(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0161203
(43) 공개일자 2024년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7035783(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년11월30일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7016107
원출원일자(국제) 2018년11월30일
심사청구일자 2021년09월24일
(85) 번역문제출일자 2024년10월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/063416
(87) 국제공개번호 WO 2019/109001
국제공개일자 2019년06월06일
(30) 우선권주장
62/593,431 2017년12월01일 미국(US)
62/676,034 2018년05월24일 미국(US)

(71) 출원인
더 텍사스 에이 & 엠 유니버시티 시스템
미국 77843-3369 텍사스주 칼리지 스테이션 티에이엠유 3369
(72) 발명자
딘돗 스콧 빅터
미국, 텍사스 77845, 칼리지 스테이션, 2608 워크워스 레인
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **엔젤만 증후군 안티센스 치료**

(57) 요 약

본 명세서에서 동물 또는 인간 뉴런에서 부계 대립유전자로부터 유비퀴틴-단백질 리가제 E3A(*UBE3A*)의 발현을 유도할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 개시된다. 올리고뉴클레오타이드는 *SNORD115-45* snoRNA 하류인 *UBE3A-AS*의 5'-말단에서 *SNHG14* 긴 비암호 RNA에 대한 혼성화에 의해 *UBE3A* 부계 대립유전자의 억제자를 표적화한다. 또한 엔젤만 증후군의 치료를 위한 약제학적 조성물 및 방법이 개시된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 43/00 (2018.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/321 (2013.01)
C12N 2310/322 (2013.01)
C12N 2310/3231 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 2로 제시된 뉴클레오타이드 서열의 인접한 부분에 대해 상보적인 핵산을 갖는 적어도 18개 리보뉴클레오타이드 길이의 인접한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 변형된 올리고뉴클레오타이드로서, *UBE3A-AS* 전사체의 5' 말단을 표적화할 수 있는, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 siRNA, shRNA, 또는 gRNA인, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 3

제2항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 siRNA인, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 4

제3항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 서열번호 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 또는 550의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 5

제2항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 shRNA인, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 6

제5항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 서열번호 569, 576, 583, 또는 585의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 7

제2항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 CRISPR 가이드 RNA(gRNA)인, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 8

제7항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 서열번호 590, 592, 593, 596, 598, 599, 또는 601의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 9

제1항에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드를 포함하는, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 10

제9항에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드가 2' 당 변형된 뉴클레오사이드인, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 11

제10항에 있어서, 하나 이상의 2' 당 변형된 뉴클레오사이드가 2'-O-알킬-RNA, 2'-O-메틸-RNA, 2'-알콕시-RNA, 2'-O-메톡시에틸-RNA, 2'-아미노-DNA, 2'-플루오로-DNA, 아라비노 핵산(arabino nucleic acid: ANA), 2'-플루오로-ANA, 및 잠금 핵산(LNA) 뉴클레오사이드로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 12

제1항에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드간 결합(internucleoside linkage)을 포함하는, 변형된 올

리고뉴클레오타이드.

청구항 13

제12항에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드간 결합이 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 결합인, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 14

제1항에 있어서, 변형된 올리고뉴클레오타이드가 탄수화물, 세포 표면 수용체 리간드, 약물 물질, 호르몬, 친유성 물질, 중합체, 단백질, 펩타이드, 독소, 비타민, 및 바이러스 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비-뉴클레오타이드 모이어티에 접합되는, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 15

제14항에 있어서, 비-뉴클레오타이드 모이어티가 트랜스페린 수용체를 표적화하는 항체 또는 항체 단편인, 변형된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 변형된 올리고뉴클레오타이드의 하나 이상, 및 약제학적으로 허용가능한 희석제, 용매, 담체, 염, 또는 부형제를 포함하는, 엔젤만 증후군의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 엔젤만 증후군을 치료 또는 예방하는 데 사용하기 위한 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 기술분야

[0002] 본 발명은 동물 또는 인간 뉴런에서 부계 대립유전자로부터 유비퀴틴-단백질 리가제 E3A(*UBE3A*)의 발현을 유도할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 이를 이용한 엔젤만 증후군의 치료에 관한 것이다.

[0003] 관련 출원에 대한 상호참조

[0004] 본 출원은 2017년 12월 1일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/593,431호, 및 2018년 5월 24일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/676,034호의 유익을 주장하며, 이들 기초출원은 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함된다.

[0005] 서열목록

[0006] 본 출원은 2018년 11월 30일자로 생성된 파일명이 "922001-2020 Sequence Listing_ST25"인 ASCII.txt 파일로서 전자 형태로 제출된 서열목록을 포함한다. 서열목록의 내용은 전체가 본 명세서에 포함된다.

배 경 기 술

[0007] 엔젤만 증후군(Angelman syndrome: AS)은 중증의 인지 및 운동 결함, 뇌전증, 수면장애, 및 비전형적 '행복' 성향과 연관된 신경발달 장애이다. AS를 갖는 개체는 종종 2 내지 3세에 진단되며, 정상적인 수명을 가진다. 이들은 그들의 생애 내내 생활 및 의학적 관리의 지원을 필요로 한다. AS를 갖는 개체에 대해 현재의 치료 선택권은 거의 없으며, 이 중 대부분은 발작을 치료하기 위해 항간질성 의약을 수반한다.

[0008] 엔젤만 증후군은 모계유전 유비퀴틴-단백질 리가제 E3A(*UBE3A*) 유전자의 발현 또는 기능에 영향을 미치는 돌연변이에 의해 야기된다. 대부분의 유전자와 달리, *UBE3A*는, 유전자의 하나의 대립유전자를 턴 오프(turn-off)하는 반면, 다른 대립유전자는 턴 온하는 희귀한, 자연적으로 일어나는 현상인 유전체 각인(genomic imprinting)을 받는다. 중추 신경계(CNS)의 뉴런에서, 부계 *UBE3A* 대립유전자는 오프(off)되는 반면, 신체의 모든 다른 세포 유형에서, *UBE3A*의 대립유전자는 둘 다 온(on)이다. 이 때문에, AS는 항상 모계유전 *UBE3A* 대립유전자에 영향을 미치는 돌연변이에 의해 야기된다.

[0009] 부계 *UBE3A* 대립유전자는 몇몇 단백질 암호화 및 비암호화 전사체를 발현시키는 긴 RNA 전사체의 성분인 *UBE3A* 안티센스 전사체(*UBE3A-AS*)에 의해 턴 오프된다. *UBE3A-AS*는 부계 대립유전자로부터 그리고 CNS의 뉴런에서만 발현되며, 부계 *UBE3A* 대립유전자의 턴 오프 발현에 충분하고 필수적이다. *UBE3A*가 뉴런에서 각인되는 이유는

불분명하지만, 이는 AS를 갖는 개체를 치료하는 독특한 기회를 생성하는데, 부계 염색체에 대한 *UBE3A*의 비활성, 복제물에도 불구하고 기능성이기 때문이다. 지금까지의 연구는 부계 *UBE3A* 대립유전자에 대한 턴온이 AS를 치료하기 위한 실행 가능한 요법이라는 것을 나타낸다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 명세서에서 안정성에 중요한 *UBE3A-AS* 전사체의 5'-말단 내 영역이 개시된다. 이들 발견에 기반하여, 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 *UBE3A-AS*의 전사를 종결시키고 부계 *UBE3A* 대립유전자의 발현을 재활성화시키기 위해 이 영역을 표적화하도록 설계되었다. *UBE3A-AS*의 5'-말단을 표적화하는 이들 ASO는 *UBE3A-AS* 전사를 중단시키고 부계 *UBE3A* 대립유전자를 턴 온할 수 있다. *SNHG14*는 *UBE3A-AS*를 비롯한 몇몇 상이한 RNA를 암호화하는 다시스트론성 전사체이다.

[0011] 따라서, 본 명세서에서 *UBE3A* 안티센스 전사체(*UBE3A-AS*)의 5'-말단을 나타내는 것으로 여겨지는 *SNORD109B*의 5'-말단과 *SNORD115*의 3'-말단 사이의 표적 엑손에 대해 적어도 98%(즉, 98%, 99% 또는 100%) 상보성을 갖는 길이가 10 내지 30개의 뉴클레오타이드(즉, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30)인 인접한 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 ASO가 개시된다. 특히 표적 엑손은 인간 염색체 15 인간 게놈 조립체 hg19 상에서 25,511,577 내지 25,516,681번 위치에 대응하는 *UBE3A-AS*의 5'-말단에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 핵산은 25,511,577 내지 25,511,761번 위치(엑손 1), 25,512,059 내지 25,512,191번 위치(엑손 2), 25,513,476 내지 25,513,600번 위치(엑손 3), 25,514,752 내지 25,514,880번 위치(엑손 4), 및 25,516,565 내지 25,516,681번 위치(엑손 5)에 대응할 수 있는 *UBE3A-AS*의 5'-말단에 위치된 5개의 엑손 중 하나이다. 따라서, 표적 핵산은 서열번호 1, 2, 3, 4 또는 5 내에서 10 내지 30개의 뉴클레오타이드의 인접한 핵산 서열일 수 있다.

[0012] 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *UBE3A-AS* 엑손 1 내지 5, *UBE3A-AS* 엑손 5 및 *SNORD109B* 엑손 1, 및/또는 *SNORD109B* 엑손 1 내지 2를 수반하는 엑손 경계이다.

[0013] ASO를 설계하기 위한 방법 및 전략은 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, ASO는인간 대상체 중에서 보존된 표적 서열에 대해 설계된다. 일부 실시형태에서, ASO는 영장류 대상체 중에서 보존된 표적 서열에 대해 설계된다.

[0014] 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어, 갭머(gapmer) 설계에 의한, 안티센스 올리고뉴클레오타이드(즉, 당업자에 의해 이해될 바와 같이- 이의 표적 핵산에 대해 안티센스)일 수 있다. 개시된 올리고뉴클레오타이드는 *UBE3A-AS* 전사체의 분해, 감소 또는 제거에 의해 뉴런에서 부계 *UBE3A* 발현을 유도할 수 있다. *SNORD109B* snoRNA 상류의 부위에서 *UBE3A-AS*의 5'-말단을 표적화함으로써 이를 행한다. 표적 엑손 1 내지 5에 대해 설계된 ASO의 예를 표 1, 2, 3, 4 또는 5에 제공한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, ASO는 핵산 서열 서열번호 6, 7, 8, 9, 10 또는 11을 포함한다.

[0015] 개시된 ASO는 안정성, 용해도, 활성, 세포 분포 및/또는 세포 흡수를 개선시키는 하나 이상의 변형을 가질 수 있다. 예를 들어, 개시된 ASO는 하나 이상의 당-변형된 뉴클레오사이드 및/또는 변형된 뉴클레오타이드간 결합을 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어, 뉴클레아제 공격에 더 저항성인 결합에 대해 천연 포스포다이에스터로부터 변형된 하나 이상의 뉴클레오사이드간 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 천연 유래 핵염기와 상이하지만, 핵산 혼성화 동안 기능성인 하나 이상의 변형된 핵염기를 함유한다.

[0016] 일부 실시형태에서, ASO는 DNA 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, ASO는 RNA 올리고뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시형태에서, ASO는 데옥시뉴클레오타이드와 리보뉴클레오타이드를 둘 다 함유한다. 예를 들어, ASO는 갭머, 헤드머(headmer) 또는 테일머(tailmer) 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 갭머의 중심 블록은 뉴클레아제 분해로부터 내부 블록을 차단하는 변형된 리보뉴클레오타이드의 블록에 측접된다. 예를 들어, ASO는 엑소뉴클레아제에 대한 보호에 대해 3'- 및 5'-말단에서 3, 4 또는 5개의 변형된 리보뉴클레오타이드 단량체와 함께 표전 RNA의 RNase H 절단을 활성화시키는 7, 8, 9, 10개 이상의 천연 DNA 단량체의 신장부를 함유할 수 있다. 일부 경우에, 변형된 리보뉴클레오타이드는 2'-O-메틸(OMe) RNA 뉴클레오타이드, 2'-O-메톡시에틸(MOE)-변형된 뉴클레오타이드, 또는 2'-잠금 핵산(Locked Nucleic Acid: LNA)이다. 갭머 ASO의 예는 표 7, 표 11 및 표 17에 제공된다. 따라서, 일부 실시형태에서, 개시된 ASO는 서열번호 362 내지 392로부터 선

택되는 핵산 서열을 가진다.

[0017] 또한 본 명세서에 개시된 ASO 중 하나 이상 및 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 담체, 염 및/또는 아쥬반트(adjuvant)를 포함하는 약제학적 조성물이 개시된다.

[0018] 또한 상기 세포에게 유효량으로 본 명세서에 개시된 ASO 또는 조성물 중 하나 이상을 투여함으로써, 부계 *UBE3A*의 발현이 억제되는 표적 세포 내 *UBE3A* 발현의 생체내 또는 시험관내 유도를 위한 방법이 개시된다.

[0019] 또한 질환, 장애 또는 기능장애, 예컨대 엔젤만 증후군을 앓고 있거나 이들에 걸리기 쉬운 대상체에게 치료적 또는 예방적 유효량의 개시된 ASO 중 하나 이상을 투여하는 단계를 포함하는 UBE3A의 생체내 활성과 연관된 질환, 장애 또는 기능장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법이 개시된다.

[0020] 본 발명의 하나 이상의 실시형태의 상세한 설명은 수반하는 도면 및 이하의 설명에 제시한다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 설명 및 도면으로부터, 청구범위로부터 분명하게 될 것이다. 예를 들어, 본 명세서를 읽는 당업자는 본 개시내용이 *UBE3A*의 발현에 영향을 주는 본 명세서에 기재된 특성 서열의 유효성을 입증하며, 더 나아가 이러한 서열이거나 이러한 서열을 표적화하는(예를 들어, 이러한 서열에 상보성인) 올리고뉴클레오타이드 형식의 유효성을 교시한다는 것을 인식할 것이다. 당업자는 본 개시내용이 임의의 특정 작용 메커니즘으로 제한되지 않으며 - 단, 올리고뉴클레오타이드는 이들이, 예를 들어, RNase H 활성을 수반하는 안티센스 메커니즘을 통해 작용하는지 여부와 상관없이 유용할 수 있으며, 이러한 서열이거나 이러한 서열을 표적화하는 올리고뉴클레오타이드의 다른 치료 형식(예를 들어, siRNA, shRNA, 뉴클레아제 gRNA 등)이 또한 제공된다는 것을 인식할 것이다. 유사하게, 당업자는 본 명세서에 기재된 바와 같은 유용한 서열을 정함으로써 본 개시내용이 또한 (예를 들어, 핵산 벡터, 예컨대 이들이 (예를 들어, 생체내, 시험관내 또는 둘 다 등에서) 발현될 수 있는 벡터의 부분으로서 이러한 서열에 대해 다양한 형식을 기재한다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 본 개시내용을 읽을 때 당업자는 본 명세서의 "ASO"에 대한 언급은 예시적이며, 적절한 핵산(예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)은 작용 메커니즘과 상관없이 이용될 수 있다는 것을 인식할 것이며; 당업자라면 임의의 다양한 메커니즘을 통해 작용하는 핵산(예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)(예를 들어, siRNA, shRNA, 뉴클레아제 gRNA 등)의 적절한 형식 및 구조에 관해 광범위한 문헌에 알고 있다. 일부 실시형태에서, 제공된 핵산은 하나 이상의 메커니즘 내용(예를 들어, RNase H, RISC, 핵산-지향 뉴클레아제, 예컨대 Cas 등을 수반)에 유용할 당업계에 알려진 형식 및/또는 구조 특징을 혼입한다.

과제의 해결 수단

[0021] 유비퀴틴-단백질 리가제 *E3A* 안티센스 전사체 및 *UBE3A-AS/Ube3a-AS*로서도 알려진 *UBE3A-AS/Ube3a-AS* 전사체는 *UBE3A* 유전자에 상대적인 안티센스 DNA 가닥 상의 *UBE3A-AS* 전사체의 전사에 의해 생성된 전사체에 대한 명칭이다. 모든 캡을 갖는 유전자 명칭은 인간 유전자(예를 들어, *UBE3A*)를 나타내고, 첫 번째 글자만으로 캡핑된 유전자 명칭은 마우스 유전자(예를 들어, *Ube3a*)를 나타낸다는 것을 주의한다. *UBE3A-AS* 전사체는 고아(orphan) C/D 박스 소형 핵소체 RNA(SNORD), 및 몇몇 특성규명되지 않은 긴 비암호화 RNA의 클러스터인 *SNURF-SNRPN*을 암호화하는 거대 다시스트론성 전사 단위의 부분으로서 전사된다. 마우스와 인간 둘 다에서, *UBE3A/Ube3a* 유전자는 중추 신경계의 뉴런에서 각인되며, 여기서 이는 모계 대립유전자로부터만 발현된다. *UBE3A-AS/Ube3a-AS* 전사체는 부계 *UBE3A/Ube3a* 대립유전자의 전사를 침묵시키는 데 필요하며 충분하고, *UBE3A-AS/Ube3a-AS*의 저해는 부계 *UBE3A/Ube3a* 대립유전자의 전사를 재활성화시킨다. 모계유전 *UBE3A* 대립유전자의 기능 또는 발현에 영향을 미치는 돌연변이는 엔젤만 증후군(AS)을 야기한다. AS에서, 부계 대립유전자는 기능성이지만, 후성유전학에 의해 침묵된다. AS 환자에서 침묵되지 않는다면, 부계 *UBE3A* 대립유전자는 뉴런에서 기능성 *UBE3A*의 공급원일 수 있었다.

[0022] *UBE3A-AS*를 암호화하는 다시스트론성 전사 단위(본 명세서에서 이하에 PTU로서 지칭됨)는 약 450,000개의 염기쌍 길이이다. PTU의 전사는 *SNURF-SNRPN* 좌위에서 상류의 엑손(U-엑손)에서 시작하고 *UBE3A*의 5'-말단쪽으로 중단된다. PTU는 다음과 같이 조직화되고(5'-3'): *SNURF-SNRPN*, *SNORD107*, *SNORD64*, *SNORD109A*, *SNORD116*(29개의 복제물), *IPW*, *SNORD115*(48개의 복제물), *SNORD109B* 및 상류의 전사체의 마주보는 방향으로 배향되는 *UBE3A*. 다시스트론성 전사체는 대안적으로 스플라이싱되며, 대안의 3'-가공 처리된다. *SNURF-SNRPN*은 2개의 폴리펩타이드를 암호화한다. SNORD는 숙주-유전자 전사체(*SNHG14*)의 인트론에 있으며, 스플라이싱된 인트론의 외부핵산분해(exonucleolytic) 탈분지에 의해 생성된다. *UBE3A-AS*는 *UBE3A* 유전자와 겹쳐지는 전사체의 3'-말단을 나타낸다. 대부분의 C/D 박스 snoRNA는 리보솜 RNA(rRNA)의 2'-O-메틸화를 지시하는 리보솜 생물발생에서 어떤 역할을 하지만; 그러나, PWS/AS 영역에 위치되는 snoRNA는 알려진 rRNA에 대해 상보성인 임의의 서열을 결여하지만; 그

러나, *SNORD115* snoRNA가 세로토닌 수용체 2C pre-mRNA의 대안적 스플라이싱을 변화시키는 것이 발견되었다.

[0023] 본 명세서에서 *UBE3A-AS* 전사체의 5'-말단이 이의 안정성에 중요하다는 증거가 개시된다. 본 명세서에 개시된 바와 같은, *UBE3A-AS*의 5'-말단을 표적화하는 ASO는 추정컨대 *UBE3A-AS*의 전사체 이온을 중단시키고 부계 *UBE3A* 대립유전자를 턴온시킴으로써 *UBE3A-AS* 수준을 감소시킬 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 둘 이상의 공유 결합된 뉴클레오사이드를 포함하는 분자로서 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 같이 정의된다. 이러한 공유결합된 뉴클레오사이드는 또한 핵산 분자 또는 올리고머로서 지칭될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 실허실에서 고체상 화학적 합성 다음에 정제에 의해 통상적으로 생성된다. 올리고뉴클레오타이드 서열을 언급할 때, 공유결합된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드의 핵염기 모이어티의 서열 또는 순서, 또는 이의 변형이 언급된다. 본 명세서에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 인공으로, 예를 들어, 화학적으로 합성된다. 본 명세서에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0025] 본 명세서에 사용된 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 표적 핵산에, 특히 표적 핵산 상의 인접한 서열에 혼성화함으로써 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있는 올리고뉴클레오타이드로서 정의된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥이다.

[0026] 용어 "인접한 뉴클레오타이드 서열"은 표적 핵산에 상보성인 올리고뉴클레오타이드의 영역을 지칭한다. 상기 용어는 본 명세서에서 용어 "인접한 핵염기 서열" 및 용어 "올리고뉴클레오타이드 모티프 서열"과 상호 호환적으로 사용된다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 모두는 인접한 뉴클레오타이드 서열에 존재한다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 인접한 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 선택적으로 추가적인 뉴클레오타이드(들), 예를 들어, 인접한 뉴클레오타이드 서열에 기능성 기를 부착시키는데 사용될 수 있는 뉴클레오타이드 링커 영역을 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 링커 영역은 표적 핵산에 대해 상보성일 수도 있고 상보성이 아닐 수도 있다.

[0027] 뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드와 폴리뉴클레오타이드의 빌딩 블록이며, 천연 유래 뉴클레오타이드와 비-천연 유래 뉴클레오타이드를 둘 다 포함할 수 있다. 천연에서, 뉴클레오타이드, 예컨대 DNA 및 RNA 뉴클레오타이드는 리보스 당 모이어티, 핵염기 모이어티 및 하나 이상의 인산염기(뉴클레오사이드에 없음)를 포함한다. 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드는 또한 상호 호환적으로 "단위" 또는 "단량체"로서 치칭될 수 있다.

[0028] 본 명세서에 사용되는 용어 "변형된 뉴클레오사이드" 또는 "뉴클레오사이드 변형"은 당 모이어티 또는 (핵)염기 모이어티의 하나 이상의 변형의 도입에 의한 동등한 DNA 또는 RNA 뉴클레오사이드에 비해 변형된 뉴클레오사이드를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오사이드는 변형된 당 모이어티를 포함한다. 용어 변형된 뉴클레오사이드는 또한 본 명세서에서 용어 "뉴클레오사이드 유사체" 또는 변형된 "단위" 또는 변형된 "단량체"와 상호 호환적으로 사용될 수 있다.

[0029] 용어 "변형된 뉴클레오사이드간 결합"은 두 뉴클레오사이드를 함께 공유 결합시키는 포스포다이에스터(PO) 결합 또는 천연 인산염 결합 이외의 결합으로서 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것으로 정의된다. 변형된 뉴클레오사이드간 결합을 갖는 뉴클레오타이드는 또한 용어 "변형된 뉴클레오타이드"로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오사이드간 결합은 포스포다이에스터 결합에 비해 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레아제 저항성을 증가시킨다. 천연 유래 올리고뉴클레오타이드에 대해, 뉴클레오사이드간 결합은 인접한 뉴클레오사이드 사이에 포스포다이에스터 결합을 생성하는 인산염기를 포함한다. 변형된 뉴클레오사이드간 결합은 생체내 사용을 위한 올리고뉴클레오타이드를 안정화시키는 데 특히 유용하고, 본 명세서에 개시된 올리고뉴클레오타이드에서 DNA 또는 RNA 뉴클레오사이드의 영역에서, 예를 들어, 갭머 올리고뉴클레오타이드의 갭 영역 내에서 뿐만 아니라 변형된 뉴클레오사이드의 영역에서 뉴클레아제 절단에 대해 보호하는 작용을 할 수 있다.

[0030] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어, 뉴클레아제 공격에 대해 더 저항성인 결합에 대해 천연 포스포다이에스터로부터 변형된 하나 이상의 뉴클레오사이드간 결합을 포함한다. 뉴클레아제 저항성은 혈액 혈청 중의 올리고뉴클레오타이드를 인큐베이션시킴으로써 또는 뉴클레아제 저항성 분석[예를 들어, 뱀독 포스포다이에스터라제(snake venom phosphodiesterase: SVPD)]를 이용함으로써 결정될 수 있으며, 이들 둘 다 당업계에 잘 공지되어 있다. 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레아제 저항성을 향성할 수 있는 뉴클레오타이드간 결합은 뉴클레아제 저항성 뉴클레오사이드간 결합으로서 지칭된다.

[0031] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드, 또는 이의 인접한 뉴클레오타이드 서열에서 뉴클레오사이드간 결합의 적어도 50%가 변형되고, 올리고뉴클레오타이드, 또는 이의 인접한 뉴클레오타이드 서열에서 뉴클레오사이드

간 결합의, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80% 또는 예컨대 적어도 90%가 변형된다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드, 또는 이의 인접한 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오사이드간 결합 모두가 변형된다.

[0032] 일부 실시형태에서, 비-뉴클레오타이드 작용기, 예컨대 접합체에 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 뉴클레오사이드간 결합이 포스포다이에스터일 수 있다는 것이 인식될 것이다. 일부 실시형태에서, 비-뉴클레오타이드 작용기에 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 뉴클레오사이드간 결합이 변형된다.

[0033] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드, 또는 이의 인접한 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오사이드간 결합 모두는 뉴클레아제 저항성 뉴클레오사이드간 결합이다.

[0034] 변형된 뉴클레오사이드간 결합은, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 다이포스포로티오에이트 및 보라노포스페이트를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 뉴클레오사이드간 결합은 본 명세서에 개시된 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 다이포스포로티오에이트, 또는 보라노포스페이트의 RNase H 보충에 적합하다.

[0035] 일부 실시형태에서, 뉴클레오사이드간 결합은 황(S), 예컨대 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 결합을 포함한다.

[0036] 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 결합은 뉴클레아제 저항성, 유익한 약물동태학 및 제조의 용이함에 기인하여 특히 유용하다. 바람직한 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드, 또는 이의 인접한 뉴클레오타이드 서열에서 뉴클레오사이드간 결합의 적어도 50%는 포스포로티오에이트이고, 예컨대 올리고뉴클레오타이드, 또는 이의 인접한 뉴클레오타이드 서열에서 뉴클레오사이드간 결합의 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 또는 예컨대 적어도 90%는 포스포로티오에이트이다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드, 또는 이의 인접한 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오사이드간 결합은 모두 포스포로티오에이트이다.

[0037] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 중성 뉴클레오사이드간 결합, 특히 포스포트라이에스터, 메틸포스포네이트, MMI, 아마이드-3, 포마세탈 또는 티오포마세탈로부터 선택되는 뉴클레오사이드간 결합을 포함한다. 추가적인 뉴클레오사이드간 결합은 WO2009/124238(본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된다. 실시형태에서, 뉴클레오사이드간 결합은 WO2007/031091(본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된 링커로부터 선택된다.

[0038] 뉴클레아제 저항성 결합, 예컨대 포스포로티오에이트 결합은 표적 핵산, 예컨대 갭머에 대한 영역 G, 또는 헤드머 및 테일머의 비-변형된 뉴클레오사이드 영역과 이중가닥을 형성할 때, 뉴클레아제를 보충할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 영역에서 특히 유용하다. 그러나, 포스포로티오에이트 결합은 또한 비-뉴클레아제 보충 영역 및/또는 친화도 향상 영역, 예컨대 갭머에 대한 영역 F 및 F', 또는 헤드머 및 테일머의 변형된 뉴클레오사이드 영역에서 유용할 수 있다.

[0039] 그러나 설계 영역 각각은 포스포로티오에이트 이외의 뉴클레오사이드간 결합, 예컨대 포스포다이에스터 결합, 특히, 변형된 뉴클레오사이드, 예컨대 LNA가 뉴클레아제 분해에 대해 결합을 보호하는 영역을 포함할 수 있다. 특히 변형된 뉴클레오사이드 단위 사이이거나 이에 인접한(전형적으로 비뉴클레아제 보충 영역에서) 포스포다이에스터 결합, 예컨대 1 또는 2개의 결합의 포함은 올리고뉴클레오타이드의 생체이용률 및/또는 생체분포를 변형시킬 수 있다. WO2008/113832는 포스포다이에스터 결합을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 교시에 대해 명세서에 참고로 포함된다.

[0040] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드에서 뉴클레오사이드간 결합은 모두 포스포로티오에이트 및/또는 보라노포스페이트 결합이다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드에서 뉴클레오사이드간 결합은 모두 포스포로티오에이트 결합이다.

[0041] 용어 핵염기는 핵산 혼성화에서 수소 결합을 형성하는 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드에 존재하는 퓨린(예를 들어, 아데닌 및 구아닌) 및 피리미딘(예를 들어, 유라실, 티미딘 및 사이토신) 모이어티를 포함한다. 용어 핵염기는 또한 천연 유래 핵염기와 상이할 수 있지만 핵산 혼성화 동안 기능성인 변형된 핵염기를 포함한다. 이와 관련하여 "핵염기"는 천연 유래 핵염기, 예컨대 아데닌, 구아닌, 사이토신, 티미딘, 유라실, 잔틴과 하이포잔틴뿐만 아니라 비천연 유래 변이체를 지칭한다.

[0042] 일부 실시형태에서, 핵염기 모이어티는 퓨린 또는 피리미딘을, 변형된 퓨린 또는 피리미딘, 예컨대 치환된 퓨린 또는 치환된 피리미딘, 예컨대 아이소사이토신, 슈도아이소사이토신, 5-메틸-사이토신, 5-티오졸로-사이토신, 5-프로핀일-사이토신, 5-프로핀일-유라실, 5-브로모유라실 5-티아졸로-유라실, 2-티오-유라실, 2'티오-티미딘,

이노신, 다이아미노퓨린, 6-아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 2,6-다이아미노퓨린 및 2-클로로-6-아미노퓨린으로부터 선택된 핵염기으로 변경함으로써 변형된다.

[0043] 핵염기 모이어티는 각각 대응하는 핵염기, 예를 들어, A, T, G, C 또는 U에 대한 한 글자 암호로 나타낼 수 있되, 각각의 글자는 선택적으로 동일한 기능의 변형된 핵염기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 예시된 올리고뉴클레오타이드에서, 핵염기 모이어티는 A, T, G, C 및 5-메틸 사이토신(5mC)으로부터 선택된다. 이들 변형의 조합이 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 5mC LNA 뉴클레오사이드가 사용될 수 있다. 마찬가지로, 2-하이드록시메틸(2'-OMe) 5mC가 사용될 수 있다.

[0044] 용어 "상보성"은 뉴클레오사이드/뉴클레오타이드의 왓슨-크릭 염기쌍에 대한 능력을 기재한다. 왓슨-크릭 염기쌍은 구아닌(G)-사이토신(C) 및 아데닌(A)-티민(T)/유라실(U)이다. 올리고뉴클레오타이드가 변형된 핵염기를 포함할 수 있고, 예를 들어, 5-메틸 사이토신이 종종 사이토신 대신 사용된다는 것이 이해될 것이며, 이러한 상보성이라는 용어는 비변형 핵염기와 변형 핵염기 사이에 왓슨 크릭 염기쌍을 포함한다는 것이 이해될 것이다.

[0045] 본 명세서에서 사용되는 용어 "상보성%"는 별개의 핵산 분자(예를 들어, 표적 핵산)의 주어진 위치에 인접한 뉴클레오타이드 서열에 대해 주어진 위치에서 상보성인(즉, 왓슨 크릿 염기쌍을 형성하는) 핵산 분자(예를 들어, 올리고뉴클레오타이드) 내 인접한 뉴클레오타이드 서열의 백분율로 뉴클레오타이드의 수를 지칭한다. 백분율은 두 서열 사이에서 쌍을 형성하는 정렬 염기의 수를 계수하고, 올리고뉴클레오타이드 내 뉴클레오타이드의 총 수로 나누고 나서, 100을 곱함으로써 계산된다. 이러한 비교에서, 정렬되지 않는(염기쌍을 형성하지 않는) 핵염기/뉴클레오타이드는 미스매치로 칭해진다.

[0046] 본 명세서에서 사용되는 용어 "혼성화하는" 또는 "혼성화한다"는 마주보는 가닥 상의 염기쌍 사이에 수소 결합을 형성하고, 이에 의해 이중가닥을 형성하는 두 핵산 가닥(예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 및 표적 핵산)으로서 이해되어야 한다. 두 핵산 가닥 사이의 결합 친화도는 혼성화 강도이다. 이는 종종 올리고뉴클레오타이드의 절반이 표적 핵산과 이중가닥을 형성하는 온도로서 정의되는 융점(Tm)에 관해 기재된다. 생리적 조건에서, Tm은 친화도(Mergny and Lacroix, 2003, Oligonucleotides 13:515-537)에 엄격하게 비례하지 않는다. 가닥 상태 깁스 자유 에너지 ΔG° 는 결합 친화도의 더 정확한 표현이며, ΔG° =RTln(Kd)에 의한 반응의 해리 상수(Kd)와 관련되고, 여기서 R은 기체 상수이고, T는 절대온도이다. 따라서, 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산 사이의 반응의 매우 낮은 ΔG° 는 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산 사이의 강한 혼성화를 반영한다. ΔG° 는 반응과 연관된 에너지이며, 여기서 수성 농도는 1M이고, pH는 7이며 온도는 37℃이다. 표적 핵산에 대한 올리고뉴클레오타이드의 혼성화는 자발적 반응이며, 자발적 반응에 대해 ΔG° 는 0 미만이다. ΔG° 는, 예를 들어, 문헌[Hansen et al., 1965, Chem. Comm. 36-38 및 Holdgate et al., 2005, Drug Discov Today]에 기재된 바와 같은 등온 적정 열량계(isothermal titration calorimetry: ITC) 방법의 사용에 의해 실험적으로 측정될 수 있다. 당업자는 상업적 기기가 ΔG° 측정에 이용 가능하다는 것을 알 것이다. ΔG° 는 또한 문헌[Sugimoto et al., 1995, Biochemistry 34:11211-11216 및 McTigue et al., 2004, Biochemistry 43:5388-5405]에 의해 기재된 적절하게 유도된 열역학적 파라미터를 이용하여 문헌[SantaLucia, 1998, Proc Natl Acad Sci USA. 95:1460-1465]에 의해 기재되는 가장 가까운 이웃 모델을 이용함으로써 수치적으로 추정될 수 있다. 혼성화에 의해 의도된 핵산 표적을 조절할 가능성을 갖기 위해, 본 명세서에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 길이가 10 내지 30개의 뉴클레오타이드인 올리고뉴클레오타이드에 대해 10㎉ 미만인 추정된 ΔG° 값을 갖는 표적 핵산에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 혼성화 정도 또는 강도는 표준 상태 깁스 자유 에너지 ΔG° 에 의해 측정된다. 올리고뉴클레오타이드는 8 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이인 올리고뉴클레오타이드에 대해 -10㎉ 범위 미만, 예컨대 -15㎉ 미만, 예컨대 -20㎉ 미만 및 예컨대 -25㎉의 추정 ΔG° 값으로 표적 핵산에 혼성화할 수 있다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 -60㎉, 예컨대 -12 내지 -40, 예컨대 -15 내지 -30㎉ 또는 -16 내지 -27㎉ 예컨대 -18 내지 -25㎉의 추정된 ΔG° 값으로 표적 핵산에 혼성화한다.

[0047] 일부 실시형태에서, 개시된 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산 분자에 존재하는 표적 서열에 상보성이거나 이에 혼성화하는 적어도 8개의 뉴클레오타이드의 인접한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 인접한 뉴클레오타이드 서열(및 그에 따른 표적 서열)은 적어도 8개의 인접한 뉴클레오타이드, 예컨대 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 인접한 뉴클레오타이드, 예컨대 12 내지 25, 예컨대 14 내지 18개의 인접한 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0048] 일부 실시형태에서, 개시된 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산 서열을 저해하거나, 돌연변이시키거나 또는 결실시키는 기능성 핵산, 예컨대 siRNA, shRNA 또는 뉴클레아제 gRNA이다.

[0049] 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현의 조절"은 올리고뉴클레오타이드의 투여 전의 UBE3A의 양에 비교할 때

UBE3A RNA/단백질의 양을 변경시키는 올리고뉴클레오타이드의 능력에 대한 전반적인 용어로서 이해되어야 한다. 대안적으로 발현의 조절은 개시된 올리고뉴클레오타이드가 투여되지 않는 대조군 실험을 참조로 하여 결정될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드에 의해 달성되는 조절은, *SNORD115-45* snoRNA 하류인 *UBE3A-AS*의 5'-말단을 표적화함으로써, 부계 *UBE3A-AS* 전사체의 억제를 감소시키거나, 제거하거나, 방지하거나, 줄이거나, 낮추거나 또는 종결시키는 그의 능력에 관한 것이다. 조절은 또한, *UBE3A-AS*에 의해 영향받는 저해 메커니즘의 제거 또는 차단에 의해 부계 *UBE3A*의 발현을 회복하거나, 증가시키거나 또는 향상시키는 올리고뉴클레오타이드의 능력으로서 고려될 수 있다.

[0050] 개시된 올리고뉴클레오타이드는 변형된 당 모이어티, 즉, DNA 및 RNA에서 발견되는 리보스 당 모이어티에 비교할 때 당 모이어티의 변형을 갖는 하나 이상의 뉴클레오사이드를 포함할 수 있다. 리보스 당 모이어티의 변형을 갖는 수많은 뉴클레오사이드는 주로, 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 친화도 및/또는 뉴클레아제 저항성의 특정 특성을 개선시킬 목적으로 생성되었다. 이러한 변형은, 예를 들어, 헥소스 고리(HNA), 또는 리보스 고리(LNA) 상의 C2와 C4 탄소 사이에 2라디칼 브리지를 전형적으로 갖는 이환식 고리, 또는 C2와 C3 탄소 사이에 결합이 전형적으로 결여된 비연결 리보스 고리(예를 들어, UNA)에 의한 대체에 의해 리보스 고리 구조가 변형된 것을 포함한다. 다른 당 변형된 뉴클레오사이드는, 예를 들어, 바이사이클로헥소스 뉴클레오사이드(WO2011/017521) 또는 삼환식 뉴클레오사이드(WO2013/154798)를 포함한다. 변형된 뉴클레오사이드는 또한 당 모이어티가, 예를 들어, 펩타이드 핵산(PNA) 또는 몰폴리노 핵산의 경우에 비-당 모이어티로 대체된 뉴클레오사이드를 포함한다.

[0051] 당 변형은 또한 수소 이외의 기에 대한 리보스 고리 상의 치환체 기, 또는 DNA 및 RNA 뉴클레오사이드에서 자연적으로 발견되는 2'-OH 기의 변경을 통해 만들어진 변형을 포함한다. 치환체는, 예를 들어, 2', 3', 4' 또는 5' 위치에 도입될 수 있다. 변형된 당 모이어티를 갖는 뉴클레오사이드는 또한 2' 변형된 뉴클레오사이드, 예컨대 2' 치환된 뉴클레오사이드를 포함한다. 또한, 2' 치환된 뉴클레오사이드의 개발에 훨씬 중점을 두었고, 수많은 2' 치환된 뉴클레오사이드는 향상된 뉴클레오사이드 저항성 및 향상된 친화도로 혼입될 때 유리한 특성을 갖는 것으로 발견되었다.

[0052] 2' 당 변형된 뉴클레오사이드는 2' 위치(2' 치환된 뉴클레오사이드)에서 H 또는 -OH 이외의 치환체를 갖거나 2' 연결된 2라디칼을 포함하는 뉴클레오사이드이고, 2' 치환된 뉴클레오사이드 및 LNA(2'-4' 2라디칼 브리지된) 뉴클레오사이드를 포함한다. 예를 들어, 2' 변형된 당은 올리고뉴클레오타이드에 대해 향상된 결합 친화도 및/또는 증가된 뉴클레아제 저항성을 제공할 수 있다. 2' 치환된 변형 뉴클레오사이드의 예는 2'-O-알킬-RNA, 2'-O-메틸-RNA(O-Me), 2'-알콕시-RNA, 2'-O-메톡시에틸-RNA(MOE), 2'-아미노-DNA, 2'-플루오로-RNA, 및 2'-플루오로-ANA(F-ANA)이다. 추가적인 예에 대해, 문헌[Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 및 Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213; 및 Deleavey and Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937]을 참조한다.

[0053] 잠금 핵산(LNA) 뉴클레오사이드는 뉴클레오타이드의 리보스 당의 C2'와 C4' 사이에 링커기(2라디칼 또는 브리지로서 지칭됨)를 포함하는 변형된 뉴클레오사이드이다. 이들 뉴클레오사이드는 또한 문헌에서 브리지된 핵산 또는 이환식 핵산(BNA)으로 지칭된다.

[0054] 뉴클레아제 매개 분해는 이러한 서열과 이중가닥을 형성할 때 상보성 뉴클레오타이드 서열의 분해를 매개할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0055] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산의 뉴클레아제 매개 분해를 통해 작용할 수 있으며, 여기서 개시된 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제, 특히 인도뉴클레아제, 바람직하게는 엔도리보뉴클레아제(RNase), 예컨대 RNase H를 보충할 수 있다. 뉴클레아제 매개 메커니즘을 통해 작용하는 올리고뉴클레오타이드 설계의 예는 전형적으로 적어도 5 또는 6개의 DNA 뉴클레오사이드의 영역을 포함하고 뉴클레오사이드, 예를 들어, 갭머, 헤드머 및 테일머의 친화도 향상에 의해 하나의 측면 상에 또는 측면 둘 다에 측접되는 올리고뉴클레오타이드이다.

[0056] 본 명세서에서 사용되는 용어 "갭머"는 하나 이상의 친화도 향상 변형된 뉴클레오사이드에 의해 측접된 5' 및 3'(측접)인 RNase H 보충 올리고뉴클레오타이드(갭)의 영역을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 다양한 갭머 설계는 본 명세서에 기재되어 있다. 헤드머 및 테일머는 측접 중 하나가 상실된 RNase H를 보충할 수 있는 올리고뉴클레오타이드이며, 즉, 올리고뉴클레오타이드의 말단 중 하나만이 친화도 향상 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 헤드머에 대해, 3' 측접은 상실되며(즉, 5' 측접은 친화도 향상 변형된 뉴클레오사이드를 포함함) 테일머에 대해 5' 측접은 상실된다(즉, 3' 측접은 친화도 향상 변형된 뉴클레오사이드를 포함함).

[0057] 하나 이상의 비-뉴클레오타이드 모이어티에 대한 개시된 올리고뉴클레오타이드의 접합은, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 활성, 세포 분포, 세포 흡수 또는 안정성에 영향을 미침으로써 올리고뉴클레오타이드의 약학을 개선시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 접합 모이어티는 올리고뉴클레오타이드의 세포 분포, 생체이용률, 대사, 배설, 투과성을 개선시킴으로써 올리고뉴클레오타이드의 약물동태학적 특성을 변형시키거나 향상시킬 수 있다. 특히 접합체는 특정 기관, 조직 또는 세포 유형에 올리고뉴클레오타이드를 표적화시킬 수 있고, 이에 의해 해당 기관, 조직 또는 세포 유형에서 올리고뉴클레오타이드의 유효성을 향상시킨다. 동시에, 접합체는 비-표적 세포 유형, 조직 또는 기관에서 올리고뉴클레오타이드의 활성, 예를 들어, 비표적 활성 또는 비표적 세포 유형, 조직 또는 기관 내 활성을 감소시키는 작용을 할 수 있다. WO 93/07883 및 WO 2013/033230은 본 명세서에 참고로 포함되는 적합한 접합 모이어티를 제공한다. 본 명세서에 참고로 포함된 WO 2012/143379는 트랜스페린 수용체에 대해 친화도를 갖는 항체 단편에 대한 접합에 의해 혈액-뇌-장벽을 가로질러 약물을 전달하는 방법을 제공한다.

[0058] 일부 실시형태에서, 비-뉴클레오타이드 모이어티(접합 모이어티)는 탄수화물, 세포 표면 수용체 리간드, 약물 물질, 호르몬, 친유성 물질, 중합체, 단백질, 펩타이드, 독소(예를 들어, 박테리아 독소), 비타민, 바이러스 단백질(예를 들어, 캡시드) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 비-뉴클레오타이드 모이어티는 항체 또는 항체 단편, 예컨대 혈액-뇌-장벽을 가로지르는 전달을 용이하게 하는 항체 또는 항체 단편, 특히 트랜스페린 수용체를 표적화하는 항체 또는 항체 단편이다.

[0059] 용어 "대상체"는 투여 또는 치료 표적인 임의의 개체를 지칭한다. 대상체는 척추동물, 예를 들어, 포유류일 수 있다. 따라서, 대상체는 인간 또는 수의학적 환자일 수 있다. 용어 "환자"는 임상의, 예를 들어, 의사의 치료 하의 대상체를 지칭한다.

[0060] 용어 "치료적으로 유효한"은 사용되는 조성물의 양이 질병 또는 장애의 하나 이상의 원인 또는 증상을 개선시키는 데 충분한 양임을 지칭한다. 이러한 개선은 반드시 제거는 아닌 감소 또는 변경만을 필요로 한다.

[0061] 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 합리적인 유해/유익비에 비례한 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 타당한 의학적 판단의 범주 내인 해당 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투약 형태를 지칭한다.

[0062] 용어 "치료"는 질환, 병리학적 병태 또는 장애를 치유하거나, 개선시키거나, 안정화하거나 또는 예방하기 위한 의도를 갖는 환자의 의학적 관리를 지칭한다. 이 용어는 활성 치료, 즉, 질환, 병리학적 병태 또는 장애의 개선에 대해 구체적으로 지시된 치료를 포함하고, 또한 원인 치료, 즉, 연관된 질환, 병리학적 병태 또는 장애의 원인 제거에 대해 지시된 치료를 포함한다. 추가로, 이 용어는 완화적 치료, 즉, 질환, 병리학적 병태 또는 장애의 치유보다는 증상의 경감을 위해 설계된 치료; 예방적 치료, 즉, 연관된 질환, 병리학적 병태 또는 장애의 발생을 최소화하거나 부분적으로 또는 완전히 저해하도록 지시된 치료; 및 지지적 치료, 즉, 연관된 질환, 병리학적 병태 또는 장애의 개선에 대해 지시된 다른 구체적 요법을 보충하기 위해 사용되는 치료를 포함한다.

[0063] 용어 "저해하다"는 활성, 반응, 병태, 질환 또는 다른 생물학적 파라미터의 감소를 지칭하며, 당업자는 일부 실시형태에서, 저해가 개시의 지연 또는 빈도 감소이거나 포함할 수 있도록 특정 시점에 평가될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일부 실시형태에서, 저해는 활성, 반응, 병태 또는 질환의 완전한 제거를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 이는 또한, 예를 들어, 천연 또는 대조군 수준에 비해 활성, 반응, 병태 또는 질환의 10% 감소를 포함할 수 있다. 따라서, 감소는 천연 또는 대조군 수준에 비해 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% 또는 이들 사이의 임의의 감소량일 수 있다.

[0064] 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 *SNORD115* 숙주-유전자 전사체(AF400500)의 5'-말단에서 엑손을 표적화하도록 설계되었는데, 이는 *SNORD115-46*, *SNORD115-47*, *SNORD115-48* 및 *SNORD109B* snoRNA를 포함하고 *UBE3A* 안티센스 전사체(*UBE3A-AS*)의 5'-말단을 나타내는 것으로 생각된다. 특히 표적 핵산은 인간 염색체 15 인간 게놈 조립체 hg19 상의 25,511,577 내지 25,516,681번 위치에 대응하는 *UBE3A-AS*의 5' 말단일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 핵산은 *UBE3A-AS*의 5'-말단에 위치된 5개의 엑손 중 하나에 대해 설계되었는데, 이는 25,511,577 내지 25,511,761(엑손 1), 25,512,059 내지 25,512,191(엑손 2), 25,513,476 내지 25,513,600(엑손 3), 25,514,752 내지 25,514,880(엑손 4), 및 25,516,565 내지 25,516,681(엑손 5)번 위치에 대응할 수 있다.

[0065] 따라서, 일부 실시형태에서, 표적 핵산은

ATGATGATATGGAAGAAAAGCACTCTTTGGCCTGTTGTGACTGGGACAGTTGAC
AGCACCCAGGTGTCCTTTAATGAAAATGCTCTTGACACCAATGCATCCTAGCAT
CACAGCTTCAGGAAGCCTTCTCAAGTGTGCATGGGGAGTACTATGTCTTTCATC
AATAATGAAATCTTCTGATTTG (엑손 1, 서열번호 1)이다.

[0066]

[0067] 일부 실시형태에서, 표적 핵산은

TAAGACATGCTGCCAAGAGATGTGCCATTCTATTATAAAAGATCAGTAGCTTCCT
TTACCGACGTGTATATTCTATCTAGAACATTGAGCTATGGAAGACTCCCACCTAA
GGGAATTAGTTTTACACCTTCAG (엑손 2, 서열번호 2)이다.

[0068]

[0069] 일부 실시형태에서, 표적 핵산은

ATAAAGACTGCTGAGAAGAGCACCCTCTGGTGTTGTCACAGAGGCAAGTGCTAC
CGCACAGGCATGCTGCAGTGAATTTAACTGATCCTCTGTCCCTGCAACCGTTGT
TTAAGGATGCTATTCTG (엑손 3, 서열번호 3)이다.

[0070]

[0071] 일부 실시형태에서, 표적 핵산은

AAAAGACTGTGGAGGAAGAAAACCCTTTACCCTGTTGTTCAGGGAGAAACTGAC
ACCACTCAACTGCCTGGCACTGAAAATGTGGCATCCAGTCCACTTTACCATCAG
TGTTTAAGGAAACCATCTCTG (엑손 4, 서열번호 4)이다.

[0072]

[0073] 일부 실시형태에서, 표적 핵산은

ATAAGGATGACTGAGGAAGAGTACTCTTTGGCTTGTTGACACCAGCACAGCTGA
CACACCCAGATATCTGTTTGGTCTCCTGTGAACTTTCAACCAGGATTTAAGGATG
CCACTCTG (엑손 5, 서열번호 5)이다.

[0074]

[0075] 일부 실시형태에서, 개시된 ASO는 핵산 서열 TAGAGGTGAAGGCCAGGCAC (ASO-1, 서열번호 6)를 가진다.

[0076] 일부 실시형태에서, ASO는 핵산 서열 GTACTCTTCCTCAGTCATCC (ASO-2, 서열번호 7)를 가진다.

[0077] 일부 실시형태에서, 개시된 ASO는 핵산 서열 TGTCAGTTTCTCCCTGAACA (ASO-3, 서열번호 8)를 가진다.

[0078] 일부 실시형태에서, 개시된 ASO는 핵산 서열 TAGAATGGCACATCTCTTGG (ASO-4, 서열번호 9)를 가진다.

[0079] 일부 실시형태에서, 개시된 ASO는 핵산 서열 GTTTTCTTCCTCCACAGTCT (ASO-6, 서열번호 10)를 가진다.

[0080] 일부 실시형태에서, 개시된 ASO는 핵산 서열 CTGGTGTCAACAAGCCAAAG (ASO-7, 서열번호 11)를 가진다.

[0081] *SNORD115* 영역의 3'-말단의 엑손 1을 표적화할 수 있는 추가적인 ASO는 이하의 표 1에 제공된다. *SNORD115*의 3'-말단의 엑손 2를 표적화할 수 있는 예시적인 ASO는 이하의 표 2에 제공된다. *SNORD115*의 3'-말단의 엑손 3을 표적화할 수 있는 예시적인 ASO는 이하의 표 3에 제공된다. *SNORD115*의 3'-말단의 엑손 4를 표적화할 수 있는 예시적인 ASO는 이하의 표 4에 제공된다. *SNORD115*의 3'-말단의 엑손 5를 표적화할 수 있는 예시적인 ASO는 이하의 표 5에 제공된다.

표 1

[0082]

엑손 1 ASOs	
표적 서열 (5'→3')	ASO (5'→3')
GAAAAUGCUCUUGACACC (서열번호 12)	GGTGTCAAGAGCATTTTC (서열번호 15)
GAAAAUGCUCUUGACACCA (서열번호 13)	TGGTGTCAAGAGCATTTTC (서열번호 16)
GAAAAUGCUCUUGACACCAA (서열번호 14)	TTGGTGTCAAGAGCATTTTC (서열번호 17)

표 2

[0083]

엑손 2 ASOs	
표적 서열 (5'→3')	ASO (5'→3')
CAUGCUGCCAAGAGAUGU (서열번호 18)	ACATCTCTTGGCAGCATG (서열번호 67)
CAUGCUGCCAAGAGAUGUG (서열번호 19)	CACATCTCTTGGCAGCATG (서열번호 68)
CAUGCUGCCAAGAGAUGUGC (서열번호 20)	GCACATCTCTTGGCAGCATG (서열번호 69)
AUGCUGCCAAGAGAUGUG (서열번호 21)	CACATCTCTTGGCAGCAT (서열번호 70)
AUGCUGCCAAGAGAUGUGC (서열번호 22)	GCACATCTCTTGGCAGCAT (서열번호 71)
AUGCUGCCAAGAGAUGUGCC (서열번호 23)	GGCACATCTCTTGGCAGCAT (서열번호 72)
UGCUGCCAAGAGAUGUGCC (서열번호 24)	GGCACATCTCTTGGCAGCA (서열번호 73)
UGCUGCCAAGAGAUGUGCCA (서열번호 25)	TGGCACATCTCTTGGCAGCA (서열번호 74)
GCUGCCAAGAGAUGUGCCA (서열번호 26)	TGGCACATCTCTTGGCAGC (서열번호 75)
GCUGCCAAGAGAUGUGCCAU (서열번호 27)	ATGGCACATCTCTTGGCAGC (서열번호 76)
CUGCCAAGAGAUGUGCCA (서열번호 28)	TGGCACATCTCTTGGCAG (서열번호 77)
CUGCCAAGAGAUGUGCCAU (서열번호 29)	ATGGCACATCTCTTGGCAG (서열번호 78)
CUGCCAAGAGAUGUGCCAUU (서열번호 30)	AATGGCACATCTCTTGGCAG (서열번호 79)
UGCCAAGAGAUGUGCCAU (서열번호 31)	ATGGCACATCTCTTGGCA (서열번호 80)
UGCCAAGAGAUGUGCCAUU (서열번호 32)	AATGGCACATCTCTTGGCA (서열번호 81)
UGCCAAGAGAUGUGCCAUUC (서열번호 33)	GAATGGCACATCTCTTGGCA (서열번호 82)
GCCAAGAGAUGUGCCAUU (서열번호 34)	AATGGCACATCTCTTGGC (서열번호 83)
GCCAAGAGAUGUGCCAUUC (서열번호 35)	GAATGGCACATCTCTTGGC (서열번호 84)
GCCAAGAGAUGUGCCAUUCU (서열번호 36)	AGAATGGCACATCTCTTGGC (서열번호 85)
CCAAGAGAUGUGCCAUUC (서열번호 37)	GAATGGCACATCTCTTGG (서열번호 86)
CCAAGAGAUGUGCCAUUCU (서열번호 38)	AGAATGGCACATCTCTTGG (서열번호 87)

[0084]

CCAAGAGAUGUGCCAUUCUA (서열번호 39)	TAGAATGGCACATCTCTTGG (서열번호 88)
CAAGAGAUGUGCCAUUCU (서열번호 40)	AGAATGGCACATCTCTTG (서열번호 89)
CAAGAGAUGUGCCAUUCUA (서열번호 41)	TAGAATGGCACATCTCTTG (서열번호 90)
CAAGAGAUGUGCCAUUCUAU (서열번호 42)	ATAGAATGGCACATCTCTTG (서열번호 91)
UCCUUUACCGACGUGUAU (서열번호 43)	ATACACGTCGGTAAAGGA (서열번호 92)
UCCUUUACCGACGUGUAUA (서열번호 44)	TATACACGTCGGTAAAGGA (서열번호 93)
UCCUUUACCGACGUGUAUAU (서열번호 45)	ATATACACGTCGGTAAAGGA (서열번호 94)
CCUUUACCGACGUGUAUA (서열번호 46)	TATACACGTCGGTAAAGG (서열번호 95)
CCUUUACCGACGUGUAUAU (서열번호 47)	ATATACACGTCGGTAAAGG (서열번호 96)
CCUUUACCGACGUGUAUAUU (서열번호 48)	AATATACACGTCGGTAAAGG (서열번호 97)
ACCGACGUGUAUAUUCUAUC (서열번호 49)	GATAGAATATACACGTCGGT (서열번호 98)
CCGACGUGUAUAUUCUAUC (서열번호 50)	GATAGAATATACACGTCGG (서열번호 99)
CCGACGUGUAUAUUCUAUCU (서열번호 51)	AGATAGAATATACACGTCGG (서열번호 100)
UCUAGAACAUUGAGCUAUGG (서열번호 52)	CCATAGCTCAATGTTCTAGA (서열번호 101)
CAUUGAGCUAUGGAAGAC (서열번호 53)	GTCTTCCATAGCTCAATG (서열번호 102)
CUAUGGAAGACUCCCACCUA (서열번호 54)	TAGGTGGGAGTCTTCCATAG (서열번호 103)
UAUGGAAGACUCCCACCUA (서열번호 55)	TAGGTGGGAGTCTTCCATA (서열번호 104)
UAUGGAAGACUCCCACCUAA (서열번호 56)	TTAGGTGGGAGTCTTCCATA (서열번호 105)
AUGGAAGACUCCCACCUA (서열번호 57)	TAGGTGGGAGTCTTCCAT (서열번호 106)
AUGGAAGACUCCCACCUAA (서열번호 58)	TTAGGTGGGAGTCTTCCAT (서열번호 107)
UGGAAGACUCCCACCUAA (서열번호 59)	TTAGGTGGGAGTCTTCCA (서열번호 108)
GACUCCCACCUAAGGGAAUU (서열번호 60)	AATTCCCTTAGGTGGGAGTC (서열번호 109)
ACUCCCACCUAAGGGAAU (서열번호 61)	ATTCCCTTAGGTGGGAGT (서열번호 110)
ACUCCCACCUAAGGGAAUU (서열번호 62)	AATTCCCTTAGGTGGGAGT (서열번호 111)
ACUCCCACCUAAGGGAAUUA (서열번호 63)	TAATTCCCTTAGGTGGGAGT (서열번호 112)
CUCCCACCUAAGGGAAUU (서열번호 64)	AATTCCCTTAGGTGGGAG (서열번호 113)
CUCCCACCUAAGGGAAUUA (서열번호 65)	TAATTCCCTTAGGTGGGAG (서열번호 114)
UCCCACCUAAGGGAAUUA (서열번호 66)	TAATTCCCTTAGGTGGGA (서열번호 115)

표 3

[0085]

엑손 3 ASO	
표적 서열 (5'→3')	ASO (5'→3')
GAUAAAGACUGCUGAGAAGA (서열번호 116)	TCTTCTCAGCAGTCTTTATC (서열번호 139)
AUAAAGACUGCUGAGAAGAG (서열번호 117)	CTCTTCTCAGCAGTCTTTAT (서열번호 140)
UAAAGACUGCUGAGAAGAGC (서열번호 118)	GCTCTTCTCAGCAGTCTTTA (서열번호 141)
AAAGACUGCUGAGAAGAGCA (서열번호 119)	TGCTCTTCTCAGCAGTCTTT (서열번호 142)
AAGACUGCUGAGAAGAGCAC (서열번호 120)	GTGCTCTTCTCAGCAGTCTT (서열번호 143)
AGACUGCUGAGAAGAGCACC (서열번호 121)	GGTGCTCTTCTCAGCAGTCT (서열번호 144)
GACUGCUGAGAAGAGCACCC (서열번호 122)	GGGTGCTCTTCTCAGCAGTC (서열번호 145)
CAAGUGCUACCGCACAGGCA (서열번호 123)	TGCCTGTGCGGTAGCACTTG (서열번호 146)
AAGUGCUACCGCACAGGCAU (서열번호 124)	ATGCCTGTGCGGTAGCACTT (서열번호 147)
AGUGCUACCGCACAGGCAUG (서열번호 125)	CATGCCTGTGCGGTAGCACT (서열번호 148)
UGCUACCGCACAGGCAUGCU (서열번호 126)	AGCATGCCTGTGCGGTAGCA (서열번호 149)
UACCGCACAGGCAUGCUGCA (서열번호 127)	TGCAGCATGCCTGTGCGGTA (서열번호 150)
GCACAGGCAUGCUGCAGUGA (서열번호 128)	TCACTGCAGCATGCCTGTGC (서열번호 151)
CACAGGCAUGCUGCAGUGAA (서열번호 129)	TTCACTGCAGCATGCCTGTG (서열번호 152)
ACAGGCAUGCUGCAGUGAAU (서열번호 130)	ATTCACTGCAGCATGCCTGT (서열번호 153)
CAGGCAUGCUGCAGUGAAUU (서열번호 131)	AATTCACTGCAGCATGCCTG (서열번호 154)
AGGCAUGCUGCAGUGAAUUU (서열번호 132)	AAATTCACTGCAGCATGCCT (서열번호 155)
GGCAUGCUGCAGUGAAUUUA (서열번호 133)	TAAATTCACTGCAGCATGCC (서열번호 156)
GCAUGCUGCAGUGAAUUUAA (서열번호 134)	TTAAATTCACTGCAGCATGC (서열번호 157)
CAUGCUGCAGUGAAUUUAAC (서열번호 135)	GTTAAATTCACTGCAGCATG (서열번호 158)
GCAGUGAAUUUAACUGAUCC (서열번호 136)	GGATCAGTTAAATTCACTGC (서열번호 159)
UCCCUGCAACCGUUGUUUAA (서열번호 137)	TTAAACAACGGTTGCAGGGA (서열번호 160)
CCCUGCAACCGUUGUUUAAG (서열번호 138)	CTTAAACAACGGTTGCAGGG (서열번호 161)

표 4

[0086]

엑손 4 ASO	
표적 서열 (5′→3′)	ASO (5′→3′)
AAAAGACUGUGGAGGAAGA (서열번호 162)	TCTTCCTCCACAGTCTTTT (서열번호 237)
AAAAGACUGUGGAGGAAGAA (서열번호 163)	TTCTTCCTCCACAGTCTTTT (서열번호 238)
AAAGACUGUGGAGGAAGAA (서열번호 164)	TTCTTCCTCCACAGTCTTT (서열번호 239)
AAAGACUGUGGAGGAAGAAA (서열번호 165)	TTTCTTCCTCCACAGTCTTT (서열번호 240)
AAGACUGUGGAGGAAGAAAA (서열번호 166)	TTTTCTTCCTCCACAGTCTT (서열번호 241)
AGACUGUGGAGGAAGAAAAC (서열번호 167)	GTTTTCTTCCTCCACAGTCT (서열번호 242)
ACUGUGGAGGAAGAAAAC (서열번호 168)	GTTTTCTTCCTCCACAGT (서열번호 243)
ACUGUGGAGGAAGAAAACC (서열번호 169)	GGTTTTCTTCCTCCACAGT (서열번호 244)
ACUGUGGAGGAAGAAAACCC (서열번호 170)	GGGTTTTCTTCCTCCACAGT (서열번호 245)
CUGUGGAGGAAGAAAACC (서열번호 171)	GGTTTTCTTCCTCCACAG (서열번호 246)
CUGUGGAGGAAGAAAACCC (서열번호 172)	GGGTTTTCTTCCTCCACAG (서열번호 247)
AAAACCCUUUACCCUGUUG (서열번호 173)	CAACAGGGTAAAGGGTTTT (서열번호 248)
AAAACCCUUUACCCUGUUGU (서열번호 174)	ACAACAGGGTAAAGGGTTTT (서열번호 249)
AAACCCUUUACCCUGUUGUU (서열번호 175)	AACAACAGGGTAAAGGGTTT (서열번호 250)
UUGUUCAGGGAGAAACUG (서열번호 176)	CAGTTTCTCCCTGAACAA (서열번호 251)
UUGUUCAGGGAGAAACUGAC (서열번호 177)	GTCAGTTTCTCCCTGAACAA (서열번호 252)
UGUUCAGGGAGAAACUGA (서열번호 178)	TCAGTTTCTCCCTGAACA (서열번호 253)
UGUUCAGGGAGAAACUGAC (서열번호 179)	GTCAGTTTCTCCCTGAACA (서열번호 254)
UGUUCAGGGAGAAACUGACA (서열번호 180)	TGTCAGTTTCTCCCTGAACA (서열번호 255)
GUUCAGGGAGAAACUGACA (서열번호 181)	TGTCAGTTTCTCCCTGAAC (서열번호 256)
UCAGGGAGAAACUGACACCA (서열번호 182)	TGGTGTCAGTTTCTCCCTGA (서열번호 257)
CAGGGAGAAACUGACACCA (서열번호 183)	TGGTGTCAGTTTCTCCCTG (서열번호 258)
AGGGAGAAACUGACACCA (서열번호 184)	TGGTGTCAGTTTCTCCCT (서열번호 259)
AGGGAGAAACUGACACCAC (서열번호 185)	GTGGTGTCAGTTTCTCCCT (서열번호 260)
AGGGAGAAACUGACACCACU (서열번호 186)	AGTGGTGTCAGTTTCTCCCT (서열번호 261)
GGGAGAAACUGACACCAC (서열번호 187)	GTGGTGTCAGTTTCTCCC (서열번호 262)

[0087]

GGGAGAAACUGACACCACU (서열번호 188)	AGTGGTGTCAGTTTCTCCC (서열번호 263)
GGGAGAAACUGACACCACUC (서열번호 189)	GAGTGGTGTCAGTTTCTCCC (서열번호 264)
GGAGAAACUGACACCACU (서열번호 190)	AGTGGTGTCAGTTTCTCC (서열번호 265)
GGAGAAACUGACACCACUC (서열번호 191)	GAGTGGTGTCAGTTTCTCC (서열번호 266)
GGAGAAACUGACACCACUCA (서열번호 192)	TGAGTGGTGTCAGTTTCTCC (서열번호 267)
GAGAAACUGACACCACUC (서열번호 193)	GAGTGGTGTCAGTTTCTC (서열번호 268)
GAGAAACUGACACCACUCA (서열번호 194)	TGAGTGGTGTCAGTTTCTC (서열번호 269)
GAGAAACUGACACCACUCAA (서열번호 195)	TTGAGTGGTGTCAGTTTCTC (서열번호 270)
AGAAACUGACACCACUCA (서열번호 196)	TGAGTGGTGTCAGTTTCT (서열번호 271)
AGAAACUGACACCACUCAA (서열번호 197)	TTGAGTGGTGTCAGTTTCT (서열번호 272)
AGAAACUGACACCACUCAAC (서열번호 198)	GTTGAGTGGTGTCAGTTTCT (서열번호 273)
GAAACUGACACCACUCAA (서열번호 199)	TTGAGTGGTGTCAGTTTC (서열번호 274)
GAAACUGACACCACUCAAC (서열번호 200)	GTTGAGTGGTGTCAGTTTC (서열번호 275)
GAAACUGACACCACUCAACU (서열번호 201)	AGTTGAGTGGTGTCAGTTTC (서열번호 276)
AAACUGACACCACUCAAC (서열번호 202)	GTTGAGTGGTGTCAGTTT (서열번호 277)
AAACUGACACCACUCAACU (서열번호 203)	AGTTGAGTGGTGTCAGTTT (서열번호 278)
AAACUGACACCACUCAACUG (서열번호 204)	CAGTTGAGTGGTGTCAGTTT (서열번호 279)
AACUGACACCACUCAACU (서열번호 205)	AGTTGAGTGGTGTCAGTT (서열번호 280)
AACUGACACCACUCAACUG (서열번호 206)	CAGTTGAGTGGTGTCAGTT (서열번호 281)
AACUGACACCACUCAACUGC (서열번호 207)	GCAGTTGAGTGGTGTCAGTT (서열번호 282)
ACUGACACCACUCAACUG (서열번호 208)	CAGTTGAGTGGTGTCAGT (서열번호 283)
ACUGACACCACUCAACUGC (서열번호 209)	GCAGTTGAGTGGTGTCAGT (서열번호 284)
ACUGACACCACUCAACUGCC (서열번호 210)	GGCAGTTGAGTGGTGTCAGT (서열번호 285)
CUGACACCACUCAACUGC (서열번호 211)	GCAGTTGAGTGGTGTCAG (서열번호 286)
CUGACACCACUCAACUGCC (서열번호 212)	GGCAGTTGAGTGGTGTCAG (서열번호 287)
CUGACACCACUCAACUGCCU (서열번호 213)	AGGCAGTTGAGTGGTGTCAG (서열번호 288)
UGACACCACUCAACUGCC (서열번호 214)	GGCAGTTGAGTGGTGTCA (서열번호 289)
UGACACCACUCAACUGCCU (서열번호 215)	AGGCAGTTGAGTGGTGTCA (서열번호 290)

[0088]

UGACACCACUCAACUGCCUG (서열번호 216)	CAGGCAGTTGAGTGGTGTCA (서열번호 291)
GACACCACUCAACUGCCU (서열번호 217)	AGGCAGTTGAGTGGTGTC (서열번호 292)
GACACCACUCAACUGCCUG (서열번호 218)	CAGGCAGTTGAGTGGTGTC (서열번호 293)
GACACCACUCAACUGCCUGG (서열번호 219)	CCAGGCAGTTGAGTGGTGTC (서열번호 294)
ACACCACUCAACUGCCUG (서열번호 220)	CAGGCAGTTGAGTGGTGT (서열번호 295)
ACACCACUCAACUGCCUGG (서열번호 221)	CCAGGCAGTTGAGTGGTGT (서열번호 296)
ACACCACUCAACUGCCUGGC (서열번호 222)	GCCAGGCAGTTGAGTGGTGT (서열번호 297)
CACCACUCAACUGCCUGGCA (서열번호 223)	TGCCAGGCAGTTGAGTGGTG (서열번호 298)
GAAAAUGUGGCAUCCAGU (서열번호 224)	ACTGGATGCCACATTTTC (서열번호 299)
AAAAUGUGGCAUCCAGUC (서열번호 225)	GACTGGATGCCACATTTT (서열번호 300)
GCAUCCAGUCCACUUUACCA (서열번호 226)	TGGTAAAGTGGACTGGATGC (서열번호 301)
CAUCCAGUCCACUUUACC (서열번호 227)	GGTAAAGTGGACTGGATG (서열번호 302)
CAUCCAGUCCACUUUACCA (서열번호 228)	TGGTAAAGTGGACTGGATG (서열번호 303)
CAUCCAGUCCACUUUACCAU (서열번호 229)	ATGGTAAAGTGGACTGGATG (서열번호 304)
AUCCAGUCCACUUUACCA (서열번호 230)	TGGTAAAGTGGACTGGAT (서열번호 305)
AUCCAGUCCACUUUACCAU (서열번호 231)	ATGGTAAAGTGGACTGGAT (서열번호 306)
AUCCAGUCCACUUUACCAUC (서열번호 232)	GATGGTAAAGTGGACTGGAT (서열번호 307)
GUUUAAGGAAACCAUCUCUG (서열번호 233)	CAGAGATGGTTTCCTTAAAC (서열번호 308)
UUUAAGGAAACCAUCUCUGG (서열번호 234)	CCAGAGATGGTTTCCTTAAA (서열번호 309)
UUAAGGAAACCAUCUCUGG (서열번호 235)	CCAGAGATGGTTTCCTTAA (서열번호 310)
UAAGGAAACCAUCUCUGG (서열번호 236)	CCAGAGATGGTTTCCTTA (서열번호 311)

표 5

[0089]

엑손 5 ASO	
표적 서열 (5'→3')	ASO (5'→3')
AUAAGGAUGACUGAGGAAG (서열번호 312)	CTTCCTCAGTCATCCTTAT (서열번호 335)
AUAAGGAUGACUGAGGAAGA (서열번호 313)	TCTTCCTCAGTCATCCTTAT (서열번호 336)
UAAGGAUGACUGAGGAAG (서열번호 314)	CTTCCTCAGTCATCCTTA (서열번호 337)
UAAGGAUGACUGAGGAAGA (서열번호 315)	TCTTCCTCAGTCATCCTTA (서열번호 338)
UAAGGAUGACUGAGGAAGAG (서열번호 316)	CTCTTCCTCAGTCATCCTTA (서열번호 339)
AAGGAUGACUGAGGAAGA (서열번호 317)	TCTTCCTCAGTCATCCTT (서열번호 340)
AAGGAUGACUGAGGAAGAG (서열번호 318)	CTCTTCCTCAGTCATCCTT (서열번호 341)
AAGGAUGACUGAGGAAGAGU (서열번호 319)	ACTCTTCCTCAGTCATCCTT (서열번호 342)
AGGAUGACUGAGGAAGAG (서열번호 320)	CTCTTCCTCAGTCATCCT (서열번호 343)
AGGAUGACUGAGGAAGAGU (서열번호 321)	ACTCTTCCTCAGTCATCCT (서열번호 344)
AGGAUGACUGAGGAAGAGUA (서열번호 322)	TACTCTTCCTCAGTCATCCT (서열번호 345)
GGAUGACUGAGGAAGAGU (서열번호 323)	ACTCTTCCTCAGTCATCC (서열번호 346)
GGAUGACUGAGGAAGAGUA (서열번호 324)	TACTCTTCCTCAGTCATCC (서열번호 347)
GGAUGACUGAGGAAGAGUAC (서열번호 325)	GTACTCTTCCTCAGTCATCC (서열번호 348)
GAUGACUGAGGAAGAGUA (서열번호 326)	TACTCTTCCTCAGTCATC (서열번호 349)
GAUGACUGAGGAAGAGUAC (서열번호 327)	GTACTCTTCCTCAGTCATC (서열번호 350)
GAUGACUGAGGAAGAGUACU (서열번호 328)	AGTACTCTTCCTCAGTCATC (서열번호 351)
AUGACUGAGGAAGAGUAC (서열번호 329)	GTACTCTTCCTCAGTCAT (서열번호 352)
AUGACUGAGGAAGAGUACU (서열번호 330)	AGTACTCTTCCTCAGTCAT (서열번호 353)
AUGACUGAGGAAGAGUACUC (서열번호 331)	GAGTACTCTTCCTCAGTCAT (서열번호 354)
UGACUGAGGAAGAGUACU (서열번호 332)	AGTACTCTTCCTCAGTCA (서열번호 355)
UGACUGAGGAAGAGUACUC (서열번호 333)	GAGTACTCTTCCTCAGTCA (서열번호 356)
UGACUGAGGAAGAGUACUCU (서열번호 334)	AGAGTACTCTTCCTCAGTCA (서열번호 357)

[0090] 개시된 올리고뉴클레오타이드는 부계 *UBE3A*의 발현, 특히 신경 세포에서 부계로 발현된 UBE3A의 유도 또는 상향 조절을 조절할 수 있다. 조절은 *UBE3A-AS*의 5'-말단에 혼성화함으로써 달성된다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 10㎉ 미만의 ΔG°, 예컨대 -10 내지 -60㎉, 예컨대 -12 내지 -40, 예컨대 -15 내지 -30㎉ 또는 -16 내지 -27㎉, 예컨대 -18 내지 -25㎉의 ΔG°를 갖는 서열번호 1의 표적 핵산의 하위 서열에 혼성화한다.

[0091] 일부 실시형태에서, 개시된 올리고뉴클레오타이드는 식염수 또는 비표적화 올리고뉴클레오타이드로 처리된 신경 세포에서 *UBE3A*의 발현 수준에 비해 적어도 20%만큼, 더 바람직하게는 식염수 또는 비표적화 올리고뉴클레오타이드로 처리한 신경 세포에서 *UBE3A*의 발현 수준에 비해 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 80%, 100%, 120%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240% 또는 250%만큼 *UBE3A*의 발현을 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 올리고뉴클레오타이드는 식염수 또는 비표적화 올리고뉴클레오타이드로 처리한 신경 세포에서 *SNORD115-45* 하류의 *SNHG14* 전사체 수준에 비해 적어도 20%만큼, 더 바람직하게는 식염수 또는 비표적화 올리고뉴클레오타이드로 처리한 신경 세포에서 *SNORD115-45* 하류의 *SNHG14* 전사체 수준에 비해 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%만큼 *SNORD115-45* 하류의 *SNHG14* 전사체 수준을 감소시킬 수 있다.

[0092] 개시된 올리고뉴클레오타이드에 의한 표적 조절은 올리고뉴클레오타이드의 인접한 뉴클레오타이드 서열과 표적 핵산 사이의 혼성화에 의해 촉발된다. 일부 실시형태에서, 개시된 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산 사이에 미스매치를 포함한다. 미스매치에도 불구하고, 표적 핵산에 대한 혼성화는 UBE3A 발현의 목적하는 조절을 나타내는 데 여전히 충분할 수 있다. 미스매치로부터 초래된 감소된 결합 친화도는 유리하게는 올리고뉴클레오타이드에서 증가된 수의 뉴클레오타이드, 및/또는 올리고뉴클레오타이드 서열에 존재하는 LNA를 비롯한 표적, 예컨대 2' 변형 뉴클레오사이드에 대해 결합 친화도를 증가시킬 수 있는 증가된 수의 변형된 뉴클레오타이드에 의해 보상될 수 있다.

[0093] 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 본 명세서에 개시된 *UBE3A-AS*의 5'-말단에 위치된 5개의 엑손 중 하나에 대해 적어도 90% 상보성, 예컨대 적어도 91%, 예컨대 적어도 92%, 예컨대 적어도 93%, 예컨대 적어도 94%, 예컨대 적어도 95%, 예컨대 적어도 96%, 예컨대 적어도 97%, 예컨대 적어도 98% 또는 100% 상보성을 갖는 10 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이의 인접한 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다.

[0094] 올리고뉴클레오타이드 설계는 올리고뉴클레오타이드 서열 내 뉴클레오사이드 당 변형 패턴을 지칭한다. 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 당-변형된 뉴클레오사이드를 포함하고, 또한 DNA, RNA, 또는 아라비노 핵산(arabino nucleic acid: ANA) 뉴클레오사이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 당-변형된 뉴클레오사이드 및 DNA 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 당-변형된 뉴클레오사이드 및 RNA 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 당-변

형된 뉴클레오사이드 및 ANA 뉴클레오사이드를 포함한다.

[0095] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오사이드, 예컨대 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15 또는 적어도 16개의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 1 내지 10개의 변형된 뉴클레오사이드, 예컨대 2 내지 9개의 변형된 뉴클레오사이드, 예컨대 3 내지 8개의 변형된 뉴클레오사이드, 예컨대 4 내지 7개의 변형된 뉴클레오사이드, 예컨대 6 또는 7개의 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다.

[0096] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오사이드간 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인접한 뉴클레오타이드 서열 내의 뉴클레오사이드간 결합은 포스포로티오에이트 또는 보라노포스페이트 뉴클레오사이드간 결합이다.

[0097] 일부 실시형태에서, 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 당 변형된 뉴클레오사이드, 예컨대 2' 당 변형된 뉴클레오사이드를 포함한다. 바람직하게는, 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 LNA 뉴클레오사이드 또는 2' 당 변형된 뉴클레오사이드를 포함하되, 2' 위치는 -F; $-CF_3$, -CN, $-N_3$, -NO, $-NO_2$, -O-(C_1-C_{10} 알킬), -S-(C_1-C_{10} 알킬), -NH-(C_1-C_{10} 알킬), 또는 -N(C_1-C_{10} 알킬)$_2$; -O-(C_2-C_{10} 알켄일), -S-(C_2-C_{10} 알켄일), -NH-(C_2-C_{10} 알켄일) 또는 -N(C_2-C_{10} 알켄일)$_2$; -O-(C_2-C_{10} 알킨일), -S-(C_2-C_{10} 알킨일), -NH-(C_2-C_{10} 알킨일), -N(C_2-C_{10} 알킨일)$_2$, -O--(C_1-C_{10} 알킬렌)-O--(C_1-C_{10} 알킬), -O-(C_1-C_{10} 알킬렌)-NH-(C_1-C_{10} 알킬), -O-(C_1-C_{10} 알킬렌)-NH(C_1-C_{10} 알킬)$_2$, -NH-(C_1-C_{10} 알킬렌)-O-(C_1-C_{10} 알킬), 및 -N(C_1-C_{10} 알킬)-(C_1-C_{10} 알킬렌)-O-(C_1-C_{10} 알킬)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 치환체로 대체된다.

[0098] 일부 실시형태에서, 개시된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 LNA 단위, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 LNA 단위, 예컨대 2 내지 6개의 LNA 단위, 예컨대 3 내지 7개의 LNA 단위, 4 내지 8개의 LNA 단위 또는 3, 4, 5, 6 또는 7개의 LNA 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 모든 변형된 뉴클레오사이드는 LNA 뉴클레오사이드이다. 일부 실시형태에서, LNA는 -L-의 2'-4' 2라디칼 브리지를 포함하되, -L-은 -O-CH_2-이고, -CH_2-는 선택적으로 치환된다. 일부 실시형태에서, LNA는 -L-의 2'-4' 2라디칼 브리지를 포함하되, -L-은 -OCH_2-이다. 일부 실시형태에서, LNA는 -L-의 2'-4' 2라디칼 브리지를 포함하되, -L-은 -O-CH(Et)-이다. 추가 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 베타-D-옥시-LNA 둘 다 그리고 다음의 LNA 단위 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 베타-D 또는 알파-L 입체배치 중 하나 또는 이들의 조합에서 티오-LNA, 아미노-LNA, 옥시-LNA, 및/또는 ENA. 추가 실시형태에서, 모든 LNA 사이토신 단위는 5-메틸-사이토신이다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드 또는 인접한 뉴클레오타이드 서열은 5' 말단에서 적어도 1개의 LNA 단위 및 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단에서 적어도 2개의 LNA 단위를 가진다.

[0099] 일부 실시형태에서, 개시된 올리고뉴클레오타이드는 RNase H를 보충할 수 있다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 본 명세서에서 단지 "갭머"로도 지칭되는 갭머 설계 또는 구조를 가진다. 갭머 구조에서, 올리고뉴클레오타이드는 '5->3' 배향으로 적어도 3개의 별개의 구조 영역, 즉, 5'-측접, 갭 및 3'-측접인, F-G-F'를 포함한다. 이 설계에서, 측접하는 영역 F 및 F'(또한 날개 영역으로 지칭됨)는 *UBE3A-AS* 표적 핵산에 대해 상보성인 인접한 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 한편, 갭 영역인 G는 올리고뉴클레오타이드가 표적 핵산과 이중 가닥이 될 때, 뉴클레아제, 바람직하게는 엔도뉴클레아제, 예컨대 RNase, 예를 들어, RNase H를 보충할 수 있는 뉴클레오타이드의 인접한 신장부를 포함한다. 뉴클레아제, 특히 RNase H를 보충할 수 있는 뉴클레오사이드는 DNA, 알파-L-옥시-LNA, 2'-플루오로-ANA 및 UNA로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 영역 G의 5' 및 3' 말단에 측접하는 영역 F 및 F'는 바람직하게는 비뉴클레아제 보충 뉴클레오사이드(3' 엔도 구조를 갖는 뉴클레오사이드, 더 바람직하게는 하나 이상의 친화도 향상 변형 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 3' 측접은 적어도 하나의 LNA 뉴클레오사이드, 바람직하게는 적어도 2 LNA 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' 측접은 적어도 하나의 LNA 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' 측접 영역과 3' 측접 영역은 둘 다 LNA 뉴클레오사이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 측접 영역 내 뉴클레오사이드는 모두 LNA 뉴클레오사이드이다. 다른 실시형태에서, 측접 영역은 LNA 뉴클레오사이드와 다른 뉴클레오사이드(혼합된 측접) 둘 다, 예컨대 DNA 뉴클레오사이드 및/또는 비-LNA 변형된 뉴클레오사이드, 예컨대 2' 치환된 뉴클레오사이드를 포함할 수 있다. 이 경우에, 갭은 친화도 향상 변형된 뉴클레오사이드, 바람직하게는 LNA, 예컨대 베타-D-옥시-LNA에 의해 5' 및 3' 말단에 측접된 뉴클레오사이드(2' 엔도 구조를 갖는 뉴클레오사이드, 바람직하게는 DNA)를 보충하는 적어도 5개의 RNase H의 인접한 서열로서 정의된다. 결과적으로, 인접한 갭 영역인 5' 측접 영역 및

3' 측접 영역의 뉴클레오사이드는 변형된 뉴클레오사이드, 바람직하게는 비-뉴클레아제 보충 뉴클레오사이드이다. 측접이 DNA를 포함하는 혼합된 측접을 갖는 올리고뉴클레오타이드에서, 5' 및 3' 뉴클레오사이드는 변형된 뉴클레오사이드이다.

[0100] 개시된 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법은 공지되어 있다. 일부 경우에, 상기 방법은 포스포르아미다이트 화학을 이용한다(예를 들어, 문헌[Caruthers et al, 1987, Methods in Enzymology vol. 154, 페이지 287-313] 참조). 추가 실시형태에서, 상기 방법은 인접한 뉴클레오타이드 서열을 접합 모이어티(리간드)와 반응시키는 단계를 포함한다.

[0101] 일부 실시형태에서, 카이랄 원자를 포함하는 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드간 결합에서 입체화학의 제어를 제공하는 올리고뉴클레오타이드 합성 방법이 이용된다. 예를 들어, 이들 방법에 대해 참고로 포함되는 WO2010/064146, WO2014/012081, WO2015/107425, WO2016/079183, WO2016/079181, WO2016/096938, WO2017/194498 및 WO2018/177825 참조.

[0102] 당업자는 본 개시내용에 의해 제공되는 유용한 핵산은 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오타이드의 서열을 저장하고/하거나 발현시키는 것을 포함한다는 것을 인식할 것이다. 일부 실시형태에서, 이러한 핵산은 세포(예를 들어 생산에 대해, 예를 들어, 미생물 세포, 및/또는, 예를 들어, 치료에 대해, 포유류 세포) 내로 전달을 위해 그리고/또는 세포에서의 복제 및/또는 발현에 적절한 벡터이거나 또는 이를 포함할 수 있다. 당업자는 다양한 기술(예를 들어, 재조합 핵산 기술, 예컨대 중합효소 연쇄 반응에 의한 증식, 예컨대 제한 분해에 의한 절단, 예컨대 결찰에 의한 결합 중 하나 이상을 이용 - 예를 들어, 갭 수선 등에 의해 시험관내이든 또는 생체내이든)을 인식한다.

[0103] 또한 앞서 언급한 올리고뉴클레오타이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드 접합체 중 어느 것 및 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 담체, 염 및/또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물이 개시된다. 약제학적으로 허용 가능한 희석제는 인산염-완충 식염수(PBS)를 포함하고, 약제학적으로 허용 가능한 염은 나트륨 및 칼륨염을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 희석제는 인공 뇌척수액(aCSF)이다.

[0104] 개시된 올리고뉴클레오타이드는 약제학적 조성물 또는 제형의 제조를 위해 약제학적으로 허용 가능한 활성 또는 비활성 물질과 혼합될 수 있다. 약제학적 조성물의 제형화를 위한 조성물 및 방법은 투여 경로, 질환 정도 또는 투여될 용량을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다수의 기준에 따른다.

[0105] 당업자는 핵산 치료제, 예컨대 올리고뉴클레오타이드 치료제의 저장 및/또는 투여에 유용한 다양한 제형 전략을 인식한다. 예를 들어, 문헌[Pushpendra et al "Nucleic Acids as Therapeutics", *From Nucleic Acid Sequences to Molecular Medicines,* ed. Erdmann and Barciszewski, Springer-Verlag, 2012; Juliano "The Delivery of Therapeutic Oligonucleotides" *Nuc. Acids. Res.* 44:6518, 2016; 등 참조].

[0106] 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 프로드러그로서 제형화된다. 특히 올리고뉴클레오타이드 접합체에 대해, 일단 프로드러그가 작용 부위, 예를 들어, 표적 세포에 전달되면, 접합체 모이어티는 올리고뉴클레오타이드를 절단할 수 있다.

[0107] 또한 본 명세서에 개시된 치료적 또는 예방적 유효량의 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 접합체 또는 약제학적 조성물을 질환을 앓고 있거나 질환에 걸리기 쉬운 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환의 치료 또는 예방 방법이 개시된다.

[0108] 또한 본 명세서에 언급된 바와 같은 장애의 치료를 위한 의약의 제조를 위한, 또는 본 명세서에 언급된 바와 같은 장애의 치료 방법을 위한 개시된 올리고뉴클레오타이드의 용도가 개시된다.

[0109] 개시된 약제학적 조성물은 국소(예컨대, 피부에, 흡입, 눈 또는 귀) 또는 장(예컨대, 경구로 또는 위장관을 통해) 또는 비경구(예컨대, 정맥내, 피하, 근육내, 대뇌내, 뇌실내 또는 초내(intrathecal)) 투여에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 약제학적 조성물은 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입, 초내 또는 두개내, 예를 들어, 대뇌내 또는 심실내 투여를 포함하는 비경구 경로에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 대뇌내 또는 뇌실내 주사에 의해 투여된다. 다른 실시형태에서, 활성 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체는 초내로 투여된다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 거대 수조내 주사에 의해 투여된다.

[0110] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물에 의한 AS 요법은 AS를 앓고 있거나 이에 걸리기 쉬운 대상체(들)에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 대상체는 모계 *UBE3A* 유전자 내 결함과 연관된 유전자 특징을 갖

는 것으로 결정되었다. 일부 실시형태에서, AS-연관 유전자 특징은 모계 결실이거나 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, AS-연관 유전자 특징은 한부모 이체성(uniparental disomy)이거나 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, AS-연관 유전자 특징은 *UBE3A* 돌연변이이거나 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, AS-연관 유전자 특징은 각인 결함이거나 이를 포함한다.

[0111] 일부 실시형태에서, 대상체는, 예를 들어, 다음 중 하나 이상과 같은 AS와 연관된 하나 이상의 개발 이력 및/또는 실험실 발견 특징을 갖는 것으로 결정되었다:

[0112] (i) 정상 머리 둘레를 갖고 주요 출생 결함이 없는 정상 부모 및 출산력;

[0113] (ii) 신생아로서 그리고/또는 영아로서 수유의 어려움;

[0114] (iii) 때때로 몸통 저긴장증(truncal hypotonus)과 연관된 6 내지 12개월의 발달 지연 증거;

[0115] (iv) 불안정한 사지 움직임 및/또는 증가된 미소;

[0116] (v) 발달이 지연되지만 진행됨(기량의 상실 없음);

[0117] (vi) 정상 대사, 혈액학적 및 화학적 실험 프로파일;

[0118] (vii) MRI 또는 CT를 이용하여 평가될 때 구조적으로 정상인 뇌(경증의 피질위축 또는 수초형성장애를 가질 수 있음).

[0119] 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시형태에서, 대상체는, 예를 들어, 다음 중 하나 이상과 같은 AS와 지속적으로 연관되는 하나 이상의 임상 특징을 나타내도록 결정되었다:

[0120] (i) 발달 지연, 기능적으로 중증

[0121] (ii) 움직임 또는 균형 장애, 보통 보행 운동 실조 및/또는 사지의 떨림 움직임. 일부 실시형태에서, 이러한 움직임 장애는 경증일 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 움직임 장애는 옆구리 운동실조로서 나타나지 않을 수도 있지만, 예를 들어, 앞쪽으로 비틀거림, 불안정함, 서투름 또는 빠르고, 격동적인 움직임이거나 이를 수반할 수 있다;

[0122] (iii) 거동의 독특함: 빈번한 웃음/미소의 임의의 조합; 겉보기에 행복한 표정; 종종 손을 위로 흔들거나 파도처럼 움직이면서 쉽게 흥분하는 성격; 과운동성 거동;

[0123] (iv) 언어 장애, 예를 들어 단어 사용이 없거나 최소임; 대안적으로 또는 추가적으로, 언어적 상호작용보다 더 높은 수용적 및 비언어적 상호작용 기술.

[0124] 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시형태에서, 대상체는 AS, 예를 들어, 다음 중 하나 이상과 빈번하게(예를 들어, 시간의 약 80%) 연관된 하나 이상의 임상 특징을 나타내도록 결정되었다:

[0125] (i) 2세까지 보통 소두증(정상 OFC의 2 이하의 S.D.)을 야기하는 머리 둘레의 지연된, 불균형 성장. 일부 실시형태에서, 소두증은 15q11.2-q13 결실을 갖는 것에서 더 확연하다;

[0126] (ii) 보통 3세 미만에 시작되는 발작. 일부 실시형태에서, 발작 중증도는 연령에 따라 감소될 수 있지만, 상관없이, 일부 실시형태에서, 발작 장애가 성인 내내 지속된다.

[0127] (iv) 당업계에 공지된 바와 같은 특징적 패턴을 갖는 비정상적 EEG. 일부 실시형태에서, EEG 이상은 생애의 처음 2년 내에 일어날 수 있고, 임상적 특징이 진행될 수 있으며, 임상적 발작 사건과 연관되지 않을 수도 있다.

[0128] 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시형태에서, 대상체는 AS, 예를 들어, 다음 중 하나 이상과 때때로(예를 들어, 시간의 약 20 내지 80%) 연관된 하나 이상의 임상적 특징을 나타내는 것으로 결정되었다:

[0129] (i) 편평한 후부

[0130] (ii) 후두동맥구

[0131] (iii) 돌출된 혀

[0132] (iv) 혀 내밀기; 빨기/연하 장애

[0133] (v) 섭식 문제 및/또는 영아 동안의 몸통 근긴장저하

[0134] (vi) 악전돌증

[0135] (vii) 넓은 입, 넓게 이격된 치아

[0136] (viii) 빈번한 침 흘림

[0137] (ix) 과도한 씹기/입의 거동

[0138] (x) 사시

[0139] (xi) 일부 실시형태에서, 가족에 비교되어 결정되고, 전형적으로 결실의 경우에만 보이는 색소침착저하된 피부, 밝은 모발 및 눈 색

[0140] (xii) 활동항진성 하지 심부 반사

[0141] (xiii) 특히 보행 동안 위로 올려지는, 구부러진 팔 위치

[0142] (xiv) 내전되거나(pronated) 외반위 위치된 발목에 의한 넓은 보폭 보행

[0143] (xv) 열에 대한 증가된 민감성

[0144] (xvi) 비정상적 수면 각성 주기 및 수면에 대한 필요 감소

[0145] (xvii) 물에 끌림/물에 대한 집착; 특정 종이 및 플라스틱과 같은 쪼글쪼글한 물품에 대한 집착

[0146] (xviii) 비정상적 식품 관련 거동

[0147] (xix) 비만(나이 든 아동에서)

[0148] (xx) 척추측만

[0149] (xxi) 변비.

[0150] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 핵산 치료제(예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 치료제, 예컨대 ASO)에 의한 AS의 치료를 위한 치료 요법은 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고/하거나 전달하는 1회 이상 용량의 약제학적 조성물의 투여이거나 이를 포함한다.

[0151] 일부 실시형태에서, 제공된 치료 요법이 투여되는 대상체는, 예를 들어, 1종 이상의 다른 핵산 치료제(예를 들어, *UBE3A-AS*를 표적화하는 하나 이상의 다른 올리고뉴클레오타이드)를 포함하는 1종 이상의 다른 AS 치료제를 받는 중이거나 받았다. 예를 들어, WO2014004572A3, 미국 특허 제9617539B2호, 미국 특허 제20170362592A1호 및 유럽 특허 제2864479B1호 참조.

[0152] 일부 실시형태에서, 제공된 치료적 요법이 투여되는 대상체는 1회 이상의 발작을 앓았거나, 앓고 있고/있거나 항-발작 요법을 받고 있거나 받았다. 예를 들어. 일부 실시형태에서, 대상체는 발프로산, 클로나제팜, 페노바비탈, 토피라메이트, 카바마제핀, 라모트리긴, 레베티라세탐, 페니토인, 조니사마이드, 에토숙사마이드, 가바펜틴, 펠바탐, 옥스카바제핀, 트란젠, ACTS, 니트라자팜, 프레가발린, 미솔린, 비가바트린 등 중 하나 이상을 받았거나 받고 있을 수 있다. 일부 특정 실시형태에서, 대상체는 발프로산, 클로나제팜, 페노바비탈, 토피라메이트, 카바마제핀, 라모트리긴 및/또는 레베티라세탐 중 하나 이상을 받았거나 받고 있을 수 있다.

[0153] 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시형태에서, 대상체는 식이요법, 예를 들어, 케톤유발 식이, 낮은 당지수 요법 등을 받았거나 받고 있을 수 있다.

[0154] 또한 추가로 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시형태에서, 대상체는 미주신경 자극제에 의한 치료를 받았거나 받고 있을 수 있다.

[0155] 본 개시내용을 읽는 당업자에게 명백한 바와 같이, 제공된 치료 방법은 대상체가 (예를 들어, 중복 투약 등을 통해 동시에 노출된) 병용 요법을 받도록 본 명세서에 기재된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 중 하나 또는 둘 다 및 추가적인 요법(예를 들어, 대안의 올리고뉴클레오타이드 및/또는 항-간질 요법 및/또는 한 가지 이상의 다른 치료적 개입)을 투여하는 단계를 수반한다. 또한 의약의 제조를 위해 본 명세서에 개시된 올리고뉴클레오타이드의 용도가 개시되되, 의약은 초내 투여를 위한 투약 형태이다.

[0156] 또한 의약의 제조를 위해 본 명세서에 개시된 올리고뉴클레오타이드의 용도가 개시되되, 의약은 대뇌내 또는 심실내 투여를 위한 투약 형태이다.

[0157] 또한 의약의 제조를 위해 본 명세서에 개시된 올리고뉴클레오타이드의 용도가 개시되되, 의약은 뇌실내 투여를 위한 투약 형태이다.

[0158] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 올리고뉴클레오타이드는 다른 치료제와의 병용 치료에서 사용하기 위한 것이다. 치료제는, 예를 들어, 항경련제 의약일 수 있다.

발명의 효과

[0159] 본 발명은 동물 또는 인간 뉴런에서 부계 대립유전자로부터 유비퀴틴-단백질 리가제 E3A(*UBE3A*)의 발현을 유도할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드는 *SNORD115-45* snoRNA 하류인 *UBE3A-AS*의 5'-말단에서 *SNHG14* 긴 비암호 RNA에 대한 혼성화에 의해 *UBE3A* 부계 대립유전자의 억제자를 표적화한다. 또한 본 발명은 엔젤만 증후군의 치료를 위한 약제학적 조성물 및 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0160] 도 1A 내지 도 1d는 인간 및 마우스에서 프래더-윌리/엔젤만 증후군(PWS/AS) 각인 영역을 도시한 도면. 도 1A는 인간 PWS/AS 각인 영역의 RefSeq 주석을 나타낸다. 도 1B는 마우스에서 PWS/AS 각인된 오솔로그 영역의 RefSeq 주석을 나타낸다. 도 1C는 *UBE3A-AS* 및 *UBE3A*의 3'-말단을 나타낸다. 도 1D는 인간, 마카크(사이노몰거스 마카크), 돼지, 코끼리, 마우스 및 래트 사이의 오솔로그 영역을 나타내는 쇄 정렬을 나타낸다. 표적 영역은 비인간 영장류에서 보존되지만, 설치류에서는 그렇지 않다. 도 1d는 또한 영역의 게놈 진화율 프로파일링(genomic evolutionary rate profiling: GERP) 플롯을 나타낸다. 양의 값은 특정 DNA 염기에서의 진화 제약을 나타낸다.

도 2a 내지 도 2e는 마우스 *Ube3a-AS*를 표적화하는 ASO의 분석을 도시한 도면. 도 2a는 마우스 *Ube3a-AS* 전사체 및 마우스-특이적 ASO의 대략의 위치의 개략도이다. 박스 및 선은 각각 엑손 및 인트론을 나타낸다. 화살표는 전사 방향을 나타낸다. 도 2B는 부계 Ube3a 단백질 수준을 측정하기 위해 사용되는 *Ube3aYFP* 리포터 대립유전자의 개략도이다. Ube3aYFP 마우스 모델은 내인성 *Ube3a* 좌위의 3'-말단에 황색 형광 단백질(yellow fluorescent protein: YFP)을 표적화함으로써 생성되었다. *Ube3a-AS*의 발현은 부계 Ube3aYFP 대립유전자의 전사를 저해하고, *Ube3a-AS*의 상실은 부계 Ube3aYFP 발현을 재활성화시키는데, 이는 항-YFP 항체를 이용하여 면역형광 영상화에 의해 검출될 수 있다. 도 2C는 마우스 1차 해마 뉴런에서 ASO를 시험하는 실험 시각표의 개략도이다. 마우스 1차 해마 뉴런은 부계 유전된 Ube3aYFP 대립유전자(0 DIV)를 갖는 신생 마우스로부터 생성되었고, 시험관내에서 7일 후에 처리되었다(7 DIV). 처리 후 3일(10 DIV)에, 개개 세포에서 Ube3aYFP 단백질 수준이 측정되었다. 도 2d는 비히클(veh), 음성 대조군 ASO(ASO-C), 토포테칸(Topo), ASO-B 및 ASO 1.1로 처리된 1차 뉴런에서 부계 Ube3aYFP 단백질을 나타내는 면역형광 영상을 함유한다. 도 2e는 비히클(veh, 1% DMSO; n = 3), 대조군 ASO(ASO-C, 15 μM; n = 3), 토포테칸(Topo, 0.3 μM; n = 3), ASO-B(1, 5, 15 μM; n = 3), ASO-1.1(1, 5, 15 μM), ASO-1.2(1, 5, 15 μM) 및 ASO 3.1(1, 5, 15 μM)로 처리한 개개 신경 세포에서의 평균 부계 Ube3aYFP 강도 수준을 나타낸다. 약어: YFP, 황색 형광 단백질; Tx, 처리; DIV, 시험관내 일수; n.s., 유의하지 않음. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다.

도 3A 내지 도 3d는 인간 *UBE3A-AS*를 표적화하는 ASO의 분석을 도시한 도면. 도 3A는 인간 *UBE3A-AS* 및 인간-특이적 ASO(ASO 1 내지 6)의 대략의 위치를 나타내는 개략도이다. ASO-7은 *UBE3A-AS*의 인트론에 위치된다. 박스 및 선은 각각 엑손 및 인트론을 나타낸다. 도 3B는 핵형이 정상인 개체로부터의 인간 GABAergic 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPSC) 유래 뉴런에서 ASO를 시험하기 위한 실험 시각표의 개략도이다. 인간 iPSC-유래 뉴런을 14 DIV 후에 처리하고, 20 DIV에 RNA 단리에 대해 처리하였다. 도 3c 및 도 3d는 대조군 ASO(ASO-C, 10 μM), 및 ASO 1 내지 7(10 μM), 및 토포테칸(Topo, 1 μM)로 처리한 iPSC-유래 뉴런에서 *UBE3A-AS*(도 3c) 및 *UBE3A*(도 3d)의 상대적 정상 상태 RNA 수준(ASO-C에 대해 정규화됨)을 나타낸다. 약어: Tx, 처리; DIV, 시험관내 일수. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다.

도 4A 내지 도 4I는 GABAergic iPSC-유래 뉴런에서 인간 ASO-4 및 토포테칸의 분석을 나타낸다. 도 4A 내지 도 4F는 ASO-4 및 토포테칸의 10-점 ½ log 용량 곡선(1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM 및 30 μM)으로 처리한 iPSC-유래 뉴런에서의 *UBE3A-AS*(도 4A), *SNORD116*(도 4B), *IPW*(도 4C), *SNORD115*(도 4D), *SNORD109A/B*(도 4E) 및 *UBE3A*(도 4F) 정상 상태 RNA 수준의 상대적 발현(1nM에 대해 정규화됨)을 나타낸다. 도 4G는 59 DIV에서 처리된 GABAergic iPSC-유래 뉴런에서 ASO-4를 시험하기 위한 실험 시각표의 개략도이다. 도 4H 내지 도 4I는 ASO-C(10 μM) 및 ASO-4(1, 5 및 10 μM)로 처리한 iPSC-유래 뉴런에서 *UBE3A-AS*(도 4H) 및 *UBE3A*(도 4I) 정상 상태 RNA 수준의 상대적 발현(ASO-C에 대해 정규화됨)을 나타낸다. 약어: Tx, 처리. 오차

막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다.

도 5A 내지 도 5F는 인간 GABAergic 및 글루타메이트성(glutamatergic) iPSC-유래 뉴런에서 최적화된 ASO의 분석을 도시한 도면. 도 5A는 GABAergic iPSC-유래 뉴런에서 최적화된 ASO를 시험하는 실험 시각표의 개략도이다. 도 5B는 ASO-3.1, ASO-3.2, ASO-4.1, ASO-4.2, ASO-4.3, ASO-4.4, ASO-6.1, ASO-4.I 및 ASO-4.S의 5-점 ½ log 용량 곡선(30nM, 100nM, 300nM, 1μM, 3μM; n = 6)로 처리한 iPSC-유래 뉴런에서의 *UBE3A-AS* 정상 상태 RNA 수준의 (물 대조군에 대해 정규화된) 상대적 발현을 나타낸다. ASO-4.I 및 ASO-4.S는 두 회사(ASO-4.I, 인테그레이티드 DNA 테크놀로지즈(Integrated DNA Technologies); ASO-4.S, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))에 의해 제조된 ASO-4를 나타낸다. 도 5C는 GABAergic iPSC-유래 뉴런에서 ASO-4 및 ASO-6.1을 시험하는 실험 시각표의 개략도이다. 도 5D는 ASO-4(ASO-4.I 및 ASO-4.S) 및 ASO-6.1의 10-점 ½ log 용량 곡선(1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1μM, 3μM, 10μM 및 30μM; n = 3)로 처리한 iPSC-유래 뉴런에서 *UBE3A-AS* 및 *UBE3A* 정상 상태 RNA 수준의 상대적 발현(1nM에 대해 정규화됨)을 나타낸다. 도 5E는 글루타메이트성 iPSC-유래 뉴런에서 ASO-4 및 ASO-6.1을 시험하는 실험 시각표의 개략도이다. 도 5F는 ASO-4(ASO-4.I 및 ASO-4.S) 및 ASO-6.1의 10-점 ½ log 용량 곡선(1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1μM, 3μM, 10μM 및 30μM; n = 3)으로 처리한 iPSC-유래 뉴런에서 *UBE3A-AS* 및 *UBE3A* 정상 상태 RNA 수준의 (물 대조군에 대해 정규화됨)의 상대적 발현을 나타낸다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다.

도 6A 내지 도 6d는 마우스 PWS/AS 각인 영역에서 ASO 표적 영역의 확인을 도시한 도면. 도 6A는 마우스 염색체 7C에 대한 오솔로그 PWS/AS 각인 영역의 RefSeq 주석을 나타낸다. 도 6B는 마우스 뇌로부터의 RNA-서열분석(RNA-seq) 데이터로부터 생성된 전사체 조립체를 도시한다. 도 6C는 *Snord115* 숙주-유전자 전사체의 엑손/*Ube3a-AS*의 5'-말단에 보유된 *Snord115* snoRNA를 나타내는 ASO 표적 영역을 나타낸다. 정렬된 RNA-seq 판독은 아래쪽의 조립된 전사체를 도시한다. 엑손 및 인트론은 각각 박스 및 선으로 도시한다. 도 6d는 보유된 엑손 Snord115_ENSMUST00000101836(서열번호 490), Snord115_ENSMUST00000101936(서열번호 491), Snord115_ENSMUST00000104493(서열번호 492), Snord115_ENSMUST00000082443(서열번호 493) 및 Snord115_ENSMUST00000104427(서열번호 494)에서 snoRNA의 서열 정렬이며, 보유된 snoRNA를 나타내는 기능적 snoRNA 형성에 필요한 축중 C 박스를 가진다.

도 7a 내지 도 7G는 인간 PWS/AS 각인 영역에서 ASO 표적 영역의 확인을 도시한 도면. 도 7a는 프래더-윌리/엔젤만 증후군(PWS/AS) 각인 영역의 RefSeq 주석을 나타낸다. 도 7b는 인간 PWS 다시스트론성 전사체의 RNA-seq 조립체를 나타낸다. 도 7c는 *SNORD115-45*가 *SNORD115* 숙주-유전자 전사체의 3'-말단/*UBE3A-AS*의 5'-말단에서 엑손에 보유된다는 것을 나타낸다. L1 LINE을 나타내는 성인 인간 뇌로부터 생성된 정렬된 RNA-seq 판독이 전사된다. 도 7D는 *SNORD115* 클러스터(*SNORD115*-39-48 및 *SNORD109B*)의 3'-말단의 RefSeq 주석을 나타낸다. 도 7E는 *SNORD115*-44와 *SNORD115*-45 사이의 L1 LINE 요소 위치를 나타낸다. 도 7F는 설치류에서 감소되더라도, *SNORD115*-45-48 영역에서 보존을 나타내는 주요 계통군을 나타내는 태반 포유류의 사슬 정렬을 나타낸다. 도 7G는 SNORD115-44(기능성 snoRNA)(서열번호 495), SNORD115-48(서열번호 496), SNORD115-45(서열번호 497), SNORD115-46(서열번호 498), 및 SNORD115-47(서열번호 499)에 대한 표적 영역 내 snoRNA의 서열 정렬을 나타내며, SNORD115-45(보유됨), SNORD115-46(부분적으로 보유됨) 및 SNORD116-47을 나타내는 것은 기능성 snoRNA 형성에 필요한 축중 C 박스를 가진다.

도 8a 내지 도 8c는 후보 ASO의 약력학적 분석을 도시한 도면. 도 8a는 상이한 골격 및 RNA 변형 설계를 갖는 ASO-4 및 ASO-6.1의 10-점 ½ log 용량 곡선(1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1μM, 3μM, 10μM 및 30μM; n = 2)으로 처리한 GABAergic iPSC-유래 뉴런에서의 정규화된 *UBE3A-AS* 정상 상태 RNA 수준의 적합화된 용량 반응 곡선을 나타낸다. 용량 반응 곡선을 4-모수 로지스틱 회귀 모델(Hill)을 이용하여 적합화하였다. 그래프는 적합화된 모델 및 표준 오차를 나타낸다. Y 축은 상대적 *UBE3A-AS* RNA 수준을 나타내고 X 축은 ASO의 log 몰(M)농도를 나타낸다. 도 8b 및 도 8c는 계층적 클러스터링 계통수, 및 후보 ASO 사이의 관계 및 3개의 클러스터로의 그룹화를 나타내는 적합화된 용량 반응 곡선의 성좌 플롯(constellation plot)이다.

도 9는 엔젤만 증후군 iPSC-유래 뉴런에서의 ASO-6.1.PO-1.0 및 ASO-4.4.PS.L의 약력학적 분석을 도시한 도면. ASO-6.1.PO-1.0 및 ASO-4.4.PS.L의 10-점 ½ log 용량 곡선(1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1μM, 3μM, 10μM 및 30μM; n = 3)으로 처리한 엔젤만 증후군 iPSC-유래 뉴런에서 정규화된 *UBE3A-AS* 정상 상태 RNA 수준의 4-모수 로지스틱 회귀 모델(Hill).

도 10은 ASO-6.1-PO-1.0 및 ASO-4.4.PS.L로 처리한 엔젤만 증후군 iPSC 뉴런에서의 PWS 다시스트론성 전사체에 의해 암호화된 RNA의 발현 분석을 도시한 도면. 비히클(1% H_2O; n = 3), ASO-6.1.PO-1.0(30μM; n = 3) 및

ASO-4.4.PS.L(30 μM; n =3)로 처리된 AS iPSC-유래 뉴런에서 *SNURF*, *SNRPN*, *SNHG116*, *SNORD116* snoRNAs, *IPW*, *SNHG115*, *SNORD115* snoRNAs, *UBE3A-AS* 및 *UBE3A*의 정규화된 정상 상태 RNA 수준을 나타낸다. 데이터는 비히클에 대해 상대적인 RNA의 평균 백분율을 나타낸다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. 별표(*)는 비히클에 상대적인 던넷 다중 비교 검정과 함께 일원 ANOVA를 이용하여 통계학적으로 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타낸다.

도 11은 사이노몰거스 마카크에서의 ASO-6.1.PO-1.0 및 ASO-4.4.PS.L의 약력학적 분석을 도시한 도면. 비히클(0.9% 식염수; n = 5), ASO-6.1.PO-1.0(10mg; n = 3) 및 ASO-4.4.PS.L(10mg; n = 3)로 처리한 마카크 CNS 영역 내 *UBE3A-AS*의 정상 상태 RNA 수준을 나타낸다. 데이터는 비히클에 상대적인 *UBE3A-AS* RNA의 평균 백분율을 나타낸다. 오차 막대는 평균의 표준오차를 나타낸다. 비히클에 상대적인 던넷 다중 비교 검정과 함께 일원 ANOVA를 이용하여 통계학적으로 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0161] 본 발명의 다수의 실시형태가 기재되었다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 정신과 범주로부터 벗어나는 일 없이 다양한 변형이 이루어질 수 있다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 다른 실시형태는 다음의 청구범위의 범주 내이다.

[0163] **실시예 1:**

[0164] 물질 및 방법

[0165] *안티센스 올리고뉴클레오타이드 설계*

[0166] 솔리고(Soligo)(핵산의 통계학적 폴딩 및 조절 RNA의 연구를 위한 소프트웨어)를 이용하여 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)를 설계하였다. 간략하게, 각각의 표적 서열에 대해 가장 낮은 결합 부위 붕괴 에너지 및 자유 결합 에너지를 갖는 후보 ASO(20 내지 18량체)를 확인하였고, 이어서, 유효성이 증가된 모티프에 대해 점검하였다. ASO는 솔리고에 의해 생성된 표적 서열의 예측된 가장 낮은 자유 에너지 중심 2차 구조 내의접근 가능성에 기반하여 추가로 필터링하였다. 일부 예에서, RNAfold 및 Mfold에 의해 생성된 가장 낮은 자유 에너지 구조를 이용하여 2차 구조 모델을 비교하였다.

[0167] 다음의 기준을 이용하여 인간 ASO를 필터링하였다: 1) 표적 서열은 다형성이었고[dbSNP138, dbSNP150, 및 1000 게놈 3상 통합 변이 호출(Genomes Phase 3 Integrated Variant Calls)(SNV, INDEL, 및 SV)]; 2) 표적 서열은 레서스 및 사이노몰거스 마카크로 100% 보존되지 않았으며; 3) 표적 서열은 보유된 *Snord115/SNORD115* snoRNA(엑손 당)의 상류에 위치되었다. 이어서, 남아있는 ASO는 자유 에너지(<= -8㎉/mol), 표적 부위 뉴클레오타이드에 대해 평균 짝지어지지 않은 확률, 결합 부위 붕괴 에너지(낮음>높음), 2차 구조 내의 위치(앙상블 센트로이드(Ensembl Centroid)) 및 고/저 유효성과 연관된 서열 모티프의 존재/부재에 따라 랭크하였다.

[0168] *마우스 1차 해마 뉴런*

[0169] *Ube3a*$^{m+/pYFP}$ 수컷을 야생형 C57BL/6J 암컷과 교배시킴으로써 P0-P1 새끼(*Ube3a*$^{m+/p+}$ 및 *Ube3a*$^{m+/pYFP}$)로부터 해마 뉴런의 1차 배양물을 생성하였다. 앞서 기재한 방법을 이용하여 유전자형을 결정하였다. 간략하게, 폴리-D-라이신(152028, 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)) 및 라미닌(23017-01, 써모 피셔 사이언티픽)으로 코팅한 96-웰 광학 바닥 플레이트 상에서 B27(인비트로젠(Invitrogen)) 및 페니실린/스트렙토마이신(인비트로젠)으로 보충한 뉴로베이셜 A(Neurobasal A) 배지(캘리포니아주 샌 디에이고에 소재)에서 해마 뉴런을 배양시켰다. 배양물을 사용할 때까지 37℃, 5% CO_2에서 유지시켰다.

[0170] *마우스 뉴런 영상화*

[0171] 마우스 1차 해마 뉴런을 4% 파라폼알데하이드를 이용하여 10 DIV(처리 후 3일)에서 고정시켰다. 이어서, 배양물을 1× PBS로 2회 세척하고 나서, PBS 중의 4% 파라폼알데하이드에서 15분 동안 고정시키고, 이어서, 1× PBS로 3회 세척하였다. 세포를 PBS(T-PBS) + 5% 염소 또는 당나귀 혈청 중의 0.3% 트리톤(Triton)-X100에서 1 내지 2시간 동안 실온에서 부드럽게 교반시키면서 차단시켰다. 세포를 항-GFP[노부스 바이올로지컬(Novus Biologicals), NB 600-308(토끼)] 및 항-NeuN(밀리포어(Millipore), 05-557(마우스)] 항체와 함께 24시간 동안 4℃에서 부드럽게 교반시키면서 인큐베이션시켰다. 세포를 0.1% 트윈(Tween) 20 1× PBS에서 15분 동안 각각 3

회 세척하고, 이어서, 항-토끼 488(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), 111-545-144) 및 항-마우스 Cy3(잭슨 이뮤노리서치, 115-165-166) 2차 항체와 함께 24시간 동안 4℃로 암실에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 0.1% 트윈(Tween) 20 1× PBS에서 각각 15분 동안 4회 세척하였다. 세 번째 세척에서 1:1000의 희석으로 훽스트 염색(Hoechst stain)(써모 피셔 사이언티픽)을 이용하여 핵을 표지하였다.

[0172] 사이테이션 5(Cytation 5) 및 Gen5 Image+ 소프트웨어(버몬트주 위누스키에 소재한 바이오텍(BioTek))을 이용하여 플레이트를 영상화하였다. 간략하게, 자동 영상 스티칭에 대한 중복 타일을 이용하여 5×4 자동 초점 영상을 획득함으로써 각각의 웰의 몽타주 영상을 생성하는 데 4× 도립 대물렌즈를 사용하였다. 사용한 필터는 DAPI(377,477), GFP(469, 525) 및 RFP(531, 593)였다. 음성 및 양성 대조군을 이용하여 각각의 플레이트에 대해 노출 시간 및 획득을 조절하였다. 각각의 웰에 대해 핵(훽스트 염색, DAPI) 상에서 자동 초점을 수행하였고, GFP 및 RFP 필터에 대해 동일한 초점 높이를 사용하였다. Gen5 Image+ 소프트웨어에 의해 함께 영상을 스티치하였다.

[0173] 인 셀 디벨로퍼(IN Cell Developer) 6.0(펜실베이니아주 피츠버그에 소재한 GE 헬스케어 라이프 사이언시즈(GE Healthcare Life Sciences))를 이용하여 단일 세포 영상 분석을 수행하였다. 간략하게, 획득 영상에서 무작위로 선택된 세포의 크기 및 강도에 기반한 포함 및 제외 파라미터를 최적화함으로써 핵(훽스트 염색, DAPI) 또는 성숙 뉴런(NeuN, RFP) 중 하나에 대해 개개 트랙 마스크를 생성하였다. 이어서, GFP의 평균 및 중위 강도 값을 선택 마스크의 경계 내에서 획득하여, 각각의 세포 내에서 Ube3aYFP에 대한 강도 값을 생성하였다.

[0174] *인간 유도만능 줄기세포 유래 뉴런*

[0175] GABAergic 및 글루타메이트성 유도만능 줄기세포(iPSC) 유래 신경 전구체 세포(NRC-100-010-001 및 GNC-301-030-001, 위스콘신주 메디슨에 소재한 셀룰러 다이나믹스 인터내셔날(Cellular Dynamics International))를 제조업자의 프로토콜에 따라 뉴런으로 분화시켰다. 간략하게, 신경 전구체 세포를 해동시키고 나서, 화학적으로 정해진 배지에서 재현탁시키고, 폴리-D-라이신 및 라미닌으로 코팅한 멸균-배양 플레이트에 첨가하였다. 플레이팅 후 24시간에 배지를 대체하고, 이어서, 배지의 1/2을 이후에 3 내지 5일마다 대체하였다.

[0176] *RNA 단리*

[0177] 배양시킨 iPSC-유래 뉴런에 대해, 55㎕의 용해물 용적으로 셀-투-CT(Cell-to-CT) 키트(써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))을 이용하여 RNA 단리 및 cDNA 합성을 수행하였다.

[0178] *RNA 수준의 분석*

[0179] TaqMan 정량적 역-전사 PCR(qRT-PCR) 분석을 이용하여 표적 전사체의 정상 상태 RNA 수준을 측정하였다. 2㎕의 cDNA, 1× 유전자 발현 마스터 믹스(Gene Expression Master mix)(4369016, 매사추세츠주 월섬에 소재한 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)), 및 1× TaqMan 프라이머 분석(써모 피셔 사이언티픽)을 포함하는 총 반응 용적은 10㎕였다. 순환 조건은 50℃에서 2분, 95℃에서 10분, 및 95℃에서 15초 및 60℃에서 1분의 40주기였고, 주기마다 60℃ 단계에서 판독을 취하였다. BIO-RAD T1000 CFX96 써모사이클러(캘리포니아주 허큘레스에 소재한 바이오래드 래버러토리즈(Bio-Rad Laboratories)) 상에서 반응을 실행하고, 내부 대조군(*PPIA*, Hs99999904_m1, 써모 피셔 사이언티픽) 및 표적[*UBE3A-AS*, Hs01372957_m1; SNORD116-11, Hs04275268_gH; SNORD115, Hs04275288_gH; IPW, Hs03455409_s1; SNORD109A/B, AP47WVR (Thermo Fisher Scientific); *UBE3A*: 정방향 ATATGTGGAAGCCGGAATCT (서열번호 500); 역방향: CCCAGAACTCCCTAATCAGAA(서열번호 501); 및 프로브: ATGACGGTGGCTATACCAGG(서열번호 502)] 반응을 함께 수행하였다. 데이터를 검색하고, 바이오래드 CFX 마에스트로(BIORAD CFX Maestro) 소프트웨어(바이오-래드 래버러토리즈)로 분석하였다. 30 이상의 내부 대조군 Cq 값을 갖는 샘플을 필터링하였다. 기술적 및/또는 플레이트 복제물 사이의 차이를 확인하기 위해 데이터의 품질을 시각적으로 검사하였다. 추정 통계학 및 설명 통계학에 대한 측정은 ΔΔCq 값으로 이루어진다($2^{-\Delta\Delta Cq} = 2^{-(Cq[표적] - Cq[내부\ 대조군]) - (Cq[표적] - Cq[내부\ 대조군])}$).

[0180] 결과

[0181] 마우스 및 인간 CNS의 RNA-서열분석은 *UBE3A-AS*의 안정성 및/또는 전사에 중요한 것으로 여겨지는 영역을 확인하였다. 영역의 추가적인 분석은 마우스와 인간 사이의 낮은 서열 보존 수준을 나타내었다(도 1A 내지 도 1d).

[0182] 이들 발견에 기반하여, *Ube3a-AS* 전사체에서 특정 영역을 표적화하도록 마우스-특이적 ASO를 설계하였다(표 6 및 도 2a). 이 영역을 표적화하는 ASO가 부계 *Ube3a* 대립유전자의 발현을 재활성화시키는지의 여부를 검사하기

위해, 1차 해마 뉴런 배양물을 Ube3aYFP 리포터 마우스 모델로부터 생성하고(Ube3a+/YFP; 도 2B), 대조군 ASO[ASO-C(10 μM, n = 3)], *Ube3a-AS*를 표적화하는 3가지의 ASO[ASO-1.1, ASO-1.2, ASO-3.1(1 μM, 5 μM 및 15 μM, n = 3)] 및 ASO-B(1 μM, 5 μM 및 15 μM, n = 3)]로 시험관내에서(DIV) 7일 동안 처리하였다. 양성 대조군으로서, 뉴런을 또한 토포테칸[Topo(300nM, n = 3)] 및 음성 비히클 대조군[Veh(1%, n = 3); 도 2C]으로 처리하였다. 치료 3일 후에(10 DIV), 면역형광 영상화를 사용하여 개개 세포에서의 부계 Ube3aYFP 단백질 수준을 정량화하였다. 대조군(ASO-C 및 Veh)에 비해, 각각의 처리는 부계 Ube3aYFP 단백질 수준을 실질적으로 증가시켰고, ASO-1.1(15 μM), ASO-3.1(15 μM), 및 토포테칸 처리에서 유사한 수준이 달성되었다(도 2d 및 도 2e).

[0183] 이어서, 인간에서의 비 다형성 영역 및 마카크(레서스 및 사이노몰거스)에 의해 보존된 영역(100%)을 표적화하는 4가지의 ASO를 포함한, 이 영역을 표적화하도록 인간-특이적 ASO를 설계하였다(표 7 및 도 3A). 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 신경 전구체 세포를 14 DIV 동안 분화시키고, 이어서, 대조군 ASO[ASO-C (10 μM, n = 3)], 토포테칸[Topo(1 μM, n = 2)], 및 *UBE3A-AS*를 표적화하는 6가지의 ASO[ASO-1, ASO-2, ASO-3, ASO-4, ASO-5 및 ASO-6(10 μM, n = 3)]로 처리하였다. 추가적으로, *SNORD109B* 하류의 인트론 영역을 표적화하는 ASO를 포함시켰다(ASO-7). 처리 후 6일(20 DIV)에, RNA를 뉴런으로부터 단리시키고, *UBE3A-AS* 및 *UBE3A*의 정상 상태 RNA 수준을 대조군 처리에 대해 추정하였다(도 3B). ASO-7을 제외하고, 각각의 ASO는 *UBE3A-AS* RNA 수준을 상당히 감소시켰으며, ASO-2 및 ASO-4는 가장 큰 효과를 가진다(표 8 및 도 3c). 각각의 ASO에 의한 처리 후 *UBE3A* RNA 수준은 또한 증가되었다(도 3d).

[0184] ASO-4의 효능은 *UBE3A-AS* RNA 수준에 대해 주어진 이의 효과를 추가로 시험하였다. GABAergic iPSC-유래 뉴런을 ASO-4 및 양성 대조군으로서 토포테칸의 10-점 ½ log 용량 반응 곡선에서 그리고 처리[1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM 및 30 μM(ASO-4, n = 6; 토포테칸, n = 2)] 사이의 비교를 위해 14 DIV에 처리하였다. 20 DIV에서, *UBE3A-AS*의 정상 상태 RNA 수준을 측정하였고, 용량 반응 곡선을 적합화시켜 IC_{50} 및 E_{max}(즉, 최대 *UBE3A-AS* 저해)(표 9 및 도 4A)를 추정하였다. ASO-4 및 토포테칸의 용량 반응 곡선은 유의하게 달랐고(유사성 검정(Parallelism test): $F_{(3,145)} = 11.2$, $p < 0.0001$), 따라서, 상대적 효능은 추정되지 않았다. 동등성 검정은 ASO-4 및 토포테칸의 IC_{50} 및 E_{max}가 동등하지 않다는 것을 나타내었다[ASO-4/토포테칸 IC_{50} 비: = 1.2(하한치 = 1.1; 상한치 = 1.3); Emax 비 = -4.1(하한치 = -12.9; 상한치 = 4.8)].

[0185] 이어서, ASO-4 및 토포테칸의 효과를 ASO-4 표적 영역 상류에 위치된 *SNORD116*, *IPW*, *SNORD115* 및 *SNORD109A* RNA에 대해 시험하였다(도 1A 참조). *SNORD116*을 제외하고, ASO-4는 *IPW*, *SNORD115* 및 *SNORD109A/B*의 RNA 수준에 대해 유의한 효과를 갖지만, 용량 의존적 방식에서는 그렇지 않았다. 대조적으로, 토포테칸은 용량 의존적인 *SNORD116*, *IPW*, *SNORD115* 및 *SNORD109A/B* RNA 수준에 대해 유의한 효과를 가졌다(표 10 및 도 4B 내지 도 4E). 보다 고농도(3 μM, 10 μM 및 30 μM; 도 4F)에서의 토포테칸을 제외하고, ASO-4와 토포테칸은 둘 다 용량-의존적 방식으로 총 *UBE3A* RNA 수준을 증가시켰다.

[0186] ASO-4의 효능을 분화에서 이후의 시점에 iPSC-유래 뉴런에서 추가로 시험하였다. GABAergic iPSC-유래 뉴런을 대조군 ASO[ASO-C, 10 μM(n = 3)] 및 ASO-4[1 μM, 5 μM 및 10 μM(n = 3)]로 59 DIV에 처리하고, *UBE3A-AS* 및 *UBE3A*의 정상 상태 RNA 수준을 상기 기재한 바와 같이 측정하였다(도 4G). 더 이른 시점에 ASO-4로 처리한 뉴런과 달리, *UBE3A* 및 *UBE3A-AS*의 RNA 수준은 상당히 반비례 관계가 있었다(도 4H 및 도 4I). 예를 들어, *UBE3A-AS* RNA 수준에 대한 ASO-4(10 μM)의 효과는 14 및 59 DIV [20 DIV: *UBE3A-AS*: ↓87%(95% 신뢰구간(CI): 80 내지 95%); 65 DIV: ↓81%(95% CI: 74 내지 88%)]에서 처리한 뉴런 간에 유사한 반면, *UBE3A* RNA 수준에 대한 ASO-4의 효과는 59 DIV[20 DIV: ↑30%(95% CI: 16 내지 44%); 65 DIV: ↑86%(95% CI: 59% 내지 113%)]에서 처리한 뉴런에서 실질적으로 더 컸다.

[0187] 이어서, *UBE3A-AS*의 5'-말단을 표적화하는 추가적인 ASO를 ASO-4(ASO-4.1, ASO-4.2, ASO-4.3 및 ASO-4.4)의 표적 서열뿐만 아니라 2개의 다른 표적 영역, 즉, ASO-3(ASO-3.1 및 ASO-3.2) 및 ASO-6(ASO-6.1)을 최적화하도록 설계하였다(표 11). 추가적으로, ASO-4를 비교 목적을 위해 두 상이한 공급업자(ASO-4.S, 시그마(Sigma); ASO-4.I, 인터그레이티드 DNA 테크놀로지즈)에서 제작하였다. 인간 iPSC-유래 뉴런(GABAergic)을 ASO-3.1, ASO-3.2, ASO-4.S, ASO-4.I, ASO-4.1, ASO-4.2, ASO-4.3, ASO-4.4 및 ASO-6.1[30nM, 100nM, 300nM, 1 μM(n = 6)]의 5-점 ½ log 용량 곡선을 이용하여 14 DIV에 처리하였다. 20 DIV에서, 각각의 ASO의 IC_{50} 및 E_{max}를 상기 기재한 바와 같이 추정하였다(도 5A 내지 도 5B 및 표 12). 용량 반응 곡선은 ASO에서 유사하였고(유사성 검정: $F_{(16,513)} = 1.6$, $p = 0.06$), ASO-4 및 ASO-6.1은 가장 높은 상대적 효능을 가졌다(표 13). ASO-4.S와 ASO-4.I 간

에 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

[0188] ASO-4와 ASO-6.1의 효능을 분화에서 이후의 시점에 iPSC-유래 뉴런에서 추가로 시험하였다. GABAergic iPSC-유래 뉴런을 ASO-4 및 ASO-6.1[1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM 및 30 μM(n = 3)]의 10-점 ½ log 용량 반응 곡선으로 29 DIV에 처리하였다. 35 DIV에, 각각의 ASO의 IC_{50} 및 E_{max}를 상기 기재한 바와 같이 추정하였다(도 5C 내지 도 5D 및 표 14). ASO-4 및 ASO-6.1의 용량 반응 곡선은 유사하지 않았다(유사성 검정: $F_{(3,172)} = 22.7$, $p < 0.0001$). 동등성 검정은 ASO-4와 ASO-6.1이 동등한 효능을 나타내었지만, 상이한 E_{max} 값을 가진다는 것을 나타내었고[[ASO-6.1/ASO-4 비: IC_{50} = 1.03(하한치 = 1.0; 상한치 = 1.1); E_{max} = -1.3(하한치 = -2.6; 상한치 = -0.08)], ASO-6.1은 *UBE3A-AS* 수준의 가장 큰 저해를 가졌다. *UBE3A* RNA 수준에 대한 ASO-4 및 ASO-6.1의 효과는 유사하였고, 각각의 처리는 용량 의존적 방식에서 RNA 수준을 증가시켰다(도 5D).

[0189] ASO-4 및 ASO-6.1을 또한 글루타메이트성 iPSC-유래 뉴런에서 시험하였다. 글루타메이트성 iPSC-유래 뉴런을 ASO-4 및 ASO-6.1[1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM 및 30 μM(n = 3)]의 10-점 ½ log 용량 반응 곡선으로 14 DIV에서 처리하였다. 20 DIV에서, 각각의 ASO의 IC_{50} 및 E_{max}를 상기 기재한 바와 같이 추정하였다(도 5E 내지 도 5F 및 표 15). ASO-4 및 ASO-6.1의 용량 반응 곡선은 유사하고, 유의하게 다르지 않았으며(유사성 검정: $F_{(3,165)} = 1.9$, $p = 0.1$), ASO-6.1은 가장 높은 상대적 효능을 가졌다(표 16). 예상한 바와 같이, ASO-4 및 ASO-6.1은 용량 의존적 방식에서 *UBE3A* RNA 수준을 증가시켰지만(도 5F); 그러나, 치료에 기인하지 않는 각각의 농도에 대해 분산도가 높았다($R^2 = 0.17$).

[0190] 결론

[0191] AS에 대한 요법 개발에 대해, 특정 영역을 표적화하는 ASO가 *Ube3a-AS*/*UBE3A-AS*를 저해하고, 마우스 및 인간 뉴런에서 부계 *Ube3a*/*UBE3A* 대립유전자의 발현을 재활성화시키는지의 여부를 결정하기 위해 실험을 수행하였다. 종합하면, 발견은 마우스 및 인간 뉴런에서 이 영역을 표적화하는 ASO가 강한 안티센스 활성을 갖고, *Ube3a*/*UBE3A*의 각인을 반전시킨다는 것을 나타낸다.

[0192] *Ube3a-AS*를 표적화시키는 3가지 ASO(ASO-1.1 및 ASO-3.1) 중 둘은 토포테칸의 최적의 농도(300nM)에 의해 달성된 것과 유사한 수준으로 마우스 뉴런에서 부계 *Ube3a* 대립유전자의 발현을 재활성화시켰다.

[0193] 마찬가지로, 인간-특이적 ASO 각각은 인간 iPSC-유래 뉴런에서 *UBE3A-AS*의 정상 상태 RNA 수준을 유의하게 감소시켰고, 고농도의 ASO-4 및 ASO-6.1은 *UBE3A-AS*의 발현을 거의 완전히 없앴다. 인간과 마카크 사이에 100% 보존된 ASO-4 및 ASO-6.1 표적 영역을 고려하면, 이들 ASO의 효능은 사이노몰거스 또는 레서스 마카크 중 하나에서 생체내에서 시험할 수 있다. 토포테칸과 달리, ASO-4는, 만약에 있다면, 상류의 *SNORD116*, *IPW*, *SNORD115* 또는 *SNORD109A/B* RNA에 대한 작은 효과를 가지며, 이는 표적 영역에서 또는 하류에서 ASO가 전사를 종결시킨다는 생각과 일치된다.

[0194] 저농도(3nM)의 ASO-4 및 ASO-6.1은 *UBE3A-AS* RNA 수준을 상당히 감소시켰지만; 그러나, *UBE3A* RNA 수준을 증가시키는 데 보다 고농도(100nM 이상)의 ASO가 필요하였다. 이는 *UBE3A-AS*가 *UBE3A*의 전사를 저해하는데 필요한 특정 역치, 또는 *UBE3A-AS*의 비활성화가 부계 *UBE3A*의 재활성화를 야기하는 시간 사이의 지연, 또는 *UBE3A* RNA 수준을 정량화하기 위해 사용한 분석의 민감도를 반영할 수 있다.

[0195] 총괄적으로, 발견은 *UBE3A-AS*에서 후보 영역을 표적화하는 ASO가 뉴런에서 *UBE3A*의 각인을 거의 완전히 없애고, 장래의 임상 연구를 위해 적어도 2개의 ASO를 나타낸다는 것을 시사한다.

[0196] 상이한 RNA 변형 [2-하이드록시메틸(2'-OMe), 2'-메톡시-에틸 2'-MOE, 및 잠금 핵산(LNA)] 및 골격[포스포로티오에이트(PS) 및 포스포다이에스터(PO)]를 포함한 ASO-4 및 ASO-6.1의 유도체를 또한 설계하였다(표 17).

표 6

[0197]

마우스 *Ube3a-AS* 올리고뉴클레오타이드						
ASO	RNA 변형	RNA 골격	DNA 골격	설계 (5'-3')	서열	서열번호
ASO-B	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	C°*C°*A°*G°*C°*c*t*t*g*t*t*g*a*t*A°*U°*C°*A°*U°	서열번호 358
ASO-1.1	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	C°*C°*A°*C°*A°*t*t*t*c*c*t*t*c*a*U°*G°*G°*A°*A°	서열번호 359
ASO-1.2	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	G°*A°*G°*U°*G°*t*t*t*g*c*a*a*a*c*c*A°*A°*U°*G°*U°	서열번호 360
ASO-3.1	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	U°*G°*U°*U°*U°*C°*t*t*t*g*g*t*g*a*t*U°*C°*U°*G°*C°	서열번호 361
대문자, RNA; 소문자, DNA; O, 2'-OMe; PS & *, 포스포로티오에이트						

표 7

[0198]

인간 *UBE3A-AS* 올리고뉴클레오타이드						
ASO	RNA 변형	RNA 골격	DNA 골격	설계 (5′-3′)	서열	서열번호
ASO-1	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	U°A°G°A°G°g*t*g*a*a*g*g*c*c*a*G°*G°*C°*A°*C°	서열번호 362
ASO-2	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	G°U°A°C°U°c*t*t*c*c*t*c*a*g*t*C°*A°*U°*C°*C°	서열번호 363
ASO-3[c]	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	U°G°U°C°A°g*t*t*t*c*t*c*c*c*t*G°*A°*A°*C°*A°	서열번호 364
ASO-4[c]	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	U°A°G°A°A°*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*C°*U°*U°*G°*G°	서열번호 365
ASO-5[c]	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	G°U°U°U°U°c*t*t*c*c*t*c*c*a*c*A°*G°*U°*C°*U°	서열번호 366
ASO-6[c]	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	C°U°G°G°U°g*t*c*a*a*c*a*a*g*c*C°*A°*A°*A°*G°	서열번호 367
약어: [c], 마카크 및 비다형성으로 보존됨; 대문자, RNA 뉴클레오타이드; 소문자, DNA 뉴클레오타이드; °, 2′-OMe; PS & *, 포스포로티오에이트						

표 8

[0199]

UBE3A-AS 및 *UBE3A* RNA 수준에 대한 인간 ASO의 분석					
UBE3A-AS					
ASO 1	ASO 2	차이	하부 CI	상부 CI	Adj. P
ASO-C	ASO-2	0.89	0.82	0.97	<.0001
ASO-R	ASO-2	0.87	0.80	0.95	<.0001
ASO-C	ASO-4	0.87	0.80	0.95	<.0001
ASO-R	ASO-4	0.85	0.78	0.93	<.0001
ASO-C	ASO-6	0.83	0.75	0.90	<.0001
ASO-R	ASO-6	0.81	0.74	0.89	<.0001
ASO-C	ASO-3	0.79	0.71	0.86	<.0001
ASO-R	ASO-3	0.77	0.70	0.85	<.0001
ASO-C	ASO-5	0.71	0.63	0.78	<.0001
ASO-R	ASO-5	0.69	0.62	0.77	<.0001
ASO-C	Topo	0.66	0.59	0.73	<.0001
ASO-R	Topo	0.64	0.57	0.72	<.0001
ASO-C	ASO-1	0.51	0.43	0.58	<.0001
ASO-R	ASO-1	0.49	0.41	0.56	<.0001
ASO-1	ASO-2	0.38	0.31	0.46	<.0001
ASO-1	ASO-4	0.36	0.29	0.44	<.0001
ASO-1	ASO-6	0.32	0.25	0.40	<.0001
ASO-1	ASO-3	0.28	0.21	0.36	<.0001
Topo	ASO-2	0.23	0.16	0.31	<.0001
Topo	ASO-4	0.21	0.14	0.29	<.0001
ASO-1	ASO-5	0.20	0.13	0.28	<.0001
ASO-5	ASO-2	0.18	0.11	0.26	<.0001
Topo	ASO-6	0.17	0.10	0.24	0.0002
ASO-5	ASO-4	0.16	0.09	0.24	0.0003
ASO-1	Topo	0.15	0.08	0.23	0.0004
Topo	ASO-3	0.13	0.06	0.20	0.0018
ASO-5	ASO-6	0.12	0.04	0.20	0.0035
ASO-3	ASO-2	0.10	0.03	0.18	0.0111
ASO-3	ASO-4	0.08	0.01	0.16	0.0360
ASO-5	ASO-3	0.08	0.00	0.15	0.0381
ASO-6	ASO-2	0.06	-0.01	0.14	0.11
Topo	ASO-5	0.05	-0.02	0.13	0.18
ASO-6	ASO-4	0.04	-0.03	0.12	0.27
ASO-3	ASO-6	0.04	-0.03	0.12	0.28
ASO-4	ASO-2	0.02	-0.06	0.09	0.58
ASO-C	ASO-R	0.02	-0.06	0.09	0.64
UBE3A					
ASO 1	ASO 2	차이	하부 CI	상부 CI	Adj. P
ASO-4	ASO-C	0.30	0.16	0.44	0.0004
ASO-4	ASO-R	0.29	0.14	0.45	0.001
ASO-2	ASO-C	0.21	0.09	0.34	0.002
ASO-2	ASO-R	0.21	0.07	0.35	0.006
ASO-1	ASO-C	0.18	0.06	0.31	0.007
Topo	ASO-C	0.18	0.04	0.32	0.01
ASO-1	ASO-R	0.18	0.04	0.32	0.02
Topo	ASO-R	0.18	0.03	0.33	0.02
ASO-4	ASO-3	0.17	0.03	0.31	0.02
ASO-5	ASO-C	0.16	0.04	0.29	0.01
ASO-6	ASO-C	0.16	0.04	0.29	0.01
ASO-5	ASO-R	0.16	0.02	0.30	0.03
ASO-6	ASO-R	0.16	0.02	0.30	0.03
ASO-4	ASO-6	0.13	-0.007	0.27	0.06
ASO-4	ASO-5	0.13	-0.007	0.27	0.06
ASO-3	ASO-C	0.13	0.00	0.26	0.04
ASO-3	ASO-R	0.13	-0.015	0.27	0.08
ASO-4	Topo	0.11	-0.04	0.27	0.1
ASO-4	ASO-1	0.11	-0.03	0.25	0.1
ASO-2	ASO-3	0.08	-0.04	0.21	0.2
ASO-4	ASO-2	0.08	-0.06	0.22	0.2

[0200]

ASO-1	ASO-3	0.05	-0.07	0.18	0.4
Topo	ASO-3	0.05	-0.09	0.19	0.4
ASO-2	ASO-6	0.05	-0.08	0.18	0.4
ASO-2	ASO-5	0.05	-0.08	0.17	0.4
ASO-5	ASO-3	0.03	-0.09	0.16	0.6
ASO-6	ASO-3	0.03	-0.09	0.16	0.6
ASO-2	Topo	0.03	-0.1	0.17	0.7
ASO-2	ASO-1	0.03	-0.01	0.16	0.6
ASO-1	ASO-6	0.02	-0.1	0.15	0.7
Topo	ASO-6	0.02	-0.1	0.16	0.8
ASO-1	ASO-5	0.02	-0.1	0.15	0.7
Topo	ASO-5	0.02	-0.1	0.16	0.8
ASO-R	ASO-C	0.00	-0.1	0.14	0.9
ASO-5	ASO-6	0.00	-0.1	0.13	0.9
ASO-1	Topo	0.00	-0.1	0.14	1.00

약어: ASO-C, ASO-대조군; Topo, 토포테칸; Adj., 조정; CI, 95% 신뢰구간

[0201]

표 9

ASO-4 및 토포테칸의 IC_{50} 및 E_{max}							
처리	IC_{50} 추정 (M)	IC_{50} 95% CI (M)		E_{max} 추정	E_{max} 95% CI		30 μM (평균)
ASO-4	6.13E-07	3.47E-07	1.08E-06	-0.06	-0.23	0.10	0.09
Topo	3.37E-08	1.85E-08	6.14E-08	0.26	0.20	0.32	0.21

4-모수 로지스틱 회귀 모델(Hill)로부터의 전체 모델 모수 추정. IC_{50} 및 신뢰구간은 몰 농도를 나타냄. E_{max} 및 30 uM 값은 비히클에 대해 정규화된 *UBE3A-AS* RNA 수준을 나타낸다.

[0202]

표 10

UBE3A, *SNORD116*, *SNORD115*, *SNORD109A/B* 및 *IPW* RNA 수준에 대한 ASO-4 및 토포테칸의 분석					
처리	RNA	DF	DFDen	F 비	FDR
ASO-4	UBE3A	9	108	16.5	< 0.0001
	SNORD109A/B	9	104.9	2.6	0.01
	SNORD115	9	108	4.0	0.0002
	SNORD116	9	108	1.74	0.09
	IPW	9	108	4.1	0.0002
토포테칸	UBE3A	9	29	5.6	0.0002
	SNORD109A/B	9	29	28.2	< 0.0001
	SNORD115	9	29	4.60	0.001
	SNORD116	9	29	7.12	< 0.0001
	IPW	9	29	49.8	< 0.0001

최소 제곱법 선형 회귀. 약어: DF, 자유도; DFDen, 자유도 밀도

[0203]

표 11

최적화된 인간 *UBE3A-AS* 안티센스 올리고뉴클레오타이드						
ASO	RNA 변형	RNA 골격	DNA 골격	설계 (5′-3′)	서열	서열번호
ASO-3.1[c]	2′-OMe	PS	PS	4-10-5	G°*U°*U°*G°*a*g*t*g*g*t*g*t*c*a*G°*U°*U°*U°*C°	서열번호 368
ASO-3.2[c]	2′-OMe	PS	PS	4-10-4	U°*U°*G°*A°*g*t*g*g*t*g*t*c*a*g*U°*U°*U°*C°	서열번호 369
ASO-6.1[c]	2′-OMe	PS	PS	4-10-4	C°*U°*G°*G°*t*g*t*c*a*a*c*a*a*g*C°*C°*A°*A°	서열번호 370
ASO-4.1[c]	2′-OMe	PS	PS	5-10-5	A°*U°*A°*G°*A°*a*t*g*g*c*a*c*a*t*c*U°*C°*U°*U°*G°	서열번호 371
ASO-4.2[c]	2′-OMe	PS	PS	4-10-5	A°*G°*A°*A°*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*C°*U°*U°*G°*G°	서열번호 372
ASO-4.3[c]	2′-OMe	PS	PS	4-10-5	U°*A°*G°*A°*a*t*g*g*c*a*c*a*t*c*U°*C°*U°*U°*G°	서열번호 373
ASO-4.4[c]	2′-OMe	PS	PS	4-10-4	A°*G°*A°*A°*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*C°*U°*U°*G°	서열번호 374

[c], 마카크 및 비 다형성으로 보존됨; 대문자, RNA 뉴클레오타이드; 소문자, DNA 뉴클레오타이드; O, 2′-OMe; PS & *, 포스포로티오에이트

[0204]

표 12

최적화된 ASO 표적 서열의 IC_{50} 및 E_{max}				
그룹	IC_{50} 추정	IC_{50} 95% CI (M)		3 μM (평균)
6.1	5.20E-07	3.33E-07	8.11E-07	0.23
4.0	1.06E-06	9.31E-07	1.21E-06	0.29
4.2	1.08E-06	8.62E-07	1.35E-06	0.31
3.2	1.88E-06	1.39E-06	2.56E-06	0.44
4.3	2.03E-06	1.67E-06	2.47E-06	0.40
4.4	2.11E-06	1.73E-06	2.59E-06	0.44
4.1	2.27E-06	1.92E-06	2.68E-06	0.42
3.1	2.98E-06	2.45E-06	3.62E-06	0.51

3-모수 로지스틱 회귀 모델로부터의 전체 모델 모수 추정. IC_{50} 및 신뢰구간은 몰 농도를 나타낸다. E_{max} (3 uM) 값은 비히클에 대해 정규화된 *UBE3A-AS* RNA 수준을 나타낸다.

[0205]

표 13

[0206]

최적화된 ASO의 상대적 효능			
ASO	IC_{50} (M)	상대적 효능	표준오차
ASO 3.1	2.81E-06	0.53	0.059
ASO 3.2	1.85E-06	0.81	0.086
ASO 4.1	2.25E-06	0.66	0.072
ASO 4.2	1.24E-06	1.21	0.13
ASO 4.3	1.96E-06	0.76	0.081
ASO 4.4	2.04E-06	0.73	0.079
ASO 6.1	7.20E-07	2.07	0.21
ASO 4.I	8.28E-07	1.80	0.19
ASO 4.S	1.49E-06	1	0
3-모수 로지스틱 회귀 모델로부터의 병행 모델 모수 추정. 효능은 몰 농도를 나타낸다. 약어: M, 몰농도; 표준오차, 평균의 표준오차.			

표 14

[0207]

GABAergic iPSC 뉴런에서 ASO-4 및 ASO-6.1의 IC_{50} 및 E_{max}							
ASO	IC_{50} 추정	IC_{50} 95% CI (M)		E_{max} 추정	E_{max} 95% CI		30 μM (평균)
ASO-4	7.77E-07	6.86E-07	8.79E-07	0.08	0.05	0.11	0.11
ASO-6.1	5.17E-07	3.41E-07	7.82E-07	-0.11	-0.22	0.01	0.06
4-모수 로지스틱 회귀 모델(Hill)로부터의 전체 모델 모수 추정. IC_{50}및 신뢰구간은 몰 농도를 나타낸다. E_{max} 및 30 uM 값은 비히클에 대해 정규화된 *UBE3A-AS* RNA 수준을 나타낸다.							

표 15

[0208]

글루타메이트성 iPSC 뉴런에서의 ASO-4 및 ASO-6.1의 IC_{50} 및 E_{max}							
ASO	IC_{50} 추정	IC_{50} 95% CI (M)		E_{max} 추정	E_{max} 95% CI		30 μM (평균)
ASO-4	1.21E-04	1.12E-13	1.32E+05	-1.45	-9.01	6.12	0.17
ASO-6.1	2.44E-07	2.39E-08	2.50E-06	-0.27	-1.24	0.70	0.04
4-모수 로지스틱 회귀 모델(Hill)로부터의 전체 모델 모수 추정. IC_{50} 및 신뢰구간은 몰 농도를 나타낸다. E_{max} 및 30 uM 값은 비히클에 대해 정규화된 *UBE3A-AS* RNA 수준을 나타낸다.							

표 16

[0209]

글루타메이트성 뉴런에서 ASO-4 및 ASO-6.1의 상대적 효능			
ASO	IC_{50} (M)	상대적 효능	표준오차
ASO-4	3.06E-06	1	0
ASO-6.1	7.8E-07	3.89	0.72
4 모수 로지스틱 회귀 모델로부터의 병행 모델 모수 추정. 약어: M, 몰농도			

표 17

[0210]

ASO-4 및 ASO-6.1의 유도체						
ASO	RNA 변형	골격	PO 연결	설계 (5′-3′)	서열 (5′-3′)	서열번호
ASO-4.0.PS.O	OMe	PS	0	5-10-5	$U^{O}*A^{O}*G^{O}*A^{O}*A^{O}*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*C^{O}*U^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}$	서열번호 375
ASO-4.0.PO-1.O	OMe	PS/PO	2	5-10-5	$U^{O}*A^{O}*G^{O}*A^{O}*A^{O}$-t*g*g*c*a*c*a*t*c*t-$C^{O}*U^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}$	서열번호 376
ASO-4.0.PO-2.O	OMe	PS/PO	0	5-10-5	$U^{O}*A^{O}$-$G^{O}*A^{O}$-A^{O}*t-g*g-c*a-c*a-t*c-t*C^{O}-$U^{O}*U^{O}$-$G^{O}*G^{O}$	서열번호 377
ASO-4.0.PS.M	MOE	PS	0	5-10-5	$T^{M}*A^{M}*G^{M}*A^{M}*A^{M}*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*5mC^{M}*T^{M}*T^{M}*G^{M}*G^{M}$	서열번호 378
ASO-4.0.PO-1.M	MOE	PS/PO	2	5-10-5	$T^{M}*A^{M}*G^{M}*A^{M}*A^{M}$-t*g*g*c*a*c*a*t*c*t-$5mC^{M}*T^{M}*T^{M}*G^{M}*G^{M}$	서열번호 379
ASO-4.0.PO-2.M	MOE	PS/PO	9	5-10-5	$T^{M}*A^{M}$-$G^{M}*A^{M}$-A^{M}*t-g*g-c*a-c*a-t*c-t*5mC^{M}-$T^{M}*T^{M}$-$G^{M}*G^{M}$	서열번호 380
ASO-4.4.PS.L	LNA	PS	0	3-11-4	$A^{L}*G^{L}*A^{L}*a*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t*5mC^{L}*T^{L}*T^{L}*G^{L}$	서열번호 381
ASO-4.4.PO-1.L	LNA	PS/PO	2	3-11-4	$A^{L}*G^{L}*A^{L}$-a*t*g*g*c*a*c*a*t*c*t-$5mC^{L}*T^{L}*T^{L}*G^{L}$	서열번호 382
ASO-4.4.PO-2.L	LNA	PS/PO	8	3-11-4	$A^{L}*G^{L}$-A^{L}*a-t*g-g*c-a*c-a*t-c*t-$5mC^{L}*T^{L}$-$T^{L}*G^{L}$	서열번호 383
ASO-6.1.PS.O	OMe	PS	0	4-10-4	$C^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}*t*g*t*c*a*a*c*a*a*g*C^{O}*C^{O}*A^{O}*A^{O}$	서열번호 384
ASO-6.1.PO-1.O	OMe	PS/PO	2	4-10-4	$C^{O}*U^{O}*G^{O}*G^{O}$-t*g*t*c*a*a*c*a*a*g-$C^{O}*C^{O}*A^{O}*A^{O}$	서열번호 385
ASO-6.1.PO-2.O	OMe	PS/PO	8	4-10-4	$C^{O}*U^{O}$-$G^{O}*G^{O}$-t*g-t*c-a*a-c*a-a*g-$C^{O}*C^{O}$-$A^{O}*A^{O}$	서열번호 386
ASO-6.1.PS.M	MOE	PS	0	4-10-4	$5mC^{M}*T^{M}*G^{M}*G^{M}*t*g*t*c*a*a*c*a*a*g*5mC^{M}*5mC^{M}*A^{M}*A^{M}$	서열번호 387
ASO-6.1.PO-1.M	MOE	PS/PO	2	4-10-4	$5mC^{M}*T^{M}*G^{M}*G^{M}$-t*g*t*c*a*a*c*a*a*g-$5mC^{M}*5mC^{M}*A^{M}*A^{M}$	서열번호 388
ASO-6.1.PO-2.M	MOE	PS/PO	8	4-10-4	$5mC^{M}*T^{M}$-$G^{M}*G^{M}$-t*g-t*c-a*a-c*a-a*g-$5mC^{M}*5mC^{M}$-$A^{M}*A^{M}$	서열번호 389
ASO-6.1.PS.L	LNA	PS	0	3-10-4	$T^{L}*G^{L}*G^{L}*t*g*t*c*a*a*c*a*a*g*5mC^{L}*5mC^{L}*A^{L}*A^{L}$	서열번호 390
ASO-6.1.PO-1.L	LNA	PS/PO	2	3-10-4	$T^{L}*G^{L}*G^{L}$-t*g*t*c*a*a*c*a*a*g-$5mC^{L}*5mC^{L}*A^{L}*A^{L}$	서열번호 391
ASO-6.1.PO-2.L	LNA	PS/PO	8	3-10-4	$T^{L}*G^{L}$-G^{L}*t-g*t-c*a-a*c-a*a-g*$5mC^{L}$-$5mC^{L}$-$A^{L}*A^{L}$	서열번호 392
대문자, RNA; 소문자, DNA. 5mC, 5-메틸사이토신. 위첨자: O, 2′-OMe; M, 2′-MOE; L, LNA. PS & *, 포스포로티오에이트; PO & -, 포스포다이에스터						

[0212] **실시예 2: ASO 표적 영역의 확인**

[0213] 마우스 조직 및 세포로부터 생성된 RNA-서열분석 데이터의 분석은 *Snord115* 클러스터의 3'-말단과 *Ube3a-AS*의 *Snord115* 숙주-유전자 전사체 및 전사의 가공에 중요한 것으로 여겨지는 유전자 요소를 함유하는 *Ube3a* 안티센스(*Ube3a-AS*) 전사체의 5'-말단 사이에 위치된 영역을 나타내었다(도 6A 내지 도 6d). 인간 조직으로부터 생성된 RNA-서열분석 데이터의 분석은 마우스에서 관찰된 것과 유사한 요소를 함유한 *SNORD115* 클러스터와 *SNORD109B*의 3'-말단 사이에 위치된 영역을 나타내었지만(도 7a 내지 도 7G); 그러나, 이 영역의 비교 분석은 인간과 설치류 사이에 서열 보존이 거의 내지는 전혀 없다는 것을 나타내었다.

[0214] 물질 및 방법

[0215] *RNA-서열분석*

[0216] 퀴아젠(Qiagen) RNAeasy 플러스(74136, 독일 힐덴에 소재한 퀴아젠)을 이용하여 RNA를 단리시켰다. 큐빗(Qubit) 형광 측정 정량화(써모 피셔 사이언티픽)를 이용하여 RNA 농도를 결정하였고, 4200 애질런트 테이프스테이션(Agilent TapeStation)(캘리포니아주 산타 클라라에 소재한 애질런트(Agilent))을 이용하여 RNA 품질을 평가하였다. 제조업자의 프로토콜에 따라 일루미나 TruSeq 가닥 토탈 RNA 키트(Illumina TruSeq RNA Stranded Total RNA kit)(20020597, 캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 일루미나 인코포레이티드(Illumina, Inc.))를 이용하여 RNA-서열분석 라이브러리를 생성하였다. 게놈 과학 및 게놈 코어 협회에 대한 텍사스 A&M 인스티튜트(Texas A&M Institute for Genome Sciences and Society Genomics core)에서 NextSeq 500(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 일루미나)을 이용하여 75개의 염기쌍-말단 서열분석을 수행하였다. CASAVA를 이용하여 원 서열분석 판독을 진행하였다. FASTQC를 이용하여 얻어진 FASTQ 서열을 시험하였다.

[0217] 다음의 설정으로 Hisat2(버전 2.1.0)을 이용하여 인간 기준 조립체(hg19)에 FASTQ 서열을 부여하였다: --fr. 이어서, 정렬된 SAM 서열을 이원 BAM 서열로 전환시키고 나서, Samtool을 이용하여 인덱싱하고, 정렬시켰다. 개개 샘플로부터의 BAM 파일을 합치고 나서, Samtool을 이용하여 인덱싱하였다. 독특하지 않게 정렬된 판독(퀄러티 > 1)을 제거하기 위해 Samtool에서 뷰 커맨드(view command)를 이용하여 정렬된 서열을 필터링하였다.

[0218] 다음의 옵션으로 Stringtie(버전 1.3.4.d)를 이용하여 병합된 샘플에 대한 전사체 조립체를 생성하였다: (가닥) --rf -f 0 -j 2. gffread(GFF 유틸리티즈(GFF utilities), 존스 홉킨스 유니버시티(Johns Hopkins University), 컴퓨터 생물학 센터(Center for Computational Biology))를 이용하여 조립된 전사체로부터 단일 엑손 전사체를 제외하였다.

[0220] **실시예 3: 리드 ASO의 확인**

[0221] 잠재적 리드 ASO를 확인하기 위해 ASO-4 및 ASO-6.1 표적 서열을 표적화하고 상이한 골격 설계 및 RNA 변형으로 이루어진 18개의 ASO를 설계하였다(표 17). IC_{50} 및 E_{max} 값을 비교하기 위해 각각의 ASO의 10-점 ½ log 용량 반응 곡선으로 정상 iPSC 유래-뉴런(GABAergic)을 처리하였다. 18 DIV에 신경 전구체 세포를 뉴런으로 분화시키고, 이어서, 10-점 ½ log 용량 반응 ASO[1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1μM, 3μM, 10μM 및 30μM(n = 2)]로 처리하였다. 24 DIV에, *UBE3A-AS*의 정상 상태 RNA 수준을 측정하고 나서, 용량 반응 곡선을 상기 기재한 바와 같이 적합화시켰다(도 8a 및 표 18). 용량 반응 곡선은 유의하게 달랐고(유사성 검정: $F_{(51,606)} = 7.86$; $p < 0.0001$; $R^2 = 0.90$), 따라서 상대적 효능은 추정되지 않아TEk. 적합화된 곡선의 계층적 클러스터링은 ASO의 3개 클러스터를 나타냈는데, 클러스터 1은 9가지의 가장 효능있는 ASO를 나타내었다(도 8b 및 도 8c). 클러스터 1의 분석은 ASO가 유사한 곡선을 가졌다는 것(유사성 검정: $F_{(24,299)} = 1.01$; $p = 0.5$; $R^2 = 0.93$)과 ASO-4.4.PS.L이 다른 ASO의 적어도 3배만큼 강하다는 것을 나타내었다(표 19). 그러나, 추가적인 분석은 ASO-4.4.PS.L, ASO-6.1.PS.M 및 ASO-6.1.PO-1.M이 동등한 IC_{50} 값을 가진 반면, 다른 ASO는 약간 덜 강하다는 것을 나타내었다(표 20). 상대적 효능 및 내부 선택 기준에 기반하여, ASO-4.4.PS.L 및 ASO-6.1.PO-1.0을 추가로 조사하였다.

[0222] 물질 및 방법

[0223] 달리 언급되지 않는 한 방법은 실시예 2에 기재한 것과 유사하였다.

표 18

후보 ASO의 IC_{50} 및 E_{max}

ASO	IC_{50} (M)	IC_{50} 95% CI (M)		E_{max}	E_{max} 95% CI		30 μM (평균)	클러스터
ASO-4.4.PS.L	2.66E-08	3.66E-09	1.93E-07	0.0	-0.23	0.23	0.05	1
ASO-6.1.PS.M	1.47E-07	6.80E-08	3.19E-07	-0.05	-0.21	0.12	0.02	1
ASO-6.1.PO-1.M	1.66E-07	7.15E-08	3.84E-07	-0.02	-0.20	0.16	0.04	1
ASO-4.4.PO-1.L	2.26E-07	8.95E-08	5.71E-07	0.04	-0.17	0.25	0.1	1
ASO-4.0.PO-1.M	2.78E-07	1.52E-07	5.08E-07	0.02	-0.11	0.15	0.05	1
ASO-4.0.PS.M	3.00E-07	1.80E-07	5.00E-07	0.05	-0.06	0.15	0.05	1
ASO-6.1.PO-1.O	3.15E-07	7.98E-08	1.24E-06	-0.1	-0.50	0.26	0.04	1
ASO-6.1.PS.L	3.62E-07	1.37E-07	9.57E-07	-0.07	-0.32	0.18	0.04	1
ASO-6.1.PS.O	5.32E-07	1.20E-07	2.36E-06	-0.2	-0.67	0.29	0.05	1
ASO-6.1.PO-2.L	7.34E-07	5.35E-08	1.01E-05	0.3	-0.11	0.76	0.4	2
ASO-4.0.PO-1.O	7.66E-07	3.70E-07	1.59E-06	0.05	-0.12	0.23	0.1	2
ASO-4.0.PS.O	1.27E-06	5.13E-07	3.13E-06	0.06	-0.20	0.31	0.1	2
ASO-6.1.PO-1.L	1.89E-06	4.42E-07	8.06E-06	0.03	-0.34	0.39	0.2	2
ASO-4.0.PO-2.O	1.30E-04	1.65E-17	1.03E+09	-0.3	-9.51	8.94	0.6	2
ASO-6.1.PO-2.M	2.69E-04	9.85E-16	7.37E+07	-1.2	-13.16	10.77	0.3	2
ASO-4.4.PO-2.L	3.27E+01	0	Inf	-2.7	-577	571	0.6	3
ASO-4.0.PO-2.M	1.14E+05	0	Inf	-76	-74,958.	74,805	0.5	3
ASO-6.1.PO-2.O	1.93E+10	0	Inf	-5569	-85,963,650	85,952,510	0.3	3

4-모수 로지스틱 회귀 모델(Hill)로부터의 전체 모델 모수 추정. IC50 및 신뢰구간은 몰 농도를 나타낸다. Emax 및 30 uM 값은 비히클에 대해 정규화된 UBE3A-AS RNA 수준을 나타낸다.

[0224] 약어: Inf, 무한대; 95% CI, 95% 신뢰구간

표 19

클러스터 1에서 ASO의 상대적 효능

ASO	IC_{50} (M)	상대적 효능	표준오차
ASO-4.4.PS.L	5.03E-08	1	0
ASO-6.1.PS.M	1.53E-07	0.3	0.08
ASO-6.1.PO-1.M	1.77E-07	0.3	0.07
ASO-6.1.PO-1.O	1.99E-07	0.3	0.06
ASO-4.0.PS.M	2.62E-07	0.2	0.05
ASO-4.0.PO-1.M	2.78E-07	0.2	0.04
ASO-6.1.PS.L	2.81E-07	0.2	0.04
ASO-4.4.PO-1.L	3.22E-07	0.2	0.04
ASO-6.1.PS.O	4.32E-07	0.1	0.03

4 모수 로지스틱 회귀 모델로부터의 병행 모델 모수 추정(Hill).

[0225] 약어: M, 몰농도; Std, 표준

표 20

ASO-4.4.PS.L에 대해 클러스터 1에서 ASO의 등가물

ASO	ASO	IC_{50} 비	하부 및 상부 신뢰 한계		한계 초과
ASO-4.4.PS.L	ASO-6.1.PO-1.M	0.90	0.81	0.98	등가
	ASO-6.1.PS.M	0.90	0.82	0.98	등가
	ASO-4.0.PO-1.M	0.87	0.79	0.94	보다 낮음
	ASO-4.0.PS.M	0.86	0.79	0.94	보다 낮음
	ASO-4.4.PO-1.L	0.88	0.79	0.96	보다 낮음
	ASO-6.1.PO-1.O	0.86	0.77	0.95	보다 낮음
	ASO-6.1.PS.L	0.85	0.77	0.93	보다 낮음
	ASO-6.1.PS.O	0.83	0.73	0.92	보다 낮음

양측 단측 검정

[0226]

[0228] **실시예 4: 엔젤만 증후군 iPSC 뉴런에서 ASO-6.1-PO-1.0 및 ASO-4.4.PS.L의 약력학적 분석**

[0229] 이어서, ASO-6.1.PS.O 및 ASO-4.4.PS.L의 효능을 15q11-q13 영역의 모계 유래 결실을 갖는 엔젤만 증후군 환자로부터의 iPSC 유래-뉴런에서 시험하였다. 유도 만능 줄기 세포를 뉴런으로 분화시키고, 이어서, ASO-6.1.PO-1.0 및 ASO-4.4.PS.L[1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1μM, 3μM, 10μM 및 30μM(n = 3)]의 10-점 ½ log 용량 반응 곡선으로 처리하였다. 처리 후 6일에, *UBE3A-AS*의 정상 상태 RNA 수준을 측정하였고, 용량 반응 곡선을 상기 기재한 바와 같이 적합화시켰다(도 9A). 용량 반응 곡선은 ASO(유사성 검정: $F_{(3,132)}$ = 1.07, p =

0.4, R^2 = 0.82) 간에 유사하였고, ASO-4.4.PS.L(437nM)은 ASO-6.1.PO-1.0(1.22μM)보다 대략 2.7배 초과로 더 강하였다. IC_{50} 값은 동등하였다[ASO-6.1.PO-1.0 /ASO-4.4.PS.L IC_{50} 비: = 0.96(하한치 = 0.9; 상한치 = 1.0)]. E_{max} 값은 유사하였지만(30μM: ASO-4.4.PS.L = 0.01 ± 0.0007; ASO-6.1.PO-1.0 = 0.05 ± 0.004), 신뢰구간 때문에 동등한 것으로 간주하지 않았다[ASO-6.1.PO-1.0 /ASO-4.4.PS.L E_{max} 비: = -9.1 (하한치 = -224; 상한치 = 205)].

[0230] 물질 및 방법

[0231] 달리 언급하지 않는 한, 방법은 실시예 2에 기재한 것과 유사하였다.

[0232] *엔젤만 증후군 유도만능 줄기세포 유래 뉴런*

[0233] 인간배아 줄기 세포 배지[DMEM/F12 (11330-057, 아일랜드 더블린에 소재한 깁코 바이오사이언시즈(Gibco Biosciences)), 20% 넉아웃 혈청 대체(Knockout Serum Replacement)(10828-028, 써모 피셔 사이언티픽), 1×비필수 아미노산, 2mM L-글루타민, 7㎕/㎖ 2-머캅토에탄올 및 4㎍/㎖ 염기성 섬유아세포 성장인자] 내 방사선 조사된 뮤린 배아 섬유아세포 상에서 엔젤만 증후군 iPS 세포(AG1-0 iPSC)(ECN001, 매사추세츠주 보스턴에 소재한 케라패스트(Kerafast))를 공동배양시켰다. 제1 계대를 위해, 세포를 해리시키기 위해 피더(feeder)가 없고 디스파제 II(SCM133, 밀리포어 시그마)를 이용하는 PluriSTEM 인간 ES/iPS 배지(SCM130, 매사추세츠주 벌링턴에 소재한 밀리포어 시그마(Millipore Sigma))에 대해 제품 매뉴얼에 따라 AG1-0 세포를 계대시켰다. 매트리겔(Matrigel)(상표명) hESC-적격 매트릭스(354277, 뉴욕주 코닝에 소재한 코닝 BD 바이오사이언시즈(Corning BD Biosciences))를 세포외 기질로서 사용하였다. 제2 계대에서, 기질을 비트로넥틴(CC130, 밀리포어 시그마)으로 전환시켰다. 후속 계대 동안, 분화된 세포가 대략 5% 미만의 콜로니를 나타낼 때까지 분화 영역을 수동으로 제거하였다. 4회의 후속 계대 후에, 세포외 기질로서 비트로넥틴은 없었지만 밀리포어 ES/iPS 신경생성 키트(SCR603, SCM110 및 SCM111)를 이용하여 AG1-0 세포를 분화시켰다. 고품질 iPS 세포를 얻기 위해 EZ-LiFT(SCM139, 밀리포어 시그마)를 이용하여 초기 계대를 수행하였다. 신경 전구체 세포를 0기(P_0)에 냉동시키고, 후속적으로 분화를 위해 해동시켰다. 10일의 분화 동안 분화 배지(SCM111)에서 폴리-D-라이신(10㎍/㎖) 및 라미닌[10㎍/㎖(23017-015, 깁코)]으로 코팅한 멸균 배양 플레이트 상에서 분화를 수행하였다. 일부 예에서, 세포를 셀룰러 다이나믹스 유지 배지(Cellular Dynamics Maintenance Medium)(NRM-100-121-001, 위스콘신주 메디슨에 소재한 셀룰러 다이나믹스 인터내셔널(Cellular Dynamics International))에서 분화시켰다.

[0235] **실시예 5: ASO-6.1-PO-1.0 및 ASO-4.4.PS.L로 처리한 엔젤만 증후군 iPSC 뉴런에서의 PWS 다시스트론성 전사체의 발현 분석**

[0236] ASO-4.4.PS.L 및 ASO-6.1.PO-1.0이 PWS 다시스트론성 전사체에 의해 암호화된 RNA 전사체 수준에 영향을 미치는지의 여부를 결정하기 위해, 각각의 ASO로 처리한 AS iPS 세포 상에서 RNA-서열분석을 수행하였고, *SNURF*, *SNRPN*, *SNORD116* 숙주-유전자 전사체(*SNHG116*), *SNORD116* snoRNA, *IPW*, *SNORD115* 숙주-유전자 전사체(*SNHG115*), *SNORD115* snoRNA, 및 *UBE3A-AS*의 정상 상태 RNA 수준을 정량화하였다. *UBE3A* 정상 상태 RNA 수준을 또한 측정하였다. 상기 기재한 바와 같이 엔젤만 증후군 iPS 세포를 뉴런으로 분화시키고, 이어서, 비히클(1% H2O, n = 3), ASO-4.4.PS.L(30μM, n = 3) 및 ASO-6.1.PO-1.0(30μM, n = 3)로 처리하였다. 처리 후 6일에, 배양물로부터 단리시킨 총 RNA(rRNA는 고갈됨)에 대한 RNA RNA-서열분석을 수행하였다. *SNHG116*, *SNHG115* 및 *UBE3A-AS* 전사체의 주석을 생성하기 위해, 비히클 RNA-seq 데이터로부터 전사체를 조립하였고, 이어서, 기준 유전자 주석에 혼입하였다. 비히클에 대해, *SNURF*, *SNRPN*, *SNHG116*, *SNORD116* snoRNA 및 *SNORD115* snoRNA의 정상 상태 RNA 수준은 유사하였지만, 유의하게 다르지 않았다. ASO-4.4.PS.L은 *IPW* 수준을 감소시켰지만(1.5배), ASO-6.1.PO-1.0은 그렇지 않았으나, 효과는 유의하지 않았다. ASO-6.1.PO-1.0 및 ASO-4.4.PS.L은 *SNHG115* 및 *UBE3A-AS* RNA 수준을 유의하게 감소시켰다. ASO-6.1.PO-1.0 및 ASO-4.4.PS.L은 *SNHG115* 수준에 대해 유의한 효과를 가졌지만; 그러나, ASO-4.4.PS.L은 ASO-6.1.PO-1.0보다 *UBE3A-AS* RNA 수준에 대해 훨씬 더 큰 효과를 가졌다 (ASO-4.4.PS.L: -6.1-배수 변화; ASO-6.1.PO-1.0: -2.8-배수 변화). ASO 처리는 *UBE3A* RNA 수준을 대략 1.2배만큼 증가시켰지만, 효과는 유의하지 않았다(도 10 및 표 21).

[0237] 물질 및 방법

[0238] 달리 언급하지 않는 한, 방법은 실시예 4에 기재한 것과 유사하였다.

[0239] *PWS RNA의 차별적 발현 분석*

[0240] 디폴트 설정 및 다음의 옵션으로 Cuffnorm을 이용하여 RefSeq 유전자 주석의 정규화된 FPKM(단편/1000개의 염기/100만개의 맵핑된 판독값: fragments per thousand per million) 값을 추정하였다: -u. 각각의 샘플에 대해 출력 파일로부터 각각의 유전자 주석의 FPKM 값을 결정하였고, 설명적 및 추정적 통계를 위해 사용하였다.

표 21

PWS 다시스트론성 전사체 및 *UBE3A*의 RNA 수준에 대한 ASO 처리 효과

유전자	처리	차이	표준오차	t 비	조정 P
SNURF	ASO-6.1.PO-1.O	-0.53	0.51	-1.02	0.5
	ASO-4.4.PS.L	0.49	0.51	0.96	0.6
SNRPN	ASO-6.1.PO-1.O	0.03	0.11	0.30	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.02	0.11	-0.16	1.0
SNHG116	ASO-6.1.PO-1.O	-0.07	0.10	-0.75	0.7
	ASO-4.4.PS.L	-0.24	0.10	-2.49	0.08
SNORD116	ASO-6.1.PO-1.O	-0.04	0.46	-0.08	1.0
	ASO-4.4.PS.L	0.27	0.45	0.60	0.8
IPW	ASO-6.1.PO-1.O	0.18	0.37	0.49	0.8
	ASO-4.4.PS.L	-0.49	0.37	-1.33	0.4
SNH115G	ASO-6.1.PO-1.O	-0.55	0.09	-5.92	0.002
	ASO-4.4.PS.L	-0.58	0.09	-6.33	0.001
SNORD115	ASO-6.1.PO-1.O	0.24	0.52	0.45	0.8
	ASO-4.4.PS.L	-0.26	0.49	-0.54	0.8
UBE3A-AS	ASO-6.1.PO-1.O	-1.48	0.06	-24.17	< 0.0001
	ASO-4.4.PS.L	-1.94	0.06	-31.56	< 0.0001
UBE3A	ASO-6.1.PO-1.O	0.74	0.48	1.53	0.3
	ASO-4.4.PS.L	0.90	0.48	1.88	0.2

비히클에 대해 던넷 다중 비교 검정과 함께 일원 ANOVA.

[0241]

[0243] **실시예 6: 사이노몰거스 마카크에서 ASO-6.1-PO-1.0 및 ASO-4.4.PS.L의 약력학적 분석**

[0244] 몇몇 비-인간 영장류(NHP) 종에 걸쳐 ASO-4 및 ASO-6 표적 영역을 보존하였고, 따라서, 거대 동물 모델에서의 안전성과 효능 연구를 가능하게 하였다. 중추 신경계(CNS)에서 ASO-4.4.PS.L 및 ASO-6.1.PO-1.0의 효능을 시험하기 위해, ASO를 초내 요추 천자에 의해 사이노몰거스 마카크에 전달하였다. 동물에 비히클(0.9% 식염수, n = 5), ASO-6.1.PO-1.0(10mg, n = 3) 및 ASO.4.4.PS.L(10mg, n = 3)의 단일 볼루스 주사를 투여하였다. 처리 후 28일에, 중추 신경(CNS) 조직을 수집하고 나서, *UBE3A-AS*의 정상 상태 RNA 수준을 측정하였다. 전반적으로, ASO-4.4.PS.L은 ASO-6.1.PO-1.0보다 *UBE3A-AS* RNA 수준에 대해 더 큰 효과를 가졌다(표 22). ASO-4.4.PS.L은 대부분의 CNS 영역에서 *UBE3A-AS* RNA를 감소시켰고, 측두엽, 1차 운동 피질, 뇌교, 연수, 해마, 담창구, 전두 피질(방사관), 전전두 피질 및 요추 척수에서 더 큰 효과를 가졌다. 유사하게, ASO-6.1.PO-1.0은 대부분의 CNS 영역에서 *UBE3A-AS* RNA 수준을 감소시켰고, 뇌교, 동안신경핵 및 요추 척수에서 더 큰 효과가 관찰되었다(도 11 및 표 23).

[0245] 물질 및 방법

[0246] *ASO의 투여*

[0247] 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committees) 기관 각각에 의해 승인된 프로토콜을 이용하여 노던 바이오메디칼 리서치(Northern Biomedical Research) 및 찰스 리버 래버러토리즈(Charles River Laboratories)에서 NHP 연구를 수행하였다. 체중이 2 내지 4kg인 수컷 및 암컷 사이노몰거스 마카크(마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*))를 마취시키고, 초내 요추 천자를 통해 단일 1㎖ 용량의 ASO 또는 비히클을 투여하였다. 비히클 대조군 항목(0.9% 염화나트륨)에서 동결건조 ASO의 용해에 의해 투약 용액을 제조하였고, 0.2㎛ 필터를 통해 여과시켰다. CNS 및 척수 샘플을 채취하고 나서, CNS를 4㎜ 관상면 슬라이스로 절편화하였다. 조직 샘플을 순간 냉동시키고, RNA 단리까지 -80℃에서 저장하였다.

[0248] *RNA 단리*

[0249] 4㎜ 조직 펀치를 관심 대상의 각각의 영역으로부터 취하였고, 이의 대략 절반을 RNA 단리를 위해 사용하였다. 티슈라이저 II(TissueLyser II)에서 5㎜ 스테인리스강 비드를 이용하여 수행한 조직을 붕괴 및 용해시키는 퀴아젠 RNeasy 플러스 미니 키트(74136, 퀴아젠)를 이용하여 RNA 단리를 수행하였다. 60㎕의 총 용리 용적을 위해,

2회 용적의 30㎕ 물에서 RNA를 용리시켰다. RNA XR 분석(Q33224, 써모 피셔 사이언티픽)에 의한 큐빗(Qubit)을 이용하여 RNA를 정량화시켰다. 50㎕의 총 반응 용적으로 고성능 RNA-대-cDNA 키트(4387406, 써모 피셔 사이언티픽)를 이용하여 2㎍의 입력 RNA로부터 cDNA를 합성하였다.

[0250] *조직에서의 UBE3A-AS RNA 수준의 분석*

[0251] SYBR 그린 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR)을 이용하여 사이노몰거스 마카크*UBE3A-AS* RNA 수준을 추정하였다. 2㎕의 cDNA, 1× 파워업(PowerUp) SYBR 그린 마스터 믹스(A25741, 써모 피셔 사이언티픽), 및 500 nM의 각각의 프라이머(정방향 및 역방향)를 포함하는 총 반응 용적은 10㎕였다. 순환 조건은 50℃에서 2분, 95℃에서 2분, 및 95℃에서 15초 및 60℃에서 1분의 40주기였으며, 주기마다 60℃ 단계에서 판독을 취하였다. BIO-RAD T1000 CFX96 써모사이클러 상에서 반응을 실행시켰고, 내부 대조군(*PPIA*, 정방향: GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC(서열번호 503); 역방향: CCTTTCTCTCCAGTGCTCAGA(서열번호 504)) 및 표적(*UBE3A-AS*, 정방향: CCTGTGAACTTTCAACCAGGA(서열번호 505); 역방향: GGATCAGACTCCAGGCCTTC(서열번호 506)) 반응을 별개로 수행하였다. 데이터를 검색하고, 바이오래드 CFX 마에스트로(BIORAD CFX Maestro) 소프트웨어를 이용하여 초기 분석을 행하였으며, 엑셀 및 JMP를 이용하여 심층 통계 분석을 수행하였다.

표 22

CNS 에서 *UBE3A-AS* RNA 수준에 대한 ASO 처리의 효과 크기

처리	처리*	코헨의 효과크기	95% 신뢰구간		FDR
비히클	ASO-4.4.PS.L	1.4	1.0	1.8	2.3E-10
ASO-6.1.PO-1.O	ASO-4.4.PS.L	1.0	0.6	1.5	6.4E-06
비히클	ASO-6.1.PO-1.O	0.3	-0.06	0.7	0.09

FDR 조정 P 값을 이용하는 스튜던트 t-검정
코헨의 효과크기: 0.2, 작음; 0.5, 중간; 0.8, 큼; 1.2, 매우 큼
약어: FDR, 위발견율

[0252]

표 23

CNS 영역에서 *UBE3A-AS* RNA 수준에 대한 ASO 처리의 효과

CNS 영역	ASO	차이	표준오차	t 비	조정 P
미상핵	ASO-6.1.PO-1.O	0.10	0.22	0.46	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.21	0.22	-0.94	0.6
소뇌	ASO-6.1.PO-1.O	-0.11	0.09	-1.15	0.5
	ASO-4.4.PS.L	-0.05	0.09	-0.53	0.8
전두 피질	ASO-6.1.PO-1.O	0.01	0.27	0.04	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.71	0.27	-2.66	0.05
전두 피질 (방사관)	ASO-6.1.PO-1.O	-0.08	0.22	-0.34	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.62	0.22	-2.79	0.04
담창구	ASO-6.1.PO-1.O	0.10	0.24	0.40	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.38	0.24	-1.54	0.3
해마	ASO-6.1.PO-1.O	-0.19	0.21	-0.91	0.6
	ASO-4.4.PS.L	-0.57	0.21	-2.66	0.05
척수(요추)	ASO-6.1.PO-1.O	-0.32	0.20	-1.63	0.2
	ASO-4.4.PS.L	-0.87	0.20	-4.46	0.004
연수	ASO-6.1.PO-1.O	-0.24	0.20	-1.16	0.45
	ASO-4.4.PS.L	-0.32	0.20	-1.59	0.3
동안신경핵	ASO-6.1.PO-1.O	-0.37	0.29	-1.27	0.4
	ASO-4.4.PS.L	-0.18	0.29	-0.62	0.8
뇌교	ASO-6.1.PO-1.O	-0.27	0.21	-1.30	0.4
	ASO-4.4.PS.L	-0.47	0.21	-2.25	0.1
운동 피질	ASO-6.1.PO-1.O	-0.19	0.30	-0.65	0.8
	ASO-4.4.PS.L	-0.59	0.30	-1.99	0.1
피곡	ASO-6.1.PO-1.O	0.07	0.15	0.44	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.04	0.15	-0.25	0.9
측두엽	ASO-6.1.PO-1.O	0.13	0.25	0.54	0.8
	ASO-4.4.PS.L	-0.59	0.25	-2.39	0.08
시상	ASO-6.1.PO-1.O	-0.02	0.14	-0.14	0.9
	ASO-4.4.PS.L	-0.20	0.14	-1.46	0.3

비히클에 대해 던넷 다중 비교 검정과 함께 일원 ANOVA.

[0253]

[0255] **실시예 7: 스플라이싱된 *UBE3A-AS* 전사체의 엑손 경계를 표적화하는 ASO**

[0256] 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *UBE3A-AS* 엑손 1 내지 5 및 *SNORD109B* 엑손 1 내지 2를 수반하는 엑손 경계이다. 표적 서열은 각각의 엑손(인접한 엑손의 5' 및 3'-말단을 나타내는 19개의 뉴클레오타이드)의 엑손 경계 상에 집중되는 38개의 뉴클레오타이드(각각의 엑손의 19개의 뉴클레오타이드)로 이루어진다. 서열의 12개의 세그먼트가 있으며, 엑손 경계는 세그먼트 1 내지 2, 2 내지 3, 3 내지 4, 5 내지 6, 7 내지 8, 9 내지 10 및 11 내지 12를 수반한다. 염색체 좌표를 표 24에 제공한다. 스플라이싱된 엑손(|, 엑손 접합) 및 개재 엑손 서열([])을 나타내는 단일의 병합된 접합 서열을 생성하였다. 엑손 접합을 표적화하는 ASO(20-, 19 및 18-량체)를

표 25에 제공한다.

[0257] *병합된 접합-서열*

AATGAAATCTTCTGATTTG|TAAGACATGCTGCCAAGAG[]ATTAGTTTTACACCTT
CAG|GATAAAGACTGCTGAGAAG[]GTTTAAGGATGCTATTCTG|AAAAGACTGTG
GAGGAAGA[]TTAAGGAAACCATCTCTGG|GATAAGGATGACTGAGGAA[]ATTTAA
GGATGCCACTCTG|GTTAAAAGCTGAAACAACT[]GAAACTTCAGGGAAAAGAG|A
AGGCCTGGAATCTGATCC (서열번호 489).

| = 3'-5' 엑손 접합

[] = 개재 엑손 서열

[0258]

표 24

표적화된 엑손 접합의 염색체 15 좌표			
세그먼트	시작	종료	엑손 영역
1	25,511,743	25,511,761	3′
2	25,512,059	25,512,079	5′
3	25,512,175	25,512,191	3′
4	25,513,475	25,513,493	5′
5	25,513,582	25,513,600	3′
6	25,514,752	25,514,770	5′
7	25,514,863	25,514,881	3′
8	25,516,564	25,516,582	5′
9	25,516,663	25,516,681	3′
10	25,522,514	25,522,532	5′
11	25,522,537	25,522,556	3′
12	25,523,994	25,524,012	5′
인간 염색체 15 좌표 (hg19 기준 조립체)			

[0259]

표 25

접합 ASO 및 대응하는 표적 영역의 목록				
ASO 크기	표적 서열 (5'-3')		ASO 서열 (5'-3')	
20 량체	GAAACCAUCUCUGGGAUAAG	서열번호 393	CTTATCCCAGAGATGGTTTC	서열번호 441
	AAACCAUCUCUGGGAUAAGG	서열번호 394	CCTTATCCCAGAGATGGTTT	서열번호 442
	AACCAUCUCUGGGAUAAGGA	서열번호 395	TCCTTATCCCAGAGATGGTT	서열번호 443
	ACCAUCUCUGGGAUAAGGAU	서열번호 396	ATCCTTATCCCAGAGATGGT	서열번호 444
	CCAUCUCUGGGAUAAGGAUG	서열번호 397	CATCCTTATCCCAGAGATGG	서열번호 445
	CAUCUCUGGGAUAAGGAUGA	서열번호 398	TCATCCTTATCCCAGAGATG	서열번호 446
	AUCUCUGGGAUAAGGAUGAC	서열번호 399	GTCATCCTTATCCCAGAGAT	서열번호 447
	UCUCUGGGAUAAGGAUGACU	서열번호 400	AGTCATCCTTATCCCAGAGA	서열번호 448
	CUCUGGGAUAAGGAUGACUG	서열번호 401	CAGTCATCCTTATCCCAGAG	서열번호 449
	UCUGGGAUAAGGAUGACUGA	서열번호 402	TCAGTCATCCTTATCCCAGA	서열번호 450
	CUGGGAUAAGGAUGACUGAG	서열번호 403	CTCAGTCATCCTTATCCCAG	서열번호 451
	UGGGAUAAGGAUGACUGAGG	서열번호 404	CCTCAGTCATCCTTATCCCA	서열번호 452
	GGGAUAAGGAUGACUGAGGA	서열번호 405	TCCTCAGTCATCCTTATCCC	서열번호 453
	GGAUAAGGAUGACUGAGGAA	서열번호 406	TTCCTCAGTCATCCTTATCC	서열번호 454
	GCUGAAACAACUGAAACUUC	서열번호 407	GAAGTTTCAGTTGTTTCAGC	서열번호 455
	GAAACAACUGAAACUUCAGG	서열번호 408	CCTGAAGTTTCAGTTGTTTC	서열번호 456
	AAACAACUGAAACUUCAGGG	서열번호 409	CCCTGAAGTTTCAGTTGTTT	서열번호 457
	AACAACUGAAACUUCAGGGA	서열번호 410	TCCCTGAAGTTTCAGTTGTT	서열번호 458
	ACAACUGAAACUUCAGGGAA	서열번호 411	TTCCCTGAAGTTTCAGTTGT	서열번호 459
	CAACUGAAACUUCAGGGAAA	서열번호 412	TTTCCCTGAAGTTTCAGTTG	서열번호 460
	ACUGAAACUUCAGGGAAAAG	서열번호 413	CTTTTCCCTGAAGTTTCAGT	서열번호 461
19 량체	AACCAUCUCUGGGAUAAGG	서열번호 414	CCTTATCCCAGAGATGGTT	서열번호 462
	ACCAUCUCUGGGAUAAGGA	서열번호 415	TCCTTATCCCAGAGATGGT	서열번호 463
	CCAUCUCUGGGAUAAGGAU	서열번호 416	ATCCTTATCCCAGAGATGG	서열번호 464
	CAUCUCUGGGAUAAGGAUG	서열번호 417	CATCCTTATCCCAGAGATG	서열번호 465
	AUCUCUGGGAUAAGGAUGA	서열번호 418	TCATCCTTATCCCAGAGAT	서열번호 466

[0260]

	UCUCUGGGAUAAGGAUGAC	서열번호 419	GTCATCCTTATCCCAGAGA	서열번호 467
	CUCUGGGAUAAGGAUGACU	서열번호 420	AGTCATCCTTATCCCAGAG	서열번호 468
	UCUGGGAUAAGGAUGACUG	서열번호 421	CAGTCATCCTTATCCCAGA	서열번호 469
	CUGGGAUAAGGAUGACUGA	서열번호 422	TCAGTCATCCTTATCCCAG	서열번호 470
	UGGGAUAAGGAUGACUGAG	서열번호 423	CTCAGTCATCCTTATCCCA	서열번호 471
	GGGAUAAGGAUGACUGAGG	서열번호 424	CCTCAGTCATCCTTATCCC	서열번호 472
	GGAUAAGGAUGACUGAGGA	서열번호 425	TCCTCAGTCATCCTTATCC	서열번호 473
	AACAACUGAAACUUCAGGG	서열번호 426	CCCTGAAGTTTCAGTTGTT	서열번호 474
	ACAACUGAAACUUCAGGGA	서열번호 427	TCCCTGAAGTTTCAGTTGT	서열번호 475
	CAACUGAAACUUCAGGGAA	서열번호 428	TTCCCTGAAGTTTCAGTTG	서열번호 476
	CAACUGAAACUUCAGGGAA	서열번호 429	TTCCCTGAAGTTTCAGTTG	서열번호 477
18 량체	CCAUCUCUGGGAUAAGGA	서열번호 430	TCCTTATCCCAGAGATGG	서열번호 478
	CAUCUCUGGGAUAAGGAU	서열번호 431	ATCCTTATCCCAGAGATG	서열번호 479
	AUCUCUGGGAUAAGGAUG	서열번호 432	CATCCTTATCCCAGAGAT	서열번호 480
	UCUCUGGGAUAAGGAUGA	서열번호 433	TCATCCTTATCCCAGAGA	서열번호 481
	CUCUGGGAUAAGGAUGAC	서열번호 434	GTCATCCTTATCCCAGAG	서열번호 482
	UCUGGGAUAAGGAUGACU	서열번호 435	AGTCATCCTTATCCCAGA	서열번호 483
	CUGGGAUAAGGAUGACUG	서열번호 436	CAGTCATCCTTATCCCAG	서열번호 484
	UGGGAUAAGGAUGACUGA	서열번호 437	TCAGTCATCCTTATCCCA	서열번호 485
	GGGAUAAGGAUGACUGAG	서열번호 438	CTCAGTCATCCTTATCCC	서열번호 486
	GGAUAAGGAUGACUGAGG	서열번호 439	CCTCAGTCATCCTTATCC	서열번호 487
	ACAACUGAAACUUCAGGG	서열번호 440	CCCTGAAGTTTCAGTTGT	서열번호 488

[0261]

[0263] **실시예 8: UBE3a-AS 엑손 1 내지 5를 표적화하는 siRNA, shRNA 및 CRISPR 가이드 RNA**

[0264] 상기 언급한 바와 같이, 일부 실시형태에서, 개시된 올리고뉴클레오타이드는 기능성 핵산, 예컨대 siRNA, shRNA 또는 뉴클레아제 gRNA인데, 이는 표적 핵산 서열을 저해하거나, 돌연변이시키거나 결실시킨다.

[0265] UBE3a-AS 엑손 1 내지 5를 표적화하는 siRNA의 예를 표 26에 제공한다. UBE3a-AS 엑손 1 내지 5를 표적화하는 shRNA의 예를 표 27에 제공한다. UBE3a-AS 엑손 1 내지 5를 표적화하는 gRNA의 예를 표 28에 제공한다.

표 26

[0266]

siRNA 표적화 UBE3a-AS 엑손 1 내지 5			
표적 서열		siRNA	
CCCAGGUGUCCUUUAAUGAA	서열번호 507	TTCATTAAAGGACACCTGGG	서열번호 538
CCAGGUGUCCUUUAAUGAAA	서열번호 508	TTTCATTAAAGGACACCTGG	서열번호 539
UGAAAAUGCUCUUGACACCA	서열번호 509	TGGTGTCAAGAGCATTTTCA	서열번호 540
GAAAAUGCUCUUGACACCAA	서열번호 510	TTGGTGTCAAGAGCATTTTC	서열번호 541
AAAUGCUCUUGACACCAAUG	서열번호 511	CATTGGTGTCAAGAGCATTT	서열번호 542
AGAUCAGUAGCUUCCUUUAC	서열번호 512	GTAAAGGAAGCTACTGATCT	서열번호 543
UCAGUAGCUUCCUUUACCGA	서열번호 513	TCGGTAAAGGAAGCTACTGA	서열번호 544
UCUAGAACAUUGAGCUAUGG	서열번호 514	CCATAGCTCAATGTTCTAGA	서열번호 545
CUAGAACAUUGAGCUAUGGA	서열번호 515	TCCATAGCTCAATGTTCTAG	서열번호 546
AACAUUGAGCUAUGGAAGAC	서열번호 516	GTCTTCCATAGCTCAATGTT	서열번호 547
ACAUUGAGCUAUGGAAGACU	서열번호 517	AGTCTTCCATAGCTCAATGT	서열번호 548
CUAUGGAAGACUCCCACCUA	서열번호 518	TAGGTGGGAGTCTTCCATAG	서열번호 549
UAUGGAAGACUCCCACCUAA	서열번호 519	TTAGGTGGGAGTCTTCCATA	서열번호 550
CAAGUGCUACCGCACAGGCA	서열번호 520	TGCCTGTGCGGTAGCACTTG	서열번호 551
AAGUGCUACCGCACAGGCAU	서열번호 521	ATGCCTGTGCGGTAGCACTT	서열번호 552
UACCGCACAGGCAUGCUGCA	서열번호 522	TGCAGCATGCCTGTGCGGTA	서열번호 553
CAGGCAUGCUGCAGUGAAUU	서열번호 523	AATTCACTGCAGCATGCCTG	서열번호 554
AGGCAUGCUGCAGUGAAUUU	서열번호 524	AAATTCACTGCAGCATGCCT	서열번호 555
ACCGUUGUUUAAGGAUGCUA	서열번호 525	TAGCATCCTTAAACAACGGT	서열번호 556
CCGUUGUUUAAGGAUGCUAU	서열번호 526	ATAGCATCCTTAAACAACGG	서열번호 557
CUGUGGAGGAAGAAAACCCU	서열번호 527	AGGGTTTTCTTCCTCCACAG	서열번호 558
AAGAAAACCCUUUACCCUGU	서열번호 528	ACAGGGTAAAGGGTTTTCTT	서열번호 559
AGAAAACCCUUUACCCUGUU	서열번호 529	AACAGGGTAAAGGGTTTTCT	서열번호 560
CUCAACUGCCUGGCACUGAA	서열번호 530	TTCAGTGCCAGGCAGTTGAG	서열번호 561
AACUGCCUGGCACUGAAAAU	서열번호 531	ATTTTCAGTGCCAGGCAGTT	서열번호 562
ACUGCCUGGCACUGAAAAUG	서열번호 532	CATTTTCAGTGCCAGGCAGT	서열번호 563

[0267]

GUGUUUAAGGAAACCAUCUC	서열번호 533	GAGATGGTTTCCTTAAACAC	서열번호 564
GUUUAAGGAAACCAUCUCUG	서열번호 534	CAGAGATGGTTTCCTTAAAC	서열번호 565
AGGAAACCAUCUCUGAUAAG	서열번호 535	CTTATCAGAGATGGTTTCCT	서열번호 566
UCUUUGGCUUGUUGACACCA	서열번호 536	TGGTGTCAACAAGCCAAAGA	서열번호 567
CUUUGGCUUGUUGACACCAG	서열번호 537	CTGGTGTCAACAAGCCAAAG	서열번호 568

표 27

[0268]

shRNA 표적화 UBE3a-AS 엑손 1-5	
GGTGCCATTCTATTATAAAtaacctgacccattaTTTATAATAGAATGGCACCTTTTT	서열번호 569
GCTTTCATCAATAATGAAAtaacctgacccattaTTTCATTATTGATGAAAGCTTTTT	서열번호 570
GGTCTTTCATCAATAATGAtaacctgacccattaTCATTATTGATGAAAGACCTTTTT	서열번호 571
GAAATCTTCTGATTTGTAAtaacctgacccattaTTACAAATCAGAAGATTTCTTTTT	서열번호 572
GCACCTAAGGGAATTAGTAtaacctgacccattaTACTAATTCCCTTAGGTGCTTTTT	서열번호 573
GTTTCAACCAGGATTTAAAtaacctgacccattaTTTAAATCCTGGTTGAAACTTTTT	서열번호 574
GCTTTCAACCAGGATTTAAtaacctgacccattaTTAAATCCTGGTTGAAAGCTTTTT	서열번호 575
GGAGATGTGCCATTCTATAtaacctgacccattaTATAGAATGGCACATCTCCTTTTT	서열번호 576
GTCTTTCATCAATAATGAAtaacctgacccattaTTCATTATTGATGAAAGACTTTTT	서열번호 577
GATCAATAATGAAATCTTAtaacctgacccattaTAAGATTTCATTATTGATCTTTTT	서열번호 578
GTGTCTTTCATCAATAATAtaacctgacccattaTATTATTGATGAAAGACACTTTTT	서열번호 579
GCAATAATGAAATCTTCTAtaacctgacccattaTAGAAGATTTCATTATTGCTTTTT	서열번호 580
GCATGCTGCAGTGAATTTAtaacctgacccattaTAAATTCACTGCAGCATGCTTTTT	서열번호 581
GGAAATCTTCTGATTTGTAtaacctgacccattaTACAAATCAGAAGATTTCCTTTTT	서열번호 582
GGTATATTCTATCTAGAAAtaacctgacccattaTTTCTAGATAGAATATACCTTTTT	서열번호 583
GTGCTGCAGTGAATTTAAAtaacctgacccattaTTTAAATTCACTGCAGCACTTTTT	서열번호 584
GTGTGCCATTCTATTATAAtaacctgacccattaTTATAATAGAATGGCACACTTTTT	서열번호 585
GTTACCATCAGTGTTTAAAtaacctgacccattaTTTAAACACTGATGGTAACTTTTT	서열번호 586
GCCTGCAACCGTTGTTTAAtaacctgacccattaTTAAACAACGGTTGCAGGCTTTTT	서열번호 587
GTATGTCTTTCATCAATAAtaacctgacccattaTTATTGATGAAAGACATACTTTTT	서열번호 588

표 28

[0269]

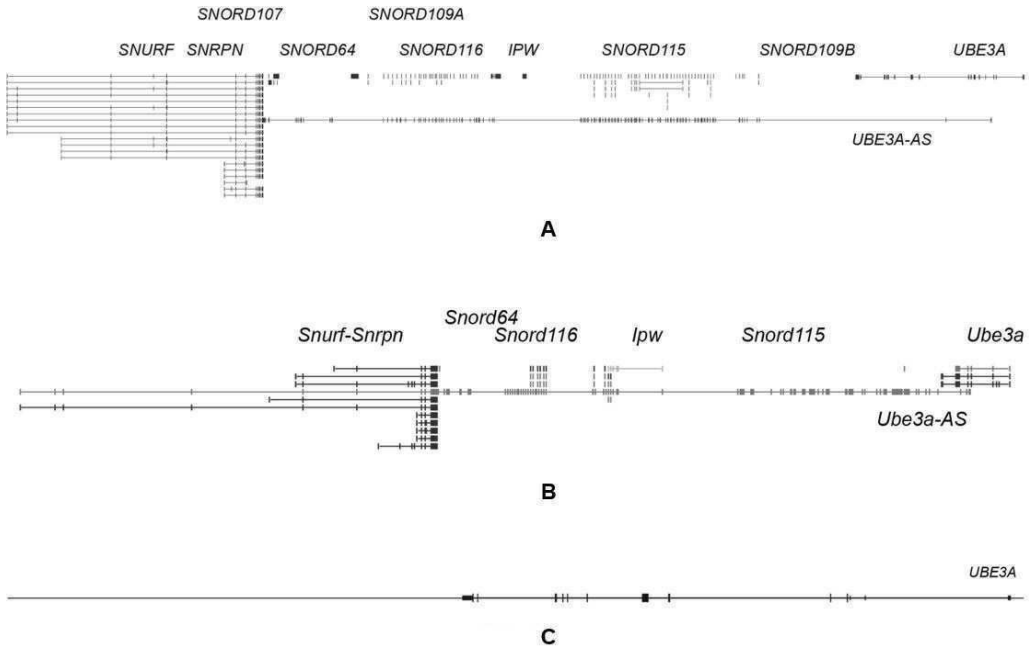
CRISPR 가이드 RNA 표적화 UBE3a-AS 엑손 1-5			
가닥	서열	서열번호	PAM
-	ACACTGATGGTAAAGTGGAC	서열번호 589	TGG
-	TAGAATATACACGTCGGTAA	서열번호 590	AGG
-	TCAACTGTCCCAGTCACAAC	서열번호 591	AGG
-	TCTAGATAGAATATACACGT	서열번호 592	CGG
-	TCTAGATAGAATATACACGT	서열번호 593	CGG
-	CTCCCCATGCACACTTGAGA	서열번호 594	AGG
-	CATCCTTAAACAACGGTTGC	서열번호 595	AGG
-	GGTGTAAAACTAATTCCCTT	서열번호 596	AGG
-	AACAACGGTTGCAGGGACAG	서열번호 597	AGG
+	TATGGAAGACTCCCACCTAA	서열번호 598	GGG
+	CTATGGAAGACTCCCACCTA	서열번호 599	AGG
+	AAGCCTTCTCAAGTGTGCAT	서열번호 600	GGG
+	CTATCTAGAACATTGAGCTA	서열번호 601	TGG
+	ACCCTCTGGTGTTGTCACAG	서열번호 602	AGG
+	AACCCTTTACCCTGTTGTTC	서열번호 603	AGG

[0271] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용하는 모든 기술적 및 과학적 용어는 개시된 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 인용된 간행물 및 이들에 인용되는 자료는 구체적으로 참고로 포함된다.

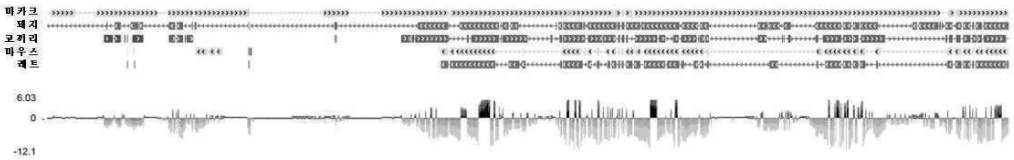
[0272] 당업자는 단지 일상적인 실험을 이용하여, 본 명세서에 기재된 본 발명의 구체적 실시형태에 대한 다수의 동등물을 인식하거나 확인할 것이다. 이러한 동등물은 다음의 청구범위에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1ac



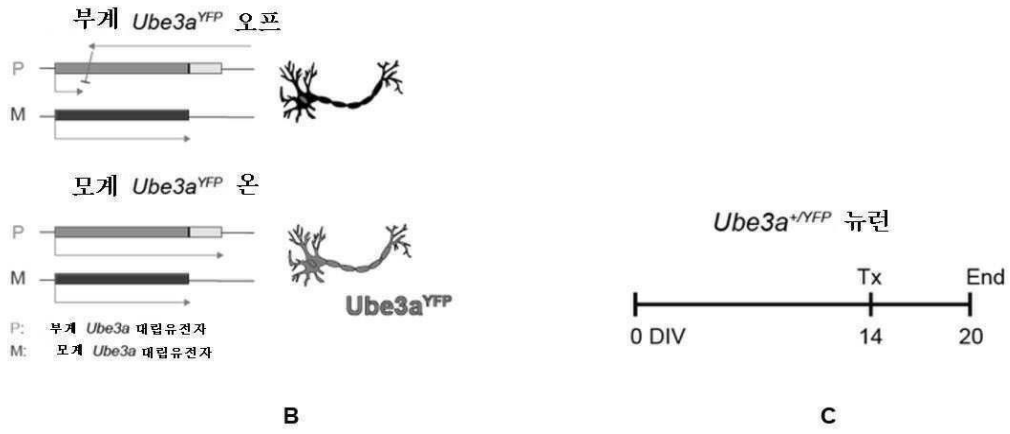
도면1d



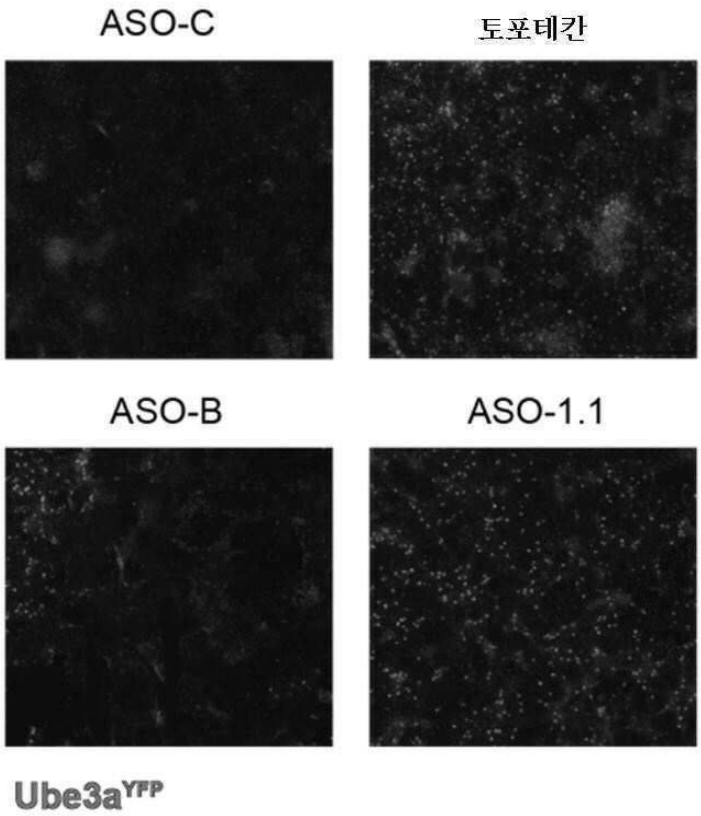
도면2a



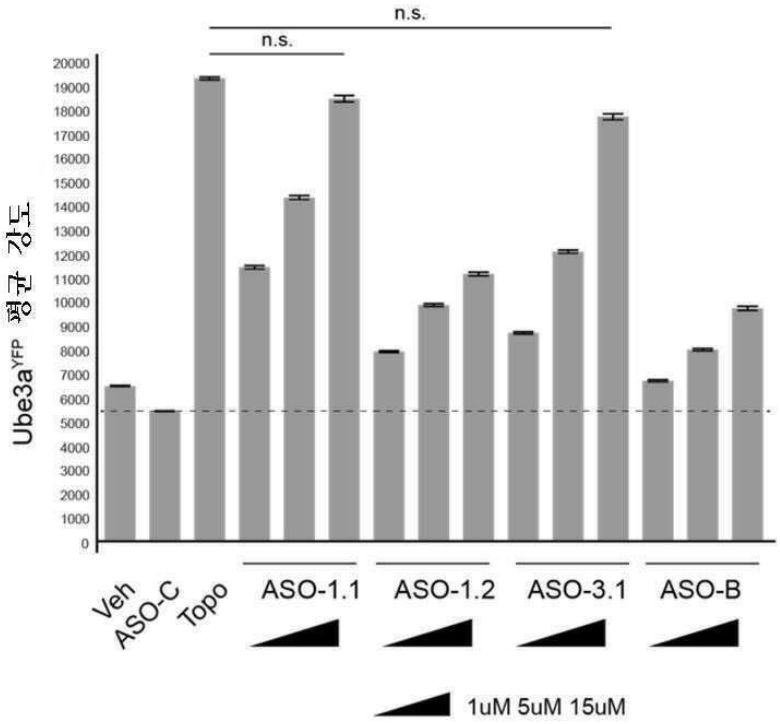
도면2bc


부계 Ube3a^YFP 오프
P
M
모계 Ube3a^YFP 온
P
M
Ube3a^YFP
P: 부계 Ube3a 대립유전자
M: 모계 Ube3a 대립유전자
B
Ube3a^+/YFP 뉴런
Tx
End
0 DIV
14
20
C

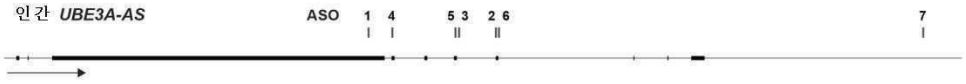
도면2d


ASO-C
토포테칸
ASO-B
ASO-1.1
Ube3a^YFP

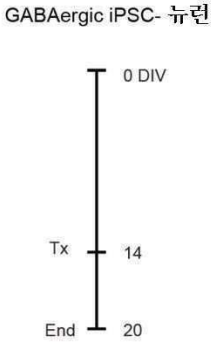
도면2e



도면3ab

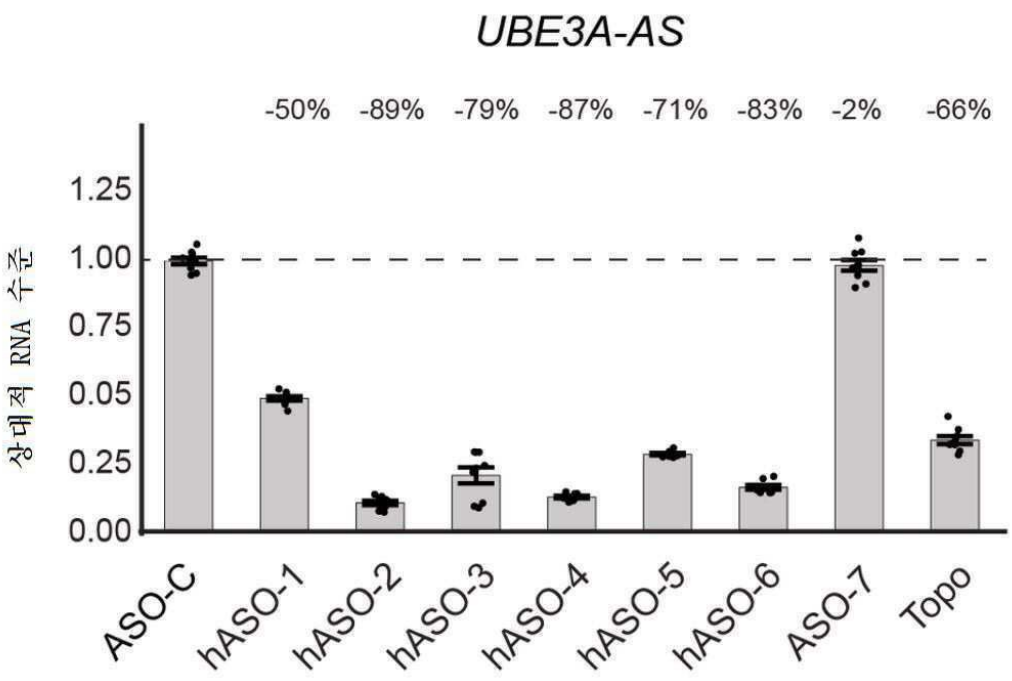


A

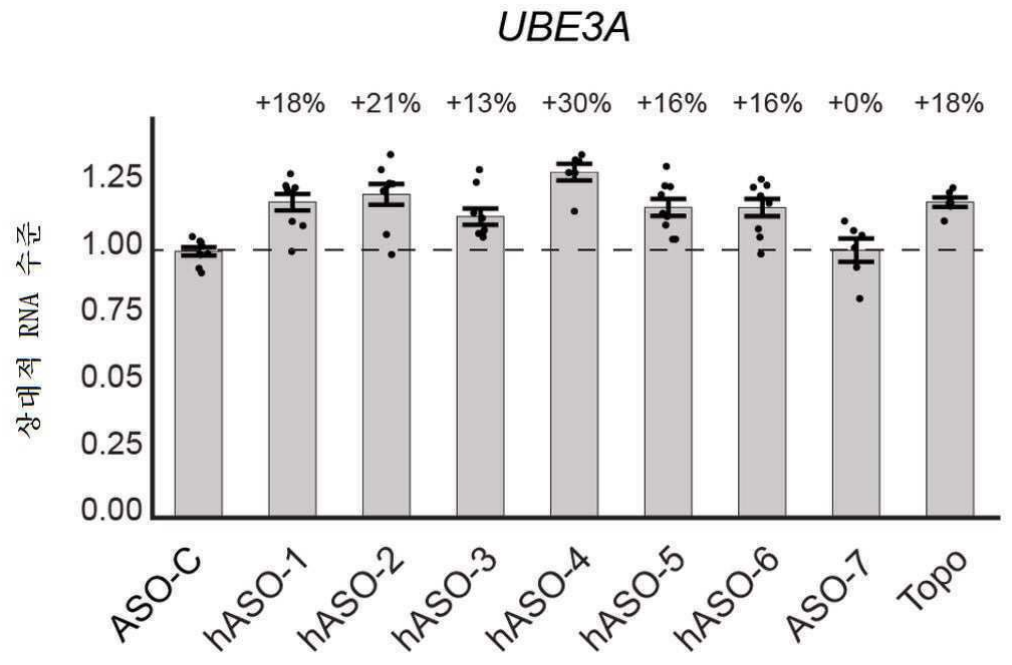


B

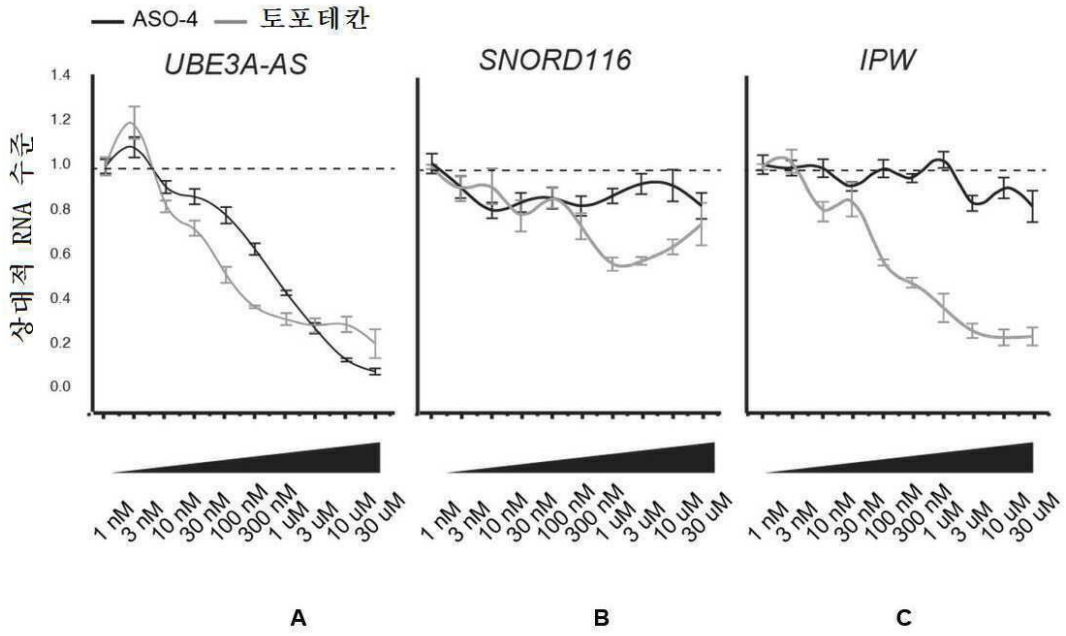
도면3c


UBE3A-AS
-50%
-89%
-79%
-87%
-71%
-83%
-2%
-66%
상대적 RNA 수준
1.25
1.00
0.75
0.05
0.25
0.00
ASO-C
hASO-1
hASO-2
hASO-3
hASO-4
hASO-5
hASO-6
ASO-7
Topo

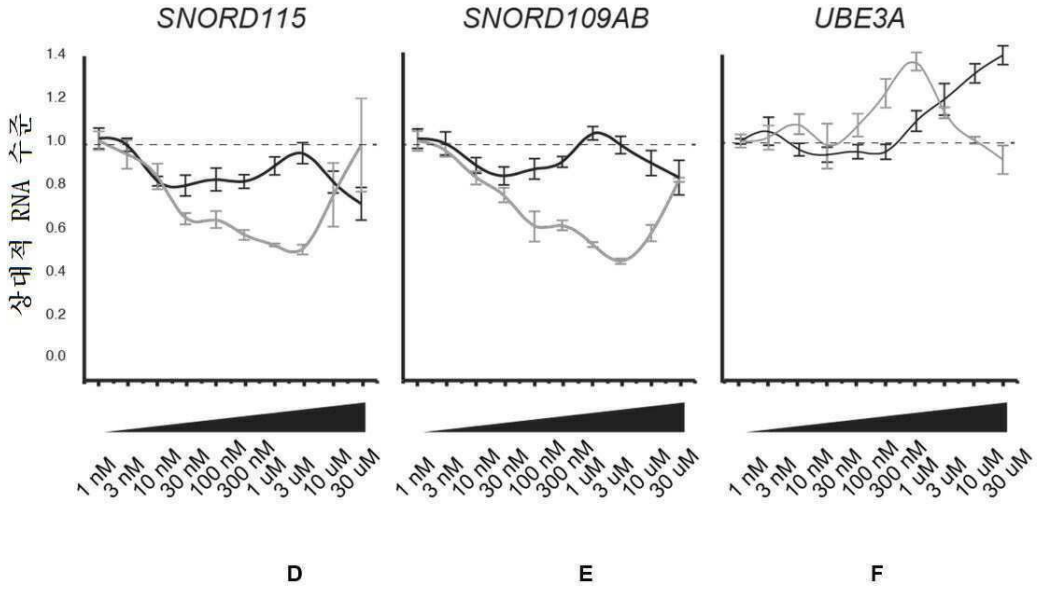
도면3d


UBE3A
+18%
+21%
+13%
+30%
+16%
+16%
+0%
+18%
상대적 RNA 수준
1.25
1.00
0.75
0.05
0.25
0.00
ASO-C
hASO-1
hASO-2
hASO-3
hASO-4
hASO-5
hASO-6
ASO-7
Topo

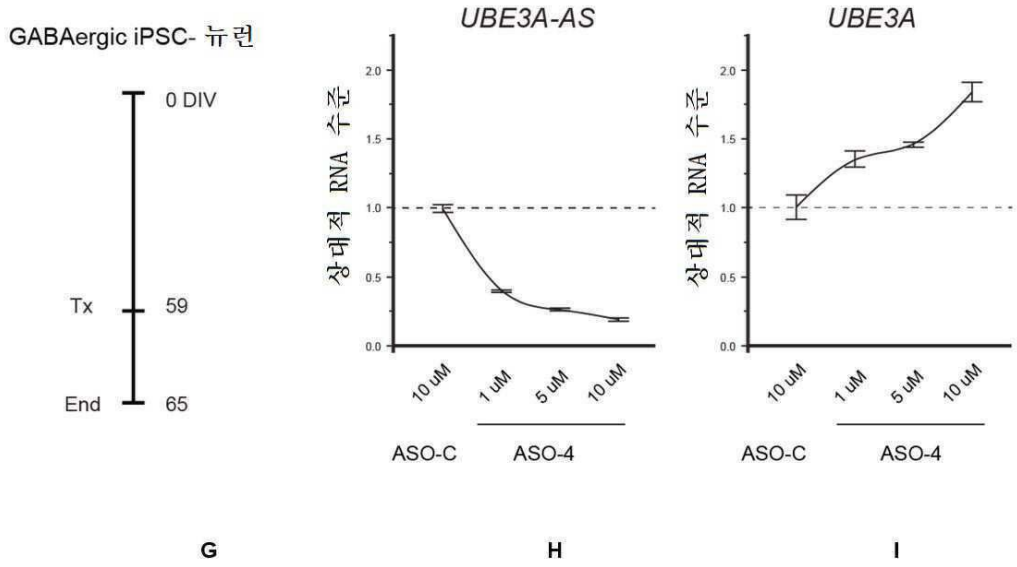
도면4ac


ASO-4
토포테칸
UBE3A-AS
SNORD116
IPW
상대적 RNA 수준
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1 nM
3 nM
10 nM
30 nM
100 nM
300 nM
1 uM
3 uM
10 uM
30 uM
A
B
C

도면4df

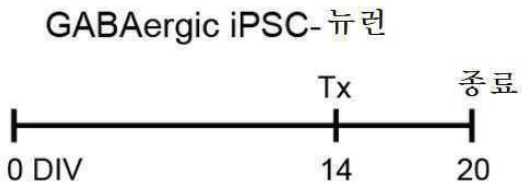

SNORD115
SNORD109AB
UBE3A
상대적 RNA 수준
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1 nM
3 nM
10 nM
30 nM
100 nM
300 nM
1 uM
3 uM
10 uM
30 uM
D
E
F

도면4gi

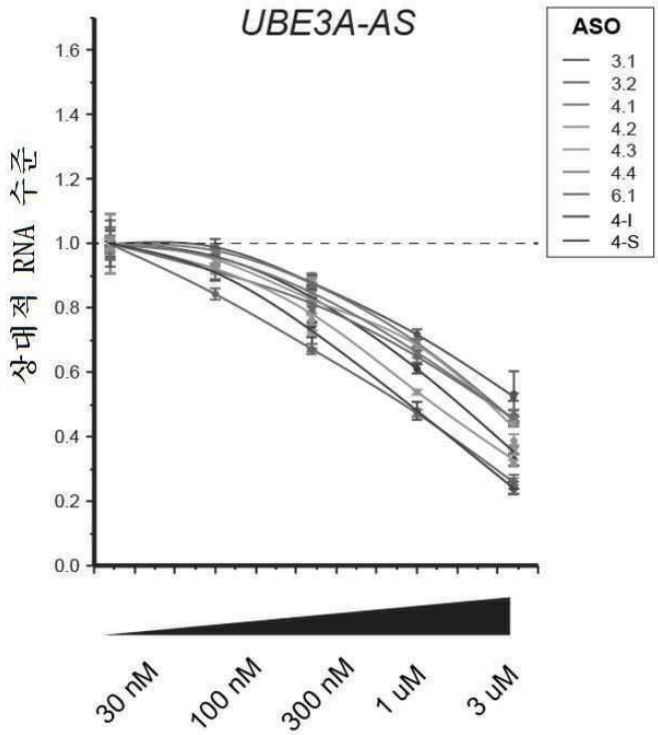

GABAergic iPSC- 뉴런
0 DIV
Tx
59
End
65
UBE3A-AS
상대적 RNA 수준
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10 uM
1 uM
5 uM
10 uM
ASO-C
ASO-4
UBE3A
상대적 RNA 수준
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10 uM
1 uM
5 uM
10 uM
ASO-C
ASO-4

G H I

도면5ab

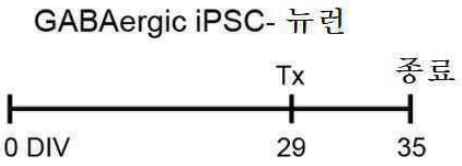

GABAergic iPSC-뉴런
Tx
종료
0 DIV
14
20

A

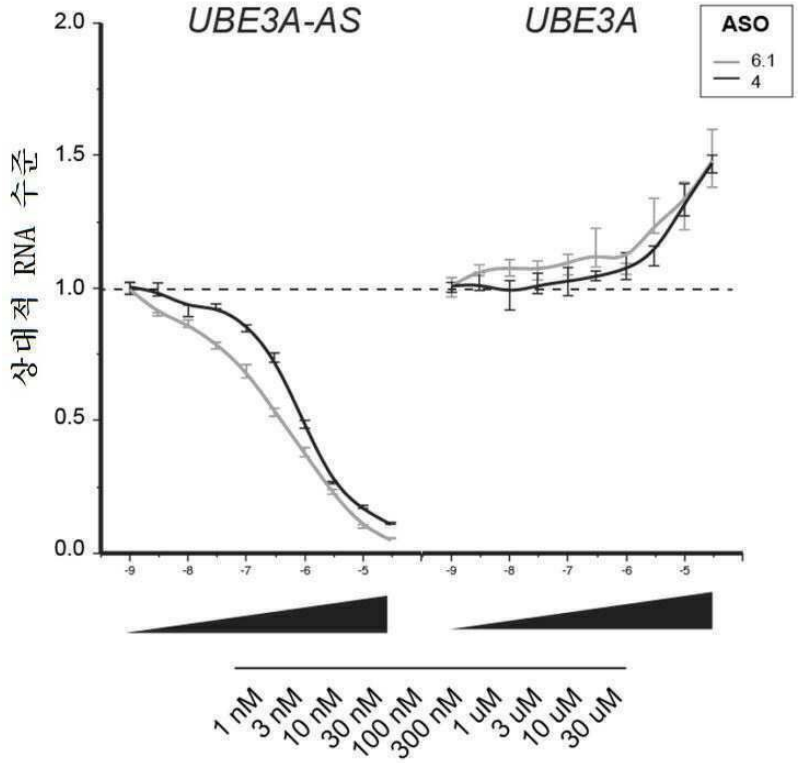

UBE3A-AS
ASO
3.1
3.2
4.1
4.2
4.3
4.4
6.1
4-I
4-S
상대적 RNA 수준
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
30 nM
100 nM
300 nM
1 uM
3 uM

B

도면5cd

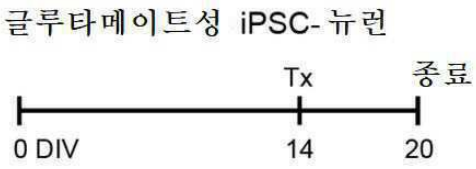

GABAergic iPSC- 뉴런
Tx
종료
0 DIV
29
35

C

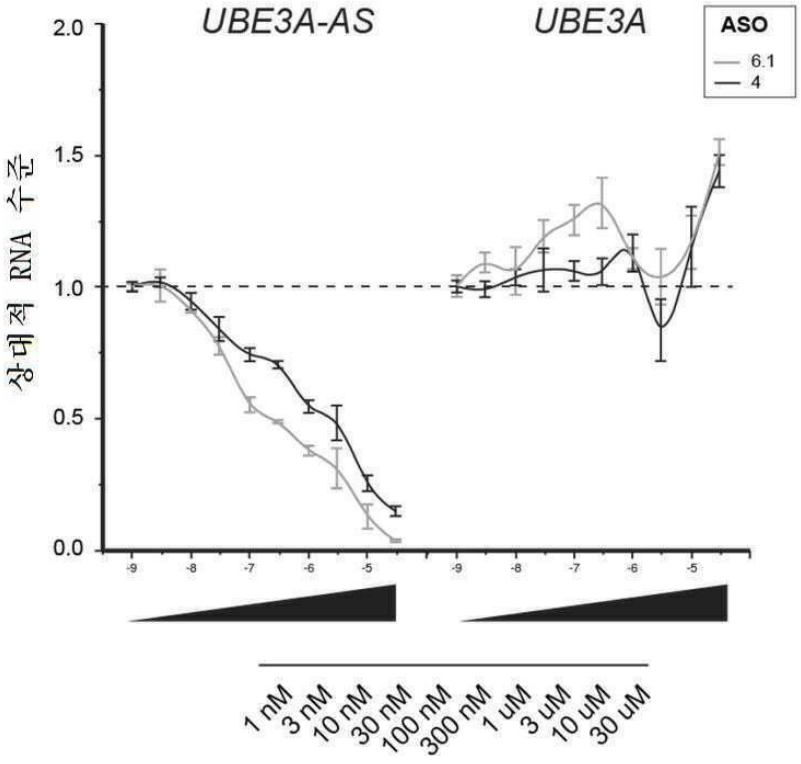

UBE3A-AS
UBE3A
ASO
6.1
4
상대적 RNA 수준
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-9
-8
-7
-6
-5
1 nM
3 nM
10 nM
30 nM
100 nM
300 nM
1 uM
3 uM
10 uM
30 uM

D

도면5ef

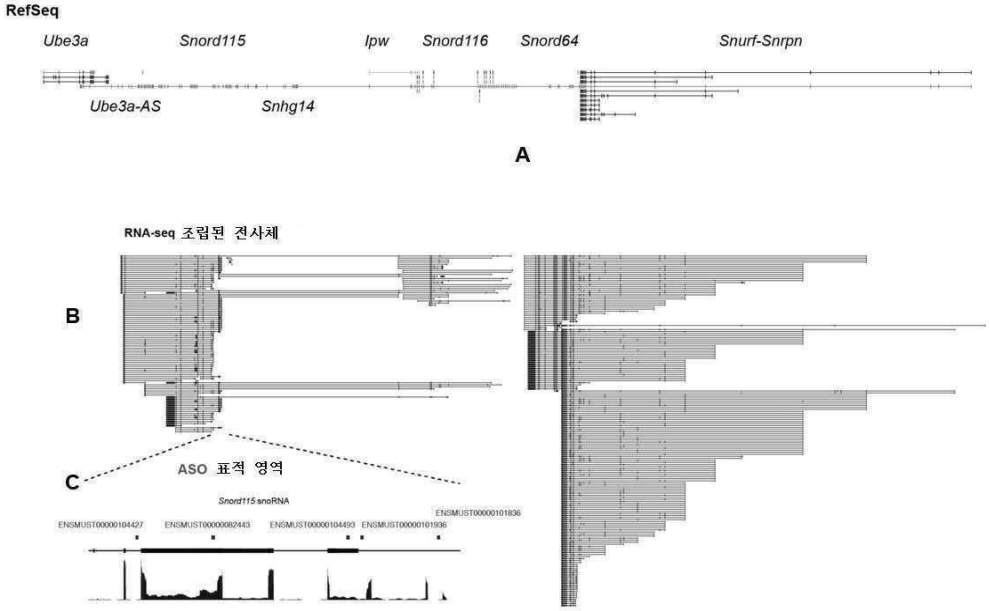

글루타메이트성 iPSC-뉴런
Tx
종료
0 DIV
14
20

E

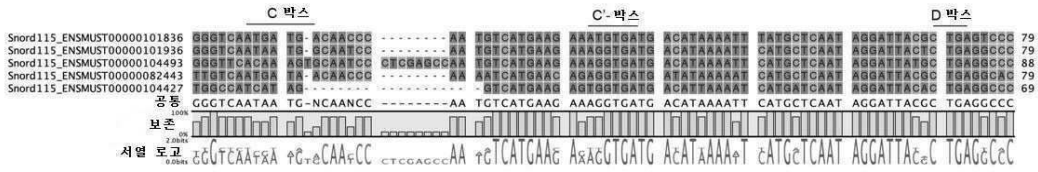

UBE3A-AS
UBE3A
ASO
6.1
4
상대적 RNA 수준
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-9
-8
-7
-6
-5
1 nM
3 nM
10 nM
30 nM
100 nM
300 nM
1 uM
3 uM
10 uM
30 uM

F

도면6ac



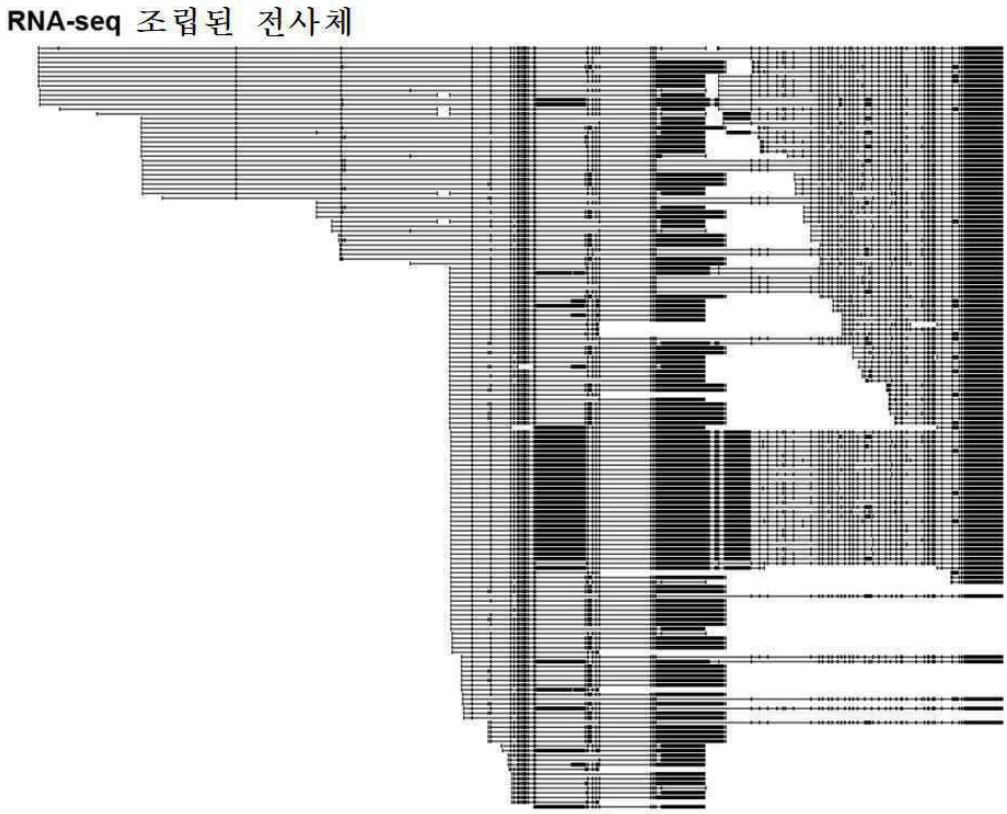
도면6d



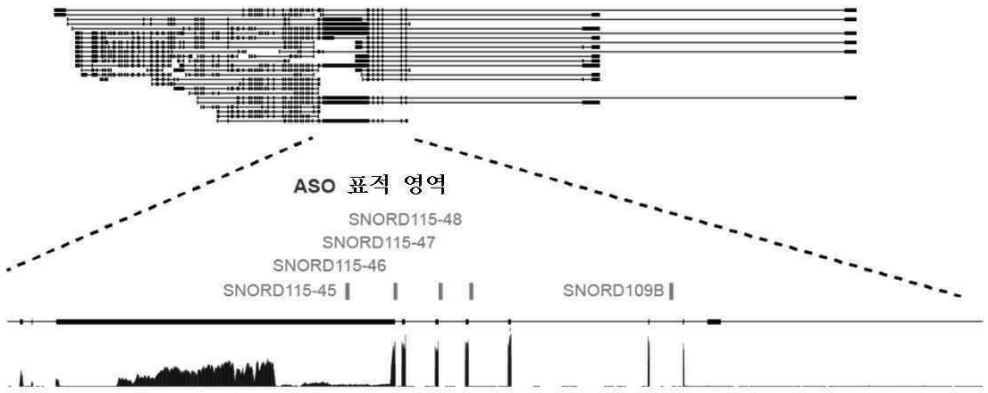
도면7a



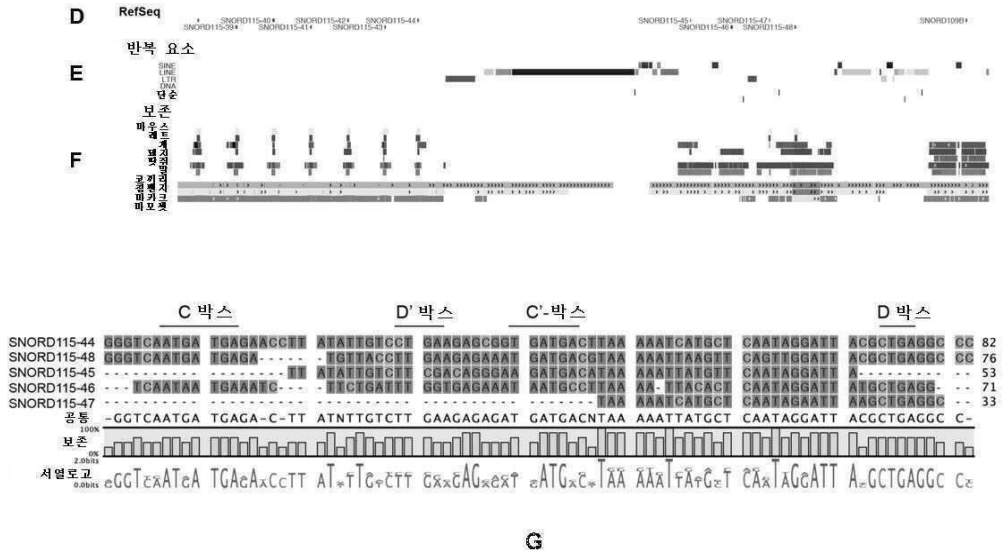
도면7b


RNA-seq 조립된 전사체

도면7c

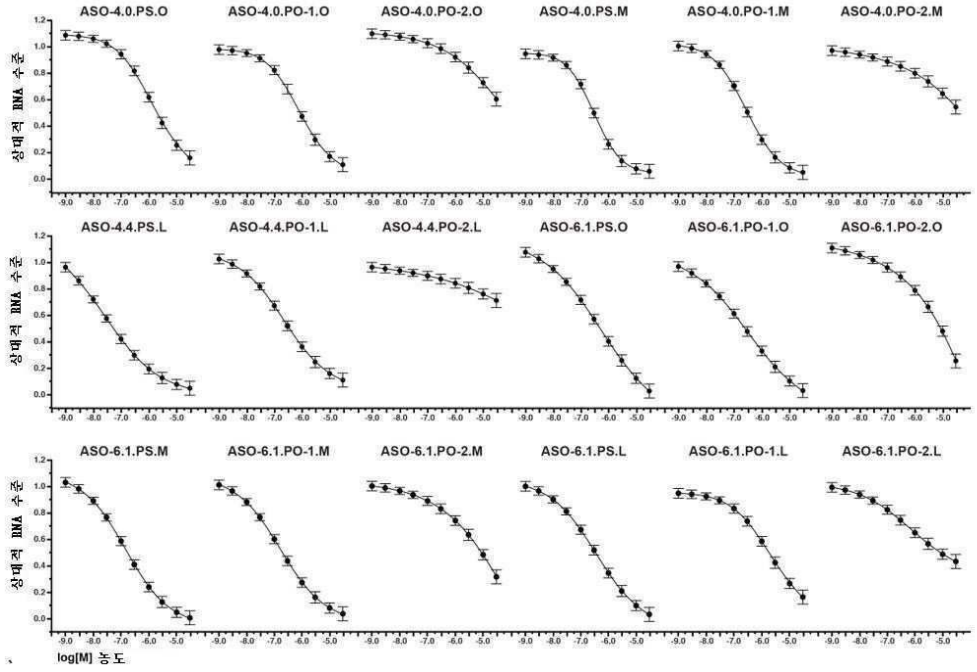

ASO 표적 영역
SNORD115-48
SNORD115-47
SNORD115-46
SNORD115-45
SNORD109B

도면7dg

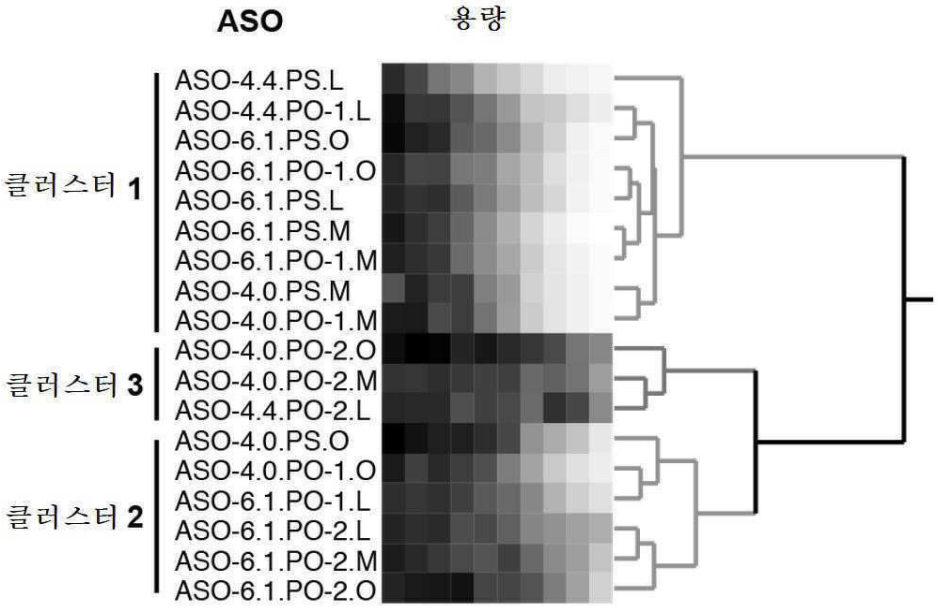

D
RefSeq
E
반복 요소
F
보존
C 박스
D' 박스
C'-박스
D 박스
SNORD115-44
SNORD115-48
SNORD115-45
SNORD115-46
SNORD115-47
공통
보존
서열로고

G

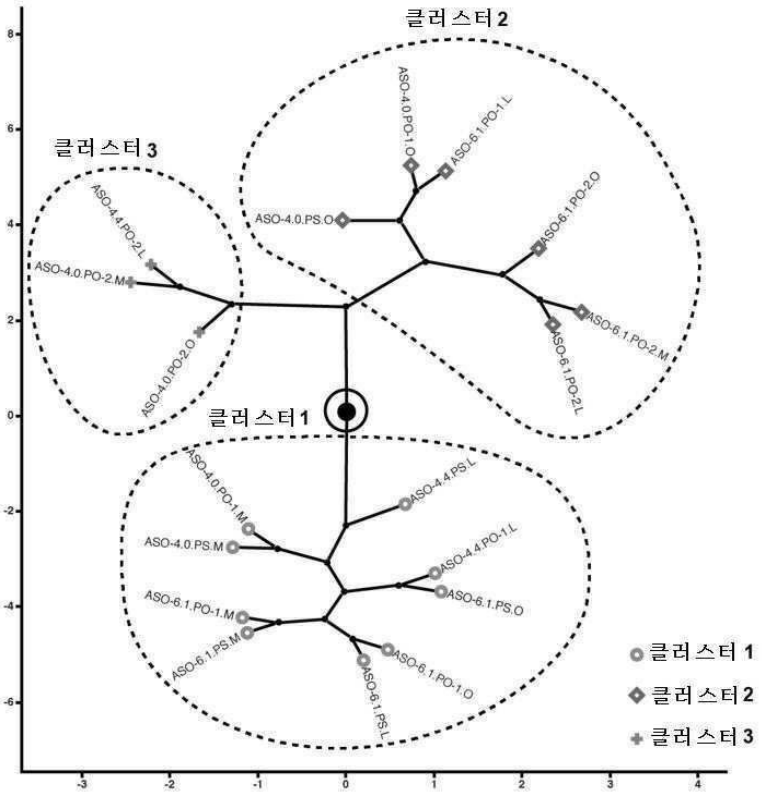
도면8a


ASO-4.0.PS.O
ASO-4.0.PO-1.O
ASO-4.0.PO-2.O
ASO-4.0.PS.M
ASO-4.0.PO-1.M
ASO-4.0.PO-2.M
ASO-4.4.PS.L
ASO-4.4.PO-1.L
ASO-4.4.PO-2.L
ASO-6.1.PS.O
ASO-6.1.PO-1.O
ASO-6.1.PO-2.O
ASO-6.1.PS.M
ASO-6.1.PO-1.M
ASO-6.1.PO-2.M
ASO-6.1.PS.L
ASO-6.1.PO-1.L
ASO-6.1.PO-2.L
상대적 RNA 수준
log[M] 농도

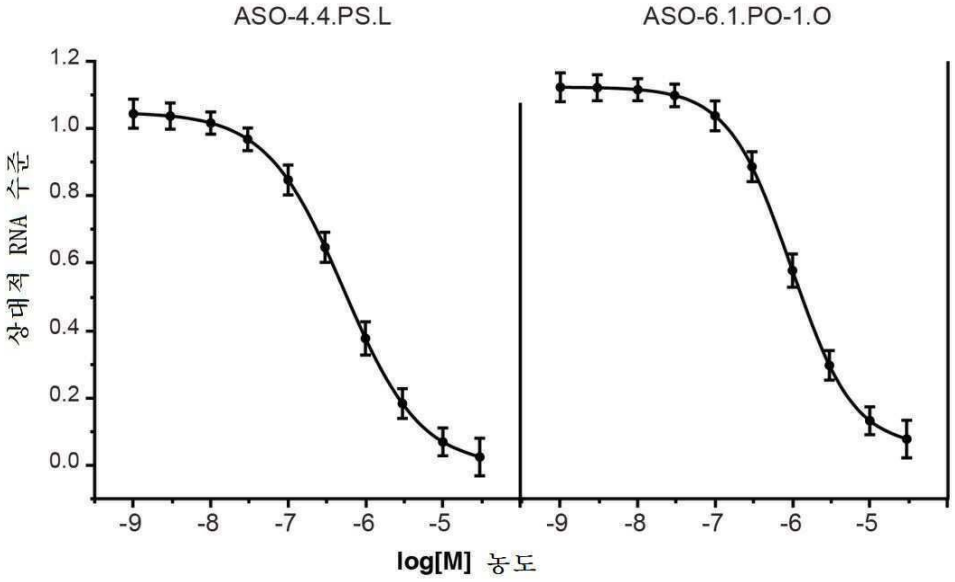
도면8b


ASO
용량
클러스터 1
ASO-4.4.PS.L
ASO-4.4.PO-1.L
ASO-6.1.PS.O
ASO-6.1.PO-1.O
ASO-6.1.PS.L
ASO-6.1.PS.M
ASO-6.1.PO-1.M
ASO-4.0.PS.M
ASO-4.0.PO-1.M
클러스터 3
ASO-4.0.PO-2.O
ASO-4.0.PO-2.M
ASO-4.4.PO-2.L
클러스터 2
ASO-4.0.PS.O
ASO-4.0.PO-1.O
ASO-6.1.PO-1.L
ASO-6.1.PO-2.L
ASO-6.1.PO-2.M
ASO-6.1.PO-2.O

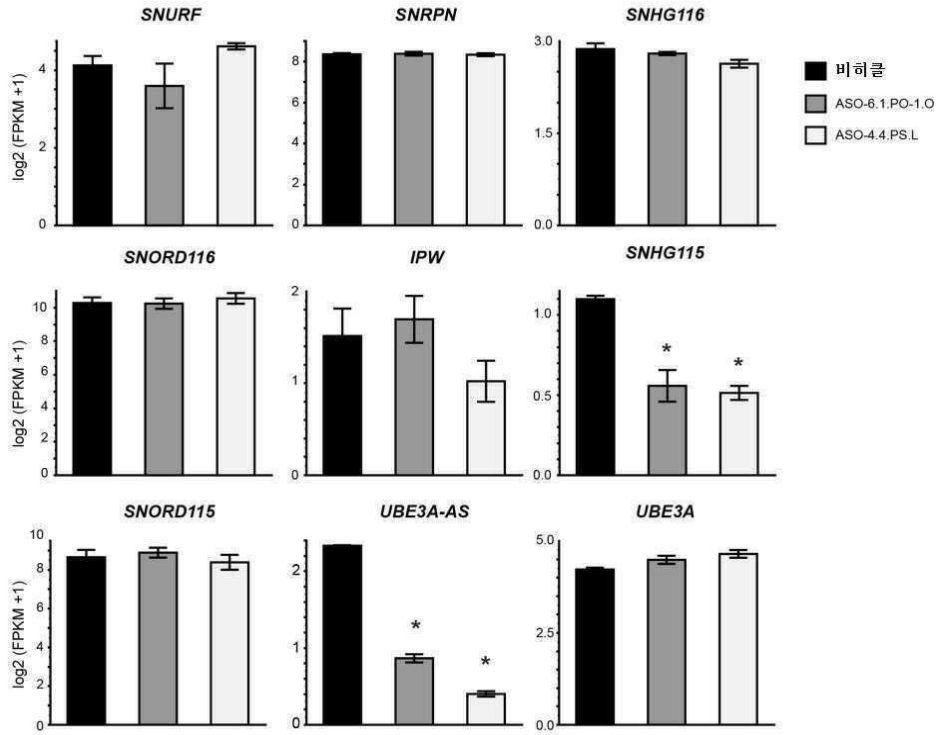
도면8c


클러스터 2
클러스터 3
클러스터 1
ASO-4.0.PO-1.O
ASO-6.1.PO-1.L
ASO-4.0.PS.O
ASO-6.1.PO-2.O
ASO-6.1.PO-2.M
ASO-6.1.PO-2.L
ASO-4.4.PO-2.L
ASO-4.0.PO-2.M
ASO-4.0.PO-2.O
ASO-4.0.PO-1.M
ASO-4.4.PS.L
ASO-4.0.PS.M
ASO-4.4.PO-1.L
ASO-6.1.PS.O
ASO-6.1.PO-1.M
ASO-6.1.PS.M
ASO-6.1.PO-1.O
ASO-6.1.PS.L
클러스터 1
클러스터 2
클러스터 3

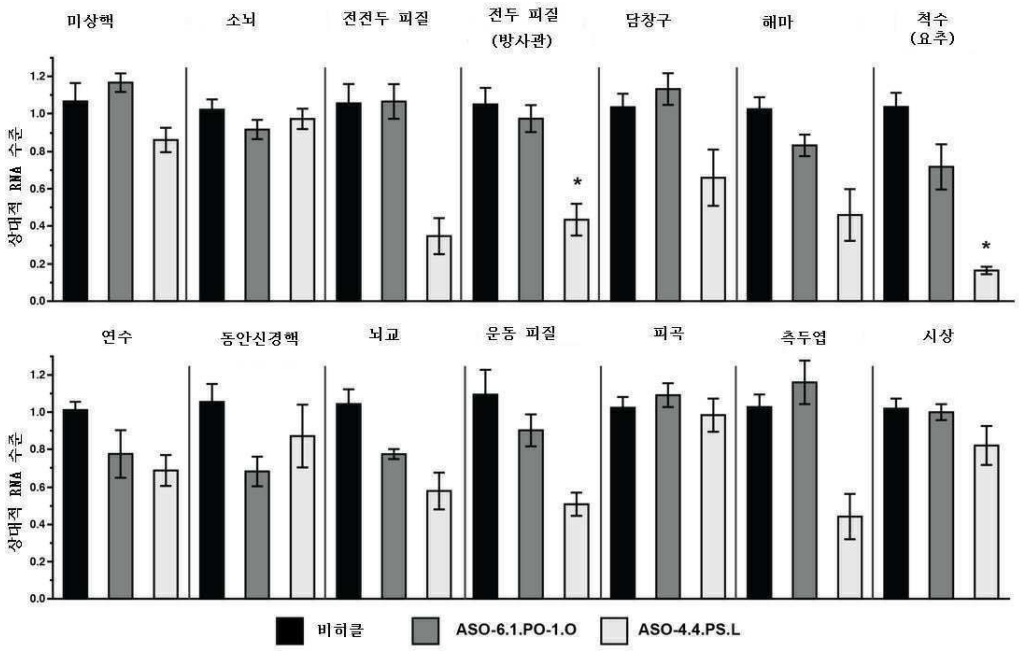
도면9


ASO-4.4.PS.L
ASO-6.1.PO-1.O
상대적 RNA 수준
log[M] 농도

도면10


SNURF
SNRPN
SNHG116
SNORD116
IPW
SNHG115
SNORD115
UBE3A-AS
UBE3A
log2 (FPKM +1)
비히클
ASO-6.1.PO-1.O
ASO-4.4.PS.L

도면11



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM

<120> ANGELMAN SYNDROME ANTISENSE TREATMENT

<130> IPA200465-US-D1-1

<140> 17/523,456

<141> 2021-11-10

<150> 16/767,916

<151> 2020-05-28

<150> PCT/US2018/063416

<151> 2018-11-30

<150> 62/676,034

<151> 2018-05-24

<150> 62/593,431

<151> 2017-12-01

<160> 605

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

atgatgatat ggaagaaaag cactctttgg cctgttgtga ctgggacagt tgacagcacc 60

caggtgtcct ttaatgaaaa tgctcttgac accaatgcat cctagcatca cagcttcagg 120

aagccttctc aagtgtgcat ggggagtact atgtctttca tcaataatga aatcttctga 180

tttg 184

<210> 2

<211> 133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

taagacatgc tgccaagaga tgtgccattc tattataaaa gatcagtagc ttcctttacc 60

gacgtgtata ttctatctag aacattgagc tatggaagac tcccacctaa gggaattagt 120

tttacacctt cag 133

<210> 3

<211> 125

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

ataaagactg ctgagaagag caccctctgg tgttgtcaca gaggcaagtg ctaccgcaca 60

ggcatgctgc agtgaattta actgatcctc tgtccctgca accgttgttt aaggatgcta 120

ttctg 125

<210> 4

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

aaaagactgt ggaggaagaa aacccttttac cctgttgttc agggagaaac tgacaccact 60

caactgcctg gcactgaaaa tgtggcatcc agtccacttt accatcagtg tttaaggaaa 120

ccatctctg 129

<210> 5

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

ataaggatga ctgaggaaga gtactctttg gcttgttgac accagcacag ctgacacacc 60

cagatatctg tttggtctcc tgtgaacttt caaccaggat ttaaggatgc cactctg 117

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

tagaggtgaa ggccaggcac 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 7

gtactcttcc tcagtcatcc 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

tgtcagtttc tccctgaaca 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

tagaatggca catctcttgg 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

gttttcttcc tccacagtct 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

ctggtgtcaa caagccaaag 20

<210> 12

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

gaaaaugcuc uugacacc 18

<210> 13

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

gaaaaugcuc uugacacca 19

<210> 14

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

gaaaaugcuc uugacaccaa 20

<210> 15

<211> 18

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

ggtgtcaaga gcattttc 18

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

tggtgtcaag agcattttc 19

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

ttggtgtcaa gagcattttc 20

<210> 18

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

caugcugcca agagaugu 18

<210> 19

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

caugcugcca agagaugug 19

<210> 20

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

caugcugcca agagaugugc 20

<210> 21

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

augcugccaa gagaugug 18

<210> 22

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

augcugccaa gagaugugc 19

<210> 23

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

augcugccaa gagaugugcc 20

<210> 24

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

ugcugccaag agaugugcc 19

<210> 25

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 25

ugcugccaag agaugugcca 20

<210> 26

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 26

gcugccaaga gaugugcca 19

<210> 27

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

gcugccaaga gaugugccau 20

<210> 28

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

cugccaagag augugcca 18

<210> 29

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 29

cugccaagag augugccau 19

<210> 30

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 30

cugccaagag augugccauu 20

<210> 31

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 31

ugccaagaga ugugccau 18

<210> 32

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 32

ugccaagaga ugugccauu 19

<210> 33

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 33

ugccaagaga ugugccauuc 20

<210> 34

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 34

gccaagagau gugccauu 18

<210> 35

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 35

gccaagagau gugccauuc 19

<210> 36

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 36

gccaagagau gugccauucu 20

<210> 37

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 37

ccaagagaug ugccauuc 18

<210> 38

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 38

ccaagagaug ugccauucu 19

<210> 39

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 39

ccaagagaug ugccauucua 20

<210> 40

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 40

caagagaugu gccauucu 18

<210> 41

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 41

caagagaugu gccauucua 19

<210> 42

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 42

caagagaugu gccauucuau 20

<210> 43

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 43

uccuuuaccg acguguau 18

<210> 44

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 44

uccuuuaccg acguguaua 19

<210> 45

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 45

uccuuuaccg acguguauau 20

<210> 46

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 46

ccuuuaccga cguguaua 18

<210> 47

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 47

ccuuuaccga cguguauau 19

<210> 48

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 48

ccuuuaccga cguguauauu 20

<210> 49

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 49

accgacgugu auauucuauc 20

<210> 50

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 50

ccgacgugua uauucuauc 19

<210> 51

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 51

ccgacgugua uauucuaucu 20

<210> 52

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 52

ucuagaacau ugagcuaugg 20

<210> 53

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 53

cauugagcua uggaagac 18

<210> 54

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 54

cuauggaaga cucccaccua 20

<210> 55

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 55

uauggaagac ucccaccua 19

<210> 56

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 56

uauggaagac ucccaccuaa 20

<210> 57

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 57

auggaagacu cccaccua 18

<210> 58

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 58

auggaagacu cccaccuaa 19

<210> 59

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 59

uggaagacuc ccaccuaa 18

<210> 60

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 60

gacucccacc uaagggaauu 20

<210> 61

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 61

acucccaccu aagggaau 18

<210> 62

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 62

acucccaccu aagggaauu 19

<210> 63

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 63

acucccaccu aagggaauua 20

<210> 64

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 64

cucccaccua agggaauu 18

<210> 65

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 65

cucccaccua agggaauua 19

<210> 66

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 66

ucccaccuaa gggaauua 18

<210> 67

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 67

acatctcttg gcagcatg 18

<210> 68

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 68

cacatctctt ggcagcatg 19

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 69

gcacatctct tggcagcatg 20

<210> 70

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 70

cacatctctt ggcagcat 18

<210> 71

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 71

gcacatctct tggcagcat 19

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 72

ggcacatctc ttggcagcat 20

<210> 73

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 73

ggcacatctc ttggcagca 19

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 74

tggcacatct cttggcagca 20

<210> 75

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 75

tggcacatct cttggcagc 19

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 76

atggcacatc tcttggcagc 20

<210> 77

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 77

tggcacatct cttggcag 18

<210> 78

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 78

atggcacatc tcttggcag 19

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 79

aatggcacat ctcttggcag 20

<210> 80

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 80

atggcacatc tcttggca 18

<210> 81

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 81

aatggcacat ctcttggca 19

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 82

gaatggcaca tctcttggca 20

<210> 83

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 83

aatggcacat ctcttggc 18

<210> 84

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 84

gaatggcaca tctcttggc 19

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 85

agaatggcac atctcttggc 20

<210> 86

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 86

gaatggcaca tctcttgg 18

<210> 87

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 87

agaatggcac atctcttgg 19

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 88

tagaatggca catctcttgg 20

<210> 89

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 89

agaatggcac atctcttg 18

<210> 90

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 90

tagaatggca catctcttg 19

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 91

atagaatggc acatctcttg 20

<210> 92

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 92

atacacgtcg gtaaagga 18

<210> 93

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 93

tatacacgtc ggtaaagga 19

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 94

atatacacgt cggtaaagga 20

<210> 95

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 95

tatacacgtc ggtaaagg 18

<210> 96

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 96

atatacacgt cggtaaagg 19

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 97

aatatacacg tcggtaaagg 20

<210> 98

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 98

gatagaatat acacgtcggt 20

<210> 99

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 99

gatagaatat acacgtcgg 19

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 100

agatagaata tacacgtcgg 20

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 101

ccatagctca atgttctaga 20

<210> 102

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 102

gtcttccata gctcaatg 18

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 103

taggtgggag tcttccatag 20

<210> 104

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 104

taggtgggag tcttccata 19

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 105

ttaggtggga gtcttccata 20

<210> 106

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 106

taggtgggag tcttccat 18

<210> 107

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 107

ttaggtggga gtcttccat 19

<210> 108

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 108

ttaggtggga gtcttcca 18

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 109

aattccctta ggtgggagtc 20

<210> 110

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 110

attcccttag gtgggagt 18

<210> 111

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 111

aattccctta ggtgggagt 19

<210> 112

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 112

taattccctt aggtgggagt 20

<210> 113

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 113

aattccctta ggtgggag 18

<210> 114

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 114

taattccctt aggtgggag 19

<210> 115

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 115

taattccctt aggtggga 18

<210> 116

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 116

gauaaagacu gcugagaaga 20

<210> 117

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 117

auaaagacug cugagaagag 20

<210> 118

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 118

uaaagacugc ugagaagagc 20

<210> 119

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 119

aaagacugcu gagaagagca 20

<210> 120

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 120

aagacugcug agaagagcac 20

<210> 121

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 121

agacugcuga gaagagcacc 20

<210> 122

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 122

gacugcugag aagagcaccc 20

<210> 123

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 123

caagugcuac cgcacaggca 20

<210> 124

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 124

aagugcuacc gcacaggcau 20

<210> 125

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 125

agugcuaccg cacaggcaug 20

<210> 126

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 126

ugcuaccgca caggcaugcu 20

<210> 127

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 127

uaccgcacag gcaugcugca 20

<210> 128

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 128

gcacaggcau gcugcaguga 20

<210> 129

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 129

cacaggcaug cugcagugaa 20

<210> 130

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 130

acaggcaugc ugcagugaau 20

<210> 131

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 131

caggcaugcu gcagugaauu 20

<210> 132

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 132

aggcaugcug cagugaauuu 20

<210> 133

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 133

ggcaugcugc agugaauuua 20

<210> 134

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 134

gcaugcugca gugaauuuaa 20

<210> 135

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 135

caugcugcag ugaauuuaac 20

<210> 136

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 136

gcagugaauu uaacugaucc 20

<210> 137

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 137

ucccugcaac cguuguuuaa 20

<210> 138

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 138

cccugcaacc guuguuuaag 20

<210> 139

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 139

tcttctcagc agtctttatc 20

<210> 140

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 140

ctcttctcag cagtctttat 20

<210> 141

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 141

gctcttctca gcagtcttta 20

<210> 142

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 142

tgctcttctc agcagtcttt 20

<210> 143

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 143

gtgctcttct cagcagtctt 20

<210> 144

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 144

ggtgctcttc tcagcagtct 20

<210> 145

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 145

gggtgctctt ctcagcagtc 20

<210> 146

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 146

tgcctgtgcg gtagcacttg 20

<210> 147

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 147

atgcctgtgc ggtagcactt 20

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 148

catgcctgtg cggtagcact 20

<210> 149

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 149

agcatgcctg tgcggtagca 20

<210> 150

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 150

tgcagcatgc ctgtgcggta 20

<210> 151

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 151

tcactgcagc atgcctgtgc 20

<210> 152

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 152

ttcactgcag catgcctgtg 20

<210> 153

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 153

attcactgca gcatgcctgt 20

<210> 154

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 154

aattcactgc agcatgcctg 20

<210> 155

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 155

aaattcactg cagcatgcct 20

<210> 156

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 156

taaattcact gcagcatgcc 20

<210> 157

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 157

ttaaattcac tgcagcatgc 20

<210> 158

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 158

gttaaattca ctgcagcatg 20

<210> 159

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 159

ggatcagtta aattcactgc 20

<210> 160

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 160

ttaaacaacg gttgcaggga 20

<210> 161

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 161

cttaaacaac ggttgcaggg 20

<210> 162

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 162

aaaagacugu ggaggaaga 19

<210> 163

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 163

aaaagacugu ggaggaagaa 20

<210> 164

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 164

aaagacugug gaggaagaa 19

<210> 165

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 165

aaagacugug gaggaagaaa 20

<210> 166

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 166

aagacugugg aggaagaaaa 20

<210> 167

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 167

agacugugga ggaagaaaac 20

<210> 168

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 168

acuguggagg aagaaaac 18

<210> 169

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 169

acuguggagg aagaaaacc 19

<210> 170

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 170

acuguggagg aagaaaaccc 20

<210> 171

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 171

cuguggagga agaaaacc 18

<210> 172

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 172

cuguggagga agaaaaccc 19

<210> 173

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 173

aaaacccuuu acccuguug 19

<210> 174

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 174

aaaacccuuu acccuguugu 20

<210> 175

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 175

aaacccuuua cccuguuguu 20

<210> 176

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 176

uuguucaggg agaaacug 18

<210> 177

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 177

uuguucaggg agaaacugac 20

<210> 178

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 178

uguucaggga gaaacuga 18

<210> 179

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 179

uguucaggga gaaacugac 19

<210> 180

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 180

uguucaggga gaaacugaca 20

<210> 181

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 181

guucagggag aaacugaca 19

<210> 182

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 182

ucagggagaa acugacacca 20

<210> 183

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 183

cagggagaaa cugacacca 19

<210> 184

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 184

agggagaaac ugacacca 18

<210> 185

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 185

agggagaaac ugacaccac 19

<210> 186

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 186

agggagaaac ugacaccacu 20

<210> 187

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 187

gggagaaacu gacaccac 18

<210> 188

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 188

gggagaaacu gacaccacu 19

<210> 189

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 189

gggagaaacu gacaccacuc 20

<210> 190

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 190

ggagaaacug acaccacu 18

<210> 191

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 191

ggagaaacug acaccacuc 19

<210> 192

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 192

ggagaaacug acaccacuca 20

<210> 193

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 193

gagaaacuga caccacuc 18

<210> 194

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 194

gagaaacuga caccacuca 19

<210> 195

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 195

gagaaacuga caccacucaa 20

<210> 196

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 196

agaaacugac accacuca 18

<210> 197

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 197

agaaacugac accacucaa 19

<210> 198

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 198

agaaacugac accacucaac 20

<210> 199

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 199

gaaacugaca ccacucaa 18

<210> 200

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 200

gaaacugaca ccacucaac 19

<210> 201

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 201

gaaacugaca ccacucaacu 20

<210> 202

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 202

aaacugacac cacucaac 18

<210> 203

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 203

aaacugacac cacucaacu 19

<210> 204

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 204

aaacugacac cacucaacug 20

<210> 205

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 205

aacugacacc acucaacu 18

<210> 206

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 206

aacugacacc acucaacug 19

<210> 207

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 207

aacugacacc acucaacugc 20

<210> 208

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 208

acugacacca cucaacug 18

<210> 209

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 209

acugacacca cucaacugc 19

<210> 210

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 210

acugacacca cucaacugcc 20

<210> 211

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 211

cugacaccac ucaacugc 18

<210> 212

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 212

cugacaccac ucaacugcc 19

<210> 213

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 213

cugacaccac ucaacugccu 20

<210> 214

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 214

ugacaccacu caacugcc 18

<210> 215

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 215

ugacaccacu caacugccu 19

<210> 216

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 216

ugacaccacu caacugccug 20

<210> 217

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 217

gacaccacuc aacugccu 18

<210> 218

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 218

gacaccacuc aacugccug 19

<210> 219

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 219

gacaccacuc aacugccugg 20

<210> 220

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 220

acaccacuca acugccug 18

<210> 221

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 221

acaccacuca acugccugg 19

<210> 222

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 222

acaccacuca acugccuggc 20

<210> 223

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 223

caccacucaa cugccuggca 20

<210> 224

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 224

gaaaaugugg cauccagu 18

<210> 225

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 225

aaaauguggc auccaguc 18

<210> 226

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 226

gcauccaguc cacuuuacca 20

<210> 227

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 227

cauccagucc acuuuacc 18

<210> 228

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 228

cauccagucc acuuuacca 19

<210> 229

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 229

cauccagucc acuuuaccau 20

<210> 230

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 230

auccagucca cuuuacca 18

<210> 231

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 231

auccagucca cuuuaccau 19

<210> 232

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 232

auccagucca cuuuaccauc 20

<210> 233

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 233

guuuaaggaa accaucucug 20

<210> 234

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 234

uuuaaggaaa ccaucucugg 20

<210> 235

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 235

uuaaggaaac caucucugg 19

<210> 236

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 236

uaaggaaacc aucucugg 18

<210> 237

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 237

tcttcctcca cagtctttt 19

<210> 238

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 238

ttcttcctcc acagtctttt 20

<210> 239

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 239

ttcttcctcc acagtcttt 19

<210> 240

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 240

tttcttcctc cacagtcttt 20

<210> 241

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 241

ttttcttcct ccacagtctt 20

<210> 242

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 242

gttttcttcc tccacagtct 20

<210> 243

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 243

gttttcttcc tccacagt 18

<210> 244

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 244

ggttttcttc ctccacagt 19

<210> 245

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 245

gggttttctt cctccacagt 20

<210> 246

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 246

ggttttcttc ctccacag 18

<210> 247

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 247

gggttttctt cctccacag 19

<210> 248

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 248

caacagggta aagggtttt 19

<210> 249

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 249

acaacagggt aaagggtttt 20

<210> 250

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 250

aacaacaggg taaagggttt 20

<210> 251

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 251

cagtttctcc ctgaacaa 18

<210> 252

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 252

gtcagtttct ccctgaacaa 20

<210> 253

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 253

tcagtttctc cctgaaca 18

<210> 254

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 254

gtcagtttct ccctgaaca 19

<210> 255

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 255

tgtcagtttc tccctgaaca 20

<210> 256

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 256

tgtcagtttc tccctgaac 19

<210> 257

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 257

tggtgtcagt ttctccctga 20

<210> 258

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 258

tggtgtcagt ttctccctg 19

<210> 259

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 259

tggtgtcagt ttctccct 18

<210> 260

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 260

gtggtgtcag tttctccct 19

<210> 261

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 261

agtggtgtca gtttctccct 20

<210> 262

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 262

gtggtgtcag tttctccc 18

<210> 263

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 263

agtggtgtca gtttctccc 19

<210> 264

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 264

gagtggtgtc agtttctccc 20

<210> 265

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 265

agtggtgtca gtttctcc 18

<210> 266

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 266

gagtggtgtc agtttctcc 19

<210> 267

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 267

tgagtggtgt cagtttctcc 20

<210> 268

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 268

gagtggtgtc agtttctc 18

<210> 269

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 269

tgagtggtgt cagtttctc 19

<210> 270

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 270

ttgagtggtg tcagtttctc 20

<210> 271

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 271

tgagtggtgt cagtttct 18

<210> 272

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 272

ttgagtggtg tcagtttct 19

<210> 273

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 273

gttgagtggt gtcagtttct 20

<210> 274

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 274

ttgagtggtg tcagtttc 18

<210> 275

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 275

gttgagtggt gtcagtttc 19

<210> 276

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 276

agttgagtgg tgtcagtttc 20

<210> 277

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 277

gttgagtggt gtcagttt 18

<210> 278

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 278

agttgagtgg tgtcagttt 19

<210> 279

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 279

cagttgagtg gtgtcagttt 20

<210> 280

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 280

agttgagtgg tgtcagtt 18

<210> 281

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 281

cagttgagtg gtgtcagtt 19

<210> 282

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 282

gcagttgagt ggtgtcagtt 20

<210> 283

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 283

cagttgagtg gtgtcagt 18

<210> 284

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 284

gcagttgagt ggtgtcagt 19

<210> 285

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 285

ggcagttgag tggtgtcagt 20

<210> 286

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 286

gcagttgagt ggtgtcag 18

<210> 287

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 287

ggcagttgag tggtgtcag 19

<210> 288

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 288

aggcagttga gtggtgtcag 20

<210> 289

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 289

ggcagttgag tggtgtca 18

<210> 290

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 290

aggcagttga gtggtgtca 19

<210> 291

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 291

caggcagttg agtggtgtca 20

<210> 292

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 292

aggcagttga gtggtgtc 18

<210> 293

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 293

caggcagttg agtggtgtc 19

<210> 294

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 294

ccaggcagtt gagtggtgtc 20

<210> 295

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 295

caggcagttg agtggtgt 18

<210> 296

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 296

ccaggcagtt gagtggtgt 19

<210> 297

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 297

gccaggcagt tgagtggtgt 20

<210> 298

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 298

tgccaggcag ttgagtggtg 20

<210> 299

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 299

actggatgcc acattttc 18

<210> 300

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 300

gactggatgc cacatttt 18

<210> 301

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 301

tggtaaagtg gactggatgc 20

<210> 302

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 302

ggtaaagtgg actggatg 18

<210> 303

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 303

tggtaaagtg gactggatg 19

<210> 304

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 304

atggtaaagt ggactggatg 20

<210> 305

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 305

tggtaaagtg gactggat 18

<210> 306

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 306

atggtaaagt ggactggat 19

<210> 307

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 307

gatggtaaag tggactggat 20

<210> 308

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 308

cagagatggt ttccttaaac 20

<210> 309

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 309

ccagagatgg tttccttaaa 20

<210> 310

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 310

ccagagatgg tttccttaa 19

<210> 311

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 311

ccagagatgg tttcctta 18

<210> 312

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 312

auaaggauga cugaggaag 19

<210> 313

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 313

auaaggauga cugaggaaga 20

<210> 314

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 314

uaaggaugac ugaggaag 18

<210> 315

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 315

uaaggaugac ugaggaaga 19

<210> 316

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 316

uaaggaugac ugaggaagag 20

<210> 317

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 317

aaggaugacu gaggaaga 18

<210> 318

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 318

aaggaugacu gaggaagag 19

<210> 319

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 319

aaggaugacu gaggaagagu 20

<210> 320

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 320

aggaugacug aggaagag 18

<210> 321

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 321

aggaugacug aggaagagu 19

<210> 322

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 322

aggaugacug aggaagagua 20

<210> 323

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 323

ggaugacuga ggaagagu 18

<210> 324

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 324

ggaugacuga ggaagagua 19

<210> 325

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 325

ggaugacuga ggaagaguac 20

<210> 326

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 326

gaugacugag gaagagua 18

<210> 327

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 327

gaugacugag gaagaguac 19

<210> 328

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 328

gaugacugag gaagaguacu 20

<210> 329

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 329

augacugagg aagaguac 18

<210> 330

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 330

augacugagg aagaguacu 19

<210> 331

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 331

augacugagg aagaguacuc 20

<210> 332

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 332

ugacugagga agaguacu 18

<210> 333

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 333

ugacugagga agaguacuc 19

<210> 334

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 334

ugacugagga agaguacucu 20

<210> 335

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 335

cttcctcagt catccttat 19

<210> 336

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 336

tcttcctcag tcatccttat 20

<210> 337

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 337

cttcctcagt catcctta 18

<210> 338

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 338

tcttcctcag tcatcctta 19

<210> 339

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 339

ctcttcctca gtcatcctta 20

<210> 340

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 340

tcttcctcag tcatcctt 18

<210> 341

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 341

ctcttcctca gtcatcctt 19

<210> 342

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 342

actcttcctc agtcatcctt 20

<210> 343

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 343

ctcttcctca gtcatcct 18

<210> 344

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 344

actcttcctc agtcatcct 19

<210> 345

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 345

tactcttcct cagtcatcct 20

<210> 346

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 346

actcttcctc agtcatcc 18

<210> 347

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 347

tactcttcct cagtcatcc 19

<210> 348

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 348

gtactcttcc tcagtcatcc 20

<210> 349

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 349

tactcttcct cagtcatc 18

<210> 350

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 350

gtactcttcc tcagtcatc 19

<210> 351

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 351

agtactcttc ctcagtcatc 20

<210> 352

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 352

gtactcttcc tcagtcat 18

<210> 353

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 353

agtactcttc ctcagtcat 19

<210> 354

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 354

gagtactctt cctcagtcat 20

<210> 355

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 355

agtactcttc ctcagtca 18

<210> 356

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 356

gagtactctt cctcagtca 19

<210> 357

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 357

agagtactct tcctcagtca 20

<210> 358

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methyluridine

<400> 358

nnnnncttgt tggatnnnnn 20

<210> 359

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-methyladenosine

<400> 359

nnnnntttcc tctcannnnn 20

<210> 360

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methyluridine

<400> 360

nnnnntttgc aaaccnnnnn 20

<210> 361

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(5)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methylcytidine

<400> 361

nnnnnctttg gtgatnnnnn 20

<210> 362

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223

> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methylcytidine

<400> 362

nnnnngtgaa ggccannnnn 20

<210> 363

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methylcytidine

<

220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-methylcytidine

<400> 363

nnnnncttcc tcagtnnnnn 20

<210> 364

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methyladenosine

<400> 364

nnnnngtttc tccctnnnnn 20

<210> 365

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-methylguanosine

<400> 365

nnnnntggca catctnnnnn 20

<210> 366

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(5)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methyluridine

<400> 366

nnnnncttcc tccacnnnnn 20

<210> 367

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(19)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methylguanosine

<400> 367

nnnnngtcaa caagcnnnnn 20

<210> 368

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(3)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(18)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methylcytidine

<400> 368

nnnnagtggt gtcannnnn 19

<210> 369

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(17)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-methylcytidine

<400> 369

nnnngtggtg tcagnnnn 18

<210> 370

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (1)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyladenosine

<400> 370

nnnntgtcaa caagnnnn 18

<210> 371

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223

> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(19)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> 2'-O-methylguanosine

<400> 371

nnnnnatggc acatcnnnnn 20

<210> 372

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(19)

<223> 2'-O-methylguanosine

<400> 372

nnnntggcac atctnnnnn 19

<210> 373

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-methylguanosine

<400> 373

nnnnatggca catcnnnnn 19

<210> 374

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> 2'-O-methylguanosine

<400> 374

nnnntggcac atctnnnn 18

<210> 375

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-methylguanosine

<400> 375

nnnnntggca catctnnnnn 20

<210> 376

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(15)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-methylguanosine

<400> 376

nnnnntggca catctnnnnn 20

<210> 377

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223

> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methyladenosine

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyluridine

<

220><221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-methylguanosine

<400> 377

nnnnntggca catctnnnnn 20

<210> 378

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

oligonucleotide

<220><221

> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified thymidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified adenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified guanosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified adenosine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified 5-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified thymidine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified guanosine

<400> 378

nnnnntggca catctnnnnn 20

<210> 379

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified thymidine

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified adenosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified guanosine

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified adenosine

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(15)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified thymidine

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified guanosine

<400> 379

nnnnntggca catctnnnnn 20

<210> 380

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified thymidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified adenosine

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified guanosine

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified adenosine

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified thymidine

<220

><221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified guanosine

<400> 380

nnnnntggca catctnnnnn 20

<210> 381

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> locked nucleic acid adenosine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> locked nucleic acid guanosine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> locked nucleic acid adenosine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> locked nucleic acid 5-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> locked nucleic acid thymidine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> locked nucleic acid guanosine

<400> 381

nnnatggcac atctnnnn 18

<210> 382

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> locked nucleic acid adenosine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> locked nucleic acid guanosine

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> locked nucleic acid adenosine

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(14)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> locked nucleic acid 5-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> locked nucleic acid thymidine

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> locked nucleic acid guanosine

<400> 382

nnnatggcac atctnnnn 18

<210> 383

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> locked nucleic acid adenosine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> locked nucleic acid guanosine

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> locked nucleic acid adenosine

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223

> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> locked nucleic acid 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> locked nucleic acid thymidine

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> locked nucleic acid guanosine

<400> 383

nnnatggcac atctnnnn 18

<210> 384

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220

><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyladenosine

<400> 384

nnnntgtcaa caagnnnn 18

<210> 385

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(14)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyladenosine

<400> 385

nnnntgtcaa caagnnnn 18

<210> 386

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic Construct

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-methyluridine

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-methylguanosine

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221>

misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> 2'-O-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-methyladenosine

<400> 386

nnnntgtcaa caagnnnn 18

<210> 387

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified thymidine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified guanosine

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified 5-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified adenosine

<400> 387

nnnntgtcaa caagnnnn 18

<210> 388

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified thymidine

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified guanosine

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(14)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified 5-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified adenosine

<400> 388

nnnntgtcaa caagnnnn 18

<210> 389

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified thymidine

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (3)..(4)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified guanosine

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified adenosine

<400> 389

nnnntgtcaa caagnnnn 18

<210> 390

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220

><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> locked nucleic acid thymidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(17)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(3)

<223> locked nucleic acid guanosine

<220><221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> locked nucleic acid 5-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> locked nucleic acid adenosine

<400> 390

nnntgtcaac aagnnnn 17

<210> 391

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> locked nucleic acid thymidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(3)

<223> locked nucleic acid guanosine

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(13)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(17)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> locked nucleic acid 5-methylcytidine

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> locked nucleic acid adenosine

<400> 391

nnntgtcaac aagnnnn 17

<210> 392

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> locked nucleic acid thymidine

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (2)..(3)

<223> locked nucleic acid guanosine

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> phosphodiester backbone

<

220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> phosphodiester backbone

<220><221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> locked nucleic acid 5-methylcytidine

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> phosphorothioate backbone

<220><221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> locked nucleic acid adenosine

<400> 392

nnntgtcaac aagnnnn 17

<210> 393

<211

> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 393

gaaaccaucu cugggauaag 20

<210> 394

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 394

aaaccaucuc ugggauaagg 20

<210> 395

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 395

aaccaucucu gggauaagga 20

<210> 396

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 396

accaucucug ggauaaggau 20

<210> 397

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 397

ccaucucugg gauaaggaug 20

<210> 398

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 398

caucucuggg auaaggauga 20

<210> 399

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 399

aucucuggga uaaggaugac 20

<210> 400

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 400

ucucugggau aaggaugacu 20

<210> 401

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 401

cucugggaua aggaugacug 20

<210> 402

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 402

ucugggauaa ggaugacuga 20

<210> 403

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 403

cugggauaag gaugacugag 20

<210> 404

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 404

ugggauaagg augacugagg 20

<210> 405

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 405

gggauaagga ugacugagga 20

<210> 406

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 406

ggauaaggau gacugaggaa 20

<210> 407

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 407

gcugaaacaa cugaaacuuc 20

<210> 408

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 408

gaaacaacug aaacuucagg 20

<210> 409

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 409

aaacaacuga aacuucaggg 20

<210> 410

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 410

aacaacugaa acuucaggga 20

<210> 411

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 411

acaacugaaa cuucagggaa 20

<210> 412

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 412

caacugaaac uucagggaaa 20

<210> 413

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 413

acugaaacuu cagggaaaag 20

<210> 414

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 414

aaccaucucu gggauaagg 19

<210> 415

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 415

accaucucug ggauaagga 19

<210> 416

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 416

ccaucucugg gauaaggau 19

<210> 417

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 417

caucucuggg auaaggaug 19

<210> 418

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 418

aucucuggga uaaggauga 19

<210> 419

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 419

ucucugggau aaggaugac 19

<210> 420

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 420

cucugggaua aggaugacu 19

<210> 421

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 421

ucugggauaa ggaugacug 19

<210> 422

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 422

cugggauaag gaugacuga 19

<210> 423

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 423

ugggauaagg augacugag 19

<210> 424

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 424

gggauaagga ugacugagg 19

<210> 425

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 425

ggauaaggau gacugagga 19

<210> 426

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 426

aacaacugaa acuucaggg 19

<210> 427

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 427

acaacugaaa cuucaggga 19

<210> 428

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 428

caacugaaac uucagggaa 19

<210> 429

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 429

caacugaaac uucagggaa 19

<210> 430

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 430

ccaucucugg gauaagga 18

<210> 431

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 431

caucucuggg auaaggau 18

<210> 432

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 432

aucucuggga uaaggaug 18

<210> 433

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 433

ucucugggau aaggauga 18

<210> 434

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 434

cucugggaua aggaugac 18

<210> 435

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 435

ucugggauaa ggaugacu 18

<210> 436

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 436

cugggauaag gaugacug 18

<210> 437

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 437

ugggauaagg augacuga 18

<210> 438

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 438

gggauaagga ugacugag 18

<210> 439

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 439

ggauaaggau gacugagg 18

<210> 440

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 440

acaacugaaa cuucaggg 18

<210> 441

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 441

cttatcccag agatggtttc 20

<210> 442

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 442

ccttatccca gagatggttt 20

<210> 443

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 443

tccttatccc agagatggtt 20

<210> 444

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 444

atccttatcc cagagatggt 20

<210> 445

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 445

catccttatc ccagagatgg 20

<210> 446

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 446

tcatccttat cccagagatg 20

<210> 447

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 447

gtcatcctta tcccagagat 20

<210> 448

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 448

agtcatcctt atcccagaga 20

<210> 449

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 449

cagtcatcct tatcccagag 20

<210> 450

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 450

tcagtcatcc ttatcccaga 20

<210> 451

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 451

ctcagtcatc cttatcccag 20

<210> 452

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 452

cctcagtcat ccttatccca 20

<210> 453

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 453

tcctcagtca tccttatccc 20

<210> 454

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 454

ttcctcagtc atccttatcc 20

<210> 455

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 455

gaagtttcag ttgtttcagc 20

<210> 456

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 456

cctgaagttt cagttgtttc 20

<210> 457

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 457

ccctgaagtt tcagttgttt 20

<210> 458

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 458

tccctgaagt ttcagttgtt 20

<210> 459

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 459

ttccctgaag tttcagttgt 20

<210> 460

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 460

tttccctgaa gtttcagttg 20

<210> 461

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 461

cttttccctg aagtttcagt 20

<210> 462

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 462

ccttatccca gagatggtt 19

<210> 463

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 463

tccttatccc agagatggt 19

<210> 464

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 464

atccttatcc cagagatgg 19

<210> 465

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 465

catccttatc ccagagatg 19

<210> 466

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 466

tcatccttat cccagagat 19

<210> 467

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 467

gtcatcctta tcccagaga 19

<210> 468

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 468

agtcatcctt atcccagag 19

<210> 469

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 469

cagtcatcct tatcccaga 19

<210> 470

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 470

tcagtcatcc ttatcccag 19

<210> 471

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 471

ctcagtcatc cttatccca 19

<210> 472

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 472

cctcagtcat ccttatccc 19

<210> 473

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 473

tcctcagtca tccttatcc 19

<210> 474

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 474

ccctgaagtt tcagttgtt 19

<210> 475

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 475

tccctgaagt ttcagttgt 19

<210> 476

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 476

ttccctgaag tttcagttg 19

<210> 477

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 477

ttccctgaag tttcagttg 19

<210> 478

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 478

tccttatccc agagatgg 18

<210> 479

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 479

atccttatcc cagagatg 18

<210> 480

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 480

catccttatc ccagagat 18

<210> 481

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 481

tcatccttat cccagaga 18

<210> 482

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 482

gtcatcctta tcccagag 18

<210> 483

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 483

agtcatcctt atcccaga 18

<210> 484

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 484

cagtcatcct tatcccag 18

<210> 485

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 485

tcagtcatcc ttatccca 18

<210> 486

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 486

ctcagtcatc cttatccc 18

<210> 487

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 487

cctcagtcat ccttatcc 18

<210> 488

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 488

ccctgaagtt tcagttgt 18

<210> 489

<211> 228

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 489

aatgaaatct tctgatttgt aagacatgct gccaagagat tagttttaca ccttcaggat 60

aaagactgct gagaaggttt aaggatgcta ttctgaaaag actgtggagg aagattaagg 120

aaaccatctc tgggataagg atgactgagg aaatttaagg atgccactct ggttaaaagc 180

tgaaacaact gaaacttcag ggaaaagaga aggcctggaa tctgatcc 228

<210> 490

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 490

gggtcaatga tgacaaccca atgtcatgaa gaaatgtgat gacataaaat ttatgctcaa 60

taggattacg ctgagtccc 79

<210> 491

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 491

gggtcaataa tggcaatcca atgtcatgaa gaaaggtgat gacataaaat tcatgctcaa 60

taggattact ctgaggccc 79

<210> 492

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 492

gggttcacaa agtgcaatcc ctcgagccaa tgtcatgaag aaaggtgatg acataaaatt 60

catgctcaat aggattatgc tgaggccc 88

<210> 493

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 493

ttgtcaatga taacaaccca aaatcatgaa cagaggtgat gatataaaaa tcatgctcaa 60

taggattacg ctgaggcac 79

<210> 494

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 494

tggccatcat aggtcatgaa gagtggtgat gacattaaaa tcatgatcaa taggattaca 60

ctgaggccc 69

<210> 495

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 495

gggtcaatga tgagaacctt atattgtcct gaagagcggt gatgacttaa aaatcatgct 60

caataggatt acgctgaggc cc 82

<210> 496

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 496

gggtcaatga tgagatgtta ccttgaagag aaatgatgac gtaaaaatta agttcagttg 60

gattacgctg aggccc 76

<210> 497

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 497

ttatattgtc ttcgacaggg aagatgacat aaaaattatg ttcaatagga tta 53

<210> 498

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 498

tcaataatga aatcttctga tttggtgaga aataatgcct taaaattaca ctcaatagga 60

ttatgctgag g 71

<210> 499

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 499

taaaaatcat gctcaataga attaagctga ggc 33

<210> 500

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 500

atatgtggaa gccggaatct 20

<210> 501

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic Construct

<400> 501

cccagaactc cctaatcaga a 21

<210> 502

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 502

atgacggtgg ctataccagg 20

<210> 503

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 503

gtctccttcg agctgtttgc 20

<210> 504

<211> 21

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 504

cctttctctc cagtgctcag a 21

<210> 505

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 505

cctgtgaact ttcaaccagg a 21

<210> 506

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 506

ggatcagact ccaggccttc 20

<210> 507

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 507

cccagguguc cuuuaaugaa 20

<210> 508

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 508

ccaggugucc uuuaaugaaa 20

<210> 509

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 509

ugaaaaugcu cuugacacca 20

<210> 510

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 510

gaaaaugcuc uugacaccaa 20

<210> 511

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 511

aaaugcucuu gacaccaaug 20

<210> 512

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 512

agaucaguag cuuccuuuac 20

<210> 513

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 513

ucaguagcuu ccuuuaccga 20

<210> 514

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 514

ucuagaacau ugagcuaugg 20

<210> 515

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 515

cuagaacauu gagcuaugga 20

<210> 516

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 516

aacauugagc uauggaagac 20

<210> 517

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 517

acauugagcu auggaagacu 20

<210> 518

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 518

cuauggaaga cucccaccua 20

<210> 519

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 519

uauggaagac ucccaccuaa 20

<210> 520

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 520

caagugcuac cgcacaggca 20

<210> 521

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 521

aagugcuacc gcacaggcau 20

<210> 522

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 522

uaccgcacag gcaugcugca 20

<210> 523

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 523

caggcaugcu gcagugaauu 20

<210> 524

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 524

aggcaugcug cagugaauuu 20

<210> 525

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 525

accguuguuu aaggaugcua 20

<210> 526

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 526

ccguuguuua aggaugcuau 20

<210> 527

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 527

cuguggagga agaaaacccu 20

<210> 528

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 528

aagaaaaccc uuuacccugu 20

<210> 529

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 529

agaaaacccu uuacccuguu 20

<210> 530

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 530

cucaacugcc uggcacugaa 20

<210> 531

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 531

aacugccugg cacugaaaau 20

<210> 532

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 532

acugccuggc acugaaaaug 20

<210> 533

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 533

guguuuaagg aaaccaucuc 20

<210> 534

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 534

guuuaaggaa accaucucug 20

<210> 535

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 535

aggaaaccau cucugauaag 20

<210> 536

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 536

ucuuuggcuu guugacacca 20

<210> 537

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 537

cuuuggcuug uugacaccag 20

<210> 538

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 538

ttcattaaag gacacctggg 20

<210> 539

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 539

tttcattaaa ggacacctgg 20

<210> 540

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 540

tggtgtcaag agcattttca 20

<210> 541

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 541

ttggtgtcaa gagcattttc 20

<210> 542

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 542

cattggtgtc aagagcattt 20

<210> 543

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 543

gtaaaggaag ctactgatct 20

<210> 544

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 544

tcggtaaagg aagctactga 20

<210> 545

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 545

ccatagctca atgttctaga 20

<210> 546

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 546

tccatagctc aatgttctag 20

<210> 547

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 547

gtcttccata gctcaatgtt 20

<210> 548

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 548

agtcttccat agctcaatgt 20

<210> 549

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 549

taggtgggag tcttccatag 20

<210> 550

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 550

ttaggtggga gtcttccata 20

<210> 551

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 551

tgcctgtgcg gtagcacttg 20

<210> 552

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 552

atgcctgtgc ggtagcactt 20

<210> 553

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 553

tgcagcatgc ctgtgcggta 20

<210> 554

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 554

aattcactgc agcatgcctg 20

<210> 555

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 555

aaattcactg cagcatgcct 20

<210> 556

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 556

tagcatcctt aaacaacggt 20

<210> 557

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 557

atagcatcct taaacaacgg 20

<210> 558

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 558

agggttttct tcctccacag 20

<210> 559

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 559

acagggtaaa gggttttctt 20

<210> 560

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 560

aacagggtaa agggttttct 20

<210> 561

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 561

ttcagtgcca ggcagttgag 20

<210> 562

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 562

attttcagtg ccaggcagtt 20

<210> 563

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 563

cattttcagt gccaggcagt 20

<210> 564

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 564

gagatggttt ccttaaacac 20

<210> 565

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 565

cagagatggt ttccttaaac 20

<210> 566

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 566

cttatcagag atggtttcct 20

<210> 567

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 567

tggtgtcaac aagccaaaga 20

<210> 568

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 568

ctggtgtcaa caagccaaag 20

<210> 569

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 569

ggtgccattc tattataaat aacctgaccc attatttata atagaatggc acctttttt 58

<210> 570

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 570

gctttcatca ataatgaaat aacctgaccc attatttcat tattgatgaa agcttttt 58

<210> 571

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 571

ggtctttcat caataatgat aacctgaccc attatcatta ttgatgaaag acctttttt 58

<210> 572

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 572

gaaatcttct gatttgtaat aacctgaccc attattacaa atcagaagat ttcttttt 58

<210> 573

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 573

gcacctaagg gaattagtat aacctgaccc attatactaa ttcccttagg tgcttttt 58

<210> 574

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 574

gtttcaacca ggatttaaat aacctgaccc attatttaaa tcctggttga aacttttt 58

<210> 575

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 575

gctttcaacc aggatttaat aacctgaccc attattaaat cctggttgaa agcttttt 58

<210> 576

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 576

ggagatgtgc cattctatat aacctgaccc attatataga atggcacatc tccttttt 58

<210> 577

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 577

gtctttcatc aataatgaat aacctgaccc attattcatt attgatgaaa gacttttt 58

<210> 578

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 578

gatcaataat gaaatcttat aacctgaccc attataagat ttcattattg atcttttt 58

<210> 579

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 579

gtgtctttca tcaataatat aacctgaccc attatattat tgatgaaaga cacttttt 58

<210> 580

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 580

gcaataatga aatcttctat aacctgaccc attatagaag atttcattat tgcttttt 58

<210> 581

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 581

gcatgctgca gtgaatttat aacctgaccc attataaatt cactgcagca tgcttttt 58

<210> 582

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 582

ggaaatcttc tgatttgtat aacctgaccc attatacaaa tcagaagatt tccttttt 58

<210> 583

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 583

ggtatattct atctagaaat aacctgaccc attatttcta gatagaatat acctttt 58

<210> 584

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 584

gtgctgcagt gaatttaaat aacctgaccc attatttaaa ttcactgcag cacttttt 58

<210> 585

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 585

gtgtgccatt ctattataat aacctgaccc attattataa tagaatggca cacttttt 58

<210> 586

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 586

gttaccatca gtgtttaaat aacctgaccc attatttaaa cactgatggt aacttttt 58

<210> 587

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 587

gcctgcaacc gttgtttaat aacctgaccc attattaaac aacggttgca ggcttttt 58

<210> 588

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 588

gtatgtcttt catcaataat aacctgaccc attattattg atgaaagaca tacttttt 58

<210> 589

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 589

acactgatgg taaagtggac 20

<210> 590

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 590

tagaatatac acgtcggtaa 20

<210> 591

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 591

tcaactgtcc cagtcacaac 20

<210> 592

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 592

tctagataga atatacacgt 20

<210> 593

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 593

tctagataga atatacacgt 20

<210> 594

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 594

ctccccatgc acacttgaga 20

<210> 595

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 595

catccttaaa caacggttgc 20

<210> 596

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 596

ggtgtaaaac taattccctt 20

<210> 597

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 597

aacaacggtt gcagggacag 20

<210> 598

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 598

tatggaagac tcccacctaa 20

<210> 599

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 599

ctatggaaga ctcccaccta 20

<210> 600

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 600

aagccttctc aagtgtgcat 20

<210> 601

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 601

ctatctagaa cattgagcta 20

<210> 602

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 602

accctctggt gttgtcacag 20

<210> 603

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 603

aacccttttac cctgttgttc 20

<210> 604

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 604

gggtcaataa tgncaancca atgtcatgaa gaaaggtgat gacataaaat tcatgctcaa 60

taggattacg ctgaggccc 79

<210> 605

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (44)..(44)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 605

ggtcaatgat gagacttatn ttgtcttgaa gagagatgat gacntaaaaa ttatgctcaa 60

taggattacg ctgaggcc 78