(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0104759
(43) 공개일자 2021년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7021183
(22) 출원일자(국제) 2019년12월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년07월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/065581
(87) 국제공개번호 WO 2020/123574
국제공개일자 2020년06월18일
(30) 우선권주장
62/779,028 2018년12월13일 미국(US)

(71) 출원인
사렙타 쎄러퓨틱스 인코퍼레이티드
미국 매사추세츠 02142, 캠브리지, 215 퍼스트 스트리트
(72) 발명자
슈넬 프레데릭 조셉
미국, 메사추세츠 02142, 캠브리지, 215 퍼스트 스트리트, 씨/오 사렙타 쎄러퓨틱스 인코퍼레이티드
카이 바오종
미국, 메사추세츠 02142, 캠브리지, 215 퍼스트 스트리트, 씨/오 사렙타 쎄러퓨틱스 인코퍼레이티드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 29 항

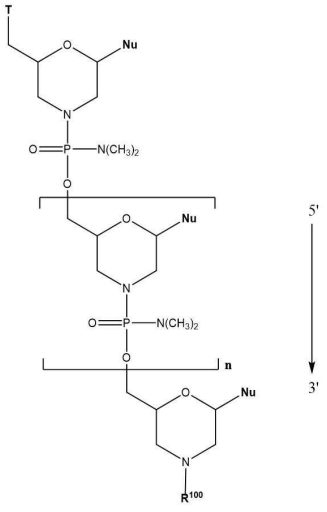
(54) 발명의 명칭 **근 이영양증을 위한 엑손 스키핑 올리고머 접합체**

(57) 요 약

엑손 50 스키핑을 유도하기 위한 인간 디스트로핀 유전자의 선택된 표적 부위에 상보적인 안티센스 올리고머가

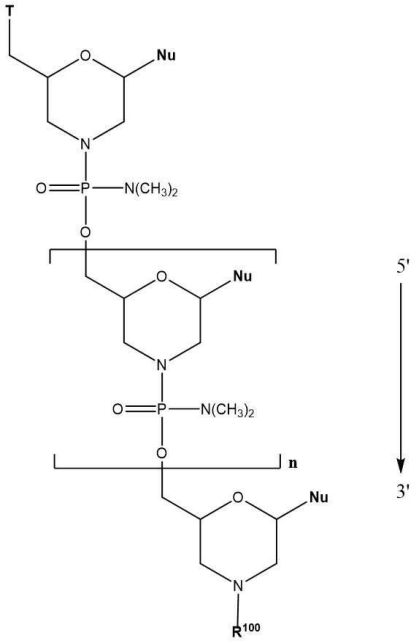
(뒷면에 계속)

대 표 도



(I)

기술된다. 다양한 양태에서, 화학식 (I)에 따른 안티센스 올리고머:



(I)

또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 기술되며, 식 중 T, Nu, n, 및 R^{100}은 본원에 정의되어 있다.

(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/3233 (2013.01)
C12N 2310/3515 (2013.01)
C12N 2320/33 (2013.01)

(72) 발명자
데사이 안커
미국, 메사추세츠 02142, 캠브리지, 215 퍼스트 스트리트, 씨/오 사렙타 쎄러퓨틱스 인코퍼레이티드

베스트위크 리차드 케이.
미국, 메사추세츠 02142, 캠브리지, 215 퍼스트 스트리트, 씨/오 사렙타 쎄러퓨틱스 인코퍼레이티드

명 세 서

청구범위

청구항 1

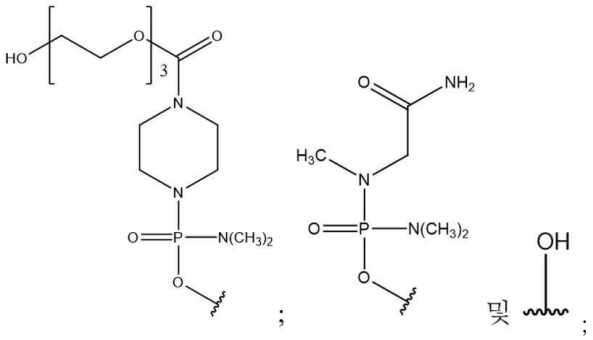
인간 디스트로핀 유전자에서 선택된 표적에 결합하여 엑손 스키핑을 유도할 수 있는 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로서, 안티센스 올리고머는 어닐링 부위로서 지정된 디스트로핀 mRNA 전구체의 엑손 50 표적 영역에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 염기 서열 및 어닐링 부위는 다음으로부터 선택되는, 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

(서열번호 1 내지 9의 각각의 T는 티민 또는 우라실임).

청구항 2

제1항에 있어서, 안티센스 올리고머는 안티센스 올리고머의 5' 말단에 부착된 T 모이어티를 함유하고, 상기 T 모이어티는 다음으로부터 선택되고:



안티센스 올리고머는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결되고;

안티센스 올리고머는 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 스키핑을 유도하는, 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 3

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 투과 펩티드는 안티센스 올리고머의 3' 말단에 부착되는, 안티센스 올리고머.

청구항 4

제3항에 있어서, 세포 투과 펩티드는 아르기닌-풍부 펩티드인, 안티센스 올리고머.

청구항 5

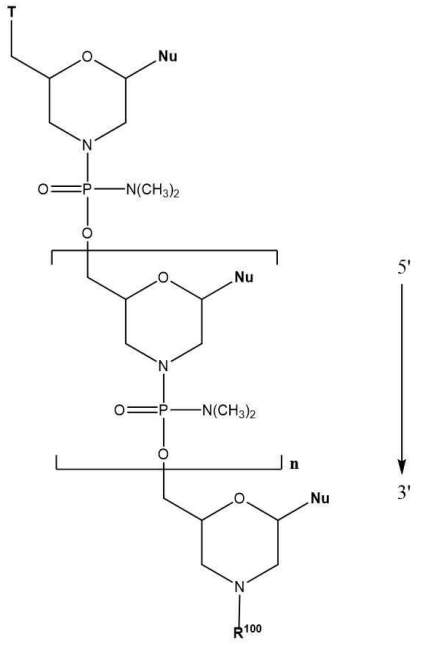
제4항에 있어서, 아르기닌-풍부 펩티드는 $-(RXR)_4-R^a$ (서열번호 15), $R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 16), $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (서열번호 17), $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 18), $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 19), $-GLY-R_5-R^a$ (서열번호 20), $-R_5-R^a$ (서열번호 21), $-GLY-R_6-R^a$ (서열번호 11), 및 $-R_6-R^a$ (서열번호 10)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 식 중 R^a는 H, 아실, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택되고, R은 아르기닌이고, X는 6-아미노헥사노익산이고, B는 β-알라닌이고, F는 페닐알라닌이고, GLY(또는 G)는 글리신인, 안티센스 올리고머.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머의 핵염기는 모르폴리노 고리 구조에 연결되는, 안티센스 올리고머.

청구항 7

화학식 (I)에 따른 안티센스 올리고머, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로서:

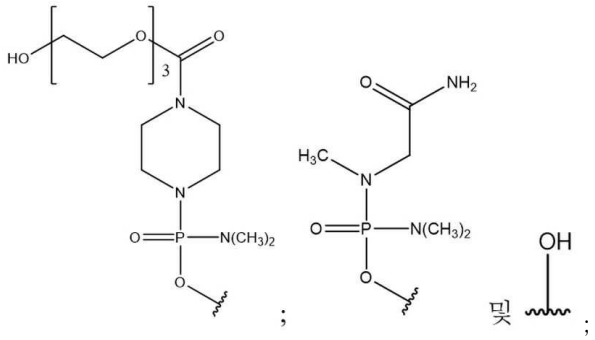


(I)

식 중:

각각의 Nu는 서로 합쳐져 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

T는 다음으로부터 선택되는 모이어티이고:



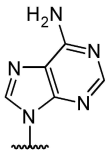
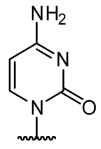
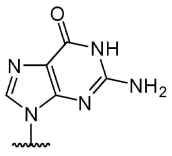
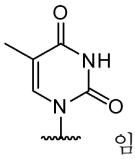
;

T 모이어티의 원위 -OH 또는 $-NH_2$는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결되고;

R^{100}은 수소 또는 세포 투과 펩티드이고;

1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응하는, 안티센스 올리고머:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

(여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이며, T는  임).

청구항 8

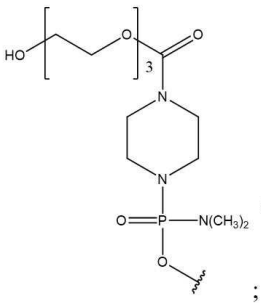
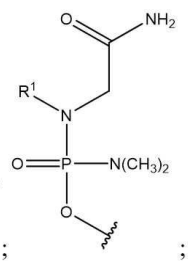
제7항에 있어서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에 상응하는, 안티센스 올리고머.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 안티센스 올리고머는 하나의 세포 투과 펩티드를 함유하는, 안티센스 올리고머.

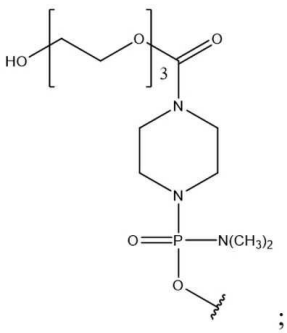
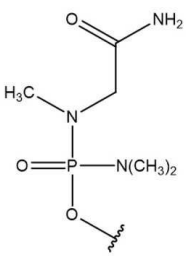
청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, T는 다음으로부터 선택된 모이어티인, 안티센스 올리고머:

 ;  ; 및 .

청구항 11

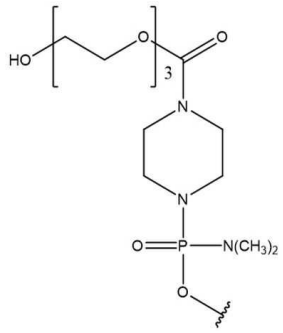
제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, T는 다음으로부터 선택된 모이어티이고:

 ;  및 ,

R^{100}은 세포 투과 펩티드인, 안티센스 올리고머.

청구항 12

제11항에 있어서,

T는  이고,

R^{100}은 세포 투과 펩티드인, 안티센스 올리고머.

청구항 13

제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 투과 펩티드는 아르기닌-풍부 펩티드인, 안티센스 올리고머.

청구항 14

제13항에 있어서, 아르기닌-풍부 펩티드는 $-(RXR)_4-R^a$ (서열번호 15), $R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 16), $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (서열번호 17), $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 18), $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 19), $-GLY-R_5-R^a$ (서열번호 20), $-R_5-R^a$ (서열번호 21), $-GLY-R_6-R^a$ (서열번호 11), 및 $-R_6-R^a$ (서열번호 10)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 식 중 R^a는 H, 아실, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택되고, R은 아르기닌이고, X는 6-아미노헥사노일이고, B는 β-알라닌이고, F는 페닐알라닌이고, GLY(또는 G)는 글리신인, 안티센스 올리고머.

청구항 15

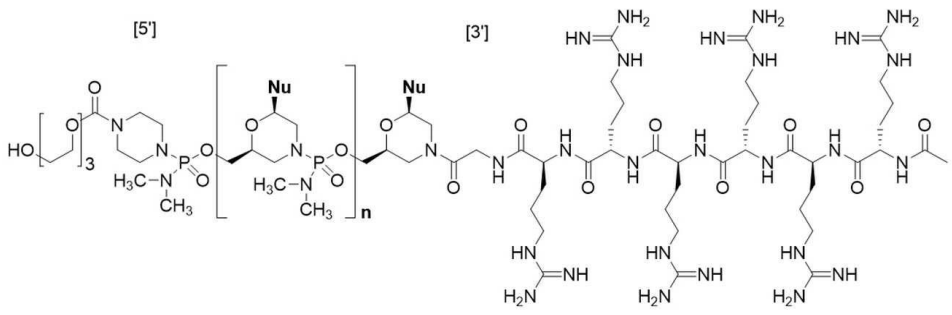
제7항 내지 제14항에 있어서, 안티센스 올리고머는 유리 염기 형태인, 안티센스 올리고머.

청구항 16

제7항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인, 안티센스 올리고머.

청구항 17

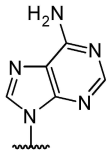
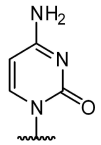
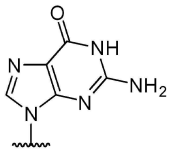
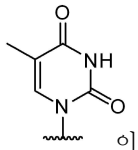
화학식 (III)에 따른 안티센스 올리고머, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로서:



(III)

식 중, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응하고:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

식 중, A는 이고, C는 이고, G는 이고, T는 이며, 화학식 (III)의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결되는, 안티센스 올리고머.

청구항 18

제17항에 있어서, 1에서 n 및 화학식 (III)의 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에 상응하는, 안티센스 올리고머.

청구항 19

제17항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머는 유리 염기 형태인, 안티센스 올리고머.

청구항 20

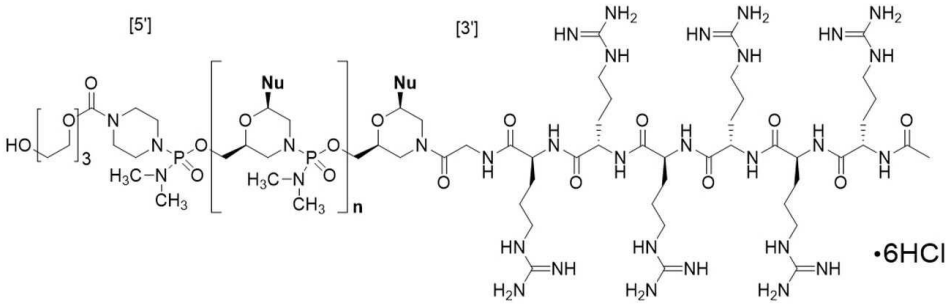
제17항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인, 안티센스 올리고머.

청구항 21

제20항에 있어서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에 상응하는, 안티센스 올리고머.

청구항 22

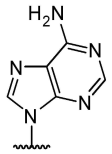
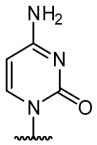
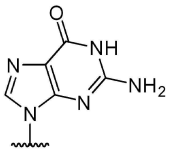
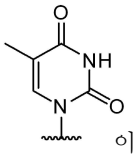
화학식 (IV)에 따른 안티센스 올리고머로서:



(IV)

식 중 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응하고:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

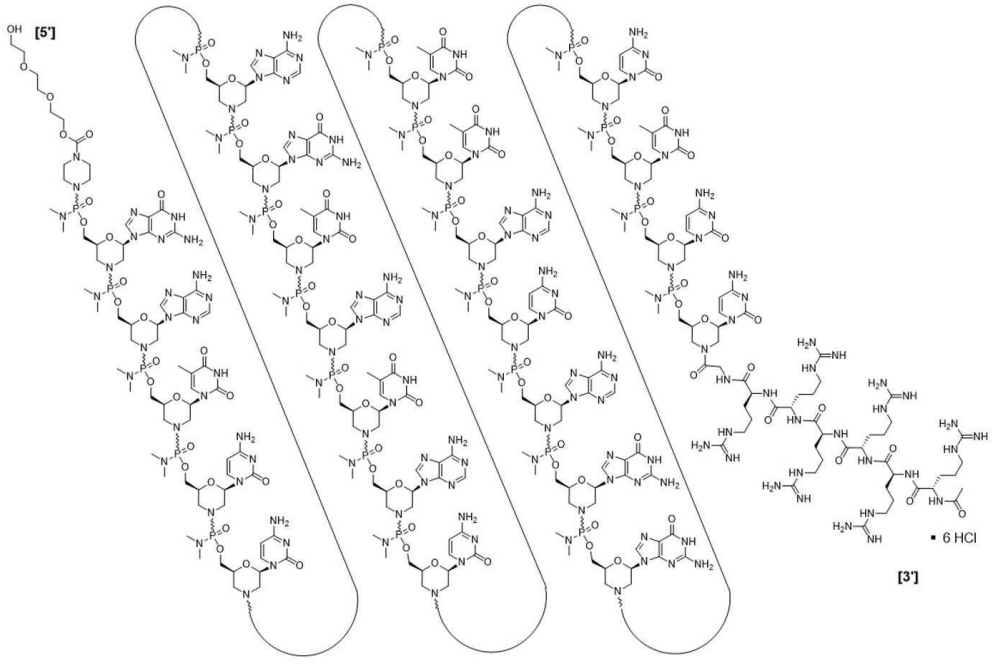
식 중, A는  이고, C는  이고, G는  이고, T는  이며, 화학식 (IV)의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결되는, 안티센스 올리고머.

청구항 23

제22항에 있어서, 1에서 n 및 화학식 (IV)의 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에 상응하는, 안티센스 올리고머.

청구항 24

제22항에 있어서, 안티센스 올리고머는 화학식 (IVa)에 따르는 것인, 안티센스 올리고머:



(IVa)

.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 26

뒤시엔느 근 이영양증(DMD)의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 안티센스 올리고머 또는 제25항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 대상체는 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는, 방법.

청구항 28

대상체에서 디스트로핀 생산을 유도하기 위해 mRNA 판독 프레임을 복원하는 방법으로서, 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 안티센스 올리고머 또는 제25항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 대상체는 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2018년 12월 13일에 출원된 미국 가출원 제62/779,028호에 대한 우선권을 주장한다. 위에 언급된 출원의 전체 교시는 그 전체가 참조로서 통합된다.

[0003] **EFS-WEB을 통해 전자 방식으로 제출된 서열 목록에 대한 참조**

[0004] 동시에 출원된 전자 제출된 서열 목록(명칭:_8171_50_WO00_SL.txt; 크기: 10,080바이트; 생성일자: 2019년 11월 6일)의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 개시는 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 50 스키핑(skipping)에 적합한 신규한 안티센스 올리고머 및 이의 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 개시는 또한 신규한 안티센스 올리고머를 사용해 엑손 50 스키핑을 유도하는 방법, 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서 디스트로핀을 생성하는 방법, 및 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체를 치료하기 위한 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0007] 뒤시엔느 근 이영양증(DMD)은 단백질 디스트로핀의 발현 결함으로 인해 발생한다. 단백질을 암호화하는 유전자는 DNA의 2백만 개가 넘는 뉴클레오티드에 걸쳐 분산된 79개의 엑손을 포함한다. 엑손의 판독 프레임을 변화시키거나, 정지 코돈을 도입하거나, 전체 프레임 외 엑손(들)의 제거 또는 하나 이상의 엑손의 중복을 특징으로 하는 임의의 엑손 돌연변이는 기능적 디스트로핀의 생산을 파괴하여 DMD를 야기할 가능성이 있다.

[0008] 덜 심각한 형태의 근 이영양증인 베커 근 이영양증(Becker muscular dystrophy, BMD)은 돌연변이, 일반적으로는 하나 이상의 엑손의 결실이 전체 디스트로핀 전사체를 따라 정확한 판독 프레임을 생성하여 mRNA의 단백질로의 번역이 조기 성숙 종결되지 않는 경우에 발생하는 것으로 밝혀졌다. 돌연변이된 디스트로핀 mRNA 전구체의 프로세싱 중에 상류 및 하류 엑손의 결합이 유전자의 정확한 판독 프레임을 유지시키는 경우, 일부 활성을 유지하는 짧은 내부 결실을 포함한 단백질을 코딩하는 mRNA가 생성되어, 베커(Becker) 표현형이 생성된다.

[0009] 엑손 50 스키핑에 적합한 안티센스 올리고머, 및 디스트로핀을 생산하고 DMD를 치료하는 치료 방법에 유용한 상응하는 약학적 조성물이 필요하다.

발명의 내용

[0010] 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 선택된 표적에 결합하여 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 스키핑을 유도할 수 있으며, 여기서 안티센스 올리고머는, 어닐링 부위로서 지정된 디스트로핀 mRNA 전구체의 엑손 50 표적 영역에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 염기 서열 및 어닐링 부위는 다음으로부터 선택된다:

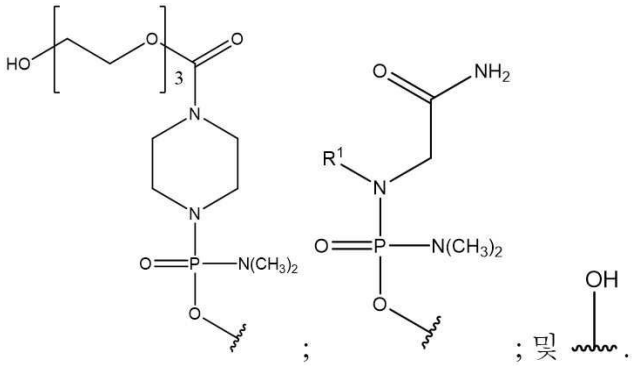
어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

[0011]

[0012] (T는 티민 또는 우라실임). 일 양태에서, 각각의 T는 티민이다.

[0013] 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다: 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 또는 서열번호 9. 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에서의 핵염기에 상응한다. 3.

[0014] 일 양태에서, 안티센스 올리고머는 안티센스 올리고머의 5' 말단에 부착된 T 모이어티를 함유하되, T 모이어티는 다음으로부터 선택된다:



[0015]

[0016] 특정 구현예에서, 안티센스 올리고머는 하나 이상의 세포 투과 펩티드(본 명세서에서 "CPP"로서 지칭됨)에 접합된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 CPP는 안티센스 올리고머의 말단에 부착된다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 CPP는 안티센스 올리고머의 5' 말단에 부착된다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 CPP는 안티센스 올리고머의 3' 말단에 부착된다. 특정 구현예에서, 제1 CPP는 안티센스 올리고머의 5' 말단에 부착되고, 제2 CPP는 3' 말단에 부착된다.

[0017] 일부 구현예에서, CPP는 아르기닌-풍부 펩티드이다. 용어 "아르기닌-풍부(arginin-rich)"는 적어도 2개, 바람직하게는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 아르기닌 잔기를 갖는 CPP를 지칭하며, 이들 아르기닌 잔기는 하나 이상의 하전되지 않은 소수성 잔기에 의해 임의로 분리되고, 약 6 내지 14개의 아미노산 잔기를 임의로 함유한다. 후술하는 바와 같이, CPP는 바람직하게는 이의 카르복시 말단에서 링커(하나 이상의 아미노산일 수도 있음)를 통해 안티센스 올리고뉴클레오티드의 3' 및/또는 5' 말단에 연결되고, 바람직하게는 이의 아미노산 말단에서 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 또는 스테아로일로부터 선택된 R^a를 갖는 치환기 R^a에 의해 또한 캡핑된다. 일부 구현예에서, R^a는 아세틸이다.

[0018] 아래 표에 보이는 바와 같이, 본원에서 사용하기 위한 CPP의 비제한적인 예는 $-(RXR)_4-R^a$ (서열번호 15), $-R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 16), $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (서열번호 17), $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 18), $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 19), $-GLY-R_5-R^a$ (서열번호 20), $-R_5-R^a$ (서열번호 21), $-GLY-R_6-R^a$ (서열번호 11) 및 $-R_6-R^a$ (서열번

호 10)를 포함하며, 식 중 R^a는 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택되고, R은 아르기닌이고, X는 6-아미노헥사노익산이고, B는 β-알라닌이고, F는 페닐알라닌이며, GLY(또는 G)는 글리신이다. CPP "R_5 (서열번호 21)"는 아미드 결합을 통해 함께 연결된 5개의 아르기닌 잔기로 이루어진 펩티드를 나타내도록 의미를 갖는다(R^5 (서열번호 21)와 같은 단일 치환기가 아님). CPP "R_6 (서열번호 10)"은 아미드 결합을 통해 함께 연결된 6개의 아르기닌 잔기로 이루어진 펩티드를 나타내도록 의미를 갖는다(R^6 (서열번호 10)과 같은 단일 치환기가 아님). 일부 구현예에서, R^a는 아세틸이다.

[0019] 예시적인 CPP가 **표 1**에 제공된다(서열번호 10, 11, 및 15 내지 21).

표 1

[0020]

명칭	서열	서열번호
R_6G	RRRRRRG	11
R_6	RRRRRR	10
$(RXR)_4$	RXRRXRRXRRXR	15
$(RFF)_3R$	RFFRFFRFFR	16
$(RXR)_4XB$	RXRRXRRXRRXRXB	17
$(RFF)_3RXB$	RFFRFFRFFRXB	18
$(RFF)_3RG$	RFFRFFRFFRG	19
R_5 G	RRRRRG	20
R_5	RRRRR	21
R은 아르기닌이고; X는 6-아미노헥사노익산이고; B는 β-알라닌이고; F는 페닐알라닌이고; G는 글리신임.		

[0021] CPP, 이들의 합성, 및 올리고머에 접합하는 방법은 미국 특허 출원 공개 제2012/0289457호 및 국제 특허 출원 공개 제WO 2004/097017호, 제WO 2009/005793호, 및 제WO 2012/150960호에 개시되어 있으며, 이들의 개시 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0022] 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 CPP와 링커의 조합으로서 정의된 치환기 "Z"를 포함한다. 링커는 그의 카르복시 말단에서 CPP를 올리고뉴클레오티드의 3' 말단 및/또는 5' 말단에 연결한다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 올리고머의 3' 말단에 연결된 하나의 CPP만을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 올리고머의 5' 말단에 연결된 하나의 CPP만을 포함할 수 있다.

[0023] Z 내의 링커는, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산을 포함할 수 있다.

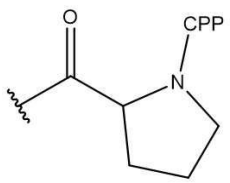
[0024] 특정 구현예에서, Z는 다음으로부터 선택되며:

[0025] $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$;

[0026] $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$;

[0027] $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$;

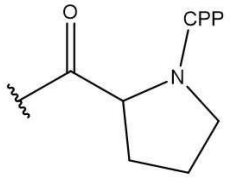
[0028] $-C(O)CH_2NH-CPP$; 및 화학식:

[0029] 

[0030] 식 중 CPP는 CPP 카르복시 말단에서 아미드 결합에 의해 링커 모이어티에 부착된다.

[0031] 다양한 구현예에서, CPP는 본원에 기술되고 표 1에 보이는 바와 같은 아르기닌-풍부 펩티드이다. 다양한 구현예

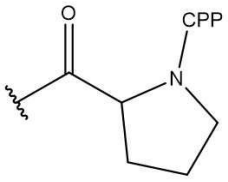
에서, 아르기닌-풍부 CPP는 R_5-R^a(즉, 5개의 아르기닌 잔기; 서열번호 21)이고, R^a는 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택된다. 특정 구현예에서, R^a는 아세틸이다. 다양한 구현예에서, CPP는 서열번호 21이고, 링커는 $-C(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)CH_2NH-$, 및



으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산을 포함한다.

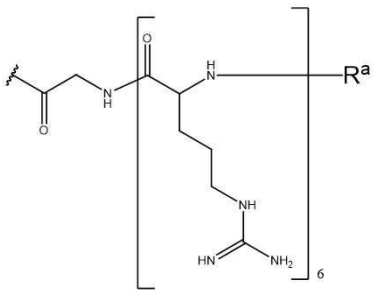
[0032] 일부 구현예에서, CPP는 서열번호 21이고, 링커는 Gly이다. 일부 구현예에서, CPP는 서열번호 20이다.

[0033] 특정 구현예에서, 아르기닌-풍부 CPP는 $-R_6$-R^a(즉, 6개의 아르기닌 잔기; 서열번호 10)이고, R^a는 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택된다. 특정 구현예에서, R^a는 아세틸이다. 다양한 구현예에서, CPP는 서열번호 10, 15, 또는 16으로부터 선택되고, 링커는 $-C(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)CH_2NH-$, 및



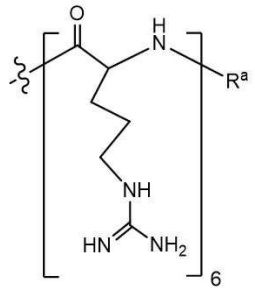
로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, CPP는 서열번호 10이고, 링커는 Gly이다. 일부 구현예에서, CPP는 서열번호 11이다.

[0034] 특정 구현예에서, Z는 올리고머의 5' 및/또는 3' 말단에서 본 개시의 안티센스 올리고머에 공유 결합된 $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$("R_6"은 서열번호 10으로서 개시됨)이고, 여기서 R^a는 R_6(서열번호 10)의 아미노 말단을 캡핑하기 위한 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 또는 스테아로일이다. 특정 구현예에서, R^a는 아세틸이다. 이들 비제한적인 예시에서, CPP는 $-R_6$-R^a (서열번호 10)이고 링커는 $-C(O)CH_2NH-$ (즉, GLY)이다. Z = $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ ("R_6"은 서열번호 10으로서 개시됨)의 이러한 특정 예시는 다음의 구조에 의해 또한 예시되며:

[0035] 

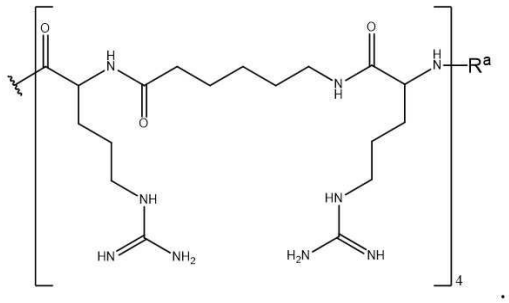
[0036] 식 중 R^a는 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택된다. 일부 구현예에서, R^a는 아세틸이다.

[0037] 다양한 구현예에서, CPP는 $-R_6-R^a$ (서열번호 10)이고, 하기 화학식으로도 예시되며:

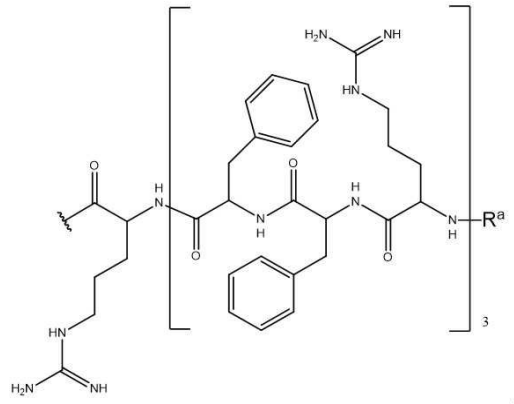
[0038] 

[0039] 식 중 R^a는 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택된다. 특정 구현예에서, CPP는 서열번호 11. 일부 구현예에서, R^a는 아세틸이다.

[0040] 일부 구현예에서, CPP는 $-(RXR)_4-R^a$ (서열번호 15)이고, 하기 화학식으로도 예시된다:

[0041] 

[0042] 다양한 구현예에서, CPP는 $-R-(FFR)_3-Ra$ (서열번호 16)이고, 하기 화학식으로도 예시된다:

[0043] 

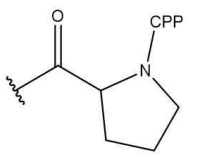
[0044] 다양한 구현예에서, Z는 다음으로부터 선택되고:

[0045] $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$;

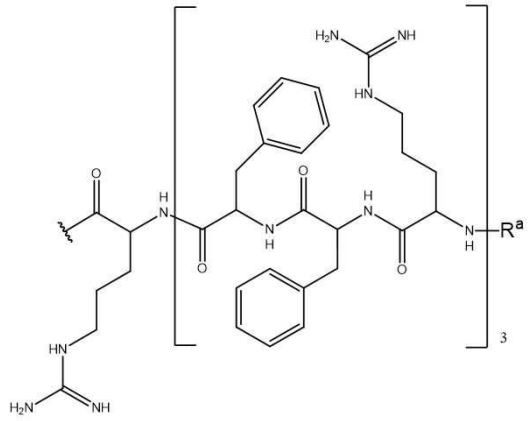
[0046] $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$;

[0047] $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$;

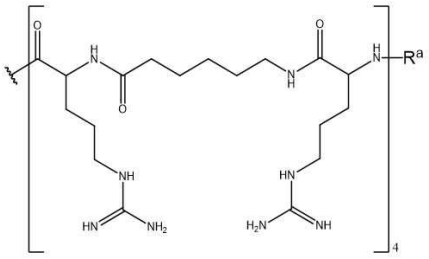
[0048] $-C(O)CH_2NH-CPP$, 및 화학식:

[0049] 

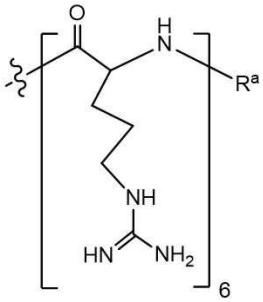
[0050] 식 중 CPP는 CPP 카르복시 말단에서 아미드 결합에 의해 링커 모이어티에 부착되고, CPP는 다음으로부터 선택된다:



[0051] , (-R-(FFR)$_3$-R^a) (서열번호 16),



, (-(RXR)$_4$-R^a) (서열번호 15),



, 및 (-R$_6$-R^a) (서열번호 10). 일부 구현예에서, R^{a}는 아세틸이다.

[0052] 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에 상응한다.

[0053] 일부 양태에서, 변형된 안티센스 올리고머의 핵염기는 모르폴리노 고리 구조에 연결되고, 여기서 모르폴리노 고리 구조는 하나의 링 구조의 모르폴리노 질소를 인접한 고리 구조의 5' 고리 외 탄소에 결합시키는 인산-함유 서브유닛 간 결합에 의해 결합된다.

[0054] 일부 양태에서, 안티센스 올리고머의 핵염기는 펩티드 핵산(PNA)에 연결되고, 여기서 인산염-당 폴리뉴클레오티드 백본은 핵염기가 연결되는 가요성 슈도-펩티드 중합체로 치환된다.

[0055] 일부 양태에서, 안티센스 올리고머의 핵염기 중 적어도 하나는 잠금 핵산(LNA)이고, 여기서 잠금 핵산 구조는, 리보오스 모이어티가 2' 산소와 4' 탄소를 연결하는 여분의 브리지를 갖는, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드 유사체이다.

[0056] 일부 양태에서, 안티센스 올리고머의 핵염기 중 적어도 하나는 가교 핵산(bridged nucleic acids, BNA)에 연결되고, 여기서 당 형태는 푸라노오스 골격에 추가의 가교 구조를 도입함으로써 제한되거나 잠긴다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머의 핵염기 중 적어도 하나는 2'-O,4'-C-에틸렌-가교 핵산(ENA)에 연결된다.

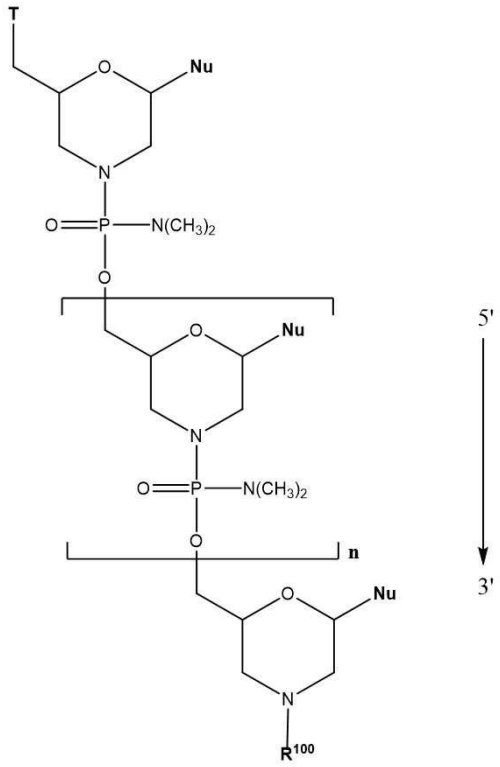
[0057] 일부 양태에서, 변형된 안티센스 올리고머는 미잠금 핵산(UNA) 서브유닛을 함유할 수 있다. UNA 및 UNA 올리고머는 서브유닛의 C2'-C3' 결합이 절단된 RNA의 유사체이다.

[0058] 일부 양태에서, 변형된 안티센스 올리고머는 비가교 산소 중 하나가 황으로 치환되는 하나 이상의 포스포로티오에이트(또는 S-올리고)를 함유한다. 일부 양태에서, 변형된 안티센스 올리고머는 리보오스의 2'-OH가 메틸, 메톡시에틸, 2-(N-메틸카르바모일)에틸, 또는 플루오로기로 각각 치환되는 하나 이상의 2' O-메틸, 2' O-MOE, MCE, 및 2'-F를 함유한다.

[0059] 일부 양태에서, 변형된 안티센스 올리고머는, 시클로프로판 고리를 도입하여 골격의 형태적 유연성을 제한하고 골격 기하학적 구조의 비틀림각(γ)을 최적화함으로써 각각의 뉴클레오티드가 변형된 제한된 DNA 유사체 클래스인, 트리시클로-DNA(tc-DNA)이다.

[0060] 다양한 양태에서, 본 개시는 화학식 (I)에 따른 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제

공하며:



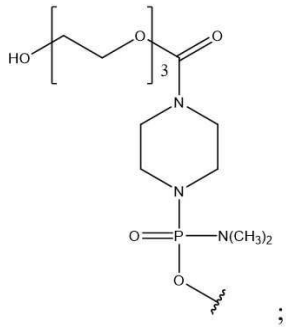
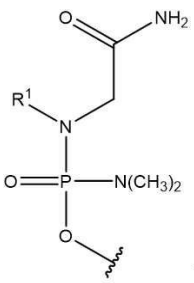
(I)

[0061]

[0062] 식 중:

[0063] 각각의 Nu는 서로 합쳐져 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

[0064] T는 다음으로부터 선택되는 모이어티이고:

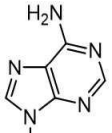
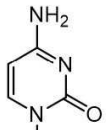
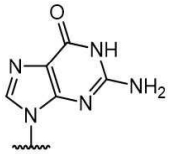
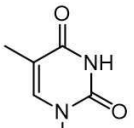
[0065]  ;  및 ; , T 모이어티의 원위 -OH 또는 $-NH_2$는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결되고;

[0066] R^{100}은 수소 또는 세포 투과 펩티드이고;

[0067] 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다:

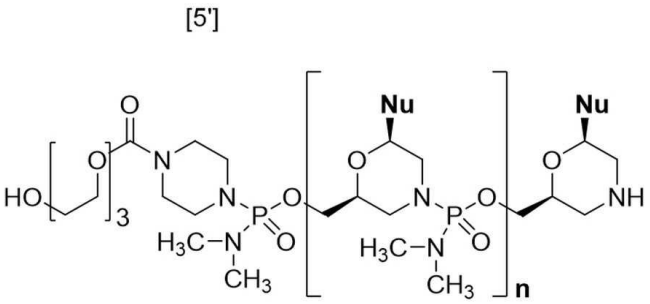
어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

[0068]

[0069] (여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이며, T는  임).

[0070] 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다: 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 또는 서열번호 9. 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에 상응한다.

[0071] 또 다른 양태에서, 본 개시는 화학식 (II)의 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며:



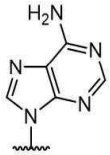
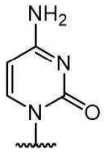
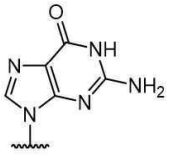
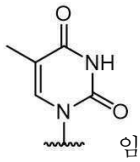
(II)

[0072]

[0073] 식 중, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

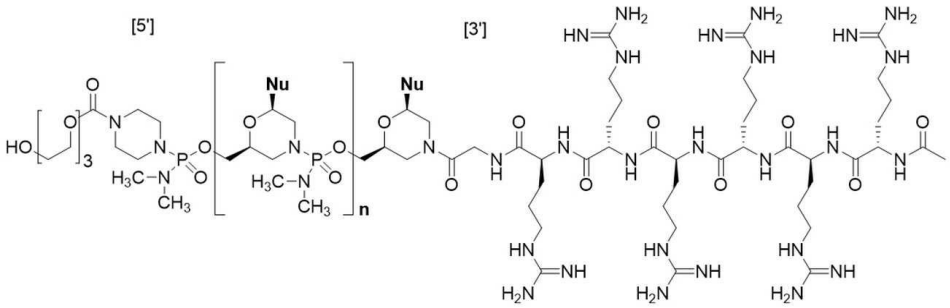
[0074]

[0075]    

(여기서 A는 이고, C는 이고, G는 이며, T는 임). 일부 구현예에서, 화학식 (II)의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 연결된다.

[0076] 일부 구현예에서, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다: 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 또는 서열번호 9. 일부 구현예에서, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 서열번호 3에 상응한다.

[0077] 또 다른 양태에서, 본 개시는 화학식 (III)의 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며:



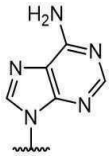
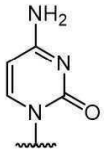
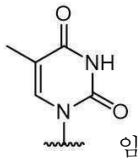
(III)

[0078]

[0079] 식 중, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

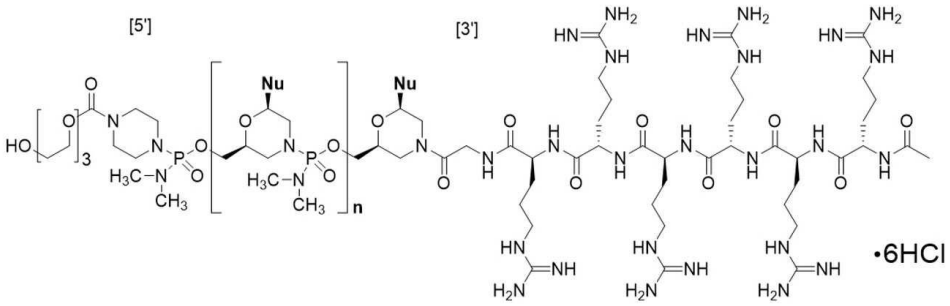
[0080]

[0081]   

(여기서 A는 이고, C는 이고, G는 이며, T는 임). 일부 구현예에서, 화학식 (III)의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 연결된다.

[0082] 일부 구현예에서, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 서열번호 3에 상응한다.

[0083] 또 다른 양태에서, 본 개시는 화학식 (IV)의 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며:



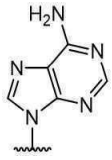
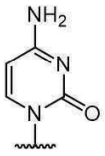
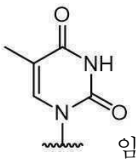
(IV)

[0084]

[0085] 식 중, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응하고:

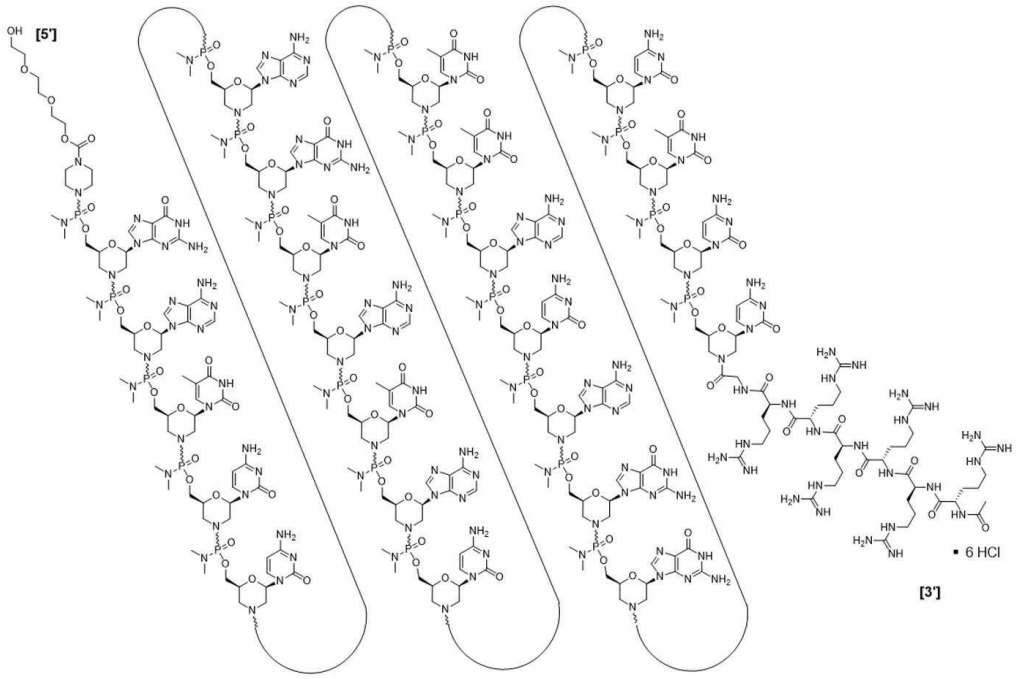
[0086]

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

[0087] (여기서 A는  이고, C는  이고, G는 이며, T는  임).

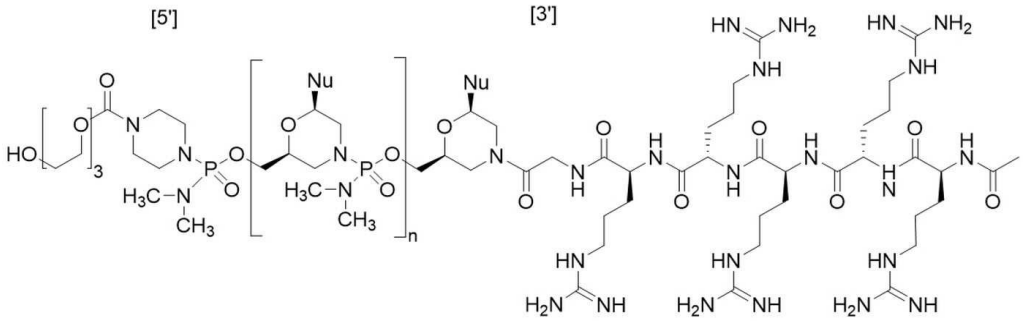
[0088] 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에 상응한다.

[0089] 화학식 (IV)의 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머는 화학식 (IVa)에 따른 것이다.



[0090] **(IVa)**

[0091] 또 다른 양태에서, 본 개시는 화학식 (V)의 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며:

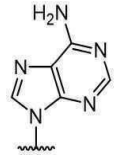
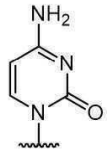
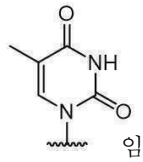


[0092] **(V)**

[0093] 식 중 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

[0094]

[0095] (여기서 A는  이고, C는  이고, G는 이며, T는  임). 일부 구현예에서, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 서열번호 3에 상응한다.

[0096] 또 다른 양태에서, 본 개시는, 뒤시엔느 근 이영양증(DMD)의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 대상체는 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖고, 상기 방법은 본 개시의 안티센스 올리고머를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또한, 본 개시는, 뒤시엔느 근 이영양증(DMD)의 치료를 필요로 하는 대상체를 대상으로 이를 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 본 개시의 안티센스 올리고머의 용도를 다루며, 여기서 대상체는 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는다.

[0097] 또 다른 양태에서, 본 개시는, 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서 디스트로핀 생산을 유도하기 위해 mRNA 판독 프레임을 복원하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 개시의 안티센스 올리고머를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 개시는, 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서 mRNA 프로세싱 도중에 디스트로핀 mRNA 전구체로부터 엑손 50를 제외시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 개시의 안티센스 올리고머를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 개시는, 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서 디스트로핀 mRNA 전구체의 엑손 50, 인트론 49, 및/또는 인트론 50에 결합하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 개시의 안티센스 올리고머를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0098] 또 다른 양태에서, 본 개시는 치료에 사용하기 위한 본 개시의 안티센스 올리고머를 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시는 뒤시엔느 근 이영양증의 치료에 사용하기 위한 본 개시의 안티센스 올리고머를 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시는 치료에 사용하기 위한 의약을 제조하는 데 사용하기 위한 본 개시의 안티센스 올리고머를 제공한다. 소정의 구현예에서, 본 개시는 뒤시엔느 근 이영양증의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 본 개시의 안티센스 올리고머를 제공한다.

[0099] 또 다른 양태에서, 본 개시는 또한, 뒤시엔느 근 이영양증(DMD)의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 대상체는 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖고, 상기 키트는 적합한 용기에 포장된 본 개시의 적어도 하나의 안티센스 올리고머 및 이의 사용을 위한 지침을 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0100] 본 개시의 구현예는 일반적으로 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 스키핑을 유도하도록 특이적으로 설계된 개선된 안티센스 올리고머 및 이의 사용 방법에 관한 것이다. 디스트로핀은 근육 기능에 있어서 중요한 역할을 하며, 다양한 근육 관련 질환은 이 유전자의 돌연변이된 형태를 특징으로 한다. 따라서, 특정 구현예에서, 본원에 기술된 개선된 안티센스 올리고머는 돌연변이된 형태의 인간 디스트로핀 유전자, 예컨대 뒤시엔느 근 이영양증(Duchenne muscular dystrophy, DMD) 및 베커 근 이영양증(Becker muscular dystrophy, BMD)에서 발견되는 돌연변이된 디스트로핀 유전자에서 엑손 스키핑을 유도한다.

[0101] 돌연변이에 의해 야기되는 비정상적인 mRNA 스플라이싱 이벤트로 인해, 이들 돌연변이된 인간 디스트로핀 유전자는 결함이 있는 디스트로핀 단백질을 발현하거나, 측정가능한 디스트로핀을 전혀 발현하지 않는데, 이는 다양한 형태의 근 이영양증으로 이어지는 병태이다. 이러한 병태를 치료하기 위해, 본 개시의 안티센스 올리고머는 돌연변이된 인간 디스트로핀 유전자의 전처리된 mRNA의 선택된 영역들에 혼성화되고, 달리 비정상적으로 스플라이싱된 해당 디스트로핀 mRNA에서 차별적 스플라이싱 및 엑손 스키핑을 유도하여, 근육 세포가 기능적 디스트로핀 단백질을 암호화하는 mRNA 전사물을 생성할 수 있게 한다. 소정의 구현예에서, 생성된 디스트로핀 단백질이 반드시 디스트로핀의 "야생형" 형태는 아니며, 오히려 절단되었지만 여전히 기능적인 형태의 디스트로핀이다.

[0102] 이들 구현예 및 관련된 구현예는, 근육 세포에서 기능적 디스트로핀 단백질의 수준을 증가시킴으로써 근 이영양증의 예방 및 치료에 유용하고, 특히 비정상적인 mRNA 스플라이싱으로 인해 손상된 디스트로핀 단백질을 발현하는 것을 특징으로 하는 DMD 및 BMD와 같은 근 이영양증의 형태들의 예방 및 치료에 유용하다. 본원에 기술된 특이적 안티센스 올리고머는 다른 올리고머에 비해 개선된 디스트로핀-엑손-특이적 표적화를 추가로 제공하고, 이에 의해, 연관 형태의 근 이영양증을 치료하는 대안적인 방법에 비해 상당하고 실용적인 이점을 제공한다.

[0103] 따라서, 본 개시는 인간 디스트로핀 유전자에서 선택된 표적에 결합하여 엑손 스키핑을 유도할 수 있는 안티센

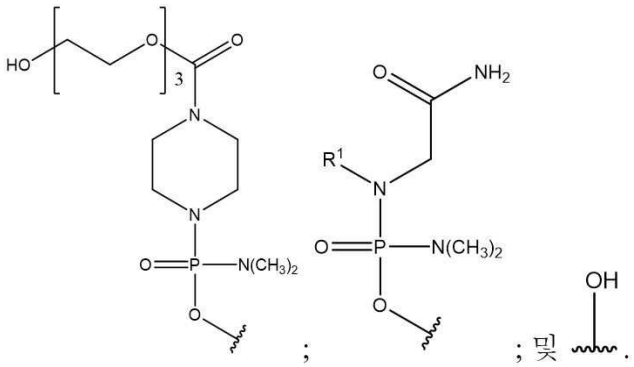
스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것으로서, 여기서 안티센스 올리고머는 어닐링 부위로서 지정된 디스트로핀 mRNA 전구체의 엑손 50 표적 영역에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 염기 서열 및/또는 어닐링 부위는 다음으로부터 선택된다:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

[0104] (T는 티민 또는 우라실임).

[0105] 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다: 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 또는 서열번호 9. 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에서의 핵염기에 상응한다. 3.

[0106] 일 양태에서, 안티센스 올리고머는 안티센스 올리고머의 5' 말단에 부착된 T 모이어티를 함유하되, T 모이어티는 다음으로부터 선택된다:

[0107] 

[0108] 특정 구현예에서, 안티센스 올리고머는 하나 이상의 세포 투과 펩티드(본 명세서에서 "CPP"로서 지칭됨)에 접합된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 CPP는 안티센스 올리고머의 말단에 부착된다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 CPP는 안티센스 올리고머의 5' 말단에 부착된다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 CPP는 안티센스 올리고머의 3' 말단에 부착된다. 특정 구현예에서, 제1 CPP는 안티센스 올리고머의 5' 말단에 부착되고, 제2 CPP는 3' 말단에 부착된다.

[0109] 일부 구현예에서, CPP는 아르기닌-풍부 펩티드이다. 용어 "아르기닌-풍부(arginin-rich)"는 적어도 2개, 바람직하게는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 아르기닌 잔기를 갖는 CPP를 지칭하며, 이들 아르기닌 잔기는 하나 이상의 하전되지 않은 소수성 잔기에 의해 임의로 분리되고, 약 6 내지 14개의 아미노산 잔기를 임의로 함유한다. 후술하는 바와 같이, CPP는 바람직하게는 이의 카르복시 말단에서 링커(하나 이상의 아미노산일 수도 있음)를 통해 안티센스 올리고뉴클레오티드의 3' 및/또는 5' 말단에 연결되고, 바람직하게는 이의 아미노산 말단에서 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 또는 스테아로일로부터 선택된 R^a를 갖는 치환기 R^a에 의해 또한 캡핑된다. 일부 구현예에서, R^a는 아세틸이다.

[0110] 아래 표에서 보이는 바와 같이, 본원에서 사용하기 위한 CPP의 비제한적인 예는 $-(RXR)_4-R^a$ (서열번호 15), $R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 16), $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (서열번호 17), $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 18), $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (서열번호 19), $-GLY-R_5-R^a$ (서열번호 20), $-R_5-R^a$ (서열번호 21), $-GLY-R_6-R^a$ (서열번호 11), 및 $-R_6-R^a$ (서열번

호 10)를 포함하되, R^a는 H, 아실, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택되고, R은 아르기닌이고, X는 6-아미노헥사노익산이고, B는 β-알라닌이고, F는 페닐알라닌이고, GLY(또는 G)는 글리신이다. CPP "R_5 (서열번호 21)"는 아미드 결합을 통해 함께 연결된 5개의 아르기닌 잔기로 이루어진 펩티드를 나타내도록 의미를 갖는다(R^5 (서열번호 21)와 같은 단일 치환기가 아님). CPP "R_6 (서열번호 10)"은 아미드 결합을 통해 함께 연결된 6개의 아르기닌 잔기로 이루어진 펩티드를 나타내도록 의미를 갖는다((R6 (서열번호 10)과 같은 단일 치환기가 아님). 일부 구현예에서, R^a는 아세틸이다.

[0111] 예시적인 CPP가 **표 1**에 제공된다(서열번호 10, 11, 및 15 내지 21).

[표 1] 예시적인 세포 투과 펩티드

명칭	서열	서열번호
R_6G	RRRRRRG	11
R_6	RRRRRR	10
$(RXR)_4$	RXRRXRRXRRXR	15
$(RFF)_3R$	RFFRFFRFFR	16
$(RXR)_4XB$	RXRRXRRXRRXRXB	17
$(RFF)_3RXB$	RFFRFFRFFRXB	18
$(RFF)_3RG$	RFFRFFRFFRG	19
R_5G	RRRRRG	20
R_5	RRRRR	21
R은 아르기닌이고; X는 6-아미노헥사노익산이고; B는 β-알라닌이고; F는 페닐알라닌이고; G는 글리신임.		

[0112]

[0113] 2012/0289457호 및 국제 특허 출원 공개 제WO 2004/097017호, 제WO 2009/005793호, 및 제WO 2012/150960호에 개시되어 있으며, 이들의 개시 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0114] 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 CPP와 링커의 조합으로서 정의된 치환기 "Z"를 포함한다. 링커는 그의 카르복시 말단에서 CPP를 올리고뉴클레오티드의 3' 말단 및/또는 5' 말단에 연결한다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 올리고머의 3' 말단에 연결된 하나의 CPP만을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 올리고머의 5' 말단에 연결된 하나의 CPP만을 포함할 수 있다.

[0115] Z 내의 링커는, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산을 포함할 수 있다.

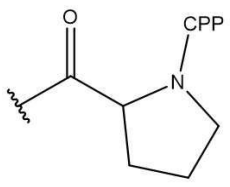
[0116] 특정 구현예에서, Z는 다음으로부터 선택되며:

[0117] $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$;

[0118] $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$;

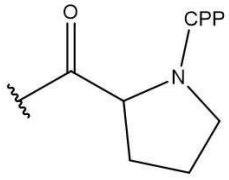
[0119] $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$;

[0120] $-C(O)CH_2NH-CPP$, 및 화학식:



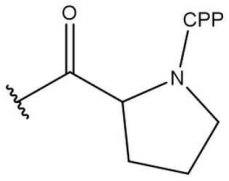
[0121]

[0122] 식 중 CPP는 CPP 카르복시 말단에서 아미드 결합에 의해 링커 모이어티에 부착된다.

[0123] 다양한 구현예에서, CPP는 본원에 기술되고 표 1에 보이는 바와 같은 아르기닌-풍부 펩티드이다. 특정 구현예에서, 아르기닌-풍부 CPP는 $-R_5-R^a$(즉, 5개의 아르기닌 잔기; 서열번호 21)이고, 여기서 R^a는 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택된다. 특정 구현예에서, R^a는 아세틸이다. 다양한 구현예에서, CPP는 서열번호 15, 16, 또는 21로부터 선택되고, 링커는 $-C(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)CH_2NH-$, 및 

로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산을 포함한다.

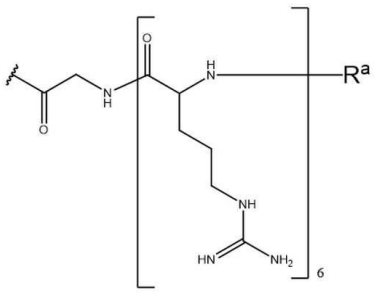
[0124] 일부 구현예에서, CPP는 서열번호 21이고, 링커는 Gly이다. 일부 구현예에서, CPP는 서열번호 20이다.

[0125] 특정 구현예에서, 아르기닌-풍부 CPP는 $-R_6-R^a$(즉, 6개의 아르기닌 잔기; 서열번호 10)이고, R^a는 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택된다. 특정 구현예에서, R^a는 아세틸이다. 다양한 구현예에서, CPP는 서열번호 10, 15, 또는 16으로부터 선택되고, 링커는 $-C(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)CH_2NH-$, 및 

로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산을 포함한다.

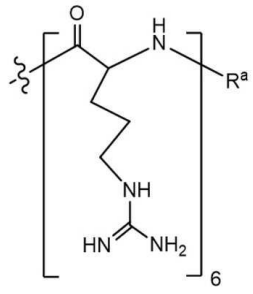
[0126] 일부 구현예에서, CPP는 서열번호 10이고, 링커는 Gly이다. 일부 구현예에서, CPP는 서열번호 11이다.

[0127] 특정 구현예에서, Z는 올리고머의 5' 및/또는 3' 말단에서 본 개시의 안티센스 올리고머에 공유 결합된 $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$("R_6"은 서열번호 10으로서 개시됨)이고, 여기서 R^a는 R_6(서열번호 10)의 아미노 말단을 캡핑하기 위한 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 또는 스테아로일이다. 특정 구현예에서, R^a는 아세틸이다. 이들 비제한적인 예시에서, CPP는 $-R_6-R^a$ (서열번호 10)이고 링커는 $-C(O)CH_2NH-$ (즉, GLY)이다. Z = $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ ("R_6"은 서열번호 10으로서 개시됨)의 이러한 특정 예시는 다음의 구조에 의해 또한 예시되며:

[0128] 

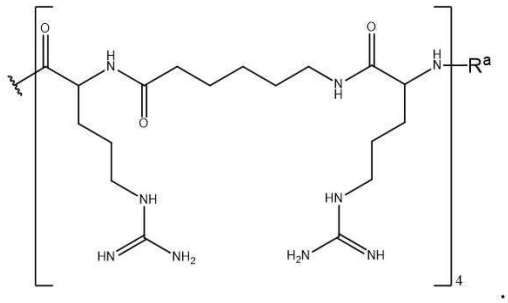
[0129] 식 중 R^a는 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택된다.

[0130] 다양한 구현예에서, CPP는 $-R_6-R^a$ (서열번호 10)이고, 하기 화학식으로도 예시되며:

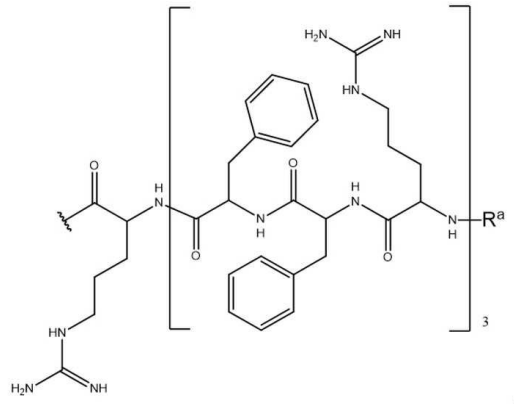
[0131] 

[0132] 식 중, R^a는 H, 아실, 아세틸, 벤조일, 및 스테아로일로부터 선택된다. 특정 구현예에서, CPP는 서열번호 11. 일부 구현예에서, R^a는 아세틸이다.

[0133] 일부 구현예에서, CPP는 $-(RXR)_4-R^a$ (서열번호 15)이고, 하기 화학식으로도 예시된다:

[0134] 

[0135] 다양한 구현예에서, CPP는 -R-(FFR)$_3$-Ra (서열번호 16)이고, 하기 화학식으로도 예시된다:

[0136] 

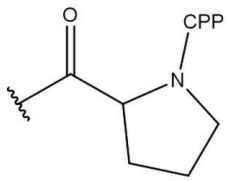
[0137] 다양한 구현예에서, Z는 다음으로부터 선택되고:

[0138] $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$;

[0139] $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$;

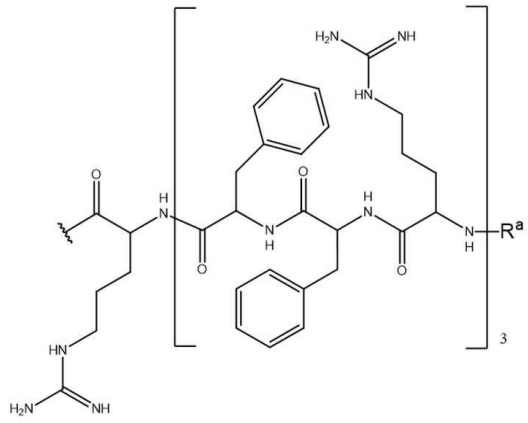
[0140] $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$;

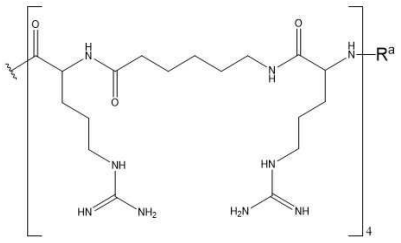
[0141] $-C(O)CH_2NH-CPP$; 및 화학식:

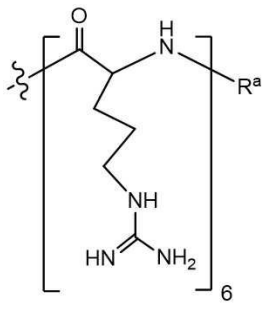
[0142] 

,

[0143] 식 중 CPP는 CPP 카르복시 말단에서 아미드 결합에 의해 링커 모이어티에 부착되고, CPP는 다음으로부터 선택된다:

[0144] 

, (-R-(FFR)$_3$-R^a) (서열번호 16), 

, (-(RXR)$_4$-R^a) (서열번호 15), 

, 또는 (-R$_6$-R^a) (서열번호 10). 일부 구현예에서, R^{a}는 아세틸이다.

[0145] 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에 상응한다.

[0146] 일부 양태에서, 변형된 안티센스 올리고머의 핵염기는 모르폴리노 고리 구조에 연결되고, 여기서 모르폴리노 고리 구조는 하나의 링 구조의 모르폴리노 질소를 인접한 고리 구조의 5' 고리 외 탄소에 결합시키는 인산-함유 서브유닛 간 결합에 의해 결합된다. 이러한 양태에서, 서열번호 1~9의 각각의 T는 바람직하게는 티민이다.

[0147] 일부 양태에서, 안티센스 올리고머의 핵염기는 펩티드 핵산(PNA)에 연결되고, 여기서 인산염-당 폴리뉴클레오티드 백본은 핵염기가 연결되는 가요성 슈도-펩티드 중합체로 치환된다.

[0148] 일부 양태에서, 안티센스 올리고머의 핵염기 중 적어도 하나는 잠금 핵산(LNA)에 연결되고, 여기서 잠금 핵산 구조는, 리보오스 모이어티가 2' 산소와 4' 탄소를 연결하는 여분의 브리지를 갖는, 화학적으로 변형된 뉴클레오티드 유사체이다. 이러한 양태에서, 서열번호 1~9의 각각의 LNA에 연결된 각각의 핵염기는 5-메틸기를 포함한다.

[0149] 일부 양태에서, 안티센스 올리고머의 핵염기 중 적어도 하나는 가교 핵산(bridged nucleic acids, BNA)에 연결되고, 여기서 당 형태는 푸라노오스 골격에 추가의 가교 구조를 도입함으로써 제한되거나 잠긴다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머의 핵염기 중 적어도 하나는 2'-O,4'-C-에틸렌-가교 핵산(ENA)에 연결된다. 이러한 양태에서, 서열번호 1~9의 각각의 BNA 또는 ENA에 연결된 각각의 핵염기는 5-메틸기를 포함한다.

[0150] 일부 양태에서, 골격의 화학이 허용하는 경우, 서열번호 1~9에서의 각각의 티민은 우라실이다.

[0151] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시가 속하는 분야의 당업자들에 의해 통상적으로 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 개시를 실시하고 시험하는 데 사용될 수 있지만, 바람직한 방법과 물질이 기술된다. 본 개시의 목적을 위

해, 하기 용어들이 아래에 정의된다.

[0152] I. 정의

[0153] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "알킬(alkyl)"은 달리 명시되지 않는 한 포화된 직선형 또는 분지형 탄화수소를 지칭한다. 소정의 구현예에서, 알킬기는 일차, 이차 또는 삼차 탄화수소이다. 소정의 구현예에서, 알킬기는 1 내지 10개의 탄소 원자를 포함한다(C_1 내지 C_{10} 알킬). 소정의 구현예에서, 알킬기는 1 내지 6개의 탄소 원자를 포함한다(C_1 내지 C_6 알킬). 상기 용어는 할로겐화 알킬기를 포함하여, 치환된 알킬기 및 치환되지 않은 알킬기 둘 다를 포함한다. 소정의 구현예에서, 알킬기는 플루오르화 알킬기이다. 알킬기가 치환될 수 있는 모이어티의 비제한적인 예는, 당업자에게 알려진 바와 같이, 예를 들어, Greene 등의 문헌[Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991](참조로 본원에 통합됨)에서 교시된 바와 같이 보호되지 않거나 필요에 따라 보호된, 할로겐(플루오로, 클로로, 브로모, 또는 요오드), 하이드록실, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설폰산(sulfonic acid), 황산염(sulfate), 포스폰산(phosphonic acid), 인산염(phosphate), 또는 포스폰산염(phosphonate)으로 이루어진 군으로부터 선택된다, 특정 구현예에서, 알킬기는 메틸, CF_3, CCl_3, $CFCl_2$, CF_2Cl, 에틸, CH_2CF_3, CF_2CF_3, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 이차-부틸, t-부틸, 펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 헥실, 이소헥실, 3-메틸펜틸, 2,2-디메틸부틸, 및 2,3-디메틸부틸로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0154] 대상체 또는 환자와 관련하여 본원에서 사용된 "엑손 50 스키핑에 순응하는(amenable to exon 50 skipping)"은 디스트로핀 유전자에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는 대상체 및 환자를 포함하도록 의도되는데, 여기서 디스트로핀 mRNA 전구체의 엑손 50의 스키핑이 없는 경우, 판독 프레임이 프레임을 벗어나게 되어 mRNA 전구체의 번역을 방해하므로, 대상체 또는 환자는 기능적 또는 반-기능적 디스트로핀을 생산할 수 없게 된다. 환자가 디스트로핀 유전자에서 엑손 스키핑에 순응하는 돌연변이를 가지고 있는지 여부는 당업자가 충분히 결정할 수 있다(예를 들어, Aartsma-Rus 등의 문헌[(2009) Hum Mutat. 30:293-299]; Gurvich 등의 문헌[Hum Mutat. 2009; 30(4) 633-640]; 및 Fletcher 등의 문헌[(2010) Molecular Therapy 18(6) 1218-1223] 참조).

[0155] 본원에서 사용된 용어 "올리고머(oligomer)"는 서브유닛 간의 결합에 의해 연결된 서브유닛의 서열을 지칭한다. 특정한 경우에, 용어 "올리고머"는 "안티센스 올리고머"와 관련하여 사용된다. "안티센스 올리고머(antisense oligomer)"의 경우, 각각의 서브 유닛이 (i) 리보오스 당 또는 이의 유도체; 및 (ii) 이에 결합된 핵염기로 이루어지므로, 염기 페어링 모이어티의 순서는 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 페어링에 의해 핵산(일반적으로는 RNA)의 표적 서열에 상보적인 염기 서열을 형성함으로써, 서브유닛, 서브유닛 간 결합, 또는 둘 다가 자연적으로 발생하지 않을 때 핵산:올리고머 이종 이합체(heteroduplex)를 표적 서열 내에 형성한다. 특정 구현예에서, 안티센스 올리고머는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)이다. 다른 구현예에서, 안티센스 올리고머는 2'-O-메틸 포스포로티오에이트이다. 다른 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 펩티드 핵산(PNA), 잠긴 핵산(LNA), 또는 2'-O,4'-C-에틸렌-브릿지 핵산(ENA)과 같은 브릿지 핵산(BNA)이다. 추가의 예시적인 구현예가 본원에 기술되어 있다.

[0156] 용어 "상보적인(complementary)" 및 "상보성(complementarity)"은 왓슨-크릭 염기-페어링 규칙에 의해 서로 연관된 둘 이상의 올리고머(즉, 각각 핵염기 서열을 포함함)를 지칭한다. 예를 들어, 핵염기 서열 "T-G-A (5'?3')"는 핵염기 서열 "A-C-T (3'? 5')"에 상보적이다. 상보성은 주어진 "부분적"일 수 있는데, 이 경우 주어진 핵염기 서열의 모든 핵염기보다 적은 수가 염기 페어링 규칙에 따라 다른 핵염기 서열과 매칭된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 주어진 핵염기 서열과 다른 핵염기 서열 간의 상보성은 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95%일 수 있다. 또는, 주어진 핵염기 서열과 실시예를 계속하기 위한 다른 핵염기 서열 간에 "완전한(complete)" 또는 "완벽한(perfect)(100%)" 상보성이 존재할 수 있다. 핵염기 서열들 간의 상보성은 서열들 간의 혼성화의 효율 및 강도에 상당한 영향을 미친다.

[0157] 용어 "유효량(effective amount)" 및 "치료적 유효량(therapeutically effective amount)"은 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, 원하는 치료 효과를 생성하는 데 효과적인 1회 투여량으로서 또는 일련의 투여량의 일부로서 포유류 대상체에게 투여되는 치료적 화합물, 예컨대 안티센스 올리고머의 양을 지칭한다. 안티센스 올리고머의 경우, 이러한 효과는 선택된 표적 서열의 번역 또는 천연 스플라이스-프로세싱을 억제하거나 임상적으로 의미 있는 양의 디스트로핀(통계적 유의성)을 생성함으로써 일반적으로 유발된다.

[0158] 일부 구현예에서, 유효량은 대상체를 치료하기 위한 기간 동안 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 약 1 mg/kg 내지 약 200 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 대상체에서 디스트로핀-양성 섬유의 수를 증가시키기

위한 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 약 1 mg/kg 내지 약 200 mg/kg이다. 특정 구현예에서, 유효량은, 예를 들어 6분 보행 검사(6 Minute Walk Test, MWT)에 있어서, 건강한 동년배에 비해 환자의 보행 거리를 개선하거나, 안정화하거나, 유지시키기 위한, 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 약 1 mg/kg 내지 약 200 mg/kg이다.

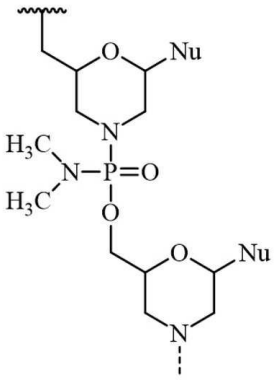
[0159] "강화(enhance 또는 enhancing)" 또는 "증가(increase 또는 increasing)" 또는 "자극(stimulate 또는 stimulating)"은, 안티센스 올리고머의 부재에 의해 야기되거나 대조군 화합물에 의해 야기된 반응과 비교했을 때, 전술한 것 중 어느 하나의 하나 이상의 안티센스 올리고머 또는 약학적 조성물이 세포 또는 대상체에서 더 큰 생리학적 반응(즉 하방 효과(downstream effect))를 생성하거나 이를 야기하는 능력을 일반적으로 지칭한다. 더 큰 생리학적 반응은, 당업계의 이해와 본원의 설명으로부터 명백한 다른 반응 가운데, 기능적 형태의 디스트로핀 단백질의 발현 증가, 또는 근육 조직에서 디스트로핀과 연관된 생물학적 활성의 증가를 포함할 수 있다.

[0160] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "기능(function)" 및 "기능적(functional)" 등은 생물학적, 효소적 또는 치료적 기능을 지칭한다.

[0161] "기능적" 디스트로핀 단백질은 일반적으로, DMD 또는 BMD를 갖는 특정 대상체에 존재하는 "손상된(defective)" 형태의 디스트로핀 단백질과 비교했을 때, 근육 조직의 점진적 분해(다르게는 근 이영양증의 특징)을 감소시키기에 충분한 생물학적 활성을 갖는 디스트로핀 단백질을 지칭한다. 일례로서, 근육 배양물을 대상으로 한 시험관 내 디스트로핀 연관 활성은 근관(myotube) 크기, 근섬유 구성(또는 해체), 수축 활성, 아세틸콜린 수용체의 자발적 클러스터링에 따라 측정될 수 있다(예를 들어, Brown 등의 문헌[Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999] 참조). 동물 모델도 질환의 병원성 연구를 위한 귀중한 자원이며, 디스트로핀 연관 활성을 시험하기 위한 수단을 제공한다. DMD 연구에 가장 널리 사용되는 동물 모델 중 두 가지는 mdx 마우스 및 골든 리트리버 근 이영양증(GRMD) 개이며, 이들 모두는 디스트로핀 음성이다(예를 들어, Collins & Morgan의 문헌[Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003] 참조). 이들 및 다른 동물 모델이 다양한 디스트로핀 단백질의 기능적 활성을 측정하는 데 사용될 수 있다. 본 개시의 엑손-스키핑 안티센스 올리고머 중 특정한 하나의 투여 후에 생성되는 형태들과 같은, 절단된 형태의 디스트로핀이 포함된다.

[0162] 용어 "미스매치(mismatch 또는 mismatches)"는 올리고머 핵염기 서열에서 (연속되거나 분리된) 하나 이상의 핵염기로서, 염기 페어링 규칙에 따라 표적 mRNA 전구체와 매칭되지 않은 핵염기를 지칭한다. 완벽한 상보성이 종종 바람직하지만, 일부 구현예는 표적 mRNA 전구체에 대해 하나 이상의, 그러나 바람직하게는 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 미스매치를 포함할 수 있다. 올리고머 내의 임의의 위치에서의 변이가 포함된다. 특정 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 내부의 말단 변이에 가까운 핵염기 서열에서의 변이를 포함하며, 존재하는 경우, 이들은 일반적으로 5' 및/또는 3'의 약 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 서브유닛 이내에 존재한다. 소정의 구현예에서, 1개, 2개, 또는 3개의 뉴클레오염기가 제거되고도 여전히 표적 상 결합(on-target binding)을 제공할 수 있다.

[0163] 용어 "모르폴리노(morpholino)", "모르폴리노 올리고머(morpholino oligomer)" 및 "PMO"는 다음의 일반 구조로 이루어지고:

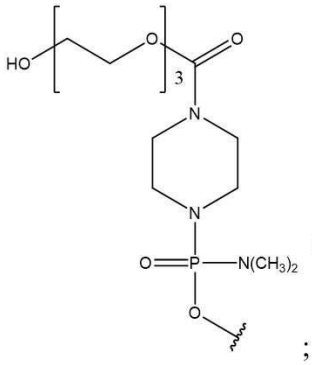
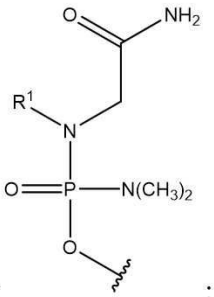
[0164] 

[0165] Summerton, J. 등의 문헌[*Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997)]의 도 2에 기술된 것과 같은 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머를 지칭한다. 본원에 기술된 것과 같은 모르폴리노는 전술한 일반 구조의 모든 입체이성질체 및 호변이성질체를 포함한다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조 및 결합 특성은 미국 특허 제5,698,685호; 제5,217,866호; 제5,142,047호; 제5,034,506호; 제5,166,315호;

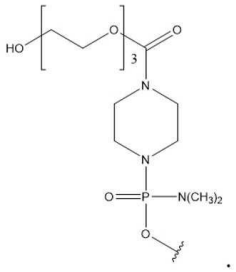
제5,521,063호; 제5,506,337호; 제8,076,476호; 및 제8,299,206호에 상세히 설명되어 있으며, 이들 모두는 참조로서 본원에 통합된다.

[0166] 소정의 구현예에서, 모르폴리노는 올리고머의 5' 단부 또는 3' 단부에서 "테일(tail)" 모이어티와 접합되어 올리고머의 안정성 및/또는 용해도를 증가시킨다. 예시적인 테일은 다음을 포함하고:

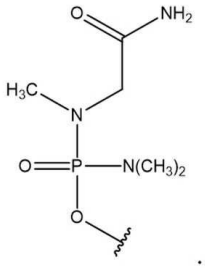
[0167] 특정 구현예에서, 모르폴리노는 올리고머의 5' 단부 또는 3' 단부에서 "테일(tail)" 모이어티와 접합되어 올리고머의 안정성 및/또는 용해도를 증가시킨다. 예시적인 테일은 다음을 포함한다:

[0168] 
; 
; 및 . T 모이어티의 원위 -OH 또는 $-NH_2$는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결된다.

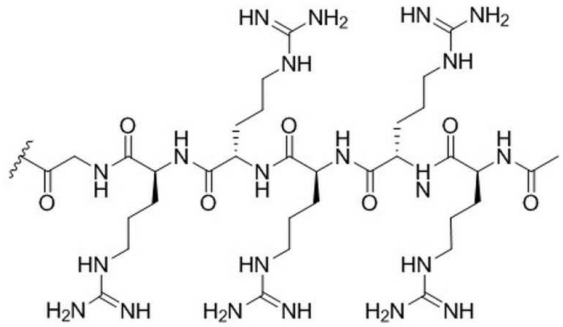
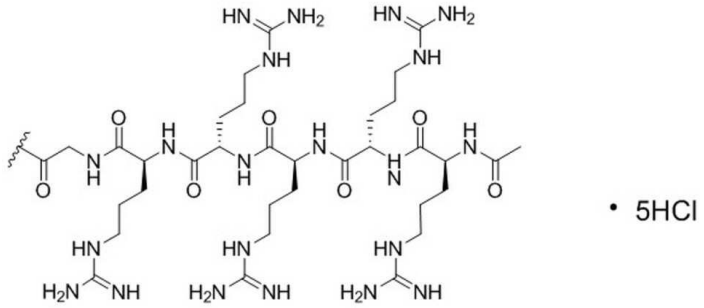
[0169] 상기 예시적인 테일 모이어티 중에서, "TEG" 또는 "EG3"은 다음의 테일 모이어티를 지칭한다:

[0170] 
.

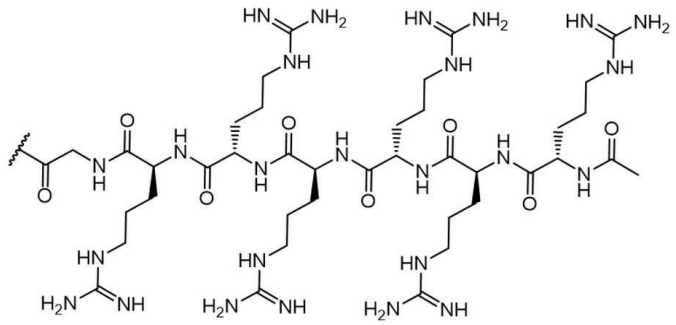
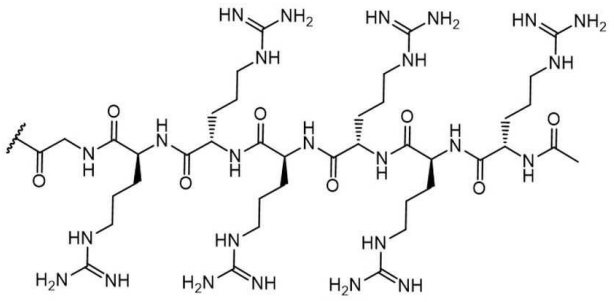
[0171] 상기 예시적인 테일 모이어티 중에서, "GT"는 다음의 테일 모이어티를 지칭한다:

[0172] 
.

[0173] 본원에서 사용되는 용어 "-G-R_5 (서열번호 20)" 및 "-G-R_5-Ac (서열번호 20)"는 상호 교환적으로 사용되며, 본 개시의 안티센스 올리고머에 접합된 펩티드 모이어티를 지칭한다. 다양한 구현예에서, "G"는 아미드 결합에 의해 "R_5 (서열번호 21)"에 접합된 글리신 잔기를 나타내고, 각각의 "R"은 아미드 결합에 의해 함께 접합된 아르기닌 잔기를 나타내므로, "R_5(서열번호 21)"는 아미드 결합에 의해 함께 접합된 5개의 아르기닌 잔기를 의미한다. 아르기닌 잔기는 임의의 입체 구성을 가질 수 있는데, 예를 들어, 아르기닌 잔기는 L-아르기닌, D-아르기닌 잔기, 또는 D-아르기닌 잔기와 L-아르기닌 잔기의 혼합물일 수 있다. 특정 구현예에서, "-G-R_5 (서열번호 20)" 또는 "-G-R_5-Ac (서열번호 20)"는 "테일" 모이어티의 원위 -OH 또는 NH_2에 연결된다. 특정 구현예에서, "-G-R_5 (서열번호 20)" 또는 "-G-R_5-Ac (서열번호 20)"는 본 개시의 PMO 안티센스 올리고머의 가장 3' 방향에 있는 모르폴리노 서브유닛의 모르폴린 고리 질소에 접합된다. 일부 구현예에서, "-G-R_5(서열번호 20)" 또는 "-G-R_5-Ac(서열번호 20)"는 본 개시의 안티센스 올리고머의 3' 단부에 접합되고 하기 화학식 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진다:

[0174]  , 또는  • 5HCl .

[0175] 본원에서 사용되는 용어 "-G-R_6(서열번호 11)" 및 "-G-R_6-Ac(서열번호 11)" 및 "R_6G(서열번호 11)"는 상호 교환적으로 사용되며, 본 개시의 안티센스 올리고머에 접합된 펩티드 모이어티를 지칭한다. 다양한 구현예에서, "G"는 아미드 결합에 의해 "R_6(서열번호 10"에 접합된 글리신 잔기를 나타내고, 각각의 "R"은 아미드 결합에 의해 함께 접합된 아르기닌 잔기를 나타내므로, "R_6(서열번호 10)"은 아미드 결합에 의해 함께 접합된 6개의 아르기닌 잔기를 의미한다. 아르기닌 잔기는 임의의 입체 구성을 가질 수 있는데, 예를 들어, 아르기닌 잔기는 L-아르기닌, D-아르기닌 잔기, 또는 D-아르기닌 잔기와 L-아르기닌 잔기의 혼합물일 수 있다. 특정 구현예에서, "-G-R_6(서열번호 11)" 또는 "-G-R_6-Ac(서열번호 11)"는 "테일" 모이어티의 원위 -OH 또는 NH_2에 연결된다. 특정 구현예에서, "-G-R_6(서열번호 11)" 또는 "-G-R_6-Ac(서열번호 11)"는 본 개시의 PMO 안티센스 올리고머의 가장 3' 방향에 있는 모르폴리노 서브유닛의 모르폴린 고리 질소에 접합된다. 일부 구현예에서, "-G-R_6(서열번호 11)" 또는 "-G-R_6-Ac(서열번호 11)"는 본 개시의 안티센스 올리고머의 3' 단부에 접합되고, 하기 화학식으로 이루어진다:

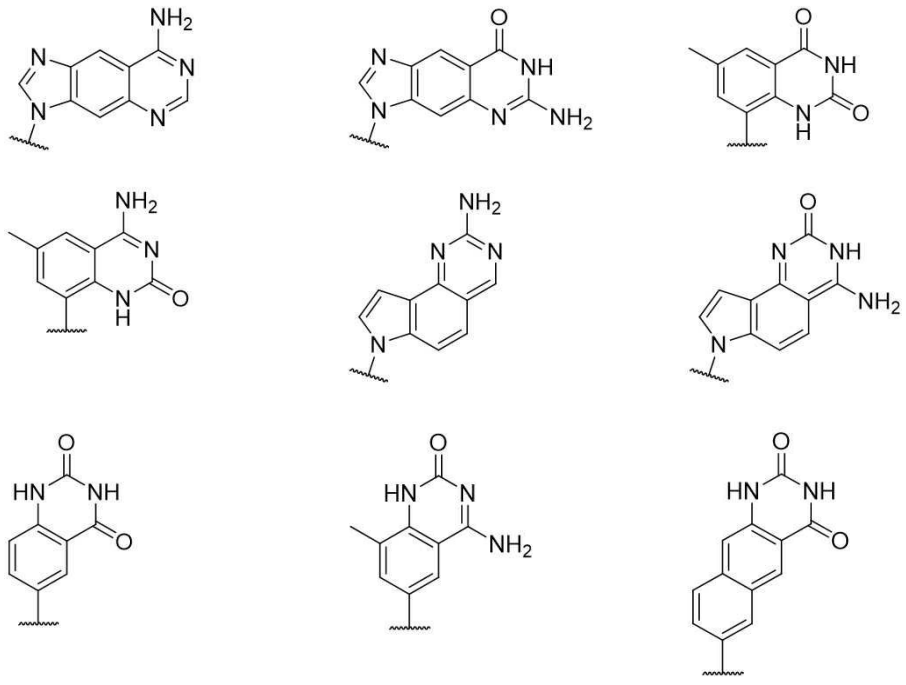
[0176]  , 또는  .6HCl .

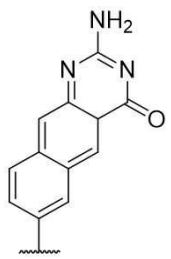
[0177] 용어 "핵염기(nucleobase, Nu)", "염기 페어링 모이어티(base pairing moiety)" 또는 "염기(base)"는 자연 발

생적인 또는 "천연" DNA 또는 RNA(예를 들어, 우라실, 티민, 아데닌, 시토신 및 구아닌)에서 발견되는 퓨린 또는 피리미딘 염기 뿐만 아니라 이들 자연 발생 퓨린과 피리미딘의 유사체를 지칭하도록 상호 교환적으로 사용된다. 이들 유사체는 올리고머에 대한 결합 친화도와 같은 개선된 특성을 부여할 수 있다. 예시적인 유사체는 하이포크산틴(이노신의 염기 성분); 2,6-디아미노퓨린; 5-메틸 시토신; C5-프로피닐-변형 피리미딘; 10-(9-(아미노에톡시)페녹사지닐)(G-클램프) 등을 포함한다.

[0178] 염기 페어링 모이어티의 추가적인 예는, 아실 보호기에 의해 보호되는 각각의 아미노 기를 갖는 우라실, 티민, 아데닌, 시토신, 구아닌 및 하이포크산틴 (이노신), 2-플루오로우라실, 2-플루오로시토신, 5-브로모라실, 5-요오드우라실, 2,6-디아미노퓨린, 아자시토신, 피리미딘 유사체(예컨대, 슈도이소시토신 및 슈도우라실) 및 다른 변형된 핵염기, 예컨대 8-치환된 퓨린, 크산틴, 또는 하이포크산틴(마지막 두 개는 천연 분해 산물임)을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 다음 문헌에 개시된 변형된 핵염기도 고려된다: Chiu 및 Rana의 문헌[RNA, 2003, 9, 1034-1048]; Limbach 등의 문헌 [Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196]; 및 Revankar 및 Rao의 문헌[Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313](이들의 내용은 참조로서 본원에 통합됨).

[0179] 염기 페어링 모이어티의 추가적인 예는 하나 이상의 벤젠 고리가 추가된 확장된-크기의 핵염기를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 핵산 염기 교체는 다음 문헌에 기술되어 있으며: Glen Research 카탈로그(www.glenresearch.com); Krueger AT 등의 문헌[Acc Chem Res., 2007, 40, 141-150]; Kool, ET의 문헌[Acc. Chem Res., 2002, 35, 936-943]; Benner S.A. 등의 문헌[Nat Rev. Genet., 2005, 6, 553-543]; Romesberg, F.E. 등의 문헌[Curr. Opin Chem Biol., 2003, 7, 723-733]; 및 Hirao, I.의 문헌[Curr. Opin Chem Biol., 2006, 10, 622-627]; 이들의 내용은 참조로서 본원에 통합되고, 본원에 기술된 안티센스 올리고머에 유용한 것으로 고려된다. 확장된 크기의 핵염기의 예는 아래에 도시된 것들 뿐만 아니라 이들의 호변이성질체 형태도 포함한다.

[0180] 

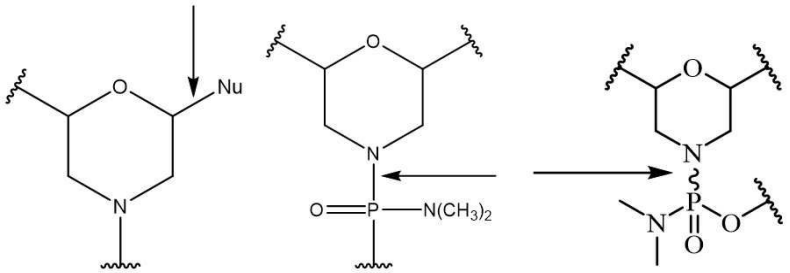
[0181] 

[0182] 본원에서 사용되는 문구 "비경구 투여(parenteral administration 및 administered parenterally)"는 경구 투여와 국소 투여 이외에 일반적으로 주사에 의한 투여 방식을 의미하며, 정맥내(intravenous), 근육내

(intramuscular), 동맥내(intraarterial), 경막내(intrathecal), 낭내(intracapsular), 안와내(intraorbital), 심장내(intracardiac), 피내(intradermal), 복강내(intraperitoneal), 경기관(transtracheal), 피하(subcutaneous), 표피하(subcuticular), 관절내(intraarticular), 피막하(subcapsular), 지주막하(subarachnoid), 척수내(intraspinal) 및 흉골내(intrasternal) 주사 및 주입을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0183] 본원에서 사용되는 바와 같이, 구조식 내에서 사용되는 괄호 세트는 괄호 사이의 구조적 특징부가 반복됨을 나타낸다. 일부 구현예에서, 사용된 괄호는 "[" 및 "]"일 수 있고, 소정의 구현예에서는, 반복되는 구조적 특징부를 나타내는 데 사용된 괄호가 "(" 및 ")"일 수 있다. 일부 구현예에서, 괄호 사이에서 구조적 특징부의 반복 회수는 2, 3, 4, 5, 6, 7 등과 같이 괄호 밖에 표시된 수이다. 다양한 구현예에서, 괄호 사이의 구조적 특징부의 반복 횟수는 괄호 밖에 표시된 변수, 예컨대 "Z" 등에 의해 표시된다.

[0184] 본원에서 사용되는 바와 같이, 구조식 내에서 키랄 탄소 원자 또는 인 원자에 대해 그려진 직선 결합 또는 구불구불한 선 결합은 키랄 탄소 또는 인의 입체화학이 정의되지 않았음을 나타내며, 모든 형태의 키랄 중심 및/또는 이들의 혼합 형태를 포함하도록 의도된다. 이러한 도해의 예가 아래에 도시되어 있다.

[0185] 

[0186] "약학적으로 허용 가능한(pharmaceutically acceptable)"이라는 문구는, 물질 또는 조성물이 제형을 포함하는 다른 성분 및/또는 이를 사용해 치료 중인 대상체와 화학적으로 및/또는 독성학적으로 양립할 수 있어야 함을 의미한다.

[0187] 본원에서 사용되는 "약학적으로 허용 가능한 담체"라는 문구는, 임의 유형의 비-독성, 불활성 고형, 반고형 또는 액체 필러, 희석제, 캡슐화 물질, 또는 제형화 보조물을 의미한다. 약학적으로 허용 가능한 담체로서의 역할을 할 수 있는 물질의 일부 예시는: 락토오스, 포도당 및 수크로오스와 같은 당류; 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; 셀룰로오스 및 이의 유도체, 예컨대, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 및 셀룰로오스 아세테이트; 분말 트라가칸트; 맥아(malt); 젤라틴(gelatin); 탈크(talc); 코코아 버터 및 좌제용 왁스와 같은 부형제; 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유, 및 대두유와 같은 오일; 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜류; 올레산 에틸 및 라우린산 에틸과 같은 에스테르; 한천(agar); 수산화마그세슘 및 수산화알루미늄과 같은 완충제(buffering agent); 알긴산(alginic acid); 발열원 제거수(pyrogen-free water); 등장성 염수(isotonic saline); 링거 용액(Ringer's solution); 에틸 알코올; 인산염 완충액; 라우릴 황산나트륨(sodium lauryl sulfate) 및 스테아린산마그네슘(magnesium stearate)과 같은 적절한 비독성 윤활제; 착색제; 이형제; 코팅제; 감미제; 향미제; 방향제(perfuming agents); 보존제; 및 항산화제 등이며, 제형 업체의 판단에 따른다.

[0188] 디스트로핀 합성 또는 생산에 관한 용어 "복원(restoration)"은 근 이영양증 환자를 대상으로 본원에 기술된 안티센스 올리고머로 치료한 후 절단된 형태의 디스트로핀을 포함하는 디스트로핀 단백질이 생산되는 것을 일반적으로 지칭한다. 치료 후 환자에서의 디스트로핀-양성 섬유의 백분율은 공지된 기술을 사용한 근육 생검에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 근육 생검은 환자의 적절한 근육, 예컨대 이두근(biceps brachii muscle)을 취하여 이루어질 수 있다.

[0189] 양성 디스트로핀 섬유의 백분율 분석은 치료 전 및/또는 치료 후 또는 치료 과정 전체 시점에 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료 후 생검은 치료 전 생검의 대측성 근육을 취하여 이루어진다. 치료 전 및 후 디스트로핀 발현 분석은 디스트로핀에 대한 임의의 적합한 검정을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역조직화학 검출은 디스트로핀의 마커인 항체, 예컨대 단클론 또는 다클론 항체를 사용해 근육 생검에서의 조직 절편에서 수행된다. 예를 들어, 디스트로핀에 대해 고도로 민감한 마커인 MANDYS106 항체를 사용할 수 있다. 임의의 적절한 이차 항체가 사용될 수 있다.

[0190] 일부 구현예에서, 디스트로핀-양성 섬유의 백분율은 양성 섬유의 수를 계수된 총 섬유로 나눔으로써 계산된다. 정상적인 근육 샘플은 100% 디스트로핀-양성 섬유를 갖는다. 따라서, 디스트로핀-양성 섬유의 백분율은 정상 수

준의 백분율로서 표현될 수 있다. 치료 전 근육 뿐만 아니라 비정상적인 섬유에서도 미량 수준의 디스트로핀의 존재를 밝혀내기 위해, 치료 후 근육에서 디스트로핀-양성 섬유를 계수할 때 환자의 치료 전 근육의 절편을 사용해 베이스라인을 설정할 수 있다. 이는 해당 환자의 치료 후 근육의 절편에서 디스트로핀-양성 섬유를 계수하기 위한 임계치로서 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 항체-염색된 조직 절편이 Bioquant 이미지 분석 소프트웨어(Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN)를 사용하는 디스트로핀 정량화에 사용될 수도 있다. 총 디스트로핀 형광 신호 강도는 정상 수준의 백분율로서 보고될 수 있다. 또한, 단클론 또는 다클론 항-디스트로핀 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 디스트로핀 양성 섬유의 백분율을 결정할 수 있다. 예를 들어, Leica Biosystems의 항-디스트로핀 항체 NCL-Dys1이 사용될 수 있다. 디스트로핀-양성 섬유의 백분율은 사르코글리칸 복합체(sarcoglycan complex) 성분(β, γ) 및/또는 신경 NOS의 발현을 결정함으로써 분석할 수도 있다.

[0191] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머를 사용하는 치료는 DMD 환자에서 치료 부재 시에 예상되는 점진적 호흡기 근육의 기능 장애 및/또는 부전을 지연시키거나 감소시킨다. 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머를 사용하는 치료는 치료 부재 시에 예상되는 호흡 지원(ventilation assistance)의 필요성을 감소시키거나 없앨 수 있다. 일부 구현예에서, 질환의 과정을 추적하는 것 뿐만 아니라 잠재적 치료 개입을 평가하기 위한 호흡 기능의 척도는 최대 흡기압(maximum inspiratory pressure, MIP), 최대 호기압(maximum expiratory pressure, MEP), 및 노력성 폐활량(forced vital capacity, FVC)을 포함한다. MIP와 MEP는 들숨과 날숨 동안에 사람이 각각 생성할 수 있는 압력 수준을 측정하는 것이며, 호흡 근육 강도의 민감한 척도이다. MIP는 횡격막 근육 취약성의 척도이다.

[0192] 일부 구현예에서, MIP 및 FVC를 포함하는 다른 폐 기능 시험에서 변화가 나타나기 전에 MEP가 감소할 수 있다. 소정의 구현예에서, MEP는 호흡기 기능 장애의 조기 표시자일 수 있다. 소정의 구현예에서, FVC를 사용해 최대 흡기 후 강제 호기 도중에 배출되는 공기의 총량을 측정할 수 있다. DMD 환자에서, FVC는 10대 초기가 될 때까지 신체의 성장과 동시에 증가한다. 그러나, 성장이 둔화되거나 질환 진행에 의해 성장이 저해되고 근육 약화가 진행됨에 따라, 폐활량은 쇠퇴기에 접어 들어 10세 내지 12세 이후에는 매년 약 8 내지 8.5%의 평균 속도로 감소한다. 소정의 구현예에서, MIP 예측률(체중에 맞게 조정된 MIP), MEP 예측률(나이에 맞게 조정된 MEP), 및 FVC 예측률(나이 및 신장에 맞게 조정된 FVC)은 보조 분석 수단이다.

[0193] 본원에서 사용된 용어 "대상체(subject)" 및 "환자(patient)"는 본 개시의 안티센스 올리고머로 치료될 수 있는 증상을 나타내거나 나타낼 위험이 있는 임의의 동물, 예컨대 DMD 또는 BMD, 또는 이들 병태(예: 근육 섬유 손실)와 관련된 증상 중 어느 하나를 가졌거나 가질 위험이 있는 대상체(또는 환자)를 포함한다. 적절한 대상체(또는 환자)에는 실험실 동물(예: 마우스, 랫트, 토끼 또는 기니피그 등), 축산 동물, 가축 또는 애완 동물(예: 고양이 또는 개)이 포함된다. 비인간 영장류 및 바람직하게는 인간 환자(또는 대상체)가 포함된다. 또한 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 가진 대상체(또는 환자)에서 디스트로핀을 생산하는 방법이 포함된다.

[0194] 본원에서 사용되는 바와 같이, "전신 투여(systemic administration 및 administered systemically)" 및 "말초 투여(peripheral administration 및 administered peripherally)"라는 문구는 화합물, 약물 또는 기타 물질이 환자의 전신에 들어감으로써 대사 및 기타 유사한 과정을 거치도록, 중추 신경계에 직접 투여하는 것을 제외한 투여, 예를 들어, 피하 투여를 의미한다.

[0195] "표적화 서열(targeting sequence)" 또는 "염기 서열(base sequence)"이라는 문구는 표적 mRNA 전구체에서 뉴클레오티드의 서열에 상보적인 올리고머의 핵염기 서열을 지칭한다. 본 개시의 일부 구현예에서, 표적 mRNA 전구체에서의 뉴클레오티드 서열은 H50D(+04-18), H50D(+07-18), H50D(+07-16), H50D(+07-17), H50A(-19+07), H50D(+07-15), H50A(-02+23), H50D(+06-18), 또는 H50D(+07-20)로서 지정된, 디스트로핀 mRNA에서의 엑손 50, 인트론 49, 및/또는 인트론 50 어닐링 부위이다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 안티센스 올리고머에 의해 표적화된 어닐링 부위는 H50D(+07-16)이다.

[0196] 대상체(예: 인간과 같은 포유류) 또는 세포의 "치료(treatment)"는 대상체 또는 세포의 자연 과정을 변경시키기 위한 시도에 사용되는 임의 유형의 개입이다. 치료는 올리고머 또는 이의 약학적 조성물의 투여를 포함하되 이에 한정되지는 않으며, 예방적으로 수행되거나 병리적 이벤트의 개시 또는 기병성 인자(etiologic agent)와의 접촉이 있은 후에 수행될 수 있다. 치료는, 특정 형태의 근 이영양증에서와 같이, 디스트로핀 단백질과 관련된 질환 또는 병태의 증상 또는 병리에 대한 임의의 바람직한 효과를 포함하며, 예를 들어, 치료 중인 질환 또는 병태의 하나 이상의 측정 가능한 마커에서의 최소 변화 또는 개선을 포함할 수 있다. "예방적(prophylactic)"

치료도 포함되는데, 이는 치료 중인 질환 또는 병태의 진행 속도를 감소시키거나, 해당 질환 또는 병태의 발생을 지연시키거나, 그 중증도를 감소시키는 것에 관한 것일 수 있다. "치료" 또는 "예방"이 반드시 질환 또는 병태, 또는 이의 관련 증상의 완전한 근절, 치유, 또는 예방을 나타내는 것은 아니다.

[0197] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머를 사용하는 치료는 신규한 디스트로핀 생산을 증가시키거나, 질환의 진행을 지연시키거나, 보행 상실(loss of ambulation)을 지연 또는 감소시키거나, 근육 염증을 감소시키거나, 근육 손상을 감소시키거나, 근육 기능을 개선하거나, 폐 기능 상실을 감소시키고/시키거나 치료 부재 시에 예상되는 근육 재생을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 질환 진행을 유지시키거나, 지연시키거나, 느리게 한다. 일부 구현예에서, 치료는 보행을 유지시키거나 보행 상실을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 폐 기능을 유지시키거나 폐 기능 상실을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 예를 들어, 6분 보행 시험(6MWT)으로 측정했을 때, 환자의 안정적인 보행 거리를 유지시키거나 증가시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 10 m를 보행/주행하는 데 걸리는 시간(즉, 10미터 보행/주행 시험)을 유지시키거나 단축시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 누운 자세에서 일어나는 데 걸리는 시간(즉, 기립 소요 시간 시험)을 유지시키거나 단축시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 4개의 표준 계단을 오르는 데 걸리는 시간(즉, 4계단 오르기 시험)을 유지시키거나 단축시킨다. 일부 구현예에서, 치료는, 예를 들어, MRI(예: 하지 근육의 MRI)에 의해 측정했을 때, 환자에서 근육 염증을 유지시키거나 감소시킨다. 일부 구현예에서, MRI는 근육 퇴행을 식별하기 위해 T2 및/또는 지방 분획을 측정한다. MRI는 염증, 부종, 근육 손상 및 지방 침윤에 의해 야기된 근육 구조와 조성의 변화를 식별할 수 있다.

[0198] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머를 사용하는 치료는 신규한 디스트로핀 생산을 증가시키고 치료 부재 시에 예상되는 보행 상실을 느리게 하거나 감소시킨다. 예를 들어, 치료는 대상체에서 보행 능력(예를 들어, 보행 안정화)을 안정화, 유지, 개선 또는 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 치료는 예를 들어, McDonald 등에 의해 기술된 6분 보행 시험(6MWT)으로 측정했을 때, 환자의 안정적인 보행 거리를 유지시키거나 증가시킨다 (Muscle Nerve, 2010; 42:966-74, 참조로서 본원에 통합됨). 6분 보행 거리(6MWD)의 변화는 절대값, 백분율 변화 또는 예측 값의 변화율(%)로서 표현될 수 있다. 6MWT에 있어서, 건강한 동년배의 전형적인 수행도(performance)에 대해 상대적인 DMD 환자의 수행도는 예측 값(%)을 계산함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 예측 6MWD(%)는 남성의 경우 다음 식을 사용해 계산할 수 있다: 196.72 + (39.81 x 나이) - (1.36 x 나이^2) + (132.28 x 신장(미터 단위)). 여성의 경우, 예측 6MWD(%)는 다음 식을 사용해 계산할 수 있다: 188.61 + (51.50 x 나이) - (1.86 x 나이^2) + (86.10 x 신장(미터 단위))(본원에 참조로서 통합된 Henricson 등의 문헌 [PLoS Curr., 2012, version 2]).

[0199] DMD 환자에서 근육 기능의 상실은 정상적인 아동기 성장 및 발달 배경과 대조적으로 일어날 수 있다. 실제로, 진행성 근육 장애에도 불구하고 DMD를 가진 아동이 어릴수록 약 1년의 과정에 걸친 6MWT에서 보행 거리의 증가를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서는, DMD 환자의 6MWD를 전형적으로 발달 중인 대조군 대상체와 비교하고 나이와 성별이 일치하는 대상체의 기존 규준(normative data)과 비교한다. 일부 구현예에서, 정상적인 성장 및 발달은 규준에 피팅된 나이와 신장 기반 등식을 사용해 설명될 수 있다. 이러한 등식은 DMD를 가진 대상체에서 6MWD를 예측 값 변화율(예측률(%))로 변환하는데 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 예상 6MWD(%) 데이터의 분석은 정상적인 성장 및 발달을 설명하는 방법을 나타내며, 초년기(예: 7세 이하) 획득한 기능이 DMD 환자에서의 개선된 능력보다 더 안정하다는 것을 보여줄 수 있다(예: Henricson 등의 문헌[PLoS Curr., 2012, version 2]을 참조하고, 동 문헌은 참조로서 본원에 통합됨).

[0200] 상이한 안티센스 분자들을 구별하기 위한 안티센스 분자 명명 시스템이 제안되고 공개되었다(Mann 등의 문헌 [(2002) J Gen Med 4, 644-654] 참조). 이러한 명명법은, 아래에 보이는 바와 같이 모두 동일한 표적 영역에서 유도되었지만 약간 상이한 여러 개의 안티센스 분자를 시험할 때 특히 유의미해졌다:

[0201] H#A/D(x:y).

[0202] 첫 글자는 종(예를 들어, H: 인간, M: 쥣과, C: 개과)을 지정한다. "#"는 표적 디스트로핀 엑손 번호를 지정한다. "A/D"는 엑손의 시작 및 끝에서의 수용자(acceptor) 또는 공여자(donor) 스플라이스 부위를 각각 나타낸다. (x y)는 어닐링 좌표를 나타내며, 여기서 "-" 또는 "+"는 각각 인트론 서열 또는 엑손 서열을 나타낸다. 예를 들어, A(-6+18)은 표적 엑손에 선행하는 인트론의 마지막 6개의 염기 및 표적 엑손의 첫 18개의 염기를 나타내게 된다. 가장 가까운 스플라이스 부위가 수용자이므로, 이들 좌표 앞에 "A"가 붙게 된다. 공여자 스플라이스 부위에서 어닐링 좌표를 설명하는 것이 D(+2-18)일 수 있고, 이 경우, 마지막 2개의 엑손 염기 및 첫 18개의 인트론 염기가 안티센스 분자의 어닐링 부위에 상응한다. A(+65+85)로 표시될 완전한 엑손 어닐링 좌표는, 해당

엑손의 시작으로부터 65번째 뉴클레오티드와 85번째 뉴클레오티드 사이의 부위이다.

[0203] II. 안티센스 올리고머

[0204] A.엑손 50 스키핑을 유도하도록 설계된 안티센스 올리고머

[0205] 특정 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 디스트로핀 유전자의 엑손 50, 인트론 49, 및/또는 인트론 50 표적 영역에 상보적이며 엑손 50 스키핑을 유도한다. 특히, 본 개시는 어닐링 부위로서 지정된 디스트로핀 mRNA 전구체의 엑손 50, 인트론 49, 및/또는 인트론 50 표적 영역에 상보적인 안티센스 올리고머에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 어닐링 부위는 H50D(+04-18), H50D(+07-18), H50D(+07-16), H50D(+07-17), H50A(-19+07), H50D(+07-15), H50A(-02+23), H50D(+06-18), 또는 H50D(+07-20)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 어닐링 부위는 H50D(+07-16)이다.

[0206] 본 개시의 안티센스 올리고머는 디스트로핀 mRNA 전구체를 표적으로 하고 엑손 50의 스키핑을 유도하므로, 엑손 50은 성숙한, 스플라이싱된 mRNA 전사물에서 제외되거나 스킵된다. 엑손 50을 스키핑함으로써, 손상된 판독 프레임은 프레임 내 돌연변이로 복원된다. DMD는 다양한 유전자 서브타입으로 이루어지는 반면, 본 개시의 안티센스 올리고머는 디스트로핀 mRNA 전구체의 엑손 50을 스킵하도록 특별히 설계하였다. 엑손 50 스키핑에 순응하는 DMD 돌연변이는 DMD 환자의 하위군(4%)을 포함한다.

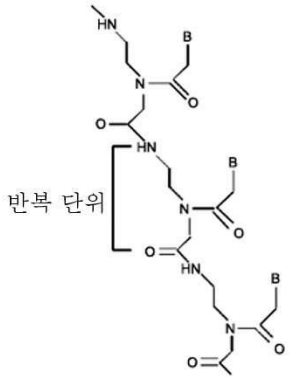
[0207] 엑손 50 스키핑을 유도하는 안티센스 올리고머의 핵염기 서열은 디스트로핀 mRNA 전구체의 엑손 50, 인트론 49, 및/또는 인트론 50 내에 있는 특이적 표적 서열에 상보적으로 설계된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머는 PMO이며, 여기서 PMO의 각 모르폴리노 고리는, 예를 들어 DNA에서 발견되는 핵염기(아데닌, 시토신, 구아닌 및 티민)을 포함하는 핵염기에 연결된다.

[0208] B.올리고머 화학물질의 특징

[0209] 본 발명의 안티센스 올리고머는 다양한 안티센스 올리고머 화학물질을 사용할 수 있다. 올리고머 화학물질의 예는 모르폴리노 올리고머, 포스포로티오에이트 변형 올리고머, 2' O-메틸 변형 올리고머, 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 포스포로티오에이트 올리고머, 2' O-MOE 변형 올리고머, 2'-플루오로-변형 올리고머, 2'O,4'C-에틸렌-가교 핵산(ENA), 트리시클로-DNA, 트리시클로-DNA 포스포로티오에이트 서브유닛, 2'-O-[2-(N-메틸카르바모일)에틸] 변형 올리고머를 포함하되 이들로 한정되지는 않으며, 전술한 것들의 임의의 조합을 포함한다. 포스포로티오에이트 및 2'-O-Me-변형 화학물질을 조합하여 2'O-Me-포스포로티오에이트 골격을 생성할 수 있다. 예를 들어, PCT 공개 번호 WO/2013/112053 및 WO/2009/008725를 참조하고, 이들은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 사용된 화학물질에 의해 허용되는 바와 같이, 서열번호 1~9 중 어느 하나의 각각의 T는 우라실일 수 있다. 사용된 화학물질에 의해 허용되는 바와 같이, 서열번호 1~9 중 어느 하나의 관련 핵염기는 5-메틸기를 포함할 수 있다. 본 개시의 올리고머 화학물질의 예시적인 구현예가 이하에서 추가로 기술된다.

[0210] 1. 펩티드 핵산(PNA)

[0211] 펩티드 핵산(PNA)은, 디옥시리보오스 골격과 구조적으로 동상체인 골격을 가진 DNA 유사체로서, 피리미딘 또는 퓨린 염기가 부착되는 N-(2-아미노에틸) 글리신 단위로 구성된다. 천연 피리미딘 및 퓨린 염기를 함유하는 PNA는 왓슨-크릭 염기-페어링 규칙을 따라 상보적 올리고머에 혼성화되며, 염기 쌍 인식의 관점에서 DNA를 모방한다. PNA의 골격은 인산디에스테르 결합보다는 펩티드 결합에 의해 형성되므로, 안티센스 응용분야에 매우 적합하다(아래 구조 참조). 골격이 하전되지 않으므로, PNA/DNA 또는 PNA/RNA 이중체는 정상보다 더 높은 열 안정성을 나타낸다. PNA는 뉴클레아제 또는 프로테아제에 의해 인식되지 않는다. PNA의 비제한적인 예가 아래에 예시되어 있다.



PNA

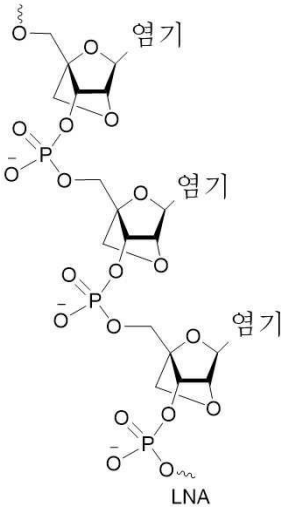
[0212]

[0213] 천연 구조에 대한 라디칼의 구조 변화에도 불구하고, PNA는 나선 형태에서 DNA 또는 RNA에 서열-특이적으로 결합할 수 있다. PNA의 특징은 상보적 DNA 또는 RNA에 대한 높은 결합 친화도, 단일 염기 미스매치에 의한 탈안정화 효과, 뉴클레아제 및 프로테아제에 대한 저항성, 염 농도와 무관하게 DNA 또는 RNA와의 혼성화, 및 호모퓨린(homopurine) DNA와의 삼중체 형성을 포함한다. PANAGENE쩨은 독점적인 Bts PNA 단량체(Bts; 벤조티아졸-2-설포닐기) 및 독점적인 올리고머화 공정을 개발하였다. Bts PNA 단량체를 사용하는 PNA 올리고머화는 탈보호화, 결합 및 캡핑의 반복적인 사이클로 구성된다. PNA는 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용해 합성하여 생산할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,969,766호; 제7,211,668호; 제7,022,851호; 제7,125,994호; 제7,145,006호; 및 제7,179,896호를 참조한다. 또한, PNA의 제조에 대해서는 미국 특허 제5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제5,719,262호를 참조한다. PNA 화합물에 대한 추가의 교시는 Nielsen 등의 문헌[*Science*, 254:1497-1500, 1991]에서 확인할 수 있다. 상기 문헌 각각은 그 전체가 참조로서 통합된다.

[0214] **2. 잠금 핵산(LNA)**

[0215] 안티센스 올리고머는 "잠금 핵산(locked nucleic acid, LNA)" 서브유닛을 함유할 수도 있다. "LNA"는 가교 핵산(BNA)이라 불리는 변형 클래스의 구성원이다. BNA는 C30-엔도 (northern) 당주름(sugar pucker)의 리보오스 고리의 형태를 잠그는 공유 연결을 특징으로 한다. LNA의 경우, 브리지는 2'-O 위치와 4'-C 위치 사이의 메틸렌으로 구성된다. LNA는 골격 사전 구성과 염기 중첩을 향상시켜 혼성화와 열 안정성을 증가시킨다.

[0216] LNA의 구조는, 예를 들어, 다음 문헌에서 확인할 수 있으며, 이들 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다: Wengel 등의 문헌[*Chemical Communications* (1998) 455]; Koshkin 등의 문헌[*Tetrahedron* (1998) 54:3607]; Jesper Wengel의 문헌[*Accounts of Chem. Research* (1999) 32:301]; Obika 등의 문헌[*Tetrahedron Letters* (1997) 38:8735]; Obika 등의 문헌[*Tetrahedron Letters* (1998) 39:5401]; 및 Obika 등의 문헌[*Bioorganic Medicinal Chemistry* (2008) 16:9230]. LNA의 비제한적인 예가 아래에 도시되어 있다.

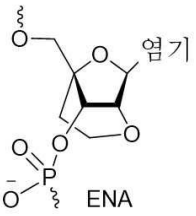


[0217]

[0218] 본 개시의 안티센스 올리고머는 하나 이상의 LNA를 포함할 수 있으며; 일부 경우에, 안티센스 올리고머는 전체가 LNA로 구성될 수 있다. 개별 LNA 뉴클레오시드 서브유닛을 합성하고 이들을 올리고머로 혼입하는 방법은, 예

를 들어, 미국 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 기술되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 통합된다. 통상적인 서브유닛 간의 링커는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 모이어티를 포함하며; 대안적으로, 인을 함유하지 않는 링커가 사용될 수 있다. 추가의 구현예는, 각각의 LNA 서브유닛이 DNA 서브유닛에 의해 분리되는 안티센스 올리고머를 함유하는 LNA를 포함한다. 특정 안티센스 올리고머는 교번하는 LNA 및 DNA 서브유닛으로 구성되며, 여기서 서브유닛 간의 링커는 포스포로티오에이트이다.

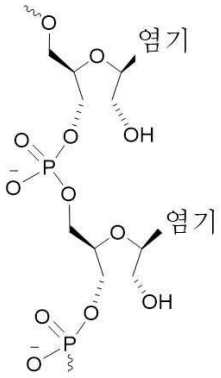
[0219] 2'O,4'C-에틸렌-브리지 핵산(ENA)은 BNA 클래스의 또 다른 구성원이다. 비제한적인 예가 아래에 예시되어 있다.

[0220] 

[0221] ENA 올리고머 및 이의 제조는 Obika 등의 문헌[*Tetrahedron Lett* (1997) 38 (50): 8735]에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 본 개시의 안티센스 올리고머는 하나 이상의 ENA 서브유닛을 포함할 수 있다.

[0222] **3. 비잠금 핵산 (UNA)**

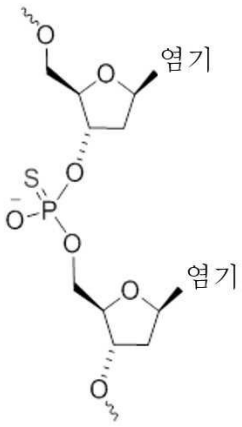
[0223] 안티센스 올리고머는 "비잠금 핵산(unlocked nucleic acid, UNA)" 서브유닛을 함유할 수도 있다. UNA 및 UNA 올리고머는 서브유닛의 C2'-C3' 결합이 절단된 RNA의 유사체이다. LNA는 (DNA 및 RNA에 비해) 형태가 제한되는 반면, UNA는 매우 유연하다. UNA는 예를 들어 WO 2016/070166에 개시되어 있다. UNA의 비제한적인 예가 아래에 도시되어 있다.

[0224] 

[0225] 통상적인 서브유닛 간의 링커는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 모이어티를 포함하며; 대안적으로, 인을 함유하지 않는 링커가 사용될 수 있다.

[0226] **4. 포스포로티오에이트**

[0227] "포스포로티오에이트"(또는 S-올리고)는 비가교 산소 중 하나가 황으로 치환된 정상 DNA의 변이체이다. 포스포로티오에이트의 비제한적인 예가 아래에 예시되어 있다.



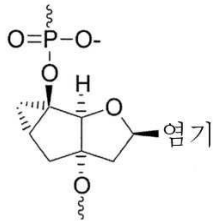
[0228]

[0229] 뉴클레오티드 간 결합의 황화(sulfurization)는 5'에서 3' 방향으로 및 3'에서 5' 방향으로 DNA POL 1 엑소뉴클레아제, 뉴클레아제 S1 및 P1, RNase, 혈청 뉴클레아제 및 뱀 독 포스포디에스테라아제를 포함하는 엔도-및 엑소뉴클레아제의 작용을 감소시킨다. 포스포로티오에이트는 두 가지 주요 경로, 즉: 이황화탄소 중 황 원소 용액이 포스폰산수소에 미치는 작용에 의하거나, 테트라에틸티우람 디설파이드(TETD) 또는 3H-1, 2-벤조디티올-3-온 1, 1-디옥사이드(BDTD) 중 하나로 포스파이트 트리에스테르를 황화시키는 방법에 의해 만들어진다(예를 들어, Iyer 등의 문헌[*J. Org. Chem.* 55, 4693-4699, 1990]을 참조하고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다). 후자의 방법은, 대부분의 유기 용매에서 황 원소의 불용성 문제와 이황화탄소의 독성 문제를 회피한다. TETD 및 BDTD 방법은 또한 고순도의 포스포로티오에이트를 산출한다.

[0230] **5. 트리시클로-DNA 및 트리시클로-포스포로티오에이트 서브유닛**

[0231] 트리시클로-DNA(tc-DNA)는, 시클로프로판 고리를 도입하여 골격의 입체적 유연성을 제한하고 골격 기하학적 구조의 비틀림각(γ)을 최적화함으로써 각각의 뉴클레오티드가 변형된 제한된 DNA 유사체 클래스이다. 동종염기성 아데닌과 티민을 함유하는 tc-DNA는 상보적 RNA와 함께 매우 안정적인 A-T 염기 쌍을 형성한다. 트리시클로-DNA 및 이의 합성은 국제 특허 출원 공개 제WO 2010/115993호에 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 본 개시의 안티센스 올리고머는 하나 이상의 트리시클로-DNA 서브유닛을 포함할 수 있으며; 일부 경우에, 안티센스 올리고머는 전체가 트리시클로-DNA 서브유닛으로 구성될 수 있다.

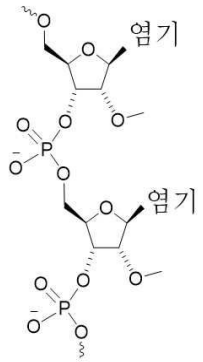
[0232] 트리시클로-포스포로티오에이트 서브유닛은 포스포로티오에이트 서브유닛 간 결합을 갖는 트리시클로-DNA 서브유닛이다. 트리시클로-포스포로티오에이트 서브유닛 및 이의 합성은 국제 특허 출원 공개 제WO 2013/053928호에 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 본 개시의 안티센스 올리고머는 하나 이상의 트리시클로-DNA 서브유닛을 포함할 수 있으며; 일부 경우에, 안티센스 올리고머는 전체가 트리시클로-DNA 서브유닛으로 구성될 수 있다. 트리사이클-DNA/트리사이클-포스포로티오에이트 서브유닛의 비제한적인 예가 아래에 예시되어 있다.



[0233] 트리시클로-DNA

[0234] **6. 2' O-메틸, 2'-O-MOE, 및 2'-F 올리고머**

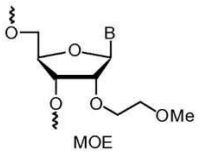
[0235] "2'-O-Me 올리고머" 분자는 리보오스 분자의 2'-OH 잔기에서 메틸기를 갖는다. 2'-O-Me-RNA는 DNA와 동일한(또는 유사한) 거동을 보이지만 뉴클레아제 분해로부터 보호된다. 2'-O-Me-RNA는 추가적인 안정화를 위해 포스포로티오에이트 올리고머(PTO)와 조합될 수도 있다. 2'O-Me 올리고머(포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트)는 당업계의 일상적인 기술에 따라 합성될 수 있다(예를 들어, Yoo 등의 문헌[*Nucleic Acids Res.* 32:2008-16, 2004]을 참조하고, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다). 2'-O-Me 올리고머의 비제한적인 예가 아래에 예시되어 있다.



2'-O-Me

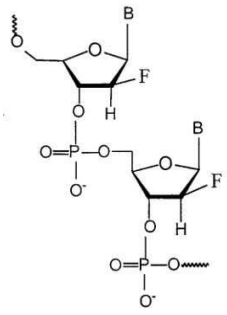
[0236]

[0237] 2'-O-메톡시에틸 올리고머(2'-O MOE)는 리보오스 분자의 2'-OH 잔기에서 메톡시에틸기를 가지고, 이에 대해서는 Martin 등의 문헌[*Helv. Chim. Acta,* 78, 486-504, 1995]에서 논의되며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 2'-O-MOE 서브유닛의 비제한적인 예가 아래에 예시되어 있다.



[0238]

[0239] 2'-플루오로 (2'-F) 올리고머는 2'-OH 대신에 2' 위치에서 플루오로 라디칼을 갖는다. 2'-F 올리고머의 비제한적인 예가 아래에 예시되어 있다.

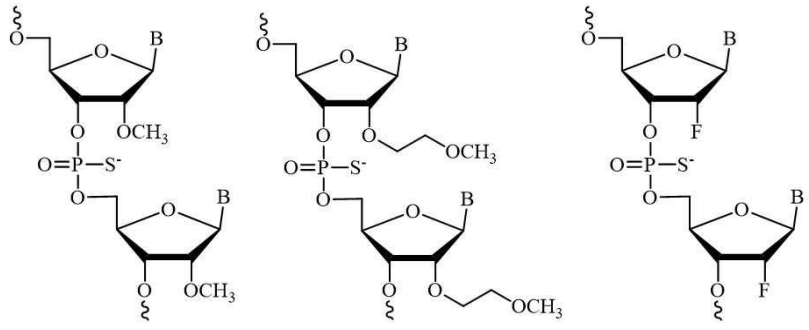


2'-F

[0240]

[0241] 2'-플루오로 올리고머는 WO 2004/043977에 추가로 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0242] 2'-O-메틸, 2'-O-MOE, 및 2'-F 올리고머는 아래에 도시된 바와 같이 하나 이상의 포스포로티오에이트(PS) 결합을 포함할 수도 있다.

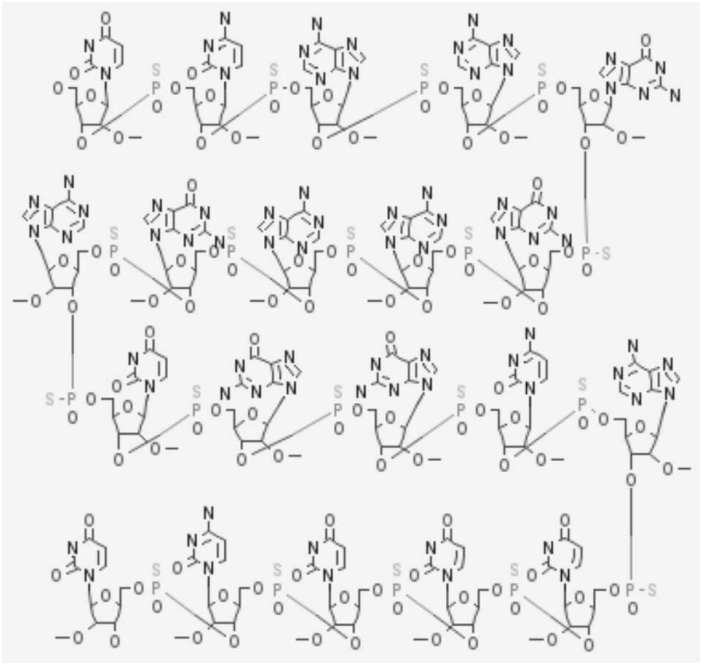


2'-O-메틸 PS　　2'-O-MOE PS　　2'-F PS

[0243]

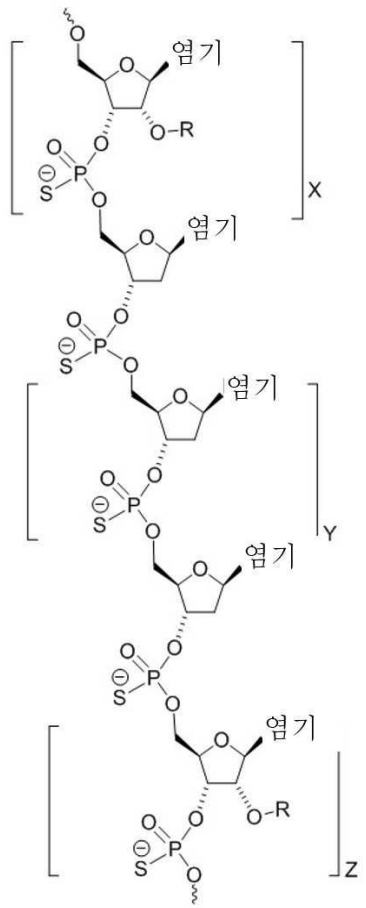
[0244] 또한, 2'-O-메틸, 2'-O-MOE, 및 2'-F 올리고머는, 예를 들어, 아래에 예시된 2'-O-메틸 PS 올리고머인 드리사퍼

센(drisapersen)에서와 같이, 올리고머 전체에 걸쳐 PS 서버유닛 간 결합을 포함할 수 있다.



[0245]

[0246] 대안적으로, 2'-O-메틸, 2'-O-MOE, 및/또는 2'-F 올리고머는 아래에 예시된 바와 같이, 올리고머의 단부에서 PS 결합을 포함할 수 있으며



[0247]

[0248] 식 중:

[0249] R은 $CH_2CH_2OCH_3$ (메톡시에틸 또는 MOE)이고;

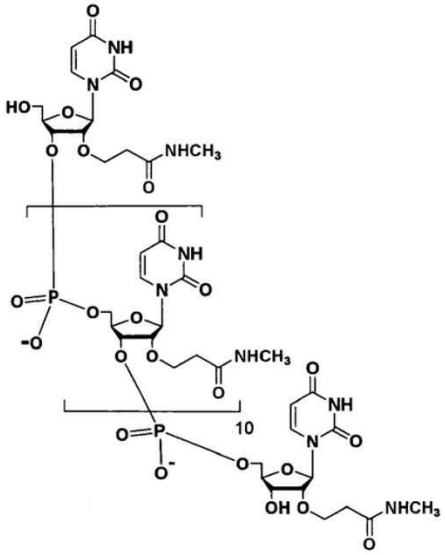
[0250] X, Y, 및 Z는 지정된 5'-윙(wing), 중앙 갭 및 3'-윙 영역의 각각에 포함된 뉴클레오티드의 수를 각각

나타낸다.

[0251] 본 개시의 안티센스 올리고머는 하나 이상의 2'-O-메틸, 2'-O-MOE, 및 2'-F 서브유닛을 포함할 수 있고, 본원에 기술된 임의의 서브유닛 간 결합을 이용할 수 있다. 일부 경우에, 본 개시의 안티센스 올리고머는 그 전체가 2'-O-메틸, 2'-O-MOE, 또는 2'-F 서브유닛으로 구성될 수 있다. 본 개시의 안티센스 올리고머의 일 구현예는 그 전체가 2'-O-메틸 서브유닛으로 구성된다.

[0252] **7. 2'-O-[2-(N-메틸카르바모일)에틸] 올리고머 (MCE)**

[0253] MCE는 본 개시의 안티센스 올리고머에 유용한 2'-O 변형 리보뉴클레오시드의 다른 또 다른 예이다. 여기서, 2'-OH는 2-(N-메틸카르바모일)에틸 모이어티로 유도체화되어 뉴클레아제 저항성을 증가시킨다. MCE 올리고머의 비제한적인 예가 아래에 예시되어 있다.

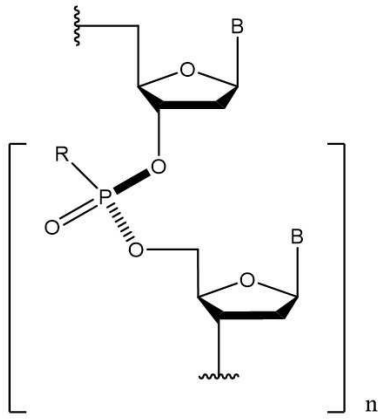


[0254]

[0255] MCE 및 이의 합성은 Yamada 등의 문헌[*J. Org. Chem* (2011) 76(9):3042-53]에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 본 개시의 안티센스 올리고머는 하나 이상의 MCE 서브유닛을 포함할 수 있다.

[0256] **8. 입체 특이적 올리고머**

[0257] 입체 특이적 올리고머는, 실질적으로 입체 순수형 올리고머가 생산되도록 각각의 인 함유 결합의 입체 화학물질이 합성 방법에 의해 고정된 것들이다. 입체 특이적 올리고머의 비제한적인 예가 아래에 예시되어 있다.



[0258]

[0259] 상기 예에서, 올리고머의 각각의 인 성분은 동일한 입체 구성을 갖는다. 추가의 예는 본원에 기술된 올리고머를 포함한다. 예를 들어, LNA, ENA, 트리시클로-DNA, MCE, 2'-O-메틸, 2'-O-MOE, 2'-F, 및 모르폴리노 계의 올리고머는, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포디에스테르, 포스포라미데이트, 포스포로디아미데이트, 또는 다른 인-함유 뉴클레오시드 간 결합과 같은 입체-특이적 인-함유 뉴클레오시드 간 결합을 이용해 제조될 수 있다. 입체 특이적 올리고머, 제조 방법, 키랄 조절식 합성, 키랄 설계, 및 이러한 올리고머의 생산에 사용하기 위한

키랄 보조제는 예를 들어, WO2017192664, WO2017192679, WO2017062862, WO2017015575, WO2017015555, WO2015107425, WO2015108048, WO2015108046, WO2015108047, WO2012039448, WO2010064146, WO2011034072, WO2014010250, WO2014012081, WO20130127858, 및 WO2011005761에 상세하게 기술되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0260] 입체 특이적 올리고머는 R_P 또는 S_P 구성에서 인을 함유하는 뉴클레오시드 간 결합을 가질 수 있다. 결합의 입체 구성이 조절되는 키랄 인을 함유하는 결합은 "입체 순수형(stereopure)"으로서 지칭되는 한편, 결합의 입체 구성이 조절되지 않는 키랄 인을 함유하는 결합은 "입체 랜덤형(stereorandom)"으로서 지칭된다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 올리고머는, 생성된 올리고머가 미리 지정된 올리고머의 위치에서 입체 순수 서브유닛을 갖도록 복수의 입체 순수형 결합 및 입체 랜덤형 결합을 포함한다. 입체 순수형 서브유닛의 예시적인 위치는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2017/062862 A2의 도 7a 및 도 7b에 제공되어 있다. 일 구현예에서, 올리고머에서 키랄 인을 함유하는 모든 결합은 입체 랜덤형이다. 일 구현예에서, 올리고머에서 키랄 인을 함유하는 모든 결합은 입체 순수형이다.

[0261] n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머의 n개의 키랄 인-함유 결합 모두는 입체 랜덤형이다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머의 n개의 키랄 인-함유 결합 모두는 입체 순수형이다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머의 n개의 인-함유 결합 중 적어도 10%는 입체 순수형이다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머의 n개의 인-함유 결합 중 적어도 20%는 입체 순수형이다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머의 n개의 인-함유 결합 중 적어도 30%는 입체 순수형이다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머의 n개의 인-함유 결합 중 적어도 40%는 입체 순수형이다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머의 n개의 인-함유 결합 중 적어도 50%는 입체 순수형이다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머의 n개의 인-함유 결합 중 적어도 60%는 입체 순수형이다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머의 n개의 인-함유 결합 중 적어도 70%는 입체 순수형이다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머의 n개의 인-함유 결합 중 적어도 80%는 입체 순수형이다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머의 n개의 인-함유 결합 중 적어도 90%는 입체 순수형이다.

[0262] n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 2개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 3개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 4개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 5개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 6개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 7개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 8개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 9개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 10개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 11개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키

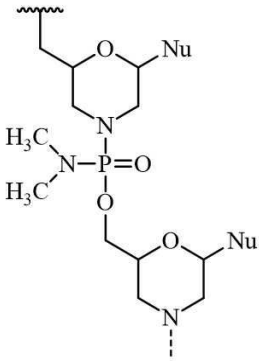
랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 12개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 13개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 14개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 15개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 16개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 17개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 18개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 19개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, (즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 20개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다.

[0263] n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_P 또는 R_P)의 적어도 2개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합 및 다른 입체 배향의 적어도 2개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유한다. 예를 들어, 올리고머는 S_P 배향의 적어도 2개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합 및 R_P 배향의 적어도 2개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 함유할 수 있다.

[0264] n개의 키랄 인-함유 결합을 갖는 올리고머의 구현예에서(여기서 n은 1 이상의 정수임), 올리고머는 동일한 입체 배향의 적어도 2개의 연속 입체 순수형 인-함유 결합을 교번하는 패턴으로 함유한다. 예를 들어, 올리고머는 2개 이상의 R_P, 2개 이상의 S_P, 및 2개 이상의 R_P 등을 순서대로 함유할 수 있다.

[0265] **9. 모르폴리노 올리고머**

[0266] 본 개시의 예시적인 구현예는 하기 일반 구조를 갖고:

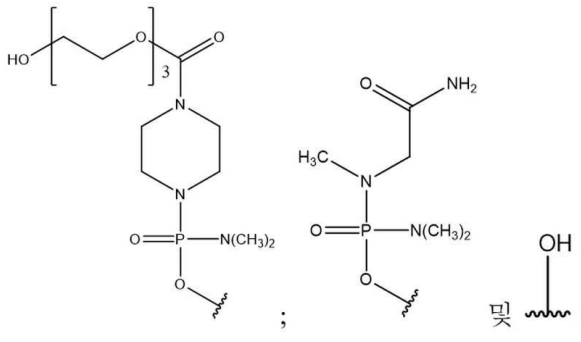


[0267]

[0268] Summerton, J. 등의 문헌[*Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997)]의 도 2에 기술된 것과 같은 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(phosphorodiamidate morpholino oligomers)에 관한 것이다. 본원에 기술된 것과 같은 모르폴리노는 전술한 일반 구조의 모든 입체이성질체 및 호변이성질체를 포함하도록 의도된다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조 및 결합 특성은 미국 특허 제5,698,685호; 제5,217,866호; 제5,142,047호; 제5,034,506호; 제5,166,315호; 제5,521,063호; 제5,506,337호; 제8,076,476호; 및 제8,299,206호에 상세히 설명되어 있으며, 이들 모두는 참조로서 본원에 통합된다.

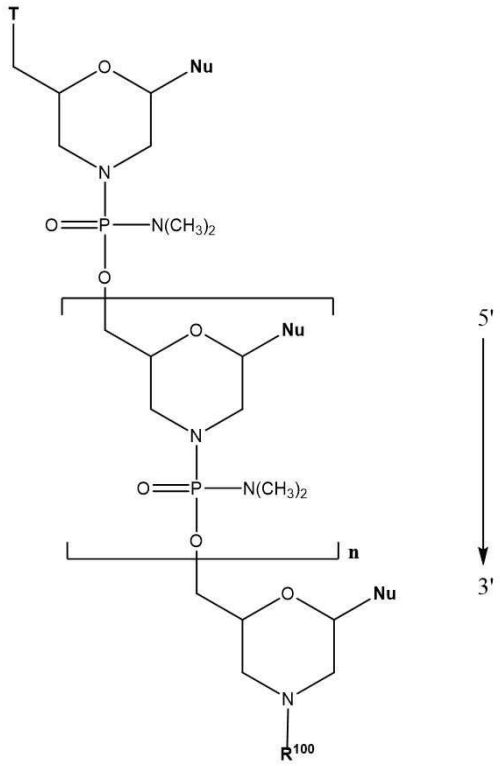
[0269] 소정의 구현예에서, 모르폴리노는 올리고머의 5' 단부 또는 3' 단부에서 "테일(tail)" 모이어티와 접합되어 올

리고머의 안정성 및/또는 용해도를 증가시킨다. 예시적인 테일은 다음을 포함하고:

[0270] 
;
및
,

[0271] "테일" 모이어티의 원위 -OH 또는 $-NH_2$는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결된다.

[0272] 다양한 양태에서, 본 개시는 화학식 (I)에 따른 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며:

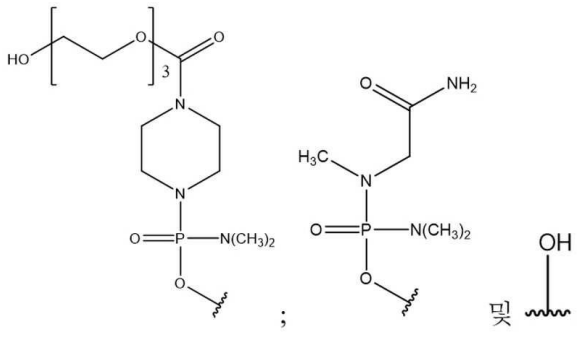


[0273] **(I)**

[0274] 식 중:

[0275] 각각의 Nu는 서로 합쳐져 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

[0276] T는 다음으로부터 선택되는 모이어티이고:

[0277] 
;
및
; T 모이어티의 원위 -OH 또는 $-NH_2$는 세포 투과 펩티드에

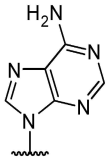
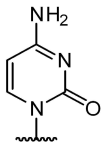
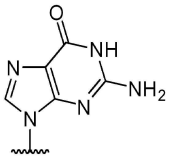
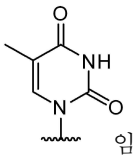
임의로 연결되고;

[0278] R^{100}은 수소 또는 세포 투과 펩티드이고;

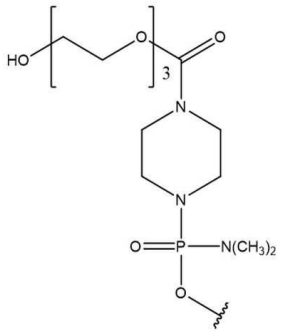
[0279] 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

[0280]

[0281] (여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이며, T는  임).

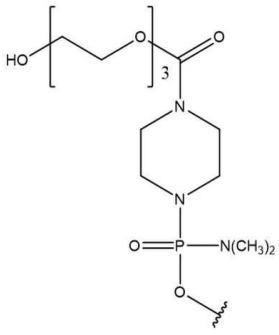
[0282] 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에 상응한다: 서열번호 1, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 또는 서열 번호 9. 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에 상응한다.



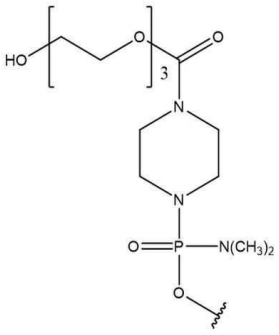
[0283] 다양한 구현예에서, T는 이고; T 모이어티의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결된다.

[0284] 다양한 구현예에서, R^{100}은 수소이다. 다양한 다른 구현예에서, R^{100}은 세포 투과 펩티드이다. 다양한 구현예에서, R^{100}은 $-R^5$(서열번호 21)이다. 다양한 구현예에서, R^{100}은 $-G-R^5$(서열번호 20)이다. 다양한 구현예에서, R^{100}은 $-R^6$(서열번호 10)이다. 다양한 구현예에서, R^{100}은 $-G-R^6$(서열번호 11)이다.

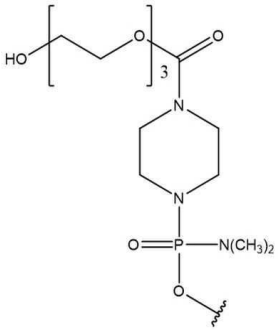
[0285] 일부 구현예에서, 화학식 (I)의 안티센스 올리고머는 유리 염기 형태이다. 일부 구현예에서, 화학식 (I)의 안티센스 올리고머는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다. 일부 구현예에서, 화학식 (I)의 안티센스 올리고머는 이의 HCl(염산) 염이다. 특정 구현예에서, HCl 염은 1HCl, 2HCl, 3HCl, 4HCl, 5HCl, 또는 6HCl 염이다. 특정 구현예에서, HCl 염은 6HCl 염이다.



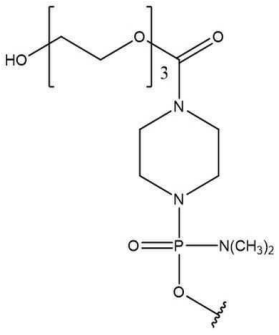
[0286] 다양한 구현예에서, T는 이고; T 모이어티의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결되고, R^{100}은 세포 투과 펩티드이다.



[0287] 다양한 구현예에서, T는 이고, R^{100}은 세포 투과 펩티드이다.

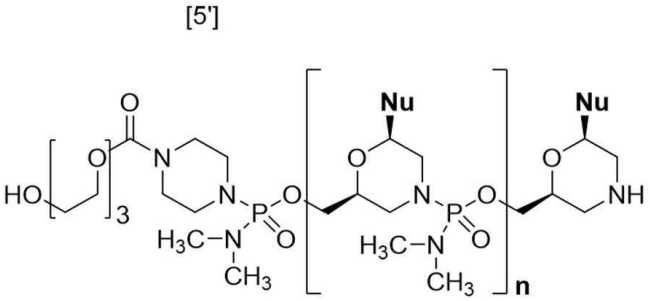


[0288] 다양한 구현예에서, T는 이고, R^{100}은 -G-R^{5}(서열번호 20)이다.



[0289] 다양한 구현예에서, T는 이고, R^{100}은 -G-R^{6}(서열번호 11)이다.

[0290] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 화학식 (II)에 따른 것이거나 이의 약학적으로 허용 가능한 염이며:



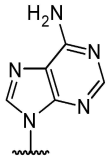
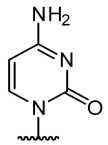
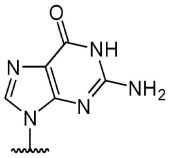
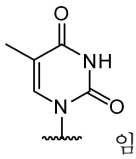
(II)

[0291]

[0292] 식 중, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다:

[0293]

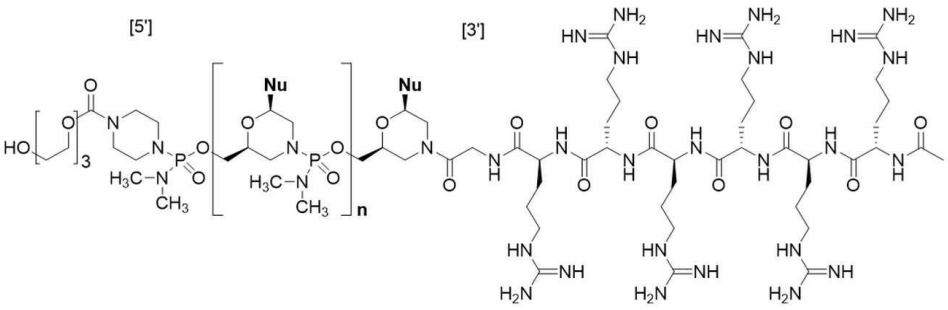
어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

[0294] (여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이며, T는  임). 일부 구현예에서, 화학식 (II)의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 연결된다.

[0295] 일부 구현예에서, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 다음 중 하나에 상응한다: 서열번호 1, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 또는 서열 번호 9. 일부 구현예에서, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 서열번호 3에 상응한다.

[0296] 일부 구현예에서, 화학식 (II)의 안티센스 올리고머는 유리 염기 형태이다. 일부 구현예에서, 화학식 (II)의 안티센스 올리고머는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다. 일부 구현예에서, 화학식 (II)의 안티센스 올리고머는 이의 HCl(염산) 염이다. 특정 구현예에서, HCl 염은 1HCl, 2HCl, 3HCl, 4HCl, 5HCl, 또는 6HCl 염이다. 특정 구현예에서, HCl 염은 6HCl 염이다.

[0297] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 화학식 (III)에 따른 것이거나 이의 약학적으로 허용 가능한 염이며:



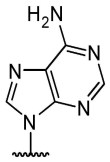
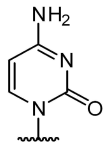
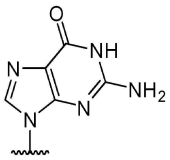
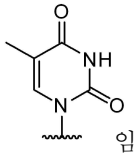
(III)

[0298]

[0299] 식 중, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

[0300]

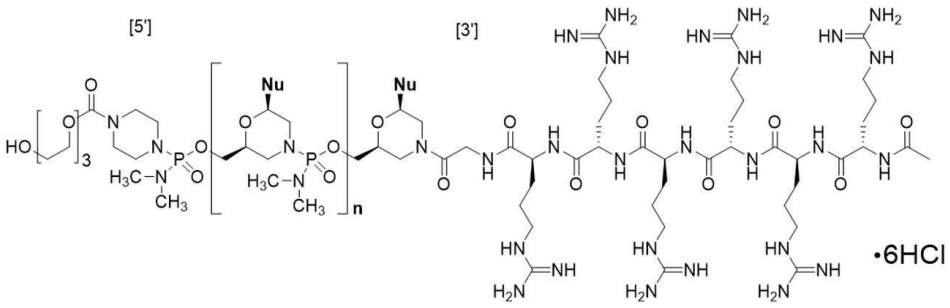
[0301] (여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이며, T는  임). 일부 구현예에서, 화학식 (III)의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 연결된다.

[0302] 일부 구현예에서, 화학식 (III)의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결된다.

[0303] 일부 구현예에서, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 다음 중 하나에 상응한다: 서열번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 또는 서열 번호 9. 일부 구현예에서, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 서열번호 3에 상응한다.

[0304] 일부 구현예에서, 화학식 (III)의 안티센스 올리고머는 유리 염기 형태이다. 일부 구현예에서, 화학식 (III)의 안티센스 올리고머는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다. 일부 구현예에서, 화학식 (III)의 안티센스 올리고머는 이의 HCl(염산) 염이다. 특정 구현예에서, HCl 염은 6HCl 염이다.

[0305] 다양한 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머 접합체는 화학식 (IV)에 따른 것이거나 이의 약학적으로 허용 가능한 염이며:

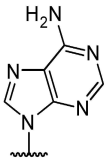
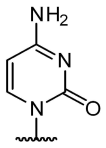
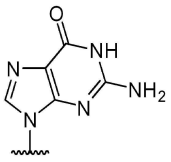
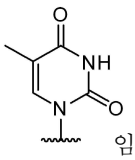


[0306] **(IV)**

[0307] 식 중 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

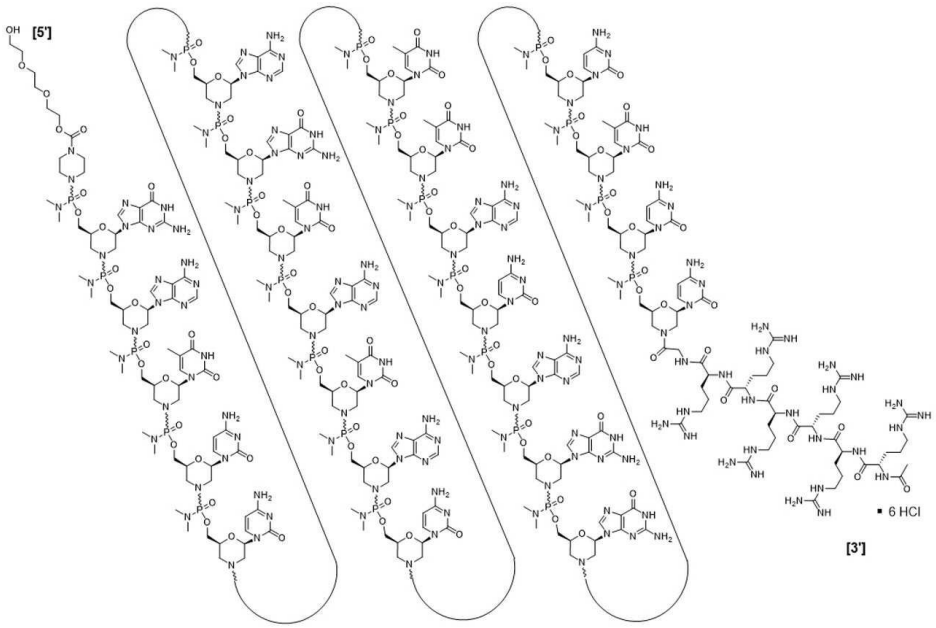
[0308]

[0309] (여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이며, T는  임).

[0310] 일부 구현예에서, 화학식 (IV)의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결된다.

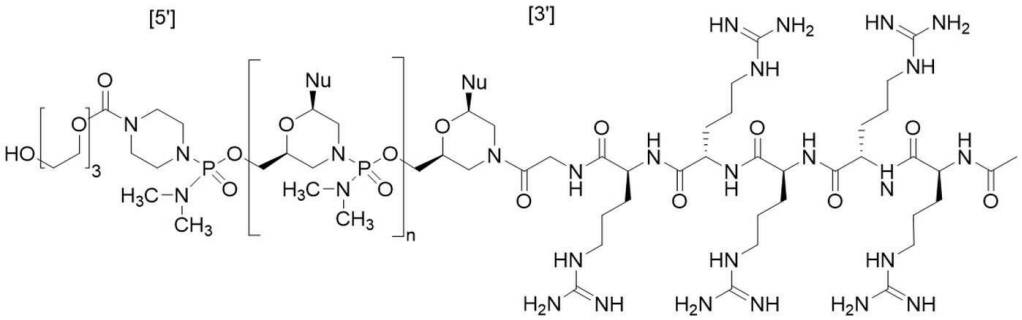
[0311] 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에 상응한다: 서열번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 또는 서열 번호 9. 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에 상응한다.

[0312] 예를 들어, 화학식 (IV)의 일부 구현예를 포함하는 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머는 화학식 (IVa)에 따른 것이다:



[0313]

[0314] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 화학식 (V)에 따른 것이거나 이의 약학적으로 허용 가능한 염이며:

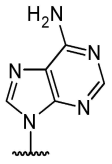
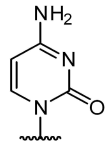
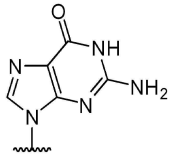
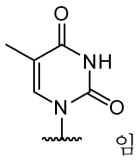


[0315] **(V)**

[0316] 식 중, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다:

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

[0317]

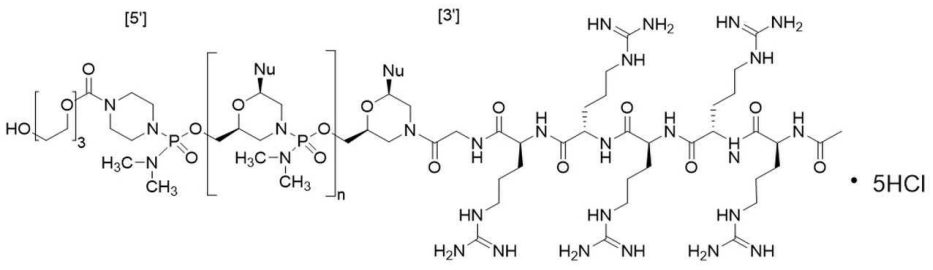
[0318] (여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이며, T는  임). 일부 구현예에서, 화학식 (IV)의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 연결된다.

[0319] 일부 구현예에서, 화학식 (V)의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결된다.

[0320] 일부 구현예에서, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 다음 중 하나에 상응한다: 서열번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 또는 서열 번호 9. 일부 구현예에서, 1에서 **n** 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 **Nu**는 서열번호 3에 상응한다.

[0321] 일부 구현예에서, 화학식 (V)의 안티센스 올리고머는 유리 염기 형태이다. 일부 구현예에서, 화학식 (V)의 안티센스 올리고머는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다. 일부 구현예에서, 화학식 (V)의 안티센스 올리고머는 이의 HCl(염산) 염이다. 특정 구현예에서, HCl 염은 5HCl 염이다.

[0322] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 화학식 (VI)에 따른 것이거나 이의 약학적으로 허용 가능한 염이며:

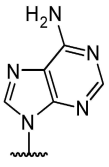
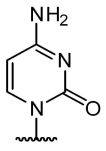
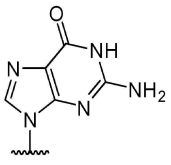
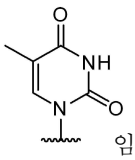


[0323] **(VI)**

[0324] 식 중 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에서의 핵염기에 상응한다:

[0325]

어닐링 부위	표적화 서열 [5'에서 3' 방향]	서열번호
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	서열번호 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	서열번호 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	서열번호 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	서열번호 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	서열번호 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	서열번호 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	서열번호 9

[0326] (여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이며, T는  임).

[0327] 일부 구현예에서, 화학식 (VI)의 원위 -OH는 세포 투과 펩티드에 임의로 연결된다.

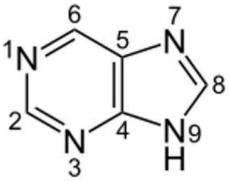
[0328] 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 다음 중 하나에 상응한다: 서열번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 또는 서열 번호 9. 일부 구현예에서, 1에서 n 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3에 상응한다.

[0329] **10. 핵염기 변형 및 치환**

[0330] 특정 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 (당업계에서 종종 "염기로" 단순히 지칭되는) RNA 핵염기 및 DNA 핵염기로 구성된다. RNA 염기는 아데닌(A), 우라실(U), 시토신(C) 및 구아닌(G)으로 흔히 알려져 있다. DNA 염기는 아데닌(A), 티민(T), 시토신(C) 및 구아닌(G)으로 흔히 알려져 있다. 다양한 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 시토신(C), 구아닌(G), 티민(T), 아데닌(A), 5-메틸시토신(5mC), 우라실(U), 및 하이포크산틴(I)으로 구성된다.

[0331] 소정의 구현예에서, 올리고머의 하나 이상의 RNA 염기 또는 DNA 염기는 RNA 염기 또는 DNA 염기 이외의 염기로 변형되거나 치환될 수 있다. 변형된 염기 또는 치환된 염기를 함유하는 올리고머는, 핵산에서 가장 흔히 발견되는 하나 이상의 퓨린 염기 또는 피리미딘 염기가 덜 흔한 염기 또는 비-천연 염기로 치환되는 올리고머를 포함한다.

[0332] 퓨린 염기는 하기 일반식에 의해 설명되는 바와 같이 이미다졸 링에 축합된 피리미딘 고리를 포함한다.

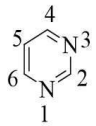


퓨린

[0333]

[0334] 아데닌과 구아닌은 핵산에서 가장 흔히 발견되는 2개의 퓨린 핵염기이다. 다른 자연 발생 퓨린은 N^6-메틸아데닌, N^2-메틸구아닌, 하이포크산틴 및 7-메틸구아닌을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0335] 피리미딘 염기는 하기 일반식에 의해 기술된 바와 같은 6-원 피리미딘 고리를 포함한다.



[0336] 피리미딘 코어

[0337] 시토신, 우라실 및 티민은 핵산에서 가장 흔히 발견되는 피리미딘 염기이다. 다른 자연 발생 피리미딘은 5-메틸시토신, 5-하이드록시메틸시토신, 슈도우라실 및 4-티오우라실을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 올리고머는 우라실 대신에 티민 염기를 함유한다.

[0338] 다른 적절한 염기는: 2,6-디아미노퓨린, 오르토산, 아그마티딘(agmatidine), 리시딘, 2-티오피리미딘(예: 2-티오우라실, 2-티오티민), G-클램프와 이의 유도체, 5-치환 피리미딘(예: 5-할로우라실, 5-프로피닐우라실, 5-프로피닐시토신, 5-아미노메틸우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 5-아미노메틸시토신, 5-하이드록시메틸시토신, 수퍼-T), 7-데아자구아닌, 7-데아자아데닌, 7-아자-2,6-디아미노퓨린, 8-아자-7-데아자구아닌, 8-아자-7-데아자아데닌, 8-아자-7-데아자-2,6-디아미노퓨린, 수퍼 G, 슈퍼 A, 및 N4-에틸시토신, 또는 이들의 유도체; N^2-시클로펜틸구아닌 (cPent-G), N^2-시클로펜틸-2-아미노퓨린 (cPent-AG), 및 N^2-프로필-2-아미노퓨린 (Pr-AP), 슈도우라실, 또는 이들의 유도체; 및 2,6-디플루오로오톨루엔과 같은 등의 축퇴행성 또는 범용 염기, 또는 무염기성 부위와 같은 부재 염기(예: 1-데옥시리보오스, 1,2-디데옥시리보오스, 1-데옥시-2-O-메틸리보오스; 또는 고리 산소가 질소로 치환된 피롤리돈 유도체(아자리보오스))를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 수퍼 A, 수퍼 G, 및 수퍼 T의 유도체의 예는 미국 특허 제6,683,173호 (Epoch Biosciences)에서 확인할 수 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. cPent-G, cPent-AP, 및 Pr-AP는 siRNA에 통합될 때 면역 자극 효과를 감소시키는 것으로 나타났다 (Peacock H. 등의 문헌[*J. Am. Chem.* Soc. 2011, 133, 9200] 참조). 슈도우라실은 우라실의 자연 발생 이성질체 버전으로서, 우리딘(uridine)에서와 같이 정상적인 N-글리코시드가 아닌 C-글리코시드를 갖는다. 슈도우리딘-함유 합성 mRNA는 우리딘-함유 mPvNA와 비교해 개선된 안전성 프로파일을 가질 수 있다 (WO 2009127230, 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨).

[0339] 특정 핵염기는 본 개시의 안티센스 올리고머의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 이들은 5-치환 피리미딘, 6-아자피리미딘, 및 N-2, N-6 및 O-6 치환 퓨린을 포함하며, 이에는 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실, 및 5-프로피닐시토신을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은, 핵산 이중체 안정성을 0.6~1.2℃만큼 증가시키는 것으로 나타났으며, 현재로서는 바람직한 염기 치환이며, 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합될 때 특히 더 그러하다. 추가의 예시적인 변형된 핵염기는 뉴클레아제의 적어도 하나의 수소 원자가 불소로 치환된 것들을 포함한다.

[0340] **11. 안티센스 올리고머의 약학적으로 허용 가능한 염**

[0341] 본원에 기술된 안티센스 올리고머의 특정 구현예는 아미노 또는 알킬아미노와 같은 염기성 작용기를 함유할 수 있으므로, 약학적으로 허용 가능한 산으로 약학적으로 허용 가능한 염을 형성할 수 있다. 이와 관련해서 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 본 개시의 안티센스 올리고머의 비교적 무독성의 무기산 부가염 및 유기산 부가염을 지칭한다. 이들 염은 투여 비히클 또는 투여 형태 제조 과정에서 인 시튜(in situ) 제조되거나, 유리 염기 형태로 정제된 본 개시의 안티센스 올리고머를 적절한 유기산 또는 무기산과 별도로 반응시키고, 그렇게 형성된 염을 후속 정제 중에 단리함으로써 제조될 수 있다. 대표적인 염은 브롬화수소산염, 염산염, 황산염, 중황산염, 인산염, 질산염, 아세트산염, 발레르산염, 올레산염, 팔미트산염, 스테아린산염, 라우릴산염, 벤조산염, 젖산염, 토실산염, 구연산염, 말레인산염, 푸마르산염, 숙신산염, 타르타르산염, 나프틸산염, 메실산염, 글루코헵톤산염, 락토바이온산염, 및 라우릴설폰산염 등을 포함한다. (예를 들어, Berge 등의 문헌[(1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 66:1-19]을 참조한다).

[0342] 본 개시의 안티센스 올리고머의 약학적으로 허용 가능한 염은, 예를 들어, 무독성 유기산 또는 무기산에서 유래된, 안티센스 올리고머의 통상적인 무독성 염 또는 사차 암모늄 염을 포함한다. 예를 들어, 이러한 통상적인 비독성 염은 염산, 브롬화수소산, 황산, 설팜산, 인산, 질산 등과 같은 유기산으로부터 염들; 및 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아린산, 젖산, 말산, 타르타르산, 구연산, 아스코르브산, 팔미트산, 말레산, 하이드록시말산, 페닐아세트산, 글루타민산, 벤조산, 살리실산, 술파닐산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔설폰산, 메탄설폰산, 에탄 디설폰산, 옥살산, 이소티온산, 등과 같은 유기산에서 제조된 염을 포함한다.

[0343] 특정 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 하나 이상의 산성 작용기를 함유할 수 있으므로, 약학적으로 허용 가능한 염기를 사용해 약학적으로 허용 가능한 염을 형성할 수 있다. 이들 경우에서의 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 본 개시의 안티센스 올리고머의 비교적 무독성의 무기염기 부가염 및 유기염기 부가염을 지칭한다. 마찬가지로 이들 염은 투여 비히클 또는 투여 형태 제조 과정에서 인 시튜 제조되거나, 유리 산 형태로 정제된 안티센스 올리고머를 수산화물, 탄산염 또는 중탄산염 또는 약학적으로 허용 가능한 금속 양이온과 같은 적절한 염기와 별도로 반응시키거나, 암모니아와 별도로 반응시키거나, 약학적으로 허용 가능한 유기 일차, 이차 또는 삼차 아민과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토염은 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄 염 등을 포함한다. 염기 부가염의 형성에 유용한 대표적인 유기 아민은 에틸아민, 디에틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진 등을 포함한다. (예를 들어, Berge 등의 전술한 문헌을 참조한다).

[0344] **III. 제형 및 투여 방식**

[0345] 특정 구현예에서, 본 개시는 본원에 기술된 바와 같은 안티센스 올리고머의 치료적 전달에 적합한 제형 또는 약학적 조성물을 제공한다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 개시는 약학적으로 허용 가능한 담체(첨가제) 및/또는 희석제와 함께 제형화된 본원에 기술된 하나 이상의 안티센스 올리고머 중 하나 이상의 치료적 유효량을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 조성물을 제공한다. 본 개시의 안티센스 올리고머를 단독으로 투여하는 것이 가능하지만, 안티센스 올리고머를 약학적 제형(조성물)으로서 투여하는 것이 바람직하다. 일 구현예에서, 제형의 안티센스 올리고머는 화학식 (III)에 따른 것이거나 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다.

[0346] 본 개시의 안티센스 올리고머에 적용될 수 있는 핵산 분자의 전달 방법은, 예를 들어: Akhtar 등의 문헌 [1992, *Trends Cell Bio.* 2:139]; Akhtar(ed.)의 문헌[Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, 1995, CRC Press]; 및 Sullivan 등의 PCT WO 94/02595에 기술되어 있다. 이들 및 다른 프로토콜이 본 개시의 안티센스 올리고머를 포함하는 실질적으로 임의의 핵산 분자를 전달하는 데 이용될 수 있다.

[0347] 본 개시의 약학적 조성물은 고형물 또는 액체 형태로 투여되도록 특별히 제형화될 수 있으며, 이에는 하기에 맞게 제형화된 것들을 포함한다: (1) 경구 투여, 예를 들어, 드렌치(수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액), 정제(구강, 설하, 또는 전신 흡수용), 볼루스, 분말, 과립, 혀에 도포하기 위한 페이스트(paste); (2) 예를 들어, 멸균 용액 또는 현탁액, 또는 서방성 제형으로서 예를 들어 피하, 근육내, 정맥내, 또는 경피 주사에 의한 비경구 투여; (3) 크림, 연고, 또는 방출 조절형 패치 또는 피부에 도포하는 스프레이로서 국소 도포; (4) 페서리(pessary), 크림 또는 발포체로서 질내 또는 직장내 투여; (5) 설하(sublingually) 투여; (6) 안와내(ocularly) 투여; (7) 경피(transdermally) 투여; 또는 (8) 비강(nasally) 투여.

[0348] 약학적으로 허용 가능한 담체로서의 역할을 할 수 있는 물질의 몇몇 예는: (1) 락토오스, 포도당 및 수크로스 등과 같은 당류; (2) 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; (3) 셀룰로오스 및 그 유도체, 예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 및 셀룰로오스 아세테이트; (4) 분말화된 트라가칸트; (5) 맥아(malt); (6) 젤라틴; (7) 탈크(talc); (8) 코코아버터 및 좌제용 왁스와 같은 부형제; (9) 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유, 및 대두유와 같은 오일; (10) 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜류; (11) 글리세린, 소르비톨, 만니톨, 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올류; (12) 올레산에틸 및 라우릴산에틴과 같은 에스테르류; (13) 한천(agar); (14) 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄과 같은 완충제; (15) 알긴산; (16) 발열원 제거수(pyrogen-free water); (17) 등장성 식염수; (18) 링거 용액; (19) 에틸 알코올; (20) pH 완충액; (21) 폴리에스테르, 폴리카르보네이트 및/또는 폴리안하이드라이드; 및 (22) 약학적 제형에 사용되는 기타 무독성의 호환 가능한 물질을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0349] 본 개시의 안티센스 올리고머와 제형화하기에 적합한 제제의 추가적인 비제한적인 예는 다음을 포함한다: PEG 접합 핵산; 인지질 접합 핵산; 친유성 모이어티 함유 핵산; 포스포로티오에이트; 다양한 조직 내로 약물이 들어가는 것을 향상시킬 수 있는 P-당단백질 억제제(예: Pluronic P85); 이식 후 서방성 전달을 위한 폴리 (D,L-락타이드-코글리콜리드) 미소구체와 같은 생분해성 중합체(Emerich, D F 등의 문헌[1999, Cell Transplant, 8, 47-58] Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.); 혈액 뇌 장벽을 가로질러 약물을 전달할 수 있고 신경 흡수 메커니즘을 변경시킬 수 있는 로딩된 나노입자, 예컨대 폴리부틸시아노아크릴레이트로 만들어진 것들(Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

[0350] 본 개시는 폴리(에틸렌 글리콜)("PEG") 지질을 함유하는 표면 변형 리포좀(PEG-변형 분지형 및 비분지형 리포좀 또는 이들의 조합, 또는 장기 순환 리포좀 또는 스텔스 리포좀)을 포함하는 조성물의 용도를 또한 포함한다. 본 개시의 안티센스 올리고머는 공유 부착된 다양한 분자량의 PEG 분자를 포함할 수도 있다. 이들 제형은 표적 조

직에서 약물의 축적을 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 이러한 부류의 약물 담체는 단핵 식균 시스템(MPS 또는 RES)에 의한 옵소닌화 및 제거에 저항하여, 캡슐화된 약물이 더 오랜 시간 동안 혈액을 따라 순환하게 하고 조직 노출을 향상시킬 수 있다(Lasic 등의 문헌[*Chem. Rev.* 1995, 95, 2601-2627]; Ishiwata 등의 문헌[*Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011] 참조). 이러한 리포좀은, 짐작컨대 혈관 신생 표적 조직에서의 혈관외 유출(extravasation) 및 포획에 의해, 종양에서 선택적으로 축적되는 것으로 나타났다(Lasic 등의 문헌[*Science* 1995, 267, 1275-1276]; Oku 등의 문헌[1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90]). 장기 순환성 리포좀은, 특히 MPS의 조직에 축적되는 것으로 알려진 통상의 양이온성 리포좀과 비교했을 때, DNA 및 RNA의 약동학 및 약력학을 향상시킨다(Liu 등의 문헌[*J. Biol. Chem.* 1995, 42, 24864-24870]; Choi 등의 국제 PCT 공개 번호 WO 96/10391; Ansell 등의 국제 PCT 공개 번호 WO 96/10390; Holland 등의 국제 PCT 공개 번호 WO 96/10392) 장기 순환성 리포좀도 간 및 비장과 같은 대사적으로 공격적인 MPS 조직에 축적되는 것을 방지하는 이들의 능력에 기초하여 약물이 뉴클레아제에 의해 분해되는 것을 양이온성 리포좀에 비해 더 많이 보호할 수 있다.

[0351] 추가의 구현예에서, 본 개시는 미국 특허 제6,692,911호; 제7,163,695호; 및 제7,070,807호에 기술된 것과 같은, 전달용으로 제조된 안티센스 올리고머 약학적 조성물을 포함한다. 이와 관련하여, 일 구현예에서, 본 개시는 본 개시의 안티센스 올리고머를 조성물로서 제공하며, 상기 조성물은 (미국 특허 제7,163,695호; 제7,070,807호; 및 제6,692,911호에 기술된 것과 같은) 리신 및 히스티딘의 공중합체(HK)를 단독으로 포함하거나 PEG(예: 분지형 또는 비분지형 PEG 또는 이 둘의 혼합물)와 조합하여 포함하거나, PEG 및 표적화 모이어티와 조합하여 포함하거나, 전술한 것 중 어느 하나를 가교제와 조합하여 포함한다. 특정 구현예에서, 본 개시는 안티센스 올리고머를 약학적 조성물로서 제공하며, 상기 조성물은 글루콘산-개질 폴리히스티딘 또는 글루코닐화-폴리히스티딘/트랜스페린-폴리리신을 포함한다. 당업자는 His 및 Lys와 유사한 특성을 갖는 아미노산이 조성물 내에서 치환될 수 있다는 것도 인식할 것이다.

[0352] 습윤제, 유화제 및 윤활제(예컨대, 라우릴 황산 마그네슘 및 스테아린산 마그네슘), 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 향미제, 방향제, 보존제, 및 항산화제가 또한 조성물 내에 존재할 수 있다.

[0353] 약학적으로 허용 가능한 항산화제의 예는, (1) 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 중황산 나트륨, 메타아황산 나트륨, 아황산 나트륨 등과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 유용성(oil-soluble) 항산화제; 및 (3) 구연산, 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은 금속 킬레이트제를 포함한다.

[0354] 본 개시의 제형은 경구, 비강, 국소(구강 및 설하 포함), 직장, 질 및/또는 비경구 투여에 적합한 것들을 포함한다. 제형은 단위 투여량 형태로 편리하게 제공될 수 있고, 약학 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료 중인 대상체와 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 활성 성분의 양일 것이다. 일반적으로, 이러한 양은 활성 성분의 약 0.1% 내지 약 99%, 바람직하게는 약 5% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 10% 내지 약 30%의 범위일 것이다.

[0355] 특정 구현예에서, 본 개시의 제형은 시클로덱스트린, 셀룰로오스, 리포좀, 미셀 형성제(예: 담즙산) 및 중합체 담체(예: 폴리에스테르 및 폴리안하이드라이드)로부터 선택된 부형제; 및 본 개시의 안티센스 올리고머를 포함한다. 일 구현예에서, 제형의 안티센스 올리고머는 화학식 (IV)에 따른 것이다. 일 구현예에서, 제형의 안티센스 올리고머는 화학식 (IVa)에 따른 것이다. 특정 구현예에서, 전술한 제형은 본 개시의 안티센스 올리고머가 경구로 생체이용될 수 있게 한다.

[0356] 이들 제형 또는 약학적 조성물을 제조하는 방법은 본 개시의 안티센스 올리고머를 담체와 결합시키고, 임의로 하나 이상의 보조 성분과 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 본 개시의 안티센스 올리고머를 액체 담체, 또는 미세하게 나눈 고형 담체, 또는 둘 다와 균일하고 밀접하게 결합시킨 다음, 필요에 따라, 생성물을 성형함으로써 제조된다.

[0357] 경구 투여에 적합한 본 개시의 제형은 캡슐, 교갑(cachets), 알약, 정제, (일반적으로 수크로오스 및 아카시아 또는 트라가칸트와 같은 향미 성분을 사용하는) 캔디(lozenges), 분말, 과립, 또는 수성 또는 비수성 액체 형태의 용액 또는 현탁액, 또는 수중유 또는 유중수 액체 유화제, 또는 엘릭서 또는 시럽, 또는 (젤라틴과 글리세린, 또는 수크로오스와 아카시아와 같은 불활성 염기를 사용하는) 캔디(pastilles) 및/또는 구강 세정액 등의 형태일 수 있으며, 이들은 활성 성분으로서 본 개시의 안티센스 올리고머의 소정의 양을 각각 함유한다. 본 개시의 안티센스 올리고머는 볼루스, 연약(electuary), 또는 페이스트로서 투여될 수도 있다.

[0358] 경구 투여를 위한 본 개시의 고형 투여 형태(캡슐, 정제, 알약, 드라제(dragees), 분말, 과립, 트로키(trouches) 등)의 경우, 활성 성분은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체, 예컨대 구연산 나트륨 또는 인산 이칼슘, 및/또는 다음 중 어느 하나와 혼합될 수 있다: (1) 필러 또는 증량제(extender), 예컨대 전분, 락토오스, 수크로오스, 포도당, 만니톨, 및/또는 규산(silicic acid); (2) 결합제, 예컨대, 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로오스 및/또는 아카시아; (3) 보습제(humectants), 예컨대 글리세롤; (4) 붕해제, 예컨대 한천, 탄산칼슘, 고구마 또는 타피오카 전분, 알긴산, 소정의 규산염, 및 탄산나트륨; (5) 용해 지연제, 예컨대 파라핀; (6) 흡수 촉진제, 예컨대 사차 암모늄 화합물 및 계면활성제, 예컨대 폴록사머 및 라우릴 황산 나트륨; (7) 습윤제, 예컨대, 세틸 알코올(cetyl alcohol), 글리세롤 모노스테아레이트, 및 비이온성 계면활성제; (8) 흡착제, 예컨대 고령토 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예컨대 탈크(talc), 스테아린산 칼슘, 스테아린산 마그네슘, 고형 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 황산 나트륨, 스테아린산 아연, 스테아린산 나트륨, 스테아린산, 및 이들의 혼합물; (10) 착색제; 및 (11) 서방형 제제, 예컨대 크로스포비돈(crospovidone) 또는 에틸 셀룰로오스. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 약학적 조성물은 완충제를 포함할 수도 있다. 유사한 유형의 고형 약학적 조성물이, 락토오스 또는 유당류 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하는 연질 및 경질 젤라틴 캡슐에 필러로서 사용될 수도 있다.

[0359] 정제는 임의로 하나 이상의 보조 성분과 함께 압축되거나 성형됨으로써 제조될 수 있다. 결합제(예를 들어, 젤라틴 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스), 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 붕해제(예를 들어, 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 가교 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스), 표면 활성화제 또는 분산제를 사용해, 압축된 정제를 제조할 수 있다. 불활성 액체 희석제로 습윤된 분말 화합물의 혼합물을 적절한 기계로 성형함으로써 성형된 정제를 제조할 수 있다.

[0360] 본 개시의 약학적 조성물의 정제, 및 기타 고형 투여 형태, 예컨대 드라제, 캡슐, 알약 및 과립 등에는 임의로 절단용 눈금이 매겨지거나(scored), 이들은 쉘(shell) 및 코팅, 예컨대 장용 코팅(enteric coatings) 및 약학-제형화 분야에 잘 알려진 기타 코팅을 갖도록 제조될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 원하는 방출 프로파일을 제공하기 위한 다양한 비율의 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스, 다른 중합체 기질, 리포좀 및/또는 미체구체를 사용해 속에 담긴 활성 성분을 서방출 또는 조절 방출시키도록 제형화될 수도 있다. 이들은 신속 방출용으로 제형화될 수 있고, 예를 들어 동결 건조될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 박테리아 포획 필터(bacteria-retaining filter)를 통한 여과에 의해 멸균되거나, 사용 직전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사용 매질에 용해될 수 있는 멸균제(sterilizing agents)를 고형의 멸균 약학적 조성물의 형태로 혼입함으로써 멸균될 수 있다. 이들 약학적 조성물은 임의로 불투명화제(opacifying agents)를 함유할 수도 있고, 이들이 활성 성분(들)만을 방출하거나, 바람직하게는, 위장관의 특정 부분에서, 임의로 지연된 방식으로 활성 성분(들)을 방출하는 조성물로 이루어질 수 있다. 사용될 수 있는 포매(embedding) 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다. 활성 성분은, 경우에 따라, 전술한 부형제 중 하나 이상이 포함된 마이크로-캡슐의 형태일 수도 있다.

[0361] 본 개시의 안티센스 올리고머의 경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 약학적으로 허용 가능한 유화제, 마이크로에멀젼(microemulsions), 용액, 현탁액, 시럽, 및 엘릭서를 포함한다. 액체 투여 형태는 활성 성분에 추가하여, 당업계에서 흔히 사용되는 불활성 희석제, 예컨대, 물이나 기타 용매, 가용화제와 유화제, 예컨대, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 에틸 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유(germ oil), 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸란 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.

[0362] 비활성 희석제에 추가하여, 경구 약학적 조성물은 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 향미제, 착색제, 방향제 및 보존제와 같은 보조제(adjuvants)를 포함할 수도 있다.

[0363] 현탁액은 활성 화합물에 추가하여, 예를 들어 에톡실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 한천 및 트라가칸트, 및 이들의 혼합물과 같은 현탁제를 함유할 수 있다.

[0364] 직장 또는 질 투여용 제형은 좌제로서 제공될 수 있는데, 이는 본 개시의 하나 이상의 화합물을, 예를 들어 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌제 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 하나 이상의 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합함으로써 제조될 수 있으며, 이는 실온에서 고체이지만, 체온에서는 액체이므로, 직장강이나 질강에서 녹아 활성 화합물을 방출하게 된다.

[0365] 본원에서 제공된 것과 같은 올리고머의 국소 또는 경피 투여용 제형 또는 투여 형태는 분말, 분무제, 연고, 페

이스트, 크림, 로션, 겔, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 올리고머 접합체는 멸균 조건 하에 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합될 수 있고, 필요에 따라 임의의 보존제, 완충제, 또는 추진제(propellants)와 혼합될 수 있다. 연고, 페이스트, 크림 및 겔은 본 개시의 활성 화합물에 추가하여, 동물성 지방과 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘(silicones), 벤토나이트, 규산(silicic acid), 탈크 및 산화아연, 또는 이들의 혼합물과 같은 부형제를 함유할 수 있다.

[0366] 분말과 분무제는 본 개시의 안티센스 올리고머에 추가하여, 락토오스, 탈크, 실리콘, 수산화알루미늄, 칼슘 실리케이트 및 폴리아미드 분말, 또는 이들 물질의 혼합물과 같은 부형제를 함유할 수 있다. 분무제는 클로로플루오로탄화수소 및 휘발성 미치환된 탄화수소, 예컨대 부탄 및 프로판과 같은 통상적인 추진제를 추가로 함유할 수 있다.

[0367] 경피 패치는 본 개시의 안티센스 올리고머가 신체에 전달되는 것을 조절할 수 있는 부가 이점을 갖는다. 이러한 투여 형태는 올리고머를 적절한 매질에 용해시키거나 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 피부를 통한 제제의 유동을 증가시키기 위해 흡수 강화제가 사용될 수도 있다. 이러한 유동 속도는 당업계에 알려진 다른 방법들 가운데, 속도 조절 막을 제공하거나 제제를 중합체 매트릭스 또는 겔에 분산시킴으로써 조절될 수 있다.

[0368] 비경구 투여에 적합한 약학적 조성물은, 본 개시의 하나 이상의 올리고머 접합체를 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 유화액, 또는 사용 직전에 멸균 주사 가능한 용액 또는 분산액으로 재구성할 수 있는 멸균 분말과의 조합으로 포함할 수 있으며, 당류, 알코올, 항산화제, 완충제, 세균 발육 저지제(bacteriostats), 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질, 현탁제 또는 증점제(thickening agents)를 함유할 수 있다. 본 개시의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적절한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 올레산 에틸과 같은 주사 가능한 유기 에스테르를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 일 구현예에서, 약학적 조성물의 안티센스 올리고머는 화학식 (IV)에 따른 것이다. 일 구현예에서, 약학적 조성물의 안티센스 올리고머는 화학식 (IVa)에 따른 것이다.

[0369] 이들 약학적 조성물은 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수도 있다. 대상 올리고머 접합체에 대한 미생물의 작용을 방지하는 것은 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤(paraben), 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함시킴으로써 보장될 수 있다. 또한, 조성물에 당류, 염화나트륨과 같은 등장화제를 포함시키는 것이 바람직할 수도 있다. 또한, 주사 가능한 약학적 형태의 흡수를 연장시키는 것은 흡수를 지연시키는 제제, 예컨대 모노스테아린산알루미늄 및 젤라틴을 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0370] 일부 경우에, 약물의 효과를 연장시키기 위해, 피하 또는 근육내 주사에 비해 약물의 흡수를 느리게 하는 것이 바람직하다. 이는 당업계에 공지된 다른 방법들 가운데, 수용해도가 낮은 결정질 또는 비정질 물질로 이루어진 액체 현탁액을 사용함으로써 달성될 수 있다. 그런 다음, 약물의 흡수는 현탁액의 용해 속도에 따라 달라지며, 이는 결국 결정 크기 및 결정 형태에 따라 달라질 수 있다. 대안적으로, 비경구 투여된 약물 형태의 흡수를 지연시키는 것은 약물을 오일 비히클에 용해시키거나 현탁함으로써 달성된다.

[0371] 주사 가능한 데포(depot) 형태는 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 중합체에 싸인 대상 올리고머 접합체의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성함으로써 제조할 수 있다. 올리고머 대 중합체의 비율, 및 사용된 특정 중합체의 성질에 따라, 올리고머의 방출 속도가 조절될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 데포 주사식 제형은, 신체 조직과 비슷한 리포좀 또는 마이크로유화액에 약물을 포획(entrapping)함으로써 제조할 수도 있다.

[0372] 본 개시의 안티센스 올리고머가 제약으로서 인간과 동물에게 투여될 때, 이들은 그 자체로서 투여되거나, 0.1 내지 99%(더 바람직하게는 10 내지 30%)의 안티센스 올리고머를 약학적으로 허용 가능한 담체와 조합하여 함유하는 약학적 조성물로서 투여될 수 있다.

[0373] 본 개시의 제형 또는 제제는 경구, 비경구, 국소 또는 직장 내 투여될 수 있다. 이들은 일반적으로 각각의 투여 경로에 적합한 형태로 투여된다. 예를 들어, 이들은 주사, 흡입, 안구 로션, 연고, 좌제, 또는 주입에 의해 정제 또는 캡슐 형태로 투여되거나; 로션 또는 연고에 의해 국소 투여되거나; 좌제에 의해 직장 내 투여된다.

[0374] 선택된 투여 경로에 관계없이, 적절한 수화 형태로 사용될 수 있는 본 개시의 안티센스 올리고머 및/또는 본 개시의 약학적 조성물은 당업자에게 공지된 종래의 방법에 의해 약학적으로 허용 가능한 투여 형태로 제형화될 수

있다. 본 개시의 약학적 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은, 환자에게 허용 가능한 독성이 없이 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 달라질 수 있다.

[0375] 선택된 투여량 수준은 다양한 인자에 따라 달라지게 되며, 이에는 사용된 본 개시의 특정 안티센스 올리고머 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 기간, 사용 중인 특정 올리고머의 배출 또는 대사 속도, 흡수 속도 및 정도, 치료 기간, 사용된 특정 올리고머와 조합으로 사용된 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료 중인 환자의 나이, 성별, 체중, 병태, 일반적인 건강 및 이전 병력, 및 의료 분야에 잘 알려진 유사한 인자들이 포함된다.

[0376] 당업계에서 통상의 기술을 가진 의사 또는 수의사는 필요한 약학적 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 약학적 조성물에 사용된 본 개시의 안티센스 올리고머의 투여량을, 원하는 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 것보다 낮은 수준에서 시작하여, 원하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 개시의 안티센스 올리고머의 적절한 일일 투여량은 치료 효과를 생성하는 데 효과적인 가장 낮은 투여량에 해당하는 양의 안티센스 올리고머일 것이다. 이러한 유효 투여량은 일반적으로 본원에 기술된 인자들에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 환자를 위한 본 개시의 안티센스 올리고머의 경구, 정맥내, 뇌실내, 및 피하 투여량은, 표시된 효과를 위해 사용될 때, 매일 약 0.0001 내지 약 100 mg/kg(체중)의 범위일 것이다.

[0377] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 일반적으로 약 1 내지 약 200 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, i.v. 투여를 위한 투여량은 약 0.5 내지 200 mg/kg이다.

[0378] 일부 구현예에서, 화학식 (I)의 안티센스 올리고머는 일반적으로 약 1 내지 200 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, i.v. 투여를 위한 화학식 (I)의 안티센스 올리고머의 투여량은 약 0.5 내지 200 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 화학식 (II)의 안티센스 올리고머는 일반적으로 약 1 내지 200 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, i.v. 투여를 위한 화학식 (II)의 안티센스 올리고머의 투여량은 약 0.5 내지 200 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 화학식 (III)의 안티센스 올리고머는 일반적으로 약 1 내지 200 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, i.v. 투여를 위한 화학식 (III)의 안티센스 올리고머의 투여량은 약 0.5 내지 200 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 화학식 (IV)의 안티센스 올리고머는 일반적으로 약 1 내지 200 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, i.v. 투여를 위한 화학식 (IV)의 안티센스 올리고머의 투여량은 약 0.5 내지 200 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 화학식 (IVa)의 안티센스 올리고머는 일반적으로 약 1 내지 200 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, i.v. 투여를 위한 화학식 (IVa)의 안티센스 올리고머의 투여량은 약 0.5 내지 200 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 화학식 (V)의 안티센스 올리고머는 일반적으로 약 1 내지 200 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, i.v. 투여를 위한 화학식 (V)의 안티센스 올리고머의 투여량은 약 0.5 내지 200 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 화학식 (VI)의 안티센스 올리고머는 일반적으로 약 1 내지 200 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, i.v. 투여를 위한 화학식 (VI)의 안티센스 올리고머의 투여량은 약 0.5 mg/kg 내지 200 mg/kg이다.

[0379] 당업계에서 이해될 수 있는 바와 같이, 매주, 2주마다, 3주마다, 또는 매월 투여는 본원에서 논의된 바와 같이 1회 이상의 투여로 이루어지거나 더 적은 투여량으로 이루어질 수 있다.

[0380] 본원에 기술된 핵산 분자 및 안티센스 올리고머는 당업자에게 알려진 다양한 방법에 의해 세포에 투여될 수 있으며, 상기 방법은 본원에서 기술되고 당업계에 알려진 것과 같은 리포좀으로 캡슐화하기, 이온영동에 의한 방법, 또는 다른 비히클(예: 하이드로겔, 시클로덱스트린, 생분해성 나노캡슐, 및 생체접착성 미소구체)로의 혼입에 의한 방법을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 소정의 구현예에서, 미세유화 기술(microemulsification technology)을 이용해 친유성(수 불용성) 약학적 제제의 생체이용률을 개선할 수 있다. 예로는, 트리메트린(Trimetrine) (Dordunoo, S. K. 등의 문헌[*Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(12), 1685-1713, 1991] 참조) 및 REV 5901 (Sheen, P. C. 등의 문헌[*J Pharm Sci* 80(7), 712-714, 1991 참조)이 있다. 다른 이점 중에서, 미세유화는 순환계 대신에 림프계로 우선적으로 흡수를 유도하여 생체이용률을 향상시키고, 간을 우회함으로써 간담즙의 순환(hepatobiliary circulation) 중에 화합물이 파괴되는 것을 방지한다.

[0381] 본 개시의 일 양태에서, 제형은 본원에서 제공된 것과 같은 올리고머 및 적어도 하나의 양친매성 담체로 형성된 미셀을 함유하며, 여기서 미셀은 약 100 nm 미만의 평균 직경을 갖는다. 더 바람직한 구현예는 약 50 nm 미만의 평균 직경을 갖는 미셀을 제공하고, 훨씬 더 바람직한 구현예는 약 30 nm 미만, 또는 심지어 약 20 nm 미만의

평균 직경을 갖는 미셀을 제공한다.

[0382] 모든 적절한 양친매성 담체가 고려되지만, 현재 바람직한 담체는 일반적으로 안전하다고 간주되는 물질(Generally-Recognized-as-safe; GRAS)의 상태를 가지는 것들, 및 본 개시의 안티센스 올리고머를 가용화시킬 뿐만 아니라, 용액이 (인간 위장관에서 발견되는 것과 같은) 복잡한 수상과 접촉하는 나중 단계에 이를 미세유화시키는 것들이다. 일반적으로, 이러한 요건을 만족하는 양친매성 성분은 2~20의 HLB(친수성 대 친유성 균형) 값을 가지며, 이들의 구조는 C-6 내지 C-20 범위의 직쇄 지방족 라디칼을 함유한다. 예로는 폴리에틸렌-글리콜화 지방 글리세리드 및 폴리에틸렌 글리콜이 있다.

[0383] 양친매성 담체의 예는, 포화 및 단일불포화 폴리에틸렌화 글리콜화 지방산 글리세리드, 예컨대 완전히 또는 부분적으로 수소화된 다양한 식물성 오일로부터 수득된 것들을 포함한다. 이러한 오일은 유리하게는, 삼-, 이-, 및 단일-지방산 글리세리드 및 상응하는 지방산의 이- 및 단일-폴리(에틸렌 글리콜) 에스테르로 구성될 수 있으며, 특히 바람직한 지방산 조성물은 카프르산(capric acid) 4~10%, 카프르산 3~9%, 라우르산(lauric acid) 40~50%, 미리스트산(myristic acid) 14~24%, 팔미트산(palmitic acid) 4~14%, 스테아르산 5~15%로 이루어질 수 있다. 또 다른 유용한 부류의 양친매성 담체는, 포화 또는 단일 불포화 지방산(SPAN-시리즈) 또는 상응하는 에톡실화 유사체(TWEEN-시리즈)를 갖는, 부분적으로 에스테르화된 소르비탄 및/또는 소르비톨을 포함한다.

[0384] 상업적으로 이용 가능한 양친매성 담체가 특히 유용할 수 있으며, 이에는 겔루시어(Gelucire)-시리즈, 라브라필(Labrafil), 라브라솔(Labrasol), 또는 라우로글리콜(Lauroglycol(전부 Gattefosse Corporation(Saint Priest, France)에 의해 제조되고 유통됨), PEG-모노-올레에이트, PEG-디-올레에이트, PEG-모노-라우레이트 및 디-라우레이트, 레시틴(Lecithin), 폴리소르베이트 80 등(미국 및 전 세계 여러 회사에 의해 생산되고 유통됨)이 포함된다.

[0385] 소정의 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물을 적절한 숙주 세포 내로 도입하기 위한 전달은 리포좀, 나노캡슐, 극미립자, 미소구체, 지질 입자, 소포체 등을 사용해 이루어질 수 있다. 특히, 본 개시의 약학적 조성물은 지질 입자, 리포좀, 소포체, 나노구체, 나노입자 등에 캡슐화되어 전달되도록 제형화될 수 있다. 이러한 전달 비히클의 제형화 및 사용은 알려진 종래의 기술을 사용해 수행될 수 있다.

[0386] 본 개시에서 사용하기에 적합한 친수성 중합체는, 쉽게 물에 녹고, 소포체 형성 지질에 공유 부착될 수 있으며, 독성 효과 없이 생체 내 내약성이 있는 (즉, 생체 적합한) 것들이다. 적합한 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 폴리락트산(폴리락티드로도 불림), 폴리글리콜산(폴리글리콜리드로도 불림), 폴리락트-폴리글리콜산 공중합체, 및 폴리비닐 알코올을 포함한다. 소정의 구현예에서, 중합체는 약 100 또는 120 달톤 내지 약 5,000 또는 10,000 달톤, 또는 약 300 달톤 내지 약 5,000 달톤의 중량 평균 분자량을 갖는다. 다른 구현예에서, 중합체는 약 100 내지 약 5,000 달톤의 중량 평균 분자량을 갖거나, 약 300 내지 약 5,000 달톤의 중량 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)이다. 소정의 구현예에서, 중합체는 약 750 달톤의 중량 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜), 예를 들어 PEG(750)이다. 중합체는 또한 그 안의 단량체의 수에 의해 정의될 수 있고; 본 개시의 바람직한 구현예는 적어도 약 3개의 단량체로 이루어진 중합체를 이용하며, 3개의 단량체로 이루어진 이러한 PEG 중합체는 대략 132 달톤의 분자량을 갖는다.

[0387] 본 개시에서 사용하기에 적합할 수 있는 다른 친수성 중합체는 폴리비닐피롤리돈, 폴리메톡사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리하이드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리디메틸아크릴아미드, 및 유도체화된 셀룰로오스, 예컨대 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 하이드록시에틸셀룰로오스를 포함한다.

[0388] 소정의 구현예에서, 본 개시의 제형은 폴리아미드, 폴리카보네이트, 폴리알킬렌, 아크릴 에스테르와 메타크릴 에스테르의 중합체, 폴리비닐 중합체, 폴리글리콜리드, 폴리실록산, 폴리우레탄 및 이의 공중합체, 셀룰로오스, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리스티렌, 젖산과 글리콜산의 중합체, 폴리무수물, 폴리(오르토)에스테르, 폴리(부트산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카프로락톤), 다당류, 단백질, 폴리히알루론산, 폴리시아노아크릴산염, 및 이들의 블렌드, 혼합물, 또는 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 생체적합성 중합체를 포함한다.

[0389] 시클로덱스트린은 그리스 글자 α, β 또는 γ로 각각 지정된, 6, 7 또는 8개의 포도당 단위로 각각 이루어진 고리형 올리고당이다. 포도당 단위는 α-1,4-글루코시드 결합에 의해 연결된다. 의자 형태로 이루어진 당 단위의 결과로서, (C-2, C-3에서의) 모든 이차 하이록실기는 고리의 일측에 위치하는 한편, C-6에서의 모든 일차 하이록실기는 타측에 위치한다. 그 결과, 외부 면은 친수성이어서, 시클로덱스트린이 수용성이 된다. 대조적으로, 시클로덱스트린의 공동은 소수성인데, 이는 이들이 원자 C-3 및 C-5의 수소, 및 에테르-유사 산소에 의해 채워지기 때문이다. 이들 매트릭스는, 예를 들어, 17α-에스트라디올과 같은 스테로이드 화합물을 포함하는 다양한

상대적으로 소수성 화합물과 복합체를 이룰 수 있게 한다(예를 들어, van Uden 등의 문헌[*Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 38:1-3-113 (1994)] 참조). 복합체화는 반데르 발스 상호작용과 수소 결합의 형성에 의해 이루어진다. 시클로덱스트린의 화학물질에 대한 전반적인 검토를 위해서는, Wenz, Agnew의 문헌 [*Chem Int. Ed. Engl.*, 33:803-822 (1994)]을 참조한다.

[0390] 시클로덱스트린 유도체의 물리-화학적 특성은 치환의 종류와 정도에 따라 크게 달라진다. 예를 들어, 이들의 수용해도는 불용성(예: 트리아세틸-베타-시클로덱스트린) 내지 147% 가용성(w/v)(G-2-베타-시클로덱스트린)의 범위이다. 또한, 이들은 많은 유기 용매에서 가용성이다. 시클로덱스트린의 특성은 이들의 용해도를 증가시키거나 감소시킴으로써 다양한 제형 성분의 용해도를 조절할 수 있게 한다.

[0391] 다수의 시클로덱스트린 및 이들의 제조 방법이 기술되어 왔다. 예를 들어, Parmeter (I) 등과 (미국 특허 제3,453,259호) Gramera 등은 (미국 특허 제3,459,731호) 전기적 중성인(electroneutral) 시클로덱스트린을 기술하였다. 다른 유도체에는 양이온성 특성을 갖는 시클로덱스트린[Parometer (II)의 미국 특허 제3,453,257호], 불용성 가교형 시클로덱스트린(Solms의 미국 특허 제3,420,788호), 및 음이온성 특성을 갖는 시클로덱스트린[Parometer (III)의 미국 특허 제3,426,011호]이 포함된다. 음이온성 특성을 갖는 시클로덱스트린 유도체 가운데 카르복실산, 아인산, 포스핀산, 포스폰산, 인산, 티오포스폰산, 티오술핀산, 및 설폰산이 모 시클로덱스트린에 부가되었다[Parmeter (III)의 미국 특허 제3,453,257호 참조]. 또한, 설포알킬 에테르 시클로덱스트린 유도체가 Stella 등에 의해 기술되었다 (미국 특허 제5,134,127호).

[0392] 리포좀은 수성 내부 구획(compartment)을 둘러싸는 적어도 하나의 지질 이중층 막으로 이루어진다. 리포좀은 막의 유형 및 크기에 따라 특징을 가질 수 있다. 소형 단층상 소포체(Small unilamellar vesicles, SUV)는 하나의 막을 가지고, 일반적으로 그 직경이 0.02 내지 0.05 μm이며, 대형 단층상 소포체(LUV)는 일반적으로 0.05 μm보다 크다. 올리고층 큰 소포체 및 다중층 소포체는 보통은 동심원을 이루는 다수의 막층(membrane layer)을 가지며, 일반적으로 0.1 μm보다 크다. 여러 개의 비동심원 막을 갖는 리포좀, 즉 큰 소포체 내에 담긴 여러 개의 작은 소포체는 다소포체형 소포체(multivesicular vesicles)라 부른다.

[0393] 본 개시의 일 양태는 본 개시의 안티센스 올리고머를 함유하는 리포좀을 포함하는 제형에 관한 것으로서, 여기서 리포좀 막은 증가된 담체 능력(carrying capacity)을 리포좀에 제공하도록 제형화된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 본 개시의 안티센스 올리고머는 리포좀의 리포좀 이중층 내에 함유되거나 그 위에 흡착될 수 있다. 본 개시의 안티센스 올리고머는 지질 계면활성제와 함께 응집되어 리포좀 내부 공간 내에서 운반될 수 있으며; 이러한 경우, 리포좀 막은 활성제-계면활성제 응집체의 파괴적 효과에 저항하도록 제형화된다.

[0394] 본 개시의 일 구현예에 따르면, 리포좀의 지질 이중층은 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)로 유도체화된 지질을 함유하여, PEG 사슬이 지질 이중층의 내부면으로부터 리포좀에 의해 캡슐화된 내부 공간으로 연장되고, 지질 이중층의 외부로부터 주변 환경 내로 연장된다.

[0395] 본 개시의 리포좀에 함유된 활성제는 가용화된 형태이다. 계면활성제와 활성제의 응집체(예컨대, 관심 활성제를 함유하는 유화액 또는 미셀)는 본 개시에 따른 리포좀의 내부 공간 내에 포획될 수 있다. 계면활성제는 활성제를 분산시키고 가용화시키는 역할을 하며, 다양한 사슬 길이의 (예를 들어, 약 C14 내지 약 C20) 생체 적합성 리소포스파티딜콜린(LPG)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 적절한 지방족, 시클로지방족 또는 방향족 계면활성제로부터 선택될 수 있다. PEG-지질과 같은 중합체-유도체화 지질은 미셀을 형성하는 데 이용될 수도 있는데, 이는 이들이 미셀/막 융합을 억제하는 역할을 하게 되고, 계면활성제 분자에 첨가된 중합체가 계면활성제의 CMC를 감소시켜 미셀 형성에 도움을 주기 때문이다. CMO를 마이크로몰 범위로 포함하는 계면활성제가 바람직하며; CMC가 더 높은 계면활성제를 이용해 본 개시의 리포좀 내에 포획된 미셀을 제조할 수 있다.

[0396] 본 개시에 따른 리포좀은 당업계에 공지된 다양한 기술 중 어느 하나에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제4,235,871호; 공개된 PCT 출원 WO 96/14057; 신규 RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104; 및 Lasic DD의 문헌[Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993]을 참조한다. 예를 들어, 본 개시의 리포좀은 친수성 중합체로 유도체화된 지질을 미리 형성된 리포좀으로 확산시킴으로써 제조될 수 있으며, 예컨대, 유도체화된 지질의 최종 몰 백분율에 상응하는 (리포좀에게는 바람직한) 지질 농도에서 지질-이식 중합체로 이루어진 미셀에 미리 형성된 리포좀을 노출시킴으로써 제조될 수 있다. 친수성 중합체를 함유하는 리포좀은 당업계에 공지된 것과 같은 균질화(homogenization), 지질 분야 수화(lipid-field hydration), 또는 압출 기술에 의해 형성될 수도 있다.

[0397] 또 다른 예시적인 제형화 절차에서, 활성제는 소수성 분자를 쉽게 가용화시키는 초음파 처리(sonication)에 의

해 리소포스파티딜콜린 또는 CMC가 낮은 다른 계면활성제(중합체 이식된 지질 포함)에서 먼저 분산된다. 이어서, 생성된 활성제의 미셀 현탁액을 사용하여, 적절한 몰 백분율의 중합체-이식 지질 또는 콜레스테롤을 포함하는 건조된 지질 샘플을 재수화한다. 이어서, 당업계에 공지된 바와 같은 압출 기술을 사용해 지질과 활성제의 현탁액을 리포좀으로 형성하고, 생성된 리포좀을 표준 컬럼 분리에 의해 캡슐화 용액으로부터 분리한다.

[0398] 본 개시의 일 양태에서, 리포좀은 선택된 크기 범위에서 실질적으로 균질한 크기를 갖도록 제조된다. 하나의 효과적인 크기 조절 방법(sizing method)은 선택된 균일한 기공 크기를 갖는 일련의 폴리카보네이트 막을 통해 리포좀의 수성 현탁액을 압출하는 단계를 포함하며; 막의 기공 크기는 해당 막을 통해 압출에 의해 생산된 가장 큰 리포좀의 크기와 대략 상응할 것이다. 예를 들어, 미국 특허 제4,737,323호(1988년 4월 12일)를 참조한다. 소정의 구현예에서, DharmaFECT® 및 Lipofectamine®과 같은 시약을 사용해 폴리뉴클레오티드 또는 단백질을 세포 내에 도입할 수 있다.

[0399] 본 개시의 제형의 방출 특성은 캡슐화 물질, 캡슐화된 약물의 농도, 및 방출 조절제의 존재에 따라 달라진다. 예를 들어, 방출은 가령, 위에서와 같이 낮은 pH에서만 방출하거나 장에서와 같이 높은 pH에서만 방출하는 pH 감수성 코팅을 사용해 pH 의존적으로 조절될 수 있다. 장용 코팅(enteric coating)을 사용해, 위를 통과할 때까지 방출이 일어나지 않게 할 수 있다. 다중 코팅 또는 상이한 물질로 캡슐화된 시안아미드(cyanamide)의 혼합물을 사용해 초기 방출이 위에서 일어나게 하고, 이어서 지연 방출이 장에서 일어나게 할 수 있다. 방출은 염 또는 기공 형성제를 포함시켜 조작할 수도 있는데, 이는 확산에 의해 수분 흡수를 증가시키거나 캡슐로부터 약물 방출을 증가시킬 수 있다. 약물의 용해도를 변형시키는 부형제를 사용해 방출 속도를 조절할 수도 있다. 매트릭스의 분해를 강화하거나 매트릭스로부터의 방출을 향상시키는 제제가 혼입될 수도 있다. 이들은 약물에 첨가되거나, 별도의 상으로서(즉, 미립자로서) 첨가되거나, 화합물에 따라 중합체 상에서 함께 용해될 수 있다. 대부분의 경우에, 양은 0.1 내지 30%(w/w 중합체)이어야 한다. 분해 증강제의 유형에는 황산 암모늄 및 염화 암모늄과 같은 무기산; 구연산, 벤조산 및 아스코르브산과 같은 유기산; 탄산나트륨, 탄산 칼륨, 탄산 칼슘, 탄산 아연, 및 수산화 아연과 같은 무기 염기; 황산 트리아민, 스페르민(spermine), 콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민, 및 트리에탄올아민과 같은 유기 염기; 및 Tween® 및 Pluronic®과 같은 계면활성제가 포함된다. 매트릭스에 미세구조를 첨가하는 기공 형성제(즉, 무기 염 및 당류와 같은 수용성 화합물)가 미립자로서 첨가된다. 범위는 통상적으로 1 내지 30%(w/w 중합체)이다.

[0400] 입자의 소화관 내 체류 시간을 변경함으로써 흡수를 조작할 수도 있다. 이는, 예를 들어, 점막 접착성 중합체로 입자를 코팅하거나 이를 캡슐화 물질로 선택함으로써 달성될 수 있다. 예에는 유리 카르복실기를 갖는 대부분의 중합체, 예컨대, 키토산, 셀룰로오스, 및 특히 폴리아크릴레이트(본원에서 사용되는 바와 같은, 폴리아크릴레이트는 아크릴레이트기 및 변형된 아클릴레이트 기, 예컨대 시아노아크릴레이트 및 메타크릴레이트를 지칭함)가 포함된다.

[0401] 안티센스 올리고머는 수술 도구나 의료 기기 또는 임플란트 내에 담기도록 제형화 되거나 이들에 의해 방출되기 적합하도록 제형화될 수 있다. 특정 양태에서, 임플란트는 안티센스 올리고머로 코팅되거나 달리 이로 처리될 수 있다. 예를 들어, 하이드로겔이나 다른 중합체, 예컨대 생체적합성 중합체 및/또는 생분해성 중합체가 본 개시의 약학적 조성물로 임플란트를 코팅하는데 사용될 수 있다(즉, 조성물은 하이드로겔 또는 다른 중합체를 사용함으로써 의료 장치와 함께 사용하도록 구성될 수 있다). 의료 장치를 제제로 코팅하기 위한 중합체 및 공중합체는 당업계에 잘 알려져 있다. 임플란트의 예로는, 스텐트, 약물-용출 스텐트, 봉합물(sutures), 보형물(prosthesis), 혈관 카테터, 투석 카테터, 혈관 이식편(vascular grafts), 인공 심장 판막(prosthetic heart valve), 심박 조절기(cardiac pacemakers), 이식형 제세동기(implantable cardioverter defibrillators), IV 바늘, 접골 및 골 형성용 장치, 예컨대 핀, 스크류, 플레이트 및 기타 장치, 및 상처 치유를 위한 인공 조직 매트릭스 등이 있지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0402] 본원에서 제공되는 방법에 추가하여, 본 개시에 따라 사용하기 위한 안티센스 올리고머는 다른 약제와의 상사성(analogy)에 따라 인간 또는 수의용 의약에 사용하기 위해, 임의의 편리한 방법으로 투여하도록 제형화될 수 있다. 안티센스 올리고머 및 이들의 상응하는 제형은 근아세포 이식, 줄기 세포 치료, 아미노글리코시드 항생제, 프로테아좀 억제제 및 상향조절 요법(예를 들어, 디스트로핀의 상염색체 파라로그인 유트로핀의 상향조절)의 투여와 같은 근 이영양증의 치료 시 단독으로 투여되거나 다른 치료 전략과 조합으로 투여될 수 있다.

[0403] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 본 개시의 안티센스 올리고머의 투여 이전에, 동시에, 또는 이후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 올리고머는 스테로이드 및/또는 항생제와 병용 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 안티센스 올리고머는 백그라운드 스테로이드 치료 (예를 들어, 간헐적 또는 만성/연속적 백그라운

드 스테로이드 치료) 중인 환자에게 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 환자는 안티센스 올리고머의 투여 전에 코르티코스테로이드로 치료 받은 적이 있으며, 계속해서 스테로이드 치료를 받는다. 일부 구현예에서, 스테로이드는 글루코코르티코이드 또는 프레드니손(prednisone)이다.

[0404] 당업자는 임의의 특정 동물 및 병태에 맞는 최적 투여 경로 및 임의의 투여량을 쉽게 결정할 수 있으므로, 기술된 투여 경로는 단지 가이드로서 의도된다. 시험관 내 및 생체 내 모두에서 기능적인 신규 유전 물질을 세포 내로 도입하기 위한 다수의 접근법이 시도되어 왔다(Friedmann의 문헌[(1989) *Science*, 244:1275-1280]). 이들 접근법에는, 발현될 유전자의 변형된 레트로바이러스로의 통합(Friedmann의 전술한 (1989) 문헌; Rosenberg의 문헌[(1991) *Cancer Research* 51(18), suppl.: 5074S-5079S]); 비-레트로바이러스 벡터(예: 아데노-연관 바이러스 벡터)로의 통합(Rosenfeld 등의 문헌[(1992) *Cell*, 68:143-155]; Rosenfeld 등의 문헌[(1991) *Science*, 252:431-434]); 또는 리포좀을 통해 이종 프로모터-인핸서 요소에 연결된 이식 유전자의 전달(Friedmann의 전술한 (1989) 문헌; Brigham 등의 문헌[(1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298:278-281]; Nabel 등의 문헌[(1990) *Science*, 249:1285-1288]; Hazinski 등의 문헌[(1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*, 4:206-209]; 및 Wang 및 Huang의 문헌[(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7851-7855]); 리간드-특이적 양이온 기반 전송 시스템에의 결합된 이식 유전자의 전달(Wu 및 Wu의 문헌[(1988) *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624]); 또는 네이키드 DNA, 발현 벡터의 사용(Nabel 등의 전술한 (1990) 문헌; Wolff 등의 문헌[(1990) *Science*, 247:1465-1468])이 포함된다. 이식 유전자를 조직에 직접 주사하면 국부적인 발현만이 생성된다(Rosenfeld의 전술한 (1992) 문헌; Rosenfeld 등의 전술한 (1991) 문헌; Brigham 등의 전술한 (1989) 문헌; Nabel의 전술한 (1990) 문헌; 및 Hazinski 등의 전술한 (1991) 문헌). Brigham 등의 문헌[그룹 (*Am. J. Med. Sci.* (1989) 298:278-281 and *Clinical Research* (1991) 39 (요약))]에서는 DNA 리포좀 복합체의 정맥내 또는 기관내 투여 후 마우스의 폐에서만 생체 내 형질감염이 나타났음이 보고되었다. 인간 유전자 치료 절차에 대한 검토 논평의 예는 Anderson의 문헌[*Science* (1992) 256:808-813]에 있다.

[0405] 추가 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은 Han 등의 문헌에서 제공된 것과 같은 탄수화물을 추가로 포함할 수 있다(Han 등의 문헌[*Nat.* Comms. 7, 10981 (2016), 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 일부 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은 5%의 헥소오스 탄수화물(hexose carbohydrate)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 약학적 조성물은 5% 포도당, 5% 과당, 또는 5% 만노오스를 포함할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은 2.5% 포도당 및 2.5% 과당을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은: 5 부피%의 양으로 존재하는 아라비노오스(arabinose); 5 부피%의 양으로 존재하는 포도당; 5 부피%의 양으로 존재하는 소르비톨; 5 부피%의 양으로 존재하는 갈락토오스; 5 부피%의 양으로 존재하는 과당; 5 부피%의 양으로 존재하는 크실리톨; 5 부피%의 양으로 존재하는 만노오스; 각각 2.5 부피%의 양으로 존재하는 포도당과 과당의 조합; 및 5.7 부피%의 양으로 존재하는 포도당, 2.86 부피%의 양으로 존재하는 과당, 및 1.4 부피%의 양으로 존재하는 크실리톨의 조합으로부터 선택된 탄수화물을 포함할 수 있다.

[0406] **IV. 사용 방법**

[0407] *엑손 스키핑을 사용해 디스트로핀 판독 프레임 복원하기*

[0408] 디스트로핀 유전자의 프레임 이탈 돌연변이에 의해 야기된 DMD의 치료에 대한 잠재적 치료 접근법이, 프레임 내 돌연변이에 의해 야기되고 BMD로서 알려진 더 온순한 형태의 근 이영양증에 의해 제안된다. 프레임 이탈 돌연변이를 프레임 내 돌연변이로 변환하는 능력은 가설적으로 mRNA 판독 프레임을 보존하고, 내부적으로 단축되었지만 여전히 기능적인 디스트로핀 단백질을 생성하게 될 것이다. 본 개시의 안티센스 올리고머는 이를 달성하도록 설계되었다.

[0409] 화학식 (I), 화학식 (II), 화학식 (III), 화학식 (IV), 화학식 (IVa), 화학식 (V), 화학식 (VI)의 안티센스 올리고머와 표적화된 mRNA 전구체 서열의 혼성화는 mRNA 전구체 스플라이싱 복합체의 형성을 방해하고 성숙한 mRNA로부터 엑손 50을 결실시킨다. 본 개시의 안티센스 올리고머의 구조와 형태는 상보 서열에 대한 서열 특이적 염기 페어링을 가능하게 한다.

[0410] 79개의 엑손 모두를 함유하는 정상 디스트로핀 mRNA는 정상 디스트로핀 단백질을 생성하게 된다. 각 엑손의 형상은 코돈이 엑손 사이에서 어떻게 분할되는지를 나타내며; 여기서, 하나의 코돈은 3개의 뉴클레오티드로 이루어진다. 직사각형의 엑손은 완전한 코돈으로 시작되어 완전한 코돈으로 끝난다. 화살표 모양의 엑손은 완전한 코돈으로 시작되지만, 코돈의 뉴클레오티드 #1만을 함유하는 분할된 코돈으로 끝난다. 이러한 코돈의 뉴클레오티드 #2 및 #3은 V자 형상(chevron shape)으로 시작될 후속 엑손에 포함된다.

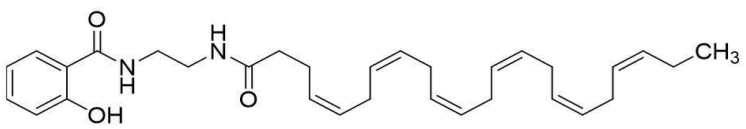
[0411] 인간 디스트로핀 mRNA 전구체의 표적 영역인 엑손 50, 인트론 49, 및/또는 인트론 50에 상보적이고 엑손 50 스키핑을 유도하는 안티센스 올리고머의 효과를 분석하는 임상 결과에는, 디스트로핀 양성 섬유 백분율(PDPF), 6분 보행 시험(6MWT), 보행 상실(LOA), 노스 스타 보행 평가(North Star Ambulatory Assessment, NSAA), 폐 기능 시험(PFT), (누운 위치에서) 외부 도움 없이 일어나는 능력, 드 노보 디스트로핀 생산 및 기타 기능적 척도가 포함된다.

[0412] 일부 구현예에서, 본 개시는 엑손 50 스키핑에 순응하는, 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서 디스트로핀을 생성하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 기술된 것과 같은 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 개시는 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 가진 뒤시엔느 근 이영양증(DMD) 환자에서 mRNA 판독 프레임을 복원하여 디스트로핀 단백질 생성을 유도하는 방법을 제공한다. 단백질 생성은 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR), 웨스턴 블롯 분석, 또는 면역조직화학(IHC)에 의해 측정할 수 있다.

[0413] 일부 구현예에서, 본 개시는 DMD 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 엑손 50 스키핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖고, 상기 방법은 본원에 기술된 것과 같은 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 다양한 구현예에서, 대상체의 치료는 질환 진행의 지연에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 대상체의 치료는 대상체에서의 보행 유지 또는 대상체에서의 보행 상실의 감소에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 보행은 6분 보행 시험(6MWT)을 사용해 측정된다. 특정 구현예에서, 보행은 노스 스타 보행 평가(NSAA)를 사용해 측정된다.

[0414] 다양한 구현예에서, 본 개시는 DMD를 가진 대상체에서 폐 기능을 유지하거나 폐 기능 상실을 감소시키는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 엑손 50 스키핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖고, 상기 방법은 본원에 기술된 것과 같은 안티센스 올리고머 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 폐 기능은 최대 호기압(MEP)으로서 측정된다. 소정의 구현예에서, 폐 기능은 최대 흡기압(MIP)으로서 측정된다. 일부 구현예에서, 폐 기능은 노력성 폐활량(Forced Vital Capacity, FVC)으로서 측정된다.

[0415] 추가 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은 Han 등의 문헌에서 제공된 바와 같이, 본 개시의 방법에서 탄수화물과 함께 동일한 제형으로 공동 투여되거나, 별도의 제형으로 투여될 수 있다(Han 등의 문헌[*Nat*. Comms. 7, 10981 (2016)], 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 일부 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은 5%의 헥소오스 탄수화물과 함께 공동 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 약학적 조성물은 5% 포도당, 5% 과당, 또는 5% 만노오스와 함께 공동 투여될 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은 2.5% 포도당 및 2.5% 과당과 함께 공동 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은: 5 부피%의 양으로 존재하는 아라비노오스(arabinose); 5 부피%의 양으로 존재하는 포도당; 5 부피%의 양으로 존재하는 소르비톨; 5 부피%의 양으로 존재하는 갈락토오스; 5 부피%의 양으로 존재하는 과당; 5 부피%의 양으로 존재하는 크실리톨; 5 부피%의 양으로 존재하는 만노오스; 각각 2.5 부피%의 양으로 존재하는 포도당과 과당의 조합; 및 5.7 부피%의 양으로 존재하는 포도당, 2.86 부피%의 양으로 존재하는 과당, 및 1.4 부피%의 양으로 존재하는 크실리톨의 조합으로부터 선택된 탄수화물과 함께 공동 투여될 수 있다.

[0416] 다양한 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머는 치료적 유효량의 비-스테로이드성 항-염증 화합물과 함께 공동 투여된다. 일부 구현예에서, 비-스테로이드성 항-염증 화합물은 NF-κB 억제제이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, NF-κB 억제제는 CAT-1004 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염일 수 있다. 다양한 구현예에서, NF-κB 억제제는 살리실레이트와 DHA의 접합체일 수 있다. 일부 구현예에서, NF-kB 억제제는 CAT-1041 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다. 소정의 구현예에서, NF-κB 억제제는 살리실레이트와 EPA의 접합체이다. 다양한 구현예에서, NF-κB 억제제는  , 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다.

[0417] 일부 구현예에서, 비-스테로이드성 항-염증 화합물은 TGF-b 억제제이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, TGF-b 억제제는 HT-100이다.

[0418] 특정 구현예에서, 치료에 사용하기 위한, 본원에 기술된 것과 같은 안티센스 올리고머가 기술된다. 특정 구현예에서, 뒤시엔느 근 이영양증의 치료에 사용하기 위한, 본원에 기술된 것과 같은 안티센스 올리고머가 기술된다.

특정 구현예에서, 치료에 사용하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한, 본원에 기술된 것과 같은 안티센스 올리고머가 기술된다. 특정 구현예에서, 뒤시엔느 근 이영양증의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한, 본원에 기술된 것과 같은 안티센스 올리고머가 기술된다.

[0419] **V. 키트**

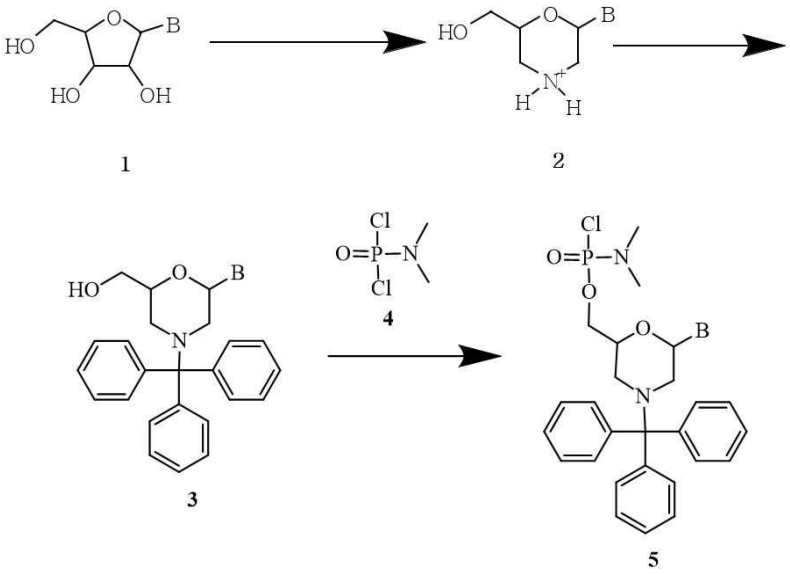
[0420] 본 개시는 또한, 유전자 질환이 있는 환자의 치료를 위한 키트를 제공하며, 상기 키트는 적절한 용기에 포장된 적어도 하나의 안티센스 분자(예를 들어, 서열번호 1~9 중 어느 하나로 제시된 염기 서열을 포함하는 안티센스 올리고머)를 이의 사용 지침과 함께 포함한다. 키트는 완충제, 안정화제 등과 같은 기타 시약을 포함할 수도 있다. 당업자는 상기 방법이 많은 다른 질환을 치료하는 데 사용하기에 적합한 안티센스 분자를 식별하는 넓은 응용분야에 적용된다는 것을 이해해야 한다. 일 구현예에서, 키트는 화학식 (I) 내지 화학식 (VI) 중 어느 하나에 따른 안티센스 올리고머를 포함한다.

[0421] **실시예**

[0422] 전술한 개시 내용은 이해를 명료하게 하기 위해 도시와 예시를 통해 일부 상세하게 설명되었지만, 당업자는 첨부된 청구범위의 사상 또는 범주를 벗어나지 않고도 이에 대한 소정의 변경 및 수정이 이루어질 수 있다는 것을 본 개시의 교시에 비추어 자명하게 알 것이다. 하기 실시예는 단지 예시로서 제공되며 제한하도록 제공되지 않는다. 당업자는 본질적으로 유사한 결과를 얻기 위해 변경되거나 수정될 수 있는 다양한 비중요 파라미터를 쉽게 인지할 것이다.

[0423] **물질 및 방법**

[0424] *모르폴리노 서브유닛의 제조*



[0425]

[0426] 반응식 1: PMO 서브유닛까지의 일반 합성 경로

[0427] 반응식 1을 참조하면(B는 염기 페어링 모이어티를 나타냄), 모르폴리노 서브유닛은 도시된 바와 같이 상응하는 리보뉴클레오시드(**1**)로부터 제조할 수 있다. 모르폴리노 서브유닛(**2**)은 적절한 보호기 전구체, 예를 들어 트리틸 클로라이드와의 반응에 의해 임의로 보호될 수 있다. 아래에 보다 상세히 기술되는 것과 같이, 3' 보호기는 고상 올리고머를 합성하는 동안에 일반적으로 제거된다. 염기 페어링 모이어티는 고상 올리고머 합성을 위해 적절히 보호될 수 있다. 적절한 보호기는 아데닌과 시토신에 대한 벤조일, 구아닌에 대한 페닐아세틸, 및 하이포크산틴(이노신)에 대한 피발로일옥시메틸을 포함한다. 피발로일옥시메틸기는 하이포크산틴 헤테로시클릭 염기의 N1 위치에 도입될 수 있다. 보호되지 않은 하이포크산틴 서브유닛이 사용될 수 있지만, 활성화 반응의 수율은 염기가 보호될 때 훨씬 우수하다. 다른 적절한 보호기는 미국 특허 제8,076,476호에 개시된 것들을 포함하고, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0428] **3**과 활성화된 인산 화합물 **4**를 반응시키면 원하는 결합 모이어티를 갖는 모르폴리노 서브유닛 **5**가 생성된다.

[0429] 구조식 **4**의 화합물은 당업자에게 알려진 임의의 수의 방법을 사용해 제조할 수 있다. 그런 다음, 모르폴리노 모

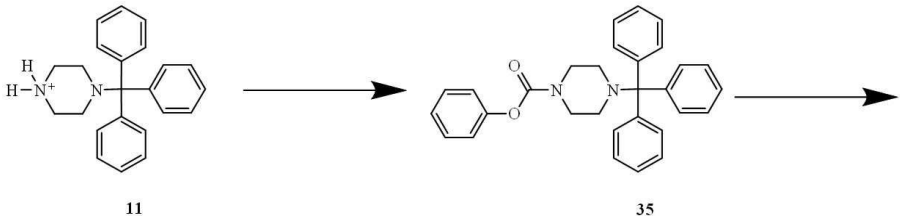
이어티와의 결합이 전술한 바와 같이 진행된다.

[0430] 구조식 5의 화합물을 고상 올리고머 합성에 사용해 서브유닛 간 결합을 포함하는 올리고머를 제조할 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 간단히 말해, 구조식 5의 화합물을 5' 단부에서 변형시켜 고형 지지체(solid support)에 대한 링커를 포함시킬 수 있다. 일단 지지되면, 3' 단부에 있는 5의 보호기(예: 트리틸)가 제거되고 유리 아민이 구조식 5의 제2 화합물의 활성화된 인 모이어티와 반응한다. 이러한 서열은 원하는 서열의 올리고가 수득될 때까지 반복된다. 말단 3' 단부에 있는 보호기는 제거되거나, 3' 변형이 필요한 경우 남겨질 수 있다. 올리고는 임의의 수의 방법을 사용하여 고형 지지체로부터 제거하거나, 예를 들어, 염기로 처리하여 고형 지지체에 대한 연결을 절단함으로써 제거할 수 있다.

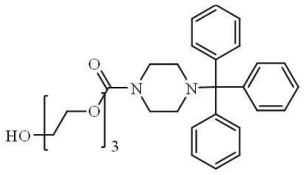
[0431] 모르폴리노 올리고머를 일반적인 모르폴리노 올리고머 및 본 개시의 특이적 모르폴리노 올리고머로 제조하는 것에 대해서는 실시예에서 보다 상세하게 기술된다.

[0432] *모르폴리노 올리고머의 제조*

[0433] 본 개시의 화합물의 제조는 반응식 2에 따른 하기 프로토콜을 사용해 수행될 수 있다:

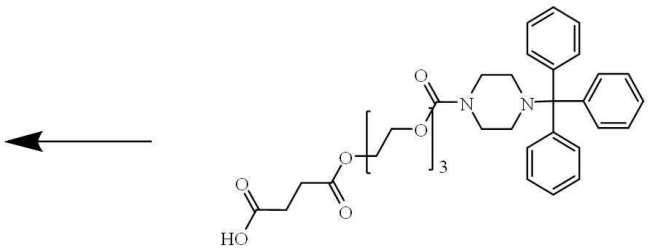


11 35



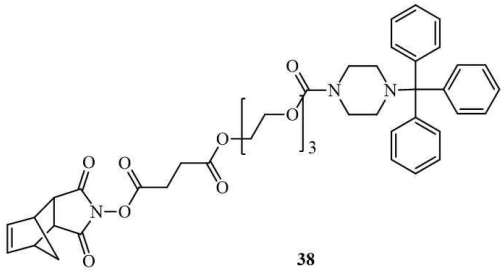
36

[0434]



37

[0435]



38

[0436]

[0437] 반응식 2: 활성화된 테일산의 제조

[0438] 트리틸 피페라진 페닐 카르바메이트 35의 제조: 디클로로메탄 중 화합물 11의 냉각 현탁액(6 mL/g 11)에 물 중 탄산칼륨(3.2당량)의 용액(4 mL/g 탄산 칼륨)을 첨가한다. 본 2상 혼합물에 디클로로메탄 중 페닐 클로로포르메

이트(1.03당량)의 용액(2 g/g 페닐 클로로포르메이트)을 서서히 첨가한다. 반응 혼합물을 20℃로 가온시킨다. 반응이 완료된 후(1~2 시간), 층을 분리시킨다. 유기층을 물로 세척하고, 무수 탄산 칼륨을 이용해 건조시킨다. 생성물 **35**를 결정화에 의해 아세토니트릴로부터 단리한다.

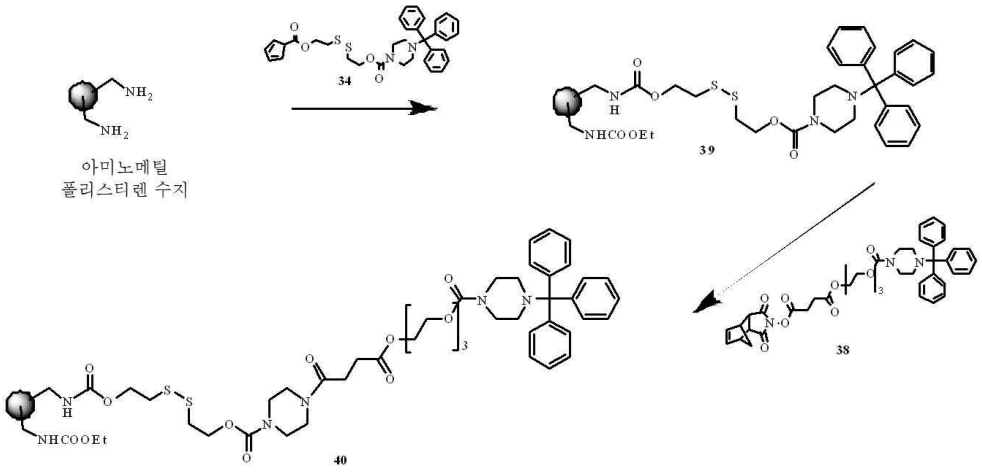
[0439] 카르바메이트 알코올 **36**의 제조: 수소화 나트륨(1.2 당량)을 1-메틸-2-피롤리디논에 현탁시킨다(32 mL/g 수소화 나트륨). 이 현탁액에 트리에틸렌 글리콜(10.0 당량)과 화합물 **35**(1.0 당량)를 첨가할 수 있다. 생성된 슬러리를 95℃로 가열한다. 반응이 완료된 후(1~2 시간), 혼합물을 20℃로 냉각시킨다. 이 혼합물에 30% 디클로로메탄/메틸 삼차-부틸 에테르 (v:v) 및 물을 첨가한다. 생성물 함유 유기층을 수성 NaOH, 수성 숙신산, 및 포화 수성 염화나트륨으로 연속 세척한다. 생성물 36을 결정화에 의해 디클로로메탄/메틸 삼차-부틸 에테르/헵탄으로부터 단리한다.

[0440] 테일산(Tail acid) **37**의 제조: 테트라하이드로푸란 중 화합물 **36**의 용액(7 mL/g **36**)에 숙신산 무수물(2.0 당량) 및 DMAP(0.5 당량)를 첨가한다. 혼합물을 50℃로 가열한다. 반응이 완료된 후(5시간), 혼합물을 20℃로 냉각시키고 수성 $NaHCO_3$를 사용해 pH 8.5까지 조절한다. 메틸 삼차-부틸 에테르를 첨가하고, 생성물을 수성층으로 추출한다. 디클로로메탄을 첨가하고, 수성층 혼합물을 수성 구연산으로 pH 3까지 조절한다. 생성물 함유 유기층을 pH=3의 구연산염 완충액과 포화 수성 염화나트륨의 혼합물로 세척한다. 이러한 **37**의 디클로로메탄 용액을 단리하지 않고 화합물 **38**의 제조에 사용한다.

[0441] **38**의 제조: 화합물 **37**의 용액에 N-하이드록시-5-노보넨-2,3-디카르복실산 이미드(HONB)(1.02 당량), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)(0.34 당량)을 첨가한 다음 1-(3-디메틸아미노프로필)-*N'*-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)(1.1 당량)를 첨가한다. 혼합물을 55℃로 가열한다. 반응이 완료된 후(4~5시간), 혼합물을 20℃로 냉각시키고 1:1 0.2 M 구연산/염수 및 염수로 연속 세척한다. 디클로로메탄 용액을 아세톤으로 용매 교환한 다음 *N,N*-디메틸포름아미드로 용매 교환하고, 생성물을 침전에 의해 아세톤/*N,N*-디메틸포름아미드로부터 단리하여 포화 수성 염화나트륨을 수득한다. 미정제 생성물(crude product)을 물 속에서 여러 번 재 슬러리화하여 잔여 *N,N*-디메틸포름아미드와 염을 제거한다.

[0442] PMO 합성 방법 A: 이황화 앵커의 사용

[0443] 고상 합성이 진행되는 동안 서브유닛의 통합에 사용한 절차에 의해, 디메틸 이미다졸리디논(DMI) 중에서 앵커 로딩된 수지에 활성화된 "테일(Tail)"을 도입한다.

[0444] 

[0445] 반응식 3: 모르폴리노 올리고머의 합성을 위한 고형 지지체의 제조

[0446] 거친 다공성(40~60 μm) 유리 프릿, 오버헤드 교반기, 및 3방향 테플론 잠금 꼭지가 구비된 실란화된 재킷형 쾝티드 용기(ChemGlass, NJ, USA)에서 이 절차를 수행하여 N_2를 프릿을 통해 버블링시키거나 진공으로 추출할 수 있다.

[0447] 다음 절차에서의 수지 처리/세척 단계는 2가지 기본 작업: 교반상 반응기를 이용한 수지 유동화 및 용매/용액 추출로 이루어진다. 수지 유동화의 경우, N_2가 프릿을 통해 흘러 나갈 수 있도록 잠금 꼭지를 위치시키고, 특정된 수지 처리/세척 볼륨을 반응기에 첨가하여 수지 처리/세척 볼륨이 수지를 투과하여 이를 완전히 습윤시키도록 한다. 그런 다음 혼합 단계가 시작되고, 수지 슬러리를 특정 시간 동안 혼합시킨다. 용매/용액 추출의 경우,

혼합과 N_2 흐름을 중단시키고, 진공 펌프를 작동시킨 다음 수지 처리/세척 볼륨이 폐기물로 배출될 수 있도록 멈춤 꼭지를 위치시킨다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 수지 처리/세척 볼륨은 15 mL/g이다.

[0448] 실란화된 재킷형 펩티드 용기 중의 아미노메틸폴리스티렌 수지(100~200 메쉬; 약 1.0 mmol/g 로드(질소 치환을 기준으로 함); 75 g, 1 당량, Polymer Labs, UK, part #1464-X799)에 1-메틸-2-피롤리디논(NMP; 20 mL/g 수지)을 첨가하고, 수지를 1~2시간 동안 혼합하면서 팽윤시킨다. 팽윤 용매를 배출시킨 후, 수지를 디클로로메탄(2 x 1~2분), 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중 5% 디이소프로필에틸아민(2 x 3~4 분) 및 디클로로메탄(2 x 1~2분)으로 세척한다. 마지막 세척액을 배출시킨 후, 1-메틸-2-피롤리디논(0.17 M; 15 mL/g 수지, 약 2.5 당량) 중 이황화 앵커 **34**의 용액으로 처리하고, 수지/시약 혼합물을 45℃에서 60시간 동안 가열한다. 반응이 완료된 후, 가열을 중단하고, 앵커 용액을 배출시키고, 수지를 1-메틸-2-피롤리디논(4 x 3~4분)과 디클로로메탄(6 x 1~2 분)으로 세척한다. 수지를 디클로로메탄 중 10% (v/v) 디에틸 디카르보네이트(DEDC)의 용액(16 mL/g; 2 x 5~6 분)으로 처리한 다음, 디클로로메탄(6 x 1~2 분)으로 세척한다. 수지 **39**가 일정한 중량(± 2%)이 되도록 N_2 기류 하에 1~3시간 동안 및 진공 하에서 건조시킨다.

[0449] 아미노메틸폴리스티렌-이황화 수지의 로딩 결정: 수지의 로딩(잠재적으로 이용 가능한 반응성 부위의 수)은 수지의 그램당 트리페닐메틸(트리틸) 기의 수에 대한 분광계 분석에 의해 결정된다.

[0450] 알려진 중량의 건조된 수지(25 ± 3 mg)를 실란화된 25 mL 부피의 플라스크에 옮기고, 디클로로메탄 중 약 5 mL의 2%(v/v) 트리플루오로아세트산을 첨가한다. 내용물을 부드럽게 돌려 혼합한 다음 30분 동안 방치한다. 디클로로메탄 중 2%(v/v) 트리플루오로아세트산을 더 첨가하여 부피가 25 mL가 되게 하고, 내용물을 꼼꼼히 혼합한다. 양 변위 피펫을 사용해, 트리틸 함유 용액의 분취액(500 μL)을 10 mL 부피 플라스크에 옮기고, 메탄설폰산을 사용해 부피가 10 mL가 되게 한다.

[0451] 최종 용액 중의 트리틸 양이온의 함량은 431.7 nm에서의 UV 흡광도로 측정하고, 수지 로딩은 적절한 부피, 희석액, 소광 계수(ε: 41 μmol-1 cm-1) 및 수지 중량을 사용해 수지 1그램 당 트리틸기(μmol/g)로 계산한다. 분석을 3회 수행하여 평균 로딩을 계산한다.

[0452] 이 실시예에서 수지 로딩 절차를 통해 대략 500 μmol/g으로 로딩된 수지를 얻게 된다. 이황화 앵커 통합 단계를 실온에서 24시간 동안 수행하는 경우, 300~400 μmol/g 로딩을 수득한다.

[0453] 테일 로딩: 아미노메틸폴리스티렌-이황화 수지의 제조와 동일한 설정과 부피를 사용해, 테일을 고형 지지체 상에 도입할 수 있다. 앵커 로딩된 수지를 산성 조건 하에서 먼저 탈보호하고, 생성된 물질을 중화시킨 후 결합시킨다. 결합 단계의 경우, 4-에틸모르폴린(NEM, 0.4 M)을 함유하는 DMI 중 **38**의 용액(0.2 M)을 1-메틸-2-피롤리디논 대신에 이황화 앵커 용액으로 사용한다. 45℃에서 2시간 후, 수지 **39**를 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중 5% 디이소프로필에틸아민으로 2회 세척하고, DCM으로 1회 세척한다. 수지에 벤조산 무수물 용액(0.4 M)과 NEM(0.4 M)을 첨가한다. 25분 후, 반응기 재킷을 실온으로 냉각시키고, 수지를 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중 5% 디이소프로필에틸아민으로 2회 세척하고 DCM으로 8회 세척한다. 수지 **40**을 여과하고 고 진공 하에 건조시킨다. 수지 **40**에 대한 로딩은 테일 로딩에 사용된 원래의 아미노메틸폴리스티렌-이황화 수지 **39**의 로딩이 되도록 정의한다.

[0454] 고상 합성: 모르폴리노 올리고머는 맞춤형 BioAutomation 128AVB(Plano, TX)를 이용해 4 mL BioComma 폴리프로필렌 반응 컬럼(Part # CT003-BC) 내에서 제조한다. 컬럼이 합성기 상에 놓일 때, 물 흐름을 위한 채널이 구비된 알루미늄 블록을 컬럼 주위에 배치한다. AVB128이 대안적으로 시약/세척 용액을 추가하고, 지정된 시간 동안 유지시키고, 진공을 이용해 컬럼을 배출시킨다.

[0455] 길이가 최대 약 25 서브유닛의 범위인 올리고머의 경우, 약 500 μmol/g의 수지를 로딩하는 아미노메틸폴리스티렌-이황화 수지가 바람직하다. 보다 큰 올리고머의 경우, 300~400 μmol/g의 수지를 로딩하는 아미노메틸폴리스티렌-이황화 수지가 바람직하다. 5'-테일을 가진 분자를 원하는 경우, 테일과 함께 로딩된 수지를 동일한 로딩 가이드라인으로 선택한다.

[0456] 하기 시약 용액을 제조하였다:

[0457] 탈트리틸화 용액: 4:1 디클로로메탄/트리플루오로에탄올 중 1% 4 시아노피리딘, 및 트리플루오로아세트산 (w/w) 용액;

[0458] 중화 용액: 5:1 디클로로메탄/이소프로판올 중 3% 디이소프로필에틸아민 용액; 및

[0459] 결합 용액: 1,3-디메틸이미다졸리디논(DMI) 중 원하는 염기 및 0.4 M N-에틸모르폴린과의 연결 유형으로 이루어진 0.18 M (또는 20 서브유닛보다 더 길게 성장한 올리고머의 경우 0.24 M) 활성화된 모르폴리노 서브유닛의 용액.

[0460] 디클로로메탄(DCM)을 상이한 시약 용액 세척제를 분리시키는 중간 세척제(transitional wash)로서 사용한다.

[0461] 합성기 상에서, 블록을 42℃로 설정하고, 30 mg의 아미노메틸폴리스티렌-이황화 수지(또는 테일 수지)가 담긴 각각의 컬럼에 2 mL의 1-메틸-2-피롤리디논을 첨가하고, 실온에서 30분 동안 방치한다. 2 mL의 디클로로메탄으로 2회 세척한 후, 하기 합성 사이클을 사용할 수 있다:

단계	부피	전달	유지 시간
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
결합	350~500 uL	주사기	40 분
DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초

[0462]

[0463] 각각의 컬럼이 적절한 결합 용액(A, C, G, T, 또는 I)이 올바른 순서로 수용되도록 개별 올리고머의 서열을 합성기에 프로그래밍한다. 컬럼 내의 올리고머가 이의 최종 서브유닛으로 통합된 후, 컬럼을 블록으로부터 제거하고, 4-메톡시트리페닐메틸 클로라이드(DMI 중 0.32 M) 및 0.89 M 4-에틸모르폴린을 함유하는 결합 용액을 사용해 최종 사이클을 수동으로 수행한다.

[0464] 수지로부터 염기와 골격 보호기의 절단 및 제거: 메톡시트리틸화 후, 2 mL의 1-메틸-2-피롤리디논으로 수지를 8회 세척한다. 1-메틸-2-피롤리디논 중 0.1 M 1,4-디티오트레이톨(DTT) 및 0.73 M 트리에틸아민으로 이루어진 1 mL의 절단 용액을 첨가한 뒤 컬럼을 캡핑하고, 실온에서 30분 동안 방치한다. 해당 시간이 지난 후, 용액을 12 mL Wheaton 바이알에 따른다. 크게 수축된 수지를 300 μL의 절단 용액으로 2회 세척한다. 용액에 4.0 mL의 농축 수성 암모니아(-20℃에서 보관함)를 첨가하고, (테플론을 덧댄 스크류 캡으로) 바이알을 단단히 캡핑하고, 혼합물을 와동시켜(swirled) 용액을 혼합한다. 바이알을 45℃ 오븐에 16~24시간 동안 두어 염기와 골격 보호기가 절단되도록 한다.

[0465] 미정제 생성물의 정제: 바이알에 담긴 암모놀리시스(ammonolysis) 용액을 오븐에서 꺼낸 뒤 방치하여 실온으로 냉각시킨다. 용액을 20 mL의 0.28% 수성 암모니아로 희석하고, Macroprep HQ 수지(BioRad)가 담긴 2.5x10 cm 컬럼을 통과시킨다. 염 구배(A: 0.28% 암모니아, B: 0.28% 암모니아 중 1 M 염화나트륨; 0에서 100% B까지 60분 소요)를 사용하여 메톡시트리틸 보호된 올리고머를 용리한다. 합쳐진 분획을 풀링하고 원하는 생성물에 따라 추가로 가공한다.

[0466] 모르폴리노 올리고머의 탈에톡시트리틸화: Macroprep 정제에서 풀링된 분획을 1M H_3PO_4로 처리하여 pH를 2.5로 낮춘다. 초기 혼합 후, 샘플을 실온에서 4분 동안 방치하는데, 이 때, 이 샘플들은 2.8% 암모니아/물로 pH 10~11까지 중화시킨다. 고상 추출(SPE)에 의해 생성물을 정제한다.

[0467] SPE 컬럼 충진 및 컨디셔닝: 앰버크롬(Amberchrome) CG-300M(Dow Chemicals (Rohm and Haas); Midland, MI)(3 mL)을 20 mL의 프릿이 구비된 컬럼(BioRad Econo-Pac 크로마토그래피 컬럼(732-1011))에 충진한 다음, 3 mL의 0.28% NH_4OH / 80% 아세토니트릴; 0.5 M NaOH / 20% 에탄올; 물; 50 mM H_3PO_4 / 80% 아세토니트릴; 물; 0.5 NaOH / 20% 에탄올; 물; 0.28% NH_4OH로 수지를 헹군다.

[0468] SPE 정제: 탈에톡시트리틸화된 용액을 칼럼 상에 로딩하고, 8 mL의 0.28% 수성 암모니아로 수지를 3회 헹군다. Wheaton 바이알(12 mL)을 컬럼 아래에 두고, 0.28% 수성 암모니아 중 2 mL의 45% 아세토니트릴로 2회 세척하여 생성물을 용리할 수 있다.

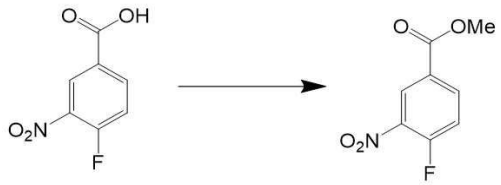
[0469] 생성물의 단리: 용액을 드라이아이스로 냉동시키고, 바이알을 적어도 2일 동안 동결 건조기에 두어 솜털 모양의 백색 분말을 수득한다. 그런 다음, 샘플을 물에 용해시키고, 주사기를 사용해 0.22미크론 필터(Pall Life Sciences, 0.2미크론 HT Tuffryn 막이 구비된 Acrodisc 25 mm 주사기 필터)를 통해 여과하고, UV 분광 광도계를 이용해 광학 밀도(OD)를 측정하여 존재하는 올리고머의 OD 단위를 결정하고 분석용 샘플도 분배한다. 그런 다음, 용액을 Wheaton 바이알에 다시 넣어 동결 건조시킨다.

[0470] MALDI에 의한 모르폴리노 올리고머의 분석: MALDI-TOF 질량 분광법을 사용해 정제물 중 분획의 조성을 결정하고, 올리고머의 동일성(분자량)을 위한 증거도 제공할 수 있다. 샘플을 3,5-디메톡시-4-하이드록시신남산(시나핀산), 3,4,5-트리하이드록시아세토포논(THAP) 또는 알파-시아노-4-하이드록시신남산(HCCA)의 용액으로 희석한 후 매트릭스로서 흘릴 수 있다.

[0471] PMO 합성 방법 B: 니트로카르복시페닐프로필 (NCP2) 앵커의 사용

[0472] NCP2 앵커 합성:

[0473] 1. 메틸 4-플루오로-3-니트로벤조에이트 (**1**)의 제조



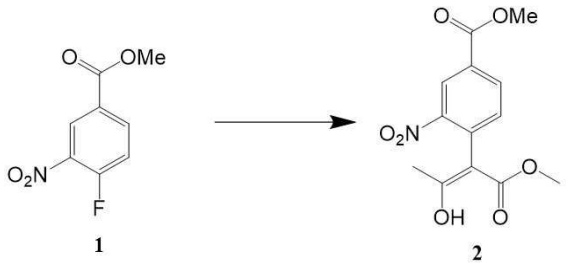
1

[0474]

[0475] 100 L 플라스크에 12.7 kg의 4-플루오로-3-니트로벤조산, 40 kg의 메탄올 및 2.82 kg의 농축 황산을 첨가할 수 있다. 혼합물을 환류(65℃) 하에 36시간 동안 교반한다. 반응 혼합물을 0℃로 냉각시킨다. 약 38℃에서 결정이 형성될 수 있다. 혼합물을 0℃에서 4시간 동안 유지시킨 다음 질소 하에 여과한다. 100 L 플라스크를 세척하고 0℃로 냉각시킨 10 kg의 메탄올로 필터 케이크를 세척한다. 고형분 필터 케이크를 깔때기를 이용해 1시간 동안 건조시키고, 트레이에 옮긴 다음, 일정 중량이 될 때까지 실온의 진공 오븐에서 건조시킨다.

[0476] 2. 3-니트로-4-(2-옥소프로필)벤조산의 제조

[0477] A. (Z)-메틸 4-(3-하이드록시-1-메톡시-1-옥소부트-2-엔-2-일)-3-니트로벤조에이트 (2)

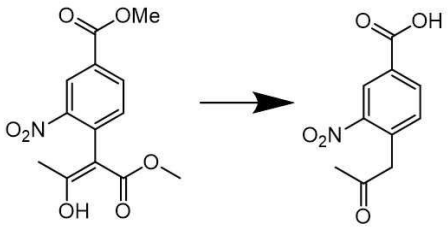


1 2

[0478]

[0479] 100 L 플라스크에 이전 단계의 3.98 kg의 메틸 4-플루오로-3-니트로벤조에이트 (1), 9.8 kg의 DMF 및 2.81 kg의 메틸 아세토아세테이트를 첨가할 수 있다. 혼합물을 교반하고 0℃로 냉각시킨다. 온도를 5℃ 이하로 유지하면서 약 4시간에 걸쳐 3.66 kg의 DBU를 첨가한다. 혼합물을 1시간 동안 추가로 교반한다. 반응 온도를 15℃ 이하로 유지하면서, 37.5 kg의 정제수 중 8.15 kg의 구연산 용액을 반응 플라스크에 첨가한다. 첨가 후, 반응 혼합물을 30분 동안 추가로 교반한 다음 질소 하에 여과한다. 습식 필터 케이크를 14.8 kg의 정제수와 함께 100 L 플라스크에 회수한다. 슬러리를 10분 동안 교반한 후 여과한다. 습식 케이크를 100 L 플라스크에 다시 회수하고, 14.8 kg의 정제수와 함께 10분 동안 슬러리화한 다음, 여과하여 미정제 생성물 (Z)-메틸 4-(3-하이드록시-1-메톡시-1-옥소부트-2-엔-2-일)-3-니트로벤조에이트를 수득한다.

[0480] B. 3-니트로-4-(2-옥소프로필)벤조산

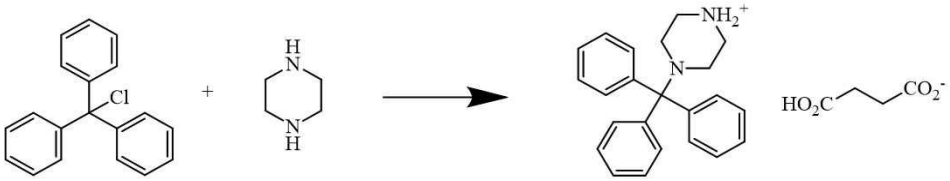


2 3

[0481]

[0482] 미정제 생성물 (Z)-메틸 4-(3-하이드록시-1-메톡시-1-옥소부트-2-엔-2-일)-3-니트로벤조에트를 질소 하에 100 L 반응 플라스크에 충진한다. 14.2 kg의 1,4-디옥산을 첨가한 다음 교반한다. 반응 혼합물의 온도를 15℃ 아래로 유지하면서, 혼합물에 16.655 kg의 농축 HCl 및 13.33 kg의 정제수의 용액(6 M HCl)을 2시간에 걸쳐 첨가한다. 첨가가 완료되면, 반응 혼합물을 환류(80℃) 하에 24시간 동안 가열하고, 실온으로 냉각시킨 다음, 질소 하에 여과한다. 고형분 필터 케이크를 14.8 kg의 정제수와 함께 분쇄하고, 여과하고, 14.8 kg의 정제수와 함께 다시 분쇄하고, 여과한다. 고형분을 39.9 kg의 DCM과 함께 100 L 플라스크에 회수하고, 1시간 동안 교반하면서 환류시킨다. 1.5 kg의 정제수를 첨가하여 남아 있는 고형분을 용해시킨다. 바닥 유기층을 예열된 72 L 플라스크에 분할한 다음, 깨끗한 100 L 건조 플라스크에 회수한다. 용액을 0℃로 냉각시키고, 1시간 동안 유지한 다음, 여과한다. 고형분 필터 케이크를 9.8 kg DCM과 5 kg 헵탄의 용액으로 2회 각각 세척한 다음, 깔때기를 이용해 건조시킨다. 고형분을 트레이로 옮기고, 건조시켜 1.855 kg의 항량의 3-니트로-4-(2-옥소프로필)벤조산을 수득한다.

[0483] 3. N-트리틸피페라진 숙시네이트(NTP)의 제조



[0484]

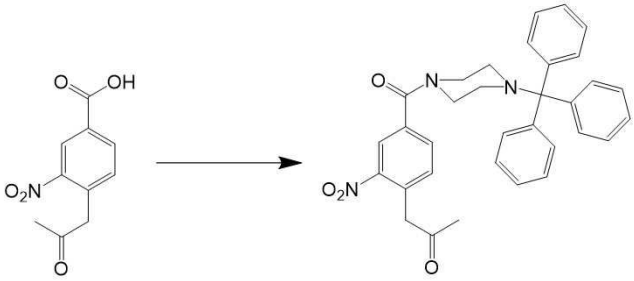
[0485] 질소 하에 72 L의 재킷형 플라스크에 1.805 kg의 트리페닐메틸 클로라이드 및 8.3 kg의 톨루엔(TPC 용액)을 충진할 수 있다. 고형분이 용해될 때까지 혼합물을 교반한다. 5.61 kg 피페라진, 19.9 kg 톨루엔 및 3.72 kg 메탄올을 질소 하에 100 L 자켓형 반응 플라스크에 첨가한다. 혼합물을 교반하고 0℃로 냉각시킨다. 반응 온도를 10℃ 이하로 유지하면서, TPC 용액을 4시간에 걸쳐 여러 번 나눠서 천천히 첨가한다. 혼합물을 10℃에서 1.5시간 동안 교반한 다음, 방치하여 14℃로 승온시킨다. 32.6 kg의 정제수를 72 L 플라스크에 충진한 다음, 내부 배치

(batch) 온도를 20±5℃로 유지하면서 100 L 플라스크에 옮긴다. 층이 분리되도록 방치한 다음, 바닥 수성층을 분리하여 저장한다. 유기층을 각각 32 kg의 정제수로 3회 추출하고, 수성층을 분리하여 저장된 수용액과 합친다.

[0486] 남아 있는 유기층을 18℃로 냉각시키고, 10.87 kg의 정제수 중 847 g의 숙신산 용액을 여러 번 나눠서 유기층에 서서히 첨가한다. 혼합물을 20±5℃에서 1.75시간 동안 교반한다. 혼합물을 여과하고, 고형분을 2 kg의 TBME 및 2 kg의 아세톤으로 세척한 다음 깔때기를 이용해 건조시킨다. 필터 케이크를 각각 5.7 kg의 아세톤과 함께 2회 분쇄하여 여과하고, 분쇄와 분쇄 사이에 1 kg의 아세톤으로 세척한다. 고형분을 깔때기를 이용해 건조시킨 다음, 트레이에 옮기고 일정 중량이 될 때까지 실온의 진공 오븐에서 건조시킨다.

[0487] 4. (4-(2-하이드록시프로필)-3-니트로펜틸)(4-트리틸피페라진-1-일)메타논의 제조

[0488] A. 1-(2-니트로-4(4-트리틸피페라진-1-카르보닐)페닐)프로판-2-온의 제조

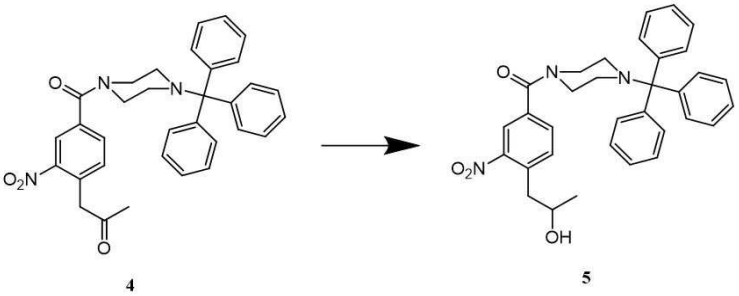


3 4

[0489]

[0490] 질소 하에 100 L의 재킷형 플라스크에 2 kg의 3-니트로-4-(2-옥소프로필)벤조산(**3**), 18.3 kg의 DCM, 및 1.845 kg의 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC.HCl)를 충진한다. 균질한 혼합물이 형성될 때까지 용액을 교반한다. 3.048 kg의 NTP를 실온에서 30분에 걸쳐 첨가하고, 8시간 동안 교반한다. 5.44 kg의 정제수를 반응 혼합물에 첨가하고 30분 동안 교반한다. 층이 분리되도록 방치한 다음, 생성물이 포함된 바닥 유기층을 따라내고 저장한다. 수성층을 5.65 kg의 DCM으로 2회 추출한다. 합쳐진 유기층을 4.08 kg 정제수 중 1.08 kg 염화나트륨 용액으로 세척한다. 유기층을 1.068 kg의 황산나트륨을 이용해 건조시키고 여과한다. 황산나트륨을 1.3 kg의 DCM으로 세척한다. 합쳐진 유기층을 252 g의 실리카 겔과 함께 슬러리화하고, 252 g의 실리카 겔 상이 담긴 필터 깔때기를 통해 여과한다. 실리카 겔 상을 2 kg의 DCM으로 세척한다. 합쳐진 유기층을 회전 증발기를 이용해 증발시킨 다음 4.8 kg의 THF를 잔류물에 첨가하고, THF 중 2.5 볼륨의 미정제 생성물 1-(2-니트로-4(4-트리틸피페라진-1-카르보닐)페닐)프로판-2-온에 도달할 때까지 회전 증발기를 이용해 증발시킨다.

[0491] B. (4-(2-하이드록시프로필)-3-니트로펜틸)(4-트리틸피페라진-1-일)메타논 (**5**)의 제조



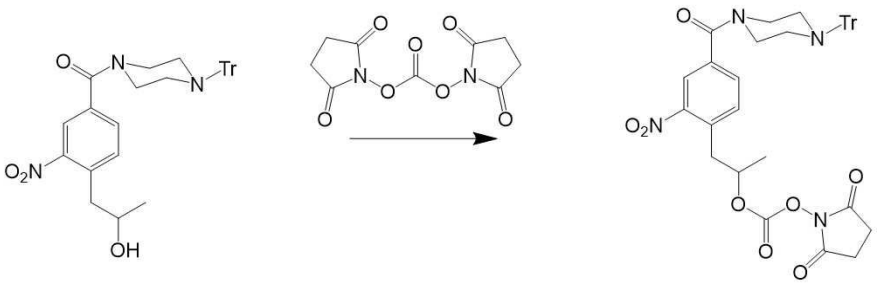
4 5

[0492]

[0493] 질소 하에, 100 L의 재킷형 플라스크에 이전 단계의 3600 g의 **4** 및 9800 g THF를 충진할 수 있다. 교반 용액을 ≤5℃로 냉각시킨다. 11525 g의 에탄올로 용액을 희석시키고 194 g의 수소화붕소나트륨을 ≤5℃에서 약 2시간에 걸쳐 첨가한다. 반응 혼합물을 ≤5℃에서 2시간 동안 추가로 교반한다. 3 kg의 물 중 1.1 kg의 염화 암모늄 용액을 서서히 첨가하여 온도를 ≤10℃로 유지함으로써 반응을 켄칭시킨다. 반응 혼합물을 30분 동안 추가로 교반하고, 여과하여 무기물을 제거한 다음, 100 L의 재킷형 플라스크에 재충진하고, 23 kg의 DCM으로 추출한다. 유기층을 분리시키고 수성층을 각각 4.7 kg의 DCM으로 2회 더 추출한다. 합쳐진 유기층을 3 kg의 물 중 800 g의 염화나트륨 용액으로 세척한 다음, 2.7 kg의 황산나트륨을 이용해 건조시킨다. 현탁액을 여과하고 필터 케이크를 2 kg의 DCM으로 세척한다. 합쳐진 여액을 2.0 볼륨으로 농축시키고, 약 360 g의 에틸 아세테이트로 희석시킨

다음, 증발시킨다. 미정제 생성물을 질소 하에 DCM으로 충진된 4 kg의 실리카 겔 컬럼 상에 로딩하고, 7.2 kg의 DCM 중 2.3 kg 에틸 아세테이트로 용리시킨다. 합쳐진 분획을 증발시키고, 잔류물을 11.7 kg의 톨루엔에 용해시킨다. 톨루엔 용액을 여과하고 필터 케이크를 각각 2 kg의 톨루엔으로 2회 세척한다. 필터 케이크를 일정한 중량이 될 때까지 건조시킨다.

[0494] 5. 2,5-디옥소피롤리딘-1-일(1-(2-니트로-4-(4-트리페닐메틸피페라진-1 카르보닐)페닐)프로판-2-일) 카보네이트(**NCP2 앵커**)의 제조



5 NCP2 앵커

[0495]

[0496] 질소 하에 100 L 자켓형 플라스크에 4.3 kg의 화합물 **5**(잔류 톨루엔에 기초하여 ^{1}H NMR에 의해 조절된 중량; 이하 모든 시약은 이에 따라 조절됨) 및 12.7 kg의 피리딘을 충진할 수 있다. 내부 온도를 ≤35℃로 유지하면서 3.160 kg의 DSC(^{1}H NMR에 의한 78.91 중량%)를 첨가한다. 반응 혼합물을 주변 실온에서 약 22시간 동안 에이징한 다음 여과한다. 필터 케이크를 200 g의 피리딘으로 세척한다. 각각 ½의 여액 볼륨을 포함하는 2개의 배치(batch)에서, 50 kg의 물 중 11 kg의 구연산 용액이 담긴 100 L 재킷형 플라스크에 여액 세척액을 서서히 충진하고, 30분 동안 교반하여 고형분을 침전시킨다. 고형분을 필터 깔때기로 수집하고, 매회 4.3 kg의 물로 2회 세척하고, 진공 하에 필터 깔때기를 이용해 건조시킨다.

[0497] 합쳐진 고형분을 100 L의 재킷형 플라스크에 충진하고, 28 kg의 DCM에 용해시키고, 4.3 kg의 물 중 900 g의 탄산칼륨 용액으로 세척할 수 있다. 1시간 후, 층을 분리시키고 수성 층을 제거한다. 유기층을 10 kg의 물로 세척하고, 분리하고, 3.5 kg의 황산나트륨을 이용해 건조시킨다. DCM을 여과하고, 증발시키고, 진공 하에 건조시켜 6.16 kg의 NCP2 앵커를 수득한다.

[0498] NCP2 앵커 로딩된 수지의 합성

[0499] 테프론 잠금 꼭지가 구비된 75 L의 고상 합성 반응기에 약 52 L의 NMP 및 2300 g의 아미노메틸 폴리스티렌 수지를 충진할 수 있다. 수지를 NMP 중에서 교반하여 약 2시간 동안 팽윤시킨 후 따라 낸다. 수지를 매회 약 4 L의 DCM으로 2회 세척한 다음, 매회 39 L의 중화 용액으로 2회 세척한 다음, 매회 39 L의 DCM 로 2회 세척한다. NCP2 앵커 용액을 교반 수지 용액에 서서히 첨가하고, 실온에서 24시간 동안 교반하고, 따라 낸다. 수지를 매회 39 L의 NMP로 4회 세척하고, 매회 39 L의 DCM으로 6회 세척한다. 수지를 ½의 디에틸 디카르보네이트(DEDC) 캡핑 용액으로 처리하고 30분 동안 교반한 다음 따라 내고, 나머지 ½의 DEDC 캡핑 용액으로 처리하고 30분 동안 교반한 다음 따라 낸다. 수지를 매회 39 L의 DCM으로 6회 세척한 다음 오븐에서 건조시켜 3573.71 g의 항량의 앵커 로딩된 수지를 수득한다.

[0500] NCP2 앵커를 사용한 모르폴리노 올리고머의 제조

[0501] PMO 미정제 약물 물질의 50 L 고상 합성

[0502] 1. 물질

표 2

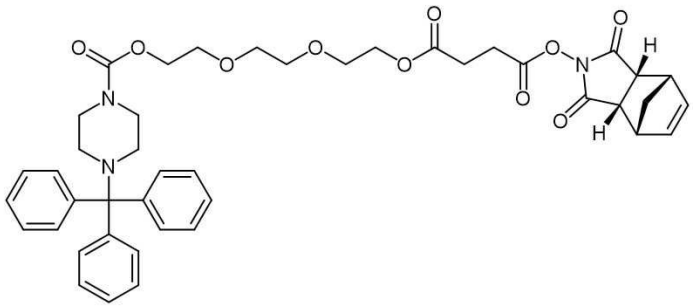
[0503]

시작 물질				
물질명	화학명	CAS 번호	화학식	분자량
활성화된 A 서브유닛	포스포르아미도클로리딕 산, *N*,*N*-디메틸-,[6-[6-(벤조일아미노)-9H-퓨린-9-일]-4-(트리페닐메틸)-2-모르폴리닐]메틸 에스테르	1155373-30-0	$C_{38}H_{37}ClN_7O_4P$	722.2

활성화된 C 서브유닛	포스포르아미도클로리딕 산, *N,N*-디메틸-,[6-[4-(벤조일아미노)-2-옥소-1(2H)-피리미디닐]-4-(트리페닐메틸)-2-모르폴리노]메틸 에스테르	1155373-31-1	$C_{37}H_{37}ClN_5O_5P$	698.2
활성화된 DPG 서브유닛	프로판산, 2,2-디메틸-,4-[[[9-[6-[[[클로로(디메틸아미노)포스피닐]옥시]메틸]-4-(트리페닐메틸)-2-모르폴리닐]-2-[(2-페닐아세틸)아미노]-9H-퓨린-6-일]옥시]메틸]페닐 에스테르	1155309-89-9	$C_{51}H_{53}ClN_7O_7P$	942.2
활성화된 T 서브유닛	포스포르아미도클로리딕산, *N,N*-디메틸-,[6-(3,4-디하이드로-5-메틸-2,4-디옥소-1(2H)-피리미디닐)]-4-(트리페닐메틸)-2-모르폴리닐]메틸 에스테르	1155373-34-4	$C_{31}H_{34}ClN_4O_5P$	609.1
활성화된 EG3 테일	부탄이산, 1-[3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-헥사하이드로-1,3-디옥소-4,7-메탄오-2H-이소인돌-2-일] 4-[2-[2-[2-[[[4-(트리페닐메틸)-1-피페라지닐]카르보닐]옥시]에톡시]에톡시]에틸] 에스테르	1380600-06-5	$C_{43}H_{47}N_3O_{10}$	765.9

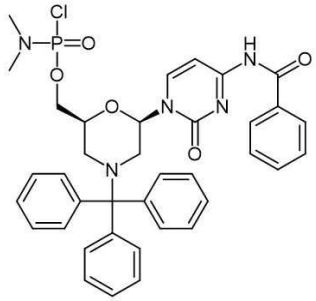
[0504] 출발 물질의 화학 구조:

[0505] A. 활성화된 EG3 테일



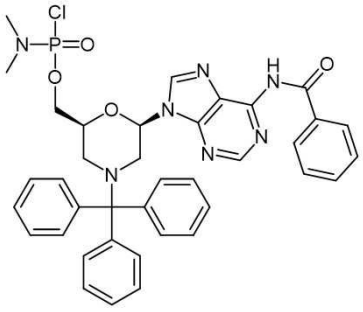
[0506]

[0507] B. 활성화된 C 서브유닛(제조용, 미국 특허 제8,067,571호 참조)



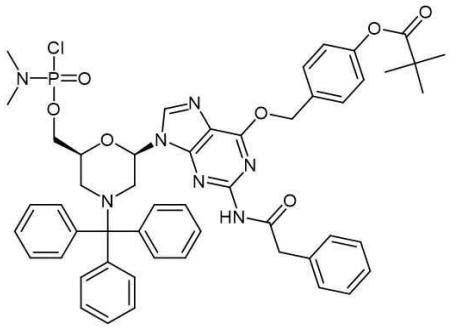
[0508]

[0509] C. 활성화된 A 서브유닛(제조용, 미국 특허 제8,067,571호 참조)



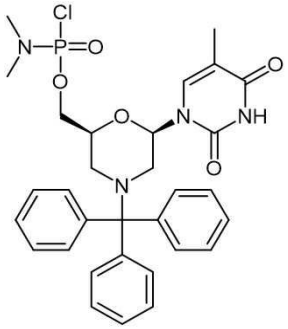
[0510]

[0511] D. 활성화된 DPG 서브유닛(제조용, WO 2009/064471 참조)



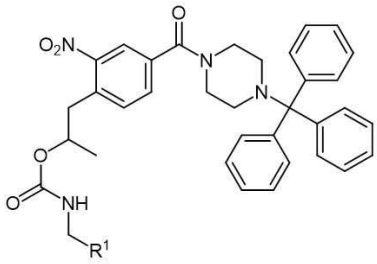
[0512]

[0513] E. 활성화된 T 서브유닛(제조용, WO 2013/082551 참조)



[0514]

[0515] F. 앵커 로딩된 수지



[0516]

[0517] (식 중 R^1은 지지-매질임)

표 3

[0518]

PMO 미정제 약물 물질의 고상 올리고머 합성을 위한 용액에 대한 설명	
용액 명칭	용액 조성
NCP2 앵커 용액	37.5 L NMP 및 1292 g NCP2 앵커
DEDC 캡핑 용액	4.16 L 디에틸 디카보네이트 (DEDC), 3.64 L NEM, 및 33.8 L DCM
CYTFA 용액	2.02 kg 4-시아노피리딘, 158 L DCM, 1.42 L TFA, 39 L TFE, 및 2 L 정제수
중화 용액	35.3 L IPA, 7.5 L DIPEA, 및 106.5 L DCM
절단 용액	1,530.04 g DTT, 6.96 L NMP, 및 2.98 L DBU

[0519] 2. PMO 미정제 약물 물질의 합성

[0520] A. 수지 팽윤

[0521] 750 g의 앵커 로딩된 수지 분취액과 10.5 L의 NMP를 50 L의 실란화된 반응기에 충진하고 3시간 동안 교반할 수 있다. NMP를 따라 내고, 앵커 로딩된 수지를 매회 5.5 L의 DCM으로 2회 세척하고 매회 5.5 L의 30% TFE/DCM으로 2회 세척한다.

[0522] B. 사이클 0: EG3 테일 결합

[0523] 앵커 로딩된 수지를 매회 5.5 L의 30% TFE/DCM으로 3회 세척한 다음 따라 내고, 5.5 L의 CYFTA 용액으로 15분 동안 세척한 다음 따라 내고, 122 mL의 1:1 NEM/DCM이 충진될 수 있는 5.5 L의 CYTFA 용액으로 15분 동안 다시 세척한 다음 따라 내지 않고, 현탁액을 2분 동안 교반한 다음 따라 낸다. 수지를 5.5 L의 중화 용액으로 5분 동안 2회 세척하고 따라 낸 다음, 매회 5.5 L의 DCM으로 2회 세척하고 따라 낸다. 3 L의 DMI 중 706.2 g의 활성화된 EG3 테일 및 234 mL의 NEM의 용액을 수지에 충진하고, RT에서 3시간 동안 교반하고 따라 낼 수 있다. 수지를 매회 5.5 L의 중화 용액으로 5분씩 2회 세척한 다음, 5.5 L의 DCM으로 1회 세척한 다음 따라 낸다. 2680 mL의 NMP 중 374.8 g의 벤조산 무수물 및 195 mL의 NEM의 용액을 충진하고 15분 동안 교반한 다음 따라낼 수 있다. 수지를 5.5 L의 중화 용액과 함께 5분 동안 교반한 다음, 5.5 L의 DCM으로 1회 세척하고, 매회 5.5 L의 30% TFE/DCM으로 2회 세척한다. 수지를 5.5 L의 30% TFE/DCM 중에 현탁시키고 14시간 동안 유지시킨다.

[0524] C. 서브유닛 결합 사이클 1~**n**

표 4

[0525]

일반 염기 서브유닛 결합								
사이클 번호: 서브유닛 (SU)	결합 전 처리				결합 사이클		결합 후 처리	
	1	2	3	4			1	2
	30% TFE/DCM 세척	CYTFA 용액[1]	중화 용액	DCM 세척	수량 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 결합 시간 (시간)	DCM 세척	30% TFE/DCM 세척
1:C	5.5 L	a) 5.5 L b) 5.5 L, 122 mL	3x5.5 L	5.5 L	536.7g; 195 mL NEM; 3.2L DMI	5	5.5 L	2x5.5 L

[0526] [1] mL는 NEM/DCM이 1:1인 양을 나타낸다.

[0527] i. 결합 전 처리

[0528] 각각의 결합 사이클 전에, 수지를: 1) 30% TFE/DCM으로 세척하고; 2) a) CYTFA 용액으로 15분 동안 처리한 다음 따라 내고, b) 1:1 NEM/DCM이 첨가된 CYTFA 용액으로 15분 동안 처리하고, 교반한 다음, 따라 내고; 3) 중화 용액과 함께 3회 교반하고; 4) DCM으로 2회 세척한다.

[0529] ii. 결합 후 처리

[0530] 각각의 서브유닛 용액을 따라 낸 다음, 수지를: 1) DCM으로 세척하고; 2) 30% TFE/DCM으로 2회 세척한다. 다음 결합 사이클 이전에 수지를 유지시키는 경우, 두 번째 TFE/DCM 세척액은 따라 내지 않으며, 수지는 상기 TFE/DCM 세척 용액 내에 유지시킨다.

[0531] iii. 활성화된 서브유닛 결합 사이클

[0532] 각각의 결합 사이클은 각각의 염기 함유 서브유닛을 대상으로 표 2에서 초기 C(시토신) 단량체 결합에 대해 일반적으로 기술된 바와 같이 수행된다.

[0533] iv. 최종 IPA 세척

[0534] 최종 결합 단계를 수행한 후, 수지를 매회 19.5 L의 IPA로 8회 세척하고, 진공 하에 실온에서 약 63.5시간 동안 건조시켜 5,579.8 g의 건조 중량을 수득한다.

[0535] C. 절단

[0536] 상기 수지 결합된 PMO 미정제 약물 물질을 2개의 로트로 나누고, 각각의 로트를 다음과 같이 처리한다. 수지의 2,789.9 g 로트를: 1) 10 L의 NMP와 함께 2시간 동안 교반한 다음, NMP를 따라 내고; 2) 매회 10 L의 30% TFE/DCM으로 3회 세척하고; 3) 10 L의 CYTFA 용액으로 15분 동안 처리한 다음; 4) 130 mL의 1:1 NEM/DCM이 첨가된 10 L의 CYTFA 용액으로 15분 동안 처리하고, 2분 동안 교반한 다음 따라 낸다. 수지를 매회 10 L의 중화 용액으로 3회 처리하고, 10 L의 DCM으로 6회 세척하고, 매회 10 L의 NMP로 8회 세척한다. 수지를 6.96 L NMP 중 1530.4 g DTT 및 2980 DBU의 절단 용액으로 2시간 동안 처리하여 PMO 미정제 약물 물질을 수지로부터 분리시킨

다. 절단 용액을 따라 내 별도의 용기에 보관한다. 반응기와 수지를 절단 용액과 합쳐진 4.97 L의 NMP로 세척한다.

[0537] D. 탈보호

[0538] 합쳐진 절단 용액과 NMP 세척액을, 냉동고에서 -10℃ 내지 -25℃의 온도로 냉동시킨 39.8 L의 NH_4OH ($NH_3 \bullet H_2O$)가 첨가된 압력 용기에 옮긴다. 압력 용기를 밀봉하고 16시간 동안 45℃로 가열한 다음, 25℃로 냉각시킨다. PMO 조 약물 물질을 함유하는 탈보호 용액을 정제수와 3:1로 희석하고, 2 M 인산으로 pH를 3.0으로 조절한 다음, NH_4OH로 pH 8.03까지 조절한다.

[0539] E. PMO 미정제 약물 물질의 정제

[0540] PMO 미정제 약물 물질을 함유하는 상기 D의 탈보호 용액을 ToyoPearl Super-Q 650S 음이온 교환 수지 칼럼(Tosoh Bioscience) 상에 로딩하고, 17 컬럼 볼륨에 걸쳐 0~35% B의 구배(완충액 A: 10 mM 수산화나트륨; 완충액 B: 10 mM 수산화나트륨 중 1 M 염화나트륨)로 용리하고, 허용 가능한 순도의 분획(C18 및 SCX HPLC)을 풀링하여 정제된 의약품 용액을 수득한다.

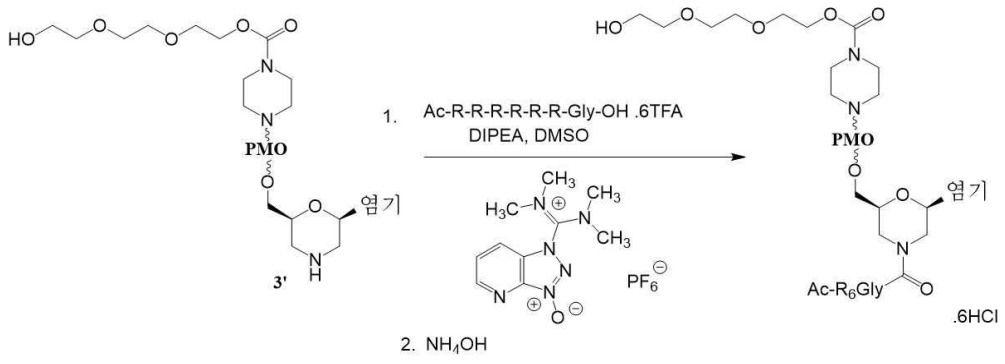
[0541] 정제된 약물 물질 탈염하고 동결 건조시켜 정제된 PMO 약물 물질을 수득한다.

표 5

[0542]

약어	
약어	**명칭**
CYTFA	4-시아노피리딘 트리플루오로아세트산
CPP	세포 투과 펩티드
DBU	1,8-디아자바이시클로운데스-7-엔
DCM	디클로로메탄
DEDC	디에틸 디카보네이트
DIPEA	N,N-디이소프로필에틸아민
DMI	1,3-디메틸-2-이미다졸리디논
DMSO	디메틸 설폭시드
DTT	DL-디티오트레이톨
HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
IPA	이소프로필 알코올
MW	분자량
NEM	N-에틸모르폴린
NMP	N-메틸-2-피롤리돈
SAX	강한 음이온 교환
SCX	강한 양이온 교환
SPE	고상 추출
RT	실온
TFA	2,2,2-트리플루오로아세트산
TFE	2,2,2-트리플루오로에탄올

[0543] *CPP 접합 ("R6Gly" 는 서열번호 11로서 개시됨)*



[0544]

[0545] 분석 절차: 시나핀산(SA) 매트릭스를 사용해 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 비행 시간 질량 스펙트럼(MALDI-TOF-MS)을 Bruker AutoflexTM Speed에 기록할 수 있다. SCX-HPLC는, 3000 다이오드 어레이 검출기 및 ProPacTM SCX-20 컬럼(250 x 4 mm)이 구비된 Thermo Dionex UltiMate 3000 시스템 상에서 1.0 mL/분의 유속을 사용해 수행할 수 있다(pH = 2; 컬럼 온도 30℃). 이동상은 **A**(24 mM H_3PO_4를 함유하는 물 중 25% 아세트니트릴) 및 **B**(1 M KCl 및 24 mM H_3PO_4를 함유하는 물 중 25% 아세토니트릴)일 수 있다. 다음의 구배 용리를 사용할 수 있다: 0분, 35% **B**; 2분, 35% **B**; 22분, 80% **B**; 25분, 80% **B**; 25.1분, 35% **B**; 30분, 35% **B**.

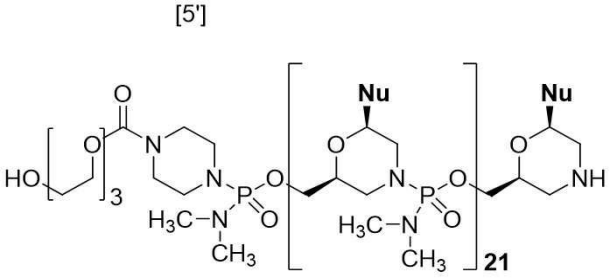
[0546] PMO(2일 동안 동결 건조에 의해 새롭게 건조함)의 혼합물에, Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH(서열번호 11) 헥사트리플루오로아세테이트 (614.7 mg, 0.354 mmol), 및 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트 (HATU, 134.4 mg, 0.354 mmol) 및 디메틸 설폭시드 (DMSO, 20 mL)를 첨가한다. 혼합물을 실온에서 3분 동안 교반한 다음, *N,N*-디이소프로필에틸아민(DIPEA, 68.5 mg, 0.530 mmol)을 첨가한다. 5분 후, 흐린 혼합물이 투명한 용액이 된다. 반응은 SCX-HPLC에 의해 모니터링할 수 있다. 2시간 후, 20 mL의 10% 수산화 암모늄 용액(2.8% NH_3*H_2O)을 첨가한다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 추가로 교반한다. 400 mL의 물을 첨가하여 반응을 종결시킨다. 트리플루오로에탄올(2.0 mL)을 용액에 첨가한다.

[0547] 용액을 2개의 부분으로 나누고, 각 부분을 WCX 컬럼(칼럼당 10 g의 수지)에 의해 정제할 수 있다. 각각의 WCX 컬럼을 우선 물 중 20% 아세토니트릴(v/v)로 세척하여 PMO 출발 물질을 제거한다. MALDI-TOF 질량 스펙트럼 분석을 통해 PMO 신호의 부재가 나타날 때 세척(각 컬럼마다 225 mL)을 중단할 수 있다. 그런 다음, 각 컬럼을 물(컬럼 당 100 mL)로 세척한다. 원하는 생성물을 2.0 M 구아니딘 HCl(각 컬럼마다 140 mL)을 사용해 용리할 수 있다. 정제된 용액을 함께 풀링한 다음, 두 부분으로 나누고, 각각을 SPE 컬럼(각 컬럼 마다 10 g의 수지)에 의해 탈염한다.

[0548] SPE 컬럼을 우선 1.0 M 수성 NaCl 용액(각 칼럼마다 100 mL)으로 세척하여 헥사하이드로클로라이드 염 형태를 생성할 수 있다. 그런 다음, 각각의 SPE 컬럼을 물(각 컬럼마다 200 mL)로 세척한다. 최종 탈염 생성물을 물 중 50% 아세토니트릴(v/v, 각 칼럼 마다 150 mL)을 사용하여 용리할 수 있다. 아세토니트릴은 감압 하에 배출에 의해 제거할 수 있다. 생성된 수용액을 동결건조하여 원하는 생성물을 헥사하이드로클로라이드 염으로서 수득할 수 있다.

[0549] **실시예 1: PMO**

[0550] 전술한 PMO 합성 방법을 사용하여, PMO#1, PMO#2, 및 PMO#3을 다음과 같이 합성하였으며:



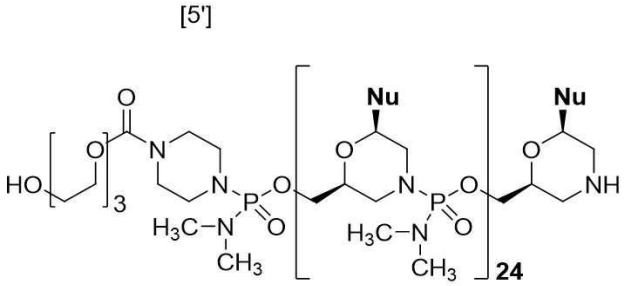
PMO#1

[0551]

[0552] 식 중 1에서 22 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 H50D(+04-18)(서열번호 1)이고:

위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu
1	G	6	C	11	A	16	T	21	G
2	G	7	C	12	T	17	A	22	C
3	G	8	A	13	A	18	C		
4	A	9	G	14	C	19	A		
5	T	10	T	15	T	20	G		

[0553]



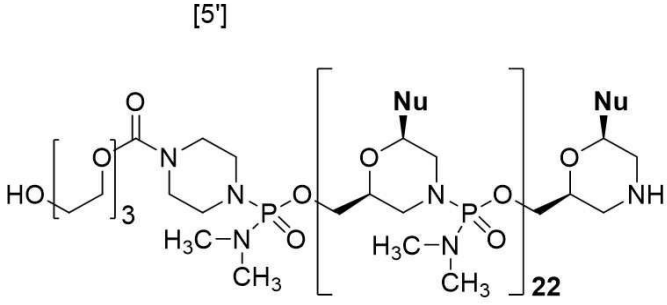
PMO#2

[0554]

[0555] 식 중 1에서 25 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 H50D(+07-18)(서열번호 2)이고:

위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu
1	G	6	C	11	A	16	T	21	G
2	G	7	C	12	T	17	A	22	C
3	G	8	A	13	A	18	C	23	T
4	A	9	G	14	C	19	A	24	C
5	T	10	T	15	T	20	G	25	C

[0556]



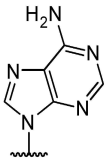
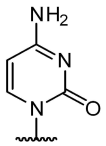
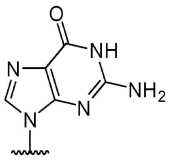
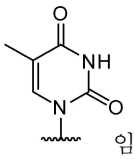
PMO#3

[0557]

[0558] 식 중, 1에서 23 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 H50D(+07-16)(서열번호 3)이다:

위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu
1	G	6	A	11	A	16	C	21	T
2	A	7	G	12	C	17	A	22	C
3	T	8	T	13	T	18	G	23	C
4	C	9	A	14	T	19	G		
5	C	10	T	15	A	20	C		

[0559]

[0560] (여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이며, T는  임).

[0561] PMO#1(서열 번호 1)로는 원료의약품 제형을 허용하기에 너무 제한된 용해도 특성을 갖는 생성물을 수득한 반면, PMO#2(서열 번호 2)로는 충분한 수율 및 순도로 제조할 수 없는 생성물을 수득하였다.

[0562] PMO#1 및 PMO#2의 합성과 대조적으로, PMO#3의 합성(5' 말단 PMO#2와 2개의 염기만이 상이함)에는 용해도 문제나 정제 문제가 없었으며, PMO#3으로부터 후속하는 PPMO#3을 합성할 수 있었다(하기 실시예 2 - 참조).

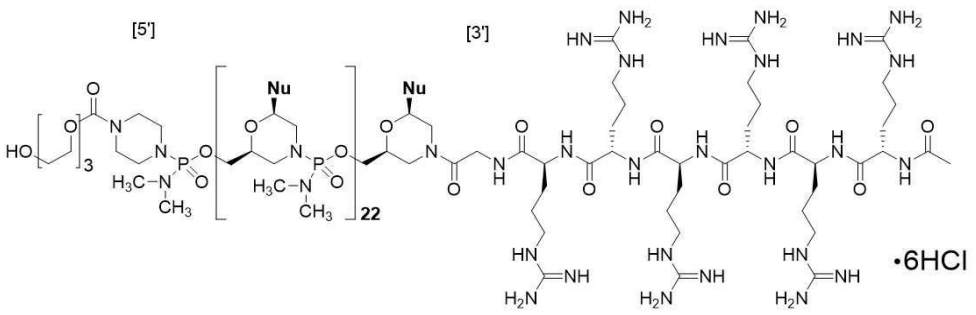
표적화 서열 (5' 에서 3' 방향)	서열번호	PMO 제조 문제:
GGGATCCAGTATACTTACAGGC	1	용해도: 미정제 PMO 는 저장 후 침전되어 제한된 용해도 및 용액 안정성을 나타내므로, 이로부터 후속 PPMO 를 합성할 수 없고, 원료의약품 후보로서 사용될 수 없다.
GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	2	정제: 미정제 PMO 는, 후속 PPMO 합성에 필요한 순도로 정제할 수 없었고, 완제의약품 후보로서 사용할 수 없었다.
GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	없음 (91% 순도; 물에 용해됨)

[0563]

[0564] 유사한 공정을 사용하여 PMO#4, PMO#5, PMO#6, PMO#7, PMO#8, 및 PMO#9를 합성하였다.

[0565] **실시예 2: PPMO#3**

[0566] 전술한 프로토콜을 사용하여, PMO#3(서열번호 3)으로부터 PPMO#3을 합성하였다:

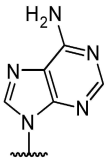
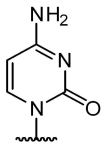
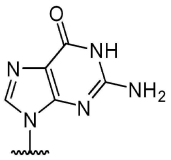
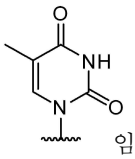


[0567] PPMO#3

[0568] (식 중, 1에서 23까지 및 5'에서 3' 방향으로 각각의 Nu는 서열번호 3이고)

[0569]

위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu	위치 번호 5'에서 3' 방향으로	Nu
1	G	6	A	11	A	16	C	21	T
2	A	7	G	12	C	17	A	22	C
3	T	8	T	13	T	18	G	23	C
4	C	9	A	14	T	19	G		
5	C	10	T	15	A	20	C		

[0570] (여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이며, T는  임).

[0571] **실시예 3: 시험관 내 엑손 50 스키핑**

[0572] 아래 표에 기술된 바와 같은 인간 디스트로핀(*DMD*) 엑손 50을 표적으로 하는 2개의 화합물, 즉 PMO#3 및 PPMO#3(둘 다 동일한 서열을 가짐)을 건강한 인간 근관세포(myotube)에서 *DMD* 엑손 50 스키핑에 대해 평가하였다.

[0573] **PMO#3 및 PPMO#3의 서열:**

[0574]

명칭	표적화 서열 (TS)	서열번호	5'	3'
PMO#3	GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	EG3	H
PPMO#3	GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	EG3	-G-R_6 (서열번호 11)

[0575] 구체적으로, 건강한 인간 근육아세포(Zen-Bio, Inc.로부터 구입한 5~6회 계대된 SKB-F-SL)를 80~90%의 융합도(confluency)에 도달하도록 SKM-M 배지에서 배양한 후, 저 혈청 배지(SKM-D, Zen-Bio, Inc.)에서 인큐베이션하여 분화를 개시하였다. 분화 후 5일차에, 성숙한 근관세포를 다양한 농도(즉, 40 μm, 20 μm, 10 μm, 5 μm, 2.5 μm, 및 1.25 μm)의 상기 화합물과 함께 인큐베이션하였다. 96시간의 인큐베이션 후, 근관세포를 PBS로 세척하고, 1% β-메르캅토에탄올로 보충된 RNeasy Micro 키트(Cat#74004, Qiagen) 중의 RLT 완충액으로 용해시켰다. RNA를 용리하기 위해, 20 μL의 RNase가 없는 물을 사용한 것을 제외하고는, 제조업자의 권장 사항에 따라 총 RNA를 단리하였다.

[0576] 두 화합물 모두에 의한 *DMD* 엑손 50 스키핑을 결정하기 위해, 1단계 종결점 RT-PCR을 수행하였다. cDNA 합성 및 PCR 증폭은 100 ng의 총 RNA, 유전자 특이적 프라이머, 및 백금 *Taq* DNA 중합효소를 이용한 SuperScript III 1단계 RT-PCR 시스템(Cat#12574-026, Invitrogen)을 사용하여 수행하였다. 인간 *DMD* 엑손 49 및 52(정방향 프라이머: CCA GCC ACT CAG CCA GTG AAG(서열번호 12); 역방향 프라이머: CGA TCC GTA ATG ATT GTT CTA GCC(서열번호 13))에서 표적화하도록 유전자-특이적 프라이머를 설계하였다. cDNA 합성 및 PCR 증폭은 표 6에 나타낸 프로그램을 사용해 BioRad CFX96 실시간 유전자 증폭기(thermocycler)에 의해 수행하였다. 스키핑된 PCR 산물 및 스키핑되지 않은 PCR 산물의 발현은, 제조업체의 지침에 따라 DNA 1K 시약(Cat#760517 및 CLS760673, Perkin Elmer)으로 제조한 LabChip GX 시스템의 DNA Extended Range LabChip 상에 22 μL PCR 산물을 로딩함으로써 평가하였다. *DMD* 엑손 50 스키핑의 백분율은 스키핑한 대역 및 스키핑하지 않은 대역의 합계 몰 농도 대비 엑손 50 스키핑한 대역의 몰 농도(nmol/L)의 백분율로서 계산된다.

[0577] 스튜던트의 독립 표본 양측 t-검정(등분산성)을 사용해 2 그룹의 평균이 각각의 투여량에서 서로 통계적으로 상이한지 여부를 평가하였다. P-값 < 0.05는 통계학적으로 유의한 것으로 간주된다.

표 6

[0578]

엑손 50 스키핑의 유무와 상관 없이 *DMD* 앰플리콘을 증폭시키는 데 사용된 유전자 증폭기 프로그램		
단계	온도	시간
역전사	55℃	30분
역전사효소 불활성화	94℃	2분
변성	94℃	45초
어닐링	59℃	45초
연장	68℃	1분
단계 3~4 반복	45 사이클	
최종 연장	68℃	10분
보관	4℃	∞

[0579] PPMO#3이 PMO#3과 비교하여 *DMD* 엑손 50 스키핑을 유의하게 증가시킨다는 것을 보여주는 결과를 (PMO#3 대 PMO#의 스키핑 비율로서) 아래 표에 제시하였다.

표 7

[0580]

인간 근관세포에서 PMO#3과 PPMO#3에 의한 *DMD* 엑손 50 스키핑의 백분율						
화합물/	상대적 엑손 스키핑					
투여량 (μm)	1.25	2.5	5	10	20	40
PMO#3	1	1	1	1	1	1
PPMO#3	2.6	3.2	3.0	2.4	2.1	1.9

[0581] 상기 표 7의 데이터는, 모든 농도에서 PMO#3으로 세포를 처리하는 것에 비해 PPMO#3으로 세포를 처리할 때, 엑손 50 스키핑이 더 높은 경우에 근관세포가 생성됨을 보여준다. 이러한 개선은, 비인간 영장류(NHP)가 PPMO#3 또는 PMO#3으로 처리되고 엑손 50 스키핑이 다양한 유연 근육 조직에서 측정되는 실시예 4의 NHP 연구와 같은 생체 내 비교 시험에서 추가로 입증될 수 있다(자세한 내용은 실시예 4 참조).

[0582] **실시예 4: NHP에서의 엑손 50 스키핑**

[0583] PPMO 안티센스 올리고머의 엑손 스키핑 효능을 추가로 입증하기 위해 비인간 영장류를 이용한다. 구체적으로, 온전한 근육 조직을 가진 시노몰구스 원숭이에게 PPMO#3(실시예 2), PMO#3(실시예 1), 또는 식염수를 정맥내 주사한다.

[0584] 임상 관찰(예: 피부와 모피, 호흡기 영향의 평가)과 체중 측정을 포함하여 임상시험 전반에 걸쳐 동물을 관찰한다. 혈액 및 소변 샘플은 적어도 검사 시작 전, 및 첫 번째 투여와 마지막 투여(해당되는 경우)로부터 24시간이 경과한 후에 채취한다.

[0585] 각각의 예정된 부검 시점, 또는 사망 직전 안락사 시점에, 횡격막 절편, 십이지장 평활근, 식도, 대동맥, 사두근, 삼각근, 이두근 및 심장을 채취하여 급냉시킨다. 엑손 50 스키핑 백분율은 전술한 바와 같이 RT-PCR을 사용하여 결정한다.

[0586] **실시예 5: PMO를 이용한 시험관 내 엑손 50 스키핑**

[0587] 일련의 PMO(서열번호 1~7; PMO#1 ~ #7)를 제조하여 엑손 50 스키핑 효율에 대해 시험하였다. 요약하자면, 인간 원발성 근아세포를 표준 기술을 사용하여 배양하였다. 동결 건조된 PMO를 뉴클레아제가 없는 물에 재현탁하여 몰농도를 확인하고, PMO 용액을 NanoDrop 2000 분광광도계(Thermo Scientific)를 사용하여 측정하였다. P3 키트(Lonza) 및 제조자의 지침에 따라 핵천공을 사용해 근아세포의 세포에 투여량 범위(예: 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 및 20 μM)의 PMO를 전달하고, RNA 추출 전에 37℃의 5% CO2 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션하였다. GE Healthcare의 RNAspin 96 웰 RNA 단리 키트를 사용해 PMO-처리된 세포로부터 RNA를 추출하고, 이를 대상으로 인간 DMD 엑손 49~52를 증폭한 프라이머로 표준 기술을 사용해 RT-PCR을 수행하였다. Caliper LabChip 바이오분석기를 사용하여 스키핑을 측정하고, 엑손 스키핑 백분율(즉, 전장 PCR 생성물에 대한 엑손-스키핑 생성물의 밴드 강도)을 다음 등식에 의해 계산하고, 각 농도에서 유도된 스키핑 백분율에 기초하여 EC_{50}을 계산하였다: [엑손 50 스키핑 생성물/(엑손 50 스키핑 생성물 및 엑손 50 스키핑되지 않은 생성물의 합)*100]. 표 8에 나타낸 바와

같이, 엑손 50의 스플라이스 수용체 또는 스플라이스 공여자 영역을 표적화하도록 설계된 본 개시의 PMO 올리고머는 엑손 50의 스키핑을 제공하였고, PMO#1, PMO#2, 및 PMO#3는 가장 높은 수준의 엑손 50 스키핑 활성(EC_{50} < 1.0 μM)을 제공하였다.

표 8

[0588]

서열번호	화합물	활성 (EC_{50} [(1)])
1	PMO#1 (+04-18)	****
2	PMO#2 (+07-18)	****
3	PMO#3 (+07-16)	****
4	PMO#4 (+07-17)	**
5	PMO#5 (-19+07)	**
6	PMO#6 (+07-15)	*
7	PMO#7 (-02+23)	*

[0589] [(1)] **** = EC_{50} < 1.0 μM; ** = EC_{50} 1.0 내지 3.0 μM; * = EC_{50} 3.0 μM 이상.

[0590] 전술한 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용 및 첨부된 실시예는 단지 예시적인 것이며, 첨부된 청구범위 및 이들의 균등물에 의해서만 정의되는 본 발명의 범주를 한정하는 것으로 간주되어서는 안된다는 것을 이해할 것이다.

[0591] 개시된 구현예에 대한 다양한 변경 및 변형은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 화학 구조, 치환기, 유도체, 중간체, 합성, 조성물, 제형, 또는 사용 방법과 관련된 것들을 포함하되 이들로 한정되지 않는 이러한 변경 및 변형은 본 발명의 사상 또는 범주를 벗어나지 않고도 이루어질 수 있다.

[0592] **서열 목록***

설명	PMO 식별자	PPMO 식별자	서열 (5'에서 3' 방향 또는 N 말단에서 C 말단 방향)	서열 번호
H50D(+04-18)	PMO#1	PPMO#1	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	1
H50D(+07-18)	PMO#2	PPMO#2	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	2
H50D(+07-16)	PMO#3	PPMO#3	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	3
H50D(+07-17)	PMO#4	PPMO#4	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	4
H50A(-19+07)	PMO#5	PPMO#5	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	5
H50D(+07-15)	PMO#6	PPMO#6	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	6
H50A(-02+23)	PMO#7	PPMO#7	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	7
H50D(+06-18)	PMO#8	PPMO#8	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	8
H50D(+07-20)	PMO#9	PPMO#9	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	9
R_6			RRRRRR	10
R_6G			RRRRRRG	11
인간 엑손 49 결합 정방향 프라이머			CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG	12
인간 엑손 52 결합 역방향 프라이머			CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC	13
PMO-G	PMO-G	PPMO-G	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	14
$(RXR)_4$			RXRRXRRXRRXR	15
$(RFF)_3R$			RFFRFFRFFR	16
$(RXR)_4XB$			RXRRXRRXRRXRXB	17
$(RFF)_3RXB$			RFFRFFRFFRXB	18
$(RFF)_3RG$			RFFRFFRFFRG	19
R_5G			RRRRRG	20
R_5			RRRRR	21
인트론 49 – 엑손 50 – 인트론 50	atcttcaaagtgttaatcgaataagtaatgtgtatgcttttctgttaaagAGGAAGTTAGAAGATCTG AGCTCTGAGTGGAAGGCGGTAAACCGTTTACTTCAAGAGCTGAGGG CAAA GCAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTATTGGAGCCTg taagtatactggatcccattctctttggctctagctatttgttcaaaag			22

[0593]

[0594] * 핵염기를 연결하는 데 사용되는 화학물질에 따라, T는 티민 또는 우라실일 수 있다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SAREPTA THERAPEUTICS, INC.

<120> EXON SKIPPING OLIGOMER CONJUGATES FOR MUSCULAR DYSTROPHY

<130> 8171.50.WO00

<140><141><150> 62/779,028

<151> 2018-12-13

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> t or u

<400> 1

ggganccagn anacnnacag gc 22

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> t or u

<400> 2

ggganccagn anacnnacag gcncc 25

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (13)..(14)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> t or u

<400> 3

ganccagnan acnnacaggc ncc 23

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> t or u

<400> 4

gganccagna nacnnacagg cncc 24

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<220><221> modified_base
<222> (3)..(4)
<223> t or u
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> t or u
<220><221> modified_base
<222> (9)..(11)
<223> t or u
<220><221> modified_base
<222> (24)..(24)
<223> t or u
<400> 5
acnnccncnn naacagaaaa gcanac 26

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide
<220><221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> t or u
<220><221> modified_base
<222> (7)..(7)
<223> t or u
<220><221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> t or u
<220><221> modified_base

<222> (12)..(13)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> t or u

<400> 6

anccagnana cnnacaggcn cc 22

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (12)..(13)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (25)..(25)

<223> t or u

<400> 7

gagcncagan cnncnaacnn ccncn 25

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> t or u

<400> 8

ggganccagn anacnnacag gcnc 24

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

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

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> t or u

<220><221> modified_base

<222> (25)..(25)

<223> t or u

<400> 9

angggancca gnanacnnac aggcncc 27

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 10

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 11

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly

1 5

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 12

ccagccactc agccagtgaa g 21

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 13

cgatccgtaa tgattgttct agcc 24

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 14

gttgcctccg gttctgaagg tgttc 25

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> 6-aminohexanoic acid

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> 6-aminohexanoic acid

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> 6-aminohexanoic acid

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> 6-aminohexanoic acid

<400> 15

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<220><221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 6-aminohexanoic acid
<220><221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 6-aminohexanoic acid
<220><221
> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 6-aminohexanoic acid
<220><221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> 6-aminohexanoic acid
<220><221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> 6-aminohexanoic acid
<220><221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Beta-alanine
<400> 17
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Ala
1 5 10
<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220><221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> 6-aminohexanoic acid
<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Beta-alanine

<400> 18

Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Xaa Ala

1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 19

Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Gly

1 5 10

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 20

Arg Arg Arg Arg Arg Gly

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 21

Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 22

<211> 209

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

atcttcaaag tgttaatcga ataagtaatg tgtatgcttt tctgttaaag aggaagttag 60

aagatctgag ctctgagtgg aaggcggtaa accgtttact tcaagagctg agggcaaagc 120

agcctgacct agctcctgga ctgaccacta ttggagcctg taagtatact ggatcccatt 180

ctctttggct ctagctattt gttcaaaag 209