



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월21일

(11) 등록번호 10-2113306

(24) 등록일자 2020년05월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C12N 15/113** (2010.01) **A61K 31/713** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
**C12N 15/113** (2013.01)  
**A61K 31/713** (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7019966(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년11월12일  
 심사청구일자 2019년07월18일
- (85) 번역문제출일자 2019년07월09일
- (65) 공개번호 10-2019-0084360
- (43) 공개일자 2019년07월16일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7033869  
 원출원일자(국제) 2010년11월12일  
 심사청구일자 2017년12월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2010/001520
- (87) 국제공개번호 WO 2011/057350  
 국제공개일자 2011년05월19일
- (30) 우선권주장  
 2009905549 2009년11월12일 오스트레일리아(AU)
- (56) 선행기술조사문헌  
 WO2006000057 A1
- (73) 특허권자  
 더 유니버시티 오브 웨스턴 오스트레일리아  
 오스트레일리아, 웨스턴 오스트레일리아 6907, 네드랜즈, 스티어링하이웨이
- (72) 발명자  
 월튼, 스테판  
 오스트레일리아, 웨스턴 오스트레일리아 6153, 애플크로스,스페이 로드 18  
 플레처, 수  
 오스트레일리아, 웨스턴 오스트레일리아 6053, 바이스워드,로버츠 스트리트 14  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 양부현

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 안티센스 분자 및 이를 이용한 질환 치료방법

## (57) 요약

본 발명은 디스트로핀 유전자에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위해 선택된 타겟 위치에 결합할 수 있는 안티센스 분자에 관한 것으로, 상기 안티센스 분자는 서열목록 제1서열 내지 서열목록 제59서열에 기재되어 있다.

대표도 - 도1

bp	수용서열 (Acceptor)	ESE	공여서열 (Donor)
uca <u>ugc</u> acugaguga <u>ccucuuucgcgcagG</u> CGCUAGC <u>UGGAG</u> CA/////CCGUGCAGACUGA <u>CGguc</u> ucau			

(52) CPC특허분류

**C12N 15/1135** (2013.01)

**C12N 15/62** (2013.01)

(72) 발명자

**아담스, 애비**

오스트레일리아, 웨스턴 오스트레일리아 6076, 칼  
라문다, 크라이텐 로드 10

**멜로니, 페니**

오스트레일리아, 웨스턴 오스트레일리아 6016, 모  
운트호손, 퍼슬로우 스트리트 10

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

다음으로부터 선택되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:

(i) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 20 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(-29-10)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(ii) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 22 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(-22-01)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(iii) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 24 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(-14+10)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(iv) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 27 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+26+52)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(v) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 28 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+40+67)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(vi) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 12 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+66+77)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(vii) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 15 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+66+80)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(viii) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 18 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+66+83)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(ix) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 18 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+78+95)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(x) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 15 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+81+95)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(xi) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 12 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+84+95)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(xii) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 27 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+90+116)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(xiii) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 27 염기 길이의 안티센스

올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+53+79)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(xiv) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 29 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+57+85)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(xv) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 30 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+71+100)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임; 및

(xvi) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 29 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+76+104)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임.

## 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 엑손 51에서 엑손 건너뛰기를 유도할 수 있는 것인, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

## 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 다음으로부터 선택되는 것인, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:

(i) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 27 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+26+52)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(ii) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 28 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+40+67)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(iii) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 27 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+53+79)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(iv) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 29 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+57+85)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임;

(v) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 30 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+71+100)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임; 및

(vi) 인간 디스트로핀 프리(pre)-mRNA의 엑손 51의 타겟 영역에 대해 100% 상보적인 29 염기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 상기 타겟 영역은 어닐링 위치 H51A(+76+104)이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드임.

## 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 활성, 세포 분포, 또는 세포 흡수를 향상시키는 1 이상의 모이어티 또는 컨쥬게이트와 화학적으로 연결된 것인, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

## 청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 폴리에틸렌 글리콜 사슬과 화학적으로 연결된 것을 특징으로 하는, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

## 청구항 6

다음으로부터 선택되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:

(i) 염기 서열 UUU GGG UUU UUG CAA AAA GG (서열번호: 297)를 포함하는 20 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(ii) 염기 서열 CUA AAA UAU UUU GGG UUU UUG C (서열번호: 298)를 포함하는 22 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(iii) 염기 서열 UGA GUA GGA GCU AAA AUA UUU UGG (서열번호: 299)를 포함하는 24 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(iv) 염기 서열 GUU UCC UUA GUA ACC ACA GGU UGU GUC (서열번호: 300)를 포함하는 27 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(v) 염기 서열 AGU UUG GAG AUG GCA GUU UCC UUA GUA A (서열번호: 301)를 포함하는 28 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(vi) 염기 서열 UGG CAU UUC UAG (서열번호: 302)를 포함하는 12 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(vii) 염기 서열 AGA UGG CAU UUC UAG (서열번호: 303)를 포함하는 15 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(viii) 염기 서열 GGA AGA UGG CAU UUC UAG (서열번호: 304)를 포함하는 18 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(ix) 염기 서열 CUC CAA CAU CAA GGA AGA (서열번호: 305)를 포함하는 18 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(x) 염기 서열 CUC CAA CAU CAA GGA (서열번호: 306)를 포함하는 15 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(xi) 염기 서열 CUC CAA CAU CAA (서열번호: 307)를 포함하는 12 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(xii) 염기 서열 GAA AUC UGC CAG AGC AGG UAC CUC CAA (서열번호: 308)를 포함하는 27 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(xiii) 염기 서열 GAU GGC AUU UCU AGU UUG GAG AUG GCA (서열번호: 309)를 포함하는 20 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(xiv) 염기 서열 AAG GAA GAU GGC AUU UCU AGU UUG GAG AU (서열번호: 310)를 포함하는 29 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(xv) 염기 서열 GGU ACC UCC AAC AUC AAG GAA GAU GGC AUU (서열번호: 69)를 포함하는 30 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염; 및

(xvi) 염기 서열 AGC AGG UAC CUC CAA CAU CAA GGA AGA UG (서열번호: 311)를 포함하는 29 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노(morpholino) 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

## 청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 디스트로핀 유전자(dystrophin gene)의 엑손 51에서 엑손 건너뛰기를 유도할 수 있는 것인, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

## 청구항 8

제 6 항에 있어서, 다음으로부터 선택되는 것인, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:

(i) 염기서열 GUU UCC UUA GUA ACC ACA GGU UGU GUC (서열번호: 300)를 포함하는 27 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(ii) 염기서열 AGU UUG GAG AUG GCA GUU UCC UUA GUA A (서열번호: 301)를 포함하는 28 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모폴리노 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(iii) 염기서열 GAU GGC AUU UCU AGU UUG GAG AUG GCA (서열번호: 309)를 포함하는 27 염기의 안티센스 올리고

뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모포리노 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(iv) 염기서열 AAG GAA GAU GGC AUU UCU AGU UUG GAG AU (서열번호: 310)를 포함하는 29 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모포리노 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염;

(v) 염기서열 GGU ACC UCC AAC AUC AAG GAA GAU GGC AUU (서열번호: 69)를 포함하는 30 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모포리노 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염; 및

(vi) 염기서열 AGC AGG UAC CUC CAA CAU CAA GGA AGA UG (서열번호: 311)를 포함하는 29 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 모포리노 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 5-치환 피리미딘 염기를 포함하도록 변형된 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

## 청구항 9

제 6 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 활성화, 세포내 분포, 또는 세포내 흡수를 강화하는 1 이상의 모이어티 또는 컨쥬게이트와 화학적으로 연결되는 것을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

## 청구항 10

제 6 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 폴리에틸렌 글리콜 체인에 화학적으로 연결된 것을 특징으로 하는, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

## 청구항 11

다음을 포함하는 근이영양증 치료용 약제학적 조성물:

(i) 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염; 및

(ii) 약제학적으로 허용가능한 담체.

## 청구항 12

삭제

## 청구항 13

제11항에 있어서, 상기 근이영양증은 뒤시엔(Duchenne) 형 근이영양증인 것을 특징으로 하는, 약제학적 조성물.

## 청구항 14

삭제

## 청구항 15

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 발명은 신규한 안티센스 화합물 및 엑손 건너뛰기(exon skipping)을 촉진하기에 적합한 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 방법에 이용되도록 채택된 치료학적 조성물 뿐 아니라 상기 신규한 안티센스 화합물을 이용하여 엑손 건너뛰기를 유도하는 방법을 제공한다.

### 배경 기술

- [0002] 배경기술의 하기 논의는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것이다. 하기 논의는 언급된 물질이 본 출원의 우선일 당시에 통상적으로 알려진 사실(knowledge)이었거나 또는 그 일부인 것에 대한 인지 또는 승인이 아니다.
- [0003] 최근에, 폭넓은 연구들이 유전자에서 질환-야기성(disease-causing) 돌연변이를 억제 또는 보상하는 방법에 대해 조사하는 것으로 확대되고 있다. 현재 안티센스 기술들은 다른 레벨(예컨대, 전사, 스플라이싱, 안정화, 해독, 등)에서 유전자 발현에 현저하게 영향을 미치는 일련의 화학기술을 이용하여 개발되고 있다. 무수히 다른 조건들에서 비정상적 유전자들 또는 질환-관계된 유전자들을 바로잡거나 또는 보상하기 위해, 많은 연구자들은 안티센스 화합물의 이용에 집중하여 왔다.
- [0004] 안티센스 분자들은 매우 특이적으로 유전자 발현을 억제할 수 있으며, 이로 인해 많은 연구자들은 유전자 발현의 조절자들이 종양유전자(oncogenes) 또는 바이러스 유전자 같은 타겟된 유전자의 발현을 억제하는 데 집중되어 있다는 점에서 올리고뉴클레오타이드에 대해서 많은 노력을 기울이고 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 RNA 폴리머라제 II에 의한 전사를 억제하는 삼중 구조를 형성할 수 있는 경우에 RNA(센스 가닥) 또는 DNA에 결합된다.
- [0005] 특이적인 유전자 하향-조절(down-regulation)에서 바람직한 효과를 달성하기 위해, 올리고뉴클레오타이드는 타겟된 mRNA의 분해(decay)를 촉진하거나 또는 상기 mRNA의 해독을 차단함으로써, 바람직하지 않은 타겟 단백질의 *데 노보(de novo)* 합성을 효과적으로 방해해야 한다.
- [0006] 상기 기술들은 비변성(native) 단백질의 생산을 상향-조절하거나 또는 넌센스 또는 프레임-쉬프트 돌연변이 같은 해독의 이른 종결을 유도하는 돌연변이들을 보상하는 목적인 경우에 유용하지 않다.
- [0007] 더 나아가, 정상적으로 기능하는 단백질이 상기 돌연변이들로 인해 이르게 종결된 경우에, 안티센스 기술을 이용하여 어떤 기능적 단백질 생산을 회복하기 위한 방법은 스플라이싱 과정에 개입하여 가능한 것으로 알려져 있다(Sierakowska H, *et al.*, (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 12840-12844; Wilton SD, *et al.*, (1999) *Neuromusc Disorders* 9, 330-338; van Deutekom JC *et al.*, (2001) *Human Mol Genet* 10, 1547-1554). 상술한 경우에서, 손상된 유전자 전사체는 타겟된 분해에 이르지 않아 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 화학은 타겟 mRNA 분해를 촉진하지 않는다.
- [0008] 많은 유전성 질환들에서, 최종적인 유전자 발현 상에 미치는 돌연변이의 효과는 스플라이싱 과정 동안 타겟된 엑손 건너뛰기의 과정에서 조절될 수 있다. 스플라이싱 과정은 프리-mRNA(pre-mRNA)에 존재하는 인접한 엑손-인트론 정션들을 매우 밀접하게 만들어 인트론의 말단에 존재하는 포스포다이에스테르 결합을 절단시키고 이후 서로 스플라이싱된 엑손들 간의 재결합(reformation)을 형성하는 복잡한 다-입자 기구(multi-particle machinery)에 의해 실시된다. 상술한 복잡적이면서 매우 정교한 스플라이싱 과정은 다양한 핵 스플라이싱 인자들과 결합한 후 스플라이싱 반응에 포함되는 상대적으로 짧은 반-보존성(semi-conserved) RNA 절편들인 프리-mRNA 내에 존재하는 서열 모티프에 의해 매개된다. 스플라이싱 기구가 프리-mRNA 과정에 포함된 모티프들을 관독하거나 또는 인지하는 방법을 변화시킴으로써, 서로 다르게 스플라이싱된 mRNA 분자들을 창출하는 것이 가능하다. 현재, 포함된 기작들이 동정되어 있지 않을 지라도 인간 유전자들 대부분이 정상적인 유전자 발현 동안 선택적으로 스플라이싱된다는 것이 알려져 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용하여, 인코딩된 mRNA에서 에러 또는 결손이 성숙한 유전자 전사체로부터 우회(bypass)되거나 또는 제거될 수 있다는 것이 밝혀졌다.
- [0009] 비록 많은 경우에서 유전적으로 매우 낮은 레벨로 발생된다고 보고되고 있을 지라도, 스플라이싱 과정에서 유전적 결실 또는 엑손 건너뛰기의 정도는 사실상 완벽하게 이해되지 않고 있다(Sherrat TG, *et al.*, (1993) *Am J Hum Genet* 53, 1007-1015). 하지만, 질환-야기성 돌연변이와 연관된 엑손들이 몇몇 유전자들로부터 특이적



로 제거될 수 있는 경우 비변성 단백질의 생물학적 특성과 유사하거나 또는 타겟 엑손과 관계된 돌연변이에 의해 야기된 질환을 약화시키는데 충분한 생물학적 활성을 가지는 짧은 단백질 산물이 때때로 생산될 수 있다는 것이 알려져 있다(Lu QL, *et al.*, (2003) *Nature Medicine* 9, 1009-1014; Aartsma-Rus A *et al.*, (2004) *Am J Hum Genet* 74: 83-92).

[0010] 타겟된 엑손 건너뛰기의 과정은 (a) 많은 엑손 및 인트론들이 존재하는 유전자; (b) 엑손의 유전적 구축 상의 중복성을 가지는 유전자; 또는 (c) 하나 이상의 특정 엑손들이 없어도 단백질이 기능할 수 있는 유전자를 포함하는 긴 유전자들에서 특히 유용한 것 같다(예를 들어, 79개의 엑손들로 구성된 디스트로핀(dystrophin) 유전자; 반복적인 서열 블록으로 인코딩된 몇몇 콜라겐 유전자들; 또는 각각 약 80개 및 370개 이상의 엑손으로 구성된 네불린(nebulin) 및 티틴(titin) 유전자).

[0011] 다양한 유전자에서 발생한 돌연변이에 의해 야기된 절단(truncations)과 연관된 유전성 질환의 치료를 위한 유전자 프로세싱을 재지시하려고 하는 노력들은 다음과 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 용도에 집중되어 왔다: (1) 스플라이싱 과정에 포함된 엘리먼트들과 완전히 또는 부분적으로 중첩된 안티센스 올리고뉴클레오타이드; 또는 (2) 엘리먼트에서 발생하는 특정 스플라이싱 반응을 정상적으로 매개하는 스플라이싱 인자들(예컨대, 차단될 엘리먼트의 3, 6 또는 9번째 뉴클레오타이드 내 위치에서 프리-mRNA와 결합하는 스플라이싱 인자들)의 결합 및 기능을 파괴하기 위해 상기 엘리먼트에 충분히 근접한 위치에서 프리-mRNA와 결합할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

[0012] 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 돌연변이 디스트로핀 프리-mRNA 스플라이싱의 조절은 *인 비트로* 및 *인 비보* 모두에서 보고되어졌다. 일본에서 보고된 디스트로핀 돌연변이의 한 형태에서, 52-염기쌍의 결실 돌연변이는 스플라이싱 과정 동안 엑손 19를 플랭킹 인트론과 함께 제거하도록 유도한다(Matsuo *et al.*, (1991) *J Clin Invest.* 87: 2127-2131). *인 비트로* minegene 스플라이싱 시스템은 디스트로핀 코브(Kobe) 엑손 19 내 결실된 서열의 5부분의 절반에 상보적인 31-머(mer) 2'-O-메틸 올리고리보뉴클레오타이드는 야생형 프리-mRNA의 스플라이싱을 억제한다는 것을 보여주는 데 이용되었다(Takeshima *et al.*, (1995), *J. Clin. Invest.* 95: 515-520). 동일한 올리고뉴클레오타이드는 배양된 인간 림포블라스토이드 세포(lymphoblastoid cells)에서 비변성 디스트로핀 유전자 전사체로부터 엑손 건너뛰기를 유도하는 데 이용되었다.

[0013] Dunckley 등(*Nucleosides & Nucleotides*, 16, 1665-1668(1997))은 근이영양증(muscular dystrophy)을 위한 모델인 mdx 마우스 돌연변이에서 돌연변이된 디스트로핀의 엑손 23 주위의 스플라이싱 분석을 위한 *인 비트로* 컨스트럭트들을 보고하였다. 어떠한 타겟 위치 또는 서열이 주어지지 않은 상황일 지라도 마우스 디스트로핀 엑손 23 내 및 인접한 스플라이싱 위치들로 타겟된 2'-변형된 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 *인 비트로*에서 상기 컨스트럭트들을 분석하기 위한 계획들이 논의되었다.

[0014] 이후, 2'-O-메틸 올리고리보뉴클레오타이드들은 상기 mdx 마우스로부터 유래된 근육모세포 내 디스트로핀 결손을 올바르게 고치는 것으로 보고되었다. 마우스 디스트로핀 인트론 22의 3'-스플라이싱 위치로 타겟된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 여러 플랭킹 엑손 뿐 아니라 돌연변이 엑손의 건너뛰기(skipping)을 야기하여 새로운 내부 결실을 포함하는 신규한 인-프레임(in-frame) 디스트로핀 전사체를 생산하는 것으로 보고되었다. 상기 돌연변이된 디스트로핀은 약 1-2%의 안티센스 올리고뉴클레오타이드-처리된 mdx 근관에서 발현되었다. 2'-O-메톡시에틸 포스포다이에스테르 같은 다른 올리고뉴클레오타이드 변형들의 이용도 보고되어 있다(Dunckley *et al.*, (1998) *Human Mol. Genetics*, 5: 1083-90).

[0015] 따라서, 안티센스 분자들은 DMD(Duchenne Muscular Dystrophy) 같은 유전성 질환들의 치료 수단을 제공할 수 있다. 하지만, 안티센스 분자들을 이용하여 엑손 건너뛰기를 유도하고자 하는 시도들은 혼란스런(mixed) 성공을 거둔 상태이다.

[0016] 많은 안티센스 분자들을 이용하여 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 19의 성공적인 건너뛰기가 이루어진 디스트로핀 엑손 19에 대한 연구들은 Errington 등(*J Gen Med*, 5: 518-527(2003))에 의해 보고된 바와 같은 엑손 정의에 포함된 엑손 내 플랭킹 스플라이싱 위치(flanking splice sites) 또는 모티프를 타겟하였다.

[0017] 엑손 19 건너뛰기 같은 명백한 용이함과는 대조적으로, Dunckley 등(1998)에 의한 mdx 마우스에서 엑손 23 건너뛰기의 첫 번째 보고는 실질적인 안티센스 활성이라기 보다는 천연적으로 발생한 복귀돌연변이(revertant) 전사체 또는 인공물에 의한 것으로 현재 간주되고 있다. 엑손 23을 잃어버린 전사체들을 지속적으로 발생시키지 않는 것 이외에도, 엑손 건너뛰기의 레벨이 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 증가하는 또는 감소하는 양에 상응하는 투여량-의존적인 효과를 증명하기 위해 Dunckley 등(1998)은 유도된 엑손 건너뛰기 또는 안티센스 올리고

고뉴클레오타이드의 역가에 대한 어떠한 결과(course)도 보이지 않았다. 더 나아가, 상기 연구는 다른 연구자들에 의해 재현될 수 없었다.

[0018] mdx 마우스 모델에서 특이적이며 재생산이 가능한 엑손 건너뛰기의 첫 번째 예는 Wilton 등(Neuromuscular Disorders 9,330-9338(1999))에 의해 보고되었다. 안티센스 분자를 공여 스플라이싱 위치(donor splice sites)로 지정함으로써, 배양된 세포에 처리하고 6시간 내에 디스트로핀 mRNA에서 지속적이고 효과적인 엑손 23 건너뛰기가 유도되었다. 또한, Wilton 등(1999)은 보다 긴 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 마우스 디스트로핀 프리-mRNA의 수용(acceptor) 부위를 타겟팅하고 Dunckley 등(1998)의 공개된 결과들을 반복할 수 없다는 것을 보고한다. 엑손 23 자체 또는 여러 플랭킹 엑손들의 다량 제거를 포함하는 어떠한 엑손 건너뛰기도 인트론 22의 수용 스플라이싱 위치로 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 선택함으로써 반복적으로 실시될 수 있다.

[0019] 인트론 23 공여 스플라이싱 위치로 지정된 첫 번째 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 일차 배양된 근육모세포에서 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도한 반면에, 상기 화합물은 높은 레벨의 디스트로핀을 발현하는 불멸화된 세포 배양에서는 덜 효과적인 것으로 밝혀졌다. 하지만, 정교한 타겟팅 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드 디자인을 통해 특이적인 엑손 제거의 효율이 약 10배(order of magnitude)까지 증가되었다(참고: Mann CJ *et al.*, (2002) *J Gen Med* 4, 644-654).

[0020] 따라서, 타겟 뉴클레오타이드 서열에 결합할 수 있고 이의 스플라이싱을 변형시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제공할 필요가 있다. 스플라이싱에 중요할 것으로 여겨지는 모티프로 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 지시하는 것만으로는 치료적 측면(therapeutic setting)에서 상기 화합물의 효율을 보장할 수 없다.

[0021] 본 발명에 대한 배경기술의 선행적인 논의사항은 오직 본 발명의 이해를 촉진하는 데 있다. 상기 논의사항은 상기 언급된 물질이 본 출원의 우선일 당시에 통상적으로 알려진 사실(knowledge)이었거나 또는 그 일부인 것에 대한 인지 또는 승인이 아니다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0022] 본 발명은 특이적이고 효과적인 엑손 건너뛰기를 유도할 수 있는 프리-mRNA의 스플라이싱에 포함된 RNA 모티프에 결합하기에 적합한 안티센스 분자 화합물 및 조성물, 그리고 이를 이용한 방법을 제공한다.

[0023] 타겟 선택의 범위는 엑손 건너뛰기의 효율 및 이후 이의 잠재적인 치료법으로서의 적용에 매우 중요한 역할을 한다. 스플라이싱에 포함될 것으로 예상된 프리-mRNA의 타겟 부위(regions)에 대한 안티센스 분자를 평이하게 디자인하는 것은 효과적이고 특이적인 엑손 건너뛰기를 유도하는 것을 보장하지 않는다. 스플라이싱 개입을 위해 가장 명백하게 또는 용이하게 제한된 타겟들은 엑손성 스플라이싱 인핸서(exonic splicing enhancers), 사일런싱 엘리먼트(silencing elements) 및 가지점(branch points)을 포함하는 덜 제한적이거나 또는 보존적인 모티프일지라도 공여 및 수용 스플라이싱 위치들(donor and acceptor splice sites)이다. 수용 및 공여 스플라이싱 위치들은 각각 약 16 염기(base) 및 8 염기의 보존 서열(consensus sequences)을 가진다(참고: 엑손 인지, 인트론 제거 및 스플라이싱 과정에 포함된 모티프 및 도메인에 대한 개략적인 도식인 도 1).

[0024] 본 발명의 첫 번째 양태에 따르면, 본 발명은 엑손 건너뛰기를 유도하기 위해 선택된 타겟에 결합할 수 있는 안티센스 분자들을 제공한다.

[0025] 예를 들어, 디스트로핀 유전자 전사체 내 엑손 5, 12, 17, 21, 22, 24, 43-47, 49, 50, 54-64, 66, 67, 70 및 72에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위해, 본 발명의 안티센스 분자들은 표 1에 나열된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 추가적인 실시예에서, 엑손 3, 4, 8, 10, 26, 36, 48, 60, 66 및 68에서 보다 효율적인 엑손 건너뛰기를 유도하기 위해 2개 이상의 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드들을 함께 조합하는 것이 가능하다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드들의 조합 또는 "칵테일(cocktail)"은 효율적인 엑손 건너뛰기를 유도하기 위해 엑손들로 지시된다.

[0027] 본 발명의 두 번째 양태에 따르면, 본 발명은 환자(patient)로의 운반에 적합한 제형 내에 하나 이상의 안티센스 분자를 포함하는 유전성 질환(genetic disorder)의 예방 또는 치료에 도움을 주기 위해 선택되고(선택되거나) 순응된 안티센스 분자들을 제공한다.

- [0028] 본 발명의 세 번째 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 유전성 질환으로 고통받는 환자(patient)를 치료하기 위한 방법을 제공한다: (a) 본 발명에 기재된 방법들에 따라 제작된 안티센스 분자를 선택하는 단계; 및 (b) 치료가 요구되는 환자(patient)에 상기 안티센스 분자를 투여하는 단계,
- [0029] 상기 유전성 질환은 특정 단백질을 인코딩하는 유전자에서 돌연변이가 있고 상기 돌연변이의 영향은 엑손 건너뛰기에 의해 제거될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 유전성 질환의 치료를 위한 의약품을 제조하기 위해 정제된 및 분리된 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 용도를 다룬다.
- [0031] 더 나아가, 본 발명은 환자에 존재하는 특정 유전성 병소(lesion)와 관련되어 적합하게 디자인된 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 유효량(effective amount)을 치료가 요구되는 환자에 투여하는 단계를 포함하는 뒤시엔형(Duchenne) 근이영양증으로 특징화된 상태(condition)을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 뒤시엔형 근이영양증을 예방하거나 또는 적어도 최소화시키기 위해 환자를 예방학적으로 치료하는 방법을 제공한다: 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 하나 이상의 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드들을 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 환자에 투여하는 단계.
- [0032] 또한, 본 발명은 적합한 용기에 패키징된 본 발명의 하나 이상의 안티센스 분자들, 그리고 이의 용도에 대한 지시(instructions)를 포함하는 유전성 질환 치료용 키트를 제공한다.
- [0034] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 도면들과 관련하여 선행하는 하기의 발명의 상세한 설명에 의해 당업자에게 보다 명확하게 된다.

**표 1**

단일 안티센스 분자들.

서열번호	엑손	서열
	<b>엑손 5</b>	
1	H5A(+35+65)	AAA CCA AGA GUC AGU UUA UGA UUU CCA UCU A
	<b>엑손 11</b>	
52	H11A(+50+79)	CUG UUC CAA UCA GCU UAC UUC CCA AUU GUA
	<b>엑손 12</b>	
2	H12A(+52+75)	UCU UCU GUU UUU GUU AGC CAG UCA
53	H12A(+30+57)	CAG UCA UUC AAC UCU UUC AGU UUC UGA U
	<b>엑손 17</b>	
3	H17A(-07+23)	GUG GUG GUG ACA GCC UGU GAA AUC UGU GAG
4	H17A(+61+86)	UGU UCC CUU GUG GUC ACC GUA GUU AC
	<b>엑손 21</b>	
5	H21A(+86+114)	CAC AAA GUC UGC AUC CAG GAA CAU GGG UC
6	H21A(+90+119)	AAG GCC ACA AAG UCU GCA UCC AGG AAC AUG
	<b>엑손 22</b>	
7	H22A(+125+146)	CUG CAA UUC CCC GAG UCU CUG C
	<b>엑손 24</b>	
8	H24A(+51+73)	CAA GGG CAG GCC AUU CCU CCU UC
	<b>엑손 43</b>	
9	H43A(+92 +117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU
	<b>엑손 44</b>	
10	H44A(+65+90)	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA
54	H44A(+59+85)	CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG AUU
	<b>엑손 45</b>	
11	H45A (-09+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U
55	H45A (-09+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G
61	H45A(-06+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA A
62	H45A(-12+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C
	<b>엑손 46</b>	
12	H46A(+81+109)	UCC AGG UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU GU

56	H46A(+93+122)	GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU CAA GUG GGA
	<b>엑손 47</b>	
13	H47A(+01+29)	UGG CGC AGG GGC AAC UCU UCC ACC AGU AA
	<b>엑손 49</b>	
14	H49A(+45+70)	ACA AAU GCU GCC CUU UAG ACA AAA UC
	<b>엑손 50</b>	
15	H50A(+48+74)	GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU
	<b>엑손 51</b>	
57	H51A(+71+100)	GGU ACC UCC AAC AUC AAG GAA GAU GGC AUU
	<b>엑손 52</b>	
58	H52A(+09+38)	UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC UGC
	<b>엑손 53</b>	
59	H53A(+33+65)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU
	<b>엑손 54</b>	
16	H54A(+67+97)	UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G
	<b>엑손 55</b>	
17	H55A(-10 +20)	CAG CCU CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA
	<b>엑손 56</b>	
18	H56A(+92+121)	CCA AAC GUC UUU GUA ACA GGA CUG CAU
19	H56A(+112+141)	CCA CUU GAA GUU CAU GUU AUC CAA ACG UCU
	<b>엑손 57</b>	
20	H57A(-10+20)	AAC UGG CUU CCA AAU GGG ACC UGA AAA AGA
	<b>엑손 58</b>	
21	H58A(+34+64)	UUC GUA CAG UCU CAA GAG UAC UCA UGA UUA C
22	H58D(+17-07)	CAA UUA CCU CUG GGC UCC UGG UAG
	<b>엑손 59</b>	
23	H59A(+96 +120)	CUA UUU UUC UCU GCC AGU CAG CGG A
	<b>엑손 60</b>	
24	H60A(+33+62)	CGA GCA AGG UCA UUG ACG UGG CUC ACG UUC
	<b>엑손 61</b>	
25	H61A(+10+40)	GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU C
	<b>엑손 62</b>	
26	H62A(23+52)	UAG GGC ACU UUG UUU GGC GAG AUG GCU CUC
	<b>엑손 63</b>	
27	H63A(+20+49)	GAG CUC UGU CAU UUU GGG AUG GUC CCA GCA
	<b>엑손 64</b>	
28	H64A(+34+62)	CUG CAG UCU UCG GAG UUU CAU GGC AGU CC
	<b>엑손 66</b>	
29	H66A(-8+19)	GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU AUU AUG
	<b>엑손 67</b>	
30	H67A(+17+47)	GCG CUG GUC ACA AAA UCC UGU UGA ACU UGC
	<b>엑손 73</b>	
60	H73A(+02+26)	CAU UGC UGU UUU CCA UUU CUG GUA G

**표 2**

안티센스 분자들의 카테일.

서열번호	엑손	서열
	<b>엑손 3 카테일</b>	
31	H3A(+30+60)	UAG GAG GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G
32	H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GAG GUC
	<b>엑손 4 카테일</b>	

33	H4A(+11+40)	UGU UCA GGG CAU GAA CUC UUG UGG AUC CUU
34	H4D(+14-11)	GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC UGC A
	<b>엑손 8 카테일</b>	
35	H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA
36	H8A(+134+158)	AUG UAA CUG AAA AUG UUC UUC UUU A
	<b>엑손 10 카테일</b>	
37	H10A(-05+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA
38	H10A(+98+119)	UCC UCA GCA GAA AGA AGC CAC G
	<b>엑손 26 카테일</b>	
39	H26A(-07+19)	CCU CCU UUC UGG CAU AGA CCU UCC AC
40	H26A(+24+50)	CUU ACA GUU UUC UCC AAA CCU CCC UUC
41	H26A(+68+92)	UGU GUC AUC CAU UCG UGC AUC UCU G
	<b>엑손 36 카테일</b>	
42	H36A(-16+09)	CUG GUA UUC CUU AAU UGU ACA GAG A
43	H36A(+22+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU
	<b>엑손 48 카테일</b>	
44	H48A(+01+28)	CUU GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA C
45	H48A(+40+67)	CAA GCU GCC CAA GGU CUU UUA UUU GAG C
	<b>엑손 60 카테일</b>	
46	H60A(+87+116)	UCC AGA GUG CUG AGG UUA UAC GGU GAG AGC
47	H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC
	<b>엑손 66 카테일</b>	
48	H66A(-02+28)	CAG GAC ACG GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU
49	H66D(+13-17)	UAA UAU ACA CGA CUU ACA UCU GUA CUU GUC
	<b>엑손 68 카테일</b>	
50	H68A(+48+72)	CAC CAU GGA CUG GGG UUC CAG UCU C
51	H68D(+23-03)	UAC CUG AAU CCA AUG AUU GGA CAC UC

### 과제의 해결 수단

- [0039] 당업자는 본 명세서에 기재된 본 발명이 특별하게 기재된 사항이 없어도 변이(variations) 및 변형(modifications)에 적용될 수 있다는 것을 용이하게 인지할 것이다. 본 발명은 그러한 모든 변이 및 변형을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 또한, 본 발명은 본 명세서에서 언급되거나 또는 지시된 모든 단계들, 특징들, 조성물 및 화합물의 개별적 또는 통합적(collectively) 내용, 그리고 상기 단계들 또는 특징들의 모든 조합 또는 2개 이상의 조합을 포함한다.
- [0040] 본 발명은 예증(exemplification)만을 목적으로 하는 본 명세서에 기재된 특별한 구현예에 의한 범위에 제한되지 않는다. 기능적으로 동등한 산물들, 조성물들 및 방법들이 본 명세서에 기재된 본 발명의 범위 안에 포함되는 것은 명백하다.
- [0041] 본 명세서에 포함된 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열 정보를 포함하는 서열 식별번호(Sequence identity numbers; SEQ ID NO:)는 발명의 상세한 설명의 끝에 포함되고 프로그램 PatentIn Version 3.0을 이용하여 제조되었다. 각 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열은 번호 지시자(numeric indicator; <210>)에 의해 서열 목록(sequence listing)에 표기되고 서열 식별자(sequence identifier)로 추가적으로 표시된다(예를 들어, <210>1, <210>2, 등).
- [0042] 각 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열에 대한 서열의 길이, 서열의 형태 및 생물체는 각각 번호 지시자 필드에서 <211>, <212> 및 <213>의 정보로 제공된다. 본 명세서에서 언급된 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 번호 지시자 필드에서 <400>의 정보로 제한되고 서열 식별자로 추가적으로 표시된다(예를 들어, <400>1, <400>2, 등).
- [0043] 안티센스 분자의 명명 시스템(nomenclature system)은 다른 안티센스 분자들을 구별하기 위해 제안되고 공개되었다(참고: Mann *et al.*, (2002) *J Gen Med* 4, 644-654). 상기 명명은 동일한 타겟 부위로 지정된 약간의 차이를 가진 여러 안티센스 분자들을 테스트하는 경우에 특히 적용되었으며, 이는 하기와 같았다: H # A/D (x :



y).

- [0044] 첫 번째 문자는 종을 지시한다(예를 들어, H: 인간, M: 마우스, C: 개).
- [0045] 본 명세서의 용어 "#" 문자는 타겟 디스트로핀 엑손 번호를 지시한다.
- [0046] 본 명세서의 용어 "A/D"는 각각 엑손의 시작 및 끝을 표시한 수용 스플라이싱 위치 또는 공여 스플라이싱 위치를 나타낸다.
- [0047] 본 명세서의 용어 "(x : y)"는 "-" 또는 "+"는 각각 인트론성 서열 또는 엑손성 서열을 나타내는 어닐링 동등물(annealing coordinates)을 표시한다. 예를 들어, A(-6+18)는 타겟 엑손에 선행하는 인트론의 마지막 염기로부터 앞의 6번째 염기 및 타겟 엑손의 첫 번째 염기로부터 18번째 염기를 나타낸다. 가장 근접한 스플라이싱 위치가 수용(acceptor) 위치이므로 상기 동등물은 "A"로 표시될 것이다. 타겟 엑손의 마지막 염기로부터 앞의 2번째 염기 및 이후 인트론의 첫 번째 염기로부터 18번째 염기가 안티센스 분자의 어닐링 위치에 상응하는 경우, 공여 스플라이싱 위치에서의 어닐링 동등물은 D(+2-18)로 나타낼 수 있다. 엑손의 시작부터 65번째 염기 및 85번째 염기 사이의 위치를 지시하는 경우, 전체적인 엑손성 어닐링 동등물은 A(+65+85)로 제시될 수 있다.
- [0048] 본 명세서에서 인용된 특허, 특허출원, 저널 논문, 실험실 매뉴얼, 책 또는 다른 문헌들을 포함하는 모든 공개 문헌들의 전문이 참조로서 삽입된다. 모든 참조문헌들이 당업계를 구성하거나 또는 본 발명이 관계된 필드에서 종사하는 당업자들의 통상적으로 일반적인 지식의 일부인 것에 대한 승인이 아니다.
- [0049] 본 명세서의 용어 "유래된(derived)" 및 "로부터 유래된(derived from)"은 소스(source)로부터 직접적으로 얻어질 필요가 없을 지라도 특별한 정수(integer)가 특별한 소스로부터 얻어질 수 있다는 것을 지시하기 위해 사용될 것이다.
- [0050] 본 명세서 전반에 걸쳐서 내용이 특별하게 언급되지 않는 한, 본 명세서의 용어 "포함(comprise)" 또는 "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)" 같은 변이들은 다른 정수 또는 정수 군의 제외가 아니라 공인된 정수 또는 정수군의 포함을 의미하는 것으로 이해될 것이다.
- [0051] 본 명세서에서 이용되는 선택된 단어들에 대한 다른 정의들은 본 발명의 상세한 설명 및 전반적인 적용(apply) 안에서 이해될 수 있다. 특별하게 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 다른 과학적 및 기술적 단어들은 본 발명에 속하는 당업자에 의해 통상적으로 이해될 수 있는 의미와 같다.
- [0053] **바람직한 구현예에 대한 상세한 설명**
- [0054] 안티센스 분자(들)이 프리-mRNA 서열의 엑손 내 스플라이싱에 포함된 뉴클레오타이드 서열로 타겟되는 경우, 엑손의 정상적인 스플라이싱이 억제됨으로써 스플라이싱 기구가 성숙 mRNA로부터 돌연변이된 엑손 전반을 우회하도록 한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드-유도된 엑손 건너뛰기의 개념은 도 2에 나타나 있다.
- [0055] 많은 유전자에서, 전체 엑손의 결실은 중요한 기능 도메인의 손실 또는 리딩 프레임(reading frame)의 파괴를 통해 비-기능성(non-functional) 단백질의 생산을 초래한다. 하지만, 몇몇 단백질에서는 리딩 프레임의 파괴 및 단백질의 생물학적 활성의 중대한 변화 없이 상기 단백질 내의 하나 이상의 엑손의 결실에 의해 상기 단백질을 축소(shorten)시키는 것이 가능하다. 전형적으로, 그러한 단백질들은 구조적인 기능을 가지고(가지거나) 말단에 기능성 도메인을 가진다. 본 발명은 특화된 디스트로핀 프리-mRNA 타겟에 결합하여 상기 유전자를 재-지시(re-direct)하는 프로세싱을 할 수 있는 안티센스 분자들을 기재한다.
- [0056] 안티센스 분자들에 기반한 치료법의 바람직한 목표는 가능한 가장 낮은 농도의 안티센스 분자를 제공하여 최대한의 엑손 건너뛰기를 얻는 것이다. 일반적으로, 안티센스 분자는 강력하고 확고한 엑손 건너뛰기를 야기하거나; 약하고 우발적인 엑손 건너뛰기를 야기하거나 또는 엑손 건너뛰기를 발생시키지 않을 수도 있다. 낮은 치료학적 투여량에서 강력하고 확고하게 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도할 수 있는 안티센스 분자들(단독 또는 조합)을 개발하는 것이 바람직하다.
- [0058] **안티센스 분자**
- [0059] 본 발명의 첫 번째 양태에 따르면, 본 발명은 엑손 건너뛰기를 유도하기 위해 선택된 타겟에 결합할 수 있는 안티센스 분자들을 제공한다. 디스트로핀 유전자 전사체의 엑손에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위해, 본 발명의 안티센스 분자들은 표 1에 나열된 화합물들의 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

- [0060] 또한, 본 발명은 엑손 건너뛰기를 유도하기 위해 선택된 타겟에 결합할 수 있는 2개 이상의 안티센스 분자들의 조합 또는 "각테일"을 제공한다. 바람직하게는, 디스트로핀 유전자 전사체의 엑손에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위해, 본 발명의 안티센스 분자들은 표 2에 나열된 화합물들의 군으로부터 선택된다.
- [0061] 보존 스플라이싱 위치(consensus splice sites)를 완벽하게 마스크하는 안티센스 분자들을 디자인하는 것이 타겟된 엑손에서 건너뛰기를 반드시 발생시키는 것은 아니다. 더 나아가, 본 발명자들은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 크기 또는 길이 자체가 안티센스 분자들을 디자인하는 데 있어서 항상 주된(primary) 요인이 아니라는 것을 발견하였다. 엑손 19 같은 몇몇 타겟들의 경우, 12 염기 길이 정도의 짧은 안티센스 올리고뉴클레오타이드들이 더 긴(20-31 염기의) 올리고뉴클레오타이드들보다 덜 효과적일 지라도 엑손 건너뛰기를 유도할 수 있었다. 마우스 디스트로핀 엑손 23 같은 다른 타겟들의 경우, 단지 17 잔기 길이의 안티센스 올리고뉴클레오타이드들이 25개의 뉴클레오타이드들의 다른 중첩하는(overlapping) 화합물 보다 더 효과적인 건너뛰기를 유도할 수 있었다. 하지만, 본 발명에서는 더 긴 안티센스 분자들이 엑손 건너뛰기 유도에 있어서 더 짧은 분자들 보다 통상적으로 더 효과적이라는 것이 일반적인 결과였다. 따라서, 본 발명의 안티센스 분자들은 24 내지 30 핵산(nucleic acids)의 길이를 가지는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 약 28개의 뉴클레오타이드 길이를 가진다. 예를 들어, 20 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드(H16A(-07+13))는 엑손 16의 엑손 건너뛰기를 유도하는 데 덜 효과적이거나, 보다 짧은 올리고뉴클레오타이드를 포괄하는 31 염기의 안티센스 올리고뉴클레오타이드(H16A(-06+25))가 엑손 건너뛰기를 유도하는 데 효과적이라는 것이 이전에 알려졌다(Harding *et al.*, (2007) *Mol Ther* 15: 157-166).
- [0062] 또한, 본 발명자들은 스플라이싱을 재지시하는 안티센스 분자들에 의해 차단되거나 또는 마스크될 수 있는 어떠한 표준 모티프도 없는 것으로 보인다는 사실을 발견하였다. 마우스 디스트로핀 엑손 23 같은 몇몇 엑손들에서, 상기 엑손의 건너뛰기를 재-지시하기 위해서 공여 스플라이싱 위치가 타겟에 가장 중요(amenable)했다. 공여 스플라이싱 위치의 중첩하는 부위들에 어닐링시키기 위해 일련의 엑손 23-특이적 안티센스 분자들을 디자인하고 테스트하는 것이 유도된 엑손 건너뛰기의 효율에 있어서 현저한 차이(variation)를 나타냈다는 사실을 주목해야 한다. Mann 등(2002)에 의한 보고에 따르면, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 어닐링에 따라 넌센스 돌연변이를 우회하는 효율 상의 유의한 차이가 나타났다("Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy". *J Gen Med*, 4: 644-654). 엑손 23 또는 여러 내부 도메인들의 수용 위치를 타겟팅하는 것이 어떠한 지속적인 엑손 23 건너뛰기도 유도하지 않는다는 것을 발견하였다.
- [0063] 제거를 위해 타겟된 다른 엑손들에서, 공여 스플라이싱 위치를 마스크하는 것은 어떠한 엑손 건너뛰기도 유도하지 않았다. 하지만, 수용 스플라이싱 위치(하기한 바와 같이, 인간 엑손 8)로 안티센스 분자들의 지시를 통해, 강력하고 지속적인 엑손 건너뛰기가 유도되었다. 인간 엑손 8의 제거는 엑손 9의 공동-제거(co-removal)와 밀접하게 연결되어 있다는 사실을 기억해야 한다. 엑손 8 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 엑손 9의 상응하는 부위 간에 높은 서열 상동성이 존재하지 않기 때문에, 교차 반응의 문제는 아닌 것으로 보인다. 오히려, 상기 2개의 엑손들의 스플라이싱 과정이 일반적으로 연결되어 있다. 개과 동물의 세포에서도 제거를 위한 엑손 8로의 타겟팅이 엑손 9의 건너뛰기를 초래한다는 결과가 관찰된 것으로 보아 이는 인간에 국한된 예(isolate instance)는 아니다. 마우스 디스트로핀 프리-mRNA에서 제거를 위한 엑손 23의 타겟팅도 엑손 22의 빈번한 제거를 초래한다. 상기 효과는 투여량-의존적으로 발생하며 2개의 인접한 엑손들의 밀접한 연결된 프로세싱 과정을 의미한다.
- [0064] 다른 타겟된 엑손들에서, 공여 스플라이싱 위치 또는 수용 스플라이싱 위치들에 지시된 안티센스 분자들은 엑손 건너뛰기를 유도하지 않았거나 또는 낮은 건너뛰기를 유도한 반면에, 안티센스 분자들을 내부-엑손성(intra-exonic) 부위(즉, 인간 디스트로핀 엑손 4 내의 엑손 스플라이싱 인헨서)로 어닐링시키는 것이 엑손 건너뛰기를 유도하는 데 가장 효과적이었다. 몇몇 엑손들(예를 들어, 마우스 및 인간 엑손 19 모두)의 건너뛰기는 안티센스 분자들을 많은 모티프들로 타겟팅시킴으로써 용이하게 실시할 수 있다. 즉, 타겟된 엑손 건너뛰기는 공여 스플라이싱 위치 및 수용 스플라이싱 위치, 또는 엑손 스플라이싱 인헨서를 마스크하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 유도된다.
- [0065] 또한, 안티센스 분자들의 각테일이 엑손 건너뛰기를 유도할 것이라고 예상하는 것이 가능하지 않다. 예를 들어, 각각 주어진 엑손의 건너뛰기를 매우 효과적으로 유도하는 2개의 안티센스 분자들의 각테일 조합이 엑손의 건너뛰기를 야기하지 않을 수 있다. 또 다른 예로, H50A(+02+30) 및 H50A(+66+95)은 각각 엑손 50 및 엑손 51의 건너뛰기를 효과적으로 유도한다. 하지만, 각테일로서 조합되는 경우 상기 각테일은 상기 2개의 엑손의 건너뛰기를 낮은 효율로 유도하였다. 이와 유사하게도, 개별적인 안티센스 분자들이 효과적일 지라도

H50A(+02+30) 및 H51A(+66+90) 또는 H50A(+02+30) 및 H51A(+61+90)의 조합은 엑손 50 및 엑손 51의 효율적인 건너뛰기를 야기하지 않았다. 하지만, 세 번째 안티센스 분자([H51D(+16-07)]); 단독으로 엑손 건너뛰기를 야기하지 않음)의 도입으로 3개의 엘리먼트 카테일([H50A(+02+30)], H51A(+66+90) 및 [H51D(+16-07)])를 제조하였으며, 상기 카테일은 1 nM 이하의 농도에서 엑손 50 및 엑손 51의 건너뛰기를 유도할 수 있었다.

[0066] 선택적으로, 그 자체로 효과적이지 않거나 또는 낮은 효율을 나타내는 2개 또는 3개의 안티센스 분자들의 조합은 우수한 엑손 건너뛰기를 야기할 수 있다. 예를 들어, H26A(-07+19)(서열목록 제39서열), H26A(+24+50)(서열목록 제40서열) 및 H26A(+68+92)(서열목록 제41서열)은 단독으로는 낮은 효율의 엑손 26 건너뛰기를 야기하고 많은 엑손 건너뛰기(엑손 26-29 또는 엑손 27-30)도 유도한다. 하지만, 3개의 안티센스 분자들이 카테일로 조합되는 경우 매우 높은 효율의 엑손 26 건너뛰기를 일으킨다.

[0067] 상술한 예 및 논의사항(discussion)으로부터 조합의 기능(work) 여부를 정확하게 예측하는 방법이 존재하지 않는다는 것이 명백하다.

[0068] 안티센스 분자들은 "투여량-의존적(dose dependant)"으로 또는 "투여량-비의존적(non-dose dependant)"으로 엑손 건너뛰기를 야기할 수 있다. 투여량-의존적인 경우, 더 많은 양의 안티센스 분자들이 더 우수한 엑손 건너뛰기를 유도하는 반면에 투여량-비의존적 안티센스 분자들은 매우 낮은 투여량에서도 엑손 건너뛰기를 유도할 수 있다. 예를 들어, H46A(+81+109)(서열목록 제12서열)이 투여량(600 nM부터 25 nM까지)에 관계없이 동일하게 우수한 엑손 46 건너뛰기를 유도하는 것을 도 15로부터 확인할 수 있다. 이와 대조적으로, H57A(-10+20)(서열목록 제20서열)은 100 nM에서 강력한 엑손 57 건너뛰기를 유도하지만 50 nM에서는 감소된 건너뛰기를 25 nM에서는 더욱 감소된 건너뛰기를 유도하였다(도 24).

[0069] 투여량-비의존적으로 엑손 건너뛰기를 유도하는 안티센스 분자를 선택하는 것이 바람직한 데, 이는 상기 안티센스 분자가 매우 낮은 농도에서 투여될 수 있고 여전히 치료 효과를 제공하기 때문이다. 하지만, 투여량-의존적으로 엑손 건너뛰기를 유도하는 안티센스 분자를 선택하는 것도 허용될 수 있는데, 이는 상기 안티센스 분자가 낮은 농도에서 우수한 또는 매우 훌륭한 엑손 건너뛰기를 유도하는 경우이다. 바람직하게는, 본 발명의 안티센스 분자들은 500 nM 이하의 농도, 보다 바람직하게는 200 nM 이하의 농도 및 보다 더 바람직하게는 100 nM, 50 nM 또는 25 nM 이하의 농도에서도 우수한 또는 매우 훌륭한 엑손 건너뛰기를 유도할 수 있다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 분자들은 100 nM의 농도에서 30% 보다 더 큰 레벨로 엑손 건너뛰기를 유도할 수 있다.

[0070] 엑손 건너뛰기의 조절에 이용하기 위해 적합한 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 동정하고 선택하기 위해, 그의 기능이 조절될 핵산 서열이 우선적으로 동정되어야만 한다. 예를 들어, 특정 질환 또는 질병 상태(state)와 관계된 유전자(또는 상기 유전자로부터 전사된 mRNA) 또는 감염성 인자(infectious agent)로부터 유래된 핵산 분자일 수 있다. 본 발명의 맥락(context) 안에서, 바람직한 타겟 위치(들)은 mRNA 스플라이싱에 포함된 위치(즉, 스플라이싱 공여 위치, 스플라이싱 수용 위치, 또는 엑손성 스플라이싱 인핸서 엘리먼트)이다. 또한, 스플라이싱 가지점(splicing branch points), 엑손 인지 서열(exon recognition sequences) 또는 스플라이싱 인핸서(splicing enhancers)도 mRNA 스플라이싱의 조절을 위한 잠재적인 타겟 위치이다.

[0071] 바람직하게는, 본 발명은 효과적이고 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도하기 위해 디스트로핀 프리-mRNA에서 선택된 타겟에 결합할 수 있는 안티센스 분자들을 제고하는 것이 목적이다. 뒤시엔형 근이영양증은 기능성 디스트로핀 유전자 산물의 합성을 방해하는 돌연변이들로부터 일어난다. 전형적으로, 상기 뒤시엔형 근이영양증 유전자 손상은 넌센스 돌연변이 또는 리딩 프레임의 파괴하는 결실, 중복(duplications) 또는 미세-결실, 또는 삽입 같은 게놈 재배열(genomic rearrangements)이다. 인간 디스트로핀 유전자가 크고 복잡한 유전자(약 11,000 염기의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 가지는 성숙한 mRNA를 발생시키기 위해 함께 스플라이싱될 79 개의 엑손들을 포함)이기 때문에, 상기 돌연변이들이 발생할 수 있는 많은 위치들이 존재한다. 결과적으로, 디스트로핀 유전자 내 많은 다른 질병-야기성 돌연변이들을 처리하기 위한 포괄적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드-기반된 치료법은 스플라이싱 과정 동안 제거를 위해 많은 엑손들이 타겟팅될 수 있다는 것을 필요로 할 것이다.

[0072] 본 발명의 맥락(context) 안에서, 바람직한 타겟 위치(들)은 mRNA 스플라이싱에 포함된 위치(즉, 스플라이싱 공여 위치, 스플라이싱 수용 위치, 또는 엑손성 스플라이싱 인핸서 엘리먼트)이다. 또한, 스플라이싱 가지점, 엑손 인지 서열 또는 스플라이싱 인핸서도 mRNA 스플라이싱의 조절을 위한 잠재적인 타겟 위치이다.

[0073] 각 분자 내에 충분한 수의 상응하는 위치들이 서로 수소결합될 수 있는 뉴클레오타이드들에 의해 점유되는



경우, 올리고뉴클레오타이드 및 DNA 또는 RNA는 서로 상보적이다. 따라서, 본 명세서의 용어 "특이적으로 혼성화할 수 있는(specifically hybridisable)" 및 "상보적인(complementary)"은 상기 올리고뉴클레오타이드 및 DNA 또는 RNA 타겟 간에 안정적이고 특이적인 결합이 일어날 수 있기에 충분한 정도의 상보성(complementarity) 또는 정확한 한 쌍(pairing)을 나타내는 데 사용되는 용어이다. 안티센스 분자의 서열이 특이적으로 혼성화될 타겟의 서열과 100% 상보적일 필요가 없다는 것은 당업계에서 자명하다. 타겟 DNA 또는 RNA 분자와 화합물(안티센스 분자)의 결합이 타겟 DNA 또는 RNA 분자의 정상적인 기능을 방해하여 유용성의 손실(a loss of utility)을 야기하는 경우, 상기 안티센스 분자는 특이적으로 혼성화할 수 있다는 것을 의미하고 이는 특이적인 결합이 요구되는 조건(즉, *인 비보* 어세이 또는 치료의 경우, 생리학적 조건; 및 *인 비트로* 어세이의 경우, 어세이가 실시되는 조건) 하에서 비-타겟 서열과 상기 안티센스 화합물의 비-특이적 결합을 피하기에 충분한 정도의 상보성이 있다는 것을 의미한다.

[0074] 상기 방법이 단백질의 생물학적 기능에 영향을 미치지 않고 짧아질 수 있는 단백질 내의 어떠한 엑손을 제거시킬 수 있는 안티센스 분자를 선택하는 데 이용되는 경우, 엑손 결실은 짧아지도록 전사된 mRNA에서 리딩 프레임 쉬프트를 초래하지 않는다. 3개의 엑손의 선형 서열에서 첫 번째 엑손의 말단이 하나의 코돈에서 3개의 뉴클레오타이드 중 2개를 인코딩하고 다음의 엑손이 결실되는 경우, 상기 선형 서열에서 세 번째 엑손은 상기 하나의 코돈의 뉴클레오타이드 트리플렛(triplet)을 완성할 수 있는 단일 뉴클레오타이드로 시작해야만 한다. 만일 상기 세 번째 엑손이 단일 뉴클레오타이드로 시작하지 않는다면, 절단된(truncated) 또는 비-기능성 단백질의 발생을 초래할 리딩 프레임 쉬프트가 일어날 것이다.

[0075] 구조 단백질에서 엑손의 말단에 위치한 코돈 배열이 항상 코돈 말단에서 일어나지 않을 수 있다는 것이 자명할 것이다. 따라서, mRNA의 인-프레임(in-frame) 리딩을 보장하기 위해 프리-mRNA로부터 하나 이상의 엑손을 결실할 필요가 있을 것이다.

[0076] 상기 상황에서, 다수의 안티센스 올리고뉴클레오타이드들이 본 발명의 방법에 의해 선택될 필요가 있는데, 각 안티센스 분자는 결실될 엑손들에서 스플라이싱을 유도하는 다른 부위로 지정된다.

[0077] 프리-mRNA 분자 내에 원하는 위치에 선택적으로 결합할 수 있는 한 안티센스 분자의 길이는 다양할 수 있다. 상기 서열의 길이는 본 명세서에 기재된 선택 과정에 따라 결정될 수 있다. 일반적으로, 안티센스 분자의 길이는 약 10개의 뉴클레오타이드부터 약 50개의 뉴클레오타이드일 것이다. 하지만, 상기 범위 내의 어떠한 뉴클레오타이드의 길이도 본 발명의 방법에 이용될 수 있다는 것은 자명할 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 안티센스 분자의 길이는 17 내지 30개의 뉴클레오타이드이다. 놀랍게도, 더 긴 안티센스 분자들이 엑손 건너뛰기를 유도하는 데 종종 더욱 효과적이라는 것을 발견하였다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 안티센스 분자의 길이는 24 내지 30개의 뉴클레오타이드이다.

[0078] 디스트로핀 유전자에서 엑손들이 어떻게 연결될 수 있는지를 결정하기 위해, 참조문헌이 엑손 경계 맵(exon boundary map)에 이용될 수 있다. 하나의 엑손과 다른 엑손의 연결은 연결될 엑손의 5'-보더(border)에 존재하는 염기서열과 같은 수의 3'-보더를 보유하는 엑손에 기반한다. 따라서, 엑손 7이 결실되는 경우 엑손 6은 리딩 프레임을 유지하기 위해 엑손 12 또는 엑손 18과 연결되어야만 한다. 이를 위해, 안티센스 올리고뉴클레오타이드들은 첫 번째 예에서 엑손 7 내지 엑손 11을 위한 스플라이싱을 재지시하거나 또는 두 번째 예에서 엑손 7 내지 엑손 17을 위한 스플라이싱을 재지시하도록 선택될 필요가 있다. 엑손 7 결실 주위의 리딩 프레임을 회복하기 위한 다소 간단한 다른 접근방법은 2개의 플랭킹(flanking) 엑손들을 제거하는 것이다. 엑손 6 및 엑손 8 건너뛰기의 도입은 엑손 5 내지 엑손 9의 스플라이싱을 가진 인-프레임 전사체를 초래할 것이다. 하지만, 프리-mRNA로부터 엑손 8의 제거를 타겟팅하는 것은 엑손 9의 공동-제거를 초래하고 이로 인해 생산된 전사체는 엑손 10에 연결된 엑손 5를 가진다. 엑손 9의 포함 또는 제거는 리딩 프레임을 변화시키지 않는다.

[0079] 일단 테스트될 안티센스 분자들이 동정되었다면, 상기 분자들은 당업계에 알려진 표준 기술들을 이용하여 제조된다. 안티센스 분자들을 생산하기 위한 가장 일반적인 방법은 2' 하이드록시리보오스(hydroxyribose) 위치의 메틸레이션 및 포스포로티오에이트 백본(phosphorothioate backbone)의 삽입이다. 상기 과정은 인위적으로 RNA를 닮지만 뉴클레아제 분해에 보다 더 저항성을 가지는 분자들을 생산한다.

[0080] 안티센스 분자들과의 듀플렉스(duplex) 형성 동안 프리-mRNA의 분해를 피하기 위해, 본 발명의 방법에서 이용된 안티센스 분자들은 내인성 RNase H에 의한 분해를 최소화 또는 예방하기 위해 개조될 수 있다. 이러한 특징은 매우 바람직하는데, 이는 세포내 환경 또는 RNase H를 포함하는 조추출물과의 접촉 하에서 메틸레이션되지 않은 RNA 올리고뉴클레오타이드의 존재는 프리-mRNA:안티센스 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스의 분해를 촉발할 것이기 때문이다. 상기 분해를 우회하거나 또는 유도하지 않는 변형된 안티센스 분자들의 형태는 본 발명의 방법

에서 이용될 수 있다. 뉴클레아제 저항성은 부분적으로 포화되지 않은 지방성 탄화수소 체인 및 하나 이상의 극성 또는 전하를 띤 그룹들(예를 들어, 카르복실산 그룹, 에스테르 그룹 및 알코올 그룹)을 포함하도록 본 발명의 안티센스 분자들을 변형시킴으로서 달성될 수 있다.

[0081] RNA와 듀플렉스를 형성하는 경우에 세포내 RNase H에 의해 절단되지 않는 안티센스 분자들의 예는 2'-O-메틸 유도체들이다. 2'-O-메틸-올리고리보뉴클레오타이드들은 세포 내 환경 및 동물 조직에서 매우 안정적이고 RNA와 형성한 듀플렉스는 리보- 또는 데옥시리보-카운터파트(ribo- or deoxyribo-counterparts)와 형성한 듀플렉스보다 더 높은 Tm 값을 가진다. 선택적으로, 본 발명의 뉴클레아제-저항성 안티센스 분자는 최소 하나 이상의 불소화된(fluorinated) 3'-말단(terminus) 뉴클레오타이드들을 가질 수 있다. 보다 선택적으로, 본 발명의 뉴클레아제-저항성 안티센스 분자들은 최소 2개 이상의 마지막 3'-말단 뉴클레오타이드 염기들 간에 포스포로티오에이트 결합 연결을 포함하고, 바람직하게는 최소 4개 이상의 3'-말단 뉴클레오타이드 염기들 간에 포스포로티오에이트 결합으로 연결된다.

[0082] RNase H를 활성화시키지 않는 안티센스 분자들은 알려진 기술들에 따라 제조될 수 있다(참고: 미국등록특허 제 5,149,797호). 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 서열일 수 있는 안티센스 분자들은 듀플렉스의 한 일원으로서 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 듀플렉스 분자에 RNase H의 결합을 입체적으로 방해 또는 예방하는 간단한 구조적 변형(modification)을 포함하고, 상기 구조적 변형은 듀플렉스 형성을 실질적으로 방해 또는 파괴하지 않는다. 듀플렉스 형성에 포함된 올리고뉴클레오타이드의 부분(portions)은 RNase H 결합에 포함된 올리고뉴클레오타이드 부분들과 실질적으로 다르기 때문에, RNase H를 활성화시키지 않는 많은 안티센스 분자들이 유용할 수 있다. 예를 들어, 상기 안티센스 분자들은 적어도 하나 이상의 또는 모든 인터-뉴클레오타이드 브릿징(inter-nucleotide bridging) 포스페이트 잔기들이 메틸 포스포네이트(methyl phosphonates), 메틸 포스포로티오에이트(methyl phosphorothioates), 포스포모폴리데이트(phosphoromorpholides), 포스포로피페라지데이트(phosphoropiperazides) 및 포스포아미데이트(phosphoramidates) 같은 변형된 포스페이트인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드들일 수 있다. 예를 들어, 다른 인터-뉴클레오타이드 브릿징 포스페이트 잔기는 기재된 바와 같이 변형될 수 있다. 다른 비-제한적 예에 있어서, 상기 안티센스 분자들은 적어도 하나 이상이거나 또는 모든 뉴클레오타이드들이 2'-저급 알킬 모이어티(2'-lower alkyl moiety; 예를 들어, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>로, 메틸, 에틸, 에테닐, 프로필, 1-프로페닐, 2-프로페닐 및 이소프로필 같은 선형 또는 가지형, 포화된 또는 비포화된 알킬)를 포함하는 것을 특징으로 하는 분자들이다. 예를 들어, 다른 뉴클레오타이드들은 기재된 바와 같이 변형될 수 있다.

[0083] 안티센스 올리고뉴클레오타이드들은 안티센스 분자의 바람직한 형태이고, 본 발명은 하기에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오타이드 모방체(mimetics)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 올리고머형(oligomeric) 안티센스 분자를 포함한다.

[0084] 본 발명에서 유용한 바람직한 안티센스 화합물의 특별한 실시예들은 변형된 백본 또는 비-천연성 인터-뉴클레오시드(non-natural inter-nucleoside) 연결을 포함하는 올리고뉴클레오타이드들을 포함한다. 본 명세서에서 정의된 바와 같이, 변형된 백본을 가지는 올리고뉴클레오타이드들은 백본에 인 원자를 가지는 올리고뉴클레오타이드들 및 백본에 이를 포함하지 않는 올리고뉴클레오타이드들을 포함한다. 본 명세서 및 때때로 당업계에서 언급된 목적에 따라, 인터-뉴클레오시드 백본에 인 원자를 가지지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드들도 올리고뉴클레오타이드들로 간주될 수 있다.

[0085] 다른 바람직한 올리고뉴클레오타이드 모방체에 있어서, 뉴클레오타이드 유닛의 당 및 인터-뉴클레오시드 연결(즉, 백본) 모두는 신규한 그룹으로 대체된다. 염기 유닛은 적절한 핵산 타겟 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 앞서 언급한 올리고머형 화합물인 매우 우수한 혼성화 특성을 가지는 것으로 알려진 올리고뉴클레오타이드 모방체는 펩타이드 핵산(peptide nucleic acid, PNA)로서 언급된다. PNA 화합물에 있어서, 올리고뉴클레오타이드의 당-백본은 백본을 포함하는 아미드(amide), 특히 아미노에틸글라이신 백본으로 대체된다. 뉴클레오-염기(nucleo-bases)는 유지되고 백본의 아미드 부분의 aza 질소 원자와 직접적으로 또는 간접적으로 결합된다.

[0086] 또한, 변형된 올리고뉴클레오타이드들은 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드들은 뉴클레오베이스(당업계에서는 종종 "염기(base)"로 단순히 언급됨) 변형 또는 치환을 포함할 수도 있다. 어떤 뉴클레오베이스는 본 발명의 올리고머형 화합물의 결합 친화도를 증가시키는 데 특히 유용하다. 상기 뉴클레오베이스들은 2-아미노프로필아데닌(aminopropyladenine), 5-프로피닐우라실(propynyluracil) 및 5-프로피닐사이토신(propynylcytosine) 같은 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된

퓨린을 포함한다. 5-메틸사이토신 치환은 0.6-1.2℃까지 핵산 듀플렉스 안정성을 증가시키는 것을 알려져 있으며, 본 발명에서 바람직한 염기 치환이고 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합되는 경우 보다 더 바람직하다.

[0087] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 다른 변형은 올리고뉴클레오타이드의 활성, 세포 내 분포 또는 세포 내 섭취(uptake)를 증가시키는 하나 이상의 모이어티 또는 컨주게이트(conjugates)와 상기 올리고뉴클레오타이드를 화학적으로 연결하는 것을 포함한다. 상기 모이어티는 콜레스테롤 모이어티 같은 지질 모이어티(lipid moieties), 콜린산, 헥실-S-트리틸티올(hexyl-S-tritylthiol) 또는 티오폴레스테롤 같은 티오에테르, 도데칸디올(dodecandiol) 또는 언데실 잔기(undecyl residues) 같은 지방성 체인(aliphatic chain), 다이-헥사데실-락-글라이세롤(di-hexadecyl-rac-glycerol) 또는 트리에틸암모늄 1,2-다이-O-헥사데실-락-글라이세로-3-H-포스포네이트(triethylammonium 1,2-di-O-hexadecyl-rac-glycero-3-H-phosphonate) 같은 포스포리피드, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글라콜 체인, 또는 아다만테인 아세트산(adamantane acetic acid), 팔미틸 모이어티 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0088] 상기 화합물에서 모든 위치를 균일하게 변형하는 것이 반드시 필요하지 않으며, 실질적으로 상술한 변형들 중 하나 이상의 변형이 단일 화합물 또는 심지어 하나의 올리고뉴클레오타이드 내 단일 뉴클레오시드에 삽입될 수 있다. 또한, 본 발명은 키메라성 화합물(chimeric compounds)인 안티센스 화합물을 포함한다. 본 발명의 맥락에서 사용되는 용어 "키메라성(chimerid)" 안티센스 화합물 또는 "키메라(chimeras)"는 2개 이상의 화학적으로 독특한 부위들을 포함하는 안티센스 분자(특히, 올리고뉴클레오타이드)로, 상기 부위는 각각 적어도 하나 이상의 모노머 유닛(즉, 올리고뉴클레오타이드 화합물의 경우에 하나의 뉴클레오타이드)로 구성되어 있다. 상술한 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 하나 이상의 부위를 포함하고, 뉴클레아제 분해에 대해 증가된 저항성, 증가된 세포 내 섭취 및 타겟 핵산에 대한 증가된 결합 친화도를 위한 추가적인 부위를 허용하도록 변형되는 것을 특징으로 한다.

#### [0090] 안티센스 분자를 제조하기 위한 방법

[0091] 본 발명에 따라 이용된 안티센스 분자들은 잘-알려진 고상(solid phase) 합성 기술을 통해 편리하고 쉽게 제조될 수 있다. 상기 합성을 위한 장치는 예를 들어 Applied Biosystems(Foster City, CA, 미국)을 포함하는 여러 회사들(vendors)에 의해 판매되고 있다. 변형된 고체 지지체 위에 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법은 미국등록특허 제4,458,066호에 기재되어 있다.

[0092] 당업계에 알려진 상기 합성을 위한 다른 방법들이 추가적으로 또는 선택적으로 이용될 수 있다. 포스포로티오에이트 및 알킬화된 유도체들 같은 올리고뉴클레오타이드들을 제조하기 위해 유사한 기술들을 이용하는 것이 잘 알려져 있다.

[0093] 상기 자동화된 일 구현예에 있어서, 디에틸-포스포라미디트(diethyl-phosphoramidites)를 출발 물질(starting materials)로 이용하여 Beaucage 등(*Tetrahedron Letters*, 22: 1859-1862(1981))에 의해 기재된 바와 같이 합성될 수 있다.

[0094] 본 발명의 안티센스 분자들은 인 비트로에서 합성되며 생물학적 기원의 안티센스 조성물 또는 안티센스 분자의 인 비보 합성을 지시하도록 디자인된 유전성 벡터 컨스트럭트의 안티센스 조성물을 포함하지 않는다. 또한, 본 발명의 분자들은 섭취, 분포 및/또는 흡수를 돕기 위해 혼합, 캡슐화, 컨주게이션되거나 또는 그렇지 않다면 리포솜, 수용체-타겟된 분자, 구강 투여용, 직장 투여용, 국부 투여용 또는 다른 제형 같은 다른 분자들, 화합물의 분자 구조물 또는 혼합물과 결합될 수 있다.

#### [0096] 치료제(Therapeutic agent)

[0097] 본 발명은 예방제 또는 치료제로서 이용될 수 있으며, 이는 유전성 질환의 치료 목적으로 이용될 수 있다.

[0098] 따라서, 본 발명의 일 구현예에 있어서 본 발명은 효과적이고 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도하기 위해 디스트로핀 프리-mRNA에 선택된 타겟에 결합하는 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 첨가제와 혼합된 치료학적으로 유효한 양의 안티센스 분자들을 제공한다.

[0099] 본 명세서에서 언급되는 구 "약제학적으로 허용되는(pharmaceutically acceptable)"은 환자(patient)에게 투여되는 경우에 생리학적으로 견딜 수 있고 전형적으로 알려지 또는 이와 유사하게 해로운 반응(예컨대, 급성위연동이상항진(gastric upset) 및 이와 유사한 증상)을 초래하지 않는 분자적 실체(entities) 및 조성물을 의미한다. 본 명세서의 용어 "담체(carrier)"는 상기 화합물이 투여될 때 포함되는 희석제, 보조제, 첨가제 또는 운반체(vehicle)를 의미한다. 상기 약제학적 담체는 물, 그리고 석유, 동물, 야채 또는 합성 기원의 오일을 포

합하는 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨(sesame) 오일 및 이의 유사체를 포함하는 오일 같은 멸균 액체일 수 있다. 바람직하게는, 물 또는 염 용액, 그리고 수용성 텍스트로오스 및 글라이세롤 용액은 담체(특히, 주입 용액)로서 이용된다. 적합한 약제학적 담체는 Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990)에 기재되어 있다.

[0100] 본 발명의 보다 특별한 형태에 있어서, 본 발명은 약제학적으로 허용되는 희석제, 보존제(preservatives), 가용화제, 유화제, 보조제(adjuvants) 및/또는 담체와 함께 안티센스 분자의 치료학적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 다양한 완충용액의 희석제(예를 들어, Tris-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도 조절제, 그리고 세제(detergents) 및 가용화제(예를 들어, Tween 80, 폴리소르베이트(Polysorbate) 80), 항-산화제(예를 들어, 아스코르브산, 소듐 메타바이설파이트(sodium metabisulfite)), 보존제(예를 들어, 티머솔(Thimersol), 벤질 알코올) 및 거대물질(bulking substances; 예를 들어, 락토오스, 만니톨) 같은 첨가제(additives)를 포함한다. 상기 물질은 PLA(polylactic acid), PGA(polyglycolic acid) 등을 포함하는 고분자화합물의 미립자 형태로 리포솜 내로 삽입될 수 있다. 또한, 히알루론산이 이용될 수 있다. 상기 화합물은 물리적 상태, 안정성, 인 *비보* 배출 속도(rate of *in vivo* release) 및 본 발명의 단백질 및 유도체의 인 *비보* 제거율(rate of *in vivo* clearance)에 영향을 줄 수 있다. Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed.(1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042)의 페이지 14351712 페이지를 참고하고, 이의 내용은 본 명세서에서 참조로서 삽입된다. 상기 조성물은 액체 형태로 제조되거나, 또는 동결건조된 형태 같은 건조 파우더로 제공될 수 있다.

[0101] 본 발명에 따라 제공된 약제학적 조성물은 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서도 투여될 수 있다는 것은 자명할 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 투여용 약제학적 조성물은 구강 주입, 또는 폐 또는 비강 주입에 의해 투여된다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 안티센스 분자는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 또는 피하 투여에 의해 운반된다.

[0103] 안티센스 분자-기반된 치료법

[0104] 또한, 유전성 질환 조절용 의약품의 제조를 위한 본 발명의 안티센스 분자의 용도가 소개된다.

[0105] 안티센스 분자의 치료학적 유효량의 운반은 이전에 공개된 방법들에 의해 실시될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 분자의 세포 내 운반은 안티센스 분자의 혼합물(admixture) 및 블록 공중합체(block copolymer)의 유효량을 포함하는 조성물을 통해 이루어질 수 있다. 상기 방법의 예는 미국특허출원번호 제20040248833호에 기재되어 있다.

[0106] 안티센스 분자의 핵으로의 운반에 대한 다른 방법들은 Mann CJ 등(Antisense-induced exon skipping and the synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc., Natl. Acad. Science*, 98(1), 42-47(2001)) 및 Gebiski 등(*Human Molecular Genetics*, 12(15): 1801-1811(2003))에 기재되어 있다.

[0107] 네이키드(naked) DNA 또는 리피드 담체와의 복합체 같은 발현 벡터를 이용하여 핵산분자를 세포로 도입하는 방법은 미국등록특허 제6,806,084호에 기재되어 있다.

[0108] 콜로이드 분산 시스템(colloidal dispersion system)으로 안티센스 분자를 운반하는 것이 바람직할 수 있다. 콜로이드 분산 시스템은 거대분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로스피어, 비드 및 O/W(oil-in-water)형 에멀전, 마이셀, 복합형 마이셀 및 리포솜 또는 리포솜 제형을 포함하는 리피드-기반된 시스템을 포함한다.

[0109] 리포솜은 인 *비트로* 및 인 *비보* 운반 전달체(delivery vehicles)로서 유용한 인공적인 막 운반체이다. 상술한 제형들은 네트 양이온성, 음이온성 또는 중성 전하의 특징을 가질 수 있으며, 인 *비트로*, 인 *비보* 및 엑스 *비보* 운반 방법에서 유용한 특질을 가진다. 0.2-4.0  $\mu\text{m}$ 의 크기를 가지는 LUV(large unilamellar vesicles)는 큰 거대분자를 포함하는 수용성 완충액의 상당량(substantial percentage)을 캡슐화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. RNA 및 DNA는 수용성 내부로 캡슐화되어 생물학적 활성 형태로 세포에 운반될 수 있다(Fraley, *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 6: 77(1981)).

[0110] 리포솜이 효과적인 유전자 전달체로 기능하기 위해, 다음과 같은 특징이 존재해야 한다: (1) 생물학적 활성의 저해 없이 목적 안티센스 분자의 고효율 캡슐화; (2) 비-타겟 세포와 비교하여 타겟 세포와의 우선적이고 높은 결합력; (3) 타겟 세포의 세포질로 운반체 내의 수용성 함유물의 고효율 운반; 및 (4) 유전 정보의 정확하고 효과적인 발현(Mannino, *et al.*, *Biotechniques*, 6: 682(1988)).

[0111] 통상적으로, 리포솜 조성물은 포스포리피드, 특히 고상-전이-온도(high-phase-transition-temperature) 포스포



리피드와 조합되거나, 또는 스테로이드, 특히 콜레스테롤과 조합된다. 다른 포스포리피드 또는 다른 리피드도 이용될 수 있다. 리포솜의 물리적인 특징은 pH, 이온 강도 및 2가 양이온의 존재에 따라 다르다.

[0112] 선택적으로, 약제학적 조성물을 제조하기 위해 본 발명의 안티센스 컨스트럭트는 다른 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 조합될 수 있다. 적합한 담체 및 희석제는 등장성 염 용액(예를 들어, 포스페이트-완충화된 염)을 포함한다. 상기 조성물은 비경구, 근육내, 정맥내, 피하, 안내, 구강 또는 경피 투여를 위해 제형화될 수 있다.

[0113] 상술한 투여 경로는 숙련된 개업의(practitioner)가 특정 동물 및 상태에 대해 최적의 투여 경로 및 투여량을 용이하게 결정할 수 있기 때문에 하나의 안내(guide)에 불과하다.

[0114] 본 발명의 안티센스 분자들은 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르 또는 이의 염, 또는 인간을 포함하는 동물에 대한 투여에서 생물학적으로 활성 대사물(metabolite) 또는 이의 잔여물(residue)을 (직접적으로 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 어떠한 화합물을 포괄한다. 따라서, 본 발명의 개시내용은 예를 들어, 프로드럭 및 본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용되는 염, 상기 프로드럭의 약제학적으로 허용되는 염, 그리고 다른 생물등가물(bioequivalents)로 제시될 수 있다.

[0115] 본 명세서에서 용어 "약제학적으로 허용되는 염(pharmaceutically acceptable salts)"은 본 발명의 화합물의 생리학적 및 약제학적으로 허용되는 염을 의미한다: 즉, 모 화합물(parent compound)의 소망하는 생물학적 활성을 가질 뿐 아니라 바람직하지 않은 독성 효과(toxicological effects)를 가지지 않는 염.

[0116] 올리고뉴클레오타이드의 경우, 약제학적으로 허용되는 염의 바람직한 예는 (a) 소듐, 포타슘, 암모니움, 마그네슘, 칼슘, 스퍼민 및 스퍼미딘 같은 폴리아민 등과 같은 양이온과 함께 형성된 염; (b) 염산, 브롬산, 황산, 인산, 질산 및 이의 유사체 같은 무기산과 함께 제조된 산-첨가 염(acid addition salts); (c) 아세트산, 옥살산, 타타르산(tartaric acid), 숙신산, 말레산, 푸마르산(fumaric acid), 글루콘산, 구연산, 말릭산, 아스코르빈산, 벤조산, 타닌산, 팔미트산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌설폰산, 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 나프탈렌다이설폰산, PGA 및 이의 유사체 같은 유기산과 함께 제조된 염; 및 (d) 염소, 브롬 및 요오드 같은 엔리덴탈 음이온과 함께 제조된 염. 본 발명의 약제학적 조성물은 국부 또는 전신성 치료가 바람직한 지 여부, 그리고 치료될 부위에 따라 많은 방법으로 투여될 수 있다. 투여는 안내 투여, 그리고 직장 운반을 포함하는 점막 운반을 포함하는 국부 투여, 파우더 또는 에어로졸의 분무(nebulizer), 기도내(intratracheal), 비강내(intranasal), 상피 및 경피를 통한 흡입(inhalation or insufflation)에 의한 폐 투여, 경구 투여 또는 비경구 투여일 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주입(injection or infusion); 또는 뇌척수강내(intrathecal) 또는 뇌실내 주입 같은 두개강내 투여를 포함한다. 하나 이상의 2'-O-메톡시에틸 변형을 가지는 올리고뉴클레오타이드는 경구 투여에 특히 유용할 것이다.

[0117] 단위 투여 형태(unit dosage form)로 편리하게 제공되는 본 발명의 약제학적 제형은 약제학적 산업에서 잘 알려진 종래의 기술들을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 기술들은 활성 성분(active ingredients)과 약제학적 담체(들) 또는 부형제(들)를 혼합(association)시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 상기 제형은 활성성분과 액체 담체 또는 정교하게 분할된 고형 담체 또는 상기 두 담체와 균일하고 밀접하게 연관(association)시키고, 필요한 경우 상기 산물을 형태화시킴으로써 제조된다.

#### [0119] 본 발명의 키트

[0120] 본 발명은 유전성 질환을 가지는 환자의 치료용 키트를 제공하는 데, 상기 키트는 적합한 용기에 패키징된 본 발명의 하나 이상의 안티센스 분자들 그리고 이의 용도에 대한 지시(instructions)를 포함한다.

[0121] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 본 발명의 키트는 표 1에 제시된 하나 이상의 안티센스 분자들 또는 표 2에 나타난 안티센스 분자의 각테일을 포함할 것이다. 또한, 본 발명의 키트는 완충액 및 안정화제 같은 보조시약(peripheral reagents)을 포함한다.

[0122] 본 발명의 키트의 함유물은 동결건조될 수 있고, 상기 동결건조된 구성성분의 재구축을 위해 추가적으로 적합한 용매를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트의 개별 구성성분들은 분리된 용기에 패키징될 수 있으며, 이와 관련하여 약물(pharmaceuticals) 또는 생물학적 산물의 제조, 이용 또는 세일을 관리하는 정부기관(governmental agency)에 의해 규정된 형태에 대한 안내서(notice)를 포함할 수 있고, 상기 안내서는 인간 투여를 위한 제조, 이용 또는 세일에 관한 정부기관의 승인을 나타낸다.

[0123] 본 발명의 키트의 구성성분이 하나 이상의 액체 용액으로 제공되는 경우, 상기 액체 용액은 수용성 용액, 예를

들어 멸균 수용성 용액일 수 있다. 인 비보 이용을 위해, 발현 컨스트럭트는 약제학적으로 허용되는 주사기형(syringeable) 조성물로 제형될 수 있다. 이 경우, 용기 수단(means)은 흡입기, 주사기, 파이펫, 점안기 또는 이와 유사한 형태의 기구일 수 있으며, 상기 수단을 이용하여 상 제형이 꽤 같은 동물의 영향받는 주위로 적용될 수 있고, 동물로 주입될 수도 있으며, 심지어 상기 키트의 다른 구성성분들과 혼합되어 적용될 수 있다.

[0124] 또한, 본 발명의 키트의 구성성분은 건조되거나 또는 동결건조된 형태로 제공될 수 있다. 시약 또는 구성성분이 건조된 형태로 제공되는 경우, 일반적으로, 재구축은 적합한 용매의 첨가에 의해 이루어진다. 용매도 다른 용기 수단으로 제공될 수 있는 것은 예측될 수 있다. 용기의 수 또는 형태와는 상관없이, 본 발명의 키트는 동물의 신체 안으로 최종 복합 조성물의 주입/투여 또는 위치화(placement)를 돕기 위한 기구(instrument)에 포함되거나 또는 패키징될 수 있다. 상기 기구는 흡입기, 주사기, 파이펫, 집게, 측량형 스포, 점안기 또는 상기 의학적으로 승인된 운반 전달체일 수 있다.

[0125] 당업자는 상술한 본 발명의 방법이 많은 질환들의 치료에 이용되기에 적합한 안티센스 분자들을 동정하는 데 폭넓은 적용성을 가진다는 것을 높이 평가할 것이다.

### 발명의 효과

[0126] 본 발명은 본 발명의 방법에 이용되도록 채택된 치료학적 조성물 뿐 아니라 상기 신규한 안티센스 화합물을 이용하여 엑손 건너뛰기를 유도하는 방법을 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0127] 도 1은 엑손 인지, 인트론 제거 및 스플라이싱 과정에 포함된 모티프 및 도메인을 도식적으로 나타내는 결과이다. 약어, bp(base pair), 염기쌍; 및 ESE(exonic splicing enhancer), 엑손성 스플라이싱 인핸서.

도 2는 질환-야기성 돌연변이를 우회하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드-유도된 엑손 건너뛰기의 개념을 개략적으로 나타낸 도면이다(비율에 따라 도시되지 않음). 첫 번째 사선이 그어진 박스(hatched box)는 mRNA의 나머지 부분이 단백질로 해독되는 것을 방해하는 돌연변이를 포함한 엑손을 나타낸다. 굵은 검은색 막대는 성숙한 mRNA에서 상기 엑손의 포함을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 나타낸다.

도 3은 배양된 정상 인간 근육세포(muscle cells)에서 10 nM의 트랜스펙션(transfection) 농도로 강력하고 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도하는 엑손 3에 지시된 안티센스 분자의 "컵테일"을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 4는 배양된 정상 인간 근육세포에서 25 nM의 트랜스펙션 농도로 강력하고 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도하는 엑손 4에 지시된 안티센스 분자의 "컵테일"을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 5는 엑손 스플라이싱 인핸서(exon splicing enhancer)로 추정되는 엑손 5의 내부 도메인(internal domain)을 지정하는 안티센스 분자[H5A(+35+65)]를 이용하여 강력하고 효과적인 인간 엑손 5 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다. 바람직하게는, 상기 화합물은 배양된 정상 인간 근육세포에서 25 nM의 트랜스펙션 농도로 강력하고 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도한다.

도 6은 배양된 정상 인간 근육세포에서 10 nM의 트랜스펙션 농도로 엑손 8 및 엑손 8/9 모두에서 강력하고 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도하는 엑손 8에 지시된 안티센스 분자의 "컵테일"을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 7은 엑손 10 및 주위의 엑손들의 건너뛰기를 유도하는 다양한 컵테일 및 단일 안티센스 분자를 보여주는 젤 전기영동 사진이다. [H10A(-05+16)] 및 [H10A(+98+119)], 또는 [H10A(-05+16)] 및 [H10A(+130+149)]의 조합은 엑손 10 및 엑손 9 내지 엑손 12의 건너뛰기를 유도하는 반면에, [H10A(-05+16)]는 단독으로 엑손 9 내지 엑손 14의 건너뛰기를 유도한다.

도 8은 엑손 14에 지시된 안티센스 분자[H14A(+31+61)]를 이용한 엑손 14 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 9는 엑손 17에 지시된 안티센스 분자[H17A(+10+35)]를 이용한 엑손 17 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 10은 엑손 26에 지시된 안티센스 분자의 2종류 컵테일을 이용한 젤 전기영동 사진이다. [H26A(-07+19)] 및 [H26A(+24+50)]의 2종류 컵테일(double cocktail)은 엑손 26의 우수한 건너뛰기 효과를 유도하고 상기 컵테일에 안티센스 분자의 추가적인 첨가는 건너뛰기의 효율에 영향을 미치지 않는다.

도 11은 배양된 정상 인간 근육세포에서 25 nM의 트랜스펙션 농도로 강력하고 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도하는 엑손 36에 지시된 안티센스 분자의 "각테일"을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 12는 안티센스 분자 [H43A(+92+117)]를 이용하여 배양된 정상 인간 근육세포에서 25 nM의 농도로 강력하고 지속적인 엑손 43 건너뛰기를 유도하는 것을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 13은 안티센스 분자 [H44A(+65+90)]를 이용하여 농도-의존적으로 엑손 55 건너뛰기를 유도하는 것을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 14는 안티센스 분자 [H45A(-09+25)]를 이용하여 강력하고 지속적인 엑손 45 건너뛰기를 유도하는 것을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 15는 안티센스 분자 [H46A(+81+109)]를 이용하여 강력하고 지속적인 엑손 46 건너뛰기를 유도하는 것을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 16은 안티센스 분자 [H47A(+01+29)]를 이용하여 강력하고 지속적인 엑손 47 건너뛰기를 유도하는 것을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 17은 강력하고 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도하는 엑손 47에 지시된 안티센스 분자의 각테일을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 18은 안티센스 분자[H49A(+45+70)]를 이용하여 강력하고 지속적인 엑손 49 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 19는 안티센스 분자[H50A(+48+74)]를 이용하여 강력하고 지속적인 엑손 50 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 20은 안티센스 분자[H51A(+66+95)]를 이용하여 강력하고 지속적인 엑손 51 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 21은 안티센스 분자[H54A(+67+97)]를 이용하여 강력하고 지속적인 엑손 54 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 22는 안티센스 분자[H55A(-10+20)]가 농도-의존적으로 엑손 55 건너뛰기를 유도한다는 것을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 23은 안티센스 분자[H56A(+92+121)]를 이용하여 강력하고 지속적인 엑손 56 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 24는 안티센스 분자[H57A(-10+20)]가 농도-의존적으로 엑손 57 건너뛰기를 유도한다는 것을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 25는 엑손 59로 지시된 안티센스 분자[H59A(+96+120)]를 이용하여 엑손 59 및 엑손 58/59 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 26은 엑손 60의 엑손 건너뛰기를 유도하는 2개의 서로 다른 각테일을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 27은 안티센스 분자[H63A(+20+49)]를 이용하여 엑손 63 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 28은 안티센스 분자[H64A(+34+62)]를 이용하여 엑손 64 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 29는 농도-의존적으로 엑손 건너뛰기를 유도하는 엑손 66에 지시된 안티센스 분자의 "각테일"을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 30은 안티센스 분자[H67A(+17+47)]를 이용하여 엑손 67 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 31은 농도-의존적으로 엑손 건너뛰기를 유도하는 엑손 68에 지시된 안티센스 분자의 "각테일"을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 32는 25 nM의 트랜스펙션 농도로 엑손 69/70의 강력하고 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도하는 안티센스 분자의 "각테일"을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 33은 엑손 50에서 다양한 레벨의 건너뛰기를 유도하는 엑손 68에 지시된 안티센스 분자의 다양한 "각테일"을

보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 34는 엑손 50/51의 효과적인 건너뛰기를 유도하는 3가지 안티센스 분자의 각테일을 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 35는 엑손 건너뛰기의 다양한 효율을 보여주는 밀도측정(densitometry) 결과를 보여주는 그래프 결과이다.

테스트된 안티센스 분자들은 다음과 같다: 엑손 3, H3A(+30+60) 및 H3A(+61+85); 엑손 4, H4D(+14-11) 및 H4A(+11+40); 엑손 14, H14A(+32+61); 엑손 17, H17A(+10+35); 엑손 26, H26A(-07+19), H26A(+24+50) 및 H26A(+68+92); 및 엑손 36, H36A(-16+09) 및 H36A(+22+51).

도 36은 엑손 건너뛰기의 다양한 효율을 보여주는 밀도측정 결과를 보여주는 그래프 결과이다. 테스트된 안티센스 분자들은 다음과 같다: 엑손 46, H46A(+81+109); 엑손 47, H47A(+01+29); 엑손 48, H48A(+01+28) 및 H48A(+40+67); 및 엑손 49, H49A(+45+70).

도 37은 안티센스 분자[H11A(+50+79)]를 이용하여 엑손 11 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 38은 안티센스 분자[H12A(+30+57)]를 이용하여 엑손 12 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 39는 안티센스 분자[H44A(+59+85)]를 이용하여 엑손 44 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 40은 안티센스 분자[H45A(-03+25)]를 이용하여 엑손 45 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 41은 안티센스 분자[H51A(+71+100)]를 이용하여 엑손 51 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 42는 안티센스 분자[H52A(+09+38)]를 이용하여 엑손 52 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 43은 안티센스 분자[H53A(+33+65)]를 이용하여 엑손 53 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 44는 안티센스 분자[H46A(+93+122)]를 이용하여 엑손 46 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 45는 안티센스 분자[H73A(+02+26)]를 이용하여 엑손 73 건너뛰기를 보여주는 젤 전기영동 사진이다.

도 46a 및 도 46b는 안티센스 분자들의 서열을 보여주는 도면이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0128] 하기의 실시예들은 본 발명의 다양한 양태를 실시하기 위해 심사숙고된 가장 우수한 모드를 설명할 뿐 아니라 상술한 본 발명을 이용하는 방식을 더욱 더 폭넓게 기재하는 데 도움을 준다. 상기 실시예들은 본 발명의 구체적인 범위에 제한되는 것이 아니라 오히려 예증적인 목적으로 제시된다. 본 명세서에서 인용된 참조문헌들은 참조로서 특별히 삽입된다.

[0129] 하기의 실시예에서 명백하게 기재되지 않은 분자적 클로닝, 번역학 및 단백질 화학적 방법들은 종래문헌(literature)에 보고되어 있고, 당업자에 의해 잘 알려져 있다. 예를 들어, 종래의 분자적 생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 기재하고 있는 당업계의 일반적인 텍스트는 다음과 같은 것을 포함한다: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1989); Glover ed., *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K.(1985); 및 Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates/Wiley Intersciences, New York(2002).

### [0131] 실시예

#### [0132] 인간 근육세포에서 유도된 엑손 건너뛰기의 결정 방법

[0133] 모든 엑손에 적용될 수 있는 일관된 경향을 나타내지 않았기 때문에, 안티센스 분자 디자인에서 이상적인 접근 방법을 개발하기 위한 본 발명자들의 시도는 항상 성공적이지 않았다. 이로 인해, 가장 효과적이고 치료학적으로 유용한 안티센스 분자 화합물들의 동정은 실험적 연구들의 결과였다.

[0134] 상술한 실험적 연구들은 스플라이싱 과정에 포함된 잠재적인 모티프들을 동정하기 위한 컴퓨터 프로그램의 이용을 포함하였다. 다른 컴퓨터 프로그램들도 광범위한 2차 구조를 가지지 않아 안티센스 분자의 어닐링을 위한 잠재적인 위치일 수 있는 프리-mRNA의 부위들(regions)을 동정하는 데 이용되었다. 상기 접근방법들은 신뢰할 만하고 효율적인 엑손 건너뛰기의 유도를 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드들을 디자인하는 데 완벽하게 신



되할 만한 것으로 증명되지는 않았다.

- [0135] 인간 디스트로핀 프리-mRNA 상의 어닐링 위치들은 먼저 스플라이싱에 포함된 알려지거나 또는 예상되는 모티프 또는 부위들에 기반된 조사를 위해 선택되었다. 조사를 위해 20머(20Me)의 안티센스 올리고뉴클레오타이드들이 타겟 서열에 상보적으로 디자인되어 Expedite 8909 핵산 합성기(Nucleic Acid Synthesiser)에서 합성되었다. 합성 완료 후, 상기 올리고뉴클레오타이드들은 지지 컬럼(support column)에서 절단되고 탈염 전에 암모늄 하이드록사이드에서 탈-보호화(de-protect)되었다. 올리고뉴클레오타이드 합성의 질은 합성 로그(synthesis log)에서 검출되는 합성 과정 동안 각 탈-보호(deprotection) 단계에서 트리틸 시그널(trityl signals)의 강도에 의해 모니터링되었다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 농도는 희석된 분취액의 흡광도를 260 nm에서 측정함으로써 평가되었다.
- [0136] 이후, 안티센스 분자의 특별한 양이 하기와 같이 인 비트로 어세이에서 엑손 건너뛰기를 유도하는 능력을 테스트하는 데 이용되었다.
- [0137] 간략하게는, 정상 일차 근육모세포 배양액은 피험자 동의서(informed consent)를 받은 후 얻어진 인간 근육 생시료로부터 제조되었다. 상기 세포는 표준 배양 기술을 이용하여 증식되어 근관으로 분화되었다. 이후, 상기 세포는 양이온성 리포플렉스(lipoplexes), 안티센스 분자의 혼합물 또는 양이온성 리포좀 제조물로 올리고뉴클레오타이드의 세포로의 운반을 통해 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 트랜스펙션되었다.
- [0138] 상기 세포는 24시간 동안 성장된 후, 총 RNA를 추출하여 분자적 분석을 실시하였다. 역전사 증폭(RT-PCR)은 디스트로픽 프리-mRNA의 타겟된 부위 또는 유도된 엑손 재-배열을 연구하기 위해 실시되었다.
- [0139] 예를 들어, 엑손 19 건너뛰기를 유도하기 위한 안티센스 분자의 테스트에 있어서, RT-PCR 테스트는 인접한 엑손들의 포함을 검출하기 위해 여러 엑손들을 스캔하였다. 다른 예로, 엑손 19의 건너뛰기를 유도하는 경우 RT-PCR은 엑손 17 및 엑손 21을 가로지르는 증폭을 할 수 있는 프라이머들을 이용하여 실시하였다. 또한, 더욱 더 거대한 산물들의 증폭(예를 들어, 엑손 13-26)은 더 짧은 길이로 유도된 엑손 건너뛰기 전사체에 대해 최소한의 증폭 오류(bias)를 보장하도록 실시하였다. 더 짧은 길이의 산물 또는 엑손 건너뛰기된 산물들은 보다 효과적으로 증폭되는 경향이 있고 측정된 정상적인 전사체 및 유도된 전사체의 잘라진 형태로 보인다.
- [0140] 증폭 반응 산물의 크기는 아가로오스 젤 상에서 측정되었으며, 적절한 크기의 표준과 비교되었다. 상기 산물들의 본질에 대한 최종 확인은 직접적인 DNA 시퀀싱을 통해 실시하였고, 이를 통해 올바른 또는 예상된 엑손 정션(junctions)이 유지되었는 지를 확인하였다.
- [0141] 효과적인 엑손 건너뛰기가 하나의 안티센스 분자로 유도되는 경우, 이후 중첩하는 안티센스 분자들이 합성되어 상술한 바와 같은 어세이로 평가되었다. 효과적인 안티센스 분자에 대한 본 발명자들의 정의는 300 nM 또는 그 이하의 트랜스펙션 농도에서 강력하고 지속적인 엑손 건너뛰기를 유도하는 안티센스 분자이다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 분자들은 100 nM의 농도에서 30% 이상의 레벨로 엑손 건너뛰기를 유도할 수 있다.
- [0143] 밀도측정방법(Densitometry Methods)
- [0144] 엑손 건너뛰기 과정의 결과들에 대한 밀도측정 분석을 통해 안티센스 분자들이 소망하는 효율을 달성하였는 지를 평가하였다. 증폭 산물은 2% 아가로오스 젤에 분획화하여 EtBr(ethidium bromide)로 염색시킨 후, Chemi-Smart 3000 gel documentation system(Vilber Lourmat, Marne La Vallee)에 의해 이미지를 캡처링하였다. 이후, 밴드들이 제조자의 지시에 따라 gel documentation system(Bio-Profil, Bio-ID version 11.9, Vilber Lourmat, Marne La Vallee)을 이용하여 분석되었다.
- [0145] 다음과 같은 안티센스 분자들을 이용하여 밀도측정을 실시하였다: (a) 도 35에서, 엑손 3, H3A(+30+60) & H3A(+61+85); 엑손 4, H4D(+14-11) & H4A(+11+40); 엑손 14, H14A(+32+61); 엑손 17, H17A(+10+35); 엑손 26, H26A(-07+19), H26A(+24+50) & H26A(+68+92); 엑손 36, H36A(-16+09) & H36A(+22+51); 및 (b) 도 36에서, 엑손 46, H46A(+81+109); 엑손 47, H47A(+01+29); 엑손 48, H48A(+01+28) & H48A(+40+67); 엑손 49, H49A(+45+70).
- [0147] 엑손 17에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드
- [0148] 엑손 17에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

[0149] 하기 표 3으로부터, 동일한 위치(엑손 17의 수용 스플라이싱 위치)에 지시된 안티센스 분자들의 효과가 2개의 안티센스 분자의 결합 위치(location)가 중첩될 지라도 매우 상이할 수 있다는 것을 관찰할 수 있었다. 인트론 16의 마지막 염기로부터 앞의 7번째 염기 및 엑손 17의 첫 번째 염기로부터 23번째 염기에 어닐링하는 H17A(-07+23)(서열목록 제3서열)이 25 nM의 농도로 세포에 전달된 경우 엑손 17 건너뛰기를 유도한다. 이와 대조적으로, 인트론 16의 마지막 염기로부터 앞의 12번째 염기 및 엑손 17의 첫 번째 염기로부터 18번째 염기에 어닐링하여 H17A(-07+23)의 결합 위치가 중첩되는 안티센스 분자인 H17A(-12+18)는 엑손 건너뛰기를 전혀 유도하지 않았다. 더 나아가, 인트론 16의 마지막 염기로부터 앞의 7번째 염기 및 엑손 17의 첫 번째 염기로부터 16번째 염기에 어닐링하는 H17A(-07+16)는 200 nM에서 엑손 17 및 엑손 18 모두의 건너뛰기를 야기하였다. 또한, 엑손 17의 내부-엑손성 스플라이싱 인핸서 모티프에 결합하는 안티센스 분자인 H17A(+61+86)(서열목록 제4서열)은 우수한 건너뛰기를 유도할 수 있다. 엑손 건너뛰기를 유도하는 안티센스 분자의 능력이 결합 위치로부터 간단하게 예측할 수 없고 엄격한(rigorous) 테스트를 통해 결정되어야만 한다는 것을 확인할 수 있다.

### 표 3

[0150] 엑손 17 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H17A(-12+18)	GGU GAC AGC CUG UGA AAU CUG UGA GAA GUA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H17A(-07+23)	GUG GUG GUG ACA GCC UGU GAA AUC UGU GAG	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H17A(-07+16)	UGA CAG CCU GUG AAA UCU GUG AG	200 nM에서 엑손 17 및 엑손 18 건너뛰기 유도
H17A(+10+35)	AGU GAU GGC UGA GUG GUG GUG ACA GC	50 nM에서 엑손 건너뛰기
H17A(+31+50)	ACA GUU GUC UGU GUU AGU GA	일관되지 않은 엑손 건너뛰기
H17A(+61+86)	UGU UCC CUU GUG GUC ACC GUA GUU AC	50 nM에서 엑손 건너뛰기
H17A(+144+163)	CAG AAU CCA CAG UAA UCU GC	300 nM에서 엑손 건너뛰기

[0151] 상기 데이터는 몇몇 특정 안티센스 분자들이 효율적인 엑손 건너뛰기를 유도한 반면에 근처(near-by) 또는 중첩하는 부위를 타겟하는 다른 안티센스 분자는 보다 더 효율적이지 않다는 것을 보여준다. 적정 연구들(titration studies)에 따르면, 하나의 분자는 20-25 nM에서 타겟된 엑손 건너뛰기를 유도할 수 있는 반면에, 덜 효과적인 안티센스 분자는 300 nM 및 그 이상의 농도에서만 엑손 건너뛰기를 유도할 수 있다는 것을 보여준다. 따라서, 본 발명자들은 스플라이싱 과정에 포함된 모티프로의 안티센스 분자들의 타겟팅이 상기 화합물의 전체적인 효율에 매우 중요한 기능을 한다는 것을 확인하였다.

[0152] 본 명세서에서 용어 "효율(efficacy)"은 타겟 엑손의 지속적인 건너뛰기를 유도할 수 있는 능력을 의미한다. 하지만, 때때로 타겟 엑손들의 건너뛰기는 플랭킹 엑손과 일관되게 연관되어 있다. 즉, 본 발명자들은 어떤 엑손들의 스플라이싱은 밀접하게 연결되어 있다는 것을 발견하였다. 예를 들어, 근이영양증의 마우스 모델에서 엑손 23의 공여 위치에 지시된 안티센스 분자를 이용한 엑손 23 타겟팅에 있어서, 엑손 22 및 엑손 23이 빠진 디스트로핀 전사체들이 종종 검출된다. 다른 예로서, 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 8로 지시된 안티센스 분자를 이용하는 경우 유도된 많은 전사체들에서 엑손 8 및 엑손 9가 결손되어 있다.

[0154] 엑손 2에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0155] 엑손 2에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

### 표 4

[0156] 엑손 2 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H2A(-14+10)	UCU CUU UCA UCU AAA AUG CAA AAU	엑손 건너뛰기 유도 없음

H2A(-1+23)	CUU UUG AAC AUC UUC UCU UUC AUC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H2A(+7+38)	UUU UGU GAA UGU UUU CUU UUG AAC AUC UUC UC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H2A(+16+39)	AUU UUG UGA AUG UUU UCU UUU GAA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H2A(+30+60)	UAG AAA AUU GUG CAU UUA CCC AUU UUG UGA A	엑손 건너뛰기 유도 없음
H2D(+19-11)	ACC AUU CUU ACC UUA GAA AAU UGU GCA UUU	엑손 건너뛰기 유도 없음
H2D(+03-21)	AAA GUA ACA AAC CAU UCU UAC CUU	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0157] 엑손 3에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0158] 엑손 3에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

[0159] 각각 단독으로 이용된 안티센스 분자 H3A(+30+60)(서열목록 제31서열) 및 H3A(+61+85)(서열목록 제32서열)은 엑손 3 건너뛰기를 유도한다. 하지만, 상기 2개의 안티센스 분자의 조합은 보다 더 효과적인 엑손 건너뛰기를 유도할 뿐 아니라(도 3), 각 안티센스 분자들에 의한 결과에 의해서 보여지지 않거나 또는 예측되지 않는 결과로, 300 nM 및 600 nM에서 엑손 4 및 엑손 5의 건너뛰기를 유도할 수 있다. 엑손 3이 없는 유도된 전사체 위로 추가적인 산물들이 헤테로듀플렉스(heteroduplex) 형성 뿐 아니라 캐리-오버 외측 프라이머(carry-over outer primers)를 이용한 RT-PCR 증폭에서 나타난다.

### 표 5

[0160] 엑손 3 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H3A(+14+38)	AGG UCA CUG AAG AGG UUC UCA AUA U	10 nM에서 보통의 엑손 건너뛰기
H3A(+20+40)	GUA GGU CAC UGA AGA GGU UCU	50 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H3A(+25+60)	AGG AGG CGU CUC CCA UCC UGU AGG UCA CUG AAG AG	약한 엑손 건너뛰기 유도
H3A(+45+65)	AGG UCU AGG AGG CGC CUC CCA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H3A(+48+73)	CUU CGA GGA GGU CUA GGA GGC GCC UC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H3A(+61+85)	GCC CUG UCA GGC CUU CGA GGA GGU C	300 nM에서 엑손 건너뛰기
H3D(+17-08)	UCA CAU ACA GUU UUU GCC CUG UCA G	엑손 건너뛰기 유도 없음
H3D(+19-02)	UAC AGU UUU UGC CCU GUC AGG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H3D(+14-10)	AAG UCA CAU ACA GUU UUU GCC CUG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H3D(+12-07)	UCA CAU ACA GUU UUU GCC C	엑손 건너뛰기 유도 없음
엑손 3에 대한 카 테일		
H3A(+30+60) H3A(+61+85)	UAG GAG GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GAG GUC	100 nM에서 매우 우수한 엑손 건너뛰기, 10 nM에서 엑손 건너뛰기 300 nM에서 엑손 4 및 엑손 5 건너뛰기
H3A(+61+85) H3A(+30+54)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GAG GUC GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G	50 nM에서 매우 강력한 엑손 건너뛰기
H3A(+61+85) H3A(+25+60)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GAG GUC AGG AGG CGU CUC CCA UCC UGU AGG UCA CUG AAG AG	50 nM에서 매우 강력한 엑손 건너뛰기

[0161] 엑손 4에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0162] 엑손 4에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다. 도 4는 H4A(+11+40)(서열목록 제33서열) 및 H4D(+14-11)(서열목록 제34서열)의 각테일을 이용한 엑손 4의 건너뛰기를 보여준다.

### 표 6

[0163] 엑손 4 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H4A(-08+17)	GAU CCU UUU UCU UUU GGC UGA GAA C	10 nM 이하에서 약한 엑손 건너뛰기
H4A(+36+60)	CCG CAG UGC CUU GUU GAC AUU GUU C	10 nM에서 좋은 엑손 건너뛰기
H4D(+14-11)	GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC UGC A	10 nM에서 아주 약한 엑손 건너뛰기 유도
엑손 3에 대한 카 테일		
H4A(+11+40) H4D(+14-11)	UGU UCA GGG CAU GAA CUC UUG UGG AUC CUU GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC UGC A	매우 우수한 엑손 건너뛰기(100 nM에서 100%) 및 5 nM 이하에서 우수한 엑손 건너뛰기

[0164] 엑손 5에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0165] 엑손 5에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다. H5D(+26-05)는 매우 낮은 레벨의 엑손 5 건너뛰기를 유도하는 데 실패하였기 때문에 비-바람직한 안티센스 분자로 간주되었다. 하지만, 엑손성 스플라이싱 인핸서를 타겟하는 것으로 예상되는 H5A(+35+65)(서열목록 제1서열)는 도 5에서 보여지는 바와 같이 타겟 엑손의 건너뛰기를 매우 효과적으로 유도하는 것으로 확인되었으며, 엑손 5 건너뛰기를 유도하는 바람직한 화합물로 간주된다.

**표 7**

[0166] 엑손 5 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H5A(+35+65)	AAA CCA AGA GUC AGU UUA UGA UUU CCA UCU A	10 nM까지 매우 우수한 엑손 건너뛰기
H5D(+26-05)	CUU ACC UGC CAG UGG AGG AUU AUA UUC CAA A	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0167] 엑손 6에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0168] 엑손 6에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 8**

[0169] 엑손 6 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H6A(-09+17)	UUC AUU ACA UUU UUG ACC UAC AUG UG	600 nM에서 매우 약한 엑손 건너뛰기
H6A(+32+57)	CUU UUC ACU GUU GGU UUG UUG CAA UC	25 nM에서 엑손 건너뛰기
KH96A(+66+94)	AAU UAC GAG UUG AUU GUC GGA CCC AGC UC	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H6A(+69+96)	AUA AUU ACG AGU UGA UUG UCG GAC CCA G	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H6A(+98+123)	GGU GAA GUU GAU UAC AUU AAC CUG UG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H6D(+18-06)	UCU UAC CUA UGA CUA UGG AUG AGA	엑손 건너뛰기 유도 없음

H6D(+07-15)	CAG UAA UCU UCU UAC CUA UGA C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H6D(+07-16)	UCA GUA AUC UUC UUA CCU AUG AC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H6D(+04-20)	UGU CUC AGU AAU CUU CUU ACC UAU	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0170] 엑손 7에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0171] 엑손 7에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 9**

[0172] 엑손 7 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H7A(-07+15)	UCA AAU AGG UCU GGC CUA AAA C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H7A(-03+18)	CCA GUC AAA UAG GUC UGG CCU A	엑손 건너뛰기 유도 없음
H7A(+41+63)	UGU UCC AGU CGU UGU GUG GCU GA	50 nM에서 엑손 건너뛰기
H7A(+41+67)	UGC AUG UUC CAG UCG UUG UGU GGC UGA	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H7A(+47+74)	UGU UGA AUG CAU GUU CCA GUC GUU GUG U	25 nM에서 약한 엑손 건너뛰기
H7A(+49+71)	UGA AUG CAU GUU CCA GUC GUU GU	25 nM까지 좋은 엑손 건너뛰기

[0173] 엑손 8에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0174] 엑손 8에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 6).

**표 10**

[0175] 엑손 8 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H8A(-10+20)	UGG AUA GGU GGU AUC AAC AUC UGU AAG CAC	10 nM까지 매우 약한 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기
H8A(-07+15)	GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG U	10 nM까지 매우 매우 약한 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기
H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA	10 nM까지 약한 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기
H8A(-04+18)	GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG U	40 nM까지 강하게 작용
H8A(+42+66)	AAA CUU GGA AGA GUG AUG UGA UGU A	10 nM까지 좋은 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기
H8A(+57+83)	GCU CAC UUG UUG AGG CAA AAC UUG GAA	10 nM 이하 또는 고농도에서 좋은 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기
H8A(+96+120)	GCC UUG GCA ACA UUU CCA CUU CCU G	300 nM까지 약한 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기
H8A(+134+158)	AUG UAA CUG AAA AUG UUC UUC UUU A	100 nM까지 약한 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기
H8D(+13-12)	UAC ACA CUU UAC CUG UUG AGA AUA G	50 nM까지 약한 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기
엑손 3에 대한 카테고리		

H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA AUG UAA CUG AAA AUG UUC UUC UUU A	10 nM까지 좋은 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기; 자체로 좋은 엑손 8 건너뛰기
H8A(+134+158)		
H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA UAC ACA CUU UAC CUG UUG AGA AUA G	10 nM까지 좋은 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기; 자체로 좋은 엑손 8 건너뛰기
H8D(+13-12)		
H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA GCU CAC UUG UUG AGG CAA AAC UUG GAA	10 nM까지 좋은 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기; 자체로 좋은 엑손 8 건너뛰기
H8A(+57+83)		
H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA GCC UUG GCA ACA UUU CCA CUU CCU G	10 nM까지 좋은 엑손 8 및 엑손 9 건너뛰기; 자체로 좋은 엑손 8 건너뛰기
H8A(+96+120)		

[0176] 엑손 9에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0177] 엑손 9에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 11**

[0178] 엑손 9 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H9A(+154+184)	AGC AGC CUG UGU GUA GGC AUA GCU CUU GAA U	100 nM까지 강력한 작용
H9D(+26-04)	AGA CCU GUG AAG GAA AUG GGC UCC GUG UAG	100 nM까지 강력한 작용

[0179] 엑손 10에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0180] 엑손 10에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다. 도 7은 엑손 10 및 엑손 주위의 건너뛰기를 유도하는 단일 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 콕테일의 예를 보여준다. 단일 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자인 H10A(-05+16)(서열목록 제37서열)은 엑손 9 내지 엑손 14의 건너뛰기를 유도할 수 있었지만, H10A(+98+119)(서열목록 제38서열)과의 조합은 엑손 10 및 엑손 9 내지 엑손 12(몇몇 경우에는 엑손 10 내지 엑손 12)의 건너뛰기만을 유도할 수 있었다. H10A(-05+16) 및 H10A(+130+149)의 조합은 엑손 10 및 엑손 9 내지 엑손 12의 건너뛰기를 유도할 수 있었다.

**표 12**

[0181] 엑손 10 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H10A(-09+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA CAA U	엑손 건너뛰기 유도 없음
H10A(+08+27)	UGA CUU GUC UUC AGG AGC UU	엑손 건너뛰기 유도 없음
H10A (+21 +42)	CAA UGA ACU GCC AAA UGA CUU G	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H10A(+27+51)	ACU CUC CAU CAA UGA ACU GCC AAA U	엑손 건너뛰기 유도 없음
H10A(+55+79)	CUG UUU GAU AAC GGU CCA GGU UUA C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H10A(+80+103)	GCC ACG AUA AUA CUU CUU CUA AAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H10D(+16-09)	UUA GUU UAC CUC AUG AGU AUG AAA C	엑손 건너뛰기 유도 없음
엑손 3에 대한 콕테일		



H10A(-05+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA	200 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H10A(+98+119)	UCC UCA GCA GAA AGA AGC CAC G	
H10A(-05+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA	200 nM에서 엑손 건너뛰기
H10A(+130+149)	UUA GAA AUC UCU CCU UGU GC	

[0182] 엑손 11에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0183] 엑손 11에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 37).

**표 13**

[0184] 엑손 11 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H11A(-07+13)	CCA UCA UGU ACC CCU GAC AA	300 nM에서 엑손 건너뛰기
H11A(+134+157)	CCC UGA GGC AUU CCC AUC UUG AAU	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H11A(+20+45)	AUU ACC AAC CCG GCC CUG AUG GGC UG	25 nM까지 엑손 건너뛰기
H11A(+46+75)	UCC AAU CAG CUU ACU UCC CAA UUG UAG AAU	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 아주 약한 엑손 건너뛰기
H11A(+50+75)	UCC AAU CAG CUU ACU UCC CAA UUG UA	10 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너 뛰기
H11A(+50+79)	CUG UUC CAA UCA GCU UAC UUC CCA AUU GUA	5 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너 뛰기
H11A(+80+105)	AGU UUC UUC AUC UUC UGA UAA UUU UC	25 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H11A(+106+135)	AUU UAG GAG AUU CAU CUG CUC UUG UAC UUC	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기(20%)
H11A(+110+135)	AUU UAG GAG AUU CAU CUG CUC UUG UA	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기(20%)
H11A(+110+139)	UUG AAU UUA GGA GAU UCA UCU GCU CUU GUA	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기(20%)

[0185] 엑손 12에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0186] 엑손 12에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 38).

**표 14**

[0187] 엑손 12 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H12D(+06-16)	CAU AAG AUA CAC CUA CCU UAU G	엑손 건너뛰기 유도 없음
H12A(+52+75)	UCU UCU GUU UUU GUU AGC CAG UCA	강력한 엑손 건너뛰기
H12A(+30+57)	CAG UCA UUC AAC UCU UUC AGU UUC UGA U	10 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너 뛰기
H12A(+60+87)	UUC CUU GUU CUU UCU UCU GUU UUU GUU A	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰 기
H12A(+90+117)	AGA UCA GGU CCA AGA GGC UCU UCC UCC A	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기(30%)

H12A(+120+147)	UGU UGU UGU ACU UGG CGU UUU AGG UCU U	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기(30%)
----------------	---------------------------------------	--------------------------

[0188]

엑손 13에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0189]

엑손 13에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 15**

[0190]

엑손 13 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H13A(-12+12)	UUC UUG AAG CAC CUG AAA GAU AAA	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0191]

엑손 14에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0192]

엑손 14에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 8).

**표 16**

[0193]

엑손 14 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H14A(+45 +73)	GAA GGA UGU CUU GUA AAA GAA CCC AGC GG	25 nM에서 엑손 건너뛰기

[0194]

엑손 16에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0195]

엑손 16에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 17**

[0196]

엑손 16 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H16A(-07+19)	CUA GAU CCG CUU UUA AAA CCU GUU AA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H16A(+09+31)	GCU UUU UCU UUU CUA GAU CCG CU	엑손 건너뛰기 유도 없음
H16D(+18-07)	CAC UAA CCU GUG CUG UAC UCU UUU C	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0197]

엑손 17에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0198]

엑손 17에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 65**



[0199]

엑손 17 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H17A(+48+78)	UGU GGU CAC CGU AGU UAC UGU UUC CAU UCA A	엑손 건너뛰기 유도 없음
H17A(+55+85)	GUU CCC UUG UGG UCA CCG UAG UUA CUG UUU C	100 nM까지 엑손 건너뛰기

[0200]

엑손 18에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0201]

엑손 18에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 9).

**표 18**

[0202]

엑손 18 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H18A(-09+11)	CAA CAU CCU UCC UAA GAC UG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H18A(+24+43)	GCG AGU AAU CCA GCU GUG AA	엑손 17 및 엑손 18의 일관되지 않은 건너뛰기
H18A(+41+70)	UUC AGG ACU CUG CAA CAG AGC UUC UGA GCG	300 nM에서 엑손 17 및 엑손 18의 건너뛰기
H18A(+83+108)	UUG UCU GUG AAG UUG CCU UCC UUC CG	300 nM에서 엑손 17 및 엑손 18의 건너뛰기
H18D(+04-16)	UUA AUG CAU AAC CUA CAU UG	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0203]

엑손 19에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0204]

엑손 19에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 19**

[0205]

엑손 19 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H19A(+19+48)	GGC AUC UUG CAG UUU UCU GAA CUU CUC AGC	25 nM까지 엑손 건너뛰기
H19A(+27+54)	UCU GCU GGC AUC UUG CAG UUU UCU GAA C	25 nM까지 엑손 건너뛰기
H19D(+3-17)	UCA ACU CGU GUA AUU ACC GU	엑손 건너뛰기

[0206]

엑손 20에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0207]

엑손 20에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 20**

[0208] 엑손 20 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H20A(+23+47)	GUU CAG UUG UUC UGA GGC UUG UUU G	600 nM에서 희미한 그림자
H20A(+140+164)	AGU AGU UGU CAU CUG CUC CAA UUG U	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0209] 엑손 23에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0210] 엑손 23에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다. 엑손 23에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다. H23(+69+98)-SNP는 이전에 보고된 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함한다.

표 66

[0211] 엑손 23 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H23(+69+98)-SNP	CGG CUA AUU UCA GAG GGC GCU UUC UUU GAC	25 nM까지 엑손 건너뛰기

[0212] 엑손 24에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0213] 엑손 24에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

표 21

[0214] 엑손 24 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H24A(+51+73)	CAA GGG CAG GCC AUU CCU CCU UC	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기

[0216] \*엑손 25에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0217] 엑손 25에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다. 올리고뉴클레오타이드 H25A(+95+119)-DupA는 환자-특이적 안티센스 분자이다.

표 22

[0218] 엑손 25 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H25A(+10+33)	UGG GCU GAA UUG UCU GAA UAU CAC	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기를 보이거나 전장 산물을 감소시키지 않았음.

H25D(+06-14)	GAG AUU GUC UAU ACC UGU UG	25 nM에서 매우 강력한 엑손 건너뛰기
H25A(+10+38)	AGA CUG GGC UGA AUU GUC UGA AUA UCA CU	5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H25A(+95+119)-DupA *	UUG AGU UCU GUU CUC AAG UCU CGA AG	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기(환자-특이적)
H25D(+13-14)	GAG AUU GUC UAU ACC UGU UGG CAC AUG	10 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기

[0220] \*엑손 26에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0221] 엑손 26에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 10).

표 23

[0222] 엑손 26 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H26A(-16+09)	GGC AUA GAC CUU CCA CAA AAC AAA C	600 nM 및 300 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H26A(-7+23)	AAG GCC UCC UUU CUG GCA UAG ACC UUC CAC	600 nM 및 300 nM에서 희미한 복합 엑손 26-29 또는 27-30 건너뛰기
H26A(-03+27)	CUU CAA GGC CUC CUU UCU GGC AUA GAC CUU	600 nM 및 300 nM에서 희미한 복합 엑손 26-29 또는 27-30 건너뛰기
H26A(+5+35)	AAC CUC CCU UCA AGG CCU CCU UUC UGG CAU	엑손 건너뛰기 유도 없음
H26A(+24+50)	CUU ACA GUU UUC UCC AAA CCU CCC UUC	600 nM 및 300 nM에서 희미한 복합 엑손 26-29 또는 27-30 건너뛰기
H26D(+06-19)	UUU CUU UUU UUU UUU UUA CCU UCA U	600 nM에서 희미한 복합 엑손 26-29 또는 27-30 건너뛰기
H26D(+21-04)	UUA CCU UCA UCU CUU CAA CUG CUU U	복합 엑손 26-29 또는 27-30 건너뛰기
H26D(+10-10)	UUU UUU UUA CCU UCA UCU CU	엑손 26 건너뛰기
엑손 26에 대한 각테일		
H26A(-07+19)	CCU CCU UUC UGG CAU AGA CCU UCC AC	25 nM 또는 그 이하로 강력한 엑손 건너뛰기
H26A(+24+50)	CUU ACA GUU UUC UCC AAA CCU CCC UUC	
H26A(+68+92)	UGU GUC AUC CAU UCG UGC AUC UCU G	

[0223] 엑손 31에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0224] 엑손 31에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

표 24

[0225] 엑손 31 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
--------------------------	----	---------------------

H31D(+12-18)	UUC UGA AAU UUC AUA UAC CUG UGC AAC AUC	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H31D(+08-22)	UAG UUU CUG AAA UAA CAU AUA CCU GUG CAA	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H31D(+06-24)	CUU AGU UUC UGA AAU AAC AUA UAC CUG UGC	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H31D(+02-22)	UAG UUU CUG AAA UAA CAU AUA CCU	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H31D(+01-25)	CCU UAG UUU CUG AAA UAA CAU AUA CC	300 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기

[0226] 엑손 32에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0227] 엑손 32에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 25**

[0228] 엑손 32 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H32A(+49+78)	ACU UUC UUG UAG ACG CUG CUC AAA AUU GGC	100 nM까지 엑손 건너뛰기

[0229] 엑손 34에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0230] 엑손 34에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 26**

[0231] 엑손 34 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H34A(+36+59)	UUU CGC AUC UUA CGG GAC AAU UUC	200 nM까지 엑손 건너뛰기
H34A(+41+70)	CAU UCA UUU CCU UUC GCA UCU UAC GGG ACA	200 nM까지 엑손 건너뛰기
H34A(+43+72)	GAC AUU CAU UUC CUU UCG CAU CUU ACG GGA	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H34A(+51+83)	UCU GUC AAG ACA UUC AUU UCC UUU CGC AUC	200 nM까지 엑손 건너뛰기
H34A(+91+120)	UGA UCU CUU UGU CAA UUC CAU AUC UGU AGC	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H34A(+92+121)	CUG AUC UCU UUG UCA AUU CCA UAU CUG UGG	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H34A(+95+120)	UGA UCU CUU UGU CAA UUC CAU AUC UG	25 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H34A(+95+124)	CUG CUG AUC UCU UUG UCA AUU CCA UAU CUG	100 nM까지 엑손 건너뛰기

[0232] 엑손 35에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0233] 엑손 35에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 27**

[0234] 엑손 35 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H35A(+14+43)	UCU UCA GGU GCA CCU UCU GUU UCU CAA UCU	100 nM까지 엑손 건너뛰기

H35A(+24+53)	UCU GUG AUA CUC UUC AGG UGC ACC UUC UGU	100 nM까지 엑손 건너뛰기
--------------	---	------------------

[0235]

엑손 36에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0236]

엑손 36에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 11).

**표 28**

[0237]

엑손 36 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자들의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H36A(-16+09)	CUG GUA UUC CUU AAU UGU ACA GAG A	엑손 건너뛰기 유도 없음
H36A(-01+19)	CCA UGU GUU UCU GGU AUU CC	300 nM에서 매우 희미한 엑손 건너뛰기
H36A(+10+39)	CAC AUU CUG GUC AAA AGU UUC CAU GUG UUU	25 nM까지 엑손 건너뛰기
H36A(+22+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H36A(+27+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC A	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H36A(+27+56)	CAC UUU GUG AUG UGG UCC ACA UUC UGG UCA	300 nM에서 엑손 건너뛰기
H36A(+32+61)	UGA UCC ACU UUG UGA UGU GGU CCA CAU UCU	25 nM까지 엑손 건너뛰기
H36A(+59+78)	AAG UGU GUC AGC CUG AAU GA	매우 약한 엑손 건너뛰기
H36A(+65+94)	UCU CUG AUU CAU CCA AAA GUG UGU CAG CCU	600 nM에서 100% 엑손 건너뛰기 및 25 nM까지 엑손 건너뛰기
H36A(+80+109)	GCU GGG GUU UCU UUU UCU CUG AUU CAU CCA	600 nM에서 100% 엑손 건너뛰기 및 25 nM까지 엑손 건너뛰기
H36D(+15-10)	UAU UUG CUA CCU UAA GCA CGU CUU C	매우 약한 엑손 건너뛰기
<b>엑손 36에 대한 각테일</b>		
H36A(-16+09)	CUG GUA UUC CUU AAU UGU ACA GAG A	25 nM 또는 그 이하로 좋은 엑손 건너뛰기
H36A(+22+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU	

[0238]

엑손 38에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0239]

엑손 38에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 29**

[0240]

엑손 38 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H38A(-21-01)	CUA AAA AAA AAG AUA GUG CUA	25 nM까지 엑손 건너뛰기
H38A(-12+14)	AAA GGA AUG GAG GCC UAA AAA AAA AG	25 nM까지 엑손 건너뛰기
H38D(+14-11)	AAC CAA UUU ACC AUA UCU UUA UUG A	25 nM까지 엑손 건너뛰기

[0241]

엑손 39에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0242]

엑손 39에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

표 30

[0243] 엑손 39 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H39A(-07+23)	ACA GUA CCA UCA UUG UCU UCA UUC UGA UC	600 nM까지 엑손 건너뛰기
H39A(-07+23)	ACA GUA CCC UCA UUG UCU UCA UUC UGA UC	600 nM까지 엑손 건너뛰기
H39A(+58+87)	CUC UCG CUU UCU CUC AUC UGU GAU UCU UUG	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H39A(+60+89)	UCC UCU CGC UUU CUC UCA UCU GUG AUU CUU	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H39A(+102+126)	UAU GUU UUG UCU GUA ACA GCU GCU G	600 nM까지 엑손 건너뛰기

[0244] 엑손 41에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0245] 엑손 41에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

표 31

[0246] 엑손 41 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
H41A(-15+5)	AUU UCC UAU UGA GCA AAA CC	200 nM 또는 그 이하로 엑손 건너뛰기
H41A(+66+90)	CAU UGC GGC CCC AUC CUC AGA CAA G	100 nM 또는 그 이하로 엑손 건너뛰기
H41A(+92+120)	GCU GAG CUG GAU CUG AGU UGG CUC CAC UG	10 nM 또는 그 이하로 엑손 건너뛰기
H41A(+143+171)	GUU GAG UCU UCG AAA CUG AGC AAA UUU GC	시각적으로 어떠한 엑손 건너뛰기 유도 없음
H41D(+5-15)	CCA GUA ACA ACU CAC AAU UU	200 nM 또는 그 이하로 엑손 건너뛰기

[0247] 엑손 42에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0248] 엑손 42에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

표 32

[0249] 엑손 20 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 42		
H42D(+18-02)	ACC UUC AGA GAC UCC UCU UGC	강력한 엑손 건너뛰기

[0250] 엑손 43에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0251] 엑손 43에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 12).

표 33

[0252]

엑손 20 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 43		
H43A(+83+110)	UCC UGU AGC UUC ACC CUU UCC ACA GGC G	엑손 건너뛰기 유도 없음
H43A(+92+117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU	10 nM에서 엑손 건너뛰기
H43A(+101+130)	AAU CA GCU GGG AGA GAG CUU CCU GUA GCU	엑손 건너뛰기 유도 없음
H43D(+08-12)	UGU GUU ACC UAC CCU UGU CG	200 nM 및 그 이하로 엑손 건너뛰기
H43A(-09+18)	UAG ACU AUC UUU UAU AUU CUG UAA UAU	25 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H43A(+89+117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UUC CA	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H43A(+81+111)	UUC CUG UAG CUU CAC CCU UUC CAC AGG CGU U	50 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H43A(+92+114)	AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU	2.5 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H43A(+92+120)	GGA GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU	10 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H43A(+95+117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CC	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 10 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기

[0253]

엑손 44에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0254]

엑손 44에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 13 및 도 39).

표 34

[0255]

엑손 44 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 44		
H44A(-13+13)	UCU GUC AAA UCG CCU GCA GGU AAA AG	
H44A(-06+24)	UUC UCA ACA GAU CUG UCA AAU CGC CUG CAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H44A(+44+68)	GCC ACU GAU UAA AUA UCU UUA UAU C	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H44A(+46+75)	UCU GUU AGC CAC UGA UUA AAU AUC UUU AUA	50 nM에서 엑손 건너뛰기
H44A(+61+84)	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H44A(+61+91)	GAG AAA CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG A	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H44A(+65+90)	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA	10 nM에서 엑손 건너뛰기
H44A(+68+98)	UCU UUC UGA GAA ACU GUU CAG CUU CUG UUA G	50 nM에서 약한 엑손 건너뛰기
H44A(-09+17)	CAG AUC UGU CAA AUC GCC UGC AGG UA	10 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H44A(-06+20)	CAA CAG AUC UGU CAA AUC GCC UGC AG	2.5 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H44A(+56+88)	AAA CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG AUU AAA	5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H44A(+59+85)	CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG AUU	5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H44A(+59+89)	GAA ACU GUU CAG CUU CUG UUA GCC ACU GAU U	10 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기



H44A(+61+88)	AAA CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG A	25 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H44A(+65+92)	UGA GAA ACU GUU CAG CUU CUG UUA GCC A	25 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H44A(+64+95)	UUC UGA GAA ACU GUU CAG CUU CUG UUA GCCA C	25 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H44A(+70+95)	UUC UGA GAA ACU GUU CAG CUU CUG UU	50 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기

[0257]

\*엑손 45에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0258]

엑손 45에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 14 및 도 40).

표 35

[0259]

엑손 45 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타 이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 45		
H45A(-14+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AG	복합 밴드를 생성함
H45A(-10 +20)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA	10 nM에서 엑손 건너뛰기
H45A(-09+30)	UUG CCG CUG CCC AAU GCC AUC CUG GAG UUC CUG UAA GAU	엑손 건너뛰기 유도 없음
H45A (-09+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U	10 nM에서 엑손 건너뛰기(25 nM에 서 100%)
H45A(-08 +19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA	50 nM에서 엑손 건너뛰기
HM45A(-07+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AG	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H45A(+09 +34)	CAG UUU GCC GCU GCC CAA UGC CAU CC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H45A(+41 +64)	CUU CCC CAG UUG CAU UCA AUG UUC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H45A(+76 +98)	CUG GCA UCU GUU UUU GAG GAU UG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H45D(+02-18)	UUA GAU CUG UCG CCC UAC CU	엑손 건너뛰기 유도 없음
H45A(-14+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC CAA	
H45A(-12+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너 뛰기
H45A(-12+13)	CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H45A(-12+16)	UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰 기
H45A(-09+16)	UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U	10 nM까지 엑손 건너뛰기
H45A(-09+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너 뛰기
H45A(-09+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U	10 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰 기
H45A(-09+30)	UUG CCG CUG CCC AAU GCC AUC CUG GAG UUC CUG UAA GAU	5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너 뛰기
HM45A(-07+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AG	2.5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H45A(-06+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA A	5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너 뛰기
H45A(-06+28)	GCC GCU GCC CAA UGA CAU CCU GGA GUU CCU GUA A	2.5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H45A(-03+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너 뛰기
H45A(-03+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	10 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너 뛰기



H45A(-03+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	2.5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H45A(-03+28)	GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	10 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H45D(+10-19)	AUU AGA UCU GUC GCC CUA CCU CUU UUU UC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H45D(+16-11)	UGU CGC CCU ACC UCU UUU UUC UGU CUG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H45A(-06+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA A	2.5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H45A(-12+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	2.5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기

[0260]

엑손 46에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0261]

엑손 46에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 15 및 도 44).

**표 36**

[0262]

엑손 46 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
<b>엑손 46</b>		
H46A(-05+19)	AUU CUU UUG UUC UUC UAG CCU GGA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H46A(+16+42)	UCU CUU UGA AAU UCU GAC AAG AUA UUC	25 nM까지 엑손 건너뛰기 및 다른 밴드들 형성
H46A(+27+44)	UUA AAU CUC UUU GAA AUU CU	엑손 건너뛰기 유도 없음
H46A(+35+60)	AAA ACA AAU UCA UUU AAA UCU CUU UG AGA U	50 nM까지 매우 희미한 엑손 건너뛰기
H46A(+56+77)	CUG CUU CCU CCA ACC AUA AAA C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H46A(+63+87)	GCA AUG UUA UCU GCU UCC UCC AAC C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H46A(+81+109)	UCC AGG UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU GU	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H46A(+83+103)	UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H46A(+90+109)	UCC AGG UUC AAG UGG GAU AC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H46A(+91+118)	CUG CUC UUU UCC AGG UUC AAG UGG GAU A	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H46A(+95+122)	GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU CAA GUG G	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H46A(+101+128)	CUU UUA GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU C	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H46A(+113+136)	AAG CUU UUC UUU UAG UUG CUG CUC	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H46A(+115+134)	GCU UUU CUU UUA GUU GCU GC	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H46A(+116+145)	GAC UUG CUC AAG CUU UUC UUU UAG UUG CUG	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H46D(+02-18)	UUC AGA AAA UAA AAU UAC CU	엑손 건너뛰기 유도 없음
H46A(+93+122)	GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU CAA GUG GGA	5 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기(25 nM에서 100%)
H46A(+95+124)	UAG UUG CUG CUC UUU UCC AGG UUC AAG UGG	25 nM에서 100% 엑손 건너뛰기

[0263]

엑손 44 내지 엑손 46에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 콕테일

[0264]

엑손 44 내지 엑손 46에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 콕테일이 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 37**

[0265]

엑손 44 내지 엑손 46 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자 콕테일의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
--------------------------	----	---------------------

엑손 44 및 엑손 45 에 대한 카테일		
H44A(+65+90) H45A(-10+20)	AGA AAC UGU UCA GCU UCU GUU AGC CA CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA	25 nM에서 엑손 건너뛰기
엑손 45 및 엑손 46 에 대한 카테일		
H45A(-10+20) H46A(+91+118)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA CUG CUC UUU UCC AGG UUC AGG UGG GAU A	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H45A(-10+20) H46A(+107+137)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA CAA GCU UUU CUU UUA GUU GCU GCU CUU UUC C	25 nM에서 엑손 건너뛰기
엑손 44 내지 엑손 46에 대한 카테일		
H45A(-10+20) H44A(+65+90) H46A(+91+118)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA AGA AAC UGU UCA GCU UCU GUU AGC CA CUG CUC UUU UCC AGG UUC AGG UGG GAU A	25 nM에서 엑손 건너뛰기

[0266]

엑손 47에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0267]

엑손 47에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 16).

**표 38**

[0268]

엑손 47 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타 이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 47		
H47A(-07+19)	GCA ACU CUU CCA CCA GUA ACU GAA AC	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H47A(+01+29)	UGG CGC AGG GGC AAC UCU UCC ACC AGU AA	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H47A(+44+70)	GCA CGG GUC CUC CAG UUU CAU UUA AUU	600 nM에서 엑손 건너뛰기
H47A(+68+92)	GGG CUU AUG GGA GCA CUU ACA AGC A	엑손 건너뛰기 유도 없음
H47A(+73+103)	CUU GCU CUU CUG GGC UUA UGG GAG CAC UUA C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H47A(+76+103)	CUU GCU CUU CUG GGC UUA UGG GAG CAC U	200 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기 및 전장 산물이 감소되지 않음
H47D(+17-10)	AAU GUC UAA CCU UUA UCC ACU GGA GAU	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0269]

엑손 48에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0270]

엑손 48에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 17).

**표 39**

[0271]

엑손 48 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타 이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 48		

H48A(-09+21)	CUC AGG UAA AGC UCU GGA AAC CUG AAA GGA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H48A(-08+19)	CAG GUA AAG CUC UGG AAA CCU GAA AGG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H48A(-07+23)	UUC UCA GGU AAA GCU CUG GAA ACC UGA AAG	600 nM 및 300 nM에서 엑손 건너뛰기
H48A(-05+25)	GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA CCU GAA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H48A(+01+28)	CUU GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA C	50 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H48A(+07+33)	UUC UCC UUG UUU CUC AGG UAA AGC UCU	50 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H48A(+40+67)	CAA GCU GCC CAA GGU CUU UUA UUU GAG C	엑손 건너뛰기 유도 없음(산발성)
H48A(+75+100)	UUA ACU GCU CUU CAA GGU CUU CAA GC	1000 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H48A(+96+122)	GAU AAC CAC AGC AGC AGA UGA UUU AAC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H48D(+17-10)	AGU UCC CUA CCU GAA CGU CAA AUG GUC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H48D(+16-09)	GUU CCC UAC CUG AAC GUC AAA UGG U	엑손 건너뛰기 유도 없음
<b>각테일 48</b>		
H48A(+01+28)	CUU GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA C	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H48A(+40+67)	CAA GCU GCC CAA GGU CUU UUA UUU GAG C	

[0273]

\* 엑손 49에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0274]

엑손 49에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 18).

**표 40**

[0275]

엑손 49 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
<b>엑손 49</b>		
H49A(-07+19)	GAA CUG CUA UUU CAG UUU CCU GGG GA	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H49A(+22+47)	AUC UCU UCC ACA UCC GGU UGU UUA GC	25 nM까지 엑손 건너뛰기
H49A(+45+70)	ACA AAU GCU GCC CUU UAG ACA AAA UC	25 nM까지 엑손 건너뛰기
H49D(+18-08)	UUC AUU ACC UUC ACU GGC UGA GUG GC	100 nM까지 엑손 건너뛰기

[0276]

엑손 50에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0277]

엑손 50에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 19 및 도 33).

**표 41**

[0278]

엑손 50 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
<b>엑손 50</b>		
H50A(-07+20)	CUC AGA UCU UCU AAC UUC CUC UUU AAC	25 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H50A(-02+27)	CUC AGA GCU CAG AUC UUC UAA CUU CCU CU	100 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H50A(+10+36)	CGC CUU CCA CUC AGA GCU CAG AUC UUC	25 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H50A(+35+61)	UCA GCU CUU GAA GUA AAC GGU UUA CCG	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기
H50A(+42+68)	UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU AAA CGG	25 nM까지 유의한 엑손 건너뛰기

H50A(+48+74)	GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H50A(+63+88)	CAG GAG CUA GGU CAG GCU GCU UUG CC	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기
H50A(+81+105)	UCC AAU AGU GGU CAG UCC AGG AGC U	
H50D(-01-27)	AAA GAG AAU GGG AUC CAG UAU ACU UAC	100 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H50D(-15-41)	AAA UAG CUA GAG CCA AAG AGA AUG GGA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H50A(+42+74)	GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU AAA CGG	10 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H50A(+46+75)	AGG CUG CUU UGC CCU CAG CUC UUG AAG UAA	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 10 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H50A(+48+78)	GUC AGG CUG CUU UGC CCU CAG CUC UUG AAG U	10 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H50A(+51+80)	AGG UCA GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
Hint49(-72-46)	AAG AUA AUU CAU GAA CAU CUU AAU CCA	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0279] 엑손 51에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0280] 엑손 51에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 20 및 도 41).

**표 42**

[0281] 엑손 51 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 51		
H51A(-29-10)	UUU GGG UUU UUG CAA AAA GG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H51A(-22-01)	CUA AAA UAU UUU GGG UUU UUG C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H51A(-14+10)	UGA GUA GGA GCU AAA AUA UUU UGG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H51(+26+52)	GUU UCC UUA GUA ACC ACA GGU UGU GUC	25 nM까지 매우 희미한 엑손 건너뛰기
H51A(+40+67)	AGU UUG GAG AUG GCA GUU UCC UUA GUA A	25 nM까지 엑손 건너뛰기 및 엑손 50 또는 엑손 52도 함께 건너뛰기
H51A(+66+77)	UGG CAU UUC UAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H51A(+66+80)	AGA UGG CAU UUC UAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H51A(+66+83)	GGA AGA UGG CAU UUC UAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H51A(+78+95)	CUC CAA CAU CAA GGA AGA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H51A(+81+95)	CUC CAA CAU CAA GGA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H51A(+84+95)	CUC CAA CAU CAA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H51A(+90+116)	GAA AUC UGC CAG AGC AGG UAC CUC CAA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H51A(+53+79)	GAU GGC AUU UCU AGU UUG GAG AUG GCA	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기
H51A(+57+85)	AAG GAA GAU GGC AUU UCU AGU UUG GAG AU	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H51A(+71+100)	GGU ACC UCC AAC AUC AAG GAA GAU GGC AUU	5 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기
H51A(+76+104)	AGC AGG UAC CUC CAA CAU CAA GGA AGA UG	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기

[0283] \* 엑손 52에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0284] 엑손 52에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 42).

표 43

[0285]

엑손 52 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 52		
H52A(-12+13)	CCU GCA UUG UUG CCU GUA AGA ACA A	엑손 건너뛰기 유도 없음
H52A(-10+10)	GCA UUG UUG CCU GUA AGA AC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H52A(+07+33)	GGG ACG CCU CUG UUC CAA AUC CUG CAU	50 nM에서 엑손 건너뛰기
H52A(+17+46)	GUU CUU CCA ACU GGG GAC GCC UCU GUU CCA	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H52A(+17+37)	ACU GGG GAC GCC UCU GUU CCA	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H52A(+67+94)	CCU CUU GAU UGC UGG UCU UGU UUU UCA A	25 nM까지 매우 거의 희미한 엑손 건너뛰기
Hint51(-40-14)	UAC CCC UUA GUA UCA GGG UUC UUC AGC	엑손 건너뛰기 유도 없음(SNP C 또는 T)
H52A(+09+38)	AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC UGC	2.5 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기
H52A(+09+41)	UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC UGC	5 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H52A(+15+44)	UCU UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA	10 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기

[0286]

엑손 53에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0287]

엑손 53에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 43).

표 44

[0288]

엑손 53 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 53		
H53A(-49-26)	AUA GUA GUA AAU GCU AGU CUG GAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H53A(-38-13)	GAA AAA UAA AUA UAU AGU AGU AAA UG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H53A(-32-06)	AUA AAA GGA AAA AUA AAU AUA UAG UAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H53A(-15+15)	UCU GAA UUC UUU CAA CUA GAA UAA AAG GAA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H53A(+39+65)	CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG	50 nM에서 엑손 건너뛰기
H53A(+39+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UG	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H39A(+39+69)SNP	CGU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GGU G	25 nM까지 엑손 건너뛰기
H53A(+40+70)	UCA UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG U	50 nM까지 엑손 건너뛰기
H53A(+41+69)	CAU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GG	50 nM까지 엑손 건너뛰기
H53A(+43+69)	CAU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA	50 nM까지 엑손 건너뛰기
H53A(+69+98)	CAG CCA UUG UGU UGA AUC CUU UAA CAU UUC	50 nM에서 엑손 건너뛰기
Hint52(-47-23)	UAU AUA GUA GUA AAU GCU AGU CUG G	엑손 건너뛰기 유도 없음
H53A(+27+56)	CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG UAC UUC	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H53A(+27+59)	UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG UAC UUC	10 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H53A(+30+59)	UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG UAC	



H53A(+30+64)	AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU UGU AC	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 10 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H53A(+30+69)	CAU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GGU GUU CUU GUA C	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H53A(+33+63)	ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GGU GUU CUU G	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H53A(+33+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU UG	50 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H53A(+33+65)	CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 2.5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H53A(+35+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기
H53A(+37+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU U	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기
H53A(+36+70)	UCA UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UC	5 nM까지 유의한 엑손 건너뛰기
H53A(+39+71)	UUC AUU CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기
H53A(+42+71)	UUC AUU CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG	100 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기 및 5 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기

[0289] 엑손 54에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0290] 엑손 54에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 21).

**표 45**

[0291] 엑손 54 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
<b>엑손 54</b>		
H54A(+13+34)	UUG UCU GCC ACU GGC GGA GGU C	300 nM에서 엑손 54 및 엑손 55 건너뛰기
H54A(+60+90)	AUC UGC AGA AUA AUC CCG GAG AAG UUU CAG	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H54A (+67+89)	UCU GCA GAA UAA UCC CGG AGA AG	40 nM까지 약한 엑손 건너뛰기 (엑손 54 및 엑손 55)
H54A(+67+97)	UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G	10 nM에서 엑손 건너뛰기
H54A(+77+106)	GGA CUU UUC UGG UAU CAU CUG CAG AAU AAU	50 nM까지 엑손 건너뛰기
<b>엑손 54 및 엑손 55에 대한 카테일</b>		
H54A(+67+97)	UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G	10 nM에서 엑손 54 및 엑손 55 건너뛰기에 특이적, 추가적인 밴드 없음
H55A(-10+14)	CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA	

[0292] 엑손 55에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0293] 엑손 55에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 22).

**표 46**

[0294]

엑손 55 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 55		
H55A(-10+14)	CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H55A(-10+20)	CAG CCU CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA	10 nM에서 엑손 건너뛰기
H55A(+39+61)	CAG GGG GAA CUG UUG CAG UAA UC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H55A(+41+71)	UCU UUU ACU CCC UUG GAG UCU UCU AGG AGC C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H55A(+73+93)	UCU GUA AGC CAG GCA AGA AAC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H55A(+107+137)	CCU UAC GGG UAG CAU CCU GAU GGA CAU UGG C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H55A(+112+136)	CUU ACG GGU AGC AUC CUG UAG GAC A	100 nM에서 매우 약한 엑손 건너뛰기
H55A(+132+161)	CCU UGG AGU CUU CUA GGA GCC UUU CCU UAC	200 nM에서 엑손 건너뛰기
H55A(+141+160)	CUU GGA GUC UUC UAG GAG CC	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H55A(+143+171)	CUC UUU UAC UCC CUU GGA GUC UUC UAG GAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H55D(+11-09)	CCU GAC UUA CUU GCC AUU GU	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0295]

엑손 56에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0296]

엑손 56에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 23).

표 47

[0297]

엑손 56 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 56		
H56A(-06+23)	GCU UCA AUU UCA CCU UGG AGG UCC UAC AG	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H56A(-06+15)	UUC ACC UUG GAG GUC CUA CAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H56A(+23 +44)	GUU GUG AUA AAC AUC UGU GUG A	엑손 건너뛰기 유도 없음
H56A(+56 +81)	CCA GGG AUC UCA GGA UUU UUU GGC UG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H56A(+67+91)	CGG AAC CUU CCA GGG AUC UCA GGA U	200 nM에서 엑손 건너뛰기
H56A(+92+121)	CCA AAC GUC UUU GUA ACA GGA CUG CAU	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H56A(+102+126)	GUU AUC CAA ACG UCU UUG UAA CAG G	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H56A(+102+131)	UUC AUG UUA UCC AAA CGU CUU UGU AAC AGG	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H56A(+112+141)	CCA CUU GAA GUU CAU GUU AUC CAA ACG UCU	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H56A(+117+146)	UCA CUC CAC UUG AAG UUC AUG UUA UCC AAA	25 nM에서 약한 엑손 건너뛰기
H56A(+121+143)	CUC CAC UUG AAG UUC AUG UUA UC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H56D(+11-10)	CUU UUC CUA CCA AAU GUU GAG	600 nM에서 엑손 건너뛰기

[0298]

엑손 57에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0299]

엑손 57에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 24).

표 48

[0300] 엑손 57 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 57		
H57A(-15+18)	CUG GCU UCC AAA UGG GAC CUG AAA AAG AAC AGC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H57A (-12+18)	CUG GCU UCC AAA UGG GAC CUG AAA AAG AAC	50 nM에서 엑손 건너뛰기
H57A(-10+20)	AAC UGG CUU CCA AAU GGG ACC UGA AAA AGA	300 nM에서 엑손 건너뛰기
H57A(-06+24)	UCA GAA CUG GCU UCC AAA UGG GAC CUG AAA	300 nM에서 엑손 건너뛰기
H57A(+21+44)	GGU GCA GAC GCU UCC ACU GGU CAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H57A(+47+77)	GCU GUA GCC ACA CCA GAA GUU CCU GCA GAG A	엑손 건너뛰기 유도 없음
H57A(+79+103)	CUG CCG GCU UAA UUC AUC AUC UUU C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H57A(+105+131)	CUG CUG GAA AGU CGC CUC CAA UAG GUG	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0301] 엑손 59에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0302] 엑손 59에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 25).

**표 49**

[0303] 엑손 59 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 59		
H59A (-06+16)	UCC UCA GGA GGC AGC UCU AAA U	엑손 건너뛰기 유도 없음
H59A(+31+61)	UCC UC GCC UGC UUU CGU AGA AGC CGA GUG A	엑손 건너뛰기 유도 없음
H59A(+66+91)	AGG UUC AAU UUU UCC CAC UCA GUA UU	엑손 건너뛰기 유도 없음
H59A(+96+120)	CUA UUU UUC UCU GCC AGU CAG CGG A	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H59A(+96+125)	CUC AUC UAU UUU UCU CUG CCA GUC AGC GGA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H59A(+101+132)	CA GGG UCU CAU CUA UUU UUC UCU GCC AGU CA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H59A(+141+165)	CAU CCG UGG CCU CUU GAA GUU CCU G	200 nM에서 엑손 58 및 엑손 59 건너뛰기
H59A(+151+175)	AGG UCC AGC UCA UCC GUG GCC UCU U	300 nM에서 엑손 건너뛰기
H59A(+161+185)	GCG CAG CUU GAG GUC CAG CUC AUC C	200 nM에서 약한 엑손 건너뛰기
H59A(+161+190)	GCU UGG CGC AGC UUG AGG UCC AGC UCA UCC	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H59A(+171+197)	CAC CUC AGC UUG GCG CAG CUU GAG GUC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H59A(+181+205)	CCC UUG AUC ACC UCA GCU UGG CGC A	엑손 건너뛰기 유도 없음
H59A(+200+220)	ACG GGC UGC CAG GAU CCC UUG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H59A(+221+245)	GAG AGA GUC AAU GAG GAG AUC GCC C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H59A(+92+125)	CUC AUC UAU UUU UCU CUG CCA GUC AGC GGA GUG C	

[0304] 엑손 60에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0305] 엑손 60에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 26).

**표 50**

[0306]

엑손 60 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 60		
H60A(-10+20)	GCA AUU UCU CCU CGA AGU GCC UGU GUG CAA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H60A(-8+19)	CAA UUU CUC CUC GAA GUG CCU GUG UGC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H60A(+29+58)	CAA GGU CAU UGA CGU GGC UCA CGU UCU CUU	50 nM까지 엑손 건너뛰기
H60A(+33+62)	CGA GCA AGG UCA UUG ACG UGG CUC ACG UUC	50 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기
H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC	100 nM에서 좋은 엑손 건너뛰기
H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC AUU GAC GUG GCU CAC	SNP
H60A(+39+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU C	100 nM에서 좋은 엑손 건너뛰기
H60A(+43+73)	UGG UAA GCU GGC GAG CAA GGU CCU UGA CGU G	100 nM에서 약한 엑손 건너뛰기
H60A(+51+75)	AGU GGU AAG CUG GCG UGC AAG GUC A	100 nM에서 약한 엑손 건너뛰기
H60A(+72+102)	UUA UAC GGU GAG AGC UGA AUG CCC AAA GUG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H60A(+75+105)	GAG GUU AUA CGG UGA GAG CUG AAU GCC CAA A	엑손 건너뛰기 유도 없음
H60A(+80+109)	UGC UGA GGU UAU ACG GUG AGA GCU GAA	100 nM에서 좋은 엑손 건너뛰기
H60A(+87+116)	UCC AGA GUG CUG AGG UUA UAC GGU GAG AGC	100 nM에서 약한 엑손 건너뛰기
H60D(+25-5)	CUU UCC UGC AGA AGC UUC CAU CUG GUG UUC	600 nM에서 약한 엑손 건너뛰기
엑손 60 카테일		
H60A(-8+19) H60A(+37+66)	CAA UUU CUC CUC GAA GUG CCU GUG UGC CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC	10 nM에서 약한 엑손 건너뛰기
H60A(+87+116) H60A(+37+66)	UCC AGA GUG CUG AGG UUA UAC GGU GAG AGC CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC	10 nM에서 엑손 건너뛰기
H60A(-10+20) H60A(+43+73)	GCA AUU UCU CCU CGA AGU GCC UGU GUG CAA UGG UAA GCU GGC GAG CAA GGU CCU UGA CGU G	10 nM에서 엑손 건너뛰기
H60A(+39+66) H60A(-10+20)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU C GCA AUU UCU CCU CGA AGU GCC UGU GUG CAA	10 nM에서 엑손 건너뛰기

[0307]

엑손 61에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0308]

엑손 61에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

### 표 51

[0309]

엑손 61 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 61		
H61A(-7+19)	CUC GGU CCU CGA CGG CCA CCU GGG AG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H61A(+05+34)	CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU CGC CGG	50 nM까지 엑손 건너뛰기

H61A(+10+40)	GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU C	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H61A(+16+40)	GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC G	엑손 건너뛰기 유도 없음
H61A(+16+45)	CCU GUG GGC UUC AUG CAG CUG CCU GAC UCG	50 nM까지 엑손 건너뛰기
H61A(+42+67)	GCU GAG AUG CUG GAC CAA AGU CCC UG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H61D(+10-16)	GCU GAA AAU GAC UUA CUG GAA AGA AA	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0310] 엑손 62에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0311] 엑손 62에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 52**

[0312] 엑손 62 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 62		
H62A(-15+15)	GAC CCU GGA CAG ACG CUG AAA AGA AGG GAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H62A(-10+20)	CCA GGG ACC CUG GAC AGA CGC UGA AAA GAA	엑손 건너뛰기 유도 없음
H62A(-05+15)	GAC CCU GGA CAG ACG CUG AA	25 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H62A(-3+25)	CUC UCC CAG GGA CCC UGG ACA GAC GCU G	엑손 건너뛰기 유도 없음
H62A(+01+30)	UGG CUC UCU CCC AGG GAC CCU GGA CAG ACG	300 nM까지 거의 100% 엑손 건너뛰기
H62A(+8+34)	GAG AUG GCU CUC UCC CAG GGA CCC UGG	300 nM에서 엑손 건너뛰기
H62A(+13+43)	UUG UUU GGU GAG AUG GCU CUC UCC CAG GGA C	25 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H62A(23+52)	UAG GGC ACU UUG UUU GGC GAG AUG GCU CUC	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H62D(+17-03)	UAC UUG AUA UAG UAG GGC AC	100 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H62D(+25-5)	CUU ACU UGA UAU AGU AGG GCA CUU UGU UUG	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0313] 엑손 63에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0314] 엑손 63에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 27).

**표 53**

[0315] 엑손 63 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 63		
H63A(-14+11)	GAG UCU CGU GGC UAA AAC ACA AAA C	시각적으로 어떠한 엑손 건너뛰기 유도 없음
H63A(+11+35)	UGG GAU GGU CCC AGC AAG UUG UUU G	600 nM에서 엑손 건너뛰기 가능
H63A(+20+49)	GAG CUC UGU CAU UUU GGG AUG GUC CCA GCA	100 nM까지 엑손 건너뛰기
H63A(+33+57)	GAC UGG UAG AGC UCU GUC AUU UUG G	시각적으로 어떠한 엑손 건너뛰기 유도 없음
H63A(+40+62)	CUA AAG ACU GGU AGA GCU CUG UC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H63D(+8-17)	CAU GGC CAU GUC CUU ACC UAA AGA C	시각적으로 어떠한 엑손 건너뛰기 유도 없음

[0316] 엑손 64에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0317] 엑손 64에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 28).

**표 54**

[0318] 엑손 64 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 64		
H64A(-3+27)	CUG AGA AUC UGA CAU UAU UCA GGU CAG CUG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H64A(+34+62)	CUG CAG UCU UCG GAG UUU CAU GGC AGU CC	50 nM에서 엑손 건너뛰기
H64A(+43+72)	AAA GGG CCU UCU GCA GUC UUC GGA GUU UCA	50 nM까지 엑손 건너뛰기
H64A(+47+74)	GCA AAG GGC CUU CUG CAG UCU UCG GAG	200 nM까지 엑손 건너뛰기
H64D(+15-10)	CAA UAC UUA CAG CAA AGG GCC UUC U	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0319] 엑손 65에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0320] 엑손 65에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 55**

[0321] 엑손 65 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 65		
H65A(+123+148)	UUG ACC AAA UUG UUG UGC UCU UGC UC	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0322] 엑손 66에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0323] 엑손 66에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 56**

[0324] 엑손 66 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 66		
H66A(-8+19)	GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU AUU AUG	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H66A(-02+28)	CAG GAC ACG GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU	엑손 건너뛰기 유도 없음
H66D(+13-17)	UAA UAU ACA CGA CUU ACA UCU GUA CUU GUC	엑손 건너뛰기 유도 없음
엑손 66 삭제		
H66A(-02+28)	CAG GAC ACG GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU	25 nM에서 엑손 건너뛰기
H66D(+13-17)	UAA UAU ACA CGA CUU ACA UCU GUA CUU GUC	



[0325] 엑손 67에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0326] 엑손 67에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 30).

**표 57**

[0327] 엑손 67 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 67		
H67A(+17+47)	GCG CUG GUC ACA AAA UCC UGU UGA ACU UGC	25 nM에서 강력한 엑손 건너뛰기
H67A(+120+147)	AGC UCC GGA CAC UUG GCU CAA UGU UAC U	엑손 건너뛰기 유도 없음
H67A(+125+149)	GCA GCU CCG GAC ACU UGG CUC AAU G	600 nM에서 엑손 건너뛰기
H67D(+22-08)	UAA CUU ACA AAU UGG AAG CAG CUC CGG ACA	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0328] 엑손 68에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0329] 엑손 68에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다(참고: 도 31).

**표 58**

[0330] 엑손 68 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 68		
H68A(-4+21)	GAU CUC UGG CUU AUU AUU AGC CUG C	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H68A(+22+48)	CAU CCA GUC UAG GAA GAG GGC CGC UUC	200 nM에서 엑손 건너뛰기
H68A(+48+72)	CAC CAU GGA CUG GGG UUC CAG UCU C	200 nM에서 엑손 건너뛰기
H68A(+74+103)	CAG CAG CCA CUC UGU GCA GGA CGG GCA GCC	엑손 건너뛰기 유도 없음
엑손 68 카테일		
H68A(+48+72)	CAC CAU GGA CUG GGG UUC CAG UCU C	10 nM에서 엑손 건너뛰기
H68D(+23-03)	UAC CUG AAU CCA AUG AUU GGA CAC UC	

[0331] 엑손 69에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0332] 엑손 69에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다. 도 32는 H69A(+32+60) 및 H70A(-06+18)의 카테일이 엑손 69 및 엑손 70을 모두 제거할 수 있다는 것을 보여준다.

**표 59**

[0333] 엑손 69 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 69		
H69A(-12+19)	GUG CUU UAG ACU CCU GUA CCU GAU AAA GAG C	엑손 건너뛰기 유도 없음

H69A(+09+39)	UGG CAG AUG UCA UAA UUA AAG UGC UUU AGAC	200 nM에서 엑손 68 내지 엑손 71 건너뛰기
H69A(+29+57)	CCA GAA AAA AAG CAG CUU UGG CAG AUG UC	200 nM에서 엑손 68 내지 엑손 71 건너뛰기, 및 엑손 68 및 엑손 69, 또는 엑손 69 및 엑손 70의 건너뛰기
H69A(+51+74)	GGC CUU UUG CAA CUC GAC CAG AAA	엑손 68 내지 엑손 71 건너뛰기
H69A(+51+80)	UUU UAU GGC CUU UUG CAA CUC GAC CAG AAA	200 nM에서 엑손 68 내지 엑손 71의 건너뛰기 (약 90%)
H69D(+08-16)	CUG GCG UCA AAC UUA CCG GAG UGC	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0334] 엑손 70에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0335] 엑손 70에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 60**

[0336] 엑손 70 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
<b>엑손 70</b>		
H70A(-09+15)	UUC UCC UGA UGU AGU CUA AAA GGG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H70A(-07+23)	CGA ACA UCU UCU CCU GAU GUA GUC UAA AAG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H70A(+16+40)	GUA CCU UGG CAA AGU CUC GAA CAU C	엑손 건너뛰기 유도 없음
H70A(+25+48)	GUU UUU UAG UAC CUU GGC AAA GUC	엑손 건너뛰기 유도 없음
H70A(+32+60)	GGU UCG AAA UUU GUU UUU UAG UAC CUU GG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H70A(+64+93)	GCC CAU UCG GGG AUG CUU CGC AAA AUA CCU	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0337] 엑손 71에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0338] 엑손 71에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

**표 61**

[0339] 엑손 71 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
<b>엑손 71</b>		
H71A(-08+16)	GAU CAG AGU AAC GGC ACU GCA AAA	
H71A(+07+30)	ACU GGC CAG AAG UUG AUC AGA GUA	100 nM에서 약하게 엑손 건너뛰기
H71A(+16+39)	GCA GAA UCU ACU GGC CAG AAG UUG	100 nM에서 엑손 건너뛰기
H71D(+19-05)	CUC ACG CAG AAU CUA CUG GCC AGA	

[0340] 엑손 72에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0341] 엑손 72에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

표 62

[0343] 엑손 72 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 72		
H72A(-8+22)	AAG CUG AGG GGA CGA GGC AGG CCU AUA AGG	600 nM에서 희미한 엑손 건너뛰기
H72A(+02+28)	GUG UGA AAG CUG AGG GGA CGA GGC AGG	엑손 건너뛰기 유도 없음
H72D(+14-10)	AGU CUC AUA CCU GCU AGC AUA AUG	엑손 건너뛰기 유도 없음

[0344] 엑손 73에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0345] 엑손 73에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

표 63

[0346] 엑손 73 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
엑손 73		
H73A(+24+49)	AUG CUA UCA UUU AGA UAA GAU CCA U	약한 엑손 건너뛰기
H73A(-16+10)	UUC UGC UAG CCU GAU AAA AAA CGU AA	25 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기
H73A(+02+26)	CAU UGC UGU UUU CCA UUU CUG GUA G	25 nM까지 강력한 엑손 건너뛰기
H73D(+23-02)	ACA UGC UCU CAU UAG GAG AGA UGC U	25 nM까지 엑손 건너뛰기
HM73A(+19+44)	UAU CAU UUA GAU AAG AUC CAU UGC UG	25 nM까지 희미한 엑손 건너뛰기

[0347] 엑손 74에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0348] 엑손 74에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.

표 67

[0349] 엑손 74 건너뛰기를 유도하는 지 여부에 대해 테스트된 안티센스 분자의 서열.

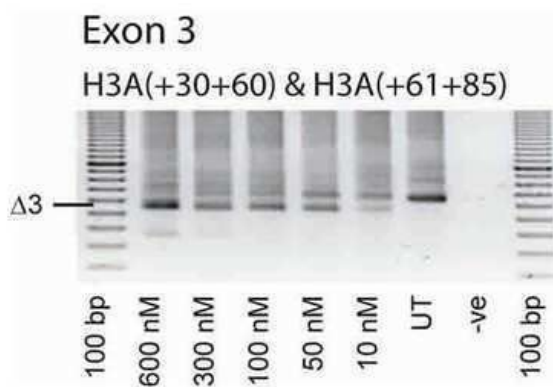
안티센스 올리고뉴클레오타이드 명칭	서열	엑손 건너뛰기를 유도하는 능력
HM74A(+20+46)	GUU CAA ACU UUG GCA GUA AUG CUG GAU	25 nM에서 엑손 건너뛰기
HM74A(+50+77)	GAC UAC GAG GCU GGC UCA GGG GGG AGU C	25 nM에서 엑손 건너뛰기(100%)
HM74A(+96+122)	GCU CCC CUC UUU CCU CAC UCU CUA AGG	25 nM에서 엑손 건너뛰기

[0350] 엑손 76에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드

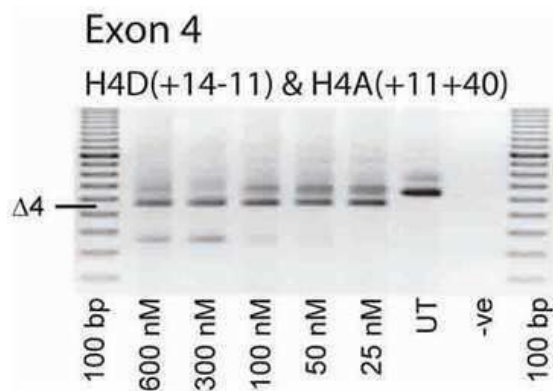
[0351] 엑손 76에 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 제조되어 상술한 바와 같은 유사한 방법들을 이용하여 인간 근육세포에서 엑손 건너뛰기를 유도하기 위한 이들의 능력을 테스트하였다.



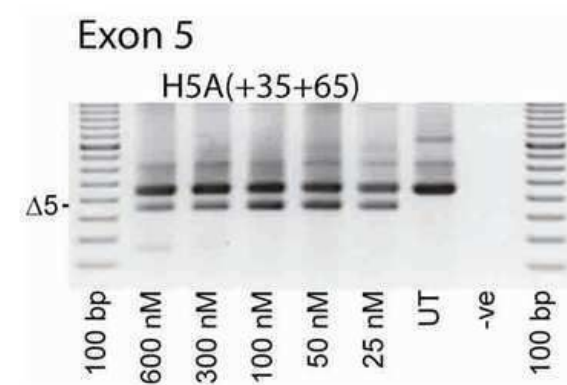
도면3



도면4



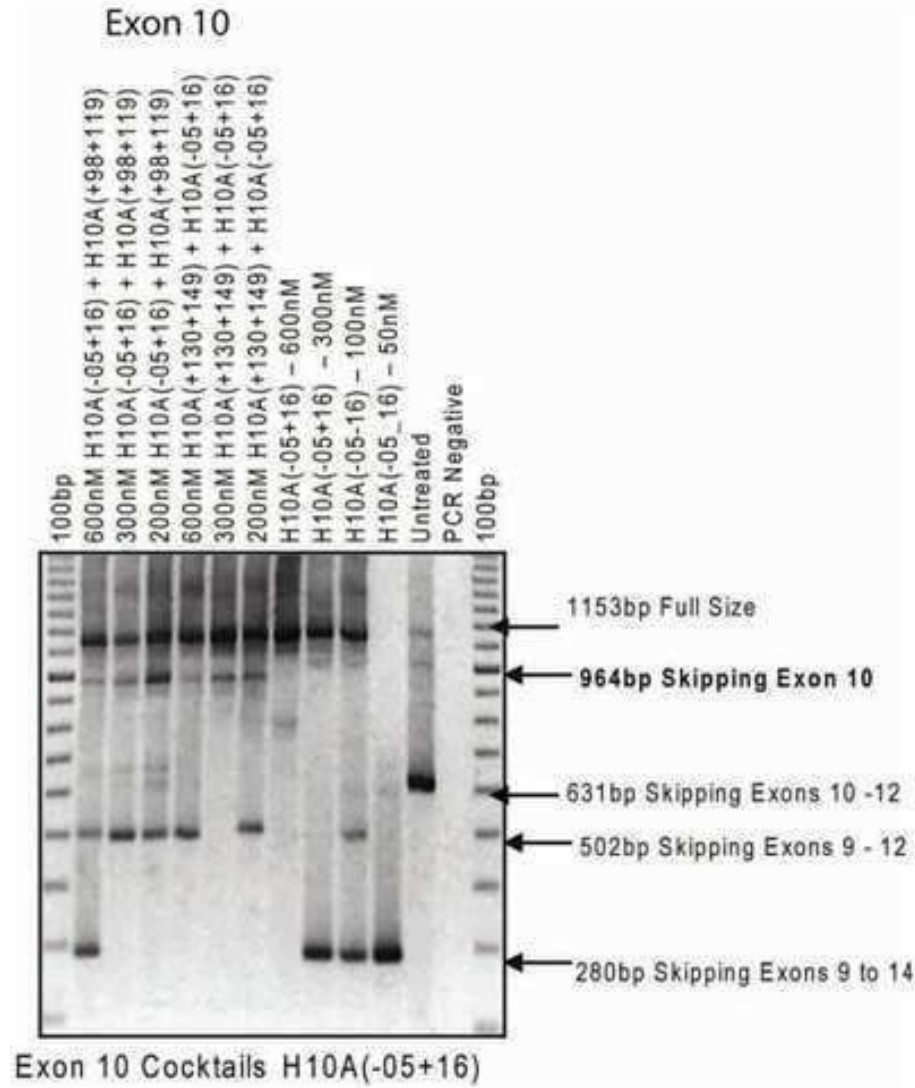
도면5



도면6

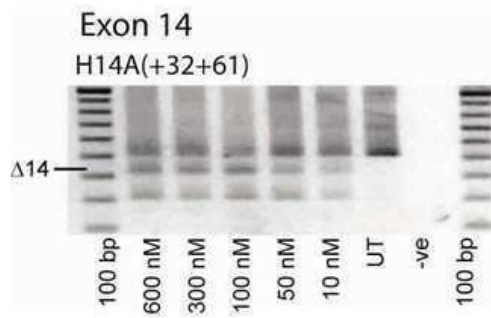


도면7

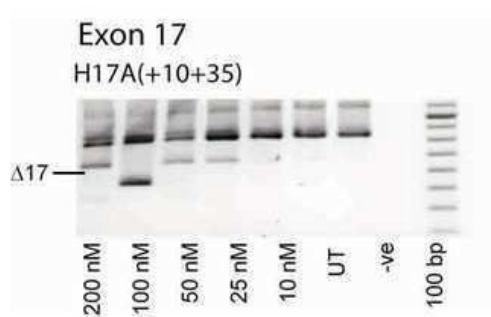




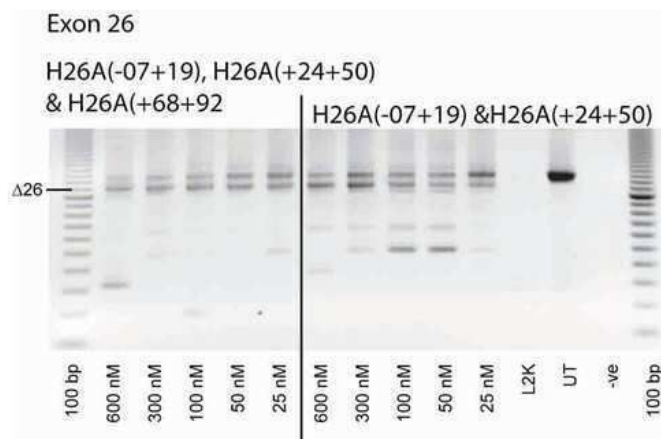
도면8



도면9



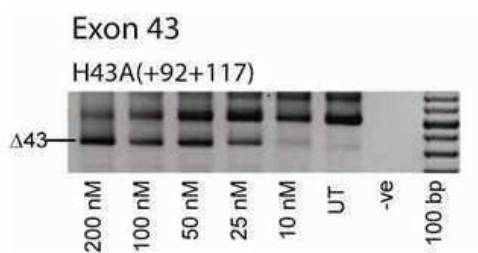
도면10



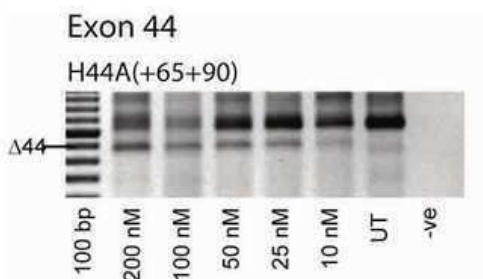
도면11



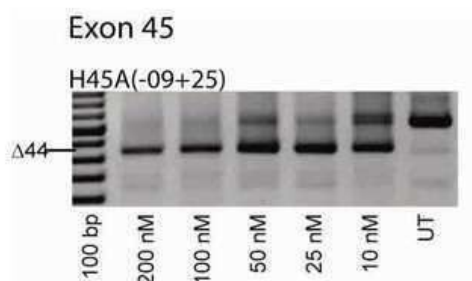
도면12



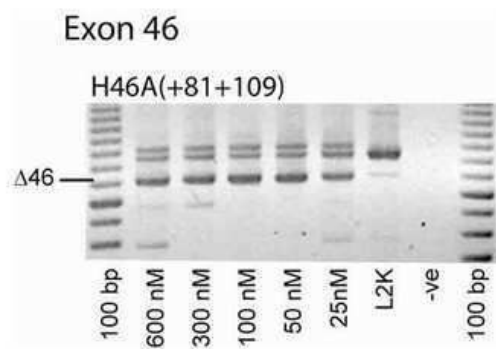
도면13



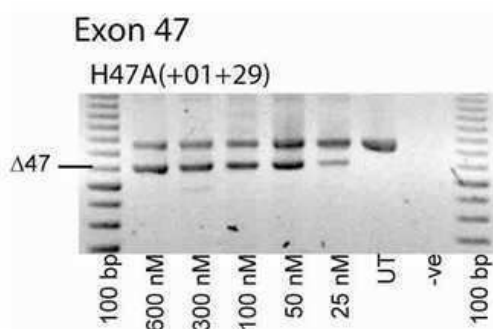
도면14



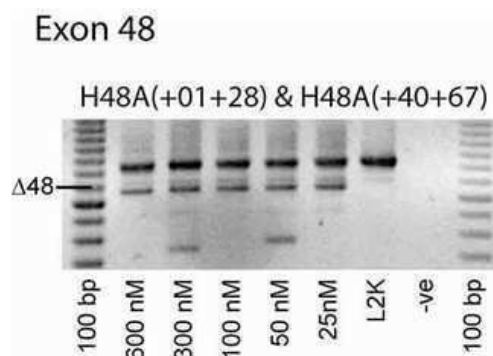
도면15



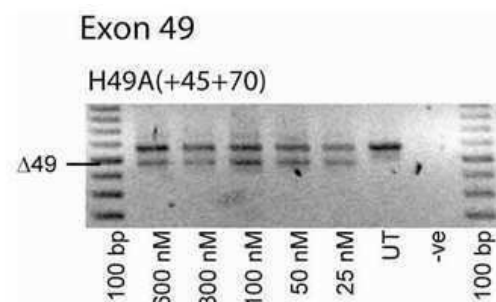
도면16



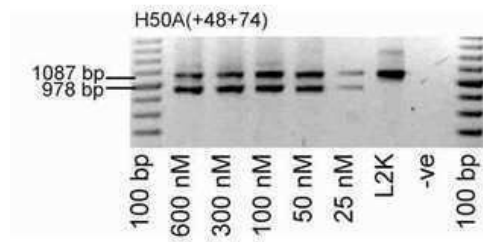
도면17



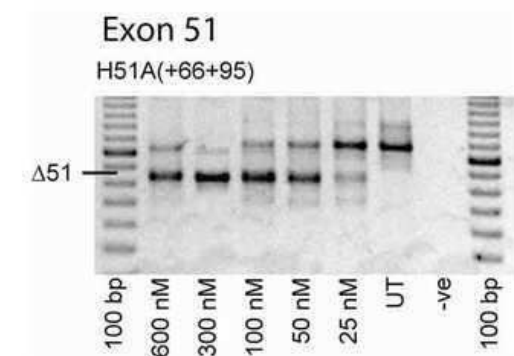
도면18



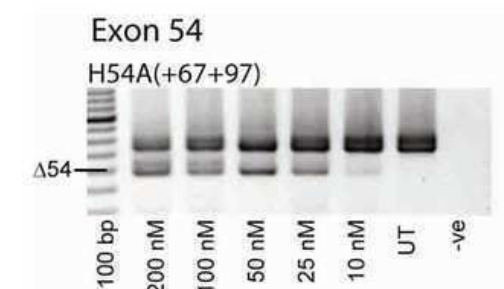
도면19



도면20



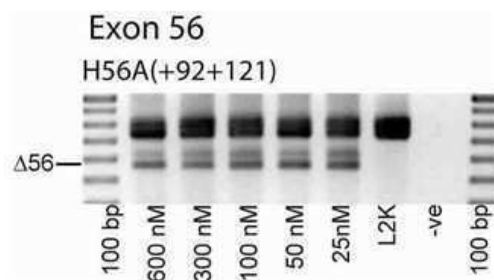
도면21



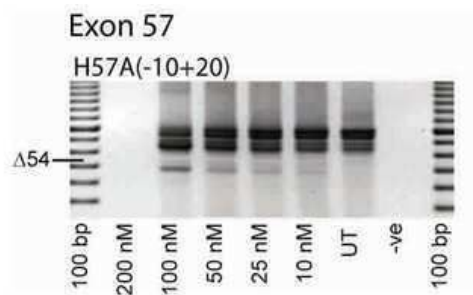
도면22



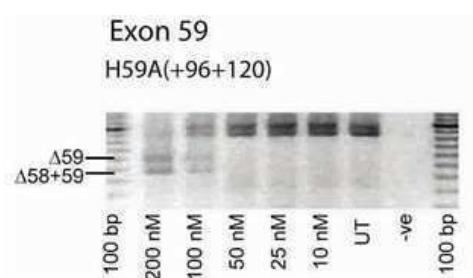
도면23



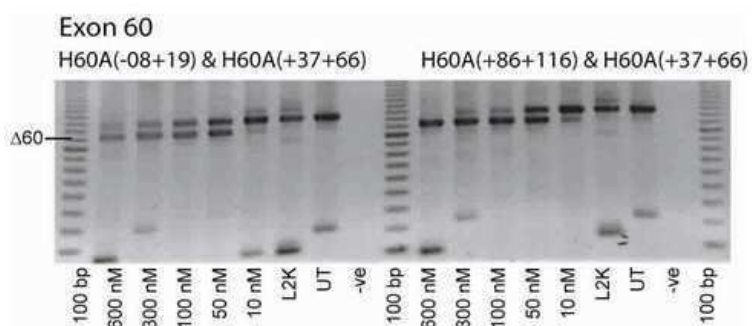
도면24



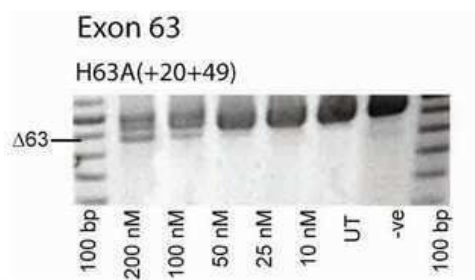
도면25



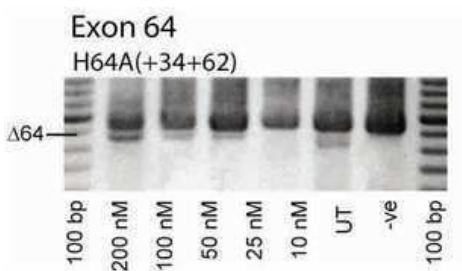
도면26



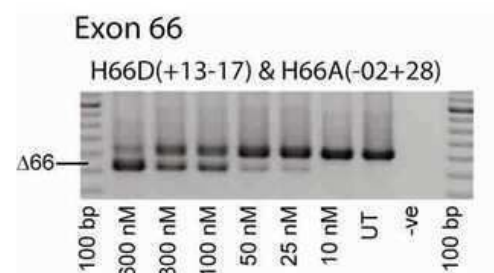
도면27



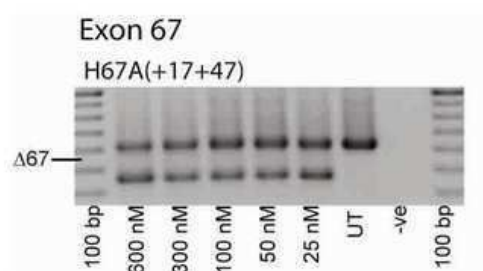
도면28



도면29



도면30





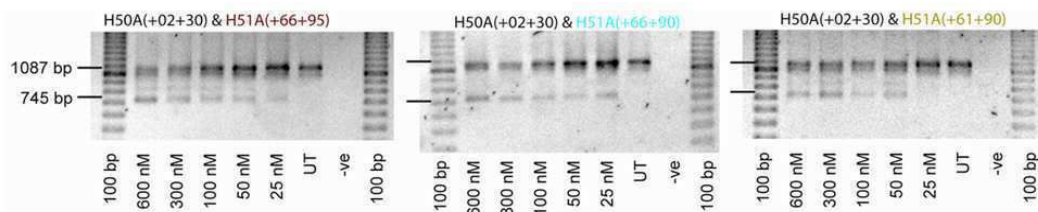
도면31



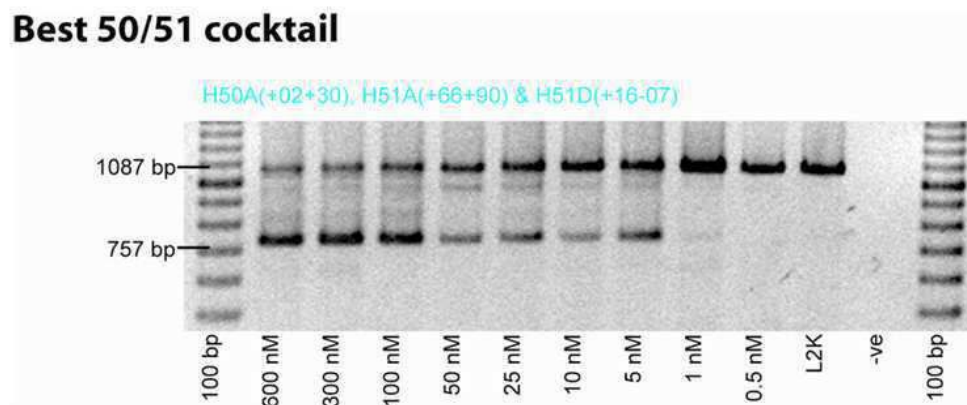
도면32



도면33

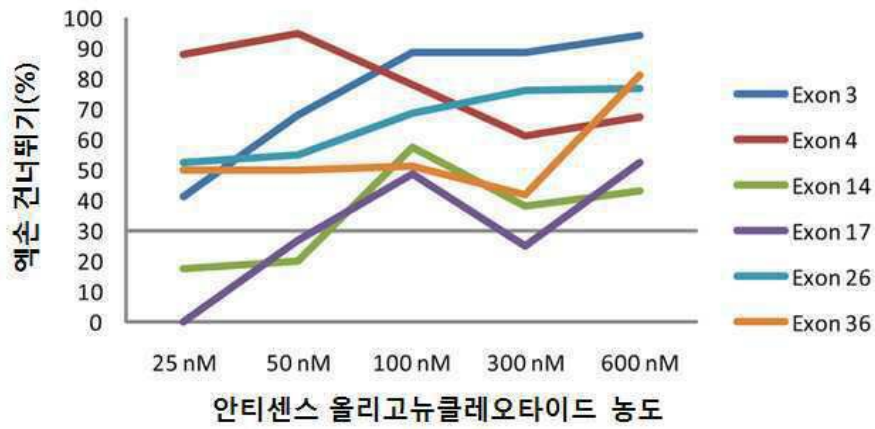


도면34



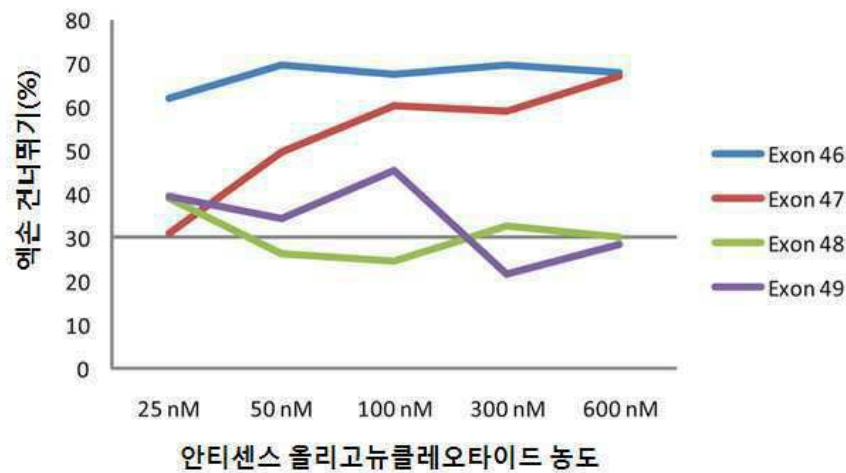
도면35

### 전장 전사체과 비교된 엑손 건너뛰기 백분율

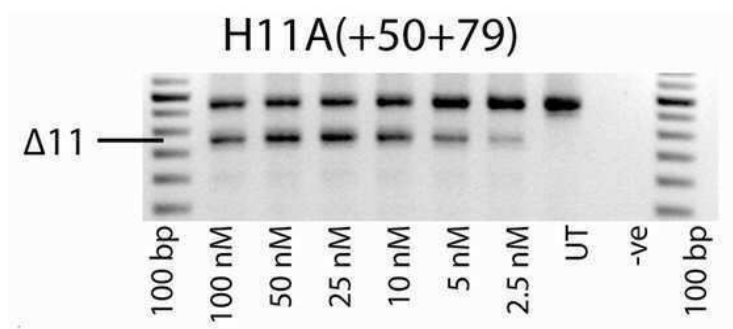


도면36

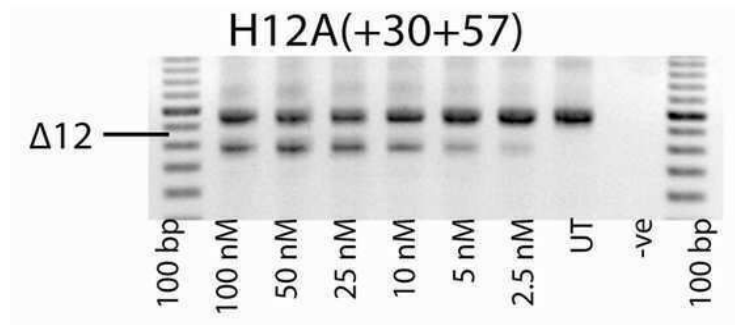
### 전장 전사체과 비교된 엑손 건너뛰기 백분율



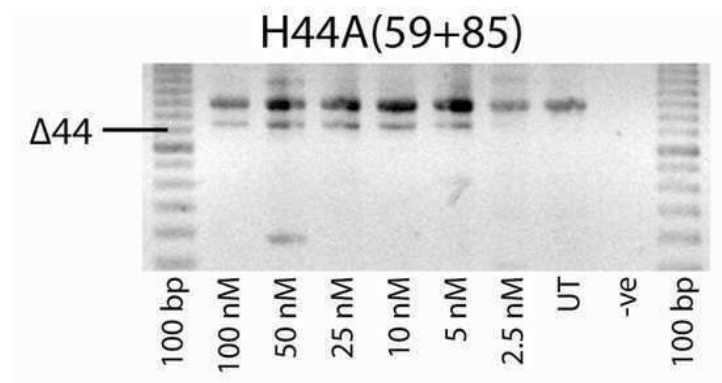
도면37



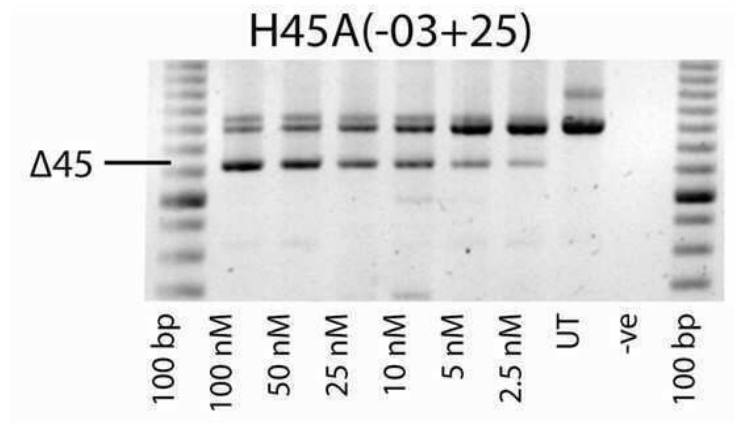
도면38



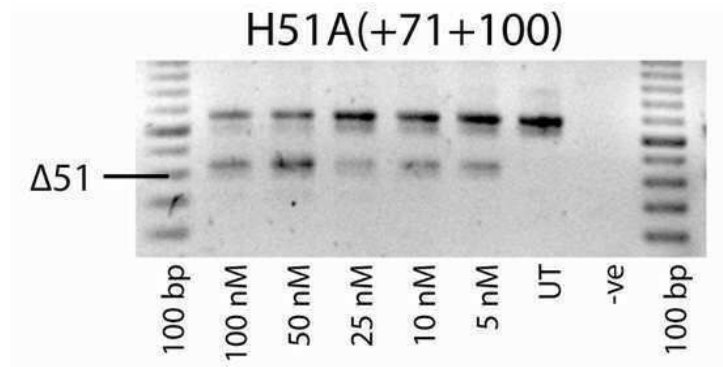
도면39



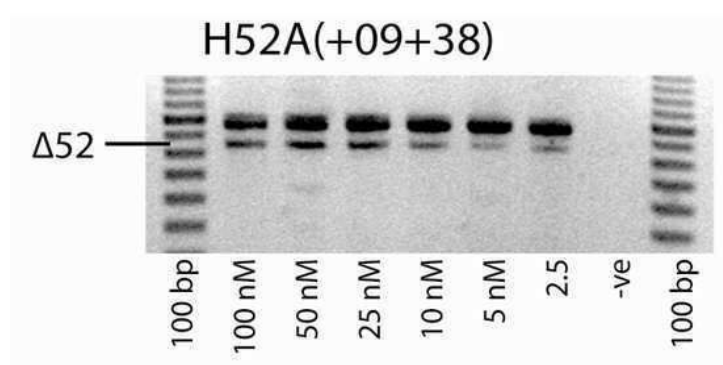
도면40



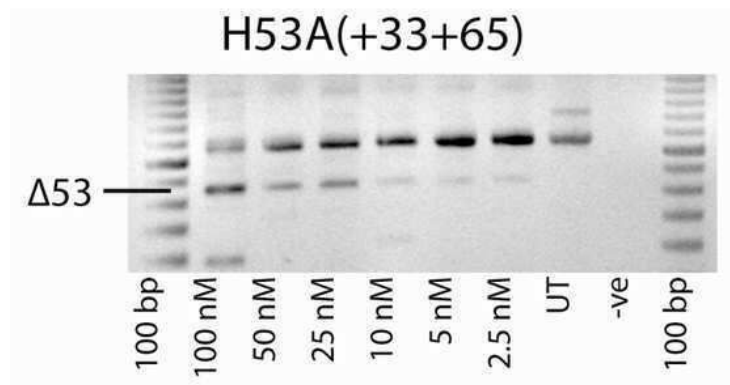
도면41



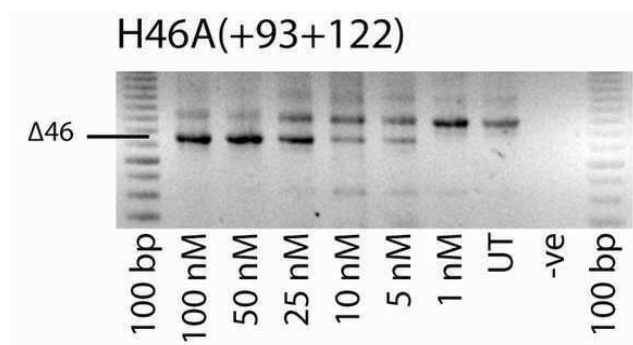
도면42



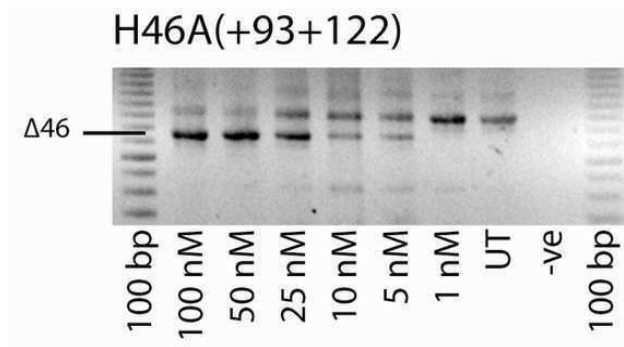
도면43



도면44



도면45



도면46a

서열번호	역순	서열
1	H5A(+35+65)	AAA CCA AGA GUC AGU UUA UGA UUU CCA UCU A
2	H12A(+52+75)	UCU UCU GUU UUU GUU AGC CAG UCA
3	H17A(+07+23)	GUG GUG GUG ACA GGC UGU GAA AUC UGU GAG
4	H17A(+51+86)	UGU UCC CUU GUG GUC ACC GUA GUU AC
5	H21A(+98+114)	CAC AAA GUC UGC AUC CAG GAA CAU GGG UC
6	H21A(+90+119)	AAG GGC ACA AAG UCU GCA UCC AGG AAC AUG
7	H22A(+125+146)	CUG CAA UUC CCC GAG UCU CUG C
8	H24A(+51+73)	CAA GGG CAG GGC AUU CCU CCU UC
9	H43A(+92+117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU
10	H44A(+65+90)	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA
11	H45A(+09+25)	GCU GGC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U
12	H48A(+81+105)	UCC AGG UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU GU
13	H47A(+01+29)	UGG CGC AGG GGC AAC UCU UCC ACC AGU AA
14	H49A(+45+70)	ACA AAU GCU GGC CUU UAG ACA AAA UC
15	H50A(+43+74)	GGC UGC UUU GGC CUC AGC UCU UGA AGU
16	H54A(+67+87)	UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G
17	H55A(+10+20)	CAG CCU CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA
18	H55A(+92+121)	CCA AAC GUC UUU GUA ACA GGA CUG CAU
19	H55A(+112+141)	CCA CUU GAA GUU CAU GUU AUC CAA AGC UCU
20	H57A(+10+20)	AAC UGG CUU CCA AAU GGG ACC UGA AAA AGA
21	H58A(+34+64)	UUC GUA CAG UCU CAA GAG UAC UCA UGA UUA C
22	H58D(+17+07)	CAA UUA CCU CUG GGC UCC UGG UAG
23	H59A(+98+120)	CUA UUU UUC UCU GGC AGU CAG CGG A
24	H60A(+33+62)	CGA GCA AGG UCA UUG ACC UGG CUC ACG UUC
25	H61A(+10+40)	GGG CUU CAU GCA GCU GGC UGA CUC GGU CCU C
26	H62A(23+52)	UAG GGC ACU UUG UUU GGC GAG AUG GCU CUC
27	H63A(+20+49)	GAG CUC UGU CAU UUU GGG AUG GUC CCA GCA
28	H64A(+34+62)	CUG CAG UCU UCG GAG UUU CAU GGC AGU CC
29	H65A(+8+19)	GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU AAU AUG
30	H67A(+17+47)	GCG CUG GUC ACA AAA UCC UGU UGA ACU UGC
31	H3A(+30+60)	UAG GAG GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G
32	H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GGC UUC GAG GAG GUC
33	H4A(+11+40)	UGU UCA GGG CAU GAA CUC UUG UGG AUC CUU
34	H4D(+14+11)	GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC UGC A
35	H8A(+08+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA



도면46b

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

서열목록

- <110> The University of Western Australia
- <120> Antisense Molecules and Methods for Treating Pathologies
- <130> PI120010DD
- <150> AU 2009905549
- <151> 2009-11-12
- <150> PCT/AU2010/001520
- <151> 2010-11-12
- <160> 62
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 31
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> H5A(+35+65)
- <400> 1



aaaccaagag ucaguuuauug auuuccaucu a	31
<210> 2	
<211> 24	
<212> RNA	
<213>	
> Artificial Sequence	
<220><223> H12A(+52+75)	
<400> 2	
ucuucuguuu uuguuagcca guca	24
<210> 3	
<211> 30	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H17A(-07+23)	
<400> 3	
guggugguga cagccuguga aaucugugag	30
<210> 4	
<211> 26	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H17A(+61+86)	
<400> 4	
uguucccuug uggucaccgu aguuac	26
<210> 5	
<211> 29	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H21A(+86+114)	
<400> 5	
cacaaagucu gcauccagga acauggguc	29
<210> 6	
<211> 30	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> H21A(+90+119)

<400> 6

aaggccacaa agucugcauc caggaacaug 30

<210> 7

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H22A(+125+146)

<400> 7

cugcaauucc ccgagucucu gc 22

<210> 8

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H24A(+51+73)

<400> 8

caagggcagg ccauuccucc uuc 23

<210> 9

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H43A(+92+117)

<400> 9

gagagcuucc uguagcuca ccuuu 26

<210> 10

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H44A(+65+90)

<400> 10

uguucagcuu cuguuagcca cuga 24

<210> 11

<211> 34

<212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H45A(-09+25)  
 <400> 11  
 gcugcccaau gccauccugg aguuccugua agau 34  
 <210> 12  
 <211> 29  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H46A(+81+109)  
 <400> 12  
 uccagguuca agugggauac uagcaaugu 29  
 <210> 13  
 <211> 29  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H47A(-01+29)  
 <400> 13  
 uggcgcaggg gcaacucuuc caccaguaa 29  
 <210> 14  
 <211> 26  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H49A(+45+70)  
 <400> 14  
 acaaaugcug ccuuuagac aaaauc 26  
 <210> 15  
 <211> 27  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H50A(+48+74)  
 <400> 15  
 ggcugcuuug ccucagcuc uugaagu 27  
 <210> 16

<211> 31  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H54A(+67+97)  
 <400> 16  
 uggucucauc ugcagaauaa ucccggagaa g 31

<210> 17  
 <211> 30  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H55A(-10+20)  
 <400> 17  
 cagccucucg cucacucacc cugcaaagga 30

<210> 18  
 <211> 27  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H56A(+92+121)  
 <400> 18  
 ccaaacgucu uuguaacagg acugcau 27

<210> 19  
 <211> 30  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H56A(+112+141)  
 <400> 19  
 ccacuugaag uucauguuau ccaaacgucu 30

<210> 20  
 <211> 30  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H57A(-10+20)  
 <400> 20

aacuggcuuc caaaugggac cugaaaaaga	30
<210> 21	
<211> 31	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H58A(+34+64)	
<400> 21	
uucguacagu cucaagagua cucaugauua c	31
<210> 22	
<211> 24	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H58D(+17-07)	
<400> 22	
caauuaccuc ugpgcuccug guag	24
<210> 23	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H59A(+96+120)	
<400> 23	
cuauuuuuuc cugccaguca gcgga	25
<210> 24	
<211> 30	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H60A(+33+62)	
<400> 24	
cgagcaaggu cauugacgug gcucacguuc	30
<210> 25	
<211> 31	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H61A(+10+40)	

<400>	25	
gggcuucaug cagcugccug acucgguccu c		31
<210>	26	
<211>	30	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H62A(23+52)	
<400>	26	
uagggcacuu uguuuggcga gauggcucuc		30
<210>	27	
<211>	30	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H63A(+20+49)	
<400>	27	
gagcucuguc auuuugggau ggucccagca		30
<210>	28	
<211>	29	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H64A(-8+19)	
<400>	28	
cugcagucuu cggaguuuca uggcagucc		29
<210>	29	
<211>	27	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H66A(+34+62)	
<400>	29	
gauccucccu guucguccccc uauuaug		27
<210>	30	
<211>	30	
<212>	RNA	



<213> Artificial Sequence

<220><223> H67A(+17+47)

<400> 30

gcgcugguca caaaauccug uugaacuugc 30

<210> 31

<211> 31

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H3A(+30+60)

<400> 31

uaggaggcgc cucccauccu guaggucacu g 31

<210> 32

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H3A(+61+85)

<400> 32

gcccugucag gccuucgagg agguc 25

<210> 33

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H4A(+11+40)

<400> 33

uguucagggc augaacucuu guggauccuu 30

<210> 34

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H4D(+14-11)

<400> 34

guacuacuua cauuauuguu cugca 25

<210> 35

<211>	30	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H8A(-06+24)	
<400>	35	
uaucuggaua gguggauca acaucuguaa		30
<210>	36	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H8A(+134+158)	
<400>	36	
auguaacuga aaauguucuu cuuua		25
<210>	37	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H10A(-05+16)	
<400>	37	
caggagcuuc caaaugcugc a		21
<210>	38	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H10A(+98+119)	
<400>	38	
uccucagcag aaagaagcca cg		22
<210>	39	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H26A(-07+19)	
<400>	39	
ccuccuuucu ggcauagacc uuccac		26

<210> 40  
 <211> 27  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H26A(+24+50)  
 <400> 40  
 cuuacaguuu ucuccaaacc ucccuuc 27

<210> 41  
 <211> 25  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H26A(+68+92)  
 <400> 41  
 ugugucaucc auucgugcau cucug 25

<210> 42  
 <211> 25  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H36A(-16+09)  
 <400> 42  
 cugguauucc uaaauuguac agaga 25

<210> 43  
 <211> 30  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H36A(+22+51)  
 <400> 43  
 ugugaugugg uccacauucu ggucaaaagu 30

<210> 44  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H48A(+01+28)

<400>	44	
cuuguuucuc agguaaagcu cuggaaac		28
<210>	45	
<211>	28	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H48A(+40+67)	
<400>	45	
caagcugccc aaggucuuuu auuugagc		28
<210>	46	
<211>	30	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H60A(+87+116)	
<400>	46	
uccagagugc ugagguuaua cggugagagc		30
<210>	47	
<211>	30	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H60A(+37+66)	
<400>	47	
cuggcgagca agguccuuga cguggcucac		30
<210>	48	
<211>	30	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H66A(-02+28)	
<400>	48	
caggacacgg auccucccug uucgucccu		30
<210>	49	
<211>	30	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223>	H66D(+13-17)	
<400>	49	
uaauauacac gacuuacauc uguacuuguc		30
<210>	50	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H68A(+48+72)	
<400>	50	
caccauggac ugggguucca gucuc		25
<210>	51	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H68D(+23-03)	
<400>	51	
uaccugaauc caaugauugg acacuc		26
<210>	52	
<211>	30	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H11A(+50+79)	
<400>	52	
cuguuccaau cagcuuacuu cccaauugua		30
<210>	53	
<211>	28	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H12A(+30+57)	
<400>	53	
cagucuuca acucuuucag uuucugau		28
<210>	54	
<211>	27	

<212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H44A(+59+85)  
 <400> 54  
 cuguucagcu ucuguuagcc acugauu 27  
 <210> 55  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H45A(-03+25)  
 <400> 55  
 gcugcccaau gccauccugg aguuccug 28  
 <210> 56  
 <211> 30  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H46A(+93+122)  
 <400> 56  
 guugcugcuc uuuuccaggu ucaaguggga 30  
 <210> 57  
 <211> 30  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H51A(+71+100)  
 <400> 57  
 gguaccucca acaucaagga agauggcauu 30  
 <210> 58  
 <211> 33  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> H52A(+09+38)  
 <400> 58  
 uccaacuggg gacgccucug uuccaaaucc ugc 33



<210>	59	
<211>	33	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H53A(+33+65)	
<400>	59	
uucaacuguu gccuccgguu cugaaggugu ucu		33
<210>	60	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H73A(+02+26)	
<400>	60	
cauugcuguu uuccauuucu gguag		25
<210>	61	
<211>	31	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H45A(-06+25)	
<400>	61	
gcugcccaau gccauccugg aguuccugua a		31
<210>	62	
<211>	31	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H45A(-12+19)	
<400>	62	
caaugccauc cuggaguucc uguaagauac c		31