

ÖZET
PATOLOJİLERİN TEDAVİSİNE YÖNELİK ANTİSENS MOLEKÜLLER VE
YÖNTEMLER

- 5 SEQ ID NO: 1 ila 59'da belirtildiği gibi, distrofin geninde ekzon atlama işlemini indüklemek üzere seçilmiş bir hedef bölgeye bağlanabilen bir antisens molekülüdür.

İSTEMLER

1. Bir insan distrofin pre-mRNA'sında ekzon 45 atlamasını indükleyen bir antisens oligonükleotid olup, özelliği antisens oligonükleotidin aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilmesidir:
 - i) CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 22 baz bir antisens oligonükleotid;
 - ii) CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 22 baz bir antisens oligonükleotid;
 - iii) GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 25 baz bir antisens oligonükleotid;
 - iv) GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 25 baz bir antisens oligonükleotid;
 - v) GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 28 baz bir antisens oligonükleotid;
 - vi) GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 28 baz bir antisens oligonükleotid;
 - vii) GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 31 baz bir antisens oligonükleotid; ve
 - viii) GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 31 baz bir antisens oligonükleotid.
2. İstem 1'e göre antisens oligonükleotidi olup, özelliği antisens oligonükleotidin, CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 22 baz olmasıdır.
3. İstem 1'e göre antisens oligonükleotidi olup, özelliği antisens oligonükleotidin, CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 22 baz olmasıdır.

4. İstem 1'e göre antisens oligonükleotidi olup, özelliği antisens oligonükleotidin, GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 25 baz olmasıdır.
- 5
5. İstem 1'e göre antisens oligonükleotidi olup, özelliği antisens oligonükleotidin, GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 25 baz olmasıdır.
- 10
6. İstem 1'e göre antisens oligonükleotidi olup, özelliği antisens oligonükleotidin, GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G'yi veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 28 baz olmasıdır.
- 15
7. İstem 1'e göre antisens oligonükleotidi olup, özelliği antisens oligonükleotidin, GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 28 baz olmasıdır.
- 20
8. İstem 1'e göre antisens oligonükleotidi olup, özelliği antisens oligonükleotidin, GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 31 baz olmasıdır.
- 25
9. İstem 1'e göre antisens oligonükleotidi olup, özelliği antisens oligonükleotidin, GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 31 baz olmasıdır.
- 30
10. İstemler 1 - 9'dan herhangi birine göre antisens oligonükleotid veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği bir 5-metilsitozin bazı içermesidir.
- 35
11. İstemler 1 ila 10'dan herhangi birine göre antisens oligonükleotid veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği oligonükleotidin RNaz H'yi aktive etmemesidir.

12. İstemler 1 ila 9'dan herhangi birine göre antisens oligonükleotid veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği omurganın inter nükleosit bağlantılarının, doğal olmayan inter nükleosit bağları ile yer değiştirilmesidir.
- 5
13. İstemler 1 - 9'dan herhangi birine göre antisens oligonükleotidi veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği nükleositler arası bağlantıların modifiye fosfatlar olmasıdır.
- 10
14. İstem 13'e göre antisens oligonükleotidi veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği modifiye edilmiş fosfatın, metil fosfonatlar, metil fosforotioatlar, fosforomorfolidatlar, fosforopiperazidatlar ve fosforoamirdatlardan seçilmesidir.
- 15
15. İstemler 1 - 9'dan herhangi birine göre antisens oligonükleotid veya farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği oligonükleotidin bir peptit nükleik asit olmasıdır.
- 20
16. İstemler 1 ila 9'dan herhangi birine göre antisens oligonükleotid veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği oligonükleotidin, antisens oligonükleotidin aktivitesini, hücresele dağılımını veya hücresele tutulumunu arttıran bir veya daha fazla kısma veya konjugeye kimyasal olarak bağlı olmasıdır.
- 25
17. İstemler 1 - 16'dan herhangi birine göre bir antisens oligonükleotid veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcıyı içeren bir bileşimdir.
- 30
18. İstemler 1 - 16'dan herhangi birine göre bir antisens oligonükleotid veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu veya istem 17'ye göre bir bileşim olup, özelliği kas distrofininin tedavisi için bir yöntemde kullanım için olmasıdır.
- 35
19. İstemler 1 ila 16'dan herhangi birine göre bir antisens oligonükleotid veya farmasötik olarak kabul edilebilir tuzunun veya istem 17'ye göre bir bileşimin kas distrofininin modülasyonuna yönelik bir ilacın üretimi için kullanılmasıdır.

20. İstem 19'a göre kullanım veya İstem 18'e göre kullanım için bileşim veya antisens oligonükleotid veya farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği musküler distrofinin Duchenne musküler distrofisi olmasıdır.

TARİFNAME

PATOLOJİLERİN TEDAVİSİNE YÖNELİK ANTİSENS MOLEKÜLLER VE YÖNTEMLER

5 **Buluşun Sahası**

Mevcut buluş, ekzon atlamalarını kolaylaştırmak için uygun yeni antisens bileşikler ve bileşimler ile ilgilidir. Ayrıca, buluşun yöntemlerinde kullanılmak üzere adapte edilmiş terapötik bileşimler sağlar.

10

Tekniğin Alt Yapısı

Arka plan teknikle ilgili aşağıdaki tartışma, sadece mevcut buluşun anlaşılmasını kolaylaştırmayı amaçlamaktadır. Bu tartışma, referans gösterilen materyalin herhangi birinin başvurunun öncelik tarihindeki ortak genel bilgilerin bir parçası olduğu veya olacağı hakkında bir onay veya kabul değildir. Halihazırda, genlerde hastalığa neden olan mutasyonları baskılayıcı veya telafi edici yöntemlerin araştırılması için ciddi düzeyde çalışmalar yapılmaktadır. Gen ekspresyonunu çeşitli farklı düzeylerde (transkripsiyon, uçbirleştirme, stabilite, translasyon) etkilemek için çeşitli kimyasallar kullanılarak antisens teknolojileri geliştirilmektedir. Bu araştırmaların büyük bir kısmı, çok farklı koşullarda anormal veya hastalık ile ilişkili genleri düzeltmek veya telafi etmek için antisens bileşiklerin kullanılması üzerine yoğunlaşmıştır.

Antisens molekülleri üstün bir özgüllükle gen ekspresyonunu inhibe etme özelliğine sahiptir ve bundan ötürü, oligonükleotidler gen ekspresyonu modülatörleri olarak tasarlayan birçok araştırma, onkogenler veya viral genler gibi hedeflenen genlerin ekspresyonunun inhibe edilmesine yoğunlaşmıştır. Antisens oligonükleotidler, ya RNA'ya (sens sarmal) veya DNA'ya yönlendirilir ve burada RNA polimeraz II ile transkripsiyonu inhibe eden üçlü yapılar oluşturur.

30

Spesifik gen aşağı-regülasyonunda istenen etkiyi elde etmek için, oligonükleotidler ya hedeflenen mRNA'nın bozunmasını kolaylaştırarak veya bu mRNA'nın translasyonunun bloke ederek istenmeyen hedef proteinin yeniden sentezini etkili bir şekilde önler.

35

Amaç natif proteini yukarı regüle etmek veya sens olmayan veya çerçeve kaydırıcı mutasyonlar gibi translasyonun erken sonlanmasına neden olan mutasyonları telafi etmek olduğunda bu teknikler kullanışlı değildir.

- 5 Ayrıca, içerisindeki mutasyonlar nedeniyle normalde işlevsel bir proteinin erken sonlandığı durumlarda, antisens teknolojisi vasıtasıyla belli ölçüde işlevsel protein üretimini eski haline getirme mekanizmasının, uçbirleştirme süreçleri esnasında müdahale yoluyla mümkün olabildiği ispat edilmiştir (Sierakowska H, et al., (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93,12840-12844; Wilton SD, et al., (1999) Neuromusc Disorders
- 10 9,330-338; van Deutekom JC et al., (2001) Human Mol Genet 10, 1547-1554). Bu durumlarda, bozuk gen transkripti, hedefe yönelik bozunmaya maruz bırakılmamalı, böylece antisens oligonükleotid kimyası hedef mRNA bozunmasını kolaylaştırmamalıdır.
- 15 Çeşitli genetik hastalıklarda, mutasyonların bir genin olası ekspresyonu üzerindeki etkileri, uçbirleştirme sürecinde hedefe yönelik ekzon atlama prosesi vasıtasıyla modüle edilebilir. Uçbirleştirme prosesi, pre-mRNA içerisindeki komşu ekzon-intron birleşmelerini yakınlaştıran ve intronların uç taraflarındaki fosfodiester bağlarının ayrılmasını gerçekleştirerek bunları birbirine birleştirilecek ekzonlar arasında sonradan
- 20 reforme eden çok parçalıklı kompleks bir mekanizma ile yönlendirilir. Bu kompleks ve ileri düzeyde hassas prosese, pre-mRNA içerisindeki, daha sonradan uçbirleştirme reaksiyonlarına dahil olan çeşitli nükleer uçbirleştirme faktörlerinin bağlandığı nispeten kısa yarı-korunumlu RNA segmentleri olan dizi motifleri aracılık eder. Uçbirleştirme mekanizmasının pre-mRNA işleme sürecine katılan motifleri okuma veya tanıma şeklini
- 25 değiştirerek, farklı şekilde eklenmiş mRNA moleküllerinin oluşturulması mümkündür. Her ne kadar uygulanan mekanizma henüz tanımlanmamış olsa da, insan genlerinin büyük çoğunluğunun, normal gen ekspresyonu esnasında alternatif olarak eklendiği artık anlaşılmıştır. Antisens oligonükleotidleri kullanılarak, kodlanmış bir mRNA içerisindeki hataların ve eksikliklerin, bypas edilebileceği veya olgun gen
- 30 transkriptlerinden uzaklaştırılabileceği ispat edilmiştir.

Doğada, genellikle çok düşük seviyelerde olmak üzere çok sayıda olay dokümanite edilmiş olsa da (Sherrat TG, et al., (1993) Am J Hum Genet 53, 1007-1015), uçbirleştirme sürecinde genetik delesyonun veya ekzon atlamasının kapsamı tam olarak

35 bilinmemektedir. Ancak, hastalığa neden olan mutasyonlar ile ilişkili ekzonların spesifik

olarak bazı genlerden silinebilmesi durumunda, natif protein ile benzer biyolojik özelliklere sahip olan veya hedef ekzon ile ilişkili mutasyonların neden olduğu hastalığı düzeltmek için yeterli biyolojik etkinliğe sahip bir kısaltılmış protein ürününün bazen elde edilebileceği anlaşılmıştır (Lu QL, et al., (2003) Nature Medicine 9,1009-1014; 5 Aartsma-Rus A et al., (2004) Am J Hum Genet 74: 83-92).

Bu hedefe yönelik ekzon atlaması süreci bilhassa, birçok ekzonun ve intronun olduğu, ekzonların genetik yapısında fazlalık olduğu veya bir proteinin bir veya daha fazla spesifik ekzon olmadan işlev gösterebildiği (örneğin 79 ekzondan oluşan distrofin geni; 10 veya muhtemelen tekrarlı dizi bloklarını şifreleyen bazı kolajen genleri veya sırasıyla - 80 ve 370'den fazla ekzondan meydana gelen büyük nebulin veya titin genleri ile) uzun genlerde muhtemel faydaya sahiptir.

Çeşitli genlerdeki mutasyonların neden olduğu kesilmeler ile ilişkili genetik hastalıkların 15 tedavisi için genin işlenmesini yeniden yönlendirmeye yönelik çalışmalar ya (1) uç-birleştirme sürecinde yer alan elemanlar ile tamamen veya kısmi olarak çakışan; veya (2) o elemanda meydana gelen spesifik uç-birleştirme reaksiyonuna normalde aracılık edecek olan uç-birleştirme faktörlerinin bağlanmasını ve fonksiyonunu bozmaya yeterli yakınlıkta olan bir pozisyonda pre-mRNA'ya bağlanan (örneğin bloke edilecek 20 elemanın 3, 6 veya 9 nükleotidi içerisindeki bir pozisyonda pre-mRNA'ya bağlanan) antisens oligonükleotidlerinin kullanılmasına yoğunlaşmıştır.

Örneğin, antisens oligoribonükleotitler ile mutant distrofin pre-MRNA atlamasının modüle edilmesi hem in vitro hem in vivo olarak bildirilmiştir. Japonya'da bildirilen 25 distrofin mutasyonunun bir türünde, uç-birleştirme sürecinde 52-baz çifti delesyonunun mutasyona uğraması, ekzon 19'un, uca eklenen intronlar ile uzaklaştırılmasına neden olmaktadır(Matsuo et al., (1991) J Clin Invest. 87:2127-2131). Bir in vitro minigen uç-birleştirme sistemi kullanılarak, distrofin Kobe ekzon 19'unda silinmiş dizinin 5' yarısını tamamlayan bir 31-mer 2'O-metil oligoribonükleotidin, doğal sıç pre-mRNA'yı inhibe 30 ettiği ispatlanmıştır (Takeshima et al. (1995), J. Clin. Invest., 95, 515-520). Aynı oligonükleotid kullanılarak, kültürlenmiş insan lenfoblastoid hücrelerinde natif distrofin gen transkriptinden ekzon atlaması indüklendi.

Dunckley et al., (1997) Nucleosides & Nucleotides, 16, 1665-1668 müsküler distrofi için 35 bir model olan mdx faresinde, mutasyona uğramış distrofinin ekzon 23'ü etrafındaki uç-

birleştirme sürecinin analizine yönelik *in vitro* yapılar tarif etmiştir. Fare distrofin ekzon 23'ü içerisinde ve buna komşu bölgeleri uç uca birleştirmeye hedeflenmiş 2' modifiye oligonükleotidler kullanılarak bu yapıları *in vitro* olarak analiz etme planları değerlendirildi, ancak herhangi bir hedef bölge veya dizi verilmedi.

5

2'-O-metil oligoribonükleotidlerin sonradan, bu gruptan olan mdx farelerine ait miyoblastlardaki distrofin eksikliğini düzelttiği bildirildi. Murin distrofin intron 22'sine ait 3' uç-birleştirme bölgesine hedeflenmiş olan bir antisens oligonükleotidin; mutant ekzonun ve bunun yanı sıra çeşitli uca eklenen ekzonların atlamasına neden olduğu ve yeni bir içsel silmeyle yeni bir çerçeve içi distrofin transkripti oluşturduğu bildirildi. Mutasyona uğramış bu distrofin, antisens ile işlenmiş mdx miyotüplerin %1-2'si içerisinde eksprese edildi. 2'-O-metoksietil fosfodiesterler gibi diğer oligonükleotid modifikasyonlarının kullanılması tarif edilmektedir (Dunckley et al. (1998) Human Mol. Genetics, 5, 1083-90).

15

Bu nedenle, antisens molekülleri, Duchenne Kas Distrofisi (DMD) gibi genetik hastalıkların tedavisinde bir araç sağlayabilir. Ancak, antisens moleküller kullanılarak ekzon atlama indüklemeye yönelik girişimlerde karma bir başarı elde edilmiştir.

20 Distrofin ekzon 19'u üzerine yapılan çalışmalarda, bu ekzonun distrofin pre-mRNA'sından başarılı bir şekilde atlatılması, Errington et al. (2003) J Gen Med 5, 518-527 tarafından tarif edildiği üzere ekzon tanımına giren ekzon bünyesindeki uç-birleşme bölgelerine veya motiflerine yönlendirilmiş çeşitli antisens moleküller kullanılarak elde edilmiştir.

25

Ekzon 19 atlamasının görünürdeki kolaylığının aksine, ilk kez Dunckley et al., (1998) tarafından bildirilmiş olan mdx faresinde ekzon 23 atlamasının günümüzde, gerçek bir antisens etkinlikten ziyade sadece doğal olarak meydana gelen bir ters evrimli transkripti veya artefaktı bildirdiği kabul edilmektedir. Ekzon 23'ten yoksun transkriptlerin istikrarlı bir şekilde üretilmemesinin yanı sıra, Dunckley et al., (1998), ekzon atlama seviyelerinin artan veya azalan miktarlarda antisens oligonükleotidine karşılık geldiği doza bağımlı etkileri göstermek için, herhangi bir indüklenmiş ekzon atlama veya hatta antisens oligonükleotidleri titrasyonu süreci ortaya koymamıştır. Ayrıca bu çalışma diğer araştırmacılar tarafından tekrarlanamamıştır.

35

Mdx fare modelinde spesifik ve çoğaltılabilir ekzon atlamasının ilk örneği Wilton et al., (1999) Neuromuscular Disorders 9, 330-338 tarafından bildirilmiştir. Bir antisens molekülünü donör uç-birleştirme bölgesine yönlendirerek ve kültürlenmiş hücrelerde yapılan 6 saatlik uygulamada distrofin mRNA'sında etkin ekzon 23 atlaması indüklendi.

5 Wilton et al., (1999) ayrıca, daha uzun antisens oligonükleotidlerle fare distrofin pre-mRNA'sına ait alıcı bölgesinin hedeflenmesini tarif etmiş ve Dunckley et al., (1998) tarafından elde edilen yayınlanmış sonuçların tekrar edilemediğini bildirmiştir. İntron 22'nin alıcı uç-birleşme bölgesine yönlendirilmiş bir dizi antisens oligonükleotidler kullanılarak, ya tek başına 23 veya eklenen çeşitli ekzonların çoklu giderimi şeklinde

10 herhangi bir ekzon atlaması, tekrar edilebilir bir şekilde saptanamamıştır.

İntron 23 donör uç-birleşme bölgesine yönlendirilmiş ilk antisens oligonükleotid, kültürlenmiş primer miyoblastlarda istikrarlı ekzon atlaması indüklerken, bu bileşiğin, daha yüksek düzeylerde distrofin eksprese eden immortalize hücre kültürlerinde çok

15 daha az etkili olduğu görülmüştür. Ancak, hedefleme ve antisens oligonükleotid tasarımının iyileştirilmesiyle birlikte, spesifik ekzon uzaklaştırma işleminin etkinliği, hemen hemen bir basamak kadar artmıştır (bakınız, Mann CJ et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654).

20 W02010/048586, ekzon atlamalarını inhibe etmek için bir insan distrofin genindeki seçilmiş bir hedef bölgeye bağlanabilen antisens molekülleri sağlamıştır.

Bu nedenle, bir hedef nükleotid dizisini bağlayabilme ve uç-birleşmesini modifiye edebilme özelliğine sahip antisens oligonükleotidler sağlanmasına halen ihtiyaç vardır.

25 Antisens oligonükleotidlerin, uç-birleştirme için kritik olduğu kabul edilen motiflere yönlendirilmesi tek başına, bu bileşiğin bir terapötik uygulaması içerisindeki etkinliğini garanti etmez.

Buluşun arka planının daha önceki tartışmasında sadece mevcut buluşun anlaşılmasını

30 kolaylaştırmak amaçlanmıştır. Tartışmanın, referans verilen materyalin herhangi birinin başvurunun öncelik tarihindeki ortak genel bilgilerin bir parçası olduğunun onaylanmadığı veya kabul etmediği takdir edilmelidir.

Buluşun Kısa Açıklaması

Mevcut buluş, spesifik ve etkili ekzon atlamalarını indükleyebilen pre-mRNA'nın birleştirilmesinde rol oynayan RNA motiflerine bağlanmak üzere uygun antisens molekülü bileşikleri ve bileşimleri ve bunların kullanımı için bir yöntem sağlar.

- 5 Hedefin tercihe göre seçilmesi, ekzon atlamasının etkinliğinde ve böylelikle bunun potansiyel bir terapiye sonradan uygulanmasında hayati bir rol oynar. Uç-birleştirme sürecinde rol oynadığı kabul edilen pre-mRNA'nın bölgelerini hedefleyecek antisens moleküllerinin tasarlanması, etkili ve spesifik ekzon atlaması indüklemeyi tek başına garanti edemez. Uç-birleştirme sürecine müdahale için en belirgin veya kolaylıkla
- 10 tanımlanan hedefler; ekzonik pekiştireçler, susturma elemanları ve dallanma noktaları dahil daha az tanımlanmış veya korunumlu motifler olsa da donör ve alıcı uç-birleşme bölgeleridir. Alıcı ve donör birleşme noktaları sırasıyla yaklaşık 16 ve 8 konsensüs dizisine sahiptir (ekzon tanıma, intron uzaklaştırma ve uç birleştirme sürecine katılan motiflerin ve sahaların şematik gösterimi için bakınız, Şekil 1).

15

Bir birinci yönüyle, buluş bir insan distrofin pre-mRNA'sında ekzon 45 atlamasını indükleyen bir antisens oligonükleotid sağlar, burada antisens oligonükleotid aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir:

- 20 i) CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 22 baz bir antisens oligonükleotid;
- ii) CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 22 baz bir antisens oligonükleotid;
- 25 iii) GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 25 baz bir antisens oligonükleotid;
- iv) GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 25 baz bir antisens oligonükleotid;
- 30 v) GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 28 baz bir antisens oligonükleotid;
- vi) GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 28 baz bir antisens oligonükleotid;

- vii) GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 31 baz bir antisens oligonükleotid; ve
- viii) GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-sübstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 31 baz bir antisens oligonükleotid.

Distrofin gen transkripsiyonunda, ekzonlar 5, 12, 17, 21, 22, 24, 43-47, 49, 50, 54-64, 66, 67, 70 ve 72'de ekzon atlamayı indüklemek için antisens molekülleri Tablo 1A'da listelenen gruptan seçilebilir.

Ekzonlar 3, 4, 8, 10, 26, 36, 48, 60, 66 ve 68'de daha etkili ekzon atlamayı indüklemek için iki veya daha fazla antisens oligonükleotidini kombine etmek mümkündür. Antisens oligonükleotidlerin bir kombinasyonu veya "kokteyl"i, etkili ekzon atlamayı indüklemek için ekzonlarda yönlendirilir.

Bir ikinci yönüyle, mevcut buluş, mevcut buluşa göre bir antisens oligonükleotid veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcıyı içeren bir bileşim sağlar.

Üçüncü bir yönüyle, buluş bir tedavi yöntemi veya kas distrofisinde kullanım için mevcut buluşa göre bir antisens oligonükleotid veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu veya mevcut buluşa göre bir bileşim sağlar.

Buluş aynı zamanda buluşa ait bir antisens oligonükleotidin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzunun veya mevcut buluşa ait bir bileşimin, kas distrofisinin modülasyonuna yönelik bir ilacın üretimi için kullanımını da ele almaktadır.

Musküler distrofi Duchenne kas distrofisi olabilir.

Buluş ayrıca, Duchenne kas distrofisi ile karakterize edilen bir durumun tedavi edilmesine yönelik bir yöntem sağlar, bu yöntem, tedaviye ihtiyacı olan bir hastaya, mevcut buluşun özel genetik lezyonu ile ilgili olarak, buluşun bir antisens oligonükleotidin etkili bir miktarının uygulanmasını içerir. Ayrıca, buluş, bir hastanın Duchenne kas distrofisini önlemek veya en azından en aza indirmek için

profilaktik olarak tedavi edilmesi için bir yöntem sağlar, bu yöntem, aşağıdaki adımları içerir: hastaya, mevcut buluşa ait bir antisens oligonükleotidin etkili bir miktarının veya bu biyolojik moleküllerin bir veya daha fazlasını içeren bir farmasötik bileşenin uygulanması.

5

Buluşun diğer özellikleri ve avantajları, aşağıdaki şekillere dayalı olarak ilerleyen tarifnamenin değerlendirilmesi açısından teknikte uzman kişilerce kolaylıkla anlaşılabilir.

10 Şekillerin Kısa Açıklaması

Şekil 1, ekzon tanıma, intron uzaklaştırma ve uç birleştirme prosesine katılan motiflerin ve sahaların şematik gösterimidir.

15 Şekil 2, hastalığa neden olan mutasyonların bypas edilmesi için antisens oligonükleotid tarafından indüklenen ekzon atlaması kavramının diyagramatik gösterimidir (ölçekli çizilmemiştir). Taralı kutu, mRNA'nın geri kalanının bir proteine translasyonunu önleyen bir mutasyon taşıyıcı ekzonu temsil etmektedir. Kalın siyah çizgi, bu ekzonun olgun mRNA'ya dahil olmasını önleyen bir antisens oligonükleotidi temsil etmektedir.

20

Şekil 3. Kültürlenmiş normal insan kas hücrelerinde 10 nanomolar bir transfeksiyon konsantrasyonunda güçlü ve tutarlı ekzon atlamasını indükleyen ekzon 3'e yönelen antisens moleküllerin bir "kokteyl"ini gösteren jel elektroforezi.

25 Şekil 4. Kültürlenmiş normal insan kas hücrelerinde 25 nanomolar bir transfeksiyon konsantrasyonunda güçlü ve tutarlı ekzon atlama indükleyen ekzon 4'e yönelen antisens moleküllerin bir "kokteyl"ini gösteren jel elektroforezi.

30 Şekil 5. Ekzon 5 dahili sahasına yönelik bir antisens molekülü [H5A(+35+65)] kullanılarak güçlü ve etkili insan ekzon 5 atlamasını gösteren jel elektroforezi, muhtemelen bir ekzon birleştirme güçlendiricisi. Bu tercih edilen bileşik, kültürlenmiş insan kas hücrelerinde 25 nanomolarlık bir transfeksiyon konsantrasyonunda tutarlı ekzon atlamalarını indükler.

Şekil 6. Kültürlenmiş normal insan kas hücrelerinde 10 nanomolar bir transfeksiyon konsantrasyonunda hem ekzon 8'in ve hem de ekzon 8/9'un güçlü ve tutarlı ekzon atlamalarını indükleyen ekzon 8'e yönelen antisens molekülünün bir "kokteyl"ini gösteren jel elektroforezi.

5

Şekil 7. Ekzon 10 ve çevresindeki ekzonların atlamasını indükleyen çeşitli kokteyller ve tekli antisens molekülü gösteren jel elektroforezi. Bir [H10A(-05+16)] ve [H10A(+98+119)] veya [H10A(-05+16)] ve [H10A(+130+149)] kombinasyonu, ekzon 10 ve ekzonlar 9-12 atlamasını indükler, [H10A(-05+16)] tek başına ekzon 9-14 atlamasını indükler.

10

Şekil 8. Ekzon 14'e yönelen antisens molekülü H14A(+31+61) kullanılarak ekzon 14 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

15

Şekil 9. Ekzon 17'ye yönelen antisens molekül H17A(+10+35) kullanılarak ekzon 17 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

20

Şekil 10. Ekzon 26'ya yönelen iki antisens molekülü kokteylini gösteren jel elektroforezi. [H26A(-07+19)] ve [H26A(+24+50)]'nin çift kokteyli ekzon 26'nın iyi atlamasını indükler ve kokteyle bir başka antisens molekülünün eklenmesi atlama etkinliğini etkilemez.

25

Şekil 11. Kültürlenmiş normal insan kas hücrelerinde 25 nanomolar transfeksiyon konsantrasyonunda güçlü ve tutarlı ekzon atlamalarını indükleyen ekzon 36'ya yönelen antisens molekülünün "kokteyl"ini gösteren jel elektroforezi.

30

Şekil 12. Antisens molekülü H43A(+92+117) kullanılarak kültürlenmiş normal insan kas hücrelerinde 25 nanomolara güçlü ve tutarlı ekzon 43 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

35

Şekil 13. Antisens molekülü H44A(+65+90) kullanılarak doz bağımlı ekzon 55 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

35

Şekil 14. H45A(-09+25) antisens molekülü kullanılarak güçlü ve tutarlı ekzon 45 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

Şekil 15. Antisens molekülü H46A(+81+109) kullanılarak güçlü ve tutarlı ekzon 46 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

5 Şekil 16. H47A(+01+29) antisens molekülü kullanılarak güçlü ve tutarlı ekzon 47 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

Şekil 17. Ekzon 47'ye yönelen güçlü ve tutarlı ekzon atlamayı indükleyen antisens moleküllerin "kokteyl"ini gösteren jel elektroforezi.

10 Şekil 18. Antisens molekül H49A(+45+70) kullanılarak güçlü ve tutarlı ekzon 49 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

Şekil 19. Antisens molekül H50A(+48+74) kullanılarak güçlü ve tutarlı ekzon 50 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

15 Şekil 20. Antisens molekülü H51A(+66+95) kullanılarak güçlü ve tutarlı ekzon 51 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

20 Şekil 21. Antisens molekül H54A(+67+97) kullanılarak güçlü ve tutarlı ekzon 54 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

Şekil 22. Antisens molekülü H55A(-10+20) indüklü doz bağımlı ekzon 55 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

25 Şekil 23. Antisens molekül H56A(+92+121) kullanılarak güçlü ve tutarlı ekzon 56 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

Şekil 24. Antisens molekülü H57A(-10+20) indüklü doz bağımlı ekzon 57 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

30 Şekil 25. Ekzon 59'a yönelen antisens molekül H59A(+96+120) kullanılarak ekzon 59 ve ekzon 58/59 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

35 Şekil 26. Ekzon 60 ekzon atlamasını indükleyen iki farklı kokteyli gösteren jel elektroforezi.

Şekil 27. Antisens molekül H63A(+20+49) kullanılarak ekzon 63 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

5 Şekil 28. Antisens molekül H64A(+34+62) kullanılarak ekzon 64 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

Şekil 29. Doz bağımlı ekzon atlamasını indükleyen ekzon 66'ya yönelen antisens moleküllerin "kokteyl"ini gösteren jel elektroforezi.

10 Şekil 30. Antisens molekül H67A(+17+47) kullanılarak ekzon 67 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

Şekil 31. Doz bağımlı ekzon atlamalarını indükleyen ekzon 68'e yönelen antisens moleküllerin "kokteyl"ini gösteren jel elektroforezi.

15

Şekil 32. 25 nanomolar transfeksiyon konsantrasyonunda 69/70 ekzonlarının güçlü ve tutarlı ekzon atlamasını indükleyen antisens moleküllerin "kokteyl"ini gösteren jel elektroforezi.

20 Şekil 33. Ekzon 50'de çeşitli atlama seviyelerini indükleyen antisens moleküllerinin çeşitli "kokteyller"ini gösteren jel elektroforezi.

Şekil 34. 50/51 ekzonlarının etkili atlamasını indükleyen üç antisens molekülün bir kokteylini gösteren jel elektroforezi..

25

Şekil 35. Ekzon atlamalarının çeşitli etkinliklerini gösteren densitometri sonuçlarının grafiği. Test edilen antisens molekülleri Ekzon 3 [H3A(+30+60) & H3A(+61+85)]; Ekzon 4 [H4D(+14-11) & H4A(+11+40)]; Ekzon 14 [H14A(+32+61)]; Ekzon 17 [H17A(+10+35)]; Ekzon 26 [H26A(-07+19), H26A(+24+50) & H26A(+68+92)]; Ekzon 36 [H36A(-16+09) ve H36A(+22+51)] idi.

30

Şekil 36. Ekzon atlamalarının çeşitli etkinliklerini gösteren densitometri sonuçlarının grafiği. Test edilen antisens molekülleri Ekzon 46 [H46A(+81+109)]; Ekzon 47 [H47A(+01+29)]; Ekzon 48 [H48A(+01+28) & H48A(+40+67)]; Ekzon 49 [H49A(+45+70)] idi.

35

Şekil 37. Antisens molekül H11A(+50+79) kullanılarak ekzon 11 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

5 Şekil 38. Antisens molekül H12A(+30+57) kullanılarak ekzon 12 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

Şekil 39. Antisens molekül H44A(+59+85) kullanılarak ekzon 44 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

10 Şekil 40. Antisens molekül H45A(-03+25) kullanılarak ekzon 45 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

Şekil 41. Antisens molekül H51A(+71+100) kullanılarak ekzon 51 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

15 Şekil 42. Antisens molekül H52A(+09+38) kullanılarak ekzon 52 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

20 Şekil 43. Antisens molekül H53A(+33+65) kullanılarak ekzon 53 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

Şekil 44. Antisens molekül H46A(+93+122) kullanılarak ekzon 46 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

25 Şekil 45. Antisens molekül H73A(+02+26) kullanılarak ekzon 73 atlamasını gösteren jel elektroforezi.

Şekil 46. Antisens moleküllerin dizileri.

30 **Detaylı Açıklama**

DİZİ LİSTELERİNİN KISA AÇIKLAMASI

Tablo 1A: Tekli antisens moleküller

SEQ ID	Ekzon	Dizi
--------	-------	------

Ekzon 5

1 H5A(+35+65) AAA CCA AGA GUC AGU UUA UGA UUU CCA UCU A

Ekzon 11

52 H11A(+50+79) CUG UUC CAA UCA GCU UAC UUC CCA AUU GUA

Ekzon 12

2 H12A(+52+75) UCU UCU GUU UUU GUU AGC CAG UCA

53 H12A(+30+57) CAG UCA UUC AAC UCU UUC AGU UUC UGA U

Ekzon 17

3 H17A(-07+23) GUG GUG GUG ACA GCC UGU GAA AUC UGU GAG

4 H17A(+61+86) UGU UCC CUU GUG GUC ACC GUA GUU AC

Ekzon 21

5 H21A(+86+114) CAC AAA GUC AUC CAG GAA CAU GGG UC

6 H21A(+90+119) AAG GCC AAG UCU GCA UCC AGG AAC AUG

Ekzon 22

7 H22A(+125+146) CUG CAA UUC CCC GAG UCU CUG C

Ekzon 24

8 H24A(+51+73) CAA GGG CAG GCC AUU CCU CCU UC

Ekzon 43

9 H43A(+92+117) GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UC

Ekzon 44

10 H44A(+65+90) UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA

54 H44A(+59+85) CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG AUU

Ekzon 45

11 H45A(-09+25) GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U

55 H45A(-03+25) GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G

61 H45A(-06+25) GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA A

Ekzon 44

62 H45A(-12+25) CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C

Ekzon 46

12 H46A(+81+109) UCC AGG UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU GU

56 H46A(+93+122) GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU CAA GUG GGA

Ekzon 47

13 H47A(+01+29) UGG CGC AGG GGC AAC UCU UCC ACC AGU AA

Ekzon 49

14 H49A(+45+70) ACA AAU GCU GCC CUU UAG ACA AAA UC

Ekzon 50

15 H50A(+48+74) GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU

Ekzon 51

57 H51A(+71+100) AGC AGG UAC CUC CAA CAU CAA GGA AGA UG

Ekzon 52

58 H52A(+09+38) UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC UGC

Ekzon 53

59 H53A(+33+65) UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU

Ekzon 54

16 H54A(+67+97) UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G

Ekzon 55

17 H55A(-10 +20) CAG CCU CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA

Ekzon 56

18 H56A(+92+121) CCA AAC GUC UUU GUA ACA GGA CUG CAU

19 H56A(+112+141) CCA CUU GAA GUU CAU GUU AUC CAA ACG UCU

Ekzon 57

20 H57A(-10+20) AAC UGG CUU CCA AAU GGG ACC UGA AAA AGA

Ekzon 58

- 21 H58A(+34+64) UUC GUA CAG UCU CAA GAG UAC UCA UGA UUA C
- 22 H58D(+17-07) CAA UUA CCU CUG GGC UCC UGG UAG

Ekzon 59

- 23 H59A(+96 +120) CUA UUU UUC UCU GCC AGU CAG CGG A

Ekzon 60

- 24 H60A(+33+62) CGA GCA AGG UCA UUG ACG UGG CUC ACG UUC

Ekzon 61

- 25 H61A(+10+40) GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU C

Ekzon 62

- 26 H62A(23+52) UAG GGC ACU UUG UUU GGC GAG AUG GCU CUC

Ekzon 63

- 27 H63A(+20+49) GAG CUC UGU CAU UUU GGG AUG GUC CCA GCA

Ekzon 64

- 28 H64A(+34+62) CUG CAG UCU UCG GAG UUU CAU GGC AGU CC

Ekzon 66

- 29 H66A(-8+19) GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU AUU AUG

Ekzon 67

- 30 H67A(+17+47) GCG CUG GUC ACA AAA UCC UGU UGA ACU UGC

Ekzon 73

- 60 H73A(+02+26) CAU UGC UGU UUU CCA UUU CUG GUA G

Tablo 1B: Antisens moleküllerin kokteylleri

SEQ ID	Ekzon	Dizi
	Ekzon kokteylleri	3

SEQ ID	Ekzon	Dizi
	Ekzon 3 kokteylleri	3
31	H3A(+30+60)	UAG GAG GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G
32	H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GAG GUC
	Ekzon 4 kokteylleri	4
33	H4A(+11+40)	UGU UCA GGG CAU GAA CUC UUG UGG AUC CUU
34	H4D(+14-11)	GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC UGC A
	Ekzon 8 kokteylleri	
35	H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA
36	H8A(+134+158)	AUG UAA CUG AAA AUG UUC UUC UUU A
	Ekzon 10 kokteylleri	
37	H10A(-05+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA
38	H10A(+98+119)	UCC UCA GCA GAA AGA AGC CAC G
	Ekzon 26 kokteylleri	
39	H26A(-07+19)	CCU CCU UUC UGG CAU AGA CCU UCC AC
40	H26A(+24+50)	CUU ACA GUU UUC UCC AAA CCU CCC UUC
41	H26A(+68+92)	UGU GUC AUC CAU UCG UGC AUC UCU G
	Ekzon 36 kokteylleri	
42	H36A(-16+09)	CUG GUA UUC CUU AAU UGU ACA GAG A
43	H36A(+22+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU
	Ekzon 48 kokteylleri	
44	H48A(+01+28)	CUU GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA C
45	H48A(+40+67)	CAA GCU GCC CAA GGU CUU UUA UUUU GAG C

Ekzon 60 kokteylleri

46	H60A(+87+116)	UCC AGA GUG CUG AGG UUA UAC GGU GAG AGC
47	H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC

Ekzon 66 kokteylleri

48	H66A(-02+28)	CAG GAC ACG GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU
49	H66D(+13-17)	UAA UAU ACA CGA CUU ACA UCU GUA CUU GUC

Ekzon 68 kokteylleri

50	H68A(+48+72)	CAC CAU GGA CUG GGG UUC CAG UCU C
51	H68D(+23-03)	UAC CUG AAU CCA AUG AUU GGA CAC UC

GENEL

- 5 Bu tarifname içerisinde yer alan nükleotid ve aminoasit dizi bilgilerini ihtiva eden dizi kimlik numaraları (SEQ ID NO:), tarifnamenin sonunda toplanmıştır ve Patentln Versiyon 3.0 programı kullanılarak hazırlanmıştır. Her nükleotid veya aminoasit dizisi, dizi listesi içerisinde <210> sayısal göstergesi, onu izleyen dizi tanım kodu ile tanımlanmaktadır (örneğin <210>1, <210>2, vb.). Her nükleotid veya aminoasit dizisi
- 10 için uzunluk, dizi tipi ve kaynak organizma, sırasıyla <211>, <212> ve <213> sayısal gösterge alanları içerisinde yer alan bilgilerle belirtilmektedir. Tarifname içerisinde belirtilen nükleotid ve aminoasit dizileri, <400> sayısal gösterge alanı içerisinde yer alan bilgi ve onu izleyen dizi tanım kodu ile tanımlanmaktadır (örneğin <400> 1, <400> 2, vb.).

15

Farklı antisens moleküllerini birbirinden ayırt etmek amacıyla bir antisens moleküller terminoloji sistemi tasarlanmış ve yayınlanmıştır (bakınız, Mann *et al.*, (2002) J Gen Med 4, 644-654). Bu terminoloji bilhassa, tümü, aşağıda gösterildiği gibi aynı hedef bölgeye yönlendirilmiş olan, birbirinden biraz farklı birkaç antisens molekülü test

20 edilirken anlamlı olmuştur:

H # A/D (x : y).

İlk harf türü belirtir (örneğin H: insan, M: murin, C: Köpek) “#” hedef distrofin ekzon numarasını belirtir.

5 “A/D”, sırasıyla ekzon başlangıcındaki ve bitimindeki alıcı veya donör uç-birleşme bölgesini gösterir.

(x y), tavlama koordinatlarını temsil eder, burada “-” veya “+”, sırasıyla intronik veya ekzonik dizileri belirtir. Örnek olarak, A(-6+18), hedef ekzondan önceki intronun son 6 bazını ve hedef ekzonun ilk 18 bazını gösterir. En yakın uç-birleşme bölgesi alıcı olacaktır, o nedenle bu koordinatların önünde “A” harfi bulunacaktır. Donör uç-birleşme bölgesindeki tavlama koordinatlarının tanımlanması D(+2-18) şeklinde olabilir, burada son 2 ekzonik baz ve ilk 18 intronik baz, antisens molekülünün tavlama bölgesine karşılık gelir. A(+65+85) ile temsil edilecek tam ekzonik tavlama bölgesi koordinatları, bu ekzonun başlangıcı itibarıyla 65. ve 85. nükleotid arasındaki bölgeyi ifade eder.

15 Burada kullanıldığı şekliyle “türetilmiş” ve “den türetilmiş” terimi, *her ne kadar o kaynaktan doğrudan alınmasa da*, belirli bir kaynaktan elde edilebilecek spesifik bir tam sayı anlamına gelecektir.

20 Bu tarifname genelinde, bağlam aksini gerektirmedikçe, “içerir” terimi ile veya bunun “içermesi” veya “içeren” gibi varyasyonları ile, bütüne ait belirtilen bir parçanın veya parça grubunun dahil edildiği ancak başka bir tamsayı veya tamsayı grubunun hariç tutulmadığı kastedilmektedir.

25 Burada kullanılan belirli terimlere ilişkin diğer tanımlar, buluşun ayrıntılı tarifnamesi içerisinde bulunabilir ve tüm belge genelinde geçerlidir. Aksi tanımlanmadıkça, burada kullanılan tüm diğer bilimsel ve teknik terimler, buluşun ait olduğu teknikte normal uzmanlığa sahip bir kişi tarafından standart şekilde anlaşılacak aynı anlama sahiptir.

30 **TERCİH EDİLEN UYGULAMANIN AÇIKLAMASI**

Antisens molekülü(molekülleri), pre-mRNA dizileri içerisindeki ekzonlarda uç-birleştirme sürecine katılan nükleotid dizilerine hedeflendiğinde, ekzonun normal uç-birleşmesi inhibe edilerek uç-birleştirme mekanizmasının, mutasyona uğramış tüm ekzonları olgun

mRNA'dan bypas etmesine neden olabilir. Antisens oligonükleotid tarafından indüklenen ekzon atlaması kavramı Şekil 2'de gösterilmektedir.

Birçok gende, tüm bir ekzonun delesyonu, önemli fonksiyonel sahaların kaybı veya okuma çerçevesinin bozulması yoluyla fonksiyonel olmayan bir proteinin üretilmesine yol açacaktır. Bununla birlikte, bazı proteinlerde, protein çerçevesinin bir veya daha fazla ekzonu silerek, okuma çerçevesini bozmadan ve proteinin biyolojik aktivitesini ciddi bir şekilde değiştirmeden proteini kısaltmak mümkündür. Tipik olarak, bu türlü proteinler yapısal bir role sahiptir ve uçlarında fonksiyonel sahalarla sahiptir. Mevcut buluş, belirtilen distrofin pre-mRNA hedeflerine bağlanabilen ve bu genin yeniden yönlendirilmesini sağlayan antisens molekülleri tarif eder.

Antisens moleküllerine dayanan bir terapinin tercih edilen bir amacı, antisens molekülünün mümkün olan en düşük konsantrasyonunu sağlayarak maksimum ekzon atlama elde etmektir. Genel olarak, bir antisens molekülü güçlü, sağlam ekzon atlamasına neden olabilir; zayıf, sporadik ekzon atlamasına neden olabilir veya hiçbir ekzon atlamasına neden olmaz. Düşük bir terapötik dozda güçlü, sağlam tutarlı ekzon atlamalarını sağlayabilen antisens moleküllerin (tek başına veya kombinasyon halinde) geliştirilmesi tercih edilir.

20 **Antisens Molekülleri**

Buluşun bir birinci yönüne göre, bir insan distrofin pre-mRNA'sında ekzon 45 atlamasını indükleyen bir antisens oligonükleotid sağlar, burada antisens oligonükleotid aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir:

25

i) CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 22 baz bir antisens oligonükleotid;

ii) CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-süstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 22 baz bir antisens oligonükleotid;

30

iii) GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 25 baz bir antisens oligonükleotid;

iv) GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-süstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 25 baz bir antisens oligonükleotid;

35

- v) GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 28 baz bir antisens oligonükleotid;
- vi) GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-süstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 28 baz bir antisens oligonükleotid;
- vii) GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 31 baz bir antisens oligonükleotid; ve
- viii) GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G içeren ve 5-süstitüe edilmiş bir pirimidin bazı veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren 31 baz bir antisens oligonükleotid.

Distrofin gen transkripsiyonunun ekzonlarında ekzon atlamalarını indüklemek için, antisens molekülleri Tablo 1A'da gösterilen bileşikler grubundan seçilebilir.

Ayrıca, ekzon atlamayı indüklemek için seçilen bir hedefe bağlanabilen iki veya daha fazla antisens oligonükleotidden oluşan bir kombinasyon veya "kokteyl" de sağlanmıştır. Distrofin gen transkripsiyonunun ekzonlarında ekzon atlamayı indüklemek için, bir "kokteyl" içindeki antisens molekülleri tercihen Tablo 1B'de gösterilen bileşikler grubundan seçilir.

Konsensüs uç-birleşme bölgelerini tamamen maskelemek amacıyla antisens moleküllerinin tasarlanması, mutlaka hedeflenen ekzonun atlamasına yol açmayabilir. Ayrıca buluş sahipleri, antisens oligonükleotidin kendi büyüklüğünün veya uzunluğunun, antisens molekülleri tasarlarken her zaman birincil bir faktör olmadığını keşfetti. Ekzon 19 gibi bazı hedeflerde, 12 bazlı kısa antisens oligonükleotidler, daha uzun (20-31 bazlı) oligonükleotidler kadar etkili olmasa da ekzon atlaması indükleyebildi. Murin distrofin ekzon 23'ü gibi bazı diğer hedeflerde, sadece 17 rezidü uzunluğundaki antisens oligonükleotidler, 25 nükleotidlik diğer bir çakışan bileşikten daha etkili bir atlama indükleyebildi. Bununla birlikte, mevcut buluşta, genellikle, daha uzun antisens moleküllerin, kısa moleküllere göre ekzon atlamalarını indüklemeye genellikle daha etkili oldukları bulunmuştur. Dolayısıyla, tercihen, mevcut buluşun antisens molekülleri, uzunluk olarak 24 ile 30 nükleik asit, tercihen yaklaşık 28 nükleotit uzunluğundadır. Örneğin, daha önce 20 baz (H16A(-07+13)) bir antisens oligonükleotidin ekzon 16 ekzon atlanmasını indüklemeye etkisiz olduğu, ancak daha

kısa oligonükleotidi tamamen içine alan 31 baz bir (H16A(-06+25)) oligonükleotidin atlamayı indüklemeye etkili olduğu bulunmuştur (Harding et al (2007) Mol Ther 15: 157-166).

Buluş sahipleri aynı zamanda, uç-birleştirme prosesini yeniden yönlendirmek için antisens molekülü tarafından bloke edilebilen veya maskelenebilen herhangi bir standart motifin olmadığını keşfetti. Fare distrofin ekzon 23'ü gibi bazı ekzonlarda, donör uç-birleşme bölgesi, bu ekzonun atlamasını yeniden yönlendirmek için en elverişli bölge oldu. Donör uç-birleşme bölgesinin çıkışan bölgelerine tavlama için bir ekzon 23 spesifik antisens molekülü serisinin tasarlanmasının ve test edilmesinin, indüklenen ekzon atlamasının etkinliğinde ciddi bir farklılık gösterdiği belirtilmelidir. Mann et al., (2002) tarafından bildirildiği üzere, antisens oligonükleotidin tavlama bağı olarak sens olmayan mutasyonu bypas etme etkinliğinde anlamlı bir farklılık oldu ("Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the *mdx* mouse model of muscular dystrophy". J Gen Med 4: 644-654). Ekzon 23 alıcı bölgesinin veya çeşitli iç sahaların hedeflenmesinin, istikrarlı bir ekzon 23 atlaması indüklemediği görüldü.

Çıkarılması hedeflenen diğer ekzonlarda, donör birleşme sahasının maskelenmesi, herhangi bir ekzon atlamayı indüklememiştir. Bununla birlikte, antisens moleküllerini alıcı birleşme sahasına yönlendirmek (aşağıda tartışıldığı gibi insan ekzonu 8), güçlü ve sürekli ekzon atlamayı indüklemiştir. İnsan ekzonu 8'in çıkarılmasının ekzon 9'un birlikte çıkarılmasıyla sıkı bir şekilde bağlantılı olduğu belirtilmelidir. Ekzon 8 antisens oligonükleotidleri ve ekzon 9'un karşılık gelen bölgeleri arasında güçlü bir dizi homolojisi yoktur, bu da bir çapraz reaksiyon durumu olmadığını göstermektedir. Aksine, bu iki ekzonun birleştirilmesi genellikle bağlantılıdır. Bu, izole bir örnek değildir, çünkü aynı etki, ekzon 9'un atlanmasıyla sonuçlanan ekzon 8'in hedeflendiği köpek hücrelerinde de gözlenmiştir. Fare distrofin pre-mRNA'da çıkarmak için ekzon 23'ün hedeflenmesi de ekzon 22'nin de sıklıkla çıkarılmasına neden olur. Bu etki doza bağlı bir şekilde gerçekleşir ve aynı zamanda 2 bitişik ekzonun yakın koordineli bir şekilde işlenmesini gösterir.

Diğer hedeflenen ekzonlarda, donör veya alıcı uç-birleşme bölgelerine yönlendirilmiş antisens molekül ekzon atlaması indüklemeyen veya kötü atlama indüklenirken antisens molekülün ekzon içi bölgelere (yani insan distrofin ekzon 4'ü içerisindeki ekzon uç-birleştirme pekiştiricileri) tavlama, ekzon atlamasının indüklenmesinde en yüksek etkinliği gösterdi. Bazı ekzonlar, örneğin fare ve insan ekzonu 19, antisens

molekülleri çeşitli motiflere hedeflendirmek yoluyla kolaylıkla atlatılır. Yani, donör ve alıcı uç-birleşme bölgelerini maskelemek için antisens oligonükleotidler veya ekzon uç-birleştirme pekiştireçleri kullanıldıktan sonra hedeflenen ekzon atlaması indüklenir.

- 5 Antisens moleküllerinin hangi kokteyllerinin ekzon atlamalarını indükleyeceğini tahmin etmek de mümkün değildir. Örneğin, tek başına, belirli bir ekzonun atlamasını indüklemeye çok iyi olan iki antisens molekülünün kombinasyonu, bir kokteylde birleştirildiğinde bir ekzonun atlamasına neden olmayabilir. Örneğin, H50A(+02+30) ve H50A(+66+95)'nin her biri, ekzon 50 ve 51'in iyi atlanmasını indükler. Ancak, bir
- 10 kokteyl olarak kombinasyon halinde, yalnızca iki ekzonun kötü şekilde atlamasını indükler. Benzer şekilde H50A(+02+30) ve H51A(+66+90) veya H50A(+02+30) ve H51A(+61+90) kombinasyonları, bireysel antisens molekülleri etkili olduğu halde, ekzon 50 ve 51'in etkili bir şekilde atlamasına neden olmamıştır. Bununla birlikte, üçüncü bir antisens molekülün ([H51D(+16-07)]) tek başına atlamaya neden olmaz)
- 15 dahil edilmesi, ekzonlar 50 ve 51'in 1 nM'ye atlamasına neden olabilecek üç elemanlı bir kokteyl ([H50A (+ 02 + 30)], H51A (+ 66 + 90) ve [H51D(+16-07)]) yaratmıştır.

- Alternatif olarak, tek başına etkisiz veya sadece orta derecede etkili olan iki veya üç antisens molekülünün kombinasyonu, kombine edildiğinde mükemmel atlamaya neden
- 20 olabilir. Örneğin, bireysel olarak H26A(-07+19) [SEQ ID NO: 39], H26A(+24+50) [SEQ ID NO: 40] ve H26A(+68+92) [SEQ ID NO: 41] ekzon 26 atlamasında etkin olmaz ve aynı zamanda çoklu ekzon atlamayı (26-29 veya 27-30) indükler. Bununla birlikte, üç ekzon bir kokteyl olarak birleştirildiğinde, yüksek verimli bir şekilde ekzon 26 atlaması meydana gelir.

25

Yukarıdaki örneklerden ve tartışmadan, bir kombinasyonun işe yaradığını veya yaramadığını doğru olarak tahmin etmenin bir yolu olmadığı açıktır.

- Antisens molekülleri, ekzonların 'doza bağımlı' veya 'doza bağımlı olmayan' şekilde
- 30 atlamasına neden olabilir. Doza bağımlı ile antisens molekülün daha büyük bir miktarının daha iyi ekzon atlamasını indüklediği, buna karşılık doza bağımlı olmayan ile antisens moleküllerin çok düşük dozlarda bile atlamayı indükleyebildiği kastedilmektedir. Örneğin, Şekil 15'ten, H46A(+81+109) [SEQ ID NO: 12]'nin, mevcut antisens molekül miktarından bağımsız olarak (600nM ila 25 nM) ekzon 46 atlamasının
- 35 eşit derecede iyi olduğu görülmektedir. Aksine, H57A(-10+20) [SEQ ID NO: 20] (Şekil

24) 100nM'de güçlü bir şekilde ekzon 57 atlamaya neden olur; ancak 50nM'de atlamayı azaltır ve 25nM'de atlamayı daha da azaltır.

5 Bu moleküller çok düşük konsantrasyonlarda verilebildiği ve yine de terapötik bir etki sağlayabildiği için, bir doza bağımlı olmayan atlama indükleyen antisens moleküllerin seçilmesi tercih edilir. Bununla birlikte, özellikle, bu moleküller, düşük konsantrasyonlarda iyi veya mükemmel atlama indüklediğinde, doza bağımlı bir şekilde atlama indükleyen antisens molekülleri olarak tercih edilen moleküller olarak seçilmeleri kabul edilebilir. Tercihen, mevcut buluşun antisens molekülleri, 500 nM'den daha az, 10 tercihen 200 nm'den daha az ve daha tercihen 100nM, 50 nM veya hatta 25 nM kadar düşük konsantrasyonlarda iyi veya mükemmel ekzon atlamaları indükleyebilmektedir. En çok tercih edilen haliyle, mevcut buluşun oligonükleotid molekülleri, 100 nM'lik bir konsantrasyonda %30 daha fazla seviyelerde atlama indükleyebilmektedir.

15 Ekzon atlamasının modülasyonunda kullanılmaya uygun antisens oligonükleotidleri belirlemek ve seçmek için, ilk olarak, işlevi modüle edilecek olan bir nükleik asit dizisinin tanımlanması gerekir. Bu örneğin, ekspresyonu belirli bir rahatsızlık veya hastalık durumu ile ilişkili olan bir gen (veya bu genden transkribe edilen mRNA) veya bir enfeksiyöz ajandan kaynaklanan bir nükleik asit molekülü olabilir. Mevcut buluş 20 bağlamında, tercih edilen hedef bölge(ler), mRNA uç-birleştirme prosesine katılanlardır (yani uç-birleştirme donör bölgeleri, uç-birleştirme alıcı bölgeleri veya ekzonik uç-birleştirme pekiştireç elemanları). Uç-birleştirici dallanma noktaları ve ekzon tanıma dizileri veya uç-birleştirme pekiştireçleri de ayrıca mRNA uç-birleştirme prosesinin modülasyonu için potansiyel hedef bölgelerdir.

25

Tercihen mevcut buluş, etkili ve istikrarlı ekzon atlaması indüklemek için distrofin pre-mRNA'sı içerisindeki seçili bir hedefe bağlanabilme özelliğine sahip antisens moleküller sağlamayı amaçlar. Duchenne kas distrofisi, bir işlevsel distrofin geni ürününün sentezine engel olan mutasyonlardan kaynaklanır. Bu Duchenne kas distrofisi gen 30 kusurları tipik olarak, okuma çerçevesini bozan delesyonlar, duplikasyonlar veya mikrodelesyonlar veya insersiyonlar gibi sens olmayan mutasyonlardır veya genomik yeniden düzenlemelerdir. İnsan distrofin geni, (79 ekzonun birbirine eklenerek yaklaşık 11.000 bazlı bir açık okuma çerçevesine sahip bir olgun mRNA oluşturduğu) geniş ve kompleks bir gen olduğundan, bu mutasyonların meydana gelebildiği birçok pozisyon 35 vardır. Sonuç olarak, distrofin geni içerisinde hastalığa neden olan farklı mutasyonların

çoğunu ele alacak antisens oligonükleotid esaslı kapsamlı bir terapi, uç-birleştirme prosesinde birçok ekzonun uzaklaştırma için hedeflenebilmesini gerektirecektir.

- Mevcut buluş bağlamında, tercih edilen hedef bölge(ler), mRNA uç-birleştirme prosesine katılanlardır (yani uç-birleştirme donör bölgeleri, uç-birleştirme alıcı bölgeleri veya ekzonik uç-birleştirme pekiştireç elemanları). Uç-birleştirici dallanma noktaları ve ekzon tanıma dizileri veya uç-birleştirme pekiştireçleri de ayrıca mRNA uç-birleştirme prosesinin modülasyonu için potansiyel hedef bölgelerdir.
- 10 Oligonükleotid ve DNA veya RNA, her molekül içerisinde yeterli sayıda ilgili pozisyon birbiriyle hidrojen bağı kurabilen nükleotidler tarafından işgal edildiğinde birbirini tamamlar. Bu nedenle, “spesifik olarak hibritleşebilen” ve “tamamlayıcı” terimleri, oligonükleotid ile DNA veya RNA hedefi arasında stabil ve spesifik bağlanma meydana gelecek şekilde yeterli bir tamamlayıcılık veya hassas eşleşme derecesine işaret etmek
- 15 için kullanılan terimlerdir. Teknikte, bir antisens molekülün dizisinin, spesifik olarak hibritleşebilir olmak için hedef dizisinin %100 tamamlamak zorunda olmadığı anlaşılır. Bir antisens molekül, bileşiğin hedef DNA veya RNA molekülüne bağlanması, hedef DNA veya RNA’nın normal işlevine müdahale ederek fayda kaybına neden olduğunda ve antisens bileşiğin, spesifik bağlanmanın istendiği durumlar altında, yani
- 20 *in vivo* analizlerin veya terapötik tedavinin yapılması durumunda fizyolojik koşullarda ve *in vitro* analizlerin yapılması durumunda analizlerin yapıldığı koşullarda, hedef olmayan dizilere spesifik olmayacak şekilde bağlanmasını önlemeye yeterli derecede bir tamamlayıcılık olduğunda spesifik olarak hibritleşebilir.
- 25 Yukarıdaki yöntem, biyolojik işlevini etkilemeden kısaltılabilme özelliğine sahip bir protein içerisinden bir ekzonu silebilme özelliğine sahip antisens molekülleri seçmek için kullanılabilirken, ekzonun silinmesi, kısaltılan transkribe edilmiş mRNA’da bir okuma çerçevesi kaymasına neden olmamalıdır. Bu nedenle, eğer üç ekzonluk bir lineer dizi içerisinde, birinci ekzonun ucu bir kodon içerisindeki üç nükleotidden ikisini
- 30 şifrelerse ve bir sonraki ekzon silinirse, lineer dizi içerisindeki üçüncü ekzon, bir kodon için nükleotid üçlüsünü tamamlama özelliğine sahip olan bir tekli nükleotid ile başlamalıdır. Eğer üçüncü ekzon bir tekli nükleotid ile başlamazsa, kesik veya işlevsel olmayan bir proteinin oluşmasına yol açacak bir okuma çerçevesi kayması meydana gelecektir.

Yapısal proteinler içerisindeki ekzonların ucundaki kodon düzenlemelerinin her zaman kodon ucunda kopmadığı anlaşılabacaktır. Sonuç olarak mRNA'nın çerçeve içi okunmasını sağlamak için pre-mRNA'dan birden fazla ekzonun silinmesinin gerekli olabilir. Böyle durumlarda, buluşa göre olan yöntemle birden fazla antisens oligonükleotidin seçilmesi gerekir, burada bunlardan her biri, silinecek ekzonlarda uç-
5 birleştirme işleminin indüklenmesinden sorumlu farklı bir bölgeye yönlendirilir.

Bir antisens molekülün uzunluğu, pre-mRNA molekülü içerisinde hedeflenen konuma seçici olarak bağlanabilme özelliğine sahip olduğu müddetçe değişiklik gösterebilir. Bu dizilerin uzunluğu, burada tarif edilen seçim prosedürlerine göre tayin edilebilir. Genel olarak, antisens molekülü, uzunluk olarak yaklaşık 10 nükleotid ile uzunluk olarak yaklaşık 50 nükleotid arasında olacaktır. Bununla birlikte, bu aralıktaki herhangi bir nükleotid uzunluğunun yöntemde kullanılabileceği takdir edilecektir. Tercihen; antisens molekülünün uzunluğu 17 ile 30 nükleotit uzunluğundadır. Şaşırtıcı bir şekilde, uzun
10 antisens moleküllerin ekzon atlamaları indüklemeye genellikle daha etkili oldukları bulunmuştur. Bu nedenle, en çok tercihen antisens molekülü, uzunluk olarak 24 ila 30 nükleotid arasındadır.

Bir distrofin geni içerisinde hangi ekzonların bağlanabildiğini tayin etmek için, bir ekzon sınır haritasının incelenmesi gerekir. Bir ekzonun diğerine bağlanması, ekzonun bağlanmakta olduğu 5' sınırında olduğu gibi 3' sınırında aynı sayıya sahip ekzonlara dayalıdır. Bu nedenle, eğer ekzon 7 silinirse, ekzon 6'nın, okuma çerçevesini sürdürmek için ya ekzon 12'ye veya 18'e bağlanması gerekir. Böylelikle, birinci oluşumda ekzonlar 7 ila 11'in veya ikinci oluşumda ekzonlar 7 ila 17'nin uç-birleşmesini
20 yönlendirmiş olan antisens oligonükleotidlerin seçilmesi gerekecektir. Bir ekzon 7 silme işlemi sonrası okuma çerçevesini eski haline getirmede başka ve bir ölçüde daha basit olan bir yaklaşım, iki kuyruk ekzonunun uzaklaştırılması olacaktır. Ekzonlar 6 ve 8'in atlamasının indüklenmesi, ekzonlar 5 ila 9'un uç-birleşmesi ile bir çerçeve içi transkript sağlayacaktır. Ancak uygulamada, ekzon 8'in pre-mRNA'dan uzaklaştırmak için
25 hedeflenmesi, oluşan transkriptte ekzon 5 ekzon 10'a birleşmiş olacak şekilde ekzon 9'un eş-uzaklaştırılmasıyla sonuçlanır. Ekzon 9'un dahil edilmesi veya çıkarılması okuma çerçevesini etkilemez.

Test edilecek antisens molekülleri tanımlandığında, teknikte bilinen standart
35 yöntemlere göre hazırlanır. Antisens moleküller üretmek için en yaygın yöntem, 2'

hidroksiriboz pozisyonunun metillenmesidir ve bir fosforotiyoat omurga dahil edilmesidir. Yüzeysel olarak RNA'ya benzeyen ancak nükleaz bozunmasına karşı çok daha dirençli olan moleküller üretir.

- 5 Pre-mRNA'nın, antisens molekülleri ile dubleks oluşumu sırasında bozunmasını önlemek için, yöntemde kullanılan antisens molekülleri, endojen RNaz H ile bölünmeyi en aza indirmek veya önlemek için adapte edilebilir. Bu özellik, metillenmiş olmayan RNA oligonükleotidlerin varlığında oldukça tercih edilir, çünkü bir hücre içi ortamda veya RNaz H içeren ham ekstraktlar ile temas halinde, pre-mRNA: antisens
- 10 oligonükleotid duplekslerinin bozunmasına yol açacaktır. Bu tür bir bozunmayı by-pass edebilen veya indükleyemeyen herhangi bir modifiye antisens molekülü, mevcut yöntemde kullanılabilir. Nükleaz direnci, buluşun antisens moleküllerini modifiye ederek, kısmen doymamış alifatik hidrokarbon zinciri ve karboksilik asit grupları, ester grupları ve alkol grupları içeren bir veya daha fazla polar veya yüklü grup içerecek
- 15 şekilde gerçekleştirilebilir.

- RNA ile dublekslendiğinde hücresel RNaz H tarafından parçalanmayan antisens molekülleri örneği 2'-O-metil türevlerdir. 2'-O-metil-oligoribonükleotidler, bir hücresel ortamda ve hayvansal dokularda oldukça stabildir ve RNA'lı dubleksleri, ribo veya
- 20 deoksiribo-muadillerinden daha yüksek T_m değerlerine sahiptir. Alternatif olarak, buluşa ait nükleaz dirençli antisens molekülleri, fluorine edilmiş son 3'-terminus nükleotidden en az birine sahip olabilir. Yine alternatif olarak, buluşun nükleaz dirençli antisens molekülleri, son 3'-terminus nükleotid bazlarının en azından ikisi arasında bağlanan fosforotiyoat bağlarına, tercihen son dört 3'-terminal nükleotid bazları arasında bağlanan
- 25 fosforotiyoat bağlarına sahiptir.

- RNaz H'yi aktive etmeyen antisens moleküller bilinen yöntemlerle göre oluşturulabilir (bakınız, örneğin, U.S. Pat. 5,149,797). Deoksiribonükleotid veya ribonükleotid dizileri olabilen bu antisens molekülleri basit anlamda, bir üyesi olarak oligonükleotid ihtiva
- 30 eden bir dubleks moleküle RNaz H'nin bağlanmasını sterikal olarak engelleyen veya önleyen bir yapısal modifikasyon içerir, bu yapısal modifikasyon dubleks oluşumunu önemli ölçüde engellemez veya bozmaz. Dubleks oluşumunda rol oynayan oligonükleotid kısımları, kendisine RNaz H bağlanmasına katılan kısımlardan önemli ölçüde farklı olduğundan, RNaz H'yi aktive etmeyen çok sayıda antisens molekülü
- 35 mevcuttur. Örneğin, bu antisens molekülleri, nükleotidler arası bağ kuran fosfat

rezidülerinden en az birinin veya tümünün metil fosfonatlar, metil fosforotiyoatlar, fosforomorfolidatlar, fosforopiperazidatlar ve fosforamidatlar gibi modifiye fosfatlar olduğu oligonükleotidler olabilir. Örneğin, nükleotidler arası bağ kuran fosfat rezidülerinin her ikisinden biri, tarif edilen şekilde modifiye edilebilir. Sınırlandırıcı nitelik taşımayan diğer bir örnekte, bu antisens moleküller, nükleotidlerin en az birinin veya tümünün bir 2' düşük alkil kısmı (örneğin metil, etil, etenil, propil, 1-propenil, 2-propenil ve izopropil gibi C₁-C₄, lineer veya dallanmış, doymuş veya doymamış alkil) ihtiva ettiği moleküllerdir. Örneğin, nükleotidlerin her ikisinden biri, tarif edilen şekilde modifiye edilebilir.

10

Antisens oligonükleotidleri, antisens moleküllerin tercih edilen bir formu olurken, mevcut buluş, sadece bunlarla sınırlı olmamak üzere, aşağıda tarif edildiği gibi olan oligonükleotid mimetikleri dahil diğer oligomerik antisens molekülleri de kapsar.

15 Bu buluşta kullanılabilir olan tercih edilir antisens bileşiklerin spesifik örnekleri, modifiye omurgalar veya doğal olmayan nükleosit arası bağlar ihtiva eden oligonükleotidleri içerir. Bu tarifnamede tanımlanan modifiye omurgalara sahip oligonükleotidler, omurgada molekülde bir fosfor atomu muhafaza eden ve omurgada fosfor atomu olmayanları içerir. Bu tarifnamenin amaçları çerçevesinde ve bazen teknikte atıfta bulunulduğu üzere, nükleositler arası omurgada bir fosfor atomuna sahip olmayan modifiye oligonükleotidler de yine oligonükleotid olarak kabul edilebilir.

Diğer tercih edilen oligonükleotid mimetiklerinde, nükleotid birimlerinin hem şeker hem de nükleosit arası bağı, yani omurgası yeni gruplar ile değiştirilir. Baz üniteleri, uygun bir nükleik asit hedef bileşiği ile hibridizasyon için muhafaza edilir. Böyle bir oligomerik bileşikte, mükemmel hibridizasyon özelliklerine sahip olduğu ispat edilmiş olan bir oligonükleotid mimetiği, peptit nükleik asit (PNA) olarak ifade edilir. PNA bileşiklerinde, bir oligonükleotidin şeker omurgası, bir amid ihtiva eden omurga ile, bilhassa bir aminoetilglisin omurgası ile değiştirilir. Nükleo-bazlar muhafaza edilir ve omurganın amid kısmına ait aza nitrojen atomlarına doğrudan veya dolaylı olarak bağlanır.

Modifiye oligonükleotidler ayrıca bir veya daha fazla süstitüe edilmiş şeker kısmını içerebilir. Oligonükleotidler ayrıca nükleobazı (genellikle teknikte "baz" olarak anılır) modifikasyonlar veya süstitüsyonlar olarak da içerebilir. Bazı nükleobazlar, buluşun oligomerik bileşiklerinin bağlanma afinitesini arttırmak için özellikle yararlıdır. Bunlar

35

arasında 5-sübstitüe edilmiş pirimidinler, 6-azapirimidinler ve 2-aminopropiladenin, 5-propinilurasil ve 5-propinilsitozin dahil N-2, N-6 ve O-6 sübstitüe edilmiş purinler, bulunur. 5-metilsitozin sübstitüsyonlarının nükleik asit dubleks stabilitesini 0.6-1.2°C arttırdığı ve daha da özellikle 2'-O-metoksietil şeker modifikasyonları ile kombine edildiğinde hali hazırda tercih edilen baz sübstitüsyonları olduğu gösterilmiştir.

Buluşa göre olan oligonükleotidlerin başka bir modifikasyonu, oligonükleotide, oligonükleotidin aktivitesini, hücre dağılımını veya hücre alımını geliştiren bir veya daha fazla kısmı veya konjüгатlarının kimyasal olarak bağlanmasını içerir. Bu kısımlar sadece şunlarla sınırlı olmamak üzere bir kolesterol kısmı gibi lipid kısımları kolik asidi, bir tiyoeteri, örneğin heksil-S-tritiltiyolü, bir tiyokolesterolü, bir alifatik zinciri, örneğin dodekandiyolü veya undesil rezidülerini, bir fosfolipidi, örneğin di-heksadesil-rak-gliserolü veya trietilamonyum 1,2-di-O-heksadesil-rak-gliserol-3-H-fosfonatı, bir poliamin veya bir polietilen glikol zincirini veya adamantan asetik asidi, bir palmitil kısmını veya bir oktadesilamin veya heksilamino-karbonil-oksikolesterol kısmını içerir.

Belli bir bileşik içerisindeki tüm pozisyonların tek tip modifiye edilmesi gerekli değildir ve uygulamada, yukarıda belirtilen modifikasyonlardan birinden fazlası bir tekli bileşiğe veya bir oligonükleotid içerisindeki bir tekli nükleosite dahil edilebilir. Mevcut buluş aynı zamanda kimerik bileşikler olan antisens bileşikler içerir. Bu buluş bağlamında "kimerik" antisens bileşikler veya "kimeralar", her biri en az bir monomer biriminden, yani bir oligonükleotid bileşiği durumunda bir nükleotidden meydana gelen iki veya daha fazla kimyasal olarak ayırık bölge ihtiva eden antisens moleküller, bilhassa oligonükleotidlerdir. Bu oligonükleotidler tipik olarak, oligonükleotidin, hedef nükleik aside nükleaz bozunmasına karşı daha yüksek direnç, daha yüksek hücre alımı ve daha yüksek bağlanma afinitesi için ek bir bölge kazandıracak şekilde modifiye edildiği en az bir bölge ihtiva eder.

Antisens Moleküllerinin Üretim Yöntemleri

Bu buluşa göre kullanılan antisens moleküller, iyi bilinen katı faz sentezi tekniği vasıtasıyla rahat ve rutin bir şekilde oluşturulabilir. Bu sentez için kullanılacak ekipmanlar, örneğin Applied Biosystems (Foster City, Calif.) gibi çeşitli satıcılar tarafından satılmaktadır. Modifiye edilmiş bir katı destek üzerinde oligonükleotidlerin sentezlenmesi için bir yöntem U.S. Pat. No. 4,458,066'da tarif edilmektedir..

Bu sentez için teknikte bilinen başka bir yöntem de ek veya alternatif olarak kullanılabilir. Fosforotiyoatlar ve alkilenmiş türevler gibi oligonükleotidlerin hazırlanması için benzer tekniklerin kullanılması iyi bilinmektedir. Böyle bir otomatize edilmiş uygulamasında, başlangıç materyali olarak dietil-fosforamiditler kullanılır ve Beaucage, *et al.*, (1981) *Tetrahedron Letters*, 22:1859-1862 tarafından tarif edildiği şekilde sentezlenebilir.

Buluşun antisens molekülleri *in vitro* olarak sentezlenir ve antisens moleküllerinin *in vivo* sentezini yönlendirmek için tasarlanmış biyolojik kökenli antisens bileşimlerini veya genetik vektör yapılarını içermez. Buluşa ait moleküller ayrıca, tutulum, dağıtım ve/veya emilime yardım etmek için örneğin lipozomlar, reseptör hedefli moleküller, oral, rektal, topikal veya diğer formülasyonlar gibi, diğer moleküller, molekül yapıları veya bileşiklerin karışımları ile karıştırılabilir, kapsüllenebilir, konjuge edilebilir veya başka şekilde birleştirilebilir.

Terapötik Ajanlar

Mevcut buluş ayrıca, musküler distrofinin tedavisi amacıyla profilaktik veya terapötik olarak da kullanılabilir.

Bu çerçevede, bir uygulamasında mevcut buluş, burada tarif edilen etkin ve sürekli ekzon atlaması indüklemek amacıyla distrofin pre-mRNA'sı içerisindeki bir seçili hedefe bağlanan, farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı, dilüent veya ekspiyan ile karıştırılmış halde terapötik olarak etkili bir miktarda antisens moleküller sağlar.

"Farmasötik olarak kabul edilebilir" ifadesi, fizyolojik olarak tolere edilebilir olan ve bir hastaya uygulandığında mide rahatsızlığı gibi bir alejik veya benzeri istenmeyen bir reaksiyon meydana getirmeyen moleküler maddeleri ve bileşimleri ifade eder. "Taşıyıcı" terimi, bileşiğin uygulandığı bir dilüenti, adjuvanı, ekspiyanı veya aracı ifade eder. Bu farmasötik taşıyıcılar su ve petrol, hayvan, bitki veya sentetik kökenli yağlar, örneğin yerfıstığı yağı, soya fasülyesi yağı, mineral yağ, susam yağı ve benzeri yağlar gibi steril sıvılar olabilir. Tercihen su veya tuzlu su solüsyonları ve sulu dekstrozu ve gliserol solüsyonları, bilhassa enjekte edilebilir solüsyon amaçlı taşıyıcı olarak kullanılır.

Uygun farmasötik taşıyıcılar Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990) içerisinde tarif edilmektedir.

Buluşun daha spesifik bir formunda, farmasötik olarak kabul edilebilir diluentler, koruyucular, çözündürücüler, emülsiyonlaştırıcılar, adjuvanlar ve/veya taşıyıcılar ile birlikte bir antisens molekülünün terapötik olarak etkili miktarlarını içeren farmasötik bileşimler sağlanmaktadır. Bu gibi bileşimler, çeşitli tampon içeriği (*örneğin*, Tris-HCl, asetat, fosfat), pH ve iyonik mukavemete sahip diluentler ve deterjanlar ve çözündürücü maddeler (*örneğin*, Tween 80, Polisorbat 80) gibi katkı maddelerini, antioksidanları (*örneğin*, askorbik asit, sodyum metabisülfid), koruyucular (*örneğin*, Thimersol, benzil alkol) ve hacim arttırıcı maddeler (*örneğin*, laktoz, mannitol) içerir. Materyal, polilaktik asit, poliglikolik asit, vb. gibi polimerik bileşiklerin veya lipozomların parçacıklı preparasyonlarına dahil edilebilir. Hiyalunorik asit de kullanılabilir. Bu gibi bileşimler, mevcut proteinlerin ve türevlerin fiziksel durumunu, kararlılığını, *in vivo* salım oranını ve *in vivo* temizlenme hızını etkileyebilir. *Bakınız, örneğin, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18. Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) pages 1435-1712, burada referans olarak dahil edilmiştir. Bileşimler, sıvı formda hazırlanabilir veya liyofilize form gibi kurutulmuş toz halinde olabilir.

Mevcut buluşa göre sağlanan farmasötik bileşimlerin, teknikte bilinen herhangi bir yöntemle uygulanabileceği anlaşılabacaktır. Tercihen, uygulamaya yönelik farmasötik bileşimler enjeksiyon yoluyla, oral olarak veya pulmoner veya nazal yolla uygulanır. Antisens molekülü daha tercihen intravenöz, intra-arteryel, intraperitoneal, intramüsküler veya subkutan uygulama yollarıyla sevk edilir.

25

Antisens molekülü bazlı terapi

Mevcut buluş tarafından ayrıca, bir musküler distrofinin modülasyonuna yönelik bir ilacın üretilmesi için, mevcut buluşun antisens moleküllerinin kullanımı da ele alınmaktadır.

30

Antisens moleküllerin terapötik olarak kullanışlı bir miktarının aktarılması, daha önceden yayınlanmış olan yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Örneğin antisens molekülün hücre içi aktarımı, antisens molekülün ve bir blok kopolimerin etkili bir miktarının bir

karışımını içeren bir bileşim vasıtasıyla gerçekleştirilir. Bu yöntemin bir örneği, US patent başvurusu US 20040248833'te tarif edilmektedir.

Antisens moleküllerin çekirdeğe sevk edilmesi için diğer yöntemler Mann CJ *et al.*, (2001) ["*Antisense-induced exon skipping and the synthesis of dystrophin in the mdx mouse*". Proc., Natl. Acad. Science, 98(1) 42-47]]'de ve Gebiski *et al.*, (2003). Human Molecular Genetics, 12(15): 1801-1811'de tarif edilmektedir.

Ya çıplak DNA olarak veya lipid taşıyıcılarına komplekslenmiş halde bir ekspresyon vektörü vasıtasıyla bir nükleik asit molekülünün bir hücreye uygulanması için bir yöntem, US patent US 6,806,084 içerisinde tarif edilmektedir.

Antisens molekülü bir koloidal dispersiyon sistemi içerisinde aktarmak istenebilir. Koloidal dispersiyon sistemleri makromolekül komplekslerini, nanokapsülleri, mikroküreleri, boncukları ve su içinde yağ emülsiyonları, miseller, karma miseller gibi lipid bazlı sistemleri ve liposomları veya liposom formülasyonlarını içerir.

Liposomlar, *in vitro* ve *in vivo* aktarım araçları olarak kullanışlı olan yapay membran vezikülleridir. Bu formülasyonlar net katyonik, anyonik veya nötr yük özelliklerine ve *in vitro*, *in vivo* ve *ex vivo* aktarma yöntemlerinde faydalı özelliklere sahip olabilir. Boyut olarak 0,2-4,0 μ m aralığında olan büyük tek tabakalı veziküllerin (LUV), büyük makromoleküller ihtiva eden bir sulu tamponun önemli bir yüzdesini kapsülleyebildiği ispat edilmiştir. RNA ve DNA sulu iç ortam içerisinde kapsüllenebilir ve biyolojik olarak aktif olan bir formda hücrelere aktarılabilir (Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981).

Bir liposomun etkin bir gen aktarma aracı olabilmesi için aşağıdaki özelliklerin bulunması gereklidir: (1) istenen antisens molekülün, biyolojik aktivitesine zarar vermeden yüksek etkinlikte kapsüllenmesi; (2) hedef dışı hücrelere kıyasla bir hedef hücreye tercihli ve önemli düzeyde bağlanma; (3) vezikülün sulu muhtevasının yüksek etkinlikte hedef hücre sitoplazmasına aktarımı; ve (4) genetik bilgilerin doğru ve etkili ekspresyonu (Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988).

Liposomun bileşimi genellikle fosfolipidlerin, bilhassa yüksek faz geçiş sıcaklığına sahip fosfolipidlerin, genellikle steroidler, bilhassa kolesterol ile kombinasyon halindeki bir

kombinasyonudur. Diğer fosfolipidler veya diğer lipidler de kullanılabilir. Liposomların fiziksel özellikleri pH'ye, iyon gücüne ve divalent katyon varlığına bağlıdır.

Alternatif olarak antisens yapısı, bir farmasötik bileşim elde etmek için farmasötik olarak kabul edilebilir olan diğer taşıyıcılarla veya dilüentlerle kombine edilebilir. Uygun taşıyıcılar ve dilüentler izotonik tuzlu su çözeltilerini, örneğin fosfat tamponlu tuzlu suyu içerir. Bileşim, parenteral, intramüsküler, intravenöz, subkutan, intraoküler, oral veya transdermal uygulama için formüle edilebilir.

10 Tarif edilen uygulama yolları sadece bir kılavuz amacı taşımaktadır, çünkü teknikte uzman bir uygulayıcı, kolaylıkla, optimum uygulama şeklini ve belirli bir hayvana ve duruma yönelik dozajı tayin edebilecektir.

Buluşun antisens molekülleri farmasötik olarak kabul edilebilir herhangi bir tuzu, esteri veya bu esterlerin tuzlarını veya bir insan dahil olmak üzere bir hayvana uygulama sonrası biyolojik olarak etkin metabolit veya bunun rezidüsünü sağlayabilme (doğrudan veya dolaylı olarak) özelliğine sahip bir bileşiği kapsar. Bu çerçevede, tarifname örneğin, buluşa göre olan bileşiklerin ön ilaçlarını ve farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarını, bu ön ilaçların farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarını ve diğer biyolojik eşdeğerleri kapsayacak şekilde genişletilir.

“Farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar” terimi, buluşa göre olan bileşiklerin fizyolojik ve farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarını: yani ana bileşiğin istenen biyolojik etkinliğini muhafaza eden ve bunun üzerinde istenmeyen toksikolojik etkiler yaratmayan tuzları ifade eder.

Oligonükleotidler için, farmasötik olarak kabul edilebilir tuzların tercih edilen örnekleri, sadece bunlarla sınırlı olmamak üzere şunları içerir: (a) sodyum, potasyum, amonyum, magnezyum, kalsiyum gibi katyonlar, spermin ve spermidin, vb. gibi poliaminler ile oluşturulan tuzlar; (b) inorganik asitlerle, örneğin hidroklorik asit, hidrobromik asit, sülfürik asit, fosforik asit, nitrik asit ve benzeri ile oluşturulan asit ilave tuzları; (c) örneğin asetik asit, oksalik asit, tartarik asit, süksinik asit, maleik asit, fumarik asit, glukonik asit, sitrik asit, malik asit, askorbik asit, benzoik asit, tanik asit, palmitik asit, alginik asit, poliglutamik asit, naftalinsülfonik asit, metansülfonik asit p-toluensülfonik asit, naftalendisülfonik asit, poligalakturonik asit ve benzeri gibi organik asitler ile

oluşturulan tuzlar; ve (d) klor, brom ve iyot gibi element anyonlarından oluşturulan tuzlar. Mevcut buluşa göre olan farmasötik bileşimler, lokal veya sistemik tedavi istenip istenmediğine ve tedavi edilecek bölgeye bağlı olarak farklı yollarla uygulanabilir. Uygulama topikal (oftalmik ve rektal aktarım dahil olmak üzere mukoza
5 membranlarına), pulmoner, örneğin tozların veya aerosollerin inhalasyonu veya insuflasyonu yoluyla (nebulizatör, intratrakeal, intranazal, epidermal ve transdermal yol dahil olmak üzere), oral veya parenteral olabilir. Parenteral uygulama, intravenöz, intra-arteryel, subkutan, intraperitoneal veya intramüsküler enjeksiyonu veya infüzyonu; veya intrakranial, örneğin, intratekal veya intraventriküler uygulamayı içerir. En az bir 2'-O-
10 metoksietil modifikasyonuna sahip oligonükleotidlerin oral uygulamaya bilhassa uygun olduğu düşünülmektedir.

Mevcut buluşa göre olan, uygun olacak şekilde birim dozaj formunda takdim edilebilecek farmasötik formülasyonlar, ilaç endüstrisinde iyi bilinen geleneksel
15 tekniklere göre hazırlanabilir. Bu teknikler, etken maddelerin farmasötik taşıyıcı(lar) veya ekspiyan(lar) ile birleştirilmesi adımını içerir. Genellikle formülasyonlar, etken maddeleri sıvı taşıyıcılar veya çok ince parçacıklar haline getirilmiş katı taşıyıcılar veya her ikisi ile homojen ve derinlemesine olarak bir araya getirmek ve daha sonra gerekiyorsa ürünü şekillendirmek suretiyle hazırlanır.

20

Buluş ait Kitler

Uygun bir kap içinde paketlenmiş en azından bir antisens molekülü içeren ve genetik bir hastalığı olan bir hastanın tedavisi için kitler, kullanımı ile ilgili talimatlar ile birlikte
25 burada öğretilmektedir.

Kitler, Tablo 1A'da gösterildiği gibi en az bir antisens molekülü veya Tablo 1B'de gösterildiği gibi bir antisens molekülü kokteyli içerebilir. Kitler ayrıca tamponlar, stabilizatörler vb. gibi çevresel reaktifler içerebilir.

30

Kitin içeriği liyofilize edilebilir ve kit ayrıca liyofilize bileşenlerin yeniden yapılandırılması için uygun bir çözücü içerebilir. Kitin münferit bileşenleri ayrı kaplarda paketlenecek ve bu kaplar ile birlikte, insana uygulanması için üretim, kullanım veya satış ile ilgili firmanın onayını yansıttığını belirten farmasötik ürünlerin veya biyolojik ürünlerin

üretimini, kullanımını veya satışını düzenleyen bir devlet dairesi tarafından reçete edilen formda bir beyan eklenecektir.

Kitin bileşenleri bir veya daha fazla sıvı çözeltide temin edildiğinde, sıvı çözelti, sulu bir çözelti, örneğin bir steril sulu çözelti olabilir. İn vivo kullanım için, ekspresyon yapısı 5 farmasötik olarak kabul edilebilir bir şırınga bileşimi halinde formüle edilebilir. Bu durumda, kap, bir hayvana enjekte edilen, hatta kitin diğer bileşenlerine uygulanan ve karıştırılan veya akciğerler gibi hayvanın etkilenen bir bölgesine formülasyonun uygulanabileceği bir inhalasyon, şırınga, pipet, göz damlası veya benzeri bir aparat 10 olabilir.

Kitin bileşenleri ayrıca kurutulmuş veya liyofilize formlarda da sağlanabilir. Reaktifler veya bileşenler, kurutulmuş bir form olarak temin edildiğinde, yeniden yapılandırma genel olarak uygun bir çözücünün eklenmesiyle elde edilir. Çözücünün başka bir kap 15 aracı içinde de sağlanmış olabileceği düşünülmektedir. Kapların sayısı veya türü ne olursa olsun, buluşun kitleri ayrıca, bir hayvanın vücudu içinde nihai kompleks bileşimin enjeksiyonu/uygulaması veya yerleştirilmesine yardımcı olan bir aleti içerebilir veya bunlarla birlikte paketlenabilir. Bu tür bir cihaz, bir inhalan, şırınga, pipet, forseps, ölçü kaşığı, göz damlası veya tıbbi olarak onaylanmış herhangi bir uygulama vehikülü 20 olabilir.

Örnekler

Aşağıdaki Örnekler, yukarıda tarif edilen buluşun kullanım şeklini daha ayrıntılı 25 açıklama ve ayrıca buluşun çeşitli özelliklerinin gerçekleştirilmesi için tasarlanan en iyi uygulama şekillerini belirtme amacı taşımaktadır. Bu Örneklerin hiçbir şekilde bu buluşun gerçek kapsamını sınırlandırma amacı olmadığı, bundan ziyade açıklama amacı için sunuldukları anlaşılabacaktır.

30 Aşağıdaki örneklerde açık bir şekilde tarif edilmeyen moleküler klonlama, immünoloji ve protein kimyası yöntemleri literatürde bildirilmektedir ve teknikte uzman kişiler tarafından bilinmektedir. Geleneksel moleküler biyolojiyi, mikrobiyolojiyi ve rekombinant DNA tekniklerini tekniğin uzmanlığı kapsamında tarif etmiş olan genel makaleler arasında örneğin şunlar yer almıştır: Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory* 35 *Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

New York (1989); Glover ed., *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I ve II, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. (1985); ve Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates/Wiley Intersciences, New York (2002).

5

İnsan Kas Hücrelerinde İndüklenen Ekzon Atlamanın Belirlenmesi

Buluş sahipleri tarafından antisens molekül tasarımı rasyonel bir yaklaşım geliştirme teşebbüsleri, tüm ekzonlara uygulanabilecek istikrarlı bir trendin olmadığı görüldüğünden tamamen başarıya ulaşmamıştır. Aynı şekilde, en etkili ve bu nedenle en terapötik antisens molekül bileşikler ampirik çalışmalar sonucu çıkmıştır.

Bu ampirik çalışmalar, uç-birleştirme prosesinde potansiyel olarak rol oynayan motifleri tanımlamak için bilgisayar programlarının kullanılmasına yer vermiştir. Kapsamlı bir ikincil yapıya ve böylelikle antisens molekülün tavlama bölgesine yönelik potansiyel bölgelere sahip olmamış pre-mRNA bölgelerini tanımlamak için ayrıca diğer bilgisayar programları da kullanılmıştır. Bu yaklaşımların hiçbirisi, ekzon atlamasının güvenli ve etkin bir şekilde indüklenmesine yönelik antisens oligonükleotidler tasarlamada güvenilirliklerini tamamen ispat etmemiştir.

20

İlk planda uç-birleştirme prosesine katılan bilinen veya tahmin edilen motiflere veya bölgelere dayalı olarak inceleme yapmak için insan distrofin pre-mRNA'sı üzerinde tavlama bölgeleri seçildi. 2OMe antisens oligonükleotidler, incelenen hedef dizileri tamamlayacak şekilde tasarlandı ve bir Expedite 8909 Nükleik Asit Sentezleyici üzerinde sentezlendi. Sentez tamamlandıktan sonra, oligonükleotidler destek kolonundan ayrıldı, amonyum hidroksit içerisinde koruyucu grup uzaklaştırıldı ve ardından tuz giderme işlemi yapıldı. Oligonükleotid sentezinin kalitesi, sentez kaydında saptandığı şekilde sentez esnasında her koruyucu grup uzaklaştırma işlemi ardından tritil sinyallerinin büyüklüğüyle izlendi. Antisens oligonükleotid konsantrasyonu, 260 nm'de bir seyreltik alikotun absorbanı ölçülerek tahmin edildi.

30

Antisens molekülünün belirtilen miktarları daha sonra, aşağıda tarif edildiği şekilde bir *in vitro* analizinde ekzon atlama indükleyebilme özelliği yönünden test edildi.

Kısaca, normal primer miyoblast kültürleri, denek rızasıyla elde edilmiş insan kas biyopsilerinden hazırlandı. Hücreler yayıldı ve standart kültürleme teknikleri kullanılarak miyotüplere ayrılmaya bırakıldı. Hücreler daha sonra, oligonükleotidlerin katyonik lipopleksler, antisens molekülü karışımları veya katyonik lipozom preparatları olarak
5 aktarılması yoluyla antisens oligonükleotidleri ile transfekte edildi.

Hücreler daha sonra 24 saat daha büyümeye bırakıldı ve bu süre sonrasında toplam RNA ekstrakte edildi ve moleküler analize başlandı. Revers transkriptaz amplifikasyonu (RT-PCR) yapılarak distrofin pre-mRNA'sının hedeflenen bölgeleri veya indüklenmiş
10 ekzonik yeni düzenlemeler incelendi.

Örneğin, ekzon 19 atlamasının indüklenmesi yönünden bir antisens molekülünün test edilmesinde, RT-PCR testi ile çeşitli ekzonlar taranarak komşu ekzonların rolü saptandı. Örneğin, ekzon 19 atlaması indüklenirken, ekzonlar 17 ve 21 üzerinde
15 amplifiye olan primerler ile RT-PCR gerçekleştirildi. İndüklenerek atlatılmış daha kısa transkriptte doğru minimal düzeyde amplifikasyon yanlılığı olmasını sağlamak için bu alanda daha bile büyük olan ürünlerin (yani ekzonlar 13-26) amplifikasyonları yapıldı. Kısa veya ekzon atlatılmış ürünler daha etkin amplifiye olma eğilimi gösterir ve normal ve indüklenmiş transkript tahminini etkileyebilir.

20 Amplifikasyon reaksiyon ürünlerinin büyüklükleri bir agaroz jeli üzerinde tahmin edildi ve ilgili boyut standartlarına göre karşılaştırıldı. Doğrudan DNA dizileme yöntemiyle bu ürünlerin kimliğinin nihai teyidi yapılarak doğru veya beklenen ekzon birleşmelerinin muhafaza edilip edilmediği anlaşıldı.

25 Bir antisens molekülü ile etkin ekzon atlaması indüklendikten sonra, takip eden çıkan antisens molekülleri sentezlenebilir ve daha sonra yukarıda tarif edildiği şekilde analiz içerisinde değerlendirilebilir. Etkin antisens molekülü tanımımız, 300 nM veya altı mertebesindeki transfeksiyon konsantrasyonlarında güçlü ve sürekli ekzon atlaması
30 indükleyen bir moleküldür. En çok tercih edilen şekilde, mevcut buluşun oligonükleotid molekülleri, 100 nM'lik bir konsantrasyonda %30 daha fazla seviyelerde atlama indükleyebilmektedir.

Densitometri Yöntemleri

Hangi antisens moleküllerinin arzu edilen etkinliği elde ettiğini belirlemek için ekzon atlama prosedürlerinin sonuçlarının densitometri analizi gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri, %2 agaroz jelleri üzerinde, etidyum bromür ile boyandı ve bir Chemi-Smart 3000 jel dokümantasyon sistemi (Vilber Lourmat, Marne La Vallee) tarafından yakalanan görüntüler fraksiyone edildi. Bantlar daha sonra jel dokümantasyon sistemi kullanılarak analiz edildi (Bio-Profil, Bio-1D versiyon 11.9, Vilber Lourmat, Marne La Vallee).

Aşağıdaki antisens moleküller üzerinde densitometri gerçekleştirilmiştir:

10

Şekil 35

Ekzon 3	H3A(+30+60) & H3A(+61+85)
Ekzon 4	H4D(+14-11) & H4A(+11+40)
Ekzon 14	H14A(+32+61)
Ekzon 17	H17A(+10+35)
Ekzon 26	H26A(-07+19), H26A(+24+50) & H26A(+68+92)
Ekzon 36	H36A(-16+09) & H36A(+22+51)

Şekil 36

Ekzon 46	H46A(+81+109)
Ekzon 47	H47A(+01+29)
Ekzon 48	H48A(+01+28) & H48A(+40+67)
Ekzon 49	H49A(+45+70)

15 Ekzon 17'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 17'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

20

Aşağıdaki Tablo 2'den, iki antisens molekülünün bağlanma yeri üst üste binse de, aynı yere (ekzon 17 alıcı birleştirme sahası) yönelik antisens moleküllerin etkisinin çok farklı

olabildiği görülebilir. İntron 16 son 7 bazına ve ekzon 17'nin 23 bazına H17A(-07+23) [SEQ ID NO:3], 25nM'lik bir konsantrasyonda hücreye verildiği zaman ekzon 17 atlamasını indükler. Aksine, intron 16 son 12 bazına ve ekzon 17 ilk 18 bazına bağlanan ve dolayısıyla of H17A(-07+23), bağlanma yeri ile örtüşen antisens molekülü H17A(-12+18), ekzon atlamayı indükleyemez. Ayrıca, intron 16 son 7 bazına ve ekzon 17 ilk 16 bazına tavlanan H17A(-07+16), 200nM'de hem ekzon 17 hem de 18 atlamasına neden olmuştur. Ekzon 17'nin bir ekzon içi ekleme artırıcı motifine bağlanan antisens molekülü H17A(+61+86) [SEQ ID NO:4], aynı zamanda iyi bir atlamaya neden olabilir. Antisens moleküllerinin ekzon atlamalarını indükleme kabiliyetlerinin, bağlanma konumlarından basit bir şekilde tahmin edilemeyeceği ve sert testlerle belirlenebilmesi gerektiği görülebilir.

Tablo 2: Ekzon 17 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
H17A(-12 +18)	GGU GAC AGC CUG UGA AAU CUG UGA GAA GUA	Atlama yok
H17A(-07+23)	GUG GUG GUG ACA GCC UGU GAA AUC UGU GAG	25nM'de atlama
H17A(-07+16)	UGA CAG CCU GUG AAA UCU GUG AG	200nM'de ekzon 17+18 atlama
H17A(+10 +35)	AGU GAU GGC UGA GUG GUG GUG ACA GC	50nM'de atlama
H17A(+31+50)	ACA GUU GUC UGU GUU AGU GA	tutarsız atlama
H17A(+61+86)	UGU UCC CUU GUG GUC ACC GUA GUU AC	50nM'de atlama
H17A(+144+163)	CAG AAU CCA CAG UAA UCU GC	300nM'de atlama

15

Bu veriler, bazı özel antisens moleküllerinin etkili ekzon atlamalarını indüklediğini gösterirken, yakın veya örtüşen bir bölgeyi hedef alan başka bir antisens molekülü

daha az etkili olabilir. Titrasyon çalışmaları, bir molekülün 20-25 nM'de hedeflenen ekzon atlamalarını indükleyebildiğini gösterirken, daha az etkili bir antisens molekülün sadece 300 nM ve üzeri konsantrasyonlarda ekzon atlamalarını indükleyebildiğini göstermektedir. Dolayısıyla, antisens moleküllerinin birleştirme prosesine katılan motiflere hedeflenmesinin, bu bileşiğin genel etkinliğinde çok önemli bir rol oynadığını gösterdik.

Etkinlik, bir hedef ekzonun tutarlı bir şekilde atlanmasının indüklenme kabiliyetini ifade eder. Bununla birlikte, bazen hedef ekzonların atlanması sürekli olarak yan taraftaki bir ekzon ile ilişkilidir. Diğer bir deyişle bazı ekzonların birbirine yapışmasının sıkı bir şekilde bağlantılı olduğunu gördük. Örneğin, ekzon 23'ü, ekzonun donör bölgesinde yönlendirilmiş antisens molekülleri içeren fare distrofisi modelinde hedef alırken, sıklıkla 22 ve 23 ekzonlarının eksik olduğu distrofin transkripsiyonları tespit edilir. Başka bir örnek olarak, insan distrofin geninin ekzon 8'ine yönelen bir antisens molekülü kullanıldığında, birçok indüklü transkripsiyonda, hem ekzon 8 hem de 9 eksik değildir.

Ekzon 2'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 2'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 3: Ekzon 2 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

25

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
H2A(-14+10)	UCU CUU UCA UCU AAA AUG CAA AAU	Atlama yok
H2A(-1+23)	CUU UUG AAC AUC UUC UCU UUC AUC	Atlama yok
H2A(+7+38)	UUU UGU GAA UGU UUU CUU UUG AAC AUC UUC UC	Atlama yok

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H2A(+16+39)	AUU UUG UGA AUG UUU UCU UUU GAA	Atlama yok
H2A(+30+60)	UAG AAA AUU GUG CAU UUA CCC AUU UUG UGA A	Atlama yok
H2D(+19-11)	ACC AUU CUU ACC UUA GAA AAU UGU GCA UUU	Atlama yok
H2D(+03-21)	AAA GUA ACA AAC CAU UCU UAC CUU	Atlama yok

Ekzon 3'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 3'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Her biri tek başına kullanılan, antisens molekülleri H3A(+30+60) [SEQ ID NO: 31] ve H3A(+61+85) [SEQ ID NO: 32] ekzon 3 atlamasını indükler. Bununla birlikte, kombinasyon halinde, iki molekül atlamayı indüklemeye daha etkilidir (Şekil 3) ve ayrıca 300nM ve 600nM'de ekzonlar 4 ve 5 atlamasını indükleyebilirler. Bu tek başına her bir antisens molekülünün kullanım sonuçları ile görülmeyen veya tahmin edilemeyen bir sonuçtur. İndüklenen transkripsiyon eksik ekzon 3'ün üzerindeki ilave ürünler, RT-PCR'den taşınan dış primerler ve ayrıca heterodubleks oluşumu kaynaklı amplifikasyondan kaynaklanır.

Tablo 4: Ekzon 3 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H3A(+14+38)	AGG UCA CUG AAG AGG UUC UCA AUA U	10nM'de orta atlama

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklenme kabiliyeti
---------------------------------	------	--------------------------------

H3A(+20+40)	GUA GGU CAC UGA AGA GGU UCU	50nM'de güçlü atlama
-------------	--------------------------------	----------------------

H3A(+25+60)	AGG AGG CGU CUC CCA UCC UGU AGG UCA CUG AAG AG	Zayıf atlama
-------------	--	--------------

H3A(+45+65)	AGG UCU AGG AGG CGC CUC CCA	Atlama yok
-------------	--------------------------------	------------

H3A(+48+73)	CUU CGA GGA GGU CUA GGA GGC GCC UC	Atlama yok
-------------	---------------------------------------	------------

H3A(+61+85)	GCC CUG UCA GGC CUU CGA GGA GGU C	300nM'ye atlama
-------------	--------------------------------------	-----------------

H3D(+17-08)	uca cau acA GUU UUU GCC CUG UCA G	Atlama yok
-------------	--------------------------------------	------------

H3D(+19-02)	UAC AGU UUU UGC CCU GUC AGG	Atlama yok
-------------	--------------------------------	------------

H3D(+14-10)	AAG UCA CAU ACA GUU UUU GCC CUG	Atlama yok
-------------	------------------------------------	------------

H3D(+12-07)	UCA CAU ACA GUU UUU GCC C	Atlama yok
-------------	------------------------------	------------

**Ekzon 3 için
kokteyller**

H3A(+30+60)	UAG GAG GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G	100nM'ye mükemmel atlama, 10nM'ye atlama. Ayrıca 4 & 5'i 300nM'e çıkaram
-------------	---	--

H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GUC	
-------------	----------------------------------	--

H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GCC	50nM'ye çok güçlü atlama
-------------	-------------------	--------------------------

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklenme kabiliyeti
	UUC GAG GAG GUC	
H3A(+30+54)	GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G	
H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GAG GUC	50nM'ye çok güçlü atlama
	AGG AGG CGU CUC	
H3A(+25+60)	CCA UCC UGU AGG UCA CUG AAG AG	

Ekzon 4'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 4'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 4, ekzon 4'ün bir H4A(+11+40) [SEQ ID NO: 33] ve H4D(+14-11) [SEQ ID NO: 34] kokteyli kullanılarak atlamasını göstermektedir.

Tablo 5: Ekzon 4 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklenme kabiliyeti
H4A(-08+17)	GAU CCU UUU UCU UUU GGC UGA GAA C	10nM'ye zayıf atlama
H4A(+36+60)	CCG CAG UGC CUU GUU GAC AUU GUU C	10nM'ye iyi atlama
H4D(+14-11)	GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC UGC A	10nM'ye çok zayıf atlama

Ekzon 4 Kokteylleri

H4A(+11+40)	UGU UCA GGG CAU GAA	Mükemmel atlama (%)	100
-------------	---------------------	---------------------	-----

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H4D(+14-11)	CUC UUG UGG AUC CUU GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC UGC A	100nM'ye) ve 5nM'ye kadar iyi atlama

Ekzon 5'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

- Ekzon 5'e yönelen antisens oligonükleotidler, yukarıda tarif edilen benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye kabiliyetleri için hazırlanmış ve test edilmiştir. H5D(+26-05), düşük seviyeli ekzon 5 atlama indüklenmediğinden, tercih edilmeyen bir antisens molekülü olarak kabul edilecektir. Bununla birlikte, muhtemelen bir ekzonik birleşme artırıcıyı hedefleyen H5A(+35+65) [SEQ ID NO: 1] değerlendirildi ve Şekil 5'de gösterildiği gibi, bu hedef ekzonun atlama indüklenmesinde yüksek derecede verimli olduğu ve indüklenen ekzon 5 atlama için tercih edilen bileşik olarak kabul edildiği bulunmuştur.

Tablo 6: Ekzon 5 atlama indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H5A(+35+65)	AAA CCA AGA GUC AGU UUA UGA UUU CCA UCU A	10nM'ye büyük atlama
H5D(+26-05)	CUU ACC UGC CAG UGG AGG AUU AUA UUC CAA A	Atlama yok

Ekzon 6'ya Yönelen Antisens Oligonükleotidler

- Ekzon 6'ya yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 7: Ekzon 6 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
H6A(-09+17)	UUC AUU ACA UUU UUG ACC UAC AUG UG	600nM'ye zayıf
H6A(+32+57)	CUU UUC ACU GUU GGU UUG UUG CAA UC	25nM'de atlama
KH9 6A(+66+94)	AAU UAC GAG UUG AUU GUC GGA CCC AGC UC	25nM'de atlama
H6A(+69+96)	AUA AUU ACG AGU UGA UUG UCG GAC CCA G	100nM'ye atlama
H6A(+98+123)	GGU GAA GUU GAU UAC AUU AAC CUG UG	Atlama yok
H6D(+18-06)	UCU UAC CUA UGA CUA UGG AUG AGA	Atlama yok
H6D(+07-15)	CAG UAA UCU UCU UAC CUA UGA C	Atlama yok
H6D(+07-16)	UCA GUA AUC UUC UUA CCU AUG AC	Atlama yok
H6D(+04-20)	UGU CUC AGU AAU CUU CUU ACC UAU	Atlama yok

5 **Ekzon 7'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler**

Ekzon 7'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indükleme yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 8: Ekzon 7 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H7A(-07+15)	UCA AAU AGG UCU GGC CUA AAA C	Atlama yok
H7A(-03+18)	CCA GUC AAA UAG GUC UGG CCU A	Atlama yok
H7A(+41+63)	UGU UCC AGU CGU UGU GUG GCU GA	atlama 50nM
H7A(+41+67)	UGC AUG UUC CAG UCG UUG UGU GGC UGA	atlama 25nM
H7A(+47+74)	UGU UGA AUG CAU GUU CCA GUC GUU GUG U	atlama 25nM ancak zayıf
H7A(+49+71)	UGA AUG CAU GUU CCA GUC GUU GU	25 nM'ye iyi atlama

Ekzon 8'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

- 5 Ekzon 8'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 6'ya bakınız.

10 Tablo 9: Ekzon 8 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H8A(-10+20)	UGG AUA GGU GGU AUC AAC AUC UGU AAG CAC	10nM'ye çok zayıf 8 + 9 atlama
H8A(-07+15)	GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG U	10nM'ye çok çok zayıf 8 + 9 atlama

Antisens	Dizi	Atlamayı indüklenme kabiliyeti
Oligonükleotid ismi		
	UAU CUG GAU AGG	
H8A(-06+24)	UGG UAU CAA CAU CUG UAA	10nM'ye zayıf 8 + 9 atlama
H8A(-04+18)	GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG U	40nM'ye güçlü çalışır
H8A(+42+66)	AAA CUU GGA AGA GUG AUG UGA UGU A	10nM'ye iyi 8 + 9 atlama
H8A(+57+83)	GCU CAC UUG UUG AGG CAA AAC UUG GAA	10nM'ye kadar yüksek konsantrasyonda 8 + 9 iyi atlama
HBA(+96+120)	GCC UUG GCA ACA UUU CCA CUU CCU G	300nM'ye zayıf 8 + 9 atlama
H8A(+134+158)	AUG UAA CUG AAA AUG UUC UUC UUU A	100nM'ye zayıf 8 + 9 atlama
HBD(+13-12)	UAC ACA CUU UAC CUG UUG AGA AUA G	50nM'ye zayıf 8 + 9 atlama

Ekzon 8 Kokteylleri

	UAU CUG GAU AGG	
H8A(-06+24)	UGG UAU CAA CAU CUG UAA	10nM'ye (8+9) iyi atlama ancak 8 tek başına
H8A(+134+158)	AUG UAA CUG AAA AUG UUC UUC UUU A	
H8A(-06+24)	UAU CUG GU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA	10nM'ye (8+9) iyi atlama ancak 8 tek başına
H8D(+13-12)	UAC ACA CUU UAC CUG UUG AGA AUA G	
H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG	10nM'ye (8+9) iyi atlama ancak 8 tek başına

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklenme kabiliyeti
	UAA	
H8A(+57+83)	GCU CAC UUG UUG AGG CAA AAC UUG GAA	
H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA	10nM'ye (8+9) iyi atlama ancak 8 tek başına
H8A(+96+120)	GCC UUG GCA ACA UUU CCA CUU CCU G	

Ekzon 9'a Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 9'a yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 10: Ekzon 9 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

.Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklenme kabiliyeti
H9A(+154+184)	AGC AGC CUG UGU GUA GGC AUA GCU CUU GAA U	100nM'ye güçlü çalışır
H9D(+26-04)	AGA CCU GUG AAG GAA AUG GGC UCC GUG UAG	200nM'ye güçlü çalışır

Ekzon 10'a Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 10'a yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir. Tek bir antisens oligonükleotid molekülü ve ekzon 10 ve çevredeki ekzonların atlamasını indükleyen kokteyller için Şekil 7'ye bakınız. Tekli antisens oligonükleotid molekülü H10A(-05+16) [SEQ ID NO: 37], ekzon 9-14'ün

atlamasını indüklerken, H10A(+98+119) [SEQ ID NO: 38] ile kombinasyonu sadece ekzon 10 atlama ve 9-12 ekzonların (ve bazı 10-12 ekzonlar) atlamasını indükler. H10A(-05+16) ve H10A(+130+149) kombinasyonu ekzon 10 ve ekzon 9-12 atlamasını indüklemiştir.

5

Tablo 11: Ekzon 10 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

.Antisens Oligonükleotid Dizi ismi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
H10A(-09+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU Atlama yok GCA CAA U
H10A(+08+27)	UGA CUU GUC UUC AGG AGC Atlama yok UU
H10A(+21+42)	CAA UGA ACU GCC AAA UGA 100nM'de atlama CUU G
H10A(+27+51)	ACU CUC CAU CAA UGA ACU Atlama yok GCC AAA U
H10A(+55+79)	CUG UUU GAU AAC GGU CCA Atlama yok GGU UUA C
H10A(+80+103)	GCC ACG AUA AUA CUU CUU Atlama yok CUA AAG
H10D(+16-09)	UUA GUU UAC CUC AUG AGU Atlama yok AUG AAA C
Ekzon 10 Kokteyller	
H10A(-05+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA
H10A(+98+119)	UCC UCA GCA GAA AGA AGC 200nM'de güçlü atlama CAC G
H10A(-05+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA
H10A(+130+149)	UUA GAA AUC UCU CCU UGU 200nM'de atlama

**.Antisens Oligonükleotid Dizi
ismi**

**Atlamayı indüklemeye
kabiliyeti**

GC

Ekzon 11'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 11'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Bakınız Şekil 37.

Tablo 12: Ekzon 11 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

.Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H11A(-07+13)	CCA UCA UGU ACC CCU GAC AA	300nM'de atlama
H11A(+134+157)	CCC UGA GGC AUU CCC AUC UUG AAU	100nM'de atlama
H11A(+20+45)	AUU ACC AAC CCG GCC CUG AUG GGC UG	25nM'ye atlama
H11A(+46+75)	UCC AAU CAG CUU ACU UCC CAA UUG UAG AAU	25nM'ye güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf
H11A(+50+75)	UCC AAU CAG CUU ACU UCC CAA UUG UA	10 nM'ye güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf
H11A(+50+79)	CUG UUC CAA UCA GCU UAC UUC CCA AUU GUA	5 nM'ye güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf
H11A(+80+105)	AGU UUC UUC AUC UUC UGA UAA UUU UC	25nM'ye zayıf atlama
H11A(+106+135)	AUU UAG GAG AUU CAU CUG CUC UUG UAC UUC	25nM'ye güçlü atlama (%20)
H11A(+110+135)	AUU UAG GAG AUU CAU CUG	25nM'ye güçlü atlama

.Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklemeye
	CUC UUG UA	(%20)	
H11A(+110+139)	UUG AAU UUA GGA GAU UCA UCU GCU CUU GUA	25nM'ye (%20)	güçlü atlama

Ekzon 12'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 12'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 38'e bakınız.

Tablo 13: Ekzon 12 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklemeye
	CAU AAG AUA CAC CUA CCU		
H12D(+06-16)	UAU G	Atlama yok	
	UCU UCU GUU UUU GUU		
H12A(+52+75)	AGC CAG UCA	Güçlü atlama	
	CAG UCA UUC AAC UCU UUC	10nM'ye güçlü atlama 2.5	
H12A(+30+57)	AGU UUC UGA U	nM'de zayıf	
	UUC CUU GUU CUU UCU	25nM'ye güçlü atlama 5	
H12A(+60+87)	UCU GUU UUU GUU A	nM'de zayıf	
	AGA UCA GGU CCA AGA GGC	25nM'ye güçlü atlama	
H12A(+90+117)	UCU UCC UCC A	(%30)	
	UGU UGU UGU ACU UGG	25nM'ye güçlü atlama	
H12A(+120+147)	CGU UUU AGG UCU U	(%30)	

10

Ekzon 13'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 13'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler

gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 14: Ekzon 13 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid Dizi ismi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H13A(-12+12)	UUC UUG AAG CAC CUG AAA GAU AAA

Ekzon 14'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 14'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 8'e bakınız.

Tablo 15: Ekzon 14 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H14A(+45 +73)	GAA GGA UGU CUU GUA AAA GAA CCC AGC GG	25nM'de atlama

Ekzon 16'ya Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 16'ya yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 16: Ekzon 16 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid Dizi ismi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
-----------------------------------	---------------------------------

Antisens Oligonükleotid Dizi ismi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
H16A(-07+19)	CUA GAU CCG CUU UUA AAA CCU GUU AA	Atlama yok
H16A(+09+31)	GCU UUU UCU UUU CUA GAU CCG CU	Atlama yok
H16D(+18-07)	CAC UAA CCU GUG CUG UAC UCU UUU C	Atlama yok

Ekzon 17'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 17'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 64: Ekzon 17 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
H17A(+48+78)	UGU GGU CAC CGU AGU UAC UGU UUC CAU UCA A	Atlama yok	
H17A(+55+85)	GUU CCC UUG UGG UCA CCG UAG UUA CUG UUU C	100nM'ye atlama	

10

Ekzon 18'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

15 Ekzon 18'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 9'a bakınız.

Tablo 17: Ekzon 18 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H18A(-09+11)	CAA CAU CCU UCC UAA GAC UG	Atlama yok
H18A(+24+43)	GCG AGU AAU CCA GCU GUG AA	Ekzon 17 + 18'de tutarsız atlama
H18A(+41 +70)	UUC AGG ACU CUG CAA CAG AGC UUC UGA GCG	Ekzon 17+18 atlama 300nM
H18A(+83+108)	UUG UCU GUG AAG UUG CCU UCC UUC CG	Ekzon 17+18 atlama 300nM
H18D(+04-16)	UUA AUG CAU AAC CUA CAU UG	Atlama yok

Ekzon 19'a Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 19'a yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 18: Ekzon 19 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H19A(+19+48)	GGC AUC UUG CAG UUU UCU GAA CUU CUC AGC	25nM'ye atlama
H19A(+27+54)	UCU GCU GGC AUC UUG CAG UUU UCU GAA C	25nM'ye atlama
H19D(+3-17)	UCA ACU CGU GUA AUU ACC GU	atlama

Ekzon 20'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 20'ye yönelik antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

- 5 Tablo 19: Ekzon 20 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid Dizi ismi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H20A(+23+47)	GUU CAG UUG UUC UGA GGC 600 nM'de zayıf atlama UUG UUU G
H20A(+140+164)	AGU AGU UGU CAU CUG CUC Atlama yok CAA UUG U

Ekzon 23'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

- 10 Ekzon 23'e yönelik antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Ekzon 23'e yönelik antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.
- 15 H23(+69+98)-SNP, daha önce belgelenmiş olan tek bir nükleotit polimorfizmini (SNP) içerir.

Tablo 65: Ekzon 23 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H23(+69+98)-SNP	CGG CUA AUU UCA GAG GGC GCU UUC UUU GAC	25nM'ye atlama

20

Ekzon 24'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 24'e yönelik antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler

gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

5 Tablo 20: Ekzon 24 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H24A(+51 +73)	CAA GGG CAG GCC AUU CCU CCU UC	25 nM'de güçlü atlama

Ekzon 25'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

10 Ekzon 25'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Oligonükleotid H25A(+95+119)-DupA, hastaya özgü bir antisens moleküldür.

15 Tablo 21: Ekzon 25 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H25A(+10+34)	UGG GCU GAA UUG UCU GAA UAU CAC	25nM'de güçlü ama tam uzunlukta ürünü azaltmadı
H25D(+06-14)	GAG AUU GUC UAU ACC UGU UG	25nM'de çok güçlü atlama
H25A(+10+38)	AGA CUG GGC UGA AUU GUC UGA AUA UCA CU	5 nM'de güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf
H25A(+95+119)-DupA*	UUG AGU UCU GUU CUC AAG UCU CGA AG	25 nM'de güçlü atlama 5 nM'de zayıf (hasta spesifik)
H25D(+13-14)	GAG AUU GUC UAU ACC UGU UGG CAC AUG	10 nM'de güçlü atlama

Ekzon 26'ya Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 26'ya yönelik antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 10'a bakınız.

5

Tablo 22: Ekzon 26 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklemeye
H26A(-16+09)	GGC AUA GAC CUU CCA CAA AAC AAA C	600 nM & 300 nM'de atlama	zayıf
H26A(-7+23)	AAG GCC UCC UUU CUG GCA UAG ACC UUC CAC	600, 300nM'de ekzon 26-29 veya 27-30	zayıf, çoklu
H26A(-03+27)	CUU CAA GGC CUC CUU UCU GGC AUA GAC CUU	600, 300nM'de ekzon 26-29 veya 27-30	zayıf, çoklu
H26A(+5+35)	AAC CUC CCU UCA AGG CCU CCU UUC UGG CAU	Atlama yok	
H26A(+24+50)	CUU ACA GUU UUC UCC AAA CCU CCC UUC	600, 300nM'de ekzon 26-29 veya 27-30	zayıf, çoklu
H26D(+06-19)	UUU CUU UUU UUU UUU UUA CCU UCA U	600'de 29 veya 27-30	zayıf, çoklu ekzon 26-
H26D(+21-04)	UUA CCU UCA UCU CUU CAA CUG CUU U	çoklu ekzon 26-29 veya 27-30	
H26D(+10-10)	UUU UUU UUA CCU UCA UCU CU	26 diğer bantta atlama yok	

Ekzon 26 kokteylleri

H26A(-07+19)	CCU CCU UUC UGG CAU AGA CCU UCC AC	25nM'ye doğru güçlü atlama
H26A(+24+50)	CUU ACA GUU UUC UCC AAA CCU CCC UUC	

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
H26A(+68+92)	UGU GUC AUC CAU UCG UGC AUC UCU G		

Ekzon 31'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 31'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 23: Ekzon 31 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
H31D(+12-18)	UUC UGA AAU UUC AUA UAC CUG UGC AAC AUC	100nM'ye atlama	
H31D(+08-22)	UAG UUU CUG AAA UAA CAU AUA CCU GUG CAA	100nM'ye atlama	
H31D(+06-24)	CUU AGU UUC UGA AAU AAC AUA UAC CUG UGC	100nM'ye atlama	
H31 D(+02-22)	UAG UUU CUG AAA UAA CAU AUA CCU	100nM'ye atlama	
H31D(+01-25)	CCU UAG UUU CUG AAA UAA CAU AUA CC	300nM'de güçlü atlama	

10

Ekzon 32'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

15 Ekzon 32'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 24: Ekzon 32 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
H32A(+49+78)	ACU UUC UUG UAG ACG CUG CUC AAA AUU GGC	100nM'ye atlama

Ekzon 34'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5

Ekzon 34'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indükleme yetenekleri açısından test edilmiştir.

10 Tablo 25: Ekzon 34 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
H34A(+36+59)	UUU CGC AUC UUA CGG GAC AAU UUC	200nM'ye atlama
H34A(+41+70)	CAU UCA UUU CCU UUC GCA UCU UAC GGG ACA	200nM'ye atlama
H34A(+43+72)	GAC AUU CAU UUC CUU UCG CAU CUU ACG GGA	100nM'ye atlama
H34A(+51+83)	UCU GUC AAG ACA UUC AUU UCC UUU CGC AUC	200nM'ye atlama
H34A(+91+120)	UGA UCU CUU UGU CAA UUC CAU AUC UGU AGC	100nM'ye atlama
H34A(+92+121)	CUG AUC UCU UUG UCA AUU CCA UAU CUG UGG	100nM'ye atlama
H34A(+95+120)	UGA UCU CUU UGU CAA UUC CAU AUC UG	25nM'de zayıf

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H34A(+95+124)	CUG CUG AUC UCU UUG UCA AUU CCA UAU CUG	100nM'ye atlama

Ekzon 35'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 35'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 26: Ekzon 35 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H35A(+14+43)	UCU UCA GGU GCA CCU UCU GUU UCU CAA UCU	100nM'ye atlama
H35A(+24+53)	UCU GUG AUA CUC UUC AGG UGC ACC UUC UGU	100nM'ye atlama

10

Ekzon 36'ya Yönelen Antisens Oligonükleotidler

15 Ekzon 36'ya yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 11'e bakınız.

Tablo 27: Ekzon 36 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H36A(-16+09)	CUG GUA UUC CUU AAU UGU ACA GAG A	Atlama yok

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indükleme
H36A(-01+19)	CCA UGU GUU UCU GGU AUU CC	300 nM çok zayıf atlama	
H36A(+10+39)	CAC AUU CUG GUC AAA AGU UUC CAU GUG UUU	25nM'ye atlama	
H36A(+22+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU	100nM'de atlama	
H36A(+27+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC A	100nM'de atlama	
H36A(+27+56)	CAC UUU GUG AUG UGG UCC ACA UUC UGG UCA	300nM'de atlama	
H36A(+32+61)	UGA UCC ACU UUG UGA UGU GGU CCA CAU UCU	25nM'ye atlama	
H36A(+59+78)	AAG UGU GUC AGC CUG AAU GA	çok zayıf atlama	
H36A(+65+94)	UCU CUG AUU CAU CCA AAA GUG UGU CAG CCU	600nM'de %100 atlama, 25nM'de atlama	
H36A(+80+109)	GCU GGG GUU UCU UUU UCU CUG AUU CAU CCA	600nM'de %100 atlama, 25nM'de atlama	
H36D(+15-10)	UAU UUG CUA CCU UAA GCA CGU CUU C	çok zayıf atlama	

Ekzon 36 kokteylleri

H36A(-16+09)	CUG GUA UUC CUU AAU UGU ACA GAG A		
H36A(+22+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU	25nM'ye iyi atlama	

Ekzon 38'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 38'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 28: Ekzon 38 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid Dizi ismi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H38A(-21-01)	CUA AAA AAA AAG AUA GUG 25nM'ye atlama CUA
H38A(-12+14)	AAA GGA AUG GAG GCC UAA 25nM'ye atlama AAA AAA AG
H38D(+14-11)	AAC CAA UUU ACC AUA UCU 25nM'ye atlama UUA UUG A

Ekzon 39'a Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 39'a yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 29: Ekzon 39 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
H39A(-07+23)	ACA GUA CCA UCA UUG UCU	600nM'ye atlama UCA UUC UGA UC
H39A(-07+23)	ACA GUA CCU UCA UUG UCU	600nM'ye atlama UCA UUC UGA UC
H39A(+58+87)	CUC UCG CUU UCU CUC AUC	100nM'ye atlama

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
	UGU GAU UCU UUG	
H39A(+60+89)	UCC UCU CGC UUU CUC UCA UCU GUG AUU CUU	100nM'ye atlama
H39A(+102+126)	UAU GUU UUG UCU GUA ACA GCU GCU G	600nM'ye atlama

Ekzon 41'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 41'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 30: Ekzon 41 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
H41A(-15+5)	AUU UCC UAU UGA GCA AAA CC	200nM'e aşağı doğru atlama
H41A(+66+90)	CAU UGC GGC CCC AUC CUC AGA CAA G	100nM'e aşağı doğru atlama
H41A(+92+120)	GCU GAG CUG GAU CUG AGU UGG CUC CAC UG	10nM'e aşağı doğru atlama
H41A(+143+171)	GUU GAG UCU UCG AAA CUG AGC AAA UUU GC	Görülen bir atlama yok
H41 D(+5-15)	CCA GUA ACA ACU CAC AAU UU	200nM'e aşağı doğru atlama

10

Ekzon 42'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 42'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler

gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

5 Tablo 31: Ekzon 20 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens ismi	Oligonükleotid Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklemeye
Ekzon 42			
H42D(+18-02)	ACC UUC AGA GAC UCC UCU UGC	Güçlü atlama	

Ekzon 43'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

10 Ekzon 43'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 12'ye bakınız.

Tablo 32: Ekzon 20 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklemeye
Ekzon 43			
H43A(+83+110)	UCC UGU AGC UUC ACC CUU UCC ACA GGC G	Atlama yok	
H43A(+92 +117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU	10nM'de atlama	
H43A(+101 +130)	AAU CA GCU GGG AGA GAG CUU CCU GUA GCU	Atlama yok	
H43D(+08-12)	UGU GUU ACC UAC CCU UGU CG	200nM'e atlama	aşağı doğru
H43A(-09+18)	UAG ACU AUC UUU UAU AUU CUG UAA UAU	Düşük 25nM'ye atlama	

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklemeye
Ekzon 43			
H43A(+89+117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UUC CA	25 nM'de güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf	
H43A(+81+111)	UUC CUG UAG CUU CAC CCU UUC CAC AGG CGU U	50 nM'de güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf	
H43A(+92+114)	AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU	2.5 nM'ye zayıf atlama	
H43A(+92+120)	GGA GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU	10 nM'de güçlü atlama 5 nM'de zayıf	
H43A(+95+117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CC	25 nM'de güçlü atlama 10 nM'de zayıf	

Ekzon 44'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 44'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler
5 gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye
yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 13 ve Şekil 39'a bakınız.

Tablo 33: Ekzon 44 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen
antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 44		
H44A(-13+13)	UCU GUC AAA UCG CCU GCA GGU AAA AG	
H44A(-06+24)	UUC UCA ACA GAU CUG UCA AAU CGC CUG CAG	Atlama yok
H44A(+44+68)	GCC ACU GAU UAA AUA UCU UUA UAU	100nM'de atlama

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 44		
	C	
H44A(+46+75)	UCU GUU AGC CAC UGA UUA AAU AUC UUU AUA	50nM'de atlama
H44A(+61 +84)	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA	100nM'de atlama
H44A(+61+91)	GAG AAA CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG A	25nM'de atlama
H44A(+65+90)	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA	10nM'de atlama
H44A(+68+98)	UCU UUC UGA GAAACU GUU CAG CUU CUG UUA G	50nM'de zayıf
H44A(-09+17)	CAG AUC UGU CAA AUC GCC UGC AGG UA	10nM'ye zayıf atlama
H44A(-06+20)	CAA CAG AUC UGU CAA AUC GCC UGC AG	2.5nM'ye zayıf atlama
H44A(+56+88)	AAA CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG AUU AAA_ _ _ _ _	5nM'de güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf
H44A(+59+85)	CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG AUU	5nM'de güçlü atlama
H44A(+59+89)	GAA ACU GUU CAG CUU CUG UUA GCC ACU GAU U	10nM'de zayıf atlama
H44A(+61+88)	AAA CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG A	25nM'ye zayıf atlama
H44A(+65+92)	UGA GAAACU GUU CAG CUU CUG UUA GCC A	25nM'ye zayıf atlama

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 44		
H44A(+64+95)	UUC UGA GAA ACU GUU CAG CUU CUG UUA GCCA C	25nM'ye atlama zayıf
H44A(+70+95)	UUC UGA GAA ACU GUU CAG CUU CUG UU	50 nM'ye atlama zayıf

Ekzon 45'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 45'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler
5 gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye
yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 14 ve Şekil 40'a bakınız.

Tablo 34: Ekzon 45 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen
antisens molekül dizileri

10

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 45		
H45A(-14+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AG	Çoklu bant üretir
H45A(-10 +20)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA	10nM'de atlama
H45A(-09+30)	UUG CCG CUG CCC AAU GCC AUC CUG GAG UUC CUG UAA GAU	Atlama yok

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 45		
H45A (-09+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U	10nM'de atlama (%100 25nM'de atlama)
H45A(-08 +19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA	50nM'de atlama
HM45A(-07+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AG	25nM'de atlama
H45A(+09 +34)	CAG UUU GCC GCU GCC CAA UGC CAU CC	Atlama yok
H45A(+41 +64)	CUU CCC CAG UUG CAU UCA AUG UUC	Atlama yok
H45A(+76 +98)	CUG GCA UCU GUU UUU GAG GAU UG	Atlama yok
H45D(+02-18)	UUA GAU CUG UCG CCC UAC CU	Atlama yok
H45A(-14+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC CAA	
H45A(-12+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	5nM'de güçlü atlama 2.5 nM zayıf
H45A(-12+13)	CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	Atlama yok
H45A(-12+16)	UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	25 nM'de güçlü atlama 5 nM zayıf
H45A(-09+16)	UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U	10nM'ye atlama
H45A(-09+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU	25 nM'de güçlü

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 45		
	GUA AGA U	atlama 2.5 nM zayıf
H45A(-09+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U	10 nM'de güçlü atlama 5 nM zayıf
H45A(-09+30)	UUG CCG CUG CCC AAU GCC AUC CUG GAG UUC CUG UAA GAU	5 nM'de güçlü atlama 2.5 nM zayıf
HM45A(-07+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AG	2.5 nM'de güçlü atlama
H45A(-06+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA A	5nM'de güçlü atlama 2.5 nM zayıf
H45A(-06+28)	GCC GCU GCC CAA UGA CAU CCU GGA GUU CCU GUA A	2.5 nM'de güçlü atlama
H45A(-03+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	5nM'de güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf
H45A(-03+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	10 nM'de güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf
H45A(-03+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	2.5 nM'de güçlü atlama
H45A(-03+28)	GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	10 nM'de güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf
H45D(+10-19)	AUU AGA UCU GUC GCC CUA CCU CUU	Atlama yok

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 45		
	UUU UC	
H45D(+16-11)	UGU CGC CCU ACC UCU UUU UUC UGU CUG	Atlama yok
H45A(-06+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA A	2.5 nM'de güçlü atlama
H45A(-12+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	25 nM'de güçlü atlama

Ekzon 46'ya Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 46'ya yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 15 ve Şekil 44'e bakınız.

Tablo 35: Ekzon 46 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 46		
H46A(-05+19)	AUU CUU UUG UUC UUC UAG CCU GGA	Atlama yok
H46A(+16+42)	UCU CUU UGA AAU UCU GAC AAG AUA UUC	25nM'ye atlama, diğer bantlar
H46A(+27+44)	UUA AAU CUC UUU GAA AUU CU	Atlama yok
H46A(+35+60)	AAA ACA AAU UCA UUU AAA UCU CUU UG	50 nM'ye çok zayıf atlama

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indükleme
Ekzon 46			
H46A(+56+77)	CUG CUU CCU CCA ACC AUA AAA C	Atlama yok	
H46A(+63+87)	GCA AUG UUA UCU GCU UCC UCC AAC C	Atlama yok	
H46A(+81+109)	UCC AGG UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU GU	25nM'de güçlü atlama	
H46A(+83+103)	UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU	25nM'de atlama	
H46A(+90+109)	UCC AGG UUC AAG UGG GAU AC	Atlama yok	
H46A(+91+118)	CUG CUC UUU UCC AGG UUC AAG UGG GAU A	25nM'de güçlü atlama	
H46A(+95+122)	GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU CAA GUG G	25nM'de güçlü atlama	
H46A(+101+128)	CUU UUA GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU C	25nM'de güçlü atlama	
H46A(+113+136)	AAG CUU UUC UUU UAG UUG CUG CUC	100nM'de atlama	
H46A(+115+134)	GCU UUU CUU UUA GUU GCU GC	100nM'de atlama	
H46A(+116+145)	GAC UUG CUC AAG CUU UUC UUU UAG UUG CUG	25nM'de güçlü atlama	
H46D(+02-18)	UUC AGA AAA UAA AAU UAC CU	Atlama yok	
H46A(+93+122)	GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU CAA GUG GGA	25 nM'de %100 atlama 5 nM'de güçlü	
H46A(+95+124)	UAG UUG CUG CUC UUU UCC	25 nM'de %100 atlama	

Antisens	Dizi	Atlamayı	indükleme
Oligonükleotid ismi		kabiliyeti	

Ekzon 46

AGG UUC AAG UGG

44 ila 46 Ekzonlara Yönelen Antisens Oligonükleotid Kokteyller

5 Ekzon 44 ila 46'ya yönelik antisens oligonükleotid kokteylleri hazırlanmış ve yukarıda tarif edilen benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlamalarını uyarma yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 36: Ekzon 44 ila 45 atlamayı indükleyen antisens molekül dizisi kokteylleri

Antisens	Oligonükleotid Dizi	Atlamayı indükleme
ismi		kabiliyeti

44 + 45 atlama için kokteyller

H44A(+65 +90)	AGA AAC UGU UCA GCU UCU GUU AGC CA
H45A(-10 +20)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU 25nM'de atlama UCC UGU AAG AUA

Ekzon 45 ve 46 atlama için kokteyller

H45A(-10 +20)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA
H46A(+91 +118)	CUG CUC UUU UCC AGG UUC 25nM'de atlama AGG UGG GAU A
H45A(-10 +20)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA
H46A(+107 +137)	CAA GCU UUU CUU UUA GUU 25nM'de atlama GCU GCU CUU UUC C

Antisens	Oligonükleotid Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
ismi		

44 + 45 atlama için kokteyller

Ekzon 44 /45/46 atlama için kokteyller

H45A(-10 +20)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA	
H44A(+65 +90)	AGA AAC UGU UCA GCU UCU GUU AGC CA	
H46A(+91 +118)	CUG CUC UUU UCC AGG UUC AGG UGG GAU A	25nM'de atlama

Ekzon 47'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

- 5 Ekzon 47'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 16'ya bakınız.

10 Tablo 37: Ekzon 47 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Oligonükleotid ismi		

Ekzon 47

H47A(-07+19)	GCA ACU CUU CCA CCA GUA ACU GAA AC	100nM'de atlama
H47A(+01+29)	UGG CGC AGG GGC AAC UCU UCC ACC AGU AA	25nM'de güçlü atlama
H47A(+44+70)	GCA CGG GUC CUC CAG	600nM'de atlama

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 47		
	UUU CAU UUA AUU	
H47A(+68+92)	GGG CUU AUG GGA GCA CUU ACA AGC A	Atlama yok
H47A(+73+103)	CUU GCU CUU CUG GGC UUA UGG GAG CAC UUA C	Atlama yok
H47A(+76+103)	CUU GCU CUU CUG GGC UUA UGG GAG CAC U	200nM'de zayıf atlama, tam uzunlukta ürün azaltılmadı
H47D(+17-10)	AAU GUC UAA CCU UUA UCC ACU GGA GAU	Atlama yok

Ekzon 48'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

- 5 Ekzon 48'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indükleme yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 17'ye bakınız.

Tablo 38: Ekzon 48 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 48		
H48A(-09+21)	CUC AGG UAA AGC UCU GGA AAC CUG AAA GGA	Atlama yok
H48A(-08+19)	CAG GUA AAG CUC UGG AAA CCU GAA AGG	Atlama yok
H48A(-07+23)	UUC UCA GGU AAA GCU CUG GAA ACC UGA AAG	600, 300nM'de atlama
H48A(-05+25)	GUU UCU CAG GUA AAG CUC	Atlama yok

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 48		
	UGG AAA CCU GAA	
H48A(+01+28)	CUU GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA C	50 nM'ye zayıf
H48A(+07+33)	UUC UCC UUG UUU CUC AGG UAA AGC UCU	50 nM'ye zayıf
H48A(+40+67)	CAA GCU GCC CAA GGU CUU UUA UUU GAG C	Atlama yok (sporadik)
H48A(+75+100)	UUA ACU GCU CUU CAA GGU CUU CAA GC	1000 nM'ye zayıf
H48A(+96+122)	GAU AAC CAC AGC AGC AGA UGA UUU AAC	Atlama yok
H48D(+17-10)	AGU UCC CUA CCU GAA CGU CAA AUG GUC	Atlama yok
H48D(+16-09)	GUU CCC UAC CUG AAC GUC AAA UGG U	Atlama yok
Kokteyl 48		
H48A(+01+28)	CUU GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA C	25 nM'de güçlü atlama
H48A(+40+67)	CAA GCU GCC CAA GGU CUU UUA UUU GAG C	

Ekzon 49'a Yönelen Antisens Oligonükleotidler

- 5 Ekzon 49'a yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indükleme yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 18'e bakınız.

Tablo 39: Ekzon 49 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid Dizi ismi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 49	
H49A(-07+19)	GAA CUG CUA UUU CAG UUU 100nM'ye atlama CCU GGG GA
H49A(+22+47)	AUC UCU UCC ACA UCC GGU 25nM'ye atlama UGU UUA GC
H49A(+45+70)	ACA AAU GCU GCC CUU UAG 25nM'ye atlama ACA AAA UC
H49D(+18-08)	UUC AUU ACC UUC ACU GGC 100nM'ye atlama UGA GUG GC

Ekzon 50'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5

Ekzon 50'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indükleme yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 19 ve 33'e bakınız.

10 Tablo 40: Ekzon 50 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 50		
H50A(-07+20)	CUC AGA UCU UCU AAC UUC CUC UUU AAC	Zayıf atlama 25 nM
H50A(-02+27)	CUC AGA GCU CAG AUC UUC UAA CUU CCU CU	Zayıf atlama 100 nM
H50A(+10+36)	CGC CUU CCA CUC AGA GCU CAG	25'e zayıf atlama

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 50		
	AUC UUC	
H50A(+35+61)	UCA GCU CUU GAA GUA AAC GGU UUA CCG	25nM'ye güçlü atlama
H50A(+42+68)	UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU AAA CGG	25nM'ye makul atlama
H50A(+48+74)	GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU	25 nM'de güçlü atlama
H50A(+63+88)	CAG GAG CUA GGU CAG GCU GCU UUG CC	25nM'ye güçlü atlama
H50A(+81+105)	UCC AAU AGU GGU CAG UCC AGG AGC U	
H50D(-01-27)	AAA GAG AAU GGG AUC CAG UAU ACU UAC	Zayıf atlama 100 nM
H50D(-15-41)	AAA UAG CUA GAG CCA AAG AGA AUG GGA	Atlama yok
H50A(+42+74)	GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU AAA CGG	10nM'ye güçlü atlama 5 nM'de zayıf
H50A(+46+75)	AGG CUG CUU UGC CCU CAG CUC UUG AAG UAA	25nM'ye güçlü atlama 10 nM'de zayıf
H50A(+48+78)	GUC AGG CUG CUU UGC CCU CAG CUC UUG AAG U	10nM'ye güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf
H50A(+51 +80)	AGG UCA GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA	25nM'ye güçlü atlama 2.5 nM'de

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 50		
		zayıf
Hint49(-72-46)	AAG AUA AUU CAU GAA CAU CUU AAU CCA	Atlama yok

Ekzon 51'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 51'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 20 ve Şekil 41'e bakınız.

Tablo 41: Ekzon 51 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 51		
H51A(-29-10)	UUU GGG UUU UUG CAA AAA GG	Atlama yok
H51A(-22-01)	CUA AAA UAU UUU GGG UUU UUG C	Atlama yok
H51A(-14+10)	UGA GUA GGA GCU AAA AUA UUU UGG	Atlama yok
H51(+26+52)	GUU UCC UUA GUA ACC ACA GGU UGU GUC	25nM'ye çok zayıf atlama
H51A(+40+67)	AGU UUG GAG AUG GCA GUU UCC UUA GUA A	25nM'ye atlama ayrıca 50 veya 52 atlama
H51A(+66+77)	UGG CAU UUC UAG	Atlama yok
H51A(+66+80)	AGA UGG CAU UUC UAG	Atlama yok

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklemeye
Ekzon 51			
H51A(+66+83)	GGA AGA UGG CAU UUC UAG	Atlama yok	
H51A(+78+95)	CUC CAA CAU CAA GGA AGA	Atlama yok	
H51A(+81+95)	CUC CAA CAU CAA GGA	Atlama yok	
H51A(+84+95)	CUC CAA CAU CAA	Atlama yok	
H51A(+90+116)	GAA AUC UGC CAG AGC AGG UAC CUC CAA	Atlama yok	
H51A(+53+79)	GAU GGC AUU UCU AGU UUG GAG AUG GCA	25 nM'de güçlü atlama	
H51A(+57+85)	AAG GAA GAU GGC AUU UCU AGU UUG GAG AU	25 nM'de güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf	
H51A(+71+100)	GGU ACC UCC AAC AUC AAG GAA GAU GGC AUU	5nM'ye atlama	
H51A(+76+104)	AGC AGG UAC CUC CAA CAU CAA GGA AGA UG	25 nM'de güçlü atlama	

Ekzon 52'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 52'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 42'ye bakınız.

Tablo 42: Ekzon 52 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
---------------------------------	------	---------------------------------------

Ekzon 52

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 52		
H52A(-12+13)	CCU GCA UUG UUG CCU GUA AGA ACA A	Atlama yok
H52A(-10+10)	GCA UUG UUG CCU GUA AGA AC	Atlama yok
H52A(+07+33)	GGG ACG CCU CUG UUC CAA AUC CUG CAU	50 nM atlama
H52A(+17+46)	GUU CUU CCA ACU GGG GAC GCC UCU GUU CCA	25 nM atlama
H52A(+17+37)	ACU GGG GAC GCC UCU GUU CCA	25 nM atlama
H52A(+67+94)	CCU CUU GAU UGC UGG UCU UGU UUU UCA A	25nM'ye çok çok zayıf atlama
Hint51(-40-14)	UAC CCC UUA GUA UCA GGG UUC UUC AGC	Atlama yok (SNP C veya T)
H52A(+09+38)	AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC UGC	2.5 nM'ye güçlü atlama
H52A(+09+41)	UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC UGC	5 nM'ye güçlü atlama 5nM'de zayıf
H52A(+15+44)	UCU UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA	10 nM'ye güçlü atlama 5nM'de zayıf

Ekzon 53'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

- 5 Ekzon 53'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 43'e bakınız.

Tablo 43: Ekzon 53 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 53		
H53A(-49-26)	AUA GUA GUA AAU GCU AGU CUG GAG	Atlama yok
H53A(-38-13)	GAA AAA UAA AUA UAU AGU AGU AAA UG	Atlama yok
H53A(-32-06)	AUA AAA GGA AAA AUA AAU AUA UAG UAG	Atlama yok
H53A(-15+15)	UCU GAA UUC UUU CAA CUA GAA UAA AAG GAA	Atlama yok
H53A(+39+65)	CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG	50 nM atlama
H53A(+39+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UG	100 nM atlama
H39A(+39+69)SNP	CGU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GGU G	25nM'ye atlama
H53A(+40+70)	UCA UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG U	50 nM atlama
H53A(+41+69)	CAU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GG	50 nM atlama
H53A(+43+69)	CAU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA	50 nM atlama
H53A(+69+98)	CAG CCA UUG UGU UGA AUC CUU UAA CAU UUC	50 nM'de atlama
Hint52(-47-23)	UAU AUA GUA GUA AAU GCU AGU CUG G	Atlama yok

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 53		
H53A(+27+56)	CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG UAC UUC	25 nM'de güçlü atlama 5 nM'de zayıf
H53A(+27+59)	UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG UAC UUC	10 nM'de güçlü atlama 5 nM'de zayıf
H53A(+30+59)	UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG UAC	
H53A(+30+64)	AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU UGU AC	25 nM'de güçlü atlama 10 nM'de zayıf
H53A(+30+69)	CAU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GGU GUU CUU GUA C	25 nM'de güçlü atlama 5 nM'de zayıf
H53A(+33+63)	ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GGU GUU CUU G	25 nM'de güçlü atlama 5 nM'de zayıf
H53A(+33+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU UG	50 nM'de güçlü atlama 5 nM'de zayıf
H53A(+33+65)	CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG	25 nM'de güçlü atlama 2.5 nM'de zayıf
H53A(+35+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU	25 nM'de güçlü atlama

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 53		
H53A(+37+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU U	25 nM'de güçlü atlama
H53A(+36+70)	<u>UCA UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG</u> UGU UC	5 nM'de makul atlama
H53A(+39+71)	UUC AUU CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG	25 nM'de güçlü atlama
H53A(+42+71)	UUC AUU CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG	100 nM'de güçlü atlama 5 nM'de zayıf

Ekzon 54'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 54'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler
5 gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye
yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 21'e bakınız.

Tablo 44: Ekzon 54 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen
antisens molekül dizileri

10

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 54		
H54A(+13+34)	UUG UCU GCC ACU GGC GGA GGU C	300nM'de atlama 55+54'ü ortaya çıkarır
H54A(+60+90)	AUC UGC AGA AUA AUC CCG GAG AAG UUU CAG	25nM'de atlama

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
Ekzon 54			
H54A (+67+89)	UCU GCA GAA UAA UCC CGG AGA AG	40nM'de 54+55	zayıf atlama -
H54A(+67+97)	UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G	10nM'de	atlama
H54A(+77+106)	GGA CUU UUC UGG UAU CAU CUG CAG AAU AAU	50 nM	atlama

**Ekzonlar 54+55 için
kokteyl**

H54A(+67+97)	UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G	54&55 için 10nM'de atlama	spesifik
H55A(-10+14)	CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA	Ek bant yok	

Ekzon 55'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 55'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 22'ye bakınız.

Tablo 45: Ekzon 55 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
Ekzon 55			
H55A(-10+14)	CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA	Atlama yok	
H55A(-10 +20)	CAG CCU CUC GCU CAC UCA	10nM'de atlama	

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 55		
	CCC UGC AAA GGA	
H55A(+39 +61)	CAG GGG GAA CUG UUG CAG UAA UC	Atlama yok
H55A(+41+71)	UCU UUU ACU CCC UUG GAG UCU UCU AGG AGC C	Atlama yok
H55A(+73+93)	UCU GUA AGC CAG GCA AGA AAC	Atlama yok
H55A(+107+137)	CCU UAC GGG UAG CAU CCU GAU GGA CAU UGG C	Atlama yok
H55A(+112+136)	CUU ACG GGU AGC AUC CUG UAG GAC A	100 nM'de çok zayıf atlama
H55A(+132+161)	CCU UGG AGU CUU CUA GGA GCC UUU CCU UAC	200nM'de atlama
H55A(+141+160)	CUU GGA GUC UUC UAG GAG CC	100nM'de atlama
H55A(+143 +171)	CUC UUU UAC UCC CUU GGA GUC UUC UAG GAG	Atlama yok
H55D(+11-09)	CCU GAC UUA CUU GCC AUU GU	Atlama yok

Ekzon 56'ya Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 56'ya yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 23'e bakınız.

Tablo 46: Ekzon 56 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 56		
H56A(-06+23)	GCU UCA AUU UCA CCU UGG AGG UCC UAC AG	25nM'de atlama
H56A(-06+15)	UUC ACC UUG GAG GUC CUA CAG	Atlama yok
H56A(+23+44)	GUU GUG AUA AAC AUC UGU GUG A	Atlama yok
H56A(+56 +81)	CCA GGG AUC UCA GGA UUU UUU GGC UG	Atlama yok
H56A(+67+91)	CGG AAC CUU CCA GGG AUC UCA GGA U	200nM'de atlama
H56A(+92+121)	CCA AAC GUC UUU GUA ACA GGA CUG CAU	25 nM'de atlama
H56A(+102+126)	GUU AUC CAA ACG UCU UUG UAA CAG G	100 nM'de atlama
H56A(+102+131)	UUC AUG UUA UCC AAA CGU CUU UGU AAC AGG	25 nM'de atlama
H56A(+112+141)	CCA CUU GAA GUU CAU GUU AUC CAA ACG UCU	25 nM'de atlama
H56A(+117+146)	UCA CUC CAC UUG AAG UUC AUG UUA UCC AAA	25 nM'de zayıf atlama
H56A(+121+143)	CUC CAC UUG AAG UUC AUG UUA UC	Atlama yok
H56D(+11-10)	CUU UUC CUA CCA AAU GUU GAG	600nM'de atlama

Ekzon 57'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 57'ye yönelik antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 24'e bakınız.

5

Tablo 47: Ekzon 57 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 57		
	CUG GCU UCC AAA UGG GAC CUG AAA AAG AAC AGC	
H57A(-15+18)		Atlama yok
	CUG GCU UCC AAA UGG GAC CUG	
H57A(-12+18)	AAA AAG AAC	50nM'de atlama
	AAC UGG CUU CCA AAU GGG ACC	
H57A(-10+20)	UGA AAA AGA	300nM'de atlama
	UCA GAA CUG GCU UCC AAA UGG	
H57A(-06 +24)	GAC CUG AAA	300nM'de atlama
	GGU GCA GAC GCU UCC ACU GGU	
H57A(+21+44)	CAG	Atlama yok
	GCU GUA GCC ACA CCA GAA GUU	
H57A(+47 +77)	CCU GCA GAG A	Atlama yok
	CUG CCG GCU UAA UUC AUC AUC	
H57A(+79+103)	UUU C	Atlama yok
	CUG CUG GAA AGU CGC CUC CAA	
H57A(+105+131)	UAG GUG	Atlama yok

Ekzon 59'a yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 25'e bakınız.

5 Tablo 48: Ekzon 59 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 59		
H59A (-06+16)	UCC UCA GGA GGC AGC UCU AAA U	Atlama yok
H59A(+31 +61)	UCC UC GCC UGC UUU CGU AGA AGC CGA GUG A	Atlama yok
H59A(+66+91)	AGG UUC AAU UUU UCC CAC UCA GUA UU	Atlama yok
H59A(+96 +120)	CUA UUU UUC.UCU GCC AGU CAG CGG A	100nM'de atlama
H59A(+96+125)	CUC AUC UAU UUU UCU CUG CCA GUC AGC GGA	Atlama yok
H59A(+101 +132)	CA GGG UCU CAU CUA UUU UUC UCU GCC AGU CA	Atlama yok
H59A(+141 +165)	CAU CCG UGG CCU CUU GAA GUU CCU G	200 nM'de atlama ekzon 58& 59
H59A(+151+175)	AGG UCC AGC UCA UCC GUG GCC UCU U	300nM'de atlama
H59A(+161 +185)	GCG CAG CUU GAG GUC CAG CUC AUC C	200 nM'de zayıf atlama
H59A(+161+190)	GCU UGG CGC AGC UUG AGG UCC AGC UCA UCC	100 nM'de atlama
H59A(+171+197)	CAC CUC AGC UUG GCG CAG CUU	Atlama yok

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 59		
	GAG GUC	
H59A(+181+205)	CCC UUG AUC ACC UCA GCU UGG CGC A	Atlama yok
H59A(+200+220)	ACG GGC UGC CAG GAU CCC UUG	Atlama yok
H59A(+221+245)	GAG AGA GUC AAU GAG GAG AUC GCC C	Atlama yok
H59A(+92+125)	CUC AUC UAU UUU UCU CUG CCA GUC AGC GGA GUG C	

Ekzon 60'a Yönelen Antisens Oligonükleotidler

- 5 Ekzon 60'a yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indükleme yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 26'ya bakınız.

Tablo 49: Ekzon 60 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 60		
H60A(-10+20)	GCA AUU UCU CCU CGA AGU GCC UGU GUG CAA	Atlama yok
H60A(-8+19)	CAA UUU CUC CUC GAA GUG CCU GUG UGC	Atlama yok
H60A(+29+58)	CAA GGU CAU UGA CGU GGC UCA CGU UCU CUU	50 nM'ye atlama

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 60		
H60A(+33+62)	CGA GCA AGG UCA UUG ACG UGG CUC ACG UUC	50 nM'ye güçlü atlama
H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC	100nM'de iyi atlama
H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC AUU GAC GUG GCU CAC	SNP
H60A(+39+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU C	100nM'de iyi atlama
H60A(+43+73)	UGG UAA GCU GGC GAG CAA GGU CCU UGA CGU G	100nM'de zayıf atlama
H60A(+51+75)	AGU GGU AAG CUG GCG UGC AAG GUC A	100nM'de zayıf atlama
H60A(+72+102)	UUA UAC GGU GAG AGC UGA AUG CCC AAA GUG	Atlama yok
H60A(+75+105)	GAG GUU AUA CGG UGA GAG CUG AAU GCC CAA A	Atlama yok
H60A(+80+109)	UGC UGA GGU UAU ACG GUG AGA GCU GAA	100nM'de iyi atlama
H60A(+87+116)	UCC AGA GUG CUG AGG UUA UAC GGU GAG AGC	100nM'de zayıf atlama
H60D(+25-5)	CUU UCC UGC AGA AGC UUC CAU CUG GUG UUC	600nM'de zayıf atlama
Ekzon 60 kokteylleri		
H60A(-8+19)	CAA UUU CUC CUC GAA GUG CCU GUG UGC	

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 60		
H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC	10nM'de zayıf atlama
H60A(+87+116)	UCC AGA GUG CUG AGG UUA UAC GGU GAG AGC	
H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC	10nM'de atlama
H60A(-10+20)	GCA AUU UCU CCU CGA AGU GCC UGU GUG CAA	
H60A(+43+73)	UGG UAA GCU GGC GAG CAA GGU CCU UGA CGU G	10nM'de atlama
H60A(+39+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU C	
H60A(-10+20)	GCA AUU UCU CCU CGA AGU GCC UGU GUG CAA	10nM'de atlama

Ekzon 61'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 61'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indükleme yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 50: Ekzon 61 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

10

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 61		
H61A(-7+19)	CUC GGU CCU CGA CGG CCA	Atlama yok

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklenme kabiliyeti
Ekzon 61		
	CCU GGG AG	
H61A(+05+34)	CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU CGC CGG	50 nM'ye atlama
H61A(+10+40)	GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU C	100nM'de atlama
H61A(+16+40)	GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC G	Atlama yok
H61A(+16+45)	CCU GUG GGC UUC AUG CAG CUG CCU GAC UCG	50 nM'ye atlama
H61A(+42+67)	GCU GAG AUG CUG GAC CAA AGU CCC UG	Atlama yok
H61D(+10-16)	GCU GAA AAU GAC UUA CUG GAA AGA AA	Atlama yok

Ekzon 62'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 62'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 51: Ekzon 62 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklenme kabiliyeti
Ekzon 62		
H62A(-15+15)	GAC CCU GGA CAG ACG CUG AAA AGA AGG GAG	Atlama yok
H62A(-10+20)	CCA GGG ACC CUG GAC AGA	Atlama yok

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
Ekzon 62			
	CGC UGA AAA GAA		
H62A(-05+15)	GAC CCU GGA CAG ACG CUG AA	25nM'ye zayıf	
H62A(-3+25)	CUC UCC CAG GGA CCC UGG ACA GAC GCU G	Atlama yok	
H62A(+01+30)	UGG CUC UCU CCC AGG GAC CCU GGA CAG ACG	300 nM'ye %100 atlama	neredeyse
H62A(+8+34)	GAG AUG GCU CUC UCC CAG GGA CCC UGG	300nM'de atlama	
H62A(+13+43)	UUG UUU GGU GAG AUG GCU CUC UCC CAG GGA C	25nM'ye zayıf	
H62A(23+52)	UAG GGC ACU UUG UUU GGC GAG AUG GCU CUC	100nM'de atlama	
H62D(+17-03)	UAC UUG AUA UAG UAG GGC AC	100nM'ye zayıf	
H62D(+25-5)	CUU ACU UGA UAU AGU AGG GCA CUU UGU UUG	Atlama yok	

Ekzon 63'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 63'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 27'ye bakınız.

Tablo 52: Ekzon 63 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
---------------------------------	------	------------------------	------------

Ekzon 63

H63A(-14+11)	GAG UCU CGU GGC UAA AAC Görünür atlama yok ACA AAA C
H63A(+11+35)	UGG GAU GGU CCC AGC AAG 600nM'de olası atlama UUG UUU G
H63A(+20+49)	GAG CUC UGU CAU UUU GGG 100nM'ye atlama AUG GUC CCA GCA
H63A(+33+57)	GAC UGG UAG AGC UCU GUC Görünür atlama yok AUU UUG G
H63A(+40+62)	CUA AAG ACU GGU AGA GCU Atlama yok CUG UC
H63D(+8-17)	CAU GGC CAU GUC CUU ACC Görünür atlama yok UAA AGA C

Ekzon 64'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 64'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler
5 gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye
yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 28'e bakınız.

Tablo 53: Ekzon 64 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen
antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 64		
H64A(-3+27)	CUG AGA AUC UGA CAU UAU Atlama yok UCA GGU CAG CUG	
H64A(+34+62)	CUG CAG UCU UCG GAG UUU 50 nM'de atlama CAU GGC AGU CC	
H64A(+43+72)	AAA GGG CCU UCU GCA GUC 50 nM'de atlama UUC GGA GUU UCA	

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 64		
H64A(+47+74)	GCA AAG GGC CUU CUG CAG UCU UCG GAG	200nM'de atlama
H64D(+15-10)	CAA UAC UUA CAG CAA AGG GCC UUC U	Atlama yok

Ekzon 65'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 65'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 54: Ekzon 65 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

10

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 65		
H65A(+123+148)	UUG ACC AAA UUG UUG UGC UCU UGC UC	Atlama yok

Ekzon 66'ya Yönelen Antisens Oligonükleotidler

15 Ekzon 66'ya yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 29'a bakınız.

Tablo 55: Ekzon 66 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

20

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 66		
H66A(-8+19)	GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU AUU AUG	100nM'de atlama
H66A(-02+28)	CAG GAC ACG GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU	Atlama yok
H66D(+13-17)	UAA UAU ACA CGA CUU ACA UCU GUA CUU GUC	Atlama yok

Ekzon 66 kokteylleri

H66A(-02+28)	CAG GAC ACG GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU	25nM'de atlama
H66D(+13-17)	UAA UAU ACA CGA CUU ACA UCU GUA CUU GUC	

Ekzon 67'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

- 5 Ekzon 67'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 30'a bakınız.

Tablo 56: Ekzon 67 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indükleme kabiliyeti
Ekzon 67		
H67A(+17+47)	GCG CUG GUC ACA AAA UCC UGU UGA ACU UGC	25 nM'de güçlü atlama
H67A(+120+147)	AGC UCC GGA CAC UUG GCU CAA UGU UAC U	Atlama yok

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 67		
H67A(+125+149)	GCA GCU CCG GAC ACU UGG GUC AAU G	600nM'de atlama
H67D(+22-08)	UAA CUU ACA AAU UGG AAG CAG CUC CGG ACA	Atlama yok

Ekzon 68'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 68'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir. Şekil 31'e bakınız.

Tablo 57: Ekzon 68 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 68		
H68A(-4+21)	GAU CUC UGG CUU AUU AUU AGC CUG C	100nM'de atlama
H68A(+22+48)	CAU CCA GUC UAG GAA GAG GGC CGC UUC	200nM'de atlama
H68A(+48+72)	CAC CAU GGA CUG GGG UUC CAG UCU C	200nM'de atlama
H68A(+74+103)	CAG CAG CCA CUC UGU GCA GGA CGG GCA GCC	Atlama yok
H68D(+23-03)	UAC CUG AAU CCA AUG AUU GGA CAC UC	Atlama yok

Ekzon 68 kokteylleri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
Ekzon 68			
H68A(+48+72)	CAC CAU GGA CUG GGG UUC CAG UCU C	10 nM'de atlama	
H68D(+23-03)	UAC CUG AAU CCA AUG AUU GGA CAC UC		

Ekzon 69'a Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 69'a yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir. Her iki ekzon 69 ve 70 çıkarmak için bir H69A(+32+60) ve H70A(-06+18) kokteyli gösteren Şekil 32'ye bakınız.

10 Tablo 58: Ekzon 69 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
Ekzon 69			
H69A(-12+19)	GUG CUU UAG ACU CCU GUA CCU GAU AAA GAG C	Atlama yok	
H69A(+09 +39)	UGG CAG AUG UCA UAA UUA AAG UGC UUU AGAC	200nM'de 68-71 atlama	
H69A(+29 +57)	CCA GAA AAA AAG CAG CUU UGG CAG AUG UC	200nM'de ayrıca 68+69 & 69+70	68-71 atlama
H69A(+51+74)	GGC CUU UUG CAA CUC GAC CAG AAA	Atlama 68-71	
H69A(+51 +80)	UUU UAU GGC CUU UUG CAA CUC GAC CAG AAA	200nM'de atlama	~%90 68-71
H69D(+08-16)	CUG GCG UCA AAC UUA	Atlama yok	

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
Ekzon 69	CCG GAG UGC		

Ekzon 70'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

- 5 Ekzon 70'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 59: Ekzon 70 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
Ekzon 70			
H70A(-09+15)	UUC UCC UGA UGU AGU CUA AAA GGG	Atlama yok	
H70A(-07 +23)	CGA ACA UCU UCU CCU GAU GUA GUC UAA AAG	Atlama yok	
H70A(+16 +40)	GUA CCU UGG CAA AGU CUC GAA CAU C	Atlama yok	
H70A(+25 +48)	GUU UUU UAG UAC CUU GGC AAA GUC	Atlama yok	
H70A(+32+60)	GGU UCG AAA UUU GUU UUU UAG UAC CUU GG	Atlama yok	
H70A(+64 +93)	GCC CAU UCG GGG AUG CUU CGC AAA AUA CCU	Atlama yok	

Ekzon 71'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 71'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

- 5 Tablo 60: Ekzon 71 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid Dizi ismi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
--------------------------------------	------------------------------------

Ekzon 71

H71A(-08+16)	GAU CAG AGU AAC GGG ACU GCA AAA
H71A(+07+30)	ACU GGC CAG AAG UUG 100nM'de zayıf atlama AUC AGA GUA
H71A(+16+39)	GCA GAA UCU ACU GGC 100nM'de atlama CAG AAG UUG
H71D(+19-05)	CUC ACG CAG AAU CUA CUG GCC AGA

Ekzon 72'ye Yönelen Antisens Oligonükleotidler

10

Ekzon 72'ye yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

- 15 Tablo 61: Ekzon 72 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
------------------------------	------	------------------------------------

Ekzon 72

H72A(-8+22)	AAG CUG AGG GGA CGA GGC 600 nM'de zayıf atlama
-------------	--

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
Ekzon 72			
	AGG CCU AUA AGG		
H72A(+02+28)	GUG UGA AAG CUG AGG GGA CGA GGC AGG	Atlama yok	
H72D(+14-10)	AGU CUC AUA CCU GCU AGC AUA AUG	Atlama yok	

Ekzon 73'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

5 Ekzon 73'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklenme yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 62: Ekzon 73 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı kabiliyeti	indüklenme
Ekzon 73			
H73A(+24+49)	AUG CUA UCA UUU AGA UAA GAU CCA U	Zayıf atlama	
H73A(-16+10)	UUC UGC UAG CCU GAU AAA AAA CGU AA	25 nM'ye zayıf	
H73A(+02+26)	CAU UGC UGU UUU CCA UUU CUG GUA G	25 nM'ye güçlü	
H73D(+23-02)	ACA UGC UCU CAU UAG GAG AGA UGC U	25nM'ye atlama	
HM73A(+19+44)	UAU CAU UUA GAU AAG AUC CAU UGC UG	25nM'ye zayıf atlama	

Ekzon 74'e Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 74'e yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 66: Ekzon 74 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid Dizi ismi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
HM74A(+20+46)	GUU CAA ACU UUG GCA GUA 25 nM atlama AUG CUG GAU
HM74A(+50+77)	GAC UAC GAG GCU GGC UCA %100 25 nM'de atlama GGG GGG AGU C
HM74A(+96+122)	GCU CCC CUC UUU CCU CAC 25 nM atlama UCU CUA AGG

Ekzon 76'ya Yönelen Antisens Oligonükleotidler

Ekzon 76'ya yönelen antisens oligonükleotidler hazırlanmış ve yukarıda tarif edilenler gibi benzer yöntemler kullanılarak insan kas hücrelerinde ekzon atlama indüklemeye yetenekleri açısından test edilmiştir.

Tablo 63: Ekzon 76 atlamayı indükleyip indüklemediklerinin belirlenmesi için test edilen antisens molekül dizileri

Antisens Oligonükleotid ismi	Dizi	Atlamayı indüklemeye kabiliyeti
Ekzon 76		
H76A(-02+25)	CAU UCA CUU UGG CCU CUG CCU GGG GCU	Atlama tespit edilmedi
H76A(+80+106)	GAC UGC CAA CCA CUC GGA GCA GCA UAG	Atlama tespit edilmedi

Bu buluşun çeşitli uygulamalarını gerçekleştirme konusunda yukarıda açıklanan modların modifikasyonları, açıklanan buluş ile ilgili yukarıdaki öğretilere dayanarak teknikte uzman kişilerce anlaşılacaktır. Buluşun yukarıdaki uygulamaları sadece örnek niteliğindedir ve herhangi bir şekilde sınırlandırıcı olduğu düşünülmemelidir.

5

DİZİ LİSTESİ

<110> UWA

<120> Patolojilerin Tedavisine Yönelik Antisens Moleküller ve Yöntemler

10 <130> 203594

<160> 59

<170> PatentIn versiyonu 3.5

<210> 1

< 211> 31

15 < 212> RNA

< 213> Homo sapiens

<400> 1

aaaccaagag ucaguuuug auuuccaucu a 31

<210> 2

20 < 211> 24

< 212> RNA

< 213> Homo sapiens

<400> 2

ucuucuguuu uuguuagcca guca 24

25 <210> 3

< 211> 30

< 212> RNA

< 213> Homo sapiens

<400> 3

30 guggugguga cagccuguga aaucugugag 30

<210> 4

< 211> 26

< 212> RNA

< 213> Homo sapiens

<400> 4
 uguucccuug uggucaccgu aguuac 26
 <210> 5
 < 211> 29
 5 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 5
 caciaagucu gcauccagga acauggguc 29
 <210> 6
 10 < 211> 30
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 6
 aaggccacaa agucugcauc caggaacaug 30
 15 <210> 7
 < 211> 22
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 7
 20 cugcaauucc ccgagucucu gc 22
 <210> 8
 < 211> 23
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 25 <400> 8
 caagggcagg ccuauuccucc uuc 23
 <210> 9
 < 211> 26
 < 212> RNA
 30 < 213> Homo sapiens
 <400> 9
 gagagcuucc uguagcuuca cccuuu 26
 <210> 10
 < 211> 24

< 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 10
 uguucagcuu cuguuagcca cuga 24
 5 <210> 11
 < 211> 34
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 11
 10 gcugcccaau gccauccugg aguuccugua agau 34
 <210> 12
 < 211> 29
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 15 <400> 12
 uccagguuca agugggauac uagcaaugu 29
 <210> 13
 < 211> 29
 < 212> RNA
 20 < 213> Homo sapiens
 <400> 13
 uggcgcaggg gcaacucuuc caccaguaa 29
 <210> 14
 < 211> 26
 25 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 14
 acaaaugcug ccuuuagac aaaauc 26
 <210> 15
 30 < 211> 27
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 15
 ggucgcuuug ccucagcuc uugaagu 27

<210> 16
 < 211> 31
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 5 <400> 16
 uggucucauc ugcagaauaa ucccggagaa g 31.
 <210> 17
 < 211> 30
 < 212> RNA
 10 < 213> Homo sapiens
 <400> 17
 cagccucucg cucacucacc cugcaaagga 30
 <210> 18
 < 211> 27
 15 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 18
 ccaaacgucu uuguaacagg acugcau 27
 <210> 19
 20 < 211> 30
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 19
 ccacuugaag uucauguuau ccaaacgucu 30
 25 <210> 20
 < 211> 30
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 20
 30 aacuggcuuc caaaugggac cugaaaaaga 30
 <210> 21
 < 211> 31
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens

<400> 21
 uucguacagu cucaagagua cucaugauua c 31
 <210> 22
 < 211> 24
 5 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 22
 caauuaccuc ugggcuccug guag 24
 <210> 23
 10 < 211> 25
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 23
 cuauuuuucu cugccaguca gcgga 25
 15 <210> 24
 < 211> 30
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 24
 20 cgagcaaggu cauugacgug gcucacguuc 30
 <210> 25
 < 211> 31
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 25 <400> 25
 gggcuucaug cagcugccug acucgguccu c 31
 <210> 26
 < 211> 30
 < 212> RNA
 30 < 213> Homo sapiens
 <400> 26
 uagggcacuu uguuuggcga gauggcucuc 30
 <210> 27
 < 211> 30

< 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 27
 gagcucuguc auuuugggau ggucccagca 30
 5 <210> 28
 < 211> 29
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 28
 10 cugcagucuu cggaguuuca uggcagucc 29
 <210> 29
 < 211> 27
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 15 <400> 29
 gauccuccu guucgucccc uauuaug 27
 <210> 30
 < 211> 30
 < 212> RNA
 20 < 213> Homo sapiens
 <400> 30
 gcgcugguca caaaauccug uugaacuugc 30
 <210> 31
 < 211> 31
 25 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 31
 uaggaggcgc cucccauccu guaggucacu g 31
 <210> 32
 30 < 211> 25
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 32
 gccugucag gccuucgagg agguc 25

<210> 33
 < 211> 30
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 5 <400> 33
 uguucagggc augaacucuu guggaucuu 30
 <210> 34
 < 211> 25
 < 212> RNA
 10 < 213> Homo sapiens
 <400> 34
 guacuacua cauuauuguu cugca 25
 <210> 35
 < 211> 30
 15 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 35
 uaucuggaua ggugguauca acaucuguaa 30
 <210> 36
 20 < 211> 25
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 36
 auguaacuga aaauguucuu cuuua 25
 25 <210> 37
 < 211> 21
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 37
 30 caggagcuuc caaauugcugc a 21
 <210> 38
 < 211> 22
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens

<400> 38
 uccucagcag aaagaagcca cg 22
 <210> 39
 < 211> 26
 5 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 39
 ccuccuuucu ggcauagacc uuccac 26
 <210> 40
 10 < 211> 27
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 40
 cuuacaguuu ucuccaaacc ucccuuc 27
 15 <210> 41
 < 211> 25
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 41
 20 ugugucaucc auucgugcau cucug 25
 <210> 42
 < 211> 25
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 25 <400> 42
 cugguauucc uaaauuguac agaga 25
 <210> 43
 < 211> 30
 < 212> RNA
 30 < 213> Homo sapiens
 <400> 43
 ugugaugugg uccacauucu ggucaaaagu 30
 <210> 44
 < 211> 28

< 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 44
 cuuguuucuc agguaaaagcu cuggaaac 28
 5 <210> 45
 < 211> 28
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 45
 10 caagcugccc aaggucuuuu auuugagc 28
 <210> 46
 < 211> 30
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 15 <400> 46
 uccagagugc ugagguuaua cggugagagc 30
 <210> 47
 < 211> 30
 < 212> RNA
 20 < 213> Homo sapiens
 <400> 47
 cuggcgagca agguccuuga cguggcucac 30
 <210> 48
 < 211> 30
 25 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 48
 caggacacgg auccucccug uucgucccu 30
 <210> 49
 30 < 211> 30
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 49
 uaaauaacac gacuuacauc uguacuuguc 30

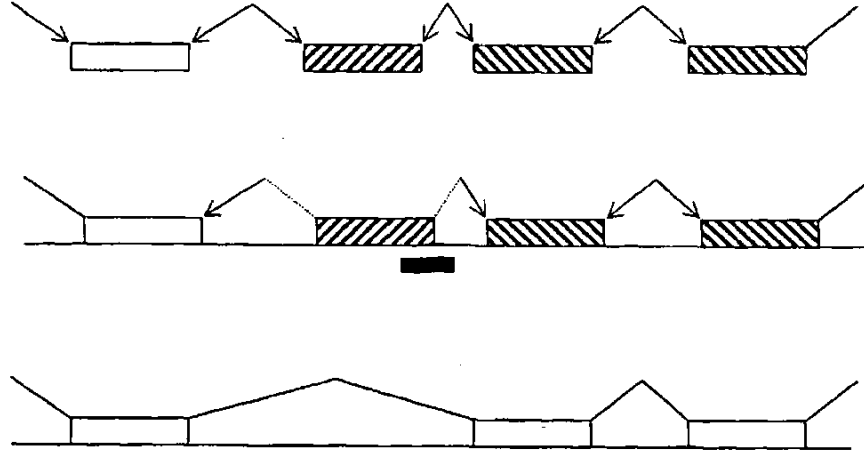
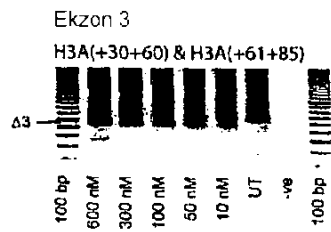
<210> 50
 < 211> 25
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 5 <400> 50
 caccauggac ugggguucca gucuc 25
 <210> 51
 < 211> 26
 < 212> RNA
 10 < 213> Homo sapiens
 <400> 51
 uaccugaauc caaugauugg acacuc 26
 <210> 52
 < 211> 30
 15 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 52
 cuguuccaau cagcuuacuu cccaauugua 30
 <210> 53
 20 < 211> 28
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 53
 cagucuuca acucuuucag uuucugau 28
 25 <210> 54
 < 211> 27
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 54
 30 cuguucagcu ucuguuagcc acugauu 27
 <210> 55
 < 211> 28
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens

<400> 55
 gcugcccaau gccauccugg aguuccug 28
 <210> 56
 < 211> 30
 5 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 56
 guugcugcuc uuuuccaggu ucaaguggga 30
 <210> 57
 10 < 211> 29
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 57
 agcagguacc uccaacauca aggaagaug 29
 15 <210> 58
 < 211> 33
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 58
 20 uccaacuggg gacgccucug uuccaaaucc ugc 33
 <210> 59
 < 211> 33
 < 212> RNA
 < 213> Homo sapiens
 25 <400> 59
 uucaacuguu gccuccgguu cugaaggugu ucu 33
 <210> 60
 < 211> 25
 < 212> RNA
 30 < 213> Homo sapiens
 <400> 60
 cauugcuguu uuccauuucu gguag 25
 <210> 61
 < 211> 31

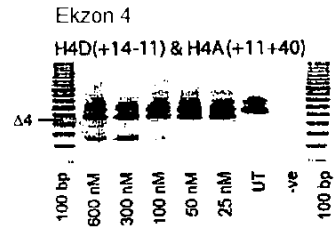
< 212> RNA
< 213> Homo sapiens
<400> 61
gcugcccaau gccauccugg aguuccugua a 31
5 <210> 62
< 211> 31
< 212> RNA
< 213> Homo sapiens
<400> 62
10 caaugccauc cuggaguucc uguaagauac c 31

Şekil 1

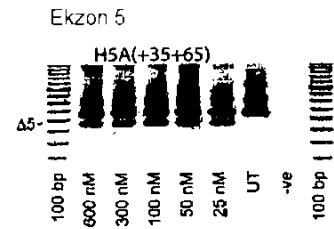
bp	Alici	ESE	Donör
ud	cgacacugagugagaccucucuuucucgcagGCGCUAGCCUGGAGGCA	CA	CGGUGCAGACUGACGGucucacau

Sekil 2**Şekil 3**

Şekil 4



Şekil 5

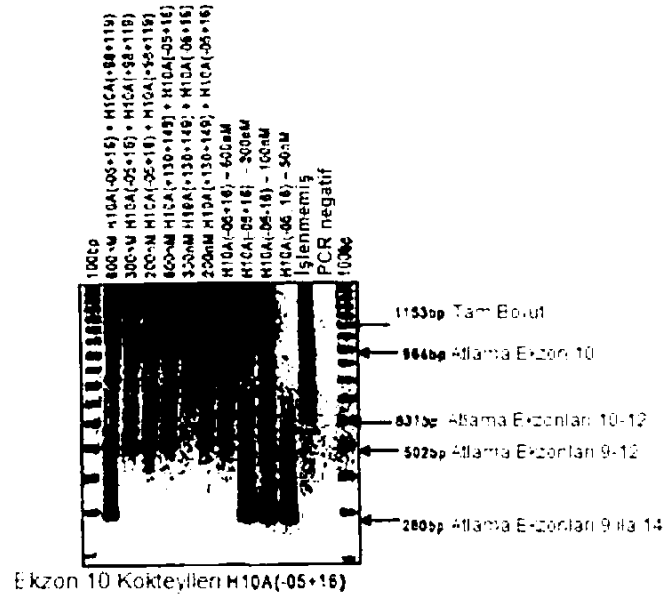


Şekil 6



Şekil 7

Ekzon 10

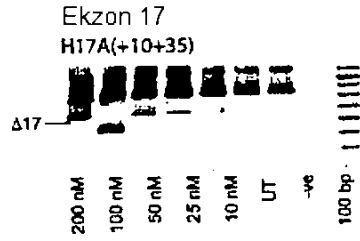


Şekil 8

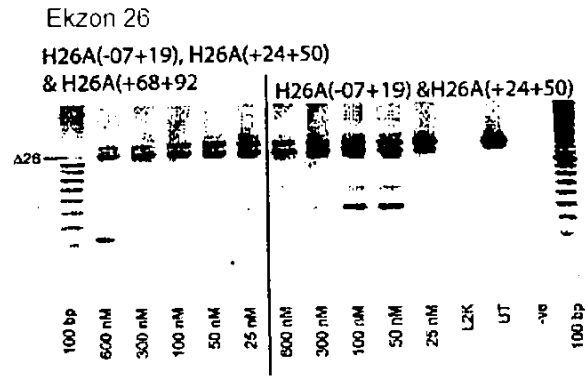
Ekzon 14



Şekil 9



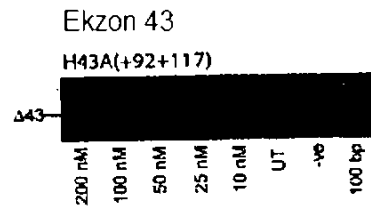
Şekil 10



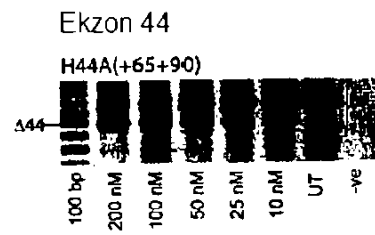
Şekil 11



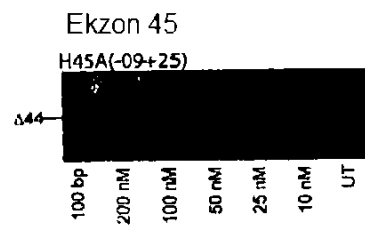
Şekil 12

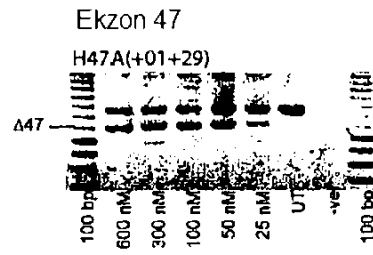
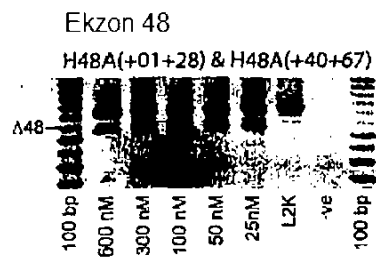


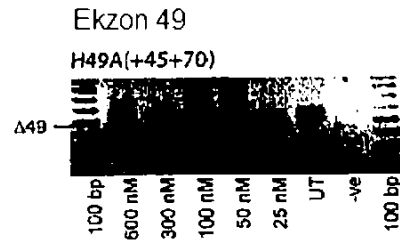
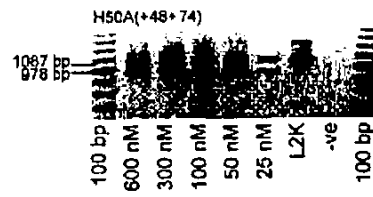
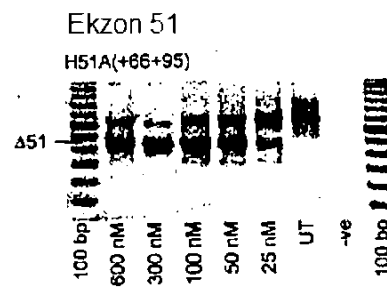
Şekil 13



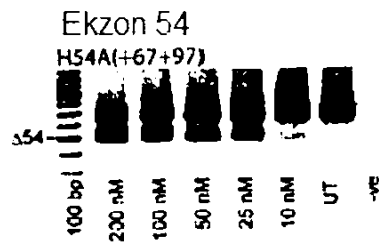
Şekil 14



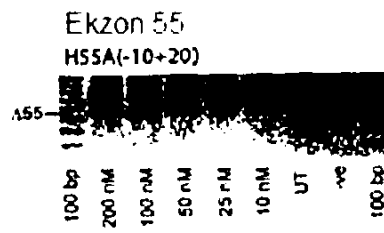
Şekil 15**Şekil 16****Şekil 17**

Şekil 18**Şekil 19****Şekil 20**

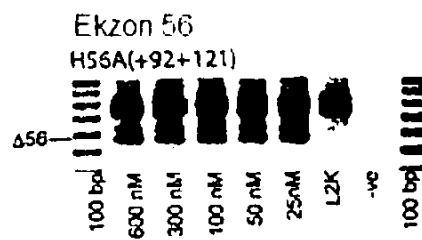
Şekil 21

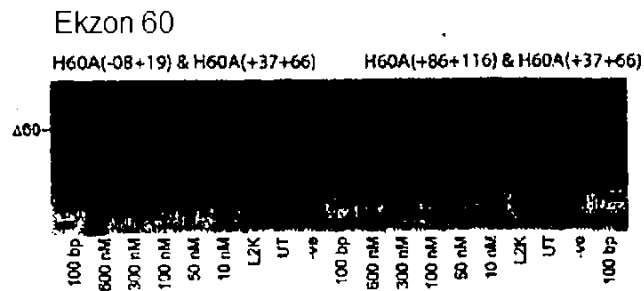


Şekil 22

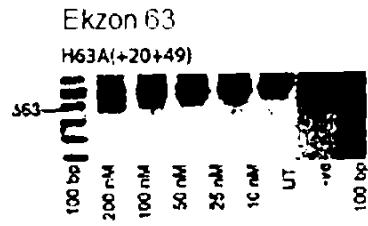


Şekil 23

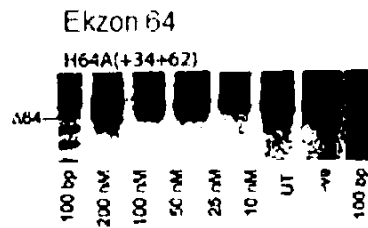


Şekil 24**Şekil 25****Şekil 26**

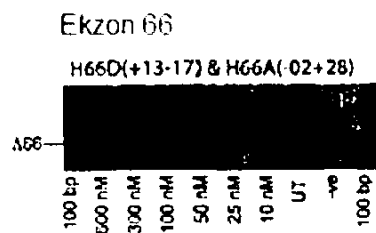
Şekil 27



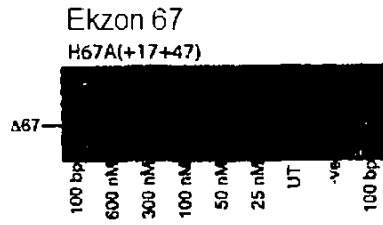
Şekil 28



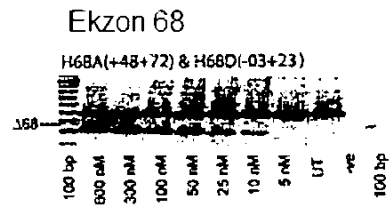
Şekil 29



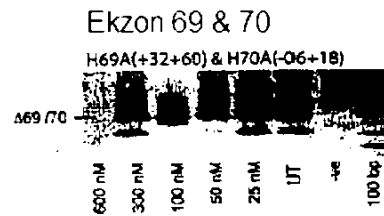
Şekil 30



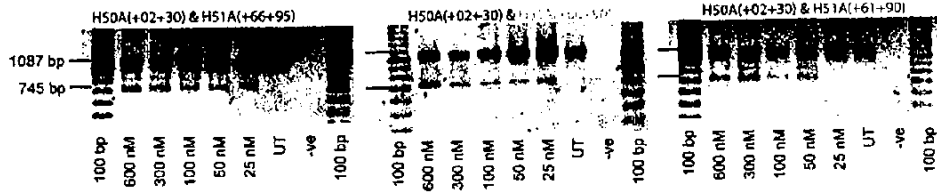
Şekil 31



Şekil 32

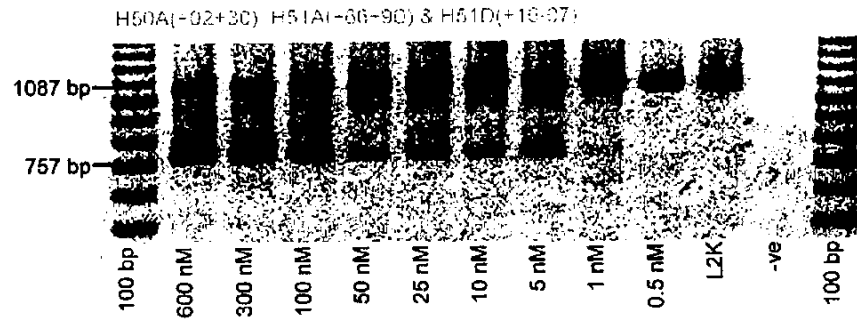


Şekil 33

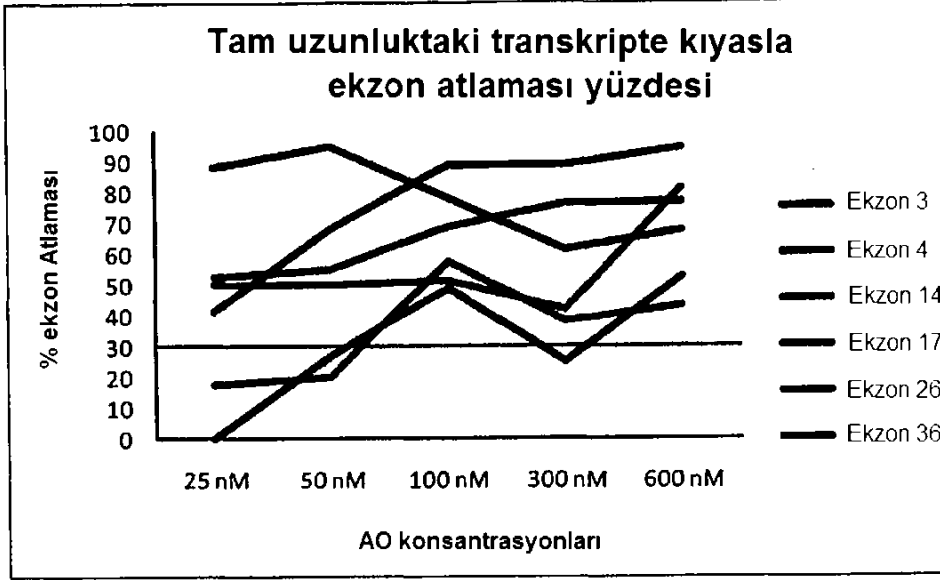


Şekil 34

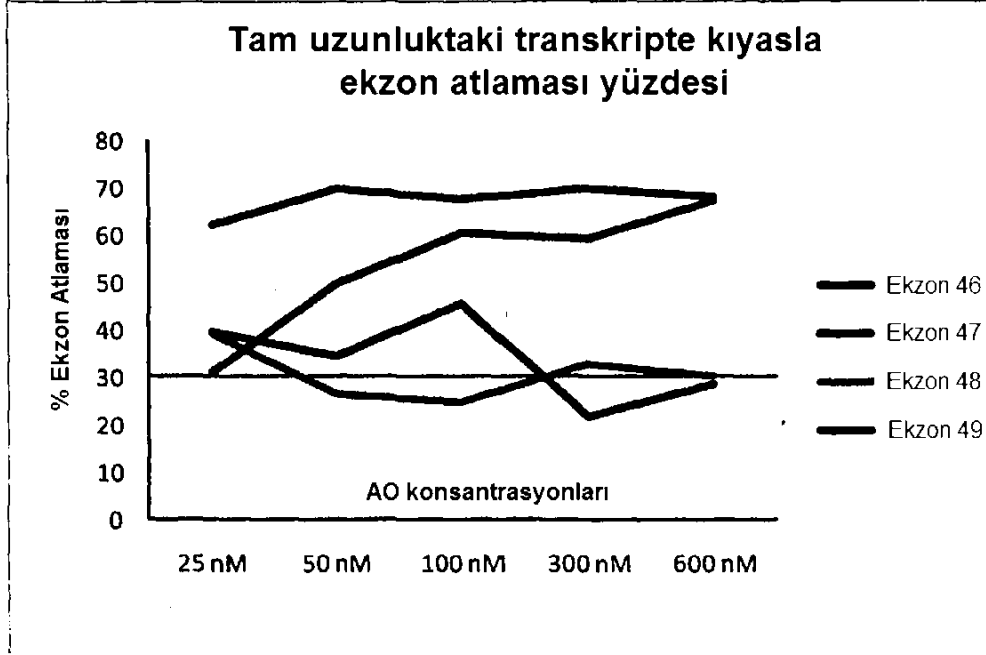
En iyi 50/51 kokteyli

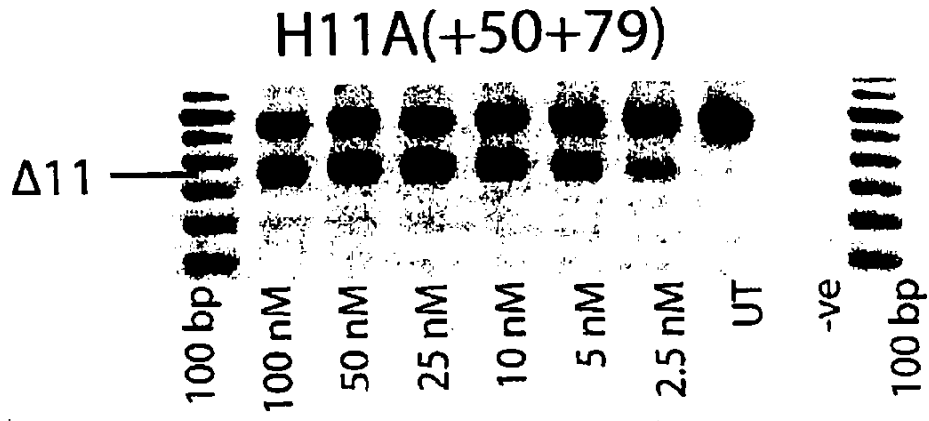


Şekil 35

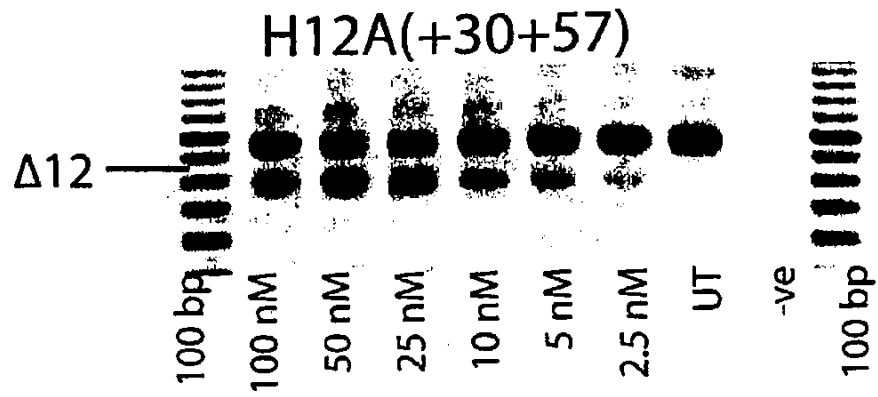


Şekil 36

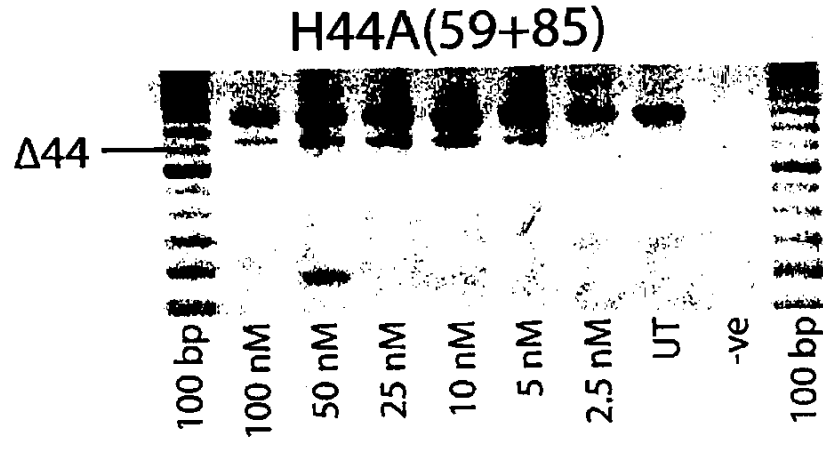




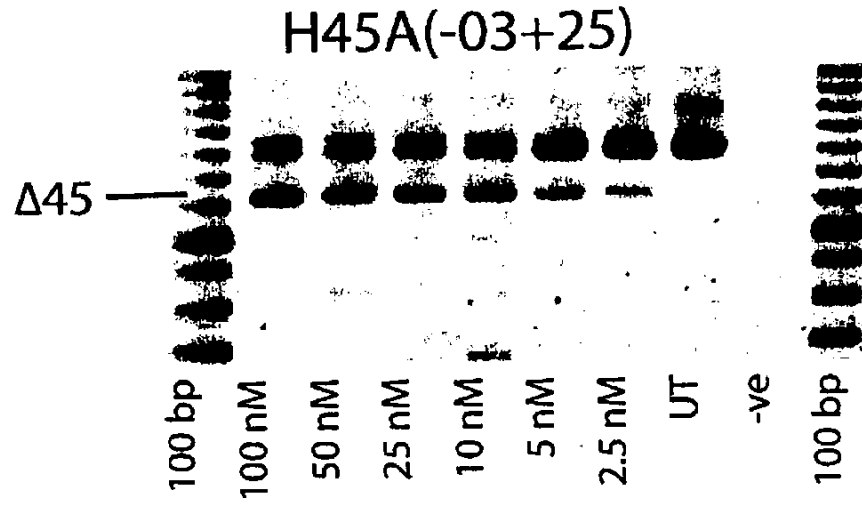
Şekil 37



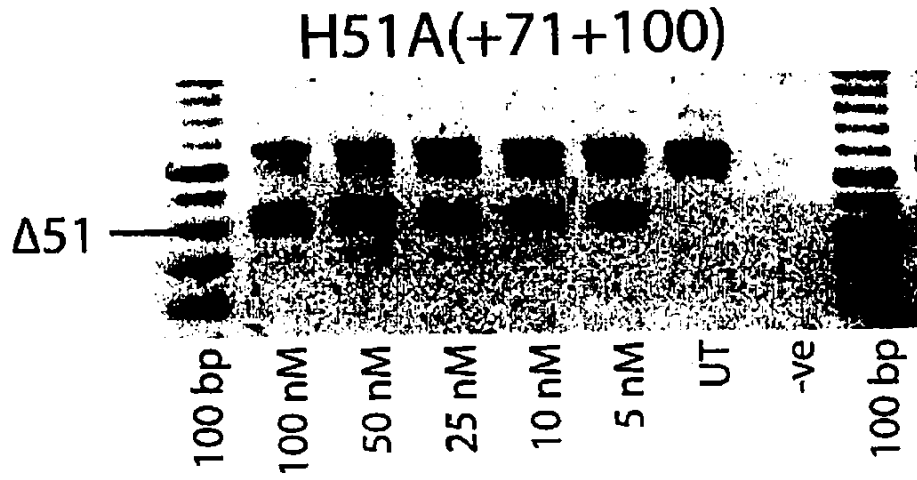
Şekil 38



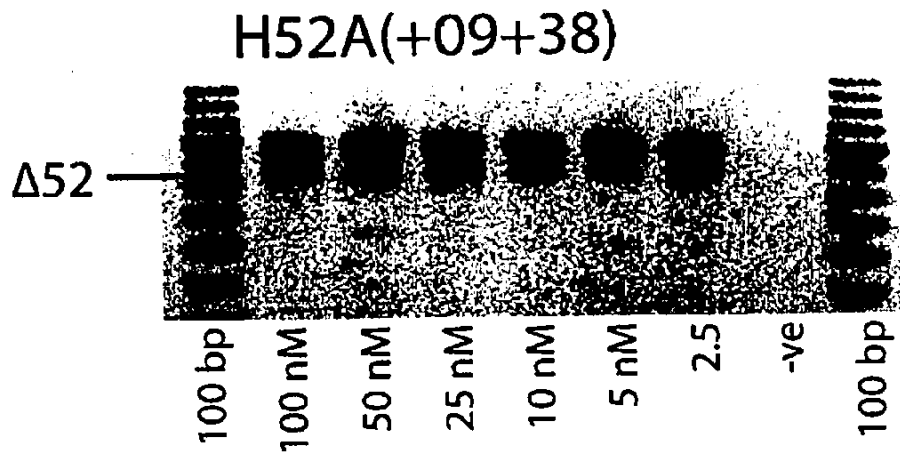
Şekil 39



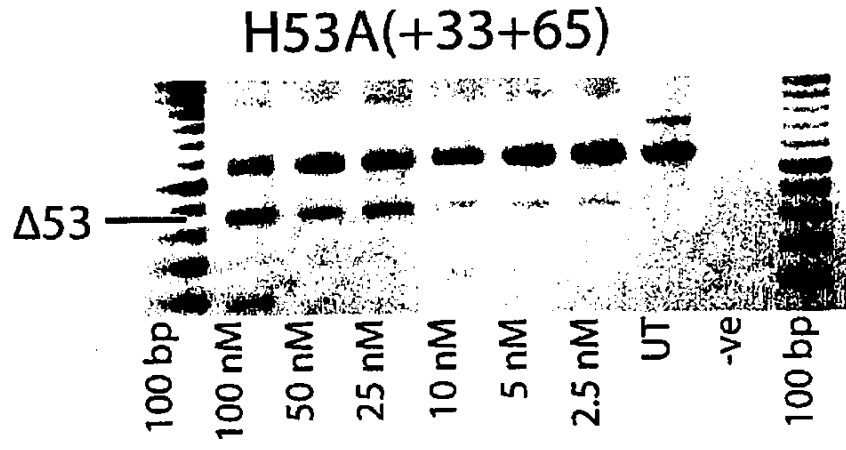
Şekil 40



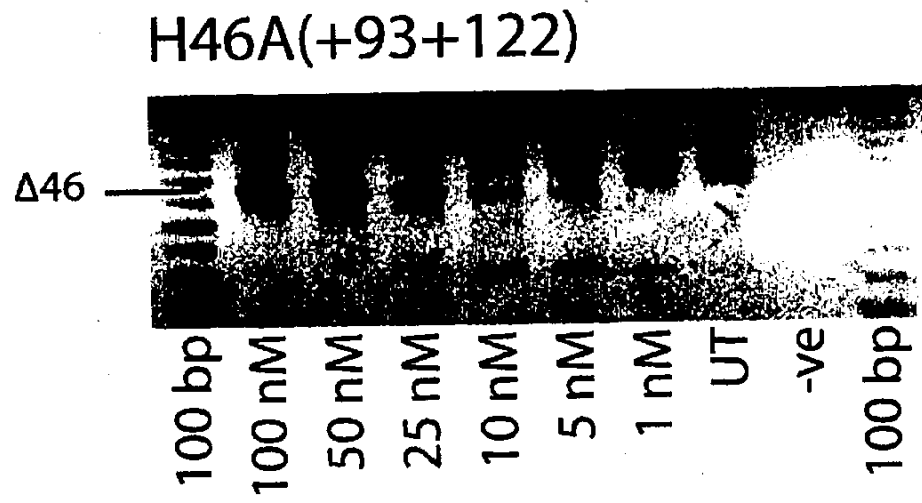
Şekil 41



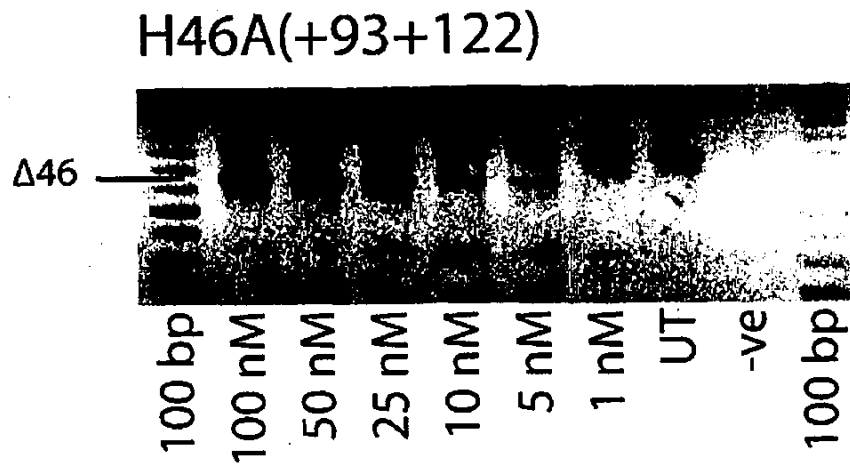
Şekil 42



Şekil 43



Şekil 44



Şekil 45

Şekil 46A

SEQ ID	Ekzon	Dizi
1	H5A(+35+65)	AAA CCA AGA GUC AGU UUA UGA UUU CCA UCU A
2	H12A(+52+75)	UCU UCU GUU UUU GUU AGC CAG UCA
3	H17A(-07+23)	GUG GUG GUG ACA GCC UGU GAA AUC UGU GAG
4	H17A(+61+86)	UGU UCC CUU GUG GUC ACC GUA GUU AC
5	H21A(+86+114)	CAC AAA GUC UGC AUC CAG GAA CAU GGG UC
6	H21A(+90+119)	AAG GCC ACA AAG UCU GCA UCC AGG AAC AUG
7	H22A(+125+146)	CUG CAA UUC CCC GAG UCU CUG C
8	H24A(+51+73)	CAA GGG CAG GCC AUU CCU CCU UC
9	H43A(+92 +117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU
10	H44A(+65+90)	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA
11	H45A (-09+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U
12	H46A(+81+109)	UCC AGG UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU GU
13	H47A(+01+29)	UGG CGC AGG GGC AAC UCU UCC ACC AGU AA
14	H49A(+45+70)	ACA AAU GCU GCC CUU UAG ACA AAA UC
15	H50A(+48+74)	GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU
16	H54A(+67+97)	UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G
17	H55A(-10 +20)	CAG CCU CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA
18	H56A(+92+121)	CCA AAC GUC UUU GUA ACA GGA CUG CAU
19	H56A(+112+141)	CCA CUU GAA GUU CAU GUU AUC CAA ACG UCU
20	H57A(-10+20)	AAC UGG CUU CCA AAU GGG ACC UGA AAA AGA
21	H58A(+34+64)	UUC GUA CAG UCU CAA GAG UAC UCA UGA UUA C
22	H58D(+17-07)	CAA UUA CCU CUG GGC UCC UGG UAG
23	H59A(+96 +120)	CUA UUU UUC UCU GCC AGU CAG CGG A
24	H60A(+33+62)	CGA GCA AGG UCA UUG ACG UGG CUC ACG UUC
25	H61A(+10+40)	GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU C
26	H62A(23+52)	UAG GGC ACU UUG UUU GGC GAG AUG GCU CUC
27	H63A(+20+49)	GAG CUC UGU CAU UUU GGG AUG GUC CCA GCA
28	H64A(+34+62)	CUG CAG UCU UCG GAG UUU CAU GGC AGU CC
29	H66A(-8+19)	GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU AUU AUG
30	H67A(+17+47)	GCG CUG GUC ACA AAA UCC UGU UGA ACU UGC
31	H3A(+30+60)	UAG GAG GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G
32	H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GAG GUC
33	H4A(+11+40)	UGU UCA GGG CAU GAA CUC UUG UGG AUC CUU
34	H4D(+14-11)	GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC UGC A
35	H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA

Şekil 46B

SEQ ID	Ekzon	Dizi
36	H8A(+134+158)	AUG UAA CUG AAA AUG UUC UUC UUU A
37	H10A(-05+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA
38	H10A(+98+119)	UCC UCA GCA GAA AGA AGC CAC G
39	H26A(-07+19)	CCU CCU UUC UGG CAU AGA CCU UCC AC
40	H26A(+24+50)	CUU ACA GUU UUC UCC AAA CCU CCC UUC
41	H26A(+68+92)	UGU GUC AUC CAU UCG UGC AUC UCU G
42	H36A(-16+09)	CUG GUA UUC CUU AAU UGU ACA GAG A
43	H36A(+22+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU
44	H48A(+01+28)	CUU GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA C
45	H48A(+40+67)	CAA GCU GCC CAA GGU CUU UUA UUU GAG C
46	H60A(+87+116)	UCC AGA GUG CUG AGG UUA UAC GGU GAG AGC
47	H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC
48	H66A(-02+28)	CAG GAC ACG GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU
49	H66D(+13-17)	UAA UAU ACA CGA CUU ACA UCU GUA CUU GUC
50	H68A(+48+72)	CAC CAU GGA CUG GGG UUC CAG UCU C
51	H68D(+23-03)	UAC CUG AAU CCA AUG AUU GGA CAC UC
52	H11A(+50+79)	CUG UUC CAA UCA GCU UAC UUC CCA AUU GUA
53	H12A(+30+57)	CAG UCA UUC AAC UCU UUC AGU UUC UGA U
54	H44A(+59+85)	CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG AUU
55	H45A(-03+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G
56	H46A(+93+122)	GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU CAA GUG GGA
57	H51A(+71+100)	AGC AGG UAC CUC CAA CAU CAA GGA AGA UG
58	H52A(+09+38)	UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC UGC
59	H53A(+33+65)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU
60	H73A(+02+26)	CAU UGC UGU UUU CCA UUU CUG GUA G
61	H45A(-06+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA A
62	H45A(-12+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C