



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월01일

(11) 등록번호 10-2473431

(24) 등록일자 2022년11월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) **A61K 31/712** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/712 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7010069(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2016년09월15일
 심사청구일자 2021년09월08일
- (85) 번역문제출일자 2019년04월08일
- (65) 공개번호 10-2019-0040098
- (43) 공개일자 2019년04월16일
- (62) 원출원 특허 10-2018-7001380
 원출원일자(국제) 2016년09월15일
 심사청구일자 2018년04월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2016/077305
- (87) 국제공개번호 WO 2017/047707
 국제공개일자 2017년03월23일
- (30) 우선권주장
 JP-P-2015-182145 2015년09월15일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2013100190 A1
 JP2012506697 A
 JP2015522275 A
 KR1020140108676 A*
- *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 니뽀 신야쿠 가부시카가이사
 일본 교토후 6018550 교토시 미나미쿠 잇쇼인니시
 노쇼몬구치초 14
 고쿠리쥬겐류가이하쥬호장 고쿠리쥬 세이신·신게
 이 이료겐류센타
 일본 도쿄도 코다이라시 오가와히가시쥬 4-1-1
- (72) 발명자
 엔야 유키코
 일본 이바라키 츠쿠바시 사쿠라 3쥬메 14-1 니뽀
 신야쿠 가부시카가이사 내
 도네 유이치로
 일본 이바라키 츠쿠바시 사쿠라 3쥬메 14-1 니뽀
 신야쿠 가부시카가이사 내
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 서종완

전체 청구항 수 : 총 14 항

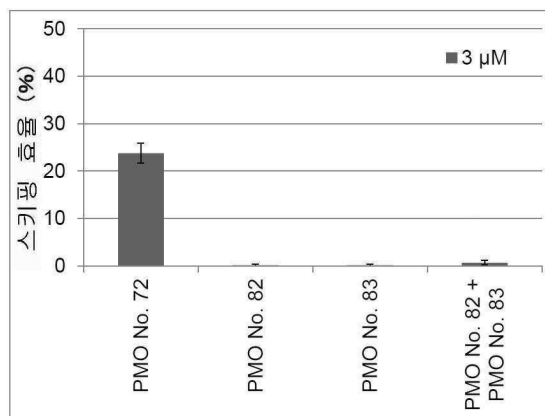
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 안티센스 핵산

(57) 요약

본 발명은 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 스키피를 가능하게 하는 올리고머를 제공한다.

대표도 - 도25



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/314 (2013.01)

C12N 2310/3233 (2013.01)

C12N 2320/30 (2013.01)

(72) 발명자

다케다 신이치

일본 도쿄도 코다이라시 오가와히가시쵸 4-1-1 고
쿠리츠겐꾸가이하쓰호징 고꾸리쵸 세이신 · 신케이
이료겐꾸센파 내

아오키 요시즈구

일본 도쿄도 코다이라시 오가와히가시쵸 4-1-1 고
쿠리츠겐꾸가이하쓰호징 고꾸리쵸 세이신 · 신케이
이료겐꾸센파 내

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

서열번호 7~12, 14~24, 26~29, 31~32, 40~52, 57, 64, 65, 81~86로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어지고, 아래의 (a)~(e)로 이루어진 군으로부터 선택되는 2개의 유닛 올리고머가 연결된 14~32 염기 길이의 안티센스 올리고머로서,

2개의 유닛 올리고머는 연속 또는 서로 중복되는 것이 아닌, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물 :

(a) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제5~15번째 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ;

(b) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제48~70번째 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ;

(c) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제128~150번째 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ;

(d) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제15~40번째 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ; 및

(e) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제110~125번째 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열로 이루어지는 유닛 올리고머.

청구항 4

제3항에 있어서,

서열번호 8 및 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어지는, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서,

올리고뉴클레오타이드인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드가 그의 당부분에서, 그의 인산 결합 부분에서, 또는 그의 당부분 및 인산 결합 부분에서 수식이 되어 있는, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 당부분이 2' 위치의 -OH기가 OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 기로 치환된 리보오스인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

(상기 R은 알킬 또는 아릴을 나타내고, 상기 R'는 알킬렌을 나타낸다.)

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 인산 결합 부분이 포스포로티오에이트 결합, 포스포로디티오에이트 결합, 알킬포스포네이트 결합, 포스포로아미데이트 결합 및 보라노포스페이트 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

청구항 9

제3항 또는 제4항에 있어서,

모르폴리노 올리고머인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

청구항 10

제9항에 있어서,

포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

청구항 11

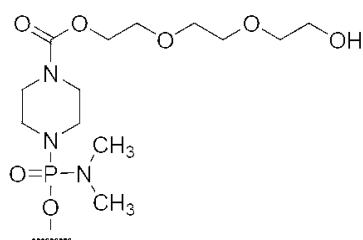
제3항 또는 제4항에 있어서,

포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

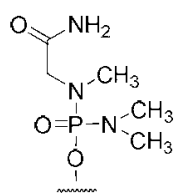
청구항 12

제9항에 있어서,

5' 말단이 하기 화학식 (1)~(3) 중 어느 하나의 기인, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.



(1)



(2)



(3)

청구항 13

제3항 또는 제4항에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물을 유효 성분으로 하는, 환자에 있어서 근이영양증 치료에 유용한 의약 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

추가로 의약적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 근이영양증 치료에 유용한 의약 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

제13항에 있어서,

상기 치료에 있어서 환자가 디스트로핀 유전자에 엑손 45 스킵의 대상이 되는 변이를 갖는 환자인, 근이영양증 치료에 유용한 의약 조성물.

청구항 21

제13항에 있어서,

상기 환자가 인간인, 근이영양증 치료에 유용한 의약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 스킵핑을 가능하게 하는 안티센스 올리고머 및 그 올리고머를 포함하는 의약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뒤시엔느형 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy ; DMD)은 출생 남자 약 3,500명에 1명이 발증하는 가장 빈도가 높은 유전성 진행성 근육질환이다. 유아아기에는 정상인 인간과 거의 다른 운동기능을 나타내지만, 만 4~5세경부터 근력 저하가 보인다. 그 후 근력 저하는 진행되어 만 12세경까지 보행 불능이 되고, 20대에서 심부전 또는 호흡 부전에 의해 사망에 이르는 심각한 질환이다. 현재 DMD에 대한 유효한 치료법은 없어, 새로운 치료제의 개발이 강하게 요구되고 있다.

[0003] DMD는 디스트로핀 유전자의 변이가 원인인 것이 알려져 있다. 디스트로핀 유전자는 X염색체에 존재하며, 220만 염기의 DNA로 이루어지는 거대한 유전자이다. DNA로부터 mRNA 전구체로 전사되고, 또한 스플라이싱에 의해 인트론이 제거되어 79의 엑손이 결합한 mRNA는 13,993 염기가 된다. 이 mRNA로부터 3,685의 아미노산으로 번역되어 디스트로핀 단백질이 생성된다. 디스트로핀 단백질은 근세포의 막 안정성 유지에 관여하고 있어, 근세포를 파손되기 어렵게 하기 위해 필요하다. DMD 환자의 디스트로핀 유전자는 변이를 갖기 때문에 근세포에 있어서 기능을 갖는 디스트로핀 단백질이 거의 발현되지 않는다. 그 때문에 DMD 환자 체내에서는 근세포의 구조를 유지할 수 없게 되어 다량의 칼슘 이온이 근세포 내로 흘러들어간다. 그 결과, 염증과 유사한 반응이 생겨 섬유화가 진행되기 때문에 근세포가 재생되기 어려워진다.

- [0004] 베커형 근이영양증(Becker's muscular dystrophy; BMD)도 디스트로핀 유전자의 변이가 원인인데, 그 증상은 근력 저하를 나타내지만 일반적으로 DMD와 비교하여 가볍고, 근력 저하의 진행도 느리며, 대부분의 경우 성인기에 발증한다. DMD와 BMD의 임상증상의 차이는 변이에 의해 디스트로핀의 mRNA가 디스트로핀 단백질로 번역될 때의 아미노산 리딩 프레임이 파괴되는지 또는 유지되는지에 따른 것으로 생각되고 있다(비특허문헌 1). 즉, DMD의 경우는 아미노산 리딩 프레임이 어긋나는 변이를 가짐으로써 기능을 갖는 디스트로핀 단백질이 거의 발현하지 않는데, BMD의 경우는 변이에 의해 엑손의 일부는 결실되어 있으나, 아미노산 리딩 프레임은 유지되어 있기 때문에 불완전하게나마 기능을 갖는 디스트로핀 단백질이 생산된다.
- [0005] DMD의 치료법으로서 엑손 스킵핑법이 기대되고 있다. 이 방법은 스플라이싱을 개변함으로써 디스트로핀의 mRNA의 아미노산 리딩 프레임을 수복하여, 부분적으로 기능을 회복한 디스트로핀 단백질의 발현을 유도하는 방법이다(비특허문헌 2). 엑손 스킵핑의 대상이 되는 아미노산 서열 부분은 상실되게 된다. 그 때문에 이 치료에서 발현되는 디스트로핀 단백질은 정상의 것보다 짧아지지만, 아미노산 리딩 프레임이 유지되기 때문에 근세포를 안정화하는 기능이 부분적으로 유지된다. 따라서, 엑손 스킵핑에 의해 DMD는 보다 경증의 BMD와 동일한 증상을 나타내게 될 것으로 기대되고 있다. 엑손 스킵핑법은 마우스나 개에 의한 동물실험을 거쳐 인간 DMD 환자에 대한 임상시험이 행해지고 있다.
- [0006] 엑손 스킵핑은 5' 또는 3' 스플라이스 부위 중 어느 하나 또는 양쪽, 또는 엑손의 내부를 표적으로 하는 안티센스 핵산의 결합에 의해 유도할 수 있다. 엑손은 양쪽의 스플라이스 부위가 이어맞추기 복합체(spliceosome)에 의해 인식된 경우만 mRNA에 포함된다. 따라서, 스플라이스 부위를 안티센스 핵산으로 타겟팅함으로써 엑손 스킵핑을 유도할 수 있다. 또한 엑손이 스플라이싱의 기구에 인식되기 위해서는 엑손 스플라이싱 인핸서(ESE)로의 세린과 아르기닌이 풍부한 SR 단백질의 결합이 필요할 것으로 생각되고 있어, ESE를 타겟팅하는 것으로도 엑손의 스킵핑을 유도할 수 있다.
- [0007] 디스트로핀 유전자의 변이는 DMD 환자에 따라 상이하기 때문에, 유전자 변이의 장소나 종류에 따른 안티센스 핵산이 필요해진다. 디스트로핀 유전자의 단일 엑손에 대해 하나의 연속하는 서열을 표적으로 하여 엑손 스킵핑을 유도하는 안티센스 핵산에 대해서 복수의 보고가 있다(특허문헌 1~6, 비특허문헌 1 및 2). 또한 디스트로핀 유전자의 동일 엑손을 표적으로 하는 2종류의 안티센스 핵산을 혼합하여 작용시키면(이중 표적화), 각 안티센스 핵산을 단독으로 사용한 경우보다 스킵핑 활성이 증강되는 경우가 있는 것이 보고되어 있다(특허문헌 7).
- [0008] 그러나 동일한 엑손 내의 2개소 이상을 표적으로 하는 연결된 단일 가닥 안티센스 핵산(연결형)이 스킵핑 활성을 나타내는 것은 아직 보고되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 국제 공개공보 제2004/048570호
(특허문헌 0002) 국제 공개공보 제2009/139630호
(특허문헌 0003) 국제 공개공보 제2010/048586호
(특허문헌 0004) 미국 특허공개공보 제2010/0168212호
(특허문헌 0005) 국제 공개공보 제2011/057350호
(특허문헌 0006) 국제 공개공보 제2006/000057호
(특허문헌 0007) 국제 공개공보 제2007/135105호

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Annemieke Aartsma-Rus et al., (2002) Neuromuscular Disorders 12: S71-S77
(비특허문헌 0002) Wilton S. D., et al., Molecular Therapy 2007: 15: p. 1288-96

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 상기와 같은 상황에 있어서 본 발명은 디스트로핀 유전자의 동일 엑손 내의 다른 2개소의 염기서열을 표적으로 하여 엑손 스킵핑을 유도하는 신규한 연결형 안티센스 올리고머 및 동 올리고머를 포함하는 근이영양증 치료제를 제공하는 것을 주된 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 상기 문헌에 기재된 기술내용 및 디스트로핀 유전자의 구조 등을 상세하게 연구한 결과, 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 상이한 2개소를 표적으로 하는 올리고머를 연결하여 얻어지는 안티센스 올리고머가 동 엑손의 스킵핑을 유도할 수 있는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 이 지견(知見)을 토대로 본 발명을 완성시켰다.

[0013] 즉, 본 발명은 아래와 같다.

[0014] [1] 아래의 (a)~(e)로 이루어진 군으로부터 선택되는 2개의 유닛 올리고머가 연결된 14~32 염기 길이의 안티센스 올리고머로서, 2개의 유닛 올리고머는 연속 또는 서로 중복되는 것이 아닌, 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물 :

[0015] (a) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제-5~15번째 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ;

[0016] (b) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제48~70번째 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ;

[0017] (c) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제128~150번째 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ;

[0018] (d) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제15~40번째 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ; 및

[0019] (e) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제110~125번째 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열로 이루어지는 유닛 올리고머.

[0020] [2] 상기 2개의 유닛 올리고머 중 하나가 (a)인, 상기 [1] 에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0021] [3] 서열번호 7~12, 14~33, 40~52, 57, 64, 65, 79~86으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어지는, 상기 [1] 또는 [2] 에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0022] [4] 서열번호 8, 10, 25, 30, 33, 79, 80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어지는, 상기 [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0023] [5] 올리고뉴클레오타이드인, 상기 [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0024] [6] 상기 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 당부분 및/또는 인산 결합 부분이 수식되어 있는, 상기 [5] 에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0025] [7] 상기 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 당부분이 2' 위치의 -OH기가 OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 기로 치환된 리보오스인, 상기 [5] 또는 [6] 에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0026] (상기 R은 알킬 또는 아릴을 나타내고, 상기 R'는 알킬렌을 나타낸다.)

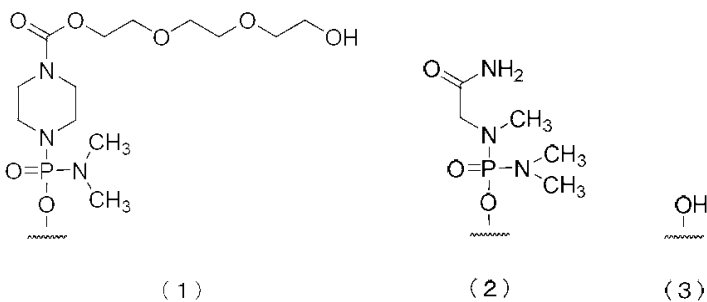
[0027] [8] 상기 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 인산 결합 부분이 포스포로티오에이트 결합, 포스포로디티오에이트 결합, 알킬포스포네이트 결합, 포스포로아미데이트 결합 및 보라노포스페이트 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것인, 상기 [6] 또는 [7] 에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0028] [9] 모르폴리노 올리고머인, 상기 [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0029] [10] 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머인, 상기 [9] 에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0030] [11] 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머인, 상기 [4] 에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0031] [12] 5' 말단이 하기 화학식 (1)~(3) 중 어느 하나의 기인, 상기 [9] 내지 [11] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.



[0032] [13] 상기 [1] 내지 [12] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물을 유효 성분으로 하는, 근이영양증 치료용 의약 조성물.

[0034] [14] 추가로 의약적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 상기 [13] 에 기재된 의약 조성물.

[0035] [15] 상기 [1] 내지 [12] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물, 또는 상기 [13] 또는 [14] 에 기재된 상기 의약 조성물을 근이영양증 환자에게 투여하는 공정을 포함하는, 근이영양증의 치료방법.

[0036] [16] 상기 근이영양증 환자가 디스트로핀 유전자에 엑손 45 스킵의 대상이 되는 변이를 갖는 환자인, 상기 [15] 에 기재된 치료방법.

[0037] [17] 상기 환자가 인간인, 상기 [15] 또는 [16] 에 기재된 치료방법.

[0038] [18] 근이영양증 치료용 의약 조성물의 제조에 있어서의 상기 [1] 내지 [12] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물의 사용.

[0039] [19] 근이영양증 치료에 사용하기 위한 상기 [1] 내지 [12] 중 어느 하나에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0040] [20] 상기 치료에 있어서 근이영양증 환자가 디스트로핀 유전자에 엑손 45 스킵의 대상이 되는 변이를 갖는 환자인, 상기 [19] 에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

[0041] [21] 상기 환자가 인간인, 상기 [19] 또는 [20] 에 기재된 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물.

발명의 효과

[0042] 본 발명의 안티센스 올리고머에 의해 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑을 효과적으로 유도하는 것이 가능하다. 또한, 본 발명의 의약 조성물을 투여함으로써, 뒤시엔느형 근이영양증의 증상을 효과적으로 경감시킬 수 있다. 대상이 되는 환자의 결실 엑손은 18-44, 44, 46, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53 등을 들 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043]

도 1은 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 2는 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 3은 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 4는 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 5는 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 6은 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 7은 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킴핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 8은 인간 황문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 9는 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킴핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 10은 인간 형문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 11은 인간 형문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 12는 인간 형문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 13은 인간 형문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 14는 인간 형문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 15는 인간 형문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 16은 인간 형문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 17은 인간 형문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 18은 인간 형문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킴핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 19는 인간 형문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 20은 인간 형문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 21은 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 22는 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 23은 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

도 24는 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

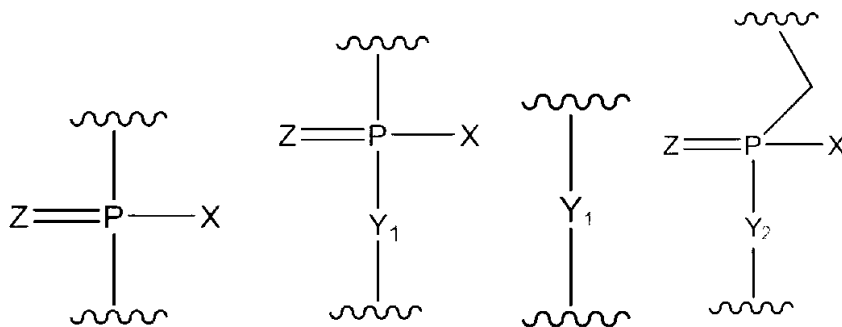
도 25는 인간 횡문근육종 세포(RD세포)에 있어서의 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 효율을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 아래에 본 발명을 상세하게 설명한다. 아래의 실시형태는 본 발명을 설명하기 위한 예시이며, 본 발명을 이 실시형태로만 한정하는 취지는 아니다. 본 발명은 그 요지를 일탈하지 않는 한 여러 형태로 실시할 수 있다.
- [0045] 또한 본 명세서에 있어서 인용한 모든 문헌 및 공개공보, 특허공보 기타 특허문헌은 참조로써 본 명세서에 포함하는 것으로 한다. 또한 본 명세서는 2015년 9월 15일에 출원된 본 출원 우선권 주장의 기초가 되는 일본국 특허출원(특허출원 제2015-182145호)의 명세서 및 도면에 기재된 내용을 포함한다.
- [0046] 1. 안티센스 올리고머
- [0047] 본 발명은 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손을 스킵핑 가능한 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물(이하, 「본 발명의 올리고머」라 함)을 제공한다.
- [0048] [인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손]
- [0049] 본 발명에 있어서 「유전자」에는 게놈 유전자 이외에 cDNA, mRNA 전구체 및 mRNA도 포함된다. 바람직하게는 유전자는 mRNA 전구체, 즉 pre-mRNA이다.
- [0050] 인간 게놈에 있어서 인간 디스트로핀 유전자는 유전자좌 Xp21.2에 존재한다. 인간 디스트로핀 유전자는 3.0 Mbp의 사이즈를 가지고 있어 기지의 인간 유전자로서는 최대 유전자이다. 단, 인간 디스트로핀 유전자의 코드영역은 겨우 14 kb에 불과하고, 그 코드영역은 79개의 엑손으로서 디스트로핀 유전자 내에 분산되어 있다(Roberts, RG., et al., Genomics, 16: 536-538 (1993)). 인간 디스트로핀 유전자의 전사물인 pre-mRNA는 스플라이싱을 받아서 14 kb의 성숙 mRNA를 생성한다. 인간의 야생형 디스트로핀 유전자의 염기서열은 공지이다(GenBank Accession No.NM_004006).
- [0051] 인간의 야생형 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 염기서열을 서열번호 13에 나타낸다. 또한, 인간의 야생형 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 13) 중, 5' 말단으로부터 세어 -5~15번째의 염기로 이루어지는 서열을 서열번호 3에 나타낸다. 마찬가지로, 48~70번째의 염기로 이루어지는 서열, 128~150번째의 염기로 이루어지는 서열, 15~40번째의 염기로 이루어지는 서열 및 110~125번째의 염기로 이루어지는 서열을 각각 서열번호 4~6, 143에 나타낸다.
- [0052] 본 발명의 올리고머는 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑에 의해 DMD형 디스트로핀 유전자로 코드되는 단백질을 BMD형 디스트로핀 단백질로 개변하는 것을 목적으로 제작된 것이다. 따라서, 본 발명의 올리고머의 엑손 스킵핑의 대상이 되는 디스트로핀 유전자의 엑손 45에는 야생형뿐만 아니라 변이형도 포함된다.
- [0053] 변이형 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45 또는 그 일부는 구체적으로는 아래의 (I) 또는 (II)에 기재된 폴리뉴클레오타이드이다.
- [0054] (I) 서열번호 13, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 143으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드를 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 폴리뉴클레오타이드 ;
- [0055] (II) 서열번호 13, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 143으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열에 대해 90% 이상의 동일성을 갖는 염기서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드

- [0056] 본 명세서 중 「폴리뉴클레오티드」란, DNA 또는 RNA를 의미한다.
- [0057] 본 명세서 중 「스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 폴리뉴클레오티드」란, 예를 들면 서열번호 13, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 143으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드의 전부 또는 일부를 프로브로서 콜로니 하이브리다이제이션법, 플라크 하이브리다이제이션법 또는 서던 하이브리다이제이션법 등을 사용함으로써 얻어지는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 하이브리다이제이션의 방법으로서, 예를 들면 "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001" 및 "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997" 등에 기재되어 있는 방법을 이용할 수 있다.
- [0058] 본 명세서 중 「상보적인 염기서열」이란, 대상이 되는 염기서열과 왓슨-크릭 염기쌍을 형성하는 염기서열에 한정되는 것은 아니고, 유동 염기쌍(Wobble base pair)을 형성하는 염기서열도 포함한다. 여기서 왓슨-크릭 염기쌍이란 아데닌-티민, 아데닌-우라실 및 구아닌-시토신 간에 수소결합이 형성되는 염기쌍을 의미하며, 유동 염기쌍이란 구아닌-우라실, 이노신-우라실, 이노신-아데닌 및 이노신-시토신 간에 수소결합이 형성되는 염기쌍을 의미한다. 또한 「상보적인 염기서열」이란 대상이 되는 염기서열과 100%의 상보성을 가지고 있지 않아도 되고, 예를 들면 대상이 되는 염기서열에 대해 1~3개, 1~2개 또는 1개의 비상보적 염기가 포함되어 있어도 된다.
- [0059] 본 명세서 중 「스트린젠트한 조건」이란, 저스트린젠트한 조건, 중스트린젠트한 조건 및 고스트린젠트한 조건 중 어느 것이어도 된다. 「저스트린젠트한 조건」은, 예를 들면 5×SSC, 5×텐하르트 용액, 0.5% SDS, 50% 포름아미드, 32℃의 조건이다. 또한 「중스트린젠트한 조건」은, 예를 들면 5×SSC, 5×텐하르트 용액, 0.5% SDS, 50% 포름아미드, 42℃ 또는 5×SSC, 1% SDS, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 50% 포름아미드, 42℃의 조건이다. 「고스트린젠트한 조건」은, 예를 들면 5×SSC, 5×텐하르트 용액, 0.5% SDS, 50% 포름아미드, 50℃ 또는 0.2×SSC, 0.1% SDS, 65℃의 조건이다. 이들 조건에 있어서 온도를 올릴수록 높은 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드가 효율적으로 얻어지는 것을 기대할 수 있다. 단, 하이브리다이제이션의 스트린젠스에 영향을 미치는 요소로서는 온도, 프로브 농도, 프로브의 길이, 이온 강도, 시간, 염농도 등의 복수의 요소를 생각할 수 있고, 담당자라면 이들 요소를 적절히 선택함으로써 동일한 스트린젠스를 실현하는 것이 가능하다.
- [0060] 또한 하이브리다이제이션에 시판의 키트를 사용하는 경우는, 예를 들면 Alkphos Direct Labelling and Detection System(GE Healthcare)을 사용할 수 있다. 이 경우는 키트에 첨부된 프로토콜에 따라 표지된 프로브와의 인큐베이션을 하룻밤 행하고, 멤브레인을 55℃의 조건하에서 0.1%(w/v) SDS를 포함하는 1차 세정 버퍼로 세정 후, 하이브리다이징한 폴리뉴클레오티드를 검출할 수 있다. 또는 서열번호 13, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 143으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 143으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열과 상보적인 염기서열의 전부 또는 일부를 토대로 프로브를 제작할 때, 시판의 시약(예를 들면 PCR 라벨링 믹스(로슈·다이어그노스틱사) 등)를 사용하여 그 프로브를 디곡시게닌(DIG) 라벨한 경우에는, DIG 핵산 검출 키트(로슈·다이어그노스틱사)를 사용하여 하이브리다이제이션을 검출할 수 있다.
- [0061] 상기의 하이브리다이징 가능한 폴리뉴클레오티드 이외의 폴리뉴클레오티드로서는, 상동성 검색 소프트웨어인 BLAST에 의해 디폴트의 파라미터를 사용하여 계산했을 때 서열번호 13, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 143으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 서열과 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상 또는 99.9% 이상의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다.
- [0062] 또한 염기서열의 동일성은 칼린 및 알취일에 의한 알고리즘 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993)를 사용하여 결정할 수 있다. BLAST의 알고리즘을 토대로 한 BLASTN이나 BLASTX로 불리는 프로그램이 개발되어 있다(Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990). BLASTN을 사용하여 염기서열을 해석하는 경우는, 파라미터는 예를 들면 score=100, wordlength=12로 한다. BLAST와 Gapped BLAST 프로그램을 사용하는 경우는 각 프로그램의 디폴트 파라미터를 사용한다.
- [0063] 어떤 태양에서는 본 발명의 올리고머는 아래의 (a)~(e)로 이루어진 군으로부터 선택되는 2개의 유닛 올리고머가 연결된 14~32 염기 길이의 안티센스 올리고머 또는 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물이다.

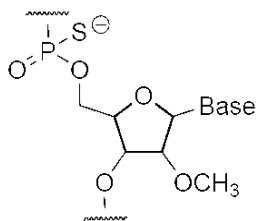
- [0064] (a) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제-5~15번째 뉴클레오티드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ;
- [0065] (b) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제48~70번째 뉴클레오티드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ;
- [0066] (c) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제128~150번째 뉴클레오티드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ;
- [0067] (d) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제15~40번째 뉴클레오티드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열로 이루어지는 유닛 올리고머 ; 및
- [0068] (e) 인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 5' 말단으로부터 제110~125번째 뉴클레오티드 서열로부터 선택되는 연속하는 7~16 염기의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 염기서열로 이루어지는 유닛 올리고머 .
- [0069] 상기 (a)~(e)의 각 유닛 올리고머(이하, 간단히 「유닛」으로 칭하는 경우도 있음)의 사이즈는 7~16 염기 길이이고, 바람직하게는 8~16 염기 길이, 9~16 염기 길이이다. 각 유닛의 사이즈는 동일해도 되고 상이해도 된다.
- [0070] 또한, (a)~(e)로 이루어진 군으로부터 2개의 유닛 올리고머를 선택할 때, 2개의 유닛 올리고머는 (a)~(e)의 동일한 조합(즉, (a)와 (a), (b)와 (b), (c)와 (c), (d)와 (d), (e)와 (e))이어도 되고, 또는 상이한 조합이어도 되지만, 바람직하게는 상이한 조합이다. 예를 들면 하나의 유닛으로서 (a)를 선택한 경우, 다른 쪽 유닛은 (b)~(e) 중 어느 하나가 되는 것이 바람직하다. 마찬가지로 한쪽에 유닛(b)를 선택한 경우, 다른 쪽 유닛은 (a), (c), (d) 또는 (e)가 되는 것이 바람직하고, 또한 한쪽에 유닛(c)를 선택한 경우, 다른 쪽 유닛은 (a), (b), (d) 또는 (e)가 되는 것이 바람직하다.
- [0071] (a)~(e)로부터 2개의 유닛을 선택한 경우, 선택된 2개의 유닛 중 어느 쪽이 5' 말단 측에 배치되어도 되지만, (a)와 (b)를 선택한 경우라면 유닛(a)가 3' 말단 측에 연결되고, (b)와 (c)를 선택한 경우라면 유닛(b)가 3' 말단 측에 연결되며, (a)와 (c)를 선택한 경우라면 유닛(a)가 3' 말단 측에 연결되고, (a)와 (d)를 선택한 경우라면 유닛(a)가 3' 말단 측에 연결되며, (a)와 (e)를 선택한 경우라면 유닛(a)가 3' 말단 측에 연결되는 것이 바람직하다.
- [0072] 여기서 「연결」이란, (a)~(e)로부터 선택된 2개의 유닛이 직결되어 있는 것을 의미한다. 즉, 2개의 유닛이 연결되어 있는 경우, 5' 말단 측에 위치하는 유닛의 3' 말단과, 3' 말단 측에 위치하는 유닛의 5' 말단이 인산 결합 또는 아래의 기를 형성하는 것을 의미한다.



- [0073]
- [0074] (식 중 X는 -OH, -CH₂R¹, -O-CH₂R¹, -S-CH₂R¹, -NR²R³ 또는 F를 나타내고 ;
- [0075] R¹은 H, 알킬을 나타내며 ;
- [0076] R² 및 R³는 동일 또는 상이하여 H, 알킬, 시클로알킬 또는 아릴을 나타내고 ;
- [0077] Y₁은 O, S, CH₂ 또는 NR¹을 나타내며 ;
- [0078] Y₂는 O, S 또는 NR¹을 나타내고 ;
- [0079] Z는 O 또는 S를 나타낸다.)

- [0080] 「인간 디스트로핀 유전자의 제45번째 엑손의 스킵핑을 가능하게 한다」는 것은, 인간 디스트로핀 유전자의 전사물(예를 들면 pre-mRNA)의 엑손 45에 해당하는 부위에 본 발명의 올리고머가 결합함으로써 그 전사물이 스플라이싱을 받았을 때, 예를 들면 엑손 44에 결실을 갖는 DMD 환자의 경우, 엑손 43의 3' 말단에 해당하는 염기에 엑손 46의 5' 말단에 해당하는 염기가 연결되어, 코돈의 프레임 시프트가 일어나지 않은 성숙 mRNA가 형성되는 것을 의미한다.
- [0081] 여기서 상기 「결합」은, 본 발명의 올리고머와 인간 디스트로핀 유전자의 전사물을 혼합한 경우에 생리적 조건 하에서 양자가 하이브리다이징하여 이중 가닥을 형성하는 것을 의미한다. 상기 「생리적 조건하」란, 생체 내와 유사한 pH, 염 조성, 온도로 조절된 조건을 의미한다. 예를 들면 25~40℃, 바람직하게는 37℃, pH 5~8, 바람직하게는 pH 7.4이며, 염화나트륨 농도가 150 mM인 조건을 들 수 있다.
- [0082] 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑 발생 여부는 디스트로핀 발현세포(예를 들면 인간 횡문근육종 세포)에 본 발명의 올리고머를 도입하고, 상기 디스트로핀 발현세포의 total RNA로부터 인간 디스트로핀 유전자 mRNA의 엑손 45의 주변영역을 RT-PCR 증폭하고, 그 PCR 증폭산물에 대해 nested PCR 또는 시퀀스 해석을 행함으로써 확인할 수 있다. 스킵핑 효율은 인간 디스트로핀 유전자의 mRNA를 피검세포로부터 회수하여, 그 mRNA 중 엑손 45가 스킵한 밴드의 폴리뉴클레오티드량 「A」와, 엑손 45가 스킵하지 않은 밴드의 폴리뉴클레오티드량 「B」를 측정하고, 이들 「A」 및 「B」의 측정값을 토대로 아래의 식에 따라 계산할 수 있다.
- [0083] 스킵핑 효율 (%) = $A / (A + B) \times 100$
- [0084] 바람직하게는 본 발명의 올리고머는 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 효율로 엑손 45를 스킵한다.
- [0085] 스킵핑 효율의 계산에 대해서는 국제 공개공보 제2012/029986호를 참조할 수 있다.
- [0086] 본 발명의 올리고머로서는, 예를 들면 14~32 염기의 길이를 갖는 올리고뉴클레오티드, 모르폴리노 올리고머 또는 펩티드 핵산(Peptide Nucleic Acid : PNA) 올리고머를 들 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 올리고머는 16~30 염기, 17~30 염기, 18~30 염기, 19~30 염기, 20~30 염기, 20~29 염기, 20~28 염기, 20~27 염기, 20~26 염기 또는 21~26 염기의 길이에 있고, 모르폴리노 올리고머인 것이 바람직하다.
- [0087] 상기 올리고뉴클레오티드(이하, 「본 발명의 올리고뉴클레오티드」라 함)는 뉴클레오티드를 구성 단위로 하는 본 발명의 올리고머로서, 이러한 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 수식 뉴클레오티드 중 어느 것이어도 된다.
- [0088] 수식 뉴클레오티드란, 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드를 구성하는 핵산 염기, 당부분 및 인산 결합 부분의 전부 또는 일부가 수식되어 있는 것을 말한다.
- [0089] 핵산 염기로서는, 예를 들면 아데닌, 구아닌, 히포크산틴, 시토신, 티민, 우라실 또는 그들의 수식 염기를 들 수 있다. 이러한 수식 염기로서는, 예를 들면 슈도우라실, 3-메틸우라실, 디히드로우라실, 5-알킬시토신(예를 들면 5-메틸시토신), 5-알킬우라실(예를 들면 5-에틸우라실), 5-할로우라실(5-브로모우라실), 6-아자피리미딘, 6-알킬피리미딘(6-메틸우라실), 2-티오우라실, 4-티오우라실, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록시메틸)우라실, 5'-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 1-메틸아데닌, 1-메틸히포크산틴, 2,2-디메틸구아닌, 3-메틸시토신, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, N6-메틸아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메틸카르보닐메틸우라실, 5-메틸옥시우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시초산, 2-티오시토신, 퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 이소구아닌, 인돌, 이미다졸, 크산틴 등을 들 수 있는데, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0090] 당부분의 수식으로서, 예를 들면 리보오스의 2' 위치의 수식 및 당의 기타 부분의 수식을 들 수 있다. 리보오스의 2' 위치의 수식으로서, 예를 들면 리보오스의 2' 위치의 -OH기를 OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br, I로 치환하는 수식을 들 수 있다. 여기서 R은 알킬 또는 아릴을 나타낸다. R'는 알킬렌을 나타낸다.
- [0091] 당의 기타 부분의 수식으로서, 예를 들면 리보오스 또는 데옥시리보오스의 4' 위치의 O를 S로 치환한 것, 당의 2' 위치와 4' 위치를 가교한 것, 예를 들면 LNA(Locked Nucleic Acid) 또는 ENA(2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids) 등을 들 수 있는데, 이들에 한정되는 것은 아니다.

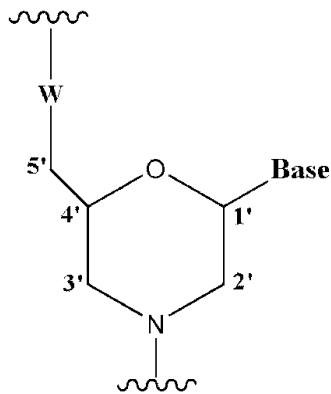
- [0092] 인산 결합 부분의 수식으로서, 예를 들면 포스포디에스테르 결합을 포스포로티오에이트 결합, 포스포로디티오에이트 결합, 알킬포스포네이트 결합, 포스포로아미데이트 결합, 보라노포스페이트 결합(Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160)으로 치환하는 수식을 들 수 있다(예를 들면 특허 재공표 공보 제2006/129594호 및 제2006/038608호를 참조).
- [0093] 알킬로서는 직쇄상 또는 분지쇄상의 탄소수 1~6의 알킬이 바람직하다. 구체적으로는 예를 들면 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, tert-펜틸, n-헥실, 이소헥실을 들 수 있다. 당해 알킬은 치환되어 있어도 되고, 이러한 치환기로서는 예를 들면 할로젠, 알콕시, 시아노, 니트로를 들 수 있으며, 이들이 1~3개 치환되어 있어도 된다.
- [0094] 시클로알킬로서는 탄소수 5~12의 시클로알킬이 바람직하다. 구체적으로는 예를 들면 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸, 시클로데실, 시클로도데실을 들 수 있다.
- [0095] 할로젠으로서는 불소, 염소, 브롬, 요오드를 들 수 있다.
- [0096] 알콕시로서는 직쇄상 또는 분지쇄상의 탄소수 1~6의 알콕시, 예를 들면 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, 이소부톡시, sec-부톡시, tert-부톡시, n-펜틸옥시, 이소펜틸옥시, n-헥실옥시, 이소헥실옥시 등을 들 수 있다. 특히 탄소수 1~3의 알콕시가 바람직하다.
- [0097] 아릴로서는 탄소수 6~10의 아릴이 바람직하다. 구체적으로는 예를 들면 페닐, α-나프틸, β-나프틸을 들 수 있다. 특히 페닐이 바람직하다. 당해 아릴은 치환되어 있어도 되고, 이러한 치환기로서는 예를 들면 알킬, 할로젠, 알콕시, 시아노, 니트로를 들 수 있으며, 이들이 1~3개 치환되어 있어도 된다.
- [0098] 알킬렌으로서는 직쇄상 또는 분지쇄상의 탄소수 1~6의 알킬렌이 바람직하다. 구체적으로는 예를 들면 메틸렌, 에틸렌, 트리메틸렌, 테트라메틸렌, 펜타메틸렌, 헥사메틸렌, 2-(에틸)트리메틸렌, 1-(메틸)테트라메틸렌을 들 수 있다.
- [0099] 아실로서는 직쇄상 또는 분지쇄상의 알카노일 또는 알로일을 들 수 있다. 알카노일로서는 예를 들면 포르밀, 아세틸, 2-메틸아세틸, 2,2-디메틸아세틸, 프로피오닐, 부티릴, 이소부티릴, 펜타노일, 2,2-디메틸프로피오닐, 헥사노일 등을 들 수 있다. 알로일로서는 예를 들면 벤조일, 톨루오일, 나프토일을 들 수 있다. 이러한 알로일은 치환 가능한 위치에 있어서 치환되어 있어도 되고, 알킬로 치환되어 있어도 된다.
- [0100] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 리보오스의 2' 위치의 -OH기가 메톡시로 치환되고, 인산 결합 부분이 포스포로티오에이트 결합인, 하기 화학식으로 표시되는 기를 구성 단위로 하는 본 발명의 올리고머이다.



- [0101]
- [0102] (식 중 Base는 핵산 염기를 나타낸다.)

- [0103] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 각종 자동합성장치(예를 들면 AKTA oligopilot plus 10/100(GE Healthcare))를 사용하여 용이하게 합성하는 것이 가능하고, 또는 제3자 기관(예를 들면 Promega사 또는 Takara사) 등에 위탁하여 제작하는 것도 가능하다.

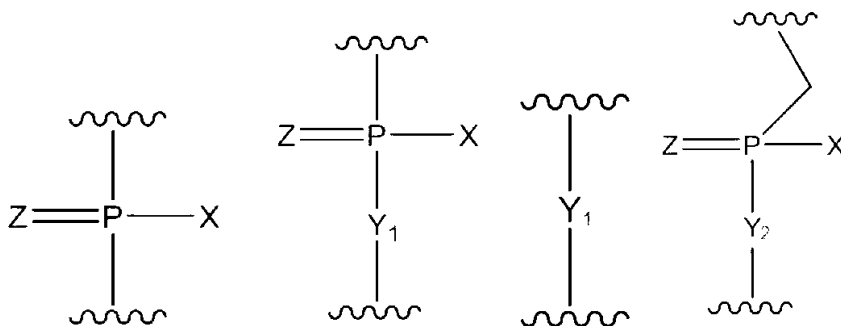
[0104] 상기 모르폴리노 올리고머는 하기 화학식으로 표시되는 기를 구성 단위로 하는 본 발명의 올리고머이다.



[0105]

[0106] (식 중 Base는 상기와 동일한 정의이고 ;

[0107] W는 다음 중 어느 하나의 식으로 표시되는 기를 나타낸다.



[0108]

[0109] (식 중 X는 $-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{NR}^2\text{R}^3$ 또는 F를 나타내고 ;

[0110] R^1 은 H, 알킬을 나타내며 ;

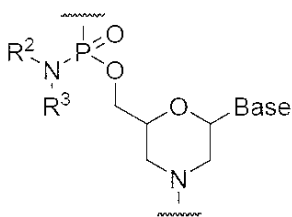
[0111] R^2 및 R^3 는 동일 또는 상이하여 H, 알킬, 시클로알킬 또는 아릴을 나타내고 ;

[0112] Y_1 은 O, S, CH_2 또는 NR^1 을 나타내며 ;

[0113] Y_2 는 O, S 또는 NR^1 을 나타내고 ;

[0114] Z는 O 또는 S를 나타낸다.))

[0115] 모르폴리노 올리고머는 바람직하게는 아래의 식으로 표시되는 기를 구성 단위로 하는 올리고머(포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고머(이하, 「PMO」라 함))이다.



[0116]

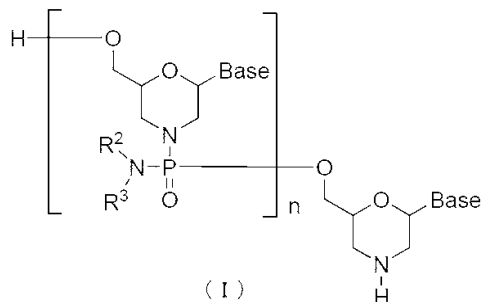
[0117] (식 중 Base, R^2 , R^3 는 상기와 동일한 정의이다.)

[0118] 모르폴리노 올리고머는 예를 들면 국제 공개공보 제1991/009033호 또는 국제 공개공보 제2009/064471호에 따라 제조할 수 있다. 특히 PMO는 국제 공개공보 제2009/064471호에 기재된 방법에 따라 제조하거나 또는 국제 공개

공보 제2013/100190호에 기재된 방법에 따라 제조할 수 있다.

[PMO의 제법]

PMO의 일태양으로서, 예를 들면 다음의 화학식(I)으로 표시되는 화합물(이하, PMO(I)이라 한다.)을 들 수 있다.



[식 중 각 Base, R^2 , R^3 는 상기와 동일한 정의이고 ;

n 은 1~99의 범위 내에 있는 임의의 정수이며, 바람직하게는 13~31의 범위 내에 있는 임의의 정수이다.]

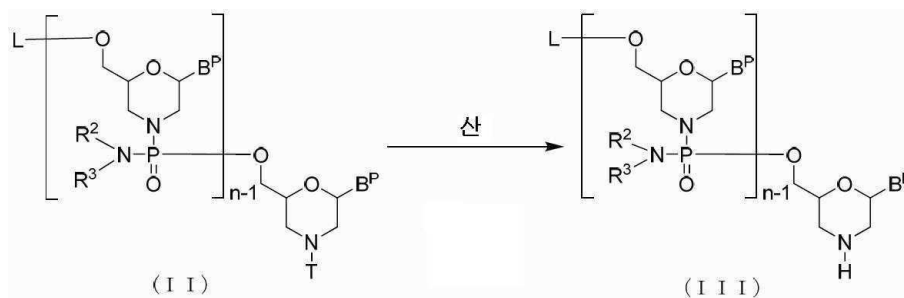
PMO(I)은 공지의 방법에 따라 제조할 수 있는데, 예를 들면 하기 공정의 조작을 실시함으로써 제조할 수 있다.

하기 공정에 사용되고 있는 화합물 및 시약은 PMO의 제조에 일반적으로 사용되고 있는 것이라면 특별히 한정되지 않는다.

또한 하기의 모든 공정은 액상법 또는 고상법(매뉴얼 또는 시판의 고상 자동합성기를 사용함)으로 실시할 수 있다. 고상법으로 PMO를 제조하는 경우, 조작 절차의 간편화 및 합성의 정확성 측면에서 자동합성기를 사용하는 방법이 바람직하다.

(1) 공정 A :

다음의 화학식(II)로 표시되는 화합물(이하, 화합물(II)라 한다.)에 산을 작용시킴으로써 다음의 화학식(III)로 표시되는 화합물(이하, 화합물(III)라 한다.)을 제조하는 공정.

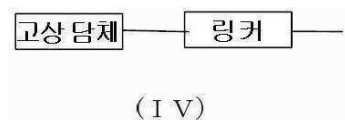


[식 중 n , R^2 , R^3 는 상기와 동일한 정의이고 ;

각 B^p 는 독립적으로 보호되어 있어도 되는 핵산 염기를 나타내며 ;

T는 트리틸기, 모노메톡시트리틸기 또는 디메톡시트리틸기를 나타내고 ;

L은 수소, 아실 또는 다음의 화학식(IV)로 표시되는 기(이하, 기(IV)라 한다.)를 나타낸다.]



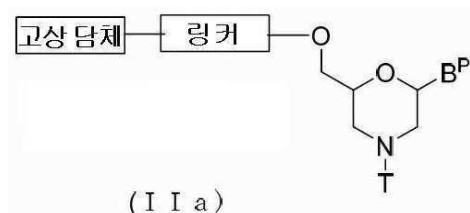
B^p 에 관계되는 「핵산 염기」로서는 Base와 동일한 「핵산 염기」를 들 수 있다. 단, B^p 에 관계되는 핵산 염기의 아미노기 또는 수산기는 보호되어 있어도 된다.

- [0136] 이러한 아미노기의 보호기로서는 핵산의 보호기로서 사용되는 것이라면 특별히 제한되지 않고, 구체적으로는 예를 들면 벤조일, 4-메톡시벤조일, 아세틸, 프로피오닐, 부티릴, 이소부티릴, 페닐아세틸, 페녹시아세틸, 4-tert-부틸페녹시아세틸, 4-이소프로필페녹시아세틸, (디메틸아미노)메틸렌을 들 수 있다. 수산기의 보호기로서는 예를 들면 2-시아노에틸, 4-니트로페닐, 페닐설폰에틸, 메틸설폰에틸, 트리메틸실릴에틸, 치환 가능한 임의의 위치에서 1~5개의 전자 흡인성기로 치환되어 있어도 되는 페닐, 디페닐카르바모일, 디메틸카르바모일, 디에틸카르바모일, 메틸페닐카르바모일, 1-피롤리디닐카르바모일, 모르폴리노카르바모일, 4-(tert-부틸카르복시)벤질, 4-[(디메틸아미노)카르복시] 벤질, 4-(페닐카르복시)벤질을 들 수 있다(예를 들면 국제 공개공보 제2009/064471호 공보 참조).
- [0137] 「고상 담체」로서는 핵산의 고상반응에 사용 가능한 담체라면 특별히 제한되지 않는데, 예를 들면 (i) 모르폴리노 핵산 유도체의 합성에 사용 가능한 시약(예를 들면 디클로로메탄, 아세토니트릴, 테트라졸, N-메틸이미다졸, 피리딘, 무수 초산, 루티딘, 트리플루오로초산)에 거의 용해되지 않고, (ii) 모르폴리노 핵산 유도체의 합성에 사용 가능한 시약에 대해 화학적으로 안정하며, (iii) 화학 수식이 가능하고, (iv) 바람직한 모르폴리노 핵산 유도체의 장전이 가능하며, (v) 처리 중에 가해지는 고압에 견디는 충분한 강도를 갖고, (vi) 일정 입경 범위와 분포인 것이 바람직하다. 구체적으로는 팽윤성 폴리스티렌(예를 들면 아미노메틸폴리스티렌 수지 1% 디벤질벤젠 가교(200~400 메시)(2.4~3.0 mmol/g)(도쿄 화학공업사 제조), Aminomethylated Polystyrene Resin · HCl [디벤질벤젠 1%, 100~200 메시] (캡티드 연구조사 제조)), 비팽윤성 폴리스티렌(예를 들면 Primer Support(GE Healthcare사 제조)), PEG 사슬 결합형 폴리스티렌(예를 들면 NH₂-PEG resin(와타나베 화학공업사 제조), TentaGel resin), 정공 유리(controlled pore glass; CPG)(예를 들면 CPG사 제조), 옥살릴화-정공 유리(예를 들면 Alul 등, Nucleic Acids Research, Vol.19, 1527(1991)을 참조), TentaGel 지지체-아미노폴리에틸렌글리콜 유도체화 지지체(예를 들면 Wright 등, Tetrahedron Letters, Vol.34, 3373(1993)을 참조), Poros-폴리스티렌/디비닐벤젠의 코폴리머를 들 수 있다.
- [0138] 「링커」로서는 통상 핵산이나 모르폴리노 핵산 유도체를 연결하기 위해 사용되는 공지의 것을 사용할 수 있는데, 예를 들면 3-아미노프로필, 숙시닐, 2,2'-디에탄올설폰, 장쇄 알킬 아미노(LCAA)를 들 수 있다.
- [0139] 본 공정은 화합물(II)에 산을 작용시킴으로써 실시할 수 있다.
- [0140] 본 공정에 사용 가능한 「산」으로서의 예를 들면 트리플루오로초산, 디클로로초산 또는 트리클로로초산을 들 수 있다. 산의 사용량으로서의 예를 들면 화합물(II) 1 몰에 대해 0.1 몰 당량~1,000 몰 당량의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 1 몰 당량~100 몰 당량의 범위 내이다.
- [0141] 또한 상기 산과 함께 유기 아민을 사용할 수 있다. 유기 아민으로서의 특별히 한정되는 것은 아니나, 예를 들면 트리에틸아민을 들 수 있다. 유기 아민의 사용량은 예를 들면 산 1 몰에 대해 0.01 몰 당량~10 몰 당량의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 0.1 몰 당량~2몰 당량의 범위 내이다.
- [0142] 본 공정에 있어서 산과 유기 아민의 염 또는 혼합물을 사용하는 경우에는, 예를 들면 트리플루오로초산과 트리에틸아민의 염 또는 혼합물을 들 수 있고, 보다 구체적으로는 트리플루오로초산 2 당량에 대해 트리에틸아민 1 당량을 혼합한 것을 들 수 있다.
- [0143] 본 공정에 사용 가능한 산은 0.1%~30% 범위 내의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석해서 사용하는 것도 가능하다. 용매로서는 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 디클로로메탄, 아세토니트릴, 알코올류(에탄올, 이소프로판올, 트리플루오로에탄올 등), 물 또는 이들의 혼합물을 들 수 있다.
- [0144] 상기 반응에 있어서의 반응온도는 예를 들면 10℃~50℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 20℃~40℃의 범위 내이며, 더욱 바람직하게는 25℃~35℃의 범위 내이다.
- [0145] 반응시간은 사용하는 산의 종류, 반응온도에 따라 상이하나, 통상 0.1분~24시간의 범위 내가 적당하다. 바람직하게는 1분~5시간의 범위 내이다.
- [0146] 또한 본 공정이 종료된 후, 필요에 따라 계(系) 중에 존재하는 산을 중화하기 위해 염기를 첨가할 수 있다. 「염기」로서는 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 디이소프로필에틸아민을 들 수 있다. 염기는 0.1%(v/v)~30%(v/v) 범위 내의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석하여 사용하는 것도 가능하다.
- [0147] 본 공정에 사용하는 용매로서는 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않으나 디클로로메탄, 아세토니트릴, 알코올류(에탄올, 이소프로판올, 트리플루오로에탄올 등), 물 또는 이들의 혼합물을 들 수 있다. 반응온도는 예를 들면 10℃~50℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 20℃~40℃의 범위 내이며, 더욱

바람직하게는 25℃~35℃의 범위 내이다.

[0148] 반응시간은 사용하는 염기의 종류, 반응온도에 따라 상이하나, 통상 0.1분~24시간의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 1분~5시간의 범위 내이다.

[0149] 또한 화합물(II)에 있어서 $n=1$ 이고, L이 기(IV)이다. 다음의 화학식(IIa)로 표시되는 화합물(이하, 화합물(IIa)라 한다.)은 아래의 방법에 따라 제조할 수 있다.

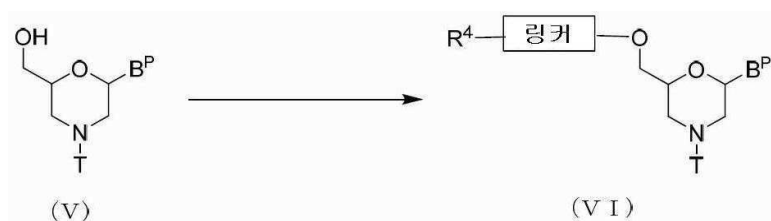


[0150]

[0151] [식 중 B^P, T, 링커, 고상 담체는 상기과 동일한 정의이다.]

[0152] 공정 1 :

[0153] 다음의 화학식(V)로 표시되는 화합물에 아실화제를 작용시킴으로써 다음의 화학식(VI)로 표시되는 화합물(이하, 화합물(VI)라 한다.)을 제조하는 공정.



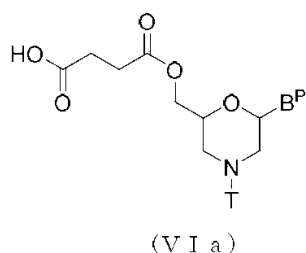
[0154]

[0155] [식 중 B^P , T, 링커는 상기와 동일한 정의이고 ;

[0156] R⁴는 수산기, 할로젠 또는 아미노를 나타낸다.]

[0157] 본 공정은 화합물(V)를 출발원료로 하여 공지의 링커 도입반응에 의해 실시할 수 있다.

[0158] 특히 다음의 화학식(VIa)로 표시되는 화합물은, 화합물(V)와 무수 숙신산을 사용하여 에스테르화 반응으로서 알려진 방법을 실시함으로써 제조할 수 있다.

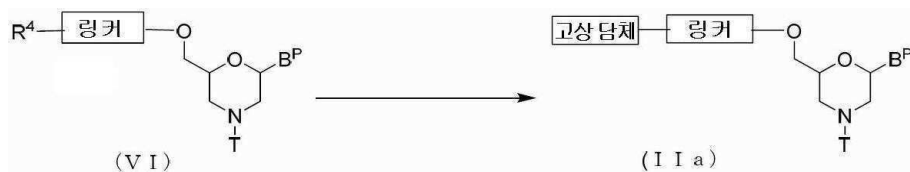


[0159]

[0160] [식 중 B^P , T는 상기와 동일한 정의이다.]

[0161] 공정 2 :

[0162] 화합물(VI)에 축합제 등을 작용시킴으로써 고상 담체와 반응시켜 화합물(IIa)를 제조하는 공정.

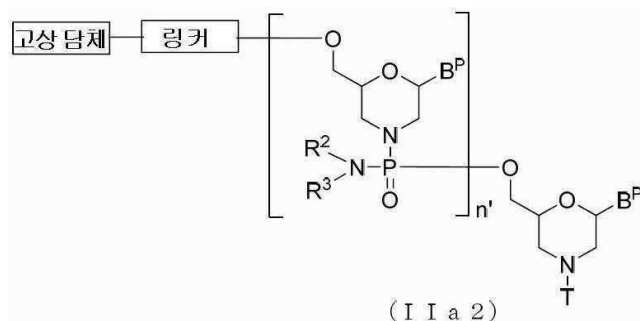


[0163]

[0164] [식 중 B^P , R^4 , T, 링커, 고상 담체는 상기와 동일한 정의이다.]

[0165] 본 공정은 화합물(VI)와 고상 담체를 사용하여 축합반응으로서 알려진 방법에 의해 제조할 수 있다.

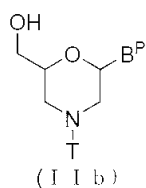
[0166] 화합물(II)에 있어서 $n=2\sim99$ 이고, L이 기(IV) 인 다음의 화학식(IIa2)로 표시되는 화합물은 화합물(IIa)를 출발 원료로 하여, 본 명세서에 기재된 PMO의 제법에 관계되는 공정 A 및 공정 B를 목적하는 횟수 반복 실시함으로써 제조할 수 있다.



[0167] [식 중 B^P , R^2 , R^3 , T, 링커, 고상 담체는 상기와 동일한 정의이고 ;

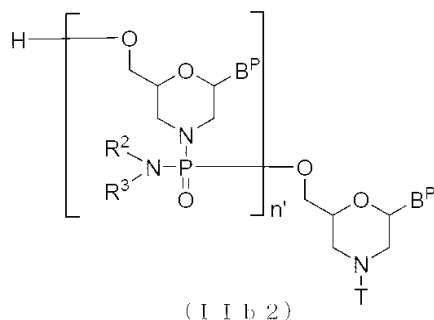
[0169] n' 는 1~98을 나타낸다.]

[0170] 또한 화합물(II)에 있어서 $n=1$ 이고, L이 수소인 다음의 화학식(IIb)로 표시되는 화합물은 예를 들면 국제 공개 공보 제1991/009033호에 기재된 방법에 의해 제조할 수 있다.



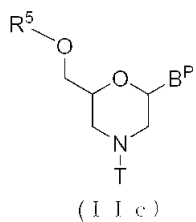
[0171] [식 중 B^P , T는 상기와 동일한 정의이다.]

[0173] 화합물(II)에 있어서 $n=2\sim99$ 이고, L이 수소인 다음의 화학식(IIb2)로 표시되는 화합물은 화합물(IIb)를 출발 원료로 하여, 본 명세서에 기재된 PMO의 제법에 관계되는 공정 A 및 공정 B를 목적하는 횟수 반복 실시함으로써 제조할 수 있다.



[0174] [식 중 B^P , n' , R^2 , R^3 , T는 상기와 동일한 정의이다.]

[0176] 또한 화합물(II)에 있어서 $n=1$ 이고, L이 아실인 다음의 화학식(IIc)로 표시되는 화합물은 화합물(IIb)에 대해 아실화 반응으로서 알려진 방법을 실시함으로써 제조할 수 있다.

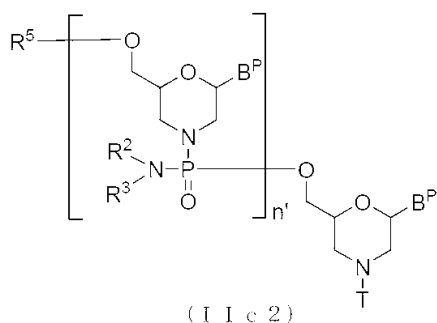


[0177]

[0178] [식 중 B^P , T는 상기와 동일한 정의이고 ;

[0179] R^5 는 아실을 나타낸다.]

[0180] 화합물(II)에 있어서 $n=2\sim99$ 이고, L이 아실인 다음의 화학식(IIc2)로 표시되는 화합물은 화합물(IIc)를 출발원료로 하여, 본 명세서에 기재된 PMO의 제법에 관계되는 공정 A 및 공정 B를 목적하는 횟수 반복 실시함으로써 제조할 수 있다.

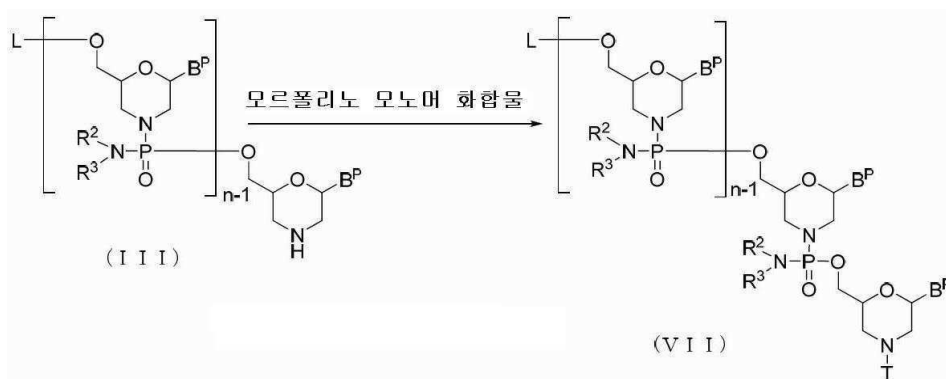


[0181]

[0182] [식 중 B^P , n' , R^2 , R^3 , R^5 , T는 상기와 동일한 정의이다.]

[0183] (2) 공정 B :

[0184] 화합물(III)에 염기 존재하에 모르폴리노 모노머 화합물을 작용시킴으로써 다음의 화학식(VII)으로 표시되는 화합물(이하, 화합물(VII)이라 한다.)을 제조하는 공정.

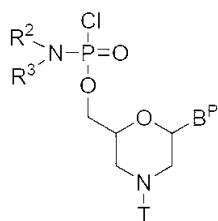


[0185]

[0186] [식 중 각 B^P , L, n, R^2 , R^3 , T는 상기와 동일한 정의이다.]

[0187] 본 공정은 화합물(III)에 염기 존재하에 모르폴리노 모노머 화합물을 작용시킴으로써 실시할 수 있다.

[0188] 모르폴리노 모노머 화합물로서는 예를 들면 다음의 화학식(VIII)으로 표시되는 화합물을 들 수 있다.



(VIII)

[0189]

[0190] [식 중 B^P , R^2 , R^3 , T는 상기와 동일한 정의이다.]

[0191] 본 공정에 사용 가능한 「염기」로서는 예를 들면 디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민 또는 N-에틸모르폴린을 들 수 있다. 염기의 사용량으로서는 예를 들면 화합물(III) 1 몰에 대해 1 몰 당량~1,000 몰 당량의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 10 몰 당량~100 몰 당량의 범위 내이다.

[0192] 본 공정에 사용 가능한 모르폴리노 모노머 화합물 및 염기는 0.1%~30%의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석하여 사용하는 것도 가능하다. 용매로서는 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 N,N-디메틸피피리딘, N-메틸피페리돈, DMF, 디클로로메탄, 아세트니트릴, 테트라히드로푸란 또는 이들의 혼합물을 들 수 있다.

[0193] 반응온도는 예를 들면 0℃~100℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 10℃~50℃의 범위 내이다.

[0194] 반응시간은 사용하는 염기의 종류, 반응온도에 따라 상이하나, 통상 1분~48시간의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 30분~24시간의 범위 내이다.

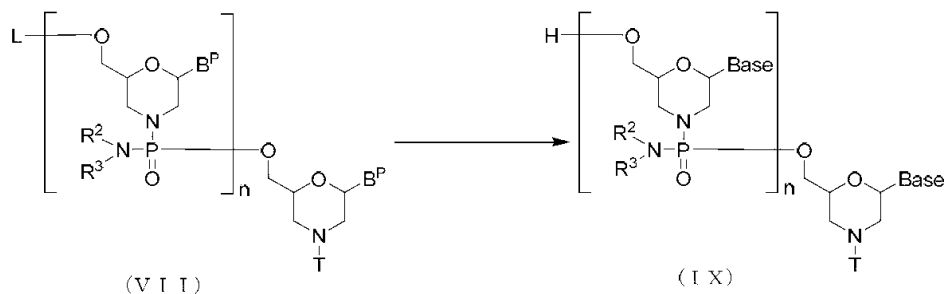
[0195] 또한 본 공정의 종료 후, 필요에 따라 아실화제를 첨가할 수 있다. 「아실화제」로서는 예를 들면 무수 초산, 초산 클로라이드, 페녹시초산 무수물을 들 수 있다. 아실화제는 예를 들면 0.1%~30% 범위 내의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석하여 사용하는 것도 가능하다. 용매로서는 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 디클로로메탄, 아세트니트릴, 알코올류(에탄올, 이소프로판올, 트리플루오로에탄올 등), 물 또는 이들의 혼합물을 들 수 있다.

[0196] 또한 필요하다면 아실화제와 함께 예를 들면 피리딘, 루티딘, 콜리딘, 트리에틸아민, 디이소프로필에틸아민, N-에틸모르폴린 등의 염기를 사용할 수 있다. 아실화제의 사용량으로서는 0.1 몰 당량~10,000 몰 당량의 범위 내가 바람직하고, 1 몰 당량~1,000 몰 당량의 범위 내가 보다 바람직하다. 염기의 사용량으로서는 예를 들면 아실화제 1 몰에 대해 0.1 몰 당량~100 몰 당량의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 1 몰 당량~10 몰 당량의 범위 내이다.

[0197] 본 반응의 반응온도는 10℃~50℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 10℃~50℃의 범위 내가 바람직하며, 보다 바람직하게는 20℃~40℃의 범위 내이고, 더욱 바람직하게는 25℃~35℃의 범위 내이다. 반응시간은 예를 들면 사용하는 아실화제의 종류, 반응온도에 따라 상이하나, 통상 0.1분~24시간의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 1분~5시간의 범위 내이다.

[0198] (3) 공정 C :

[0199] 공정 B에 있어서 제조되는 화합물(VII)에 있어서 탈보호제를 사용하여 보호기를 탈리해서, 화학식(IX)로 표시되는 화합물을 제조하는 공정.



[0200]

[0201] [식 중 Base, B^P, L, n, R², R³, T는 상기와 동일한 정의이다.]

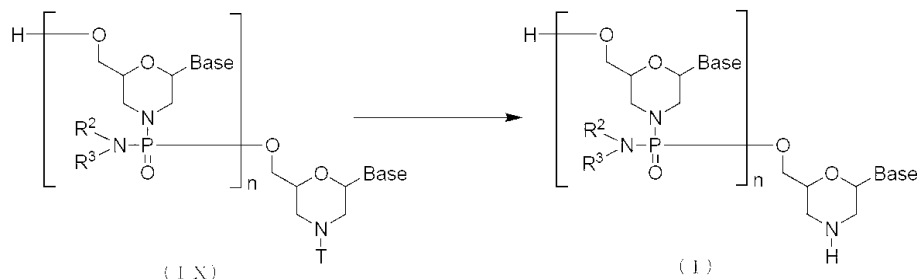
[0202] 본 공정은 화합물(VII)에 탈보호제를 작용시킴으로써 실시할 수 있다.

[0203] 「탈보호제」로서는 예를 들면 농암모니아수, 메틸아민을 들 수 있다. 본 공정에 사용 가능한 「탈보호제」는 예를 들면 물, 메탄올, 에탄올, 이소프로필알코올, 아세토니트릴, 테트라히드로푸란, DMF, N,N-디메틸이미다졸리돈, N-메틸피페리돈 또는 이들의 혼합용매로 희석해서 사용하는 것도 가능하다. 그중에서도 에탄올이 바람직하다. 탈보호제의 사용량으로서는 예를 들면 화합물(VII) 1 몰에 대해 예를 들면 1 몰 당량~100,000 몰 당량의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 10 몰 당량~1,000 몰 당량의 범위 내이다.

[0204] 반응온도는 예를 들면 15℃~75℃의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 40℃~70℃의 범위 내이며, 보다 바람직하게는 50℃~60℃의 범위 내이다. 탈보호 반응시간은 화합물(VII)의 종류, 반응온도 등에 따라 상이하나, 10분~30시간의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 30분~24시간의 범위 내이며, 보다 바람직하게는 5시간~20시간의 범위 내이다.

[0205] (4) 공정 D :

[0206] 공정 C에 있어서 제조되는 화합물(IX)에 산을 작용시킴으로써 PMO(I)을 제조하는 공정.



[0207]

[0208] [식 중 Base, n, R², R³, T는 상기와 동일한 정의이다.]

[0209] 본 공정은 화합물(IX)에 산을 첨가함으로써 실시할 수 있다.

[0210] 본 공정에 있어서 사용 가능한 「산」으로서는 예를 들면 트리클로로초산, 디클로로초산, 초산, 인산 및 염산 등을 들 수 있다. 산의 사용량으로서는 예를 들면 용액의 pH가 0.1~4.0의 범위 내가 되도록 사용하는 것이 적당하고, 보다 바람직하게는 1.0~3.0의 범위 내가 되도록 사용한다. 용매로서는 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 아세토니트릴, 물 또는 이들의 혼합용매를 들 수 있다.

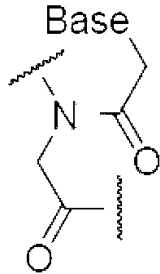
[0211] 반응온도는 10℃~50℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 20℃~40℃의 범위 내이며, 더욱 바람직하게는 25℃~35℃의 범위 내이다. 탈보호 반응시간은 화합물(IX)의 종류, 반응온도 등에 따라 상이하나, 0.1분~5시간의 범위 내가 적당하고, 바람직하게는 1분~1시간의 범위 내이며, 보다 바람직하게는 1분~30분의 범위 내이다.

[0212] PMO(I)은 본 공정에서 얻어진 반응 혼합물로부터 통상의 분리정제 수단, 예를 들면 추출, 농축, 중화, 여과, 원심분리, 재결정, C₈~C₁₈의 역상 칼럼크로마토그래피, 양이온 교환 칼럼크로마토그래피, 음이온 교환 칼럼크로마토그래피, 겔 여과 칼럼크로마토그래피, 고속 액체 크로마토그래피, 투석, 한계여과 등의 수단을 단독 또는 조합해서 사용함으로써 얻을 수 있어, 목적하는 PMO(I)을 단리 정제할 수 있다(예를 들면 국제 공개공보 W01991/09033을 참조).

[0213] 역상 크로마토그래피를 사용하여 PMO(I)을 정제하는 경우에는 용출 용매로서, 예를 들면 20 mM의 트리에틸아민/초산 완충액과 아세토니트릴의 혼합용액을 사용할 수 있다.

[0214] 또한 이온교환 크로마토그래피를 사용하여 PMO(I)을 정제하는 경우에는, 예를 들면 1 M의 식염수와 10 mM의 수산화나트륨 수용액의 혼합용액을 사용할 수 있다.

[0215] 상기 펩티드 핵산 올리고머는 하기 화학식으로 표시되는 기를 구성 단위로 하는 본 발명의 올리고머이다.



[0216]

[0217] (식 중 Base는 상기와 동일한 정의이다.)

[0218] 펩티드 핵산은 예를 들면 아래의 문헌에 따라 제조할 수 있다.

[0219] 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Science, 254, 1497 (1991)

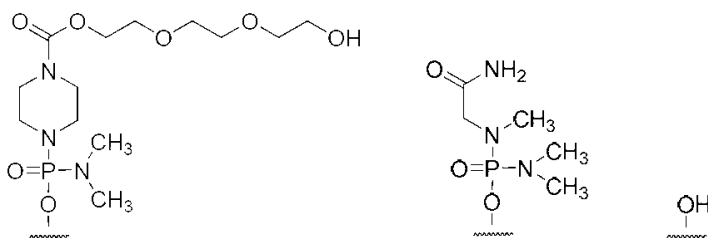
[0220] 2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, JACS., 114, 1895 (1992)

[0221] 3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, J. Org. Chem., 59, 5767 (1994)

[0222] 4) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, J. Pept. Sci., 1, 175 (1995)

[0223] 5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, J. Pept. Res., 49, 80 (1997)

[0224] 또한 본 발명의 올리고머는 5' 말단이 하기 화학식 (1)~(3) 중 어느 하나의 기여도 된다. 바람직하게는 (3) -OH이다.



[0225]

[0226] 이하, 상기 (1), (2) 및 (3)으로 나타내어지는 기를 각각 「기(1)」, 「기(2)」 및 「기(3)」이라 부른다.

[0227] 2. 의약 조성물

[0228] 본 발명의 올리고머는 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑을 가능하게 한다. 따라서, 본 발명의 올리고머를 포함하는 의약 조성물을 디스트로핀 유전자에 엑손 45 스킵의 대상이 되는 변이(엑손 45 스킵핑으로 인프레임(in-frame)화하는 변이)를 갖는 DMD 환자에게 투여함으로써 근이영양증의 증상을 완화시킬 수 있는 것으로 예측된다. 또한 짧은 사슬 길이로 이루어지는 본 발명의 올리고머는 제조 공정이 간편하고, 또한 제조 비용이 억제된다는 메리트가 있다.

[0229] 이에 다른 실시태양으로서 본 발명의 올리고머, 그의 의약적으로 허용 가능한 염 또는 수화물을 유효 성분으로 하는 근이영양증 치료용 의약 조성물(이하, 「본 발명의 조성물」이라 함)을 제공한다.

[0230] 본 발명의 조성물에 포함되는 본 발명의 올리고머의 의약적으로 허용 가능한 염의 예로서는 나트륨염, 칼륨염,

리튬염과 같은 알칼리금속염, 칼슘염, 마그네슘염과 같은 알칼리토류금속염; 알루미늄염, 철염, 아연염, 구리염, 니켈염, 코발트염 등의 금속염; 암모늄염; t-옥틸아민염, 디벤질아민염, 모르폴린염, 글루코사민염, 페닐글리신알킬에스테르염, 에틸렌디아민염, N-메틸글루카민염, 구아니딘염, 디에틸아민염, 트리에틸아민염, 디시클로헥실아민염, N,N'-디벤질에틸렌디아민염, 클로로프로카인염, 프로카인염, 디에탄올아민염, N-벤질-페네틸아민염, 피페라진염, 테트라메틸암모늄염, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄염과 같은 유기 아민염; 플루오르화 수소산염, 염산염, 브롬화 수소산염, 요오드화 수소산염과 같은 할로젠화 수소산염; 질산염, 과염소산염, 황산염, 인산염 등의 무기산염; 메탄설폰산염, 트리플루오로메탄설폰산염, 에탄설폰산염과 같은 저급 알칸설폰산염; 벤젠설폰산염, p-톨루엔설폰산염과 같은 아릴설폰산염; 초산염, 말산염, 푸마르산염, 숙신산염, 구연산염, 타르타르산염, 옥살산염, 말레산염 등의 유기산염; 글리신염, 리신염, 아르기닌염, 오르니틴염, 글루타민산염, 아스파라긴산염과 같은 아미노산염 등을 들 수 있다. 이들 염은 공지의 방법으로 제조할 수 있다. 또는 본 발명의 조성물에 포함되는 본 발명의 올리고머는 그의 수화물의 형태로 있어도 된다.

[0231] 본 발명의 조성물의 투여형태는 의약적으로 허용 가능한 투여형태라면 특별히 제한되지 않고 치료방법에 따라 선택할 수 있으나, 근조직으로의 송달 용이성의 관점에서 정맥내 투여, 동맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 경구 투여, 조직내 투여, 경피 투여 등이 바람직하다. 또한 본 발명의 조성물이 취할 수 있는 제형으로서는 특별히 제한되지 않으나, 예를 들면 각종 주사제, 경구제, 점적제, 흡입제, 연고제, 로션제 등을 들 수 있다.

[0232] 본 발명의 올리고머를 근이영양증 환자에게 투여하는 경우, 본 발명의 조성물은 그 올리고머의 근조직으로의 송달을 촉진하는 담체를 포함하는 것이 바람직하다. 이러한 담체는 의약적으로 허용 가능한 것이라면 특별히 제한되지 않고, 그 예로서 양이온성 리포솜, 양이온성 폴리머 등의 양이온성 담체 또는 바이러스 엔벨로프를 이용한 담체를 들 수 있다. 양이온성 리포솜으로서는 예를 들면 2-0-(2-디에틸아미노에틸)카르바모일-1,3-0-디올레오일 글리세롤과 인지질을 필수 구성성분으로서 형성되는 리포솜(이하, 「리포솜 A」라 함), 올리고펙트아민(등록상표)(Invitrogen사 제조), 리포펙틴(등록상표)(Invitrogen사 제조), 리포펙트아민(등록상표)(Invitrogen사 제조), Lipofectamine 2000(등록상표)(Invitrogen사 제조), DMRIE-C(등록상표)(Invitrogen사 제조), GeneSilencer(등록상표)(Gene Therapy Systems사 제조), TransMessenger(등록상표)(QIAGEN사 제조), TransIT TKO(등록상표)(Mirus사 제조), Nucleofector II(Lonza)를 들 수 있다. 그들 중에서 리포솜 A가 바람직하다. 양이온성 폴리머로서는 예를 들면 JetSI(등록상표)(Qbiogene사 제조), Jet-PEI(등록상표)(폴리에틸렌이민, Qbiogene사 제조)를 들 수 있다. 바이러스 엔벨로프를 이용한 담체로서는 예를 들면 GenomeOne(등록상표)(HVJ-E 리포솜, 이시하라 산교사 제조)을 들 수 있다. 또는 일본국 특허 제2924179호에 기재된 의약 디바이스, 일본국 특허 제공표 공보 제2006/129594호 및 일본국 특허 제공표 공보 제2008/096690호에 기재된 양이온성 담체를 사용하는 것도 가능하다.

[0233] 본 발명의 조성물에 포함되는 본 발명의 올리고머의 농도는 담체의 종류 등에 따라 상이하나, 0.1 nM~100 μ M의 범위 내가 적당하고, 1 nM~10 μ M의 범위 내가 바람직하며, 10 nM~1 μ M의 범위 내가 보다 바람직하다. 또한 본 발명의 조성물에 포함되는 본 발명의 올리고머와 담체의 중량비(담체/본 발명의 올리고머)는 그 올리고머의 성질 및 그 담체의 종류 등에 따라 상이하나, 0.1~100의 범위 내가 적당하고, 1~50의 범위 내가 바람직하며, 10~20의 범위 내가 보다 바람직하다.

[0234] 본 발명의 조성물에는 본 발명의 올리고머와 전술한 담체 이외에 임의로 의약적으로 허용 가능한 첨가제를 배합할 수 있다. 이러한 첨가제로서 예를 들면 유화 보조제(예를 들면 탄소수 6~22의 지방산이나 그의 의약적으로 허용 가능한 염, 알부민, 텍스트란), 안정화제(예를 들면 콜레스테롤, 포스파티딘산), 등장화제(예를 들면 염화나트륨, 글루코오스, 말토오스, 락토오스, 수크로오스, 트레할로오스), pH 조정제(예를 들면 염산, 황산, 인산, 초산, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 트리에탄올아민)를 들 수 있다. 이들을 1종 또는 2종 이상 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물 중 당해 첨가제의 함유량은 90 중량% 이하가 적당하고, 70 중량% 이하가 바람직하며, 50 중량% 이하가 보다 바람직하다.

[0235] 본 발명의 조성물은 담체의 분산액에 본 발명의 올리고머를 첨가하고 적당히 교반함으로써 조제할 수 있다. 또한 첨가제는 본 발명의 올리고머의 첨가 전에도 첨가 후에도 적당한 공정에서 첨가할 수 있다. 본 발명의 올리고머를 첨가시킬 때 사용할 수 있는 수성 용매로서는 의약적으로 허용 가능한 것이라면 특별히 제한되지 않고, 예를 들면 주사용수, 주사용 증류수, 생리식염수 등의 전해질액, 포도당액, 말토오스액 등의 당액을 들 수 있다. 또한 이러한 경우의 pH 및 온도 등의 조건은 당업자가 적절히 선택할 수 있다.

[0236] 본 발명의 조성물은 예를 들면 액제나 그의 동결건조제제로 할 수 있다. 당해 동결건조제제는 통상의 방법으로 액제의 형태를 가지고 있는 본 발명의 조성물을 동결건조처리함으로써 조제할 수 있다. 예를 들면 액제의 형태

를 가지고 있는 본 발명의 조성물을 적당한 멸균을 행한 후 소정량을 바이알병에 분주하고, 약 -40~-20℃의 조건에서 예비 동결을 2시간 정도 행하여, 약 0~10℃에서 감압하에 1차 건조를 행하고, 이어서 약 15~25℃에서 감압하에 2차 건조하여 동결건조할 수 있다. 그리고 일반적으로는 바이알 내부를 질소가스로 치환하고, 타전(打栓)하여 본 발명의 조성물의 동결건조제제를 얻을 수 있다.

[0237] 본 발명의 조성물의 동결건조제제는 일반적으로는 임의의 적당한 용액(재용해액)의 첨가에 의해 재용해해서 사용할 수 있다. 이러한 재용해액으로서는 주사용수, 생리식염수, 기타 일반 수액을 들 수 있다. 이 재용해액의 액량은 용도 등에 따라 상이하어 특별히 제한되지 않으나, 동결건조 전 액량의 0.5~2배량 또는 500 mL 이하가 적당하다.

[0238] 본 발명의 조성물을 투여할 때의 용량으로서는 함유되는 본 발명의 올리고머의 종류, 제형, 연령이나 체중 등의 환자의 상태, 투여 경로, 질환의 성질과 정도를 고려하여 조제하는 것이 바람직하나, 성인에 대해 본 발명의 올리고머의 양으로서 1일당 0.1 mg~10 g/인간의 범위 내가, 바람직하게는 1 mg~1 g/인간의 범위 내가 일반적이다. 이 수치는 표적으로 하는 질환의 종류, 투여형태, 표적 분자에 따라서도 상이한 경우가 있다. 따라서, 경우에 따라서는 이 이하여도 충분하고, 또한 반대로 이 이상의 용량을 필요로 할 때도 있다. 또한 1일 1회 내지 수회의 투여 또는 1일 내지 수일 간의 간격으로 투여할 수 있다.

[0239] 본 발명의 조성물의 다른 태양으로서 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 발현할 수 있는 벡터와 전술한 담체를 포함하는 의약 조성물을 들 수 있다. 이러한 발현 벡터는 복수의 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 발현 가능한 것 이어도 된다. 당해 조성물에는 본 발명의 올리고머를 함유하는 본 발명의 조성물과 마찬가지로 의약적으로 허용 가능한 첨가제를 첨가할 수 있다. 당해 조성물 중에 포함되는 발현 벡터의 농도는 담체의 종류 등에 따라 상이하나, 0.1 nM~100 μM의 범위 내가 적당하고, 1 nM~10 μM의 범위 내가 바람직하며, 10 nM~1 μM의 범위 내가 보다 바람직하다. 당해 조성물 중에 포함되는 발현 벡터와 담체의 중량비(담체/발현 벡터)는 발현 벡터의 성질, 담체의 종류 등에 따라 상이하나, 0.1~100의 범위 내가 적당하고, 1~50의 범위 내가 바람직하며, 10~20의 범위가 보다 바람직하다. 또한 당해 조성물 중에 포함되는 담체의 함유량은 본 발명의 올리고머를 함유하는 본 발명의 조성물의 경우와 동일하고, 그의 조제방법 등에 관해서도 본 발명의 조성물의 경우와 동일하다.

[0240] 아래에 실시예 및 시험예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하나, 본 발명은 실시예에 나타내어지는 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0241] 실시예

[0242] [참고예 1]

[0243] 아미노폴리스티렌 수지에 담지된 4-{ [(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1-일)-4-트리틸모르폴린-2-일] 메톡시}-4-옥소부탄산

[0244] 공정 1 : 4-{ [(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일] 메톡시}-4-옥소부탄산의 제조

[0245] 아르곤 분위기하, N-{1- [(2R,6S)-6-(히드록시메틸)-4-트리틸모르폴린-2-일] -2-옥소-1,2-디히드로피리미딘-4-일}벤즈아미드 3.44 g과 4-디메틸아미노피리딘(4-DMAP) 1.1 g을 디클로로메탄 50 mL에 현탁하고, 무수 숙신산 0.90 g을 첨가하여 실온에서 3시간 교반하였다. 반응액에 메탄올 10 mL를 첨가하고 감압 농축하였다. 잔사에 초산에틸과 0.5 M의 인산이수소칼륨 수용액을 사용하여 추출 조작을 행하였다. 얻어진 유기층을 0.5 M의 인산이수소칼륨 수용액, 물, 포화식염수의 순으로 세정하였다. 얻어진 유기층을 황산나트륨으로 건조하고, 감압 농축하여 4.0 g의 목적물을 얻었다.

[0246] 공정 2 : 아미노폴리스티렌 수지에 담지된 4-{ [(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1-일)-4-트리틸모르폴린-2-일] 메톡시}-4-옥소부탄산의 제조

[0247] 4-{ [(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일] 메톡시}-4-옥소부탄산 4.0 g을 피리딘(탈수) 200 mL에 용해하고, 4-DMAP 0.73 g, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 염산염 11.5 g을 첨가하였다. 이어서 아미노폴리스티렌 수지 Primer support 200 amino(GE Healthcare Japan사 제조, 17-5214-97) 25.0 g, 트리에틸아민 8.5 mL를 첨가하고 실온에서 4일간 진탕하였다. 반응 후 수지를 여과하여 모았다. 얻어진 수지를 피리딘, 메탄올, 디클로로메탄의 순으로 세정하고 감압 건조하였다. 얻어진 수지에 테트라히드로푸란(탈수) 200 mL, 무수 초산 15 mL, 2,6-루티딘 15 mL를 첨가하고 실온에서 2시간 진탕하였다. 수지를 여과하여 모아 피리딘, 메탄올, 디클로로메탄의 순으로 세정하고 감압 건조하여 26.7 g의 목적물을 얻었다.

- [0248] 당해 목적물의 로딩량은 공지의 방법을 사용하여 수지 1 g당 트리틸의 물량을 409 nm에 있어서의 UV 흡광도를 측정함으로써 결정하였다. 수지의 로딩량은 129.2 $\mu\text{mol/g}$ 이었다.
- [0249] UV 측정조건
- [0250] 기기 : U-2910(히타치 제작소)
- [0251] 용매 : 메탄선폰산
- [0252] 파장 : 409 nm
- [0253] ϵ 값 : 45000
- [0254] [참고예 2]
- [0255] 아미노폴리스티렌 수지에 담지된 4-{ [(2S,6R)-6-(5-메틸-2,4-디옥소피리미딘-1-일)-4-트리틸모르폴린-2-일] 메톡시}-4-옥소부탄산
- [0256] 참고예 1과 동일한 방법에 따라 표기 화합물을 제조하였다. 단, 참고예 1의 공정 1에서 사용한 N-{1- [(2R,6S)-6-(히드록시메틸)-4-트리틸모르폴린-2-일] -2-옥소-1,2-디히드로피리미딘-4-일}벤즈아미드 대신에, 본 공정에서는 1- [(2R,6S)-6-(히드록시메틸)-4-트리틸모르폴린-2-일] -5-메틸피리미딘-2,4(1H,3H)-디온을 사용하였다.
- [0257] 당해 목적물의 로딩량은 공지의 방법을 사용하여 수지 1 g당 트리틸의 물량을 409 nm에 있어서의 UV 흡광도를 측정함으로써 결정하였다. 수지의 로딩량은 164.0 $\mu\text{mol/g}$ 이었다.
- [0258] [참고예 3]
- [0259] 아미노폴리스티렌 수지에 담지된 4-{ [(2S,6R)-6-(6-벤즈아미드퓨린-9-일)-4-트리틸모르폴린-2-일] 메톡시}-4-옥소부탄산
- [0260] 참고예 1과 동일한 방법에 따라 표기 화합물을 제조하였다. 단, 참고예 1의 공정 1에서 사용한 N-{1- [(2R,6S)-6-(히드록시메틸)-4-트리틸모르폴린-2-일] -2-옥소-1,2-디히드로피리미딘-4-일}벤즈아미드 대신에, 본 공정에서는 N-{9- [(2R,6S)-6-(히드록시메틸)-4-트리틸모르폴린-2-일] 퓨린-6-일}벤즈아미드를 사용하였다.
- [0261] 당해 목적물의 로딩량은 공지의 방법을 사용하여 수지 1 g당 트리틸의 물량을 409 nm에 있어서의 UV 흡광도를 측정함으로써 결정하였다. 수지의 로딩량은 185.7 $\mu\text{mol/g}$ 이었다.
- [0262] [참고예 4]
- [0263] 아미노폴리스티렌 수지에 담지된 4-{[(2S,6R)-6-{6-(2-시아노에톡시)-2- [(2-페녹시아세틸)아미노] 퓨린-9-일}-4-트리틸모르폴린-2-일}메톡시}-4-옥소부탄산
- [0264] 참고예 1과 동일한 방법에 따라 표기 화합물을 제조하였다. 단, 참고예 1의 공정 1에서 사용한 N-{1- [(2R,6S)-6-(히드록시메틸)-4-트리틸모르폴린-2-일] -2-옥소-1,2-디히드로피리미딘-4-일}벤즈아미드 대신에, 본 공정에서는 N-{6-(2-시아노에톡시)-9- [(2R,6S)-6-(히드록시메틸)-4-트리틸모르폴린-2-일] 퓨린-2-일}-2-페녹시아세트아미드를 사용하였다.
- [0265] 당해 목적물의 로딩량은 공지의 방법을 사용하여 수지 1 g당 트리틸의 물량을 409 nm에 있어서의 UV 흡광도를 측정함으로써 결정하였다. 수지의 로딩량은 164.8 $\mu\text{mol/g}$ 이었다.
- [0266] 아래의 실시예 1의 기재에 따라 표 1의 PMO No.1~81의 염기서열을 갖는 PMO(R^2 , R^3 는 메틸이고, 5' 말단은 기(3)임)를 합성하였다. 합성한 PMO를 주사용수(오즈카 제약 공장사 제조)로 용해하였다.

표 1

PMO No.	염기서열	서열명	서열번호
1	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTC	H45_1-13_18-30	14
2	GTTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_20-32	7
3	GCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_18-28	15
4	CCGCTGCCCAATGTCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_15-27	16
5	TTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_18-30	17
6	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_21-31	18
7	TTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTC	H45_-1-11_20-31	19
8	TGCCGCTGCCCCGACATCCTGGAGTTC	H45_1-15_19-29	20
9	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	H45_-2-10_21-32	8
10	CAGTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_20-34	9
11	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	H45_-2-8_19-34	10
12	GTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-12_20-32	21
13	CAGTTTGCCGCTGCTGGAGTTCCT	H45_-2-8_21-34	22
14	ACAGTTTGCCGCTCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_23-35	23
15	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT	H45_-2-7_20-34	24
16	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	H45_-1-8_19-32	25
17	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCTG	H45_-3-7_20-34	26
18	CCGCTGCCCAATGTGGAGTTCCTGT	H45_-4-8_15-27	27
19	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	H45_1-8_19-34	28
20	CCGCTGCCCAATCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_16-27	29
21	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	H45_-1-8_19-34	30
22	TTGCCGCTGCCCACTGGAGTTCCT	H45_-2-9_18-30	31
23	TTGCCGCTGCCCACTGGAGTTCCTGT	H45_-4-9_18-30	32
24	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTC	H45_-1-10_25-35	33
25	GTTTGCCGCTGC	H45_21-32	34
26	CCTGGAGTTCCT	H45_-2-10	35
27	TGGAGTTCCT	H45_-2-8	36
28	CAGTTTGCCGCTGCCC	H45_19-34	37
29	TTCTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	H45_2-14_53-65	38
30	AGACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTT	H45_2-14_136-148	39
31	TTCTTTCCCAGTTGCGCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_52-66	11
32	CAGACCTCCTGCCACGCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_135-149	12
33	GACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTTC	H45_1-14_136-147	40

[0267]

34	TCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_52-62	41
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_137-147	42
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-14_53-64	43
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGTTC	H45_1-13_51-63	44
38	CCTCCTGCCACCGCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_133-145	45
39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_134-146	46
40	TTTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_55-67	47
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_138-150	48
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_52-66	49
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_50-61	50
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTTC	H45_-1-10_52-66	51
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_52-64	52
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTTC	H45_1-11_135-149	53
47	TGCAGACCTCCTGCCCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_137-151	54
48	CTGTTTGAGACCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_144-156	55
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTTCCTGTA	H45_-5-8_141-153	56
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_128-142	57
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTGCCAAT	H45_16-30_132-146	58
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_98-110	59
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTTT	H45_85-97_132-144	60
54	ACCTCCTGCCACCGCTCTTCCCCAGTTGCA	H45_51-65_132-146	61
55	TGGCATCTGTTTTTCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_85-97	62
56	TTATTTCTTCCCCAGTTCTGTGAAGA	H45_-8-5_58-70	63
57	GCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	H45_-1-15_114-123	64
58	GGCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_114-124	65
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	H45_129-143_156-170	66
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGCTGAATT	H45_69-83_129-143	67
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTTTT	H45_84-98_129-143	68
62	TCCTGCCACCGCAGATTTTCTGTAGAATA	H45_99-113_129-143	69
63	GCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15	70
64	TTCTTCCCCAGTTGC	H45_52-66	71
65	CAGACCTCCTGCCAC	H45_135-149	72
66	TCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11	73
67	GTTTGCCGCTGCC	H45_20-32	74
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCAAT	H45_16-28_132-144	75

[0268]

69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTGCA	H45_51-63_117-129	76
70	TGGAGTTCC	H45_-1-8	77
71	TGGAGTTC	H45_1-8	78
72	CAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-34	79
73	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_25-35	80
74	GTTTGCCGCTGCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_20-32	81
75	AACAGTTTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_26-36	82
76	CAGTTTGCCGCTGGAGTTC	H45_1-10_25-34	83
77	CAGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_24-34	84
78	AGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_24-33	85
79	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	H45_-1-9_25-35	86
80	TGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_18-29	87
81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCAATGC	H45_14-27_130-141	88
82	CCTGGAGTTCC	H45_-1-10	144
83	CAGTTTGCCG	H45_25-34	145
84	ACAGTTTGCCG	H45_25-35	146

[0269]

[0270]

[0271]

[실시예 1]

5' 말단 염기에 대응하는 아미노폴리스티렌 수지에 담지된 4-{ [(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1(2H)-일)-4-트리틸모르폴린-2-일] 메톡시}-4-옥소부탄산(참고예 1), 또는 아미노폴리스티렌 수지에 담지된 4-{ [(2S,6R)-6-(5-메틸-2,4-디옥소피리미딘-1-일)-4-트리틸모르폴린-2-일] 메톡시}-4-옥소부탄산(참고예 2), 또는 아미노폴리스티렌 수지에 담지된 4-{ [(2S,6R)-6-(6-벤즈아미드퓨린-9-일)-4-트리틸모르폴린-2-일] 메톡시}-4-옥소부탄산(참고예 3), 또는 아미노폴리스티렌 수지에 담지된 4-{[(2S,6R)-6-{6-(2-시아노에톡시)-2-[(2-페녹시아세틸)아미노] 퓨린-9-일}-4-트리틸모르폴린-2-일}메톡시}-4-옥소부탄산(참고예 4) 0.2 g을 필터 부착 칼럼에 충전하고, 핵산 합성기(AKTA Oligopilot 10 plus)를 사용하여 하기 합성 사이클을 개시하였다. 표 1에 기재된 각 화합물의 염기서열이 되도록 각 커플링 사이클에 있어서 목적하는 모르폴리노 모노머 화합물을 첨가하였다(하기 표 2를 참조).

표 2

스텝	시약	양 (mL)	시간 (분)
1	디블로킹 용액	18~32	1.8~3.2
2	중화·세정 용액	30	1.5
3	커플링 용액 B	5	0.5
4	커플링 용액 A	1.3	0.25
5	스텝 3과 4에서 투입한 시약에 의한 커플링 반응		120~300
6	아세트니트릴	20	1.0
7	캠핑 용액	9	2.0
8	아세트니트릴	30	2.0

(주) 3' 말단 아세틸화의 경우에만 최종 사이클 후 스텝 1, 2, 7, 8 만을 재차 실시.

[0272]

[0273]

또한 디블로킹 용액으로서는 3%(w/v) 트리플루오로초산을 함유하는 디클로로메탄 용액을 사용하였다. 중화·세정 용액으로서는 N,N-디이소프로필에틸아민을 10%(v/v)가 되도록, 또한 테트라히드로푸란을 5%(v/v)가 되도록 35%(v/v)의 아세트니트릴을 함유하는 디클로로메탄 용액으로 용해한 것을 사용하였다. 커플링 용액 A로서는 모

르폴리노 모노머 화합물을 0.10 M이 되도록 테트라히드로푸란으로 용해한 것을 사용하였다. 커플링 용액 B로서는 N,N-디이소프로필에틸아민을 20%(v/v)가 되도록, 또한 테트라히드로푸란을 10%(v/v)가 되도록 아세트니트릴로 용해한 것을 사용하였다. 캡핑 용액으로서는 아세트니트릴에 대해 20%(v/v)의 무수 초산과 30%(v/v)의 2,6-루티딘을 용해한 것을 사용하였다.

[0274] 상기에서 합성한 PMO가 담지된 아미노폴리스티렌 수지를 반응 용기로부터 회수하여 2시간 이상 실온에서 감압 건조하였다. 건조한 아미노폴리스티렌 수지에 담지된 PMO를 반응 용기에 넣고, 28% 암모니아수-에탄올(1/4) 5 mL를 첨가하여 55℃에서 15시간 교반하였다. 아미노폴리스티렌 수지를 여과 분별하고, 물-에탄올(1/4) 1 mL로 세정하였다. 얻어진 여액을 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 20 mM의 초산-트리에틸아민 완충액(TEAA 완충액)과 아세트니트릴의 혼합용매(4/1) 10 mL에 용해하고, 멤브레인 필터로 여과하였다. 얻어진 여액을 역상 HPLC로 정제하였다. 사용한 조건은 아래의 표 3에 나타내는 바와 같다.

표 3

칼럼	XBridge 5 μ m C18 (Waters, ϕ 19×50mm, 1CV =14mL)
유속	10mL/분
칼럼 온도	실온
A 액	20mM TEAA 완충액
B 액	CH ₃ CN
그라디언트	(B) conc. 10→70%/15CV

CV : 칼럼 볼륨

[0275]

[0276] 각 분획을 분석하여 목적물을 회수하고 감압 농축하였다. 농축 잔사에 2 M의 인산 수용액 0.5 mL를 첨가하고 15 분간 교반하였다. 추가로 2 M의 수산화나트륨 수용액 2 mL를 첨가하여 알칼리성으로 하고 멤브레인 필터(0.45 μ m)로 여과하였다.

[0277] 얻어진 목적물을 함유하는 수용액을 음이온 교환 수지 칼럼으로 정제하였다. 사용한 조건은 하기 표 4에 나타내는 바와 같다.

표 4

칼럼	Source 15Q (GE Healthcare, ϕ 10×108mm, 1CV =8.5mL)
유속	8.5mL/min
칼럼 온도	실온
A 액	10mM 의 수산화나트륨 수용액
B 액	10mM 의 수산화나트륨 수용액, 1M 의 염화나트륨 수용액
그라디언트	(B) conc. 1→50%/40CV

[0278]

[0279] 각 분획을 분석(HPLC)하여 목적물을 수용액으로서 얻었다. 얻어진 수용액에 0.1 M의 인산 완충액(pH 6.0)을 첨가하여 중화하였다. 이어서, 하기 표 5에 나타내는 조건으로 역상 HPLC로 탈염하였다.

표 5

칼럼	XBridge 5 μ m C8 (Waters, ϕ 10 $\times$ 50mm, 1CV=4mL)
유속	4mL/분
칼럼 온도	60 $^{\circ}$ C
A 액	물
B 액	CH ₃ CN
그라디언트	(B) conc. 0 $\rightarrow$ 50%/20CV

[0280]

[0281]

목적물을 회수하고 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 물에 녹이고 동결건조하여 백색 면상(綿狀) 고체로서 목적 화합물을 얻었다. ESI-TOF-MS의 계산값, 측정값을 하기 표 6에 나타낸다.

표 6

PMO No.	염기서열	계산값	측정값
1	TTGCCGCTGCCACATCCTGGAGTTC	8520.95	8520.65
2	GTTTGCCGCTGCCCTCCTGGAGTTCCT	8542.94	8542.57
3	GCCGCTGCCACATCCTGGAGTTCCT	8505.95	8506.57
4	CCGCTGCCCAATGTCCTGGAGTTCCT	8520.95	8521.37
5	TTGCCGCTGCCACATCCTGGAGTTCCT	8511.94	8511.70
6	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	8526.94	8527.07
7	TTTGCCGCTGCCCTCCTGGAGTTCC	7857.71	7857.32
8	TGCCGCTGCCCGCCATCCTGGAGTTC	8521.95	8521.98
9	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	7897.72	7897.71
10	CAGTTTGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCCT	9851.40	9851.60
11	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	8551.95	8551.80
12	GTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	8236.84	8236.69
13	CAGTTTGCCGCTGCTGGAGTTCCT	7921.73	7921.91
14	ACAGTTTGCCGCTCTGGAGTTCCT	7905.73	7905.53
15	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT	7906.73	7906.65
16	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	7567.61	7567.35
17	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCTCG	8261.85	8261.67
18	CCGCTGCCCAATGTGGAGTTCCTGT	8245.85	8245.68
19	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	7906.73	7906.70
20	CCGCTGCCCAATCTGGAGTTCCT	7520.61	7520.60
21	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	8221.84	8221.48
22	TTGCCGCTGCCCACTGGAGTTCCT	7866.72	7866.77
23	TTGCCGCTGCCCACTGGAGTTCCTGT	8551.95	8552.23
24	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	7245.51	7245.48
25	GTTTGCCGCTGC	3912.36	3912.16
26	CCTGGAGTTCCT	3896.36	3896.12
27	TGGAGTTCCT	3266.14	3265.99
28	CAGTTTGCCGCTGCCC	5196.81	5196.30
29	TCTTCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	8510.93	8511.8
30	AGACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTT	8513.95	8513.72
31	TTCTTCCCAGTTGCCCATCCTGGAGTTC	9826.39	9826.15
32	CAGACCTCCTGCCACGCCATCCTGGAGTTC	9814.41	9813.82
33	GACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTTC	8489.95	8490.01

[0282]

34	TCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	8520.95	8520.97
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGTTC	8505.95	8506.48
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	8495.94	8495.43
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGTTC	8519.95	8520.35
38	CCTCCTGCCACCGCATCCTGGAGTTC	8465.94	8466.23
39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGTTC	8449.94	8449.88
40	TTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTTC	8485.93	8486.01
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTTC	8529.96	8529.54
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	9156.16	9156.62
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCCT	7535.61	7535.92
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTTCC	8486.93	8486.27
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTCCT	9141.16	9141.18
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTTC	8489.95	8489.65
47	TGCAGACCTCCTGCCTCCTGGAGTTC	8520.95	8520.58
48	CTGTTTGAGACCCATCCTGGAGTTC	8559.96	8560.66
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTTCCTGTA	8574.96	8574.85
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTTC	9854.42	9854.07
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTGCCCAAT	9750.39	9750.67
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGTTC	8567.97	8567.11
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTTT	8486.93	8486.39
54	ACCTCCTGCCACCGCTCTTCCCCAGTTGCA	9725.38	9725.57
55	TGGCATCTGTTTTTCATCCTGGAGTTC	8580.95	8580.81
56	TTATTTCTTCCCCAGTTCTGTAAGA	8508.94	8508.7
57	GCTTCCAATGCCATCCTGGAGTTCC	8504.95	8504.88
58	GGCTTCCAATGCCATCCTGGAGTTC	8544.96	8544.72
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	9844.41	9844.1
60	TCCTGCCACCGCAGAGGATTGCTGAATT	9957.45	9957.8
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTTTT	9850.4	9850.45
62	TCCTGCCACCGCAGATTTTCCTGTAGAATA	9867.42	9867.85
63	GCCATCCTGGAGTTC	4905.71	4905.02
64	TTCTTCCCCAGTTGC	4831.68	4831.14
65	CAGACCTCCTGCCAC	4819.7	4819.64
66	TCCTGGAGTTCCT	4226.47	4226.03
67	GTTTGCCGCTGCC	4227.47	4227.48
68	CTCCTGCCACCGCGCGCTGCCCAAT	8435.93	8436.58

[0283]

69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTGCA	8479.93	8479.03
70	TGGAGTTCC	2936.03	2936.07
71	TGGAGTTC	2620.92	2620.97
72	CAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	6906.39	6906.44
73	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCCT	7260.51	7260.67
74	GTTTGCCGCTGCCTGGAGTTCC	7252.5	7252.48
75	AACAGTTTGCCCTGGAGTTCC	7229.51	7229.07
76	CAGTTTGCCGCTGGAGTTC	6591.28	6591.07
77	CAGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	7236.5	7236.76
78	AGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	6921.39	6921.06
79	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTC	6930.4	6930.42
80	TGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCC	7851.72	7852.1
81	CTGCCACCGCAGCCCTCCCAATGC	8484.96	8484.68
82	CCTGGAGTTCC	3566.25	3566.51
83	CAGTTTGCCG	3251.14	3251.19
84	ACAGTTTGCCG	3590.26	3590.04

[0284]

[0285]

[시험예 1]

[0286]

생체 외 어세이(In vitro assay)

[0287]

RD세포(인간 황문근육종 세포주) 3.5×10^5 개에 대해 표 1의 안티센스 올리고머 1~10 μ M를 Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L을 사용하여 Nucleofector II(Lonza)에 의해 도입하였다. 프로그램은 T-030을 사용하였다.

[0288]

도입 후 세포를 10% 소태아 혈청(FBS)(인비트로젠사 제조)을 포함하는 EMEM(Eagle's minimal essential medium) 배지(시그마사 제조, 이하 동일) 2 mL 중 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 3일간 배양하였다.

[0289]

세포를 PBS(넛스이사 제조, 이하 동일)로 1회 세정한 후, 1%의 2-메르캅토에탄올(나칼라이 테스크사 제조)을 포함하는 Buffer RLT(키아젠사 제조)를 350 μ L 세포에 첨가하고, 수 분간 실온에 방치하여 세포를 용해시켜 QIAshredder 호모나이저(키아젠사 제조)에 회수하였다. 15,000 rpm으로 2분간 원심하고, 호모지네이트를 제작하였다. RNeasy Mini Kit(키아젠사 제조)에 첨부된 프로토콜에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA의 농도는 NanoDrop ND-1000(엘·엠·에스사 제조)을 사용해서 측정하였다.

[0290]

추출한 total RNA 400 ng에 대해 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit(키아젠사 제조)를 사용하여 One-Step RT-PCR을 행하였다. 키트에 첨부된 프로토콜에 따라 반응액을 조제하였다. 서멀 사이클러는 PTC-100(MJ Research사 제조) 또는 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch(다카라 바이오사 제조)를 사용하였다. 사용한 RT-PCR의 프로그램은 아래와 같다.

[0291]

50℃, 30분간 : 역전사반응

[0292]

95℃, 15분간 : 폴리머라아제 활성화, 역전사 효소 불활성화, cDNA 열변성

[0293]

[94℃, 30초간 ; 60℃, 30초간 ; 72℃, 1분간] × 35사이클 : PCR 증폭

[0294]

72℃, 10분간 : 최종 신장반응

[0295]

RT-PCR에 사용한 포워드 프라이머와 리버스 프라이머의 염기서열은 아래와 같다.

포워드 프라이머 : 5' -GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (서열번호 1)

리버스 프라이머 : 5' -GGGCAACTCTTCCACCAGTA -3' (서열번호 2)

상기 PCR의 반응산물 1 μ L를 Bioanalyzer(아질렌트사 제조) 및 MultiNA(시마즈 제작소 제조)를 사용해서 해석하였다.

엑손 45가 스킵한 밴드의 폴리뉴클레오티드량 「A」와, 엑손 45가 스킵하지 않은 밴드의 폴리뉴클레오티드량 「B」를 측정하였다. 이들 「A」 및 「B」의 측정값을 토대로 아래의 식에 따라 스킵핑 효율을 구하였다.

$$\text{스킵핑 효율 (\%)} = A / (A + B) \times 100$$

실험결과를 도 1~5, 8, 10, 11 및 16~24에 나타낸다. 본 실험에 의해 본 발명의 올리고머는 엑손 45를 유효하게 스킵시키는 것이 판명되었다.

[시험예 2]

생체 외 어세이

시험예 1과 동일한 방법으로 실험을 행하였다. 단, RD세포(인간 황문근육종 세포주) 3.5×10^5 개에 대해 본 발명 올리고머 단독(PMO No.11 또는 PMO No.9), 각각을 구성하고 있는 2개의 개개의 유닛 올리고머 또는 그의 혼합물을 각 3 μ M의 농도로 Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L을 사용하여 Nucleofector II(Lonza)에 의해 도입하였다. 프로그램은 T-030을 사용하였다. 도입한 서열의 조합은 아래와 같다.

표 7

도입 서열의 조합

서열 조합	도입 농도 (μ M)
PMO NO. 11 (PMO No. 27과 PMO No. 28의 연결)	3 μ M
PMO NO. 27	3 μ M
PMO NO. 28	3 μ M
PMO NO. 27 및 PMO NO. 28	각 3 μ M
PMO NO. 9 (PMO No. 25와 PMO No. 26의 연결)	3 μ M
PMO NO. 25	3 μ M
PMO NO. 26	3 μ M
PMO NO. 25 및 PMO NO. 26	각 3 μ M
PMO NO. 72 (PMO NO. 82와 PMO NO. 83의 연결)	3 μ M
PMO NO. 82	3 μ M
PMO NO. 83	3 μ M
PMO NO. 82 및 PMO NO. 83	각 3 μ M

실험결과

결과를 도 6, 25에 나타낸다. 본 실험에 의해 엑손 45 내의 상이한 부위를 표적으로 하는 2개의 안티센스 올리고머를 연결한 PMO NO.11(서열번호 10), PMO NO.9(서열번호 8), 또는 PMO NO.72(서열번호 79)의 본 발명의 올

리고머는, 그것을 구성하는 개개의 안티센스 올리고머(PMO NO.27(서열번호 36), PMO NO.28(서열번호 37), PMO NO.25(서열번호 34), PMO NO.26(서열번호 35), PMO NO.82(서열번호 144), 또는 PMO NO.83(서열번호 145)) 또는 그의 혼합물(PMO NO.27 및 PMO NO.28, PMO NO.25 및 PMO NO.26, 또는 PMO NO.82 및 PMO NO.83)과 비교하여 높은 효율로 엑손 45를 스킵시키는 것이 관명되었다.

[0307] [시험예 3]

[0308] 생체 외 어세이

[0309] 서열번호 89~141, 11 및 12에 기재된 2'-O-메톡시-포스포로티오에이트체(2'-OMe-S-RNA)의 안티센스 올리고머를 사용해서 실험을 행하였다. 어세이에 사용한 각종 안티센스 올리고머는 일본 바이오 서비스사로부터 구입하였다. 각종 안티센스 올리고머의 서열을 아래에 나타낸다.

표 8

서열명	염기서열	서열번호
H45_1-15_48-62	UCCCCAGUUGCAUUCGCCAUCCUGGAGUUC	89
H45_1-15_56-70	UUAAUUUCUUCGCCAGGCCAUCCUGGAGUUC	90
H45_1-15_131-145	CCUCCUGCCACCGCAGCCAUCCUGGAGUUC	91
H45_-2-13_131-145	CCUCCUGCCACCGCACAUCUGGAGUUCU	92
H45_-2-13_135-149	CAGACCUCCUGCCACCAUCCUGGAGUUCU	93
H45_-2-13_48-62	UCCCCAGUUGCAUUCGAUCCUGGAGUUCU	94
H45_-2-13_52-66	UUCUUCGCCAGUUGCCAUCUGGAGUUCU	95
H45_-2-13_56-70	UUAAUUUCUUCGCCAGCAUCCUGGAGUUCU	96
H45_-2-13_18-32	GUUUGCCGCUGCCCAUCCUGGAGUUCU	97
H45_-2-13_139-153	UUUGCAGACCUCCUGCAUCCUGGAGUUCU	98
H45_1-17_135-147	GACCUCCUGCCACAUGCCAUCUGGAGUUC	99
H45_1-17_52-64	CUUCCCCAGUUGCAUCCAUCCUGGAGUUC	100
H45_1-15_139-153	UUUGCAGACCUCCUGGCCAUCCUGGAGUUC	101
H45_-2-13_99-113	UUUUCUGUAGAAUACAUCUGGAGUUCU	102
H45_53-67_132-146	ACCUCCUGCCACCGCUUUCUCCCCAGUUG	103
H45_16-30_99-113	UUUUCUGUAGAAUUAUUGCCGUGCCCAAU	104
H45_1-15_153-167	CUGUCUGACAGCUGGCCAUCCUGGAGUUC	105
H45_1-15_67-81	GGAUUGCUGAAUUAUGCCAUCUGGAGUUC	106
H45_1-15_99-113	UUUUCUGUAGAAUAGCCAUCUGGAGUUC	107
H45_1-13_46-58	CAGUUGCAUACAACUCCUGGAGUUC	108
H45_1-13_54-66	UUCUUCGCCAGUUCAUCCUGGAGUUC	109
H45_1-13_62-74	UGAAUUAUUUCUACAUCUGGAGUUC	110
H45_6-18_46-58	CAGUUGCAUCAAAGGCCAUCCUGG	111
H45_6-18_54-66	UUCUUCGCCAGUUAAGGCCAUCCUGG	112
H45_6-18_62-74	UGAAUUAUUUCUAAAGGCCAUCCUGG	113
H45_1-13_121-133	GCAGAUUCAGGCUCAUCCUGGAGUUC	114
H45_1-13_129-141	CUGCCACCGCAGACAUCUGGAGUUC	115
H45_1-13_137-149	CAGACCUCCUGCCCAUCCUGGAGUUC	116
H45_6-18_121-133	GCAGAUUCAGGCUAAUGCCAUCUGG	117
H45_6-18_129-141	CUGCCACCGCAGAAUGCCAUCUGG	118
H45_6-18_137-149	CAGACCUCCUGCCAAUGCCAUCUGG	142
H45_16-28_116-128	UUCAGGCUUCCAGCCGUGCCCAAU	119
H45_16-28_124-136	ACCGCAGAUUCAGGCCGUGCCCAAU	120

[0310]

H45_16-28_132-144	CUCCUGCCACCGCGCCGUGCCCAU	121
H45_26-38_116-128	UUCAGGCUUCCCAACAACAGUUGCC	122
H45_26-38_124-136	ACCGCAGAUUCAGACAACAGUUGCC	123
H45_26-38_132-144	CUCCUGCCACCGCACAACAGUUGCC	124
H45_51-63_110-122	CUUCCCAAUUUUUUUCCAGUUGCA	125
H45_51-63_117-129	AUUCAGGCUUCCUUCUCCAGUUGCA	126
H45_51-63_124-136	ACCGCAGAUUCAGUUCUCCAGUUGCA	127
H45_60-72_110-122	CUUCCCAAUUUUUAAUUAUUCUCC	128
H45_60-72_117-129	AUUCAGGCUUCCCAAUAUUCUCC	129
H45_60-72_124-136	ACCGCAGAUUCAGAAUUAUUCUCC	130
H45_68-80_110-122	CUUCCCAAUUUUGAUUGCUCAAUA	131
H45_68-80_117-129	AUUCAGGCUUCCGUAUUGCUCAAUA	132
H45_68-80_124-136	ACCGCAGAUUCAGGAUUGCUCAAUA	133
H45_10-5_52-66	UUCUUCUCCAGUUGCAGUUCUGAAGUA	134
H45_10-5_135-149	CAGACCUCCUGCCACAGUUCUGAAGUA	135
H45_69-83_95-109	CCUGUAGAAUACUGGGAGGAUUGCUGAAU	136
H45_16-30_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUUGCCGUGCCAAU	137
H45_16-30_53-67	UUUCUUCUCCAGUUGUUGCGCUGCCAAU	138
H45_1-15_84-98	CUGGCAUCUGUUUUGCCAUCCUGGAGUUC	139
H45_84-98_132-146	ACCUCCUGCCACCGCCUGGCAUCUGUUUU	140
H45_53-67_99-113	UUUUCUGUAGAAUUAUUCUCCAGUUG	141
H45_1-15_52-66	UUCUUCUCCAGUUGCGCAUCCUGGAGUUC	11
H45_1-15_135-149	CAGACCUCCUGCCACGCAUCCUGGAGUUC	12

[0311]

[0312]

24웰 플레이트에 RD세포(인간 황문근육종 세포주) 5×10^4 개를 파종하고, 10% 소태아 혈청(FCS)(인비트로젠사 제조)을 포함하는 EMEM(Eagle's minimal essential medium) 배지(시그마사 제조, 이하 동일) 0.5 mL 중 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 하룻밤 배양하였다. 상기 엑손 45 스킵핑용 각종 안티센스 올리고머(일본 바이오 서비스사 제조)(1 μM 또는 300 nM)와 Lipofectamine 2000(인비트로젠사 제조)의 복합체를 제작하고, 0.45 mL로 배지 교환한 RD세포에 1웰당 50 μL를 첨가하여 최종농도 100 nM 또는 30 nM로 하였다.

[0313]

첨가 후 하룻밤 배양하였다. 세포를 PBS(닛스이사 제조, 이하 동일)로 1회 세정한 후, 1%의 2-메르캅토에탄올(나칼라이 테스크사 제조)을 포함하는 Buffer RLT(키아젠사 제조)를 350 μL 세포에 첨가하고, 수분간 실온에 방치하여 세포를 용해시키고, QIAshredder 호모지나이저(키아젠사 제조)에 회수하였다. RNeasy Mini Kit(키아젠사 제조)에 첨부된 프로토콜에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA의 농도는 NanoDrop ND-1000(엘·엠·에스사 제조)을 사용해서 측정하였다.

[0314]

추출한 total RNA 400 ng에 대해 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit(키아젠사 제조)를 사용하여 One-Step RT-PCR을 행하였다. 키트에 첨부된 프로토콜에 따라 반응액을 조제하였다. 서멀 사이클러는 PTC-100(MJ Research사 제조) 또는 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch(다카라 바이오사 제조)를 사용하였다. 사용한 RT-PCR의 프로그램은 아래와 같다.

[0315]

50℃, 30분간 : 역전사반응

[0316]

95℃, 15분간 : 폴리머라아제 활성화, 역전사 효소 불활성화, cDNA 열변성

[0317]

[94℃, 30초간 ; 60℃, 30초간 ; 72℃, 1분간] ×35사이클 : PCR 증폭

[0318]

72℃, 10분간 : 최종 신장반응

[0319] RT-PCR에 사용한 포워드 프라이머와 리버스 프라이머의 염기서열은 아래와 같다.

포워드 프라이머 : 5' -GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (서열번호 1)

[0320] 리버스 프라이머 : 5' -GGGCAACTCTTCCACCAGTA -3' (서열번호 2)

[0321] 상기 PCR의 반응산물 1 μ L를 Bioanalyzer(아질런트사 제조) 및 MultiNA(시마즈 제작소사 제조)를 사용해서 해석하였다.

[0322] 엑손 45가 스킵한 밴드의 폴리뉴클레오티드량 「A」와, 엑손 45가 스킵하지 않은 밴드의 폴리뉴클레오티드량 「B」를 측정하였다. 이들 「A」 및 「B」의 측정값을 토대로 아래의 식에 따라 스킵핑 효율을 구하였다.

[0323] 스킵핑 효율 (%) = $A / (A + B) \times 100$

[0324] 실험결과

[0325] 결과를 도 7, 12~15에 나타낸다. 본 실험에 의해 본 발명의 안티센스 올리고머는 유효하게 엑손 45를 스킵핑시키는 것이 판명되었다.

[0326] [시험예 4]

[0327] 생체 외 어세이

[0328] 시험예 1과 동일한 방법으로 실험을 행하였다. 단, RD세포(인간 황문근육종 세포주) 3.5×10^5 개에 대해 본 발명 올리고머 단독(PMO No.2, PMO No.31 또는 PMO No.32), 각각을 구성하고 있는 2개의 개개의 유닛 올리고머를 각 3 μ M 또는 10 μ M의 농도로 Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L을 사용하여 Nucleofector II(Lonza)에 의해 도입하였다. 프로그램은 T-030을 사용하였다. 도입한 서열의 조합은 아래와 같다.

표 9

서열	도입 농도
PMO No. 2 (PMO No. 66과 PMO No. 67의 연결)	3 μ M 또는 10 μ M
PMO No. 66	3 μ M 또는 10 μ M
PMO No. 67	3 μ M 또는 10 μ M
PMO No. 31 (PMO No. 63과 PMO No. 64의 연결)	3 μ M 또는 10 μ M
PMO No. 63	3 μ M 또는 10 μ M
PMO No. 64	3 μ M 또는 10 μ M
PMO No. 32 (PMO No. 63과 PMO No. 65의 연결)	3 μ M 또는 10 μ M
PMO No. 65	3 μ M 또는 10 μ M

[0329]

[0330] 실험결과

[0331] 결과를 도 9에 나타낸다. 본 실험에 의해 엑손 45 내의 상이한 부위를 표적으로 하는 2개의 안티센스 핵산을 연결한 PMO No.2(서열번호 7), PMO No.31(서열번호 11) 또는 PMO No.32(서열번호 12)의 본 발명의 올리고머는,

그것을 구성하는 개개의 안티센스 핵산(PMO No.66, PMO No.63, PMO No.64, 또는 PMO No.65)과 비교하여 높은 효율로 엑손 45를 스킵시키는 것이 판명되었다.

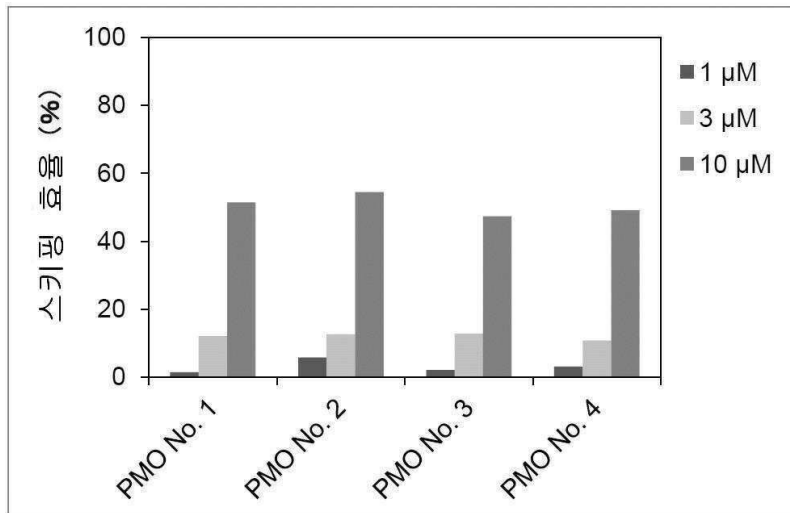
산업상 이용가능성

[0332]

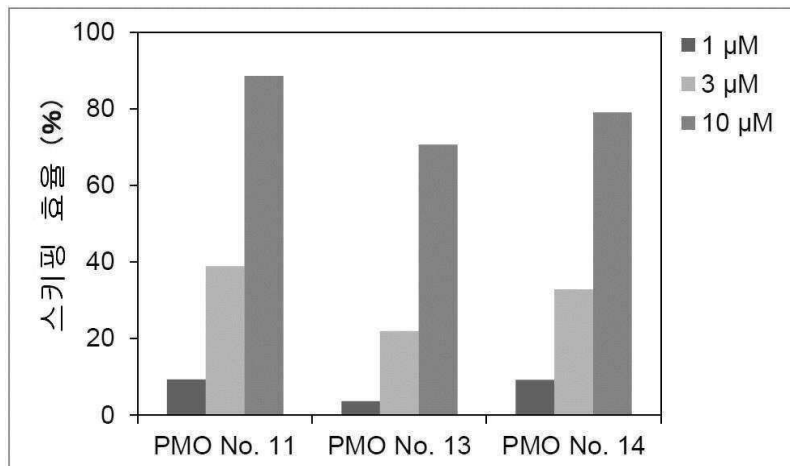
시험예에 나타내는 실험결과로부터 짧은 올리고머를 연결한 본 발명의 올리고머는 RD세포에 있어서 엑손 45의 스킵핑을 일으키는 것이 나타났다. 따라서, 본 발명의 올리고머는 DMD의 치료에 있어서 매우 유용하다.

도면

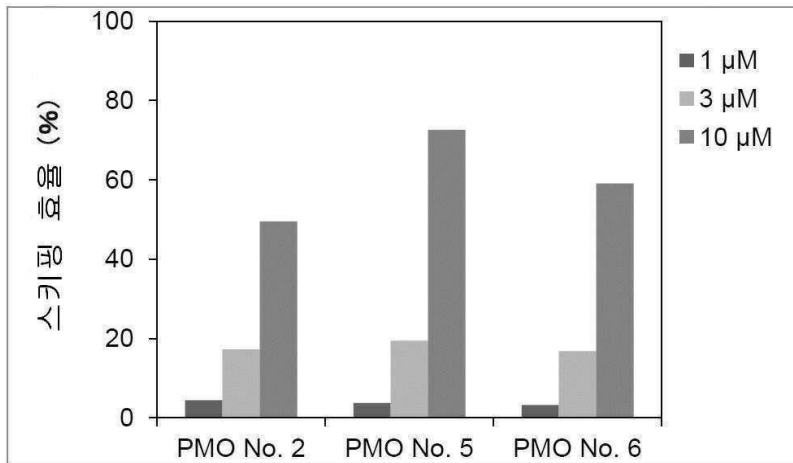
도면1



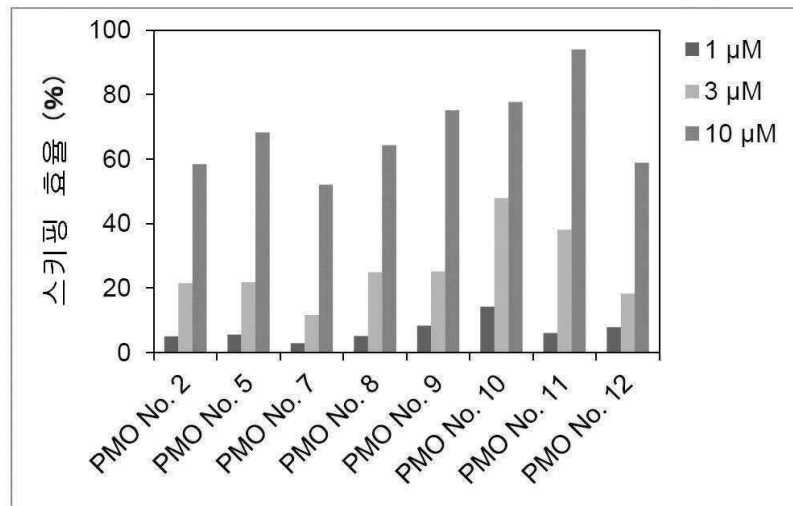
도면2



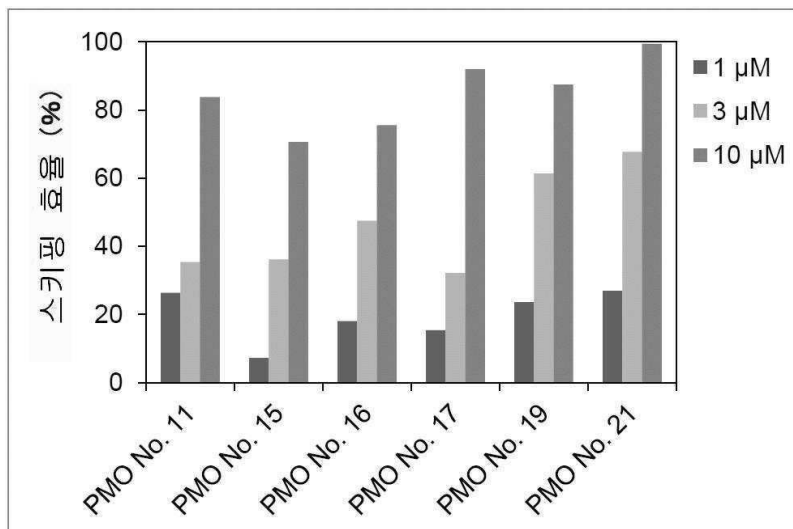
도면3



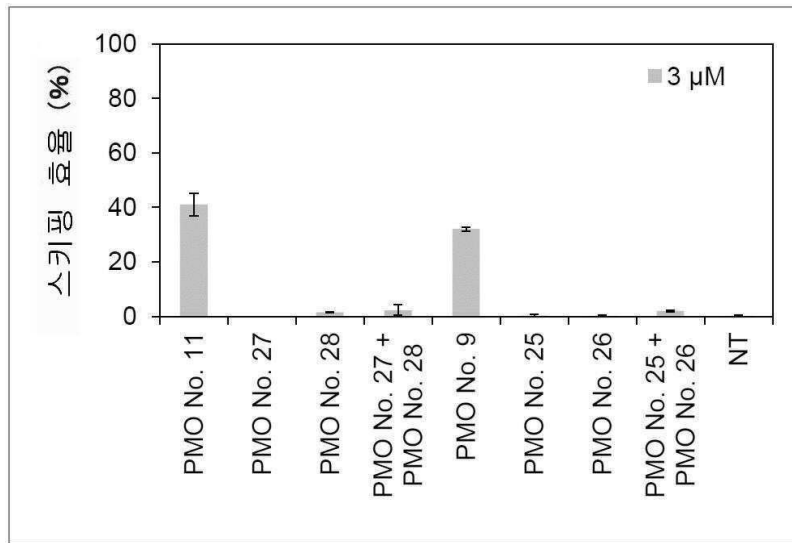
도면4



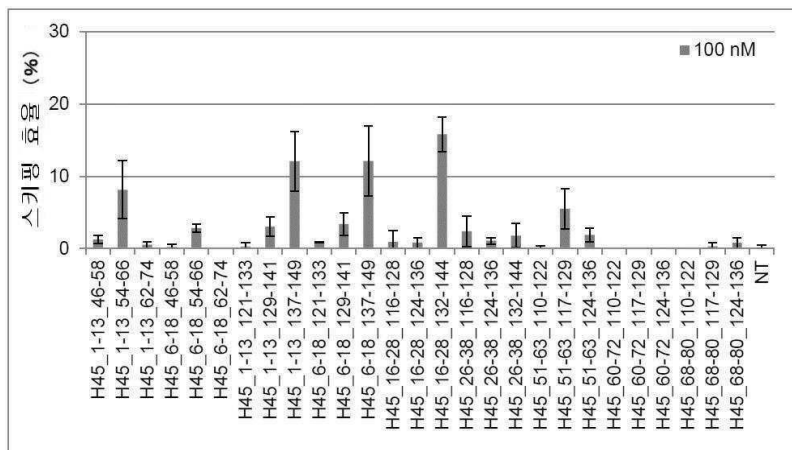
도면5



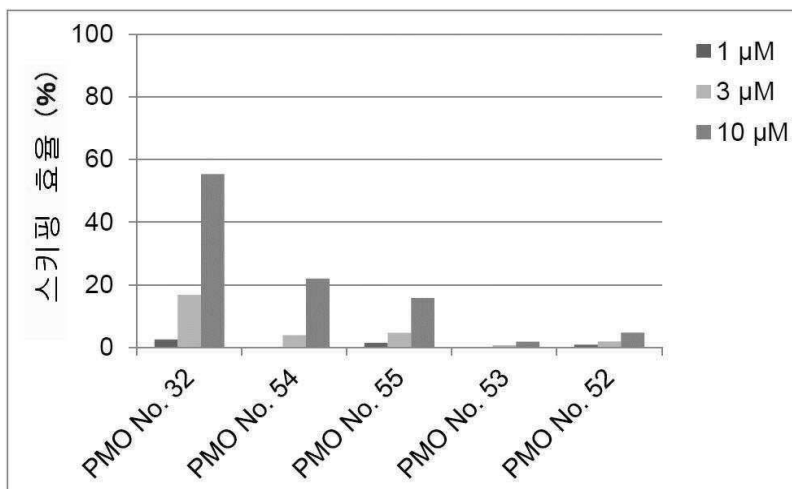
도면6



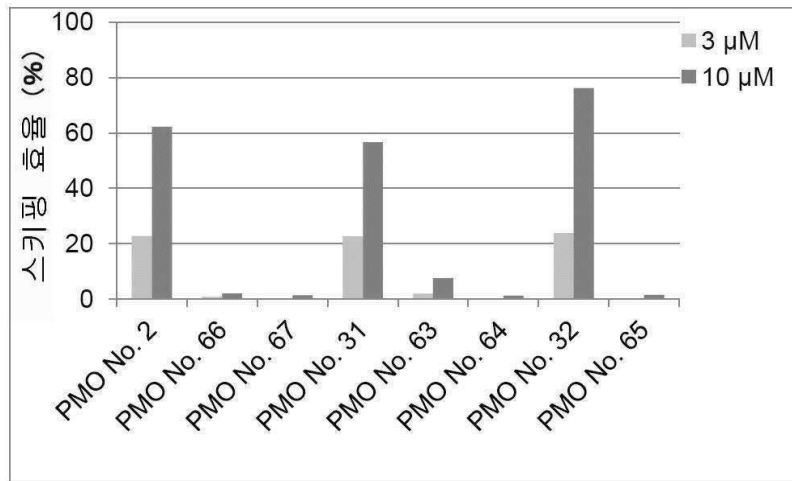
도면7



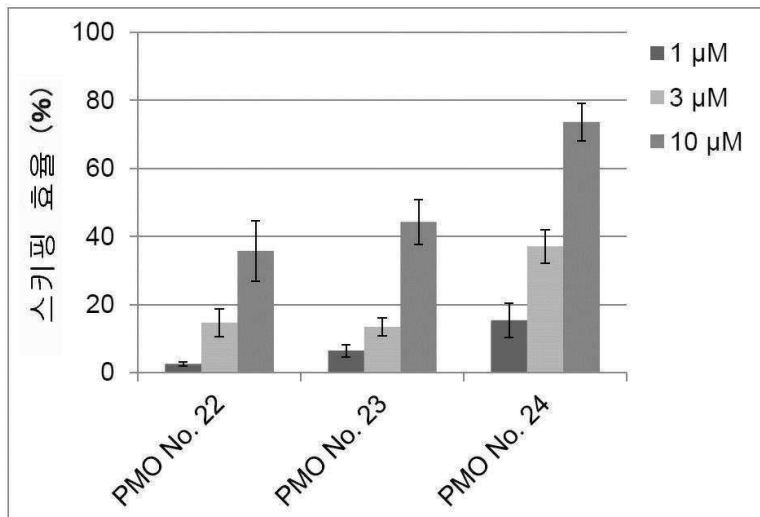
도면8



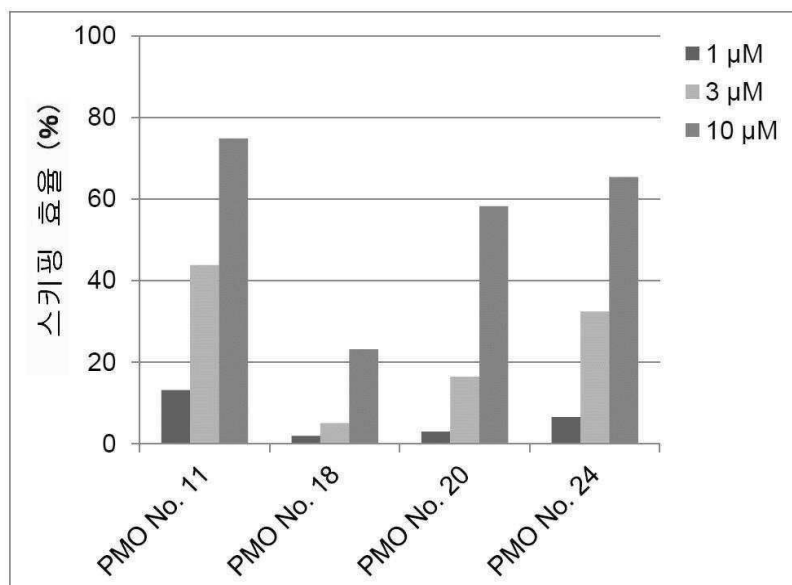
도면9



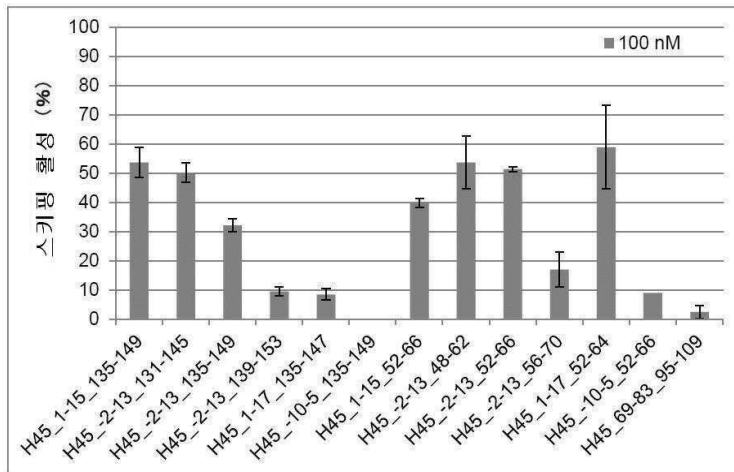
도면10



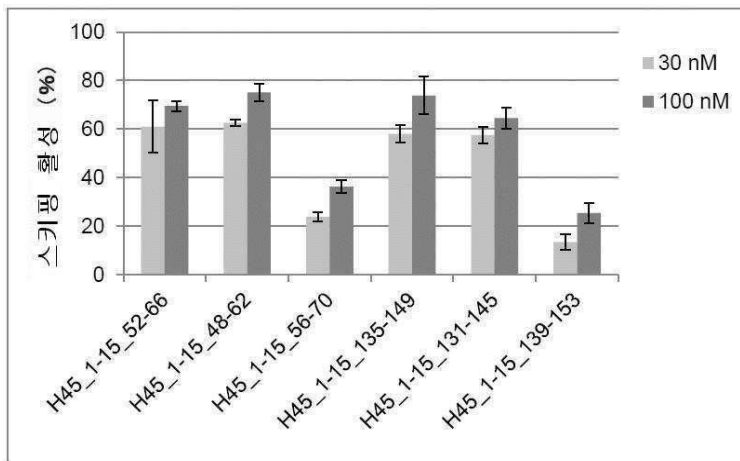
도면11



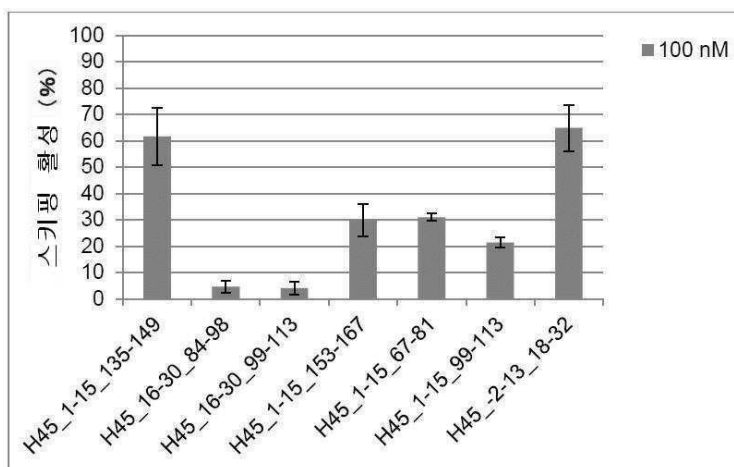
도면12



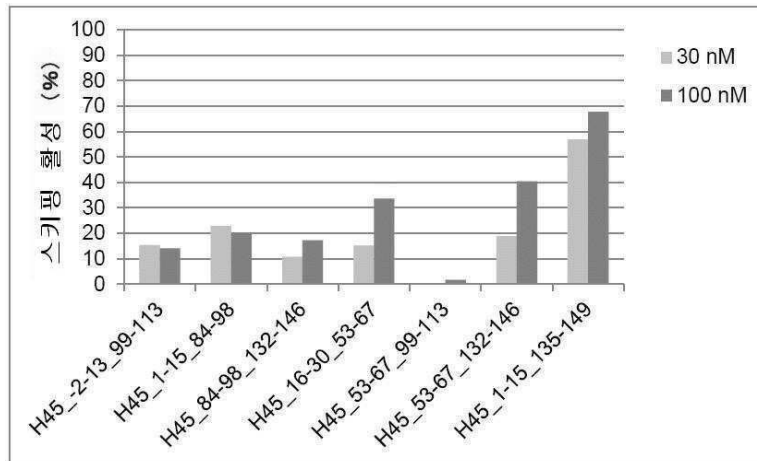
도면13



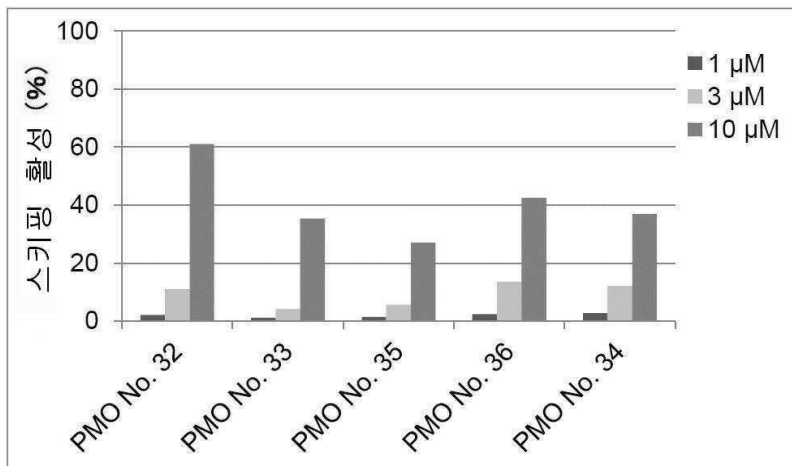
도면14



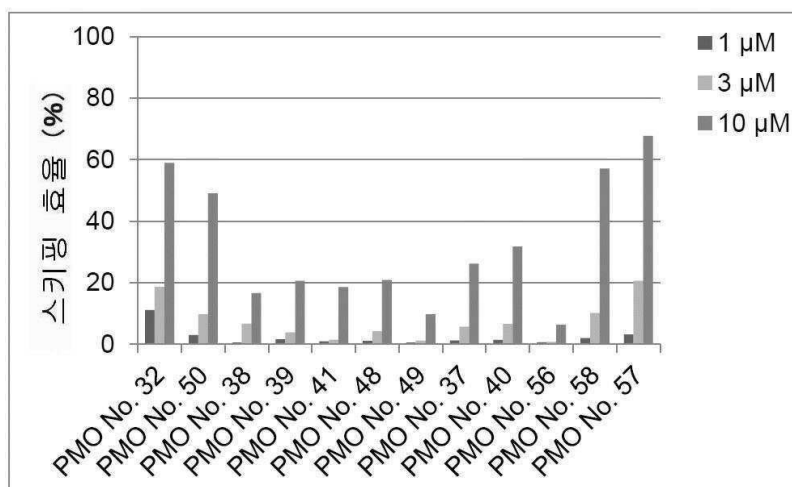
도면15



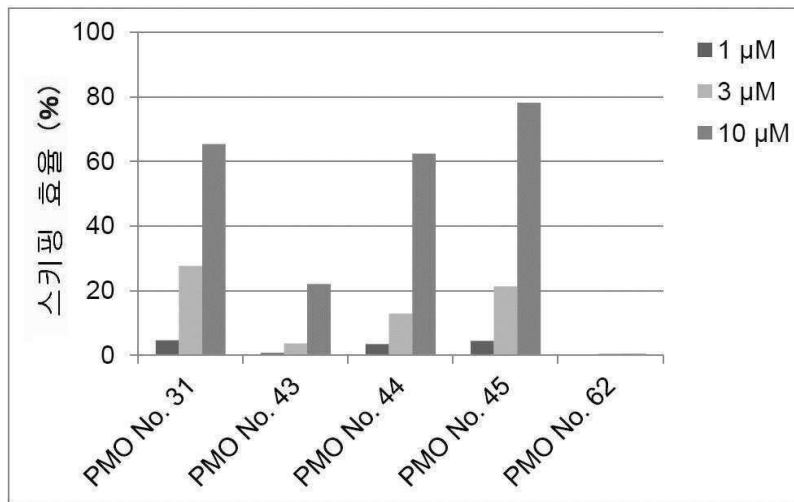
도면16



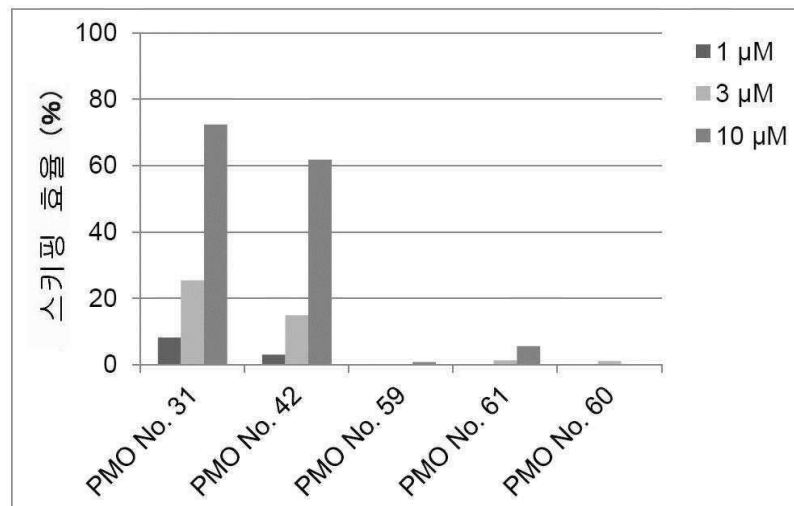
도면17



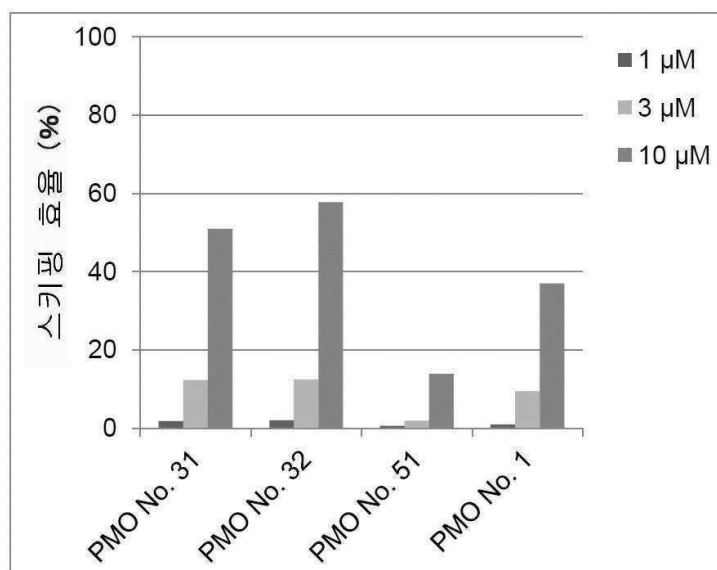
도면18



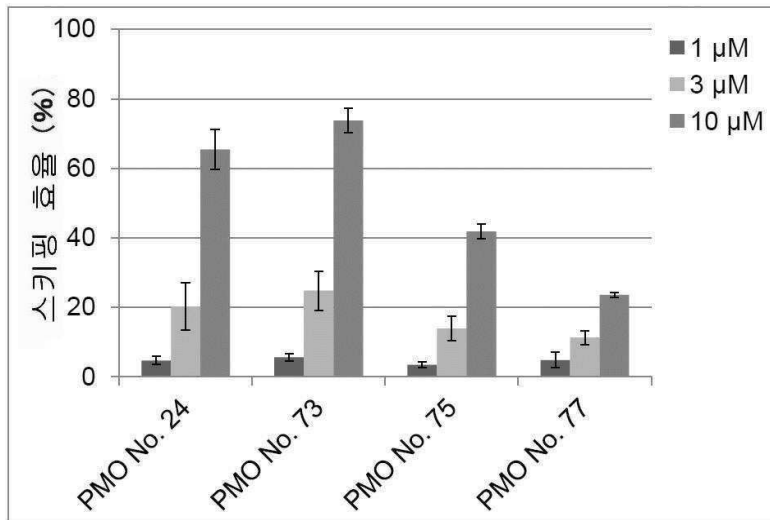
도면19



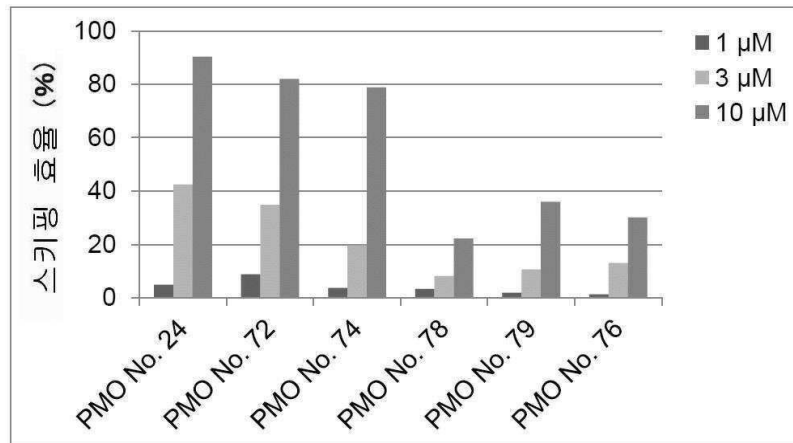
도면20



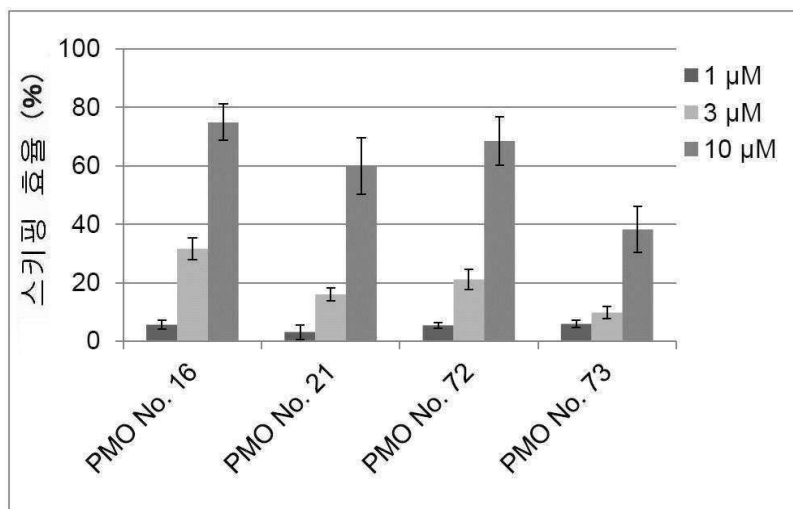
도면21



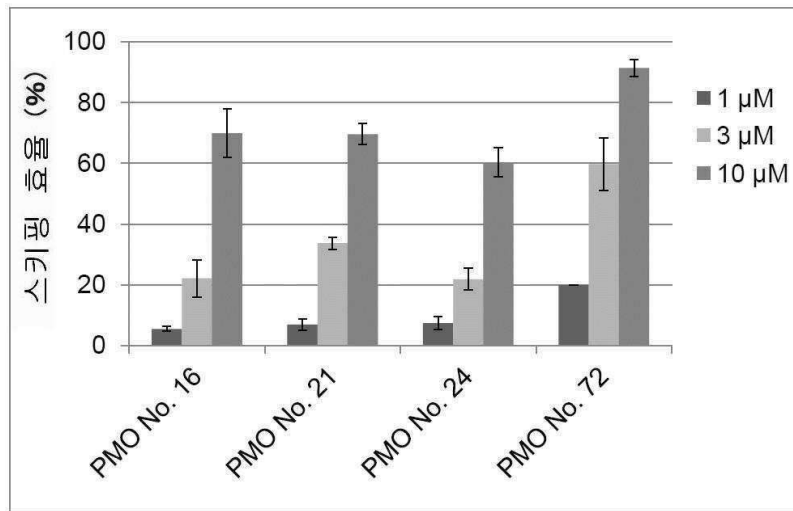
도면22



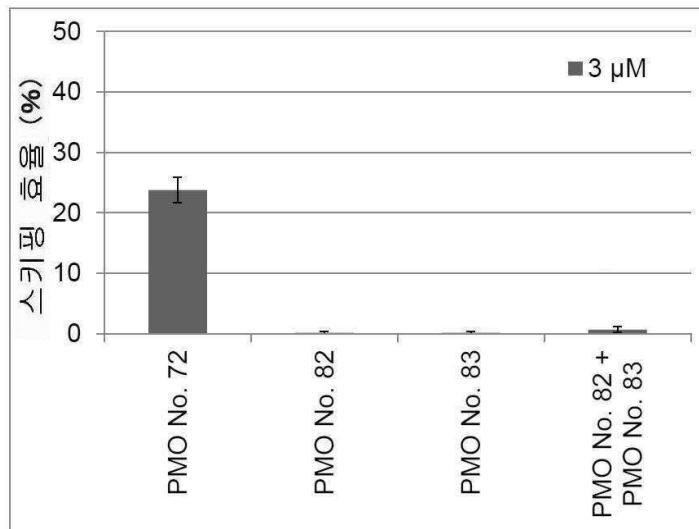
도면23



도면24



도면25



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON SHINYAKU CO., LTD.

NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY

<120> Antisense Nucleic Acid

<130> G1428W0

<150> JP2015-182145

<151> 2015-09-15

<160> 146

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 1
 gctcaggtcg gattgacatt 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 2
 gggcaactct tccaccagta 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 3
 tacaggaact ccaggatggc 20
 <210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 4
 gaatgcaact gggaagaaa taa 23
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223>
 > Synthetic Nucleic Acid

<400> 5	
atctgcggtg gcaggaggtc tgc	23
<210> 6	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 6	
cattgggcag cggcaaactg ttgtca	26
<210> 7	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 7	
gtttgccgct gcctcctgga gttcct	26
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 8	
gtttgccgct gccctggagt tcct	24
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 9	
cagtttgccg ctgcccaccc tggagttcct	30
<210> 10	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 10

cagtttgccg ctgccctgga gttcct 26

<210

> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 11

ttcttcccca gttgcgcat cctggagttc 30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 12

cagacctcct gccacgcat cctggagttc 30

<210> 13

<211> 176

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

gaactccagg atggcattgg gcagcggcaa actgttgtca gaacattgaa tgcaactggg 60

gaagaaataa ttcagcaatc ctcaaaaaca gatgccagta ttctacagga aaaattggga 120

agcctgaatc tgcggtggca ggaggtctgc aaacagctgt cagacagaaa aaagag 176

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 14

ttgccgctgc ccacatcctg gagttc 26

<210> 15

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 15
 gccgctgccc acatcctgga gttcct 26
 <210> 16
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid

 <400> 16
 ccgctgccc atgtcctgga gttcct 26
 <210> 17
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 17
 ttgccgtgc ccatacctgga gttcct 26
 <210> 18
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 18
 tttgccgtg ccatacctgga gttcct 26
 <210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <
 220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 19

tttgccgctg cctcctggag ttcc	24
<210> 20	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 20	
tgccgctgcc cgccatcctg gagttc	26
<210> 21	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 21	
gtttgccgct gccatcctgg agttc	25
<210> 22	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 22	
cagtttgccg ctgctggagt tcct	24
<210> 23	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 23	
acagtttgcc gctctggagt tcct	24
<210> 24	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	

<400> 24	
cagtttgccg ctgccggagt tcct	24
<210> 25	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 25	
gtttgccgct gccctggagt tcc	23
<210> 26	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 26	
cagtttgccg ctgccggagt tcctg	25
<210> 27	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 27	
ccgctgcccc atgtggagtt cctgt	25
<210> 28	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 28	
cagtttgccg ctgccctgga gttc	24
<210> 29	
<211> 23	
<212> DNA	

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 29

ccgctgccca atctggagtt cct 23

<210> 30

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 30

cagtttgccg ctgccctgga gttcc 25

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 31

ttgccgctgc ccactggagt tect 24

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 32

ttgccgctgc ccactggagt tectgt 26

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 33

acagtttgcc gcctggagtt cc 22

<210> 34

<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 34	
gtttgccgct gc	12
<210> 35	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 35	
cctggagtgc ct	12
<210> 36	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 36	
tggagttcct	10
<210> 37	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 37	
cagtttgccg ctgccc	16
<210> 38	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 38	
tcttccccag ttgccatcct ggagtt	26

<210> 39
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 39
 agacctcctg ccaccatcct ggagtt 26

<210> 40
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 40
 gacctcctgc caccatcctg gagttc 26

<210> 41
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 41
 tccccagttg cgccatcctg gagttc 26

<210> 42
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 42
 gacctcctgc cgccatcctg gagttc 26

<210> 43
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 43
cttccccagt tgccatcctg gagttc 26
<210> 44
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Synthetic Nucleic Acid
<400> 44
ttccccagtt gcacatcctg gagttc 26
<210> 45
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Synthetic Nucleic Acid
<400> 45
cctcctgcca ccgcatcctg gagttc 26
<210> 46
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Synthetic Nucleic Acid
<400> 46
acctcctgcc acccatcctg gagttc 26
<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Synthetic Nucleic Acid
<400> 47
tttcttcccc agtcacatcctg gagttc 26
<210> 48
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 48

gcagacctcc tgccatcctg gagttc

26

<210> 49

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 49

ttcttcccca gttgccatcc tggagttc

28

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 50

ccccagttgc atctggagtt cct

23

<210> 51

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 51

ttcttcccca gttgccctgg agttcc

26

<210> 52

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 52

cttccccagt tgccatcctg gagttcct

28

<210> 53

<211> 26

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 53
 cagacctcct gccactcctg gagttc 26
 <210> 54
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 54
 tgcagacctc ctgcctcctg gagttc 26

 <210> 55
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 55
 ctgtttgcag acccatcctg gagttc 26
 <210> 56
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 56
 tttgcagacc tcctggagtt cctgta 26
 <210> 57
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 57
 cctgccaccg cagatgccat cctggagttc 30

<210> 58
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 58
 acctcctgcc accgcttgcc gctgccaat 30
 <210> 59
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 59
 tcctgtagaa taccatcctg gagttc 26
 <210> 60
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 60
 ctctgccac cgctggcatc tgtttt 26

 <210> 61
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 61
 acctcctgcc accgctcttc cccagttgca 30
 <210> 62
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 62

tggcacatctgt ttccatcctg gagttc	26
<210> 63	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 63	
ttattttcttc ccagttcct gtaaga	26
<210> 64	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 64	
gcttcccaat gccatcctgg agttcc	26
<210> 65	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 65	
ggcttcccaa tgccatcctg gagttc	26
<210> 66	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 66	
tttctgtctg acagtcctg ccaccgcaga	30
<210> 67	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 67

tcctgccacc gcagagagga ttgctgaatt 30

<210> 68

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 68

tcctgccacc gcagactggc atctgttttt 30

<210> 69

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 69

tcctgccacc gcagattttc ctgtagaata 30

<210> 70

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 70

gccatcctgg agttc 15

<210> 71

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 71

tttttcccca gttgc 15

<210> 72

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 72	
cagacctcct gccac	15
<210> 73	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 73	
tcctggagtt cct	13
<210> 74	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 74	
gtttgccgct gcc	13
<210> 75	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 75	
ctcctgccac cgcgccgtg cccaat	26
<210> 76	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 76	
attcaggctt cccttcccca gttgca	26
<210> 77	

<211> 9	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 77	
tggagttcc	9
<210> 78	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 78	
tggagttc	8
<210> 79	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 79	
cagtttgccg cctggagttc c	21
<210> 80	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 80	
acagtttgcc gctggagttc ct	22
<210> 81	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 81	

gtttgccgct gcctggagtt cc	22
<210> 82	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 82	
aacagtttgc ccctggagtt cc	22
<210> 83	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 83	
cagtttgccg cctggagttc	20
<210> 84	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 84	
cagtttgccg ctctggagtt tc	22
<210> 85	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 85	
agtttgccgc tctggagtt c	21
<210> 86	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 86	
acagtttgcc gctggagttc c	21
<210> 87	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 87	
tgccgctgcc catcctggag ttcc	24
<210> 88	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 88	
ctgccaccgc agccgctgcc caatgc	26
<210> 89	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 89	
uccccaguug cauucgccau ccuggaguuc	30
<210> 90	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 90	
uuauuuucuuc cccaggccau ccuggaguuc	30
<210> 91	
<211> 30	

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 91
 ccuccugcca ccgcagccau ccuggaguuc 30
 <210> 92
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 92
 ccuccugcca ccgcacaucc uggaguuccu 30
 <210> 93
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 93
 cagaccuccu gccaccaucc uggaguuccu 30
 <210> 94
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 94
 uccccaguug cauuccaucc uggaguuccu 30
 <210> 95
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 95
 uucuucccca guugccaucc uggaguuccu 30
 <210> 96

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 96
 uuauuuucuuc cccagcaucc uggaguuccu 30

<210> 97
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 97
 guuugccgcgcu gcccacaucc uggaguuccu 30

<210> 98
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 98
 uuugcagacc uccugcaucc uggaguuccu 30

<210> 99
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 99
 gaccuccugc cacaugccau ccuggaguuc 30

<210> 100
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 100

cuuccccagu ugcaugccau ccuggaguuc	30
<210> 101	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 101	
uuugcagacc uccuggccau ccuggaguuc	30
<210> 102	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 102	
uuuuccugua gaauacaucc uggaguuccu	30
<210> 103	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 103	
accuccugcc accgcuuucu ucccaguug	30
<210> 104	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 104	
uuuuccugua gaauauugcc gcugcccaau	30
<210> 105	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	

<400> 105	
cugucugaca gcugugccau ccuggaguuc	30
<210> 106	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 106	
ggauugcuga auuauGCCAU ccuggaguuc	30
<210> 107	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 107	
uuuuccugua gaauagccau ccuggaguuc	30
<210> 108	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 108	
caguugcauu caacauccug gaguuc	26
<210> 109	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 109	
uuuuuuccca guucauccug gaguuc	26
<210> 110	
<211> 26	
<212> DNA	

<213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 110
 ugaauuuuuu cuucauccug gaguuc 26
 <210> 111
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 111
 caguugcauu caaaaugcca uccugg 26

 <210> 112
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 112
 uucuucccca guuaaugcca uccugg 26
 <210> 113
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 113
 ugaauuuuuu cuuaaugcca uccugg 26
 <210> 114
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 114
 gcagauucag gcucauccug gaguuc 26

 <210> 115

<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 115	
cugccaccgc agacauccug gaguuc	26
<210> 116	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 116	
cagaccuccu gcccauccug gaguuc	26
<210> 117	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 117	
gcagauucag gcuaaugcca uccugg	26
<210> 118	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 118	
cugccaccgc agaaaugcca uccugg	26
<210> 119	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 119	
uucagguuc ccagccgcug cccaau	26

<210> 120
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 120
 accgcagauu caggccgcug cccaau 26

<210> 121
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 121
 cuccugccac cgcgccgcug cccaau 26

<210> 122
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 122
 uucaggcuuc ccaacaacag uuugcc 26

<210> 123
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 123
 accgcagauu cagacaacag uuugcc 26

<210> 124
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 124	
cuccugccac cgcacaacag uuugcc	26
<210> 125	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 125	
cuucccaauu uuuuucccca guugca	26
<210> 126	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 126	
auucagggcuu ccuucccca guugca	26
<210> 127	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 127	
accgcagauu caguucccca guugca	26
<210> 128	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<400> 128	
cuucccaauu uuuaauuauu ucuucc	26
<210> 129	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 129

auucagguuu cccaaauuuu ucuucc

26

<210> 130

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 130

accgcagauu cagaauuuu ucuucc

26

<210> 131

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 131

cuucccauuu uuugauugcu gaauua

26

<210> 132

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 132

auucagguuu cccgauugcu gaauua

26

<210> 133

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 133

accgcagauu caggauugcu gaauua

26

<210> 134

<211> 30

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 134
 uucuucccca guugcaguuc cuguaagaua 30
 <210> 135
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 135
 cagaccuccu gccacaguuc cuguaagaua 30

 <210> 136
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 136
 ccuguagaau acugggagga uugcugaauu 30
 <210> 137
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 137
 cuggcaucug uuuuuuugcc gcugcccaau 30
 <210> 138
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 138
 uuucuucccc aguuguugcc gcugcccaau 30

<210> 139
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 139
 cuggcaucug uuuuugccau ccuggaguuc 30
 <210> 140
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 140
 accuccugcc accgccuggc aucuguuuuu 30
 <210> 141
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 141
 uuuuccugua gaauuuuucu uccccaguug 30

 <210> 142
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 142
 cagaccuccu gccaaugcca uccugg 26
 <210> 143
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 143

aaaaattggg aagcct	16
<210> 144	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> synthetic nucleic acid	
<400> 144	
cctggagttc c	11
<210> 145	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> synthetic nucleic acid	
<400> 145	
cagtttgccg	10
<210> 146	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> synthetic nucleic acid	
<400> 146	
acagtttgcc g	11