



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0088009
(43) 공개일자 2021년07월13일

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/66 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01) C07F 9/6533 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
A61K 31/66 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7020751(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년09월05일
심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2016-7008806
원출원일자(국제) 2014년09월05일
심사청구일자 2019년09월04일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년07월02일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2014/054384</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2015/035231
국제공개일자 2015년03월12일</p> <p>(30) 우선권주장
61/874,261 2013년09월05일 미국(US)
61/932,195 2014년01월27일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
사렙타 제러퓨틱스, 인코퍼레이티드
미국, 매사추세츠 02142, 캠프리지, 스위트 7,
215 퍼스트 스트리트
머독 유니버시티
호주 6150 웨스턴 오스트레일리아 머독 사우스 스트리트 90</p> <p>(72) 발명자
윌턴, 스티븐 도널드
호주 6150 웨스턴 오스트레일리아 머독 사우스 스트리트 90
플레처, 수
호주 6150 웨스턴 오스트레일리아 머독 사우스 스트리트 90
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 김영</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

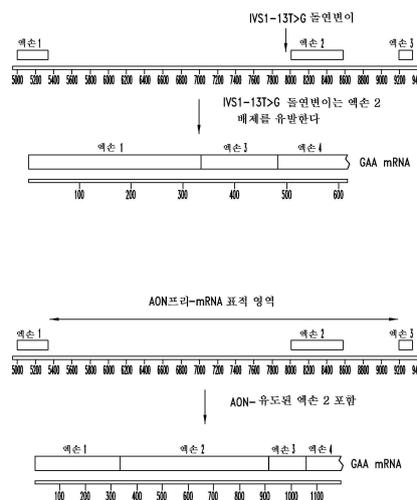
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 산성 알파-글루코시다제 내 안티센스-유도된 엑손2 포함

(57) 요약

본 개시는 안티센스 올리고머 및 관련 조성물 및 글리코젠 축적 질환 유형 II(GSD-II)(폼페병, 글리코젠증 II, 산성 말타제 결핍증(AMD), 산성 알파-글루코시다제 결핍증, 및 리소좀 알파-글루코시다제 결핍으로도 또한 알려짐)에 대한 치료법으로서 엑손 포함(exon inclusion)을 유도하는 방법에 관한 것이고, 보다 특수하게는 엑손 2의 포함을 유도함으로써 GAA 유전자에 의해 코딩된 효소 활성 산성 알파-글루코시다제(GAA)의 수치를 복원하는 것에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/7125 (2013.01)

C07F 9/6533 (2013.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/3145 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/3181 (2013.01)

C12N 2310/3231 (2013.01)

C12N 2310/3233 (2013.01)

C12N 2310/3513 (2013.01)

(72) 발명자

헨슨, 군나르 제임스

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 퍼스트 스트리트 215

베스트워, 리차드 키스

미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 퍼스트 스트리트 215

명세서

청구범위

청구항 1

포스포라미데이트 또는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO), 펩티스 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 포스포로티오에이트 올리고머, 트리시클로-DNA 올리고머, 트리시클로-포스포로티오에이트 올리고머, 2'O-Me-포스포로티오에이트 올리고머, 또는 상기의 임의의 조합으로부터 선택된 비-천연 화학적 백본; 및

인간 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA의 인트론 1(서열 1), 인트론 2(서열 2), 또는 엑손 2(서열 3) 내의 영역에 상보적인 표적화 서열

을 포함하는, 10 내지 40개 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체의 안티센스 올리고머 화합물의 용도.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] <관련 출원의 교차출원>
- [0002] 본 출원은 2013년 9월 5일자 제출된 U.S. 출원 제61/874,261호; 및 2014년 1월 27일자 제출된 U.S. 출원 제 61/932,195호에 대해 35 U.S.C. § 119(e) 하의 우선권을 주장하고; 이들 각각은 그의 전부가 참조문헌으로 포함된다.
- [0003] <서열 목록에 관한 선언>
- [0004] 본 출원에 관한 서열 목록은 종이본의 대신에 텍스트 포맷으로 제공되고, 명세서에 참조문헌으로 본원에 포함된다. 서열 목록을 포함하는 텍스트 파일명은 SATH_001_02WO_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 약 62 KB이고, 2014년 9월 5일에 생성됐으며, EFS-Web을 통해 전자 제출된다.

배경 기술

- [0005] <본 개시의 분야>
- [0006] 본 개시는 안티센스 올리고머 및 관련 조성물 및 글리코젠 축적 질환 유형 II(GSD-II)(폼페병(Pompe disease), 글리코젠증 II, 산성 말타제 결핍증(AMD), 산성 알파-글루코시다제 결핍증, 및 리소좀 알파-글루코시다제 결핍증으로도 또한 알려짐)의 치료법으로서 엑손 포함(exon inclusion)을 유도하기 위한 방법에 관한 것이고, 보다 특이적으로 엑손 2의 포함을 유도함으로써 GAA 유전자에 의해 코딩되는 효소 활성화된 산성 알파-글루코시다제(GAA)의 수치를 회복시키는 것에 관한 것이다.
- [0007] <관련 기술의 기재>
- [0008] 선택적 스플라이싱은 단일 유전자로부터 다수의 단백질을 생산함으로써 인간 게놈의 코딩 가능성을 증가시킨다. 부적절한 선택적 스플라이싱은 또한 점점 더 많은 수의 인간 질환과 관련된다.
- [0009] GSD-II는 산성 알파-글루코시다제(GAA)라 불리는 효소의 결핍으로 인해 야기되는 유전적 상염체성 열성 리소좀 축적 장애이다. 인체 내 GAA의 역할은 글리코젠을 분해하는 것이다. GAA 활성의 수치 감소 또는 부재는 심장, 근골격(호흡에 관한 것을 포함), 간, 및 신경계를 비롯해 발병한 조직 내 글리코젠의 축적으로 이어진다. 이러한 글리코젠의 축적은 GSD-II를 갖는 개인의 진행성 근력 저하 및 호흡 부전을 야기하는 것으로 여겨진다. GSD-II는 영아, 유아, 또는 성인에서 일어날 수 있고, 진단법은 증상의 발병 시점 및 중증도에 따라 달라진다. 임상적으로, GSD-II는 중증(소아)에서부터 보다 경증의 후기 발병 성인형에 이르기까지 광범위하고 연속적인 중증도의 스펙트럼을 나타낼 수 있다. 환자는 호흡 부전으로 인해 궁극적으로 사망한다. 질환의 중증도와 잔여 산성 알파-글루코시다제 활성 간에는, 후기 발병시 활성이 정상치의 10-20%인 반면, 질환의 조기 발병형에서는 2% 미만인 것과 같이 양호한 상관관계가 존재한다. GSD-II는 전세계적으로 대략 5,000 내지 10,000 명에서 발병하는 것으로 예측된다.
- [0010] 질환의 성인 발병형에 관한 가장 흔한 돌연변이는 IVS1-13T>G이다. 성인 발병 GSD-II 환자의 삼분의 이 이상에

서 발견된, 이 돌연변이는 이형접합성 개인에서 선택적 이점을 부여할 수 있거나 또는 매우 오래된 돌연변이이다. 이 돌연변이를 갖는 성인 발병 GSD-II 개인의 광범위한 인종적 변이는 공통 설립자(common founder)에 대해 논박한다.

- [0011] GAA 유전자는 약 20kb를 스패닝하는 20 엑손으로 이루어진다. 3.4 kb mRNA는 대략 105kD의 분자량을 갖는 단백질을 코딩한다. IVS1-13T>G 돌연변이는 개시 AUG 코돈을 함유하는 엑손 2(577 염기)의 결손을 유발한다.
- [0012] GSD-II의 치료는 뚜렷한 성공 없이 약물 치료 전략, 식단 조절, 및 골수 이식에 의존했다. 최근에, 효소 보충 요법(enzyme replacement therapy; ERT)은 GSD-II 환자에게 새로운 희망을 제공했다. 예컨대, 재조합 GAA 단백질 약물인 미오자임(Myozyme)[®]은 미국 및 유럽 양국에서 2006년에 GSD-II 질환을 갖는 환자에서의 사용 승인을 받았다. 미오자임[®]은 리소좀에 전달되기 위해 GAA 단백질의 표면의 만노스-6-포스페이트(M6P)에 의존한다.
- [0013] RNA 하향 조절에 주로 사용된 안티센스 기술은 최근 스플라이스 프로세스를 변경하도록 조정됐다. 많은 유전자의 일차 유전자 전사물(프리-mRNA)의 프로세싱은 공여자 스플라이스 사이트(donor splice site)가 수용자 스플라이스 사이트(acceptor splice site)에 결합되도록 하는 인트론의 제거 및 엑손의 정교한 스플라이싱에 관련된다. 스플라이싱은 포지티브 엑손 스플라이스 인핸서(엑손 내에 우세하게 위치됨) 및 네거티브 스플라이스 모티프(스플라이스 사일런서는 인트론 내에 우세하게 위치됨)가 균형을 이루어 공여자 및 수용자 스플라이스 사이트, 및 분기점(수용자 스플라이스 사이트의 상류)의 동조된 인식을 수반하는 정교한 프로세스이다.
- [0014] GAA 프리-mRNA의 스플라이싱을 변경할 수 있는 효과적인 제제는 GSD-II의 개선된 치료를 위해 치료적으로 유용할 것이다.

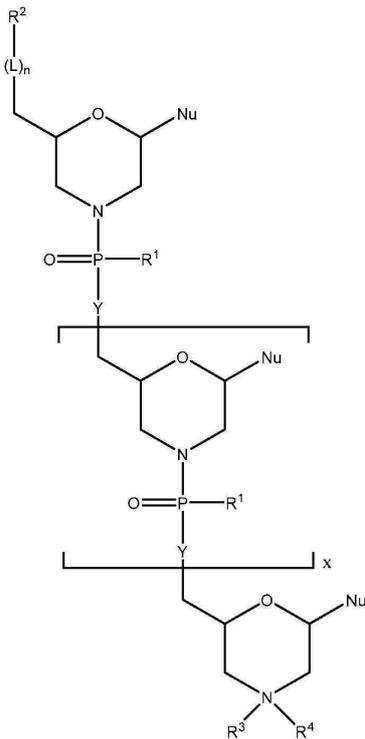
발명의 내용

- [0015] 본 개시의 실시양태는 안티센스 올리고머 및 관련 조성물 및 세포를 충분한 길이 및 GAA 유전자의 프리-mRNA 내의 영역에 특이적으로 혼성화하기 위한 상보성을 갖는 안티센스 올리고머와 접촉시키는 것을 포함하는, 세포 내 엑손 2-함유 GAA-코딩 mRNA의 수치를 증가시키는 방법에 관한 것으로, 여기서 상기 영역에 대한 안티센스 올리고머의 결합은 세포 내 엑손 2-함유 GAA-코딩 mRNA의 수치를 증가시킨다.
- [0016] 이에 따라, 일부 실시양태에서, 본 개시는 충분한 길이 및 인간 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA의 인트론 1(서열 1), 엑손 2(서열 2), 또는 인트론 2(서열 3) 내의 영역에 특이적으로 혼성화하는 상보성을 갖는 표적화 서열을 포함하는, 10 내지 40개 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체의 안티센스 올리고머에 관한 것이다.
- [0017] 특정 실시양태에서, 본 개시는,
- [0018] 포스포라미데이트 또는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO), 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 포스포로티오에이트 올리고머, 트리시클로-DNA 올리고머, 트리시클로-포스포로티오에이트 올리고머, 2'-O-Me-개질된 올리고머, 또는 상기의 임의의 조합으로부터 선택된 비-천연 화학적 백분; 및
- [0019] 인간 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA의 인트론 1(서열 1), 인트론 2(서열 2), 또는 엑손 2(서열 3) 내의 영역에 상보적인 표적화 서열
- [0020] 을 포함하는, 안티센스 올리고머 화합물에 관한 것이다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 표 1에 제시된 인트론 1, 엑손 2, 및/또는 인트론 2 GAA 서열(들) 내의 영역에 특이적으로 혼성화한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 인트론 스플라이스 스플라이서(splicer) 요소 또는 엑손 스플라이스 사일런서(silencer) 요소에 특이적으로 혼성화한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 표 2에 제시된 표적화 서열, 표 2의 표적화 서열의 10개 이상의 인접 뉴클레오티드, 또는 표 2의 표적화 서열과 80% 이상의 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 변이체를 포함한다. 특이적 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 표 2에 제시된 표적화 서열로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어진다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 포스포라미데이트 또는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO), PMO-X, PPMO, 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 포스포로티오에이트 올리고머, 트리시클로-DNA 올리고머, 트리시클로-포스포로티오에이트 올리고머, 2'-O-Me-개질된 올리고머, 또는 상기의 임의의 조합이다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 약, 적어도 약, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 이하 양이온성 뉴클레오시드간 연결을 함유한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 약, 또는 적어도 약 10%,

15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 양이온성 뉴클레오시드간 연결을 함유한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 약 4.5 내지 약 12의 pKa를 나타내는 약, 적어도 약, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 이하 뉴클레오시드간 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 약 4.5 내지 약 12의 pKa를 나타내는 약 또는 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 뉴클레오시드간 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 염기성 질소 및 알킬, 아릴, 또는 아르알킬기 둘 다를 함유하는 뉴클레오시드간 연결을 갖는다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 모르폴리노를 포함한다.

[0024] 특정 실시양태에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 하기 화학식 I의 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염이고,

[0025] <화학식 I>



[0026]

[0027] 여기서,

[0028] 각각의 Nu는 함께 취해져 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

[0029] x는 8 내지 38의 정수이고;

[0030] 각각의 Y는 O 또는 -NR^a로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R^a는 수소, -T¹-NR^cR^dR^e, 및 -[(C(O)CHR'^bNH)_m]R''로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서

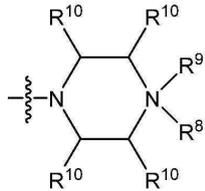
[0031] R'^b는 자연 발생 아미노산 또는 그의 일- 또는 이-탄소 상동체의 측쇄이고, R''은 수소 또는 아실로부터 선택되고, m은 1 내지 60의 정수이고, R^c은 수소, C₁-C₆ 알킬, 아르알킬, 및 -C(=NH)NH₂로 이루어진 군으로부터 선택되고, R^d은 수소, 아르알킬, 및 C₁-C₆ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 R^c 및 R^d이 각각 독립적으로 C₁-C₆ 알킬 또는 아르알킬인 경우 이들이 부착된 질소 원자와 함께 취해진 R^c 및 R^d은 함께 취해져 5-7원 고리를 형성하고, 여기서 고리는 C₁-C₆ 알킬, 페닐, 할로젠, 및 아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기로 임의적으로 치환되고, R^e은 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬, 및 아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0032] 각각의 L은 $-P(O)_2OH-$, $-P(O)_2R^1-$, 피페라지닐기, 카르보닐기, $H(O(CH_2)_sO)_w-$, $-(OCH_2CH_2O)_w$, 및 $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 w는 3-20으로부터 선택된 정수이고, S는 1 내지 8로부터 선택된 정수이고;

[0033] n은 0 내지 3의 정수이고;

[0034] 각각의 R¹은 $-N(CH_3)_2$, $-NR^5R^6$, $-OR^7$, 하기 화학식 II

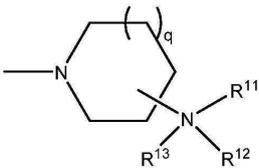
[0035] <화학식 II>



[0036]

[0037] 의 모이어티(여기서 R⁸은 수소, 메틸, $-C(=NH)NH_2$, $-Z-T^2-NHC(=NH)NH_2$, 및 $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 Z는 카르보닐 또는 직접 결합이고, R⁹은 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬, 및 아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 각각의 R¹⁰은 수소 또는 메틸로부터 독립적으로 선택됨), 및 하기 화학식 III

[0038] <화학식 III>



[0039]

[0040] 의 모이어티(여기서, q는 0 내지 2의 정수이고, R¹¹은 수소, C₁-C₆ 알킬, 아르알킬, 및 $-C(=NH)NH_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고, R¹²은 수소, 아르알킬, 및 C₁-C₆ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 취해진 R¹¹ 및 R¹²은 5-7원 고리를 형성하고(여기서 고리는 C₁-C₆ 알킬, 페닐, 할로젠, 및 아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기로 임의적으로 치환됨), R¹³은 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬, 및 아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택됨)

[0041] 로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되고;

[0042] R²은 수소, OH, 뉴클레오티드, $-(CH_2)_mC(O)NR^fR^g$ (여기서 R^f 및 R^g은 H, 아실, C₁-C₆ 알킬, 및 $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$ 로부터 독립적으로 선택됨)로 이루어진 군으로부터 선택되고, $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$, $H(O(CH_2)_sO)_w-$, $H(OCH_2CH_2O)_w-$, 트리틸, $-C(=O)OR^f$, 및 아실로부터 독립적으로 선택되거나(여기서 R^f은 하나 이상의 산소 또는 히드록실 모이어티 또는 그의 조합을 포함하는 C₁-C₃₀ 알킬임) 또는 R²은 부재하고;

[0043] R³은 수소, C₁-C₆ 알킬, 뉴클레오티드, $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$, $-C(=NH)NH_2$, 트리틸, $-C(=O)OR^g$, 아실, $-C(O)(CH_2)_mC(O)$, 및 T⁴- $(4-(4,6-(NR_2)-1,3,5-트리아진-2-일)피페라진-1-일)$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R^g은 하나 이상의 산소 또는 히드록실 모이어티 또는 그의 조합을 포함하는 C₁-C₃₀ 알킬이고, T⁴는 $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ 또는 $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$ 로부터 선택되고, R은 $-(CH_2)OC(O)NH(CH_2)_6NHC(NH)NH_2$ 이고;

[0044] R^4 은 전자쌍, 수소, C_1-C_6 알킬, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0045] 각각의 R^5 은 수소 또는 메틸로부터 독립적으로 선택되고;

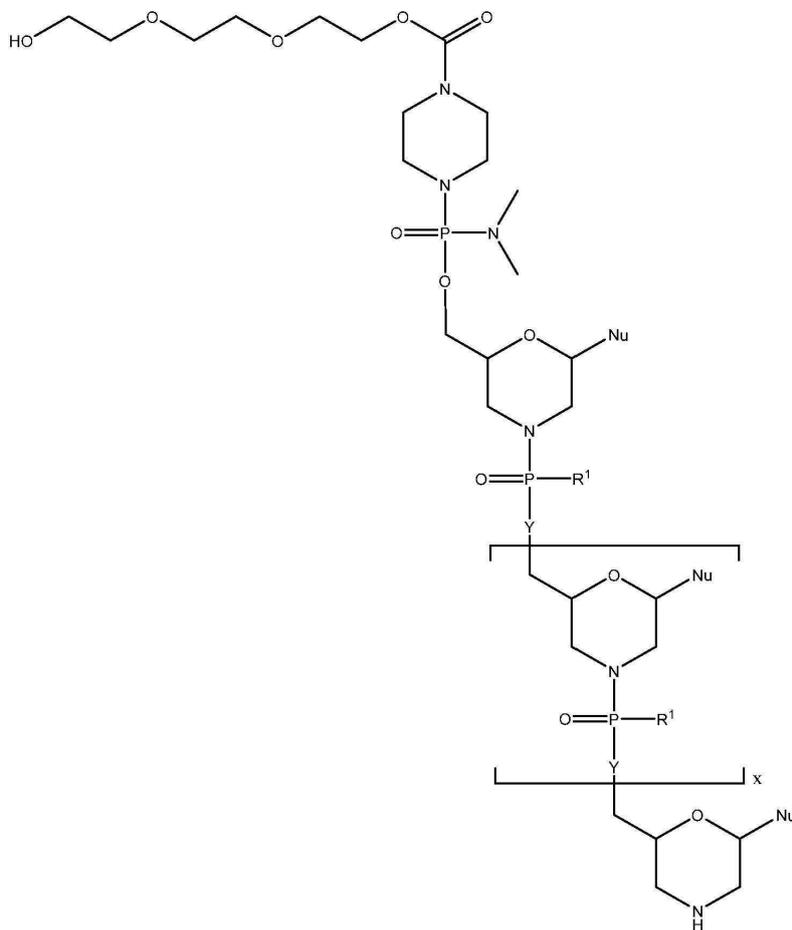
[0046] 각각의 R^6 및 각각의 R^7 은 수소 또는 $-T3-NR^cR^dR^e$ 로부터 독립적으로 선택되고;

[0047] 각각의 T^1 , T^2 , 및 T^3 는 독립적으로 알킬, 알콕시, 또는 알킬아미노기, 또는 그의 조합을 포함하는 길이 18개 이하 원자의 임의적 링커이고,

[0048] 여기서 표적화 서열은 인간 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA 인트론 1(서열 1), 인트론 2(서열 2), 또는 엑손 2(서열 3) 내의 영역에 상보적이다.

[0049] 특정 실시양태에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 하기 화학식 IV의 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염이고,

[0050] <화학식 IV>



[0051]

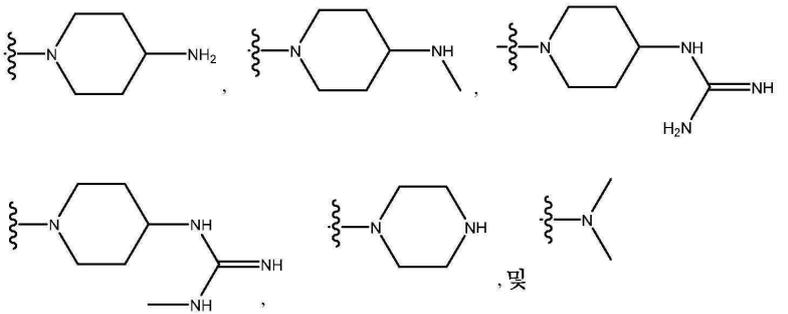
[0052] 여기서,

[0053] 각각의 Nu는 함께 취해져 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

[0054] x는 15 내지 25의 정수이고;

[0055] 각각의 Y는 O이고;

[0056] 각각의 R¹은



[0057]

[0058] 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고,

[0059] 여기서 적어도 하나의 R¹은 -N(CH₃)₂이고,

[0060] 여기서 표적화 서열은 서열 4-120으로부터 선택되고, 여기서 X는 우라실(U) 또는 티민(T)으로부터 선택된다.

[0061] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 세포 흡수를 강화하는 펩티드 모이어티를 더 포함한다.

[0062] 표 2에 제시된 것과 같이, 충분한 길이 및 인간 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA의 인트론 1 (서열 1), 엑손 2(서열 2), 또는 인트론 2(서열 3) 내의 영역에 특이적으로 혼성화하는 상보성을 갖는 표적화 서열을 포함하는 안티센스 올리고머도 또한 본 개시의 범위 내에 포함된다. 일부 실시양태에서, 표적화 서열은 서열 번호 4 내지 120으로부터 선택된 표적화 서열의 10 이상의 인접 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 X는 우라실(U) 또는 티민(T)으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 표적화 서열은 서열 번호 4 내지 120으로부터 선택된 표적화 서열과 80% 서열 동일성을 포함하고, 여기서 X는 우라실(U) 또는 티민(T)으로부터 선택된다.

[0063] 구체적 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 포스포라미데이트 또는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (PMO), PMO-X, PPMO, 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 포스포로티오에이트 올리고머, 트리시클로-DNA 올리고머, 트리시클로-포스포로티오에이트 올리고머, 2'-O-Me-개질된 올리고머, 또는 상기의 임의의 조합이다.

[0064] 생리학적으로 허용되는 담체 및 본원에 기재된 안티센스 올리고머를 포함하는 제약 조성물도 또한 포함된다.

[0065] 특정 실시양태는 충분한 길이 및 GAA 유전자의 프리-mRNA 내의 영역에 특이적으로 혼성화하는 상보성을 갖는 안티센스 올리고머와 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 세포 내 엑손 2-함유 산성 알파-글루코시다제(GAA) mRNA의 수치를 증가시키는 방법을 포함하고, 여기서 상기 영역에 대한 안티센스 올리고머의 결합은 세포 내 엑손 2-함유 GAA mRNA의 수치를 증가시킨다.

[0066] 일부 실시양태에서, 세포 내 엑손 2-함유 GAA mRNA의 수치는 대조군에 비해 약 10% 이상 증가된다. 특정 실시양태에서, 세포 내 기능성 GAA 단백질의 수치는 대조군에 비해 약 10% 이상 증가된다. 특정 실시양태에서, 세포는 (안티센스 치료의 부재시) 엑손 2-함유 GAA mRNA의 발현 감소를 야기하는 그의 게놈의 하나 이상의 대립유전자에서 IVS1-13T>G 돌연변이를 갖는다.

[0067] 일부 실시양태에서, 세포는 이를 필요로 하는 대상체에 존재하고, 방법은 대상체에 안티센스 올리고머를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 글리코겐 축적 질환 유형 II(GSD-II)을 갖거나, 또는 가질 위험에 처해 있다. 본 개시의 일부 실시양태는 글리코겐 축적 질환 유형 II(GSD-II; 폼페병)의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본 개시의 안티센스 올리고머의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 글리코겐 축적 질환 유형 II(GSD-II; 폼페병)를 치료하는 방법에 관한 것이다. 반면, 특정 실시양태는 글리코겐 축적 질환 유형 II(GSD-II; 폼페병)의 치료를 위한 의학의 조제에 사용하기 위하나 안티센스 올리고머에 관한 것이다.

[0068] 특정 실시양태에서, 대상체는 소아 GSD-II를 갖거나 또는 가질 위험에 처해 있다. 구체적 실시양태에서, 대상체는 후기 발병 GSD-II를 갖거나 또는 가질 위험에 처해 있다. 특정 실시양태에서, 방법은 대상체의 하나 이상의 조직에서 대조군에 비해 약 10% 이상 글리코겐 수치를 감소시키는 것을 포함한다.

[0069] 이에 더하여, 본 개시는 서열 121, 122, 또는 123으로 이루어진 군으로부터 선택된 염기 서열을 포함하는 하나 이상의 중합효소 연쇄 반응 프라이머로 GAA mRNA를 증폭하는 것을 포함하는, 인간 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자 mRNA 내 엑손 2 포함을 검출하는 방법을 또한 포함한다.

[0070] 본 개시의 이들 및 다른 측면은 하기의 상세한 설명 및 첨부 도면을 참조하면 명백해질 것이다. 본원에 개시된 모든 참조문헌은 각각 개별적으로 포함된 것처럼 그의 전부가 본원에 참조문헌으로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 입체 차단 안티센스 올리고머가 엑손 삭제된 GAA mRNA에 비해 엑손 2-함유 GAA mRNA의 수치를 강화할 수 있는 하나의 메커니즘을 나타낸다.

도 2는 엑손1(정방향) 및 엑손3(역방향)에 대해 지시된 프라이머를 사용한, 엑손 2를 함유한 야생형 GAA 유전자로부터의 ~1177 염기 PCR 증폭 생성물을 보여준다(실시에 2 참조).

도 3a-3c는 실시예2의 표 E1의 2'-O-메틸 개질된 안티센스 올리고머에 대한 결과를 보여준다. 도 3a는 ~600 염기 앰플리콘의 증폭의 감소(전장 ~1177 염기 앰플리콘에 비해)로써 증거되는 것과 같이, IVS1-13G>T 돌연변이를 포함하는 인간 세포에서 올리고머 9(GAA-IVS1 (-74-55)) 및 12(GAA-IVS1 (-158-140))가 엑손 2 포함을 유도했음을 보여준다. 도 3b는 올리고머 14(GAA-IVS2 (-53-72))가 엑손 2 포함을 유도했음을 보여주고, 도 3c는 올리고머 20(GAA-IVS2 (-173-192)) 및 22(GAA-IVS2 (-338-364))가 마찬가지로 일정한 엑손-2 포함을 유도했음을 보여준다.

도 4a-4c는 표 4a의 PMO 안티센스 올리고머에 대한 RT-PCR 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] I. 정의

[0073] 달리 정의되지 않는 이상, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시가 속한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질은 본 개시의 주제의 실시 또는 시험에 사용될 수 있으며, 바람직한 방법 및 물질이 기재된다. 본 개시의 목적상 다음 용어가 하기에 정의된다.

[0074] 관사 "한" 및 "하나의"는 일 또는 일 초과(즉, 적어도 일)의 관사의 문법적 대상을 의미하도록 본원에 사용된다. 예로써, "하나의 요소"는 일 요소 또는 일 초과 요소의 요소를 의미한다.

[0075] "약"은 기준 수량, 수치, 값, 숫자, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 비해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 만큼 다른 수량, 수치, 값, 숫자, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0076] "코딩 서열"은 유전자의 폴리펩티드 생성물에 대한 코드에 기여하는 임의의 핵산 서열을 의미한다. 반면, 용어 "비-코딩 서열"은 유전자의 폴리펩티드 생성물에 대한 코드에 직접적으로 기여하지 않는 임의의 핵산 서열을 의미한다.

[0077] 본 개시를 통해, 문맥상 달리 요구되지 않는 이상, 단어 "포함하다", "포함한", 및 "포함하는"은 언급된 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 균의 포함을 의미하지만, 임의의 다른 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 균의 배제를 의미하지는 않는 것으로 이해될 것이다.

[0078] "이루어진"은 어구 "~로 이루어진"이 지시하는 모든 것을 포함하면서 이에 제한된다는 것을 의미한다. 따라서, 어구 "이루어진"은 나열된 요소가 필요하거나 의무적이고, 다른 어떠한 요소도 존재할 수 없음을 지칭한다. "본질적으로 이루어진"은 어구 이후에 나열된 임의의 요소를 포함하고, 나열된 요소에 대한 개시에 명시된 활성 또는 작용에 간섭하거나 기여하지 않는 다른 요소로 제한된다는 것을 의미한다. 따라서, 어구 "본질적으로 이루어진"은 나열된 요소가 필요하거나 필수적이지만, 다른 요소도 임의적이고 이들이 나열된 요소의 활성 또는 작용에 물질적으로 영향을 미치든지 미치지 않든지에 따라 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있음을 나타낸다.

[0079] 본원에 사용된, 용어 "세포에 접촉시키는", "유도하는" 또는 "전달하는"은 관련 기술분야에서 상용되는 방법, 예컨대, 트랜스펙션(예컨대, 리포솜, 칼슘-포스페이트, 폴리에틸렌이민), 전기천공(예컨대, 뉴클레오펙션), 미세주입법에 의해 세포로 본 개시의 올리고머를 전달하는 것을 포함한다.

[0080] 본원에 사용된, 용어 "알킬"은 하나 이상의 관능기로 임의적으로 치환된 선형(즉, 비분지형 또는 비고리형), 분지형, 시클릭, 또는 폴리시클릭 비-아로마형 탄화수소를 포함하는 것으로 의도된다. 달리 명시되지 않는 이

상, "알킬"기는 1 내지 8, 및 바람직하게는 1 내지 6개 탄소 원자를 함유한다. C₁-C₆ 알킬은 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, 및 C₆ 알킬기를 포함하는 것으로 의도된다. 저급 알킬은 1 내지 6개 탄소 원자를 함유하는 알킬기를 의미한다. 알킬의 예시는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, 시클로프로필, 부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, 시클로부틸, 펜틸, 이소펜틸, tert-펜틸, 시클로펜틸, 헥실, 이소헥실, 시클로헥실 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 알킬은 치환되거나 또는 치환되지 않을 수 있다. 예시적인 치환된 알킬기는 플루오로메틸, 디플루오로메틸, 트리플루오로메틸, 2-플루오로에틸, 3-플루오로프로필, 히드록시메틸, 2-히드록시에틸, 3-히드록시프로필, 벤질, 치환된 벤질, 펜에틸, 치환된 펜에틸 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0081] 본원에 사용된, 용어 "알콕시"는 지시된 수의 탄소를 갖는 상기에서 정의된 알킬기가 산소 가교를 통해 부착된 알킬의 부분집합을 의미한다. 예컨대, "알콕시"는 알킬기가 선형, 분지형, 고리형 구조의 1 내지 8개 탄소 원자를 함유하는 -O-알킬기를 의미한다. "알콕시"의 예시는 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, i-프로폭시, t-부톡시, n-부톡시, s-펜톡시 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0082] 본원에 사용된, 단독으로 또는 "아르알킬", "아랄콕시", 또는 "아릴콕시-알킬"에서와 같이 보다 큰 모이어티의 일부로서 사용되는 용어 "아릴"은 6 내지 14원 원자를 갖는 방향성 고리기 예컨대 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 1-안트라실 및 2-안트라실을 의미한다. "아릴" 고리는 하나 이상의 치환기를 함유할 수 있다. 용어 "아릴"은 용어 "아릴 고리"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. "아릴"은 방향성 고리가 하나 이상의 고리에 융합된, 융합된 폴리시클릭 방향성 고리 시스템을 또한 포함한다. 유용한 아릴 고리기의 비-제한적 예시는 페닐, 히드록시페닐, 할로페닐, 알콕시페닐, 디알콕시페닐, 트리알콕시페닐, 알킬렌디옥시페닐, 나프틸, 페난트릴, 안트릴, 페난트로 등 뿐만 아니라 1-나프틸, 2-나프틸, 1-안트라실 및 2-안트라실을 포함한다. 본원에 사용된, 라디칼 또는 부착점이 방향성 고리에 있고, 방향성 고리가 하나 이상의 비-방향성 고리, 예컨대 인다닐, 페난트리디닐, 또는 테트라히드로나프틸에 융합된 기도 용어 "아릴"의 범위 내에 또한 포함된다.

[0083] 용어 "아실"은 C(O)R 기(R은 상기 정의된 것처럼 H, 알킬 또는 아릴을 지칭함)를 의미한다. 아실기의 예시는 포르밀, 아세틸, 벤조일, 페닐아세틸 및 유사기를 포함한다.

[0084] 본원에 사용된 용어 "상동체"는 동일한 화학기의 연속적인 부가에 의해 규칙적으로 달라지는 화합물을 의미한다. 예컨대, 화합물의 상동체는 하나 이상의 -CH₂- 기, 아미노산 잔기, 뉴클레오티드, 또는 뉴클레오티드 유사체의 부가에 의해 달라질 수 있다.

[0085] 용어 "세포 관통 펩티드"(CPP) 또는 "세포 흡수를 강화하는 펩티드 모이어티"는 상호교환적으로 사용되고, 양이온성 세포 관통 펩티드를 의미하며, "수송 펩티드", "담체 펩티드", 또는 "펩티드 도입 도메인"으로도 또한 불린다. 본원에 나타난 것과 같은 펩티드는 주어진 세포 배양군의 세포 중 약 또는 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 내에서 세포 관통을 유도할 수 있는 능력을 갖고, 전신 투여시 생체내에서 다중 조직내에서 거대분자 전좌를 허용한다. 일부 실시양태에서, CPP는 화학식 $-(C(O)CHR'NH)_mR''$ 을 갖고, 여기서 R'은 자연 발생 아미노산 또는 그의 일- 또는 이-탄소 상동체의 측쇄이고, R''은 수소 또는 아실로부터 선택되고, m은 50 이하의 정수이다. 부가적 CPP는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예컨대, 그의 전부가 참조문헌으로 포함된 U.S. 출원 제2010/0016215호에 개시되어 있다. 다른 실시양태에서, m은 1 내지 50으로부터 선택된 정수이고, 여기서, m이 1일 때, 모이어티는 단일 아미노산 또는 그의 유도체이다.

[0086] 본원에 사용된, "아미노산"은 일차 아미노기, 카르복실산기, 측쇄, 및 수소 원자가 부착된 탄소 원자로 이루어진 화합물을 의미한다. 예컨대, 용어 "아미노산"은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 아스파라긴, 글루타민, 리신 및 아르기닌을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 부가적으로, 본원에 사용된 "아미노산"은 또한, 아미노산의 유도체 예컨대 에스테르, 및 아미드, 및 염, 뿐만 아니라 대사후 활성형으로 제약적 특성을 갖는 유도체를 포함하는 다른 유도체를 포함한다. 이에 따라, 용어 "아미노산"은 자연 발생 및 비-자연 발생 아미노산을 포함하는 것이라 이해된다.

[0087] "전자쌍"은 다른 원자와 결합되거나 공유되지 않은 전자의 원자가 쌍을 의미한다.

[0088] "상동성"은 동일하거나 보존적 치환을 구성하는 아미노산의 퍼센트 수를 의미한다. 상동성은 서열 비교 프로그램, 예컨대 GAP(문헌[Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395])을 사용하여 결정될 수 있다. 이 방식으로 본원에 인용된 것과 유사하거나 또는 실질적으로 상이한 길이의 서열이 예컨대, GAP에서 사용된 비교 알고리즘에 의해 결정된 간격을 정렬에 삽입함으로써 비교될 수 있다.

[0089] "단리된"은 그의 자연 상태에서는 정상적으로 이를 수반하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 부재한 물질을

의미한다. 예컨대, 본원에 사용된 "단리된 폴리뉴클레오티드", "단리된 올리고뉴클레오티드", 또는 "단리된 올리고머"는 자연 발생 상태에서 이와 인접한 서열로부터 정제되거나 제거된 폴리뉴클레오티드, 예컨대, 게놈 내 단편에 인접한 서열로부터 제거된 DNA 단편을 의미할 수 있다. 세포와 관련된 용어 "단리하는"은 공급원 대상체(예컨대, 폴리뉴클레오티드 반복 질환을 갖는 대상체)로부터의 세포(예컨대, 섬유모세포, 림프아구)의 정제를 의미한다. mRNA 또는 단백질의 맥락에서, "단리하는"은 공급원, 예컨대 세포로부터 mRNA 또는 단백질의 회수를 의미한다.

[0090] 용어 "조절하다"는 임의적으로 한정된 및/또는 통계적으로 유의한 양 만큼 하나 이상의 정량 가능한 파라미터를 "증가시키거나" 또는 "감소시키는" 것을 포함한다. "증가시키다" 또는 "증가시키는", "강화시키다" 또는 "강화하는" 또는 "자극하다" 또는 "자극하는"은 안티센스가 없는 화합물 또는 대조군 화합물에 의해 야기된 반응에 비해, 세포 또는 대상체에서 훨씬 더 큰 생리학적 반응(즉, 하류 효과)을 생성하거나 또는 야기하는 하나 이상의 안티센스 화합물 또는 조성물의 능력을 일반적으로 의미한다. 관련된 생리학적 또는 세포 반응(생체내 또는 생체외)은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이고, GAA-코딩 프리-mRNA 내 엑손 2의 포함시 증가하거나, 또는 이를 필요로 하는 세포, 조직, 또는 대상체에서 기능성 GAA 효소의 발현시 증가할 수 있다. "증가된" 또는 "강화된" 양은 전형적으로 "통계학적으로 유의한" 양이고, 안티센스가 없는 화합물(제제의 부재) 또는 대조군 화합물에 의해 생산된 양에 비해, 그 사이 및 1 초과(예컨대, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8)의 모든 정수 및 소수 점을 포함하여 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 또는 그 이상의 배수(예컨대, 500, 1000배)의 증가를 포함할 수 있다. 용어 "줄이다" 또는 "억제하다"는 하나 이상의 안티센스 화합물 또는 조성물이 관련된 생리학적 또는 세포 반응, 예컨대 진단 분야에서 상용적인 기술에 따라 측정된 본원에 기재된 질환 또는 상태의 증상을 "감소시키는" 능력에 일반적으로 관련될 수 있다. 관련된 생리학적 또는 세포 반응(상체내 또는 생체외)은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 글리코젠 축적 질환, 예컨대 폼페병의 증상 또는 병리학의 감소, 예컨대 하나 이상의 조직에서 글리코젠의 축적의 감소를 포함할 수 있다. 반응에서 "감소시키다"는 안티센스 없는 화합물 또는 대조군 조성물에 의해 생성된 반응에 비해 "통계적으로 유의한" 것일 수 있고, 그 사이의 모든 정수를 포함하여 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%를 포함할 수 있다.

[0091] 본원에 사용된, "안티센스 올리고뉴클레오티드", "안티센스 올리고머" 또는 "올리고뉴클레오티드"는 왓슨-크릭 염기 쌍형성에 의해 RNA에서 핵염기가 표적 서열에 혼성화하여 표적 서열 내에서 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스(heteroduplex)를 형성하게 하는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체의 선형 서열을 의미한다. 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드", "안티센스 올리고머", "올리고머" 및 "화합물"은 올리고머를 의미하는 것으로 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 시클릭 서브유닛은 리보스 또는 다른 펜토스 당 또는, 특정 실시양태에서, 모르폴리노기(하기 모르폴리노 올리고머의 기재 참조)에 기반할 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 다른 안티센스 제제 중에서 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 트리시클로-DNA 올리고머, 트리시클로-포스포포티오에이트 올리고머, 및 2'-O-메틸 올리고머도 또한 고려된다.

[0092] (i) 개질된 백본 구조, 예컨대, 자연-발생 올리고- 및 폴리뉴클레오티드에서 발견되는 표준 포스포디에스테르 연결 외의 백본, 및/또는 (ii) 개질된 당 모이어티, 예컨대, 리보스 또는 디옥시리보스 모이어티 외의 모르폴리노 모이어티를 갖는 올리고머를 포함하는 비-자연 발생 올리고머 "올리고뉴클레오티드 유사체"가 포함된다. 올리고머 유사체는 표준 폴리뉴클레오티드 염기에 왓슨-크릭 염기 쌍형성함으로써 수소 결합할 수 있는 염기를 지지하고, 여기서 유사체 백본은 올리고머 유사체 분자 및 표준 폴리뉴클레오티드(예컨대, 단일 가닥 RNA 또는 단일 가닥 DNA) 내 염기 간에 서열-특이적 방식의 수소 결합을 허용하는 방식으로 염기를 현출한다. 바람직한 유사체는 실질적으로 비하전된, 염 함유 백본을 갖는다.

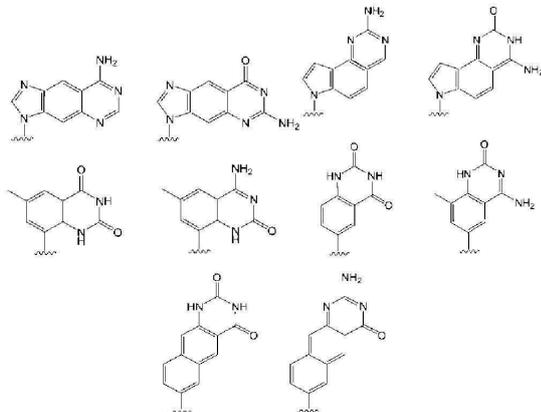
[0093] "뉴클레아제-저항성" 올리고머는 체내 통상적인 세포의 및 세포내 뉴클레아제에 의해(예컨대, 엑소뉴클레아제 예컨대 3'-엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제, RNase H에 의해) 비-혼성화되거나 또는 혼성화된 형태에서 그의 백본이 실질적으로 뉴클레아제 절단에 저항성을 갖는 것을 의미하고, 즉, 올리고머는 올리고머가 노출된 체내 정상 뉴클레아제 상태 하에서 뉴클레아제 절단이 거의 없거나 또는 거의 보여주지 않는다. "뉴클레아제-저항성 헤테로듀플렉스"는 헤테로듀플렉스가 이중 가닥 RNA/RNA 또는 RNA/DNA 복합체를 절단할 수 있는 세포내 및 세포외 뉴클레아제에 의한 생체내 분해에 실질적으로 저항성을 갖도록 안티센스 올리고머가 그의 상보적 표적에 결합함으로써 형성된 헤테로듀플렉스를 의미한다. "헤테로듀플렉스"는 안티센스 올리고머와 표적 RNA의 상보적 부위 간의 듀플렉스(duplex)를 의미한다.

[0094] 본원에 사용된, "핵염기"(Nu), "염기쌍 모이어티" 또는 "염기"는 천연 DNA 또는 RNA(우라실, 티민, 아데닌, 시

토신, 및 구아닌)에서 발견되는 퓨린 또는 피리미딘, 뿐만 아니라 올리고머에 대한 결합 친화력과 같은 개선된 특성을 제공하는 자연 발생 퓨린 및 피리미딘 유사체를 의미하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. 예시적 유사체는 히포산틴(뉴클레오시드 이노신의 염기 성분); 2, 6-디아미노퓨린; 5-메틸 시토신; C5-프로피닐-개질된 피리미딘; 9-(아미노에톡시)페녹사진(G-클램프) 등을 포함한다.

[0095] 염기 쌍형성 모이어티의 추가적 예시는 아실 보호기에 의해 보호되는 그의 각각의 아미노기를 갖는 우라실, 티민, 아데닌, 시토신, 구아닌 및 히포산틴, 2-플루오로우라실, 2-플루오로시토신, 5-브로모우라실, 5-아이오도우라실, 2,6-디아미노퓨린, 아자시토신, 피리미딘 유사체 예컨대 수도이소시토신 및 수도우라실 및 다른 개질된 핵염기 예컨대 8-치환된 퓨린, 크산틴, 또는 히포크산틴(마지막 두 개는 천연 분해 생성물)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 문헌[Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048, Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196] 및 문헌[Revankar and Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313] 에 개시된 개질된 핵염기도 또한 고려된다.

[0096] 염기 쌍형성 모이어티의 추가적 예시는 하나 이상의 벤젠 고리가 부가된 확장된 크기의 핵염기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 문헌[Glen Research catalog (www.glenresearch.com); Krueger AT et al, Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150; Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A., et al., Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733; Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627]에 기재된 핵 염기 교체가 본원에 기재된 올리고머의 합성을 위해 유용한 것으로 고려된다. 확장된 크기의 핵염기의 예시는 하기에 나타난다:



[0097]

[0098] 리보스, 당 유사체 또는 모르폴리노에 공유결합으로 연결된 핵염기는 뉴클레오시드를 포함한다. "뉴클레오티드"는 뉴클레오시드와 함께 하나의 포스페이트기로 구성된다. 포스페이트기는 인접한 뉴클레오티드와 서로 공유결합으로 연결되어 올리고머를 형성한다.

[0099] 만약 올리고머가 40°C 또는 45°C보다 실질적으로 더 높은, 바람직하게는 50°C 이상, 및 전형적으로 60°C-80°C 또는 그 이상의 Tm의 생리학적 조건 하에서 표적과 혼성화한다면, 올리고머는 표적 폴리뉴클레오티드에 "특이적으로 혼성화한다". 이러한 혼성화는 바람직하게는 엄격한(stringent) 혼성 조건에 해당한다. 주어진 이온 세기 및 pH에서, Tm은 표적 서열의 50%가 상보적 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 온도이다. 이러한 혼성화는 표적 서열에 대한 안티센스 올리고머의 "근접한" 또는 "실질적인" 상보성으로 뿐만 아니라 정확한 상보성으로 일어날 수 있다.

[0100] 본원에 사용된, "충분한 길이"는 GAA 인트론 1, 엑손 2, 또는 인트론 2의 영역, 또는 상기 중 임의의 것을 스패닝하는 영역에서 8 이상, 보다 전형적으로 8-40의 인접한 핵염기에 대해 상보적인 안티센스 올리고머를 의미한다. 충분한 길이의 안티센스 올리고머는 돌연변이 RNA 내 GAA 프리-mRNA 반복부의 영역에 특이적으로 혼성화할 수 있는 최소 수 이상의 뉴클레오티드를 갖는다. 바람직하게는 충분한 길이의 올리고머는 길이 8 내지 30개 뉴클레오티드이다. 보다 바람직하게는, 충분한 길이의 올리고머는 길이 9 내지 27개 뉴클레오티드이다.

[0101] 본원에 사용된, 예컨대, "서열 50% 동일한"을 포함하는 용어 "서열 동일성"은 서열이 비교 윈도우에서 뉴클레오티드-대-뉴클레오티드 기준 또는 아미노산-대-아미노산 기준에서 동일한 정도를 의미한다. 따라서, "서열 동일성의 퍼센트"는, 비교의 윈도우에서 두 개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기(예컨대, A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기(예컨대, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 두 서열 모두에서 나타나는 위치의 수를 결정하여 일치된

위치의 수를 얻고, 비교 윈도우 내 위치의 총 수(즉, 윈도우 크기)로 일치된 위치의 수를 나누고, 결과를 100으로 곱해 서열 동일성의 퍼센트를 얻음으로써 계산될 수 있다. 비교 윈도우를 정렬하기 위한 서열의 최적 정렬은 알고리즘의 컴퓨터 실행(위스콘신 지네틱스 소프트웨어 패키지 릴리즈(Wisconsin Genetics Software Package Release) 7.0, 지네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group), 미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575(575 Science Drive Madison, Wis., USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA)에 의해, 또는 임의의 선택된 다양한 방법에 의해 생성된 점검 및 최상의 정렬(즉, 비교 윈도우에서 최고의 퍼센트 상동성을 나타내는)에 의해 수행될 수 있다. 참조는 예컨대, 문헌[Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997.]에 개시된 것과 같은 프로그램의 BLAST 패밀리로도 또한 만들어질 수 있다.

[0102] "대상체" 또는 "이를 필요로 하는 대상체"는 인간 대상체와 같은 포유류 대상체를 포함한다. 예시적 포유류 대상체는 GSD-II(또는 폼페병)을 갖거나 또는 가질 위험에 처해 있다. 본원에 사용된, 용어 "GSD-II"는 글리코젠 축적 질환 유형 II(GSD-II 또는 폼페병), 발병한 개체에서 GAA 단백질의 낮은 발현을 보통 특징으로 하는 인간 상염체성 열성 질환을 의미한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 하나 이상의 조직, 예컨대, 심장, 골격근, 간, 및 신경계 조직에서 GAA 단백질의 발현 및/또는 활성이 감소된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 하나 이상의 조직, 예컨대, 심장, 근육, 간, 및 신경계 조직에서 글리코젠의 축적이 증가된다. 특이적 실시양태에서, 대상체는 IVS1-13T>G 돌연변이 또는 기능성 GAA 단백질의 발현 감소로 이어지는 다른 돌연변이를 갖는다(예컨대, 문헌[Zampieri et al., European J. Human Genetics. 19:422-431, 2011] 참조).

[0103] 본원에 사용된, 용어 "표적"은 RNA 영역, 및 특이적으로, GAA 유전자에 의해 확인된 영역을 의미한다. 구체적 실시양태에서 표적은 엑손 2 포함을 촉진하는 신호의 역제의 원인이 되는 GAA-코딩 프리-mRNA의 인트론 1 또는 인트론 2 내의 영역이다. 또다른 실시양태에서 표적 영역은 GAA 엑손 2의 mRNA의 영역이다.

[0104] 용어 "표적 서열"은 올리고머 유사체가 지시하는 표적 RNA의 부위, 즉, 올리고머 유사체가 상보적 서열의 왓슨-크릭 염기쌍에 의해 혼성화될 서열을 의미한다.

[0105] 용어 "표적화 서열"은 RNA 게놈 내 "표적 서열"에 상보적인(이에 더해, 실질적으로 상보적임을 의미함) 올리고머 또는 올리고머 유사체의 서열이다. 안티센스 올리고머의 전체 서열, 또는 일부 부위는 표적 서열에 상보적일 수 있다. 예컨대, 20-30 염기를 갖는 올리고머에서, 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29개가 표적 영역에 상보적인 표적화 서열일 수 있다. 전형적으로, 표적화 서열은 올리고머 내 인접 염기들로 형성되지만, 그러나 예컨대, 올리고머의 반대편 말단으로부터 함께 위치될 경우, 표적 서열을 스페닝하는 서열을 구성하는 비-인접 서열로 대신 형성될 수 있다.

[0106] "표적화 서열"은 표적 서열에 "근접한" 또는 "실질적인" 상보성을 갖으면서도 본 개시의 목적을 위한 기능을 가질 수 있고, 즉, 여전히 "상보적"이다. 바람직하게는, 본 개시에 이용된 올리고머 유사체 화합물은 10 뉴클레오티드 중에서 표적 서열과 최대 하나의 불일치, 및 바람직하게는 20 뉴클레오티드 중에서 최대 하나의 불일치를 갖는다. 대안으로, 이용되는 안티센스 올리고머는 본원에 표시된 예시적 표적화 서열에서 90% 이상의 서열 상동성, 및 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는다.

[0107] 본원에 사용된, 용어 "정량화하는", "정량화" 또는 다른 관련 단어는 핵산, 폴리뉴클레오티드, 올리고머, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질의 단위 부피 내의 양, 질량, 또는 농도를 결정하는 것을 의미한다.

[0108] 본원에 사용된, 대상체(예컨대, 인간과 같은 포유류) 또는 세포의 "치료"는 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경하기 위한 시도에 사용되는 임의의 유형의 개입이다. 치료는 제약 조성물의 투여를 포함하지만 이제 제한되지 않고, 병리학적 사건의 개시 또는 병인체와의 접촉에 대해 예방적으로 또는 후속으로 수행될 수 있다. 치료되는 질환 또는 상태의 진행 속도를 감소시키거나, 질환 또는 상태의 발병을 지연시키거나, 또는 그의 발병의 중증도를 감소시키는 것에 관련될 수 있는 "예방적" 치료도 또한 포함된다. "치료" 또는 "예방"은 질환 또는 상태, 또는 그의 연관된 증상의 박멸, 치유, 또는 방지를 반드시 지시하지는 않는다.

[0109] **II. GAA의 스플라이싱 조절을 위한 서열**

[0110] 특정 실시양태는, 세포 내 엑손-2 삭제된 GAA mRNA에 비해 엑손 2-함유 GAA mRNA의 수치가 강화되도록, 충분한 길이 및 GAA 유전자 내의 영역에 특이적으로 혼성화하기 위한 상보성을 갖는 안티센스 올리고머와 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 세포 내 엑손-2 삭제된 GAA mRNA에 비해 엑손 2-함유 GAA-코딩 mRNA의 수치를 강화시키는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 세포는 대상체에 존재하고, 방법은 대상체에 안티센스 올리고머를 투여하는 것을 포함한다.

[0111] 안티센스 올리고머는 mRNA의 번역을 차단하거나 또는 억제하거나 또는 조절하도록, 프리-mRNA 스플라이싱 프로

세스를 억제하거나 또는 조절하도록, 또는 표적화된 mRNA의 분해를 유도하도록 디자인될 수 있고, 혼성화되는 표적 서열에 "지시거나" 또는 "표적화된다"고 부를 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적 서열은 프리-프로세싱된 mRNA의 3' 또는 5' 스플라이스 사이트, 분기점, 또는 스플라이싱의 조절에 연관된 다른 서열을 유도하는 영역을 포함한다. 표적 서열은 엑손 내에 또는 인트론 내에 존재하거나 또는 인트론/엑손 접합부에 스패닝할 수 있다.

[0112] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 효과적인 방식으로 표적 RNA(예컨대, 프리-mRNA)의 영역을 차단하기 위해 충분한 표적 RNA(즉, 스플라이스 사이트 선택이 조절되는 RNA)에 대한 서열 상보성을 갖는다. 예시적 실시양태에서, 이러한 GAA 프리-mRNA의 차단은 다른 식으로 스플라이싱을 조절할 수 있는 천연 단백질에 대한 결합 사이트를 마스킹함으로써, 및/또는 표적화된 RNA의 구조를 변경시킴으로써, 스플라이싱을 조절하는 데 기여한다. 일부 실시양태에서, 표적 RNA는 표적 프리-mRNA(예컨대, GAA 유전자 프리-mRNA)이다.

[0113] 표적 RNA의 스플라이싱을 조절하기에 충분한 표적 RNA 서열에 대한 서열 상보성을 갖는 안티센스 올리고머란 안티센스 제제가 다른 식으로 표적화된 RNA의 스플라이싱을 조절할 수 있고 및/또는 3 차원 구조를 변경시키는 천연 단백질에 대한 결합 부위의 마스킹을 촉발시키기에 충분한 서열을 갖는다는 것을 의미한다. 마찬가지로, 표적 RNA의 스플라이싱을 조절하기 위한 표적 RNA 서열에 대한 충분한 서열 상보성을 갖는 충분한 서열 상보성을 갖는 올리고머 제제란 올리고머 제제가 다른 식으로 표적화된 RNA의 스플라이싱을 조절할 수 있고 및/또는 3 차원 구조를 변경시키는 천연 단백질에 대한 결합 사이트의 마스킹을 촉발시키기에 충분한 서열을 갖는다는 것을 의미한다.

[0114] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 충분한 길이 및 인간 GAA 프리-mRNA의 인트론 1, 인간 GAA 프리-mRNA의 엑손 2, 또는 인간 GAA 프리-mRNA의 인트론 2 내의 서열에 상보성을 갖는다. 인간 GAA 프리-mRNA의 인트론 1/엑손 2를 스패닝하는 영역, 또는 인간 GAA 프리-mRNA의 엑손 2/인트론 2를 스패닝하는 영역에 상보적인 안티센스 올리고머도 또한 포함된다. 인간 GAA 유전자에 대한 인트론 1(서열 1), 엑손 2(서열 2), 및 인트론 2(서열 3) 서열은 하기 표 1에 나타난다(서열 1의 3' 말단 근처에 하이라이트된 T/G는 상기된 IVS1-13T>G 돌연변이이고; 이 위치의 뉴클레오티드는 T 또는 G이다).

[0115] <표 1>

GAA-표적화된 올리고머에 대한 표적 서열 (NG_009822로부터)		
명칭	서열 (5' -3')	서열번호
GAA-IVS1	GTGAGACACCTGACGCTCTGCCCGCGCTGCCGGCGGTAACATCCCAGAAGCGGGTTT GAACGTGCCTAGCCGTGCCCGCCAGCCTCTTCCCTGAGCGGAGCTTGAGCCCCAGAC CTCTAGTCCCTCCCGGCTTTATCTGAGTTCAGCTTAGAGATGAACGGGGAGCCGCC TCCTGTGCTGGGCTTGGGGCTGGAGGCTGCATCTTCCCGTTTCAGGGTTTCCCTTTC CCCTTTTGATCGACGCAGTGTCTCAGTCTTGGCCGGGACCCGAGCCACCTCTCCTGCT CCTGCAGGACGCACATGGCTGGGTCTGAATCCCTGGGGTGAGGAGCACCCGTGGCCTG AGAGGGGGCCCTGGGCCAGCTCTGAATCTGAATGTCTCAATCACAAAGACCCCTT TAGGGCAGGCCAGGGGTGACTGTCTGCTGCTTGTCCCTGGTTGCTGGCCACATAGC ACCCGAAACCCTTGGAAACCGAGTGATGAGAGAGCCTTTGTCTCATGAGGTGACTGA TGACCGGGGACACCAGGTGGCTTCCAGGATGGAAGCAGATGGCCAGAAAGACCAAGGC CTGATGACGGGTTGGGATGAAAAGGGGTGAGGGCTGGAGATTGAGTGAATCACCA ATGGCTTAGTCAACCATGCTGCACAATGGAACCCCGTAAGAAACACAGGGATCAG AGGGCTTCCCGCCGGTGTGGAACACACCAAGGCACTGGAGGTTGGTGCAGCAGA GAGCAGAGCATCACTGCCCGCCCTCACACCAGGCCCTACGCATCTCTTCCATACGG CTGTCTGAGTTTATCTTGTAAATAAACAGCAACGTGAAGAACCGCACCTTCTCTG AGTTCTGTGACCTGAAGAGGGAGTCTGGGAACCTCTGAATTTATAACTAGTTGAT CGAAAGTACAAGTGACAACCTGGGATTTGCCATTTGGCCTCTGAAGTGAAGGCAGTGT TGTGGGACTGAGCCCTTAACCTGTGGAGTCTGTGCTGACTCCAGGTAGTGTCAAGAT TGAATGAATTGATAGGACACCCAGCCGTGCCAGAAAGTGCAGAATTGATGGGTGT GAGAAAAACCTTACACATTTAATGTGAGAAGTGTGGTAAAATGTTTACCCCTCCAG CCAGAGGCCCTAATTTACCAGTGGCCACGGTGAACACCCAGTCCAGTCCAGGCGGGGG CAGAGCGTTCCAGCCAAAGCCTTCTGTAACATGACATGACAGGTCAGACTCCCTCGG GCCCTGAGTTCACTTCTTCCCTGGTATGTGACCAGCTCCAGTACCAGAGAAGGTGTC ACAGTCCCTGCTCCAAGGAGCTTCACTGCCCAGGGGCTGCTTTCTGAAATCTTTCG CTGCCCTGCTCCAAGGCCGTTCCCTCAGAGACGACAGCCCTCTGATGGCTGACTT TGGTTTGGAGGACTCTCTGCATCCCTCCCGCATGGCCTTGTCTTAGGACACCTTCT TCCCTCCCTTCCCTGGGGTCAAGCTTGCCTAGGTGGGCTGCTCTTCCCTTCCCG ACGCCCTCCCATGTTGTTATTACACACACCAAGGGACTCCCTATTGAAATCCATG CATATTGAATCGCATGTGGGTTCCCGCTGCTCCTGGGAGGAGCCAGGCTAATAGAA GTTTGGCATAAAAATATAATGTACAGAGAAGCGAAACAAAGGTCGTTGGTACTTGT AACCTTACCAGCAGAATAATGAAAGCGAACCCCATATCTCATCTGCACCGGACATC CTTGTGTGTCTGTACCCGAGGCTCCAGGTGCAGCCACTGTTACAGAGACTGTGTTT CTTCCCAATGTACTCCGGGGCCCGGAGGGGTTCTGATCTGCAAAAGTCCGACAGGT TAAGTCCCTTCTCTTGTGGCTTTGCCACCCCTGGAGTGCACCCCTCAGCTGCGGT GCCAGGATTCGCCACTGTGGTATGTCCGTGCACCCAGTCAATAGGAAAGGGAGCAAG GAAAGTACTGGGTCCCGCTAAGGACATACGAGTTGCCAGAATCACTTCCGTGACA CCAGTGGACCAAGCCGACCTTTATGCAAGTGGGGCTCCAGCCAGGCGTGGTTC ACTCCTGAAATCCAGCACTTCGGAAGGCCAAGGGGGTGGATCACTGAGCTCAGG AGTTCGAGACCCAGCCTTGGGTAACATGGCAAAATCCCGTCTTCAAAAATACAGAAA ATTAGCTGGGTGCGGTGGTGTGCTTACAGTCCAGCTACTCAGGAGGCTGAAGTG GGAGGATTGCTTGTGCTGGGAGGTGGAGGTGCAGTGAAGCCAGGATCTCACACAG CACTCTGGCCAGGCGACAGCTGTTTGGCCTGTTCAAGTGTCTACCTGCTTGTGCTG GTCTTCTGGGGACATTTCAAGCGTGTGTTGATTTGTAAACATTTTAGCAGACTGTGCA AGTGTCTGCACTCCCTGCTGGAGCTTTTCTCGCCCTTCTTCTGGCCCTCTCCCG AGTCTAGACAGAGGGCAACCCACCCCTGGCCACCTTACCCACCTGCTGGGTGTC TGCAGTCCAGCCCGGTTGATGTCTCAGAGCTGCTTTGAGAGCCCGTGTGAGTGC CCCTCCCGCCTCCCTGCTGAGCCCGCTT/GCTTCTCCCGCAG	1
GAA-엑손2	GCCTGTAGGAGCTGTCCAGGCCATCTCCAACCATGGGAGTGAGGACCCCGCCCTGCT CCCACCGGCTCCTGGCGTCTGCGCCCTCGTGTCTTGGCAACCGCTGCACTCCTGG GGCACATCTACTCCATGATTTCTGCTGGTTCCCGGAGAGCTGAGTGGCTCCTCCC CAGTCTGGAGGAGACTCACCCAGCTCACCAGCAGGAGGAGCCAGCAGACCGGGCCCC GGGATGCCAGGCACACCCCGCCGTTCCAGAGCAGTGGCCACACAGTGGCAGCTCC CCCCAACAGCCGCTTCGATTGCGCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAACAGTGGC AGGCCCGCGGCTGTGCTACATCCCTGCAAAAGCAGGGGCTGCAGGGAGCCAGATGG GGCAGCCCTGGTGTCTTCCACCCAGCTACCCAGCTACAAGCTGGAGAACCCTGA GCTCCTCTGAAATGGGCTACACGGCCACCTGACCCGTACCACCCACCTTCTTCC CCAAGGACATCTGACCTGCGGCTGGACGTGATGATGGAGACTGAGAACCCTCC ACTTCACG	2

[0116]

GAA-IVS2	GTGGCAGGGCAGGGCGGGGGCGGCGCCAGGGCAGAGGTTGCGGCTGGACATCGA CACCCACGCACCTCACAAAGGTGGGGTGCATGTTGCACCACTGTGTCTGGCCCTT GCTGGGAGCGGAGGTGTGAGCAGACAATGGCAGCGCCCTCGGGGAGCAGTGGGGAC ACCAGGTTGACAGGTACTCCAGAAGGCAGGGCTCGGGGCTCATTCATCTTATGAAA AGGTGGTCAAGTAGAGTAGGGTGCAGAGGTTGCGAATGAAAACAGGATGCCAG TAAACCCGAAATGACAGATACCCAGGCATGACTTTGTTTTTTTTGTGTAAGGATGCAA AATTTGGGATGATTTATTAAGTAAAGCTGCTTGTGTTTATCTGAAATTCAGAGT TATCAGGTGTTCTGATTTTACCTCCATCCTGGGGAGGGGCTCCTCCTCTGGCTCT GCAGATGAGGGAGCCGAGGCTCAGAGAGGCTGAATGTGCTGCCCATGGTCCACATC CATGTGTGGCTGACCCAGGACCTGACCTGTCTTGGCGTGGGGTGTCTCTCTGGAG AGTAAGGTGGCTGTGGGGAACATCAATAAACCCCATCTCTCTAG	3
----------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

[0117]

[0118]

특정 실시양태에서, 안티센스 표적화 서열은 표 1에 나열된 하나 이상의 표적 서열의 영역에 혼성화되도록 디자인된다. 선택된 안티센스 표적화 서열은 예컨대, 약 12 염기 또는 그 이상, 예컨대, 약 40 염기로 보다 짧게 만들어질 수 있고, 서열이 표적 서열에 혼성화한 후 스플라이싱 조절을 유도하기에 충분히 상보적이고, 임의적으로 RNA와 함께 45 °C 이상의 Tm을 갖는 헤테로듀플렉스를 형성한다면, 소수의 불일치를 포함한다.

- [0119] 특정 실시양태에서, 표적 서열 및 안티센스 표적화 서열 간의 일정한 상보성은 안정한 듀플렉스를 형성하기에 충분하다. 표적 RNA 서열을 갖는 안티센스 올리고머의 상보성을 갖는 영역은 8-11 염기만큼 짧을 수 있지만, 그러나 12-15 염기 이상, 예컨대, 10-40 염기, 12-30 염기, 12-25 염기, 15-25 염기, 12-20 염기, 또는 15-20 염기(이들 범위 내의 모든 정수를 포함)일 수 있다. 약 14-15 염기의 안티센스 올리고머는 고유한 상보적 서열을 갖기에 일반적으로 충분히 길다. 특정 실시양태에서, 상보적 염기의 최소 길이는 본원에서 논의된 것과 같이, 필요한 결합 T_m 을 달성하는 것이 요구될 수 있다.
- [0120] 특정 실시양태에서, 적어도 최소 수의 염기, 예컨대, 10-12 염기가 표적 서열에 대해 상보적인 40 염기 길이의 올리고머가 적합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 자극되거나 또는 능동적인 세포 내 흡수는 약 30 염기 미만의 올리고머 길이에서 최적화된다. 본원에서 추가로 기재된 PMO 올리고머에서, 결합 안정성 및 흡수의 최적 균형은 일반적으로 18-25 염기의 길이에서 일어난다. 적어도 약 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40 인접 또는 비-인접 염기가 표 1의 표적 서열(예컨대, 서열 1-3, 서열 1/2 또는 서열 2/3을 스페닝하는 서열)에 대해 상보적인, 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40 염기로 이루어진 안티센스 올리고머(예컨대, PMO, PMO-X, PNA, LNA, 2'-OMe)가 본 개시 내에 포함된다.
- [0121] 안티센스 올리고머는 전형적으로 인간 GAA 유전자의 프리-mRNA 서열의 인트론 1, 엑손 2, 또는 인트론 2 내 또는 인접한 서열 또는 영역에 충분히 상보적인 염기 서열을 포함한다. 이상적으로, 안티센스 올리고머는 GAA 프리-mRNA의 이상 스플라이싱을 효과적으로 조절함으로써 활성 GAA 단백질의 발현을 증가시킬 수 있다. 이 요건은 올리고머 화합물이 포유류 세포에 의해 능동적으로 흡수될 수 있고, 일단 흡수되면 임의적으로 약 40°C 또는 45°C보다 더 높은 T_m 으로 표적 mRNA와 안정한 듀플렉스(또는 헤테로듀플렉스)를 형성할 수 있는 능력을 갖을 경우 임의적으로 충족된다.
- [0122] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 표적 서열에 100% 상보적일 수 있거나, 예컨대, 올리고머 및 표적 서열 간에 형성된 헤테로듀플렉스가 세포내 뉴클레아제의 작용 및 생체내에서 일어날 수 있는 다른 모드의 분해를 견뎌내기에 충분히 안정하다면, 변이체를 수용하기 위한 불일치를 포함할 수 있다. 따라서, 특정 올리고머는 올리고머 및 표적 서열 간에 약 또는 적어도 약 70% 상보성을 의미하는 실질적인 상보성, 예컨대, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 상보성을 가질 수 있다. 뉴클레아제에 의한 절단에 덜 민감한 올리고머 백본이 본원에서 논의된다. 만약 존재한다면, 불일치는 전형적으로 혼성체 듀플렉스의 중간에서보다 말단 영역에서 덜 탈안정화한다. 허용되는 불일치의 수는 듀플렉스 안정성의 널리 이해된 원칙에 따라, 올리고머의 길이, 듀플렉스 내 G:C 염기 쌍의 퍼센트, 및 듀플렉스 내 불일치(들)의 위치에 따라 달라질 것이다. 이러한 안티센스 올리고머가 반드시 표적 서열에 대해 100% 상보적일 필요는 없지만, 이는 표적 프리-RNA의 스플라이싱이 조절되도록 표적 서열에 안정적이고 특이적으로 결합하는데 효과적이다.
- [0123] 올리고머 및 표적 서열 간에 형성된 듀플렉스의 안정성은 결합 T_m 및 세포내 효소 절단에 대한 듀플렉스의 민감도의 함수이다. 상보적-서열 RNA에 대한 올리고머의 T_m 은 예컨대 문헌[Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, pp. 107-108 or as described in Miyada C. G. and Wallace R. B., 1987, *Oligomer Hybridization Techniques, Methods Enzymol.* Vol. 154 pp. 94-107]에 기재된 것과 같은 종래 방법으로 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 체온보다 더 높고 바람직하게는 약 45°C 또는 50°C보다 더 높은, 상보적-서열 RNA에 대한 결합 T_m 을 가질 수 있다. 60-80°C 이상의 T_m 도 또한 포함된다. 널리 공지된 원칙에 따라, 상보적 염기의 RNA 혼성체에 대한 올리고머의 T_m 은 듀플렉스 내 C:G 쌍형성된 염기의 비를 증가시킴으로써, 및/또는 헤테로듀플렉스의 길이(염기쌍 내)를 증가시킴으로써 증가될 수 있다. 동시에, 세포 내 흡수를 최적화하기 위한 목적에서, 올리고머의 크기를 제한하는 것이 이로우 수 있다. 이 이유 때문에, 높은 T_m 값에 대해 25 염기 초과를 요구하는 것에 비해 25 이하의 염기의 길이에서 높은 T_m (45-50°C 이상)을 보여주는 화합물이 일반적으로 바람직하다.
- [0124] 하기 표 2는 인간 GAA 유전자의 인트론 1, 엑손 2, 또는 인트론 2 프리-mRNA 서열에 대해 완전히 상보적인(5'-에서-3' 배향의) 예시적 표적화 서열을 보여준다.

GAA-IVS1.2206.20	AXXXXCXGXAXXXXGXAGA	77
GAA-IVS1.2208.20	XAXXXXCXGXAXXXXGXGA	78
GAA-IVS1.2210.20	GCXAXXXXCXGXAXXXXGXG	79
GAA-IVS1(-74-55)	GGCXXCXAAAGCAGCXCXGA	104
GAA-IVS1(-79-55)	GGCXXCXAAAGCAGCXCGAGACAX	105
GAA-IVS1(-74-50)	CACGGGCGCXCAAGCAGCXCGA	106
GAA-IVS1(-79-60)	XCAAGCAGCXCGAGACAX	107
GAA-IVS1(-69-55)	CACGGGCGCXCAAGCAGC	108
GAA-IVS1(-158-140)	GCCXGCGXGXGACXG	109
GAA-IVS1(-163-140)	GCCCXGCGXGXGACXGGGAGA	110
GAA-IVS1(-158-135)	GXGXGCCCCXGCGXGXGGACXGG	111
GAA-IVS1(-163-145)	GXGXGACXGGGAGA	112
GAA-IVS1(-153-135)	GXGXGCCCCXGCGXGXG	113
GAA-IVS2(-173-192)	CXGAGXACXGXCACCGXG	114
GAA-IVS2(-168-192)	CXGGAGXACXGXCACCGXGGXGX	115
GAA-IVS2(-173-197)	GCCXGXGAGXACXGXCACCGXG	116
GAA-IVS2(-168-187)	GXACXGXACCGXGGXGX	117
GAA-IVS2(-178-197)	GCCXGXGAGXACXGXCA	118
GAA 엑손 2 안티센스 서열		
GAAEx2A(+202+226)	GGCCCXGGXGXGXGCCCCXGCGX	24
GAAEx2A(+367+391)	GXCXCCXGCGAGCCCCXGCGXGCGAG	25
GAA 인트론 2 안티센스 서열		
GAA-IVS2(-4-20)	CCCCCCCCXGCCCCGCC	10
GAA-IVS2(-14-30)	XGGCCGCGCCCCCGCCC	11
GAA-IVS2(-33-52)	XGXCCACGCGCACCXGXG	12
GAA-IVS2(-53-72)	GXGAGXGCGXGGGXGCGA	13
GAA-IVS2(-73-92)	GCAACAXGCAACCCACCCXX	14
GAA-IVS2(-93-112)	AGGGCCAGCACAGXGGX	15
GAA-IVS2(-113-132)	XCACACXCGCGXCCAGCA	16
GAA-IVS2(-133-150)	GGCGXGCCAXXGXGCG	17
GAA-IVS2(-153-172)	GXGXCCCGXGXGCCCGA	18
GAA-IVS2(-173-192)	CXGGAGXACXGXCACCGXG	19
GAA-IVS2(-193-212)	XGAGCCCCGAGCCXGCCCXX	20
GAA-IVS2(-213-237)	XGACCCACXGXCAAAAGAXGAA	21
GAA-IVS2(-234-258)	CXGXGGCAGCCXACXGXGCG	22
GAA-IVS2(-338-364)	CXAGXAXAAAXACAXCCCAAAXXXG	23
GAA-IVS2.1.20	CCCGCCCCXGCCCCAC	80
GAA-IVS2.6.20	CCGCCCCCGCCCCXGCCCCG	81
GAA-IVS2.9.20	CCGCGCCCCCGCCCCXGCC	82
GAA-IVS2.12.20	XGGCCGCGCCCCCGCCCCX	83
GAA-IVS2.18.20	CXGCCCCGCGCGCCCCCG	84
GAA-IVS2.24.20	CACCCXGXGCCXGGCCG	85
GAA-IVS2.27.20	GCGCACCCXGXGCCXGGCC	86
GAA-IVS2.40.20	XGXCGAXGXCACGCGCACC	87
GAA-IVS2.45.20	GXGGGXGCGAXGCCACGC	88
GAA-IVS2.48.20	XGCGXGGGXGCGAXGXCCA	89
GAA-IVS2.54.20	GXGAGGXGCGXGGGXGCGA	90
GAA-IVS2.67.20	GCACCCACCCXGXGAGGX	91
GAA-IVS2.72.20	AACAXGCACCCACCCXXGX	92
GAA-IVS2.431.20	AGGAGGAGGACGCCXCCCC	93
GAA-IVS2.446.20	CXCAXCXGAGAGCCAGGAG	94
GAA-IVS2.448.20	CCXCAXCXGAGAGCCAGG	95
GAA-IVS2.450.20	CXCCCXCAXCXGAGAGCCA	96
GAA-IVS2.451.20	GXCXCCXCAXCXGAGAGCC	97
GAA-IVS2.452.20	GGXCCCXCAXCXGAGAGC	98
GAA-IVS2.453.20	CGGCXCCXCAXCXGAGAG	99
GAA-IVS2.454.20	XCGGCXCCXCAXCXGAGAG	100
GAA-IVS2.455.20	CXCGGCXCCXCAXCXGAGAG	101

[0127]

GAA-IVS2.456.20	CCXCGGCXCCXCAXCXGCA	102
GAA-IVS2.457.20	GCCXCGGCXCCXCAXCXGCG	103

[0128]

표 2의 임의의 서열에서, 각각의 X는 티민(T) 또는 우라실(U)로부터 독립적으로 선택된다

[0129]

특정 안티센스 올리고머는 따라서 표 1의 서열(예컨대, 서열 4-120) 또는 그의 변이체 또는 인접하거나 비-인접한 부위(들)을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 이로 본질적으로 이루어진다. 예컨대, 특정 안티센스 올리고머는 서열 4-120 중 어느 하나의 약 또는 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27 인접 또는 비-인접 뉴클레오티드를 포함한다. 비-인접 부위에 대해, 개재된 뉴클레오티드는 삭제되거나 또는 상이한 뉴클레오티드로 치환될 수 있거나, 또는 개재된 뉴클레오티드가 부가될 수 있다. 변이체의 부가적 예시는 서열 4-120 중 어느 하나의 전체 길이에 대해 약 또는 적어도 약 70% 서열 동일성 또는 상동성, 예컨대 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성 또는 상동성을 갖는 올리고머를 포함한다.

[0130]

안티센스 올리고머 및 그의 변이체 활성은 관련 기술분야의 상용 기술에 따라 분석될 수 있다. 예컨대, 조사된

RNA 및 단백질의 스플라이싱형 및 발현량은 전사된 핵산 또는 단백질의 스플라이싱 형태 및/또는 발현을 검출하는 매우 광범위한 널리 공지된 방법으로 평가될 수 있다. 이러한 방법의 비-제한적 예시는 RNA의 스플라이싱 형태의 RT-PCR 이후 PCR 생성물의 크기 분리, 핵산 혼성화 방법, 예컨대 노던 블롯 및/또는 핵산 분석법의 사용; 핵산 증폭 방법; 단백질의 검출을 위한 면역학적 방법; 단백질 정제 방법; 및 단백질 기능 또는 활성 분석법을 수행하는 것을 포함한다.

[0131] RNA 발현량은 세포, 조직 또는 생물로부터 mRNA/cDNA(즉, 전사된 폴리뉴클레오티드)를 준비하고, 분석된 핵산, 또는 그의 단편의 상보체인 기준 폴리뉴클레오티드와 mRNA/cDNA를 혼성화함으로써 분석될 수 있다. cDNA는 상보적 폴리뉴클레오티드와의 혼성화 전에 다양한 중합효소 연쇄 반응 또는 시험관내 전사 방법 중 어느 하나를 사용하여 임의적으로 증폭될 수 있지만; 바람직하게는, 증폭되지 않는다. 하나 이상의 전사물의 발현은 전사물(들)의 발현양을 평가하기 위해 정량적 PCR을 사용해서도 또한 검출될 수 있다.

[0132] **III. 안티센스 올리고머 화학**

[0133] **A. 일반적 특성**

[0134] 본 개시의 특정 안티센스 올리고머는 인트론 스플라이스 사일런서 요소 또는 엑손 스플라이스 사일런서 요소에 특이적으로 혼성화한다. 일부 안티센스 올리고머는 표 2에 제시된 표적화 서열, 표 2의 표적화 서열의 10 이상의 인접 뉴클레오티드, 또는 표 2의 표적화 서열과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함한다. 특이적 안티센스 올리고머는 표 2에 제시된 표적화 서열로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 뉴클레아제-저항성을 갖는다.

[0135] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 포스포라미데이트 또는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO), 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 포스포로티오에이트 올리고머, 트리시클로-DNA 올리고머, 트리시클로-포스포로티오에이트 올리고머, 2'-O-Me-개질된 올리고머, 또는 상기의 임의의 조합으로부터 선택된 비-천연 화학적 백본, 및 인간 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA의 인트론 1(서열 1), 인트론 2(서열 2), 또는 엑손 2(서열 3) 내의 영역에 상보적인 표적화 서열을 포함한다. 예컨대, 일부 실시양태에서, 표적화 서열은 서열 4 내지 120으로부터 선택되고, 여기서 X는 우라실(U) 또는 티민(T)으로부터 선택된다.

[0136] 본 개시의 안티센스 올리고머는 예컨대, 함께 상기에서 논의된 것과 같과 같은 표적화 서열을 형성하거나 포함하는 핵염기를 각각 포함하는 복수의 뉴클레오티드 서브유닛을 일반적으로 포함한다. 이에 따라, 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 길이 약 10 내지 약 40개 서브유닛, 보다 바람직하게는 약 10 내지 30개 서브유닛, 및 전형적으로 15-25개 서브유닛의 범위에 있다. 예컨대, 본 개시의 안티센스 화합물은 길이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40개 서브유닛일 수 있거나, 또는 10개 서브유닛 내지 30개 서브유닛, 177개 서브유닛 내지 27개 서브유닛, 10개 서브유닛 내지 27개 서브유닛, 10개 서브유닛 내지 25개 서브유닛, 및 10개 서브유닛 내지 20개 서브유닛의 범위에 있을 수 있다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 길이 약 10 내지 약 40개 또는 약 5 내지 약 30개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 길이 약 14 내지 약 25개 또는 약 17 내지 약 27개 뉴클레오티드이다.

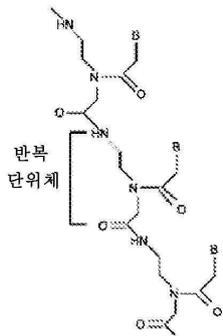
[0137] 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머의 백본은 실질적으로 비하전되고, 세포막을 통해 능동적 또는 촉진된 수송을 위한 기질로서 임의적으로 인식된다. 일부 실시양태에서, 모든 뉴클레오시드간 연결은 비하전된다. 표적 RNA와 함께 안정한 듀플렉스를 형성할 수 있는 올리고머의 능력은 표적에 대한 안티센스 올리고머의 길이 및 상보성의 정도, G:C 대 A:T 염기 일치 비, 임의의 불일치된 염기의 위치를 포함해 백본의 다른 특징에도 또한 관련될 수 있다. 세포내 뉴클레아제에 저항할 수 있는 안티센스 올리고머의 능력은 생존 및 세포 원형질로의 체제의 궁극적 전달을 용이하게 할 수 있다. 예시적인 안티센스 올리고머 표적화 서열은 표 2에 나열된다(위).

[0138] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 생리학적 pH에서 양성으로 하전되거나 또는 양이온성인 하나 이상의 뉴클레오시드간 연결을 갖는다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 약 5.5 내지 약 12의 pKa를 나타내는 하나 이상의 뉴클레오시드간 결합을 갖는다. 임의적으로, 안티센스 올리고머는 질소 및 알킬, 아릴, 또는 아르알킬기 양쪽 모두를 갖는 하나 이상의 뉴클레오시드간 결합을 갖는다. 구체적 실시양태에서, 양이온성 뉴클레오시드간 연결 또는 연결들은 4-아미노피페리딘-1-일(APN)기, 또는 그의 유도체를 포함한다. 어느 한 이론에 의해서도 구속되지 않지만, 올리고머 내 양이온성 연결 또는 연결들(예컨대, APN 기 또는 APN 유도체)의 존재는 표적 뉴클레오티드 내 음성적으로 하전된 포스페이트에 대한 결합을 촉진한다. 따라서, 돌연변이 RNA 및 양이온성 연결-함유 올리고머간 헤테로듀플렉스의 형성은 이온성 인력 및 왓슨-크릭 염기 쌍형성 양쪽 모두에 의해

유지될 수 있다.

- [0139] 일부 실시양태에서, 양이온성 연결의 수는 2 이상이고 총 뉴클레오시드간 결합의 약 절반 이하, 예컨대, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 이하의 양이온성 연결이다. 일부 실시양태에서, 그러나, 모든 뉴클레오시드간 연결까지가 양이온성 연결이고, 예컨대, 총 뉴클레오시드간 결합 중 약 또는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40개가 양이온성 연결이다. 특이적 실시양태에서, 약 19-20 서브유닛의 올리고머는 2-10, 예컨대, 4-8 양이온성 연결을 가질 수 있고, 나머지는 비하전된 연결일 수 있다. 다른 특이적 실시양태에서, 14-15 서브유닛의 올리고머는 2-7, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7 양이온성 연결을 가질 수 있고 나머지는 비하전된 연결일 수 있다. 올리고머 내 양이온성 연결의 총 수는 따라서 약 1 내지 10 내지 15 내지 20 내지 30 이상(그 사이의 모든 정수 포함)으로 변할 수 있고, 올리고머를 내에 배치될 수 있다.
- [0140] 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 매 2-5 또는 2, 3, 4, 또는 5의 비하전된 연결 당 약 1 양이온성 이하, 예컨대 매 10의 비하전된 연결 당 약 4-5 또는 4 또는 5의 연결을 가질 수 있다.
- [0141] 특정 실시양태는 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 양이온성 연결을 함유하는 안티센스 올리고머를 포함한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 활성의 최적의 개선은 만약 약 25%의 백본 연결이 양이온성일 경우 나타날 수 있다. 특정 실시양태에서, 강화는 소수 예컨대, 10-20% 양이온성 연결에서, 또는 양이온성 연결의 수가 50-80% 범위, 예컨대 약 60%일 경우 나타날 수 있다.
- [0142] 일부 실시양태에서, 양이온성 연결은 백본을 따라 배치된다. 이러한 올리고머는 2 이상의 연이은 비하전된 연결을 임의적으로 함유하고; 즉, 올리고머는 임의적으로 그의 전체 길이를 따라 엄격하게 변경되는 패턴을 갖지 않는다. 특이적 예시에서, 각각의 하나 또는 두 양이온성 연결(들)은 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5의 비하전된 연결에 의해 백본을 따라 분리된다.
- [0143] 양이온성 연결의 블록 및 비하전된 연결의 블록을 갖는 올리고머도 또한 포함된다. 예컨대, 비하전된 연결의 중심 블록은 양이온성 연결의 블록에 인접할 수 있고, 반대의 경우도 가능하다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 대략 동일-길이 5', 3' 및 중심 영역을 갖고, 중심 영역 내 양이온성 연결부의 퍼센트는 양이온성 연결부의 총 수의 약 50%, 60%, 70%, 또는 80% 초과이다.
- [0144] 특이적 안티센스 올리고머에서, 대부분의 양이온성 연결(예컨대, 양이온성 연결의 70, 75%, 80%, 90%)은 "중심-영역" 백본 연결, 예컨대, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 최중심 연결에 근접하게 분포된다. 예컨대, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24-머 올리고머는 8, 9, 10, 11, 또는 12 최중심 연결부에 국재화된 총 양이온성 연결부 중 적어도 50%, 60%, 70%, 또는 80%를 가질 수 있다.
- [0145] **B. 백본 화학 특징**
- [0146] 안티센스 올리고머는 다양한 안티센스 화학을 이용할 수 있다. 올리고머 화학의 예시는 임의의 하기의 조합을 포함해, 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 포스포로티오에이트, 2'-O-Me-개질된 올리고머, 모르폴리노, PMO, PPMO, PMO플러스, 및 PMO-X 화학을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, PNA 및 LNA 화학은 PMO 및 2'-O-Me 올리고머에 비해 상대적으로 높은 표적 결합 강도 때문에 보다 짧은 표적화 서열을 활용할 수 있다. 포스포로티오에이트 및 2'-O-Me-개질된 화학이 보통 결합되어 2'-O-Me-포스포로티오에이트 백본을 생성한다. 그의 전부가 참조문헌으로 본원에 포함된 PCT 공보 제WO/2013/112053호 및 제WO/2009/008725호를 참조하라.
- [0147] 일부 예시에서, PMO와 같은 안티센스 올리고머는 세포 관통 펩티드(CPP)와 접합되어 세포내 전달을 용이하게 할 수 있다. 펩티드-접합된 PMO는 PPMO라 불리고 특정 실시양태는 그의 전부가 본원에 참조문헌으로 포함된 PCT 공보 제WO/2012/150960호에 기재된 내용을 포함한다.
- [0148] **1. 펩티드 핵산(PNA)**
- [0149] 펩티드 핵산(PNA)은 피리미딘 또는 퓨린 염기가 부착된 N-(2-아미노에틸)글리신 단위체로 이루어진, 백본이 디옥시리보스 백본과 구조적으로 동형의 DNA의 유사체이다. 천연 피리미딘 및 퓨린 염기를 함유하는 PNA는 왓슨-크릭 염기 쌍형성 규칙을 준수하면서 상보적 올리고머에 혼성화하고, 염기쌍 인식의 측면에서 DNA를 모방한다(문헌[Egholm, Buchardt et al. 1993]). PNA의 백본은 포스포디에스테르 결합보다는 펩티드 결합에 의해 형성되어, 이들을 안티센스 적용에 잘 들어맞게 한다(하기 구조 참조). 백본은 비하전되어 정상보다 더 큰 열 안정

성을 나타내는 PNA/DNA 또는 PNA/RNA 듀플렉스를 생성한다. PNA는 뉴클레아제 또는 프로테아제에 의해 인식되지 않는다. PNA의 비-제한적 예시는 하기에 도시된다:



PNA

[0150]

[0151]

[0152]

천연 구조에서의 급격한 구조적 변화에도 불구하고, PNA는 DNA 또는 RNA로의 나선형의 서열-특이적 결합이 가능하다. PNA의 특성은 상보적 DNA 또는 RNA에 대한 높은 결합 친화도, 단일-염기 불일치에 의해 야기되는 탈안정화 효과, 뉴클레아제 및 프로테아제에 대한 저항성, 염 농도에 비의존적인 DNA 또는 RNA와의 혼성화 및 호모퓨린 DNA와의 트리플렉스(triplex) 형성을 포함한다. PANAGENE.TM.은 그의 전매인 Bts PNA 모노머(Bts; 벤조티아졸-2-술폰닐기) 및 전매 올리고머화 프로세스를 개발했다. Bts PNA 모노머를 사용한 PNA 올리고머화는 탈보호화, 커플링, 및 캡핑의 반복적 사이클로 구성된다. PNA는 관련 기술분야에 공지된 임의의 기법을 사용하여 합성적으로 생성될 수 있다. 예컨대, U.S. 특허 제6,969,766호, 제7,211,668호, 제7,022,851호, 제7,125,994호, 제7,145,006호 및 제7,179,896호를 참조하라. PNA의 제조에 대해서는 U.S. 특허 제5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제5,719,262호도 또한 참조하라. PNA 화합물의 추가적인 교시는 문헌[Nielsen et al., Science, 254:1497-1500, 1991]에서 찾을 수 있다. 상기 문헌 각각은 그의 전부가 참조문헌으로 포함된다.

[0153]

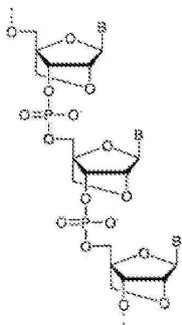
2. 잠금 핵산(LNA)

[0154]

안티센스 올리고머 화합물은 "잠금 핵산(locked nucleic acid)" 서브유닛(LNA)을 또한 함유할 수 있다. "LNA"는 가교 핵산(bridged nucleic acid; BNA)이라 불리는 일종의 개질체의 구성원이다. BNA는 C30-엔도(노던) 당 푸커(pucker) 내 리보스 고리의 형성을 잠금 공유 연결을 특징으로 한다. LNA에서, 가교는 2'-O 및 4'-C변간의 메틸렌으로 구성된다. LNA는 백본 사전조직화 및 염기 스테킹을 강화하여 혼성화 및 열 안정성을 증가시킨다.

[0155]

LNA의 구조는 예컨대, 문헌[Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54:3607, and Accounts of Chem. Research (1999) 32:301]; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; (1998) 39:5401, 및 Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230]에서 찾을 수 있다. LNA의 비-제한적 예시는 하기에 도시된다:



LNA

[0156]

[0157]

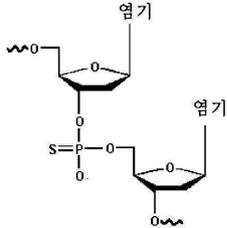
[0158]

본 개시의 화합물은 하나 이상의 LNA를 포함할 수 있고, 일부 실시양태에서 화합물은 전적으로 LNA로 구성될 수 있다. 개별 LNA 뉴클레오시드 서브유닛의 합성 및 올리고머로의 그의 도입 방법은 예컨대, 각각 그의 전부가 참조문헌으로 포함된 U.S. 특허 제7,572,582호, 제7,569,575호, 제7,084,125호, 제7,060,809호,

제7,053,207호, 제7,034,133호, 제6,794,499호, 및 제6,670,461호에 기재된다. 전형적인 서브유닛간 링커는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 모이어티를 포함하고; 대안으로, 비-인 함유 링커가 이용될 수 있다. 일 실시양태는 각 LNA 서브유닛이 DNA 서브유닛에 의해 분리된 LNA 함유 화합물이다. 특정 화합물은 서브유닛간 링커가 포스포로티오에이트인 교대 LNA 및 DNA 서브유닛으로 구성된다.

[0159] **3. 포스포로티오에이트**

[0160] "포스포로티오에이트"(또는 S-올리고)는 비가교 산소 중 하나가 황으로 교체된 정상 DNA의 변이체이다. 포스포로티오에이트의 비-제한적 예시는 하기에 도시된다:



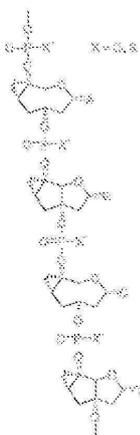
[0161]

[0162] 뉴클레오티드간 결합의 황화는 5'에서 3' 및 3'에서 5' DNA POL 1 엑소뉴클레아제, 뉴클레아제 S1 및 P1, RNase, 혈청 뉴클레아제 및 뱀독 포스포디에스테라제를 포함한 엔도-및 엑소뉴클레아제의 작용을 줄인다. 포스포로티오에이트는 히드로젠 포스포네이트의 이황화탄소 내 황 원소의 용액의 작용에 의해, 또는 테트라에틸티우람 디설피드(TETD) 또는 3H-1, 2-벤조디티올-3-온 1, 1-디옥시드(BDTD)와 포스파이트 트리에스테르를 황화시키는 방법에 의한 두 가지 주요 경로에 의해 만들어진다(예컨대, 문헌[Iyer et al., J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990 참조]). 후자의 방법은 대부분의 유기 용매 내 황 원소의 불용성 및 이황화탄소의 독성의 문제가 없다. TETD 및 BDTD 방법에 의해 또한 보다 고순도의 포스포로티오에이트가 수득된다.

[0163] **4. 트리시클로-DNA 및 트리시클로-포스포로티오에이트 뉴클레오티드**

[0164] 트리시클로-DNA(tc-DNA)는 각각의 뉴클레오티드가 백본의 구조적 유동성을 제한하고 비틀림각 γ 의 백본 기하학을 최적화하기 위해 시클로프로판 고리의 도입에 의해 개질된 일종의 제약된 DNA 유사체이다. 호모염기 아데닌- 및 티민-함유 tc-DNA는 상보적 RNA와 특별히 안정한 A-T 염기쌍을 형성한다. 트리시클로-DNA 및 그의 합성은 국제특허출원 공개공보 제WO 2010/115993호에 기재된다. 본 개시의 화합물은 하나 이상의 트리사이클-DNA 뉴클레오티드를 포함할 수 있고; 일부 경우에서, 화합물은 전적으로 트리사이클-DNA 뉴클레오티드로 구성될 수 있다.

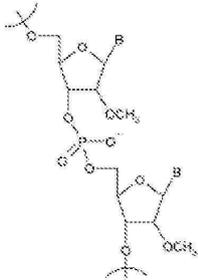
[0165] 트리시클로-포스포로티오에이트 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 서브유닛간 연결을 갖는 트리시클로-DNA 뉴클레오티드이다. 트리시클로-포스포로티오에이트 뉴클레오티드 및 그의 합성은 국제특허출원 공개공보 제WO 2013/053928호에 기재된다. 본 개시의 화합물은 하나 이상의 트리사이클-DNA 뉴클레오티드를 포함할 수 있고; 일부 경우에서, 화합물은 전적으로 트리사이클-DNA 뉴클레오티드로 구성될 수 있다. 트리사이클-DNA/트리사이클-포스포로티오에이트 뉴클레오티드의 비-제한적 예시는 하기에 도시된다:



[0166]

[0167] 5. 2'-O-메틸 올리고머

[0168] "2'-O-Me 올리고머" 분자는 리보스 분자의 2'-OH 잔기에 메틸기를 포함한다. 2'-O-Me-RNA는 DNA와 동일한(또는 유사한) 거동을 보여주지만, 그러나 뉴클레아제 분해로부터 보호된다. 2'-O-Me-RNA는 추가적 안정성을 위해 포스포티오에이트 올리고머(PTO)와 또한 결합될 수 있다. 2'-O-Me 올리고머(포스포디에스테르 또는 포스포티오에이트)는 관련 기술분야의 상용 기법에 따라 합성될 수 있다(문헌[Yoo et al., Nucleic Acids Res. 32:2008-16, 2004] 참조). 2'-O-Me 올리고머의 비-제한적 예시는 하기에 도시된다:



[0169]

[0170] 2'-O-Me 올리고머는 포스포티오에이트 연결을 또한 포함할 수 있다(2'-O-Me 포스포티오에이트 올리고머).

[0171] 6. 모르폴리노 올리고머

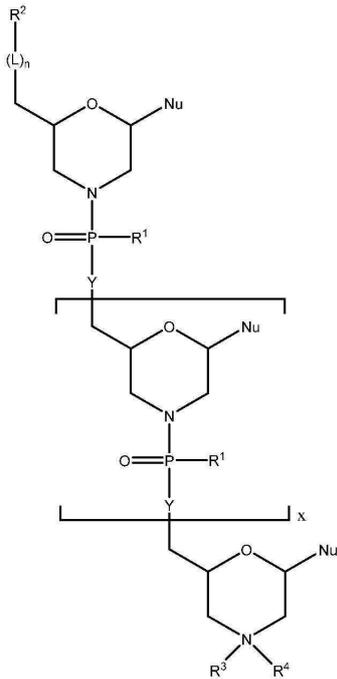
[0172] "모르폴리노 올리고머" 또는 "PMO"는 중합체가 펜토스 당 백본 모이어티가 없는 대신 모르폴리노 고리를 함유하는 전형적인 폴리뉴클레오티드와 수소 결합할 수 있는 핵염기를 지지하는 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 따라서, PMO에서 모르폴리노 고리 구조는 염기 쌍형성 모이어티를 지지하여, 세포 내 또는 치료되는 대상체 내 선택된 안티센스 표적에 혼성화하도록 전형적으로 디자인된 염기 쌍형성 모이어티의 서열을 형성한다. 예시적 "모르폴리노" 올리고머는 각 서브유닛이 폴리뉴클레오티드 내 염기에 염기-특이적 수소 결합으로 결합하기에 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 핵염기를 포함하도록, 한 서브유닛의 모르폴리노 질소와 인접한 서브유닛의 4' 엑소시클릭 탄소를 결합하는 포스포라미데이트 또는 포스포로디아미데이트 연결에 의해 연결된 모르폴리노 서브유닛 구조를 포함한다. 모르폴리노 올리고머(안티센스 올리고머를 포함)는 예컨대, U.S. 특허 제5,698,685호; 제5,217,866호; 제5,142,047호; 제5,034,506호; 제5,166,315호; 제5,185,444호; 제5,521,063호; 제5,506,337호 및 출원계속 중인 US 특허출원 제12/271,036호; 제12/271,040호; 및 PCT 공개공보 제WO/2009/064471호 및 제WO/2012/043730호에 상술되며, 이들 모두는 그의 전부가 참조문헌으로 본원에 포함된다.

[0173] 올리고머 구조 내에서, 포스페이트기는 올리고머의 "뉴클레오시드간 연결"을 형성하는 것으로 흔히 언급된다. RNA 및 DNA의 자연 발생 뉴클레오시드간 연결은 3'에서 5' 포스포디에스테르 연결이다. "포스포라미데이트" 기는 세 개의 부착된 산소 원자 및 한 개의 부착된 질소 원자를 갖는 인을 포함하는 반면, "포스포로디아미데이트" 기는 두 개의 부착된 산소 원자 및 두 개의 부착된 질소 원자를 갖는 인을 포함한다. 본원에 기재된 PMO 및/또는 PMO-X 올리고머의 비하전된 또는 양이온성 서브유닛간 연결에서, 하나의 질소는 항상 백본 쇠에 대해 펜던트성이다. 포스포로디아미데이트 연결 내 제2 질소는 전형적으로 모르폴리노 고리 구조 내 고리 질소이다.

[0174] "PMO-X"는 (i) 모르폴리노 고리의 질소 원자에 대한 공유 결합 및 (ii) 4-아미노피페리딘-1-일(즉, APN) 또는 4-아미노피페리딘-1-일의 유도체의 고리 질소에 대한 제2 공유결합을 갖는 인 원자를 갖는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)를 의미한다. 예시적 PMO-X 올리고머는 각각 그의 전부가 참조문헌으로 본원에 포함된 PCT 출원 제PCT/US2011/38459호 및 PCT 공개공보 제WO/2013/074834호에 개시된다. "PMO-apn" 또는 "APN"은 인 원자가 모르폴리노기 및 4-아미노피페리딘-1-일(즉, APN)의 고리 질소에 연결된, 하나 이상의 뉴클레오시드간 연결을 포함하는 PMO-X 올리고머를 의미한다. 특이적 실시양태에서, 표 2에 제시된 표적화 서열을 포함하는 안티센스 올리고머는 하나 이상의 APN-함유 연결 또는 APN 유도체-함유 연결을 포함한다. 특이적 실시양태는 나머지 연결(만약 100% 미만일 경우)가 비하전된 연결부인 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% APN/APN 유도체-함유 연결을 갖는 PMO를 포함하고, 예컨대, 총 뉴클레오시드간 연결의 약 또는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40이 APN/APN 유도체-함유 연결이다.

[0175] 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이고,

[0176] <화학식 I>



[0177]

[0178] 여기서,

[0179] 각각의 Nu는 함께 취해져 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

[0180] x는 8 내지 38의 정수이고;

[0181] 각각의 Y는 O 또는 -NR^a로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R^a는 수소, -T¹-NR^cR^dR^e, 및 -[(C(O)CHR'NH)_m]R''로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서:

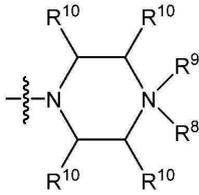
[0182] R'은 자연 발생 아미노산 또는 그의 일- 또는 이-탄소 상동체의 측쇄이고, R''은 수소 또는 아실로부터 선택되고, m은 1 내지 60의 정수이고, R^c는 수소, C₁-C₆ 알킬, 아르알킬, 및 -C(=NH)NH₂로 이루어진 군으로부터 선택되고, R^d는 수소, 아르알킬, 및 C₁-C₆ 알킬로부터 선택되거나, 또는 R^c 및 R^d가 서로 독립적으로 C₁-C₆ 알킬 또는 아르알킬일 경우, 이들이 부착된 질소 원자와 함께 취해진 R^c 및 R^d는 5-7원 고리를 형성하고(여기서 고리는 C₁-C₆ 알킬, 페닐, 할로젠, 및 아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기로 임의적으로 치환됨), R^e는 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬, 및 아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0183] 각각의 L은 -P(O)₂OH-, -P(O)₂R¹-, -P(O)₂(N(CH₃)₃-N(CH₃)CH₂C(O)NH₂, 피페라지닐기, 카르보닐기, H(O(CH₂)_sO)_w-, -(OCH₂CH₂O)_w, 및 -[(C(O)CHR'NH)_m]R''로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 w는 3-20으로부터 선택된 정수이고, S는 1 내지 8로부터 선택된 정수이고;

[0184] n은 0 내지 3의 정수이고;

[0185] 각각의 R¹은 -N(CH₃)₂, -NR⁵R⁶, -OR⁷, 하기 화학식 II

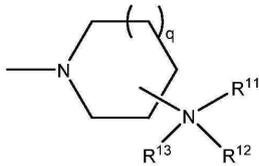
[0186] <화학식 II>



[0187]

[0188] 의 모이어티(여기서 R⁸은 수소, 메틸, -C(=NH)NH₂, -Z-T²-NHC(=NH)NH₂, 및 -[(C(O)CHR'NH)_m]R''로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 Z는 카르보닐 또는 직접 결합이고, R⁹은 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬, 및 아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 각각의 R¹⁰은 수소 또는 메틸로부터 독립적으로 선택됨); 및 하기 화학식 III

[0189] <화학식 III>



[0190]

[0191] 의 모이어티(여기서 q는 0 내지 2의 정수이고, R¹¹은 수소, C₁-C₆ 알킬, 아르알킬, 및 -C(=NH)NH₂로 이루어진 군으로부터 선택되고, R¹²은 수소, 아르알킬, 및 C₁-C₆ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 취해진 R¹¹ 및 R¹²은 5-7원 고리를 형성하고, 여기서 고리는 C₁-C₆ 알킬, 페닐, 할로젠, 및 아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택된 치환기로 임의적으로 치환되고, R¹³은 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬, 및 아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택됨)로부터 독립적으로 선택되고,

[0192] R²은 수소, OH, 뉴클레오티드, -(CH₂)_mC(O)NR^fR^g(여기서 R^f 및 R^g은 H, 아실, C₁-C₆ 알킬, 및 -[(C(O)CHR'NH)_m]R''로부터 독립적으로 선택됨), -[(C(O)CHR'NH)_m]R'', H(O(CH₂)_sO)_w-, H(OCH₂CH₂O)_w-, 트리틸, -C(=O)OR^f, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R^f은 하나 이상의 산소 또는 히드록실 모이어티 또는 그의 조합을 포함하는 C₁-C₃₀ 알킬이거나, 또는 R²은 부재하고;

[0193] R³은 수소, C₁-C₆ 알킬, 뉴클레오티드, -[(C(O)CHR'NH)_m]R'', -C(=NH)NH₂, 트리틸, -C(=O)OR^g, 아실, -C(O)(CH₂)_mC(O), 및 T⁴-(4-(4,6-(NR₂))-1,3,5-트리아진-2-일)피페라진-1-일로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R^g은 하나 이상의 산소 또는 히드록실 모이어티 또는 그의 조합을 포함하는 C₁-C₃₀ 알킬이고, T⁴는 -C(O)(CH₂)₆C(O)- 또는 -C(O)(CH₂)₂S₂(CH₂)₂C(O)-로부터 선택되고, R은 -(CH₂)OC(O)NH(CH₂)₆NHC(NH)NH₂이고;

[0194] R⁴은 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0195] 각각의 R⁵은 수소 또는 메틸로부터 독립적으로 선택되고;

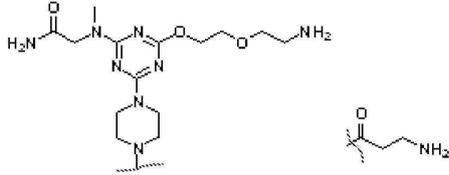
[0196] 각각의 R⁶ 및 각각의 R⁷은 수소 또는 -T³-NR^cR^dR^e로부터 독립적으로 선택되고;

[0197] 각각의 T¹, T², 및 T³은 독립적으로 알킬, 알콕시, 또는 알킬아미노기 또는 그의 조합을 포함하는 길이 18개 이하 원자의 임의적 링커이고,

[0198] 여기서 표적화 서열은 인간 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA의 인트론 1(서열 1), 인트론 2(서열 2), 또는 엑손 2(서열 3) 내의 영역에 상보적이다.

[0199] 일부 실시양태에서, R³은 모이어티 T⁴-(4-(4,6-(NR₂)-1,3,5-트리아진-2-일)피페라진-1-일이고, 여기서 T⁴은 -C(O)(CH₂)₆C(O)- 또는 -C(O)(CH₂)₂S₂(CH₂)₂C(O)-로부터 선택되고, R은 -(CH₂)OC(O)NH(CH₂)₆NHC(NH)NH₂이다. 이러한 모이어티는 그의 전부가 참조문헌으로 본원에 포함된 U.S. 특허 제7,935,816 호에 추가로 기재된다.

[0200] 특정 실시양태에서, R³은 하기에 도시된 모이어티를 포함할 수 있다:

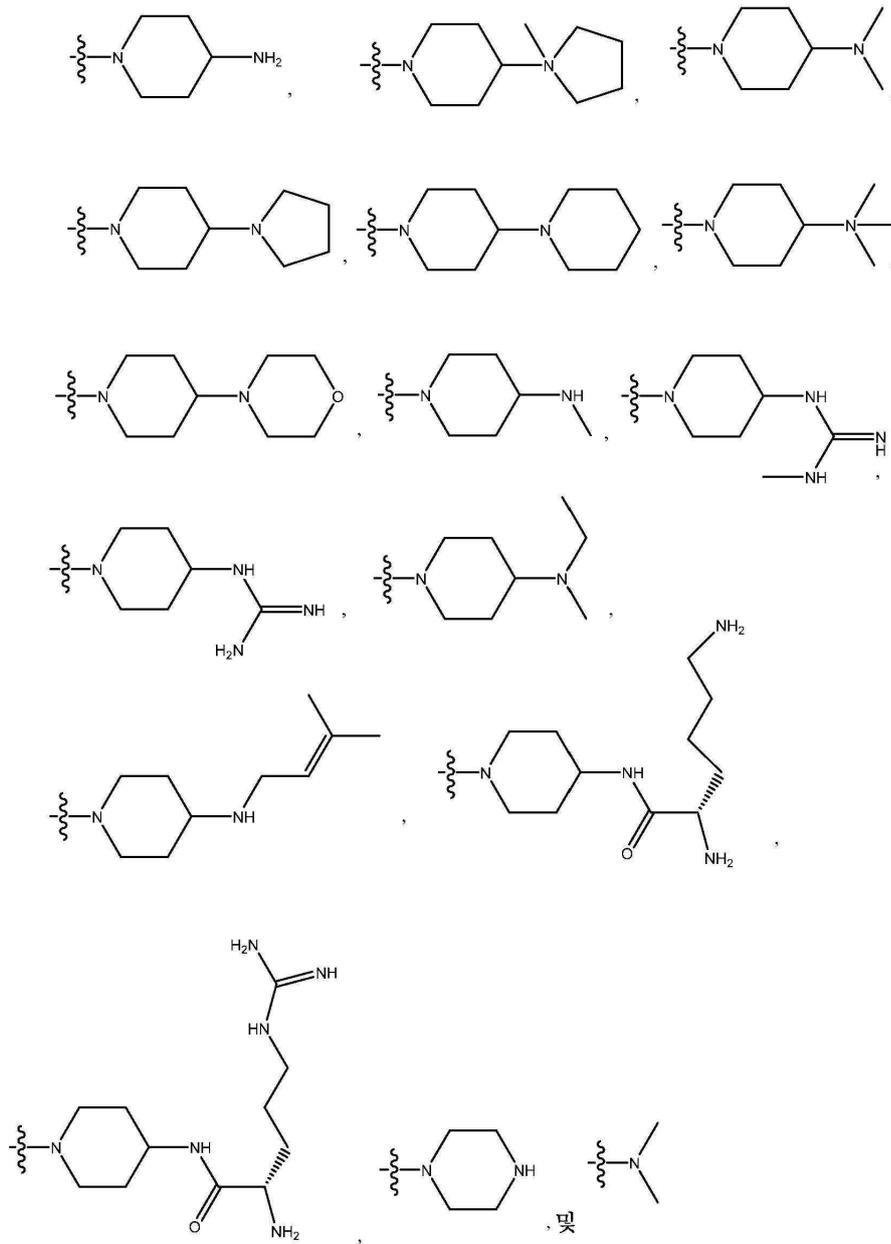


[0201]

[0202] 특정 실시양태에서, 각각의 R¹은 -N(CH₃)₂이다. 일부 실시양태에서, R₁ 기의 약 50-90%는 디메틸아미노(즉, -N(CH₃)₂)이다. 특정 실시양태에서, R₁ 기의 약 66%가 디메틸아미노이다.

[0203] 일부 실시양태에서, 표적화 서열은 서열 4 내지 120으로부터 선택되고, 여기서 X는 우라실(U) 또는 티민(T)으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 각각의 R¹은 -N(CH₃)₂이고 표적화 서열은 서열 4 내지 120으로부터 선택되고, 여기서 X는 우라실(U) 또는 티민(T)으로부터 선택된다.

[0204] 본 개시의 일부 실시양태에서, R₁은



[0205]

[0206] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

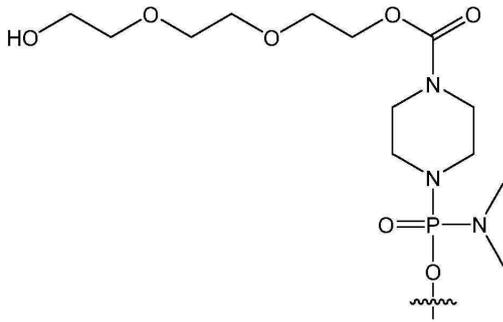
[0207] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 R¹은



[0208]

[0209] 이다.

[0210] 특정 실시양태에서, n은 2이고, 함께 취해진 R² 및 L은 하기 화학식

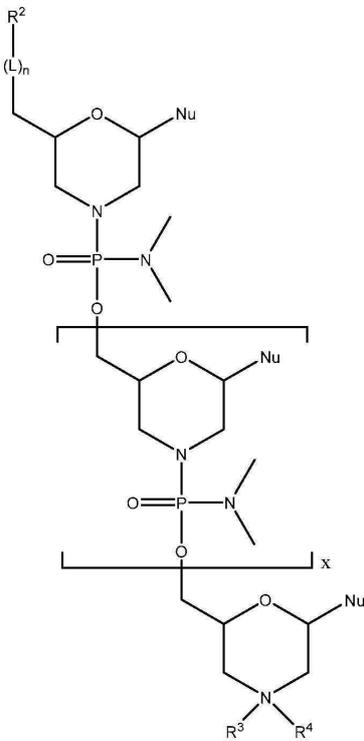


[0211]

[0212] 이고, Y는 각각의 경우 O이다.

[0213] 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 하기 화학식 IV의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이고,

[0214] <화학식 IV>



[0215]

[0216] 여기서,

[0217] 각각의 Nu는 함께 취해져 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

[0218] x는 8 내지 38의 정수이고;

[0219] 각각의 L은 -P(O)₂OH-, -P(O)₂R¹-, -P(O)₂(N(CH₃)₃-N(CH₃)CH₂C(O)NH₂, 피페라지닐기, 카르보닐기, H(O(CH₂)_sO)_w-, -(OCH₂CH₂O)_w, 및 -[(C(O)CHR'NH)_m]R''로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 w는 3-20으로부터 선택된 정수이고, S는 1 내지 8로부터 선택된 정수이고, R'은 자연 발생 아미노산 또는 그의 일- 또는 이-탄소 상동체의 측쇄이고, R''은 수소 또는 아실로부터 선택되고, m은 1 내지 60의 정수이고;

[0220] n은 0 내지 3의 정수이고;

[0221] R²은 수소, OH, 뉴클레오티드, -(CH₂)_mC(O)NR^fR^g(여기서 R^f 및 R^g은 H, 아실, C₁-C₆ 알킬, 및 -[(C(O)CHR'NH)_m]

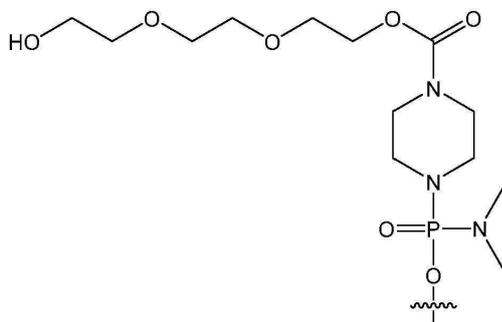
R¹'로부터 독립적으로 선택됨), $-\text{[(C(O)CHR'NH)}_m]\text{R}''$, $\text{H}(\text{O}(\text{CH}_2)_s\text{O})_w-$, $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_w-$, 트리틸, $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^f$, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R^f은 하나 이상의 산소 또는 히드록실 모이어티 또는 그의 조합을 포함하는 C₁-C₃₀ 알킬이거나, 또는 R²은 부재하고;

[0222] R³은 수소, C₁-C₆ 알킬, 뉴클레오티드, $-\text{[(C(O)CHR'NH)}_m]\text{R}''$, $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0223] R⁴은 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0224] 여기서 표적화 서열은 인간 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA의 인트론 1(서열 1), 인트론 2(서열 2), 또는 엑손 2(서열 3) 내의 영역에 상보적이다.

[0225] 일부 실시양태에서, n은 2이고; 함께 취해진 R² 및 L은 하기 화학식



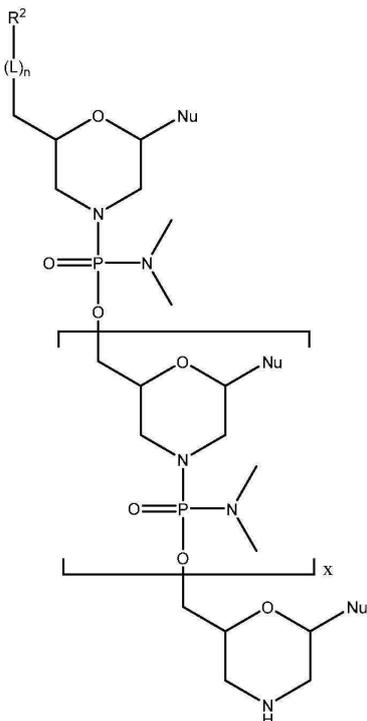
[0226]

[0227] 이고;

[0228] R³은 수소이고; R⁴은 전자쌍이다.

[0229] 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 하기 화학식 V의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이고,

[0230] <화학식 V>



[0231]

[0232]

여기서,

[0233]

각각의 Nu는 함께 취해져 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

[0234]

x는 8 내지 38의 정수이고; 각각의 L은 $-P(O)_2OH^-$, $-P(O)_2R^1-$, $-P(O)_2(N(CH_3)_3-N(CH_3)CH_2C(O)NH_2$, 피페라지닐기, 카르보닐기, $H(O(CH_2)_sO)_w-$, $-(OCH_2CH_2O)_w$, 및 $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 w는 3-20으로부터 선택된 정수이고, S는 1 내지 8로부터 선택된 정수이고, R'은 자연 발생 아미노산 또는 그의 일- 또는 이-탄소 상동체의 측쇄이고, R''은 수소 또는 아실로부터 선택되고, m은 1 내지 60의 정수이고;

[0235]

n은 0 내지 3의 정수이고; R^2 은 수소, OH, 뉴클레오티드, $-(CH_2)_mC(O)NR^fR^g$ (여기서 R^f 및 R^g 은 H, 아실, C_1-C_6 알킬, 및 $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$ 로부터 독립적으로 선택됨), $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$, $H(O(CH_2)_sO)_w-$, $H(OCH_2CH_2O)_w-$, 트리틸, $-C(=O)OR^f$, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R^f 은 하나 이상의 산소 또는 히드록실 모이 어티 또는 그의 조합을 포함하는 C_1-C_{30} 알킬이거나, 또는 R^2 은 부재하고,

[0236]

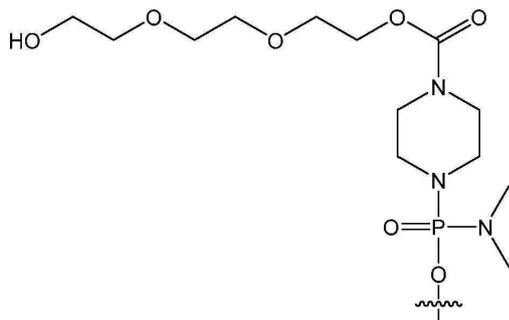
여기서 표적화 서열은 인간 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA의 인트론 1(서열 1), 인트론 2(서열 2), 또는 엑손 2(서열 3) 내의 영역에 상보적이다.

[0237]

일부 실시양태에서, n은 2이고;

[0238]

함께 취해진 R^2 및 L은 하기 화학식



[0239]

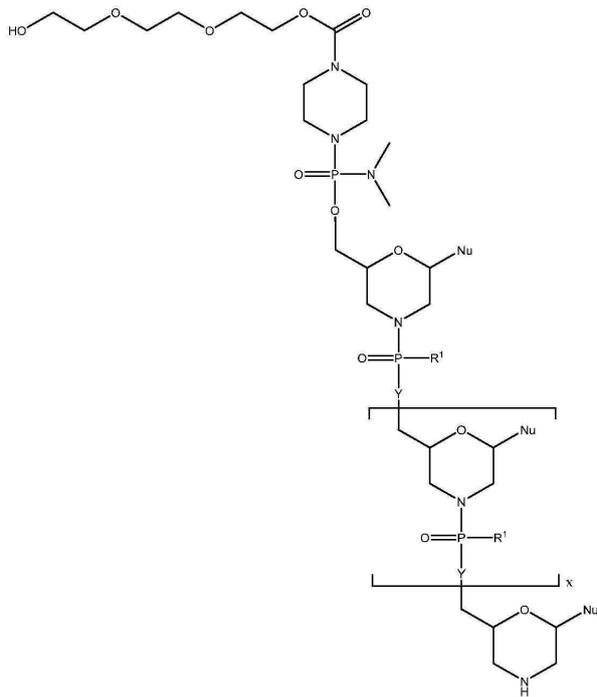
이다.

[0240]

[0241]

특정 실시양태에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 하기 화학식 VI의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이고,

[0242] <화학식 VI>



[0243]

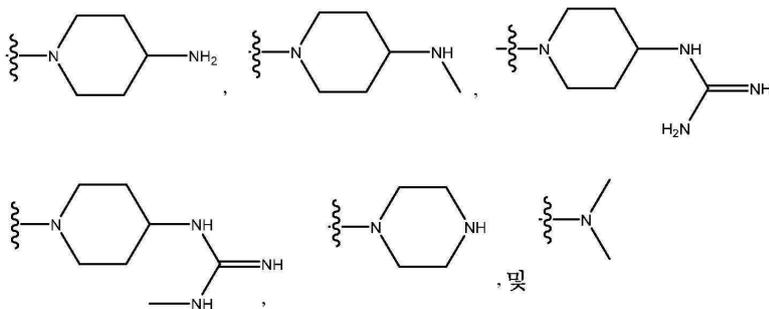
[0244] 여기서,

[0245] 각각의 Nu는 함께 취해져 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

[0246] x는 15 내지 25의 정수이고;

[0247] 각각의 Y는 O이고;

[0248] 각각의 R¹은



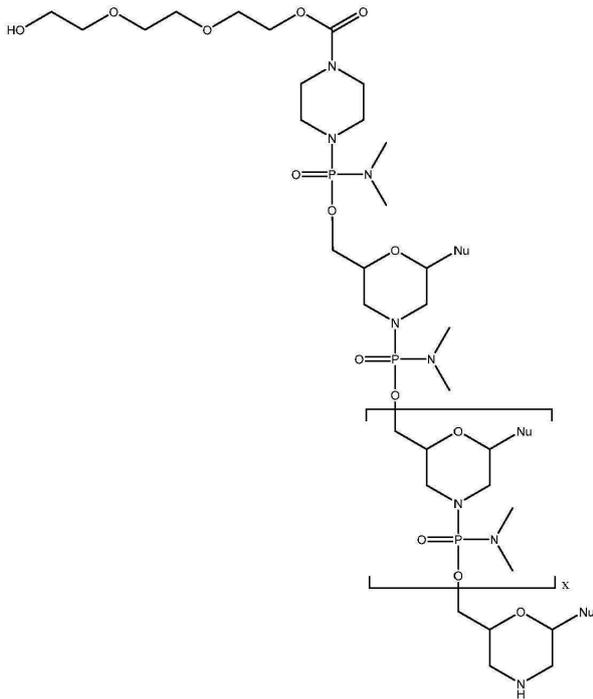
[0249]

[0250] 으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 적어도 하나의 R¹은 -N(CH₃)₂이고, 여기서 표적화 서열은 서열 4-120으로부터 선택되고, 여기서 X는 우라실(U) 또는 티민(T)으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 각각의 R¹은 -N(CH₃)₂이다.

[0251] 일부 실시양태에서, 화학식 I, IV, V, 및 VI의 화합물을 포함하는 본 개시의 안티센스 올리고머의 각각의 Nu는 아데닌, 구아닌, 티민, 우라실, 시토신, 히포산틴, 2-6-디아미노퓨린, 5-메틸 시토신, C5-프로피닐-개질된 피리미딘, 및 9-(아미노에톡시)페녹사진으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시양태에서, 화학식 I, IV, V, 및 VI의 화합물을 포함하는 본 개시의 안티센스 올리고머의 표적화 서열은 서열 4 내지 120으로부터 선택되고, 여기서 X는 우라실(U) 또는 티민(T)으로부터 선택된다.

[0252] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 하기 화학식 VII의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이고,

[0253] <화학식 VII>



[0254]

[0255] 여기서,

[0256] 각각의 Nu는 함께 취해져 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

[0257] x는 8 내지 38의 정수이고;

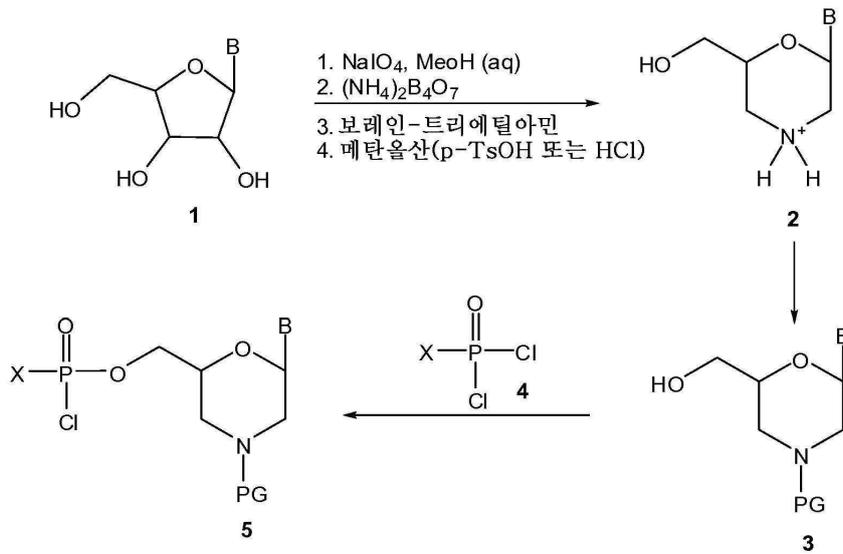
[0258] 여기서 표적화 서열은 서열 4-120으로부터 선택되고, 여기서 X는 우라실(U) 또는 티민(T)으로부터 선택된다.

[0259] 본 개시에 따라 사용될 수 있는 부가적 안티센스 올리고머/화학은 그의 내용이 참조문헌으로 본원에 포함되는 다음 특허 및 특허출원에 개시된 것을 포함한다: PCT 공개공보 제WO/2007/002390호; 제WO/2010/120820호; 및 제WO/2010/148249호; U.S. 특허 제7,838,657호; 및 U.S. 출원 제2011/0269820호.

[0260] **C. 염기성 질소 뉴클레오시드간 링커를 갖는 PMO-X의 제조.**

[0261] 모르폴리노 서브유닛, 개질된 서브유닛간 연결, 및 그를 포함하는 올리고머는 예컨대, 그의 전부가 참조문헌으로 포함된 U.S. 특허 제5,185,444호, 및 제7,943,762호에 기재된 것과 같이 제조될 수 있다. 모르폴리노 서브유닛은 다음 일반 반응도(I)에 따라 제조될 수 있다.

[0262] 반응도 1. 모르폴리노 서브유닛의 제조



[0263]

[0264]

B가 염기 쌍형성 모이어티를 나타내고 PG가 보호기를 나타내는 반응도 1을 보면, 모르폴리노 서브유닛은 나타난 것과 같이 해당 리보뉴클레오사이드(1)로부터 제조될 수 있다. 모르폴리노 서브유닛(2)은 적합한 보호기 전구체, 예컨대 트리틸 클로라이드와의 반응에 의해 임의적으로 보호될 수 있다. 3' 보호기는 일반적으로 하기에서 보다 상세하게 기재되는 것과 같이 고체-상태 올리고머 합성 도중 제거된다. 염기 쌍형성 모이어티는 고체상 올리고머 합성을 위해 적절히 보호될 수 있다. 적합한 보호기는 아데닌 및 시토신에 대해 벤조일, 구아닌에 대해 페닐아세틸, 및 히포산틴(I)에 대해 피발로일록시메틸을 포함한다. 피발로일록시메틸기는 히포산틴 헤테로시클릭 염기의 N1번에 도입될 수 있다. 비보호된 히포산틴 서브유닛이 이용될 수 있지만, 활성 반응의 수율은 염기가 보호될 경우 훨씬 더 우수하다. 다른 적합한 보호기는 그의 전부가 참조문헌으로 본원에 포함된, 공동 출원 계속 중인 U.S. 출원 제12/271,040호에 개시된 것을 포함한다.

[0265]

활성화된 인 화합물(4)과의 반응(3)은 바람직한 연결 모이어티(5)를 갖는 모르폴리노 서브유닛을 생성한다. 구조(4)의 화합물은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 개수의 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예컨대, 이러한 화합물은 해당 아민 및 인 옥시클로라이드의 반응에 의해 제조될 수 있다. 이와 관련하여, 아민 출발 물질은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예컨대 실시예 및 U.S. 특허 제7,943,762호에 기재된 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0266]

구조(5)의 화합물은 서브유닛간 연결을 포함하는 올리고머의 제조를 위해 고체-상태 자동화된 올리고머 합성에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 간략하게, 구조(5)의 화합물은 5' 말단에서 개질되어 고체 지지체에 대한 링커를 함유할 수 있다. 예컨대, 화합물(5)은 L^{11} 및 L^{15} 을 포함하는 링커에 의해 고체 지지체에 연결될 수 있다. 예시적 방법은 도 1 및 2에 설명된다. 일단 지지되면, 보호기(예컨대, 트리틸)는 제거되고 유리 아민은 구조(5)의 제2 화합물의 활성화된 인 모이어티와 반응한다. 이 순서는 바람직한 길이의 올리고가 얻어질 때까지 반복된다. 말단부 5' 말단의 보호기는 제거되거나 또는 만약 5'-개질이 바람직하다면 남겨질 수 있다. 올리고는 임의의 수의 방법, 예컨대 도 3 및 4에 도시된 것과 같이 DTT 처리 후 암모늄 히드록시드 처리를 사용하여 고체 지지체로부터 제거될 수 있다.

[0267]

개질된 모르폴리노 서브유닛 및 모르폴리노 올리고머의 제조는 실시예에 더 상술된다. 임의의 개수의 개질된 연결을 함유하는 모르폴리노 올리고머는 본원에 기재된 방법, 관련 기술분야에 공지된 방법 및/또는 본원의 참조문헌에 기재된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 이전에 기재된 것과 같이 제조된 모르폴리노 올리고머의 전반적 개질도 또한 실시예에 기재된다(PCT 공개공보 제W02008036127호 참조).

[0268]

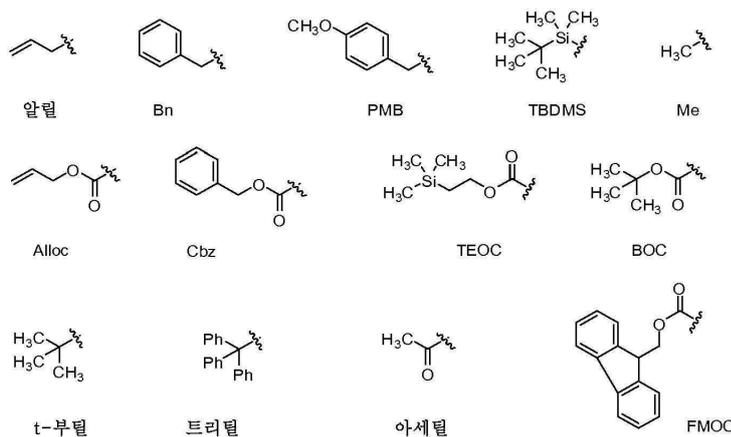
용어 "보호기"는 보호기가 제거될 때까지 화합물의 일부 또는 모든 반응성 모이어티를 차단하고 이러한 모이어티가 화학 반응에 참여하지 못하게 하는 화학적 모이어티, 예컨대, 문헌[T.W. Greene, P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd ed. John Wiley & Sons (1999)]에 나열되고 기재된 모이어티를 의미한다. 상이한 보호기가 이용될 경우, 각각의 (상이한) 보호기가 상이한 수단에 의해 제거될 수 있는 것이 이룰 수 있다. 완전히 이질적인 반응 조건 하에서 절단되는 보호기는 이러한 보호기의 차등적 제거를 허용한

다. 예컨대, 보호기는 산, 염기, 및 가수소분해에 의해 제거될 수 있다. 트리틸, 디메톡시트리틸, 아세틸 및 tert-부틸디메틸실릴과 같은 기는 산 분해성이고, 가수소분해에 의해 제거가능한 Cbz 기 및 염기 분해성인 Fmoc 기로 보호된 아미노기의 존재 하에서 카르복실 및 히드록시 반응 모이어티를 보호하기 위해 사용될 수 있다. 카르복실산 모이어티는 메틸, 또는 에틸과 같은 염기 분해성 기에 의해 제한 없이 차단될 수 있고, 히드록시 반응성 모이어티는 tert-부틸 카르바메이트와 같은 산 분해성 기에 의해 또는 산 및 염기 양 쪽 모두에서 안정하지만 가수분해적으로 분해가능한 카르바메이트에 의해 차단된 아민의 존재 하에서 아세틸과 같은 염기 분해성 기로 차단될 수 있다.

[0269] 카르복실산 및 히드록실 반응성 모이어티는 벤질기와 같은 가수분해적으로 제거가능한 보호기에 의해 또한 차단될 수 있는 반면, 아민기는 Fmoc와 같은 염기 분해성 기에 의해 차단될 수 있다. 화학식 I의 화합물의 합성을 위해 특히 유용한 아민 보호기는 트리플루오로아세트아미드이다. 카르복실산 반응성 모이어티는 2,4-디메톡시벤질과 같은 산화적으로 제거가능한 보호기에 의해 차단될 수 있는 반면, 공동 존재하는 아미노기는 플루오라이드 분해성 실릴 카르바메이트에 의해 차단될 수 있다.

[0270] 안정하고 금속 또는 파이-산 촉매에 의해 후속 제거될 수 있기 때문에, 알릴 차단기는 산- 및 염기- 보호기의 존재 하에서 유용하다. 예컨대, 알릴-차단된 카르복실산은 산 분해성 t-부틸 카르바메이트 또는 염기-분해성 아세테이트 아민 보호기의 존재 하에서 팔라듐(0)-촉매된 반응에 의해 탈보호될 수 있다. 또한, 또다른 형태의 보호기는 화합물 또는 중간체가 부착될 수 있는 수지이다. 잔기가 수지에 부착된 이상, 관능기는 차단되고 반응할 수 없다. 일단 수지로부터 방출되면, 관능기는 반응할 수 있다.

[0271] 전형적인 차단/보호기는 관련 기술분야에 공지되어 있고 다음 모이어티를 포함하지만 이에 제한되지 않는다:



[0272]

[0273] 달리 표시되지 않는 이상, 모든 화합물질은 시그마-알드리치-플루카(Sigma-Aldrich-Fluka)에서 얻었다. 벤조일 아데노신, 벤조일 시티딘, 및 페닐아세틸 구아노신은 영국 카르보신스 리미티드(Carbosynth Limited)에서 얻었다.

[0274] 본원에 개시된 것과 같은 추가적 연결 개질을 함유하는 PMO, PMO+, PPMO, 및 PMO-X의 합성은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 수행되었고, 그의 전부가 본원에 참조문헌으로 포함된 출원계속 중인 U.S. 출원 제 12/271,036호 및 제12/271,040호 및 PCT 공개공보 제W0/2009/064471호에 기재되었다.

[0275] 3' 트리틸 개질을 갖는 PMO는 탈트리틸화 단계가 생략된 예외를 제외하면 본질적으로 PCT 공개공보 제 W0/2009/064471호에 기재된 것과 같이 합성된다.

[0276] **IV. 제형**

[0277] 본 개시의 화합물은 또한 혼합되거나, 캡슐화되거나, 접합되거나, 또는 다른 분자, 분자 구조 또는 화합물의 혼합물, 예컨대, 리포솜, 수용체-표적화된 분자, 구강, 직장, 국소적 또는 다른 제형, 섭취, 분배 및/또는 흡수를 도와주기 위한 다른 제형에 달리 연관될 수 있다. 이러한 섭취, 배포, 및/또는 흡수-보조 제형의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 각각 참조문헌으로 본원에 포함되는 U.S. 특허 제5,108,921호; 제5,354,844호; 제5,416,016호; 제5,459,127호; 제5,521,291호; 제5,543,158호; 제5,547,932호; 제5,583,020호; 제5,591,721호; 제4,426,330호; 제4,534,899호; 제5,013,556호; 제5,108,921호; 제5,213,804호; 제5,227,170호; 제5,264,221호; 제5,356,633호; 제5,395,619호; 제5,416,016호; 제5,417,978호; 제5,462,854호;

제5,469,854호; 제5,512,295호; 제5,527,528호; 제5,534,259호; 제5,543,152호; 제5,556,948호; 제5,580,575호; 및 제5,595,756호를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- [0278] 본 개시의 안티센스 화합물은 임의의 제약상 허용되는 염, 에스테르, 또는 이러한 에스테르의 염, 또는 인간을 포함한 동물에 투여시 생물학적으로 활성인 대사물질 또는 그의 잔여물을 (직접적으로 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 임의의 다른 화합물을 망라한다. 이에 따라, 예컨대, 본 개시는 본 개시의 화합물의 전구약물 및 제약상 허용되는 염, 이러한 전구약물의 제약상 허용되는 염, 및 다른 생물학적 동등물에도 또한 관련된다.
- [0279] 용어 "전구약물"은 내인성 효소 또는 다른 화학물질의 작용 및/또는 조건에 의한 신체 또는 그의 세포 내의 활성형(즉, 약물)으로 전환되는 비활성형으로 제조된 치료제를 나타낸다. 구체적으로, 본 개시의 올리고머의 전구약물 버전은 문헌[W0 93/24510 to Gosselin et al., published Dec. 9, 1993] 또는 문헌[W0 94/26764 and U.S. Pat. No. 5,770,713 to Imbach et al]에 개시된 방법에 따른 SATE [(S-아세틸-2-티오에틸) 포스페이트] 유도체로 제조된다.
- [0280] 용어 "제약상 허용되는 염"은 본 개시의 화합물의 생리학적 및 제약상 허용되는 염: 즉, 모화합물의 바람직한 생물학적 활성을 유지하면서 그에 바람직하지 않는 독성학적 효과를 부여하지는 않는 염을 의미한다. 올리고머에서, 제약상 허용되는 염 및 그의 용도의 예시는 그의 전부가 본원에 포함되는 U.S. 특허 제6,287,860호에 추가로 개시된다.
- [0281] 본 개시는 본 개시의 안티센스 화합물을 포함하는 약학적 조성물 및 제형을 또한 포함한다. 본 개시의 약학적 조성물은 국부 또는 전신 치료를 원하는지에 따라 그리고 치료되는 영역에 따라 많은 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 국소적(눈 및 질 및 직장을 포함하는 점막에의 전달을 포함), 폐, 예컨대, 네블라이저를 포함하는 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 통기에 의해(기관내, 비강내, 표피, 경피), 경구 또는 비경구일 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내, 또는 근육내 주사 또는 주입; 또는 두개내, 예컨대, 척추강내 또는 뇌실내 투여를 포함한다. 하나 이상의 2'-O-메톡시에틸 개질을 갖는 올리고머는 경구 투여에 특히 유용한 것이라 여겨진다. 국소 투여를 위한 제약 조성물 및 제형은 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 드롭, 좌약, 스프레이, 액체 및 분말을 포함할 수 있다. 종래의 제약 담체, 수성, 분말 또는 오일성 베이스, 점증제 등이 필요하거나 또는 바람직할 수 있다. 코팅된 콘돔, 글로브 등이 또한 유용할 수 있다.
- [0282] 전통적으로 단위 투여형으로 나타날 수 있는 본 개시의 약학적 제형은 제약 산업에 널리 공지된 종래 기법에 따라 제조될 수 있다. 이러한 기법은 약학적 담체(들) 또는 부형제(들)을 유효 성분에 연합하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 균일하게 및 충실히 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 양쪽 모두를 유효 성분에 연합하고, 그 다음, 만약 필요하다면, 제품을 성형함으로써 제조된다.
- [0283] 본 개시의 조성물은 임의의 많은 가능한 투여형 예컨대, 정제, 캡슐, 젤 캡슐, 액체 시럽, 연성 젤, 좌약, 및 관장제로 제형화될 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 본 개시의 조성물은 또한 수성, 비-수성 또는 혼합 매질내 현탁액으로 제형화될 수 있다. 수성 현탁액은 예컨대, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 소르비톨, 및/또는 텍스트란을 포함하는 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 추가로 함유할 수 있다. 현탁액은 또한 안정화제를 함유할 수 있다.
- [0284] 본 개시의 제약 조성물은 용액, 에멀전, 폼 및 리포솜-함유 제형을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 개시의 제약 조성물 및 제형은 하나 이상의 경피흡수 촉진제, 담체, 부형제 또는 다른 유효 또는 비유효 성분을 포함할 수 있다.
- [0285] 에멀전은 통상적으로, 지름 0.1 μm 을 보통 초과하는 액적의 형태로 또다른 액체에 분산된 한 액체의 비균일 시스템이다. 에멀전은 분산된 상에 추가로 부가적 성분, 및 수성 상, 오일 상 또는 분리된 상 그 자체로 용액으로서 존재할 수 있는 활성 약물을 함유할 수 있다. 마이크로에멀전은 본 개시의 실시양태로서 포함된다. 에멀전 및 그의 용도는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고 그의 전부가 본원에 포함된 U.S. 특허 제6,287,860호에 추가로 기재된다.
- [0286] 본 개시의 제형은 리포솜 제형을 포함한다. 본 개시에서 사용된, 용어 "리포솜"은 구형 이중층 또는 이중층들로 배열된 양친매성 액체로 구성된 소포를 의미한다. 리포솜은 친유성 물질로부터 형성된 막 및 전달될 조성물을 함유하는 수성 내부공간을 갖는 단층 또는 다층 소포이다. 양이온성 리포솜은 음성적으로 하전된 DNA 분자와 상호작용하여 안정한 복합체를 형성한다고 여겨지는 양성적으로 하전된 리포솜이다. pH-민감성이거나 또는 음성-하전된 리포솜은 그와 복합체를 형성하기보다는 DNA를 포획한다고 여겨진다. 양이온성 및 비양이온성 리포솜 둘 모두는 세포에 DNA를 전달하기 위해 사용됐다.

- [0287] 리포솜은, 본원에 사용되기로, 리포솜으로 도입될 경우 이러한 특화된 지질이 없는 리포솜에 비해 강화된 순환 수명을 가져오는 하나 이상의 특화된 지질을 포함하는 리포솜을 의미하는 용어인 "입체적으로 안정된" 리포솜을 또한 포함한다. 입체적으로 안정화된 리포솜의 예시는 리포솜의 소포 형성 지질 부위의 부분이 하나 이상의 글리코지질을 포함하거나 또는 하나 이상의 친수성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티에서 유래된 것들이다. 리포솜 및 그의 용도는 그의 전부가 본원에 포함된 U.S. 특허 제6,287,860호에 추가로 개시된다.
- [0288] 본 개시의 약학적 제형 및 조성물은 계면활성제를 또한 포함한다. 약물 제품, 제형 및 에멀전에서 계면활성제의 용도는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 계면활성제 및 그의 용도는 그의 전부가 본원에 포함된 U.S. 특허 제6,287,860호에 추가로 기재된다.
- [0289] 일부 실시양태에서, 본 개시는 핵산, 특히 올리고머의 효율적인 전달을 구현하기 위해 다양한 경피흡수 촉진제를 이용한다. 세포막을 통한 비-친유성 약물의 확산을 보조하는 것에 더해, 경피흡수 촉진제는 친유성 약물의 흡수성을 또한 강화한다. 경피흡수 촉진제는 5가지 넓은 카테고리, 즉, 계면활성제, 지방산, 담즙 염, 킬레이트제, 및 비-킬레이팅 비-계면활성제 중 하나에 속하는 것으로 분류될 수 있다. 경피흡수 촉진제 및 그의 용도는 그의 전부가 본원에 포함된 U.S. 특허 제6,287,860호에 추가로 기재된다.
- [0290] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 제형이 그의 의도된 용도, 즉 투여의 경로에 따라 상용적으로 디자인된다는 것을 인식할 것이다.
- [0291] 국소 투여를 위한 제형은 본 개시의 올리고머가 국소 전달 제제 예컨대 지질, 리포솜, 지방산, 지방산 에스테르, 스테로이드, 킬레이트제 및 계면활성제와의 혼합물인 것을 포함한다. 지질 및 리포솜은 중성(예컨대, 디올레오일포스파티딜 DOPE 에탄올라민, 디미리스토일포스파티딜 콜린 DMPC, 디스테아로일포스파티딜 콜린) 음성(예컨대, 디미리스토일포스파티딜 글리세롤 DMPG) 및 양이온성(예컨대, 디올레오일테트라메틸아미노프로필 DOTAP 및 디올레오일포스파티딜 에탄올라민 DOTMA)을 포함한다.
- [0292] 국소 또는 다른 투여를 위해, 본 개시의 올리고머는 리포솜 내에 캡슐화될 수 있거나 또는 그것에, 특히 양이온성 리포솜에 복합체를 형성할 수 있다. 대안으로, 올리고머는 지질에, 특히 양이온성 지질에 복합체 형성될 수 있다. 지방산 및 에스테르, 그의 제약상 허용되는 염, 및 그의 용도는 그의 전부가 본원에 포함된 U.S. 특허 제6,287,860호에 추가로 기재된다. 국소 제형은 그의 전부가 참조문헌으로 본원에 포함된, 1999년 5월 20일자 출원된 U.S. 특허출원 제09/315,298호에 상술된다.
- [0293] 경구 투여를 위한 조성물 및 제형은 분말 또는 과립, 마이크로입자, 나노입자, 물 또는 비-수성 매질 내 현탁액 또는 용액, 캡슐, 겔 캡슐, sachets, 정제 또는 미니정제를 포함한다.
- [0294] 점증제, 방향제, 희석제, 유화제, 분산 조제 또는 결합제가 바람직할 수 있다. 경구 제형은 본 개시의 올리고머가 하나 이상의 경피흡수 촉진제, 계면활성제 및 킬레이터와 결합되어 투여되는 것들이다. 계면활성제는 지방산 및/또는 에스테르 또는 그의 염, 담즙산 및/또는 그의 염을 포함한다. 담즙 산/염 및 지방산 및 그의 용도는 그의 전부가 본원에 포함된 U.S. 특허 제6,287,860호에 추가로 기재된다. 일부 실시양태에서, 본 개시는 경피흡수 촉진제의 조합, 예컨대, 담즙산/염과 결합된 지방산/염을 제공한다. 예시적 조합은 라우릴산, 카프르산 및 UDCA의 소듐 염이다. 추가의 경피흡수 촉진제는 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-20-세틸 에테르를 포함한다. 본 개시의 올리고머는 분무된 건조 입자를 포함하거나, 또는 복합체 형성되어 마이크로 또는 나노입자를 형성하도록 과립형으로 경구로 전달될 수 있다. 올리고머 착화제 및 그의 용도는 그의 전부가 본원에 포함된 U.S. 특허 제6,287,860호에 추가로 개시된다. 올리고머를 위한 경구 제형 및 그의 침투는 그의 전부가 참조문헌으로 본원에 포함된 U.S. 출원 제09/108,673호(1998년 7월 1일자 출원), 제09/315,298호(1999년 5월 20일자 출원) 및 2002년 2월 8일자 출원된 제10/071,822호에 상술된다.
- [0295] 비경구, 척추강내 또는 뇌실내 투여를 위한 조성물 및 제형은 완충액, 희석제 및 다른 적합한 첨가제, 예컨대, 이에 제한되지 않고, 경피흡수 촉진제, 담체 화합물 및 다른 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 또한 함유할 수 있는 멸균 수성 용액을 포함할 수 있다.
- [0296] 본 개시의 특정 실시양태는 하나 이상의 올리고머 화합물 및 비-안티센스 메커니즘에 의해 기능하는 하나 이상의 다른 화학치료제를 함유하는 제약 조성물을 제공한다. 이러한 화학치료제의 예시는 암 화학치료제 예컨대 다우노루비신, 다우노마이신, 닥티노마이신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 에소루비신, 블레오마이신, 마포스파미드, 이포스파미드, 시토신 아라비노시드, 비스-클로로에틸니트로스우레아, 부술판, 미토마이신 C, 악티노마이신 D, 미트라마이신, 프레드니손, 히드록시프로게스테론, 테스토스테론, 타목시펜, 다카바진, 프로카바진, 핵사메틸멜라민, 펜타메틸멜라민, 미톡산트론, 암사크린, 클로람부실, 메틸시클로헥실니트로스우레아, 질소

머스타드, 멜팔란, 시클로포스파미드, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-아자시티딘, 히드록시우레아, 데옥시코-포르마이신, 4-히드록시피옥시시클로포스포라미드, 5-플루오로우라실(5-FU), 5-플루오로데옥시우리딘(5-FUdR), 메토티렉세이트(MTX), 콜히친, 텍솔, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드(VP-16), 트리메트렉세이트, 이리노테칸, 토포테칸, 겐시타빈, 테니포시드, 시스플라틴 및 디에틸stil베스트롤(DES)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 개시의 화합물과 함께 사용될 경우, 이러한 화학치료제는 개별적으로(예컨대, 5-FU 및 올리고머), 순차적으로(예컨대, 일정 기간의 5-FU 및 올리고머 후 MTX 및 올리고머), 또는 하나 이상의 다른 이러한 화학치료제와 조합하여(예컨대, 5-FU, MTX 및 올리고머, 또는 5-FU, 방사성요법 및 올리고머) 사용될 수 있다. 비스테로이드성 항-염증성 약물 및 코르티코스테로이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 항-염증성 약물, 및 리비비린, 비다라빈, 아시클로비르 및 간시클로비르를 포함하지만 이에 제한되지 않는 항바이러스성 약물이 본 개시의 조성물과 또한 조합될 수 있다. 안티센스 화합물 및 다른 비-안티센스 약물의 조합도 또한 본 개시의 범위 내에 있다. 둘 이상 조합되는 화합물은 함께 또는 순차적으로 사용될 수 있다.

[0297] 또다른 관련 실시양태에서, 본 개시의 조성물은 제1 핵산에 표적화된 하나 이상의 안티센스 화합물, 특히 올리고머, 및 제2 핵산 표적에 표적화된 하나 이상의 부가적 안티센스 화합물을 함유할 수 있다. 대안으로, 본 개시의 조성물은 동일한 핵산 표적의 상이한 영역에 표적화된 둘 이상의 안티센스 화합물을 함유할 수 있다. 안티센스 화합물의 많은 예시가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 둘 이상의 복합 화합물은 함께 또는 순차적으로 사용될 수 있다.

[0298] **V. 사용 방법**

[0299] 특정 실시양태는 치료 목적을 위해(예컨대, GSD-II를 갖는 대상체의 치료) 본 개시의 안티센스 올리고머를 사용하여 엑손 2-함유 GAA mRNA 및/또는 단백질의 발현을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 이에 따라, 일부 실시양태에서, 본 개시는 대상체에 본 개시의 안티센스 올리고머의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, GSD-II에 의해 고통받거나 발달 위험에 처해 있는 개인을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 충분한 길이 및 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA 내의 영역에 특이적으로 혼성화하는 상보성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 여기서 상기 영역에 대한 안티센스 올리고머의 결합은 대상체의 세포 및/또는 조직 내 엑손 2-함유 GAA mRNA의 수치를 증가시킨다. 예시적 안티센스 표적화 서열은 표 2에 나타난다.

[0300] 충분한 길이 및 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA 내의 영역에 특이적으로 혼성화하는 상보성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 여기서 상기 영역에 대한 안티센스 올리고머의 결합이 엑손 2-함유 GAA mRNA의 수치를 증가시키는 것인, 글리코겐 축적 질환 유형 II(GSD-II; 폼페병)의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 안티센스 올리고머가 또한 포함된다.

[0301] GSD-II의 치료 방법 또는 GSD-II의 치료를 위한 의약의 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머 화합물은:

[0302] 포스포라미데이트 또는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO), 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 포스포로티오에이트 올리고머, 트리스클로-DNA 올리고머, 트리스클로-포스포로티오에이트 올리고머, 2'-O-Me-개질된 올리고머, 또는 상기의 임의의 조합으로부터 선택된 비-천연 화학적 백본; 및

[0303] 인간 산성 알파-글루코시다제(GAA) 유전자의 프리-mRNA의 인트론 1(서열 1), 인트론 2(서열 2), 또는 엑손 2(서열 3) 내의 영역에 상보적인 표적화 서열

[0304] 을 포함한다.

[0305] 상기된 것과 같이, "GSD-II"는 글리코겐 축적 질환 유형 II(GSD-II 또는 폼페병), 발병한 개인에서 GAA 단백질의 하향 발현을 보통 특징으로 하는 인간 상염체성 열성 질환을 의미한다. 소아 GSD-II를 갖는 대상체 및 질환의 후기 발병형을 갖는 대상체가 포함된다.

[0306] 특정 실시양태에서, 대상체는 심장, 골격근, 간, 및 신경계 조직을 포함하는 하나 이상의 조직 내 GAA 단백질의 발현 및/또는 활성이 (예컨대, 건강한 대상체 또는 보다 초기 시점에 비해) 감소된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 심장, 골격근, 간, 및 신경계 조직을 포함하는 하나 이상의 조직 내 글리코겐의 축적이 (예컨대, 건강한 대상체 또는 보다 초기 시점에 비해) 증가된다. 특이적 실시양태에서, 대상체는 기능성 GAA 단백질의 발현 감소로 이어질 수 있는 다른 돌연변이(들)과 결합할 수도 있는, 하나 이상의 IVS1-13T>G 돌연변이(c.336-13T>G로도 또한 언급됨)를 갖는다. GSD-II에 사용된 분자 유전학 테스트의 요약이 하기 표 3에 나타난다.

[0307] <표 3>

유전자 기호	테스트 방법	검출된 돌연변이	테스트 방법에 의한 돌연변이 검출 빈도	테스트 유용성
GAA	서열 분석	p.Arg854*	~50%-60%	임상적
		p.Asp645Glu	~40%-80%	
		IVS1-13T>G	~50%-85%	
		유전자의 다른 서열 변이체	83%-93%	
	선택 엑손의 서열 분석	선택 엑손의 서열 변이체	83%-93%	
	표적화된 돌연변이 분석	표적화된 장소의 서열 변이체	표적화된 돌연변이 중 변이체에 대해 100%	
검출/중복 분석	엑손 및 전체-개놈 삭제/중복	5%-13%		

[0308]

[0309]

특정 실시양태는 본원에 기재된 것과 같이, 세포, 조직, 및/또는 대상체 내 엑손 2-함유 GAA mRNA 또는 단백질의 발현을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 일부 예시에서, 엑손-2 함유 GAA mRNA 또는 단백질은 대조군, 예컨대, 대조군 세포/대상체, 안티센스 올리고머가 없는 대조군 조성물, 치료의 부재, 및/또는 보다 초기 시점에 비해 약 또는 적어도 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 만큼 증가한다. 건강한 대조군의 수치에 비해 엑손-2 함유 GAA mRNA 또는 단백질의 발현을 유지하는 방법이 또한 포함된다.

[0310]

일부 실시양태는 본원에 기재된 세포, 조직, 및/또는 대상체 내 기능성/활성 GAA 단백질의 발현을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 특정 예시에서, 기능성/활성 GAA 단백질의 수치는 대조군, 예컨대, 대조군 세포/대상체, 안티센스 올리고머가 없는 대조군 조성물, 치료의 부재, 및/또는 보다 초기 시점에 비해 약 또는 적어도 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 만큼 증가한다. 건강한 대조군의 수치에 비해 기능성/활성 GAA 단백질의 발현을 유지하는 방법도 또한 포함된다.

[0311]

구체적 실시양태는 본원에 기재된 것과 같이 하나 이상의 세포, 조직, 및/또는 대상체 내 글리코겐의 축적을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 특정 예시에서, 글리코겐의 축적은 대조군, 예컨대 대조군 세포/대상체, 안티센스 올리고머가 없는 대조군 조성물, 치료의 부재, 및/또는 보다 초기 시점에 비해 약 또는 적어도 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 만큼 감소된다. 세포, 조직, 및/또는 대상체 내 정상이거나 또는 달리 건강한 글리코겐 수치(예컨대, 무증상 수치 또는 GSD-II의 감소된 증상과 연관된 수치)를 유지하는 방법도 또한 포함된다.

[0312]

이를 필요로 하는 대상체에서 GSD-II의 하나 이상의 증상을 감소시키는 방법도 또한 제공된다. 구체적 예시는 소아 GSD-II의 증상 예컨대 심장 비대증, 저안압, 심근증, 좌심실 유출로 협착, 호흡 장애, 운동 지연/근력 저하, 및 섭식장애/성장장애를 포함한다. 부가적 예시는 후기 발병 GSD-II의 증상 예컨대 근력 저하(예컨대, 진행성 근력 저하를 포함하는 골격근 약화), 기침 악화, 재발성 흉부 감염, 저안압, 지연된 운동 이정표, 연하 또는 저작 곤란, 및 폐활량 감소 또는 호흡 부전을 포함한다.

[0313]

본 개시의 안티센스 올리고머는 GSD-II를 치료되는 대상체에 (예방적으로 또는 치료적으로) 투여될 수 있다. 이러한 치료와 함께, 개놈약학(즉, 개인의 유전자형 및 외부 화합물 또는 약물에 대한 개인의 반응 간의 연관관계의 연구)이 고려될 수 있다. 치료의 대사의 차이는 약리학적으로 활성 약물의 투여량 및 혈중 농도 간의 관계를 변경시킴으로써 중증 독성 또는 치료적 실패로 이어질 수 있다.

[0314]

따라서, 내과의 또는 임상적의 치료제를 투여할 것인지를 결정하는 것 뿐만 아니라 치료제에 의한 치료의 투여량 및/또는 치료 요법을 미세조정하기 위해 관련 개놈약학 연구에서 얻은 지식을 적용하는 것을 고려할 수 있다.

[0315]

표적 핵산으로의 안티센스 올리고머의 효과적 전달은 치료의 일 측면이다. 안티센스 올리고머 전달의 경로는 경구 및 비경구 경로, 예컨대, 정맥내, 피하, 복강내, 및 근육내, 뿐만 아니라 흡입, 경피 및 국소 전달을 포함

하는 다양한 전신 경로를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 적절한 경로는 치료되는 대상체의 상태에 적절하게 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다. 혈관 또는 혈관의 순환, 혈액 또는 림프계, 및 뇌척수액은 RNA가 도입될 수 있는 비-제한적 장소이다. 직접적 CNS 전달이 이용될 수 있고, 예컨대, 대뇌 뇌실 또는 척추강내 투여가 투여의 경로로 사용될 수 있다.

[0316] 구체적 실시양태에서, 안티센스 올리고머(들)은 근육내 주사(IM)에 의해 대상체에 투여되고, 즉, 이들은 근육내 투여되거나 또는 전달된다. 근육내 주사 부위의 비-제한적 예시는 팔의 삼각 근육, 다리의 외측 광근 근육, 및 둔부의 복면 근육, 및 볼기의 배면 근육을 포함한다. 특이적 실시양태에서, PMO, PMO-X, 또는 PPMO는 IM에 의해 투여된다.

[0317] 특정 실시양태에서, 이를 필요로 하는 대상체는 중추 신경계 조직 내 글리코겐 축적이 일어난다. 예시는 중추 신경계 병리학이 GSD-II의 호흡 결함에 기여하는 예시를 포함한다(예컨대, 문헌[DeRuisseau et al., PNAS USA. 106:9419-24, 2009] 참조). 이에 따라, 본원에 기재된 안티센스 올리고머는 예컨대, 대상체가 CNS와 연관성을 갖는 GSD-II를 갖는 경우, 임의의 관련 기술분야에 알려진 방법으로 대상체의 신경계에 전달될 수 있다. 예컨대, 본 개시의 안티센스 올리고머의 말초 혈액 주사가 확산 및/또는 능동 수단을 통해 상기 체제를 말초 뉴런으로 전달하기 위해 사용될 수 있다. 대안으로, 안티센스 올리고머는 중추 신경계(CNS)의 뉴런 세포에 상기 체제의 전달을 달성하기 위해 혈액-뇌-장벽(BBB)의 통과를 용이하게 하도록 개질될 수 있다. 안티센스 올리고머 기술 및 전달 전략의 특정 최근 진보는 뉴런 장벽을 위한 안티센스 올리고머 사용의 범위를 확장했다(예컨대, 문헌[Forte, A., et al. 2005. Curr. Drug Targets 6:21-29; Jaeger, L. B., and W. A. Banks. 2005. Methods Mol. Med. 106:237-251; Vinogradov, S. V., et al. 2004. Bioconjug. Chem. 5:50-60] 참조; 상기 문헌은 참조문헌으로 그의 전부가 본원에 포함된다). 예컨대, 본 개시의 안티센스 올리고머는 펩티드 핵산(PNA) 화합물로 생성될 수 있다. PNA 체제는 BBB를 통과하는 것으로 각각 확인되었다(문헌[Jaeger, L. B., and W. A. Banks. 2005. Methods Mol. Med. 106:237-251]). 예컨대, 혈관작용제에 의한 대상체의 치료는 또한 BBB를 통한 수송을 용이하게 하는 것으로 기재되었다(Id). BBB를 통해 능동 수송된 체제로의 본 개시의 안티센스 올리고머의 계류도 전달 메카니즘으로 또한 사용될 수 있다. 이오핵술과 같은 대조 작용제와 함께(예컨대, 동일한 제형 내 별도로, 공동으로) 안티센스 체제의 투여는 그의 전부가 참조문헌으로 포함된 PCT 공개공보 제 WO/2013/086207호에 기재된 것과 같이 BBB를 통한 전달을 또한 용이하게 할 수 있다.

[0318] 특정 실시양태에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 경피적 방법으로(예컨대, 리포솜으로 임의적으로 패키징된 안티센스 올리고머와 함께 에멀전으로 안티센스 올리고머를 도입함으로써) 전달될 수 있다. 이러한 경피 및 에멀전/리포솜-매개 전달 방법은 관련 기술분야에, 예컨대, 그의 내용이 본원에 참조문헌으로 그의 전부가 포함된 U.S. 특허 제6,965,025호에 안티센스 올리고머의 전달을 위해 기재된다.

[0319] 본원에 기재된 안티센스 올리고머는 임플란트식 장치를 통해서도 또한 전달될 수 있다. 이러한 장치의 디자인은 예컨대, 그의 내용이 본원에 참조문헌으로 그의 전부가 포함된 U.S. 특허 제6,969,400호에 기재된 합성 임플란트 디자인과 함께 관련 기술분야에 인식된 프로세스이다.

[0320] 안티센스 올리고머는 관련 기술분야에 인식된 기법(예컨대, 트랜스펙션, 전기천공, 융합, 리포솜, 콜로이드 폴리머 입자 및 바이러스성 및 비-바이러스성 벡터 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 다른 수단)을 사용하여 세포에 도입될 수 있다. 선택된 전달의 방법은 적어도 올리고머 화학, 처리될 세포 및 세포의 위치에 따라 달라질 것이고 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 예컨대, 국제화는 리포솜을 인도하기 위해 표면에 특이적 마커를 갖는 리포솜, 표적 세포를 함유하는 조직에의 직접 주사, 또는 특이적 수용체-매개 흡수 등에 의해 달성될 수 있다.

[0321] 관련 기술분야에 공지된 것과 같이, 안티센스 올리고머는 예컨대 리포솜-매개 흡수, 지질 접합체, 폴리리신-매개 흡수, 나노입자-매개 흡수, 및 수용체-매개 엔도시토시스를 수반하는 방법, 뿐만 아니라 부가적인 비-엔도시토시스 전달 모드 예컨대 미세주입법, 투과화(예컨대, 스트렙토리신-0 투과화, 음이온성 펩티드 투과화), 전기천공법, 및 관련 기술분야에 공지된 다양한 비-침투적 비-엔도시토시스적 전달 방법(그의 전부가 참조문헌으로 포함된 문헌[Dokka and Rojanasakul, Advanced Drug Delivery Reviews 44, 35-49] 참조)을 사용하여 전달될 수 있다.

[0322] 안티센스 올리고머는 생리학적이고 및/또는 제약적으로 허용되는 임의의 종래 비히클 또는 담체로 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이용되는 임의의 다양한 표준 제약상 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 예시는 살린, 포스페이트 완충된 살린(PBS), 물, 수성 에탄올, 에멀전, 예컨대 오일/물 에멀전 또는 트리글리세리드 에멀전, 정제 및 캡슐을 포함하지만 이제 제한되지 않는다. 적합한 생리학적으로

허용가능한 담체의 선택은 선택된 투여의 모드에 따라 달라질 것이다. "제약상 허용되는 담체"는 제약적 투여에 적합한 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아성 및 항균성 제제, 등장성 및 흡수 지연 제제 등을 포함하도록 의도된다. 약학적으로 활성인 물질을 위한 이러한 매질 및 제제의 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 임의의 종래 매질 또는 제제가 활성 화합물에 부적합하지 않는 이상, 조성물에서 그의 사용이 고려된다. 보충적 활성 화합물도 또한 조성물에 도입될 수 있다.

[0323] 본 개시의 화합물(예컨대, 안티센스 올리고머)은 유리산 또는 유리염기로서 일반적으로 활용될 수 있다. 대안으로, 본 개시의 화합물은 산 또는 염기 부가염의 형태로 사용될 수 있다. 본 개시의 유리 아미노 화합물의 산 부가염은 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있고, 유기 및 무기산으로부터 형성될 수 있다. 적합한 유기산은 말레산, 푸마르산, 벤조산, 아스코르브산, 숙신산, 메탄술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 옥살산, 프로피온산, 타르타르산, 살리실산, 시트르산, 글루콘산, 락트산, 만델산, 시남산, 아스파르트산, 스테아르산, 팔미트산, 글리콜산, 글루탐산, 및 벤젠술폰산을 포함한다.

[0324] 적합한 무기산은 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 및 질산을 포함한다. 염기 부가염은 카르복실레이트 음이온과 함께 형성된 염을 포함하고, 유기 및 무기 양이온 예컨대 알칼리 및 알칼리 토금속(예컨대, 리튬, 소듐, 포타슘, 마그네슘, 바륨 및 칼슘), 뿐만 아니라 암모늄 이온 및 그의 치환된 유도체(예컨대, 디벤질암모늄, 벤질암모늄, 2-히드록시에틸암모늄 등)으로부터 선택된 양이온과 함께 형성된 염을 포함한다. 따라서, 용어 "제약상 허용되는 염"은 임의의 그리고 모든 허용가능한 염 형태를 망라하도록 의도된다.

[0325] 이에 더하여, 전구약물이 본 개시의 맥락 내에 또한 포함된다. 전구약물은 환자에게 투여될 경우 생체내에서 화합물을 방출하는 임의의 공유결합된 담체이다. 전구약물은 상용의 조작법에 의해 또는 생체내에서 개질체가 절단되어 모화합물을 방출하는 방식으로 관능기를 개질함으로써 일반적으로 제조된다. 전구약물은, 예컨대, 히드록시, 아민 또는 술폰히드릴기가 환자에게 투여될 경우, 절단되어 히드록시, 아민 또는 술폰히드릴기를 형성하는 임의의 기에 결합되는, 본 개시의 화합물을 포함한다. 따라서, 전구약물의 대표예는 본 개시의 안티센스 올리고머의 알콜 및 아민 관능기의 아세테이트, 포르메이트 및 벤조에이트 유도체를 포함한다(그러나 이에 제한되지 않음). 또한, 카르복실산(-COOH)의 경우, 메틸 에스테르, 에틸 에스테르 등과 같은 에스테르가 이용될 수 있다.

[0326] 일부 예시에서, 리포솜이 세포로의 안티센스 올리고머의 흡수를 촉진시키기 위해 이용될 수 있다(예컨대, 문헌 [Williams, S.A., Leukemia 10(12):1980-1989, 1996; Lappalainen et al., Antiviral Res. 23:119, 1994; Uhlmann et al., antisense oligomers: a new therapeutic principle, Chemical Reviews, Volume 90, No. 4, 25 pages 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Chapter 14, Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, pp. 287-341, Academic Press, 1979] 참조). 히드로겔이 예컨대, 제WO 93/01286호에 기재된 것과 같이 안티센스 올리고머 투여를 위한 비히클로 또한 사용될 수 있다. 대안으로, 올리고머는 마이크로스페어 또는 마이크로 입자로 투여될 수 있다(예컨대, 문헌[Wu, G.Y. and Wu, C.H., J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 30 1987] 참조). 대안으로, 안티센스 올리고머와 복합체 형성된 가스-충전된 마이크로버블의 사용은 US 특허 제6,245,747호에 기재된 것과 같이 표적 조직으로의 전달을 강화할 수 있다. 지속 방출 조성물이 또한 사용될 수 있다. 이들은 필름 또는 마이크로캡슐과 같은 성형된 제품의 형태의 반침투성 중합체 매트릭스를 포함할 수 있다.

[0327] 일 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 적합한 제약적 담체로 리소좀 저장 장애의 증상을 나타내는 포유류 대상체, 예컨대, 인간 또는 가축에 투여된다. 방법의 일 측면에서, 대상체는 인간 대상체, 예컨대, GSD-II(포페병)을 갖는 것으로 진단된 환자이다. 한 바람직한 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 제약상 허용되는 담체에 함유되고, 경구로 전달된다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 올리고머는 제약상 허용되는 담체에 함유되고, 정맥내(i.v.) 전달된다.

[0328] 일 실시양태에서, 안티센스 화합물은 적어도 200-400 nM 안티센스 올리고머의 피크 혈중 농도를 생성하는 데 효과적인 양 및 방식으로 투여된다. 전형적으로, 안티센스 올리고머의 하나 이상의 투여량이 일반적으로 약 1 내지 2주의 기간 동안 일정한 간격으로 투여된다. 경구 투여를 위한 바람직한 투여량은 70 kg 당 약 1-1000 mg 올리고머이다. 일부 경우에서, 1000 mg 올리고머/환자 초과 투여량이 필요할 수 있다. i.v. 투여를 위해, 바람직한 투여량은 70 kg 당 약 0.5 mg 내지 1000 mg 올리고머이다. 안티센스 올리고머는 짧은 기간 동안 일정한 간격으로, 예컨대, 2 주 이하 동안 매일 투여될 수 있다. 그러나, 일부 경우에서 올리고머는 보다 긴 기간 동안 간헐적으로 투여된다. 투여는 항생제의 투여 또는 다른 치료제 치료가 뒤따르거나, 또는 병행된다. 치료요법은 치료 하의 대상체의 면역분석법, 다른 생화학적 테스트 및 생리학적 검사의 결과에 기초하여, 지시된 대로 조정될 수 있다(투여량, 빈도, 경로 등).

[0329] 본 개시의 안티센스 올리고머를 사용한 효과적인 생체내 치료 요법은 투여의 기간, 투여량, 빈도 및 경로, 뿐만 아니라 치료 하의 대상체의 상태(즉, 예방적 투여 대 국부 또는 전신 감염에 대한 투여)에 따라 달라질 수 있다. 이에 따라, 이러한 생체내 요법은 최적의 치료 효과를 달성하기 위해, 치료 하의 장애의 구체적인 유형에 적절한 테스트에 의한 모니터링 및 투여량 또는 치료 요법의 상응하는 조정이 종종 필요할 것이다.

[0330] 치료는 예컨대, 관련 기술분야에 공지된 질환의 일반적 지표에 의해 모니터링될 수 있다. 본 개시의 생체내 투여된 안티센스 올리고머의 효능은 안티센스 올리고머의 투여 이전, 도중, 및 이후 대상체로부터 취한 생물학적 샘플(조직, 혈액, 소변 등)로부터 결정될 수 있다. 이러한 샘플의 분석은 (1) 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 절차, 예컨대, 전기영동 겔 이동 분석법을 사용한 표적 및 비-표적 서열에 의한 헤테로듀플렉스의 존재 또는 부재의 모니터링; (2) 표준 기법 예컨대 RT-PCR, 노던 블롯팅, ELISA 또는 웨스턴 블롯팅에 의해 결정된 기준 정상 mRNA 또는 단백질에 대한 돌연변이 mRNA의 양의 모니터링을 포함한다.

[0331] 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 포유류 세포에 의해 능동적으로 받아들여진다. 추가적 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 이러한 흡수를 용이하게 하기 위해 본원에 기재된 것과 같이 수송 모이어티(예컨대, 수송 펩타이드 또는 CPP)에 접합될 수 있다.

[0332] **VI. 용량**

[0333] 치료 조성물 및 그의 후속 투여(용량)의 배합은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 달려있다고 여겨진다. 용량은 수 일 내지 수 개월 지속되는 치료의 과정으로 또는 치유가 효과를 나타내거나 또는 질환 상태의 축소가 달성될 때까지 치료되는 질환 상태의 중증도 및 반응성에 의존한다. 최적의 용량 스케줄은 환자의 체내 약물 축적의 측정으로부터 계산될 수 있다. 통상의 기술자는 최적 용량, 용량 방법론 및 반복률을 쉽게 결정할 수 있다. 최적 용량은 개별 올리고머의 상대적 효능에 따라 달라질 수 있고, 생체의 및 생체의 동물 모델에서 효과적인 것으로 발견된 EC50에 기초하여 일반적으로 예측될 수 있다. 일반적으로, 용량은 체중 kg 당 0.01 μ g 내지 100 g 이고, 매일, 매주, 매월, 또는 매년 1회 이상, 또는 심지어 매 2 내지 20년에 1회 제공될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 체액 또는 조직 내 약물의 측정된 지속 시간 및 농도에 기초한 용량의 반복률을 쉽게 예측할 수 있다. 성공적인 치료 이후, 질환 상태의 재발을 방지하기 위해 올리고머가 체중 kg 당 0.01 μ g 내지 100 g 범위로, 매일 1회 이상에서 매 20년에 1회 유지 용량으로 투여되도록 환자가 유지 요법을 체험하게 하는 것이 바람직할 수 있다.

[0334] 본 개시는 그의 실시양태의 일부에 따른 특수성에 따라 기재되었지만, 하기 실시예는 본 개시를 오직 예시하기 위해 제공되고 이를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본 출원에 인용된 각각의 참조문헌, 특허, 특허출원, GenBank 수탁 번호 등은 그의 전부가 참조문헌으로 본원에 포함된다.

[0335] **VII. 실시예**

[0336] **실시예 1**

[0337] **안티센스 표적화 서열의 디자인**

[0338] 안티센스 올리고머 표적화 서열을 인간 GAA 유전자의 IVS1-13T>G 돌연변이에 관한 치료용 스플라이싱-스위칭 적용을 위해 디자인했다. 이에, 스플라이싱-스위칭 올리고머는 인트론 및 엑손 스플라이스 사일런스 요소(각각 ISS 및 ESS 요소)를 억제함으로써 성숙한 GAA mRNA 내 엑손 2 유지를 촉진할 것이라 예상된다. 정상적이거나 또한 거의 정상적인 GAA 발현의 복원은 그 다음 기능성 효소가 합성되게 함으로써 GSD-II 환자에게 임상적 이점을 제공할 것이다.

[0339] 따라서, 특정 안티센스 표적화 서열을 GAA 유전자의 엑손 2 내 또는 그의 인접 인트론 내의 스플라이스 사일런스 요소를 마스킹하도록 디자인했다. 가능한 사일런스 요소 표적의 비-제한적 예시는 hnRNP1 motifs(TAGGGA), Tra2- β motifs, 및 9G8 motifs를 포함한다. 인트론 1 및 2(각각 IVS1 및 IVS2) mRNA의 실리코 이차 구조 분석(mFold)을 적합한 안티센스 표적 서열을 제공할 수 있는 장거리 상호작용을 확인하기 위해 또한 이용했다. 이 분석으로부터 얻은 안티센스 표적화 서열은 표 2에 나타난다(서열 4-120을 또한 참조).

[0340] 표 2에 제시된 것과 같은 표적화 서열을 포함하는 예시적 올리고머를 포스포로티오에이트 백분을 갖는 2'-O-메틸 개질된 안티센스 올리고머로서 이 실시예로 제조했다. 이들 안티센스 올리고머를 양이온성 전달 체제(리포펙타민(Lipofectamine) 2000, 리포펙타민 또는 그와 유사한 것)와 함께 복합체 형성했고, 하기 실시예2에 기재된 것과 같이 IVS1-13T>G 돌연변이를 갖는 GSD-II 환자에서 유래한 섬유모세포 및/또는 림프구로 트랜스펙션했다.

- [0341] 추가적 실험에서, 표 2에 제시된 것과 같은 표적화 서열을 포함하는 다른 예시적 올리고머를 PMO로 제조했다. 이들 안티센스 올리고머를 하기 실시예 2에 또한 기재된 것과 같이 뉴클레오펙션 프로토콜을 사용하여 환자에서 유래된 섬유모세포 및/또는 림프구로 도입했다.
- [0342] 실시예 2
- [0343] **GSD-II 환자에서 유래된 섬유모세포 내 안티센스 올리고머 유도된 엑손 2 포함**
- [0344] GSD-II를 갖는 개인으로부터 유래된 섬유모세포 및/또는 림프구 내 엑손 2 포함을 유도하기 위한 안티센스 올리고머의 능력을 테스트하기 위한 실험을 수행했다. 실험의 한 세트에서, 2'-O-메틸 개질된 안티센스 올리고머를 표준 프로토콜에 따라 제조하여 IVS1-13G>T 돌연변이를 갖는 GSD-II 환자에서 유래된 섬유모세포 및/또는 림프구에 트랜스펙션했다. 실험의 또다른 세트에서, PMO를 표준 프로토콜에 따라 제조하여 뉴클레오펙션에 의해 동일한 세포에 도입했다. 엑손 2-함유 mRNA의 수치를 그 다음 RT-PCR로 측정했다.
- [0345] **GSD-II 세포.** GSD-II를 갖는 개인으로부터 환자의 환자-유래된 섬유모세포 또는 림프구(코리엘(Coriell) 세포주 GM00443, GM11661, GM14463 및/또는 GM14484)를 10% FBS를 갖는 이글스(Eagle's) MEM에서의 표준 프로토콜에 따라 배양했다. 세포를 실험 전 약 3-5일 계대배양했고 트랜스펙션 또는 뉴클레오펙션시 대략 80% 증만도를 가졌다.
- [0346] GM00443 섬유모세포는 30세 연령의 남성으로부터 유래했다. 성인형; 30대에 발병; GAA에 대한 mRNA, 항체에 의해 검출된 GAA 단백질, 그러나 오직 9 내지 26%의 정상 산성 알파-1,4-글루코시다제 활성; CCR에서 계대 3; 공여 대상체는 제1 코딩 엑손[엑손 2(IVS1-13T>G)]이 삭제된 선택적 스플라이싱된 전사물을 생성하는, GAA 유전자의 인트론 1의 수용자 사이트의 -13번에서 T/G 전환을 갖는 하나의 대립유전자를 갖는 이형접합체이다.
- [0347] GM11661 섬유모세포는 38세 연령의 남성에서 유래했다. 비정상적 간 기능 테스트; 육체 활동 동안 때때로 다리의 근육경직(charley-horse); 아침 두통; 기름진 음식에 불내성; 비정상적 낭포; 결손 섬유모세포 및 WBC 산성 알파-1,4-글루코시다제 활성; 공여 대상체는 복합 이형접합체; 대립유전자 1은 GAA 유전자의 인트론 1의 수용자 사이트의 -13번의 T>G 전환을 갖음(IVS1-13T>G); 생성된 선택적 스플라이싱된 전사물은 개시 코돈을 함유하는 엑손 2의 프레임 삭제를 갖음; 대립유전자 2는 엑손 18의 삭제를 갖음.
- [0348] GM14463 림프구는 26세 연령의 여성에서 유래했다. 임상적으로 발병함; 성인 발병; 중증 일반화된 근력 저하 및 쇠약; 중증 호흡 부전; 근육 생검은 산성 말타제 결핍을 보여줌; 공여 대상체는 복합 이형접합체임; 하나의 대립유전자는 제1 코딩 엑손, 엑손 2가 삭제된 선택적 스플라이싱된 전사물을 생성하는 GAA 유전자의 인트론 1의 수용자 사이트의 -13번의 T>G 전환을 갖음(IVS1-13T>G); 제2 대립유전자는 프레임시프트 및 단백질 절삭(Gln124SerfsX18)을 가져오는 엑손 2 (c.366delT) 내 뉴클레오티드 366의 1 bp 삭제를 갖음.
- [0349] GM14484 림프구는 61세 연령의 남성에서 유래했다. 임상적으로 발병함; 성인 발병; 공여 대상체는 복합 이형접합체; 한 대립유전자는 제1 코딩 엑손, 엑손 2가 삭제된 교대 스플라이싱된 전사물을 생성하는 GAA 유전자의 인트론 1의 수용자 사이트의 -13번에서 T>G 변이를 갖음(IVS1-13T>G); 제2 대립유전자는 코돈 58에서의 정지[Gln58Ter (Q58X)]를 유발하는 엑손 2 내 뉴클레오티드 172에서의 C>T 전이를 갖음(c.172C>T).
- [0350] 도착 후, GSD-II 환자 세포를 풀고 분획을 장기 저장을 위해 동결했다. 세포를 그 다음 번식시켰고 엑손 2가 성숙한 GAA-코딩 전사물에서 빠진 것을 확인하기 위해 세포로부터 추출된 전체 RNA에서 RT-PCR을 수행했다.
- [0351] **트랜스펙션 프로토콜.** 간략하게, 2'-O-메틸 개질된 안티센스 올리고머를 리포펙타민 2000과 같은 양이온성 리포솜 준비물과 혼합했고 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 및 200 nM 농도 범위로 배양된 세포에 첨가했다. 트랜스펙션 5 시간 후, 배양액을 교체했고 세포를 24 내지 72 시간 동안 37 °C에서 5% CO₂에서 인큐베이션했다. 거짓 트랜스펙션 및 비처리된 세포를 음성 대조군으로 포함시켰다. 전체 RNA를 세포 준비물로부터 추출했고, GAA 발현의 변화를 모니터링하기 위해, 특히 성숙한 GAA 전사물 내 엑손 2의 포함/유지의 증가를 보기 위해 RT-PCR 분석시 주형으로 사용했다. 트랜스펙션된 2'-O-메틸 개질된 안티센스 올리고머는 하기 표 E1에 나타난다. 이 예시에서, 서열 119 및 120의 각각의 X는 우라실(U)이었다.

[0352] <표 E1>

겔 상의 번호	명칭	서열	서열번호
1	GAA-IVS2 (-4-20)	CCCGCCCCUGCCCUGCC	10
2	GAA-IVS2 (-14-30)	UGGCCCGCCGCCCGGCC	11
3	GAA-IVS2 (-33-52)	UGUCCACGCGCACCCUCUGC	12
4	GAA-IVS2 (-213-237)	UGACCCACCUUUUCAUAAAGAUGAA	21
5	GAA-IVS2 (-234-258)	CUCUGGCAGCCUACUCUACCUGAC	22
6		GGCCCXGGXCXGCXGGCXCCCXGCX	119
7		GCXCCCXGCAGCCCXGCXXXGCAG	120
8	GAA-IVS1 (-39-20)	GCUCAGCAGGGAGGCGGGAG	4
9	GAA-IVS1 (-74-55)	GGCUCUCAAAGCAGCUCUGA	5
10	GAA-IVS1 (-99-75)	GACAUCAACCGCGGUGGCACUGCA	6
11	GAA-IVS1 (-139-115)	GGGUAAGGUGGCCAGGGUGGGUGUU	7
12	GAA-IVS1 (-158-140)	GCCCUGCUGUCUAGACUGG	8
13	GAA-IVS1 (-179-160)	GAGAGGGCCAGAAGGAAGGG	9
14	GAA-IVS2 (-53-72)	GUGAGGUGCGUGGGUGUCGA	13
15	GAA-IVS2 (-73-92)	GCAACAUGCACCCCACCCUU	14
16	GAA-IVS2 (-93-112)	AGGGCCCAGCACACAGUGGU	15
17	GAA-IVS2 (-113-132)	UCACACCUCCGCUCCCAGCA	16
18	GAA-IVS2 (-133-150)	GGCGCUGCCAUUGUCUGC	17
19	GAA-IVS2 (-153-172)	GUGUCCCCACUGCUCCCCGA	18
20	GAA-IVS2 (-173-192)	CUGGAGUACCGUCACCCUG	19
21	GAA-IVS2 (-193-212)	UGAGCCCCGAGCCUGCCUU	20
22	GAA-IVS2 (-338-364)	CUAGUAUAAAUACAUCCCAAUUUUGC	23

표 E1의 임의의 서열에서, 우라실 염기(U)는 티민 염기(T)로 치환될 수 있고 반대의 경우도 마찬가지이며, 각각의 X는 티민(T) 또는 우라실(U)로부터 독립적으로 선택된다

[0353]

[0354]

뉴클레오펙션 프로토콜. 안티센스 PMO를 뉴클레오펙션을 위해 적절한 희석액이 만들어진 뉴클레아제 없는 물 (DEPC로 처리하지 않음)에서 1-2 mM 스톱 용액으로 제조했다. GSD-II 세포를 트립신 처리하고, 카운팅하고, 10 분 동안 90g에서 원심분리하고, 웰 당 1-5x10⁵ 세포를 뉴클레오펙션 용액 P2(론자(Lonza))에 재현탁시켰다. 안티센스 PMO 용액 및 세포를 그 다음 뉴클레오펙션(Nucleocuvette) 16-웰 스트립의 각각의 웰에 첨가했고, 프로그램 EN-100으로 펄싱했다. 세포를 10 분 동안 상온에서 인큐베이션했고 12-웰 플레이트에 2회 옮겼다. 전체 RNA를 제조자의 추천 프로토콜에 따라 GE 일러스트라(Illustra) 96 스핀 키트를 사용하여 48시간 후 처리된 세포로부터 단리했다. 회수된 RNA를 분석 전에 -80 °C에 저장했다.

[0355]

GAA RT-PCR. 엑손 2-함유 mRNA의 PCR 검출을 위해, 프라이머 서열을 엑손 1(전방향)부터 엑손 3(역방향)까지로 선택했다. 엑손 1-3에 걸친 RT-PCR은 약 1177 염기의 전장 앰플리콘을 생성할 것이다(정상 인간 세포의 전장 앰플리콘에 대해서는 도 2를 참조). 무손상 앰플리콘(~1177 염기) 및 엑손 2(엑손 2는 ~578 염기)가 빠진 ~600 염기 전사물 간의 크기 차이는 더 짧은 생성물의 실질적으로 선호되는 증폭이 존재할 것임을 의미한다. 이것은 전장 전사물 또는 엑손 2-함유 전사물의 스플라이싱을 유도하는 안티센스 올리고머의 효능을 분석하는 우수한 기준을 설정할 것이다.

[0356]

역 전사효소 PCR을 슈퍼스크립트(SuperScript) III 원-스텝 RT-PCR 시스템(인비트로젠(Invitrogen))을 사용하여 GAA 대립유전자를 증폭하기 위해 수행했다. 뉴클레오펙션된 세포로부터 단리된 400 ng 전체 RNA를 역전사시켰고 유전자-특이적 프라이머로 증폭시켰다.

[0357]

원-스텝 키트에 제공된 증폭 용액을 형광에 의한 밴드 시각화를 가능하게 하기 위해 Cy5-표지된 dCTP(GE)로 보충했다. 소화된 샘플을 프리-캐스트 10% 아크릴아미드/TBE 겔(인비트로젠)에서 달리게 했고 633nm 여기 레이저 및 플라텐 표면에서 초점면을 갖는 670nm BP 30 방출 필터를 사용한 타이폰 트리오(Typhoon Trio)(GE)에서 시각화했다. 겔을 밴드의 강도를 결정하기 위해 이미지퀀트(ImageQuant)(GE)로 분석했다. 엑손 2를 함유하는 모든 밴드의 강도가 함께 더해져 포함 분석에서 전체 엑손 2 전사물을 나타낸다.

[0358]

대안으로, PCR 증폭 생성물을 % 엑손 포함의 결정을 위해 캘리퍼(Caliper) 바이오분석기 또는 애길런트(Agilent) 2200 테이프 스테이션에서 분석했다.

[0359]

표 E1의 2'-O-메틸 개질된 안티센스 올리고머에 대한 결과가 도 3a-3c에 나타난다. 도 3a는 ~600 염기 앰플리콘(전장 ~1177 염기 앰플리콘에 비해)의 증폭 감소로부터 증거되는 것과 같이, IVS1-13G>T 돌연변이를 갖는 인간 세포 내 올리고머 9(GAA-IVS1 (-74-55)) 및 12(GAA-IVS1 (-158-140)) 유도된 엑손 2-포함을 보여준다. 도

3b는 올리고머 14(GAA-IVS2 (-53-72))가 엑손-2 포함을 유도했음을 보여주고, 도 3c는 올리고머 20(GAA-IVS2 (-173-192)) 및 22(GAA-IVS2 (-338-364))가 마찬가지로 일정한 엑손-2 포함을 유도했음을 보여준다.

[0360] 실시예 3

[0361] 안티센스 올리고머는 GSD-II 환자에서 유래된 섬유모세포 내 효소 활성화된 산성 알파-글루코시다제의 수치 증가를 유도한다

[0362] (상기된 바와 같이) 본 개시의 안티센스 올리고머로 처리된 GSD-II 환자 세포는 엑손 2-함유 GAA mRNA의 발현 증가 때문에 기능성/활성 GAA의 수치가 증가되었음을 보여준다. 처리된 세포를 준비했고 표준 프로토콜을 사용하여 단백질을 추출했다. 단백질 농도를 결정했고 추출된 단백질의 정량을 GAA 효소 활성화에 대해 측정했다. 보다 고농도의 GAA를 유도하는 안티센스 올리고머는 본 개시의 바람직한 실시양태이다.

[0363] 실시예 4

[0364] GSD-II 환자에서 유래된 섬유모세포 내 안티센스 PMO-유도된 투여량-의존적 엑손 2 포함

[0365] GM00443 섬유모세포를 상기된 최초 GAA 엑손 2 포함 결과에 기반하여 상기된 뉴클레오펙션 절차 및 실시예 2에서 PMO로 만들어진 안티센스 서열을 사용하여 처리했다. 하기 표 4A에 확인된 표적화 서열을 갖는 상기 화학식 VII에 따른 20 μ M PMO를 이전에 기재된 것과 같이 뉴클레오펙션했고, 전체 RNA 단리 이전에 세포를 24 시간 동안 5% CO₂로 37 °C에서 인큐베이션했다. 표 4B의 프라이머 FWD124(서열 121), FWD645(서열 122) 및 REV780(서열 123)로 RNA의 RT-PCR 증폭을 퍼센트 엑손 2 포함을 결정하기 위해 칼리퍼 랩칩(LabChip)을 사용하여 분석했고, 그의 결과가 도 4a(인트론 1을 표적화하는 PMO), 4b(엑손 2를 표적화하는 PMO), 및 4c(인트론 2를 표적화하는 PMO)에 나타난다.

[0366] <표 4A>

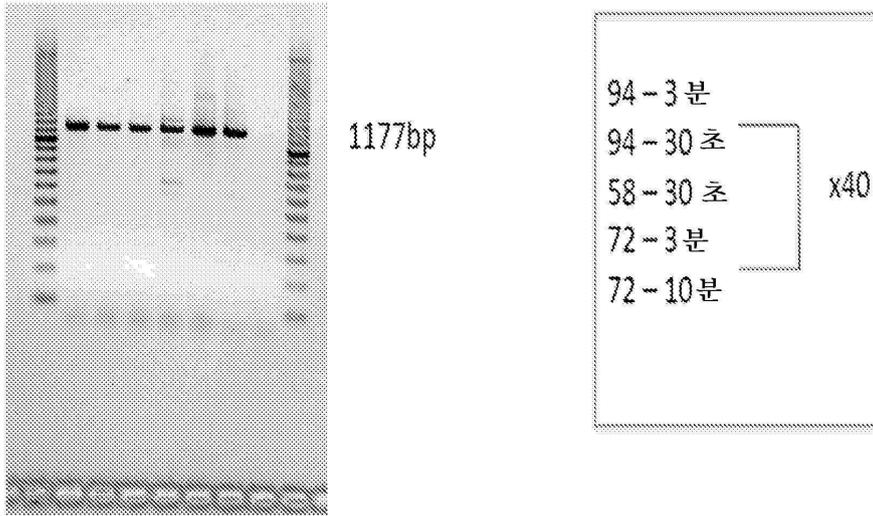
뉴클레오타이드 서열		
명칭	서열 (5'-3')	서열번호
GAA 인트론 1 안티센스 서열: 도 4a		
GAA-IVS1(-39-20)	GCUCAGCAGGGAGGCGGGAG	4
GAA-IVS1(-74-55)	GGCUCUCAAGCAGCUCUGA	5
GAA-IVS1(-99-75)	GACAUCAACCCGCGGUGGCACUGCA	6
GAA-IVS1(-139-115)	GGGUAAGGUGGCCAGGGUGGGUGUU	7
GAA-IVS1(-158-140)	GCCUCGUCUGUAGACUGG	8
GAA-IVS1(-179-160)	GAGAGGGCCAGAAGGAAGGG	9
GAA-IVS1.6.20	CCGGGGCAGACGTCAGGTGT	27
GAA-IVS1.10.20	CAGCGCGGGCAGACGTCAG	29
GAA-IVS1.14.20	CCGGCAGCGCGGGCAGACG	31
GAA-IVS1.17.20	CCGCCGCGAGCCGCGGGCAG	33
GAA-IVS1.24.20	GATGTTACCGCCGCGACGCG	35
GAA-IVS1.28.20	CTGGGATGTTACCGCCGCA	37
GAA-IVS1.32.20	GCTTCTGGGATGTTACCGCC	39
GAA-IVS1.2015.20	TGGCAACTCGTATGTCCCTTA	41
GAA-IVS1.2019.20	ATTCTGGCAACTCGTATGTTC	43
GAA-IVS1.2024.20	AAGTGATTCTGGCAACTCGT	45
GAA-IVS1.2037.20	TGGGTGTCAGCGGAAGTGAT	46
GAA-IVS1.2043.20	GTCCACTGGGTGTCAGCGGA	48
GAA-IVS1.2048.20	GCTTGGTCCACTGGGTGTC	50
GAA-IVS1.2071.20	CCCCACTTCTGCATAAAGGT	52
GAA-IVS1.2075.20	GGAGCCCCACTTCTGCATAA	54
GAA-IVS1.2079.20	GCTGGGAGCCCCACTTCTGC	56
GAA-IVS1.2088.20	CCACGCTGGCTGGGAGCCC	58
GAA-IVS1.2115.20	TCCGAAGTGCTGGGATTTCA	59
GAA-IVS1.2132.20	TCCACCCCTTGGCCTTCC	60
GAA-IVS1.2135.20	TGATCCACCCCTTGGCCT	61
GAA-IVS1.2140.20	TCAAGTGATCCACCCCTT	62
GAA-IVS1.2152.20	GAACCTCTGAGCTCAAGTGA	64
GAA-IVS1.2156.20	TCTCGAACTCCTGAGCTCAA	65
GAA-IVS1.2165.20	CCAGGCTGGTCTCGAACTCC	67
GAA-IVS1.2178.20	TTTGCCATGTTACCCAGGCT	68
GAA-IVS1.2185.20	ACGGGATTTGCCATGTTAC	70
GAA-IVS1.2190.20	TAGAGACGGGATTTTGCCAT	72
GAA-IVS1.2195.20	TTTTGTAGAGACGGGATTTT	73
GAA-IVS1.2202.20	TCTGTATTTTGTAGAGACG	75
GAA-IVS1.2206.20	ATTTTCTGTATTTTGTAGA	77
GAA-IVS1.2210.20	GCTAATTTTCTGTATTTTG	79
GAA 엑손 2 안티센스 서열: 도 4b		
GAAEx2A(+202+226)	GGCCUGGUCUGCGGCUCCUGCU	24
GAAEx2A(+367+391)	GCUCCUGCAGCCCGUCUUUGCAG	25
GAA 인트론 2 안티센스 서열: 도 4c		
GAA-IVS2(-4-20)	CCCGCCCCUGCCCCGCC	10
GAA-IVS2(-14-30)	UGGCCCGCCCGCCCGCC	11
GAA-IVS2(-33-52)	UGUCCACGCGCACCCUCUGC	12
GAA-IVS2(-53-72)	GUGAGGUGCGUGGGUGCCGA	13
GAA-IVS2(-73-92)	GCAACAUGCACCCACCCUU	14
GAA-IVS2(-93-112)	AGGGCCCGACACAGUGGU	15
GAA-IVS2(-113-132)	UCACACCUCCGCUCCAGCA	16
GAA-IVS2(-133-150)	GGCGUGCCAUUGUCUGC	17
GAA-IVS2(-153-172)	GUGUCCCGACUGCUCCCGA	18
GAA-IVS2(-173-192)	CUGGAGUACCUGUCACCGUG	19
GAA-IVS2(-193-212)	UGAGCCCCGAGCCUGCCUU	20
GAA-IVS2(-213-237)	UGACCCACCUUUUCAUAAAGAUGAA	21
GAA-IVS2(-234-258)	CUCUGGCAGCCCUACUCUACCUGAC	22
GAA-IVS2(-338-364)	CUAGUAUAAUACAUCCAAUUUUGC	23
GAA-IVS2.6.20	CCGCCCGCCCGCCCTGCCCTG	81
GAA-IVS2.9.20	CCGCCCGCCCGCCCTGCC	82
GAA-IVS2.12.20	TGGCCGCGCCCGCCCGCCCT	83

[0367]

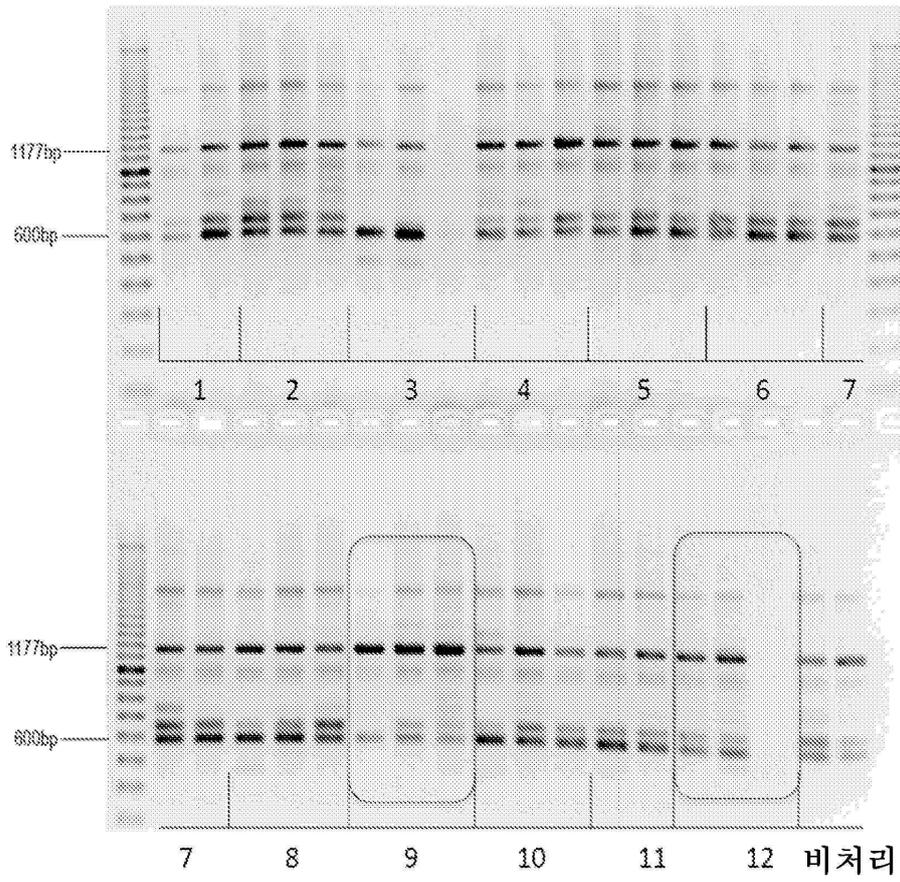
GAA-IVS2.18.20	CTGCCCTGGCCGCGCCCGCC	84
GAA-IVS2.24.20	CACCCCTGCGCCCTGGCCGCG	85
GAA-IVS2.27.20	GCGCACCCCTGCGCCGCGCC	86
GAA-IVS2.40.20	TGTCGATGTCACGCGCACCC	87
GAA-IVS2.48.20	TGCGTGGGTGTCGATGTCCA	89
GAA-IVS2.67.20	GCACCCACCCCTGTGAGGT	91
GAA-IVS2.72.20	AACATGCACCCACCCCTGT	92
GAA-IVS2.431.20	AGGAGGAGGACGCCTCCCGC	93
GAA-IVS2.446.20	CTCATCTGCAGAGCCAGGAG	94
GAA-IVS2.451.20	GCTCCCTCATCTGCAGAGCC	97
GAA-IVS2.454.20	TCGGCTCCCTCATCTGCAGA	100
GAA-IVS2.457.20	GCCTCGGCTCCCTCATCTGC	103

[0368]

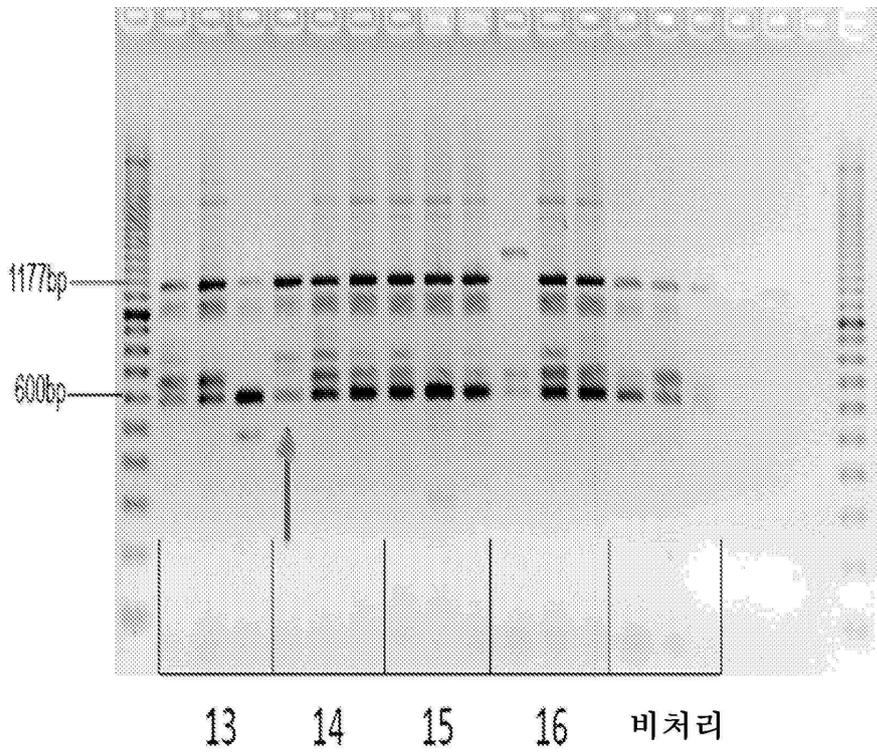
도면2



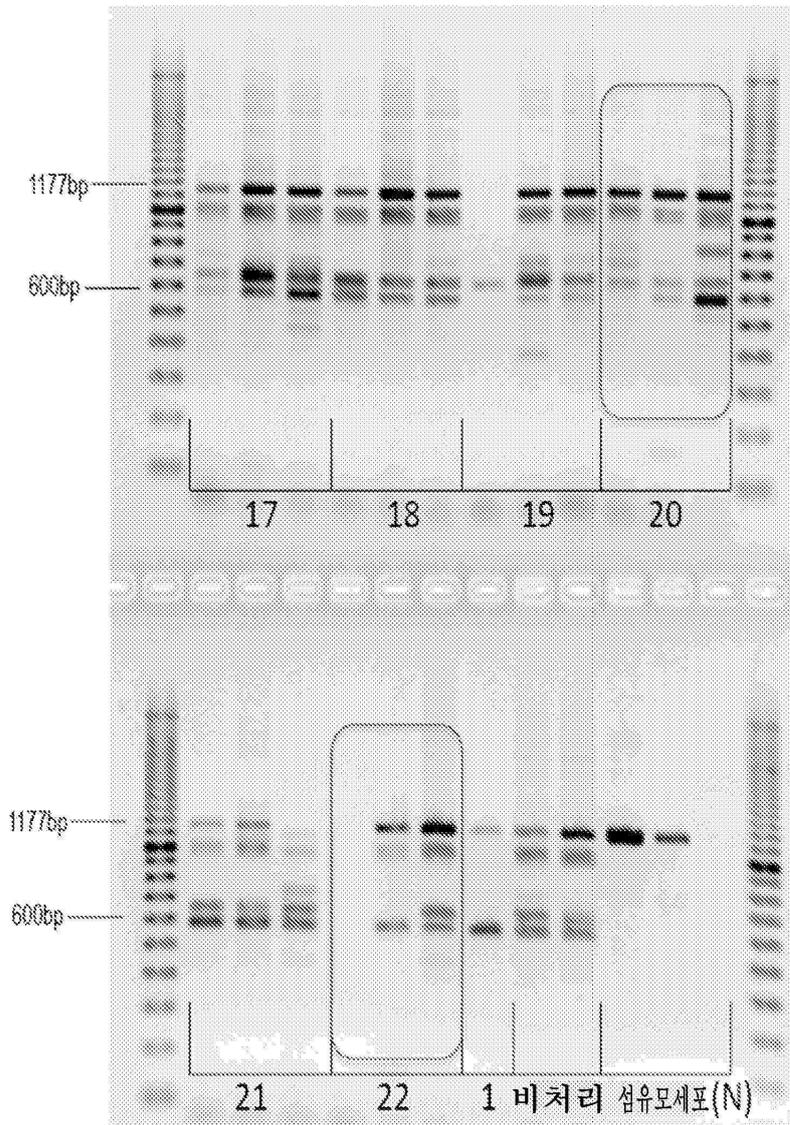
도면3a



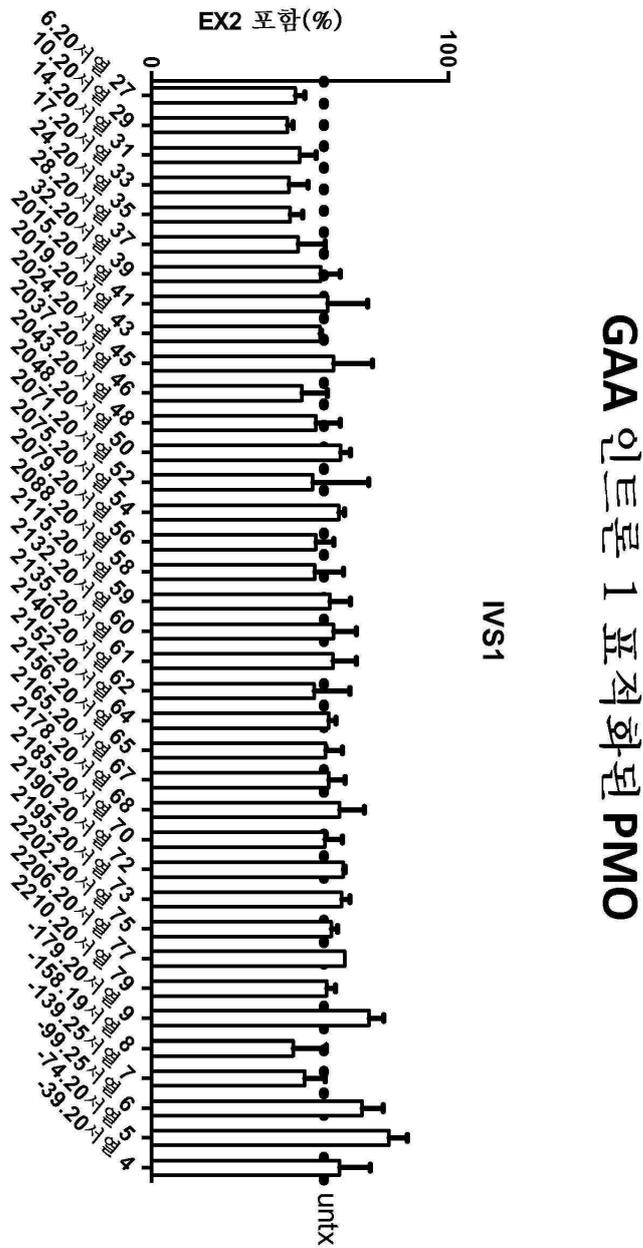
도면3b



도면3c

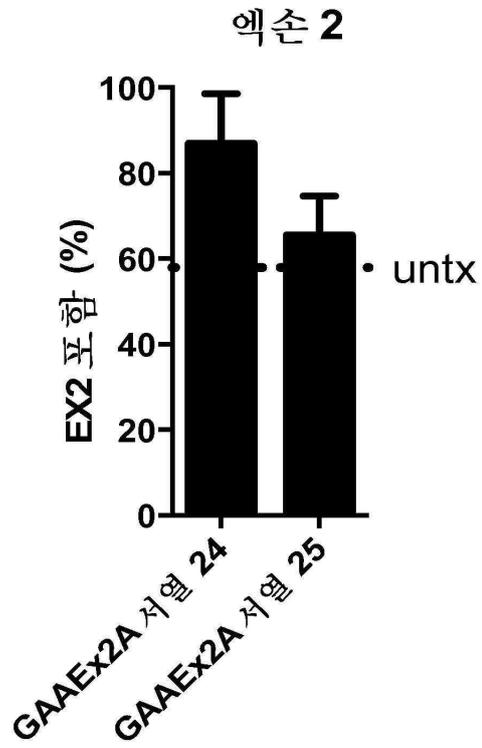


도면4a

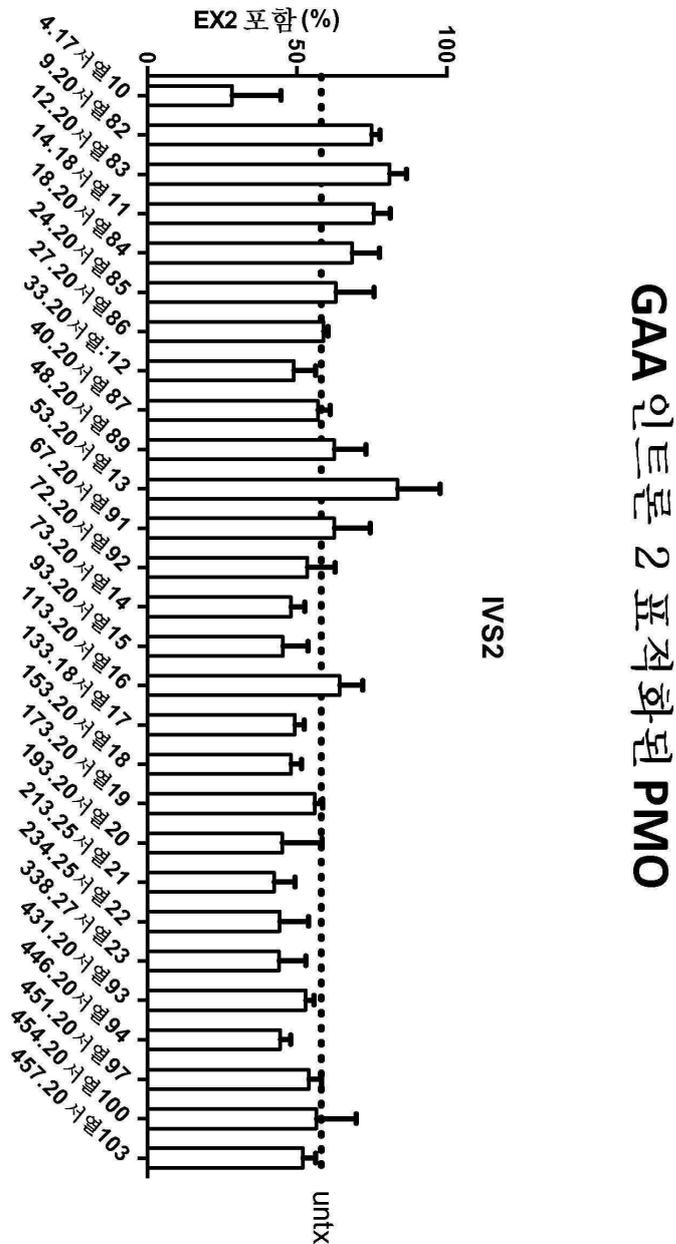


도면4b

GAA엑손 2 표적화된PMO



도면4c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Sarepta Therapeutics

Wilton, Donald Stephen

Fletcher, Sue

<120> ANTISENSE-INDUCED EXON2 INCLUSION IN ACID ALPHA-GLUCOSIDASE

<130> SATH-001/02WO

<150> US 61/874,261

<151> 2013-09-05
 <150> US 61/932,195
 <151> 2014-01-27
 <160> 123
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 2664
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (2652)..(2652)
 <223> n i s t o r u
 <400> 1

gtgagacacc tgacgtctgc cccgcgctgc cggcggtaac atcccagaag cgggtttgaa 60

cgtgcctagc cgtgccccca gcctcttccc ctgagcggag cttgagcccc agacctctag 120
 tcctccccgt ctttatctga gttcagctta gagatgaacg gggagccgcc ctctctgtct 180
 gggcttgggg ctggaggctg catcttcccg ttcttagggt ttcctttccc cttttgatcg 240
 acgcagtgct cagtcctggc cgggaccga gccacctctc ctgctcctgc aggacgcaca 300
 tggctgggtc tgaatccctg gggtagggag caccgtggcc tgagaggggg cccctgggcc 360
 agctctgaaa tctgaatgct tcaatcaca agacccctt aggccaggcc aggggtgact 420
 gtctctggtc tttgtccctg gttgctggca catagcacc gaaacccttg gaaaccgagt 480

gatgagagag cttttgctc atgaggtgac tgatgaccgg ggacaccagg tggcttcagg 540
 atggaagcag atggccagaa agaccaagc ctgatgacgg gttgggatgg aaaaggggtg 600
 aggggctgga gattgagtga atcaccagtg gcttagtcaa ccatgcctgc acaatggaac 660
 cccgtaagaa accacagga tcagagggt tcccgccggg ttgtggaaca caccaaggca 720
 ctggagggtg gtgcgagcag agagcacagc atcactgcc ccacctcaca ccaggcccta 780
 cgcactctt ccataggct gtctgagttt tacccttgt aataaaccag caactgtaag 840
 aaacgcactt tctgagttc tgtgacctg aagagggagt cctgggaacc tctgaattta 900

taactagttg atcгааagta caagtgaaa cctgggattt gccattggcc tctgaagtga 960
 aggcagtgtt gtgggactga gcccttaacc tgtggagtct gtgctgactc caggtagtgt 1020
 caagattgaa ttgaattgta ggacaccag ccgtgtccag aaagttgcag aattgatggg 1080
 tgtgagaaaa accctacaca tttaatgtca gaagtgtggg taaaatgttt caccctccag 1140

cccagagagc cctaatttac cagtggccca cggtggaaca ccacgtccgg cggggggcag 1200
 agcgttccca gccaaacctt ctgtaacatg acatgacagg tcagactccc tcgggcctg 1260
 agttcacttc ttcttggtat gtgaccagct cccagtacca gagaaggttg cacagtctc 1320

 tgctccaagg agcttactg gccaggggct gctttctgaa atccttgctt gcctctgctc 1380
 caaggccctg tcctcagaga cgcagacccc tctgatggct gactttggtt tgaggacctc 1440
 tctgcatccc tcccctatgg ccttgctect aggacacctt cttctcctt tcctgggggt 1500
 cagacttgcc taggtgcggt ggctctccca gccttccca cgcctcccc atggtgtatt 1560
 acacacacca aagggactcc cctattgaaa tccatgcata ttgaatcgca tgtgggttcc 1620
 ggctgctcct gggaggagcc aggctaatag aatgtttgcc ataaaatatt aatgtacaga 1680
 gaagcgaac aaaggtcgtt ggtacttgtt aaccttacca gcagaataat gaaagcgaac 1740

 ccccatatct catctgcacg cgacatcctt gttgtgtctg tacccgaggc tccaggtgca 1800
 gccactgtta cagagactgt gtttcttccc catgtacctc gggggccggg aggggttctg 1860
 atctgcaaag tcgccagagg ttaagtcctt tctctctgtt ggctttgcca cccctggagt 1920
 gtcacctca gctgcggtgc ccaggattcc cactgtggtt atgtccgtgc accagtcaat 1980
 aggaaagga gcaaggaaag gtactgggtc ccctaagga catacgagtt gccagaatca 2040
 cttccgctga caccagtg accaagccgc acctttatgc agaagtgggg ctcccagcca 2100
 ggctgtgca ctctgaaat cccagcactt cggaggcca aggggggtgg atcacttgag 2160

 ctcaggagt cagaccagc ctgggtaaca tggcaaaatc ccgtctctac aaaaatacag 2220
 aaaatagct gggtagcgtg gtgtgtgctt acagtccag ctaactcagga ggctgaagtg 2280
 ggaggattgc ttgagtctgg gaggtggagg ttgcagtgag ccaggatctc accacagcac 2340
 tctggccag gcgacagctg tttggcctgt tccaagtgc tactgctt gctggtctt 2400
 ctggggacat tcaagcgtg tttgattgtt aacatttag cagactgtgc aagtgtctg 2460
 cactcccctg ctggagcttt tctgcccctt cttctggcc ctctcccag tctagacagc 2520
 agggcaaac ccacctggc caccttacc cactgctg ggtgctgcag tgccagccgc 2580

 ggttgatgtc tcagagctgc tttgagagcc ccgtgagtgc cgcctccc gcctcctg 2640
 tgagcccgt tnttctccc gcag 2664

 <210> 2
 <211> 578
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

gcctgtagga gctgtccagg ccatctccaa ccatgggagt gaggcacccg cctgctccc 60
 accggtcct ggccgtctgc gccctcgtgt ccttggcaac cgctgcactc ctggggcaca 120
 tcctactcca tgatttcctg ctggttcccc gagagctgag tggctcctcc ccagtctgg 180
 aggagactca cccagctcac cagcagggag ccagcagacc agggccccgg gatgccagg 240

cacaccccgg ccgtcccaga gcagtgccca cacagtgcga cgtcccccc aacagccgct 300
 tcgattgcgc cctgacaag gccatcacc aggaacagtg cgaggccccg ggctgttgct 360
 acatccctgc aaagcagggg ctgcagggag cccagatggg gcagccctgg tgcttcttc 420
 caccagcta cccagctac aagctggaga acctgagctc ctctgaaatg ggctacacgg 480
 ccacctgac ccgtaccacc cccacttct tcccgaagga catctgacc ctgcggctgg 540
 acgtgatgat ggagactgag aaccgcctcc acttcacg 578

<210> 3

<211> 616

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gtgggcaggg caggggcggg ggcgccggcc agggcagagg gtgcgcgtgg acatcgacac 60
 ccacgcacct cacaaggggt gggtgcatgt tgcaccactg tgtgctgggc ccttgcctgg 120
 agcggaggtg tgagcagaca atggcagcgc ccctcgggga gcagtgggga caccacggtg 180
 acaggtactc cagaaggcag ggctcggggc tcattcatct ttatgaaaag gtgggtcagg 240
 tagagtaggg ctgccagagg ttgcgaatga aaacaggatg cccagtaaac ccgaattgca 300
 gatacccag gcatgacttt gttttttgt gtaaggatgc aaaatttggg atgtatttat 360
 actagaaaag ctgcttgttg tttatctgaa attcagagtt atcaggtgtt ctgtatttta 420

cctccatcct gggggaggcg tectctcct ggctctgcag atgagggagc cgaggctcag 480
 agaggctgaa tgtgctgcc atgggtcccac atccatgtgt ggctgcacca ggacctgacc 540
 tgtccttggc gtgcgggttg ttctctggag agtaaggtgg ctgtggggaa catcaataaa 600
 ccccatctc ttctag 616

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n i s t o r u

<400> 4

gcncagcagg gaggcgggag

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<400> 5

ggcncncaaa gcagcncnga

20

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n i s t o r u
 <400> 6
 gacancaacc gcggcnggca cngca 25
 <210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> n i s t o r u
 <400> 7
 gggnaaggng gccagggngg gngnn 25
 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n i s t o r u
 <400> 8
 gccnngcngn cnagacngg 19
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <400> 9
 gagaggcca gaaggaaggg 20
 <210> 10
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(14)

<223> n i s t o r u
 <400> 10
 cccgccccng ccngcc 17
 <210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n i s t o r u
 <400> 11
 nggccgccgc cccgcc 18
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (16)..(16)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n i s t o r u
 <400> 12
 ngnccacgcg caccncngc 20
 <210> 13

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n i s t o r u

<400> 13

gngagngcg ngggngcga

20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 14

gcaacangca ccccaccm

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n i s t o r u

<400> 15

agggccccagc acacagnggn

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n i s t o r u

<400> 16

ncacaccncc gcncccagca

20

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223>
 n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n i s t o r u
 <400> 17

ggcgcngcca nngncngc

18

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n i s t o r u
 <220><221>
 > misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n i s t o r u

<400> 18
gngnccccac ngcnccccga 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222>
(11)..(11)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n i s t o r u
<400> 19
cnggagnacc ngncaccgng 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (15)..(15)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> n i s t o r u

<400> 20

ngagccccga gcccgccnn

20

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(13)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n i s t o r u

<400> 21

ngaccaccn nncanaaag angaa

25

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223>
 > n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n i s t o r u
 <400> 22
 cncnggcagc ccnacncnac cngac 25
 <210> 23
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><
 221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(25)

<223> n i s t o r u

<400> 23

cnagnanaaa nacancccaa annnngc

27

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA exon 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222

> (6)..(6)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n i s t o r u

<400> 24

ggcccnggnc ngcnggcnc cngcn

25

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA exon 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(21)

<223> n i s t o r u

<400> 25

gcncccngca gcccngcnn ngcag

25

<210> 26

<211> 20

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n i s t o r u

<400> 26

ggggcagacg ncagngncn

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n i s t o r u

<400> 27

gcggggcaga cgncagngn

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 28
 gcgcggggca gacgncaggn 20
 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n i s t o r u
 <400> 29
 cagcgcgggg cagacgncag 20
 <210> 30
 <211> 20
 <
 212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n i s t o r u
 <400> 30
 ggcagcgcgg ggcagacgnc 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <400> 31
 ccggcagcgc ggggcagacg 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<400> 32

gccggcagcg cggggcagac 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<400> 33

ccgccggcag cgcgggcag 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> n i s t o r u

<400> 34

gnnaccgccg gcagcgcggg 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> n i s t o r u

<400> 35

gangnnaccg ccggcagcgc 20

<210

> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> n i s t o r u

<400> 36

gggangnnac cgccggcagc 20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222

> (2)..(2)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> n i s t o r u

<400> 37

cngggangnn accgccgca 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> n i s t o r u
 <400> 38

nncngggang nnaccgccgg

20

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature

 <222> (11)..(11)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> n i s t o r u

<400> 39
gcnncnggga ngnnaccgcc 20
<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223>
> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (16)..(17)
<223> n i s t o r u
<400> 40
gcaacncgna ngnccnagg 20
<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (8)..(8)

<223> n i s t o r u

<220><

221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> n i s t o r u

<400> 41

nggcaacncg nangnccnna

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 42
 ncnggcaacn cgnangnccn

20

<210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n i s t o r u

<400> 43
anncnggcaa cncgnangnc 20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n i s t o r u
<220>
><221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n i s t o r u
<400> 44
gnganncngg caacncgnan 20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (4)..(4)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n i s t o r u

<400> 45

aagnganncn ggcaacncgn

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223>

> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 46
 ngggngncag cggaagngan 20
 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><
 221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n i s t o r u
 <400> 47
 ccacngggng ncagcggaag 20
 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (11)..(11)

<223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <400> 48
 gnccacnggg ngncagcgga 20
 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n i s t o r u

 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n i s t o r u
 <400> 49
 nggnccacng ggngncagcg 20
 <210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<400> 50

gcnnngncca cngggngnca

20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223>

> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<400> 51
ccacnncngc anaaaggngc 20
<210> 52
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (7)..(8)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n i s t o r u
<220>
><221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n i s t o r u
<400> 52
ccccacnncn gcanaaaggn 20
<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<400> 53

agccccacnn cngcanaaag

20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<400> 54

ggagccccac nncngcanaa

20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 55
 ngggagcccc acnncngcan 20
 <210> 56
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n i s t o r u
 <400> 56
 gcngggagcc ccacmngc 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 57
 nggcngggag cccacnncn 20
 <210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature

 <222> (8)..(8)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n i s t o r u
 <400> 58
 ccacgccngg cngggagccc 20
 <210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223>

n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(18)

<223> n i s t o r u

<400> 59

nccgaagngc ngggannca 20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> n i s t o r u

<400>

60

nccaccccc nngccnnc 20

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n i s t o r u

<400> 61

nganccaccc cccnnggccn

20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> n i s t o r u

<400> 62

ncaagnganc cacccccm

20

<210> 63

<211> 20

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n i s t o r u
 <400> 63
 agcncaagng anccaccccc 20
 <210> 64
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n i s t o r u
 <400> 64
 gaacncnga gcncagnga 20
 <210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n i s t o r u

<400> 65

ncncgaacnc cngagcncaa

20

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n i s t o r u
 <400> 66
 aggcnggnen cgaacncng 20
 <210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n i s t o r u
 <400> 67
 ccaggcnggn cncgaacnc 20
 <210> 68
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature

 <222> (1)..(3)
 <223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 68
 nnngccangn naccagcn 20
 <210> 69
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(8)
 <223>
 n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> n i s t o r u
 <400> 69
 gggannnngc cangnaccc 20
 <210> 70
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(10)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n i s t o r u

<220

><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> n i s t o r u

<400> 70

acggganmn gccangnac

20

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(13)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n i s t o r u

<400> 71

gagacgggan nngccangn

20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 72
 nagagacggg annnngccan 20
 <210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 73
 nnnngnagag acgggannnn 20
 <210> 74
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<400> 74

ngnanmnnng nagagacggg

20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n i s t o r u

<400> 75

ncngnanmnn ngnagagacg

20

<210> 76

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature

<222> (9)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n i s t o r u
 <400> 76

nnncngnann nnngnagaga

20

<210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(15)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n i s t o r u

<400> 77

annnncngna nnnnngnaga

20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(17)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> n i s t o r u

<400> 78

naannnncng nannnngnaga

20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(19)

<223> n i s t o r u

<400> 79

gcnaannnnc ngnannnnng

20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n i s t o r u

<400> 80
cccgcgccng ccngcccac 20
<210> 81
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<
223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n i s t o r u
<400> 81
ccgccccgc ccngcccng 20
<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n i s t o r u
<400> 82
ccgccgccc cgcccngcc 20
<210> 83
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 83
 nggccgccgc ccccgcccn 20
 <210> 84
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature

 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u
 <400> 84
 cngcccnggc cgccgcccc 20
 <210> 85
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <400> 85

cacccnngc ccnggccgcc

20

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<400> 86

gcgcaccnc ngcccnggcc

20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u
 <400> 87
 ngncgangnc cacg'gcacc 20
 <210> 88
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature

 <222> (2)..(2)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n i s t o r u
 <400> 88
 gngggngncg angnccacgc 20
 <210> 89
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n i s t o r u

<400> 89

ngcgnngngng ncgangncca

20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n i s t o r u
 <400> 90
 gngagngcgc ngggngncga 20

<210> 91
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 91

gcaccccacc cnngngaggn 20
 <210> 92
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 92
 aacangcacc ccacccnngn 20
 <210> 93
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n i s t o r u
 <400> 93
 aggaggagga cgccncccc 20

 <210> 94
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u
 <400> 94
 cncancngca gagccaggag 20
 <210> 95
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<400> 95

cccncancng cagagccagg

20

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<400> 96

cncccncanc ngcagagcca

20

<210> 97

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n i s t o r u
 <400> 97

gnccccncan cngcagagcc

20

<210> 98
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)

<223> n i s t o r u
 <400> 98
 ggcncccnca ncngcagagc 20
 <210> 99
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223>
 > n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n i s t o r u
 <400> 99
 cggcnccnc ancngcagag 20
 <210> 100
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n i s t o r u

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n i s t o r u

<400> 100

ncggcncccn cancngcaga

20

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<400> 101

cncggcnccc ncancngcag

20

<210> 102

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)

<
 223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n i s t o r u
 <400> 102

ccncggcnc cncancngca

20

<210> 103
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA Intron 2 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n i s t o r u

 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n i s t o r u
 <400> 103
 gccncggcnc ccncancgc 20
 <210> 104
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature

 <222> (4)..(4)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n i s t o r u
 <400> 104
 ggcncncaaa gcagcncnga 20
 <210> 105
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223>

> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n i s t o r u

<400> 105

ggcncncaaa gcagcncnga gacan

25

<210> 106

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220>

><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n i s t o r u
 <400> 106
 cacggggcnc ncaaagcagc ncnga 25
 <210> 107
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature

 <222> (1)..(1)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n i s t o r u
 <400> 107
 ncaaagcagc ncngagacan 20
 <210> 108
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n i s t o r u

<400> 108
cacggggcnc ncaaagcagc 20
<210> 109
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n i s t o r u
<
220><221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n i s t o r u
<400> 109
gcccnngcngn cnagacngg 19
<210> 110
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n i s t o r u
<220><221> misc_feature
<222> (8)..(8)

<223> n is t or u

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n is t or u

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n is t or u

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n is t or u

<400> 110

gcccnngcngn cnagacnggg gaga

24

<210> 111

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n is t or u

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<

223> n is t or u

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n is t or u

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n is t or u

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n is t or u

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n i s t o r u

<400> 111

gngnngcccn gcngncngga cngg

24

<210> 112

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n i s t o r u

<400> 112

gcngncnaga cnggggaga

19

<210> 113

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n i s t o r u
 <400> 113
 gngnngcccn gcngcnag
 <210> 114
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)

19

<223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n i s t o r u
 <400> 114
 cnggagnacc ngncaccgng

20

<210> 115
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(22)

 <223> n i s t o r u
 <220><221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> n i s t o r u
 <400> 115

cnggagnacc ngncaccgng gngnc

25

<210> 116

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> n i s t o r u

<400> 116

gccnncngga gnaccngnca ccgng

25

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> n i s t o r u

<400> 117

gnaccngnea ccgngngnc

20

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA intron 1 targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<400> 118

gccnncngga gnaccngnca

20

<210> 119

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n i s t o r u

<400> 119

ggcccnggnc ngcnggcnc cngcn 25

<210> 120

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense oligomer - GAA targeting sequence

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n i s t o r u

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(21)

<223> n i s t o r u

<400> 120

gnccccngca gcccncgcn ngcag 25

<210> 121

<211> 17

<212>

DNA

<213> Homo sapiens

<400> 121

cgttgttcag cgaggga 17

<210> 122

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 122

ctcctctgaa atgggctaca c 21

<210> 123

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 123

acctcgtagc gcctgtta

18