



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월21일

(11) 등록번호 10-2810425

(24) 등록일자 2025년05월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/64 (2017.01) *A61K 31/712* (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/645 (2017.08)
A61K 31/712 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7022506(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년12월13일
 심사청구일자 2023년07월26일
- (85) 번역문제출일자 2023년07월03일
- (65) 공개번호 10-2023-0110811
- (43) 공개일자 2023년07월25일
- (62) 원출원 특허 10-2019-7020418
 원출원일자(국제) 2017년12월13일
 심사청구일자 2020년12월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/066222
- (87) 국제공개번호 WO 2018/118599
 국제공개일자 2018년06월28일
- (30) 우선권주장
 62/436,182 2016년12월19일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020140028058 A*
 KR1020150133768 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
 사렘타 셰리퓨틱스 인코퍼레이티드
 미국 매사추세츠 02142, 캠브리지, 215 퍼스트 스트리트
- (72) 발명자
 파시니 마르코 에이.
 미국, 매사추세츠 02142, 캠브리지, 스위트 415, 215 퍼스트스트리트
 헨슨 군나르 제이.
 미국, 매사추세츠 02142, 캠브리지, 스위트 415, 215 퍼스트스트리트
- (74) 대리인
 특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 25 항

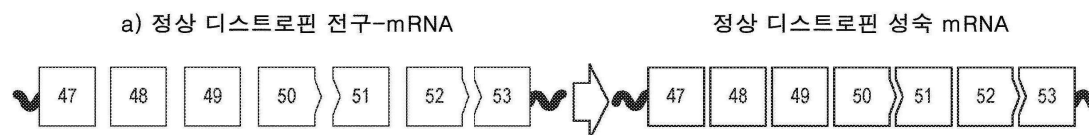
심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 근육 이상증에 대한 엑손 스킵핑 올리고머 결합체

(57) 요약

엑손 51 스킵핑을 유도하기 위한 인간 디스트로핀 유전자에서의 선택된 표적 부위에 상보적인 안티센스 올리고머 결합체가 기재되어 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/7125 (2013.01)

A61P 21/00 (2018.01)

(30) 우선권주장

62/443,476 2017년01월06일 미국(US)

62/479,173 2017년03월30일 미국(US)

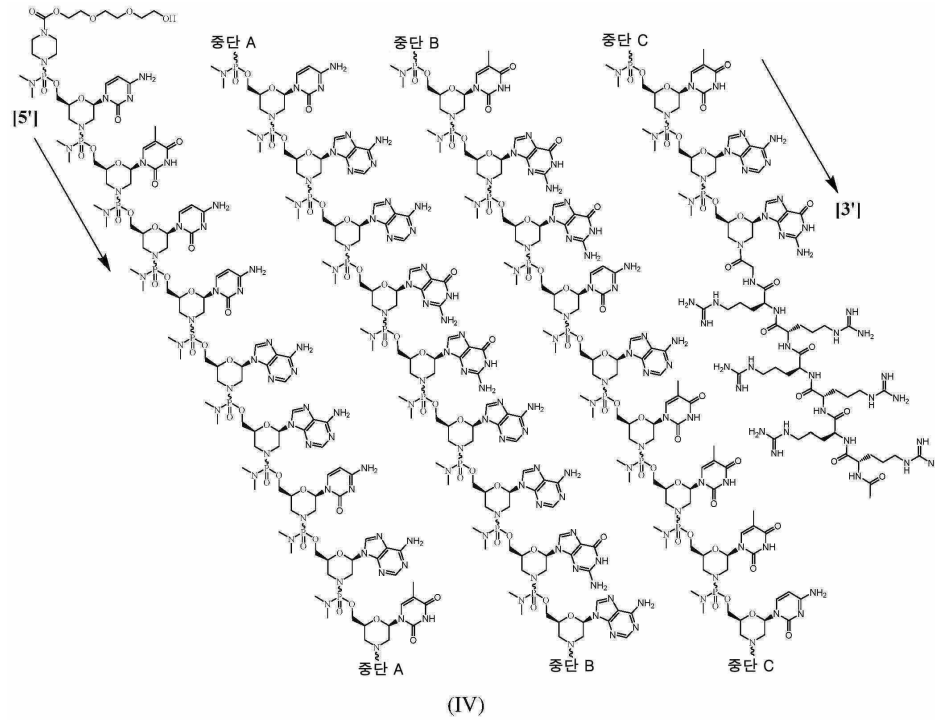
62/562,080 2017년09월22일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 (IV)의 안티센스 올리고머 결합체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 뒤센 근육 이상증을 치료하기 위한 약제학적 조성물:

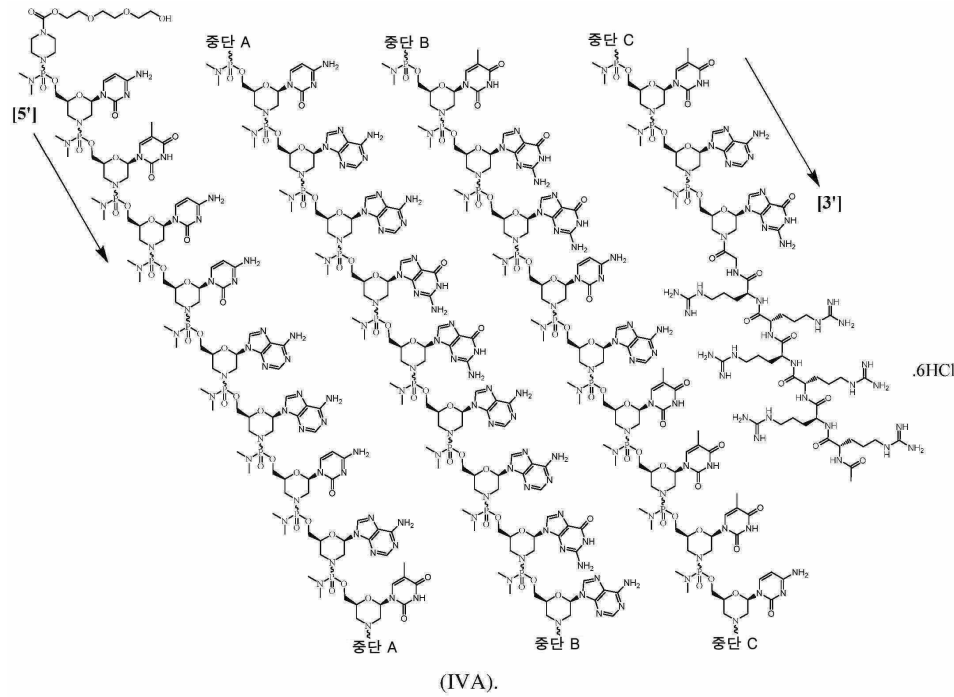


청구항 2

제1항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 약제학적으로 허용가능한 염의 형태인, 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 화학식 (IVA)의 약제학적으로 허용가능한 염의 형태인, 약제학적 조성물:



청구항 4

제3항에 있어서, 대상체가 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는, 약제학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 매주 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 격주 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 매 3주마다 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 매일 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 9

제3항에 있어서, 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서 디스트로핀 생산을 유도하기 위해 mRNA 해독를 복구하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 매주 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 격주 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 매 3주마다 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 13

제9항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 매월 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 14

제3항에 있어서, 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서의 mRNA 처리 과정에서 디스트로핀 전구-mRNA으로부터 엑손 51을 배제하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 15

제3항에 있어서, 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51에 결합하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 21 내지 39 mg/kg의 용량으로 투여되기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 30 mg/kg의 용량으로 투여되기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 28 내지 52 mg/kg의 용량으로 투여되기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 40 mg/kg의 용량으로 투여되기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 42 내지 78 mg/kg의 용량으로 투여되기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 60 mg/kg의 용량으로 투여되기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 56 내지 104 mg/kg의 용량으로 투여되기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 80 mg/kg의 용량으로 투여되기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 112 내지 208 mg/kg의 용량으로 투여되기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머 결합체가 160 mg/kg의 용량으로 투여되기 위한 것인, 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 정보

[0002] 본 특허출원은 2016년 12월 19일에 출원된 미국 가출원 제62/436182호, 2017년 1월 6일자로 출원된 미국 가출원 제62/443476호, 2017년 3월 30일자로 출원된 미국 가출원 제62/479173호 및 2017년 9월 22일자로 출원된 미국 가출원 제62/562080호의 이익을 주장한다. 상기-언급된 가특허 출원의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 본 개시내용의 기술분야

[0004] 본 개시내용은 인간 디스트로핀 유전자 및 이의 약제학적 조성물에서 엑손 51 스킵핑에 적합한 신규한 안티센스 올리고머 결합체에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 신규한 안티센스 올리고머 결합체를 사용하는 엑손 51 스킵핑의 유도 방법, 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서의 디스트로핀의 생성 방법, 및 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다.

배경 기술

[0005] 본 개시내용의 기술배경

[0006] 안티센스 기술은 여러 가지의 상이한 수준 (전사, 스플라이싱, 안정성, 번역)에서 유전자 발현에 영향을 주는 일정 범위의 화학을 사용하여 개발되었다. 다수의 이 연구는 넓은 범위의 적응증에서 비정상적인 또는 질환-관련 유전자를 교정하거나 또는 보충하기 위한 안티센스 화합물의 사용에 집중되었다. 안티센스 분자는 특이성을 갖는 유전자 발현을 억제할 수 있고, 이 때문에, 유전자 발현의 조절자로서의 올리고머와 관련된 수많은 연구가 표적화 유전자의 발현 또는 시스-작용 요소(cis-acting elements)의 기능을 억제하는데 집중되고 있다. 안티센스 올리고머는 전형적으로 RNA, 센스 가닥 (예를 들면, mRNA), 또는 일부 바이러스성 RNA 표적의 경우 센스 가닥 (예를 들면, mRNA), 또는 음성-가닥에 대해 유도된다. 특히 유전자 하향-조절의 원하는 효과를 달성하기 위해, 올리고머는 일반적으로 표적화된 mRNA의 붕괴를 촉진하거나, mRNA의 번역을 차단하거나 또는 시스-작용 RNA 요소의 기능을 차단하고, 이에 의해 표적 단백질의 새로운 합성 또는 바이러스성 RNA의 복제를 효과적으로 방지한다.

[0007] 그러나, 이러한 기술은 원상태 단백질의 생산을 상향 조절하거나 또는 번역의 조기 종결을 유도하는 돌연변이, 예컨대 논센스 또는 프레임 이동 돌연변이에 대해 보충하는 것이 목적인 경우에 유용하지 않다. 이러한 경우, 불완전 유전자 전사체는 표적화된 분해 또는 입체 억제에 가해지지 않을 것이고, 이로써 안티센스 올리고머 화학은 표적 mRNA 붕괴를 촉진하거나 또는 번역을 차단하지 못할 것이다.

[0008] 다양한 유전자 질환에서, 유전자의 최종적 발현에 대한 돌연변이의 효과는 스플라이싱 과정에서 표적화된 엑손 스킵핑 과정을 통해 조절될 수 있다. 스플라이싱 과정은 전구-mRNA에서의 인접한 엑손-인트론 접합을 밀접하게 근접시키고, 함께 스플라이싱되는 엑손들 사이의 이의 후속 재형성과 함께 인트론의 말단에서의 포스포디에스테르 결합의 절단을 수행하는 복합 다성분 기작에 의해 유도된다. 이러한 복잡하고 고도로 정밀한 과정은 이후 스플라이싱 반응에 수반되는 다양한 핵 스플라이싱 인자가 결합되는 상대적으로 짧은 반보존된 RNA 분절인 전구-mRNA에서의 서열 모티프에 의해 중재된다. 스플라이싱 기작이 전구-mRNA에 관련된 모티브를 관독하거나 또는 인식하는 방식을 변화시킴으로써, 상이한 스플라이싱된 mRNA 분자를 생성하는 것이 가능하다. 관련된 기전은 확인되지 않았지만 현재 다수의 인간 유전자가 정상 유전자 발현 과정에서 대안적으로 스플라이싱되는 것으로 인식되어 있다. Bennett 등 (미국특허 번호 6,210,892)은 표적 RNA의 RNase H-매개된 절단을 유도하지 않은 안티센스 올리고머 유사체를 사용하는 야생형 세포 mRNA 처리의 안티센스 조절을 기술하고 있다. 이는 (예를 들면 엑손 인코딩 막-관통 도메인이 결합된 가용성 TNF 상과 수용체의 생성을 위한 문헌 [Sazani, Kole, et al. 2007]에 기재된 바와 같은) 특정 엑손이 결합된 스플라이싱된 mRNA를 대안적으로 생성할 수 있는 유용성을 발견하였다.

[0009] 정상 기능 단백질이 그 내의 돌연변이로 인하여 조기 종결되는 경우에, 안티센스 기술을 통한 일부 기능 단백질 생성을 복구하기 위한 수단은 스플라이싱 과정 동안 개입을 통해 가능한 것을 나타내었고, 질환 유발 돌연변이와 관련된 엑손이 일부 유전자로부터 특이적으로 결실될 수 있는 경우, 원상태 단백질의 유사한 생물학적 특성을 가지거나 또는 엑손과 관련된 돌연변이에 의해 야기된 질환을 완화시키는데 충분한 생물학적 활성을 갖는 단

축된 단백질 생성물이 종종 생성될 수 있는 것을 나타내었다(예를 들면, 문헌 [Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Aartsma-Rus, Janson et al. 2004] 참조). Kole 등 (미국특허 번호 5,627,274; 5,916,808; 5,976,879; 및 5,665,593)은 표적화된 전구-mRNA의 붕괴를 촉진하지 못하는 변형된 안티센스 올리고머 유사체를 사용하여 비정상적 스플라이싱을 방지하는 방법을 개시하고 있다. Bennett 등 (미국특허 번호 6,210,892)은 표적 RNA의 RNase H-매개된 절단을 유도하지 못하는 안티센스 올리고머 유사체를 또한 사용하는 야생형 세포 mRNA 처리의 안티센스 조절을 기술하고 있다.

- [0010] 표적화된 엑손 스킵핑의 공정은 다수의 엑손 및 인트론이 존재하는 경우, 엑손의 유전적 구성에서의 중복성 (redundancy)이 존재하는 경우, 또는 단백질이 하나 이상의 특정 엑손 없이 기능할 수 있는 경우 긴 유전자에서 특히 유용할 수 있다. 다양한 유전자에서의 돌연변이에 의해 야기된 절단과 관련된 유전자 질환의 치료를 위한 유전자 처리를 전용하기 위한 노력은 (1) 스플라이싱 공정에 관련된 요소와 완전하게 또는 부분적으로 중첩되거나; 또는 (2) 이 요소에서 발생하는 특정 스플라이싱 반응을 정상적으로 중재할 수 있는 스플라이싱 인자의 결합 및 기능을 방해하는 요소와 충분하게 근접한 위치에서 전구-mRNA에 결합되는 안티센스 올리고머의 사용에 집중되고 있다.
- [0011] 뒤센 근육 이상증 (DMD)은 단백질 디스트로핀의 발현시 결함에 의해 야기된다. 단백질을 인코딩한 유전자는 DNA의 2 백만개 초과 뉴클레오타이드 상에 퍼져 있는 79 엑손을 포함한다. 엑손의 해독틀을 변화시키거나, 또는 정지 코돈을 도입하거나, 또는 전체 아웃오브프레임 엑손 또는 엑손들의 제거, 또는 하나 이상의 엑손의 복제를 특징으로 하는 임의의 엑손 돌연변이는 DMD를 야기하는 기능적 디스트로핀의 생산을 방해하는 잠재성을 가진다.
- [0012] 덜 중증 형태의 근육 이상증, 베커 근육 이상증 (BMD)은 돌연변이, 전형적으로 하나 이상의 엑손의 결실이 전체 디스트로핀 전사체와 함께 교정된 해독틀을 야기하고, 이로써 단백질로의 mRNA의 번역이 조기에 종결되지 않음을 발견하였다. 돌연변이된 디스트로핀 전구-mRNA의 처리시의 업스트림 및 다운스트림 엑손의 연결이 유전자의 교정된 해독틀을 유지하는 경우에, 그 결과는 일부 활성이 유지된 짧은 내부 결실을 갖는 단백질에 대해 코딩된 mRNA이고, 이는 베커 표현형을 야기한다.
- [0013] 수해 동안, 디스트로핀 단백질의 해독틀을 변경하지 않는 엑손 또는 엑손들의 결실이 BMD 표현형을 야기할 것이고, 반면 프레임-이동 (frame-shift)을 야기하는 엑손 결실은 DMD를 야기할 것이다 (문헌 [(Monaco, Bertelson et al. 1988)]). 일반적으로, 해독틀을 변화시키고, 이에 따라 적절한 단백질 번역을 방해하는 점 돌연변이 및 엑손 결실을 포함하는 디스트로핀 돌연변이는 DMD를 야기한다. 또한 일부 BMD 및 DMD 환자는 엑손 결실이 포함된 다중 엑손을 가지는 것을 주지하여야 한다.
- [0014] 안티센스 올리고리보뉴클레오타이드로의 돌연변이체 디스트로핀 전구-mRNA 스플라이싱의 조절은 *시험관내* 및 *생체내* 모두에서 보고된 바 있다 (예를 들면, 문헌 [Matsuo, Masumura et al. 1991; Takeshima, Nishio et al. 1995; Pramono, Takeshima et al. 1996; Dunckley, Eperon et al. 1997; Dunckley, Manoharan et al. 1998; Wilton, Lloyd et al. 1999; Mann, Honeyman et al. 2002; Errington, Mann et al. 2003]) 참조).
- [0015] 안티센스 올리고머는 전구-mRNA의 특정 영역, 전형적으로 DMD 유전자의 돌연변이의 스킵핑을 유도하는 엑손을 표적화하고, 이에 의해 내부적으로 단축되었으나 아직 기능적인 디스트로핀 단백질의 생산을 가능하게 하는 프레임 내의 이러한 아웃오브프레임 돌연변이를 복구하도록 구체적으로 설계되었다. 이러한 안티센스 올리고머는 엑손 (소위 엑손 내부 서열) 내에서 또는 엑손으로부터 인트론의 일부를 가로지르는 스플라이스 공여체 또는 스플라이스 수용체 연결에서 완전하게 표적화되는 것으로 알려져 있다.
- [0016] DMD에 대한 이러한 안티센스 올리고머의 발견 및 개발은 선행 연구의 분야이었다. 이러한 개발은 하기로부터의 것을 포함한다: (1) 서호주 대학교 및 Sarepta Therapeutics (본 출원의 양수인): WO 2006/000057; WO 2010/048586; WO 2011/057350; WO 2014/100714; WO 2014/153240; WO 2014/153220; (2) Academisch Ziekenhuis Leiden/Prosensa Technologies (현재 BioMarin Pharmaceutical): WO 02/24906; WO 2004/083432; WO 2004/083446; WO 2006/112705; WO 2007/133105; WO 2009/139630; WO 2009/054725; WO 2010/050801; WO 2010/050802; WO 2010/123369; WO 2013/112053; WO 2014/007620; (3) 캐롤라이나 의학센터: WO 2012/109296; (4) Royal Holloway: 미국 출원 번호 61/096,073 및 61/164,978을 포함하고 이의 이익을 주장하는 특허 및 출원, 예컨대 US 8,084,601 및 US 2017-0204413 (4) JCR Pharmaceuticals 및 Matsuo: US 6,653,466; JP 2000-125448을 포함하고 이의 이익을 주장하는 특허 및 출원, 예컨대 US 6,653,467; JP 2000-256547을 포함하고 이의 이익을 주장하는 특허 및 출원, 예컨대 US 6,727,355; WO 2004/048570; (5) Nippon Shinyaku: WO 2012/029986; WO 2013/100190; WO 2015/137409; WO 2015/194520; 및 (6) Association Institut de

Myologie/Universite Pierre et Marie Curie/Universität Bern/Centre national de la Recherche Scientifique/Synthema AG; WO 2010/115993; WO 2013/053928.

[0017] 에테플리센은 해독물을 복구하고, 기능성의 더 짧은 형태의 디스트로핀 단백질을 생성하도록 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 DMD를 갖는 환자에서 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 51을 스킵핑하도록 설계된 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (PMO)이다. 미국 식품 의약품국 (FDA)은 2016년에 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 DMD 유전자의 확인된 돌연변이를 갖는 환자에서의 뒤센 근육 이상증 (DMD)의 치료를 위한 Exondys 51[™] (에테플리센)을 승인하였다.

[0018] 또한, DMD에 대한 세포-침투 펩타이드에 결합된 안티센스 올리고머의 발견 및 개발이 연구되고 있다 (PCT 공개 번호 WO 2010/048586; 문헌[Wu, B. et al., *The American Journal of Pathology*, Vol. 181 (2): 392-400, 2012]; 문헌[Wu, R. et al., *Nucleic Acids Research*, Vol. 35 (15): 5182-5191, 2007]; 문헌[Mulders, S. et al., *19th International Congress of the World Muscle Society*, Poster Presentation Berlin, October 2014]; 문헌[Bestas, B. et al., *The Journal of Clinical Investigation*, doi: 10.1172/JCI76175, 2014; Jearawiriyapaisarn, N. et al., *Molecular Therapy*, Vol. 16(9): 1624-1629, 2008]; 문헌[Jearawiriyapaisarn, N. et al., *Cardiovascular Research*, Vol. 85: 444-453, 2010]; 문헌[Moulton, H.M. et al., *Biochemical Society Transactions*, Vol. 35 (4): 826-828, 2007]; 문헌[Yin, H. et al., *Molecular Therapy*, Vol. 19 (7): 1295-1303, 2011; Abes, R. et al., *J. Pept. Sci.*, Vol. 14: 455-460, 2008]; 문헌[Lebleu, B. et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 60: 517-529, 2008]; 문헌[McCloy, G. et al., *Gene Therapy*, Vol. 13: 1373-1381, 2006]; 문헌[Alter, J. et al., *Nature Medicine*, Vol. 12 (2): 175-177, 2006]; 및 문헌[Youngblood, D. et al., *American Chemical Society, Bioconjugate Chem.*, 2007, 18 (1), pp 50-60] 참조).

[0019] 세포-침투 펩타이드 (CPP), 예를 들어, 아르기닌-풍부 펩타이드 수송 모이어티는 예를 들어 CPP에 결합된 안티센스 올리고머의 세포로의 침투를 향상시키는데 효과적일 수 있다.

[0020] 이러한 효과에도 불구하고, 엑손 51을 표적화하는 개선된 안티센스 올리고머 및 디스트로핀을 생성하고, DMD를 치료하는 치료 방법에 잠재적으로 유용한 상응하는 약제학적 조성물에 대한 필요성이 잔존한다.

발명의 내용

[0021] 본원에서 제공된 안티센스 올리고머 결합체는 CPP에 결합된 안티센스 올리고머 모이어티를 포함한다. 일 양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 안티센스 올리고머 결합체를 제공한다:

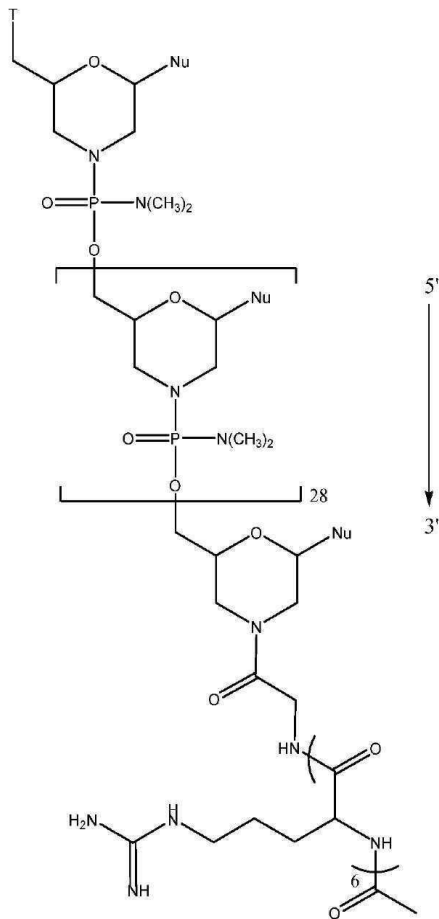
[0022] 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 스킵핑을 유도하기 위한 선택된 표적을 결합할 수 있는 30개의 하위단위의 길이의 안티센스 올리고머를 제공하며, 여기서 안티센스 올리고머는 어닐링 부위로서 표시된 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51 표적 영역에 상보적인 염기의 서열; 및

[0023] 링커 모이어티에 의해 안티센스 올리고머에 결합된 세포-침투 펩타이드 (CPP)을 포함한다.

[0024] 일 구현예에서, 어닐링 부위는 H51A(+66+95)이다.

[0025] 일 구현예에서, 안티센스 올리고머의 염기는 모르폴리노 고리 구조에 연결되며, 모르폴리노 고리 구조는 하나의 고리 구조의 모르폴리노 질소를 인접한 고리 구조의 5' 고리의 탄소에 연결하는 인-함유 하위단위간의 연결기에 의해 연결된다. 특정 구현예에서, 세포-침투 펩타이드는 6개의 아르기닌 단위("R₆")이고, 링커 모이어티는 글리신이다. 일 구현예에서, 안티센스 올리고머는 서열 번호: 1로 표시된 염기의 서열을 포함한다.

[0026] 또 다양한 양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식 (I)에 따른 것일 수 있는 안티센스 올리고머 결합체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다:



(I)

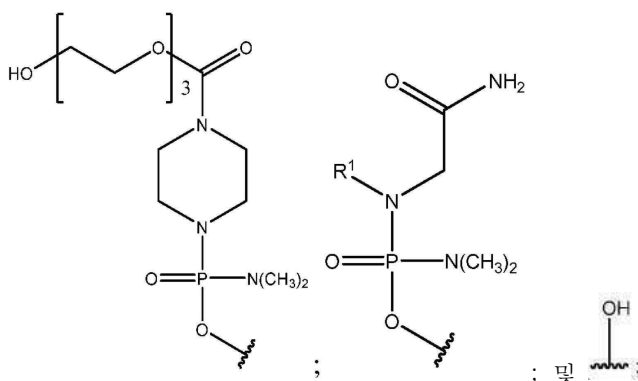
[0027]

[0028]

[0029]

각각의 Nu는 함께 취해서 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

T는 하기로부터 선택되는 모이어티이다:



[0030]

[0031]

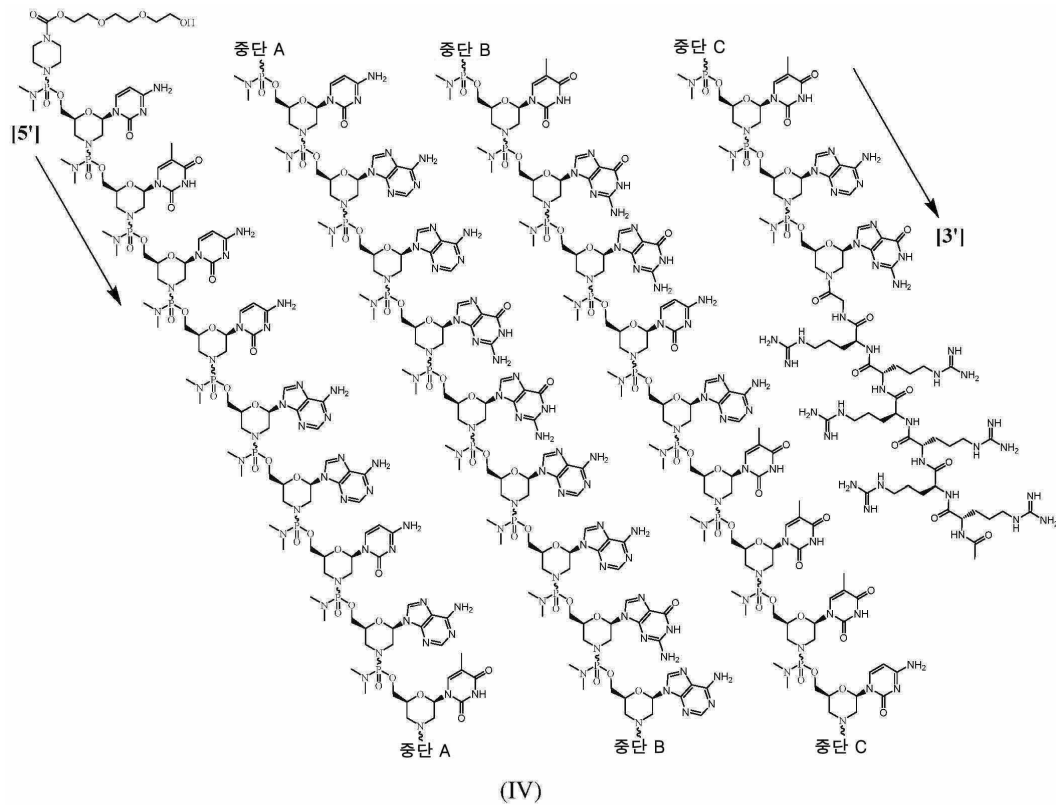
[0032]

[0033]

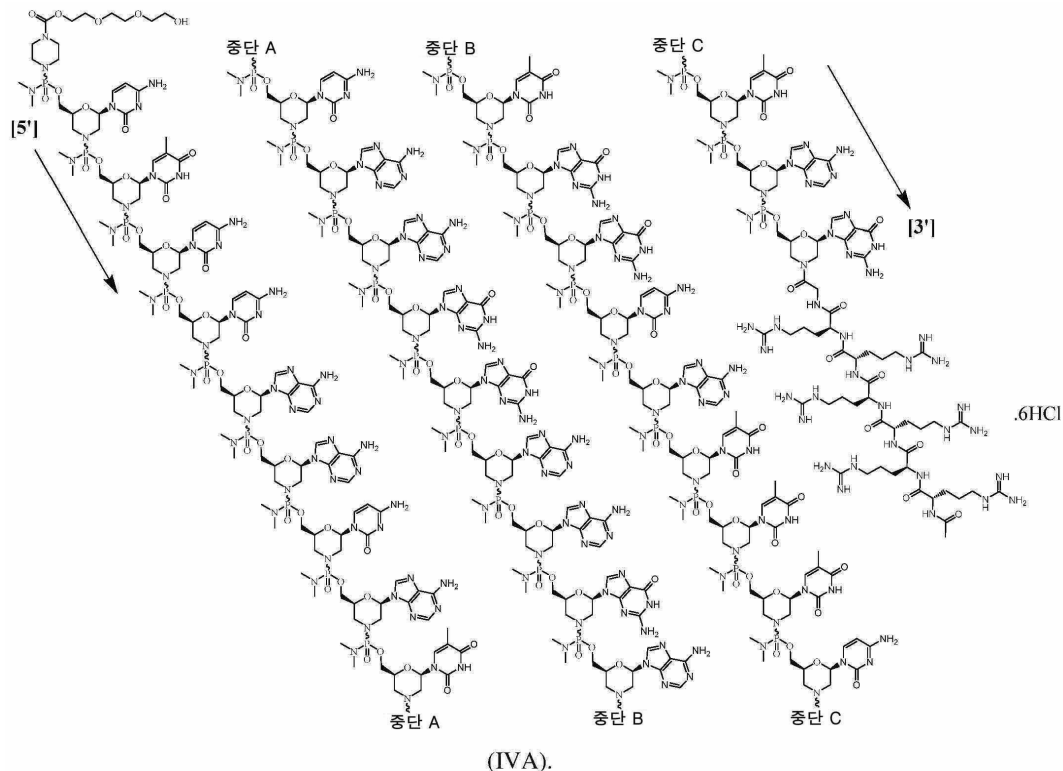
식 중, R¹는 C₁-C₆ 알킬이며;

상기 표적화 서열은 H51A(+66+95)로 표시된 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51 어닐링 부위에 상보적이다.

또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기 식(IV)의 안티센스 올리고머 결합체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다:



또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기 식(IVA)의 안티센스 올리고머 결합체를 제공한다:



또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 약제학적으로 허용가능한 담체는 인산염 완충액을 포함하는 염수 용액을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

또 다른 양태에서, 본 개시내용은 그것을 필요로 하는 대상체에서의 뒤센 근육 이상증 (DMD)의 치료 방법을 제공하며, 여기서 상기 대상체는 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖고, 상기 방법

은 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시내용은 또한 그것을 필요로 하는 대상체에서의 뒤센 근육 이상증 (DMD)의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체의 용도를 다루며, 여기서 상기 대상체는 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 가진다.

[0039] 다른 양태에서, 본 개시내용은 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서 디스트로핀 생산을 유도하기 위한 mRNA 해독들을 복구하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 다른 양태에서, 본 개시내용은 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서의 mRNA 처리 과정에서 디스트로핀 전구-mRNA으로부터 엑손 51을 배제하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 다른 양태에서, 본 개시내용은 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서의 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51을 결합하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0040] 다른 양태에서, 본 개시내용은 요법에서 사용하기 위한 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용은 뒤센 근육 이상증의 치료에서 사용하기 위한 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용은 요법에서 사용하기 위한 의약의 제조에서 사용하기 위한 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용은 뒤센 근육 이상증의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 제공한다.

[0041] 다른 양태에서, 본 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서의 뒤센 근육 이상증 (DMD)의 치료 방법이 제공되며, 여기서 상기 대상체는 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 가지며, 상기 키트는 적합한 컨테이너 내에 팩킹된 적어도 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체 및 이의 사용을 위한 설명서를 포함한다.

[0042] 이러한 그리고 다른 목적 및 특징은 본 개시내용의 하기 상세한 설명이 도면과 결합하여 관독되는 경우에 보다 완전하게 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0043] **도 1**은 정상 디스트로핀 전구-mRNA 및 성숙한 mRNA의 구간을 도시한다.
- 도 2**는 비정상 디스트로핀 전구-mRNA (DMD의 예) 및 생성된 비기능성, 불안정한 디스트로핀의 구간을 도시한다.
- 도 3**은 내부적으로 결실된 디스트로핀을 생성하기 위해, 엑손 51의 스킵핑, 전구-mRNA의 "인프레임" 관독의 복원에 대해 설계된 에테폴리센을 도시한다.
- 도 4**는 RT-PCR에 의해 측정된 바와 같은 치료후 96시간 시점에서 다양한 농도로의 PMO#1 및 PPMO#1에 의한 분화된 인간 근세포에서의 엑손 51 스킵핑의 백분율의 막대 그래프이다.
- 도 5a-5d**는 상이한 시점 [7일 (5a), 30일 (5b), 60일 (5c), 및 90일 (5d)]에 대한 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)로 처리된 mdx 마우스의 사두근에서의 디스트로핀 단백질을 측정하기 위한 웨스턴 블랏 분석의 대표적인 이미지를 제공한다.
- 도 6a**는 웨스턴 블랏 분석에 의해 결정된 바와 같이 주사후 90일에 걸친 mdx 마우스의 사두근에서의 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)에 의해 유도된 엑손 23 스킵핑의 백분율을 도시하는 선 그래프를 제공한다.
- 도 6b**는 RT-PCR에 의해 결정된 바와 같이 주사후 90일에 걸친 mdx 마우스의 사두근에서의 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)에 의해 유도된 엑손 23 스킵핑의 백분율을 도시하는 선 그래프를 제공한다.
- 도 7a-7d**는 상이한 시점 [7일 (7a), 30일 (7b), 60일 (7c), 및 90일 (7d)]에 대한 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)로 처리된 mdx 마우스의 횡격막에서의 디스트로핀 단백질을 측정하기 위한 웨스턴 블랏 분석의 대표적인 이미지를 제공한다.
- 도 8a**는 웨스턴 블랏 분석에 의해 결정된 바와 같은 주사후 90일에 걸친 mdx 마우스의 횡격막에서의 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)에 의해 유도된 야생형 디스트로핀의 백분율을 도시하는 선 그래프를 제공한다.
- 도 8b**는 RT-PCR에 의해 결정된 바와 같은 주사후 90일에 걸친 mdx 마우스의 횡격막에서의 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)에 의해 유도된 엑손 23 스킵핑의 백분율을 도시하는 선 그래프를 제공한다.

도 9a-9d는 상이한 시점 [7일 (9a), 30일 (9b), 60일 (9c), 및 90일 (9d)]에 대한 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)로 처리된 mdx 마우스의 심장에서의 디스트로핀 단백질을 측정하는 웨스턴 블랏 분석의 대표적인 이미지를 제공한다.

도 10a는 웨스턴 블랏 분석에 의해 결정된 바와 같은 주사후 90일에 걸친 mdx 마우스의 심장에서의 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)에 의해 유도된 야생형 디스트로핀의 백분율을 도시하는 선 그래프를 제공한다.

도 10b는 RT-PCR에 의해 결정된 바와 같은 주사후 90일에 걸친 mdx 마우스의 심장에서의 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)에 의해 유도된 엑손 23 스킵핑의 백분율을 묘사하는 선 그래프를 제공한다.

도 11은 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)에 의해 유도된 mdx 마우스 좌측 사두근에서의 디스트로핀을 나타내는 면역조직화학 분석을 제공한다.

도 12는 다양한 용량으로의 4주 동안 매주 PMO#1 또는 PPMO#1로 처리된 비인간 영장류에서의 엑손 51 스킵핑 백분율을 나타내는 선 그래프를 제공한다. 엑손 51 스킵핑 백분율은 RT-PCR에 의해 결정되는 바와 같이 횡격막 (좌측) 및 사두근 (우측)의 근육 샘플로부터 측정된다.

도 13은 다양한 용량으로의 4주 동안 매주 PMO#1 또는 PPMO#1로 처리된 비인간 영장류에서의 엑손 51 스킵핑 백분율을 나타내는 선 그래프를 제공한다. 엑손 51 스킵핑 백분율은 RT-PCR에 의해 결정되는 바와 같이 심장 (좌측) 및 십이지장 (우측)의 근육 샘플로부터 측정된다.

도 14는 다양한 용량으로의 4주 동안 매주 PMO#1 또는 PPMO#1로 처리된 비인간 영장류에서의 엑손 51 스킵핑 백분율을 나타내는 선 그래프를 제공한다. 엑손 51 스킵핑 백분율은 RT-PCR에 의해 결정되는 바와 같이 이두근 (좌측) 및 삼각근 (우측)의 근육 샘플로부터 측정된다.

도 15는 다양한 용량으로의 4주 동안 매주 PMO#1 또는 PPMO#1로 처리된 비인간 영장류에서의 엑손 51 스킵핑 백분율을 나타내는 선 그래프를 제공한다. 엑손 51 스킵핑 백분율은 RT-PCR에 의해 결정되는 바와 같은 식도 (좌측) 및 대동맥 (우측)의 근육 샘플로부터 측정된다.

도 16a-b는 상이한 용량: 40 mg/kg, 80 mg/kg, 및 120 mg/kg에 대한 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)로 처리된 mdx 마우스의 심장에서의 디스트로핀 단백질을 측정하는 웨스턴 블랏 분석의 대표적인 이미지를 제공한다.

도 17은 상이한 용량: 40 mg/kg, 80 mg/kg, 및 120 mg/kg에서의 주사후 30일 시점에서 웨스턴 블랏 분석에 의해 결정되는 바와 같은 mdx 마우스의 심장에서의 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)에 의해 유도된 야생형 디스트로핀의 백분율을 나타내는 막대 그래프를 제공한다.

도 18a-b는 상이한 용량 40 mg/kg, 80 mg/kg, 및 120 mg/kg에 대한 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)로 처리된 mdx 마우스의 횡격막에서의 디스트로핀 단백질을 측정하는 웨스턴 블랏 분석의 대표적인 이미지를 제공한다.

도 19는 상이한 용량: 40 mg/kg, 80 mg/kg, 및 120 mg/kg에서 주사후 30일 시점에서 웨스턴 블랏 분석에 의해 결정된 바와 같은 mdx 마우스의 횡격막에서의 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)에 의해 유도된 야생형 디스트로핀의 백분율을 도시하는 막대 그래프를 제공한다.

도 20a-b는 상이한 용량: 40 mg/kg, 80 mg/kg, 및 120 mg/kg에서 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)로 처리하는 mdx 마우스의 사두근에서의 디스트로핀 단백질을 측정하는 웨스턴 블랏 분석의 대표적인 이미지를 제공한다.

도 21은 상이한 용량: 40 mg/kg, 80 mg/kg, 및 120 mg/kg에서 주사후 30일 시점에서 웨스턴 블랏 분석에 의해 결정된 mdx 마우스의 사두근에서 PMO (PMO4225) 또는 PPMO (PPMO4225)로 유도된 야생형 디스트로핀의 백분율을 도시하는 막대 그래프를 제공한다.

도 22는 주사후 30 및 60 일 시점에 단일 40 mg/kg 용량의 PPMO#1으로 처리한 비-인간 영장류에서의 엑손 51 스킵핑 백분율을 나타내는 막대 그래프를 제공한다. 퍼센트 엑손 51 스킵핑은 RT-PCR에 의해 결정되는 바와 같은 사두근, 횡격막, 심장, 및 GI 관의 근육 샘플로부터 측정된다.

도 23은 PMO 합성 방법 B에 의해 수행된 커플링 사이클을 제공한다.

도 24는 mdx 마우스 및 야생형 마우스에서의 염수와 비교하여 PPMO (PPMO4225)에 의해 유도된 mdx 마우스 횡격막 및 심장에서의 디스트로핀 및 라미닌을 나타내는 면역조직화학 분석을 제공한다.

도 25는 RT-PCR에 의해 측정되는 바와 같은 치료후 96시간 시점에서 다양한 농도로의 PMO#1 및 PPMO#1에 의한 건강한 인간 근아세포에서의 엑손 51 스킵핑의 백분율의 막대 그래프를 제공한다. 오차 막대는 $\pm$ SD를 의미한다.

도 26은 RT-PCR에 의해 측정되는 바와 같은 치료후 96시간 시점에서 다양한 농도로의 PMO#1 및 PPMO#1에 의한 건강한 인간 근관세포에서 엑손 51 스킵핑의 백분율의 막대 그래프를 제공한다. 오차 막대는 $\pm$ SD를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 본 개시내용의 구현에는 일반적으로 인간 디스트로핀 유전자에서의 엑손 스킵핑을 유도하기 위해 특별하게 설계된 개선된 안티센스 올리고머 결합체, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다. 디스트로핀은 근육 기능에서의 생명 유지 관련 역할을 하고, 다양한 근육-관련 질환은 이러한 유전자의 돌연변이된 형태를 특징으로 한다. 그러므로, 특정 구현예에서, 본원에 기재된 개선된 안티센스 올리고머 결합체는 뒤센 근육 이상증 (DMD) 및 베커 근육 이상증 (BMD)에서 발견되는 인간 디스트로핀 유전자, 예컨대 돌연변이된 디스트로핀 유전자의 돌연변이된 형태에서의 엑손 스킵핑을 유도한다.
- [0045] 돌연변이에 의해 야기된 비정상적인 mRNA 스플라이싱 사건으로 인하여, 이러한 돌연변이된 인간 디스트로핀 유전자는 불완전 디스트로핀 단백질을 발현하거나 또는 전혀 측정가능한 디스트로핀을 발현하지 않고, 다양한 형태의 근육 이상증을 유발하는 질병을 발현시킨다. 이러한 질병을 치료하기 위해, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 돌연변이된 인간 디스트로핀 유전자의 사전-가공된 mRNA의 선택된 영역에 대해 혼성화되고, 그렇지 않으면 비정상적으로 스플라이싱된 디스트로핀 mRNA에서 엑손 스킵핑 및 차별적인 스플라이싱을 유도하고, 이에 의해 근육 세포가 기능적 디스트로핀 단백질을 인코딩하는 mRNA 전사체를 생성하게 한다. 특정 구현예에서, 생성된 디스트로핀 단백질은 "야생형" 형태의 디스트로핀이 아닌, 절단되었으나 아직 기능적인 형태의 디스트로핀이다.
- [0046] 근육 세포에서의 기능적 디스트로핀 단백질의 수준을 증가시킴으로써, 이러한 관련된 구현예는 근육 이상증, 특히 근육 이상증의 형태의 것, 예컨대 비정상적인 mRNA 스플라이싱으로 인한 불완전 디스트로핀 단백질의 발현을 특징으로 하는 DMD 및 BMD의 예방 및 치료에 있어서 유용하다. 본원에 기재된 특정 안티센스 올리고머 결합체는 추가로 다른 올리고머에 대한 개선된 디스트로핀-엑손-특이적 표적화를 제공하고, 이에 의해 관련된 형태의 근육 이상증의 대안적인 치료 방법에 대해 상당한 그리고 실질적인 장점을 제공한다.
- [0047] 따라서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 안티센스 올리고머 결합체에 관한 것이다:
- [0048] 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 스킵핑을 유도하기 위한 선택된 표적을 결합할 수 있는 30개의 하위단위의 길이의 안티센스 올리고머를 제공하며, 여기서 안티센스 올리고머는 어닐링 부위로서 표시된 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51 표적 영역에 상보적인 염기의 서열; 및
- [0049] 링커 모이어티에 의해 안티센스 올리고머에 결합된 세포-침투 펩타이드 (CPP).
- [0050] 일 구현예에서, 어닐링 부위는 H51A(+66+95)이다.
- [0051] 일 구현예에서, 안티센스 올리고머의 염기는 모르폴리노 고리 구조에 연결되며, 모르폴리노 고리 구조는 하나의 고리 구조의 모르폴리노 질소를 인접한 고리 구조의 5' 고리와 탄소에 연결하는 인-함유 하위단위간의 연결기에 의해 연결된다. 특정 구현예에서, 세포-침투 펩타이드는 R₆이고, 링커 모이어티는 글리신이다. 일 구현예에서, 안티센스 올리고머는 서열 번호: 1로 표시된 염기 서열을 포함하며, 각각의 티민 염기(T)는 선택적으로 우라실 염기(U)이다.
- [0052] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 당해 분야의 숙련자에게 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에서 기재된 것과 유사하거나 또는 동일한 임의의 방법 및 물질이 본 개시내용의 실시 또는 실험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 기재되어 있다. 본 개시내용의 목적을 위해, 하기 용어들이 하기에 정의되어 있다.
- [0053] **I. 정의**
- [0054] "약"은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변화되는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

- [0055] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "알킬"은, 달리 구체화되지 않는 한, 포화된 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소를 지칭한다. 특정 구현예에서, 알킬기는 일차, 이차, 또는 삼차 탄화수소이다. 특정 구현예에서, 알킬기는 1 내지 10개의 탄소 원자, 즉, C_1 내지 C_{10} 알킬을 포함한다. 특정 구현예에서, 알킬기는 1 내지 6개의 탄소 원자, 즉, C_1 내지 C_6 알킬을 포함한다. 특정 구현예에서, 알킬기는 메틸, CF_3 , CCl_3 , $CFCI_2$, CF_2Cl , 에틸, CH_2CF_3 , CF_2CF_3 , 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, sec-부틸, t-부틸, 펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 헥실, 이소헥실, 3-메틸펜틸, 2,2-디메틸부틸, 및 2,3-디메틸부틸로 이루어진 군으로부터 선택된다. 상기 용어는 할로겐화된 알킬기를 포함하여 치환된 및 비치환된 알킬기 모두를 포함한다. 특정 구현예에서, 알킬기는 플루오르화된 알킬기이다. 알킬기가 치환될 수 있는 모이어티의 비제한적인 예는 할로젠 (플루오로, 클로로, 브로모, 또는 아이오도), 하이드록실, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설폰산, 설페이트, 포스포산, 포스페이트, 또는 포스포네이트 (필요에 따라 비보호되거나 또는 보호됨)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 이는 당해 분야의 숙련자에게 알려진 바와 같이 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991]에 교시되어 있고, 이는 참조로 본원에 편입되어 있다.
- [0056] 대상체 또는 환자와 관련하여 본 명세서에서 사용된 바와 같은 문구 "엑손 51 스킵핑이 허용가능한"은 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51의 스킵핑이 없고, 해독틀이 아웃오브프레임이 되게 하며, 이에 의해 대상체 또는 환자가 기능성 또는 반-기능성 디스트로핀을 생성할 수 없게 하는 전구-mRNA의 번역을 방지하는, 디스트로핀 유전자에서의 하나 이상의 돌연변이를 갖는 대상체 및 환자를 포함하는 것으로 의도된다. 엑손 51 스킵핑이 허용가능하게 하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이의 예는 예를 들면, 엑손 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 및 52-63에 돌연변이를 포함한다(Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database, Leiden University Medical Center, The Netherlands). 환자가 엑손 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자에서의 돌연변이를 가지는지 여부를 결정하는 것은 충분히 당해 분야의 숙련가의 능력 내의 것이다 (예를 들면, 문헌 [Aartsma-Rus et al. (2009) Hum Mutat. 30:293-299; Gurvich et al., Hum Mutat. 2009; 30(4) 633-640; and Fletcher et al. (2010) Molecular Therapy 18(6) 1218-1223] 참조).
- [0057] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "올리고머"는 하위단위 간의 연결기에 의해 연결된 하위단위의 서열을 지칭한다. 특정 경우에, 용어 "올리고머"는 "안티센스 올리고머"와 관련하여 사용된다. "안티센스 올리고머"에 대해, 각각의 하위단위는 하기로 이루어진다: (i) 리보오스 당 또는 이의 유도체; 및 (ii) 단, 서브 유닛, 서브 유닛 간 결합 또는 이 둘 모두 자연 발생적이지 않는 조건으로, 염기쌍 모이어티의 순서가 표적화 서열 내에 핵산:올리고머 헤테로듀플렉스를 형성하도록 왓슨-크릭 염기 페어링(Watson-Crick base pairing)에 의해 핵산 (전형적으로 RNA)에서 표적화 서열에 상보적인 염기 서열을 형성하도록 이에 결합된 핵염기. 특정 구현예에서, 안티센스 올리고머는 PMO이다. 다른 구현예에서, 안티센스 올리고머는 2'-O-메틸 포스포로티오에이트이다. 다른 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머는 펩타이드 핵산 (PNA), 잠금 핵산 (LNA), 또는 브릿징된 핵산 (BNA) 예컨대 2'-O,4'-C-에틸렌-브릿징된 핵산 (ENA)이다. 추가의 예시적인 구현예는 본원에 기재되어 있다.
- [0058] 용어들 "상보적" 및 "상보성"은 왓슨-크릭 염기 페어링 법칙에 의해 서로 관련된 2개 이상의 올리고머 (즉, 각각은 핵염기 서열을 포함함)을 지칭한다. 예를 들어, 핵염기 서열 "T-G-A (5'→3') "은 핵염기 서열 "A-C-T (3'→5') "에 상보적이다. 상보성은 "부분적"일 수 있고, 이에서 주어진 핵염기 서열의 전체 미만의 핵염기가 염기 페어링 법칙에 따라 다른 핵염기 서열과 매칭된다. 예를 들어, 일부 구체 예에서, 주어진 핵염기 서열과 다른 핵염기 서열 간의 상보성은 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95%일 수 있다. 또한, 주어진 핵염기 서열과 다른 핵염기 서열 사이의 "완전한" 또는 "완벽한" (100%) 상보성이 있어 실시예를 계속할 수 있다. 핵염기 서열 사이의 상보성의 정도는 서열 사이의 혼성화의 효율 및 강도에 대해 유의미한 효과를 가진다.
- [0059] 용어 "유효량" 및 "치료적 유효량"은 본원에서 상호교환적으로 사용되고 원하는 치료 효과를 생성하는데 유효한 단일 용량으로서 또는 일련의 용량의 일부로서 포유동물 대상체에게 투여되는 치료 화합물, 예컨대 안티센스 올리고머의 양을 지칭한다.
- [0060] 안티센스 올리고머의 경우, 이러한 효과는 전형적으로 선택된 표적화 서열의 자연 스플라이싱 처리 또는 번역을 억제하거나 또는 임상적으로 유의미한 양의 디스트로핀 (통계적 유의도)를 생성함으로써 일어난다.
- [0061] 일부 구현예에서, 유효량은 대상체를 치료하기 위한 일정 기간 동안 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 적어도 10 mg/kg 또는 적어도 20 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 정상의 적어도 20%로 대상체에서의 디스트로핀-양성 섬유의 수를 증가시키는 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 적어도 20 mg/kg이다. 특정 구현

예에서, 유효량은 건강한 유사집단에서 환자에서 예를 들어 6 MWT에 있어서의 20% 감소의 보행 거리 (walking distance)를 안정화시키거나, 유지하거나 또는 개선하는 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 적어도 10 mg/kg 또는 적어도 20 mg/kg이다. 다양한 구현예에서, 유효량은 적어도 10 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 적어도 20 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 25 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 또는 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 약 10 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 30 mg/kg 또는 약 50 mg/kg이다. 또 다른 양태에서, 유효량은 이에 의해 대상체에서 정상의 적어도 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 까지 디스트로핀-양성 섬유의 수를 증가시키고, 건강한 유사집단에서 환자에서 예를 들어 6 MWT에 있어서의 20% 감소의 워킹 거리를 안정화시키거나 또는 개선하기 위한 적어도 24 주, 적어도 36 주, 또는 적어도 48 주 동안의 적어도 적어도 약 10 mg/kg, 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30mg/kg, 또는 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 치료는 환자에서 정상의 20-60%, 또는 30-50%까지 디스트로핀-양성 섬유의 수를 증가시킨다.

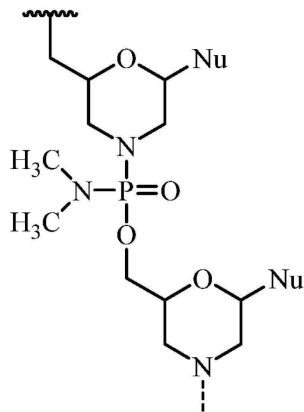
[0062] "향상시킨다" 또는 "향상시키는", 또는 "증가시킨다" 또는 "증가하는", 또는 "자극한다" 또는 "자극하는"은 일반적으로 안티센스 올리고머 결합체가 없는 또는 대조군 화합물에 의해 야기된 반응과 비교되는 바와 같은 세포 또는 대상체에서의 더 큰 생리적 반응 (즉, 다운스트림 효과)을 생성하거나 또는 야기하는 하나 이상의 안티센스 올리고머 결합체 또는 약제학적 조성물의 능력을 지칭한다. 보다 큰 생리적 반응은 기능적 형태의 디스트로핀 단백질의 증가된 발현, 또는 기술 분야에서의 이해 및 본원의 설명으로부터 자명한 다른 반응 중에서 근육 조직에서의 증가된 디스트로핀-관련된 생물학적 활성을 포함할 수 있다. 증가된 근육 기능은 또한 측정될 수 있고, 이는 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%까지의 근육 기능에서의 증가 또는 개선을 포함한다. 기능적 디스트로핀을 발현하는 근육 섬유의 백분율이 또한 측정될 수 있고, 이는 근육 섬유의 약 1%, 2%, 5%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%에서의 증가된 디스트로핀 발현을 포함한다. 예를 들어, 대략 40%의 근육 기능 개선은 섬유의 25-30%가 디스트로핀을 발현하는 경우에 발생할 수 있다는 것이 나타났다 (예를 들면, 문헌 [DelloRusso et al, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002] 참조). "증가된" 또는 "향상된" 양은 전형적으로 "통계적으로 상당한" 양이고, 안티센스 올리고머 결합체 부재 (제제의 부재) 또는 대조군 화합물에 의해 생성된 양의 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50배 이상 (예를 들면, 500, 1000배, 그 사이의 1 초과와 모든 정수 및 소수점 포함), 예를 들면, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 등)의 증가를 포함한다.

[0063] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "기능" 및 "기능적" 등은 생물학적, 효소적, 또는 치료적 기능을 지칭한다.

[0064] "기능적" 디스트로핀 단백질은 전형적으로 DMD 또는 BMD를 갖는 특정 대상체에 존재하는 변경된 또는 "불완전" 형태의 디스트로핀 단백질과 비교하여 그렇지 않으면 근육 이상증을 특징으로 하는 근육 조직의 진행성 열화를 감소시키는데 충분한 생물학적 활성을 갖는 디스트로핀 단백질을 일반적으로 지칭한다. 특정 구현예에서, 기능적 디스트로핀 단백질은 본 기술분야의 일상적인 기술에 따라 측정된 바와 같은 야생형 디스트로핀의 시험관내 또는 생체내 생물학적 활성의 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% (그 사이의 모든 정수 포함)을 가질 수 있다. 일 예로서, 근육 배양액에서의 디스트로핀-관련된 활성은 시험관내에서 근관세포 크기, 근원섬유 조직화 (또는 탈조직화), 수축성 활성, 및 아세틸콜린 수용체의 자발적인 클러스터링에 따라 측정될 수 있다 (예를 들면, 문헌 [Brown et al., Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999] 참조). 동물 모델은 질환의 발병을 연구하기 위한 귀중한 자원이고, 디스트로핀-관련된 활성을 시험하기 위한 수단을 제공한다. DMD 연구에 대해 가장 널리 사용된 동물 모델 중 2개는 mdx 마우스 및 골든 리트리버 근육 이상증 (GRMD) 개이고, 이 둘 모두는 디스트로핀 음성이다 (예를 들면, 문헌 [Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003] 참조). 이러한 그리고 다른 동물 모델은 다양한 디스트로핀 단백질의 기능적 활성을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 디스트로핀의 절단된 형태, 예컨대 본 개시내용의 특정 엑손-스킵핑 안티센스 올리고머 결합체의 투여 후에 생산되는 형태를 포함한다.

[0065] 용어 "불일치(mismatch)" 또는 "불일치한다(mismatches)"는 염기 페어링 법칙에 따라 표적 전구-mRNA와 매칭되지 않는 올리고머 핵염기 서열에서의 하나 이상의 핵염기 (인접 또는 분리됨)를 지칭한다. 완전한 상보성이 종종 바람직한 한편, 일부 구현예는 표적 전구-mRNA와 관련하여 하나 이상 그러나 바람직하게는 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 불일치를 포함할 수 있다. 올리고머 내의 임의의 위치에서의 변화가 포함된다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 내측에서의 말단 변화 근처의 핵염기 서열에서의 변화를 포함하고, 존재하는 경우 전형적으로 5' 및/또는 3' 말단의 약 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 하위단위 내에 존재한다.

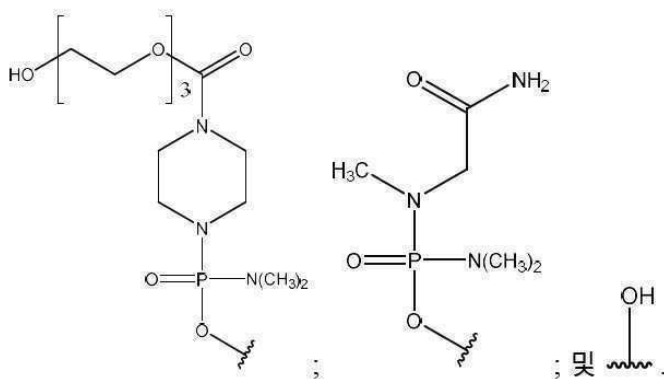
[0066] 용어 "모르폴리노", "모르폴리노 올리고머", 및 "PMO"는 하기 일반 구조의 포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고머를 지칭한다:



[0067]

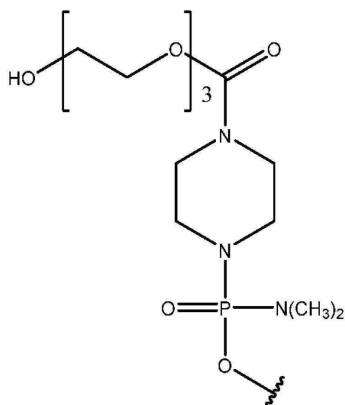
[0068] 이는 문헌 [Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997)]의 도 2에 기재되어 있다. 본 명세서에서 기재된 바와 같은 모르폴리노는 전술한 일반적인 구조의 모든 입체이성질체 및 호변체를 포함한다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조 및 결합 특징은 미국특허번호: 5,698,685; 5,217,866; 5,142,047; 5,034,506; 5,166,315; 5,521,063; 5,506,337; 8,076,476; 및 8,299,206에 상세되어 있고, 이들 모두는 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0069] 특정 구현예에서, 모르폴리노는 올리고머의 5' 또는 3'말단에서 "테일(tail)" 모이어티와 결합되어 그것의 안정성 및/또는 용해도를 증가시킨다. 예시적인 테일은 하기의 것을 포함한다:



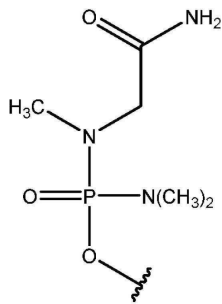
[0070]

[0071] 상기 예시적인 테일 모이어티 중에서, "TEG" 또는 "EG3"는 하기 테일 모이어티를 지칭한다:



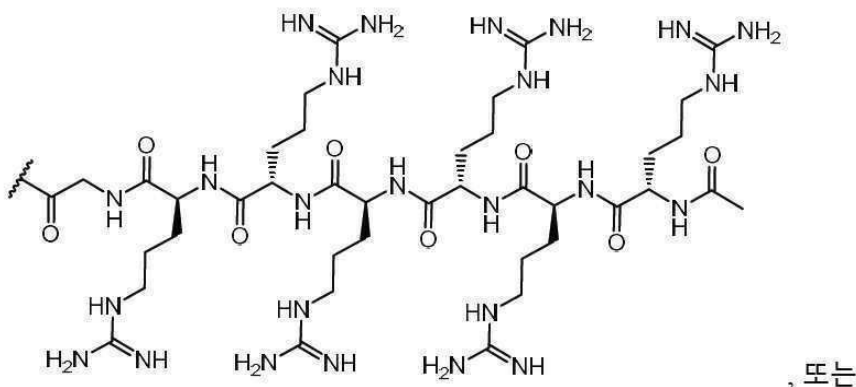
[0072]

[0073] 상기 예시적인 테일 모이어티 중에서, "GT"는 하기 테일 모이어티를 지칭한다:

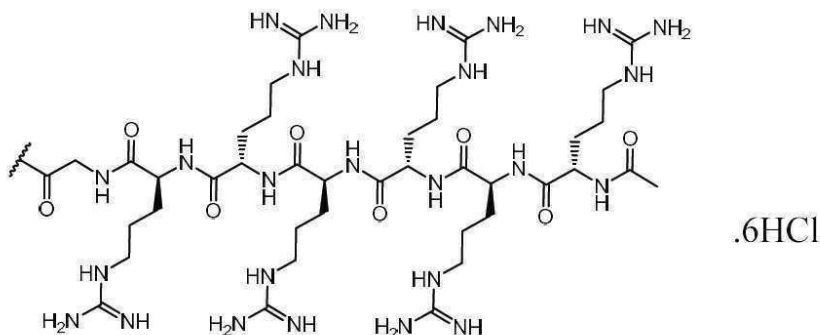


[0074]

[0075] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "-G-R₆" 및 "-G-R₆-Ac"는 상호교환적으로 사용되고, 본 개시내용의 안티센스 올리고머에 결합된 펩타이드 모이어티를 지칭한다. 다양한 구현예에서, "G"는 아미드 결합에 의해 "R₆"에 접합된 글리신 잔기를 나타내고, 각각의 "R"은 "R₆"가 아미드 결합에 의해 함께 결합된 여섯(6) 개의 아르기닌 잔기를 의미하도록 아미드 결합에 의해 함께 결합된 아르기닌 잔기를 나타낸다. 아르기닌 잔기는 임의의 입체 구조를 가질 수 있고, 예를 들어, 아르기닌 잔기는 L-아르기닌 잔기, D-아르기닌 잔기, 또는 D- 및 L-아르기닌 잔기의 혼합물일 수 있다. 특정 구현예에서, "-G-R₆" 또는 "-G-R₆-Ac"는 본 개시내용의 PMO 안티센스 올리고머의 3' 최말단 모르폴리노 서브유닛의 모르폴린 고리 질소에 결합된다. 일부 구현예에서, "-G-R₆" 또는 "-G-R₆-Ac"는 본 개시내용의 안티센스 올리고머의 3' 말단에 결합되고, 이는 하기 화학식의 것이다:



[0076]



[0077]

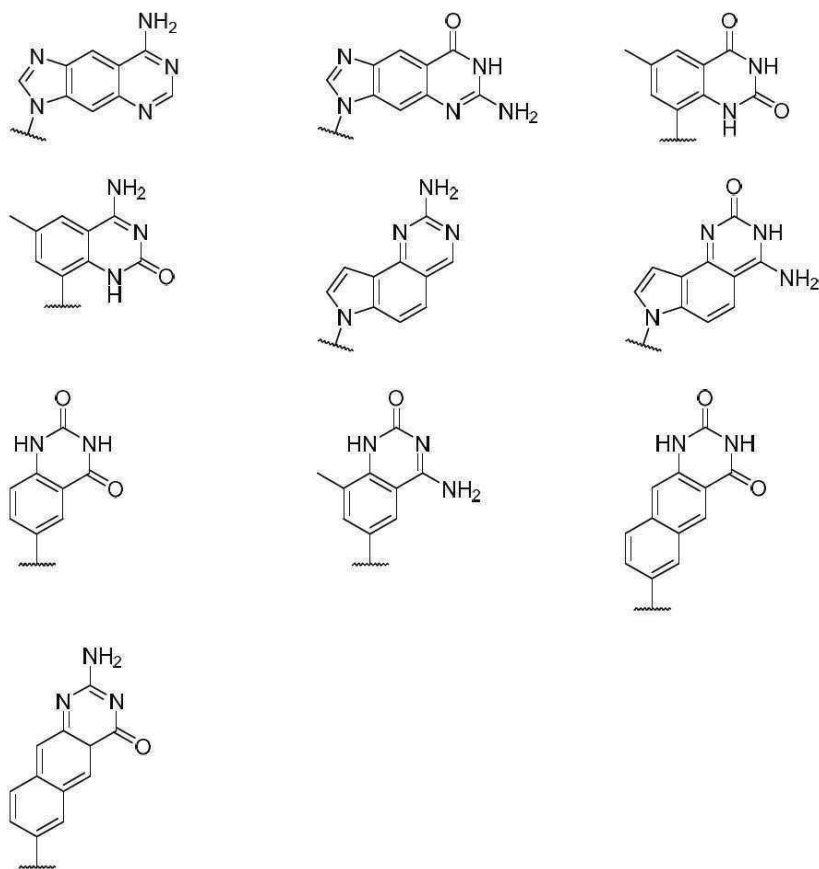
[0078] 용어 "핵염기" (Nu), "염기 페어링 모이어티" 또는 "염기"는 자연 발생된 것으로 발견된 퓨린 또는 피리미딘, 또는 "원시적(native)" DNA 또는 RNA (예를 들어, 우라실, 티민, 아데닌, 시토신, 및 구아닌)뿐만 아니라 이들 자연 발생 퓨린 및 피리미딘의 유사체를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 이들 유사체는 올리고머에 개선된 특성, 예컨대 결합 친화도를 부여할 수 있다. 예시적인 유사체는 하이포잔틴 (이노신의 기본 구성요소); 2,6-디아미노퓨린; 5-메틸 시토신; C5-프로피닐-변형된 피리미딘; 10-(9-(아미노에톡시)펜옥사지닐) (G-클램프) 및 기타 동종의 것을 포함한다.

[0079] 염기 페어링 모이어티의 추가의 예는 비제한적으로 우라실, 티민, 아데닌, 시토신, 구아닌 및 하이포잔틴 (이노

신) (아실 보호기에 의해 보호된 그것의 각각의 아미노기를 가짐), 2-플루오로우라실, 2-플루오로시토신, 5-브로모우라실, 5-아이오도우라실, 2,6-디아미노퓨린, 아자시토신, 피리미딘 유사체 예컨대 슈도이소시토신 및 슈도우라실 및 다른 변형된 핵염기 예컨대 8-치환된 퓨린, 잔틴, 또는 하이포잔틴 (후자 2개는 자연 변성 생성물임)을 포함한다. 문헌[Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048; Limbach *et al.* Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196]; 및 문헌 [Revankar and Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313]에 개시된 변이된 핵염기가 또한 고려되며, 이들의 내용은 참조로 본원에 편입된다.

[0080]

염기 페어링 모이어티의 추가의 예는 비제한적으로, 하나 이상의 벤젠 고리가 첨가된 팽창된-크기 핵염기를 포함한다. 이의 내용이 본원에 참조로 편입된 문헌 [Glen Research catalog (www.glenresearch.com)]; 문헌 [Krueger *et al.*, Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150; Kool, *ET*, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943]; 문헌 [Benner S.A., *et al.*, Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733]; 및 문헌 [Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627]에 기재된 핵염기 대체물은 본원에 기재된 안티센스 올리고머 결합체에 유용한 것으로 고려된다. 팽창된-크기 핵염기의 예는 하기에 나타낸 것뿐만 아니라 이의 호변이성질체 형태를 포함한다.



[0081]

[0082]

본 명세서에서 사용된 바와 같이 어구 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여된"은 보통 주사에 의한 장관 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고, 비제한적으로, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 관절내, 안와내, 심장내, 진피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막밑, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.

[0083]

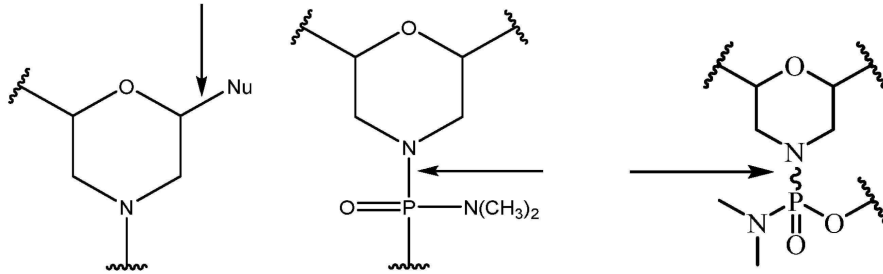
명백하게 하기 위해, 예를 들어, 화학식 (IV)을 포함하는 본 개시내용의 구조는 5'에서 3'까지 연속되며, 조밀한 형태로 전체 구조를 도시하는 편의를 위해, 다양한 설명 중단 표지 "중단 A", "중단 B", 및 "중단 C"가 포함되었다. 본 기술분야의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이, 예를 들면 "중단 A"의 각각의 표시는 이러한 지점에서의 구조의 도시의 연속을 나타낸다. 본 기술분야의 숙련가는 상기 구조에서의 "중단 B" 및 "중단 C"에 대한 각 경우에 대해 상기의 것이 적용됨을 이해한다. 그러나, 중단 표시의 어느 것도 당업자에게 이들이 상기 구조의 실제 불연속을 의미하는 것을 나타내는 것으로 의도되지 않는다.

[0084]

본 명세서에서 사용된 바와 같이, 구조 화학식 내에 사용된 한 세트의 괄호는 괄호 사이의 구조 특징이 반복된다. 일부 구현예에서, 사용되는 괄호는 "[" 및 "]"일 수 있고, 특정 구현예에서, 반복 구조 특징을 나타내기 위

해 사용된 괄호는 "(" 및 ")"일 수 있다. 일부 구현예에서, 괄호 사이의 구조 특징의 반복의 수는 괄호 외부에 나타난 수 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7 등이다. 다양한 구현예에서, 괄호 사이의 구조 특징의 반복의 수는 괄호 외부에 나타난 변수 예컨대 "Z"로 나타난다.

[0085] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 구조 화학식 내의 키랄 탄소 또는 인 원자에 대해 도시된 직선형 결합 또는 구불구불한 결합은 키랄 탄소 또는 인의 구조가 정의되지 않으며, 모든 형태의 키랄 중심을 포함하도록 의도된다. 이러한 예시의 예들은 하기에 도시되어 있다.



[0086]

[0087] 어구 "약제학적으로 허용가능한"은 물질 또는 조성물이 제형을 포함하는 다른 성분, 및/또는 이로 치료되는 대상체와 화학적으로 및/또는 독물학적으로 상용성이어야 함을 의미한다.

[0088] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 어구 "약제학적으로-허용가능한 담체"는 임의의 유형의 무독성, 불활성 고체, 반-고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질 또는 제형 보조제를 의미한다. 약제학적으로 허용가능한 담체로서 역할을 할 수 있는 물질의 일부 예는 당류 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 그것의 유도체 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말화된 트라가칸스; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일 예컨대 땅콩 오일, 목화씨 오일, 잇꽃 오일, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 대두 오일; 글리콜; 그와 같은 프로필렌 글리콜; 에스테르 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제 예컨대 수산화마그네슘 및 알루미늄 수산화물; 알긴산; 무발열원 물; 등장성 염수; 링거액; 에틸 알코올, 및 포스페이트 완충 용액이고, 무독성 양립가능한 윤활제 예컨대 나트륨 라우릴 설페이트 및 스테아르산마그네슘; 착색제; 이형제; 코팅제; 감미제; 풍미제; 방향제; 보존제; 및 산화방지제이다(제형자의 판단에 따라).

[0089] 디스트로핀 합성 또는 생산과 관련된 용어 "복원"은 일반적으로 본 명세서에서 기재된 바와 같은 안티센스 올리고머 결합체로의 치료 이후에 근육 이상증을 갖는 환자에서의 디스트로핀의 절단된 형태를 포함하는 디스트로핀 단백질의 생산을 지칭한다. 일부 구현예에서, 치료는 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% (그 사이의 모든 정수 포함)까지의 환자에서의 새로운 디스트로핀 생산에서의 증가를 유발한다. 일부 구현예에서, 치료는 대상체에서 정상적 적어도 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 95% 내지 100%까지 디스트로핀-양성 섬유의 수를 증가시킨다. 다른 구현예에서, 치료는 대상체에서 정상적의 약 20% 내지 약 60%, 또는 약 30% 내지 약 50%까지 디스트로핀-양성 섬유의 수를 증가시킨다. 치료 이후의 환자에서의 디스트로핀-양성 섬유의 백분율은 공지된 기술을 사용하는 근육 생검에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 근육 생검은 환자에서 적합한 근육, 예컨대 팔이두근 근육으로부터 취해질 수 있다.

[0090] 양성 디스트로핀 섬유의 백분율의 분석은 전처리 및/또는 후처리 또는 시점 치료 과정 전반에 걸쳐 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 후처리 생검은 전처리 생검으로부터 반대측 근육으로부터 취해진다. 전처리 및 후처리 디스트로핀 발현 분석은 디스트로핀에 대한 임의의 적합한 검정을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역조직화학 검출은 디스트로핀에 대한 마커인 항체, 예컨대 단클론성 또는 다클론성 항체를 사용하여 근육 생검으로부터 조직 절편에 대해 수행된다. 예를 들어, 디스트로핀에 대해 고도의 감수성 마커인 MANDYS106 항체가 사용될 수 있다. 임의의 적합한 2차 항체가 사용될 수 있다.

[0091] 일부 구현예에서, 디스트로핀-양성 섬유 백분율은 양성 섬유의 수를 계수된 총 섬유로 나누어 계산된다. 정상 근육 샘플은 100%의 디스트로핀-양성 섬유를 가진다. 따라서, 디스트로핀-양성 섬유 백분율은 정상적 백분율로서 표현될 수 있다. 전처리 근육뿐만 아니라 복귀 돌연변이체 섬유에서의 미량 수준의 디스트로핀의 존재를 조절하기 위해서, 기준선은 후처리 근육에서의 디스트로핀-양성 섬유를 계수하는 경우에 환자로부터의 전처리 근육의 일부를 사용하여 설정될 수 있다. 이는 이 환자에서의 후처리 근육의 일부에서의 디스트로핀-양성 섬유를 계수하기 위한 한계값으로서 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 항체-염색된 조직 절편은 또한 Bioquant 이미지 분석 소프트웨어 (Bioquant Image Analysis Corporation, 테네시주 내슈빌 소재)를 사용하는 디스트로핀 정량

화를 위해 사용될 수 있다. 전체 디스트로핀 형광 신호 강도는 정상의 백분율로서 기록될 수 있다. 또한, 단클론성 또는 다클론성 항-디스트로핀 항체를 사용하는 웨스턴 블랏 분석이 디스트로핀 양성 섬유의 백분율을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, Leica Biosystems로부터의 항 디스트로핀 항체 NCL-Dys1이 사용될 수 있다. 또한, 디스트로핀-양성 섬유의 백분율은 사르코글리칸 복합체 (β , γ) 및/또는 뉴런의 NOS의 성분의 발현을 결정하기 위해 분석될 수 있다.

[0092] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머로 결합체의 치료는 치료 없이 예상될 수 있는 DMD를 앓는 환자에서의 진행성 호흡 근육 기능이상 및/또는 부전을 느리게 하거나 또는 감소시킨다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체로의 치료는 치료 없이 예상될 수 있는 호흡 지원 (ventilation assistance)에 대한 필요성을 감소시키거나 또는 근절시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 질환의 추적 과정을 위한 호흡 기능의 측정뿐만 아니라 잠재적인 치료 개입의 평가는 최대 흡기압 (MIP), 최대 날숨압 (MEP) 및 노력성 폐활량 (FVC)을 포함한다. MIP 및 MEP는 사람이 흡입 및 날숨 각각의 과정에서 발생할 수 있는 압력의 수준을 측정하고, 호흡기 근육 강도의 감수성 측정값이다. MIP는 횡경막 근육 약화의 측정값이다.

[0093] 일부 구현예에서, MEP는 MIP 및 FVC를 포함하는 다른 폐 기능 시험에서의 변화 이전에 감소될 수 있다. 특정 구현예에서, MEP는 호흡 기능이상의 초기 지표일 수 있다. 특정 구현예에서, FVC는 최대 흡기 이후에 강제 날숨 과정에서 배출되는 공기의 총 부피를 측정하기 위해 사용될 수 있다. DMD를 앓는 환자에서, FVC는 십대 초기까지 신체 성장과 함께 동반하여 증가된다. 그러나, 성장이 느려지거나 또는 질환 진행, 및 근육 약화 진행에 의해 성장이 저해됨에 따라, 노력성 폐활량은 감소 단계로 들어가고, 10 내지 12세 나이에서 1년마다 약 8 내지 8.5 백분율의 평균 속도로 감소된다. 특정 구현예에서, 예상된 MIP 백분율 (증량에 대해 조정된 MIP), 예상된 MEP 백분율 (나이에 대해 조정된 MEP) 및 예상된 FVC 백분율 (나이 및 키에 대해 조정된 FVC)는 지원된 분석이다.

[0094] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체" 및 "환자"는 증상을 나타내거나, 또는 증상을 나타낼 위험이 있고, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체로 처리될 수 있는 임의의 동물, 예컨대 DMD 또는 BMD, 또는 이러한 질병 (예를 들면, 근육 섬유 손실)과 관련된 임의의 증상을 가지거나 또는 가질 위험이 있는 대상체(또는 환자)를 포함한다. 적합한 대상체 (또는 환자)는 실험실 동물 (예컨대 마우스, 랫트, 토끼, 또는 기니아 피그), 농장 동물, 및 가축 또는 애완동물 (예컨대 고양이 또는 개)를 포함한다. 비-인간 영장류 및 바람직하게는 인간 환자(또는 대상체)가 포함된다. 또한, 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체(또는 환자)에서의 디스트로핀의 생성 방법이 포함된다.

[0095] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 어구 "전신 투여," "전신으로 투여된," "말초 투여" 및 "말초로 투여된"은 화합물, 약물 또는 기타 다른 물질의 중추신경계로 직접적으로 투여되어 이것이 환자의 계로 유입되고, 이에 따라 대사작용을 받는 투여 및 기타 다른 과정, 예를 들면 피하 투여를 의미한다.

[0096] 어구 "표적 서열"은 표적 전구-mRNA의 뉴클레오타이드의 서열에 상보적인 올리고머의 핵산염기 서열을 지칭한다. 본 개시내용의 일 구현예에서, 표적 전구-mRNA의 뉴클레오타이드의 서열은 H51A(+66+95)로 표시된 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51 어닐링 부위이다.

[0097] 대상체 (예를 들면 포유동물, 예컨대 인간) 또는 세포의 "치료"는 상기 대상체 또는 세포의 자연 과정을 변경하기 위한 시도에서 사용되는 임의의 유형의 개입이다. 치료는 비제한적으로 올리고머 또는 이의 약제학적 조성물의 투여를 포함하고, 이는 예방적으로 수행되거나 또는 병리적 사건의 개시 또는 변인적 체제와의 접촉 이후에 수행될 수 있다. 치료는 특정형태의 근육 이상증과 같이 디스트로핀 단백질과 관련된 질환 또는 병태의 증상 또는 병리학에 대한 임의의 바람직한 효과를 포함하고, 이는 예를 들어 치료되는 질환 또는 병태의 하나 이상의 측정가능한 마커에서의 최소 변화 또는 개선을 포함할 수 있다. 또한, 치료되는 질환 또는 병태의 진행 속도를 감소시키거나, 이 질환 또는 병태의 개시를 지연시키거나, 또는 그것의 개시의 중증도를 감소시키는 것이 지향될 수 있는 "예방적" 치료를 포함한다. "치료" 또는 "예방"은 반드시 질환 또는 병태, 또는 이의 관련된 증상의 완전한 박멸, 치유, 또는 예방을 나타내는 것은 아니다.

[0098] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체로의 치료는 신규한 디스트로핀 생산을 증가시키거나, 질환 진행을 지연시키거나, 또는 보행의 손실을 느리게 하거나 또는 감소시키거나, 근육 염증을 감소시키거나, 근육 손상을 감소시키거나, 근육 기능을 개선하거나, 폐 기능의 손실을 감소시키거나, 및/또는 치료 없이 예상되는 근육 재생을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 질환 진행을 유지하거나, 지연시키거나, 또는 느리게 한다. 일부 구현예에서, 치료는 보행을 유지하거나 또는 보행의 손실을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 폐 기능을 유지하거나 또는 폐 기능의 손실을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 예를 들어, 6분

보행 테스트 (6MWT)에 의해 측정되는 환자에서의 안전한 보행 거리를 유지하거나 또는 증가시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 보행/실행 10미터(즉, 10 미터 보행/시험 실행)로의 시간을 유지하거나 또는 감소시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 누운 자세로부터 일어서는 시간 (즉, 일어서는 시험에 대한 시간)을 유지하거나 또는 감소시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 4개의 표준 계단을 오르는 시간 (즉, 4-계단 보행 시험)을 유지하거나 또는 감소시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 예를 들어, MRI (예를 들면, 다리 근육의 MRI)에 의해 측정되는 환자에서의 근육 염증을 유지하거나 또는 감소시킨다. 일부 구현예에서, MRI는 근육 퇴행을 확인하기 위한 T2 및/또는 지방 분율을 측정한다. MRI는 염증, 부종, 근육 손상 및 지방 침윤에 의해 야기된 근육 구조 및 조성에서의 변화를 확인할 수 있다.

[0099] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체로의 치료는 신규한 디스트로핀 생산을 증가시키고, 치료 없이 기대되는 보행의 손실을 느리게 하거나 또는 감소시킨다. 예를 들어, 치료는 대상체에서의 보행 능력 (예를 들면, 걷기의 안정화)을 유지하거나, 개선하거나 또는 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 치료는 문헌 [McDonald, et al. (Muscle Nerve, 2010; 42:966-74, 본원에 참조로 포함됨)]에 기재된 바와 같이 예를 들어, 6분 걷기 테스트 (6MWT)에서 측정되는 환자에서의 안전한 보행 거리를 유지하거나 또는 유지한다. 일부 구현예에서, 6 분 보행 거리 (6MWD)에서의 변화는 절대 값, 백분율 변화 또는 %-예상된 값에서의 변화로서 표현될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료는 건강한 유사집단에 비해 상기 대상체에서의 20% 결손의 6MWT에서의 안전한 보행 거리를 유지하거나 또는 개선한다. 건강한 유사집단의 전형적인 성능에 비해 6MWT에서의 DMD 환자의 성능은 %-예상된 값을 계산함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, %-예상된 6MWD는 숫자: $196.72 + (39.81 \times \text{연령}) - (1.36 \times \text{연령}^2) + (132.28 \times \text{높이, 단위 미터})$ 에 대해 하기 방정식을 사용하여 계산될 수 있다. 암컷에 대해, %-예상된 6MWD는 하기 방정식: $188.61 + (51.50 \times \text{연령}) - (1.86 \times \text{연령}^2) + (86.10 \times \text{높이, 단위 미터})$ (문헌 [Henricson et al. PLoS Curr., 2012, version 2], 본원에 참조로 포함됨)을 사용하여 계산될 수 있다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머로의 치료는 기준선으로부터 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 또는 50 미터 (그 사이의 모든 정수 포함) 초과까지 안전한 보행 거리를 증가한다.

[0100] DMD를 갖는 환자에서의 근육 기능의 손실은 정상 소아기 성장 및 발달의 배경에 대해 일어날 수 있다. 사실상, DMD를 갖는 더 어린 소아는 진행성 근육 손상에도 불구하고 약 1년의 과정에 걸쳐 6MWT 동안 보행한 거리에서의 증가가 느려질 수 있다. 일부 구현예에서, DMD를 갖는 환자로부터의 6MWD는 전형적으로 발달된 대조군 대상체 및 나이 및 성별 매칭된 대상체로부터의 현재 기준 데이터와 비교된다. 일부 구현예에서, 정상 성장 및 개발은 기준 데이터에 피팅된 방정식에 기초한 나이 및 키를 사용하여 계산될 수 있다. 이러한 방정식은 6MWD를 DMD를 갖는 대상체에서의 백분율-예상된 (%-예상된) 값으로 변환시키기 위해 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, %-예상된 6MWD 데이터의 분석은 성장 성장 및 발달에 대해 계산하는 방법을 나타내고, 어린 나이 (예를 들면, 7세 이하)에서의 기능에서의 증가는 DMD를 갖는 환자에서의 능력을 개선하는 것보다 안전한 것을 나타내는 것을 나타낼 수 있다 (문헌 [Henricson et al. PLoS Curr., 2012, version 2], 본원에 참조로 포함됨).

[0101] 안티센스 분자 명명법 시스템은 상이한 안티센스 분자들 사이에서 구분하기 위해 제시되고 공개되었다 (문헌 [Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654] 참조). 이러한 명명법은 다수의 약간의 상이한 안티센스 분자를 시험하는 경우에 특히 관련되고, 이들 모두는 하기 나타낸 바와 같이 동일한 표적 영역을 가리킨다:

[0102] H#A/D(x:y).

[0103] 첫번째 문자는 종 (예를 들어, H: 인간, M: 쥐과, C: 개과)을 표시한다. "#"은 표적 디스트로핀 엑손 수를 표시한다. "A/D"는 각각 엑손의 시점 및 말단에서의 수용체 또는 공여체 스플라이스 부위를 나타낸다. (x y)는 어닐링 좌표를 나타내고, 여기서 "-" 또는 "+"는 각각 트론 또는 엑손 서열을 나타낸다. 예를 들어, A(-6+18)는 표적 엑손에 선행되는 인트론의 마지막 6개의 염기 및 표적 엑손의 최초 18개의 염기를 나타낼 것이다. 최근접 스플라이스 부위는 이러한 좌표가 "A"에 선행되는 수용체일 것이다. 공여체 스플라이스 부위에서의 어닐링 좌표를 기술하는 것은 D(+2-18)일 수 있고, 여기서 마지막 2개의 엑손 염기 및 최소 18개의 인트론 염기는 안티센스 분자의 어닐링 부위에 상응한다. 전체 엑손 어닐링 좌표는 A(+65+85)로 표시되고, 이는 이 엑손의 시점으로부터의 65번째 내지 85번째 뉴클레오타이드 사이의 부위이다.

[0104] II. 안티센스 올리고머

[0105] A. 엑손 51 스킵핑을 유도하도록 설계된 안티센스 올리고머 결합체

[0106] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 디스트로핀 유전자의 엑손 51 표적 영역에 대해 상보적이고, 엑손 51 스킵핑을 유도한다. 특히, 본 개시내용은 어닐링 부위로서 표시된 디스트로핀 전구-mRNA의

엑손 51 표적 영역에 상보적인 안티센스 올리고머 결합체에 관한 것이다. 일 구현예에서, 어닐링 부위는 H51A(+66+95)이다.

[0107] 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 디스트로핀 전구-mRNA를 표적화하고, 엑손 51의 스킵핑을 유도하고, 이로써 이는 성숙한 스플라이싱된 mRNA 전사체로부터 배제되거나 또는 스킵핑된다. 엑손 51을 스킵핑 함으로써, 파괴된 해독틀은 인프레임 돌연변이로 복구된다. DMD가 다양한 유전자 하위유형을 포함하는 한편, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51를 스킵핑하도록 특별하게 설계되었다. 스킵핑 엑손 51이 허용되는 DMD 돌연변이는 DMD 환자의 하위그룹(13%)을 포함한다.

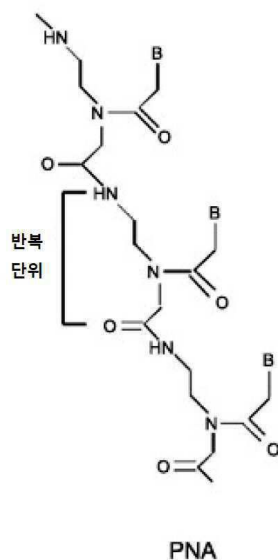
[0108] 엑손 51 스킵핑을 유도하는 안티센스 올리고머 결합체의 핵염기 서열은 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51 내의 특정 표적화 서열에 상보적일도록 설계된다. 일 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체의 안티센스 올리고머는 PMO이며, 여기서 PMO의 각각의 모르폴리노 고리는 예를 들어, DNA (아데닌, 시토신, 구아닌, 및 티민)에서 발견 되는 핵염기를 포함하는 핵염기에 연결된다.

[0109] B. 올리고머 화학물질 특징

[0110] 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 다양한 안티센스 올리고머 화학물질을 이용할 수 있다. 올리고머 화학의 예는 비제한적으로 모르폴리노 올리고머, 포스포로티오에이트 변형된 올리고머, 2' O-메틸 변형된 올리고머, 펩타이드 핵산 (PNA), 잠금 핵산 (LNA), 포스포로티오에이트 올리고머, 2' O-MOE 개질된 올리고머, 2'-플루오로-개질된 올리고머, 2' O,4'C-에틸렌-가교된 핵산 (ENA), 트리사이클로-DNA, 트리사이클로-DNA 포스포로티오에이트 하위단위, 2'-O-[2-(N-메틸카바모일)에틸] 개질된 올리고머를 포함하며, 전술한 것 중 임의의 것의 조합을 포함한다. 포스포로티오에이트 및 2'-O-Me-개질된 화학물질은 조합되어 2'O-Me-포스포로티오에이트 골격을 생성할 수 있다. 예를 들면, PCT 공개 번호 WO/2013/112053 및 WO/2009/008725를 참조하고, 이는 그 전문이 참조로 본원에 포함된다. 본 개시내용의 올리고머 화학물질의 예시적인 구현예는 하기에 추가로 기재되어 있다.

[0111] 1. 펩타이드 핵산 (PNA)

[0112] 펩타이드 핵산 (PNA)은 골격이 구조적으로 데옥시리보스 골격과 이체동형인 DNA의 유사체이고, 이는 피리미딘 또는 퓨린 염기가 부착된 N-(2-아미노에틸) 글리신 단위로 구성된다. 천연 피리미딘 및 퓨린 염기를 함유하는 PNA는 왓슨-크릭 염기 페어링 법칙에 따른 상보적 올리고머, 및 염기쌍 인식과 관련된 모사 DNA에 대해 혼성화된다 (문헌 [Egholm, Buchardt et al. 1993]). PNA의 골격은 포스포디에스테르 결합 이외에 펩타이드 결합에 의해 형성되고, 이는 안티센스 적용 (하기 구조 참조)에 대해 이들을 매우 적합하게 만든다. 골격은 미하전되고, 이는 정상 열적 안정성보다 더 크게 나타나는 PNA/DNA 또는 PNA/RNA 듀플렉스를 야기한다. PNA는 뉴클레아제 또는 프로테아제에 의해 인식되지 않는다. PNA의 비제한적인 예는 하기에 도시된다:



[0113]

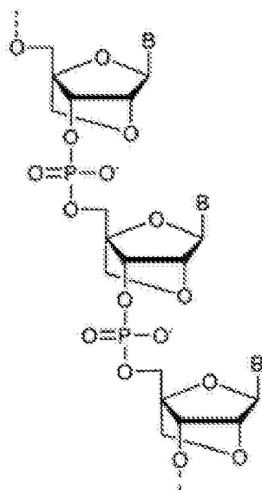
[0114] 천연 구조에 대한 라디칼 구조적 변화에도 불구하고, PNA는 DNA 또는 RNA에 대해 나선형 형태로의 서열-특이적 결합을 가능하게 한다. PNA의 특징은 상보적 DNA 또는 RNA에 대한 높은 결합 친화도, 단일-염기 불일치에 의해 야기되는 불안정화 효과, 뉴클레아제 및 프로테아제에 대한 저항성, 염 농도와 별개의 DNA 또는 RNA와의 혼성화

및 호모퓨린 DNA와의 트리플렉스(triplex) 형성을 포함한다. PANAGENE™은 이의 등록된 Bts PNA 모노머 (Bts; 벤조티아졸-2-설폰닐기) 및 등록된 올리고머화 공정을 개발하였다. Bts PNA 모노머를 사용하는 PNA 올리고머화는 탈보호화, 커플링 및 캡핑의 반복 사이클을 포함한다. PNA는 본 기술 분야에 공지된 임의의 기술을 사용하여 합성하여 제조될 수 있다. 미국특허 번호: 6,969,766; 7,211,668; 7,022,851; 7,125,994; 7,145,006; 및 7,179,896를 참조한다. PNA를 제조하기 위한 미국특허 번호: 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262를 참조한다. PNA 화합물의 추가의 교시는 문헌 [Nielsen et al., Science, 254:1497-1500, 1991]에서 발견될 수 있다. 상술한 것의 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

2. 잠금 핵산 (LNA)

안티센스 올리고머 결합체는 또한 "잠금 핵산" 하위단위 (LNA)를 포함할 수 있다. "LNA"은 가교된 핵산 (BNA)으로 지칭되는 일 부류의 개질의 구성요소이다. BNA는 C30-엔도 (노던) 당 주름에서의 리보오스 고리의 형태를 잠그는 공유결합을 특징으로 한다. LNA의 경우, 가교는 2'-O와 4'-C 위치 사이의 메틸렌을 포함한다. LNA는 골격 사전형성 및 염기 적층을 향상시켜 혼성화 및 열안정성을 증가시킨다.

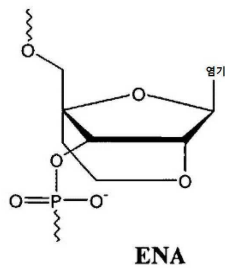
LNA의 구조는 예를 들어 문헌 [Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Koshkin et al., Tetrahedron (1998) 54:3607, Jesper Wengel, Accounts of Chem. Research (1999) 32:301]; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1998) 39:5401; 및 Obika, et al., Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230]에서 발견될 수 있고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함되어 있다. LNA의 비제한적인 예는 하기에 도시되어 있다.



LNA

본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하나 이상의 LNA를 포함할 수 있고; 일부 경우에서, 안티센스 올리고머 결합체는 전적으로 LNA로 구성될 수 있다. 개개의 LNA 뉴클레오사이드 하위단위 및 이의 올리고머로의 혼입의 합성을 위한 방법은 예를 들어 미국특허번호: 7,572,582; 7,569,575; 7,084,125; 7,060,809; 7,053,207; 7,034,133; 6,794,499; 및 6,670,461에 기재되어 있고, 이의 각각은 그 전문이 참조로 포함되어 있다. 전형적인 하위단위 간 링커는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 모이어티를 포함하고; 대안적으로 비-인 함유 링커가 이용될 수 있다. 추가의 구현에는 LNA 함유 안티센스 올리고머 결합체를 포함하고, 여기서 각각의 LNA 하위단위는 DNA 하위단위에 의해 분리된다. 특정 안티센스 올리고머 결합체는 교대되는 LNA 및 DNA 하위단위로 구성되고, 여기서 하위단위 간의 링커는 포스포로티오에이트이다.

[0120] 2'0,4'C-에틸렌-가교된 핵산 (ENA)은 BNA의 부류의 다른 구성원이다. 비-제한적인 예는 하기에 도시되어 있다:

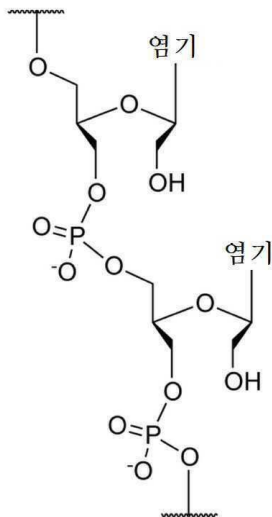


[0121]

[0122] ENA 올리고머 및 그것의 제조는 문헌 [Obika et al., *Tetrahedron Lett* (1997) 38(50): 8735]에 기재되어 있고, 이의 전문은 본원에 참조로 포함되어 있다. 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하나 이상의 ENA 하위단위를 포함할 수 있다.

[0123] 3. 비잠금 핵산 (UNA)

[0124] 안티센스 올리고머 결합체는 또한 비잠금 핵산 (UNA) 서브유닛을 함유할 수 있다. UNA들 및 UNA 올리고머는 서브유닛의 C2'-C3' 결합이 절단된 RNA의 유사체이다. LNA가 (DNA 및 RNA에 대해) 형태적으로 제한되는 반면, UNA는 매우 가요성이다. UNA는 예를 들어 WO 2016/070166에 개시되어 있다. UNA의 비제한적인 예는 하기에 도시되어 있다.

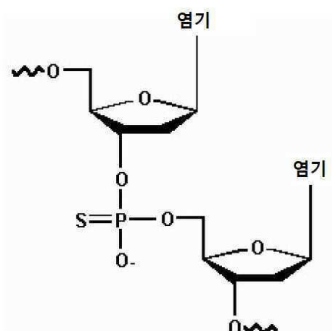


[0125]

[0126] 전형적인 서브유닛간 링커는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 모이어티를 포함하고; 대안적으로, 비-인 함유 링커(non-phosphorous containing linker)가 이용될 수 있다.

[0127] 4. 포스포로티오에이트

[0128] "포스포로티오에이트" (또는 S-올리고)는 하나의 비가교 산소가 황으로 대체된 정상 DNA의 변이체이다. 포스포로티오에이트의 비-제한적인 예는 하기에 도시되어 있다:



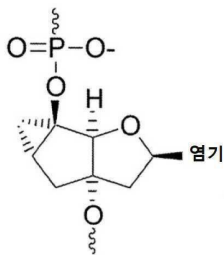
[0129]

[0130] 뉴클레오타이드간 결합의 황화는 5'에서 3' 및 3'에서 5' DNA POL 1 엑소뉴클레아제, 뉴클레아제 S1 및 P1, RNases, 혈청 뉴클레아제 및 뱀독 포스포디에스테라제. 포스포로티오에이트를 포함하는 엔도-및 엑소뉴클레아제의 작용을 감소시킨다. 포스포로티오에이트는 2개의 주요 경로로 이루어진다: 수소 포스포네이트 상의 탄소 디설파이드에서의 원소 황의 용액의 작용의 경로, 또는 포스파이트 트리에스테르를 테트라에틸티우람 디설파이드 (TETD) 또는 3H-1, 2-벤소디티올-3-온 1, 1-디옥사이드 (BDTD)로의 황화시키는 방법의 경로 (예를 들어, 문헌 [Iyer et al., J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990] 참조, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 후자 방법은 대부분 유기 용매에서의 원소 황의 불용해성 및 탄소 디설파이드의 독성의 문제를 회피한다. TETD 및 BDTD 방법은 또한 더 높은 순도의 포스포로티오에이트를 산출한다.

[0131] **5. 트리사이클로-DNA 및 트리사이클로-포스포로티오에이트 하위단위**

[0132] 트리사이클로-DNA (tc-DNA)는 각각의 뉴클레오타이드가 골격의 형태적 가요성을 제한하고, 비틀림 각도 γ 의 골격 기하학적 형태를 최적화하기 위해 사이클로프로판 고리의 도입에 의해 개질되는 구속된 DNA 유사체의 부류이다. 1염기성 아데닌- 및 티민-함유 tc-DNA는 상보적 RNA를 갖는 특히 안정한 A-T 염기쌍을 형성한다. 트리사이클로-DNA 및 이의 합성은 국제특허출원 공개번호 WO 2010/115993에 기재되어 있고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함되어 있다. 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하나 이상의 트리사이클-DNA 하위단위를 포함하고; 일부 경우에서 안티센스 올리고머 결합체는 트리사이클-DNA 하위단위로 전적으로 구성될 수 있다.

[0133] 트리사이클로-포스포로티오에이트 하위단위는 포스포로티오에이트 하위단위간 연결기를 갖는 트리사이클로-DNA 하위단위이다. 트리사이클로-포스포로티오에이트 하위단위 및 그것의 합성은 국제특허출원 공개번호 WO 2013/053928에 기재되어 있고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함되어 있다. 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하나 이상의 트리사이클-DNA 하위단위를 포함할 수 있고; 일부 경우에서, 안티센스 올리고머 결합체는 전적으로 트리사이클-DNA 하위단위로 구성될 수 있다. 트리사이클-DNA/트리사이클-포로티오에이트 하위단위의 비-제한적인 예는 하기에 도시되어 있다:

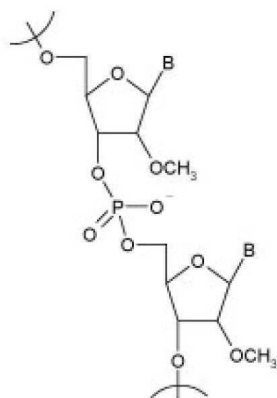


트리사이클로-DNA

[0134]

[0135] **6. 2' O-메틸, 2' O-MOE, 및 2'-F 올리고머**

[0136] "2'-O-Me 올리고머" 분자는 리보오스 분자의 2'-OH 잔류기에서 메틸기를 수반한다. 2'-O-Me-RNA는 DNA와 동일한 (또는 유사한) 거동을 나타내나, 뉴클레아제 열화로부터 보호된다. 2'-O-Me-RNA는 또한 추가의 안정화를 위해 포스포로티오에이트 올리고머 (PTO)와 조합될 수 있다. 2'-O-Me 올리고머 (포스포디에스테르 또는 포스포티오에이트)는 본 기술 분야의 일상적인 기술에 따라 합성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Yoo et al., Nucleic Acids Res. 32:2008-16, 2004] 참조, 그 전문이 본원에 참조로 포함되어 있음). 2' O-Me 올리고머의 비-제한적인 예는 하기에 도시되어 있다:



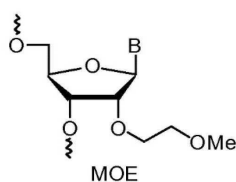
[0137]

[0138]

2' O-Me

[0139]

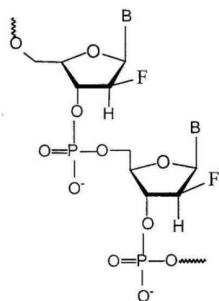
2' O-메톡시에틸 올리고머 (2'-O MOE)는 리보오스 분자의 2'-OH 잔류물에서 메톡시에틸기를 수반하고, 이는 문헌 [Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504, 1995]에 논의되어 있고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함되어 있다. 2' O MOE 하위단위의 비-제한적인 예는 하기에 도시되어 있다:



[0140]

[0141]

2'-플루오로 (2'-F) 올리고머는 2'OH 대신에 2' 위치에서 플루오로 라디칼을 가진다. 2'-F 올리고머의 비제한적인 예는 하기에 도시되어 있다:



[0142]

[0143]

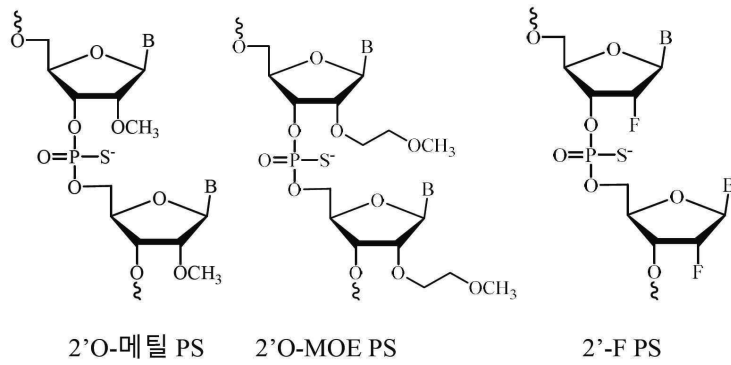
2'-F

[0144]

2'-플루오로 올리고머는 WO 2004/043977에 추가로 기재되어 있고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0145]

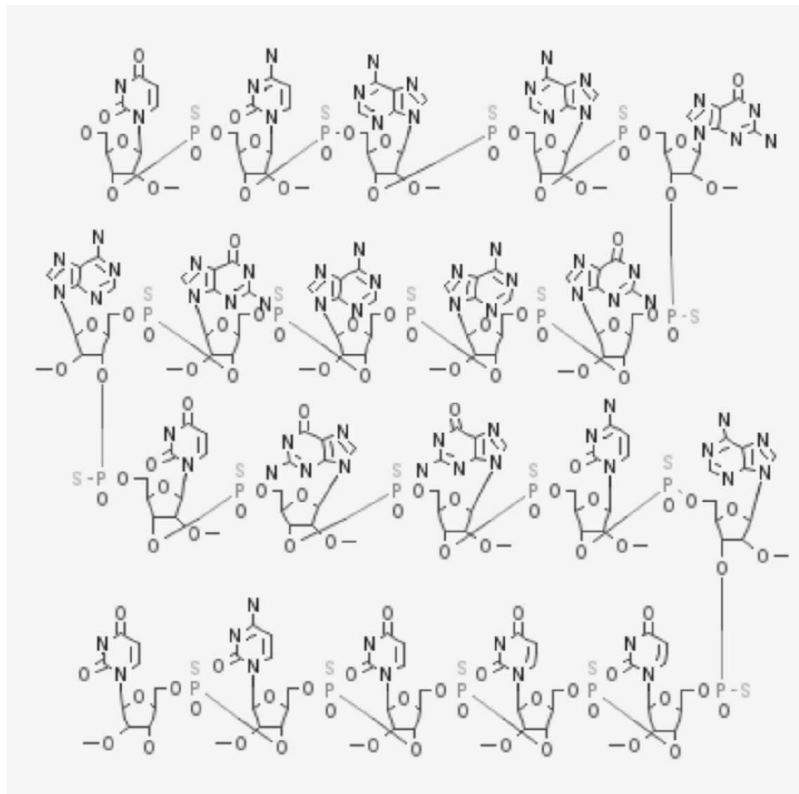
또한, 2'-O-메틸, 2' O-MOE, 및 2'-F 올리고머는 하기 도시된 바와 같은 하나 이상의 포스포로티오에이트 (PS) 연결기를 포함할 수 있다:



[0146]

[0147]

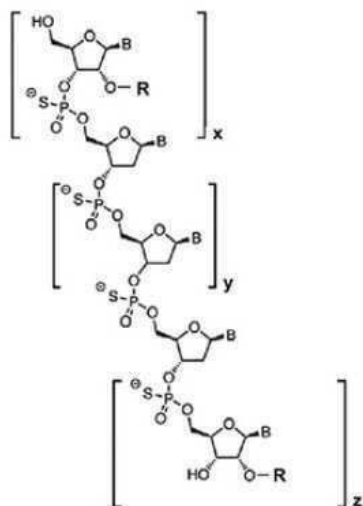
추가적으로, 2'-O-메틸, 2'-O-MOE, 및 2'-F 올리고머는 예를 들어 하기 도시된 2'-O-메틸 PS 올리고머에서와 같이 올리고머를 통해 PS 하위단위간 연결기를 포함할 수 있다:



[0148]

[0149]

대안적으로, 2'-O-메틸, 2'-O-MOE, 및/또는 2'-F 올리고머는 하기 도시된 바와 같이 올리고머의 단부에서 PS 연결기를 포함할 수 있다:



[0150]

[0151]

[0152]

[0153]

[0154]

[0155]

[0156]

식 중,

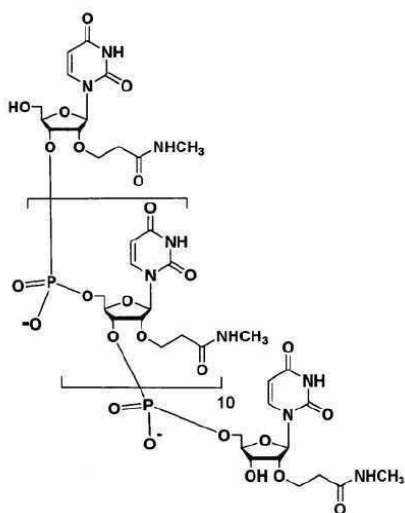
R은 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ (메톡시에틸 또는 MOE)이고;

x, y, z는 각 표시된 5'-원, 중심 핵, 및 3' 원 영역 내에 포함된 뉴클레오타이드의 수를 의미한다.

본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하나 이상의 2'-O-메틸, 2' O-MOE, 및 2'-F 하위단위를 포함할 수 있고, 이는 본원에 기재된 하위단위간 연결기 중 임의의 것을 이용할 수 있다. 일부 경우에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 전체적으로 2'-O-메틸, 2' O-MOE, 또는 2'-F 하위단위로 구성될 수 있다. 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체의 일 구현예에서, 전체적으로 2'-O-메틸 하위단위로 구성된다.

7. 2'-O-[2-(N-메틸카바모일)에틸] 올리고머 (MCE)

MCE는 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체에 유용한 2'O 변형된 리보뉴클레오사이드의 또 다른 예이다. 본원에서, 2'OH는 뉴클레아제 저항을 증가시키기 위해 2-(N-메틸카바모일)에틸 모이어티로 유도체화된다:



[0157]

[0158]

[0159]

[0160]

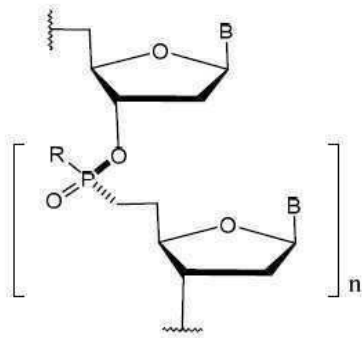
[0161]

MCE

MCE 및 그것의 합성은 문헌 [Yamada et al., *J. Org. Chem.*, (2011) 76(9):3042-53]에 기재되어 있고, 이는 본원에 그 전문이 참조로 포함되어 있다. 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하나 이상의 MCE 하위단위를 포함할 수 있다.

8. 입체 특이적 올리고머

입체 특이적 올리고머는 각각의 인-함유 연결기의 입체 화학이 실질적으로 입체-순수한 올리고머를 제조하게 하는 합성 방법에 의해 고정된 것이다. 입체 특이적 올리고머의 비제한적인 예는 하기 도시되어 있다:



[0162]

[0163]

상기 예에서, 올리고머의 각각의 인은 동일한 입체 구성을 가진다. 추가의 예는 상기 기재된 올리고머를 포함한다. 예를 들어, LNA, ENA, 트리아이클로-DNA, MCE, 2' O-메틸, 2' O-MOE, 2'-F, 및 모르폴리노계 올리고머는 입체-특이적 인-함유 뉴클레오사이드간 연결기 예컨대, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포디에스테르, 포스포아미데이트, 포스포로디아미데이트, 또는 다른 인-함유 뉴클레오사이드간 연결기로 제조될 수 있다. 이러한 올리고머의 제조에 사용하기 위한 입체 특이적 올리고머, 제조 방법, 키랄 제어된 합성, 키랄 디자인, 및 키랄 보조물은 예를 들어, WO2017192664, WO2017192679, WO2017062862, WO2017015575, WO2017015555, WO2015107425, WO2015108048, WO2015108046, WO2015108047, WO2012039448, WO2010064146, WO2011034072, WO2014010250, WO2014012081, WO20130127858, 및 WO2011005761에 상세되어 있고, 이들 각각은 그 전문이 참조로 본원에 포함되어 있다.

[0164]

입체 특이적 올리고머는 R_p 또는 S_p 형태로 인-함유 뉴클레오시드 사이의 결합을 가질 수 있다. 결합의 입체 배열이 조절되는 키랄 인-함유 결합은 "입체적순수"로서 지칭되는데, 결합의 입체 배열이 조절되지 않는 키랄 인-함유 결합은 "입체적랜덤"으로서 지칭된다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 올리고머는 comprise 복수의 입체적순수 및 입체적랜덤 결합을 포함하며, 이로써 생성된 올리고머는 올리고머의 미리-특정된 위치에서 입체적순수 하위단위를 갖는다. 입체적순수 하위단위의 위치의 예는 도 7a 및 7b의 국제 출원 공보 WO 2017/062862 A2에 제공된다. 일 구현예에서, 올리고머에서 모든 키랄인 인-함유 결합은 입체적랜덤이다. 일 구현예에서, 올리고머 내의 모든 키랄 인-함유 결합은 입체적순수이다.

[0165]

n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머 내의 키랄 인-함유 결합의 모든 n 은 입체적랜덤이다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머 내의 키랄 인-함유 결합의 모든 n 은 입체적순수이다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머 내의 n 개의 인-함유 결합의 적어도 10%(가장 가까운 정수까지)는 입체적순수이다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머 내의 n 개의 인-함유 결합의 적어도 20% (가장 가까운 정수까지)는 입체적순수이다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머 내의 n 개의 인-함유 결합의 적어도 30% (가장 가까운 정수까지)는 입체적순수이다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머 내의 n 개의 인-함유 결합의 적어도 40% (가장 가까운 정수까지)는 입체적순수이다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머 내의 n 개의 인-함유 결합의 적어도 50% (가장 가까운 정수까지)는 입체적순수이다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머 내의 n 개의 인-함유 결합의 적어도 60% (가장 가까운 정수까지)는 입체적순수이다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머 내의 n 개의 인-함유 결합의 적어도 70% (가장 가까운 정수까지)는 입체적순수이다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머 내의 n 개의 인-함유 결합의 적어도 80% (가장 가까운 정수까지)는 입체적순수이다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머 내의 n 개의 인-함유 결합의 적어도 90% (가장 가까운 정수까지)는 입체적순수이다.

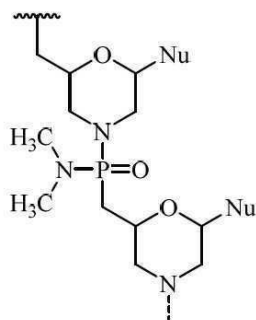
[0166]

n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 2개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 3개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상

의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 4개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 5개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 6개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 7개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 8개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 9개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 10개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 11개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 12개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 13개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 14개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 15개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 16개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 17개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 18개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 19개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다. n 개의 키랄 인-함유 결합 (여기서 n 은 1이상의 정수임)을 갖는 올리고머의 일 구현예에서, 올리고머는 동일한 입체 배향(즉, S_p 또는 R_p)의 적어도 20개의 인접한 입체적순수 인-함유 결합을 함유한다.

[0167] 9. 모르폴리노 올리고머

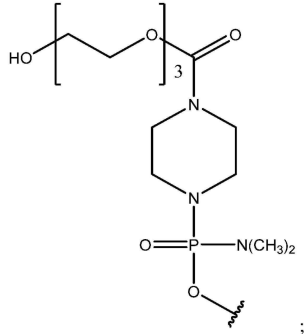
[0168] 본 개시내용의 예시적인 구현예는 문헌 [Summerton, J., 등, *안티센스 & 핵산 약물 Development*, 7: 187-195 (1997)]의 도 2에 개시된 바와 같은 하기 일반 구조의 포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고머에 관한 것이다:



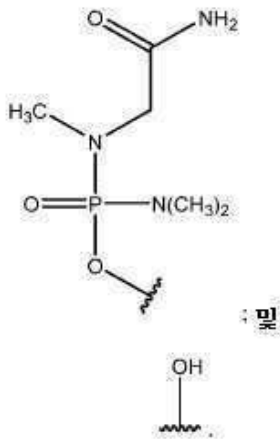
[0169]

[0170] 본 명세서에서 기재된 바와 같은 모르폴리노는 전술한 일반적인 구조의 모든 입체이성질체 및 호변체를 포괄하는 것으로 의도된다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조 및 결합 특징은 미국특허번호: 5,698,685; 5,217,866; 5,142,047; 5,034,506; 5,166,315; 5,521,063; 5,506,337; 8,076,476; 및 8,299,206에 상세되어 있고, 이들 모두는 그 전문이 참조로 포함된다.

[0171] 특정 구현예에서, 모르폴리노는 "테일" 모이어티를 갖는 올리고머의 5' 또는 3' 말단에서 결합되어 안정성 및/또는 가용성이 증가된다. 예시적인 테일은 하기를 포함한다:

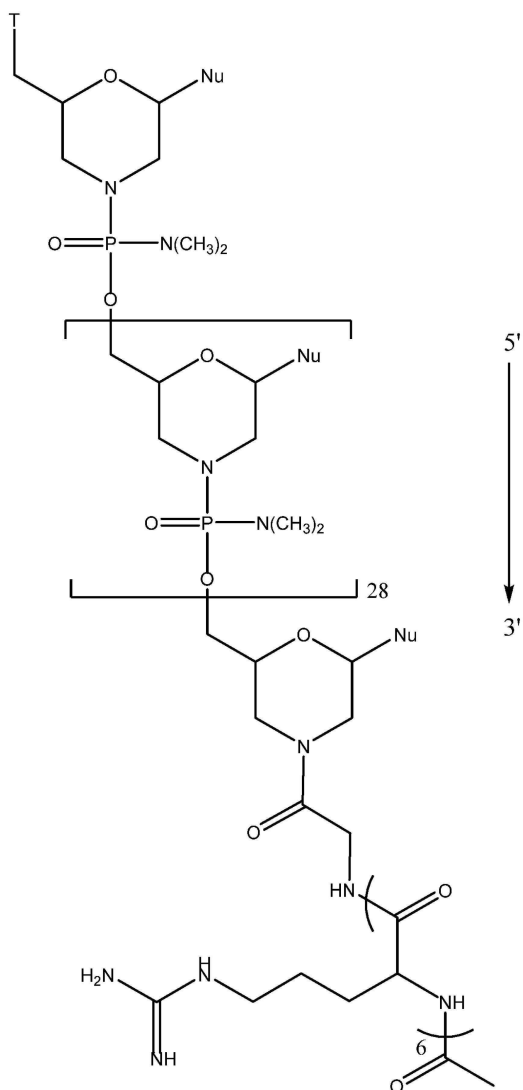


[0172] ;



[0173]

[0174] 다양한 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하기 화학식 (I)의 것 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염에 따른 것이다:

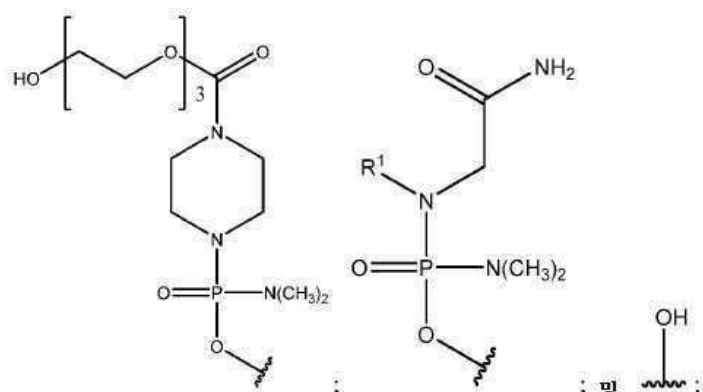


(I)

[0175]

[0176] 각각의 Nu는 함께 취해져 표적화 서열을 형성하는 핵염기이고;

[0177] T는 하기로부터 선택되는 모이어티이고:

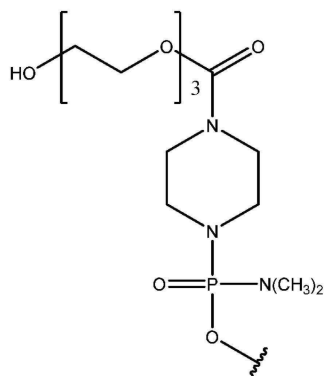


[0178]

[0179] 식 중, R¹는 C₁-C₆ 알킬이고;

[0180]

여기서 표적화 서열은 H51A(+66+95)로 표시된 디스트로핀 전구-mRNA에서 엑손 51 어닐링 부위에 상보적이다.



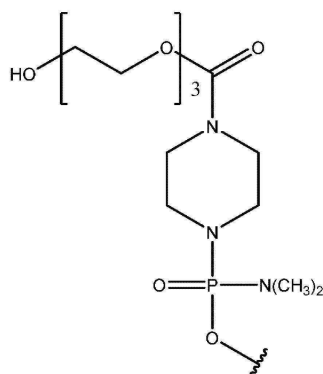
[0181] 다양한 구현예에서, T는 이다.

[0182] 다양한 구현예에서, R¹은 메틸, CF₃, CCl₃, CFC1₂, CF₂Cl, ethyl, CH₂CF₃, CF₂CF₃, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, sec-부틸, t-부틸, 펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 헥실, 이소헥실, 3-메틸펜틸, 2,2-디메틸부틸, 또는 2,3-디메틸부틸이다.

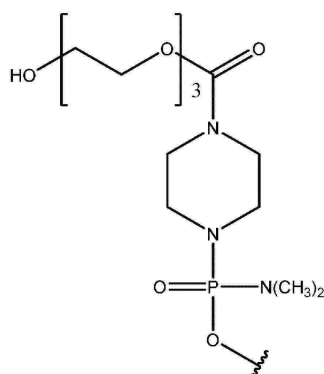
[0183] 일 구현예에서, 식 (I)의 안티센스 올리고머 결합체는 이의 HCl (염산) 염이다. 특정 구현예에서, HCl 염은 .6HCl 염이다.

[0184] 일 구현예에서, 각각의 Nu는 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T), 아데닌 (A), 5-메틸시토신 (5mC), 우라실 (U), 및 하이포크산틴 (I)으로부터 독립적으로 선택된다.

[0185] 일 구현예에서, 표적 서열은 서열 번호: 1 (5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3')이고, 여기서 각각의 티민 (T)은 선택적으로 우라실 (U)이다.

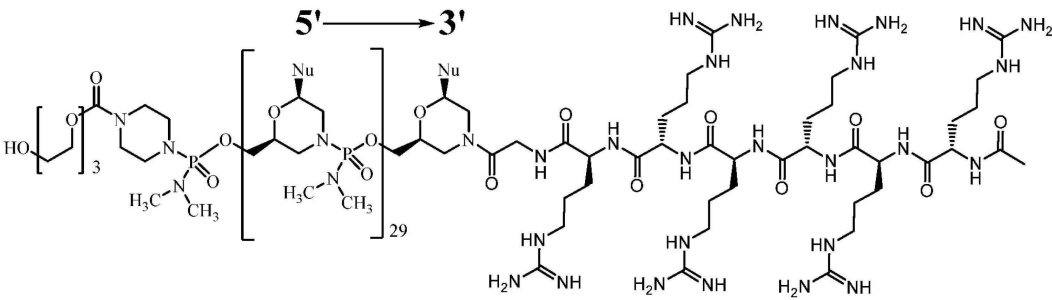


[0186] 다양한 구현예에서, T는 이고, 목표 서열은 서열 번호: 1 (5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3')이고, 각각의 티민 (T)은 선택적으로 우라실 (U)이다.



[0187] 다양한 구현예에서, T는 이고, 목표 서열은 서열 번호: 1 1 (5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3')이다.

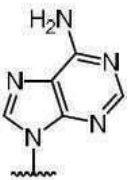
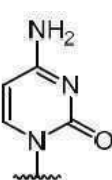
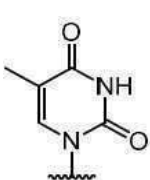
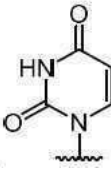
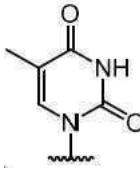
[0188] 일 구현예에서, 예를 들면, 식 (I)의 일부 구현예를 포함하여, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 식 (II) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염에 따른 것이다:



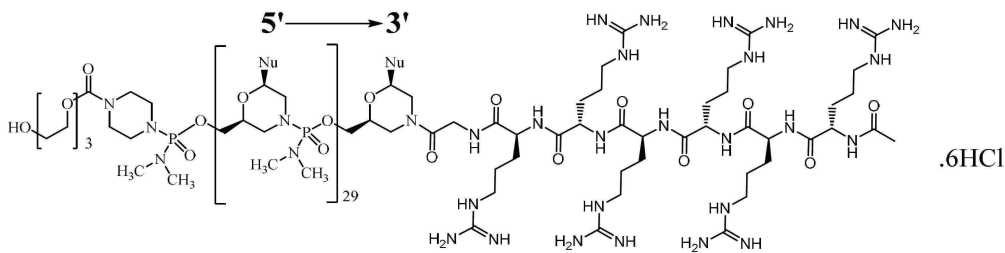
(II)

식 중,
각각의 Nu는 H51A(+66+95)로 표시된 디스트로핀 전구-mRNA 내의 엑손 51 어닐링 부위에 대해 상보적인 표적화 서열을 함께 취해져 형성하는 핵염기이다.
일부 구현예에서, 각각의 Nu는 독립적으로 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T), 아데닌 (A), 5-메틸시토신 (5mC), 우라실 (U), 및 하이포잔틴 (I)으로부터 선택된다.
다양한 구현예에서, 1 내지 30의 5'에서 3'으로의 각각의 Nu는 하기의 (서열번호: 1)이다:

위치 번호 5' 에서 3'	Nu	위치 번호 5' 에서 3'	Nu	위치 번호 5' 에서 3'	Nu	위치 번호 5' 에서 3'	Nu	위치 번호 5' 에서 3'	Nu	위치 번호 5' 에서 3'	Nu
1	C	6	A	11	A	16	A	21	G	26	X
2	X	7	C	12	A	17	G	22	C	27	C
3	C	8	A	13	G	18	A	23	A	28	X
4	C	9	X	14	G	19	X	24	X	29	A
5	A	10	C	15	A	20	G	25	X	30	G

여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이고, X는  또는  이다. 특정 구현예에서, 각각의 X는 독립적으로  이다.

일부 구현예에서, 화학식 (II)의 안티센스 올리고머 결합체는 이의 HCl (염산) 염이다. 특정 구현예에서, HCl 염은 .6HCl 염이다.
예를 들어, 화학식 (II)의 일부 구현예를 포함하는 일부 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하기 화학식 (IIA)을 따른다:



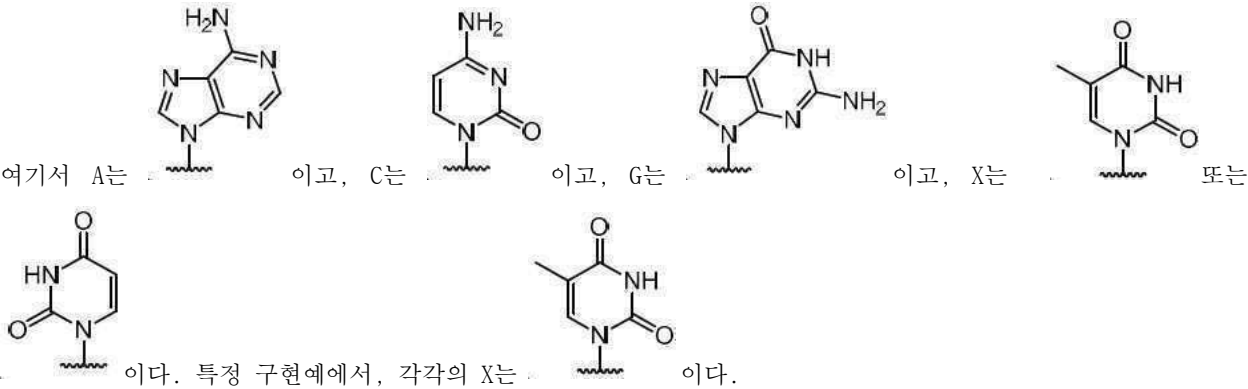
(IIA)

여기서 각각의 Nu는 함께 취하여 H51A(+66+95)로 표시된 디스트로핀 전구-mRNA에서의 엑손 51 어닐링 부위에 대해 상보적인 표적화 서열을 형성하는 핵염기이다.

일부 구현예에서, 각각의 Nu는 독립적으로 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T), 아데닌 (A), 5-메틸시토신 (5mC), 우라실 (U), 및 하이포잔틴 (I)로부터 선택된다.

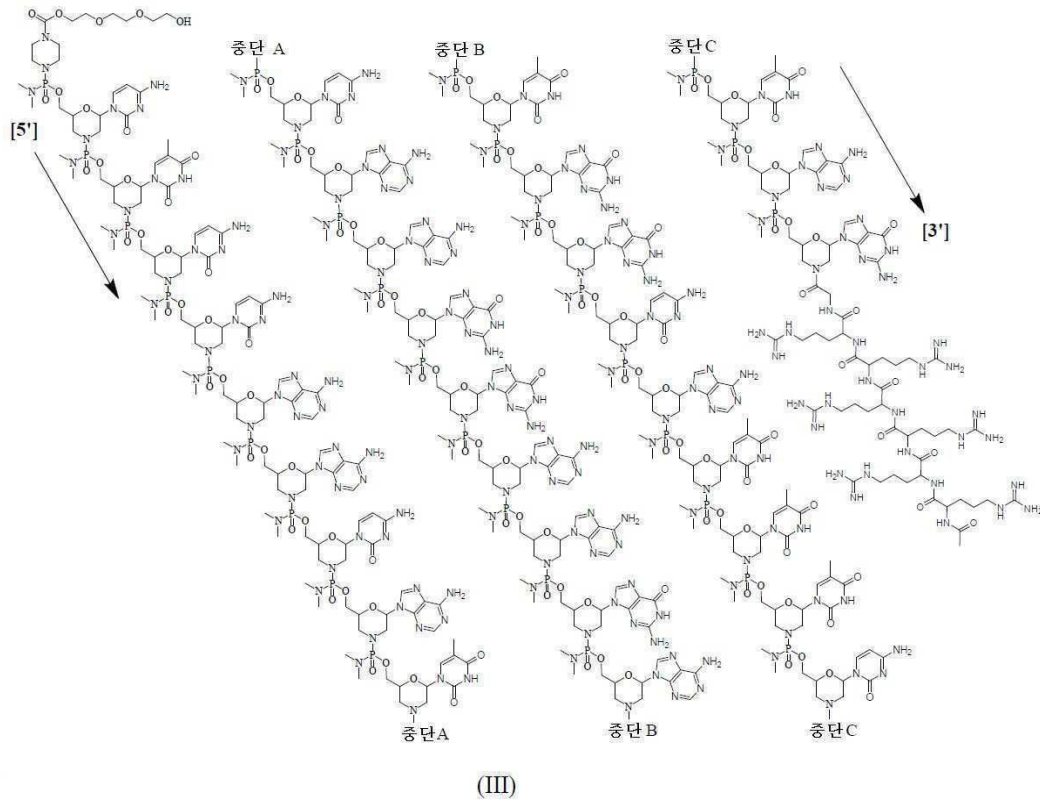
다양한 구현예에서, 1 내지 30의 5'에서 3'으로의 각각의 Nu는 (서열번호: 1)이다:

위치 번호 5' 에서 3'	Nu	위치 번호 5' 에서 3'	Nu	위치 번호 5' 에서 3'	Nu	위치 번호 5' 에서 3'	Nu	위치 번호 5' 에서 3'	Nu	위치 번호 5' 에서 3'	Nu
1	C	6	A	11	A	16	A	21	G	26	X
2	X	7	C	12	A	17	G	22	C	27	C
3	C	8	A	13	G	18	A	23	A	28	X
4	C	9	X	14	G	19	X	24	X	29	A
5	A	10	C	15	A	20	G	25	X	30	G



예를 들어, 화학식 (II) 및 화학식 (IIA)의 안티센스 올리고머 결합체의 구현예를 포함하는 일부 구현예에서, 표적화 서열은 서열번호: 1 (5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3')이고, 각각의 티민 (T)은 선택적으로 우라실 (U)이다. 예를 들어, 화학식 (II) 및 화학식 (IIA)의 안티센스 올리고머 결합체의 구현예를 포함하는 다양한 구현예에서, 표적화 서열은 서열번호: 1 (5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3')이다.

예를 들어, 화학식 (I)의 안티센스 올리고머 결합체의 구현예를 포함하는 일부 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하기 화학식 (III) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 따른다:



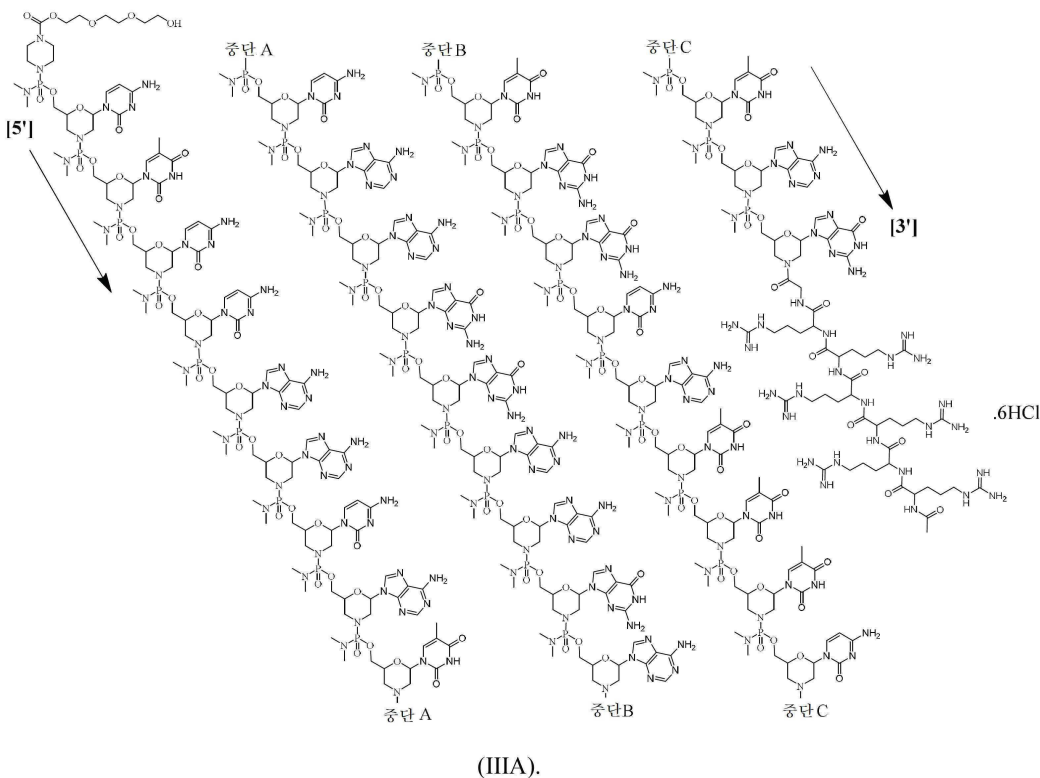
[0206]

[0207]

일부 구현예에서, 화학식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 이의 HCl (염산) 염이다. 특정 구현예에서, HCl 염은 .6HCl 염이다.

[0208]

예를 들어, 화학식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체의 구현예를 포함하는 일부 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하기 화학식 (IIIA)을 따른다:

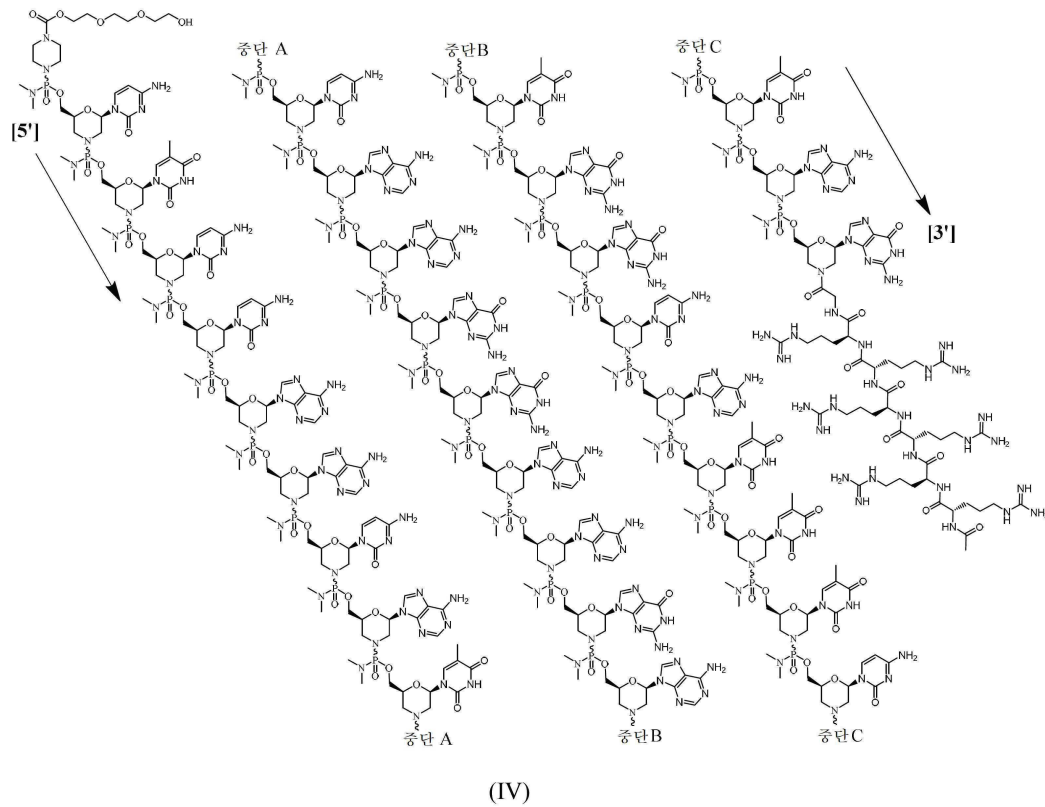


[0209]

[0210]

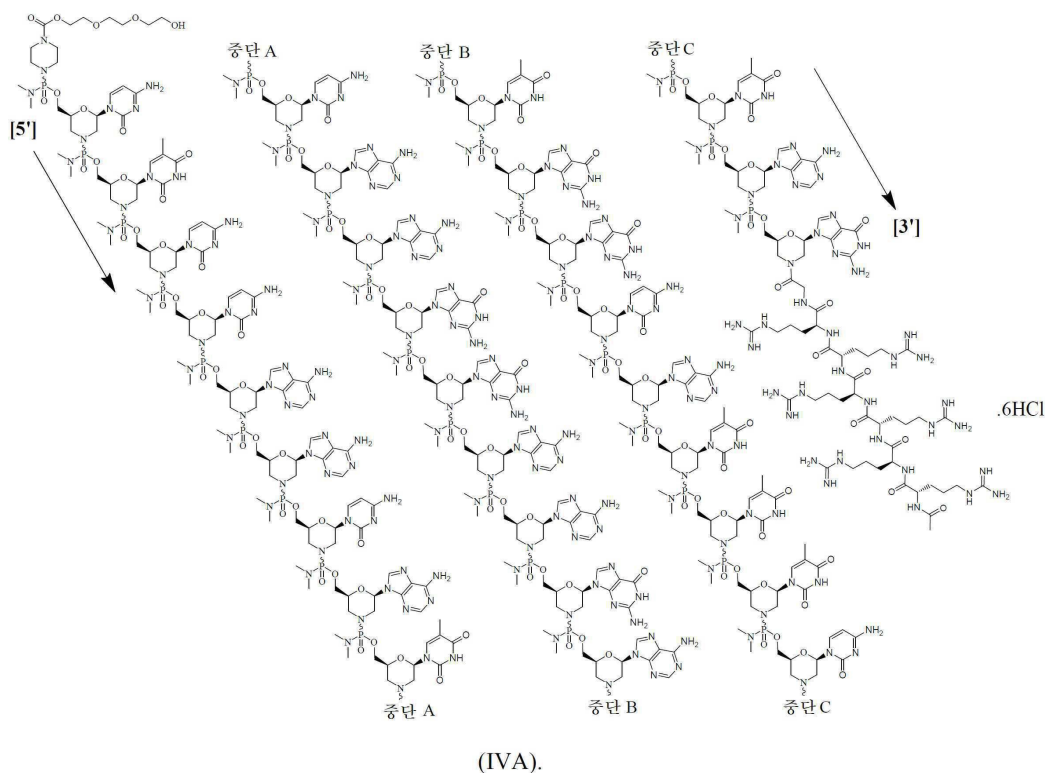
화학식 (I)의 안티센스 올리고머 결합체의 일부 구현예 및 화학식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체의 구현예를 포함하는 본 개시내용의 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 화학식 (IV) 또는 이의 약제학적으로

허용가능한 염을 따른다:



일부 구현예에서, 화학식 (IV)의 안티센스 올리고머 결합체는 이의 HCl (염산) 염이다. 특정 구현예에서, HCl 염은 .6HCl 염이다.

예를 들어, 화학식 (IV)의 안티센스 올리고머 결합체의 구현예를 포함하는 일부 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하기 화학식 (IVA)을 따른다:

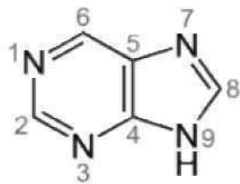


[0215] 10. 핵염기 개질 및 치환

[0216] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 RNA 핵염기 및 DNA 핵염기 (대개 본 기술분야에서 "염기"로 간단하게 지칭됨)로 구성된다. RNA 염기는 통상적으로 아데닌 (A), 우라실 (U), 시토신 (C) 및 구아닌 (G)으로 공지되어 있다. DNA 염기는 통상적으로 아데닌 (A), 티민 (T), 시토신 (C) 및 구아닌 (G)으로 공지되어 있다. 다양한 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T), 아데닌 (A), 5-메틸시토신 (5mC), 우라실 (U), 및 하이포크산틴 (I)로 구성된다.

[0217] 특정 구현예에서, 올리고머에서 하나 이상의 RNA 염기 또는 DNA 염기는 RNA 염기 또는 DNA 염기 이외의 다른 염기로 개질되거나 또는 치환될 수 있다. 개질된 또는 치환된 염기를 포함하는 올리고머는 핵산에서 가장 일반적으로 발견되는 하나 이상의 퓨린 또는 피리미딘 염기는 덜 일반적이고 비-천연 염기로 대체된 올리고머를 포함한다.

[0218] 퓨린 염기는 하기 일반 화학식으로 기재된 바와 같은 이미다졸 고리에 융합된 피리미딘 고리를 포함한다:

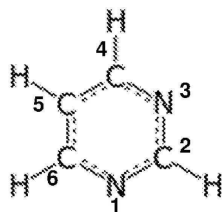


퓨린

[0219]

[0220] 아데닌 및 구아닌은 핵산에서 발견되는 가장 일반적인 2개의 퓨린 핵염기이다. 다른 자연-발생 퓨린은 비제한적으로 N^6 -메틸아데닌, N^2 -메틸구아닌, 하이포잔틴, 및 7-메틸구아닌을 포함한다.

[0221] 피리미딘 염기는 하기 일반 화학식에 의해 기재된 6원 피리미딘 고리를 포함한다:



[0222]

[0223] 피리미딘

[0224] 시토신, 우라실, 및 티민은 핵산에서 가장 일반적으로 발견되는 피리미딘 염기이다. 다른 자연-발생된 피리미딘은 비제한적으로 5-메틸시토신, 5-하이드록시메틸시토신, 슈도우라실, 및 4-티오우라실을 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 올리고머는 우라실 대신에 티민 염기를 포함한다.

[0225] 다른 적합한 염기는 비제한적으로, 2,6-디아미노퓨린, 오로트산, 아그마티딘, 라이시딘, 2-티오피리미딘 (예를 들면 2-티오우라실, 2-티오티민), G-클램프 및 그것의 유도체, 5-치환된 피리미딘 (예를 들면 5-할로우라실, 5-프로피닐우라실, 5-프로피닐시토신, 5-아미노메틸우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 5-아미노메틸시토신, 5-하이드록시메틸시토신, 슈퍼 T), 7-테아자구아닌, 7-테아자아데닌, 7-아자-2,6-디아미노퓨린, 8-아자-7-테아자구아닌, 8-아자-7-테아자아데닌, 8-아자-7-테아자-2,6-디아미노퓨린, 슈퍼 G, 슈퍼 A, 및 N4-에틸시토신, 또는 이의 유도체; N^2 -사이클로펜틸구아닌 (cPent-G), N^2 -사이클로펜틸-2-아미노퓨린 (cPent-AP), 및 N^2 -프로필-2-아미노퓨린 (Pr-AP), 슈도우라실 또는 이의 유도체; 및 퇴화 및 유니버설 염기, 예컨대 2,6-디플루오로톨루엔 또는 무염기(absent base) 예컨대 무염기성 부위 ((예를 들면 1-데옥시리보스, 1,2-디데옥시리보스, 1-데옥시-2-O-메틸리보오스; 또는 피롤리딘 유도체, 이에서 고리 산소는 질소로 대체됨 (아자리보오스))을 포함한다. 슈퍼 A, 슈퍼 G 및 슈퍼 T의 유도체의 예는 하기에서 발견될 수 있다: 미국특허번호 6,683, 173 (Epoch Biosciences), 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함되어 있다. cPent-G, cPent-AP 및 Pr-AP는 siRNA에 편입되는 경우에 면역자극성 효과를 감소시키는 것을 보인다 (문헌 [Peacock H. 등 J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200]). 슈도우라실은 우리딘에서 규칙적 N-글리코사이드가 아닌 C-글리코사이드를 갖는 우라실의 자연발생된 이성체화된 형태이다. 슈도우리딘-함유 합성 mRNA는 우리딘-함유 mPvNA와 비교하여 개선된 안전성 프로파일을 가질 수 있다 (WO

2009127230, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨).

[0226] 특정 핵염기는 특히 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 이들은 2-아미노프로필아데닌, 5-프로필닐우라실 및 5-프로필닐시토신을 포함하는 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은 0.6-1.2℃까지 핵산 듀플렉스 안정성을 증가시키는 것을 나타내었고, 이는 심지어 보다 특히 2'-O-메톡시에틸 당 개질과 조합되는 경우에 현재 바람직한 염기 치환이다. 추가적인 예시적인 변형된 핵염기는 핵염기의 적어도 하나의 수소 원자가 불소로 대체되는 것들을 포함한다.

[0227] 11. 안티센스 올리고머 결합체의 약제학적으로 허용가능한 염

[0228] 본원에 기재된 안티센스 올리고머 결합체의 특정 구현에는 염기성 작용기, 예컨대 아미노 또는 알킬아미노를 포함할 수 있고, 이에 따라 약제학적으로-허용가능한 산과 함께 약제학적으로-허용가능한 염을 형성할 수 있다. 이러한 점에서 용어 "약제학적으로-허용가능한 염"은 본 개시내용의 화합물의 상대적으로 비독성인 무기 및 유기산 부가염과 관련된다. 이러한 염은 투여 비히클 또는 투약 형태 제조 과정에서 원위치에서, 또는 자유 염기 형태로의 본 개시내용의 정제된 안티센스 올리고머 결합체를 적합한 유기산 또는 무기산과 별도로 반응시키고, 후속 정제 과정에서 이와 같이 형성된 염을 분리하는 것에 의해 제조될 수 있다. 대표적인 염은 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 설페이트, 바이설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 아세테이트, 발레레이트, 올레이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 라우레이트, 벤조에이트, 락테이트, 토실레이트, 시트레이트, 말레에이트, 푸마레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 나프틸레이트, 메실레이트, 글루코헵토네이트, 락토바이오네이트, 및 라우릴설포네이트 염 등을 포함한다 (예를 들면, 문헌 [Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19] 참조).

[0229] 본 안티센스 올리고머 결합체의 약제학적으로 허용가능한 염은 무독성 유기산 또는 무기산으로부터의 종래의 비독성 염 또는 안티센스 올리고머 결합체의 4차 암모늄염을 포함한다. 예를 들어, 이러한 종래의 비독성 염은 무기산 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산, 설패산, 인산, 질산 등으로부터 유래된 것; 및 유기산 예컨대 아세트산, 프로피온산, 석신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타르트르산, 시트르산, 아스코르브산, 팔미트산, 말레산, 하이드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 설파닐산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔설포산, 메탄설포산, 에탄 디설포산, 옥살산, 이소티온산 등으로 유래된 것을 포함한다.

[0230] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 하나 이상의 산성 작용기를 함유할 수 있고, 이에 따라 약제학적으로-허용가능한 염기와 함께 약제학적으로-허용가능한 염을 형성할 수 있다. 이러한 경우 용어 "약제학적으로-허용가능한 염"은 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체의 상대적으로 무독성, 무기 및 유기 염기 부가염을 지칭한다. 이러한 염은 마찬가지로 투여 비히클 또는 투약 형태 제조 과정에서 원위치에서, 또는 유리산 형태로의 정제된 안티센스 올리고머 결합체를 적합한 염기, 예컨대 약제학적으로-허용가능한 금속 양이온의 수산화물, 탄산염 또는 중탄산염과, 암모니아와, 또는 약제학적으로-허용가능한 유기 1차, 2차 또는 3차 아민과 별도로 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리토 염은 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 및 알루미늄염을 포함한다. 염기 부가염의 형성에 유용한 대표적인 유기 아민은 에틸아민, 디에틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진 등을 포함한다 (예를 들면, 문헌 [Berge et al.] 참조, 상동).

[0231] III. 제형 및 투여 방식

[0232] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 안티센스 올리고머 결합체의 치료적 전달을 위해 적합한 제형 또는 약제학적 조성물을 제공한다. 그러므로, 특정 구현예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체 (첨가제) 및/또는 희석제와 함께 제형화된 본원에 기재된 안티센스 올리고머 결합체의 치료적으로-유효량의 하나 이상의 본원에 기재된 올리고머를 포함하는 약제학적으로 허용가능한 조성물을 제공한다. 단독으로 투여되는 본 개시내용의 올리고머에 대해 가능하지만, 한편 약제학적 제형 (조성물)으로서 안티센스 올리고머 결합체를 투여하는 것이 바람직하다. 일 구현예에서, 제형의 안티센스 올리고머 결합체는 식 (III)에 따른 것이다.

[0233] 핵산 분자의 전달을 위한 방법은, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체에 적용될 수 있으며, 문헌 [Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, CRC Press]; 및 Sullivan 등의 PCT WO 94/02595에 기재되어 있다. 이러한 그리고 다른 프로토콜은 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 포함하는 사실상 임의의 핵산 분자의 전달을 위해 이용될 수

있다.

[0234] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 하기에 대해 적합한 것을 포함하여 고체 또는 액체 형태로 투여하기 위해 특별하게 제형화될 수 있다: (1) 경구 투여, 예를 들어, 드렌치(drench) (수성 또는 비-수용액 또는 현탁액), 정제 (볼, 설하, 또는 전신 흡수를 목표로 함), 볼러스, 분말, 과립, 혀에 적용하기 위한 페이스트의 것에 대해 표적화된 것; (2) 비경구 투여, 예를 들어, 예를 들어, 멸균된 용액 또는 현탁액, 또는 지속-방출 제형으로서의 피하, 근육내, 정맥내 또는 경막외 주사; (3) 국소 도포, 예를 들어, 크림, 연고, 또는 피부에 적용되는 조절-방출 패치 또는 분무; (4) 질내로 또는 직장내로, 예를 들어, 페서리, 크림 또는 포움; (5) 설하로; (6) 안구로; (7) 경피로; 또는 (8) 비강으로.

[0235] 약제학적으로-허용가능한 담체로서 역할을 할 수 있는 물질의 일부 예는 비제한적으로 하기를 포함한다: (1) 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; (2) 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스, 및 그것의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말화된 트라가칸쓰; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 탈크; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; (9) 오일, 예컨대 땅콩 오일, 목화씨 오일, 잇꽃 오일, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 대두 오일; (10) 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; (11) 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; (12) 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; (13) 한천; (14) 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 알루미늄 수산화물; (15) 알긴산; (16) 무발열원 물; (17) 등장성 염수; (18) 링거액; (19) 에틸 알코올; (20) pH 완충 용액; (21) 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리무수물; 및 (22) 약제학적 제형에 이용되는 다른 무독성 양립 가능한 물질.

[0236] 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 사용하는 제형에 적합한 제제의 추가의 비-제한적인 예는 하기를 포함한다: PEG 접합된 핵산, 인지질 접합된 핵산, 친유성 모이어티함유 핵산, 포스포로티오에이트, P-글리코단백질 억제제 (예컨대 플루론산 P85) (이는 다양한 조직으로의 약물의 유입을 향상할 수 있음); 생분해성 폴리머, 예컨대 이식 이후 지속 방출을 위한 폴리 (D,L-락타이드-코글리콜라이드) 마이크로구형체 (문헌 [Emerich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58]) Alkermes, Inc. 매사추세츠주 캄브리지 소재; 및 장입된 나노입자, 예컨대 폴리부틸시아노아크릴레이트로 제조된 것 (이는 혈액 뇌 장벽을 통해 약물을 전달할 수 있고, 뉴런의 흡수 기전을 변경할 수 있음) (문헌 [Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999]).

[0237] 본 개시내용은 또한 폴리 (에틸렌 글리콜) ("PEG") 지질 (PEG-개질된, 분지형 및 비분지형 또는 이의 조합, 또는 장기-순환형 리포솜 또는 스텔스 리포솜)을 포함하는 표면 개질된 리소솜을 포함하는 조성물의 사용을 특징으로 한다. 본 개시내용의 올리고머 결합체는 또한 다양한 분자량의 공유결합된 PEG 분자를 포함할 수 있다. 이러한 제형은 표적 조직에서의 약물의 축적을 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 이러한 부류의 약물 담체는 단핵 식세포 시스템 (MPS 또는 RES)에 의한 제거 및 흡수인화에 저항적이고, 이에 의해 더 긴 혈액 순환 시간 및 캡슐화된 약물에 대한 향상된 조직 노출을 가능하게 한다 (문헌 [Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011]). 이와 같은 리포솜은 짐작컨대 신생혈관이 발달된 표적 조직에서의 분출 및 포집에 의해 종양에서 선택적으로 축적되는 것으로 보여진다 (문헌 [Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90]). 장기 순환 리포솜은 특히 MPS의 조직에서의 축적되는 것으로 공지된 종래의 양이온성 리포솜과 비교하여 DNA 및 RNA의 약동학 및 약력학을 향상시킨다 (문헌 [Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi et al., 국제 PCT 공개 번호 WO 96/10391; Ansell 등의 국제 PCT 공개 번호 WO 96/10390; Holland 등의 국제 PCT 공개번호 WO 96/10392]). 장기 순환 리포솜은 또한 대사성으로 공격성 MPS 조직 예컨대 간 및 비장에서 축적을 회피하는 이의 능력에 기초하여 양이온성 리포솜과 비교하여 더 큰 정도로 뉴클레아제 열화로부터 약물을 보호할 수 있을 것이다.

[0238] 추가 구현예에서, 본 개시내용은 미국특허 번호: 6,692,911; 7,163,695; 및 7,070,807에 기재된 전달을 위해 제조된 안티센스 올리고머 결합체 약제학적 조성물을 포함한다. 이와 관련하여, 일 구현예에서, 본 개시내용은 PEG (예를 들면, 분지형 또는 비분지형 PEG 또는 이 둘의 혼합물)과 조합하여, PEG 및 표적화 모이어티와 조합하여 또는 가교결합체와의 조합에서 전술한 임의의 것과 조합하여 또는 단독으로 라이신 및 히스티딘 (HK)의 코폴리머 (미국특허번호 7,163,695, 7,070,807, 및 6,692,911에 기재됨)을 포함하는 조성물에서 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용은 글루콘산-산-변형된 폴리히스티딘 또는 글루코닐레이트화-폴리히스티딘/트랜스페린-폴리라이신을 포함하는 약제학적 조성물에서의 안티센스 올리고머 결합체를 제공한다. 당해 분야의 숙련가는 또한 His 및 Lys과 유사한 특성을 갖는 아미노산은 조성물 내에서 치

환될 수 있음을 인식할 것이다.

- [0239] 습윤제, 유화제 및 윤활제 (예컨대 나트륨 라우릴 설페이트 및 스테아르산마그네슘), 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 풍미제 및 방향제, 보존제 및 산화방지제는 또한 조성물에 존재할 수 있다.
- [0240] 약제학적으로-허용가능한 산화방지제의 예는 하기를 포함한다: (1) 수용성 산화방지제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 중황산나트륨, 나트륨 메타바이설파이트, 아황산나트륨 등; (2) 오일용해성 산화방지제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화된 하이드록시아니솔 (BHA), 부틸화된 하이드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; (3) 금속 킬레이트제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등.
- [0241] 본 개시내용의 제형은 경구, 비강, 국소 (볼 및 설하 포함), 직장, 질 및/또는 비경구 투여에 적합한 것을 포함한다. 제형은 간편하게는 단위 투약 형태에 존재할 수 있고, 약학 분야에 잘 알려진 임의의 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투약 형태를 제조하기 위한 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 대상체, 및 특정 투여 방식에 따라 변화될 수 있다. 단일 투약 형태를 제조하기 위한 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 활성 성분의 양일 것이다. 일반적으로, 그 양은 약 0.1 퍼센트 내지 99 퍼센트, 바람직하게는 약 5 퍼센트 내지 약 70 퍼센트, 가장 바람직하게는 약 10 퍼센트 내지 약 30 퍼센트의 범위일 것이다.
- [0242] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 제형은 사이클로덱스트린, 셀룰로스, 리포솜, 교질입자 형성제, 예를 들면, 담즙산, 및 폴리머 담체, 예를 들면, 폴리에스테르 및 폴리무수물로부터 선택되는 부형제; 및 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 포함한다. 일 구현예에서, 제형의 안티센스 올리고머 결합체는 식 (III)에 따른 것이다. 특정 구현예에서, 상기 언급된 제형은 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 경구로 생체이용가능하게 한다.
- [0243] 이러한 제형 또는 약제학적 조성물의 제조 방법은 본 개시내용의 회합 안티센스 올리고머 결합체를 담체 및, 선택적으로, 하나 이상의 부수 성분과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 본 개시내용의 회합 안티센스 올리고머 결합체를 액체 담체, 또는 미세하게 분쇄된 고형 담체, 또는 이 둘 모두와 균일하게 및 친밀하게 접촉시키고, 필요한 경우 이후 생성물을 성형하는 것에 의해 제조된다.
- [0244] 경구 투여에 적합한 본 개시내용의 제형은 캡슐, 카세, 알약, 정제, 로젠지 (풍미제, 일반적으로 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸스), 분말, 과립의 형태로, 또는 수성 또는 비-수성 액체 중에, 또는 수중유 또는 유중수 액체 에멀전으로서의 용액 또는 현탁액 또는 엘릭시르 또는 시럽, 또는 사탕형 알약 (불활성 염기, 예컨대 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아 사용) 및/또는 구강 세정제 등의 것일 수 있고, 이들 각각은 활성 성분으로서 본 개시내용의 예정된 양의 안티센스 올리고머 결합체를 함유한다. 또한, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 볼러스, 연약 또는 페이스트로서 투여될 수 있다.
- [0245] 경구 투여를 위한 본 개시내용의 고체 투약 형태 (캡슐, 정제, 알약, 당의정, 분말, 과립, 트로키 등)에 있어서, 활성 성분은 하나 이상의 약제학적으로-허용가능한 담체, 예컨대 나트륨 시트레이트 또는 인산제2칼슘, 및/또는 하기 중 임의의 것과 혼합될 수 있다: (1) 충전제 또는 증량제, 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 및/또는 규산; (2) 결합제, 예컨대, 예를 들어, 카복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아; (3) 휴멕턴트, 예컨대 글리세롤; (4) 봉해제, 예컨대 한천, 탈산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이트, 및 탄산나트륨; (5) 용액 지연제, 예컨대 파라핀; (6) 흡수 가속제, 예컨대 4차 암모늄 화합물 및 계면활성제, 예컨대 폴록사머 및 나트륨 라우릴 설페이트; (7) 습윤제, 예컨대, 예를 들어, 세틸 알코올, 글리세롤 모노스테아레이트, 및 비-이온성 계면활성제; (8) 흡수제, 예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예컨대 탈크, 칼슘 스테아레이트, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리 에틸렌 글리콜s, 나트륨 라우릴 설페이트, 스테아르산아연, 스테아르산나트륨, 스테아르산, 및 이들의 혼합물; (10) 착색제; 및 (11) 조절 방출 제제 예컨대 크로스포비돈 또는 에틸 셀룰로스. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 약제학적 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 약제학적 조성물은 또한 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜과 같은 이러한 부형제를 사용하여 연질 및 경질-셀의 젤라틴 캡슐 내에 충전제로서 이용될 수 있다.
- [0246] 정제는 선택적으로 하나 이상의 부수 성분과 함께 압축 또는 성형될 수 있다. 압축 정제는 결합제 (예를 들면, 젤라틴 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로스), 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 봉해제 (예를 들어, 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 가교결합된 나트륨 카복시메틸 셀룰로스), 표면-활성 또는 분산제를 사용하여 제조될 수

있다. 성형된 정제는 불활성 액체 희석제로 습윤된 분말화된 화합물의 적합한 기계적 혼합물로 성형됨으로써 제조될 수 있다.

[0247] 본 개시내용의 약제학적 조성물의 정제, 및 다른 고형 투약 형태, 예컨대 당의정, 캡슐, 알약 및 과립은 선택적으로 평점화되고 코팅물 및 셸, 예컨대 장용 코팅물 및 약제학적 제형 기술에 잘 알려진 다른 코팅물로 제조될 수 있다. 이는 또한 원하는 방출 프로파일, 다른 폴리머 매트릭스, 리포좀 및/또는 마이크로구형체를 제공하는 다양한 비율로 예를 들어, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스를 사용하여 그 안의 활성 성분의 서방형 또는 조절 방출을 제공하도록 제형화될 수 있다. 이는 급속 방출을 위해 제형화되거나, 예를 들면 냉동건조될 수 있다. 이는 예를 들어 박테리아-고정 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용하기 직전에 멸균수, 또는 일부 다른 멸균된 주사가능 매체에 용해될 수 있는 멸균된 고체 약제학적 조성물의 형태로 살균제를 혼입함으로써 멸균될 수 있다. 이들 약제학적 조성물은 또한 선택적으로 불투명화제를 포함할 수 있고, 우선적으로 위장관의 특정 부분에서, 임의로 지연 방식으로 이들이 활성 성분(들)만을 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 내포된 조성물의 예는 폴리머성 물질 및 왁스를 포함한다. 활성 성분은 또한 적절한 경우 하나 이상의 상기 기재된 부형제를 갖는 마이크로 캡슐화된 형태일 수 있다.

[0248] 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체의 경구 투여를 위한 액체 투약 형태는 약제학적으로 허용가능한 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 활성 성분 이외에, 액체 투약 형태는 본 기술분야에 사용되는 통상적인 불활성 희석제, 예컨대, 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 세균, 올리브, 캐스터 및 참깨 오일), 글리세롤, 테트라하이드로푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0249] 불활성 희석제 이외에, 경구 약제학적 조성물은 또한 아췌반트 예컨대 습윤제, 유화 및 현탁제, 감미제, 풍미제, 착색제, 방향제 및 보존제를 포함할 수 있다.

[0250] 활성 화합물 이외의 현탁액은 예를 들어, 에복실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미세결정성 셀룰로스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 한천 및 트라가칸쓰, 및 이들의 혼합물로서 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0251] 직장 또는 질 투여를 위한 제형은 좌약으로서 제공될 수 있고, 이는 본 개시내용의 하나 이상의 화합물을 실온에서 고체이나 체온에서 액체이고, 이에 따라 직장 또는 질 강 내에서 용융되어 활성 화합물을 방출하는 예를 들어, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌약 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 하나 이상의 적합한 무자극 부형제 또는 담체와 혼합됨으로써 제조될 수 있다.

[0252] 본 명세서에서 제공된 바와 같은 올리고머의 국소 또는 경피 투여를 위한 제형 또는 투약 형태는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 올리고머 결합체는 멸균 조건 하에 약제학적으로-허용가능한 담체, 및 필요로 될 수 있는 임의의 보존제, 완충액, 또는 추진제와 혼합될 수 있다. 연고, 페이스트, 크림 및 젤은 본 개시내용의 활성 화합물 이외에 부형제, 예컨대 동물 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸쓰, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연, 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0253] 분말 및 스프레이는 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체 이외에 부형제 예컨대 락토스, 탈크, 규산, 알루미늄 수산화물, 칼슘 실리케이트 및 폴리아미드 분말, 또는 이들 물질의 혼합물을 포함할 수 있다. 스프레이는 추가로 종래의 추진제, 예컨대 클로로플루오로탄화수소 및 휘발성 비치환된 탄화수소, 예컨대 부탄 및 프로판을 포함할 수 있다.

[0254] 경피 패치는 본 발명의 안티센스 올리고머 결합체의 신체로의 조절된 전달을 제공하는 추가의 장점을 가진다. 이러한 투약 형태는 적절한 매체 중에 올리고머를 용해시키거나 또는 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 흡수 촉진제는 또한 피부에 걸쳐 제제의 유동을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 이러한 유동의 속도는 다른 당해 분야에서 공지된 방법 중에서 속도 조절 막을 제공하거나 또는 폴리머 매트릭스 또는 겔 중에 제제를 분산시킴으로써 제어될 수 있다.

[0255] 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물은 사용 직전에 멸균된 주사가능 용액 또는 분산물로 재구성될 수 있는 하나 이상의 약제학적으로-허용가능한 멸균된 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산물, 현탁액 또는 에멀전, 또는 멸균된 분말과 조합하여 본 개시내용의 하나 이상의 올리고머 결합체를 포함할 수 있고, 이는 당, 알코올,

산화방지제, 완충액, 정균제, 용질 (이는 제형을 의도된 수령체의 혈액 또는 현탁제 또는 증점제와 등장성이게 만들)을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 약제학적 조성물에 이용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브유, 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트를 포함한다. 적절한 유체성은 예를 들어 코팅 물질, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산물의 경우 요구된 입자 크기의 유지에 의해, 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물의 안티센스 올리고머 결합체는 식 (III)에 따른 것이다.

[0256] 또한, 이러한 약제학적 조성물은 아췌반트 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 포함할 수 있다. 본 올리고머 결합체에 대한 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 혼입에 의해 보장될 수 있다. 또한, 등장제, 예컨대 당, 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능 약제학적 형태의 지속적 흡수는 제제의 혼입에 의해 일어날 수 있고, 이는 흡수를 지연시키는 제제, 예컨대 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 혼입에 의해 일어날 수 있다.

[0257] 일부 경우에, 약물의 효과를 연장시키기 위해서, 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 느리게 하는 것이 바람직하다. 이는 다른 당해 분야에서 공지된 방법 중에서 열악한 수용성을 갖는 결정성 또는 비결정성 물질의 액체 현탁액의 사용에 의해 달성될 수 있다. 약물의 흡수율은 이후 그것의 용해 속도에 좌우되고, 이는 결국 결정 크기 및 결정형에 좌우될 수 있다. 대안적으로, 비경구로-투여된 약물의 지연된 흡수는 오일 비히클 중에 약물을 용해시키거나 또는 현탁시킴으로써 달성된다.

[0258] 주사가능 데포 형태는 생분해성 폴리머 예컨대 폴리락타이드-폴리글리콜라이드 중에 상기 올리고머 결합체의 마이크로캡슐화 매트릭스를 형성함으로써 제조될 수 있다. 폴리머에 대한 올리고머의 비, 및 이용되는 특정한 폴리머의 특징에 따라, 올리고머 방출 속도는 조절될 수 있다. 다른 생분해성 폴리머의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)를 포함한다. 또한, 데포 주사가능 제형은 신체 조직과 양립가능한 리포솜 또는 마이크로에멀전에 약물을 포집함으로써 제조될 수 있다.

[0259] 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체가 의약품으로서 인간 및 동물에 투여되는 경우, 이는 그 자체로 또는 약제학적으로 허용가능한 담체와 조합하여 예를 들어, 0.1 내지 99% (더 바람직하게는, 10 내지 30%)의 안티센스 올리고머 결합체를 포함하는 약제학적 조성물로서 주어질 수 있다.

[0260] 본 개시내용의 제형 또는 제제는 경구로, 비경구로, 국소적으로, 또는 직장적으로 제공될 수 있다. 이는 전형적으로 각각의 투여 경로에 적합한 형태를 가진다. 예를 들어, 이는 주사, 흡입, 눈 로션, 연고, 좌약, 또는 주입; 로션 또는 연고에 의해 국소적으로; 또는 좌약에 의해 직장적으로 투여된다.

[0261] 선택되는 투여의 경로와 무관하게, 적합하게 수화된 형태로 사용될 수 있는 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체, 및/또는 본 개시내용의 약제학적 조성물은 본 기술분야의 종래의 공지된 방법에 의해 약제학적으로-허용가능한 투약 형태로 제형화될 수 있다. 본 개시내용의 약제학적 조성물에서의 활성 성분의 실제의 투약량 수준은 환자에 대해 허용되지 않는 독성 없이 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 다량하는데 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 변화될 수 있다.

[0262] 선택된 투약량 수준은 이용되는 본 개시내용의 특정 안티센스 올리고머 결합체, 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 이용되는 특정 올리고머의 배출 속도 또는 대사작용, 흡수의 속도 및 정도, 치료 기간, 이용되는 특정 올리고머와 조합되어 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 연령, 성별, 체중, 질병, 치료되는 환자의 일반 건강 및 이전 병력, 및 의학 분야에 알려진 유사 인자를 포함하는 다양한 인자에 좌우될 것이다.

[0263] 본 기술분야의 통상적인 기술을 갖는 의사 또는 수의사는 요구되는 약제학적 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고, 처방할 수 있다. 예를 들면, 의사 또는 수의사는 원하는 치료 효과를 달성하고, 원하는 효과가 달성될 때까지 투약량을 서서히 증가시키기 위해 요구된 것보다 낮은 수준으로 약제학적 조성물에 이용되는 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체의 투여를 시작할 수 있다. 일반적으로, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체의 적합한 1일 용량은 치료 효과를 생성하는데 효과적인 최저 용량인 안티센스 올리고머 결합체의 양일 것이다. 이러한 유효 용량은 일반적으로 본원에 기재된 인자에 좌우될 것이다. 일반적으로, 환자에 대한 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체의 경구, 정맥내, 뇌실내 및 피하 용량은 표시된 효과를 위해 사용되는 경우 약 0.0001 내지 약 100 mg /체중 킬로그램/1일일 범위일 것이다.

- [0264] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 일반적으로 약 10-160 mg/kg 또는 20-160 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 경우에서, 160 mg/kg 초과 용량이 필요할 수 있다. 일부 구현예에서, 정맥내 투여를 위한 용량은 약 0.5 mg 내지 160 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 약 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 또는 10 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 18 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33 mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43 mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg, 50 mg/kg, 51 mg/kg, 52 mg/kg, 53 mg/kg, 54 mg/kg, 55 mg/kg, 56 mg/kg, 57 mg/kg, 58 mg/kg, 59 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 105 mg/kg, 110 mg/kg, 115 mg/kg, 120 mg/kg, 125 mg/kg, 130 mg/kg, 135 mg/kg, 140 mg/kg, 145 mg/kg, 150 mg/kg, 155 mg/kg, 160 mg/kg의 용량으로 투여되며, 이는 이들 사이의 모든 정수를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고머는 10 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 20 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 30 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 40 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 60 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 80 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 160 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 50 mg/kg로 투여된다.
- [0265] 일부 구현예에서, 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 일반적으로 약 10-160 mg/kg 또는 20-160 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, i.v. 투여에 대한 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체의 투여량은 약 0.5 mg 내지 160 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 약 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 또는 10 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 약 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 18 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33 mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43 mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg, 50 mg/kg, 51 mg/kg, 52 mg/kg, 53 mg/kg, 54 mg/kg, 55 mg/kg, 56 mg/kg, 57 mg/kg, 58 mg/kg, 59 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 105 mg/kg, 110 mg/kg, 115 mg/kg, 120 mg/kg, 125 mg/kg, 130 mg/kg, 135 mg/kg, 140 mg/kg, 145 mg/kg, 150 mg/kg, 155 mg/kg, 160 mg/kg의 투여량으로 투여되며, 이는 이들 사이의 모든 정수를 포함한다. 일부 구현예에서, 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 10 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 20 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 30 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 40 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 60 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 80 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 160 mg/kg로 투여된다. 일부 구현예에서, 식 (III)의 안티센스 올리고머 결합체는 50 mg/kg로 투여된다.
- [0266] 원하는 경우, 활성 화합물의 유효한 1일 용량은 하루에 걸쳐 임의로 단위 투약 형태로 투여되는 2, 3, 4, 5, 6 회 이상의 하위-용량으로서 투여될 수 있다. 특정 상황에서, 투약은 일일당 1회 투여이다. 특정 구현예에서, 투약은 필요에 따라, 기능성 디스트로핀 단백질의 원하는 발현을 유지하기 위해 매 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일, 또는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 주, 또는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 개월마다 1회 이상의 투여이다. 특정 구현예에서, 투여는 매 2주에 1회 한번 이상 투여한다. 일부 구현예에서, 투여는 매 2주마다 1회 한번 투여한다. 다양한 구현예에서, 투여는 매달 한번 이상 투여된다. 특정 구현예에서, 투여는 매달 한번 투여된다.
- [0267] 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 10 mg/kg로 매주 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 20 mg/kg로 매주 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 30 mg/kg로 매주 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 40 mg/kg로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 60 mg/kg로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 80 mg/kg로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 100 mg/kg로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 160 mg/kg로 매주 투여된다. 본원에 사용된 바와 같이, 주 단위는 매주 기술-허용되는 의미로 이해된다.
- [0268] 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 10 mg/kg로 격주로 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올

리고머 결합체는 20 mg/kg로 격주로 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 30 mg/kg로 격주로 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 40 mg/kg로 격주로 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 60 mg/kg로 격주로 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 80 mg/kg로 격주로 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 100 mg/kg로 격주로 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 160 mg/kg로 격주로 투여된다. 본원에 사용된 바와 같이, 격주 단위는 매 격주의 기술-허용되는 의미로 이해된다.

[0269] 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 10 mg/kg로 매 3주마다 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 20 mg/kg로 매 3주마다 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 30 mg/kg로 매 3주마다 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 40 mg/kg로 매 3주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 60 mg/kg로 매 3주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 80 mg/kg로 매 3주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 100 mg/kg로 매 3주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 160 mg/kg로 매 3주마다 투여된다. 본원에 사용된 바와 같이, 매 3주 단위는 매 3주에 한번씩 기술-허용되는 의미로 이해된다.

[0270] 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 10 mg/kg로 매월 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 20 mg/kg로 매월 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 30 mg/kg로 매월 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 40 mg/kg로 매월 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 60 mg/kg로 매월 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 80 mg/kg로 매월 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 100 mg/kg로 매월 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 160 mg/kg로 매월 투여된다. 본원에 사용된 바와 같이, 매월은 매달에 한번씩 기술-허용되는 의미로 이해된다.

[0271] 당해 기술 분야에서 이해되는 바와 같이, 매주, 격주, 매 3주마다, 또는 매월 투여는 본원에서 논의된 바와 같은 한번 이상의 투여 또는 서브-투여량일 수 있다.

[0272] 본원에 기재된 안티센스 올리고머 결합체 및 핵산 분자는 비제한적으로 리포솜에서의 캡슐화, 이온침투요법에 의해, 본원에 기재되고, 본 기술분야에 공지된 다른 비히클 예컨대 하이드로겔, 사이클로덱스트린, 생분해성 나노캡슐, 및 생체접착 마이크로구형체로의 혼입을 포함하여 본 기술분야의 숙련자에게 공지된 다양한 방법에 의해 세포로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 마이크로에멀전화 기술은 친유성 (수불용성) 약제학적 제제의 생체이용률을 개선하기 위해 이용될 수 있다. 그 예는 트리메트린(Trimetrine) (문헌 [Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991] and REV 5901 (Sheen, P. C., et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991])을 포함한다. 다른 장점 중에서, 마이크로에멀전화는 흡수를 순환계 대신에 림프계로 우선적으로 유도함으로써 향상된 생체이용률을 제공하며, 이에 의해 간을 우회하고, 간담도 순환시 화합물의 파괴를 방지한다.

[0273] 본 개시내용의 일 양태에서, 제형은 본 명세서에서 제공된 바와 같은 올리고머로부터 형성된 교질입자 및 적어도 하나의 양친매성 담체를 포함하고, 이에서 교질입자는 약 100 nm 미만의 평균 직경을 가진다. 더 바람직한 구현예는 약 50 nm의 평균 직경을 가지는 교질입자를 제공하고, 더욱 더 바람직한 구현예는 약 30 nm 미만, 또는 심지어 약 20 nm 미만의 평균 직경을 갖는 교질입자를 제공한다.

[0274] 모든 적합한 양친매성 담체가 고려되는 한편, 현재 바람직한 담체는 일반적으로 안전하다고 인식되는 물질 (GRAS) 상태를 갖고, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 가용화시킬 수 있으면서도 용액이 복합 수성상 (예컨대 인간 위-장관에서 발견되는 것)과 접촉되는 경우에 말기에 마이크로에멀전화되는 것이다. 일반적으로, 이러한 요건을 충족시키는 양친매성 성분은 2-20의 HLB (친수성 대 친유성 밸런스) 값을 가지고, 이의 구조는 C-6 내지 C-20의 범위의 직쇄 지방족 라디칼을 포함한다. 그 예는 폴리에틸렌-글리콜화 지방 글리세라이드 및 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0275] 양친매성 담체의 예는 포화된 및 단일불포화된 폴리에틸렌글리콜화 지방산 글리세라이드, 예컨대 완전하게 또는 부분적으로 수소화된 다양한 식물성 오일로부터 수득된 것을 포함한다. 이러한 오일은 유리하게는 트리-, 디-, 및 모노-지방산 글리세라이드 및 상응하는 지방산의 디- 및 모노-폴리(에틸렌 글리콜) 에스테르로 구성될 수 있고, 특히 바람직한 지방산 조성물은 카프르산 4-10%, 카프르산 3-9%, 라우르산 40-50%, 미리스트산 14-24%, 팔미트산 4-14% 및 스테아르산 5-15%를 포함한다. 또 다른 유용한 부류의 양친매성 담체는 포화된 또는 모노-불포화된 지방산 (SPAN-시리즈) 또는 상응하는 에톡실화된 유사체 (TWEEN-시리즈)와 함께 부분적으로 에스테르화된 소르비탄 및/또는 소르비톨을 포함한다.

- [0276] 상업적으로 입수가 가능한 양친매성 담체가 특히 유용할 수 있고, 이는 겔루시르-시리즈, 라브라필, 라브라솔, 또는 라우로글리콜 (이들 모두는 Gattefosse Corporation로부터 제조되고 배포됨, 프랑스 생프리스트 소재), PEG-모노-올레이트, PEG-디-올레이트, PEG-모노-라우레이트 및 디-라우레이트, 레시틴, 폴리소르베이트 80 등(미국 및 전세계적으로 여러 회사에서 제조되고 배포됨)을 포함한다.
- [0277] 특정 구현예에서, 전달은 적합한 숙주세포로의 본 개시내용의 약제학적 조성물의 도입을 위한 리포좀, 나노캡슐, 극미립자, 마이크로구형체, 지질 입자, 소포 등의 사용에 의해 일어날 수 있다. 특히, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 지질 입자, 리포좀, 소포, 나노구형체, 나노입자 등으로의 캡슐화된 전달을 위해 제형화될 수 있다. 이러한 전달 비히클의 제형화 및 사용은 공지된 종래 기술을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0278] 본 개시내용에서 사용하기에 적합한 친수성 폴리머는 용이하게 수용성이며, 소포-형성 지질에 공유결합될 수 있으며, 독성 효과 없이 (즉 생체적합성임) 생체내에서 용인되는 것이다. 적합한 폴리머는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG), 폴리락타산 (또한 일명 폴리락타이드), 폴리글리콜산 (또한 일명 폴리글리코라이드), 폴리락타산-폴리글리콜산 코폴리머, 및 폴리비닐 알코올을 포함한다. 특정 구현예에서, 폴리머는 약 100 또는 120 달톤, 최대, 약 5,000 또는 10,000 달톤, 또는 약 300 달톤 내지 약 5,000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진다. 다른 구현예에서, 폴리머는 약 100 내지 약 5,000 달톤의 중량 평균 분자량을 가지거나, 또는 약 300 내지 약 5,000 달톤의 중량 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)이다. 특정 구현예에서, 폴리머는 약 750 달톤, 예를 들어 PEG(750)의 중량 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)이다. 또한, 폴리머는 이의 모노머의 수에 의해 정의될 수 있고; 본 개시내용의 바람직한 구현예는 적어도 약 3개의 모노머의 폴리머, 예컨대 대략 132 달톤의 분자량을 갖는 3개의 모노머로 이루어진 PEG 폴리머를 이용한다.
- [0279] 본 개시내용에서 사용하기에 적합할 수 있는 다른 친수성 폴리머는 폴리비닐피롤리돈, 폴리메톡사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리하이드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리디메틸아크릴아미드, 및 유도된 셀룰로스 예컨대 하이드록시메틸셀룰로스 또는 하이드록시에틸셀룰로스를 포함한다.
- [0280] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 제형은 폴리아미드, 폴리카보네이트, 폴리알킬렌, 아크릴 및 메타크릴 에스테르의 폴리머, 폴리비닐 폴리머, 폴리글리콜라이드, 폴리실록산, 폴리우레탄 및 이의 코폴리머, 셀룰로스, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리스티렌, 락트산 및 글리콜산의 폴리머, 폴리무수물, 폴리(오르토)에스테르, 폴리(부티산), 폴리(발레르산), 폴리(락타이드-코-카프로락톤), 다당류, 단백질, 폴리하이알루론산, 폴리시아노아크릴레이트, 및 그것의 블렌드, 혼합물, 또는 코폴리머로 이루어진 군으로부터 선택된 생체적합성 폴리머를 포함한다.
- [0281] 사이클로텍스트린은 각각 그리스 문자, α , β , 또는 γ 로 표시되는 6, 7 또는 8개의 글루코스 단위로 이루어진 환형 올리고당이다. 글루코스 단위는 α -1,4-글루코사이드 결합에 의해 연결된다. 당 단위의 의자 형태의 결과로서, (C-2, C-3에서의) 모든 2차 하이드록실기는 고리의 한쪽에 위치하고, 한편 C-6에서의 모든 1차 하이드록실기는 다른 면에 위치한다. 그 결과, 외면은 친수성이고, 이는 사이클로텍스트린이 수용성 있게 만든다. 그에 반해서, 사이클로텍스트린의 공동은 소수성이고, 이는 이들이 원자 C-3 및 C-5의 수소에 의해 그리고 에테르-유사 산소에 의해 라이닝되기 때문이다. 이러한 매트릭스는 예를 들어, 스테로이드 화합물, 예컨대 17 α -에스트라디올 (예를 들면, 문헌 [van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)] 참조)를 포함하는 다수의 상대적으로 소수성의 화합물로의 착화를 가능하게 한다. 착화는 반데르발스 상호작용에 의해, 수소 결합 형성에 의해 일어난다. 사이클로텍스트린의 화학물질의 총평에 대해 문헌 [Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994)]을 참조한다.
- [0282] 사이클로텍스트린 유도체의 물리-화학적 특성은 종류 및 치환도에 강하게 의존된다. 예를 들어, 물에서의 그것의 용해도는 불용성 (예를 들면, 트리아세틸-베타-사이클로텍스트린)으로부터 147% 가용성 (w/v) (G-2-베타-사이클로텍스트린)까지의 범위이다. 또한, 이들은 다수의 유기 용매에서 가용성이다. 사이클로텍스트린의 특성은 그것의 용해도를 증가시키거나 또는 감소시킴으로써 다양한 제형 성분의 용해도에 대한 조절을 가능하게 한다.
- [0283] 다수의 사이클로텍스트린 및 이의 제조 방법이 기재되어 있다. 예를 들면, Parmeter (I) 등의 (미국특허 번호 3,453,259) 및 Gramera 등의 (미국특허 번호 3,459,731)은 전기중성적 사이클로텍스트린을 기술하고 있다. 다른 유도체는 양이온성 특성을 갖는 사이클로텍스트린 [Parmeter (II), 미국특허 번호 3,453,257], 불용성 가교결합된 사이클로텍스트린 (Solms, 미국특허 번호 3,420,788), 및 음이온성 특성을 갖는 사이클로텍스트린 [Parmeter (III), 미국특허 번호 3,426,011]을 포함한다. 음이온성 특성을 갖는 사이클로텍스트린 유도체 중에서, 카복실산, 아인산, 아포스핀 산, 포스포산, 인산, 티오포스포산, 티오설펜산, 및 설펜산은 모 사이클로텍스트린에 첨부되었다 [Parmeter (III)(상동)을 참조한다]. 게다가, 설포알킬 에테르 사이클로텍스트린 유도체는 Stella, 등

(미국특허 번호 5,134,127)에 기재되어 있다.

- [0284] 리포솜은 수성 내부 구획을 밀폐하는 적어도 하나의 지질 이중층 막으로 이루어진다. 리포솜은 막 유형 및 크기를 특징으로 할 수 있다. 소형 단일라멜라 소포 (SUV)는 단일 막을 가지고, 전형적으로 직경에 있어서 0.02 내지 0.05 μm 의 범위이고; 대형 단일라멜라 소포 (LUV)는 전형적으로 0.05 μm 보다 크다. 올리고라멜라 대소포 및 다중층 소포는 복수개의, 일반적으로 동심성의 막 층을 가지고, 전형적으로 0.1 μm 보다 크다. 다수의 비동심성 막을 갖는 리포솜, 즉 더 큰 소포 내에 함유된 다수의 더 작은 소포는 다소포체 소포(multivesicular vesicle)로 명명된다.
- [0285] 본 개시내용의 일 양태는 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체를 포함하는 리포솜 함유 제형에 관한 것이고, 여기서 리포솜 막은 증가된 수송 능력을 갖는 리포솜을 제공하도록 제형화된다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 리포솜의 리포솜 이중층 내에 함유되거나, 또는 그 위에 흡착될 수 있다. 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 지질 계면활성제와 함께 응집될 수 있거나, 리포솜의 내부 공간 내에 수반되고; 이러한 경우에, 리포솜 막은 활성제-계면활성제 응집체의 파괴적 효과(disruptive effect)에 저항적이도록 제형화된다.
- [0286] 본 개시내용의 일 구현예에 따라, 리포솜의 지질 이중층은 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)로 유래된 지질을 함유하고, 이로써 PEG 사슬은 지질 이중층의 내면으로부터 리포솜에 의해 캡슐화된 내측 공간으로 연장되고, 지질 이중층의 외측으로부터 주위 환경으로 연장된다.
- [0287] 본 개시내용의 리포솜 내에 함유된 활성제는 가용화된 형태의 것이다. 계면활성제 및 활성제의 응집체 (예컨대 관심대상의 활성제를 함유하는 에멀전 또는 교질입자)는 본 개시내용에 따라 리포솜의 내측 공간에 포획될 수 있다. 계면활성제는 활성제를 분산시키고 가용화하는 역할을 하며, 비제한적으로 다양한 사슬 길이 (예를 들어, 약 C14 내지 약 C20)의 생체적합성 라이소포스파티딜콜린 (LPG)을 포함하여 임의의 적합한 지방족, 지환족 또는 방향족 계면활성제로부터 선택될 수 있다. 또한, 폴리머-유도된 지질 예컨대 PEG-지질은 이들이 교질입자/막 용해를 억제하는 역할을 할 것이고, 계면활성제 분자에의 폴리머의 첨가가 계면활성제의 CMC를 감소시키고, 교질입자 형성을 보조하기 때문에 교질입자 형성을 위해 이용될 수 있다. 마이크로몰 범위의 CMO를 갖는 계면활성제가 바람직하고; 더 고도의 CMC 계면활성제는 본 개시내용의 리포솜 내에 포획된 교질입자를 제조하기 위해 이용될 수 있다.
- [0288] 본 개시내용에 따른 리포솜은 당해 기술에 공지되어 있는 여러 기술 중의 임의의 것에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 미국특허 번호 4,235,871; 공개된 PCT 출원 WO 96/14057; 문헌 [New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104; 및 Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993] 참조. 예를 들어, 본 개시내용의 리포솜은 사전형성된 리포솜에 친수성 폴리머로 유도된 지질을 확산시킴으로써, 예컨대 리포솜에서 바람직한 유도체화된 지질의 최종 물%에 해당하는 지질 농도로 사전형성된 리포솜을 지질-그래프팅된 폴리머로 구성된 교질입자에 노출시킴으로써 제조될 수 있다. 친수성 폴리머를 포함하는 리포솜은 또한 당해 기술에 공지되어 있는 균질화, 지질-분야 수화, 또는 압출 기술에 의해 형성될 수 있다.
- [0289] 또 다른 예시적인 제형 절차에서, 활성제는 우선 소수성 분자를 용이하게 가용화시키는 라이소포스파티딜콜린 또는 다른 낮은 CMC 계면활성제 (폴리머 그래프팅된 지질 포함) 중에서의 초음파처리에 의해 분산된다. 활성제의 수득한 교질입자 현탁액은 이후 적합한 물 퍼센트의 폴리머-그래프팅된 지질, 또는 콜레스테롤을 포함하는 건조된 지질 샘플을 재수화시키기 위해 사용된다. 지질 및 활성제 현탁액은 이후 당해 기술에 공지된 압출 기술을 사용한 리포솜, 및 표준 컬럼 분리에 의해 비캡슐화된 용액으로부터 분리된 생성된 리포솜으로 형성된다.
- [0290] 본 개시내용의 일 양태에서, 리포솜은 선택된 크기 범위에서 실질적으로 균질한 크기를 갖도록 제조된다. 하나의 효과적인 사이징 방법은 선택된 균일한 기공 크기를 갖는 일련의 폴리카보네이트 막을 통해 리포솜의 수성 현탁액을 압출하는 것을 수반하고; 막의 기공 크기는 이 막을 통한 압출에 의해 생성된 리포솜의 최대 크기에 대략적으로 상응할 것이다. 예를 들면, 미국특허 번호 4,737,323 (1988년 4월 12일)을 참조한다. 특정 구현예에서, 시약 예컨대 DharmaFECT® 및 Lipofectamine®은 세포로 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질을 주입하기 위해 이용될 수 있다.
- [0291] 본 개시내용의 제형의 방출 특징은 캡슐화 물질, 캡슐화된 약물의 농도, 방출 개질제의 존재에 좌우된다. 예를 들어, 위에서 단지 낮은 pH에서, 이어서 장에서 더 높은 pH에서 방출되는 pH 감수성 코팅을 사용하는 방출은 pH 의존적이도록 조작될 수 있다. 장용 코팅물은 위를 통과한 이후까지 방출이 방지되도록 사용될 수 있다. 상이한

물질에서 캡슐화된 시안아미드의 혼합물 또는 다중 코팅물은 위에서의 초기 방출, 이후 장에서의 후속 방출을 얻기 위해 사용될 수 있다. 방출은 또한 염 또는 기공 형성체의 혼입에 의해 조작될 수 있고, 이는 수분 흡수를 증가시키거나 또는 캡슐로부터의 확산에 의해 약물을 방출할 수 있다. 또한, 약물의 용해도를 변경하는 부형제는 방출 속도를 조절하기 위해 사용될 수 있다. 매트릭스의 열화를 향상시키거나 또는 매트릭스로부터 방출되는 제제가 또한 혼입될 수 있다. 이는 약물에 첨가되거나, 별개의 상으로서 (즉, 미립자로서) 첨가될 수 있거나, 또는 화합물에 따라 폴리머 상에 공동 용해될 수 있다. 대개의 경우, 양은 0.1 내지 30%(w/w 폴리머)일 것이다. 열화 인헨서의 유형은 무기염 예컨대 황산암모늄 및 암모늄 염화물, 유기산 예컨대 시트르산, 벤조산, 및 아스코르브산, 무기 염기 예컨대 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탈산칼슘, 아연 카보네이트, 및 아연 수산화물, 및 유기 염기 예컨대 프로타민 설페이트, 스페르민, 콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민, 및 트리에탄올아민 및 계면활성제 예컨대 Tween® 및 Pluronic®을 포함한다. 매트릭스 (즉, 수용성 화합물 예컨대 무기 염 및 당류)에 미세구조를 추가하는 기공 형성체는 미립자로서 첨가된다. 그 범위는 전형적으로 1 내지 30% (w/w 폴리머)이다.

[0292] 또한, 흡수는 소화관에서의 입자의 체류 시간을 변경함으로써 조작될 수 있다. 이는 예를 들어 입자를 캡슐화 물질, 점막 접착성 폴리머로 코팅하거나, 또는 선택함으로써 달성될 수 있다. 그 예는 유리 카복실기를 갖는 대부분의 폴리머, 예컨대 키토산, 셀룰로스, 및 특히 폴리아크릴레이트 (본 명세서에서 사용된 바와 같은 폴리아크릴레이트는 아크릴레이트기 및 개질된 아크릴레이트기 예컨대 시아노아크릴레이트 및 메타크릴레이트를 포함하는 폴리머를 지칭함)를 포함한다.

[0293] 안티센스 올리고머 결합체는 외과적 또는 의료 기기 또는 임플란트 내에 함유되도록 제형화되거나, 또는 이에 의해 방출하도록 적용될 수 있다. 특정 양태에서, 임플란트는 안티센스 올리고머 결합체로 코팅될 수 있거나 또는 그렇지 않으면 이로 처리될 수 있다. 예를 들어, 하이드로겔, 또는 다른 폴리머, 예컨대 생체적합성 및/또는 생분해성 폴리머는 본 개시내용의 약제학적 조성물로 임플란트를 코팅하기 위해 사용될 수 있다 (즉, 본 조성물은 하이드로겔 또는 다른 폴리머를 사용하여 의료 기기와 함께 사용하기에 적합하다). 제조로 의료 기기를 코팅하기 위한 폴리머 및 코폴리머는 본 기술분야에 공지되어 있다. 임플란트의 예는 비제한적으로, 스텐트, 약물-용출 스텐트, 봉합, 보철, 혈관 카테터, 투석 카테터, 혈관 이식편, 보철 심장판막, 심장 심장박동기, 삽입형 제세동기, IV 니들, 골 고정 및 형성을 위한 장비, 예컨대 핀, 스크류, 플레이트, 및 상처 치료를 위한 다른 장치, 및 인공 조직 매트릭스를 포함한다.

[0294] 본원에 제공된 방법 이외에, 본 개시내용에 따라 사용하기 위한 안티센스 올리고머 결합체는 다른 의약품과의 유사성에 의해 인간 또는 수의과 의약에서 사용하기 위한 임의의 편리한 방식으로 투여를 위해 제형화될 수 있다. 안티센스 올리고머 결합체 및 그것의 상응하는 제형은 단독으로 또는 근육 이상증의 치료에서의 다른 치료 전략, 예컨대 근아세포 이식, 줄기 세포 요법, 아미노글리코사이드 항생제, 프로테아솜 억제제의 투여, 및 상향 조절 요법 (예를 들면, 우트로핀, 디스트로핀의 상염색체 패럴로그의 상향 조절)과 조합하여 투여될 수 있다.

[0295] 일부 구현예에서, 추가의 치료는 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체의 투여 이전에, 그와 동시에 또는 이에 후속하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 올리고머 결합체는 스테로이드 및/또는 항생제와 조합하여 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 안티센스 올리고머 결합체는 배경 스테로이드 이론 (예를 들면, 간헐적 또는 만성/연속적 배경 스테로이드 요법)에 해당하는 환자에 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서 환자는 안티센스 올리고머의 투여 이전에 코르티코스테로이드로 치료되고, 지속하여 스테로이드 요법을 받는다. 일부 구현예에서, 스테로이드는 글루코코르티코이드 또는 프레드니손이다.

[0296] 기재된 투여 경로는 지침으로서만 의도되며, 이는 당업자는 임의의 특정 동물 및 조건에 대해 최적의 투여 경로 및 임의의 투약량을 용이하게 결정할 수 있다. 시험관내 및 생체내 모두에서 세포로 기능적 신규한 유전 물질을 도입하기 위한 복수개의 방법이 시도되었다 (문헌 [Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280]). 이러한 방법은 변형된 레트로바이러스로 발현되게 하는 유전자의 통합 (문헌 [Friedmann (1989) 상동; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), suppl.: 5074S-5079S]); 비-레트로바이러스 벡터 (예를 들면, 아데노-관련 바이러스 벡터)로의 통합 (예를 들면, 문헌 [Rosenfeld, et al. (1992) Cell, 68:143-155; Rosenfeld, et al. (1991) Science, 252:431-434]); 또는 리포솜을 통한 이중성 프로모터-인헨서 성분 연결된 이식유전자의 전달 (문헌 [Friedmann (1989), 상동; Brigham, et al. (1989) Am. J. Med. Sci., 298:278-281; Nabel, et al. (1990) Science, 249:1285-1288; Hazinski, et al. (1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209; and Wang and Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855]); 리간드-특이적 양이온 기반 수송 시스템에 의한 통합 (문헌 [Wu and Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624] 또는 the use of naked DNA, expression vectors (Nabel et al. (1990), 상동)) 또는 네이키드 DNA, 발현 벡터의 사용 (문헌 [Nabel et al. (1990), 상동; Wolff et al. (1990) Science, 247:1465-1468])을 포함한다. 조직으로의 이식유전자의 직접 주사는 단지

국소화된 발현만을 생성한다 (문헌 [Rosenfeld (1992) 상동]; Rosenfeld et al. (1991) 상동; Brigham et al. (1989) 상동; Nabel (1990) 상동; and Hazinski et al. (1991) 상동]). Brigham 등의 그룹 (문헌 [Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 and Clinical Research (1991) 39 (초록)])은 DNA 리포좀 복합체의 정맥내 또는 기관내 투여에 뒤따르는 마우스의 폐만의 생체내 형질감염을 보고한 바 있다. 인간 유전자 요법 절차의 검토 논문의 예는 하기의 것이다: 문헌 [Anderson, Science (1992) 256:808-813].

[0297] 추가 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 그 전문이 본원에 참조로 편입된 문헌 [Han et al., Nat. Comms. 7, 10981 (2016)]에 제공된 바와 같이, 동일한 제형으로 또는 별개의 제형으로 본 개시내용의 방법에서 탄수화물과 공동-투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 5% 글루코스, 5% 푸룩토스, 또는 5% 만노스와 함께 공동-투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 2.5% 글루코스 및 2.5% 푸룩토스와 함께 공동-투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 하기로부터 선택되는 탄수화물과 함께 공동-투여될 수 있다: 5 부피%의 양으로 존재하는 아라비노오스, 5 부피%의 양으로 존재하는 글루코스, 5 부피%의 양으로 존재하는 소르비톨, 5 부피%의 양으로 존재하는 갈락토스, 5 부피%의 양으로 존재하는 푸룩토스, 5 부피%의 양으로 존재하는 자일리톨, 5 부피%의 양으로 존재하는 만노스, 2.5 부피%의 양으로 각각 존재하는 글루코스 및 푸룩토스의 조합, 및 5.7 부피%의 양으로 존재하는 글루코스, 2.86 부피%의 양으로 각각 존재하는 푸룩토스, 및 1.4 부피%의 양으로 존재하는 자일리톨의 조합.

[0298] IV. 사용 방법

[0299] 엑손 스킵핑을 사용하는 디스트로핀 해독물의 복원

[0300] 디스트로핀 유전자에서 아웃오브프레임 돌연변이에 의해 야기된 DMD의 치료에 대한 잠재적인 치료 방법은 인프레임 돌연변이에 의해 야기되는 BMD로서 공지된 디스트로핀병증의 더 온화한 형태로 제시되었다. 아웃오브프레임 돌연변이를 인프레임 돌연변이로 전환하는 능력은 가설로서 mRNA 해독물을 보존하고, 내부적으로 단축된 다른 기능적 디스트로핀 단백질을 생성할 것이다. 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 이를 달성하기 위해 설계되었다.

[0301] 표적화된 전구-mRNA 서열을 갖는 PMO의 혼성화는 전구-mRNA 스플라이싱의 형성을 방지하고, 성숙한 mRNA로부터 엑손 51를 결손시킨다. 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체의 구조 및 형태는 서열-특이적 염기쌍에 대해 상보적 서열이 가능하게 한다. 유사한 메커니즘에 의해, 예를 들어, 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51을 스킵핑 하도록 설계된 PMO인 에테플리센은 서열-특이적 염기쌍에 대해 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51 내에 함유된 상보적 서열이 가능하게 한다.

[0302] 모든 79 엑손을 함유하는 정상 디스트로핀 mRNA는 정상 디스트로핀 단백질을 생성할 것이다. 도 1에서의 그래프는 엑손 47로부터 엑손 53까지의 디스트로핀 전구-mRNA 및 성숙한 mRNA의 작은 부분을 도시하고 있다. 각각의 엑손의 형상은 코돈이 엑손들 사이에서 분리되는 방식을 도시하고 있고; 중요하게는, 하나의 코돈이 3개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 직사각형 형상화된 엑손은 완전한 코돈으로 시작되고 종결된다. 화살표 형상화된 엑손은 완전한 코돈으로 시작되나, 코돈의 뉴클레오타이드 #1만을 함유하는 분리된 코돈으로 종결된다. 이러한 코돈의 뉴클레오타이드 #2 및 #3는 V형 형상으로 시작될 것인 후속 엑손에 함유된다.

[0303] 디스트로핀 유전자로부터의 전체 엑손이 결손된 디스트로핀 mRNA는 전형적으로 DMD를 야기한다. 도 2에서의 그래프는 DMD를 초래하는 것으로 공지된 유전적 돌연변이의 유형 (엑손 50의 결실)을 예시한다. 완전한 코돈 및 엑손 51에서의 엑손 49 단부가 코돈의 제2 뉴클레오타이드로 시작되고, 엑손 49 뒤의 해독물이 이동되어, 아웃오브프레임 mRNA 해독물 및 돌연변이로부터의 다운스트림에의 잘못된 아미노산의 혼입을 야기한다. 기능적 C-말단 디스트로글리칸 결합 도메인의 후속 부재는 불안정한 디스트로핀 단백질의 생산을 야기한다.

[0304] 에테플리센은 엑손 51을 스킵핑하여 mRNA 해독물을 복원한다. 완전한 코돈 및 엑손 52에서의 엑손 49 단부가 코돈의 제1 뉴클레오타이드로 시작되고, 엑손 51의 결실은 해독물을 복원하고, 이는 "인프레임" BMD 돌연변이에 유사한 온전한 디스트로글리칸 결합 부위를 갖는 내부적으로-단축된 디스트로핀 단백질의 생산을 야기한다 (도 3).

[0305] 디스트로핀 mRNA 열린 해독물을 복원하기 위해 엑손 스킵핑을 사용하여 DMD 표현형을 완화하는 실행가능성은 비임상적 연구에 의해 지지된다. DMD의 디스트로핀 동물 모델에서의 다수의 연구는 엑손 스킵핑에 의한 디스트로핀의 복원이 근육 강도 및 기능에서의 신뢰성 있는 개선을 유발하는 것으로 보여주었다 (문헌 [Sharp 2011; Yokota 2009; Wu 2008; Wu 2011; Barton-Davis 1999; Goyenvalle 2004; Gregorevic 2006; Yue 2006; Welch 2007; Kawano 2008; Reay 2008; van Putten 2012]). 이의 설득력 있는 예는 엑손 스킵핑 (PMO 사용) 요법 이후

의 디스트로핀 수준이 동일한 조직에서의 근육 기능과 비교되는 연구로부터의 것이다. 퇴행성 *mdx* 마우스에서, 마우스-특이적 PMO로 처리된 전경골근 (TA) 근육은 스트레스-유도 수축 이후에 이의 최대 힘 수용력의 ~75%를 유지하였고, 반면, 비치리된 반대측 TA 근육은 이의 최대 힘 수용력의 단지 ~25%만을 유지하였다 ($p < 0.05$) (Sharp 2011). 또 다른 연구에서, 3마리의 퇴행성 *CXMD* 개는 2-5 월령에서 그것의 유전적 돌연변이에 대해 특이적 PMO를 사용하는 엑손-스킵핑 요법을 5 내지 7 주 동안 1주 1회로 또는 22주 동안 격주로 받았다. 엑손-스킵핑 요법 이후, 모든 3마리 개는 골격 근육에서 디스트로핀의 광범위한 신체 전반의 발현뿐만 아니라, 기준에 비해 유지되거나 또는 개선된 보행 (15 m 달리기 시험)을 입증하였다. 그에 반해서, 비치리된 연령-매칭된 *CXMD* 개는 연구 과정에 걸쳐 보행에서의 현저한 감소를 나타내었다 (Yokota 2009).

[0306] PMO는 *mdx* 마우스 및 인간화된 DMD (hDMD) 마우스 모델 모두에서 포스포로티오에이트보다 등물 농도에서 더 높은 엑손 스킵핑 활성을 가지는 것을 보였고, 이는 전체 인간 DMD 전사체를 발현한다 (Heemskirk 2009). 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 상이한 돌연변이를 갖는 DMD 환자로부터의 정상 인간 골격 근육 세포 또는 근육 세포에서의 역전사 폴리머라제 연쇄 반응 (RT-PCR) 및 웨스턴 블랏 (WB)을 사용하는 시험관내 실험에서 엑손 51 스킵핑의 강력한 유도제로서 에테플리센 (PMO)을 확인하였다. 에테플리센-유도된 엑손 51 스킵핑은 hDMD 마우스 모델에서 생체내에서 확인되었다 (Arechavala-Gomez 2007).

[0307] 인간 디스트로핀 전구-mRNA의 엑손 51의 표적 영역에 대해 상보적이고, 엑손 51 스킵핑을 유도하는 안티센스 올리고머 결합체의 효과를 분석하기 위한 임상 결과는 디스트로핀 양성 섬유 (PDFF) 백분율, 6-분 걷기 테스트 (6MWT), 보행 (LOA)의 손실, 노스 스타 보행 평가 (North Star Ambulatory Assessment, NSAA), 폐 기능 시험 (PFT), 외부 지탱 없이 (반듯이 누운 위치로부터의) 일어나는 능력, 신규 디스트로핀 생성 및 다른 기능적 측정을 포함한다.

[0308] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서의 디스트로핀의 생성 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 안티센스 올리고머 결합체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용은 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 뒤센 근육 이상증 (DMD)을 앓는 대상체에서 디스트로핀 단백질 생산을 유도하기 위해 mRNA 해독물을 복원하는 방법을 제공한다. 단백질 생산은 역-전사 폴리머라제 연쇄 반응 (RT-PCR), 웨스턴 블랏 분석, 또는 면역조직화학 (IHC)에 의해 측정될 수 있다.

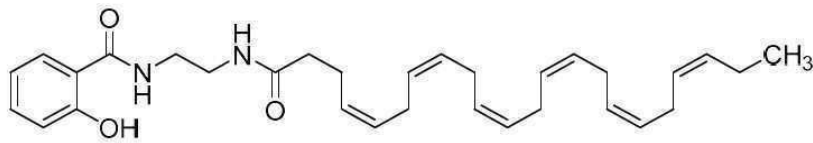
[0309] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 그것을 필요로 하는 대상체에서의 DMD를 치료하기 위한 방법을 제공하며, 여기서 상기 대상체는 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 가지고, 상기 방법은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 안티센스 올리고머 결합체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 다양한 구현예에서, 상기 대상체의 치료는 질환 진행의 지연에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체의 치료는 대상체에서의 보행의 유지 또는 대상체에서의 보행의 손실의 감소에 의해 측정된다. 특정 구현예에서, 보행이 노스 스타 보행 평가 (NSAA)를 사용하여 측정된다.

[0310] 다양한 구현예에서, 본 개시내용은 폐 기능의 유지를 위한 또는 DMD를 가진 대상체에서의 폐 기능의 손실을 감소시키기 위한 방법이 제공되며, 여기서 상기 대상체는 엑손 51 스킵핑이 허용가능한 DMD 유전자의 돌연변이를 가지고, 상기 방법은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 안티센스 올리고머 결합체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 폐 기능은 최대 날숨압 (MEP)으로서 측정된다. 특정 구현예에서, 폐 기능은 최대 흡기압 (MIP)으로서 측정된다. 일부 구현예에서, 폐 기능은 노력성 폐활량 (FVC)으로서 측정된다.

[0311] 추가 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 그 전문이 본원에 참조로 편입된 문헌 [Han *et al.*, Nat. Comms. 7, 10981 (2016)]에 제공된 바와 같이, 동일한 제형으로 또는 별개의 제형으로 본 개시내용의 방법에서 탄수화물과 공동-투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 5% 글루코스, 5% 푸룩토스, 또는 5% 만노스와 함께 공동-투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 2.5% 글루코스 및 2.5% 푸룩토스와 함께 공동-투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 하기로부터 선택되는 탄수화물과 함께 공동-투여될 수 있다: 5 부피%의 양으로 존재하는 아라비노오스, 5 부피%의 양으로 존재하는 글루코스, 5 부피%의 양으로 존재하는 소르비톨, 5 부피%의 양으로 존재하는 갈락토스, 5 부피%의 양으로 존재하는 푸룩토스, 5 부피%의 양으로 존재하는 자일리톨, 5 부피%의 양으로 존재하는 만노스, 2.5 부피%의 양으로 각각 존재하는 글루코스 및 푸룩토스의 조합, 및 5.7 부피%의 양으로 존재하는 글루코스, 2.86 부피%의 양으로 각각 존재하는 푸룩토스, 및 1.4 부피%의 양으로 존재하는 자일리톨의 조합.

[0312] 다양한 구현예에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고머 결합체는 치료적 유효량의 비-스테로이드 항-염증성 화합

물과 함께 공동-투여된다. 일부 구현예에서, 비-스테로이드 항-염증성 화합물은 NF-κB 억제제이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, NF-κB 억제제는 CAT-1004 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염일 수 있다. 다양한 구현예에서, NF-κB 억제제는 DHA 및 살리실레이트의 결합체일 수 있다. 일부 구현예에서, NF-κB 억제제는 CAT-1041 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이다. 특정 구현예에서, NF-κB 억제제는 EPA 및 살리실레이트의 결합체일 수 있다. 다양한 구현예에서, NF-κB 억제제는 하기와 같다:



[0313] , 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

[0314] 일부 구현예에서, 비-스테로이드 항-염증성 화합물은 TGF-β 억제제이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, TGF-β 억제제는 HT-100이다.

[0315] 특정 구현예에서, 요법에서 사용하기 위한 명세서에서 기재된 바와 같은 안티센스 올리고머 결합체가 기술되어 있다. 특정 구현예에서, 뒤센 근육 이상증의 치료에 사용하기 위한 명세서에서 기재된 바와 같은 안티센스 올리고머 결합체가 기술되어 있다. 특정 구현예에서, 뒤센 근육 이상증의 치료용 의약의 제조에 사용하기 위한 명세서에서 기재된 바와 같은 안티센스 올리고머 결합체가 기술되어 있다.

[0316] V. 키트

[0317] 본 개시내용은 또한 유전자 질환을 갖는 환자의 치료를 위한 키트를 제공하고, 이 키트는 적어도 안티센스 분자(예를 들면, 서열 번호: 1에 제시된 안티센스 올리고머를 포함하는 안티센스 올리고머 결합체)를 포함하고, 이의 사용을 위한 설명서와 함께 적합한 컨테이너에 포장된다. 또한, 키트는 주변 시약 예컨대 완충액, 안정화제 등을 포함할 수 있다. 본 기술분야의 당업자는 상기 방법의 적용이 다수의 다른 질환의 치료에 사용하는데 적합한 안티센스 분자를 확인하기 위한 폭넓은 응용분야를 가진다. 일 구현예에서, 키트는 식 (III)에 따른 안티센스 올리고머 결합체르 포함한다.

[0318] 실시예

[0319] 전술한 개시내용이 이해의 명확성의 목적을 위한 설명 및 예로서 어느 정도 상세하게 기재되었으나, 특정 변화 및 변형이 첨부된 청구항의 사상 또는 범위를 벗어남 없이 이루어질 수 있음은 본 개시내용의 교시와 관련하여 본 기술분야의 당업자에게 쉽게 이해될 것이다. 하기 그 예는 제한하기 위한 것이 아닌 단지 예시로서 제공된다. 본 기술분야의 숙련가는 유사한 결과를 본질적으로 산출하기 위해 변화되거나 또는 변형될 수 있는 다양한 비임계적 파라미터를 용이하게 인식할 것이다.

[0320] 물질 및 방법

[0321] 세포 및 조직 배양 처리 조건

[0322] 분화된 인간 근세포 (ZenBio, Inc.)를 이용하여 엑손 스킵핑을 측정하였다. 구체적으로, 근아세포 (ZenBio, Inc., SKB-F)는 성장 배지 (SKB-M; ZenBio, Inc.)에서 37°C 및 5% CO₂에서 80-90% 컨플루언스(confluence)에 도달되도록 성장되었다. 분화 배지 (SKM-D; ZenBio, Inc.)로 성장 배지를 교체함으로써 분화를 개시하였다. 엑손 51 스킵핑을 검정하기 위해, 1x10⁴ 분화된 세포는 24-웰 플레이트에 플레이팅하였고, 다양한 농도의 PMO 또는 PPMO를 함유하는 1 mL의 분화 배지 (SKM-D; ZenBio, Inc.)를 각 웰에 첨가하였고, 96시간 동안 인큐베이션하였다.

[0323] 웨스턴 블랏 분석

[0324] 웨스턴 블랏 분석을 위해, 133 μl의 완충액에서 대략 5 mm 직경으로 9 내지 18 x 20-μm 조직 절편의 비로 균질화 완충액 (4% SDS, 4 M 우레아, 125 mM 트리스-HCl (pH 6.8))으로 조직을 균질화시켰다. 상응하는 용해물을 수집하였고, 제조자의 지시 (BioRad Cat. 500-0122)에 따라 RC DC 단백질 검정 키트를 사용하여 단백질 정량화를 거쳤다. 조직 추출물 샘플을 BSA 표준 곡선의 범위 내에 포함되도록 균질화 완충액을 사용하여 1:10로 희석시켰다. 35 μl의 샘플이 25 μl의 단백질 용해물을 사용한 원하는 양의 단백질, 7 μl의 NuPAGE LDS 샘플 완충액 (Life Technologies Cat. NP0008, Carlsbad, 캘리포니아, USA), 및 3 μl의 NuPAGE 환원제 (10x) (Life Technologies Cat. NP0004)을 함유하도록 샘플을 제조하였다. 95°C에서 5분 동안 단백질 샘플을 가열한 이후,

샘플을 원심분리하였고, 상청액을 레인당 최대 50 μ g의 총 단백질 장입량으로 NuPAGE Novex 10 웰, 미니 3-8% 폴리아크릴아미드 트리스-아세트레이트 겔 (Life Technologies Cat. EA0375) 상에 장입하였다. 겔을 정면 염료가 겔 외부로 흘러나올 때까지 150 볼트에서 실온으로 실시하였다. NuPAGE 수송 완충액 (Life Technologies NP006-1), 10% 메탄올 및 0.1% NuPAGE 산화방지제 (Life Technologies NP0005)을 사용하여 30 볼트로 실온에서 75분 동안 PVDF 막 (Life Technologies Cat. LC2007)으로 단백질 겔을 수송하였다.

[0325] 단백질 수송 이후, PVDF 막을 TTBS 완충액 (1X TBS (Amresco Cat. J640-4L), 0.1% (v/v) 트윈-20)에 액침시켰다. 막을 블로킹 완충액 (TTBS 중의 5% (w/v) 탈지분유(Lab Scientific Cat. M0841))으로 수송하였고, 약한 흔들림을 사용하며 4℃에서 밤새 침지시켰다. 블로킹 이후, 블로킹 완충액을 사용하여 1:20으로 희석된 DYS1 (Leica Cat. NCL-DYS1)에서 60분 동안 실온에서, 또는 블로킹 완충액으로 1:100,000으로 희석된 항- α -악티닌 항체 (Sigma-Aldrich Cat. NA931V)에서 20분 동안 실온에서 막을 인큐베이션하였고, 이후 6회 세정(각각 TTBS로 5분)을 후속하였다. 홀스래디쉬 페록시다아제 (GE Healthcare Cat. NA931V)에 결합된 항-마우스 IgG를 블로킹 완충액을 사용하여 1:40,000으로 희석하였고, 45 분 (DYS1) 또는 15 분 (α -악티닌) 동안 막에 첨가하였고, 다시 6회 세정을 후속하였다. ECL 프라임 웨스턴 검출 키트 (GE Healthcare Cat. RPN2232)을 사용하여, 막을 겔에 노출시켰고, 이에 따라 현상시켰다. 현상된 필름을 스캐닝하였고, ImageQuant TL 플러스 소프트웨어 (버전 8.1)를 사용하여 분석하였고, 선형 회귀 분석을 Graphpad 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0326] 각각의 웨스턴 블랏 겔은 예를 들어, 64%, 16%, 4%, 1%, 및 0.25% (예를 들어 도 5a 및 도 5b)로 희석시킨 정상 조직 (마우스 사두근, 횡격막, 또는 심장)으로부터 추출된 총 단백질을 사용하여 준비된 4 또는 5 포인트 디스트로핀 표준 곡선을 포함하고, DMD 조직 (예를 들어, mdx 마우스 사두근, 횡격막, 또는 심장, 또는 NHP 사두근, 횡격막, 또는 평활근 (GI)) 추출물로 스캐닝하였다. 표준 곡선 샘플을 상기에 기재된 바와 같이 처리하였다. 디스트로핀 밴드 강도를 겔 표준 곡선과 비교함으로써 야생형 디스트로핀 수준 (%WT)의 백분율로서 디스트로핀 단백질 수준을 결정하였다.

[0327] RT-PCR 분석

[0328] RT-PCR 분석을 위해, 제조자의 프로토콜에 따라 Illustra GE 스핀 키트를 사용하여 세포로부터 RNA를 분리하였다. RNA의 농도 및 순도는 NanoDrop을 사용하여 결정하였다. 엑손 51 스킵핑을 엑손 49 서열번호: 5 (5'-CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG-3')을 결합하는 정방향 프라미어 및 엑손 52 서열번호: 6 (5'-CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC-3')을 결합하는 역방향 프라이머를 사용하여 RT-PCR에 의해 측정하였다. 스킵핑된 엑손 51은 246 bp 앰플리콘을 야기하고, 비스킵핑된 엑손 51은 478 bp 앰플리콘을 야기하였다.

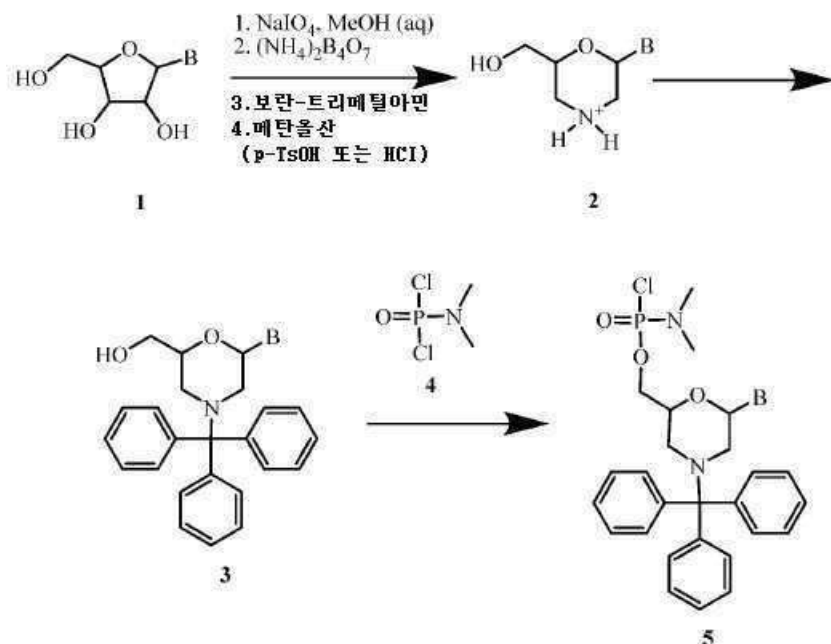
[0329] 마우스 엑손 23 스킵핑을 정방향 프라미어-서열번호: 7 (5'-CACATCTTTGATGGTGTGAGG-3') 및 역방향 프라이머 서열번호: 8 (5'-CAACTTCAGCCATCCATTTCTG -3')을 사용하여 RT-PCR에 의해 측정하였다.

[0330] RNA가 RT-PCR에 가해진 후, 겔 모세관 전기영동을 사용하여 캘리퍼스 기계를 사용하여 샘플을 분석하였다. 엑손 스킵핑 백분율을 하기 식을 사용하여 계산하였다: (스킵핑된 밴드에 대한 곡선하 면적)/(스킵핑된 및 비스킵핑된 밴드에 대한 곡선하 면적의 합계)x100.

[0331] 면역조직화학: 디스트로핀 염색:

[0332] 마우스 사두근의 10 마이크론의 냉동된 조직 절편을 사용하여 PBS 중의 10% 염소 혈청 + 1% BSA에서의 디스트로핀 일차 항체 (희석 1:250, 토끼, Abcam, cat#ab15277) 및 10% 염소 혈청 + 1% BSA 중의 이차 항체 Alexa-플루오로 488 염소 항-토끼 (1:1000의 희석)에 의해 디스트로핀을 검출하였다.

[0333] 모르폴리노 하위단위의 제조



[0334]

[0335]

반응식 1: PMO 하위단위에 대한 일반 합성 경로

[0336]

반응식 1을 참조하면, B는 염기쌍 모이어티를 나타내고, 모르폴리노 하위단위는 나타난 바와 같은 상응하는 리비뉴클레오사이드 (1)로부터 제조될 수 있다. 모르폴리노 하위단위 (2)는 적합한 보호기 전구체, 예를 들면 트리틸 염화물과의 반응에 의해 선택적으로 보호될 수 있다. 3' 보호기는 일반적으로 하기에 보다 상세하게 기재되는 고체상 올리고머 합성 과정에서 제거된다. 염기쌍 모이어티는 고체상 올리고머 합성을 위해 적합하게 보호될 수 있다. 적합한 보호기는 아데닌 및 시토신에 대해 벤조일, 구아닌에 대해 페닐아세틸, 및 하이포잔틴 (I)에 대해 피발로일옥시메틸을 포함한다. 피발로일옥시메틸기는 하이포잔틴 복소환형 염기의 N1 위치 상에 도입될 수 있다. 비보호된 하이포잔틴 하위단위가 이용될 수 있지만, 활성화 반응에서의 수율은 상기 염기가 보호되는 경우 훨씬 높다. 다른 적합한 보호기는 미국특허 번호 8,076,476에 개시된 것을 포함하고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0337]

3의 활성화된 인 화합물 4와의 반응은 원하는 연결 모이어티 5를 갖는 모르폴리노 하위단위를 야기한다.

[0338]

구조 4의 화합물은 본 기술분야에 공지된 임의의 수의 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 모르폴리노 모이어티와의 커플링은 이후 상기 개략된 바와 같이 진행된다.

[0339]

구조 5의 화합물은 하위단위간 연결기를 포함하는 올리고머의 제조를 위한 고체상 올리고머 합성시 사용될 수 있다. 이와 같은 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 간단히 말하자면, 구조 5의 화합물은 5' 말단에서 개질되어 고형 지지체에 대한 링커를 포함할 수 있다. 지지되는 경우, 5의 보호기 (예를 들면, 3'-말단에서의 트리틸)는 제거되고, 유리 아민이 구조 5의 제2 화합물의 활성화된 인 모이어티와 반응된다. 이러한 순서는 원하는 길이의 올리고머가 얻어질 때까지 반복된다. 보호기는 터미널 3' 말단에서의 보호기는 제거되거나 또는 3' 개질이 바람직한 경우 남겨질 수 있다. 올리고는 임의의 수의 방법, 또는 고형 지지체에서의 연결을 분리하기 위한 염기 처리의 예시적 처리를 사용하여 고형 지지체로부터 제거될 수 있다.

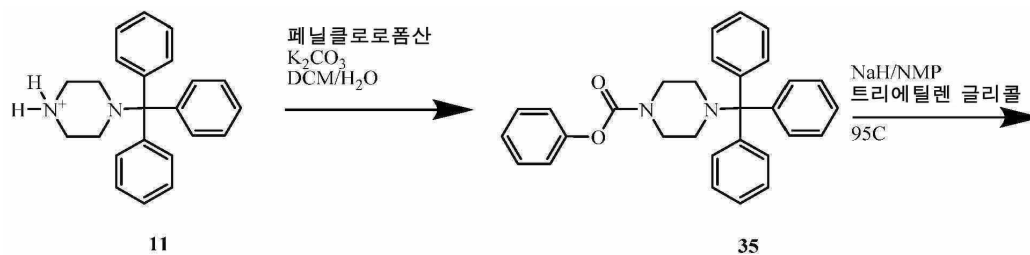
[0340]

본 개시내용의 일반적인 및 특정한 모르폴리노 올리고머에서의 모르폴리노 올리고머의 제조는 하기 실시예에 보다 상술되어 있다.

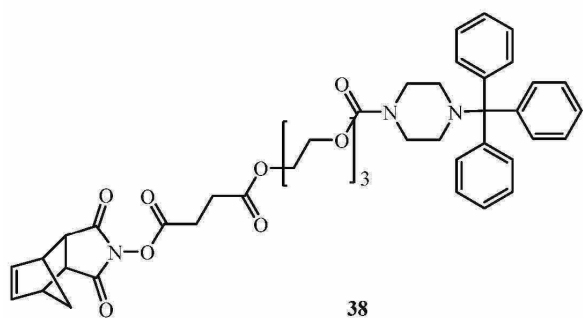
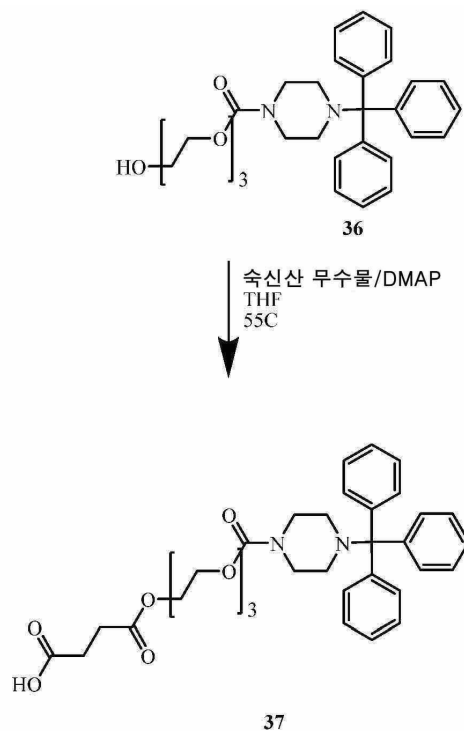
[0341]

모르폴리노 올리고머의 제조

[0342] 본 개시내용의 화합물의 제조는 하기 반응식 2에 따라 하기 프로토콜을 사용하여 수행된다:



[0343]



[0344]

[0345] 반응식 2: 활성화된 테일 산의 제조

[0346] 트리틸 피페라진 페닐 카바메이트 35의 제조: 디클로로메탄 (6 mL/g 11) 중의 화합물 11의 냉각된 현탁액에 수 중의 탄산칼륨 (3.2 당량)의 첨가된 용액 (4 mL/g 탄산칼륨)을 첨가하였다. 이러한 2-상 혼합물에 디클로로메탄 중의 페닐 클로로포르메이트 (1.03 당량)(2 g/g 페닐 클로로포르메이트)의 용액을 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C로 가온시켰다. 반응 완료(1-12시간)시, 층을 분리하였다. 유기층을 물로 세정하였고, 무수 탄산칼륨으로 건조시켰다. 생성물 35를 아세토니트릴로부터의 결정화에 의해 분리하였다.

[0347] 카바메이트 알코올 36의 제조: 수소화나트륨 (1.2 당량)을 1-메틸-2-피롤리디논에 현탁시켰다 (32 mL/g 수소화나트륨). 이 현탁액에 트리에틸렌 글리콜 (10.0 당량) 및 화합물 35 (1.0 당량)을 첨가하였다. 수득한 슬러리를 95°C로 가열하였다. 반응 완료 (1-2 시간)시, 혼합물을 20°C로 냉각시켰다. 이러한 혼합물에 30% 디클로로메탄/메틸 tert-부틸 에테르 (v:v) 및 물을 첨가하였다. 생성물-함유 유기층을 수성 NaOH, 수성 석신산, 및 포화된 수성 염화나트륨으로 연속적으로 세정하였다. 생성물 36을 디클로로메탄/메틸 tert-부틸 에테르/헵탄으로부터의

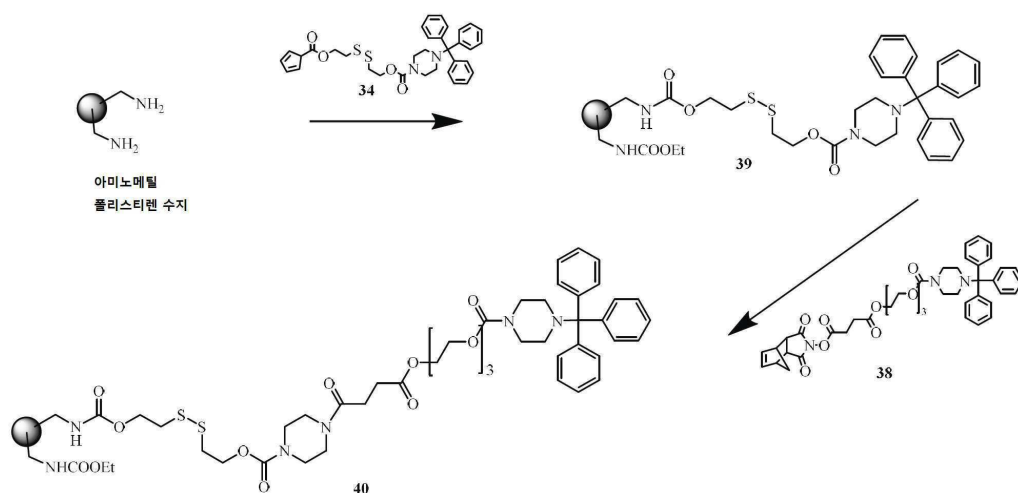
결정화에 의해 분리하였다.

[0348] 테일 산 **37**의 제조: 테트라하이드로푸란 (7 mL/g **36**) 중의 화합물 **36**의 용액에 석신산 무수물 (2.0 당량) 및 DMAP (0.5 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 50℃로 가열하였다. 반응 완료 (5 hr)시, 혼합물을 20℃로 냉각시키고, 수성 NaHCO₃로 pH 8.5로 조정하였다. 메틸 tert-부틸 에테르를 첨가하였고, 생성물을 수성층으로 추출하였다. 디클로로메탄을 첨가하고, 혼합물을 수성 시트르산으로 pH 3으로 조정하였다. 생성물-함유 유기층을 pH=3 시트레이트 완충액 및 포화된 수성 염화나트륨의 혼합물로 세정하였다. **37**의 이 디클로로 메탄 용액을 화합물 **38**의 제조시 분리 없이 사용하였다.

[0349] **38**의 제조: 화합물 **37**의 용액에 N-하이드록시-5-노르보르넨-2,3-디카복실산 이미드 (HONB) (1.02 당량), 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP) (0.34 당량), 및 그 다음 1-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드 (EDC) (1.1 당량)에 첨가하였다. 혼합물을 55℃로 가열하였다. 반응 완료(4-5 시간)시, 혼합물을 20℃로 냉각시키고, 1:1 0.2 M 시트르산/염수 및 염수로 연속적으로 세정하였다. 디클로로메탄 용액은 아세톤으로, 그 다음 N,N-디메틸포름아미드로 용매 교환되었고, 생성물을 아세톤/ N,N-디메틸포름아미드로부터 포화된 수성 염화나트륨으로의 침전에 의해 분리하였다. 조 생성물을 물에서 수회 재슬러리화시켜 잔류 N,N-디메틸포름아미드 및 염을 제거하였다.

[0350] PMO 합성 방법 A: 디설파이드 앵커의 사용

[0351] 앵커-장입된 수지 상에의 활성화된 "테일"의 도입을 고상 합성 과정에서 하위단위의 혼입을 위해 사용되는 절차에 의해 디메틸 이미다졸리딘은 (DMI)에서 수행되었다.



[0352]

[0353] 반응식 3: 모르폴리노 올리고머의 합성을 위한 고품 지지체의 제조

[0354] 이러한 절차를 조립 다공성 (40-60 μm) 유리 프리트, 오버헤드 교반기, 및 3-웨이 테플론 스톱콥을 갖는 실란화된 재킷형 펌프타이드 용기 (ChemGlass, NJ, USA)에서 수행하여 N₂가 프리트 또는 진공 추출을 통해 버블링되게 한다.

[0355] 하기 절차에서의 수지 처리/세정 단계는 2개의 기본 작업으로 구성된다: 수지 유동화 또는 교반기 층 반응기 및 용매/용액 추출. 수지 유동화를 위해, 스톱콥을 배치하여 N₂가 프리트를 통해 상향 유동시킬 수 있고, 특정된 수지 처리/세정물은 반응기에 부가되어 수지에 투과되어 완전하게 습윤시키게 한다. 혼합을 이후 시작하고, 수지 슬러리를 특정 시간 동안 혼합하였다. 용매/용액 추출의 경우, 혼합 및 N₂ 유동을 중단시키고, 진공 펌프를 개시하고, 그 다음 스톱콥을 수지 처리/세정물을 배출하여 폐기시켰다. 모든 수지 처리/세정물 용적은 달리 언급되지 않는 한 15 mL/수지의 g이었다.

[0356] 실란화된 재킷형 펌프타이드 용기 중의 아미노메틸폴리스티렌 수지 (100-200 메쉬; 질소 치환에 기초한 ~1.0 mmol/g 하중; 75 g, 1 당량, 폴리머 Labs, UK, 파트 #1464-X799)에 1-메틸-2-피롤리딘 (NMP; 20 ml/g 수지)을 첨가하였고, 수지를 1-2 시간 동안 혼합하여 팽윤시켰다. 팽윤 용매의 배출 이후, 수지를 디클로로메탄 (2 x 1-2 min), 25% 이소프로판올/디클로로메탄 (2 x 3-4 min) 중의 5% 디이소프로필에틸아민 및 디클로로메탄 (2 x 1-2 min)으로 세정하였다. 최종 세정물의 배출 이후, 수지를 1-메틸-2-피롤리딘 중의 디설파이드 앵커 **34**의

용액 (0.17 M; 15 mL/g 수지, ~2.5 당량)으로 처리하였고, 수지/시약 혼합물을 60시간 동안 45℃에서 가열하였다. 반응 완료시, 가열을 중단하였고, 앵커 용액을 배출하고, 수지를 1-메틸-2-피롤리디논 (4 x 3-4 min) 및 디클로로메탄 (6 x 1-2 min)으로 세정하였다. 수지를 디클로로메탄 중의 10% (v/v) 디에틸 디카보네이트의 용액 (16 mL/g; 2 x 5-6 min)으로 처리하였고, 그 다음 디클로로메탄 (6 x 1-2 min)으로 세정하였다. 수지 39는 1-3 시간 동안 N2 스트림 하에서 건조시키고, 이후 진공 하에서 일정 중량 (± 2%)으로 건조시켰다. 수율: 최초 수지 중량의 110-150%.

[0357] 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지의 장입의 결정: 수지의 장입 (잠재적으로 이용가능한 반응성 부위의 수)은 수지의 그램당 트리페닐메틸 (트리틸) 기의 수에 대한 분광법 검정에 의해 결정한다.

[0358] 공지된 중량의 건조된 수지 (25 ± 3 mg)는 실란화된 25 ml 용적 플라스크로 이송되었고, 디클로로메탄 중의 2% (v/v) 트리플루오로아세트산 ~5 mL를 첨가하였다. 내용물을 온건한 스월링에 의해 혼합하고, 그 다음 30분 동안 정치시켰다. 용적은 디클로로메탄 중의 추가의 2% (v/v) 트리플루오로아세트산과 함께 최대 25 mL이었고, 내용물을 완전하게 혼합하였다. 직접 치환 피펫을 사용하여, 트리틸-함유 용액 (500 µL)의 분취액을 10 mL 용적 플라스크로 이송시켰고, 용적은 메탄설폰산과 함께 최대 10 mL이었다.

[0359] 최종 용액에서의 트리틸 양이온 함량은 431.7 nm 에서 UV 흡광도에 의해 측정하였고, 수지 장입량은 적절한 용적, 희석, 소광 계수 (ϵ : 41 µmol-lcm⁻¹) 및 수지 중량을 사용하여 수지 그램당 트리틸기 (µmol/g)로 계산하였다. 검정을 3회 수행하고, 평균 장입량을 계산하였다.

[0360] 본 실시예에서 수지 장입 절차는 대략 500 µmol/g의 장입량을 갖는 수지를 제공할 것이다. µmol/g로의 300-400의 장입량은 디설파이드 앵커 혼입 단계가 실온에서 24시간 동안 수행되는 경우에 얻어진다.

[0361] 테일 장입: 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지의 제조를 위한 동일한 설정 및 용적을 사용하여, 테일은 고형 지지체로 도입될 수 있다. 앵커 장입된 수지를 우선 산성 조건 하에 탈보호시켰고, 생성된 물질을 커플링 이전에 중화시켰다. 커플링 단계의 경우, 4-에틸모폴린 (NEM, 0.4 M)을 함유하는 DMI 중의 38 (0.2 M)의 용액을 디설파이드 앵커 용액에 대신에 사용하였다. 45℃에서 2시간 이후, 수지 39를 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중의 5% 디이소프로필에틸아민으로 2회 세정하였고, DCM로 1회 세정하였다. 수지에 벤조산 무수물 (0.4 M) 및 NEM (0.4 M)의 용액을 첨가하였다. 25분 이후에, 반응기 재킷을 실온으로 냉각시켰고, 수지를 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중의 5% 디이소프로필에틸아민으로 2회 세정하였고, DCM로 8회 세정하였다. 수지 40을 여과시켰고, 고진공 하에 건조시켰다. 수지 40에 대한 장입량은 테일 장입량에서 사용되는 최초 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지 39의 장입인 것으로 정의된다.

[0362] 고상 합성: 모르폴리노 올리고머를 2 mL Gilson 폴리프로필렌 반응 칼럼 (파트 # 3980270) 중의 Gilson AMS-422 자동화 펌프타이드 합성기 상에서 제조하였다. 물 흐름을 위한 채널을 갖는 알루미늄 블록을 합성기 상에 배치되도록 칼럼 주변에 배치하였다. AMS-422는 대안적으로 시약/세정 용액이 첨가되고, 특정 시간 동안 유지되고, 진공을 사용하여 컬럼을 배출하였다.

[0363] 길이가 최대 약 25 하위단위의 범위의 올리고머의 경우, 대략 500 µmol/g의 수지의 장입량을 갖는 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지가 바람직하다. 더 큰 올리고머의 경우, 300-400 µmol/g의 수지의 장입량을 갖는 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지가 바람직하다. 5'-테일을 갖는 분자가 바람직한 경우, 테일과 함께 장입된 수지는 동일한 장입 지침으로 선택된다.

[0364] 하기 시약 용액을 제조하였다:

[0365] ● 탈트리틸화 용액: 4:1 디클로로메탄/아세트니트릴 중의 10% 시아노아세트산 (w/v);

[0366] ● 중화 용액: 3:1 디클로로메탄/이소프로판올 중의 5% 디이소프로필에틸아민; 및

[0367] ● 커플링 용액: 1,3-디메틸이미다졸리딘 중의 원하는 염기 및 연결 유형의 0.18 M (또는 20개 초과 하위단위로 성장된 올리고머의 경우 0.24 M) 활성화된 모르폴리노 하위단위 및 0.4 M N 에틸모폴린.

[0368] 디클로로메탄 (DCM)을 상이한 시약 용액 세정물을 분리하는 과도기적 세정으로서 사용되었다.

[0369] 합성기 상에서 42℃로 설정된 블록을 사용하여, 30 mg의 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지 (또는 테일 수지)를 포함하는 각각의 칼럼에 2 mL의 1-메틸-2-피롤리디논에 첨가하였고, 30분 동안 실온에 두었다. 2회의 2 mL의 디클로로메탄으로 세정한 이후, 하기 합성 사이클을 이용하였다:

단계	체적	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
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
커플링	350-500uL	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

[0370]

[0371]

개별 올리고머의 순서를 합성기로 프로그래밍하였고, 이로써 컬럼은 적절한 순서로 적절한 커플링 용액 (A,C,G,T,I)을 공급받았다. 컬럼에서의 올리고머가 그것의 최종 하위단위의 완료된 혼입을 가지는 경우, 컬럼은 블록으로부터 제거되었고, 최종 사이클을 0.89 M 4-에틸모폴린을 함유하는 4-메톡시트리페닐메틸 염화물 (DMI 중의 0.32 M)로 구성된 커플링 용액을 사용하여 수작업으로 수행하였다.

[0372]

염기 및 골격 보호기의 제거 및 수지로부터의 절단: 메톡시트리틸화 이후, 수지를 2 mL 1-메틸-2-피롤리디논으로 8회 세정하였다. 1-메틸-2-피롤리디논 중의 1mL의 0.1 M 1,4-디티오트레이톨 (DTT) 및 0.73 M 트리에틸아민으로 이루어진 1 mL의 절단 용액을 첨가하였고, 컬럼을 캡핑시키고, 실온에서 30분 동안 정치시켰다. 그 이후, 용액을 12 mL Wheaton 바이알로 배출시켰다. 매우 수축된 수지를 300 μ L의 절단 용액으로 2회 세정하였다. 용액을 4.0 mL 농축 암모니아수 (-20℃에서 저장함)를 첨가하였고, 바이알을 (테플론 라이닝된 스크류 캡을 사용하여) 단단하게 캡핑하였고, 혼합물을 와류시켜 용액을 혼합하였다. 바이알을 16-24 시간 동안 45℃ 오븐에 배치하여 염기 및 골격 보호기의 절단을 실시하였다.

[0373]

조 생성물 정제: 유리병에 넣은 암모니아분해 용액을 오븐으로부터 빼내고, 실온으로 냉각시켰다. 용액을 20 mL의 0.28% 암모니아수로 희석시켰고, Macroprep HQ 수지 (BioRad)를 포함하는 2.5x10 cm 컬럼에 통과시켰다. 염구배 (A: 0.28% 암모니아와 함께 B: 0.28% 암모니아 중의 1 M 염화나트륨; 0-100% B, 60분 이내)를 사용하여 메톡시트리틸 함유 피크를 용리시켰다. 조합된 분획을 모집하였고, 원하는 생성물에 따라 추가로 처리하였다.

[0374]

모르폴리노 올리고머의 데메톡시트리틸화: Macroprep 정제로부터의 모집된 분획은 1 M H3PO4로 처리하여 2.5로 pH를 낮추었다. 초기 혼합 이후, 샘플을 실온에서 4분 동안 정치시켰고, 일정 시점에서 2.8% 암모니아/물을 사용하여 pH 10-11로 중화시킨다. 생성물을 고상 추출 (SPE)로 정제하였다.

[0375]

SPE 컬럼 팩킹 및 컨디셔닝: Amberchrome CG-300M (Rohm 및 Haas; 펜실베이니아주 필라델피아 소재)은 20 mL 용

용된 칼럼 (BioRad Econo-Pac 크로마토그래피 칼럼 (732-1011))에 팩킹시켰고, 수지를 3 mL의 하기의 것으로 세정하였다: 0.28% NH₄OH / 80% 아세토니트릴; 0.5M NaOH / 20%에탄올; 물; 50 mM H₃PO₄ / 80% 아세토니트릴; 물; 0.5 NaOH / 20% 에탄올; 물; 0.28% NH₄OH.

[0376] SPE 정제: 데메톡시트리틸화로부터의 용액을 칼럼에 장입하였고, 수지를 3-6 mL 0.28% 암모니아수로 3회 세정하였다. Wheaton 바이알 (12 mL)을 컬럼 하에 배치시켰고, 생성물을 0.28% 암모니아수 중의 2 mL의 45% 아세토니트릴로의 2회의 세정으로 용출시켰다.

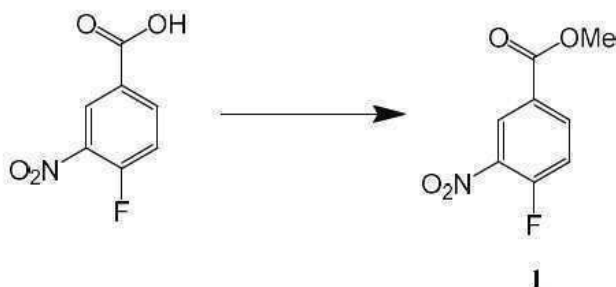
[0377] 생성물 분리: 용액을 드라이아이스에서 냉동시켰고, 바이알을 냉동 건조기에 배치하여 습털 같은 백색 분말을 생성하였다. 샘플을 물에 용해시키고, 주사기를 사용하여 0.22 마이크론 필터 (Pall Life Sciences, Acrodisc 25 mm 주사기 필터, 0.2 마이크론 HT Tuffryn 막을 가짐)에 통과시켰고, 광학 밀도 (OD)을 UV 분광측정기 상에서 측정하여 존재하는 올리고머의 OD 단위를 결정할 뿐만 아니라 분석을 위한 샘플을 분산시켰다. 용액을 이후 동결건조용 Wheaton 바이알에 다시 배치하였다.

[0378] MALDI에 의한 모르폴리노 올리고머의 분석: MALDI-TOF 질량 분광분석법을 사용하여 정제에서의 분획의 조성을 결정할 뿐만 아니라 올리고머의 동일성 (분자량)에 대한 증거를 제공하였다. 매트릭스로서 3,5-디메톡시-4-하이드록시신남산 (시나피닉산), 3,4,5-트리하이드록시아세토펜 (THAP) 또는 알파-시아노-4-하이드록시신남산 (HCCA)의 용액으로의 희석 이후에 샘플을 실시하였다.

[0379] PMO 합성 방법 B: NCP2 앵커의 사용

[0380] NCP2 앵커 합성:

[0381] 1. 메틸 4-플루오로-3-니트로벤조에이트 (1)의 제조

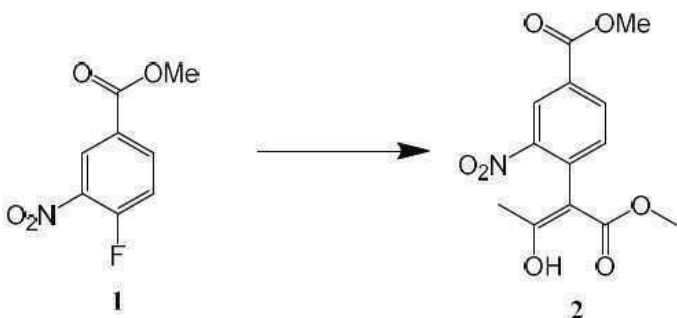


[0382]

[0383] 100 L 플라스크에 12.7 kg의 4-플루오로-3-니트로벤조산을 충전하였고, 40 kg의 메탄올 및 2.82 kg 농축된 황산을 첨가하였다. 혼합물을 36시간 동안 환류(65℃) 하에 교반하였다. 혼합물을 4시간 동안 0℃로 유지하였고, 이후 질소 하에 여과하였다. 100 L 플라스크를 세정하고, 필터 케이크를 0℃로 냉각된 10 kg의 메탄올로 세정하였다. 고체 필터 케이크를 1시간 동안 깔때기 상에서 건조하였고, 트레이로 이송시켰고, 13.695 kg의 일정 중량의 메틸 4-플루오로-3-니트로벤조에이트 (100% 수율; HPLC 99%)로 실온에서 진공 오븐에서 건조시켰다.

[0384] 2. 3-니트로-4-(2-옥소프로필)벤조산의 제조

[0385] A. (Z)-메틸 4-(3-하이드록시-1-메톡시-1-옥소부트-2-엔-2-일)-3-니트로벤조에이트 (2)

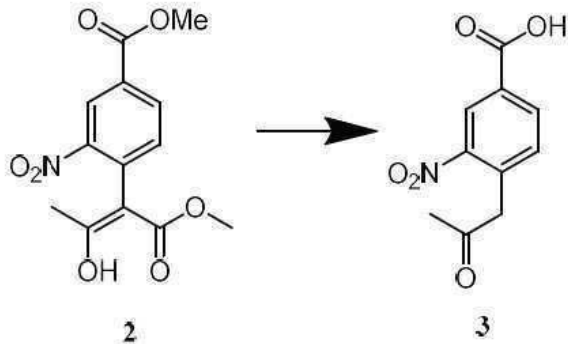


[0386]

[0387] 100 L 플라스크에 이전 단계로부터의 3.98 kg의 메틸 4-플루오로-3-니트로벤조에이트 (1), 9.8 kg DMF, 2.81 kg 메틸 아세토아세테이트를 충전하였다. 혼합물을 교반하였고, 0℃로 냉각하였다. 이에 온도를 5℃에서 또는

그 미만으로 유지하면서 약 4시간에 걸쳐 3.66 kg DBU를 첨가하였다. 혼합물을 추가 1시간 동안 교반하였다. 반응 온도를 15℃에서 또는 그 미만으로 유지하면서 반응 플라스크에 37.5 kg의 정제수 중의 8.15 kg의 시트르산의 용액을 첨가하였다. 첨가 이후, 반응 혼합물을 추가의 30분 동안 교반하였고, 이후 질소 하에 여과하였다. 습윤 필터 케이크를 14.8 kg의 정제수와 함께 100 L 플라스크로 복귀시켰다. 슬러리를 10분 동안 교반하고 이후 여과시켰다. 습윤 케이크를 다시 100 L 플라스크로 복귀시키고, 10분 동안 14.8 kg의 정제수로 슬러리화하였고, 조물질 (Z)-메틸 4-(3-하이드록시-1-메톡시-1-옥소부트-2-엔-2-일)-2-니트로벤조에이트로 여과하였다.

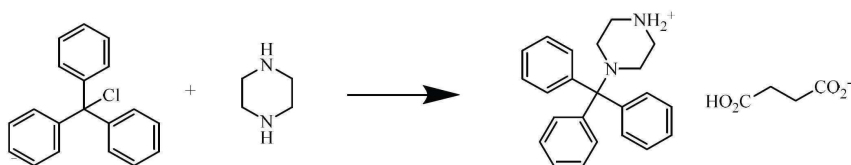
[0388] B. 3-니트로-4-(2-옥소프로필)벤조산



[0389]

[0390] 조물질 (Z)-메틸 4-(3-하이드록시-1-메톡시-1-옥소부트-2-엔-2-일)-3-니트로벤조에이트를 질소 하에 100 L 반응 플라스크에 충전하였다. 이에 14.2 kg 1,4-디옥산을 첨가하였고, 교반하였다. 반응 혼합물의 온도를 15℃ 미만으로 유지하면서 혼합물에 16.655 kg 농축된 HCl 및 13.33 kg 정제수 (6 M HCl)의 용액을 2시간에 걸쳐 첨가하였다. 첨가가 완료되는 경우, 반응 혼합물을 환류 (80℃) 하에 24시간 동안 가열하였고, 실온으로 냉각하였고, 질소 하에 여과하였다. 고체 필터 케이크를 14.8 kg의 정제수로 분말화하고, 여과시키고, 다시 14.8 kg의 정제수로 분말화하고, 여과시켰다. 고형물을 39.9 kg의 DCM를 가진 100 L 플라스크로 복귀시켰고, 1시간 동안 교반하면서 환류시켰다. 1.5 kg의 정제수를 첨가하여 잔류 고형물을 용해시켰다. 바닥 유기층을 예비-가온된 72 L 플라스크에 분리하였고, 이후 깨끗한 건조 100 L 플라스크로 복귀시켰다. 용액을 0℃로 냉각시켰고, 1시간 동안 유지하였고, 이후 여과시켰다. 고체 필터 케이크를 각각 9.8 kg DCM 및 5 kg 헵탄의 용액으로 각각 2회 세정하였고, 이후 깔때기 상에서 건조시켰다. 고형물을 트레이로 수송하였고, 1.855 kg의 일정 중량의 3-니트로-4-(2-옥소프로필)벤조산으로 건조시켰다. 화합물 1로부터의 전체 수율 42%. HPLC 99.45%.

[0391] 3. N-트리틸피페라진 석시네이트 (NTP)의 제조



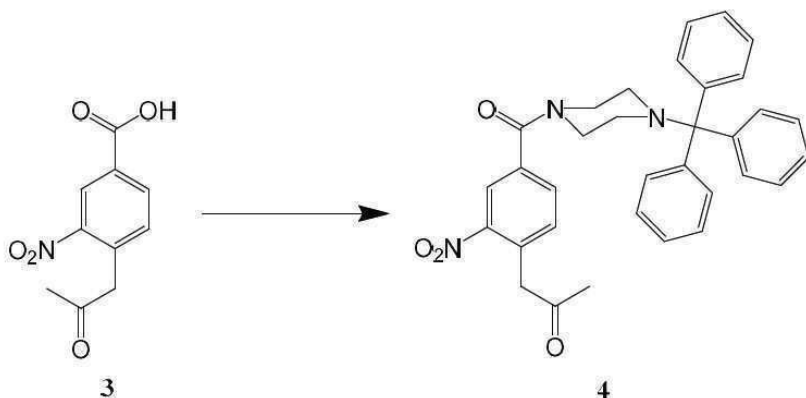
[0392]

[0393] 72 L 자켓형 플라스크에 1.805 kg 트리페닐메틸 클로라이드 및 8.3 kg의 톨루엔 (TPC 용액)을 질소 하에 충전하였다. 혼합물을 고형물이 용해될 때까지 교반하였다. 100 L 자켓형 플라스크에 5.61 kg 피페라진, 19.9 kg 톨루엔, 및 3.72 kg 메탄올을 질소 하에 첨가하였다. 혼합물을 교반하고, 0℃로 냉각하였다. 반응 온도를 10℃로 또는 그 미만으로 유지하면서 이에 TPC 용액을 4시간에 걸쳐 분할하여 서서히 첨가하였다. 혼합물을 10℃에서 1.5 시간 동안 교반하였고, 이후 14℃로 가온하였다. 32.6 kg의 정제수를 72 L 플라스크에 충전하였고, 이후 내부 배치 온도를 20 +/- 5℃로 유지하면서 100 L 플라스크로 수송하였다. 층을 분리하여 바닥 수성층을 분리하여 저장하였다. 유기층을 각각 32 kg의 정제수로 3회 추출하였고, 수성층을 분리하고 저장된 수성 용액과 조합하였다.

[0394] 잔류 유기층을 18℃로 냉각시켰고, 10.87 kg의 정제수 중의 847 g의 석신산을 유기층에 분할하여 서서히 첨가하였다. 혼합물을 20 +/- 5℃로 1.75 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하였고, 고형물을 2 kg TBME 및 2 kg의 아세톤으로 세정하였고, 이후 깔때기 상에서 건조하였다. 필터 케이크를 각각 5.7 kg의 아세톤으로 2회 연마하고, 여과시켰고, 연마 사이에 1 kg의 아세톤으로 세정하였다. 고형물을 깔때기 상에서 건조하고, 트레이로 이송시켰고, 실온에서 진공 오븐 중에서 2.32 kg의 일정 중량의 NTP로 건조시켰다. 수율 80%.

[0395] 4. (4-(2-하이드록시프로필)-3-니트로페닐)(4-트리틸피페라진-1-일)메탄온의 제조

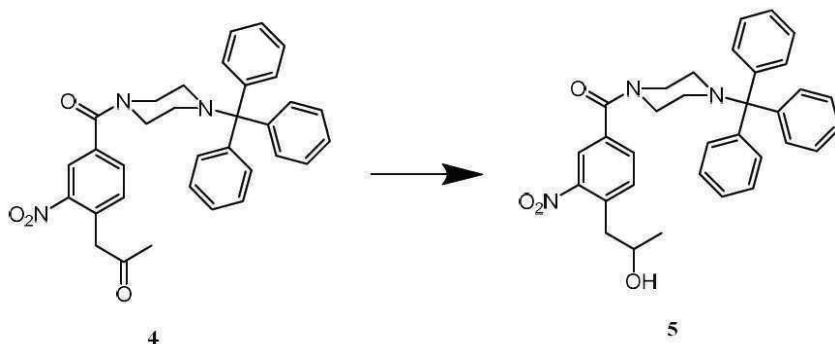
[0396] A. 1-(2-니트로-4(4-트리틸피페라진-1-카보닐)페닐)프로판-2-온의 제조



[0397]

[0398] 100 L 재킷형 플라스크에 질소 하에서 2 kg의 3-니트로-4-(2-옥소프로필)벤조산 (3), 18.3 kg DCM, 및 1.845 kg N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드 (EDC.HCl)를 충전하였다. 균질 혼합물이 형성될 때까지 용액을 교반하였다. 3.048 kg의 NTP를 실온에서 30분에 걸쳐 첨가하였고, 8시간 동안 교반하였다. 5.44 kg의 정제수를 반응 혼합물에 첨가하였고, 30분 동안 교반하였다. 층을 분리하였고, 생성물을 함유한 바닥 유기층을 배출하여 저장하였다. 수성층을 5.65 kg의 DCM으로 2회 추출하였다. 조합된 유기층을 4.08 kg의 정제수 중의 1.08 kg의 염화나트륨의 용액으로 세정하였다. 유기층을 1.068 kg의 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시켰다. 황산나트륨을 1.3 kg의 DCM으로 세정하였다. 조합된 유기층을 252 g의 실리카겔로 슬러리화하였고, 252 g의 실리카겔의 층을 함유한 필터 깔때기를 통해 여과시켰다. 실리카겔층을 2 kg의 DCM으로 세정하였다. 조합된 유기층을 회전증발기 상에서 증발시켰다. 4.8 kg의 THF를 잔류물에 첨가하였고, THF 중의 2.5 용적의 조물질을 1-(2-니트로-4(4-트리틸피페라진-1-카보닐)페닐)프로판-2-온이 달성될 때까지 회전증발기 상에서 증발시켰다.

[0399] B. (4-(2-하이드록시프로필)-3-니트로페닐)(4-트리틸피페라진-1-일)메탄온 (5)의 제조

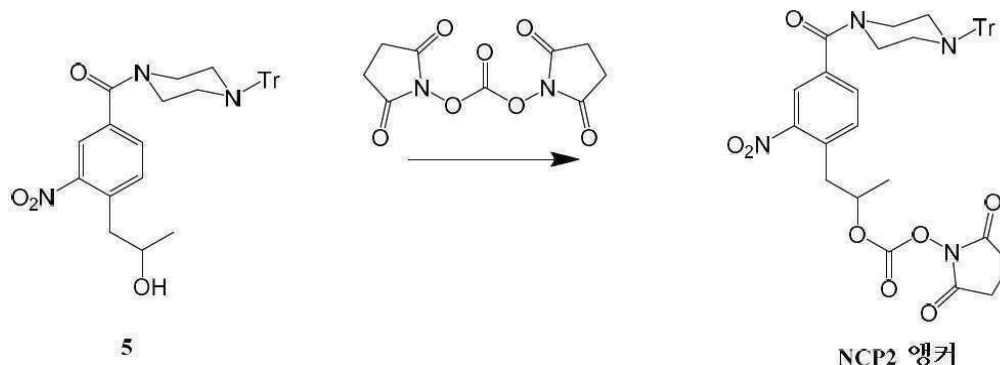


[0400]

[0401] 100 L 자켓형 플라스크에 질소 하에 이전 단계로부터의 3600 g의 4, 및 9800 g THF를 첨가하였다. 교반된 용액을 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 로 냉각시켰다. 용액을 11525 g 에탄올로 희석시켰고, 194 g의 소듐 보로하이드라이드를 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 에서 약 2시간에 걸쳐 첨가했다. 반응 혼합물을 추가의 2시간 동안 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 에서 교반하였다. 반응물을 서서히 첨가함으로써 약 3 kg의 물 중의 약 1.1 kg의 염화암모늄의 용액으로 케칭시켜 $\leq 10^{\circ}\text{C}$ 로 온도를 유지하였다. 반응 혼합물을 추가의 30분 동안 교반하였고, 여과시켜 무기물을 제거하였고, 100 L 자켓형 플라스크에 재충전하였고, 23 kg의 DCM으로 추출하였다. 유기층을 분리하였고, 수성층을 각각 4.7 kg의 DCM로 2회 초과로 추출하였다. 조합층을 약 3 kg의 물 중의 약 800 g의 염화나트륨의 용액으로 세정하였고, 이후 2.7 kg의 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 현탁액을 여과시키고, 필터 케이크를 2 kg의 DCM으로 세정하였다. 조합된 여과물을 2.0 용적으로 농축시켰고, 약 360 g의 에틸 아세테이트로 희석시키고, 증발시켰다. 조 생성물을 질소 하에 DCM로 패키징된 4 kg의 실리카의 실리카겔 컬럼 상에 장입하였고, 7.2 kg의 DCM 중의 2.3 kg 에틸 아세테이트로 용출시켰다. 조합된 분획을 증발시키고, 잔류물을 11.7 kg의 톨루엔 중에서 수거하였다. 톨루엔 용액을 여과시키고, 필터 케이크를 각각 2 kg의 톨루엔으로 2회 세정하였다. 필터 케이크를 2.275 kg의 일정 중량의 화합물 5 (화합물 3으로부터

46% 수율)로 건조시켰다 HPLC 96.99%.

[0402] 5. 2,5-디옥소피롤리딘-1-일(1-(2-니트로-4-(4-트리페닐메틸피페라진-1 카보닐)페닐)프로판-2-일) 카보네이트 (NCP2 앵커)의 제조



[0403]

[0404] 100 L 자켓형 플라스크를 질소 하에 4.3 kg의 화합물 5 (H^1 NMR에 의해 잔류 톨루엔에 기초하여 조정된 중량; 본원에서의 이후 모든 시약은 이에 따라 조절됨) 및 12.7 kg 피리딘을 충전하였다. 내부 온도를 $\leq 35^\circ\text{C}$ 에서 유지하면서 이에 3.160 kg의 DSC (H^1 NMR에 의한 78.91 중량%)를 충전하였다. 반응 혼합물을 주위분위기에서 약 22시간 동안 에이징시켰고, 이후 여과시켰다. 필터 케이크를 200 g의 피리딘으로 세정하였다. 각각 $\frac{1}{2}$ 여과물 용적을 포함하는 2개의 배치로 여과물을 약 50 kg의 물 중의 약 11 kg 시트르산의 용액을 함유한 100 L 자켓형 플라스크에 서서히 첨가하였고, 30분 동안 교반하여 고체 침전을 일으켰다. 고형물을 필터 깔때기로 수집하였고, 세정마다 4.3 kg의 물로 2회 세정하였고, 진공 하에 필터 깔때기 상에서 건조하였다.

[0405] 조합된 고형물을 100 L 자켓형 플라스크에 충전하였고, 28 kg의 DCM에 용해시키고, 4.3 kg의 물 중의 900 g의 탄산칼륨의 용액으로 세정하였다. 1시간 이후, 층을 분리하고, 수성층을 제거하였다. 유기층을 10 kg의 물로 세정하고, 분리하고, 3.5 kg의 황산나트륨 상에서 건조시켰다. DCM을 여과시키고, 증발시키고, 진공 하에 6.16 kg의 NCP2 앵커 (114% 수율)로 건조시켰다.

[0406] NCP2 앵커 장입된 수지 합성

[0407] 테프론 스톱 콕(stop cock)이 구비된 75 L 고체상 합성 반응기에 약 52 L의 NMP 및 2300 g의 아미노메틸 폴리스티렌 수지를 충전하였다. 수지를 NMP에서 교반하여 약 2시간 동안 팽윤시키고, 이후 배출하였다. 수지를 세정마다 약 4 L DCM로 2회 세정하였고, 이후 세정 마다 39 L 중화 용액으로 2회 세정하였고, 이후 세정 마다 39 L의 DCM으로 2회 세정하였다. NCP2 앵커 용액을 교반 수지 용액에 서서히 첨가하였고, 24시간 동안 실온에서 교반하여 배출하였다. 수지를 세정 마다 39 L의 NMP로 4회, 및 세정 마다 39 L의 DCM으로 6회 세정하였다. 수지를 처리하였고, 30분 동안 $\frac{1}{2}$ 의 DEDC 캡핑 용액과 함께 교반하였고, 배출하였고, 처리하고, 30분 동안 2번째 $\frac{1}{2}$ 의 DEDC 캡핑 용액과 함께 교반하고, 배출하였다. 수지를 세정 마다 39 L의 DCM으로 6회 세정하였고, 오븐에서 3573.71 g의 일정 중량의 앵커 장입된 수지로 건조하였다.

[0408] NCP2 앵커를 사용한 모르폴리노 올리고머의 제조

[0409] 에테플리센 (PMO#1) 약물 조물질의 50 L 고체상 합성

[0410] 1. 재료

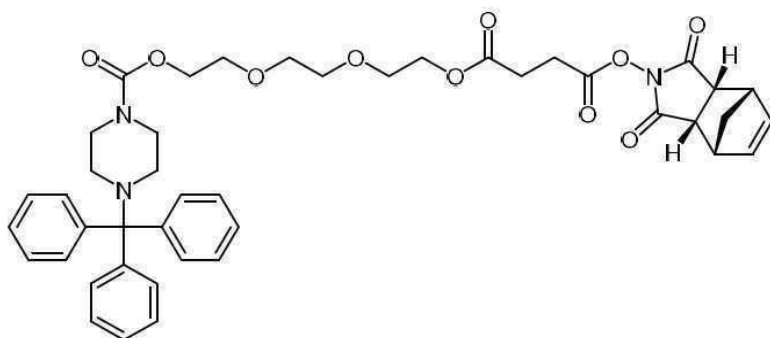
[0411] 표 2: 출발 물질

물질명	화학명	CaS 번호	화학식	분자량
활성화된 A 서브유닛	포스포르아미도클로리딕산, <i>N,N</i> -디메틸-, [6-[6-(벤조일아미노)-9H-퓨린-9-일]-4-(트리페닐메틸)-2-모폴리닐]메틸 에스테르	1155373-30-0	$C_{38}H_{37}ClN_7O_4P$	722.2
활성화된 C 서브유닛	포스포르아미도클로리딕산, <i>N,N</i> -디메틸-, [6-[4-(벤조일아미노)-2-옥소-1(2H)-피리미디닐]-4-(트리페닐메틸)-2-모폴리닐]메틸 에스테르	1155373-31-1	$C_{37}H_{37}ClN_5O_5P$	698.2
활성화된 DPG 서브 유닛	프로판산, 2,2-디메틸-, 4-[[[9-[6-[[[클로로(디메틸아미노)포스핀일]옥시]메틸]-4-(트리페닐메틸)-2-모폴리닐]-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, <i>N,N</i> -디메틸-, [6-(3,4-디하이드로-5-메틸-2,4-디옥소-1(2H)-피리미디닐)-4-(트리페닐메틸)-2-모폴리닐]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-메타노-2H-이소인돌-2-일] 4-[2-[2-[2-[[[4-(트리페닐메틸)-1-피페라지닐]카보닐]옥시]에톡시]에톡시]에틸] 에스테르	1380600-06-5	$C_{43}H_{47}N_3O_{10}$	765.9

[0412]

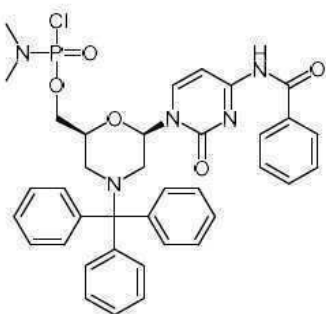
[0413] 출발 물질의 화학 구조

[0414] A. 활성화된 EG3 테일



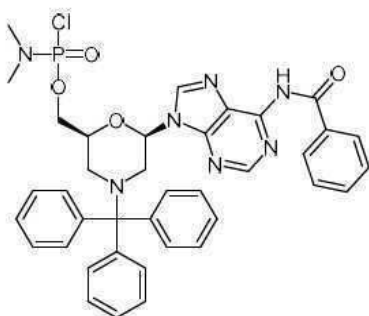
[0415]

[0416] B. 활성화된 C 서브유닛 (제조를 위해 미국 특허 번호 8,067,571 참조)



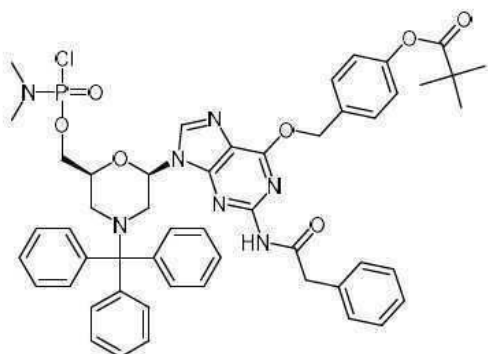
[0417]

[0418] C. 활성화된 A 서브유닛 (제조를 위해 미국 특허 번호 8,067,571 참조)



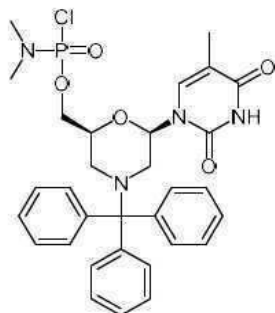
[0419]

[0420] D. 활성화된 DPG 서브유닛 (제조를 위해 미국 특허 번호 WO 2009/064471 참조)



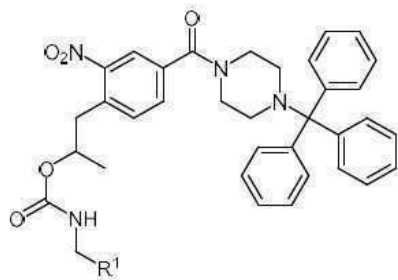
[0421]

[0422] E. 활성화된 T 서브유닛 (제조를 위해 미국 특허 번호 WO 2013/082551 참조)



[0423]

[0424] F. 앵커 장입된 수지



[0425]

[0426] 식 중, R¹은 지지-매체이다.

[0427] **표 3:** 에테플리센 약물 조물질의 고상 올리고머 합성을 위한 용액의 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

[0428]

[0429] 2. 에테플리센 약물 조물질의 합성

[0430] A. 수지 팽윤

[0431] 750 g의 앵커 장입 수지 및 10.5 L의 NMP를 50 L 실린화된 반응기에 충전하였고, 3시간 동안 교반하였다. NMP를 배출하고, 앵커 장입 수지를 각각 5.5 L의 DCM로 2회 그리고 각각 5.5 L의 30% TFE/DCM로 2회 세정하였다.

[0432] B. 사이클 0: EG3 테일 커플링

[0433] 앵커 장입 수지를 각각 5.5 L의 30% TFE/DCM으로 3회 세정하고 배출하였고, 5.5 L의 CYTFA 용액으로 15분 동안 세정하고 배출하였고, 다시 배출하지 않고 15분 동안 5.5 L의 CYTFA 용액으로 세정하고, 이에 122 mL의 1:1 NEM/DCM을 충전하였고, 현탁액을 2분 동안 교반하고, 배출하였다. 수지를 각각 5.5 L의 중화 용액으로 5분 동안 2회 세정하고 배출하고, 이후 각각 5.5 L의 DCM로 2회 세정하고 배출하였다. 3L의 DMI 중의 234 mL의 NEM 및 706.2 g의 활성화된 EG3 테일 (MW 765.85)의 용액을 수지에 충전하였고, 실온에서 3분 동안 교반하고 배출하였다. 수지를 각 세정 마다 5분 동안 각각 5.5 L의 중화 용액으로 2회 세정하였고, 5.5 L의 DCM으로 1회 세정하고 배출하였다. 2680 mL NMP 중의 195 mL NEM 및 374.8 g의 벤조산 무수물의 용액을 충전하였고, 15분 동안 교반하고 배출하였다. 수지를 5분 동안 5.5 L의 중화 용액과 함께 교반하였고, 이후 5.5 L의 DCM로 1회 그리고 각각 5.5 L의 30% TFE/DCM로 2회 세정하였다. 수지를 5.5 L의 30% TFE/DCM에 현탁시키고, 14시간 동안 유지시켰다.

[0434] C. 서브유닛 커플링 사이클 1-30

[0435] i. 예비-커플링 처리

[0436] 도 23에 기재된 바와 같이 각각의 커플링 사이클 이전에, 수지를 1) 30% TFE/DCM로 세정하였고; 2) a) 15분 동안 CYTFA 용액으로 처리하고 배출하였고, b) 15분 동안 CYTFA 용액으로 처리하고, 이에 1:1 NEM/DCM을 첨가하고, 교반하고, 배출하였고; 3) 중화 용액으로 3회 교반하였고; 4) DCM으로 2회 세정하였다. 도 23 참조.

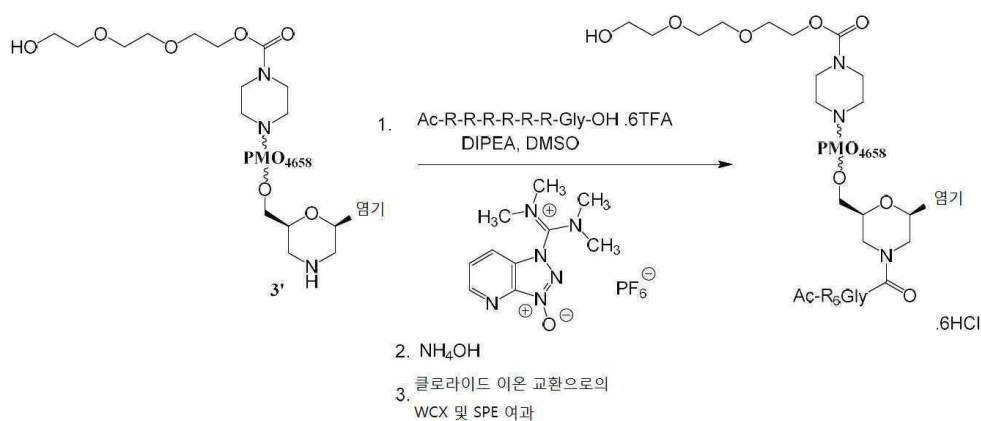
- [0437] ii. 후커플링 처리
- [0438] 각각의 서브유닛 용액을 도 23에 기재된 바와 같이 배출한 이후, 수지를 1) DCM으로 세정하였고; 2) 30% TFE/DCM으로 2회 세정하였다. 수지를 후속 커플링 사이클 이전에 일정 기간 동안 유지시키는 경우, 제2 TFE/DCM 세정액을 배출하지 않고, 수지를 상기 TFE/DCM 세정액에 잔류시켰다. 도 23 참조.
- [0439] iii. 활성화된 서브유닛 커플링 사이클
- [0440] 커플링 사이클을 도 23에 기재된 바와 같이 수행하였다.
- [0441] iv. 최종 IPA 세정
- [0442] 최종 커플링 단계를 도 23에 기재된 바와 같이 수행한 이후에, 수지를 각각 19.5 L의 IPA로 8회 세정하였고, 약 63.5 시간 동안 실온에서 진공 하에 5,579.8 g의 건조 중량으로 건조시켰다.
- [0443] C. 절단
- [0444] 상기 수지 결합 에테플리센 약물 조물질을 2개의 랫(lot)으로 나누고, 각각의 랫을 하기와 같이 처리하였다. 수지의 2,789.9 g 랫을 1) 2시간 동안 10L의 NMP로 교반하였고, 이후 NMP를 배출하였고, 2) 각각 10 L의 30% TFE/DCM으로 3회 세정하였고; 3) 15분 동안 10 L CYTFA 용액으로 처리하고; 4) 10 L의 CYTFA 용액으로 15분 동안 처리하고, 이후 130 ml 1:1 NEM/DCM를 첨가하였고, 2분 동안 교반하고 배출하였다. 수지를 각각 10 L의 중화 용액으로 3회 처리하였고, 10 L의 DCM으로 6회 세정하고, 각각 10 L의 NMP로 8회 세정하였다. 수지를 6.96 L NMP 중의 1530.4 g DTT 및 2980 DBU의 절단 용액으로 2시간 동안 처리하여 수지로부터 에테플리센 약물 조물질을 분리하였다. 절단 용액을 배출하였고, 별개의 용기에 잔류시켰다. 반응기 및 수지를 절단 용액과 조합한 4.97 L의 NMP로 세정하였다.
- [0445] D. 탈보호
- [0446] 조합된 절단 용액 및 NMP 세정액을 냉동고에서 -10℃ 내지 -25℃의 온도로 냉각된 39.8 L의 NH_4OH ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)가 첨가된 압력 용기로 이송하였다. 압력 용기를 밀봉하고, 16시간 동안 45℃로 가열하였고, 이후 25℃로 냉각시켰다. 에테플리센 약물 조물질을 함유한 이러한 탈보호 용액은 정제수로 3:1로 희석시켰고, 2 M 인산으로 pH를 3.0으로 조정하였고, 이후 NH_4OH . HPLC (C18) 73-74%를 사용하여 pH 8.03로 조정하였다.
- [0447] 에테플리센 (PMO#1) 약물 조물질의 정제
- [0448] 에테플리센 약물 조물질을 함유한 상기 D 부분으로부터의 탈보호 용액을 ToyoPearl Super-Q 650S 음이온 교환 수지의 컬럼 (Tosoh Bioscience) 상에 장입하였고, 17 컬럼 용적 (완충액 A: 10 mM 수산화나트륨; 완충액 B: 10 mM 수산화나트륨 중의 1 M 염화나트륨)보다 0-35% 초과 B의 구배로 용출시켰고, 허용가능한 순도 (C18 및 SCX HPLC)의 분획을 정제된 약물 생성물 용액에 수집하였다. HPLC : 97.74% (C18) 94.58% (SCX).
- [0449] 정제된 약물 물질 용액을 탈염시키고, 1959 g의 정제된 에테플리센 약물 물질로 동결건조시켰다. 수율 61.4%; HPLC : 97.7% (C18) 94.6% (SCX).

[0450] 표 5. 약어

약어	명칭
DBU	1,8-디아자바이사이클로헥-7-엔
DCM	디클로로메탄
DIPEA	N,N-디이소프로필에틸아민
DMI	1,3-디메틸-2-이미다졸리디논
DTT	디티오프레일
IPA	이소프로필 알코올
MW	분자량
NEM	N-에틸모폴린
NMP	N-메틸-2-피롤리돈
RT	실온
TFA	2,2,2-트리플루오로아세트산
TFE	2,2,2-트리플루오로에탄올

[0451]

[0452] CPP 결합체



[0453]

[0454] 분석적 절차: 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 비행시간 질량 스펙트럼 (MALDI-TOF-MS)을 Bruker Autoflex™ 스피드에 시나핀산 (SA) 매트릭스를 사용하여 기록하였다. 1.0 mL/min의 유량 (pH = 2; 30°C 컬럼온도)을 사용하여 3000 다이오드 어레이 검출기 및 ProPac™ SCX-20 컬럼(250 x 4 mm)이 구비된 Thermo Dionex Ultimate 3000 시스템 상에서 SCX-HPLC를 수행하였다. 이동상은 A (24 mM H₃PO₄를 함유한 물 중의 25% 아세토니트릴) 및 B (1 M KCl 및 24 mM H₃PO₄를 함유한 물 중의 25% 아세토니트릴)이었다. 하기 구배 용출을 이용하였다. 0분, 35% B; 2분, 35% B; 22분, 80% B; 25분, 80% B; 25.1분, 35% B; 30분, 35% B.

[0455]

PMO#1 (1.82 g, 0.177 mmol, 2일 동안 동결건조에 의해 새롭게 건조됨), Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH 헥사트리플루오로아세테이트 (614.7 mg, 0.354 mmol), 및 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘 3-옥시드헥사플루오로포스페이트 (HATU, 134.4 mg, 0.354 mmol)의 혼합물에 디메틸 설폭사이드 (DMSO, 20 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3분 동안 교반하였고, 이후 N,N-디이소프로필에틸아민 (DIPEA, 68.5 mg, 0.530 mmol)을 첨가하였다. 5분 이후, 탁한 혼합물이 맑은 용액이 되었다. 반응을 SCX-

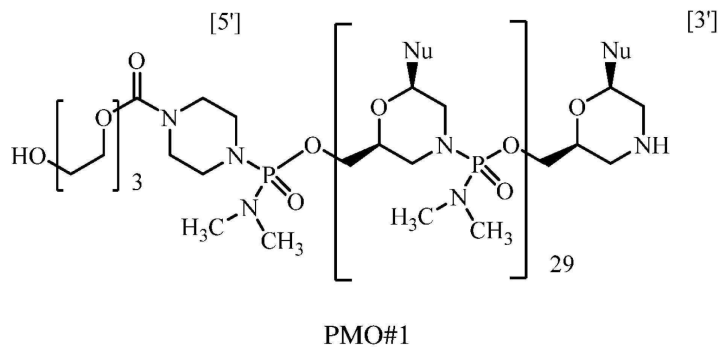
HPLC에 의해 모니터링하였다. 2시간 이후, 20 mL의 10% 수산화암모늄 용액 (2.8% NH₃)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 추가 2시간 동안 교반하였다. 반응을 400 mL 물을 첨가하여 종결시켰다. 트리플루오로에탄올 (2.0 mL)을 상기 용액에 첨가하였다.

[0456] 용액을 2개의 부분을 나누고, 각 부분을 WCX 컬럼 (컬럼당 10 g 수지)으로 정제하였다. 각각의 WCX 컬럼을 우선 수증의 20% 아세토니트릴 (v/v)로 세정하여 PMO#1 출발 물질을 제거하였다. MALDI-TOF 질량 스펙트럼 분석이 PMO#1 신호의 부재를 나타내었을 경우에 세정 (각 컬럼마다 225 mL)을 중단하였다. 각각의 컬럼을 이후 물 (컬럼당 100 mL)로 세정하였다. 원하는 생성물, PPMO#1을 2.0 M 구아니딘 HCl (각 컬럼당 140 mL)에 의해 용출시켰다. PPMO#1의 정제된 용액을 함께 수집하고, 이후 2개의 부분으로 나누고, SPE 컬럼 (각 컬럼당 10 g 수지)에 의해 탈염시켰다.

[0457] SPE 칼럼을 우선 1.0 M NaCl 수용액 (각 칼럼당 100 mL)으로 세정하여 PPMO#1의 헥사하이드로클로라이드 염을 생성하였다. 각각의 SPE 칼럼을 이후 물 (각각의 칼럼당 200 mL)로 세정하였다. 최종 탈염된 PPMO#1을 물 중의 50% 아세토니트릴 (v/v, 각 칼럼당 150 mL)에 의해 용출시켰다. 감압에서의 공기제거에 의해 아세토니트릴을 제거하였다. 수득한 수용액을 동결건조시켜 원하는 결합체 PPMO#1 헥사하이드로클로라이드 (1.93 g, 94.5% 수율)를 얻었다.

[0458] 실시예 1: PMO#1

[0459] 상기 기재된 PMO 합성 방법 B 프로토콜을 사용하여, PMO#1은 하기를 합성하였다:



[0460] 식 중, 각각의 Nu는 1 내지 30이고 5' 내지 3'는 하기이다:

[0461]

위치 번호 5' 내지 3'	Nu	위치 번호 5' 내지 3'	Nu	위치 번호 5' 내지 3'	Nu	위치 번호 5' 내지 3'	Nu	위치 번호 5' 내지 3'	Nu	위치 번호 5' 내지 3'	Nu
1	C	6	A	11	A	16	A	21	G	26	T
2	T	7	C	12	A	17	G	22	C	27	C
3	C	8	A	13	G	18	A	23	A	28	T
4	C	9	T	14	G	19	T	24	T	29	A
5	A	10	C	15	A	20	G	25	T	30	G

[0462]

여기서, A는 이고, C는 이고, G는 이고, T는 이다.

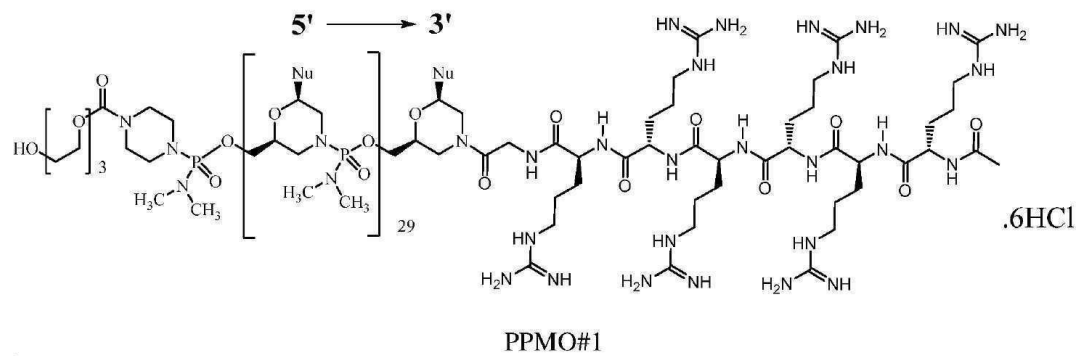
[0463]

[0464] HPLC: 97.7% (C18) 94.6% (SCX).

[0465]

실시예 2: PPMO#1

[0466] 상기 기재된 프로토콜을 사용하여,PPMO#1은 PMO#1로부터 합성하였다:

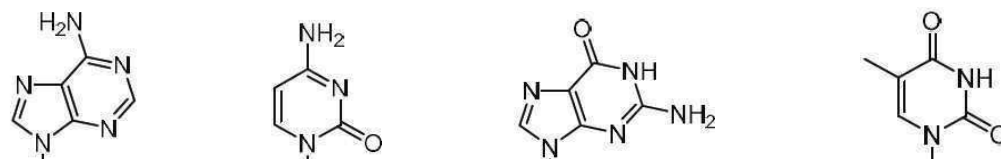


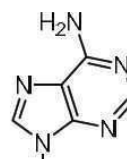
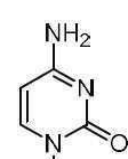
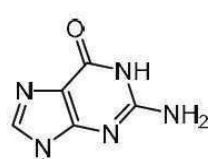
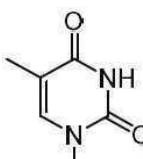
[0467]

[0468] 식 중, 각각의 Nu는 1 내지 30이고 5' 내지 3'는 하기이다:

위치 번호 5' 내지 3'	Nu	위치 번호 5' 내지 3'	Nu	위치 번호 5' 내지 3'	Nu	위치 번호 5' 내지 3'	Nu	위치 번호 5' 내지 3'	Nu	위치 번호 5' 내지 3'	Nu
1	C	6	A	11	A	16	A	21	G	26	T
2	T	7	C	12	A	17	G	22	C	27	C
3	C	8	A	13	G	18	A	23	A	28	T
4	C	9	T	14	G	19	T	24	T	29	A
5	A	10	C	15	A	20	G	25	T	30	G

[0469]



[0470] 여기서 A는  이고, C는  이고, G는  이고, T는  이다.

[0471] SCX-HPLC 분석은 순도가 주 피크 통합에 의해 93.3%이고 총 PPMO#1 통합에 의해 99.69%임을 보여준다. MALDI-TOF 질량 스펙트럼: *m/z* 계산치 C₄₀₄H₆₄₇N₂₀₂O₁₃₀P₃₀ [M + 1]⁺: 11342.25; 측정치: 11342.12.

[0472] 실시예 3: 체외에서 엑손 51 스킵핑 (근세포)

[0473] 하기 표에 기재된 바와 같이 인간 디스트로핀 엑손 51을 표적으로 하는 2가지 화합물, PMO#1 및 PPMO#1 모두는 동일한 서열로 조립되어 엑손 51 스킵핑을 유도하는 능력에 대해 평가하였다.

명칭	표적 서열 (TS)	TS 서열번호 번호	5'	3'
PMO#1	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	1	EG3	H
PPMO#1	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	1	EG3	-G-R ₆

[0474]

[0475] 구체적으로, 분화된 인간 근세포를 사용하여 상이한 농도 (즉, 40 μm, 20 μm, 10 μm, 5 μm, 2.5 μm, 및 1.25 μm)에서 엑손 51 스킵핑을 유도하는 상기 화합물의 능력을 결정하였다. 분화 이후, 세포를 96시간 동안 화합물과 함께 인큐베이션시켰고, 이후 RNA 단리를 후속하였고, 엑손 51 스킵핑을 상기 기재된 바와 같이 RT-PCR에 의해 측정하였다. PMO#1와 비교하여 PPMO#1이 엑손 51 스킵핑을 상당히 증가시키는 것을 나타내는 결과는 하기 표 및 도 4에 나타나 있다:

	엑손 스킵핑 백분율					
용량 (μm)	40	20	10	5	2.5	1.25
화합물						
PMO#1	41.93	34.56	22.23	15.3	12.8	4.16
PPMO#1	68.03	58.9	56.76	37.46	23.53	12.13

실시예 4: MDX 마우스 연구

mdx 마우스는 디스트로핀 유전자의 엑손 23에서의 돌연변이를 함유하는 뉘센스 근육 이상증 (DMD)에 대해 허용되는 잘-특정규명된 동물 모델이다. M23D 안티센스 서열 (서열번호: 2)은 엑손 23 스킵핑을 유도하고, 기능성 디스트로핀 발현을 복구하는 것으로 알려져 있다. 6-7 주령의 MDX 마우스에 40 mg/kg의 용량의 하기 표의 PPMO4225 또는 PMO4225 또는 염수의 꼬리 정맥으로의 단일 주사를 시행하였다.

명칭	표적화 서열 (TS)	TS 식별 번호	5'	3'
PMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	H
PPMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	-G-R ₆

상기 기재된 PMO 방법 A 및 CPP 결합체 방법에 의해 PMO4225 및 PPMO4225를 각각 제조하였다.

단일 용량 주사후 7, 30, 60 및 90일차에 처리된 마우스를 희생시켰다 (그룹당 n=6). 횡격막, 심장 및 우측 사두근을 처리하여 디스트로핀 단백질의 생성을 측정하기 위한 웨스턴 블랏 분석 및 엑손 스킵핑의 백분율을 측정하기 위한 RT-PCR 분석을 위해 처리하였고, 좌측 사두근을 상기에 기재된 바와 같은 면역조직화학 및 H/E 염색을 위해 처리하였다.

각각 상기 기재된 바와 같이 디스트로핀 단백질 복구를 웨스턴 블랏에 의해 정량화하였고, 엑손 23 스킵핑의 백분율을 RT-PCR에 의해 측정하였다.

RT-PCR 결과는 도 5a-10b 및 하기 표에 나타나 있다. 놀랍게도, PPMO4225는 PMO4225와 비교하여 디스트로핀의 복구 및 엑손 23 스킵핑을 상당히 더 높고 지속된 수준으로 유도하였다. 최고 수준은 주사후 30일차에 일어났다. 더욱더 놀랍게도, PPMO4225는 PMO4225가 없는 경우에 심장에서 디스트로핀 수준을 증가시켰고; 디스트로핀 및 엑손 스킵핑은 PMO4225를 사용한 모든 시점에서 심장에서 관찰되지 않았다.

	웨스턴 블랏에 의한 야생형 단백질(%WT)의 백분율로서의 디스트로핀 단백질의 정량화								
	화합물	PMO4225				PPMO4225			
	일수	7	30	60	90	7	30	60	90
조직									
사두근		1.1	2.3	1.6	0.7	20.7	28.1	20.8	8.2
횡격막		1.4	1.9	1.3	0.6	14.5	15.2	9.8	2.3
심장		0	0	0	0	2.0	1.0	0.9	0.1

	RT-PCR 에 의해 측정된 엑손 스킵핑 백분율								
	화합물	PMO4225				PPMO4225			
	일수	7	30	60	90	7	30	60	90
조직									
사두근		21.2	5.5	7.9	2.8	61.5	42.02	28.8	6.9
횡경막		29.9	2.6	0.5	0	51.6	36.76	3.05	0
심장		0	0	0	0	13.15	2.64	0	0

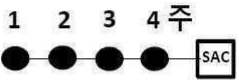
[0485]

[0486] 면역조직화학 결과는 도 11에 나타나 있다. 본원에서 PPMO4225는 사두근 전반에서 디스트로핀을 복구시키고, 반면 4225는 발현의 '패치-유사(patchy-like)' 패턴을 생성한다. PPMO4225 처리로의 디스트로핀의 균일한 분포는 골격근의 넓은 표적화가 달성가능함을 나타낸다. PPMO4225는 생체내에서 PMO4225보다 상당히 개선된 전달을 가진다.

[0487] 실시예 5: NHP에서의 엑손 51 스킵핑

[0488] PPMO 안티센스 올리고머의 엑손 스킵핑의 효율을 추가로 입증하기 위해, 비인간 영장류를 이용하였다. 구체적으로, 온전한 근육 조직을 갖는 시노몰구스 원숭이에 하기 표의 투여 스케줄에 따라 PPMO#1, PMO#1 (실시예 2로부터의 것), 또는 염수를 정맥내 주사하였다:

[0489] 시노물구스 투여 스케줄

그룹	화합물	용량 (mg/kg)	그룹당 수	전달 전략
1	PPMO#1	20	3	 1 주 1 회 투여, 4 회 총 용량 동물을 22 일차에 마지막 용량 이후 48 시점에 희생시켰다.
2	PPMO#1	40	3	
3	PPMO#1	80	3	
4	PPMO#1	160	3	
5	PMO#1	40	3	
6	염수	0	2	
7	PPMO#1	40	2	 4 주 회수로의 1 일 차의 단일 용량
8	PPMO#1	40	2	 8 주 회수로의 1 일 차의 단일 용량

[0490]

[0491] 그룹 1-5에서의 동물은 20, 40 및 80 mg/kg에서 모두 4개의 용량이 허용되었다. 동물은 제3 투여 이후 160 mg/kg이 허용되지 않았으며, 이는 투여 당일 안락사된 2마리 동물 및 다음날 안락사된 한마리 동물을 야기하였다. 이러한 동물은 체중 손실을 나타내었다.

[0492] 각각의 스케줄 잡힌 또는 사망시 안락사된 검시시에, 횡경막, 십이지장, 식도, 및 대동맥의 평활근, 사두근, 삼각근, 이두근, 심장의 절편을 수집하였고, 동결 보존하였다. 엑손 51 스킵핑 백분율을 상기 기재된 바와 같이 RT-PCR을 사용하여 결정하였다. 결과는 도 12-15 및 하기 표에 나타나 있다.

근육	엑손 스킵핑 백분율				
	PPMO#1				PMO#1
	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg	160 mg/kg	40 mg/kg
사두근	5.2	43.8	92.4	nd	0.0
횡경막	30.2	80.5	94.9	100.0	0.0
이두근	4.4	30.2	65.7	90.6	0.0
삼각근	6.8	36.4	78.2	95.0	0.0
심장	0.0	2.6	60.7	98.5	0.0
십이지장	14.9	17.0	61.0	71.4	0.0
식도	4.1	22.4	66.6	97.4	0.0
대동맥	26.1	40.8	60.1	nd	4.8

nd = 미결정됨

[0493]

[0494]

놀랍게도, PPMO#1은 PMO#1과 비교하여 시험되는 온전한 조직에서 엑손 스킵핑의 높은 수준을 생성하였다. 구체적으로, PMO#1 투여가 임의의 수집된 조직에서 임의의 검출된 스킵핑을 야기하지 않은 반면, PPMO#1은 예를 들어 80 mg/kg 복용량 수준에서 사두근 및 횡경막에서 90% 과량으로 그리고 십이지장에서 60% 과량으로 엑손 스킵핑을 생성하였다. 예를 들어 80 mg/kg으로 심장에서 달성된 엑손 스킵핑의 수준은 특히 놀라운 것이며, 여기서 엑손 스킵핑은 60% 과량이었다. 임의의 특정 이론에 구속됨을 의도함 없이, 온전한 비-디스트로핀 NHP의 근육 조직으로의 PPMO#1의 체계적인 투여 및 전달 및 특히 심근에서 PPMO#1에 의해 달성되는 정도도의 엑손 51 스킵핑의 달성은 실시예 4의 상기 mdx 마우스로부터 예상할 수 없는 것이었다. 오히려, NHP에서와 같이 건강한 조직으로의 전달은 디스트로핀 조직으로의 전달과는 상이하다.

[0495]

그룹 7 및 8의 경우, 엑손 51 스킵핑 백분율을 상기 기재된 바와 같이 RT-PCR을 사용하여 결정하였다. 그 결과는 도 22 및 하기 표에 나타나 있다.

근육	엑손 스킵핑 백분율	
	PPMO#1	
	30 일	60 일
사두근	13.7	4.6
횡경막	62.4	49.1
심장	3.1	0
GI 관	1.25	0

[0496]

[0497]

상기 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 분석된 각 근육에서의 60일차와 비교하여 30일차에 엑손 스킵핑이 더 높았고, 이는 엑손 스킵핑 효율이 단일 투여 이후 시간에 따라 감소되는 것을 입증한다.

[0498]

실시예 6: MDX 마우스 용량 반응 연구

[0499]

6-7주령의 MDX 마우스에 40 mg/kg, 80 mg/kg, 또는 120 mg/kg의 용량 (그룹당 n=6)으로 상기 기재된 PPMO4225 또는 PMO4225의 꼬리 정맥으로의 단일 주사를 시행하였다.

[0500] 처리된 마우스를 주사후 30일차에 희생시켰다. 횡경막, 사두근, 및 심장은 하기와 같이 변형된 상기 기재된 웨스턴 블랏 프로토콜 (예를 들어 실시예 4에서 사용됨)에 기초하여 디스트로핀 단백질의 생성을 측정하기 위해 웨스턴 블랏 분석을 위해 처리하였다:

파라미터	실시예 4의 웨스턴 블랏 프로토콜	웨스턴 블랏 프로토콜 변형
단백질 정량화	RC DC 단백질 검정 키트	BCA 방법
블록킹 단계	4°C 에서 밤새	RT 에서 1 시간
1 차 항체 인큐베이션	RT 에서 1 시간	4°C 에서 밤새
1 차 항체 농도	1:20	1:500

[0501]

[0502] %야생형으로서의 디스트로핀 단백질 복구는 하기 표 및 도 16-19에 나타나 있다.

	웨스턴 블랏에 의한 야생형 단백질(%WT)의 백분율로서의 디스트로핀 단백질의 정량화						
	화합물	PMO4225			PPMO4225		
	용량 (mg/kg)	40	80	120	40	80	120
조직							
횡경막		0.80	0.97	1.83	8.02	26.03	42.77
심장		0.13	0.24	0.34	0.61	6.34	19.48
사두근		3.5	2.6	3.0	43	90	144

[0503]

[0504] 놀랍게도, 상기 데이터는 PPMO4225의 단일 투여가 PMO4225보다 상당하고 실질적으로 더 큰 정도로 mdx 마우스에서 용량-의존적 방식으로 디스트로핀 수준을 증가시켰음을 보여준다.

[0505] 실시예 7: 횡경막 및 심장의 MDX 마우스 IHC 연구

[0506] 6-7주령의 MDX 마우스에 80 mg/kg의 용량으로의 PPMO4225 및 염수의 꼬리 정맥으로의 단일 주사를 시행하였고, 6-7주령의 야생형 마우스에 염수의 단일 주사를 시행하였다. 처리된 mdx 마우스, 염수 mdx 마우스, 및 야생형 마우스를 단일 투여 주사후 30일차에 희생시켰다 (그룹당 n=4). 면역조직화학 결과는 도 24에 나타나 있다. 본원에서, 상기 결과는 PPMO4225로 처리된 mdx 마우스에서의 DMD에서의 발병률 및 사망률과 관련된 조직에서의 디스트로핀의 균일한 증가를 나타낸다.

[0507] 실시예 8: 시험관내 엑손 51 스킵핑 (근아세포)

[0508] 하기 표에 기재된 바와 같은 인간 디스트로핀 (DMD) 엑손 51, PMO#1 및 PPMO#1 (둘 모두 동일한 서열을 함유함)을 표적화하는 2개의 안티센스 올리고머 결합체를 건강한 인간 근아세포에서의 DMD 엑손 51 스킵핑에 대해 평가하였다.

[0509] 인간 *DMD* 엑손 51에 대한 PMO#1 및 PPMO#1의 서열

명칭	표적화 서열 (TS)	TS 식별 번호	5'	3'
PMO#1	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	1	EG3	H
PPMO#1	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	1	EG3	-G-R ₆

[0510]

[0511] 구체적으로, 건강한 인간 근아세포 (계대배양 5-6, SKB-F-SL, Zen-Bio, Inc.로부터 구입함)을, SKM-M 배지 (Zen-Bio, Inc.)에서 다양한 농도 (즉, 40 μ m, 20 μ m, 10 μ m, 5 μ m, 2.5 μ m, 및 1.25 μ m)의 PMO#1 또는 PPMO#1로 처리되는 경우에 ~40% 컨플루언스로 플레이팅시켰다. 96시간의 인큐베이션 이후, 근아세포를 PBS로 세정하였고, Illustra GE RNeasy 96 키트 (Cat#25-055-75, GE Healthcare Bio-Sciences)에서 RA1 용해 완충액에 의해 용해시켰다. 총 RNA를 제조자의 권고에 따라 단리하였고, 단, 40 μ L RNase-무함유 물을 RNA를 용출시키기 위해 사용하였다.

[0512] 두 화합물에 의한 엑손 51 스킵핑을 결정하기 위해, 2단계 종점 RT-PCR을 수행하였다. 구체적으로 11 마이크로리터의 총 RNA를 제조자 지시에 따라 무작위 헥사머를 사용하는 SuperScript IV 퍼스트-스트랜드 합성 키트 (Cat#18091200, Invitrogen)에 의해 cDNA로 우선 역전사시켰다. 인간 *DMD* 엑손 49 및 52 [정방향 프라이머 (식별번호: 5): CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG; 역방향 프라이머 (식별번호: 6): CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC]를 표적화한 프라이머와 함께 백금 Taq DNA 폴리머라아제 PCR 슈퍼믹스 하이 피델리티(Supermix High Fidelity) (Cat#12532024, Invitrogen)로 9 μ L cDNA를 첨가하여 PCR을 수행하였다. 하기 표에 나타난 프로그램을 사용하여 BioRad CFX96 실시간 서모사이클러를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 스킵핑된 또는 비-스킵핑된 PCR 생성물의 발현을 DNA 고민감성 시약 키트(DNA High Sensitivity Reagent kit) (CLS760672, Perkin Elmer)를 사용하는 LabChip GX 시스템 상에 32 μ L PCR 생성물을 장입하여 평가하였다. *DMD* 엑손 51 스킵핑의 백분율을 스킵핑된 (246 bp) 및 비스킵핑된 (478 bp) 밴드에 대한 몰농도 합계와 비교되는 엑손 51 스킵핑된 밴드 (246 bp)에 대한 몰농도 (nmol/l)의 백분율로서 계산하였다.

[0513] 양측 비대응 스튜던트 t-검정 (homoscedastic)을 사용하여 2개의 그룹의 평균이 각 용량에서 서로 통계적으로 상이한지 여부를 평가하였다. P -값 < 0.05은 통계적으로 유의미한 것으로 고려되었다.

[0514] 엑손 51 스킵핑을 사용하거나 또는 사용하지 않는 *DMD* 앰플리콘을 증폭시키기 위해 사용되는 서모사이클러 프로그램

단계	온도	시간
1. 변성	94 °C	2 분
2. 변성	94 °C	30 초
3. 어닐링	55 °C	30 초
4. 신장	68 °C	1 분
5. 단계 2-4 반복	34 사이클	
6. 최종 신장	68 °C	5 분
7. 저장	4 °C	∞

[0515]

[0516] 결과는 하기 표 및 도 25에 제공된다.

[0517] 인간 근아세포에서 PMO#1 및 PPMO#1에 의한 *DMD* 엑손 51 스킵핑의 백분율

화합물/ 용량 (μ m)	엑손 스킵핑 백분율 (평균 $\pm$ SD)					
	1.25	2.5	5	10	20	40
PMO#1	0.66 $\pm$ 0.76	1.49 $\pm$ 0.67	2.76 $\pm$ 1.69	2.63 $\pm$ 0.48	5.29 $\pm$ 1.36	8.46 $\pm$ 1.83
PPMO#1	2.20 $\pm$ 0.09	2.92 $\pm$ 0.69	6.28 $\pm$ 0.14	8.71 $\pm$ 1.26	18.92 $\pm$ 0.73	29.24 $\pm$ 1.64

[0518]

[0519] 이러한 시험관내 결과는 PPMO#1이 인간 근아세포에서의 PMO#1과 비교하여 DMD 엑손 51 스킵핑을 상당히 증가시키는 것을 나타낸다.

[0520] 실시예 9: 시험관내 엑손 51 스킵핑 (근관세포)

[0521] 하기 표에 기재된 바와 같은 인간 디스트로핀 (DMD) 엑손 51, PMO#1 및 PPMO#1 (둘 모두 동일한 서열을 함유함)을 표적화하는 2개의 안티센스 올리고머 결합체를 건강한 인간 근관세포에서의 DMD 엑손 51 스킵핑에 대해 평가하였다.

[0522]

명칭	표적화 서열 (TS)	TS 서열 번호	5'	3'
PMO#1	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	1	EG3	H
PPMO#1	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	1	EG3	-G-R ₆

[0523] 구체적으로, 건강한 인간 근아세포 (계대배양 5-6, SKB-F-SL, Zen-Bio, Inc.로부터 구입함)을, 저혈청 배지 (SKM-D, Zen-Bio, Inc.)에서의 인큐베이션에 의한 분화의 개시 이전에 SKM-M 배지에서 80-90% 컨플루언스에 도달되도록 배양하였다. 분화후 5일차에, 성숙한 근관세포를 다양한 농도 (즉, 40 μ m, 20 μ m, 10 μ m, 5 μ m, 2.5 μ m, 및 1.25 μ m)로의 PMO#1 또는 PPMO#1과 함께 인큐베이션시켰다. 96 시간의 인큐베이션 이후, 근관세포를 PBS로 세정하였고, Illustra GE RNAspin 96 키트 (Cat#25-055-75, GE Healthcare Bio-Sciences)에서 RA1 용해 완충액에 의해 용해시켰다. 총 RNA를 제조자의 권고에 따라 단리하였고, 단, 40 μ L RNase-무함유 물을 RNA를 용출시키기 위해 사용하였다.

[0524] PMO#1 또는 PPMO#1에 의한 엑손 51 스킵핑을 결정하기 위해, 2단계 종점 RT-PCR을 수행하였다. 구체적으로 11 마이크로리터의 총 RNA를 제조자 지시에 따라 무작위 핵사머를 사용하는 SuperScript IV 퍼스트-스트랜드 합성 키트 (Cat#18091200, Invitrogen)에 의해 cDNA로 우선 역전사시켰다. 인간 DMD 엑손 49 및 52 [정방향 프라이머 (식별번호: 5): CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG; 역방향 프라이머 (식별번호: 6): CGATCCGTAATGATTGTCTAGCC]를 표적화한 프라이머와 함께 백금 Taq DNA 폴리머라아제 PCR 수퍼믹스 하이 피델리티 (Cat#12532024, Invitrogen)로 9 μ L cDNA를 첨가하여 PCR을 수행하였다. 하기 표에 나타난 프로그램을 사용하여 BioRad CFX96 실시간 서모사이클러를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 스킵핑된 또는 비-스킵핑된 PCR 생성물의 발현을 DNA 고민감성 시약 키트 (CLS760672, Perkin Elmer)를 사용하는 LabChip GX 시스템 상에 32 μ L PCR 생성물을 장입하여 평가하였다. DMD 엑손 51 스킵핑의 백분율을 스킵핑된 (246 bp) 및 비스킵핑된 (478 bp) 밴드에 대한 몰농도 합계와 비교되는 엑손 51 스킵핑된 밴드 (246 bp)에 대한 몰농도 (nmol/l)의 백분율로서 계산하였다.

[0525] 양측 비대응 스튜던트 t-검정 (homoscedastic)을 사용하여 2개의 그룹의 평균이 각 용량에서 서로 통계적으로 상이한지 여부를 평가하였다. P -값 < 0.05은 통계적으로 유의미한 것으로 고려되었다.

[0526] 엑손 51 스킵핑을 사용하거나 또는 사용하지 않는 DMD 애플리곤을 증폭시키기 위해 사용되는 서모사이클러 프로그램

단계	온도	시간
8. 변성	94 °C	2 분
9. 변성	94 °C	30 초
10. 어닐링	55 °C	30 초
11. 신장	68 °C	1 분
12. 단계 2-4 반복	34 사이클	
13. 최종 신장	68 °C	5 분
14. 저장	4 °C	∞

[0527]

[0528] PPMO#1가 PMO#1과 비교하여 DMD 엑손 51 스킵핑을 상당히 증가시키는 것을 나타내는 결과는 하기 표 및 도 26에 나타나 있다.

[0529] 인간 근관세포에서의 PMO#1 및 PPMO#1에 의한 DMD 엑손 51 스킵핑의 백분율

화합물/	엑손 스킵핑 백분율 (평균 ± SD)					
용량 (μm)	1.25	2.5	5	10	20	40
PMO#1	0.64 ± 0.84	0.70 ± 0.08	1.23 ± 0.49	2.11 ± 0.88	2.85 ± 1.06	5.68 ± 1.83
PPMO#1	1.61 ± 1.16	2.80 ± 0.98	5.71 ± 2.19	8.18 ± 2.94	16.08 ± 1.90	27.79 ± 4.04

[0530]

[0531] *****

[0532] 본 명세서에서 인용된 모든 공보 및 특허 출원은 각각의 개별 공보 또는 특허 출원이 참조로 혼입된 것처럼 구체적으로 개별적으로 나타낸 것처럼 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0533] 참조문헌

- Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, et al. (2004). "Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense." Am J Hum Genet **74**(1): 83-92.
- Abes, R., et al. (2008). "Arginine-rich cell penetrating peptides: design, structure-activity, and applications to alter pre-mRNA splicing by steric-block oligonucleotides." J Pept. Sci. **14**: 455-460.
- Alter, J., et al. (2006). "Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology." Nat. Med. **12**(2): 175-177.
- Bestas, B., et al. (2014). "Splice-correcting ligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model." J. Clin. Invest.
- Cirak, S., V. Arechavala-Gomez, et al. (2011). "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study." Lancet **378**(9791): 595-605.
- Dunkley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997). "Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides." Nucleosides & Nucleotides **16**(7-9): 1665-1668.
- Dunkley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides." Hum Mol Genet **7**(7): 1083-90.
- Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene." J Gene Med **5**(6): 518-27.
- Goemans, N. M., M. Tulinius, et al. (2011). "Systemic Administration of PRO051 in Duchenne's Muscular Dystrophy." N Engl J Med.
- Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." Mol Ther.
- Jearawiriyapaisarn, N., et al. (2010). "Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-conjugated morpholino oligomers." Cardiovascular Research **85**: 444-453.
- Kinali, M., V. Arechavala-Gomez, et al. (2009). "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular

[0534]

- dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study." Lancet Neurol **8**(10): 918-28.
- Leblue, B., et al. (2008). "Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides." Adv. Drug Deliv. Rev. **60**: 517-529.
- Lu, Q. L., C. J. Mann, et al. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." Nat Med **9**(8): 1009-14.
- Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy." J Gene Med **4**(6): 644-54.
- Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." Journal of Immunological Methods **325**(1-2): 114-126.
- Matsuo, M., T. Masumura, et al. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe." J Clin Invest **87**(6): 2127-31.
- McClory, G., et al. (2006). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restored dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD." Gene Therapy **13**: 1373-1381.
- Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus." Genomics **2**(1): 90-5.
- Moulton, H.M., (2007). "Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication *in vivo*." Biochem. Society Trans **35**(4): 826-828.
- Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence." Biochem Biophys Res Commun **226**(2): 445-9.
- Sazani, P., R. Kole, et al. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina

[0535]

- Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12840-4.
- Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **7**(3): 187-95.
- Takeshima, Y., H. Nishio, et al. (1995). "Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe." J Clin Invest **95**(2): 515-20.
- van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout, et al. (2001). "Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells." Hum Mol Genet **10**(15): 1547-54.
- van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). "Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051." N Engl J Med **357**(26): 2677-86.
- Wilton, S. D., A. M. Fall, et al. (2007). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript." Mol Ther **15**(7): 1288-96.
- Wilton, S. D., F. Lloyd, et al. (1999). "Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides." Neuromuscul Disord **9**(5): 330-8.
- Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 14814-9.
- Wu, B., et al. (2012). "Long-term rescue of dystrophin expression and improvement in muscle pathology and function in dystrophic mdx mice by peptide-conjugated morpholino." The Am. J. Pathol. **181**(2): 392-400.
- Wu, P., et al. (2007) "Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity." Nucleic Acids Research **35**(15): 5182-5191.
- Yin, H., H. M. Moulton, et al. (2008). "Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function." Hum Mol Genet **17**(24): 3909-18.
- Yin, H., et al. (2011). "Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin exon skipping in heart and phenotypic correction in mdx mice." Mol. Ther **19**(7): 1295-1303.
- Youngblood, D., et al. (2006). "Stability of cell-penetrating peptide- morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells." Am. Chem. Soc.

[0536]

[0537]

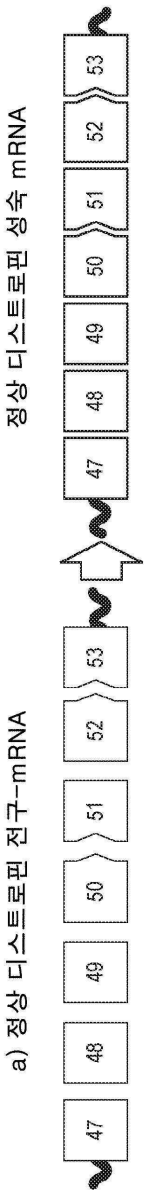
[0538] 서열 목록

상세	서열 5' 내지 3' 또는 N 말단 내지 C 말단	서열 번호
H51A(+66+95)	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	1
mdx4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2
R ₆	RRRRRR	3
R ₆ -G	RRRRRRG	4
인간 엑손 49 결합 포워드 프라이머	CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG	5
인간 엑손 52 결합 리버스 프라이머	CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC	6
마우스 엑손 23 결합 포워드 프라이머	CACATCTTTGATGGTGTGAGG	7
마우스 엑손 23 결합 리버스 프라이머	CAACTTCAGCCATCCATTTCTG	8

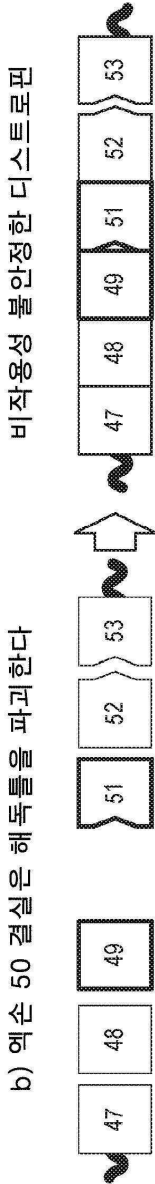
[0539]

도면

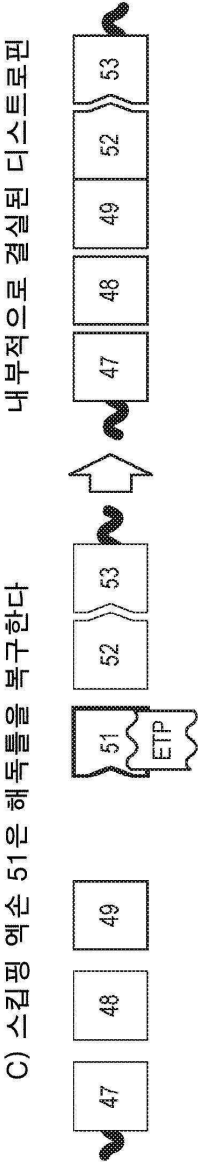
도면1



도면2

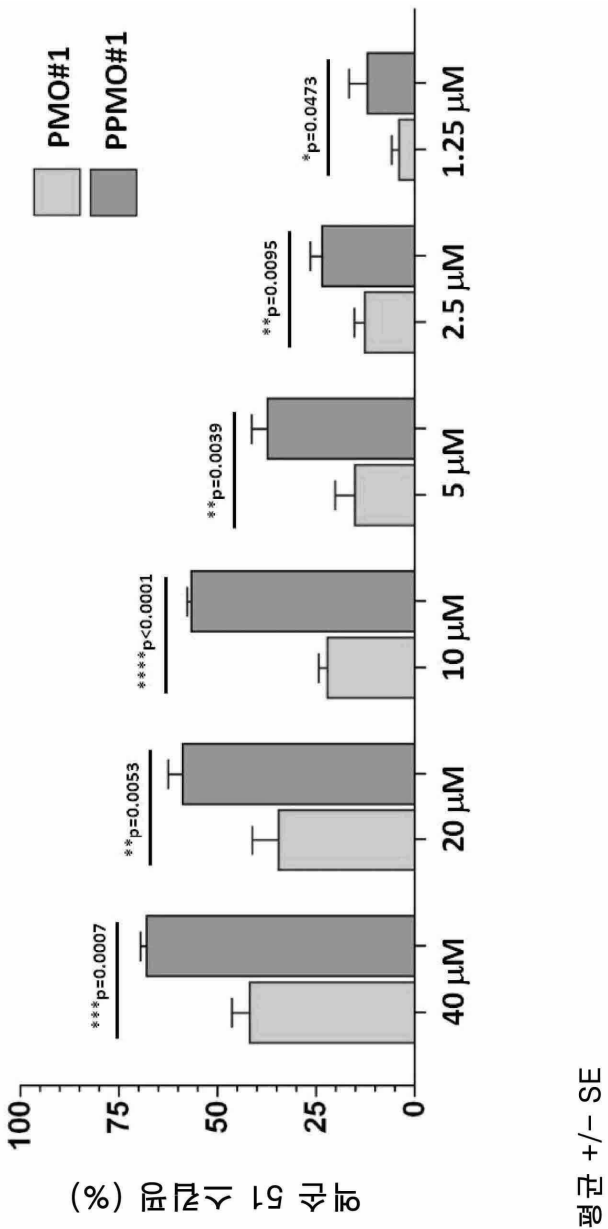


도면3

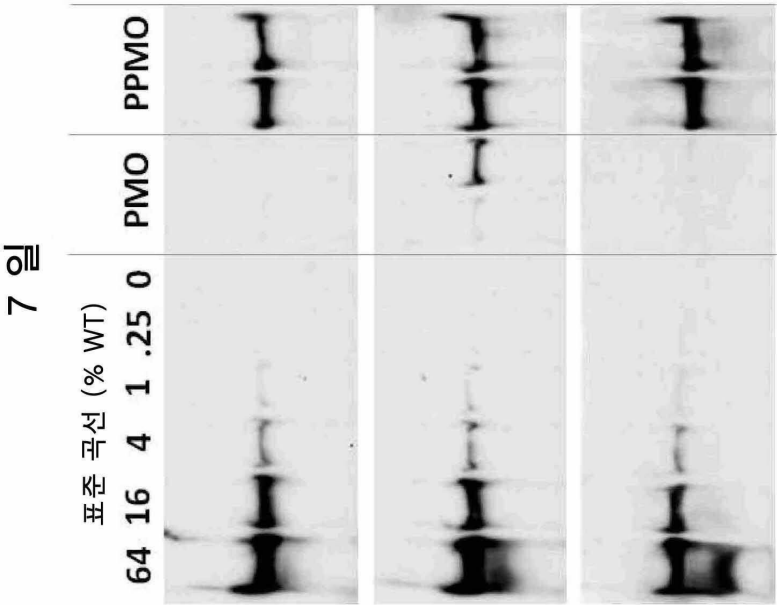


출처 : Kote2012에서 수정됨.

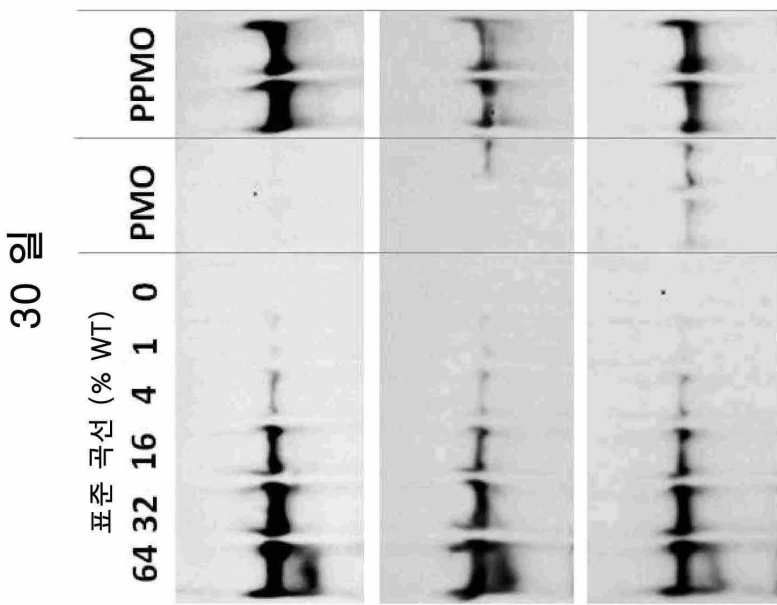
도면4



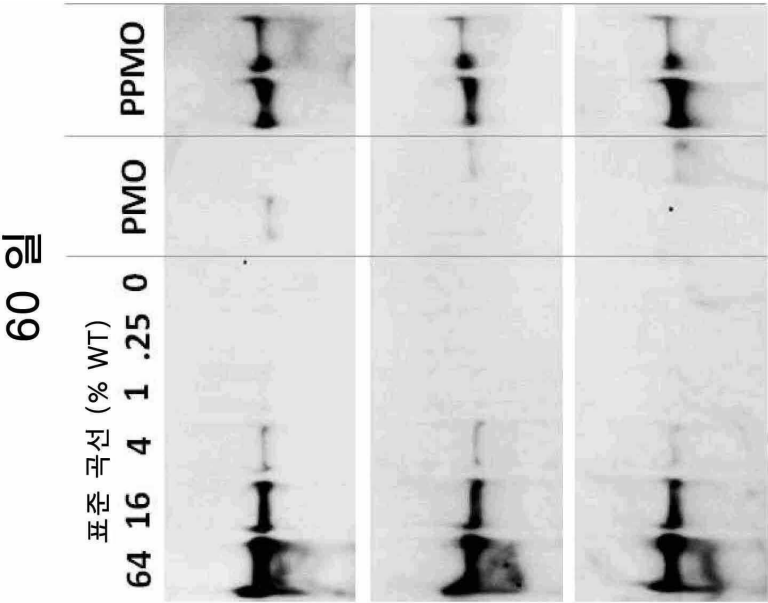
도면5a



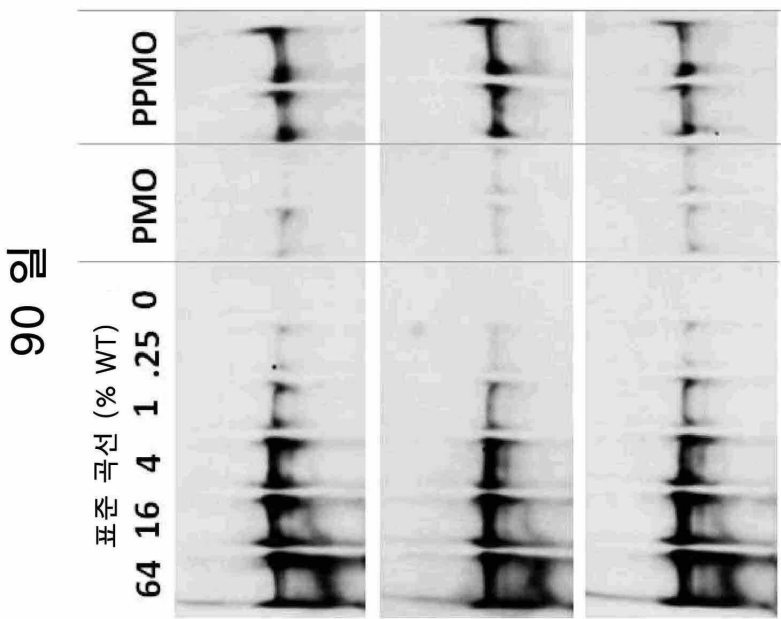
도면5b



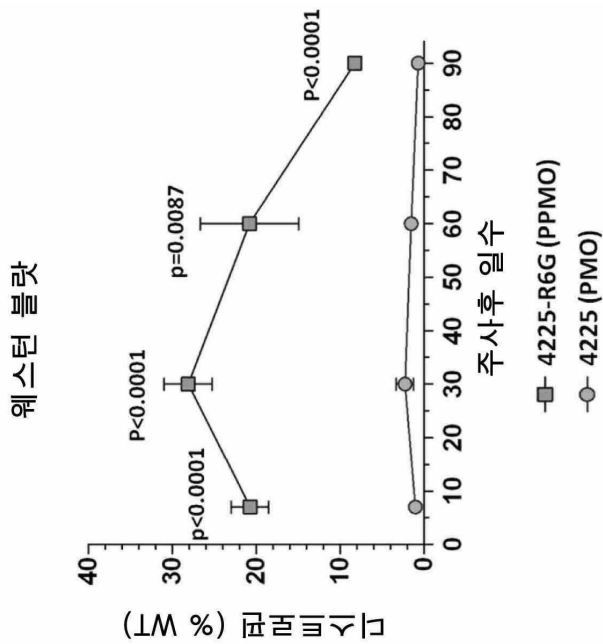
도면5c



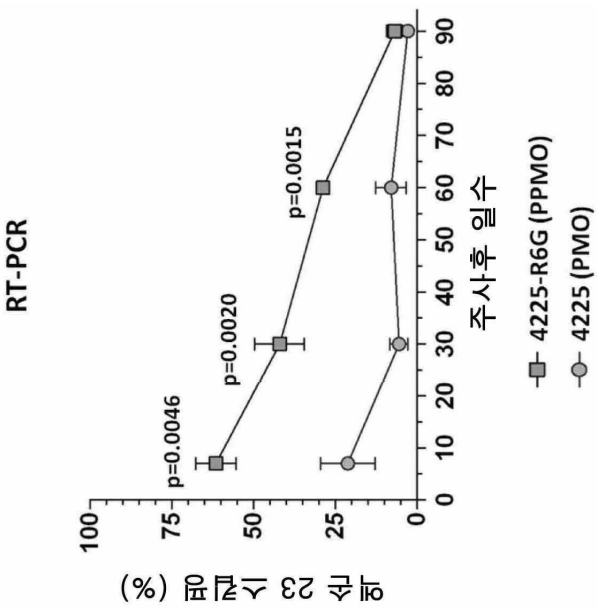
도면5d



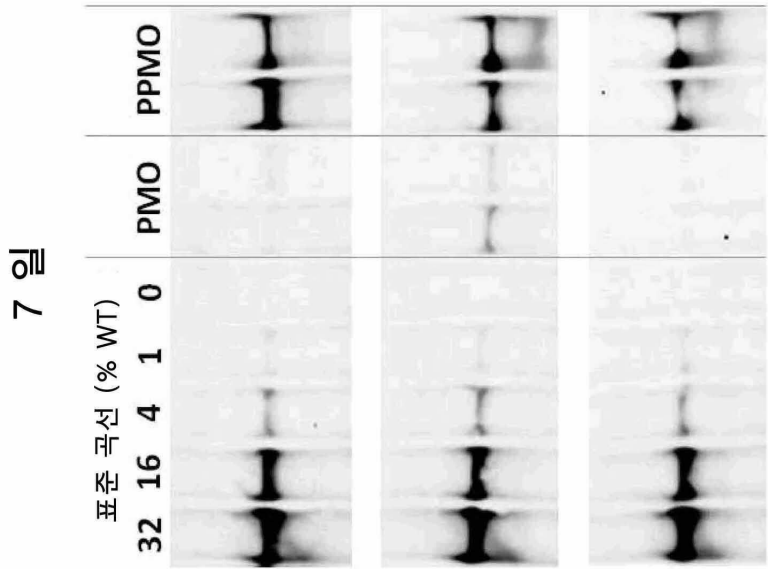
도면6a



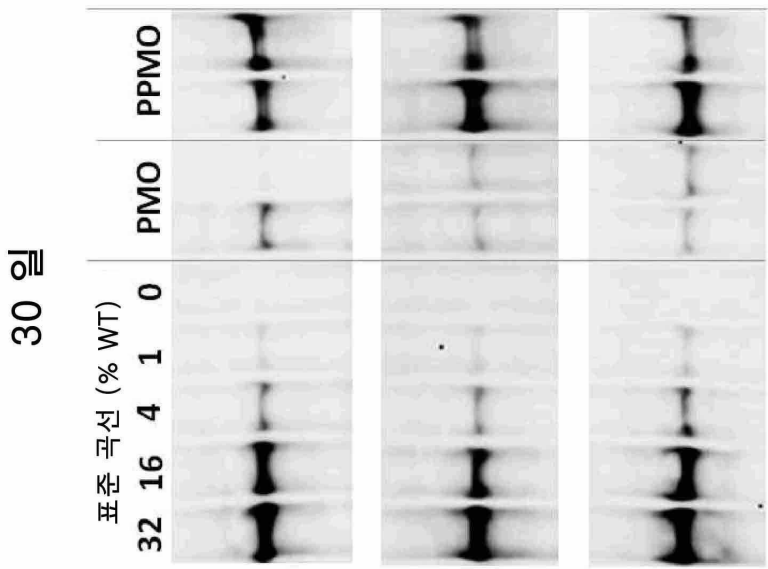
도면6b



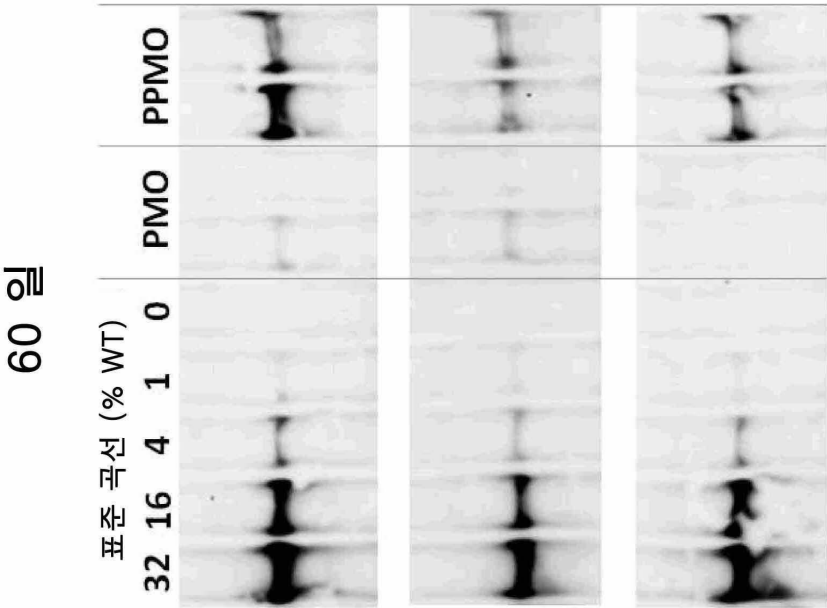
도면7a



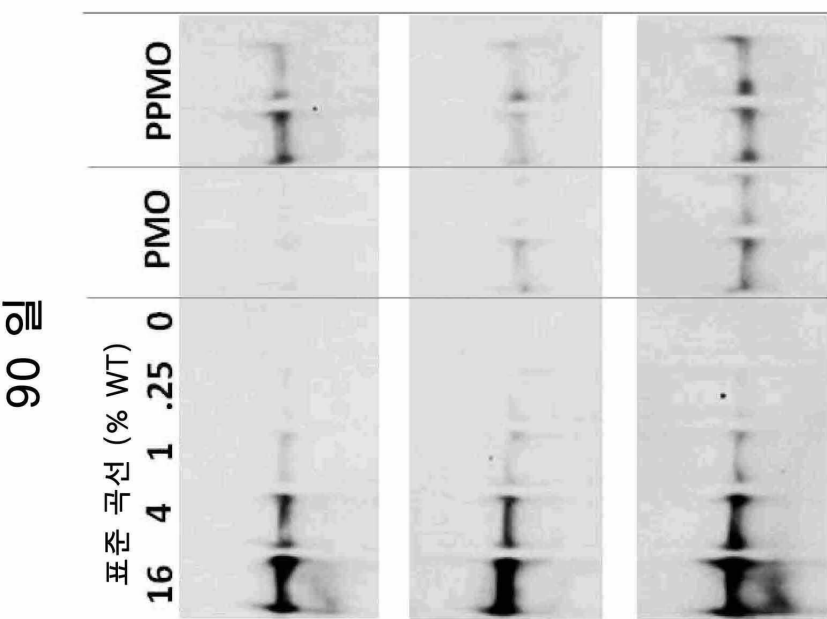
도면7b



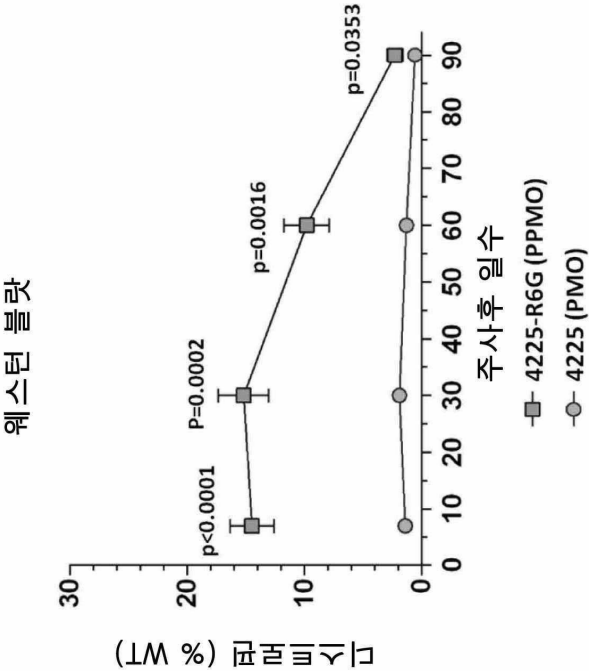
도면7c



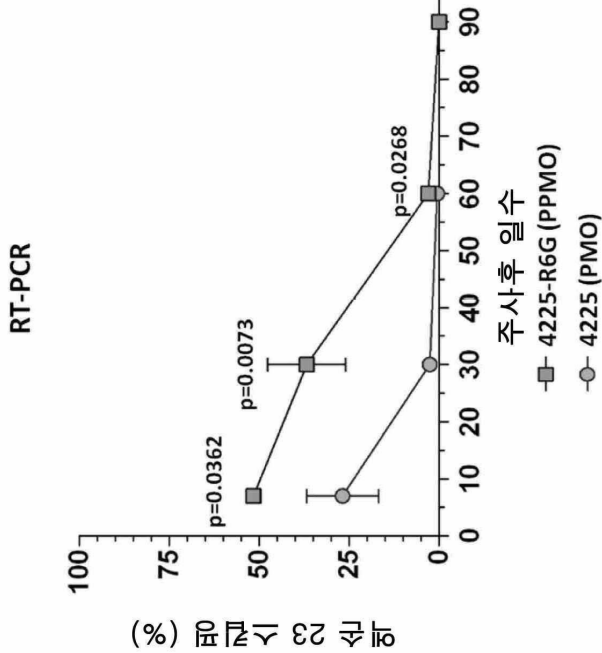
도면7d



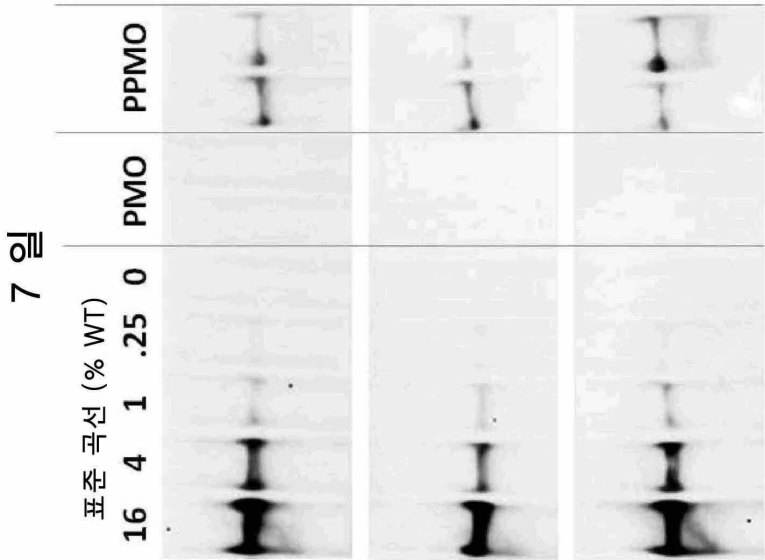
도면8a



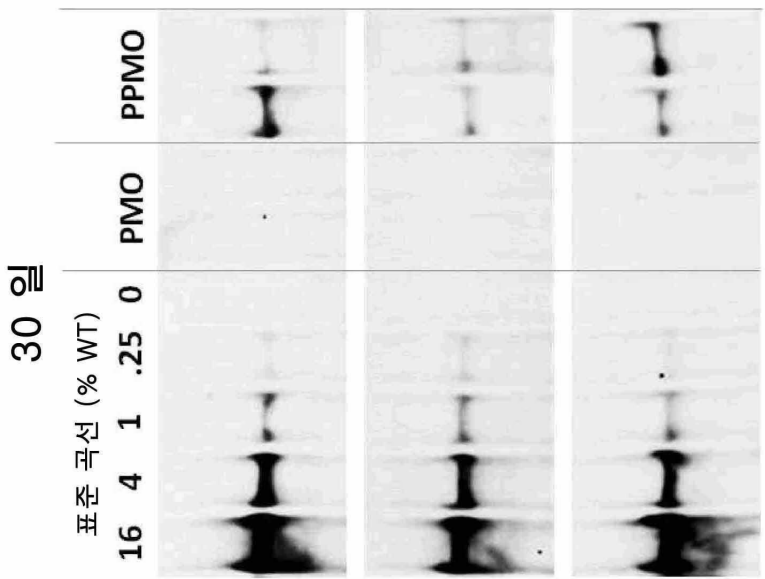
도면8b



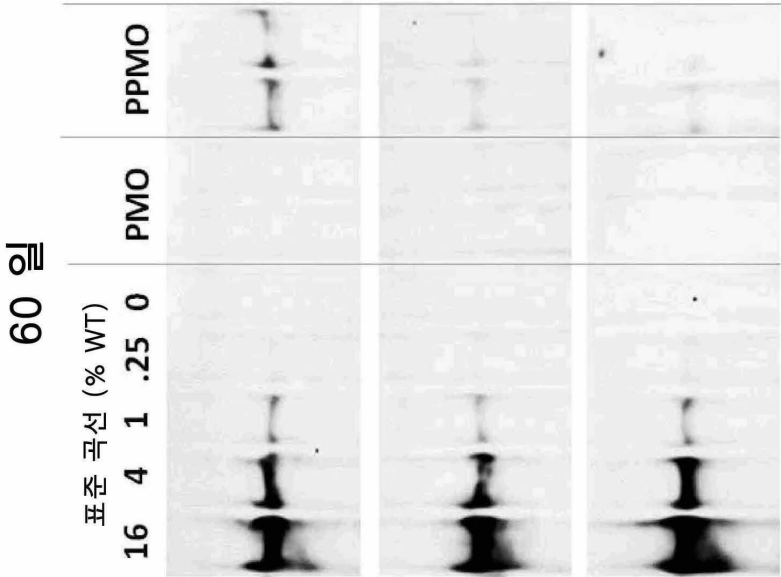
도면9a



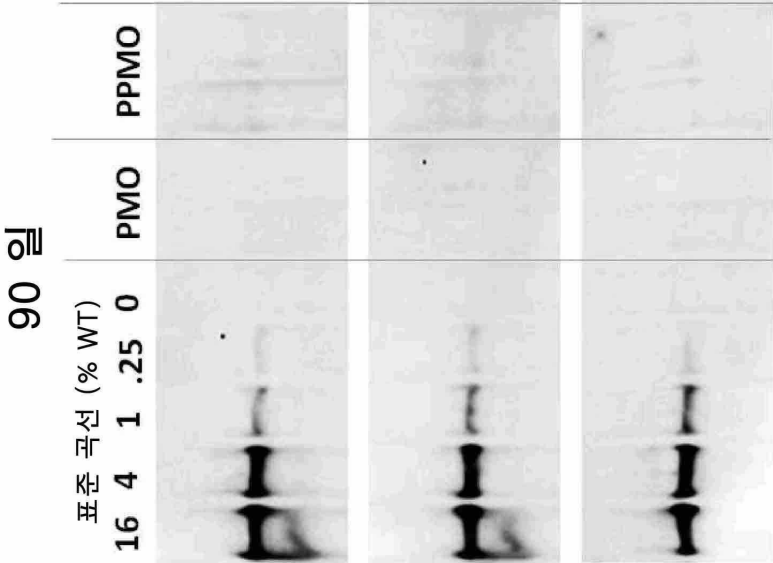
도면9b



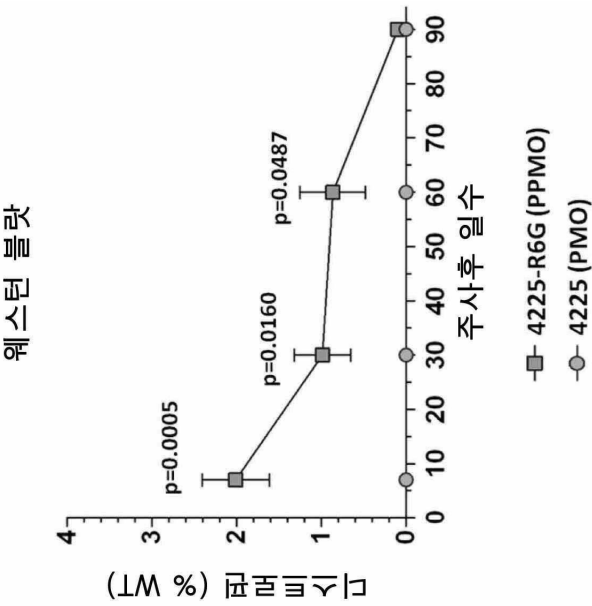
도면9c



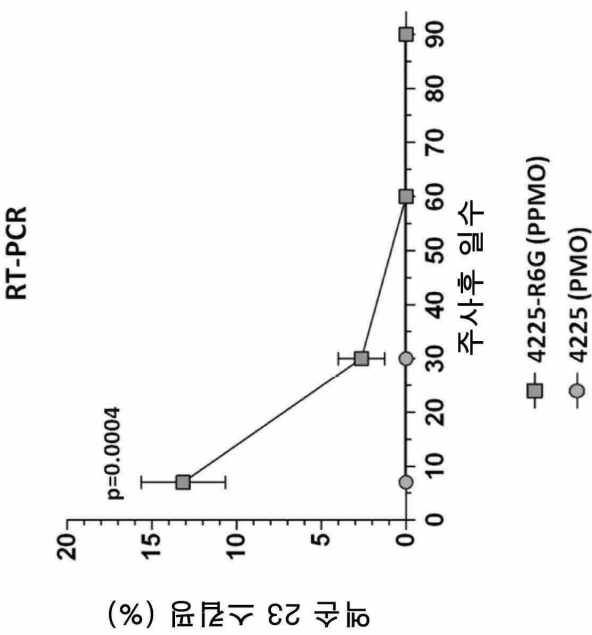
도면9d



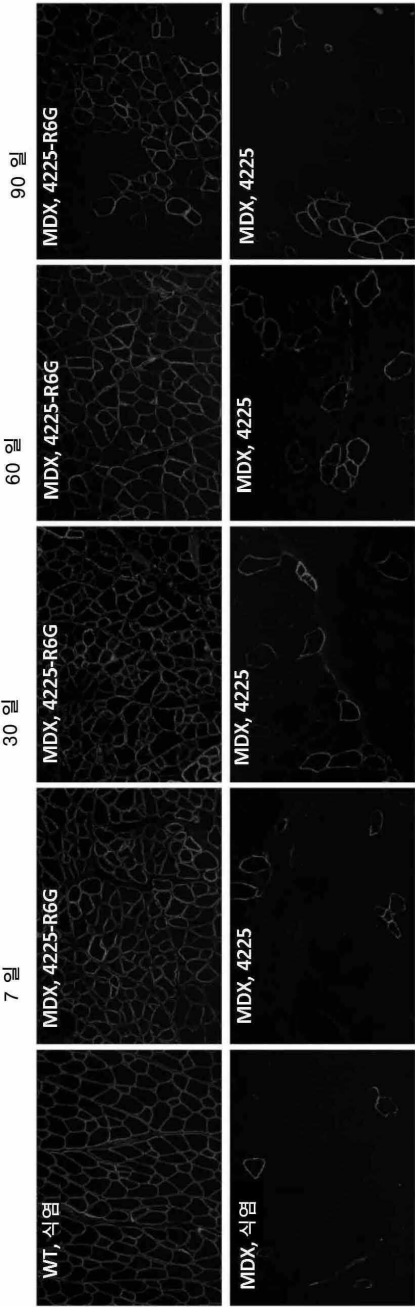
도면10a



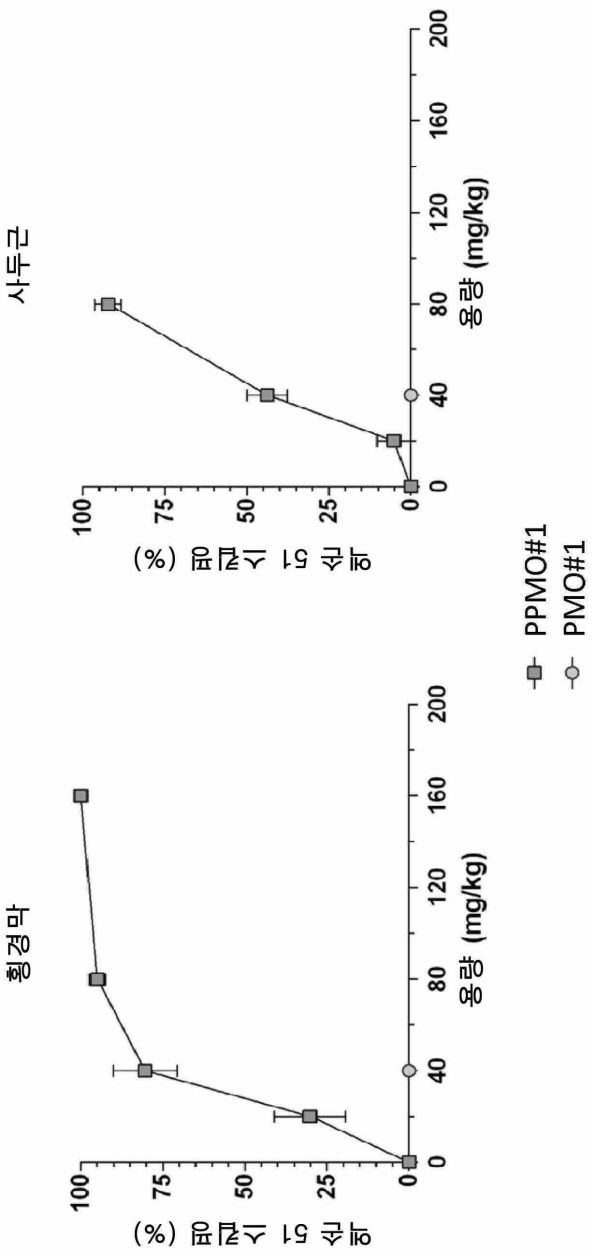
도면10b



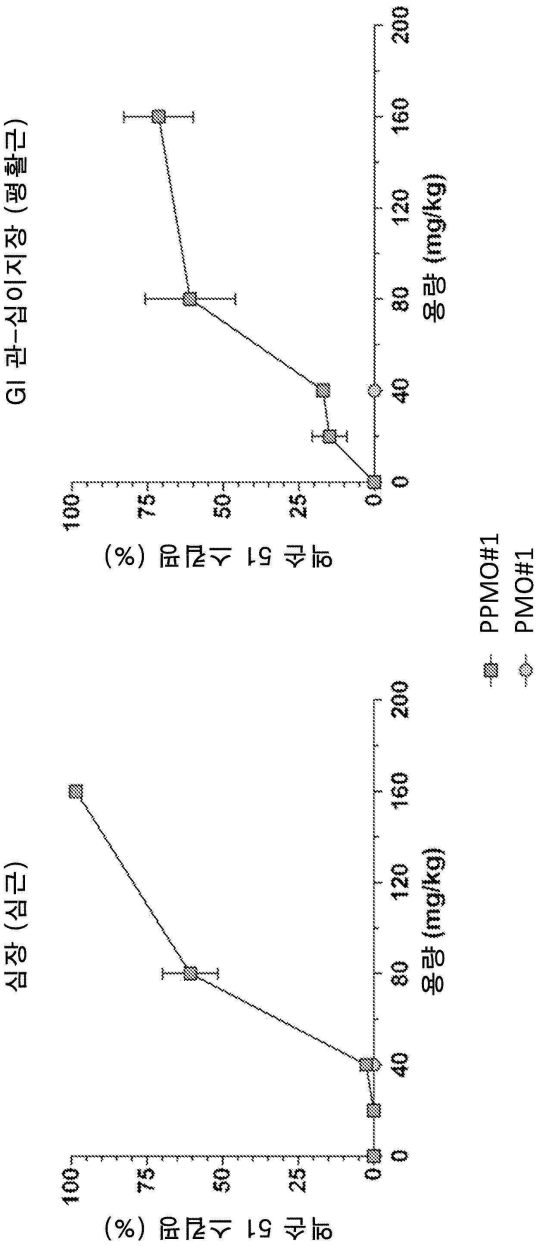
도면11



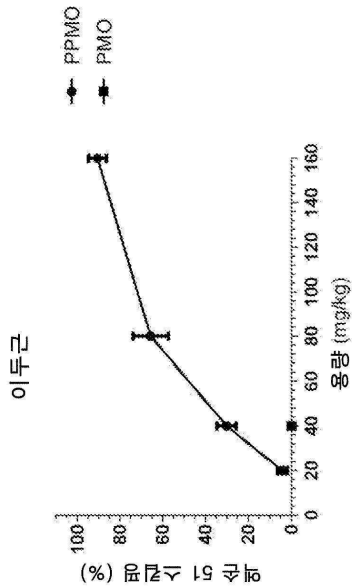
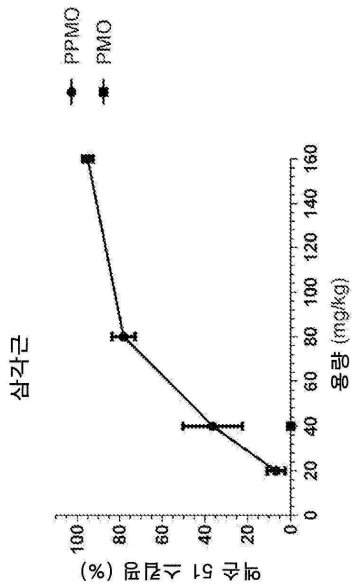
도면12



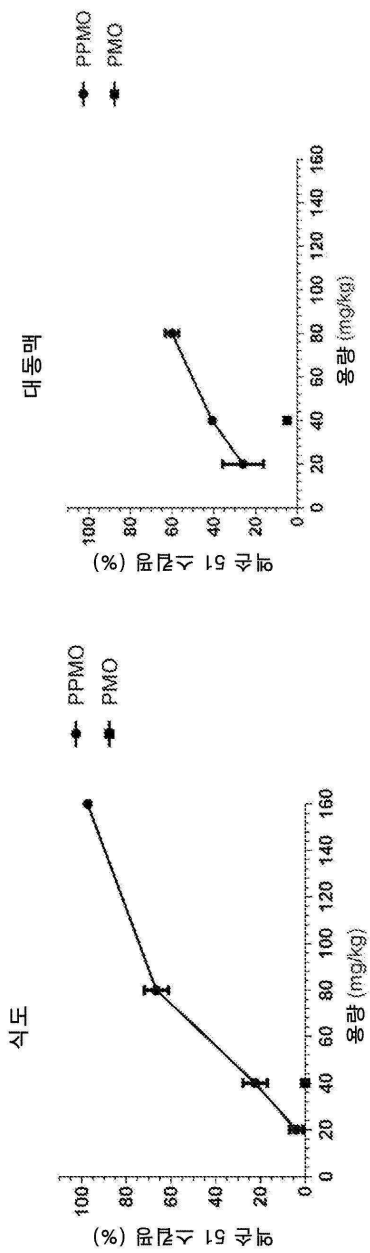
도면13



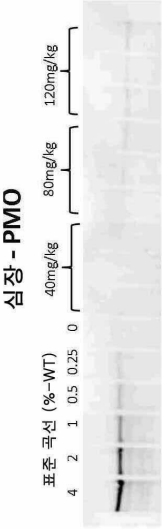
도면14



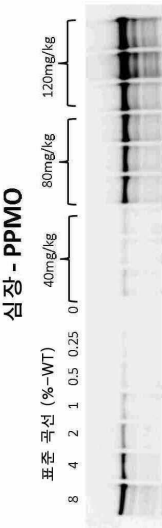
도면15



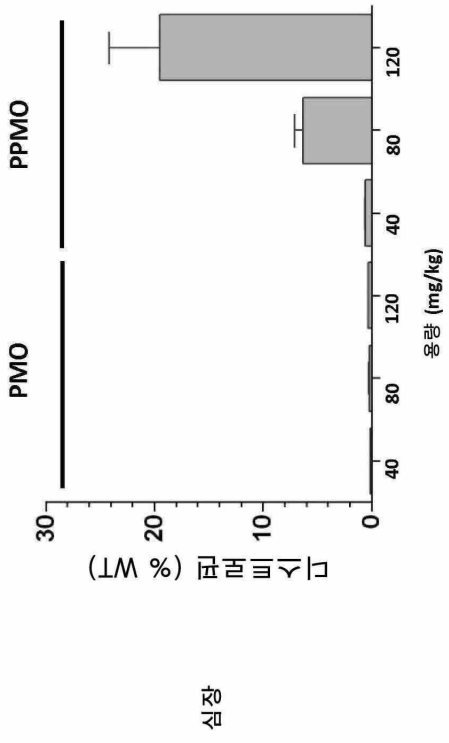
도면16a



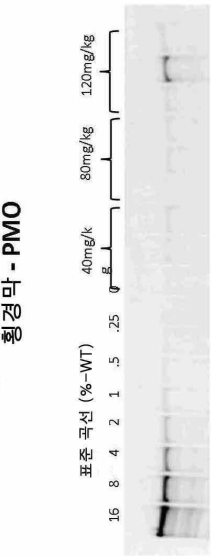
도면16b



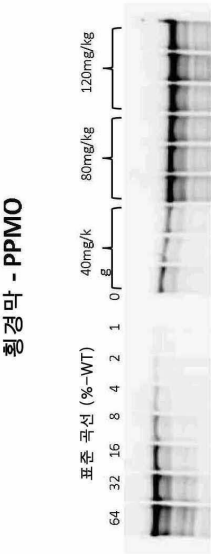
도면17



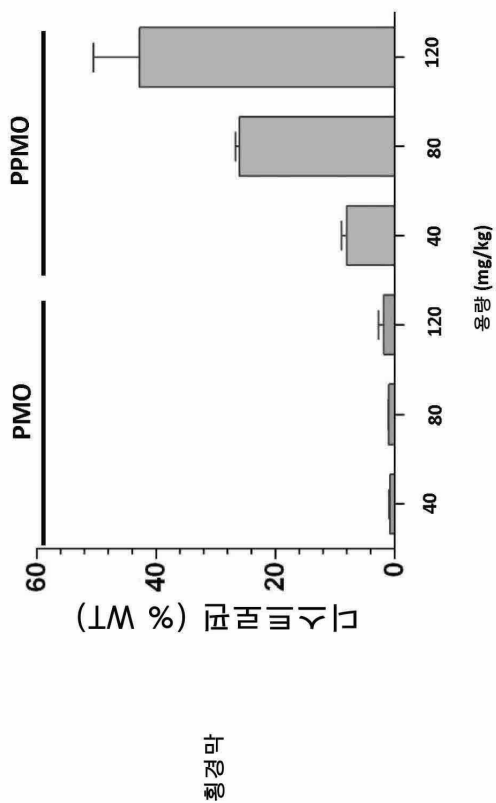
도면18a



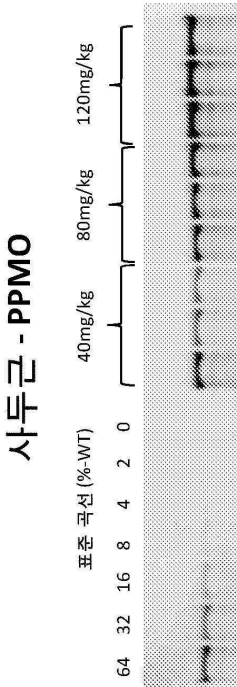
도면18b



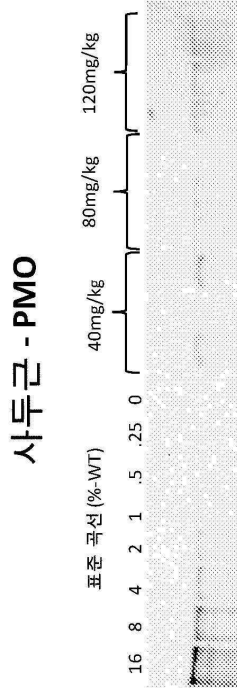
도면19



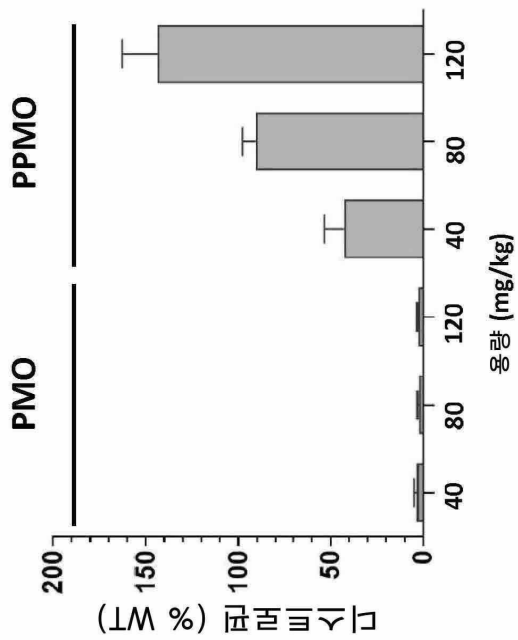
도면20a



도면20b

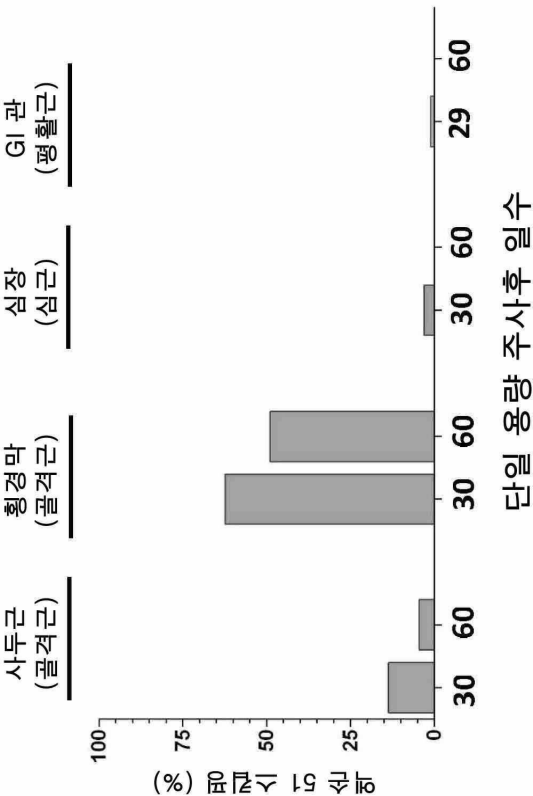


도면21



사두근

도면22



도면23a

사이클 번호: 서브유닛 (SU)	사전-커플링 처리				커플링 사이클		커플링후 처리	
	1	2	3	4	정량 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 커플링 시간 (Hrs.)	1	2
	30% TFE/DCM 세정	CYTFA 용액 ¹	중성 용액	DCM 세정			DCM 세정	30% TFE/DCM 세정
1:C	5.5L	a) 5.5L b) 5.5L, 122ml	3x5.5L	5.5L	536.7g; 195 ml NEM; 3.2L DMI	5	5.5L	2x5.5L
2:T	7.0L	a) 7L b) 7L, 158ml	3x7L	2x7L	468.2g and 195ml NEM 3.2L DMI	4.25	7L	2x7L ²
3:C	8L	a) 8L b) 8L, 182ml	3x8L	2x8L	536.7g; 195ml NEM; 3.4L DMI	4.25	8L	2x8L
4:C	9L	a) 9L b) 9L, 206ml	3x9L	2x9L	536.7g; 195ml NEM; 3.6L DMI	4.25	9L	2x9L ³

¹ ml는 1:1 NEM/DCM의 양을 나타낸다.

² 수지는 1/2일 동안 본 단계에서 유지된다

³ 수지는 1/2일 동안 본 단계에서 유지된다

도면23b

사이클 번호: 서브유닛 (SU)	사전-커플링 처리				커플링 사이클		커플링후 처리	
	1	2	3	4			1	2
	30% TFE/DCM 세정	CYTFA 용액 ¹	중성 용액	DCM 세정	정량 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 커플링 시간 (Hrs.)	DCM 세정	30% TFE/DCM 세정
5:A	9.5L	a) 9.5L b) 9.5L, 220ml	3x9.5L	2x9.5L	555.2g; 195ml NEM; 3.4L DMI	4.25	9.5L	2x9.5L
6:A	10L	a) 10L b) 10L, 232ml	3x10L	2x10 L	555.2g; 195ml NEM; 3.45L DMI	4.25	10L	2x10L ⁴
7:C	11L	a) 11L b) 11L, 256ml	3x11L	2x11L	536.7g; 195ml NEM; 3.57L DMI	4.25	11L	2x11L
8:A	11L	a) 11L b) 11L, 256ml	3x11L	2x11L	555.2g; 195ml NEM; 3.64L DMI	4.25	11L	2x11L ⁵

⁴ 수지는 0.4일 동안 본 단계에서 유지된다

⁵ 수지는 2.5일 동안 본 단계에서 유지된다

도면23c

사이클 번호: 서브유닛 (SU)	사전-커플링 처리				커플링 사이클		커플링후 처리	
	1	2	3	4			1	2
	30% TFE/DCM 세정	CYTFA 용액 ¹	중성 용액	DCM 세정	정량 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 커플링 시간 (Hrs.)	DCM 세정	30% TFE/DCM 세정
9:T	11.5L	a) 11.5L b) 11.5L 268ml	3x11.5L	2x 11.5L	468.2g; 195ml NEM; 3.72L DMI	4.25	11.5L	2x11.5L
10:C	12L	a) 12L b) 12L, 280ml	3x12L	2x12L	536.7g; 195ml NEM; 3.96L DMI	4.25	12L	2x12L ⁶
11:A	13.5L	a) 13.5L b) 13.5L, 204ml	3x13.5L	2x 13.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	13.5L	2x13.5L
12:A	13.5L	a) 13.5L b) 13.5L, 204ml	3x13.5L	2x 13.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	13.5L	2x13.5L ⁷

⁶ 수지는 1/2일 동안 본 단계에서 유지된다

⁷ 수지는 0.4일 동안 본 단계에서 유지된다

도면23d

사이클 번호: 서브유닛 (SU)	사전-커플링 처리				커플링 사이클		커플링후 처리	
	1	2	3	4			1	2
	30% TFE/DCM 세정	CYTFA 용액 ¹	중성 용액	DCM 세정	정량 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 커플링 시간 (Hrs.)	DCM 세정	30% TFE/DCM 세정
13:DPG	14L	a) 14L b) 14L, 216ml	3x14L	2x14L	941.9g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	14L	2x14L
14:DPG	14.5L	a) 14.5L b) 14.5L, 228ml	3x14.5L	2x 14.5L	941.9g; 253ml NEM; 4.1L DMI	4.25	14.5L	2x14.5L ⁸
15:A	15.5L	a) 15.5L b) 15.5L, 254ml	3x15.5L	2x 15.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.26L DMI	4.25	15.5L	2x15.5L
16:A	15.5L	a) 15.5L b) 15.5L, 254ml	3x15.5L	2x 15.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.26L DMI	4.25	15.5L	2x15.5L ⁹

⁸ 수지는 0.4일 동안 본 단계에서 유지된다

⁹ 수지는 0.4일 동안 본 단계에서 유지된다

도면23e

사이클 번호: 서브유닛 (SU)	사전-커플링 처리				커플링 사이클		커플링후 처리	
	1	2	3	4			1	2
	30% TFE/DCM 세정	CYTFA 용액 ¹	중성 용액	DCM 세정	정량 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 커플링 시간 (Hrs.)	DCM 세정	30% TFE/DCM 세정
17:DPG	16L	a) 16L b) 16L, 366ml	3x16L	2x16L	941.9g; 253ml NEM; 4.4L DMI	4.75	16L	2x16L
18:A	16.5L	a) 16.5L b) 16.5L, 378ml	3x16.5L	2x 16.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.4L DMI	4.25	16.5L	2x16.5L ¹⁰
19:T	16.5L	a) 16.5L b) 16.5L, 378ml	3x16.5L	2x 16.5L	608.7g; 253ml NEM; 4.57L DMI	4.25	16.5L	2x16.5L
20:DPG	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	941.9g; 253ml NEM; 4.57L DMI	4.75	17L	2x17L ¹¹

¹⁰ 수지는 1.5일 동안 본 단계에서 유지된다

¹¹ 수지는 0.3일 동안 본 단계에서 유지된다

도면23f

사이클 번호: 서브유닛 (SU)	사전-카플링 처리				카플링 사이클		카플링후 처리	
	1	2	3	4			1	2
	30% TFE/DCM 세정	CYTFA 용액 ¹	중성 용액	DCM 세정	정량 SU (g) NEM (l) DMI (l)	RT 카플링 시간 (Hrs.)	DCM 세정	30% TFE/DCM 세정
21:DPG	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	1159.2g; 311ml NEM; 4.72L DMI	4.25	17L	2x17L
22:C	17.5L	a) 17.5L b) 17.5L, 402ml	3x17.5L	2x 17.5L	858.7g; 311ml NEM; 4.72L DMI	4.75	17.5L	2x17.5L ¹²
23:A	17.5L	a) 17.5L b) 17.5L, 402ml	3x17.5L	2x 17.5L	888.3g; 311ml NEM; 4.88L DMI	4.25	17.5L	2x17.5L
24:T	18L	a) 18L b) 18L, 414ml	3x18L	2x18L	749.1g; 311ml NEM; 4.95L DMI	4.25	18L	2x18L ¹³

¹² 수지는 0.4일 동안 본 단계에서 유지된다

¹³ 수지는 0.4일 동안 본 단계에서 유지된다

도면23g

사이클 번호: 서브유닛 (SU)	사전-키프링 처리				키프링 사이클		키프링후 처리	
	1	2	3	4	정량 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 키프링 시간 (Hrs.)	1	2
	30% TFE/DCM 세정	CYTFA 용액 ¹	중성 용액	DCM 세정			DCM 세정	30% TFE/DCM 세정
25:T	18L	a) 18L b) 18L, 414ml	3x18L	2x18L	749.1g; 311ml NEM; 5.1L DMI	4.25	18L	2x18L
26:T	18.5L	a) 18.5L b) 18.5L, 426ml	3x18.5L	2x 18.5L	749.1g; 311ml NEM; 5.1L DMI	4.25	18.5L	2x18.5L ¹⁴
27:C	18.5L	a) 18.5L b) 18.5L, 426ml	3x18.5L	2x 18.5L	858.7g; 311ml NEM; 5.25L DMI	4.25	18.5L	2x18.5L
28:T	19L	a) 19L b) 19L, 438ml	3x19L	2x19L	749.1g; 311ml NEM; 5.25L DMI	4.25	19L	2x19L ¹⁵

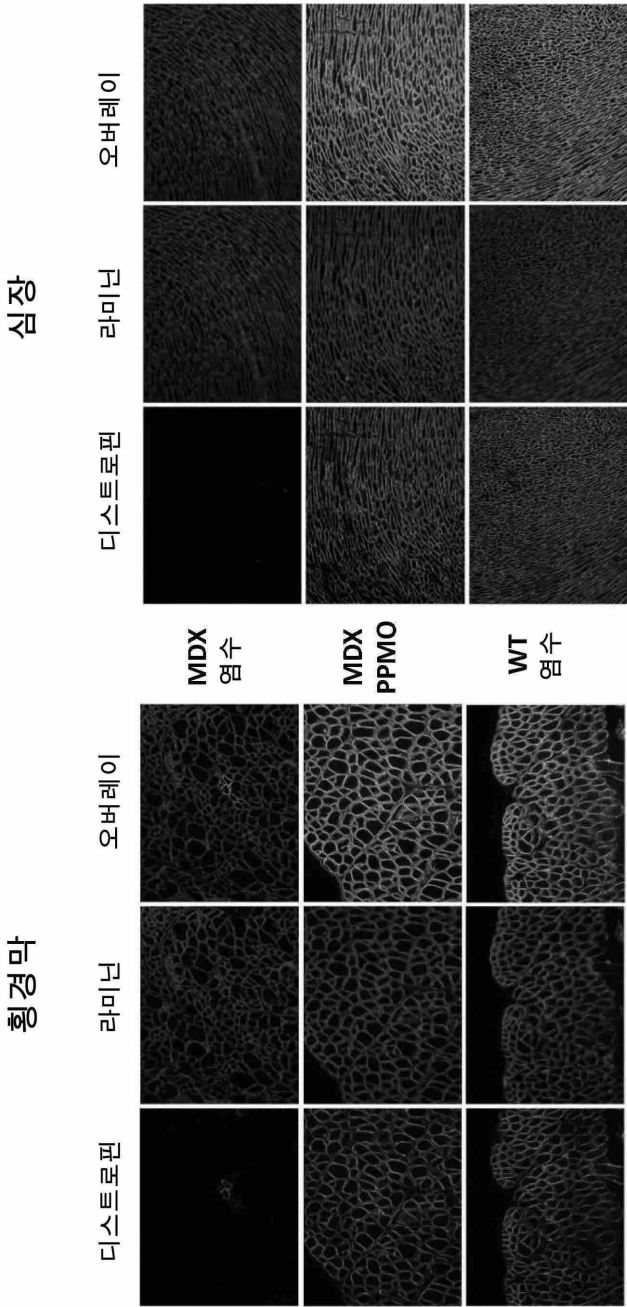
¹⁴ 수지는 0.4일 동안 본 단계에서 유지된다

¹⁵ 수지는 0.3일 동안 본 단계에서 유지된다

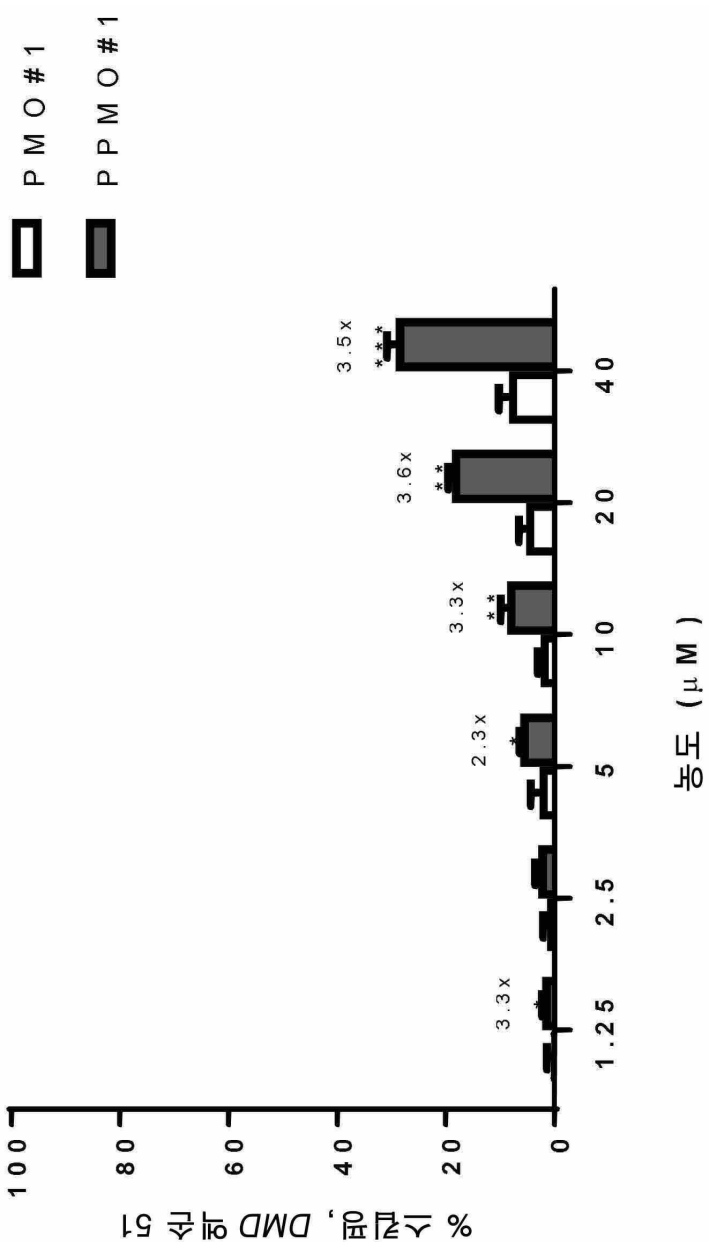
도면23h

사이클 번호: 서브유닛 (SU)	사전-커플링 처리				커플링 사이클		커플링후 처리	
	1	2	3	4	정량 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 커플링 시간 (Hrs.)	1	2
	30% TFE/DCM 세정	CYTFA 용액 ¹	중성 용액	DCM 세정			DCM 세정	30% TFE/DCM 세정
29:A	19L	a) 19L b) 19L, 438ml	3x19L	2x19L	888.3g; 311ml NEM; 5.41L DMI	4.25	19L	2x19L
30:DPG	19.5L	a) 19.5L b) 19.5L, 450ml	3x19.5L	2x 19.5L	1159.2g; 311ml NEM; 5.44L DMI	4.75	19.5L	2x19.5L

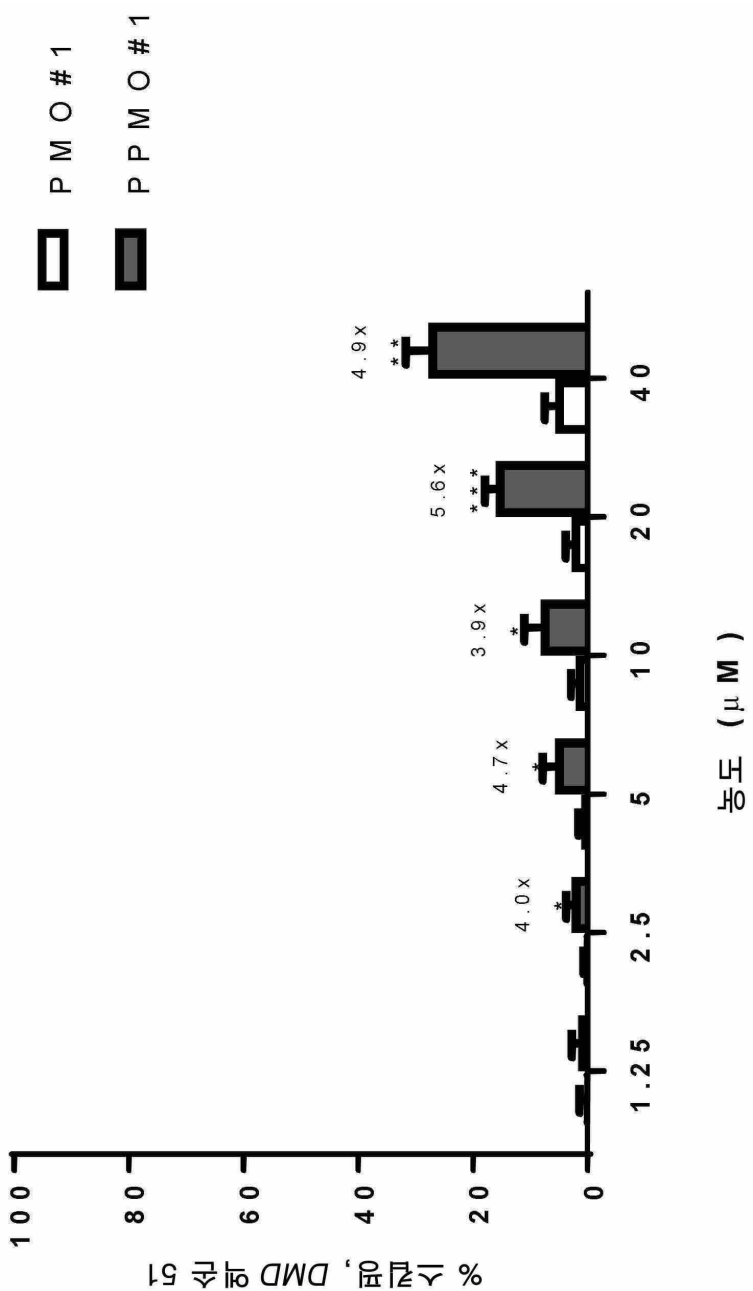
도면24



도면25



도면26



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> SAREPTA THERAPEUTICS, INC.
- <120> EXON SKIPPING OLIGOMER CONJUGATES FOR MUSCULAR DYSTROPHY
- <130> IPA190717-US-D1
- <140> PCT/US2017/066222
- <141> 2017-12-13
- <150> US 62/436,182

<151> 2016-12-19
 <150> US 62/443,476
 <151> 2017-01-06
 <150> US 62/479,173
 <151> 2017-03-30
 <150> US 62/562,080
 <151> 2017-09-22
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: H51A(+66+95)

<400> 1
 ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag 30

<210> 2
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: mdx4225

<400> 2
 ggccaaacct cggcttacct gaaat 25

<210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: R6

<400> 3
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: R6-G

<400> 4

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly

1 5

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Human exon 49 binding forward primer

<400> 5

ccagccactc agccagtga g 21

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Human exon 52 binding reverse primer

<400> 6

cgatccgtaa tgattgttct agcc 24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Mouse exon 23 binding forward primer

<400> 7

cacatctttg atggtgtgag g 21

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Mouse exon 23 binding reverse primer

<400> 8

caacttcagc catccatttc tg 22