 T-세포 기능

[0768]

네이키드 PD-L1 안티센스 화합물이 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 생체외 HBV 항원 자극 후에 만성적으로 감염된 HBV(CHB) 환자의 T-세포 기능을 증가시킬 수 있는지 여부를 조사하였다.

[0769]

3명의 만성 HBV 감염된 환자로부터의 냉동된 PBMC를 해동하고, 100 μ L 매질(RPMI1640 + 글루타맥스 + 8% 인간 혈청 + 25 mM 해페스 + 1% 펜스트랩) 중 200,000 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 다음날, 세포를, 100 pg/mL IL-12 및 5 ng/mL IL-7을 함유하는 100 μ L 매질 중 5 μ M의 화합물 번호 466_1 또는 화합물 번호 640_1의 존재 또는 부재 하에 1 μ M 펩믹스(PepMix) HBV 라지 외피 단백질 또는 1 μ M 펩믹스 HBV 코어 단백질(표 9 참고)로 자극하였다(콘카나발린 자극을 단지 8일에 적용하였음). 4일 후, PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드 처치를 50 IU IL-2를 함유하는 매질로 새롭게 하였다. 첫 번째 자극 후 8일에, 세포를 펩믹스 또는 5 μ g/mL 콘카나발린 A + PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드로 24시간 동안 재자극하였다. 자극의 마지막 5시간 동안, 0.1 μ L 브레펜던 A, 0.1 μ L 모넨신 및 3 μ L 항-인간 CD-107(APC)을 추가하였다.

[0770]

24시간 후, 세포를 염색 완충액(PBS + 1% BSA + 0.09% 나트륨 아자이드 + EDTA)으로 세척하고, 표면 염색을 4°C에서 30분 동안 적용하였다[항-인간 CD3(BV 605), 항-인간 CD4(FITC), 항-인간 CD8(BV711), 항-인간 PD-L1(BV421), 항-인간 PD1(PerCP-Cy5.5) 및 라이브 앤 데드(Live and Dead) 염색(BV510)(비디 바이오사이언시스)]. 세포를 4°C에서 15분 동안 비디 고정 완충액에 고정하였다. 다음날 아침, 세포에 비디 펌/워쉬 완충액을 4°C에서 15분 동안 투과시키고, 세포내 염색을 4°C에서 30분 동안 수행하였다[항-인간 INFg(PE)]. 펌/워쉬 완충액에서 세척 후, 세포를 250 μ L 염색 완충액에 용해시켰다.

[0771]

FACS 측정을 비디 포테싸(BD Fortessa, 비디 바이오사이언시스) 상에서 수행하였다. 분석을 위하여, 전체 세포 집단을 먼저 살아있는 세포 상에서 염색하고(라이브 앤 데스(Live and Death) 염색, BV510), 이어서 CD3+(BV605) 세포 상에서 염색하였다. 이어서, CD3+ 세포를 CD107a+(APC) 대 IFNg+(PE)로서 도표화하였다.

[0772]

결과는 표 24에 제시된다.

[0773]

[표 24]

[0774]

3명의 만성적으로 HBV 감염된 환자로부터 단리된 PBMC로부터의 CD3+ T-세포 상에서 PD-L1 ASO 치료의 효과.

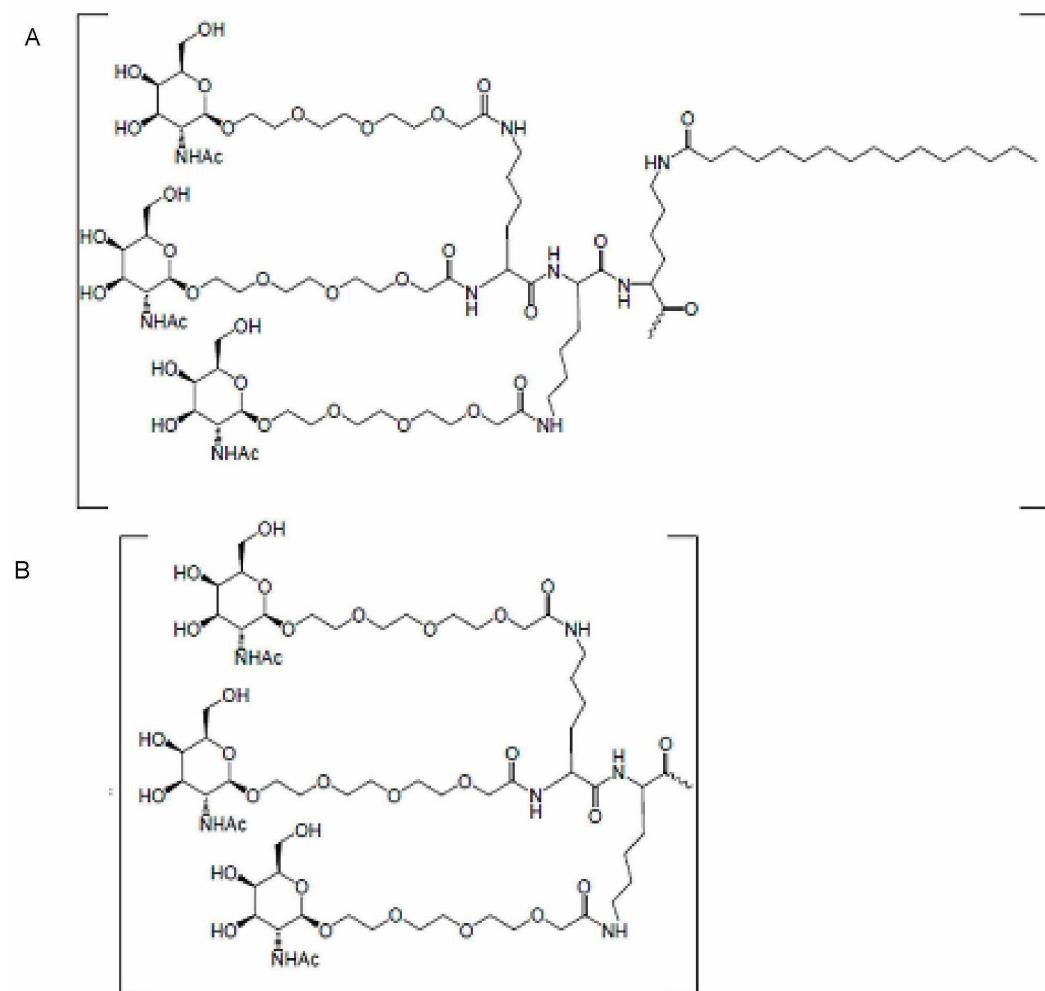
	항원 자극			외피 항원			코어 항원		
	염수	CMP 466_1	CMP 640_1	염수	CMP 466_1	CMP 640_1	염수	CMP 466_1	CMP 640_1
INF γ -/ CD107+	1.16	4.95	4.81	4.7	9.12	8.62	3.84	9.66	7.31
	2.7	3.59	2.74	2.57	3.69	3.2	3.25	3.34	2.92
	3	3.87	3.98	4.59	12.5	10.9	9.23	6.11	6.88
INF γ +/ CD107+	0.12	1.03	1.15	3.19	17.3	18.9	2.38	15.1	5.75
	0.49	3.12	1.75	2.73	7	5.34	1.63	2.35	1.9
	0.24	1.13	1.5	1.6	8.16	3.06	1.68	1.9	1.91
INF γ +/ CD107-	0.33	1.43	1.08	5.11	7.74	9.47	3.14	7.76	2.83
	0.61	2.9	2.26	7.84	5.79	5.78	2.33	2.82	2.95
	0.17	1.57	1.72	1.22	2.58	0.99	0.1	0.61	1.04

[0775]

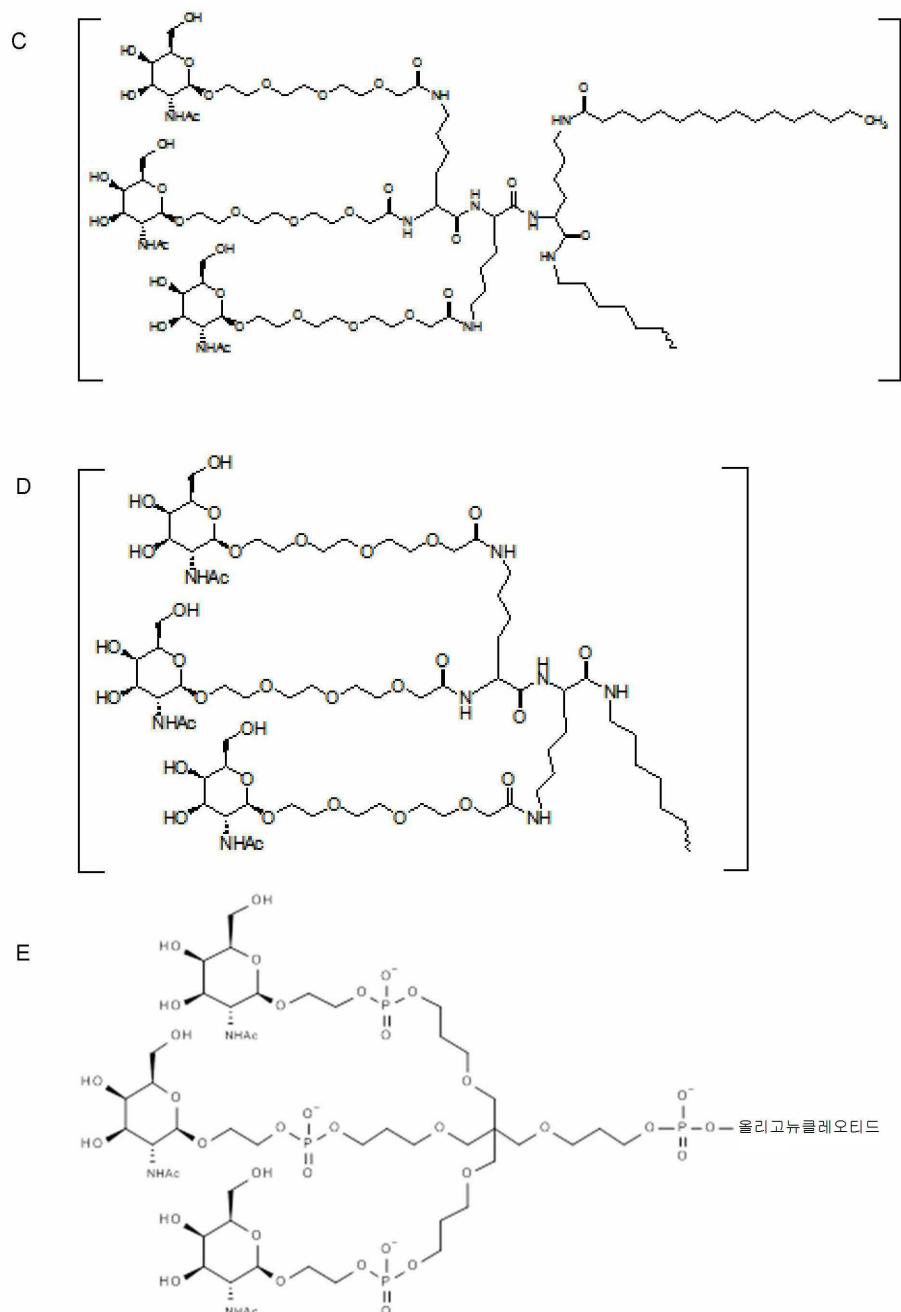
[0776] 이러한 데이터로부터, 항원 자극 자체가 CHB 환자(n=3)의 PBMC에서 T-세포 활성화(INF γ 및/또는 CD107a를 발현하는 CD3+ 세포의 증가 %)를 유도할 수 있음을 알 수 있다. PD-L1 안티센스 올리고뉴클레오티드 CMP 466_1 또는 640_1의 첨가는 CD3+ T-세포 반응의 추가적인 증가를 야기하였다. 이러한 증가는 주로 HBV 외피 자극된 군에서 관찰되었다.

도면

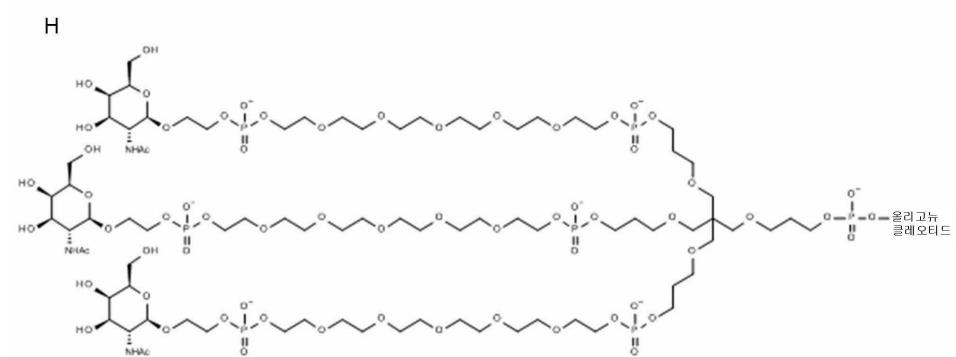
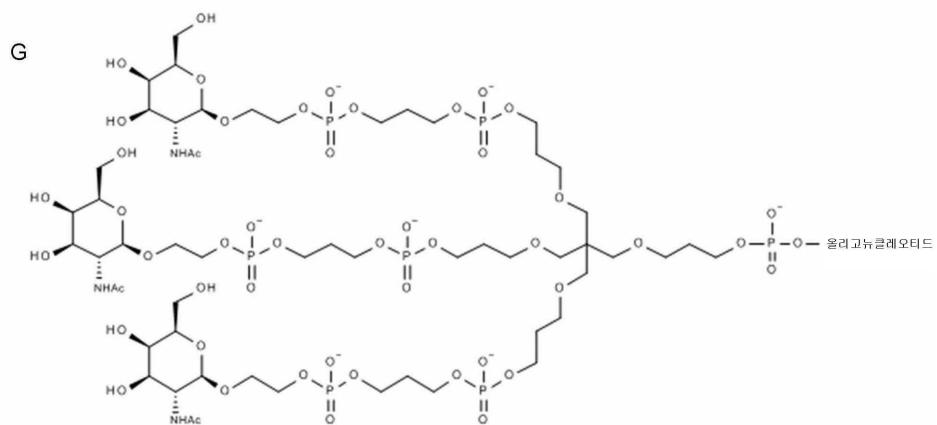
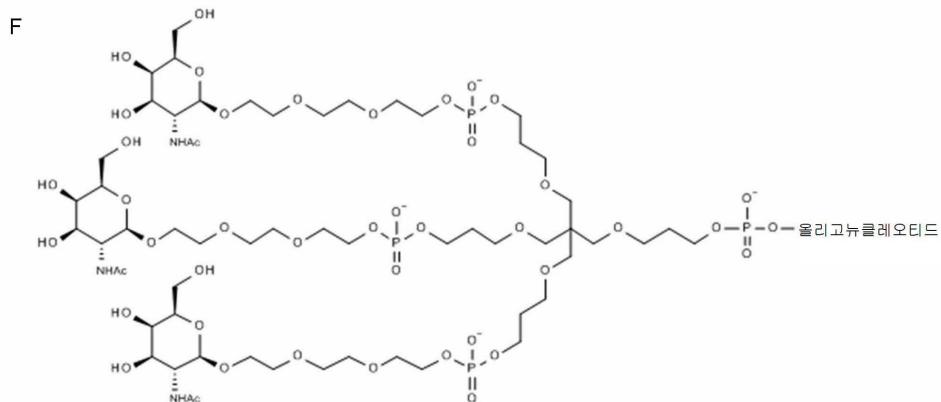
도면 1a



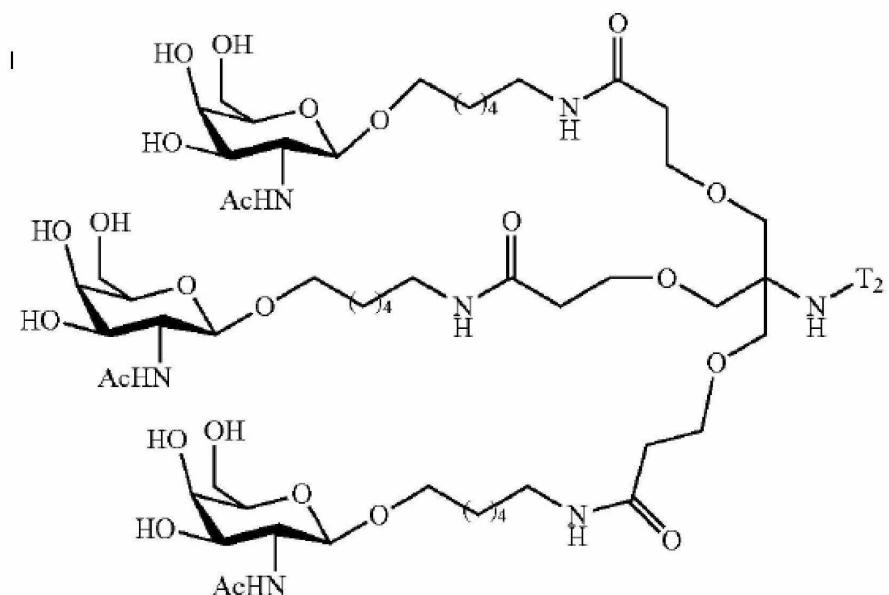
도면 1b



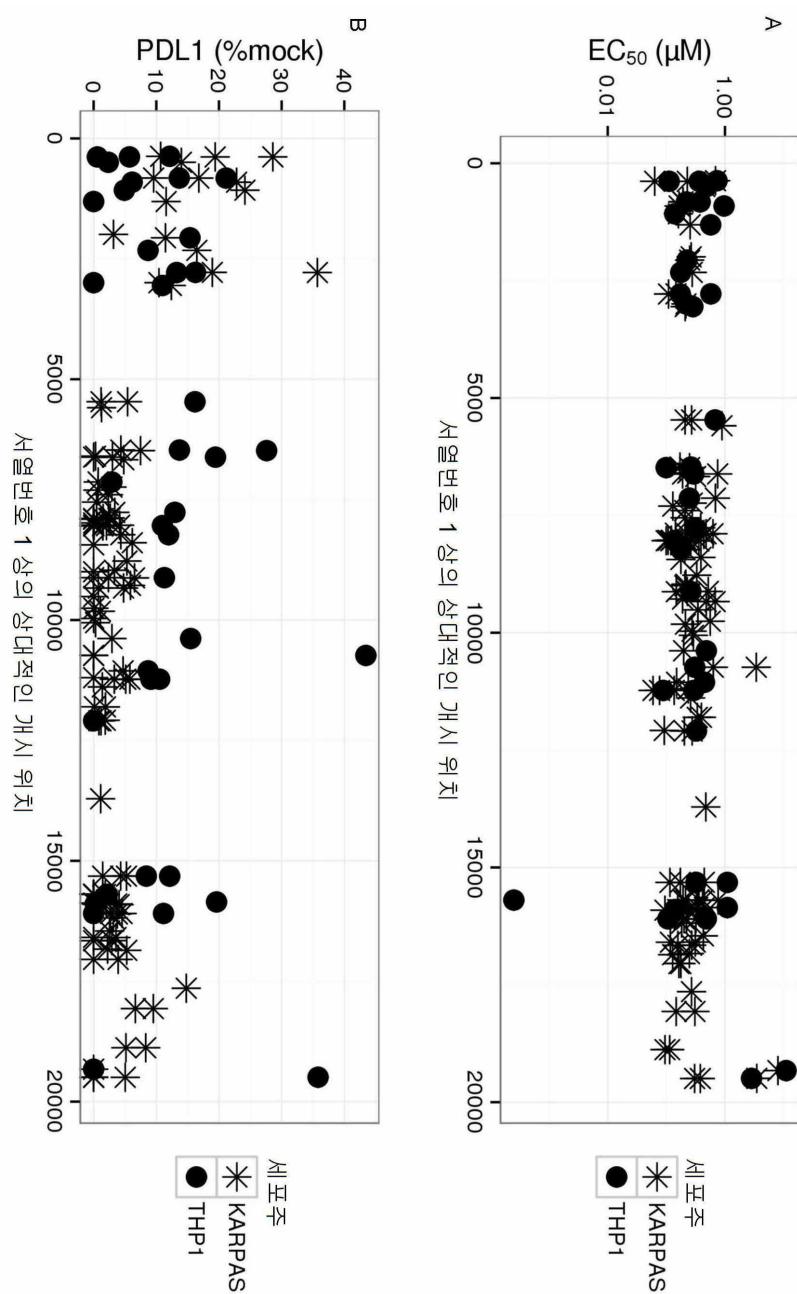
도면 1c



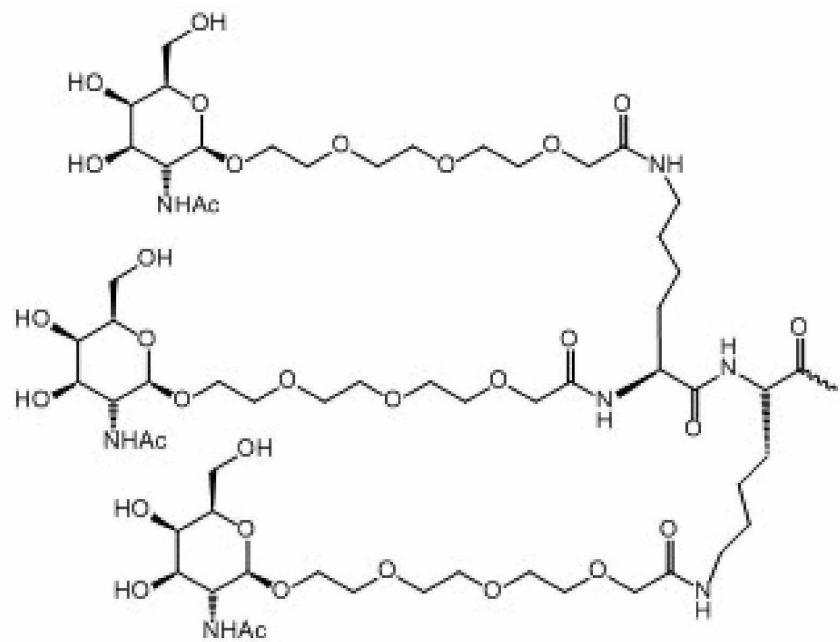
도면 1d



도면2

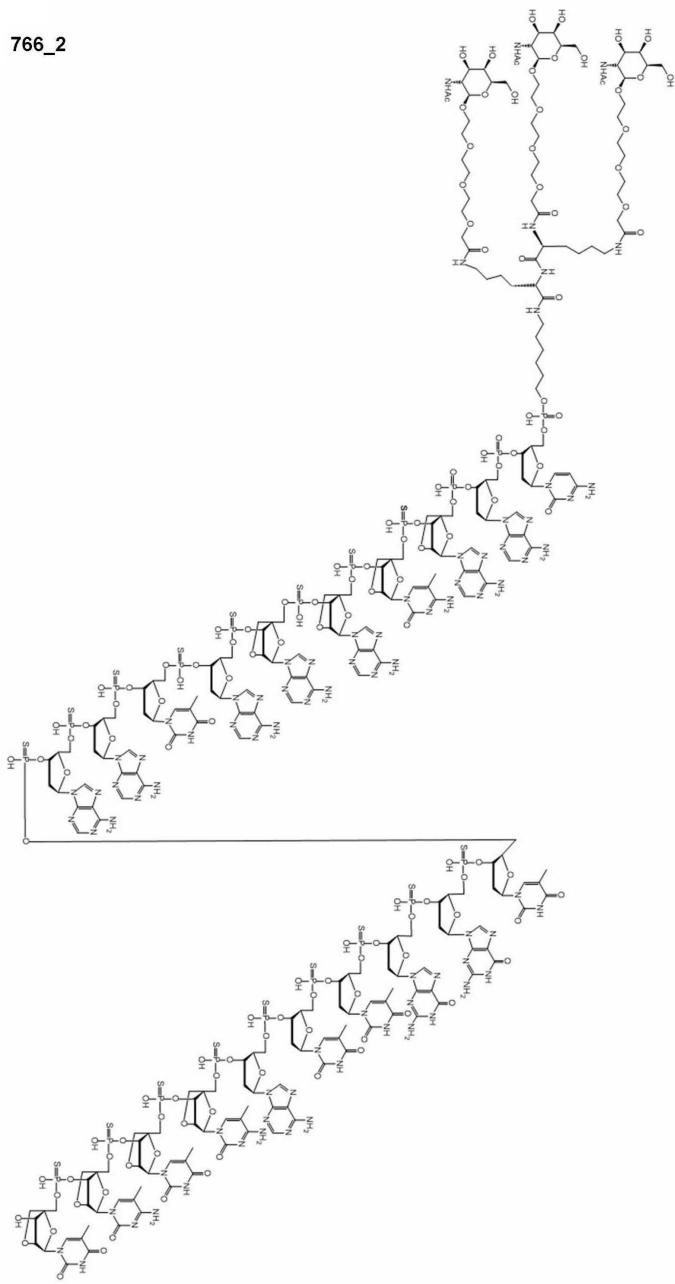


도면3



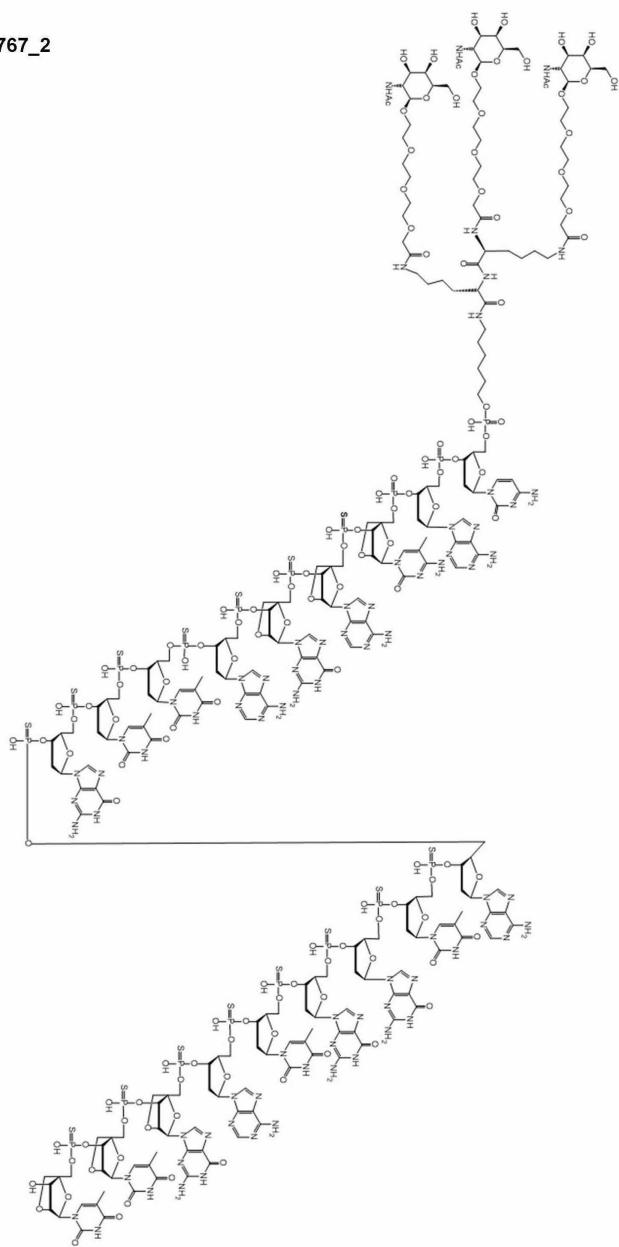
도면4

화합물 번호 766_2



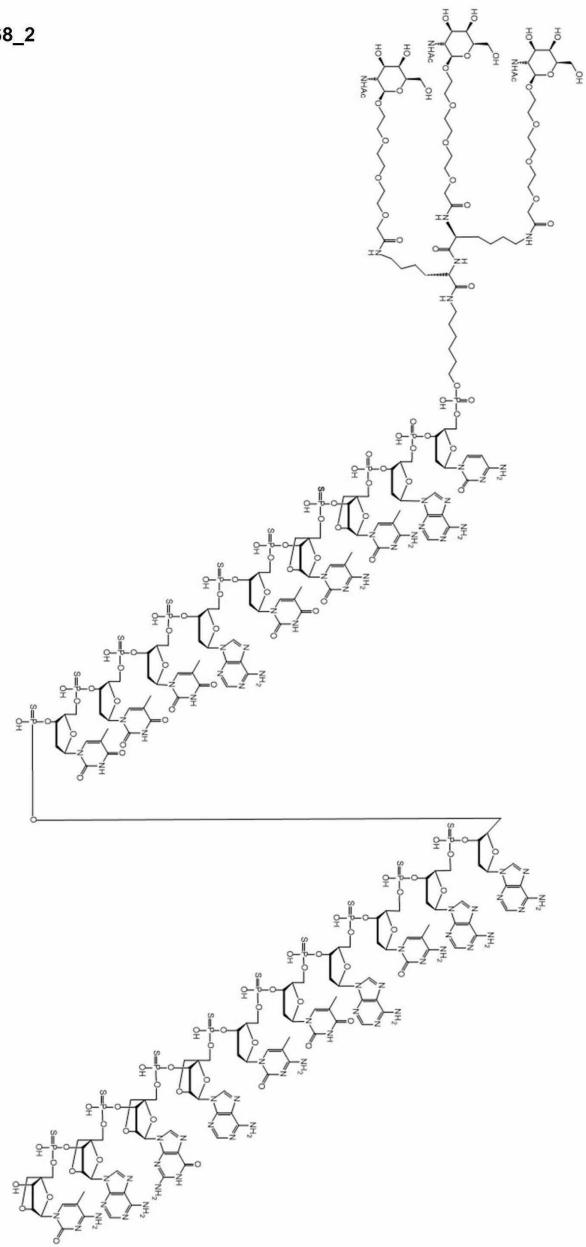
도면5

화합물 번호 767_2



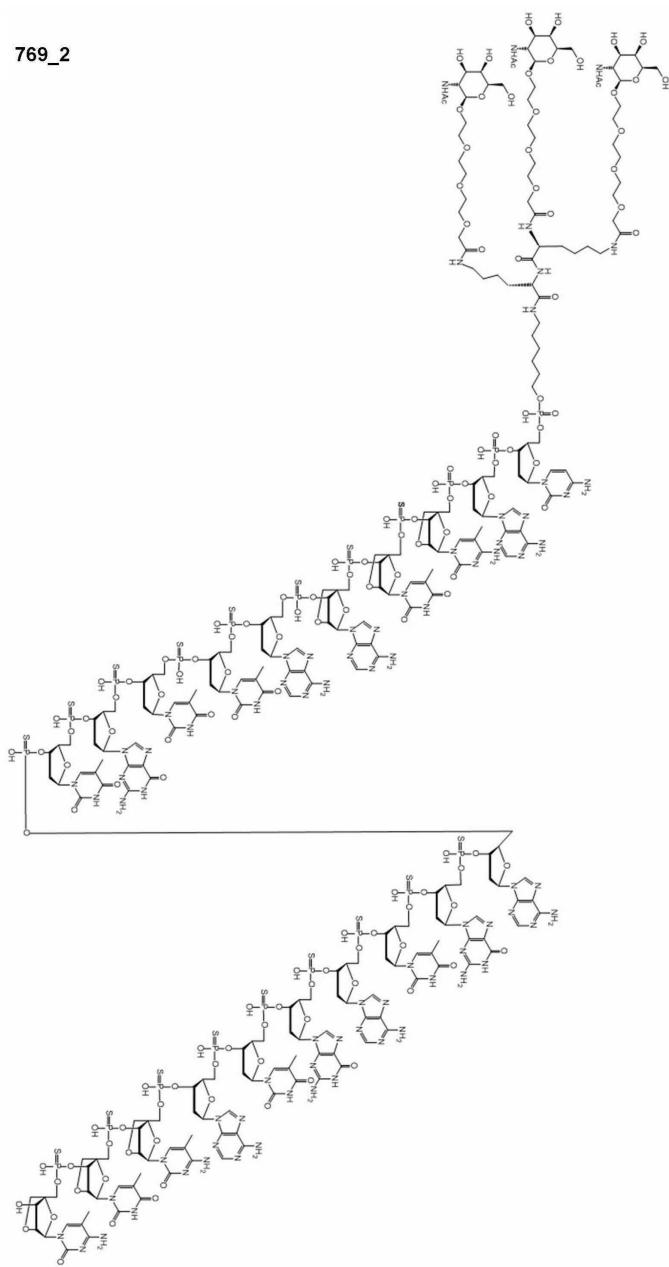
도면6

화합물 번호 768_2



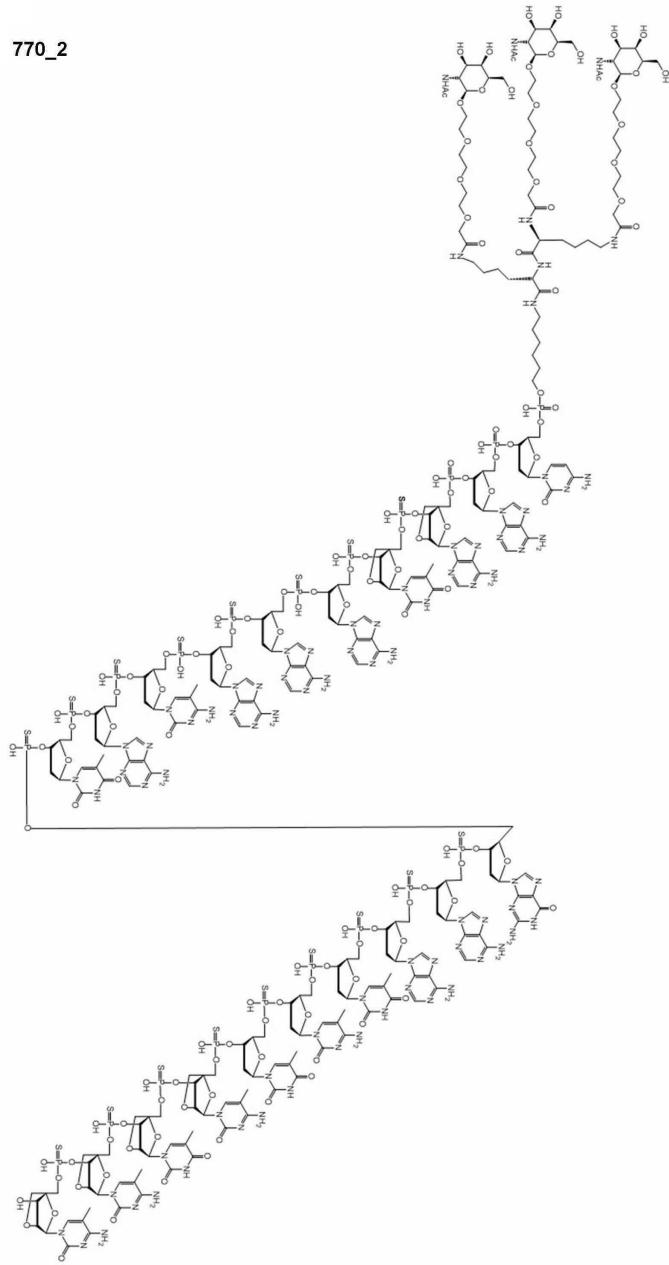
도면7

화합물 번호 769_2

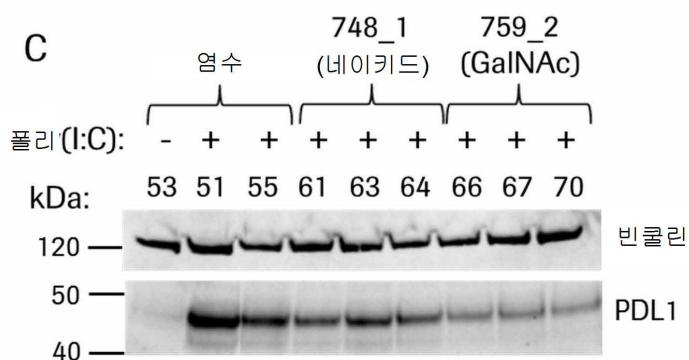
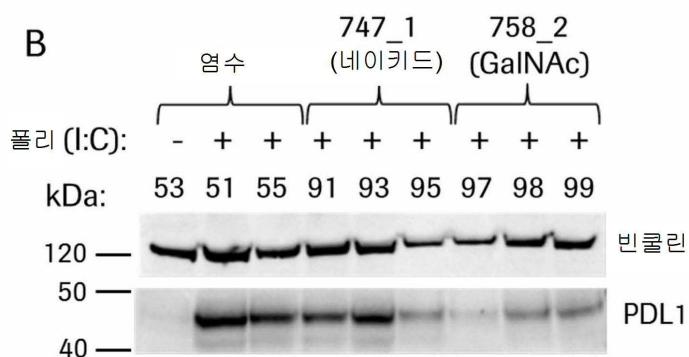
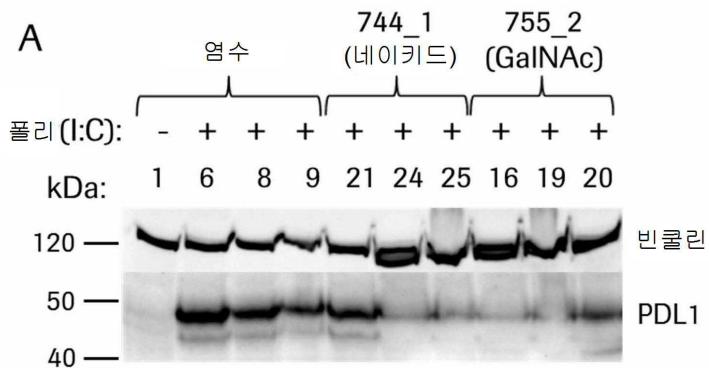


도면8

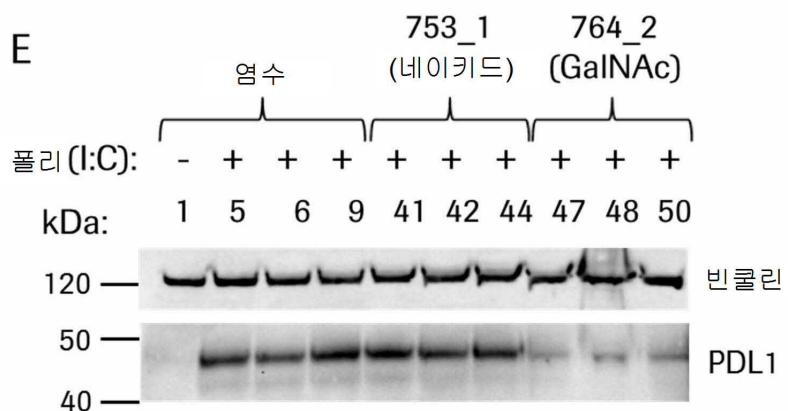
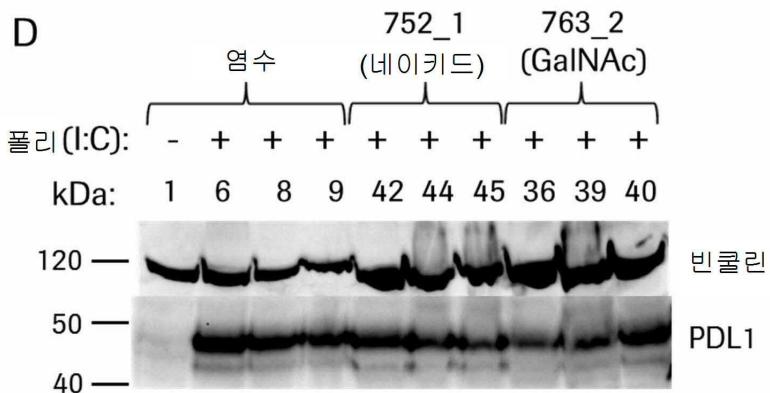
화합물 번호 770_2



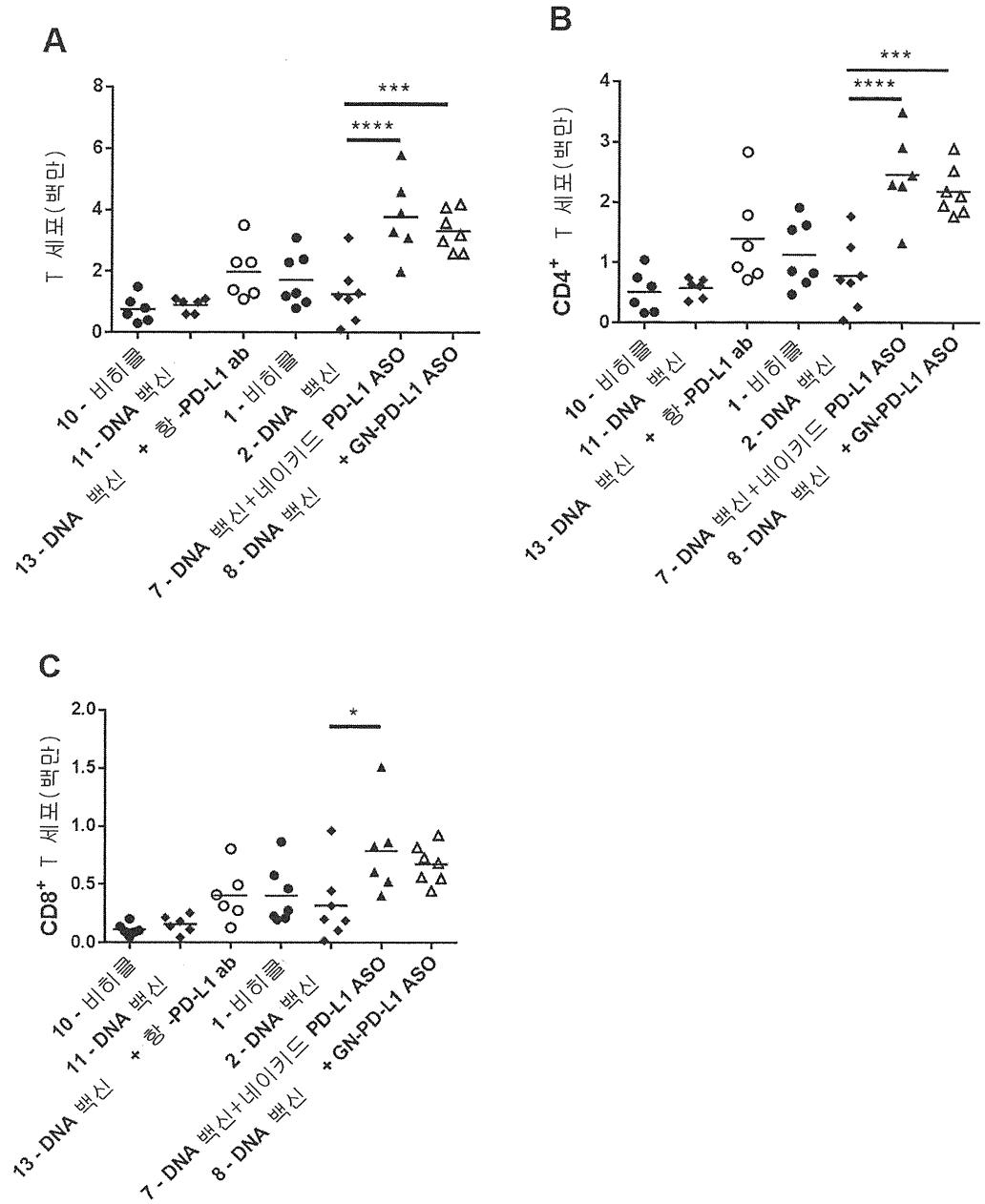
도면9a



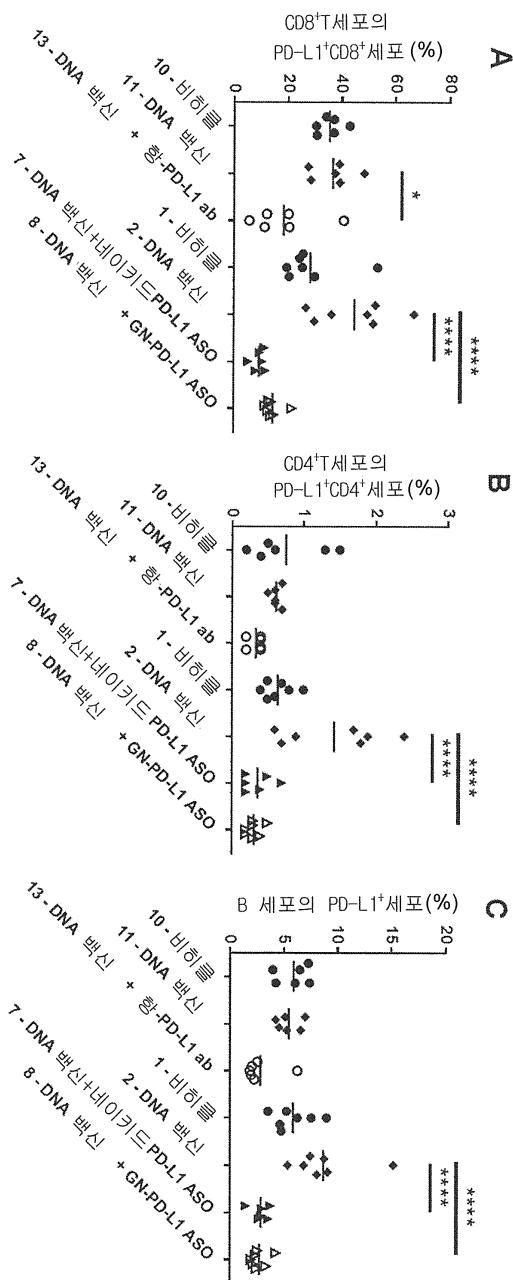
도면9b



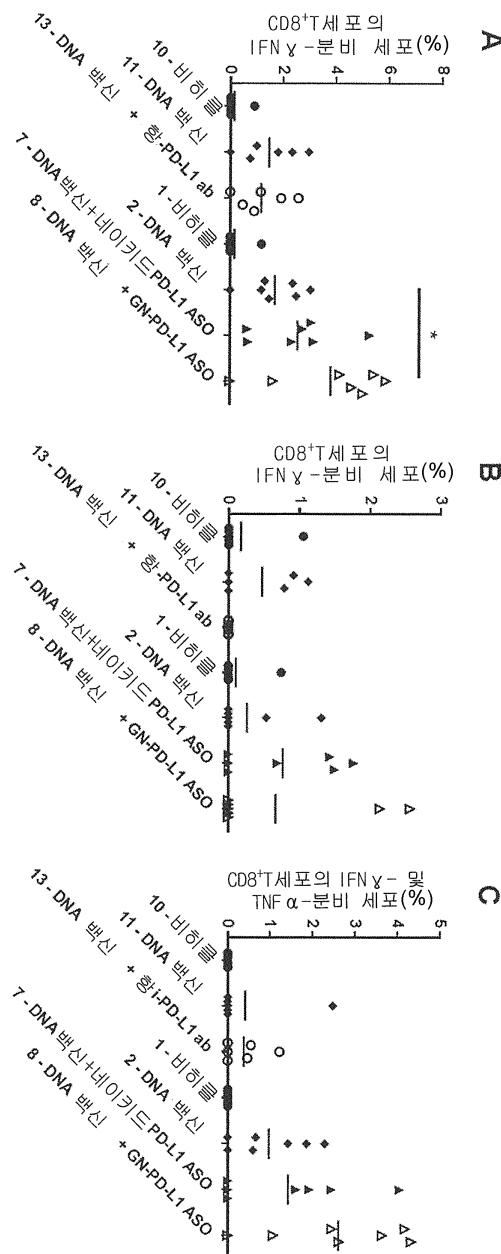
도면10



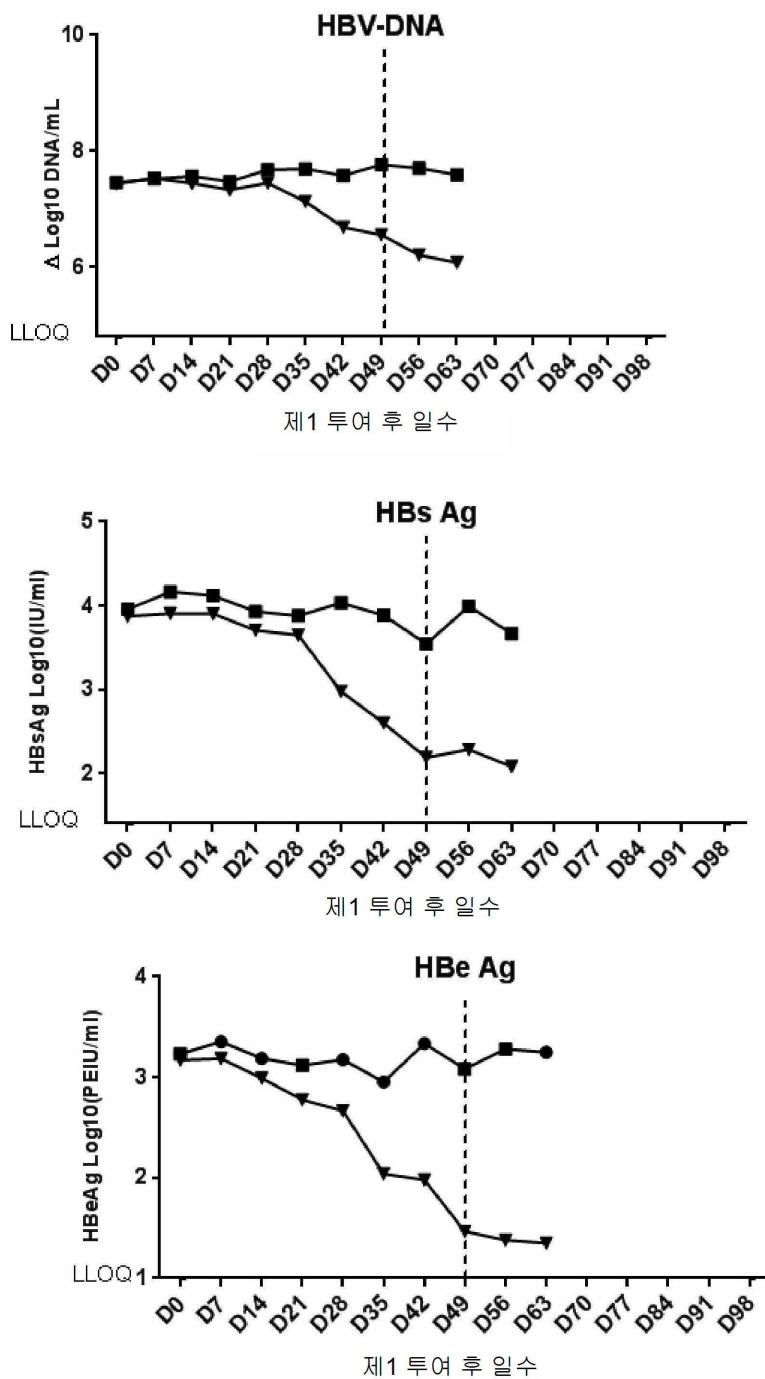
도면11



도면12



도면13



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> OLIGONUCLEOTIDES FOR REDUCTION OF PD-L1 EXPRESSION

<130> P33358-WO

<140> PCT/EP2017/055925

<141> 2017-03-14

<150> EP 16160149.7

<151> 2016-03-14

<160> 786

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20064

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 1

ggcgcAACgc tgagcagctg ggcgtcccg cgccggccca gttctgcga gcttcccag	60
gctccgcacc agccgcgtt ctgtccgcct gcaggttaggg agcgttgttc ctccgcgggt	120
gcccacggcc cagtatctc ggctagctcg ctggcactt taggacggag ggtctctaca	180
ccctttcttt gggatggaga gaggagaagg gaaaggaaac gcgttgttct agggggcagt	240
agagccaatt acctgttggg gtaataaga acaggcaatg catctggcct tcctccaggc	300
gcgattcagt ttigctctaa aaataattt tacctctaaa aataaataag ataggttagta	360
taggataggt agtattttt atgcgactgt gtgttcagaa tatagctctg atgcgttagct	420
ggaggtctgg acacgggtcc aagtccaccc ccagctgcct gctagtaaca tgacttgtt	480
aagtatccc agtgcagca tctaagtaag tctttccctg cgctaagcag gtccaggatc	540
cctgaacgga atttatttgc tctgtccatt ctgagaaccc aaaggagtcc taaaagagga	600
atggaggaggc ctaagaataa aaatagtata ataaaacatt tcttagacac attgacattg	660
gcctatgtca aagttcagtc tgggttgtc ttataacaca aggagtaaaa gtaccattgt	720
tctacctctt ttttaatac ttgaaaaaaa ttactgtgg atgctttct atgaattaaa	780
taaccttcta aaaaatgttt tcattgctgc attcgattag attggtaac taaatgaaat	840
taattcctca ctgttggta taaaggatatt ttacagtgg tctgtcttag ccattcactg	900
aactcattgc atatatatct ctggaatatt gctgattttt tcctcaagt aaacttagaa	960
gtgtaactac ttagtcaaag agcctgaata tttaaaggc ctgttgaaga aaactgaaaa	1020
tgcttccag aaaggatgta ttagttgaca atgacagtgc tcaacagtat ttaaggagaa	1080
ctatgatact ctgaagaaaa acttagcatt tctcagtaaa agtaggttagg cagaggccac	1140
atgacagcag tttaggtgt gccttcaagg aagtccacaga aatactgtgg ggaattgaaa	1200
ccccatgtgg aaaaatgtaca agagtgttc agtgcgtactg agaaggaggt tggcatgg	1260
gtttcatgga gtttaataaa gtttggcac ttagtagagg tttataataat caactgtctt	1320
aatcttgat cctacttaag aattttttt ttgttttgtt agagatgggg ctctgttat	1380

tttgcggccagg ctgttctcgaa actccttagcc tcagggcgatc ctcccttcctc aggctccaga	1440
agtccctggga ttactggcgga gagccaccat gcaggcctct tgctcctact tttgagaaaag	1500
gaaggttaac cggtttttt tgtctttttt ttttttttt tgagacagag tctcactctg	1560
ttgcccattgc tggagtgcag tggtgcaatc tcagctcaact gcctccggg ttcaagtgtat	1620
tctcctgcct cagcctcccg agtagctggg actacaggca cctgccacca cggccagcta	1680
attttgtat ttttagtaga aatggggttt caccatattg gccaggctga tctcgaactc	1740
ctgacacctag gtgatccgcc tgcctcgcc tcccaaagtgc ctgggattac aggcattgagc	1800
cactgctct ggctgtttaa cttttctct atctcatct cctaccatc ctacccttgg	1860
aagatagaga agtagtatta gttccatagt gttatactgg gttccccca gggacaaacc	1920
cacttccccca acctgaatga gccatcaattt cttcccaagt ttacattca ttgctcttta	1980
aatgtctcca ttccggatatg ggaattcaca tatggtcata attttacact gaagaagatg	2040
tcaagtcttct tctcttagac caactgcctt gatatgaggt ttagaggtta aagaacatgt	2100
gtgtatattac atgatcttg tatttcgcct tttcgtccct cactaatgac agctgcaccc	2160
caaggaaatg gagctgtgga agagagggtt tgataagaaa ttaagtaat attggatcta	2220
atccatcacc ctccaggaaag ccttattac tcctaaaaat tcaacccaaa ttcataaaaag	2280
gacaagaact ccaccagagt aggccataaa catggcaaa attagttgtat atccatgact	2340
agatttaatg tccctttgtt ttattccat atggttataa tgctttgcctt ggcatttaggg	2400
gtatatttaag ttttcttctg cctagtaagt gaatttgcgtt ttataataca ataatacataa	2460
aatatcacat taatattta taactgtaca gttataaaat attttataag taatatttat	2520
attttataag taatattta taactgtaca gttaactctg gcccaggaa aagatagtct	2580
gatagatgtt gcagccccat tttagcaat gtgacctcac aggcctgaat gccatcgcta	2640
ttccacatct acaggataga cggaaaggaa agaaataaaa aaataggtac ctaacactgg	2700
caagaggatg atgactcatg ttatttcact taacctttt attttaac atgaaggact	2760
catacagggtt gataagaaaac cagtgcata aacagaccaaa aaaatgtca gatcttcaa	2820
attagcaaaaa aaataatatt ttttaacaa tgggtgaaaa tacagtgtaa cagtagccat	2880
tatcaacatg tggatggaaac cagaaaaatg ttctttctt ttgtatcgca acactatttgc	2940
ggaaaatcta tcctcaggccctt ctagcctggg gcctggcac acagtaggca ctcaacgaat	3000
atttgctgaa cacacaaata cttatgatattttaaaaat tggcaacaat ctgataccata	3060
acaatagagg gattaaatat tatggactgt ttaataaaga tgcttatgaa taccatcgac	3120

taagatggc aatatttatg ccataagctt taatgaaaca aatgggtatt aaatgtatga	3180
taaggttata aattactttt taaaagatta cagggaaaaa aattgaaaga tatacactga	3240
aatgttttt gctcacagtgtg tgacaaaggt ttctcagcac tggcactgtt gacgttttag	3300
gctgtatgtc ttigctgtgg gaggctggcc tgcactgc agggtgttgc gcagcactct	3360
tggcctctgc ccctagatag caatagcagt ctcctcaaa ccagccaaat tttgacaacc	3420
aaaaatgttt ccaggcatca ccagatgtc cctgggtgag agtgatgaaa tagtagggaa	3480
ttttccctt ctttcttat ttctgtat tccattatat tacttaata ataagaaaaa	3540
aacataaaaa aataaacgaa ttttattttt ctacgtcagt ttggatgtt ggactccatt	3600
ttgggttctt ttcattata tcacttggc tgctaaacat tctacgtttt ggttaaggta	3660
agtgattcat gaaattttgg ttttattttt ttcctgatac taaaataaa acatttttc	3720
acttggaaat ttggacacag aacacaaaaa aaaatccata atctcatctc tcttttctg	3780
tctttcctt ctttttcc ctttaaaaac aataaagagt gaaacctacc ttttccct	3840
ctaatttaat tcctaaatat aatactgtc aatattttgg acatttctgt tttctaaaca	3900
cacacacaca cttttttttt tcagcaaaag tggattctg ctacatgttag tttctgcaa	3960
cttactttct atgtgtttac aaaatcgta catgtacata tgctgaattc agtcctaat	4020
ggtattatatttttgaata tacaaaattt tgtaacca cttagacaat ctaggatatt	4080
ctcagttgc tttatgagc aatgtcttc ctttacatat acagacatat atatatatat	4140
gtgtgtgt gtgtttttgt ttttagtagga tagattctt ggagagggtg aaaggtctta	4200
tgacatccgc attacgatt gtaataggaa gtatcaaagt gccccctaaa gaaaaaaatc	4260
ctccattag tggtaagaa agcctatttgc ttcatatctt cacaacact aaatattaga	4320
aatatttaca atgtggta agctcataag tgaaaatggt atttcatatc ttatatttt	4380
tatttgaga ttgaacatct ttcatatgtt tacatgtcac ctgtatttct tattctctga	4440
actataatgtt atgaccttac acttttttc ctcatgggtt atgtgttagtt tgtatagtt	4500
tcttattgt ttttaggagc tatttataa ttaggaacat taatctctgt tcttataat	4560
acgtggcatc gattagttga tcattttgtga gttcatgtct gtatacaaag attggagagg	4620
cactaagagg gaaaacttac ctctttctta tcaaagtttgg taaatataatg tataacagaa	4680
gagggagaaa atattaataa atgcacagat tggctgaaat agagtataaa tctttactc	4740
ccctacttca acataaactg caaaaggaga gtgacttttc ttctactctg acttccgtat	4800
tcctcatgtc taaaatagtgcctagcacag aagagggtgtt caatcgtgtt tgctaaacg	4860
aaataattatgcacatttcac agcaggatga cttaaatgaag aatagaatct aggcaatc	4920
tctgaaagatggctgtgag tcattcatat ctttagtatga attagtcaaa tccaactctc	4980

tccccttccc actccccact gtttagtagaa gaatctgtt attgagagaa tagattata 5040
atttagaata agtgagaggg gcagaagagg agatttgaa ggatggcacc tgaaggagga 5100
ctagcatgcc tgagacagtg aagtggaaagc cttgaatgc taaaggtaa gatgaaagta 5160
tttagctgt a gggggaaaaa gcattgacag gttggaaaag taaaagtca g attcccttg 5220

ctctgaaatt ttgtacaggg caggttctac taggtatgtt acaatgcaga aaaaacatga 5280
aataattgag aggaatttgg tgcaatatta tcttcttggc tcctttgag tgggcagatt 5340
ttttcacgg cctgtaacta taataaattt gaaacttctc atcttttagt aactttttc 5400
acttaagttt atgtggctgt gggcaatgga atgaagatat tgaacttcca attccctgtt 5460
gggtttccac aattacaagt caatcatgac tggttattag aagactattt cagttagaac 5520
cacaagtcc catattgtca tattgtatgt ttaatttata agtgaagcag tcttcttcc 5580
gtgtttcca taatttagggc attccagaaa gatgaggata ttgcgtct ttatattcat 5640

gacctactgg catttgcgtga acggttaagac accaaatcct tccattaggt tctatattt 5700
aaatatttta accatgagtt taaaactaaa atgatcattt aaaatgcattt caattttctt 5760
atagagagaa cattctattt cttcttctac tttacacaat ggcaaagtct tccttctact 5820
ttacgcaatg ataaagttaac ctgtgtcatt ttgtaaaaat atagagaata tagacaattt 5880
gaaagacaca aaataatcta ttaccattt cccagggtta actactgaaa atatctgggg 5940
aaatggccctg tatgtataca tttatttgg tgccttcaac aaggccaaga tccttgcatt 6000
tttcagtctt ggttgctctg tgacatgcct ttccctgatga ggatacttta aggaagaatt 6060

gtaagataca tggaaaatgt caggcttaaca cagtaactggc atcacccgt gctttctt 6120
gaactccata ccaatgtact tcttgcaga aactgatca aaagttagg gaagtaaaaa 6180
gagatgactg ttagaatcta ccattccctc tatgttaggaa gcaaataagg gtccgtcaa 6240
aggacattct ggggatgtct acatgaaacc aagtctccct ggttgtaagg actccatctc 6300
catataatat ttatacagta atataatgtt ataaattgtg gggcaactt gtttagctaa 6360
ttttattttt ctgctattgg gacactgtgt ctcatgtga gatatagtgt cccaaaacat 6420
atttcaagcc cattggataa aatatgttt tagcaagttc ttaaatataa tgataacata 6480

accgaccaga taaagtgatt tataaacgt gtgcattt tgtaatgtt tcgaggaatt 6540
ttccctttc tgaagattgt cttttttct ttttagcatt tactgtcagc gttcccaagg 6600
acctatatgt ggttagatgt ggttagaata tgacaattga atgcaattc ccagtagaaa 6660
aacaatttga cctggctgca ctaatgtct attggaaat ggaggataag aacattattc 6720
aatttgtgca tggagagggaa gacctgaagg ttcagcatag tagctacaga cagagggccc 6780
ggctgttgaa ggaccagetc tccctggaa atgctgcact tcagatcaca gatgtgaaat 6840

tgcaggatgc aggggtgtac cgctgcatga tcagctatgg tggtgccgac tacaagcgaa	6900
ttactgtcaa agtcaatggta aagaattatt atagatgaga ggcctgatct ttattgaaaa	6960
catattccaa gtgttgaaga cttttcattc ttgttaagtcc atacttattt tcaaacagaa	7020
cagcatagtc ttttcattca ttcatcaat tcatgaattc attcacataa ttatccaatt	7080
tcttgagcac ctatttgata gtcactggaa atccagagac aaacaacaca gagccatgtt	7140
ctacagtatg tacagtttc caaaaagaat ttcttagtctt tactttttt ttacaaatgg	7200
aatacgtata ctgcaata attcagatac tgttgaagag atcaaatgaa ttgcaaaagt	7260
gtccctctc cttcaccac tatctccat ggcattgcaga gagatgaaacc attatttg	7320
tgtccctcca gaaattttt tattcaacta ctatTTTTt attttattag gtccgtcagt	7380
tttcctttt tgagcccttc tataatcaa at gcaaaataat atattcagaa caaaccac	7440
tgtaaggttc acattaaaaa agacttgaag tcaccctatg aagacaaaaa ataatcacat	7500
taagtgtcaa agaacctatt cttccagttc aggataagcc atacttactg ggcataattt	7560
catcttggaa atctatactg atgttgtttt ggggatttga aaaggaacta ggagtgttag	7620
ttcctcggtt ttgaccacata gttatgtt caggtcactt gagttcaaag ttttgtttt	7680
gcactagcta agtaaaggaa aacaccttg ctttcattgt tgagttcac agaattgaga	7740
gctgaaagga tcccaggcag gagcagctaa tccaaactcc cacaagaac aaaaatcccc	7800
cagaggatct tcgttctta tatttcctgc aatggcgccc ctgtcatatc ccacaatggc	7860
ctccctgcca ttggatatac cttccatat cctgttggaa ttactcccta atagtaagct	7920
gaaatctgcc cctctagttt tagtcttggg attatttcat ttacatgtt acctttat	7980
atttgacttag aattaaatca tctcccttg gtcttccat tcctggctt actaccatca	8040
atctgaggc taacaataca agtagaaaaa gtatacattt gtcactgtt actgtatcaat	8100
tattaaatcaa tgatcactga taactataaa ctcaaaaaca aaatcatgtt gggattaaga	8160
gaaatgtatc agtttatgt tttatgttctg gtccctgata ctggctcagg taatgccact	8220
attgtcaaga agataaccact tttttttttt cattatattt taccatatgc	8280
ttctccatcc atgacatctc ttgagatgtt gtggttata ctgttccatc ttctccatc	8340
catccgaaaa tatcaggcat ctactgtttt ccaagatatt aaagaaatca tcatgactta	8400
gcctcatcaa cagcattgtt agatctggaa tggaaaggaa ggttataatc ctggcagtca	8460
ggaagaaggc agcataaagt ataagttct gtttccaaaa aaggttccatc atcagctgt	8520
aggagtggtt tagggaaaggc acagctgtcc ttgttaggg gaagggtttt attcaggatcg	8580

tctgggctcc ataatatccc ttgtgtatct gcagtctcct ttgccatgga tcaacacaat	8640
aggaaatctt ccggcactiga tggtttcc aagggggagt tcttcctgga gcaaagcaa	8700
tgaccaacca ggttgagga cctgattgt ttgacaattc catttgtat tgtaaattac	8760
ttaattggca ttctactccc aatccatctt gtcatttgc tacagtggtt ttgggattga	8820
gttcagctat accaaaagtc tgaacctct gcacttagaa caaggcaacc accaagctc	8880
acttgcactg aggccgtgc tccaatggaa atgaggcagc tggcttgcag gagctccca	8940
actcaggaa gtagaactcc tgagtacctt ccatatgcaa atgattcac agtaatgctg	9000
ttgaacttca ctccccatca cagcaaatgt gtggtaacat agcttccca caggagttt	9060
ctcaccatgg tattttaag gtgaaacatt tcaaaaactga aatttgaag aatttagttt	9120
tggattcaact caattatcac tatcaattcg ggtgttattt cacccctt gtttgtgagt	9180
ttaaatgcca gactctcagg ccactaactt tcaattaaaa gtgtttct ttaatcgctg	9240
aacctaacag cagggaaaac gaaatgttca tttagactt cagaacccatc aatgagatta	9300
ggcagctgaa agatcaaagt gttgcatagt tgcatacgata aagctattt gatcatatgg	9360
accaaatacgat ctgcgtcat tccccaccaa cccatctt cccaaattt cccagccctg	9420
ttaagtgtt ctctgttagca tttatctcta tctagtatat tgcgttagcat atcatatcat	9480
actttctgt tttgttattt gtctctctcc tcctagaata taaactccac aagcacaaag	9540
atttggcct gtttataat attttgcattt cccaggggcc tgatatacag cagagtgg	9600
gtacgaaaag agcacacaaa aaaatatttgg tttagtcaat gaatgaatga ttccctcaa	9660
taggatttagc ctaaaattt ggaacatga acagattgg atatgtaaa atttatttcc	9720
agactgttca tcaggaactg tttagcagtt ctaaaggta cactggagca gcagtagtaa	9780
aaggaggaag aggagcagct ctgcgtactgc tactatcgat tactactaca attagcattt	9840
gcttattctg tgcgttaggc cctgtactga acactctgtc taaatttagtt catttcctcc	9900
tggaaatgac tctagggggta aagtgcattca tcatgtaa tgagtatttt tcacattttg	9960
ttgtgtctga aatctgatgt tgcatttcaa tgatggatcc ttgatttccat tgataagtgg	10020
tattattccc attttaaagga tgaggaaact gaggtccaaa gaaattaagt aatttgc	10080
aatttccacca gcctagaaaa tgataagct agttctaaac ccaaggat tagctctgaa	10140
gtctggggccc ttaataacca cttttatttgc cctatatttgc tacatctgtt gatgtatca	10200
agttatatgt tgacttcaaa actatcatga cttttcttgc gttttgatttgc tccaaatattt	10260
gtatagtgtt ctgggtctgc aaaaatttttgc attactcatc tcatctgtaa aacatttttgc	10320
actcgtgtt ttgtgcattgc acattttgtt gtaatttataa aattttact ttctgtttaat	10380
atataatgtt tgcataaga aactgcgtt tttgaagatc aaaaaaaaggt tgaatgttac	10440

cagttacatc tggtaacc taatagacat ttgtacaaa acagacattt taagggttg aaataaaaat ttaataaaca atatttcag ttttactaa ttgtgatgct tcactatcat tagctaataat gtcaaggcat aatacaccc agggtaact ttatcattaa caaagggtgga tttgtcaat aatcttgagg ttgtgttt ttatataac actgcgaggt ctaatiaagt	10500 10560 10620 10680
acttactgtt taccacctca tacagtggcc gataaaaagt gtcacttctg ctgtttcctc tgggttgtc ttgaattatt agtattatct tcagtcctca gttctttgt gggaaacttt ttaatttagtt gttaaatttt gtaagatgg tagtttagc aaaatttagat aagagaattt gaaaatccgt agctacccc aagcaaccta cacataagaa ctattattt tgtgtttga aatcataatt ttattgattt ccagtgttc cactggtagt gtttcattig atataggagt atcaaaacat cactcattat ttatccagt ttcatgtt cctagccgtt ttgtattaac tctctgtgaa gaaattacct cacaatcta ttgtgtcct ttgtaaagga atggagaatt	10740 10800 10860 10920 10980 11040 11100
aaggctctag atcatttagtg gttacactat agtattagaa gtaaaaaaaa gattatacca acaaaataag aacatgttaa tgtacttgta atgaataaac atgaataaag ctcttatgct atataagggtc actaaacaat ctactagaat tgtcagcaaa ctacgtatct taatcctgaa agggtcccaa accaatgatc taaaattgaa tcaaacttgc ttcccttgagc ataattactt aaatgattt taaaatagc cagcattaa aagcttaaaa tgtaatatc ataatgtgg atcctagata gcatcccaga acagaaaaag gatattaggg aaaaactgga ggaatggaat aaattatgca gtttagttt taataatgtc ctaacgtcct tagttatgac gattgtacca	11160 11220 11280 11340 11400 11460 11520
tggttaatgta agatactaac aatagaggaa accgggtaag gagtatacag taactctata ctatcttgc aactttttg taaatttaa acttctaaaa taaagaacaa atttaacat taaaaagtat caccaggaac atatatcact gtttacagat gaaatactat gtatccat atctaatttc tgatcattga cttcaaatca gaaaagtgaa tgacacctca aaatcaggtt ttctgtttac tgaagtctaa gaaaagaaaag cataccagct ggagagatc atgtttataa agacagattt ataacaacaa aaataaaaata tccaagaata aatttaaagaa gaagcacttt actgagaac atatgaaaac ctgaacaaat ggagagggat attttgtatt tgaatagaaa	11580 11640 11700 11760 11820 11880 11940
gacttctgg ttaaagataa ttctctttaa attattttt gtagaaattt aagggtaca agagcagtgt tgcacatgg atatattaca tagtggtaa gtctgggtt ttgtgtaaa ttaatctta catttgttt gagcccaata aatgtacca catgatttt atagaaagat agtcatcctt ataatccaa acttgcacca actttgaatt gaattgaggc agagctagca ggtgtcccc acggctgagg catctgaaca ttaagcatat ccctctgaga accagcctgc attgataactc ttctaatgt ggacagcatc aagctatgtc cgtagttctg tgctcagcaa	12000 12060 12120 12180 12240 12300

aagccctgac ttcttttgt ttatgtccta gccccataca aaaaaatcaa ccaaagaatt	12360
ttgggttgaa atccagtcac ctctgaacat gaactgacat gtcaggctga gggctacccc	12420
aaggccgaag tcatactggac aagcagtgcac catcaagtcc tgagtggtaa gaccaccacc	12480
accaattcca agagagagga gaagctttc aatgtgacca gcacactgag aatcaacaca	12540
acaactaatg agatttcta ctgcactttt aggagattag atcctgagga aaaccataca	12600
gctgaattgg tcatcccagg taatattctg aatgtgtcca taaaatatg tctaactg	12660
tcccttagca cctagcatga tgtctgccta tcatagtcat tcagtgattt ttgaataat	12720
gaatgaatga ataacactat gtttacaaaa tatatcctaa ttccctcacct ccattcatcc	12780
aaaccatatt gttacttaat aaacattcag cagatattt tggaatatac ctttggttcc	12840
atgcattgtat gtaactcattt gatacacata gaataataag actcaggta cactctttag	12900
gaaacagata aaaaactaag aaacaaacaa aaaacaggca atccaacacc atgtgggaaa	12960
tgcttcata gccggaaac ctgggaaata cctgagagga atactcaatt caggccttgt	13020
ttcaggaatc caaatcctgg cacatcagag ctgctccct cttccaggg tggcaggaaa	13080
taaatggAAC atatTTTCT atcttatgcc aaacatgagg gaccTTTCT ccccggtgcc	13140
tctcccaagg tagtctacaa tatttcaact cttagcgtct gcttagtgca tagaacatga	13200
ggctgtgtgt ccctggcaa attactagac ttctgtgtgc ttactttcc ctgtaggatt	13260
ataatctact gagcaagctt attgttaaggg tcagattagc aacagtgtat gaaaatgatt	13320
ttagaccatt gcctgcacaa attcaactat tttttttat ctcaactactc tacagaagta	13380
ggtagggtgg gagacagagt ctgatgagag gctcagaatg taaaagaaaag tgaggcgagt	13440
gagcatgata ttAAatataa acacaaagat attctgagaa gagctgctca ctgccccctc	13500
ccccaaataca tggataggaaaatgccac gtacttcagc aaaaacaact gaaaaattag	13560
atagaaaagt caatcaatag gaaaagataa tccaggacgg tgggtgtgaac agaaagaggg	13620
ggaaaaaaact ttagaaaaatg atggggatgc tcttactggg gtacgagtcc tcaggtattt	13680
aactgggttt cagtaaaagc tagatttagtgg ggttctgcatttacaage tggtttatga	13740
caacttactt gttgggtggc ctacagtaac tcacctaact gcactgagtc tggttctca	13800
tctgtaaatt ggggattttt tttaataac ctggcatgcc taactcataa agttgttctg	13860
aaactgaaat aaaacatacg tgaacaggca ttgtaaactg taagttacgg aaaaagctgg	13920
ctgtgttgtt gtctttaag ttccacctgg gtgtcaaaatg atggatcatg ggtctcgt	13980
gagagctgag ccaggcagga gctgactaag ggtgagaggt gggagtttagc agcctctgaa	14040

agttgatttgcacaagaaa taattgtgcagcatgtat tttgaatatt tctctggaaa	15960
aaaagatttag ttggcagtag aaatggatag aaatcaatag atattaaaat acctcagaat	16020
ttggttcatctctggaaaa gatgaaaaat aaaagtgtat actcctcaag aacatctagg	16080
atcaaaagca tgccctac actattgaat taattaacct cataagttgg gaccgtggaa	16140
ataaggatgt ccaccagact tccttagggat tacaaatgtt tcacagaact tgaatattaa	16200
acttgggtca ctgtatggta tgttagagctg tgctatatgg aaataaaaat gatttcttt	16260
tctcaaggaa gaatgatggta tgtgaaaaaa tgtggcatcc aagataaaaaa ctcaaagaag	16320
caaagtggta agaatatcg aaggaattgg gaagtaaaag tcaaaggaaa caaaaagcta	16380
aagcaataac aaagagaaaat ccatcagtc taatctc tcctttaaa gaatgttgtt	16440
tccccttgc ctacagcta acacaagaac tcctccaccg tctgaggagg tttaggagca	16500
gggaagggga agggtcagc ttcatgtt aatctctgt tgccctgcac cctagcagct	16560
ccttcagca gggacaagg atgacttagg tggatggata attaattgtat tctaaaat	16620
tgtgtcag tattgtataa ctatgttaat tgccatgc acgttatctc atttaatccc	16680
ccaccccttgcattacca agagagagag agagagagag agagaaatac tagaatttat	16740
cctcattta cagtagagaa aacagagggt caagaagata atgtaaagtgc ccaagaaca	16800
cacagctgat cacaaaaatc aagttgggg gccattagcc taaccacaga cccttactct	16860
taaccatct gctcaatcc atttgctac aaatgtttac atttataagc agggcagaaa	16920
aacatcatcc agttattga actaagaaga aagttatatt aagtttcta attttttaa	16980
tgttagtaga aaccaaactt aacaatgagcccaagttaa agcagtcataa ttaacctggaa	17040
caagctcagg caagttcat tctgtggccc atagcatcat ctgtgtgt aagctaagta	17100
gcaaatgtt tttgggtcat gctggggac aagccatccc aatttgctca ggactgagg	17160
gtttccagg atatcatgtt aggtataattt ggtacaaata taacctgctg ctttctctca	17220
tttcaaattt atcatttatac atatcagca ctatgttta tttttttat tagatttctt	17280
gttactttt ccccagacca cttccatga aattatata ctattatcac tctccagata	17340
cacatttggaa ggagacgttac tccagcattt gaaacttctgtatcaagca gggattctca	17400
acctgtggtt taggggttca tcggggctga gcgtgacaag aggaaggaat gggccctgg	17460
gatgcaggca atgtggact taaaaggccc aagcactgaa aatggaaacct ggcgaaagca	17520
gaggaggaga atgaagaaag atggagtcaa acagggagcc tggaggaga ctttgatact	17580
ttcaatgcc tgagggctc atcgacgcct gtgacaggaa gaaaggatac ttctgaacaa	17640
ggagcctcca agcaaatacat ccattgtca tccttaggaag acgggttgag aatccataat	17700
ttgagggtca gttctgcag aagtgcctt tgcctccact caatgcctca atttgtttc	17760

tgcatgactg agagtctcag ttttggaaac ggacagtatt tatgtatgat ttttcctat	17820
ttatTTTgag tctgtgagg ctTCTTGTca tgtgagtgt gttgtgaatg atttctttg	17880
aagatataattt gtagtagatg ttacaatttt gtcGCCAAAC taaaACTTGTc gcttaatgat	17940
ttgctcacat ctagtaaaac atggagtatt tgtaaggTgc ttggTCTCCT cTataactac	18000
aagtatacat tggaaGcata aagatcaaAc cgTTGGTgc ataggatgtc acCTTtattt	18060
aaccCattaa tactctggTT gacctaAtct tattctcaga cCTcaagtgt ctgtgcagta	18120
tCTGTTCCat ttaaatatca gCTTACAAT tatgtggtag cCTCACACACA taatctcatt	18180
tcatcgctgt aaccaccctg ttgtgataac cactattatt ttacccatcg tacagctgag	18240
gaagcaaaca gattaagtaa ctTGCcAAA ccAGTAATAA gcAGACCTCA gACTGCCACC	18300
cactgtcctt ttataataca atttacagct atatTTTact ttaAGCAATT ctTTTATTCA	18360
aaaaccattt attaagtGCC ctTgcaatAt caatcgctgt gCcaggCatt gaatctacag	18420
atgtgagcaa gacaaggTAC ctgtcctAA ggAGCTCATa gtATAATGAG gagattaaca	18480
agaaaaatgta ttattacaat ttagTCCAGT gTCatAGCAT aaggatgtg cgagggaaa	18540
acccgagcag tttgccaag aggaggAAAt aggcaatgt ggtctggac ggttggatAT	18600
acttaaacat cttaataatc agagtaattt tcattacaa agagaggTcg gtactaaaa	18660
taaccctgaa aaataacact ggaattcctt ttctAGCATT atatttattc ctgatttgc	18720
tttgcCATAT aatctaAtgc ttgtttatAt agtGCTGgtt attgtttaac agttctgtct	18780
tttctattt aatGCCacta aattttAAAt tcatacctt ccatgattca aaattcaaaa	18840
gatcccattgg gagatggTTg gaaaatctcc acttcatcct ccaAGCCATT caagtttct	18900
ttccagaAGC aactgctact gcctttcatt catatgttct tctaaAgata gtctacattt	18960
ggaaatgtat gtAAAAGCA cgtattttt AAATTTTT CCTAAATAGT aacacattgt	19020
atgtctgctg tGtactttgc tatttttatt tatttttagtG tttcttatAt agcagatgga	19080
atgaatttga agttcccagg gctgaggatc catgccttct ttgtttctaa gttatcttc	19140
ccatagettt tcattatctt tcatatgatc cagTataAtgt taaatAtgtc ctacatatac	19200
atTTAGACAA ccaccatttg ttaagtattt gctctaggac agagttggA tttgtttatG	19260
tttgcTCAA AggAGACCCa tgggctctcc agggTgcAct gagtcaatct agtctaaAA	19320
agcaatcttA ttAttaactc tGtAtgacag aatcatgtct ggaacttttG ttttctgtt	19380
tctgtcaagt ataaaccttA ctttgatgt gtacttgAA aatcacattt tctttctggA	19440
aattccggca gtgtaccttG actgcttagct accctgtgcc agaaaAGCCT cattcgTT	19500

gcttgaaccc ttgaatgccca ccagctgtca tcactacaca gccctcctaa gaggcttcct	19560
ggagggttcg agattcagat gccctggag atccagagt ttccttccc tcttggccat	19620
attctgggtt caatgacaag gagtacacctg gcttgccac atgtcaaggc tgaagaaaca	19680
gtgtctccaa cagagctcct tgtgttactt gtttgtacat gtgcatttgt acagtaattg	19740
gtgtgacagt gttcttgtg tgaattacag gcaagaattt tggctgagca aggacatag	19800
tctactcagt ctattcctaa gtcctaactc ctcctgtgg tggatgtt gtaaggcact	19860
ttatcccttt tgtctcatgt ttcatcgtaa atggcatagg cagagatgtt acctaattct	19920
gcatttgatt gtcactttt gtacctgcat taatattaata aaatattctt atttattttg	19980
ttacttggta caccagcatg tccatTTCT tgTTTATTG gtgttaata aaatgttcag	20040
tttaacatcc cagtggagaa agtt	20064
<210> 2	
<211> 20261	
<212> DNA	
<213> macaca fascicularis	
<400> 2	
gtaaaaatcaa ggtgcgttca gatgttggct tggatgtttt attaataaca	60
taccaaatgt ggatttggttt taatcttcgg aactttcc ggtgaaaacc tcatttacaa	120
gaaaactgga ctgacaggtt tcaatttctg ttcatTTCT atacatagct ttattcctag	180
gacacccaaca ccactcgcta cccaaactga aagttcccc gattccggccg aaggtaggaa	240
aagtccaaatg cggggcaaac tggatttgc gccttgcgc gagggtggcg ggaccccgcc	300
tccggggccgg ggcggcaagtt gagcagctgg cacgcctcgc gaagccccag tcctgaagcc	360
ccagtcctgc gctgtttccc gaggctccgc accagcccg accatgttttgc cctgcaggtt	420
gggagcgttg ttctccgca ggtgcccacg gcccagcatc tctggcttaac tcgctggca	480
ccttaggacg gaggatctt acacccttc ttggatgg agagaggagg agggaaaggg	540
aaggcgatgg tctagggggc agtagagcca attacgtt ggggttaata agaacaggca	600
atgcatctgg gtttcctcca ggccaaattt agtttgctc taaaataat ttataccctt	660
aaaaataataat aagggtggta gtataggata ggttagtcatt ctatgcgc cgtgtgttca	720
gaatatagtt ctgtatgtt gctggaaatc tggacacggg tcctgttca ccgtcagctg	780
cttgcgttca atatgactt tggatgttcat cccagctgca gcagataatg aagtctttc	840
ctgcgttcaag cacgtccagg acccctgaac ggaatttatt tggatgttcc attctgaaaa	900
cccaaaaggag tcctaaaaga ggaatggagg agcctaagaa taaaatagt ataataaaac	960

atttcttaga catgttgacc ttggcctatg tcaaagttca gtctgggttt gtcttataac	1020
ataaggagta aaagtaccat tggtctacct cttttttaa tacttgaaaa aaaatttact	1080
gtatgtctt ttcttataat taaataacct tctaaaaat gtttttagt ctgcattcga	1140
ttaggttggta taactaaatg aaattaattc ctcactgtg ggtataaagg ttatttacag	1200
tggttctgtc ttagtatttc actgaacatc attacataga tatctctgga atattgtga	1260
ttgtttccgt caataaaactt agaagtgtaa ctacttagt aaagagactg aatattttaa	1320
aggcatttg aagaaaactg aaaatgctt ccagaaagga tgtatcagtt gacaatgatg	1380
gttgtcaaca gtattnaagg agaactatga tactctgaag aaaaacttag ccttctcag	1440
tagaagcagg taggcagagg ccacatgaca gcagtttagag tgggtcttc aaggaagtca	1500
cagaataact gtgggaaatt gaaacccaa gtggaaatg tacaagagtg tctcagtgt	1560
actgagaagg aggtggcgt tgggtttaa cttagaatt ttttcttt tctttgtgg	1620
agataggcgt ttgttatgt tacccaggct ggtcttgaac tcctaggctc aggcgatcct	1680
cccgccctcag gctgcagaag tcctggatt actggccgga gccaccatgc aggctcttgc	1740
ctcctacttt tgagaaagga agcttaacct tttttttt tttgtttgtt tttttttt	1800
gtttttttt agacgagtct cactctgtt cccaagctgg agtgcagtgg tgccatctca	1860
gctcacggca accctgcct cctgggtca agtgattctc ctgcctcagc ctcccgagta	1920
gctggacta caggcaccca ccaccacgcc cggttaattt ttgtatTTTt agtagagatg	1980
gggttccacc atattggtca ggctgatctc gaactctga ctcatgtat ccacctgcct	2040
cagcctccca aagtgcgttgg attacaggcg tgagccacg cgctggcca ctgtacttt	2100
tctctatctc ttcccttctac ccatcctacc ctggaaagat agagaagtaa tatcagtcc	2160
atcgtgttat actgggttc ccccaggac aaacccactt ccccaacctg aatgagccat	2220
cacttctcc ccagttaca ttcatgtt cttgaatgt ctccgttcgg atatggaat	2280
tcacatgtgg tcataattct tacctgaaga agactgacgt ctcttctct tagaccaact	2340
gcctgtatgt gaggtttaga ggttaagaa catgtgtta ttacatgtat ctgttattc	2400
tgcctttcg tccctacta atgacagctg aaccccaagg aaatagagct gtggaggaga	2460
gggtttatgt agaaagttagg taaatattgg atctaattcca tcatcttcca ggaaacctcc	2520
attacttcta aaaatttcaa ccaattcgt taaaggacaa gaactccacc agagtagggc	2580
cataaacatt ggcaaaatata gttgtatct atgactagat ttaatgtccc ttgttttat	2640
tcacatatgg ttataatgtt tgcttggaa ttagggat ttaatgtttt ctctgccta	2700

gtaaatgttat ttgtgcttat aatacaataa ttataaaata tcacattaat attttataac	2760
tgtacagttt actctggccc aaggaaaaga tagtccggta gatgctgcag cctgatttt	2820
tatctaacc tggcaagagg ataatgactc atgttatttc acttaccctt ttatcttt	2880
aacatgaagg gctcatatag gtcaataaga aaccagtgtat aaaaacagac caaaaaatga	2940
ttagatctt cacattagca aaaaaaaaata tttttaaac aatacccaac tgggtgaaa	3000
tacagtgtaa cagtacaaa tatcaacatg tgtcaagaac cagaaaaatg tttgtttct	3060
ttgatcagca acactatgg agggaaatcta tcctcaggc ctagcctggg gcctggcaca	3120
cagtaggcac tgaacaaata tttgtgaac acacacatac ttatgtatatt tttaaaatgt	3180
gcaacaatcc aatacccaat aatagaggaa ttaaatattt tagaactgtt caataagat	3240
cttacgaata tcatgcagta agatggcaa fttttatatc ataagctaa atgaaacaaa	3300
tgggtattaa aggtatggta aggttataaa ttacttttta agagattaaa gggaaaagac	3360
tgaaagatatactgaaat gctcacagtg gtgacaagggt tccccagcct tggcactatt	3420
gacattttgg gctatgtctt tgctgtggga ggctggcctg tgctctgcag gaggtttggc	3480
agcaactctg gtttctaccc cttagatgca gtagcaaccc tccctcaacc ageccaattt	3540
tgacaaccaa aaatgtttcc aggcatcacc agattctccc tgggtgagag tgatgaaaca	3600
gttagtgatt ttcccttct tttctcattt tctgttaattt tgtcacatta cgtaataat	3660
aaggaaaaaaa cataaaaaat agatgaattt attattctac ctcagttgg atgtttggac	3720
tcccttggg ggttcttcc attatatcac ttggctgtctt aaacagtcta tgggtggca	3780
aggtgaaatg attcatgaaa tttttttttt attttttacc tgatactaaa agtaaaacat	3840
tcattcgctt gaaaatttgg acacagaaca caaaaaaaaa tccataatct catctcttt	3900
tttctgtctt ttcccttcctt tttccctttt aaaaacaaga gtgaaaacct accggttctc	3960
cctccaattt aattcctaaa tataatcact gttttttttt tggacatttc ctgtgtctaa	4020
acacacatac tcacttttc ttttttttag caaaaagtgg atttctgcta catgttgt	4080
tccgcaactt cctacatgtt tacaaaatca gtacatttac atatgtgaa ttcatgtctt	4140
aatggtatta tattttgtga atataacaaa atttattttaa ccacttagac aatctaagat	4200
attctcagtt tgctgttatg agcaatgctc ttcccttaca tatacatata tatgtgtgt	4260
tgtgtgtgtg tttttttttt ttttagtagg atagatttctt aggagaggc	4320
gaaatgtcat atgacatcca cattacaat tgtaatagga agtataaagtgcccttaa	4380
aaaaaaaaat tcctccatt agtgtgtgag aaaggctatt tgttcatatc ttccaaaca	4440
ctaaatatttta caattgtgtt caagctaaga agtggaaaat ggtatttcat	4500
atcttataat ttttgtgtg agattgaaca tatttcattt gtttacatgt cacctgtatt	4560

tcttattctc tgaactatac gttatgacct ttcaattttt ttcctcatgg gttatgtgtat	4620
gttttgttag ttgtcttatt gattgttagg agctatttat atattaggaa cattaatctc	4680
ctgtcttata tgtatgtggc attgatttagt tgatcatttg tgagttcatg tctgtataca	4740
aagatiaagag aggagtaag agggaaaact taccttttcc ttatcaaagt ttgtaaatat	4800
atgtataaca gaagagagag aaaacattaa taaatgctga aataaagtat aaattttta	4860
ctccactact tcaacataaa ctacaaaagg agagtgactt ttcttcatg ctgacttcca	4920
tattccccat gcctaaaata gtgccttagca cagaagaggt gctcaatcag tgtttgctaa	4980
atgaaagaat tagtaacatt tcaagcagga tgactaaatg aagaatagaa tcttaggcaga	5040
tactctggaa gagtgactgt gagtcatca tggcttggat atgaatttagt caaatccagc	5100
tttctcccct tcactccc cactgttagt agaataatct gtttatttag agaatagatt	5160
tataatttag aataagaggg gcagaagagg agatttgaa ggatggcacc tgaaggagga	5220
ctagcatggc tgagatagtg aagtggaaatg ctggaaagc taaaggtaa gatggaaagta	5280
tttagccgta gggggaaaaa gcattgacag gttggaaatg taaaagtcag atttccttg	5340
ctttgaaatt ttgtacaggg caggttctac taggtatgtt acaatgcaga aaaaacatga	5400
aatagttgag aggaatttgg taaaatatta tcttcctggc ttctttgag tgagcagatt	5460
ttttcaggg cctgtacta taataaattt gaaacttctc atcttttagt aactttttc	5520
acttaagttt atgtggctgt gggcaatggg atgaaggat tgaacttctt attccctgct	5580
gggtttcac aattacaagt caatcatgac tggttattag aagactat taaatggaaac	5640
caccaagtcc cataatgtca tattgtgtt ttaatttta agtaaagcag tcttctttt	5700
gtgtttcca taatttagcac attccagaaa gatgaggata tttgctgtct ttatattcac	5760
gatctactgg catttgcgtga atggtaagac accaaatctc tccatttagt tctatatttt	5820
aaatatttttta accatgagtt taaaactaaa atgataattt aaaaatgcattt caattttttt	5880
atagagagaa tattcttctc ttcttctac ttacacaat gacaaagtct ttcttctgct	5940
ttacacaatg ataaagttcc ctgtgtcatt gtgtaaaaat atagagaata tagacaaattt	6000
gaaagacaca aaataatcta ttacccattt cccagggtta actactgaaa atatctgggg	6060
aatggcctg tatgtatata ttatggtt tggtttcaac aaggccagga tctttcaatc	6120
tttcaatctt ggttgctctg tgacatgcct ttccctgatga gaatactcta aggaagaattt	6180
gttaggataca tggaaaatgt cagggttaaca cagttactggc accaccctgc ggtctttct	6240
gaactccata ccaatgtact tcttgcaga aaactgtatca aaagtttagg gaagtaaaaa	6300
gagatgttag aatctaccat tccctctatg taggaagcaa ataggtgtcc agtcaaagga	6360
cattctgggg atgtctacat gaaaccaagt ctcctgggttgaatgtactcc atctccatat	6420

aatatttcta cagtaatata tgtttataaa ttgtggggc aacttgttta gctaattta	6480
ttattctgtt atgggacac tatgtctctg catgagacat agtgtccaa aacatattc	6540
aagcccattg gataaaatat gtathtagca agttcttaaa tataatgata acataactga	6600
ccagataagg tgatTTTaa atgctgtgcc aactttataa atgttttag gaattttccc	6660
ttttctgaag gttattcttc ttctttta gcattactg tcacggttcc caaggaccta	6720
tatgtggtag agtatggcag caatatgaca attgaatgca aattccagt agaaaaacaa	6780
ttagaccta cttcaata tgcatttgaa gaaatggagg ataagaacat tattcaattt	6840
gtgcatggag aggaagacct gaaggttcag catagtaact acagacagag ggcccgactg	6900
ttgaaggacc agctctccct gggaaatgct gcacttcgga tcacagatgt gaaattgcag	6960
gatgcagggg ttaccgctg catgatcagc tatgggtgt ccgactacaa gcggattacc	7020
gtgaaagtca atgtaagaa ttattataga tgagaggcct gatcttata gaaaacatat	7080
tctaagtgtt gaagactttt cattttata agtccatact tattttcaaa cagaatagca	7140
tagtctcttc attcattcat tcagttcatg aattcattca cgtaagtctc caattagcat	7200
ttcttgagca cctatatgat agtcattgaa aatccagaga caacacagag ccatgttcta	7260
cgttatgtac agtttccaa aaataattcc tagtcttac ttttttatta taaatgtaat	7320
acatatactt gcaaagaatt cagataactat ggaagagatc aaatgaattt caaaagtgtc	7380
cctctccct tcaccactat ctcccatgat ataaccacaa gacactccaa gagagtaacc	7440
attatttgat tgccctcca gaacctttt tattcaacta ccattttttt atttttag	7500
gtctgtcagt ttccctttt tgagcctctc tataatcaa gtaataaaat atattcagat	7560
caaaccac tgaagggttc atattaaaaa agacttgaag tctccatg aagacaaaaaa	7620
ataatcatat taagtgtaaa agaacttatt cttccagtagc agtataaaact atactcactg	7680
ggcatatatt catctgaaa atctatactg atgttgtt gggaaattga agaggaacta	7740
ggagtgtcaa ttccctggaa ctgaccacata gttatgtcat caggtcaactt gagttcgaag	7800
ttttgttttgcactagcta agtaaaggaa aacacctctg ctttcattgt tgagtttcat	7860
agaattgaga gctgaaagga tcccaggcag gagcgcactaa tccaaactcc cacaagaac	7920
aaaaatcccc cagaggatct tctgttcata tatttcctgc agtggcatcc ctgtcatatc	7980
ccacaatggc atccctgcca ttggactcc cttccatata cctgttgaaa ttactccata	8040
atagaatgct gaaatctgcc cctctagtt tagtttgaa attattcat ttccatgat	8100
accttttaat attgacttag aattaaatca tctcccttg gtatttccat tcctggacta	8160

actaccatca atctgagggc taacaataca agtagaaaaa gtctacactt gtcattgtc	8220
actgatcaat gattaatcaa tgatcaactga taattataaa ctcaaaaaca aaatcatgt gggattaaga gaaatgtatc agtttatgt tgtatctg gtccctgatt ctggctcaa	8280
taatgtaact atigtcaaga agatatactact tgtaaagttag attaatttt cattatatt taccatgtgc ttctccattc acggcattc ttgagatgtt gtggttata cttagtgc	8340
ttctccagtc catcagcaaa tatcaggcat ctactgtgtt ccaagatatt aaagaatca tcatgactta gcctcatcaa cagcattgtc agatctggaa tgaaaagaa gagtataatc	8400
ctggcagtca ggaagaaggc tgcataaaagt ataagttct gcttccaaag aagatctc atcagcctgt agggagtgtt tagggaggg acagctgtcc ttgttagtagc aaagggttt	8460
attcaggtca tctgggctcc ataatatccc ttgtgtatct gcagtcctt ttgcattgaa tcaacacaat aggaatctt ccggcactga tggttttcc aagggggagt tcttcaggaa	8520
gcaaagcaaa tgaccaacca ggttgagga cctgatttga caattccatt ttgtatTTA aattagttaa ttgcatttctt agtcccaatc catctgtca ttgcagacaa gtggtttgg ggttgagttt agctataccaa aagatctgaa ccttctgcac tttagacaag gaaggcaacc	8820
accaggcttc acttgcactg aggcaagtgtc tccaatggaa acgaggtagc tggcttgcag aagcttcca actcaggaa gtagaactcc tgagtacactt ccatacgaa ataatttac agtactgctg ttgaacttca cttccatca cagcaatgt gtggtaacat agcttgc caggagtttta ctcaccatgg gatTTAAAG gtgaaacatt tcaaaactga aatttgaag aatttagttt tggatttactt caattatcat gatcactttg gggtttattt caccttcat gtttgtgagt ttaaataccaa gactctcagg cctctaactt tcaattaaaa gtgttttct ttaatcactg aacctaatacg tagggaaaac gaaatgttca tttagactt caggaccc 9000	9060
aatgagatga ggcagctgaa agatcaaagt gttgcatagt tatcccagta aagctattt gatcgatgg accagatcaa ctgctgtcat tccccaccaa ccccatctt ccccaaaatt cccagccctg tttaagtgtt ctctgttagca ttatctcta tctagatattt tgttagcat atcatatcat actttctat ttgtttattt gtctctcttcc tcttagaata taaactcc aagcacagag atttgggtct gtttttaat attgtgtat ccccagggt tgacgtaaag cagagtggta gtatgacaaa agcacacaaa aaaatattt gtagtcaat gaatgaatga tttcctcaaa taggatttgc ctAAAATTT ggaaacatga acagacttgg atatatgaaa	9120
9240	
9300	
9360	
9420	
9480	
9540	
9600	
9660	
9720	
9780	
9840	
9900	
9960	
10020	

tgtgtgttag gtcctgtact gaacattctg cctaaattag ttcatttcct cctggaaatg	10080
actctgtggg gtaggtgttt catcatgtaa gatgagtatt tttcacactt cactgtctct	10140
gaaaatctgag tgtgtcttc aatgtatggaa tctttgattt catgataagt ggtattattc	10200
ccattttaag gatgaggaaaa ctgggttcca aagaattaa gtaatttgcc caaattcacc	10260

tagcctcgta aatgataaaag cttagttctaa atccaaggcag attggctctg aagtctggc	10320
ccttaataac cacttattgc ctgtattgc acctctggtg tatgtatcaa gttatatatt	10380
ggcttcaaaa ctatcatgac ctttcttga ttttgattgt tcaatattag tatagtgtc	10440
tagatctagt agaccagggg tctgcaaaaa attttgatta ctcacccat ctgtaaaaca	10500
ttttaaactt gtgtgtctgt gcaggcacat ttgtgtgtaa ttataaaaaa ttactatct	10560
attaatataat aggttgtacc gtaagaaaaa ttgccattt tgaagagcaa aaaagggtga	10620
atattaccag ttccatctgg ttcaacctaa tagacatttg tacaaaaaca gacatttaa	10680

gaggatgaaa taaaaattta ataaacaata tttcaattt ttactaattt tgacgcttca	10740
ctattgttag ctaatatgtc aaggcatgat ataccttagg gtggattta tcattaacaa	10800
aggtggatag tgtcaataat cttgaggttt gtgtttttt atataacact gtgaggctta	10860
attaagtact taattgtta caacctcata cagtcgc当地 taataagtgt cacttctgt	10920
gtttcctctg gggtgtgctt gaattattag tattatcttc aatcctcagt ttcttgtgg	10980
aaaactttt aatttagttt ttaattttgt aagatggta gtttagtcaa aattagataa	11040
gagaatctga aaatccataa ttacccaaa gcaacccact cataagaact attattttg	11100

tgtttgaaa tcataatcc attgattcc agtgttcca ctggtagtgg ttcatttat	11160
gttaggagttt caaaacatca ctaattatcc attcagttt tgtttgatcc tagctgttt	11220
gtgttaactt tgaagaattt acatcacaga tctattgttgc tccttggtaa aggaatggag	11280
agttaaggctt ctagatcattt agtggtttagt ctgttgtt aggagtaaaa aaaaagat	11340
tatcaacaaa ataagaacat ttgtatgtac ttgtataga taaacatgaa taaagcttt	11400
atgctatata gatgcactga acaatctactt agaattgtca gcaaaccgtt tcttaatctt	11460
aaaagggtttt ccaccaatgtt atctaaaattt gaatcaaactt ttcttccttg agcataat	11520

ttaagtgtat tattaaaat agccagcatt taaaagctt aataataatgt atcataatgt	11580
ggtatcctag atagatccc gaacagagaa aggatattag ggaaaaactg gaggaatgga	11640
ataaattatg cagtttagtt attaataatg tactaatgtc cttagttatg accattgtac	11700
catggtaaag taagatacta acaatagagg aaattggta agggtatat gtaactctat	11760
actatcttg caatttttt gtaaatttaa aacttctaaa ataaagaaca aatttgaaca	11820
ttaaaaagtgcgccccccatgtatcac tgttacaga tgaaacagta tgtatttttt	11880

tatctaattt ctgatcattt gcttcaaattt agaaaaagtta atgacacatc aagatcagg	11940
tttcgttta ctaataaaag tctaagaaaa caaagcatac cagctggaga gattcatgtt	12000
tataaagaca gatttataac aacaaaata aaatatccaa gaataaattt aagaagaaat	12060
aggcactat gtaaaaagta tagcattt ctgagaaaca tatgaaaacc tgaatacatg	12120
gagagaggtt ttttatattt gaatagaaag attgctggtt taaagataat tctctttaaa	12180
tttttttgtt agaaatttaa gaggtacaag agcagtttg tcacacggat atattacata	12240
gtggtaagt ctggggtttt agttaattt aatcttaca tttgtttga gcccaataaa	12300
tgtaccaaca tgatTTTt agcaagatag tcattctat taacccaaac ttgtcccaac	12360
tttgaactga actgaggcag agcttagcagg tgttccccac tgctgaggca tctgaacatt	12420
aagcgatcc ctctgagaac cagcctgcat tgatccttt tctaattgtt acagcatcaa	12480
gctatatac tagtctgtt ctcagcaaaa gccctgactt cttttgctt atgtcctagc	12540
tccatacaac aaaatcaacc aaagaatttt ggttgtcgat ccagtccaccc ctgaacatga	12600
actaacatgt caggctgagg gctacccaa ggccgaagtc atttggacaa gcagtgacca	12660
tcaagtctg agtggtaaga ccaccacca caattccaag agagaggaga agctttaaa	12720
tgtgaccagc acactgagaa tcaacacaac agctaatttgc attttctact gcatttttag	12780
gagatttagat cctgaggaaa accatacagc tgaattggc atcccaggta atattctgaa	12840
tgtgtccatt aaaatatgtc taacactgtc cccttagcacc tagttagatg tctgcctatc	12900
atagtcattt cttttttttt gaataaatgtt attaatgtt aacatttatat ttacaaaatgtt	12960
tatcctaattt cctcaatttcc attcatccaa atcatatttt tacttaataa acattcacca	13020
aatattttttaa gaatatgcct ttgttccat gcattgtgtt actcatttga cacacataga	13080
ataataagac tcacgttcac actcttcagg aaacagataa aaaacaaatgt aacaaacaaa	13140
aaacaggcaaa tccaataccca tgtggaaat gcttcatac catgtggaa acctggggaa	13200
ataacctgaga ggaatattca attcaggcca tgtttcaggaa atccaaatcc tggcacatca	13260
gagccgcctc ctcttacta gggtttctgtt ggcaggaaat aaatggaaacg tattttctatc	13320
tcttatgccaa aacaggaggaccctttccctccctgtgcctt ctcggaaatgtt agtctacaat	13380
atttcaacgc tagcagtctg tttagtgcac aggacatgag gctgtgtatc cctggccaaat	13440
ttgctacact tctgtgtgtt tcacttttcctc tgttaggatataacctactg agcaaggta	13500
ttgtgggggtt caaatttagca acagtgtatg aaaatgattt gagaccatgtt cctgcacaaa	13560
ttcaactattt ttttttatac tcactactt atagaagtagt gtaggatggg agacagatgtt	13620

tgtatggagg ctcaagaatgt gaaagtaagt gaggtgagtg agcatgatat ttcatataaa	13680
cacaagata ctctgagaag agcttctcac ttcccccgc cccaatagat gttgacagga	13740
aatgccatg tacttcagca aaaacagctg aaaaattaga cataaaagtc aatcaatagg	13800
aaaagataat ccaggatggt cttgtaaca gaaagaggga aaaaaaaagt ttagaaaatg	13860
atggggatgc tcctactggg gtatgagtcc tcaggtattc aactggctt cagaaaaagc	13920
tagacttagt gttcctgcc atttaaaagc tgtttatga caacttactt gttgggtggc	13980
ctacagtaac tcacttaact gtgctgagtc tgttcctca tctgtaaatt ggggattttt	14040
taaaataact ggcattgccta actcataaaag ttgttctgaa actgaaataa aacatatatg	14100
aacaggcatt gtaaactgta agttacggaa aaagctggct gtgttgtgt cttaaagct	14160
tcacctgggt agttagagat ggatcatggg tctcagtgga gagctgagcc aggccaggagc	14220
tgactaaggg taagaggtgg gagttageaa tctctgaaca tctgtgtgcc atggacccc	14280
ttttcctcct gcatggtacc ccagacaagg agcctagtaa gagatactaa tgacttgttgc	14340
tccagagatg ttcaaactgc agagaaagat aagacaacaa gcattggcct ccaatcatga	14400
tgacagatag gaggaggtgg gagtcctta gcagtgcgttgg ttggtttcc atgttctact	14460
gtggccatc tctgccatgt actgttaggtt actaacttct atattaaaa atgcaagagg	14520
ggccgggagt ggaggctcat gcctgtatc tcagcactt gggaggccaa ggtggcaga	14580
tcacttgagg tcaggagttt gtaaccagcc tggccaacat ggtaatctc tgcctctact	14640
aaaaatacaa aaattagcca gatgtggtgg cgtgcacccg taatcccagc tactcggaa	14700
gctgaggcac gagaattgct tgaacctggg aggccggaggt tgcagtgagc caagatttg	14760
ccactgcctt ccagcctggg caacagagaa agacttgc tcaaaaataa ataataataat	14820
aaataaataa ataaataaat aaatggaagt gaaataatca aggccaccat ttaatactga	14880
gtgccactc catgtggtaac tggctaaac acattataaa atattagcct cacaagaaat	14940
gtatttagcat ttgtatttt tacactgggtt aagtatctg cccaagaccc caaaaactgg	15000
taaggggcag cagaatttaa ccccgccgc acctttcaa agtctggct tcttacactt	15060
ctccatgctg ttccatttt aacagatgtt tctgcgcatt ccagccactc aaactttggc	15120
atttaaagaaa attatcctaa agctaaacta aacttcaagg atgactattc tctgtatgac	15180
cccttccat caaaattttt tctttagtca gtttgggggg gttttttt gttttcaga	15240
actaccttg gcgcttcctc caaatgaaag gactcaactt gtaattctgg gagccatctt	15300
tttactcctt ggtgttagcac tgacattcat cttctatttta agaaaaggta gtatttcctt	15360
aattgcagtg gtcctccactg gggatgagga ggggggtgaga attggatcga tcatggctgc	15420
aaggaaacct gacttaacct ctgcagggtg gtgcaaaggc attccactat tcaacagtaa	15480

ttatattgaa gctgcattggg atcaactgggt gaagatgagg tgtaagggtt gagggacagg	15540
agaatggta tggatggagg tagaagatgc agtgcatac aattttttc tatcatgaaa	15600
ataaccacag acttactgta aagaaggagc taaaatgcct gtcatttca gttgcattt	15660
agtttigcat tagttgcacc cagctggtt ctgggtactc taagtaataa aaatagtcc	15720
tctgtagaac tgttagtattt tcaccataga gtatggta aaattattgg tagaggatgt	15780
tacataattt gcatgtgttc ctttctccat ttacctgtgg gaacaattaa aatccagggaa	15840
aatgagtata ttcaaaataat ttccctccat ttatgtat tcagagtaaa taattccct	15900
gatacttaga gaagtatacc aagagatcca gtgattgtat agagttgtct gatgttaat	15960
agggaaatgg tag aatatggaa ggaattccaa tagtcgttga aaaattcccc acaaccctt	16020
acatggggga aagtgggttt aactgagata gtagagataa gctgttacca aaaattatgt	16080
tcttaacagg attgagatag ccagaatata aggtcaagt ttcaatgaca gtaagatcct	16140
gagatgcagt tgatttgacaa aaagaataa ttgttgcag ctgcatttt gaatattct	16200
ctggaaaaag agatttagtt gcagtagaaa tgaatagaaa tcaatagata ttaaaatacc	16260
tcagaatttgc attcatctct gggaaaagat gaaaataaa agtgtatagt cctcaagaaa	16320
atctggatc aaaagcatgg gccttaccctt attgaattaa ttaacccatcg aagttggaa	16380
ctgttggata aggtgtcca ccagacttcc tagggattac aaatgttca tagaacttga	16440
aatttaaact tgggtcactg tatggatgt agagctgtc tatatggaaa taaaaatgt	16500
ttcttttctt caagggagaa tggatgtt gaaaaatgtt ggcattcgag ttacaactc	16560
aaagaagcaa cgtggtaaga atatcagaag gaattggaa gtagaaggca aagggaaacaa	16620
aaagctaaag caataacaaa gagaatcca ttagtataa tctcctctcc ttttaagaa	16680
tgctgggtcc ctttgcctc acaactaata caagaacttc tccaccatct caggaagtt	16740
agggatggcc ttcaagagta gagagttaggg agcagctctg tggagagagg agaggagcag	16800
ggaagggaa ggagttagct tcttttgc aatctgttgc cctgcaccct agcagctccc	16860
tgcagcagg gacaagggtt acttaggtgg atggataatt aattgattct aaaatattgt	16920
gtgtcagtat tggatattgt aatactatgt taactgcgcc atgcacggta tctcattaa	16980
tcccccaccc ctggcattt ccaaaaagag agagagaaaa atactagaat tatcctatt	17040
ttacagttaga gaaaacagag ggtcaagaag ataaagtaaa gtgcaccaaga acacacaact	17100
gatcacaat atcaagcttg gggccattt gcctaaccac agacccttac tcttaacccca	17160
tctgcttcaa tccatgggtc tacaaatgtt tacattata tgcagggcag aaaagtctca	17220
tccagtttat tgaactaaga agaaagttt attaagggtt ctaattttt ttaatgttagt	17280
tagaaaccaa acttaacaat gagcccaagt ttaaaggcgt ctaattaact tgacaagctc	17340

aggcaagttt cattctgtgg cctgttagcat catctgtgtt gtaaagctaa gtagcaaatg	17400
ttattinggt catcctgggg ggaaagtcat cccaatttc tcaagactga ggggttttc	17460
aggatatcat gtaaggataa ttgggtacaa atataacctg ctctttctc tcatttcaa	17520
tttatcattt atcatctcg caactatgag ttatgtttt tattagattt cttgttactt	17580
tttccccaga ccgcctccca tgaaaattat atactattat cactctccag atacacaatt	17640
ggaggagacg taatccagca ttggaacttc tgatctcaa gcagggattc tcagcctgt	17700
gtttgggggt tcgtcaggc tgagcatgac cagaggaatg aatggcccg tggatgcat	17760
gcagtaggg actaaaagg cccaagcact gaaaatggaa cctggcgaaa gcagaggagg	17820
agaatgaaga aaaaatggagt tgaacaggga gcgtggaggg agaccttgat acttcaaat	17880
gcctgagggg ctcatcggtg catgtgacag ggagaaagga tacttctgaa caaggagcct	17940
ccaagcaaat catccactgc tcatcttagg aaaacgggtt gagaatccct aatttgaggg	18000
tcagttctg cagaagtgcc cttgcctcc actcaatgcc tcaatttgtt ttctgcgtga	18060
ctgagggtcc cagtgttggaa acagtatttata tgtatgagat ttccttattt attttgagtc	18120
tgtgaggctt tcttgtcatg ggagtgtggt tgtgaatgat ttctttgaa gatataattgt	18180
agttagatgtt acaattttgt cgccaaacta aacttgatgc ttaatgactt gtcacatct	18240
agtaaaacat ggagtattttaaaggtgctt ggtctcctct ataactacaa gtacacattg	18300
gaagcataaa gatcaaaccg ttgatttta taggatgtca ctttatttta acccattaa	18360
actctgattt acttaatctt attctcagac ctcaagtgtc tgtgcagttt ctgtccatt	18420
taaatatcag cttataattt atgtggtacc atacacacat aatctcctt catgcgtta	18480
accaccctgt tgtgtatgacc actattttt tacccattgtt acagctgagg aagcaaacag	18540
attaagtaac ttgccaaac cagtaatag cagagcttag actgccaccc actgtcctt	18600
tataatacaa ttacagcta tattttactt taagcaatttca aaccattta	18660
ttaagtgcctt tgcaatatac aatcaactgtt ccaggcattt aatctacaga tgtgagcaag	18720
agaaagtacc tgcctcaag gagttggag tataataagg agattaataa gaaaatataat	18780
tattacaatc tagtccagtg tcatagcata aggatgtat gaggagaaaa gctgagcagt	18840
gttgccttggaa gggaaata gccaatgtt gtctggaca gttgaatgtt tttaaacatc	18900
ttaataatca aagtaattttt catttacaaa gagaagtctag tacttaaaat aaccctgaaa	18960
aataacactg gaattccctt tctagcatta tattttccc tgatggctt ttgcctaca	19020
atctaattgtt gtttatataa gttctgtata ttgtttaaca gttctgtctt ttctattca	19080

atgttattaa attttaaatt cataccttc catgattcaa aattcaaaag atcccatggg	19140
agatggtttgc aaaaatctcca cttccatcctc caagccatc aagtttccctt tccagaagca	19200
actgtactg ccttttattc atatgttctt ctaaagatag tctacatttg gaaatgtatg	19260
ttaaaaggcat atatttttaa attttttcc ctaaatagta acacattata tgtctgtgt	19320
gcactttgct attttattt attgttagtgt ttcttatgta gcagatggaa tgaatttga	19380
gctcccaagg gtcaggcac acatgcctt tttttctaag ttatcttcc catagcttt	19440
cataatctt catatgattt agtacatgtt aaatatgtgc tacatataca ttttagacaac	19500

cagcatttgt taagtatttg ctctaggact gagttggat ttatgttgc tcaaaaggag	19560
accatgggc tcicccagggt gcactgagtc aatctagtcc taaaaagcaa tcttatttatt	19620
aactctgtat gacagaatca tatctggaac ttttggggc tgctttctgt caagtataaa	19680
cttcaacttg atgtgtact tgcaaaatca catttctt ctggaaattc cagtagtgta	19740
ccttgactgc tagttaccct gtgccagaaa agcctcattc gttgtgcttg aaccctttaa	19800
tgccaccaggc tgtcatcaact acacaggcct cctaagaggc ttccctggagg ttttgagatt	19860
cagatgcctt gagagatccc agagttcct ttccctctg gccacattct ggtgtcagtg	19920

acaaggaata cttcgctt gccacccgtc aagggtgaag aaacagcgtc tccaacagag	19980
ctccttggt tatctgtttg tacatgtgca tttgtacagt aatttgtgtg acagtgttct	20040
tttgtgtaat tacaggcaag aactgtggct gagcaaggca catagtctac tcagtctatt	20100
cctaactcct cttttgggt ttggatttg aaggcactt atcccttttgc tctcatgttt	20160
catgttaat ggcataaggca gagatgat ctaattctgc atttgattgt cacttttgt	20220
acctgcatta attaataaa atatccttat ttatttgtt a	20261

<210> 3

<211> 20340

<212> DNA

<213> macaca fascicularis

<220><221> misc_feature

<222> (1658)..(1881)

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

<220><221> misc_feature

<222> (2742)..(2745)

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

<220><221> misc_feature

<222> (2747)..(2747)

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

<220><221> misc_feature

<222> (2749)..(2749)

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

<220><221> misc_feature

<222> (4764)..(4802)

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

<220><221> misc_feature

<222> (8775)..(8778)

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

<220><221> misc_feature

<222> (8980)..(8984)

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

<220><221> misc_feature

<222> (9161)..(9293)

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

<220><221> misc_feature

<222> (9344)..(9348)

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

<220><221> misc_feature

<222> (9840)..(9874)

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

<220><221> misc_feature

<222> (9958)..(9973)

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

<220><221> misc_feature

<222> (10437)..(10452)

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

<220><221> misc_feature

<222> (10603)..(10603)

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

<220><221>

> misc_feature

<222> (10830)..(10830)

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

<220><221> misc_feature

<222> (10989)..(11006)

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

<220><221> misc_feature

<222> (11105)..(11122)

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

<220><221> misc_feature

<222> (11457)..(11457)

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

<220><221> misc_feature

<222> (13710)..(13710)

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

<220><221> misc_feature

<222> (14015)..(14049)

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

<220><221> misc_feature

<222> (14518)..(14585)

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

<220><221> misc_feature

<222> (14689)..(14699)

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

<220><221> misc_feature

<222> (14707)..(14767)

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

<220><221> misc_feature

<222> (14837)..(14865)

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

<220><221> misc_feature

<222> (15703)..(15741)

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

<220><221> misc_feature

<222> (17403)..(17415)

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

<220><221> misc_feature

<222> (19122)..(19135)

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

<400> 3

ctgaaagctt ccccgattcc gccgaaggtc aggaaagtcc aatgccggc aaactggatt 60

tgctgcctg cgcatgggtg ggcgggaccc cgcctccggg ccgggcgcca agttgagcag 120

ctggcacgcc tcgcgaagcc ccagtcttga agccccagtc ctgcgtgtc tcccgaggct 180

ccgcaccaggc cgcgcttctc tctgcctgca ggttagggagc gtttgttcctc cgcaggtgcc 240

cacggcccaag catctctggc taactcgctg ggcacacct tag gacggaggat ctctacaccc 300

tttcttgaa atggagagag gaggaggaa aggaaaggcg atggtcttagg gggcagtaga 360

gccaaattacc tgggggtt aataagaaca ggcaatgcat ctgggttcc tccagcgcaa 420

ttcagtttg ctctaaaaat aatttatacc tctaaaaata aataaggtgg gtagtatagg 480

ataggtatgc attcttatgc gaccgtgtgt tcagaatata gctctgatgc taggctggaa 540

gtctggacac gggcctagt ccaccgtcag ctgcttgcta gtaatatgac ttgtgtaa 600

catcccagct gcagcagata agtaagtctc ttccctgcgt aagcacgtcc aggaccctg 660

aacggaattt atttgctctg tccattctga aaaccttcaag gagtcctaaa agaggaatgg 720

aggagcctaa gaataaaaat agtataataa aacatttctt agacaggttg accttggcct 780

atgtcaaagt tcagtctggg tttgtcttat aacataagga gtaaaagtac cattgttcta 840

cctttttt taatacttga aaaaaaattt actgttagatg cttttctatt aattaaataa 900

ccttctaaaa aatgtttta gtgctgcatt cgatttagtt ggataactaa atgaaattaa 960

ttcctcactg ttgggtataa aggttattta cagtggttct gtcttagcta ttcactgaac 1020

atcattacat agatatctt ggaatattgc tgattgttc cgtcaataaa cttagaagtg 1080

taactactta gtcaaagaga ctgaatattt taaaggcatt ttgaagaaaa ctgaaaatgc 1140

tttccagaaa ggatgtatca gttgacaatg atggtgtca acagtattta aggagaacta 1200

tgtatctctg aagaaaaact tagcctttct cagttagaaggc aggttaggcag aggccacatg 1260

acagcagtta gagtgtggc ttcaaggaag tcacagaaat actgtgggaa attgaaaccc 1320

caagtggaaa atgtacaaga gtgtctcagt gtgactgaga aggaggttgg gcttgggtt 1380

taacttaaga atttttctt ttctttgtg gagataggc ttttgtatg ttacccagc 1440

tggcttgaa ctcctagcct caggcgatcc tcccgctca ggctgcagaa gtcctggat 1500

tactggccgg agccaccatg caggcctttt gctcctacttt ttgagaaagg aagcttaacc 1560

caagctggag tgcagtggtg ccatctcagc tcacagcn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	1680
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	1740
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	1800
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	1860
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngacttttc tctatcttt ccttctaccc atcctaccc	1920
tggaagatag agaagaata ttagttccat cgtgtatac tgggcttccc ccagggacaa	1980
acccacttcc ccaacctgaa tgagccatca cttctcccc agtttacatt tcatgtct	2040
ttgaatgtct ccgttcggat atggaaattc acatgtggc ataattctta cctgaagaag	2100
actgacgtct tcttctctta gaccaactgc cctgatgtga ggtttagagg ttaagaaca	2160
tgtgtgtatt tacatgatct ttgtattctg cctttcgct cctcaacta gacagctgaa	2220
ccccaaaggaa atagagctgt ggaggagagg gttttagatgaa aaagtaggtaa aatattggat	2280
ctaattccatc atcttccagg aaacctccat tacttctaaa aatttcaacc aaattcgta	2340
aaggacaaga actccaccag agtagggcca taaacattgg caaaatttagt tgtaatctat	2400
gactagattt aatgtccctt tgtttattt acatatggtt ataatgtttt gcttggattt	2460
aggggtattt taagtttct tctgccttagt aagtgtattt gtgcttataa tacaataatt	2520
ataaaaatatc acattaatat ttataactg tacagttAAC tctggccaa ggaaaagata	2580
gtccggtaga tgctgcagcc tgatTTTGA tctaaccctg gcaagaggat aatgactcat	2640
gttatttcac ttacccttt tatctttaa catgaaggc tcatataggt caataagaaa	2700
ccagtgtat aacacagacca aaaaatgtac agatcttca cnnnnanana aaaaaaatat	2760
ttttaaacaa taccctactg ggtgaaaata caatgtaaacatgtt gtaacatgtt	2820
tcaagaacca gaaaaatgtt tgTTTCTTt gatcagcaac actatttgag gaaatctatc	2880
ctcaggccct agcctgggac ctggcacaca gtaggcactg aacaatatt tgctgaacac	2940
acacataactt atgatatttt taaaattggc aacaatccaa taccctaa tagaggaatt	3000
aaatattata gaactgttca ataagatgtc tacgaatatac atgcagtaag atggcaata	3060
tttatatcat aagcttaat gaaacaaatg ggtatTTAAG gtatggtaag gttataatt	3120
acttttaag agattaaagg gaaaagactg aaagatatac actgaaatgc tcacagtgg	3180
gacaagggttc cccagccttg gcactatiga catTTGGC tATGTCCTTG ctgtgggagg	3240
ctggccctgtc ctctgcggaa ggTTTGGCAG cacttctggt ttctaccctt agatagcagt	3300
agcaaccctc cctcaaccag ccaattttg acaaccaaaa atgtttccag gcatcaccag	3360

attctccctg ggtgagagtg atgaaacagt aggtgatttt ccccttctt tctcatttc	3420
tgtatTTT tcacattacg ttaataataa ggaaaaaaca taaaaaatag atgaatttat	3480
tattctacct cagTTggat gttggactc ctttgggg ttcttccat tatatcactt	3540
ggtctgctaa acagtctatg gttggcaag gtgaaatgat tcatgaaatt ttgttttat	3600
tttttacctg atactaaaag taaaacattc attcgcttga aaatttgac acagaacacc	3660
aaaaaaaaatc cataatctca tctctttt tctgtcttt cttcccttt ttcccttaa	3720
aaacaagagt gaaaacctac cggttccc tccaatttaa ttcctaata taatcactgt	3780
taacatctg gacatttctt gtgtctaaac acacatactc acttttctt ttttttagca	3840
aaaagtggat ttctgctaca tgttagtgtc cgcaacttcc tacatgtta caaaatcagt	3900
acatttacat acgctgaatt cagtccttaa tggattata ttttgtaat ataacaaaat	3960
ttatTTaacc acttagacaa tctaagatat tctcagtttgc tgTTatgag caatgcttt	4020
ccttacata tacataataa tgTgtgtgt tgTgtgtgt tgTgtgtgt tgTgtgtgt	4080
ttagtaggat agatttctag gagagggcga aatgtcatat gacatccaca ttacaattt	4140
taataggaag tatcaaagtg cccccaaaaa aaaaaatttcc ctcccattag tgTgtgagaa	4200
agcctattttt ttcatatctt cacaacact aaatattaga aatattaca attgtgtca	4260
agctaagaag tgaaaaatgg tatttcatat ctTataattt ttgttgtgag attgaacata	4320
tttccatgtt ttacatgtca cctgtatttc ttattctctg aactatacgt tatgacctt	4380
cacttattttt cctcatgggt tatgtgttgt ttgtgttgtt gtcttattga ttgttaggag	4440
ctatTTtat attaggaaca ttaatctctt gtcttataatg tatgtggcat tgattagtg	4500
atcatttgtg agttcatgtc tgtataaaaaa gatttagagag gcagtaagag ggaaaaactta	4560
ccttttctt atcaaagtttt gtaaatatat gtataacaga agagagagaa aacattaata	4620
aatgctgaaa taaagtataa attttactc cactacttca acataaaacta caaaaggaga	4680
gtgacttttcc ttcatgtcg acttccatat tccccatgcc taaaatagtgc cctagcacag	4740
aagagggtgtt caatcagtgt ttgnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	4800
nnaaatgaag aatagaatct aggcatatc tctgaaagag tgactgtgag tcattcatgg	4860
tcttggtatg aattgtcaatccacgtttt ctcccattcc cactccccac tgTTatgaga	4920
ataatctgtt tattgagaga atagattttt aatttagaat aagagggcga gaagaggaga	4980
ttttgaagga tggcacatca aggaggacta gcatggctga gatagtgaat tggaagtctt	5040
ggaaagctaa agggtaagat gaaagtattt agccgttaggg ggaaaaagca ttgacagggtt	5100
ggaaatgtaa aagtcagattt ctccttgctt tgaaatTTT tacagggcag gttctactag	5160
gtatgttaca atgcagaaaaa aacatgaaat agttgagagg aatttggtaa aatattatct	5220

tcctggcttc tttgagtga gcagatttt ttcaggccct gtaactataa taaattgaa	5280
acttctcatc ttttagtaac tttttcaact taagttatg tggctgtggg caatggaaatg	5340
aaggatttga acttcctatt ccctgctggg tttccacaat tacaagtcaa tcatgactgg	5400
ttattagaag aciatttcaa ttagaaccac caagtcccat aaigtcatat tgtgtttta	5460
attattaagt aaagcagtct tcctttgtg tttccataa ttagcacatt ccagaaagat	5520
gaggatattt gctgtctta tattcacat ctactggcat ttgctgaatg gtaagacacc	5580
aaatcctcc attaggttct atatttaaa tatttaacc atgagttaa aactaaaatg	5640
ataatttaaa atgcatgcaaa tttcttata gagagaatat tctttctt cttctacttt	5700
acacaatgac aaagtcttc ttctgcitia cacaatgata aagctccctg tgtcatttg	5760
taaaaaatata gagaatatag acaaattgaa agacacaaaa taatcttata cccattccc	5820
agggttaact actgaaaata tctggggaaa tggcctgtat gtatatattt atttgttgc	5880
tttcaacaag gccaggatct tcaatctt caatcttgt tgctctgtga catgccttc	5940
ctgatgagaa tactctaagg aagaatttga ggatacatgg aaaatgtcag ggtaacacag	6000
tactggcacc accctgcgtt ctttctgaa ctccatacca atgtacttct tgccagaaaa	6060
ctgatcaaaa gtttagggaa gtaaaaagag atgttagaat ctaccattcc ctctatgttag	6120
gaagcaataa ggtgtccagt caaaggacat tctggggatg tctacatgaa accaagtctc	6180
ctggtttaa gtactccatc tccatataat atttctacag taatataatgt ttataaatttgc	6240
tggggcaac ttgttagct aattttata ttctgttatt gggactat gtctctgcatt	6300
gagacatagt gtcccaaaac atatttcaag cccattggat aaaatatgtt ttttagcaagt	6360
tcttaaatat aatgataaca taactgacca gataaggta tttttaaatg ctgtgccaac	6420
tttataatg tttttagggaa tttccctt tctgaaggat attcttctt ctttttagca	6480
tttactgtca cggtcccaa ggacctataat gtggtagagt atggcagcaa tatgacaatt	6540
gaatgcaaat tcccgataga aaaacaatttta gacccgtactt cactaattgt ctattggaa	6600
atggaggata agaacattat tcaatttgc tctggagagg aagacctgaa gtttcagcat	6660
agtaactaca gacagaggcgc ccagctgtt aaggaccacg tctccctggg aaatgctgca	6720
cttcggatca cagatgtgaa attgcaggat gcaggggtt accgctgcatt gatcagctat	6780
ggtgtgtcccg actacaagcg gattaccgtt aaagtcaatg gtaagaatttta ttatagatga	6840
gaggccctat ctttatagaa aacatattct aagtgttga gactttcat tcttataatg	6900
ccatacttat ttcaaacatc aatagcatag tcttttctt cattcattca gttcatgaat	6960
tcattcacgt aagtctccaa ttagcatttgc ttgagcacct atatgatagt cattggaaat	7020
ccagagacaa cacagagccca tggcttacgg tatgtacatgt tttccaaaaa taattccatg	7080

tctttacttttattataatgttaatacataatacttgcaagaatttcgataactatgttgaa	7140
agagatcaaa tgaattgcaa aagtgtccct cctccctca ccactatctc ccatgagata	7200
accaagagac actccaagag agtaaccatt atttgtgtgt ccctccagaa cctttttat	7260
tcaactacca ttttttatt ttattaggc tgcgtttt ccttttga gcctcttat	7320
atcaaatgt aataaatata ttcaagatcaa accccactgt aaggttcata taaaaaaaaga	7380
cttgaagtct ccctatgaag aaaaaata atcatattaa gtgtaaaaga acttattctt	7440
ccagtagt ataaactata ctcaactggc atatattcat ctggaaaatc tatactgtat	7500
ttgtcttggg gaattgaaga ggaacttagga gtgtcaattc ctgggaactg acccacagtt	7560
atgtcatcag gtcacttgag ttcaagttt tggttagca ctagctaagt aaaggaaaac	7620
acctctgctt tcattgttga gttcataga attgagagct gaaaggatcc caggcaggag	7680
cgactaatcc aaactcccac aaagaacaaa aatccccag aggtcttct gttcatatat	7740
ttcctgcagt ggcattcccg tcatatccca caatggcatc cctgccattt ggactcccc	7800
tccatatcct gttgaaatta ctccctaata gtaagctgaa atctggccct ctagttgtat	7860
ttttggaaatt atttcatttc catgtgacc tttaatatt tgactagaat taaatcatct	7920
cccttggtt tttccattcc tggactaact accatcaatc tgaggctaa caatacaagt	7980
agaaaaagtc tacacttgc attgatcaact gatcaatgtat taatcaatgatcactgataa	8040
ttataaactc aaaaacaaaaa tcatgttaggg attaagagaa atgtatcagt tttatgtgt	8100
atttctggc cctgattctg gctcaataa tgctactatt gtcaagaaga tatcacttgt	8160
aaagtagatt taatttcat tatattttac catgtgcttc tccattcacg gcatttcttgc	8220
agatgttgtg gtttatactt tcagttttc tccagtcatt cagcaaatat caggcatctat	8280
ctgtgttcca agatattaaa gaaatcatca tgacttagcc tcatcaacag cattgctaga	8340
tctggatgg aaaagaagag tataatctgc gcagtcagga agaaggctgc ataaagtata	8400
agtttctgtc tccaaagaag atctctcatc agcctgttagg gagtgtatag ggagggaca	8460
gctgtccttg tagtagcaaa gggtttattt caggtcatct gggctccata atatcccttg	8520
tgtatctgca gtctccttg ccatggatca acacaatagg aaatcttcg gcactgtatgg	8580
tttttccaag ggggaggatct tcagggagca aagcaatga ccaaccaggt ttgaggacat	8640
gatttgacaa ttccattttg tattttaaat tagttaaat gcattctatgt ccaatccat	8700
cttgtcattt gcagacatgt gtttgggt tgagttgagc tataccaaaa gtctgaacct	8760
tctgcactta gaacnnnnaa ggcaaccacc aagcttcaact tgcaactgagg cagtgcttcc	8820

aatggaaacg aggtagctgg cttgcagaag ctttccaact cagggaagta gaactcctga	8880
gtcacctcca tatgcaaata atttcacagt actgctgtg aacttcactt cccatcacag	8940
caaatgtgtg gtaacatagc tttgccacag gagttactn nnnncatgg gatttaag	9000
tgaaacatt tcaaaactga aatttcaaag aatttagttt tggattcact caattatcat	9060
gatcacttg ggtgttattt caccttcat gttgtgagt ttaataccat gactctcagg	9120
cctctaactt tcaattaaaa gtgtttct ttaatactg nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	9180
nn	9240
nn	9300
tccccaccaa ccccatctt ccccaaattt cccagccctg tttnnnngt tttcttaa	9360
tcactgaacc taatagtagg gaaaacgaaa tggttattca gacttcagg acctcaatg	9420
agatgaggca gctgaaagat caaagttagt gcatagttat ccagtaaag ctattggat	9480
cgtatggacc agatcaactg ctgtcattcc ccaccaaccc catcttccc caaaattccc	9540
agccctgttt aagtgttctc ttagcattt atctctatct agtatattgt gtagcatatc	9600
atatcatact ttcttattttt gtttattgtc tctctctcc tagaatataa actccacaag	9660
cacagagatt tgggtctgtt tttaatatt gtttatccc cagggcttga cgtaaagcag	9720
agtggtagta tgacaaaagc acacaaaaaa tatttgta gtcaatgaat gaatgatttc	9780
ctcaaatagg attagctaa aatttgaaa catgaacaga ctggatata tgaaaattt	9840
nn	9900
tagaaaaagg aggaggagga aaagcagtc tgctactact attatcgagt actactann	9960
nn	10020
gttaggtctt gtactgaaca ttctgcctaa attagttcat ttctcttgc aaatgactct	10080
gtggggtagg tgcttcatca tgtaagatga gtatttca cacttcactg tctctgaaat	10140
ctgagtggtt cttaatga tgaaatctt gattcatga taagtggat tattccatt	10200
ttaaggatga gaaaactggg gtccaaagaa attaagtaat ttgcccaaatt tcacctagcc	10260
tctaaatga taaagctgt tctaaatcca agcagattgg ctctgaagtc tggccctta	10320
ataaccacctt attgcctgta ttgcaccc tgggtatgt atcaagttat atattggctt	10380
caaaactatc atgacctttt ctgatttt attgttaat attagtatag tggtctnnnn	10440
nn	10500
aacttgcgtg tctgtgcagg cacatttgc tgtaattata aaaaatttac tatctattaa	10560
tatatagggtt gtaccgtaag aaaaatttgc attttgcag agncaaaaaa gggtgaat	10620
taccagtttca atctgggttca acctaatacata catttgcata aaaacagaca tttaagagg	10680

atgaaataaa aatttaataa acaatattt caatttac taatttgac gcttcactat	10740
tgttagctaa tatgtcaagg catgatatac cttagggtgg aatttatcat taacaaaggt	10800
ggatagtgtc aataatctg aggttgtgn tttttatat aacactgtga ggtctaatta	10860
agtacttaat tgittacaac ctcatacagt cgccaataat aagtgtcact tctgcigtt	10920
cctctgggtt gtgctgaat tattagtatt atctcaatc cttagttct ttgtggaaaa	10980
cttttaann nnnnnnnnnn nnnnnnaaga tggttagtt agtcaaattt agataagaga	11040
atctgaaaat ccataattac cccaaagcaa cccactcata agaactatta ttttgtgtt	11100
ttggnnnnnn nnnnnnnnnn ntccagt gttccactg gtagtggttt cattgatgt	11160
ggagtatcaa aacatcacta attatttatt tcagttttgt ttgatcttag ctgttttgt	11220
ttaacttga agaaattaca tcacagatct attgttgcc ttggtaaagg aatggagagt	11280
taaggctcta gatcattagt ggttatgtc tagtattagg agaaaaaaaaa agattatatc	11340
aacaaaataa gaacatgtt atgtacttgt aatagataaa catgaataaa gctttatgc	11400
tatatacatg cactgaacaa tctactagaa ttgtcagcaa acggatctt aatcctnaaa	11460
agggtccaa accaatgatc taaaattgaa tcaaacttcc ttccctgagc ataatttattt	11520
aagtgatttta taaaatagc cagcattaa aagctaaaaa tataagtatc ataatgtgg	11580
atcctagata gatcccagaa cagagaaagg atattaggaa aaaactggag gaatggaaata	11640
aattatgcag tttagttatt aataatgtac taatgtcctt agttatgacc attgtaccat	11700
ggtaaagtaa gatactaaca atagagggaa ttggtaagg ggtatatgtt actctataact	11760
atcttgcaa tttttgtt aattttaaac ttctaaaata aagaacaaat ttgaacatta	11820
aaaagtgtcg ccaggaacat gtatcactgt ttacagatga aacagtatgt atttttat	11880
ctaatttctg atcattggct tcaatcaga aaagtgaatg acacatcaag atcaggttt	11940
ctgtttacta aataaagtct aagaaaacaa agcataccag ctggagagat tcatgtttat	12000
aaagacagat ttataacaac aaaataaaat atccaagaat aaatttaaga agaaataggg	12060
cactatgtaa aaagtatagc actttactga gaaacatatg aaaacctgaa tacatggaga	12120
gaggtatttt atatttgaat agaaagattt ctggttaaa gataattctc tttaaatttt	12180
ttttgttaga aatttaagag gtacaagagc agttttgtca cacggatata ttacatagt	12240
gtgaagtctg gggttttagt gtaaattat ctttacattt tgttgagcc caataaatgt	12300
accaacatga tttttatagc aagatagtca ttccattaa cccaaacttg tcccaacttt	12360
gaactgaact gaggcagagc tagcaggtgt tccccactgc tgaggcatct gaacattaag	12420
cgtatccctc tgagaaccag cctgcattga tcctttctt aatgttagaca gcatcaagct	12480
atatatctatc ttctgtgctc agcaaaagcc ctgacttctt tttgctttagt tcctagctcc	12540

ataacaacaaa atcaaccaaa gaattttgggt tgtcgatcca gtcacccctg aacatgaact	12600
aacatgtcag gctgagggct accccaaggc cgaagtcatt tggacaagca gtgaccatca	12660
agtccctgagt ggttaagacca ccaccaccaa ttccaagaga gaggagaagc ttttaaatgt	12720
gaccagcaca ctgagaatca acacaacagc taatgagatt ttctactgca tttttaggag	12780
attagatcct gaggaaaacc atacagctga attggcattc ccaggtataa ttctgaatgt	12840
gtccattaaa atatgtctaa cactgtcccc tagcacctag tatgtatgt gcctatcata	12900
gtcattcagt gtttgtgaa taaatgaattt aatgaataac attatattt caaaatgtat	12960
cctaattcct cacttccatt catccaaatc atattgttac ttaataaaca ttcaccaaatt	13020
atttattgaa tatgcctttt gttccatgca ttgttagtact catttgacac acatagaata	13080
ataagactca cgttcacact cttcaggaaa cagataaaaa acaaataaac aaacaaaaaa	13140
caggcaatcc aataccatgt gggaaatgtt ttcataccat gtggaaacc tggggaaata	13200
cctgagagga atattcaattt caggccatgt ttccaggatc caaatcctgg cacatcagag	13260
ccgcctcctt ctacttaggg tttctgtggc aggaataaaa tggaacgtat tttctatct	13320
tatgccaaac aggagggacc ctttctcccc tttgcctctc ccaaggtagt ctacaatatt	13380
tcaacgctag cagtctgtttt agtgcacagg acatgaggct gtgtatccctt gggcaaaattt	13440
ctacacttct gtgtgcttca ctttctctgtt aggattataa cctactgagc aaggttattt	13500
tggggtcaa attagcaaca gtgtatgaaa atgattttag accagtgcct gcacaaattt	13560
aactatttt ttttatctca ctactctata gaagtaggtt ggtatggaga cagagtctga	13620
tggaggctc agaatgtgaa agtaagttagt gttgatgttgc atgatatttc atataaacc	13680
aaagataactc tgagaagagc ttctcacttn cccccc aatagatgtt gacaggaaaa	13740
tgccacgtac ttccagcaaaa acagctgaaa aatttagacat aaaagtcattt caataggaaa	13800
agataatcca ggatggtctt gtgaacagaa agagggaaaaaaa aaaagtttaggaaaatgtt	13860
ggatgctt actgggtat gagtcctcag gtattcaact ggcttcaga aaaagctaga	13920
ctagtgggtt cctgccattt aaaagctgtt ttatgacaac ttacttgggtt ggtggctac	13980
agtaactcac ttaactgtgc tgagtctgtt tcctnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	14040
nnnnnnnnnnna tgccataactc ataaagttgt tctgaaactg aaataaaaca tatatgaaca	14100
ggcattgtaa actgtaaatgtt acggaaaaag ctggctgtt gttgtctttt aaagcttac	14160
ctgggtatgtt agagatggat catgggtctc agtggagagc tgagccagggc aggagctgac	14220
taaggtaag aggtggaaat tagcaatctc tgaacatctg tttgtccatgg gaccctttt	14280

cctcctgcat ggtacccag acaaggagcc tagtaagaga tactaatgac ttgttgtcca	14340
gagatgttca aactgcagag aaagataaga caacaagcat tggctccaa tcatgtgac	14400
agatagagga ggtggagct ctttagcgt gctgggttgt tttccatgtt ctactgtgg	14460
ccatcttcgc caigtactgt aggctactaa cttctatatt aaaaaatgca agagggnnn	14520
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnn	14580
nnnnmtcagg agttttaac cagcctggcc aacatggta atctctgcct ctactaaaa	14640
tacaaaatt agccagatgt ggtggcgtgc acccgtaatc ccagctacnn nnnnnnnnnna	14700
ggcacgnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnn	14760
nnnnnnnagc atggcaaca gagaaagact ttgcctaaa aataaataaa aaataaataa	14820
ataaataaat aaataannn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnncattt aatactgagt	14880
agccactcca tgggtactg tgctaagecac attataaaat attagcctca caagaaatgt	14940
attagcattt gtatttgta cactggtaa gatatggcc caagacctca aaactggta	15000
agggcagca gaatttaacc ccagcgccac ctttcaaag tctggcttc ttacacttct	15060
ccatgctgtt cccatttaa cagatgtatc tcgccattcc agccactcaa actttggcat	15120
ttaagaaaat tatcctaaag ctaaactaaa cttcaaggat gactattctc ctcatgacc	15180
cttcccatca aaattttatc tttagtcgt ttgttttgt tttgtttgt tttcagaac	15240
tacctctggc gctcctcca aatgaaagga ctcacttgtt aattctggga gccatcttt	15300
tactccttgg ttagactg acattcatct tctatTTaa aaaaggttgtt atttccttaa	15360
ttgcgttgtt ctccactggg gatgaggagg gggtgagaat tggatcgatc atggctgca	15420
ggaaacctga cttaacctct gcagggttgtt gcaaaggcat tccactattc aacagtaatt	15480
atattgaagc tgcattggat cactgggtga agatgggttg taaggggtga gggacaggag	15540
aatgggtatg gatggaggtt gaagatgcag tgtcatacaa tttttctt tcatgaaaat	15600
aaccacagac ttactgtaaa gaaggagctt aatgcctgtt cattttcgt tgcatTTtag	15660
ttttgcattt gttgcaccca gctggttctt gggtactcta acnnnnnnnn nnnnnnnnn	15720
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nccatagagt attttgtaaa attattggca gaggatgtac	15780
ataatttgca tggatccctt tctccattt cctgtggaa caattttttt ccaggaaaat	15840
gagttatattc aaataatttc ctcccattt tggatgttca gagttatattt ttccctgtat	15900
acttagagaa gtatccaag agatccagtg attgtataga gttgtctgtt gttttttttt	15960
gaagttagaat atgaaaggta ttccatagt cggtggaaaa ttccccacaa ccccttacat	16020
gggggaaagt ggtgttaact gagatgttagt agataagctg ttacaaaaaa ttatgttctt	16080
aacaggattt agatagccag aatataagga tcaagttca atgacagttt gatcctgaga	16140

tgcagttgat ttgcacaaag aaataattgt tgccagctg catttgaat atttctgg	16200
aaaaagagat tagttggcag tagaaatcaa tagatattaa aatacctcag	16260
aatttgcattc atctctggaa aaagatgaaa aataaaagtg tatagtcctc aagaaaatct	16320
gggatcaaaa gcatggcct taccctattt aatttaattaa ctcagaagt tggaaactgt	16380
ggaataaggaa tgtccaccag acttcctagg gattacaat gttcataga acttggaaatt	16440
taaacttggg tcactgtatg ggatgttagag ctgtgtata tggaaataaa aatgattct	16500
ttttctcaag ggagaatgt ggatatgaaa aaatgtggca ttcgagttac aaactcaaag	16560
aagcaacgtg gtaagaatat cagaaggaat tgggaagttag aaggcaagg aaacaaaag	16620
ctaaagcaat aacaagaga aatccattag tcataatctc ctctccccc aaagaatgct	16680
ggttccctt tgcctcacaa ctaatacaag aacttctcca ccatctcagg aagtttaggg	16740
atggccttca agagtagaga gtagggagca gctctgtgga gagaggagag gagcaggaa	16800
ggggaggagg tcagcttctc ttgctaattt tggtgcctg caccctagca gctccctgca	16860
gcaggggaca agtttgactt aggtggatgg ataattaattt gattctaaaa tattgtgtt	16920
cagtttgta tattgtataa ctatgttaac tgcgcattgc acggatctc atttaatccc	16980
ccacccctt ccattaccaa aaagagagag agaaaaatac tagaatttac ctcattttac	17040
agtagagaaa acagagggtc aagaagataa agtaaagtgc ccaagaacac acaactgatc	17100
acaaatatca agttgggtt ccattagcct aaccacagac cttactctt aaccatctg	17160
cttcaatcca ttttgcata aatgtttaca ttatatgcag ggcagaaaag tctcatccag	17220
tttattgaac taagaagaaa gttatattaa ggtgtctaattttttat gtatgttagaa	17280
accaaactta acaatgagcc caagttaaa gcagtctaattttaacttgaca agctcaggca	17340
agtttcattt tggcctgt agcatcatct gtgtgtaaa gctaagttagc aaatgttatt	17400
tgnnnnnnnn nnnnnngtca tcctgggggg aaagtcatcc caatttgcctc aagactgagg	17460
ggtttttcag gatatcatgt aaggataattt ggttacaaat ataacctgtc tctttctc	17520
atttcaaattt ttcattttt catctcagca actatgagtt atgtttttta ttagattct	17580
tgttactttt tccccagacc gtcctccatg aaattaatattt actattatca ctctccagat	17640
acacaatttgg aggagacgta atccagcattt ggaacttctg atcttcaagc agggattctc	17700
agccctgtgtt tgggggttc gtcaggctg agcatgacca gaggaatgaa tggccctgt	17760
ggatgcattgc agtatggac ttaaaaggcc caagcactga aaatggaaacc tggcgaaagc	17820
agaggaggag aatgaagaaa aatggagttt aacaggagc gtggaggag accttgatac	17880
tttcaaatgc ctgagggctt catcggtca tgcacaggg agaaaggata cttctgaaca	17940
aggagcctcc aagcaaatca tccactgctc atcttaggaa aacgggttga gaatccctaa	18000

tttggggtc agtcctgca gaagtgcct ttgcctccac tcaatgcctc aattgtttt	18060
ctgcgtgact gagggtccca gtgttggAAC agtatttagt tatgagattt tcctattat	18120
ttttagtctg tgaggcttc ttgtcatgg agtgtggtg tgaatgattt ctttgaaga	18180
tatattgtat tagatgttac aatttgcg ccaaactaaa ctgtatgctt aatgactgc	18240
tcacatctag taaaatgg agtattgtt aggtgtttg tctccttat aactacaagt	18300
acacattgga agcataaaga tcaaaccgtt gattgtata ggatgtcacc tttatTTAC	18360
ccattaatac tctgattgac ttaatctt tctcagacct caagtgtctg tgcagttct	18420
gttccattt aatatcagct ttataattt gtggattt acacacataa tctccttca	18480
tcgctgtaac caccctgttg tcatgaccac tatttttta cccattgtac agctgaggaa	18540
gcaaacatg taagtaactt gccaaaccca gtaaatagca gagtcagac tgccaccac	18600
tgtcctttta taatacaatt tacagctata ttttacttta agcaattcat ttattcaaaa	18660
cccattttt aagtgcctt gcaatataa tcactgtacc aggcatgtaa tctacagatg	18720
tgagcaagag aaagtacctg tcctcaagga gcttggagta taataaggag attaataaga	18780
aaatatattt ttacaatcta gtccagtgtc atagcataag gatgatgtga ggagaaaagc	18840
tgagcagtgt tgccaagagg agggaaatagg ccaatgtggt ctgggacagt tgaatgtatt	18900
taaacatctt aataatcaaa gtaatttca ttacaatggaa gaagtcaatg cttaaaataa	18960
ccctgaaaaa taacactgga attcctttc tagcattata ttatccctg atttgcittt	19020
gccatacaat ctaatgcttg ttatatagt gtctgatatt gtttaacagt tctgtcttt	19080
ctattcaatg ctatattttaaatttata ctttccatg annnnnnnnn nnnnmgatcc	19140
catggagat gtttggaaaa tctccacttc atcctccaag ccattcaagt ttccttcca	19200
gaagcaactg ctactgcctt ttattcatat gttttctaa agatagtcta cattggaaa	19260
tgtatgttaa aagcatatat tttaattt tttccctaa atagtaacac attatatgtc	19320
tgctgtgcac ttgttattttt ttattttttt tagtgtttct tatgttagcag atggaaatgaa	19380
tttggactc ccaagggtca ggacacatgc ctttttttt tctaagttat ctttccata	19440
gcttttccata atcttcata tgatttagta catgttaat atgtgtaca tatacattt	19500
gacaaccaggc atttgttaag tatttgcctt aggactgagt ttggattttt gtttgctcaa	19560
aaggagaccc atgggctctc cagggtgcac tgagtcaatc tagcctaaa aagcaatctt	19620
attattaaact ctgtatgaca gaatcatatc tggaactttt gttttctgtt ttctgtcaag	19680
tataaacttc actttgatgc tgtacttgca aaatcacatt ttctttctgg aaattccagt	19740

agtgtaccc gactgctagt taccctgtgc cagaaaagcc tcattcggt tgcttgaacc	19800
ctttaatgcc accagctgac atcactacac aggcctccca agaggcttcc tggaggttt	19860
gagattcaga tgccctgaga gatcccagag ttcccttcc ctcttggcca cattctggtg	19920
tcagtgacaa ggaataccctt cgcttgcac cccgtcaagg tigaagaaac agcgtctcca	19980
acagagctcc ttgtgttatac tggtgtaca tgtgcattt tacagtaatt tgtgtgacag	20040
tgttcttgt gtgaattaca ggcaagaact gtggctgagc aaggcacata gtctactcag	20100
tctattccca actccctcctt ttgggtttgg atttgttaagg cactttatcc ctgggtctc	20160
atgtttcatc gtaaatggca taggcagaga tgatatctaa ttctgcattt gattgtcact	20220
ttttgtacct gcattaattt aataaaatat ccttattttt tttgttactt ggtacaccag	20280
catgtccatt ttcttggtaa tttgtgttt cataaaatgc ttagttaac atccgggtgg	20340
<210> 4	
<211> 20641	
<212> DNA	
<213> mus musculus	
<400> 4	
gcctcatgcc aggctgcact tgcacgtcgc gggccagttt cctcgccgtc aggttaaggga	60
gcatacttcg cggaaatccg cttgcaggc actttaaaga gccagaatcc cttagaccc	120
tttaggacgga gaaggaaacc ggtttctgg gaaagttaag aactcagaat ccgcagttt	180
gtgtgtttat ggatcttggc ggttaggtac tgggtcagaa gagatgaatt aattggcct	240
agcgcgactt gactgtttgc tagcaatgac tgggttttc cacttgaagc atctccggag	300
gtcccttcctt ctgtcgaggt ctaggatgtt ggagcttaag atttcattt tatctgccca	360
gagaacctaa aggattttg gaagaaaatg tcccaaacag ttcttagata cagtgaccta	420
ggctatgtta aagtttaggt tgggttgc ataagaggtt aaagtacaat attctatctt	480
ttttaaaaaa taaattttaa caggtgctt cctatgaaattt acttagccag tttttttta	540
attgttatat tccattgtgc tgggttattt aaggcatca ctctccact gaggaatgca	600
caggtagta atagtcctt actagctcag tcattccactg accatctgt tatgtgactg	660
tctgaaatat ggcttaggtat ttcattttaga taaactctta tatgtataag tacttcattt	720
tgtttgagtg tctgaaaggc ctttggtagt aaaaaaaaaa aacaacaacc tgagaataca	780
ttccagaaag tatccgcagc tcatgtatgtt agtgcaccaag cgggtttaa ggagaacttt	840
atacaggaa aatattcacc ttcccagctt gagcatcata gataggaaga catgtatgt	900
gttatatgtt gctctaagga gggatggaga agggatggat ttgagcacag gggtcaggat	960

cattttagat aatttggaaa ctgggtaaat tttcactctt ttgagaaaagg aagtttgcat	1020
ctgctcccc tcccccccc aggcaactttt cccccccca tcccccccg tgccccccc	1080
ccccatggga agataaagaa gtggcggtcc aagatctca tctggacttc ccctgggaca	1140
aacctatttc cccatcttga atgagcgtca cttcttact ttaaactctg ttctgtgaaa	1200
ggctctcagc tcttgtctgg gaatttgtga aaggttacag tttcttgccg gaggaggga	1260
gaaggtgacc ctggactttt agccatgtt agaggtgcag gtttagaggt caaaggccat	1320
gctgatttac atggccctg aatttccctt ttgatctac tgctcacacc tgacccctga	1380
gagccaggga ggggaggata tgatactgaa gaaggtgact atcagaccca acccatcacc	1440
ttcagactt tatactaagc ttaaaggcag actcataagc aatagataac tgttccaact	1500
gagtctgccca tcaacgtagg aaaaattagg tacagtcttc agtggatatac atgtacactca	1560
ttgtgactgt cttagtactcg gcttggccat ttctccagg gcctcattgc aacagtca	1620
gtgtccctcac aggcctggat gtcatcctgc ctcatctgt tggcagatg aactggagag	1680
atatgattaa taatgagtca ttgatttg ctctttgtt aaatgtcctt ggttggttt	1740
ggtttggta tttttgttt tttttgtttt gtttggttt atttcatgc tcttggttt	1800
gtttgagaca gagtctcaact atgtagccca ggctagccctc ttcccccagt ctctcagatg	1860
ctgttgcatc tgccctttc taacatcaat gattcataat aatcagcaag aaggctatga	1920
ccttaacagt caaaataagt aatcaggtaa ttattgagag cttaatattt atttaaaca	1980
atcaagttgc attttcaag aattgaatgg gggatctaa aaagtaatgt ttgtgtcga	2040
caaagatgta gtggtatcag ttgccatagt ctctccct agatccgcag atctccctag	2100
ggaaatctat aattcaagcc taaacttggc cctggcacac aactggtaact cgcccaaaca	2160
ttggccaagc acacacatat ttgtgactct gaaaaaagg acaacacata acagcaaagg	2220
cgctccgtgt tagggccctg ttaatacaca gacttggga aattatgccca taatctaca	2280
ttttaaaaat ggcttattaca tgtgtgagac aacggggct ggagagatac ctcagaggtt	2340
ctagcacaat atatggcaag cagatgtaca agcaggcaaa acattttaa aaaacaaaaa	2400
caaaacccca aaacagattt ctcttataat tattttatgt gggttctgcc tgcgtgtaca	2460
cctgaaggc agaggagac accaggcttc ataggtggtt ggttgttaagc taccatatgg	2520
ttgcttagaa ttaaactcag gactttggta agagcagccca gtgtcttaa cctctgagcc	2580
atccctccag tcccagacaa aacactctt cacataaaat aaatcaatct ttaaaagtgt	2640
agaggaaaat ggctgaacag aaactattga cagacatgct gagagtggc accgtttctc	2700

cagcttggca ctgggttgtc tgttaggccat ctcagtgtct gtcacccgg ggcggggcgg	2760
ggggcgggag ggggggaagg cggcaggcga gggcttgcc agcatctcg gcctctattt	2820
catcacatca gtaacagctc tccttcgtcc caagcaagct tggcaacca aataaatatg	2880
ttagccaata ttaccaaactg gtcccttagag gagaatgtgt gtaatgtgcc tacatcgtt	2940
tttataacaa caccacaat atccaaccat aaaaataaac taaaatggtc actctacctc	3000
agtgacaacg tctgagctcc gtttcagggt ccctcacaag aaattcgata ggtgtaatga	3060
tttatttttc ctaataagta aaatgattat tcactcattt gaaaattgga cacacacaca	3120
aaaaaatgaa gaaaaatattt gctatttcat ctctccctt ctatctctt ccctttaaaa	3180
aaagtataaa tggggctaa agagatggc cagcgttaa gagcactggc tgctctccg	3240
gaggtactga gttcaaactg caccaaccac atggtggctc acaaccatct gtaatggat	3300
ctgatgcctt ctctgggtgt gtcttagagac agtgacagtg tactcacata cataaaataa	3360
gtaaaaaaaaaaa aaaaaacaaa actttttttt aagtataat gtgtaaac ttacctgtct	3420
tccctataaa agccacaatt accttgcag ataattcactg tcaggcagtg tcttcagag	3480
aagtgggtt gttctacgac acaagaatat ttttggat atactaccct ctaagctcct	3540
tcctacttct ctgcaaactc atcccctgtg catatactga aatctatccg tcacggattt	3600
ttgagtatac acagttatcc gtcacggtat tttgagtata cacagtttta ttagctaata	3660
catgggtat ttcaagtctg ggactgtgt tggctgtgc atctctgtta catatgactt	3720
atattttcta agatgaattt ccaagacagg aatagagaga tcatacgaca tgcacagtta	3780
aagtttaag agattacaaa attgacctt aagaagctat acaatttcac atccttcca	3840
ggaaaggcata agaaatccct gtatccac taatgtacc tatgaggagt ctgtatttt	3900
ggtagagcag aaggccaaa tggatcaca gatcctccat ggactttctt atcgagagcg	3960
ttcttcgc tttattgtat ttccttcga gctatgtgag actctcatcc gtctccct	4020
tgaccgatgt atagtttct cactgagttc agaggctagg atgcagaagc cgtccctg	4080
agcttatac accttcaga ttgactgtga atgacccac aggtcagaga gacggtaaagg	4140
gaagacctac tctccatga acgttgaaa catgcgaata acacagaagc agaaaatgt	4200
aactattaga ctggctggaa tgtacgtc accttgagc ccactccctt agacaccgg	4260
ttcatggaaatggctct gttccacc tgctgttca gcagtcccc aatagtgcc	4320
agattcagag gagatactca gtgttgccg agtgaattag gaaagtgttc agcggagg	4380
acactagcat tcagacatcc agaccttgc gtaaccggc cagatggaaatctcc	4440
tcccatagct gttaccactg tactgtctt actggggaaa agatttatca tgtgaatag	4500
gtgcgaggca gaggtgagat ttaatgggg aggaagcatt gaaaagtgaa agtggaaatt	4560

ggatgcttt tgcttgaag cttgcctaa agcagggttt agctttcaaa tacgttcaa	4620
tgttgaaga acgcatgata catatggagg ggggcctgg gggggcctt ggctgagttt	4680
gaatgtacat taacaatctg gggggctaatt aactcaatgt aaagctgctg atcccatcat	4740
actgacttct ttccacttgg ttctacatgg ctttagtta caaaaatgaaa gcattgatt	4800
ttgaactgtt cagctgtgtt tccacacttg caaatcggtt gttggccagc cctcagaatt	4860
gttcagttt cagctggctc gtctgcttt tccagactgg cttttagggc ttatgtatat	4920
atgagaagga cacattact agtgtctct tgctctgcta ttgaaattaa gcagaccct	4980
ctgtttcc cgtaactaga tagttccaa aacatgagga tatttgcgtt cattatattc	5040
acagccctgct gtcacttgct acgggtaag tcaccaaatttcc tttcagtgg gttctatatt	5100
ttcaatattt tagctatgaa taaaaatgg aagtaatttgcgtt tgggggtgtt atgtgtgtt	5160
atatgtgtt gttaggggg gtcgtgtt atgtgcagtt gctaggcaca cataaagcgt	5220
tcataggaca accttagagct tagtcctcac cttctaccc ttgagaca aggtcttta	5280
tttggttgtac attgctgagt cctgttagttc ggcttagctca gaacctcctg gggctctcc	5340
tgtctccacc tcccagtcca ctgagattgt aggacatgc tactgcacct ggcttctacc	5400
tggctctgg ggatttgaac ttgggtccat gggctacaca gcaagtcgtt tacttactgg	5460
gcaatcaactc catccccaa gataattata aggaatatac cttgcttatac caaacacatt	5520
ctcattctcc ttggccataa ataagttact tggcaatatac attgtatgta ttttaataaa	5580
ataaataaaa tctaaaaat aaataaaaatt atttgtgaag aaaaaaaaaa taagttactt	5640
ggaaaggatg aaggaaaata ctggagctt gggtgtgtt tagtagtaga acacttggct	5700
gatgtaaaaa aaaagcccta ggtgcaatcc caacaccaga aacaaatgaa ggaatgaaca	5760
acaacccccc ccacccccc ggggatgaat ataaaaatatac caggttaatac agaactaaca	5820
ggtgatccgt ttccatgaa taactactga acattccag ggaggtggcc cactgataat	5880
atatttttat ttattgggtt cttaaaaca agactggaa tatattatct agcttgcatac	5940
accaccacca ccccccaccc cgcggccatg aagttatttc aaagaagaat tttagtggc	6000
atgtgattcc ctaaataaaa tggatgtac cttttacca ggtttcaga tgtgtttggaa	6060
ggagtttct gtcttctgag ggctggctt ctttccttt cagcgttac tatcacggct	6120
ccaaaggact tgcgtgtt ggagtatggc agcaacgtca cgtggagtg cagattccct	6180
gtagaacggg agctggaccc gttgcgtta gtgggtact gggaaaagga agatgagcaa	6240
gtgattcagt ttgtggcagg agaggaggac cttaaaggctc agcacagcaa cttcaggggg	6300
agagcctcgc tgccaaagga ccagctttt aaggaaatg ctgccttca gatcacagac	6360
gtcaagctgc aggacgcagg cgttactgc tgcataatca gctacgggtt gtcggactac	6420

aagcgaatca cgctgaaagt caatggtaag aattaccctg gatgggaaag gcttcatccg	6480
tatttaaaac agctccctaa tggtagagc tcttcattct tgagagttcg cacgcacttc	6540
tcacagaaca acagcagcct gtttctcg ctgcgttgc cattcgttgc ttcacacact	6600
tcaccagtga aaaaggctag cactgtgtgt ttgatagtaa ctggagattc agtaccagat	6660
aatactcagc catgtttgc agtcgttacc atgatcttc aaaggtaaa tgccagggtgt	6720
ttgtttctta tcataaatgc aatatataat atattacata gatgtataga tataactgtg	6780
taacatgca taagatataa tatgcatata tttcatataa cataatgtat aatatataat	6840
gtataataat atatactaca atatatagtt atatgcatac ttatataattt catttatgat	6900
aaaaagcaaa cacctggcat ttcactttt caagttttt gaattacttg taaatataa	6960
tacatgcaaa catacataca cacatgtt ttttacaag taatttgaat gtcatggaaa	7020
gaaatagaat cataaaaatg tccctctcc ctaactacca tcttctaagc ataaatatac	7080
agtaactact atttgtacat ccctccatga cttttgatt ggattactgt ttatattaa	7140
tctatcaggc tttagcacatt ttcttcctt tgaataccctc catacaaaat tcaatgtgt	7200
tttatataata tatgtatata tatagttata tcataatcata tatcatacaa agttttat	7260
atgtatacat atataaacac acatatctac acatacatac acattttta tatataatac	7320
caatatataa tgtatatgtg tgtgtgtgtg catataccctc tatatctatc tatctatcta	7380
tctatctatc tatctatcta tctatctatc tatagttct actgttaaggg tcactttta	7440
aaaaattaag gtaatctat gaaggatgag aagtgaagat ctttaatgtta gaagaagccg	7500
ttcttccaca gagatggtaac aggctacact cagcaggcat gcattcattt tcagggctg	7560
catctctggg agtgctgagg aggaactatg agtgtaagtt cctggtaac gagccacaga	7620
aatgtcatca ggtcccttga gttcacggtt ctgggttggactaactaag ggaaggaaaa	7680
cacccgtca accaccctgt ctccactgt tgggttgcatacctg gacacatggata gcttcactca	7740
tcgcaggcgt gcacacagcc agcccagttt cccaccagga ctggaaatcc ccaaggctct	7800
cctttcaca tacctccac agtgggttcc ctgcatacg gtccttgc tggtctgcgg	7860
aaacttcacc ttgatggaca ctgagccgaa ccccgcttc tccaggcaga cgttgcagat	7920
ggctgcctg ctcccttcg gtttctaa taactttaa actattggc tagaatcaga	7980
tagtctcctt cgatctttt actcctaaac tagtgtgaag ctcaatatta tacataggaa	8040
aaatttcacat tcctcataag ggatcacggc agtttataac gcaatctttagttagat	8100
ggaaaaatgt gtccattcga cagtttataa atgggtctgt gatgggggt cgcttagagc	8160

ttatgaagat gccacttgc ttatttcgt gctggctct aactccatt acctttact	8220
tacaattctt catttgtac actcatgaaa ggagactcg gatatggtt ttaatatctt	8280
gagcagctgt tagtacatca gcaaataatga ggctcctgtt tggttccaag attttaaag	8340
acatgtgaa gciggaaggc catgagcagt caaagtgtct ggacctgggg cactggaagg	8400
agctcaaggc gggcagtcag gaagaaggga gcagggtgt agcctctgt acaagaggc	8460
tctcatggct ttttaggagt aggtgactct ggttaaggagg aatttactct agattatgt	8520
ctcagtgata tctctgatac caaagacaat ctgggagc gcacggcttc tccacggagg	8580
gacctgtgat gcccggcaaa gtttatccaa gcagtcttga aggccgtctt gactatgg	8640
ttttcttaca gaaatcacta cgctcgatatt ttactccag ttcacccat catttgcatt	8700
cacgttagct ggtctaggcc aagagtctga accttggtt tggttcaaattt ctgtatctc	8760
agctatgtgg gaagctgagg caggagaatc ggcgaattt gacttgcgtt agctacgaa	8820
atatacgagg ttcaagagca gcctgggcaa ttggcaaga tccgttctca aagacataca	8880
tacatacata tatttggcaa gatccgttctt caaagacata catacataca tacatttggc	8940
aagatccgtt ctcaaaagaca tacatacatg catgcatttca taaatacatg tataaatgaa	9000
tataaaatataa aaataggaac aggactgagg acatgccatg tggatgtacag gaccctgg	9060
tcagtttcta gcaccatggt cgctggcatg caaaagctt ccatgtcaag gaagttagaac	9120
tcctgaatttctt tggctatgc aaatgacttc acagcaaggt tcctccat cactgcaagt	9180
gtgtgggtt gaagcagccc tacaggagt tcactcgcca tgggtttt aaggtgaatt	9240
atttcaaaac tggaaatctga aagagtgttag tttggattt actcagttt tattatctt	9300
ttggataatg ttctacccatc aaagggttac agaagaccc tggcatcag gcttttattt	9360
gaaaaatattt cagtttaat cactgacccatc aatatcagaa aagaatgtt gttccattt	9420
gtgtcctcg gaccgttagat ggcatttgc agctgttgc aacacgttca tcacatgg	9480
caacaattaa ggattggccat ggtgcacccg atccccccgc tctgtttaaa cttttctct	9540
gtcatctatg cctatcttgc atgtctcgcg atatcatgtt tattgtctt tccttctct	9600
tgaacacaag ctcttaggggtt aggggtttt gtcagttt tttttggacc tttttggc	9660
gacgtattat gaaggggcag tggatataaga aaagaaaacc gtgtttttt atggatgtt	9720
ttaaaaaaaaaa attagctttaa aatgtatgtt atacgaacgg gcatgaatctt gggagat	9780
agactgttcc ttgtgagccg taggaactttt ctgtttctt gttcacagt cctccgcagc	9840
tgtgctcatg gtcctccaca tctgccttac aacagcagg gtagatgtt taatttttttt	9900
tcacagaaca cctgatatgtt gagagggtt gcccctggct tttgtctcat atgaatttt	9960
ttcatcttta acataactct tcgggggagg cacttgccca tgaccatggc ttgttttttt	10020

tcctatcgac tatcttcaa atcggaatgt gtcctccct aggtgacatc tcagattcaa	10080
tgttacacg cactgctgtg cccatttca ggcattaaaa atgcgatccg cctaaattcc	10140
accccgataa aattatgcag ccaggttcgg aacccaacta gcccatctt aaaaatctat	10200
gcccttccta gcctcgctt gttgcctgtc ttgtaccc tggagtgggt atcaaggAAC	10260
agaatggcTT taaacatgtat ttgaactttt cctggTTTT gatcacAGCA gtaacAGAGT	10320
gttctagaga taagccAGAG gtttgAAAAC aaacAGAAct tgcTTTGAG gtgttATAAA	10380
catgtgtgt attataaAGG atatatCTGG tgCCAAATGG tataGCTTt attataAGAA	10440
atggccATTG tgaAGATCAG aaggAGATAA CTCACTGATT tcAGGTGGTT gattCAATCT	10500
aacACATGAT atattCTGAA actgtACAAA aaAGATATTc AAAAGAAGAA acACATGAA	10560
caaAGAGTAT atggAAATTc tgacaACTCA gaATCAGTGT atgttaAGAT gaAGTTcatG	10620
attaACAAAT ggAGATGGTC gcAGTCATCC tgaAGCTTt tttAGCCAAT gCTTtACAC	10680
atCCAACtCA atTCGTTT ttttttttC agatGGATCT tCCCATTTT aattAACCTT	10740
atcatgatAG cccCTAGTAA ggcATGTCt gacATTCTT ttCTTTTT ttAtAGCTTA	10800
tgttCTTTT tttaAAAtt ttTTTACTAC atATTTCTT caATTACATT tCCAATGCTA	10860
tCCCAAAGT CCCCATAcc ctCCtCCCCC ACTCCCTAC CCACCCACTC CCACtTTG	10920
gCCCTGGGGT tCCCTGTAC tggggatAT aaAGTCTGCG tgcTCAATGG gcCTCTTTT	10980
ccAGTGTGGA CCTACTAGGC catTTTGA tacATATGCA gCTTGAGTCA agAGCTCCGG	11040
ggtactggTT agttcatAGT gttgttCCAC ctatAGGTT gcAGATCCt ttAGTtCCtt	11100
gggtgcTTtC tctAGCTtCt ccATTGGAG ccCTGTGATC catCCAATAG ctGACTGTGA	11160
gcATCCACTT ctGTGTTGc taggtCCCGG ccaAGTCTCA caAGAGACAG ctATTTcAGG	11220
gtCCCTTCAG catATGCTtG ctAGTGTATG caATGGTGTc ATGTTGGA ggCTAATTAT	11280
gggatGGCTC CCTGGATATG gcAGTCTCTA aATGGTCCAT CCTTTGTCT cAGCTCCAA	11340
cTTTGTCTCT GtaACTCCTT tcaATCTCG ttTTAATGT ccGAAAATGA ctggtaACGT	11400
cactgcttAC attCCCTTt gCTTGTGTT gaATTGTGAG ctTTATCTT gatCTGGAGT	11460
ttCTTAAAGA agACTTGTa atgtGCTTt ttTTAAAGAT ggtGAATTCA attAAAGATA	11520
gacaAGAGGG acGGGTCTGT atttCATCTG gtagAGTGT tacCTGCCAT tcatGAAGTT	11580
ctggTTcGAT cccCGGcACA gcatAGAACC acATGCGGTG gcaACTCAGT tgcCTGTGAC	11640
cccAGCActC aggAGCTAGA ggcAGGTTAC ctTTGACTAC acAGCAAGTT caAGGCTAGC	11700
ctggTCTACA tgcaACTCTT cctCAAAGGG aaaACAAAAC aaaaATAGAC aggAGAATTG	11760
gaaACATCCA tagAAACCCA aATATGAATC aATAGACTCC cctCTTCCTG tgcAGACAT	11820
tcAGACTCAG tgacAGCCGT cacCGTTtAT gaggCATGAC tgATTTACA gatCCTAGAG	11880

caagcgtgca caattctgg tttcctgcc tgcgtctca cacacacgct caccttaggg	11940
acggaggcag cgagggtcta gtcagttca gacgaatcca ctcatcagct gtcaccatg	12000
gtcttctagg tgaagcagaa ctctccttcc atcagcaccc gtaaaaaca aaagtggaaa	12060
gcagatattt cactccgaat gcttatcat tggcagtgtat ttcaaattt aaccactaat	12120
ttcccagaag aattaggtca cgggccatgt ggcattagac cctattgtgg tgacattatt	12180
tcctgatgtg cctatataat aatgtatagt ggtctcatct ttatgtttt ggtctgaat	12240
gtgataaata caagactggg caagtgtca tcaaagctgt tacttgaat tggtaattata	12300
cctatttgt tggtggtgtt tttcttggt tcatggacaa ccaaacacat tacggcttg	12360
ctttgttta gctactctgt gtcaagttcc tgtgaaaata ccgtattaca gtgtcttat	12420
tacatcttg gtaatgaagt agtcacctaa gcccctatcc tggctctct atggctcact	12480
aaagaatcgt aagttggata atgattgctg aagaaataga tatgtttt ttacatttag	12540
gtagaaaagac ctgtggttc taggtaacag tttacttaac ttagttgcta catctagtt	12600
gcactcagta aacaccctgg tgtggtttt acaacaacaa gttgttctt gaagccccaa	12660
catggccag attgaatag aagacctgag gcagactaac actcactccc tgctgccaaa	12720
gtacgagac cggggacata tttctccaaat agccagcccg agttgatgct ctttgtaagc	12780
agacaccaca aagccacacg gctagcccta agatggaga gccctgacct ctcttgctt	12840
ctgacctagc cccataccgc aaaatcaacc agagaatttc cgtggatcca gccacttctg	12900
agcatgaact aatatgtcag gccgagggtt atccagaagc tgaggttaatc tggacaaaca	12960
gtgaccacca acccgtgagt gggaaagagaa gtgtaccac tttccggaca gagggatgc	13020
ttctcaatgt gaccagcgt ctgagggtca acgccccacg gaatgtatgtt ttctactgt	13080
cgtttggag atcacagcca gggcaaaacc acacagcgaa gctgatcatc ccaggtgagt	13140
tgcctaactc gtccccggat tcctagcagc atggccatcc gccatagtca ttttagcgt	13200
gttggccgag tgtatgaata catgaaactt acattggcta gacgtattct agttccttt	13260
tctttcgct gcaagccata atgtacttg gtcaacactc agcaagaatt aagtgtttgc	13320
tcctgacaga cagtagttt gtcattgagt attcgtggct ggataggaca taagttactc	13380
tgctccagga aacaggtgac agtcgtatgtt aggagatgtt ctgttaactt gggcaccacg	13440
ggcaacgtga gagcaagctt atgcttcagg aatgtaaacc tttgtcacat caaagctgcc	13500
ctctccctc cggggctgct gtatgtttt gttatcttacatc tttttttt tttttttt	13560
attcaacagg aagaatcctt tttccata ctcccttca gggcattccc tgatacttca	13620

actccagggaa gctgcctgt gcatagaaca cgaggctgat gcctatggc aaccgactag	13680
ctgggttga actcaccagg ccagggcatt gtagggatag aatgagctc acgaaaatga	13740
ttgttagaaaa atcgtttag aattcagctg tcttaaat tcattacat tacagaataa	13800
ggcccacagg agacagttt gtagagggct cagagcat taigaatatg aaccagagg	13860
tactcactt gaggagggtt gcttcgtt ccatcgacac cccttcca atgtatgtca	13920
acagtacatt gatgtctaga gatagcttg tgaagttt tagaagatata taaaactaca	13980
ttaaaaagtc aaccaatatg aaaaatgaag cccaggatgg gcgtggagcc aaaaggagca	14040
cacaagttt gaaaaatgtt aaataaaaag gaagacactc taactagaat tggactttc	14100
cataaaaagct atattgttgg tttctacca tttaatgtt taigggctg gagacgttgt	14160
agctcagttt ggagagttact tgcctagcat ccacaatgtt ctgacccag cgccatataa	14220
acgtatatac ggctcaccta tagtctaaac actttgggg tggaaagccgg agggtcgtt	14280
caaggtcatc ctcagttca tagcaagttc aaggccagta tggactgact acaagagacc	14340
ctgcctcaaa gacaaaacaa gcaaacatca tcataataaa acagaaaaa gctttctt	14400
ggccatttct ttgttagaca tcctggatgta acttaaccac tctgagttc tcttctcatc	14460
tgtacttgg gttcatagtg ggaccaaata ggagctgagt tacaacagga gatgaaatt	14520
agcaatctca gaggatccc gagccctggg acccatttt ctcttctca aaactccagg	14580
cagagaaaca gggagatgtt aatgactgga gtgccaaga gtctcagaca tggaaagaaac	14640
acaacccgca ctggccaca ttgtggag acagaagccgg ctttcgttgc ccccgcttc	14700
ccatgtcgg gagttggct tccacacca gtcagccatt actgtctata ttaatgatgt	14760
cacaaggaag ttactgcact aaggttacca tttaatattt cagtcactt ctgtggcaac	14820
atgtcacagg cctggatgtc ttctctgtgc tgctccagt ttcttaggat atctgtttc	14880
ttcttccaaac ctttacactgg acattaactt tcgtgatata agattaccct aagaccaaacc	14940
tatatttcag gagtcatcat tccctgtact atggcgacg aaagccctac cttccatcag	15000
cttctttta tcctttcca gaactgcctg caacacatcc tccacagaac aggactca	15060
gggtgcttc gggatccatc ctgttgcctc tcattgttgt gtccacggtc ctcctttct	15120
tgagaaaaaca aggtatttcc tccattgttg tactgcctgc agggaaatgc atgagggtcc	15180
tttaccattt gccttgatca ggcagtgcac gagatggatc caccctgaca agaacagacc	15240
cacatcacag ggcgtccatc actgcacgtc agctgaacct caccagaaaa cactgacttg	15300
aaaggtgctg ccctccattc cctggcttg ctgttgcattt cacagatggaa gttttacac	15360
tgactctgtt gtaactgatgc ttctttaatg cctgttccata ttgttgcctc ggcacatctc	15420
ctaccttggaa gctcggttgg ggaccctgtt gtaatatgaa gaggtatcag ttggacaagg	15480

gcgttaggaa gctaaaagac ttagcttca aggcgtggg gagggggagg gcattgtgag	15540
gtccctgtt cagcggttca gagtaaagct gggcagcaca caagttaga caacaaggaa	15600
gatgctcaa ctgggttgg aggtcaatgg tgcaggata gtagcaatg gaggttaaag	15660
aagaaagcca taaggttct ttctacagac tctgaagaca gagcactgt gtgcctattg	15720
gtctcaggtg aactcaagtc ttgtgttct tacaccacct attgagctgg gttctggata	15780
ccctaagtgg aaaaacactt ctgtctaaaa agagctgtgg catcttacc acaaagcact	15840
ttttttttt gcaagattc tgaagaccaa atgacacagt ttttaaata atttccatat	15900
atttatttca gtacttaccc ataagaatga ctgaaatcta ggaaaatgaa tatattcaaa	15960
taatgccttc ciattgtaaa gtgactttaga gtaaaccttt tcaccaaata ctttgaatg	16020
cataccaagt gagccaatga tgcatggact tgtgtgaagc caaatggga aatagaatat	16080
gggagggAAC atcaatcatc agagaggaat tccccatcac cctttggag ggcgcgtgt	16140
tggaaaaagt gttgttaactg gggcggtagc gaccagctgc ttccaaagaa taagccctga	16200
gcagaaccaa gagggttgcc agggtgtgaa gattaagctt cagagacaca tctggcttag	16260
ggcttagccta ggacttgcac aggaccgcag ttgtgccta atggcatctg ggtatgattgg	16320
ctgaggatga gggaaagcaga gagtcagttt ggtggtaagc tagtcagga tgtggacgt	16380
ttctgaggga agggtgaaag acaaagttaga cagtcctaaa aaccatctga gaatgaaagt	16440
atgtacccta aattgttcaa taattaactt tgccgcgtgg gatctgaaat aaggaagttc	16500
acggcctaaa agcctgtgtt gtagggatt gatcgtgtc tcctaaaaac cttaaatgt	16560
aaatcgagtc cctgtgggtt gtagtagcat cttgtataa ggaattaaga ttgatttctt	16620
cttccttagt gagaatgcta gatgtggaga aatgtggcgt tgaagataca agctaaaaaa	16680
accgaaatgg taagtgttag taacgaggga gggcaagcc gagggatga gtggacaga	16740
gcagccaagc agggcctgc aaggcgtca gttccagcgc tctgttaggt gaggcagggg	16800
gatagggagt tccaggccag caaccacaca gccaaaacaa aacaaacaaa aaaaaaaca	16860
aagcaaaagg aagagcagaa aaagctactg ttaccaacaa gagacatact ttagccgtga	16920
tctcctctcc ttccaaagga agctgttgtt ggggctgtt ggttcctctg cctaaggatc	16980
gccacatctg agaaaaactct gggtttgctg ctgcgggtgc tgtgtggtag ccctgcaacc	17040
agggacgctg ttgacttatt tgaatggca tttgattaag caaatgattc tgctgtgtgg	17100
ttagctgtta actgtttcat gtgtatgata tggcatttca tttcatcatc ctgccttcaaa	17160
tcagataaat atgagaatca tctccattgt atagtaggaa aaacagggt gagaagataa	17220
tgcgagggtgc ctaagaacac acagacttgc taccacagac gtccgttctt tgcttaggtgc	17280
ttcaatctat gctgtacta atgtctgtat ttataagagt agaaaaactct gcccggcgt	17340

tgggtggccca cgccttaat cccagcac tc gggaggcaga ggtagtcgga tt tctgagg t	17400
tgaggccagc ctggtctaca gagtgagt tc caggacagcc aggctacaca gagaaaccc t	17460
gtctcgaaaa aaatcaaaaa agaaaaaaga acaagaaaac tctaactgaa ctatcttgc t	17520
gtaaattaca gtgtgttca attcat tta gtgtgttag aaaccaaaca gtaaggccag c	17580
gcagaactaa agtggttcg ctaacttggg cagacccaag caggttccct cctgtacatt a	17640
accatttatt ctgctgagtc accctgagga accggcctgg ct tgctcaag actgaggatt	17700
tctcagccat gaacacttc cat ttaaaa ct tagggcagt cccggacaag caaggatggt	17760
tagtcatcct tcatcatgta aggtagtca gacataggt a gtagtct ctgtcttacg	17820
gcaacgttac tatctgctct agcaaacatc ccattt gttt atcttacata tcatacg tt	17880
ccccccaca tattccctgc ccctgtgaaa ttattatact atgatcactc tccagataca	17940
caattcgagg agacgtaagc agtggtaac cctctgatcg tcgattggca gcttgggtc	18000
tgtgaaagaa agggccatg ggacatgagt ccaaagactc aagatggAAC ctgagggaga	18060
gaaccaagaa agtggtgga gaggagcctg gaacaacgga cat ttttcc agggagacac	18120
tgctaa gcaa gttgccatc agtgc ttttgc gaaatggat tgagggtcc tggcttagca	18180
gctggccctt gcacagtgc ac tttcc tct gctcagtgcc gggatgagag atggagtc	18240
gagtgttgaa gaataagtgc ct tctattta tttt gagg tct gtgtgttctc acttggca	18300
tgttaattatg actggtaat tctgacgaca tgatagatct taagatgtag tcaccaact	18360
caactgctgc tt tagcatcct ccgtaactac tgatacaagc agggAACaca gaggtcac	18420
gcttggtttgc acaggctt gctgtgtac tcaataatc ttat ttttgc agtcc tcaag	18480
gctttcgat agcagttgtt ctgtatcagc cttatagtg tcaaggatag cactcaacat	18540
ctcatctcat tacaatagca accctcatca ccatagcaac agctaacc tctc tg tttatc	18600
acttcatatgc caggaagctg agc gactaag tca ct tggccc acagagat tca agtctc	18660
tttctgttct tcagccactg tc ctttcagg atagaatttgc tg ttaagaa attaattaa	18720
aaactgatta ttgagtagca ttgtatatca atcacaacat gccttgc a ctgtgtggc	18780
ctctgagcat aaagatgtac gccggagatc cggtcgac ttttgc tg ttaat	18840
tca gagaat gttcat taaac aaggagtttgc cat ttttagag acactggaa gtaactcc	18900
tttcatgttct agcattacat ttacccatt tgctatcctt gccatc a ctgtgttct	18960
ccatgaagtgc tcatgaatct tg ttaat ttttttattttaaatgt ttctat taa	19020
atgatatttgcatctgaggc gatagctc tg tggaaaac ctttcc tca caagtgtaa	19080

accctgagtc ttatccctag aacccacata aaaaacagtt gcgtatgtt gtgcattgtt	19140
ttgatcccag cactagggag gcagaggcag gcagatcctg agctctcatt gaccacccag	19200
ccttagcctac atggttagct ccaggcctac aggagctggc agagcctgaa aaacgatgcc	19260
tagacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacca gtactcatag	19320
acctaagtgc accctcctac acatgcacac acatacaatt caaacacaaa tcaacaggga	19380
attgtctcag aatggtcccc aagacaaaga agaagaaaaa caccaaacca gctctattcc	19440
ctcagcctat cctctctact cttcctaga agcaactact attgttttg tatataaatt	19500
tacccaacga cagttaatat gtagaatata tattaaagtg tctgtcaata tatattatct	19560
ctttctttct ttcttcctt ctttcttct ttctttctt ctttctttct ttcttcctt	19620
ctttcttct tccttccttc ctcccttcct tccttccttc ctttctttct ttcttcctt	19680
ttttctgtct atctgtacct aatgggtgc tcactatgca tttctgtgc tcttcgcct	19740
ttttattnaa tgatggata ttatgctgc ttccagaatg gatctaaagc tctttgttc	19800
taggtttct ccccatcct tctaggcattc tctcacactg tctaggccag acaccatgtc	19860
tgctgcctga atctgttagac accattata aagcacgtac tcaccgagtt tgtatggc	19920
ttgttctgtg tctgattaaa gggagaccat gagtccccag ggtacactga gttacccag	19980
taccaagggg gaggcttgtt tgggtctcca tggcagaagc aggccctggag ccattttgg	20040
ttcttccttg acttctctca aacacagacg cctcaattgc tcattacagg ttcttccttg	20100
ggaatgtcag cattgctcct tggactgtgg ctgccttgaa aggagccat tagctctgt	20160
tgagcccttg acagctactg ccttcctta ccacagggc ctctaagata ctgttaccta	20220
gaggcttgaa ggatctgtgt tctctgggg gaggaaagga ggaggaaccc agaactttct	20280
tacagtttc ctgttctgt cacatgtcaa gactgaagga acaggctggg ctacgtatgt	20340
agatcctgtc tcaaaggaaa gacgagcata gccgaacccc cggtgaaacc ccctctgtta	20400
cctttcaca caagcttatt gatgagtctc atgttaatgt ctgtttgtt tgaagttaa	20460
gaaaatatcg gttggggcaa cacattctat ttattcattt tatttggaaat cttatgcca	20520
tctcatgggt ttggattgggt gtggcacttt attctttgtt gttgtgtata accataaatt	20580
ttattnnca tcagattgtc aatgtattgc attaattaa taaatatttt tatttattaa	20640
a	20641
<210> 5	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 5

taattggctc tactgc

16

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 6

tccgcataaga atgact

16

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 7

tgaacacaca gtcgca

16

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 8

ctgaacacac agtcgc

16

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 9

tctgaacaca cagt cg

16

<210> 10

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 10	
ttctgaacac acagtc	16
<210> 11	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 11	
acaagtcatg ttacta	16
<210> 12	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 12	
acacaaggta tggtaac	16
<210> 13	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 13	
cttacttaga tgctgc	16
<210> 14	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 14	
acttacttag atgctg	16
<210> 15	

<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	15	
gacttactta gatgct		16
<210>	16	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	16	
agacttactt agatgc		16
<210>	17	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	17	
gcaggaagag acttac		16
<210>	18	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	18	
aataaattcc gttcagg		17
<210>	19	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	19	

gcaaataaat tccgtt

16

<210> 20
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 20

agcaaataaa ttccgt

16

<210> 21
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 21

cagagcaaat aaattcc

17

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 22

tggacagagc aaataaat

18

<210> 23
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 23

atggacagag caaata

16

<210> 24
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 24	
cagaatggac agagca	16
<210> 25	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 25	
ttctcagaat ggacag	16
<210> 26	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 26	
ctgaacttg acatag	16
<210> 27	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 27	
aagacaacc cagactga	18
<210> 28	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 28	
tataagacaa acccagac	18
<210> 29	
<211> 18	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 29	
ttataagaca aaccaga	18
<210> 30	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 30	
tgttataaga caaaccc	17
<210> 31	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 31	
tagaacaatg gtacttt	17
<210> 32	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 32	
gtagaacaat ggtact	16
<210> 33	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 33	
aggtagaaca atggta	16
<210> 34	

<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 34	
aagaggtaga acaatgg	17
<210> 35	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 35	
gcatccacag taaatt	16
<210> 36	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 36	
gaaggttatt taattc	16
<210> 37	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 37	
ctaatcgaat gcagca	16
<210> 38	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 38	

tacccaatct aatcga	16
<210> 39	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 39	
 tagttaccca atctaa	 16
<210> 40	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 40	
 catttagtta cccaat	 16
<210> 41	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 41	
 tcatttagtt acccaa	 16
<210> 42	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 42	
 ttcattttgt taccca	 16
<210> 43	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 43	
gaatataattt catttagt	18
<210> 44	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 44	
cagtggaaat ttaattt	17
<210> 45	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 45	
ccaacagtga ggaattt	16
<210> 46	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 46	
cccaacagtg aggaat	16
<210> 47	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 47	
tatacccaac agtgagg	17
<210> 48	
<211> 17	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 48	
ttataccaa cagttag	17
<210> 49	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 49	
tttataccca acagtga	17
<210> 50	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 50	
cctttatacc caacag	16
<210> 51	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 51	
taaccttat acccaa	16
<210> 52	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 52	
aataaccctt ataccca	17
<210> 53	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 53	
gtaaataacc tttata	16
<210> 54	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 54	
actgtaaata acctttat	18
<210> 55	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 55	
atatatatgc aatgag	16
<210> 56	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 56	
agatatatat gcaatg	16
<210> 57	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 57	
gagatatata tgcaat	16

<210> 58	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 58	
ccagagatat atatgc	16
<210> 59	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 59	
caatattcca gagatat	17
<210> 60	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 60	
gcaatattcc agagata	17
<210> 61	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 61	
agcaatattc cagagat	17
<210> 62	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 62	
cagcaatatt ccagag	16
<210> 63	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 63	
aatcagcaat attccag	17
<210> 64	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 64	
acaatcagca atattcc	17
<210> 65	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 65	
actaagttagt tacacttct	19
<210> 66	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 66	
ctaaggtagtt acaccttc	17
<210> 67	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 67	
gactaaggtag ttacactt	18
<210> 68	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 68	
tgactaagta gttaca	16
<210> 69	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 69	
cttgactaa gtatgtt	17
<210> 70	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 70	
ctcttgact aatgttt	16
<210> 71	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 71	
gctcttgac taatgtt	16
<210> 72	
<211> 17	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 72	
ccttaaatac tggtagac	17
<210> 73	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 73	
cttaaataact gttgac	16
<210> 74	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 74	
tccttaata ctgttg	16
<210> 75	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 75	
tctccttaaa tactgtt	17
<210> 76	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 76	
tatcatagtt ctcctt	16

<210> 77	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 77	
agtatcatag ttctcc	16
<210> 78	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 78	
gagtatata gttctc	16
<210> 79	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 79	
agagtatcat agttct	16
<210> 80	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 80	
cagagtatca tagttc	16
<210> 81	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 81	

ttcagagtat catag	16
<210> 82	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 82	
ttcagagtat ctagat	16
<210> 83	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 83	
ttcttcagat tatcata	17
<210> 84	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 84	
tttcttcaga gtatcat	17
<210> 85	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 85	
gagaaaggct aagttt	16
<210> 86	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 86	
gacactttg tacatt	16
<210> 87	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 87	
tgagacactc ttgtaca	17
<210> 88	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 88	
tgagacactc ttgtac	16
<210> 89	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 89	
ctttataaa ctccat	16
<210> 90	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 90	
accaaactt attaaa	16
<210> 91	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 91	
aaacctctac taagtg	16
<210> 92	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 92	
agat taagac agttga	16
<210> 93	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 93	
aagt taggagc aagaggc	17
<210> 94	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 94	
aaagt taggag caagagg	17
<210> 95	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 95	
gttaaggcagc caggag	16
<210> 96	

<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	96	
aggtaggat gggtag		16
<210>	97	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	97	
aaggtagga tggta		16
<210>	98	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	98	
caaggtagg atgggt		16
<210>	99	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	99	
ccaaggtag gatggg		16
<210>	100	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	100	

tccaagggtta ggatgg

16

<210> 101
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 101

cttccaaggg taggat 16

<210> 102
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 102

atcttccaag ggttagga 17

<210> 103
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 103

agaagtgtat gctcatt 17

<210> 104
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 104

aagaagtgtat ggctcat 17

<210> 105
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 105	
gaagaagtga tggctca	17
<210> 106	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 106	
atgaaatgt a aactggg	17
<210> 107	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 107	
caatgaaatg taaaactgg	18
<210> 108	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 108	
gcaatgaaat gtaaactg	18
<210> 109	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 109	
agcaatgaaa tgtaaact	18
<210> 110	
<211> 18	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 110	
gagcaatgaa atgttaaac	18
<210> 111	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 111	
tgaatttccca tatccga	17
<210> 112	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 112	
agaatttatga ccatat	16
<210> 113	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 113	
aggttaagaat tatgacc	17
<210> 114	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 114	
tcaggtaaga attatgac	18
<210> 115	

<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 115	
cttcaggtaa gaattatg	18
<210> 116	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 116	
tttcaggta agaatta	17
<210> 117	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 117	
tttccagg taagaat	17
<210> 118	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 118	
tttttcag gtaagaa	17
<210> 119	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 119	

tcttcttcag gtaaga	16
<210> 120	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 120	
 tggctctaaga gaagaag	 17
<210> 121	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 121	
 gttgtctaa gagaag	 16
 <210> 122	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 122	
 agtggctca agagaa	 16
<210> 123	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 123	
 cagtggct aagagaa	 17
<210> 124	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 124	
gcagttggtc taagagaa	18
<210> 125	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 125	
cgatggct aagaga	16
<210> 126	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 126	
gcagttggtc taagaga	17
<210> 127	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 127	
gcagttggtc taagag	16
<210> 128	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 128	
ctcatatcag ggcagt	16
<210> 129	
<211> 17	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 129	
cacacatgtt cttaac	17
<210> 130	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 130	
taaatacaca catgttct	18
<210> 131	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 131	
gtaaatacac acatgttc	18
<210> 132	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 132	
tgtaaataca cacatgtt	18
<210> 133	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 133	
gatcatgtaa atacacac	18
<210> 134	

<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	134	
agatcatgt aatacaca		18
<210>	135	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	135	
caaagatcat gtaaatcac		20
<210>	136	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	136	
acaaagatca tgtaaataca		20
<210>	137	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	137	
gaatacaaag atcatgt a		18
<210>	138	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	138	
agaataaaaa gatcatgt		18

<210> 139	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 139	
cagaatacaa agatcatg	18
<210> 140	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 140	
gcagaataca aagatca	17
<210> 141	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 141	
aggcagaata caaagat	17
<210> 142	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 142	
aaggcagaat acaaaga	17
<210> 143	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 143	
attagtgagg gaccaa	16
<210> 144	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 144	
cattagttag ggacga	16
<210> 145	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 145	
gagggtgatg gattag	16
<210> 146	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 146	
ttaggatgtaa taaagg	16
<210> 147	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 147	
ttaatgaatt tggttg	16
<210> 148	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 148	
ctttaatgaa ttgggt	16
<210> 149	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 149	
catggattac aactaa	16
<210> 150	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 150	
tcatggatta caacta	16
<210> 151	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 151	
gtcatggatt acaact	16
<210> 152	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 152	
cattaaatct agtcat	16
<210> 153	
<211> 17	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 153	
gacattaaat ctagtca	17
<210> 154	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 154	
aggcacatta aatcta	16
<210> 155	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 155	
caaagcatta taacca	16
<210> 156	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 156	
acttactagg cagaag	16
<210> 157	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 157	
cagagttaac tgtaca	16

<210> 158	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 158	
ccagagttaa ctgtac	16
<210> 159	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 159	
gccagagtta actgtac	16
<210> 160	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 160	
tgggccagag ttaact	16
<210> 161	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 161	
cagcatctat cagact	16
<210> 162	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 162	

tgaataaca tgagtcat	18
<210> 163	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 163	
tgaaataac atgagtc	17
<210> 164	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 164	
tctgttat tcactg	16
<210> 165	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 165	
gtctgttat gtca	16
<210> 166	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 166	
tggtctgttt atgtca	16
<210> 167	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 167	
ttggtctgtt tatgtc	16
<210> 168	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 168	
tcacccattg tttaaa	16
<210> 169	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 169	
ttcagcaaat attcg	16
<210> 170	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 170	
gtgtgttcag caaatat	17
<210> 171	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 171	
tctattgtta ggtatc	16
<210> 172	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 172	
attgcccatc ttactg	16
<210> 173	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 173	
tattgeccat cttaact	16
<210> 174	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 174	
aaatatggcc catctt	16
<210> 175	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 175	
ataacacctat cataca	16
<210> 176	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 176	
tataacctta tcatac	16
<210> 177	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 177	
ttataaacctt atcata	16
<210> 178	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 178	
tttataacctt tatcat	16
<210> 179	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 179	
actgctattt ctatct	16
<210> 180	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 180	
aggacttgcta ttgcta	16
<210> 181	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 181	

gaggactgct attgct	16
<210> 182	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 182	
acgtagaata ataaca	16
<210> 183	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 183	
ccaagtgata taatgg	16
<210> 184	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 184	
ttagcagacc aagtga	16
<210> 185	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 185	
gttttagcaga ccaagt	16
<210> 186	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 186	
tgcacagtgtatatt	16
<210> 187	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 187	
tgtccaagatattgac	16
<210> 188	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 188	
gaatatccctaaatttgt	16
<210> 189	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 189	
caaactgagaatatcc	16
<210> 190	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 190	
gcaaaactgagaaatatc	16
<210> 191	
<211> 16	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 191	
tcctattaca atcgta	16
<210> 192	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 192	
ttcctattac aatcgta	16
<210> 193	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 193	
actaatggga ggattt	16
<210> 194	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 194	
tagttcagag aataag	16
<210> 195	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 195	
taacatatacg ttccaga	16
<210> 196	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 196	
ataacatata gttcag	16
<210> 197	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 197	
cataacatat agttca	16
<210> 198	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 198	
tcataacata tagttc	16
<210> 199	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 199	
tagctcctaa caatca	16
<210> 200	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 200	

ctccaatctt tgata	16
<210> 201	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 201	
tctccaatct ttgtat	16
<210> 202	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 202	
tctatttcag ccaatc	16
<210> 203	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 203	
cggaaagt cag agtgaa	16
<210> 204	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 204	
ttaagcatga ggaata	16
<210> 205	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 205

tgattgagca cctctt

16

<210> 206

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 206

gactaattat ttcggt

16

<210> 207

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 207

tgactaatta ttgcgt

16

<210> 208

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 208

tgactaattt atttcg

16

<210> 209

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 209

ctgcttggaa tgtgac

16

<210> 210

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 210	
cctgcgtgaa atgtga	16
<210> 211	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 211	
atcctgcttg aaatgt	16
<210> 212	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 212	
attataaatac tattct	16
<210> 213	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 213	
gctaaaatact ttcatc	16
<210> 214	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 214	
cattgttaaca taccta	16
<210> 215	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 215	
gcattgtaac atacct	16
<210> 216	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 216	
taatattgca ccaaat	16
<210> 217	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 217	
gataaatattt caccaa	16
<210> 218	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 218	
agataaatattt gcacca	16
<210> 219	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 219	
gccagaaga taatat	16

<210> 220	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 220	
cacagccaca taaact	16
<210> 221	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 221	
ttgtaattgt ggaaac	16
<210> 222	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 222	
tgacttgtaa ttgtgg	16
<210> 223	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 223	
tctaactgaa atagtc	16
<210> 224	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 224	
gtggttctaa ctgaaa	16
<210> 225	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 225	
caatatggga cttggc	16
<210> 226	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 226	
atgacaatat gggact	16
<210> 227	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 227	
tatgacaata tggcac	16
<210> 228	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 228	
atatgacaat atggca	16
<210> 229	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 229	
cttcacttaa taatta	16
<210> 230	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 230	
ctgcttcact taataa	16
<210> 231	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 231	
aagactgcct cactta	16
<210> 232	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 232	
gaatgcccta attatg	16
<210> 233	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 233	
tggaatgccccc taatta	16
<210> 234	
<211> 16	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 234	
gcaaatgccatgggt	16
<210> 235	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 235	
ctaatggaaggatttg	16
<210> 236	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 236	
aatatagaacctaattg	16
<210> 237	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 237	
gaaagaatagaatgtt	16
<210> 238	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 238	
atgggtataatttat	16

<210> 239	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 239	
gaaagagcac agggtg	16
<210> 240	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 240	
ctacatagag ggaatg	16
<210> 241	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 241	
gcttcctaca tagagg	16
<210> 242	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 242	
tgcttcctac atagag	16
<210> 243	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 243	

tgggcttgaa atatgt	16
<210> 244	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 244	
cattatattt aagaac	16
<210> 245	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 245	
tcggttatgt tatcat	16
<210> 246	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 246	
cacttatct ggtcg	16
<210> 247	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 247	
aaatttggcac agcgtt	16
<210> 248	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 248	
accgtgacag taaatg	16
<210> 249	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 249	
tgggaaccgt gacagta	17
<210> 250	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 250	
ccacatatacg tcctt	16
<210> 251	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 251	
catattgcta ccatac	16
<210> 252	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 252	
tcatattgct accata	16
<210> 253	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 253	
caattgtcat atigct	16
<210> 254	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 254	
cattcaattg tcatattg	18
<210> 255	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 255	
tttctactgg gaatttg	17
<210> 256	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 256	
caattagtgc agccag	16
<210> 257	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 257	
gaataatgtt ctatatcc	17
<210> 258	

<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 258	
cacaattgaaatgttct	20
<210> 259	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 259	
catgcacaaa ttgaataat	19
<210> 260	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 260	
atcctgcaat ttcacat	17
<210> 261	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 261	
ccaccatagc tgatca	16
<210> 262	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 262	

accaccatag ctgatca

17

<210> 263

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 263

caccaccata gctgtac

17

<210> 264

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 264

tagtcggcac caccat

16

<210> 265

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 265

ctttagatcg gcaccac

17

<210> 266

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 266

ctttagatcg gcacca

16

<210> 267

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 267	
cgcttgtagt cggtcac	16
<210> 268	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 268	
tcaataaaga tcaggc	16
<210> 269	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 269	
tggacttaca agaatg	16
<210> 270	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 270	
atggacttac aagaat	16
<210> 271	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 271	
gctcaagaaa ttggat	16
<210> 272	
<211> 16	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 272	
tactgttagaa catggc	16
<210> 273	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 273	
gcaatttcatt tgcatct	16
<210> 274	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 274	
tgaagggagg agggacac	18
<210> 275	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 275	
agtggtaag ggaggag	17
<210> 276	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 276	
tagtggtgaa gggaggag	18
<210> 277	

<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 277	
atagtggta agggaggag	19
<210> 278	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 278	
tagtggtgaa gggagga	17
<210> 279	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 279	
atagtggta agggagga	18
<210> 280	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 280	
tagtggtgaa gggagg	16
<210> 281	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 281	

atagtggta agggagg	17
<210> 282	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 282	
gatagtggtg aagggagg	18
<210> 283	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 283	
atagtggta agggag	16
<210> 284	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 284	
gatagtggtg aagggag	17
<210> 285	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 285	
gagatagtgg tgaagg	16
<210> 286	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 286	
catggagat agtgtt	16
<210> 287	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 287	
acaaataatg ttactct	18
<210> 288	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 288	
acacacaaat aatggta	18
<210> 289	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 289	
gaggcacaca caaataat	18
<210> 290	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 290	
atatagagag gctcaa	16
<210> 291	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 291	
ttgatata gaggct	16
<210> 292	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 292	
gcattt gata tagaga	16
<210> 293	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 293	
tttgcattt atatag	16
<210> 294	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 294	
ctggaagaat aggttc	16
<210> 295	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 295	
actggaagaa tagtt	16
<210> 296	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 296	
tactggaga ataggt	16
<210> 297	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 297	
tggcttatcc tgtact	16
<210> 298	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 298	
atggcttatac ctgtac	16
<210> 299	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 299	
tatggcttat cctgtac	16
<210> 300	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 300	
gtatggctta tcctgt	16

<210> 301	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 301	
atgaatatat gcccagt	17
<210> 302	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 302	
gatgaatata tgccca	16
<210> 303	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 303	
caagatgaat atatgcc	17
<210> 304	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 304	
gacaacatca gtataga	17
<210> 305	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 305	
caagacaaca tcagta	16
<210> 306	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 306	
cactcctagt tccttt	16
<210> 307	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 307	
aacactccta gttcct	16
<210> 308	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 308	
taacactcct agttcc	16
<210> 309	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 309	
ctaacacactcc tagttc	16
<210> 310	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 310	
tgataaacata actgtg	16
<210> 311	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 311	
ctgataacat aactgt	16
<210> 312	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 312	
tttgaactca agtgac	16
<210> 313	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 313	
tccttactt agctag	16
<210> 314	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 314	
gagtttggat tagctg	16
<210> 315	
<211> 16	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 315	
tgggatatga caggga	16
<210> 316	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 316	
tgtggatat gacagg	16
<210> 317	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 317	
atatggaagg gatatac	16
<210> 318	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 318	
acaggatatg gaaggg	16
<210> 319	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 319	
atttcaacag gatatgg	17

<210> 320	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 320	
gagtaatttc aacagg	16
<210> 321	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 321	
aggagtaat ttcaaca	17
<210> 322	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 322	
attagggagt aatttca	17
<210> 323	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 323	
cttactatta gggagt	16
<210> 324	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 324	

cagcttacta ttaggg	16
<210> 325	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 325	
 tcagcttact attagg	 16
<210> 326	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 326	
 atttcagctt actattag	 18
<210> 327	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 327	
 ttcagcttac tattag	 16
<210> 328	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 328	
 cagatttcag cttaact	 16
<210> 329	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 329	
gactacaact agaggg	16
<210> 330	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 330	
agactacaac tagagg	16
<210> 331	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 331	
aagactacaa ctagag	16
<210> 332	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 332	
atgatttaat tctagtcaaa	20
<210> 333	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 333	
tttaattcta gtcaaa	16
<210> 334	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 334	
gatttaattc tagtca	16
<210> 335	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 335	
atgatttaat tctagtca	18
<210> 336	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 336	
gatgatttaa ttctagtc	19
<210> 337	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 337	
gatttaattc tagtca	16
<210> 338	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 338	
gatgatttaa ttctagtc	18
<210> 339	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 339	
tgatttaatt ctatgc	16
<210> 340	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 340	
gagatgattt aattcta	17
<210> 341	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 341	
gagatgattt aattct	16
<210> 342	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 342	
cagattgtatg gtatgtt	16
<210> 343	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 343	

ctcagattga tggtag

16

<210> 344

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 344

gttagccctc agattg

16

<210> 345

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 345

tgtattgtta gccctc

16

<210> 346

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 346

acttgtattg ttagcc

16

<210> 347

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 347

agccagtatc agggac

16

<210> 348

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 348	
tgcacaatag tggcat	16
<210> 349	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 349	
acaagtggta tccttct	16
<210> 350	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 350	
aatctacttt acaagt	16
<210> 351	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 351	
cacagtagat gcctgata	18
<210> 352	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 352	
gaacacagta gatgcc	16
<210> 353	
<211> 17	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 353	
c tt gga acac agtagat	17
<210> 354	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 354	
a t a t c t t g g a a c a c a g	16
<210> 355	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 355	
t c t t a a t a t c t t g g a a c	18
<210> 356	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 356	
t g a t t c t t t a a t a t c t t g	19
<210> 357	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 357	
t g a t g a t t c t t a a t a t c	19
<210> 358	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 358	
aggctaagtc atgatg	16
<210> 359	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 359	
ttgatgaggc taagtc	16
<210> 360	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 360	
ccaggattat actctt	16
<210> 361	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 361	
gccaggatta tactct	16
<210> 362	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 362	

ctgccaggat tatact	16
<210> 363	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 363	
cagaaaactta tactttatg	19
<210> 364	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 364	
aagcagaaac ttatact	17
<210> 365	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 365	
gaagcagaaaa ctatatact	18
<210> 366	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 366	
tggaaggcaga aacttatact	20
<210> 367	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 367	
tggaaggcaga aacttatac	19
<210> 368	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 368	
aagcagaaac ttatac	16
<210> 369	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 369	
tggaaggcaga aacttata	18
<210> 370	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 370	
aaggatatt atggag	16
<210> 371	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 371	
tgcggaga tttcct	16
<210> 372	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 372	
atggattggg agtaga	16
<210> 373	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 373	
agatggattt ggagta	16
<210> 374	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 374	
aagatggattt gggagt	16
<210> 375	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 375	
acaagatgga ttggga	16
<210> 376	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 376	
agaaggttca gacttt	16
<210> 377	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 377	
gcagaaggtt cagact	16
<210> 378	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 378	
tgcagaaggt tcagac	16
<210> 379	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 379	
agtgcagaag gttcag	16
<210> 380	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 380	
aagtgcagaa gtttca	16
<210> 381	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 381	
taagtgcaga agtttc	16

<210> 382	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 382	
tctaagtgca gaaggt	16
<210> 383	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 383	
ctcaggagtt ctacttc	17
<210> 384	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 384	
ctcaggagtt ctactt	16
<210> 385	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 385	
atggagggtga ct caggag	18
<210> 386	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 386	
atggagggtga ctcagga	17
<210> 387	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 387	
atggagggtga ctcagg	16
<210> 388	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 388	
tatggaggtg actcagg	17
<210> 389	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 389	
atatggaggta gactcagg	18
<210> 390	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 390	
tatggaggtg actcag	16
<210> 391	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 391

atatggaggt gactcag

17

<210> 392

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 392

catatggagg tgactcag

18

<210> 393

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 393

atatggaggt gactca

16

<210> 394

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 394

catatggagg tgactca

17

<210> 395

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 395

catatggagg tgactc

16

<210> 396

<211> 17

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 396	
gcatatggag gtgactc	17
<210> 397	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 397	
tgcataatgga ggtgactc	18
<210> 398	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 398	
ttgcatatgg aggtgactc	19
<210> 399	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 399	
tttgcataatg gaggtgactc	20
<210> 400	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 400	
gcatatggag gtgact	16

<210> 401	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 401	
tgcatatgga ggtgact	17
<210> 402	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 402	
ttgcatatgg aggtgact	18
<210> 403	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 403	
tttgcataatg gaggtgact	19
<210> 404	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 404	
tgcataatgga ggtgac	16
<210> 405	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 405	

ttgcatatgg aggtgac	17
<210> 406	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 406	
 tttgcataatg gaggtgac	 18
<210> 407	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 407	
 tttgcataatg gaggtga	 17
<210> 408	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 408	
 tttgcataatg gaggtg	 16
<210> 409	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 409	
 aagtgaagtt caacagc	 17
<210> 410	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 410	
tgggaagtga agt tca	16
<210> 411	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 411	
atgggaagtg aagt ttc	16
<210> 412	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 412	
gatgggaagt gaagt t	16
<210> 413	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 413	
ctgtgatggg aagt gaa	17
<210> 414	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 414	
attgagtgaa tccaaa	16
<210> 415	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 415	
aattgagtga atccaa	16
<210> 416	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 416	
gataatttag tgaatcc	17
<210> 417	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 417	
gtgataattg agtcaa	16
<210> 418	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 418	
aagaaaggta caataaa	16
<210> 419	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 419	
caagaaaggta gcaataaa	16
<210> 420	

<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	420	
acaagaaagg tgcaat		16
<210>	421	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	421	
atttaaactc acaaac		16
<210>	422	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	422	
ctgttagttt cagcga		16
<210>	423	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	423	
tctgaatgaa catttcg		17
<210>	424	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oligonucleotide motif	
<400>	424	

ctcattgaag gttctg

16

<210> 425

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 425

ctaatctcat tgaagg

16

<210> 426

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 426

cctaatctca ttgaag

16

<210> 427

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 427

actttgatct ttccagc

16

<210> 428

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 428

actatgcac acttttgc

16

<210> 429

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 429	
caaatacgctt tatcg	16
<210> 430	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 430	
ccaaatagct ttatcg	16
<210> 431	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 431	
tccaaatagc ttatc	16
<210> 432	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 432	
gatccaaata gcttta	16
<210> 433	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 433	
atgatccaaa tagtt	16
<210> 434	
<211> 16	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 434	
tatgatccaa atagct	16
<210> 435	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 435	
taaacaggc tggaat	17
<210> 436	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 436	
acttaaacag ggctgg	16
<210> 437	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 437	
acacttaaac agggct	16
<210> 438	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 438	
gaacacttaa acaggg	16
<210> 439	

<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 439	
agagaacact taaacag	17
<210> 440	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 440	
ctacagagaa cactta	16
<210> 441	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 441	
atgctacaga gaacact	17
<210> 442	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 442	
ataaatgcta cagagaaca	19
<210> 443	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 443	

agataaatgc tacagaga	18
<210> 444	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 444	
tagagataaaa tgctaca	17
<210> 445	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 445	
tagatagaga taaatgct	18
<210> 446	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 446	
caatatacta gatagaga	18
<210> 447	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 447	
tacacaatat actagatag	19
<210> 448	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 448	
ctacacaata tactag	16
<210> 449	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 449	
gctacacaat atacta	16
<210> 450	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 450	
atatgtaca caatatac	18
<210> 451	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 451	
tgatatgcta cacaat	16
<210> 452	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 452	
atgatatgat atgctac	17
<210> 453	
<211> 18	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 453	
gaggagagag acaataaa	18
<210> 454	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 454	
ctaggaggag agagaca	17
<210> 455	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 455	
tattcttagga ggagaga	17
<210> 456	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 456	
ttatattcta ggaggag	17
<210> 457	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 457	
gtttatattc taggag	16
<210> 458	

<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 458	
tggagtttat attctagg	18
<210> 459	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 459	
cgtaccacca ctctgc	16
<210> 460	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 460	
tgaggaaatc attcatc	18
<210> 461	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 461	
tttggggaaa tcattcat	18
<210> 462	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 462	
aggctaattcc tatttg	16

<210> 463	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 463	
tttaggctaa tcctat	16
<210> 464	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 464	
tgctccagtg taccct	16
<210> 465	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 465	
tagtagtact cgatag	16
<210> 466	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 466	
ctaattttag tagtactc	18
<210> 467	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 467	
tgcttaattgt agtagt	16
<210> 468	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 468	
agtgctaatt gtagta	16
<210> 469	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 469	
gcaagtgcata attgtat	16
<210> 470	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 470	
gaggaaatga actaattta	19
<210> 471	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 471	
caggaggaaa tgaacta	17
<210> 472	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 472	
ccctagagt c attcc	16
<210> 473	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 473	
atcttacatg atgaagc	17
<210> 474	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 474	
gacacacactca gatttcag	18
<210> 475	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 475	
agacacacactc agatttcag	19
<210> 476	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 476	
aagacacact cagatttcag	20
<210> 477	
<211> 18	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 477	
aagacacactc agatttca	18
<210> 478	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 478	
aagacacact cagatttca	19
<210> 479	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 479	
aaagacacac tcagatttca	20
<210> 480	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 480	
gaaagacaca ctcagatttca	20
<210> 481	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 481	
aagacacact cagatttca	18

<210> 482	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 482	
aaagacacac tcagattc	19
<210> 483	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 483	
tgaaagacac actcagattt	20
<210> 484	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 484	
tgaaagacac actcagatt	19
<210> 485	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 485	
tgaaagacac actcagat	18
<210> 486	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 486	

attgaaagac acactca	17
<210> 487	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 487	
 tcatgaaag acacact	 17
<210> 488	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 488	
 ttccatcatt gaaaga	 16
<210> 489	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 489	
 ataataccac ttatcat	 17
<210> 490	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 490	
 ttacttaatt tcttgga	 18
<210> 491	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 491	
ttagaactag ctttatca	18
<210> 492	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 492	
gaggtaaaaa tatagg	16
<210> 493	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 493	
ctttagatac aactta	16
<210> 494	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 494	
tcttatgata caactt	16
<210> 495	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 495	
ttcttatgat acaact	16
<210> 496	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 496	
cagtttctta tgatac	16
<210> 497	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 497	
gcagtttctt atgata	16
<210> 498	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 498	
tacaaatgtc tattagtt	19
<210> 499	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 499	
tgtacaaatg tctattag	18
<210> 500	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 500	
agcatcacaa ttagta	16
<210> 501	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 501	
ctaattgatag tgaagg	16
<210> 502	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 502	
agcttaatgat agtggaa	16
<210> 503	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 503	
atgccttgac atatta	16
<210> 504	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 504	
ctcaagattt ttgacac	17
<210> 505	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 505	

acctcaagat tattga

16

<210> 506

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 506

aacctcaaga ttattg

16

<210> 507

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 507

cacaaacctc aagatttatt

19

<210> 508

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 508

gtacttaatt agacct

16

<210> 509

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 509

agtacttaat tagacc

16

<210> 510

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 510	
gtatgaggtg gtaaac	16
<210> 511	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 511	
aggaaacagc agaagtg	17
<210> 512	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 512	
gcacaaccca gagaa	16
<210> 513	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 513	
caagcacaac ccagag	16
<210> 514	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 514	
ttcaagcaca acccag	16
<210> 515	
<211> 16	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 515	
aattcaaggca caaccc	16
<210> 516	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 516	
taataattca agcacaacc	19
<210> 517	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 517	
actaataattt caagcac	17
<210> 518	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 518	
ataataactaa taattcaagc	20
<210> 519	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 519	
tagattttgtg aggtaa	16
<210> 520	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 520	
agccttaatt ctccat	16
<210> 521	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 521	
aatgatctag agccta	17
<210> 522	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 522	
ctaatgatct agagcc	16
<210> 523	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 523	
actaatgatc tagagc	16
<210> 524	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 524	

cattaacatg ttcttatt	18
<210> 525	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 525	
acaagtacat taacatgttc	20
<210> 526	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 526	
ttacaaggta attaacatg	19
<210> 527	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 527	
gctttattca tgtttat	17
<210> 528	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 528	
gctttattca tgttta	16
<210> 529	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 529	
agagctttat tcatgttt	18
<210> 530	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 530	
ataagagctt tattcatg	18
<210> 531	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 531	
cataagagct ttattca	17
<210> 532	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 532	
gcataaagg ctttat	16
<210> 533	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 533	
tagattgttt agtgca	16
<210> 534	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 534	
gttagattttt tagtgtc	16
<210> 535	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 535	
gacaattcttta gttagatt	17
<210> 536	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 536	
ctgacaatttcc tagtag	16
<210> 537	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 537	
gctgacaattt ctagta	16
<210> 538	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 538	
aggattaaga tacgta	16
<210> 539	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 539	
caggattaag atacgt	16
<210> 540	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 540	
t caggattaa gatacg	16
<210> 541	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 541	
t t caggatta agatac	16
<210> 542	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 542	
aggagaagaag tt tgattc	18
<210> 543	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 543	
t caaggaaga aagt tt ga	18

<210> 544	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 544	
ctcaaggaag aaagtttg	18
<210> 545	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 545	
tgctcaagga agaaagt	17
<210> 546	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 546	
aattatgctc aaggaaga	18
<210> 547	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 547	
taggatacca cattatga	18
<210> 548	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 548	
cataattat tccattcctc	20
<210> 549	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 549	
tgcataattt attccat	17
<210> 550	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 550	
actgcataat ttattcc	17
<210> 551	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 551	
ctaaactgca taatttatt	19
<210> 552	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 552	
ataactaaac tgcatc	16
<210> 553	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 553

ttattaataa ctaaactgc

19

<210> 554

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 554

tagtacatta ttaataact

19

<210> 555

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 555

cataactaag gacgtt

16

<210> 556

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 556

tcataactaa ggacgt

16

<210> 557

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 557

cgtcataact aaggac

16

<210> 558

<211> 16

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 558	
tcgtcataac taagga	16
<210> 559	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 559	
atcgtcataa ctaagg	16
<210> 560	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 560	
gttagtatct tacatt	16
<210> 561	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 561	
ctctattgtt agtatac	16
<210> 562	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 562	
agtatagagt tactgt	16

<210> 563	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 563	
ttcctggta tacttt	16
<210> 564	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 564	
gttcctggtg atactt	16
<210> 565	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 565	
tgttcctgg gatact	16
<210> 566	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 566	
ataaacatga atctctcc	18
<210> 567	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 567	

ctttataaac atgaatctc	19
<210> 568	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 568	
ctgtctttat aaacatg	17
<210> 569	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 569	
ttgttataaa tctgtctt	18
<210> 570	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 570	
ttaaatttat tcttgata	19
<210> 571	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 571	
cttaaattta ttcttgga	18
<210> 572	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 572	
cttcttaat ttattcttg	19
<210> 573	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 573	
tatgtttctc agtaaag	17
<210> 574	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 574	
gaattatctt taaacca	17
<210> 575	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 575	
cccttaaatt tctaca	16
<210> 576	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 576	
acactgctct tgtacc	16
<210> 577	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 577	
tgacaacact gctctt	16
<210> 578	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 578	
tacatttattt gggctc	16
<210> 579	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 579	
gtacatttat tgggct	16
<210> 580	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 580	
ttggcacattt tattgg	16
<210> 581	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 581	
catgttggta cattat	17
<210> 582	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 582	
aatcatgttg gtacat	16
<210> 583	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 583	
aaatcatgtt ggtaca	16
<210> 584	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 584	
gacaagtttg gattaa	16
<210> 585	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 585	
aatgttcaga tgcctc	16
<210> 586	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 586	

gcttaatgtt cagatg	16
<210> 587	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 587	
cgtacatagc ttgatg	16
<210> 588	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 588	
gtgaggaaatt aggata	16
<210> 589	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 589	
gtaacaatat gtttg	16
<210> 590	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 590	
gaaaatattgt agacta	16
<210> 591	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 591	
ttgaaatatt gtagac	16
<210> 592	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 592	
aagtcgtatc atttgc	16
<210> 593	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 593	
gctcagtatc ttataa	16
<210> 594	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 594	
catacactgt tgctaa	16
<210> 595	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 595	
atggtctcaa atcatt	16
<210> 596	
<211> 16	

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 596
caatggtctc aaatca 16
<210> 597
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 597
ttcctattga ttgact 16
<210> 598
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 598
tttctgttca caacac 16

<210> 599
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 599
aggaacccac taatct 16
<210> 600
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 600
taaatggcag gaaccc 16
<210> 601

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 601	
gttaaatggca ggaacc	16
<210> 602	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 602	
ttgttaatgg cagggaa	16
<210> 603	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 603	
tttatgaggta ggcattg	16
<210> 604	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 604	
ccaggtgaaa cttaa	16
<210> 605	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 605	

cccttagtca gctcct	16
<210> 606	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 606	
acccttagtc agtcc	16
<210> 607	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 607	
cacccttagt cagtc	16
<210> 608	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 608	
tctcttacta ggctcc	16
<210> 609	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 609	
cctatctgtc atcatg	16
<210> 610	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 610	
tcctatctgt catcat	16
<210> 611	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 611	
gagaagtgtg agaagc	16
<210> 612	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 612	
catccttgaa gtttag	16
<210> 613	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 613	
taataagatg gctccc	16
<210> 614	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 614	
caaggcataa taagat	16
<210> 615	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 615	
ccaaggcata ataaga	16
<210> 616	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 616	
tgatccaatt ctcacc	16
<210> 617	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 617	
atgatccaat tctcac	16
<210> 618	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 618	
cgcttcatct tcaccc	16
<210> 619	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 619	
tatgacactg cattt	16
<210> 620	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 620	
gtatgacact gcatct	16
<210> 621	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 621	
tgtatgacac tgcata	16
<210> 622	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 622	
ttctttctg taagtc	16
<210> 623	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 623	
ttctacagag gaacta	16
<210> 624	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 624	
actacagtgc tacaga	16

<210> 625	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 625	
ttcccacagg taaatg	16
<210> 626	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 626	
attatttcaaatactcatt	20
<210> 627	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 627	
tgggaggaaa ttatgg	17
<210> 628	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 628	
tgactcatct taaatg	16
<210> 629	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 629	
ctgactcatc ttaaat	16
<210> 630	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 630	
tttactctga ctcatc	16
<210> 631	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 631	
tattggagga attatt	16
<210> 632	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 632	
gtattggagg aattat	16
<210> 633	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 633	
tggataactt ctctaagtat	20
<210> 634	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 634	
gatctttgg tatact	16
<210> 635	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 635	
cagacaactc tatacc	16
<210> 636	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 636	
aacatcagac aactcta	17
<210> 637	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 637	
ttaacatca gacaactc	18
<210> 638	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 638	
taacatcaga caactc	16
<210> 639	
<211> 16	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 639	
attnaacatc agacaa	16
<210> 640	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 640	
cctatttaac atcagac	17
<210> 641	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 641	
tccctattt acatca	16
<210> 642	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 642	
tcaacgacta ttggaat	17
<210> 643	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 643	
cttatattct ggctat	16

<210> 644	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 644	
atccttatat tctggc	16
<210> 645	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 645	
gatcctata ttctgg	16
<210> 646	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 646	
tgatcctat attctg	16
<210> 647	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 647	
attgaaacctt gatcct	16
<210> 648	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 648	

actgtcattg aaactt	16
<210> 649	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 649	
tcttactgtc attgaa	16
<210> 650	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 650	
aggatcttac tgtcatt	17
<210> 651	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 651	
gcaaatcaac tccatc	16
<210> 652	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 652	
gtgcaaatca actcca	16
<210> 653	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 653	
caatttattc ttgtgc	17
<210> 654	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 654	
tggcaacaat tatttctt	18
<210> 655	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 655	
gctggcaaca attatt	16
<210> 656	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 656	
atccatttct actgcc	16
<210> 657	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 657	
taatatctat tgatttcta	19
<210> 658	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 658	
tcaatagtgt agggca	16
<210> 659	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 659	
ttcaatagtg tagggc	16
<210> 660	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 660	
aggtaatattt attcaatag	19
<210> 661	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 661	
catttgtaat cccttag	16
<210> 662	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 662	
acatttgtaa tcccta	16
<210> 663	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 663	
aacatttgta atccct	16
<210> 664	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 664	
taaatttcaa gttctg	16
<210> 665	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 665	
gtttaaattt caagttct	18
<210> 666	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 666	
ccaagtttaa attcaag	18
<210> 667	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 667	

acccaagttt aaatttc

17

<210> 668
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 668

catacagtga cccaaagttt 19

<210> 669
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 669

acatccatca cagtga 16

<210> 670
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 670

agcacagctc tacatc 16

<210> 671
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 671

atatagcaca gctcta 16

<210> 672
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 672	
tccatatacg acagct	16
<210> 673	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 673	
atttccatat agcaca	16
<210> 674	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 674	
tttatttcca tatagca	17
<210> 675	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 675	
tttatttcca tatagc	16
<210> 676	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 676	
aaggagagga gattatg	17
<210> 677	
<211> 16	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 677	
agt tcttgtg ttagct	16
<210> 678	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 678	
gagttcttgt gtttagc	16
<210> 679	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 679	
attaattatac catccac	17
<210> 680	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 680	
atcaattaaat tatccatc	18
<210> 681	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 681	
agaatcaatt aattatcc	18
<210> 682	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 682	
tgagataccg tgcatg	16
<210> 683	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 683	
aatgagatac cgtgca	16
<210> 684	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 684	
ctgtggtag gctaatt	16
<210> 685	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 685	
aagagtaagg gtctgtggtt	20
<210> 686	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 686	

gatgggttaa gagtaa	16
<210> 687	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 687	
 agcagatggg ttaaga	 16
<210> 688	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 688	
 tgtaaacatt tgttagc	 16
<210> 689	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 689	
 cctgcttata aatgtc	 16
<210> 690	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 690	
 tgccctgctt ataaat	 16
<210> 691	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 691	
tcttcttagt tcaata	16
<210> 692	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 692	
tggttctaa ctacat	16
<210> 693	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 693	
agtttggtt ctaacta	17
<210> 694	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 694	
gaatgaaact tgccctg	16
<210> 695	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 695	
attatcctta catgat	16
<210> 696	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 696

gtacccaatt atcctt 16

<210> 697

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 697

tgtacccaat tatcct 16

<210> 698

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 698

ttgtacccaa ttatcc 16

<210> 699

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 699

tttgtaccca attatac 16

<210> 700

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide motif
<400> 700

agcagcagg tataatt 16

<210> 701

<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 701	
tgggaagtgg tctggg	16
<210> 702	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 702	
ctggagatgt ataata	16
<210> 703	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 703	
aatgctggat tacgtc	16
<210> 704	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 704	
caatgctgga ttacgt	16
<210> 705	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 705	
tttgttcagaa gtatcc	16

<210> 706	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 706	
gatgatttgc ttggag	16
<210> 707	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 707	
gaaatcattc acaacc	16
<210> 708	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 708	
ttgttaacatc tactac	16
<210> 709	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 709	
cattaaggcag caagt	16
<210> 710	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	

<400> 710	
ttactagatg tgagca	16
<210> 711	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 711	
tttactagat gtgagc	16
<210> 712	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 712	
gaccaaggcac cttaaca	16
<210> 713	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 713	
agaccaaggca ccttac	16
<210> 714	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 714	
atgggttaaa taaaagg	16
<210> 715	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 715	
tcaaccagag tattaa	16
<210> 716	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 716	
gtcaaccaga gtatta	16
<210> 717	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 717	
attgtaaagg tgatat	16
<210> 718	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 718	
cacataattg taaagg	16
<210> 719	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 719	
gagggtctgctt attaac	16
<210> 720	
<211> 16	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 720	
tgtagattca atgcct	16
<210> 721	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 721	
cctcattata ctatga	16
<210> 722	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 722	
ccttatgcta tgacac	16
<210> 723	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 723	
tccttatgct atgaca	16
<210> 724	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 724	
aagatgttta agtata	16

<210> 725	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 725	
ctgattatta agatgt	16
<210> 726	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 726	
tggaaaggta tgaatt	16
<210> 727	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 727	
acttgaatgg ctgg	16
<210> 728	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 728	
aacttgaatg gcttgg	16
<210> 729	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 729	

caatgtgtta ctattt	16
<210> 730	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 730	
acaatgtgtt actattt	16
<210> 731	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 731	
catctgctat ataaga	16
<210> 732	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 732	
cctagagcaa atacttt	16
<210> 733	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 733	
cagagttaat aataagg	16
<210> 734	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 734	
gttcaagcac aacgaa	16
<210> 735	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 735	
agggttcaag cacaac	16
<210> 736	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 736	
tgttgagac actgtt	16
<210> 737	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 737	
aaggaggagt taggac	16
<210> 738	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 738	
ctatgccatt tacgat	16
<210> 739	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 739	
tcaaatgcag aattag	16
<210> 740	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 740	
agtgacaatc aaatgc	16
<210> 741	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 741	
aagtgacaat caaatg	16
<210> 742	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 742	
gtgtaccaag taacaa	16
<210> 743	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 743	
tgggatgtta aactga	16
<210> 744	

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 744

agttagtacatt ttctgc

16

<210> 745

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 745

tatgtgaaga ggagag

16

<210> 746

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 746

caccttaaaa acccca

16

<210> 747

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 747

tcctttataa tcacac

16

<210> 748

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 748

acggatattt cacagg

16

<210> 749

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 749

gacactaca tgagga

16

<210> 750

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 750

tggtttttag gactgt

16

<210> 751

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 751

cgacaaattc tatcct

16

<210> 752

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif

<400> 752

tgatatacaa tgctac

16

<210> 753

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 753	
tcgttggta aattta	16
<210> 754	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 754	
tgctttataa atggta	16
<210> 755	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 755	
caagtttaca tttctgc	18
<210> 756	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 756	
catatgtgaa gaggagag	18
<210> 757	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 757	
caccttaaaa acccca	16
<210> 758	
<211> 18	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 758	
catcccttat aatcacac	18
<210> 759	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 759	
caacggattt ttcacagg	18
<210> 760	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 760	
cagacactac aatgagga	18
<210> 761	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 761	
catgtttt aggactgt	18
<210> 762	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 762	
cacgacaat tctatcct	18
<210> 763	

<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 763	
catgatatac aatgctac	18
<210> 764	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 764	
catcggttggg taaattta	18
<210> 765	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 765	
catgcgttat aaatggtg	18
<210> 766	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 766	
caacaataa tggttactct	20
<210> 767	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 767	

cacagattga tggtagtt	18
<210> 768	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 768	
 cactattta acatcagac	19
<210> 769	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 769	
 cactaatgt agtagtactc	20
 <210> 770	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 770	
 caataaacat gaatctctcc	20
<210> 771	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide motif	
<400> 771	
 tgatttaatt ctatgtca	17
<210> 772	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> Target sequence	

<400> 772

gcagtagagc caattt

16

<210> 773

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HBV epitope

<400> 773

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val

1 5 10

<210> 774

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HBV epitope

<400> 774

Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp

1 5 10 15

<210> 775

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HBV epitope

<400> 775

Thr Thr Phe His Gln Thr Leu Gln Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu

1 5 10 15

<210> 776

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HBV epitope

<400> 776

Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser

1 5 10 15

<210> 777

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HBV epitope

<400> 777

Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile

1 5

<210> 778

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HBV epitope

<400> 778

Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln

1 5 10 15

<210> 779

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HBV epitope

<400> 779

Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu

1 5

<210> 780

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HBV epitope

<400> 780

Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val

1 5

<210>

> 781

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HBV epitope

<400> 781

Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr

1 5 10 15

Val Trp Leu Ser Val

20

<210> 782

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> HBV epitope

<400> 782

Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val

1 5 10

<210> 783

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

><223> HBV epitope

<400> 783

Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu

1 5 10

<210> 784

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 784

ctgtgccttg ggtggcttt 19

<210> 785

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 785

aaggaaagaa gtcagaaggc aaaa 24

<210> 786

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 786

ttcttataa gggtcgatgt ccatg 25