



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0145192
(43) 공개일자 2021년12월01일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A61K 31/7125</i> (2006.01)
 <i>A61K 9/00</i> (2006.01) <i>A61P 21/04</i> (2006.01)
 <i>A61P 43/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 48/00</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/7125</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7034183
 (22) 출원일자(국제) 2020년03월25일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2021년10월21일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2020/024550
 (87) 국제공개번호 WO 2020/198268
 국제공개일자 2020년10월01일
 (30) 우선권주장
 62/825,573 2019년03월28일 미국(US)
 62/902,518 2019년09월19일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 사렙타 쉐러퓨틱스 인코퍼레이티드
 미국 매사추세츠 02142, 캄브리지, 215 퍼스트 스트리트</p> <p>(72) 발명자
 카예 에드워드 엠.
 미국, 매사추세츠 02142, 캄브리지, 215 퍼스트 스트리트, 씨/오 사렙타 쉐러퓨틱스 인코퍼레이티드</p> <p>(74) 대리인
 특허법인한얼</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **카시머센으로 근 이영양증을 치료하는 방법**

(57) 요약

본 개시는, 무엇보다도, 근 이영양증을 치료하기 위한 개선된 조성물 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 개시는 유효량의 카시머센을 투여함으로써 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는 뒤시엔느 근 이영양증 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

A61P 21/04 (2018.01)

A61P 43/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는, 이를 필요로 하는 환자에서 뒤시엔느 근 이영양증 (DMD)을 치료하는 방법으로서, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 투여량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 투여량은 환자의 체중의 약 30 mg/kg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 투여량은 단일 투여량으로 투여되는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여량은 매주 1회 투여되는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 엑손 7 내지 42, 12 내지 42, 18 내지 42, 44 내지 46, 44 내지 47, 44 내지 48, 44 내지 49, 44 내지 51, 44 내지 53, 44 내지 55, 44 내지 57, 또는 44 내지 59, 또는 엑손 44로 이루어진 군으로부터 선택되는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 만성적으로 카시머센을 투여받는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 적어도 48주 동안 카시머센을 투여받는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 카시머센의 투여 전에 적어도 6개월 동안 코르티코스테로이드의 안정적인 투여량을 투여 중인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 약학적 조성물로서 제형화되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 약 50 mg/mL의 강도를 갖는 약학적 조성물로서 제형화되는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 약 50 mg/mL의 강도를 갖는 약학적 조성물로서 제형화되고 약 100 mg/2 mL의 용량 형태로 제공되는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 용량 형태는 일회용 바이알에 담긴, 방법.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물로서 제형화되는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 인산염 완충 용액인, 방법.

청구항 15

엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는, 이를 필요로 하는 뒤시엔느 근 이영양증(DMD) 환자에서 엑손 스킵핑을 유도하기 위해 mRNA 관독 프레임을 복원하는 방법으로서, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 투여량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 투여량은 환자의 체중의 약 30 mg/kg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 투여량은 매주 1회 투여되는, 방법.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 적어도 48주 동안 카시머센을 투여받는, 방법.

청구항 19

엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는, 이를 필요로 하는 뒤시엔느 근 이영양증(DMD) 환자에서 디스트로핀 생산을 증가시키는 방법으로서, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 투여량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 투여량은 환자의 체중의 약 30 mg/kg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 투여량은 매주 1회 투여되는, 방법.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 적어도 48주 동안 카시머센을 투여받는, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 카시머센을 투여하기 전에 상기 환자가 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 가지고 있는지 확인하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 24

이를 필요로 하는 환자에서 뒤시엔느 근 이영양증(DMD)을 치료하는 데 사용하기 위한 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로서, 환자는 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 가지며, 치료는 주 1회 약 30 mg/kg의 카시머센의 단일 정맥내 투여량을 상기 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 25

이를 필요로 하는 뒤시엔느 근 이영양증(DMD) 환자에서 엑손 스킵핑을 유도하기 위해 mRNA 관독 프레임을 복원하는 데 사용하기 위한 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로서, 환자는 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 가지며, 치료는 주 1회 약 30 mg/kg의 카시머센의 단일 정맥내 투여량을 상기 환자

에게 투여하는 것을 포함하는, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 26

이를 필요로 하는 뒤시엔스 근 이영양증(DMD) 환자에서 디스트로핀 생산을 증가시키는 데 사용하기 위한 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로서, 환자는 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 가지며, 치료는 주 1회 약 30 mg/kg의 카시머센의 단일 정맥내 투여량을 상기 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2019년 3월 28일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/825,573호 및 2019년 9월 19일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/902,518호의 이익을 주장한다. 위에 언급된 출원의 전체 교시는 그 전체가 참조로서 통합된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 환자에서 근 이영양증을 치료하기 위한 개선된 방법에 관한 것이다. 또한 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 45 스킵핑(exon 45 skipping)을 용이하게 하는데 적합한 조성물을 제공한다.

배경 기술

[0005] 다양한 유전 질환에서, 유전자의 궁극적인 발현에 미치는 돌연변이의 효과는 스플라이싱 프로세스 동안에 표적화된 엑손 스킵핑의 프로세스를 통해 조절될 수 있다. 정상적으로 기능하는 단백질이 내부의 돌연변이로 인해 조기에 종결되는 경우, 안티센스 기술을 통해 일부 기능성 단백질 생산을 회복하는 수단이 스플라이싱 과정 동안의 개입을 통해 가능한 것으로 나타났으며, 질환 유발 돌연변이와 관련된 엑손이 일부 유전자로부터 특이적으로 결실될 수 있는 경우, 종종 천연 단백질과 유사한 생물학적 특성을 갖거나 엑손과 관련된 돌연변이에 의해 유발된 질환을 완화시키기 위해 충분한 생물학적 활성을 갖는 단축된 단백질 생성물을 생산할 수 있다(예를 들어, Sierakowska, Sambade 등의 1996; Wilton, Lloyd 등의 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout 등의 2001; Lu, Mann 등의 2003; Aartsma-Rus, Janson 등의 2004 참조).

[0006] 뒤시엔스 근 이영양증(DMD)은 단백질 디스트로핀의 발현 결함으로 인해 발생한다. 디스트로핀은 막대 모양의 세포질 단백질이며, 근섬유의 세포골격을 세포막을 통해 주변의 세포의 기질에 연결하는 단백질 복합체의 필수 부분이다. 디스트로핀은 근섬유에서 중요한 구조적 역할을 하여, 세포의 기질과 세포골격을 연결한다. N-말단 영역은 액틴에 결합하는 반면, C-말단 말단은, 근섬유막(sarcolemma)에 걸쳐 있는, 디스트로핀 당단백질 복합체(DGC)의 일부이다. mdx 마우스의 디스트로핀 결핍 근섬유는 수축-유도 근섬유막 파열에 대해 증가된 감수성을 나타내는 것으로 나타났다(Petrof 등의 1993; Cirak 등의 2012 참조).

[0007] 디스트로핀 단백질을 암호화하는 유전자는 DNA의 2백만 개가 넘는 뉴클레오타이드에 걸쳐 분산된 79개의 엑손을 포함한다. 엑손의 판독 프레임을 변화시키거나, 정지 코돈을 도입하거나, 전체 프레임 외 엑손(들)의 제거 또는 하나 이상의 엑손의 중복을 특징으로 하는 임의의 엑손 돌연변이는 기능적 디스트로핀의 생산을 파괴하여 DMD를 야기할 가능성이 있다.

[0008] 질환 발병은 크레아틴 키나아제 수치가 상승한 상태로 출생 시 기록될 수 있고, 유의한 운동 결손이 생후 첫 해에 존재할 수 있다. 7세 또는 8세 즈음에, 대부분의 DMD 환자들은 점점 더 힘들어지는 걸음걸이를 하고 바닥에서 일어나 계단을 오르는 능력을 상실하게 되며; 10세에서 14세가 되면, 대부분 휠체어에 의존하게 된다. DMD는 한결같이 치명적이며; 영향을 받은 개체는 일반적으로 10대 후반 또는 20대 초반에 호흡기 및/또는 심부전으로 사망한다. 지속적인 DMD 진행은 모든 질환 단계에서 치료적 개입을 허용한다; 그러나, 최근 치료는 당질코르티코이드로 제한되었으며, 이는 체중 증가, 행동 변화, 사춘기 변화, 골다공증, 쿠싱양 외관(Cushingoid facies), 성장 억제, 및 백내장을 포함하는 다수의 부작용과 관련이 있다. 결과적으로, 이 질환의 근본적인 원인을 치료하기 위한 더 나은 치료법을 개발하는 것이 필수적이다.

[0009] 덜 심각한 형태의 근 이영양증인 베커 근 이영양증(Becker muscular dystrophy, BMD)은 돌연변이, 일반적으로는 하나 이상의 엑손의 결실이 전체 디스트로핀 전사체를 따라 정확한 판독 프레임을 생성하여 mRNA의 단백질로의 번역이 조기 성숙 종결되지 않는 경우에 발생하는 것으로 밝혀졌다. 돌연변이된 디스트로핀 전-mRNA(pre-

mRNA)의 가공 중에 상류 및 하류 엑손의 결합이 유전자의 정확한 관독 프레임을 유지시키는 경우, 일부 활성을 유지하는 짧은 내부 결실을 포함한 단백질을 코딩하는 mRNA가 생성되어, 베커(Becker) 표현형이 생성된다.

[0010] 수년 간, 디스트로핀 단백질의 관독 프레임을 변경시키지 않는 엑손 또는 엑손들의 결실이 BMD 표현형을 야기하는 반면, 프레임-시프트(frame-shift)를 유발하는 엑손 결실은 DMD를 야기하는 것으로 알려져 왔다 (Monaco, Bertelson 등의 1988 참조). 일반적으로, 점 돌연변이와 엑손 결실을 포함하여, 관독 프레임을 변화시켜 적절한 단백질 번역을 방해하는 디스트로핀 돌연변이는 DMD를 야기한다. 일부 BMD 및 DMD 환자들은 다수의 엑손을 포함하는 엑손 결실을 갖는다는 점에 주목해야 한다.

[0011] DMD의 치료를 위해 스플라이스 스위칭 올리고뉴클레오타이드(SSO)의 안전성과 효능을 시험하는 최근의 임상시험은 스플라이스좀의 입체 차단에 의해 전-mRNA의 대안적인 스플라이싱을 유도하는 SSO 기술에 기초한다(Cirak 등, 2011; Goemans 등, 2011; Kinali 등, 2009; van Deutekom 등, 2007). 그러나, 이러한 성공에도 불구하고, DMD를 치료하기 위해 이용할 수 있는 약리학적 옵션은 제한적이다.

[0012] 따라서, 환자에서 DMD 및 BMD와 같은, 디스트로핀을 생산하고 근 이영양증을 치료하기 위한 개선된 조성물 및 방법에 대한 필요성이 남아 있다.

발명의 내용

[0013] 본 개시는, 적어도 부분적으로, 엑손 45 스킵핑 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 카시머센(casimersen)을 사용한 치료가 베이스라인 대비 환자에서 디스트로핀 단백질을 상당히 증가시켰음을 보여주는 임상 증거에 기초한다. 또한, 엑손 스킵핑과 드노보 디스트로핀 단백질 간의 양의 상관관계가 관찰되었다.

[0014] 따라서, 일부 측면에서, 본 개시는, 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는, 이를 필요로 하는 환자에서 뒤시엔스 근 이영양증(DMD)을 치료하는 방법을 제공하며, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0015] 일부 측면에서, 본 개시는, 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는, 이를 필요로 하는 뒤시엔스 근 이영양증(DMD) 환자에서 엑손 스킵핑을 유도하기 위해 mRNA 관독 프레임을 복원하는 방법을 제공하며, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0016] 일부 측면에서, 본 개시는, 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는, 이를 필요로 하는 뒤시엔스 근 이영양증(DMD) 환자에서 디스트로핀 생산을 증가시키는 방법을 제공하며, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0017] 일부 측면에서, 투여량은 환자의 체중의 약 4 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 40 mg/kg, 또는 약 50 mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0018] 일부 측면에서, 투여량은 단일 투여량으로 투여된다. 일부 측면에서, 투여량은 매주 1회 투여된다. 일부 측면에서, 투여량은 정맥내 투여된다. 일부 측면에서, 투여량은 주입에 의해 정맥내 투여된다. 일부 측면에서, 투여량은 35-60분에 걸쳐 주입에 의해 정맥내 투여된다. 일부 측면에서, 투여량은 피하 주사에 의해 정맥내 투여된다.

[0019] 일부 측면에서, 환자는 최대 40세, 최대 30세, 또는 최대 21세이다. 일부 측면에서, 환자는 1 내지 21세이다. 일부 측면에서, 환자는 5 내지 21세이다. 일부 측면에서, 환자는 7 내지 13세이다.

[0020] 일부 측면에서, 본 개시는 전술한 또는 관련된 측면 중 어느 하나에 따른 방법을 제공하며, 여기서 상기 환자는 엑손 7 내지 42, 12 내지 42, 18 내지 42, 44 내지 46, 44 내지 47, 44 내지 48, 44 내지 49, 44 내지 51, 44 내지 53, 44 내지 55, 44 내지 57, 또는 44 내지 59, 또는 엑손 44를 포함하는 군으로부터 선택되는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는다.

[0021] 일부 측면에서, 본 개시는 전술한 또는 관련된 측면 중 어느 하나에 따른 방법을 제공하며, 여기서 환자는 만성적으로 카시머센을 투여받는다. 일부 측면에서, 환자는 적어도 48주 동안 카시머센을 투여받는다. 일부 측면에서, 환자는 1년 초과, 2년 초과, 3년 초과, 4년 초과, 5년 초과, 10년 초과, 20년 초과, 또는 30년 초과 동안 카시머센을 투여받는다.

[0022] 일부 측면에서, 본 개시는 전술한 또는 관련된 측면 중 어느 하나에 따른 방법을 제공하며, 여기서 상기 환자는 카시머센의 투여 전에 적어도 6개월 동안 코르티코스테로이드의 안정한 투여량을 투여받는다. 일부 측면에서, 환자는 카시머센의 투여 전에 적어도 6개월 동안 코르티코스테로이드의 안정한 투여량을 투여받으며, 카시머센

의 투여 동안 코르티코스테로이드를 계속 투여받는다.

[0023] 일부 측면에서, 본 개시는 전술한 또는 관련된 측면 중 어느 하나에 따른 방법을 제공하며, 여기서 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 약학적 조성물로서 제형화된다. 일부 측면에서, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 50 mg/mL의 강도를 갖는 약학적 조성물로서 제형화된다. 일부 측면에서, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 50 mg/mL의 강도를 갖는 약학적 조성물로서 제형화되고, 100 mg/2 mL의 용량 형태로 제공된다. 일부 측면에서, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 50 mg/mL의 강도를 갖는 약학적 조성물로서 제형화되고, 500 mg/2 mL의 용량 형태로 제공된다. 일부 측면에서, 용량 형태는 일회용 바이알에 담긴다.

[0024] 일부 측면에서, 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물로서 제형화된다. 일부 측면에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 인산염 완충 용액이다.

[0025] 일부 측면에서, 본 개시는 전술한 또는 관련된 측면 중 어느 하나에 따른 방법을 제공하며, 여기서 엑손 스킵핑은 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)에 의해 측정된다.

[0026] 일부 측면에서, 본 개시는 전술한 또는 관련된 측면 중 어느 하나에 따른 방법을 제공하며, 상기 방법은 환자에서 디스트로핀 생산을 증가시킨다. 일부 측면에서, 디스트로핀 생산은 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정된다. 일부 측면에서, 디스트로핀 생산은 면역조직화학(IHC)에 의해 측정된다.

[0027] 일부 측면에서, 본 개시는 전술한 또는 관련된 측면 중 어느 하나에 따른 방법을 제공하며, 상기 방법은 카시머센을 투여하기 전에 환자가 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자에서 돌연변이를 가지고 있는지 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[0028] 일부 측면에서, 본 개시는, 이를 필요로 하는 환자에서 뒤시엔스 근 이영양증(DMD)을 치료하는 데 사용하기 위한 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며, 상기 환자는 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 가지고, 여기서 상기 치료는 매주 1회 약 30 mg/kg의 카시머센의 단일 정맥내 투여량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0029] 일부 측면에서, 본 개시는, 이를 필요로 하는 뒤시엔스 근 이영양증(DMD) 환자에서 엑손 스킵핑을 유도하기 위해 mRNA 관독 프레임을 복원하는 데 사용하기 위한 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며, 상기 환자는 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 가지고, 여기서 상기 치료는 매주 1회 약 30 mg/kg의 카시머센의 단일 정맥내 투여량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0030] 일부 측면에서, 본 개시는, 이를 필요로 하는 뒤시엔스 근 이영양증(DMD) 환자에서 디스트로핀 생산을 증가시키는 데 사용하기 위한 카시머센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며, 상기 환자는 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 돌연변이를 가지고, 여기서 상기 치료는 매주 1회 약 30 mg/kg의 카시머센의 단일 정맥내 투여량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 개시의 구현예들은 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 45 스킵핑을 유도하도록 특이적으로 고안된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 카시머센을 투여함으로써, DMD와 같은, 근 이영양증을 치료하는 방법에 관한 것이다. 디스트로핀은 근육 기능에 있어서 중요한 역할을 하며, 다양한 근육 관련 질환은 이 유전자의 돌연변이된 형태를 특징으로 한다. 따라서, 소정의 구현예에서, 본원에 기술된 방법은 DMD에서 발견되는 돌연변이된 디스트로핀 유전자와 같은, 인간 디스트로핀 유전자의 돌연변이된 형태로 엑손 45 스킵핑을 유도하는 데 사용될 수 있다.

[0032] 따라서, 본 개시는 환자에서 엑손 45 스킵핑을 유도함으로써, DMD와 같은, 근 이영양증을 치료하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 개시는 DMD 환자에서 엑손 스킵핑을 유도하기 위해 mRNA 관독 프레임을 복원하는 방법에 관한 것이다. 본 개시는 또한 DMD 환자에서 디스트로핀 생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0033] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 통상의 기술자를 가진 자들에 의해 통상적으로 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명을 실시하고 시험하는 데 사용될 수 있지만, 바람직한 방법과 물질이 기술된다. 본 발명의 목적을 위해, 하기 용어들이 아래에 정의된다.

[0034] I.정의

- [0035] "약(about)"이란 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이가 기준 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 많게는 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1%만큼 변화하는 것을 의미한다.
- [0036] 대상체 또는 환자와 관련하여 본원에서 사용된 "엑손 45 스킵핑에 순응하는(amenable to exon 45 skipping)"은 디스트로핀 유전자에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는 대상체 및 환자를 포함하도록 의도되는데, 여기서 디스트로핀 유전자의 엑손 45의 스킵핑이 없는 경우, 판독 프레임이 프레임을 벗어나게 되어(out-of-frame) 전-mRNA의 번역을 방해하므로, 대상체 또는 환자는 디스트로핀을 생산할 수 없게 된다. 엑손 45 스킵핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 다음과 같은 엑손들에서의 돌연변이의 비한정적인 예는, 예를 들어: 엑손 7 내지 42, 12 내지 42, 18 내지 42, 44 내지 46, 44 내지 47, 44 내지 48, 44 내지 49, 44 내지 51, 44 내지 53, 44 내지 55, 44 내지 57, 또는 44 내지 59, 또는 엑손 44의 결실을 포함한다. 환자가 엑손 스킵핑에 순응하는 디스트로핀 유전자에서 돌연변이를 가지고 있는지 여부는 본 기술분야의 통상의 기술을 가진 자가 충분히 결정할 수 있다(예를 들어, Aartsma-Rus 등의 (2009) Hum Mutat. 30:293-299, Gurvich 등의 Hum Mutat. 2009; 30(4) 633-640, 및 Fletcher 등의 (2010) Molecular Therapy 18(6) 1218-1223 참조).
- [0037] 용어 "안티센스 올리고머" 및 "안티센스 화합물" 및 "안티센스 올리고뉴클레오타이드" 및 "올리고머" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 본 개시에서 상호 교환적으로 사용되고, 서브유닛 간 연결에 의해 연결된 환형 서브유닛의 서열을 지칭하며, 각각의 환형 서브유닛은: (i) 리보오스 당 또는 이의 유도체; 및 (ii) 이에 결합된 염기쌍 모이어티로 이루어져 있어서, 표적 서열 내의 핵산:올리고머 이중이중체를 형성하기 위해, 상기 염기쌍 모이어티의 순서가 왓슨-크릭 염기 페어링에 의해 핵산(전형적으로 RNA) 내의 표적 서열에 상보적인 염기 서열을 형성하도록 한다. 소정의 구현예에서, 올리고머는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머("PMO")이다. 다른 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 포스포로티오에이트이다. 다른 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 펩티드 핵산(PNA), 잠긴 핵산(LNA), 또는 2'-O,4'-C-에틸렌-브릿지 핵산(ENA)과 같은 브릿지 핵산(BNA)이다.
- [0038] 용어 "상보적인(complementary)" 및 "상보성(complementarity)"은 왓슨-크릭 염기-페어링 규칙에 의해 서로 연관된 (즉, 핵염기 서열을 각각 포함하는) 둘 이상의 올리고머를 지칭한다. 예를 들어, 핵염기 서열 "T-G-A (5' → 3') "은 핵염기 서열 "A-C-T (3' → 5') "에 대해 상보적이다. 상보성은 "부분적인 것"일 수 있는데, 이 경우 주어진 핵염기 서열의 모든 핵염기보다 적은 수가 염기 페어링 규칙에 따라 다른 핵염기 서열과 매칭된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 주어진 핵염기 서열과 다른 핵염기 서열 간의 상보성은 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95%일 수 있다. 또는, 주어진 핵염기 서열과 실시예를 계속하기 위한 다른 핵염기 서열 간에 "완전한(complete)" 또는 "완벽한(perfect)(100%)" 상보성이 존재할 수 있다. 핵염기 서열들 간의 상보성은 서열들 간의 혼성화의 효율 및 강도에 상당한 영향을 미친다.
- [0039] "디스트로핀(Dystrophin)"은 막대 형상의 세포질 단백질이며, 근섬유의 세포골격을 세포막을 통해 주변 세포의 기질에 연결하는 단백질 복합체의 필수 부분이다. 디스트로핀은 다수의 기능적 도메인을 함유한다. 예를 들어, 디스트로핀은 약 아미노산 14-240에서 액틴 결합 도메인 및 약 아미노산 253-3040에서 중앙 로드 도메인을 함유한다. 이러한 큰 중앙 도메인은 알파-액티닌 및 스펙트린과 상동성을 갖는, 약 109개 아미노산의 24개의 스펙트린-유사 삼중-나선 요소에 의해 형성된다. 반복체는 일반적으로 힌지 영역이라고도 지칭되는, 4개의 프롤린-풍부 비-반복 분절에 의해 차단된다. 반복체 15 및 16은 디스트로핀의 단백질분해 절단을 위한 주요 부위를 제공하는 것처럼 보이는 18개의 아미노산 스트레치에 의해 분리된다. 대부분의 반복체 간의 서열 동일성은 10-25% 범위이다. 하나의 반복체는 3개의 알파-나선: 1, 2 및 3을 함유한다. 알파-나선 1 및 3은 각각 7개 나선 회전에 의해 형성되며, 아마도 소수성 계면을 통해 꼬인 코일로서 상호작용한다. 알파-나선 2는 보다 복잡한 구조를 가지며, 글리신 또는 프롤린 잔기에 의해 분리된, 4 및 3개 나선 회전의 분절에 의해 형성된다. 각각의 반복체는 2개의 엑손에 의해 암호화되며, 일반적으로 알파-나선 2의 제1 부분에서 아미노산 47과 48 사이의 인트론에 의해 차단된다. 다른 인트론은 반복체의 상이한 위치에서 발견되며, 일반적으로 나선-3에 걸쳐 산재된다. 디스트로핀은 또한, 점균류(slime mold)(딕티오스테리움 디스코이데움(Dictyostelium discoideum)) 알파-액티닌의 C-말단 도메인과 상동성을 보여주는 시스테인-풍부 분절(즉, 280개 아미노산 중 15개 시스테인)을 포함하는, 약 아미노산 3080-3360에서 시스테인-풍부 도메인을 함유한다. 카르복시-말단 도메인은 약 아미노산 3361-3685에 있다.
- [0040] 디스트로핀의 아미노-말단은 F-액틴에 결합하고, 카르복시-말단은 근섬유막에서 디스트로핀-결합 단백질 복합체(DAPC)에 결합한다. DAPC는 디스트로글리칸, 사르코글리칸, 인테그린 및 카베올린을 포함하며, 이들 성분 중 어느 하나의 돌연변이는 상염색체 유전성 근 이영양증을 유발한다. 디스트로핀이 없을 때 DAPC는 불안정화되어,

구성원 단백질의 수준이 감소하게 되고, 결과적으로 점진적인 섬유 손상 및 막 누출로 이어진다. 뒤시엔느 근 이영양증(DMD) 및 베커 근 이영양증(BMD)과 같은, 다양한 형태의 근 이영양증에서, 근육 세포는 디스트로핀의 변경되고 기능적으로 결함 있는 형태를 생산하거나, 디스트로핀을 전혀 생산하지 않는데, 이는 주로 부정확한 스플라이싱을 유발하는 유전자 서열의 돌연변이로 인한 것이다. 위에서 언급한 바와 같이, 결함이 있는 디스트로핀 단백질의 우세한 발현, 또는 디스트로핀 또는 디스트로핀-유사 단백질의 완전한 결여는, 근육 변성의 급속한 진행을 초래한다. 이와 관련하여, "결함 있는" 디스트로핀 단백질은 당 기술분야에 공지된 바와 같이, DMD 또는 BMD가 있는 특정 대상체에서 생산되는 디스트로핀의 형태, 또는 검출 가능한 디스트로핀이 없는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0041] "엑손"은 단백질을 암호화하는 핵산의 정의된 섹션, 또는 예비-가공된 (또는 전구체) RNA의 어느 한 부분이 스플라이싱에 의해 제거된 후에 RNA 분자의 성숙한 형태로 표시되는 핵산 서열을 지칭한다. 성숙한 RNA 분자는 메신저 RNA(mRNA) 또는 논-코딩 RNA의 기능적 형태, 예컨대 rRNA 또는 tRNA일 수 있다. 인간 디스트로핀 유전자는 약 79개의 엑손을 갖는다.

[0042] "인트론"은 단백질로 번역되지 않는 (유전자 내의) 핵산 영역을 지칭한다. 인트론은 전구체 mRNA(전-mRNA)로 전사되고, 이어서 성숙한 RNA의 형성 동안 스플라이싱에 의해 제거되는 논-코딩 섹션이다.

[0043] "유효량(effective amount)" 및 "치료적 유효량(therapeutically effective amount)"은 원하는 치료 효과를 생성하는 데 효과적인 1회 투여량으로서 또는 일련의 투여량의 일부로서, 포유류 대상체에게 투여되는, 예를 들어 카시머센을 비롯한, 안티센스 올리고머와 같은, 치료적 화합물의 양을 지칭한다. 안티센스 올리고머의 경우, 이러한 효과는 선택된 표적 서열의 번역 또는 천연 스플라이스-가공을 억제하거나 디스트로핀 생산을 증가시키기 위한 엑손 스킵핑에 의해 유발된다.

[0044] 일부 구현예에서, 유효량은 대상체를 치료하기 위한 기간 동안 안티센스 올리고머, 또는 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 적어도 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg, 또는 적어도 20 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 대상체에서 디스트로핀-양성 섬유의 수를 증가시키기 위한, 안티센스 올리고머, 또는 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 적어도 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg, 또는 적어도 20 mg/kg이다. 다양한 구현예에서, 유효량은 적어도 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg 약 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 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 30 mg/kg 또는 약 50 mg/kg이다.

[0045] 다양한 구현예에서, 유효량은 대상체에서 디스트로핀의 생산을 증가시키기 위한 안티센스 올리고머, 또는 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 적어도 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg 또는 적어도 20 mg/kg이다. 다양한 구현예에서, 유효량은 적어도 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 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 30 mg/kg 또는 약 50 mg/kg이다.

[0046] 소정의 구현예에서, 유효량은, 예를 들어 6 MWT에 있어서, 건강한 동년배에 비해 환자의 보행 거리가 20% 부족한 것을 안정화하거나, 유지시키거나 개선하기 위한, 안티센스 올리고머, 또는 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 적어도 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg, 또는 적어도 20 mg/kg이다. 다양한 구현예에서, 유효량은 적어도 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg, 약 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 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 30 mg/kg 또는 약 50 mg/kg이다.

[0047] 소정의 구현예에서, 유효량은 대상체에서 디스트로핀-양성 섬유의 수를 증가시키기 위한, 적어도 24주, 적어도 36주, 또는 적어도 48주 동안, 적어도 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 또는 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 소정의 구현예에서, 대상체에서 디스트로핀-양성 섬유의 수 증가는 정상 수준의 적어도 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 약 95%까지이다. 일부 구현예에서, 치료는 환자에서 디스트로핀-양성 섬유의 수를 정상 수준의 20~60%, 또는 30~50%까지 증가시킨다.

[0048] 소정의 구현예에서, 유효량은, 예를 들어 6 MWT에 있어서, 건강한 동년배에 비해 환자의 보행 거리가 20% 부족한 것을 안정화하거나 개선하기 위한, 적어도 24주, 적어도 36주, 또는 적어도 48주 동안, 적어도 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 또는 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다.

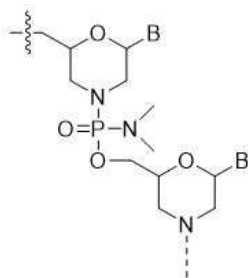
- [0049] 다양한 구현예에서, 유효량은 대상체에서 디스트로핀 생산을 증가시키기 위한, 적어도 24주, 적어도 36주, 또는 적어도 48주 동안, 적어도 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 또는 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 증가된 디스트로핀 생산은 건강한 동년배에 비해 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%, 1%, 1.01%, 1.5%, 2%, 2.01%, 2.5%, 3%, 3.01%, 3.5%, 4%, 4.01%, 4.5%, 5%, 5.01%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 10.5%, 11%, 11.5%, 12%, 12.5%, 13%, 13.5%, 14%, 14.5%, 15%, 15.5%, 16%, 16.5%, 17%, 17.5%, 18%, 18.5%, 19%, 19.5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 60%이다. 소정의 구현예에서, 디스트로핀 생산의 증가는 건강한 동년배에 비해 약 0.1% 내지 0.5%, 0.5% 내지 0.9%, 0.8% 내지 1%, 0.9% 내지 1.2%, 0.9% 내지 1.0%, 0.9% 내지 1.01%, 1% 내지 1.01%, 1% 내지 1.5%, 1.5% 내지 2%, 1.9% 내지 2.0%, 1.9% 내지 2.01%, 2% 내지 2.01%, 2%, 내지 2.5%, 2.5% 내지 3%, 2.9% 내지 3.0%, 2.9% 내지 3.01%, 2% 내지 3.01%, 3% 내지 3.5%, 3.5% 내지 4%, 4% 내지 4.5%, 4.5% 내지 5%, 5% 내지 6%, 6% 내지 7%, 7% 내지 8%, 8% 내지 9%, 9% 내지 10%, 1% 내지 2%, 1% 내지 3%, 1% 내지 5%, 2% 내지 4%, 2% 내지 5%, 4% 내지 6%, 5%, 내지 8%, 8% 내지 10%, 1% 내지 5%, 2% 내지 6%, 3% 내지 7%, 4% 내지 8%, 5% 내지 10%, 10% 내지 12%, 12% 내지 15%, 15% 내지 20%, 17% 내지 20%, 20% 내지 22%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 또는 30% 내지 35%일 수 있다.
- [0050] "강화(enhance 또는 enhancing)" 또는 "증가(increase 또는 increasing)" 또는 "자극(stimulate 또는 stimulating)"은, 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 부재에 의해 야기되거나 대조군 화합물에 의해 야기된 반응과 비교했을 때, 예를 들어 카시머셀을 비롯한, 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 또는 이의 약학적 조성물이 세포 또는 대상체에서 더 큰 생리학적 반응(즉 하방 효과(downstream effect))를 생성하거나 이를 야기하는 능력을 일반적으로 지칭한다. 측정가능한 생리학적 반응은, 당업계의 이해와 본원의 설명으로부터 명백한 다른 반응 가운데, 기능적 형태의 디스트로핀 단백질의 발현 (또는 생산) 증가, 또는 근육 조직에서 디스트로핀과 연관된 생물학적 활성의 증가를 포함할 수 있다. 근육 기능이 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% 만큼 증가하거나 개선되는 것을 포함하여, 근육 기능의 증가를 측정할 수도 있다. 근육 섬유 중 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%에서 디스트로핀 발현이 증가하는 것을 포함하여, 기능적 디스트로핀을 발현하는 근육 섬유의 백분율을 측정할 수도 있다. 예를 들어, 섬유의 25~30%가 디스트로핀을 발현하는 경우, 약 40%의 근육 기능 개선이 발생할 수 있는 것으로 나타났다(예를 들어, DelloRusso 등의 문헌 [Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002] 참조). 일부 구현예에서, 증가된 디스트로핀 생산은 건강한 동년배에 비해 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%, 1%, 1.01%, 1.5%, 2%, 2.01%, 2.5%, 3%, 3.01%, 3.5%, 4%, 4.01%, 4.5%, 5%, 5.01%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 10.5%, 11%, 11.5%, 12%, 12.5%, 13%, 13.5%, 14%, 14.5%, 15%, 15.5%, 16%, 16.5%, 17%, 17.5%, 18%, 18.5%, 19%, 19.5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 60%이다. 소정의 구현예에서, 디스트로핀 생산의 증가는 건강한 동년배에 비해 약 0.1% 내지 0.5%, 0.5% 내지 0.9%, 0.8% 내지 1%, 0.9% 내지 1.2%, 0.9% 내지 1.0%, 0.9% 내지 1.01%, 1% 내지 1.01%, 1% 내지 1.5%, 1.5% 내지 2%, 1.9% 내지 2.0%, 1.9% 내지 2.01%, 2% 내지 2.01%, 2%, 내지 2.5%, 2.5% 내지 3%, 2.9% 내지 3.0%, 2.9% 내지 3.01%, 2% 내지 3.01%, 3% 내지 3.5%, 3.5% 내지 4%, 4% 내지 4.5%, 4.5% 내지 5%, 5% 내지 6%, 6% 내지 7%, 7% 내지 8%, 8% 내지 9%, 9% 내지 10%, 1% 내지 2%, 1% 내지 3%, 1% 내지 5%, 2% 내지 4%, 2% 내지 5%, 4% 내지 6%, 5%, 내지 8%, 8% 내지 10%, 1% 내지 5%, 2% 내지 6%, 3% 내지 7%, 4% 내지 8%, 5% 내지 10%, 10% 내지 12%, 12% 내지 15%, 15% 내지 20%, 17% 내지 20%, 20% 내지 22%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 또는 30% 내지 35%일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "증가된 디스트로핀 생산", "디스트로핀 생산 증가" 등은 대상체에서 디스트로핀, 디스트로핀-유사 단백질, 또는 기능성 디스트로핀 단백질 중 적어도 하나의 생산 증가를 지칭한다.
- [0051] "증가(increased)"량 또는 "강화(enhanced)"량은 통상적으로 "통계학적으로 유의한" 양이며, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 없을 때(제제의 부재) 또는 대조 화합물에 의해 생산된 양의 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50배 또는 이상의 증가(예를 들어, 500, 1000배)(1을 넘고 이들 사이의 모든 정수 및 소수점을 포함함), 예, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등)를 포함할 수 있다.
- [0052] 용어 "감소" 또는 "억제"는 일반적으로 진단 기술의 일상적인 기술에 따라 측정했을 때, 본 발명의 하나 이상의 안티센스 화합물이 본원에 기술된 질환 또는 병태의 증상과 같은, 관련 생리학적 또는 세포 반응을 "감소"시키

는 능력에 관한 것일 수 있다. 관련 생리학적 또는 세포 반응 (생체내 또는 시험관내)은 당업자에게 명백할 것이고, 근 이영양증의 증상 또는 병리의 감소, 또는 DMD 또는 BMD를 가진 개체에서 발현되는 디스트로핀의 변경된 형태와 같은, 디스트로핀의 결함 있는 형태의 발현의 감소를 포함할 수 있다. 반응의 "감소"는 안티센스 화합물이 없거나 대조 조성물에 의해 생성된 반응과 비교하여 통계적으로 유의할 수 있고, 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% 감소(이들 사이의 모든 정수를 포함함)를 포함할 수 있다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "기능(function)" 및 "기능적(functional)" 등은 생물학적, 효소적 또는 치료적 기능을 지칭한다.

[0054] "기능적" 디스트로핀 단백질은 일반적으로, DMD 또는 BMD를 갖는 특정 대상체에 존재하는 "손상된(defective)" 형태의 디스트로핀 단백질과 비교했을 때, 근육 조직의 점진적 분해(다르게는 근 이영양증의 특징)를 감소시키기 위해 충분한 생물학적 활성을 갖는 디스트로핀 단백질을 지칭한다. 소정의 구현예에서, 기능적 디스트로핀 단백질은 당업계의 일상적인 기술에 따라 측정했을 때, 야생형 디스트로핀의 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%(이들 사이의 모든 정수를 포함함)의 시험관 내 또는 생체 내 생물학적 활성을 가질 수 있다. 일례로서, 근육 배양물을 대상으로 한 시험관 내 디스트로핀 연관 활성은 근관(myotube) 크기, 근섬유 구성(또는 해체), 수축 활성, 아세틸콜린 수용체의 자발적 클러스터링에 따라 측정될 수 있다(예를 들어, Brown 등의 문헌[Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999] 참조). 동물 모델도 질환의 병원성 연구를 위한 귀중한 자원이며, 디스트로핀 연관 활성을 시험하기 위한 수단을 제공한다. DMD 연구에 가장 널리 사용되는 동물 모델 중 두 가지는 mdx 마우스 및 골든 리트리버 근 이영양증(GRMD) 개이며, 이들 모두는 디스트로핀 음성이다(예를 들어, Collins & Morgan의 문헌[Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003] 참조). 이들 및 다른 동물 모델이 다양한 디스트로핀 단백질의 기능적 활성을 측정하는 데 사용될 수 있다. 본 개시의 엑손-스킵핑 안티센스 올리고뉴클레오타이드 중 특정한 하나에 의해 생성되는 형태들과 같은, 절단된 형태의 디스트로핀이 포함된다.

[0055] 용어 "모르폴리노(morpholino)", "모르폴리노 올리고머(morpholino oligomer)" 및 "PMO"는 다음의 일반 구조:

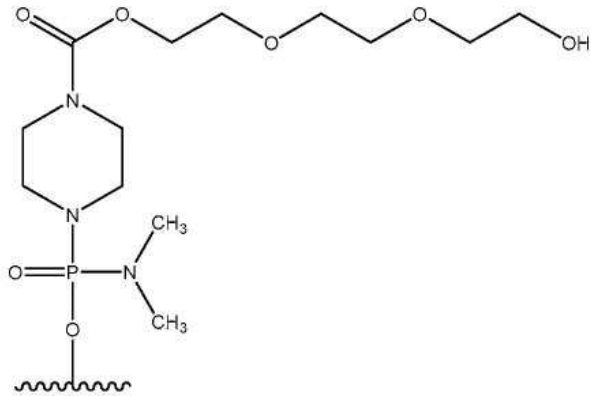


B = 핵염기

[0056]

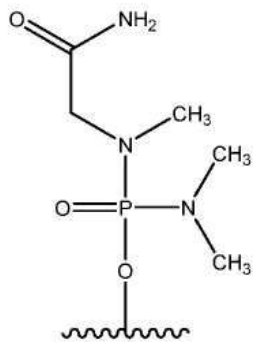
[0057] 및 Summerton, J. 등의 문헌[Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 7: 187-195 (1997)]의 도 2에 기술된 것과 같은 포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고머를 지칭한다. 본원에 기술된 것과 같은 모르폴리노는 진술한 일반 구조의 모든 입체이성질체 (및 그 혼합물) 및 배위를 포함하도록 의도된다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조 및 결합 특성은 미국 특허 번호 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,521,063, 5,506,337, 8,076,476 및 8,299,206에 상세히 설명되어 있으며, 이들 모두는 참조로서 본원에 통합된다. 소정의 구현예에서, 모르폴리노는 올리고머의 5' 단부 또는 3' 단부에서 "테일(tail)" 모이어티와 접합되어 올리고머의 안정성 및/또는 용해도를 증가시킨다. 예시적인 테일은 다음을 포함한다:

[0058] (1)



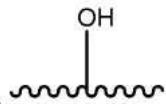
[0059]

[0060] (2)



[0061]

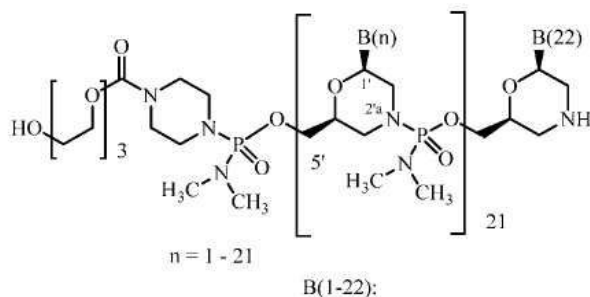
[0062] (3)



[0063]

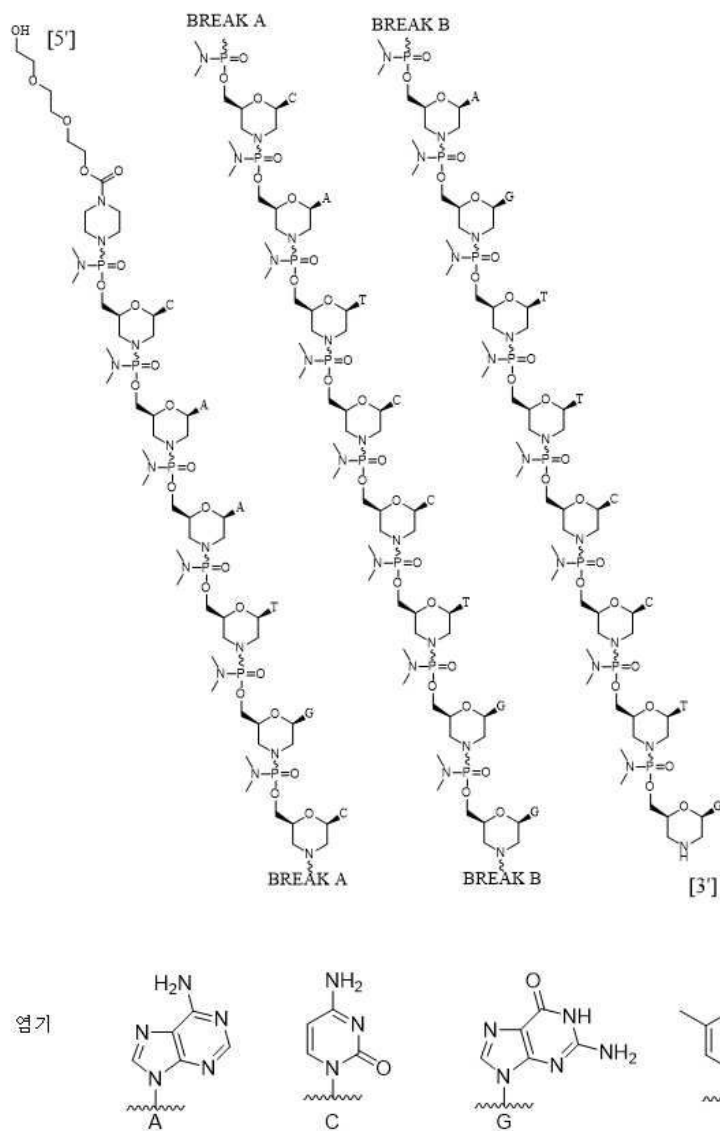
[0064] 코드 명칭 "SRP-4045"로도 알려진 "카시머센(Casimersen)"은 염기 서열 5'- CAATGCCATCCTGGAGTCCTG - 3' (서열번호 1)을 갖는 PMO이다. 카시머센은 CAS 등록 번호 1422959-91-8로 등록되어 있다. 화학명은 다음을 포함한다: all-P-ambo-[P,2',3'-트리데옥시-P-(디메틸아미노)-2',3'-이미노-2',3'-seco](2'a→5')(C-A-A-T-G-C-A-T-C-C-T-G-G-A-G-T-T-C-C-T-G) 5'-[4-({2-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]에톡시}카르보닐)-N,N-디메틸피페라진-1-포스포아미데이트] (서열번호 1).

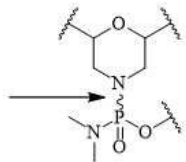
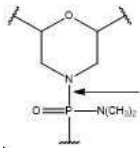
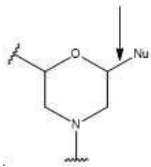
[0065] 카시머센은 다음의 구조를 갖는다:



[0066] C-A-A-T-G-C-C-A-T-C-C-T-G-G-A-G-T-T-C-C-T-G (서열번호 1)

[0067] 또한, 하기 화학 구조식으로 표현된다:





[0072]

[0073]

[0074]

[0075] 본원에서 사용되는 문구 "비경구 투여(parenteral administration 및 administered parenterally)"는 경구 투여와 국소 투여 이외에 일반적으로 주사에 의한 투여 방식을 의미하며, 정맥내(intravenous), 근육내(intramuscular), 동맥내(intraarterial), 경막내(intrathecal), 낭내(intracapsular), 안와내(intraorbital), 심장내(intracardiac), 피내(intradermal), 복강내(intraperitoneal), 경기관(transtracheal), 피하(subcutaneous), 표피하(subcuticular), 관절내(intraarticular), 피막하(subcapsular), 지주막하(subarachnoid), 척수내(intraspinal) 및 흉골내(intrasternal) 주사 및 주입을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0076] "약학적으로 허용 가능한(pharmaceutically acceptable)"이라는 문구는, 물질 또는 조성물이 제형을 포함하는 다른 성분 및/또는 이를 사용해 치료 중인 대상체와 화학적으로 및/또는 독성학적으로 양립할 수 있어야 함을 의미한다.

[0077] 본원에서 사용되는 "약학적으로 허용 가능한 담체"라는 문구는, 임의 유형의 비-독성, 불활성 고체, 반고체 또는 액체 필러, 희석제, 캡슐화 물질, 또는 제형화 보조물을 의미한다. 약학적으로 허용 가능한 담체로서의 역할을 할 수 있는 물질의 일부 예시는: 락토오스, 포도당 및 수크로오스와 같은 당류; 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; 셀룰로오스 및 이의 유도체, 예컨대, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 및 셀룰로오스 아세테이트; 분말 트라가칸트; 맥아(malt); 젤라틴(gelatin); 탈크(talc); 코코아 버터 및 좌제용 왁스와 같은 부형제; 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유, 및 대두유와 같은 오일; 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜류; 올레산 에틸 및 라우린산 에틸과 같은 에스테르; 한천(agar); 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄과 같은 완충제(buffering agent); 알긴산(alginic acid); 발열원 제거수(pyrogen-free water); 등장성 염수(isotonic saline); 링거 용액(Ringer's solution); 에틸 알코올, 및 인산염 완충액이며, 뿐만 아니라 라우릴 황산나트륨(sodium lauryl sulfate) 및 스테아린산마그네슘(magnesium stearate)과 같은 기타 비독성 혼화성 윤활제, 뿐만 아니라 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 향미제 및 방향제(perfuming agents), 보존제 및 항산화제가 제형 업체의 판단에 따라, 조성물에 존재할 수도 있다.

[0078] 디스트로핀 합성 또는 생산에 관한 용어 "복원(restoration)"은 근 이영양증 환자를 대상으로 본원에 기술된 안티센스 올리고머로 치료한 후 절단된 형태의 디스트로핀을 포함하는 디스트로핀 단백질이 생산되는 것을 일반적으로 지칭한다. 일부 구현예에서, 치료는 환자에게서 디스트로핀 생산을 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%(이들 사이의 모든 정수 포함)만큼 증가시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 대상체에서 디스트로핀-양성 섬유의 수를 정상 수준의 적어도 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 약 95% 내지 100%까지 증가시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 대상체에서 디스트로핀-양성 섬유의 수를 정상 수준의 약 20% 내지 약 60%, 또는 약 30% 내지 약 50%까지 증가시킨다. 치료 후 환자에서의 디스트로핀-양성 섬유의 백분율은 공지된 기술을 사용한 근육 생검에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 근육 생검은 환자의 적절한 근육, 예컨대 이두근(biceps brachii muscle)을 취하여 이루어질 수 있다.

[0079] 양성 디스트로핀 섬유의 백분율 분석은 치료 전 및/또는 치료 후 또는 치료 과정 전체 시점에 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료 후 생검은 치료 전 생검의 대측성 근육을 취하여 이루어진다. 치료 전 및 후 디스트로핀 발현 연구는 디스트로핀에 대한 임의의 적합한 검정을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역조직화

학 검출은 디스트로핀의 마커인 항체, 예컨대 단클론 또는 다클론 항체를 사용해 근육 생점에서의 조직 절편에서 수행된다. 예를 들어, 디스트로핀에 대해 고도로 민감한 마커인 MANDYS106 항체를 사용할 수 있다. 임의의 적절한 이차 항체가 사용될 수 있다.

[0080] 일부 구현예에서, 디스트로핀-양성 섬유의 백분율은 양성 섬유의 수를 계수된 총 섬유로 나눔으로써 계산된다. 정상적인 근육 샘플은 100% 디스트로핀-양성 섬유를 갖는다. 따라서, 디스트로핀-양성 섬유의 백분율은 정상 수준의 백분율로서 표현될 수 있다. 치료 전 근육 뿐만 아니라 비정상적인 섬유에서도 미량 수준의 디스트로핀의 존재를 제어하기 위해, 치료 후 근육에서 디스트로핀-양성 섬유를 계수할 때 각각의 환자의 치료 전 근육의 절편을 사용해 베이스라인을 설정할 수 있다. 이는 해당 환자의 치료 후 근육의 절편에서 디스트로핀-양성 섬유를 계수하기 위한 임계치로서 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 항체-염색된 조직 절편이 Bioquant 이미지 분석 소프트웨어(Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN)를 사용하는 디스트로핀 정량화에 사용될 수도 있다. 총 디스트로핀 형광 신호 강도는 정상 수준의 백분율로서 보고될 수 있다. 또한, 단클론 또는 다클론 항-디스트로핀 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 디스트로핀 양성 섬유의 백분율을 결정할 수 있다. 예를 들어, Novacastra의 항-디스트로핀 항체 NCL-Dys1이 사용될 수 있다. 디스트로핀-양성 섬유의 백분율은 사르코글리칸 복합체(sarcoglycan complex) 성분 (β , γ) 및/또는 신경 NOS의 발현을 결정함으로써 분석할 수도 있다.

[0081] 일부 구현예에서, 카시머센과 같은, 본 개시의 안티센스 올리고머를 사용하는 치료는, DMD 환자에서 치료 부재 시에 예상되는 점진적 호흡기 근육의 기능 장애 및/또는 부전을 지연시키거나 감소시킨다. 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머를 사용하는 치료는 치료 부재 시에 예상되는 호흡 지원(ventilation assistance)의 필요성을 감소시키거나 없앨 수 있다. 일부 구현예에서, 질환의 과정을 추적하는 것 뿐만 아니라 잠재적 치료 개입을 평가하기 위한 호흡 기능의 척도는 최대 흡기압(maximum inspiratory pressure, MIP), 최대 호기압(maximum expiratory pressure, MEP), 및 노력성 폐활량(forced vital capacity, FVC)을 포함한다. MIP와 MEP는 들숨과 날숨 동안에 사람이 각각 생성할 수 있는 압력 수준을 측정하는 것이며, 호흡 근육 강도의 민감한 척도이다. MIP는 횡격막 근육 취약성의 척도이다.

[0082] 일부 구현예에서, MIP 및 FVC를 포함하는 다른 폐 기능 시험에서 변화가 나타나기 전에 MEP가 감소할 수 있다. 소정의 구현예에서, MEP는 호흡기 기능 장애의 조기 표시자일 수 있다. 소정의 구현예에서, FVC를 사용해 최대 흡기 후 강제 호기 도중에 배출되는 공기의 총량을 측정할 수 있다. DMD 환자에서, FVC는 10대 초기가 될 때까지 신체의 성장과 동시에 증가한다. 그러나, 성장이 둔화되거나 질환 진행에 의해 성장이 저해되고 근육 약화가 진행됨에 따라, 폐활량은 쇠퇴기에 접어들어 10세 내지 12세 이후에는 매년 약 8 내지 8.5%의 평균 속도로 감소한다. 소정의 구현예에서, MIP 예측률(체중에 맞게 조정된 MIP), MEP 예측률(나이에 맞게 조정된 MEP), 및 FVC 예측률(나이 및 신장에 맞게 조정된 FVC)은 보조 분석 수단이다.

[0083] 본원에서 사용된 "대상체(subject)" 및 "환자(patient)"는 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드로 치료될 수 있는 증상을 나타내거나 증상을 나타낼 위험이 있는 임의의 동물, 예컨대 DMD 또는 BMD, 또는 이들 병태(예: 근육 섬유 손실)와 관련된 증상 중 어느 하나를 가졌거나 가질 위험이 있는 대상체를 포함한다. 적절한 대상체(또는 환자)에는 실험실 동물(예: 마우스, 랫트, 토끼 또는 기니피그 등), 축산 동물, 및 가축 또는 애완 동물(예: 고양이 또는 개)이 포함된다. 비인간 영장류 및 바람직하게는 인간 환자가 포함된다. 또한 엑손 45 스킵핑에 순응하는 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 가진 대상체에서 디스트로핀을 생산하는 방법이 포함된다.

[0084] 본원에서 사용되는 "소아 환자"는 만 1세 내지 21세 환자이다.

[0085] 본원에서 사용되는 바와 같이, "전신 투여(systemic administration 및 administered systemically)" 및 "말초 투여(peripheral administration 및 administered peripherally)"라는 문구는 화합물, 약물 또는 기타 물질이 환자의 전신에 들어감으로써 대사 및 기타 유사한 과정을 거치도록, 중추 신경계에 직접 투여하는 것을 제외한 투여, 예를 들어, 피하 투여를 의미한다.

[0086] 본원에서 사용되는 바와 같이, "만성적 투여"는 연속적인, 규칙적인, 장기 치료적 투여, 즉 실질적인 중단 없는 주기적 투여를 지칭한다. 예를 들어, 환자의 근 이영양증을 치료하기 위한 목적으로, 적어도 수주 또는 수개월 또는 수년의 기간 동안, 매일. 예를 들어, 환자의 근 이영양증을 치료하기 위한 목적으로, 적어도 수개월 또는 수년의 기간 동안, 매주 (예: 적어도 6주 동안 매주, 적어도 12주 동안 매주, 적어도 24주 동안 매주, 적어도 48주 동안 매주, 적어도 72주 동안 매주, 적어도 96주 동안 매주, 적어도 120주 동안 매주, 적어도 144주 동안 매주, 적어도 168주 동안 매주, 적어도 180주 동안 매주, 적어도 192주 동안 매주, 적어도 216주 동안 매주, 또는 적어도 240주 동안 매주).

- [0087] 본원에서 사용되는 바와 같이, "주기적 투여"는 투여량들 사이에 간격을 두고 투여하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 주기적 투여는 반복될 수 있는 고정된 간격(예: 매주, 매월)으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0088] 본원에서 사용되는 바와 같이, "위약"은 치료 효과가 없고 대조군으로서 사용될 수 있는 물질을 지칭한다.
- [0089] 본원에서 사용되는 바와 같이, "위약 대조군"은 병용 요법, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 비-스테로이드성 항염증 화합물, 및/또는 다른 약학 조성물보다는 위약을 투여받는 대상체 또는 환자를 지칭한다. 위약 대조군은, 대상체 또는 환자와, 동일한 돌연변이 상태를 가질 수도 있고, 연령이 유사할 수 있고, 보행 능력이 유사할 수 있고, 그리고 또는 동일한 병용 약물(스테로이드 등을 포함함)을 받을 수도 있다.
- [0090] "표적화 서열(targeting sequence)", "염기 서열(base sequence)" 또는 "뉴클레오타이드 서열(nucleobase sequence)"이라는 문구는 표적 전-mRNA에서 뉴클레오타이드의 서열에 상보적인 올리고머의 핵염기 서열을 지칭한다. 본 개시의 일부 구현예에서, 표적 전-mRNA의 뉴클레오타이드 서열은 디스트로핀 전-mRNA에서 H45A(-03+19)로 지정된 엑손 45 어닐링 부위이다.
- [0091] 대상체(예: 인간과 같은 포유류) 또는 세포의 "치료(treatment)"는 대상체 또는 세포의 자연 과정을 변경시키기 위한 시도에 사용되는 임의 유형의 개입이다. 치료는 올리고머 또는 이의 약학적 조성물의 투여를 포함하되 이에 한정되지는 않으며, 예방적으로 수행되거나 병리적 이벤트의 개시 또는 기병성 인자(etiological agent)와의 접촉이 있는 후에 수행될 수 있다. 치료는, 특정 형태의 근 이영양증에서와 같이, 디스트로핀 단백질과 관련된 질환 또는 병태의 증상 또는 병리에 대한 임의의 바람직한 효과를 포함하며, 예를 들어, 치료 중인 질환 또는 병태의 하나 이상의 측정 가능한 마커에서의 최소 변화 또는 개선을 포함할 수 있다. "예방적(prophylactic)" 치료도 포함되는데, 이는 치료 중인 질환 또는 병태의 진행 속도를 감소시키거나, 해당 질환 또는 병태의 발생을 지연시키거나, 그 중증도를 감소시키는 것에 관한 것일 수 있다. "치료" 또는 "예방"이 반드시 질환 또는 병태, 또는 이의 관련 증상의 완전한 근절, 치유, 또는 예방을 나타내는 것은 아니다.
- [0092] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머를 사용하는 치료는 치료 부재 시에 예상되거나 치료 부재 시에 예상되는 디스트로핀 생산을 증가시키거나, 질환의 진행을 지연시키거나, 보행 상실(loss of ambulation)을 지연 또는 감소시키거나, 근육 염증을 감소시키거나, 근육 손상을 감소시키거나, 근육 기능을 개선하거나, 폐 기능 상실을 감소시키고/시키거나 근육 재생을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 질환 진행을 유지시키거나, 지연시키거나, 느리게 한다. 일부 구현예에서, 치료는 보행을 유지시키거나 보행 상실을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 폐 기능을 유지시키거나 폐 기능 상실을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 예를 들어, 6분 보행 시험(6MWT)으로 측정했을 때, 환자의 안정적인 보행 거리를 유지시키거나 증가시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 10 m를 보행/주행하는 데 걸리는 시간(즉, 10미터 보행/주행 시험)을 유지시키거나 단축시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 누운 자세에서 일어나는 데 걸리는 시간(즉, 기립 소요 시간 시험)을 유지시키거나 단축시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 4개의 표준 계단을 오르는 데 걸리는 시간(즉, 4계단 오르기 시험)을 유지시키거나 단축시킨다. 일부 구현예에서, 치료는, 예를 들어, MRI(예: 하지 근육의 MRI)에 의해 측정했을 때, 환자에서 근육 염증을 유지시키거나 감소시킨다. 일부 구현예에서, MRI는 근육 퇴행을 식별하기 위해 T2 및/또는 지방 분획을 측정한다. MRI는 염증, 부종, 근육 손상 및 지방 침윤에 의해 야기된 근육 구조와 조성의 변화를 식별할 수 있다.
- [0093] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머를 사용한 치료는 디스트로핀 생산을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 증가된 디스트로핀 생산은 건강한 동년배에 비해 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%, 1%, 1.01%, 1.5%, 2%, 2.01%, 2.5%, 3%, 3.01%, 3.5%, 4%, 4.01%, 4.5%, 5%, 5.01%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 10.5%, 11%, 11.5%, 12%, 12.5%, 13%, 13.5%, 14%, 14.5%, 15%, 15.5%, 16%, 16.5%, 17%, 17.5%, 18%, 18.5%, 19%, 19.5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 60%이다. 소정의 구현예에서, 디스트로핀 생산의 증가는 건강한 동년배에 비해 약 0.1% 내지 0.5%, 0.5% 내지 0.9%, 0.8% 내지 1%, 0.9% 내지 1.2%, 0.9% 내지 1.0%, 0.9% 내지 1.01%, 1% 내지 1.01%, 1% 내지 1.5%, 1.5% 내지 2%, 1.9% 내지 2.0%, 1.9% 내지 2.01%, 2% 내지 2.01%, 2%, 내지 2.5%, 2.5% 내지 3%, 2.9% 내지 3.0%, 2.9% 내지 3.01%, 2% 내지 3.01%, 3% 내지 3.5%, 3.5% 내지 4%, 4% 내지 4.5%, 4.5% 내지 5%, 5% 내지 6%, 6% 내지 7%, 7% 내지 8%, 8% 내지 9%, 9% 내지 10%, 1% 내지 2%, 1% 내지 3%, 1% 내지 5%, 2% 내지 4%, 2% 내지 5%, 4% 내지 6%, 5%, 내지 8%, 8% 내지 10%, 1% 내지 5%, 2% 내지 6%, 3% 내지 7%, 4% 내지 8%, 5% 내지 10%, 10% 내지 12%, 12% 내지 15%, 15% 내지 20%, 17% 내지 20%, 20% 내지 22%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 또는 30% 내지 35%일 수 있다.
- [0094] 소정의 구현예들에서, 본 개시의 안티센스 올리고머를 사용하는 치료는 치료 부재 시에 예상되는 디스트로핀 생

산을 증가시키고 보행 상실을 느리게 하거나 감소시킨다. 예를 들어, 치료는 대상체에서 보행 능력(예를 들어, 보행 안정화)을 안정화, 유지, 개선 또는 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 치료는 예를 들어, McDonald 등에 의해 기술된 6분 보행 시험(6MWT)으로 측정했을 때, 환자의 안정적인 보행 거리를 유지시키거나 증가시킨다(Muscle Nerve, 2010; 42:966-74, 참조로서 본원에 통합됨). 6분 보행 거리(6MWD)의 변화는 절대값, 백분율 변화 또는 예측 값의 변화율(%)로서 표현될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료는 6MWT에 있어서 건강한 동년배에 비해 대상체의 안전한 보행 거리가 20% 부족한 것을 유지시키거나 개선한다. 6MWT에 있어서, 건강한 동년배의 전형적인 수행도(performance)에 대해 상대적인 DMD 환자의 수행도는 예측 값(%)을 계산함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 예측 6MWD(%)는 남성의 경우 다음 식을 사용해 계산할 수 있다: $196.72 + (39.81 \times \text{나이}) - (1.36 \times \text{나이}^2) + (132.28 \times \text{신장(미터 단위)})$. 여성의 경우, 예측 6MWD(%)는 다음 식을 사용해 계산할 수 있다: $188.61 + (51.50 \times \text{나이}) - (1.86 \times \text{나이}^2) + (86.10 \times \text{신장(미터 단위)})$ (본원에 참조로서 통합된 Henricson 등의 문헌[PLoS Curr., 2012, version 2]).

[0095] 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머를 사용하는 치료는 환자에서 안전한 보행 거리를 베이스라인 대비 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 또는 50미터(이들 사이의 모든 정수 포함)보다 더 크게 증가시킨다. 일부 구현예에서, 증가된 디스트로핀 생산은 건강한 동년배에 비해 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%, 1%, 1.01%, 1.5%, 2%, 2.01%, 2.5%, 3%, 3.01%, 3.5%, 4%, 4.01%, 4.5%, 5%, 5.01%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 10.5%, 11%, 11.5%, 12%, 12.5%, 13%, 13.5%, 14%, 14.5%, 15%, 15.5%, 16%, 16.5%, 17%, 17.5%, 18%, 18.5%, 19%, 19.5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 60%이다. 소정의 구현예에서, 디스트로핀 생산의 증가는 건강한 동년배에 비해 약 0.1% 내지 0.5%, 0.5% 내지 0.9%, 0.8% 내지 1%, 0.9% 내지 1.2%, 0.9% 내지 1.0%, 0.9% 내지 1.01%, 1% 내지 1.01%, 1% 내지 1.5%, 1.5% 내지 2%, 1.9% 내지 2.0%, 1.9% 내지 2.01%, 2% 내지 2.01%, 2% 내지 2.5%, 2.5% 내지 3%, 2.9% 내지 3.0%, 2.9% 내지 3.01%, 2% 내지 3.01%, 3% 내지 3.5%, 3.5% 내지 4%, 4% 내지 4.5%, 4.5% 내지 5%, 5% 내지 6%, 6% 내지 7%, 7% 내지 8%, 8% 내지 9%, 9% 내지 10%, 1% 내지 2%, 1% 내지 3%, 1% 내지 5%, 2% 내지 4%, 2% 내지 5%, 4% 내지 6%, 5% 내지 8%, 8% 내지 10%, 1% 내지 5%, 2% 내지 6%, 3% 내지 7%, 4% 내지 8%, 5% 내지 10%, 10% 내지 12%, 12% 내지 15%, 15% 내지 20%, 17% 내지 20%, 20% 내지 22%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 또는 30% 내지 35%일 수 있다.

[0096] DMD 환자에서 근육 기능의 상실은 정상적인 아동기 성장 및 발달 배경과 대조적으로 일어날 수 있다. 실제로, 진행성 근육 장애에도 불구하고 DMD를 가진 아동이 어릴수록 약 1년의 과정에 걸친 6MWT에서 보행 거리의 증가를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서는, DMD 환자의 6MWD를 전형적으로 발달 중인 대조군 대상체와 비교하고 나이와 성별이 일치하는 대상체의 기존 기준(normative data)과 비교한다. 일부 구현예에서, 정상적인 성장 및 발달은 기준에 피팅된 나이와 신장 기반 등식을 사용해 설명될 수 있다. 이러한 등식은 DMD를 가진 대상체에서 6MWD를 예측 값 변화율(예측률(%))로 변환하는데 사용될 수 있다. 소정의 구현예에서, 예상 6MWD(%) 데이터의 분석은 정상적인 성장 및 발달을 설명하는 방법을 나타내며, 초년기(예: 7세 이하) 획득한 기능이 DMD 환자에서의 개선된 능력보다 더 안전하다는 것을 보여줄 수 있다(예: Henricson 등의 문헌[PLoS Curr., 2012, version 2])을 참조하고, 동 문헌은 참조로서 본원에 통합됨).

[0097] 상이한 안티센스 분자들을 구별하기 위한 안티센스 분자 명명 시스템이 제안되고 공개되었다(Mann 등의 문헌[(2002) J Gen Med 4, 644-654] 참조). 이러한 명명법은, 아래에 보이는 바와 같이 모두 동일한 표적 영역에서 유도되었지만 약간 상이한 여러 개의 안티센스 분자를 시험할 때 특히 유의미해졌다:

[0098]

[0099] H#A/D(x:y).

[0100] 첫 글자는 종(예를 들어, H: 인간, M: 쥐과, C: 개과)을 지정한다. "#"는 표적 디스트로핀 엑손 번호를 지정한다. "A/D"는 엑손의 시작 및 끝에서의 수용자(acceptor) 또는 공여자(donor) 스플라이스 부위를 각각 나타낸다. (x y)는 어닐링 좌표를 나타내며, 여기서 "-" 또는 "+"는 각각 인트론 서열 또는 엑손 서열을 나타낸다. 예를 들어, A(-6+18)은 표적 엑손에 선행하는 인트론의 마지막 6개의 염기 및 표적 엑손의 첫 18개의 염기를 나타내게 된다. 가장 가까운 스플라이스 부위가 수용자이므로, 이들 좌표 앞에 "A"가 붙게 된다. 공여자 스플라이스 부위에서 어닐링 좌표를 설명하는 것이 D(+2-18)일 수 있고, 이 경우, 마지막 2개의 엑손 염기 및 첫 18개의 인트론 염기가 안티센스 분자의 어닐링 부위에 상응한다. A(+65+85)로 표시될 완전한 엑손 어닐링 좌표는, 해당 엑손의 시작으로부터 65번째 뉴클레오타이드와 85번째 뉴클레오타이드 사이의 부위이다.

[0101] II. 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0102] 엑손 45의 스킵핑에 영향을 미치기 위해 디스트로핀 유전자의 전-mRNA를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 본 개시의 방법에 따라 사용된다.

[0103] 이러한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 mRNA의 번역을 차단하거나 억제하도록 설계되거나, 천연 전-mRNA 스플라이스 가공을 억제하도록 설계될 수 있고, 안티센스 올리고머와 혼성화되는 표적 서열에 대해 "유도되는 것" 또는 "표적화되는 것"으로서 지칭될 수 있다. 표적 서열은 일반적으로 mRNA의 AUG 시작 코돈, 번역 억제 올리고머, 또는 전처리된 mRNA의 스플라이스 부위, 스플라이스 억제 올리고머(SSO)를 포함하는 영역이다. 스플라이스 부위에 대한 표적 서열은, 전처리된 mRNA의 정상 스플라이스 수용체 접합부의 하류에서 이의 5' 말단 1 내지 약 25개의 염기쌍을 갖는 mRNA 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은, 스플라이스 부위를 포함하거나 엑손 코딩 서열 내에 완전히 포함되거나 스플라이스 수용체 또는 공여자 부위에 걸치는 전가공된 mRNA의 임의의 영역일 수도 있다. 올리고머는, 올리고머가 전술한 방식으로 표적의 핵산에 대해 표적화될 때, 단백질, 바이러스, 또는 박테리아와 같은 생물학적으로 관련된 표적에 대해 "표적화되는 것"으로서 더 일반적으로 지칭된다.

[0104] 소정의 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 디스트로핀 전-mRNA의 엑손 45 표적 영역에 특이적으로 혼성화되고 엑손 45 스킵핑을 유도한다. 소정의 구현예에서, 디스트로핀 전-mRNA의 엑손 45 표적 영역에 혼성화되고 엑손 45 스킵핑을 유도하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)이다.

[0105] 소정의 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 카시머센이다.

[0106] 카시머센은 천연 핵산 구조의 재설계인, 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)라고 불리는 독특한 부류의 신규한 합성 안티센스 RNA 치료제에 속한다. 카시머센은 디스트로핀 전-mRNA의 엑손 45 표적 영역에 혼성화되고 엑손 45 스킵핑을 유도하는 PMO이다. 카시머센은 전술한 참조 문헌들과 추가적으로 국제 특허 출원 번호 PCT/US2017/040017에 상세히 기술된 방법을 사용하여, 단계적으로 고품질 합성에 의해 제조될 수 있고, 이들 전체가 본원에 참조로서 명시적으로 통합된다.

[0107] PMO는 생체 내 비임상 관찰에 기초하여 잠재적인 임상적 이점을 제공한다. PMO는 생체 내 안정성을 보장하기 위해 뉴클레아제에 의한 효소 분해로부터 이를 보호하는, RNA의 당 고리에 대한 변형을 포함한다. PMO는 RNA, DNA 및 기타 많은 합성 안티센스 RNA 올리고뉴클레오타이드에서 발견되는 5-원 리보푸라노실 고리를 대체하는, 6-원 합성 모르폴리노 고리의 사용을 통해 부분적으로 천연 핵산 및 기타 안티센스 올리고뉴클레오타이드 부류와 구별된다.

[0108] PMO에 특이적인 미하전 포스포로디아미데이트 연결은 잠재적으로 단백질에 대한 탈-표적(off-target) 결합을 감소시키는 것으로 간주된다. PMO는 다른 임상 단계 합성 안티센스 RNA 올리고뉴클레오타이드에 사용된 음으로 하전된 포스포로티오에이트 연결 대신에 각각의 모르폴리노 고리를 연결하는 미하전 포스포로디아미데이트 연결을 갖는다.

[0109] DMD 유전자의 프레임 이탈 돌연변이에 의해 야기된 DMD의 치료에 대한 잠재적 치료 접근법이, 프레임 내 돌연변이에 의해 야기되고 BMD로서 알려진 더 온순한 형태의 근 이영양증에 의해 제안된다. 프레임 이탈 돌연변이를 프레임 내 돌연변이로 변환하는 능력은 가설적으로 mRNA 관독 프레임을 보존하고, 내부적으로 단축되었지만 여전히 기능적인 디스트로핀 단백질을 생성하게 될 것이다. 카시머센은 이를 달성하기 위해 설계되었다.

[0110] 카시머센은 디스트로핀 전-mRNA를 표적으로 하고 엑손 45의 스킵핑을 유도하므로, 엑손 45는 성숙한, 스플라이싱된 mRNA 전사체에서 제외되거나 스킵된다. 엑손 45를 스킵함으로써, 손상된 관독 프레임은 프레임 내 돌연변이로 복원된다. DMD는 다양한 유전자 서브타입으로 이루어지는 반면, 카시머센은 디스트로핀 전-mRNA의 엑손 45를 스킵하도록 특별히 설계되었다.

[0111] 카시머센의 22개 핵염기의 서열은 디스트로핀 전-mRNA의 특이적 어닐링 부위에 상보적이며, 가공 중에 엑손 45의 스킵핑을 유도하도록 설계된다. 카시머센의 각각의 모르폴리노 고리는 DNA에서 발견되는 4개의 헤테로고리 핵염기(아데닌, 시토신, 구아닌 및 티민) 중 하나에 연결된다.

[0112] 표적화된 전-mRNA 서열과 카시머센을 혼성화하면 전-mRNA 스플라이싱 복합체의 형성이 방해되고 성숙한 mRNA로부터 엑손 45가 결실된다. 카시머센의 구조와 배위는 상보 서열에 대한 서열 특이적 염기 페어링을 가능하게 한다. 예를 들어, 디스트로핀 전-mRNA의 엑손 51을 스킵하도록 설계된 PMO인, 에테플러센(etepflisen)은 디스트

로핀 전-mRNA의 엑손 51에 포함된 상보 서열에 대한 서열 특이적 염기 페어링을 가능하게 한다.

[0113] 엑손 스킵핑을 사용한 디스트로핀 판독 프레임 복원

[0114] 79개의 엑손 모두를 함유하는 정상 디스트로핀 mRNA는 정상 디스트로핀 단백질을 생성하게 된다.

[0115] 디스트로핀 유전자로부터 전체 엑손을 상실한 디스트로핀 mRNA는 일반적으로 DMD를 야기한다.

[0116] 또 다른 엑손 스킵핑 PMO인, 에테플러센은 엑손 51을 스킵핑하여 mRNA 판독 프레임을 복원한다. 엑손 49가 완전한 코돈으로 끝나고 엑손 52가 코돈의 제1 뉴클레오티드로 시작하므로, 엑손 스킵핑에 의한 엑손 51의 결실은 해독 프레임을 복원시켜, 온전한 디스트로글리칸 결합 부위를 갖는 내부적으로 단축된 디스트로핀 단백질이 생산되게 한다.

[0117] 엑손 스킵핑을 사용해 디스트로핀 mRNA 개방 판독 프레임을 복원하여 DMD 표현형을 개선하는 것이 가능한지 여부는 비임상 연구에 의해 뒷받침된다. DMD의 디스트로핀 동물 모델을 다룬 수많은 연구는, 엑손 스킵핑에 의한 디스트로핀 복원이 신뢰할 수 있는 근육 강도와 기능 향상으로 이어진다는 것을 보여주었다(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). 이에 대한 설득력 있는 예는, (PMO를 사용한) 엑손 스킵핑 치료 후의 디스트로핀 수준을 동일한 조직에서의 근육 기능과 비교하는 연구에서 유래된다. 디스트로핀 *mdx* 마우스에서, 마우스-특이적 PMO로 치료한 전경골(TA) 근육은 스트레스 유발 수축 후에 최대 힘 용량(maximum force capacity)의 약 75%를 유지한 반면, 반대쪽에 있는 미처리된 TA 근육은 최대 힘 용량의 단지 약 25%를 유지하였다($p < 0.05$)(Sharp 2011). 또 다른 연구에서, 3마리의 디스트로핀 *CXMD* 개에게, 2~5월령에 이들의 유전자 돌연변이에 특이적인 PMO를 사용한 엑손-스킵핑 요법을 5 내지 7주 동안 매주 1회 투여하거나, 22주 동안 2주에 1회 투여하였다. 엑손-스킵핑 요법 후, 3마리 개 모두는 골격근에서 디스트로핀의 광범위한 전신 발현을 나타냈을 뿐만 아니라, 베이스라인에 비해 유지되었거나 개선된 보행(15 m 달리기 시험)도 나타냈다. 대조적으로, 동일한 월령의 미치료 *CXMD* 개는 연구 과정에 걸쳐 뚜렷한 보행 감소를 나타냈다(Yokota 2009).

[0118] PMO는, 전체 인간 DMD 전사물을 발현하는 *mdx* 마우스 및 인간화 DMD (hDMD) 마우스 모델을 대상으로, 동일한 물농도에서 포스포로티오에이트보다 더 많은 엑손 스킵핑 활성을 갖는 것으로 나타났다(Heemskirk 2009).

[0119] 디스트로핀 전-mRNA의 엑손 45 표적 영역에 특이적으로 혼성화되고 엑손 45 스킵핑을 유도하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 효과를 분석하는 임상 결과에는, 디스트로핀 양성 섬유 백분율(PDPF), 6분 보행 시험(6MWT), 보행 상실(LOA), 노스 스타 보행 평가(North Star Ambulatory Assessment, NSAA), 폐 기능 시험(PFT), (누운 위치에서) 외부 도움 없이 일어나는 능력, 드 노보 디스트로핀 생산 및 기타 기능적 척도가 포함된다.

[0120] III. 제형 및 투여 방식

[0121] 소정의 구현예에서, 본 개시는 본원에 기술된 바와 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드의 치료적 전달에 적합한 제형 또는 약학적 조성물을 제공한다. 따라서, 소정의 구현예에서, 본 개시는 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체(첨가제) 및/또는 희석제와 함께 제형화된, 본원에 기술된 안티센스 올리고뉴클레오티드 중 하나 이상의 치료적 유효량을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 조성물을 제공한다. 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 단독으로 투여하는 것이 가능하지만, 상기 화합물을 약학적 제형(조성물)으로서 투여하는 것이 바람직하다.

[0122] 핵산 분자의 전달 방법은, 예를 들어, Akhtar 등의 1992, Trends Cell Bio., 2:139; 및 Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivan 등의 PCT WO 94/02595에 기술되어 있다. 이들 및 다른 프로토콜이 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 실질적으로 임의의 핵산 분자를 전달하는 데 이용될 수 있다.

[0123] 아래에 자세히 설명되어 있듯이, 본 개시의 약학적 조성물은 고체 또는 액체 형태로 투여되도록 특별히 제형화될 수 있으며, 이에는 하기에 맞게 제형화된 것들을 포함한다: (1) 경구 투여, 예를 들어, 드렌치(수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액), 정제, 예를 들어, 구강, 설하, 및 전신 흡수용으로 표적화된 것, 볼루스, 분말, 파립, 혀에 도포하기 위한 페이스트(paste); (2) 예를 들어, 멸균 용액 또는 현탁액, 또는 서방성 제형으로서 예를 들어 피하, 근육내, 정맥내, 또는 경피 주사에 의한, 비경구 투여; (3) 예를 들어 크림, 연고, 또는 방출 조절형 패치 또는 피부에 도포하는 스프레이로서 국소 도포; (4) 예를 들어 페서리(pessary), 크림 또는 발포체로서 질내 또는 직장내 투여; (5) 설하(sublingually) 투여; (6) 안와내(ocularly) 투여; (7) 경피(transdermally) 투여; 또는 (8) 비강(nasally) 투여.

- [0124] 약학적으로 허용 가능한 담체로서의 역할을 할 수 있는 물질의 몇몇 예는: (1) 락토오스, 포도당 및 수크로스 등과 같은 당류; (2) 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; (3) 셀룰로오스 및 그 유도체, 예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 및 셀룰로오스 아세테이트; (4) 분말화된 트라가칸트; (5) 맥아 (malt); (6) 젤라틴; (7) 탈크(talc); (8) 코코아버터 및 좌제용 왁스와 같은 부형제; (9) 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유, 및 대두유와 같은 오일; (10) 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜류; (11) 글리세린, 소르비톨, 만니톨, 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올류; (12) 올레산에틸 및 라우릴산에틸과 같은 에스테르류; (13) 한천(agar); (14) 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄과 같은 완충제; (15) 알긴산; (16) 발열원 제거수(pyrogen-free water); (17) 등장성 식염수; (18) 링거 용액; (19) 에틸 알코올; (20) pH 완충액; (21) 폴리에스테르, 폴리카르보네이트 및/또는 폴리안하이드라이드; 및 (22) 약학적 제형에 사용되는 기타 무독성의 호환 가능한 물질을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0125] 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 제형화하기에 적합한 제제의 추가적인 비제한적인 예는 다음을 포함한다: PEG 접합 핵산, 인지질 접합 핵산, 친유성 모이어티 함유 핵산, 포스포로티오에이트, 다양한 조직 내로 약물이 들어가는 것을 향상시킬 수 있는 P-당단백질 억제제(예: Pluronic P85); 이식 후 서방성 전달을 위한 폴리 (D,L-락타이드-코글리콜리드) 미소구체와 같은 생분해성 중합체(Emerich, D F 등의 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; 및 혈액 뇌 장벽을 가로질러 약물을 전달할 수 있고 신경 흡수 메커니즘을 변경시킬 수 있는 로딩된 나노입자, 예컨대 폴리부틸시아노아크릴레이트로 만들어진 것들(Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).
- [0126] 본 개시는 폴리(에틸렌 글리콜) 지질을 함유하는 표면 개질 리포좀(PEG-개질 분지형 및 비분지형 리포좀 또는 이들의 조합, 또는 장기 순환 리포좀 또는 스텔스 리포좀)을 포함하는 조성물의 용도를 또한 포함한다. 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 다양한 분자량의 공유 부착된 PEG 분자를 또한 포함할 수 있다. 이들 제형은 표적 조직에서 약물의 축적을 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 이러한 부류의 약물 담체는 단핵 식균 시스템(MPS 또는 RES)에 의한 흡수 및 제거에 저항하여, 캡슐화된 약물이 더 오랜 시간 동안 혈액을 따라 순환하게 하고 조직 노출을 향상시킬 수 있다(Lasic 등의 Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata 등의 Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). 이러한 리포좀은, 집작전대 혈관 신생 표적 조직에서의 혈관외 유출(extravasation) 및 포획에 의해, 종양에서 선택적으로 축적되는 것으로 나타났다(Lasic 등의 Science 1995, 267, 1275-1276; Oku 등의 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). 장기 순환성 리포좀은, 특히 MPS의 조직에 축적되는 것으로 알려진 통상의 양이온성 리포좀과 비교했을 때, DNA 및 RNA의 약동학 및 약력학을 향상시킨다(Liu 등의 J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi 등의 국제 PCT 공개 번호 WO 96/10391; Ansell 등의 국제 PCT 공개 번호 WO 96/10390; Holland 등의 국제 PCT 공개 번호 WO 96/10392). 장기 순환성 리포좀도 간 및 비장과 같은 대사적으로 공격적인 MPS 조직에 축적되는 것을 방지하는 이들의 능력에 기초하여 약물이 뉴클레아제에 의해 분해되는 것을 양이온성 리포좀에 비해 더 많이 보호할 수 있다.
- [0127] 추가의 구현예에서, 본 개시는 미국 특허 번호 6,692,911, 7,163,695 및 7,070,807에 기술된 것과 같은, 전달용으로 제조된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 약학적 조성물을 포함한다. 이와 관련하여, 일 구현예에서, 본 개시는 본 개시의 올리고머를 조성물에 제공하며, 상기 조성물은 (미국 특허 번호 7,163,695, 7,070,807 및 6,692,911에 기술된 것과 같은) 리신 및 히스티딘의 공중합체(HK)를 단독으로 포함하거나 PEG(예: 분지형 또는 비분지형 PEG 또는 이 둘의 혼합물)와 조합하여 포함하거나, PEG 및 표적화 모이어티와 조합하여 포함하거나, 전술한 것 중 어느 하나를 가교제와 조합하여 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 개시는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 약학적 조성물에 제공하며, 상기 조성물은 글루콘산-개질 폴리히스티딘 또는 글루코닐화-폴리히스티딘/트랜스페린-폴리리신을 포함한다. 당업자는 His 및 Lys와 유사한 특성을 갖는 아미노산이 조성물 내에서 치환될 수 있다는 것도 인식할 것이다.
- [0128] 본원에 기술된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 특정 구현예는 아미노 또는 알킬아미노와 같은 염기성 작용기를 함유할 수 있으므로, 약학적으로 허용 가능한 산과 약학적으로 허용 가능한 염을 형성할 수 있다. 이와 관련해서 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 본 개시의 화합물의 비교적 무독성의 무기산 부가염 및 유기산 부가염을 지칭한다. 이들 염은 투여 비히클 또는 용량 형태 제조 과정에서 인 시튜(in situ) 제조되거나, 유리 염기 형태로 정제된 본 개시의 화합물을 적절한 유기산 또는 무기산과 별도로 반응시키고, 그렇게 형성된 염을 후속 정제 중에 단리함으로써 제조될 수 있다. 대표적인 염은 브롬화수소산염, 염산염, 황산염, 중황산염, 인산염, 질산염, 아세트산염, 발레르산염, 올레산염, 팔미트산염, 스테아린산염, 라우릴산염, 벤조산염, 젯산염, 인산염, 토실산염, 구연산염, 말레인산염, 푸마르산염, 숙신산염, 타르타르산염, 나프틸산염, 메실산염, 글루코헵톤산염, 락토바이온산염, 및 라우릴설포산염 등을 포함한다. (예를 들어, Berge 등의 (1977) "Pharmaceutical

Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19을 참조한다).

- [0129] 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 약학적으로 허용 가능한 염은, 예를 들어, 무독성 유기산 또는 무기산에서 유래된, 화합물의 통상적인 무독성 염 또는 사차 암모늄 염을 포함한다. 예를 들어, 이러한 통상적인 무독성 염은 염산, 브롬화수소산, 황산, 설파산, 인산, 질산 등과 같은 무기산으로부터 염들; 및 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아린산, 젖산, 말산, 타르타르산, 구연산, 아스코르브산, 팔미트산, 말레산, 하이드록시말산, 페닐아세트산, 글루타민산, 벤조산, 살리실산, 술과닐산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔설폰산, 메탄설폰산, 에탄 디설폰산, 옥살산, 이소티온산, 등과 같은 유기산에서 제조된 염을 포함한다.
- [0130] 소정의 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 산성 작용기를 함유할 수 있으므로, 약학적으로 허용 가능한 염기와 약학적으로 허용 가능한 염을 형성할 수 있다. 이들 경우에서의 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 본 개시의 화합물의 비교적 무독성의 무기염기 부가염 및 유기염기 부가염을 지칭한다. 마찬가지로 이들 염은 투여 비히클 또는 용량 형태 제조 과정에서 인 시튜 제조되거나, 유리 산 형태로 정제된 화합물을 수산화물, 탄산염 또는 중탄산염 또는 약학적으로 허용 가능한 금속 양이온과 같은 적절한 염기와 별도로 반응시키거나, 암모니아와 별도로 반응시키거나, 약학적으로 허용 가능한 유기 일차, 이차 또는 삼차 아민과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토염은 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄 염 등을 포함한다. 염기 부가염의 형성에 유용한 대표적인 유기 아민은 에틸아민, 디에틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진 등을 포함한다. (예를 들어, Berge 등의 *전술한 문헌*을 참조한다).
- [0131] 습윤제, 유화제 및 윤활제(예컨대, 라우릴 황산 나트륨 및 스테아린산 마그네슘), 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 향미제 및 방향제, 보존제, 및 항산화제가 또한 조성물 내에 존재할 수 있다.
- [0132] 약학적으로 허용 가능한 항산화제의 예는, (1) 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 중황산 나트륨, 메타아황산 나트륨, 아황산 나트륨 등과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 유용성(oil-soluble) 항산화제; 및 (3) 구연산, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은 금속 킬레이트제를 포함한다.
- [0133] 본 개시의 제형은 경구, 비강, 국소(구강 및 설하 포함), 직장, 질 및/또는 비경구 투여에 적합한 것들을 포함한다. 제형은 단위 투여량 형태로 편리하게 제공될 수 있고, 약학 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료 중인 숙주와 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 활성 성분의 양일 것이다. 일반적으로, 100% 중에서, 이러한 양은 약 0.1% 내지 약 99%의 활성 성분, 바람직하게는 약 5% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 10% 내지 약 30%의 범위일 것이다.
- [0134] 소정의 구현예에서, 본 개시의 제형은 시클로텍스트린, 셀룰로오스, 리포솜, 미셀 형성제(예: 담즙산) 및 중합체 담체(예: 폴리에스테르 및 폴리안하이드라이드)로부터 선택된 부형제; 및 본 개시의 올리고머를 포함한다. 소정의 구현예에서, 전술한 제형은 본 개시의 올리고머가 경구로 생체이용될 수 있게 한다.
- [0135] 이들 제형 또는 약학적 조성물을 제조하는 방법은 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 담체와 결합시키고, 임의로, 하나 이상의 보조 성분과 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 본 개시의 화합물을 액체 담체, 또는 미세하게 나눈 고체 담체, 또는 둘 다와 균일하고 긴밀하게 결합시킨 다음, 필요에 따라, 생성물을 성형함으로써 제조된다.
- [0136] 경구 투여에 적합한 본 개시의 제형은 캡슐, 교갑(cachets), 알약, 정제, (일반적으로 수크로오스 및 아카시아 또는 트라카칸트와 같은 향미 기재를 사용하는) 캔디(lozenges), 분말, 과립, 또는 수성 또는 비수성 액체 형태의 용액 또는 현탁액, 또는 수중유 또는 유중수 액체 유화제, 또는 엘릭서 또는 시럽, 또는 (젤라틴과 글리세린, 또는 수크로오스와 아카시아와 같은 불활성 염기를 사용하는) 캔디(pastilles) 및/또는 구강 세정액 등의 형태일 수 있으며, 이들은 활성 성분으로서 본 개시의 화합물의 소정의 양을 각각 함유한다. 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 볼루스, 연약(electuary), 또는 페이스트로서 투여될 수도 있다.
- [0137] 경구 투여를 위한 본 개시의 고형 투여 형태(캡슐, 정제, 알약, 드라제(dragees), 분말, 과립, 트로키(trouches) 등)의 경우, 활성 성분은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체, 예컨대 구연산 나트륨 또는 인산 이칼슘, 및/또는 다음 중 어느 하나와 혼합될 수 있다: (1) 필러 또는 증량제(extender), 예컨대 전분, 락토

오스, 수크로오스, 포도당, 만니톨, 및/또는 규산(silicic acid); (2) 결합제, 예컨대, 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로오스 및/또는 아카시아; (3) 보습제(humectants), 예컨대 글리세롤; (4) 붕해제, 예컨대 한천, 탄산칼슘, 고구마 또는 타피오카 전분, 알긴산, 소정의 규산염, 및 탄산나트륨; (5) 용해 지연제, 예컨대 파라핀; (6) 흡수 촉진제, 예컨대 사차 암모늄 화합물 및 계면활성제, 예컨대 폴록사머 및 라우릴 황산 나트륨; (7) 습윤제, 예컨대, 세틸 알코올(cetyl alcohol), 글리세롤 모노스테아레이트, 및 비이온성 계면활성제; (8) 흡착제, 예컨대 고령토 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예컨대 탈크(talc), 스테아린산 칼슘, 스테아린산 마그네슘, 고형 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 황산 나트륨, 스테아린산 아연, 스테아린산 나트륨, 스테아린산, 및 이들의 혼합물; (10) 착색제; 및 (11) 서방형 제제, 예컨대 크로스포비돈(crospovidone) 또는 에틸 셀룰로오스. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 약학적 조성물은 완충제를 포함할 수도 있다. 유사한 유형의 고형 약학적 조성물이, 락토오스 또는 유당류 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하는 연질 및 경질 젤라틴 캡슐에 필러로서 사용될 수도 있다.

[0138] 정제는 임의로 하나 이상의 보조 성분과 함께 압축되거나 성형됨으로써 제조될 수 있다. 결합제(예를 들어, 젤라틴 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스), 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 붕해제(예를 들어, 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 가교 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스), 표면 활성화제 또는 분산제를 사용해, 압축된 정제를 제조할 수 있다. 불활성 액체 희석제로 습윤된 분말 화합물의 혼합물을 적절한 기계로 성형함으로써 성형된 정제를 제조할 수 있다.

[0139] 본 개시의 약학적 조성물의 정제, 및 기타 고형 투여 형태, 예컨대 드라제, 캡슐, 알약 및 과립 등에는 임의로 절단용 눈금이 매겨지거나(scored), 이들은 셸(shell) 및 코팅, 예컨대 장용 코팅(enteric coatings) 및 약학-제형화 분야에 잘 알려진 기타 코팅을 갖도록 제조될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 원하는 방출 프로파일을 제공하기 위한 다양한 비율의 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스, 다른 중합체 기질, 리포솜 및/또는 미체구체를 사용해 속에 담긴 활성 성분을 서방출 또는 조절 방출시키도록 제형화될 수도 있다. 이들은 신속 방출용으로 제형화될 수 있고, 예를 들어 동결 건조될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 박테리아 포획 필터(bacteria-retaining filter)를 통한 여과에 의해 멸균되거나, 사용 직전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사용 매질에 용해될 수 있는 멸균제(sterilizing agents)를 고형의 멸균 약학적 조성물의 형태로 혼입함으로써 멸균될 수 있다. 이들 약학적 조성물은 임의로 불투명화제(opacifying agents)를 함유할 수도 있고, 이들이 활성 성분(들)만을 방출하거나, 바람직하게는, 위장관의 특정 부분에서, 임의로 지연된 방식으로 활성 성분(들)을 방출하는 조성물로 이루어질 수 있다. 사용될 수 있는 포매(embedding) 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다. 활성 성분은, 경우에 따라, 전술한 부형제 중 하나 이상이 포함된 마이크로-캡슐의 형태일 수도 있다.

[0140] 본 개시의 화합물의 경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 약학적으로 허용 가능한 유화제, 마이크로에멀전(microemulsions), 용액, 현탁액, 시럽, 및 엘릭서를 포함한다. 액체 투여 형태는 활성 성분에 추가하여, 당업계에서 흔히 사용되는 불활성 희석제, 예컨대, 물이나 기타 용매, 가용화제와 유화제, 예컨대, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 에틸 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유(germ oil), 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸란 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.

[0141] 비활성 희석제에 추가하여, 경구 약학적 조성물은 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 향미제, 착색제, 방향제 및 보존제와 같은 보조제(adjuvants)를 포함할 수도 있다.

[0142] 현탁액은 활성 화합물에 추가하여, 예를 들어 에톡실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 한천 및 트라가칸트, 및 이들의 혼합물과 같은 현탁제를 함유할 수 있다.

[0143] 직장 또는 질 투여용 제형은 좌제로서 제공될 수 있는데, 이는 본 개시의 하나 이상의 화합물을, 예를 들어 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌제 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 하나 이상의 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합함으로써 제조될 수 있으며, 이는 실온에서 고체이지만, 체온에서는 액체이므로, 직장강이나 질강에서 녹아 활성 화합물을 방출하게 된다.

[0144] 본원에서 제공된 것과 같은 올리고머의 국소 또는 경피 투여용 제형 또는 투여 형태는 분말, 분무제, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 멸균 조건 하에 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합될 수 있고, 필요에 따라 임의의 보존제, 완충제, 또는 추진제(propellants)와 혼합될 수 있다. 연고, 페이스트, 크림 및 젤은 본 개시의 활성 화합물에 추가하여, 동물성 지

방과 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘(silicones), 벤토나이트, 규산(silicic acid), 탈크 및 산화아연, 또는 이들의 혼합물과 같은 부형제를 함유할 수 있다.

[0145] 분말과 분무제는 본 개시의 올리고머에 추가하여, 락토오스, 탈크, 규산, 수산화알루미늄, 규산칼슘 및 폴리아미드 분말, 또는 이들 물질의 혼합물과 같은 부형제를 함유할 수 있다. 분무제는 클로로포름으로 산화수소 및 휘발성 미치환된 탄화수소, 예컨대 부탄 및 프로판과 같은 통상적인 추진제를 추가로 함유할 수 있다.

[0146] 경피 패치는 본 개시의 올리고머가 신체에 전달되는 것을 조절할 수 있는 부가 이점을 갖는다. 이러한 투여 형태는 올리고머를 적절한 매질에 용해시키거나 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 피부를 통한 제제의 유동을 증가시키기 위해 흡수 강화제가 사용될 수도 있다. 이러한 유동 속도는 당업계에 알려진 다른 방법들 가운데, 속도 조절 막을 제공하거나 제제를 중합체 매트릭스 또는 겔에 분산시킴으로써 조절될 수 있다.

[0147] 비경구 투여에 적합한 약학적 조성물은, 본 개시의 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 유화액, 또는 사용 직전에 멸균 주사 가능한 용액 또는 분산액으로 재구성할 수 있는 멸균 분말과의 조합으로 포함할 수 있으며, 당류, 알코올, 항산화제, 완충제, 세균 발육 저지제(bacteriostats), 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질 또는 현탁제 또는 증점제(thickening agents)를 함유할 수 있다. 본 개시의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적절한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 올레산 에틸과 같은 주사 가능한 유기 에스테르를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다.

[0148] 이들 약학적 조성물은 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수도 있다. 대상 안티센스 올리고뉴클레오티드에 대한 미생물의 작용을 방지하는 것은 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤(paraben), 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함시킴으로써 보장될 수 있다. 또한, 조성물에 당류, 염화나트륨과 같은 등장화제를 포함시키는 것이 바람직할 수도 있다. 또한, 주사 가능한 약학적 형태의 흡수를 연장시키는 것은 흡수를 지연시키는 제제, 예컨대 모노스테아린산알루미늄 및 젤라틴을 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0149] 일부 경우에, 약물의 효과를 연장시키기 위해, 피하 또는 근육내 주사에 비해 약물의 흡수를 느리게 하는 것이 바람직하다. 이는 당업계에 공지된 다른 방법들 가운데, 수용해도가 낮은 결정질 또는 비정질 물질로 이루어진 액체 현탁액을 사용함으로써 달성될 수 있다. 그런 다음, 약물의 흡수는 현탁액의 용해 속도에 따라 달라지며, 이는 결국 결정 크기 및 결정 형태에 따라 달라질 수 있다. 대안적으로, 비경구 투여된 약물 형태의 흡수를 지연시키는 것은 약물을 오일 비히클에 용해시키거나 현탁함으로써 달성된다.

[0150] 주사 가능한 데포(depot) 형태는 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 중합체에 대상 안티센스 올리고뉴클레오티드의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성함으로써 제조할 수 있다. 올리고머 대 중합체의 비율, 및 사용된 특정 중합체의 성질에 따라, 올리고머의 방출 속도가 조절될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)를 포함한다. 데포 주사식 제형은, 신체 조직과 비슷한 리포솜 또는 마이크로유화액에 약물을 포획(entrapping)함으로써 제조할 수도 있다.

[0151] 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드가 제약으로서 인간과 동물에게 투여될 때, 이들은 그 자체로서 투여되거나, 0.1 내지 99%(더 바람직하게는 10 내지 30%)의 활성 성분을 약학적으로 허용 가능한 담체와 조합하여 함유하는 약학적 조성물로서 투여될 수 있다.

[0152] 상기에서 언급한 바와 같이, 본 개시의 제형 또는 제제는 경구, 비경구, 국소 또는 직장 내 투여될 수 있다. 이들은 일반적으로 각각의 투여 경로에 적합한 형태로 투여된다. 예를 들어, 이들은 주사, 흡입, 안구 로션, 연고, 좌제 등에 의한, 정제 또는 캡슐 형태로 투여되거나, 주사, 주입 또는 흡입에 의한 투여; 로션 또는 연고에 의한 국소 투여; 및 좌제에 의한 직장 내 투여로 투여된다.

[0153] 선택된 투여 경로에 관계없이, 적절한 수화 형태로 사용될 수 있는 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드 및/또는 본 개시의 약학적 조성물은 당업자에게 공지된 종래의 방법에 의해 약학적으로 허용 가능한 투여 형태로 제형화될 수 있다. 본 개시의 약학적 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은, 환자에게 허용 가능한 독성이 없이 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 달라질 수 있다.

- [0154] 선택된 투여량 수준은 다양한 인자에 따라 달라지게 되며, 이에는 사용된 본 개시의 특정 올리고머 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 기간, 사용 중인 특정 올리고머의 배출 또는 대사 속도, 흡수 속도 및 정도, 치료 기간, 사용된 특정 올리고머와 조합으로 사용된 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료 중인 환자의 나이, 성별, 체중, 병태, 일반적인 건강 및 이전 병력, 및 의료 분야에 잘 알려진 유사한 인자들이 포함된다.
- [0155] 당업계에서 통상의 기술을 가진 의사 또는 수의사는 필요한 약학적 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 약학적 조성물에 사용된 본 개시의 화합물의 투여량을, 원하는 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 것보다 낮은 수준에서 시작하여, 원하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 개시의 화합물의 적절한 일일 투여량은 치료 효과를 생성하는 데 효과적인 가장 낮은 투여량인 양의 화합물일 것이다. 이러한 유효 투여량은 일반적으로 본원에 기술된 인자들에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 환자를 위한 본 개시의 화합물의 경구, 정맥내, 뇌실내, 및 피하 투여량은, 표시된 효과를 위해 사용될 때, 매일 체중의 약 0.0001 내지 약 100 mg/kg의 범위일 것이다.
- [0156] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 약 4 내지 100 mg/kg, 또는 약 10 내지 100 mg/kg, 또는 약 20 내지 100 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 예를 들어, i.v. 투여를 위한 비경구 투여량은 약 0.5 내지 100 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는, 이들 사이의 모든 정수를 비롯하여, 약 4 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 17 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, 39mg/kg, 40mg/kg, 41mg/kg, 42mg/kg, 43mg/kg, 44mg/kg, 45mg/kg, 46mg/kg, 47mg/kg, 48mg/kg, 49mg/kg, 50mg/kg, 51mg/kg, 52mg/kg, 53mg/kg, 54mg/kg, 55mg/kg, 56mg/kg, 57mg/kg, 58mg/kg, 59mg/kg, 60mg/kg, 65mg/kg, 70mg/kg, 75mg/kg, 80mg/kg, 85mg/kg, 90mg/kg, 95mg/kg, 또는 100 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 약 4 mg/kg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 약 10 mg/kg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 약 20 mg/kg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 약 30 mg/kg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 약 40 mg/kg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 약 50 mg/kg으로 투여된다.
- [0157] 원하는 경우, 활성 화합물의 유효 일일 투여량은, 하루 전체에 걸쳐 적당한 간격을 두고 2, 3, 4, 5, 6회 또는 그 이상의 하위 투여량으로 투여될 수 있고, 임의로는 단위 투여량 형태로 투여될 수 있다. 소정의 상황에서는, 투여가 매일 1회 이루어진다. 소정의 구현예에서, 투여는 기능성 디스트로핀 단백질질의 원하는 발현을 유지하기 위해 필요에 따라 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일마다 1회 이상 투여되거나 1 또는 2주마다 1회 이상 투여되는 것이다. 소정의 구현예에서, 투여는 매주 1회 투여되는 것이다. 소정의 구현예에서, 투여는 2주마다 1회 이상 투여되는 것이다. 일부 구현예에서, 투여는 2주마다 1회 투여되는 것이다.
- [0158] 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 4 mg/kg으로 매주 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 10 mg/kg으로 매주 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 20 mg/kg으로 매주 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 30 mg/kg으로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 40 mg/kg으로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 50 mg/kg으로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 60 mg/kg으로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 80 mg/kg으로 매주 투여된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 매주(weekly)는 당업계에서 인정되는 매주(every week)의 의미를 갖는 것으로 이해된다.
- [0159] 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 4 mg/kg으로 2주마다 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 10 mg/kg으로 2주마다 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 20 mg/kg으로 2주마다 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 30 mg/kg으로 2주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 40 mg/kg으로 2주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 50 mg/kg으로 2주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 60 mg/kg으로 2주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 80 mg/kg으로 2주마다 투여된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 2주마다(biweekly)는 당업계에서 인정되는 2주마다(every two week)의 의미를 갖는 것으로 이해된다.
- [0160] 핵산 분자는 당업자에게 알려진 다양한 방법에 의해 세포에 투여될 수 있으며, 상기 방법은 본원에서 기술되고 당업계에 알려진 것과 같은 리포솜으로 캡슐화하기, 이온영동에 의한 방법, 또는 다른 비히클, 예컨대 하이드로

겔, 시클로텍스트린, 생분해성 나노캡슐, 및 생체접착성 미소구체로의 혼입에 의한 방법을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 소정의 구현예에서, 미세유화 기술(microemulsification technology)을 이용해 친유성(수 불용성) 약학적 제제의 생체이용률을 개선할 수 있다. 예로는, 트리메트린(Trimetrine) (Dordunoo, S. K. 등의 문헌[Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991] 참조) 및 REV 5901 (Sheen, P. C. 등의 문헌[J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991 참조]이 있다. 다른 이점 중에서, 미세유화는 순환계 대신에 림프계로 우선적으로 흡수를 유도하여 생체이용률을 향상시키고, 간을 우회함으로써 간담즙의 순환 (hepatobiliary circulation) 중에 화합물이 파괴되는 것을 방지한다.

[0161] 본 개시의 일 측면에서, 제형은 본원에서 제공된 것과 같은 올리고머 및 적어도 하나의 양친매성 담체로 형성된 미셀을 함유하며, 여기서 미셀은 약 100 nm 미만의 평균 직경을 갖는다. 더 바람직한 구현예는 약 50 nm 미만의 평균 직경을 갖는 미셀을 제공하고, 훨씬 더 바람직한 구현예는 약 30 nm 미만, 또는 심지어 약 20 nm 미만의 평균 직경을 갖는 미셀을 제공한다.

[0162] 모든 적절한 양친매성 담체가 고려되지만, 현재 바람직한 담체는 일반적으로 안전하다고 간주되는 물질 (Generally-Recognized-as-safe; GRAS) 상태를 가지며, 본 개시의 화합물을 양쪽 모두에서 가용화하여, 용액이 (인간 위장관에서 발견되는 것과 같은) 복잡한 수상과 접촉하는 나중 단계에 이를 미세유화시킬 수 있다. 일반적으로, 이러한 요건을 만족하는 양친매성 성분은 2~20의 HLB(친수성 대 친유성 균형) 값을 가지며, 이들의 구조는 C-6 내지 C-20 범위의 직쇄 지방족 라디칼을 함유한다. 예로는 폴리에틸렌-글리콜화 지방 글리세리드 및 폴리에틸렌 글리콜이 있다.

[0163] 양친매성 담체의 예는, 포화 및 단일불포화 폴리에틸렌화 글리콜화 지방산 글리세리드, 예컨대 완전히 또는 부분적으로 수소화된 다양한 식물성 오일로부터 수득된 것들을 포함한다. 이러한 오일은 유리하게는, 삼-, 이-, 및 단일-지방산 글리세리드 및 상응하는 지방산의 이- 및 단일-폴리에틸렌글리콜 에스테르로 구성될 수 있으며, 특히 바람직한 지방산 조성물은 카프르산(capric acid) 4-10, 카프르산 3-9, 라우르산(lauric acid) 40-50, 미리스트산(myristic acid) 14-24, 팔미트산(palmitic acid) 4-14, 스테아르산 5-15%로 이루어질 수 있다. 또 다른 유용한 부류의 양친매성 담체는, 포화 또는 단일 불포화 지방산(SPAN-시리즈) 또는 상응하는 에톡실화 유사체(TWEEN-시리즈)를 갖는, 부분적으로 에스테르화된 소르비탄 및/또는 소르비톨을 포함한다.

[0164] 상업적으로 이용 가능한 양친매성 담체가 특히 유용할 수 있으며, 이에겐 겔루시어(Gelucire)-시리즈, 라브라필(Labrafil), 라브라솔(Labrasol), 또는 라우로글리콜(Lauroglycol(전부 Gattefosse Corporation(Saint Priest, France)에 의해 제조되고 유통됨), PEG-모노-올레에이트, PEG-디-올레에이트, PEG-모노-라우레에이트 및 디-라우레에이트, 레시틴(Lecithin), 폴리소르베이트 80 등(미국 및 전 세계 여러 회사에 의해 생산되고 유통됨)이 포함된다.

[0165] 소정의 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물을 적절한 숙주 세포 내로 도입하기 위한 전달은 리포솜, 나노캡슐, 극미립자, 미소구체, 지질 입자, 소포체 등을 사용해 이루어질 수 있다. 특히, 본 개시의 약학적 조성물은 지질 입자, 리포솜, 소포체, 나노구체, 나노입자 등에 캡슐화되어 전달되도록 제형화될 수 있다. 이러한 전달 비히클의 제형화 및 사용은 알려진 종래의 기술을 사용해 수행될 수 있다.

[0166] 본 개시에서 사용하기에 적합한 친수성 중합체는, 쉽게 물에 녹고, 소포체 형성 지질에 공유 부착될 수 있으며, 독성 효과 없이 생체 내 내약성이 있는 (즉, 생체 적합한) 것들이다. 적합한 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리락트산(폴리락티드로도 불림), 폴리글리콜산(폴리글리콜리드로도 불림), 폴리락트-폴리글리콜산 공중합체, 및 폴리비닐 알코올을 포함한다. 소정의 구현예에서, 중합체는 약 100 또는 120 달톤 내지 최대 약 5,000 또는 10,000 달톤, 또는 약 300 달톤 내지 약 5,000 달톤의 분자량을 갖는다. 다른 구현예에서, 중합체는 약 100 내지 약 5,000 달톤의 분자량을 갖거나, 약 300 내지 약 5,000 달톤의 분자량을 갖는 폴리에틸렌글리콜이다. 소정의 구현예에서, 중합체는 750달톤의 폴리에틸렌글리콜(PEG(750))이다. 중합체는 또한 그 안의 단량체의 수에 의해 정의될 수 있고; 본 개시의 바람직한 구현예는 적어도 약 3개의 단량체로 이루어진 중합체를 이용하며, 이러한 PEG 중합체는 3개의 단량체로 이루어진다 (대략 150 달톤).

[0167] 본 개시에서 사용하기에 적합할 수 있는 다른 친수성 중합체는 폴리비닐피롤리돈, 폴리메톡사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리하이드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리디메틸아크릴아미드, 및 유도체화된 셀룰로오스, 예컨대 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 하이드록시에틸셀룰로오스를 포함한다.

[0168] 소정의 구현예에서, 본 개시의 제형은 폴리아미드, 폴리카보네이트, 폴리알킬렌, 아크릴 에스테르와 메타크릴 에스테르의 중합체, 폴리비닐 중합체, 폴리글리콜리드, 폴리실록산, 폴리우레탄 및 이의 공중합체, 셀룰로오스,

폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리스티렌, 젖산과 글리콜산의 중합체, 폴리무수물, 폴리(오르토)에스테르, 폴리(부트산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카프로락톤), 다당류, 단백질, 폴리히알루론산, 폴리시아노아크릴산염, 및 이들의 블렌드, 혼합물, 또는 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 생체적합성 중합체를 포함한다.

[0169] 시클로텍스트린은 그리스 글자 α , β 또는 γ 로 각각 지정된, 6, 7 또는 8개의 포도당 단위로 이루어진 고리형 올리고당이다. 포도당 단위는 α -1,4-글루코시드 결합에 의해 연결된다. 의자 형태로 이루어진 당 단위의 결과로서, (C-2, C-3에서의) 모든 이차 하이록실기는 고리의 일측에 위치하는 한편, C-6에서의 모든 일차 하이록실기는 타측에 위치한다. 그 결과, 외부 면은 친수성이어서, 시클로텍스트린이 수용성이 된다. 대조적으로, 시클로텍스트린의 공동은 소수성인데, 이는 이들이 원자 C-3 및 C-5의 수소, 및 에테르-유사 산소에 의해 채워지기 때문이다. 이들 매트릭스는, 예를 들어, 17 α -에스트라디올과 같은 스테로이드 화합물을 포함하는 다양한 상대적으로 소수성 화합물과 복합체를 이룰 수 있게 한다(예를 들어, van Uden 등의 문헌[Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)] 참조). 복합체화는 반데르 발스 상호작용과 수소 결합의 형성에 의해 이루어진다. 시클로텍스트린의 화학물질에 대한 전반적인 검토를 위해서는, Wenz, Agnew의 문헌 [Chem Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994)]을 참조한다.

[0170] 시클로텍스트린 유도체의 물리-화학적 특성은 치환의 종류와 정도에 따라 크게 달라진다. 예를 들어, 이들의 수용해도는 불용성(예: 트리아세틸-베타-시클로텍스트린) 내지 147% 가용성(w/v)(G-2-베타-시클로텍스트린)의 범위이다. 또한, 이들은 많은 유기 용매에서 가용성이다. 시클로텍스트린의 특성은 이들의 용해도를 증가시키거나 감소시킴으로써 다양한 제형 성분의 용해도를 조절할 수 있게 한다.

[0171] 다수의 시클로텍스트린 및 이들의 제조 방법이 기술되어 왔다. 예를 들어, Parmeter (I) 등과 (미국 특허 제 3,453,259호) Gramera 등은 (미국 특허 제 3,459,731호) 전기적 중성인(electroneutral) 시클로텍스트린을 기술하였다. 다른 유도체에는 양이온성 특성을 갖는 시클로텍스트린[Parometer (II)의 미국 특허 제 3,453,257호], 불용성 가교형 시클로텍스트린(Solms의 미국 특허 제 3,420,788호), 및 음이온성 특성을 갖는 시클로텍스트린[Parometer (III)의 미국 특허 제 3,426,011호]이 포함된다. 음이온성 특성을 갖는 시클로텍스트린 유도체 중에는, 카르복실산, 안인산, 포스핀산(phosphinous acids), 포스폰산(phosphonic acids), 인산(phosphoric acids), 티오포스폰산, 티오술피산(thiosulphinic acids), 및 설포산이 부모 시클로텍스트린에 첨가된 것들이 있다[Parmeter (III)의 전술한 문헌 참조]. 또한, 설포알킬 에테르 시클로텍스트린 유도체가 Stella 등에 의해 기술되었다 (미국 특허 제 5,134,127호).

[0172] 리포솜은 수성 내부 구획(compartment)을 둘러싸는 적어도 하나의 지질 이중층 막으로 이루어진다. 리포솜은 막의 유형 및 크기에 따라 특징을 가질 수 있다. 소형 단층상 소포체(Small unilamellar vesicles, SUV)는 하나의 막을 가지고, 일반적으로 그 직경이 0.02 내지 0.05 μm 이며, 대형 단층상 소포체(LUV)는 일반적으로 0.05 μm 보다 크다. 올리고층 큰 소포체 및 다중층 소포체는 보통은 동심원을 이루는 다수의 막층(membrane layer)을 가지며, 일반적으로 0.1 μm 보다 크다. 여러 개의 비동심원 막을 갖는 리포솜, 즉 큰 소포체 내에 담긴 여러 개의 작은 소포체는 다소포체형 소포체(multivesicular vesicles)라 부른다.

[0173] 본 개시의 일 측면은 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 리포솜을 포함하는 제형에 관한 것으로서, 여기서 리포솜 막은 증가된 담체 능력(carrying capacity)을 리포솜에 제공하도록 제형화된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 본 개시의 화합물은 리포솜의 리포솜 이중층 내에 함유되거나 그 위에 흡착될 수 있다. 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 지질 계면활성제와 함께 응집되어 리포솜 내부 공간 내에서 운반될 수 있으며; 이러한 경우, 리포솜 막은 활성제-계면활성제 응집체의 파괴적 효과에 저항하도록 제형화된다.

[0174] 본 개시의 일 구현예에 따르면, 리포솜의 지질 이중층은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 유도체화된 지질을 함유하여, PEG 사슬이 지질 이중층의 내부면으로부터 리포솜에 의해 캡슐화된 내부 공간으로 연장되고, 지질 이중층의 외부로부터 주변 환경 내로 연장된다.

[0175] 본 개시의 리포솜에 함유된 활성제는 가용화된 형태이다. 계면활성제와 활성제의 응집체(예컨대, 관심 활성제를 함유하는 유화액 또는 미셀)는 본 개시에 따른 리포솜의 내부 공간 내에 포획될 수 있다. 계면활성제는 활성제를 분산시키고 가용화시키는 역할을 하며, 다양한 사슬 길이의 (예를 들어, 약 C14 내지 약 C20) 생체 적합성 리소포스파티딜콜린(LPG)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 적절한 지방족, 시클로지방족 또는 방향족 계면활성제로부터 선택될 수 있다. PEG-지질과 같은 중합체-유도체화 지질은 미셀을 형성하는 데 이용될 수도 있는데, 이는 이들이 미셀/막 융합을 억제하는 역할을 하게 되고, 계면활성제 분자에 첨가된 중합체가 계면활성제의 임계 미셀 농도 (critical micelle concentration; "CMC")를 감소시켜 미셀 형성에 도움을 주기 때문이다. CMC를 마이크로몰 범위로 포함하는 계면활성제가 바람직하며; CMC가 더 높은 계면활성제를 이용해 본

개시의 리포좀 내에 포획된 미셀을 제조할 수 있다.

[0176] 본 개시에 따른 리포좀은 당업계에 공지된 다양한 기술 중 어느 하나에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,235,871; 공개된 PCT 출원 WO 96/14057; 신규 RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104; Lasic DD의 문헌[Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993]을 참조한다. 예를 들어, 본 개시의 리포좀은 친수성 중합체로 유도체화된 지질을 미리 형성된 리포좀으로 확산시킴으로써 제조될 수 있으며, 예컨대, 유도체화된 지질의 최종 물 백분율에 상응하는 (리포좀에게는 바람직한) 지질 농도에서 지질-이식 중합체로 이루어진 미셀에 미리 형성된 리포좀을 노출시킴으로써 제조될 수 있다. 친수성 중합체를 함유하는 리포좀은 당업계에 공지된 것과 같은 균질화(homogenization), 지질 분야 수화(lipid-field hydration), 또는 압출 기술에 의해 형성될 수도 있다.

[0177] 또 다른 예시적인 제형화 절차에서, 활성제는 소수성 분자를 쉽게 가용화시키는 초음파 처리(sonication)에 의해 리소포스파티딜콜린 또는 CMC가 낮은 다른 계면활성제(중합체 이식된 지질 포함)에서 먼저 분산된다. 이어서, 생성된 활성제의 미셀 현탁액을 사용하여, 적절한 물 백분율의 중합체-이식 지질 또는 콜레스테롤을 포함하는 건조된 지질 샘플을 재수화한다. 이어서, 당업계에 공지된 바와 같은 압출 기술을 사용해 지질과 활성제의 현탁액을 리포좀으로 형성하고, 생성된 리포좀을 표준 컬럼 분리에 의해 캡슐화 용액으로부터 분리한다.

[0178] 본 개시의 일 측면에서, 리포좀은 선택된 크기 범위에서 실질적으로 균질한 크기를 갖도록 제조된다. 하나의 효과적인 크기 조절 방법(sizing method)은 선택된 균일한 기공 크기를 갖는 일련의 폴리카보네이트 막을 통해 리포좀의 수성 현탁액을 압출하는 단계를 포함하며; 막의 기공 크기는 해당 막을 통해 압출에 의해 생산된 가장 큰 리포좀의 크기와 대략 상응할 것이다. 예를 들어, 미국 특허 제4,737,323호(1988년 4월 12일)를 참조한다. 소정의 구현예에서, DharmaFECT® 및 Lipofectamine®과 같은 시약을 사용해 폴리뉴클레오티드 또는 단백질을 세포 내에 도입할 수 있다.

[0179] 본 개시의 제형의 방출 특성은 캡슐화 물질, 캡슐화된 약물의 농도, 및 방출 조절제의 존재에 따라 달라진다. 예를 들어, 방출은 가령, 위에서와 같이 낮은 pH에서만 방출하거나 장에서와 같이 높은 pH에서만 방출하는 pH 감수성 코팅을 사용해 pH 의존적으로 조절될 수 있다. 장용 코팅(enteric coating)을 사용해, 위를 통과할 때까지 방출이 일어나지 않게 할 수 있다. 다중 코팅 또는 상이한 물질로 캡슐화된 시안아미드(cyanamide)의 혼합물을 사용해 초기 방출이 위에서 일어나게 하고, 이어서 지연 방출이 장에서 일어나게 할 수 있다. 방출은 염 또는 기공 형성제를 포함시켜 조작할 수도 있는데, 이는 확산에 의해 수분 흡수를 증가시키거나 캡슐로부터 약물 방출을 증가시킬 수 있다. 약물의 용해도를 변형시키는 부형제를 사용해 방출 속도를 조절할 수도 있다. 매트릭스의 분해를 강화하거나 매트릭스로부터의 방출을 향상시키는 제제가 혼입될 수도 있다. 이들은 약물에 첨가되거나, 별도의 상으로서(즉, 미립자로서) 첨가되거나, 화합물에 따라 중합체 상에서 함께 용해될 수 있다. 대부분의 경우에, 양은 0.1 내지 30%(w/w 중합체)이어야 한다. 분해 증강제의 유형에는 황산 암모늄 및 염화 암모늄과 같은 무기산; 구연산, 벤조산 및 아스코르브산과 같은 유기산; 탄산나트륨, 탄산 칼륨, 탄산 칼슘, 탄산 아연, 및 수산화 아연과 같은 무기 염기; 황산 트리아민, 스페르민(spermine), 콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민, 및 트리에탄올아민과 같은 유기 염기; 및 Tween® 및 Pluronic®과 같은 계면활성제가 포함된다. 매트릭스에 미세구조를 첨가하는 기공 형성제(즉, 무기 염 및 당류와 같은 수용성 화합물)가 미립자로서 첨가된다. 범위는 통상적으로 1 내지 30%(w/w 중합체)이다.

[0180] 입자의 소화관 내 체류 시간을 변경함으로써 흡수를 조작할 수도 있다. 이는, 예를 들어, 점막 접착성 중합체로 입자를 코팅하거나 이를 캡슐화 물질로 선택함으로써 달성될 수 있다. 예에는 유리 카르복실기를 갖는 대부분의 중합체, 예컨대, 키토산, 셀룰로오스, 및 특히 폴리아크릴레이트(본원에서 사용되는 바와 같은, 폴리아크릴레이트는 아크릴레이트기 및 변형된 아크릴레이트기, 예컨대 시아노아크릴레이트 및 메타크릴레이트를 지칭함)가 포함된다.

[0181] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 수술 도구나 의료 기기 또는 이식재 내에 담기도록 제형화되거나 이들에 의해 방출되기 적합하도록 제형화될 수 있다. 소정의 측면에서, 이식재는 안티센스 올리고뉴클레오티드로 코팅되거나 달리 이로 처리될 수 있다. 예를 들어, 하이드로겔이나 다른 중합체, 예컨대 생체적합성 중합체 및/또는 생분해성 중합체가 본 개시의 약학적 조성물로 이식재를 코팅하는데 사용될 수 있다(즉, 조성물은 하이드로겔 또는 다른 중합체를 사용함으로써 의료 장치와 함께 사용하도록 구성될 수 있다). 의료 장치를 제제로 코팅하기 위한 중합체 및 공중합체는 당업계에 잘 알려져 있다. 이식재의 예로는, 스텐트, 약물-용출 스텐트, 봉합물(sutures), 보형물(prosthesis), 혈관 카테터, 투석 카테터, 혈관 이식편(vascular grafts), 인공 심장 판막(prosthetic heart valve), 심박 조절기(cardiac pacemakers), 이식형 제세동기(implantable cardioverter

defibrillators), IV 바늘, 접골 및 골 형성용 장치, 예컨대 핀, 스크류, 플레이트 및 기타 장치, 및 상처 치유를 위한 인공 조직 매트릭스 등이 있지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0182] 본원에서 제공되는 방법에 추가하여, 본 개시에 따라 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 다른 약제와의 유사성(analogy)에 따라 인간 또는 수의용 의약에 사용하기 위해, 임의의 편리한 방법으로 투여하도록 제형화될 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 상응하는 제형은 근아세포 이식, 줄기 세포 치료, 아미노글리코시드 항생제 투여, 프로테아좀 억제제 및 상향조절 요법(예를 들어, 디스트로핀의 상염색체 파라로그인 유티트로핀의 상향조절) 같은 근 이영양증의 치료 시 단독으로 투여되거나 다른 치료 전략과 조합으로 투여될 수 있다.

[0183] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 투여 이전에, 동시에, 또는 이후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 스테로이드 및/또는 항생제와 병용 투여될 수 있다. 소정의 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 백그라운드 스테로이드 치료(예를 들어, 간헐적 또는 만성/연속적 백그라운드 스테로이드 치료) 중인 환자에게 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 환자는 안티센스 올리고머의 투여 전에 코르티코스테로이드로 치료 받은 적이 있으며, 계속해서 스테로이드 치료를 받는다. 일부 구현예에서, 스테로이드는 글루코코르티코이드 또는 프레드니손(prednisone)이다.

[0184] 당업자는 임의의 특정 동물 및 병태에 맞는 최적 투여 경로 및 임의의 투여량을 쉽게 결정할 수 있으므로, 기술된 투여 경로는 단지 가이드로서 의도된다. 시험관 내 및 생체 내 모두에서 기능적인 신규 유전 물질을 세포 내로 도입하기 위한 다수의 접근법이 시도되어 왔다(Friedmann의 문헌[(1989) Science, 244:1275-1280]). 이들 접근법에는, 발현된 유전자의 변형된 레트로바이러스로의 통합(Friedmann의 전술한 (1989) 문헌; Rosenberg의 문헌[(1991) Cancer Research 51(18), suppl.: 5074S-5079S]); 비-레트로바이러스 벡터(예: 아데노-연관 바이러스 벡터)로의 통합(Rosenfeld 등의 문헌[(1992) Cell, 68:143-155]; Rosenfeld 등의 문헌[(1991) Science, 252:431-434]); 또는 리포솜을 통해 이중 프로모터-인핸서 요소에 연결된 이식 유전자의 전달(Friedmann의 전술한 (1989) 문헌; Brigham 등의 문헌[(1989) Am. J. Med. Sci., 298:278-281]; Nabel 등의 문헌[(1990) Science, 249:1285-1288]; Hazinski 등의 문헌[(1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209]; 및 Wang 및 Huang의 문헌[(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855]); 리간드-특이적 양이온 기반 전송 시스템에의 결합(Wu 및 Wu의 문헌[(1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624]) 또는 네이키드 DNA, 발현 벡터의 사용(Nabel 등의 전술한 (1990) 문헌; Wolff 등의 문헌[(1990) Science, 247:1465-1468])이 포함된다. 이식 유전자를 조직에 직접 주사하면 국부적인 발현만이 생성된다(Rosenfeld의 전술한 (1992) 문헌; Rosenfeld 등의 전술한 (1991) 문헌; Brigham 등의 전술한 (1989) 문헌; Nabel의 전술한 (1990) 문헌; 및 Hazinski 등의 전술한 (1991) 문헌). Brigham 등의 문헌[그룹 (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 and Clinical Research (1991) 39 (요약))]에서는 DNA 리포솜 복합체의 정맥내 또는 기관내 투여 후 마우스의 폐에서만 생체 내 형질감염이 나타났음이 보고되었다. 인간 유전자 치료 절차에 대한 검토 논평의 예는 Anderson의 문헌[Science (1992) 256:808-813]에 있다.

[0185] 추가 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은 Han 등의 문헌에서 제공된 것과 같은 탄수화물을 추가로 포함할 수 있다(Han 등의 문헌[Nat. Comms. 7, 10981 (2016), 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨]). 일부 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은 5%의 헥소오스 탄수화물(hexose carbohydrate)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 약학적 조성물은 5% 포도당, 5% 과당, 또는 5% 만노오스를 포함할 수 있다. 소정의 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은 2.5% 포도당 및 2.5% 과당을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 약학적 조성물은: 5 부피%의 양으로 존재하는 아라비노스(arabinose); 5 부피%의 양으로 존재하는 포도당; 5 부피%의 양으로 존재하는 소르비톨; 5 부피%의 양으로 존재하는 갈락토오스; 5 부피%의 양으로 존재하는 과당; 5 부피%의 양으로 존재하는 크실리톨; 5 부피%의 양으로 존재하는 만노오스; 각각 2.5 부피%의 양으로 존재하는 포도당과 과당의 조합; 및 5.7 부피%의 양으로 존재하는 포도당, 2.86 부피%의 양으로 존재하는 과당, 및 1.4 부피%의 양으로 존재하는 크실리톨의 조합으로부터 선택된 탄수화물을 포함할 수 있다.

[0186] IV. 키트

[0187] 본 개시는 또한, 유전자 질환(예, DMD)이 있는 환자의 치료를 위한 키트를 제공하며, 상기 키트는 적절한 용기에 포장된 적어도 하나의 안티센스 분자(예, 카시머센)를 이의 사용 지침과 함께 포함한다. 키트는 완충제, 안정화제 등과 같은 기타 시약을 포함할 수도 있다. 당업자는 상기 방법이 많은 다른 질환을 치료하는 데 사용하기에 적합한 안티센스 분자를 식별하는 넓은 응용분야에 적용된다는 것을 이해해야 한다.

[0188] 예

- [0189] **예 1: 본질**
- [0190] ClinicalTrials.gov 식별자: NCT02500381
- [0191] 연구의 주된 목적은, 각각 엑손 45 및 엑손 53 스킵핑에 순응하는 프레임 d1이탈(out-of-frame) 결실 돌연변이를 가진 뒤시엔느 근 이영양증(DMD) 환자에서 위약과 비교하여 카시머센(SRP-4045) 및 골로더센(Golodirsen)(SRP-4053)의 효능을 평가하는 것이다.
- [0192] 연구 유형: 중재적(Interventional)
- [0193] 연구 설계: 할당: 무작위 배정
- [0194] 중재 모델: 평행 할당
- [0195] 가림: 4인 1조 (참여자, 간병인, 시험자, 결과 평가자)
- [0196] 주요 목적: 치료
- [0197] 공식 제목: 뒤시엔느 근 이영양증 환자를 대상으로 SRP-4045 및 SRP-4053의 효능 및 안전성을 평가하기 위한 공개형 연장(Open-Label Extension) 임상시험이 있는 이중 맹검, 위약-대조, 다기관 임상시험
- [0198] 재료 및 방법
- [0199] 카시머센(일명, SRP-4045)은 본원에 기술된 화학 구조의 PMO이며, Sarepta Therapeutics, Inc에 의해 공급되었다. 카시머센 의약품은 일회용 바이알로 공급되는 멸균, 등장성, 인산염 완충 수용액으로서 50 mg/mL의 농도로 제형화되었다. 임상 환경에서 IV 주입을 통해 투여하기 전에, 의약품을 생리식염수(0.9% 염화나트륨 주사액)로 희석하였다.
- [0200] 환자: 적격성
- [0201] 적격한 환자는 엑손 45 스킵핑에 순응하는 DMD 유전자의 프레임 외 결실을 가진 7세 내지 13세였다.
- [0202] 선정 기준:
- [0203] · DMD로 진단, 유전자형 확인됨.
 - [0204] · 적어도 24주 동안 안정적인 용량의 경구용 코르티코스테로이드.
 - [0205] · 온전한 우측 및 좌측 이두근 또는 2개의 대안적인 상부 근육 군.
 - [0206] · 300 미터 이상 및 450 미터 이하의 평균 6MWT.
 - [0207] · 안정적인 폐 및 심장 기능: 50% 이상의 예측된 강제 폐활량(FVC) 및 50% 초과 좌심실 박출률(LVEF).
- [0208] 제외 기준:
- [0209] · 언제든지 SMT C1100(BMN-195)으로의 이전 치료
 - [0210] · 언제든지 유전자 요법으로 치료
 - [0211] · 1주차 전 24주 내에 PR0045 또는 PR0053으로의 이전 치료
 - [0212] · 1주차 전 12주 내에 (데플라자코트(deflazacort) 이외의) 일체의 다른 실험적 치료를 이용한 현재 또는 이전 치료
 - [0213] · 1주차 전 12주 내에 다른 DMD 중재적 임상 연구에 참여함
 - [0214] · 1주차 전 3개월 내에 대수술
 - [0215] · 기타 임상적으로 유의한 질병 존재
 - [0216] · 1주차 전 3개월 내에 물리 치료 요법의 주요 변화.
- [0217] 연구 설계
- [0218] 엑손 45 스킵핑에 순응하는 환자들이 이중 눈가림 기간에 최대 96주 동안 30 mg/kg으로, 카시머센(SRP-4045)을 정맥내(IV) 주입받았다. 그 후, 모든 환자들이 OL 기간(연구에서 최대 144주차까지) 48주 동안 30 mg/kg/주 IV

주입으로 카시머센(SRP-4045)의 공개형 활성 치료를 받게 될 공개형 연장 기간이 이어졌다.

- [0219] 일차 결과 척도: 96주차에 6-분 보행 검사(6MWT) 동안 보행한 총 거리의 베이스라인 대비 변화 [타임 프레임: 베이스라인 및 96주차].
- [0220] 이차 결과 척도:
- [0221] · 144주차(OL 기간의 48주차)에 6-분 보행 검사(6MWT) 동안 보행한 총 거리의 베이스라인 대비 변화 [타임 프레임: 베이스라인, 144주차].
- [0222] · 48주차 또는 96주차에 웨스턴 블롯에 의해 결정되는 디스트로핀 단백질 수준의 베이스라인 대비 변화 [타임 프레임: 베이스라인 및 48주차 또는 96주차].
- [0223] · 48주차 또는 96주차에 면역조직화학법(IHC)에 의해 결정되는 디스트로핀 강도 수준의 베이스라인 대비 변화 [타임 프레임: 베이스라인 및 48주차 또는 96주차].
- [0224] · 바닥에서 독립적으로 일어나는 능력 [타임 프레임: 96주차, 144주차].
- [0225] · 보행 상실(LOA)까지의 시간 [타임 프레임: 베이스라인, 96주차, 144주차].
- [0226] · 96주차 및 144주차에서 노스 스타 보행 평가(NSAA) 총점의 베이스라인 대비 변화 [타임 프레임: 베이스라인, 96주차, 144주차]. NSAA는 구체적으로 뒤시엔느 근 이영양증(DMD)이 있는 보행자 소아에서 사용하기 위해 Hammersmith 운동 능력 척도에서 고안한 기능적 척도이다. 이는 0(수행 불가), 1(변형 수행), 2(정상 움직임) 등급의 17개의 활동으로 구성된다. 척도는 기능적으로 보행이 가능한 상태를 유지하는 데 필요한 활동(예: 바닥에서 일어나기), 질병 초기에도 어려울 수 있는 활동(예: 발뒤꿈치로 서기) 및 시간이 지남에 따라 점진적으로 악화되는 것으로 알려진 활동(의자에서 일어나기, 걷기)을 평가한다. NSAA 총 점수는 0에서 34 범위이며, 34점은 정상 기능을 의미한다.
- [0227] · 96주차 및 144주차에 예측된 강제 폐활량 백분율(FVC%)의 베이스라인 대비 변화 [타임 프레임: 베이스라인, 96주차, 144주차].
- [0228] 중간 분석(Interim Analysis)
- [0229] 엑손 45 스킵핑에 순응하는 환자들은 96주 동안 30 mg/kg 투여량의 카시머센(N=27) 또는 위약(N=16)을 주 1회 정맥내(IV) 주입 받도록 무작위 배정되었다. 중간 분석은 베이스라인 및 48주차 치료 중인 이두근 생검에서 얻은 데이터로 수행하였다.
- [0230] 중간 분석의 주요 결과는 다음을 포함한다:
- [0231] · 평균 디스트로핀 단백질(웨스턴 블롯으로 측정된 정상 디스트로핀 %)은 정상의 평균 베이스라인 0.925%와 비교해 정상의 1.736%까지 증가하였다 ($p<0.001$).
- [0232] · 베이스라인부터 48주차까지 디스트로핀 단백질의 평균 변화에 있어서, 위약군과 비교해 카시머센 치료군 간에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다 ($p=0.009$ (민감도 분석) $p=0.004$ (주 방법 분석)).
- [0233] · 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 사용하여 초기 분석에서 엑손 스킵핑 mRNA의 증가에 대해 시험한 카시머센을 투여받은 22명의 환자 중에서, 모두가 베이스라인 수준에 비해 엑손 45 스킵핑의 증가를 나타냈으며 ($p<0.001$), 이는 100% 반응률을 나타낸다.
- [0234] · 초기 분석에서, 엑손 45 스킵핑과 디스트로핀 생산 간에 통계적으로 유의한 양의 상관관계가 관찰되었다 (스피어만 순위 상관관계 = 0.635, $p<0.001$).
- [0235] · 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 사용하여 엑손 스킵핑 mRNA 증가에 대해 시험한 카시머센을 투여받은 27명의 모든 환자에 대한 분석에서, 모두가 베이스라인 수준에 비해 엑손 45 스킵핑의 증가를 나타냈으며 ($p<0.001$), 이는 100% 반응률을 나타낸다.
- [0236] · 모든 27명의 환자 분석에서, 엑손 45 스킵핑과 디스트로핀 생산 간에 통계적으로 유의한 양의 상관관계가 관찰되었다 (스피어만 순위 상관관계 = 0.627, $p<0.001$).
- [0237]
- [0238] 본 연구는 진행 중이며 추가 유효성 및 안전성 데이터를 수집하기 위해 눈가림 상태를 유지한다.

[0239] 예 2:

[0240] 연구의 주요 목적은 카시머센의 안전성과 내약성을 평가하고, 진행성 단계 DMD 및 엑손 45 스킵핑에 순응하는 확인된 돌연변이를 가진 환자에서 카시머센의 약동학(PK)을 평가하는 것이다.

[0241] 방법

[0242] 다기관, 무작위 배정, 이중 맹검, 위약-대조, 투여량 적정, 1/2상 연구는 진행성 단계 DMD 및 엑손 45 스킵핑에 순응하는 확인된 돌연변이를 가진 환자들을 등록시켰다.

[0243] 이중 맹검 투여량 적정 기간 동안, 환자들은 $\approx$ 12주 동안 카시머센 또는 위약을 투여 받도록 (2:1) 무작위 배정되었다. 카시머센에 무작위 배정된 환자들은, 투여량 수준당 $\geq$ 2주 동안 정맥내(IV) 주입을 통해 매주 1회 투여되는 4가지 상승 투여량 수준(4, 10, 20 및 30 mg/kg)을 투여 받았다. 상기 이중 맹검 투여량 적정 기간 후, 추가로 최대 132주 동안 공개형 연장 기간에 주 1회 카시머센 30 mg/kg의 안전성 및 효능을 평가하였다.

[0244] 환자: 적격성

[0245] 적격의 환자들은 DMD를 임상 진단받은 7-21세 남성으로, 엑손 45 스킵핑에 순응하는 확인된 유전자 돌연변이를 가졌으며, 심장과 폐 기능이 안정적이었으며, 연구 개시 전 $\geq$ 24주 동안 경구용 코르티코스테로이드를 투여받지 않았고, 보행이 불가능하거나 6분 보행 검사로 $\geq$ 300미터 보행할 수 없었다.

[0246] 연구 평가

[0247] 안전성 평가에는 치료유발 이상반응(treatment-emergent adverse event, TEAE), 임상 실험실 이상, 활력 징후 및 신체검사 이상, 및 심전도 검사(electrocardiogram) 및 심장초음파검사(echocardiogram)의 임상적으로 유의한 악화가 포함되었다.

[0248] PK 평가에는 농도-시간 곡선 하 면적(AUC), 총 신체 청소율(CL), 최대 관찰 농도(C_{max}), 말기 반감기(terminal phase half-life) ($t_{1/2}$), 최대 관찰 농도 시간(t_{max}), 및 항정 상태 분포 용적(volume of distribution at steady-state)(V_{ss})이 포함되었다.

[0249] 데이터는 요약 및 기술 통계학(summary and descriptive statistics)을 사용하여 평가하고 제시하였다.

[0250] 카시머센에 대한 PK 변수들은 PK 측정치들이 연속적으로 수집되는 방문에 대해 비구획 분석을 사용하여 계산하였다.

[0251] 결과

[0252] 등록된 12명의 환자 중, 11명(91.7%)이 연구를 완료하였다. 카시머센 치료에 무작위 배정된 환자들은 일반적으로 약간 더 높은 연령이었으며, 위약에 무작위 배정된 환자들보다 더 진행된 질환을 가지고 있었다 (표 1).

표 1

매개변수	위약 (n=4)	카시머센 (n=8)	합계 (n=12)
평균 (SD) 연령, y	12.0 (2.2)	14.4 (3.3)	13.6 (3.1)
인종, n%			
백인	4 (100)	6 (75.0)	10 (83.3)
아시아인	0	2 (25.0)	2 (16.7)
민족, n (%)			
히스패닉계 또는 라틴계	0	1 (12.5)	1 (8.3)
비 히스패닉계 또는 라틴계	4 (100)	7 (87.5)	11 (91.7)
평균 BMIa (SD), kg/m^2	21.9 (1.2)	25.9 (4.8)	24.6 (4.3)
평균 6MWT 거리 ^{a,b} (SD), 미터	115.0 (134.2)	0.9 (2.5)	39.1 (90.0)
DMD 진단 후 평균 시간 (SD), 월	91.8 (33.7)	136.1 (47.9)	121.3 (47.4)

코르티코스테로이드 사용의 평균 지속 기간 (SD), 월	84.5 (38.3)	80.1 (34.5)	81.6 (34.1)
--------------------------------	-------------	-------------	-------------

[0254] ^a 베이스라인은 연구 약물의 첫 번째 투여 전 마지막 값으로 정의하였다.

[0255] ^b 보행이 불가능한 환자는 6MWT 거리가 0미터인 것으로 간주하였다.

[0256] 6MWT, 6분 보행 검사; BMI, 체질량 지수; SD, 표준 편차.

[0257] 평균 (SD) 총 연구 기간은 144.7(3.45) 주였다. 통합 연구 기간 동안 카시머센 치료에 대한 평균 (SD) 기간은 139.6(9.26) 주였다.

[0258] 안전성

[0259] 모든 환자들은 표 2에 기술된 하나 이상의 치료유발 이상반응(TEAE)을 경험했다.

표 2

환자, n (%)	위약 (n=4)	카시머센 4 mg/kg (1-2주) (n=8)	카시머센 10 mg/kg (3-4주) (n=8)	카시머센 20 mg/kg (5-6주) (n=8)	카시머센 30 mg/kg (7-8주) (n=8)	카시머센 30 mg/kg (7주에서 이중 맹검 기간 종료 시까지) (n=8)	합계 (N=8)	합계 카시머센 ^{a, b} (N=12)
≥1 TEAE	4 (100)	5 (62.5)	3 (37.5)	3 (37.5)	4 (50.0)	7 (87.5)	8 (100)	12 (100)
>1 중증 TEAE	0	0	0	0	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	3 (25.0)
>1 치료와 관련된 TEAE	1 (25.0)	1 (12.5)	0	0	0	1 (12.5)	2 (25.0)	2 (16.7)
중증도 별, 총 TEAE 수								
경증	11	9	3	9	13	26	47	159
중등	0	0	0	1	1	3	4	14
중증	0	0	0	0	2	2	2	2

[0261] ^a 이중 맹검 기간에 카시머센-치료한 환자에 대해 보고된 TEAE에는 카시머센 기간에 대한 요약에도 포함된다.

[0262] ^b TEAE로 인해 연구 약물을 중단하거나 연구 약물 용량을 감량한 환자는 없었으며, 연구 중에 사망이 발생하지 않았다.

[0263] TEAE로 인해 연구 약물을 중단하거나 연구 약물 용량을 감량한 환자는 없었다. 대부분의 TEAE는 이중 맹검 (88.7%) 및 공개형(90.9%) 치료 기간 동안 중증도가 경증이었다. 시술 통증과 비인두염은 이중 맹검 및 공개형 치료 기간 동안 각각 가장 흔히 보고된 TEAE였다 (표 3 및 4).

표 3

[0264] 이중 맹검 치료 기간 동안 위약 또는 총 카시머센 군에서 ≥25%의 환자에서 보고된 치료 후 발생 이상반응^a

환자, n (%)	위약 (n=4)	카시머센 4 mg/kg (1-2주) (n=8)	카시머센 10 mg/kg (3-4주) (n=8)	카시머센 20 mg/kg (5-6주) (n=8)	카시머센 30 mg/kg (7-8주) (n=8)	카시머센 30 mg/kg (7주에서 이중 맹검 기간 종료시까지) (n=8)	합계 (N=8)
≥1 TEAE	4 (100)	5 (62.5)	3 (37.5)	3 (37.5)	4 (50.0)	7 (87.5)	8 (100)
시술 통증	1 (25.0)	0	0	2 (25.0)	2 (25.0)	3 (37.5)	4 (50.0)

두통	0	1 (12.5)	0	0	1 (12.5)	2 (25.0)	3 (37.5)
구토	0	0	0	2 (25.0)	1 (12.5)	2 (25.0)	3 (37.5)
메스꺼움	0	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	0	0	2 (25.0)
비인두염	1 (25.0)	1 (12.5)	0	0	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)
사지 통증	1 (25.0)	0	0	0	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)
피부 유두종	1 (25.0)	0	0	0	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)
접촉성 피부염	2 (50.0)	0	0	0	0	0	0
등 통증	1 (25.0)	0	0	0	0	0	0
인대 염좌	1 (25.0)	0	0	0	0	0	0
구인두 통증	1 (25.0)	0	0	0	0	0	0
어루러기	1 (25.0)	0	0	0	0	0	0

[0265] ^a공개형 기간의 첫 번째 투여량까지 발병일이 연구 약물의 첫 번째 투여량 투여 후인 TEAE만 포함된다.

표 4

[0266] 총 카시머센 군 약물 이증 맹검, 공개형 치료 기간 중 환자의 $\geq 25\%$ 에서 보고된 치료유발 이상반응^a

환자, n (%)	총 카시머센 군 (N=12)
≥ 1 TEAE	12 (100)
비인두염	9 (75.0)
기침	4 (33.3)
두통	4 (33.3)
시술 통증	4 (33.3)
상기도 감염	4 (33.3)
구토	4 (33.3)
메스꺼움	3 (25.0)
사지 통증	3 (25.0)
구인두 통증	3 (25.0)
발진	3 (25.0)
경골 골절	3 (25.0)

[0267] ^a발병일이 카시머센의 첫 번째 투여량 투여 후인 TEAE만 포함된다.

[0268] 치료 관련 TEAE에는 2명의 카시머센 치료 환자에서 1건의 중등도 철 결핍증과 1건의 경증 홍조, 위약을 투여받은 1명의 환자에서 경증 접촉성 피부염이 포함되었다. 카시머센 관련 TEAE는 연구 기간 동안 해결되었으며; 위약 관련 TEAE는 연구 종료 시 진행 중이었다.

[0269] 5건의 중증의 TEAE(1명의 환자에서 경골 골절, 1명의 환자에서 세균혈증, 패혈 색전증 및 대정맥 혈전증, 1명의 환자에서 대퇴골 골절)가, 병용 치료 기간 동안 30 mg/kg의 카시머센을 투여받은 환자들에서 발생했다. 5건의 사례 모두 치료와 관련이 없는 것으로 간주되었고, 연구 기간 동안 해결되었으며, 추가 투여로 재발하지 않았다.

[0270] 혈액학, 응고병증, 화학 또는 기타 임상 실험실 매개변수들에서 패턴, 추세 또는 이상은 관찰되지 않았다. 심장 초음파검사에 의한 전도 시간 또는 기능 평가에서 어떠한 심장 신호도 관찰되지 않았다. 1건의 일과성 심실성 빈맥 사례가 보고되었지만, 이 사례는 카시머센 치료와 관련이 없는 것으로 간주되었고, 심전도는 후유증 없이 정상화되었다.

[0271] 약동학

[0272] 30 mg/kg 투여량 수준에 대해 평균 혈장 카시머센 농도 대 시간 프로파일은 7주차와 60주차에 유사하였다. 카시머센 30 mg/kg 투여량 수준에 대해 모든 PK 매개변수들은 7주차와 60주차에 유사하였다 (표 5).

표 5

[0273] 주요 혈장 카시머센 비구획 PK 매개변수 요약, 투여량 수준 및 주 기준

매개변수	1주차 카시머센 4 mg/kg (n=8)	3주차 카시머센 10 mg/kg (n=8) ^a	5주차 카시머센 20 mg/kg (n=8)	7주차 카시머센 30 mg/kg (n=8)	60주차 카시머센 30 mg/kg (n=12)
C _{max} , ng/mL	13,700 (25.0)	39,400 (11.7)	64,400 (27.4)	119,000 (33.6)	115,000 (31.5)
t _{max} , h	1.1(0.9-1.2)	1.03 (0.9-1.2)	1.03 (0.8-1.2)	0.94 (0.8-1.2)	0.95 (0.8-1.1)
AUC _∞ , h · ng/mL	23,300(29.5)	58,300 (16.0)	101,000 (17.7)	189,000 (27.5)	182,000 (33.9)
V _{ss} , L/kg	0.369(24.4)	0.343 (12.5)	0.407 (23.4)	0.319 (31.4)	0.367 (28.9)
CL, L/h/kg	0.177(29.1)	0.181 (15.9)	0.205 (18.5)	0.163 (27.7)	0.180 (35.0)
t _{1/2} , h	2.92(0.985)	3.29 (0.640)	3.71 (0.616)	3.82 (0.741)	3.45 (0.359)

[0274] 값들은 t_{max} 및 t_{1/2}을 제외한 모든 매개변수에 대해 기하 평균 (기하 변동 계수 백분율)으로 제시하며; t_{max}는 중간값(최소-최대)으로 제시하며; t_{1/2}는 중간값(표준 편차)으로 제시한다.

[0275] ^a3주차에, AUC_∞, V_{ss}, CL, 및 t_{1/2}의 경우 n= 7.

[0276] AUC_∞, 0시간부터 무한대까지 외삽된 농도-시간 곡선 하 면적.

[0277] 요약

[0278] 이 연구에서, 카시머센 30 mg/kg은 진행성-단계 DMD 및 엑손 45 스킵핑에 순응하는 확인된 돌연변이를 가진 환자에서 내약성이 양호하였다. 대부분의 보고된 TEAE는 경증이었으며, 치료 관련 TEAE는 거의 보고되지 않았으며, TEAE로 인해 연구 약물을 중단하거나 연구 약물 투여량을 감량한 환자는 없었다. 임상적으로 유의한 실험실 이상 또는 심전도 및 심장초음파의 악화는 관찰되지 않았다. 카시머센 PK 분석에 의하면 30 mg/kg의 주 1회 투여 후 축적이 거의 없거나 전혀 없음을 시사한다.

[0279] *****

[0280] 본 명세서에 인용된 모든 간행물 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물 또는 특허 출원이 마치 구체적으로 그리고 개별적으로 표시되어 참조에 의해 통합된 것처럼 참조에 의해 본원에 통합된다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SAREPTA THERAPEUTICS, INC.

<120> METHODS FOR TREATING MUSCULAR DYSTROPHY

<130> 8174.45.W000

<140><141><150> 62/902,518

<151> 2019-09-19

<150> 62/825,573

<151> 2019-03-28

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 1

caatgccatc ctggagttcc tg

22