(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0037996
(43) 공개일자 2024년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01) *A61P 7/00* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2024.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7004273
(22) 출원일자(국제) 2022년07월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년02월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/073668
(87) 국제공개번호 WO 2023/288240
국제공개일자 2023년01월19일
(30) 우선권주장
63/222,336 2021년07월15일 미국(US)
63/224,362 2021년07월21일 미국(US)

(71) 출원인
반다 파마슈티칼즈, 인코퍼레이티드.
미국 워싱턴 디씨 20037 웬실베니아 에비뉴 엔더블유 2200 수트 300-이
(72) 발명자
프히호젠, 바르틀로메이
미국 워싱턴 20037 워싱턴 22 스트리트 엔더블유 #4 1414
스미제크, 산드라
미국 워싱턴 20037 워싱턴 22 스트리트 엔더블유 #4 1414
(74) 대리인
특허법인 무한

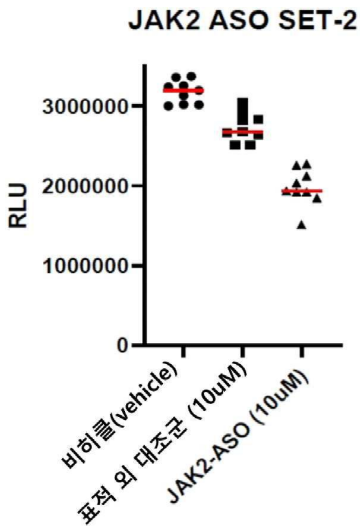
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO) 유전자 억제 및 치료**

(57) 요 약

본 발명의 구현예는 일반적으로 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)에 관한 것이며, 보다 구체적으로는, ASO를 사용하여 단백질 합성을 조절하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 본 발명은 골수이형성 증후군(MDS)으로 진단된 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 환자에게 JAK2 (ASO-T-JAK2) 화합물을 암호화하는 핵산 분자를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)를 이러한 질병을 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 25/02 (2018.01)
A61P 7/00 (2018.01)
C12N 15/1137 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2320/30 (2013.01)
C12N 2320/34 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome, MDS)으로 진단된 환자를 치료하는 방법으로서,

상기 환자에게 골수이형성 증후군을 치료하는데 효과적인 양의 ASO-T-JAK2 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 ASO-T-JAK2 화합물은 서열번호 2 또는 서열번호 3, 또는 둘 다를 표적으로 하는 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 ASO-T-JAK2 화합물은 서열번호 4 또는 서열번호 5를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 ASO-T-JAK2 화합물의 양은 환자에서 JAK2의 발현을 억제하는데 충분한 양인 것인, 방법.

청구항 5

진성적혈구증가증(polycythemia vera, PV)으로 진단된 환자를 치료하는 방법으로서,

상기 환자에게 진성적혈구증가증을 치료하는데 효과적인 양의 ASO-T-JAK2 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 ASO-T-JAK2 화합물은 서열번호 2 또는 서열번호 3, 또는 둘 다를 표적으로 하는 것인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 ASO-T-JAK2 화합물은 서열번호 4 또는 서열번호 5를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 ASO-T-JAK2 화합물의 양은 환자에서 JAK2의 발현을 억제하는데 충분한 양인 것인, 방법.

청구항 9

개체(individual)에서 JAK2 유전자의 발현을 억제하는 방법으로서,

개체에게 JAK2 발현을 억제하는데 효과적인 양의 ASO-T-JAK2 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 ASO-T-JAK2 화합물은 서열번호 2, 서열번호 3, 또는 둘 다를 표적으로 하는 것인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 ASO-T-JAK2 화합물은 서열번호 4 또는 서열번호 5를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

JAK2를 암호화하는 핵산 분자를 표적으로 하는, 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO).

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 안티센스 뉴클레오티드(ASO)는 서열번호 2, 서열번호 3 또는 둘 다를 표적으로 하는, 안티센스 뉴클레오티드(ASO).

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 안티센스 뉴클레오티드(ASO)는 서열번호 4 및 서열번호 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 안티센스 뉴클레오티드(ASO).

청구항 15

제12항의 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO); 및

약제학적으로 허용되는 희석제, 담체, 보조제(adjuvant), 또는 이들의 조합;을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 멸균 비경구 제형을 추가로 더 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 17

샤르코-마리-투스 2형 (Charcot-Marie-Tooth type 2, CMT2)으로 진단된 환자를 치료하는 방법으로서,

상기 환자에게 샤르코-마리-투스 2형을 치료하는데 효과적인 양의 ASO-T-IGHMBP2 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 환자는 샤르코-마리-투스 2S형 (CMT2S)으로 진단된 환자인 것인, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 ASO-T-IGHMBP2 화합물은 서열번호 7을 표적으로 하는 것인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 ASO-T-IGHMBP2 화합물은 서열번호 9를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 ASO-T-IGHMBP2 화합물은 서열번호 8을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 ASO-T-IGHMBP2 화합물은 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 ASO-T-IGHMBP2 화합물은 서열번호 15의 서열 중 길이가 13 내지 35 뉴클레오티드인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 24

IGHMBP2 유전자의 C31401A 돌연변이를 보유한 개체에서 돌연변이된 IGHMBP2 유전자의 발현을 억제하는 방법으로서,

상기 개체에게 돌연변이된 IGHMBP2 유전자의 발현을 억제하는데 효과적인 양의 ASO-T-IGHMBP2 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 ASO-T-IGHMBP2 화합물은 서열번호 7을 표적으로 하는 것인, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 ASO-T-IGHMBP2 화합물은 서열번호 9를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 ASO-T-IGHMBP2 화합물은 서열번호 8을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방

법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 ASO-T-IGHMBP2 화합물은 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 ASO-T-IGHMBP2 화합물은 서열번호 15의 서열 중 길이가 13 내지 35 뉴클레오티드인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 30

돌연변이된 IGHMBP2 유전자를 암호화하는 핵산 분자를 표적으로 하는, 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO).

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)는 서열번호 7을 표적으로 하는, 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO).

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)는 서열번호 9를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 안티센스 뉴클레오티드.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)는 서열번호 8을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 안티센스 뉴클레오티드(ASO).

청구항 34

제32항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)는 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO).

청구항 35

제32항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)는 서열번호 15의 서열 중 길이가 13 내지 35 뉴클레오티드인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO).

청구항 36

제30항의 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO); 및

약제학적으로 허용되는 희석제, 담체, 보조제 또는 이들의 조합;을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 멸균 비경구 제형을 추가로 더 포함하는, 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] *관련 출원에 대한 상호 참조*

[0002] 본 출원은 동시-계류 중인(co-pending) 2021년 7월 15일에 출원된 출원번호 제63/222,336호의 미국 특허가출원 및 2021년 7월 21일에 출원된 출원번호 제63/224,362호의 미국 특허가출원에 대해 우선권을 주장하며, 각 출원은 본 명세서에 완전히 명시된 것처럼 본 명세서에 통합되어 있다.

[0003] *서열 목록*

[0004] 2022년 6월 19일에 생성되고, 63 kb이며, "_VAND-0224-PCT.xml"을 파일명으로 하는 전자 파일을 포함하는 서열 목록이 본 명세서에 통합된다.

배 경 기 술

[0005] 본 발명은 특정 신규 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)에 관한 것이며, 보다 구체적으로는, 이의 약제학적 조성물 및 ASO를 이용한 단백질 합성 조절이 치료적 가치를 가질 수 있는 특정 질병 또는 병태를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 보다 구체적인 측면은 진성적혈구증가증(polycythemia vera, PV), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome, MDS), 및 샤르코-마리-투스병 2형 (Charcot-Marie-Tooth type 2, CMT2)과 같은 알려진 질환의 치료에 관한 것이다.

[0006] PV는 적혈구 증식, 골수성 백혈구 증가증, 혈소판 증가증, 및 비장 비대증을 특징으로 하는 골수 증식성 질환이다. PV로 진단받은 대부분의 개체(individual)들은 JAK2 유전자 내 617번 위치의 발린이 페닐알라닌으로 변이된 돌연변이 (V617F)를 가지고 있다.

[0007] MDS는 비효율적인 조혈 작용을 특징으로 하는 클론성 혈액 줄기세포 질환 그룹으로, 종종 빈혈을 유발한다. 일부 MDS 사례에서는 위와 같은 JAK2 유전자의 V617F 돌연변이와 관련이 있으며, 특히 혈소판 수의 증가와 관련이 있는 것으로 나타났다.

[0008] JAK2 유전자는 세포 성장, 발달, 분화 및 히스톤 변형, 사이토카인 및 성장 인자 신호 전달에 관여하는 비수용체 티로신 키나아제를 암호화한다.

[0009] 유전성 운동 및 감각 신경병증으로도 알려진, 샤르코-마리-투스병(CMT)은 말초 신경과 근육 조절에 관여하는 신경에 손상을 일으킨다. 증상은 발과 다리 아래쪽에서 시작하여 팔, 손, 및 손가락으로 이어지는 점진적인 양상을 보인다.

[0010] 거의 모든 케이스의 CMT는 유전된다. 40개 이상의 유전자가 CMT와 연관되어 있다. 일부 유전자는 두 가지 형태 이상의 CMT와 연관되어 있고, 일부 형태의 CMT는 두 가지 이상의 유전자와 연관되어 있다. 따라서, 한 개체가 두 가지 이상의 유전적 돌연변이로 인해 두 가지 형태 이상의 CMT를 앓을 수 있다. 전체 CMT 사례의 절반 이상은 17번 염색체에 있는 PMP22 유전자의 중복으로 인해 발생한다. CMT의 다른 형태는 X-연관 돌연변이에 의해 발생한다.

[0011] CMT 2형(CMT2)은 신경 축삭에 영향을 미치는 CMT의 덜 흔한 서브타입(subtype)이다. 대부분의 CMT2 형태는 상염색체 우성 패턴으로 유전되지만, CMT 2S형 (CMT2S)를 포함한 일부 형태들은 상염색체 열성 패턴으로 유전된다. 따라서, CMT2S와 관련된 증상들은 일반적으로 상염색체 우성 형태의 CMT2에 비해 덜 심각하다. CMT2S와 관련된 돌연변이는 11번 염색체에 있는 IGHMBP2 (면역글로불린 뮤 DNA 결합 단백질 2) 유전자의 돌연변이로, 비정상적인 RNA 프로세싱 및 축삭 신경병증을 유발한다.

발명의 내용

[0012] *요약*

[0013] “안티센스 올리고뉴클레오티드” 또는 “ASO”는 mRNA 분자를 비활성화하는 등 유전자 발현을 억제할 수 있는 방식으로 표적 RNA 서열에 혼성화 되는 다중 합성 뉴클레오티드 RNA 화합물을 말한다.

[0014] 본 발명은 MDS로 진단된 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 환자에게 MDS 치료에 효과적인 양의 ASO-T-JAK2 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명에 따라, ASO-T-JAK2 화합물은 JAK2를 암호화하는 핵산 분자를 표적으로 하는 임의의 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)를 말한다. 또한, MDS의 치료에 효과적인 ASO-T-JAK2 화합물의 양은 환자의 JAK2 단백질 발현을 억제하는데 효과적인 양의 화합물의 투여를 필요로 한다.

[0015] 위에서 언급한 바와 같이, “ASO-T-JAK2”라는 용어는 JAK2 유전자를 암호화하는 핵산 분자를 표적으로 하는 ASO를 의미한다. “핵산 분자”라는 용어는 폴리뉴클레오티드 화합물, 즉 RNA를 지칭한다. “안티센스 올리고뉴클레오티드” 또는 “ASO”는 mRNA를 비활성화하는 등 유전자 발현을 억제할 수 있는 방식으로 표적 RNA에 혼성화되는 다중 합성 뉴클레오티드 DNA 화합물을 말한다. 예시적인 ASO-T-JAK2 화합물이 본 명세서에 개시되어 있다 (각각 서열번호 2 및 3을 표적으로 하는, 서열번호 4 및 5). 표적 RNA 서열에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 개발하기 위해 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 추가적인 ASO-T-JAK2 화합물을 식별하고 제조할 수 있다.

[0016] “ASO-T-IGHMBP2”라는 용어는 IGHMBP2 유전자를 암호화하는 핵산 분자를 표적으로 하는 ASO를 말한다. “핵산 분자”라는 용어는 폴리뉴클레오티드 화합물, 즉 RNA를 지칭한다. 예시적인 ASO-T-IGHMBP2 화합물은 하기에 개시되어 있으며 자세히 설명되어 있다. 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 표적 RNA 서열에 특이적인 ASO를 개발하기 위해 추가적인 ASO-T-IGHMBP2 화합물을 식별하고 제조할 수 있다.

[0017] 상기 언급된 “환자”는 질병 또는 질환, 특히 PV 또는 MDS 또는 CMT2S를 진단받았거나, 이를 앓고 있거나, 이의 발병 위험이 있는 개체를 의미한다.

[0018] 다른 구현예에서, 본 발명은 PV로 진단된 환자를 치료하는 방법을 제공하는데, 이는 환자에게 PV 치료에 효과적인 양의 ASO-T-JAK2 화합물을 투여하는 것을 포함한다. PV 치료에 효과적인 ASO-T-JAK2 화합물의 유효량은 환자의 JAK2 단백질 발현을 억제하는 데 효과적인 양이다.

[0019] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 개체에서 JAK2 유전자의 발현을 억제하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 개체에게 그러한 억제를 달성하는데 효과적인 양의 ASO-T-JAK2 화합물을 투여하는 것을 포함한다.

[0020] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 새로운 ASO-T-JAK2 화합물을 제공한다. 위에서 언급한 바와 같이, 이러한 화합물은 서열번호 4 및 서열번호 5의 올리고뉴클레오티드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 뉴클레오티드 염기 서열이 결정되기만 하면, ASO를 제조하는 다양한 방법이 당업계에 존재한다. ASO-T-JAK2 화합물에 대한 적절한 염기 서열의 결정은 마찬가지로, ASO가 RNA 결합 시 유전자에 의한 단백질 발현이 억제될 수 있는 유전자 서열을 식별하기 위해 당업계에 알려진 전략들에 의해 수행된다.

[0021] ASO-T-JAK2를 투여하여 개별 환자들을 치료할 때, 그 용량 및 복용법(dosage regimen)을 쉽게 결정할 수 있다. 뉴시너젠 (제품명: 스핀라자), 미포머르센(mipomersen) (제품명: 카이나므로(Kynamro)) 및 포미바르센 (제품명: 비트라벤)을 포함하여 승인된 수많은 ASO 투여 사례가 당업계에게 알려져 있다. 특정 상황에서는, 생체이용률, 작용 기간, 또는 치료 효과를 최적화하기위해 유도체화 또는 변형된 형태로 ASO-T-JAK2를 투여하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 변형/유도체화를 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로 문헌 [Drug Delivery Trends in Clinical Trails and Translational Medicine: challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics, J Pharm Sci. (2011 Jan); 100(1): 38-52]을 참조할 수 있다. 본 발명의 목적상, ASO는 정맥으로 투여되지만, 경구 투여를 포함한 다른 투여 경로도 가능하다. 이러한 대안적인 투여 경로는 본 명세서에 설명된 ASO에 적용될 수 있다.

[0022] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 치료 대상 환자에게 ASO-T-JAK2 화합물을 투여하는데 사용되는 약제학적 조성물이다. 여기에는 의약품의 정맥 투여에 통상적으로 사용되는 유형인 멸균 비경구 제형이 포함된다. 이러한 약제학적 조성물에는 필요할 수 있는 부형제가 함유되어 있다. 여기에는 완성된 제형의 생산을 위해 당업계에 공지된 하나 이상의 희석제, 담체, 보조제 또는 이들의 조합이 포함될 수 있다.

[0023] 일 구현예에서, 본 발명은 샤르코-마리-투스 2형 (CMT2)으로 진단된 환자를 치료하는 방법을 제공하는데, 이는 해당 환자에게 해당 질병을 치료하는데 효과적인 양의 ASO-T-IGHMBP2 화합물을 투여하는 것을 포함한다.

[0024] 다른 구현예에서, 본 발명은 IGHMBP2 유전자의 C31401A 돌연변이를 보유한 개체에서 돌연변이된 IGHMBP2 유전자

의 발현을 억제하는 방법을 제공하며, 이 방법은 개체에게 돌연변이된 IGHMBP2 유전자의 발현을 억제하는데 효과적인 양의 ASO-T-IGHMBP2 화합물을 투여하는 것을 포함한다.

[0025] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 돌연변이된 IGHMBP2 유전자를 암호화하는 핵산 분자를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)를 제공한다. 이러한 ASO는 약제학적으로 허용되는 희석제, 담체, 보조제 또는 이들의 조합과 함께 약제학적 조성물에 포함될 수 있다.

[0026] 뉴클레오티드 염기 서열이 결정되기만 하면, ASO를 제조하는 다양한 방법이 당업계에 존재한다. ASO-T-IGHMBP2 화합물에 적절한 염기 서열의 결정은 마찬가지로 RNA 결합시 유전자에 의한 단백질 발현이 억제될 수 있는 유전자 서열을 식별하기 위해 당업계에 알려진 전략에 의해 수행된다.

[0027] ASO-T-IGHMBP2를 투여하여 개별 환자를 치료할 때, 그 용량과 복용법을 쉽게 결정할 수 있다. 뉴시너젠 (제품명: 스핀라자), 미포머르센 (제품명: 카이나므로) 및 포미바르센 (제품명: 비트라벤)을 포함하여 승인된 수많은 ASO 투여 사례가 당업계에게 알려져 있다. 특정 상황에서는, 생체 이용률, 작용 기간, 또는 치료 효과를 최적화하기위해 유도체화 또는 변형된 형태로 ASO-T-IGHMBP2를 투여하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 변형/유도체화를 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로 문헌 [Drug Delivery Trends in Clinical Trails and Translational Medicine: challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics, J Pharm Sci. (2011 Jan); 100(1): 38-52]을 참조할 수 있다. 본 발명의 목적상, ASO는 정맥으로 투여되지만, 경구 투여를 포함한 다른 투여 경로도 가능하다. 이러한 대안적인 투여 경로는 본 명세서에 설명된 ASO에 적용될 수 있다.

[0028] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 치료 대상 환자에게 ASO-T-IGHMBP2 화합물을 투여하는데 사용되는 약제학적 조성물이다. 여기에는 의약품의 정맥 투여에 통상적으로 사용되는 유형인 멸균 비경구 제형이 포함된다. 이러한 약제학적 조성물에는 필요할 수 있는 부형제가 함유되어 있다. 여기에는 완성된 제형의 생산을 위해 당업계에 공지된 하나 이상의 희석제, 담체, 보조제 또는 이들의 조합이 포함될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 이러한 본 발명의 특징 및 기타 특징들은 본 발명의 다양한 구현예들을 도시한 도면들과 함께 본 발명의 다양한 측면에 대한 다음의 상세한 설명으로부터 보다 쉽게 이해될 것이다.

도 1은 ASO 처리가 JAK2 발현을 억제하고 세포 생존력을 감소시킨다는 생체발광(bioluminescence) 분석결과를 보여준다.

도 2a 및 도 2b는 각각 본 발명의 구현예에 따라 ASO로 처리된 SET-2 세포의 형광 및 명시야 이미지를 보여준다.

도 3a 및 도 3b는 각각 본 발명의 구현예에 따라 ASO로 처리된 HEL 세포의 형광 및 명시야 이미지를 보여준다.

도 4a 및 도 4b는 각각 본 발명의 구현예에 따라 ASO로 처리된 SET-2 세포의 형광 및 명시야 이미지를 보여준다.

도 5a 및 도 5b는 각각 본 발명의 구현예에 따라 ASO로 처리된 HEL 세포의 형광 및 명시야 이미지를 보여준다.

본 발명의 도면들은 비율이 일정하지 않음(not to scale)을 이해해야 한다. 도면은 본 발명의 전형적인 측면만을 설명하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다. 도면에서 유사한 번호는 도면 중 유사한 요소를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명은 합성 ASO에 결합할 수 있는 JAK2 pre-mRNA의 표적 서열을 제공한다. 이와 같이 결합하면, JAK2 유전자의 발현이 억제된다. MDS 및 PV로 진단된 환자에서 이러한 JAK2 발현 억제는 이 질환을 효과적으로 치료할 수 있는 방법을 제공한다.

[0031] 위에서 언급한 바와 같이, MDS와 PV는 모두 JAK2 단백질의 V617F 돌연변이와 관련이 있다. 야생형 JAK2 단백질 서열은 서열번호 1에 나와있으며, 해당 서열에서 617번 위치의 아미노산은 발린이다.

[0032] 본 발명의 일 측면에서, JAK2 pre-mRNA 분자 내의 표적 영역이 식별되는데, 이 표적 영역은 ASO와 결합될 때, JAK2 단백질의 합성을 억제할 수 있다. 이 영역에는 다음의 19bp 서열이 포함된다:

[0033] TTTCCTTAGTCTTTCTTTG (서열번호 2)

[0034] 및 더 짧은 다음의 16bp 서열이 포함된다:

[0035] CCTTAGTCTTTCTTTG (서열번호 3).

[0036] 상보적인 ASO 서열은 각각 다음과 같다:

[0037] 5'-CAAAGAAAGACUAAGGAAA-3' (서열번호 4); 및

[0038] 5'-CAAAGAAAGACUAAGG-3' (서열번호 5).

[0039] 이러한 각 서열은 JAK2 pre-mRNA의 엑손과 인트론을 연결한다. 이러한 서열을 함유하는 ASO가 JAK2 pre-mRNA에 결합하면 pre-mRNA가 성숙한 mRNA로 처리되지 못하고, JAK2 단백질의 합성도 방지된다.

[0040] JAK2 pre-mRNA에 결합하고 JAK2 단백질 합성을 억제하는 서열번호 4 및/또는 서열번호 5를 갖는 ASO의 효능을 테스트하기 위해, 3가지 인간 세포주 (SET-2, HEL, CMK)를 각각 이러한 ASO와 함께 인큐베이션하고 사이클로헥시미드 (cycloheximide)로 처리하였다. 48시간 인큐베이션 후, 처리된 세포주를 수집하여 CellTiter-Glo® (CTG) 분석 및 RNA 추출을 수행하였다. 세포주 및 배양배지와 관련된 데이터는 아래 표 1에 나와있다.

표 1

[0041]

세포주	성장 기간	배양배지
SET-2	60-80 시간	80% RPMI 1640 + 20% 열-비활성화된 FBS
HEL	36시간	90% RPMI 1640 + 10% 열-비활성화된 FBS
CMK	40-50 시간	80% RPMI 1640 + 20% 열-비활성화된 FBS

[0042] 성장 기간동안 세포를 채취하고 Cellometer K2를 이용하여 세포를 계수하였다. 6-웰 플레이트의 각 웰에서 나열된 배지에 100만 개의 세포를 인큐베이션하고, 37℃에서 5% CO_2로 가습 인큐베이터에서 인큐베이션하였다.

[0043] 24시간 후 배지를 교체하고, ASO를 추가한 다음, 동일한 조건에서 24시간 동안 배양을 계속한다. 그런 다음 사이클로헥시미드를 최종 농도 0.1 mg/mL로 첨가한다. 사이클로헥시미드를 첨가한 후 24시간이 지나면, 배지와 세포를 15 mL의 코니칼 튜브 내에서 결합하고, 50 μL의 세포 분취량(aliquot)를 96-웰 분석 플레이트에 추가하여 CTG 분석을 수행한다. 발광은 바이오텍 시너지 네오2 멀티-모드 리더기를 사용하여 기록하였다. 남은 세포를 4℃에서 회전시켜 RNA 추출을 위한 세포 펠릿을 트리졸 시약으로 수집한다.

[0044] 도 1은 위에서 설명한 SET-2 세포주에 대한 CTG 분석 결과를 보여준다. 첫 번째 열에는 ASO가 함유되지 않은 분석 비히클(vehicle)의 결과가 표시된다. 평균 상대 발광 단위(RLU)는 3,000,000을 초과한다. RLU는 분석 웰의 생존 세포 수에 비례한다.

[0045] 두 번째 열은 표적 외 대조군 ASO (즉, JAK2 pre-mRNA 또는 JAK2 mRNA를 표적으로 하지 않는 ASO)를 사용한 경우 분석 결과를 보여준다. 평균 RLU는 비히클에 비해 감소했으나, 여전히 2,500,000을 초과한다.

[0046] 도 1의 세 번째 열은 서열번호 4 또는 서열번호 5를 함유하는 ASO를 추가했을 때의 분석 결과를 보여준다. 여기서 평균 RLU는 2,000,000 미만으로 감소했으며, 일부 샘플에서는 대략 1,500,000까지 감소한 것으로 나타났다. 이는 비히클과 비교하여, RLU와 그에 따른 세포 생존율이 현저히 감소한다는 것을 의미한다.

[0047] 이러한 결과는 차세대 염기서열 분석(NGS)을 이용한 RNA 서열분석으로 JAK2 유전자의 발현을 정량화하여 확인하였다. 도 2a 및 도 2b는 각각 서열번호 4 또는 서열번호 5를 함유하는 ASO로 처리된 SET-2 세포에 대한 분석 웰의 형광(GFP) 및 명시야 이미지를 보여준다. 도 3a 및 3b는 각각 동일한 ASO로 처리한 HEL 세포의 형광 및 명시야 이미지를 보여준다. 각각의 경우, 형광은 처리되지 않은 세포보다 낮게 나타나며, 이는 서열번호 4 또는 서열번호 5를 함유하는 ASO로 인큐베이션한 샘플에서 성숙한 JAK2 mRNA가 감소했음을 보여준다.

[0048] 따라서, 본 발명의 구현예들은 JAK2의 발현을 억제하기 위해, 개체에게 서열번호 4, 서열번호 5 또는 둘 다를 함유하는 ASO를 투여하는 것; MDS, PV, 또는 둘 다를 치료하기 위한 이러한 투여; 서열번호 2, 서열번호 3, 또는 둘 다를 표적으로 하는 ASO; 서열번호 4 또는 서열번호 5를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 ASO; 및 약제학적으로 허용되는 희석제, 담체, 보조제 또는 이들의 조합과 함께 이러한 ASO를 함유하는 조성물;을 포함한다.

[0049] 다른 측면에서, 본 발명은 합성 ASO에 결합할 수 있는 돌연변이 IGHMBP2 pre-mRNA의 표적 서열을 제공한다. 이렇게 결합하면, 돌연변이 IGHMBP2 유전자의 발현이 억제된다. 돌연변이가 이형접합인 CMT2S로 진단된 환자의 경우, 이러한 억제를 통해 IGHMBP2 단백질이 "복구(rescue)", 즉 정상 기능으로 회복될 수 있다.

[0050] 야생형 IGHMBP2 유전자의 전장 서열은 첨부된 서열목록의 서열번호 6에 나타나 있다. 이 뉴클레오티드의 31401 위치는 사이토신이다. CMT2S와 관련된 돌연변이에서 이 위치의 뉴클레오티드는 아데닌이다.

[0051] 본 발명의 일 측면에서, 생성된 돌연변이 IGHMBP2 pre-mRNA 분자 내 표적 영역이 식별되는데, 이 표적 영역은 ASO와 결합될 때, 돌연변이 IGHMBP2 단백질의 합성을 억제할 수 있다. 돌연변이 IGHMBP2 유전자 내의 해당 영역은 C31401A 돌연변이를 포함하는 19bp 서열을 포함한다:

[0052] CACTTCCACAGGGGGAAGA (서열번호 7).

[0053] 상보적인 ASO 서열은 다음과 같다:

[0054] UCUUCCCCCUGUGGAAGUG (서열번호 8).

[0055] 서열번호 3을 포함하는 ASO는 돌연변이 IGHMBP2 pre-mRNA의 인트론과 엑손을 연결하고, pre-mRNA에 결합하면 돌연변이 IGHMBP2 단백질의 합성을 방지한다.

[0056] 돌연변이 IGHMBP2 pre-mRNA에 결합하고 돌연변이 IGHMBP2 단백질 합성을 억제하는 서열번호 8을 포함하는 ASO의 효능을 테스트하기 위해, CMT2S 환자의 섬유아세포주를 10%의 FBS가 보충된 RPMI 1640 배지에서 서열번호 8을 포함하는 ASO와 함께 인큐베이션하고 사이클로헥시미드로 처리한다. 48시간 배양 후, 처리된 세포를 채취하여 RNA 추출 및 웨스턴 블롯 분석을 통해 IGHMBP2 단백질 발현을 확인한다.

[0057] 보다 구체적으로, 백만 개의 세포를 37℃에서, 5% 이산화탄소의 가습 인큐베이터에서, 위에서 설명한 RPMI 1640 배지 중 2 mL로 인큐베이션한다. 24시간 후 배지를 교체하고, ASO를 추가한 다음 24시간 더 배양을 계속한다. 그런 다음 사이클로헥시미드를 최종 농도 0.1 mg/mL로 첨가한다. 사이클로헥시미드를 첨가한 후 24시간이 지나면, 배지와 세포를 15 mL의 코니칼 튜브 내에서 결합하고, 이를 회전시켜 트리졸 시약으로 RNA 추출을 위한 세포 펠릿을 수집한다. RNA 추출은, 예를 들어, Qiagen의 RNeasy 미니 키트를 사용하여 수행된다. 그런 다음 웨스턴 블랏을 수행하여 샘플 내 야생형 및 돌연변이 단백질의 농도를 확인한다.

[0058] 도 4a와 4b는 각각 SET-2 세포를 서열번호 8을 포함하는 ASO로 처리한 후의 형광 및 명시야 현미경 사진으로, 이러한 ASO가 세포막을 투과하는 능력을 보여준다.

[0059] 도 5a와 5b는 각각 HEL 세포를 서열번호 8을 포함한 ASO로 처리한 후의 유사한 형광 및 명시야 현미경 사진을 보여준다. 다시, 이들 결과는 이러한 ASO가 세포막을 투과하는 능력을 보여준다.

[0060] 본 발명을 실시하는데 있어서, 서열번호 8을 포함하는 ASO 이외의 ASO 또는 서열번호 8을 포함하는 ASO에 추가한 ASO는 유용할 수 있다. 출원인은 돌연변이 IGHMBP2 pre-mRNA에 대해 ASO의 차별적인 결합이 가능하도록, 충분한 특이성을 갖는 서열의 기초를 제공하는 서열번호 8 내의 "핵심(core)" 11개의 뉴클레오티드 서열을 확인하였다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 본 명세서에서 기술된 것과 같은 효율적이고 효과적인 ASO 치료법은 ASO와 표적 서열의 차별적인 결합을 보장하기에 충분한 길이를 갖는 ASO를 사용해야 한다. 길이가 13 뉴클레오티드에서 35 뉴클레오티드 사이의 서열을 포함하고, 서열번호 9의 핵심 서열을 포함하는 ASO는 본 발명의 실예에서 사용하기에 충분한 길이를 갖는다.

[0061] 5'-CCCCCUGUGGA-3' (서열번호 9)

[0062] 따라서, 서열번호 4를 포함하는 뉴클레오티드 서열과 2개 내지 24개의 인접한 뉴클레오티드를 갖는 ASO는 본 발명의 실시예에 유용하다. 이러한 뉴클레오티드 서열에는, 예를 들어, 서열번호 10, 11 및 12의 길이 13 뉴클레오티드 서열과 같은 짧은 서열이 포함된다:

[0063] 5'-CCCCCUGUGGAAG-3' (서열번호 10)

[0064] 5'-UCCCCCUGUGGAA-3' (서열번호 11)

[0065] 5'-UUCCCCCUGUGGA-3' (서열번호 12)

[0066] 이러한 뉴클레오티드 서열에는, 예를 들어, 서열번호 13 및 14의 길이 35 뉴클레오티드 서열과 같은 긴 서열도 포함된다:

[0067] 5'-GAAGAAAUCAAUCUUCCCCCUGUGGAAGUGAGGGC-3'

[0068] (서열번호 13)

[0069] 5'-GAAAUCAAUCUUCCCCCUGUGGAAGUGAGGGCCAG-3'

[0070] (서열번호 14)

[0071] 보다 일반적으로, 길이가 13 뉴클레오티드에서 35 뉴클레오티드 사이의 뉴클레오티드 서열을 갖는 ASO는, 서열번호 9의 핵심 서열 및 최대 15개의 상류 뉴클레오타이드 및/또는 12개의 하류 뉴클레오타이드를 포함한다. ASO "서열 윈도우 (sequence window)"는 서열번호 15로 표시된다.

[0072] 5'-GAAGAAAUCAAUCUUCCCCCUGUGGAAGUGAGGGCCAG-3'

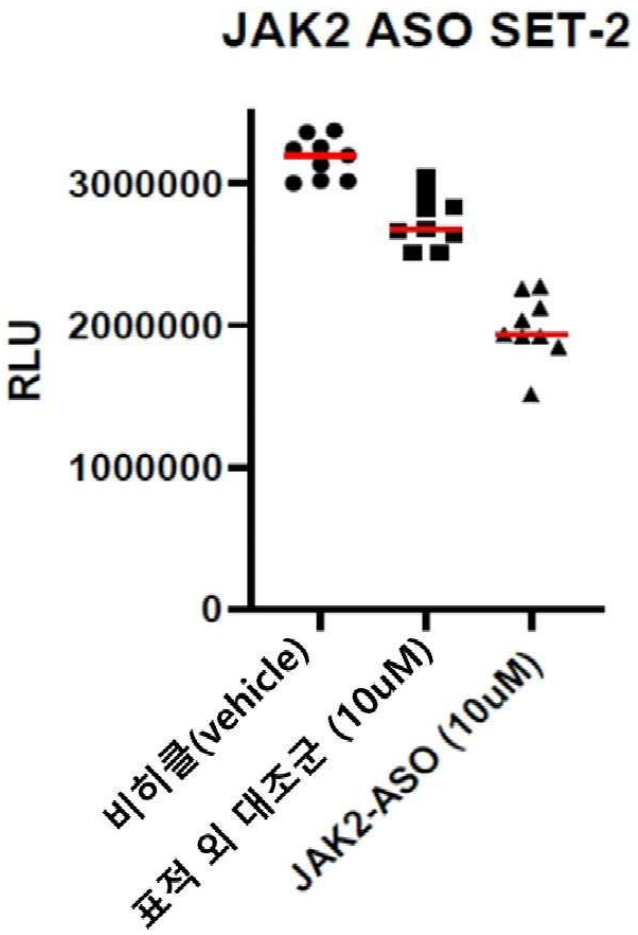
[0073] (서열번호 15)

[0074] 본 명세서에서 사용되는 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한, 복수형도 포함한다. 본 명세서에서 사용될 때, "포함한다" 및/또는 "포함하는"이라는 용어는 명시된 특징, 정수, 단계, 연산, 요소, 및/또는 구성요소의 존재를 명시하지만, 하나 이상의 다른 특징, 정수, 단계, 연산, 요소, 구성요소, 및/또는 이들의 그룹의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다는 것을 추가로 이해할 것이다.

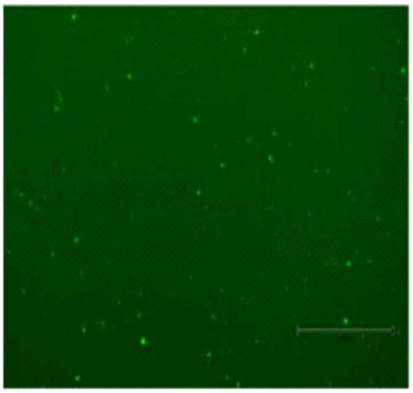
[0075] 본 명세서는 실시예를 사용하여, 최적의 실시예를 포함하는 본 발명을 개시하고, 또한 당업자가 임의의 장치 또는 시스템을 제작 및 사용하고, 임의의 관련되거나 또는 통합된 방법을 수행하는 것을 포함하여 본 발명을 실시할 수 있도록 한다. 본 발명의 특허 가능한 범위는 청구범위에 의해 정의되며, 당업자에게 발생하는 다른 실시예를 포함할 수 있다. 이러한 다른 실시예는 청구항의 문언과 다르지 않은 구조적 요소를 가지고 있거나, 또는 청구항의 문언과 실질적 차이가 없는 등가의 구조적 요소를 포함하는 경우, 청구항의 범위 내에 있는 것으로 간주된다.

도면

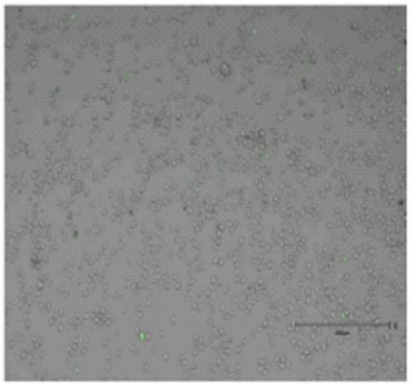
도면1


JAK2 ASO SET-2
RLU
3000000
2000000
1000000
0
비히클(vehicle)
표적 외 대조군 (10uM)
JAK2-ASO (10uM)

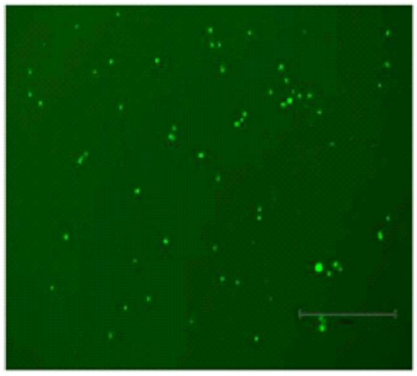
도면2a



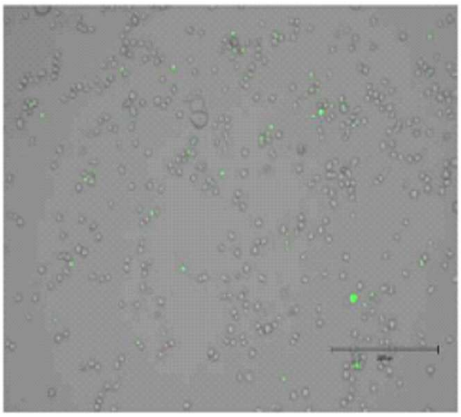
도면2b



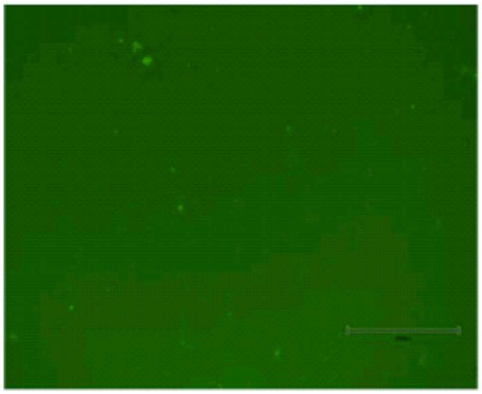
도면3a



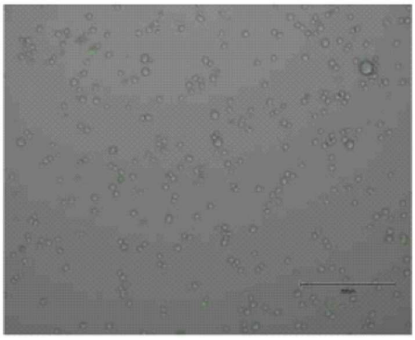
도면3b



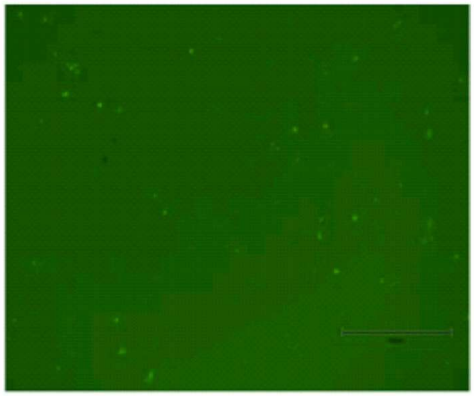
도면4a



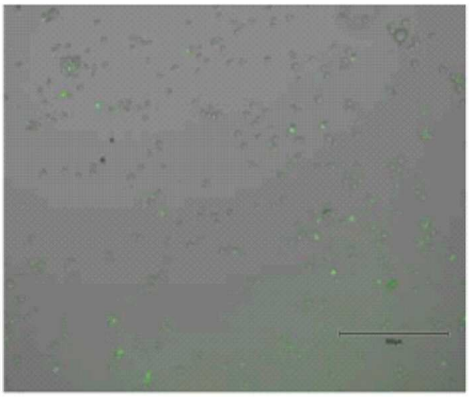
도면4b



도면5a



도면5b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.