

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0052963 (43) 공개일자 2014년05월07일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/7088 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01) A61P 21/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-7023595 (22) 출원일자(국제) 2012년02월08일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2013년09월06일 (86) 국제출원번호 PCT/US2012/024230 (87) 국제공개번호 WO 2012/109296 국제공개일자 2012년08월16일 (30) 우선권주장 61/440,603 2011년02월08일 미국(US)		(71) 출원인 더 살루테-맥클렌버그 하스피털 오쏘러티 디/비/ 에이 카롤리나스 헬스케어 시스템 미국 노스캐롤라이나주 28232 살루테 포스트 오피스 박스 32861 (72) 발명자 루 퀴 룡 미국 노스캐롤라이나주 28270 살루테 엘프레다 로드 6628 (74) 대리인 제일특허법인

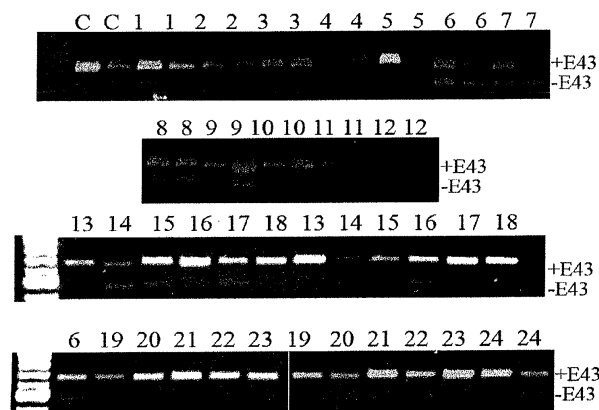
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 안티센스 올리고뉴클레오타이드

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 근이영양증, 특히 뒤센 근이영양증(DMD)의 치료를 위한 안티센스 화합물 및 조성물에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자를 포함하는 약학 조성물 및 제형, 및 근이영양증 관련 질환 및 장애의 치료 방법에 관한 것으로서, 이때 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자는 서열번호 5 내지 8, 10, 12, 14, 16, 24, 27, 28, 34, 35, 37, 40, 42, 44 내지 46, 79, 97, 100, 101 및 116, 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기 서열을 포함한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

하기 염기 서열들, 및 이들의 유사체 및 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기 서열을 포함하고 디스트로핀(dystrophin) 유전자의 엑손에서 표적 부위에 결합하여 엑손 스킵핑(skipping)을 야기할 수 있는, 뒤센(Duchenne) 근이영양증(DMD)을 치료하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자:

GCTGGGAGAGAGCTTCCTGTAGCTTCAC(서열번호 5);
 TGTACCTACCCTTGTCGGTCCTGTAC(서열번호 6);
 CTGCTGTCTTCTTGCTATGAATAATGTC(서열번호 7);
 GCGTTGCACTTTGCAATGCTGTGTCT(서열번호 8);
 TTGGAAATCAAGCTGGGAGAGAGCTTCC(서열번호 9);
 CTACCCCTTGTCGGTCCTGTACATTTTG(서열번호 12);
 GTCAATCCGACCTGAGCTTGTGTGTAGA(서열번호 14);
 CTTGCTATGAATAATGTCAATCCGACC(서열번호 16);
 TATATGTGTACCTACCCTTGTCGGTCC(서열번호 24);
 GCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 27);
 CCAATGCCATCCTGGAGTTCCT(서열번호 28);
 CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGA(서열번호 34);
 CCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 35);
 CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT(서열번호 37);
 CCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 40);
 TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG(서열번호 42);
 CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG(서열번호 44);
 TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA(서열번호 45);
 GTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 46);
 AACUCCUCUUUAACAGAAAAGCAUAC(서열번호 79);
 GGAUCCAGUAUACUACAGGCUCC(서열번호 97);
 CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCT(서열번호 100);
 CATCAAGGAAGATGGCATTCTAGT(서열번호 101); 및
 CAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAG(서열번호 116).

청구항 2

제1항에 있어서,

엑손 스킵핑이 야기되는 디스트로핀 유전자의 엑손이 엑손 43, 45, 50, 51 및 53으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상이한 화학물질에 접합되거나 상이한 화학물질과 복합체를 형성하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자.

청구항 4

제1항에 있어서,

포스포로다이아미테이트 모폴리노 올리고뉴클레오타이드(PMO)인 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자.

청구항 5

제1항에 있어서,

상보적 RNA 서열에 결합할 수 있는 올리고머인 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자.

청구항 6

제1항에 있어서,

한 말단에서 1개 또는 2개의 추가 뉴클레오타이드 염기, 또는 서열의 말단에서 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드 염기의 결실을 포함하되, 상기 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드 염기가 표적 서열에 상보적일 수 있고/있거나 상보적이지 않을 수 있는, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자.

청구항 7

제1항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자, 및 약학적으로 허용가능한 담체, 보조제 또는 비히클을 포함하는, DMD를 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 8

안티센스 올리고뉴클레오타이드의 전달 및 안티센스 효과를 향상시키기 위한 중합체와 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하되, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 하기 올리고뉴클레오타이드들, 및 이들의 유사체 및 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학 조성물:

GCTGGGAGAGAGCTTCCTGTAGCTTCAC(서열번호 5);

TGTTACCTACCCCTTGTCGGTCCTGTAC(서열번호 6);

CTGCTGTCTTCTTGCTATGAATAATGTC(서열번호 7);

GGCGTTGCACTTTGCAATGCTGCTGTCT(서열번호 8);

TTGGAAATCAAGCTGGGAGAGAGCTTCC(서열번호 9);

CTACCCCTTGTCGGTCCTTGTACATTTTG(서열번호 12);

GTCAATCCGACCTGAGCTTTGTTGTAGA(서열번호 14);

CTTGCTATGAATAATGTCAATCCGACC(서열번호 16);

TATATGTGTTACCTACCCTTGTCGGTCC(서열번호 24);

GCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 27);

CCAATGCCATCCTGGAGTTCCT(서열번호 28);

CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGA(서열번호 34);

CCGCTGCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT(서열번호 35);

CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT(서열번호 37);

CCGCTGCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 40);

TGCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG(서열번호 42);

CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG(서열번호 44);

TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA(서열번호 45);
 GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 46);
 AACUCCUCUUUACAGAAAAGCAUAC(서열번호 79);
 GGGAUCCAGUAUACUACAGGCUCC(서열번호 97);
 CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCT(서열번호 100);
 CATCAAGGAAGATGGCATTCTAGT(서열번호 101); 및
 CAACTGTTGCCTCCGGTCTGAAG(서열번호 116).

청구항 9

제8항에 있어서,

안티센스 올리고뉴클레오티드가 약 15개 내지 40개의 염기쌍 단위(단량체)를 갖는 모폴리노 올리고머 또는 PNA 올리고머를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

모폴리노 올리고머가 포스포로다이아미테이트-연결된 모폴리노 올리고머를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,

중합체가 펩티드인, 약학 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서,

중합체가 양이온성 중합체인, 약학 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서,

중합체가 덴드리머성(dendrimeric) 옥타구아닌딘 중합체인, 약학 조성물.

청구항 14

하기 올리고뉴클레오티드 분자들, 및 이들의 유사체 및 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 유효량의 안티센스 올리고뉴클레오티드 분자를 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체의 근이영양증의 치료 방법:

GCTGGGAGAGAGCTTCCTGTAGCTTCAC(서열번호 5);
 TGTTACCTACCCTTGTCGGTCCTGTAC(서열번호 6);
 CTGCTGTCTTCTTGCTATGAATAATGTC(서열번호 7);
 GGCGTTGCACCTTTGCAATGCTGCTGTCT(서열번호 8);
 TTGGAAATCAAGCTGGGAGAGAGCTTCC(서열번호 9);
 CTACCCTTGTCGGTCCTTGACATTTTG(서열번호 12);
 GTCAATCCGACCTGAGCTTGTGTGAGA(서열번호 14);
 CTTGCTATGAATAATGTCAATCCGACC(서열번호 16);
 TATATGTGTTACCTACCCTTGTCGGTCC(서열번호 24);

GCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 27);
 CCAATGCCATCCTGGAGTTCCT(서열번호 28);
 CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGA(서열번호 34);
 CCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 35);
 CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT(서열번호 37);
 CCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 40);
 TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG(서열번호 42);
 CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG(서열번호 44);
 TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA(서열번호 45);
 GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 46);
 AACUCCUUCUUUACAGAAAAGCAUAC(서열번호 79);
 GGGAUCCAGUUAUACUACAGGCUCC(서열번호 97);
 CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCT(서열번호 100);
 CATCAAGGAAGATGGCATTCTAGT(서열번호 101); 및
 CAACTGTTGCCTCCGTTCTGAAG(서열번호 116).

청구항 15

제14항에 있어서,
 근이영양증이 뒤센 근이영양증(DMD)인, 치료 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,
 근이영양증이 벡커(Becker) 근이영양증(BMD)인, 치료 방법.

청구항 17

제14항에 있어서,
 서열이 서열번호 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 및 24로 이루어진 군으로부터 선택되고, 엑손이 엑손 43인, 치료 방법.

청구항 18

제14항에 있어서,
 서열이 서열번호 27, 28, 34, 35, 37, 40, 42, 44, 45 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 엑손이 엑손 45인, 치료 방법.

청구항 19

제14항에 있어서,
 서열이 서열번호 79 및 97로 이루어진 군으로부터 선택되고, 엑손이 엑손 50인, 치료 방법.

청구항 20

제14항에 있어서,
 서열이 서열번호 100 및 101로 이루어진 군으로부터 선택되고, 엑손이 엑손 51인, 치료 방법.

청구항 21

제14항에 있어서,

서열이 서열번호 116이고, 엑손이 엑손 53인, 치료 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 근이영양증, 특히 뒤센(Duchenne) 근이영양증(DMD)의 치료를 위한 안티센스 화합물 및 조성물에 관한 것이다.

[0002] 연방 지원 연구 또는 개발

[0003] 본 발명은 국립보건원의 국립 신경 질환 및 뇌졸중 연구소(NIH/NINDS)에 의해 수여된 승인 번호 U01NS062709 하에서 미국 정부 지원으로 만들어졌다.

배경기술

[0004] 뒤센 근이영양증(DMD)은 근이영양증의 가장 흔하고 심각한 형태이다. 3500명의 신생아 중 1명에게 영향을 미치는 DMD는 인간 DMD 유전자의 넌센스(nonsense) 돌연변이 및 아웃 오프 프레임(out of frame) 돌연변이에 의해 야기되는 중증 x-연관 근육 소모 질환이다. DMD 환자는 전형적으로 10세 내지 12세까지 휠체어를 필요로 하고 10대 후반 내지 30대 초반에 사망한다.

[0005] DMD는 기능성 단백질의 합성을 방해하는 디스트로핀(dystrophin) 유전자 내의 돌연변이에 의해 야기된다. 디스트로핀 유전자는 230만 개 초과인 염기쌍에 걸쳐 있는 79개의 엑손을 함유하는, 인간 게놈 내의 가장 큰 유전자들 중 하나이다. 일반적으로, 하나의 전체 엑손 또는 엑손들의 제거, 또는 하나 이상의 엑손의 중복에 의해 판독 프레임을 변화시키거나 정지 코돈을 도입하는, 디스트로핀 유전자의 엑손 부분들 중 임의의 엑손 부분 내의 돌연변이는 DMD를 초래할 수 있는, 기능성 디스트로핀의 생성을 파괴하는 잠재력을 갖는다.

[0006] 최근에, 연구는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AO)에 근거한 치료법이 DMD를 포함하는 유전 관련 질환들의 기대되는 치료를 제공할 수 있다는 것을 보여주었다. 특히, 표적화된 유전자 발현에 대한 특이성을 나타내는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AO)가 개발되었다. 예를 들면, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 엑손 스킵핑(skiping)을 유도하여 기능성 디스트로핀의 판독 프레임 및 발현을 복구시키는 것으로 밝혀졌다. 디스트로핀 유전자의 아웃 오프 프레임 돌연변이를 스킵핑함으로써 판독 프레임이 복구될 수 있고, 절단된(truncated) 기능성 벡커(Becker) 유사 디스트로핀 단백질이 발현된다.

[0007] 시험관내 인간 세포에서의 연구 및 생체내 동물 질환 모델에서의 연구는 DMD에 대한 잠재적 치료법으로서 엑손 스킵핑의 원리를 입증하였다. 고무적인 결과를 제공하는, 2종의 상이한 AO 화합물질(포스포로다이아미테이트 모폴리노 올리고머(PMO) 및 포스포로티오에이트-연결된 2'-베타.-메틸 RNA(2'OMePS))를 사용한 초기 임상 시험이 최근에 수행되었다. 엑손 51에 대한 2'OMePS AO가 주입된 4명의 DMA 환자의 TA 근육에서 디스트로핀 발현의 복구가 반 듀테콤(van Deutekom) 등에 의해 보고되었다.

[0008] 디스트로핀 판독 프레임을 복구시키는 특정 엑손의 표적화된 제거의 효과를 결정하는 한 결정적인 인자는 특정 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 확인이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 정상적으로 단지 20개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 이루어진 서열을 갖기 때문에, 각각의 엑손 디스트로핀 엑손을 표적화하기 위해 수백 개 이상의 잠재적 후보 AO가 존재할 수 있다. 실제로, 많은 안티센스 올리고뉴클레오타이드들이 효율적인 엑손 스킵핑을 발생시키지 못한다. 따라서, DMD의 치료를 위한 디스트로핀 판독 프레임의 복구를 위해 엑손을 효과적으로 제거하기 위해, 각각의 인간 디스트로핀 엑손을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 스크리닝되고 선별되어야 할 필요가 있다. 그러나, 개별 엑손을 표적화하는 가장 효과적인 AO의 선별에 적용될 규칙이 없다. 더욱이, 모든 종래기술들은 DMD 환자의 근육 섬유의 최종 표적화 세포와 상당히 상이한 세포 배양물에서만 엑손 스킵핑 효과를 보이는 AO를 확인하였다. 세포 배양물에서 선별된 개별 AO의 생물학적 효과는 생체내 근육에서의 잠재적 효과와 상당히 상이할 수 있다.

[0009] 따라서, 디스트로핀 유전자의 표적화된 엑손에서 효율적인 엑손 스킵을 야기하는 개선된 안티센스 올리고뉴클레오티드가 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0010] 본 발명의 실시양태는 일반적으로 근이영양증, 특히 뒤센 근이영양증(DMD)의 치료를 위한 안티센스 화합물 및 조성물에 관한 것이다.

[0011] 한 실시양태에서, 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오티드 분자, 안티센스 올리고뉴클레오티드 분자를 포함하는 약학 조성물 및 제형, 및 근이영양증 관련 질환 및 장애의 치료 방법에 관한 것으로서, 이때 안티센스 올리고뉴클레오티드 분자는 하기 염기 서열들, 및 이들의 유사체 및 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기 서열을 포함하고, 상기 분자는 디스트로핀 유전자에서 표적 부위에 결합하여 엑손 스킵을 야기할 수 있다:

[0012] GCTGGGAGAGAGCTTCCTGTAGCTTCAC(서열번호 5);

[0013] TGTACCTACCCTTGTCGGTCCTGTAC(서열번호 6);

[0014] CTGCTGTCTTCTTGCTATGAATAATGTC(서열번호 7);

[0015] GCGGTGCACTTTGCAATGCTGCTGTCT(서열번호 8);

[0016] TTGGAATCAAGCTGGGAGAGAGCTTCC(서열번호 10);

[0017] CTACCCCTTGTCGGTCCTTGACATTTTG(서열번호 12);

[0018] GTCAATCCGACCTGAGCTTTGTTGTAGA(서열번호 14);

[0019] CTTGCTATGAATAATGTCAATCCGACC(서열번호 16);

[0020] TATATGTGTTACCTACCCTTGTCGGTCC(서열번호 24);

[0021] GCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 27);

[0022] CCAATGCCATCCTGGAGTTCCT(서열번호 28);

[0023] CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGA(서열번호 34);

[0024] CCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT(서열번호 35);

[0025] CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT(서열번호 37);

[0026] CCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 40);

[0027] TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG(서열번호 42);

[0028] CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG(서열번호 44);

[0029] TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA(서열번호 45);

[0030] GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 46);

[0031] AACUCCUCUUUACAGAAAAGCAUAC(서열번호 79);

[0032] GGGAUCCAGUUAUACUACAGGCUCC(서열번호 97);

[0033] CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCT(서열번호 100);

[0034] CATCAAGGAAGATGGCATTTCTAGT(서열번호 101); 및

[0035] CAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAG(서열번호 116).

[0036] 각각의 말단에서 1개 또는 2개의 뉴클레오티드를 덜 갖거나 더 갖는 이들 서열들은 유사한 효과를 나타낼 것으로 예측되므로, 디스트로핀 유전자에서의 표적화된 엑손 스킵에 사용될 수도 있다.

[0037] 본 발명의 추가 양태는 안티센스 올리고뉴클레오티드 분자의 향상된 세포 전달을 위한 중합체에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 폴록사머와 폴리에틸렌이민(PEI)의 접합체인 한 부류의 중합체를 제공한다. 폴록

사머는 폴리옥시프로필렌(폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 쇄 및 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개 측면(flanking) 친수성 쇄를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 본 발명은 일반적인 용어로 기재되어 있지만, 반드시 일정한 비율로 작도되어 있지 않은 도면이 참조될 것이다.
- 도 1 내지 6은 본 발명의 실시양태에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자를 사용한 다양한 엑손의 스킵핑을 보여주는 웨스턴 블롯의 이미지이다.
- 도 7은 본 발명의 실시양태에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자의 전달에 사용된 중합체의 화학구조를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 본 발명은 본 발명의 모든 실시양태가 아니라 몇몇 실시양태가 제시되어 있는 첨부된 도면을 참조하면서 이하에 보다 완전히 기재될 것이다. 실제로, 본 발명은 많은 상이한 형태로 구현될 수 있고 본원에 기재된 실시양태로 한정되는 것으로서 해석되어서는 안 되고, 오히려 이들 실시양태는 본 개시내용이 적용가능한 법률 요건을 충족시키기 위해 제공된다. 유사한 번호는 전체에서 유사한 요소를 지칭한다.
- [0040] 본 발명의 실시양태는 특정 표적에 결합하여 엑손 스킵핑을 유도할 수 있는 하나 이상의 안티센스 분자에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 일부 실시양태는 뒤센 근이영양증(DMD)을 포함하는 이영양증 관련 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0041] 본 발명의 실시양태에 따른 안티센스 분자는 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 43, 엑손 45, 엑손 50, 엑손 51 및 엑손 53 중 하나 이상에서 엑손 스킵핑을 유도할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0042] 바람직하게는, 본 발명의 실시양태에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적화된 서열에서 엑손 스킵핑을 고효율로 유도한다. 한 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자는 20% 이상, 보다 바람직하게는 40% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상의 효율로 엑손 스킵핑을 야기할 수 있다.
- [0043] 한 실시양태에서, 본 발명은 디스트로핀 유전자의 엑손 43의 엑손 스킵핑을 유도할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자에 관한 것이다. 엑손 43의 표적화를 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자는 하기 서열들 및 이들의 유사체 중 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [0044] GCTGGGAGAGAGCTTCCTGTAGCTTCAC(서열번호 5);
- [0045] TGTTACCTACCCTTGTCGGTCCTGTAC(서열번호 6);
- [0046] CTGCTGTCTTCTTGCTATGAATAATGTC(서열번호 7);
- [0047] GGCGTTGCACTTTGCAATGCTGCTGTCT(서열번호 8);
- [0048] TTGGAAATCAAGCTGGGAGAGAGCTTCC(서열번호 10);
- [0049] CTACCCCTTGTCGGTCCTGTACATTTTG(서열번호 12);
- [0050] GTCAATCCGACCTGAGCTTTGTTGTAGA(서열번호 14);
- [0051] CTGTGCTATGAATAATGTCAATCCGACC(서열번호 16); 및
- [0052] TATATGTGTTACCTACCCTTGTCGGTCC(서열번호 24).
- [0053] 추가 실시양태에서, 본 발명은 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 엑손 스킵핑을 유도할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자에 관한 것이다. 엑손 45의 표적화를 위한 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자는 하기 서열들 및 이들의 유사체 중 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [0054] GCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 27);
- [0055] CCAATGCCATCCTGGAGTTCCT(서열번호 28);

- [0056] CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGA(서열번호 34);
- [0057] CCGCTGCCCCAATGCCATCCTGGAGTTCC(서열번호 35);
- [0058] CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT(서열번호 37);
- [0059] CCGCTGCCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 40);
- [0060] TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG(서열번호 42);
- [0061] CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG(서열번호 44);
- [0062] TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA(서열번호 45); 및
- [0063] GTGCCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG(서열번호 46).
- [0064] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 디스트로핀 유전자의 엑손 50의 엑손 스킵핑을 유도할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자에 관한 것이다. 엑손 50의 표적화를 위한 본 발명의 실시양태에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자는 하기 서열들 및 이들의 유사체 중 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [0065] AACUCCUCUUUAAACAGAAAAGCAUAC(서열번호 79); 및
- [0066] GGGAUCCAGUUAUACUACAGGCUCC(서열번호 97).
- [0067] 또한, 본 발명의 실시양태는 디스트로핀 유전자의 엑손 51의 엑손 스킵핑을 유도할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자에 관한 것이다. 엑손 51의 표적화를 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자는 하기 서열들 및 이들의 유사체 중 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [0068] CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCT(서열번호 100); 및
- [0069] CATCAAGGAAGATGGCATTCTAGT(서열번호 101).
- [0070] 또한, 본 발명의 실시양태는 디스트로핀 유전자의 엑손 53의 엑손 스킵핑을 유도할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자에 관한 것이다. 엑손 53의 표적화를 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자는 하기 서열 및 이들의 유사체 중 하나 이상을 포함할 수 있다: CAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAG(서열번호 116).
- [0071] 본 발명이 상기 올리고뉴클레오타이드 서열들의 유사체도 포함한다는 것을 인식해야 한다. 본 발명에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 서열의 용어 "유사체"는 우라실(U) 염기가 하나 이상의 티미딘(T) 염기로 치환되어 있는 서열 및 하나 이상의 티미딘(T) 염기가 우라실(U) 염기로 치환되어 있는 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열에서 상기 두 염기들 중 어느 한 염기의 존재는 상기 서열이 상보적 서열이기 때문에 일반적으로 분자가 디스트로핀 유전자의 전구-mRNA에 여전히 결합하게 한다. 따라서, 분자에서 상기 두 염기들 중 어느 한 염기의 존재는 일반적으로 엑손 스킵핑을 유도할 것이다. 분자의 상기 서열들은 모두 티미딘, 모두 우라실 또는 이들의 조합물을 함유할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이, 서열에서 T 또는 U의 선택은 적어도 부분적으로 분자를 생성하는 데에 사용된 화합물질에 근거할 수 있다. 예를 들면, 분자가 포스포로다이아미테이트 모폴리노 올리고뉴클레오타이드(PMO)인 경우, PMO를 생성할 때 T가 사용되기 때문에 X는 바람직하게는 T일 수 있다. 다르게는, 분자가 포스포로티오에이트-연결된 2'-O-메틸 올리고뉴클레오타이드(2'OMePS)인 경우, 2'OMePS를 생성할 때 U가 사용되기 때문에 X는 바람직하게는 U일 수 있다.
- [0072] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 서열의 추가 유사체는 2개 이하의 염기가 결실되어 있거나 다른 염기로 치환되어 있는 서열을 포함할 수 있되, 분자는 표적화된 엑손의 엑손 스킵핑을 유도할 수 있어야 한다. 본 발명에 따른 추가 유사체는 서열의 한 말단 또는 양 말단에 추가된 추가 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 서열, 또는 서열의 대향하는 말단들 중 하나 이상의 말단에서 1개의 염기가 결실되어 있는 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, CTGCTGTCTTCTTGCTATGAATAATGTC(서열번호 7)의 유사체는 하기 서열을 포함할 수 있다:
- [0073] XCTGCTGTCTTCTTGCTATGAATAATGTCX'(서열번호 119)(이때, X 및 X'는 독립적으로 C, T, G, U 및 A 중 하나임);
- [0074] TGCTGTCTTCTTGCTATGAATAATGTC(서열번호 120)
- [0075] CTGCTGTCTTCTTGCTATGAATAATGT(서열번호 121); 및
- [0076] TGCTGTCTTCTTGCTATGAATAATGT(서열번호 122).
- [0077] 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자는, 이 분자가 선택된 염기 서열을 갖고 디스트로핀 전구-

mRNA의 표적 부위에 결합하여 엑손 스킵핑을 야기할 수 있는 한, 임의의 종류의 분자일 수 있다. 예를 들면, 상기 분자는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 올리고리보뉴클레오타이드, 포스포로다이하미데이트 모폴리노 올리고뉴클레오타이드(PMO) 또는 포스포로티오에이트-연결된 2'-O-메틸 올리고뉴클레오타이드(2'OMePS)일 수 있다. 바람직하게는, 상기 올리고뉴클레오타이드는 PMO이다. 바람직하게는, 상기 분자는 다른 화합물 또는 오염물질을 갖지 않도록 단리된다.

[0078] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자는 PMO 및 펩티드 핵산(PNA)을 포함한다. 모폴리노 올리고머는 전형적인 폴리뉴클레오타이드와 수소결합할 수 있는 염기를 지탱하는 골격을 갖는 중합체 분자이고, 이때 상기 중합체는 오탄당 골격 부분(moiety), 보다 구체적으로 뉴클레오타이드 및 뉴클레오시드의 전형적인 특징인 포스포다이에스터 결합에 의해 연결된 리보스 골격을 결여하는 대신에 고리 질소를 통한 커플링을 갖는 고리 질소를 함유한다. 적합한 모폴리노 올리고머의 예에는 포스포로다이하미데이트 모폴리노 올리고머가 포함된다. 본 발명의 실시에서 사용될 수 있는 모폴리노 올리고머의 예는 미국 특허 제5,698,685호, 제5,217,866호, 제5,142,047호, 제5,034,506호, 제5,166,315호, 제5,185,444호, 제5,521,063호, 제5,506,337호, 제6,124,271호, 제6,784,291호, 제7,049,431호, 제7,582,615호 및 제7,625,873호에 보다 상세히 기재되어 있다.

[0079] 펩티드 핵산 중합체(PNA)도 본 발명의 실시에서 안티센스 올리고머로서 사용될 수 있다. PNA는 데옥시리보스 골격과 구조적으로 이체동형적인(homomorphous) 골격을 갖고 뉴클레오염기가 부착된 경우 N-(2-아미노에틸)글리신 단위(unit)로 이루어진다. PNA는 인간 질환과 관련된 유전자를 표적화하는 잠재력에 대해 안티센스 올리고머로서 연구되었다. 양으로 하전된 중합체와 함께 PNA의 용이한 합성으로 인해, PNA 및 이의 접합체는 암, 유전 질환 및 다른 질환에 대한 실험 요법의 약물로서 광범위하게 시험되고 있다.

[0080] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자, 특히 모폴리노 올리고머 및 PNA는 매우 다양한 상이한 양으로 하전된 중합체들과 접합될 수 있다. 양으로 하전된 중합체의 예에는 펩티드, 예컨대, 아르기닌 풍부 펩티드(본 발명의 실시에서 사용될 수 있는 양으로 하전된 펩티드의 예에는 R9F2C; (RXR)₄XB(이때, X는 임의의 아미노산일 수 있음); R5F2R4C; (RFF)3; Tat 단백질, 예컨대, TAT 서열 CYGRKKRRQRRR; 및 (RFF)3R이 포함됨), 양이온성 중합체, 예컨대, 덴드리머성(dendrimeric) 옥타구아닌딘 중합체, 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화합물과 접합되는 것으로서 당분야에서 공지되어 있는 다른 양으로 하전된 분자가 포함된다. 한 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 1,000 달톤 내지 20,000 달톤, 바람직하게는 약 5,000 달톤 내지 10,000 달톤의 분자량을 갖는 중합체를 포함하는 양으로 하전된 중합체와 접합된다. 양으로 하전된 중합체의 또 다른 예는 그의 분지쇄 또는 비분지쇄 내에 다수의 양으로 하전된 아민 기를 갖는 폴리에틸렌아민(PEI)이다. PEI는 유전자 및 올리고머 전달 비히클로서 널리 사용되고 있다.

[0081] 또한, 본 발명의 실시양태는 DMD의 치료, 특히 DMD의 영향을 호전을 위한 약학 제형 및 조성물에 관한 것이다. 개체(예를 들면, 포유동물, 예컨대, 인간) 또는 세포의 "치료" 또는 상기 개체 또는 세포를 "치료하는"은 상기 개체 또는 세포의 자연 경과를 변경시키기 위한 시도에서 이용된 임의의 종류의 시술을 포함할 수 있다. 치료는 약학 조성물의 투여를 포함하나 이것으로 한정되지 않고 예방 목적으로 수행될 수 있거나 병리학적 사건의 개시 또는 병인 물질과의 접촉 후에 수행될 수 있다. 치료는 일부 형태의 근이영양증에서와 같이 디스트로핀 단백질과 관련된 질환 또는 병태(condition)의 증상 또는 병상에 대한 임의의 바람직한 효과를 포함하고, 예를 들면, 치료되는 질환 또는 병태의 하나 이상의 측정가능한 마커의 최소한의 변화 또는 개선을 포함할 수 있다. 치료되는 질환 또는 병태의 진행 속도의 감소, 상기 질환 또는 병태의 발병의 지연, 또는 그의 발병의 중증도의 감소에 관한 것일 수 있는 "예방적" 치료도 포함된다. "치료" 또는 "예방"은 반드시 질환 또는 병태, 또는 이의 관련 증상의 완전한 박멸, 치유 또는 예방을 표시하는 것은 아니다.

[0082] 특히, 본 발명의 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드(예를 들면, 서열번호 5 내지 8, 10, 12, 14, 16, 24, 27, 28, 34, 35, 37, 40, 42, 44, 45, 46, 79, 97, 100, 101 및 116, 및 이들의 유사체 및 조합물)를 선택적으로 약학 제형 또는 투약 형태의 일부로서 근이영양증의 치료가 필요한 대상체에게 투여함으로써 근이영양증, 예컨대, DMD 및 BMD를 치료하는 방법이 포함된다. 하나 이상의 안티센스 올리고머를 투여하여 대상체에서 엑손 스킵핑을 유도하는 방법도 포함되고, 이때 상기 엑손은 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 42, 44, 45, 50, 51 및 53, 및 이들의 조합물 중 하나이다. 본원에서 사용된 "대상체"는 본 발명의 안티센스 화합물로 치료될 수 있는 증상을 나타내거나 증상을 나타낼 위험이 있는 임의의 동물, 예컨대, DMD 또는 BMD, 또는 이들 병태들과 관련된 임의의 증상(예를 들면, 근육 섬유 손실)을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체를 포함한다. 적합한 대상체(환자)는, 이러한 대상체가 본 발명의 상보적 서열을 함유하는 한, 실험 동물(예컨대, 마우스,

래트, 토끼 또는 기니아 피그), 농장 동물, 및 가축 또는 애완동물(예컨대, 고양이 또는 개)을 포함한다. 비인간 영장류 및 바람직하게는 인간 환자가 포함된다.

- [0083] 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자를 포함하는 약학 제형은 임의의 편리한 생리학적으로 허용가능한 비히클로 투여될 수 있다. 표준 약학적으로 허용가능한 담체의 예에는 식염수, 인산염 완충 식염수(PBS), 물, 수성 에탄올, 에멀전, 예컨대, 유/수 에멀전, 트라이글리세라이드 에멀전, 습윤화제, 정제 및 캡슐제가 포함된다. 적합한 생리학적으로 허용가능한 담체의 선택은 선택된 투여 방식에 따라 달라질 것임을 인식해야 한다.
- [0084] 한 실시양태에서, 약학 조성물은 복수의 본 발명의 분자를 포함할 수 있고, 이때 각각의 분자는 상이한 엑손에서의 엑손 스킵핑에 관한 것이다. 다르게는, 약학 조성물은 복수의 본 발명의 분자를 포함할 수 있고, 이때 각각의 분자는 동일한 엑손에서의 엑손 스킵핑에 관한 것이다.
- [0085] 본 발명의 약학 조성물은 직접적인 투여(예를 들면, 배양 배지에의 첨가에 의한 시험관내 투여, 또는 치료 부위에서의 주사 또는 국소 투여에 의한 동물 생체내 국소 투여) 또는 전신 투여(예를 들면, 비경구 또는 경구, 또는 정맥내, 피하)를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 표적 세포에 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 화합물 및 조성물은 생리학적으로 허용가능한 용액이 표적 세포로의 원하는 물질의 전달 이외에 세포, 조직 또는 대상체의 전해질, 부피 및/또는 대사에 달리 불리한 영향을 미치지 않도록 상기 생리학적으로 허용가능한 용액의 일부를 구성한다.
- [0086] 본 발명에서 사용되는 약학 조성물 및 화합물은 비강내, 경구, 흡입, 장내, 국소, 자궁내, 질, 설하, 직장, 근육내, 흉막내, 심실내, 복강내, 눈, 정맥내 또는 피하 수단에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 약학 용액은 정맥내 주사를 통해 제공된다.
- [0087] 본 발명에 따른 약학 조성물은 액체 또는 고체 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 용매, 희석제, 부형제, 방부제, 에멀전화제, 향, 맛, pH 등을 조절하는 화합물 등을 추가로 포함할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 약학 조성물은 활성 화합물 이외에 약학적으로 사용될 수 있는 제형으로의 활성 화합물의 프로세싱 및 전달을 용이하게 하는 적합한 부형제 및 보조제를 함유할 수 있다. 적합한 부형제는 충전제, 예컨대, 당, 예를 들면, 락토스, 수크로스, 만니톨 또는 소르비톨, 셀룰로스 제형, 인산칼슘, 및 결합제, 예컨대, 전분, 젤라틴, 메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 원하는 경우, 붕해제, 예컨대, 상기 전분뿐만 아니라 카복시메틸 전분, 가교결합된 폴리비닐 피롤리돈, 아가, 알긴산 또는 이의 염이 첨가될 수 있다. 보조제는 유동 조절제 및 윤활제, 예를 들면, 실리카, 탈크, 스테아르산 또는 이의 염, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0088] 제형은 경구, 전신 주사, 경피, 경막 또는 다른 전형적인 경로에 의해 추가 담체 또는 희석제와 함께 또는 이들 없이 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 약학 제형은 당의정, 정제, 입자, 과립제 또는 산제 형태로 경구 투여될 수 있다.
- [0089] 본 발명은 치료 유효량 및/또는 예방 유효량의 상기 약학 제형을 하나 이상의 의학적 병태의 치료 및/또는 상기 병태의 영향을 호전이 필요한 환자에게 투여함으로써 하나 이상의 의학적 병태를 치료하고/하거나 상기 병태의 영향을 호전시키는 방법도 제공한다. 본 발명에 따라, 본 발명의 화합물, 조합물 또는 약학 조성물의 "치료 유효량"은 원하는 약리학적 효과를 달성하기에 충분한 양이다. 일반적으로, 유효량의 상기 조성물을 제공하는 데에 요구되고 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 조절될 수 있는 투여량은 수용자의 연령, 건강, 신체 상태, 성별, 체중 및 질환 정도에 따라 달라질 것이다. 추가로, 투여량은 치료 빈도 및 원하는 효과의 성질 및 범위에 의해 결정될 수 있다.
- [0090] 약학 제형 중의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 전형적인 투여량은 체중 kg 당 약 0.05 mg 내지 1000 mg, 특히 체중 kg 당 약 5 mg 내지 500 mg일 수 있다. 한 실시양태에서, 투여량은 2주 당 1회, 1주 당 1회 또는 2회, 또는 치료 효과를 달성하는 데에 요구되는 임의의 빈도로 체중 kg 당 약 50 mg 내지 300 mg이다.
- [0091] 물론, 투여되는 투여량은 용도 및 공지된 인자, 예컨대, 활성 성분의 약력학적 특성; 수용자의 연령, 건강 및 체중; 증상의 성질 및 정도; 병행 치료의 종류; 치료의 빈도; 및 원하는 효과에 따라 달라질 것이다. 수용자는 임의의 종류의 포유동물일 수 있으나, 바람직하게는 인간이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 약학 조성물의 투약 형태(조성물)는 단위 당 약 1 μ g 내지 20,000 μ g의 활성 성분, 특히 단위 당 약 10 μ g 내지 1,000 μ g의 활성 성분을 함유할 수 있다.
- [0092] (이때, 단위가 1회 주사를 위한 하나의 바이알 또는 하나의 팩키지를 의미하는 경우, 상기 단위는 훨씬 더 높을

것이다(환자의 체중이 50 kg인 경우 최대 15 g)). 정맥내 전달의 경우, 약학 제형의 단위 투여량은 일반적으로 체중 kg 당 0.5 μg 내지 500 μg 의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자를 함유할 것이고 바람직하게는 체중 kg 당 5 μg 내지 300 μg , 특히 10 μg , 15 μg , 20 μg , 30 μg , 40 μg , 50 μg , 100 μg , 200 μg 또는 300 μg ($\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중)의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자를 함유할 것이다. 바람직한 정맥내 투여량은 체중 kg 당 10 ng 내지 2000 μg , 바람직하게는 3 μg 내지 300 μg , 보다 바람직하게는 10 μg 내지 100 μg 이다. 다르게는, 단위 투여량은 2 μg 내지 20 μg 의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자를 함유할 수 있고, 원하는 경우 상기 1일 투여량을 제공하기 위해 다회 투여될 수 있다. 이들 약학 조성물에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자는 통상적으로 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.5 중량% 내지 95 중량%의 양으로 존재할 것이다.

[0093] 한 구체적인 실시양태에서, 투여량은 개별 환자 반응에 근거하여 증가될 수 있거나 감소될 수 있다는 것을 인식해야 한다. 사용되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자의 실제 양은 사용되는 구체적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자, 제형화되는 구체적인 조성물, 적용 방식, 및 구체적인 투여 부위에 따라 달라질 것이다.

[0094] 경구 투여의 경우, 조성물이 정제 또는 캡슐제의 형태로 존재하는 경우, 활성 성분은 락토스, 전분, 수크로스, 글루코스, 메틸 셀룰로스, 스테아르산마그네슘, 인산이칼슘, 황산칼슘, 만니톨, 소르비톨 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는 경구 무독성의 약학적으로 허용가능한 불활성 담체와 조합될 수 있다. 추가로, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 착색제도 혼합물 내로 도입될 수 있다. 적합한 결합제는 전분, 젤라틴, 천연 당, 예컨대, 글루코스 또는 베타-락토스, 옥수수 감미제, 천연 고무 및 합성 고무, 예컨대, 아카시아, 트라가칸스 또는 알긴산나트륨, 카복시메틸셀룰로스, 폴리에틸렌 글리콜, 왁스 등을 포함할 수 있다. 이들 투약 형태에서 사용되는 윤활제는 올레산나트륨, 스테아르산나트륨, 스테아르산마그네슘, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨 등을 포함할 수 있다. 붕해제는 전분, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토나이트, 잔탄 고무 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0095] 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자 제형은 표적화가능한 약물 담체로서의 가용성 중합체와 커플링될 수도 있다. 이러한 중합체는 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈, 피란 공중합체, 폴리하이드록시프로필메타크릴아미드-페놀, 폴리하이드록시에틸아스파르트아미드페놀, 팔미토일 잔기로 치환된 폴리에틸렌옥사이드-폴리라이신, 폴록사머 및 폴리에틸렌이민(PEI), 또는 폴록사머와 PEI의 접합된 중합체를 포함할 수 있다. 폴록사머는 임의의 폴록사머, 예컨대, L44, L64, P85, P123 및 F127일 수 있다. 이와 관련하여, 도 7은 본 발명의 일부 실시양태에 따라 세포 전달에 사용될 수 있는 중합체를 보여준다.

[0096] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자 제형은 약물의 조절 방출을 달성하는 데에 유용한 한 부류의 생체분해성 중합체, 예를 들면, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락트산과 폴리글리콜산의 공중합체, 폴리엠틸론 카프로락톤, 폴리하이드록시 부티르산, 폴리오르토에스터, 폴리아세탈, 폴리다이하이드로피란, 폴리스시아노아실레이트, 폴록사머와 PEI의 접합된 중합체, 및 하이드로겔의 가교결합된 또는 양친매성 블록 공중합체와 커플링될 수 있다.

[0097] 본원에 기재된 조성물은 지속 방출 제형(즉, 투여 후 조절제의 서방출을 수행하는 제형, 예컨대, 캡슐, 수지 또는 스폰지)의 일부로서 투여될 수 있다. 이러한 제형은 일반적으로 잘 공지되어 있는 기술을 이용함으로써 제조될 수 있고 예를 들면, 직장 또는 피하 이식에 의해, 또는 원하는 표적 부위에서의 이식에 의해 투여될 수 있다. 지속 방출 제형은 담체 매트릭스 내에 분산되고/되거나 속도 조절 막에 의해 둘러싸인 저장기 내에 함유된 조절제를 함유할 수 있다. 이러한 제형 내에서 사용될 담체는 생체적합하고 생체분해성을 나타낼 수도 있고, 바람직하게는 상기 제형은 상대적으로 일정한 수준의 조절제 방출을 제공한다.

[0098] 인간은 일반적으로 마우스 또는 본원에 예시된 다른 실험 동물보다 더 오래 치료된다는 것을 인지해야 한다. 따라서, 치료의 기간은 일반적으로 질환 또는 병리생리학적 과정의 기간, 강도 또는 선행 지속기간에 비례할 수 있고, 동물 종, 약물 효과 및 요구되거나 권장된 효과의 정도에 의해서도 좌우될 수 있다. 투여량은 1일, 1주, 1년 내지 전체 수명의 기간에 걸쳐 단회 투여량 또는 다회 투여량일 수 있다.

[0099] 한 실시양태에서, 본 발명의 약학 조성물 및 화합물은 특히, 치료 표적이 눈, 피부 또는 하부 소화관의 질환을 포함하는, 국소 적용에 의해 용이하게 접근될 수 있는 영역 또는 장기를 포함하는 경우 국소 투여될 수 있다. 국소 적용은 본 발명의 조합물, 화합물 및 조성물을 피부 아래 조직, 예컨대, 근육에 투여하는 데에도 용이하게 이용될 수 있다. 적합한 국소 제형은 이들 영역들 또는 장기들 각각에 대해 제조될 수 있다.

[0100] 하부 소화관의 국소 적용은 직장 좌약 제형 또는 적합한 관장 제형으로 수행될 수 있다. 국소 경피 패치도 사용될 수 있다. 국소 적용의 경우, 약학 조성물은 하나 이상의 담체에 현탁되거나 용해된 활성 성분을 함유하는

적합한 연고로 제형화될 수 있다. 본 발명의 화합물의 국소 투여용 담체는 광물유, 액상 바셀린, 백색 바셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 에멀전화 왁스 및 물을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 다르게는, 약학 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체에 현탁되거나 용해된 활성 성분을 함유하는 적합한 로션 또는 크림으로 제형화될 수 있다. 적합한 담체는 광물유, 소르비탄 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 세틸 에스터 왁스, 세테아릴 알코올, 2-옥틸도데칸올, 벤질 알코올 및 물을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0101] 눈 사용의 경우, 약학 조성물은 방부제, 예컨대, 염화벤질알코늄을 갖거나 갖지 않는, 등장성 pH-조절된 멸균 식염수 중의 미분화된 현탁액 또는 바람직하게는 등장성 pH-조절된 멸균 식염수 중의 용액으로서 제형화될 수 있다. 다르게는, 눈 사용의 경우, 약학 조성물은 연고, 예컨대, 바셀린으로 제형화될 수 있다.

[0102] 눈에 국소 투여되기에 적합한 제형은 활성 성분이 적합한 담체, 특히 활성 성분을 위한 수성 용매에 용해되어 있거나 현탁되어 있는 점안제도 포함한다. 활성 성분은 바람직하게는 0.5 중량/중량% 내지 20 중량/중량%, 유리하게는 0.5 중량/중량% 내지 10 중량/중량%, 특히 약 1.5 중량/중량%의 농도로 이러한 제형들에 존재한다.

[0103] 환자의 전신 순환계 내로의 활성 성분의 경피 통과로 본 발명의 약학 제형을 전달하기 위해 국소 투여를 이용할 수 있다. 피부 부위는 약물을 경피 투여하기 위한 해부학적 영역, 예컨대, 팔뚝, 복부, 흉부, 등, 둔부, 넓적다리 및 이개후방 영역을 포함한다. 화합물은 화합물을 포함하는 국소 제형 또는 화합물을 투여하는 경피 약물 전달 디바이스를 피부 상에 배치함으로써 피부에 투여된다. 실시양태에서, 전달 비히클은 피부 상에서의 용이한 배치 및 편안한 보유를 위해 디자인되고 성형되고 크기 조절되고 개조되거나, 제형은 처방된 양 및 일정으로 피부 상에 직접적으로 적용된다.

[0104] 국소 투여에 적합한 제형은 피부를 통한 침투에 적합한 액체 또는 반액체 제형(예를 들면, 도포제, 로션, 연고, 크림, 젤 또는 페이스트), 및 눈, 귀 또는 코에 투여되기에 적합한 점적제를 포함한다. 본 발명의 화합물의 활성 성분의 적합한 국소 투여량은 임의의 다른 국소 경로 및 전신 경로에 의해 사용되는 투여량과 유사할 것으로 예측된다.

[0105] 연고로 제형화되는 경우, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 파라핀계 또는 수혼화성 연고 기재와 함께 사용될 수 있다. 다르게는, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 에멀전화된 크림 기재와 함께 크림으로 제형화될 수 있다. 원하는 경우, 크림 기재의 수성층은 예를 들면, 30 중량/중량% 이상의 다가 알코올, 예컨대, 프로필렌 글리콜, 부탄-1,3-다이올, 만니톨, 소르비톨, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 국소 제형은 바람직하게는 피부 또는 다른 영향받은 영역을 통한 활성 성분의 흡수 또는 침투를 향상시키는 화합물을 포함할 수 있다. 이러한 피부 침투 향상제의 예에는 메토카바몰, 장쇄 알코올, 다이메틸설폭사이드 및 관련 유사체가 포함된다.

[0106] 다양한 경피 약물 전달 디바이스가 본 발명의 약학 제형과 함께 사용될 수 있다. 예를 들면, 백킹 물질 및 아크릴레이트 접착제를 포함하는 단순한 접착 패치가 제조될 수 있다. 약물 및 임의의 침투 향상제는 접착제 주조 용액으로 제형화될 수 있다. 접착제 주조 용액은 백킹 물질 상으로 직접적으로 주조될 수 있거나 피부에 도포되어 접착 코팅을 형성할 수 있다.

[0107] 경피 투여는 저장기 및 다공성 막 종류의 패치 또는 고체 매트릭스 종류의 패치를 사용함으로써 달성될 수 있다. 어느 경우에서든, 활성 성분은 막을 통해 저장기 또는 미세캡슐로부터, 수용자의 피부 또는 점막과 접촉하는 활성 성분 투과가능한 접착제 내로 연속적으로 전달된다. 활성 성분이 피부를 통해 흡수되는 경우, 활성 성분의 조절되고 예정된 유동이 수용자에게 투여된다. 미세캡슐의 경우, 캡슐화제도 막으로서 작용할 수 있다.

[0108] 다른 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 액체 저장기 시스템 약물 전달 디바이스를 사용함으로써 전달될 것이다. 이들 시스템은 전형적으로 백킹 물질, 막, 아크릴레이트 기재의 접착제 및 방출 라이너를 포함한다. 상기 막은 백킹 물질에 밀봉되어 저장기를 형성한다. 그 다음, 약물 또는 화합물 및 임의의 비히클, 향상제, 안정화제, 젤화제 등이 저장기 내로 도입된다.

[0109] 백킹 물질, 약물/침투 향상제 매트릭스, 막 및 접착제를 포함하는 매트릭스 패치도 본 발명의 화합물을 경피로 전달하는 데에 사용될 수 있다. 상기 매트릭스 물질은 전형적으로 폴리우레탄 발포체를 포함할 것이다. 약물, 임의의 향상제, 비히클, 안정화제 등은 발포체 전구체와 조합된다. 발포체는 경화되어, 백킹 물질에 직접적으로 부착될 수 있는 점착성 탄성체 매트릭스를 생성한다.

[0110] 무독성의 약학적으로 허용가능한 국소 담체와 함께 전형적으로 약 0.001% 내지 10%의 농도로 본 발명의 화합물을 포함하는, 피부에 국소 적용될 제제도 본 발명에 포함된다. 이들 국소 제형은 본 발명에 따른 활성 성분을

국소 무수 제형, 액체 제형 및 크림 제형에서 통상적으로 사용되는 통상적인 약학 희석제 및 담체와 조합함으로써 제조될 수 있다. 연고 및 크림은 예를 들면, 적합한 비후제 및/또는 겔화제가 첨가된 수성 또는 유성 기제를 사용함으로써 제형화될 수 있다. 이러한 기제는 물 및/또는 오일, 에컨대, 액상 파라핀 또는 식물성 오일, 에컨대, 땅콩유 또는 피마자유를 포함할 수 있다. 기제의 성질에 따라 사용될 수 있는 비후제는 연질 파라핀, 스테아르산알루미늄, 세토스테아릴 알코올, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 양모지, 수소첨가된 라놀린, 밀랍 등을 포함한다.

[0111] 로션은 수성 또는 유성 기제를 사용함으로써 제형화될 수 있고 일반적으로 하기 물질들 중 하나 이상의 물질도 포함할 것이다: 안정화제, 에멀전화제, 분산제, 현탁제, 비후제, 착색제, 풍미제, 향수 등. 산제는 임의의 적합한 산제 기제, 예를 들면, 탈크, 락토스, 전분 등을 사용함으로써 형성될 수 있다. 점적제는 하나 이상의 분산제, 현탁제, 가용화제, 풍미제, 착색제 등도 포함하는 수성 기제 또는 비수성 기제를 사용함으로써 제형화될 수 있다.

[0112] 본 발명의 에멀전의 오일층은 공지된 방식으로 공지된 성분들로부터 구성될 수 있다. 상기 층은 에멀전화제만을 포함할 수 있지만, 하나 이상의 에멀전화제와 지방 또는 오일의 혼합물, 또는 하나 이상의 에멀전화제와 지방 및 오일의 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 친수성 에멀전화제는 안정화제로서 작용하는 친유성 에멀전화제와 함께 포함된다. 오일 및 지방 둘다를 포함시키는 것도 바람직하다. 더불어, 안정화제와 함께 또는 안정화제 없이 에멀전화제는 소위 에멀전화 왁스를 구성하고, 오일 및 지방과 함께 상기 왁스는 크림 제형의 분산된 오일층을 형성하는 소위 에멀전화 연고 기제를 구성한다. 본 발명의 제형에서 사용되기에 적합한 에멀전화제 및 에멀전 안정화제는 트윈(TWEEN: 상표) 60, 스팬(SPAN: 상표) 80, 세토스테아릴 알코올, 미리스틸 알코올, 글리세릴 모노스테아레이트, 나트륨 라우릴 설페이트, 단독으로 또는 왁스와 함께 글리세릴 다이스테아레이트, 또는 당분야에서 잘 공지되어 있는 다른 물질을 포함한다.

[0113] 제형에 적합한 오일 또는 지방의 선택은 약학 에멀전 제형에서 사용될 대다수 오일에서의 활성 화합물의 가용성이 매우 낮기 때문에 원하는 미관 성질을 달성하는 것에 근거한다. 따라서, 크림은 바람직하게는 튜브 또는 다른 용기로부터의 누출을 피하기에 적합한 점조도(consistency)를 갖는 비광택 비오염성의 세척가능한 제품이어야 한다. 직쇄 또는 분지쇄 일염기성 또는 이염기성 알킬 에스터, 에컨대, 다이아이스오아디페이트, 아이소세틸스테아레이트, 코코넛 지방산의 프로필렌 글리콜 다이에스터, 아이소프로필 미리스테이트, 데실 올레에이트, 아이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트, 2-에틸헥실 팔미테이트 또는 분지쇄 에스터의 블렌드가 사용될 수 있다. 이들은 요구되는 성질에 따라 단독으로 또는 조합물로 사용될 수 있다. 다르게는, 고융점 지질, 에컨대, 백색 연질 파라핀 및/또는 액상 파라핀 또는 다른 광물유가 사용될 수 있다.

[0114] 본 발명에 따른 국소 약학 조성물은 하나 이상의 방부제 또는 정균제, 예를 들면, 메틸 하이드록시벤조에이트, 프로필 하이드록시벤조에이트, 클로로크레올, 염화벤즈알코늄 등도 포함할 수 있다. 국소 약학 조성물은 다른 활성 성분, 에컨대, 항미생물제, 특히 항생제, 마취제, 진통제 및 항소양제뿐만 아니라 항진균제도 함유할 수 있다. 증발에 의해 국소 제형/도포를 경화시키거나 건조하면서 조성물에 향을 부여하는 향수 또는 휘발성 물질도 포함될 수 있다.

[0115] 본 발명의 약학 조성물은 점막을 통해 전달될 수도 있다. 경점막(즉, 설하, 협측 및 질) 약물 전달은 전신 순환계로의 활성 성분의 효율적인 도입을 제공하고 간 및 장벽 플로라(flora)에 의한 즉시 대사를 감소시킨다. 경점막 약물 투약 형태(예를 들면, 정제, 좌약제, 연고, 폐사리, 막 및 산제)는 전형적으로 점막과 접촉 상태로 유지되고 신속히 봉쇄되고/되거나 용해되어 즉시 전신 흡수를 허용한다.

[0116] 한 실시양태에서, 본 방법은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히 특정 유전자 발현을 복구시키거나 유전자의 동형체(isoform)들을 전환시킬 목적으로 특정 유전자 영역을 표적화하도록 선택된 모폴리노 올리고머를 대상체에게 투여함으로써 수행된다. 일반적으로, 본 방법은 무결성, 전사 또는 스플라이싱을 방해하여 단백질의 정상 발현을 억제하거나 복구시키거나 상이한 동형체들의 발현을 전환시키기에 효과적인 양의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자를 적합한 약학 담체와 함께 대상체에게 투여함을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본 방법은 단백질의 음성 음성 변이체를 발현시킨다. 본 방법의 한 양태에서, 대상체는 인간 대상체이다. 항바이러스 치료에서 사용되기 위해, 경구 및 비경구 경로, 예를 들면, 정맥내, 피하, 복강내 및 근육내뿐만 아니라 흡입, 경피 및 국소 전달을 포함하는 다양한 전신 전달 경로가 이용될 수 있다.

[0117] 전형적으로, 1회 이상의 투여량의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자가 일반적으로 규칙적인 간격으로, 바람직하게는 1일 당 1회 내지 1개월 당 1회 투여된다. 경구 투여를 위한 바람직한 투여량은 체중 kg 당 약 1 mg의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자 내지 체중 kg 당 약 600 mg의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자, 보다 바람

직하게는, 체중 kg 당 약 30 mg의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자 내지 체중 kg 당 약 300 mg의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자이다. IV 투여의 경우, 바람직한 투여량은 상기 투여량과 유사하다. 투여량은 환자의 연령, 건강, 성별, 신장 및 체중, 투여 경로, 및 특정 질환 상태에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자의 효능과 같은 인자에 따라 달라질 것이다.

[0118] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 효과적인 생체내 치료법은 투여의 빈도 및 경로뿐만 아니라 치료받는 대상체의 상태에 따라 달라질 것이다. 주어진 경로에 대한 최적 투여량은 당분야에서 공지되어 있는 방법에 따른 상용적 실험에 의해 결정될 수 있다. 이러한 생체내 요법은 일반적으로 치료될 질병의 구체적인 종류에 적합한 시험에 의해 모니터링되고, 최적 치료 결과를 달성하기 위해 투여량 또는 치료법을 상응하게 조절할 수 있다.

[0119] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 분자 및 이의 사용 설명서를 포함하는, 환자에서 DMD를 호전시키는 키트를 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 키트는 동일한 엑손 또는 복수의 엑손들에서 엑손 스킵핑을 야기하는 데에 사용될 복수의 분자를 함유할 수 있다.

[0120] 실시예

[0121] 하기 실시예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자의 효능을 시험하기 위해 3종의 상이한 시험관내 모델 및 생체내 모델을 이용하였다: 1) DMA 근모세포; 2) 정상 인간 근모세포; 및 3) (거의 정상 수준의 디스트로핀을 발현하는 전체 인간 디스트로핀 유전자를 함유하는) 인간화된 DMD(hDMD) 마우스. 상기 3종의 모델을 이용하여 특정 인간 디스트로핀 엑손을 표적화하는 안티센스 올리고머를 스크리닝하였다.

[0122] DMD 근모세포 및 정상 인간 근모세포를 24웰 플레이트에서 생장시켰고, 2.5 μ M의 PMO 또는 2'-O-메틸 올리고뉴클레오타이드(2'OMePS)를 각각의 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대한 초기 이중 스크리닝에 사용하였다. A0 처리로부터 24시간 후, 세포를 분화 배지에서 추가 2일 동안 배양하였다.

[0123] hDMD 마우스에서의 시험을 위해, 20 μ g의 PMO 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 40 μ l의 식염수에서 제조하였고 근육내 주사를 통해 이중으로 투여하였다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 폴록사머와 폴리에틸렌이민(PEI)의 접합체, 또는 근육 섬유 전달을 용이하게 하기 위한 덴드리머성 옥타구아닌딘 중합체와 접합된 PMO를 포함하는 중합체와 함께 전달되었다. 폴록사머는 폴리옥시프로필렌(폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성쇄 및 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개 측면 친수성쇄를 포함한다. 도 7을 참조한다.

[0124] 단회 주사로부터 7일 후 처리된 근육을 모아 액체 질소-냉각된 이소펜탄에서 급속 냉동시키고 -80°C에서 저장하였다. 상기 근육으로부터 절편을 잘라내어 미세원심분리기 튜브 내로 모은 후, RT-PCR을 위해 RNA를 추출하였다.

[0125] 각각의 모델 시스템에서 엑손 스킵핑 효율을, DMD 유래의 세포 및 인간 근모세포에서는 RT-PCR 및 네스티드(Nested)-PCR로 측정하였고 hDMD 마우스에서는 RT-PCR로 측정하였다. 하기 절차를 이용하였다: 올리고머로 처리된 세포 또는 근육 조직으로부터 RNA를 제조자의 설명서에 따라 트라이졸(TriZol) 시약(인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)으로 추출하였다. 추후 사용을 위해 RNA를 -80°C에서 저장하였다. RT-PCR을 RT-피델리택 마스터믹스(RT-Fidelitax MasterMix)(USB, 미국 오하이오주 클리블랜드 소재)로 수행하여 관심 있는 서열을 증폭하였다. 100 ng의 주형 RNA를 각각의 25 μ l RT-PCR 반응에 사용하였다. PCR 조건은 43°C에서 15분; 94°C에서 2분; 및 이어서 94°C에서 30초, 65°C에서 30초 및 68°C에서 1분으로 이루어진 30회 주기이었다. 네스티드-PCR에 대한 조건은 94°C에서 2분; 및 이어서 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 및 72°C에서 5분으로 이루어진 30회 주기이었다.

[0126] RT-PCR 및 네스티드-PCR을 위해 하기 프라이머 쌍들을 사용하였다:

[0127] RT-PCR 프라이머 1:

[0128] 정방향 프라이머: Ex47/48F3, 5'-GTGGATAAAGGTTTCCAGAGC-3'

[0129] 역방향 프라이머 Ex53/52R3, 5'-GAATTCTTTCAATTCGATCCGTA-3'

[0130] 네스티드-PCR 프라이머 1:

[0131] 정방향 프라이머: Ex48F2, 5'-TCTGCTGCTGTGGTTATCTC-3'

- [0132] 역방향 프라이머: Ex52R2, 5'-TTTTGGGCAGCGTAATGAG-3'
- [0133] RT-PCR 프라이머 2:
- [0134] 정방향 프라이머: E43F6206/6230, 5'-TGGAAAGGGTGAAGCTACAGGAAG-3'
- [0135] 역방향 프라이머: E46-47R6780/6775, 5'-CAACTCTTCCACCAGTAACTTGACT-3'
- [0136] 네스티드-PCR 프라이머 2:
- [0137] 정방향 프라이머 E43F6265/6290, 5'-AACAAAATGTACAAGGACCGACAAGG-3'
- [0138] 역방향 프라이머 E46R6732/6708, 5'-CTGCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGG-3'
- [0139] RT-PCR 프라이머 3:
- [0140] 정방향 프라이머: E43F6206/6230, 5'-TGGAAAGGGTGAAGCTACAGGAAG-3'
- [0141] 역방향 프라이머: E49R7111/7137, 5'-CACATCCGGTTGTTTAGCTTGAAGTGC -3'
- [0142] 네스티드-PCR 프라이머 3:
- [0143] 정방향 프라이머: E43F6265/6290, 5'-AACAAAATGTACAAGGACCGACAAGG-3'
- [0144] 역방향 프라이머: E48R7034/7017, 5'-CTAATAGGAGATAACCACAGCAGCAGA-3'
- [0145] RT-PCR 프라이머 4:
- [0146] hDysEx41F1: GGGAAATTGAGAGCAAATTTGC
- [0147] hDysEx45R1: GAGGATTGCTGAATTATTTCTTCC
- [0148] 네스티드-PCR 프라이머 4:
- [0149] hDysEx41/42F2: CAACTTTGCACAAATTCACAC
- [0150] hDysEx45R2: CAATGTTCTGACAACAGTTTGCCG.
- [0151] PCR 생성물을 2% 아가로스 겔 상에서 전기영동으로 조사하였다. 에티디움 브로마이드 염색에 의해 입증된 PCR 생성물의 강도를 NIH 영상 J 1.42 소프트웨어로 측정하였다.
- [0152] 일반적으로, 스킵된 표적화된 엑손을 갖는 mRNA를 나타내는 PCR 생성물은 표적화된 엑손의 스킵이 없는 mRNA를 나타내는 PCR 생성물과 비교될 것이다. 2개 밴드들로부터의 총 신호 강도는 100%인 것으로 간주될 것이다. 따라서, 스킵된 표적화된 엑손을 갖는 전사체의 신호 강도가 엑손 스킵을 갖지 않는 정상 mRNA의 신호 강도와 동등한 경우, 엑손 스킵 효율은 50%인 것으로 간주될 것이다. 또 다른 예에서, 스킵된 표적화된 엑손을 갖는 전사체의 신호 강도가 스킵된 표적화된 엑손을 갖는 전사체 및 스킵된 표적화된 엑손을 갖지 않는 전사체 둘다를 나타내는 총 신호 강도의 90%인 경우 엑손 스킵 효율은 90%인 것으로 간주될 것이다.
- [0153] 제조되고 평가된 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열에 대한 결과는 하기 표들에 요약되어 있다.

표 1

엑손 43을 표적화하는 AO 서열

안티센스 올리고뉴클레오 티드 명칭	서열(5'에서 3'으로)	길이 (bp)	스킵핑 효율 (%)			서열 번호
			인간 근모세포	DMD 근모세포	HDMD 마우스	
HE43 (-1+27)	GCTTTGTTGTAGACTATCTTTTATATTC	28	75	60*	15	1
HE43 (+9+36)	CCGACCTGAGCTTTGTTGTAGACTATCT	28	80	100**	12.5	2
HE43(+85+112)	CTTCCTGTAGCTTCACCCCTTCCACAGG	28	15	40	15	3
HE43(+97+124)	GCTGGGAGAGAGCTTCCTGTAGCTTCAC	28	10	50*	2.5	4
HE43(+156-10)	TGTTACCTACCCTTGTCGGTCCTGTAC	28	45	40	40	5
HE43(+26+53)	CTATGAATAATGTCAATCCGACCTGAGC	28	85	40*	50	6
HE43(+40+67)	CTGCTGCTCTCTTGCTATGAATAATGTC	28	80	48*	55	7
HE43(+59+86)	GGCGTTGCACCTTGCAATGCTGCTGCT	28	35	48*	40	8
HE43(+108+135)	TTGGAAATCAAGCTGGGAGAGAGCTTCC	28	10	48*	22.5	9
HE43(+118+145)	CTTTTCCCATTTGGAAATCAAGCTGGGA	28	50	40	.5	10
HE43(+142+169)	GTCGGTCCTTGACATTTTGTTAACTTT	28	10	0	2.5	11
HE43(+150-4)	CTACCCTTGTCGGTCCTTGACATTTTG	28	75	48*	15	12
HE43(+7+34)	GACCTGAGCTTTGTTGTAGACTATCTTT	28	40	30	0	13
HE43(+14+42)	GTCATCCGACCTGAGCTTTGTTGTAGA	28	30	40	50	14
HE43(+19+46)	TAATGTCAATCCGACCTGAGCTTTGTTG	28	25	5	20	15
HE43(+31+57)	CTTGCTATGAATAATGTCAATCCGACC	27	45	5	30	16
HE43(+35+62)	GTCCTCTTGCTATGAATAATGTCAATCC	28	30	10	25	17
HE43(+53+80)	GCACTTGCAATGCTGCTGCTCTCTTGTC	28	35	5	5	18
HE43(+64+91)	CCACAGGCGTTGCACCTTGCAATGCTGC	28	10	100	10	19
HE43(+77+104)	AGCTTCACCCCTTCCACAGGCGTTGCAC	28	40	45	10	20
HE43(+78+100)	TCACCCTTCCACAGGCGTTGCA	23	40	95	10	21
HE43(+101+120)	GGAGAGAGCTTCCTGTAGCT	20	20	95	10	22
HE43(+113+140)	TCCCATTG GAAATCAAGCTGGGAGAGAG	28	10	50	5	23
HE43(+162-16)	TATATGTGTACCTACCCTTGTCGGTCC	28	65	40	45	24

[0154]

[0155]

상기 표에서, *는 엑손 43 및 엑손 44 둘다가 결실된 전사체 및 엑손 43만이 결실된 전사체를 보여준다. **는 엑손 43 및 엑손 44 둘다가 결실된 전사체 및 엑손 43만이 결실된 전사체의 높은 수준을 보여준다. 세포 배양 물과 생체내 근육 사이에 개별 AO 서열을 사용한 표적화된 엑손 스킵핑의 효율 차이가 명확히 존재한다. 한 실 시양태에서, 디스트로핀 엑손 43을 표적화하기에 바람직한 AO 서열은 엑손 스킵핑 효율이 생체내 근육에서 30% 이상에 도달하는, 서열번호 5, 6, 7, 8, 14, 16 및 24의 HE43(+156-10), HE43(+26+53), HE43(+40+67), HE43(+14+42), HE43(+31+57), HE43(+108+135), HE43(+150-4), HE43(+59+86) 및 HE43(+162-16)을 포함한다.

표 2

엑손 45를 표적화하는 AO 서열

안티센스 올리고뉴클레 오티드 명칭	서열(5'에서 3'으로)	길이 (bp)	스킵핑 효율 (%)			서열 번호
			인간 근모세포	DMD 근모세포	HDMD 마우스	
HE45 (-12+15)	GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC	27	81.4	<10	17.8	25
HE45 (-19+6)	GAGTTCCTGTAAGATACCAAAAAGG	25	59.4	<10	0	26
HE45(-3+22)	GCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	25	33.6	63.8	59.6	27
HE45(-2+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCT	22	51.4	58.1	57.2	28
HE45(-6+18)	AATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	24	59.1	76.5	0	29
HE45(-15+10)	CCTGGAGTTCCTGTAAGATACCAAA	25	9	<5	-	30
HE45(-9+16)	TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	25	10.5	<5	-	31
HE45(-11+11)	TCCTGGAGTTCCTGTAAGATAC	21	27.8	<5	-	32
HE45(-11+14)	CCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATAC	25	67.2	<5	-	33
HE45(-8+21)	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGA	29	54.5	52.1	61.3	34
HE45(-1+27)	CCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCC	28	66.6	72.1	55.1	35
HE45(-11+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATAC	30	93.4	<5	0	36
HE45(-9+21)	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	30	88.2	16	60	37
HE45(-2+28)	GCCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT	30	38.7	42.8	0	38
HE45(-12+18)	AATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC	30	25.8	<5	-	39
HE45(-3+27)	CCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	30	54.4	<10	44.2	40
HE45(-1+29)	TGCCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCC	30	24.5	32.5	0	41
HE45(-7+23)	TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG	30	17	<5	64.1	42
HE45(-9+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	28	41.6	<5	0	43
HE45(-7+21)	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG	28	24.3	81.2	42.8	44
HE45(-5+23)	TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA	28	63.2	88.4	23	45
HE45(-3+25)	GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	28	27.3	95.4	21	46
HE45(-12+13)	CATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC	25	<10	<10	-	47
HE45(-12+15)	GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC	27	<10	<10	-	48
E45+1+25	GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	25	<10	<10	-	49
E45+3+22	GCCCAATGCCATCCTGGAGT	20	<10	<10	-	50
E45+5+29	TGCCGCTGCCCAATGCCATCCTGGA	25	<10	<10	-	51
E45+6+24	CTGCCCAATGCCATCCTGG	19	<10	<10	-	52
E45+9+34	CAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCATCC	26	<10	<10	-	53
E45+12+35	ACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCA	24	<10	<10	-	54

[0156]

E45+17+41	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA	25	20.9	20.9	-	55
E45+34+53	GCATTCAATGTTCTGACAAC	20	<10	<10	-	56
E45+44+73	GAATTATTTCTCCCCAGTTGCATTCAATG	30	<10	<10	-	57
E45+69+98	CTGGCATCTGTTTTGAGGATTGCTGAATT	30	<10	<10	-	58
E45+34+59	CCAGTTGCATTCAATGTTCTGACAAC	26	<10	<10	-	59
E45+56+78	TTGCTGAATTATTTCTCCCCAG	23	<10	<10	-	60
E45+60+88	TTTTTGAGGATTG CTGAATTATT TCTTCC	29	<10	<10	-	61
E45+88+112	TTTCTGTAGAATACTGGCA TCTGT	25	<10	<10	-	62
E45+92+122	CTTCCCAATTTTCTGTAGAATACTGGCAT	31	<10	<10	-	63
E45+94+118	CCAATTTTCTGTAGAATACTGGC	25	<10	<10	-	64
E45+98+126	CAGGCTTCCCAATTTTCTGTAGAATAC	29	<10	<10	-	65
E45+119+144	CTCCTGCCACCGCAGATTCAGGCTTC	26	<10	<10	-	66
E45+126+150	GCAGACCTCC TGCCACCGCAGATTC	25	<10	<10	-	67
E45+126+155	TTGTTTGACAGACCTCC TGCCACCGCAGATTC	30	<10	<10	-	68
E45+134+157	GCTGTTTGACAGACCTCCTGCCACC	24	<10	<10	-	69
E45+130+154	GTTTGACAGACCTCCTGCCACCGCAG	25	<10	<10	-	70
E45+145+174	CTTTTTCTGTCTGACAGCTGTTGACAGAC	30	<10	<10	-	71
E45+147+167	CTGTCTGACAGCTGTTTGACAG	21	<10	<10	-	72
E45+156-4	CTACCTCTTTTTCTGTCTGACAGC	25	<10	<10	-	73
E45+170-20	TATTAGATCTGTCGCCCTACCTCTT	25	<10	<10	-	74
E45+174-22	CCTATTAGATCTGTCGCCCTACCTC	25	<10	<10	-	75

[0157]

[0158]

한 실시양태에서, 디스트로핀 엑손 45를 표적화하기에 바람직한 A0 서열은 서열번호 27, 34, 35, 37, 40, 42, 44, 45 및 46의 HE45(-3+22), HE45(-2+20), HE45(-8+21), HE45(-1+27), HE45(-9+21), HE45(-3+27), HE45(-7+23), HE45(-7+21), HE45(-5+23) 및 HE45(-3+25)를 포함한다.

표 3

엑손 50을 표적화하는 AO 서열

안티센스 올리고뉴클레오티드 명칭	서열(5'에서 3'으로)	길이 (bp)	스킵핑 효율 (%)			서열 번호
			인간 근모세포	GFP 레포터 근모세포	HDMD 마우스	
HE50 (-19-1)	CUUUAAACAGAAAAGCAUAC	19	0	0	-	76
HE50 (-19+1)	UCUUUAACAGAAAAGCAUAC	20	0	0	-	77
HE50(-19+3)	CCUCUUUAACAGAAAAGCAUAC	22	3	4	-	78
HE50(-19+8)	AACUCCUCUUUAACAGAAAAGCAUAC	27	29	21	34	79
HE50(-19+13)	CUUCUAACUCCUCUUUAACAGAAAAGCAUAC	32	1	3	-	80
HE50(-13+3)	CCUCUUUAACAGAAAA	16	0	0	-	81
HE50(-14+8)	AACUCCUCUUUAACAGAAAAG	22	0	0	-	82
HE50(-9+8)	AACUCCUCUUUAACAG	17	0	0	-	83
HE50(-9+21)	GCUCAGAUCUUCUAACUCCUCUUUAACAG	30	0	0	-	84
HE50(-8+8)	AACUCCUCUUUAACA	16	0	0	-	85
HE50(+2+30)	CCACUCAGAGCUCAGAUUCUUAACUCC	29	25	8	25	86
HE50(+11+27)	CUCAGAGCUCAGAUUU	17	4	2	-	87
HE50(+42+58)	GCUCUUGAAGUAAACGG	17	0	0	0	88
HE50(+85+102)	AAUAGUGGUCAGUCCAGG	18	0	0	-	89
HE50(+92-5)	CUUACAGGCUCCAAUAGUGGUCA	23	0	0	-	90
HE50(+92-10)	GUAUACUUACAGGCUCCAAUAGUGGUCA	28	0	0	-	91
HE50(+94-14)	UCCAGUAUACUUACAGGCUCCAAUAGUGGU	30	0	0	0	92
HE50(+97-5)	CUUACAGGCUCCAAUAGU	18	0	3	-	93
HE50(+97-10)	GUAUACUUACAGGCUCCAAUAGU	23	0	0	-	94
HE50(+97-14)	UCCAGUAUACUUACAGGCUCCAAUAGU	27	0	1	-	95
HE50(+102-14)	UCCAGUAUACUUACAGGCUCCA	22	1	3	-	96
HE50(+103-18)	GGGAUCCAGUAUACUUACAGGCUCC	25	65	28	62	97
HE50(+105-14)	UCCAGUAUACUUACAGGCU	19	0	6	-	98
HE50(+109-14)	UCCAGUAUACUUACA	15	0	0	-	99

[0159]

[0160]

한 실시양태에서, 디스트로핀 엑손 50을 표적화하기에 바람직한 AO 서열은 HE50(-19+8)(서열번호 79) 및 HE50(+103-18)(서열번호 97)을 포함한다.

표 4

엑손 51을 표적화하는 AO 서열

안티센스 올리고뉴클레 오타이드 명칭	서열(5'에서 3'으로)	길이 (bp)	스킵핑 효율 (%)			서열 번호
			인간 근모세포	DMD 근모세포	HDMD 마우스	
HE51 (+68+95)	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCT	28	50	-	35	100
HE51 (+65+89)	CATCAAGGAAGATGGCATTCTAGT	25	40	-	18	101
HE51 (-22+4)	GGAGCTAAAATATTTGGGTTTTTGC	26	2	-	5	102
HE51 (+220-11)	TTTTCTCATACCTTCTGCTTGATGA	25	0	-	-	103
HE51 (+74+101)	AGGTACCTCCAACATCAAGGAAGATGG	28	5	-	-	104
HE51(+71+95)	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATT	25	15	-	<5	105
HE51(+68+95)	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCT	28	5	-	-	106
HE51(+66+95)	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	30	0	-	-	107
HE51(+61+85)	AAGGAAGATGGCATTCTAGTTGG	25	20	-	<5	108
HE51(-10+15)	CAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	25	0	-	-	109
HE51(-16+9)	GAGTAGGAGCTAAAATATTTGGGT	25	0	-	-	110

[0161]

[0162]

한 실시양태에서, 디스트로핀 엑손 51을 표적화하기에 바람직한 AO 서열은 HE51(+68+95)(서열번호 100) 및 HE51(+65+89)(서열번호 101)을 포함한다.

표 5

엑손 53을 표적화하는 AO 서열

안티센스 올리고뉴클레 오타이드 명칭	서열(5'에서 3'으로)	길이 (bp)	스킵핑 효율 (%)			서열 번호
			인간 근모세포	DMD 근모세포	HDMD 마우스	
HE53 (-11+14)	CUGAAUUCUUAACUAGAAUAAAA	25	0	-	-	111
HE53 (+69+96)	GCCAUUGUGUUGAAUCCUUUAACAUUUC	28	0	-	-	112
HE53(+134+158)	CCAUGACUCAAGCUUGGCUCUGGCC	25	0	-	-	113
HE53(+168+187)	CCCUAUACAGUAGAUGCAAU	20	0	-	-	114
HE53(+200-11)	UUGAUACUAACCUUGGUUUCUGUG	24	0	-	-	115
HE53 (+42+65)	CAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAG	24	20	-	10	116
HE53 (+146+169)	GGACCCTCCTTCATGACTCAAGC	24	0	-	0	117
HE53 (+204-18)	GGTATCTTGATACTAACCTTGTTTC	27	15	-	6	118

[0163]

[0164]

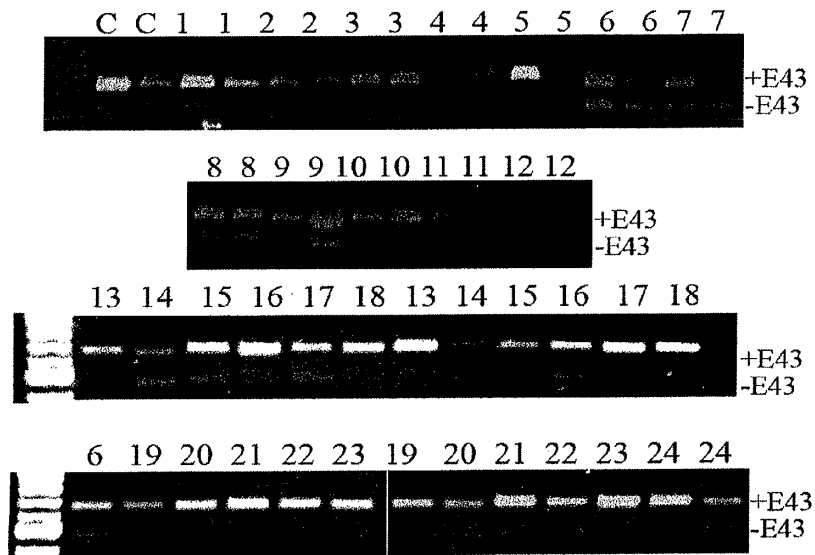
한 실시양태에서, 디스트로핀 엑손 53을 표적화하기에 바람직한 AO 서열은 HE53(+42+65)(서열번호 116)을 포함한다.

[0165]

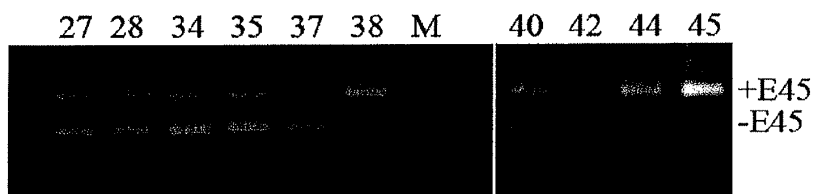
본원에 기재된 본 발명의 많은 변경들 및 다른 실시양태들은 상기 설명 및 관련 도면에서 제시된 교시의 이점을 갖는, 본 발명이 속하는 분야에서 숙련된 기술을 가진 자에 의해 도출될 것이다. 따라서, 본 발명은 개시된 특정 실시양태로 한정되지 않고 상기 변경들 및 다른 실시양태들은 첨부된 특허청구범위 내에 포함된다는 것을 이해해야 한다. 특정 용어들이 본원에서 사용되어 있지만, 이들은 한정을 위해 사용되는 것이 아니라 일반적 및 설명적 의미에서만 사용된다.

도면

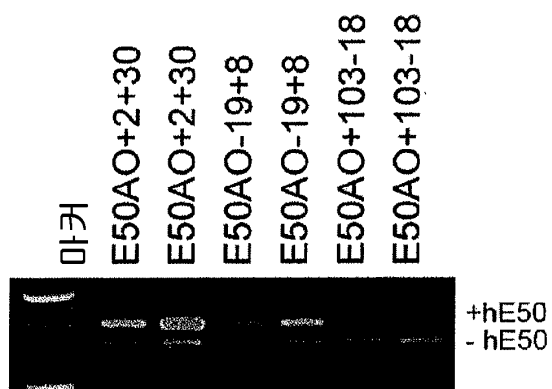
도면1



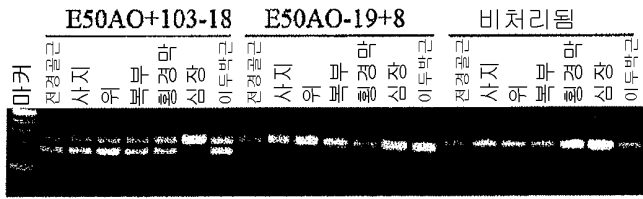
도면2



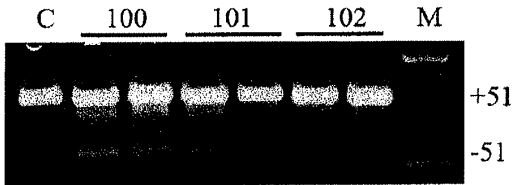
도면3



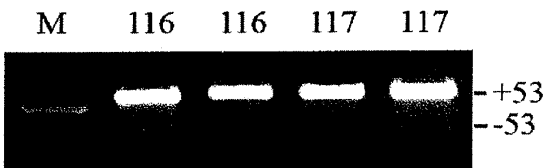
도면4



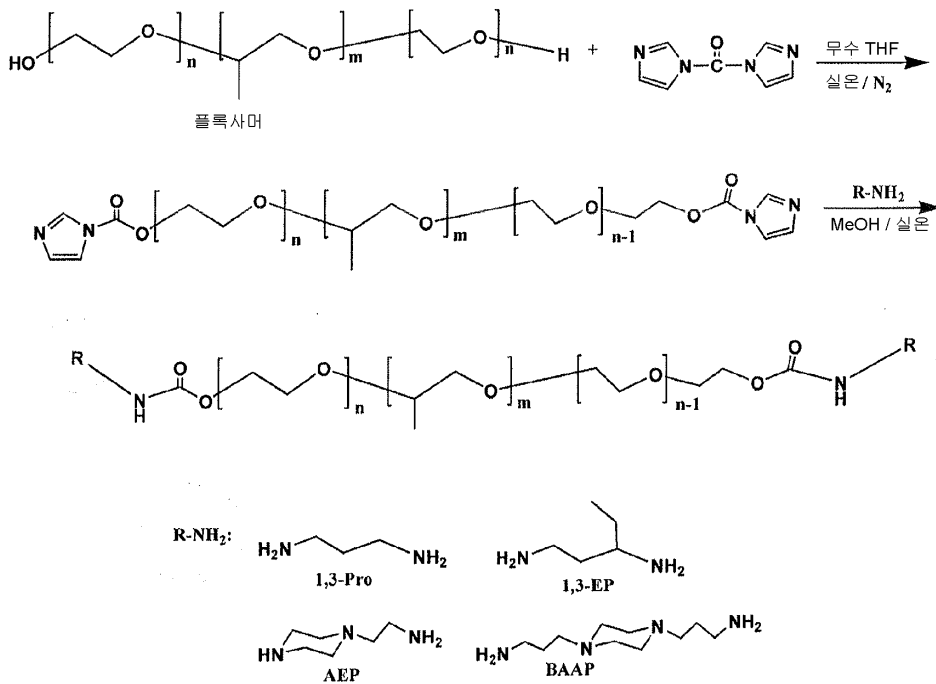
도면5



도면6



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Charlotte-Mecklenburg Hospital Authority D/B/A Carolinas

Healthcare System

<120> Antisense Oligonucleotides

<130> 038151/414612

<140> PCT/US2012/024230

<141> 2012-02-08

<150> 61/440,603

<151> 2011-02-08

<160> 118

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE43 (-1+27)

<400> 1

gctttgttgt agactatctt ttatatct

28

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE43 (+9+36)

<400> 2

ccgacctgag cttgttgta gactatct

28

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE43(+85+112)

<400> 3

cttcctgtag cttcaccctt tccacagg

28

<210> 4

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE43(+97+124)
 <400> 4
 gctgggagag agcttcctgt agcttcac 28

<210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE43(+156-10)
 <400> 5
 tgttacctac cctgtcggc ccttgtac 28

<210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE43(+26+53)
 <400> 6
 ctatgaataa tgtcaatccg acctgagc 28

<210> 7
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE43(+40+67)
 <400> 7
 ctgctgtctt cttgctatga ataatgtc 28

<210> 8
 <211> 28

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE43(+59+86)
 <400> 8
 ggcgttgac tttgcaatgc tgctgtct 28
 <210> 9
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE43(+108+135)
 <400> 9
 ttggaaatca agctgggaga gagcttcc 28
 <210> 10
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE43(+118+145)
 <400> 10
 ctttttcca ttggaaatca agctggga 28
 <210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE43(+142+169)
 <400> 11
 gtcggtcctt gtacattttg ttaacttt 28
 <210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE43(+150-4)

<400> 12

ctacccttgt cggtccttgt acattttg 28

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE43(+7+34)

<400> 13

gacctgagct ttgttgtaga ctatcttt 28

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE43(+14+42)

<400> 14

gtcaatccga cctgagcttt gttgtaga 28

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE43(+19+46)

<400> 15

taatgtcaat ccgacctgag ctttgttg 28

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE43(+31+57)

<400> 16	
cttgctatga ataatgtcaa tccgacc	27
<210> 17	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE43(+35+62)	
<400> 17	
gtcttcttgc tatgaataat gtcaatcc	28
<210> 18	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE43(+53+80)	
<400> 18	
gcactttgca atgctgctgt cttcttgc	28
<210> 19	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE43(+64+91)	
<400> 19	
ccacaggcgt tgcactttgc aatgctgc	28
<210> 20	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE43(+77+104)	
<400> 20	

agcttcaccc ttccacagg cgttgac	28
<210> 21	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE43(+78+100)	
<400> 21	
tcaccctttc cacaggcgtt gca	23
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE43(+101+120)	
<400> 22	
ggagagagct tcctgtagct	20
<210> 23	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE43(+113+140)	
<400> 23	
tccattgga aatcaagctg ggagagag	28
<210> 24	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE43(+162-16)	
<400> 24	
tatatgtgtt acctaccctt gtcggtcc	28
<210> 25	

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45 (-12+15)
 <400> 25
 gccatcctgg agttcctgta agatacc 27

<210> 26
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45 (-19+6)
 <400> 26
 gagttcctgt aagataccaa aaagg 25

<210> 27
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-3+22)
 <400> 27
 gcccaatgcc atcctggagt tcctg 25

<210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-2+20)
 <400> 28
 ccaatgccat cctggagttc ct 22

<210> 29
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-6+18)
 <400> 29
 aatgccatcc tggagttcct gtaa 24
 <210> 30
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-15+10)
 <400> 30
 cctggagttc ctgtaagata ccaaa 25
 <210> 31
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-9+16)
 <400> 31
 tgccatcctg gagttcctgt aagat 25

 <210> 32
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-11+11)
 <400> 32
 tcctggagtt cctgtaagat ac 22
 <210> 33
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic HE45(-11+14)
 <400> 33
 ccatcctgga gttcctgtaa gatac 25
 <210> 34
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-8+21)
 <400> 34
 cccaatgcca tcttgagatt cctgtaaga 29
 <210> 35
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-1+27)
 <400> 35
 ccgctgcccc atgccatcct ggagttcc 28
 <210> 36
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-11+19)
 <400> 36
 caatgccatc ctggagttcc tgtaagatac 30
 <210> 37
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-9+21)

<400> 37
 cccaatgccca tcctggagtt cctgtaagat 30

<210> 38
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-2+28)

<400> 38
 gccgctgccc aatgccatcc tggagttcct 30
 <210> 39
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-12+18)

<400> 39
 aatgccatcc tggagttcct gtaagatacc 30
 <210> 40
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-3+27)

<400> 40
 ccgctgccc atgccatcct ggagttcctg 30

<210> 41
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-1+29)

<400> 41

tgccgctgcc caatgccatc ctggagttcc	30
<210> 42	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE45(-7+23)	
<400> 42	
tgcccaatgc catcctggag ttctgtgaag	30
<210> 43	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE45(-9+19)	
<400> 43	
caatgccatc ctggagttcc tgtaagat	28
<210> 44	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE45(-7+21)	
<400> 44	
cccaatgcca tcctggagtt cctgtaag	28
<210> 45	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE45(-5+23)	
<400> 45	
tgcccaatgc catcctggag ttctgtga	28
<210> 46	

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-3+25)
 <400> 46
 gctgcccaat gccatcctgg agttcctg 28

<210> 47
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-12+13)
 <400> 47
 catcctggag ttctgtaag atacc 25

<210> 48
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE45(-12+15)
 <400> 48
 gccatcctgg agttcctgta agatacc 27

<210> 49
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+1+25
 <400> 49
 gctgcccaat gccatcctgg agttc 25

<210> 50
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+3+22
 <400> 50
 gcccaatgcc atcctggagt 20
 <210> 51
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+5+29
 <400> 51
 tgccgctgcc caatgccatc ctgga 25
 <210> 52
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+6+24
 <400> 52
 ctgcccaatg ccatcctgg 19
 <210> 53
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+9+34
 <400> 53
 cagtttgccg ctgcccaatg ccatcc 26
 <210> 54
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+12+35

<400> 54

acagtttgcc gctgcccaat gcca 24

<210> 55

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+17+41

<400> 55

ctgacaacag ttgcccgtg cccaa 25

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+34+53

<400> 56

gcattcaatg ttctgacaac 20

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+44+73

<400> 57

gaattatttc ttccccagtt gcattcaatg 30

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+69+98

<400> 58

ctggcatctg tttttgagga ttgctgaatt

30

<210> 59

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+34+59

<400> 59

ccagttgcat tcaatgttct gacaac

26

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+56+78

<400> 60

ttgctgaatt atttcttccc cag

23

<210> 61

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+60+88

<400> 61

tttttgagga ttgctgaatt atttcttcc

29

<210> 62

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+88+112

<400> 62

tttcctgtag aatactggca tctgt 25

<210> 63

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+92+122

<400> 63

cttcccaatt tttcctgtag aatactggca t 31

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+94+118

<400> 64

ccaatttttc ctgtagaata ctggc 25

<210> 65

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+98+126

<400> 65

caggcttccc aatttttcct gtagaatac 29

<210> 66

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic E45+119+144

<400> 66

ctcctgccac cgcagattca ggcttc 26

<210> 67

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+126+150
 <400> 67
 gcagacctcc tgccaccgca gattc 25

<210> 68
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+126+155
 <400> 68
 ttgtttgcag acctcctgcc accgcagatt c 31

<210> 69
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+134+157
 <400> 69
 gctgtttgca gacctcctgc cacc 24

<210> 70
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+130+154
 <400> 70
 gtttgacagac ctccctgccac cgcag 25

<210> 71
 <211> 30

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+145+174
 <400> 71
 cttttttctg tctgacagct gtttgcagac 30
 <210> 72
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+147+167
 <400> 72
 ctgtctgaca gctgtttgca g 21
 <210> 73
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+156-4
 <400> 73
 ctacctcttt tttctgtctg acagc 25
 <210> 74
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic E45+170-20
 <400> 74
 tattagatct gtcgccctac ctctt 25
 <210> 75
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>	
<223> synthetic E45+174-22	
<400> 75	
cctattagat ctgtcgccct acctc	25
<210> 76	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE50 (-19-1)	
<400> 76	
cuuuuacaga aaagcauac	19
<210> 77	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE50 (-19+1)	
<400> 77	
ucuuuacag aaaagcauac	20
<210> 78	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE50(-19+3)	
<400> 78	
ccucuuuac agaaaagcau ac	22
<210> 79	
<211> 27	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE50(-19+8)	

<400> 79

aacuuccucu uuaacagaaa agcauac

27

<210> 80

<211> 32

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE50(-19+13)

<400> 80

cuucuaacuu ccucuuuaac agaaaagcau ac

32

<210> 81

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE50(-13+3)

<400> 81

ccucuuuaac agaaaa

16

<210> 82

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE50(-14+8)

<400> 82

aacuuccucu uuaacagaaa ag

22

<210> 83

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE50(-9+8)

<400> 83

aacuuccucu uuaacag	17
<210> 84	
<211> 30	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE50(-9+21)	
<400> 84	
gcucagaucu ucuaacuucc ucuuuaacag	30
<210> 85	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE50(-8+8)	
<400> 85	
aacuuccucu uuaaca	16
<210> 86	
<211> 29	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE50(+2+30)	
<400> 86	
ccacucagag cucagaucuu cuaacuucc	29
<210> 87	
<211> 17	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE50(+11+27)	
<400> 87	
cucagagcuc agaucuu	17
<210> 88	

<211> 17
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE50(+42+58)
 <400> 88
 gcucuugaag uaaacgg 17

<210> 89
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE50(+85+102)
 <400> 89
 aaauagugguc aguccagg 18

<210> 90
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE50(+92-5)
 <400> 90
 cuuacaggcu ccaauagugg uca 23

<210> 91
 <211> 28
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE50(+92-10)
 <400> 91
 guauacuuac aggcuccaau agugguca 28

<210> 92
 <211> 30

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE50(+94-14)
 <400> 92
 uccaguauac uuacaggcuc caauaguggu 30
 <210> 93
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE50(+97-5)
 <400> 93
 cuuacaggcu ccaauagu 18
 <210> 94
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE50(+97-10)
 <400> 94
 guauacuuac aggcuccaau agu 23

 <210> 95
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE50(+97-14)
 <400> 95
 uccaguauac uuacaggcuc caauagu 27
 <210> 96
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>	
<223> synthetic HE50(+102-14)	
<400> 96	
uccaguauac uuacaggcuc ca	22
<210> 97	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE50(+103-18)	
<400> 97	
gggauccagu auacuuacag gcucc	25
<210> 98	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE50(+105-14)	
<400> 98	
uccaguauac uuacaggcu	19
<210> 99	
<211> 15	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE50(+109-14)	
<400> 99	
uccaguauac uuaca	15
<210> 100	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE51 (+68+95)	

<400> 100	
ctccaacatc aaggaagatg gcatttct	28
<210> 101	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE51 (+65+89)	
<400> 101	
catcaaggaa gatggcattt ctagt	25
<210> 102	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE51 (-22+4)	
<400> 102	
ggagctaaaa tatTTTgggt ttttgc	26
<210> 103	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE51 (+220-11)	
<400> 103	
ttttctcata cttctgctt gatga	25
<210> 104	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE51 (+74+101)	
<400> 104	

aggtacctcc aacatcaagg aagatgg	27
<210> 105	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE51(+71+95)	
<400> 105	
ctccaacatc aaggaagatg gcatt	25
<210> 106	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE51(+68+95)	
<400> 106	
ctccaacatc aaggaagatg gcatttct	28
<210> 107	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE51(+66+95)	
<400> 107	
ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag	30
<210> 108	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetic HE51(+61+85)	
<400> 108	
aaggaagatg gcatttctag tttgg	25
<210> 109	

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE51(-10+15)
 <400> 109
 cagtctgagt aggagctaaa atatt 25

<210> 110
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE51(-16+9)
 <400> 110
 gagtaggagc taaaatatatt tgggt 25

<210> 111
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE53 (-11+14)
 <400> 111
 cugaaauuu ucaacuagaa uaaaa 25

<210> 112
 <211> 28
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE53 (+69+96)
 <400> 112
 gccauugugu ugaaucuuu aacauuuc 28

<210> 113
 <211> 25

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE53(+134+158)
 <400> 113
 ccaugacuca agcuuggcuc uggcc 25
 <210> 114
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE53(+168+187)
 <400> 114
 ccuauacag uagaugcaau 20
 <210> 115
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE53(+200-11)
 <400> 115
 uugauacuaa ccuugguuuc ugug 24
 <210> 116
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic HE53 (+42+65)
 <400> 116
 caactgttgc ctccggttct gaag 24
 <210> 117
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE53 (+146+169)

<400> 117

ggaccctcct tccatgactc aagc

24

<210> 118

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic HE53 (+204-18)

<400> 118

ggtatctttg atactaacct tggtttc

27