



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월02일
(11) 등록번호 10-2258326
(24) 등록일자 2021년05월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7028186
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월14일
심사청구일자 2019년03월13일
- (85) 번역문제출일자 2015년10월08일
- (65) 공개번호 10-2015-0133751
- (43) 공개일자 2015년11월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/029689
- (87) 국제공개번호 WO 2014/153220
국제공개일자 2014년09월25일
- (30) 우선권주장
61/784,547 2013년03월14일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020110082576 A*
WO2012150960 A1
US20100168212 A1
WO2011057350 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
사렘타 세리퓨틱스 인코퍼레이티드
미국 매사추세츠 02142, 캠브리지, 215 퍼스트 스트리트
- (72) 발명자
베스트윅, 리차드, 케이.
미국 97330 오리건주 코르발리스 엔더블유 클라렌스 서클 3905
프랭크, 다이앤, 엘리자베스
미국 98115 워싱턴주 시애틀 34번 애비뉴 엔이 6049
슈넬, 프레드 조셉
미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 퍼스트 스트리트 215
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 근육 이영양증의 치료를 위한 엑손 스키피핑 조성물

(57) 요약

인간 디스트로핀 유전자에서 선택된 표적 부위에 결합하여 엑손 44 스키피핑을 유도할 수 있는 인간 안티센스 분자가 기재된다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/111 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/3233 (2013.01)
C12N 2310/33 (2013.01)
C12N 2310/351 (2013.01)
C12N 2310/3513 (2013.01)
C12N 2310/3535 (2013.01)
C12N 2320/30 (2013.01)
C12N 2320/33 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

선택된 표적에 결합하여 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 스키피핑을 유도할 수 있는 길이 22개 뉴클레오티드의 안티센스 올리고머이며,

여기서 상기 안티센스 올리고머는 H44A(-07+15)로 이루어진 엑손 44 표적 영역에 특이적으로 혼성화하는 염기의 서열을 포함하고,

상기 올리고머의 염기는 모르폴리노 고리 구조에 연결되고,

상기 모르폴리노 고리 구조는 하나의 고리 구조의 모르폴리노 질소를 인접한 고리 구조의 5' 엑소시클릭 탄소에 결합시키는 인-함유 서브유닛간 연결에 의해 결합되는 것인,

안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열이 서열번호 5를 포함하거나;

터민 염기가 우라실 염기로 치환된 서열번호 5의 염기 서열을 포함하는 22개 염기의 안티센스 올리고머인,

안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 5로 이루어진 것인 안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, RNase H를 활성화시키지 않는 안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머의 활성화, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증진시키는 하나 이상의 모이어티 또는 접합체에 화학적으로 연결되는 안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 6

제5항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜 분자에 화학적으로 연결되는 안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 아르기닌-풍부 펩티드에 접합되는 안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 아르기닌-풍부 펩티드가 서열번호 24 내지 39로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 고리 구조의 모르폴리노 질소를 인접한 고리 구조의 5' 엑소시클릭 탄소에 결합시키는 실질적으로 비하전된 인-함유 서브유닛간 연결에 의해 결합된 모르폴리노 고리 구조

를 포함하는 안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 서브유닛간 연결이 비하전되고, 생리학적 pH에서 양으로 하전된 연결과 함께 배치되며, 상기 양으로 하전된 연결의 총 수가 2 내지 연결의 총 수의 절반 이하인 안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

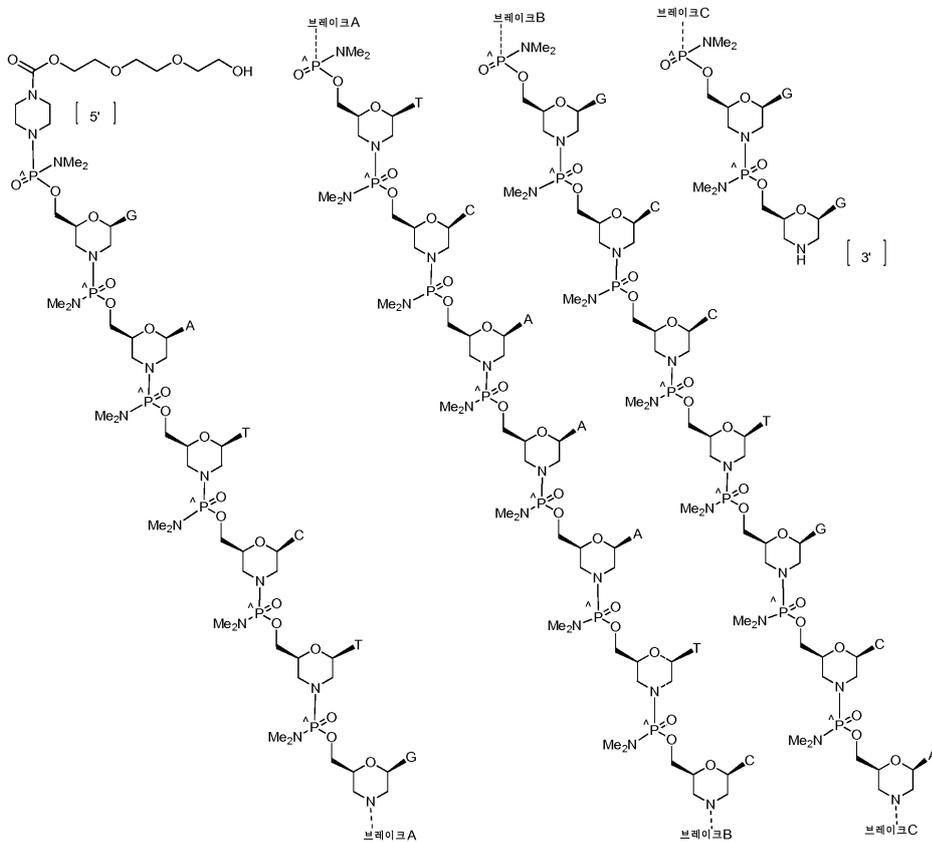
청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 모르폴리노 고리 구조 및 포스포로디아미데이트 서브유닛간 연결을 포함하는 안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 12

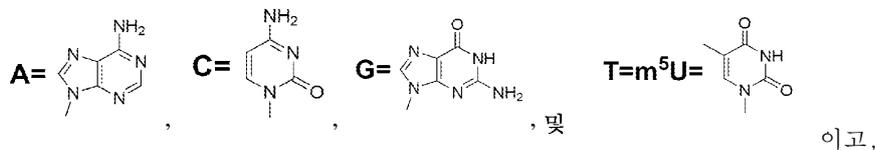
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 펜던트 양이온 기로 변형된 안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 13



H44A(-07+15);

로 이루어지고, 여기서



\wedge = 인 중심의 입체화학은 한정되지 않은 것인,

안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 14

제1항 내지 제3항 및 제13항 중 어느 한 항의 안티센스 올리고머 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 근육 이영양증의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 근육 이영양증이 뒤시엔느 근육 이영양증 (DMD)인 제약 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 근육 이영양증이 베키 근육 이영양증 (BMD)인 제약 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 특허 출원은 2013년 3월 14일에 출원된 미국 특허 가출원 제61/784547호를 우선권 주장한다. 상기 참조된 특허 가출원의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 스킵핑을 용이하게 하는 데 적합한 신규한 안티센스 화합물 및 조성물에 관한 것이다. 이는 또한 본 발명의 방법에 사용하기에 적합화된 신규한 안티센스 조성물을 사용하여 엑손 스킵핑을 유도하는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0005] 안티센스 기술은 다양한 상이한 수준 (전사, 스플라이싱, 안정화, 번역)에서 유전자 발현에 영향을 주는 다양한 화학을 사용하여 개발되고 있다. 많은 그 연구는 폭넓은 범위의 적응증에서 비정상적 또는 질환-연관된 유전자를 수정 또는 보정하기 위한 안티센스 화합물의 사용에 초점을 맞추었다. 안티센스 분자는 특이성을 갖는 유전자 발현을 억제할 수 있고, 이 때문에 유전자 발현의 조절제로서의 올리고뉴클레오티드에 관심을 갖는 많은 연구는 표적화된 유전자의 발현 또는 시스-작용 요소의 기능을 억제하는 데 초점을 맞추었다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 센스 가닥 (예를 들어, mRNA), 또는 일부 바이러스 RNA 표적의 경우 마이너스-가닥인 RNA에 대해 지정된다. 특이적 유전자 하류-조절의 바람직한 효과를 달성하기 위해, 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 표적화된 mRNA의 붕괴를 촉진하거나, mRNA의 번역을 차단하거나, 시스-작용 RNA 요소의 기능을 차단함으로써, 표적 단백질의 신생 합성 또는 바이러스 RNA의 복제를 효과적으로 방지한다.

[0006] 그러나, 이러한 기술은 넨센스 또는 프레임-이동 돌연변이와 같이 목적이 천연 단백질의 생산을 상향-조절하거나, 번역의 미성숙 종결을 유도하는 돌연변이를 보정하기 위한 것일 경우에는 유용하지 않다. 이들 경우에, 결

합성 유전자 전사체는 표적화된 분해 또는 입체적 억제를 겪지 않아야 하며, 따라서 안티센스 올리고뉴클레오티드 화학은 표적 mRNA 붕괴를 촉진하거나 번역을 차단하지 않아야 한다.

[0007] 다양한 유전적 질환에서, 유전자의 궁극적인 발현에 대한 돌연변이의 효과는 스플라이싱 프로세스 동안 표적화된 엑손 스킵핑의 프로세스를 통해 조절될 수 있다. 스플라이싱 프로세스는 프리-mRNA(pre-mRNA)에서의 인접한 엑손-인트론 접합이 매우 근접하게 하고, 인트론의 말단에서 포스포디에스테르 결합의 절단과, 함께 스플라이싱 되는 엑손 사이에서 그들의 후속 변형을 수행하는 복잡한 다중-성분 기구에 의해 감독된다. 이 복잡하고 매우 정확한 프로세스는 이어서 스플라이싱 반응에 관련되는 다양한 핵 스플라이싱 인자가 결합하는, 상대적으로 짧고, 반-보존된 RNA 절편인 프리-mRNA에서의 서열 모티프에 의해 매개된다. 스플라이싱 기구가 프리-mRNA 프로세싱에 관련된 모티프를 판독하거나 인식하는 방식을 변화시킴으로써, 차등적으로 스플라이싱된 mRNA 분자를 생성할 수 있다. 그 메커니즘은 확인되지 않았지만, 이제는 대부분의 인간 유전자가 정상적인 유전자 발현 동안 선택적으로 스플라이싱된다는 것이 인지되었다. 베네트 등(Bennett et al.) (미국 특허 제6,210,892호)은 표적 RNA의 RNase H-매개된 절단을 유도하지 않는 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체를 사용한 야생형 세포 mRNA 프로세싱의 안티센스 조절을 기재하고 있다. 이는 막 스페닝 도메인을 코딩하는 엑손이 결합된 가용성 TNF 슈퍼패밀리 수용체의 생성을 위한 특이적 엑손이 결합된 선택적으로 스플라이싱된 mRNA를 생성할 수 있는 유용성을 발견하고 있다 (예를 들어, 문헌 [Sazani, Kole, et al. 2007]에 의해 기재된 바와 같음).

[0008] 정상적 기능성 단백질이 그 안의 돌연변이로 인해 미성숙하게 종결되는 경우, 안티센스 기술을 통해 일부 기능성 단백질 생성을 복원하는 수단은 스플라이싱 프로세스 동안 개입을 통해 가능한 것으로 나타났으며, 질환-유발 돌연변이와 연관된 엑손이 일부 유전자로부터 특이적으로 결실될 수 있을 경우, 천연 단백질의 유사한 생물학적 특성을 갖거나, 엑손과 된 돌연변이에 의해 유발되는 질환을 개선하는 충분한 생물학적 활성을 갖는 짧은 단백질 생성물이 때때로 생성될 수 있다 (예를 들어, 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). 콜 등(Kole et al.) (미국 특허 제5,627,274호; 제5,916,808호; 제5,976,879호; 및 제5,665,593호)은 표적화된 프리-mRNA의 붕괴를 촉진시키지 않는 변형된 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체를 사용한 비정상적 스플라이싱의 방지 방법을 개시하고 있다. 베네트 등 (미국 특허 제6,210,892호)은 표적 RNA의 RNase H-매개된 절단을 유도하지 않는 안티센스 올리고뉴클레오티드 유사체를 또한 사용한 야생형 세포 mRNA 프로세싱의 안티센스 조절을 기재하고 있다.

[0009] 표적화된 엑손 스킵핑의 프로세스는 많은 엑손 및 인트론이 있는 긴 유전자에서 특히 유용할 가능성이 있으며, 여기서 엑손의 유전적 구성에 중복이 있거나, 단백질이 하나 이상의 특정 엑손 없이 기능할 수 있다. 다양한 유전자에서의 돌연변이에 의해 유발되는 말단절단과 연관된 유전적 질환의 치료를 위한 유전자 프로세싱을 제지정하기 위한 노력은 (1) 스플라이싱 프로세스에 관련된 요소와 완전히 또는 부분적으로 중복되거나; 또는 (2) 그 요소에서 일어나는 특정 스플라이싱 반응을 정상적으로 매개할 스플라이싱 인자의 결합 및 기능을 방해하는 요소에 충분히 가까운 위치에서 프리-mRNA에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 사용에 초점을 맞추었다.

[0010] 뒤시엔느(Duchenne) 근육 이영양증 (DMD)은 단백질 디스트로핀의 발현의 결함에 의해 유발된다. 단백질을 코딩하는 유전자는 2백만개 초과 뉴클레오티드의 DNA에 걸쳐 퍼져 있는 79개의 엑손을 함유한다. 엑손의 리딩 프레임을 변화시키거나, 정지 코돈을 도입하거나, 프레임 엑손 또는 엑손들로부터의 전체의 제거 또는 하나 이상의 엑손의 복제를 특징으로 하는 임의의 엑손 돌연변이는 기능성 디스트로핀의 생성을 방해하여 DMD를 초래할 잠재성을 갖는다.

[0011] 근육 이영양증의 덜 심각한 형태인 베커(Becker) 근육 이영양증 (BMD)은 돌연변이, 전형적으로 하나 이상의 엑손의 결실이 전체 디스트로핀 전사체를 따라 올바른 리딩 프레임을 초래하여, mRNA의 단백질로의 번역이 미성숙하게 종결될 경우 일어나는 것으로 밝혀졌다. 돌연변이된 디스트로핀 프리-mRNA의 프로세싱에서 상류 및 하류 엑손의 결합이 유전자의 올바른 리딩 프레임을 유지하는 경우, 결과는 베커 표현형을 초래하는, 일부 활성을 보유하는 짧은 내부 결실을 갖는 단백질에 대한 mRNA 코딩이다.

[0012] 수년 동안, 디스트로핀 단백질의 리딩 프레임을 변경하지 않는 엑손 또는 엑손들의 결실은 BMD 표현형을 일으키는 반면, 프레임-이동을 유발하는 엑손 결실은 DMD를 일으키는 것으로 알려졌다 (Monaco, Bertelson et al. 1988). 일반적으로, 리딩 프레임을 변화시키고, 따라서 적절한 단백질 번역을 방해하는 점 돌연변이 및 엑손 결실을 포함하는 디스트로핀 돌연변이는 DMD를 초래한다. 또한, 일부 BMD 및 DMD 환자는 다중 엑손을 커버하는 엑손 결실을 가짐이 주목되어야 한다.

[0013] 안티센스 올리고리보뉴클레오티드를 사용한 돌연변이체 디스트로핀 프리-mRNA 스플라이싱의 조절은 시험관내 및

생체내 둘 다에서 보고되었다 (예를 들어, 문헌 [Matsuo, Masumura et al. 1991]; [Takeshima, Nishio et al. 1995]; [Prarono, Takeshima et al. 1996]; [Dunckley, Eperon et al. 1997]; [Dunckley, Manoharan et al. 1998]; [Errington, Mann et al. 2003] 참조).

[0014] mdx 마우스 모델에서 특이적 및 재생적 엑손 스킵의 첫번째 예는 윌튼 등(Wilton et al.)에 의해 보고되었다 (Wilton, Lloyd et al. 1999). 공여자 스플라이스 부위에 안티센스 분자를 지정함으로써, 배양된 세포의 처리 6시간 내에 일정하고 효과적인 엑손 23 스킵이 디스트로핀 mRNA에서 유도되었다. 윌튼 등은 또한 보다 긴 안티센스 올리고뉴클레오티드를 갖는 마우스 디스트로핀 프리-mRNA의 수용자 영역의 표적화를 기재하고 있다. 인트론 23 공여자 스플라이스 부위에서 지정된 제1 안티센스 올리고뉴클레오티드는 1차 배양된 근모세포에서 일정한 엑손 스킵을 유도한 반면, 이 화합물은 보다 높은 수준의 디스트로핀을 발현하는 불멸화 세포 배양물에서 훨씬 덜 효과적인 것으로 밝혀졌다. 그러나, 엄밀한 표적화 및 안티센스 올리고뉴클레오티드 설계로, 특이적 엑손 제거의 효율이 거의 한 자릿수로 증가되었다 (Mann, Honeyman et al. 2002).

[0015] 최근의 연구는 디스트로핀의 부재에 의해 영향을 받는 조직에서 최소의 역효과를 수반하는 지속성 디스트로핀 발현을 달성하는 도전을 다루기 시작했다. DMD를 갖는 4명의 환자에서 엑손 51 (PR0051)로 표적화된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 전경골근 내로의 근육내 주입은 임의의 임상적으로 명백한 역효과 없이 엑손 51의 특이적 스킵을 초래하였다 (Mann, Honeyman et al. 2002; van Deutekom, Janson et al. 2007). mdx 마우스에서 엑손 23으로 표적화된 세포-관통 펩티드에 접합된 안티센스 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (PPMO)의 전신적 전달을 살펴본 연구는 검출가능한 독성 없이 골격근 및 심근에서 높고 지속된 디스트로핀 단백질 생성을 산출하였다 (Jearawiriyapaisarn, Moulton et al. 2008; Wu, Moulton et al. 2008; Yin, Moulton et al. 2008).

[0016] DMD의 치료를 위한 스플라이스 스위칭 올리고뉴클레오티드 (SSO)의 안전성 및 효율을 시험하는 최근의 임상적 시도는 스플라이세오솜의 입체적 봉쇄에 의해 프리-mRNA의 선택적 스플라이싱을 유도하는 SSO 기술에 기초한다 (Cirak et al., 2011; Goemans et al., 2011; Kinali et al., 2009; van Deutekom et al., 2007).

[0017] 이들 성공에도 불구하고, DMD 치료적 적용을 위한 다중 디스트로핀 엑손에 표적화된 개선된 안티센스 올리고머 및 개선된 근육 전달 조성물 및 방법에 대한 필요가 남아있다.

발명의 내용

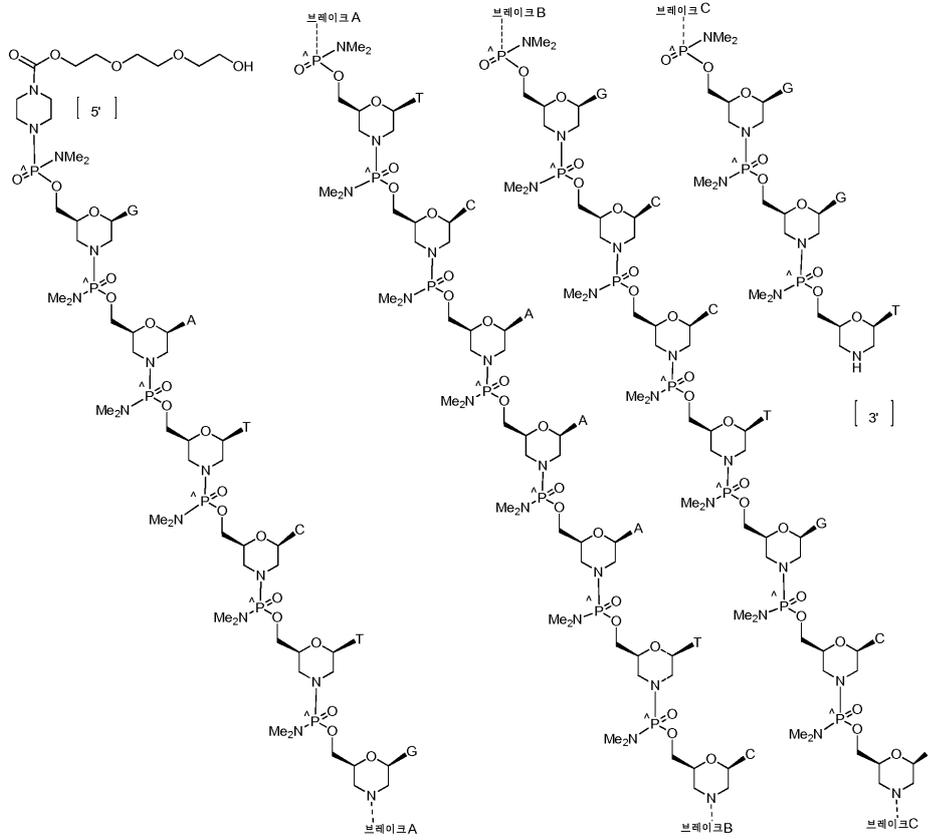
[0018] 한 측면에서, 본 발명은 인간 디스트로핀 유전자에서 선택된 표적에 결합하여 엑손 스킵을 유도할 수 있는 길이 20 내지 50개 뉴클레오티드의 안티센스 올리고머이며, 여기서 상기 안티센스 올리고머는 H44A(-07+15), H44A(-08+15), H44A(-06+15), H44A(-08+17), H44A(-07+17) 및 H44A(-06+17)로 이루어진 군으로부터 선택된 엑손 44 표적 영역에 특이적으로 혼성화하는 염기의 서열을 포함하고, 상기 올리고머의 염기는 모르폴리노 고리 구조에 연결되고, 상기 모르폴리노 고리 구조는 하나의 고리 구조의 모르폴리노 질소를 인접한 고리 구조의 5' 엑소시클릭 탄소에 결합시키는 인-함유 서브유닛간 연결에 의해 결합되는 것인 안티센스 올리고머를 제공한다. 한 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 1 및 4 내지 8로 이루어진 군으로부터 선택된 염기의 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 길이 약 20 내지 30개 뉴클레오티드 또는 길이 약 22 내지 28개 뉴클레오티드이다. 또 다른 실시양태에서, 서열은 서열 1 및 4 내지 8로부터 선택된 서열로 이루어진다. 한 실시양태에서, 본 발명은 RNase H를 활성화시키지 않는 안티센스 올리고머를 제공한다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 안티센스 올리고머의 활성화, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증진시키는 하나 이상의 모이어티 또는 접합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 분자에 화학적으로 연결되는 안티센스 올리고머를 제공한다. 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 아르기닌-풍부 펩티드, 예컨대 서열 24 내지 39로부터 선택된 서열에 접합된다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 디스트로핀 유전자에서 선택된 표적에 결합하여 엑손 스킵을 유도할 수 있는 길이 20 내지 50개 뉴클레오티드의 안티센스 올리고머이며, 여기서 상기 안티센스 올리고머는 H44A(-07+15), H44A(-08+15), H44A(-06+15), H44A(-08+17), H44A(-07+17) 및 H44A(-06+17)로 이루어진 군으로부터 선택된 엑손 44 표적 영역에 특이적으로 혼성화하는 염기의 서열을 포함하고, 상기 올리고머의 염기는 모르폴리노 고리 구조에 연결되고, 상기 모르폴리노 고리 구조는 하나의 고리 구조의 모르폴리노 질소를 인접한 고리 구조의 5' 엑소시클릭 탄소에 결합시키는 실질적으로 비하전된 인-함유 서브유닛간 연결에 의해 결합되는 것인 안티센스 올리고머를 제공한다. 한 실시양태에서, 안티센스 올리고머의 연결의 5% 내지 35%가 양으로 하전된다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머의 서브유닛간 연결은 비하전되고, 생리학적 pH에서 양으로 하전된 연결

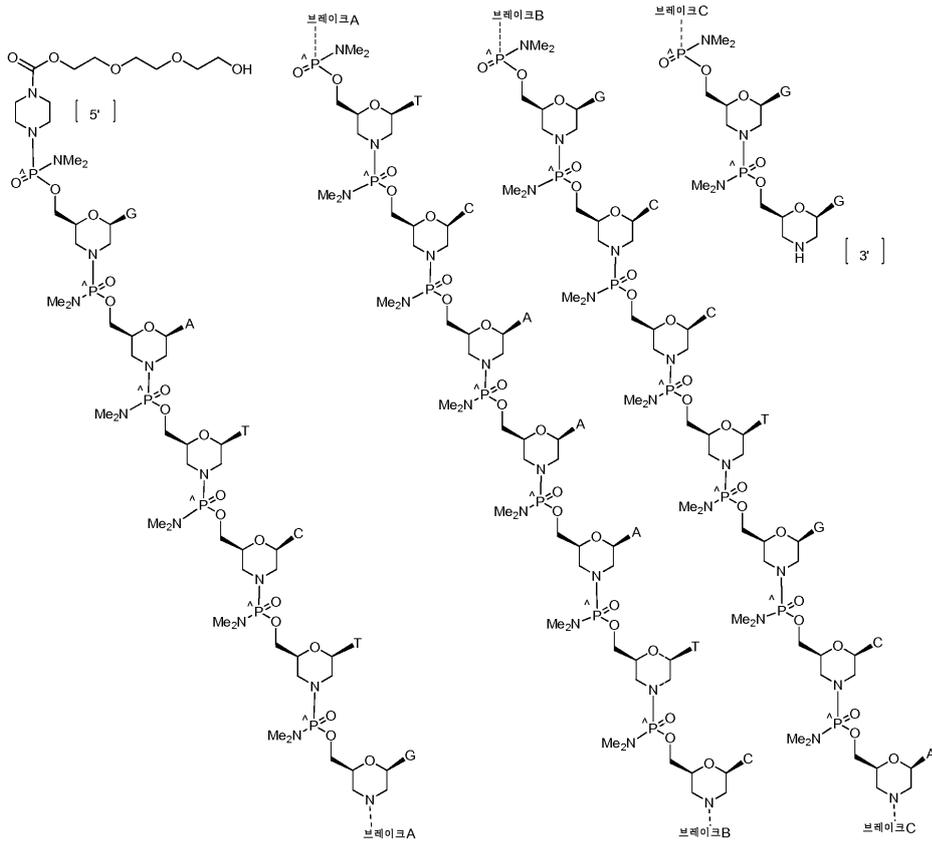
과 함께 배치되며, 양으로 하전된 연결의 총 수는 2 내지 연결의 총 수의 절반 이하이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 모르폴리노 고리 구조 및 포스포로디아미데이트 서브유닛간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 펜던트 양이온 기로 변형된다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본 발명은



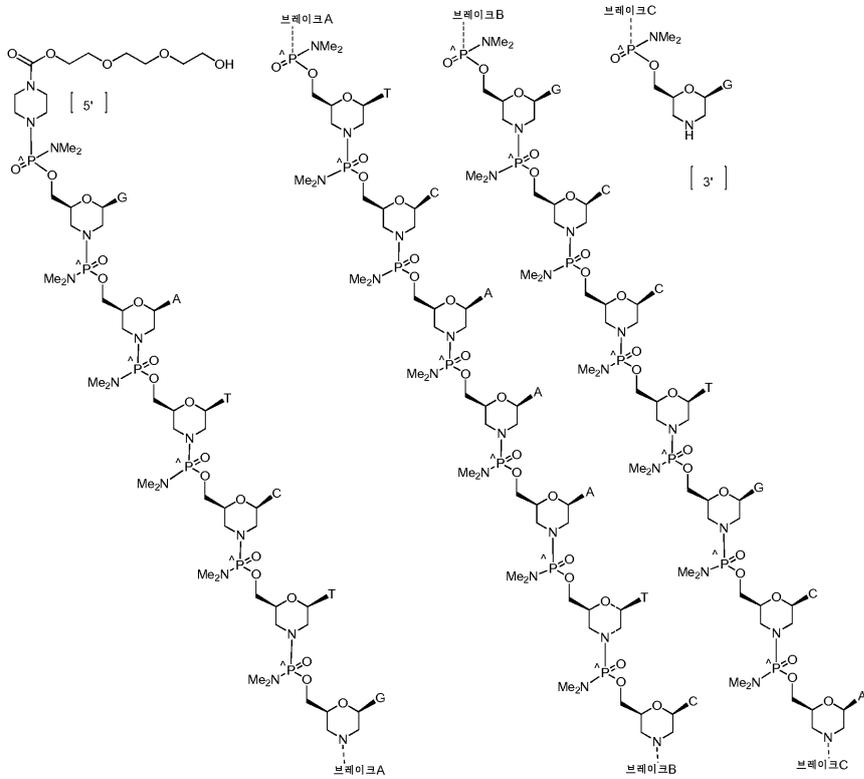
H44A(-8+15);

[0022]



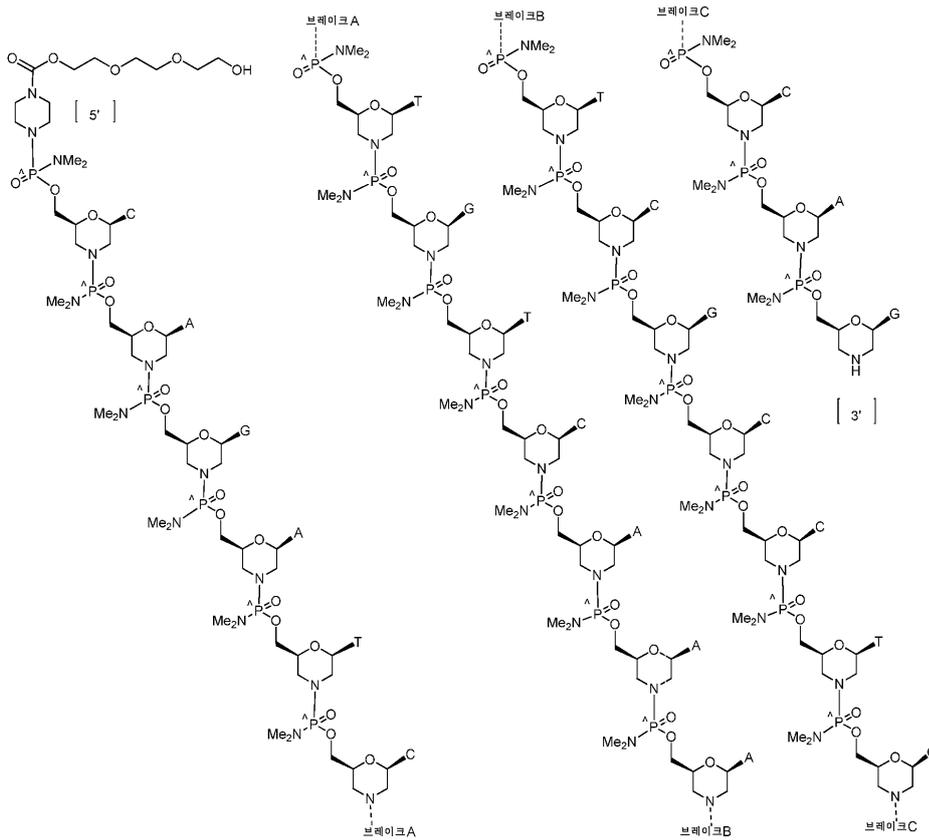
H44A(-7+15);

[0023]



H44A(-6+15);

[0024]

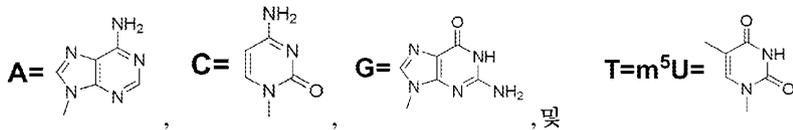


H44A(-6+17)

[0027]

[0028]

로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서



[0029]

이고,

[0030]

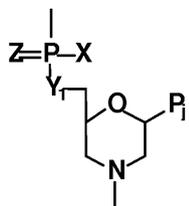
^ = 인 중심의 입체화학은 한정되지 않은 것인 안티센스 올리고머를 제공한다.

[0031]

일부 실시양태에서, 상기 구조에서 티민은 우라실로 치환될 수 있다.

[0032]

한 측면에서, 안티센스 화합물은 하나의 서브유닛의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유닛의 5' 엑소시클릭 탄소에 결합시키는 인-함유 서브유닛간 연결로 이루어지며, 연결은 구조



[0033]

[0034]

에 따른 포스포로디아미데이트 연결이다.

[0035]

여기서, $Y_1=0$, $Z=0$, P_j 는 염기-특이적 수소 결합에 의해 폴리뉴클레오티드의 염기에 결합하는 데 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기-쌍형성 모이어티이고, X는 알킬, 알콕시, 티오알콕시 또는 알킬 아미노이고, 예를 들어, $X=NR_2$, 여기서 각각의 R은 독립적으로 수소 또는 메틸이다. 비하전된 상기 서브유닛간 연결은 생리학적 pH에서 양으로 하전된 연결과 함께 배치될 수 있으며, 여기서 양으로 하전된 연결의 총 수는 1 내지 서브유닛간 연결의 총 수의 전부 이하이다.

[0036] 또 다른 예시적인 실시양태에서, 화합물은 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 제13/118,298호에 기재된 바와 같은 서브유닛간 연결 및 말단 변형으로 이루어진다.

[0037] 한 측면에 따라, 본 발명은 인간 디스트로핀 프리-mRNA에서 선택된 표적에 결합하여 엑손 스키피를 유도할 수 있는 안티센스 분자를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 함께 사용되어 단일 또는 다중 엑손 스키피를 유도하는 둘 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 예를 들어, 단일 또는 다중 엑손의 엑손 스키피는 둘 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드 분자를 함께 연결함으로써 달성될 수 있다.

[0038] 또 다른 측면에서, 본 발명은 엑손 44 스키피를 유도하는 어닐링 부위에 특이적으로 혼성화하는, H44A(-07+17), H44A(-07+20), H44A(-07+22), H44A(-8+15), H44A(-7+15), H44A(-6+15), H44A(-8+17), H44A(-6+17), H44A(+77+101), H44A(+64+91), H44A(+62+89), H44A(+62+85), H44A(-13+14), H44A(-14+15)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어닐링 부위로서 지정되는 디스트로핀 유전자의 엑손 44 표적 영역에 상보적인 적어도 10, 12, 15, 17, 20개 또는 그 초과인 연속적 뉴클레오티드를 포함하는, 길이 20 내지 50개 뉴클레오티드의 단리된 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 길이 25 내지 28개 뉴클레오티드이다.

[0039] 또 다른 측면에서, 본 발명은 디스트로핀 유전자의 엑손 44 표적 영역에 특이적으로 혼성화하여 엑손 44 스키피를 유도하는, 서열 1 내지 12, 46 및 47로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열의 적어도 10, 12, 15, 17, 20개 또는 그 초과인 뉴클레오티드를 포함하는, 길이 20 내지 50개 뉴클레오티드의 단리된 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 서열 1 내지 12, 46 및 47에서 티민 염기는 임의로 우라실이다.

[0040] 엑손 44에 표적화된 예시적인 안티센스 서열은 하기 확인된 것들을 들 수 있다.

- H44A(-07+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (서열 1)
- H44A(-07+20): 5'-CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (서열 2)
- H44A(-07+22): 5'-CTCAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (서열 3)
- H44A(-8+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT-3' (서열 4)
- H44A(-7+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (서열 5)
- H44A(-6+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAG-3' (서열 6)
- H44A(-8+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT-3' (서열 7)
- H44A(-6+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAG-3' (서열 8)
- H44A(+77+101): 5'-GTGCTTTCTGAGAACTGTTTCAGC-3' (서열 9)
- H44A(+64+91): 5'-GAGAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC-3' (서열 10)
- H44A(+62+89): 5'-GAAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG-3' (서열 11)
- H44A(+62+85): 5'-CTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG-3' (서열 12)
- H44A(-13+14): 5'-ATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAG-3' (서열 46)
- H44A(-14+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGC-3' (서열 47)

[0041]

[0042] 한 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 1과 같은 어닐링 부위 H44A(-07+17)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 2와 같은 어닐링 부위 H44A(-07+20)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 3과 같은 어닐링 부위 H44A(-07+22)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 4와 같은 어닐링 부위 H44A(-8+15)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 5와 같은 어닐링 부위 H44A(-7+15)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 6과 같은 어닐링 부위 H44A(-6+15)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 7과 같은 어닐링 부위 H44A(-8+17)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 8과 같은 어닐링 부위 H44A(-6+17)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 9와 같은 어닐링 부위 H44A(+77+101)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 10과 같은 어닐링 부위 H44A(+64+91)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 11과 같은 어

닐링 부위 H44A(+62+89)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 12와 같은 어닐링 부위 H44A(+62+85)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 46과 같은 어닐링 부위 H44A(-13+14)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 47과 같은 어닐링 부위 H44A(-14+15)에 특이적으로 혼성화한다.

[0043] 일부 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 RNase H에 의한 절단을 최소화 또는 방지하기 위한 하나 이상의 변형을 함유한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 RNase H를 활성화시키지 않는다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 비-천연 골격을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 골격의 당 모이어티는 모르폴리노와 같은 비-천연 모이어티로 대체된다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 변형된 포스페이트와 같은 비-천연 뉴클레오티드간 연결로 대체되는 올리고뉴클레오티드 골격의 뉴클레오티드간 연결을 갖는다. 예시적인 변형된 포스페이트로는 메틸 포스포네이트, 메틸 포스포로티오에이트, 포스포모르폴리데이트, 포스포로피페라지데이트 및 포스포로아미데이트를 들 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 2'-O-메틸-올리고리보뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산이다.

[0044] 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 염기 변형 또는 치환을 함유한다. 예를 들어, 특정 핵-염기는 본원에 기재된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 결합 친화성을 증가시키기 위해 선택될 수 있다. 이들의 예로는 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실, 5-프로피닐시토신 및 2,6-디아미노퓨린을 포함하는, 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린을 들 수 있다. 5-메틸시토신 치환은 0.6 내지 1.2 °C로 핵산 이중가닥 안정성을 증가시키는 것으로 나타났으며, 본원에 기재된 안티센스 올리고뉴클레오티드 내로 혼입될 수 있다. 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 하나의 피리미딘 염기는 5-치환된 피리미딘 염기를 포함하며, 여기서 피리미딘 염기는 시토신, 티민 및 우라실로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 5-치환된 피리미딘 염기는 5-메틸시토신이다. 또 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 하나의 퓨린 염기는 N-2, N-6 치환된 퓨린 염기를 포함한다. 한 실시양태에서, N-2, N-6 치환된 퓨린 염기는 2,6-디아미노퓨린이다.

[0045] 한 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 단독으로 또는 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 같은 또 다른 변형과 조합으로 하나 이상의 5-메틸시토신 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 단독으로 또는 또 다른 변형과 조합으로 하나 이상의 2,6-디아미노퓨린 치환을 포함한다.

[0046] 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 활성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증진시키는 하나 이상의 모이어티, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 모이어티, 또는 접합체, 예컨대 아르기닌-풍부 세포 관통 펩티드 (예를 들어, 서열 24 내지 39)에 화학적으로 연결된다. 한 예시적 실시양태에서, 아르기닌-풍부 폴리펩티드는 그의 N-말단 또는 C-말단 잔기에서 안티센스 화합물의 3' 또는 5' 말단에 공유적으로 커플링된다. 또한 예시적 실시양태에서, 안티센스 화합물은 모르폴리노 서브유닛 및 하나의 서브유닛의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유닛의 5' 엑소시클릭 탄소에 결합시키는 인-함유 서브유닛간 연결로 이루어진다.

[0047] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 안티센스 올리고뉴클레오티드, 예를 들어 서열 1 내지 12, 46 및 47의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 혼입하는 발현 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 변형된 레트로바이러스 또는 비-레트로바이러스 벡터, 예컨대 아데노-연관 바이러스 벡터이다.

[0048] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 포스페이트 완충액을 포함하는 염수 용액을 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0049] 또 다른 측면에서, 본 발명은 환자에게 전달하는 데 적합한 형태로 적어도 안티센스 분자를 포함하는 유전적 장애의 예방적 또는 치유적 치료에 도움되도록 선택되고 적합화된 안티센스 분자를 제공한다.

[0050] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 본원에 기재된 방법에 따라 안티센스 분자를 선택하는 단계; 및 (b) 하기 치료를 필요로 하는 환자에게 분자를 투여하는 단계를 포함하는, 특정 단백질을 코딩하는 유전자에 돌연변이가 있고, 돌연변이의 영향이 엑손 스킵핑에 의해 제거될 수 있는 유전적 질환을 앓고 있는 환자의 치료 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 유전적 질환의 치료용 의약의 제조를 위한, 본 발명의 정제 및 단리된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 용도를 다룬다.

[0051] 또 다른 측면에서, 본 발명은 환자에게 그 환자에서의 특정 유전적 병변에 관련된 본 발명의 적절하게 설계된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 뒤시엔스 근육 이영양증을 특징으로 하는 상태의 치료 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 환자에게 유효량의 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 하나 이상

의 이들 생물학적 분자를 포함하는 제약 조성물을 투여함으로써, 뒤시엔느 근육 이영양증을 예방 또는 최소화하기 위한 환자의 예방적 치료 방법을 제공한다.

[0052] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 적합한 용기에 패키징된 본 발명의 적어도 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 그의 사용을 위한 설명서를 포함하는, 유전적 질환의 치료용 키트를 제공한다.

[0053] 이들 및 다른 목적 및 특징은 하기 본 발명의 상세한 설명을 도면과 함께 읽을 경우 보다 완전하게 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1a는 포스포로디아미테이트 연결을 갖는 예시적인 모르폴리노 올리고머 구조를 나타낸다.

도 1b는 본 발명의 실시양태에 따른 아르기닌-풍부 펩티드 및 안티센스 올리고머의 접합체를 나타낸다.

도 1c는 골격 연결이 하나 이상의 양으로 하전된 기를 함유하는 도 1b에서와 같은 접합체를 나타낸다.

도 1d 내지 1g는 d 내지 g로 지정된 예시적인 모르폴리노 올리고뉴클레오티드의 반복 서브유닛 절편을 나타낸다.

도 2a 내지 2b는 고체 상 합성을 위한 링커 및 올리고머 합성을 위한 고체 지지체의 제조를 위한 반응식을 나타낸다.

도 3 및 4는 배양된 인간 횡문근육종 세포에서 엑손 44 스킵핑을 유도하기 위한 예시적인 안티센스 올리고머의 상대적 활성을 나타내는 실험에 상응하는 그래프를 나타낸다. 지시된 올리고머로 처리된 횡문근육종 세포로부터 단리된 RNA를 엑손 44-특이적 네스팅된 RT-PCR 증폭, 그 후 겔 전기영동 및 밴드 강도 정량으로 처리한다. 데이터를 PCR에 의해 평가된 바와 같은 % 엑손 스킵핑, 즉 전장 PCR 생성물에 상대적인 엑손-스킵핑된 생성물의 밴드 강도로서 플롯팅한다. 도 3에서, H44A(-06+14), H44A(-06+20) 및 H44A(-09+17) (각각 서열 13, 19 및 20)은 공개된 올리고머이다. 도 4에서, H44A(+85+104), H44A(+59+85) 및 H44A(+65+90) (각각 서열 14, 21 및 23)은 공개된 올리고머이다.

도 5 및 6은 1차 인간 근모세포에서 엑손 44 스킵핑을 유도하기 위한 예시적인 안티센스 올리고머의 상대적 활성을 나타내는 실험에 상응하는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 본 발명의 실시양태는 일반적으로 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 스킵핑을 유도하도록 특이적으로 설계된 개선된 안티센스 화합물, 및 그의 사용 방법에 관한 것이다. 디스트로핀은 근육 기능에 필수적인 역할을 담당하며, 다양한 근육-관련 질환은 이 유전자의 돌연변이된 형태를 특징으로 한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 개선된 안티센스 화합물은 뒤시엔느 근육 이영양증 (DMD) 및 베커 근육 이영양증 (BMD)에서 발견되는 돌연변이된 디스트로핀 유전자와 같은 인간 디스트로핀 유전자의 돌연변이된 형태에서 엑손 스킵핑을 유도한다.

[0056] 돌연변이에 의해 유발되는 비정상적 mRNA 스플라이싱 사건으로 인해, 이들 돌연변이된 인간 디스트로핀 유전자는 근육 이영양증의 다양한 형태를 초래하는 상태인 결함성 디스트로핀 단백질을 발현하거나, 측정할 수 있는 디스트로핀을 전혀 발현하지 않는다. 이 상태를 해결하기 위해, 본 발명의 안티센스 화합물은 돌연변이된 인간 디스트로핀 유전자의 예비-프로세싱된 RNA의 선택된 영역에 혼성화하고, 그렇지 않다면 비정상적으로 스플라이싱되는 디스트로핀 mRNA에서 엑손 스킵핑 및 차등적 스플라이싱을 유도함으로써, 근육 세포가 기능성 디스트로핀 단백질을 코딩하는 mRNA 전사체를 생성하게 한다. 특정 실시양태에서, 생성된 디스트로핀 단백질은 반드시 디스트로핀의 "야생형" 형태일 필요는 없지만, 다소 디스트로핀의 말단절단된, 여전히 기능성 또는 반-기능성 형태이다.

[0057] 근육 세포에서 기능성 디스트로핀 단백질의 수준을 증가시킴으로써, 이들 및 관련된 실시양태는 비정상적 mRNA 스플라이싱에 기인한 결함성 디스트로핀 단백질의 발현을 특징으로 하는, 특히 DMD 및 BMD와 같은 근육 이영양증의 형태의 예방 및 치료에 유용할 수 있다. 본원에 기재된 특이적 올리고머는 또한 사용되는 다른 올리고머에 걸쳐 개선된 디스트로핀-엑손-특이적 표적화를 제공함으로써, 근육 이영양증의 관련 형태를 치료하는 대안적인 방법에 걸쳐 중요하고 실제적인 이점을 제공한다.

[0058] 한 측면에서, 본 발명은 인간 디스트로핀 유전자에서 선택된 표적에 결합하여 엑손 스킵핑을 유도할 수 있는 길

이 20 내지 50개 뉴클레오티드의 안티센스 올리고머이며, 여기서 상기 안티센스 올리고머는 H44A(-07+15), H44A(-08+15), H44A(-06+15), H44A(-08+17), H44A(-07+17) 및 H44A(-06+17)로 이루어진 군으로부터 선택된 엑손 44 표적 영역에 특이적으로 혼성화하는 염기의 서열을 포함하고, 상기 올리고머의 염기는 모르폴리노 고리 구조에 연결되고, 상기 모르폴리노 고리 구조는 하나의 고리 구조의 모르폴리노 질소를 인접한 고리 구조의 5' 엑소시클릭 탄소에 결합시키는 인-함유 서브유닛간 연결에 의해 결합되는 것인 안티센스 올리고머를 제공한다. 한 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 서열 1 및 4 내지 8로 이루어진 군으로부터 선택된 염기의 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 길이 약 20 내지 30개 뉴클레오티드 또는 길이 약 22 내지 28개 뉴클레오티드이다. 또 다른 실시양태에서, 서열은 서열 1 및 4 내지 8로부터 선택된 서열로 이루어진다. 한 실시양태에서, 본 발명은 RNase H를 활성화시키지 않는 안티센스 올리고머를 제공한다.

[0059] 또 다른 측면에서, 본 발명은 안티센스 올리고머의 활성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증진시키는 하나 이상의 모이어티 또는 접합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 분자에 화학적으로 연결된 안티센스 올리고머를 제공한다. 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 아르기닌-풍부 펩티드, 예컨대 서열 24 내지 39로부터 선택된 서열에 접합된다.

[0060] 또 다른 측면에서, 본 발명은 선택된 표적에 결합하여 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 스킵핑을 유도할 수 있는 길이 20 내지 50개 뉴클레오티드의 안티센스 올리고머이며, 여기서 상기 안티센스 올리고머는 H44A(-07+15), H44A(-08+15), H44A(-06+15), H44A(-08+17), H44A(-07+17) 및 H44A(-06+17)로 이루어진 군으로부터 선택된 엑손 44 표적 영역에 특이적으로 혼성화하는 염기의 서열을 포함하고, 상기 올리고머의 염기는 모르폴리노 고리 구조에 연결되고, 상기 모르폴리노 고리 구조는 하나의 고리 구조의 모르폴리노 질소를 인접한 고리 구조의 5' 엑소시클릭 탄소에 결합시키는 실질적으로 비하전된 인-함유 서브유닛간 연결에 의해 결합되는 것인 안티센스 올리고머를 제공한다. 한 실시양태에서, 안티센스 올리고머의 연결의 5% 내지 35%가 양으로 하전된다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고머의 서브유닛간 연결은 비하전되고, 생리학적 pH에서 양으로 하전된 연결과 함께 배치되며, 양으로 하전된 연결의 총 수가 2 내지 연결의 총 수의 절반 이하이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 모르폴리노 고리 구조 및 포스포포디아미데이트 서브유닛간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고머는 펜던트 양이온 기로 변형된다.

[0061] 또 다른 측면에서, 본 발명은 실시예 2 내지 7에 기재된 안티센스 올리고머를 제공한다. 일부 실시양태에서, 실시예 2 내지 7에 기재된 안티센스 올리고머에서 티민은 우라실로 치환될 수 있다.

[0062] 한 측면에서, 본 발명은 H44A(-07+17), H44A(-07+20), H44A(-07+22), H44A(-8+15), H44A(-7+15), H44A(-6+15), H44A(-8+17), H44A(-6+17), H44A(+77+101), H44A(+64+91), H44A(+62+89), H44A(+62+85), H44A(-13+14), H44A(-14+15)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어닐링 부위로서 지정되는 디스트로핀 유전자의 엑손 44 표적 영역에 상보적인 적어도 10, 12, 15, 17, 20개 또는 그 초과 연속적 뉴클레오티드를 포함하는, 길이 20 내지 50개 뉴클레오티드의 단리된 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 엑손 44 스킵핑을 유도하는 어닐링 부위에 특이적으로 혼성화한다.

[0063] 본 발명의 다른 안티센스 올리고뉴클레오티드는 길이 20 내지 50개 뉴클레오티드이며, 서열 1 내지 12, 46 및 47의 적어도 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25개 또는 그 초과 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 1 내지 12, 46 및 47에서 티민 염기는 임의로 우라실이다.

[0064] 본 발명의 예시적인 안티센스 올리고머는 하기 설명된 것이다.

- H44A(-07+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (서열 1)
- H44A(-07+20): 5'-CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (서열 2)
- H44A(-07+22): 5'-CTCAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (서열 3)
- H44A(-8+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (서열 4)
- H44A(-7+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (서열 5)
- H44A(-6+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAG-3' (서열 6)
- H44A(-8+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (서열 7)
- H44A(-6+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAG-3' (서열 8)
- H44A(+77+101): 5'-GTGTCTTCTGAGAACTGTTTCAGC-3' (서열 9)
- H44A(+64+91): 5'-GAGAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC-3' (서열 10)
- H44A(+62+89): 5'-GAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG-3' (서열 11)
- H44A(+62+85): 5'-CTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG-3' (서열 12)
- H44A(-13+14): 5'-ATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAG-3' (서열 46)
- H44A(-14+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAG-3' (서열 47)

[0065]

[0066] 한 실시양태에서, 서열 1과 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(-07+17)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 2와 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(-07+20)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 3과 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(-07+22)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 4와 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(-8+15)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 5와 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(-7+15)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 6과 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(-6+15)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 7과 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(-8+17)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 8과 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(-6+17)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 9와 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(+77+101)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 10과 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(+64+91)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 11과 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(+62+89)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 12와 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(+62+85)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 46과 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(-13+14)에 특이적으로 혼성화한다. 또 다른 실시양태에서, 서열 47과 같은 안티센스 올리고머는 어닐링 부위 H44A(-14+15)에 특이적으로 혼성화한다.

[0067] 달리 정의되지 않는다면, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질은 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있으며, 바람직한 방법 및 물질이 기재된다. 본 발명의 목적상, 하기 용어는 하기에 정의된다.

[0068] I. 정의

[0069] "약"은 참조 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 만큼 다른 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0070] 용어 "상보적" 및 "상보성"은 염기-쌍형성 규칙에 의해 관련된 폴리뉴클레오티드 (즉, 뉴클레오티드의 서열)를 지칭한다. 예를 들어, 서열 "T-G-A (5'-3') "는 서열 "T-C-A (5'-3') "에 대해 상보적이다. 상보성은 "부분적"일 수 있으며, 여기서 단지 핵산의 염기의 일부만이 염기 쌍형성 규칙에 따라 매칭된다. 또는, 핵산 사이에 "완전한" 또는 "전체적인" 상보성이 있을 수 있다. 핵산 가닥 사이의 상보성의 정도는 핵산 가닥 사이의 혼성화의 효율 및 강도에 유의한 효과를 갖는다. 완벽한 상보성이 때로 바람직한 반면, 일부 실시양태는 표적 RNA에 관해 하나 이상의, 그러나 바람직하게는 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 미스매치를 포함할 수 있다. 올리고머

내에 임의의 위치에서의 변이가 포함된다. 특정 실시양태에서, 올리고머의 말단 부근의 서열의 변이는 일반적으로 내부의 변이에 대해 바람직하며, 존재할 경우 전형적으로 5' 및/또는 3' 말단의 약 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 개 뉴클레오티드 내이다.

[0071] 용어 "세포 관통 펩티드" 및 "CPP"는 상호교환적으로 사용되며, 양이온 세포 관통 펩티드를 지칭하고, 또한 수송 펩티드, 담체 펩티드 또는 펩티드 도입 도메인으로도 불린다. 본원에 나타낸 바와 같은 펩티드는 주어진 세포 배양 집단의 세포의 100% 내에서 세포 관통을 유도하는 능력을 가지며, 전신 투여시 생체내에서 다중 조직 내에서 거대분자 전좌를 허용한다. 바람직한 CPP 실시양태는 하기에 추가로 기재된 바와 같은 아르기닌-풍부 펩티드이다.

[0072] 용어 "안티센스 올리고머" 및 "안티센스 화합물" 및 "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 상호교환적으로 사용되며, 염기-쌍형성 모이어티가 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍형성에 의해 핵산 (전형적으로 RNA)에서 표적 서열에 혼성화하여 표적 서열 내에서 핵산:올리고머 헤테로듀플렉스를 형성하는 것을 허용하는, 서브유닛간 연결에 의해 연결된 염기-쌍형성 모이어티를 각각 갖는 시클릭 서브유닛의 서열을 지칭한다. 시클릭 서브유닛은 리보스 또는 또 다른 펜토스 당 또는 바람직한 실시양태에서 모르폴리노 기 (하기 모르폴리노 올리고머의 설명 참조)에 기초한다. 올리고머는 표적 서열에 대해 정확하거나 근사한 서열 상보성을 가질 수 있으며, 올리고머의 말단 부근의 서열에서의 변이는 일반적으로 내부에서의 변이에 대해 바람직하다.

[0073] 이러한 안티센스 올리고머는 mRNA의 번역을 차단 또는 억제하도록 또는 천연 프리-mRNA 스플라이스 프로세싱을 억제하도록 설계될 수 있으며, 그것이 혼성화하는 표적 서열"에 대해 지정"되거나 그"에 대해 표적화"되는 것으로 언급될 수 있다. 표적 서열은 전형적으로 mRNA의 AUG 개시 코돈인 번역 억제 올리고머, 또는 예비-프로세싱된 mRNA의 스플라이스 부위인 스플라이스 억제 올리고머 (SSO)를 포함하는 영역이다. 스플라이스 부위에 대한 표적 서열은 예비프로세싱된 mRNA에서 정상적인 스플라이스 수용자 접합의 하류에 그의 5' 말단 1 내지 약 25개 염기쌍을 갖는 mRNA 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 표적 서열은 스플라이스 부위를 포함하거나, 엑손 코딩 서열 내에 전체적으로 함유되거나, 스플라이스 수용자 또는 공여자 부위에 걸쳐 있는 예비프로세싱된 mRNA의 임의의 영역이다. 올리고머는 보다 일반적으로 그것이 상기 기재된 방식으로 표적의 핵산에 대해 표적화될 경우, 생물학적으로 관련된 표적, 예컨대 단백질, 바이러스 또는 박테리아"에 대해 표적화"되는 것으로 언급된다.

[0074] 용어 "모르폴리노 올리고머" 또는 "PMO" (포스포라미데이트- 또는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머)는 (i) 구조가 1 내지 3개 원자 길이, 바람직하게는 2개 원자 길이, 및 바람직하게는 비하전된 또는 양이온성의, 하나의 서브유닛의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유닛의 5' 엑소시클릭 탄소에 결합시키는, 인-함유 연결에 의해 함께 연결되고, (ii) 각각의 모르폴리노 고리가 염기 특이적 수소 결합에 의해 폴리뉴클레오티드의 염기에 결합하는 데 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기-쌍형성 모이어티를 갖는 모르폴리노 서브유닛 구조로 이루어진 올리고뉴클레오티드 유사체를 지칭한다. 예를 들어, 바람직한 포스포로디아미데이트 연결 유형을 나타내는 도 1a의 구조를 참조한다. 용어 "모르폴리노 고리 구조"는 용어 "모르폴리노 서브유닛"과 상호교환적으로 사용될 수 있다. 결합 또는 활성을 방해하지 않는 한, 변이가 이 연결에 이루어질 수 있다. 예를 들어, 인에 부착된 산소는 황으로 치환될 수 있다 (티오포스포로디아미데이트). 5' 산소는 아미노 또는 저급 알킬 치환된 아미노로 치환될 수 있다. 인에 부착된 펜던트 질소는 비치환되거나, (임의로 치환된) 저급 알킬로 일치환 또는 이치환될 수 있다. 또한, 하기 양이온성 연결의 논의를 참조한다. 퓨린 또는 피리미딘 염기 쌍형성 모이어티는 전형적으로 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실, 티민 또는 이노신이다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조 및 결합 특징은 미국 특허 제5,698,685호, 제5,217,866호, 제5,142,047호, 제5,034,506호, 제5,166,315호, 제5,521,063호, 제5,506,337호, 제8,076,476호, 제8,299,206호 및 제7,943,762호 (양이온성 연결)에 상세화되어 있으며, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다. 변형된 서브유닛간 연결 및 말단 기는 PCT 출원 US2011/038459 및 공보 WO/2011/150408에 상세화되어 있으며, 이들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0075] "아미노산 서브유닛" 또는 "아미노산 잔기"는 α-아미노산 잔기 (-CO-CHR-NH-) 또는 β- 또는 다른 아미노산 잔기 (예를 들어, -CO-(CH₂)_nCHR-NH-)를 지칭할 수 있으며, 여기서 R은 (수소를 포함할 수 있는) 측쇄이고, n은 1 내지 6, 바람직하게는 1 내지 4이다.

[0076] 용어 "천연 발생 아미노산"은 자연에서 발견되는 단백질에 존재하는 아미노산을 지칭한다. 용어 "비-천연 아미노산"은 자연에서 발견되는 단백질에 존재하지 않는 아미노산을 지칭하며, 예로는 베타-알라닌 (β-Ala), 6-아미노헥산산 (Ahx) 및 6-아미노헵탄산을 들 수 있다.

[0077] 용어 "천연 발생 핵산"은 자연에서 발견되는 핵산을 지칭한다. 전형적으로, 천연 발생 핵산은 포스포디에스테르 연결에 의해 함께 접합된 뉴클레오티드의 중합체이다 (각각 퓨린 또는 피리미딘 핵염기 및 펜토스 당을 함유

함). 예시적인 천연 발생 핵산 분자로는 RNA 및 DNA를 들 수 있다. 용어 "비-천연 발생 핵산"은 자연에 존재하지 않는 핵산을 지칭한다. 예를 들어, 비-천연 발생 핵산은 하나 이상의 비-천연 염기, 당, 및/또는 서브유닛간 연결, 예를 들어 천연 발생 핵산 분자에서 발견되는 것에 관해 변형 또는 치환된 당, 염기, 및/또는 연결을 포함할 수 있다. 예시적인 변형은 본원에 기재된다. 일부 실시양태에서, 비-천연 발생 핵산은 하나 초과 유형의 변형, 예를 들어 당 및 염기 변형, 당 및 연결 변형, 염기 및 연결 변형, 또는 염기, 당 및 연결 변형을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 비-천연 발생 핵산 분자이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 비-천연 (예를 들어, 변형 또는 치환된) 염기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 비-천연 (예를 들어, 변형 또는 치환된) 당을 함유한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 비-천연 (예를 들어, 변형 또는 치환된) 서브유닛간 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 초과 유형의 변형 또는 치환, 예를 들어 비-천연 염기 및/또는 비-천연 당, 및/또는 비-천연 서브유닛간 연결을 함유한다. 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 천연 발생 핵산 분자의 화학적 조성을 가지며, 즉 안티센스 올리고뉴클레오티드는 변형 또는 치환된 염기, 당 또는 서브유닛간 연결을 포함하지 않는다. 화학적 조성과 무관하게, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 시험관내에서 합성되며, 생물학적 기원의 안티센스 조성물을 포함하지 않는다.

[0078] "엑손"은 예비-프로세싱된 (또는 전구체) RNA의 모든 부분이 스플라이싱에 의해 제거된 후의, 단백질을 코딩하는 핵산의 한정된 구획, 또는 RNA 분자의 성숙한 형태에서 나타나는 핵산 서열을 지칭한다. 성숙한 RNA 분자는 전령 RNA (mRNA) 또는 rRNA 또는 tRNA와 같은 비-코딩 RNA의 기능성 형태일 수 있다. 인간 디스트로핀 유전자는 약 79개의 엑손을 갖는다.

[0079] "인트론"은 단백질로 번역되지 않는 (유전자 내의) 핵산 영역을 지칭한다. 인트론은 전구체 mRNA (프리-mRNA)로 전사되고, 이어서 성숙한 RNA의 형성 동안 스플라이싱에 의해 제거되는 비-코딩 구획이다.

[0080] "유효량" 또는 "치료 유효량"은 바람직한 치료 효과를 생성하는 데 유효한 단일 용량으로서 또는 일련의 용량의 부분으로서 포유동물 대상체에 투여되는, 치료적 화합물, 예컨대 안티센스 올리고머의 양을 지칭한다. 안티센스 올리고머에 대해, 이 효과는 전형적으로 선택된 표적 서열의 번역 또는 자연적 스플라이스-프로세싱을 억제함으로써 초래된다.

[0081] "엑손 스킵핑"은 일반적으로 전체 엑손 또는 그의 부분이 주어진 예비-프로세싱된 RNA로부터 제거됨으로써, 단백질로 번역되는 성숙한 mRNA와 같은 성숙한 RNA에 존재하는 것으로부터 배제되는 프로세스를 지칭한다. 따라서, 그렇지 않다면 스킵핑된 엑손에 의해 코딩되는 단백질의 부분은 단백질의 발현된 형태에 존재하지 않으며, 전형적으로 여전히 기능성이지만 변경된 형태의 단백질을 생성한다. 특정 실시양태에서, 스킵핑되는 엑손은 인간 디스트로핀 유전자로부터의 비정상적 엑손이며, 이는 그렇지 않다면 비정상적 스플라이싱을 유발하는 그의 서열에 돌연변이 또는 다른 변경을 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, 스킵핑되는 엑손은 디스트로핀 유전자의 엑손 1 내지 79의 임의의 하나 이상이지만, 인간 디스트로핀 유전자의 엑손 44가 바람직하다.

[0082] "디스트로핀"은 막대-형상 세포질 단백질이며, 근육 섬유의 세포골격을 세포막을 통해 주위의 세포외 매트릭스에 연결하는 단백질 복합체의 필수적인 부분이다. 디스트로핀은 다중 기능성 도메인을 함유한다. 예를 들어, 디스트로핀은 약 아미노산 14 내지 240에서 액틴 결합 도메인 및 약 아미노산 253 내지 3040에서 중앙 막대 도메인을 함유한다. 이 큰 중앙 도메인은 약 109개 아미노산의 24개 스펙트린-유사 삼중-나선 요소에 의해 형성되며, 이는 알파-액티닌 및 스펙트린에 대해 상동성을 갖는다. 반복체는 전형적으로 4개의 프롤린-풍부 비-반복 절편에 의해 차단되며, 또한 힌지 영역으로 지칭된다. 반복체 15 및 16은 디스트로핀의 단백질분해성 절단을 위한 주요 부위를 제공하는 것으로 보이는 18 아미노산 스트레치에 의해 분리된다. 대부분의 반복체 사이의 서열 동일성은 10 내지 25% 범위이다. 하나의 반복체는 3개의 알파-이중나선: 1, 2 및 3을 함유한다. 알파-이중나선 1 및 3은 아마도 소수성 계면을 통해 코일화된-코일로서 상호작용하는 7개의 이중나선 턴에 의해 각각 형성된다. 알파-이중나선 2는 보다 복잡한 구조를 가지며, 글리신 또는 프롤린 잔기에 의해 분리되는 4 및 3개의 이중나선 턴의 절편에 의해 형성된다. 각각의 반복체는 2개의 엑손에 의해 코딩되며, 전형적으로 알파-이중나선 2의 제1 부분에서 아미노산 47 및 48 사이의 인트론에 의해 차단된다. 다른 인트론은 반복체에서 상이한 위치에서 발견되며, 통상적으로 이중나선-3에 걸쳐 산포된다. 디스트로핀은 또한 점균류 (딕티오스테일럼 디스코이데움(Dictyostelium discoideum)) 알파-액티닌의 C-말단 도메인에 대해 상동성을 나타내는 시스테인-풍부 절편 (즉, 280개 아미노산 중 15개 시스테인)을 포함하는, 약 아미노산 3080 내지 3360에 시스테인-풍부 도메인을 함유한다. 카르복시-말단 도메인은 약 아미노산 3361 내지 3685이다.

- [0083] 근육속막에서, 디스트로핀의 아미노-말단은 F-액틴에 결합하며, 카르복시-말단은 디스트로핀-연관 단백질 복합체 (DAPC)에 결합한다. DAPC는 디스트로글리칸, 사르코글리칸, 인테그린 및 카베올린을 포함하며, 임의의 이들 성분에서의 돌연변이는 상염색체적으로 유전되는 근육 이영양증을 유발한다. DAPC는 디스트로핀이 부재하는 경우 불안정화되며, 이는 감소된 수준의 막 단백질을 초래하고, 결국 진행성 섬유 손상 및 막 누출을 초래한다. 뒤시엔느 근육 이영양증 (DMD) 및 베커 근육 이영양증 (BMD)과 같은 다양한 형태의 근육 이영양증에서, 부정확한 스플라이싱을 초래하는 유전자 서열에서의 돌연변이에 주로 기인하여 근육 세포는 디스트로핀의 변경되고 기능적으로 결합성 형태를 생성하거나, 전혀 디스트로핀을 생성하지 않는다. 결합성 디스트로핀 단백질의 우세한 발현, 또는 디스트로핀 또는 디스트로핀-유사 단백질의 완전한 소실은 상기 주목된 바와 같이 근육 변성의 급속한 진행을 초래한다. 이와 관련하여, "결합성" 디스트로핀 단백질은 관련 기술분야에서 공지된 바와 같은 DMD 또는 BMD를 갖는 특정 대상체에서 생성되는 디스트로핀의 형태, 또는 검출가능한 디스트로핀의 부재를 특징으로 할 수 있다.
- [0084] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "기능" 및 "기능성" 등은 생물학적, 효소적 또는 치료적 기능을 지칭한다.
- [0085] "기능성" 디스트로핀 단백질은 일반적으로, 전형적으로 DMD 또는 BMD를 갖는 특정 대상체에 존재하는 디스트로핀 단백질의 변경된 또는 "결합성" 형태에 비하여, 그렇지 않다면 근육 이영양증의 특징인 근육 조직의 진행성 분해를 감소시키는 충분한 생물학적 활성을 갖는 디스트로핀 단백질을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 기능성 디스트로핀 단백질은 관련 기술분야에서 통상의 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 정수를 포함함)를 가질 수 있다. 한 예로서, 시험관내 근육 배양물에서 디스트로핀-관련된 활성은 근관 크기, 근원섬유 조직화 (또는 해체), 수축성 활성, 및 아세틸콜린 수용체의 자발적 클러스팅에 따라 측정될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Brown et al., Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999] 참조). 동물 모델은 또한 질환의 발병기전을 연구하기 위한 가치있는 자원이며, 디스트로핀-관련된 활성을 시험하기 위한 수단을 제공한다. DMD 연구에 가장 폭넓게 사용되는 동물 모델 중 2가지는 mdx 마우스 및 골든 리트리버 근육 이영양증 (GRMD) 개이며, 이들 둘 다는 디스트로핀 음성이다 (예를 들어, 문헌 [Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003] 참조). 이들 및 다른 동물 모델은 다양한 디스트로핀 단백질의 기능적 활성을 측정하는 데 사용될 수 있다. 디스트로핀의 말단절단된 형태, 예컨대 본 발명의 특정 엑손-스키핑 안티센스 화합물에 의해 생성되는 형태가 포함된다.
- [0086] "단리된"은 그의 천연 상태에서 정상적으로 이를 수반하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 의미한다. 예를 들어, 본원에 사용된 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 천연-발생 상태에서 그것에 플랭킹된 서열로부터 정제 또는 제거된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 단편에 정상적으로 인접한 서열로부터 제거된 DNA 단편을 지칭할 수 있다.
- [0087] 본원에 사용된 "충분한 길이"는 표적 디스트로핀 프리-mRNA에서 적어도 8개, 보다 전형적으로 8 내지 30개의 연속적 핵염기에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 충분한 길이의 안티센스는 표적 디스트로핀 프리-mRNA에서 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20개 또는 그 초과인 연속적 핵염기를 포함한다. 다른 실시양태에서, 충분한 길이의 안티센스는 표적 디스트로핀 프리-mRNA에서 적어도 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개의 연속적 핵염기를 포함한다. 충분한 길이의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 엑손 4에 특이적으로 혼성화할 수 있는 적어도 최소 수의 뉴클레오티드를 갖는다. 바람직하게는, 충분한 길이의 올리고뉴클레오티드는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 및 40개 또는 그 초과인 뉴클레오티드의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 길이 약 10 내지 약 50개 뉴클레오티드이다. 한 실시양태에서, 충분한 길이의 올리고뉴클레오티드는 길이 10 내지 약 30개 뉴클레오티드이다. 또 다른 실시양태에서, 충분한 길이의 올리고뉴클레오티드는 길이 15 내지 약 25개 뉴클레오티드이다. 또 다른 실시양태에서, 충분한 길이의 올리고뉴클레오티드는 길이 20 내지 30개, 또는 20 내지 50개 뉴클레오티드이다. 또 다른 실시양태에서, 충분한 길이의 올리고뉴클레오티드는 길이 22 내지 25개, 22 내지 28개, 24 내지 28개, 24 내지 29개, 25 내지 28개, 20 내지 30개, 또는 25 내지 30개 뉴클레오티드이다.
- [0088] "증진시키다" 또는 "증진시키는", 또는 "증가시키다" 또는 "증가시키는", 또는 "자극하다" 또는 "자극하는"은 일반적으로 안티센스 화합물이 없는 것 또는 대조군 화합물에 의해 유발되는 반응에 비하여, 세포 또는 대상체에서 보다 큰 생리학적 반응 (즉, 하류 효과)를 생성 또는 유발하는 것 또는 안티센스 화합물 또는 조성물의 능력을 지칭한다. 측정가능한 생리학적 반응은 관련 기술분야의 이해 및 본원의 기재로부터 명백한 다른 반응 중에서, 디스트로핀 단백질의 기능성 형태의 증가된 발현, 또는 근육 조직에서의 증가된 디스트로핀-관련된 생물

학적 활성을 포함할 수 있다. 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%로 근육 기능의 증가 또는 개선을 포함하는, 증가된 근육 기능이 또한 측정될 수 있다. 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 근육 섬유에서의 증가된 디스트로핀 발현을 포함하는, 기능성 디스트로핀을 발현하는 근육 섬유의 퍼센트가 또한 측정될 수 있다. 예를 들어, 섬유의 25 내지 30%가 디스트로핀을 발현할 경우, 근육 기능 개선의 약 40%가 일어날 수 있는 것으로 나타났다 (예를 들어, 문헌 [DelloRusso et al, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002] 참조). "증가된" 또는 "증진된" 양은 전형적으로 "통계학적으로 유의한" 양이며, 안티센스 화합물이 없는 것 (제제의 부재) 또는 대조군 화합물에 의해 생성되는 양의 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50배 또는 그 초과 (예를 들어, 500, 1000배) (그 사이 및 1 위의 모든 정수 및 소수점, 예를 들어 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등을 포함함)의 증가를 포함할 수 있다.

[0089] "감소시키다" 또는 "억제하다"는 일반적으로 진단 기술분야에서 통상적인 기술에 따라 측정된 바와 같은, 본원에 기재된 질환 또는 상태의 증상과 같은, 관련 생리학적 또는 세포적 반응을 "감소시키는" 본 발명의 하나 이상의 안티센스 화합물의 능력에 관한 것일 수 있다. 관련 생리학적 또는 세포적 반응 (생체내 또는 시험관내)은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이며, DMD 또는 BMD를 갖는 개체에서 발현되는 디스트로핀의 변경된 형태와 같은, 근육 이영양증의 증상 또는 병리의 감소, 또는 디스트로핀의 결함성 형태의 발현의 감소를 포함할 수 있다. 반응의 "감소"는 안티센스 화합물이 없는 것 또는 대조군 조성물에 의해 생성되는 반응에 비하여, 통계학적으로 유의할 수 있으며, 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 (그 사이의 모든 정수를 포함함)를 포함할 수 있다.

[0090] 또한, 본원에 기재된 바와 같은 서열 1 내지 12, 46 및 47 중 임의의 하나 이상을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 발현하는 벡터와 같은, 본 발명의 올리고머성 디스트로핀-표적화 서열을 발현할 수 있는 벡터 전달 시스템이 포함된다. "벡터" 또는 "핵산 구축물"은 예를 들어 폴리뉴클레오티드가 삽입 또는 클로닝될 수 있는 플라스미드, 박테리오파지, 효모 또는 바이러스로부터 유도된 폴리뉴클레오티드 분자, 바람직하게는 DNA 분자를 의미한다. 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 고유한 제한 부위를 함유하며, 그의 표적 세포 또는 조직 또는 전구 세포 또는 조직을 포함하는 한정된 숙주 세포에서 자율적 복제를 할 수 있거나, 클로닝된 서열이 재생가능하도록 한정된 숙주의 계통과 통합될 수 있다. 따라서, 벡터는 자율적으로 복제하는 벡터, 즉 염색체-외 실체로서 존재하는 벡터일 수 있으며, 그의 복제는 염색체 복제, 예를 들어 선형 또는 폐쇄된 원형 플라스미드, 염색체-외 요소, 미니-염색체, 또는 인공 염색체와는 독립적이다. 벡터는 자가-복제를 보증하기 위한 임의의 수단을 함유할 수 있다. 대안적으로, 벡터는 숙주 세포 내로 도입될 경우 계통 내로 통합되고 그것이 통합되는 염색체 (들)과 함께 복제되는 것일 수 있다.

[0091] 개체 (예를 들어, 포유동물, 예컨대 인간) 또는 세포의 "치료"는 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경하기 위한 시도에 사용되는 임의의 유형의 개입이다. 치료로는 제약 조성물의 투여를 들 수 있으나 이에 제한되지는 않으며, 병리학적 사건의 개시 또는 병인체와의 접촉에 대해 예방적으로 또는 후속으로 수행될 수 있다. 치료는 근육 이영양증의 특정 형태에서와 같이 디스트로핀 단백질과 관련된 질환 또는 상태의 증상 또는 병리에 대한 임의의 바람직한 효과를 포함하며, 예를 들어 치료되는 질환 또는 상태의 하나 이상의 측정가능한 마커에서의 최소의 변화 또는 개선을 포함할 수 있다. 또한, 치료되는 질환 또는 상태의 진행 속도를 감소시키거나, 그 질환 또는 상태의 발병을 지연시키거나, 그의 발병의 중증도를 감소시키는 데 관련될 수 있는 "예방적" 치료가 포함된다. "치료" 또는 "예방"은 반드시 질환 또는 상태, 또는 그의 관련된 증상의 완전한 박멸, 치유 또는 예방을 지시하지는 않는다.

[0092] 따라서, 본 발명의 하나 이상의 안티센스 올리고머 (예를 들어, 서열 1 내지 12, 46 및 47, 및 그의 변이체)를 그를 필요로 하는 대상체에게 임의로 제약 제제의 일부 또는 투여 형태로서 투여함으로써, 근육 이영양증, 예컨대 DMD 및 BMD를 치료하는 방법이 포함된다. 또한, 하나 이상의 안티센스 올리고머를 투여함으로써 대상체에서의 엑손-스키핑을 유도하는 방법이 포함되며, 여기서 엑손은 디스트로핀 유전자, 바람직하게는 인간 디스트로핀 유전자로부터의 엑손 44이다. 본원에 사용된 "대상체"는 DMD 또는 BMD, 또는 이들 상태와 관련된 임의의 증상 (예를 들어, 근섬유 소실)을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체와 같은, 본 발명의 안티센스 화합물로 치료될 수 있는 증상을 나타내거나 증상을 나타낼 위험이 있는 임의의 동물을 포함한다. 적합한 대상체 (환자)는 실험실 동물 (예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 기니아 피그), 농장 동물 및 가축 또는 애완동물 (예컨대 고양이 또는

개)을 포함한다. 비-인간 영장류 및 바람직하게는 인간 환자가 포함된다.

- [0093] "알킬" 또는 "알킬렌" 둘 다는 1 내지 18개의 탄소를 함유하는 포화 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 그 예로는 제한 없이 메틸, 에틸, 프로필, 이소-프로필, 부틸, 이소-부틸, tert-부틸, n-펜틸 및 n-헥실을 들 수 있다. 용어 "저급 알킬"은 1 내지 8개의 탄소를 함유하는 본원에 정의된 바와 같은 알킬기를 지칭한다.
- [0094] "알케닐"은 2 내지 18개의 탄소를 함유하며, 적어도 하나의 탄소 대 탄소 이중 결합을 포함하는 불포화 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 그 예로는 제한 없이 에테닐, 프로페닐, 이소-프로페닐, 부테닐, 이소-부테닐, tert-부테닐, n-펜테닐 및 n-헥세닐을 들 수 있다. 용어 "저급 알케닐"은 2 내지 8개의 탄소를 함유하는 본원에 정의된 바와 같은 알케닐기를 지칭한다.
- [0095] "알키닐"은 2 내지 18개의 탄소를 함유하며, 적어도 하나의 탄소 대 탄소 삼중 결합을 포함하는 불포화 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 그 예로는 제한 없이 에티닐, 프로피닐, 이소-프로피닐, 부티닐, 이소-부티닐, tert-부티닐, 펜티닐 및 헥시닐을 들 수 있다. 용어 "저급 알키닐"은 2 내지 8개의 탄소를 함유하는 본원에 정의된 바와 같은 알키닐기를 지칭한다.
- [0096] "시클로알킬"은 모노- 또는 폴리-시클릭 알킬 라디칼을 지칭한다. 그 예로는 제한 없이 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸 및 시클로옥틸을 들 수 있다.
- [0097] "아릴"은 하나 이상의 폐쇄된 고리(들)를 갖는 내지 18개의 탄소를 함유하는 시클릭 방향족 탄화수소 모이어티를 지칭한다. 그 예로는 제한 없이 페닐, 벤질, 나프틸, 안트라세닐, 페난트라세닐 및 비페닐을 들 수 있다.
- [0098] "아라킬"은 화학식 $RaRb$ 의 라디칼을 지칭하며, 여기서 Ra는 상기 정의된 바와 같은 알킬렌 쇠이고, Rb는 상기 정의된 바와 같은 하나 이상의 아릴 라디칼, 예를 들어 벤질, 디페닐메틸 등이다.
- [0099] "티오알콕시"는 화학식 $-SRc$ 의 라디칼을 지칭하며, 여기서 Rc는 본원에 정의된 바와 같은 알킬 라디칼이다. 용어 "저급 티오알콕시"는 1 내지 8개의 탄소를 함유하는 본원에 정의된 바와 같은 알콕시기를 지칭한다.
- [0100] "알콕시"는 화학식 $-ORd$ 의 라디칼을 지칭하며, 여기서 Rd는 본원에 정의된 바와 같은 알킬 라디칼이다. 용어 "저급 알콕시"는 1 내지 8개의 탄소를 함유하는 본원에 정의된 바와 같은 알콕시기를 지칭한다. 알콕시기의 예로는 제한 없이 메톡시 및 에톡시를 들 수 있다.
- [0101] "알콕시알킬"은 알콕시기로 치환된 알킬기를 지칭한다.
- [0102] "카르보닐"은 $C(=O)-$ 라디칼을 지칭한다.
- [0103] "구아니디닐"은 $H_2N(C=NH_2)-NH-$ 라디칼을 지칭한다.
- [0104] "아미디닐"은 $H_2N(C=NH_2)CH-$ 라디칼을 지칭한다.
- [0105] "아미노"는 NH_2 라디칼을 지칭한다.
- [0106] "알킬아미노"는 화학식 $-NHRd$ 또는 $-NRdRd$ 의 라디칼을 지칭하며, 여기서 각각의 Rd는 독립적으로 본원에 정의된 바와 같은 알킬 라디칼이다. 용어 "저급 알킬아미노"는 1 내지 8개의 탄소를 함유하는 본원에 정의된 바와 같은 알킬아미노기를 지칭한다.
- [0107] "헤테로사이클"은 포화, 불포화 또는 방향족이며, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하고, 여기서 질소 및 황 헤테로원자는 임의로 산화될 수 있고, 질소 헤테로원자는 임의로 4급화될 수 있는, 임의의 상기 헤테로사이클이 벤젠 고리에 융합된 비시클릭 고리를 포함하는, 5 내지 7원 모노시클릭, 또는 7 내지 10원 비시클릭 헤테로시클릭 고리를 의미한다. 헤테로사이클은 임의의 헤테로원자 또는 탄소 원자를 통해 부착될 수 있다. 헤테로사이클은 하기 정의되는 바와 같은 헤테로아릴을 포함한다. 따라서, 하기 열거된 헤테로아릴 외에, 헤테로사이클은 또한 모르폴리닐, 피롤리디노닐, 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페리지닐, 히단토이닐, 발레로락타밀, 옥시라닐, 옥세타닐, 테트라히드로푸라닐, 테트라히드로피라닐, 테트라히드로피리디닐, 테트라히드로티오페닐, 테트라히드로티오피라닐, 테트라히드로피리미디닐, 테트라히드로티오피라닐 등을 들 수 있다.
- [0108] "헤테로아릴"은 질소, 산소 및 황으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 갖고, 적어도 1개의 탄소 원자를 함유하고, 모노- 및 비시클릭 고리계 둘 다를 포함하는 5 내지 10원의 방향족 헤테로사이클 고리를

의미한다. 대표적인 헤테로아릴은 피리딜, 푸릴, 벤조푸라닐, 티오펜닐, 벤조티오펜닐, 퀴놀리닐, 피롤릴, 인돌릴, 옥사졸릴, 벤조사졸릴, 이머다졸릴, 벤즈이머다졸릴, 티아졸릴, 벤조티아졸릴, 이속사졸릴, 피라졸릴, 이소티아졸릴, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 트리아지닐, 신놀리닐, 프탈라지닐 및 퀴나졸리닐이다.

[0109] 용어 "임의로 치환된 알킬", "임의로 치환된 알케닐", "임의로 치환된 알콕시", "임의로 치환된 티오알콕시", "임의로 치환된 알킬 아미노", "임의로 치환된 저급 알킬", "임의로 치환된 저급 알케닐", "임의로 치환된 저급 알콕시", "임의로 치환된 저급 티오알콕시", "임의로 치환된 저급 알킬 아미노" 및 "임의로 치환된 헤테로시클릴"은 치환될 경우 적어도 하나의 수소 원자가 치환기로 대체되는 것을 의미한다. 옥소 치환기 (=O)의 경우, 2개의 수소 원자가 대체된다. 이와 관련하여, 치환기로는 중수소, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클, 임의로 치환된 시클로알킬, 옥소, 할로젠, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO2Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -S0mRx 및 -S0mNRxRy를 들 수 있으며, 여기서 m은 0, 1 또는 2이고, Rx 및 Ry는 동일하거나 상이하며, 독립적으로 수소, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클 또는 임의로 치환된 시클로알킬이고, 각각의 상기 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알케닐, 임의로 치환된 알키닐, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로사이클 및 임의로 치환된 시클로알킬 치환기는 하나 이상의 옥소, 할로젠, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO2Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -S0mRx 및 -S0mNRxRy로 더 치환될 수 있다.

[0110] 안티센스 분자 명명 시스템은 상이한 안티센스 분자 사이를 구별하기 위해 제안 및 반포되었다 (문헌 [Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654] 참조). 이 명명은 몇몇 약간 상이한 안티센스 분자를 시험할 경우에 특히 관련되게 되었으며, 하기 나타낸 바와 같이 모두 동일한 표적 영역에 지정된다:

[0111] H#A/D(x:y).

[0112] 첫번째 문자는 종 (예를 들어 H: 인간, M: 무린, C: 개)을 지정한다. "#"은 표적 디스트로핀 엑손 수를 지정한다. "A/D"는 각각 엑손의 시작과 끝에서의 수용자 또는 공여자 스플라이스 부위를 지시한다. (x y)는 "-" 또는 "+"가 각각 인트론 또는 엑손 서열을 지시하는 어닐링 배위자를 나타낸다. 예를 들어, A(-6+18)은 표적 엑손에 선행하는 인트론의 마지막 6개의 염기 및 표적 엑손의 첫번째 18개의 염기를 지시할 것이다. 가장 가까운 스플라이스 부위는 이들 배위자가 "A"에 선행되기 때문에 수용자일 것이다. 공여자 스플라이스 부위에서 어닐링 배위자의 기제는 D(+2-18)일 수 있으며, 여기서 마지막 2개의 엑손 염기 및 첫번째 18개의 인트론 염기는 안티센스 분자의 어닐링 부위에 상응한다. 전체적으로 엑손 어닐링 배위자는 그 엑손의 시작으로부터 65번째와 85번째 뉴클레오티드 사이의 부위인 A(+65+85)로 나타내어질 것이다.

[0113] **II. 안티센스 올리고뉴클레오티드**

[0114] 안티센스 분자(들)이 프리-mRNA 서열 내에서 엑손의 스플라이싱에 관련되는 뉴클레오티드 서열에 표적화될 경우, 엑손의 정상적인 스플라이싱이 억제되어, 스플라이싱 기구가 성숙한 mRNA로부터 전체 표적화된 엑손을 우회하는 것을 유발할 수 있다. 많은 유전자에서, 전체 엑손의 결실은 중요한 기능성 도메인의 소실 또는 리딩 프레임의 붕괴를 통해 비-기능성 단백질의 생성을 초래할 것이다. 그러나, 일부 단백질에서, 리딩 프레임의 붕괴 없이, 그리고 단백질의 생물학적 활성을 심각하게 변경시킴 없이, 단백질 내에서부터 하나 이상의 엑손을 결실시킴으로써 단백질을 짧게 할 수 있다. 전형적으로, 이러한 단백질은 구조적 역할을 갖고/거나, 그의 말단에 기능성 도메인을 갖는다. 뒤시엔느 근육 이영양증은 전형적으로 리딩 프레임을 붕괴시킴으로써, 기능성 디스트로핀 유전자 생성물의 합성을 방해하는 돌연변이로부터 일어난다. 돌연변이를 함유하는 디스트로핀 유전자의 영역의 엑손 스킵핑을 유도하는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 근육 세포가 기능성 디스트로핀 단백질을 코딩하는 성숙한 mRNA 전사체를 생성하도록 할 수 있다. 생성된 디스트로핀 단백질은 반드시 "야생형" 형태의 디스트로핀은 아니지만, 다소 말단절단되고, 여전히 기능성 또는 반-기능성 형태의 디스트로핀이다. 본 발명은 엑손 44에서 특이화된 디스트로핀 프리-mRNA 표적에 결합할 수 있고, 그 유전자의 프로세싱을 재-지정할 수 있는 안티센스 분자를 기재한다.

[0115] 특히, 본 발명은 H44A(-07+17), H44A(-07+20), H44A(-07+22), H44A(-8+15), H44A(-7+15), H44A(-6+15), H44A(-8+17), H44A(-6+17), H44A(+77+101), H44A(+64+91), H44A(+62+89), H44A(+62+85), H44A(-13+14), H44A(-14+15)로부터 선택되는 어닐링 부위로서 지정된 디스트로핀 유전자의 엑손 44 표적 영역에 상보적인 적어도 10, 12, 15, 17, 20개 또는 그 초과와 연속적 뉴클레오티드를 포함하는, 길이 20 내지 50개 뉴클레오티드의 단리된 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 엑손 44 스킵핑을 유도하는 어닐링 부위에 특이적으로 혼성화한다.

- [0116] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 표적 RNA는 각각의 분자에서 상응하는 위치의 충분한 수가 서로와 수소 결합할 수 있는 뉴클레오타이드에 의해 점유되어 올리고뉴클레오타이드와 표적 사이에 안정하고 특이적인 결합이 발생하는 경우 서로 상보적이다. 따라서, "특이적으로 혼성화가능한" 및 "상보적인"은 올리고뉴클레오타이드와 표적 사이에 안정하고 특이적인 결합이 발생하도록 충분한 정도의 상보성 또는 정확한 쌍형성을 지시하는 데 사용되는 용어이다. 안티센스 분자의 서열은 특이적으로 혼성화가능한 그의 표적 서열의 그것에 100% 상보적일 필요는 없음은 관련 기술분야에서 이해되어 있다. 안티센스 분자는 올리고뉴클레오타이드의 표적 분자에서의 결합이 표적 RNA의 정상적인 기능을 방해할 경우 특이적으로 혼성화가능하며, 특이적 결합이 바람직한 조건 하에서, 즉 생체 내 검정 또는 치료적 처치의 경우 생리학적 조건 하에서, 및 시험관내 검정의 경우 검정이 수행되는 조건 하에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 비-표적 서열에의 비-특이적 결합을 피하기 위한 충분한 정도의 상보성이 있다.
- [0117] 안티센스 분자의 길이는 프리-mRNA 분자 내에서 의도된 위치에 선택적으로 결합할 수 있는 한, 다양할 수 있다. 이러한 서열의 길이는 본원에 기재된 선택 절차에 따라 결정될 수 있다. 일반적으로, 안티센스 분자는 길이 약 10개 뉴클레오타이드 내지 길이 약 50개 뉴클레오타이드 이하일 것이다. 그러나, 이 범위 내의 임의의 길이의 뉴클레오타이드가 본 방법에 사용될 수 있음이 이해될 것이다. 바람직하게는, 안티센스 분자의 길이는 길이 10 내지 30개 뉴클레오타이드이다.
- [0118] 한 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 길이 20 내지 50개 뉴클레오타이드이며, 임의의 서열 1 내지 12, 46 및 47의 적어도 10, 12, 15, 17, 20개 또는 그 초과 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 1 내지 12, 46 및 47에서 티민 염기는 임의로 우라실이다.
- [0119] 엑손 결실은 짧아진 전사된 mRNA에서 리딩 프레임 이동을 초래하지 않아야 한다. 따라서, 3개의 엑손의 선형 서열에서 첫번째 엑손의 말단이 코돈에서 3개의 뉴클레오타이드 중 2개를 코딩하고, 다음 엑손이 결실될 경우, 선형 서열에서 세번째 엑손은 코돈에 대해 뉴클레오타이드 3염기를 완성할 수 있는 단일 뉴클레오타이드로 시작해야 한다. 세번째 엑손이 단일 뉴클레오타이드로 시작하지 않을 경우, 말단절단된 또는 비-기능성 단백질의 생성을 초래할 리딩 프레임 이동이 있을 것이다.
- [0120] 구조 단백질에서의 엑손의 말단에서 코돈 배열은 항상 코돈의 말단에서 파괴되지는 않을 수 있으며, 결과적으로 mRNA의 프레임-내 리딩을 보증하기 위해 프리-mRNA로부터 하나 초과 엑손을 결실시킬 필요가 있을 수 있다. 이러한 상황에서, 복수의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 각각이 결실되는 엑손에서 스플라이싱을 유도하는 것을 담당하는 상이한 영역에 대해 지정되는 본 발명의 방법에 의해 선택될 필요가 있을 수 있다.
- [0121] 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 천연 발생 핵산 분자의 화학적 조성을 가지며, 즉 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형 또는 치환된 염기, 당 또는 서브유닛간 연결을 포함하지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비-천연 발생 핵산 분자이다. 예를 들어, 비-천연 발생 핵산은 하나 이상의 비-천연 염기, 당 및/또는 서브유닛간 연결, 예를 들어 천연 발생 핵산 분자에서 발견되는 것에 관해 변형 또는 치환된 염기, 당 및/또는 연결을 포함할 수 있다. 예시적인 변형은 하기에 기재된다. 일부 실시양태에서, 비-천연 발생 핵산은 하나 초과 유형의 변형, 예를 들어 당 및 염기 변형, 당 및 연결 변형, 염기 및 연결 변형, 또는 염기, 당 및 연결 변형을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비-천연 (예를 들어, 변형 또는 치환된) 염기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비-천연 (예를 들어, 변형 또는 치환된) 당을 함유한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 비-천연 (예를 들어, 변형 또는 치환된) 서브유닛간 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 초과 유형의 변형 또는 치환, 예를 들어 비-천연 염기 및/또는 비-천연 당, 및/또는 비-천연 서브유닛간 연결을 함유한다.
- [0122] 안티센스 분자로의 이중가닥 형성 동안 프리-mRNA의 분해를 피하기 위해, 안티센스 분자는 내인성 RNase H에 의한 절단을 최소화 또는 방지하도록 적합화될 수 있다. 이 특성은 세포내 또는 RNase H를 함유하는 조 추출물에서 비메틸화된 올리고뉴클레오타이드로의 RNA의 처리가 프리-mRNA: 안티센스 올리고뉴클레오타이드 이중가닥의 분해를 초래할 때 매우 바람직하다. 이러한 분해를 우회하거나 유도하지 않을 수 있는 임의의 형태의 변형된 안티센스 분자는 본 방법에 사용될 수 있다. RNA로 이중가닥화된 경우 세포 RNase H에 의해 절단되지 않는 안티센스 분자의 예는 2'-O-메틸 유도체이다. 2'-O-메틸-올리고리보뉴클레오타이드는 세포 환경 및 동물 조직에서 매우 안정하며, RNA를 갖는 그의 이중가닥은 그의 리보- 또는 데옥시리보-대응물보다 높은 Tm 값을 갖는다. 2' 히드록시리보스 위치의 메틸화 및 포스포포티오에이트 골격의 혼입은 표면적으로 RNA와 유사하지만 뉴클레아제 분해에 훨씬 더 저항성인 분자를 생성하는 통상적인 전략이다.

[0123] RNase H를 활성화시키지 않는 안티센스 분자는 공지된 기술에 따라 제조될 수 있다 (예를 들어 미국 특허 제 5,149,797호 참조). 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 서열일 수 있는 이러한 안티센스 분자는 RNase H의 그의 일 원으로서의 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 이중가닥 분자에의 결합을 입체적으로 방해하거나 방지하는 임의의 구조적 변형을 단순히 함유하며, 여기서 구조적 변형은 이중가닥 형성을 실질적으로 방해 또는 방해하지 않는다. 이중가닥 형성에 관련된 올리고뉴클레오타이드의 부분은 그에 대한 RNase H 결합에 관련된 부분과 실질적으로 상이하며, RNase H를 활성화시키지 않는 많은 안티센스 분자가 이용가능하다. 예를 들어, 이러한 안티센스 분자는 적어도 하나, 또는 전부의 뉴클레오타이드-간 브리징 포스페이트 잔기가 변형된 포스페이트, 예컨대 메틸 포스포네이트, 메틸 포스포리오에이트, 포스포로모르폴리테이트, 포스포로피페라지테이트 및 포스포르아미테이트인 올리고뉴클레오타이드를 들 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드간 브리징 포스페이트 잔기의 하나 걸러 하나는 기재된 바와 같이 변형될 수 있다. 또 다른 비-제한적 예에서, 이러한 안티센스 분자는 적어도 하나, 또는 전부의 뉴클레오타이드가 2' 저급 알킬 모이어티 (예를 들어, C₁-C₄, 직쇄형 또는 분지형, 포화 또는 불포화 알킬, 예컨대 메틸, 에틸, 에테닐, 프로필, 1-프로페닐, 2-프로페닐 및 이소프로필)을 함유하는 분자이다. 예를 들어, 뉴클레오타이드의 하나 걸러 하나는 기재된 바와 같이 변형될 수 있다.

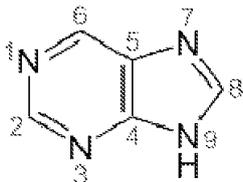
[0124] 본 발명에 유용한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 특징 예는 변형된 골격 또는 비-천연 서브유닛간 연결을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 변형된 골격을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 골격에 인 원자를 보유하는 것 및 골격에 인 원자를 갖지 않는 것을 포함한다. 그의 뉴클레오타이드간 골격에 인 원자를 갖지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드는 또한 올리고뉴클레오타이드로 간주될 수 있다.

[0125] 다른 안티센스 분자에서, 뉴클레오타이드 단위의 당 및 뉴클레오타이드간 연결, 즉 골격 둘 다는 신규한 기로 대체된다. 염기 단위는 적절한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 우수한 혼성화 특성을 갖는 것으로 나타난 올리고뉴클레오타이드 모방체인 하나의 이러한 올리고머성 화합물은 펩티드 핵산 (PNA)으로서 지칭된다. PNA 화합물에서, 올리고뉴클레오타이드의 당-골격은 아마이드 함유 골격, 특히 아미노에틸글리신 골격으로 대체된다. 핵-염기는 골격의 아마이드 부분의 아자 질소 원자에 직접적 또는 간접적으로 보유하고 결합된다.

[0126] 변형된 올리고뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다.

[0127] 올리고뉴클레오타이드는 또한 핵염기 (때로 관련 기술분야에서 간단히 "염기"로서 지칭됨) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 변형 또는 치환된 염기를 함유하는 올리고뉴클레오타이드는 핵산에서 가장 통상적으로 발견되는 하나 이상의 퓨린 또는 피리미딘 염기가 덜 통상적이거나 비-천연 염기로 대체된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0128] 퓨린 염기는 하기 화학식으로 기재되는 바와 같이 이미다졸 고리에 융합된 피리미딘 고리를 포함한다.

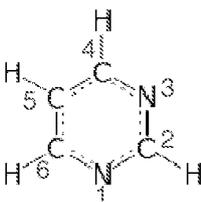


[0129]

[0130] 퓨린

[0131] 아데닌 및 구아닌은 핵산에서 가장 통상적으로 발견되는 2가지 퓨린 핵염기이다. 이들은 N⁶-메틸아데닌, N²-메틸구아닌, 히포크산틴 및 7-메틸구아닌을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 천연-발생 퓨린으로 치환될 수 있다.

[0132] 피리미딘 염기는 하기 화학식으로 기재되는 바와 같이 6원 피리미딘 고리를 포함한다.



[0133]

[0134] 피리미딘

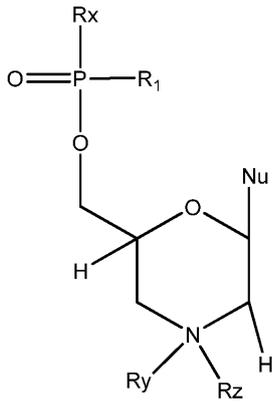
- [0135] 시토신, 우라실 및 티민은 핵산에서 가장 통상적으로 발견되는 피리미딘 염기이다. 이들은 5-메틸시토신, 5-히드록시메틸시토신, 슈도우라실 및 4-티오우라실을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 천연-발생 피리미딘으로 치환될 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드는 우라실 대신 티민 염기를 함유한다.
- [0136] 다른 변형 또는 치환된 염기의 예로는 2,6-디아미노퓨린, 오로트산, 아그마티딘, 리시딘, 2-티오피리미딘 (예를 들어 2-티오우라실, 2-티오티민), G-클램프 및 그의 유도체, 5-치환된 피리미딘 (예를 들어 5-할로우라실, 5-프로피닐우라실, 5-프로피닐시토신, 5-아미노메틸우라실, 5-히드록시메틸우라실, 5-아미노메틸시토신, 5-히드록시메틸시토신, 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 그의 유도체; N²-시클로펜틸구아닌 (cPent-G), N²-시클로펜틸-2-아미노퓨린 (cPent-AP), 및 N²-프로필-2-아미노퓨린 (Pr-AP), 슈도우라실 또는 그의 유도체; 및 2,6-디플루오로톨루엔과 같은 축중 또는 유니버설 염기 또는 무염기 부위와 같은 부재 염기 (예를 들어 1-데옥시리보스, 1,2-디데옥시리보스, 1-데옥시-2-O-메틸리보스; 또는 고리 산소가 질소로 대체된 피롤리딘 유도체 (아자리보스))를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 슈퍼 A, 슈퍼 G 및 슈퍼 T의 유도체의 예는 미국 특허 제6,683,173호 (에포치 바이오사이언시즈 (Epoch Biosciences))에서 발견될 수 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. cPent-G, cPent-AP 및 Pr-AP는 siRNA에 혼입될 경우 번역자극 효과를 감소시키는 것으로 나타났다 (Peacock H. et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200). 슈도우라실은 우리딘에서와 같이 규칙적인 N-글리코시드보다 C-글리코시드를 갖는, 우라실의 천연 발생 이성질체화된 형태이다. 슈도우리딘-함유 합성 mRNA는 우리딘-함유 mPvNA에 비하여 개선된 안전성 프로파일을 가질 수 있다 (WO 2009127230, 그 전문이 본원에 참조로 포함됨).
- [0137] 특정 변형 또는 치환된 핵-염기는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 결합 친화도를 증가시키는 데 특히 유용하다. 이들의 예로는 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함하는, 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린을 들 수 있다. 5-메틸시토신 치환체는 0.6 내지 1.2°C로 핵산 이중가닥 안정성을 증가시키며, 심지어 보다 특히 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합될 경우 본원에서 바람직한 염기 치환체이다.
- [0138] 일부 실시양태에서, 변형 또는 치환된 핵-염기는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 정제를 용이하게 하는 데 유용하다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 3개 이상 (예를 들어, 3, 4, 5, 6개 이상)의 연속적 구아닌 염기를 함유할 수 있다. 특정 안티센스 올리고뉴클레오티드에서, 3개 이상의 연속적 구아닌 염기의 스트링은 정제를 복잡하게 하는 올리고뉴클레오티드의 응집을 초래할 수 있다. 이러한 안티센스 올리고뉴클레오티드에서, 하나 이상의 연속적 구아닌은 이노신으로 치환될 수 있다. 3개 이상의 연속적 구아닌 염기의 스트링에서 하나 이상의 구아닌을 이노신으로 치환하는 것은 안티센스 올리고뉴클레오티드의 응집을 감소시킴으로써 정제를 용이하게 할 수 있다.
- [0139] 한 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 또 다른 변형은 올리고뉴클레오티드의 활성화, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증진시키는 하나 이상의 모이어티 또는 접합체를 올리고뉴클레오티드에 화학적으로 연결시키는 것을 포함한다. 이러한 모이어티로는 지질 모이어티, 예컨대 콜레스테롤 모이어티, 담즙산, 티오에테르, 예를 들어 핵실-5-트리틸티올, 티오콜레스테롤, 지방족 쇠, 예를 들어 도데칸디올 또는 운데실 잔기, 인지질, 예를 들어 디-핵사테실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-O-핵사테실-rac-글리세롤-3-H-포스포네이트, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 쇠, 또는 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 또는 옥타데실아민 또는 핵실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0140] 주어진 화합물에서 모든 위치는 균일하게 변형될 필요는 없으며, 사실 하나 초과와 상이언급된 변형은 단일 화합물에서 또는 심지어 올리고뉴클레오티드 내의 단일 뉴클레오시드에서 혼입될 수 있다. 본 발명은 또한 키메라 화합물인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명의 내용에서, "키메라" 안티센스 화합물 또는 "키메라"는 각각 적어도 하나의 단량체 단위로 이루어진 2개 이상의 화학적으로 분리된 영역, 즉 올리고뉴클레오티드 화합물의 경우 뉴클레오티드를 함유하는 안티센스 분자, 특히 올리고뉴클레오티드이다. 이들 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 올리고뉴클레오티드가 뉴클레아제 분해에 대해 증가된 저항성, 증가된 세포 흡수를 제공하도록 변형된 적어도 하나의 영역, 및 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화도를 위한 추가의 영역을 함유한다.
- [0141] 본 발명에 따라 사용되는 안티센스 분자는 고체 상 합성의 널리 공지된 기술을 통해 편리하고 통상적으로 제조될 수 있다. 이러한 합성의 장비는 예를 들어 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems) (캘리포니아주 포스터 시티 소재)를 포함하는 몇몇 판매자에 의해 판매된다. 변형된 고체 지지체 상에서 올리고뉴클레오티드

를 합성하는 하나의 방법은 미국 특허 제4,458,066호에 기재되어 있다.

- [0142] 관련 기술분야에서 공지된 이러한 합성을 위한 임의의 다른 수단이 추가적으로 또는 대안적으로 채용될 수 있다. 포스포로티오에이트 및 알킬화된 유도체와 같은 올리고뉴클레오티드를 제조하기 위해 유사한 기술을 사용하는 것은 널리 공지되어 있다. 하나의 이러한 자동화된 실시양태에서, 디에틸-포스포르아미데이트는 출발 물질로서 사용되며, 문헌 [Beaucage, et al., (1981) Tetrahedron Letters, 22:1859-1862]에 의해 기재된 바와 같이 합성될 수 있다.
- [0143] 본 발명의 안티센스 분자는 시험관내에서 합성되며, 생물학적 기원의 안티센스 조성물을 포함하지 않는다. 본 발명의 분자는 또한 흡수, 분포 및/또는 흡수를 보조하기 위해 다른 분자, 분자 구조물 또는 화합물의 혼합물, 예를 들어 리포솜, 수용체 표적화된 분자, 경구, 직장, 국소 또는 다른 제제와 혼합, 캡슐화, 접합 또는 다르게는 회합될 수 있다.
- [0144] **A. 모르폴리노 올리고머**
- [0145] 본 발명의 예시적인 실시양태는 도 1a 내지 1c에 도시된 인-함유 골격 연결을 갖는 모르폴리노 올리고머에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 한 측면에 따라 그의 골격 연결의 바람직하게는 10% 내지 50%에서 양으로 하전된 기를 함유하도록 변형된 도 1c에 나타난 바와 같은 포스포로디아미데이트-연결된 모르폴리노 올리고머가 제공된다. 안티센스 올리고머를 포함하는 비하전된 골격 연결을 갖는 모르폴리노 올리고머는 예를 들어 문헌 [Summerton and Weller 1997] 및 공유된 미국 특허 제5,698,685호, 제5,217,866호, 제5,142,047호, 제5,034,506호, 제5,166,315호, 제5,185,444호, 제5,521,063호, 제5,506,337호, 제8,076,476호, 제8,299,206호 및 제7,943,762호에 상세화되어 있으며, 이들 모두는 명확히 본원에 참조로 포함된다. 하전된 연결을 포함하는 변형된 연결을 갖는 모르폴리노 올리고머는 USSN: 13/118,298 (본원에 참조로 포함됨)에서 발견될 수 있다.
- [0146] 모르폴리노-기재 서브유닛의 중요한 특성으로는 1) 안정한 비하전된 또는 양으로 하전된 골격 연결에 의해 올리고머성 형태에 연결되는 능력; 2) 상대적으로 짧은 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 10 내지 15 염기)에서 약 45°C 위의 T_m 값인 표적 RNA를 포함하는 상보성-염기 표적 핵산과 형성된 중합체가 혼성화할 수 있도록 뉴클레오티드 염기 (예를 들어 아데닌, 시토신, 구아닌, 티미딘, 우라실 및 이노신)를 지지하는 능력; 3) 포유동물 세포 내로 능동적 또는 수동적으로 수송되는 올리고뉴클레오티드의 능력; 및 4) 각각 RNase 및 RNase H 분해를 저항하는 안티센스 올리고뉴클레오티드:RNA 헤테로듀플렉스의 능력을 들 수 있다.
- [0147] 청구된 대상의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 예시적인 골격 구조는 각각 비하전된 또는 양으로 하전된 인-함유 서브유닛 연결에 의해 연결되는 도 1d 내지 1g에 나타난 모르폴리노 서브유닛 유형을 포함한다. 도 1d는 5개의 원자 반복-단위 골격을 형성하는 인-함유 연결을 나타내며, 여기서 모르폴리노 고리는 1-원자 포스포아미드 연결에 의해 연결된다. 도 1e는 6-원자 반복-단위 골격을 생성하는 연결을 나타낸다. 이 구조에서, 5' 모르폴리노 탄소를 인 기에 연결하는 원자 Y는 황, 질소, 탄소 또는 바람직하게는 산소일 수 있다. 인으로부터의 X 모이어티 펜던트는 모르폴린 또는 피페리딘과 같은 시클릭 구조를 포함하는, 플루오린, 알킬 또는 치환된 알킬, 알콕시 또는 치환된 알콕시, 티오알콕시 또는 치환된 티오알콕시, 또는 비치환된, 1치환된 또는 2치환된 질소일 수 있다. 알킬, 알콕시 및 티오알콕시는 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자를 포함한다. Z 모이어티는 황 또는 산소이며, 바람직하게는 산소이다.
- [0148] 도 1f 및 1g에 나타난 연결은 7-원자 단위-길이 골격을 위해 설계된다. 구조 1f에서, X 모이어티는 구조 1e에서와 같으며, Y 모이어티는 메틸렌, 황, 또는 바람직하게는 산소일 수 있다. 구조 1g에서, X 및 Y 모이어티는 구조 1e에서와 같다. 특히 바람직한 모르폴리노 올리고뉴클레오티드로는 도 1e에 나타난 형태의 모르폴리노 서브유닛 구조로 이루어진 것을 들 수 있으며, 여기서 X=NH₂, N(CH₃)₂, 또는 1-피페라진 또는 다른 하전된 기이고, Y=O, 및 Z=O이다.
- [0149] 실질적으로 비하전된 올리고뉴클레오티드는 본 발명의 측면에 따라, 하전된 연결, 예를 들어 매 2 내지 5개의 비하전된 연결 당 약 1개 이하, 예컨대 매 10개의 비하전된 연결 당 약 4 내지 5개를 포함하도록 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 안티센스 활성의 최적 개선은 골격 연결의 약 25%가 양이온성일 경우 나타날 수 있다. 특정 실시양태에서, 소수, 예를 들어 10 내지 20% 양이온성 연결, 또는 양이온성 연결의 수가 50 내지 80% 범위, 예컨대 약 60%로 증진이 나타날 수 있다.
- [0150] 완전히 양이온성-연결된 올리고머를 포함하는 임의의 수의 양이온성 연결을 갖는 올리고머가 제공된다. 그러나, 바람직하게는 올리고머는 예를 들어 10% 내지 80%를 갖는 부분적으로 하전된 것이다. 바람직한 실시

양태에서, 약 10% 내지 60%, 바람직하게는 20% 내지 50%의 연결이 양이온성이다.

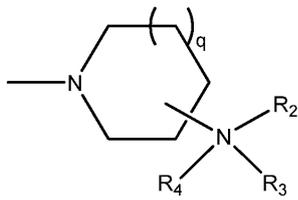
- [0151] 한 실시양태에서, 양이온성 연결은 골격을 따라 배치된다. 부분적으로 하전된 올리고머는 바람직하게는 적어도 2개의 연속적 비하전된 연결을 함유하며, 즉 올리고머는 바람직하게는 그의 전체 길이를 따라 엄밀하게 교대하는 패턴을 갖지 않는다.
- [0152] 또한, 양이온성 연결의 블록 및 비하전된 연결의 블록을 갖는 올리고머가 고려되며, 예를 들어 비하전된 연결의 중앙 블록은 양이온성 연결의 블록에 의해 플랭킹될 수 있거나, 반대로 마찬가지이다. 한 실시양태에서, 올리고머는 대략 동일-길이 5', 3' 및 중앙 영역을 가지며, 중앙 영역에서 양이온성 연결의 퍼센트는 약 50% 초과, 바람직하게는 약 70% 초과이다.
- [0153] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 혼합물 또는 비하전된 및 양이온성 골격 연결을 갖는 올리고뉴클레오티드의 합성에 관한 상기 및 하기에 인용된 참고문헌, 및 본원의 실시예에서 상세화된 방법을 채용하여, 단계적 교체-상 합성에 의해 제조될 수 있다. 일부의 경우, 예를 들어 약동학을 증진시키거나 화합물의 포획 또는 검출을 용이하게 하기 위해 추가의 화학적 모이어티를 안티센스 화합물에 첨가하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 모이어티는 표준 합성 방법에 따라 공유적으로 부착될 수 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 또는 다른 친수성 중합체, 예를 들어 1 내지 100개 단량체성 서브유닛을 갖는 것의 첨가가 가용성을 증진시키는 데 유용할 수 있다.
- [0154] 리포터 모이어티, 예컨대 플루오레세인 또는 방사성표지된 기는 검출의 목적으로 부착될 수 있다. 대안적으로, 올리고머에 부착된 리포터 표지는 표지된 항체 또는 스트렙타비딘을 결합할 수 있는 리간드, 예컨대 항원 또는 비오틴일 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 부착 또는 변형을 위한 모이어티를 선택하는 데 있어서, 일반적으로 물론 생체적합성이며 바람직하지 않은 부작용 없이 대상체에 의해 내성화될 가능성이 있는 거의 화학적 화합물을 선택하는 것이 바람직하다.
- [0155] 안티센스 적용에 사용하기 위한 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 길이 약 10 내지 약 50개 서브유닛, 보다 바람직하게는 약 10 내지 30개 서브유닛, 전형적으로 15 내지 25개 염기의 범위이다. 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오티드에 대한 유용한 길이인 19 내지 20개 서브유닛을 갖는 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 이상적으로 2 내지 10개, 예를 들어 4 내지 8개의 양이온성 연결 및 나머지 비하전된 연결을 가질 수 있다. 14 내지 15개 서브유닛을 갖는 올리고뉴클레오티드는 이상적으로 2 내지 7개, 예를 들어 3, 4 또는 5개의 양이온성 연결 및 나머지 비하전된 연결을 가질 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 25 내지 28개 서브유닛을 갖는다.
- [0156] 각각의 모노플리노 고리 구조는 염기 쌍형성 모이어티를 지지하여, 전형적으로 세포 또는 치료되는 대상체에서 선택된 안티센스 표적에 혼성화하도록 설계된 염기 쌍형성 모이어티의 서열을 형성한다. 염기 쌍형성 모이어티는 천연 DNA 또는 RNA에서 발견되는 퓨린 또는 피리미딘 (예를 들어, A, G, C, T 또는 U) 또는 유사체, 예컨대 히포크산틴 (뉴클레오시드 이노신의 염기 성분), 5-메틸 시토신, 2-6-디아미노퓨린 또는 관련 기술분야에서 공지된 및 하기 기재된 다른 변형된 염기일 수 있다.
- [0157] 상기 주목된 바와 같이, 특정 실시양태는 PMO-X 올리고머 및 변형된 말단 기를 갖는 것을 포함하는, 신규한 서브유닛간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 이들 올리고머는 상응하는 비변형된 올리고머가 하는 것보다 DNA 및 RNA에 대해 높은 친화성을 갖고, 다른 서브유닛간 연결을 갖는 올리고머에 비하여 개선된 세포 전달, 효능 및/또는 조직 분포 특성을 발휘한다. 다양한 연결 유형 및 올리고머의 구조적 특징 및 특성은 하기 논의에 보다 상세하게 기재된다. 이들 및 관련된 올리고머의 합성은 공유된 미국 출원 제13/118,298호에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 참고로 도입된다.
- [0158] 특정 실시양태에서, 본 발명은 인간 질환과 관련된 표적 서열에 상보적인 서열을 가지며, 하기 화학식의 뉴클레오티드의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 및 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.



[0159]

[0160] 여기서, Nu는 핵염기이고;

[0161] R₁은 화학식



[0162]

[0163] 을 갖고,

[0164] q는 0, 1 또는 2이고;

[0165] R₂는 수소, C₁-C₅ 알킬, C₁-C₅ 아랄킬 및 포름아미디닐기로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0166] R₃은 수소, C₁-C₁₀ 아실, C₁-C₁₀ 아미노아실, 천연 또는 비천연 알파 또는 베타 아미노산의 아실 모이어티, C₁-C₁₀ 아랄킬 및 C₁-C₁₀ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는

[0167] R₂ 및 R₃은 접합되어 5 내지 7원 고리를 형성하며, 여기서 고리는 C₁-C₁₀ 알킬, 페닐, 할로젠 및 C₁-C₁₀ 아랄킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기로 임의로 치환될 수 있고;

[0168] R₄는 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬 및 C₁-C₆ 아랄킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

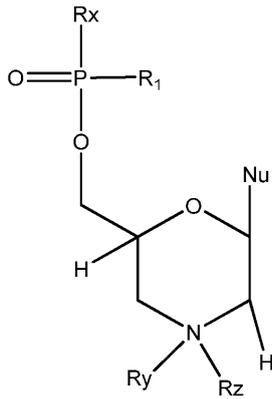
[0169] Rx는 사르코신아미드, 히드록실, 뉴클레오티드, 세포 관통 펩티드 모이어티 및 피페라지닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0170] Ry는 수소, C₁-C₆ 알킬, 뉴클레오티드, 세포 관통 펩티드 모이어티, 아미노산, 포름아미디닐기 및 C₁-C₆ 아실로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0171] Rz는 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬 및 C₁-C₆ 아실로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0172] Nu는 아데닌, 구아닌, 티민, 우라실, 시토신 및 히포크산틴으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 보다 바람직하게는, Nu는 티민 또는 우라실이다.

[0173] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식을 갖는 뉴클레오티드의 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 및 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.



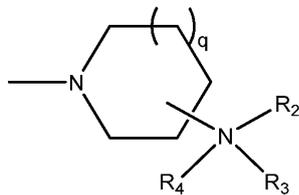
[0174]

[0175]

여기서, Nu는 핵염기이고;

[0176]

R₁은 R₁' 및 R₁"로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R₁'는 디메틸-아미노이고, R₁"는 화학식



[0177]

[0178]

을 갖고,

[0179]

여기서, 적어도 하나의 R₁은 R₁"이고;

[0180]

q는 0, 1 또는 2이되; 단, 적어도 하나의 R₁은 피페리디닐 모이어티이고;

[0181]

R₂는 수소, C₁-C₅ 알킬, C₁-C₅ 아랄킬 및 포름아미디닐기로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0182]

R₃은 수소, C₁-C₁₀ 아실, C₁-C₁₀ 아미노아실, 천연 또는 비천연 알과 또는 베타 아미노산의 아실 모이어티, C₁-C₁₀ 아랄킬 및 C₁-C₁₀ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는

[0183]

R₂ 및 R₃은 접합되어 5 내지 7원 고리를 형성하며, 여기서 고리는 C₁-C₁₀ 알킬, 페닐, 할로젠 및 C₁-C₁₀ 아랄킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기로 임의로 치환될 수 있고;

[0184]

R₄는 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬 및 아랄킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0185]

R_x는 사르코신아미드, 히드록실, 뉴클레오티드, 세포 관통 펩티드 모이어티 및 피페라지닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0186]

R_y는 수소, C₁-C₆ 알킬, 뉴클레오티드, 세포 관통 펩티드 모이어티, 아미노산, 포름아미디닐기 및 C₁-C₆ 아실로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0187]

R_z는 전자쌍, 수소, C₁-C₆ 알킬 및 C₁-C₆ 아실로 이루어진 군으로부터 선택된다.

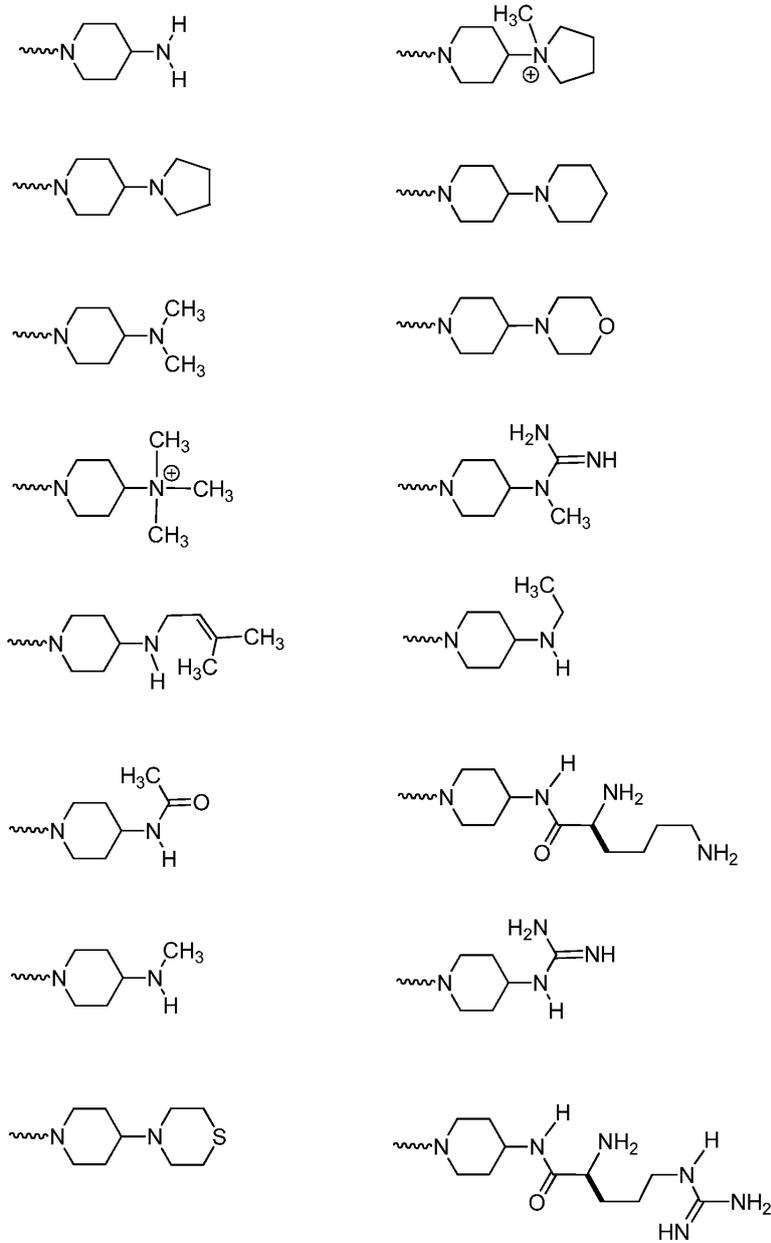
[0188]

Nu는 아데닌, 구아닌, 티민, 우라실, 시토신 및 히포크산틴으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 보다 바람직하게는, Nu는 티민 또는 우라실이다.

[0189]

R₁ 기의 약 90 내지 50%는 디메틸아미노 (즉, R₁')이다. 보다 바람직하게는, R₁ 기의 90 내지 50%는 디메틸아미노이다. 가장 바람직하게는, R₁ 기의 약 66%는 디메틸아미노이다.

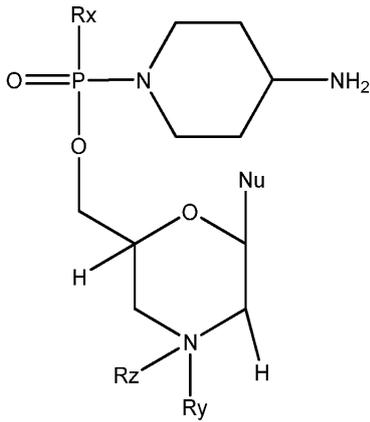
[0190] R₁"는



[0191]

[0192] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0193] 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 화학식



[0194]

[0195] 을 갖는다.

[0196] 여기서, Rx, Ry, Rz 및 Nu는 상기 언급된 바와 같다. 가장 바람직하게는, Nu는 티민 또는 우라실이다.

[0197] 티민 (T)은 상기 기재된 화학적 변형을 함유하는 바람직한 염기 쌍형성 모이어티 (Nu 또는 Pi)이지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 염기 서브유닛이 염기 쌍형성 모이어티로서 사용될 수 있다.

[0198] **B. 펩티드 수송체**

[0199] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 CPP에 접합된 올리고뉴클레오타이드 모이어티, 바람직하게는 세포 내로의 화합물의 수송을 증진시키는 데 효과적인 아르기닌-풍부 펩티드 수송 모이어티를 포함할 수 있다. 수송 모이어티는 바람직하게는 예를 들어 도 1b 및 1c에 나타난 바와 같이 올리고머의 말단에 부착된다. 펩티드는 주어진 세포 배양 집단의 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%의 세포 (그 사이의 모든 정수를 포함함) 내에서 세포 관통을 유도하는 능력을 가지며, 전신 투여시 생체내에서 다중 조직 내의 거대분자 전좌를 허용한다. 한 실시양태에서, 세포-관통 펩티드는 아르기닌-풍부 펩티드 수송체일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포-관통 펩티드는 페네트라틴 또는 Tat 펩티드일 수 있다. 이들 펩티드는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 미국 공보 제2010-0016215 A1호에 개시되어 있으며, 이는 그 전문이 참고로 도입된다. 펩티드의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로의 접합에 대한 특히 바람직한 접근은 PCT 공보 WO2012/150960에서 발견될 수 있으며, 이는 그 전문이 참고로 도입된다. 본 발명의 펩티드 접합된 올리고뉴클레오타이드의 바람직한 실시양태는 CPP와 안티센스 올리고뉴클레오타이드 사이의 링커로서 글리신을 이용한다. 예를 들어, 바람직한 펩티드 접합된 PMO는 R₆-G-PMO로 이루어진다.

[0200] 상기 기재된 바와 같은 수송 모이어티는 부착된 수송 모이어티의 부재 하에서의 올리고머의 흡수에 비해, 부착된 올리고머의 세포 유입을 크게 증진시키는 것으로 나타났다. 흡수는 바람직하게는 비접합된 화합물에 비해, 적어도 10배, 보다 바람직하게는 20배로 증진된다.

[0201] 아르기닌-풍부 펩티드 수송체 (즉, 세포-관통 펩티드)의 사용은 본 발명을 실시하는 데 특히 유용하다. 특정 펩티드 수송체는 근육 세포를 포함하는 1차 세포 내로의 안티센스 화합물의 전달에 매우 효과적인 것으로 나타났다. (Marshall, Oda et al. 2007; Jearawiriyapaisarn, Moulton et al. 2008; Wu, Moulton et al. 2008). 더욱이, 다른 공지된 펩티드 수송체, 예컨대 페네트라틴 및 Tat 펩티드에 비하여, 본원에 기재된 펩티드 수송체는 안티센스 PMO에 접합될 경우 몇몇 유전자 전사체의 스플라이싱을 변경하는 증진된 능력을 발휘한다 (Marshall, Oda et al. 2007). 모르폴리노-펩티드 수송체 접합체의 바람직한 실시양태는 WO/2012/150960에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 도입된다.

[0202] 링커를 제외한 예시적인 펩티드 수송체는 하기 표 1에 주어진다.

[0203] <표 1>

[0204] 예시적인 펩티드 수송체

명칭 (칭호)	서열	서열 번호 ^A
rTAT	RRRQRKKR	24
Tat	RKKRRQRRR	25
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFF	26
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR	27
R ₄	RRRR	28
R ₅	RRRRR	29
R ₆	RRRRR	30
R ₇	RRRRRR	31
R ₈	RRRRRRR	32
R ₉	RRRRRRRR	33
(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXRXR	34
(RAhxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	35
(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	36
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	37
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRRFF	38
(RGR) ₄ F ₂	RGRGRRRGRGRFF	39

[0205]

[0206] ^A서열 번호로 할당된 서열은 연결 부분을 포함하지 않는다 (예를 들어, C, G, P, Ahx, B, AhxB, 여기서 Ahx 및 B는 각각 6-아미노헵산산 및 베타-알라닌을 지칭한다).

[0207] C. 발현 벡터

[0208] 한 실시양태에서, 본 발명은 세포에서의 본원에 기재된 디스트로핀-표적화 서열의 발현을 위한 발현 벡터를 포함한다. 벡터 전달 시스템은 본 발명의 올리고머성 디스트로핀-표적화 서열을 발현할 수 있다. 한 실시양태에서, 이러한 벡터는 하나 이상의 서열 1 내지 12, 46 및 47의 적어도 10개의 연속적 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 발현한다. 또 다른 실시양태에서, 이러한 벡터는 하나 이상의 서열 1 내지 12, 46 및 47을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 발현한다. 유전자 전달에 적합한 발현 벡터는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 발현 벡터는 본원에 기재된 디스트로핀-표적화 서열을 발현하도록 변형될 수 있다. 예시적인 발현 벡터로는 예를 들어 폴리뉴클레오티드가 삽입 또는 클로닝될 수 있는 플라스미드, 박테리오파지, 효모 또는 바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 렌티바이러스 등)로부터 유래된 폴리뉴클레오티드 분자, 바람직하게는 DNA 분자를 들 수 있다. 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 고유한 제한 부위를 함유하며, 표적 세포 또는 조직 또는 전구 세포 또는 그의 조직을 포함하는 한정된 숙주 세포에서 자율적 복제가 가능할 수 있거나, 클로닝된 서열이 재생되도록 한정된 숙주의 게놈과 통합될 수 있다. 따라서, 벡터는 자율적으로 복제하는 벡터, 즉 염색체-외 실체로서 존재하는 벡터일 수 있으며, 그의 복제는 염색체 복제, 예를 들어 선형 또는 폐쇄된 원형 플라스미드, 염색체-외 요소, 미니-염색체 또는 인공 염색체와는 독립적이다. 벡터는 자가-복제를 보증하기 위한 임의의 수단을 함유할 수 있다. 대안적으로, 벡터는 숙주 세포 내로 도입될 경우 게놈 내로 통합되고, 그것이 통합되는 염색체(들)과 함께 복제되는 것일 수 있다.

[0209] 한 실시양태에서, 발현 벡터는 관심의 특정 세포 또는 조직 (예를 들어, 근육)에서 본원에 기재된 올리고머성 디스트로핀-표적화 서열의 발현을 촉진시키는, 조직-특이적 프로모터, 예를 들어 근육-특이적 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한다. 근육 세포에서의 발현에 적합한 프로모터 서열 및 발현 벡터는 예를 들어 US 2011/0212529 에 기재된 것을 들 수 있으며, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다. 예시적인 근육-특이적 프로모터로는 데스민 프로모터, 근육 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, Pitx3 프로모터, 골격 알파-액틴 프로모터 또는 트로포닌 I 프로모터를 들 수 있다. 근육-특이적 프로모터의 용도는 예를 들어 문헌 [Talbot et al., Molecular Therapy (2010), 18(3): 601-608]; [Wang et al., Gene Therapy (2008), 15(22): 1489-99]; 및 [Coulon et al., Journal of Biological Chemistry (2007), 282(45): 33192-33200]에 더 기재되어 있다.

[0210] III. 제제 및 투여의 방식

[0211] 특정 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 안티센스 올리고머의 치료적 전달에 적합한 제제 또는 조성물을 제공한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 (첨가제) 및/또는 희석제와 함께 제제화된, 치료학적-유효량의 하나 이상의 본원에 기재된 올리고머를 포함하는 제약상 허용되는 조성물을 제공한다. 본 발명의 올리고머는 단독으로 투여될 수 있지만, 화합물을 제약 제제 (조성물)로서 투여하는 것이 바람직하다.

- [0212] 핵산 분자의 전달을 위한 방법은 예를 들어 문헌 [Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139]; 및 [Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar]; 설리번 등(Sullivan et al.)의 PCT WO 94/02595에 기재되어 있다. 이들 및 다른 프로토콜은 본 발명의 단리된 올리고머를 포함하는, 사실상 임의의 핵산 분자의 전달에 이용될 수 있다.
- [0213] 하기에 상세화된 바와 같이, 본 발명의 제약 조성물은 하기에 적합화된 것들을 포함하여, 고체 또는 액체 형태로 투여하기 위해 특별히 제제화될 수 있다: (1) 경구 투여, 예를 들어 드렌치 (수성 또는 비-수성 용액 또는 현탁액), 정제, 예를 들어 혀로 투여하기 위한 협측, 실하, 및 전신 흡수, 불루스, 분말, 과립, 페이스트에 대해 표적화된 것; (2) 예를 들어 멸균 용액 또는 현탁액, 또는 지속-방출 제제로서의, 예를 들어 피하, 근육내, 정맥내 또는 경막의 주사에 의한 비경구 투여; (3) 피부에 도포되는 크림, 연고, 또는 조절-방출 패치 또는 스프레이로서의 국소 적용; (4) 예를 들어 질좌제, 크림 또는 폼으로서의 질내 또는 직장내; (5) 설하; (6) 안구; (7) 경피; 또는 (8) 비강.
- [0214] 어구 "제약상 허용되는"은 본원에서 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 합리적인 이익/위험 비율과 상응하는 과도한 독성, 자극, 알러지 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직에 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭하기 위해 채용된다.
- [0215] 본원에 사용된 어구 "제약상 허용되는 담체"는 대상 화합물을 하나의 기관 또는 신체의 부분으로부터 또 다른 기관 또는 신체의 부분으로 전달 또는 수송하는 데 관련되는, 제약상 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 제조 보조제 (예를 들어, 윤활제, 탈크 마그네슘, 칼슘 또는 아연 스테아레이트, 또는 스테아르산), 또는 용매 캡슐화 물질을 의미한다. 각각의 담체는 제제의 다른 성분과의 혼화성이고, 환자에게 손상을 주지 않는 의미에서 "허용되어야" 한다.
- [0216] 제약상 허용되는 담체로서 기능할 수 있는 물질의 일부 예로는, 제한 없이 (1) 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; (2) 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스 및 그의 유도체, 예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말화된 트라가칸트; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 탈크; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스; (9) 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 해바라기유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; (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 수산화알루미늄; (15) 알긴산; (16) 피로젠-무함유 수; (17) 등장성 염수; (18) 링거 용액; (19) 에틸 알코올; (20) pH 완충된 용액; (21) 폴리에스테르, 폴리카르보네이트 및/또는 폴리무수물; 및 (22) 제약 제제에 채용되는 다른 비-독성 혼화성 물질을 들 수 있다.
- [0217] 본 발명의 안티센스 올리고머와 제제화하기에 적합한 제제의 추가의 비제한적 예로는 다양한 조직 내로의 약물의 유입을 증진시킬 수 있는 PEG 접합된 핵산, 인지질 접합된 핵산, 친지질성 모이어티를 함유하는 핵산, 포스포티오에이트, P-당단백질 억제제 (예컨대 프루로닌 P85); 이식 후의 지속 방출 전달을 위한 생체분해성 중합체, 예컨대 폴리 (DL-락티드-코글리콜리드) 미소구 (Emerich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) (메사추세츠주 캠브리지 소재 알케임즈 인코포레이티드 (Alkermes, Inc.)); 및 혈액 뇌 장벽을 통해 약물을 전달할 수 있으며, 신경 흡수 메커니즘을 변경시킬 수 있는 로딩된 나노입자, 예컨대 폴리부틸시아노아크릴레이트로 제조된 것 (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999)을 들 수 있다.
- [0218] 본 발명은 또한 폴리 (에틸렌 글리콜) 지질 (PEG-변형된, 분지된 및 비분지된 또는 그의 조합, 또는 오랜 시간-순환하는 리포솜 또는 잠행성 리포솜)을 함유하는 표면-변형된 리포솜을 포함하는 조성물의 용도를 특징으로 한다. 본 발명의 올리고머는 또한 다양한 분자량의 공유적으로 부착된 PEG 분자를 포함한다. 이들 제제는 표적 조직에서의 약물의 축적을 증가시키는 방법을 제공한다. 이 부류의 약물 담체는 단핵 포식세포계 (MPS 또는 RES)에 의해 흡수 및 배설에 저항함으로써, 캡슐화된 약물에 대한 보다 오랜 혈액 순환 시간 및 증진된 조직 노출을 가능하게 한다 (Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). 이러한 리포솜은 아마도 분출에 의해 종양에서 선택적으로 축적되며, 혈관신생된 표적 조직에서 포획되는 것으로 나타났다 (Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). 오랜 시간-순환하는 리포솜은 특히 MPS의 조직에서 축적되는 것으로 공지된 통상적인 양이온성 리포솜에 비하여, DNA 및 RNA의 약동학 및 약역학을 증진시킨다 (Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; 최 등 (Choi et al.), 국제 PCT 공보 제WO 96/10391호; 안셀 등 (Ansell et al.), 국제 PCT 공보 제WO 96/10390호; 홀란드 등 (Holland et al.), 국제 PCT 공보 제WO 96/10392호). 오랜 시간-순환하는 리포솜은 또한 간 및 비장과 같은 물질대사적으로 공격적인 MPS 조직에서의 축적을 피하는 그

들의 능력에 기초하여, 양이온성 리포솜에 비하여 보다 큰 정도로 뉴클레아제 분해로부터 약물을 보호할 가능성이 있다.

- [0219] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 미국 특허 제6,692,911호, 제7,163,695호 및 제7,070,807호에 기재된 바와 같은 전달을 위해 제조된 올리고머 조성물을 포함한다. 이와 관련하여, 한 실시양태에서, 본 발명은 리신 및 히스티딘 (HK)의 공중합체를 포함하는 조성물 (미국 특허 제7,163,695호, 제7,070,807호 및 제6,692,911호에 기재된 바와 같음)에서의, 단독으로 또는 PEG (예를 들어, 분지된 또는 비분지된 PEG 또는 둘 다의 혼합물)과 조합으로, PEG 및 표적화 모이어티 또는 가교제와 조합으로의 임의의 상기의 것과 조합으로 본 발명의 올리고머를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 글루콘산-변형된 폴리히스티딘 또는 글루코닐화-폴리히스티딘/트랜스페린-폴리리신을 포함하는 조성물에서의 안티센스 올리고머를 제공한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 또한 His 및 Lys와 유사한 특성을 갖는 아미노산이 조성물 내에서 치환될 수 있음을 인지할 것이다.
- [0220] 본원에 기재된 올리고머의 특정 실시양태는 염기성 관능기, 예컨대 아미노 또는 알킬아미노를 함유할 수 있으며, 따라서 제약상 허용되는 산과 함께 제약상 허용되는 염을 형성할 수 있다. 이와 관련하여 용어 "제약상 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 상대적으로 비-독성, 무기 및 유기 산 부가염을 지칭한다. 이들 염은 계내에서 투여 비히클 또는 투여 형태 제조 공정으로, 또는 본 발명의 정제된 화합물을 그의 유리 염기 형태로 적합한 유기 또는 무기산과 별개로 반응시키고, 후속 정제 동안 이렇게 형성되는 염을 단리함으로써 제조될 수 있다. 대표적인 염으로는 히드로브로마이드, 히드로클로라이드, 술페이트, 비술페이트, 포스페이트, 니트레이트, 아세테이트, 발레레이트, 올레레이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 라우레이트, 벤조에이트, 락테이트, 포스페이트, 토실레이트, 시트레이트, 말레레이트, 푸마레이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 나프틸레이트, 메실레이트, 글루코헵토네이트, 락토비오네이트 및 라우릴술포네이트 염 등을 들 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19] 참조).
- [0221] 대상 올리고머의 제약상 허용되는 염은 예를 들어 비-독성 유기 또는 무기산으로부터의 화합물의 통상적인 비독성 염 또는 4급 암모늄염을 포함한다. 예를 들어, 이러한 통상적인 비독성 염으로는 무기산, 예컨대 히드로클로라이드, 브롬화수소산, 황산, 술폰산, 인산, 질산 등으로부터 유도된 것; 및 유기산, 예컨대 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 락산, 말산, 타르트르산, 시트르산, 아스코르브산, 팔미트산, 말레산, 히드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리시클릭산, 술폰산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔술폰산, 메탄술폰산, 에탄 디술폰산, 옥살산, 이소티온산 등으로부터 제조된 염을 들 수 있다.
- [0222] 특정 실시양태에서, 본 발명의 올리고머는 하나 이상의 산성 관능기를 함유할 수 있으며, 따라서 제약상 허용되는 염기와 함께 제약상 허용되는 염을 형성할 수 있다. 이들 예에서 용어 "제약상 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 상대적으로 비-독성, 무기 및 유기 염기 부가염을 지칭한다. 이들 염은 유사하게 계내에서 투여 비히클 또는 투여 형태 제조 공정으로, 또는 정제된 화합물을 그의 유리 산 형태로 적합한 염기, 예컨대 제약상 허용되는 금속 양이온의 히드록시드, 카르보네이트 또는 비카르보네이트와, 암모니아와, 또는 제약상 허용되는 유기 1차, 2차 또는 3차 아민과 별개로 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리토 염으로는 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄 염 등을 들 수 있다. 염기 부가염의 형성에 유용한 대표적인 유기 아민으로는 에틸아민, 디에틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진 등을 들 수 있다 (예를 들어, 버지 등 (Berge et al.), 상기 문헌 참조).
- [0223] 습윤제, 유화제 및 윤활제, 예컨대 나트륨 라우릴 술페이트 및 마그네슘 스테아레이트, 및 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 향미제 및 방향제, 보존제 및 항산화제는 또한 조성물에 존재할 수 있다.
- [0224] 제약상 허용되는 항산화제의 예로는 (1) 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 나트륨 비술페이트, 나트륨 메타비술포이트, 나트륨 술포이트 등; (2) 지용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이트제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르트르산, 인산 등을 들 수 있다.
- [0225] 본 발명의 제제는 경구, 비강, 국소 (협착 및 설하를 포함함), 직장, 질내 및/또는 비경구 투여에 적합한 것을 포함한다. 제제는 편리하게는 단위 투여 형태로 제시될 수 있으며, 약학 기술분야에서 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 형태를 제조하기 위한 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 숙주, 특정 투여 방식에 따라 다양할 것이다. 단일 투여 형태를 제조하기 위한 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 화합물의 양일 것이다. 일반적으로, 100 퍼센트 중, 이 양은 활성 성분의 약 0.1 퍼센트 내지 약 99 퍼센트, 바람직하게는 약 5 퍼센트 내지 약 70 퍼센트, 가장 바

람직하게는 약 10 퍼센트 내지 약 30 퍼센트의 범위일 것이다.

- [0226] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 시클로텍스트린, 셀룰로스, 리포솜, 미셀 형성제, 예를 들어 담즙산, 및 중합체성 담체, 예를 들어 폴리에스테르 및 폴리무수물; 및 본 발명의 올리고머를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 언급된 제제는 본 발명의 올리고머를 경구적으로 생체이용가능하게 만든다.
- [0227] 이들 제제 또는 조성물의 제조 방법은 본 발명의 올리고머를 담체, 및 임의로 하나 이상의 부속 성분과 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제제는 본 발명의 화합물을 액체 담체, 또는 미세하게 분리된 고체 담체, 또는 둘 다와 균일하고 긴밀하게 회합시킨 후, 필요할 경우 생성물을 성형함으로써 제조된다.
- [0228] 경구 투여에 적합한 본 발명의 제제는 캡슐제, 카세제, 환제, 정제, 로젠지제 (향미된 베이스, 통상적으로 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸트를 사용함), 분말제, 과립제의 형태로, 또는 수성 또는 비-수성 액체 중의 용액 또는 현탁액으로서, 또는 수중유 또는 유중수 액체 에멀전으로서, 또는 엘릭시르제 또는 시럽제로서, 또는 캔디제 (불활성 염기, 예컨대 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아를 사용함)로서, 및/또는 구강 청결제로서 등일 수 있으며, 이들 각각은 미리 결정된 양의 본 발명의 화합물을 활성 성분으로서 함유한다. 본 발명의 올리고머는 또한 볼루스제, 연약 또는 페이스트제로서 투여될 수 있다.
- [0229] 경구 투여를 위한 본 발명의 고체 투여 형태 (캡슐제, 정제, 환제, 당제, 분말제, 과립제, 트로키제 등)에서, 활성 성분은 하나 이상의 제약상 허용되는 담체, 예컨대 나트륨 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트, 및/또는 하기 중 임의의 것과 혼합될 수 있다: (1) 충전제 또는 증량제, 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및/또는 규산; (2) 결합제, 예를 들어 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아; (3) 보습제, 예컨대 글리세롤; (4) 붕괴제, 예컨대 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이이트 및 탄산나트륨; (5) 용액 지연제, 예컨대 과라핀; (6) 흡수 촉진제, 예컨대 4급 암모늄 화합물 및 계면활성제, 예컨대 폴록사머 및 나트륨 라우릴 술페이트; (7) 습윤제, 예를 들어 세틸 알코올, 글리세롤 모노스테아레이트, 및 비-이온성 계면활성제; (8) 흡수제, 예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예컨대 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 술페이트, 아연 스테아레이트, 나트륨 스테아레이트, 스테아르산, 및 이들의 혼합물; (10) 착색제; 및 (11) 제어 방출제, 예컨대 크로스포비돈 또는 에틸 셀룰로스. 캡슐제, 정제 및 환제의 경우, 제약 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 부형제, 예컨대 락토스 또는 유당, 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용한 연결 및 경질-겔화된 젤라틴 캡슐 중의 충전제로서 채용될 수 있다.
- [0230] 정제는 임의로 하나 이상의 부속 성분과 함께 압축 또는 성형함으로써 제조될 수 있다. 압축된 정제는 결합제 (예를 들어, 젤라틴 또는 히드록시프로필메틸 셀룰로스), 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 붕괴제 (예를 들어, 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 가교된 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스), 표면-활성제 또는 분산제를 사용하여 제조될 수 있다. 성형된 정제는 불활성 액체 희석제로 습윤화된 분말화된 화합물의 혼합물을 적합한 기계에서 성형함으로써 제조될 수 있다.
- [0231] 본 발명의 제약 조성물의 정제, 및 다른 고체 투여 형태, 예컨대 당제, 캡슐제, 환제 및 과립제는 임의로 코팅 및 셀, 예컨대 장용성 코팅 및 제약-제제화 기술분야에서 널리 공지된 다른 코팅으로 스코어링 또는 제조될 수 있다. 이들은 또한 예를 들어 바람직한 방출 프로파일을 제공하는 다양한 비율의 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 미소구를 사용하여 그 안의 활성 성분의 저속 또는 제어된 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다. 이들은 급속 방출을 위해 제제화, 예를 들어 동결-건조될 수 있다. 이들은 예를 들어 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용 직전에 멸균수, 또는 일부 다른 멸균 주사가 가능한 매질에 용해될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 멸균제를 혼합함으로써 멸균될 수 있다. 이들 조성물은 또한 임의로 불투명화제를 함유할 수 있으며, 활성 성분(들)만을, 또는 우선적으로 위장관의 특정 부분에서, 임의로 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 매립 조성물의 예로는 중합체성 물질 및 왁스를 들 수 있다. 활성 성분은 또한 적절할 경우 하나 이상의 상기 기재된 부형제를 갖는 미소-캡슐화된 형태일 수 있다.
- [0232] 본 발명의 화합물의 경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 제약상 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 활성 성분 외에, 액체 투여 형태는 관련 기술분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예를 들어 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 발아유, 올리브유, 피마자유 및 참깨유), 글리세롤, 테트라히드로푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.

- [0233] 불활성 희석제 외에, 경구 조성물은 또한 아췌반트, 예컨대 습윤제, 유화제 및 현탁화제, 감미제, 향미제, 착색제, 방향제 및 보존제를 포함할 수 있다.
- [0234] 활성 화합물 외에 현탁액은 현탁화제, 예를 들어 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미세결정질 셀룰로스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 한천-한천 및 트라가칸트, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0235] 직장 또는 질내 투여를 위한 제제는 하나 이상의 본 발명의 화합물을 예를 들어 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌제 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 하나 이상의 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합함으로써 제조될 수 있고, 실온에서 고체이지만, 체온에서는 액체이고, 따라서 직장 또는 질강에서 용해되어 활성 화합물을 방출하는 좌제로서 제시될 수 있다.
- [0236] 본원에서 제공된 바와 같은 올리고머의 국소 또는 경피 투여를 위한 제제 또는 투여 형태는 분말제, 스프레이제, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 올리고머는 멸균 상태에서 제약상 허용되는 담체, 및 필요할 수 있는 임의의 보존제, 완충제 또는 추진제와 혼합될 수 있다. 연고, 페이스트, 크림 및 젤은 본 발명의 활성 화합물 외에 부형제, 예컨대 동물성 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연, 또는 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0237] 분말제 및 스프레이제는 본 발명의 올리고머 외에 부형제, 예컨대 락토스, 탈크, 규산, 수산화알루미늄, 칼슘 실리케이트 및 폴리아미드 분말, 또는 이들 물질의 혼합물을 함유할 수 있다. 스프레이제는 통상적인 추진제, 예컨대 클로로플루오로히드로카본 및 휘발성 비치환된 탄화수소, 예컨대 부탄 및 프로판을 추가로 함유할 수 있다.
- [0238] 경피 패치는 본 발명의 올리고머의 신체로의 제어된 전달을 제공하는 추가의 이점을 갖는다. 이러한 투여 형태는 올리고머를 적절한 매질에 용해 또는 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 흡수 증진제는 또한 피부를 통한 제제의 유동을 증가시키는 데 사용될 수 있다. 이러한 유동의 속도는 관련 기술분야에서 공지된 다른 방법 중에서 속도 제어 막을 제공하거나, 제제를 중합체 매트릭스 또는 젤에 분산시킴으로써 제어될 수 있다.
- [0239] 비경구 투여에 적합한 제약 조성물은 하나 이상의 본 발명의 올리고머를 의도되는 수용자의 혈액과 제제를 등장성이 되도록 하는, 당, 알코올, 항산화제, 완충제, 정균제, 용질 또는 현탁화제 또는 증점제를 함유할 수 있는, 사용 직전에 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는, 하나 이상의 제약상 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전, 또는 멸균 분말과 조합으로 포함할 수 있다. 본 발명의 제약 조성물에 채용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브유, 및 주사가 가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트를 들 수 있다. 예를 들어, 코팅 물질, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 적절한 유동성이 유지될 수 있다.
- [0240] 이들 조성물은 또한 아췌반트, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 대상 올리고머에 대한 미생물의 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 도입에 의해 보증될 수 있다. 또한, 등장화제, 예컨대 당, 염화나트륨 등이 조성물 내에 포함되는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사가 가능한 제약 형태의 연장된 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제의 도입에 의해 일어날 수 있다.
- [0241] 일부의 경우, 약물의 효과를 연장하기 위해, 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 감속시키는 것이 바람직하다. 이는 관련 기술분야에서 공지된 다른 방법 중에서, 빈약한 수 용해성을 갖는 결정질 또는 비정질 물질의 액체 현탁액의 사용을 수반할 수 있다. 그러면, 약물의 흡수 속도는 그의 용해 속도에 의존하며, 결국 결정 크기 및 결정질 형태에 의존할 수 있다. 대안적으로, 비경구-투여되는 약물 형태의 지연된 흡수는 약물을 오일 비히클에 용해 또는 현탁시킴으로써 달성된다.
- [0242] 주사가 가능한 데포 형태는 생체분해성 중합체, 예컨대 폴리락티드-폴리글리콜리드에서 대상 올리고머의 미소캡슐 매트릭스를 형성함으로써 제조될 수 있다. 올리고머 대 중합체의 비율, 및 채용되는 특정 중합체의 성질에 따라, 올리고머 방출의 속도는 제어될 수 있다. 다른 생체분해성 중합체의 예로는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)을 들 수 있다. 데포 주사가 가능한 제제는 또한 약물을 신체 조직과 혼화성인 리포솜 또는 마이크로에멀전에서 포획함으로써 제조될 수 있다.

- [0243] 본 발명의 올리고머가 약제로서 인간 및 동물에게 투여될 경우, 이는 그 자체로 또는 예를 들어 0.1 내지 99% (보다 바람직하게는, 10 내지 30%)의 활성 성분을 제약상 허용되는 담체와 조합으로 함유하는 제약 조성물로서 주어질 수 있다.
- [0244] 상기 주목된 바와 같이, 본 발명의 제제 또는 조제물은 경구, 비경구, 국소 또는 직장으로 주어질 수 있다. 이는 전형적으로 각각의 투여 경로에 적합한 형태로 주어진다. 예를 들어, 이는 정제 또는 캡슐 형태로 주사, 주입 또는 흡입에 의한 주사, 흡입, 안약, 연고, 좌제 등의 투여에 의해; 로션 또는 연고에 의한 국소; 및 좌제에 의한 직장으로 투여된다.
- [0245] 본원에 사용된 어구 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여되는"은 통상적으로 주사에 의한, 장관 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 제한 없이 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 관절낭내, 안와내, 심장내, 진피내, 복강내, 경기관내, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척주내 및 흉골내 주사 및 주입을 들 수 있다.
- [0246] 본원에 사용된 어구 "전신 투여", "전신적으로 투여되는", "말초 투여" 및 "말초적으로 투여되는"은 화합물, 약물 또는 다른 물질의, 그것이 환자의 계로 들어가고, 따라서 물질대사 및 다른 프로세스를 겪도록 하는 중추 신경계 내로 직접적 이외의 투여, 예를 들어 피하 투여를 의미한다.
- [0247] 선택되는 투여 경로와 무관하게, 적합한 수화된 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 올리고머, 및/또는 본 발명의 제약 조성물은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 제약상 허용되는 투여 형태로 제제화될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물에서의 활성 성분의 실제 투여 수준은 환자에 대한 수용할 수 없는 독성 없이, 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대한 바람직한 치료 반응을 달성하는 데 효과적인 활성 성분의 양을 달성하도록 다양할 수 있다.
- [0248] 선택되는 투여 수준은 채용되는 본 발명의 특정 올리고머 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 채용되는 특정 올리고머의 배설 또는 물질대사, 흡수의 속도 및 정도, 치료의 기간, 채용되는 특정 올리고머와 조합으로 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적 건강 및 이전의 병력을 포함하는 다양한 인자, 및 의학 기술분야에서 널리 공지된 유사 인자에 의존할 것이다.
- [0249] 관련 기술분야에서 통상의 기술을 갖는 의사 또는 수의사는 필요한 제약 조성물의 유효량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 바람직한 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 것보다 낮은 수준으로 제약 조성물에서 채용되는 본 발명의 화합물의 용량을 개시하고, 바람직한 효과를 달성할 때까지 투여량을 점차 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 화합물의 적합한 일일 용량은 치료 효과를 생성하는 데 효과적인 최저 용량인 화합물의 양일 것이다. 이러한 유효 용량은 일반적으로 상기 기재된 인자에 의존할 것이다. 일반적으로, 지시된 효과를 위해 사용될 경우 환자에 대한 본 발명의 화합물의 경구, 정맥내, 뇌실내 및 피하 용량은 1일 당 체중 킬로그램 당 약 0.0001 내지 약 100 mg의 범위일 것이다.
- [0250] 바람직할 경우, 활성 화합물의 유효 1일 용량은 임의로 단위 투여 형태에서 하루를 통해 적절한 간격으로 개별적으로 투여되는 2, 3, 4, 5, 6 이상의 하위-용량으로서 투여될 수 있다. 특정 상황에서, 용량은 1일 당 한 번의 투여이다. 특정 실시양태에서, 용량은 필요에 따라 기능성 디스트로핀 단백질의 바람직한 발현을 유지하기 위한 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, 12주, 또는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개월 당 하나 이상의 투여이다.
- [0251] 핵산 분자는 본원에 기재되고 관련 기술분야에서 공지된 바와 같이, 전리요법에 의한, 또는 다른 비히클, 예컨대 히드로겔, 시클로텍스트린, 생체분해성 나노캡슐 및 생체결합성 미소구 내로의 혼입에 의한 리포솜 내의 캡슐화를 포함하나 이에 제한되지 않는, 관련 기술분야의 숙련인에게 공지된 다양한 방법에 의해 세포에 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 마이크로에멀전화 기술은 친지질성 (수불용성) 제약 제제의 생체분해성을 개선하기 위해 이용될 수 있다. 그 예로는 트리메트린 (Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991) 및 REV 5901 (Sheen, P. C., et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991)을 들 수 있다. 다른 이점 중에서, 마이크로에멀전화는 순환계 대신 림프계에 대한 흡수를 우선적으로 지칭함으로써 간을 우회하고, 간담즙성 순환에서 화합물의 파괴를 방지함으로써, 증진된 생체이용률을 제공한다.
- [0252] 본 발명의 한 측면에서, 제제는 본원에 제공된 바와 같은 올리고머 및 적어도 하나의 양친매성 담체로부터 형성된 미셀을 함유하며, 여기서 미셀은 약 100 nm 미만의 평균 직경을 갖는다. 보다 바람직한 실시양태는 약 50 nm 미만의 평균 직경을 갖는 미셀을 제공하며, 보다 더 바람직한 실시양태는 약 30 nm 미만, 또는 심지어 약 20 nm 미만의 평균 직경을 갖는 미셀을 제공한다.

- [0253] 모든 적합한 양친매성 담체가 고려되는 반면, 본원에서 바람직한 담체는 일반적으로, 일반적으로 안전한 것으로서 인지된 (Generally-Recognized-as-Safe (GRAS)) 상태를 가지며, 본 발명의 화합물을 가용화하고, 용액이 복합 수상 (예컨대 인간 위장관에서 발견되는 것)과 접촉할 경우 후속 단계에서 이를 마이크로에멀전화할 수 있는 것이다. 통상적으로, 이들 요건을 만족시키는 양친매성 성분은 2 내지 20의 HLB (친수성 대 친지질성 밸런스) 값을 가지며, 이들의 구조는 C-6 내지 C-20의 범위의 직쇄 지방족 라디칼을 함유한다. 그 예는 폴리에틸렌-글리콜화된 지방 글리세리드 및 폴리에틸렌 글리콜이다.
- [0254] 양친매성 담체의 예로는 포화 및 모노불포화 폴리에틸렌글리콜화된 지방산 글리세리드, 예컨대 완전히 또는 부분적으로 수소화된 다양한 식물성 오일로부터 얻어진 것을 들 수 있다. 이러한 오일은 유리하게는 카르프산 4 내지 10, 카르프산 3 내지 9, 라우르산 40 내지 50, 미리스트산 14 내지 24, 팔미트산 4 내지 14 및 스테아르산 5 내지 15%를 포함하는 특히 바람직한 지방산 조성을 갖는, 트리-, 디- 및 모노-지방산 글리세리드 및 상응하는 지방산의 디- 및 모노-폴리에틸렌글리콜 에스테르로 이루어질 수 있다. 또 다른 유용한 부류의 양친매성 담체로는 포화 또는 모노-불포화 지방산 (스판 (SPAN)-계열) 또는 상응하는 에톡실화 유사체 (트윈 (TWEEN)-계열)를 갖는, 부분적으로 에스테르화된 소르비탄 및/또는 소르비톨을 들 수 있다.
- [0255] 겔루시르 (Gelucire)-계열, 라브라필 (Labrafil), 라브라솔 (Labrasol) 또는 라우로글리콜 (Lauroglycol) (모두 프랑스 생 프리에스트 소재 가테포세 코포레이션 (Gattefosse Corporation)에 의해 제조 및 유통됨), PEG-모노-올레에이트, PEG-디-올레에이트, PEG-모노-라우레이트 및 디-라우레이트, 레시틴 (Lecithin), 폴리소르베이트 (Polysorbate) 80 등 (미국 및 전세계의 다수의 회사에 의해 생산 및 유통됨)을 포함하는, 시판되는 양친매성 담체가 특히 유용할 수 있다.
- [0256] 특정 실시양태에서, 전달은 본 발명의 조성물을 적합한 숙주 세포 내로 도입하기 위한 리포솜, 나노캡슐, 미소입자, 미소구, 액체 입자, 베지클 등의 사용에 의해 일어날 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 액체 입자, 리포솜, 베지클, 나노구, 나노입자 등에 캡슐화되어 전달을 위해 제제화될 수 있다. 제제 및 이러한 전달 비히클의 사용은 공지된 및 통상적인 기술을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0257] 본 발명에 사용하기에 적합한 친수성 중합체는 용이하게 수용성이고, 베지클-형성 지질에 공유적으로 부착될 수 있고, 독성 효과 없이 생체내에서 내성화되는 (즉, 생체적합성인) 것이다. 적합한 중합체로는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리락트산 (또한 폴리락티드로도 지칭됨), 폴리글리콜산 (또한 폴리글리콜리드로도 지칭됨), 폴리락트산-폴리글리콜산 공중합체 및 폴리비닐 알코올을 들 수 있다. 특정 실시양태에서, 중합체는 약 100 또는 120 달톤 내지 약 5,000 또는 10,000 달톤, 또는 약 300 달톤 내지 약 5,000 달톤의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, 중합체는 약 100 내지 5,000 달톤의 분자량을 갖는, 또는 약 300 내지 5,000 달톤의 분자량을 갖는 폴리에틸렌글리콜이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 750 달톤의 폴리에틸렌글리콜 (PEG(750))이다. 중합체는 또한 그 안의 단량체의 수에 의해 정의될 수 있으며, 본 발명의 바람직한 실시양태는 적어도 약 3개의 단량체의 중합체, 예컨대 3개의 단량체로 이루어진 PEG 중합체 (대략 150 달톤)를 이용한다.
- [0258] 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 다른 친수성 중합체로는 폴리비닐피롤리돈, 폴리메톡사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리히드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리디메틸아크릴아미드, 및 유도체화된 셀룰로스, 예컨대 히드록시메틸셀룰로스 또는 히드록시에틸셀룰로스를 들 수 있다.
- [0259] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 폴리아미드, 폴리카르보네이트, 폴리알킬렌, 아크릴산 및 메타크릴산 에스테르의 중합체, 폴리비닐 중합체, 폴리글리콜리드, 폴리실록산, 폴리우레탄 및 그의 공중합체, 셀룰로스, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리스티렌, 락트산 및 글리콜산의 중합체, 폴리무수물, 폴리(오르토)에스테르, 폴리(부트산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카프로락톤), 다당류, 단백질, 폴리히알루론산, 폴리시아노아크릴레이트, 및 이들의 블렌드, 혼합물 또는 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 생체적합성 중합체를 포함한다.
- [0260] 시클로텍스트린은 각각 그리스 문자 α , β 또는 γ 에 의해 지정되는 6, 7 또는 8개의 글루코스 단위로 이루어진 시클릭 올리고당류이다. 글루코스 단위는 α -1,4-글루코시드 결합에 의해 연결된다. 당 단위의 쇠 형태의 결과로서, 모든 2차 히드록실기 (C-2, C-3에서)는 고리의 한 측면에 위치되는 반면, C-6에서의 모든 1차 히드록실기는 다른 측면에 위치된다. 결과로서, 외부 면은 시클로텍스트린을 수용성으로 만드는 친수성이다. 반대로, 시클로텍스트린의 공동은, 이들이 원자 C-3 및 C-5의 수소에 의해 및 에테르-유사 산소에 의해 라이닝되기 때문에 소수성이다. 이들 매트릭스는 예를 들어 스테로이드 화합물, 예컨대 17 α -에스트라디올을 포함하는, 다양한 상대적으로 소수성 화합물과 복합체화를 허용한다 (예를 들어, 문헌 [van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)] 참조). 복합체화는 반 데르 발스 상호작용 및 수소 결합 형성에 의해

일어난다. 시클로텍스트린의 화학의 일반적인 검토를 위해서는, 문헌 [Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994)]을 참조한다.

- [0261] 시클로텍스트린 유도체의 물리-화학적 특성은 치환의 종류 및 정도에 강하게 의존한다. 예를 들어, 수중에서의 이들의 용해도는 불용성 (예를 들어, 트리아세틸-베타-시클로텍스트린) 내지 147% 가용성 (w/v) (G-2-베타-시클로텍스트린)의 범위이다. 또한, 이들은 많은 유기 용매에 가용성이다. 시클로텍스트린의 특성은 그들의 용해도를 증가 또는 감소시킴으로써 다양한 제제 성분의 용해도에 걸쳐 제어를 가능하게 한다.
- [0262] 다수의 시클로텍스트린 및 그의 제조 방법이 기재되었다. 예를 들어 파메터 (I) 등 (Parmeter (I), et al.) (미국 특허 제3,453,259호) 및 그라메라 등 (Gramera, et al.) (미국 특허 제3,459,731호)은 전기중성적 시클로텍스트린을 기재하였다. 다른 유도체로는 양이온성 특성을 갖는 시클로텍스트린 [파메터 (II), 미국 특허 제 3,453,257호], 불용성 가교된 시클로텍스트린 (솔름즈 (Solms), 미국 특허 제3,420,788호), 및 음이온성 특성을 갖는 시클로텍스트린 [파메터 (III), 미국 특허 제3,426,011호]을 들 수 있다. 음이온성 특성을 갖는 시클로텍스트린 유도체 중에서, 카르복실산, 아인산, 포스포닉산, 포스포산, 인산, 티오포스포산, 티오술피산 및 술폰산은 모 시클로텍스트린에 부속될 수 있다 [파메터 (III), 상기 문헌 참조]. 또한, 술폰알킬 에테르 시클로텍스트린 유도체는 스텔라 등 (Stella, et al.) (미국 특허 제5,134,127호)에 의해 기재되었다.
- [0263] 리포솜은 수성 내부 구획을 둘러싸는 적어도 하나의 지질 이중층 막으로 이루어진다. 리포솜은 막 유형 및 크기에 의해 특성화될 수 있다. 소형 유니라멜라 베지클 (SUV)은 단일 막을 가지며, 전형적으로 직경 0.02 내지 0.05 μm 범위이고, 대형 유니라멜라 베지클 (LUVS)은 전형적으로 0.05 μm 초과이다. 올리고라멜라 대형 베지클 및 다중라멜라 베지클은 다중의 통상적으로 동심원의 막 층을 가지며, 전형적으로 0.1 μm 초과이다. 몇몇 비동심원 막을 갖는 리포솜, 즉 보다 대형 베지클 내에 함유된 몇몇 보다 소형 베지클은 다중베지클성 베지클로 지칭된다.
- [0264] 본 발명의 한 측면은 본 발명의 올리고머를 함유하는 리포솜을 포함하는 제제에 관한 것이며, 여기서 리포솜 막은 증가된 운반 능력을 갖는 리포솜을 제공하도록 제제화된다. 대안적으로 또는 추가로, 본 발명의 화합물은 리포솜의 리포솜 이중층 내에 함유되거나, 그 위로 흡수될 수 있다. 본 발명의 올리고머는 지질 계면활성제와 응집되고, 리포솜의 내부 공간 내로 운반될 수 있으며, 이들의 경우, 리포솜 막은 활성제-계면활성제 응집체의 파괴 효과를 저항하도록 제제화된다.
- [0265] 본 발명의 한 실시양태에 따라, 리포솜의 지질 이중층은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)로 유도체화된 지질을 함유하여, PEG 층은 지질 이중층의 내표면으로부터 리포솜에 의해 캡슐화된 내부 공간으로 연장되며, 지질 이중층의 외부로부터 주변 환경으로 연장된다.
- [0266] 본 발명의 리포솜 내에 함유된 활성제는 가용화된 형태이다. 계면활성제 및 활성제의 응집체 (예컨대 관심의 활성제를 함유하는 에멀전 또는 미셀)는 본 발명에 따른 리포솜의 내부 공간 내에 포획될 수 있다. 계면활성제는 활성제를 분산 및 가용화시키는 작용을 하며, 다양한 쇄 길이 (예를 들어, 약 C14 내지 약 C20)의 생체적합성 리소포스파티딜콜린 (LPG)을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 적합한 지방족, 지환족 또는 방향족 계면활성제로부터 선택될 수 있다. 중합체-유도체화된 지질, 예컨대 PEG-지질은 또한 이들이 미셀/막 용해를 억제하도록 작용하고, 중합체의 계면활성제 분자로의 첨가가 미셀 형성에서 계면활성제 및 보조제의 CMC를 감소시키는 것과 같이 미셀 형성에 이용될 수 있다. 마이크로몰 범위의 CMO를 갖는 계면활성제가 바람직하며, 보다 높은 CMC 계면활성제는 본 발명의 리포솜 내에서 포획되는 미셀을 제조하는 데 이용될 수 있다.
- [0267] 본 발명에 따른 리포솜은 관련 기술분야에서 공지된 임의의 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제4,235,871호; 공개된 PCT 출원 WO 96/14057; 문헌 [New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104]; [Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993]을 참조한다. 예를 들어, 본 발명의 리포솜은 친수성 중합체로 유도체화된 지질을 예비형성된 리포솜 내로 확산시킴으로써, 예컨대 리포솜에서 바람직한 유도체화된 지질의 최종 물 퍼센트에 상응하는 지질 농도로, 예비형성된 리포솜을 지질-그래프팅된 중합체로 이루어진 미셀에 노출시킴으로써 제조될 수 있다. 친수성 중합체를 함유하는 리포솜은 또한 관련 기술분야에서 공지된 바와 같은 균질화, 지질-장 수화 또는 압출 기술에 의해 형성될 수 있다.
- [0268] 또 다른 예시적인 제제화 과정에서, 활성제는 먼저 소수성 분자를 용이하게 가용화하는 리소포스파티딜콜린 또는 다른 저 CMC 계면활성제 (중합체 그래프팅된 지질을 포함함)에서의 초음파처리에 의해 분산된다. 생성된 활성제의 미셀 현탁액은 그 후 적합한 물 퍼센트의 중합체-그래프팅된 지질, 또는 콜레스테롤을 함유하는 건조된

지질 샘플을 재수화하는 데 사용된다. 지질 및 활성제 현탁액은 그 후 관련 기술분야에서 공지된 압출 기술을 이용하여 리포솜으로 형성되며, 생성된 리포솜은 표준 칼럼 분리에 의해 비캡슐화된 용액으로부터 분리된다.

[0269] 본 발명의 한 측면에서, 리포솜은 선택된 크기 범위에서 실질적으로 균질한 크기를 갖도록 제조된다. 하나의 효과적인 사이징 방법은 선택된 균일한 공극 크기를 갖는 일련의 폴리카르보네이트 막을 통해 리포솜의 수성 현탁액을 압출하는 것을 포함하며, 막의 공극 크기는 그 막을 통한 압출에 의해 제조되는 리포솜의 가장 큰 크기와 대략 상응할 것이다. 예를 들어, 미국 특허 제4,737,323호 (1988년 4월 12일)를 참조한다. 특정 실시양태에서, 다르마FECT (DharmaFECT)® 및 리포펙타민 (Lipofectamine)®과 같은 시약이 폴리뉴클레오티드 또는 단백질질을 세포 내로 도입하는 데 이용될 수 있다.

[0270] 본 발명의 제제의 방출 특성은 캡슐화 물질, 캡슐화된 약물의 농도, 및 방출 변형제의 존재에 의존한다. 예를 들어, 방출은 예를 들어 위에서와 같이 낮은 pH에서, 또는 장에서와 같이 보다 높은 pH에서만 방출하는 pH 민감성 코팅을 이용하여 pH 의존성이 되도록 조작될 수 있다. 장용성 코팅은 위를 통한 통과 후까지 방출의 발생을 방지하는 데 사용될 수 있다. 상이한 물질 내에 캡슐화된 시안아미드의 다중 코팅 또는 혼합물은 위에서 초기 방출을 얻은 후, 장에서 후기 방출을 얻는 데 사용될 수 있다. 방출은 또한 캡슐로부터의 확산에 의해 약물의 물 흡수 또는 방출을 증가시킬 수 있는 염 또는 공극 형성제의 포함에 의해 조작될 수 있다. 약물의 용해도를 변형하는 부형제는 또한 방출 속도를 제어하는 데 사용될 수 있다. 매트릭스의 분해 또는 매트릭스로부터의 방출을 증진시키는 제제가 또한 혼입될 수 있다. 이는 개별 상으로서 (즉, 입자로서) 첨가되는 약물에 첨가될 수 있거나, 화합물에 의존하는 중합체 상에 공동-용해될 수 있다. 대개의 경우, 양은 0.1 내지 30 퍼센트 (w/w 중합체)일 것이다. 분해 증진제의 유형으로는 무기염, 예컨대 황산암모늄 및 염화암모늄, 유기산, 예컨대 시트르산, 벤조산 및 아스코르브산, 무기 염기, 예컨대 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탄산칼슘, 탄산아연 및 수산화아연, 및 유기 염기, 예컨대 프로타민 술페이트, 스페르민, 콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민 및 트리에탄올아민 및 계면활성제, 예컨대 트윈 (Tween)® 및 플루로닉 (Pluronic)®을 들 수 있다. 매트릭스에 미소구조를 첨가하는 공극 형성제 (즉, 수용성 화합물, 예컨대 무기염 및 당)은 입자로서 첨가된다. 범위는 전형적으로 1 내지 30 퍼센트 (w/w 중합체)이다.

[0271] 흡수는 또한 장 내의 입자의 체류 시간을 변경함으로써 조작될 수 있다. 이는 예를 들어 점막 접착성 중합체로 입자를 코팅함으로써, 또는 캡슐화 물질로서 선택함으로써 달성될 수 있다. 그 예로는 유리 카르복실기를 갖는 대부분의 중합체, 예컨대 키토산, 셀룰로스, 특히 폴리아크릴레이트 (본원에 사용된 폴리아크릴레이트는 아크릴레이트기 및 변형된 아크릴레이트기, 예컨대 시아노아크릴레이트 및 메타크릴레이트를 포함하는 중합체를 지칭함)를 들 수 있다.

[0272] 올리고머는 외과적 또는 의학적 장치 또는 이식물에 의해 그 내에 함유되거나 방출에 적합하도록 제제화될 수 있다. 특정 측면에서, 이식물은 올리고머로 코팅되거나, 다르게는 처리될 수 있다. 예를 들어, 히드로겔, 또는 다른 중합체, 예컨대 생체적합성 및/또는 생체분해성 중합체는 본 발명의 조성물로 이식물을 코팅하는 데 사용될 수 있다 (즉, 조성물은 히드로겔 또는 다른 중합체를 사용함으로써 의학적 장치로 사용하는 데 적합화될 수 있음). 제제로 의학적 장치를 코팅하기 위한 중합체 및 공중합체는 관련 기술분야에서 널리 공지되어 있다. 이식물의 예로는 스텐트, 약물-용리 스텐트, 봉합물, 보철, 혈관 카테터, 투석 카테터, 혈관 그래프트, 인공 심장 판막, 심장 박동 조율기, 삽입형 제세동기, IV 바늘, 골 세팅 및 형성을 위한 장치, 예컨대 핀, 스크루, 플레이트, 및 다른 장치, 및 상처 치유를 위한 인공 조직 매트릭스를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0273] 본원에 제공된 방법 외에, 본 발명에 따라 사용하기 위한 올리고머는 다른 약제와의 유사성에 의해, 인간 또는 동물 의약에 사용하기 위해 임의의 편리한 방법으로 투여용으로 제제화될 수 있다. 안티센스 올리고머 및 그의 상응하는 제제는 단독으로 또는 근육 이영양증의 치료에서의 다른 치료 전략, 예컨대 근모세포 이식, 줄기 세포 요법, 아미노글리코시드 항생제의 투여, 프로테아좀 억제제, 및 상향-조절 요법 (예를 들어, 유트로핀의 상향조절, 디스트로핀의 상염색체 파라로그)과 조합으로 투여될 수 있다.

[0274] 숙련된 의사는 임의의 특정한 동물 및 상태를 위한 최적의 투여 경로 및 임의의 투여량을 용이하게 결정할 수 있을 것이기 때문에, 기재된 투여 경로는 안내로서만 의도된다. 기능성 신규 유전 물질을 세포 내로 시험관내 및 생체내 둘 다로 도입하는 다수의 접근이 시도되었다 (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280). 이들 접근근으로는 변형된 레트로바이러스 내로 발현되는 유전자의 통합 (Friedmann (1989) 상기 문헌; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), suppl.: 5074S-5079S); 비-레트로바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노-연관 바이러스 벡터) 내로의 통합 (Rosenfeld, et al. (1992) Cell, 68:143-155; Rosenfeld, et al. (1991) Science, 252:431-434); 또는 리포솜을 통한 이중 프로모터-인핸서 요소에 연결된 트랜스진의 전달 (Friedmann (1989),

상기 문헌; 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; 및 Wang and Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855); 리간드-특이적, 양이온-기재 수송 시스템으로의 커플링 (Wu and Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) 또는 네이키드 DNA, 발현 벡터의 사용 (Nabel et al. (1990), 상기 문헌); Wolff et al. (1990) Science, 247:1465-1468)을 들 수 있다. 트랜스젠의 조직 내로의 직접 주입은 국제화된 발현만을 생성한다 (Rosenfeld (1992) 상기 문헌); Rosenfeld et al. (1991) 상기 문헌; Brigham et al. (1989) 상기 문헌; Nabel (1990) 상기 문헌; 및 Hazinski et al. (1991) 상기 문헌). 브리그 함 등 (Brigham et al.) 그룹 (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 및 Clinical Research (1991) 39 (abstract))은 DNA 리포솜 복합체의 정맥내 또는 동맥내 투여 후의 마우스의 폐만의 생체내 형질감염을 보고하였다. 인간 유전자 요법 과정의 검토 문헌의 예는 문헌 [Anderson, Science (1992) 256:808-813]이다.

IV. 키트

본 발명은 또한 그의 사용을 위한 지시서와 함께 적합한 용기에 패키징된 적어도 안티센스 분자 (예를 들어, 서열 1 내지 12, 46 및 47로 설명된 안티센스 올리고머)를 포함하는, 유전적 질환을 갖는 환자의 치료를 위한 키트를 제공한다. 키트는 또한 보조 시약, 예컨대 완충액, 안정화제 등을 함유할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 방법의 적용이 많은 다른 질환의 치료에 사용하기에 적합한 안티센스 분자를 확인하기 위한 폭넓은 적용을 가짐을 이해해야 한다.

V. 실시예

상기 발명이 이해의 명확화의 목적으로 설명 및 예시의 방식으로 다소 상세하게 기재되었지만, 부속된 청구범위의 정신 또는 범위를 벗어나지 않고 특정 변화 및 변경이 그에 이루어질 수 있음은 본 발명의 기술의 관점에서 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다. 하기 실시예는 설명의 방식으로만 제공되며, 제한의 방식이 아니다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본질적으로 유사한 결과를 생성하도록 변화 또는 변경될 수 있는 다양한 중요하지 않은 파라미터를 용이하게 인지할 것이다.

물질 및 방법

세포 및 조직 배양 처리 조건

인간 횡문근육종 세포 (ATCC, CCL-136; RD 세포)를 조직 배양-처리된 T75 플라스크 (넉크 (Nunc)) 내로 1.5 x 10⁶ 세포/플라스크로 L-글루타민 (하이클론 (HyClone)), 10% 소 태아 혈청, 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 항생제 용액 (겔그로 (CelGro))을 갖는 가온된 DMEM 24 mL에서 시딩하고, 24시간 후, 배지를 흡인하고, 세포를 가온된 PBS에서 한번 세척하고, 신선한 배지를 첨가하였다. 세포를 37°C 인큐베이터에서 5.0% CO₂에서 80% 융합으로 성장시키고, 트립신을 사용하여 수확하였다. 동결건조된 포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고머 (PMO)를 뉴클레아제-무함유 수에서 대략 0.5 내지 2.0 mM로 재현탁화하고, 몰농도를 확인하기 위해, PMO 용액을 나노드롭 (NanoDrop) 2000 분광광도계 (써모 사이언티픽 (Thermo Scientific))를 사용하여 측정하였다. PMO를 제조자의 지시서 및 SG 키트 (론자 (Lonza))에 따라 핵천공을 이용하여 RD 세포로 전달하였다. PMO를 지시된 바와 같은 다양한 농도 (예를 들어, 2.5, 5, 10, 12.5, 20 및 25 마이크로몰)에서 시험하였다. 세포를 핵천공 후 24 시간 동안 12 또는 24-웰 플레이트 (n=2 또는 3)의 웰 당 대략 2 내지 3 X 10⁵ 세포로 인큐베이션한 후, 하기 기재된 바와 같이 RNA 추출에 제공하였다.

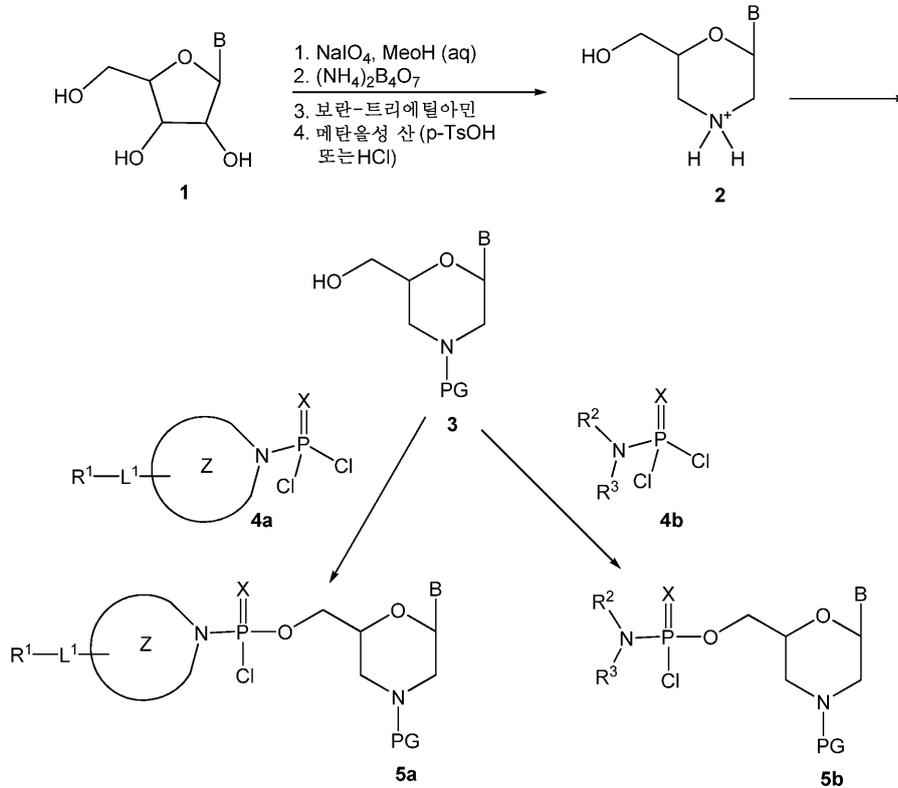
1차 인간 근모세포를 골격근 세포 성장 배지 (프로모셀 (PromoCell))에서 표준 기술을 이용하여 배양하였다. 다양한 농도에서의 PMO의 핵천공을 상기 RD 세포에 대해 기재된 바와 같이 수행하였다. 그 후, 세포를 프로모셀 성장 배지에서 12-웰 플레이트의 3중 웰에 플레이트팅하고, 24시간 동안 인큐베이션한 후, 하기 기재된 바와 같이 RNA 추출하였다.

RNA 추출 및 PCR 증폭

RNA를 PMO-처리된 세포 (RD 세포 또는 1차 인간 근모세포)로부터 GE 헬스케어 (GE Healthcare)로부터의 RNA스핀 96 웰 RNA 단리 키트를 사용하여 추출하고, 표준 기술 및 하기 프라이머 쌍을 이용하여 네스팅된 또는 비네스팅된 RT-PCR로 처리하였다. 외부 프라이머: 전방향 5'-CAATGCTCTGACCTCTGTGC-3' (서열 40), 역방향 5'-GCTCTTTCCAGGTTCAAGTGG-3' (서열 41); 내부 프라이머: 전방향 5'-GCTACAACAAGCTCAGGTGC-3' (서열 42), 역방향 5'-GCAATGTTATCTGCTTCTCCAACC-3' (서열 43). 일부의 경우, 비네스팅된 PCR은 내부 프라이머를 사용하여 수행하였다. 엑손 스킵핑을 겔 전기영동에 의해 또는 칼리퍼 랩칩 (Caliper LabChip) 생체분석기를 사용함으로써

써 측정하고, % 엑손 스킵핑 (즉, 전장 PCR 생성물에 상대적인 엑손-스킵핑된 생성물의 밴드 강도)를 도 3 내지 6에 나타낸 바와 같이 그래프화하였다.

[0285] 모르폴리노 서브유닛, PMO 및 변형된 서브유닛간 연결을 갖는 PMO의 제조



[0286]

[0287] 반응식 1: PMO 및 변형된-PMO 서브유닛에 대한 일반적인 합성 경로

[0288]

B가 염기 쌍형성 모이어티를 나타내고, PG가 보호기를 나타내는 반응식 1을 참고로, 모르폴리노 서브유닛은 나타낸 바와 같은 상응하는 리보뉴클레오시드 (1)로부터 제조될 수 있다. 모르폴리노 서브유닛 (2)은 적합한 보호기 전구체, 예를 들어 트리틸 클로라이드와의 반응에 의해 임의로 보호될 수 있다. 3' 보호기는 일반적으로 하기에 보다 상세하게 기재된 바와 같은 고체-상태 올리고머 합성 동안 제거된다. 염기 쌍형성 모이어티는 고체-상 올리고머 합성을 위해 적합하게 보호될 수 있다. 적합한 보호기로는 아데닌 및 시토신에 대해 벤조일, 구아닌에 대해 페닐아세틸, 및 히포크산틴에 대해 피발로일옥시메틸을 들 수 있다 (I). 피발로일옥시메틸기는 히포크산틴 헤테로시클릭 염기의 N1 위치에 도입될 수 있다. 비보호된 히포크산틴 서브유닛이 채용될 수 있지만, 활성화 반응에서의 수율은 염기가 보호될 경우 훨씬 우수하다. 다른 적합한 보호기로는 미국 특허 제 8,076,476호에 개시된 것을 들 수 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0289]

활성화된 인 화합물 4a 또는 4b와 3의 반응은 바람직한 연결 모이어티를 갖는 모르폴리노 서브유닛 (5a 또는 5b)을 생성한다. R¹ 및/또는 L¹ 모이어티는 또한 P-O 결합의 형성 후 또는 심지어 서브유닛이 올리고머 내로 혼입된 후에 헤테로시클릭 고리 Z 상에 설치될 수 있음이 주목되어야 한다.

[0290]

구조 4a 또는 4b의 화합물은 실시예에 기재된 것을 포함하는, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 수의 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 그 후, 모르폴리노 모이어티와의 커플링이 상기 개요된 바와 같이 진행된다.

[0291]

구조 5a 또는 5b의 화합물은 서브유닛간 연결을 포함하는 올리고머의 제조를 위한 고체-상 올리고머 합성에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 관련 기술분야에서 널리 공지되어 있다. 간략하게, 구조 5a 또는 5b의 화합물은 고체 지지체에 대한 링커를 함유하도록 5' 말단에서 변형될 수 있다. 일단 지지되면, 5a 또는 5b의 보호기 (예를 들어, 3'-말단에서 트리틸)는 제거되고, 유리 아민은 구조 5a 또는 5b의 제2 화합물 (또는 그의 유사체)의 활성화된 인 모이어티와 반응한다. 이 서열은 바람직한 길이의 올리고가 얻어질 때까지 반복된다. 말단 3' 말단에서의 보호기는 제거되거나, 3' 변형이 바람직할 경우 잔류할 수 있다. 올리고는 임의의 수의 방법, 또는 고체 지지체로의 연결을 절단하는 염기로의 예시 처리를 이용하여 고체 지지체로부터 제거될 수 있다.

- [0292] 본 발명의 일반적 및 특정 모르폴리노 올리고머에서의 모르폴리노 올리고머의 제조는 실시예에서 보다 상세하게 기재된다.
- [0293] **실시예 1**
- [0294] **모르폴리노 올리고머의 제조**
- [0295] 본 발명의 화합물의 제조는 하기 프로토콜을 이용하여 수행된다:
- [0296] 트리틸 피페라진 페닐 카르바메이트 35의 제조 (**도 2a 및 2b**): 디클로로메탄 중 화합물 11의 냉각된 현탁액 (6 mL/g 11)에 물 중 탄산칼륨 (3.2 당량)의 용액 (4 mL/g 탄산칼륨)을 첨가하였다. 이 2-상 혼합물에 디클로로메탄 중 페닐 클로로포르메이트 (1.03 당량)의 용액 (2 g/g 페닐 클로로포르메이트)를 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C로 가온하였다. 반응이 완료되면 (1 내지 2시간), 층을 분리하였다. 유기층을 물로 세척하고, 무수 탄산칼륨 상에서 건조시켰다. 생성물 35를 아세트니트릴로부터 결정화에 의해 단리하였다.
- [0297] 카르바메이트 알코올 36의 제조: 수화나트륨 (1.2 당량)을 1-메틸-2-피롤리디논에 현탁하였다 (32 mL/g 수화나트륨). 이 현탁액에 트리에틸렌 글리콜 (10.0 당량) 및 화합물 35 (1.0 당량)를 첨가하였다. 생성된 슬러리를 95°C로 가열하였다. 반응이 완료되면 (1 내지 2시간), 혼합물을 20°C로 냉각시켰다. 이 혼합물에 30% 디클로로메탄/메틸 tert-부틸 에테르 (v:v) 및 물을 첨가하였다. 생성물-함유 유기층을 수성 NaOH, 수성 숙신산 및 포화 수성 염화나트륨으로 연속적으로 세척하였다. 생성물 36을 디클로로메탄/메틸 tert-부틸 에테르/헵탄으로부터 결정화에 의해 단리하였다.
- [0298] 테일산 37의 제조: 테트라히드로푸란 중 화합물 36의 용액 (7 mL/g 36)에 숙신산 무수물 (2.0 당량) 및 DMAP (0.5 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 50°C로 가열하였다. 반응이 완료되면 (5시간), 혼합물을 20°C로 냉각시키고, 수성 NaHCO₃로 pH 8.5로 조정하였다. 메틸 tert-부틸 에테르를 첨가하고, 생성물을 수성 층으로 추출하였다. 디클로로메탄을 첨가하고, 혼합물을 수성 시트르산으로 pH 3으로 조정하였다. 생성물-함유 유기층을 pH=3 시트레이트 완충액 및 포화 수성 염화나트륨의 혼합물로 세척하였다. 이 37의 디클로로메탄 용액을 단리 없이 화합물 38의 제조에 사용하였다.
- [0299] 38의 제조: 화합물 37의 용액에 N-히드록시-5-노르보르넨-2,3-디카르복실산 이미드 (HONB) (1.02 당량), 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP) (0.34 당량), 그 후 1-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) (1.1 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 55°C로 가열하였다. 반응이 완료되면 (4 내지 5시간), 혼합물을 20°C로 냉각시키고, 1:1 0.2 M 시트르산/염수 및 염수로 연속적으로 세척하였다. 디클로로메탄 용액을 아세톤, 그 후 N,N-디메틸포름아미드로 용매 교환을 하고, 생성물을 아세톤/N,N-디메틸포름아미드로부터 포화 수성 염화나트륨으로 침전에 의해 단리하였다. 조 생성물을 물 중에서 수회 재슬러리화하여 잔류의 N,N-디메틸포름아미드 및 염을 제거하였다.
- [0300] 앵커-적하된 수지 상으로의 활성화된 "테일 (Tail)"의 도입은 디메틸 이미다졸리딘 (DMI)에서 고체 상 합성 동안 서브유닛의 혼입에 사용되는 절차에 의해 수행하였다.
- [0301] 모르폴리노 올리고머의 합성을 위한 고체 지지체의 제조: 이 절차는 거친 공극물 (40 내지 60 μm) 유리 프리트, 오버헤드 교반기 및 3-웨이 테플론 (Teflon) 정지콕을 갖는 실란화된 재킷형 펌프드 관 (미국 뉴저지주 소재 켐글래스 (ChemGlass))에서 수행하여 N₂를 프리트 또는 진공 추출을 통해 버블화하였다.
- [0302] 하기 절차에서 수지 처리/세척 단계는 2가지 기본적인 작동으로 이루어진다: 수지 유동화 또는 교반기 층 반응기 및 용매/용액 추출. 수지 유동화를 위해, 정지콕을 프리트를 통한 N₂ 유동을 허용하도록 위치시키고, 특정화된 수지 처리/세척액을 반응기에 첨가하고, 수지를 침투하게 하고, 완전히 습윤화시켰다. 그 후, 혼합을 개시하고, 수지 슬러리를 특정화된 시간 동안 혼합하였다. 용매/용액 추출을 위해, 혼합 및 N₂ 유동을 중단하고, 진공 펌프를 개시한 후, 정지콕을 수지 처리/세척액을 배기하여 제거되도록 위치시켰다. 모든 수지 처리/세척액 부피는 달리 언급되지 않는다면 수지 15 mL/g이었다.
- [0303] 실란화된 재킷형 펌프드 관 중 아미노메틸폴리스티렌 수지 (100 내지 200 메쉬; 질소 치환에 기초하여 약 1.0 mmol/g 적하; 75 g, 1 당량, 영국 소재 폴리머 랩스 (Polymer Labs), 파트 #1464-X799)에 1-메틸-2-피롤리딘 (NMP; 20 mL/g 수지)을 첨가하고, 수지를 1 내지 2시간 동안 혼합하면서 팽윤시켰다. 팽윤 용매의 배기 후, 수지를 디클로로메탄 (2 x 1 내지 2분), 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중 5% 디이소프로필에틸아민 (2 x 3 내지 4분) 및 디클로로메탄 (2 x 1 내지 2분)으로 세척하였다. 최종 세척액의 배기 후, 수지를 1-메틸-2-피롤리딘 중 디술피드 앵커 34의 용액 (0.17 M; 15 mL/g 수지, 약 2.5 당량)으로 처리하고, 수지/시약 혼합물을 45

℃에서 60시간 동안 가열하였다. 반응이 완료되면, 가열을 중단하고, 앵커 용액을 배기하고, 수지를 1-메틸-2-피롤리디논 (4 x 3 내지 4분) 및 디클로로메탄 (6 x 1 내지 2분)으로 세척하였다. 수지를 디클로로메탄 중 10% (v/v) 디에틸 디카르보네이트의 용액 (16 mL/g; 2 x 5 내지 6분)으로 처리한 후, 디클로로메탄 (6 x 1 내지 2분)으로 세척하였다. 수지 39 (도 4 참조)를 N2 스트림 하에서 1 내지 3시간 동안, 그 후 진공 하에서 일정한 중량 (± 2%)으로 건조시켰다. 수율: 원래 수지 중량의 110 내지 150%.

- [0304] 아미노메틸폴리스티렌-디설피드 수지의 적하량의 측정: 수지의 적하량 (잠재적으로 이용가능한 반응 부위의 수)은 수지의 그램 당 트리페닐메틸 (트리틸) 기의 수에 대한 분광 검정에 의해 측정된다.
- [0305] 알려진 중량의 건조된 수지 (25 ± 3 mg)를 실란화된 25 ml 부피측정 플라스크에 옮기고, 디클로로메탄 중 2% (v/v) 트리플루오로아세트산 약 5 mL을 첨가하였다. 내용물을 부드러운 스웰링에 의해 혼합한 후, 30분 동안 정치하였다. 부피를 추가의 디클로로메탄 중 2% (v/v) 트리플루오로아세트산으로 25 mL이 되게 하고, 내용물을 철저히 혼합하였다. 포지티브 대체 피펫을 사용하여, 트리틸-함유 용액 (500 µL)의 분취액을 10 mL 부피측정 플라스크로 옮기고, 부피를 메탄술폰산으로 10 mL이 되게 하였다.
- [0306] 최종 용액 중 트리틸 양이온 함량을 431.7 nm에서 UV 흡광도에 의해 측정하고, 수지 적하량을 적절한 부피, 희석액, 소광 계수 (ϵ : 41 µmol⁻¹cm⁻¹) 및 수지 중량을 이용하여 그램 수지 당 트리틸기 (µmol/g)로 계산하였다. 검정을 3회 수행하고, 평균 적하량을 계산하였다.
- [0307] 본 실시예에서 수지 적하 절차는 대략 500 µmol/g의 적하량을 갖는 수지를 제공할 것이다. 디설피드 앵커 혼합 단계를 실온에서 24시간 동안 수행할 경우, µmol/g으로 300 내지 400의 적하량이 얻어졌다.
- [0308] 테일 적하: 아미노메틸폴리스티렌-디설피드 수지의 제조를 위한 것과 동일한 설정 및 부피를 이용하여, 테일을 고체 지지체 내로 도입할 수 있다. 앵커 적하된 수지를 먼저 산성 조건 하에서 탈보호하고, 생성된 물질을 중화시킨 후, 커플링시켰다. 커플링 단계를 위해, 4-에틸모르폴린을 함유하는 DMI (NEM, 0.4 M) 중 38 (0.2 M)의 용액을 디설피드 앵커 용액 대신 사용하였다. 45℃에서 2시간 후, 수지 39를 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중 5% 디이소프로필에틸아민으로 2회, 및 DCM으로 1회 세척하였다. 수지에 벤조산 무수물 (0.4 M) 및 NEM (0.4 M)의 용액을 첨가하였다. 25분 후, 반응기 재킷을 실온으로 냉각시키고, 수지를 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중 5% 디이소프로필에틸아민으로 2회, 및 DCM으로 8회 세척하였다. 수지 40을 여과하고, 고진공 하에서 건조시켰다. 수지 40에 대한 적하량은 테일 적하에 사용된 원래의 아미노메틸폴리스티렌-디설피드 수지 39의 적하량인 것으로 정의된다.
- [0309] 고체 상 합성: 모르폴리노 올리고머를 2 mL 길손 (Gilson) 폴리프로필렌 반응 칼럼 (파트 # 3980270)에서 길손 AMS-422 자동화 펌프드 합성기 상에서 제조하였다. 물 유동을 위한 채널을 갖는 알루미늄 블록을 이들이 합성기 상에 놓인 것처럼 칼럼 주위에 정치하였다. AMS-422는 시약/세척 용액을 교대로 첨가하고, 특정화된 시간 동안 보유하고, 진공을 이용하여 칼럼을 배기할 것이다.
- [0310] 길이 약 25개 서브유닛 이하의 범위의 올리고머에 대해, 수지의 500 µmol/g 부근의 적하량을 갖는 아미노메틸폴리스티렌-디설피드 수지가 바람직하다. 보다 큰 올리고머에 대해, 수지의 300 내지 400 µmol/g의 적하량을 갖는 아미노메틸폴리스티렌-디설피드 수지가 바람직하다. 5'-테일을 갖는 분자가 바람직할 경우, 테일로 적하된 수지가 동일한 적하 지침으로 선택된다.
- [0311] 하기 시약 용액을 제조하였다:
- [0312] 탈트리틸화 용액: 4:1 디클로로메탄/아세트니트릴 중 10% 시아노아세트산 (w/v); 중화 용액: 3:1 디클로로메탄/이소프로판올 중 5% 디이소프로필에틸아민; 커플링 용액: 1,3-디메틸이미다졸리딘 중 바람직한 염기 및 연결 유형의 0.18 M (또는 20개 서브유닛보다 길게 성장된 올리고머에 대해 0.24 M) 활성화된 모르폴리노 서브유닛 및 0.4 M N 에틸모르폴린. 디클로로메탄 (DCM)을 상이한 시약 용액 세척액을 분리하는 과도적 세척액으로서 사용하였다.
- [0313] 42℃로 설정된 블록을 갖는 합성기 상에서, 아미노메틸폴리스티렌-디설피드 수지 (또는 테일 수지) 30 mg을 함유하는 각각의 칼럼에 1-메틸-2-피롤리디논 2 mL을 첨가하고, 실온에서 30분 동안 정치하였다. 디클로로메탄 2 mL로 2회 세척한 후, 하기 합성 사이클을 채용하였다:

단계	부피	전달	유지 시간
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
탈트리틸화	1.5 mL	매니폴드	15 초
DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
중화	1.5 mL	매니폴드	30 초
DCM	1.5 mL	매니폴드	30 초
커플링	350-500uL	시린지	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

[0314]

[0315]

각각의 칼럼이 적절한 서열에서 적절한 커플링 용액 (A,C,G,T,I)을 수용하도록 개별 올리고머의 서열을 합성기 내로 프로그래밍하였다. 칼럼 내의 올리고머가 그의 최종 서브유닛의 혼입을 완료했을 때, 칼럼을 블록으로부터 제거하고, 0.89 M 4-에틸모르폴린을 함유하는 4-메톡시트리페닐메틸 클로라이드로 이루어진 커플링 용액 (DMI 중 0.32 M)으로 최종 사이클을 수동으로 수행하였다.

[0316]

수지로부터의 절단 및 염기 및 골격 보호기의 제거: 메톡시트리틸화 후, 수지를 2 mL 1-메틸-2-피롤리디논으로 8회 세척하였다. 1-메틸-2-피롤리디논 중 0.1 M 1,4-디티오프레이탈 (DTT) 및 0.73 M 트리에틸아민으로 이루어진 절단 용액 1 mL을 첨가하고, 칼럼을 캡핑하고, 실온에서 30분 동안 정치하였다. 그 시간 후, 용액을 12 mL 휘톤 (Wheaton) 바이알 내로 배수하였다. 크게 줄어든 수지를 절단 용액 300 µL로 2회 세척하였다. 용액에 4.0 mL 농축 수성 암모니아 (20°C에서 저장됨)를 첨가하고, 바이알을 긴밀하게 캡핑하고 (테플론 라이닝된 스크루 캡으로), 혼합물을 스웰링하여 용액을 혼합하였다. 바이알을 45°C 오븐에서 16 내지 24시간 동안 정치하여 염기 및 골격 보호기의 절단을 실시하였다.

[0317]

조 생성물 정제: 바이알된 가암모니아분해 용액을 오븐으로부터 제거하고, 실온으로 냉각시켰다. 용액을 0.28 % 수성 암모니아 20 mL으로 희석하고, 마크로프랩 (Macroprep) HQ 수지 (바이오래드 (BioRad))를 함유하는 2.5x10 cm 칼럼을 통해 통과시켰다. 염 구배 (0.28% 암모니아 중 A: 0.28% 암모니아와 B: 1 M 염화나트륨; 60분에서 0 내지 100% B)를 사용하여 피크를 함유하는 메톡시트리틸을 용리하였다. 합한 분획을 풀링하고, 바람직한 생성물에 따라 추가로 가공하였다.

[0318]

모르폴리노 올리고머의 탈메톡시트리틸화: 마크로프랩 정제로부터 풀링된 분획을 1 M H3PO4로 처리하여 pH를 2.5로 낮추었다. 초기 혼합 후, 샘플을 실온에서 4분 동안 정치하고, 그 때 이들을 2.8% 암모니아/물로 pH 10 내지 11로 중화시켰다. 생성물을 고체 상 추출 (SPE)에 의해 정제하였다.

[0319] SPE 칼럼 패키징 및 컨디셔닝: 앰버크롬 (Amberchrome) CG-300M (미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재 롬 앤 하스 (Rohm and Haas)) (3 mL)을 20 mL 프릿된 칼럼 (바이오래드 이코노-팩 크로마토그래피 칼럼 (BioRad Econo-Pac Chromatography Columns) (732-1011)) 내로 패키징하고, 수지를 하기 3 mL로 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.

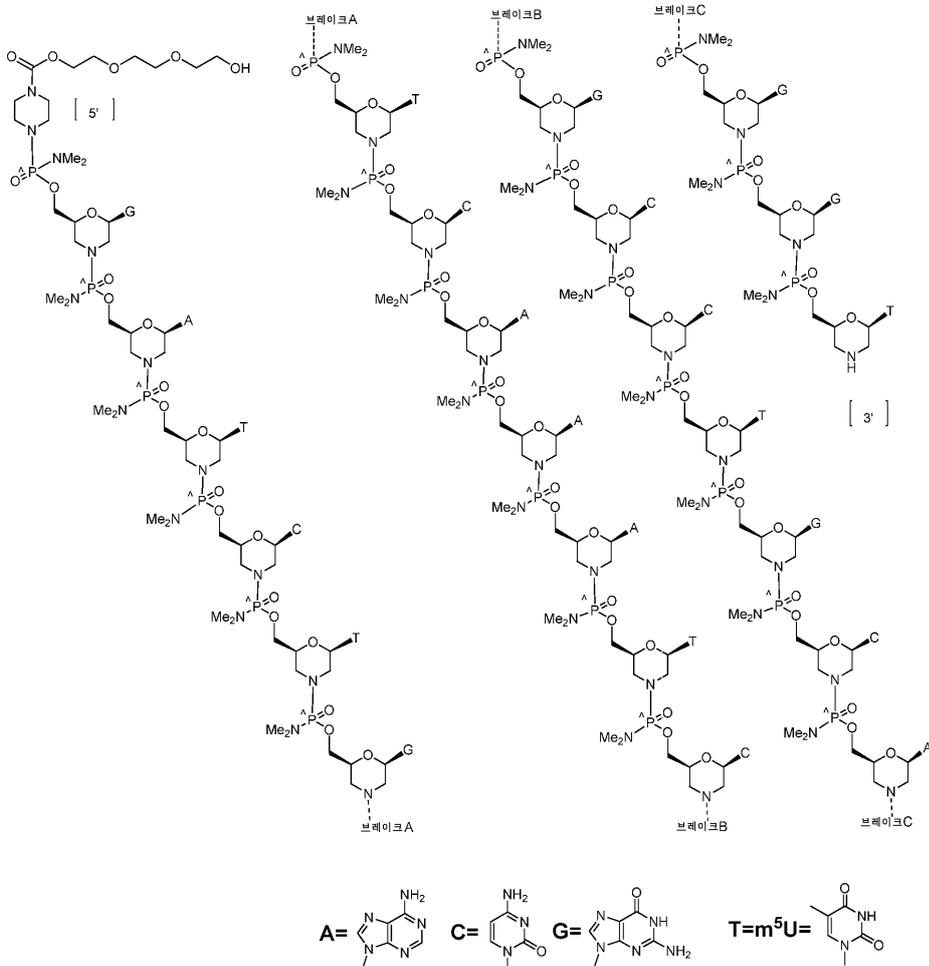
[0320] SPE 정제: 탈메톡시트리틸화로부터의 용액을 칼럼 상에 적하하고, 수지를 0.28% 수성 암모니아 3 내지 6 mL로 3회 세정하였다. 휘톤 바이알 (12 mL)을 칼럼 아래에 정치하고, 생성물을 0.28% 수성 암모니아 중 45% 아세토니트릴 2 mL로 2회 세척에 의해 용리하였다.

[0321] 생성물 분리: 용액을 드라이 아이스에서 동결하고, 바이알을 동결 건조기에 정치하여 솜털이 있는 백색 분말을 생성하였다. 샘플을 물에 용해시키고, 0.22 μm 필터 (폴 라이프 사이언스 (Pall Life Sciences), 0.2 μm HT 터프린 (Tuffryn) 막을 갖는 아크로디스크 (Acrodisc) 25 mm 시린지 필터)를 통해 시린지를 사용하여 여과하고, 광학 밀도 (OD)를 UV 분광광도계 상에서 측정하여 존재하는 올리고머의 OD 단위를 측정하고, 분석용 샘플을 제공하였다. 그 후, 용액을 동결건조를 위해 휘톤 바이알에 다시 정치하였다.

[0322] MALDI에 의한 모르폴리노 올리고머의 분석: MALDI-TOF 질량 분광법을 이용하여 정제에서 분획의 조성을 측정하고, 올리고머의 확인을 위한 증거 (분자량)를 제공하였다. 매트릭스로서 3,5-디메톡시-4-히드록시신남산 (시나핀산), 3,4,5-트리히드록시아세토페논 (THAP) 또는 알파-시아노-4-히드록시신남산 (HCCA)의 용액으로 희석한 후 샘플을 구동하였다.

[0323] 실시예 2

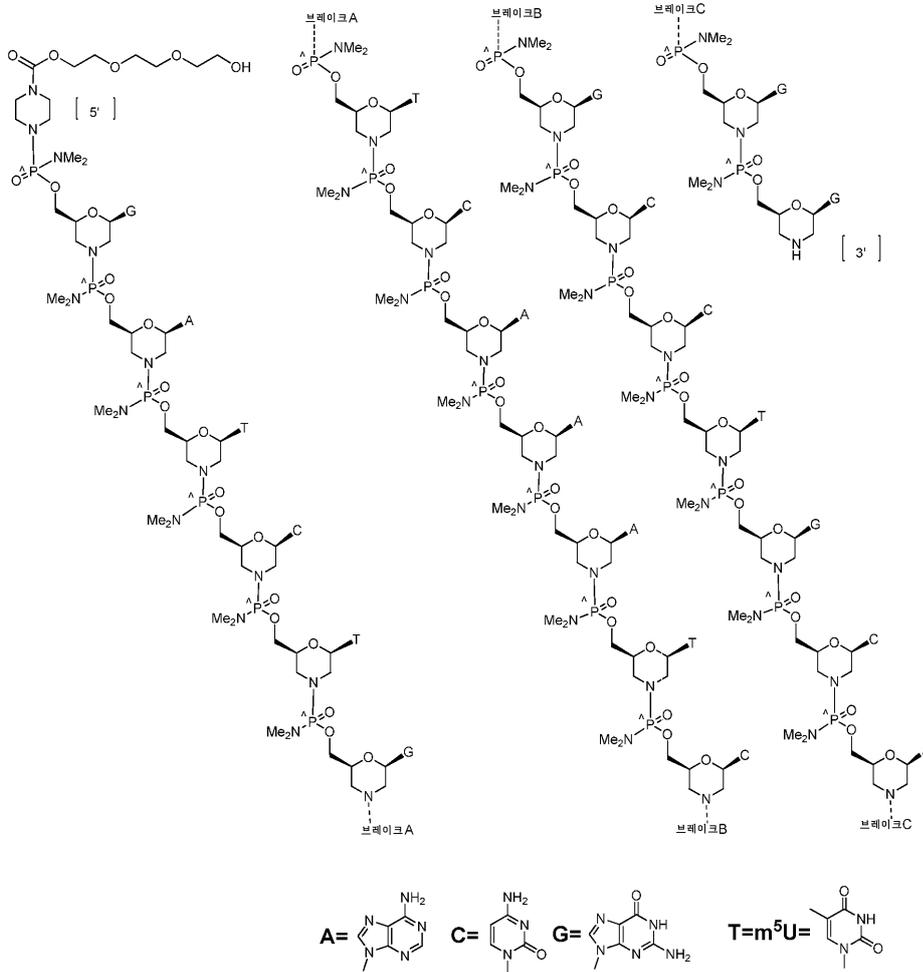
[0324] 실시예 1에 기재된 프로토콜을 이용하여, 하기 PMO, NG-13-0391 H44A(-8+15), 서열 4 (5'-GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG GT-3')를 합성하고, 실시예 8 및 9에 사용하였다.



[0325] [0326] ^인 중심의 입체화학은 한정되지 않음

[0327] 실시예 3

[0328] 실시예 1에 기재된 프로토콜을 이용하여, 하기 PMO, NG-13-0392 H44A(-7+15), 서열 5 (5'-GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG G-3')를 합성하고, 실시예 8 및 9에 기재된 바와 같이 사용하였다.

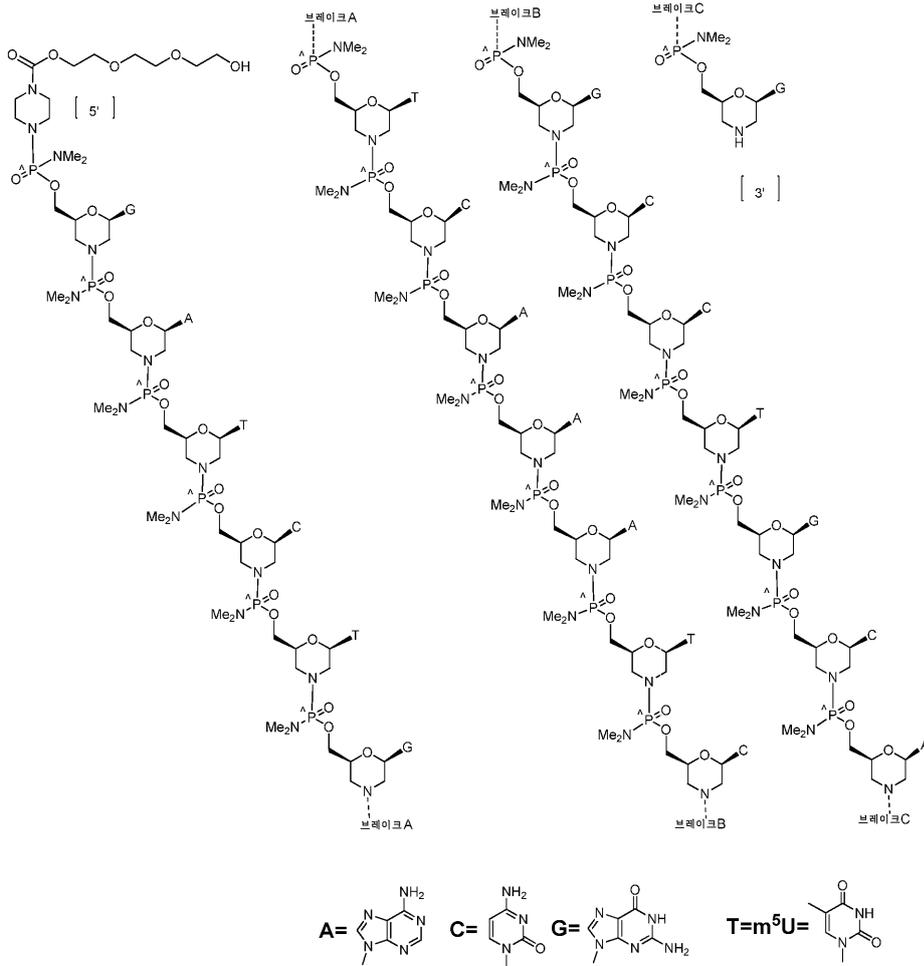


[0329]

[0330] ^인 중심의 입체화학은 한정되지 않음

[0331] 실시예 4

[0332] 실시예 1에 기재된 프로토콜을 이용하여, 하기 PMO, NG-13-0393 H44A(-6+15), 서열 6 (5'-GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG-3')을 합성하고, 실시예 8 및 9에 기재된 바와 같이 사용하였다.

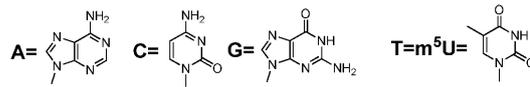
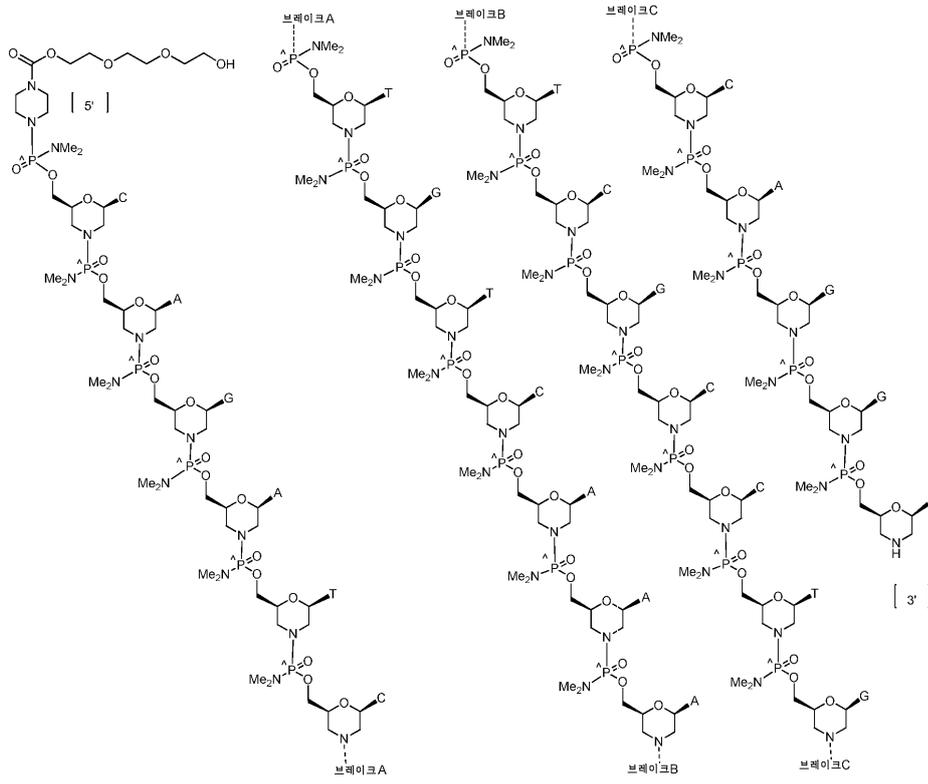


[0333]

[0334] ^인 중심의 입체화학은 한정되지 않음

[0335] 실시예 5

[0336] 실시예 1에 기재된 프로토콜을 이용하여, 하기 PMO, NG-13-0394 H44A(-8+17), 서열 7 (5'-CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AGG T-3')을 합성하고, 실시예 8 및 9에 기재된 바와 같이 사용하였다.

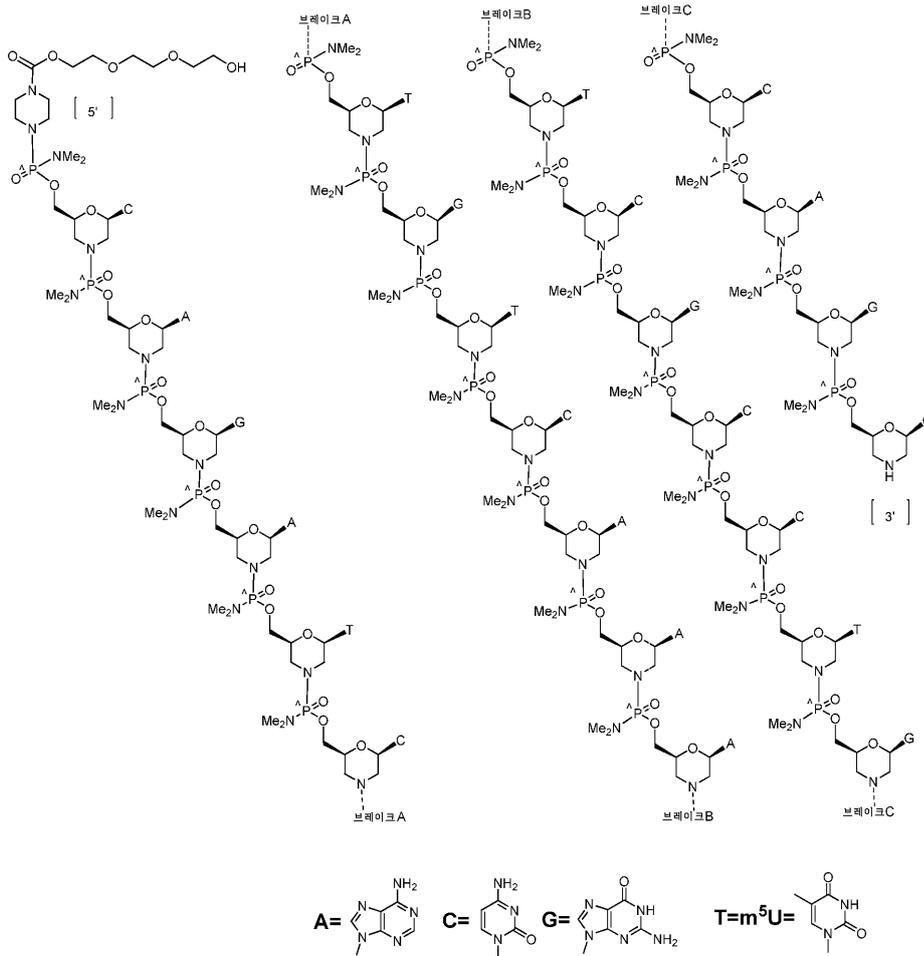


[0337]

[0338] ^인 중심의 입체화학은 한정되지 않음

[0339] 실시예 6

[0340] 실시예 1에 기재된 프로토콜을 이용하여, 하기 PMO, NG-13-0008 H44A(-7+17), 서열 1 (5'-CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AGG-3')을 합성하고, 실시예 8 및 9에 기재된 바와 같이 사용하였다.

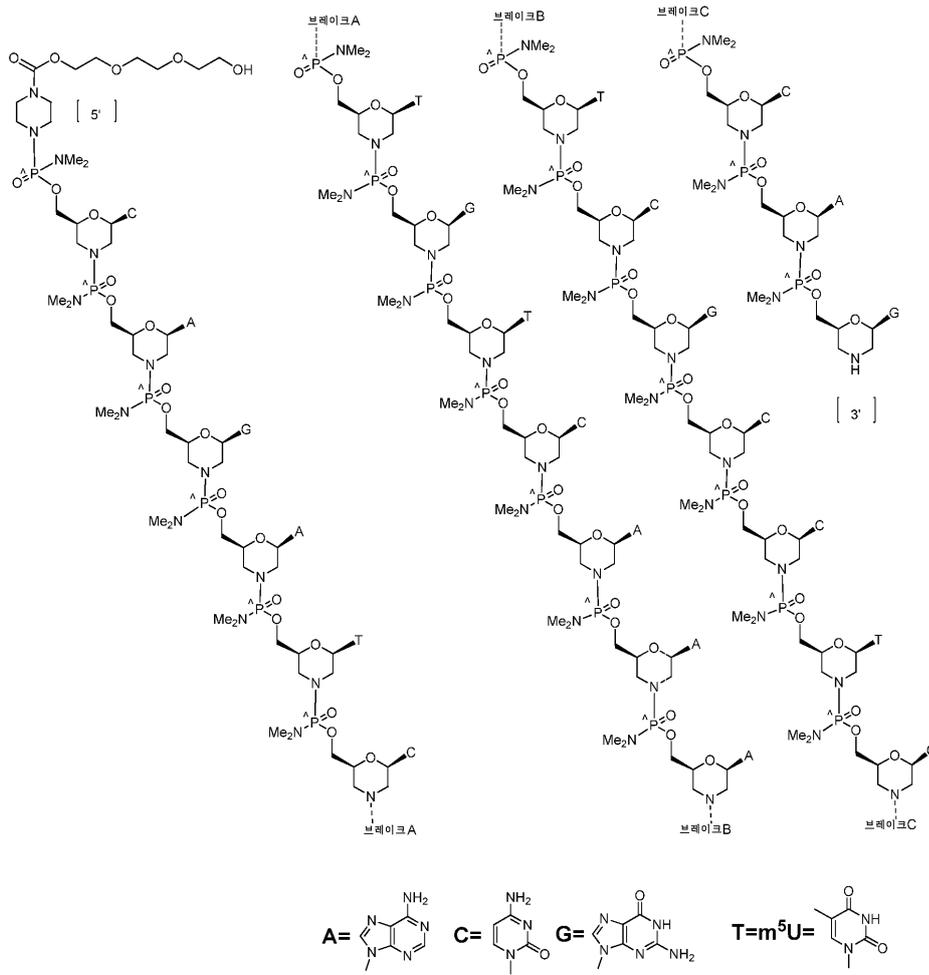


[0341]

[0342] ^인 중심의 입체화학은 한정되지 않음

[0343] 실시예 7

[0344] 실시예 1에 기재된 프로토콜을 이용하여, 하기 PMO, NG-13-0395 H44A(-6+17), 서열 8 (5'-CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AG-3')을 합성하고, 실시예 8 및 9에 기재된 바와 같이 사용하였다.



[0345]

[0346] ^인 중심의 입체화학은 한정되지 않음

[0347] 실시예 8

[0348] 예손 44 스키핑

[0349] 인간 디스트로핀 엑손 44를 표적화하는 일련의 안티센스 올리고머를 하기와 같이 설계하고, 합성하였다:

설명	서열	서열 번호
H44A(-07+17)	CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	1
H44A(-07+20)	CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	2
H44A(-07+22)	CTCAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	3
H44A(-8+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT	4
H44A(-7+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	5
H44A(-6+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAG	6
H44A(-8+17)	CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT	7
H44A(-6+17)	CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAG	8
H44A(+77+101)	GTGTCTTTCTGAGAACTGTTTTCAGC	9
H44A(+64+91)	GAGAACTGTTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	10
H44A(+62+89)	GAACTGTTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG	11
H44A(+62+85)	CTGTTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG	12
H44A(-13+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAG	46
H44A(-14+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGC	47

[0350]

[0351] 상기 나타난 선택된 안티센스 올리고머를 다양한 지시된 농도에서 RD 세포를 처리함으로써 엑손 스키피ng 효율에 대해 평가하였다. 이들 실험에서, H44A(-06+14) 및 H44A(+85+104) (미국 특허 제8,232,384호; 각각 서열: 167 및 165) 및 H44A(-06+20), H44A(-09+17), H44A(+59+85) 및 H44A(+65+90) (W02011/057350; 각각 서열: 68, 220, 54 및 10)에 상응하는 공개된 안티센스 올리고머를 비교용 올리고머로서 사용하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 올리고머 H44A(-07+17) (서열 1)은 공지된 서열에 비하여 RD 세포에서 엑손 44 스키피ng을 유도하는 데 매우 효과적이었다. 도 4에 나타난 바와 같이, H44A(+62+89) (서열 11)는 관련 기술분야에서 공지된 다른 매우 활성인 안티센스 올리고뉴클레오티드에 비하여 배양된 RD 세포에서 엑손 44 스키피ng을 유도하는 데 매우 효과적이었다.

[0352] 실시예 9

[0353] 1차 인간 근모세포에서의 엑손 44 스키피ng

[0354] 실시예 8에 기재된 상기 결과에 기초하여, 1차 인간 근모세포에서 추가의 올리고머를 설계하고, 시험하였다. 관련 기술분야에서 공지된 추가의 서열은 새롭게 설계된 올리고머에 대한 비교물로서 분석에 포함되었다 (H44A(-10+15) 및 H44A(-20+5); 각각 서열: 44 및 45). 이들 서열은 PCT 공보 W0/2010/048586에 서열 4 및 2로서 개시되어 있다. 도 5 내지 6에 나타난 바와 같이, H44A(-07+17)로서 정의된 표적 영역 내에 네스팅된 올리고머의 범위는 모두 관련 기술분야에서 공지된 서열에 비하여 상대적으로 높은 수준으로 엑손 44 스키피ng을 유도하는 능력을 갖는다. 바람직한 올리고머는 상기에 실시예 2 내지 7에 나타나 있다 (각각 서열 4, 5, 6, 7, 1 및 8).

[0355] *****

[0356] 본 명세서에 인용된 모든 공보 및 특허 출원은 각각의 개별 공보 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참고로 도입되는 것으로 지시되는 것처럼 본원에 참조로 포함된다.

[0357] 서열 목록

설명	서열	서열 번호
H44A(-07+17)	CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	1
H44A(-07+20)	CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	2
H44A(-07+22)	CTCAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	3
H44A(-8+15)	GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG GT	4
H44A(-7+15)	GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG G	5
H44A(-6+15)	GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG	6
H44A(-8+17)	CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AGG T	7
H44A(-6+17)	CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AG	8
H44A(+77+101)	GTGTCTTTCTGAGAACTGTTTCAGC	9
H44A(+64+91)	GAGAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	10
H44A(+62+89)	GAAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG	11
H44A(+62+85)	CTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG	12
H44A(-06+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAG	13
H44A(+85+104)	TTTGTGTCTTTCTGAGAAAC	14
H44A(+61+84)	TGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGA	15
H44A(-10+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	16
H44A(+64+88)	AAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	17
H44A(+79+103)	TTGTGTCTTTCTGAGAACTGTTCA	18
H44A(-06+20)	CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAG	19
H44A(-09+17)	CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTA	20
H44A(+59+85)	CTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGATT	21
H44A(+59+89)	GAAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGATT	22
H44A(+65+90)	AGAAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCA	23
rTAT	RRRQRRKKR	24
Tat	RKKRRQRRR	25
R ₃ F ₂	RRRRRRRRFF	26
R ₃ F ₂ R ₄	RRRRRFRRRR	27
R ₄	RRRR	28
R ₅	RRRRR	29
R ₆	RRRRRR	30
R ₇	RRRRRRR	31
R ₈	RRRRRRRR	32
R ₉	RRRRRRRRR	33
(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXR	34
(RAh _x R) ₄ ; (P007)	RAh _x RRAh _x RRAh _x RRAh _x R	35
(RAh _x R) ₅ ; (CP04057)	RAh _x RRAh _x RRAh _x RRAh _x RRAh _x R	36
(RAh _x RRBR) ₂ ; (CP06062)	RAh _x RRBRRAh _x RRBR	37

[0358]

(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRRFF	38
(RGR) ₄ F ₂	RGRRRRRRRGRFF	39
프라이머	CAATGCTCCTGACCTCTGTGC	40
프라이머	GCTCTTTCCAGGTTCAAGTGG	41
프라이머	GTCTACAACAAAGCTCAGGTGG	42
프라이머	GCAATGTTATCTGCTTCTCCTCAACC	43
H44A(-10+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	44
H44A(-20+5)	ATCGCCTGCAGGTAAAAGCATATGG	45
H44A(-13+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAG	46
H44A(-14+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGC	47

[0359]

[0360]

참고문헌

- 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.
- 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.
- Dunckley, 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.
- Dunckley, 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*.
- Kinali, M., V. Arechavala-Gomez, et al. (2009). "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study." *Lancet Neurol* **8**(10): 918-28.
- 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.
- 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.
- Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide

[0361]

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

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.

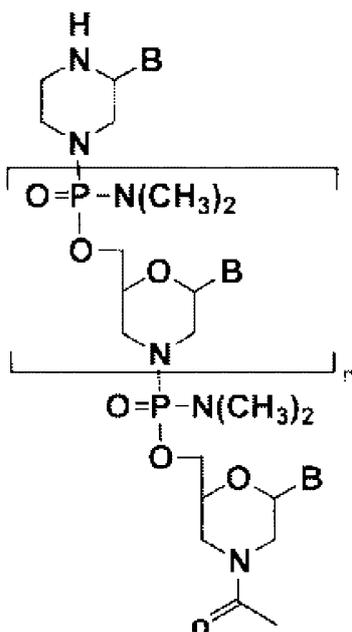
Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(39): 14814-9.

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.

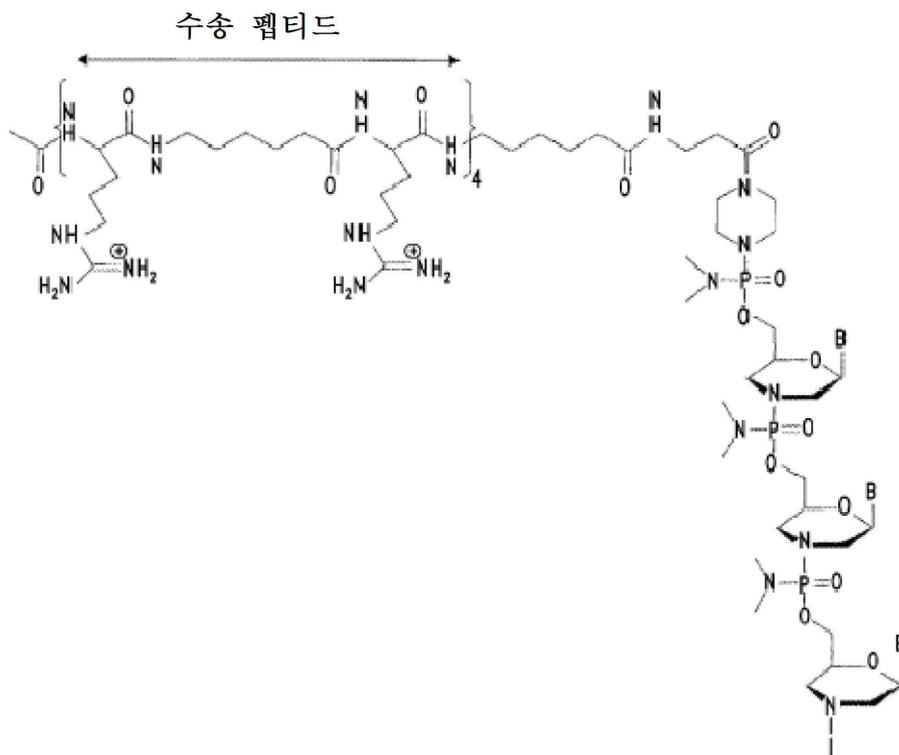
[0362]

도면

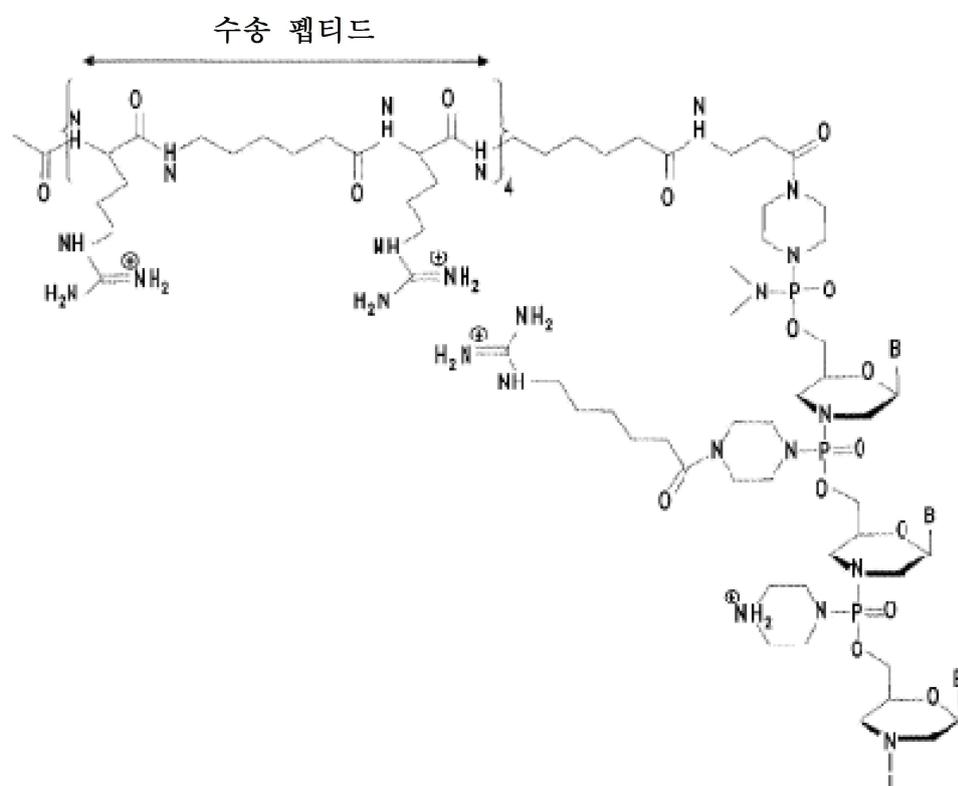
도면1a



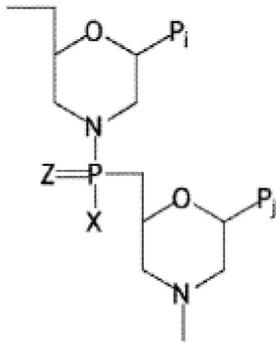
도면1b



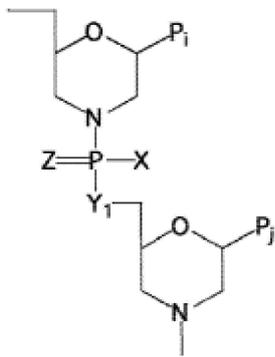
도면1c



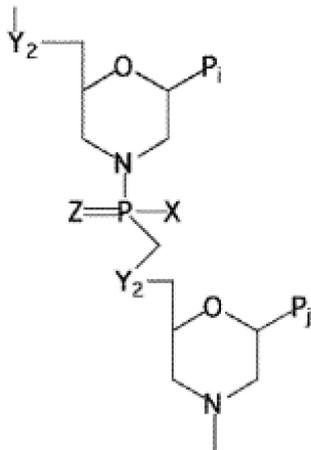
도면1d



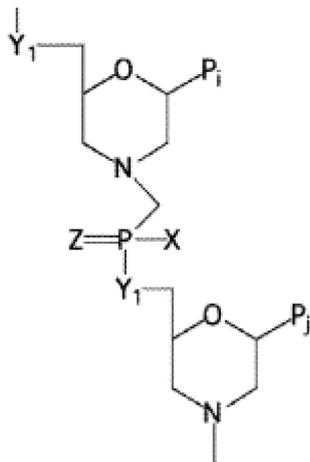
도면1e



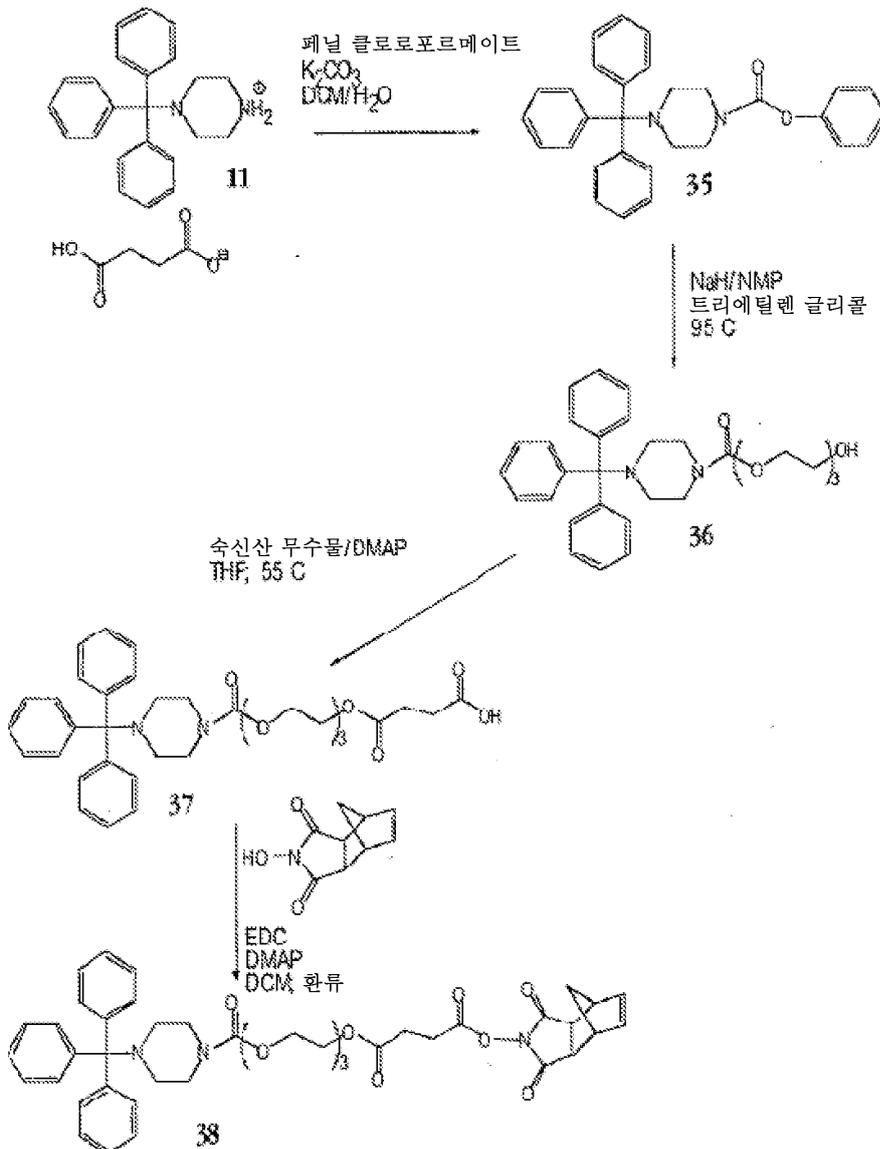
도면1f



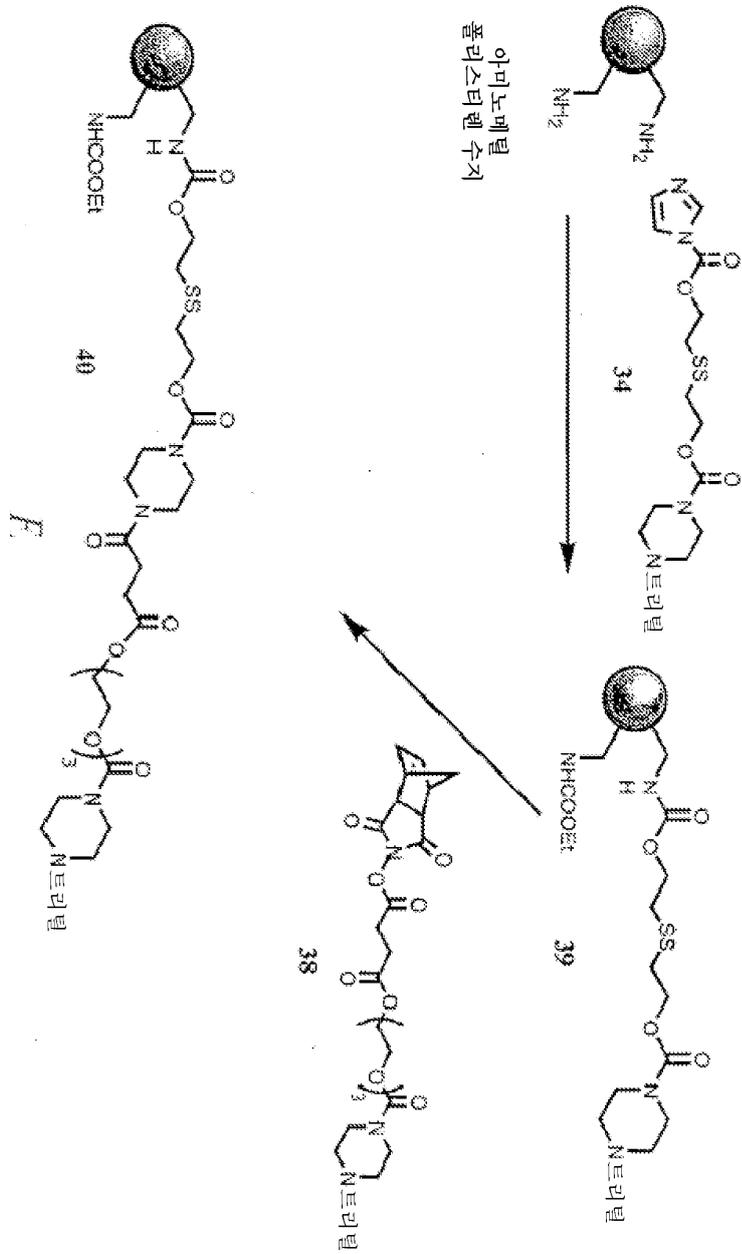
도면1g



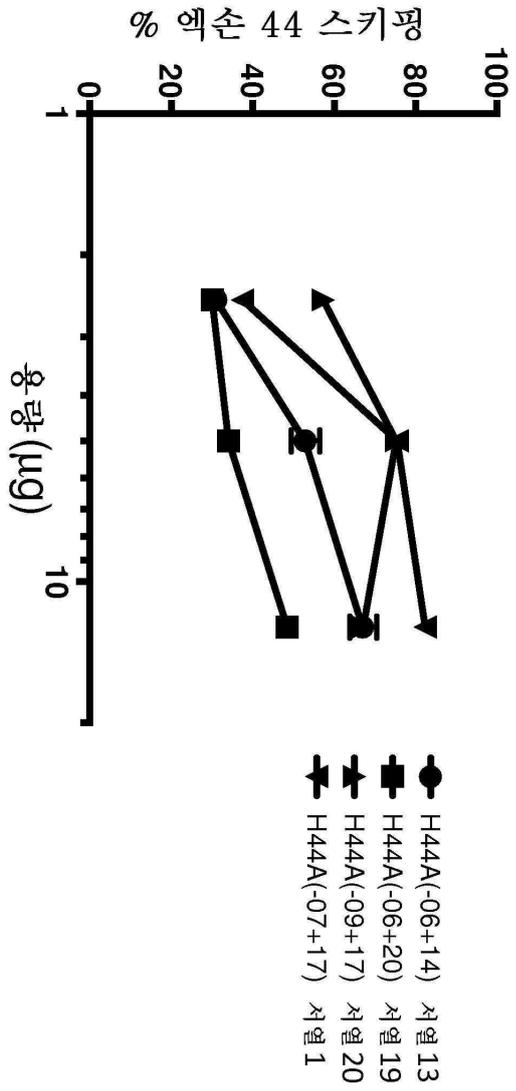
도면2a



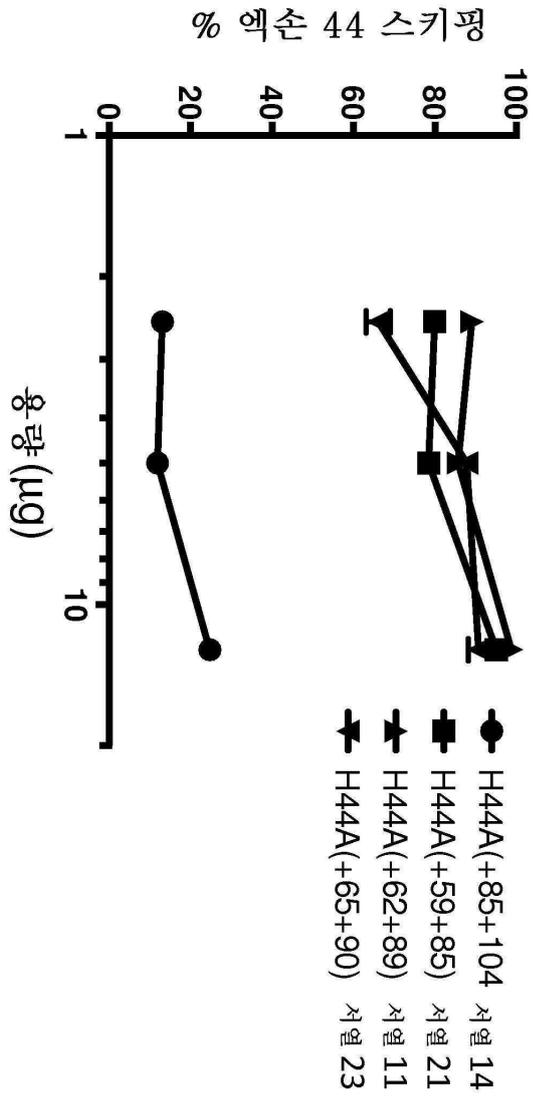
도면2b



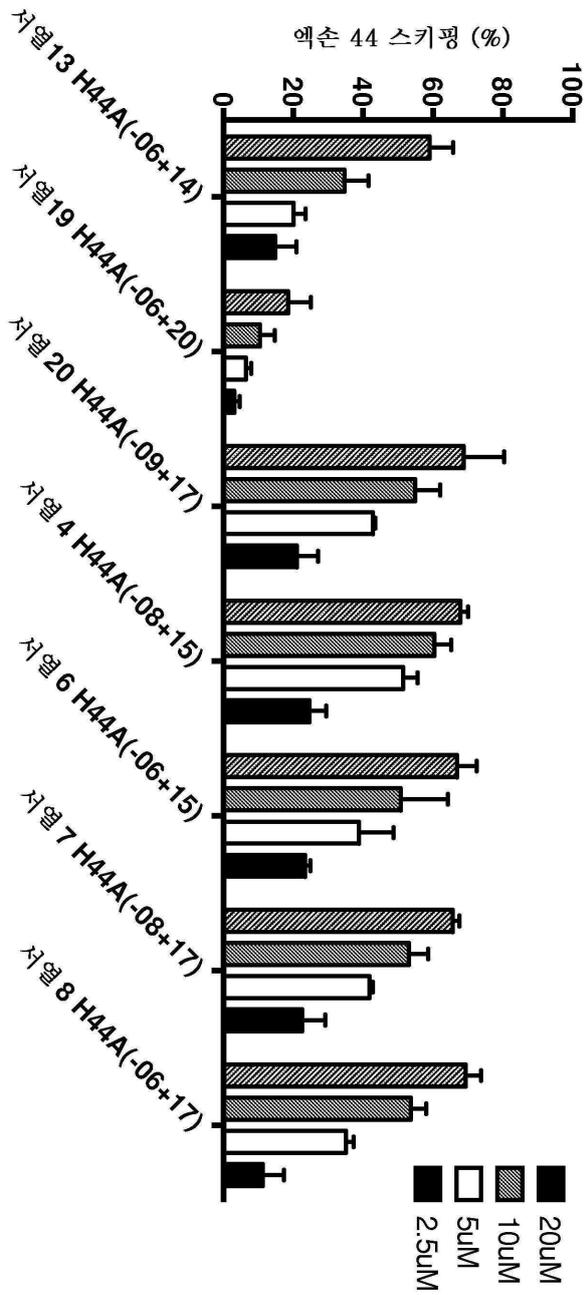
도면3



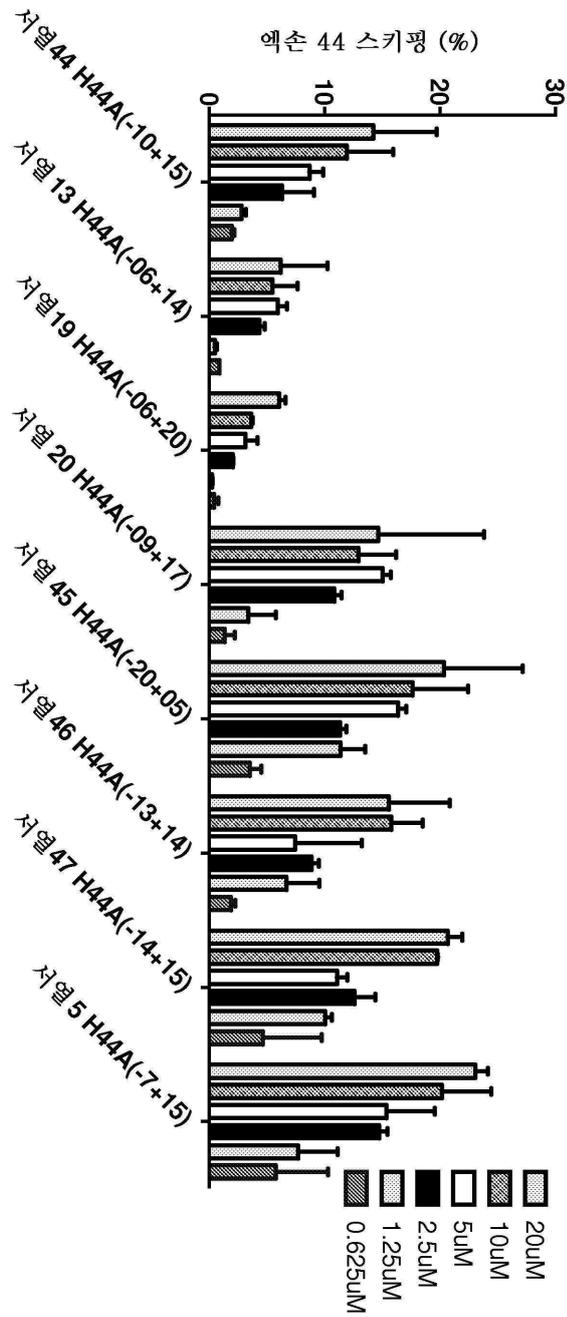
도면4



도면5



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SAREPTA THERAPEUTICS, INC.

BESTWICK, Richard K., et al.

<120> EXON SKIPPING COMPOSITIONS FOR TREATING MUSCULAR DYSTROPHY

<130> AVN-013BPC

<140> PCT/US2014/029689

<141> 2014-03-14
 <150> US 61/784,547
 <151> 2013-03-14
 <160> 47
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 1
 cagatctgtc aaatcgctg cagg 24

<210> 2
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 2
 caacagatct gtcaaatcgc ctgcagg 27

<210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 3
 ctcaacagat ctgtcaaadc gcctgcagg 29

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 4
 gatctgtcaa atcgctgca ggt 23

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 5
 gatctgtcaa atcgctgca gg 22
 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 6
 gatctgtcaa atcgctgca g 21
 <210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 7
 cagatctgtc aaatcgctg caggt 25

 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 8
 cagatctgtc aaatcgctg cag 23
 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 9

gtgtctttct gagaaactgt tcagc 25
 <210> 10
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 10
 gagaaactgt tcagcttctg ttagccac 28

 <210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 11
 gaaactgttc agcttctggtt agccactg 28
 <210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 12
 ctgttcagct tctgttagcc actg 24
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 13
 atctgtcaaa tcgctgcag 20

 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 14
 tttgtgtcctt tctgagaaac 20
 <210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 15
 tgttcagctt ctgtagcca ctga 24
 <210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 16
 gatctgtcaa atcgctgca ggtaa 25
 <210> 17
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 17
 aaactgttca gcttctgtta gccac 25
 <210> 18
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 18
 ttgtgtcttt ctgagaaact gttca 25
 <210> 19
 <211> 26
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 19
 caacagatct gtcaaatcgc ctgcag 26

<210> 20
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 20
 cagatctgtc aaatgcctg caggta 26

<210> 21
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 21
 ctgttcagct tctgttagcc actgatt 27

<210> 22
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 22
 gaaactgttc agcttctggt agcactgat t 31

<210> 23
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 23
 agaaactggt cagcttctgt tagcca 26

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 24

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 25

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 26

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe

1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 27

Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic peptide

<400> 28

Arg Arg Arg Arg

1

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 29

Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 31

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 32

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 33

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 34

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

1 5 10 15

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is 6-aminohexanoic acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is 6-aminohexanoic acid

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is 6-aminohexanoic acid

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is 6-aminohexanoic acid

<400> 35

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

1 5 10

<210> 36

<211> 15

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa is 6-aminohexanoic acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa is 6-aminohexanoic acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa is 6-aminohexanoic acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa is 6-aminohexanoic acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa is 6-aminohexanoic acid
 <400> 36

Arg Xaa Arg
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa is 6-aminohexanoic acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa is beta-alanine
 <220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is 6-aminohexanoic acid

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is beta-alanine

<400> 37

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

1 5 10

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 38

Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Phe Phe

1 5 10

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 39

Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Phe Phe

1 5 10

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 40

caatgetcct gacctctgtg c

21

<210> 41

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 41
 gctcttttcc aggttcaagt gg 22

<210> 42
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 42
 gtctacaaca aagctcaggt cg 22

<210> 43
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 43
 gcaatgttat ctgcttcctc caacc 25

<210> 44
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 44
 gatctgtcaa atcgctgca ggtaa 25

<210> 45
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 45
 atcgctgca ggtaaaagca tatgg 25

<210> 46

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 46

atctgtcaaa tgcctgcag gtaaaag 27

<210> 47

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 47

gatctgtcaa atgcctgca ggtaaaagc 29