(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0012255
(43) 공개일자 2018년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7032446
(22) 출원일자(국제) 2016년05월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년11월09일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/061495
(87) 국제공개번호 WO 2016/185041
국제공개일자 2016년11월24일
(30) 우선권주장
1508733.1 2015년05월21일 영국(GB)
1516505.3 2015년09월17일 영국(GB)

(71) 출원인
프로큐알 테라퓨틱스 Ⅱ 비.브이.
네덜란드 레이덴 2333 CK, 제르니케드레프 9
(72) 발명자
하이스마, 엘리자베스, 마를렌
네덜란드 레이덴 2333 CK, 제르니케드레프 9, 프로큐알 테라퓨틱스 Ⅱ 비.브이.
포트만, 마르코
네덜란드 레이덴 2333 CK, 제르니케드레프 9, 프로큐알 테라퓨틱스 Ⅱ 비.브이.
플라텐부르그, 제라두스, 요하네스
네덜란드 레이덴 2333 CK, 제르니케드레프 9, 프로큐알 테라퓨틱스 Ⅱ 비.브이.
(74) 대리인
김동완

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **이영양성 수포성 표피박리증 치료를 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드**

(57) 요 약

인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시키는 방법.

대 표 도

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포 내에서 pre-mRNA로부터 스플라이싱에 의해 mRNA가 생성될 때 인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 안티센스 뉴클레오타이드(AON)에 있어서,

상기 안티센스 뉴클레오타이드(AON)는

- COL7A1 유전자의 엑손 80의 적어도 일부에 상보적이고 COL7A1 유전자의 엑손 80 업스트림 인트론에 상보적이지 않음; 또는

- 엑손 80의 적어도 일부에 상보적이고 24개 이하의 뉴클레오타이드 길이를 지님;

을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 AON은 엑손 80과의 상보성 영역을 포함하며, 상기 상보성 영역은 최대 20개 뉴클레오타이드 길이이며 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개 뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 AON은 엑손 80의 3' 부분 및 다운스트림 인트론의 5' 부분에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함함을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AON은 뉴클레오타이드 서열 5'-UCACCACU-3', 5'-ACCACUGG-3' 또는 5'-ACUCACCA-3'을 포함함을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 AON은 서열번호: 7, 8, 25, 26, 28, 31 및 32로 이루어진 군에서 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함함을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AON은 24개 미만 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게는 20, 21, 22 또는 23개 뉴클레오타이드 길이를 포함함을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 AON은 서열번호: 4 또는 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함함을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 8

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 AON은 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열을 포함함을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 AON은 서열번호: 30의 뉴클레오타이드 서열을 포함함을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AON은 올리고리보뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 인터뉴클레오사이드 결합은 바람직하게는 포스포로티오에이트-결합인 화학적으로 변형된 결합임을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AON의 당 모이어티는 저급 2'-O-알킬, 바람직하게는 2'-O-메틸 치환 당 모이어티임을 특징으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드.

청구항 13

(ⅰ) 서열번호: 4~15 및 25~32로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열; (ⅱ) 서열번호: 4~15 및 25~32로 이루어진 군으로부터 선택된 RNA 뉴클레오타이드 서열; 또는 (ⅲ) U가 T로 치환된 서열번호: 4~15 및 25~32로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 서열로 구성된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 따른 올리고뉴클레오타이드와 담체, 부형제, 안정화제, 트랜스펙션 제제, 희석제, 겔화제 또는 완충제 중 하나 이상을 포함하는 조성물.

청구항 15

제 14항에 있어서, 인간 치료에서 사용하기 위한 약제학적 조성물임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

mRNA가 인간, 세포에서 RNA 전사체로부터 스플라이싱에 의해 생성될 때 인간 COL7A1 mRNA로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시키는 방법에 있어서,

상기 방법은 세포에 의한 올리고뉴클레오타이드의 흡수를 유도하는 조건 및 스플라이싱의 발생을 허용하는 조건

하에서 시험관 내 또는 생체 외로 세포, 조직, 또는 이와 같은 세포를 지니는 인간에 청구항 제 1항 내지 제 13항 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드 또는 청구항 제 14항 또는 제 15항의 조성물을 제공하는 단계를 포함함을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인간 질병의 치료에 사용하기 적합한 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명은 이영양성 수포성 표피박리증의 치료에 적합한 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON)에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 수포성 표피 박리증(Epidermolysis Bullosa, EB)은 만성 취약성과 피부 및 점막의 수포로 특징 되어지는 유전성 피부병의 하나이다. 하위 유형에 따라 EB의 증상 범위는 매우 넓다. 약한 피부 상태의 최소의 증상에서 일반적인 합병증이 있는 매우 심각한 증상에 이르기까지 다양하다. 전 세계적으로 약 35만 명의 환자가 고통받고 있다. 일부 EB 형태에서는 손톱, 머리카락, 치아가 포함될 수 있다. EB의 주된 유형은 단순성 수포성 표피 박리증(EBS), 연접부 수포성 표피 박리증(JEB), 이영양성 수포성 표피 박리증(DEB) 및 킨들러 증후군(KS)을 포함한다(Fine 외 2014).

[0003] 이영양성 수포성 표피 박리증은 수포성 표피 박리증 환자의 약 25%를 점하며 우성 또는 열성 유전성이 있을 수 있으며 제 Ⅶ형 콜라겐(COL7A1, OMIM 120120)의 결함에 근거한다. COL7A1은 콜라겐 Ⅶ의 α-1 사슬을 암호화한다. 콜라겐 Ⅶ는 치밀판(기저막의 일부)에 대한 진피 상부의 고정 피브릴(anchoring fibril)로서 작용한다. 후-번역 변형 후 3개의 동일한 α-1 사슬은 콜라겐성 3중 나선 도메인과 함께 폴딩된다. 이어서 고정 피브릴을 형성하도록 정렬되는 역평행 이량체가 형성된다. 콜라겐 Ⅶ는 각질세포와 피부 섬유아세포에 의해 피부에서 합성된다. 이영양성 수포성 표피 박리증 질병의 심각성은 대개 기저막 영역에서의 제 Ⅶ형 콜라겐 발현량과 관련이 있다.

[0004] 우성 이영양성 수포성 표피 박리증(DDEB)의 특징에는 손, 발, 팔꿈치 및 무릎에 국한되며 일반화된 수포가 포함된다. 흔한 발견으로는 흉터, 비립종, 점막 침범, 비정상적이거나 결핍된 손톱이 있다. 열성 이영양성 수포성 표피 박리증(RDEB, DEB 환자의 약 50%)은 일반적으로 우성 이영양성 수포성 표피 박리증보다 더 일반화되고 심각하다. 우성 이영양성 수포성 표피 박리증의 증상 외에도 열성 이영양성 수포성 표피 박리증의 다른 흔한 증상으로는 영양 실조, 빈혈, 골다공증, 식도 협착, 성장 지연, 웨빙(webbing) 또는 손가락과 발가락의 융합(의사합지증), 근육 수축의 진전, 치아의 기형, 소구증 및 눈의 흉터 등이 있다. 편평 상피암의 위험은 이 그룹에서 크게 증가할 뿐만 아니라 전이성 편평 세포암으로 인한 사망도 크게 증가한다.

[0005] 유전자 COL7A1에는 400 가지 이상의 다른 변이가 알려져 있다. 가장 유력한 영향을 받는 엑손(RDEB의 7%) 중 하나는 3가지 이상의 상이한 변이, 미스센스 변이 또는 조기 종결 코돈(PTC)으로 이끄는 변이를 지닌 엑손 80이다. COL7A1 유전자의 엑손의 대다수가 프레임 내에 존재하기 때문에 엑손 스킵핑은 잠재적으로 단백질 기능을 유지하면서 PTC 변이를 지닌 엑손을 제거하는 가능한 전략이다(Goto 등, 2006).

[0006] 현재 DEB에 대한 치료법은 없으며 대증적 치료만 적용된다. RDEB의 심각한 형태는 사회의 의료 예산에 높은 비용을 부과하는 것이다. 드레싱 및 약물 치료의 평균 비용은 환자 당 연간 약 20만 유로이다. DEB 환자의 예상 수명은 30~40년이다.

[0007] 프랑스 국립 보건 의료 연구원(INSERM)의 WO 2013/053819는 엑손 80에 상보적인 22개 뉴클레오타이드를 지니는 두 개의 24-머 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 업스트림 인트론에 2개 뉴클레오타이드를 개시하고 있으며 전

체 엑손이 mRNA로부터 스킵핑되게 한다.

[0008] ESE80.3 GGCC UCUU GGAC CCUG CAGA CCCU (서열번호: 2)

[0009] ESE80.3-Q2I70X GGCC UCUU GGAC CCUA CAGA CCCU (서열번호: 3)

[0010] 엑손-80-결핍 mRNA는 대부분 야생형 단백질보다 짧으나 야생형 콜라겐 VII와 유사하게 기능하는 기능적 폴리펩타이드로 번역된다. 본 발명자들은 인간 1차 섬유아세포(HPF) 및 HeLa 세포에서 WO2013/053819에 개시된 올리고뉴클레오타이드를 시험하여 그의 스킵핑 효율을 평가하였다. 시험 조건에서 두 AON 모두 50% 이하의 스킵핑 효율을 나타낸 반면에 ESE80.3은 ESE80.3-Q2170X보다 약간 우수한 효율을 나타내었다. 이러한 엑손 스킵핑 올리고뉴클레오타이드는 이 심각한 질병에 대처하는 유망한 첫 걸음을 제공하나, 엑손 80 스킵핑의 효율성을 향상시키기 위한 또 다른 대안적인 올리고뉴클레오타이드가 여전히 필요하다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 mRNA가 포유동물 세포(예를 들어 인간 세포에서 생체 내)에서 pre-mRNA로부터 스플라이싱에 의해 생성될 때 인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 다양한 AON을 제공한다. 첫번째 측면에서 올리고뉴클레오타이드는 (a) 엑손 80의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, (b) 길이가 24 뉴클레오타이드 미만이다. 따라서 이들 올리고뉴클레오타이드는 선행 기술에 개시된 것들보다 더 짧아 유리하다.

[0012] 두 번째 측면에서 올리고뉴클레오타이드는 엑손 80의 3' 부분 및 다운스트림 인트론의 5'부분에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 엑손 80과 그 다운스트림 인트론 사이의 경계 부위(span)의 AON은 종래에는 기술되지 않았지만 본 명세서 내에서는 엑손 스킵핑을 용이하게 하는데 효과적인 것으로 나타낸다. 예를 들어 이러한 AON은 5'-UCACCACU-3', 5'-ACCACUGG-3' 및/또는 5'-ACUCACCA-3'을 포함할 수 있다.

[0013] 세 번째 측면에서 올리고뉴클레오타이드는 엑손 80의 업스트림인 인트론에 혼성화되지 않는다. 예를 들어 올리고뉴클레오타이드는 엑손 80의 일부분에 상보 적이나 업스트림 인트론에는 상보적이지 않을 수 있다. 즉 혼성화는 다운스트림 인트론에서만 발생할 수 있다. 유사하게 올리고뉴클레오타이드는 엑손 80의 일부와 상보성 영역을 포함할 수 있으나 상보성은 업스트림 인트론으로 연장되지 않는다(일부 실시형태에서 엑손 80에 인접한 어느 인트론으로도 연장되지 않는다).

[0014] 따라서 (도 1에 나타난 바와 같이) 염기쌍에 따라 엑손 80과 함께 배치될 때 올리고뉴클레오타이드는 업스트림 인트론의 염기쌍을 포함하지 않는다(및 일부 실시형태에서는 업스트림 및 다운스트림 인트론이 없음). 대조적으로 선행 기술의 AON은 엑손 80 및 그의 업스트림 인트론을 포함한다(도 1의 'ESE' 올리고뉴클레오타이드 참조).

[0015] 네 번째 측면에서 올리고뉴클레오타이드는 엑손 80에 대한 상보성 영역인 최대 20 뉴클레오타이드 길이(예를 들어 최대 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 뉴클레오타이드; 최대 11~17)를 포함한다. 대조적으로 당 업계에 공지된 AON은 엑손 내에 22-머 서열을 포함한다. 본 명세서에서 엑손 80에 상보적인 11개 내지 14개 뉴클레오타이드를 지니는 올리고뉴클레오타이드가 매우 효과적인 것으로 나타났다.

[0016] 따라서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 (a) 예를 들어 11~17 뉴클레오타이드 길이와 같은 최대 20 뉴클레오타이드 길이인 엑손 80에 대한 상보성 영역, (b) 엑손 80의 업스트림 또는 다운스트림 인트론 내의 RNA

전사체에 상보적인 영역(바람직하게는 다운스트림 인트론)을 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 AON은 바람직하게는 24개 이하 뉴클레오타이드 길이, 예를 들면 20~23개 뉴클레오타이드 길이이다. 본 발명의 AON은 바람직하게는 RNA AON이다. 천연 핵산과 비교하여 이들은 화학적으로 변형된 인터뉴클레오사이드 결합(예를 들어 포스포로티오에이트 결합)을 지닐 수 있으며 변형된 당(예를 들어 2'-O-알킬 치환을 지닌)을 지닐 수 있다.

[0018] 본 발명의 AON은 인간 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물로 제제화 될 수 있으며, 포유동물, 바람직하게는 인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시키는 방법에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 5' 및 3' 인접 인트론 경계(소문자; 서열번호: 19의 업스트림 및 서열번호: 20의 다운스트림)를 지닌 엑손 80(굵은 대문자; 서열번호: 18)을 포함하는 인간 COL7A1 유전자의 단편(서열번호: 1)을 나타낸 것이다. 본 명세서에서 시험된 다양한 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON)를 하단에 나타내었다(3'에서 5' 방향으로 나타냄).

ESE80.3 및 ESE80.3_Q2170X는 WO 2013/053819에 개시되어 있으며 다른 AON은 본 발명에 따른 것이다. RNA 전사체 엑손 80 내의 밑줄친 뉴클레오타이드는 EB 환자에서 가장 흔하게 발견되는 엑손 80 변이를 나타낸다. 대문자 및 소문자의 사용은 엑손(대문자) 및 인트론(소문자) 서열 및 경계의 인식을 용이하게 하고 올리고뉴클레오타이드와 그의 상보적인 표적 서열의 배치를 용이하게 하기 위한 것이다. 서열번호: 22, 23 및 24는 본 발명의 상이한 AON 내에 겹치거나 또는 부분적으로 겹치는 서열이다.

도 2는 본 명세서에 개시된 AON으로 처리한 인간 1차 섬유아세포(HPF)에서 엑손 스킵핑에 대한 랩-온-어-칩 결과를 나타낸 것이다. 전체-길이 밴드 및 엑손 80 스킵핑 밴드는 화살표로 나타내었다. 레인 1~16은 좌에서 우로 공 대조군; maxPei 대조군; ESE80.3; ESE80.3_Q2I70X; AON80.1; AON80.2; AON80.3; AON80.4; AON80.5; AON80.6; AON80.7; AON80.8; AON80.9; AON80.10; AON80.11; 및 AON80.12를 나타낸다. 위 화살표는 전체 길이 mRNA 생성물을 나타내고 아래 화살표는 엑손 80이 제거된 mRNA 생성물을 나타낸다.

도 3은 AON으로 처리된 HeLa 세포에서 엑손 스킵핑에 대한 랩-온-어-칩 결과를 나타낸 것이다. 전체-길이 밴드 및 엑손 80 스킵핑 밴드의 위치는 도 2와 동일하게 레인 1~16이다.

도 4는 AON80.5에서 최적화되고 HPF에서 테스트한 AON의 랩-온-어-칩 결과를 나타낸 것이다. AON80.5.1, AON80.5.2 및 AON80.13은 AON80.5.3, AON80.5.4 및 AON80.5.5보다 높은 스플라이싱 효율을 지닌다. 형성된 모든 생성물의 정확한 서열을 평가하기 위해 서열 분석을 수행하였다. 바이오분석기로 분석한 후에 가시화된 추가 생성물(상단 두 개의 화살표)은 mRNA에 인트론 82가 포함되어 있다(서열분석으로 감지됨). 인트론 82의 존재는 종결 코돈의 존재를 야기하며 이는 단백질의 분해를 야기할 수 있다. FL은 전체길이를 나타낸다.

도 5는 AON80.5에 비교하여 최적화된 AON으로 처리된 HPF에서 엑손 스킵핑에 대한 랩-온-어-칩 결과를 나타낸 것이다. 위의 화살표는 전체 길이의 mRNA를 나타내며 아래의 화살표는 엑손 80이 제거된 mRNA를 나타낸다. 레인 1-7은 AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.7, AON80.5.8 및 AON80.13이다.

도 6은 지시된 처리에 대한 면역원성(NF-κB 및/또는 AP-1 활성화)을 나타낸 것이며 AON80.5 및 AON80.5.1 각각에 대한 3회 투여를 포함한다. y-축은 SEAP 활성도(OD655nm, 임의 단위)를 나타낸 것이며 식염수에 대한 배수 변화를 나타낸다. **** P <0.0001, ** P <0.01, * P <0.05.

도 7은 지시된 처리 후 RAW-블루 대식세포의 세포 생존 능력을 나타낸 것이며 AON80.5 및 AON80.5.1 각각에 대한 3회 투여를 포함한다. y-축은 레조루핀 수준($\lambda_{Ex560nm}$/ $\lambda_{Em590nm}$)을 나타낸 것이며 식염수에 대한 배수 변화를 나타낸다. **** P <0.0001, ** P <0.01, * P <0.05.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 놀랍게도 본 명세서에 개시된 분석에서 선행 기술에 개시된 것과 비교하여 유사하거나 더 우수한 엑손 스킵핑

특성을 지닌 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON)가 수득되었다. 본 발명의 이러한 AON은 인간 질병, 특히 수포성 표피박리증(epidermolysis bullosa, EB), 특히 COL7A1 엑손 80의 변이에 관련된 EB를 치료하기 위한 처리에서 활성 약물 물질로서 사용될 수 있다. 이러한 AON은 단독 활성 약제 물질로 사용할 수 있으며 COL7A1 exon 80(본 명세서에 개시된 것을 포함)을 표적으로 하는 다른 AON 및/또는 EB 질병을 치료하기 위한 다른 활성 약제 물질과 조합하여 사용할 수 있다.

[0021] 이러한 다른 약제 물질은 다른 AON, 예를 들어 다른 엑손(엑손 73, 74 또는 3 포함)에서 변이를 표적으로 하는 약제 물질이거나 비-AON 활성 약제 물질일 수 있다. 병용 요법은 동시에 또는 연속적으로 투여되는 단일 조성물 또는 다중 조성물의 형태일 수 있다.

[0022] 본 발명은 세포 내에서 pre-mRNA로부터의 스플라이싱에 의해 mRNA가 생성될 때 인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 AON에 관한 것이며 AON은 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 이때 뉴클레오타이드 서열은 엑손 80의 적어도 일부에 상보적이고 COL7A1 유전자의 엑손 80 업스트림 인트론에 상보적이지 않거나; 엑손 80의 적어도 일부에 상보적이고 24개 이하 뉴클레오타이드 길이이다.

[0023] 바람직한 실시형태에서 본 발명에 따른 AON은 엑손 80과의 상보성 영역을 포함하며 이때 상보성 영역은 최대 20 뉴클레오타이드 길이이며 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17 뉴클레오타이드이다.

[0024] 더욱 바람직하게는 상기 AON은 엑손 80의 3' 부분 및 다운스트림 인트론의 5' 부분에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는 AON은 뉴클레오타이드 서열 5'-UCACCACU-3', 5'-ACCACUGG-3' 또는 5'-ACUCACCA-3'을 포함한다. 가장 바람직하게는 본 발명에 따른 AON은 서열번호: 7, 8, 25, 26, 28, 31 및 32로 이루어진 군에서 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0025] 다른 실시형태에서 본 발명은 24개 미만 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게는 20, 21, 22 또는 23 뉴클레오타이드를 포함하는 본 발명에 따른 AON에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 AON은 서열번호: 4 또는 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 더욱 바람직하게는 상기 AON은 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며 또는 상기 AON은 서열번호: 30의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0026] 본 발명에 따른 그들의 효과와는 별개로 본 발명에 따른 AON이 종래 기술에 개시된 것보다 짧아 바람직하다는 관점에서 제조 가능성, 분석 및/또는 제품 비용의 측면에서 종래 기술에 개시된 것보다 특정 이점을 지닌다.

[0027] 본 발명의 바람직한 AON은 20, 21, 22 또는 23개 뉴클레오타이드 길이와 같이 24개 미만이다. AON이 엑손 80에만 상보적이고 인접한 어느 쪽의 인트론과도 상보적이지 않으면(본 명세서에 개시된 바와 같이) 전체 엑손의 길이는 36nt까지 어느 길이도 가능하다.

[0028] 본 발명의 AON을 사용한 치료의 결과로서 전체 엑손 80이 결실된 단축된 mRNA는 더 짧지만 기능적인 COL Ⅶ 단백질로 번역될 것이다. 그러나 일부 예에서 본 발명의 특정 AON의 사용은 더 긴 전사체 형성을 유발하며(예를 들어 인트론 82로부터의 서열) 이는 더 짧은 (기능적) 단백질과 함께 (비 기능적이며 쉽게 분해 가능한) 단백질의 발현을 유발할 수 있다.

[0029] 놀랍게도 mRNA가 포유동물 세포에서 pre-mRNA로부터 스플라이싱에 의해 생성될 때 인간 COL7A1 mRNA로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 AON이 확인되었으며 상기 올리고뉴클레오타이드의 서열은 엑손 80의 3' 부분과 다운스트림 인트론의 5' 부분에 상보적이다(예를 들어 12 엑손 뉴클레오타이드 및 12 인트론 뉴클레오타

이드를 지니는 24-머 5'-CCTGGCCCAGTGgtgagtacccaa-3'(서열번호: 21)에 (부분적으로) 상보적). 이전에는 엑손 80과 그 다운스트림 인트론 사이의 경계를 덮는 AON이 개시되지 않았다.

[0030] 이러한 AON은 예를 들어 (i) 엑손/인트론 경계의 양측으로부터 적어도 4개의 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 5'-UCACCACU-3'(서열번호: 22); (ii) 경계의 인트론 측으로부터 적어도 2개의 뉴클레오타이드 및 엑손 측으로부터 적어도 6개의 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 5'-ACCACUGG-3'(서열번호: 23); 및/또는 (iii) 경계의 인트론 측으로부터 적어도 6개의 뉴클레오타이드 및 엑손 측으로부터 적어도 2개의 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 5'-ACUCACCA-3'(서열번호: 24);을 포함할 수 있다.

[0031] AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 및 AON80.5.8(하기 참조)은 이러한 AON의 예시이다. 이러한 유형의 AON은 이상적으로 경계의 각 측면으로부터 적어도 2개의 뉴클레오타이드를 포함하지만(예를 들어 각 측면에서 4개 또는 6개의 뉴클레오타이드) 각 측면으로부터 동일한 수의 뉴클레오타이드를 포함할 필요는 없다(예를 들어 AON80.5 시리즈와 같은 홀수의 뉴클레오타이드).

[0032] 다르게 표현하면 3' 스플라이싱 부위 및 다운스트림 인트론의 5' 부분을 포함하며 mRNA가 포유동물 세포에서 pre-mRNA로부터 스플라이싱에 의해 생성될 때 인간 COL7A1 mRNA로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 엑손 80의 3' 부분에 상보적인 AON이 처음으로 개시되었다.

[0033] 이들 AON은 유용한 것으로 여겨지지만 포유동물 세포에서 pre-mRNA로부터 스플라이싱에 의해 생성될 때 인간 COL7A1 mRNA로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 다른 AON과 함께 조합될 수 있는 우수한 후보로 간주된다. 특히 엑손 80의 내부 부분 또는 엑손 80의 5' 부분 및/또는 엑손 80의 5' 경계 및 그의 업스트림 인트론과 같은 엑손 80의 상이한 부분과 상보적인 AON을 포함한다. 이러한 조합은 엑손 80이 스킵핑되는 효율을 증가시킬 필요가 있을 때 유리한 것으로 고려된다.

[0034] 그러나 다른 실시형태에서 본 발명의 AON은 엑손 80에만 혼성화될 수 있으므로 엑손 80의 업스트림 및 다운스트림 인트론에 혼성화하는 영역을 포함하지 않을 수 있다. AON80.3은 AON80.13과 같은 AON의 하나의 예이다(하기 참조).

[0035] 추가적 실시형태에서 AON은 엑손 80에 혼성화될 수 있으며 그의 업스트림 인트론에는 혼성화되지 않는다. 이러한 AON의 예는 AON80.3, AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7, AON80.5.8 및 AON80.13이다(이때 AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 및 AON80.5.8은 엑손 80의 바로 다운스트림에 있는 인트론에도 혼성화하는 AON의 예시이다).

[0036] 추가적 실시형태에서 AON은 최대 20 뉴클레오타이드 길이인 엑손 80과의 상보성 영역을 포함한다(반면에 선행 기술의 엑손-상보성 영역은 22 뉴클레오타이드 길이이다). AON80.1, AON80.2, AON80.3, AON80.4 및 AON80.5 각각(하기 표 1 참조)은 이러한 AON의 예시이며 각각 10, 17, 20, 12 및 12 엑손-상보성 뉴클레오타이드 스트레치를 지닌다. AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 및 AON80.5.8 시리즈를 추가적 예로 들 수 있다(9 내지 14개 뉴클레오타이드의 엑손 중첩을 지님). 따라서 엑손 80과의 상보성 영역은 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17 뉴클레오타이드와 같은 11 내지 17 뉴클레오타이드와 같은 8 내지 20 길이이다(예를 들어 10 내지 20 뉴클레오타이드).

[0037] 이러한 AON의 경우 20개 이하 뉴클레오타이드 길이의 엑손 상보성 영역 이외에도 엑손 80의 업스트림 또는 다운스트림에 상보적인 영역이 있을 수 있다. 따라서 이러한 AON은 단일이며 본질적으로 중단되지 않는 엑손 80 및

그의 인접한 인트론 사이의 경계를 포함하는 초기 RNA 전사체에 상보적인 스트레치를 포함한다.

[0038] 본 발명의 바람직한 AON은하기 표 1 및 표 2에 개시된 AON80.1, AON80.2, AON80.3, AON80.4 및 AON80.5이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 AON은 표 1 및 표 2에 개시된 바와 같은 AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.4, AON80.5.7, AON80.5.8 및 AON80.13이다. 본 발명에 따른 매우 바람직한 AON은 AON80.2(서열번호: 5), AON80.5(서열번호: 8), AON80.5.1(서열번호: 25), AON80.5.2(서열번호: 26), AON80.5.7(서열번호: 31), AON80.5.8(서열번호: 32) 및 AON80.13(서열번호: 30) 이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서 모든 리보스 잔기는 2'-O-메틸화되고 실질적으로 모든 뉴클레오사이드 결합은 포스포로티오에이트이다.

[0039] 본 발명의 모든 실시형태에서, "엑손 내포를 방지 또는 적어도 감소시킴" 및 "엑손 스킵핑"라는 용어는 동의어이다. COL7A1과 관련하여 "엑손 내포를 방지 또는 적어도 감소시킴" 또는 "엑손 스킵핑"은 인간 COL7A1 mRNA로부터 엑손 80(서열번호: 18 또는 이의 대립형질)을 배제하는 것으로 해석되어야 한다(도 1 참조).

[0040] 엑손 스킵핑이란 용어는 본 명세서에서 엑손 스킵핑을 지니지 않는 성숙 mRNA에 존재할 수 있는 특정 엑손을 함유하지 않는 성숙한 mRNA의 세포 내에서의 유도로서 정의된다.

[0041] 엑손 스킵핑은 예를 들면 스플라이싱의 생화학적 과정을 허용하는데 요구되는 스플라이스 공여체 또는 스플라이스 수용체 서열; 또는 성숙한 mRNA에 포함될 엑손으로서 뉴클레오타이드의 스트레치의 인식에 필요한 엑손 내포 신호를 간섭할 수 있는 분자;와 같은 서열과 간섭할 수 있는 분자로 상기 성숙한 mRNA의 pre-mRNA를 발현시키는 세포를 제공하는 것으로 달성될 수 있다. 여기에서 이와 같은 분자들을 엑손 스킵핑 분자로서 칭한다.

[0042] pre-mRNA라는 용어는 전사에 의해 세포 내에서 DNA 주형으로부터 합성되는 비-처리 또는 부분적으로 처리된 전구체 mRNA를 의미한다.

[0043] 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 pre-mRNA 분자, hnRNA(이종 핵 RNA) 또는 mRNA 분자에서 표적 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 의미하는 것으로 이해되며 따라서 그의 상응하는 표적 서열과 어닐링할 수 있다.

[0044] 본 출원에 사용된 용어 "상보적"은 "완전히 상보적"및 "실질적으로 상보적"을 포함하며 이는 일반적으로 올리고뉴클레오타이드와 그의 상응하는 표적 서열 사이에 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상의 상보성을 지닌 것이며 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상이다. 예를 들어 20개 길이 뉴클레오타이드 길이 중 그의 서열과 표적 서열 사이에서 하나의 미스매치를 지니는 올리고뉴클레오타이드에 있어서 상보성의 정도는 95%이다.

[0045] 안티센스 서열의 상보성 정도는 바람직하게는 안티센스 서열을 포함하는 분자가 생리적 조건 하에서 RNA 분자 내의 표적 뉴클레오타이드 서열에 어닐링할 수 있는 안티센스 서열을 포함하는 분자이며 엑손 스킵핑을 용이하게 한다. 다른 것에 비해서 AON과 표적 서열 사이의 용융 온도 또는 Tm의 관점에서 표현된 바와 같이 특정 미스매치가 결합 강도에 적은 영향을 미치기 때문에 특정 미스 매치는 다른 것에 비해 허용 가능하다는 것은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0046] 특정 비-상보적 염기쌍은 사실상 미스매치보다 어느 정도까지 전체 결합을 파괴하는 "워블(wobble)"을 형성할 수 있다. AON의 길이는 또한 결합의 강도에 있어서 중요한 역할을 하며 더 긴 길이의 AON은 더 짧은 길이 AON에 비해서 높은 용융 온도를 지닌다. 또한 올리고뉴클레오타이드의 G/C 함량은 결합의 강도를 결정하는 요소이며

어떠한 길이에서도 G/C 의 높은 함량은 높은 용융온도를 나타낸다.

[0047] 본 발명에 의해 고려되는 핵산염기 또는 당-인산 골격의 특정 화학적 변형은 또한 결합 강도에 영향을 미칠 수 있기 때문에 상보성의 정도는 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드를 설계할 때 고려되어야할 오직 하나의 요소이다.

[0048] 하나의 올리고뉴클레오타이드에서 하나의 CpG 또는 다수(2개 이상)의 CpG가 존재하면 일반적으로 상기 올리고뉴클레오타이드의 증가된 면역원성과 관련이 있다(Dorn 및 Kippenberger, 2008). 이 증가된 면역원성은 치료될 조직, 즉 피부(진피 및/또는 표피)의 손상을 유도할 수 있기 때문에 바람직하지 않다. 따라서 본 발명의 AON은 1개 또는 2개 이하의 CpG 디뉴클레오티드 서열(바람직하게는 단지 하나)을 포함하는 것이 바람직하다.

[0049] 본 발명은 수용 가능한 RNA 결합 동역학 및/또는 열역학 특성을 지니는 올리고뉴클레오타이드를 설계할 수 있게 한다. RNA 결합 동역학 및/또는 열역학 특성은 올리고뉴클레오타이드의 용융 온도(Tm; 기본 Tm과 가장 가까운 이웃 모델을 사용한 단일 가닥 RNA에 대한 올리고뉴클레오타이드 특성 계산기(www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html)를 이용하여 계산됨) 및/또는 AON-표적 엑손 복합체의 자유 에너지(RNA 구조 버전 4.5를 사용)에 의해 적어도 부분적으로 결정된다.

[0050] Tm이 너무 높으면 올리고뉴클레오타이드는 덜 특이적일 것으로 예상된다. 수용 가능한 Tm 및 자유 에너지는 올리고뉴클레오타이드의 서열, 골격의 화학적 특성(포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트, 펩타이드-핵산 등), 당 모이어티의 특성(리보스, 데옥시리보스, 치환된 리보스, 분자 내 브릿지) 및 핵산염기의 화학적 변형에 의존한다. 따라서, Tm의 범위는 광범위하게 변할 수 있다.

[0051] 엑손 스킵핑 백분율 또는 효율은 증폭된 야생형 밴드의 농도를 측정하고 증폭된 더 짧아진(엑손 80-제거) 밴드의 농도로 나누어 계산된다. 주어진 프라이머 세트에 대하여 주어진 PCR 사이클 횟수와 100% 시간 경과 후, 증폭이 여전히 대수적 상태 내에 존재하도록 사이클 수를 제공한다. 정량화는 DNA1000 키트와 함께 Agilent 2100 Bioanalyzer를 사용하여 수행한다.

[0052] 바람직하게는 서열번호: 1에 나타난 바와 같은 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 본 발명에 따른 AON은 표적 서열에 대해 상보적인 부분이 적어도 80% 이상, 바람직하게는 적어도 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 100% 상보적인 서열이다.

[0053] 따라서 상보성 영역의 모든 염기가 대응 가닥의 염기와 혼성화될 수 있는 것을 절대적으로 요구하지는 않는다. 예를 들어 올리고뉴클레오타이드를 설계할 때 상보적 가닥상의 염기와 염기쌍을 이루지 않는 잔기를 통합시킬 수 있다. 세포의 상황에 따라 뉴클레오타이드의 스트레치가 상보적인 부분에 충분히 혼성화될 수 있다면 어느 정도의 미스 매치가 허용 될 수 있다.

[0054] 이러한 맥락에서 "충분히"는 본 발명에 따른 AON이 엑손 80의 엑손 스킵핑을 유도할 수 있다는 것을 의미한다. 표적 엑손을 스킵핑하는 것은 PCR/Bioanalyzer, 선택적으로 ddPCR에 의해 편리하게 평가될 수 있다. 상보적 영역은 결합될 때 pre-mRNA 내의 엑손에 특이성을 지니도록 설계하는 것이 바람직하다.

[0055] 이러한 특이성은 시스템의 다른 (pre-) mRNA 분자의 실제 서열에 의존하기 때문에 다양한 길이의 상보적인 영역으로 생성될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 다른 pre-mRNA 분자와 혼성화할 수 있는 가능성은 올리고뉴클레오타이드의 크기가 증가함에 따라 감소한다. 또한 제조 가능성, 정제 및/또는 분석 문제를 야기시

킬 수 있도록 너무 긴 길이를 지니지 않아야 한다.

[0056] 상보성 영역에서 미스 매치를 포함하지만 pre-mRNA 내의 표적화 영역에 혼성화 및/또는 결합하는 능력을 보유하는 올리고뉴클레오타이드가 본 발명에서 사용될 수 있음은 명백하다. 그러나 적어도 상보적 부분은 미스매치를 포함하지 않는 것이 바람직하며 이는 하나 이상의 상보적 영역에서 이러한 미스매치를 지니는 뉴클레오타이드보다 높은 효율성 및 높은 특이성을 지니기 때문이다. 보다 높은 혼성화 강도(즉 대응 가닥과의 상호작용의 수를 증가시킴)는 시스템의 스플라이싱 기작을 저해하는 프로세스를 증가시키는데 바람직한 것으로 생각된다. 바람직하게는 상보성은 90% 내지 100%이다. 일반적으로 이는 20개 뉴클레오타이드의 올리고뉴클레오타이드에서 1 또는 2개의 미스매치를 허용하는 것이다.

[0057] 본 발명의 엑손 스킵핑 분자는 바람직하게는 서열번호: 1 내의 엑손 80 서열(서열번호: 18)에 상보적인 (안티센스) 올리고뉴클레오타이드이다.

[0058] 바람직하게는 올리고뉴클레오타이드의 상보적인 부분의 길이는 올리고뉴클레오타이드의 길이와 동일하며, 이는 표적 RNA와 염기쌍을 형성하지 않는 올리고의 5' 또는 3' 말단이 존재하지 않음을 의미한다. 따라서 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 바람직한 길이는 예를 들면 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23개의 뉴클레오타이드와 같은 23개 또는 그 이하이다.

[0059] 20, 21 또는 23개 뉴클레오타이드 길이를 지니는 AON으로 특히 우수한 결과가 얻어졌다.

[0060] AON이 엑손 80에만 상보적이거나 그 인접한 인트론 중 어느 하나에 상보적이지 않은 경우 AON은 예를 들면 20-머(AON80.3) 또는 36-머(AON80.13)와 같은 12~36개 뉴클레오타이드 길이와 같은 임의의 길이일 수 있다.

[0061] 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자는 하기에서 상세하게 설명하는 바와 같이 하나 이상의 DNA 잔기(결과적으로 RNA "u" 잔기는 DNA 대응관계로서 "t" 잔기가 된다), 또는 하나 이상의 RNA 잔기, 및/또는 하나 이상의 뉴클레오타이드 유사체 또는 균등물을 함유할 수 있다. 서열번호: 4~15 및 서열번호: 25~32는 RNA 서열이나 본 발명은 또한 이들 각각 서열의 DNA 형태, 또한 이들 서열의 가상 DNA/RNA AON을 포함한다.

[0062] 본 발명의 엑손 스킵핑 분자는 뉴클레아제 내성을 증가시키거나 및/또는 표적 서열에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 친화성을 증가시키기 위해 변형된 하나 이상의 잔기를 포함하는 것이 바람직하다. 따라서 바람직한 실시형태에서 안티센스 뉴클레오타이드 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체 또는 균등물을 포함하며, 여기서 뉴클레오티드 유사체 또는 균등물은 변형된 염기 및/또는 변형된 골격 및/또는 비-천연 인터뉴클레오사이드 결합 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0063] 바람직한 실시형태에서 뉴클레오타이드 유사체 또는 균등물은 변형된 골격을 포함한다. 이러한 골격의 예는 모르폴리노 골격, 카바메이트 골격, 실록산 골격, 설파이드, 설폭사이드 및 설폰 골격, 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격, 메틸렌포름아세틸 골격, 리보아세틸 골격, 알켄 함유 골격, 설파메이트, 설포네이트 및 설폰아미드 골격, 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 골격 및 아미드 골격을 들 수 있다.

[0064] 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머는 이전에 안티센스 작용제로 연구된 변형된 골격 올리고뉴클레오타이드이다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 DNA의 데옥시리보스 당이 6원 고리로 대체되고 포스포디에스테르 결합이 포스포로디아미데이트 결합으로 대체된 전하를 지니지 않는 골격을 지닌다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 효소 분해에 내성을 지니며 RNase H를 활성화시키는 것보다는 번역을 정지시키거나 pre-mRNA 스플라이

싱을 간섭함으로써 안티센스 작용제로 기능하는 것으로 보인다.

[0065] 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 세포막을 물리적으로 파괴하는 방법으로 조직 배양 세포에 성공적으로 전달되었으며, 이러한 몇 가지 방법을 비교한 한 연구는 스크랩(scrape) 로딩이 가장 효율적인 전달 방법이라는 것을 발견하였다. 그러나 모르폴리노 골격은 전하를 지니지 않기 때문에 양이온성 지질은 세포에서 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드 흡수의 효과적인 매개자가 아니다.

[0066] 본 발명에 실시형태에 있어서, 단사슬 알킬 또는 시클로알킬 인터뉴클레오사이드 결합, 혼성 헤테로 원자 및 알킬 또는 시클로알킬 인터뉴클레오사이드 결합, 또는 하나 또는 그 이상의 단사슬 헤테로 원자 또는 헤테로사이클릭 뉴클레오사이드 결합으로 형성된 결합과 같은 골격 내의 잔기 사이의 결합은 인 원자를 포함하지 않는 것이 바람직하다.

[0067] 이러한 실시형태에 따르면 바람직한 뉴클레오타이드 유사체 또는 균등물은 변형된 폴리아미드 골격을 지니는 펩타이드 핵산(PNA)을 포함한다(Nielsen 등, 1991). PNA 기반 분자는 염기-쌍 인식의 관점에서 DNA 분자의 진정한 모방품(mimic)이다. PNA의 골격은 펩타이드 결합에 의해 연결된 N-(2-아미노에틸)-글리신 단위로 구성되며, 핵산염기는 메틸렌 카르보닐 결합에 의해 골격에 연결된다.

[0068] 대안적인 골격은 하나의 탄소가 연장된 피롤리딘 PNA 단량체를 포함한다(Govindaraju 및 Kumar. 2005). PNA 분자의 골격은 전하를 지니는 인산염 그룹을 포함하지 않기 때문에 PNA-RNA 혼성화는 각각 RNA-RNA 또는 RNA-DNA 혼성화보다 일반적으로 안정하다(Egholm 등, 1993).

[0069] 본 발명의 또 다른 실시형태에 있어서, 골격은 리보오스 또는 데옥시리보스 당이 6-원 모르폴리노 고리로 치환된 모르폴리노 뉴클레오타이드 유사체 또는 균등물을 포함하는 것이다. 가장 바람직한 뉴클레오타이드 유사체 또는 균등물은 리보스 또는 데옥시리보스 당이 6-원 모르폴리노 고리로 치환되고 인접한 모르폴리노 고리 사이의 음이온성 포스포디에스테르 결합이 비이온성 포스포로디아미데이트 결합으로 대체된 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)를 포함한다.

[0070] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 뉴클레오타이드 유사체 또는 균등물은 포스포디에스테르 결합에서 비-가교 산소 중 하나의 치환을 포함한다. 이 변형은 염기쌍을 약간 불안정하게 만들지만 뉴클레아제 분해에 대한 상당한 저항성을 부여한다.

[0071] 바람직한 뉴클레오타이드 유사체 또는 균등물은 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, H-포스포네이트, 메틸 및 3'-알킬렌 포스포네이트, 5'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 다른 알킬 포스포네이트, 포스피네이트, 3'-아미노포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트를 포함하는 포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 셀레노포스페이트 또는 보라노포스페이트를 포함한다.

[0072] 본 발명의 더욱 바람직한 뉴클레오타이드 유사체 또는 균등물은 -OH와 같이 2', 3' 및/또는 5' 위치에서 1치환 또는 2치환된 하나 이상의 당 모이어티; -F; 치환 또는 비치환된 하나 이상의 헤테로원자에 의해 방해될 수 있는 선형 또는 분지형 저급(C1-C10) 알킬, 알케닐, 알키닐, 알크아릴, 알릴 또는 아르알킬; O-, S- 또는 N-알킬; O-, S- 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알키닐; O-, S- 또는 N-알릴; O-알킬-O-알킬, -메톡시, -아미노프로폭시; 메톡시에톡시; -디메틸아미노옥시에톡시; 및 -디메틸아미노에톡시에톡시 등을 포함한다.

[0073] 당 모이어티는 퓨라노스 또는 이의 유도체, 또는 데옥시퓨라노스 또는 이의 유도체, 바람직하게는 리보스 또는 이의 유도체, 또는 데옥시리보스 또는 유도체일 수 있다.

[0074] 바람직한 유도체화 당 모이어티는 2'-탄소 원자가 당 고리의 3 ' 또는 4' 탄소 원자에 연결되어 바이사이클릭 당 모이어티를 형성하는 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid, LNA)을 포함한다. 바람직한 LNA는 2'-O, 4'-C-에틸렌 가교 핵산을 포함한다(Morita 등, 2001. Nucleic Acid Res Supplement No. 1: 241-242). 이러한 치환은 뉴클레오타이드 유사체 또는 균등물에 RNase H 및 뉴클레아제 내성을 부여하고 표적 RNA에 대한 친화성을 증가시킨다.

[0075] 당업자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 내의 모든 인터뉴클레오사이드 결합이 변형될 필요는 없다는 것을 이해한다. 예를 들어 특정의 인터뉴클레오사이드 결합이 변형되지 않는 반면에 다른 인터뉴클레오사이드 결합은 변형될 수 있다.

[0076] AON의 길이에 따라 일정하거나 일정하지 않게 분포된 (변형된) 인터뉴클레오사이드 결합 중 하나의 형태, (변형된) 인터뉴클레오사이드 결합 중 다수의 형태로 구성된 골격을 포함하는 AON은 모두 본 발명의 범위에 포함된다. 더욱이 골격 변형(일정한, 일정하지 않은, 모노-형태 또는 다수 형태 및 그의 모든 순열)의 모든 형태는 당의 어떠한 형태 또는 뉴클레오사이드 변형 또는 하기 언급되는 동족체와 결합할 수 있다.

[0077] 본 발명에 따른 AON에 대한 특히 바람직한 골격은 균일한 (모든) 포스포로티오에이트(PS) 골격이다.

[0078] 또 다른 실시형태에서 본 발명의 뉴클레오타이드 유사체 또는 균등물은 하나 이상의 염기 변형 또는 치환을 포함한다. 변형된 염기는 합성 및 천연 염기를 포함하며 이는 이노신, 크산틴, 하이포크산틴 및 다른 -아자, 데아자, -하이드록시, -할로, -티오, 티올, -알킬, -알케닐, -알키닐, 피리미딘의 티오알킬 유도체 및 또는 당 업계에 공지된 퓨린 염기이다.

[0079] 당업자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 모든 위치가 균일하게 변형될 필요는 없다는 것을 이해한다. 또한 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 내의 단일 위치에 전술한 유사체 또는 균등물 중 하나 이상을 혼입시킬 수 있다. 특정 실시형태에서 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 2종 이상의 상이한 유형의 유사체 또는 균등물을 지닌다.

[0080] 또 다른 실시형태에 따르면 본 발명에 따른 AON은 2'-O-메틸 변형 리보스 (RNA), 2'-O-메톡시에틸 변형 리보스, 2'-O-에틸 변형 리보스, 2'-O-프로필 변형 리보스 및/또는 예를 들면 할로겐화 유도체와 같은 이들 변형체의 치환된 유도체와 같은 2'-O 알킬(바람직하게는 저급 알킬) 포스포로티오에이트 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0081] 본 발명에 따른 효과적이고 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 형태는 바람직하게는 실질적으로 모든 리보스 모이어티가 2'-O-메틸이고 실질적으로 모든 인터뉴클레오사이드 결합이 포스포로티오에이트 결합인 포스포로티오에이트 골격을 지니는 2'-O-메틸 변형 리보스 모이어티를 포함한다.

[0082] 또한 상이한 AON이 COL7A1 유전자의 엑손 80을 효율적으로 스킵핑하기 위해 결합될 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 2개의 AON의 조합은 2개의 AON, 3개의 상이한 AON, 4개의 상이한 AON, 또는 5개의 상이한 AON와 같으며 적어도 하나의 AON이 본 발명에 따른 것이라면 이는 엑손 80의 동일하거

나 상이한 영역을 표적으로 한다(도 1).

[0083] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포, 바람직하게는 피부 세포에서 AON의 흡수를 증가시키는 모이어티에 연결될 수 있다. 상기 모이어티의 예로는 콜레스테롤, 탄수화물, 비타민, 비오틴, 지질, 인지질, 안테나페디아(antennapedia), TAT, 트랜스포르탄(transportan) 및 올리고아르기닌, 폴리-아르기닌, 올리고라이신 또는 폴리라이신과 같은 양 전하를 지닌 아미노산를 포함하나 이에 한정되지는 않는 세포-침투 펩타이드, 항체에 의해 제공되는 것과 같은 항원-결합 도메인, 항체의 Fab 단편, 또는 카멜리드 단일 도메인 항원-결합 도메인과 같은 단일 사슬 항원 결합 도메인을 들 수 있다.

[0084] 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자는 네이키드 (gymnotic) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 벡터(벡터화된 AON)로부터 발현되거나 컨쥬게이트된 형태이다.

[0085] 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자는 당업계에 공지된 적절한 수단을 사용하여 투여될 수 있다. 엑손 스킵핑 분자가 벡터화된 AON인 경우, 예를 들면 개체 또는 상기 개체의 세포, 조직 또는 기관에 발현 벡터의 형태로 제공될 수 있으며 이때 발현 벡터는 상기 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 전사체를 코드화하는 것이다.

[0086] 발현 벡터는 바람직하게는 바이러스 벡터와 같은 유전자 전달 비히클을 통해 세포, 조직, 기관 또는 개체 내로 도입된다. 바람직한 실시형태에서 본 발명에서 확인된 바와 같은 엑손 스킵핑 분자의 발현 또는 전사를 유도하는 발현 카세트 또는 전사 카세트를 포함하는 바이러스성 발현 벡터가 제공된다.

[0087] 따라서 본 발명은 엑손 스킵핑 분자의 발현을 유도하는 조건하에서 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자를 발현하는 바이러스 벡터를 제공한다. 세포는 엑손 80내포에 필수적이거나 적어도 유도할 수 있는 서열을 간섭하는 엑손 스킵핑 분자가 공급될 수 있으며 예를 들면 플라스미드-유래 AON 발현 또는 아데노바이러스 또는 아데노-관련 바이러스 기반 벡터에 의한 바이러스 발현을 통해 상기 간섭은 COL7A1 mRNA 내로 엑손 80의 내포를 방지하거나 적어도 감소시킬 수 있다.

[0088] 발현은 U1, U6 또는 U7 RNA 프로모터와 같은 중합효소 Ⅲ 프로모터에 의해 유도될 수 있다. 바람직한 전달 비히클은 아데노-관련 바이러스 벡터(AAV)와 같은 바이러스 벡터 또는 렌티 바이러스 벡터와 같은 레트로 바이러스 벡터 등을 들 수 있다.

[0089] 또한 플라스미드, 인공 염색체, 표적 동종 재조합 및 세포의 포유동물(바람직하게는 인간) 게놈에서의 통합에 사용할 수 있는 플라스미드는 본원에서 정의된 올리고뉴클레오타이드의 전달에 적합하게 적용될 수 있다. 현재 발명에서 바람직한 것은 전사가 Pol-Ⅲ 프로모터로부터 유도되거나 및/또는 전사체가 U1 또는 U7 전사체와의 융합 형태로 존재하는 벡터이며 작은 전사체 전달에 양호한 결과를 제공하는 것이다.

[0090] 적절한 전사체를 설계하는 것은 당업자의 기술 범위 내에 있다. Pol-Ⅲ 유도된 전사체가 바람직하다. 바람직하게는 U1 또는 U7 전사체를 지니는 융합 전사체의 형태로 존재한다. 이러한 융합체는 당 업계에 기술된 바와 같이 생성될 수 있다 *vide*: Gorman L 등, 1998 또는 Suter D 등, 1999).

[0091] 하나의 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 발현 시스템은 아데노바이러스 관련 바이러스(AAV)-기반 벡터이다. 단일 사슬 및 이중 사슬 AAV-기반 벡터가 개발되어 COL7A1 엑손 80의 고효율 스킵핑을 위한 안티센스 뉴클레오타이드 서열의 연장된 발현에 사용될 수 있다.

[0092] 예를 들면 바람직한 AAV-기반 벡터는 중합효소 Ⅲ-프로모터(Pol Ⅲ)에 의해 구동되는 발현 카세트를 포함한다. 바람직한 Pol Ⅲ 프로모터는 예를 들면 U1, U6 또는 U7 RNA 프로모터이다.

[0093] 따라서 본 발명은 또한 COL7A1 엑손 80의 스킵핑을 유도하기 위한 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 발현을 위한 Pol Ⅲ-프로모터 구동 발현 카세트를 포함하는 바이러스성 벡터를 제공한다.

[0094] 본 발명에 따른 AAV 벡터는 재조합 AAV 벡터이며, 본 명세서의 다른 곳에 도시된 바와 같은 AAV 혈청형으로부터 유래된 캡시드 단백질의 단백질 쉘 내에 캡시드화된 본 발명에 따른 코드화된 엑손 스킵핑 분자를 포함하는 AAV 게놈의 일부를 포함하는 AAV 벡터를 지칭한다. AAV 게놈의 일부는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9 등과 같은 아데노-관련 바이러스 혈청형에서 유래된 인버트 말단 반복(ITR)을 포함할 수 있다.

[0095] 캡시드 단백질로 구성된 단백질 쉘은 AAV1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 등과 같은 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 단백질 쉘은 또한 캡시드 단백질 쉘로 명명될 수 있다. AAV 벡터는 하나 또는 바람직하게는 모든 야생형 AAV 유전자가 결실되어 있으나 여전히 기능적 ITR 핵산 서열을 포함할 수 있다. 기능적 ITR 서열은 AAV 비리온의 복제, 복구(rescue) 및 패키징에 필요하다.

[0096] ITR 서열은 야생형 서열이거나 야생형 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 서열 상동성을 지닌 서열이거나, 그의 기능을 유지하는 한 예를 들면 뉴클레오타이드의 삽입, 변이, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있다. 상기 설명에서 기능성은 게놈의 캡시드 쉘에게로 직접적 패키징이 가능한 능력을 의미하며 감염된 숙주 세포 또는 표적 세포 내의 발현을 가능하게 하는 것이다. 본 발명과 관련하여 캡시드 단백질 쉘은 AAV 벡터 게놈 ITR과 상이한 혈청형일 수 있다.

[0097] 따라서 본 발명에 따른 AAV 벡터는 예를 들어 AAV 혈청형 2와 같은 하나의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질(VP1, VP2 및/또는 VP3)을 포함하는 캡시드 단백질을 포함하는 정사각형 캡시드로 구성될 수 있다. 이때 AAV5 벡터에 포함된 ITR 서열은 AAV2 벡터를 포함하며 상기에서 기재된 임의의 AAV 혈청형 중 하나일 수 있다. "AAV2 벡터"는 AAV 혈청형 2의 캡시드 단백질 쉘을 포함하는 반면에 "AAV5 벡터"는 AAV 혈청형 5의 캡시드 단백질 쉘을 포함하며 이로써 본 발명에 따른 어떠한 AAV 벡터 게놈 ITR도 캡시드화할 수 있다.

[0098] 바람직하게는 본 발명에 따른 재조합 AAV 벡터는 AAV 혈청형 2, 5, 8 또는 AAV 혈청형 9의 캡시드 단백질 쉘을 포함하며 상기 AAV 벡터에 존재하는 AAV 게놈 또는 ITR은 AAV 혈청형 2, 5, 8 또는 AAV 혈청형 9로부터 유래된 것이다. 이러한 AAV 벡터는 AAV2/2, AAV 2/5, AAV2/8, AAV2/9, AAV5/2, AAV5/5, AAV5/8, AAV 5/9, AAV8/2, AAV 8/5, AAV8/8, AAV8/9, AAV9/2, AAV9/5, AAV9/8 또는 AAV9/9 벡터로서 언급된다.

[0099] 더욱 바람직하게는 본 발명에 따른 재조합 AAV 벡터는 피부 및 표피 세포에 대한 국소적 적용이 가능하고 AAV 혈청형 5 또는 8의 캡시드 단백질 쉘을 포함한다. 상기 벡터에 존재하는 AAV 게놈 또는 ITR은 예를 들면 AAV 혈청형 2와 동일하거나 상이한 혈청형으로부터 유래될 수 있으며 상기 벡터를 AAV 2/5 또는 AAV 2/8 벡터라고 한다. 혈청형 5 캡시드를 지니는 AAV는 기저 및 상부 기저 각질 세포 및 피부 섬유아세포와 같은 피부 및 표피 세포에 대한 국소 적용증을 지닌다. 5형 캡시드를 지니는 AAV 벡터는 2형 캡시드를 지니는 AAV와 비교하여 훨씬 높은 형질도입 효율을 나타낸다(Keswani 등, 2012).

[0100] 유사하게, 혈청형 8의 캡시드를 지니는 AAV는 진피 섬유아세포 및 (주로) 상부 기저 각질세포에 국소 적용증을 지닌다. 더욱이 AAV 2/8은 AAV 2/5보다 포유동물 바람직하게는 인간의 피부 및 표피 세포를 형질 도입하는데 보다 효율적이다. 그러나 형질도입 효율은 상처 치유 중 투여의 타이밍에 의존하는 것으로 보이며, AAV 2/2는 그보다 더 이후 시점에서 AAV 2/5 및 AAV 2/8보다 높은 형질도입 효율을 나타낸다 (Keswani 등, 2012).

[0101] 따라서 본 발명에 따른 AON을 전달하기 위해서는 AAV 2/2, AAV x/5 및 AAV x/8이 선호되는 AAV이고, 이들의 선택은 투여 시간 및 표적화 될 세포 유형을 고려하여 결정될 수 있다. 이러한 세부 사항은 전임상 또는 임상 연구에서 당업자가 용이하게 실시할 수 있다.

[0102] 선택된 핵산 서열에 의해 나타내어지는 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자를 암호화하는 핵산 분자는 상기에서 확인된 바와 같이 AAV 게놈 또는 ITR 서열 사이에 바람직하게 삽입되며 예를 들면 코딩 서열 및 3' 종결 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 조절 요소를 포함하는 발현 컨스트럭트이다.

[0103] "AAV 헬퍼 기능"은 일반적으로 전환 중에(in trans) AAV 벡터에 공급된 AAV 복제 및 패키징에 필요한 상응 AAV 기능을 나타낸다. AAV 헬퍼 기능은 AAV 벡터에서 누락된 AAV 기능을 보완하지만 AAV 벡터 게놈에 의해 제공되는 AAV ITR은 결핍되어 있다. AAV 헬퍼 기능은 AAV의 2개의 주요 ORF, 즉 rep 코딩 영역 및 cap 코딩 영역 또는 이들의 기능적으로 실질적으로 동일한 서열을 포함한다.

[0104] Rep 및 Cap 영역은 당 업계에 잘 공지되어 있으며 예를 들어 문헌 Chiorini 등.(1999, J. of Virology, Vol 73(2): 1309-1319) 또는 미국 특허 제5,139,941호에 기술되어 있고 본 명세서 내에 통합되어 있다. AAV 헬퍼 기능은 플라스미드일 수 있는 AAV 헬퍼 컨스트럭트 상에 제공될 수 있다. 헬퍼 구조의 숙주 세포로의 도입은 예를 들면 형질 전환, 형질 감염 또는 형질 도입에 의해 본 명세서에서 확인된 바와 같은 AAV 벡터에 존재하는 AAV 게놈의 도입 이전에 또는 동시에 도입될 수 있다.

[0105] 본 발명의 AAV 헬퍼 컨스트럭트는 한편으로는 AAV 벡터 캡시드 단백질 쉘에 대한 원하는 혈청형의 조합을 생성하도록 선택될 수 있으며 다른 한편으로는 AAV 벡터 복제 및 패키징에 존재하는 AAV 게놈을 위한 원하는 혈청형의 조합을 생성하도록 선택될 수 있다.

[0106] "AAV 헬퍼 바이러스"는 AAV 복제 및 패키징에 필요한 추가 기능을 제공한다. 적합한 AAV 헬퍼 바이러스는 아데노 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스(예를 들면 HSV 유형 1 및 2) 및 백시니아 바이러스를 포함한다. 헬퍼 바이러스에 의해 제공되는 추가 기능은 또한 본 명세서 내에 참고문헌으로 통합된 미국 특허 제6,531,456호에 기재된 바와 같이 벡터를 통해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.

[0107] 바람직하게는 본 발명에 따른 재조합 AAV 벡터에 존재하는 AAV 게놈은 AAV의 *rep*(복제) 또는 *cap*(캡시드) 유전자와 같은 바이러스 단백질을 암호화하는 임의의 뉴클레오타이드 서열을 포함하지 않는다. AAV 게놈은 예를 들어 항생제 내성 유전자, 형광 단백질(예, *gfp*)을 암호화하는 유전자 또는 당업계에 알려진 화학적으로 효소적으로 또는 기타 검출 가능한 및/또는 선택 가능한 생성물(예를 들어 *lacZ, aph* 등)을 암호화하는 유전자와 같은 마커 또는 리포터 유전자를 추가로 포함할 수 있다.

[0108] 본 발명에 따른 바람직한 AAV 벡터는 AAV 벡터, 바람직하게는 AAV2/5, AAV2/8, AAV2/9 또는 AAV2/2 벡터이며 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자를 발현한다. 이때 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하기 표 1에 나타난 바와 같이 AON80.1, AON80.2, AON80.3, AON80.4 및 AON80.5로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하거나 서열로 구성된다.

[0109] 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자를 개체 또는 상기 개체의 세포, 조직, 기관에 제공하는 수단의 개선은 이미 지금까지 달성된 개량을 고려하여 예상될 수 있다. 이러한 미래의 개선은 물론 본 발명의 방법을 사용하여 mRNA의 재구성에 대한 언급된 효과를 달성하기 위해 통합될 수 있다. 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자는 그대로 개체, 상기 개체의 세포, 조직 또는 기관에 전달될 수 있다. 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자를 투여할 때 상기 분자는 전달 방법과 배합 가능한 용액에 용해되는 것이 바람직하다.

[0110] 짐노틱(Gymnotic) AON은 생체 내에서 대부분의 세포에 쉽게 흡수될 수 있으며 등장성 (생리식염수) 용액 내에 본 발명의 AON을 통상 녹일 수 있어 예를 들면 피부 (진피 및 표피) 세포와 같은 표적 세포에 충분히 도달시킬 수 있다. 한편으로는 본 발명의 짐노틱 AON은 약제학적으로 허용 가능한 부형제, 첨가제, 안정화제, 용매, 색소 등과 같은 물질로 제형화시킬 수 있다. 더욱이 짐노틱 AON은 하기 언급하는 트랜스펙션 보조제와 함께 제형화시킬 수 있다.

[0111] 피부 (진피 및 표피) 세포는 등장성 (생리식염수) 용액과 같은 수용액에서 플라스미드를 제공함으로써 안티센스 올리고뉴클레오타이드 발현을 위한 플라스미드를 제공할 수 있다. 대안적으로 플라스미드는 공지된 트랜스펙션 제제를 사용하여 트랜스펙션 시킴으로써 제공될 수 있다.

[0112] 정맥 내, 피하, 근육 내, 경막내 및/또는 피내 투여를 위해 용액은 등장성 (생리식염수) 용액인 것이 바람직하다. 본 발명에서 특히 바람직한 것은 세포 및/또는 세포, 바람직하게는 피부 (진피 및 표피) 세포에 본 발명에서 정의된 바와 같은 각각의 성분 전달을 위한 부형제 또는 트랜스펙션 제제의 사용이다. 세포막을 통해 소포체 또는 리포솜에 복합화 되거나 포획된 본 발명에서 정의된 바와 같은 각각의 성분을 전달하는 복합체, 나노입자, 마이셀, 비시클 및/또는 리포솜을 형성할 수 있는 부형제 또는 트랜스펙션 제제를 사용할 수 있다.

[0113] 이들 부형제 중 많은 것이 당 업계에 공지되어 있다. 적합한 부형제 또는 트랜스펙션 제제는 폴리에틸렌이민(PEI; ExGen500 (MBI Fermentas)), LipofectAMINE 2000(Invitrogen) 또는 이의 유도체, 폴리프로필렌이민 또는 폴리에틸렌이민 공중합체(PEC) 및 유도체를 포함하는 유사 양이온성 고분자, 합성 양친매성 물질(SAINT-18), 리포펙틴, DOTAP 및/또는 피부 (진피 및 표피) 세포 내로 본 발명에 정의된 바와 같이 각각의 조성을 전달할 수 있는 입자 내로의 자가 조립이 가능한 바이러스 캡시드 단백질을 포함한다.

[0114] 이러한 부형제는 피부 (진피 및 표피) 세포를 비롯한 다양한 배양 세포에 안티센스 핵산과 같은 올리고뉴클레오타이드를 효율적으로 전달하는 것으로 나타났다. 이들의 높은 트랜스펙션 가능성은 전반적인 세포 생존의 관점에서 허용될 수 있을 정도의 경미한 내지 중간 정도의 독성과 결합된다. 추가적 변형 및 이들의 추가적인 (생체내) 핵산 전달 특성 및 독성 분석을 가능하게 하는데 구조적 변형을 용이하게 적용할 수 있다.

[0115] 리포펙틴은 리포좀성 트랜스펙션 제제의 예를 나타낸다. 그것은 2개의 지질 성분으로 구성되어 있으며 이는 양이온성 지질인 N-[1-(2,3 디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA)(메틸황산염인 DOTAP와 비교)와 중성 지질인 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE)이다. 중성 요소는 세포 내 방출을 매개한다. 또 다른 전달 시스템의 그룹은 중합체성 나노 입자이다.

[0116] DNA 트랜스펙션 시약으로 잘 알려져 있는 디에틸아미노에틸아미노에틸(DEAE)-덱스트란과 같은 폴리 양이온(Polycation)은 세포막을 가로질러 세포 내로 본 발명에 정의된 바와 같은 각각의 조성, 바람직하게는 올리고뉴클레오타이드를 전달할 수 있는 양이온성 나노입자를 제조하기 위한 부틸시아노아크릴레이트(PBCA)와 헥실시아노아크릴레이트(PHCA)와 결합할 수 있다.

[0117] 이러한 일반적인 나노 입자 물질 외에도 양이온성 펩타이드 프로타민은 올리고뉴클레오타이드를 콜로이드로 제형화 하기 위한 대안적인 접근법을 제공한다. 이 콜로이드성 나노 입자 시스템은 소위 프로티클(proticle)이라고 불리는 입자를 형성할 수 있으며 이는 올리고뉴클레오타이드의 세포 내 방출을 패키지화하고 조절하는 간단한 자가-조립 과정에 의해 제조될 수 있다.

[0118] 당업자는 본 발명에서 사용하기 위한 엑손 스킵핑 분자를 패키지화하고 전달하기 위한 상기한 것 또는 상업적으로 이용 가능한 다른 부형제 및 전달 시스템 중 임의의 것을 선택하고 적용할 수 있으며 이는 COL7A1 유전자 내의 엑손 80 변이에 관련된 질병 또는 상태의 예방, 치료 또는 지연을 표적으로 이를 전달하기 위한 것이다.

[0119] 또한 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자는 세포(특히 피부(진피) 세포), 세포질 및/또는 그의 핵으로의 흡수를 용이하게 하도록 특별히 고안된 표적 리간드에 공유 결합 또는 비공유 결합될 수 있다. 이러한 리간드는 (ⅰ) 세포 내 흡수를 촉진시키는 세포, 조직 또는 기관 특이 엘레멘트를 인식하는 화합물(펩타이드 유사 구조를 포함하나 이에 한정하지는 않음) 및/또는 (ⅱ) 예를 들면 엔도좀 또는 라이소좀과 같은 비시클로부터 올리고뉴클레오타이드의 세포로 및/또는 세포 내로 방출되는 것의 흡수를 용이하게 할 수 있는 화학적 화합물을 포함할 수 있다.

[0120] 따라서 바람직한 실시형태에서 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자는 조성물 또는 약제 또는 조성물 내에 제형화되어 있으며 적어도 부형제 및/또는 전달을 위한 표적 리간드 및/또는 세포로의 전달 및/또는 그의 세포 내 전달 강화를 위한 기구와 함께 제공될 수 있다.

[0121] 조성물이 본 발명에서 후술하는 부가 화합물와 같은 부가적인 성분을 포함하는 경우, 조성물의 각 성분은 하나의 단일 조합 또는 조성물 또는 제제로 제형화될 수 있음을 이해해야 한다. 그들의 제형에 따라 당업자는 본 발명에서 정의된 바와 같이 각각의 성분에 대해 어느 유형의 제제가 가장 적합한지를 인지할 수 있다. 하나의 실시형태에서 본 발명은 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자 및 본 발명에서 후술하는 추가의 부가 화합물을 포함하는 키트 형태인 조성물 또는 제형을 제공한다.

[0122] 필요에 따라 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자 또는 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자를 발현하는 벡터, 바람직하게는 바이러스 벡터는 약제학적으로 허용 가능한 담체를 첨가함으로써 약제학적으로 활성인 혼합물로 통합될 수 있다.

[0123] 따라서 본 발명은 본 발명에 따른 짐노틱 AON 또는 바이러스 벡터와 같은 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자와 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 조성물, 바람직하게는 약제학적 조성물은을 제공하는 것이다. 이러한 조성물은 본 발명에 따른 단일 엑손 스킵핑 분자를 포함할 수 있으며 본 발명에 따른 다수의 별개의 엑손 스킵핑 분자를 또한 포함할 수 있다.

[0124] 이러한 약제학적 조성물은 담체, 부형제, 안정화제, 트랜스펙션제, 겔화제, 완충제, 충전제, 방부제, 보조제, 용해제 및/또는 희석제를 포함하는 임의의 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함 할 수 있다. 이러한 약제학적으로 허용 가능한 성분은 예를 들어 Remington, 2000에서 찾을 수 있다. 상기 조성물의 각 특징은 앞서 본 발명에 정의되어 있다.

[0125] 본 발명에 따른 다수의 별개의 엑손 스킵핑 분자가 사용되는 경우, 본 발명에서 정의된 농도 또는 용량은 사용된 모든 올리고뉴클레오타이드의 총 농도 또는 투여량 또는 사용되거나 첨가된 개별 엑손 스킵핑 분자의 농도 또는 투여량을 지칭할 수 있다. 따라서 하나의 실시형태에서 사용된 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자의 개별 또는 총 함량은 0.0001 내지 100 mg/kg, 바람직하게는 0.001 내지 50 mg/kg 범위의 양으로 투여되는 조성물이 제공되며, 가장 바람직하게는 0.01 내지 20 mg/kg이다.

[0126] 본 발명에 따른 바람직한 엑손 스킵핑 분자는 개체의 DEB 또는 더욱 일반적으로 변이 COL7A1 엑손 80 관련 질병 또는 상태의 치료를 위한 것이다. 본 발명의 모든 실시형태에서 "치료"라는 용어는 질병 또는 상태의 예방 및/또는 지연을 포함하는 것으로 이해된다. 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자를 사용하여 치료될 수 있는 개체는

이미 DEB 또는 COL7A1 엑손 80 관련 질병 또는 상태를 지니는 것으로 진단되었을 수 있다.

[0127] 대안적으로 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자를 사용하여 치료될 수 있는 개체는 아직 진단되지 않았을 수 있으나 그 또는 그녀의 주어진 유전적 배경으로 인해 미래에 DEB 또는 COL7A1 엑손 80 관련 질병 또는 상태를 발달시킬 수 있는 증가된 위험을 지니는 개체일 수 있다. 바람직하게는 개체는 인간이다. 바람직한 실시형태에서 변이 COL7A1 엑손 80 관련 질병 또는 상태는 이영양성 수포성 표피박리증(DEB)이다.

[0128] 본 발명은 AON, 또는 본 발명에 따른 바이러스 벡터와 같은 AON을 암호화하는 벡터, 또는 AON 또는 본 발명에 따른 AON을 암호화하는 벡터를 포함하는 조성물과 같은 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자를 제공하는 것이다. 이때 예를 들면 개체의 DEB 또는 더욱 일반적으로 변이 COL7A1 엑손 80 관련 질병 또는 상태의 치료 용도 의약으로서 사용하기 위한 것이다 (상기에 기재된 바와 같음).

[0129] 본 발명은 AON, 또는 본 발명에 따른 바이러스 벡터와 같은 AON을 암호화하는 벡터, 또는 AON 또는 본 발명에 따른 AON을 암호화하는 벡터를 포함하는 조성물과 같은 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자의 용도를 제공하는 것이다. 이때 예를 들면 개체의 DEB 또는 더욱 일반적으로 변이 COL7A1 엑손 80 관련 질병 또는 상태의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 것이다 (상기에 기재된 바와 같음).

[0130] 또한 본 발명은 DEB를 포함하는 질병 또는 장애의 원인이 되는 COL7A1 유전자의 엑손 80 내의 게놈 변이를 지니는 포유동물(바람직하게는 인간)의 치료 방법을 제공하는 것으로, AON, (바이러스) 벡터 또는 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 포유동물(인간)에게 투여하는 방법을 포함하는 것이다. 이 환자들은 DEB 또는 관련된 질병으로 고통받을 수 있다.

[0131] 관련 장애, 질병 또는 증상은 COL7A1 유전자의 엑손 80 변이에 의하거나 변이에 관련된 피부 또는 개체의 다른 기관의 콜라겐 VII 결핍 또는 이상의 결과로 발생할 수 있는 피부암 (흑색 종) 또는 다른 암종을 포함한다.

[0132] 본 발명의 또 다른 실시형태는 AON, AON을 암호화하는 바이러스 벡터 및 COL7A1 유전자의 엑손 80에서 변이를 그의 게놈 내에서 지니는 포유동물(바람직하게는 인간)을 치료하기 위한 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 AON을 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0133] 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자는 (수성) 용액, 현탁액, (오일-인-워터) 에멀젼, 연고, 로젠지, 필 등의 형태로 삼킴, 주사, 흡입, 주입, 분무에 의해 경구, 안구 내, 폐 내, 비강 내, 근육 내, 피하, 피내, 직장 내로 전체적 부분적 국소적으로 투여될 수 있다.

[0134] 본 발명에 따른 AON의 바람직한 투여 방법은 AON을 방출할 수 있는 AON이 코팅 된 붕대의 기구에 의한 것이다. 특히 WO 2014/150074에 개시된 바와 같은 다층 (층별, LbL)-코팅된 붕대가 유용하다. MIT의 명칭으로 출원된 국제 특허 출원은 상기 siRNA를 함유하는 다층 필름으로 코팅된 접착 붕대로부터 상처 치유 촉진용 siRNA의 장기적이고 효과적인 방출을 개시한다.

[0135] 본 발명에 따른 AON과 함께 적절하게 사용될 수 있는 붕대는 Tegaderm이다. 본 발명에 따른 AON과 조합하여 사용될 수 있는 siRNA의 전달을 위한 적절한 다층 코팅은 층별(layer-by-layer) 구조를 함유하는 Laponite를 포함한다.

[0136] 핵산 치료제를 방출 할 수있는 Tegaderm 이외의 붕대가 사용될 수 있다. 또한 붕대가 피부 또는 상처 부위와 밀접하게 접촉하기 때문에 환자에게 덜 고통스러운 비-접착성 붕대 또한 사용될 수 있다. 붕대와 조합하여 본 발명에 따른 AON을 전달하기 위한 AON- 함유 LBL 필름은 WO 2014/150074에 개시되어 있다.

[0137] 투약 용량은 투여 경로와 환자의 필요에 따라 매일, 주간, 월간, 분기 별, 1년에 한 번일 수 있다.

[0138] 질병의 조기 발병으로 인해 DEB를 포함한 COL7A1 유전자의 변이된 엑손 80에 의해 유발되거나 관련된 질병, 장애 또는 증상을 앓고 있거나 증상이 나타날 위험이 있는 환자는 자궁 내에서(in utero), 출생 직후에, 1, 2, 3, 6개월령 부터, 1세 부터, 3세 부터, 5세 부터 치료할 수 있으며 증상이 나타나기 전 또는 직후에 질병의 증상을 완화, 발달 지연, 중지 또는 역전시킬 수 있다.

[0139] 본 발명에 따른 치료 방법 및 용도는 1주일 이상, 1개월 이상, 몇 개월 이상, 1년 이상, 2, 3, 4, 5, 6년 이상 또는 만성적으로, 환자의 일생동안 지속된다. 본 발명의 용도에 따른 본 발명에서 정의된 엑손 스킵핑 분자 또는 엑손 스킵핑 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 균등물은 변이 COL7A1 엑손 80 관련 장애, 질병 또는 증상에 이미 영향을 받거나 또는 발병 위험이 있는 개체의 생체 내에서 세포, 조직 및/또는 기관에 직접 투여하기에 적합할 수 있으며 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내로 직접 투여될 수 있다.

[0140] 본 발명의 AON, 조성물, 화합물 또는 보조 화합물의 투여 빈도는 환자의 연령, 엑손 스킵핑 분자의 특성(예를 들면 짐노틱 AON 또는 벡터화 AON, 즉 AAV 또는 AON 발현 렌티바이러스 벡터), 투여량, 상기 분자의 제형 등을 포함하는 여러 요소에 의해 결정된다.

[0141] 엑손 스킵핑 분자, 바람직하게는 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드의 투여량 범위는 엄격한 프로토콜 요건이 존재하는 임상 시험(생체 내 사용)에서 요구하는 투여량 연구에 기초하여 바람직하게 설계된다. 본 발명에서 정의된 올리고뉴클레오타이드는 0.0001 내지 20 mg/kg, 바람직하게는 0.001 내지 20 mg/kg의 투여량 범위에서 사용될 수 있다. 투여량 및 치료 방법은 많은 요인에 의해 다양하게 변화할 수 있으며 이는 투여 경로(예를 들어 전신 대 국소), 올리고가 짐노틱 AON으로 또는 벡터화된 AON으로 투여되는지의 여부, 투약 요법, 환자의 연령 및 체중 등을 포함하며 이에 한정되지는 않는다.

[0142] 바람직한 실시형태에서 본 발명에 따른 분자를 위한 전달 비히클로서의 바이러스 벡터, 바람직하게는 본 발명에서 이전에 개시된 바와 같은 AAV 벡터는 주사 당 1×10^{9} ~ 1×10^{17} 바이러스 입자, 바람직하게는 1×10^{10} ~ 1×10^{14}, 가장 바람직하게는 1×10^{10} ~ 1×10^{12} 바이러스 입자의 범위로 투여된다.

[0143] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 올리고뉴클레오타이드(들)의 서열 및 화학적 성질, 투여 경로, 제형, 투여량, 투약 요법, 형태(바이러스 벡터 또는 짐노틱 올리고뉴클레오타이드), 환자의 연령 및 체중, 질병의 단계 등과 같은 요인에 따라 치료의 세부지침이 수립되어야 한다는 것이 명백할 것이며 추가적 비-임상적 및 임상적 조사를 필요로 할 수 있다.

[0144] 본 발명은 세포, 바람직하게는 피부 (진피) 세포를 짐노틱 AON 또는 본 발명에 따른 AON을 암호화하는 (바이러스) 벡터와 같은 본 발명에 따른 엑손 스킵핑 분자 또는 본 발명에 따른 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 세포에서 COL7A1 엑손 80의 내포를 방지하거나 적어도 감소시키는 방법을 추가로 제공한다. 이 측면의 특징은 바람직하게는 본 발명에서 앞서 정의된 특징이다.

[0145] 다르게 지시되지 않는 한 본 발명에 기재된 바와 같은 각각의 실시형태는 본 발명에 기술된 다른 실시형태와 결합될 수 있다.

[0146] 본 발명은 포유동물 세포에서 pre-mRNA로부터 스플라이싱에 의해 mRNA가 생성될 때, 인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이며 이때 올리고뉴클레오타이드는 (a) 엑손 80의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 (b) 24개 이하 뉴클레오타이드 길이임을 특징으로 한다.

[0147] 또 다른 실시형태에서 본 발명은 포유동물 세포에서 pre-mRNA로부터 스플라이싱에 의해 mRNA가 생성될 때, 인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이며 이때 상기 올리고뉴클레오타이드는 엑손 80의 3' 부분 및 다운스트림 인트론의 5' 부분에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함함을 특징으로 하며 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 21에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 예를 들어 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 22(5'-UCACCACU-3'), 서열번호: 23(5'-ACCACUGG-3') 및/또는 서열번호: 24(5'-ACUCACCA-3')를 포함함을 특징으로 한다.

[0148] 다른 측면에서 본 발명은 포유동물 세포에서 pre-mRNA로부터 스플라이싱에 의해 mRNA가 생성될 때, 인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이며 이때 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 22(5'-UCACCACU-3'), 서열번호: 23(5'-ACCACUGG-3')및/또는 서열번호: 24(5'-ACUCACCA-3')를 포함함을 특징으로 한다.

[0149] 바람직하게는 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드는 24개 이하 뉴클레오타이드 길이, 특정 실시형태에서는 바람직하게는 20개 내지 23개 뉴클레오티드이다. 따라서 상기 올리고뉴클레오타이드는 20, 21, 22 또는 23개 뉴클레오타이드 길이인 것이 바람직하다.

[0150] 바람직한 측면에서 올리고뉴클레오타이드는 AON80.1, AON80.2, AON80.3, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 및 AON80.5.8로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직하게는 상기 올리고뉴클레오타이드는 하기 군에서 선택된다 :

[0151] (i) AON80.2 및 AON80.5;

[0152] (ii) AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4 및 AON80.5.5; 또는

[0153] (iii) AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 및 AON80.5.8.

[0154] 또 다른 바람직한 실시형태에서 올리고뉴클레오타이드는 AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 및 AON80.5.8로 이루어진 군에서 선택된다.

[0155] 본 발명은 또한 포유동물 세포에서 RNA 전사체로부터의 스플라이싱에 의해 mRNA가 생성될 때, 인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 관한 것으로 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 엑손 80의 업스트림인 인트론에 혼성화되지 않음을 특징으로 한다.

[0156] 바람직하게는 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다. 바람직하게는 상기 올리고뉴클레오타이드의 서열은 AON80.3, AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7, AON80.5.8 및 AON80.13으로 이루어진 군의 올리고뉴클레오타이드의 서열을 포함한다.

[0157] 또 다른 실시형태에서 본 발명은 상기 mRNA가 포유동물 세포에서 RNA 전사체로부터의 스플라이싱에 의해 생성될 때 인간 COL7A1 mRNA로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 관한 것으로, 이때 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 엑손 80에 상보적이나 그의 업스트림 또는 다운스트림 인트론에는 상보적이지 않다.

[0158] 또 다른 실시형태에서 본 발명은 상기 mRNA가 포유동물 세포에서 pre-mRNA로부터 스플라이싱에 의해 생성 될 때 인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 관한 것으로, 이때 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 엑손 80과 상보적인 영역을 포함하며 상보적 영역은 엑손 80에 인접한 인트론 중 하나로 연장되지 않는다. 이러한 실시형태에서 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 AON80.3 또는 AON80.13이다.

[0159] 본 발명은 또한 포유동물 세포에서 RNA 전사체로부터의 스플라이싱에 의해 mRNA가 생성될 때 인간 COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 관한 것으로 이때 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 최대 20 뉴클레오타이드 길이를 지닌 엑손 80과의 상보성 영역을 포함함을 특징으로 한다.

[0160] 바람직하게는, 상기 올리고 뉴클레오타이드는 AON80.1, AON80.2, AON80.3, AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 및 AON80.5.8로 이루어진 군으로부터의 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 바람직하게는 엑손 80과의 상보성 영역은 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17 뉴클레오타이드 길이와 같은 최대 9개 내지 17개 뉴클레오타이드이다.

[0161] 보다 바람직하게는 올리고뉴클레오타이드가 엑손 80의 바로 다운스트림에 있는 인트론과 상보성 영역을 지니는 경우 엑손 80과의 상보성 영역은 9, 10, 11, 12, 13 또는 14 뉴클레오타이드와 같은 최대 9개 내지 14개 뉴클레오타이드이다. 엑손 80의 상보성 영역이 최대 12 뉴클레오타이드길이 일 때 올리고뉴클레오타이드는 AON80.1, AON80.4, AON80.5, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 및 AON80.5.8로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0162] 다른 바람직한 측면에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 (a) 최대 20 뉴클레오타이드 길이인 엑손 80과의 상보성 영역 및 (b) 엑손 80의 업스트림 또는 다운스트림 인트론에서 RNA 전사체와 상보적인 영역을 포함한다. 더욱 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 엑손 80의 인트론 다운스트림에서 RNA 전사체와 상보적인 부분을 포함한다. 하나의 실시형태에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 18의 열 개의 3'에 가장 인접한 뉴클레오타이드로 이루어진 엑손 80의 일부에 상보적인 부분을 포함한다(즉 서열번호: 18의 27~36 뉴클레오타이드).

[0163] 또 다른 실시형태에서 엑손 80과의 상보성 부분은 n 개의 3'에 가장 인접한 뉴클레오타이드로 이루어져 있으며 이때 n은 서열번호: 18의 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 또는 9와 같은 3'뉴클레오타이드에 가장 인접한 9 내지 20이다. 보다 바람직한 실시형태에서 엑손 80의 부분은 엑손 80의 12 개의 3'에 가장 인접한 뉴클레오타이드로 구성된다(즉 서열번호: 18의 25~36 뉴클레오타이드). 올리고뉴클레오타이드가 엑손 80의 일부에 상보적인 경우 그 서열은 바람직하게는 24개 이하의 뉴클레오타이드 길이를 지닌다.

[0164] 본 발명에 따른 모든 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 관련하여 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 올리고리보뉴클레오타이드이고, 보다 바람직하게는 뉴클레오사이드 간의 결합은 바람직하게는 포스포로티오에이트-결합인 화학적으로 변형된 결합이다. 또 다른 바람직한 측면에서 올리고뉴클레오타이드의 당 모이어티는 저급 2'-O-알킬, 바람직하게는 2'-O-메틸 치환 당 모이어티이다.

[0165] 본 발명은 또한 (ⅰ) 서열번호: 4~17 및 25~32로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열; (ii) 서열번호: 4~15 및 25~32로 이루어진 군으로부터 선택된 RNA 뉴클레오타이드 서열; 또는 (iii) 임의의 U가 T로 치환된 서열번호: 4~15 및 25~32로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 뉴클레오타이드 서열;을 포함한다.

[0166] 본 발명은 또한 하나 이상의 담체, 부형제, 안정화제, 트랜스펙션 제제, 희석제, 겔화제 또는 완충제 중 하나 이상을 임의로 포함하는 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 조성물은 인간 치료에서 사용하기 위한 약제학적 조성물로서 보다 바람직하게는 이영양성 수포성 표피박리증(DEB)의 치료에 사용하기 위한 것이고 더욱 바람직하게는 COL7A1 유전자의 엑손 80에서의 변이에서 유발된 DEB를 앓고 있는 인간 환자의 치료에 사용하기 위한 것이다. 다른 실시형태에서 본 발명은 COL7A1 유전자의 변이된 엑손 80의 내포로 유발된 질병을 앓고 있는 인간 객체의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다.

[0167] 본 발명은 또한 상기 mRNA가 포유동물, 바람직하게는 인간, 세포에서 RNA 전사체로부터 스플라이싱에 의해 생성될 때 포유류, 바람직하게는 인간 COL7A1 mRNA 로의 엑손 80 내포를 예방 또는 감소시키는 방법에 관한 것이다. 이때 상기 방법은 시험관 내 또는 생체 외로 세포, 조직, 또는 이와 같은 세포를 지니는 인간을 포함하는 살아있는 동물에 이와 같은 세포에 의한 올리고뉴클레오타이드의 흡수를 유도하는 조건 및 스플라이싱의 발생을 허용하는 조건하에서 제 1항 내지 제 27항에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 제 29항 내지 제 30항에 따른 조성물을 제공하는 것이다.

[0168] 본 발명에 따른 AON 또는 상기 AON을 코딩하는 (바이러스) 벡터와 같은 엑손 스킵핑 분자의 COL7A1 유전자가 포유류(바람직하게는 인간) 세포에서 발현될 때 변이 COL7A1 엑손 80 내포를 방지하거나 적어도 감소시키는 능력 및 5' 스플라이싱 수용체의 선택에 영향을 미치는 영역에서 생리학적 조건 하에서 포유동물(인간) COL7A1 pre-mRNA에 결합함으로써 변이된 엑손 80의 COL7A1 mRNA로의 내포를 감소시키는 능력은 본 명세서의 실시예에 개시된 분석을 사용하여 편리하게 평가할 수 있다.

[0169] 특히 엑손 스킵핑 분자는 엑손 80을 포함하는 mRNA의 세포에 의한 생산을 감소시키는 능력을 평가하기 위해 COL7A1 유전자의 엑손 80(반드시 변이되지는 않음)을 함유하는 세포와 함께 인큐베이션 시킬 수 있다. 예를 들면 실험 섹션 및 실시예에 개시된 바와 같이 RT-PCR(Bioanalyzer 장치를 사용하여 정량화될 수 있음)에 의해 수행된다.

[0170] 본 명세서의 실험 섹션 및 실시예에 나타난 바와 같이, RNA 수준에서 COL7A1 유전자의 엑손 80을 표적으로 하는 본 발명에 따른 다양한 AON의 첨가는 엑손 80이 결여된 mRNA를 통해 더 짧지만 기능적 콜라겐 Ⅶ 단백질의 생성을 유도한다.

[0171] 섬유아세포(피부 세포에서 유도될 수 있음)에서는 콜라겐 Ⅶ이 풍부하게 발현된다. 따라서 DEB 환자의 배양된 섬유아세포에 AON을 첨가하면 웨스턴 블롯에서 검출 가능한 짧지만 기능성인 콜라겐 Ⅶ 단백질의 양이 증가할 것으로 예상되며 따라서 AON 기반 치료법은 COL7A1 mRNA의 스플라이싱을 리디렉션할 뿐만 아니라 콜라겐 Ⅶ 기능 회복을 유도할 것이라는 것이 예견된다.

[0172] "아데닌", "구아닌", "시토신", "티민", "우라실" 및 하이포크산틴(이노신의 핵산염기)이라는 용어는 핵산염기를 의미한다.

[0173] 아데노신, 구아노신, 시티딘, 티미딘, 우리딘 및 이노신이라는 용어는 (데 옥시) 리보스 당과 연결된 핵산염기를 의미한다.

[0174] "뉴클레오사이드"라는 용어는 (데옥시) 리보스 당에 연결된 핵산염기를 의미한다.

[0175] 본 명세서와 그 청구항에서 "~을 포함한다"라는 동사와 그의 활용은 그 단어 뒤에 오는 엘레멘트가 포함되지만 특별히 언급되지 않은 엘레멘트는 제외되지 않는다는 것을 의미하는 제한적이지 않은 의미로 사용된다. 또한 부정관사 "a"또는 "an"에 의한 하나의 요소에 대한 언급은 문맥 상 하나의 요소만이 명백하게 요구되는 경우를 제외하고는 하나 이상의 요소가 존재할 가능성을 배제하지 않는다. 따라서 부정관사 "a"또는 "an"은 일반적으로 "적어도 하나"를 의미한다.

[0176] "포함하다"라는 단어와 그의 모든 시제와 활용법은 "포함하지만 이에 한정되지 않음"으로 해석되어야 한다.

[0177] "엑손 스킵핑 분자"라는 단어는 짐노틱 AON과 벡터화된 AON을 포함하는 것을 의미하며 호환 가능한 세포에서 AON을 발현할 수 있는 바이러스 벡터를 포함한다.

[0178] 수치(예를 들어, 약 10)와 관련하여 사용되는 "약" 또는 "대략"이라는 단어는 값이 소정 수치(10)의 ±5% 일 수 있음을 의미한다.

[0179] 본 명세서에 제공된 서열 정보는 잘못 식별된 염기를 포함할 수 있도록 너무 좁지 않게 해석하여야 한다. 당업자는 이러한 잘못 식별된 염기를 식별할 수 있으며 이러한 오류를 수정하는 방법을 알고 있다. 서열 오류의 경우, 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 서열번호: 1에 존재하는 유전자의 발현에 의해 수득 가능한 폴리펩타이드의 서열이 우선하여야 한다.

[0180] (실시예 1) 엑손 80의 mRNA 분석

[0181] COL7A1의 mRNA에서 엑손 80 mRNA의 존재를 검출하기 위해 HeLa 세포 및 인간 1차 섬유아세포(HPF) 모두의 mRNA를 추출하였다. 세포의 배양은(a) HeLa에 대해 10% 우태아 혈청(FBS)이 보충된 Dulbecco 변형 Eagle 배지(DMEM) 또는 (b) HPF 세포에 대해 20% FBS 및 1% 피루브산 나트륨이 보충된 DMEM AQE에서 수행하였다. 모든 세포는 37℃ 5% CO_2에서 배양하였다.

[0182] 상기한 AON의 엑손 스킵핑 효율을 결정하기 위해 세포를 12-웰 플레이트에 60,000 세포/웰(HeLa) 또는 6-웰 플레이트에 150,000 세포/웰(HPF)로 시드 접종하였다. 세포 성장을 허용한 24시간 후에 세포를 100nm AON-maxPei 복합체로 트랜스펙션 시켰다.

[0183] RNA 분리는 ReliaPrep RNA Cell Miniprep System(Promega)으로 수행하였으며 이어서 cDNA는 Thermo Scientific Verso 키트를 사용하여 수득되었다. 엑손 80에 대한 PCR은 엑손 77에 위치한 정방 프라이머 5'-CAAGGTCCCAAAGGAGACAG-3'(서열번호: 16)과 그의 역방 프라이머로서 엑손 84에 위치한 역방 프라이머 5'-AGTCCCACAGCTCCAGTAGG-3'(서열번호: 17) 또는 엑손 82/83 경계에 위치한 역방 프라이머 5'-GAAGGGGGAGCCTGGAGA-3'(서열번호: 33)으로 수행되었다.

[0184] PCR 생성물은 DNA1000 칩을 사용하여 Bioanalyzer로 시각화 되었으며 생성물 길이 분석은 소프트웨어 Expert 2100을 사용하였다. 초기 올리고뉴클레오타이드 디자인은 AON80.1 부터 AON80.12까지의 12개 올리고뉴클레오타이드를 생성하였으며 표 1은 이들 각각 AON에 대한 인간 1차 섬유아세포(HPF) 및 HeLa 세포에서 엑손 80의 반-정량적 스킵핑 효율을 나타낸다. AON80.5 21-머를 기반으로 한 추가 디자인 작업으로 AON80.5.1 부터 AON80.5.5로 명명된 5개 유도체를 생성하였다(모두 21-머).

[0185] 또한 완전한 엑손 80에 대해 36-머 올리고뉴클레오타이드(AON80.13)를 디자인하였다. 이들 추가 AON에 대한 데이터는 표 1에 포함되어 있으며 본 발명에 따른 바람직한 AON의 뉴클레오타이드 및 서열번호 또한 나타나있다(AON80.1 내지 AON80.5, AON80.5.n 시리즈, AON80.13). 2개의 20-머 올리고뉴클레오타이드(AON80.5.7 및 AON80.5.8)를 3회 시험하였다. 결과는 표 2에 나타내었으며 비교 가능한 결과를 보여준다.

[0186] 표 1은 mRNA로부터의 엑손 80 배제 효율성을 나타낸 것이다. 세포는 24시간 동안 100nM AON으로 처리하였다. 비교를 위해 WO 2013/053819에 개시된 ESE-80.3 및 ESE-80.3_Q2170X를 사용하였다. 데이터는 - (엑손 80 배제 없음), + (1-10% 엑손 배제), ++ (11-20% 엑손 80 배제), +++ (21-30% 엑손 80 배제)로 표시하였다.

【표 1】

[0187]

AON	HPF	HeLa	서열 5' – 3'	서열번호
ESE80.3	+++	++++	GGCCUCUUGGACCCUGCAGACCCU	2
ESE80.3_Q2170X	++	++++	GGCCUCUUGGACCCUACAGACCCU	3
AON80.1	+	+	CCUGCAGACCCUACAUAGAG	4
AON80.2	++++	++++	CUUGGACCCUGCAGACCCUA	5
AON80.3	++	++	GGGCCUCUUGGACCCUGCAG	6
AON80.4	++	+++	UUGGGUACUCACCACUGGGCCAGG	7
AON80.5	+++++++	++	GGUACUCACCACUGGGCCAGG	8
AON80.5.1	+++++++	+++++++	GUACUCACCACUGGGCCAGGG	25
AON80.5.2	+++++	++++	UACUCACCACUGGGCCAGGGG	26
AON80.5.3	-	-	GGGUACUCACCACUGGGCCAG	27
AON80.5.4	++	++	UGGGUACUCACCACUGGGCCA	28
AON80.5.5	-	-	UUGGGUACUCACCACUGGGCC	29
AON80.6	-	-	GGCAAGACAGGUGAAGGUUCUUGG	9
AON80.7	-	-	CAGGGCACAGGAUGGGGGCAAGACA	10
AON80.8	-	-	GUCACUGGGGCAGGGCACAGGAUGG	11
AON80.9	-	-	CUUGGGCCUGUUCCCAACCUCUGGG	12
AON80.10	-	-	AUCUGGGCCUCACUUGGGCCUG	13
AON80.11	-	-	AGGGCACUGAUGAGCCUCAAUCUGG	14
AON80.12	-	-	CAUAGAGAGGGCACUGAUGAGCCUC	15
AON80.13	+++++++	++++++++	CACUGGGCCAGGGGGGCCUCUUGGACCCUGCAGACC	30

[0188] 표 2는 mRNA로부터의 엑손 80 배제 효율성을 나타낸 것이다. 평균 결과는 표 1과 동일하게 수행된 3개의 독립적인 실험에 대해 나타내었으며 2개의 새로운 AON(AON80.5.7 및 AON80.5.8) 및 이전에 테스트된 AON과 비교하였다(상기 참조). 데이터는 표 1과 같이 나타내었다.

【표 2】

[0189]

AON	HPF	HeLa	서열 5′ – 3′	서열번호
AON80.5	+++++++	+++++++	GGUACUCACCACUGGGCCAGG	8
AON80.5.1	+++++++	+++++++	GUACUCACCACUGGGCCAGGG	25
AON80.5.2	+++++	++++++	UACUCACCACUGGGCCAGGGG	26
AON80.5.3	+	-	GGGUACUCACCACUGGGCCAG	27
AON80.5.4	++	++	UGGGUACUCACCACUGGGCCA	28
AON80.5.5	-	-	UUGGGUACUCACCACUGGGCC	29
AON80.5.7	++++++	++++++	GUACUCACCACUGGGCCAGG	31
AON80.5.8	++++++	++++++	GGUACUCACCACUGGGCCAG	32
AON80.13	+++++++	++++++++	CACUGGGCCAGGGGGGCCUCUUGGACCCUGCAGACC	30

[0190] 도 2~5는 표 1 및 표 2의 AON에 대한 랩-온-어-칩 결과를 나타낸다. AON80.1 내지 AON80.5로 명명된 본 발명에 따른 AON은 양호한 성능을 나타내며, AON80.2, AON80.4 및 AON80.5가 더 우수한 성능을 나타낸다. 추가 디자인 작업에서 AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.7, AON80.5.8 및 AON80.13이 테스트된 AON 중에서 최상의 스플라이싱 효율성을 갖는 것으로 나타났다. 본 발명에 따른 가장 바람직한 AON은 AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.7 및 AON80.5.8으로 나타났다.

[0191] 형성된 모든 생성물의 정확한 서열을 평가하기 위해 서열 분석을 수행하였다. Bioanalyzer로 분석한 후에 보이는 추가 생성물은 mRNA에서 인트론 82를 포함하였다(서열 분석에서 나타난 바와 같음). 그러나 이 인트론이 단백질로 번역될 경우 종료 코돈이 포함되어 트렁크화된 콜라겐 단백질로 나타나며 대부분 분해될 것이다.

[0192] AON의 면역원성 효과를 평가하기 위해 Invivogen의 RAW-Blue 세포를 사용하여 하기 시험관 내 시험 절차가 수행될 수 있다. 이 RAW-Blue 세포는 마우스 RAW 264.7 마크로파지로부터 유래되었으며 NF-κB 및 AP-1에 의해 유도되는 통합 분비 배아 알칼리 포스파타아제(SEAP) 리포터 구조를 지닌다. 모든 TLR(TLR5 제외), NOD1, NOD2, RIG-I, MDA 또는 DECTIN-1의 작용제의 존재는 NF-κB 및 AP-1의 활성화 및 SEAP의 후속 생산을 유도하는 신호 전달 경로를 유도한다.

[0193] SEAP 수준이 검출되어 면역원성 활성화를 나타낼 수 있다. 도 6은 시험관 내 자극 24시간 후의 실험 결과를 나타낸다. 양성 대조군 CpG-DNA, LPS 및 R848은 NF-κB 및/또는 AP-1을 활성화시켰다. 대조적으로 AON80.5.1이 1 μM의 최종 농도에서 NF-κB 및/또는 AP-1의 활성화를 의미하는 SEAP의 경미한 증가를 유도한다는 것을 제외하고는 생리 식염수 처리된 RAW-blue 세포와 비교하여 시험된 AON에 대해 NF-κB 및/또는 AP-1의 활성화가 관찰되지 않았다. 측정된 수치는 SEAP (OD) 측정에 대한 다중 비교를 위한 Holm-Sidak 테스트와 함께 One-Way ANOVA를 사용하여 생리식염수와 비교되었다.

[0194] 24시간의 시험관 내 자극 동안 AON의 면역독성을 RAW-Blue 세포를 사용하여 시험하였으며 레조루핀 수준의 증가를 관찰하였다(PPR 활성화로 인한 세포 수 증가 및/또는 촉진된 세포 대사로 인한 증가된 증식으로 설명될 수 있음). 임의의 AON에 대한 자극 후에 세포 생존능에 대한 효과가 관찰되지 않았다(도 7). 양성 대조군 CpG-DNA만이 합성된 레조루핀 수준을 현저히 상승시켰다(그러나 LPS와 R848에 대한 효과의 부재는 오래된 배치의 사용으로 인한 것일 수 있음). 검출된 수치는 레조루핀 측정에 대한 다중 비교를 위한 Holm-Sidak 테스트와 One-Way ANOVA를 사용하여 생리식염수와 비교되었다.

[0195] 예를 들면 단백질 안정성 및 엑손 80이 제거된 콜라겐 VII의 고정 피브릴 형성과 같은 기능성은 문헌에 기술된 몇 가지 시험관 내 방법을 사용하여 확인할 수 있다 :

[0196] 1. 웨스턴 블로팅을 사용한 α1-콜라겐 사슬의 크기와 정확한 조립에 대한 단백질 분석(Titeux 등, 2010). 주목할 것은 스킵핑된 엑손의 크기는 작고 야생형 단백질의 크기는 크기 때문에 단백질 크기의 명백한 차이가 나타나지 않을 수도 있다.

[0197] 2. 비환원 조건 하에서 웨스턴 블로팅을 사용한 콜라겐 Ⅶ 호모트리머의 열 안정성 분석. 야생형 콜라겐 Ⅶ는 3개의 α1- 콜라겐 사슬로 구성되며 41℃의 Tm을 지닌다(Mecklenbeck 등, 2002).

[0198] 3. 콜로이드성 금 또는 스크래치 Radius ™ 24-웰 세포 이동 분석을 이용한 세포 이동 분석. 야생형 콜라겐 Ⅶ을 발현하거나 엑손 80이 제거된 트렁크화된 단백질을 발현하는 섬유아세포 및/또는 각질세포의 운동성을 비교한다(Chen 등, 2002). 처리된 변이 인간 섬유아세포 배양 배지의 존재하에서 각질세포의 운동성을 비처리된 배양 배지에 대해서 비교한다.

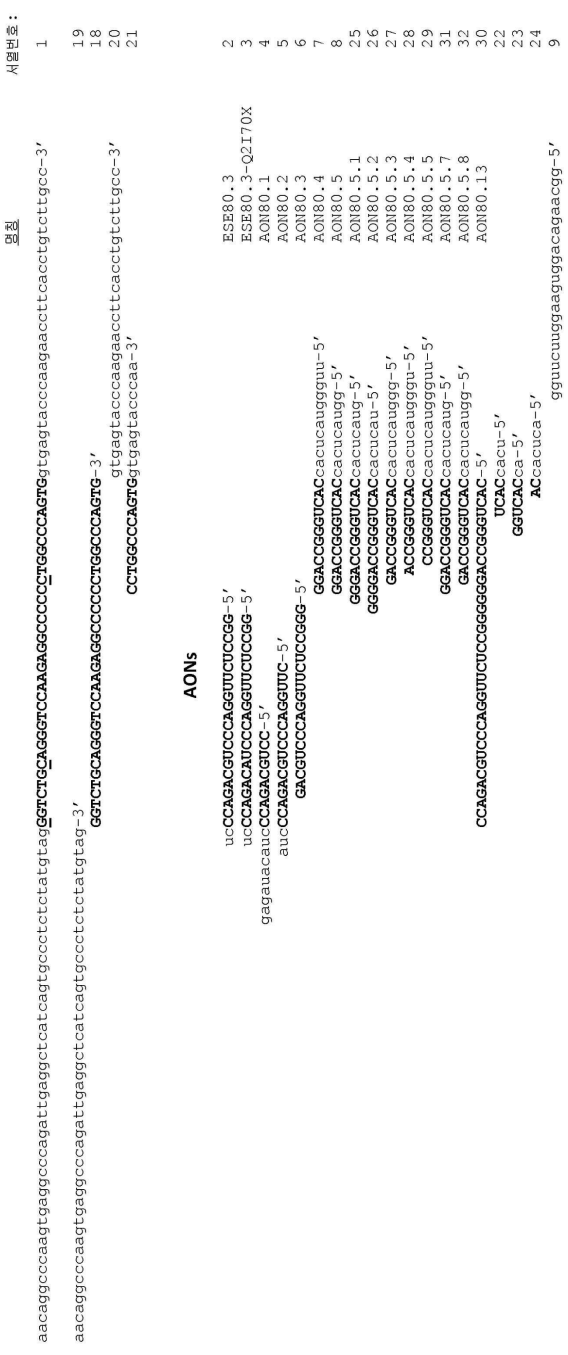
[0199] 4. 예를 들면 콜라겐 Ⅵ, 라미닌-332, 라미닌-1 또는 피브로넥틴과 같은 다양한 세포 외 매트릭스 성분에 대한 세포 접착(Chen 등, 2002).

[0200] 본 발명자들은 포유류(바람직하게는 인간) COL7A1 mRNA 내로의 엑손 80 내포를 예방하거나 또는 적어도 감소시키는 관점에서 가장 우수한 것으로 나타난 AON이 콜라겐 Ⅶ 기능성의 관점에서 상기한 선행 기술의 방법을 사용하여 이미 평가된 바와 같이 만족스러운 결과를 나타낼 것이라고 예측한다.

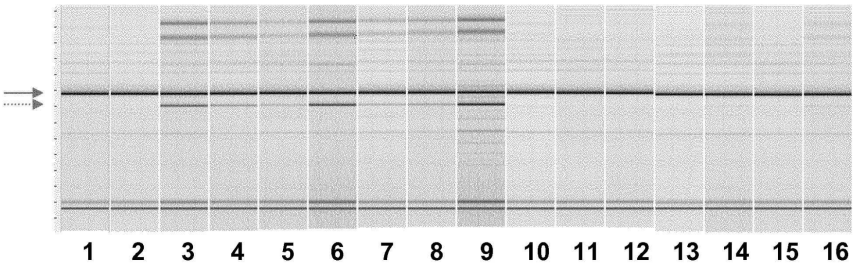
[0201] 본 발명은 단지 예로써 설명되었지만 본 발명의 범위 및 정신 내에서 변형이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다.

도면

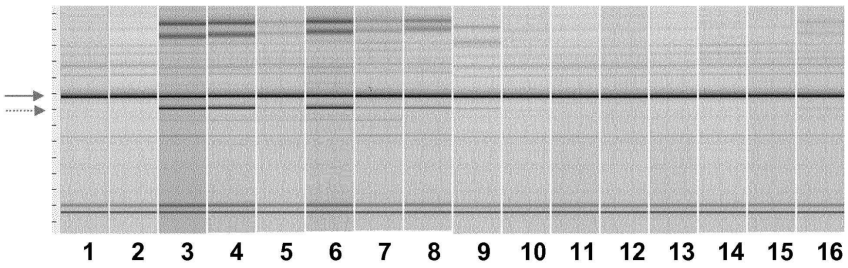
도면1


서열번호 :
명칭
AONs
ESE80.3
ESE80.3-Q2I70X
AON80.1
AON80.2
AON80.3
AON80.4
AON80.5
AON80.5.1
AON80.5.2
AON80.5.3
AON80.5.4
AON80.5.5
AON80.5.7
AON80.5.8
AON80.13

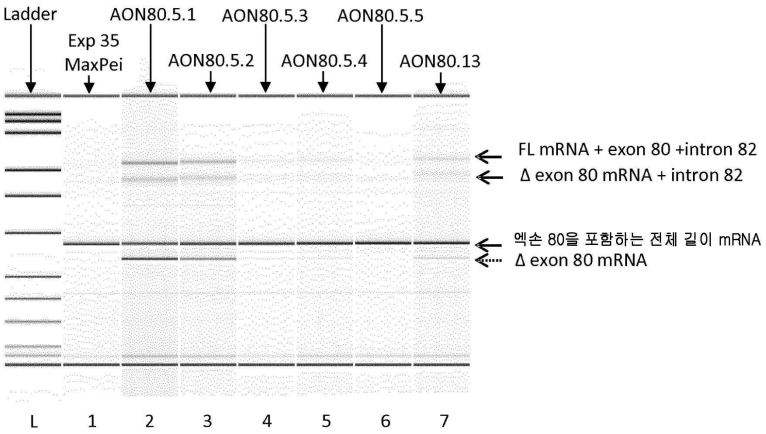
도면2


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

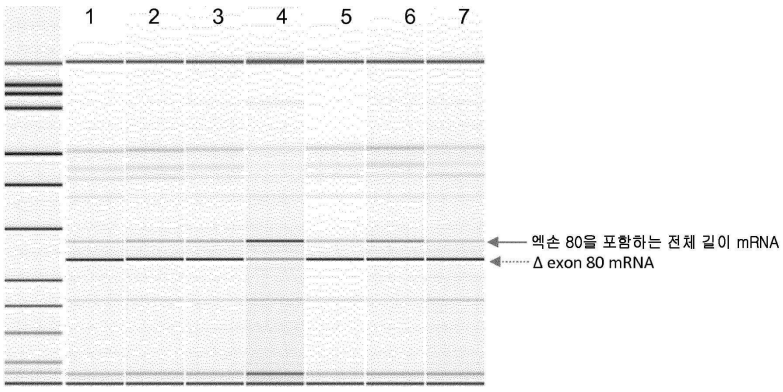
도면3


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

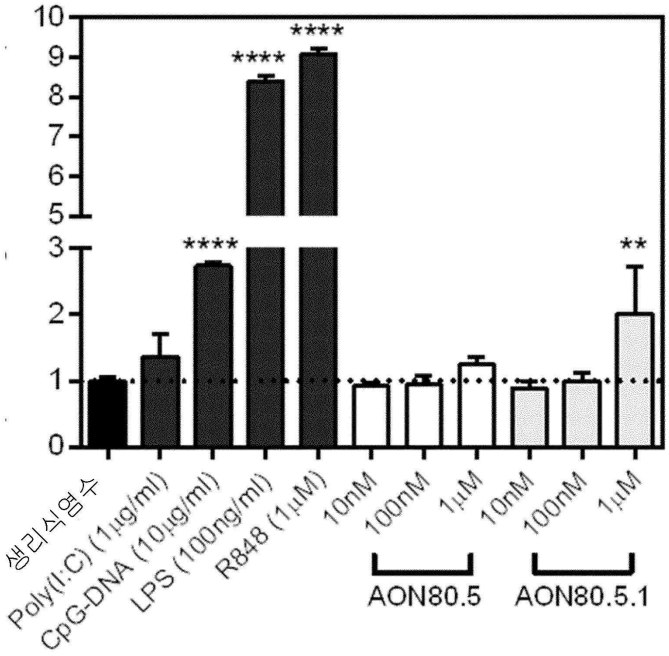
도면4


Ladder
Exp 35 MaxPei
AON80.5.1
AON80.5.2
AON80.5.3
AON80.5.4
AON80.5.5
AON80.13
FL mRNA + exon 80 +intron 82
Δ exon 80 mRNA + intron 82
엑손 80을 포함하는 전체 길이 mRNA
Δ exon 80 mRNA
L 1 2 3 4 5 6 7

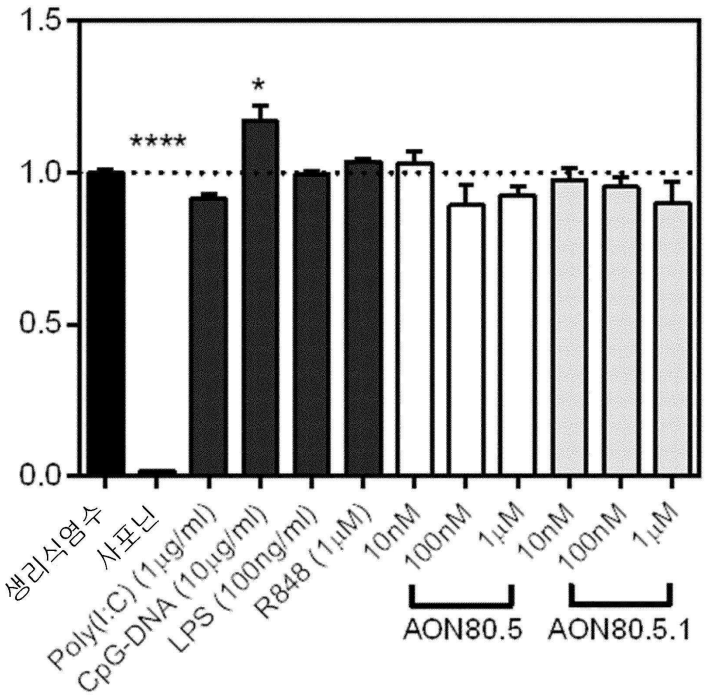
도면5


1 2 3 4 5 6 7
엑손 80을 포함하는 전체 길이 mRNA
Δ exon 80 mRNA

도면6



도면7



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ProQR Therapeutics II B.V.

<120> Antisense oligonucleotides to treat dystrophic epidermolysis bullosa

<130> P066271WO

<140> n/a

<141> 2016-05-20

<150> GB 1508733.1

<151> 2015-05-20

<150> GB 1516505.3

<151> 2015-09-17

<160> 33

<170> SeqWin2010, version 1.0

<210> 1

<211> 121

<212> DNA

<213> Human COL7A1 gene

<400> 1

aacaggccca agtgaggccc agattgaggc tcatcagtgc cctctctatg tagggtctgc 60

agggtccaag aggccccccct ggcccagtgg tgagtaccca agaaccttca cctgtcttgc 120

c 121

<210> 2

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 2

ggccucuugg acccugcaga cccu 24

<210> 3

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 3

ggccucuugg acccuacaga cccu 24

<210> 4

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 4

ccugcagacc cuacauagag 20

<210> 5

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 5

cuuggacccu gcagacccua 20

<210> 6

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 6

gggccucuug gacccugcag 20

<210> 7

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 7

uuggguacuc accacugggc cagg 24

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 8

gguacucacc acugggccag g 21

<210> 9

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 9

ggcaagacag gugaagguuc uugg 24

<210> 10

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 10

cagggcacag gaugggggca agaca 25

<210> 11

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 11

gucacugggg cagggcacag gaugg 25

<210> 12

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 12

cuugggccug uucccaaccu cuggg 25

<210> 13

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 13

aucugggccu cacuugggcc ug 22

<210> 14

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 14

agggcacuga ugagccucaa ucugg 25

<210> 15

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 15

cauagagagg gcacugauga gccuc 25

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 16

caaggtccca aaggagacag 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 17

agtcccacag ctccagtagg 20

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Human COL7A1 gene

<400> 18

ggtctgcagg gtccaagagg ccccccctggc ccagtg 36

<210> 19

<211> 53

<212> DNA

<213> Human COL7A1 gene

<400> 19

aacaggccca agtgaggccc agattgaggc tcatcagtgc cctctctatg tag 53

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Human COL7A1 gene

<400> 20

gtgagtaccc aagaaccttc acctgtcttg cc 32

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Human COL7A1 gene

<400> 21

cctggcccag tggtgagtac ccaa 24

<210> 22

<211> 8

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 22

ucaccacu 8

<210> 23

<211> 8

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 23

accacugg 8

<210> 24

<211> 8

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 24

acucacca 8

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 25

guacucacca cugggccagg g 21

<210> 26

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 26

uacucaccac ugggccaggg g 21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 27

ggguacucac cacugggcca g 21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 28

uggguacuca ccacugggcc a 21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 29

uuggguacuc accacugggc c 21

<210> 30

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 30

cacugggcca ggggggccuc uuggacccug cagacc 36

<210> 31

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 31

guacucacca cugggccagg 20

<210> 32

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligonucleotide

<400> 32

gguacucacc acugggccag 20

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 33

gaagggggag cctggaga 18