



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0024192
(43) 공개일자 2022년03월03일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7042828</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년05월29일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년12월28일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2020/035212</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2020/243490
국제공개일자 2020년12월03일</p> <p>(30) 우선권주장
62/855,793 2019년05월31일 미국(US)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
알리코스 테라퓨틱스 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌프란시스코 1
코퍼레이트 드라이브 2층</p> <p>(72) 발명자
베이젤만 레오니드
미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌프란시스코 1
코퍼레이트 드라이브 2층
팬디 라젠드라 케이
미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌프란시스코 1
코퍼레이트 드라이브 2층
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
제일특허법인(유)</p> |
|--|---|

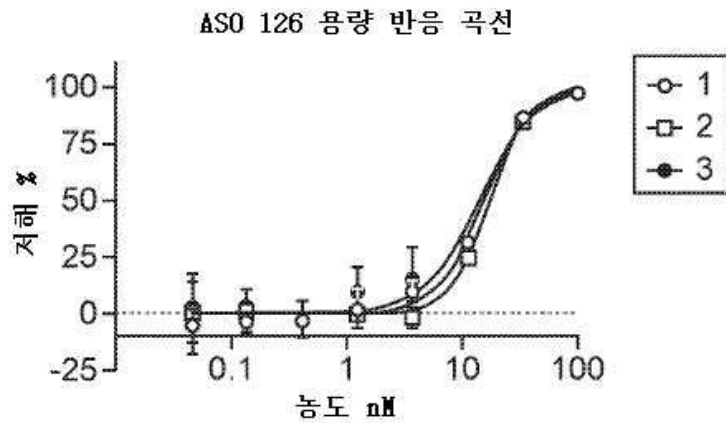
전체 청구항 수 : 총 68 항

(54) 발명의 명칭 변형된 캡머 올리고뉴클레오타이드 및 사용 방법

(57) 요약

본 개시내용은 캡머 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를, 제조 방법, 및 사용 방법, 예를 들어, HBV에 대한 것과 함께 포함한다.

대표도



도 1A

(52) CPC특허분류

A61P 31/20 (2018.01)
C12N 15/1131 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/3231 (2013.01)
C12N 2310/333 (2013.01)
C12N 2310/3341 (2013.01)
C12N 2310/335 (2013.01)
C12N 2310/336 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/937,760 2019년11월19일 미국(US)
62/943,532 2019년12월04일 미국(US)

(72) 발명자

라즈완시 비벡 쿠마르

미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌프란시스코 1
코퍼레이트 드라이브 2층

스미스 데이비드 버나드

미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌프란시스코 1
코퍼레이트 드라이브 2층

홍 진

미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌프란시스코 1
코퍼레이트 드라이브 2층

명세서

청구범위

청구항 1

B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서,

상기 대상체에게 제1 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide: ASO) 및 제2 ASO를 투여하는 단계를 포함하되,

상기 제1 및 제2 ASO는 각각 독립적으로 14 내지 22개의 뉴클레오타이드 단위를 함유하고, 상기 제1 및 제2 ASO는, 각각 독립적으로,

- (a) 6개 이상의 인접 DNA 뉴클레오타이드를 포함하는 중심 영역(B'),
- (b) 2 내지 6개의 고정(locked) 뉴클레오타이드 또는 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하는 5'-윙(wing) 영역(A'), 및
- (c) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오타이드 또는 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하는 3'-윙 영역(C')

을 함유하고, 상기 제1 ASO는 HBV의 제1 X 영역 또는 제1 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하고, 상기 제2 ASO는 HBV의 제2 X 영역 또는 제2 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 상기 5'-윙 영역이 2 내지 6개의 포스포로티오에이트-연결된 잠금 뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 상기 3'-윙 영역이 2 내지 6개의 포스포로티오에이트-연결된 잠금 뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 상기 중심 영역이 적어도 5개의 인접 포스포로티오에이트-연결된 DNA 뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 상기 중심 영역이 각각 독립적으로 8 내지 10개의 인접 포스포로티오에이트-연결된 DNA 뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 잠금 뉴클레오타이드가 LNA, scpBNA, AmNA(N-H), AmNA(N-Me), GuNA, GuNA(N-R)로부터 선택되되, R은 Me, Et, *i*-Pr, *t*-Bu 및 이들의 조합으로부터 선택되는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 ASO가 상기 HBV의 제2 X 영역 중 상기 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 ASO가 상기 HBV의 S 영역 중 상기 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 ASO가 표적화 기를 더 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 표적화 기가 GalNAc 모이어티를 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 ASO가 각각 독립적으로 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 단위를 함유하는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 ASO가 동시에 투여되는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 ASO가 연속적으로 투여되는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 포유류인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 포유류가 성인인, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료가 상기 대상체 중 HBV의 바이러스 부하(load)를 감소시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료가 상기 대상체 중 바이러스 항원의 수준을 감소시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO가 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 또는 19에 열거된 서열로부터 선택되는 뉴클레오타이드에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 ASO가 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 또는 19의 서열로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 20

제1 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO) 및 제2 ASO를 포함하는 약제학적 조성물로서,

상기 제1 및 제2 ASO는 각각 독립적으로 14 내지 22개의 뉴클레오타이드 단위를 함유하고, 상기 제1 및 제2 ASO는 각각 독립적으로

- (a) 6개 이상의 인접 DNA 뉴클레오사이드를 포함하는 중심 영역(B'),
- (b) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오사이드 또는 2' 치환된 뉴클레오사이드를 포함하는 5'-윙 영역(A'), 및
- (c) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오사이드 또는 2' 치환된 뉴클레오사이드를 포함하는 3'-윙 영역(C')

을 함유하되, 상기 제1 ASO는 HBV의 제1 X 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하고, 상기 제2 ASO는 HBV의 제2 X 영역 또는 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하는, 억제학적 조성물.

청구항 21

표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 또는 19에 열거된 서열로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO).

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 ASO가 표적화 모이어티를 더 포함하는, ASO.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 GalNAc 모이어티를 포함하는, ASO.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 표적화 모이어티가 링커를 통해 부착된 3개의 연속 GalNAc 모이어티를 포함하는, ASO.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 GalNAc 모이어티가 GalNAc-4 또는 GalNAc-6인 올리고뉴클레오타이드.

청구항 26

B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 제1 ASO 및 제2 ASO의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 제1 및 제2 ASO는 제21항 내지 제25항 중 어느 한 항의 ASO로부터 독립적으로 선택되는, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제18항 및 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자에게 뉴클레오타이드 유사체, 캡시드 어셈블리 조절제 또는 또 다른 올리고뉴클레오타이드와 같은 추가 HBV 치료제를 투여하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 추가 HBV 치료제가 ALG-010133, ALG-000184, 재조합 인터페론 알파 2b, IFN- α , PEG-IFN- α -2a, 라미부딘(lamivudine), 텔비부딘(telbivudine), 아테포비어 디피복실(adefovir dipivoxil), 클레부딘(clevudine), 엔테카비어(entecavir), 테노포비어 알라페나미드(tenofovir alafenamide), 테노포비어 다이소프록실(tenofovir disoproxil), NVR3-778, BAY41-4109, JNJ-632, JNJ-3989(ARO-HBV), RG6004, GSK3228836, REP-2139, REP-2165, AB-729, VIR-2218, DCR-HBVS, JNJ-6379, GLS4, ABI-H0731, JNJ-440, NZ-4, RG7907, EDP-514, AB-423, AB-506, ABI-H03733 및 ABI-H2158을 포함하는 것으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 29

제1항 내지 제18항 및 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 추가 HBV 치료제로 치료되었던 환자인, 방법.

청구항 30

제10항에 있어서, 상기 GalNAc 모이어티가 링커를 통해 부착된 1개의 GalNAc 모이어티 또는 3개의 연속 GalNAc 모이어티를 포함하되, 상기 GalNAc 모이어티는 GalNAc-4 또는 GalNAc-6인, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 적어도 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 또는 15 mg/kg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 32

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 0.5 mg/kg 내지 50 mg/kg, 0.5 mg/kg 내지 40 mg/kg, 0.5 mg/kg 내지 30 mg/kg, 1 mg/kg 내지 50 mg/kg, 1 mg/kg 내지 40 mg/kg, 1 mg/kg 내지 30 mg/kg, 1 mg/kg 내지 20 mg/kg, 3 mg/kg 내지 50 mg/kg, 3 mg/kg 내지 40 mg/kg, 3 mg/kg 내지 30 mg/kg, 3 mg/kg 내지 20 mg/kg, 3 mg/kg 내지 15 mg/kg, 3 mg/kg 내지 10 mg/kg, 4 mg/kg 내지 50 mg/kg, 4 mg/kg 내지 40 mg/kg, 4 mg/kg 내지 30 mg/kg, 4 mg/kg 내지 20 mg/kg, 4 mg/kg 내지 15 mg/kg, 4 mg/kg 내지 10 mg/kg, 5 mg/kg 내지 50 mg/kg, 5 mg/kg 내지 40 mg/kg, 5 mg/kg 내지 30mg/kg, 5 mg/kg 내지 20 mg/kg, 5 mg/kg 내지 15 mg/kg, 또는 5 mg/kg 내지 10 mg/kg 사이의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 투여되는, 방법.

청구항 34

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 1일 마다 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회, 1주 마다 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회, 또는 1개월마다 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 투여되는, 방법.

청구항 35

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21일마다 적어도 1회 투여되는, 방법.

청구항 36

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21일, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 51, 52, 53, 54 또는 55주의 기간 동안 투여되는, 방법.

청구항 37

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 5 mg/kg의 단일 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 10 mg/kg의 단일 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 39

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 주 1회 10 mg/kg의 3회 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 40

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 3일에 한 번씩 10 mg/kg의 3회 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 41

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 3일마다 한번 10 mg/kg의 5회 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 42

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 1 mg/kg 내지 15 mg/kg, 1 mg/kg 내지 10 mg/kg, 2 mg/kg 내지 15 mg/kg, 2 mg/kg 내지 10 mg/kg, 3 mg/kg 내지 15 mg/kg, 또는 3 mg/kg 내지 10 mg/kg 범위의 6회 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 제1 용량 및 제2 용량이 적어도 3일 간격으로 투여되는, 방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 제2 용량 및 제3 용량이 적어도 4일 간격으로 투여되는, 방법.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 용량 및 제4 용량, 제4 용량 및 제5 용량, 또는 제5 용량 및 제6 용량이 적어도 7일 간격으로 투여되는, 방법.

청구항 46

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 입자 또는 바이러스 벡터로 투여되는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV), 알파바이러스, 플라비바이러스, 단순 포진 바이러스, 렌티바이러스, 홍역 바이러스, 피코나바이러스, 폭스바이러스, 레트로바이러스 또는 람다바이러스의 벡터인, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 재조합 바이러스 벡터인, 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 AAVrh.74, AAVrh.10, AAVrh.20, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 및 AAV-13으로부터 선택되는, 방법.

청구항 50

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 전신 투여되는, 방법.

청구항 51

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 국소적으로 투여되는, 방법.

청구항 52

제1항 내지 제18항 및 제26항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO 및/또는 제2 ASO가 정맥내, 피하 또는 근육내 투여되는, 방법.

청구항 53

14 내지 22개의 뉴클레오타이드 단위를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)로서, 상기 ASO는,

- (a) 6개 이상의 인접 DNA 뉴클레오타이드를 포함하는 중심 영역(B')으로서, 상기 인접 DNA 뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 변형된 뉴클레오타이드인 중심 영역,
- (b) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오타이드 또는 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하는 5'-윙 영역(A'), 및
- (c) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오타이드 또는 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하는 3'-윙 영역(C')

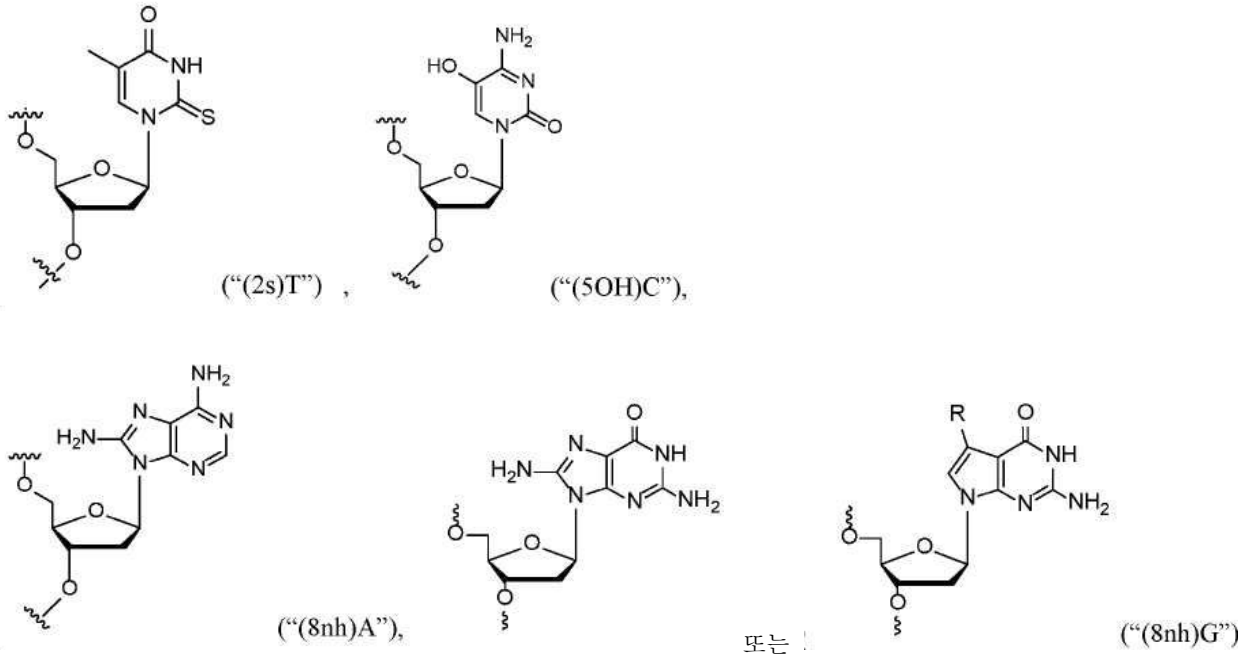
을 포함하되, 상기 ASO의 중심 영역은 HBV의 X 영역 또는 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하는, 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO).

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오타이드가 상기 중심 영역의 5' 단부로부터 위치 3의 뉴클레오타이드에서 발생하는, ASO.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오타이드가



의 보호된 버전 또는 비보호된 버전을 갖는 뉴클레오타이드이되,

R은 할로젠 또는 R'-C≡C-이고;

R'는 C₆₋₁₂ 아릴, 5- 내지 12-원 헤테로아릴, 하이드록시-C₁₋₆ 알킬 또는 C₁₋₇ 알카노일옥시인, ASO.

청구항 56

제53항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ASO가 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 또는 19에 열거된 서열로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, ASO.

청구항 57

제21항 내지 제25항 및 제53항 내지 제56항 중 어느 한 항의 ASO의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 갖고 있는 대상체를 치료하는, 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 ASO가 ASO 120인, 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 제2 ASO를 투여하는 단계를 더 포함하되, 상기 제2 ASO는 제21항 내지 제25항 및 제53항 내지 제56항 중 어느 한 항의 ASO인, 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 제2 ASO가 ASO 121인, 방법.

청구항 61

제57항에 있어서, 상기 ASO가 ASO 121인, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 제2 ASO를 투여하는 것을 더 포함하되, 상기 제2 ASO는 제21항 내지 제25항 및 제53항 내지 제56항 중 어느 한 항의 ASO인, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 제2 ASO가 ASO 120인, 방법.

청구항 64

제1항 내지 제19항 및 제26항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO가 ASO 120인, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 제2 ASO가 ASO 121인, 방법.

청구항 66

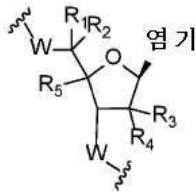
제1항 내지 제19항 및 제26항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 ASO가 ASO 121인, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 제2 ASO가 ASO 120인, 방법.

청구항 68

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오타이드가 하기 구조를 갖는 뉴클레오타이드인, ASO:



상기 구조 중,

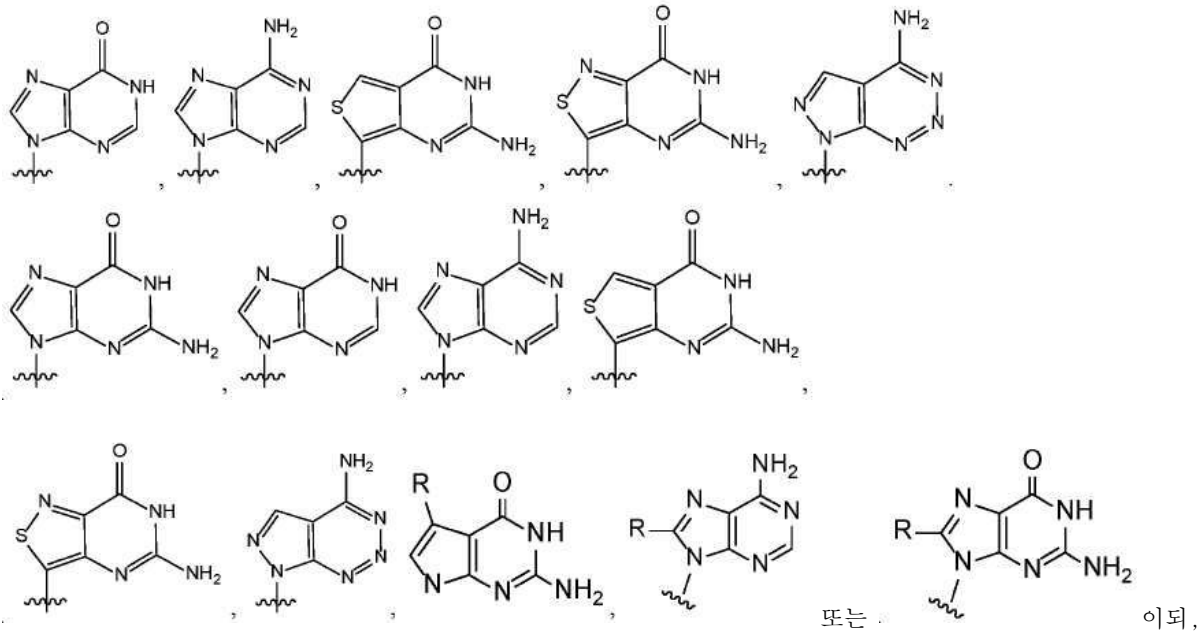
W는 독립적으로 O, N 또는 S이고;

R₁, R₂ 및 R₅는 독립적으로 H 또는 D이고;

R₃은 H 또는 F이고;

R₄는 F 또는 OCH₃이고;

염기는



R은 할로겐 또는 R'-C≡C-이고;

R'는 C₆₋₁₂알킬, 5원 내지 12원 헤테로알킬, 하이드록시-C₁₋₆알킬 또는 C₁₋₇알카노일옥시를 나타낸다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 12월 4일자로 출원된 미국 가출원 제62/943,532호, 2019년 11월 19일자로 출원된 미국 가출원 제62/937,760호 및 2019년 5월 31일자로 출원된 미국 가출원 제62/855,793호에 대한 우선권을 주장하며, 이들의 개시내용은 전체가 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

배경 기술

[0003] 전 세계적으로 약 3억 명의 사람들은 HBV에 만성적으로 감염되어 있다. "기능적 치료"의 핵심 양상인 HBsAg 상실은 많은 새로운 치료법의 목표이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 동물 모델에서 HBsAg를 감소시키는 데 효과적인 양식인 것으로 입증되었고 이러한 분자에 대한 임상 연구가 진행 중이다.

[0004] 그러나, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 HBV의 치료는, 예를 들어, 뉴클레아제 분해 및 간 독성으로 여전히 고통받는다. 따라서, 뉴클레아제 분해에 대한 더 큰 저항성 및 개선된 간 안전성 프로파일을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 발견하는 것이 본 기술분야에 필요하다.

발명의 내용

[0005] 본 개시내용은 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 화합물 및 조성물, 및 질병 및 상태, 예를 들어, B형 간염 (HBV)을 예방 또는 치료하는데 있어서 그의 용도에 관한 것이다.

[0006] 일부 실시형태는 제1 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide: ASO) 및 제2 ASO를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 갖고 있는 대상체를 치료하는 방법을 포함하며, 여기서 제1 및 제2 ASO는 각각 독립적으로 14 내지 22개의 뉴클레오타이드 단위를 함유하고, 제1 및 제2 ASO는 각각 독립적으로 (a) 6개 이상의 인접 DNA 뉴클레오타이드를 포함하는 중심 영역(B'), (b) 2 내지 6개의 잠금 (locked) 뉴클레오타이드 또는 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하는 5'-윙 영역(A'), 및 (c) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오타이드 또는 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하는 3'-윙 영역(C')을 함유하며, 여기서 제1 ASO는 HBV의 제1 X 영역 또는 제1 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하고, 제2 ASO는 HBV의 제

2 X 영역 또는 제2 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다.

[0007]

일부 실시형태에서, B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 갖고 있는 대상체를 치료하는 방법은 대상체에게 제1 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 제1 ASO는 14 내지 22개의 뉴클레오타이드 단위를 함유하고, 제1 ASO는 (a) 6개 이상의 인접 DNA 뉴클레오타이드를 포함하는 중심 영역(B'), (b) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오타이드 또는 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하는 5'-윙 영역(A'), 및 (c) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오타이드 또는 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하는 3'-윙 영역(C')을 함유하고, 여기서 제1 ASO는 HBV의 제1 X 영역 또는 제1 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 방법은 대상체에게 제2 ASO를 투여하는 것을 더 포함하며, 여기서 제2 ASO는 14 내지 22개의 뉴클레오타이드 단위를 함유하고, 제2 ASO는 (a) 6개 이상의 인접 DNA 뉴클레오타이드를 포함하는 중심 영역(B'), (b) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오타이드 또는 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하는 5'-윙 영역(A'), 및 (c) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오타이드 또는 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하는 3'-윙 영역(C')을 함유하고, 제2 ASO는 HBV의 제2 X 영역 또는 제2 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다.

[0008]

일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 5'-윙 영역은 2 내지 6개의 포스포로티오에이트-연결된 잠금 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 5'-윙 영역은 2 내지 6개의 포스포로티오에이트-연결된 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 5'-윙 영역은 적어도 하나의 잠금 뉴클레오타이드 및 적어도 하나의 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 잠금 뉴클레오타이드와 2' 치환된 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 5'-윙 영역은 RNA 뉴클레오타이드 또는 DNA 뉴클레오타이드를 더 포함하고, 여기서 RNA 뉴클레오타이드 및 DNA 뉴클레오타이드는 잠금 뉴클레오타이드 또는 2'-치환된 뉴클레오타이드가 아니다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 5'-윙 영역의 적어도 2개의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 5'-윙 영역의 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 3'-윙 영역은 2 내지 6개의 포스포로티오에이트-연결된 잠금 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 3'-윙 영역은 2 내지 6개의 2' 포스포로티오에이트-연결된 치환된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 3'-윙 영역은 적어도 하나의 잠금 뉴클레오타이드 및 적어도 하나의 2' 치환된 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 잠금 뉴클레오타이드 및 2' 치환된 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 3'-윙 영역은 RNA 뉴클레오타이드 또는 DNA 뉴클레오타이드를 더 포함하고, 여기서 RNA 뉴클레오타이드 및 DNA 뉴클레오타이드는 잠금 뉴클레오타이드 또는 2'-치환된 뉴클레오타이드가 아니다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 3'-윙 영역의 적어도 2개의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 3'-윙 영역의 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 중심 영역은 적어도 5개의 인접 포스포로티오에이트-연결된 DNA 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 중심 영역의 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 중심 영역의 DNA 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 5'-윙 영역의 뉴클레오타이드에 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 중심 영역의 DNA 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 3'-윙 영역의 뉴클레오타이드에 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 중심 영역은 각각 독립적으로 8 내지 10개의 인접 포스포로티오에이트-연결된 DNA 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 잠금 뉴클레오타이드는 LNA, scpBNA, AmNA(N-H), AmNA(N-Me), GuNA, GuNA(N-R)로부터 선택되며, 여기서 R은 Me, Et, *i*-Pr, *t*-Bu 및 이의 조합으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 제2 ASO는 HBV의 제2 X 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 제2 ASO는 HBV의 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 ASO는 표적화 기를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 기는 GalNAc 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO는 각각 독립적으로 14 내지 18개의 뉴클레오타이드 단위를 함유한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO는 동시에 투여된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO는 연속적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 대상체는 포유류이다. 일부 실시형태에서, 포유류는 성인이다. 일부 실시형태에서, 치료는 대상체에서 HBV의 바이러스 부하(load)를 감소시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료는 대상체에서 바이러스 항원의 수준을 감소시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 ASO는 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 또는 19

에 열거된 서열로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 ASO는 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 또는 19의 서열로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 ASO는 서열번호 2 내지 428 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 ASO는 서열번호 2 내지 428 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 ASO는 ASO 120 또는 ASO 121이다. 일부 실시형태에서, 제2 ASO는 ASO 120 또는 ASO 121이다.

[0009] 일부 실시형태는 제1 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO) 및 제2 ASO를 포함하는 약제학적 조성물을 포함하며, 여기서 제1 및 제2 ASO는 각각 독립적으로 14 내지 22개의 뉴클레오타이드 단위를 함유하고, 제1 및 제2 ASO는 각각 독립적으로 (a) 6개 이상의 인접 DNA 뉴클레오사이드를 포함하는 중심 영역(B'), (b) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오사이드 또는 2' 치환된 뉴클레오사이드를 포함하는 5'-윙 영역(A'), 및 (c) 2 내지 6개의 잠금 뉴클레오사이드 또는 2' 치환된 뉴클레오사이드를 포함하는 3'-윙 영역(C')을 함유하며, 여기서 제1 ASO는 HBV의 제1 X 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하고, 제2 ASO는 HBV의 제2 X 영역 또는 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 5'-윙 영역은 RNA 뉴클레오사이드 또는 DNA 뉴클레오사이드를 더 포함하고, 여기서 RNA 뉴클레오사이드 및 DNA 뉴클레오사이드는 잠금 뉴클레오사이드 또는 2'-치환된 뉴클레오사이드가 아니다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 5'-윙 영역의 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 3'-윙 영역은 RNA 뉴클레오사이드 또는 DNA 뉴클레오사이드를 더 포함하고, 여기서 RNA 뉴클레오사이드 및 DNA 뉴클레오사이드는 잠금 뉴클레오사이드 또는 2'-치환된 뉴클레오사이드가 아니다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 3'-윙 영역의 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 중심 영역의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개의 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 중심 영역의 DNA 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 5'-윙 영역의 뉴클레오사이드에 연결된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 중심 영역의 DNA 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 제1 및 제2 ASO 중 적어도 하나의 3'-윙 영역의 뉴클레오사이드에 연결된다.

[0010] 다른 실시형태는 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 또는 19에 열거된 서열로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 표적화 모이어티를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 GalNAc 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 링커를 통해 부착된 3개의 연속적인 GalNAc 모이어티를 포함한다.

[0011] 다른 실시형태는 서열번호 2 내지 428 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 표적화 모이어티를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 GalNAc 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 링커를 통해 부착된 3개의 연속적인 GalNAc 모이어티를 포함한다.

[0012] 추가 실시형태는 이전 실시형태 중 임의의 실시형태의 하나 이상의 ASO의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 갖고 있는 대상체를 치료하는 방법을 포함한다.

[0013] 일부 실시형태는 추가 HBV 치료제, 예컨대, 뉴클레오타이드 유사체, 캡시드 어셈블리 조절제 또는 또 다른 올리고뉴클레오타이드를 환자에게 투여하는 것을 더 포함하는, 이전 실시형태 중 임의의 실시형태의 방법을 포함한다. 일부 실시형태에서, 추가 HBV 치료제는 STOPS™ ALG-010133, 캡시드 어셈블리 조절제 ALG-000184, 재조합 인터페론 알파 2b, IFN-a, PEG-IFN-a-2a, 라미부딘(lamivudine), 텔비부딘(telbivudine), 아데포비어 디피복실(adefovir dipivoxil), 클레부딘(clevudine), 엔테카비어(entecavir), 테노포비어 알라페나미드(tenofovir alafenamide), 테노포비어 디소프록실(tenofovir disoproxil), NVR3-778, BAY41-4109, JNJ-632, JNJ-3989(ARO-HBV), RG6004, GSK3228836, REP-2139, REP-2165, AB-729, VIR-2218, DCR-HBVS, JNJ-6379, GLS4, ABI-H0731, JNJ-440, NZ-4, RG7907, EDP-514, AB-423, AB-506, ABI-H03733 및 ABI-H2158을 포함하는 것으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, GalNAc 모이어티는 링커를 통해 부착된 1개의 GalNAc 모이어티 또는 3개의 연속 GalNAc 모이어티를 포함하고, 여기서 GalNAc 모이어티는 GalNAc-4 또는

GalNAc-6이다.

[0014] 일부 실시형태는 환자가 뉴클레오타이드 유사체, 캡시드 어셈블리 조절제 또는 또 다른 올리고뉴클레오타이드와 같은 추가 HBV 치료제로 치료받았던 환자인, 임의의 이전 실시형태 중 임의의 실시형태의 방법을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1A는 3가지 실험에서 HepG2.215 세포의 ASO 126에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다.
 도 1B는 3가지 실험에서 HepG2.215 세포의 ASO 120에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다.
 도 1C는 3가지 실험에서 HepG2.215 세포의 ASO 124에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다.
 도 2A는 3가지 실험에서 HepG2.215 세포의 ASO 127에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다.
 도 2B는 3가지 실험에서 HepG2.215 세포의 ASO 121에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다.
 도 2C는 3가지 실험에서 HepG2.215 세포의 ASO 125에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다.
 도 3A는 ASO 120으로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
 도 3B는 ASO 121로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
 도 3C는 ASO 120으로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
 도 3D는 ASO 121로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
 도 4A는 ASO 121 또는 ASO 120으로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
 도 4B는 ASO 121 또는 ASO 120으로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
 도 4C는 (i) ASO 121 및 ASO 120의 조합; 또는 (ii) 단일 작용제로서 ASO 123으로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
 도 4D는 (i) ASO 121 및 ASO 120의 조합; 또는 (ii) 단일 작용제로서 ASO 123으로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
 도 5A는 1×5 mg/kg의 ASO 128, ASO 129 또는 ASO 120으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 보여준다.
 도 5B는 ASO 128, ASO 129 또는 ASO 120의 5×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
 도 5C는 ASO 128, ASO 129 또는 ASO 120의 5×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
 도 6A는 1×5 mg/kg의 ASO 130으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
 도 6B는 ASO 130의 5×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
 도 6C는 ASO 130의 5×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT의 그래프를 나타낸다.
 도 7A는 ASO 131의 3×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
 도 7B는 ASO 131의 3×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
 도 8A는 ASO 121의 5×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
 도 8B는 ASO 121의 5×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT의 그래프를 나타낸다.
 도 9A는 단일 용량 ASO 120, ASO 131, 및 1:1, 2:1 및 3:1 질량비의 ASO 120과 ASO 131의 조합으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBeAg의 변화 그래프를 나타낸다.
 도 9B는 단일 용량 ASO 120, ASO 121, 및 1:1, 2:1 및 3:1 질량비의 ASO 120과 ASO 121의 조합으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBeAg의 변화 그래프를 나타낸다.
 도 10A는 3×10 mg/kg QW의 ASO 133 내지 136 및 137A로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.

- 도 10B는 3×10 mg/kg QW의 ASO 133 내지 136 및 137A로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
- 도 11A는 3×10 mg/kg QW의 ASO 138 또는 153으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
- 도 11B는 3×10 mg/kg QW의 ASO 138 또는 153으로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
- 도 12A는 3×10 mg/kg QW의 ASO 132A 또는 137A로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
- 도 12B는 3×10 mg/kg QW의 ASO 132A 또는 137A로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
- 도 13A는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 140 내지 142로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
- 도 13B는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 140 내지 142로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
- 도 14A는 3×10 mg/kg Q3D의 ASO 143, 144, 145A 또는 146으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
- 도 14B는 3×10 mg/kg Q3D의 ASO 143, 144, 145A, 또는 146으로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
- 도 15A는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 148 내지 150으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
- 도 15B는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 148 내지 150으로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
- 도 16A는 3×10 mg/kg QW의 ASO 151 내지 154로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
- 도 16B는 3×10 mg/kg QW의 ASO 151 내지 154로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
- 도 17A는 3×10 mg/kg Q3D의 ASO 147, 155, 또는 156으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
- 도 17B는 3×10 mg/kg Q3D의 ASO 147, 155, 또는 156으로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.
- 도 18A는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 157 내지 159로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다.
- 도 18B는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 157 내지 159로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 개시내용은 변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 약제학적 조성물을 사용 및 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0017] **본 개시내용의 화합물**
- [0018] 본 개시내용의 화합물은 변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)를 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 14 내지 22개의 뉴클레오타이드 단위, 예를 들어, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22개의 뉴클레오타이드 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 3개의 영역, 즉 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 5'-윙 영역(A'); 윙과 상이한 유형의 뉴클레오타이드, 예를 들어, RNase H 절단을 유도할 수 있는 뉴클레오타이드를 포함하는 중심 영역(B'); 및 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 3'-윙 영역(C')을 포함하는 갭머(gapmer)이다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 5'-윙 영역 및 3'-윙 영역은 2 내지 6개의 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 이러한 뉴클레오타이드 중 하나 이상은 변형된다(예를 들어, 뉴클레오타이드 중 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개가 변형됨). 다른 한편, 중심 영역은 포스포다이에스터 또는 티오포스페이트("ps") 뉴클레오타이드간 결합에 의해 연결된 6개 이상의 인접 DNA 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 중심 영역은 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 중심 영역은 이 중심 영역이 RNase H 절단을 유도할 수 있는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 중심 영역은 변형된 핵염기를 갖는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 중심 영역은 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11개의 인접 DNA 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 중심 영역의 DNA

뉴클레오사이드 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11개는 변형된다.

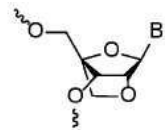
[0020] 따라서, 일부 양상에서, 본 개시내용의 캡머 ASO 화합물은 하기 화학식 (I)의 화합물을 포함한다:

[0021] A'- B'- C',

[0022] 여기서, A' 및 C'는 각각 독립적으로 2 내지 6개의 뉴클레오타이드를 포함하고, 이 중 하나 이상은 변형된 뉴클레오타이드이며, B'는 포스포다이에스터 또는 티오포스페이트 뉴클레오타이드간 결합에 의해 연결된 6개 이상의 인접 DNA 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, B'는 하나 이상의 변형된 DNA 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오타이드는 잠금 뉴클레오사이드 또는 2'-치환된 뉴클레오사이드로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 변형된 DNA 뉴클레오사이드는 잠금 뉴클레오사이드 또는 2'-치환된 뉴클레오사이드로부터 선택된다.

[0023] 특정 양상에서, A', B', 및 C'의 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오사이드의 수는 다음 그룹 (A':B':C'): (2:10:2), (2:10:3), (2:10:4), (2:10:5), (3:10:2), (3:10:3), (3:10:4), (3:10:5), (4:10:2), (4:10:3), (4:10:4), (4:10:5), (5:10:2), (5:10:3), (5:10:4), (5:10:5), (2:9:2), (2:9:3), (2:9:4), (2:9:5), (3:9:2), (3:9:3), (3:9:4), (3:9:5), (4:9:2), (4:9:3), (4:9:4), (4:9:5), (5:9:2), (5:9:3), (5:9:4), (5:9:5), (2:8:2), (2:8:3), (2:8:4), (2:8:5), (3:8:2), (3:8:3), (3:8:4), (3:8:5), (4:8:2), (4:8:3), (4:8:4), (4:8:5), (5:8:2), (5:8:3), (5:8:4), (5:8:5), (2:7:2), (2:7:3), (2:7:4), (2:7:5), (3:7:2), (3:7:3), (3:7:4), (3:7:5), (4:7:2), (4:7:3), (4:7:4), (4:7:5), (5:7:2), (5:7:3), (5:7:4), (5:7:5), (2:6:2), (2:6:3), (2:6:4), (2:6:5), (3:6:2), (3:6:3), (3:6:4), (3:6:5), (4:6:2), (4:6:3), (4:6:4), (4:6:5), (5:6:2), (5:6:3), (5:6:4), (5:6:5)로부터 선택된다.

[0024] 일부 실시형태에서, 5'-윙 영역은 하나 이상의 잠금 뉴클레오사이드 또는 2'-치환된 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 3'-윙 영역은 하나 이상의 잠금 뉴클레오사이드 또는 2'-치환된 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 중심 영역은 하나 이상의 잠금 뉴클레오사이드 또는 2'-치환된 뉴클레오사이드를 포함한다. 잠금 뉴클레오사이드는 당의 4' 위치와 2' 위치 사이에 가교를 함유할 수 있으며, 여기서 가교



는 2 내지 4개의 선택적으로 치환된 원자를 포함한다. 예를 들어, LNA 뉴클레오사이드는 이다. 다른 예시적인 잠금 뉴클레오사이드는 다음을 포함한다:

[0025] (ScpBNA 또는 "cp"); (AmNA), 여기서 R은 H 또는 알킬임(또는 R이 알킬인 경우에

는 AmNA(N-Me)); (GuNA); 또는 GuNA(N-R), R=Me, Et, *i*-Pr, *t*-Bu.

특정 실시형태에서, 5'-윙 영역의 모든 뉴클레오사이드는 잠금 뉴클레오사이드이다. 일부 실시형태에서, 3'-윙 영역의 모든 뉴클레오사이드는 잠금 뉴클레오사이드이다. 일부 실시형태에서, 3'-윙 영역은 LNA, 및 ScpBNA, AmNA 및 GuNA로부터 선택되는 1개 또는 2개의 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 5'-윙 영역은 모두 LNA이고 3'-윙 영역은 LNA, 및 ScpBNA, AmNA 및 GuNA로부터 선택되는 1개 또는 2개의 뉴클레오사이드를 함유한다. 다른 뉴클레오타이드는 PCT/JP2010/068409, PCT/JP2013/075370, PCT/JP2015/054308, PCT/JP2018/006061, 및/또는 PCT/JP2018/006062에 포함되어 있으며, 이들은 그 전문이 참고로 포함된다.

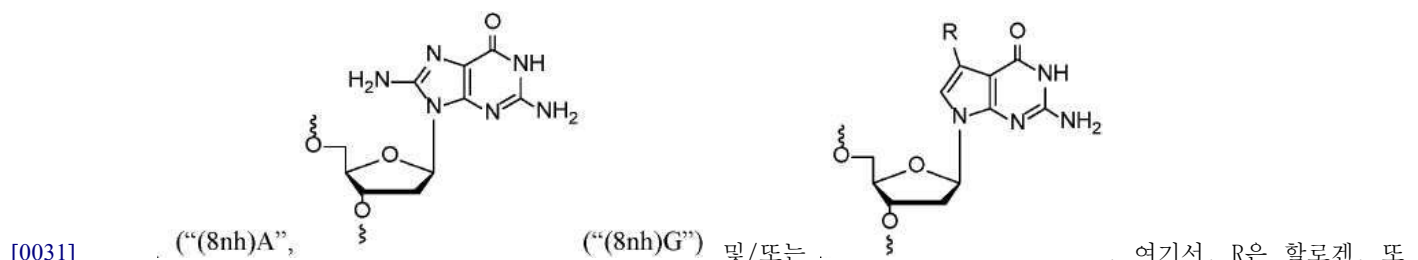
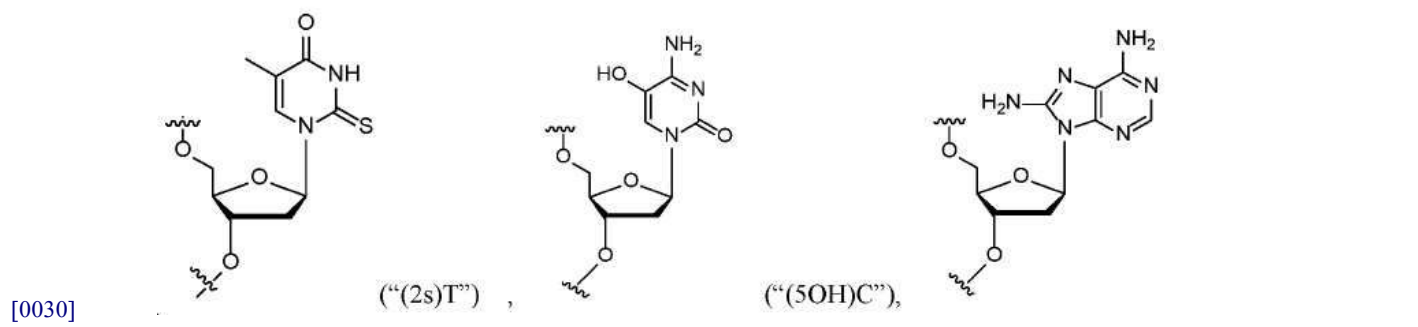
[0026] 일부 실시형태에서, ASO의 5'-윙 영역은 2 내지 6개의 포스포로티오에이트-연결된 잠금 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 5'-윙 영역은 2 내지 6개의 포스포로티오에이트-연결된 2' 치환된 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 5'-윙 영역은 적어도 하나의 잠금 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 2' 치환된 뉴클레오사이드를 포함하고, 여기서 잠금 뉴클레오사이드 및 2' 치환된 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 5'-윙 영역은 RNA 뉴클레오사이드 또는 DNA 뉴클레오사이드를 더 포

함하고, 여기서 RNA 뉴클레오사이드 및 DNA 뉴클레오사이드는 잠금 뉴클레오사이드 또는 2'-치환된 뉴클레오사이드가 아니다. 일부 실시형태에서, 5'-윙 영역의 적어도 2개의 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 5'-윙 영역의 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다.

[0027] 일부 실시형태에서, ASO의 3'-윙 영역은 2 내지 6개의 포스포로티오에이트-연결된 잠금 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 3'-윙 영역은 2 내지 6개의 2' 포스포로티오에이트-연결된 치환된 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 3'-윙 영역은 적어도 하나의 잠금 뉴클레오사이드 및 적어도 하나의 2' 치환된 뉴클레오사이드를 포함하고, 여기서 잠금 뉴클레오사이드 및 2' 치환된 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 3'-윙 영역은 RNA 뉴클레오사이드 또는 DNA 뉴클레오사이드를 더 포함하고, 여기서 RNA 뉴클레오사이드 및 DNA 뉴클레오사이드는 잠금 뉴클레오사이드 또는 2'-치환된 뉴클레오사이드가 아니다. 일부 실시형태에서, 3'-윙 영역의 적어도 2개의 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 3'-윙 영역의 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다.

[0028] 특정 실시형태에서, 5'-윙 영역 및/또는 3'-윙 영역의 뉴클레오타이드 중 하나 이상은 티오포스페이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 특정 실시형태에서, 5'-윙 영역의 모든 뉴클레오타이드는 티오포스페이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 3'-윙 영역의 모든 뉴클레오타이드는 티오포스페이트 뉴클레오타이드간 결합을 포함한다.

[0029] 일부 실시형태에서, 중심 영역은 변형된 핵염기를 갖는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 중심 영역은 하기의 보호된 또는 비보호된 버전을 갖는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다:



[0033] 여기서,

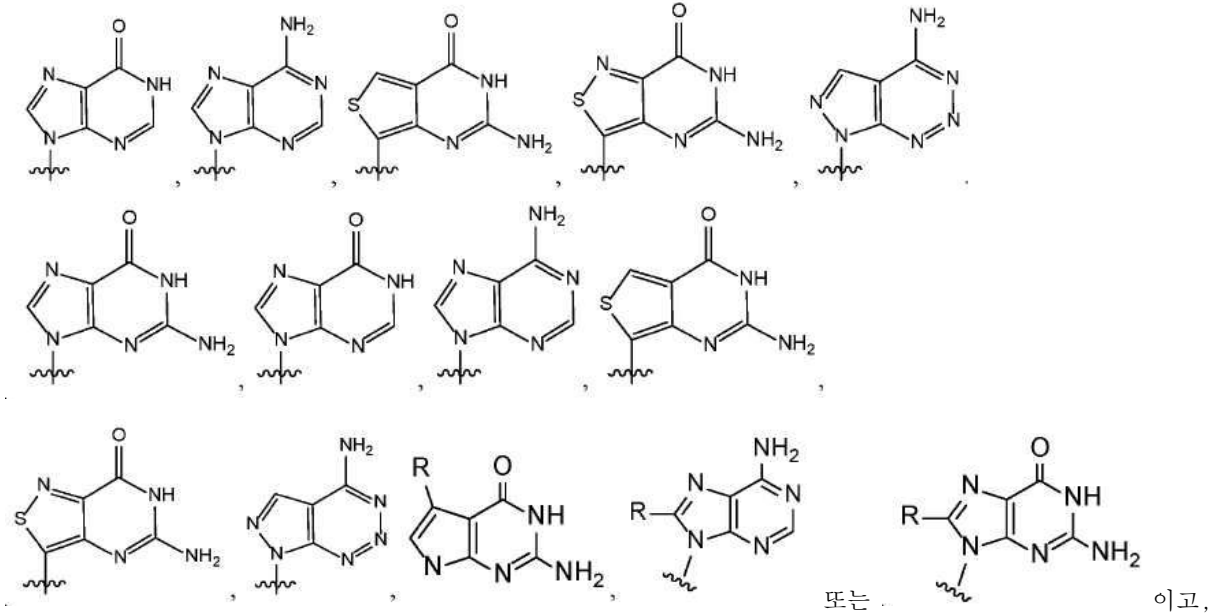
[0034] W는 독립적으로 O, N 또는 S이고;

[0035] R₁, R₂ 및 R₃는 독립적으로 H 또는 D이고;

[0036] R₃은 H 또는 F이고;

[0037] R₄는 F 또는 OCH₃이고; 그리고

[0038] 염기는



[0039] 여기서,

[0040] R은 할로겐 또는 R'-C≡C-이고; 그리고

[0041] R'는 C₆₋₁₂ 아릴, 5원 내지 12원 헤테로아릴, 하이드록시-C₁₋₆ 알킬 또는 C₁₋₇ 알카노일옥시를 나타낸다.

[0042] 일부 실시형태에서, C₁₋₇ 알카노일은 포르밀, 아세틸, 에틸 카보닐, n-프로필 카보닐, 아이소프로필 카보닐, n-부틸 카보닐, 아이소부틸 카보닐, t-부틸 카보닐, n-펜틸 카보닐 및 n-헥실 카보닐을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 다른 변형 뉴클레오타이드는 PCT/JP2018/006061에 있는 것들을 포함하며, 이는 그 전체가 참고로 포함된다.

[0043] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 달리 표시되지 않는 한, "아릴"은 완전히 비편재화된 파이-전자 시스템을 갖는 탄소환식(전체 탄소) 고리를 지칭한다. "아릴" 기는 2개 이상의 융합 고리(2개의 인접한 탄소 원자를 공유하는 고리)로 구성될 수 있다. 아릴이 융합 고리 시스템인 경우 나머지 분자에 연결된 고리는 완전히 비편재화된 파이 전자 시스템을 갖는다. 융합 고리 시스템의 다른 고리(들)는 완전히 비편재화된 파이-전자 시스템을 갖거나 갖지 않을 수 있다. 아릴 기의 예는 벤젠, 나프탈렌 및 아줄렌의 라디칼을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0044] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 달리 표시되지 않는 한, "헤테로아릴"은 완전히 비편재화된 파이-전자 시스템을 갖고, 고리에 질소, 산소, 및 황으로 이루어진 그룹에서 독립적으로 선택되는 하나 이상의 헤테로원자(예를 들어, 1 내지 3개의 헤테로원자, 또는 1 내지 4개의 헤테로원자, 또는 1 내지 5개의 헤테로원자)를 함유하는 고리를 지칭한다. "헤테로아릴" 기는 2개 이상의 융합 고리(2개의 인접한 탄소 원자를 공유하는 고리)로 구성될 수 있다. 헤테로아릴이 융합 고리 시스템인 경우, 나머지 분자에 연결된 고리는 완전히 비편재화된 파이 전자 시스템을 갖는다. 융합 고리 시스템의 다른 고리(들)는 완전히 비편재화된 파이-전자 시스템을 갖거나 갖지 않을 수 있다. 헤테로아릴 고리의 예는 푸란, 티오펜, 피롤, 옥사졸, 티아졸, 이미다졸, 피라졸, 아이속사졸, 아이소티아졸, 트리아졸, 티아디아아졸, 피리딘, 피리다진, 피리미딘, 피라진 및 트리아진을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0045] 일부 실시형태에서, ASO의 중심 영역은 적어도 5개의 인접 포스포로티오에이트-연결된 DNA 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 중심 영역의 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 중심 영역의 DNA 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 5'-윙 영역의 뉴클레오사이드에 연결된다. 일부 실시형태에서, 중심 영역의 DNA 뉴클레오사이드는 포스포로티오에이트 링커에 의해 3'-윙 영역의 뉴클레오사이드에 연결된다. 일부 실시형태에서, 중심 영역은 8 내지 10개의 인접 포스포로티오에이트-연결된 DNA 뉴클레오사이드를 포함한다.
- [0046] 일부 실시형태에서, ASO는 HBV의 X 영역 또는 HBV의 S 영역에서 시작하는 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 필수적인 표적은, 예를 들어, acc. KC315400.1(유전자형 B, "gt B")에서, 또는 유전자형 A, C 또는 D 중 어느 하나 중 표적 부위의 5'-단부에서 시작할 수 있다. 본 기술분야의 기술자는 HBV 위치를, 예를 들어, Wing-Kin Sung, et al., *Nature Genetics* 44:765(2012)에 기재된 바와 같이 이해할 것이다. 일부 실시형태에서, S 영역은 작은 S 단백질의 시작(유전자형 B KC315400.1 분리물 중에서, 위치 #155)부터 X 단백질의 시작 전(유전자형 B KC315400.1 분리물 중에서, 위치 #1373)까지로 정의된다. 일부 실시형태에서, X 영역은 X 단백질의 시작(유전자형 B KC315400.1 분리물 중에서, 위치 #1374)부터 DR2 부위의 끝(유전자형 B KC315400.1 분리물 중에서, 위치 #1603)까지로 정의된다.
- [0047] 일부 실시형태에서, ASO는 서열번호 1의 위치 100 내지 800 또는 1050 내지 1700 내의 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 인접 뉴클레오타이드를 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어지는 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, ASO는 서열번호 1의 위치 100 내지 800 또는 1050 내지 1700 내의 5 내지 15개, 5 내지 14개, 5 내지 13개, 5 내지 12개, 5 내지 11개, 5 내지 10개, 5 내지 9개, 5 내지 8개, 6 내지 15개, 6 내지 14개, 6 내지 13개, 6 내지 12개, 6 내지 11개, 6 내지 10개, 7 내지 15개, 7 내지 14개, 7 내지 13개, 7 내지 12개, 또는 7 내지 11개 인접 뉴클레오타이드를 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어지는 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, ASO는 서열번호 1의 위치 180 내지 280, 300 내지 450, 650 내지 775, 1125 내지 1300, 또는 1400 내지 1650 내의 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 인접 뉴클레오타이드를 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어지는 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, ASO는 서열번호 1의 위치 180 내지 215, 230 내지 270, 350 내지 420, 675 내지 730, 1165 내지 1210, 1245 내지 1290, 1400 내지 1480, 또는 1500 내지 1630 내의 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 인접 뉴클레오타이드를 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어지는 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, ASO는 서열번호 1의 위치 191, 245, 246, 276, 376, 377, 381, 383, 694, 700, 1182, 1261, 1262, 1408, 1410, 1426, 1431, 1432, 1433, 1435, 1438, 1441, 1443, 1513, 1516, 1517, 1518, 1519, 1520, 1521, 1522, 1527, 1559, 1575, 1576, 1577, 1580, 1581, 1582, 또는 1589에서 시작하는 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 인접 뉴클레오타이드를 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어지는 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, ASO는 바이러스 표적 RNA 서열에 완벽하게 상보적이다. 일부 실시형태에서, ASO와 바이러스 표적 서열 사이에는 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 불일치가 존재한다. 일부 실시형태에서, ASO와 바이러스 표적 서열 사이에는 2개 이하의 불일치가 존재한다. 일부 실시형태에서, ASO와 바이러스 표적 서열 사이에는 1개 이하의 불일치가 존재한다. 일부 실시형태에서, 불일치는 ASO의 윙 영역에 있다. 일부 실시형태에서, 불일치는 ASO의 5' 윙 영역에 있다. 일부 실시형태에서, 불일치는 ASO의 3' 윙 영역에 있다. 일부 실시형태에서, 불일치는 ASO의 중심 영역에 있다.
- [0048] 일부 실시형태에서, 중심 영역은 서열번호 1의 위치 100 내지 800 또는 1050 내지 1700 내의 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어지는 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 중심 영역은 서열번호 1의 위치 100 내지 800 또는 1050 내지 1700 내의 5 내지 15개, 5 내지 14개, 5 내지 13개, 5 내지 12개, 5 내지 11개, 5 내지 10개, 5 내지 9개, 5 내지 8개, 6 내지 15개, 6 내지 14개, 6 내지 13개, 6 내지 12개, 6 내지 11개, 6 내지 10개, 7 내지 15개, 7 내지 14개, 7 내지 13개, 7 내지 12개, 또는 7 내지 11개 인접 뉴클레오타이드를 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어지는 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 중심 영역은 서열번호 1의 위치 180 내지 280, 300 내지 450, 650 내지 775, 1125 내지 1300, 또는 1400 내지 1650 내의 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 인접 뉴클레오타이드를 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어지는 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 중심 영역은 서열번호 1의 위

치 180 내지 215, 230 내지 270, 350 내지 420, 675 내지 730, 1165 내지 1210, 1245 내지 1290, 1400 내지 1480, 또는 1500 내지 1630 내의 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 인접 뉴클레오타이드를 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어지는 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 중심 영역은 서열번호 1의 위치 191, 245, 246, 276, 376, 377, 381, 383, 694, 700, 1182, 1261, 1262, 1408, 1410, 1426, 1431, 1432, 1433, 1435, 1438, 1441, 1443, 1513, 1516, 1517, 1518, 1519, 1520, 1521, 1522, 1527, 1559, 1575, 1576, 1577, 1580, 1581, 1582, 또는 1589에서 시작하는 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 인접 뉴클레오타이드를 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어지는 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 중심 영역은 바이러스 표적 RNA 서열에 완벽하게 상보적이다. 일부 실시형태에서, 중심 영역과 바이러스 표적 서열 사이에는 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 불일치가 존재한다. 일부 실시형태에서, 중심 영역과 바이러스 표적 서열 사이에는 2개 이하의 불일치가 존재한다. 일부 실시형태에서, 중심 영역과 바이러스 표적 서열 사이에는 1개 이하의 불일치가 존재한다.

[0049]

이하 표 1의 특정 서열은 본 개시내용의 범위 내에 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, ln = 잠금 핵산(LNA); lnA = 잠금 핵산(LNA) A; ln(5m)C = 잠금 핵산(LNA)-5메틸 C; lnG = 잠금 핵산(LNA) G; lnT = 잠금 핵산(LNA) T; (5m)C = 5메틸C; mA = 2-O-메톡시 A; mU = 2-O-메톡시 U; (8nh)A = 8-아미노 A; (8nh)G = 8-아미노 G; (2s)T = 2-티오 T; (5-OH)C = 5-하이드록시 C; cp = scp = 사이클로프로필; cpC = scpC = 사이클로프로필 C; cpG = scpG = 사이클로프로필 G; cpT = scpT = 사이클로프로필 T; ps = 포스포로티오에이트 결합. "HBV 게놈 중 위치"는 acc. KC315400.1(유전자형 B) 중 표적 부위의 5'-단부를 나타낸다.

표 1

예시적인 ASO			
서열 번호	ASO 번호	HBV 게놈 내의 위치_길이_캡머 구조	서열 [5'에서 3'로]
2	1	1527_16mer_3-10-3	5'In(5m)CpsInGpsIn(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpsInGpsInTpsInG 3'
3	2	1559_15mer_4-8-3	5'In(5m)CpsIn(5m)CpsInGpsInGps(5m)CpsApsGpsApsTpsGpsApsGpsInApsInApsInG 3'
4	3	1576_16mer_4-8-4	5'InApsInApsInGpsIn(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsApsIn(5m)CpsInApsIn(5m)CpsInG 3'
5	4	1432_17mer_4-10-3	5'InGpsInGpsInApsInTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsIn(5m)CpsInGpsInG 3'
6	5	1582_16mer_3-10-3	5'InGpsInApsInGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsInGpsInTpsInG 3'
7	6	1522_15mer_3-8-4	5'InApsInApsInGpsApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsInGpsIn(5m)CpsIn(5m)CpsIn(5m)C 3'
8	7	1432_16mer_4-9-3	5'InGpsInApsInTpsInTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsIn(5m)CpsInGpsInG 3'
9	8	1527_17mer_4-10-3	5'In(5m)CpsIn(5m)CpsInGpsIn(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpsInGpsInTpsInG 3'
10	9	1431_17mer_3-10-4	5'InGpsInApsInTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsIn(5m)CpsInGpsInGpsInG 3'
11	10	1580_15mer_3-9-3	5'InGpsInTpsInGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsInGpsIn(5m)CpsInA 3'
12	11	1589_15mer_2-10-3	5'In(5m)CpsInGpsInTpsGps(5m)CpsApsGpsApsGpsGpsTpsGpsInApsInApsInG 3'
13	12	1435_15mer_3-8-4	5'InGpsInGpsInGpsApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGpsIn(5m)CpsIn(5m)CpsInGpsInA 3'
14	13	1432_17mer_4-8-5	5'InGpsInGpsInApsInTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsInGpsInApsIn(5m)CpsInGpsInG 3'
15	14	1431_15mer_3-9-3	5'InTpsInTpsIn(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps(5m)CpsInGpsInGpsInG 3'
16	15	1432_17mer_4-9-4	5'InGpsInGpsInApsInTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsInApsIn(5m)CpsInGpsInG 3'
17	16	1527_16mer_3-9-4	5'In(5m)CpsInGpsIn(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsInGpsInGpsInTpsInG 3'
18	17	1513_15mer_3-9-3	5'InGpsIn(5m)CpsInGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpsTpsGpsGpsTpsIn(5m)CpsInGpsInG 3'
19	18	245_17mer_4-10-3	5'In(5m)CpsInApsIn(5m)CpsIn(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApsGpsInAps(5m)CpsInT 3'
20	19	1426_15mer_3-8-4	5'In(5m)CpsInGps(5m)CpsGpsAps(5m)CpsGpsGpsGpsApsIn(5m)CpsInGpsInTpsInA 3'
21	20	377_17mer_4-8-5	5'InApsInApsInApsIn(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsApsIn(5m)CpsInApsIn(5m)CpsInApsInT 3'

[0050]

22	21	1516_15mer_3-10-2	5'InGpslnGpslnTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpsTpsGpslnGpslnT 3'
23	22	1575_16mer_3-10-3	5'InApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
24	23	1580_16mer_3-9-4	5'InGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'
25	24	1261_15mer_3-8-4	5'In(5m)CpslnGpsln(5m)CpsApsGpsTpsApsTpsGpsGpsApslnTpsln(5m)CpslnGpslnG 3'
26	25	1519_16mer_3-10-3	5'InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'
27	26	1433_17mer_5-8-4	5'InGpslnGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
28	27	1433_15mer_3-8-4	5'InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpslnAps(5m)CpslnG 3'
29	28	1431_17mer_4-10-3	5'InGpslnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
30	29	1518_16mer_3-10-3	5'InApslnGpslnApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpslnGpslnTpslnG 3'
31	30	1431_17mer_4-9-4	5'InGpslnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
32	31	1520_15mer_3-8-4	5'InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)CpslnG 3'
33	32	1519_17mer_3-10-4	5'InApslnGpslnApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'
34	33	1581_16mer_3-10-3	5'InApslnGpslnGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)C 3'
35	34	1575_15mer_3-10-2	5'InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'
36	35	1438_15mer_3-9-3	5'In(5m)CpslnGps(5m)CpsGpsGpsGpsApsTpsTps(5m)CpsApsGpsln(5m)CpslnGpsln(5m)C 3'
37	36	1520_15mer_3-10-2	5'InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnG 3'
38	37	1520_17mer_4-10-3	5'InApslnApslnGpslnApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)CpslnG 3'
39	38	1517_15mer_3-9-3	5'InApslnGpslnGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpslnTpslnGpslnG 3'
40	39	1262_15mer_3-8-4	5'In(5m)Cpsln(5m)CpslnGps(5m)CpsApsGpsTpsApsTpsGpsGpslnApslnTpsln(5m)CpslnG 3'
41	40	246_17mer_3-10-4	5'In(5m)Cpsln(5m)CpslnAps(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'
42	41	191_16mer_3-9-4	5'In(5m)Cpsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'
43	42	1441_15mer_3-8-4	5'InGpslnTpsln(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsGpsGpsGpsApsTpslnTpsln(5m)CpslnApslnG 3'
44	43	1443_17mer_3-10-4	5'InGpslnGpslnTps(5m)CpsGpsTps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsGpsGpslnApslnTpslnTpsln(5m)C 3
45	44	1408_17mer	5'InApsln(5m)CpslnApslnApsApsGpsGpsAps(5m)CpsGpsTps(5m)C

[0051]

		4-10-3	ps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnG 3'
46	45	1433_16mer_4-9-3	5'lnGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
47	46	1432_17mer_3-10-4	5'lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
48	47	1433_16mer_3-10-3	5'lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
49	48	246_17mer_4-10-3	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'
50	49	1575_16mer_4-9-3	5'lnApslnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
51	50	1576_15mer_4-8-3	5'lnApslnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnG 3'
52	51	1580_16mer_3-10-3	5'lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'
53	52	1576_15mer_3-10-2	5'lnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnG 3
54	53	191_16mer_4-8-4	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'
55	54	1435_15mer_3-9-3	5'lnGpslnGpslnGpsApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnA 3'
56	55	1518_15mer_3-9-3	5'lnGpslnApslnGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpslnGpslnTpslnG 3'
57	56	1581_16mer_4-9-3	5'lnApslnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)C 3'
58	57	694_17mer_4-9-4	5'lnGpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)CpsTpsAps(5m)CpsGpsApsAps(5m)Cps(5m)CpsApsln(5m)CpslnTpslnGpslnA 3'
59	58	377_15mer_4-8-3	5'lnApsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpsApslnT 3'
60	59	383_17mer_4-10-3	5'lnApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsln(5m)CpslnApslnG 3'
61	60	1432_15mer_4-8-3	5'lnApslnTpslnTpsln(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
62	61	1408_15mer_2-10-3	5'lnApslnApsApsGpsGpsAps(5m)CpsGpsTps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnG 3'
63	62	1522_15mer_3-9-3	5'lnApslnApslnGpsApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)Cps 3'
64	63	1432_15mer_3-8-4	5'lnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3
65	64	383_17mer_4-8-5	5'lnApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'
66	65	1410_15mer_4-8-3	5'lnApsln(5m)CpslnApslnApsApsGpsGpsAps(5m)CpsGpsTps(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)CpslnG 3'
67	66	1581_15mer_3-10-2	5'lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)C 3'
68	67	376_17mer_4-10-3	5'lnApslnApsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnApslnTpsln(5m)C 3'

[0052]

69	68	377_17mer_4-9-4	5'lnApslnApslnApsln(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApslnT 3'
70	69	377_15mer_3-8-4	5'lnApsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApslnT 3'
71	70	1582_15mer_3-10-2	5'lnApslnGpslnGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnG 3'
72	71	377_16mer_3-10-3	5'lnApslnApsln(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApslnT 3'
73	72	1576_16mer_4-9-3	5'lnApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnG 3'
74	73	381_17mer_5-8-4	5'lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'
75	74	1580_16mer_4-9-3	5'lnGpslnGpslnTpslnGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'
76	75	694_17mer_3-10-4	5'lnGpsln(5m)Cpsln(5m)Cps(5m)CpsTpsAps(5m)CpsGpsApsAps(5m)Cps(5m)CpsApsln(5m)CpslnTpslnGpslnA 3'
77	76	1261_15mer_3-10-2	5'ln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsApsGpsTpsApsTpsGpsGpsApsTps(5m)CpslnGpslnG 3'
78	77	1518_15mer_3-10-2	5'lnGpslnApslnGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpslnTpslnG 3'
79	78	383_17mer_4-9-4	5'lnApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'
80	79	383_17mer_3-10-4	5'lnApslnTpslnGpsApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'
81	80	377_17mer_4-10-3	5'lnApslnApslnApsln(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApslnT 3'
82	81	1521_16mer_4-9-3	5'lnApslnApslnGpslnApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)C 3'
83	82	1577_15mer_3-10-2	5'lnApslnApslnGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)C 3'
84	83	1182_15mer_3-8-4	5'lnGpslnTpslnTpsGps(5m)CpsGpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpslnApslnApslnApsln(5m)C 3'
85	84	700_17mer_3-10-4	5'lnGpslnGpslnGpsApsApsApsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsTpsAps(5m)CpslnGpslnApslnApsln(5m)C 3'
86	85	383_17mer_5-8-4	5'lnApslnTpslnGpslnApslnTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'
87	86	1576_16mer_4-8-4	5'lnApslnApslnGps(5m)AmCpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnG 3'
88	87	1576_16mer_4-8-4	5'lnApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsApsln(5m)CpsAmApsln(5m)CpslnG 3'
89	88	1576_16mer_4-8-4	5'lnApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)AmCpslnApsln(5m)CpslnG 3'
90	89	1575_16mer_3-10-3	5' ScpApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
91	90	1575_16mer_3-10-3	5'lnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'
92	91	383_17mer_	5' ScpApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps

[0053]

		4-8-5	Gpsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps lnApslnG 3'
93	92	383_17mer_4-8-5	5'lnApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)CpsGpsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps lnApsScpG 3'
94	93	383_17mer_4-8-5	5'lnApsScpTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'
95	94	1527_16mer_3-10-3	5'ln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsApslnGpsScpTpslnG 3'
96	9A	1431_17mer_3-10-4	5'lnGpslnApsScpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
97	9B	1431_17mer_3-10-4	5'mU-lnGpslnApsScpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
98	9C	1431_17mer_3-10-4	5'mU-lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps ln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'
99	25A	1519_16mer_3-10-3	5'lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'
100	25B	1519_16mer_3-10-3	5'lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsAmT 3'
101	25C	1519_16mer_3-10-3	5'lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsAm(5m)CpslnGpslnT 3'
102	25D	1519_16mer_3-10-3	5'lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsScpT 3'
103	25E	1519_16mer_3-10-3	5'lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)scpCpslnGpslnT 3'
104	25F	1519_16mer_3-10-3	5'mU-lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps ln(5m)CpslnGpslnT 3'
105	25G	1519_16mer_3-10-3	5'mU-lnGpslnApslnGpsAps(8nh)GpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsScp(5m)CpslnGpslnT 3'
106	47A	1433_16mer_3-10-3	5'lnGpslnGpslnAps(2s)TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
107	47B	1433_16mer_3-10-3	5'lnGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
108	47C	1433_16mer_3-10-3	5'lnGpslnGpslnApsTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
109	47D	1433_16mer_3-10-3	5'mU-lnGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
110	47E	1433_16mer_3-10-3	5'mU-lnGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsScp(5m)CpslnG 3'
111	47F	1433_16mer_3-10-3	5'mU-lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps lnApsln(5m)CpslnG 3'
112	73A	381_17mer_5-8-4	5'lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsScp(5m)C 3'
113	73B	381_17mer_5-8-4	5'mA-lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsScp(5m)C 3'
114	73C	381_17mer	5'mA-lnGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)C

[0054]

		5-8-4	ps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsScp(5m)C 3'
115	34A	1575_15mer_3-10-2	5'mU-lnGpln(5m)CpsScpGpsAps(8nh)ApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'
116	40A	246_17mer_3-10-4	5'mA-ln(5m)CpsScp(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'
117	23A	1580_16mer_3-9-4	5'mU-lnGpslnGpsScpTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'

[0055]

[0056]

일부 실시형태에서, ASO는 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 또는 19에 열거된 서열로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 ASO 120 또는 ASO 121이다.

[0057]

일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 1개의 뉴클레오사이드가 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 또는 19의 ASO와 상이한 서열을 갖는다. 다른 실시형태에서, ASO는 1, 2, 3 또는 4개의 뉴클레오사이드가 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 또는 19의 ASO와 상이한 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 서열은 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 또는 19로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90% 동일하다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 또는 19의 서열을 갖지만, 중심 영역의 하나의 T가 (2s)T로 대체되고, 중심 영역의 하나의 C가 (50H)C로 대체되며, 및/또는 하나의 A가 중심 영역에서 (8NH)A로 대체된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 표 1, 2A, 3, 4, 7,

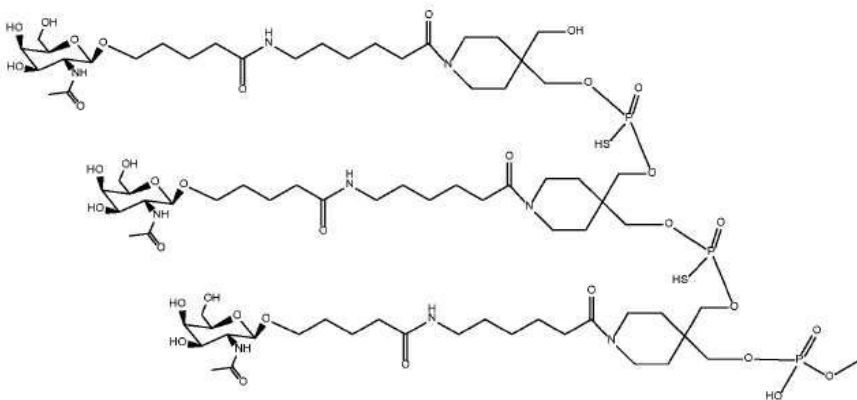
8, 9, 10, 11, 13, 14, 또는 19의 서열을 갖지만, 5' 윙 부분에 1 또는 2개의 ScpBNA, AmNA 또는 GuNA를 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 또는 19의 서열을 갖지만, 3' 윙 부분에 1개 또는 2개의 ScpBNA, AmNA 또는 GuNA를 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 또는 19의 서열을 갖지만, 이 서열의 5' 단부에 mA 또는 mU가 추가되어 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 표 1, 2A, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 또는 19의 서열을 갖지만, 본 명세서에 상세히 설명된 바와 같은 GalNAc 유도체(예를 들어, GalNAc4, 예컨대, GalNAc4-(PS)2-p-, 또는 GalNAc6, 예컨대, GalNAc6-(PS)2-p-)에 연결되는 서열의 5' 단부에 mA 또는 mU가 추가되어 있다.

[0058] 일부 실시형태에서, ASO는 서열번호 2 내지 428 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 서열번호 400 또는 404의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0059] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 1개의 뉴클레오사이드가 서열번호 2 내지 428의 뉴클레오타이드 중 임의의 뉴클레오타이드와 상이한 서열을 갖는다. 다른 실시형태에서, ASO는 1, 2, 3 또는 4개의 뉴클레오사이드가 서열번호 2 내지 428의 뉴클레오타이드 중 임의의 뉴클레오타이드와 상이한 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2 내지 428의 뉴클레오타이드 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 90% 동일하다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 서열번호 2 내지 428 중 어느 하나의 서열을 갖지만, 중심 영역의 하나의 T가 (2s)T로 대체되고, 중심 영역의 하나의 C가 (5H)C로 대체되며, 및/또는 하나의 A가 중심 영역에서 (8NH)A로 대체된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 서열번호 2 내지 428 중 어느 하나의 서열을 갖지만, 5' 윙 부분에 1 또는 2개의 ScpBNA, AmNA 또는 GuNA를 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 서열번호 2 내지 428 중 어느 하나의 서열을 갖지만, 3' 윙 부분에 1개 또는 2개의 ScpBNA, AmNA 또는 GuNA를 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 서열번호 2 내지 428 중 어느 하나의 서열을 갖지만, 이 서열의 5' 단부에 mA 또는 mU가 추가되어 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO는 서열번호 2 내지 428 중 어느 하나의 서열을 갖지만, 본 명세서에 상세히 설명된 바와 같은 GalNAc 유도체(예를 들어, GalNAc4, 예컨대, GalNAc4-(PS)2-p-, 또는 GalNAc6, 예컨대, GalNAc6-(PS)2-p-)에 연결되는 서열의 5' 단부에 mA 또는 mU가 추가되어 있다.

[0060] 본 개시내용은 또한 하나 이상의 단부가 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 표적화 모이어티와 같이 ASO에 접합된 추가 성분에 관한 것이다.

[0061] 일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 탄수화물, 예컨대, 단당류, 예를 들어, *N*-아세틸갈락토사민(GalNAc), 이당류, 삼당류, 사당류, 올리고당류, 및 다당류를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적화 모이어티는 하나 이상의 GalNAc 유도체, 예컨대, 하나 이상의 링커를 통해 ASO에 부착된 2개 또는 3개의 GalNAc 유도체를, 선택적으로 연속적인 구조로 포함한다. 특정 실시형태에서, 표적화 모이어티는 다음과 같은 링커를 통해 부착된 3개의 연속 GalNAc 모이어티를 포함한다:



[0062] 일부 실시형태에서, ASO는 ASO의 5'-단부, 3'-단부, 또는 양쪽 단부에 표적화 모이어티를 함유한다.

[0064] 특정 실시형태에서, ASO는 하나 이상의 단부가 비닐 포스포네이트 모이어티, 예컨대, 5'-비닐 포스포네이트 모이어티에 의해 변형된다.

[0065] **조성물**

[0066] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 ASO를 포함하는 약제학적 조성물을 포괄한다. 일 실시형태는 본 개시내용의 하나 이상의 ASO, 및 약제학적 허용성 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0067] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO를 함유하는 약제학적 조성물은 비경구 전달을 통한 전신 투여용으로 제형화된다. 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입; 또한 진피하 투여, 예를 들어, 이식된 장치를 통한 투여를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 본 개시내용의 ASO를 함유하는 약제학적 조성물은 피하(SC) 또는 정맥내(IV) 전달을 위해 제형화된다. 비경구 투여를 위한 제형은 멸균 수용액을 포함할 수 있으며, 이는 또한 본 기술분야의 기술자가 알고 있는 바와 같은 완충액, 희석제 및 기타 약제학적 허용성 첨가제를 함유할 수 있다. 정맥내 용도인 경우, 용질의 총 농도는 제제를 등장성으로 만들기 위해 조절될 수 있다.

[0068] 본 개시내용의 ASO를 함유하는 약제학적 조성물은, 예를 들어, HBV 유전자의 발현 또는 활성과 관련된 질환 또는 장애를 치료하는데 유용하다.

[0069] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 HBV의 제1 X 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하는 본 개시내용의 제1 ASO, 및 HBV의 제2 X 영역 또는 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하는 본 개시내용의 제2 ASO, 및 약제학적 허용성 희석제 또는 담체를 포함한다. 약제학적 조성물이 2개 이상의 ASO를 포함하는 경우, ASO는 다양한 양으로 존재할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 제1 ASO 대 제2 ASO의 중량비는 1:4 내지 4:1, 예를 들어, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 또는 4:1이다. 일부 실시형태에서, 제1 ASO 대 제2 ASO의 몰비는 1:4 내지 4:1, 예를 들어, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 또는 4:1이다.

[0070] **사용 방법**

[0071] 본 기술의 일 양상은 HBV 감염 및/또는 HBV 관련 장애를 갖는 것으로 진단되거나, 갖는 것으로 의심되거나, 가질 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 치료 적용예에서, 본 기술의 하나 이상의 ASO를 포함하는 조성물은 그러한 질환이 의심되거나 또는 이미 앓고 있는 대상체(예를 들어, HBV cccDNA의 지속, 대상체의 혈청 및/또는 간 중에 HBV 항원(예를 들어, HBsAg 및/또는 HBeAg)의 존재, 또는 상승된 HBV 바이러스 부하 수준)에게, 질환의 합병증 및 질환의 발달 중 중간 병리학적 표현형을 포함하는 질환의 증상을 치유 또는 적어도 부분적으로 저지시키기에 충분한 양으로 투여된다.

[0072] HBV 감염 및/또는 HBV 관련 장애를 앓고 있는 대상체는 본 기술분야에 공지된 진단 또는 예후 검정 중 임의의 검정 또는 조합에 의해 식별될 수 있다. 예를 들어, HBV 감염 및/또는 HBV 관련 장애의 전형적인 증상으로는 간 HBV cccDNA의 존재, 혈청 및/또는 간 HBV 항원(예를 들어, HBsAg 및/또는 HBeAg)의 존재, 상승된 ALT, 상승된 AST, 항-HBV 항체의 부재 또는 낮은 수준, 간 손상, 간경변, 델타 감염, 급성 B형 간염, 급성 전격성 B형 간염, 만성 B형 간염, 간 섬유증, 말기 간 질환, 간세포 암종, 혈청병 유사 증후군, 식욕부진, 메스꺼움, 구토, 미열, 근육통, 피로, 미각 및 후각 장애(음식과 담배에 대한 혐오감), 우상복부 및 상복부 통증(간헐적, 경증 내지 중등도), 간 뇌병증, 졸림, 수면 패턴 장애, 정신 착란, 혼수, 복수, 위장 출혈, 응고병증, 황달, 간비대(약간 비대, 부드러운 간), 비장 비대, 손바닥 홍반, 거미 모반, 근육 소모, 거미혈관종, 혈관염, 정맥류 출혈, 말초 부종, 여성형 유방, 고환 위축, 복부 측부 정맥(고환 메두사), 높은 수준의 알라닌 아미노전이효소(ALT) 및 아스파테이트 아미노전이효소(AST)(1000-2000 IU/ml 범위 내), AST 수준보다 높은 ALT 수준, 감마-글루타밀 트랜스펩티다제(GGT) 및/또는 알칼리성 포스파타제(ALP) 수준 상승, 알부민 수준 감소, 혈청 철 수준 상승, 백혈구감소증(즉, 과립구감소증), 림프구감소증, 적혈구 침강 속도(ESR) 증가, 단축된 적혈구 생존, 용혈, 혈소판감소증, 국제 표준화 비율(INR)의 연장, 혈청 HBV DNA의 존재, 아미노전이효소의 상승(ULN의 5배 미만), 빌리루빈 수치 증가, 프로트롬빈 시간(PT) 연장, 고글로불린혈증, 항평활근 항체(ASMA) 또는 항핵항체(ANA)와 같은 조직 특이적 항체의 존재, 갑상선에 대한 항체와 같은 조직 특이적 항체의 존재, 류마티스 인자(RF) 수치 상승, 고빌리루빈혈증, 낮은 혈소판 및 백혈구 수, ALT 수준보다 높은 AST 수준, 퇴행성 및 재생성 간세포 변화를 동반한 소엽 염증 및 주로 소엽중심 피사를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0073] 일부 실시형태에서, 본 기술의 ASO 조성물로 처리된 대상체는 하기 상태 또는 증상 중 하나 이상의 개선 또는 제거를 나타낼 것이다: 간 HBV cccDNA의 존재, 혈청 및/또는 간 HBV 항원(예를 들어, HBsAg 및/또는 HBeAg)의 존재, 항-HBV 항체의 부재 또는 낮은 수준, 간 손상, 간경변, 델타 감염, 급성 B형 간염, 급성 전격성 B형 간염, 만성 B형 간염, 간 섬유증, 말기 간 질환, 간세포 암종, 혈청병 유사 증후군, 식욕부진, 메스꺼움, 구토, 미열, 근육통, 피로, 미각 및 후각 장애(음식과 담배에 대한 혐오), 우상복부 및 상복부 통증(간헐적, 경증 내지 중등도), 간성 뇌증, 졸음, 수면패턴의 장애, 정신 착란, 혼수, 복수, 위장출혈, 응고병증, 황달, 간비대(약간 비대, 부드러운 간), 비장종대, 손바닥 홍반, 거미 네비(nevi), 근육 소모, 거미 혈관종, 혈관염, 정맥류 출

혈, 말초 부종, 여성형 유방, 고환 위축, 복부 측부 정맥(수두), AST 수준보다 높은 ALT 수준, 백혈구감소증(즉, 과립구감소증), 알부민 수준 감소, 혈청 철 수준 상승, 림프구증가, 적혈구 침강 속도(ESR) 증가, 적혈구 생존 단축, 용혈, 혈소판감소증, 국제 표준화 비율(INR) 연장, 혈청 HBV DNA 존재, 프로트롬빈 시간(PT) 연장, 고글로불린혈증, 항평활근 항체(ASMA) 또는 항핵항체(ANA)와 같은 조직 비특이적 항체의 존재, 갑상선에 대한 항체와 같은 조직 특이적 항체의 존재, 고빌리루빈혈증, 낮은 혈소판 및 백혈구수, ALT 수준보다 높은 AST 수준, 퇴행성 및 재생성 간세포 변화를 동반하는 소엽 염증, 주로 소엽중심 괴사.

- [0074] 본 개시내용은 본 기술의 ASO 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, HBV 감염 및/또는 HBV 관련 장애가 있는 것으로 진단되거나 의심되는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 방법은 본 개시내용의 제1 ASO 및 본 개시내용의 제2 ASO를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 제1 ASO는 HBV의 제1 X 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화하고, 제2 ASO는 HBV의 제2 X 영역 또는 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 제2 ASO는 HBV의 제2 X 영역에서 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다. 다른 실시형태에서, 제2 ASO는 HBV의 S 영역 중 바이러스 표적 RNA 서열에 상보적이거나 혼성화한다.
- [0075] 본 개시내용의 ASO는 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법은 본 명세서에 개시된 임의의 ASO를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 필요로 하는 대상체에서 질병을 치료하는 방법은 본 명세서에 개시된 임의의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0076] ASO의 투여는 본 기술분야에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, ASO는 피하(SC) 또는 정맥내(IV) 전달에 의해 투여된다. 본 개시내용의 제제(예를 들어, ASO 또는 조성물)는 경구, 비경구, 국소 또는 직장으로 제공될 수 있다. 물론 각각의 투여 경로에 적합한 형태로 제공된다. 예를 들어, 이들은 정제 또는 캡슐 형태로, 주사, 주입 또는 흡입에 의한 투여; 로션 또는 연고에 의한 국소; 좌약에 의한 직장투여로 투여된다. 일부 실시형태에서, 피하 투여가 바람직하다.
- [0077] 본 명세서에 사용된 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여되는"이라는 문구는 장관 및 국소 투여 이외의 투여 방식, 일반적으로 주사에 의한 투여 방식을 의미하고, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관내, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 제한없이 포함한다.
- [0078] 본 명세서에 사용된 "전신 투여", "전신으로 투여되는", "말초 투여" 및 "말초로 투여되는"이라는 문구는 중추 신경계로 직접 투여와 다른 화합물, 약물 또는 기타 물질의 투여를 의미하며, 이에 따라 환자의 시스템으로 들어가, 대사 및 기타 유사한 과정을 받게 되는 것, 예를 들어, 피하 투여이다.
- [0079] 이들 화합물은 임의의 적절한 투여 경로로 치료하기 위해 인간 및 기타 동물에게 투여될 수 있으며, 그 예로는 구강, 비강, 예를 들어, 스프레이로서, 직장, 질내, 비경구, 수조내 및 국소적으로, 분말, 연고 또는 점적제로서, 예컨대 흡입 및 설하를 포함한다.
- [0080] 선택된 투여 경로에 관계없이, 적합한 수화된 형태로 사용될 수 있는 본 개시내용의 화합물(예를 들어, ASO), 및/또는 본 개시내용의 약제학적 조성물은 본 기술분야의 기술자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 약제학적 허용성 투여 형태로 제형화된다.
- [0081] 본 개시내용의 약제학적 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 환자에게 독성 없이 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 획득하기 위해 변동될 수 있다.
- [0082] 선택된 투여량 수준은 이용된 본 개시내용의 특정 화합물(예를 들어, ASO), 또는 이의 에스터, 염 또는 아마이드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 이용되는 특정 화합물의 배출 또는 대사 속도, 흡수 속도 및 정도, 치료 기간, 이용되는 특정 화합물과 조합으로 사용되는 기타 약물, 화합물 및/또는 물질, 연령, 성별, 체중, 상태, 일반 건강 및 치료 중인 환자의 이전 병력, 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사한 요인을 비롯한 다양한 요인에 따라 달라질 것이다.
- [0083] 본 기술분야의 통상의 기술을 가진 의사 또는 수의사는 필요한 약제학적 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 원하는 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 것보다 낮은 수준으로 약제학적 조성물에 사용된 본 개시내용의 화합물(예를 들어, ASO)의 용량으로 시작하고, 원하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다.

[0084]

일반적으로, 본 개시내용의 화합물(예를 들어, ASO)의 적합한 1일 용량은 치료 효과를 생성하는데 효과적인 최저 용량인 화합물의 양이다. 이러한 유효 용량은 일반적으로 위에서 설명한 요인에 따라 달라진다. 바람직하게는, 화합물은 약 0.01 mg/kg 내지 약 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 약 0.1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 더욱 더 바람직하게는 약 0.5 mg/kg 내지 약 50 mg/kg으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 약 1 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 15 mg/kg, 또는 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 0.29, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 또는 1 mg/kg 이상의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30 mg/kg 이상의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 또는 15 mg/kg 이하의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물의 총 1일 용량은 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 또는 100 mg 이상이다.

[0085]

원하는 경우, 활성 화합물(예를 들어, ASO)의 유효 1일 용량은 하루 동안 적절한 간격을 두고 별도로 투여되는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 이상의 용량 또는 하위용량으로서, 선택적으로 단위 투여량 형태로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 화합물은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15회 투여된다. 바람직한 투약은 1일 1회 투여이다. 일부 실시형태에서, 화합물은 주당 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 21회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 월당 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 21회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 21일마다 1회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 3일마다 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15주마다 1회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 매달 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개월마다 1회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 또는 70일의 기간 동안 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 또는 53주의 기간 동안 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 또는 53회의 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 또는 53개월의 기간 동안 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 또는 53회의 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 또는 53주의 기간 동안 적어도 주 1회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 또는 53개월의 기간 동안 적어도 주 1회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 또는 70주의 기간 동안 적어

도 주 2회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 또는 70 개월의 기간 동안 적어도 주 2회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 또는 70주의 기간 동안 2주마다 적어도 1회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 또는 70 개월의 기간 동안 2주마다 적어도 1회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 또는 70 주 동안 4주마다 적어도 1회 투여된다. 일부 실시형태에서, 화합물은 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 또는 70 개월의 기간 동안 4주마다 적어도 1회 투여된다.

[0086] 기재된 방법의 대상체는 포유류일 수 있으며, 이는 인간 및 비-인간 포유류를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 인간, 예컨대, 성인이다.

[0087] 일부 실시형태는 본 개시내용의 하나 이상의 ASO 또는 본 개시내용의 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하여 대상체 중 바이러스의 바이러스 부하를 감소시키고 및/또는 대상체 중 바이러스 항원의 수준을 감소시키는 것을 포함하는 바이러스로 감염된 대상체의 HBV 바이러스를 치료하는 방법을 포함한다. ASO는 바이러스의 표적 RNA의 일부, 예를 들어, HBV의 제2 X 영역 및/또는 S 영역에 상보적이거나 혼성화할 수 있다.

[0088] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 변형된 올리고뉴클레오타이드는 HBV 및/또는 HDV 복제를 치료 및/또는 저해하기 위한 하나 이상의 추가 작용제(들)와 조합으로 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 화합물(예를 들어, ASO)이 추가 작용제와 공동투여되는 경우, 유효량은 화합물이 단독으로 사용될 때보다 적을 수 있다. 추가 작용제로는 인터페론, 뉴클레오사이드/뉴클레오타이드 유사체, 캡시드 어셈블리 조절제(CAM), siRNA, 기타 ASO, 핵산 중합체 또는 S-항원 수송-저해 올리고뉴클레오타이드 중합체(NAP 또는 STOPS), 진입 억제제 및/또는 소분자 면역조절제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 추가 작용제의 예로는 ALG-010133, ALG-000184, 제조함 인터페론 알파 2b, IFN-a, PEG-IFN-a-2a, 라미부딘, 텔비부딘, 아데포비어 디피복실, 클레부딘, 엔테카비어, 테노포비어, 알라페나미드, 테노포비어 다이소프록실, NVR3-778, BAY41-4109, JNJ-632, JNJ-3989(ARO-HBV), RG6004, GSK3228836, REP-2139, REP-2165, AB-729, VIR-2218, DCR-HBVS, JNJ-6379, GLS4, ABI-H0731, JNJ-440, NZ-4, RG7907, EDP-514, AB-423, AB-506, ABI-H03733 및 ABI-H2158을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 임의의 ASO는 STOPS 중 하나와 공동투여된다. 예시적인 STOPS는 국제 공개 번호 WO2020/097342 및 미국 공개 번호 2020/0147124에 기술되어 있으며, 이 둘 모두는 전체가 참고로 포함된다. 일부 실시형태에서, STOP은 ALG-010133이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 임의의 ASO는 테노포비어와 공동투여된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 임의의 ASO는 CAM과 공동투여된다. 예시적인 CAM은 문헌[Berke et al., *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(8):e00560-17, Klumpp, et al., *Gastroenterology*, 2018, 154(3):652-662.e8], 국제 출원 번호 PCT/US2020/017974, PCT/US2020/026116, PCT/US2020/028349 및 미국 출원 번호 16/789,298, 16/837,515, 및 16/849,851에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전문이 참고로 포함된다. 일부 실시형태에서, CAM은 ALG-000184, ALG-001075, ALG-001024, JNJ-632, BAY41-4109, 또는 NVR3-778이다. 일부 실시형태에서, ASO 및 추가 작용제는 동시에 투여된다. 일부 실시형태에서, ASO 및 추가 작용제는 순차적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, ASO는 추가 작용제를 투여하기 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, ASO는 추가 작용제를 투여한 후에 투여된다.

[0089] 정의

[0090] 특정 범위는 본 명세서에서 "약"이라는 용어가 선행되는 수치 값에 의해 제시된다. "약"이라는 용어는 이것이 선행하는 정확한 수에 대한 문자 그대로의 지지뿐만 아니라 이 용어가 선행하는 수에 근접하거나 근사치인 수를

제공하기 위해 본 명세서에 사용된다. 수가 구체적으로 언급된 숫자에 근접하거나 근사치인지 여부를 결정할 때, 언급되지 않은 근접한 또는 근사치인 수는 이것이 제시된 문맥에서 구체적으로 언급된 수의 실질적인 등가물을 제공하는 수일 수 있다.

[0091] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 또한 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있을지라도, 대표적인 예시적 방법 및 물질이 이제 설명된다.

[0092] 값의 범위가 제공되는 경우, 그 범위의 상한 및 하한 사이에서 문맥이 달리 분명하게 명시하지 않는 한 하한 단위의 1/10까지의 각 개재 값 및 그 언급된 범위에서의 임의의 다른 언급된 또는 개재 값도 본 발명의 범위 내에 포괄되는 것으로 이해한다. 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한은 더 적은 범위에 독립적으로 포함될 수 있고, 또한 언급된 범위 중 임의의 구체적으로 배제된 한계를 조건으로, 본 발명 내에 포괄된다. 언급된 범위가 그 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 포함된 한계 중 어느 하나 또는 둘 모두를 배제하는 범위도 본 발명에 포함된다.

[0093] 본 개시내용은 기술된 특정 실시형태에 제한되지 않으며, 그 자체가 변동될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어들은 특정 실시형태를 설명할 목적만인 것으로서, 첨부된 특허청구범위에 의해서만 본 발명의 범위가 제한될 것이기 때문에, 제한하려고 의도된 것이 아님을 이해해야 한다.

[0094] 본 개시내용을 읽으면 본 기술분야의 기술자에게 명백해지는 것으로서, 본 명세서에 기술되고 예시된 개별 실시양태는 각각 본 발명의 범위 또는 사상에서 벗어남이 없이 임의의 다른 여러 실시양태의 특징들과 쉽게 분리되거나 조합될 수 있는 별도의 구성요소 및 특징을 갖는다. 임의의 언급된 방법은 언급된 이벤트의 순서대로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서대로 수행될 수 있다.

[0095] 본 명세서에 인용된 모든 간행물 및 특허는 각각의 개별 간행물 또는 특허가 참고로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시되었을지라도 본 명세서에 참고로 포함되며, 간행물이 인용된 것과 연관된 방법 및/또는 재료를 개시 및 기술하기 위해 본 명세서에 참고로 포함된다. 임의의 간행물의 인용은 출원일 이전의 개시내용에 대한 것이며, 본 발명이 선행 발명으로 인해 그러한 간행물보다 선행할 자격이 없음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 또한, 제공되는 공개일은 독자적으로 확인해야 하는 실제 공개일과 다를 수 있다.

[0096] **실시예**

[0097] 하기 실시예는 본 개시내용을 실시하는데 있어서 본 기술분야의 기술자를 돕기 위해 본 개시내용의 특정 실시형태를 예시한다. 따라서, 실시예는 본 개시내용의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0098] **실시예 1: ASO 합성**

[0099] 꺾머 ASO 서열

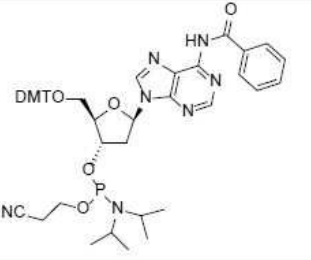
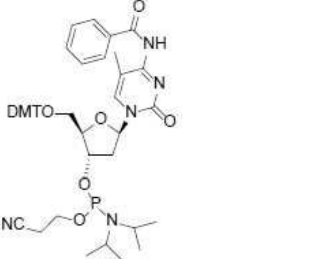
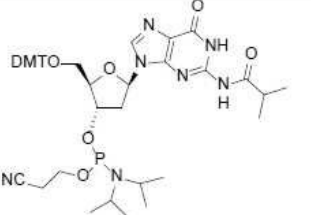
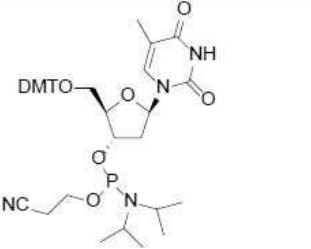
[0100] DNA, 2'-O-Me, 2'-MOE 및 LNA 포스포아미다이트 단량체는 상업적으로 이용 가능한 출처(Hongene Biotech USA Inc.)에서 구했다. 모든 단량체는 건조제(P₂O₅, RT 24h)가 있는 진공 데시케이터에서 건조했다. 부착된 범용 고체 지지체(CPG)는 ChemGenes Corporation에서 입수했다. 합성 작업흐름을 위한 화학 물질 및 용매는 VWR/Sigma 상용 출처에서 구입했으며 임의의 정제 또는 처리 없이 사용했다. 용매(아세트나이트릴) 및 용액(아미다이트 및 활성화제)은 합성 동안 분자체 상에서 보관했다.

[0101] 대조군 및 표적 올리고뉴클레오타이드 서열은 몇 가지 대기 단계 및 수정된 커플링 단계에 대한 수정과 함께 제조업체에 의해 작성된 표준 사이클을 사용하여 Expedite 8909 합성기에서 합성했다. 고체 지지체는 제어된 기공 유리였고 단량체는 표준 보호기를 함유했다. 각 키메라 올리고뉴클레오타이드는 상업적으로 이용가능한 5'-O-(4,4'-다이메톡시트리틸)-3'-O-(2-시아노에틸-N,N-다이아이소프로필) DNA, 2'-OMe, 2'-MOE 및 또는 6-N-벤조일 아데노신(A^{Bz}), 4-N-아세틸시티딘(C^{Ac}), 2-N-아이소부틸릴구아노신(G^{Ibu}) 및 우리딘(U) 또는 티미딘(T)의 LNA 포스포아미다이트 단량체를 사용하여 표준 고체상 포스포아미다이트 합성 프로토콜에 따라 개별적으로 합성했다. 2'-O-Me-2,6-다이아미노퓨린 포스포아미다이트는 Glen Research에서 구입했다. 포스포아미다이트는 무수 아세트나이트릴에 0.1M 용액으로 제조했다. 5-에틸티오테트라졸은 활성화제로 사용했고, 다이클로로메탄 중 3% 다이클로로아세트산은 탈트리틸화에 사용했으며, THF 중 아세트산 무수물 및 THF 중 16% N-메틸이미다졸은 커플링에 사용했고, DDTT((다이메틸아미노-메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-다이티아졸린-3-티온은 올리고리보뉴클레오타이드 포스포로티오에이트의 합성을 위한 황 전달제로서 사용했다. 5-(에틸티오)-1H-테트라졸 활성화제의 존재하에

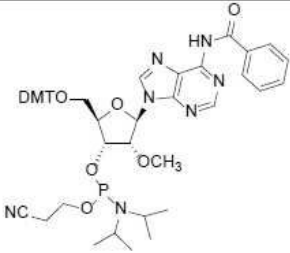
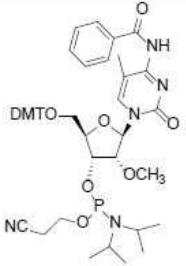
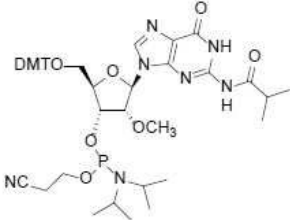
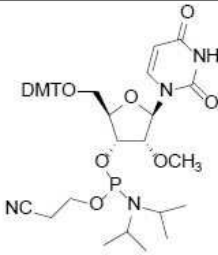
CH₃CN 중 포스포아미다이트의 0.1M 용액을 고체 결합된 올리고뉴클레오타이드에 연장 커플링시킨 후, 연장 캡핑, 산화 및 탈보호를 통해 변형된 올리고뉴클레오타이드를 제공했다. 모든 변형된 포스포아미다이트의 단계적 커플링 효율은 98.5% 초과였다.

[0102] 범용 링커가 사용되었을 때, 고체 지지체로부터의 탈보호 및 절단은 65°C에서 15분 동안 암모니아 메틸아민 (1:1, AMA)의 혼합물을 사용하여 달성하였고, 탈보호는 65°C에서 90분 동안 탈보호를 방치하거나 또는 고체 지지체를 암모니아 수용액(28%)과 55°C에서 8시간 동안 가열하여 염기 불안정 보호기를 탈보호화했다.

[0103] 고체 지지체를 제거하기 위해 여과한 후, 탈보호 용액은 GeneVac 원심 증발기에서 진공하에 제거했다.

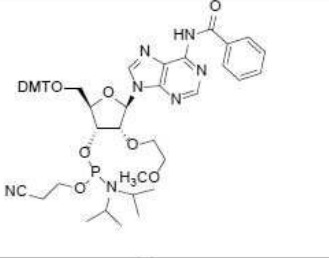
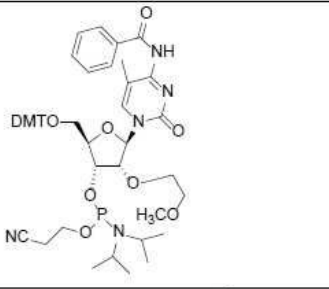
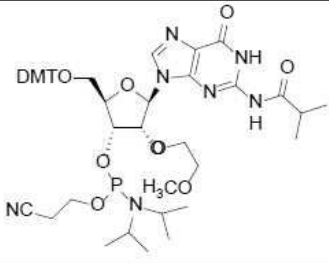
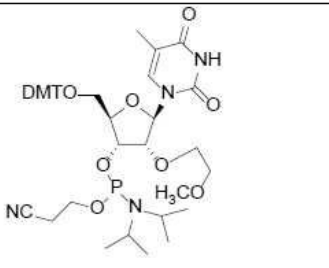
dA 포스포아미다이트	
(5-Me)-dC 포스포아미다이트	
dG 포스포아미다이트	
dT 포스포아미다이트	

[0104]

<p>2'-OMe-A 포스포아미다이트</p>	
<p>2'-OMe-(5m)C 포스포아미다이트</p>	
<p>2'-OMe-G 포스포아미다이트</p>	
<p>2'-OMe-U 포스포아미다이트</p>	

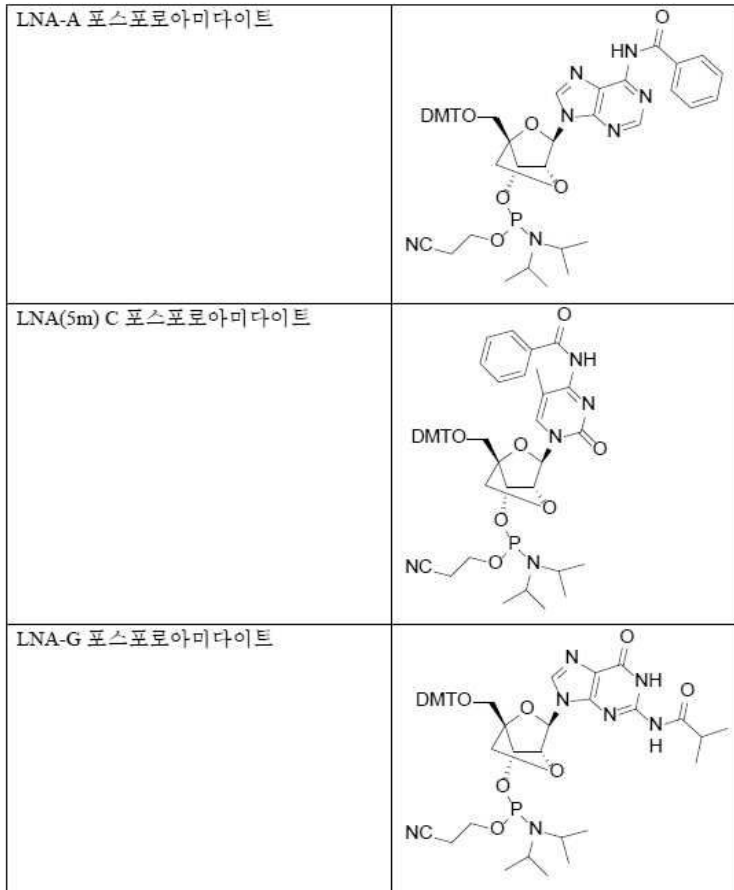
[0105]

2'-MOE 포스포로아미다이트

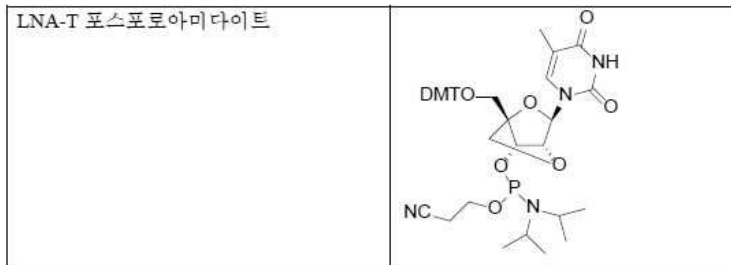
<p>2'-MOE-A 포스포로아미다이트</p>	
<p>2'-MOE (5m) C 포스포로아미다이트</p>	
<p>2'-MOE-G 포스포로아미다이트</p>	
<p>2'-MOE-T 포스포로아미다이트</p>	

[0106]

잠금 핵산 (LNA) 포스포로아미다이트



[0107]



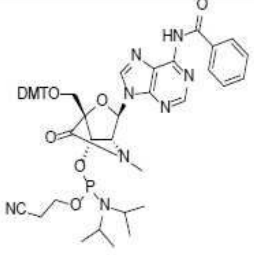
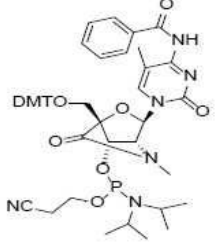
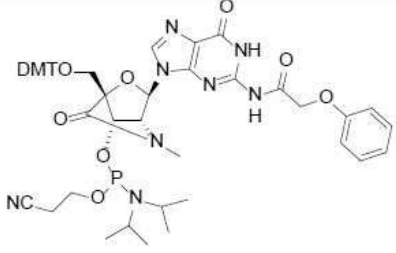
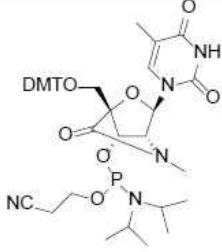
[0108]

[0109] 변형된 캡머 서열

[0110] AmNA(N-Me)-T, AmNA(N-Me)-4-*N*-벤조일(5m) 시티딘((5m)^{C^{Bz}}), AmNA(N-Me)-4-*N*-벤조일시티딘(A^{Bz}), 및 AmNA(N-Me)-2-*N*-pac(G^{pac})은 Luxna Biotech에서 구입한 반면, scp-BNA-T, scp-BNA-6-*N*-벤조일아데노신(A^{Bz}), scp-BNA-4-*N*-벤조일-5 메틸 시티딘((5m)^{C^{Bz}}), scp-BNA-2-*N*-이구아노신(G^{iBu}) 포스포아미다이트 단량체는 문헌(Takao Yamaguchi, Masahiko Horiba and Satoshi Obika; *Chem. Commun.*, 2015, 51, 9737-9740; Masahiko Horiba, Takao Yamaguchi, and Satoshi Obika; *Journal of Organic Chemistry*, 2016, 81, 11000-11008)에 기술된 절차에 따라 합성했다. 모든 단량체는 건조제(KOH 및 P₂O₅, 실온에서 24시간 동안)가 있는 진공 데시케이터에서 건조했다. AmNA(N-Me)-PS-DNA-PS 변형 및 scp-BNA-PS-DNA-PS 변형의 경우에, 합성은 0.3M 5-(벤질티오)-1H-테트라졸 활성화제(커플링 시간 16분)의 존재 하에 무수 CH₃CN에 0.12M의 농도로 희석된 포스포아미다이트 단량체를 가지고 고체 결합된 올리고뉴클레오타이드에 대해 3'에서 5' 방향으로 1 μM 규모로 수행한 뒤, 변형 캡핑, 산화, 및 탈보호를 통해 변형된 올리고뉴클레오타이드를 제공하였다. 모든 변형된 포스포아미다이트의 단계적 커플링 효율은 97% 초과였다. DDTT(다이메틸아미노-메틸리덴)아미노-3H-1,2,4-다이티아자올란-3-티온은 올리고리보뉴클레오타이드 포스포로티오에이트 합성을 위한 황 전달체로 사용했다. 올리고뉴클레오타이드 보유 고체 지지체는 아세트나이트릴 중 20% DEA 용액으로 15분 동안 세척한 다음, 컬럼을 MeCN으로 철저히 세척하였다. 지지

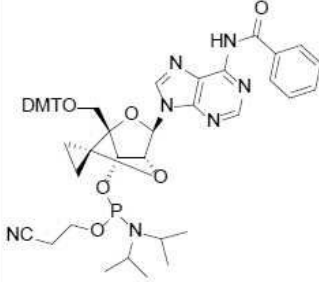
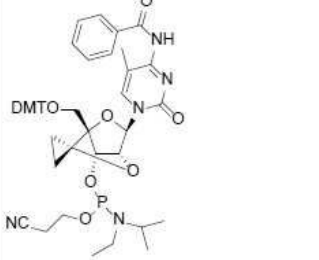
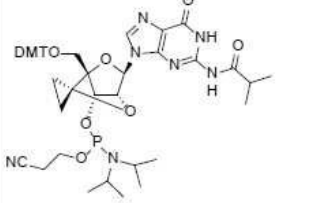
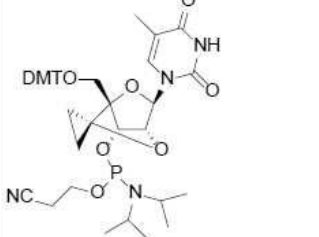
체를 다이아이소프로필아민:물:메탄올(1:1:2)과 함께 열 블록에서 65℃에서 8시간 동안 가열하여 지지체로부터 절단하여 염기 불안정 보호기를 탈보호화했다.

AmNA (N-Me) 단량체

AmNA-NCH ₃ -A 포스포로아미다이트	
AmNA-NCH ₃ -(5m)C 포스포로아미다이트	
AmNA-NCH ₃ -G 포스포로아미다이트	
AmNA-NCH ₃ -T 포스포로아미다이트	

[0111]

scp-BNA 단량체

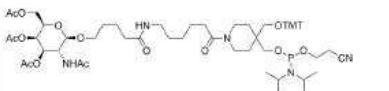
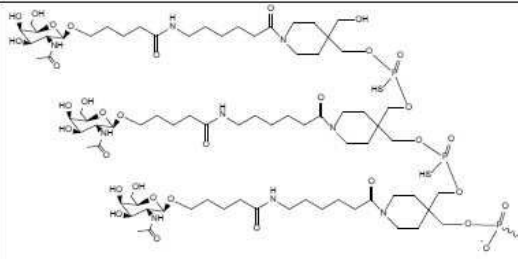
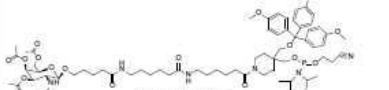
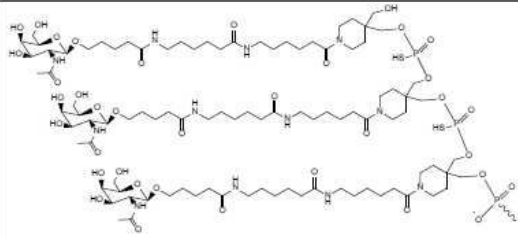
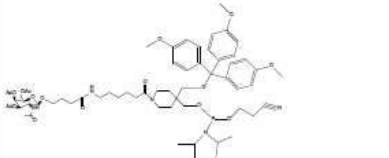
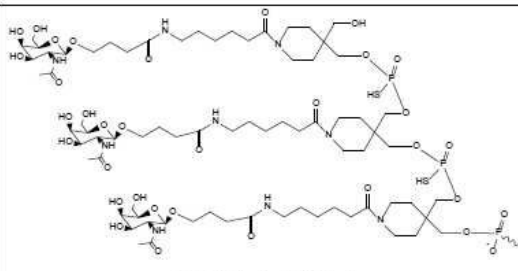
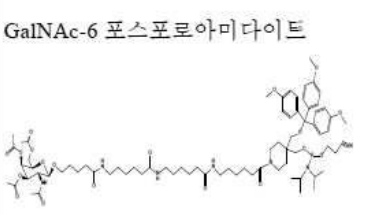
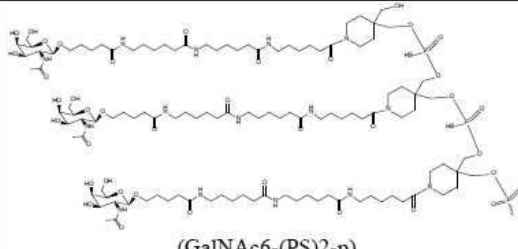
<p>scp-BNA-A 포스포로아미다이트</p>	
<p>scp-BNA-(5m)C 포스포로아미다이트</p>	
<p>scp-BNA-G 포스포로아미다이트</p>	
<p>scp-BNA-T 포스포로아미다이트</p>	

[0112]

[0113]

5' 및 3'-GalNAc 접합된 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어, 이하에 기재된 바와 같이, 다양한 길이의 GalNAc 모이어티로 합성하였다. GalNAc3, GalNAc4, GalNAc5 및 GalNAc6은 이하에 기재되는 바와 동일한 방식으로 1, 2 또는 3개의 모이어티로 합성 동안 올리고뉴클레오타이드에 접합시켰다. 또한, 본 명세서에서 앞서 기술한 GalNAc-1 및 GalNAc-2와 같은 추가 GalNAc 모이어티는 합성후 접합을 사용하여 5' 및 3'-GalNAc를 형성하는 데 사용된다.

GalNAc 포스포로아미다이트

GalNAc 빌딩 블록	올리고에 부착 후 (명명법)
<p>GalNAc-3 포스포로아미다이트</p> 	 <p>(GalNAc3-(PS)2-p)</p>
<p>GalNAc-4 포스포로아미다이트</p> 	 <p>(GalNAc4-(PS)2-p)</p>
<p>GalNAc-5 포스포로아미다이트</p> 	 <p>(GalNAc5-(PS)2-p)</p>
<p>GalNAc-6 포스포로아미다이트</p> 	 <p>(GalNAc6-(PS)2-p)</p>

[0114]

[0115]

[0116]

미정제 올리고머의 정량 또는 원료 분석

[0117]

샘플을 탈이온수(1.0ml)에 용해시키고 다음과 같이 정량하였다: 먼저 물 단독을 가지고 블랭크화를 Nanodrop UV 분광광도계에서 수행하였다. Nano Drop 장비는 다중 경로 길이(multiple path length)를 사용하여 광범위한 농도 범위의 핵산을 측정할 수 있다. 가장 정확한 정량 결과는 희석된 올리고뉴클레오타이드를 260 nm에서 흡광도로 측정함으로써 달성할 수 있다. 미정제 물질은 -20°C에 보관한다.

[0118]

미정제물 HPLC/LC-MS 분석

[0119]

미정제 샘플의 0.1 OD는 미정제 MS 분석에 사용하였다. 미정제 LC-MS 데이터를 확인한 후, 정제 단계를 수행하였다.

[0120]

HPLC 정제

[0121]

포스포다이에스터(PO), 포스포로티오에이트(PS) 및 키메라 변형된 올리고뉴클레오타이드는 음이온 교환 HPLC로 정제하였다. 완충액은 10% CH₃CN 중 20mM 인산나트륨, pH 8.5(완충액 A) 및 10% CH₃CN 중 20mM 인산나트륨,

1.8M NaBr, pH 8.5(완충액 B)였다. 전체 길이의 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 분획을 풀링하고, 탈염 및 동결건조시켰다.

[0122] 지질 접합된 올리고뉴클레오타이드는 사내 패킹된 RPC-Source15 역상 컬럼에 의해 정제하였다. 완충액은 10% CH₃CN 중 20mM 아세트산나트륨(완충액 A) 및 CH₃CN(완충액 B)이었다. 전체 길이의 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 분획을 풀링하고, 탈염 및 동결건조시켰다.

[0123] 정제된 올리고머의 탈염

[0124] 정제된 건조 올리고머는 이후 Sephadex G-25 M(Amersham Biosciences)을 사용하여 탈염시켰다. 카트리지는 10 ml의 탈이온수로 3회 상태조정했다. 2.5ml 탈이온수에 철저히 용해된 정제된 올리고뉴클레오타이드를 매우 천천히 적가 용출에 의해 카트리지에 적용했다. 무염 올리고머는 3.5ml 탈이온수를 이용하여 스크류 캡 바이알 내로 직접 용출시켰다.

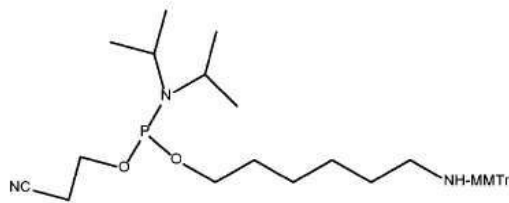
[0125] 최종 HPLC 및 전기분무 LC/MS 분석

[0126] 약 0.10 OD의 올리고머를 물에 용해시킨 다음, IEX-HPLC 및 LC/MS 분석을 위한 특수 바이알에 피펫팅한다. 분석용 HPLC 및 ES LC-MS로 키메라 올리고뉴클레오타이드의 무결성을 입증하였다.

[0127] 올리고뉴클레오타이드에 대한 GalNAc 에스터의 합성 후 접합

[0128] 5'-C6-아미노 전구체 합성

[0129] 범용 지지체(로딩 65 μmol/g)를 사용하여 서열을 10 μmol 규모로 합성하였다. 5'-말단에 C6-NH₂ 링커를 도입시키기 위해 0.1M 아세트나이트릴 중 6-(4-모노메톡시트리틸아미노)헥실-(2-시아노에틸)-(N,N-다이아이소프로필)-포스포아미다이트를 커플링 시간 10분으로 사용했다. 올리고뉴클레오타이드-보유 고체 지지체는 진탕기에서 암모니아/메틸아민(1:1) 수용액과 3시간 동안 실온에서 가열하여 지지체로부터 절단시켜 염기 불안정 보호기를 탈보호화했다. IEX 정제 및 탈염 후, C6-NH₂ 변형된 ASO는 합성 후 접합을 수행하는데 사용하였다.

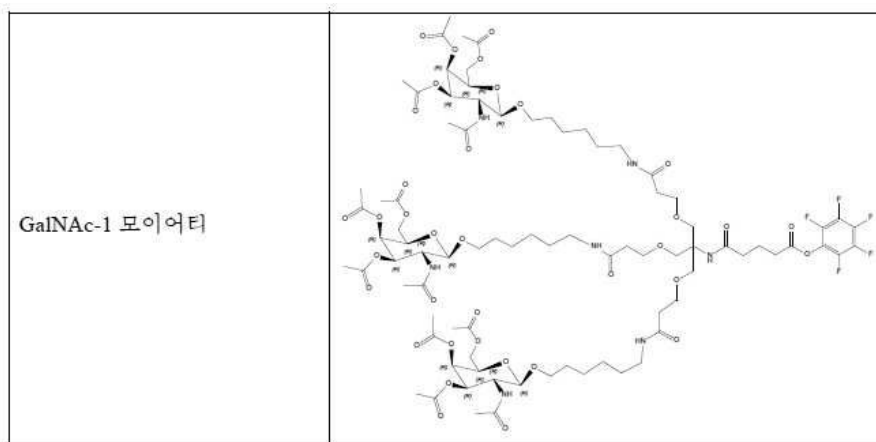


5'-아미노-변형제 C6

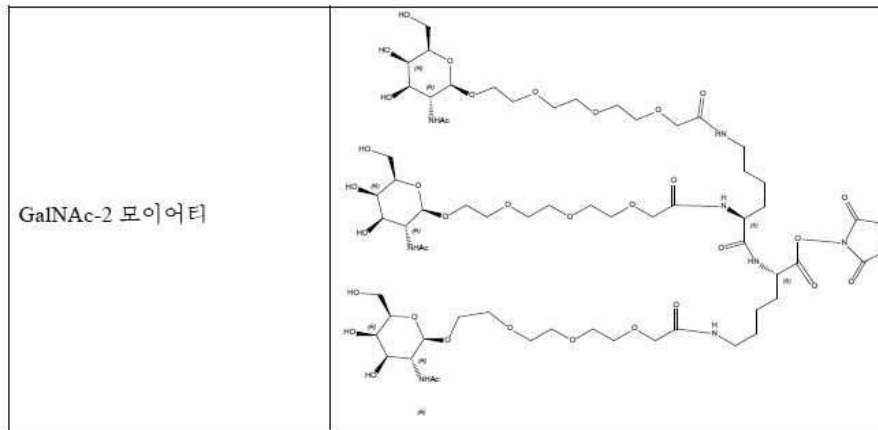
6-(4-모노메톡시트리틸아미노)헥실-(2-시아노에틸)-(N,N-다이아이소프로필)-포스포아미다이트

[0130]

[0131] 접합을 위한 GalNAc 에스터



[0132]



[0133]

[0134]

5'-GalNAc 합성의 합성 후 정제

[0135]

5'-C6-NH₂ 변형된 서열은 0.2M 중탄산나트륨 완충액, pH 8.5(0.015mM)에 용해시키고, DMSO에 용해된 5 내지 7 몰 당량의 GalNAc 에스터를 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 임의의 미반응 아미노 변형된 ASO가 존재하는지 확인하기 위해 샘플을 분석했다. 여기에 암모니아 수용액(28 wt%)을 첨가했고(5x 반응 부피), 실온에서 2-3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축하고 잔류물을 물에 용해시키고 강 음이온 교환 컬럼 상에서 HPLC로 정제하였다.

[0136]

실시예 2. HBsAg 방출 검정 프로토콜(HepG2.2.15)

[0137]

HepG2.2.15 세포(4개의 통합된 HBV 게놈을 갖는 안정한 세포주)를 10% 소 태아 혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1% 글루타민, 1% 비펩수 아미노산, 1% 피루브산 나트륨 및 250 µg/ml G418을 함유한 DMEM 배지에서 유지시켰다. 세포는 5% CO₂ 대기에서 37°C로 유지시켰다. HBsAg 방출 검정을 위해, 검정 배지를 제조했다: 5% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1% 글루타민 및 1% DMSO를 함유한 DMEM. 분석 전날, 트립신처리된 HepG2.2.15 세포를 검정 배지로 1회 세척하고, 250g x 5분 회전시키고, 검정 배지에 재현탁시키고, 콜라겐 코팅된 96웰 평판 중 검정 배지에서 50,000/웰로 세포를 접종했다. 다음 날, ASO는 Opti-MEM, 9pt, 3배 희석율로 희석하고, 리포펙타민 RNAiMAX(Invitrogen)를 제조업체 설명서에 따라 희석했다. ASO 희석액과 RNAiMAX 희석액을 혼합하여 실온에서 5분간 방치한 후, 96웰 평판의 각 웰에 15µl씩 첨가하였다. 평판은 인큐베이터에서 5% CO₂, 37°C 하에 5일 동안 방치했다. 항원처리 후, 상청액을 수확하고 ELISA 키트(Diasino)를 사용하여 HBsAg를 측정했다. 세포 생존율은 CellTiter-Glo(Promega)로 측정하였다. 미처리 세포 대조군에 상대적으로, HBsAg 분비를 50% 감소시키는 데 필요한 약물의 농도인 EC₅₀을 Prism Graphpad를 사용하여 계산했다. 미처리 세포 대조군에 상대적으로, 세포 생존율을 50% 감소시키는 데 필요한 약물의 농도인 CC₅₀은 동일한 소프트웨어로 계산했다.

[0138]

표 1의 화합물에 대한 결과적으로 생성된 EC₅₀ 및 CC₅₀은 하기 표 2에 제시된다. EC₅₀ 값은 다음과 같다: A: < 0.1 nM, B: 0.1 nM 내지 1 nM, C: 1 내지 10 nM.

표 2

ASO 번호	HBsAg 방출 검정	
	HepG2.2.15 HBsAg 방출 검정 EC ₅₀	HepG2.2.15 세포 생존력 CC ₅₀ nM
1	A	> 10
2	A	> 10
3	A	> 10
4	A	> 10
5	B	> 10
6	B	> 10
7	B	> 10
8	B	> 10
9	B	> 10
10	B	> 10
11	B	> 10
12	B	> 10
13	B	> 10
14	B	> 10
15	B	> 10
16	B	> 10
17	B	> 10
18	B	> 10
19	B	> 10
20	B	> 10
21	B	> 10
22	B	> 10
23	B	> 10
24	B	> 10
25	B	> 10
26	B	> 10
27	B	> 10
28	B	> 10
29	B	> 10
30	B	> 10
31	B	> 10
32	B	> 10
33	B	> 10
34	B	> 10
35	B	> 10
36	B	> 10
37	B	> 10
38	B	> 10
39	B	> 10
40	B	> 10
41	B	> 10

[0139]

HBsAg 방출 검정		
ASO 번호	HepG2.2.15 HBsAg 방출 검정 EC ₅₀	HepG2.2.15 세포 생존력 CC ₅₀ nM
42	B	>10
43	B	>10
44	B	>10
45	B	>10
46	B	>10
47	B	>10
48	B	>10
49	B	>10
50	B	>10
51	B	>10
52	B	>10
53	C	>10
54	C	>10
55	C	>10
56	C	>10
57	C	>10
58	C	>10
59	C	>10
60	C	>10
61	C	>10
62	C	>10
63	C	>10
64	C	>10
65	C	>10
66	C	>10
67	C	>10
68	C	>10
69	C	>10
70	C	>10
71	C	>10
72	C	>10
73	C	>10
74	C	>10
75	C	>10
76	C	>10
77	C	>10
78	C	>10
79	C	>10
80	C	>10
81	C	>10
82	C	>10
83	C	>10
84	C	>10

[0140]

HBsAg 방출 검정		
ASO 번호	HepG2.2.15 HBsAg 방출 검정 EC ₅₀	HepG2.2.15 세포 생존력 CC ₅₀ nM
85	C	>10
86	C	>10
87	C	>10
88	C	>10
89	B	>10
90	C	>10
91	C	>10
92	B	>10
93	C	>10
94	C	>10

[0141]

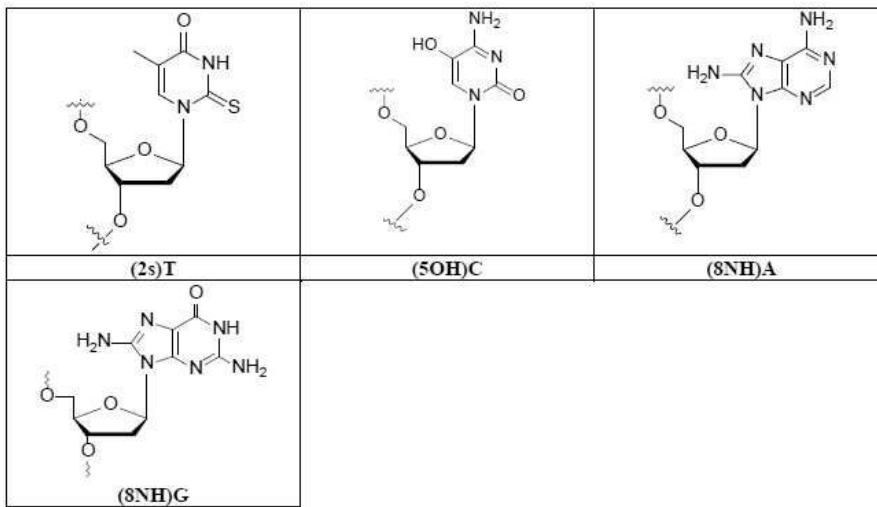
[0142] 표 2A

1x5mg/kg 에 의한 혈청 HBsAg Log 감소 (최저치)

서열 번호	ASO 번호	서열 5'에서 3'	위치, 길이 및 구조	혈청 HBsAg
118	116	5'InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	1432_17mer_3-10-4	B
119	117	5'InGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1580_16mer_3-10-3	B
120	118	5'In(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	1576_17mer_4-10-3	B
121	119	5'InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsCpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	1431_17mer_5-8-4	C

[0143]

[0144] 표 2A에서 볼드체의 뉴클레오사이드는 다음 변형을 함유한다:



[0145]

[0146] 실시예 3. AAV-HBV 마우스 모델에서 GalNAc ASO 테스트

[0147]

AAV/HBV는 복제가가능한 HBV 게놈을 운반하는 재조합 AAV이다. 유전자형 8 AAV의 고도의 간지향적 특성을 이용하면 HBV 게놈은 마우스 간 세포로 효율적으로 전달될 수 있다. AAV/HBV에 의한 면역 적격(competent) 마우스의 감염은 환자의 만성 HBV 감염을 모방하는 장기간 HBV 바이러스혈증을 초래할 수 있다. AAV/HBV 모델을 사용하여 다양한 유형의 항-HBV 작용제의 생체내 활성을 평가하였다. 연구 -28일째에 마우스를 AAV-HBV로 감염시켰다. 테스트 물품 또는 음성 대조군(PBS)은 0일째에 5 mg/kg의 단일 용량으로, 또는 0일째에 10 mg/kg의 단일 용량으로; 또는 주 1회(QW) 3×10 mg/kg; 또는 3일마다(Q3D) 3×10mg/kg; 또는 Q3D 5×10mg/kg; 또는 0, 3, 7, 14, 21, 28일째에 3 mg/kg씩 6회 용량; 또는 0, 3, 7, 14, 21, 28일째에 10 mg/kg씩 6회 용량으로 피하 투여했다(달리 명시되지 않는 한). 연속 혈액 수집은 0, 5, 10 및 15일에 5일마다 수행했고; 또는 각 연구 설계에 따라 더 긴 기간 동안 수행했다. 혈청 HBV S 항원(HBsAg), E 항원(HBeAg) 및 ALT는 다음 방법을 통해 검정했다:

[0148]

파라미터	장치	시약
HBsAg	ARCHITECT i2000 (Abbott Laboratories, Lake Bluff, 미국 일리노이주)	HBsAg Reagent Kit (Abbott Ireland Diagnostics Division, Finisklin Business Park Sligo, IRL) Catalog: 6C36 / 08P08
HBeAg	ARCHITECT i2000 (Abbott Laboratories, Lake Bluff, 미국 일리노이주)	HBeAg Reagent Kit (Abbott GmbH & Co. KG, 독일 비스바덴) Catalog: 6C32 / 07P64
알라닌 아미노전이효소 (ALT)	Roche Cobas 6000 c501 Chemistry Analyzer (Roche Diagnostics, 독일 만하임)	Alanine Aminotransferase acc. to IFCC (Roche Diagnostics, 독일 만하임) Catalog: ACN 685

[0149] 연구 동안 결과적으로 수득되는 혈청 HBsAg의 최저 log₁₀ 감소는 다음 표에 제시되며, 여기서 A는 ≥1 log₁₀ HBsAg 감소, B는 0.5 내지 1 log₁₀ HBsAg 감소, 및 C는 <0.5 log₁₀ HBsAg 감소이다.

표 3

1x5 mg/kg ASO 로 처리된 마우스의 혈청 HBsAg Log 감소 (최저치)				
서열 번호	ASO 번호	서열 5'에서 3'로	위치, 길이 및 구조	혈청 HBsAg
122	95	5'-GalNAc1-C6-p-InGpslnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	1432_16mer_4-9-3	B
123	96	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnTpslnGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	1580_15mer_3+9+3	C
124	97	5'-GalNAc1-C6-p-InApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)mCpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1576_16mer_4-8-4	B
125	98	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	1431_17mer_3-10-4	A
126	99	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApslnGpslnTpslnG 3'	1582_16mer_3-10-3	B
127	100	5'-GalNAc3-(PS)2-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnAps(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	246_17mer_3-10-4	A
128	101	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'	1575_15mer_3-10-2	B
129	102	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	1432_17mer_4-9-4	C
130	103	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)C 3'	1581_15mer_3-10-2	B
131	104	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnG 3'	1576_15mer_3-10-2	B
132	105	5'-GalNAc3-(PS)2-p--InApslnGpslnGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnG 3'	1582_15mer_3-10-2	A
133	106	5'-GalNAc5-(PS)2-p-po-InApslnGpslnGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpslnTpslnGpslnG 3'	1517_15mer_3-9-3	A
134	107	5'-GalNAc1-C6-p-CA-InGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1433_16mer_3-10-3	A
135	108	5'-GalNAc1-C6-p-CA-	1519_16mer	A

[0150]

1x5 mg/kg ASO 로 처리된 마우스의 혈청 HBsAg Log 감소 (최저치)				
서열 번호	ASO 번호	서열 5'에서 3'로	위치, 길이 및 구조	혈청 HBsAg
		lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'	er_3-10-3	
136	109	5'-GalNAc1-C6-p-CA- lnApslnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)C 3'	1581_16mer_4-9-3	A
137	110	5'-GalNAc1-C6-p-CA- lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	1580_16mer_3-9-4	A
138	111	5'-GalNAc1-C6-p-CA- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'	191_16mer_4-8-4	A
139	112	5'-GalNAc1-C6-p-CA- lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	381_17mer_5-8-4	A
140	113	5'-GalNAc1-C6-p-CA- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	246_17mer_4-10-3	A
141	114	5'-GalNAc1-C6-p-CA- ln(5m)CpslnApsln(5m)Cpsln(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApsGpslnApsln(5m)CpslnT 3'	245_17mer_4-10-3	A
142	115	5'-GalNAc1-C6-p-CA- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'	191_16mer_3-9-4	A
143	108A	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'	1519_16mer_3-10-3	
144	108B	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsAmT 3'	1519_16mer_3-10-3	
145	108C	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsAm(5m)CpslnGpslnT 3'	1519_16mer_3-10-3	
146	108D	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsscpT 3'	1519_16mer_3-10-3	
147	108E	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)scpCpslnGpslnT 3'	1519_16mer_3-10-3	
148	107A	5'-GalNAc6-(PS)2-p- lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	1433_16mer_3-10-3	
149	107B	5'-GalNAc6-(PS)2-p- lnGpslnGpslnAps(2s)TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(1433_16mer_3-10-3	

[0151]

표 4

ASO 조합에 대한 HBsAg 검정			
ASO 번호	EC ₅₀ nM	CC ₅₀ nM	위치_길이_구조
8	C	> 10	1527_17mer_4-10-3
30	C	> 10	1431_17mer_4-9-4
50% ASO 8 + 50% ASO 30	A	>10	
ASO 번호	EC ₅₀ nM	CC ₅₀ nM	위치_길이_구조
8	C	> 10	1527_17mer_4-10-3
7	B	> 10	1432_16mer_4-9-3
50% ASO 8 + 50% ASO 7	A	>10	
ASO 번호	EC ₅₀ nM	CC ₅₀ nM	위치_길이_구조
8	C	> 10	1527_17mer_4-10-3
9	C	> 10	1431_17mer_3-10-4
50% ASO 8 + 50% ASO 9	A	>10	
ASO 번호	EC ₅₀ nM	CC ₅₀ nM	위치_길이_구조
5	A	> 10	1582_16mer_4-9-3
7	B	> 10	1432_16mer_4-9-3
50% ASO 5 + 50% ASO 7	B (7 단독보다 적은)	>10	
ASO 번호	EC ₅₀ nM	CC ₅₀ nM	위치_길이_구조
40	C	> 10	246_17mer_3-10-4
1	A	> 10	1527_16mer_3-10-3
50% ASO 40 + 50% ASO 1	A (1 단독보다 적은)	10	

[0155]

[0156] 실시예 5. 점 변형을 갖는 AAV-HBV 마우스 모델에서 변형된 ASO 테스트

[0157]

LNA 및 BNA 화학물질을 갖는 ASO는 표준 포스포아미다이트 화학물질을 사용하여 ABI 394 및 Expedite 8909 합성기에서 합성했다. LNA ASO의 시험관내 스크리닝은 HBsAg 방출 검정을 사용하여 HepG2.2.15 세포에서 수행했다. 강력한 LNA 함유 ASO를 N-아세틸갈락토사민(GalNac) 접합을 위해 선택했고 아데노 관련 바이러스(AAV)-HBV 마우스 모델에서 3일마다 3×10mg/kg로 테스트했다. BNA wing 변형을 적용했고, 이의 전체-LNA ASO와 비교했다. 표 5는 ASO 108과 비교된 3×10mg/kg QW에 의한 HBsAg 최저치(Nadir)를 보여준다. HBx를 포함하는 모든 HBV 전사체를 표적으로 하는 HBx 영역 중 이러한 LNA 함유 ASO에서, wing의 5-메틸 LNA C를 5-메틸 스피로사이클로프로필 C로 단일 교체한 결과, 혈청 알라닌 아미노전이효소(ALT)를 3배 감소시키면서 HBsAg의 최하치를 0.5 Log₁₀ IU/ml 개선시켰다.

표 5

HBsAg 최저치		
ASO 번호	3x10mg/kg QW에 의한 HBsAg 최저치	3x10mg/kg QW에 의한 Max ALT
108A	1 log 이하	611 U/ℓ
108B	0.97 log 이하	629 U/ℓ
108C	1.25 log 이하	488 U/ℓ
108D	1.17 log 이하	272 U/ℓ
108E	1.44 log 이하	243 U/ℓ

[0158]

[0159]

LNA 및 갭-변형된 화학물질을 갖는 ASO는 표준 포스포아미다이트 화학물질을 사용하여 ABI 394 및 Expedite 8909 합성기에서 합성하였다. LNA ASO의 시험관내 스크리닝은 HBsAg 방출 검정을 사용하여 HepG2.2.15 세포에서 수행했다. 강력한 LNA 함유 ASO는 N-아세틸갈락토사민(GalNac) 접합을 위해 선택했고, 아데노 관련 바이러스(AAV)-HBV 마우스 모델에서 3×10 mg/kg로 3일마다 테스트했다. 핵염기 갭 변형을 적용했고 ASO 107과 비교했다. 표 6은 ASO 107과 비교하여 3×10mg/kg QW에 의한 HBsAg 최저치를 보여준다. 이러한 HBx 영역 LNA ASO에서, 2-티오 T에 의한 갭 중 테옥시-T의 단일 교체는 생체내 활성을 유지하면서 혈청 ALT를 정상 수준에 대해 30배 감소시켰다.

표 6

HBsAg 최저치		
ASO 번호	HBsAg 최저치	Max ALT
107A	0.90 log 이하	596 U/ℓ
107B	0.99 log 이하	168 U/ℓ
107C	0.90 log 이하	29 U/ℓ
107D	1.06 log 이하	380 U/ℓ
1xPBS	0.1 log 이하	28 U/ℓ

[0160]

[0161]

실시예 6. 1×5mg/kg 단일 용량으로 AAV-HBV 마우스 모델에서 GalNac ASO 테스트

[0162]

ASO는 아데노 관련 바이러스(AAV)-HBV 마우스 모델에서 1 x 5 mg/kg으로 테스트했다. 이 투약 요법은 주로 ASO의 생체내 효능의 순위를 매기기 위한 것이다. 비록 본 발명자들은 1×5mg/kg에서 ALT 상승을 갖는 간에서 매우 독성인 ASO의 소량을 제거할 수 있었지만, 대부분의 ASO는 간 독성을 구별하기 위해 더 엄격한 투약 요법을 필요로 한다. 연구 중 결과적으로 수득한 혈청 HBsAg의 최저 log₁₀ 감소 및 ALT의 배수 변화는 표 7에 제시했고, 여기서 A는 ≥1 log₁₀ HBsAg 감소, B는 0.5-1 log₁₀ HBsAg 감소, C는 <0.5 log₁₀ HBsAg 감소이고, 및 X는 정상으로 간주되는 비히클 대조군 ALT의 3배 이하, Y는 비히클 대조군 ALT의 3-30배, Z는 비히클 대조군 ALT의 30배 이상이다. Y 및 Z는 모두 간 독성인 것으로 간주된다.

[0163]

이하 표 7의 특정 서열은 본 개시내용의 범위 내에 있는 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, In = 잠금 핵산(LNA); InA = 잠금 핵산(LNA) A; In(5m)C = In(5m)C = 잠금 핵산(LNA)-5메틸 C; InG = 잠금 핵산(LNA) G; InT= 잠금 핵산(LNA) T; (5m)C = 5 메틸C; mA = 2-O-메톡시 A; mU = 2-O-메톡시 U; (8nh)A = 8-아미노 A; (8nh)G = 8-아미노 G; (2s)T = 2-티오 T; cp = scp = 사이클로프로필; cpC = scpC = 사이클로프로필 C; cpG = scpG = 사이클로프로필 G; cpT = scpT = 사이클로프로필 T; ps = 포스포로티오에이트 결합이다.

표 7

1 x 5 mg/kg 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
164	160	5'-GalNAc6-(PS)2-p-ClnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	B	X
165	161	5' GalNAc1-C6-NH-InGpslnTpslnGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	B	X
166	162	5' GalNAc1-C6-p-InApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
167	163	5'GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnTpslnGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	C	X
168	164	5'GalNAc1-C6-p-InApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)mCpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnG 3'	B	X
169	165	5' GalNAc1-C6-p-InGpslnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
170	166	5' GalNAc1-C6-p-In(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApslnGpslnGpslnTpslnG 3'	B	X
171	167	5' GalNAc1-C6-p-InGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	C	X
172	168	5'GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApslnGpslnTpslnG 3'	B	Y
173	169	5'-GalNAc3-(PS)2-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpslnGpslnTpslnG 3'	C	X
174	170	5'GalNAc3-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	X
175	171	5'-GalNAc3-(PS)2-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnAps(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	A	X
176	172	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'	C	X
177	173	5'-GalNAc3-(PS)2-p-InGpsln(5m)Cpsln(5m)C(5m)CpsTpsAps(5m)CpsGpsApsAps(5m)C	C	X

[0164]

1 x 5 mg/kg 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		ps(5m)CpsApslnCpslnTpslnGpslnA 3'		
178	174	5'-GalNAc3-(PS)2-p- lnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)Cps Apsln(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
179	175	5'-GalNAc3-(PS)2-p- ln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsGpsGpsApsTpsTps(5m)CpsApsGpsl n(5m)CpslnGpsln(5m)C 3'	C	X
180	176	5'-GalNAc3-(PS)2-p- lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
181	177	5'-GalNAc3-(PS)2-p- lnGpslnGpslnTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cp sGpsTpsGpslnGpslnG 3'	C	X
182	178	5'-GalNAc3-(PS)2-p- lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsTpslnGpsl n(5m)C 3'	B	X
183	179	5'-GalNAc3-(PS)2-p- lnGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5 m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	C	X
184	180	5'- lnGpslnApslnGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApslnGps lnTpslnG-p-(PS)2-GalNAc3 3'	C	X
185	181	5'-GalNAc3-(PS)2-p- lnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)Cps Apsln(5m)CpslnG 3'	B	X
186	182	5'-GalNAc3-(PS)2-p- lnApslnGpslnGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpsl nG 3'	A	Y
187	183	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpsTpsGp sGpsTpsln(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
188	184	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnApslnGpslnGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsGpslnTpslnGpslnG 3	A	Y
189	185	5'-GalNAc3-(PS)2-p- ln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpsl nGpslnTpslnG 3'	C	X
190	186	5'-GalNAc3-(PS)2-p- ln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpsl nGpslnTpslnG 3'	C	X
191	187	5'-GalNAc4-(PS)2-p- ln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpsl nGpslnTpslnG 3'	C	X

[0165]

1 x 5 mg/kg 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
192	188	5'-GalNAc4-(PS)2-p- lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps GpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	B	X
193	189	5'-GalNAc3-(PS)2-p- lnApscpTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'	C	X
194	190	5'-GalNAc2-C6-p- CAlnApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps (5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'	C	X
195	191	5'-GalNAc2-C6-p- CAlnApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5 m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG 3'	C	X
196	192	5'-GalNAc6-(PS)2-p- lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps GpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	X
197	193	5'-GalNAc6-(PS)2-p- ln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpsApsGpsl nGpslnTpslnG 3'	C	X
198	194	5'-GalNAc6-(PS)2-p- CAlnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m) CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	B	X
199	195	5'- lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps GpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGC-p-(PS)2-GalNAc6-3'	A	X
200	196	5' lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps GpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGCA-p-(PS)2-GalNAc6-3'	A	X
201	197	5'-GalNAc4-(PS)2-p- ClnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cp sGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	B	X
202	198	5'-GalNAc4-(PS)2-p- CAlnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m) CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	B	X
203	199	5' lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps GpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGC-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
204	200	5' lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps GpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGCA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	A	X
205	201	5'-GalNAc6-(PS)2-p- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsAps GpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	C	X
206	202	5'-GalNAc4-(PS)2-p-	A	X

[0166]

1 x 5 mg/kg 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'		
207	203	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpscGpslnG 3'	B	X
208	204	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpsln(5m)CpscGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
209	205	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpsc(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
210	206	5'-GalNAc5-(PS)2-p-cpGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG 3'	B	X
211	207	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpsc(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpscGpslnG 3'	C	X
212	208	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpsln(5m)CpscGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpscGpslnG 3'	C	X
213	209	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpsAmG	A	X
214	210	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpsAmGpslnG	A	X
215	211	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpsAmGpslnGpslnG	B	X
216	212	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsam(5m)CpslnGpslnGpslnG	B	X
217	213	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpslnApsamTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG	A	X
218	214	5'-GalNAc5-(PS)2-p-lnGpsAmApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG	B	X
219	215	5'-GalNAc5-(PS)2-p-AmGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG	A	X
220	216	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps	C	X

[0167]

1 x 5 mg/kg 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'		
221	217	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnApslnApslnGpsApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpslnGpsln(5m)Cpsln(5m)Cpsln(5m)C 3'	B	X
222	218	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpscpG 3'	A	X
223	219	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpscpGpslnGpslnG 3'	B	X
224	220	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApscp(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	B	X
225	221	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApscpTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	X
226	222	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpscpApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG	B	X
227	223	5'-GalNAc5-(PS)2-p-cpGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	B	X
228	224	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApscpTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApscp(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	X
229	225	5'-GalNAc5-(PS)2-p-ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApscp(5m)C	C	X
230	226	5'-GalNAc5-(PS)2-p-ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApscpGpslnApsln(5m)C	B	X
231	227	5'-GalNAc5-(PS)2-p-ln(5m)Cpscp(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C	C	X
232	228	5'-GalNAc5-(PS)2-p-cp(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C	C	X
233	229	InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
234	230	5'lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG(5m)C-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
235	231	5'lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGG-p-(PS)2-GalNAc4-3'	C	X

[0168]

1 x 5 mg/kg 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALI				
서열번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALI
236	232	5'lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGmA-p-(PS)2-GalNAc4-3'	C	X
237	233	5'lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGm(5m)C-p-(PS)2-GalNAc4-3'	C	X
238	234	5'lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGmG-p-(PS)2-GalNAc4-3'	C	X
239	235	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
240	236	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C(5m)C-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
241	237	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CG-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
242	238	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CmA-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
243	239	5'ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
244	240	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
245	241	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C(5m)C-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
246	242	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CG-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
247	243	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CmU-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
248	244	5'- lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)Cm(5m)C-p-(PS)2-GalNAc4-3'	C	X
249	245	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CmG-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X
250	246	5'-GalNAc4-(PS)2-p- lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C	B	X
251	247	5'	B	X

[0169]

1 x 5 mg/kg 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		InGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnAmU-p-(PS)2-GalNAc4 3'		
252	248	InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc6 3'	B	X
253	249	5'-InGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-3'	B	X
254	250	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mUlnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA-3'	C	X
255	251	5'-GalNAc4-(PS)2-p-TlnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG-3'	B	X
256	252	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mUlnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG	B	X
257	253	5'-GalNAc6-(PS)2-p-mUlnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG	C	X
258	254	5'-GalNAc4-(PS)2-p-AlnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	B	X
259	255	5'-GalNAc6-(PS)2-p-AlnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	B	X
260	256	5'-GalNAc4-(PS)2-p-Aln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	B	X
261	257	InGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGmA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
262	258	5'-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnTmA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
263	259	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mUlnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG-3'	B	X
264	260	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mUlnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT-3'	B	X
265	261	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mUlnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	A	X
266	262	5'	A	X

[0170]

1 x 5 mg/kg 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGmU-p-(PS)2-GalNAc4 3'		

[0171]

[0172]

[0173]

실시예 7. AAV-HBV 마우스 모델에서 3×10 mg/kg QW의 변형된 ASO 테스트

ASO는 아데노 관련 바이러스(AAV)-HBV 마우스 모델에서 매주 3×10 mg/kg으로 테스트했다. 3×10 mg/kg QW의 이 투약 요법은 이전 섹션에 제시된 1 x 5 mg/kg보다 더 엄중한 것이다. 본 발명자들은 최소 ALT 상승을 갖는 효능성 ASO를 추가로 선택할 수 있다. 연구 중 결과적으로 수득되는 혈청 HBsAg의 최저 log₁₀ 감소 및 ALT의 배수 변화는 표 8에 제시되며, 여기서 A는 ≥1 log₁₀의 HBsAg 감소, B는 0.5-1 log₁₀의 HBsAg 감소, C는 <0.5 log₁₀의 HBsAg 감소이며, X는 비히클 대조군 ALT의 3배 이하이며, 이는 정상으로 간주된다. Y는 비히클 대조군의 ALT의 3배 내지 30배이고, Z는 비히클 대조군의 ALT의 30배 이상이다. Y 및 Z는 모두 간 독성을 나타내는 것으로 간주되며 Z가 더욱 심각한 것이다.

[0174]

이하 표 8의 특정 서열은 본 개시내용의 범위 내인 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, ln = 잠금 핵산(LNA); lnA = 잠금 핵산(LNA) A; = ln(5m)C = 잠금 핵산(LNA)-5메틸 C; lnG = 잠금 핵산(LNA) G; lnT= 잠금 핵산(LNA) T; (5m)C=5 메틸C; mA = 2-O-메톡시 A; mU = 2-O-메톡시 U; (8nh)A = 8-아미노 A; (8nh)G = 8-아미노 G; (2s)T = 2-티오 T; cp = scp = 사이클로프로필; cpC = scpC = 사이클로프로필 C; cpG = scpG = 사이클로프로

로필 G; cpT = scpT = 사이클로프로필 T; ps = 포스포티오에이트 결합; p = 포스포다이에스터 결합이다.

표 8

3x10 mg/kg QW 에 대한 HBsAg 최저치(Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
267	263	5'-GalNAc1-C6-p-CpsApslnGpslnApslnTpslnTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	A	X
268	264	5'-GalNAc1-C6-p-CpsApslnGpslnTpslnGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsGpsTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	A	Y
269	265	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	Y
270	147	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG-3	A	Y
271	266	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnApsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApslnT-3'	A	Z
425	132B	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'	A	Y
426	267A	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	A	Y
274	268	5'-GalNAc2-C6-p-CAln(5m)Cpsln(5m)CpslnGps(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'	A	Z
275	269	5'-GalNAc2-C6-p-CAln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)Cps(5m)CpsTpsGpsTpsApsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnApslnG 3'	A	Z
276	270	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnA	A	X

[0175]

3x10 mg/kg QW 에 대한 HBsAg 최저치(Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		psIn(5m)C 3'		
277	271	5'-GalNAc2-C6-p-CAIn(5m)CpsInApsIn(5m)CpsIn(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApsGpsInApsIn(5m)CpsInT 3'	A	Z
278	272	5'-GalNAc2-C6-p-CAInApsInTpsInGpsInApsTpsApsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsIn(5m)CpsInApsInG 3'	B	X
427	273A	5'-GalNAc2-C6-p-CAIn(5m)CpsIn(5m)CpsInApsIn(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApsInGpsInApsIn(5m)C 3'	A	Y
280	274	5'-GalNAc2-C6-p-CAInGpsIn(5m)CpsIn(5m)CpsIn(5m)CpsTpsAps(5m)CpsGpsApsAps(5m)Cps(5m)CpsApsIn(5m)CpsInTpsInGpsInA 3'	B	X
281	275	5'-GalNAc2-C6-p-CAInApsInApsInApsIn(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpsApsGpsApsIn(5m)CpsInAIn(5m)CpsInApsInT 3'	A	Z
282	276	5'-GalNAc2-C6-p-CAInApsInGpsInGpsInTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsInTpsInGpsIn(5m)C 3'	A	Y
283	277	5'-GalNAc2-C6-p-CAInGpsInGpsInTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsInTpsInGpsIn(5m)CpsInA 3'	A	X
284	151	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpsInGpsInApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsInApsIn(5m)CpsInG-3'	B	Y
205	201	5'-GalNAc6-(PS)2-p-In(5m)CpsIn(5m)CpsInApsIn(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApsInGpsInApsIn(5m)C 3'	B	X
285	279	5'-GalNAc2-C6-p-CAInGpsIn(5m)CpsInGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsApsCpsAps(5m)CpsInGpsInG 3'	A	X
286	152	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpsInGpsInAps(2s)TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)	B	Y

[0176]

3x10 mg/kg QW 에 대한 HBsAg 최저치(Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG-3'		
287	153	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG-3'	A	X
288	154	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG-3'	A	Y
289	280	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	A	Y
290	281	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnApslnTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	A	X
291	282	5'-GalNAc6-(PS)2-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5oh)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
292	283	5'-GalNAc6-(PS)2-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5oh)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	B	X
293	284	In(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)Cps(2s)TpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	B	X
294	285	5'-GalNAc2-C6-p-CApslnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnG-3'	A	Y
295	286	5'-InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
296	287	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsc	A	X

[0177]

3x10 mg/kg QW 에 대한 HBsAg 최저치(Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		p(5m)C-3'		
297	288	5'- lnGpslnApscpTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
298	289	5'- GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG-3'	A	Z
299	290	5'- lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApscp(5m)CpslnG-3'	A	Z
300	136	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpscpT-3'	A	Y
301	137	5'- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpscp(5m)CpslnGpslnT-3'	A	Y
302	133	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT-3'	A	Y
303	134	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsamT-3'	B	Y
304	135	5'-GalNAc5-(PS)2-p- lnGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cpsam(5m)CpslnGpslnT-3'	A	Y
305	291	5'-GalNAc2-C6-p- CAlnApslnGpslnApsGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpslnCpslnCpslnGpslnT-3'	A	Y
306	292	5'-GalNAc2-C6-p- CAlnApsln(5m)CpslnApslnApsApsGpsGpsAps(5m)CpsGpsTps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnG-3'	A	X
307	293	5'-GalNAc2-C6-p- CAlnApslnTpslnGpslnApsTpsApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpslnApslnG-3'	B	X

[0178]

3x10 mg/kg QW 에 대한 HBsAg 최저치(Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
308	294	5'-GalNAc2-C6-p- CAln(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsln(5m)CpsGpsTpsApsApsApsGpsApsGpslnGpslnTpslnG-3'	B	X

[0179]

[0180] 실시예 8. AAV-HBV 마우스 모델에서 3×10 mg/kg Q3D에 의한 변형된 ASO 테스트

[0181] ASO는 아데노 관련 바이러스(AAV)-HBV 마우스 모델에서 3일마다 3×10 mg/kg으로 테스트했다. 3×10 mg/kg Q3D의 투약 요법은 3×10 mg/kg QW보다 더욱 엄중한 것이며 최상의 치료 지수를 갖는 ASO를 추가로 선택할 수 있다. 연구 중 결과적으로 수득되는 혈청 HBsAg의 최저 log₁₀ 감소 및 ALT의 배수 변화는 표 9에 제시되며, 여기서 A는 ≥1 log₁₀ HBsAg 감소, B는 0.5 내지 1 log₁₀ HBsAg 감소, C는 <0.5 log₁₀ HBsAg 감소이고, X는 비히클 대조군의 ALT의 3배 이하인 것으로, 이는 정상으로 간주된다. Y는 비히클 대조군의 ALT의 3배 - 30배이고, Z는 비히클 대조군의 ALT의 30배 이상이다. Y 및 Z는 모두 간 독성으로 간주되며 Z가 더욱 심각한 것이다.

[0182] 하기 표 9의 특정 서열은 본 개시내용의 범위 내에 있는 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, ln = 잠금 핵산(LNA); lnA = 잠금 핵산(LNA) A; ln(5m)C = ln(5m)C = 잠금 핵산(LNA)-5메틸 C; lnG = 잠금 핵산(LNA) G; lnT= 잠금 핵산(LNA) T; (5m)C=5 메틸C; mA = 2-O-메톡시 A; mU = 2-O-메톡시 U; (8nh)A = 8-아미노 A; (8nh)G = 8-아미노 G; (2s)T = 2-티오 T; cp = scp = 사이클로프로필; cpC = scpC = 사이클로프로필 C; cpG = scpG =

사이클로프로필 G; cpT = scpT = 사이클로프로필 T; ps = 포스포로티오에이트 결합이다. "HBV 게놈에서의 위치"는 acc.KC315400.1(유전자형 B) 중 표적 부위의 5'-단부를 나타낸 것으로, 이는 서열번호 1에 상응한다.

표 9

3x10 mg/kg Q3D 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
270	147	5' GalNAc2-C6-p-CAlnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG 3'	B	Z
309	295	5' GalNAc6-(PS)2-p-lnGpslnApslnTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	B	X
244	240	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
310	297	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
311	298	5' lnGpsln(5m)CpscpGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
312	299	5' lnGpscp(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4	B	X
313	300	5' cpGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
314	301	5' lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpscpGA 3'	B	X
315	302	5' lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpscpGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
316	303	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpscpApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
317	304	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpscpApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
318	305	5' lnGpslnApslnTpslnApscpApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-	B	X

[0183]

3x10 mg/kg Q3D 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		(PS)2-GalNAc4 3'		
319	306	5' lnGpslnApscTpInApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
320	307	5' lnGpsln(5m)CpsamGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
321	308	5' lnGpsam(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
322	309	5' lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpsamGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
323	310	5' lnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsamGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
324	311	5' amGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
325	312	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsam(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
326	313	5' lnGpslnApsamTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
327	314	5' amGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
328	315	5' lnGpsamApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
329	316	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApscGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
330	317	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsc(5m)CA-	B	Y

[0184]

3x10 mg/kg Q3D 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		p-(PS)2-GalNAc4 3'		
331	318	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApscpGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
332	319	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApscp(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
333	320	5' ln(5m)Cpscp(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
334	321	5' cp(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
335	322	5' lnGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
336	323	5' lnGpscp(5m)CpslnGpsAps(8nh)ApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
337	324	5' cpGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
338	325	5' lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpscp(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
339	326	5' lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpscpGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
340	327	5' lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpscpTpslnGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
341	328	5' lnGpslnGpscpTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnAA	B	X
342	329	5' lnGpscpGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGp	B	X

[0185]

3x10 mg/kg Q3D 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		slnTpslnGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'		
343	330	5' cpGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGp slnTpslnGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
344	331	5' lnGpslnApslnTpscpApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)C ps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p- (PS)2-GalNAc4 3'	B	X
345	332	5' lnGpscpApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)C ps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p- (PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
346	333	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)C psGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpscpApsln(5m)CA- p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
347	334	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpscpApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)C psGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA- p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Y
348	335	5' cp(5m)Cpscp(5m)CpscpApscp(5m)Cps(5m)CpsAps(5m) CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApscpGpscpApscp(5m)C A-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
349	336	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cp s(5m)CpsGps(5m)CpsamApslnGpslnApsln(5m)CT-p- (PS)2-GalNAc4 3'	B	X
350	337	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cp s(5m)CpsGps(5m)CpslnApsamGpslnApsln(5m)CT-p- (PS)2-GalNAc4 3'	B	X
351	338	5' lnGpslnApslnTpslnApsamApsApsAps(5m)CpsGps(5m)C ps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p- (PS)2-GalNAc4 3'	B	X
352	339	5' lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGp slnTpslnGpsln(5m)CpscpAA	B	X
353	340	5' lnGpslnApslnTpsamApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)C ps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p- (PS)2-GalNAc4 3'	B	X

[0186]

3x10 mg/kg Q3D 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALI				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALI
354	341	5' lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpsamApsln(5m)CT-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
355	342	5' lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsam(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
356	343	5' lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpsamGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
357	344	5' lnGpslnGpslnTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpsamTpslnGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
358	345	5' lnGpslnGpsamTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnAA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	X
359	346	5' lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpscpGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
360	347	5' lnGpslnGpslnAps(2s)TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApscp(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
361	348	5' lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpscpApsln(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
362	349	5' lnGpslnGpscpApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
363	350	5' lnGpscpGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
364	351	5' cpGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GalNAc4 3'	B	Z
365	352	5' lnGpslnApslnGpsAps(8nh)GpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpscp(5m)CpslnGpslnTA-p-(PS)2-	B	Y

[0187]

3x10 mg/kg Q3D 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		5' GaNAc4 3'		
366	353	5' lnGpslnApscpTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGT-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	Y
367	354	5' lnGpslnApslnGps(8nh)ApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpscp(5m)CpslnGpslnTA-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	Z
368	145	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsam(5m)CA-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	Y
369	143	5' ln(5m)Cpsam(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	Y
370	144	5' am(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	Y
371	146	5' ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsam(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CA-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	X
372	355	5' amGpsam(5m)CpsamGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsamGpsamGA-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	X
373	356	5' lnGpslnApscpTpslnApslnApsAps(8nh)Aps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)CT-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	X
374	357	5' lnGpsln(5m)CpscpGpsAps(8nh)ApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGA-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	Y
375	358	5' lnGpslnApslnGpsApsGps(8nh)GpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpscp(5m)CpslnGpslnTA-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	Y
376	359	5' GaNAc4-(PS)2-p-mUlnGpscp(5m)CpslnGpsAps(8nh)ApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG	B	Y

[0188]

3x10 mg/kg Q3D 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
377	156	5' lnGpslnGpslnApsTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApscp(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	Y
428	155A	5' lnGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApscp(5m)CpslnGA-p-(PS)2-GaNAc4 3'	B	X

[0189]

[0190]

실시에 9. AAV-HBV 마우스 모델에서 변형된 ASO 테스트

[0191]

본 실시예는 5×10 mg/kg의 투약 요법을 사용하여 ASO의 치료 지수를 평가한다. ASO는 아테노 관련 바이러스 (AAV)-HBV 마우스 모델에서 3일마다 5×10 mg/kg으로 테스트했다. 연구 중 결과적으로 수득되는 혈청 HBsAg의 최저 log₁₀ 감소 및 ALT의 배수 변화는 표 10에 제시되며, 여기서 A는 ≥1 log₁₀ HBsAg 감소, B는 0.5 내지 1 log₁₀ HBsAg 감소, C는 <0.5 log₁₀ HBsAg 감소이며, X는 비히클 대조군의 ALT의 3배 이하이고, 이는 정상으로 간주된다. Y는 비히클 대조군의 ALT의 3배 - 30배이고, Z는 비히클 대조군의 ALT의 30배 이상이다. Y 및 Z는 둘 모두 간 독성을 나타내며 Z는 더욱 심각한 것이다.

[0192]

도 3A는 ASO 120에 대한 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 3B는 ASO 121에 대한 혈청 HBsAg의 변화 그

래프를 나타낸다. 도 3C는 ASO 120에 대한 혈청 ALT의 그래프를 나타낸다. 도 3D는 ASO 121에 대한 혈청 ALT의 그래프를 나타낸다. 이러한 결과는 Luxna Chemistry 변형이 생체내 효능을 유지하면서 ALT를 감소시키거나 또는 제거하였음을 입증한다.

[0193]

이하 표 10의 특정 서열은 본 개시내용의 범위 내에 있는 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, In = 잠금 핵산(LNA); InA = 잠금 핵산(LNA) A; In(5m)C = In(5m)C = 잠금 핵산(LNA)-5메틸 C; InG = 잠금 핵산(LNA) G; InT= 잠금 핵산(LNA) T; (5m)C=5 메틸C; mA = 2-O-메톡시 A; mU = 2-O-메톡시 U; (8nh)A = 8-아미노 A; (8nh)G = 8-아미노 G; (2s)T = 2-티오 T; cp = scp = 사이클로프로필; cpC = scpC = 사이클로프로필 C; cpG = scpG = 사이클로프로필 G; cpT = scpT = 사이클로프로필 T; ps = 포스포로티오에이트 결합이다.

표 10

5x10 mg/kg Q3D 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
270	147	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG-3'	A	Z
276	270	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	A	X
379	361	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpsln(5m)CpslnGps(8nh)ApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG-3'	A	X
380	362	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5oh)CpslnGpslnG-3'	A	Y
381	363	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpsln(5m)CpslnGpsAps(8nh)ApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnG-3'	A	Y
382	364	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnGpslnTps(8nh)GpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA-3'	A	X
383	365	5'-GalNAc2-C6-p-InGpsln(5m)CpslnGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnGpslnGmG-3'	A	Y
384	366	5'-GalNAc2-C6-p-In(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)CmG-3'	A	X
385	367	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	Y
386	368	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(8nh)Aps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
387	369	5'-GalNAc2-C6-p-CAlnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
388	370	5'-GalNAc2-C6-p-CAln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5oh)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
389	371	5'-GalNAc2-C6-p-	A	X

[0194]

5x10 mg/kg Q3D 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		CAln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'		
390	372	5'-GalNAc2-C6-p-CAln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5oh)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	A	Y
391	373	5'-ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5oh)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpscpApsln(5m)CmA-p-(PS)2-GalNAc3-3'	A	Y
392	157	5'-lnGpslnApslnTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpscpGT-p-(PS)2-GalNAc4-3'	A	Z
393	158	5'-lnGpslnApscpTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGT-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	Y
394	159	5'-lnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnGT-p-(PS)2-GalNAc4-3'	A	X
395	374	5'-ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5oh)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpscpApsln(5m)CmA-p-(PS)2-GalNAc4-3'	A	Z
396	128	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'	A	X
397	129	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'	A	X
398	130	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAln(5m)Cpscp(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'	B	X
399	375	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApscpGpslnApsln(5m)C-3'	A	X
400	120	5'-GalNAc4-(PS)2-p-	A	X

[0195]

5x10 mg/kg Q3D 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
		mAlnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'		
401	376	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpsamApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'	B	X
402	377	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnGpscpTpsGpsAps(8nh)ApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA-3'	A	X
403	378	5'-ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpscpApsln(5m)CmA-p-(PS)2-GalNAc4-3'	B	X

[0196]

[0197]

[0198]

실시예 10. AAV-HBV 마우스 모델에서 변형된 ASO 테스트

ASO는 단일 작용제로서 또는 조합(S+X 트리거(Trigger) 및 S+S 트리거)으로서 아데노-관련 바이러스(AAV)-HBV 마우스 모델에서 1×10 mg/kg으로 테스트했다. 연구 중 결과적으로 수득되는 혈청 HBsAg의 최저 log₁₀ 감소 및 ALT의 배수 변화는 표 11에 제시되며, 여기서 A는 ≥1 log₁₀의 HBsAg 감소, B는 0.5 내지 1 log₁₀의 HBsAg 감소, C는 <0.5 log₁₀의 HBsAg 감소이고, X는 비히클 대조군의 ALT의 3배 이하, Y는 비히클 대조군의 ALT의 3 내지 30

배, Z는 비히클 대조군의 ALT의 30배 이상이다. 결과는 S 및 X 트리거 ASO가 조합되었을 때 부가적 내지 약간의 상승작용 효과를 나타내었음을 입증했다.

[0199] 도 9A는 ASO 120, ASO 131, 및 1:1, 2:1 및 3:1 질량비의 ASO 120 및 ASO 131의 조합으로 처리된 마우스로부터의 혈청 B형 간염 e-항원(HBeAg)의 변화 그래프를 나타낸다. 도 9B는 ASO 120, ASO 121, 및 1:1, 2:1 및 3:1 질량비의 ASO 120 및 ASO 121의 조합으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBeAg의 변화 그래프를 나타낸다. 이들 결과는 ASO의 조합이 통합된 게놈으로부터의 RNA 뿐만 아니라 X 유전자를 포함하는 모든 HBV RNA의 파괴를 초래한다는 것을 입증한다.

표 11

1x10 mg/kg 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
418	123	5-moeGpsmoe(5m)CpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGpsmoe(5m)C-3	B	X
423	265A	5'-GalNAc-NH-C6-CA-InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	X
424	147A	5'-GalNAc-NH-C6-CA-InApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG-3'	A	X
273	267	5'-GalNAc-NH-C6-CA-InGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'	A	X
279	273	5'-GalNAc-NH-C6-CA-In(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	A	X
	ASO 273 + ASO 285 (1 : 1)		A	X
	ASO 273 + ASO 285 (2 : 1)		A	X
	ASO 273 + ASO 285 (3 : 1)		A	X
396	128	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C 3'	A	X
	ASO 128 + ASO 377 (1 : 1)		B	X
	ASO 128 + ASO 377 (2 : 1)		A	X
397	129	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C 3'	A	X
	ASO 129 +		A	X

[0200]

1x10 mg/kg 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
	ASO 267 (1 : 1)			
	ASO 129 + ASO 267 (2 : 1)		A	X
	ASO 129 + ASO 267 (3 : 1)		A	X
398	130	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAln(5m)Cpscp(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C 3'	B	X
	130 + 120 (1:1)		B	X
	ASO 130 + ASO 121 (1:1)		B	X
	ASO 130 + ASO 121 (2:1)		B	X
	ASO 130 + ASO 121 (3:1)		B	X
	ASO 130 + ASO 131 (1:1)		B	X
	ASO 130 + ASO 131 (2:1)		B	X
	ASO 130 + ASO 131 (3:1)		A	X
399	375	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApscpGpslnApsln(5m)C 3'	C	X
400	120	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C 3'	B	X
	ASO 120 + ASO 121 (1:1)		A	X
	ASO 120 + ASO 121 (2:1)		A	X
	ASO 120 + ASO 121 (3:1)		A	X
	ASO 120 + ASO 131 (1:1)		A	X
	ASO 120 +		A	X

[0201]

1x10 mg/kg 에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT				
서열 번호	ASO 번호	서열	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
	ASO 131 (2:1)			
	ASO 120 + ASO 131 (3:1)		A	X
401	376	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpsamApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C 3'	C	X
402	377	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mAlnGpslnGpscpTpsGpsAps(8nh)ApsGps(5m)CpsGpsApsApsGpslnTpslnGpsln(5m)CpslnA 3'	B	X
156	121	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mUlnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG 3'	A	X
419	131	5'-GalNAc4-(PS)2-p-mUlnGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApscp(5m)CpslnG 3'	A	X

[0202]

[0203]

실시에 11. AAV-HBV 마우스 모델에서 변형된 ASO 테스트

[0204] ASO는 아데노 관련 바이러스(AAV)-HBV 마우스 모델에서 0, 3, 7, 14, 21 및 28일째에 3 mg/kg 또는 10 mg/kg의 6회 반복 용량으로 테스트했다. 연구 중 결과적으로 수득되는 혈청 HBsAg의 최저 log₁₀ 감소 및 ALT의 배수 변화는 표 12에 제시되며, 여기서 A는 ≥1 log₁₀의 HBsAg 감소, B는 0.5 내지 1 log₁₀의 HBsAg 감소, C는 <0.5 log₁₀의 HBsAg 감소이고, X는 비히클 대조군의 ALT의 3배 미만인 것으로, 정상으로 간주된다. Y는 비히클 대조군의 ALT의 3-30배이고 Z는 비히클 대조군의 ALT의 30배 이상이다. Y 및 Z는 모두 간 독성을 나타낸다. 조합(1:1 및 2:1)의 S 및 X ASO 트리거는 이들이 단독 작용제인지, 또는 조합 작용제인지에 상관 없이 총 투약 약물 함량(mg)은 일정하다. 그 결과는 S 및 X의 조합(1:1)이 약간의 상승작용 효과가 있음을 보여준 반면, 2:1(S:X)의 혼합물은 이점이 더 적다는 것을 보여주었다. 도 4A는 ASO 121 또는 ASO 120으로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 4B는 ASO 121 또는 ASO 120으로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 ALT의 그래프를 나타낸다. 도 4C는 (a) ASO 121 및 ASO 120의 조합, 또는 (b) ASO 123 단독으로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 4D는 (a) ASO 121 및 ASO 120의 조합; 또는 (b) ASO 123 단독으로 처리된 HBV 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다. 이러한 결과는 Luxna Wing 및 캡-변형된 화학물질을 갖는 ASO가 HBV를 효과적으로 처리할 수 있음을 입증한다. 또한, 2가지 ASO의 조합으로 처리된 마우스는 ASO 123 단독으로 처리된 마우스에 비해 개선된 효능을 나타냈다. ASO 123은 GSK836이고, 이는 현재 GSK가 후원하는 임상 2B상 실험이 진행 중이다.

표 12

0, 3, 7, 14, 21, 28 일째 6 회 반복 용량에 대한 HBsAg 최저치 (Log) 및 ALT			
ASO 번호*	용량	HBsAg 최저치 (Log)	ALT
123	6x10mg/kg	B	X
123	6x3mg/kg	C	X
130	6x10mg/kg	B	X
130	6x3mg/kg	C	X
120	6x10mg/kg	A	X
120	6x3mg/kg	A	X
ASO 120 + ASO 130 (1:1)	6x10mg/kg	A	X
ASO 120 + ASO 130 (1:1)	6x3mg/kg	B	X
ASO 120 + ASO 121 (1:1)	6x10mg/kg	A	X
ASO 120 + ASO 121 (1:1)	6x3mg/kg	A	X
ASO 120 + ASO 121 (2:1)	6x10mg/kg	A	X
ASO 120 + ASO 121 (2:1)	6x3mg/kg	B	X
ASO 121	6x10mg/kg	A	X
ASO 121	6x3mg/kg	B	X

*조합물의 경우, (1:1) 및 (2:1)는 ASO 의 질량비를 지칭함.

[0205]

[0206] 실시예 12. HepG2.2.15 HBV 세포 모델에서 HBsAg 방출 검정의 ASO 용량 반응 테스트

[0207] ASO의 증가하는 용량의 시험관내 스크리닝은 HBsAg 방출 검정을 사용하여 HepG2.2.15 세포에서 수행했다. 3가지 실험에 대한 용량 반응 곡선 및 결과적인 IC₅₀(nm) 값은 도 1A-2c 및 표 13에 제시되며, 여기서 A: ≤5 nM, B는 5 - 20 nM, C: ≥20 nM이다. 결과는 Luxna 화학물질 변형 ASO(윙 및 캡 모두에서 변형됨)가 우수한 시험관내 효능을 나타냈음을 입증한다. 일부 서열의 경우, GalNac가 부착된 ASO는 GalNac가 제거된 동일한 ASO와 비교하여 여전히 우수한 효능을 나타낸다. 다른 서열의 경우, GalNac가 여전히 부착되어 있는 ASO는 동일한 서열의 비접합 ASO에 비해 더 적은 효능을 나타냈다.

표 13

SO 용량 반응에 대한 IC ₅₀ (nM) 값					
서열번호	ASO 번호	서열	IC ₅₀ (nM)		
			Expt. 1	Expt. 2	Expt. 3
420	126	5'-mA- lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'	B	B	B
400	120	5'-GalNac4-ps2-p-mA- lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'	C	C	C
421	124	5'- lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'	B	B	B
422	127	5' mU- lnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	A	A	A
156	121	5' GalNac4-ps2-p-mU-po- lnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	A	A	A
404	125	5'- lnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-3'	A	A	A

[0208]

[0209] 실시예 13. ASO 합성

[0210] LNA 및/또는 갭-변형된 화학물질을 갖는 ASO는 표준 포스포아미다이트 화학물질을 사용하여 ABI 394 및 Expedite 8909 합성기에서 합성했다. LNA 함유 ASO는 N-아세틸갈락토사민(GalNac)에 접합시켰다.

[0211] 이하 표 14의 특정 서열은 본 개시내용의 범위 내에 있는 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, ln = 잠금 핵산(LNA); lnA = 잠금 핵산(LNA) A; ln(5m)Cln(5m)C = 잠금 핵산(LNA)-5메틸 C; lnG = 잠금 핵산(LNA) G; lnT= 잠금 핵산(LNA) T; (5m)C=5 메틸C; mA = 2-O-메톡시 A; mU = 2-O-메톡시 U; (8nh)A = 8-아미노 A; (8nh)G = 8-아미노 G; (2s)T = 2-티오 T; cp = scp = 사이클로프로필; cpC = scpC = 사이클로프로필 C; cpG = scpG = 사이클로프로필 G; cpT = scpT = 사이클로프로필 T; ps = 포스포리티오에이트 결합이다.

표 14

ASO 합성				
서열번호	ASO 번호	서열 5'→3'	총량 (mg)	최종량 (μmole)
405	380 (ASO 120 유사체)	cpGpscpApscpTpscpApscpApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpscpApscpGpscpApscp(5m)C	0.33	0.05
406	381 (ASO 121 유사체)	cpGpscpApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApscp(5m)CpscpGpscpGpscpG	0.36	0.06
407	382 (ASO 130 유사체)	cp(5m)Cpscp(5m)CpscpApscp(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApscpGpscpApscp(5m)C	0.36	0.06

[0212]

[0213] HepG2.2.15 세포(4개의 통합된 HBV 게놈을 갖는 안정한 세포주)는 10% 소태아혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1% 글루타민, 1% 비필수 아미노산, 1% 피루브산 나트륨 및 250 μg/ml G418을 함유한 DMEM 배지에서 유지시켰다. 세포는 5% CO₂ 대기 하에 37°C에서 유지시켰다. HBsAg 방출 검정을 위해, 검정 배지를 제조했다: 5% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1% 글루타민 및 1% DMSO. 검정 전날, 트립신화 처리된 HepG2.2.15 세포를 검정 배지로 1회 세척하고, 250g x 5분으로 회전시키고, 검정 배지에 재현탁시키고, 콜라겐 코팅된 96웰 평판의 검정 배지에서 50,000/웰의 세포로 집중했다. 다음 날, ASO를 Opti-MEM, 9pt, 3배 희석물로 희석하고, Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)를 제조업체 설명서에 따라 희석했다. ASO 희석물과 RNAiMAX 희석물을 혼합

하여 실온에서 5분간 방치한 후, 96웰 평판의 각 웰에 15 µl씩 첨가했다. 평판을 인큐베이터에서 5일 동안 37°C, 5% CO₂에 방치했다. 항온처리 후, 상청액을 수확하고 ELISA 키트(Diasino)를 사용하여 HBsAg를 측정했다. 세포 생존율은 CellTiter-Glo(Promega)로 측정했다. 미처리 세포 대조군에 상대적으로, HBsAg 분비를 50% 감소시키는데 필요한 약물의 농도인 EC₅₀을 Prism Graphpad를 사용하여 계산하였다. 미처리 세포 대조군에 상대적으로 세포 생존율을 50% 감소시키는데 필요한 약물의 농도인 CC₅₀은 동일한 소프트웨어로 계산했다.

[0214] 표 14의 화합물에 대한 생성된 EC₅₀ 및 CC₅₀은 하기 표 15에 제시된다. EC₅₀ 값은 다음과 같다: A: < 0.1 nM, B: 0.1 nM 내지 5 nM, C: >5 nM.

표 15

ASO 번호	EC ₅₀	CC ₅₀
380	C	> 500
381	B	> 500
382	C	> 500

[0215]

[0216] 실시예 14. HBV의 S 및 X 유전자 영역을 표적으로 하는 ASO의 생물정보학

[0217] 이 실시예는 HBV의 S 및 X 유전자 영역을 표적으로 하는 ASO의 유전자형 적용범위 및 표적의 프로파일을 분석한다. 표 15는 S 유전자 영역을 표적으로 하는 ASO 120 및 X 유전자 영역을 표적으로 하는 ASO 121에 대한 HBV 유전자형 A-J의 유전자형 적용범위를 보여준다. 8000개 초과 의 임상 단리물 간의 상동성 %(완전히 일치하거나 1개의 불일치를 갖는 것으로 정의됨)는 표 16에 제시된다.

표 16

유전자형 커버리지: >8000 개 임상 단리물 중 상동성 %										
유전자형	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
ASO 120 (S)	98%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ASO 121 (X)	99%	100%	99%	100%	96%	100%	99%	100%	100%	97%
ASO 120 (S) + ASO 121 (X)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

[0218]

[0219] 실시예 15. ASO 조합 요법

[0220] 이 실시예는 ASO 120 및 ASO 121과 다른 HBV 치료제(예를 들어, S-항원 수송-저해 올리고뉴클레오타이드 중합체(STOPS), 테노포비어, 및 캡시드 어셈블리 조절제(CAM))를 사용한 조합 요법을 조사한다. ASO(2:1, 1:1 또는 1:2 비율의 ASO 120:ASO 121)와 STOPS ALG-010133 조합 연구를 위해, 웰당 35,000개의 HepG2.2.15 세포를 콜라겐 I 코팅된 96웰 평판(Corning, Biocoat; 카탈로그 356698)에서 역 형질감염시켰다. ALG-010133 및 ASO 혼합물을 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium(Thermo Fisher Scientific; 카탈로그 31985088)에서 x40로 희석시켰고, 원하는 최종 테스트 농도는 그 다음 각각 최대 5개 또는 9개의 개별 농도까지 연속 희석(1:3)했다. 각각 희석된 화합물의 3.25 µL 분취량을 체커보드 방식으로 조합하고, 여기서 ASO 혼합물은 가장 높은 농도가 평판의 상단에 있는 10개의 세로열에 첨가했고, ALG-010133은 가장 높은 농도가 평판 가장 우측 웰에 있는 7개의 가로줄에 첨가했다. 이 화합물 조합을 0.3 µL Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 13778150) 및 6.2 µL의 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium과 혼합했다. 20분 동안 항온처리한 후, 혼합물을 HepG2.2.15 세포에 첨가했다. 참조 대조군으로서 각 화합물 단독의 적정을 위한 공간도 할당했다. 세포는 5% CO₂ 대기의 37°C에서 3일 동안 화합물과 함께 항온처리했다. 초기 형질감염 3일 후, 배지를 새로 교환하고, 초기 형질감염에 사용된 것과 동일한 프로토콜에 따라 세포를 재형질감염시켰다. 또 다른 3일

후, 상청액을 HBsAg 수준에 대해 검정하고 나머지 세포는 세포독성에 대해 분석했다. CAM 또는 Tenofovir와 같은 소분자와 ASO 혼합물의 조합을 위해, 테스트 물질은 다이메틸 설펍사이드(DMSO) 스톱 용액에 용해하였고, 0.5% DMSO의 최종 농도에서 형질감염 없이 세포에 첨가했다. 검정의 다른 모든 양상은 ASO + STOPS 조합 연구에 사용된 프로토콜과 일치했다. CAM 또는 Tenofovir와 같은 소분자와의 이러한 조합물에 대해 상청액 중 HBV DNA를 측정했다.

[0221] HBsAg 수준은 HBsAg ELISA 키트(Diasino Laboratories, Ref. DS187701)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 결정했다. Perkin Elmer multilabel counter Victor3V를 사용하여 발광을 기록했다. HBV DNA 수준은 실시간 qPCR로 측정했다.

[0222] HepG2.2.15 세포 생존력 검정을 위해, Promega CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay(Catalog G7572)를 사용했다. CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay는 존재하는 아데노신 트리포스페이트(ATP)의 정량을 기반으로 배양물 중 생존 세포의 수를 결정하는 동질의 방법으로서, 대사 활성 세포의 존재를 알려준다. 검정 평판은 항-HBV 활성 검정에서와 동일한 형식으로 구성했다. CellTiter Glo 시약 100 μL 분취량을 각 웰에 첨가하고 실온에서 8분 동안 항온처리했다. Perkin Elmer multilabel counter Victor3V를 사용하여 발광을 기록했다.

[0223] 각 실험은 3 반복(3개의 평판)으로 수행했다. 3가지 실험에서 HBsAg의 평균 저해 백분율이 생성되었고 Prichard의 방법(MacSynergy II)을 사용하여 분석했다.

[0224] 표 17에 나타낸 바와 같이, STOPS와 함께 ASO 조합 요법은 세포독성 없이 HBsAg 감소에 부가적인 효과를 나타냈다. 표 18에 나타낸 바와 같이, 테노포비어와 ASO 조합 요법은 HBsAg 감소에 강력한 상승작용 효과를 나타냈고, CAM과 ASO 조합 요법은 HBsAg 감소에 중간 정도의 상승작용 효과를 나타냈다.

표 17

STOPS™ ALG-010133 과의 ASO 조합 요법			
화합물	ASO 120:ASO121 비율	상승작용	세포독성
STOPS	1:2	부가적	없음
STOPS	1:1	부가적	없음
STOPS	2:1	부가적	없음

[0225]

표 18

HBV 치료제와의 ASO 조합 (ASO 120 +ASO121 1:1) 요법			
화합물	클래스	상승작용	CC50
테노포비트	NA	강한 상승작용	없음
CAM	CAM II	중등도 상승작용	없음

[0226]

[0227] 실시예 16. AAV-HBV 마우스 모델에서 변형된 ASO 테스트

[0228] LNA 및/또는 Luxna 링 또는 겐-변형된 화학물질을 갖는 ASO는 표준 포스포아미다이트 화학물질을 사용하여 ABI 394 및 Expedite 8909 합성기에서 합성했다. ASO는 아데노 관련 바이러스(AAV)-HBV 마우스 모델에서 3일마다 1 × 10 mg/kg 또는 5 × 10 mg/kg의 용량으로 테스트했다. 도 5A는 1 × 10 mg/kg의 ASO 128, ASO 129 또는 ASO 120 으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 5B는 ASO 128, ASO 129 또는 ASO 120 5 × 10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 겐 변형 없는 ASO, 겐 위치 #1 에서 Luxna 화학물질 변형을 갖는 ASO, 및 겐 위치 #3에서 Luxna 변형을 갖는 ASO 3가지 모두의 효능은 동일한 효력이었다. 도 5C는 ASO 128, ASO 129 또는 ASO 120 5 × 10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스의 혈청 ALT 그래프를

나타낸다. 결과는 겹 위치 #3에서의 Luxna 변형이 최고의 간 안전성 프로파일을 나타낸다는 것을 보여주었다.

[0229] 실시예 17. AAV-HBV 마우스 모델에서 ASO 130의 평가

[0230] ASO 130은 표준 포스포아미다이트 화학물질을 사용하여 ABI 394 및 Expedite 8909 합성기에서 합성했다. ASO 130은 아데노 관련 바이러스(AAV)-HBV 마우스 모델에서 3일마다 1×10 mg/kg 또는 5×10 mg/kg의 용량으로 테스트했다. 도 6A는 1×10 mg/kg의 ASO 130으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg에 대한 변화 그래프를 나타낸다. 도 6B는 ASO 130의 5×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg에 대한 변화 그래프를 나타낸다. 도 6C는 ASO 130의 5×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스에 대한 혈청 ALT 그래프를 나타낸다. 이러한 결과는 웅 및 겹에서 Luxna 화학물질 변형이 ALT 상승 없이 강력하고 내구성 있는 반응을 생성할 수 있음을 입증한다.

[0231] 실시예 18. AAV-HBV 마우스 모델에서 ASO ASO 131의 평가

[0232] ASO 131은 표준 포스포아미다이트 화학물질을 사용하여 ABI 394 및 Expedite 8909 합성기에서 합성했고 GalNac4에 접합시켰다. ASO 131은 아데노 관련 바이러스(AAV)-HBV 마우스 모델에서 3일마다 3×10 mg/kg의 용량으로 테스트했다. 도 7A는 ASO 131의 3×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 7B는 ASO 131의 3×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다. 이러한 결과는 웅 및 겹에서 Luxna 화학물질 변형이 ALT 상승 없이 강력하고 내구성 있는 반응을 생성할 수 있음을 입증한다.

[0233] 실시예 19. AAV-HBV 마우스 모델에서 ASO 121의 평가

[0234] ASO 121은 표준 포스포아미다이트 화학물질을 사용하여 ABI 394 및 Expedite 8909 합성기에서 합성했고 GalNac4에 접합시켰다. ASO 121은 아데노 관련 바이러스(AAV)-HBV 마우스 모델에서 3일마다 5×10 mg/kg의 용량으로 테스트했다. 도 8A는 ASO 121의 5×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 8B는 ASO 121의 5×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다. 이러한 결과는 3×10 mg/kg Q3D의 매우 엄중한 투약 요법 하에서 웅 및 겹에서의 Luxna 변형이 많은 ALT 상승을 갖는 강건하고 내구성 있는 반응을 생성할 수 있음을 입증한다.

[0235] 실시예 20. ASO 변형의 평가

[0236] 이 실시예에서는 ASO 중 다양한 뉴클레오타이드 위치의 변형(LNA 또는 겹-변형 화학물질)을 효력 및 독성에 대해 스크리닝했다.

[0237] 이하 표 19의 특정 서열은 본 개시내용의 범위 내에 있는 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, ln = 잠금 핵산(LNA); lnA = 잠금 핵산(LNA) A; ln(5m)C ln(5m)C = 잠금 핵산(LNA)-5메틸 C; lnG = 잠금 핵산(LNA) G; lnT = 잠금 핵산(LNA) T; (5m)C=5 메틸C; mA = 2-O-메톡시 A; mU = 2-O-메톡시 U; (8nh)A = 8-아미노 A; (8nh)G = 8-아미노 G; (2s)T = 2-티오 T; am = amNA; am(5m)C = AmNA-NCH₃-(5m)C 포스포아미다이트; cp = scp = 사이클로프로필; cpC = scpC = 사이클로프로필 C; cpG = scpG = 사이클로프로필 G; A = dA; G = dG, C = dC, T = 티미딘; cpT = scpT = 사이클로프로필 T; ps = 포스포로티오에이트 결합; p= 포스포다이에스터 결합이다.

표 19

ASO 변형		
서열번호	ASO 번호	서열 (5'→3')
272	132	5'-GalNAc1-C6-p-CA-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'
302	133	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'
303	134	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpsAmT 3'
304	135	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)CpsAm(5m)CpslnGpslnT 3'
300	136	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpscpT 3'
408	137A	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cps(5m)scpCpslnGpslnT 3'
409	138	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
410	132A	5'-GalNAc5-(PS)2-p-InGpslnApslnGpsApsGpsGpsTpsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)Cps(5m)Cpsln(5m)CpslnGpslnT 3'
411	140	5'-GalNAc1-C6-p-CA-InGpslnApslnTpslnApslnAps(8nh)ApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'
412	141	5'-GalNAc1-C6-p-CA-InGpslnApslnTpslnApslnApsAps(8nh)Aps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'

[0238]

ASO 변형		
서열번호	ASO 번호	서열 (5'→3')
413	142	5' -GalNAc1-C6-p-CA- lnGpslnApslnTpslnApslnApsAps(5OH)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5 m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C-3'
369	143	5' - ln(5m)Cpsam(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-A-p-(PS)2-GalNAc4-3'
370	144	5' - am(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-A-p-(PS)2-GalNAc4-3'
414	145A	5' - am(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-A-p-(PS)2-GalNAc4-3'
371	146	5' - ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsam(5m)Cps(5m)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-A-p-(PS)2-GalNAc4-3'
270	147	5' -GalNAc2-C6-p- CAlnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln (5m)CpslnGpslnG-3
415	148	5' -GalNAc1-C6-p-CA- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5OH)CpsAps(5m)CpsGpsApsGpsTps (5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'
416	149	5' -GalNAc1-C6-p-CA- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)Cps(8nh)Aps(5m)CpsGpsApsGps Tps(5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'
417	150	5' -GalNAc1-C6-p-CA- ln(5m)Cpsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps(5m)CpsAps(5OH)CpsGpsApsGpsTps (5m)CpsTpsApslnGpslnApsln(5m)C-3'
284	151	5' -GalNAc6-(PS)2-p- lnGpslnGpslnApsTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsl nApsln(5m)CpslnG-3'

[0239]

ASO 변형		
서열번호	ASO 번호	서열 (5'→3')
286	152	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
287	153	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
288	154	5'-GalNAc6-(PS)2-p-InGpslnGpslnApsTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApsln(5m)CpslnG 3'
378	155	5'lnGpslnGpslnApsTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApscp(5m)CpslnG-A-p-(PS)2-GalNAc6-3'
377	156	5'lnGpslnGpslnApsTpsTps(5oh)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpslnApscp(5m)CpslnG-A-p-(PS)2-GalNAc4-3'
392	157	5'-lnGpslnApslnTpsTps(5OH)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpscpG-T-p-(PS)2-GalNAc4-3'
393	158	5'-lnGpslnApscpTps(2s)Tps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-T-p-(PS)2-GalNAc4-3'
394	159	5'-lnGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG-T-p-(PS)2-GalNAc4-3'

[0240]

[0241]

HBV 마우스를 ASO 133 내지 136, 및 137A 3×10 mg/kg QW의 용량으로 처리하였다. 결과적으로 수득되는 혈청 HBsAg의 변화는 도 10A에 나타냈고, 혈청 ALT는 도 10B에 나타냈다. 이러한 결과는 이 특정 서열에서 (5m)cpC Luxna 변형을 갖는 ASO 링(ASO 137A)이 모든 LNA(Luxna 화학물질 없음, ASO 133), cpT 변형(ASO 136), AmT 변형(ASO 134) 및 AM(5m)C(ASO 135)보다 높은 효력 및 낮은 ALT를 나타낸다는 것을 입증한다.

[0242]

HBV 마우스를 3×10 mg/kg QW 용량의 ASO 138 또는 153으로 처리했다. 도 11A는 3×10 mg/kg QW의 ASO 138 또는 153으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 11B는 3×10 mg/kg QW의 ASO 138 또는 153으로 처리된 마우스의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다. 이러한 결과는 중심("갭") 영역, 갭 위치 #2에 (2s)T에 의한 Luxna 변형을 갖는 ASO가 효력을 유지하면서 ALT를 제거할 수 있다는 것을 입증한다.

[0243]

HBV 마우스를 3×10 mg/kg QW의 용량의 ASO 132A 또는 137A로 처리했다. 도 12A는 3×10 mg/kg QW의 ASO 132A 또는 137A로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 12B는 3×10 mg/kg QW의 ASO 132A 또는 137A로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT의 그래프를 나타낸다. 이러한 결과는 링 영역에 Luxna 화학 물질 (5m)cpC 변형을 갖는 ASO가 모든 LNA(링) ASO로부터의 효력을 개선시키면서 ALT를 감소시킬 수 있음을 입증한다.

[0244]

HBV 마우스를 5×10 mg/kg Q3D 용량의 ASO 140-142로 처리하였다. 도 13A는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 140-142로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 13B는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 140-142로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT의 그래프를 나타낸다. 3개 서열은 모두 링에 모든 LNA가 있지만, 갭의 5' 단부(예를 들어, 중심 영역)으로부터 각각 위치 #1(ASO 140), #2(ASO 141) 및 #3(ASO 142)에 8-아미노 A, 8-아미노 A 또는 (5-OH)C를 갖는다. Gap의 #3 위치에 (5-OH)C가 있는 ASO 142는 ALT 상승이 없고 효력이 우수했다. 이러한 결과는 중심 영역에 변형이 있는 ASO가 효력을 유지하면서 ALT를 감소 또는 제거할 수 있음을 입증한다.

[0245]

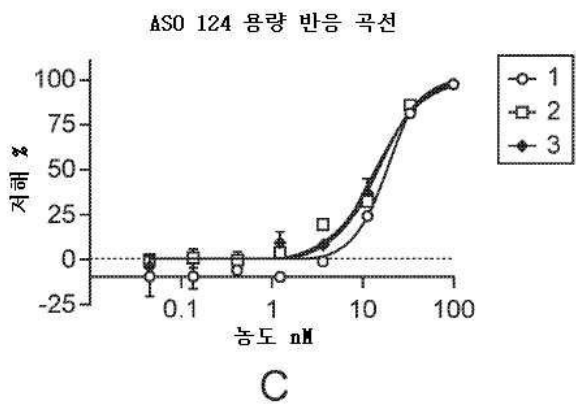
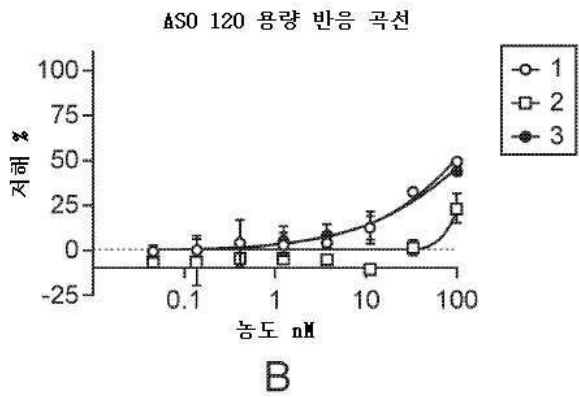
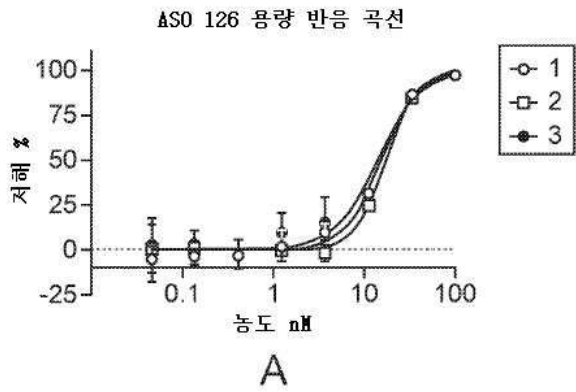
HBV 마우스를 3×10 mg/kg Q3D 용량의 ASO 143, 144, 145A, 또는 146으로 처리했다. 도 14A는 ASO 143, 144, 145A, 또는 146 3×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 14B는 ASO 143, 144, 145A 또는 146 3×10 mg/kg Q3D로 처리된 마우스의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다. 이들 서열은 Am(5m)C를 사용하여 서열을 "워크(walk)"하여, ln(5m)C를 하나씩 대체하도록 설계했다. 이러한 결과는 5' 링 단부에 Am(5m)C 변형이 있는 ASO가 다른 위치에 있는 Am(5m)C와 비교하여 최상의 치료 지수를 나타낸다는 것을 입

증한다.

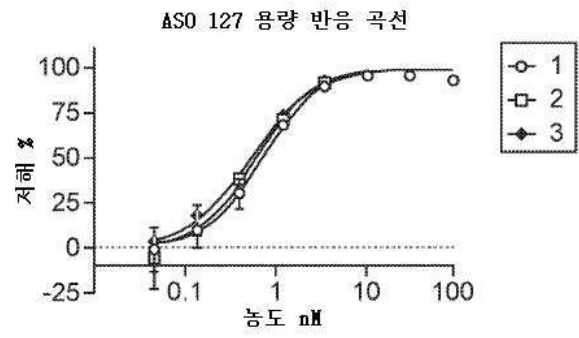
- [0246] HBV 마우스를 5×10 mg/kg Q3D 용량의 ASO 148-150으로 처리하였다. 도 15A는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 148-150으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 15B는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 148-150으로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT의 그래프를 나타낸다. 이 서열들은 모든 LNA 링을 갖고 있지만, 각각 중심 영역의 5' 단부로부터 위치 #1(ASO 148), #2(ASO 149) 및 #3(ASL 150)에 Luxna Gap 변형을 갖고 있다. 이들 결과는 이 서열에서 Gap #2 위치에 Luxna 변형이 있는 ASO가 최상의 치료 지수를 나타낸다는 것을 입증한다.
- [0247] HBV 마우스를 3×10 mg/kg, SC, QW 용량의 ASO 151-154로 처리하였다. 도 16A는 QW 3×10 mg/kg의 ASO 151-154로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 16B는 QW 3×10 mg/kg의 ASO 151-154로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT의 그래프를 나타낸다. 이 서열들은 모든 LNA 링을 갖지만, 각각 Luxna 화학물질 변형이 없고(ASO 151), #1에 Luxna 겹 변형(ASO 152); #2(ASO 153) 및 #3(ASO 154)에 Luxna 겹 변형을 갖고 있다. 이들 결과는 중심 영역에 Luxna 겹 변형이 있는 ASO(ASO 152, 153 및 154)가 효력을 유지하면서, Luxna 겹 변형이 없는 ASO(ASO 151)로부터 ALT를 감소시키거나 제거할 수 있음을 입증한다. ASO 152, 153, 154 중에서, 겹 위치 #2에 Luxna 변형을 가진 ASO 153은 ALT를 전혀 상승시키지 않았다.
- [0248] HBV 마우스를 3×10 mg/kg, SC, Q3D 용량의 ASO 147, 155 또는 156으로 처리했다. 도 17A는 3×10 mg/kg Q3D의 ASO 147, 155, 또는 156으로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 17B는 3×10 mg/kg Q3D의 ASO 147, 155, 또는 156으로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT의 그래프를 나타낸다. ASO 155 및 156은 동일한 Luxna 링 변형을 갖지만, 상이한 겹 변형을 갖는다. ASO 155는 #2 위치에 Luxna 겹 변형을 갖고 156은 #3 위치에 Luxna 겹 변형을 갖는다. 이들 결과는 Luxna 변형이 있는 두 ASO가 모두 ALT를 감소시키거나 제거할 수 있지만, #2 겹 위치에서의 변형이 이 특정 서열에 대해 더 우수하게 작용했음을 입증한다.
- [0249] HBV 마우스를 5×10 mg/kg, SC, Q3D 용량의 ASO 157-159로 처리했다. 도 18A는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 157-159로 처리된 마우스로부터의 혈청 HBsAg의 변화 그래프를 나타낸다. 도 18B는 5×10 mg/kg Q3D의 ASO 157-159로 처리된 마우스로부터의 혈청 ALT 그래프를 나타낸다. 이 결과는 겹의 #3 위치에서 Luxna 변형을 갖고 링에 cpT 변형을 갖는 ASO가 최상의 효력 및 안전성을 갖고 있음을 입증한다.

도면

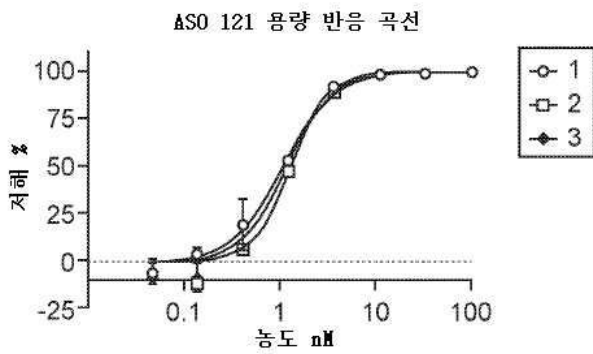
도면1



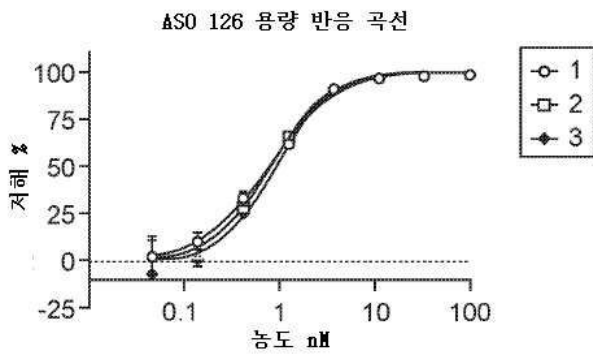
도면2



A

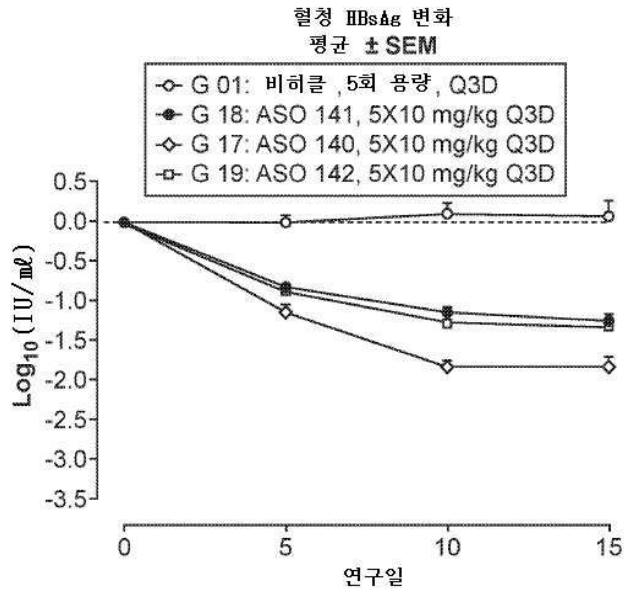


B

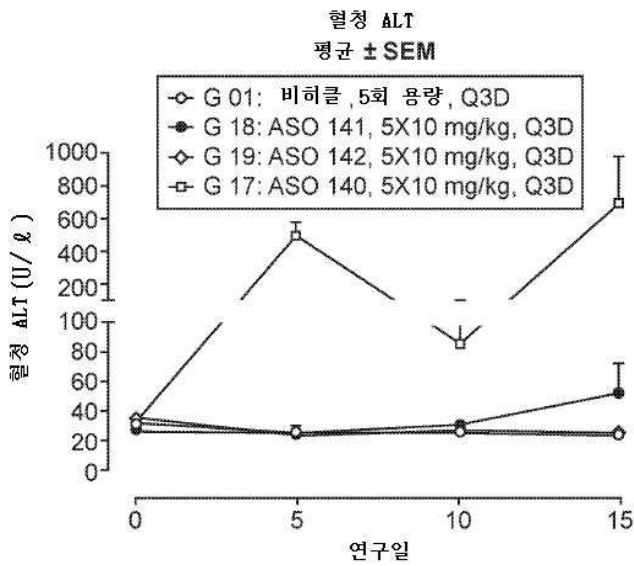


C

도면3ab

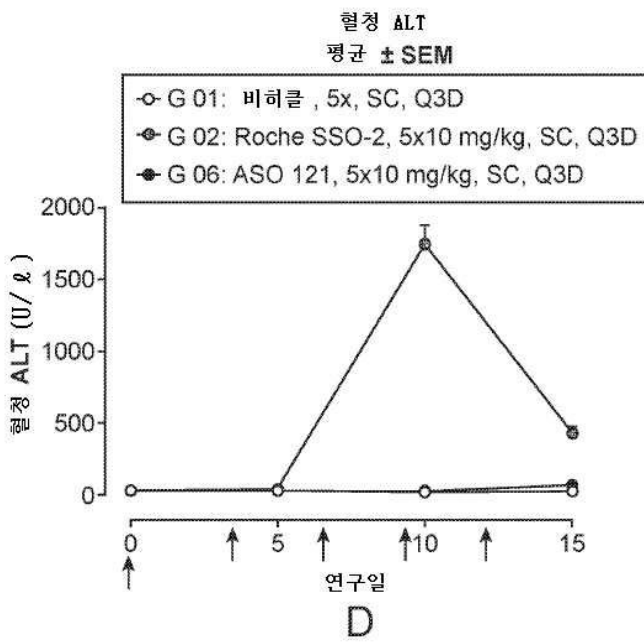
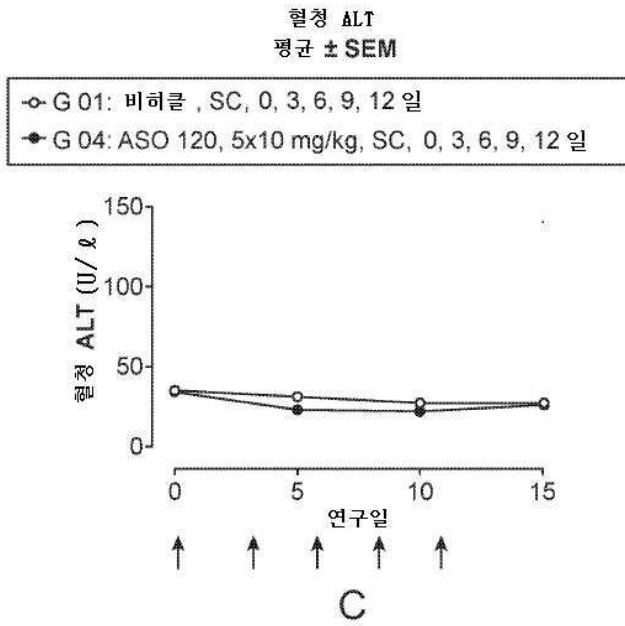


A

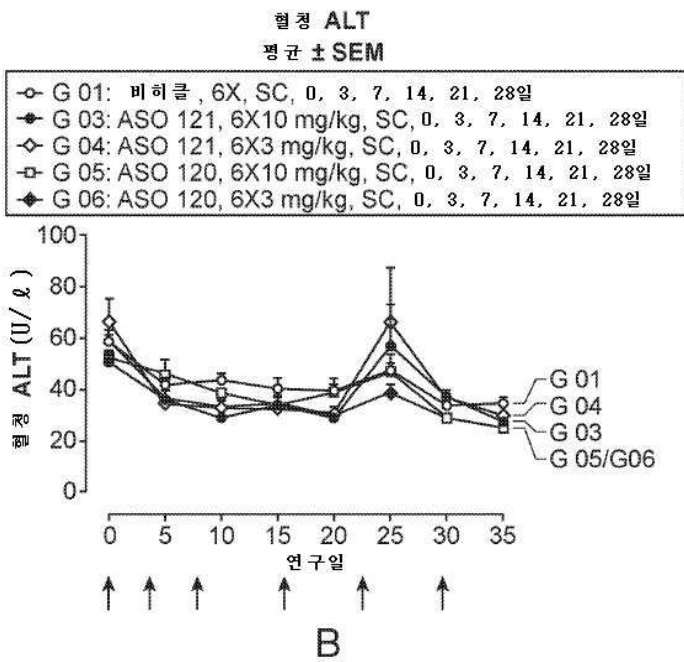
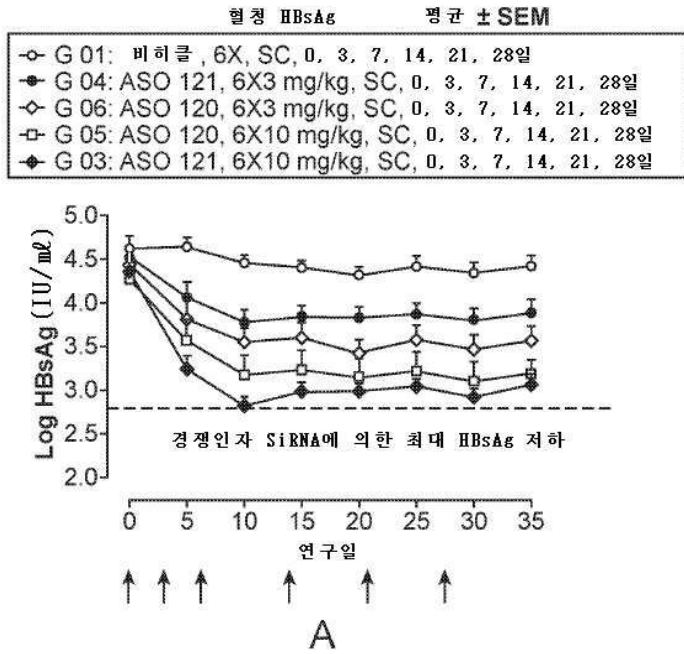


B

도면3cd



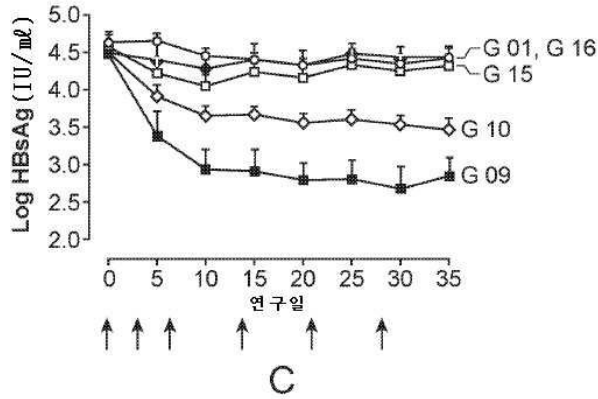
도면4ab



도면4cd

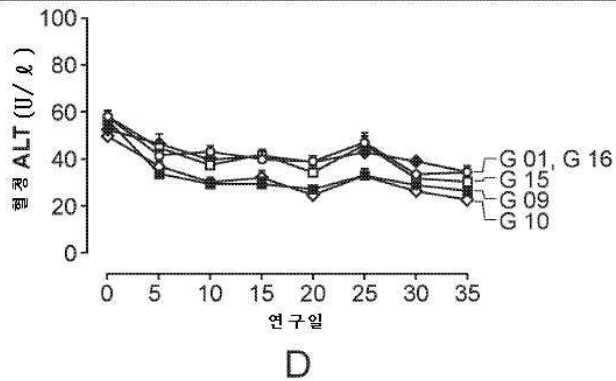
혈청 HBsAg
평균 ± SEM

○	G 01: 비히클, 6X, SC, 0, 3, 7, 14, 21, 28일
■	G 09: ASO 121 + ASO 120 (1:1), 6X10 mg/kg, SC, 0, 3, 7, 14, 21, 28일
◇	G 10: ASO 121 + ASO 120 (1:1), 6X3 mg/kg, SC, 0, 3, 7, 14, 21, 28일
□	G 15: ASO 123, 6X10 mg/kg, SC, 0, 3, 7, 14, 21, 28일
◆	G 16: ASO 123, 6X3 mg/kg, SC, 0, 3, 7, 14, 21, 28일

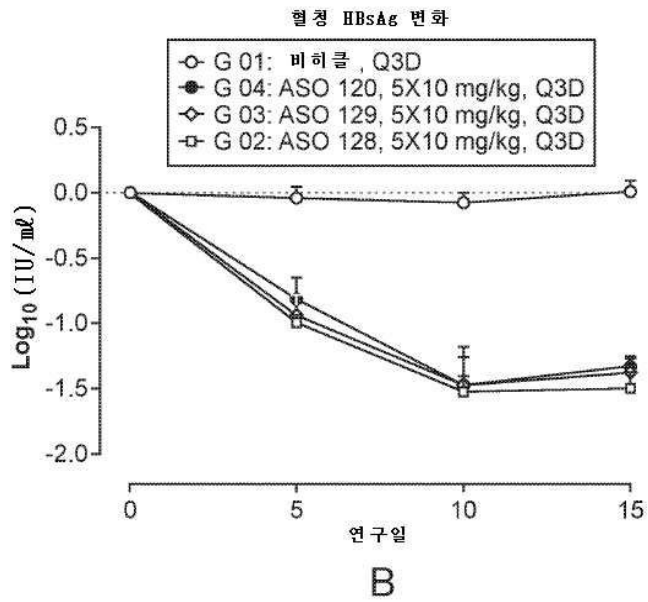
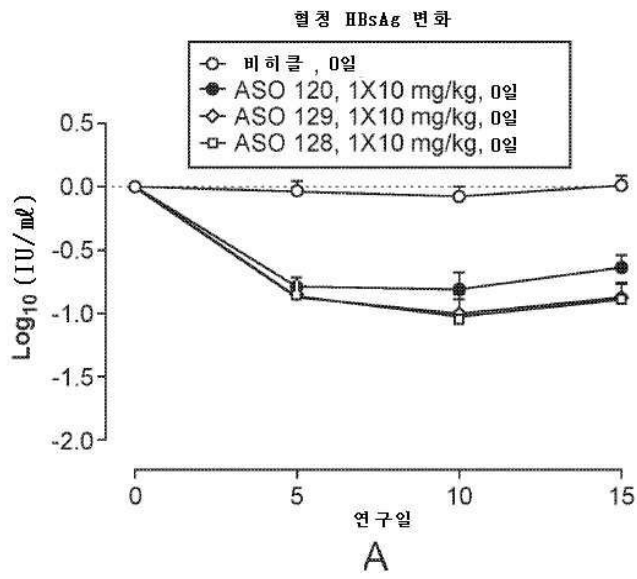


혈청 ALT
평균 ± SEM

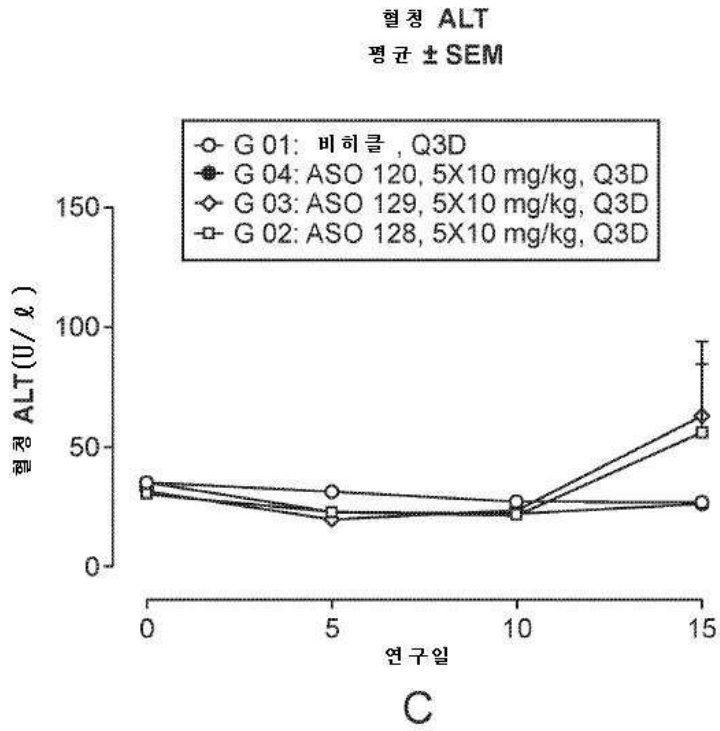
○	G 01: 비히클, 6X, SC, 0, 3, 7, 14, 21, 28일
■	G 09: ASO 121 + ASO 120 (1:1), 6X10 mg/kg, SC, 0, 3, 7, 14, 21, 28일
◇	G 10: ASO 121 + ASO 120 (1:1), 6X3 mg/kg, SC, 0, 3, 7, 14, 21, 28일
□	G 15: ASO 123, 6X10 mg/kg, SC, 0, 3, 7, 14, 21, 28일
◆	G 16: ASO 123, 6X3 mg/kg, SC, 0, 3, 7, 14, 21, 28일



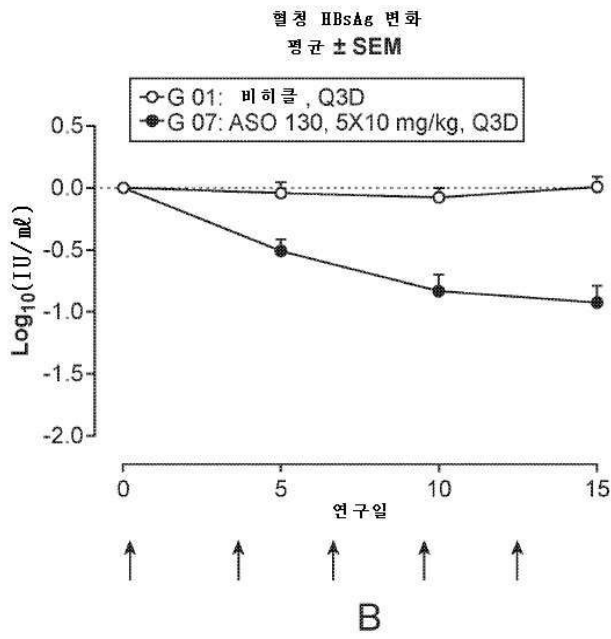
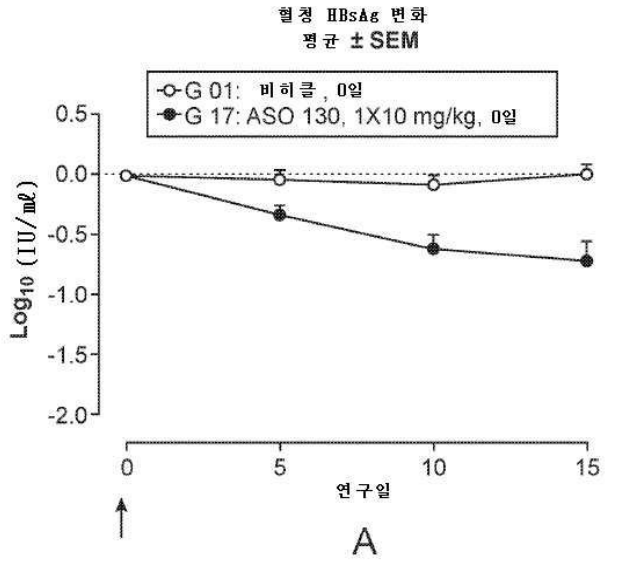
도면5ab



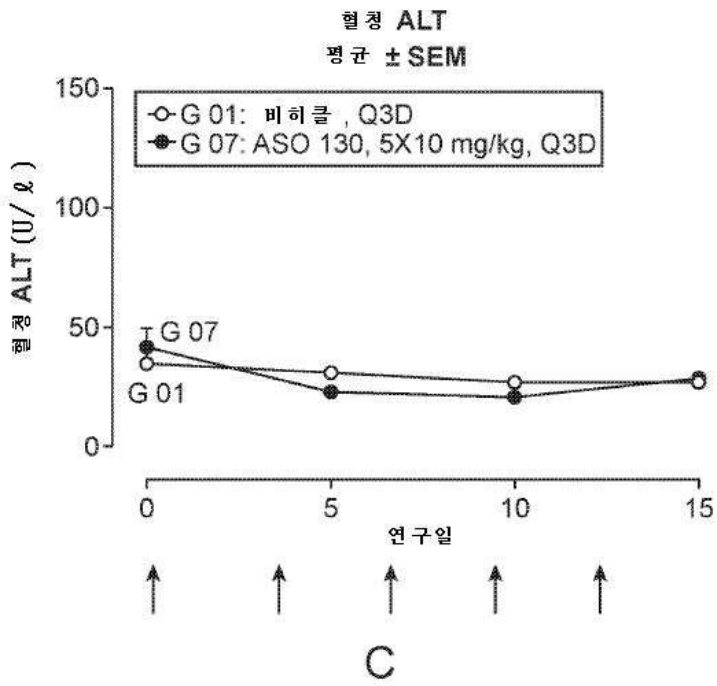
도면5c



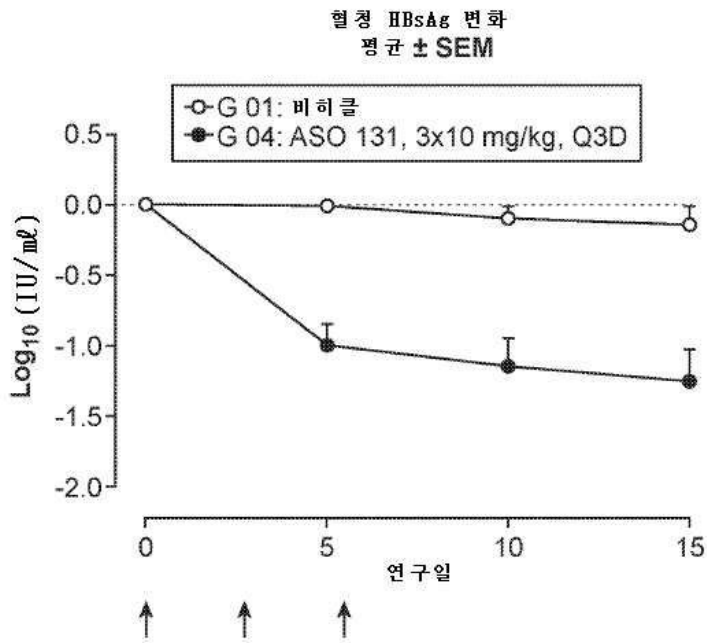
도면6ab



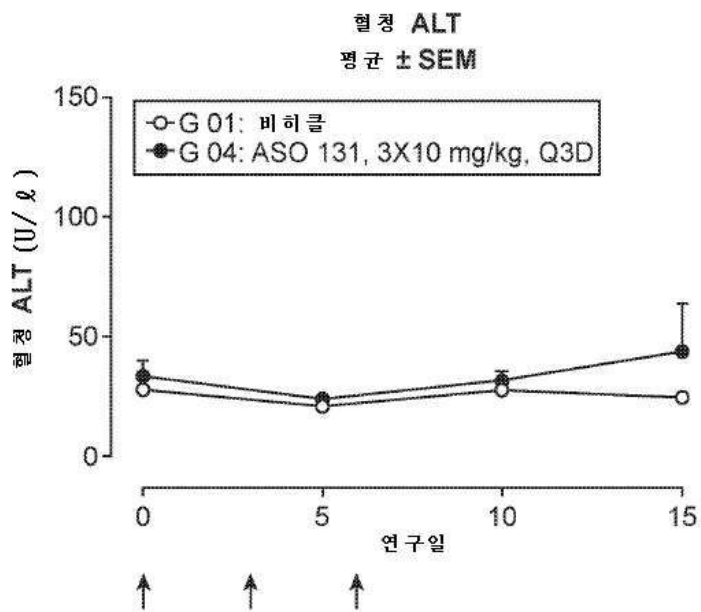
도면6c



도면7

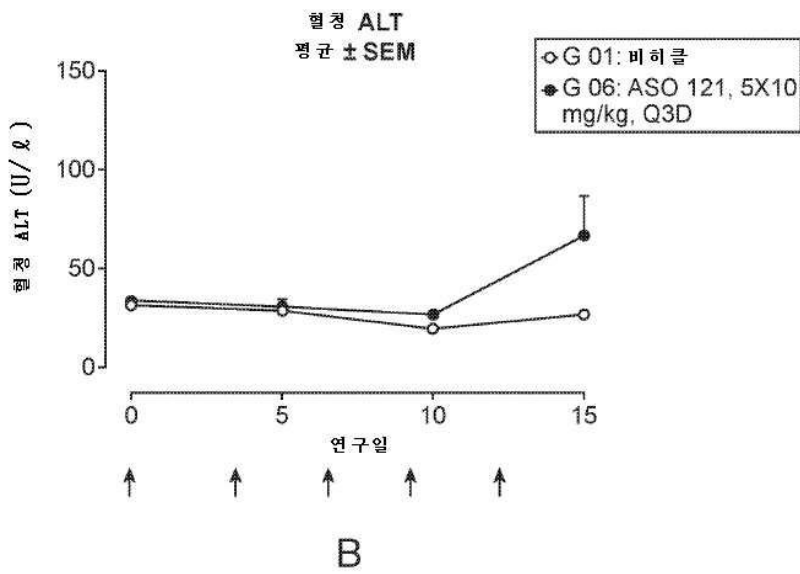
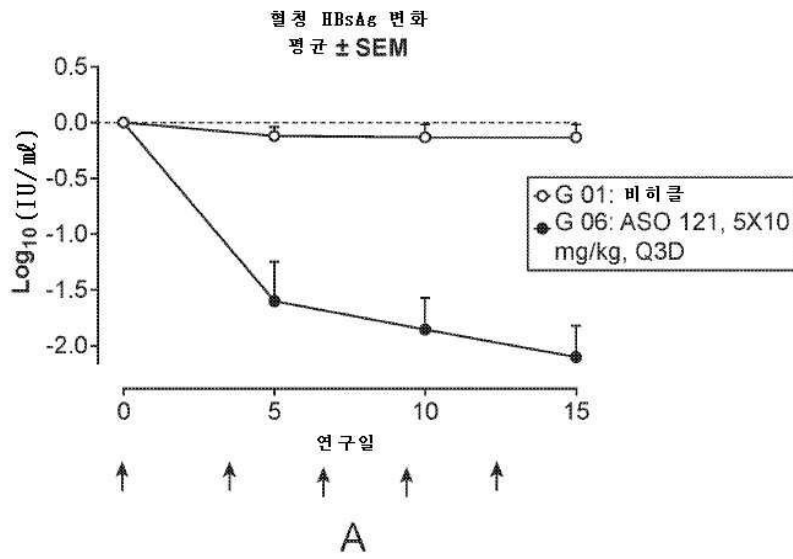


A

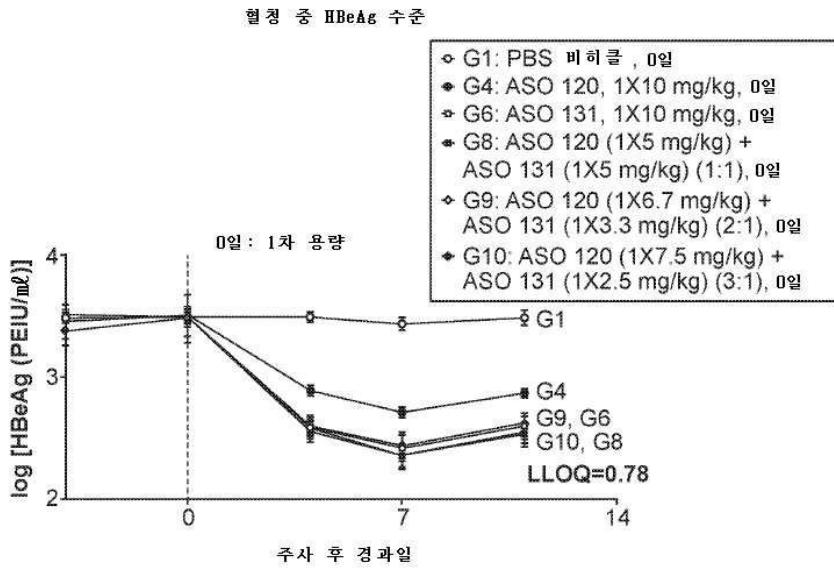


B

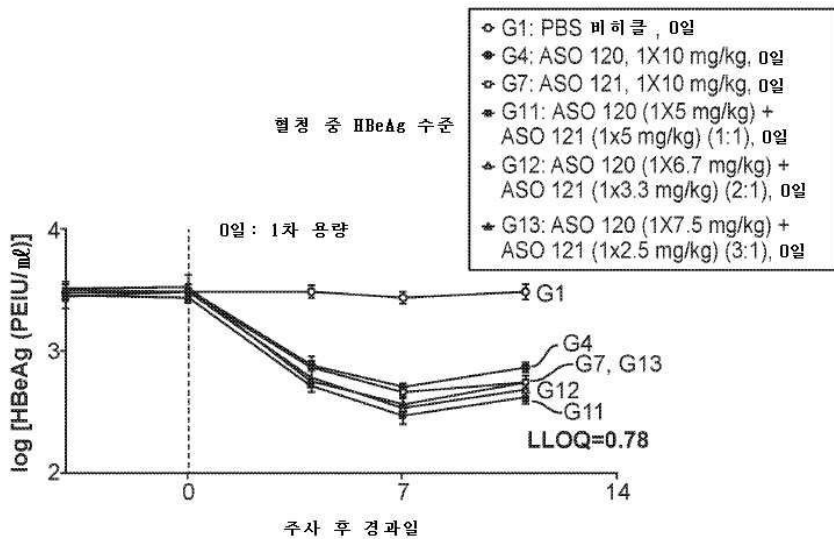
도면8



도면9

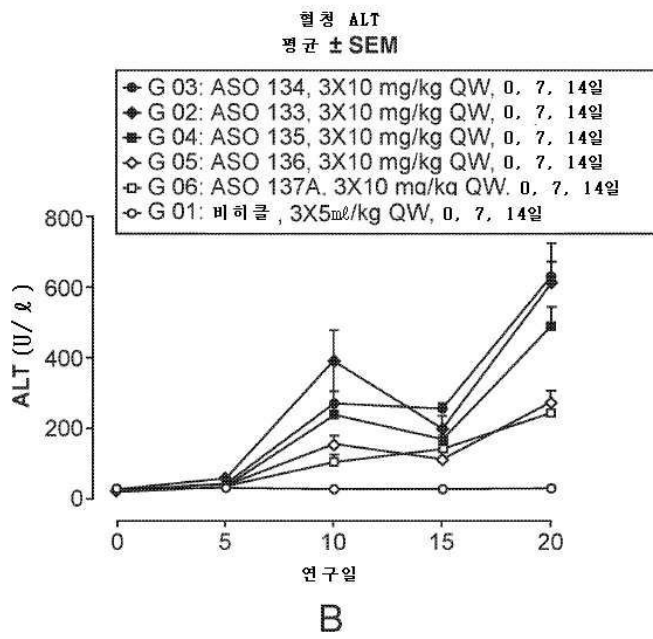
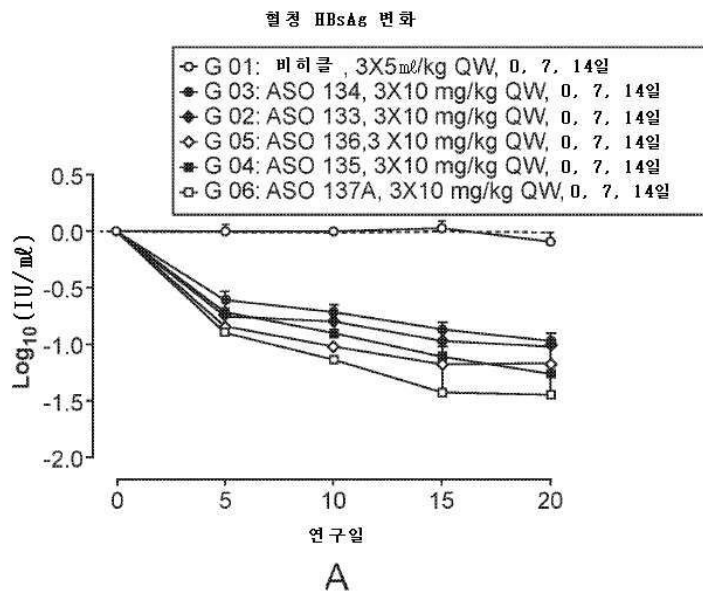


A

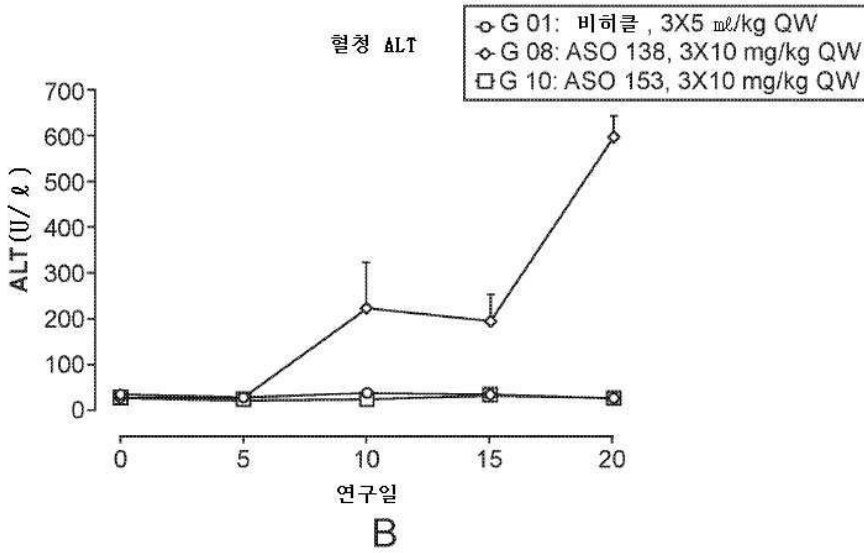
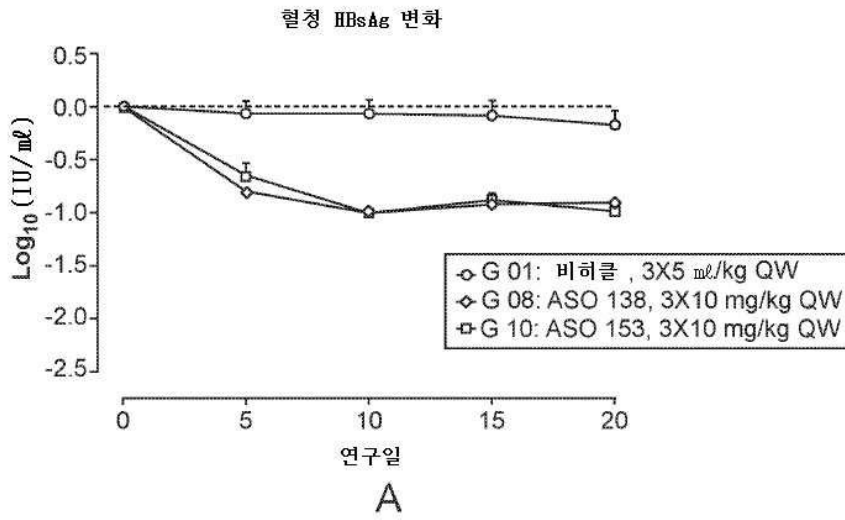


B

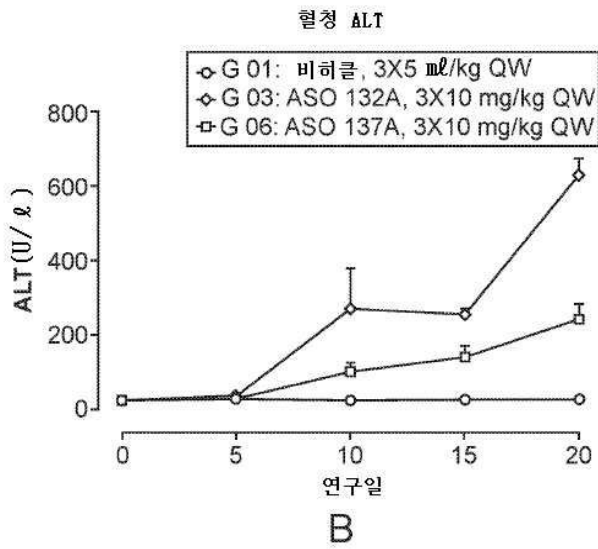
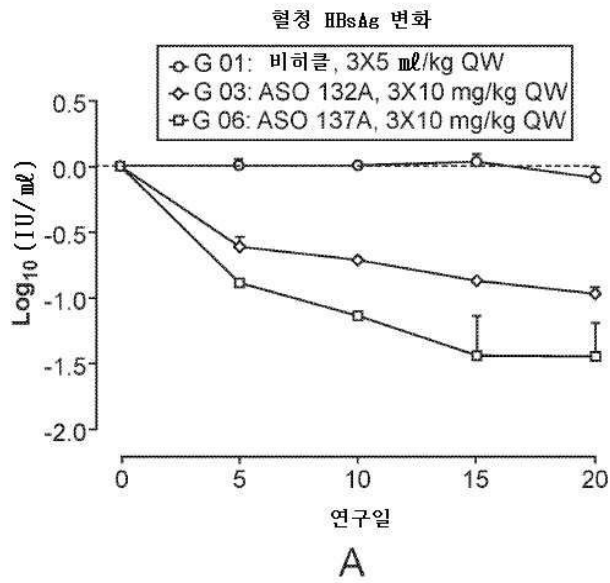
도면10



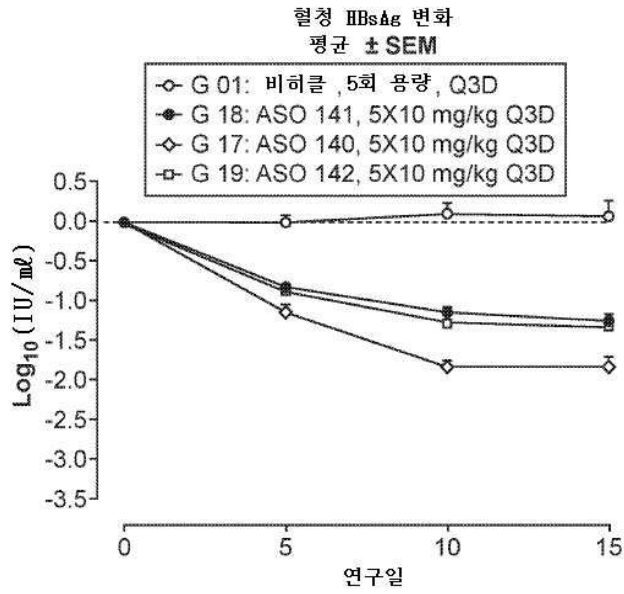
도면11



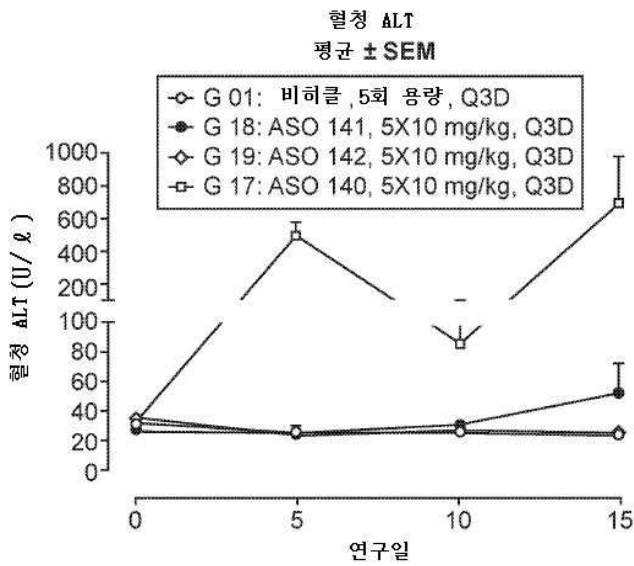
도면12



도면13

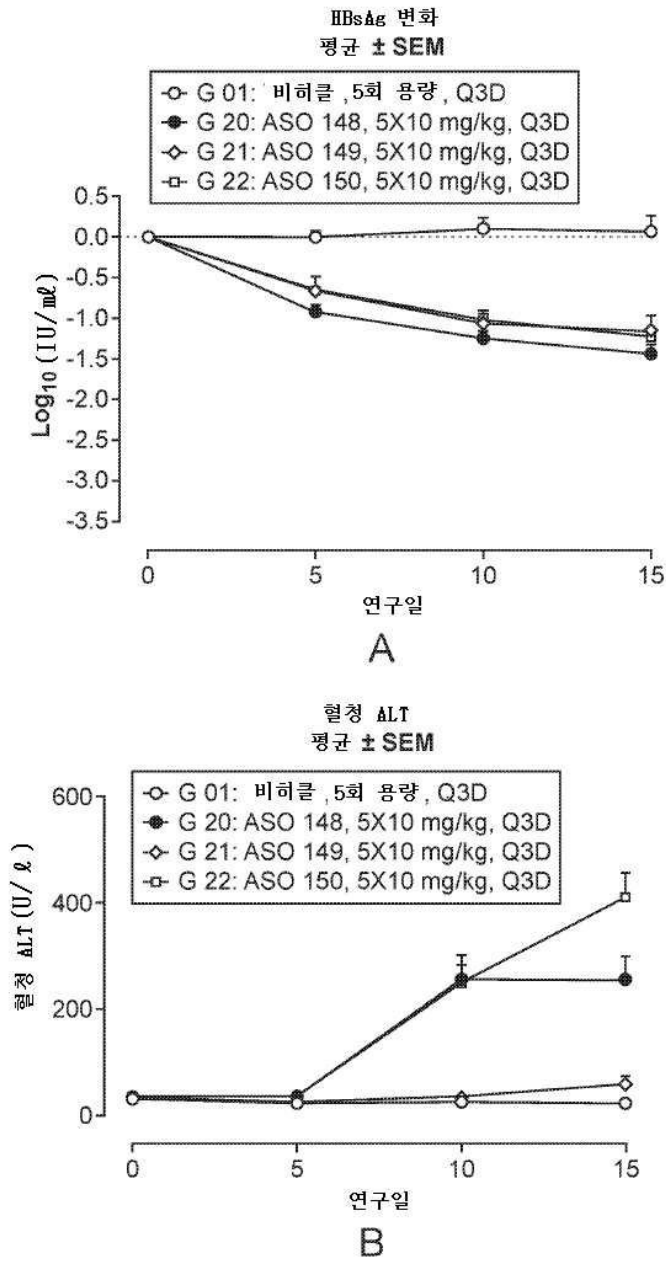


A

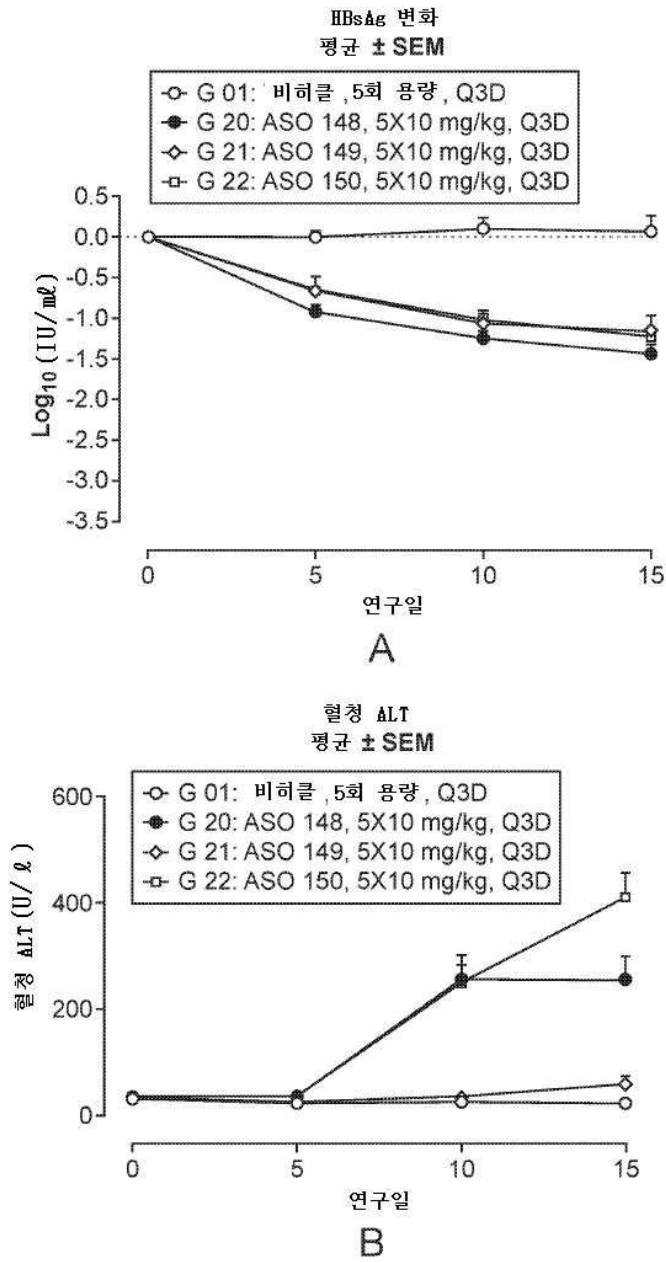


B

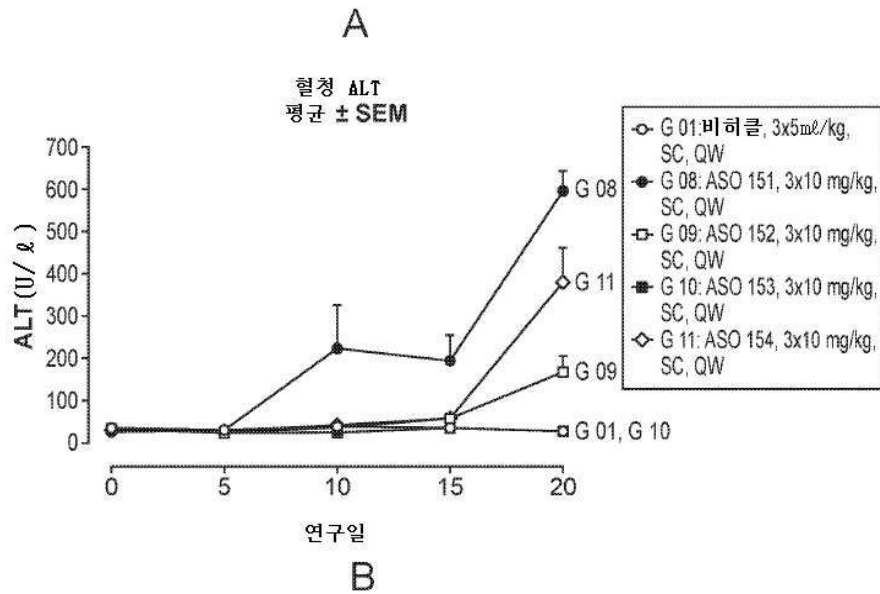
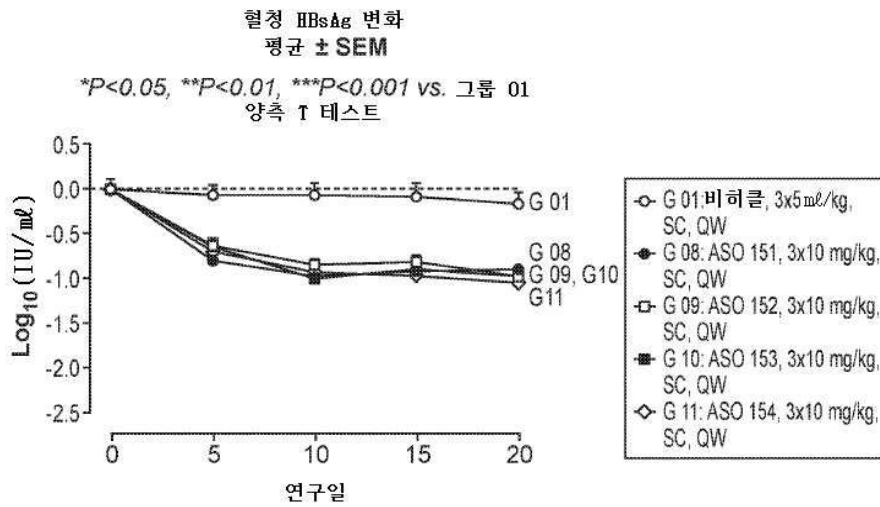
도면14



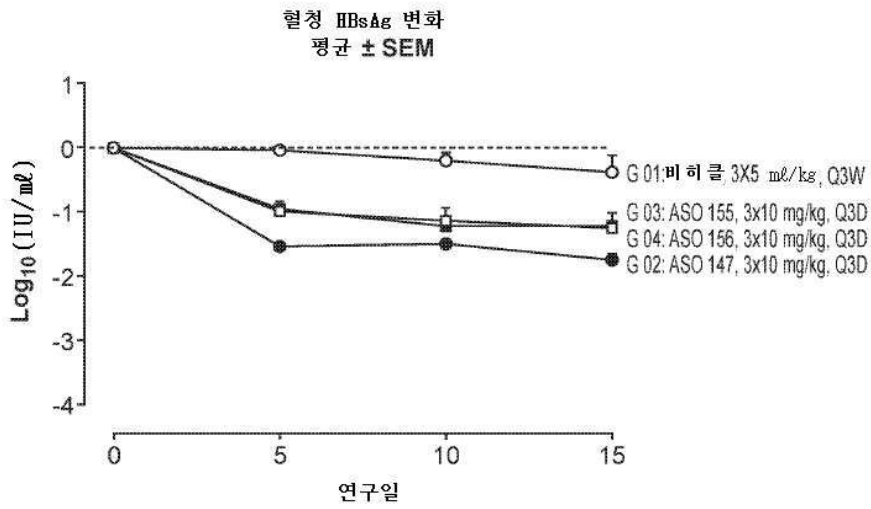
도면15



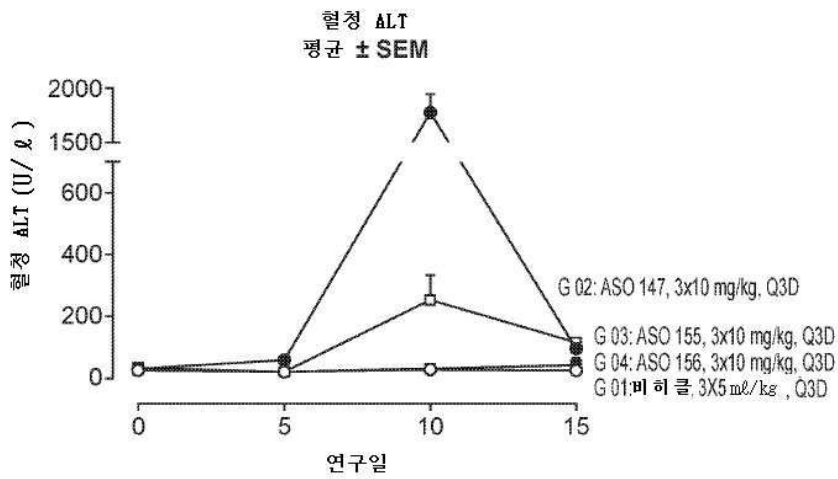
도면16



도면17

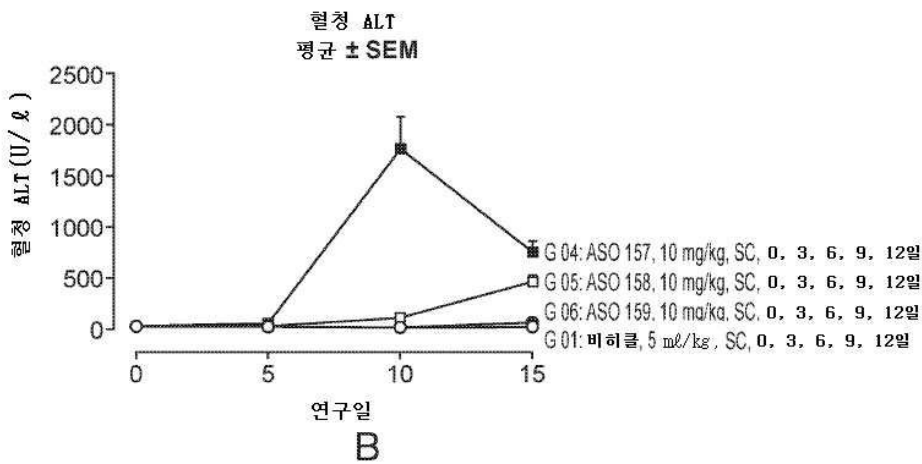
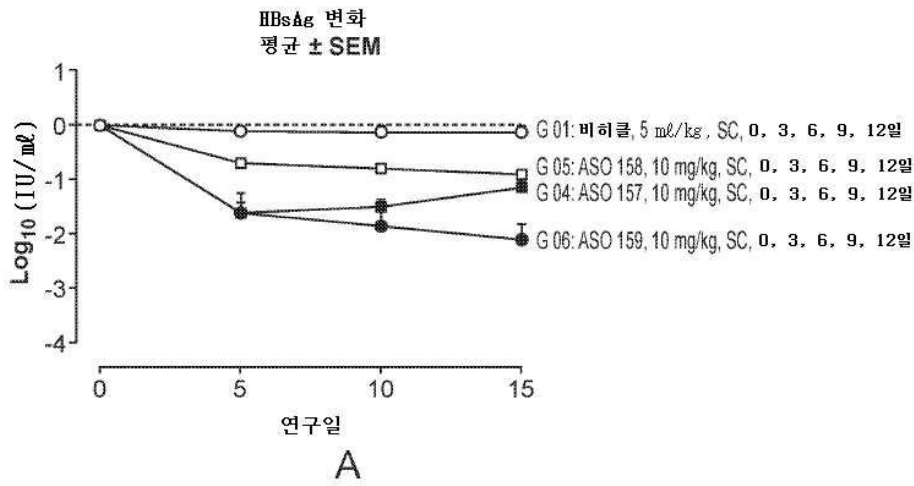


A



B

도면18



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> ALIGOS THERAPEUTICS, INC.

<120> MODIFIED GAPMER OLIGONUCLEOTIDES AND METHODS OF USE

<130> 122400-0131

<140> PCT/US2020/035212

<141> 2020-05-29

<150> 62/943,532

<151> 2019-12-04

<150> 62/937,760

<151> 2019-11-19

<150> 62/855,793

<151> 2019-05-31

<160> 428

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3215

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 1

```

ctccaccact ttcacacaaa ctcttcaaga tcccagagtc agggccctgt actttcctgc      60
tgggtgctca agttccggaa cagtaaacc tgcctcgact actgcctctc ccatatcgtc      120

aatcttctcg aggactgggg accctgtacc gaatatggag agcaccacat caggattcct      180
aggaccctg ctctgttac aggcggggtt tttctgttg acaagaatcc tcacaatacc      240
acagagtcta gactcgtggt ggacttctct caatcttcta gggggagcac ccacgtgtcc      300
tggccaaaat ttgcagtccc caacctcaa tctctacca acctcttgc ctccaattg      360
tcctggttat cgctggatgt gtctcggcgt ttttatcctc ttctcttca tctgtctgct      420
atgcctcctc ttctgttgg ttctctgga ctaccaaggt atgttgcctg tttgtctctc      480
acttcagga acatcaacta ccagcaccgg accatgcaaa acctgcacaa ctactgctca      540

agggacctct atgtttccct catgttctg tacaacacct acggacggaa actgcacctg      600
tattcccatc ccatcatctt gggctttcgc aaaataccta tgggagtggg cctcagtccg      660
tttctcttgg ctctgttac tagtgccatt tgttcagtgg ttcgtagggc tttccccac      720
tgtctggcct tcagttatat ggatgatgtg gttttggggg ccaagtctgt acaacatctt      780
gagtcctctt ataccgctgt taccaatctt cttttatctt tgggtataca tttaacctt      840
cacaaaacaa aaagatgggg atattccctt aacttcatgg gatatgtaat tgggagtgg      900
ggcactttgc ctcaggaaca tattgtacaa aaaatcaagc aatgttttag gaaacttct      960

gtaaacaggc ctattgattg gaaagtatgt caacraattg tgggtctttt ggggtttgcc      1020
gccctttca cgcaatgtgg atatcctgct ttaatgcctt tatatgcatg tatacaagct      1080
aagcaggcct ttactttctc gccaaacttac aaggcctttc tgtgtaaaca atatctgaac      1140
ctttacccc ttgctcggca acggtcaggt ctttgccaag tgtttgctga cgcaacccc      1200
actggttggg gcttggccat aggccatcag cgcctcgtg gaacctttgt ggctcctctg      1260
ccgatccata ctgcggaact cctagcagct tgttttctc gcagccggtc tggagcaaaa      1320
cttatcgga ccgacaactc tgttctctc tctcggaat acacctctt tccatggctg      1380

ctaggatgtg ctgccaactg gatcctcgcg gggacgtcct ttgtctacgt cccgtcggcg      1440
ctgaatcccg cggacgaccc atctcggggc cgtttgggac tctaccgtcc ctttctcgt      1500

```

ctgccgttcc gcccgaccac ggggcgcacc tctctttacg cggctcctccc gtctgtgcct 1560
tctcatctgc cggaccgtgt gcacttcgct tcacctctgc acgtcgcattg gagaccaccg 1620
tgaacccca cgggaacctg cccaaggtct tgcataagag gactcttgga ctttcagcaa 1680
tgtcaacgac cgaccttgag gcataactca aagactgtgt gtttactgag tgggaggagt 1740
tgggggagga ggttaggta aaggctttg tactaggagg ctgtaggcat aaattggtgt 1800

gttcaccage accatgcaac tttttcacct ctgcctaate atctcatgtt catgtcctac 1860
tgttcaagcc tccaagctgt gccttgggtg gctttggggc atggacattg acccgtataa 1920
agaatttggg gcttctgtgg agttactctc ttttttgctt tctgacttct ttccttctat 1980
tcgagatctc ctgcacaccg cctctgctct gtatcgggag gccttagagt ctccggaaca 2040
ttgttcacct caccatacgg cactcaggca agcaattctg tgttgggggtg agttaatgaa 2100
tctagccacc tgggtgggaa gtaatttggg agatccagca tccaggaat tagtagtcag 2160
ctatgtcaac gttaatatgg gcctaaaaat cagacaacta ttgtggtttc acatttctg 2220

tcttactttt gggagagaaa ctgttcttga atatttgggtg tcttttgag tgtggattcg 2280
cactcctcct gcatatagac cacaaaatgc cctatetta tcaacacttc cggaaactac 2340
tgttgttaga cgaagaggca ggtccctag aagaagaact ccctcgcctc gcagacgaag 2400
gtctcaatcg ccgcgtcgca gaagatctca atctcgggaa tctcaatgtt agtattcctt 2460
ggacacataa ggtgggaaac tttacggggc tttattcttc tacggtagct tgctttaatc 2520
ctaaatggca aactccttct tttctgaca ttcatattgca ggaggacatt gttgatagat 2580
gtaagcaatt tgtggggccc cttacagtaa atgaaaacag gagacttaa ttaattatgc 2640

ctgctaggtt ttatcccaat gttactaaat atttgccctt agataaaggg atcaaaccgt 2700
attatccaga gtatgtagtt aatcattact tcagacgcg acattattta cacactcttt 2760
ggaaggcggg gatcttatat aaaagagagt ccacacgtag cgcctcattt tgcgggtcac 2820
catattcttg ggaacaagat ctacagcatg ggaggttggg cttccaacc tcgaaaaggc 2880
atggggacaa atctttctgt cccaatccc ctgggattct tccccgatca tcagttggac 2940
cctgcattca aagccaactc agaaaateca gattgggacc tcaaccaca caaggacaac 3000
tggccggacg ccaacaaggt gggagtggga gcattcgggc cagggttcac ccctcctcat 3060

gggggactgt tggggtggag ccctcaggct cagggcataat tcacaacagt gccagcagct 3120
cctcctcctg cctccacaa tcggcagtca ggaaggcagc ctactcctt ctctccacct 3180
ctaagagaca ctatcctca ggccatgcag tggaa 3215

<210> 2

<211> 16

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 2
 cgcgtaaaga gaggtg 16
 <210> 3
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 3
 ccggcagatg agaag 15
 <210> 4
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 4
 aagcgaagtg cacacg 16
 <210> 5
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

 oligonucleotide
 <400> 5
 ggatcagcgc cgacgg 16
 <210> 6
 <211> 16
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 6
 gaggtgaagc gaagtg 16
 <210> 7
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 7
 aagagaggtg cgccc 15
 <210> 8
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 8
 gattcagcgc cgacgg 16
 <210> 9
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 9
 ccgcgtaaag agaggtg 17
 <210> 10
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 10
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 11
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 11
 gtgaagcgaa gtgca 15
 <210> 12
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 12
 cgtgcagagg tgaag 15
 <210> 13
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 13
 gggattcagc gccga 15
 <210> 14
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 14
 ggattcagcg cgcacgg 17

<210> 15
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 15
 ttcagcgccg acggg 15

<210> 16
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 16
 ggattcagcg cgcacgg 17

<210> 17
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 17
 cgcgtaaaga gagtg 16

<210> 18
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 18

gcgccccgtg gtcgg 15

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 19

caccacgagt ctagact 17

<210> 20

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 20

cgcgacggga cgta 14

<210> 21

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 21

aaacgccga gacacat 17

<210> 22

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 22

ggtgcgcccc gtggt 15

<210> 23
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 23
 agcgaagtgc acacgg 16
 <210> 24
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 24
 ggtgaagcga agtgca 16
 <210> 25
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 25
 cgcagtatgg atcgg 15
 <210> 26
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 26
 gagaggtgcg ccccg 16
 <210> 27

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 27
 gggattcagc gccgacg 17
 <210> 28
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 28
 gattcagcgc cgacg 15

 <210> 29
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 29
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 30
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 30
 agaggtgcgc cccgtg 16
 <210> 31
 <211> 17
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 31

gattcagcgc cgacggg

17

<210> 32

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 32

gagaggtgcg ccccg

15

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 33

agagaggtgc gccccgt

17

<210> 34

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 34

aggtgaagcg aagtgc

16

<210> 35

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 35
 gcgaagtgca cacgg 15

<210> 36
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 36
 cgcgggattc agcgc 15

<210> 37
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 37
 gagaggtgcg ccccg 15

<210> 38
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 38
 aagagaggtg cgccccg 17

<210> 39
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 39
 aggtgcgccc cgtgg 15
 <210> 40
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 40
 ccgcagtatg gatcg 15
 <210> 41
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 41
 ccaccacgag tctagac 17
 <210> 42
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 42
 ccgcctgtaa cacgag 16
 <210> 43
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 43
gtccgcggga ttcag 15
<210> 44
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 44
ggtcgtccgc gggattc 17
<210> 45
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 45
acaaaggacg tccgcg 17
<210> 46
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 46
ggattcagcg cgcgacg 16
<210> 47
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 47

ggattcagcg cgcacgg 17
 <210> 48
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 48
 ggattcagcg cgcacg 16
 <210> 49
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 49
 ccaccacgag tctagac 17

 <210> 50
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 50
 agcgaagtgc acacgg 16
 <210> 51
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 51
 agcgaagtgc acacg 15
 <210> 52

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 52

ggtgaagcga agtgca

16

<210> 53

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 53

agcgaagtgc acacg

15

<210> 54

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 54

ccgcctgtaa cacgag

16

<210> 55

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 55

gggattcagc gccga

15

<210> 56

<211> 15

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 56
 gaggtgcgcc ccgtg 15

<210> 57
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 57
 aggtgaagcg aagtgc 16

<210> 58
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 58
 gcctacgaa cactga 17

<210> 59
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 59
 acgccgaga cacat 15

<210> 60
 <211> 17
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 60
 atgataaaac gccgcag 17
 <210> 61
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 61
 attcagcgcc gacgg 15
 <210> 62
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 62
 aaaggacgtc ccgcg 15
 <210> 63
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 63
 aagagagtg cgccc 15
 <210> 64
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 64
 attcagcgcc gacgg 15
 <210> 65
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 65
 atgataaaac gccgcag 17
 <210> 66
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 66
 acaaaggacg tcccg 15
 <210> 67
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 67
 ggtgaagcga agtgc 15
 <210> 68
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 68
 aacgccgcag acacatc 17
 <210> 69
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 69
 aaacgccgca gacacat 17
 <210> 70
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 70
 acgccgcaga cacat 15
 <210> 71
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 71
 aggtgaagcg aagtg 15
 <210> 72
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 72

aacgccgcag acacat 16

<210> 73

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 73

aagcgaagtg cacacg 16

<210> 74

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 74

gataaaacgc cgcagac 17

<210> 75

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 75

ggtgaagcga agtgca 16

<210> 76

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 76

gcctacgaa cactga 17

<210> 77
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 77
 cgcagtatgg atcgg 15

<210> 78
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 78
 gaggtgccc cctg 15

<210> 79
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 79
 atgataaac gccgag 17

<210> 80
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 80
 atgataaac gccgag 17

<210> 81

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 81
 aaacgccgca gacacat 17
 <210> 82
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 82
 aagagaggtg cgcccc 16
 <210> 83
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 83
 aagcgaagtg cacac 15
 <210> 84
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 84
 gttgcgtcag caaac 15
 <210> 85
 <211> 17

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 85
 gggaaagccc tacgaac 17
 <210> 86
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 86
 atgataaaac gccgcag 17
 <210> 87
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 87
 aagacgaagt gcacacg 17
 <210> 88
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 88
 aagcgaagtg cacaacg 17
 <210> 89
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 89

aagcgaagtg caacacg

17

<210> 90

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 90

agcgaagtgc acacgg

16

<210> 91

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 91

agcgaagtgc acacgg

16

<210> 92

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 92

atgataaaac gcgcgag

18

<210> 93

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 93
 atgataaaac gcgcgag 18
 <210> 94
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 94
 atgataaaac gccgcag 17
 <210> 95
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 95
 cgcgtaaaga gaagtg 16
 <210> 96
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 96
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 97
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 97
 ugattcagcg cgcacggg 18
 <210> 98
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 98
 ugattcagcg cgcacggg 18
 <210> 99
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 99
 gagaggtgcg ccccg 16
 <210> 100
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 100
 gagaggtgcg ccccgat 17
 <210> 101
 <211> 17
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 101
 gagaggtgcg cccacgt 17
 <210> 102
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 102
 gagaggtgcg ccccg 16
 <210> 103
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 103
 gagaggtgcg ccccg 16
 <210> 104
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 104
 ugagaggtgc gccccg 17
 <210> 105
 <211> 17

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 105
 ugagaggtgc gccccgt 17
 <210> 106
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 106
 ggattcagcg ccgacg 16
 <210> 107
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 107
 ggattcagcg ccgacg 16
 <210> 108
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 108
 ggattcagcg ccgacg 16
 <210> 109
 <211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 109

uggattcagc gccgacg

17

<210> 110

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 110

uggattcagc gccgacg

17

<210> 111

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 111

uggattcagc gccgacg

17

<210> 112

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 112
 gataaaacgc cgcagac 17

<210> 113
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 113
 agataaaacg ccgcagac 18
 <210> 114
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 114
 agataaaacg ccgcagac 18
 <210> 115
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 115
 ugcgaagtgc acacgg 16
 <210> 116
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 116
 accaccacga gtctagac 18
 <210> 117
 <211>
 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 117
 uggatgaagcg aagtgca 17
 <210> 118
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 118
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 119
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 119
 ggattcagcgc ccgacg 16
 <210> 120
 <211> 17
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 120

ccaccacgag tctagac 17

<210> 121

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 121

gataaaaacg ccgccagac 19

<210> 122

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 122

gattcagcgc cgacgg 16

<210> 123

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 123

gtgaagcgaa gtgca 15

<210> 124

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 124
 aagcgaagtg cacacg 16
 <210> 125
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 125
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 126
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 126
 gaggtgaagc gaagtg 16
 <210> 127
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 127
 ccaccagag tctagac 17
 <210> 128
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 128
 gcgaagtgca cacgg 15
 <210> 129
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 129
 ggattcagcg ccgacgg 17
 <210> 130
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 130
 ggtgaagcga agtgc 15
 <210> 131
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 131
 agcgaagtgc acacg 15
 <210> 132
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 132

aggtgaagcg aagtg	15
<210> 133	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 133	
aggtgcgcc cgtgg	15
<210> 134	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 134	
caggattcag cgccgacg	18
<210> 135	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 135	
cagagaggtg cgccccgt	18
<210> 136	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 136	
caaggtgaag cgaagtgc	18

<210> 137

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 137

caggtgaagc gaagtgca 18

<210> 138

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 138

caccgctgt aacacgag 18

<210> 139

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 139

cagataaaac gccgcagac 19

<210> 140

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 140

caccaccag agtctagac 19

<210> 141

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 141
 cacaccacga gtctagact 19
 <210> 142
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 142
 caccgcctgt aacacgag 18
 <210> 143
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 143
 gagagtgcg ccccg 16
 <210> 144
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

 oligonucleotide
 <400> 144
 gagagtgcg ccccgat 17
 <210> 145
 <211> 17

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 145
 gagaggtgcg cccacgt 17
 <210> 146
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 146
 gagaggtgcg ccccg 16
 <210> 147
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 147
 gagaggtgcg ccccg 16
 <210> 148
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 148
 ggattcagcg cgcacg 16
 <210> 149
 <211> 16
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 149

ggattcagcg cgcgacg 16

<210> 150

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 150

ggattcagcg cgcgacg 16

<210> 151

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 151

ggattcagcg cgcgacg 16

<210> 152

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 152

uggattcagc gccgacg 17

<210> 153

<211> 17

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 153
 uggattcagc gccgacg 17
 <210> 154
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 154
 agataaaacg ccgcagac 18
 <210> 155
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 155
 agataaaacg ccgcagac 18
 <210> 156
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 156

ugattcagcg cgcacggg 18

<210> 157

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 157

ugattcagcg cgcacggg 18

<210> 158

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 158

ugcgaagtgc acacgg 16

<210> 159

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 159

uggtgaagcg aagtgca 17

<210> 160

<211> 17

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 160
 ugagaggtgc gccccgt 17
 <210> 161
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 161
 ugagaggtgc gccccgt 17
 <210> 162
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 162
 accaccacga gtctagac 18
 <210> 163
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 163
 uggattcagc gccgacg 17
 <210> 164
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 164
 cgattcagcg ccgacggg 18
 <210> 165
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 165
 gtgaagcgaa gtgca 15
 <210> 166
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 166
 agcgaagtgc acacgg 16
 <210> 167
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 167
 gtgaagcgaa gtgca 15
 <210> 168
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 168
 aagcgaagtg cacacg 16
 <210> 169
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 169
 gattcagcgc cgacgg 16
 <210> 170
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 170
 cgcgtaaaga gagtg 16
 <210> 171
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 171

ggattcagcg cgcacgg 17
 <210> 172
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 172
 gaggtgaagc gaagtg 16
 <210> 173
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 173
 ccgcgtaaag agagtg 17

 <210> 174
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 174
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 175
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 175
 ccaccagag tctagac 17
 <210> 176

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 176

atgataaaac gccgcag

17

<210> 177

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 177

gccctacgaa cactga

17

<210> 178

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 178

agcgaagtgc acacgg

16

<210> 179

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 179

cgcgggattc agcgc

15

<210> 180

<211> 15

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 180
 gcgaagtgca cacgg 15

<210> 181
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 181
 ggtgcccc gtggg 15

<210> 182
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 182
 ggtgaagcga agtgc 15

<210> 183
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 183
 ggattcagcg ccgacgg 17

<210> 184
 <211> 16
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 184
 gaggtgaagc gaagtg 16
 <210> 185
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 185
 agcgaagtgc acacg 15
 <210> 186
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 186
 aggtgaagcg aagtg 15
 <210> 187
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 187
 gcgccccgtg gtcgg 15
 <210> 188
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 188
 aggtgcgccc cgtgg 15
 <210> 189
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 189
 cgcgtaaaga gagtg 16
 <210> 190
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 190
 cgcgtaaaga gagtg 16
 <210> 191
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 191
 cgcgtaaaga gagtg 16
 <210> 192
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 192
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 193
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 193
 atgataaaac gccgcag 17
 <210> 194
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 194
 caatgataaa acgccgcag 19
 <210> 195
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 195
 caatgataaa acgccgcag 19
 <210> 196
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 196

gattcagcgc cgacggg 17

<210> 197

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 197

cgcgtaaaga gaggtg 16

<210> 198

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 198

cagattcagc gccgacggg 19

<210> 199

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 199

gattcagcgc cgacgggc 18

<210> 200

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 200

gattcagcgc cgacgggca 19

<210> 201
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 201
 cgattcagcg cgcgacggg 18

<210> 202
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 202
 cagattcagc gccgacggg 19

<210> 203
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 203
 gattcagcgc cgacgggc 18

<210> 204
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 204
 gattcagcgc cgacgggca 19

<210> 205

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 205
 ccaccacgag tctagac 17
 <210> 206
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 206
 ccaccacgag tctagac 17
 <210> 207
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 207
 gcgaagtgca cacgg 15
 <210> 208
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 208
 gcgaagtgca cacgg 15
 <210> 209
 <211> 15

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 209
 gcgaagtgca cacgg 15
 <210> 210
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 210
 gcgaagtgca cacgg 15
 <210> 211
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 211
 gcgaagtgca cacgg 15
 <210> 212
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 212
 gcgaagtgca cacgg 15
 <210> 213
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 213

gattcagcgc cgacggag

18

<210> 214

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 214

gattcagcgc cgacgagg

18

<210> 215

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 215

gattcagcgc cgacaggg

18

<210> 216

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 216

gattcagcgc cgacggg

17

<210> 217

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 217
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 218
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 218
 gaattcagcgc ccgacggg 18
 <210> 219
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 219
 agattcagcgc ccgacggg 18
 <210> 220
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 220
 caggattcag cgccgacgg 19
 <210> 221
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 221
 caaagagagg tgcgccc 17

<210> 222
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 222
 gattcagcgc cgacggg 17

<210> 223
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 223
 gattcagcgc cgacggg 17

<210> 224
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 224
 gattcagcgc cgacggg 17

<210> 225
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 225

gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 226
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 226
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 227
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 227
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 228
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 228
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 229
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 229
 ccaccagag tctagac 17

<210> 230
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 230
 ccaccacgag tctagac 17
 <210> 231
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 231
 ccaccacgag tctagac 17
 <210> 232
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 232
 ccaccacgag tctagac 17
 <210> 233
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 233
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 234
 <211> 16

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 234
 gcgaagtgca cacggc 16
 <210> 235
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 235
 gcgaagtgca cacggg 16
 <210> 236
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 236
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 237
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 237
 gcgaagtgca cacggc 16
 <210> 238
 <211> 16
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 238

gcgaagtgca cacggg 16

<210> 239

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 239

ccaccacgag tctagaca 18

<210> 240

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 240

ccaccacgag tctagacc 18

<210> 241

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 241

ccaccacgag tctagacg 18

<210> 242

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 242
 ccaccacgag tctagaca 18
 <210> 243
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 243
 ccaccacgag tctaga 16
 <210> 244
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 244
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 245
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 245
 gataaaacgc cgcagacc 18
 <210> 246
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 246
 gataaaacgc cgcagacg 18
 <210> 247
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 247
 gataaaacgc cgcagacu 18
 <210> 248
 <211>
 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 248
 gataaaacgc cgcagacc 18
 <210> 249
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 249
 gataaaacgc cgcagacg 18
 <210> 250
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 250
 gataaaacgc cgcagac 17
 <210> 251
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 251
 ggtgaagcga agtgcau 17
 <210> 252
 <211>
 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 252
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 253
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 253
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 254
 <211> 17
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 254

uggtgaagcg aagtgca

17

<210> 255

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 255

tgccaagtgc acacgg

16

<210> 256

<211>

16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 256

ugcgaagtgc acacgg

16

<210> 257

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 257
 ugcgaagtgc acacgg 16
 <210> 258
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 258
 agataaaacg ccgcagac 18
 <210> 259
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 259
 agataaaacg ccgcagac 18
 <210> 260
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 260
 accaccacga gtctagac 18
 <210> 261
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 261

ggattcagcg cgcgca 17

<210> 262

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 262

gagaggtgcg cccgta 17

<210> 263

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 263

uggattcagc gccgacg 17

<210> 264

<211>

17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<400> 264

ugagaggtgc gccccgt 17

<210> 265

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 265
 ugattcagcg cgcacggg 18

<210> 266
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 266
 gattcagcgc cgacgggu 18

<210> 267
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 267
 cagattcagc gccgacgg 18

<210> 268
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 268
 cagtgaagcg agtgca 16

<210> 269

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 269
 cagattcagc gccgacggg 19

<210> 270
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 270
 caagcgaagt gcacacgg 18

<210> 271
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 271
 caacgccgca gacacat 17

<210> 272
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 272
 cagagaggtg cgccccgt 18

<210> 273
 <211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 273
 caggattcag cgccgacg 18
 <210> 274
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 274
 caccgcctgt aacacgag 18
 <210> 275
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 275
 caccgcctgt aacacgag 18
 <210> 276
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 276
 cagataaaac gccgcagac 19
 <210> 277
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 277
 cacaccacga gtctagact 19
 <210> 278
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 278
 caatgataaa acgccgcag 19
 <210> 279
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 279
 caccaccag agtctagac 19
 <210> 280
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 280
 cagccctacg aaccactga 19
 <210> 281
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 281

caaaacgccg cagacacat

19

<210> 282

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 282

caaggtgaag cgaagtgc

18

<210> 283

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 283

caggtgaagc gaagtgca

18

<210> 284

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 284

ggattcagcg ccgacg

16

<210> 285

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 285
 cagcgaagtg cacacgg 17
 <210> 286
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 286
 ggattcagcg ccgacg 16
 <210> 287
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 287
 ggattcagcg ccgacg 16
 <210> 288
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 288
 ggattcagcg ccgacg 16
 <210> 289
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 289
gattcagcgc cgacggg 17

<210> 290
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 290
gattcagcgc cgacggg 17

<210> 291
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 291
ccaccacgag tctagac 17

<210> 292
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 292
ccaccacgag tctagac 17

<210> 293
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 293

ccaccacgag tctagac 17

<210> 294

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 294

caagcgaagt gcacacg 17

<210> 295

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 295

gataaaacgc cgcagac 17

<210> 296

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 296

gataaaacgc cgcagac 17

<210> 297

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 297

gataaaacgc cgcagac 17

<210> 298
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 298
 ggattcagcg cgcgacg 16
 <210> 299
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 299
 ggattcagcg cgcgacg 16
 <210> 300
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 300
 gagagtgcg cccgt 16
 <210> 301
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 301
 gagagtgcg cccgt 16
 <210> 302
 <211> 16

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 302
 gagaggtgcg ccccg 16
 <210> 303
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 303
 gagaggtgcg ccccg 16
 <210> 304
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 304
 gagaggtgcg ccccg 16
 <210> 305
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 305
 caagagaggt gcgccccgt 19
 <210> 306
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 306

caacaagga cgtcccgcg 19

<210> 307

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 307

caatgataaa acgccgcag 19

<210> 308

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 308

caccgcgtaa agagaggtg 19

<210> 309

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 309

gattcagcgc cgacggg 17

<210> 310

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 310
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 311
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 311
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 312
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 312
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 313
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 313
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 314
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 314
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 315
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 315
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 316
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 316
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 317
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 317
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 318
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 318

gataaaacgc cgcagact 18

<210> 319
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 319
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 320
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 320
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 321
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 321
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 322
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 322
 gcgaagtgca cacgga 16

<210> 323

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 323

gcgaagtgca cacgga

16

<210> 324

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 324

gcgaagtgca cacgga

16

<210> 325

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 325

gataaaacgc cgcagact

18

<210> 326

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 326

gataaaacgc cgcagact

18

<210> 327

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 327
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 328
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 328
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 329
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 329
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 330
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 330
 ccaccacgag tctagaca 18
 <210> 331
 <211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 331
 ccaccacgag tctagaca 18
 <210> 332
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 332
 ccaccacgag tctagaca 18

 <210> 333
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 333
 ccaccacgag tctagaca 18
 <210> 334
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 334
 ccaccacgag tctagaca 18
 <210> 335
 <211> 18
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 335

gataaaacgc cgcagact 18

<210> 336

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 336

gcgaagtgca cacgga 16

<210> 337

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 337

gataaaacgc cgcagact 18

<210> 338

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 338

ggtgaagcga agtgcaa 17

<210> 339

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 339
 ggtgaagcga agtgcaa 17

<210> 340
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 340
 ggtgaagcga agtgcaa 17

<210> 341
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 341
 ggtgaagcga agtgcaa 17

<210> 342
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 342
 ggtgaagcga agtgcaa 17

<210> 343
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 343
 ggtgaagcga agtgcaa 17
 <210> 344
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 344
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 345
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 345
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 346
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 346
 ccaccagag tctagaca 18
 <210> 347
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 347
ccaccacgag tctagaca 18
<210> 348
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 348
ccaccacgag tctagaca 18
<210> 349
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 349
gataaaacgc cgcagact 18
<210> 350
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 350
gataaaacgc cgcagact 18
<210> 351
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 351

gataaaacgc cgcagact 18

<210> 352

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 352

ggtgaagcga agtgcaa 17

<210> 353

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 353

gataaaacgc cgcagact 18

<210> 354

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 354

gataaaacgc cgcagact 18

<210> 355

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 355

ggtgaagcga agtgcaa 17

<210> 356

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 356

ggtgaagcga agtgcaa

17

<210> 357

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 357

ggtgaagcga agtgcaa

17

<210> 358

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 358

ggtgaagcga agtgcaa

17

<210> 359

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 359

ggattcagcg cgcgacga

17

<210> 360

<211> 17

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
<400> 360
ggattcagcg cgcacga 17

<210> 361
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
<400> 361
ggattcagcg cgcacga 17

<210> 362
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
<400> 362
ggattcagcg cgcacga 17

<210> 363
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
<400> 363
ggattcagcg cgcacga 17

<210> 364
<211> 17
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 364
 ggattcagcg cgcacga 17
 <210> 365
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 365
 gagaggtgcg ccccgta 17
 <210> 366
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 366
 gattcagcgc cgacgggt 18
 <210> 367
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 367
 gagaggtgcg ccccgta 17
 <210> 368
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 368
 ccaccacgag tctagaca 18
 <210> 369
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 369
 ccaccacgag tctagaca 18
 <210> 370
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 370
 ccaccacgag tctagaca 18
 <210> 371
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 371
 ccaccacgag tctagaca 18
 <210> 372
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 372
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 373
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 373
 gataaaacgc cgcagact 18
 <210> 374
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 374
 gcgaagtgca cacgga 16
 <210> 375
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 375
 gagaggtgcg cccgta 17
 <210> 376
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 376
 ugcgaagtgc acacgg 16

<210> 377
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 377
 ggattcagcg ccgacga 17

<210> 378
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 378
 ggattcagcg ccgacga 17

<210> 379
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 379
 cagcgaagtg cacacgg 17

<210> 380
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 380
cagcgaagtg cacacgg 17

<210> 381
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 381
cagcgaagtg cacacgg 17

<210> 382
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 382
caggtgaagc gaagtgca 18

<210> 383
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 383
gcgaagtgca cacggg 16

<210> 384
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 384

ccaccacgag tctagacg 18

<210> 385

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 385

cagataaaac gccgcagac 19

<210> 386

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 386

cagataaaac gccgcagac 19

<210> 387

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 387

cagataaaac gccgcagac 19

<210> 388

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 388

caccaccag agtctagac 19

<210> 389
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 389
 caccaccag agtctagac 19

<210> 390
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 390
 caccaccag agtctagac 19

<210> 391
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 391
 ccaccacgag tctagaca 18

<210> 392
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 392
 gattcagcgc cgacgggt 18

<210> 393
 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 393

gattcagcgc cgacgggt

18

<210> 394

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 394

gattcagcgc cgacgggt

18

<210> 395

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 395

ccaccagag tctagaca

18

<210> 396

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 396

agataaaacg ccgcagac

18

<210> 397

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 397
 agataaaacg ccgcagac 18

<210> 398
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 398
 accaccacga gtctagac 18

<210> 399
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 399
 accaccacga gtctagac 18

<210> 400
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 400
 agataaaacg ccgcagac 18

<210> 401
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 401
 agataaaacg ccgcagac 18
 <210> 402
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 402
 aggtgaagcg aagtgca 17
 <210> 403
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 403
 ccaccacgag tctagaca 18
 <210> 404
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 404
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 405
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide
 <400> 405
 gataaaacgc cgcagac 17
 <210> 406
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 406
 gattcagcgc cgacggg 17
 <210> 407
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 407
 ccaccacgag tctagac 17
 <210> 408
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 408
 gagaggtgcg cccgt 16
 <210> 409
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 409	
ggattcagcg cgcgacg	16
<210> 410	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 410	
gagaggtgcg ccccg	16
<210> 411	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 411	
cagataaaac gccgcagac	19
<210> 412	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 412	
cagataaaac gccgcagac	19
<210> 413	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 413	
cagataaaac gccgcagac	19

<210> 414

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 414

ccaccacgag tctagaca

18

<210> 415

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 415

caccaccag agtctagac

19

<210> 416

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 416

caccaccag agtctagac

19

<210> 417

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 417

caccaccag agtctagac

19

<210> 418

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 418
 gcagaggtga agcgaagtgc 20

<210> 419
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 419
 uggattcagc gccgacg 17

<210> 420
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 420
 agataaaacg ccgcagac 18

<210> 421
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 421
 gataaaacgc ccgcagac 17

<210> 422
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 422
 ugattcagcg cgcgacggg 18

<210> 423
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 423
 cagattcagc gccgacggg 19

<210> 424
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 424
 caagcgaagt gcacacgg 18

<210> 425
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 425

cagagaggtg cgccccgt 18
 <210> 426
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 426
 caggattcag cgccgacg 18
 <210> 427
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 427
 caccaccacg agtctagac 19
 <210> 428
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 428
 ggattcagcg ccgacga 17