



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0132442
(43) 공개일자 2023년09월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61K 47/54 (2017.01)
A61P 3/06 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7019144

(22) 출원일자(국제) 2021년12월10일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2023년06월07일

(86) 국제출원번호 PCT/US2021/062831

(87) 국제공개번호 WO 2022/125913

국제공개일자 2022년06월16일

(30) 우선권주장

63/124,581 2020년12월11일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인

씨비 바이오파마, 인크.

미국 메리랜드 20815 체비 체이스 위스콘신 애비뉴 5425

(72) 발명자

오림, 헨리크

미국 메리랜드 20815 체비 체이스 위스콘신 애비뉴 5425 씨비 바이오파마, 인크. 내

노블, 스튜어트 알윈

미국 메리랜드 20815 체비 체이스 위스콘신 애비뉴 5425 씨비 바이오파마, 인크. 내

시어, 찰스 레스터

미국 메리랜드 20815 체비 체이스 위스콘신 애비뉴 5425 씨비 바이오파마, 인크. 내

(74) 대리인

특허법인에이아이피

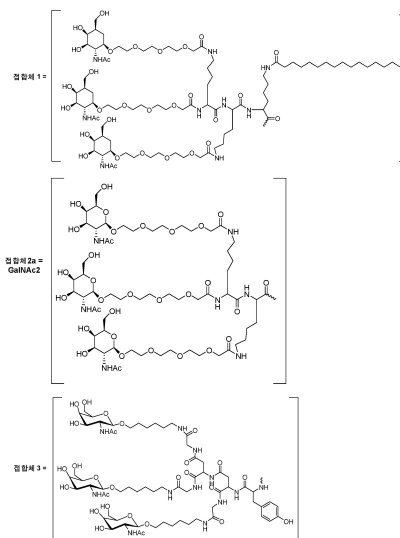
전체 청구항 수 : 총 123 항

(54) 발명의 명칭 PCSK9를 표적으로 하는 안티센스 접합체의 경구 전달

(57) 요약

본 개시내용은 안티센스 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, CIVI 008) 및 경구 전달제, 예컨대 5-CNAC를 포함하는 경구 전달용 약학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008 및 5-CNAC의 건조 블렌드, 및 선택적으로 스타틴을 포함하는 캡슐을 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/542 (2017.08)
A61K 47/549 (2017.08)
A61P 3/06 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)
C12N 15/1137 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/3231 (2013.01)

(30) 우선권주장

63/134,884	2021년01월07일	미국(US)
63/178,340	2021년04월22일	미국(US)
63/261,505	2021년09월22일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

안티센스 올리고머 및 경구 전달제를 포함하는 약학적 조성물로서, 여기서 안티센스 올리고머는 길이가 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오티드이고, 여기서 안티센스 올리고머의 서열은 PCSK9 표적 서열에 100% 상보성인, 길이가 16개의 뉴클레오티드인 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 캡머이고, 여기서 안티센스 올리고머는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화하고, 여기서 경구 전달제는 상기 안티센스 올리고머에 공유적으로 또는 비공유적으로 부착된, 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 RNA는 pre-mRNA, pre-mRNA의 스플라이스 변이체, 성숙 mRNA, 또는 이의 대립형질 변이체 또는 돌연변이체인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, PCSK9 표적 서열은 엑손 또는 인트론 내에 있는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, PCSK9 표적 서열은 서열번호: 31에 제시되어 있는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, PCSK9 표적 서열은 엑손과 인트론 사이의 접합부를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, PCSK9 표적 서열은 PCSK9를 인코딩하는 개방 판독 프레임의 5' 말단으로부터 상류인, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, PCSK9 표적 서열은 PCSK9를 인코딩하는 개방 판독 프레임의 3' 말단으로부터 하류인, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, LNA는 옥시-LNA, 티오-LNA, 아미노-5 LNA, 5'-메틸-LNA, ENA, cET, cMOE 또는 이의 조합인, 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, LNA는 베타-D-배열 또는 알파-L 배열에서의 α -입체이성질체인, 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 cET 단위를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 안티센스 올리고머는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 LNA 단위를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 안티센스 올리고머 내 모든 LNA 단위는 동일한 배열에서의 입체이성질체인, 약학적 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 안티센스 올리고머 내 모든 LNA 단위는 베타-D-옥시 LNA 단위인, 약학적 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 안티센스 올리고머 내 모든 LNA 단위는 알파-L-옥시-LNA 단위인, 약학적 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 안티센스 올리고머의 서열은 적어도 하나의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸 포스포네이트, 포스포라미데이트 또는 보라노포스페이트 인터뉴클레오시드 연결을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 모든 인터뉴클레오시드 연결은 포스포로티오에이트인, 약학적 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 하나 이상의 인터뉴클레오시드 연결은 R 입체형태 및/또는 S 입체형태에서 키랄 중심을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 모든 키랄 중심은 R 입체형태인, 약학적 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, 모든 키랄 중심은 S 입체형태인, 약학적 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서, 안티센스 올리고머 및 서열번호: 31의 올리고머는 LNA가 없는 상응하는 안티센스 올리고머를 포함하는 상응하는 듀플렉스에 비해 증가된 열 안정성을 갖는 듀플렉스를 형성할 수 있는, 약학적 조성물.

청구항 21

안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체 및 경구 전달제를 포함하는 약학적 조성물로서, 여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는:

(i) 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오타이드인 안티센스 올리고머로서, 여기서 안티센스 올리고머의 서열은 PCSK9 표적 서열에 100% 상보성인, 16개 뉴클레오타이드 길이의 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 캡머인, 안티센스 올리고머, 및

(ii) 상기 안티센스 올리고머에 직접적으로 부착되거나 또는 인접하는 올리고머 서열과 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티 사이에 위치된 링커를 통해 공유적으로 부착된 적어도 하나의 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티를 포함하며,

여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 PCSK9를 인코딩하는 mRNA를 표적화하고, 여기서 경구 전달제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체에 공유적으로 또는 비공유적으로 부착된, 약학적 조성물.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 RNA는 pre-mRNA, pre-mRNA의 스플라이스 변이체, 성숙 mRNA, 또는 이의 대립형질 변이체 또는 돌연변이체인, 약학적 조성물.

청구항 23

제1항에 있어서, PCSK9 표적 서열은 엑손 또는 인트론 내의 서열인, 약학적 조성물.

청구항 24

제1항에 있어서, PCSK9 표적 서열은 서열번호: 31에 제시되어 있는, 약학적 조성물.

청구항 25

제1항에 있어서, PCSK9 표적 서열은 엑손과 인트론 사이의 접합부를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 26

제1항에 있어서, PCSK9 표적 서열은 PCSK9를 인코딩하는 개방 판독 프레임의 5' 말단으로부터 상류인, 약학적 조성물.

청구항 27

제1항에 있어서, PCSK9 표적 서열은 PCSK9를 인코딩하는 개방 판독 프레임의 3' 말단으로부터 하류인, 약학적 조성물.

청구항 28

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 비뉴클레오티드 또는 비폴리뉴클레오티드 모이어티는 안티센스 올리고머의 5'-말단 또는 3'-말단에 부착된 간 표적화 모이어티인, 약학적 조성물.

청구항 29

제21항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 간 표적화 모이어티는 링커를 통해 안티센스 올리고머에 연결된, 약학적 조성물.

청구항 30

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 간 표적화 모이어티는 갈락토스, 락토스, N-아세틸갈락토스아민 (GalNAc), 만노스, 만노스-6-포스페이트 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 탄수화물을 포함하는 탄수화물 접합체 모이어티를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 탄수화물 접합체 모이어티는 선형 탄수화물 중합체가 아닌, 약학적 조성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 탄수화물 접합체 모이어티는 1, 2, 3 또는 4개의 탄수화물 모이어티를 포함하는 탄수화물 그룹인, 약학적 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 모든 탄수화물 모이어티는 동일한, 약학적 조성물.

청구항 34

제32항에 있어서, 적어도 하나의 탄수화물 모이어티는 다른 탄수화물 모이어티에 대해 상이(비동일)한, 약학적 조성물.

청구항 35

제32항에 있어서, 탄수화물 접합체 모이어티는 적어도 하나의 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 36

제30항에 있어서, 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티는 1가, 2가, 3가 또는 4가 GalNAc 클러스터를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, GalNAc 클러스터에서 각 GalNAc는 스페이서를 통해 분기점 그룹에 부착되는, 약학적 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 분기점 그룹은 디리신을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 39

제37항에 있어서, 스페이서는 PEG 스페이서를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 40

제30항에 있어서, 링커는 C6 내지 C12 아미노 알킬기 또는 1 내지 6개의 뉴클레오타이드를 포함하는 생체절단가능한 포스페이트 뉴클레오타이드 링커를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 41

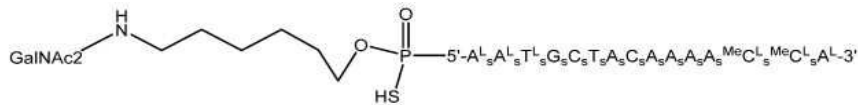
제36항에 있어서, 3가 GalNAc 클러스터는 접합체 1, 접합체 2, 접합체 1a 또는 접합체 2a를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 42

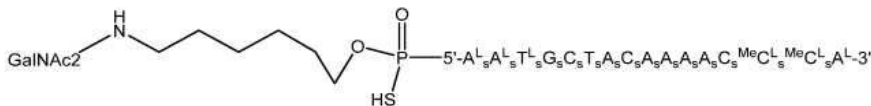
제21항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티는 공유 결합을 통해 안티센스 올리고머에 공유적으로 부착되는, 약학적 조성물.

청구항 43

서열번호: 18 또는 서열번호: 19의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체



서열번호 18



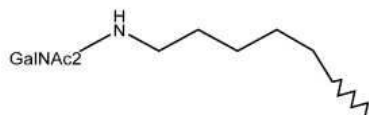
서열번호 19[LMF1]

및 경구 전달제를 포함하는 약학적 조성물로서, 여기서

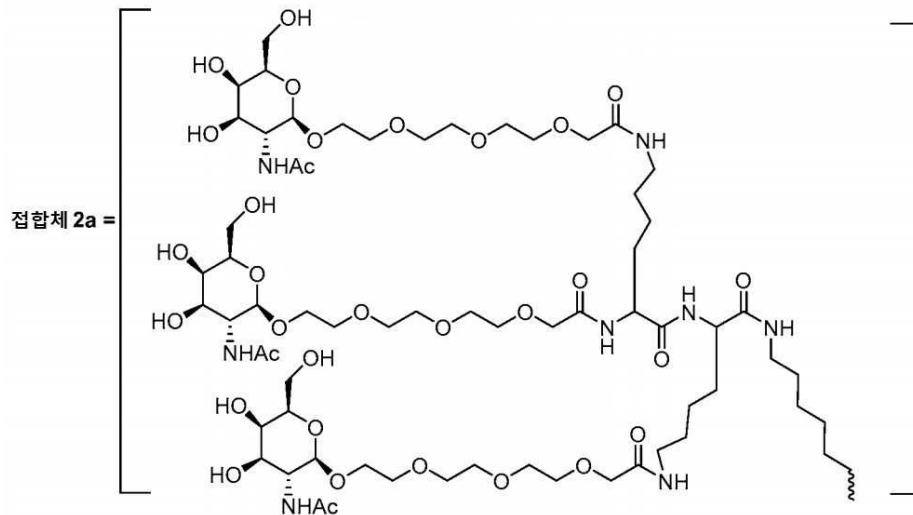
위첨자 ^L은 베타-D-옥시 LNA 단위를 식별하고,

^{Me}C는 5-메틸시토신 단위를 식별하고,

아래첨자 s는 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 연결을 식별하고,



여기서 는 접합체 모이어티를 표적화하는 접합체 2a 아시알로당단백질 수용체,



이고,

여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화하는, 약학적 조성물.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 이의 조합을 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 이의 조합은 pH 조절제, 방부제, 풍미제; 맛 차폐제; 방향제; 습윤제; 긴장화제 착색제; 계면활성제; 가소제; 윤활제; 흐름 보조제; 압축 보조제; 가용화제; 부형제; 희석제; 포스페이트 완충염; 시트르산, 글리콜, 분산제, 크로스포비돈, 포비돈, 또는 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 46

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 스타틴, 에세티미베, 담즙 격리 수지, 니코틴산, 피브르산 유도체, 프로부콜, 네오마이신, 텍스트로티록신, 식물성 스타놀 에스테르, 콜레스테롤 흡수 억제제, 임플리타피드, 담즙산 수송체의 억제제, 간 CYP7a의 조절자, 에스트로겐 대체 치료제, 및 항염증제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치료제를 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 스타틴은 로바스타틴, 세리바스타틴, 프라바스타틴, 아토르바스타틴, 심바스타틴, 로수바스타틴 및 플루바스타틴으로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 48

치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 비정상적인 발현 수준 및/또는 활성에 의해 야기된 질환 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 약학적 조성물의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 약학적 조성물의 투여는 상기 대상체에서 혈청 PCSK9의 수준을 감소시키고/시키거나 혈청 LDL 콜레스테롤의 수준을 감소시키는, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, PCSK9는 (i) PCSK9 대립형질 변이체; (ii) PCSK9 돌연변이체; 또는 (iii) PCSK9 스플라이스 변이체인, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, PCSK9 돌연변이체는 PCSK9 기능 획득 돌연변이체인, 방법.

청구항 51

제48항에 있어서, 질환 또는 병태는 죽상동맥경화증, 고콜레스테롤혈증, HDL/LDL 콜레스테롤 불균형, 이상지질혈증, 관상동맥질환(CAD) 및 관상심장질환(CHD)으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 이상지질혈증은 가족성 고지혈증(FCHL) 또는 후천성 고지혈증인, 방법.

청구항 53

제51항에 있어서, 고콜레스테롤혈증은 가족성 고콜레스테롤혈증 또는 스타틴 내성 고콜레스테롤혈증인, 방법.

청구항 54

제48항에 있어서, 스타틴, 에제티미브, 담즙 격리 수지, 니코틴산, 피브르산 유도체, 프로부콜, 네오마이신, 텍스트로티록신, 식물성 스타놀 에스테르, 콜레스테롤 흡수 억제제, 임폴리타피드, 담즙산 수송체의 억제제, 간 CYP7a의 조절자, 에스트로겐 대체 치료제, 항염증제, 또는 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 치료제의 투여를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 스타틴은 로바스타틴, 세리바스타틴, 프라바스타틴, 아토르바스타틴, 심바스타틴, 로수바스타틴 및 플루바스타틴으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 약학적 조성물은 경구로 투여되는, 방법.

청구항 57

제48항에 있어서, 약학적 조성물은 단일 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 58

제48항에 있어서, 약학적 조성물은 다중 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 59

치료를 필요로 하는 대상체에서 죽상동맥경화증, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, HDL/LDL 콜레스테롤 불균형, 관상동맥질환(CAD) 또는 관상심장질환(CHD)으로 구성된 군으로부터 선택된 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 약학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 60

세포에서 PCSK9의 발현 수준 및/또는 활성을 감소시키는 시험관내 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 약학적 조성물의 유효량을 상기 세포에 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 61

PCSK9의 발현 수준 및/또는 활성 감소를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 발현 수준 및/또는 활성을 감소시키는 방법으로서, 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 약학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 62

콜레스테롤 수준 감소를 필요로 하는 상기 대상체에서 콜레스테롤 수준을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 약학적 조성물의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 63

약학적 조성물을 제조하는 방법으로서, 상기 제조 방법은,

(i) 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오타이드 길이인 안티센스 올리고머로서, 여기서 안티센스 올리고머의 서열은 서열번호: 31의 서열에 100% 상보성인, 길이가 16개의 뉴클레오타이드인 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 겹머이고, 여기서 안티센스 올리고머는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화하는, 안티센스 올리고머; 및,

(ii) 경구 전달제

를 혼합하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 64

약학적 조성물을 제조하는 방법으로서,

(i) (a) 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오타이드인 안티센스 올리고머로서, 여기서 안티센스 올리고머의 서열은 서열번호: 31의 서열에 100% 상보성인, 길이가 16개의 뉴클레오타이드인 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 겹머인, 안티센스 올리고머, 및 (b) 인접하는 올리고머 서열과 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티 사이에 위치된 링커를 통해 또는 직접적으로 상기 안티센스 올리고머에 공유적으로 부착된 적어도 하나의 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화하는, 접합체; 및,

(ii) 경구 전달제

를 혼합하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 65

제1항 내지 제47항, 또는 제48항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머의 서열은 서열번호: 26을 포함하거나 이로 구성되는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 66

제1항 내지 제47항, 또는 제48항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머의 서열은 서열번호: 2 또는 서열번호: 3을 포함하거나 이들로 구성되는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 67

제21항 내지 제47항, 또는 제48항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고머 접합체의 서열은 서열번호: 18 또는 서열번호: 19를 포함하거나 이들로 구성되는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 68

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제67항, 또는 제48항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 경구 전달제는 카프릴산(C8), 카프르산(C10), 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 69

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제68항, 또는 제48항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 염은 나트륨 염인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 70

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제69항, 또는 제48항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 조성물은 고체인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 71

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제70항, 또는 제48항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 조성물은 정제 또는 캡슐의 형태인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 캡슐은 액체 캡슐인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 73

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제72항, 또는 제48항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 조성물은 장용으로 코팅되는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 74

제71항에 있어서, 정제 또는 캡슐은 장용으로 코팅되는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 75

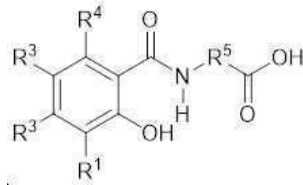
제71항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 정제 또는 캡슐은 5mg 내지 1000mg, 10mg 내지 500mg, 10mg 내지 250mg, 100mg 내지 200mg, 또는 250mg 내지 500mg의 중량을 갖는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 76

제71항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 정제 또는 캡슐의 안티센스 올리고머 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 양은 1mg 내지 100mg, 5mg 내지 100mg, 10mg 내지 100mg, 20mg 내지 100mg, 20mg 및 50mg의 범위인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 77

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제76항, 또는 제48항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 경구 전달제는



이고, 여기서

R^1 , R^2 , R^3 , 및 R^4 는 독립적으로 수소, -OH, $-NR^6R^7$, 할로젠, C_1-C_4 알킬 또는 C_1-C_4 알콕시이고;

R^5 는 치환 또는 비치환된 C_2-C_{16} 알킬렌, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{16} 알케닐렌, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{12} 알킬(아릴렌), 또는 치환 또는 비치환된 아릴(C_1-C_4 알킬렌)이고; 그리고

R^6 및 R^7 은 독립적으로 수소, 산소 또는 C_1-C_4 알킬인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 78

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제77항, 또는 제48항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 전달제는 N-(8-[2-하이드록시벤조일]아미노)카프릴산(SNAC), N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산(5-CNAC), N-(10-[2-하이드록시벤조일]아미노)데칸산(SNAD), 4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산(4-CNAB), N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노]옥탄산(4-MOAC), 8-(4-하이드록시페녹시) 옥탄산(4-HPO), 4-m-톨릴옥시부티르산(3-TBA), 4-(3-하이드록시페닐술파닐)부티르산(3-HPBS), 5-페닐펜탄산(5-PPA), 8-(2-하이드록시페녹시)옥틸디에탄올아민(2-HPOD), (4-이소프로필벤질옥시)아세트산(4-IBOA), 2-(5-펜탄산)-5-(2-하이드록시페닐)-1,3,4-옥사디아졸(2-PHOD), 7-옥소-7-페닐헵탄산(7-OPHA), 4-(3-플루오로페닐술파닐)부티르산(3-FPSB), 또는 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 79

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제78항, 또는 제48항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 경구 전달제는

N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 81

제80항에 있어서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 나트륨 염인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 82

제80항에 있어서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 일나트륨 염(살카프로자이트 나트륨 203787-91-1, SNAC, 나트륨 8-(2-하이드록시벤조아미노)옥타노에이트)인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 83

제80항에 있어서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 이나트륨 염인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 84

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제78항, 또는 제48항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 경구 전달제는 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 나트륨 염인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 87

제85항에 있어서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 일나트륨 염인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 88

제85항에 있어서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 이나트륨 염인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 89

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제88항, 또는 제48항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 경구 전달제는 카프르산(C10)의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 조합인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 카프르산(C10)의 염은 카프르산(C10)의 나트륨염, 칼륨염 및 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 91

제90항에 있어서, 카프르산(C10)의 염은 카프르산나트륨인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 92

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제91항, 또는 제48항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 조성물은 식사 이전 5분 내지 60분에 투여되는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 93

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제92항, 또는 제48항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 조성물은 식사 이전 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 또는 60분에 투여되는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 94

제1항 내지 제47항 또는 제65항 내지 제93항, 또는 제48항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 조성물은 pH 민감성 코팅을 추가로 포함하는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, pH 민감성 코팅은 pH 민감성 중합체인, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 96

제94항에 있어서, pH 민감성 중합체는 셀룰로오스, 아크릴산 또는 이의 유도체를 포함하는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 97

제94항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, pH 민감성 코팅은 pH 민감성 하이드로겔, pH 활성화된 약물 전달 시스템, pH 민감성 리포솜, 미셀 또는 지질 나노입자, pH 민감성 마이크로스피어, pH 민감성 나노입자, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 약학적 조성물 또는 방법.

청구항 98

정제 또는 캡슐로서,

(i) (GalNAc)3-아미노-헥사메틸렌-5' 포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 티미딜릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시구아노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시시티디닐릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시티미딜릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시시티디닐릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 (5-메틸-시티디닐릴)-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 (5-메틸-시티디닐릴)-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 아데노실릴 헥사데카 나트륨 염,

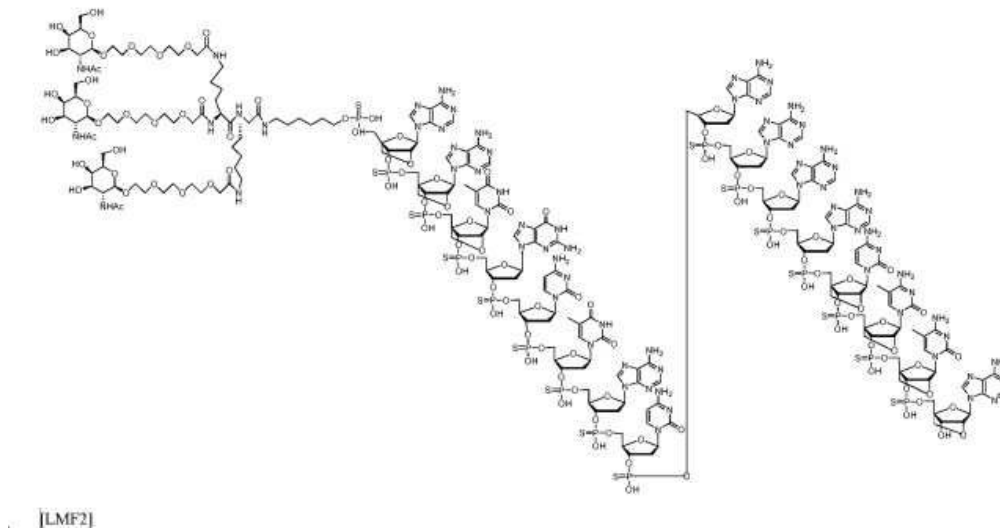
(ii) SNAC, 5-CNAC, C10, 이의 수화물, 용매화물 또는 염, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 경구 전달제; 및

(iii) 선택적으로 스타틴을 포함하는, 정제 또는 캡슐.

청구항 99

정제 또는 캡슐로서,

(i) CIVI 008



(ii) SNAC, 5-CNAC, C10, 이의 수화물, 용매화물 또는 염, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 경구 전달체; 및,

(iii) 선택적으로 스타틴

을 포함하는, 정제 또는 캡슐.

청구항 100

제98항 또는 제99항에 있어서, 경구 전달체는 SNAC인, 정제 또는 캡슐.

청구항 101

제100항에 있어서, SNAC는 일나트륨 염인, 정제 또는 캡슐.

청구항 102

제100항에 있어서, SNAC는 이나트륨 염인, 정제 또는 캡슐.

청구항 103

제98항 또는 제99항에 있어서, 경구 전달체는 5-CNAC인, 정제 또는 캡슐.

청구항 104

제103항에 있어서, 5-CNAC는 일나트륨 염인, 정제 또는 캡슐.

청구항 105

제103항에 있어서, 5-CNAC는 이나트륨 염인, 정제 또는 캡슐.

청구항 106

제98항 또는 제99항에 있어서, 경구 전달체는 C10인, 정제 또는 캡슐.

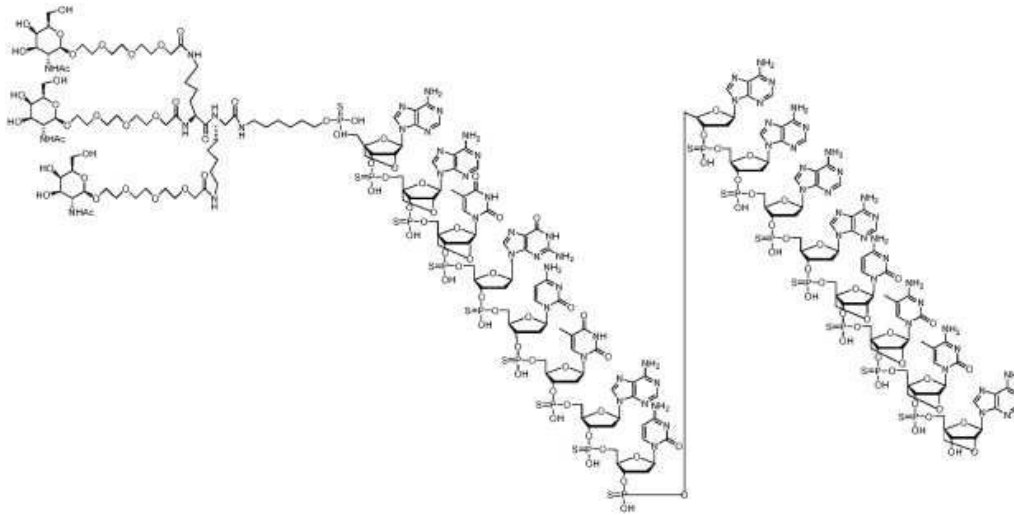
청구항 107

제98항 또는 제99항에 있어서, 경구 전달체는 C8 또는 C12인, 정제 또는 캡슐.

청구항 108

캡슐로서,

(i) CIVI 008



(ii) 5-CNAC

를 포함하는, 캡슐.

청구항 109

제108항에 있어서, CIVI 008 및 5-CNAC는 건조 블렌드 내에 있는, 캡슐.

청구항 110

제108항 또는 제109항에 있어서, 캡슐은 젤라틴 캡슐인, 캡슐.

청구항 111

제110항에 있어서, 겔 캡슐은 경질-셸 젤라틴 캡슐인, 캡슐.

청구항 112

제108항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 캡슐은 장용으로 코팅되는, 캡슐.

청구항 113

제108항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 캡슐은 5 내지 30mg의 CIVI 008 및 100 내지 200mg의 5-CNAC를 포함하는, 캡슐.

청구항 114

제113항에 있어서, 캡슐은 약 5mg, 약 10mg, 약 20mg, 약 25mg 또는 약 30mg의 CIVI 008을 포함하는, 캡슐.

청구항 115

제108항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 캡슐은:

- 10mg의 CIVI 008 및 100mg의 5-CNAC;
- 20mg의 CIVI 008 및 200mg의 5-CNAC;
- 5mg의 CIVI 008 및 200mg의 5-CNAC;
- 10mg의 CIVI 008 및 200mg의 5-CNAC;
- 25mg의 CIVI 008 및 200mg의 5-CNAC; 또는,
- 30mg의 CIVI 008 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는, 캡슐.

청구항 116

제108항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 스타틴을 추가로 함유하는, 캡슐.

청구항 117

치료를 필요로 하는 대상체에서 죽상동맥경화증, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, HDL/LDL 콜레스테롤 불균형, 관상동맥질환(CAD) 또는 관상심장질환(CHD)으로 구성된 군으로부터 선택된 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제108항 내지 제116항 중 어느 한 항의 캡슐을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 118

PCSK9의 발현 수준 및/또는 활성 감소를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 발현 수준 및/또는 활성을 감소시키는 방법으로서, 대상체에게 제108항 내지 제116항 중 어느 한 항의 캡슐을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 119

제108항 내지 제116항 중 어느 한 항의 캡슐을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 콜레스테롤 수준을 감소를 필요로 하는 상기 대상체에서 콜레스테롤 수준을 감소시키는 방법.

청구항 120

죽상동맥경화증, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, HDL/LDL 콜레스테롤 불균형, 관상동맥질환(CAD) 또는 관상심장질환(CHD)으로 구성된 군으로부터 선택된 장애의 치료에 사용하기 위한 제108항 내지 제116항 중 어느 한 항의 캡슐.

청구항 121

대상체에서 PCSK9의 발현 수준 및/또는 활성을 감소시키기 위한 약제로서 사용하기 위한 제108항 내지 제116항 중 어느 한 항의 캡슐.

청구항 122

대상체에서 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위한 약제로서 사용하기 위한 제108항 내지 제116항 중 어느 한 항의 캡슐.

청구항 123

제108항 내지 제116항 중 어느 한 항의 캡슐을 제조하는 방법으로서,

- (i) CIVI 008을 포함하는 제1 조성물 및 5-CNAC를 포함하는 제2 조성물을 건조 블렌딩하는 단계; 및,
- (ii) 생성된 단계 (i)의 건조 블렌드를 캡슐에 캡슐화하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 교차-참조 참조 및 참조에 의한 통합
- [0002] 본 PCT 출원은 2020년 12월 11일에 출원된 미국 가출원 번호 63/124,581, 2021년 1월 7일에 출원된 63/134,884, 2021년 4월 22일에 출원된 63/178,340 및 2021년 9월 22일에 출원된 63/261,505의 우선권 이익을 주장하고, 이는 이의 전문이 참조로 본 명세서에 포함된다.
- [0003] 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조
- [0004] 출원과 함께 제출된 ASCII 텍스트 파일(명칭 4009-021PC04_Sequence_listing_ST25.txt; 크기: 26,230바이트; 및 생성일: 2021년 12월 9일)에 전자적으로 제출된 서열 목록의 내용은 이의 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다.
- [0005] 분야
- [0006] 본 개시내용은 PCSK9의 감소된 발현을 야기하는, 세포에서 프로단백질 전환효소 서브틸리신/케신 유형 9(PCSK9) mRNA를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 경구 제형에 관한 것이다. PCSK9 발현의 감소는 고콜

레스테롤혈증 및 관련된 장애와 같은 광범위의 의학적 장애에 유익하다.

배경 기술

[0007] 프로단백질 전환효소 서브틸리신/케신 유형 9(PCSK9)는 저-밀도 지단백질 콜레스테롤(LDL-C)의 감소를 위한 치료 표적으로 부상했다. PCSK9는 LDL 수용체의 분해를 증가시켜, PCSK9 활성이 높은 개체에서 높은 LDL-C를 초래한다. Lindholm 등, Molecular Therapy (2012); 20 2, 376-381은 비인간 영장류에서 LDL-C의 지속적인 감소를 일으키는 PCSK9를 표적화하는 LNA 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 보고했다. 사용된 화합물은 마찬가지로 국제출원 공개 W02011/009697에 개시된 SPC5001로 명명된 14량체였다. 이 화합물은 심각한 신장 독성 및 급성 신장 손상으로 인해 임상 시험 중에 중단되었다. 예를 들어, van Poelgeest 등 (2013) American Journal of Kidney Disease 62(4):796-800 참조.

[0008] 약리학적 활성제의 경구 전달이 일반적으로 선택되는 전달 경로인데, 그것이 편리하고, 상대적으로 용이하고, 일반적으로 통증이 없기 때문이며, 다른 전달 방식에 비해 더 큰 환자 순응도를 초래하기 때문이다. 그러나, 위장관에서 다양한 pH, 강력한 소화 효소 및 활성제 불투과성 위장막과 같은 생물학적, 화학적 및 물리적 장벽은 포유동물에게 일부 약리학적 활성제의 경구 전달, 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 치료적 핵산의 경구 전달을 문제가 있게 만든다. 따라서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 치료적 핵산의 경구 전달을 허용하는 시스템을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

[0009] 요약

[0010] 본 개시내용은 안티센스 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, ASO), 및 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 5-CNAC, 또는 이의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합)를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 안티센스 올리고머는 길이가 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오타이드이고, 여기서 안티센스 올리고머의 서열은 서열 번호: 31의 서열에 100% 상보성인, 길이가 16개의 뉴클레오타이드인 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 겹머이고, 여기서 안티센스 올리고머는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화한다. 일부 양태에서, RNA는 pre-mRNA, pre-mRNA의 스플라이스 변이체, 성숙 mRNA, 또는 이의 대립형질 변이체 또는 돌연변이체이다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 엑손 내의 서열을 표적화한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 인트론 내의 서열을 표적화한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 엑손과 인트론 사이의 접합부를 포함하는 서열을 표적화한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 PCSK9를 인코딩하는 개방 판독 프레임의 5' 말단(예를 들어, 5' UTR)으로부터 상류의 서열을 표적화한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 PCSK9를 인코딩하는 개방 판독 프레임의 3' 말단(예를 들어, 3' UTR)으로부터 하류의 서열을 표적화한다.

[0011] 일부 양태에서, LNA는 옥시-LNA, 티오-LNA, 아미노-5 LNA, 5'-메틸-LNA, ENA, cET, cMOE 또는 이의 조합이다. 일부 양태에서, LNA는 β -D-배열 또는 α -L 배열에서의 입체이성질체이다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 cET 단위를 포함한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 LNA 단위를 포함한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머에서 모든 LNA 단위는 동일한 배열에서의 입체이성질체이다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머에서 모든 LNA 단위는 β -D-옥시 LNA 단위이다. 일부 양태에서 안티센스 올리고머에서 모든 LNA 단위는 α -L-옥시-LNA 단위이다.

[0012] 일부 양태에서, 안티센스 올리고머의 서열은 적어도 하나의 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트 또는 보라노포스페이트 인터뉴클레오시드 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 모든 인터뉴클레오시드 연결은 포스포로티오에이트이다. 일부 양태에서, 하나 이상의 인터뉴클레오시드 연결은 R 입체형태 및/또는 S 입체형태에서 키랄 중심을 포함한다. 일부 양태에서, 모든 키랄 중심은 R 입체형태에 있다. 일부 양태에서, 모든 키랄 중심은 S 입체형태에 있다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머 및 서열번호: 31의 올리고머는 LNA가 없는 상응하는 안티센스 올리고머를 포함하는 상응하는 듀플렉스에 비해 증가된 열 안정성을 갖는 듀플렉스를 형성할 수 있다.

[0013] 본 개시내용은 또한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체 및 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 5-CNAC, 또는 이의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합)를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는

[0014] (i) 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오타이드인 안티센스 올리고머로서, 여기서 안티센스 올리고머의 서열은 서열

번호: 31의 서열에 100% 상보성인, 길이가 16개의 뉴클레오타이드인 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 캡머인, 안티센스 올리고머, 및

- [0015] (ii) 상기 안티센스 올리고머에 직접적으로 부착되거나 또는 인접하는 올리고머 서열과 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티 사이에 위치한 링커를 통해 공유적으로 부착된 적어도 하나의 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티를 포함하며,
- [0016] 여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 PCSK9를 인코딩하는 RNA, 예를 들어 mRNA를 표적화한다.
- [0017] 일부 양태에서, RNA는 상기 개시된 바와 같이 pre-mRNA, pre-mRNA의 스플라이스 변이체, 성숙 mRNA, 또는 이의 대립형질 변이체 또는 돌연변이체이다.
- [0018] 일부 양태에서, 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티는 안티센스 올리고머의 5'-말단 또는 3'-말단에 부착된 간 표적화 모이어티이다. 일부 양태에서, 간 표적화 모이어티는 링커를 통해 안티센스 올리고머에 연결된다. 일부 양태에서, 간 표적화 모이어티는 갈락토스, 락토스, N-아세틸갈락토사민(GalNAc), 만노스, 만노스-6-포스페이트 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 탄수화물을 포함하는 탄수화물 접합체 모이어티를 포함한다.
- [0019] 일부 양태에서, 탄수화물 접합체 모이어티는 선형 탄수화물 중합체가 아니다. 일부 양태에서, 탄수화물 접합체 모이어티는 1, 2, 3, 또는 4개의 탄수화물 모이어티를 포함하는 탄수화물 그룹이다. 일부 양태에서, 모든 탄수화물 모이어티는 동일하다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 탄수화물 모이어티는 다른 탄수화물 모이어티에 대해 상이하다(비동일성이다). 일부 양태에서, 탄수화물 접합체 모이어티는 적어도 하나의 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티를 포함한다. 일부 양태에서, 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티는 1가, 2가, 3가 또는 4가 GalNAc 클러스터를 포함한다. 일부 양태에서, GalNAc 클러스터에서 각 GalNAc는 스페이서를 통해 분기점 그룹에 부착된다. 일부 양태에서, 분기점 그룹은 펩티드, 예를 들어 디-리신을 포함한다. 일부 양태에서, 스페이서는 PEG 스페이서를 포함한다. 일부 양태에서, 링커는 C6 내지 C12 아미노 알킬기 또는 1 내지 6개의 뉴클레오타이드를 포함하는 생체절단가능한 포스페이트 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 일부 양태에서, 3가 GalNAc 클러스터는 접합체 1, 접합체 2, 접합체 1a 또는 접합체 2a GalNAc 접합체 모이어티를 포함한다. 일부 양태에서, 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티는 공유 결합을 통해 안티센스 올리고머에 공유 부착된다.
- [0020] 본 개시내용은 또한 도 18a에 도시된 바와 같은 서열번호: 18 또는 서열번호: 19의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체 및 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 5-CNAC, 또는 이의 염, 수화물, 용매화물, 또는 이의 조합)를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화한다. 일부 양태에서, RNA는 pre-mRNA, pre-mRNA의 스플라이스 변이체, 성숙 mRNA, 또는 이의 대립형질 변이체 또는 돌연변이체이다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 엑손 내의 서열을 표적화한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 인트론 내의 서열을 표적화한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 엑손과 인트론 사이의 접합부를 포함하는 서열을 표적화한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 PCSK9를 인코딩하는 개방 관독 프레임의 5' 말단으로부터 상류인 서열을 표적화한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 PCSK9를 인코딩하는 개방 관독 프레임의 3' 말단으로부터 하류인 서열을 표적화한다.
- [0021] 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 약학적 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 이의 조합은 pH 조절제, 방부제, 풍미제; 및 차폐제; 방향제; 습윤제; 긴장화제 착색제; 계면활성제; 가소제; 윤활제; 흐름 보조제; 압축 보조기; 가용화제; 부형제; 희석제; 인산염 완충염; 시트르산, 글리콜, 분산제, 크로스포비돈, 포비돈, 또는 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 약학적 조성물은 스타틴, 담즙 격리 수지, 니코틴산, 피브르산 유도체, 프로부콜, 네오마이신, 텍스트로티록신, 식물성 스타놀 에스테르, 콜레스테롤 흡수 억제제, 임플리타피드, 담즙산 수송체의 억제제, 간 CYP7a의 조절자, 에스트로겐 대체 치료제, 항-염증제, 또는 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 치료제를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 스타틴은 로바스타틴, 세리바스타틴, 프라바스타틴, 아토르바스타틴, 심바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0022] 본 개시내용은 또한 유효량의 본 명세서에 개시된 약학적 조성물, 예를 들어, 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 및 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 5-CNAC, 또는 이의 염, 수화물, 또는 용매화물, 또는 이의 조합)를 투여하는 것을 포함하는 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 비

정상적인 발현 수준 및/또는 활성에 의해 야기된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 약학적 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 PCSK9의 수준을 감소시키고/시키거나 혈청 LDL 콜레스테롤의 수준을 감소시킨다. 일부 양태에서, PCSK9는 (i) PCSK9 대립형질 변이체; (ii) PCSK9 돌연변이체; 또는 (iii) PCSK9 스플라이스 변이체이다. 일부 양태에서, PCSK9 돌연변이체는 PCSK9 기능 획득 돌연변이체이다.

[0023] 일부 양태에서, 질환 또는 병태는 죽상동맥경화증, 고콜레스테롤혈증, HDL/LDL 콜레스테롤 불균형, 이상지질혈증, 관상동맥질환(CAD) 및 관상심장질환(CHD)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 이상지질혈증은 가족성 고지혈증(FCHL) 또는 후천성 고지혈증이다. 일부 양태에서, 고콜레스테롤혈증은 가족성 고콜레스테롤혈증 또는 스타틴 내성 고콜레스테롤혈증이다.

[0024] 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 치료의 방법은 스타틴, 담즙 격리 수지, 니코틴산, 피브르산 유도체, 프로부콜, 네오마이신, 텍스트로티록신, 식물성 스타놀 에스테르, 콜레스테롤 흡수 억제제, 임플리타피드, 담즙산 수송체의 억제제, 간 CYP7a의 조절자, 에스트로겐 대체 치료제, 항-염증제, 또는 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 치료제의 투여를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 스타틴은 로바스타틴, 세리바스타틴, 프라바스타틴, 아토르바스타틴, 심바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0025] 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 약학적 조성물은 경구로 투여된다. 일부 양태에서, 약학적 조성물은 단일 용량으로 투여된다. 일부 양태에서, 약학적 조성물은 다중 용량으로 투여된다.

[0026] 본 개시내용은 또한 치료를 필요로 하는 대상체에서 죽상동맥경화증, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, HDL/LDL 콜레스테롤 불균형, 관상동맥질환(CAD) 또는 관상심장질환(CHD)으로 구성된 군으로부터 선택된 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 명세서에 개시된 약학적 조성물, 예를 들어 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오티드 집합체(예를 들어, CIVI 008) 및 경구 전달 증강제(예를 들어, SNAC, C10, 5-CNAC, 또는 이의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0027] 본 개시내용은 또한 유효량의 본 명세서에 개시된 약학적 조성물, 예를 들어, 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오티드 집합체(예를 들어, CIVI 008) 및 경구 전달 증강제(예를 들어, SNAC, C10, 5-CNAC, 또는 이의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합)를 포함하는 조성물을 세포에 투여하는 것을 포함하는 세포에서 PCSK9의 발현 수준 및/또는 활성을 감소시키는 시험관내 또는 생체내 방법을 제공한다.

[0028] 또한 유효량의 본 명세서에 개시된 약학적 조성물, 예를 들어, 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오티드 집합체(예를 들어, CIVI 008) 및 경구 전달 증강제(예를 들어, SNAC, C10, 5-CNAC, 또는 이의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 이를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9 발현 수준 및/또는 PCSK9 활성을 감소시키는 방법이 제공된다.

[0029] 본 개시내용은 또한 이를 필요로 하는 대상체에서, 유효량의 본 명세서에 개시된 약학적 조성물, 예를 들어 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오티드 집합체(예를 들어, CIVI 008) 및 경구 전달 증강제(예를 들어, SNAC, C10, 5-CNAC, 또는 이의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합)를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 콜레스테롤 수준을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0030] 또한 (i) 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오티드 길이인 안티센스 올리고머로서, 여기서 안티센스 올리고머의 서열은 서열번호: 31의 서열에 100% 상보성인, 길이가 16개의 뉴클레오티드인 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 겹머이고, 여기서 안티센스 올리고머는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화하는, 안티센스 올리고머, 및 (ii) 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 5-CNAC, 또는 이의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합)를 혼합하는 것을 포함하는 약학적 조성물을 제조하는 방법이 제공된다.

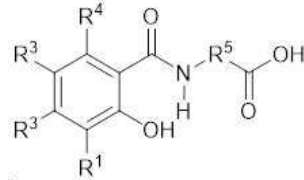
[0031] 본 개시내용은 또한 (i) (a) 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오티드인 안티센스 올리고머로서, 여기서 안티센스 올리고머의 서열은 서열번호: 31의 서열에 100% 상보성인, 길이가 16개의 뉴클레오티드인 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 겹머인, 안티센스 올리고머, (b) 인접하는 올리고머 서열과 비뉴클레오티드 또는 비폴리뉴클레오티드 모이어티 사이에 위치한 링커를 통해 또는 직접적으로 상기 안티센스 올리고머에 공유적으로 부착된 적어도 하나의 비뉴클레오티드 또는 비폴리뉴클레오티드 모이어티로서, 여기서 안티센스 올리고뉴클레오티드 집합체는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화하는, 모이어티를 포함하는 집합체; 및 (ii) 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 5-CNAC, 또는 이의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합)를 혼합하는 것을 포함하는 약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

- [0032] 일부 양태에서, 안티센스 올리고머의 서열은 서열번호: 26, 즉 서열번호: 31과 동일한 길이를 갖는 서열번호: 31에 100% 상보성인 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머의 서열은 서열번호: 2 또는 서열번호: 3, 즉 서열번호: 26의 염기 서열을 갖지만 특정 패턴의 염기 및 골격 변형을 갖는 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머 접합체는 서열번호: 18 또는 서열번호: 19, 즉 GalNAc2 모이어티에 접합된 서열번호: 2 또는 서열번호: 3을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0033] 본 개시내용의 약학적 조성물 및 방법의 일부 양태에서, 경구 전달제는, 예를 들어, 카프릴산(C8), 카프르산(C10), 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물 또는 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 약학적으로 허용가능한 염은 나트륨염, 칼륨염 또는 이의 조합이다. 일부 양태에서, 약학적 조성물은 고체이다.
- [0034] 일부 양태에서, 약학적 조성물은 정제 또는 캡슐의 형태이다. 일부 양태에서, 캡슐은 액체 캡슐이다. 일부 양태에서, 약학적 조성물은 장용 코팅된다. 일부 양태에서, 정제 또는 캡슐은 장용 코팅된다. 일부 양태에서, 정제 또는 캡슐은 5mg 내지 1000mg, 10mg 내지 500mg, 10mg 내지 250mg, 100mg 내지 200mg, 또는 250mg 내지 500mg의 중량을 갖는다. 일부 양태에서, 정제 또는 캡슐의 안티센스 올리고머 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 양은 1mg 내지 100mg, 5mg 내지 100mg, 10mg 내지 100mg, 20mg 내지 100mg, 20mg 및 50mg의 범위이다.
- [0035] 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합이다. 일부 양태에서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 나트륨염이다. 일부 양태에서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 일나트륨 염(살카프로자이트 나트륨 203787-91-1, SNAC, 나트륨 8-(2-하이드록시벤조아미도)옥타노에이트)이다. 일부 양태에서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 이나트륨 염이다.
- [0036] 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합이다. 일부 양태에서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 나트륨염이다. 일부 양태에서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 일나트륨 염(5-SNAC)이다. 일부 양태에서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 이나트륨 염이다.
- [0037] 일부 양태에서, 경구 전달제는 카프르산(C10)의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 조합이다. 일부 양태에서, 카프르산(C10)의 염은 카프르산(C10)의 나트륨염, 칼륨염 및 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 카프르산(C10)의 염은 카프르산나트륨이다.
- [0038] 일부 양태에서, 약학적 조성물은 식사 이전 약 5분 내지 약 60분에 투여된다. 일부 양태에서, 약학적 조성물은 식사 이전 적어도 약 5, 약 10, 적어도 약 15, 적어도 약 20, 적어도 약 25, 적어도 약 30, 적어도 약 35, 적어도 약 40, 적어도 약 45, 적어도 약 50, 적어도 약 55 또는 적어도 약 60분에 투여된다.
- [0039] 일부 양태에서, 약학적 조성물은 pH 민감성 코팅을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, pH 민감성 코팅은 pH-민감성 중합체이다. 일부 양태에서, pH-민감성 중합체는 셀룰로오스, 아크릴산, 이의 유도체, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, pH 민감성 코팅은 pH-민감성 하이드로겔, pH-활성화된 약물 전달 시스템, pH-민감성 리포솜, 미셀 또는 지질 나노입자, pH-민감성 마이크로스피어, pH-민감성 나노입자, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.
- [0040] 본 개시내용은 또한 (GalNAc)3-아미노-헥사메틸렌-5' 포스포로티오일)-(2'-0,4'-C-메틸렌 아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 티미딜릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시구아노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시시티디닐릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시티미딜릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시시티디닐릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 (5-메틸-시티디닐릴)-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 (5-메틸-시티디닐릴)-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 아데노실릴 헥사데카 나트륨 염, 및 SNAC, C10, 5-CNAC, 이의 수화물, 용매화물 또는

염, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 경구 전달제를 포함하는 알약 또는 캡슐을 제공한다.

[0041] 본 개시내용은 또한 도 18b에 도시된 바와 같은 CIVI 008 및 SNAC, C10, 5-CNAC, 이의 수화물, 용매화물 또는 염, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 경구 전달제를 포함하는 알약 또는 캡슐을 제공한다. 일부 양태에서, 알약 또는 캡슐은 CIVI 008 및 SNAC를 포함한다. 일부 양태에서, 알약 또는 캡슐은 CIVI 008 및 C10을 포함한다. 일부 양태에서, 알약 또는 캡슐은 CIVI 008 및 5-CNAC를 포함한다.

[0042] 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법의 일부 양태에서 경구 전달제는



[0043]

이고, 여기서

[0044]

R^1 , R^2 , R^3 , 및 R^4 는 독립적으로 수소, $-OH$, $-NR^{6,7}$, 할로젠, C_1-C_4 알킬 또는 C_1-C_4 알콕시이고;

[0045]

R^5 는 치환 또는 비치환된 C_2-C_{16} 알킬렌, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{16} 알케닐렌, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{12} 알킬 (아릴렌), 또는 치환 또는 비치환된 아릴(C_1-C_4 알킬렌)이고;

[0046]

R^6 및 R^7 는 독립적으로 수소, 산소 또는 C_1-C_4 알킬이다.

[0047]

본 명세서에 개시된 조성물 및 방법의 일부 양태에서 경구 전달제는 N-(8-[2-하이드록시벤조일]아미노)카프릴산 (SNAC), N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산(5-CNAC), N-(10-[2-하이드록시벤조일]아미노)테칸산(SNAD), 4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산(4-CNAB), N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노) 옥탄산(4-MOAC), 8-(4-하이드록시페녹시) 옥탄산(4-HPO), 4-m-톨릴옥시부티르산(3-TBA), 4-(3-하이드록시페닐솔 파닐)부티르산(3-HPSB), 5-페닐펜탄산(5-PPA), 8-(2-하이드록시페녹시)옥틸디에탄올아민(2-HPD), (4-이소프로 필벤질옥시)아세트산(4-IBOA), 2-(5-펜탄산)-5-(2-하이드록시페닐)-1,3,4-옥사디아졸(2-PHOD), 7-옥소-7-페닐 헵탄산(7-OPHA), 4-(3-플루오로페닐솔파닐)부티르산(3-FPSB), 또는 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0048]

일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 이나트륨 염이다.

[0049]

일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 조합이다. 일부 양태에서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노 카프릴산의 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 나트륨염이다. 일부 양태에서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카 프릴산의 염은 이나트륨 염이다. 일부 양태에서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 이나트륨 염이다.

[0050]

본 개시내용은 또한 (i) CIVI 008을 포함하는 조성물 및 (ii) 5-CNAC를 포함하는 조성물을 포함하는 캡슐을 제공한다. 일부 양태에서, CIVI 008을 포함하는 조성물 및 5-CNAC를 포함하는 조성물은 건조 블렌드 내에 있다. 일부 양태에서, 캡슐은 젤라틴 캡슐이다. 일부 양태에서, 겔 캡슐은 경질-셀 젤라틴 캡슐이다. 일부 양태에서, 캡슐은 장용 코팅된다. 일부 양태에서, 캡슐은 5mg 내지 30mg의 CIVI 008 및 100mg 내지 200mg의 5-CNAC를 포함한다. 일부 양태에서, 캡슐은 약 5mg, 약 10mg, 약 20mg, 약 25mg, 또는 약 30mg의 CIVI 008을 포함한다. 일부 양태에서, 여기서 캡슐은 10mg의 CIVI 008 및 100mg의 5-CNAC; 20mg의 CIVI 008 및 200mg의 5-CNAC; 5mg의 CIVI 008 및 200mg의 5-CNAC; 10mg의 CIVI 008 및 200mg의 5-CNAC; 25mg의 CIVI 008 및 200mg의 5-CNAC; 또는 30mg의 CIVI 008 및 200mg의 5-CNAC를 포함한다. 일부 양태에서 캡슐은 스타틴을 함유한다.

[0051]

일부 양태에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 죽상동맥경화증, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, HDL/LDL 콜레스테롤 불균형, 관상동맥질환(CAD) 또는 관상심장질환(CHD)으로 구성된 군으로부터 선택된 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 대상체에게 (i) CIVI 008을 포함하는 조성물 및 (ii) 5-CNAC를 포함하는 조성물을 포함하는 캡슐을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 본 개시내용은 또한 (i) CIVI 008을 포함하는 조성물 및 (ii) 5-CNAC를 포함하는 조성물을 포함하는 캡슐을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 이를 필요

[0052]

로 하는 대상체에서 PCSK9의 발현 수준 및/또는 활성을 감소시키는 방법을 제공한다. 또한 이를 필요로 하는 대상체에서, (i) CIVI 008을 포함하는 조성물 및 (ii) 5-CNAC를 포함하는 조성물을 포함하는 캡슐을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 콜레스테롤 수준을 감소시키는 방법이 제공된다. 또한 죽상동맥경화증, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, HDL/LDL 콜레스테롤 불균형, 관상동맥질환(CAD) 또는 관상심장질환(CHD)으로 구성된 군으로부터 선택된 장애의 치료에 사용하기 위한 (i) CIVI 008을 포함하는 조성물 및 (ii) 5-CNAC를 포함하는 조성물을 포함하는 캡슐이 제공된다. 또한 대상체에서 PCSK9의 발현 수준 및/또는 활성을 감소시키기 위한 약제로서 사용하기 위한 (i) CIVI 008을 포함하는 조성물 및 (ii) 5-CNAC를 포함하는 조성물을 포함하는 캡슐이 제공된다. 본 개시내용은 또한 대상체에서 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위한 약제로서 사용하기 위한 (i) CIVI 008을 포함하는 조성물 및 (ii) 5-CNAC를 포함하는 조성물을 포함하는 캡슐을 제공한다. 또한 (i) CIVI 008을 포함하는 제1 조성물 및 5-CNAC를 포함하는 제2 조성물을 건조 블렌딩하는 단계; 및 (ii) 단계 (i)의 생성된 건조 블렌드를 캡슐에 캡슐화하는 단계를 포함하는 CIVI 008을 포함하는 조성물 및 5-CNAC를 포함하는 조성물을 포함하는 캡슐을 제조하는 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0053]

도 1a, 1b 및 1c는 본 명세서에 개시된 경구 조성물에 사용될 수 있는 트리-GalNAc 접합체의 예를 도시한다. 접합체 1-4는 4개의 적합한 GalNAc 접합체 모이어티를 예시하고, 접합체 1a-4a는 접합체를 올리고머 (영역 A 또는 생체-절단가능한 링커, 예컨대 영역 B)에 연결하는데 사용되는 추가의 링커 모이어티(Y)를 갖는 동일한 접합체를 지칭한다. 물결선은 올리고머에 대한 공유 연결을 나타낸다.

도 2는 본 명세서에 개시된 경구 조성물에 사용될 수 있는 콜레스테롤 및 토크페롤 접합체 모이어티의 예를 도시한다. 접합체 5a 및 6a는 접합체를 올리고머(영역 A 또는 생체-절단가능한 링커, 예컨대 영역 B)에 연결하는데 사용되는 추가의 링커 모이어티(Y)를 갖는 동일한 접합체를 지칭한다. 물결선은 올리고머에 대한 공유 연결을 나타낸다.

도 3은 특정 LNA 화합물을 도시한다. 베타-D-옥시 LNA는 문자 뒤에 위첨자 L로 식별되며, 아래첨자 s는 포스포로티오에이트 연결을 나타내고, 대문자 C 앞의 위첨자 Me는 5-메틸 시토신 LNA를 나타내고, 비 LNA 뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드(위첨자 L 없음)이다.

도 4는 본 명세서에 개시된 경구 조성물에 사용될 수 있는 LNA 화합물의 콜레스테롤 접합체의 예를 도시한다. 베타-D-옥시 LNA는 문자 뒤에 위첨자 L로 식별되며, 아래첨자 s는 포스포로티오에이트 연결을 나타내고, 아래첨자 o는 포스포디에스테르 연결을 나타내고, 대문자 C 앞의 위첨자 Me는 5-메틸 시토신 LNA를 나타내고, 비 LNA 뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드(위첨자 L 없음)이다.

도 5a는 본 명세서에 개시된 경구 조성물에 사용될 수 있는 LNA 화합물의 GalNAc 접합체의 예를 도시한다. 접합체는 본질적으로 물결선이 LNA 올리고머로 대체된 도 1에서의 접합체 2a에 상응한다. 베타-D-옥시 LNA는 문자 뒤에 위첨자 L로 식별되며, 아래첨자 s는 포스포로티오에이트 연결을 나타내고, 대문자 C 앞의 위첨자 Me는 5-메틸 시토신 LNA를 나타내고, 비 LNA 뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드(위첨자 L 없음)이다.

도 5b는 서열번호 18의 상세한 구조를 도시한다.

도 5c는 서열번호 19의 상세한 구조를 도시한다.

도 6은 FAM 접합체 그룹의 예를 나타낸다.

도 7은 절단가능한 포스포디에스테르 연결이 있거나 없는 LNA-FAM 접합체를 도시한다. 베타-D-옥시 LNA는 문자 뒤에 위첨자 L로 식별되며, 아래첨자 s는 포스포로티오에이트 연결을 나타내고, 아래첨자 o는 포스포디에스테르 연결을 나타내고, 대문자 C 앞의 위첨자 Me는 5-메틸 시토신 LNA를 나타내고, 비 LNA 뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드(위첨자 L 없음)이다.

도 8은 시험관내 효능에 따라 순위가 매겨진 항-PCSK9 캡머를 도시한다.

도 9는 시험관내 효능에 따라 순위가 매겨진 선택된 항-PCSK9 캡머를 도시한다.

도 10은 선택된 항-PCSK9 화합물의 시험관내 효능 및 IC₅₀ 데이터를 도시한다.

도 11은 선택된 항-PCSK9 접합체에 대한 생체내 알려진 아미노트랜스퍼라제(ALT) 수준을 도시한다.

도 12는 인터-뉴클레오타이드 연결 L이 예를 들어 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트,

보라노포스페이트 또는 메틸포스포네이트, 예컨대 포스포디에스테르일 수 있음을 도시한다. PO는 포스포디에스테르 연결이다. 화합물 (a)는 단일 DNA(또는 RNA)를 갖는 영역 B를 가지며, 제2 영역과 제1 영역 사이의 연결은 PO이다. 화합물 (b)는 포스포디에스테르 연결에 의해 연결된 2개의 DNA/RNA(예를 들어, DNA) 뉴클레오타이드를 갖는다. 화합물 (c)는 포스포디에스테르 연결에 의해 연결된 3개의 DNA/RNA(예컨대, DNA) 뉴클레오타이드를 갖는다. 일부 양태에서, 영역 B는 추가 포스포디에스테르 DNA/RNA(예컨대 DNA 뉴클레오타이드)에 의해 추가로 확장될 수 있다. 접합체 그룹(본 명세서에서 X로 표시, 그렇지 않으면 영역 C)은 각 화합물(예를 들어, 콜레스테롤, GalNAc, 접합체 1-4, 1a-4a, 및 5 또는 6)의 좌측 면에 예시되고, 선택적으로 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 보라노포스페이트, 포스포로아미데이트 또는 메틸포스포네이트와 같은 인 뉴클레오타이드 연결기를 통해 영역 B의 말단 뉴클레오타이드에 공유적으로 부착될 수 있거나, 또는 대안적 연결, 예를 들어 트리아졸 연결(화합물 d, e 및 f에서 L 참조)을 통해 연결될 수 있다.

도 13은 도 12에 제시된 명명법을 사용하여, 화합물이 제3(접합체) 영역(X)과 제2 영역(영역 B) 사이에 선택적 링커(Y)를 포함하는 경우를 도시한다. 적합한 링커는 본 명세서에 개시되어 있고, 예를 들어 C6 링커와 같은 알킬 링커를 포함한다. 화합물 a), b) 및 c)에서, X와 영역 B 사이의 링커는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 보라노포스페이트, 포스포로아미데이트 또는 메틸포스포네이트와 같은 인 뉴클레오타이드 연결기를 통해 영역 B에 부착되거나 대안적 연결, 예를 들어 트리아졸 연결(Li)을 통해 연결될 수 있다. 이들 화합물에서 Li는 제1(A)과 제2 영역(B) 사이의 인터뉴클레오타이드 연결을 나타낸다. 화합물 d), e) 및 f)는 영역 B와 접합체 기 사이에 링커(Y)를 추가로 포함하고, 영역 Y는 예를 들어 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로아미데이트, 보라노포스페이트 또는 메틸포스포네이트와 같은 인 뉴클레오타이드 연결기를 통해, 또는 일부 양태에서 트리아졸 연결을 통해 영역 B에 연결될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, X는 활성화 기 또는 반응성 기일 수 있다. X는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트, 포스포로디티오에이트, 보라노포스페이트 또는 메틸포스포네이트와 같은 인 뉴클레오타이드 연결기를 통해 영역 B에 공유적으로 부착될 수 있거나, 대안적 연결, 예를 들어 트리아졸 연결을 통해 연결될 수 있다.

도 14는 콜레스테롤-접합체의 투여에 이은 PCSK9 mRNA의 생체내 사일런싱을 도시한다. 마우스에 단일 용량의 10mg/kg 비접합된 LNA-안티센스 올리고뉴클레오타이드(#40) 또는 상이한 링커로 콜레스테롤에 접합된 LNA 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 등물량을 주입하고 투여 후 1, 3, 7 및 10일차에 희생시켰다. RNA는 간과 신장에서 분리되었고 PCSK9 특이적 RT-qPCR에 적용되었다. 패널 A는 간 샘플로부터의 PCSK9 mRNA의 정량화가 BACT로 정규화되었고 동등한 식염수 대조군의 평균 백분율로 표시되었음을 도시한다. 패널 B는 신장 샘플로부터의 PCSK9 mRNA의 정량화가 BACT로 정규화되었고 동등한 식염수 대조군의 평균 백분율로 표시되었음을 도시한다.

도 15는 랫트 안전성 연구(실시예 5 참조)로부터의 Kim-1 발현을 도시한다.

도 16은 서열번호:2 또는 서열번호:18의 0.5mg/kg/주 또는 1.5mg/kg/주로 4회(1회 주사/주) 주사된 사이노몰구스 원숭이로부터의 샘플에서 혈청 PCSK9 및 LDL 콜레스테롤을 도시한다.

도 17은 서열번호: 3 및 서열번호: 19의 0.5 또는 1.5mg/kg/주로 4회(1회 주사/주) 주사된 사이노몰구스 원숭이로부터의 샘플에서 혈청 PCSK9 및 LDL 콜레스테롤을 도시한다.

도 18a는 서열번호: 18 및 서열번호: 19의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 개략도 구조를 도시한다.

도 18b는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체 CIVI 008(cepadacursen)의 상세한 화학 구조 및 전체 명칭을 도시한다.

도 19는 예시적인 경구 전달체의 화학 구조를 도시한다.

도 20은 실시예 9에 제시된 임상 실험의 디자인을 도시한다.

도 21은 SNAC와 함께 또는 없이 투여 후 CIVI 008의 혈장 농도 수준을 도시한다.

도 22는 SQ(피하) 아암(P0001, P0002, P0901 및 P0902) 및 PO(경구) 아암의 실시예 9 연구(P0301, P0302, P0303, P1201, P1202, P1203, P0401, P0402, P0403, P1301, P1302, P1303, P0501, 및 P1401)에서의 혈장 AUC 수준을 도시한다.

도 23은 실시예 9에 제시된 연구의 SQ 및 PO 아암에서 CIVI 008의 간 농도 수준을 도시한다.

도 24는 경구 CIVI 008 투여 후 35 및 42일차에서 기준선 수준에 관한 PCSK9 발현 수준에서의 평균 변화를 도시

한다.

도 25a 및 **25b**는 CIVI 008의 1개 또는 2개의 캡슐의 투여 후(**도 25a**) 또는 대조군 조건(**도 25b**) 하에 기준선에 관한 혈장 LDL 콜레스테롤 수준에서의 변화를 도시한다.

도 26은 실시예 9에 제시된 연구 동안 기준선에 관한 혈장 LDL 콜레스테롤 수준에서의 변화를 도시한다.

도 27은 실시예 11에 제시된 연구의 도식적 설명을 도시한다.

도 28은 5-CNAC로 투여 후 CIVI 008의 혈장 농도 수준을 도시한다.

도 29는 SNAC 또는 5-CNAC를 포함하는 CIVI 008 캡슐의 투여에 상응하는 약동학 매개변수(평균 AUC_{0-5} 및 평균 C_{max}) 사이의 비교를 도시한다.

도 30은 크기 4 캡슐(그룹 A) 또는 크기 0 캡슐(그룹 B)에서 5-CNAC와 함께 CIVI 008의 투여에 상응하는 혈장 농도 수준 및 약동학 매개변수(평균 AUC_{0-5} 및 평균 C_{max})를 도시한다.

도 31은 5-CNAC로 제형화된 CIVI 008의 5mg 내지 30mg을 투여한 원숭이에서 1 및 3일차에서 평균 AUC 및 평균 C_{max} 를 도시한다.

도 32a 및 **도 32b**는 건조 블렌딩(**도 32a**) 또는 동결-건조(**도 32b**)에 의해 제조된 캡슐에서 유사한 용량의 CIVI 008을 투여한 원숭이에서 1 및 3일차에서 평균 약동학 매개변수의 비교를 도시한다.

도 33은 투여 22일 후 PCSK9 및 혈장 LDL에서의 기준선으로부터 감소를 도시한다.

도 34는 SNAC 또는 5-CNAC로 제형화된 CIVI 008을 투여한 원숭이에서 기준선으로부터 % LDL 감소를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0054] 본 개시내용은 안티센스 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 및 경구 전달제, 예를 들어, C10, SNAC, 또는 5-CNAC를 포함하는 경구 전달용 약학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 길이가 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오타이드이고 그의 서열은 서열번호: 31의 PCSK9 표적 서열에 100% 상보성인 길이가 16개의 뉴클레오타이드인 인접하는 서열을 포함하며, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 캡머이고, 여기서 안티센스 올리고머는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화한다.
- [0055] 일부 양태에서, 올리고머는 서열번호: 18 또는 서열번호: 19에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 (i) 길이가 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오타이드인 안티센스 올리고머 모이어티로서, 여기서 그의 서열은 서열번호: 31의 PCSK9 표적 서열에 100% 상보성인, 길이가 16개의 뉴클레오타이드인 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 캡머이고, 여기서 안티센스 올리고머는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화하는, 안티센스 올리고머 모이어티, 및 (ii) 올리고머의 5' 말단에 접합된 GalNAc 모이어티 포함한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 **도 18b**에 묘사된 바와 같은 CIVI 008이다.
- [0056] 본 명세서에 개시된 경구 약학적 조성물, 예를 들어 알약 또는 캡슐 형태인 CIVI 008을 포함하는 조성물은 위장관을 통해(예를 들어, 위와 소장의 상부 부분을 통해) 통과하는 동안 페이로드(예를 들어, CIVI 008)를 보호하는 적어도 하나의 경구 전달제를 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 카프릴산(옥탄산, C8), 카프르산(데칸산 또는 데실산, C10), 이의 유도체(예를 들어, 8-[2-하이드록시벤조일]아미노) 카프릴산, SNAC, 또는 5-CNAC와 같은 지방산의 염(예를 들어, 나트륨 염), 또는 이의 조합이다. 특정 양태에서, 경구 전달제는 염, 예를 들어 SNAC의 나트륨 염 또는 5-CNAC의 나트륨 염이다.
- [0057] 또한 본 명세서에 개시된 약학적 조성물을 제조하는 방법이 제공된다. 개시내용은 또한 대상체가 치료를 필요로 하는 경우 본 명세서에 개시된 경구 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0058] 정의
- [0059] 본 설명이 더 쉽게 이해될 수 있도록 하기 위해, 특정 용어가 먼저 정의된다. 추가적인 정의는 상세한 설명 전반에 걸쳐 제시된다.

- [0060] 용어 "a" 또는 "an" 엔티티는 그 엔티티 중 하나 이상을 지칭한다는 점에 유의해야 한다. 예를 들어, "뉴클레오타이드 서열"은 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 나타내는 것으로 이해된다. 이와 같이, 용어 "a"(또는 "an"), "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0061] 더욱이, 본 명세서에서 사용되는 "및/또는"은 다른 것이 있거나 없는 2개의 특정한 특징 또는 구성요소의 각각의 특정한 개시로 취해져야 한다. 따라서, 본 명세서에서 "A 및/또는 B"와 같은 구에서 사용되는 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A"(단독) 및 "B"(단독)를 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, "A, B 및/또는 C"와 같은 구에서 사용되는 용어 "및/또는"은 다음의 각각의 양태를 포괄하도록 의도된다: A, B 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).
- [0062] 명세서에서 용어 "포함하는"이라는 양태가 기술되는 경우, 달리는 "이루어지는" 및/또는 "본질적으로 이루어지는"의 용어로 기술되는 유사한 양태가 또한 제공되는 것으로 이해된다.
- [0063] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 관련된 기술 분야에서 통상인에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 및 Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press는 당업자에게 본 개시내용에서 사용된 많은 용어의 일반 사전을 제공한다.
- [0064] 단위, 접두어 및 기호는 국제 단위 시스템(SI) 허용 형식으로 표시된다. 숫자 범위에는 범위를 정의하는 숫자가 포함된다. 달리 표시되지 않는 한, 뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 기재된다. 아미노산 서열은 아미노에서 카복시 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 기재된다. 본 명세서에 제공된 제목은 명세서 전체를 참조하여 가질 수 있는 개시내용의 다양한 양태의 제한이 아니다. 따라서 바로 아래 정의된 용어들은 명세서 그 전체를 참조함에 의해 보다 완전하게 정의된다.
- [0065] 용어 "약"은 본 명세서에서 대략적으로, 대략, 대강 또는 그 영역을 의미하는 것으로 사용된다. 용어 "약"이 수치 범위와 조합하여 사용되는 경우, 이는 제시된 수치 값 위아래로 경계를 확장하여 그 범위를 변형한다. 일반적으로, 용어 "약"은 예를 들어 10%의 변동에 의해 상부 또는 하부로(더 높거나 낮음) 언급된 값의 위아래로 수치 값을 변형할 수 있다. 예를 들어, 안티센스 올리고머 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008)가 올리고머 또는 접합체의 투여에 이어서 세포에서 PCSK9 단백질의 발현을 적어도 약 60% 감소시킨다고 언급된 경우, PCSK9 발현 수준이 50% 내지 70%의 범위로 감소된다는 것이 함축된다.
- [0066] 본 개시내용의 맥락에서 용어 "올리고머" 또는 "올리고뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되고, 2개 이상의 뉴클레오타이드의 공유 연결에 의해 형성된 분자를 지칭한다. 본 명세서에서, 단일 뉴클레오타이드(단위)는 단량체 또는 단위로 지칭될 수도 있다.
- [0067] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유도체"는 본 명세서에 개시된 화합물(예를 들어, C10, SNAC, 또는 5-CNAC)과 구조적으로 관련된 화학적 화합물, 예를 들어, 동일한 탄소 골격을 갖지만, 예를 들어, 하나 이상의 위치에 본 명세서에 개시된 측쇄 또는 기를 도입하기 위해 화학적으로 변형된 화합물을 지칭하고, 여기서 유도체는 그것이 유도체인 엔티티 또는 분자의 생물학적 활성과 실질적으로 유사한 생물학적 활성(경구 전달체로서 기능하는 능력)을 보유한다.
- [0068] 본 명세서에서 사용되는 용어 "뉴클레오타이드"는 당 모이어티, 염기 모이어티 및 공유적으로 연결된 기(연결기), 예컨대 포스페이트 또는 포스포로티오에이트 인터뉴클레오시드 연결기를 포함하는 글리코시드를 지칭하고, 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드, 예컨대 DNA 또는 RNA, 및 본 명세서에서 "뉴클레오타이드 유사체"로도 지칭되는 변형된 당 및/또는 염기 모이어티를 포함하는 비자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드 둘 모두를 커버한다. 본 명세서에서, 단일 뉴클레오타이드는 단량체 또는 단위로 지칭될 수 있다. 특정 양태에서, 용어 "뉴클레오타이드 유사체"는 변형된 당 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 변형된 당 모이어티(예를 들어, LNA)를 갖는 뉴클레오타이드의 비제한적 예는 본 명세서에서 다른 곳에 개시된다. 다른 양태에서, 용어 "뉴클레오타이드 유사체"는 변형된 핵염기 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 변형된 핵염기 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드는 5-메틸-시토신, 이소시토신, 슈도이소시토신, 5-브로모우라실, 5-프로피닐우라실, 6-아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 이노신, 디아미노퓨린 및 2-클로로-6-아미노퓨린을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 양태에서, 용어 "뉴클레오타이드", "단위" 및 "단량체"는 상호교환적으로 사용된다. 뉴클레오타이드 또는 단량체의 서열을 언급할 때 언급되는 것은 A, T, G, C 또는 U와 같은 염기의 서열 및 이의 유사체임을 인지할 것이다.

- [0069] 본 명세서에서 사용되는 용어 "뉴클레오타이드"는 당 모이어티 및 염기 모이어티를 포함하는 글리코시드를 지칭하는데 사용되고, 따라서 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008)의 뉴클레오타이드 사이의 인터뉴클레오타이드 연결에 의해 공유적으로 연결되는 뉴클레오타이드 단위를 지칭할 때 사용될 수 있다. 생명공학의 분야에서 용어 "뉴클레오타이드"는 종종 핵산 단량체 또는 단위를 지칭하는데 사용된다. 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008)의 맥락에서, 용어 "뉴클레오타이드"는 염기 단독, 즉 시토신(DNA 및 RNA), 구아닌(DNA 및 RNA), 아데닌(DNA 및 RNA), 티민(DNA) 및 우라실(RNA)을 포함하는 핵염기 서열을 지칭할 수 있으며, 여기에는 당 골격 및 인터뉴클레오타이드 연결의 존재가 내포되어 있다. 유사하게, 특히 하나 이상의 인터뉴클레오타이드 연결기가 변형된 올리고뉴클레오타이드의 경우, 용어 "뉴클레오타이드"는 "뉴클레오타이드"를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 용어 "뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드 사이의 연결의 존재 또는 특성을 명시할 때에도 사용될 수 있다.
- [0070] 일부 양태에서, 용어 "뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드", "단위" 및 "단량체"는 상호교환적으로 사용된다. 뉴클레오타이드 또는 단량체의 서열을 언급할 때 언급되는 것은 A, T, G, C 또는 U와 같은 염기의 서열임이 인지될 것이다.
- [0071] 복수 용어 "핵산들" 또는 "뉴클레오타이드들"은 복수 핵산을 포괄하는 것으로 의도된다. 일부 양태에서, 용어 "핵산들" 또는 "뉴클레오타이드들"은 *생체내* 또는 *시험관내*에서 표적 서열, 예를 들어 pre-mRNA, mRNA 또는 DNA를 지칭한다. 용어가 표적 서열에서의 핵산들 또는 뉴클레오타이드들을 지칭할 때, 핵산들 또는 뉴클레오타이드들은 세포 내에서 자연적으로 발생하는 서열일 수 있다. 다른 양태에서, "핵산들" 또는 "뉴클레오타이드들"은 개시내용의 올리고머 또는 접합체 내의 서열을 지칭한다. 용어가 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 내의 서열을 지칭할 때, 핵산들 또는 뉴클레오타이드들은 비자연적으로 발생하는, 즉 화학적으로 합성되거나 효소적으로 생산되거나, 재조합으로 생산될 수 있거나, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 내의 핵산들 또는 뉴클레오타이드들은 합성적으로 또는 재조합적으로 생성되지만, 자연적으로 발생하는 서열 또는 이의 단편은 아니다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 내의 핵산들 또는 뉴클레오타이드들은 자연에서 자연적으로 발생적이지 않은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체를 함유하기 때문에 자연적으로 발생하지 않는다.
- [0072] 본 명세서에서 사용되는 용어 "역보체", "역상보성인" 및 "역상보성"은 용어 "보체", "상보성인" 및 "상보성"과 상호교환가능하다.
- [0073] 용어 "상보성인"은 하나의 서열이 역-평행 센스에서 다른 서열에 결합할 수 있을 때 두 서열은 상보성임을 의미하며 여기서 각 서열의 3'-말단은 다른 서열의 5'-말단에 결합하고, 그런 다음 하나의 서열의 각 A, T(U), G 및 C는 다른 서열의 T(U), A, C 및 G와 각각 정렬된다. 일반적으로, 올리고뉴클레오타이드의 상보성인 서열은 정의된 서열에 대해 적어도 90%, 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 100%의 상보성을 갖는다.
- [0074] 용어 "상응하는 뉴클레오타이드 유사체" 및 "상응하는 뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드 유사체 내의 뉴클레오타이드와 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드가 동일하다는 것을 나타내도록 의도된다. 예를 들어, 뉴클레오타이드의 2-데옥시리보스 단위가 아데닌에 연결된 경우 "상응하는 뉴클레오타이드 유사체"는 아데닌에 연결된 오타당 단위(2-데옥시리보스와는 다름)를 함유한다. 핵염기의 예는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티미딘, 우라실, 크산틴, 하이포크산틴, 5-메틸시토신, 이소시토신, 슈도이소시토신, 5-브로모우라실, 5-프로피닐우라실, 6-아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 이노신, 디아미노퓨린, 및 2-클로로-6-아미노퓨린을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 양태에서 핵염기는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티미딘, 우라실, 5-메틸시토신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 일부 양태에서 핵염기는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티미딘 및 5-메틸시토신으로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머에 존재하는 핵염기 중 적어도 하나는 5-메틸시토신, 이소시토신, 슈도이소시토신, 5-브로모우라실, 5-프로피닐우라실, 6-아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 이노신, 디아미노퓨린 및 2-클로로-6-아미노퓨린으로 구성된 군으로부터 선택된 변형된 핵염기이다.
- [0075] "뉴클레오타이드 유사체"는 당 및/또는 염기 모이어티에서 변형에 의한 DNA 또는 RNA 뉴클레오타이드와 같은 자연 뉴클레오타이드의 변이체이다. 유사체는 원칙적으로 단순히 "휴지상태"이거나 올리고뉴클레오타이드의 맥락에서 자연 뉴클레오타이드에 "등가"일 수 있으며, 즉 올리고뉴클레오타이드가 표적 유전자 발현을 억제하도록 작용하는 방식에 기능적 영향을 미치지 않는다. 그럼에도 불구하고 이러한 "등가" 유사체는 예를 들어 제조하기 더 쉽고 저

렴하거나 저장 또는 제조 조건에 더 안정적이거나 태그 또는 라벨을 나타내는 경우 유용할 수 있다.

- [0076] 본 명세서에서 사용되는 용어 "PCSK9"는 프로단백질 전환효소 서브틸리신/켄신 유형 9를 지칭하며, 인간에서 염색체 1 상에서 *PCSK9* 유전자에 의해 인코딩되는 효소이다. PCSK9 유전자는 염색체 1 상의 밴드 1p32.3에 존재한다. 이것은 다른 단백질을 활성화시키는 단백질의 프로단백질 전환효소 패밀리의 9번째 구성원이다. 유사한 유전자(이중상동유전자)가 많은 종에 걸쳐 발견된다. PCSK9의 용해된 구조는 전-처리된 단백질에서 4가지 주요 구성요소를 밝힌다: 신호 펩티드(잔기 1-30); N-말단 프로도메인(잔기 31-152); 촉매 도메인(잔기 153-425); 및 C-말단 도메인(잔기 426-692)으로, 이는 3개의 모듈로 더 분할된다. N-말단 프로도메인은 유연한 결정 구조를 가지고 촉매 도메인과 상호작용하고 차단함에 의해 PCSK9 기능을 조절하는 역할을 하며, 이는 그렇지 않으면 LDLR의 표피 성장 인자-유사 반복 A(EGF-A) 도메인에 결합한다. 이전 연구에서는 C-말단 도메인이 LDLR 결합에 관여하지 않는 것으로 나타났지만, 최근 연구에서는 C-말단 도메인이 LDLR에 결합하는 것으로 나타났다. PCSK9의 분비는 N-말단 프로도메인이 촉매 도메인과의 그 회합을 유지하지만 신호 펩티드 및 N-말단 프로도메인의 자가절단에 크게 의존한다. 특히, N-말단 프로도메인에서 잔기 61-70은 그의 자가처리에 중요하다.
- [0077] 용어 "이의 자연적으로 발생하는 변이체"는 정의된 분류학적 그룹, 예컨대 마우스, 원숭이, 바람직하게는 인간과 같은 포유동물 내에 자연적으로 존재하는 핵산 서열의 PCSK9 폴리펩티드의 변이체를 지칭한다. 전형적으로, 폴리뉴클레오티드의 "자연적으로 발생하는 변이체"를 언급할 때 용어는 또한 염색체의 전좌 또는 중복에 의해 염색체 4에서, 4 C7에서 발견되는 게놈 DNA 및 RNA, 예컨대 그로부터 유래된 mRNA를 인코딩하는 PCSK9의 임의의 대립형질 변이체를 포괄할 수 있다. "자연적으로 발생하는 변이체"는 또한 PCSK9 mRNA의 대안적인 스플라이싱으로부터 유래된 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 폴리펩티드 서열을 언급할 때, 용어는 또한, 예를 들어 공동- 또는 후-번역 변형, 예를 들어 신호 펩티드 절단, 단백질분해적 절단 또는 글리코실화에 의해, 따라서 처리될 수 있는 단백질의 자연적으로 발생하는 형태를 포함한다.
- [0078] 본 명세서에 사용된 "2'-F"는 2' 위치에서 플루오로기를 포함하는 당을 지칭한다.
- [0079] 본 명세서에 사용된 "2'-OMe" 또는 "2'-OCH₃" 또는 "2'-O-메틸"은 각각 당 고리의 2' 위치에서 -OCH₃ 기를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다.
- [0080] 본 명세서에 사용된 용어 "뉴클레오티드 길이"는 주어진 서열에서 뉴클레오티드(단량체)의 총 수를 의미한다. 당업계에서 통상인이 인식하는 바와 같이, 올리고뉴클레오티드의 5' 말단 뉴클레오티드는 5' 말단 기를 포함할 수 있지만 5' 인터뉴클레오시드 연결 기를 포함하지 않는다.
- [0081] 본 명세서에 기재된 화합물은 여러 비대칭 중심을 함유할 수 있고 광학적으로 순수한 거울상이성질체, 거울상이성질체의 혼합물 예컨대, 예를 들어 라세미체, 부분입체이성질체의 혼합물, 부분입체이성질체 라세미체 또는 부분입체이성질체 라세미체의 혼합물의 형태로 존재할 수 있다. 일부 양태에서, 비대칭 중심은 비대칭 탄소 원자일 수 있다. 용어 "비대칭 탄소 원자"는 4개의 상이한 치환기를 갖는 탄소 원자를 의미한다. Cahn-Ingold-Prelog Convention에 따르면 비대칭 탄소 원자는 "R" 또는 "S" 배열될 수 있다.
- [0082] 본 명세서에 사용된 용어 "바이사이클릭 당"은 바이사이클릭 구조를 생성하는 제2 고리를 형성하도록 4 내지 7 원 고리의 2개의 원자를 연결하는 가교를 포함하는 4 내지 7원 고리를 포함하는 변형된 당 모이어티를 지칭한다. 일부 양태에서, 가교는 LNA 뉴클레오시드에서 관찰되는 바와 같이 뉴클레오시드의 리보스 당 고리의 C2' 및 C4'을 연결한다(즉, 2'-4' 가교).
- [0083] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "코딩 영역", "코딩 서열" 또는 "개방 판독 프레임"은 아미노산으로 번역가능한 코돈으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일부이다. "정지 코돈"(TAG, TGA 또는 TAA)은 전형적으로 아미노산으로 번역되지 않지만, 코딩 영역의 일부로 간주될 수 있으나, 임의의 측접하는 서열, 예를 들어, 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결자, 인트론, 비번역된 영역("UTR") 등은 코딩 영역의 일부가 아니다. 코딩 영역의 경계는 전형적으로 생성된 폴리펩티드의 아미노 말단을 인코딩하는 5' 말단에서의 시작 코돈 및 생성된 폴리펩티드의 카르복실 말단을 인코딩하는 3' 말단에서의 번역 정지 코돈에 의해 결정된다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체(예를 들어, CIVI 008)는 PCSK9 단백질, 예를 들어, RNA를 인코딩하는 핵산의 PCSK9 코딩 영역을 표적화할 수 있다.
- [0084] 본 명세서에서 사용되는 용어 "비코딩 영역"은 코딩 영역이 아닌 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 비코딩 영역의 예는 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결자, 인트론, 비번역된 영역("UTR"), 비코딩 엑손 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부의 엑손은 각 전사체의 5' 비번역된 영역(5' UTR) 또는 3' 비번역된 영역(3' UTR)의 전체 또는 일부일 수 있다. 비번역된 영역은 전사체의 효율적인 번역과 번역의 속도 및 전사체의 반감기를 제어

하는데 중요하다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 집합체(예를 들어, CIVI 008)는 PCSK9 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어, RNA의 PCSK9 비코딩 영역을 표적화할 수 있다.

- [0085] 뉴클레오타이드 서열의 맥락에서 사용될 때 용어 "영역"은 그 서열의 섹션을 지칭한다. 예를 들어, 어구 "뉴클레오타이드 서열 내의 영역" 또는 "뉴클레오타이드 서열의 보체 내의 영역"은 뉴클레오타이드 서열보다 짧지만, 각각 특정 뉴클레오타이드 서열 또는 뉴클레오타이드 서열의 보체 내에 위치한 적어도 10개 뉴클레오타이드보다 긴 서열을 지칭한다. 용어 "하위-서열" 또는 "하위서열"은 또한 뉴클레오타이드 서열의 영역을 지칭할 수 있다.
- [0086] 뉴클레오타이드 서열을 언급할 때 용어 "하류"는 핵산 또는 뉴클레오타이드 서열이 참조 뉴클레오타이드 서열에 대해 3'에 위치함을 의미한다. 특정 양태에서, 하류 뉴클레오타이드 서열은 전사의 시작점을 따르는 서열에 관한 것이다. 예를 들어, 유전자의 번역 개시 코돈은 전사의 시작 부위의 하류에 위치된다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 집합체(예를 들어, CIVI 008)는 PCSK9 개방 판독 프레임(ORF)의 하류인 PCSK9 단백질을 인코딩하는 핵산의 영역, 예를 들어, RNA를 표적화할 수 있다.
- [0087] 용어 "상류"는 참조 뉴클레오타이드 서열에 대해 5'에 위치한 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 집합체(예를 들어, CIVI 008)는 PCSK9 개방 판독 프레임(ORF)의 상류인 PCSK9 단백질을 인코딩하는 핵산의 영역, 예를 들어, RNA를 표적화할 수 있다.
- [0088] 본 명세서에서 사용되는 용어 "조절 영역"은 코딩 영역의 상류(5' 비코딩 서열), 내부 또는 하류(3' 비코딩 서열)에 위치되고 연관된 코딩 영역의 전사, RNA 처리, 안정성 또는 번역에 영향을 미치는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 조절 영역은 프로모터, 번역 리더 서열, 인트론, 폴리아데닐화 인식 서열, RNA 처리 부위, 이펙터 결합 부위, UTR 및 스템-루프 구조를 포함할 수 있다. 코딩 영역이 진핵 세포에서의 발현을 위해 의도된 경우, 폴리아데닐화 신호 및 전사 종결 서열은 일반적으로 코딩 서열에 대해 3'에 위치할 것이다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 집합체(예를 들어, CIVI 008)는 조절 영역을 표적화할 수 있다.
- [0089] 본 명세서에서 사용되는 용어 "전사체"는 DNA의 전사에 의해 합성되어 처리 후 메신저 RNA(mRNA), 즉 전구체 메신저 RNA(pre-mRNA)가 되는 일차 전사체, 및 처리된 mRNA 그 자체를 지칭할 수 있다. 용어 "전사체"는 "pre-mRNA" 및 "mRNA"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. DNA 가닥이 1차 전사체로 전사된 후 새로 합성된 일차 전사체는 다른 단백질 및 RNA 예컨대 mRNA, tRNA, rRNA, lncRNA, miRNA 등을 생성하기 위해 그의 성숙하고 기능적인 형태로 변환되도록 여러 가지 방법으로 변형된다. 따라서 용어 "전사체"는 엑손, 인트론, 5' UTR 및 3' UTR을 포함할 수 있다.
- [0090] 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현"은 폴리뉴클레오타이드가 유전자 산물, 예를 들어 RNA 또는 폴리펩티드를 생산하는 과정을 지칭한다. 이는 제한 없이 메신저 RNA(mRNA)로의 폴리뉴클레오타이드의 전사 및 폴리펩티드로의 mRNA의 번역을 포함한다. 발현은 "유전자 산물"을 생성한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 유전자 산물은 핵산, 예를 들어 유전자의 전사에 의해 생성된 메신저 RNA, 또는 전사체로부터 번역되는 폴리펩티드일 수 있다. 본 명세서에 기술된 유전자 산물은 전사 후 변형, 예를 들어 폴리아데닐화 또는 스플라이싱을 갖는 핵산, 또는 번역 후 변형, 예를 들어 메틸화, 글리코실화, 지질의 첨가, 다른 단백질 서브유닛과의 회합 또는 단백질분해적 절단을 갖는 폴리펩티드를 추가로 포함한다.
- [0091] 2개 이상의 핵산의 맥락에서 용어 "동일한" 또는 퍼센트 "동일성"은 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 아미노산 치환을 고려하지 않고 최대 상응성에 대해 비교하고 정렬(필요한 경우 갭 도입)했을 때 동일하거나 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 특정된 백분율을 갖는 2개 이상의 서열을 지칭한다. 퍼센트 동일성은 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 사용하거나 육안 검사에 의해 측정될 수 있다. 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열의 정렬을 얻기 위해 사용될 수 있는 다양한 알고리즘 및 소프트웨어가 당업계에 공지되어 있다.
- [0092] 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열 사이의 용어 "퍼센트 서열 동일성" 또는 "퍼센트 동일성"은 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입되어야 하는 첨가 또는 결실(즉, 갭)을 고려하여 비교 윈도우에 걸쳐 서열에 의해 공유되는 동일한 일치된 위치의 수를 지칭한다. 일치된 위치는 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산이 표적 및 참조 서열 둘 모두에 제시되는 임의의 위치이다. 갭은 뉴클레오타이드 또는 아미노산이 아니기 때문에 표적 서열에 제시된 갭은 계산되지 않는다. 마찬가지로, 참조 서열로부터 뉴클레오타이드 또는 아미노산이 아니라 표적 서

열 뉴클레오티드 또는 아미노산이 계수되기 때문에 참조 서열에 제시된 갭은 계수되지 않는다.

- [0093] 서열 정렬 알고리즘의 하나의 이러한 비제한적 예는 Karlin 등, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877에서 변형되고, NBLAST 및 XBLAST 프로그램(Altschul 등, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402)에 포함된 바와 같이, Karlin 등, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268에 기술된 알고리즘이다. 특정 양태에서, 갭이 있는 BLAST는 Altschul 등, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402에 기술된 바와 같이 사용될 수 있다. BLAST-2, WU-BLAST-2(Altschul 등, 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2(Genentech, 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 소재) 또는 Megalign(DNASTAR)은 서열을 정렬하는데 사용될 수 있는 추가의 공개적으로 이용가능한 소프트웨어 프로그램이다. 특정 양태에서, 2개의 뉴클레오티드 서열 사이의 퍼센트 동일성은 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 사용하여(예를 들어, NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70 또는 90의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 사용하여) 결정된다. 특정 대안적 양태에서, Needleman 및 Wunsch(*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970))의 알고리즘을 포함하는 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 사용하여(예를 들어, BLOSUM 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5의 길이 가중치를 사용하여) 두 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성을 결정할 수 있다. 대안적으로, 특정 양태에서, 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성은 Myers 및 Miller(CABIOS, 4:11-17(1989))의 알고리즘을 사용하여 결정된다. 예를 들어, 퍼센트 동일성은 ALIGN 프로그램(버전 2.0)을 사용하고 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 갖는 PAM120을 사용하여 결정될 수 있다. 당업자는 특정 정렬 소프트웨어에 의해 최대 정렬을 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 특정 양태에서 정렬 소프트웨어의 기본 매개변수가 사용된다.
- [0094] 당업자는 퍼센트 서열 동일성의 계산을 위한 서열 정렬의 생성이 전적으로 일차 서열 데이터에 의해 구동되는 이진 서열-서열 비교에 제한되지 않는다는 것을 인식할 것이다. 서열 정렬은 다중 서열 정렬로부터 유도될 수 있다. 다중 서열 정렬을 생성하기 위한 하나의 적합한 프로그램은 www.clustal.org에서 이용가능한 ClustalW2이다. 또 다른 적합한 프로그램은 www.drive5.com/muscle/에서 이용가능한 MUSCLE이다. ClustalW2 및 MUSCLE은, 예를 들어 EBI(European Bioinformatics Institute)로부터 대안적으로 이용가능하다.
- [0095] 구조적 데이터(예를 들어, 결정학적 단백질 구조), 기능적 데이터(예를 들어, 돌연변이의 위치), 또는 계통발생학적 데이터와 같은 이중 소스로부터의 데이터와 서열 데이터를 통합함에 의해 서열 정렬이 생성될 수 있음이 또한 인식될 것이다. 다중 서열 정렬을 생성하기 위해 이중 데이터를 통합하는 적합한 프로그램은 T-Coffee이며, www.tcoffee.org에서 이용가능하고 대안적으로 예를 들어 EBI에서 이용가능하다. 또한 퍼센트 서열 동일성을 계산하는데 사용되는 최종 정렬은 자동 또는 수동으로 큐레이트될 수 있음이 인식될 것이다.
- [0096] 특정 양태에서, 제2 뉴클레오티드 서열에 대한 제1 뉴클레오티드 서열의 백분율 동일성 "X"는 $100 \times (Y/Z)$ 로 계산되며, 여기서 Y는 제1 및 제2 서열의 정렬(육안 검사 또는 특정 서열 정렬 프로그램에 의해 정렬됨)에서 동일한 매치로 평가된 아미노산 잔기의 수이고 Z는 제2 서열에서 잔기의 총 수이다. 제1 서열의 길이가 제2 서열보다 긴 경우, 제2 서열에 대한 제1 서열의 퍼센트 동일성은 제1 서열에 대한 제2 서열의 퍼센트 동일성보다 높을 것이다.
- [0097] 폴리뉴클레오티드 참조 서열과 정렬되는 단일 폴리뉴클레오티드 표적 서열 내의 상이한 영역은 각각 그 자신의 퍼센트 서열 동일성을 가질 수 있다. 퍼센트 서열 동일성 값은 가장 가까운 10분의 1로 반올림된다는 것에 유의한다. 예를 들어 80.11, 80.12, 80.13 및 80.14는 80.1로 반올림되고 80.15, 80.16, 80.17, 80.18 및 80.19는 80.2로 반올림된다. 또한 길이 값은 항상 정수인 것에 유의한다.
- [0098] 개시내용의 올리고머(또는 이의 영역)와 본 명세서에 개시된 것과 같은 표적 영역 사이의 "상보성"의 정도를 결정함에 있어서, "상보성"(또한, "상동성" 또는 "동일성")의 정도는 올리고머(또는 이의 영역)의 서열과 이와 가장 잘 정렬되는 표적 영역(또는 표적 영역의 역 보체)의 서열 사이의 백분율 동일성(또는 백분율 상동성)으로 표현된다. 백분율은 두 서열 사이에 동일한 정렬된 염기의 수를 계수하고 올리고머에서의 인접하는 단량체의 총 수로 나눈 다음 100을 곱하여 계산된다. 이러한 비교에서, 간격이 존재하는 경우에 그러한 갭은 개시내용의 올리고머와 표적 영역 사이에서 갭 내의 단량체의 수가 다른 영역이라기보다는 단지 불일치이라는 것이 바람직할 수 있다.
- [0099] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 예를 들어 PCSK9 유전자 전사체의 발현 및/또는 PCSK9 단백질 수준 또는 PCSK9 활성을 "억제하는" 및 "감소시키는"이라는 용어는 세포, 조직 또는 대상체에서 PCSK9 유전자 전사체의 발현 및/또는 PCSK9 단백질 수준 및/또는 활성을 감소시키는 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체(예를 들어, CIVI 008)를 지칭한다.

- [0100] 일부 양태에서, 용어 "억제하는" 및 "감소시키는"은 PCSK9 유전자 전사체 또는 PCSK9 단백질 수준 및/또는 활성의 완전한 억제(100% 억제 또는 비검출가능한 수준)를 지칭한다. 다른 양태에서, 용어 "억제하는" 및 "감소시키는"은 예를 들어, 세포, 조직 또는 대상체에서 PCSK9 유전자 전사체 및/또는 PCSK9 단백질 발현 및/또는 활성의 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99% 억제를 지칭한다.
- [0101] 폴리뉴클레오타이드 변이체는 코딩 영역, 비코딩 영역 또는 둘 모두에 변동을 함유할 수 있다. 일 양태에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 사일런트 치환, 첨가 또는 결실을 생성하지만 인코딩된 폴리펩티드의 특성 또는 활성을 변동하지 않는 변동을 함유한다. 또 다른 양태에서, 뉴클레오타이드 변이체는 유전자 코드의 축퇴로 인한 사일런트 치환에 의해 생성된다. 다른 양태에서, 5-10, 1-5, 또는 1-2개의 아미노산이 임의의 조합으로 치환, 결실 또는 첨가된 변이체. 폴리뉴클레오타이드 변이체는 다양한 이유로, 예를 들어 특정 숙주에 대한 코돈 발현을 최적화(인간 mRNA에서의 코돈을 다른 것으로, 예를 들어 대장균과 같은 박테리아 숙주로 변경)하기 위해 생산될 수 있다.
- [0102] 자연적으로 발생하는 변이체는 "대립형질 변이체"라고 불리고 유기체의 염색체 상에 주어진 좌를 차지하는 유전자의 여러 대체 형태 중 하나를 지칭한다(Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). 이들 대립형질 변이체는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩티드 수준에서 변할 수 있고 본 개시내용에 포함된다. 대안적으로, 비자연적으로 발생하는 변이체는 돌연변이유발 기술 또는 직접 합성에 의해 생성될 수 있다.
- [0103] 본 명세서에서 사용된 용어 "에 연결된" 또는 "에 접합된"은 상호교환적으로 사용되고 제1 모이어티와 제2 모이어티, 예를 들어 본 개시내용의 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드) 및 접합체 모이어티(예를 들어, GalNAc) 사이에 형성된 공유 또는 비공유 결합을 지칭한다.
- [0104] 용어 "개체", "대상체", "숙주" 및 "환자"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되고 진단, 치료 또는 요법이 요구되는 임의의 포유동물 대상체, 특히 인간을 지칭한다. 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 인간 요법 및 수의학 적용 둘 모두에 적용가능하다. 일부 양태에서 대상체는 포유동물이고, 다른 양태에서 대상체는 인간이다. 본 명세서에서 사용되는 "포유동물 대상체"는 인간, 가축(예를 들어, 개, 고양이 등), 농장 동물(예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 및 실험실 동물(예를 들어, 원숭이, 랫트, 마우스, 토끼, 기니아 피그 등)을 포함하나 이에 제한되지 않는 모든 포유동물을 포함한다.
- [0105] 용어 "약학적 조성물"은 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하게 되도록 허용하는 그러한 형태로 되어 있고 조성물이 투여되는 대상체에게 허용할 수 없을 정도로 독성인 추가 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 조성물은 무균일 수 있다. 용어 "경구 약학적 조성물"은 경구로 투여될 수 있는 약학적 조성물을 지칭한다. 경구 투여는 물질이 입을 통해 섭취되는 투여 경로이다. P.O.로 약칭되는 "Per os"는 때로는 약물이 경구로 취해지도록 하는 지시로 사용된다. 많은 약물은 그것이 예를 들어 혈류를 통해 신체의 다른 부분에 도달하는 전신 효과를 가지도록 의도되기 때문에 경구로 취해진다.
- [0106] 본 명세서에서 사용되는 용어 "전달제"는 본 개시내용의 치료제의 전달에 유용한 담체 화합물 또는 담체 분자를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "경구 전달제"는 본 개시내용의 치료제의 경구 전달에 유용한 담체 화합물 또는 담체 분자를 지칭한다.
- [0107] 일부 양태에서, 본 개시내용의 약학적 조성물은 경구로 투여된다. 본 명세서에 사용된 용어 "경구" 및 그의 문법적 변형(예를 들어, 경구로)은 임의의 종류의 경구 전달 경로(흡착, 입술밑 및 설하 경로 포함)를 포함한다. 경구 투여를 위한 약물은 경구 고형 복용(OSD) 형태(예를 들어, 삼키거나, 씹거나, 물 또는 혀 아래에서 용해되는 정제; 예를 들어, 위 또는 장에서 용해되어 그기에서 약물을 방출하는 코팅을 갖는 캡슐 및 씹을 수 있는 캡슐; 약물을 서서히 방출하는 시간-방출 또는 지속-방출 정제 및 캡슐; 분말; 또는 과립) 및 경구 액체 복용 형태(예를 들어, 차, 점적약, 액체 약물, 현탁액 또는 시럽)를 포함하는 다양한 형태로 될 수 있다.
- [0108] 본 명세서에 사용된 "투여하는"은 본 명세서에 개시된 조성물, 예를 들어 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008)를 포함하는 경구 약학적 조성물을 대상체에게 약학적으로 허용가능한 경로를 통해, 예를 들어 경구로 제공하는 것을 의미한다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008)를 포함하는 경구 약학적 조성물의 예를 들어 "유효량"은 구체적으로 언급된 목적을 수행하기에

충분한 양이다. "유효량"은 언급된 목적과 관련하여 경험적으로 그리고 일상적인 방식으로 결정될 수 있다.

[0109] 본 명세서에서 사용되는 "치료하다", "치료" 또는 "치료하는"은 예를 들어 질환 또는 병태의 중증도에서 감소; 질환 진행의 기간에서 단축; 질환 또는 병태와 관련된 하나 이상의 증상의 개선 또는 제거; 질환 또는 병태를 반드시 치료하지 않고 질환 또는 병태를 가진 대상체에게 유익한 효과의 제공을 지칭한다. 용어는 또한 질환 또는 병태 또는 이의 증상의 예방 또는 방지를 포함한다.

[0110] 본 명세서에서 사용되는 "예방하다" 또는 "예방하는"은 특정 결과의 발생 또는 중증도를 감소시키거나 줄이는 것을 지칭한다. 일부 양태에서 결과를 예방하는 것은 예방적 치료를 통해 달성된다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고머, ASO) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008)를 포함하는 경구 약학적 조성물은 예방적으로 대상체에게 투여된다. 일부 양태에서, 대상체는 예를 들어 고콜레스테롤혈증 또는 심장 질환이 발병할 위험이 있다.

[0111] I. 경구 약학적 조성물

[0112] 본 개시내용은 안티센스 올리고머 및 경구 전달제를 포함하는 경구 투여용 약학적 조성물, 즉 경구 약학적 조성물 또는 제형을 제공한다. 일부 양태에서, 여기서 안티센스 올리고머는 길이가 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오타이드이고, 안티센스 올리고머의 서열은 서열번호: 31의 서열에 100% 상보성인, 길이가 16개의 뉴클레오타이드인 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 갭머이고, 여기서 안티센스 올리고머는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화한다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고머는 특정 조직, 예를 들어 간을 표적화할 수 있는 모이어티에 접합될 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체 및 경구 전달제를 포함하는 경구 투여용 약학적 조성물, 즉 경구 약학적 조성물 또는 제형을 제공하며, 여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는, 예를 들어, (i) 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오타이드인 안티센스 올리고머로서, 여기서 안티센스 올리고머의 서열은 서열번호: 31의 서열에 100% 상보성인, 길이가 16개의 뉴클레오타이드인 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 갭머인, 안티센스 올리고머, 및 (ii) 상기 안티센스 올리고머에 직접적으로 부착되거나 또는 인접하는 올리고머 서열과 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티 사이에 위치한 링커를 통해 공유적으로 부착된 적어도 하나의 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티를 포함하며, 여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화한다. 일부 양태에서, 올리고머는 본 개시내용의 섹션 II에 개시된 임의의 올리고머일 수 있다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 본 개시내용의 섹션 III에 개시된 임의의 올리고뉴클레오타이드 접합체일 수 있다.

[0113] 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 도 18a에 제시된 서열번호: 18 또는 서열번호: 19에 제시된 분자이다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 (GalNAc)₃-아미노-헥사메틸렌-5' 포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌 티미딜릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시구아노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시시티디닐릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시티미딜릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시시티디닐릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시아데노실릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-데옥시시티디닐릴-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4' C메틸렌 (5-메틸-시티디닐릴)-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2'-0,4'-C-메틸렌(5-메틸-시티디닐릴)-(3'>5' 0,0-포스포로티오일)-2' -0,4'-C-메틸렌 아데노실릴 헥사데카 나트륨 염, 즉 CIVI 008이다. 또한 도 18b의 CIVI 008의 상세한 화학식을 참조한다.

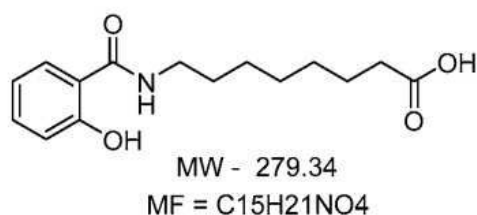
[0114] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은 본 명세서에 개시된 올리고머 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 및 SNAC, C10, 5-CNAC, 수화물, 용매화물 또는 이의 염, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 경구 전달제를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 경구 전달제는, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,866,536에 개시된 123개의 변형된 아미노산 중 임의의 하나, 또는 예를 들어 미국 특허 번호 5,773,647에 개시된 193개의 변형된 아미노산 중 임의의 하나인 작용제 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 전술한 미국 특허 번호 5,773,647호 및 5,866,536의 내용은 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0115] 일부 양태에서, 경구 전달제는 단일 화합물(예를 들어, C8, C10, SNAC 또는 5-CNAC)을 포함한다. 다른 양태에서, 경구 전달제는 화합물의 조합(예를 들어, C8, C10, SNAC 또는 5-CNAC의 임의의 조합)을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 C8, C10, SNAC, 5-CNAC, 4-CNAB, 4-MOAC, SNAD, 4-HPO(8-(4-하이드록시페녹시)옥탄산), 5-PPA(5-페닐펜탄산), 2-PHOD(8-(2-하이드록시페녹시)옥틸디에탄올아민), 3-TBA(4-m-톨릴옥시부티르산),

2-HPOD(2-(5-펜탄산)-5-(2-하이드록시페닐)-1,3,4-옥사디아졸), 7-OPHA(7-옥소-7-페닐헵탄산), 3-HPSB(4-(3-하이드록시페닐술폰닐)부티르산), 4-IBOA((4-이소프로필벤질옥시)아세트산), 3-FPSB(4-(3-플루오로페닐술폰닐)부티르산), 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 예를 들어, 도 22 참조.

[0116] 일부 양태에서, SNAC는 SNAD(나트륨 10-N-(2-하이드록시벤조일)아미노데칸산)와 같은 유사한 화합물로 선택적으로 대체될 수 있다. SNAD의 구조는 지방산 모이어티의 길이에서만 SNAC의 것과 상이하다. 본 개시내용의 일부 양태에서, SNAC는 선택적으로 유사한 화합물로 대체될 수 있으며, 여기서 SNAC의 카프릴산 모이어티는 적어도 6 개의 탄소 원자 길이, 예를 들어 6 내지 20개의 탄소 원자 길이, 선택적으로 6 내지 18개의 탄소 원자 길이, 선택적으로 6 내지 16개의 탄소 원자 길이, 선택적으로 6 내지 14개의 탄소 원자 길이, 선택적으로 6 내지 12개의 탄소 원자 길이 및 선택적으로 6 내지 10개의 탄소 원자 길이의 또 다른 지방산 모이어티에 의해 대체된다. 지방산 모이어티는 포화(예를 들어, SNAC에서 카프릴산 및 SNAD에서 데칸산인 것과 같음)되거나 불포화(즉, 적어도 하나의 불포화 탄소-탄소 결합을 포함함)될 수 있다.

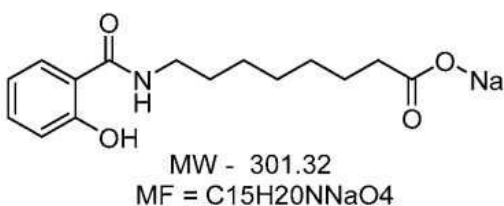
[0117] 일부 양태에서, 경구 전달제는 하기에 도시된 바와 같은 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산을 포함한다.



[0118]

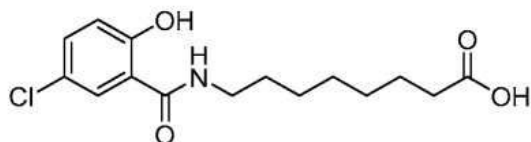
[0119] 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 용매화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 수화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0120] 일부 양태에서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 나트륨염이다. 일부 양태에서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 이나트륨 염이다. 일부 양태에서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 하기에 도시된 바와 같은 일나트륨 염(살카프로자이트 나트륨 203787-91-1, SNAC, 나트륨 8-(2-하이드록시벤조아미노)옥타노에이트)이다.



[0121]

[0122] 일부 양태에서, 경구 전달제는 하기에 도시된 바와 같은 5-CNAC(N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산)을 포함한다.

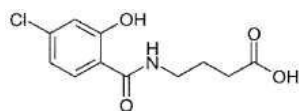


[0123]

[0124] 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 용매화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 수화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0125] 일부 양태에서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 나트륨염이다. 일부 양태에서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 이나트륨 염이다. 일부 양태에서, N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산의 염은 일나트륨 염이다.

[0126] 일부 양태에서, 경구 전달제는 하기에 도시된 바와 같은 4-CNAB(4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산; 살클로부제이트)를 포함한다.

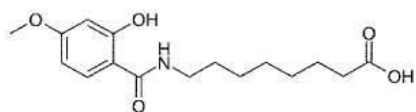


[0127]

[0128] 일부 양태에서, 경구 전달제는 4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산의 염을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산의 용매화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산의 수화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0129] 일부 양태에서, 4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산의 염은 4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산의 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산의 염은 나트륨 염이다. 일부 양태에서, 4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산의 염은 이나트륨 염이다. 일부 양태에서, 4-[(4-클로로-2-하이드록시-벤조일)아미노]부탄산의 염은 일나트륨 염이다.

[0130] 일부 양태에서, 경구 전달제는 하기에 도시된 바와 같은 4-MOAC(N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노]옥탄산)을 포함한다.

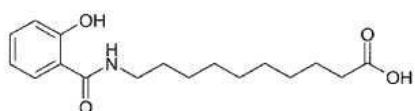


[0131]

[0132] 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노] 옥탄산의 염을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노] 옥탄산의 용매화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노] 옥탄산의 수화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노] 옥탄산의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0133] 일부 양태에서, N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노] 옥탄산의 염은 N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노] 옥탄산의 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노] 옥탄산의 염은 나트륨 염이다. 일부 양태에서, N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노] 옥탄산의 염은 이나트륨 염이다. 일부 양태에서, N-(8-[4-메톡시-클로로-2-하이드록시벤조일-아미노] 옥탄산의 염은 일나트륨 염이다.

[0134] 일부 양태에서, 경구 전달제는 하기에 도시된 바와 같은 SNAD(N-(10-[2-하이드록시벤조일]-아미노) 데칸산)를 포함한다.



[0135]

[0136] 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(10-[2-하이드록시벤조일]-아미노) 데칸산의 염을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(10-[2-하이드록시벤조일]-아미노) 데칸산의 용매화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(10-[2-하이드록시벤조일]-아미노) 데칸산의 수화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 N-(10-[2-하이드록시벤조일]-아미노) 데칸산의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0137] 일부 양태에서, N-(10-[2-하이드록시벤조일]-아미노) 데칸산의 염은 N-(10-[2-하이드록시벤조일]-아미노) 데칸산의 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, N-(10-

[2-하이드록시벤조일]-아미노) 테칸산의 염은 나트륨 염이다. 일부 양태에서, N-(10-[2-하이드록시벤조일]-아미노) 테칸산의 염은 이나트륨 염이다. 일부 양태에서, N-(10-[2-하이드록시벤조일]-아미노) 테칸산의 염은 일나트륨 염이다.

[0138] 일부 양태에서, 경구 전달제는 도 22에 제시된 화합물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 도 22에 제시된 화합물의 염을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 도 22에 제시된 화합물의 용매화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 도 22에 제시된 화합물의 수화물을 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 도 22에 제시된 화합물의 염, 수화물 또는 용매화물 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0139] 일부 양태에서, 도 22에 제시된 화합물의 염은 도 22에 제시된 화합물의 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 양태에서, 도 22에 제시된 화합물의 염은 나트륨염이다. 일부 양태에서, 도 22에 제시된 화합물의 염은 이나트륨 염이다. 일부 양태에서, 도 22에 제시된 화합물의 염은 일나트륨 염이다.

[0140] US5650386A, US6399798B2, US7384982B2, US7659311B2, US8003697B2, US8207227B2, US8658695B2, US7544833B2, US7659311, US8003697, US8207227, US8658695, US7384982, US9278123B2, US10086047B2, US20180360918A1, US20110092426A1, US20150283212A1, US8435946B2, US8748383B2, US7569539B2를 참조하며, 이들 모두는 본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된다.

[0141] 일부 양태에서, 경구 전달제는 하기 제시된 식의 화합물을 포함하며



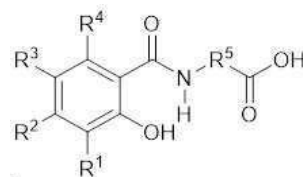
[0142]

[0143] 여기서

[0144] R^1 , R^2 , R^3 , 및 R^4 는 독립적으로 수소, $-OH$, $-NR^6R^7$, 할로젠, C_1-C_4 알킬 또는 C_1-C_4 알콕시이고;

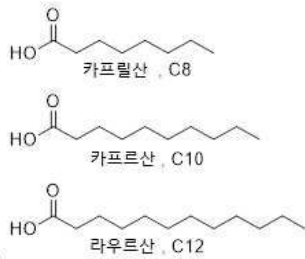
[0145] R^5 는 치환 또는 비치환된 C_2-C_{16} 알킬렌, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{16} 알케닐렌, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{12} 알킬(아릴렌), 또는 치환 또는 비치환된 아릴(C_1-C_4 알킬렌)이고; 그리고

[0146] R^6 및 R^7 는 독립적으로 수소, 산소 또는 C_1-C_4 알킬이다.



[0147] 일부 양태에서, 경구 전달제는 상기 기재된 바와 같은 식 의 화합물을 포함하며, 여기서 화합물은 유리산 또는 나트륨 염, 예를 들어 일나트륨 또는 이나트륨 염이다. 일부 양태에서, 화합물은 수화물 또는 용매화물이다. 일부 양태에서, 화합물은 알코올 용매화물이다. 일부 양태에서, 알코올 용매화물은 에탄올 용매화물이다. 일부 양태에서, 에탄올 용매화물은 염의 용매화물이다. 일부 양태에서, 에탄올 용매화물은 일나트륨 염의 에탄올 용매화물이다. 일부 양태에서, 에탄올 용매화물은 이나트륨 염의 에탄올 용매화물이다. 일부 양태에서, 화합물은 수화물이다. 일부 양태에서, 수화물은 염의 수화물이다. 일부 양태에서, 수화물은 일나트륨 염의 수화물이다. 일부 양태에서, 수화물은 이나트륨염의 수화물이다.

[0148] 일부 양태에서, 본 개시내용에 유용한 경구 전달제는 C8(카프릴산), C10(카프르산) 또는 C12(라우르산)과 같은 중쇄 지방산(MCFA), 이의 유도체, 약학적으로 허용가능한 이의 염, 수화물 또는 용매화물, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다.



[0149]

[0150]

일부 양태에서, 경구 전달제는 C8, C10, SNAC 또는 5-CNAC의 염의 용매화물을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "용매화물"은 전달제 화합물 또는 이의 염, 또는 이의 수화물 또는 용매화물의 분자 또는 이온과 용매의 분자 또는 이온의 분자 또는 이온 복합체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0151]

일부 양태에서, 경구 전달제는 C8, C10, SNAC 또는 5-CNAC 염의 수화물을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "수화물"은 (i) 분자 형태로 조합된 물을 함유하는 물질 및 (ii) 하나 이상의 결정화수 분자를 함유하는 결정질 물질 또는 자유수를 함유하는 결정질 성분을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0152]

일부 양태에서, 경구 전달제는 C8, C10, SNAC, 또는 5-CNAC의 염의 용매화물을 포함하며, 여기서 염은 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염 또는 이의 조합이다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 C8, C10, SNAC, 또는 5-CNAC의 염의 용매화물을 포함하며, 여기서 염은 나트륨염이다.

[0153]

일부 양태에서, 경구 전달제는 C8, C10, SNAC 또는 5-CAN의 염의 용매화물을 포함하며, 여기서 염은 일나트륨염이다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 C8의 나트륨 염, 예를 들어 일나트륨 카프릴레이트를 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 C10의 나트륨 염, 예를 들어 일나트륨 카프릴레이트를 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 SNAC의 나트륨 염, 예를 들어 일나트륨 SNAC를 포함한다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 5-CNAC의 나트륨 염, 예를 들어 일나트륨 5-CNAC를 포함한다.

[0154]

일부 양태에서, 경구 전달제는 C8, C10, SNAC 또는 5-CNAC의 염의 알코올 용매화물을 포함하며, 여기서 염은 나트륨염이다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 C8, C10, SNAC 또는 5-OCNAC의 염의 알코올 용매화물을 포함하며, 여기서 염은 일나트륨 염이다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 C8, C10, SNAC 또는 5-CNAC의 염의 수화물을 포함하며, 여기서 염은 나트륨염이다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 C8, C10, SNAC 또는 5-CNAC의 염의 수화물을 포함하며, 여기서 염은 일나트륨 염이다. 일부 양태에서, 경구 전달제는 C8, C10, SNAC 또는 5-CNAC의 염의 수화물을 포함하며, 여기서 염은 나트륨염이고 수화물은 일수화물이다.

[0155]

나트륨 염, 알코올 용매화물 및 수화물을 제조하는 방법은 예를 들어 국제 공개 WO 00/059863에 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다. 예를 들어, 나트륨염은 에탄올 용매화물을 당업계에 공지된 방법에 의해 증발 또는 건조시켜 무수 나트륨염을 형성함에 의해 에탄올 용매화물로부터 제조될 수 있다. 건조는 일반적으로 약 80°C 내지 약 120°C, 예를 들어 약 85°C 내지 약 90°C의 온도에서 수행된다. 일부 양태에서, 건조는 약 85°C에서 수행된다. 건조 단계는 일반적으로 약 660mmHg(8.8kPa) 이상의 압력에서 수행된다. 무수 나트륨염은 일반적으로 무수 나트륨염의 총 중량 100%를 기준으로 약 5중량% 미만의 에탄올, 바람직하게는 약 2중량% 미만의 에탄올을 함유한다.

[0156]

본 명세서에 개시된 경구 전달제의 나트륨염은 또한 물에서 전달제의 슬러리를 만들고 수성 수산화나트륨, 나트륨 알콕사이드 등을 첨가함에 의해 제조될 수 있다. 적합한 나트륨 알콕사이드는 나트륨 메톡사이드, 나트륨 에톡사이드 및 이의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 나트륨염을 제조하는 또 다른 방법은 전달제를 수산화나트륨과 반응시킴에 의해 나트륨염을 얻는 것이다.

[0157]

나트륨염은 진공 증류에 의해 나트륨염을 함유하는 용액을 진한 페이스트로 농축함에 의해 고체로서 분리될 수 있다. 이 페이스트는 전달제의 나트륨염을 고체로서 얻기 위해 진공 오븐에서 건조될 수 있다. 고체는 또한 이 나트륨 염의 수용액을 분무 건조함에 의해 분리될 수 있다. 본 명세서에 개시된 경구 전달제는 당업계에 공지된 방법에 의해, 예를 들어 상기 언급된 바와 같이, 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,773,647 및 5,866,536에 기술된 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0158]

본 명세서에 개시된 경구 전달제 분자(예를 들어, C8, C10, SNAC, 5-CNAC, 또는 이의 임의의 조합)의 에탄올 용매화물은 전달제의 나트륨 염의 분자 또는 이온과 에탄올 용매의 분자 또는 이온의 분자 또는 이온 복합체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 전형적으로, 에탄올 용매화물은 전달제의 나트륨 염의 모든 분자에 대해 약 하

나의 에탄올 분자 또는 이온을 함유한다.

- [0159] 전달제의 나트륨 염의 에탄올 용매화물은 전달제를 에탄올에 용해시킴에 의해 제조될 수 있다. 전달제/에탄올 용액은 그 다음 전달제에 비해, 즉 1몰 초과인 나트륨 양이온이 존재하는 전달제의 모든 몰에 대해 몰 과잉의 나트륨 함유 염, 예컨대 일나트륨 함유 염과 반응되어, 에탄올 용매화물을 생성한다. 적합한 일나트륨염은 수산화나트륨; 나트륨 메톡사이드 및 나트륨 에톡사이드와 같은 나트륨 알콕사이드; 및 전술한 것의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 반응은 주위 온도와 같은 혼합물의 환류 온도 이하에서 수행된다. 에탄올 용매화물은 그 다음 대기에서의 증류에서 생성된 슬러리의 농축, 농축된 슬러리의 냉각 및 고체 여과와 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 회수된다. 회수된 고체는 그 다음 진공 건조되어 에탄올 용매화물을 얻을 수 있다.
- [0160] 전달제의 나트륨 염의 수화물은 상기 기술한 바와 같이 에탄올 용매화물을 건조시켜 무수 이나트륨 염을 형성하고 무수 나트륨 염을 수화시킴에 의해 제조될 수 있다. 일부 양태에서, 나트륨염의 일수화물이 형성된다. 무수 나트륨염은 매우 흡습성이 높기 때문에, 대기의 수분에 노출 시 수화물을 형성한다. 일반적으로, 수화 단계는 약 주위 온도 내지 약 50℃, 바람직하게는 주위 온도 내지 약 30℃ 및 적어도 50% 상대 습도를 갖는 환경에서 수행된다. 대안적으로, 무수 나트륨염은 증기로 수화될 수 있다.
- [0161] 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은 전형적으로 본 명세서에 개시된 하나 이상의 전달제(예를 들어, C8, C10, SNAC, 5-CNAC, 또는 이의 임의의 조합)의 유효량, 즉 원하는 효과를 위한 활성제(예를 들어, CIVI 008)를 전달하기 위해 충분한 양을 함유한다. 일반적으로, 경구 전달제(예를 들어, C8, C10, SNAC, 5-CNAC, 또는 이의 임의의 조합)는 약 2.5중량% 내지 약 99.4중량%의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, C8, C10, SNAC, 5-CNAC, 또는 이의 임의의 조합)는 약 15중량% 내지 약 75중량%의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, C8, C10, SNAC, 5-CNAC, 또는 이의 임의의 조합)는 적어도 약 25중량%, 적어도 약 30중량%, 또는 적어도 약 35중량%이지만 약 60 또는 약 70중량% 이하의 양으로 존재한다. 따라서, 일부 양태에서 경구 전달제(예를 들어, C8, C10, SNAC, 5-CNAC, 또는 이의 임의의 조합)는 중량으로 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65% 또는 적어도 약 70%의 양으로 존재한다. 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, C8, C10, SNAC, 5-CNAC, 또는 이의 임의의 조합)는 중량으로 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65% 또는 약 70%의 양으로 존재한다.
- [0162] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은 단일 용량으로 투여된다. 용어 "단일 용량"은 본 명세서에 개시된 올리고머 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 및 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 수화물, 용매화물 또는 염, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 경구 전달제를 포함하는 발명에 따른 경구 약학적 조성물이, 예를 들어 경구 단위 용량의 형태로 인간 또는 동물 환자에게 단일 용량으로 투여된다는 것을 의미한다.
- [0163] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은 다중 용량으로 투여된다. 용어 "다중 용량"은 본 명세서에 개시된 올리고머 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 및 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 수화물, 용매화물 또는 염, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 경구 전달제를 포함하는 발명에 따른 경구 약학적 조성물이, 예를 들어 경구 단위 용량의 형태로 인간 또는 동물 환자에게 그 조성물에 대해 적합한 복용 간격에 따라 적어도 2회 용량으로 투여된다는 것을 의미한다.
- [0164] 본 명세서에서 사용되는 용어 "경구 단위-용량 형태"는 당업계에 공지된 바와 같이 인간 및 동물 소비에 적합하고 개별적으로 포장된 물리적으로 별개의 단위를 지칭한다. 본 명세서에 개시된 올리고머 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 및 경구 전달제의 치료학적으로 유효한 양을 포함하는 복용 형태는 치료적 효과를 달성하기 위해 하나 이상의 단위 용량(예를 들어, 정제, 캡슐)을 포함할 수 있음이 본 개시내용의 목적을 위해 고려된다.
- [0165] 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10, 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체)의 경구 복용 형태(예를 들어, 정제 또는 캡슐)는 식사 이전 약 5분 내지 약 60분에 투여될 수 있다. 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체)의 경구 복용 형태는 식사 이전 약 30분 내지 약 60분에 투여될 수 있다. 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10, 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체)의 경구 복용 형태(예를 들어, 정제 또는 캡슐)는 식사 이전 약 45분 내지 약 90분에 투여될 수 있다. 본 개시내용의 경구 약학적 조

성물(예를 들어, SNAC, C10, pr 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체)의 경구 복용 형태(예를 들어, 정제 또는 캡슐)는 식사 이전 약 60분(1시간) 내지 약 120분(2시간)에 투여될 수 있다.

[0166] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체)은 식사 이전 적어도 약 5, 적어도 약 10, 적어도 약 15, 적어도 약 20, 적어도 약 25, 적어도 약 30, 적어도 약 35, 적어도 약 40, 적어도 약 45, 적어도 약 50, 적어도 약 55, 적어도 약 60, 적어도 약 65, 적어도 약 70, 적어도 약 75, 적어도 약 80, 적어도 약 85, 적어도 약 90, 적어도 약 95, 적어도 약 100, 적어도 약 105, 적어도 약 110, 적어도 약 115, 또는 적어도 약 120분에 투여될 수 있다.

[0167] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체)는 식사 이전 약 5, 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 약 50, 약 55, 약 60, 약 65, 약 70, 약 75, 약 80, 약 85, 약 90, 약 95, 약 100, 약 105, 약 110, 약 115, 또는 약 120분에 투여된다.

[0168] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체)은 음식의 섭취 전 적어도 약 30분에 투여된다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체)은 음식의 섭취 전 적어도 약 45분에 투여된다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체)은 음식의 섭취 전 적어도 약 60분에 투여된다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체)은 음식의 섭취 전 적어도 약 2시간에 투여된다.

[0169] 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체)은 고체 형태로 제공될 수 있다. 일부 양태에서, 고체 형태는 캡슐, 예를 들어 연질-겔 캡슐 또는 액체 충전 캡슐(액체 캡슐)이다. 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은 또한 정제, 캐플릿 또는 기타 고체 경구 복용 형태로 제공될 수 있으며, 이들 모두는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0170] 일부 양태에서, 경구 복용 형태(예를 들어, 정제 또는 캡슐)는 약 5mg 내지 약 1000mg, 약 10mg 내지 약 500mg, 약 10mg 내지 약 250mg, 약 100mg 내지 약 200mg, 또는 약 250mg 내지 약 500mg의 중량을 가질 수 있다. 일부 양태에서, 경구 복용 형태(예를 들어, 정제 또는 캡슐)의 중량은 약 5mg, 약 10mg, 약 20mg, 약 25mg, 약 50mg, 약 100mg, 약 200mg, 약 250mg, 약 375mg, 약 500mg, 약 750mg, 또는 약 1000mg이다.

[0171] 일부 양태에서, 경구 복용 형태(예를 들어, 정제 또는 캡슐) 중 안티센스 올리고머 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체(예를 들어, CIVI 008)의 양은 약 1mg 내지 약 100mg, 약 5mg 내지 약 100mg, 약 10mg 내지 약 100mg, 약 20mg 내지 약 100mg, 또는 약 20mg과 약 50mg의 범위이다.

[0172] 본 개시내용의 일부 양태에서, CIVI 008은 캡슐 형태로 제형화되며, 여기서 캡슐은 경질 셀룰라틴 캡슐이다. 일부 양태에서, 캡슐은 크기 0 캡슐(폐쇄 길이 21.7mm x 외부 직경 7.6mm)이다. 일부 양태에서, 캡슐은 크기 4 캡슐(폐쇄 길이 14.3mm x 외부 직경 5.05mm)이다. 일부 양태에서, 캡슐은 약 5mg 내지 약 30mg의 CIVI 008(세파다쿠르센 나트륨), 예를 들어 약 5mg, 약 10mg, 약 15mg, 약 20mg, 약 25mg, 또는 약 30mg의 CIVI 008을 함유한다. 일부 양태에서, 캡슐은 약 100mg 또는 약 200mg의 5-CNAC, 예를 들어 약 100mg, 약 125mg, 약 150mg, 약 175mg, 또는 약 200mg의 5-CNAC를 함유한다. 일부 양태에서, 캡슐의 충전물은 성분(즉, 건조 CIVI 008 및 건조 5-CNAC)을 건조 블렌딩함에 의해 제조된다. 일부 양태에서, 캡슐의 충전물은 성분(즉, CIVI 008 및 5-CNAC)의 동시-용해된 혼합물을 동결-건조함에 의해 제조된다. 일부 양태에서, 캡슐은 약 10mg CIVI 008 및 약 100mg 5-CNAC를 포함한다. 일부 양태에서, 캡슐은 약 20mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC를 포함한다. 일부 양태에서, 캡슐은 약 5mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC를 포함한다. 일부 양태에서, 캡슐은 약 25mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC를 포함한다. 일부 양태에서, 캡슐은 약 30mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC를 포함한다.

[0173] 일부에서, 본 개시내용은 예를 들어 약 10mg CIVI 008 및 약 100mg 5-CNAC, 약 20mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC, 약 5mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC, 약 25mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC, 또는 약 30mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC를 포함하는, 예를 들어 캡슐 형태인 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 대상체에게 약학적

조성물의 투여는 5-CNAC 대신에 SNAC를 포함하는 상응하는 약학적 조성물이 대상체에게 투여될 때 측정된 평균 AUC_{0-50} 에 관하여 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 100%의 평균 AUC_{0-50} 의 증가를 초래한다. 특정 양태에서, 5-CNAC 대신 SNAC를 포함하는 상응하는 약학적 조성물이 대상체에게 투여될 때 측정된 평균 AUC_{0-50} 에 관하여 평균 AUC_{0-50} 의 증가는 약 80%이다.

[0174] 본 명세서에서 사용된 용어 "5-CNAC 대신에 SNAC를 포함하는 상응하는 약학적 조성물"은 시험 약학적 조성물과 동일한 성분을 포함하는 참조 약학적 조성물을 지칭하며, 여기서 참조 약학적 조성물과 시험 조성물 사이의 유일한 차이는 5-CNAC로 참조 약학적 조성물에 존재하는 SNAC의 대체이다. 예를 들어, 시험 약학적 조성물이 10mg CIVI 008 및 100mg 5-CNAC를 포함하는 크기 4 캡슐에 있는 경우, 상응하는 참조 약학적 조성물도 크기 4 캡슐에 있을 것이고 10mg CIVI 008 및 100mg SNAC를 함유할 것이다.

[0175] 일부 양태에서, 본 개시내용은 예를 들어 약 10mg CIVI 008 및 약 100mg 5-CNAC, 약 20mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC, 약 5mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC, 약 25mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC, 또는 약 30mg CIVI 008 및 약 200mg 5-CNAC를 포함하는, 예를 들어 캡슐 형태인 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 대상체에게 약학적 조성물의 투여는 5-CNAC 대신에 SNAC를 포함하는 상응하는 약학적 조성물이 대상체에게 투여될 때 측정된 평균 C_{max} 에 관하여 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 100%, 적어도 약 110%, 적어도 약 120%, 적어도 약 130%, 적어도 약 140%, 또는 적어도 약 150%의 평균 C_{max} 의 증가를 초래한다. 특정 양태에서, 5-CNAC 대신에 SNAC를 포함하는 상응하는 약학적 조성물이 대상체에게 투여될 때 측정된 평균 C_{max} 에 관하여 평균 C_{max} 의 증가는 약 110%이다.

[0176] 일부 양태에서, 경구 복용 형태(예를 들어, 정제 또는 캡슐)에서 안티센스 올리고머 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008)의 양은 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39, 약 40, 약 41, 약 42, 약 43, 약 44, 약 45, 약 46, 약 47, 약 48, 약 49, 약 50, 약 51, 약 52, 약 53, 약 54, 약 55, 약 56, 약 57, 약 58, 약 59, 약 60, 약 61, 약 62, 약 63, 약 64, 약 65, 약 66, 약 67, 약 68, 약 69, 약 70, 약 71, 약 72, 약 73, 약 74, 약 75, 약 76, 약 77, 약 78, 약 79, 약 80, 약 81, 약 82, 약 83, 약 84, 약 85, 약 86, 약 87, 약 88, 약 89, 약 90, 약 91, 약 92, 약 93, 약 94, 약 95, 약 96, 약 97, 약 98, 약 99, 또는 약 100mg이다.

[0177] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 및 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 또는 5-CNAC)에 부가하여, 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 이의 조합은, 예를 들어 관례적으로 이용되는 양으로, pH 조절제, 방부제, 향미제, 맛 차폐제, 방향제, 습윤제, 긴장제, 착색제, 계면활성제, 가소제, 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제, 유동 보조제, 압축 보조제, 가용화제, 부형제, 미정질 셀룰로오스와 같은 희석제(예를 들어, Avicel PH 102) 또는 이의 임의의 조합으로 구성되지만 이에 제한되지 않는 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체)은 미세결정질 셀룰로스를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체)은 인산염 완충액 염, 시트르산, 글리콜, 기타 분산제, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0178] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체)은 희석제, 예를 들어, 미정질 셀룰로오스(예를 들어, Avicel) 및 윤활제, 예를 들어, 스테아르산마그네슘을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제와 조합된 CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체)은 포비돈 및/또는 크로스포비돈을 포함할 수 있다. 크로스포비돈은 임의의 크로스포비돈일 수 있다. 크로스포비돈은 1,000,000 이상의 분자량을 갖는, 1-에테닐-2-피롤리디논으로도 지칭되는, N-비닐-2-피롤리돈의 합성의 가교된 단독중합체이다. 상업적으로 이용가능한 크로스포비돈은 ISP로부터 이용가능한 폴리플라스돈 XL, 폴리플라스돈 XL-10, 폴리플라스돈 INF-10, BASF 코포레이션으로부터 이용가능한 콜리돈 CL을

포함한다. 일부 양태에서, 크로스포비돈은 폴리플라스돈 XL이다. 포비돈은 일반적으로 2,500에서 3,000,000 사이의 분자량을 갖는 선형 1-비닐-2-피롤리딘은 그룹으로 구성된 합성 중합체이다. 상업적으로 이용가능한 포비돈은 BASF 코포레이션으로부터 이용가능한 콜리돈 K-30, 콜리돈 K-90F 및 ISP로부터 이용가능한 플라스돈 K-30 및 플라스돈 K-29/32를 포함한다. 상기에 언급된 바와 같이 크로스포비돈과 포비돈은 상업적으로 이용가능하다. 대안적으로, 이들은 공지된 공정에 의해 합성될 수 있다. 크로스포비돈, 포비돈 또는 이의 조합은 전체 경구 약학적 조성물의 총 중량에 비해 0.5 내지 50중량 퍼센트, 예를 들어 경구 약학적 조성물의 총 중량에 비해 중량으로 약 2 내지 약 25퍼센트, 또는 약 5 내지 약 20퍼센트의 양으로 본 개시내용의 경구 약학적 조성물에 존재할 수 있다.

[0179] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체 및 SNAP 또는 C10과 같은 경구 전달체, 및 선택적 스타틴)을 포함하는 경구 복용 형태(예를 들어, 정제 또는 캡슐)는 코팅, 예를 들어 장용 코팅 및/또는 pH 민감성 코팅을 포함할 수 있고, 선택적으로 효소-억제제를 포함할 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, 고체 경구 복용 형태는 위에서 실질적으로 봉해되거나 용해되지 않지만, 장에서는 실질적으로 봉해되거나 용해된다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체 및 SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달체, 및 선택적 스타틴)은 위 또는 상부 장에서, 약학적 제형에서 활성제, 예를 들어 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 및/또는 스타틴과 같은 선택적 치료제의 효소적 분해를 방지하는 하나 이상의 효소-억제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0180] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물 또는 본 명세서에 개시된 경구 복용 형태(예를 들어, 정제 또는 캡슐)는 위에서 봉해를 지연시키기 위해 장용으로 코팅된다. 장용 코팅은 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 프탈레이트, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 아세테이트 석시네이트, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트, 셀룰로스 아세테이트 트리멜리테이트, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 폴리(메타크릴산-에틸아크릴레이트), 폴리(메타크릴산-메틸 메타크릴레이트) 및 이의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또 다른 양태에서, 경구 약학적 제형은 봉해되기보다는 경구 복용 형태의 표면으로부터 침식되도록 제형화될 수 있다.

[0181] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물 또는 본 명세서에 개시된 경구 복용 형태(예를 들어, 정제 또는 캡슐)는 pH 민감성 코팅, 예를 들어 pH-민감성 중합체를 추가로 포함하며, 이는 위에서의 산성 환경으로부터 경구 약학적 조성물 또는 이의 경구 복용 형태를 보호한다. 일부 양태에서, pH-민감성 중합체는 셀룰로오스, 아크릴산 또는 이의 유도체를 포함한다. 일부 양태에서, pH 민감성 코팅은 pH-민감성 하이드로겔, pH-활성화된 약물 전달 시스템, pH-민감성 리포솜, 미셀 또는 지질 나노입자, pH-민감성 마이크로스피어, pH-민감성 나노입자, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0182] 예를 들어, 액체 또는 겔 캡슐에 사용되는 장용(위-내성) 코팅, pH 민감성 코팅, 효소 억제제 및 젤라틴 기반 제형은 하기에 보다 상세히 기재되어 있다.

[0183] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 및 경구 전달체(예를 들어, SNAC, C10, 또는 5-CNAC)에 부가하여, 스타틴(예를 들어, 로바스타틴, 세리바스타틴, 프라바스타틴, 아토르바스타틴, 심바스타틴, 로수바스타틴, 플루바스타틴 또는 이의 조합), 에체티미베, 담즙 격리 수지, 니코틴산, 피브린산 유도체, 프로부콜, 네오마이신, 텍스트로티록신, 식물성 스타놀 에스테르, 콜레스테롤 흡수 억제제, 임플리타피드, 담즙산 수송체의 억제제, 간 CYP7a의 조절제, 에스트로겐 대체 치료제 및 항-염증제로 구성된 군으로부터 선택된 제2 치료적으로 활성인 화합물(치료제)을 포함할 수 있다. 일반적으로, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체(예를 들어, CIVI 008) 및 경구 전달체(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)에 부가하여, PCSK9 발현 및/또는 PCSK9 활성에서의 증가와 연관된 질환 또는 병태를 치료하기 위해 당업계에서 사용되는 제2 치료적으로 활성인 화합물을 포함할 수 있다.

[0184] 일부 양태에서, 본 개시내용은 예를 들어 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체(예를 들어, CIVI 008), 경구 전달체(예를 들어, SNAC, C10, 또는 5-CNAC), 및 선택적으로 스타틴과 같은 제2 치료제를 포함하는 유효량의 본 개시내용의 경구 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 세포에서 PCSK9의 발현 수준 및/또는 활성을 감소시키는 시험관내 방법을 제공한다.

[0185] 본 개시내용은 또한 예를 들어, 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체(예를 들어, CIVI 008), 경구 전달체(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC), 및 선택적으로 스타틴과 같은 제2 치료제를 포함하는 본 개시내용의 경구 약학적 조성물의 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대

상체에서 PCSK9 발현 수준 및/또는 PCSK9 활성 수준을 감소시키는 방법을 제공한다. 또한, 예를 들어, 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008), 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 또는 5-CNAC), 및 선택적으로 스타틴과 같은 제2 치료제를 포함하는 유효량의 본 개시내용의 경구 약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 상기 대상체에서 콜레스테롤 수준을 감소시키는 방법이 제공된다.

[0186] 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은 통상적인 방법, 예를 들어 활성제 또는 활성제들, 경구 전달제 및 기타 성분의 혼합물을 블렌딩하고, 반죽하고, 캡슐 안에 충전하거나, 또는 캡슐 안에 충전하는 대신에 성형하고 이어서 추가로 정제화 또는 압축-성형하여 정제를 제공함에 의해 제조될 수 있다. 부가하여, 고체 분산체는 공지된 방법에 의해 형성될 수 있으며 이어서 정제 또는 캡슐을 형성하기 위한 추가 가공될 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물의 성분은 고형 복용 형태 전반에 걸쳐 균질하게 또는 균일하게 혼합된다.

[0187] 본 명세서에 사용된 용어 "캡슐"은 전형적으로 단일 용량의 활성 물질(예를 들어, CIVI 008)을 함유하는 경질 또는 연질 쉘(예를 들어, 젤라틴 쉘)을 포함하는 약학적 제제를 의미하는 것으로 의도된다. 일 양태에서, 캡슐은 경구 투여를 위해 의도된다. 일부 양태에서, 캡슐 쉘(캡슐 본체로도 알려짐)은 캡슐 내용물(예를 들어, CIVI 008 및 5-CNAC를 포함하는 본 명세서에 개시된 건조 블렌드)을 방출하기 위해 섭취(예를 들어, 삼킴) 후 위에서 분해될 것이다.

[0188] 본 명세서에서 사용되는 용어 건조 블렌딩 용어 "건조 블렌딩"은 액체 매질의 부재에서 함께 여러 성분(예를 들어, CIVI 800 및 5-CNAC)을 완전히 혼합하는 것을 의미한다. 일부 양태에서, 건조 블렌드의 성분(예를 들어, CIVI 800, 5-CNAC, 또는 둘 모두)은 분말 형태일 수 있다. 일부 양태에서, 건조 블렌드의 성분(예를 들어, CIVI 800 및 5-CNAC)은 미립자 형태일 수 있고, 예를 들어 과립화될 수 있다.

[0189] 일부 양태에서, 본 개시내용은 10mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 100mg의 5-CNAC를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 20mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 5mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 10mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 25mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 30mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다.

[0190] 일부 양태에서, 본 개시내용은 10mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 100mg의 5-CNAC를 포함하는 캡슐(예를 들어, 장용으로 코팅된 경질 쉘 젤라틴 캡슐)을 제공하며, 여기에서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 20mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 캡슐을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 5mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 캡슐을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 10mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 캡슐을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 25mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 캡슐을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 30mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 캡슐을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다.

[0191] 일부 양태에서, 본 개시내용은 10mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 100mg의 5-CNAC를 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 높은 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있고 선택적으로 여기서 성분들은 캡슐(예를 들어, 장용으로 코팅된 경질 쉘 젤라틴 캡슐)에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 20mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 높은 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있고 선택적으로 여기서 성분들은 캡슐에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 5mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 높은 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있고 선택적으로 여기서 성분들은 캡슐에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 10mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-

CNAC를 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 높은 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있고 선택적으로 여기서 성분들은 캡슐에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 25mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 높은 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있고 선택적으로 여기서 성분들은 캡슐에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 30mg의 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 200mg의 5-CNAC를 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 높은 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있고 선택적으로 여기서 성분들은 캡슐에 있다.

[0192] 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40 또는 1:50의 비율로 포함하는 약학적 조성물을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:5의 비율로 포함하는 약학적 조성물을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:10의 비율로 포함하는 약학적 조성물을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:20의 비율로 포함하는 약학적 조성물을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:40의 비율로 포함하는 약학적 조성물을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다.

[0193] 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40 또는 1:50의 비율로 포함하는 캡슐을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:5의 비율로 포함하는 캡슐을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:10의 비율로 포함하는 캡슐을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:20의 비율로 포함하는 캡슐을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:40의 비율로 포함하는 캡슐을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있다.

[0194] 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비율로 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 높은 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있고 선택적으로 여기서 성분은 캡슐에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:5의 비율로 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 높은 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있고 선택적으로 여기서 성분은 캡슐에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:10의 비율로 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 높은 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있고 선택적으로 여기서 성분은 캡슐에 있다. 일부 양태에서, CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:20의 비율로 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 높은 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있고 선택적으로 여기서 성분은 캡슐에 있다. 일부 양태에서, CIVI 008(세파다쿠르센) 및 5-CNAC를 1:40의 비율로 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 높은 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며 여기서 두 성분 모두 건조 블렌드에 있고 선택적으로 여기서 성분은 캡슐에 있다.

[0195] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 SNAC 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제를 포함함) 및, 예를 들어, 경구 약학적 조성물이 음식의 섭취 이전에 복용될 수 있다는 것을 나타내는 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.

[0196] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은 길이가 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오티드인 안티센스 올리고머를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체를 포함하며, 여기서 안티센스 올리고머의 서열은 서

열번호: 31(또는 본 명세서에 개시된 또 다른 적합한 PCSK9 표적 영역)의 서열에 대해 100% 상보성인, 길이가 16개의 뉴클레오타이드인 인접하는 서열을 포함하고, 여기서 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위 및 상기 안티센스 올리고머에 직접적으로 부착되거나 또는 인접하는 올리고머 서열과 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티 사이에 위치한 링커를 통해 공유적으로 부착된 적어도 하나의 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티(예를 들어, GalNAc와 같은 간 표적화 모이어티)를 포함하는 캡머(예를 들어, 3-10-3 캡머)이고, 여기서 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 PCSK9를 인코딩하는 RNA를 표적화한다.

[0197] 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 서열번호: 18 또는 서열번호: 19를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체, 예를 들어, 서열번호: 18 또는 서열번호: 19의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 약학적으로 허용가능한 염이다. 일부 양태에서, 염은 나트륨 염이다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 뉴클레오타이드 단위당 나트륨 이온을 포함한다. 따라서, 특정 양태에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 CIVI 008로 지정된 서열번호: 19의 나트륨염이고, 이는 도 18b에 묘사된 바와 같은 서열번호: 19의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 헥사데카소듐 염이다.

[0198] PCSK9 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어 RNA를 표적화하는 데 사용될 수 있는 본 개시내용의 경구 약학적 조성물에서 올리고뉴클레오타이드 접합체의 유형은 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)에 제한되지 않는다. 일부 양태에서, 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드 접합체에서의 올리고머는 PCSK9의 발현 및/또는 활성을 조절할 수 있는 siRNA, shRNA, 앵타머, 또는 임의의 핵산일 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드 접합체에서의 올리고머는 단량체 또는 다량체, 예를 들어 본 개시내용의 올리고머, 예를 들어 서열번호:26, 예를 들어 서열번호:2 또는 서열번호:3으로부터 유래된 올리고머의 다중 연쇄상의 단위일 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, 올리고머는 절단가능한 링커가 다량체 올리고머에서 각 ASO 단위 사이에 개재된 서열번호: 2 또는 서열번호: 3의 다중 연쇄상의 카피를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0199] 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체는 RNA, 예를 들어, pre-mRNA, pre-mRNA의 스플라이스 변이체, 또는 성숙 mRNA를 표적화할 수 있다. 일부 양태에서, RNA, 예를 들어 pre-mRNA, pre-mRNA의 스플라이스 변이체 또는 성숙 mRNA는 정상 PCSK9 유전자의 대립형질 변이체에 상응한다. 일부 양태에서, RNA, 예를 들어, pre-mRNA, pre-mRNA의 스플라이스 변이체, 또는 성숙 mRNA는 정상 PCSK9 유전자의 돌연변이체에 상응한다. 일부 양태에서, 돌연변이체는 기능 획득 돌연변이체이다. 일부 양태에서, PCSK9 활성을 낮추기 위해 기능 획득 돌연변이체의 발현 및/또는 활성을 억제하는 것이 바람직할 수 있다. 그러나, 일부 양태에서, 기능 상실 돌연변이체의 발현을 억제하는 것은 돌연변이체 형태의 발현이 해로울 수 있거나 돌연변이체 또는 불활성 PCSK9 단백질의 퇴적의 축적을 초래할 수 있는 경우 바람직할 수 있다.

[0200] 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체는 PCSK9 엑손 내의 서열을 표적화할 수 있다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체는 PCSK9 인트론 내의 서열을 표적화할 수 있다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체는 엑손과 인트론 사이의 접합부를 포함하는 서열을 표적화할 수 있다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체는 PCSK9를 인코딩하는 개방 관독 프레임의 5' 말단으로부터 상류 서열을 표적화할 수 있다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머 또는 올리고뉴클레오타이드 접합체는 PCSK9를 인코딩하는 개방 관독 프레임의 3' 말단으로부터 하류 서열을 표적화할 수 있다.

[0201] 섹션 II(안티센스 올리고머) 및 III(올리고뉴클레오타이드 접합체)는 본 개시내용의 경구 약학적 조성물에 사용될 수 있는 올리고머(예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, ASO) 및 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체)를 제공한다. 이와 같이, 임의의 안티센스 올리고머(예를 들어, 서열번호: 2 또는 3의 올리고머) 및/또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, 서열번호: 18 또는 19의 올리고뉴클레오타이드 접합체)는 본 명세서에 개시된 적어도 하나의 경구 전달제, 예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC와 조합되어 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, 예로써 CIVI 008 및 SNAC 또는 5-CNAC를 포함하는 알약 또는 캡슐)을 생성할 수 있다는 것이 이해된다. 이러한 경구 약학적 조성물은 또한 본 명세서에 개시되거나 당 업계에 공지된 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체, 염 또는 보조제를 포함할 수 있다. 예를 들어, WO2007/031091은 본 개시내용의 경구 약학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체 및 보조제, 적합한 복용, 제형, 투여 경로, 조성물, 복용 형태, 다른 치료제와의 조합, 및 프로-드러그 제형을 제공한다.

- [0202] 본 명세서에 개시된 경구 안티센스 약학적 조성물은 PCSK9의 비정상적인 발현 수준 및/또는 활성화에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 유효량의 본 명세서에 개시된 경구 약학적 조성물 (예를 들어, CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체 및 SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제를 포함하는 경구 약학적 조성물)를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 비정상적인 발현 수준 및/또는 활성화에 의해 유발된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 약학적 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 PCSK9의 수준을 감소시키고/시키거나 혈청 LDL 콜레스테롤의 수준을 감소시킨다.
- [0203] 일부 양태에서, 질환 또는 병태는 죽상동맥경화증, 고콜레스테롤혈증(예를 들어, 가족성 고콜레스테롤혈증 또는 스타틴 저항성 고콜레스테롤혈증), HDL/LDL 콜레스테롤 불균형, 이상지질혈증(예를 들어, 가족성 고지혈증(FCHL) 또는 후천성 고지혈증), 관상동맥질환(CAD) 및 관상심장질환(CHD)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 따라서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 죽상동맥경화증, 고콜레스테롤혈증(예를 들어, 가족성 고콜레스테롤혈증 또는 스타틴 저항성 고콜레스테롤혈증), HDL/LDL 콜레스테롤 불균형, 이상지질혈증(예를 들어, 가족성 고지혈증(FCHL) 또는 후천성 고지혈증), 관상동맥질환(CAD), 및 관상심장질환(CHD)으로 구성된 군으로부터 선택된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 명세서에 개시된 경구 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008과 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체 및 SNAC, C10 또는 5-CNAC와 같은 경구 전달제를 포함하는 경구 약학적 조성물)을 투여하는 것을 포함한다.
- [0204] 본 개시내용은 또한 (i) 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고머 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008); 및 (ii) 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)를 혼합하는 것을 포함하는 경구 약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0205] 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고머 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체(예를 들어, CIVI 008)에 직접적으로 또는 링커 또는 링커의 조합을 통해 공유적으로 부착되며, 여기서 링커 또는 링커의 조합은 절단가능한 링커를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)는 올리고머 모이어티에 직접적으로 또는 스페이서를 통해 공유적으로 부착된다. 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티(예를 들어, GalNAc 모이어티 CIVI 008)에 직접적으로 또는 링커, 스페이서 또는 이의 조합을 통해 공유적으로 부착된다. 따라서, 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC) 또는 이의 조합은 예를 들어 절단가능한 링커를 포함하는 GalNAc 접합체 모이어티에 부착된다. 절단가능한 링커 또는 이의 조합의 절단은 접합체로부터 GalNAc 및 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC) 둘 모두를 방출할 수 있다. 다른 양태에서, GalNAc 모이어티 및 경구 전달제는 동일하거나 상이할 수 있는 2개의 별도 절단가능한 링커를 통해 부착된다. 일부 양태에서, 절단가능한 링커 둘 모두는 동일한 메카니즘(예를 들어, 2개의 pH 민감성 링커)에 따라 절단될 수 있다. 다른 양태에서, 각각의 절단가능한 링커는 상이한 메카니즘(예를 들어, 링커는 pH 민감성 링커일 수 있고, 제2 링커는 예를 들어, 에스테라제에 의해 효소적으로 절단될 수 있음)에 따라 절단될 수 있다.
- [0206] 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 올리고머 모이어티의 5'에 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 올리고머 모이어티의 3'에 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 올리고머 모이어티의 5' 또는 3'에 직접적으로(예를 들어, 5' 또는 3' 뉴클레오타이드에) 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 올리고머 모이어티의 5' 또는 3'에 간접적으로 링커, 스페이서, 또는 이의 조합을 통해 5' 또는 3' 뉴클레오타이드에 공유적으로 부착될 수 있다.
- [0207] 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체에 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10, 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 올리고머 모이어티에 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티(예를 들어, GalNAc 모이어티)에 공유적으로 부착될 수 있다.
- [0208] 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체에 링커, 스페이서 또는 이의 조합을 통해 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 양태에서, 경구 전달

제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 올리고머 모이어티에 링커, 스페이서 또는 이의 조합을 통해 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 양태에서, 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 비뉴클레오타이드 또는 비폴리뉴클레오타이드 모이어티(예를 들어, GalNAc 모이어티)에 링커, 스페이서, 또는 이의 조합을 통해 공유적으로 부착될 수 있다.

[0209] 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머 모이어티 또는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 본 명세서에 개시된 하나 초과와 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)에 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 올리고머 모이어티 또는 본 명세서에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 상이한 위치에서 공유적으로 부착된 본 명세서에 개시된 하나 초과와 경구 전달제(예를 들어, SNAC, C10 또는 5-CNAC)를 가질 수 있다(예를 들어, 올리고머에 부착된 경구 전달제 및 GalNAc 모이어티에 부착된 경구 전달제).

[0210] II. 올리고머

[0211] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 길이가 16-20개 뉴클레오타이드 사이의 LNA 캡머이고 서열번호 31의 상응하는 길이에 상보성인 16개 뉴클레오타이드의 인접하는 서열을 포함한다. 또한 서열번호 26, 27, 28, 29 및 44로 구성된 군으로부터 선택된 인접하는 서열을 포함하는 올리고머가 개시된다. 본 개시내용의 안티센스 올리고머 또는 접합체는 PCSK9를 표적화하고, 이와 같이 이들은 PCSK9, 예컨대 인간에서 또는 PCSK9를 발현하는 세포에서 PCSK9의 발현을 하향 조절 및/또는 억제할 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 길이가 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 길이가 14개 초과와 뉴클레오타이드이다. 일부 양태에서, 서열번호: 33 또는 34 또는 45의 상응하는 길이에 상보성인 10-16개의 뉴클레오타이드의 인접하는 서열의 인트뉴클레오타이드 연결은 포스포로티오에이트 연결일 수 있다.

[0212] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머(예를 들어, 서열번호: 31에 상보성인 올리고머)는 서열번호: 2 및 서열번호: 3으로 구성된 군으로부터 선택된 인접하는 서열을 포함하거나, 구성되거나, 본질적으로 구성된다.

[0213] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머(예를 들어, 서열번호: 31에 상보성인 올리고머)는 10-16개의 포스포로티오에이트 연결된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머(예를 들어, 서열번호: 31에 상보성인 올리고머)는 14개 초과와 포스포로티오에이트 연결된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 양태에서, 올리고머(예를 들어, 서열번호: 31에 상보성인 올리고머)는 길이가 15, 16, 17, 18, 18, 19, 20, 21, 또는 22개의 뉴클레오타이드이다.

[0214] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머(예를 들어, 서열번호: 31에 상보성인 올리고머)는 서열번호 31의 상응하는 길이에 상보성인, 14개 초과와 뉴클레오타이드, 예를 들어, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 뉴클레오타이드의 인접하는 서열을 포함하는 LNA 캡머이며, 여기서 인접하는 서열은 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 특정 양태에서, 올리고머는 길이가 16개의 뉴클레오타이드이다. 일 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 친화성 향상 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 양태에서, 뉴클레오타이드 유사체는 2'-O-알킬-RNA 단위, 2'-OMe-RNA 단위, 2'-아미노-DNA 단위 및 2'-플루오로-DNA 단위로 구성된 군으로부터 독립적으로 또는 종속적으로 선택된 당 변형된 뉴클레오타이드와 같은 당 변형된 뉴클레오타이드이다.

[0215] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머(예를 들어, 서열번호: 31에 상보성인 올리고머)는 LNA 캡머 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 양태에서, LNA 캡머는 2 내지 4개의 뉴클레오타이드 유사체, 바람직하게는 LNA 유사체의 각 측면(5' 및 3')에 날개를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머(예를 들어, 서열번호: 31에 상보성인 올리고머)는 추가로 1 내지 6개의 뉴클레오타이드(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 뉴클레오타이드)를 선택적으로 포함할 수 있으며, 이는 포스포에이트 뉴클레오타이드 링커와 같은 생체절단가능한 뉴클레오타이드 영역을 형성하거나 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 생체절단가능한 뉴클레오타이드 영역은 생리학적 불안전한 뉴클레오타이드의 짧은 스트레치(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 뉴클레오타이드)로 형성된다. 이것은 DNA/RNA 뉴클레오타이드와 포스포디에스테르 연결을 사용함에 의해 달성될 수 있거나 생리학적 경향이 유지될 수 있는 경우 다른 뉴클레오타이드가 사용될 수 있다. 생리학적 불안정성은 예를 들어 실시예 6에 예시된 바와 같이 간 추출물을 사용하여 측정될 수 있다.

[0216] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 서열번호 31의 상응하는 길이에 상보성인 16개 뉴클레오타이드(제1 영역 또는 영역 A)의 인접하는 서열을 포함한다. 본 개시내용의 올리고머는 추가의 뉴클레오타이드 영역을 포함할

수 있다. 일부 양태에서, 추가의 뉴클레오티드 영역은 영역 A를 접합체 그룹과 같은 비뉴클레오티드 모이어티에 공유적으로 연결할 수 있는 포스페이트 뉴클레오티드 서열(제2 영역, 영역 B)과 같은 생체절단가능한 뉴클레오티드 영역을 포함한다(제3 영역 또는 영역 C). 일부 양태에서 본 개시내용의 올리고머의 인접하는 뉴클레오티드 서열(영역 A)은 영역 C에 직접적으로 공유적으로 연결된다. 일부 양태에서 영역 C는 생체절단가능하다.

[0217] 일부 양태에서, 올리고머는 16-22, 예컨대 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22개 뉴클레오티드 길이, 예컨대 16개 뉴클레오티드 길이의 인접하는 뉴클레오티드 서열로 구성되거나 이를 포함한다. 따라서, 일부 양태에서, 올리고머는 영역 A 및 영역 B의 조합된 길이, 예를 들어 영역 A로부터 16-22개 뉴클레오티드(예컨대 16개 뉴클레오티드) 및 예를 들어 영역 B로부터 1 내지 6개 뉴클레오티드를 지칭할 수 있다.

[0218] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 RNA(단위)를 포함하지 않으며, 예를 들어 일부 양태에서 그것은 DNA 단위만을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 DNA 및 RNA 단위를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 따른 올리고머, 올리고머의 제1 영역, 또는 올리고머의 제1 및 제2 영역은 함께(예를 들어, 단일 인접하는 서열로서) 선형 분자이다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 따른 올리고머, 올리고머의 제1 영역, 또는 올리고머의 제1 및 제2 영역은 함께(예를 들어, 단일 인접하는 서열로서) 선형 분자로서 합성된다. 따라서, 일부 양태에서 올리고머는 단일 가닥의 분자일 수 있다. 일부 양태에서, 올리고머는 동일한 올리고머 내의 등가 영역(즉, 듀플렉스)에 상보적인, 예를 들어 적어도 3, 4 또는 5개의 인접하는 뉴클레오티드의 짧은 영역을 포함하지 않는다.

[0219] 일부 양태에서, 올리고머는 이중 가닥의 핵산이 아니다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 siRNA가 아니다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 shRNA가 아니다. 일부 양태에서, 올리고머는 이중 가닥의 핵산이다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 siRNA이다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 shRNA이다.

[0220] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)이다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 다량체이다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 다량체 ASO이고, 예를 들어 그것은 본 개시내용의 여러 연쇄상의 올리고머를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 10개 초과 연쇄상의 올리고머를 포함한다. 일부 양태에서, 연쇄상의 올리고머는 ASO 다량체에서 각각의 ASO 단위 사이에 개재된 절단가능한 링커를 통해 연결된다.

[0221] 본 명세서에 개시된 2개의 올리고뉴클레오티드의 비교에 적용되는 용어 "상응하는" 및 "상응한다"는 본 개시내용의 올리고머의 뉴클레오티드 서열(즉, 핵염기 또는 염기 서열)과 핵산 표적 또는 이의 하위-영역의 역보체(예를 들어, 서열번호 31, 32, 33, 34 또는 45) 사이의 비교를 지칭한다. 뉴클레오티드 유사체는 그의 동등하거나 상응하는 뉴클레오티드와 직접적으로 비교된다. 일부 양태에서, 올리고머(또는 이의 제1 영역)는 완전히 상보성인 것과 같이 표적 영역 또는 이의 하위-영역(예를 들어 서열번호 31, 32, 33, 34 또는 45)에 대해 상보성이다.

[0222] II.a 올리고머 서열

[0223] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 표 1A에 개시된 표적 영역을 표적화할 수 있다. 표 1A는 표적 영역의 서열뿐만 아니라 PCSK9 mRNA에서 그의 위치를 제시한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 표 1A의 표적 서열 중 하나의 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개의 뉴클레오티드에 상보성인 상보성 영역을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 표 1A의 표적 서열 중 하나의 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개의 뉴클레오티드에 상보성인 상보성 영역을 포함하며, 여기서 상보적 영역은 올리고머의 5' 말단에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 표 1A의 표적 서열 중 하나의 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개의 뉴클레오티드에 상보성인 상보성 영역을 포함하며, 여기서 상보적 영역은 올리고머의 3' 말단에 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 표 1A의 표적 서열 중 하나의 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개의 뉴클레오티드에 상보성인 상보성 영역을 포함하며, 여기서 상보적 영역은 올리고머의 5' 말단에 있고, 여기서 올리고머는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 표 1A의 표적 서열 중 하나의 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개의 뉴클레오티드에 상보성인 상보성 영역을 포함하며, 여기서 상보적 영역은 올리고머의 3' 말단에 있고, 여기서 올리고머는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0224] 표 1A: PCSK9 표적 서열

서열번호	표적 서열	길이	PCSK9 mRNA 상의 위치
30	UGGGUUUUUGUAGCA	14	3643-3656
31	UGGGUUUUUGUAGCAUU	16	3643-3658
32	CCAAGCUCACACAGC	15	3251-3265
33	CCAAGCUCACACAGCA	16	3251-3266
34	GGAACACAGACCAGGA	16	3373-3388
45	CGCUUCCACAGAC	13	1005-1017

[0225]

[0226] 표 1B는 염기 서열 또는 핵염기 모티프 서열인 서열번호:25 내지 29 및 44를 나타낸다. 예를 들어, 서열번호: 26은 서열번호: 31을 표적화하는 16-mer이다. 일부 양태에서, 핵염기 모티프 서열은 표 1B에 제시된 모티프 서열의 5' 말단, 3' 말단 또는 둘 모두로부터 연장된 것에 상보적인 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 20개 초과 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 올리고머 서열은 특정 패턴의 핵염기 유사체 및/또는 인터뉴클레오타이드 연결을 포함하는 본 명세서에 개시된 모티프 서열로부터 유래된다.

[0227] 표 1B: 모티프 서열.

서열번호	모티프 서열	PCSK9 mRNA 상의 위치	표적 서열의 서열번호
25	tgctacaaaacca	3643-3656	30
26	aatgctacaaaacca	3643-3658	31
27	gctgtgtgagcttgg	3251-3265	32
28	tgctgtgtgagcttgg	3251-3266	33
29	tcctggtctgtgtcc	3373-3388	34
44	gtctgtggaagcg	1005-1017	45

[0228]

[0229] 표 1C는 상이한 올리고머 서열, 이의 집합체 형태, 및 PCSK9 유전자 상의 표적 상응 표적 영역을 제시한다.

[0230] 표 1C: 올리고머 및 집합체

서열번호	올리고머 서열	집합체			표적 PCSK9 mRNA 상의 위치
		PO	Chol-C6	GalNAc	
1	TGCTacaaaacCCA				3643-3656
2	AATgctacaaaCCCA				3643-3658
3	AATgctacaaaCCA				3643-3658
4	GCtgtgtgagcttGG				3251-3265
5	TGctgtgtgagctTGG				3251-3266
6	TGCTgtgtgagctTGG				3251-3266
7	TCCtggtctgtgtTCC				3373-3388
8	TCCtggtctgtgtCC				3373-3388
9	TGCTacaaaacCCA	예	예		3643-3656
10	AATgctacaaaCCCA	예	예		3643-3658
11	AATgctacaaaCCA	예	예		3643-3658
12	GCtgtgtgagcttGG	예	예		3251-3265
13	TGctgtgtgagctTGG	예	예		3251-3266
14	TGCTgtgtgagctTGG	예	예		3251-3266
15	TCCtggtctgtgtTCC	예	예		3373-3388

[0231]

16	TCCtggtctgtgtCC	예	예		3373-3388
17	TGCtacaaaacCCA			예	3643-3656
18	AATgctacaaaacCCA			예	3643-3658
19	AATgctacaaaacCCA			예	3643-3658
20	GCtgtgtgagcttGG			예	3251-3265
21	TGctgtgtgagctTGG			예	3251-3266
22	TGCTgtgtgagctTGG			예	3251-3266
23	TCCtggtctgtgtTCC			예	3373-3388
24	TCCtggtctgtgtCC			예	3373-3388
40	GTctgtggaaGCG				1005-1017
41	GTctgtggaaGCG		예		1005-1017
42	GTctgtggaaGCG	예	예		1005-1017
43	GTctgtggaaGCG	예	예		1005-1017

[0232]

[0233]

서열번호: 1은 W02011/009697에 개시된 안티센스 올리고머인 SPC5001이며, 이는 인간 대상체에게 투여될 때 심각한 신장 독성을 야기하는 것으로 알려져 있다. 서열번호 1-24 및 40 내지 43은 LNA 캡머 올리고머와 같은 뉴클레오타이드 유사체를 포함하는 올리고머이며, 여기서 소문자는 DNA 단위(뉴클레오타이드/뉴클레오타이드)이고 대문자는 LNA 단위이다. 일부 양태에서, 모든 LNA C는 5-메틸 시토신이다. 일부 양태에서, 모든 LNA 단위는 베타-D-옥시 LNA이다. 일부 양태에서, 서열번호 1-24 및 40 내지 43의 뉴클레오타이드 사이의 인터뉴클레오타이드 연결은 모두 포스포로티오에이트 연결이다. 일부 양태에서, 포스포로티오에이트 연결은 제1 및/또는 제2 5' 포스포로티오에이트 연결에만 존재한다. 일부 양태에서, 포스포로티오에이트 연결은 제1 및/또는 제2 3' 포스포로티오에이트 연결에만 존재한다. 일부 양태에서, 포스포로티오에이트 연결은 제1 및/또는 제2 5' 포스포로티오에이트 연결 및 제1 및/또는 제2 3' 포스포로티오에이트 연결에 존재한다.

[0234]

서열번호: 1-24 및 40-43은 각각의 날개가 2, 3 또는 4개의 LNA 단위를 포함하는 캡머이다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 서열번호: 1-24 및 40-43의 변이체에 상응하며, 여기서 변이체는 캡머의 5' 날개에 1, 2, 3 또는 4개의 부가적인 LNA 단위를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 서열번호: 1-24 및 40-43의 변이체에 상응하며, 여기서 변이체는 캡머의 3' 날개에 1, 2, 3 또는 4개의 부가적인 LNA 단위를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 서열번호: 1-24 및 40-43의 변이체에 상응하며, 여기서 변이체는 캡머의 5' 날개에 1, 2, 3 또는 4개의 부가적인 LNA 단위 및 캡머의 3' 날개에 있는 1, 2, 3 또는 4개의 부가적인 LNA 단위를 포함한다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 캡머, 예를 들어 표 1C의 캡머 또는 이의 변이체의 LNA 단위는 옥시-LNA, 티오-LNA, 아미노-5 LNA, 5'-메틸-LNA, ENA, cET, 또는 cMOE일 수 있다.

[0235]

서열번호 9-16 및 41 내지 43은 (SEQ ID에 의해 표시된 바와 같은) 올리고머뿐만 아니라 올리고머의 올리고머 5' 또는 3' 말단에 선택적으로 포스페이트 뉴클레오타이드 링커와 같은 생체절단가능한 링커를 통해 공유적으로 연결될 수 있는 콜레스테롤 접합체를 포함한다. 일부 양태에서, 콜레스테롤 접합체는 올리고머의 5' 말단에 연결된다. 서열번호 17 - 24는 (SEQ ID에 의해 표시된 바와 같은) 올리고머뿐만 아니라 올리고머의 올리고머 5' 또는 3' 말단에 선택적으로 포스페이트 뉴클레오타이드 링커 또는 절단가능한 펩티드 링커와 같은 생체절단가능한 링커를 통해 공유적으로 연결될 수 있는 GalNAc 접합체를 포함한다. 일부 양태에서, GalNAc 접합체는 올리고머의 5' 말단에 연결된다. 본 명세서에서 사용된 특정 올리고머 및 접합체는 **도 3**(비접합된 올리고머), **도 4**(콜레스테롤 접합체), 및 **도 5a, 5b 및 5c**(GalNAc 접합체)에 예시되어 있다. 본 개시내용의 올리고머와 함께 사용될 수 있는 접합체 모이어티의 다른 예는 도 1a, 1c 및 1c 및 도 2에 예시되어 있고, 아래 GalNAc 접합체 모이어티 섹션에 기술되어 있다.

[0236]

표 2는 올리고머 및 접합체의 특정한 조합을 제공한다.

표 2: 올리고머/접합체 모이어티 조합

서열번호	접합체 모이어티											
	번호											
	(도 1a-1c 참조)											
	Conj1	Conj2	Conj3	Conj4	Conj1a	Conj2a	Conj3a	Conj4a	Conj5	Conj6	Conj5a	Conj6a
2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C70	C71
3	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C72	C73
4	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C74	C75
5	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	C38	C39	C76	C77
6	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47	C48	C49	C78	C79
7	C50	C51	C52	C53	C54	C55	C56	C57	C58	C59	C80	C81
8	C60	C61	C62	C63	C64	C65	C66	C67	C68	C69	C82	C83

표 2에 제시된 올리고머 접합체는 **도 1a**, **도 1b**, **도 1c** 또는 **도 2**에 제시된 접합체 모이어티에 그의 5' 말단을 통해 접합된 서열번호: 1-8의 올리고머에 상응한다. 올리고머는 물결 **도 1a**, **도 1b**, **도 1c** 또는 **도 2**에서의 물결선에 의해 표시된 위치에 공유적으로 결합된다. 일부 양태에서, 접합체 모이어티는 올리고머의 3' 말단에 부착된다.

도 5a, **5b** 및 **5c**는 접합체 2a와 상기 표시된 서열번호와의 조합을 나타낸다. **도 5b** 및 **5c**는 **도 5a**에서의 화합물의 2개의 상세한 예이고 각각 서열번호: 18 및 서열번호: 19의 접합체에 상응한다.

일부 양태에서, 선택적인 생체절단가능한 링커(B)가 접합체 모이어티(C)와 올리고머(A) 사이에 존재할 수 있다. 접합체 1-4 및 1a-4a의 경우 GalNAc 접합체 자체는 GalNAc 클러스터에서의 펩티드 링커를 활용하여 생체절단가능하고, 이와 같이 추가 생체절단가능한 링커(B)가 사용되거나 사용되지 않을 수 있다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 포스포이트 뉴클레오타이드 링커와 같은 생체절단가능한 링커(B)의 함입은 GalNAc 클러스터 올리고머 접합체의 활성을 증강시킬 수 있다. **도 4**는 Conj5a(콜레스테롤-C6)와 상기 표시된 서열번호와의 조합을 나타낸다.

II.b PCSK9 표적 영역

본 개시내용은 PCSK9 RNA, 예를 들어 mRNA에서의 표적화 영역을 특이적으로 표적화함에 의해 PCSK9 유전자의 발현을 조절할 수 있는 본 개시내용의 올리고머(예를 들어, ASO)를 포함하는 경구 투여용 약학적 조성물에 대한 것이다. 일부 양태에서, 올리고머는 이러한 표적 영역에 결합함에 의해 PCSK9 유전자의 발현을 하향-조절할 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 PCSK9 RNA, 예를 들어 mRNA에서의 특정한 표적 영역에 결합함에 의해, 예를 들어 인간과 같은 포유동물 대상체에서 PCSK9의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 PCSK9 RNA, 예를 들어 mRNA에서의 특정한 표적 영역에 결합함에 의해 인간 세포, 예를 들어 간 세포에서 PCSK9의 발현에 영향을 미칠 수 있다.

본 명세서에 사용된 용어 "표적 핵산" 또는 "표적 영역"은 핵산의 하위서열, 예를 들어 포유동물 PCSK9 또는 그의 자연적으로 발생하는 변이체 또는 돌연변이체 형태, 예를 들어 인간 PCSK9를 인코딩하는 mRNA 같은 RNA를 지칭한다. 일부 양태에서, 포유동물 PCSK9 또는 그의 자연적으로 발생하는 변이체 또는 돌연변이체 형태를 인코딩하는 핵산은 RNA이다. 일부 양태에서, RNA는 pre-mRNA와 같은 mRNA이다. 일부 양태에서, RNA는 성숙 mRNA이다. 본 개시내용에 따른 올리고머는 바람직하게는 표적 핵산에 혼성화할 수 있다. 서열번호: 46은 cDNA 서열이고, 이와 같이 cDNA 서열에서 우라실이 티미딘으로 대체되기는 하지만 성숙 mRNA 표적 서열에 상응함을 인지할 것이다.

일부 양태에서, 표적 서열은 서열번호: 46에 제시된 PCSK9를 인코딩하는 서열의 하위서열에 상응한다. 특정한 표적 서열은 상기 표 1A에, 예를 들어 서열번호:46의 위치 3643-3656에 상응하는, 서열번호: 30; 서열번호: 46의 위치 3643-3658에 상응하는, 서열번호: 31; 서열번호: 46의 위치 3251-3265에 상응하는, 서열번호: 32; 서열번호: 46의 위치 3251-3266에 상응하는, 서열번호: 33; 서열번호: 46의 위치 3373-3388에 상응하는, 서열번호: 34; 및 서열번호: 46의 위치 1005-1017에 상응하는, 서열번호: 45에 제시되어 있다.

- [0246] 일부 양태에서, 표적 서열은 서열번호: 30, 31, 32, 33, 34, 또는 45의 표적 영역의 5' 말단을 넘어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드를 연장할 수 있다. 일부 양태에서, 표적 서열은 서열번호: 30, 31, 32, 33, 34, 또는 45의 표적 영역의 3' 말단을 넘어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오타이드를 연장할 수 있다. 일부 양태에서, 표적 서열은 서열번호: 30, 31, 32, 33, 34, 또는 45의 표적 영역의 5' 말단을 넘어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오타이드 및/또는 3' 말단을 넘어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드를 연장할 수 있다. 일부 양태에서, 연장된 표적 영역은 서열번호: 30, 31, 32, 33, 34 또는 45의 표적 영역의 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개의 뉴클레오타이드와 중첩된다.
- [0247] 일부 양태에서, 표적 영역은 서열번호: 46의 mRNA를 인코딩하는 PCSK9 유전자의 돌연변이체 또는 대립형질 변이체의 서열로부터 유래된 상응하는 표적 서열 영역을 포함하거나 이로 구성된다. 다른 양태에서, 표적 영역은 PCSK9를 인코딩하는 또 다른 mRNA 전사 변이체에 존재하는 하위서열일 수 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 서열번호: 46의 mRNA를 인코딩하는 PCSK9 유전자의 파라로그 또는 오르토포로그의 서열로부터 유래된 상응하는 표적 서열 영역을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0248] 일부 양태에서, 표적 영역은 NCBI Ref Seq 수탁 번호 NM_174936에 제시된 서열의 하위서열, 즉 호모 사피엔스 프로단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 유형 9(PCSK9), 전사체 변이체 1을 인코딩하는 mRNA에 상응한다. 이 NCBI Ref Seq 데이터베이스 진입은 www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_174936에서 액세스할 수 있고 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다.
- [0249] NM_174936 mRNA 전사체에서의 PCSK9 코딩 서열은 위치 291...2369에 위치된다. 따라서, 일부 양태에서, 표적 영역은 NM_174936 mRNA 전사체의 위치 291과 2369 사이에 위치된다. 일부 양태에서, 표적 영역은 5' 비코딩 영역 내에 위치된다. 일부 양태에서, 표적 영역은 3' 비코딩 영역 내에 위치된다. NM_174936 mRNA 전사체는 위치 1...497(엑손 1), 498...689(엑손 2), 690...813(엑손 3), 814...947(엑손 4), 948...1089(엑손 5), 1090...1286(엑손 6), 1287...1470(엑손 7), 1471...1644(엑손 8), 1645...1793(엑손 9), 1794...1971(엑손 10), 1972...2153(엑손 11), 및 2154...3637(엑손 12)에 위치한 엑손을 포함한다. 엑손 1 내지 12는 인트론 1 내지 11에 의해 분리되고, 예를 들어, 인트론 1은 엑손 1과 엑손 2 사이에 위치하며, 인트론 2는 엑손 2와 엑손 3 사이에 위치하는 등이다.
- [0250] 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 1 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 2 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 3 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 4 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 5 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 6 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 7 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 8 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 9 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 10 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 11 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 12 내에 있다.
- [0251] 일부 양태에서, 표적 영역은 PCSK9 pre mRNA에서의 인트론 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 1 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 2 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 3 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 4 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 5 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 6 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 7 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 8 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 9 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 10 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 11 내에 있다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 1과 인트론 1 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트로 1과 엑손 2 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 2와 인트론 2 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 2와 엑손 3 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 3과 인트론 3 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 4와 인트론 4 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 4와 엑손 5 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 5와 인트론 5 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 5와 엑손 6 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 6과 인트론 6 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 6과 엑손 7 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 7과 인트론 7 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 7과 엑손 8 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 8과 인트론 8 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 8과 엑손 9 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 9와 인트론 9 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 9와 엑손 10 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은

엑손 10과 인트론 10 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 10과 엑손 11 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 엑손 11과 인트론 11 사이의 접합부를 포함한다. 일부 양태에서, 표적 영역은 인트론 11과 엑손 12 사이의 접합부를 포함한다.

[0252] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 표적 핵산(예를 들어, 서열번호: 31)에 결합하고 PCSK9 발현 및/또는 활성 수준에 대한 효과는 정상 PCSK9 발현 수준(예를 들어, 식염수로 처리된 세포, 동물 또는 인간의 PCSK9 발현 수준) 및/또는 정상 활성 수준(예를 들어, 식염수로 처리된 세포, 동물 또는 인간의 발현 수준)과 비교하여 PCSK9 발현 및/또는 활성 수준에서 적어도 약 10% 내지 약 20% 감소된다. 일부 양태에서, PCSK9 발현 및/또는 활성에서의 감소는 정상 발현 및/또는 활성 수준과 비교하여 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100%이다. 일부 양태에서, 발현 및/또는 활성에서의 감소는 정상 발현 및/또는 활성 수준과 비교하여 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100%이다.

[0253] 일부 양태에서, 이러한 조절(예를 들어, 발현 수준 및/또는 활성의 감소)은 0.04nM 내지 25nM, 예컨대 0.8nM 내지 20nM 농도의 본 개시내용의 올리고머를 사용할 때 나타난다. 일부 양태에서, 이러한 조절(예를 들어, 발현 수준 및/또는 활성의 감소)은 적어도 약 0.04nM, 적어도 약 0.05nM, 적어도 약 0.06nM, 적어도 약 0.07nM, 적어도 약 0.08nM, 적어도 약 0.09nM, 적어도 약 0.1nM, 적어도 약 0.2nM, 적어도 약 0.3nM, 적어도 약 0.4nM, 적어도 약 0.5nM, 적어도 약 0.6nM, 적어도 약 0.7nM, 적어도 약 0.8nM, 적어도 약 0.9nM, 적어도 약 1nM, 적어도 약 2nM, 적어도 약 3nM, 적어도 약 4nM, 적어도 약 5nM, 적어도 약 6nM, 적어도 약 7nM, 적어도 약 8nM, 적어도 약 9nM, 적어도 약 10nM, 적어도 약 11nM, 적어도 약 12nM, 적어도 약 13nM, 적어도 약 14nM, 적어도 약 15nM, 적어도 약 16nM, 적어도 약 17nM, 적어도 약 18nM, 적어도 약 19nM, 적어도 약 20nM, 적어도 약 21nM, 적어도 약 22nM, 적어도 약 23nM, 적어도 약 24nM, 적어도 약 25nM 농도의 본 개시내용의 올리고머를 사용할 때 나타난다. 일부 양태에서, 이러한 조절(예를 들어, 발현 수준 및/또는 활성의 감소)은 약 0.04nM, 약 0.05nM, 약 0.06nM, 약 0.07nM, 약 0.08nM, 약 0.09nM, 약 0.1nM, 약 0.2nM, 약 0.3nM, 약 0.4nM, 약 0.5nM, 약 0.6nM, 약 0.7nM, 약 0.8nM, 약 0.9nM, 약 1nM, 약 2nM, 약 3nM, 약 4nM, 약 5nM, 약 6nM, 약 7nM, 약 8nM, 약 9nM, 약 10nM, 약 11nM, 약 12nM, 약 13nM, 약 14nM, 약 15nM, 약 16nM, 약 17nM, 약 18nM, 약 19nM, 약 20nM, 약 21nM, 약 22nM, 약 23nM, 약 24nM, 약 25nM 농도의 본 개시내용의 올리고머를 사용할 때 나타난다.

[0254] 일부 양태에서, 이러한 조정(예를 들어, 발현 수준 및/또는 활성의 감소)은 0.01 내지 15mg/kg, 예컨대 0.05 내지 10mg/kg, 예컨대 0.1 내지 7.5mg/kg, 예컨대 0.25 내지 5mg/kg, 예컨대 0.5 내지 2.5mg/kg 농도의 본 개시내용의 화합물을 사용할 때 나타난다. 일부 양태에서, 이러한 조정(예를 들어, 발현 수준 및/또는 활성의 감소)은 적어도 약 0.01mg/kg, 적어도 약 0.02mg/kg, 적어도 약 0.03mg/kg, 적어도 약 0.04mg/kg, 적어도 약 0.05mg/kg, 적어도 약 0.06mg/kg, 적어도 약 0.07mg/kg, 적어도 약 0.08mg/kg, 적어도 약 0.09 mg/kg, 적어도 약 0.1mg/kg, 적어도 약 0.2mg/kg, 적어도 약 0.3mg/kg, 적어도 약 0.4mg/kg, 적어도 약 0.5mg/kg, 적어도 약 0.6mg/kg, 적어도 약 0.7mg/kg, 적어도 약 0.8mg/kg, 적어도 약 0.9mg/kg, 적어도 약 1mg/kg, 적어도 약 1.5mg/kg, 적어도 약 2mg/kg, 적어도 약 2.5mg/kg, 적어도 약 3mg/kg, 적어도 약 4mg/kg, 적어도 약 4.5mg/kg, 적어도 약 5mg/kg, 적어도 약 6mg/kg, 적어도 약 6.5mg/kg, 적어도 약 7mg/kg, 적어도 약 7.5mg/kg, 적어도 약 8mg/kg, 적어도 약 8.5mg/kg, 적어도 약 9mg/kg, 적어도 약 9.5mg/kg, 적어도 약 10mg/kg, 적어도 약 10.5mg/kg, 적어도 약 11mg/kg, 적어도 약 11.5mg/kg, 적어도 약 12mg/kg, 12.5mg/kg, 적어도 약 13mg/kg, 적어도 약 13.5mg/kg, 적어도 약 14mg/kg, 적어도 약 14.5mg/kg, 또는 적어도 약 15mg/kg 농도의 본 개시내용의 화합물을 사용할 때 나타난다. 일부 양태에서, 이러한 조절(예를 들어, 발현 수준 및/또는 활성의 감소)은 약 0.01mg/kg, 약 0.02mg/kg, 약 0.03mg/kg, 약 0.04mg/kg, 약 0.05mg/kg, 약 0.06mg/kg, 약 0.07mg/kg, 약 0.08mg/kg, 약 0.09mg/kg, 약 0.1mg/kg, 약 0.2mg/kg, 약 0.3mg/kg, 약 0.4mg/kg, 약 0.5mg/kg, 약 0.6mg/kg, 약 0.7mg/kg, 약 0.8mg/kg, 약 0.9mg/kg, 약 1mg/kg, 약 1.5mg/kg, 약 2mg/kg, 약 2.5mg/kg, 약 3mg/kg, 약 4mg/kg, 약 4.5mg/kg, 약 5mg/kg, 약 6mg/kg, 약 6.5mg/kg, 약 7mg/kg, 약 7.5mg/kg, 약 8mg/kg, 약 8.5mg/kg, 약 9mg/kg, 약 9.5mg/kg, 약 10mg/kg, 약 10.5mg/kg, 약 11mg/kg, 약 11.5mg/kg, 약 12mg/kg, 약 12.5mg/kg, 약 13mg/kg, 약 13.5mg/kg, 약 14mg/kg, 약 14.5mg/kg, 또는 약 15mg/kg 농도의 본 개시내용의 화합물을 사용할 때 나타난다.

[0255] 일부 양태에서, 본 개시내용의 화합물의 투여 후 PCSK9 발현 및/또는 활성 수준은 본 개시내용의 화합물의 투여

이전 PCSK9 발현 및/또는 활성 수준의 약 2% 미만, 약 5% 미만, 약 10% 미만, 약 15% 미만, 약 20% 미만, 약 25% 미만, 약 30% 미만, 약 35% 미만, 약 40% 미만, 약 45% 미만, 약 50% 미만, 약 55% 미만, 약 60% 미만, 약 65% 미만, 약 70% 미만, 약 75% 미만, 또는 약 80% 미만이다.

[0256] 일부 양태에서, 본 개시내용의 화합물의 투여 후 PCSK9 발현 및/또는 활성 수준은 본 개시내용의 화합물의 투여 이전 PCSK9 발현 및/또는 활성 수준의 약 2% 내지 약 5%, 약 5% 내지 약 10%, 약 10% 내지 약 15%, 약 15% 내지 약 20%, 약 20% 내지 약 25%, 약 25% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 35%, 약 35% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 65%, 약 65% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 75%, 또는 약 75% 내지 약 80%이다.

[0257] 발현 수준의 조정은 예를 들어, 표적 단백질에 대해 생성된 적절한 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅이 이어지는 SDS-PAGE와 같은 방법에 의해, 단백질 수준을 측정함에 의해 결정될 수 있다. 대안적으로, 발현 수준의 조정은 예를 들어 노던 블롯팅 또는 정량적 RT-PCR에 의해 mRNA의 수준을 측정함에 의해 결정될 수 있다. mRNA 수준을 통해 측정할 때, 0.04nM 내지 25nM 사이, 예컨대 0.8 내지 20nM 농도와 같은 적절한 복용량을 사용할 때 하향-조절 수준은 일부 양태에서 전형적으로 본 개시내용의 화합물의 부재에서의 정상 수준 10-20% 사이의 수준이다.

[0258] 따라서 본 개시내용은 PCSK9 단백질 및/또는 mRNA를 발현하고 있는 세포에서 PCSK9 단백질 및/또는 mRNA의 발현을 하향-조절하거나 억제하는 *시험관내* 또는 *생체내* 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 세포에서 PCSK9 단백질 및/또는 mRNA의 발현을 하향-조절하거나 억제하기 위해 본 개시내용에 따른 올리고머 또는 접합체, 예를 들어 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, 예로서 CIVI 008 및 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 그의 유도체 같은 경구 전달제, 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 이의 염, 또는 이의 염의 조합을 포함하는 경구 제형)을 상기 세포에 투여하는 것을 포함한다. 적합하게 세포는 인간 세포와 같은 포유동물 세포이다.

[0259] II.c 길이

[0260] 본 개시내용의 올리고머는 총 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22개의 인접하는 뉴클레오타이드 길이의 인접하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 양태에서, 올리고머는 22개의 인접하는 뉴클레오타이드 길이보다 더 길다. 길이는 영역 A 또는 영역 A 및 B를 포함할 수 있다. 일부 양태에서 본 개시내용의 올리고머는 예를 들어 본 명세서에 개시된 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 연쇄상의 ASO를 포함하는 다량체일 수 있으며, 이는 다량체에서 각각의 ASO 사이에 개재된 뉴클레오타이드 또는 비뉴클레오타이드 단위를 포함하는 스페이서 또는 링커에 의해 선택적으로 연결될 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 총 적어도 약 20, 적어도 약 25, 적어도 약 30, 적어도 약 35, 적어도 약 40, 적어도 약 45, 적어도 약 50, 적어도 약 55, 적어도 약 60, 적어도 약 65, 적어도 약 70, 적어도 약 75, 적어도 약 80, 적어도 약 85, 적어도 약 90, 적어도 약 95, 적어도 약 100, 적어도 약 110, 적어도 약 120, 적어도 약 130, 적어도 약 140, 적어도 약 150, 적어도 약 160, 적어도 약 170, 적어도 약 180, 적어도 약 190, 또는 적어도 약 200개의 인접하는 뉴클레오타이드 길이의 인접하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0261] 일부 양태에서, 올리고머는 총 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오타이드 길이, 예컨대 16, 17, 18, 18, 20, 21, 또는 22개의 인접하는 뉴클레오타이드 길이의 인접하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 특정 양태에서, 영역 A의 올리고머는 16개의 인접하는 뉴클레오타이드 길이의 인접하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0262] 일부 양태에서, 본 개시내용에 따른 올리고머는 길이가 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개 이하의 인접하는 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 길이가 22개 미만, 21개 미만, 20개 미만, 19개 미만, 18개 미만 또는 17개 미만의 인접하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용에 따른 올리고머는 길이가 16 또는 17, 16 내지 18, 16 내지 19, 16 내지 20, 16 내지 21, 또는 16 내지 22개의 인접하는 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0263] II.d 뉴클레오타이드 유사체

[0264] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 비자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드 유사체, 예를 들어 변형된 당 모이어티, 예를 들어, 바이사이클릭 뉴클레오타이드 또는 2' 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 2' 치환된 뉴클레오타이드를 갖는 뉴클레오타이드를 포함한다. 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드의 비자연적으로 유사체로의 대체는 올리고머에 바람직한 특징 또는 특성, 예를 들어 분해에 대한 증가된 저항성 또는 안정성을 부여할 수 있다. 일부 양태에서, 뉴클레오타이드 유사체는; 예를 들어, 표적에 대한 증가된 결합 친화성(친화성 증강) 및/또는 세포내 뉴클레아제에 대한 증가된 저항성 및/또는 세포 안로의 이송의 증가된 용이성을 생성함에 의해, 올리고머가 발

립적으로 선택된다.

- [0270] 일부 양태에서, 뉴클레오타이드 유사체는 2'-O-메톡시에틸-RNA(2'MOE), 2'-플루오로-DNA 단량체 또는 LNA 뉴클레오타이드 유사체이고, 이와 같이 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이들 3가지 유형의 유사체로부터 독립적으로 선택된 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있거나, 또는 3가지 유형으로부터 선택된 한 유형의 유사체만을 포함할 수 있다. 일부 양태에서 상기 뉴클레오타이드 유사체 중 적어도 하나는 2'-MOE-RNA, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 2'-MOE-RNA 뉴클레오타이드 단위이다. 일부 양태에서, 상기 뉴클레오타이드 유사체 중 적어도 하나는 2'-플루오로 DNA, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 2'-플루오로-DNA 뉴클레오타이드 단위이다.
- [0271] 일부 양태에서, 올리고머는 센스 및 안티센스 가닥을 포함하는 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 여기서 센스 가닥은 패턴 3'ABABABABAAABBBBABABA5'를 따르고 안티센스 가닥은 패턴 5'BABABABABABBBAAABABAB3'을 따르고, 여기서 A는 2'-플루오로 유사체이고 B는 2-OMe 유사체이고, 여기서 안티센스 가닥은 센스 가닥에 관하여 2개의 염기 오버행을 갖는다. 일부 양태에서, 센스 가닥의 5' 말단은 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일부 양태에서, 안티센스 가닥의 5' 말단의 마지막 2개의 연결은 PS이다.
- [0272] 일부 양태에서, 올리고머는 센스 및 안티센스 가닥을 포함하는 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 여기서 센스 가닥은 패턴 3'BBBBBBBABAAABBBBBBBBB5'를 따르고 안티센스 가닥은 패턴 5'BBBBBBBABABBBBABBBBAB3'을 따르고, 여기서 A는 2'-플루오로 유사체이고 B는 2-OMe 유사체이고, 여기서 안티센스 가닥은 센스 가닥에 관하여 2개의 염기 오버행을 갖는다. 일부 양태에서, 센스 가닥의 5' 말단은 GalNAc 모이어티에 접합된다. 일부 양태에서, 안티센스 가닥의 5' 말단 및 3' 말단의 마지막 2개의 연결은 PS이고, 센스 가닥의 마지막 2개의 3' 말단 연결은 PS이다.
- [0273] 일부 양태에서, 올리고머는 센스 및 안티센스 가닥을 포함하는 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 여기서 센스 가닥은 5' 말단에서 하나 이상의 말단, 키랄-변형된 인터뉴클레오타이드 연결을 포함하고; 안티센스 가닥은 5' 말단에서 하나 이상의 말단 키랄-변형된 인터뉴클레오타이드 연결 및 3' 말단에서 하나 이상의 말단 키랄-변형된 인터뉴클레오타이드 연결을 포함한다.
- [0274] 일부 양태에서, 올리고머는 센스 및 안티센스 가닥을 포함하는 듀플렉스 RNA일 수 있으며 센스 가닥 서열은 이들 중 적어도 4개는 5' 말단의 4개 말단 뉴클레오타이드에서 발생하는, 4-12개의 비대칭 2'-O-알킬 변형을 가지고; 그리고 안티센스 서열은 적어도 4개의 비대칭 포스포로티오에이트 변형을 갖는다.
- [0275] 일부 양태에서, 올리고머는 3' 말단 또는 5' 말단으로부터 처음 3, 4, 5 또는 6 위치 내에 있는 제1 서열에서의 제1 단량체 및 제2 서열에서의 제2 단량체를 갖는, 제1 및 제2 서열을 포함하는 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 여기서 제1 및 제2 단량체는 (i) 제1 및 제2 단량체가 자연적으로 발생하는 리보뉴클레오타이드 또는 자연적으로 발생하는 염기를 갖는 변형된 리보뉴클레오타이드이고, 여기서 제1 단량체의 리보뉴클레오타이드 및 제2 단량체의 리보뉴클레오타이드는 쌍을 이루지 않고 상당한 수준의 H-결합이 없는 상보적 부위를 점유할 때 비규범적인 Watson-Crick 쌍을 형성하고; (ii) 제1 서열과 제2 서열 사이의 듀플렉스 형성에 기여하는 단량체의 쌍 형성의 안정성은 제1 서열과 표적 서열 사이 또는 제2 서열과 표적 서열 사이 쌍 형성의 안정성과 상이하며, 여기서 듀플렉스 RNA는 TT 오버행 서열을 포함하도록 선택된다.
- [0276] 일부 양태에서, 올리고머는 이들 중 적어도 4개는 5' 말단의 6개 말단 뉴클레오타이드 내에서 발생하는, 4-12개의 비대칭 2'-O-알킬 변형을 갖는 센스 가닥 서열; 및 적어도 4개의 비대칭 포스포로티오에이트 변형을 갖는 안티센스 서열을 포함하는 듀플렉스 RNA일 수 있다.
- [0277] 일부 양태에서, 올리고머는 이들 중 적어도 4개는 5' 말단의 6개 말단 뉴클레오타이드 내에서 발생하는, 4-12개의 비대칭 2'-O-알킬 변형을 갖는 센스 서열; 및 적어도 4개의 비대칭 포스포로티오에이트 변형을 갖는 안티센스 서열을 포함하는 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 여기서 듀플렉스 RNA는 다가 갈락토스 또는 다가 N-아세틸-갈락토스아민을 포함하고, 여기서 안티센스 서열은 PCSK9 표적 서열을 표적화한다.
- [0278] 일부 양태에서, 올리고머는 센스 서열 및 안티센스 서열을 포함하는, 세포에서 PCSK9의 발현을 억제하기 위한 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 여기서 센스 서열은 하나 이상의 비대칭 2'-O 알킬 변형을 갖고 안티센스 서열은 4-20개의 포스포로티오에이트 변형을 가지며, 여기서 듀플렉스 RNA는 다가 갈락토스 또는 다가 N-아세틸-갈락토스아민을 포함하고, 여기서 안티센스 서열은 인간 PCSK9 서열을 표적화한다.
- [0279] 일부 양태에서, 올리고머는 센스 서열 및 안티센스 서열을 포함하는, 세포에서 PCSK9의 발현을 억제하기 위한 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 여기서 센스 서열은 하나 이상의 비대칭 2'-O 알킬 변형을 가지고 안티센스 서열은

4-20개의 포스포로티오에이트 변형을 가지며, 여기서 안티센스 서열은 센스 서열보다 더 적은 비대칭 2'-O 알킬 변형을 가지며, 여기서 센스 서열은 접합체 기를 포함하고, 여기서 안티센스 서열은 PCSK9 서열을 표적화한다.

[0280] 일부 양태에서, 올리고머는: a. 표적 유전자에 상보적인 안티센스 가닥; 및 b. 상기 안티센스 가닥에 상보적이고 표적 절단 부위에 상응하는 영역에 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 센스 가닥을 포함하는, 표적-외 RNA 억제 활성이 감소된 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 여기서 상기 변형된 뉴클레오타이드는 무염기성이고; 여기서 상기 감소된-표적-외 RNA 억제 활성은 상응하는 변형되지 않은 듀플렉스 RNA 작용제에 상대적이다.

[0281] 일부 양태에서, 올리고머는: (a) 센스 가닥으로, 여기서 상기 센스 가닥은 (i) 적어도 2개의 상이한 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 교호하는 모티프; 및 (ii) 하나 이상의 탄수화물 리간드를 포함하는, 센스 가닥; 및 (b) 안티센스 가닥으로, 여기서 상기 안티센스 가닥은 (i) 적어도 2개의 상이한 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 교호하는 모티프를 포함하는, 안티센스 가닥을 포함하는, 생체내에서 PCSK9 발현을 억제할 수 있는 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 여기서 교호하는 모티프는 듀플렉스 영역 내에 있고 조성물은 선택적으로 하나 이상의 오버행 및/또는 캡핑 기를 추가로 포함한다.

[0282] 일부 양태에서, 올리고머는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 PCSK9의 발현을 억제할 수 있는 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 각각의 가닥은 14 내지 30개의 뉴클레오타이드를 가지며, 여기서 듀플렉스는 하기 식에 의해 표시되며:

[0283] 센스: $5' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -(X \text{ } X \text{ } X) \text{ } _i \text{ } -N_b \text{ } -Y \text{ } Y \text{ } Y \text{ } -N_b \text{ } -(Z \text{ } Z \text{ } Z)_j \text{ } -N_a \text{ } - \text{ } n_q \text{ } 3'$

[0284] 안티센스: $3' \text{ } n_p' \text{ } -N_a' \text{ } -(X'X'X')_k \text{ } -N_b' \text{ } -Y'Y'Y' \text{ } -N_b' \text{ } -(Z'Z'Z')_l \text{ } -N_a' \text{ } - \text{ } n_q' \text{ } 5' \text{ } \text{ (III)}$

[0285] 여기서:

[0286] i, j, k 및 l은 각각 독립적으로 0 또는 1이고, 단 i, j, k 및 l 중 적어도 하나는 1이고;

[0287] p 및 q는 각각 독립적으로 0-6이고;

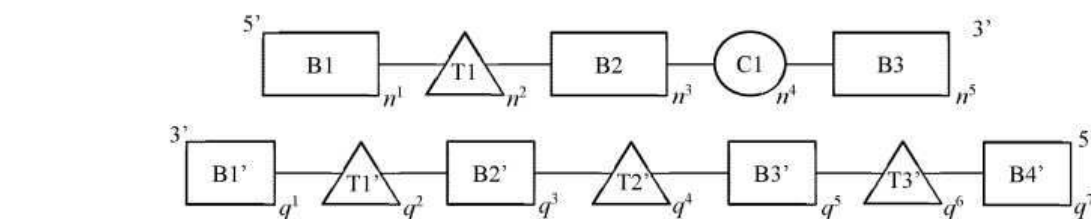
[0288] 각각의 N_a 및 N_a' 는 독립적으로 변형되거나 변형되지 않은 2-20개의 뉴클레오타이드 또는 이의 조합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내며, 각각의 서열은 적어도 2개의 상이하게 변형된 뉴클레오타이드를 포함하고, 각각의 N_b 및 N_b' 는 독립적으로 1-10개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 나타내고;

[0289] 각각의 n_p , n_p' , n_q 및 n_q' 는 독립적으로 0-6개의 뉴클레오타이드를 포함하는 오버행 뉴클레오타이드 서열을 나타내고; 그리고

[0290] XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' 및 Z'Z'Z'는 각각 독립적으로 3개의 인접하는 뉴클레오타이드 상에 3개의 동일한 변형의 하나의 모티프를 나타내고; 그리고

[0291] 여기서 N_b 에 대한 변형은 Y에 대한 변형과 상이하고 N_b' 에 대한 변형은 Y'에 대한 변형과 상이하다.

[0292] 일부 양태에서, 올리고머는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는, PCSK9의 발현을 억제할 수 있는 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 각각의 가닥은 14 내지 40개의 뉴클레오타이드를 가지며, 여기서 dsRNA 작용제는 하기 식에 의해 표시되며:



[0294] 여기서 B1, B2, B3, B1', B2', B3' 및 B4'는 각각 독립적으로 2'-O 알킬, 2'-치환된 알콕시, 2'-치환된 알킬, 2'-할로, ENA 및 BNA/LNA로 구성된 군으로부터 선택된 변형을 함유하는 뉴클레오타이드를 나타내고;

[0295] C1은 i) 안티센스 가닥에서 반대 뉴클레오타이드와 불일치 쌍을 형성하는 뉴클레오타이드, ii) 무염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 및 iii) 당 변형을 갖는 뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택된 열적으로 불안정한 뉴클레오타이드

드이고, 안티센스 가닥의 시드 영역(위치 2-8)에 대항하는 부위에 배치되고;

- [0296] T1, T1', T2' 및 T3'은 각각 독립적으로 2'-OMe 변형의 입체적 부피보다 작은 입체적 부피를 뉴클레오타이드에 제공하는 변형을 포함하는 뉴클레오타이드를 나타내며, 여기서 변형은 뉴클레오타이드의 리보스 당의 2'-위치 또는 리보스 당의 2'-위치와 유사한 비리보스 뉴클레오타이드의 위치에 있고, 여기서 T1' 및 T3'는 11개의 뉴클레오타이드 길이에 의해 분리되어 있고;
- [0297] 각각의 n^1 , n^3 및 q^1 은 독립적으로 4 내지 15개의 뉴클레오타이드 길이이고;
- [0298] 각각의 n^5 , q^3 및 q^7 은 독립적으로 1-6개의 뉴클레오타이드(들) 길이이고;
- [0299] 각각의 n^2 , n^4 및 q^6 은 독립적으로 1-3개의 뉴클레오타이드(들) 길이이고;
- [0300] q^5 는 독립적으로 0-10개의 뉴클레오타이드(들) 길이이고; 그리고
- [0301] 각각의 n^2 , n^4 및 q^4 는 독립적으로 0-3개의 뉴클레오타이드(들) 길이이고; 그리고
- [0302] 여기서 dsRNA 작용제는 dsRNA 듀플렉스의 양쪽 말단에 2개의 무딘 말단을 갖는다.
- [0303] 일부 양태에서, 올리고머는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는, PCSK9의 발현을 억제할 수 있는 듀플렉스 RNA일 수 있으며, 각각의 가닥은 14 내지 40개의 뉴클레오타이드를 가지며, 여기서 안티센스 가닥은 RNA 간섭을 매개하도록 표적 서열에 대해 충분한 상보성을 가지며, 여기서 상기 안티센스 가닥은 5' 영역의 처음 9개 뉴클레오타이드 위치 내의 듀플렉스 또는 이의 전구체의 적어도 하나의 열적으로 불안정한 변형을 포함하고, 여기서 상기 센스 가닥은 ASGPR 리간드를 포함한다.
- [0304] 일부 양태에서, 올리고머는, 이들 모두가 그 전체로 본 명세서에 참조로 포함된, 미국 특허 번호 8,110,674; 8,420,799; 8,809,516; 9,222,091; 9,708,615; 10,273,477; 9,290,760; 10,233,448; 또는 9,796,974; 미국 출원 공개 번호 2018-0258427A1; 또는 국제 공개 WO2018098328A1에 개시된 변형 모티프(예를 들어, 센스 및 안티센스 서열, 인터뉴클레오타이드 연결, 접합체 모이어티 등을 따라 뉴클레오타이드 유사체의 분포 패턴)를 포함한다.
- [0305] 일부 양태에서, 뉴클레오타이드 유사체는 LNA, 예컨대 옥시-LNA(예컨대 베타-D-옥시-LNA 및 알파-L-옥시-LNA) 및/또는 아미노-LNA(예컨대 베타-D-아미노-LNA 및 알파-L-아미노-LNA) 및/또는 티오-LNA(예컨대 베타-D-티오-LNA 및 알파-L-티오-LNA) 및/또는 ENA(예컨대 베타-D-ENA 및 알파-L-ENA)이다. 일부 양태에서, LNA는 베타-D-옥시-LNA이다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 인접하는 뉴클레오타이드 서열에 존재하는 상기 유형의 뉴클레오타이드 유사체, 예를 들어, LNA 중 단 하나가 존재한다.
- [0306] 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 잠금 핵산(LNA) 단위, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 LNA 단위, 예컨대 3 내지 7개 또는 4 내지 8개의 LNA 단위를 포함한다. 일부 양태에서, 뉴클레오타이드 유사체 중 적어도 하나는 잠금 핵산(LNA)이고; 예를 들어, 뉴클레오타이드 유사체 중 적어도 3개 또는 적어도 4개, 또는 적어도 5개, 또는 적어도 6개, 또는 적어도 7개 또는 8개가 LNA일 수 있다. 일부 양태에서, 모든 뉴클레오타이드 유사체는 LNA일 수 있다.
- [0307] 일부 양태에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체(예를 들어, LNA) 및 DNA 단위 둘 모두를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 뉴클레오타이드 유사체(바람직하게는 LNA)와 DNA 단위의 조합된 전체는 5 내지 22, 예를 들어 16 내지 18, 또는 16 내지 20, 또는 16 내지 22이다. 일부 양태에서, 뉴클레오타이드 유사체(예를 들어, LNA)와 DNA 단위의 조합된 전체는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22이다.
- [0308] 일부 양태에서, 인접하는 뉴클레오타이드 서열과 같은 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체(LNA)로 구성되고 나머지 뉴클레오타이드 단위는 DNA 단위이다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 LNA 뉴클레오타이드 유사체 및 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드(예컨대 RNA 또는 DNA, 가장 바람직하게는 DNA 뉴클레오타이드)만을 포함하며, 선택적으로 포스포로티오에이트와 같은 변형된 인터뉴클레오타이드 연결을 갖는다.
- [0309] 뉴클레오타이드로만 구성된 특정 뉴클레오타이드 서열 모티프 또는 뉴클레오타이드 서열을 언급할 때, 그 서열에 의해 정의되는 본 개시내용의 올리고머는 올리고머/표적 듀플렉스의 듀플렉스 안정성/ T_m 을 높이는 LNA 단위 또는 다른 뉴클레오타이드 유사체(즉, 친화성 증강 뉴클레오타이드 유사체)와 같은 상기 서열에 존재하는 하나 이상의 뉴클

레오티드 대신에 상응하는 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있음을 인식할 것이다.

[0310] **Tm 결정:** 올리고뉴클레오티드 및 RNA 표적(PO) 듀플렉스를 500ml RNase-비함유 물에서 3mM로 희석하고 500ml 2x Tm-완충액(200mM NaCl, 0.2mM EDTA, 20mM 인산나트륨, pH 7.0)과 혼합한다. 용액을 95℃로 3분 동안 가열한 다음 실온에서 30분 동안 어닐링한다. 듀플렉스 용융 온도(Tm)는 PE Templab 소프트웨어(Perkin Elmer)를 사용하여 Peltier 온도 프로그래머 PTP6이 장착된 Lambda 40 UV/VIS 스펙트로포토미터에서 측정된다. 온도는 약 20℃에서 약 95℃로 올린 다음 약 25℃로 내려 260nm에서 흡수를 기록한다. 용융 및 어닐링 둘 모두의 1차 도함수 및 로컬 최대값을 사용하여 듀플렉스 Tm을 평가한다.

[0311] 일부 양태에서, 올리고머의 뉴클레오티드 서열과 표적 서열 사이의 임의의 불일치는 친화성 증강 뉴클레오티드 유사체 외부의 영역, 예컨대 갭머 디자인 섹션에서 언급된 영역 Y'에서 및/또는 올리고뉴클레오티드 및/또는 인접하는 뉴클레오티드 서열에 대해 5' 또는 3'인 영역에서 DNA 뉴클레오티드와 같은, 비변형된 위치에서 발견된다.

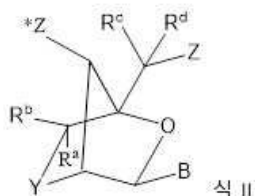
[0312] II.eLNA

[0313] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머(예를 들어, ASO)는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함한다. 용어 "잠금 핵산" 및 "LNA"는 리보스 고리에서 2'와 4' 위치 사이에 가교를 포함하는 임의의 바이사이클릭 뉴클레오티드 유사체, 즉 2'에서 4' 바이사이클릭 뉴클레오티드 유사체를 지칭한다. LNA는 문헌에서 때때로 BNA(가교된 핵산 또는 바이사이클릭 핵산)로 지칭되고 두 용어는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 용어 LNA는 일반적으로 LNA 단량체를 지칭한다. 용어 "LNA 올리고뉴클레오티드"는 이러한 바이사이클릭 뉴클레오티드 유사체를 하나 이상 함유하는 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 갭머와 같은 ASO)를 지칭한다. 일부 양태에서, 바이사이클릭 뉴클레오티드 유사체는 LNA 뉴클레오티드이고, 따라서 이들 용어는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 이러한 양태에서, 둘 모두는 리보스 당 고리의 C2'와 C4' 사이에 링커 그룹(예컨대 브릿지)의 존재를 특징으로 한다.

[0314] 일부 양태에서, 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 베타-D-옥시-LNA 둘 모두, 및 다음 LNA 단위 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 베타-D 또는 알파-L 배열 또는 이의 조합인 티오-LNA, 아미노-LNA, 옥시-LNA, 5'-메틸-LNA 및/또는 ENA.

[0315] 일부 양태에서, 모든 LNA 시토신 단위는 5'-메틸-시토신이다. 일부 양태에서, 제1 영역(X')에 존재하는 적어도 하나의 뉴클레오티드 유사체는 바이사이클릭 뉴클레오티드 유사체이다. 일부 양태에서, 제1 영역(X')에 존재하는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개의 뉴클레오티드 유사체는 바이사이클릭 뉴클레오티드 유사체이다. 따라서, 일부 양태에서, 영역 Y'의 DNA 및/또는 RNA 뉴클레오티드를 제외한 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드에서의 모든 뉴클레오티드는 당 변형된 뉴클레오티드 유사체, 예를 들어 바이사이클릭 뉴클레오티드 유사체, 예컨대 LNA(예를 들어, 베타-D-X-LNA 또는 알파-L-X-LNA, 여기서 X는 옥시, 아미노 또는 티오임), (R/S) cET, cMOE 또는 5'-Me-LNA를 포함하나 이에 제한되지 않는 본 명세서에 개시된 기타 LNA, 또는 이의 임의의 조합이다.

[0316] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드에 사용되는 LNA는 일반식 II의 구조를 갖는다:

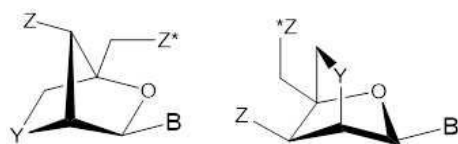


[0317]

[0318] 여기서 Y는 -O-, -CH₂O-, -S-, -NH-, N(R^e) 및/또는 -CH₂-로 구성된 군으로부터 선택되고; Z 및 Z*는 인트뉴클레오티드 연결, RH, 말단기 또는 보호기 중에서 독립적으로 선택되고; B는 자연 또는 비자연 뉴클레오티드 염기 모이어티(핵염기)를 구성하고, 그리고 RH는 수소 및 C1-4-알킬로부터 선택되고; R^a, R^b, R^c, R^d 및 R^e는 선택적으로 독립적으로 수소, 선택적으로 치환된 C1-12-알킬, 선택적으로 치환된 C2-12-알케닐, 선택적으로 치환된 C2-12-알킬, 하이드록시, C1-12-알콕시, C2-12-알콕시알킬, C2-12-알케닐옥시, 카르복시, C1-12-알콕시카르보닐, C1-12-알킬카르보닐, 포르밀, 아릴, 아릴옥시-카르보닐, 아릴옥시, 아릴카르보닐, 헤테로아릴, 헤테로아릴옥시-카르보닐, 헤테로아릴옥시, 헤테로아릴카르보닐, 아미노, 모노- 및 디(C1-6-알킬)아미노, 카르바모일, 모노- 및 디(C1-6-알킬)-아미노-카르보닐, 아미노-C1-6-알킬-아미노카르보닐, 모노- 및 디(C1-6-알킬)아미노-C1-6-알킬-

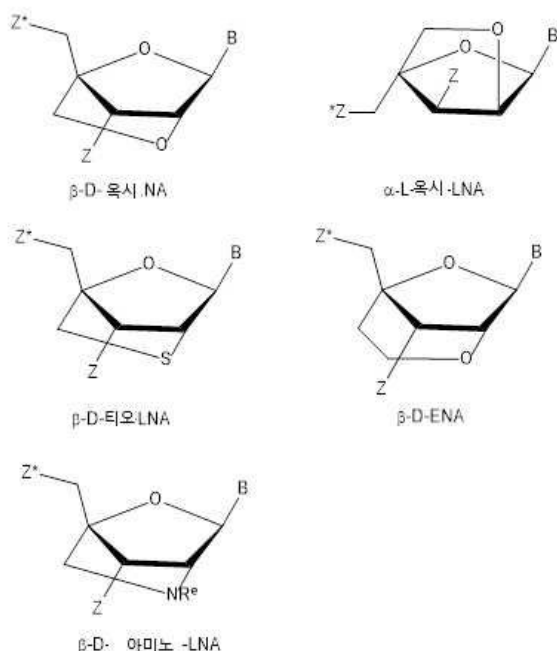
아미노카르보닐, C1-6-알킬-카르보닐아미노, 카르바미도, C1-6-알카노일옥시, 술포노, C1-6-알킬술포닐옥시, 니트로, 아지도, 술폰, C1-6-알킬티오, 할로젠, DNA 인터칼레이터, 광화학적으로 활성화된 기, 열화학적으로 활성화된 기, 킬레이트기, 리포터기 및 리간드로 구성된 군으로부터 선택되며, 여기서 아릴 및 헤테로아릴은 선택적으로 치환될 수 있고 여기서 2개의 같은 자리 치환기 R^a 및 R^b 는 함께 선택적으로 치환된 메틸렌($=CH_2$)을 나타낼 수 있고; RH는 수소 및 C1-4-알킬로부터 선택된다.

[0319] 일부 양태에서 R^a , R^b , R^c , R^d 및 R^e 는 선택적으로 수소 및 C1-6 알킬, 예컨대 메틸로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된다. 모든 키랄 중심에 대해 비대칭 그룹은 R 또는 S 배향에서 발견될 수 있으며, 예를 들어, 2개의 예시적인 입체화학적 이성질체는 다음과 같이 예시될 수 있는 베타-D 및 알파-L 이소형을 포함한다:



[0320]

[0321] 구체적인 예시적인 LNA 단위는 아래에 도시되어 있다:



[0322]

[0323] 용어 "티오-LNA"는 상기 일반식에서 Y가 S 또는 $-CH_2-S-$ 로부터 선택되는 잠금 뉴클레오타이드를 포함한다. 티오-LNA는 베타-D 및 알파-L 배열 둘 모두로 될 수 있다.

[0324] 용어 "아미노-LNA"는 상기 일반식에서 Y가 $-N(H)-$, $N(R)-$, $CH_2-N(H)-$ 및 $-CH_2-N(R)-$ 로부터 선택되는 잠금 뉴클레오타이드를 포함하며 여기서 R은 수소 및 C1-4-알킬로부터 선택된다. 아미노-LNA는 베타-D 및 알파-L 배열 둘 모두로 될 수 있다.

[0325] 용어 "옥시-LNA"는 상기 일반식에서 Y가 $-O-$ 를 나타내는 잠금 뉴클레오타이드를 포함한다. 옥시-LNA는 베타-D 및 알파-L 배열 둘 모두로 될 수 있다.

[0326] 용어 "ENA"는 상기 일반식에서 Y가 $-CH_2-O-$ 인 잠금 뉴클레오타이드를 포함한다(여기서 $-CH_2-O-$ 의 산소 원자는 염기 B에 대해 2'-위치에 부착됨). R^e 는 수소 또는 메틸이다.

[0327] 일부 예시적인 양태에서 LNA는 베타-D-옥시-LNA, 알파-L-옥시-LNA, 베타-D-아미노-LNA 및 베타-D-티오-LNA로부터 선택되고, 특히 베타-D-옥시-LNA이다.

[0328] 본 명세서에서 사용되는 "바이사이클릭 뉴클레오시드"는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 변형된 뉴클레오시드를 지칭한다. 바이사이클릭 뉴클레오시드의 예는 제한 없이 4' 및 2' 리보실 고리 원자 사이에 브릿지를 포

합하는 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 양태에서, 본 명세서에서 제공되는 화합물은 하나 이상의 바이사이클릭 뉴클레오시드를 포함하며 여기서 브릿지는 4'에서 2' 바이사이클릭 뉴클레오시드를 포함한다. 이러한 4'에서 2' 바이사이클릭 뉴클레오시드의 예는 하기 식 중 하나를 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 4'-(CH₂)-O-2'(LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' 및 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2*, 및 이의 유사체(본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된 미국 특허 번호 7,399,845 참고); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2', 및 이의 유사체(본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된 PCT 공개 WO2009/006478 참고); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2', 및 이의 유사체(본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된 PCT 공개 WO2008/150729 참고); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된 미국 특허 출원 공개 US2004/0171570 참고); 4'-CH₂-N(R)-O-2', 여기서 R은 H, C1-C10 알킬 또는 보호기임(본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된 미국 특허 번호 7,427,672 참고); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'(본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된 Chatopadhyaya 등, J. Org. Chem., 2009, 74:118-134 참고); 및 4'-CH₂-C(=CH₂)-2', 및 이의 유사체(본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된 PCT 공개 WO 2008/154401 참고). 또한, 예를 들어: Singh 등, Chem. Commun., 1998, 4:455-456; Koshkin 등, Tetrahedron, 1998, 54:3607-3630; Wahlestedt 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97:5633-5638; Kumar 등, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8:2219-2222; Singh 등, J. Org. Chem., 1998, 63:10035-10039; Srivastava 등, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129:8362-8379; Elayadi 등, Curr. Opinion Inven. Drugs, 2001, 2:558-561; Braasch 등, Chem. Biol, 2001, 8:1-7; Oram 등, Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3:239-243; 미국 특허 번호 U.S. 6,670,461, 7,053,207, 6,268,490, 6,770,748, 6,794,499, 7,034,133, 6,525,191, 7,399,845; 공개된 PCT 공개 WO2004/106356, WO94/14226, WO2005/021570, 및 WO2007/134181; 미국 특허 출원 공개 US2004/0171570, US2007/0287831, 및 US2008/0039618; 및 미국 특허 출원 번호 12/129,154, 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787, 및 61/099,844; 및 PCT 국제 출원 번호 PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154, 및 PCT/US2008/068922를 참고하며, 이들 모두는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0329]

전술한 바이사이클릭 뉴클레오시드의 각각은 예를 들어 α-L-리보푸라노스 및 베타-D-리보푸라노스를 포함하는 하나 이상의 입체화학적 당 배열을 갖도록 제조될 수 있다(예를 들어, PCT 공개 WO 99/14226 참고). 일부 양태에서, LNA 뉴클레오시드의 바이사이클릭 당 모이어티는 펜토푸라노실 당 모이어티의 4' 및 2' 위치 사이에 적어도 하나의 브릿지를 갖는 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않으며 여기서 이러한 브릿지는 독립적으로 -[C(R^a)(R^b)]-, -C(R^a)=C(R^b)-, -C(R^a)=N-, -C(=NR^a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R^a)₂-, -S(=O)_x-, 및 -N(R^a)-로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2 내지 4개의 연결된 기를 포함하며; 여기서: x는 0, 1 또는 2이고; n은 1, 2, 3 또는 4이고; 각각의 R^a 및 R^b는 독립적으로 H, 보호기, 하이드록실, C1-C12 알킬, 치환된 C1-C12 알킬, C2-C12 알케닐, 치환된 C2-C12 알케닐, C2-C12 알키닐, 치환된 C2-C12 알키닐, C5-C20 아릴, 치환된 C5-C20 아릴, 헤테로사이클 라디칼, 치환된 헤테로사이클 라디칼, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, C5-C7 지환족 라디칼, 치환된 C5-C7 지환족 라디칼, 할로젠, OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, COOJ1, 아실(C(=O)-H), 치환된 아실, CN, 술폰(S(=O)₂-J1), 또는 술폰실(S(=O)-J1)이며, 여기서 각각의 J1 및 J2는 독립적으로 H, C1-C6 알킬, 치환된 C1-C12 알킬, C2-C12 알케닐, 치환된 C2-C12 알케닐, C2-C12 알키닐, 치환된 C2-C12 알키닐, C5-C20 아릴, 치환된 C5-C20 아릴, 아실(C(=O)-H), 치환된 아실, 헤테로사이클 라디칼, 치환된 헤테로사이클 라디칼, C1-C12 아미노알킬, 치환된 C1-C12 아미노알킬, 또는 보호기이다.

[0330]

일부 양태에서, 바이사이클릭 당 모이어티의 브릿지는 -[C(R^a)(R^b)]_n-, -[C(R^a)(R^b)]_n-O-, -C(R^a)(R^b)-N(R)-O- 또는, -C(R^a)(R^b)-O-N(R)-이다. 일부 양태에서, 브릿지는 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2', 및 4'-CH₂-N(R)-O-2'-이며, 여기서 각 R은 독립적으로 H, 보호기, 또는 C1-C12 알킬이다.

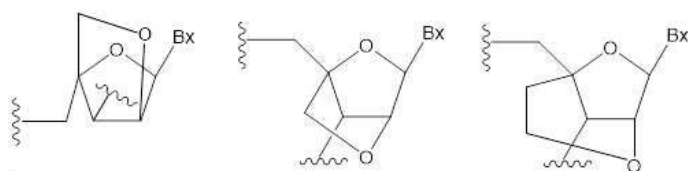
[0331]

일부 양태에서, 바이사이클릭 뉴클레오시드는 이성질체의 배열에 의해 추가로 정의된다. 예를 들어, 4'-2' 메틸렌-옥시 브릿지를 포함하는 뉴클레오시드는 α-L 배열 또는 β-D 배열로 될 수 있다. 이전에는 α-L-메틸렌옥시(4'-CH₂-O-2') BNA가 안티센스 활성을 나타내는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 안으로 통합되었다. Frieden 등 (2003) Nucleic Acids Research 21:6365-6372) 참고.

[0332]

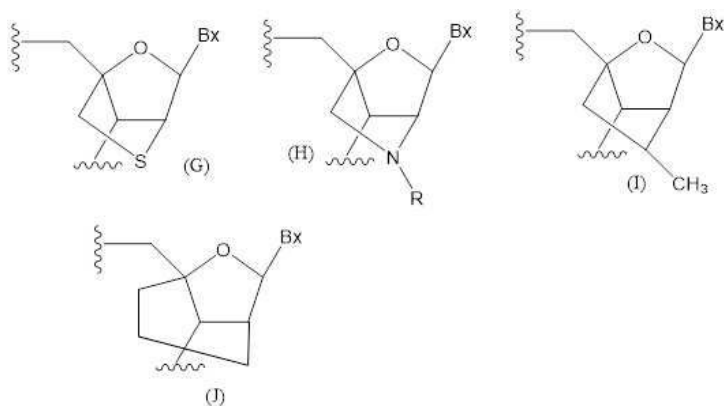
일부 양태에서, 바이사이클릭 뉴클레오시드는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

- [0333] (A) α -L-메틸렌옥시(4'-CH₂-O-2') BNA,
- [0334] (B) β -D-메틸렌옥시(4'-CH₂-O-2') BNA,
- [0335] (C) 에틸렌옥시(4'-(CH₂)₂-O-2') BNA,
- [0336] (D) 아미노옥시(4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA,
- [0337] (E) 옥시아미노(4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA,
- [0338] (F) 메틸(메틸렌옥시)(4'-CH(CH₃)-O-2') BNA,
- [0339] (G) 메틸렌-티오(4'-CH₂-S-2') BNA,
- [0340] (H) 메틸렌-아미노(4'-CH₂-N(R)-2') BNA,
- [0341] (I) 메틸 카르보사이클릭(4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA, 및
- [0342] (J) 하기에 묘사된 바와 같은 프로필렌 카르보사이클릭(4'-(CH₂)₃-2') BNA.



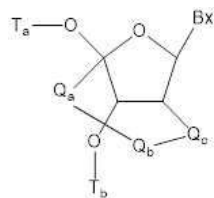
[0343]

[0344] 여기서 Bx는 염기 모이어티이고 R은 독립적으로 H, 보호기 또는 C1-C2 알킬이다.



[0345]

[0346] 일부 양태에서, 바이사이클릭 뉴클레오시드는 하기 식에 의해 정의된다:



[0347]

[0348] 여기서:

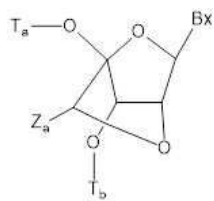
[0349] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이고;

[0350] -Qa-Qb-Qc는 -CH₂-N(Rc)-CH₂-, -C(=O)-N(Rc)-CH₂-, -CH₂-O-N(Rc)-, -CH₂-N(Rc)-O-, 또는 -N(Rc)-O-CH₂이고;

[0351] Rc는 C1-C12 알킬 또는 아미노 보호기이고; 그리고,

[0352] Ta 및 Tb는 각각 독립적으로 H, 하이드록실 보호기, 접합체 기, 반응성 인기, 인 모이어티 또는 지지 매질에 대한 공유 부착이다.

[0353] 일부 양태에서, 바이사이클릭 뉴클레오시드는 하기 식에 의해 정의된다:



[0354]

[0355] 여기서:

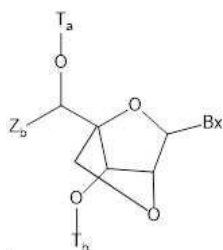
[0356] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이고;

[0357] Ta 및 Tb는 각각 독립적으로 H, 하이드록실 보호기, 접합체 기, 반응성 인기, 인 모이어티 또는 지지 매질에 대한 공유 부착이고; 그리고,

[0358] Za는 C1-C6 알킬, C2-C6 알케닐, C2-C6 알키닐, 치환된 C1-C6 알킬, 치환된 C2-C6 알케닐, 치환된 C2-C6 알키닐, 아실, 치환된 아실, 치환된 아미드, 티올 또는 치환된 티오이다.

[0359] 일부 양태에서, 각각의 치환된 기는 독립적으로 할로겐, 옥소, 하이드록실, OJc, NJd, SJc, N₃, OC(=X)Jc 및 NJeC(=X)NJcJd로부터 독립적으로 선택되는 치환된 기로 모노 또는 폴리 치환되며, 여기서 각각의 Jc, Jd 및 Je는 독립적으로 H, C1-C6 알킬 또는 치환된 C1-C6 알킬이고 X는 O 또는 NJc이다.

[0360] 일부 양태에서, 바이사이클릭 뉴클레오시드는 하기 식에 의해 정의된다:



[0361]

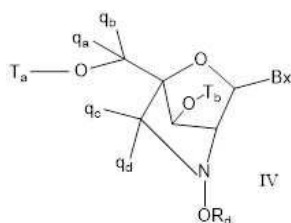
[0362] 여기서:

[0363] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이고;

[0364] Ta 및 Tb는 각각 독립적으로 H, 하이드록실 보호기, 접합체 기, 반응성 인기, 인 모이어티 또는 지지 매질에 대한 공유 부착이고; 그리고,

[0365] Rd는 C1-C6 알킬, C2-C6 알케닐, C2-C6 알키닐, 치환된 C1-C6 알킬, 치환된 C2-C6 알케닐, 치환된 C2-C6 알키닐 또는 치환된 아실(C(=O)-)이다.

[0366] 일부 양태에서, 바이사이클릭 뉴클레오시드는 하기 식에 의해 정의된다:



[0367]

[0368] 여기서:

[0369] Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이고;

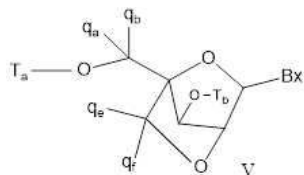
[0370] Ta 및 Tb는 각각 독립적으로 H, 하이드록실 보호기, 접합체 기, 반응성 인기, 인 모이어티 또는 지지 매질에 대한 공유 부착이고;

[0371] Rd는 C1-C6 알킬, 치환된 C1-C6 알킬, C2-C6 알케닐, 치환된 C2-C6 알케닐, C2-C6 알키닐, 치환된 C2-C6 알키

닐이고;

[0372] 각각의 qb, qc 및 qd는 독립적으로 H, 할로젠, C-C6 알킬, 치환된 C1-C6 알킬, C2-Ce 알케닐, 치환된 C2-C6 알케닐, C2-C6 알키닐, 또는 치환된 C2-C6 알키닐, C1-C6 알콕실, 치환된 C1-C6 알콕실, 아실, 치환된 아실, C1-C6 아미노알킬, 또는 치환된 C1-C6 아미노알킬이다;

[0373] 일부 양태에서, 바이사이클릭 뉴클레오시드는 다음 식에 의해 정의된다:



[0374]

여기서:

[0375]

Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이고;

[0376]

[0377] Ta 및 Tb는 각각 독립적으로 H, 하이드록실 보호기, 접합체 기, 반응성 인기, 인 모이어티 또는 지지 매질에 대한 공유 부착이고;

[0377]

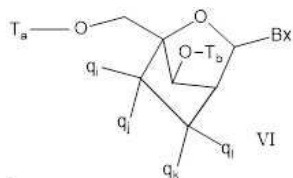
[0378] qa, qb, qc 및 qf는 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C1-C12 알킬, 치환된 C1-C12 알킬, C2-C12 알케닐, 치환된 C2-C12 알케닐, C2-C12 알키닐, 치환된 C2-C12 알키닐, C1-C12 알콕시, 치환된 C1-C12 알콕시, OJj, SJj, SOJj, SO2Jj, NJjJk, N₃, CN, C(=O)OJj, C(=O)NJj Jk, C(=O)Jj, O-C(=O)NJj Jk, N(H)C(=NH)NJj Jk, N(H)C(=O)NJj Jk, 또는 N(H)C(=S)NJjJk이고;

[0378]

[0379] 또는 qe 및 qf는 함께 =C(qg)(qh)이며 여기서 qg 및 qh는 각각 독립적으로 H, 할로젠, C1-C12 알킬 또는 치환된 C1-C12 알킬이다.

[0379]

[0380] 일부 양태에서, 바이사이클릭 뉴클레오시드는 다음 식에 의해 정의된다:



[0381]

여기서:

[0382]

Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이고;

[0383]

[0384] Ta 및 Tb는 각각 독립적으로 H, 하이드록실 보호기, 접합체 기, 반응성 인기, 인 모이어티 또는 지지 매질에 대한 공유 부착이고; 각 qj, qj, qk 및 ql은 독립적으로 H, 할로젠, C1-C12 알킬, 치환된 C1-C12 알킬, C2-C12 알케닐, 치환된 C2-C12 알케닐, C2-C12 알키닐, 치환된 C2-C12 알키닐, C1-C12 알콕실, 치환된 C2-C12 알콕실, OJj, SJj, SOJj, SO2Jj, NJjJk, N₃, CN, C(=O)OJj, C(=O)NJjJk, C(=O)Jj, O-C(=O)NJjJk, N(H)C(=NH)NJjJk, N(H)C(=O)NJjJk, 또는 (H)C(=S)NJjJk이고;

[0384]

[0385] 그리고 qi 및 qj 또는 ql 및 qk는 함께 =C(qg)(qh)이며 여기서 qg 및 qh는 각각 독립적으로 H, 할로젠, C1-C12 알킬 또는 치환된 C1-C6 알킬이다.

[0385]

[0386] 4'-(CH₂)₃-2' 브릿지 및 알케닐 유사체, 브릿지 4'-CH=CH-CH₂-2'를 갖는 하나의 카르보사이클릭 바이사이클릭 뉴클레오시드는 Freier 등 (1997) Nucleic Acids Research 25:4429- 4443 및 Albaek 등 (2006) J. Org. Chem. 71:7731-77 '40에 기재되어 있다.

[0386]

[0387] 본 명세서에 사용된 바와 같이 "4'-2' 바이사이클릭 뉴클레오시드" 또는 "4'에서 2' 바이사이클릭 뉴클레오시드"는 2' 탄소 원자와 4' 탄소 원자를 연결하는 브릿지를 포함하는 푸라노스 고리를 포함하는 바이사이클릭 뉴클레오시드를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "모노사이클릭 뉴클레오시드"는 바이사이클릭 당 모이어티가 아닌 변형된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다. 일부 양태에서, 뉴클레오시드의 당 모이어티 또는 당 모이어티 유사체는 임의의 위치에서 변형되거나 치환될 수 있다. 본 명세서에 사용된

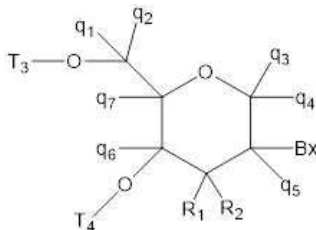
[0387]

바와 같이 "2'-변형 당"은 2' 위치에서 변형된 푸라노실 당을 의미한다. 일부 양태에서, 이러한 변형은 치환 및 비치환된 알콕시, 치환 및 비치환된 티오알킬, 치환 및 비치환된 아미노 알킬, 치환 및 비치환된 알킬, 치환 및 비치환된 알릴, 및 치환 및 비치환된 알키닐을 포함하지만 이에 제한되지 않는 할라이드로부터 선택되는 치환기를 포함한다. 일부 양태에서, 2' 변형은 $O[(CH_2)_nO]mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$, 및 $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ 를 포함하지만 이에 제한되지 않는 치환기로부터 선택되며, 여기서 n 및 m은 1 내지 약 10이다.

[0388] 다른 2'-치환기 그룹은 또한 C1-C12 알킬; 치환된 알킬; 알케닐; 알키닐; 알카릴; 아르알킬; 0-알크아릴 또는 0-아르알킬; SH; SCH₃; OCN; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; 헤테로사이클로알킬; 헤테로사이클로알카릴; 아미노알킬아미노; 폴리알킬아미노; 치환된 실릴; R; 절단기; 리포터기; 인터칼레이터; 약동학적 특성을 개선하기 위한 기; 및 안티센스 화합물의 약력학적 특성을 개선하기 위한 기 및 유사한 특성을 갖는 기타 치환기로부터 선택될 수 있다.

[0389] 일부 양태에서, 변형된 뉴클레오시드는 2'-MOE 측쇄를 포함한다. 이러한 2'-MOE 치환은 변형되지 않은 뉴클레오시드 및 2'-O-메틸, 0-프로필 및 0-아미노프로필과 같은 기타 변형된 뉴클레오시드에 비해 개선된 결합 친화성을 갖는 것으로 기술되었다. 2'-MOE 치환기를 갖는 올리고뉴클레오티드는 *생체내* 사용을 위한 유전자 발현의 강력한 안티센스 억제자이다.

[0390] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "변형된 테트라하이드로피란 뉴클레오시드" 또는 "변형된 THP 뉴클레오시드"는 정상 뉴클레오시드(당 대체물)에서 펜토포라노실 잔기가 치환된 6-원 테트라하이드로피란 "당"을 갖는 뉴클레오시드를 의미한다. 변형된 THP 뉴클레오시드는 당업계에서 핵시톨 핵산(HNA), 알트리톨 핵산(ANA), 만니톨 핵산(MNA), 플루오로 HNA(F-HNA)로 지칭되는 것, 또는 하기 식에 의해 정의되는 이들 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:



[0391]

여기서:

[0392]

Bx는 헤테로사이클릭 염기 모이어티이고;

[0393]

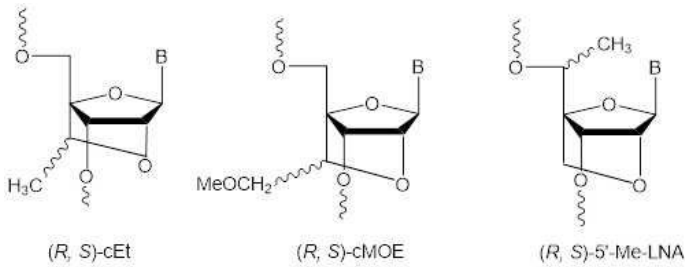
[0394] T3 및 T4는 각각 독립적으로 테트라하이드로피란 뉴클레오시드 유사체를 안티센스 화합물에 연결하는 인터뉴클레오시드 연결기이거나 T3 및 T4 중 하나는 테트라하이드로피란 뉴클레오시드 유사체를 안티센스 화합물에 연결하는 인터뉴클레오시드 연결기이고 T3 및 T4 중 다른 하나는 H, 하이드록실 보호기, 연결된 접합체 기, 또는 5' 또는 3'-말단기이고;

[0395] q1, q2, q3, q4, q5, q6 및 q7은 각각 독립적으로 H, C1-C6 알킬, 치환된 C1-C6 알킬, C2-C6 알케닐, 치환된 C2-C6 알케닐, C2-C6 알키닐, 또는 치환된 C2-C6 알키닐이고; R₁ 및 R₂ 중 하나는 수소이고 다른 하나는 할로젠, 치환 또는 비치환된 알콕시, NJ, J2, SJ, N₃, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2, 및 CN으로부터 선택되고, 여기서 X는 O, S 또는 NJ1이고, 각각의 J1, J2 및 J3은 독립적으로 H 또는 C1-C6 알킬이다. 일부 양태에서, qm, qn, qp, qr, qs, qt 및 qu가 각각 H인 상기 식의 변형된 THP 뉴클레오시드가 제공된다. 일부 양태에서, qm, qn, qp, qr, qs, qt 및 qu 중 적어도 하나는 H 이외의 것이다. 일부 양태에서, qm, qn, qp, qr, qs, qt 및 qu 중 적어도 하나는 메틸이다. 일부 양태에서, R₁ 및 R₂ 중 하나가 F인 상기 식의 THP 뉴클레오시드가 제공된다. 일부 양태에서, R₁은 플루오로이고 R₂는 H이거나, R₁은 메톡시이고 R₂는 H이거나, 또는 R₁은 메톡시에톡시이고 R₂는 H이다.

[0396] 본 명세서에 사용된 바와 같이 "2'-변형된" 또는 "2'-치환된"은 H 또는 OH 이외의 2' 위치에서 치환기를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다. 2'-변형된 뉴클레오시드는 알릴, 아미노, 아지도, 티오, 0-알릴, 0-C1-C10 알킬, -OCF₃, 0-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, 0-(CH₂)₂-O- N(Rm)(Rn), 또는 0-CH₂-C(=O)-N(Rm)(Rn)과

같은 비가교 2' 치환기를 갖는 뉴클레오시드를 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 여기서 각각의 R_m 및 R는 독립적으로 H 또는 치환 또는 비치환된 C1-C10 알킬이다. 2'-변형된 뉴클레오시드는 예를 들어 당의 다른 위치 및/또는 핵염기에서 다른 변형을 추가로 포함할 수 있다.

[0397] 일부 양태에서, LNA 단위는 다음 그룹으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0398]

[0399] LNA 또는 2'-치환된 당과 같은, 올리고머에 친화성-중강 뉴클레오티드 유사체의 혼입은 특이적으로 결합하는 올리고머의 크기가 감소되도록 할 수 있고 비특이적이거나 비정상적인 결합이 발생하기 전에 올리고머의 크기로 상한을 줄일 수 있다.

[0400] II.f RNase 동원

[0401] 본 개시내용의 올리고머 화합물은 표적 mRNA의 비 RNase 매개된 분해를 통해, 예컨대 번역의 입체 장애 또는 다른 방법에 의해 기능할 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 RNase H와 같은 엔도리보뉴클레아제(RNase)를 동원할 수 있다. 영역 A 또는 인접하는 뉴클레오티드 서열과 같은 일부 올리고머에서, 상보성인 표적 RNA와 듀플렉스로 형성될 때 RNase(예컨대 DNA 단위)를 동원할 수 있는, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16개의 인접하는 뉴클레오티드를 포함하는, 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개의 인접하는 뉴클레오티드 단위, 예컨대 적어도 8 또는 적어도 9개의 인접하는 뉴클레오티드 단위(잔기)를 포함한다. RNase를 동원할 수 있는 인접하는 서열은 본 명세서에 기재된 바와 같은 캡머의 맥락에서 언급되는 바와 같이 영역 Y'일 수 있다. 일부 양태에서 영역 Y'와 같은 RNase를 동원할 수 있는 인접하는 서열의 크기는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 단위와 같이 더 높을 수 있다.

[0402] 올리고머는 상보성 RNA 표적과 함께 제공될 때, 그것이 pmol/1/분으로 측정된 바와 같은 초기 비율이 적어도 1%, 예컨대 적어도 5%, 예컨대 적어도 10% 또는 20% 초과 DNA 단독 올리고뉴클레오티드를 사용하여 결정된 초기 비율을 가져, 예를 들어 EP1222309에 제공된 방법론을 사용하여, 올리고뉴클레오티드에서의 모든 단량체 사이에 포스포로티오에이트 연결 기를 갖는, 무 2' 치환을 갖는, 동일한 염기 서열을 갖지만 DNA 단량체만 함유하는 경우, RNase H를 동원할 수 있는 것으로 간주된다.

[0403] 일부 양태에서, 올리고머는 상보성 RNA 표적 및 RNaseH와 함께 제공될 때, pmol/1/분으로 측정된 바와 같은 RNaseH 초기 비율이, 예를 들어 EP1222309에 제공된 방법론을 사용하여, 올리고뉴클레오티드에서의 모든 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 연결 기를 갖는, 무 2' 치환을 갖는, 등가 DNA 단독 올리고뉴클레오티드를 사용하여 결정된 초기 비율의 1% 미만, 예컨대 5% 미만, 예컨대 10% 미만 또는 20% 미만인 경우 본질적으로 RNaseH를 동원할 수 없는 것으로 간주된다.

[0404] 다른 양태에서, 올리고머는 상보성 RNA 표적 및 RNaseH와 함께 제공될 때, pmol/1/분으로 측정된 바와 같은 RNaseH 초기 비율이, 예를 들어 EP1222309에 제공된 방법론을 사용하여, 올리고뉴클레오티드에서의 모든 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 연결 기를 갖는, 무 2' 치환을 갖는, 등가 DNA 단독 올리고뉴클레오티드를 사용하여 결정된 초기 비율의 적어도 20%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 80%인 경우 RNaseH를 동원할 수 있는 것으로 간주된다.

[0405] 전형적으로, 상보성 표적 RNA와 함께 듀플렉스로 형성될 때 RNase를 동원할 수 있는 인접하는 뉴클레오티드 단위를 형성하는 올리고머의 영역은 RNA 표적과 함께 듀플렉스 같은 DNA/RNA를 형성하는 뉴클레오티드 단위로 구성된다. 제1 영역과 같은 본 개시내용의 올리고머는 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체 둘 모두를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, LNA 캡머의 형태로 된다.

[0406] II.g 캡머 디자인

[0407] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 LNA 캡머이다. 캡머 올리고머는 본 명세서에서 영역 Y'(Y')로 지칭되

는, 적어도 6 또는 7개의 DNA 뉴클레오타이드의 영역과 같은, RNaseH와 같은 RNase를 동원할 수 있는 뉴클레오타이드의 인접하는 스트레치를 포함하는 올리고머이며, 여기서 영역 Y'는 RNase를 동원할 수 있는 뉴클레오타이드의 인접하는 스트레치에 대한 1-6개의 뉴클레오타이드 유사체 5' 및 3'과 같은 친화성 증강 뉴클레오타이드 유사체의 영역에 의해 5' 및 3' 둘 모두에 축적된다 - 이들 영역은 영역 X'(X') 및 Z'(Z')로 각각 지칭된다. X' 및 Z' 영역은 갭머의 영역이라고도 할 수 있다. 갭머의 예는 예를 들어 WO2004/046160, WO2008/113832 및 WO2007/146511에 개시되어 있다.

[0408] 일부 양태에서, RNase를 동원할 수 있는 단량체는 DNA 단량체, 알파-L-LNA 단량체, C4' 알킬화된 DNA 단량체 및 UNA(연결되지 않은 핵산) 뉴클레오타이드로 구성된 그룹에서 선택된다. UNA는 전형적으로 리보스의 C2-C3 C-C 결합이 제거되어 잠금 해제된 "당" 잔기를 형성하는 잠금 해제된 핵산이다. 일부 양태에서, LNA 갭머는 식 (5'에서 3'), X'-Y'-Z'의 (폴리)뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서; 영역 X'(X')(5' 영역)은 LNA 단위와 같은 1-6개의 뉴클레오타이드 유사체와 같은, 적어도 하나의 LNA 단위와 같은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체로 이루어지거나 이를 포함하고; 영역 Y'(Y')는 DNA 뉴클레오타이드와 같은 RNase(mRNA 표적과 같은 상보성 RNA 분자와 함께 듀플렉스로 형성될 때)를 동원할 수 있는 적어도 4개 또는 적어도 5개의 인접하는 뉴클레오타이드로 구성되거나 이를 포함하고, 그리고; 영역 Z'(Z')(3' 영역)은 LNA 단위와 같은 1-6개의 뉴클레오타이드 유사체와 같은 적어도 하나의 LNA 단위와 같은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체로 구성되거나 이를 포함한다.

[0409] 일부 양태에서, 영역 X'는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 LNA 단위, 예컨대 2-5개의 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 2-5 LNA 단위, 예컨대 3개 또는 4개의 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 3개 또는 4개의 LNA 단위로 구성되고; 및/또는 영역 Z'는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 뉴클레오타이드 유사체 예컨대 LNA 단위, 예컨대 2-5개의 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 2-5 LNA 단위, 예컨대 3 또는 4개의 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 3 또는 4 LNA 단위로 구성된다.

[0410] 일부 양태에서, Y'는 RNase를 동원할 수 있는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 인접하는 뉴클레오타이드, 또는 RNase를 동원할 수 있는 4-12 또는 6-10 또는 7-9, 예컨대 8개의 인접하는 뉴클레오타이드로 구성되거나 이를 포함한다. 일부 양태에서, 영역 Y'는 적어도 하나의 DNA 뉴클레오타이드 단위, 예컨대 1-12개 DNA 단위, 바람직하게는 4-12개 DNA 단위, 보다 바람직하게는 6-10개 DNA 단위, 예컨대 7-10개 DNA 단위, 가장 바람직하게는 8, 9 또는 10개 DNA 단위로 구성되거나 이를 포함한다. 일부 양태에서, 영역 X'는 3 또는 4개의 뉴클레오타이드 유사체 예컨대 LNA로 구성되고, 영역 X'는 7, 8, 9 또는 10개 DNA 단위로 구성되고, 그리고 영역 Z'는 3 또는 4개 뉴클레오타이드 유사체 예컨대 LNA로 구성된다. 이러한 디자인은 (X'-Y'-Z') 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 3-7-3, 3-7-4, 4-7-3을 포함한다. 일부 양태에서, 갭머는 3-9-4 갭머이다. 일부 양태에서, 갭머는 3-10-3 갭머이다.

[0411] 일부 양태에서, 올리고머, 예를 들어 영역 X'는 총 10, 11, 12, 13 또는 14개의 뉴클레오타이드 단위의 인접하는 뉴클레오타이드 서열로 구성되며, 여기서 인접하는 뉴클레오타이드 서열은 식 (5'-3'), X'-Y'-Z'의 것이거나 이를 포함하며 여기서; X'는 1, 2 또는 3개의 뉴클레오타이드 유사체 단위, 예컨대 LNA 단위로 구성되며; Y'는 상보성 RNA 분자(예컨대 mRNA 표적)와 함께 듀플렉스로 형성될 때 RNase를 동원할 수 있는 7, 8 또는 9개의 인접하는 뉴클레오타이드 단위로 구성되고; Z'는 1, 2 또는 3개의 뉴클레오타이드 유사체 단위 예컨대 LNA 단위로 구성된다.

[0412] 일부 양태에서, X'는 1개의 LNA 단위로 구성된다. 일부 양태에서 X'는 2개의 LNA 단위로 구성된다. 일부 양태에서 X'는 3개의 LNA 단위로 구성된다. 일부 양태에서 Z'는 1개의 LNA 단위로 구성된다. 일부 양태에서 Z'는 2개의 LNA 단위로 구성된다. 일부 양태에서 Z'는 3개의 LNA 단위로 구성된다. 일부 양태에서 Y'는 7개의 뉴클레오타이드 단위로 구성된다. 일부 양태에서 Y'는 8개의 뉴클레오타이드 단위로 구성된다. 일부 양태에서 Y'는 9개의 뉴클레오타이드 단위로 구성된다. 특정 양태에서, 영역 Y'는 10개의 뉴클레오타이드 단량체로 구성된다. 일부 양태에서, 영역 Y'는 1-10개의 DNA 단량체로 이루어지거나 이를 포함한다. 일부 양태에서, Y'는 1-9개의 DNA 단위, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 DNA 단위를 포함한다. 일부 양태에서 Y'는 DNA 단위로 구성된다. 일부 양태에서, Y'는 알파-L 배열에서의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 LNA 단위와 같은 알파-L 배열에 있는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함한다. 일부 양태에서, Y'는 적어도 하나의 알파-L-옥시 LNA 단위를 포함하거나 여기서 알파-L-배열에서의 모든 LNA 단위는 알파-L-옥시 LNA 단위이다. 일부 양태에서, X'-Y'-Z'에 존재하는 뉴클레오타이드의 수는 (뉴클레오타이드 유사체 단위 - 영역 Y' - 뉴클레오타이드 유사체 단위): 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4, or; 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1, 2-10-3, 또는 3-10-2로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, X'-Y'-Z'에서 뉴클레오타이드 수는 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3,

2-7-3, 3-7-2, 3-7-4, 및 4-7-3으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0413] 특정 양태에서, 각각의 영역 X' 및 Y'는 3개의 LNA 단량체로 구성되고, 영역 Y'는 8 또는 9 또는 10개의 뉴클레오시드 단량체, 바람직하게는 DNA 단량체로 구성된다. 일부 양태에서, X' 및 Z' 둘 모두는 각각 2개의 LNA 단위로 구성되고, Y'는 8 또는 9개의 뉴클레오타이드 단위, 바람직하게는 DNA 단위로 구성된다. 일부 양태에서, 다른 갭머 디자인은 영역 X' 및/또는 Z'가 3, 4, 5 또는 6개의 뉴클레오시드 유사체, 예컨대 2'-O-메톡시에틸-리보스당(2'-MOE)을 함유하는 단량체 또는 2'-플루오로-데옥시리보스당을 함유하는 단량체로 구성되고, 그리고 영역 Y'가 8, 9, 10, 11 또는 12개의 뉴클레오시드, 예컨대 DNA 단량체로 구성되는 것들을 포함하며, 여기서 영역 X'-Y'-Z'는 3-9-3, 3-10-3, 5-10-5 또는 4-12-4 단량체를 갖는다. 추가의 갭머 디자인은 예를 들어 WO 2007/146511A2에 개시되어 있으며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0414] 일부 양태에서, 본 개시내용의 갭머 올리고머는 서열번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 40에 제시된 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 갭머 올리고머는 서열번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 40에 제시된 서열로 구성된다.

[0415] II.h 인터뉴클레오시드 연결

[0416] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오시드 단량체는 인터뉴클레오시드 연결기를 통해 함께 커플링된다. 각 단량체는 연결기를 통해 3' 인접 단량체에 연결된다. 각 뉴클레오타이드는 또한 연결기를 통해 3' 인접 뉴클레오타이드에 연결된다. 본 개시내용의 맥락에서, 올리고머의 말단에서 5' 단량체는 5' 연결기를 포함하지 않지만, 그것은 5' 말단기 또는 접합을 위한 연결기를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

[0417] 용어 "연결기" 또는 "인터뉴클레오시드 연결"은 2개의 뉴클레오타이드를 함께 공유적으로 커플링할 수 있는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 구체적인 예는 포스포이트기 및 포스포로티오에이트기를 포함한다. 인터뉴클레오시드 연결은 인터뉴클레오시드 연결과 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0418] 적합한 인터뉴클레오시드 연결은 예를 들어 WO2007/031091에 열거된 것을 포함하며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다. 일부 양태에서, 영역 B(존재하는 경우)의 포스포디에스테르 연결(들) 이외에, 인터뉴클레오시드 연결은 그의 정상적인 포스포디에스테르로부터 포스포로티오에이트 또는 보라노포스포이트와 같은, 뉴클레아제 공격에 더 저항성이 있는 것으로 변형될 수 있다. RNase H에 의해 절단될 수 있는 이들 둘은 또한 표적 유전자의 발현을 감소시키는 안티센스 역제의 경로를 허용한다.

[0419] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 보라노포스포이트, 메틸 포스포네이트, 포스포로아미데이트, 또는 이의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 뉴클레오시드 연결을 포함한다. 본 명세서에 제공된 바와 같은 인터뉴클레오시드 연결을 함유하는 적합한 황(S), 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포디티오에이트 또는 이의 조합이 사용될 수 있다. 포스포로티오에이트 인터뉴클레오시드 연결이 또한 특히 갭머, 믹스머, 안티미르 스플라이스 스위칭 올리고머 및 토탈머에서와 같은 제1 영역에 대해 바람직하다.

[0420] 용어 "믹스머"는 자연적으로 및 비자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드 둘 모두를 포함하는 올리고머를 지칭하며, 여기서 갭머, 테일머 및 헤드머와 달리 5개 초과인 인접하는 서열이 없고, 일부 양태에서 4개 이하의 연속하는, 예컨대 3개 이하의 연속하는, 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드, 예컨대 DNA 단위가 있다.

[0421] 용어 "토탈머"는 당-변형된 뉴클레오시드 유사체와 같은 비자연적으로 발생하는 뉴클레오시드만을 포함하는 단일 가닥의 올리고머를 지칭한다.

[0422] 갭머의 경우, 올리고머에서의 인터뉴클레오시드 연결은, 예를 들어 포스포로티오에이트 또는 보라노포스포이트일 수 있어 표적화된 RNA의 RNase H 절단을 허용한다. 개선된 뉴클레아제 저항성 및 기타 이유, 예컨대 제조의 용이성 때문에 포스포로티오에이트가 바람직하다.

[0423] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머의 나머지 인터뉴클레오시드 연결인, 제1 영역과 제2 영역 사이, 그리고 선택적으로 영역 B 내에서의 포스포디에스테르 연결을 제외하고, 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체는 포스포로티오에이트 기의 수단에 의한 서로 연결된다.

[0424] 일부 양태에서, 제1 영역에서의 뉴클레오시드 사이의 모든 인터뉴클레오시드 연결의 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 110%는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 또는 보

라노포스페이트로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 제1 영역에서의 뉴클레오시드 사이의 모든 인터뉴클레오시드 연결의 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65 %, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 100%는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 또는 보라노포스페이트로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0425] 일부 양태에서, 제1 영역에서 뉴클레오시드 사이의 모든 인터뉴클레오시드 연결의 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 약 110%는 포스포로티오에이트이다. 일부 양태에서, 제1 영역의 뉴클레오시드 사이의 모든 인터뉴클레오시드 연결의 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 100%는 포스포로티오에이트이다.

[0426] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 단지 하나의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 3개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 4개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 5개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 6개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 7개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 8개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 9개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 10개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 11개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 12개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 13개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 14개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 15개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 16개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 17개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 18개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 19개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 20개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 21개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[0427] WO09124238은 중성 인터뉴클레오시드 연결에 의해 3' 또는 5' 말단에 부착된 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오시드를 갖는 올리고머 화합물을 지칭한다. 따라서 본 개시내용의 올리고머는 하나 이상의 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, MMI, 아마이드-3, 포름아세탈 또는 티오포름아세탈과 같은 중성 인터뉴클레오시드 연결에 의해 3' 또는 5' 말단에 부착된 적어도 하나의 바이사이클릭 뉴클레오시드를 가질 수 있다. 나머지 연결은 포스포로티오에이트일 수 있다.

[0428] III. 올리고뉴클레오티드 접합체

[0429] 일부 양태에서, 적어도 하나의 비뉴클레오티드 또는 비폴리뉴클레오티드 모이어티(C)를 포함하는 본 개시내용의 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체는, 선택적으로 올리고머 및 접합 모이어티(B 및/또는 Y)의 인접하는 서열 사이에 위치한 링커 영역을 통해 상기 올리고머(A)에 공유적으로 부착되었다.

[0430] 올리고뉴클레오티드와 함께 사용된 대표적인 접합체 모이어티는 스테로이드 분자를 포함하는 친유성 분자(방향족 및 비방향족); 단백질(예를 들어, 항체, 효소, 혈청 단백질); 펩티드; 비타민(수용성 또는 지용성); 중합체(수용성 또는 지용성); 약물, 독소, 리포터 분자 및 수용체 리간드를 포함하는 소분자; 탄수화물 복합체; 핵산 절단 복합체; 금속 킬레이터(예를 들어, 포르피린, 텍사피린, 크라운 에테르 등); 하이브리드 포토뉴클레아제/인터칼레이터를 포함하는 인터칼레이터; 가교제(예를 들어, 광활성, 산화환원 활성), 및 이의 조합 및 유도체를 포함할 수 있다.

[0431] 일부 양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체를 제공한다:

[0432] a. 서열번호: 31의 상응하는 길이에 상보성인 16개 뉴클레오티드의 인접하는 서열을 포함하는 길이가 16-22개

사이의 뉴클레오타이드의 안티센스 올리고머(A)이고, 여기서 상기 안티센스 올리고머는 LNA 캡머임, 및

- [0433] b. 상기 올리고머(A)에 공유결합으로 부착된 적어도 하나의 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티(C).
- [0434] 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머는 간을 표적화하는데, 즉 전신 투여 후 화합물은 간 세포(예컨대 간세포)에 축적된다. 간에 대한 표적화는 접합체 모이어티(C)의 첨가에 의해 크게 증강될 수 있다. 그러나, 올리고머의 효능을 최대화하기 위해 종종 접합체(또는 표적화 모이어티)가 뉴클레오타이드 포스페이트 링커와 같은 생체절단가능한 링커(B)를 통해 올리고머에 연결되는 것이 바람직하다. 따라서 간세포에서 흡수 및 활성을 증강시키는 접합체 모이어티를 사용하는 것이 바람직하다. 활성의 증강은 증강된 흡수로 인한 것일 수 있거나 간세포에서 화합물의 증강된 효능으로 인한 것일 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 또한 안티센스 올리고머, 선택적으로 생체절단가능한 링커, 예컨대 영역 B 및 탄수화물 접합체(영역 C로 지칭될 수 있음)를 포함하는 LNA 올리고머, 예컨대 캡머, 또는 예를 들어 LNA 안티센스 올리고머(본 명세서에서 영역 A로 지칭될 수 있음)의 형태에서의 올리고머성 화합물을 제공한다. LNA 안티센스 올리고머는 길이가 7 내지 30개의 뉴클레오타이드, 예를 들어 길이가 8-26개의 뉴클레오타이드일 수 있고, 적어도 하나의 LNA 단위(뉴클레오타이드)를 포함한다.
- [0435] 일부 양태에서, 접합체는 탄수화물이거나 이를 포함할 수 있거나 탄수화물 군을 포함한다. 일부 양태에서, 탄수화물은 갈락토스, 락토스, n-아세틸갈락토스아민, 만노스 및 만노스-6-포스페이트로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 접합체 기는 만노스 또는 만노스-6-포스페이트이거나 이를 포함할 수 있다. 탄수화물 접합체는 간 및/또는 근육과 같은 광범위한 조직에서 전달 또는 활성을 증강시키는데 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 접합체는 탄수화물 모이어티, 예컨대 GalNAc 모이어티(영역 C로 지칭될 수 있음)의 형태에서의 아시알로당단백질 수용체 표적화 모이어티 접합체 모이어티를 포함한다. 탄수화물 모이어티는, 예를 들어 2, 3, 4 또는 4개의 동일하거나 비동일한 탄수화물 모이어티가 선택적으로 링커 또는 링커들(예컨대 영역 Y)를 통해 올리고머에 공유적으로 연결될 수 있는 것과 같이 다가일 수 있다.
- [0436] 일부 양태에서, 탄수화물 모이어티는 선형 탄수화물 중합체가 아니다. 그러나 탄수화물 모이어티는, 예를 들어 2, 3, 4 또는 4개의 동일하거나 비동일한 탄수화물 모이어티가 선택적으로 링커 또는 링커들을 통해 올리고머에 공유적으로 연결될 수 있는 것과 같이 다가일 수 있다.
- [0437] **III.a GalNAc 접합체 모이어티**
- [0438] 본 개시내용은 본 개시내용의 올리고머 및 아시알로당단백질 수용체 표적화 모이어티 접합체 모이어티, 예컨대 GalNAc 모이어티를 포함하는 접합체를 제공하며, 이는 추가 영역(영역 C로 지칭됨)의 일부를 형성할 수 있다. 본 개시내용은 또한 하기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체를 제공한다:
- [0439] a. 서열번호: 31의 상응하는 길이에 상보성인 16개 뉴클레오타이드의 인접하는 서열을 포함하는 길이가 16-22개 사이의 뉴클레오타이드의 안티센스 올리고머(A)이고, 여기서 상기 안티센스 올리고머는 적어도 하나의 LNA 단위를 포함하는 LNA 캡머임, 및
- [0440] b. 상기 올리고머(A)에 공유결합으로 부착된 적어도 하나의 아시알로당단백질 수용체 표적화 접합체 모이어티(C).
- [0441] 일부 양태에서, 접합체 모이어티(예컨대 제3 영역 또는 영역 C)는 예컨대 갈락토스, 갈락토스아민, N-포르밀-갈락토스아민, N-아세틸갈락토스아민, N-프로피오닐-갈락토스아민, N-n-부타노일-갈락토스아민 및 N-이소부타노일 갈락토스-아민으로 구성된 군으로부터 선택된 아시알로당단백질 수용체 표적화 모이어티를 포함한다. 일부 양태에서 접합체는 N-아세틸갈락토스아민 삼량체와 같은 갈락토스 클러스터를 포함한다. 일부 양태에서, 접합체 모이어티는 1-가, 2-가, 3-가 또는 4-가 GalNAc와 같은 GalNAc(N-아세틸갈락토스아민)를 포함한다.
- [0442] 3가 GalNAc 접합체는 화합물을 간에 표적화하기 위해 사용될 수 있다. GalNAc 접합체는 메틸포스포네이트 및 PNA 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 siRNA와 함께 사용되었다. WO2012/083046은 절단가능한 약동학적 조절자를 포함하는 GalNAc 접합체 모이어티를 갖는 siRNA를 개시하며, 이는 본 개시내용에 사용하기에 적합하며, 바람직한 약동학적 조절자는 C16 소수성 기 예컨대 팔미토일, 헥사데크-8-에노일, 올레일, (9E, 12E)-옥타데카-9,12-디에노일, 디옥타노일 및 C16-C20 아실이다. '046 절단가능한 약동학적 조절자는 또한 콜레스테롤일 수 있다.
- [0443] "표적화 모이어티"(접합체 모이어티)는 갈락토즈, 갈락토스아민, N-포르밀-갈락토스아민, N-아세틸갈락토스아민, N-프로피오닐-갈락토스아민, N-n-부타노일-갈락토스아민,

N-이소-부타노일갈락토스-아민, 갈락토스 클러스터, 및 N-아세틸갈락토스아민 삼량체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 16개 이상의 탄소 원자를 갖는 소수성 기, 16-20개의 탄소 원자를 갖는 소수성 기, 팔미토일, 헥사데크-8-에노일, 올레일, (9E,12E)-옥타데카-9,12-디에노일, 디옥타노일 및 C16-C20 아실 및 콜레스테롤로 구성된 군으로부터 선택된 약동학적 조절자를 가질 수 있다. '046에 개시된 특정 GalNAc 클러스터는: (E)-헥사데크-8-에노일(C16), 올레일(C18), (9E,12E)-옥타데카-9,12-디에노일(C18), 옥타노일(C8), 도데세카노일(C12), C-20 아실, C24 아실, 디옥타노일(2xC8)을 포함한다. 표적화 모이어티-약동학적 조절자 표적화 모이어티는 생리학적으로 불안정한 결합 또는, 예를 들어 디설파이드 결합 또는 PEG 링커를 통해 폴리뉴클레오티드에 연결될 수 있다. 본 개시내용은 또한 올리고머와 접합체 기 사이의 포스포디에스테르 링커의 사용에 관한 것이다(이들은 본 명세서에서 영역 B로 지칭되고, 적합하게는 LNA 올리고머와 탄수화물 접합체 기 사이에 위치됨).

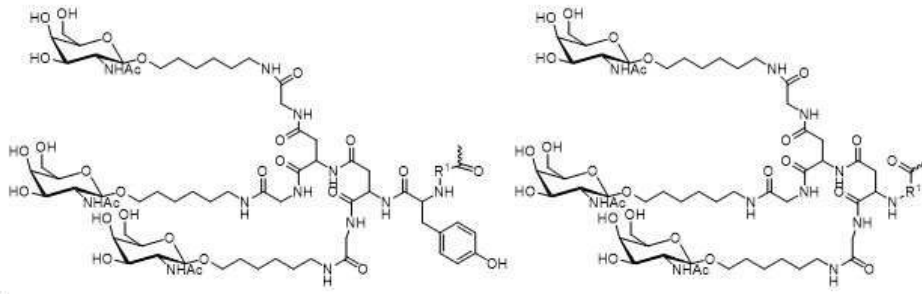
[0444] 간에서 간세포를 표적화하기 위해, 바람직한 표적화 리간드는 갈락토스 클러스터이다. 갈락토스 클러스터는 2개 내지 4개의 말단 갈락토스 유도체를 갖는, 예를 들어 포함하는 분자를 포함한다. 일부 양태에서, 갈락토스 유도체는 N-아세틸-갈락토스아민(GalNAc)이다. 아시알로당단백질 수용체에 대해 친화성을 갖는 다른 사카라이드는 갈락토스아민, N-n-부타노일갈락토스아민 및 N-이소-부타노일갈락토스아민을 포함하는 목록으로부터 선택될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 갈락토스 유도체는 갈락토스 및 갈락토스의 것보다 크거나 같은 아시알로당단백질 수용체에 대한 친화성을 갖는 갈락토스의 유도체 둘 모두를 포함한다. 말단 갈락토스 유도체는 그 C-I 탄소를 통해 분자에 부착된다. 아시알로당단백질 수용체(ASGPr)는 주로 간세포 상에 발현되고 분지형 갈락토스-말단 당단백질에 결합한다. 갈락토스 클러스터는 각각 아시알로당단백질 수용체에 대해 친화성을 갖는 3개의 말단 갈락토스아민 또는 갈락토스아민 유도체를 갖는다. 또 다른 갈락토스 클러스터는 3개의 말단 N-아세틸-갈락토스아민을 갖는다. 당업계에서 통상적인 다른 용어는 3-축각 갈락토스, 3-가 갈락토스 및 갈락토스 삼량체를 포함한다. 3-축각 갈락토스 유도체 클러스터는 2-축각 또는 1-축각 갈락토스 유도체 구조보다 더 큰 친화성으로 ASGPr에 결합되는 것으로 알려져 있다. nM 친화성을 달성하기 위해 다가가 요구된다.

[0445] 갈락토스 클러스터는 중앙 분기점에 각각 연결된 2개 또는 바람직하게는 3개의 갈락토스 유도체를 포함할 수 있다. 갈락토스 유도체는 당류의 C-I 탄소를 통해 중앙 분기점에 부착된다. 갈락토스 유도체는 바람직하게는 링커 또는 스페이서를 통해 분기점에 연결된다. 일부 양태에서, 스페이서는 가요성 친수성 스페이서, 예를 들어 PEG3 스페이서와 같은 PEG 스페이서이다. 분기점은 3개의 갈락토스 유도체의 부착을 허용하고 추가로 올리고머에 대한 분기점의 부착을 허용하는 임의의 소분자일 수 있다. 예시적인 분기점 그룹은 디-리신이다. 디-리신 분자는 3개의 갈락토스 유도체가 이를 통해 부착될 수 있는 3개의 아민 그룹과 디-리신이 올리고머에 이를 통해 부착될 수 있는 카르복실 반응성 그룹을 함유한다. 올리고머에 대한 분기점의 부착은 링커 또는 스페이서를 통해 발생할 수 있다. 일부 양태에서, 스페이서는 가요성 친수성 스페이서, 예를 들어 PEG3 스페이서(3개의 에틸렌 단위)와 같은 PEG 스페이서이다. 갈락토스 클러스터는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 올리고머의 3' 또는 5' 말단에 부착될 수 있다.

[0446] 본 개시내용의 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체의 접합체 모이어티는 접합체 1, 2, 3, 4 및 접합체 1a, 2a, 3a 및 4a를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 양태에서, 접합체 모이어티는 접합체 2a를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체는 서열번호: 18 및 19로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0447] 따라서 GalNAc 클러스터(예를 들어, GalNAc)의 각 탄수화물 모이어티는 디, 트리, 테트라, 펜타, 헥사-에틸렌 글리콜 링커와 같은 (폴리)에틸렌 글리콜 링커(PEG)와 같은 스페이서를 통해 올리고머에 접합될 수 있다. 상기에 나타난 바와 같이 PEG 모이어티는 갈락토스 당 모이어티와 펩티드(트리리신이 도시됨) 링커 사이에 스페이서를 형성한다.

[0448] 일부 양태에서, GalNAc 클러스터는 펩티드 링커, 예를 들어 Tyr-Asp(Asp) 트리펩티드 또는 Asp(Asp) 디펩티드를 포함하며, 이는 바이라디칼 링커를 통해 올리고머(또는 영역 Y 또는 영역 B)에 부착되며, 예를 들어 GalNAc 클러스터는 다음의 바이라디칼 링커를 포함할 수 있다:



[0449]

[0450]

R1은 바람직하게는 $-C_2H_4-$, $-C_3H_6-$, $-C_4H_8-$, $-C_5H_{10}-$, $-C_6H_{12}-$, 1,4-사이클로헥실($-C_6H_{10}-$), 1,4-페닐($-C_6H_4-$), $-C_2H_4OC_2H_4-$, $-C_2H_4(OC_2H_4)_2-$ 또는 $-C_2H_4(OC_2H_4)_3-$, $-C(O)CH_2-$, $-C(O)C_2H_4-$, $-C(O)C_3H_6-$, $-C(O)C_4H_8-$, $-C(O)C_5H_{10}-$, $-C(O)C_6H_{12}-$, 1,4-사이클로헥실($-C(O)C_6H_{10}-$), 1,4-페닐($-C(O)C_6H_4-$), $-C(O)C_2H_4OC_2H_4-$, $-C(O)C_2H_4(OC_2H_4)_2-$ 또는 $-C(O)C_2H_4(OC_2H_4)_3-$ 로부터 선택된 바이라디칼이다.

[0451]

일부 양태에서, R1은 바람직하게는 $-C_2H_4-$, $-C_3H_6-$, $-C_4H_8-$, $-C_5H_{10}-$, $-C_6H_{12}-$, 1,4-사이클로헥실($-C_6H_{10}-$), 1,4-페닐($-C_6H_4-$), $-C_2H_4OC_2H_4-$, $-C_2H_4(OC_2H_4)_2-$ 또는 $-C_2H_4(OC_2H_4)_3-$ 로부터 선택된 바이라디칼이다.

[0452]

탄수화물 접합체(예를 들어, GalNAc) 또는 탄수화물-링커 모이어티(예를 들어, 탄수화물-PEG 모이어티)는 적합하게는 리신, 디-리신 또는 트리-리신 또는 테트라-리신과 같은 2개 이상의 아미노기(예컨대 3, 4 또는 5개)를 포함하는, 아미노산 또는 펩티드와 같은 분기점 그룹을 통해 올리고머에 공유 접합(연결)될 수 있다. 트리-리신 분자는 갈락토스 & 유도체(예를 들어, GalNAc)와 같은 3개의 탄수화물 접합체 그룹과 추가 접합체 예컨대 소수성 또는 친유성 모이어티/그룹이 부착될 수 있는 4개의 아민 그룹 및 트리-리신이 이를 통해 올리고머에 부착될 수 있는 카르복실 반응성 그룹을 함유한다. 추가 접합체 예컨대 친유성/소수성 모이어티는 올리고머에 부착된 리신 잔기에 부착될 수 있다.

[0453]

본 개시내용의 LNA 올리고머와 함께 사용하기 위한 GalNAc 접합체는 약동학적 조절자(예를 들어, 하기 개시된 친유성 모이어티)를 필요로 하지 않는다. 따라서, 일부 양태에서, GalNAc 접합체는 예를 들어 C8-C36 지방산 또는 스테롤을 포함하지 않는 본 명세서에 기재된 것과 같은 친유성 또는 소수성 모이어티에 공유적으로 연결되지 않는다. 따라서, 본 개시내용은 접합된 친유성 또는 소수성 약동학적 조절자를 포함하지 않는 LNA 올리고머 GalNAc 접합체를 제공한다.

[0454]

III.b 친유성 모이어티

[0455]

본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드는 (예를 들어, GalNAc 모이어티 대신에 또는 그에 부가하여) 하나 이상의 부가의 접합체 모이어티를 추가로 포함할 수 있으며, 이 중에서 접합체 그룹이 탄수화물 모이어티인 경우와 같이 친유성 또는 소수성 모이어티가 특히 흥미롭다. 이러한 친유성 또는 소수성 모이어티는 약동학적 조절자로서 작용할 수 있고, 탄수화물 접합체, 올리고머에 탄수화물 접합체를 연결하는 링커 또는 다중 탄수화물 접합체(다가) 접합체를 연결하는 링커, 또는 올리고머에, 선택적으로 생체 절단가능한 링커와 같은 링커를 통해, 공유적으로 연결될 수 있다.

[0456]

따라서 올리고머 또는 접합체 모이어티는 친유성 또는 소수성 모이어티와 같은 약동학적 조절자를 포함할 수 있다. 이러한 모이어티는 WO2012/082046에서의 siRNA 접합체의 맥락 내에서 개시되어 있으며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다. 소수성 모이어티는 포화되거나 불포화될 수 있는 C8-C36 지방산을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28, C30, C32 및 C34 지방산이 사용될 수 있다. 소수성 그룹은 16개 이상의 탄소 원자를 가질 수 있다.

[0457]

예시적인 적합한 소수성 그룹은 스테롤, 콜레스테롤, 팔미토일, 헥사데크-8-에노일, 올레일, (9E,12E)-옥타데카-9,12-디에노일, 디옥타노일 및 C16-C20 아실을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 16개 미만의 탄소 원자를 갖는 소수성 그룹은 폴리뉴클레오타이드 표적화를 증강시키는데 덜 효과적이지만, 이들은 효능을 증강시키기 위해 다중 카피(예를 들어, 2x, 예컨대 2x C8 또는 C10, C12 또는 C14)로 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 표적화 모이어티로서 유용한 약동학적 조절자는 콜레스테롤, 알킬기, 알케닐기, 알킬닐기, 아릴기, 아르알킬기, 아르알케닐기 및 아르알킬닐기로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 이들 각각은 선형, 분지형 또는 환형일 수 있다. 약동학적 조절자는 바람직하게는 탄소 및 수소 원자만을 함유하는 탄화수소이다. 그러나, 소수성을 유지하

는 치환기 또는 헤테로원자, 예를 들어, 불소는 허용될 수 있다.

[0458] III.c 친유성 접합체

[0459] 일부 양태에서, 접합체 모이어티는 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤, 콜레스테릴, 콜레스타놀, 스티그마스테롤, 콜란산 및 에르고스테롤)과 같은 친유성 모이어티이거나 이를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 접합체 모이어티는 토크페롤이거나 이를 포함한다(도 2에서 접합체 6 및 접합체 6a로 예시됨). 일부 양태에서, 접합체 모이어티는 콜레스테롤이거나 이를 포함할 수 있다(도 2에서 접합체 5 및 접합체 5a로 예시됨).

[0460] 일부 양태에서, 접합체 모이어티는 지질, 인지질 또는 친유성 알코올, 예컨대 양이온성 지질, 중성 지질, 스펅 고지질, 및 지방산, 예컨대 스테아르산, 올레산, 엘라이드산, 리놀레산, 리놀레이드산, 리놀렌산 및 미리스트산 이거나 이를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 지방산은 C4-C30 포화 또는 불포화된 알킬 사슬을 포함한다. 알킬 사슬은 선형 또는 분지형일 수 있다.

[0461] 친유성 접합체 모이어티는, 예를 들어, 올리고머 화합물의 친수성 특성에 대항하고 세포의 침투를 증강시키기 위해 사용될 수 있다.

[0462] 친유성 모이어티는, 예를 들어 스테롤, 스타놀 및 스테로이드 및 관련된 화합물 예컨대 콜레스테롤, 디옥콜레스테롤, 라노스테롤, 코프로스타놀, 스티그마스테롤, 에르고스테롤, 칼시페롤, 콜산, 테옥시콜산, 에스트론, 에스트라디올, 에스트라트리올, 프로게스테론, 스틸베스트롤, 테스토스테론, 안드로스테론, 테옥시코르티코스테론, 코르티손, 17-하이드록시코르티코스테론, 이의 유도체 등을 포함한다. 일부 양태에서, 접합체는 콜레스테롤, 디옥콜레스테롤, 라노스테롤, 코프로스타놀, 스티그마스테롤, 에르고스테롤, 칼시페롤, 콜산, 테옥시콜산, 에스트론, 에스트라디올, 에스트라트리올, 프로게스테론, 스틸베스트롤, 테스토스테론, 안드로스테론, 테옥시코르티코스테론, 코르티손, 17-하이드록시코르티코스테론으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 다른 친유성 접합체 모이어티는 지방족 그룹, 예컨대, 예를 들어 직쇄, 분지형 및 환형 알킬, 알케닐 및 알키닐을 포함한다. 지방족 그룹은 예를 들어 5 내지 약 50, 6 내지 약 50, 8 내지 약 50, 또는 10 내지 약 50개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 예시적인 지방족 그룹은 운데실, 도데실, 헥사데실, 헵타데실, 옥타데실, 노나데실, 테르펜, 보르닐, 아다만틸, 이의 유도체 등을 포함한다. 일부 양태에서, 지방족 그룹에서 하나 이상의 탄소 원자는 O, S 또는 N(예를 들어, 게라닐옥시헥실)과 같은 헤테로원자에 의해 대체될 수 있다. 추가로 적합한 친유성 접합체 모이어티는 알킬글리세롤, 비스(알킬)글리세롤, 트리스(알킬)글리세롤, 모노글리세라이드, 디글리세라이드 및 트리글리세라이드와 같은 글리세롤의 지방족 유도체를 포함한다. 일부 양태에서, 친유성 접합체는 디-헥실테실-rac-글리세롤 또는 1,2-디-O-헥실테실-rac-글리세롤 또는 이의 포스포네이트이다. 예를 들어, 지방산, 지방 알코올, 지방 에스테르 및 지방 아민과 같은 포화 및 불포화된 지방 작용기는 또한 친유성 접합체 모이어티로 작용할 수 있다. 일부 양태에서, 지방 작용기는 약 6개 탄소 내지 약 30개 또는 약 8개 내지 약 22개 탄소를 함유할 수 있다. 예시적인 지방산은 카프르산, 카프틸산, 라우르산, 팔미트산, 미리스트산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 아라키돈산, 에이코센산 등을 포함한다.

[0463] 추가 양태에서, 친유성 접합체 그룹은 6 내지 약 50개, 10 내지 약 50개, 또는 14 내지 약 40개 탄소 원자를 갖는 폴리사이클릭 방향족 그룹일 수 있다. 폴리사이클릭 방향족 그룹의 예는 피렌, 퓨린, 아크리딘, 크산텐, 플루오렌, 페난트렌, 안트라센, 퀴놀린, 이소퀴놀린, 나프탈렌, 이의 유도체 등을 포함한다. 다른 적합한 친유성 접합체 모이어티는 멘톨, 트리틸(예를 들어, 디메톡시트리틸(DMT)), 페녹사진, 리포산, 인지질, 에테르, 티오에테르(예를 들어, 헥실-S-트리틸티올), 이의 유도체 등을 포함한다.

[0464] 저-밀도 지단백질(LDL)에 대한 친화성을 갖는 접합체 모이어티를 함유하는 올리고머성 화합물은 효과적인 표적화된 전달 시스템을 제공하는 것을 도울 수 있다. 중앙 세포에서 LDL에 대한 수용체의 높은 발현 수준은 LDL을 이들 세포에 약물의 선택적인 전달을 위한 매력적인 담체로 만든다. LDL에 대해 친화성을 갖는 모이어티는 스테로이드(예를 들어, 콜레스테롤), 지방산, 이의 유도체 및 이의 조합과 같은 많은 친유성 그룹을 포함한다. 일부 양태에서, LDL 친화성을 갖는 접합체 모이어티는 케노테옥시콜산 및 리토콜산과 같은 콜산의 디올레일 에스테르일 수 있다. 일부 양태에서, 친유성 접합체는 비오틴일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 친유성 접합체 모이어티는 글리세라이드 또는 글리세라이드 에스테르일 수 있거나 이를 포함할 수 있다.

[0465] 스테롤, 스타놀 및 스테인, 예컨대 콜레스테롤 또는 본 명세서에 개시된 것과 같은 친유성 접합체 모이어티는 예를 들어 간(전형적으로는 간세포)으로의 올리고뉴클레오타이드의 전달을 증강시키기 위해 사용될 수 있다. 본 개시내용의 일부 양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체의 접합체 모이어티는 접합체 5, 5a, 6 또는 6a를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 양태에서, 접합체 모이어티는 접합체 5a를 포함하거나 이로 구성된다. 일부

양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접합체는 서열번호: 10 및 11로 구성된 군으로부터 선택된다.

III.d 링커

연결 또는 링커는 하나 이상의 공유 결합을 통해 관심있는 하나의 화학 그룹 또는 세그먼트를 관심있는 다른 화학 그룹 또는 세그먼트에 연결하는 2개의 원자 사이의 관계이다. 접합체 모이어티(또는 표적화 또는 차단 모이어티)는 올리고머 화합물에 직접적으로 또는 연결 모이어티(링커 또는 테더) - 링커를 통해 부착될 수 있다. 링커는 제3 영역, 예를 들어 접합체 모이어티를 올리고머성 화합물(예컨대 영역 A)에 공유적으로 접속하는 역할을 하는 이기능성 모이어티이다. 일부 양태에서, 링커는 에틸렌 글리콜 또는 아미노산 단위와 같은 반복 단위의 사슬 구조 또는 올리고머를 포함한다. 링커는 적어도 2개의 작용기를 가질 수 있는데, 하나는 올리고머 화합물에 부착하기 위한 것이고 다른 하나는 접합체 모이어티에 부착하기 위한 것이다. 링커 작용기 예는 올리고머 또는 접합체 모이어티 상의 친핵성 기와 반응하기 위해 친전자성이거나 친전자성 기와 반응하기 위해 친핵성일 수 있다. 일부 양태에서, 링커 작용기는 아미노, 하이드록실, 카르복실산, 티올, 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스페이트, 포스파이트, 불포화(예를 들어, 이중 또는 삼중 결합) 등을 포함한다. 일부 링커 예는 8-아미노-3,6-디옥사옥탄산(ADO), 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-I-카르복실레이트(SMCC), 6-아미노헥산산(AHEX 또는 AHA), 6-아미노헥실옥시, 4-아미노부티르산, 4-아미노사이클로헥실카르복실산, 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-I-카르복시-(6-아미도-카프로에이트)(LCSMCC), 숙신이미딜 m-말레이미도-벤조일레이트(MBS), 숙신이미딜 N-e-말레이미도-카프로일레이트(EMCS), 숙신이미딜 6-(베타- 말레이미도-프로피온아미도)헥사노에이트(SMPH), 숙신이미딜 N-(a-말레이미도 아세테이트)(AMAS), 숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(SMPB), 베타-알라닌(베타-ALA), 페닐글리신(PHG), 4-아미노사이클로헥산산(ACHC), 베타-(사이클로프로필)알라닌(베타-CYPR), 아미노 도데칸산(ADC), 알릴렌 디올, 폴리에틸렌 글리콜, 아미노산 등을 포함한다.

올리고머성 화합물에 대한 접합체 모이어티의 부착에 유용할 수 있는 다양한 추가 링커 그룹이 당업계에 공지되어 있다. 많은 유용한 링커 그룹에 대한 리뷰는 예를 들어 Antisense Research and Applications, S. T. Crooke and B. Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, p. 303-350에서 찾아볼 수 있다.

올리고머성 화합물의 접합체의 제조에서 링커 및 그의 사용은 WO 96/11205 및 WO 98/52614 및 미국 특허 번호 4,948,882; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,580,731; 5,486,603; 5,608,046; 4,587,044; 4,667,025; 5,254,469; 5,245,022; 5,112,963; 5,391,723; 5,510,475; 5,512,667; 5,574,142; 5,684,142; 5,770,716; 6,096,875; 6,335,432; 및 6,335,437; 및 WO 2012/083046에서와 같이 종래 기술 전반에 걸쳐 제공되어 있으며, 이들 모두는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

본 명세서에 사용된 바와 같이, 생리학적으로 불안정한 결합은 포유동물 신체 내에서 일반적으로 마주치거나 또는 마주치는 것에 유사한 조건 하에서 절단가능한 불안정한 결합이다(절단가능한 링커로도 지칭되며, 도 12 및 도 13에서 영역 B로 예시됨). 생리학적으로 불안정한 연결기는 그것이 특정 생리학적 조건에 존재할 때 화학적 변형(예를 들어, 절단)을 겪도록 선택된다. 포유동물 세포내 조건은 pH, 온도, 산화 또는 환원 조건 또는 작용제, 및 포유동물 세포에서 발견되거나 마주치는 것에 유사한 염 농도와 같은 화학적 조건을 포함한다. 포유동물 세포내 조건은 또한 단백질분해적 또는 가수분해적 효소와 같은 포유동물 세포에 정상적으로 존재하는 효소적 활성의 존재를 포함한다. 일부 양태에서, 절단가능한 링커는 예를 들어 표적 세포에서 발현될 수 있는 뉴클레아제(들)에 민감하고 - 따라서 본 명세서에 상세히 설명된 바와 같이 링커는 짧은 영역(예를 들어, 1-10) 포스포디에스테르 연결된 뉴클레오시드, 예컨대 DNA 뉴클레오시드일 수 있다.

화학적 변형(불안정한 결합의 절단)은 약학적으로 허용가능한 작용제를 세포에 첨가함에 의해 개시될 수 있거나 불안정한 결합을 함유하는 분자가 적절한 세포-내 및/또는 세포-외 환경에 도달할 때 자발적으로 발생할 수 있다. 예를 들어 pH 불안정한 결합은 분자가 산성화된 엔도솜에 들어갈 때 절단될 수 있다. 따라서, pH 불안정한 결합은 엔도솜의 절단가능한 결합인 것으로 간주될 수 있다. 효소 절단가능한 결합은 엔도솜 또는 리소솜 또는 세포질에 존재하는 것과 같은 효소에 노출될 때 절단될 수 있다. 디설파이드 결합은 분자가 세포질의 보다 환원 환경에 들어갈 때 절단될 수 있다. 따라서, 디설파이드는 세포질의 절단가능한 결합인 것으로 간주될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, pH-불안정한 결합은 산성 조건(pH<7) 하에서 선택적으로 파괴되는 불안정한 결합이다. 세포 엔도솜과 리소솜의 pH가 7 미만이기 때문에 이러한 결합은 또한 엔도솜으로 불안정한 결합이라고 한다.

III.e 올리고머 연결된 생체절단가능한 접합체

- [0473] 올리고머 화합물은 선택적으로 올리고머(영역 A로 지칭됨)와 접합체(영역 C로 지칭됨) 사이에 위치되는 제2 영역(영역 B)을 포함할 수 있다. 예를 위한 **도 12** 및 **도 13** 참조). 영역 B는 절단가능한 링커(생리학적으로 불안정한 연결로도 지칭됨)와 같은 링커일 수 있다. 뉴클레아제 민감성 생리학적 불안정 연결: 일부 양태에서, 본 개시내용의 올리고머(또한 올리고머성 화합물로도 지칭됨)(또는 접합체)는 3개의 영역을 포함한다:
- [0474] i) 예를 들어, 16-18개의 인접하는 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 영역(영역 A);
- [0475] ii) 생체절단가능한 링커를 포함하는 제2 영역(영역 B); 및,
- [0476] iii) 접합체 모이어티, 표적화 모이어티, 활성화 모이어티를 포함하는 제3 영역(C), 여기서 제3 영역은 제2 영역에 공유 연결됨.
- [0477] 일부 양태에서, 영역 B는 포스페이트 뉴클레오타이드 링커일 수 있다. 예를 들어, 그러한 링커는 접합체가 지질, 지방산, 스테롤, 예컨대 콜레스테롤 또는 토크페롤과 같은 친유성 접합체일 때 사용될 수 있다. 포스페이트 뉴클레오타이드 링커는 또한 다른 접합체, 예를 들어 GalNAc와 같은 탄수화물 접합체를 위해 사용될 수 있다.
- [0478] **III.e.1 펩티드 링커**
- [0479] 일부 양태에서, 생체절단가능한 링커(영역 B)는 triGalNAc 접합체와 같은 polyGalNAc 접합체에 사용될 수 있는 트리리신 펩티드 링커와 같은 펩티드이다. 또한 본 명세서에 언급된 펩티드 바이라디칼 참조.
- [0480] 사용될 수 있는 당업계에 공지된 다른 링커는 디설파이드 링커를 포함한다.
- [0481] **III.e.2 포스페이트 뉴클레오타이드 링커**
- [0482] 일부 양태에서, 영역 B는 1-6개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 이는 제1 영역(영역 A)의 5' 또는 3' 뉴클레오타이드에, 예컨대 인트뉴클레오시드 연결기 예컨대 포스포디에스테르 연결을 통해 공유적으로 연결되며, 여기서
- [0483] a. 제1 영역과 제2 영역 사이의 인트뉴클레오시드 연결은 포스포디에스테르 연결이고 제1 영역에 [예컨대 직접적으로] 인접하는 제2 영역의 뉴클레오시드는 DNA 또는 RNA이고; 및/또는
- [0484] b. 제2 영역의 적어도 1개의 뉴클레오시드는 포스포디에스테르 연결된 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드이다.
- [0485] 일부 양태에서, 영역 A 및 영역 B는 길이가 16-22개 뉴클레오타이드의 단일 인접하는 뉴클레오타이드 서열을 형성한다.
- [0486] 일부 양태에서 제1 영역과 제2 영역 사이의 인트뉴클레오시드 연결은 제2 영역의 일부로 간주될 수 있다.
- [0487] 일부 양태에서, 제2 영역과 제3 영역 사이에 인 함유 연결기가 있다. 인 연결기는, 예를 들어 포스페이트(포스포디에스테르), 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 또는 보라노포스페이트 기일 수 있다. 일부 양태에서, 이 인 함유 연결기는 제2 영역과 제3 영역에 부착된 링커 영역 사이에 위치된다. 일부 양태에서, 포스페이트 기는 포스포디에스테르이다.
- [0488] 따라서, 일부 양태에서 올리고머성 화합물은 적어도 2개의 포스포디에스테르 기를 포함하며, 여기서 적어도 하나는 상기 진술에 따른 것이고, 다른 하나는 제2 영역과 제3 영역 사이, 선택적으로 링커 그룹과 제2 영역 사이에 위치된다.
- [0489] 일부 양태에서, 제3 영역은 활성화 그룹, 예컨대 접합에 사용하기 위한 활성화 그룹이다. 이와 관련하여, 본 개시내용은 또한 영역 A 및 B 및 활성화 그룹, 예를 들어 접합에 적합한 것과 같은 제3 영역에 대한 후속 연결에 적합한 중간체를 포함하는 활성화된 올리고머를 제공한다.
- [0490] 일부 양태에서, 제3 영역은 반응성 그룹, 예컨대 접합에 사용하기 위한 반응성 그룹이다. 이와 관련하여, 본 개시내용은 또한 영역 A 및 B 및 반응성 그룹, 예를 들어 접합에 적합한 것과 같은 제3 영역에 대한 후속 연결에 적합한 중간체를 포함하는 올리고머를 제공한다. 반응성 그룹은 일부 양태에서 아민기와 같은 알코올기의 아민을 포함할 수 있다.
- [0491] 일부 양태에서 영역 A는 적어도 하나, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 21개의 포스포디에스테르 이외의 인트뉴클레오시드 연결, 예컨대 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 및 보라노포스페이트로 구성된 군으로부터 (선택적으로 독립적으로) 선택되는 인트뉴클레오시드 연결, 및 메틸포스포네이트, 예컨대 포스포로티오에이트를 포함한다. 일부 양태에서 영역 A는 적어도 하나 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 양태에서 인트뉴클레오시드 연결의 적어도 50%, 예컨대 적어도 75%, 예컨

대 적어도 90%, 예컨대 영역 A 내의 모든 인티뉴클레오시드 연결은 포스포디에스테르 이외의 것이며, 예를 들어 포스포로티오에이트 연결이다. 일부 양태에서 영역 A에서의 모든 인티뉴클레오시드 연결은 포스포디에스테르 이외의 것이다.

- [0492] 일부 양태에서, 올리고머성 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체와 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 제1 영역 및 선택적으로 제2 영역일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 일부 양태에서, 영역 B는 (핵산) 표적에 상보성인 인접하는 핵염기 서열의 일부를 형성할 수 있다. 다른 양태에서, 영역 B는 표적에 대한 상보성을 결할 수 있다.
- [0493] 달리 말하면, 일부 양태에서, 본 개시내용은 포스포디에스테르 연결을 통해 올리고뉴클레오티드의 인접하는 뉴클레오시드에 연결된 적어도 하나의 말단(5' 및/또는 3') DNA 또는 RNA 뉴클레오시드를 갖는 비포스포디에스테르 연결된, 예컨대 포스포로티오에이트 연결된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오티드)를 제공하며, 여기서 말단 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드는 선택적으로 링커 모이어티를 통해 접합체 모이어티, 표적화 모이어티 또는 차단 모이어티에 추가로 공유적으로 연결된다.
- [0494] 일부 양태에서, 올리고머 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오티드 접합체와 같은 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 제1 영역 및 선택적으로 제2 영역일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 일부 양태에서, 영역 B는 (핵산) 표적에 상보성인 인접하는 핵염기 서열의 일부를 형성할 수 있다. 다른 양태에서, 영역 B는 표적에 대한 상보성을 결할 수 있다.
- [0495] 일부 양태에서, 제2 영역의 적어도 2개의 인접하는 뉴클레오시드는 DNA 뉴클레오시드(예컨대 적어도 3 또는 4 또는 5개의 인접하는 DNA 뉴클레오티드)이다.
- [0496] 이러한 양태에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 다음 식에 따라 기술될 수 있다: 5'-A-PO-B[Y]X-3' 또는 3'-A-PO-B[Y]X-5' 여기서 A는 영역 A이고, PO는 포스포디에스테르 연결이고, B는 영역 B이고, Y는 선택적 연결기이고, X는 접합체, 표적화, 차단 그룹 또는 반응성 또는 활성화 그룹이다.
- [0497] 일부 양태에서, 영역 B는 3'-5' 또는 5'-3': (i) 영역 A의 5' 또는 3' 뉴클레오시드에 대한 포스포디에스테르 연결, (ii) DNA 또는 RNA 뉴클레오시드, 예컨대 DNA 뉴클레오시드, 및 (iii) 추가 포스포디에스테르 연결 5'-A-PO-B-PO-3' 또는 3'-A-PO-B-PO-5'를 포함한다.
- [0498] 추가 포스포디에스테르 연결은 영역 B 뉴클레오시드를 하나 이상의 추가 뉴클레오시드, 예컨대 하나 이상의 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드와 연결하거나, 또는 선택적으로 연결기(Y)을 통해 (접합체, 표적화 또는 차단 그룹 또는 반응성 또는 활성화 그룹인) X에 연결할 수 있다.
- [0499] 일부 양태에서, 영역 B는 3'-5' 또는 5'-3': i) 영역 A의 5' 또는 3' 뉴클레오시드에 대한 포스포디에스테르 연결, ii) 2-10 사이의 DNA 또는 RNA 포스포디에스테르 연결된 뉴클레오시드, 예컨대 DNA 뉴클레오시드, 및 선택적으로 iii) 다음의 추가의 포스포디에스테르 연결을 포함한다:
- [0500] 5'-A-[PO-B]_n - [Y]-X 3' 또는 3'-A-[PO-B]_n -[Y]-X 5'
- [0501] 5'-A-[PO-B]_n - PO-[Y]-X 3' 또는 3'-A-[PO-B]_n - PO-[Y]-X 5'
- [0502] 여기서 A는 영역 A를 나타내고, [PO-B]_n은 영역 B를 나타내며, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10과 같이 1-10이고, PO는 영역 B와 X(또는 존재하는 경우 Y) 사이의 선택적 포스포디에스테르 연결기이다.
- [0503] 일부 양태에서 본 개시내용은 다음 식 중 하나에 따른(또는 포함하는) 화합물을 제공한다:
- [0504] 5' [영역 A] - PO - [영역 B] 3' -Y - X
- [0505] 5' [영역 A] - PO - [영역 B]-PO 3' -Y - X
- [0506] 5' [영역 A] - PO - [영역 B] 3' - X
- [0507] 5' [영역 A] - PO - [영역 B]-PO 3' - X
- [0508] 3' [영역 A] - PO - [영역 B] 5' -Y - X
- [0509] 3' [영역 A] - PO - [영역 B]-PO 5' -Y - X
- [0510] 3' [영역 A] - PO - [영역 B] 5' - X

- [0511] 3' [영역 A] - PO - [영역 B]-PO 5' - X
- [0512] 영역 B는 예를 들어 다음을 포함하거나 구성될 수 있다:
- [0513] 5' DNA3'
- [0514] 3' DNA 5'
- [0515] 5' DNA-PO-DNA-3'
- [0516] 3' DNA-PO-DNA-5'
- [0517] 5' DNA-PO-DNA-PO-DNA 3'
- [0518] 3' DNA-PO-DNA-PO-DNA 5'
- [0519] 5' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 3'
- [0520] 3' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 5'
- [0521] 5' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 3'
- [0522] 3' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 5'
- [0523] 포스페이트 연결된 생체절단가능한 링커는 DNA 및 RNA 이외의 뉴클레오시드를 채용할 수 있음을 인식해야 한다. 생체절단가능한 뉴클레오티드 링커는 실시예 6에서의 검정을 사용하여 동정될 수 있다.
- [0524] 일부 양태에서, 본 개시내용의 화합물은 생체절단가능한 링커(생리학적으로 불안정한 링커, 뉴클레아제 민감성 생리학적으로 불안정한 연결, 또는 뉴클레아제 민감성 링커로도 지칭됨), 예를 들어 포스페이트 뉴클레오티드 링커(예컨대 영역 B) 또는 펩티드 링커를 포함하며, 이는 올리고머(또는 인접하는 뉴클레오티드 서열 또는 영역 A)를 접합체 모이어티(또는 영역 C)에 접합시킨다.
- [0525] 실시예 6에 나타낸 검정에서 절단에 대한 민감성은 링커가 생체절단가능한지 또는 생리학적으로 불안정한지를 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0526] 본 개시내용에 따른 생체절단가능한 링커는 표적 조직, 예를 들어 간 및/또는 신장에서 절단에 대해 민감한(즉, 생리학적으로 불안정함) 링커를 포함한다. 표적 조직에서 관찰되는 절단 속도는 혈액 혈청에서 발견되는 것보다 큰 것이 바람직하다. 조직(예를 들어, 간 또는 신장) 및 혈청에서 절단의 수준(%)을 결정하기 위한 적합한 방법은 실시예 6에서 발견된다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 화합물에서, 영역 B와 같은 생체절단가능한 링커(생리학적으로 불안정한 링커, 또는 뉴클레아제 민감성 링커로도 지칭됨)는 실시예 6의 간 또는 신장 균질물 검정에서 적어도 약 20% 절단되고, 예컨대 적어도 약 30% 절단되고, 예컨대 적어도 약 40% 절단되고, 예컨대 적어도 약 50% 절단되고, 예컨대 적어도 약 60% 절단되고, 예컨대 적어도 약 70% 절단되고, 예컨대 적어도 약 75% 절단된다. 일부 양태에서, 실시예 6에서의 검정에 사용된 바와 같이 혈청에서의 절단(%)은 약 30% 미만, 약 20% 미만, 예컨대 약 10% 미만, 예컨대 5% 미만, 예컨대 약 1% 미만이다.
- [0527] 동일하거나 상이할 수 있는 일부 양태에서, 본 개시내용의 화합물에서, 영역 B와 같은 생체절단가능한 링커(생리학적으로 불안정한 링커, 또는 뉴클레아제 민감성 링커로도 지칭됨)는 S1 뉴클레아제 절단에 대해 민감성이다. S1 절단에 대한 민감성은 실시예 6에 나타낸 S1 뉴클레아제 검정을 사용하여 평가될 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 화합물에서, 영역 B와 같은 생체절단가능한 링커(생리학적으로 불안정한 링커, 또는 뉴클레아제 민감성 링커로도 지칭됨)는 실시예 6에서 사용된 검정에 따라 S1 뉴클레아제와 함께 120분 인큐베이션 후에 적어도 약 30% 절단되고, 예컨대 적어도 약 40% 절단되고, 예컨대 적어도 약 50% 절단되고, 예컨대 적어도 약 60% 절단되고, 예컨대 적어도 약 70% 절단되고, 예컨대 적어도 약 80% 절단되고, 예컨대 적어도 약 90% 절단되고, 예컨대 적어도 약 95% 절단된다.
- [0528] **영역 B에서의 서열 선택:** 일부 양태에서, 표적 서열에 대해 상보성이 아닌 영역(영역 B)을 포함하는 본 개시내용의 올리고머. 다른 양태에서, 영역 B는 표적 서열에 대해 상보성인 서열을 형성한다. 일부 양태에서, 영역 A 및 B는 함께 표적 서열에 대한 상보성인 단일 인접하는 서열을 형성할 수 있다.
- [0529] 일부 양태에서, 영역 B에서 염기의 서열은 표적 조직 또는 세포 또는 세포-하의 구획에 존재하는 우세한 엔도뉴클레아제 절단 효소에 기반하여 최적의 엔도뉴클레아제 절단 부위를 제공하도록 선택된다. 이와 관련하여, 표적 조직 및 비표적 조직으로부터 세포 추출물을 단리함에 의해, 영역 B에서 사용하기 위한 엔도뉴클레아제 절단 서

열은 비표적 세포(예를 들어, 신장)와 비교하여 원하는 표적 세포(예를 들어, 간/간세포)에서의 우선적인 절단 활성화에 기반하여 선택될 수 있다. 이와 관련하여, 표적 하향-조절을 위한 화합물의 효능은 원하는 조직/세포에 대해 최적화될 수 있다.

[0530] 일부 양태에서 영역 B는 서열 AA, AT, AC, AG, TA, TT, TC, TG, CA, CT, CC, CG, GA, GT, GC 또는 GG의 디뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 C는 5-메틸시토신일 수 있고, 및/또는 T는 U로 대체될 수 있다. 일부 양태에서 영역 B는 서열 AAA, AAT, AAC, AAG, ATA, ATT, ATC, ATG, ACA, ACT, ACC, ACG, AGA, AGT, AGC, AGG, TAA, TAT, TAC, TAG, TTA, TTT, TTC, TAG, TCA, TCT, TCC, TCG, TGA, TGT, TGC, TGG, CAA, CAT, CAC, CAG, CTA, CTG, CTC, CTT, CCA, CCT, CCC, CCG, CGA, CGT, CGC, CGG, GAA, GAT, GAC, CAG, GTA, GTT, GTC, GTG, GCA, GCT, GCC, GCG, GGA, GGT, GGC, 및 GGG의 트리뉴클레오티드를 포함하며 여기서 C는 5-메틸시토신일 수 있고 및/또는 T는 U로 대체될 수 있다.

[0531] 일부 양태에서 영역 B는 서열 AAAX, AATX, AACX, AAGX, ATAX, ATTX, ATCX, ATGX, ACAX, ACTX, ACCX, ACGX, AGAX, AGTX, AGCX, AGGX, TAAX, TATX, TACX, TAGX, TTAX, TTTX, TTCX, TAGX, TCAX, TCTX, TCCX, TCGX, TGAX, TGTX, TGCX, TGGX, CAAX, CATX, CACX, CAGX, CTAX, CTGX, CTCX, CTTX, CCAX, CCTX, CCCX, CCGX, CGAX, CGTX, CGCX, CGGX, GAAX, GATX, GACX, CAGX, GTAX, GTTX, GTCX, GTGX, GCAX, GCTX, GCCX, GCGX, GGAX, GGTX, GGCX, 및 GGGX의 테트라뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 X는 A, T, U, G, C 및 이의 유사체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 여기서 C는 5-메틸시토신일 수 있고 및/또는 T는 U로 대체될 수 있다. (자연적으로 발생하는) 핵염기 A, T, U, G, C를 언급할 때, 이들은 동등한 자연 핵염기(예를 들어, 상보성인 뉴클레오시드와의 염기쌍)로 기능하는 핵염기 유사체로 대체될 수 있다는 것이 인지될 것이다. 일부 양태에서 영역 B는 T 또는 U를 포함하지 않는다.

[0532] IV. 의학적 적응증

[0533] 일부 양태에서, 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)은 PCSK9 유전자의 정상, 돌연변이체, 대립형질 변이체 또는 스플라이스 변이체 형태의 과발현 또는 발현과 연관된 병태의 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다. 본 개시내용은 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)은 본 명세서에 언급된 질환, 장애 또는 병태의 치료를 위한 약제의 제조에서의 용도를 추가로 제공한다.

[0534] 본 개시내용은 치료적으로 유효한 양의 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, PCSK9의 비정상적인 수준 및/또는 활성화와 연관된 병태를 앓고 있거나 이에 걸리기 쉬운 포유동물, 예를 들어 인간을 치료하는 방법을 제공한다.

[0535] 본 명세서에 언급된 질환 또는 장애는 일부 양태에서 PCSK9 유전자 또는 그의 단백질 생성물이 PCSK9와 연관되거나 상호작용하는 유전자의 돌연변이와 연관될 수 있다. 따라서, 일부 양태에서 표적은 RNA이다. 일부 양태에서, mRNA는 pre-mRNA이다. 일부 양태에서, RNA는 mRNA에서의 인트론이다. 일부 양태에서, RNA는 RNA에서의 엑손이다. 일부 양태에서, RNA는 인트론과 엑손 사이의 접합부이다. 일부 양태에서, RNA는 예를 들어 결손 프로모터에 의해, 또는 PCSK9를 포함하는 대사 또는 시그널링 경로의 다른 구성요소에 의해 상향조절되는 정상 PCSK9로부터의 mRNA이다. 일부 양태에서, mRNA는 PCSK9 유전자의 대립형질 변이체로부터의 것이다. 일부 양태에서, mRNA는 정상 또는 돌연변이체 PCSK9 유전자의 스플라이스 변이체로부터의 것이다. 일부 양태에서, mRNA는 PCSK9 유전자의 돌연변이된 형태(예를 들어, 기능 획득 돌연변이체)로부터의 것이다.

[0536] PCSK9는 주로 원형질막 상의 LDLR 수준을 감소시킴에 의해 콜레스테롤 항상성에서 주요 조절 역할을 수행한다. 감소된 LDLR 수준은 LDL-입자의 대사를 감소시켜 고콜레스테롤혈증을 유발할 수 있다. LDL이 LDLR에 결합하는 경우 엔도솜 내에서 LDLR-LDL 복합체의 내재화를 유도한다. PCSK9가 (EGF-A 도메인을 통해) LDLR에 결합하는 경우 PCSK9는 수용체-리간드 복합체의 입체형태의 변화를 방지한다. 이 억제제는 대신 LDLR을 리소좀으로 재지향시킨다.

[0537] PCSK9는 또한 소장 및 식후 지방혈증에서 장내 트리글리세라이드-풍부 apoB 지단백질 생산에 중요한 역할을 수행한다. PCSK9의 변이체는 순환하는 콜레스테롤을 감소시키거나 증가시킬 수 있다. 다른 변이체는 희귀한 상염

색채 우성 가족성 고콜레스테롤혈증(HCHOLA3)과 연관되어 있다. 돌연변이는 그의 프로테아제 활성을 증가시켜, LDLR 수준을 낮추고 콜레스테롤이 세포 안으로 흡수되는 것을 방지한다. PCSK9는 내피, 평활근 세포 및 대식세포와 같은 동맥벽에서 높게 발현되어 혈관 항상성 및 죽상동맥경화증을 조절할 수 있는 국소 효과를 갖는다. 따라서, PCSK9는 항-죽상경화증의 효과를 가지고 지단백질 합성을 조절한다.

- [0538] PCSK9는 글루코스 대사 및 비만, 고혈압과 관련된 신장에서의 나트륨 재-흡수의 조절에 관여한다. 더욱이, PCSK9는 박테리아 또는 바이러스 감염 및 패혈증에 관여할 수 있다.
- [0539] 일부 양태에서, PCSK9 유전자는 Pro174Ser PCSK0, Ser127Arg PCSK9, Phe216Leu PCSK9, 및 Asp374Tyr PCSK9로부터 선택된 대립형질 변이체이다.
- [0540] 본 명세서에 개시된 방법은 바람직하게는 PCSK9의 비정상적인 수준 및/또는 활성에 의해 야기되는 질환에 대한 치료 또는 예방을 위해 이용된다. 본 개시내용은 치료적으로 유효한 양의 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 비정상적인 수준 및/또는 활성을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0541] 본 개시내용은 또한 약제로 사용하기 위한 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)에 관한 것이다.
- [0542] 본 개시내용은 추가로 PCSK9 및/또는 PCSK9의 활성의 비정상적인 수준 및/또는 PCSK9의 돌연변이체 형태(예를 들어, 기능 획득 돌연변이체), PCSK9의 대립형질 변이체, 또는 PCSK9의 스플라이스 변이체의 발현의 치료를 위한 약제의 제조를 위해 치료적으로 유효한 양의 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)을 사용하는 것에 관한 것이다.
- [0543] 본 개시내용은 대상체에게 치료적으로 유효한 양의 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)을 투여하는 것을 포함하는 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 비정상적인 수준 및/또는 활성에 의해 야기된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 약학적 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 PCSK9의 수준을 감소시키고/시키거나 혈청 LDL 콜레스테롤의 수준을 감소시킨다. 일부 양태에서, 질환 또는 병태는 죽상동맥경화증, 고콜레스테롤혈증, HDL/LDL 콜레스테롤 불균형, 이상지질혈증, 관상동맥질환(CAD) 및 관상심장질환(CHD)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 이상지질혈증은 가족성 고지혈증(FCHL) 또는 후천성 고지혈증이다. 일부 양태에서, 고콜레스테롤혈증은 가족성 고콜레스테롤혈증 또는 스타틴 내성 고콜레스테롤혈증이다. 일부 양태에서, 치료가 필요한 대상체 또는 환자는 본 명세서에 개시된 질환 또는 장애를 앓고 있거나 앓을 가능성이 있는 대상체 또는 환자이다.
- [0544] 일부 예에서, 본 명세서에서 사용되는 용어 '치료'는 존재하는 질환, 예를 들어 본 명세서에 개시된 질환 또는 장애의 치료 또는 질환의 방지, 즉 예방 둘 모두를 지칭한다. 따라서, 일부 양태에서 본 명세서에 언급된 바와 같은 치료는 예방적일 수 있다.
- [0545] 일부 양태에서, 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)로의 치료는 본 명세서에 개시된 질환의 증상을 치료, 개선 또는 억제할 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)로의 치료는 본 명세서에 개시된 질환과 관련된 후유증을 예방, 지연 또는 개선할 수 있다.
- [0546] 예를 들어, 일부 양태에서, 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)을 투여하는 것은 대상체에서 고콜레스테롤혈증을 치료할 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)을 투여하는 것은 위험에 처한 대상체에서 고콜레스테롤혈증의 전개를 억제할 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도

체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)을 투여하는 것은 위험에 처한 대상체에서 고콜레스테롤혈증의 개시를 지연시킬 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)을 투여하는 것은 위험에 처한 대상체에서 고콜레스테롤혈증의 전개를 억제할 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)을 투여하는 것은 대상체에서 고콜레스테롤혈증의 증상, 예를 들어, 활동성 흉통, 황색종(힘줄과 팔꿈치, 엉덩이 및 무릎에서 종종 발견되는 지방 침착물), 황색판증(눈꺼풀 주위의 콜레스테롤 침착물), 각막궁(각막 주위의 회백색 콜레스테롤 침착물) 등의 개시 또는 전개를 억제하거나 지연시킬 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제, 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)을 투여하는 것은 대상체에서 고콜레스테롤혈증의 후유증 또는 합병증, 예를 들어, 심장 질환, 심혈관 질환, 심장마비, 장기 죽상동맥경화증, 뇌졸중 등의 개시 또는 전개를 억제하거나 지연시킬 수 있다.

[0547] 일부 양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 CIVI 008 및 경구 전달제 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물 또는 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 경구 제형(예를 들어, 알약 또는 캡슐 형태)의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 PCSK9의 비정상적인 발현 수준 및/또는 활성에 의해 유발된 질환 또는 병태, 예를 들어 고콜레스테롤혈증을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 약학적 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 PCSK9의 수준을 감소시키고 혈청 LDL 콜레스테롤의 수준을 감소시킨다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 CIVI 008 및 경구 전달제 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC를 포함하는 경구 제형(예를 들어, 알약 또는 캡슐 형태)의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 고콜레스테롤혈증을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 약학적 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 PCSK9의 수준을 감소시키고 혈청 LDL 콜레스테롤의 수준을 감소시킨다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 CIVI 008 및 SNAC를 포함하는 경구 제형(예를 들어, 알약 또는 캡슐 형태)의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 고콜레스테롤혈증을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 약학적 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 PCSK9의 수준을 감소시키고 혈청 LDL 콜레스테롤의 수준을 감소시킨다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 CIVI 008 및 C10을 포함하는 경구 제형(예를 들어, 알약 또는 캡슐 형태)의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 고콜레스테롤혈증을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 약학적 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 PCSK9의 수준을 감소시키고 혈청 LDL 콜레스테롤의 수준을 감소시킨다.

[0548] 일부 양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 CIVI 008 및 5-CNAC를 포함하는 경구 제형(예를 들어, 알약 또는 캡슐 형태)의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 고콜레스테롤혈증을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 약학적 조성물의 투여는 대상체에서 혈청 PCSK9의 수준을 감소시키고 혈청 LDL 콜레스테롤의 수준을 감소시킨다.

[0549] V. 조합 치료

[0550] 일부 양태에서 본 개시내용의 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 또는 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형)은 또 다른 치료제와의 조합 치료에 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 추가 치료제는 동일한 약학적 조성물의 일부로서, 예를 들어 동일한 알약 또는 캡슐의 추가 성분으로서 공동-투여될 수 있다. 일부 양태에서, 추가 치료제는 별도로 공동-투여될 수 있으며, 즉 본 개시내용의 약학적 조성물은, 예를 들어 알약 또는 캡슐로서 투여되고, 추가 성분은, 예를 들어 또 다른 알약 또는 캡슐로 투여된다.

[0551] 본 개시내용의 약학적 조성물과 공동-투여될 수 있는 추가 치료제는, 예를 들어 대사 질환의 치료에 널리 사용되는 스타틴과 같은 HMG CoA 환원효소의 억제제를 포함한다(WO2009/043354 참조, 조합 치료의 예를 위해 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함됨).

[0552] 본 개시내용의 약학적 조성물과 공동-투여될 수 있는 치료제는 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 화합물과 같은, 다른 콜레스테롤 저하 화합물일 수 있다:

[0553] (i) 담즙염 격리 수지(예를 들어, 콜레스티라민, 콜레스티폴 및 콜레세벨람 하이드로클로라이드);

- [0554] (ii) HMGCoA-환원효소 억제제(예를 들어, 로바스타틴, 세리바스타틴, 프라바스타틴, 아토르바스타틴, 심바스타틴, 로수바스타틴 및 플루바스타틴);
- [0555] (iii) 니코틴산;
- [0556] (iv) 피브르산 유도체(예를 들어, 클로피브레이트, 켄피브로질, 페노피브레이트, 베자피브레이트 및 시프로피브레이트);
- [0557] (v) 프로부콜;
- [0558] (vi) 네오마이신;
- [0559] (vii) 텍스트로티록신;
- [0560] (viii) 식물-스타놀 에스테르,
- [0561] (ix) 콜레스테롤 흡수 억제제(예를 들어, 에제티미브);
- [0562] (x) 임플리타피드;
- [0563] (xi) 담즙산 수송체의 억제제(예를 들어, 정단 나트륨-의존성 담즙산 수송체);
- [0564] (xii) 간 CYP7a의 조절제;
- [0565] (xiii) 에스트로겐 대체 치료제(예를 들어, 타목시펜);
- [0566] (xiv) 항-염증제(예를 들어, 글루코코르티코이드); 및,
- [0567] (xv) 이의 임의의 조합.
- [0568] 일 양태에서, 공동-요법은 본 개시내용의 경구 약학적 조성물(예를 들어, CIVI 008 및 경구 전달제 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 또는 염, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는, 예를 들어 경구 제형), 및 스타틴을 포함하는 경구 전달용 알약 또는 캡슐을 포함한다. 일 양태에서, 공동-요법은 (i) CIVI 008, (ii) 경구 전달제 예컨대 SNAC, C10 또는 5-CNAC, 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 수화물, 용매화물, 또는 염, 또는 이의 임의의 조합, 및 (iii) 스타틴을 포함하는 경구 전달용 알약 또는 캡슐을 포함한다. 일 양태에서, 공동-요법은 (i) CIVI 008, (ii) SNAC 및 (iii) 스타틴을 포함하는 경구 전달용 알약 또는 캡슐을 포함한다. 일 양태에서, 공동-요법은 (i) CIVI 008, (ii) C10 및 (iii) 스타틴을 포함하는 경구 전달용 알약 또는 캡슐을 포함한다. 일 양태에서, 공동-요법은 (i) CIVI 008, (ii) 5-CNAC 및 (iii) 스타틴을 포함하는 경구 전달용 알약 또는 캡슐을 포함한다.
- [0569] **VI. 제어된 방출 제형**
- [0570] 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은 위 및 상부 장을 통한 통과를 용이하게 하는 성분, 예를 들어 장용 코팅, pH 민감성 물질 및 효소 억제제를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 경구 약학적 조성물은, 예를 들어, 코팅제 또는 점도-증가제로서 젤라틴을 또한 포함할 수 있다.
- [0571] 장용(위-내성) 코팅 물질, 예를 들어 중합체는 위의 것보다 더 높은 pH 수준, 예를 들어 소장 내에서도 같이 4.5보다 큰 pH에서 장액에 용해되고, 따라서 소장의 영역에서 활성 물질의 방출을 허용하고 실질적으로 위장관의 상부 부분에서는 방출을 허용하지 않는 것일 수 있다. 일 양태에서, 장용 물질은 약 4.5 내지 약 5.5의 pH에서 수성 용액에 용해되기 시작한다. 다른 양태에서, 장용 물질은 약 5 사이의 pH에서 수성 용액에 빠르게 용해된다. 또 다른 양태에서, 장용 물질은 약 5.5 사이의 pH에서 수성 용액에 빠르게 용해된다.
- [0572] 적합한 장용(위-내성) 물질은 가교된 폴리비닐 피롤리돈; 비가교된 폴리비닐피롤리돈; 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스 프탈레이트, 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트, 셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트; 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트, 셀룰로오스 아세테이트 트리멜리테이트; 전분 아세테이트 프탈레이트; 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트; 카르복시메틸 셀룰로오스; 메틸 셀룰로오스 프탈레이트; 메틸 셀룰로오스 숙시네이트; 메틸 셀룰로오스 프탈레이트 숙시네이트; 메틸 셀룰로오스 프탈산 하프 에스테르; 에틸 셀룰로오스 숙시네이트; 카르복시메틸아미드; 칼륨 메타크릴레이트 디비닐벤젠 공중합체; 폴리비닐 알코올; 폴리옥시에틸렌 글리콜; 폴리에틸렌 글리콜; 알긴산나트륨; 갈락토만난; 카르복시폴리메틸렌; 나트륨 카르복시메틸 전분; 아크릴산 및/또는 메타크릴산과 다음으로부터 선택된 단량체와의 공중합체: 메틸 메타크릴레이트, 에틸 메타크릴레이트, 에틸 아크릴레이트, 부틸

메타크릴레이트, 헥실 메타크릴레이트, 데실 메타크릴레이트, 라우릴 메타크릴레이트, 페닐 메타크릴레이트, 메틸 아크릴레이트, 이소프로필 아크릴레이트, 이소부틸 아크릴레이트, 또는 옥타데실 아크릴레이트, 예를 들어 Evonik Industries로부터 이용가능한 L 100-55, L 30 D-55, L 100, S 100, L 12.5 및 S 12.5를 포함하는 EUDRAGIT™-L 및 -S 시리즈; 폴리비닐 아세테이트; 지방; 오일; 왁스; 지방 알코올; 셀락; 제인; 글루텐; 에틸 아크릴레이트-말레산 무수물 공중합체; 말레산 무수물-비닐 메틸 에테르 공중합체; 스티롤-말레산 공중합체; 2-에틸-헥실-아크릴레이트 말레산 무수물; 크로톤산-비닐 아세테이트 공중합체; 글루타민산/글루탐산 에스테르 공중합체; 카르복시메틸에틸셀룰로오스 글리세롤 모노옥타노에이트; 폴리아르기닌; 폴리(에틸렌); 폴리(프로필렌); 폴리(에틸렌 옥사이드); 폴리(에틸렌 테레프탈레이트); 폴리(비닐 이소부틸 에테르); 폴리(염화비닐); 및 폴리우레탄을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0573] 장용 물질의 조합이 또한 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 장용 물질은 pH 5.5 이상에서 빠르게 용해되어 상부 장에서 빠른 용해를 제공한다. 예를 들어, 장용 물질은 메타크릴산과 메틸 메타크릴레이트의 공중합체 및 메타크릴산과 에틸 아크릴레이트의 공중합체로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 장용 중합체는 폴리(메타크릴산 코-에틸 아크릴레이트)1:1 (EUDRAGIT™ L 30 D-55 및 EUDRAGIT™ L 100-55)이다.

[0574] 장용 코팅 코팅의 다른 적합한 예는 밀랍 및 글리세릴 모노스테아레이트; 밀랍, 셀락 및 셀룰로오스; 및 세틸 알코올, 매스틱 및 셀락, 및 셀락 및 스테아르산; 폴리비닐 아세테이트 및 에틸 셀룰로오스; 및 폴리메타크릴산 에스테르의 중성 공중합체(EUDRAGIT™ L 30D); 메타크릴산과 메타크릴산 메틸에스테르의 공중합체, 또는 금속성 스테아레이트를 함유하는 폴리메타크릴산 에스테르의 중성 공중합체를 포함한다. 이러한 코팅은 지방과 지방산, 셀락과 셀락 유도체 및 셀룰로오스산 프탈레이트, 예를 들어 유리 카르복실 함량을 갖는 것들의 혼합물을 포함한다.

[0575] 당업계에 공지된 바와 같이 그 유연성을 증가시키고 취성을 감소시키기 위해 하나 이상의 가소제가 장용 중합체에 첨가될 수 있다. 적합한 가소제는 예를 들어 부틸 시트레이트, 트리에틸 시트레이트, 디에틸 프탈레이트, 디부틸 세바케이트, 폴리에틸렌 글리콜(PEG, 예컨대 PEG 6000), 아세틸 트리에틸 시트레이트 및 트리아세틴을 포함한다. 일 양태에서, 가소제는 트리에틸 시트레이트이다. 일부 장용 물질은 유연하고 가소제를 필요로 하지 않지만, 보다 취성인 중합체(예를 들어, EUDRAGIT™ L/S 유형, EUDRAGIT™ RL/RS 및 EUDRAGIT™ FS 30 D)가, 예를 들어 약 8중량% 내지 약 12중량% 사이 폴리(메타크릴산 코-에틸 아크릴레이트) 1:1을 갖는 트리에틸 시트레이트인, 건조 중합체 질량을 기준으로 5중량% 내지 30중량%의 범위인 가소제의 이점이 있다.

[0576] 특정 양태에서, 장용 코팅은 당업계에 공지된 바와 같이 필름의 점착성을 감소시키고 응집을 방지하기 위해 하나 이상의 항-점착제(항접착제)를 포함한다. 적합한 항-점착제는 활석, 글리세릴 모노스테아레이트, 발연 실리카(예를 들어, AEROSIL™ 200), 침강 실리카(예를 들어, SIPERNAT™ PQ) 및 마그네슘 스테아레이트를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 항-점착제는 예를 들어 건조 중합체 질량을 기준으로 약 10중량% 내지 100중량%, 약 10중량% 내지 약 50중량%, 약 10중량% 내지 약 30중량%, 또는 약 15중량% 내지 약 30중량%의 범위인 임의의 적절한 양으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 일 양태에서, 건조 중합체 질량을 기준으로 15중량% 내지 약 30중량% 범위이다.

[0577] 하나 이상의 계면활성제가 또한 당업계에 공지된 바와 같이 기재 습윤성을 증가시키고/시키거나 현탁액을 안정화시키기 위해 장용 코팅 혼합물에 첨가될 수 있다. 계면활성제는 폴리소르베이트 80, 소르비탄 모노올레이트 및 나트륨 도데실 설페이트, 및 본 명세서에 기술된 다른 계면활성제를 포함한다.

[0578] 장용 코팅은 임의의 적합한 공정에 의해 형성될 수 있다. 코팅 공정은 예를 들어 팬 코팅, 유동층 코팅 및 건조 코팅(예를 들어, 열 건조 코팅 및 정전기 건조 코팅)을 포함한다. 용매를 사용하는 팬 코팅 및 유동층 코팅은 잘 확립된 공정이다. 액체 코팅에서 장용 물질 및 선택적인 부형제(예를 들어, 안료, 가소제, 항-점착제)는 유기 용매 또는 물에서 혼합되어 용액 또는 분산액을 형성한다. 코팅 용액 또는 분산액을 팬 코터 또는 유동층 건조기에서 고형 복용 형태로 분무하고 뜨거운 공기에 의해 건조한다. 예를 들어, Wurster 유동층 코팅 공정에서, 코팅 유체는 유동층 장치의 바닥에서 분무된다. 대안적으로, 코팅 유체는 탑 스프레이에 의해 적용된다. 특정 양태에서 접선 스프레이가 적용된다.

[0579] 적용되는 장용 물질의 양은 원하는 산 내성 및 방출 특성을 달성하기에 충분하다. 예를 들어, 일 양태에서 장용 코팅의 양은 지연-방출 복용 형태에 대한 USP <711> 요구사항(USP 36-NF 31)을 충족하므로 0.1N HCl에서 2시간 후 약물의 10.0중량%를 방출하지 않는다. 특정 양태에서, 제형은, 예를 들어 USP 36-NF 31 섹션 <711>의 용해 방법을 사용하여, pH 6.8 완충액에서 20분 내에 활성제의 적어도 80%를 방출한다.

- [0580] 일 양태에서, 장용 코팅은 코팅되지 않은 입자 코어와 비교하여 중량 증가로 측정할 때 약 10% 내지 40%, 또는 25% 내지 약 35%의 범위, 또는 코팅되지 않은 입자 코어의 중량을 기준으로 약 25% 내지 약 31% 중량 증가, 약 27% 내지 약 31% 중량 증가, 또는 약 28.5% 내지 약 31% 중량 증가의 범위인 양으로 존재한다.
- [0581] 제형은 캡슐 쉼을 포함할 수 있다. 연질 및 경질 캡슐 쉼이 알려져 있다. 일 양태에서, 캡슐 쉼은 하드-캡슐 쉼, 예를 들어 젤라틴 캡슐 쉼 또는 식물성 하드 캡슐 쉼이다. 특정 양태에서, 캡슐 쉼은 본 명세서에 기재된 하나 이상의 장용 코팅을 포함한다. 가속된 보관 동안 젤라틴 캡슐이 붕괴될 수 있다. 따라서, 특정 양태에서, 제형은 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 캡슐 쉼을 포함할 수 있다.
- [0582] 본 발명의 고형 복용 형태는 위에서의 분해를 방지하거나 지연시키도록 제형화될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 제어된 방출 제형은 예를 들어 장용 코팅을 포함할 수 있거나 표면으로부터 침식되도록 제형화될 수 있다.
- [0583] 일 양태에 따르면, 고형 경구 복용 형태는 치료적으로 유효한 양의 본 개시내용의 경구 약학적 조성물을 포함하며, 여기서 고형 경구 복용 형태는 경구로 투여될 때 약 250초 내지 약 650초의 분해 시간을 갖는다. 또 다른 양태에서, 분해 시간은 경구로 투여될 때 약 350 내지 약 550초이다. 일 양태에서 분해 시간은 경구로 투여될 때 60초 초과이다. 또 다른 양태에서, 분해 시간은 경구로 투여될 때 400초 초과이다. 분해 시간은 USP <701>에 기술된 방법을 사용하여 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 물에서 결정될 수 있다.
- [0584] 본 개시내용의 고형 복용 형태(예를 들어, 정제 또는 캡슐)는 장용 코팅에 의해 덮일 수 있다. 장용 코팅은 고형 복용 형태에서의 약물 조성물 또는 조성물들의 방출을 지연시키기 위한 일차 제어로서 작용할 수 있다. 장용 코팅은 위에서 온전한 상태를 유지하고 고형 복용 형태에서 위 안으로의 방출을 방지하거나 지연시킨다. 활성제의 방출은 고형 복용 형태가 장에 도달할 때까지 지연된다. 장에 들어가면 더 높은 pH가 활성제의 방출을 야기한다. 장용 코팅은 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 프탈레이트, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 아세테이트 석시네이트, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트, 셀룰로스 아세테이트 트리멜리테이트, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 폴리(메타크릴산-에틸아크릴레이트) 및 폴리(메타크릴산-메틸 메타크릴레이트)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 다른 장용 코팅은 미국 특허 번호 5,851,579에 기술되어 있으며, 이는 참조로 본 명세서에 포함된다.
- [0585] 본 개시내용의 일 양태에서, 장용 코팅은 전체 정제 또는 다른 복용 형태에 적용된다. 일 양태에서 장용 코팅은 마이크로입자 및/또는 나노입자를 포함하는 시스템과 같은 다중-미립자 시스템에 적용된다.
- [0586] 본 개시내용의 고형 복용 형태는 정제(또는 다른 복용 유니폼)의 표면으로부터, 또는 다중-미립자 시스템(예를 들어, 마이크로입자를 포함하는 시스템)의 표면에서 침식되도록 제형화될 수 있다. 이들 표면 침식 제형은 분해되기보다는 표면에서 천천히 용해된다. 표면 침식의 속도를 제어함에 의해 고형 복용 형태의 활성제 및 약물 조성물의 방출이 지연될 수 있다. 표면 침식 제형은 고형 경구 복용 형태가 장에 도달할 때까지 활성제 또는 약물 조성물의 실질적인 방출이 일어나지 않도록 제형화될 수 있다.
- [0587] 일부 양태에서, 본 개시내용의 고형 복용 형태는 또한 뉴클레아제 억제제와 같은 보호제를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 뉴클레아제 억제제는 아우린트리카르복실산을 포함한다. 일부 양태에서, 뉴클레아제 억제제는 RNasin과 같은 광범위한 특이성 뉴클레아제 억제제를 포함한다. 일부 양태에서, 뉴클레아제 억제제는 GS-6620, IDX184, PSI-7777, PSI-938, RG7128, TMC649128 또는 ABT-072를 포함한다.
- [0588] 일부 양태에서, 본 개시내용의 고형 복용 형태는 또한 GalNAc 접합체 모이어티의 분해를 방지하거나 감소시키는 보호제를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 보호제는 올리고머로부터 GalNAc 접합체 모이어티의 절단을 방지하거나 감소시킨다. 일부 양태에서, 보호제는 GalNAc 모이어티에서 하나 이상의 N-아세틸갈락토스아민 단위의 절단 또는 분해를 방지하거나 감소시킨다.
- [0589] 일부 양태에서, 본 개시내용의 고형 복용 형태는 또한 제산 화합물을 포함할 수 있다. 용어 "제산 화합물"은 위산(예를 들어, 수성 용액 중의 HCl)을 중화할 수 있는 임의의 약학적으로 허용가능한 화합물을 지칭하며, 바람직하게는 여기서 제산 화합물 1몰은 적어도 0.5몰의 HCl을 중화할 수 있고, 보다 바람직하게는 적어도 1몰의 HCl을 중화할 수 있다. 본 명세서에 기재된 치료적으로 활성인 작용제(예를 들어, CIVI 008 단독 또는 스타틴과 같은 제2 제제와 조합), 경구 전달제(예를 들어, SNAC 또는 5-CNAC) 및 프로테아제 억제제는 비록 본 발명의 일부 실시형태에서 위산을 중화시키는 일부 능력을 나타낼 수 있지만, 그것은 "제산제 화합물"이라는 어구의 범주에서 제외된다.

- [0590] 하나 이상의 제산제 화합물(본 명세서에 기재된 개시내용의 임의의 양태에 따름)과 관련하여 본 명세서에 기재된 양태 중 임의의 하나에 사용될 수 있는 제산 화합물의 예는 제한 없이, 탄산칼슘, 칼슘 글루콘산염, 시트르산칼슘, 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 글루콘산나트륨, 시트르산나트륨, 수산화나트륨, 탄산칼륨, 중탄산칼륨, 글루콘산칼륨, 시트르산칼륨, 수산화칼륨, 탄산마그네슘, 글루콘산마그네슘, 시트르산마그네슘, 수산화마그네슘, 산화마그네슘, 탄산알루미늄, 글루콘산알루미늄, 시트르산알루미늄 및 수산화알루미늄을 포함한다.
- [0591] 일부 양태에서, 본 개시내용의 고품 복용 형태는 또한 위산 분비 억제제를 포함할 수 있다. 용어 "위산 분비 억제제"는 이미 분비된 산에 대해 반드시 어떠한 영향도 미치지 않는지만 위 안으로 산의 분비를 감소시키는 임의의 제제를 지칭한다. 제산제 조성물과 관련하여 본 명세서에 기술된 임의의 양태에서 사용될 수 있는 위산 분비 억제제의 예는 제한 없이, 시메티딘, 파모티딘, 니자티딘 및 라니티딘과 같은 H₂수용체 길항제; 및 오메프라졸, 란소프라졸, 텍란소프라졸, 에소메프라졸, 라베프라졸 및 일라프라졸과 같은 양성자 펌프 억제제를 포함한다.
- [0592] 본 개시내용의 고품 복용 형태는 또한 효소 억제제를 포함할 수 있다. 고품 복용 단위 형태에 포함된 효소 억제제는 효소적 분해에 민감할 수 있는 올리고머 또는 기타 활성제의 분해를 방지할 수 있다. 효소 억제제는 본 명세서에 참조로 포함된 미국 특허 번호 6,458,383에 기술되어 있다. 효소 억제제의 선택 및 수준은 독성 및 억제제의 효능에 기반하고, 당업자에게 명백할 것이다. 이론에 구애됨이 없이, 억제제는 효소의 기질 결합 부위에 결합함에 의해 기질에 대한 접근을 방지함에 의한, 경쟁적 억제제; 그의 결합 부위가 동일하지 않기 때문에 기질과 함께 효소 부위에 동시에 결합할 수 있는 비경쟁적 억제제; 및/또는 효소 구조에서 필수적 금속 이온이 없는 결합에 기인한 효소적 활성에서의 손실로 인한 착화제로서 단독으로 또는 조합하여 기능할 수 있다고 여겨진다.
- [0593] 일부 양태에서, 본 명세서에 기술된 임의의 조성물(조성물 단위 복용 형태 포함)에 포함된 프로테아제 억제제는 적어도 하나의 트립신 억제제를 포함한다. 일부 양태에서, 프로테아제 억제제는 본질적으로 하나 이상의 트립신 억제제(들)로 구성된다.
- [0594] 이용될 수 있는 트립신 억제제의 예는 제한 없이, 리마콩 트립신 억제제, 아프로티닌, 대두 트립신 억제제, 오보뮤코이드 트립신 억제제 및 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 트립신 억제제는 대두 트립신 억제제(SBTI)를 포함한다. 일부 양태에서, 트립신 억제제(선택적으로 적어도 하나의 프로테아제 억제제)는 본질적으로 SBTI로 구성된다.
- [0595] 일부 양태에서, 프로테아제 억제제는 적어도 하나의 세르핀을 포함한다. 일부 양태에서, 프로테아제 억제제는 본질적으로 하나 이상의 세르핀(들)으로 구성된다. 본 명세서에 기재된 양태 중 임의의 하나에서 이용될 수 있는 세르핀의 예는 제한 없이 알파 1-항트립신, 항트립신-관련된 단백질, 알파 1-항키모트립신, 칼리스타틴, 단백질 C 억제제, 코르티솔 결합 글로불린, 티록신-결합 글로불린, 안지오텐시노젠, 센터린, 단백질 Z-관련된 프로테아제 억제제, 바스핀, 단백질/호중구 엘라스타제 억제제, 플라스미노젠 활성제 억제제-2, 편평 세포 암종 항원-1(SCCA-1), 편평 세포 암종 항원-2(SCCA-2), 마스핀, 프로테이나제 억제제 6(PI-6), 메그신, 세르핀 B8(PI-8), 세르핀 B9(PI-9), 보마핀, 유코핀, 허핀/헤드핀, 안티트롬빈, 헤파린 보조인자 II, 플라스미노젠 활성제 억제제 1, 글리아-유래된 넥신, 색소 상피 유래된 인자, 알파 2-안티플라스민, 보체 1-억제제, 47kDa 열충격 단백질(HSP47), 뉴로세르핀 및 판핀을 포함한다.
- [0596] 일부 양태에서, 프로테아제 억제제는 적어도 하나의 시스테인 프로테아제 억제제를 포함한다. 일부 양태에서, 프로테아제 억제제는 본질적으로 하나 이상의 시스테인 프로테아제 억제제(들)로 구성된다. 본 명세서에 기재된 양태 중 임의의 하나에 이용될 수 있는 시스테인 프로테아제 억제제의 예는 제한 없이, 유형 1 시스타틴, 유형 2 시스타틴, 인간 시스타틴 C, D, S, SN 및 SA, 시스타틴 E/M, 시스타틴 F, 및 유형 3 시스타틴(키니노젠 포함)을 포함한다.
- [0597] 일부 양태에서, 프로테아제 억제제는 적어도 하나의 트레오닌 프로테아제 억제제를 포함한다. 일부 양태에서, 프로테아제 억제제는 본질적으로 하나 이상의 트레오닌 프로테아제 억제제(들)로 구성된다. 본 명세서에 기재된 양태 중 임의의 하나에서 이용될 수 있는 트레오닌 프로테아제 억제제의 예는 제한 없이, 보르테조미, MLN-519, ER-807446 및 TMC-95A를 포함한다.
- [0598] 일부 양태에서, 프로테아제 억제제는 적어도 하나의 아스파르트산 프로테아제 억제제를 포함한다. 일부 양태에서, 프로테아제 억제제는 본질적으로 하나 이상의 아스파르트산 프로테아제 억제제(들)로 구성된다. 본 명세서에 기재된 양태 중 임의의 하나에 이용될 수 있는 아스파르트산 프로테아제 억제제의 예는 제한 없이, α2-마크로글로불린, 펩스타틴 A, 아스파르트산 프로테아제 억제제 11, 아스파르트산 프로테아제 억제제 1, 아스파르트산 프로테아제 억제제 2, 아스파르트산 프로테아제 억제제 3, 아스파르트산 프로테아제 억제제 4, 아스파르트산

프로테아제 억제제 5, 아스파르트산 프로테아제 억제제 6, 아스파르트산 프로테아제 억제제 7, 아스파르트산 프로테아제 억제제 8, 아스파르트산 프로테아제 억제제 9, 펩신 억제제 Dit33 및 프로테아제 A 억제제 3을 포함한다.

[0599] 일부 양태에서, 프로테아제 억제제는 적어도 하나의 메탈로프로테아제 억제제를 포함한다. 일부 양태에서, 프로테아제 억제제는 본질적으로 하나 이상의 메탈로프로테아제 억제제(들)로 구성된다. 본 명세서에 기재된 양태 중 임의의 하나에서 이용될 수 있는 메탈로프로테아제 억제제의 예는 제한 없이, 안지오텐신-1-전환효소 억제성 펩티드, 항출혈 인자 BJ46a, 베타-카제인, 프로테이나제 억제제 CeKI, 베타 메탈로프로테이나제 억제제 DM43, 카르복시펩티다제 A 억제제, smp1, IMPI, 알칼리 단백분해효소, 라텍스, 카르복시펩티다아제 억제제, 항출혈 인자 HSF, 테스티칸-3, SPOCK3, TIMP1, 메탈로프로테이나아제 억제제 1, 메탈로프로테이나아제 억제제 2, TIMP2, 메탈로프로테이나아제 억제제 3, TIMP3, 메탈로프로테이나아제 억제제 4, TIMP4, 추정 메탈로프로테이나아제 억제제 태그-225, 메탈로프로테아제의 조직 억제제, WAP, 카잘 억제제, 면역글로불린, 및 쿠니즈 및 NTR 도메인-함유 단백질 1을 포함한다.

[0600] 본 명세서에 기재된 양태 중 임의의 하나에서 이용될 수 있는 프로테아제 억제제의 예는 또한 제한 없이, AEBSF-HCl, ϵ -아미노카프로산, α 1-안티키모토티신, 안티페인, 항트롬빈 III, α 1-항트립신, APMSF(4-아미디노페닐-메탄 설포닐-플루오라이드), 스프로티닌, 벤즈아미딘, 키모스타틴, DFP(디이소프로필플루오로-포스페이트), 류펩틴, 4-(2-아미노에틸)-벤젠설포닐 플루오라이드 하이드로클로라이드, PMSF(페닐메틸 설포닐 플루오라이드), TLCK(1-클로로-3-토실아미도-7-아미노-2-헵탄논), TPCK(1-클로로-3-토실아미도-4-페닐-2-부탄논), 펜타미딘 이소티오네이트, 펩스타틴, 구아니딘, α 2-마크로글로불린, 아연의 킬레이트제 및 요오도아세테이트를 포함한다.

[0601] 특정 양태에서, 정제 또는 캡슐은 위의 낮은 pH에서 용해되지 않도록 pH-민감성 코팅으로 코팅될 수 있다. 예를 들어, pH-민감성 물질은 복용 형태가 위에서 비워질 때까지 유의하게 용해되지 않는다. 소장의 pH는 십이지장망울에서 약 4.5에서 약 6.5로, 소장의 원위부(회장)에서 약 7.2로 점진적으로 증가한다. 약 3시간(예를 들어, 2-3시간)의 소장 통과 시간에 상응하는 예측가능한 용해를 제공하고 그 안에서 재현가능한 방출을 허용하기 위해, 코팅은 십이지장의 pH 범위 내에서 용해되기 시작하고 소장 내의 pH 범위에서 계속 용해되어야 한다. 따라서, 장용 코팅의 양(두께)은 소장(예를 들어, 근위 및 중간-소장) 내에서 약 3-시간의 통과 시간 동안 실질적으로 용해되기에 충분해야 한다.

[0602] 일부 양태에서, 본 발명의 약학적 복용 형태는 pH 민감성 코팅의 특정 디자인을 통해 대상체, 예를 들어 인간 대상체의 공장, 예를 들어 말단 공장에서 그의 활성 화합물(들)을 방출한다. 코팅은 바람직하게는 약 5.5 내지 약 7.5, 바람직하게는 약 7.2 내지 약 7.3의 pH 값에서 실질적으로 분해 및/또는 용해하는 pH 민감성 중합체로부터 선택되는 장용 코팅의 특정 선택에 의해 공장에서 실질적으로 분해 및/또는 용해된다. 이러한 pH 민감성 중합체는 바람직하게는 하이드록시프로필메틸 셀룰로스(이하 "하이프로멜로스"로도 지칭됨) 및 메타크릴산과 메타크릴메타크릴레이트의 음이온성 공중합체로부터 선택된다. 일부 양태에서, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스를 함유하거나 이로 제조되는 pH 민감성 장용 코팅은 하이드록시프로필메틸 셀룰로스 아세테이트 숙시네이트이다. 이 종류의 상업적으로 이용가능한 제품은 AQOAT®, 예를 들어 AQOAT®-HF(Shin-Etsu Chemical Co., 일본 시오다 소재)이다. 메타크릴산 및 메타크릴메타크릴레이트의 음이온성 공중합체의 유형의 다른 양태에서 다양한 형태의 EUDRAGIT® 중합체가 또한 사용될 수 있다. EUDRAGIT®은 독일 에센 소재의 Evonik Healthcare & Nutrition GmbH에서 상업적으로 이용가능하다. 일부 양태에서, EUDRAGIT® FS30D는 코팅의 pH 민감성 중합체 또는 적어도 이의 일부로서 사용된다.

[0603] 개시내용의 추가 양태에서, 상이한 코팅이 조합되어 적용될 수 있다. 일 양태에 따르면, 코팅은 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스 및 메타크릴산과 메타크릴메타크릴레이트의 음이온성 공중합체의 조합을 포함하거나 이로 제조된다. 일부 양태에서, 전형적으로 하나의 pH 민감성 중합체의 서브-코팅이 제1 층으로서 적용되고 제2 pH 민감성 중합체의 코팅이 서브-코팅 상에 제2 층으로서 적용되도록 코팅의 조합이 적용된다. 예를 들어, pH 민감성 코팅은 각각 제1 층으로서 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스를 포함하거나 또는 이의 서브-코팅, 및 서브-코팅 상에 제2 층으로서 제공되는 메타크릴산과 메타크릴메타크릴레이트의 음이온성 공중합체를 포함하거나 이로 제조되는 제2 코팅을 포함할 수 있다. 추가 양태에서, 발명의 약학적 경구 복용 형태의 코팅은 메타크릴산 및 메타크릴메타크릴레이트의 음이온성 중합체, 예컨대 EUDRAGIT®, 예를 들어 EUDRAGIT® FS30D를 포함하거나 이로 제조되는 제1 층(서브-코팅), 및 AQOAT®, 더 바람직하게는 AQOAT®-HF와 같은 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스를 포함하거나 이로 제조되는 제2 층을 포함하는 코팅을 포함한다. 보다 바람직하게는, 메타크릴산과 메타크릴메타크릴레이트의 음이온성 공중합체, 예를 들어 EUDRAGIT® FS30D와 같은 EUDRAGIT®은 AQOAT®, 예를 들어 AQOAT®-HF와 같은 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스보다 적은 양으로 존재한다. 환언하면, 이 유형의 조합의 제1

층의 두께는 이 조합에서 제2 층의 두께보다 더 낮다. 보다 구체적으로, 제1 층과 제2 층 사이의 양 또는 두께의 비율은 각각 전형적으로 약 1:10 내지 약 1:50, 예를 들어 약 1:20 내지 약 1:30의 범위이다.

[0604] 일 양태에서, 본 개시내용은 치수가 작은, 바람직하게는 최대 치수가 3mm 미만, 보다 바람직하게는 최대 치수가 약 0.6mm 내지 약 1.7mm인 상기 약술된 특정 약학적 복용 형태를 제공한다. 이러한 작은 복용 형태는 편리하게는 과립 또는 펠렛의 형태를 취할 수 있다. 발명의 작은 복용 형태는 대상체의 위에서 유체처럼 거동하여 발명의 약학적 경구 복용 형태가 장관 안으로 빠르고 지속적으로 유입되도록 하고, 따라서 대상체의 공장, 바람직하게는 대상체의 말단(즉, 원위 부분) 공장에서의 표적화된 폭발적인 방출 영역으로 이것을 보다 고르게 수송할 수 있는 이점을 갖는다.

[0605] 본 개시내용의 다른 양태에서, 약학적 경구 복용 형태가 더 큰 크기, 즉 복용 형태의 최대 치수가 약 3mm 이상인 형태인 것이 또한 편리할 수 있으며, 상한 크기는 편리하게는 복용 형태가 대상체에 의해 잘 삼킬 수 있도록 당업자에 의해 선택되어 제한된다. 발명의 약학적 경구 복용 형태에 대한 전형적인 범위는 최대 치수가 약 3 내지 약 10mm인 복용 형태이다. 이 범위는 mm의 모든 정수, 즉 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10mm 뿐만 아니라 이의 임의의 하위-비율을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0606] 젤라틴은 산 또는 알칼리에 의한 동물 콜라겐의 부분 가수분해에 의해 얻어질 수 있는 정제된 단백질 분획의 혼합물이다. 산 가수분해의 과정은 유형 A로 지칭되고 알칼리성 가수분해에 의한 과정은 유형 B로 지칭된다. 젤라틴은 15,000에서 250,000의 범위인 분자량을 생성할 수 있는 아미노산으로 구성된 선형 중합체이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 젤라틴은 동물 콜라겐의 산 및 알칼리성 가수분해물을 포함한다.

[0607] 젤라틴은 코팅, 현탁화제, 정제 결합제 및/또는 점도-증가제와 같은 많은 기능을 제공하기 위해 본 발명의 제형에 적용될 수 있다. 물에서 젤라틴은 부풀어 오르고 부드러워지고 자체 무게의 5-10배 사이의 물을 흡수할 수 있다. 특정 양태에서 젤라틴 대신 적용될 수 있는 몇 가지 친수성 자연 및 합성 중합체가 있다. 예를 들면, (a) 알긴산, 텍스트란 셀레이트, 펙틴과 같은 음이온성 중합체; (b) 키토산 또는 폴리리신과 같은 양이온성 산; (c) 카르복실메틸 키틴 또는 피브린과 같은 양친매성 중합체; 또는 (d) 텍스트란, 아가로스 또는 폴루란과 같은 중성 중합체.

[0608] 본 명세서에서 사용된 용어 젤라틴은 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980)의 1245페이지 및 1576-1582페이지에 개시된 젤라틴 및 젤라틴 대체물을 포함하며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다. 용어 젤라틴은 또한 미국 특허 번호 6,090,915, 미국 특허 번호 4,043,996, 미국 특허 번호 4,064,008, 미국 특허 번호 4,176,117, 미국 특허 번호 4,889,920, 미국 특허 번호 4,374,063, 미국 특허 번호 5,210,182, 미국 특허 번호 4,232,425, 미국 특허 번호 4,402,873, 미국 특허 번호 4,427,583, 미국 특허 번호 5,093,474, 미국 특허 번호 5,288,408 및 미국 특허 번호 5,459,241에 개시된 조성물을 포함하며, 이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0609] 본 명세서에서 사용된, 용어 젤라틴은 또한 젤라틴 대체물 및 대체물들을 포함한다. 일반적으로, 그러한 젤라틴 대체물은 균일한 조성을 갖고 젤라틴의 모든 필수적 특성을 갖는, 용이하게 얻을 수 있는(예를 들어, 식물성) 물질로부터 만들어 질 수 있다. 연질 젤 필름 및 캡슐의 제조에서, 연질 젤 조성물은 바람직하게는 양호한 습윤 및 건조 필름 강도, 냉수, 오일 및 알코올에 대한 불용성, 뜨거운 물에서 용해성, 온도 및 압력 밀봉성, 필름 투명도, 필름 유연성, 식용성, 캡슐화되어 지는 약물 또는 기타 물질에 대한 불활성, 및 뜨거운 액체에서 젤을 형성하는 빠른 경화의 특성을 보유한다.

[0610] 하나의 젤라틴 대체물은 변성 전분 및 밀랍성 전분으로부터 선택되는 전분 물질; 검; 및 참조로 본 명세서에 포함되는 미국 특허 번호 6,375,981에 개시된 가소제를 포함하는 필름-형성 조성물이다. 변성 전분 또는 왁스상 전분은 바람직하게는 약 1 미만의 텍스트로스 당량(DE)을 갖고, 더 바람직하게는 측정가능한 DE를 갖지 않는다. 이 조성물은 100% 젤라틴-프리일 수 있지만 그렇게 요구되는 것은 아니다. 따라서, 조성물은 젤라틴 대체로서 또는 젤라틴 제형에서 증량제로서 사용될 수 있다.

[0611] 또 다른 젤라틴 대체물은 미국 특허 번호 6,440,480에 개시된 밀 섬유 겔이며, 이는 본 명세서에 참조로 포함된다. 밀 섬유 겔은 밀 섬유의 열적/물리적 가공에 의해 만들어 진다. 특수 밀링 기술이 밀 재료를 처리하기 위해 사용되어 큰 비율의 미세 입자를 함유하는 생성물을 초래한다. 생성물을 말도텍스트린과 혼합함에 의해 특정한 개선사항이 얻어진다. 이렇게 얻은 생성물은 펜실베이니아주 필라델피아 소재의 FMC Biopolymer에 의해 상표명 VITACEL® 하에서 판매된다. 이 생성물은 물에 용이하게 분산되는 건조 분말이다. 분산액을 교반하면 전단력을 통해 겔이 형성된다. 밀 섬유 겔은 요거트나 아이스크림의 젤라틴 대체제로 사용될 수 있는 것으로 보고되었

다.(I. I. Bollinger, Food Marketing & Techn. October 1995, 4-6).

[0612] 카라기난은 또 다른 젤라틴 대체물이다. 카라기난은 해조류에서 유래된 다당류 하이드로콜로이드인, 자연 하이드로콜로이드이다. 그것은 유의한 수의 분지 또는 치환 없이 선형인 반복되는 당 단위의 탄수화물 중합체를 포함한다.

[0613] 실시예

[0614] 올리고뉴클레오타이드는 EXPEDITE™ 8900/MOSS 합성기(다중 올리고뉴클레오타이드 합성 시스템) 또는 OLIGOMAKER™ 48에서 각각 4 μmol 또는 1 μmol 규모로 포스포르아미다이트 접근법을 사용하여 유리된 범용 지지체에서 합성되었다. 합성의 종료 시, 60℃에서 5-16시간 동안 수성 암모니아를 사용하여 고형 지지체로부터 올리고뉴클레오타이드를 절단하였다. 올리고뉴클레오타이드는 역상 HPLC(RP-HPLC) 또는 고체상 추출에 의해 정제되고 UPLC에 의해 특성화되었고, 분자 질량은 ESI-MS에 의해 추가로 확인되었다. 보다 자세한 사항은 아래를 참조한다.

[0615] **올리고뉴클레오타이드의 신장:** β-시아노에틸-포스포르아미다이트의 커플링(DNA-A(Bz), DNA-G(ibu), DNA-C(Bz), DNA-T, LNA-5-메틸-C(Bz), LNA-A(Bz), LNA-G(dmf), LNA-T 또는 C6-S-S-C6 링커)은 활성제로서 아세토니트릴(0.25M)에서 DCI(4,5-디시아노이미다졸) 및 아세토니트릴에서 5'-O-DMT-보호된 아미다이트 0.1M의 용액을 사용함에 의해 수행되었다. 최종 사이클을 위해 상업적으로 이용가능한 C6-연결된 콜레스테롤 포스포르아미다이트를 DCM에서 0.1M로 사용하였다. 포스포로티오에이트 연결의 도입을 위한 티올화는 수소화잔탄(아세토니트릴/피리딘 9:1에서 0.01M)을 사용하여 수행되었다. 포스포디에스테르 연결은 THF/피리딘/물 7:2:1 내 0.02M 요오드를 사용하여 도입되었다. 나머지 시약은 올리고뉴클레오타이드 합성에 전형적으로 사용되는 것들이었다. 고체상 합성 후 접합을 위해, 상업적으로 이용가능한 C6 아미노링커 포스포르아미다이트를 고체상 합성의 마지막 사이클에 사용하였고 고체 지지체로부터의 탈보호 및 절단 후에 아미노연결된 탈보호된 올리고뉴클레오타이드를 단리하였다. 접합체는 표준 합성 방법을 사용하여 작용기의 활성화를 통해 도입되었다.

[0616] **RP-HPLC에 의한 정제:** 미정제 화합물을 PHENOMENEX™ JUPITER® C18 10 μ 150x10mm 컬럼에서 정제용 RP-HPLC에 의해 정제하였다. 0.1M 암모늄 아세테이트 pH 8 및 아세토니트릴을 5mL/분의 유속에서 완충액으로 사용하였다. 수집된 분획을 동결건조하여 정제된 화합물을 전형적으로 백색 고체로 얻었다.

[0617] **약어:** DCI(4,5-디시아노이미다졸), DCM(디클로로메탄), DMF(디메틸포름아미드), DMT(4,4'-디메톡시트리틸), THF(테트라하이드로퓨란), Bz(벤조일), Ibu(이소부티릴), RP-HPLC(역상 고성능 액체 크로마토그래피)

[0618] 합성된 화합물은 본 개시내용의 도면 및 표에 나타나 있다.

[0619] 실시예 1

[0620] 새로운 PCSK9 표적 모티프 발견

[0621] 인간 및 영장류 PCSK9에 특이적인 521개의 항-PCSK9 안티센스 올리고뉴클레오타이드 - 모두 10개의 DNA를 측정한 3개의 잠금 핵산, 즉 16-mer LNA 캡머 디자인을 가진 -를 디자인하고 합성하였다. 인간 세포주 15PC3은 농도 0.3 μM에서 인간 PCSK9에 표적화된 잠금 핵산-변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 모의와 함께 3일 동안 인큐베이션하였다. 각각의 항-PCSK9 올리고뉴클레오타이드는 3개의 독립적인 실험에서 테스트되었다. PCSK9 mRNA 수준은 기재된 바와 같이 실시간 PCR을 사용하여 추출된 RNA로부터 정량화되었고, β-액틴 mRNA에 대해 정규화되고 도 8에서 12개의 모의 처리된 샘플에서의 평균 수준에 비하여, 도 9에서 가장 강력한 분자의 부분-집합의 클로즈-업으로 제시되었다.

[0622] 실시예 2

[0623] 실험실내 mRNA 녹다운

[0624] 인간 세포주 15PC3은 농도 0.0012 μM, 0.06 μM, 0.3 μM 및 1.5 μM에서 인간 PCSK9에 표적화된 서열번호: 1 내지 8을 갖는 잠금 핵산 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 모의와 함께 3일 동안 인큐베이션하였다. PCSK9 mRNA 수준은 기재된 바와 같이 실시간 PCR을 사용하여 추출된 RNA로부터 정량화되었고, 도 10에서 4개의 모의 처리된 샘플에서의 평균 수준에 비하여 제시되었다. 각각의 올리고뉴클레오타이드에 대해, 절반 최대 유효 농도(EC₅₀)로 정량화된 역가는 하한이 0%로 고정되고 상한이 100%로 고정된 2-매개변수 로지스틱 형식에서 Hill 방정식의 최소 제곱 피팅에 의해 EC₅₀ = 추정값 ± 표준편차로 결정되었다.

[0625] 실시예 3

[0626] **생체내 알라닌 아미노트랜스퍼라제 ALT 수준**

[0627] 도착 시 대략적으로 20g 중량의 4주령 암컷 NMRI 마우스(Taconic, 덴마크 소재)에 용량 7.5 및 15mg/kg에서 인간 PCSK9에 표적화된 서열번호 9 내지 16을 갖는 잠금 핵산-변형된, 콜레스테롤-접합된 올리고뉴클레오타이드 또는 식염수를 1회 정맥내로 주사하였다. 투여 후 7일째 마우스를 희생시키고 효소 검정(Horiba ABX Diagnostic s)을 사용하여 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT)의 혈청 수준을 결정하였다. 5마리 마우스의 각 처리군에 대해 평균 및 표준편차를 계산하고 식염수 처리 마우스의 평균 수준에 비하여 **도 11**에 제시하였다. ALT 상승은 전부는 아니지만 일부의 콜레스테롤 접합된 분자에 대해 두 농도 모두에서 나타났다. 서열번호: 9 및 10과 같은 몇 가지 화합물은 콜레스테롤이 간에서 화합물의 흡수를 증강시키기 위한 접합체로 사용된 경우에도 임상적으로 의미있는 방식으로 마우스에서 ALT를 증강시키지 않았다.

[0628] **실시예 4**

[0629] **비인간 영장류 연구**

[0630] 이 연구의 일차 목적은 사이노몰구스 원숭이에게 항-PCSK9 LNA 화합물의 단일 느린 일시 주사 후 7주에 걸쳐 선택된 지질 마커를 조사하고 원숭이에서 화합물의 잠재적 독성을 평가하는 것이었다. 이 연구에 사용된 화합물은 초기 농도 0.625mg/ml 및 2.5mg/ml로 멸균 식염수(0.9%)에서 제조된, 서열번호: 10, 13, 18, 19, 20 및 21이었다.

[0631] 적어도 24개월령의 수컷 원숭이를 사용하였고, 수돗물에 자유롭게 접근할 수 있게 하였고 180g의 MWM(E) SQC SHORT 확장식이(Dietex France, SDS, 프랑스 생 그라티앙 소재)를 동물당 매일 분배하였다. 각 우리에 분배된 총 사료량은 당일 우리에 있는 동물의 수에 따라 계산되었다. 부가하여, 매일 각 동물에게 과일이나 채소를 제공했다. 동물을 처리 기간의 시작 전 적어도 14일의 기간 동안 연구 조건에 순응시켰다. 이 기간 동안 처리-전 조사를 수행하였다. 동물에게 각각 서열번호: 10, 13, 18 및 21을 0.25mg/kg, 1.0mg/kg 또는 2.5mg/kg의 단일 용량으로 정맥내로(i.v.) 또는 서열번호: 19 및 20에 대해 1.0mg/kg 또는 2.5mg/kg의 단일 용량으로 투여했다. 용량 부피는 0.4mL/kg이었다. 그룹당 두(2) 마리 동물을 사용하였다.

[0632] 용량 제형을 1일차에 1회 투여하였다. 동물을 처리 후 7주의 기간 동안 관찰하였고, 51일차에 연구로부터 해제하였다. 1일차는 처리 기간의 첫째 날에 해당하였다. 임상 관찰과 체중 및 음식 섭취(그룹당)를 연구 이전과 연구 동안 기록했다.

[0633] 다음 시점에서 혈액을 샘플링하고 분석을 수행했다.

연구 일	매개변수
-8	RCP, L, Apo-B, PCSK9*, OA
-1	L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
1	복용
4	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, OA
8	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
15	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
22	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
29	L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
36	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
43	L, PK, Apo-B, PCSK9* PK, OA
50	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA

[0634]

[0635] RCP는 일상적인 임상 병리학을 의미하고, LSB는 간 안전 생화학을 의미하고, PK는 약동학을 의미하고, OA는 기타 분석을 의미하고, L은 지질을 의미한다. 표시된 경우에 모든 생존 동물에 대해 결정된 매개변수는 -8, 15 및 50일차에 전체 생화학 패널(아래 전체 목록), 4, 8, 22 및 36일차에 간 안전성(ASAT, ALP, ALAT, TBIL 및 GGT 단독), 및 -1, 4, 8, 22, 29, 36 및 43일차에 지질 프로파일(총 콜레스테롤, HDL-C, LDL-C 및 트리글리세라이드) 및 Apo-B 단독 -이었다. 혈액(대략적으로 1.0mL)을 리튬 헤파린 튜브(ADVIA 1650 혈액 생화학 분석기를 사용함) 안으로 취하였다: Apo-B, 나트륨, 칼륨, 염화물, 칼슘, 무기 인, 글루코스, HDL-C, LDL-C, 요소, 크레아티닌, 총 빌리루빈(TBIL), 총 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 알칼리 포스파타제(ALP), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALAT), 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(ASAT), 크레아틴 키나아제, 감마-글루타밀 트랜스퍼라제(GGT), 락테이트 탈수소효소, 총 단백질, 알부민, 알부민/글로불린 비율.

[0636] **혈액 내 PCSK9의 분석:** PCSK9 분석을 위한 혈액 샘플을 -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 및 50일차에 수집하

였다. 정맥 혈액(대략적으로 2mL)을 각 동물에서의 적절한 정맥에서 혈청 분리 튜브(SST) 안으로 수집하였고 실온에서 적어도 60 ± 30분 동안 응고되도록 하였다. 혈액을 냉장된 조건(+4℃를 유지하도록 설정됨) 하에서 10분 동안 1000g에서 원심분리했다. 혈청을 3개의 개별 튜브 안으로 옮기고 ELISA 방법(Circulex Human PCSK9 ELISA 키트, CY-8079, 사이노몰구스 원숭이로부터의 샘플에 대해 검증됨)을 사용하여 CitoxLAB France에서 분석할 때까지 -80℃에서 저장했다.

[0637] **기타 분석:** W02011009697은 qPCR 및 PCSK9 mRNA 분석에 대한 방법을 제공한다. 기타 분석은 PCSK9 단백질 ELISA, ELISA를 사용한 혈청 Lp(a) 분석(Mercodia No. 10-1106-01), 조직 및 혈장 올리고뉴클레오타이드 분석(약물 함량), 샘플의 추출(표준- 및 QC-샘플), 및 ELISA에 의한 올리고뉴클레오타이드 함량 결정을 포함한다.

[0638] SEQ IS NOS: 10, 13, 18, 19, 20 및 21인 화합물의 투여 후 관찰된 사전-용량 값과 비교된 PCSK9 발현의 값은 다음 표에 나타나 있다:

2.5mg/kg 용량에 대한 값				
화합물 서열번호	PCSK9 단백질 4 일차 (용량-전의 퍼센트)	PCSK9 단백질 29 일차 (용량-전의 퍼센트)	최대 PCSK9 효과 (데이터는 용량-전의 퍼센트를 나타냄)	최대 LDL-C 효과 (데이터는 용량-전의 퍼센트를 나타냄)
10	86%	71.5%	69% (d15)	87% (d29)
13	81%	71%	71% (d29)	84% (d22)
18	57%	42%	42% (d29)	71% (d15)
21	80.5%	56%	55% (d29)	84% (d15)
20	51%	53%	48% (d4)	94% (d8)
19	55%	60%	55% (d4)	89% (d4)

[0639]

[0640] PCSK9 표적화 화합물로의 간독성 또는 신독성의 징후는 없었다. 특히, PCSK9-GalNAc 화합물은 광범위한 기간(연구의 전체 길이)에 걸쳐 유지되었던 PCSK9의 신속하고 매우 효과적인 하향 조절을 제공했으며, 이는 GalNAc 접합된 화합물이 신속한 초기 녹-다운, 및 긴 지속시간 둘 모두의 관점에서 더 효과적이라는 것을 예시하며, 결합되지 않은 모 화합물 및 콜레스테롤 접합과 같은 대체 접합 기술을 사용하는 화합물 둘 모두와 비교할 때 상대적으로 드물게 그리고 낮은 복용량으로 투여될 수 있음을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, 결합되지 않은 올리고머가 투여된 경우에도 녹 다운이 관찰되었다. 따라서, 양 유형의 화합물은 상이한 치료적 용도를 가질 수 있다. 예를 들어, 결합되지 않은 화합물은 일시적인 효과가 요구될 때 또는 예를 들어 로이딩 용량의 일부로 사용될 수 있다. 반대로, 결합된 올리고머는 장기간 효과가 필요할 때 투여될 수 있다.

[0641] 서열번호: 18은 연구 기간 전반에 걸쳐 PCSK9 및 LDL-C의 신속하고 지속적인 하향 조절을 제공했다(혈장 PCSK9 단백질 수준이 사전-용량의 71%인 단일 2.5mg/kg 용량의 투여 후 48일차에서 나타난 현저한 PCSK9 하향-조절로, 2.5mg/kg 용량에서 34일차에 나타남).

[0642] **실시예 5**

[0643] **랫트에서의 간 및 신장 독성 평가.**

[0644] 본 개시내용의 화합물을 설치류에서 그의 독성 프로파일에 대해 평가하였다. Wistar Han CrI:WI(Han)를 대략적으로 8주령의 연령에 사용하였다. 이 나이에 수컷의 무게는 대략적으로 250g이었다. 모든 동물은 SSNIFF R/M-H 펠릿 유지 식이(SSNIFF Spezialdiäten GmbH, 독일 쇠스트 소재)와 병에 담긴 수돗물(0.22µm 필터로 여과됨)에 자유롭게 접근했다. 10mg/kg/용량 및 40mg/kg/용량의 용량 수준이 사용되었고(피하 투여) 1 및 8일차에 복용되었다. 동물은 15일에 안락사되었다. 소변 및 혈액 샘플은 7 및 14일차에 수집되었다. 임상 병리학적 평가는 14일차에 수행하였다. 체중은 연구 이전, 투여의 투여 첫째 날 및 부검 1주 이전에 측정하였다. 그룹당 음식 소비량을 매일 평가하였다. 6시간 금식 후 꼬리 정맥을 통해 혈액 샘플을 채취했다. 다음의 혈청 분석을 수행하였다: 적혈구 계수, 평균 세포 부피 충전된 세포 부피, 헤모글로빈, 평균 세포 헤모글로빈 농도, 혈소판 계수, 백혈구 계수, 세포 형태학에 따른 차등 백혈구 계수, 망상적혈구 계수, 나트륨, 칼륨, 염화물, 칼슘, 무기 인, 글루코스, 요소, 크레아티닌, 총 빌리루빈, 총 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 알칼리 포스파타제, 알라닌 아미노트랜스퍼라제, 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제, 총 단백질, 알부민 및 알부민/글로불린 비율.

[0645] 소변검사도 수행하였다. 다음의 매개변수를 측정했다: α-GST, β-2 마이크로글로불린, 칼빈딘, 클러스터린, 시

스타틴 C, KIM-1, 오스테오폰틴, TIMP-1, VEGF 및 NGAL 발현. 7개의 분석물(칼빈딘, 클러스터린, GST- α , KIM-1, 오스테오폰틴, TIMP-1 및 VEGF)은 패널 1(MILLIPLEX® MAP 랫트 신장 독성 자기 비드 패널 1, RKTIX1MAG-37K) 하에서 정량화되었다. 3개의 분석물(β -2 마이크로글로불린, 시스타틴 C, 리포칼린-2/NGAL)은 패널 2(MILLIPLEX® MAP 랫트 신장 독성 자기 비드 패널 2, RKTIX2MAG-37K) 하에서 정량화되었다. 랫트 소변에서 이들 바이오마커의 농도의 결정을 위한 검정은 Luminex xMAP® 기술을 기반으로 한다. 항- α -GST/ β -2 마이크로글로불린/칼빈딘/클러스터린/시스타틴 C/KIM-1/오스테오폰틴/TIMP-1/VEGF/NGAL 항체로 코팅된 미소구체를 두 가지 상이한 형광 염료로 색상-코드화했다. 소변 단백질과 소변 크레아티닌은 또한 ADVIA 1650을 사용하여 소변에서 결정되었다. 양적 매개변수, 즉 부피, pH(10-Multistix SG 테스트 스트립/Clinitek 500 소변 분석기 사용), 비중(굴절계 사용), 반-정량적 매개변수(10-Multistix SG 테스트 스트립/Clinitek 500 소변 분석기 사용): 단백질, 글루코스, 케톤, 빌리루빈, 아질산염, 혈액, 우로빌리노겐, 침강물의 세포학(현미경 검사에 의함)이 또한 결정되었다. 외관 및 색상과 같은 정성적 매개변수가 또한 결정되었다.

[0646] 희생 후, 체중 및 신장, 간 및 비장 중량을 결정하고 장기 중량 대 체중 비율을 계산하였다. 신장과 간 샘플을 채취하고 냉동하거나 포르말린에 보관했다. 현미경 분석을 수행했다.

[0647] KIM-1(신장 조직 손상 바이오마커) 발현 데이터는 도 15에 나타나 있다. 데이터는 서열번호: 4를 제외한 모든 분자가 서열번호: 1(SPC5001)보다 더 낮은 소변 KIM-1 신호를 가져, 원래 및 이전에 특성화된 접합되지 않은 분자에 대하여 향상된 신장 안전성을 입증함을 도시한다. 신장 독성의 결여는 서열번호: 2 및 서열번호: 3의 접합되지 않은 올리고머 뿐만 아니라 이의 상응하는 GalNAc 접합된 형태 서열번호: 18 및 서열번호: 19 둘 모두에서 관찰되었으며, 이는 신장 독성의 결여가 GalNAc의 존재 때문이 아니라는 것을 나타낸다. 따라서, 데이터는 서열번호: 1(SPC5001)의 길이를 2개의 핵염기에 의해 증가시키는 것이 예기치 않게 신장 독성을 제거했음을 나타낸다. 사실, 2개의 여분의 염기의 첨가가 올리고머와 표적 부위 사이의 상호작용의 강도를 증가시켰기 때문에 당 업자라면 반대의 효과를 예상했을 것이다.

[0648] 실시예 6

[0649] 절단가능한 링커의 분석

[0650] 상이한 DNA/PO-링커를 갖는 FAM(플루오레세인 아마다이트)-표지된 안티센스 올리고머(ASO)를 S1 뉴클레아제 추출물(하기 표), 간 또는 신장 균질물 또는 혈청에서 시험관내 절단시켰다.

#	서열 (5'-3')	절단가능한 링커 (B)	접합체 (C)
35	GCattggtatTCA	3PO-DNA (5'tca3')	FAM
36	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	FAM
37	GCattggtatTCA	1PO-DNA (5'a3')	FAM
38	GCattggtatTCA	3PO-DNA (5'gac3')	FAM
39	GCattggtatTCA	없음	FAM

[0651]

[0652] 대문자는 LNA 뉴클레오타이드(예를 들어, 베타-D-옥시 LNA)이고, 소문자는 DNA 뉴클레오타이드이다. 아래첨자 s는 포스포로티오에이트 인티뉴클레오타이드 연결을 나타낸다. LNA 시토신은 선택적으로 5-메틸 시토신이다. FAM 접합체 모이어티는 도 6에 도시되어 있고 접합된 분자는 도 7에 도시되어 있다.

[0653] 상이한 DNA/PO-링커를 갖는 FAM-표지된 ASO 100 μ M은 20분 및 120분 동안 뉴클레아제 완충액(60U pr. 100 μ L)에서 S1 뉴클레아제에 의해 시험관내 절단되었다(A). 완충액 용액에 EDTA를 첨가함에 의해 효소 활성을 정지시켰다. 그런 다음 용액을 Dionex DNAPac p-100 컬럼 및 pH 7.5에서 10mM - 1M 과염소산나트륨의 범위인 구배를 사용하여 Dionex Ultimate 3000에서 AIE HPLC 분석에 적용했다. 절단 및 절단되지 않은 올리고뉴클레오타이드의 함량은 615nm에서 형광 검출기와 260nm에서 u.v. 검출기 둘 모두를 사용한 표준에 대하여 결정되었다.

서열번호	링커 서열	20분 후 절단된 S1 %	120분 후 절단된 S1 %
39	—	2	5
37	a	29.1	100
36	ca	40.8	100
35	tca	74.2	100
38	gac	22.9	n.d

[0654]

[0655] PO 링커(또는 본 명세서에서 언급되는 영역 B)는 접합체 모이어티(또는 그룹 C)의 절단을 초래하였다. 링커의 길이 및/또는 서열 구성 둘 모두는 영역 B의 핵염기 절단에 대한 감수성을 조절하는데 사용될 수 있다. DNA/PO-링커에 대한 서열의 선택은 20분 후에 영역 B에 대한(예를 들어, DNA/PO-링커에 대한) 뉴클레아제 S1 추출 서열 선택에서 보여지는 바와 같이 절단 속도를 조절할 수 있었다. 따라서, DNA/PO-링커의 특정 서열의 선택은 또한

혈청 및 표적 조직의 세포에서 절단의 수준을 조절하는데 사용될 수 있다.

[0656] 간 및 신장 균질물 및 혈청을 서열번호: 35의 올리고머로 200 µg/g 조직의 농도로 스파이킹하였다. NMRI 마우스에서 수집된 간 및 신장 샘플을 균질화 완충액(0.5% Igepal CA-630, 25mM Tris pH 8.0, 100mM NaCl, pH 8.0, 1N NaOH로 조정)에서 균질화했다. 균질액을 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하고 그 후 균질물을 페놀-클로로포름으로 추출하였다. 간 및 신장으로부터의 추출물 및 혈청에서의 절단 및 비절단된 올리고머 접합체의 함량은 상기 개시된 HPLC 방법을 사용하여 표준에 대해 결정되었다.

[0657]

서열번호	링커 서열	24시간 후 절단된 간 균질물 %	24시간 후 절단된 신장 균질물 %	혈청에서 24시간 후 절단된 %
35	tca	83	95	0

[0658] PO 링커(또는 본 명세서에 언급된 바와 같은 영역 B)의 존재는 접합체 모이어티(또는 그룹 C)가 간 또는 신장 균질물에서 절단되게 했지만, 혈청에서는 그렇지 않았다. 실시예 6에 나타낸 검정에서 절단에 대한 민감성은 링커가 생체절단가능한지 또는 생리학적으로 불안정한지를 결정하는데 사용될 수 있다. 상기 검정에서 절단은 절단가능한 링커 단독의 절단을 지칭하고; 즉, 올리고머 또는 영역 A는 기능적으로 그대로 유지되어야 한다(즉, 분해를 경험하지 않아야 한다).

[0659] 실시예 7

[0660] 생체내에서 콜레스테롤 접합체로 PCSK9 mRNA의 녹 다운

[0661] NMRI 마우스에 단일 용량 식염수 또는 10mg/kg 접합되지 않은 LNA-안티센스 올리고뉴클레오티드(서열번호: 40) 또는 상이한 링커를 갖는 콜레스테롤에 접합된 등몰량의 LNA 안티센스 올리고뉴클레오티드를 주입하고 다음에 따라 1-10일차에서 희생시켰다.

[0662]

#	서열 (5'-3') (A)	절단가능한 링커 (B)	접합체 (C)
40	GTctgtggaaGCG	아니오	아니오
41	GTctgtggaaGCG	아니오	콜레스테롤
42	GTctgtggaaGCG	2PO-DNA (5'ca3')	콜레스테롤
43	GTctgtggaaGCG	2PO-DNA (5'ct3')	콜레스테롤

[0663] RNA를 간 및 신장으로부터 분리하고 PCSK9 특이적 프라이머 및 프로브로 qPCR을 수행하여 PCSK9 mRNA 녹다운을 분석하였다. 결과를 도 14에 나타내었다.

[0664] 포스포디에스테르-글리콜(서열번호: 42 및 서열번호: 43)을 갖는 2개의 DNA로 구성된 링커를 갖는 PCSK9 LNA 안티센스 올리고뉴클레오티드에 접합된 콜레스테롤은 접합되지 않은 화합물(서열번호: 40), 뿐만 아니라 안정한 링커(서열번호: 41)를 갖는 콜레스테롤 접합체와 비교하여 PCSK9의 증강된 간 녹 다운을 나타냈다(도 14).

[0665] 재료 및 방법:

[0666] 실험 디자인:

부문	그룹 번호	동물 Id 번호	동물의 수	동물 계통/성별/사료	일당 화합물 용량 수준	용량 부피 10 ml/kg 에서 농도	투여 경로	복용량 일	체중 일	희생 일
A	1	1-3	3	NMRI/♀/음식	식염수	—	iv	0	0.1	1
	2	4-6	3	NMRI/♀/음식	서열번호 40 10mg/kg	1mg/ml	iv	0	0.1	1
	3	7-9	3	NMRI/♀/음식	서열번호 41 등물 11.3mg/kg	1.13mg/ml	iv	0	0.1	1
	5	13-15	3	NMRI/♀/음식	서열번호 42 등물 12.7mg/kg	1.27mg/ml	iv	0	0.1	1
	6	16-18	3	NMRI/♀/음식	서열번호 43 등물 12.7mg/kg	1.27mg/ml	iv	0	0.1	1
B	7	19-21	3	NMRI/♀/음식	식염수	—	iv	0	0.3	3
	8	22-24	3	NMRI/♀/음식	서열번호 40	1mg/ml	iv	0	0.3	3

[0667]

부문	그룹 번호	동물 Id 번호	동물의 수	동물 계통/성별/사료	일당 화합물 용량 수준	용량 부피 10 ml/kg 에서 농도	투여 경로	복용량 일	체중 일	희생 일
					10mg/kg					
	9	25-27	3	NMRI/♀/음식	서열번호 41 등물 11.3mg/kg	1.13mg/ml	iv	0	0.3	3
	11	31-33	3	NMRI/♀/음식	서열번호 42 등물 12.7mg/kg	1.27mg/ml	iv	0	0.3	3
	12	34-36	3	NMRI/♀/음식	서열번호 43 등물 12.7mg/kg	1.27mg/ml	iv	0	0.3	3
C	13	37-39	3	NMRI/♀/음식	식염수	—	iv	0	0.7	7
	14	40-42	3	NMRI/♀/음식	서열번호 40 10mg/kg	1mg/ml	iv	0	0.7	7
	15	43-45	3	NMRI/♀/음식	서열번호 41 등물 11.3mg/kg	1.13mg/ml	iv	0	0.7	7
	17	49-51	3	NMRI/♀/음식	서열번호 42 등물 12.7mg/kg	1.27mg/ml	iv	0	0.7	7
	18	52-54	3	NMRI/♀/음식	서열번호 43 등물 12.7mg/kg	1.27mg/ml	iv	0	0.7	7
D	19	55-57	3	NMRI/♀/음식	식염수	—	iv	0	0.7, 10	10
	20	58-60	3	NMRI/♀/음식	서열번호 40 10mg/kg	1mg/ml	iv	0	0.7, 10	10
	21	61-63	3	NMRI/♀/음식	서열번호 41 등물 11.3mg/kg	1.13mg/ml	iv	0	0.7, 10	10
	24	70-72	3	NMRI/♀/음식	서열번호 42 등물 12.7mg/kg	1.27mg/ml	iv	0	0.7, 10	10
A	25	73-75	3	NMRI/♀/음식	식염수	—	iv	0	0.1	1

[0668]

[0669] **용량 투여:** 도착 시 대략 20gr 인 NMRI 암컷 동물에게 (0일차 체중에 따라) kg BW당 10ml로 상기 표에 따라 식염수 내에 제형화된 본 개시내용의 화합물 또는 식염수 단독의 i.v.로 투여하였다.

[0670] **간 및 신장 조직의 샘플링:** 동물을 70% CO₂-30% O₂로 마취시키고 경추 탈구로 희생시켰다. 큰 간엽의 하나의 절반과 하나의 신장을 다져 RNAlater에 침지하였다.

[0671] 총 RNA를 제조업체의 지침에 따라 MagNA Pure 96 Cellular RNA 큰 부피 키트(Roche 카탈로그 번호 546753500 1)를 사용하여 MagNA Pure LC RNA 단리 조직 완충액(Roche 카탈로그 번호 03 604 721 001)의 존재에서 비드-밀

링에 의해 균질화된 최대 10mg의 조직으로부터 추출하였다.

[0672] 첫 번째 가닥 합성을 제조업체의 지침에 따라 Ambion으로부터 역전사효소 시약을 사용하여 수행하였다.

[0673] 각각의 샘플에 대해, 0.5 µg 총 RNA를 RNase 프리 H₂O로 (10.8 µl)로 조정하고, 2 µl 무작위 데카머(50 µM) 및 4 µl dNTP 믹스(각각 dNTP 2.5mM)와 혼합하고, 70°C로 3분 동안 가열하고, 그 후 샘플을 얼음 상에서 빠르게 냉각했다.

[0674] 2 µl 10x 완충액 RT, 1 µl MMLV 역전사효소(100U/µl) 및 0.25 µl RNase 억제제(10U/µl)를 각 샘플에 첨가하고 이어서 42°C에서 60분 동안 인큐베이션하고, 95°C에서 10분 동안 효소의 열 불활성화를 하고 그 다음 샘플을 4°C로 냉각했다. cDNA 샘플을 1:5로 희석하고 제조업체 프로토콜에 따라 Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x(Applied Biosystems Cat #4364103) 및 Taqman 유전자 발현 검정(mPCSK9, Mn00463738_m1 및 mActin #4352341E)을 사용하여 RT-QPCR을 수행하고 고속 모드에서 Applied Biosystems RT-qPCR 기기(7500/7900 또는 ViiA7)에서 처리하였다.

[0675] 실시예 8

[0676] 비인간 영장류 연구; 다중 피하(s.c.) 주사

[0677] 이 비인간 영장류 연구의 목적은 화합물이 피하 주사(s.c.)에 의해 투여될 때 반복 투여 설정에서 본 명세서에 개시된 항-PCSK9 화합물의 효능 및 안전성을 평가하는 것이었다. 이 연구에서 사용된 화합물은 0.625 및 2.5mg/ml의 초기 농도에서 멸균 식염수(0.9%)에서 제조된 서열번호: 2, 3, 18 및 19였다.

[0678] 적어도 24개월령의 암컷 사이노몰구스 원숭이를 사용하였고, 수돗물에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였고 180g의 OWM(E) SQC SHORT 확장식이(Dietex France, SDS, 프랑스 생 그라티앙 소재)를 동물당 매일 분배하였다. 부가하여, 매일 각 동물에게 과일이나 채소를 제공하였다. 동물을 처리 기간의 시작 전 적어도 14일의 기간 동안 연구 조건에 순응시켰다. 이 기간 동안 사전-처리 조사를 수행하였다.

[0679] 동물에게 0.5mg/kg(서열번호: 2, 3, 18 및 19) 또는 1.5mg/kg/주사(서열번호: 18 및 19)의 용량에서 4주 동안 주당 1회, 4주의 기간에 걸쳐 총 4회 주사로 s.c. 투여하였다. 용량 부피는 0.4mL/kg/주사였다. 그룹당 6마리의 동물을 사용하였다. 네 번째 및 최종 용량 후 일주일 동안 동물을 관찰한 후 간 apoB 전사 조절, 지질 매개변수, 간 및 신장 조직학, 간 및 신장 조직 분포를 연구하기 위해 동물의 절반을 희생시켰다. 1일차는 처리 기간의 첫 번째 날에 해당한다. 임상 관찰 및 체중과 음식 섭취(그룹당)를 연구 이전과 연구 동안 기록하였다.

[0680] 혈액 및 조직은 하기 표에 도시된 시점에서 샘플링 및 분석되었다.

연구 일	매개변수
-10	L, Apo-B, OA
-5	LSB, L, Apo-B, OA
-1	RCP, L, Apo-B, PK, OA
1	복용
8 용량-전	LSB, L, Apo-B, PK, OA
8	복용
15 용량-전	LSB, L, Apo-B, PK, OA
15	복용
22 용량-전	LSB, L, Apo-B, PK, OA
22	복용
29	RCP, PK, OA + 부검 매인
36 (회복 동물)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
43 (회복 동물)	RCP, PK, Apo-B, PK, OA
50 (회복 동물)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
57 (회복 동물)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
64 (회복 동물)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
71 (회복 동물)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
78 (회복 동물)	RCP, L, Apo-B, PK, OA + 부검 회복

[0681]

[0682] RCP는 일상적인 임상 병리학을 의미하고, LSB는 간 안전 생화학을 의미하고, PK는 약동학을 의미하고, OA는 기타 분석을 의미하고, L은 지질을 의미한다. 혈액(대략적으로 1.0mL)을 리튬 헤파린 튜브 안에 취하고 나트륨, 칼륨, 염화물, 갈슘, 무기 인, 글루코스, HDL-C, LDL-C, 요소, 크레아티닌, 총 빌리루빈(TBIL), 총 콜레스테롤, 중성지방, 알칼리 포스파타아제(ALP), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(ASAT), 크레아틴 키나아제, 감마-글루타밀 트랜스퍼라제(GGT), 락테이트 탈수소효소, 총 단백질, 알부민 및 알부민/글로불린 비율을 ADVIA 1650 혈액 생화학 분석기를 사용하여 분석하였다.

[0683] **혈액의 분석:** ApoB 분석을 위한 혈액 샘플을 -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 및 50일차에 그룹 1-16 동물(즉, 항-ApoB 화합물로 처리된 동물)에서만 수집하였다. 정맥 혈액(대략적으로 2mL)을 각 동물에서의 적절한 정

맥에서 혈청 분리 튜브(SST) 안으로 수집하였고 실온에서 적어도 60 ± 30분 동안 응고되도록 하였다. 혈액을 냉장된 조건(+4℃를 유지하도록 설정됨) 하에서 10분 동안 1000g에서 원심분리했다. 혈청을 3개의 개별 튜브 안으로 옮기고 ELISA에 의해 ApoB 단백질을 분석할 때까지 -80℃에서 저장했다.

[0684] 기타 분석: W02010142805는 qPCR 및 ApoB mRNA 분석에 대한 방법을 제공했다. 기타 분석은 ELISA(Mercodia No. 10-1106-01)를 사용한 혈청 Lp(a) 분석, 조직 및 혈청 올리고뉴클레오타이드 분석(약물 함량), 샘플의 추출, 표준 - 및 QC-샘플, 및 ELISA에 의한 올리고뉴클레오타이드 함량 결정을 포함했다.

[0685] 항-PCSK9 올리고뉴클레오타이드에 대한 의도된 약리학은 순환에서 PCSK9 단백질("혈청 PCSK9")의 감소에 의한 LDL 콜레스테롤에서의 감소이다. 접합되지 않은 형태와 접합된 형태 둘 모두는 약리학적 효과를 나타냈지만, GalNAc 접합된 분자는 혈청 PCSK9 및 LDL 콜레스테롤 둘 모두를 연구했을 때 접합되지 않은 분자에 비해 향상된 효능을 입증했다(도 16 및 도 17).

[0686] 도 16은 접합되지 않은 서열번호: 2의 0.5mg/kg/주사의 4회 매주 주사가 혈청 PCSK9 및 LDL 콜레스테롤에 일시적인 효과를 갖는 반면, 동일한 LNA 겐머(서열번호: 18)의 GalNAc 접합체는 혈청 PCSK9 및 LDL 콜레스테롤 둘 모두에 대한 강력하고 오래 지속되는 감소 효과를 가짐을 예시한다. 서열번호: 3 및 서열번호: 19의 다중 주사에 대한 데이터를 비교할 때 동일한 관계가 주목되었으며(도 17), 즉 접합되지 않은 분자의 투여에 이어서 일시적인 효과가 관찰되었고, 상응하는 GalNAc 접합체(서열번호: 19)가 투여되었을 때 강력하고 오래 지속되는 혈청 PCSK9 및 LDL 콜레스테롤의 하향-조절이 관찰되었다.

[0687] 혈청 PCSK9 및 LDL 콜레스테롤에 대한 서열번호: 18 및 19의 효과는 용량 의존적이었고 작용 기간이 길었으며, 혈청 PCSK9 및 LDL 콜레스테롤은 마지막 주사 후 적어도 7주 동안 평균 기준선 수준보다 낮았다(마지막 주입 22 일차, 최대 71일차까지의 회복 기간에 대해 예시된 데이터).

[0688] 간 및 신장 올리고뉴클레오타이드 함량은 마지막 주사 1주 후, 즉 연구의 29일차에 분석하였다. 올리고뉴클레오타이드 함량은 서열번호: 2를 사용하여 하이브리드화 ELISA(Lindholm 등, Mol Ther. 2012 Feb;20(2):376-81에 기술된 바와 같음)를 사용하여 분석하여 (접합된) 서열번호: 18이 표준 곡선의 작성에 사용되는 경우 결과에 변화가 없도록 제어한 후, 서열번호: 2 및 서열번호: 18(즉, GalNAc에 접합된 서열번호:2)로 처리된 동물로부터의 샘플에 대한 표준 곡선을 작성했다. 동일한 방식으로, 서열번호: 3을 서열번호: 19가 이들 샘플의 ELISA 분석을 위한 표준 곡선의 작성에 사용된 경우의 결과에 차이가 없도록 제어한 후 서열번호: 3과 서열번호: 19(즉, GalNAc에 접합된 서열번호: 2)에 대한 표준 곡선의 작성을 위해 사용하였다.

마지막 주입 후 및 주입에 조직에서 올리고뉴클레오타이드 함량					
	간 (μg 올리고뉴클레오타이드/ g 습윤 조직)		신장 (μg 올리고뉴클레오타이드/ g 습윤 조직)		간/신장 비율
	평균	SD	평균	SD	
서열번호 2, 4x0.5 mg/kg	0.260	0.14	30.3	4.8	0.008
서열번호 18, 4x0.5 mg/kg	3.57	0.61	11.5	2.5	0.310
서열번호 18, 4x1.5 mg/kg	18.8	1.7	26.8	6.6	0.701
서열번호 3, 4x0.5 mg/kg	0.149	0.059	38.2	0.72	0.004
서열번호 19, 4x0.5 mg/kg	2.72	0.69	16.3	1.5	0.167
서열번호 19, 4x1.5 mg/kg	12.2	3.44	41.2	6.5	0.296

[0689] 상기 표에 예시된 바와 같이, 서열번호: 2 및 서열번호: 3의 접합은 동물이 4주 동안 1회/주로 피하 주사되었을 때 마지막 주사 1주 후 상응하는 접합되지 않은 분자보다 접합된 분자(서열번호: 18 및 서열번호: 19)에 대해 더 높은 간/신장 비율을 초래하였다.

[0691] 세뇨관 독성의 징후가 다른 접합되지 않은 항-PCSK9 분자(예컨대 도 15에 예시된 바와 같은 서열번호: 1)로 증명되었고, 간이 항-PCSK9 처리에 대한 표적 기관이라는 점을 고려하면, 더 높은 간/신장 비율로의 이동은 접합되지 않은 서열번호: 2 및 3과 비교하여 서열번호: 18 및 19의 접합체에서 증가된 안전성을 초래할 것으로 예상된다. 그럼에도 불구하고, 도 15에 나타난 바와 같이, 상기 표의 데이터는 서열번호: 18 및 19의 접합체로 안전성이 증가되었음을 나타내지만, 서열번호: 2 및 3 모두 KIM-1에서의 증가를 일으키지 않았고 따라서 신장에 대해 독성이 아니었다.

[0692] 도 16 및 도 18에 예시된 바와 같이, 서열번호 18 및 19는 약리학적 관련 수준으로 복용되었다. 처리 기간 및 회복 단계 동안 동일한 동물의 임상 화학 프로파일은 간 또는 신장 안전 매개변수에서 임상적으로 관련된 증가가 없음을 입증했다.

[0693] 실시예 9

[0694] CIVI008: SNAC를 담체로 사용한 사이노몰구스 원숭이에서 CIVI 008의 피하 또는 경구(캡슐) 반복-용량 독성 및 독성동력학 연구

[0695] 본 연구의 목적은 CIVI008의 독성 및 가역성을 평가하고 2주에 1회 투여되는 피하 경로(이전에 조사됨)에 의한 투여와 비교하여 42일 동안 모리셔스 기원의 사이노몰구스 원숭이에게 경구 캡슐로 매일 투여할 때 CIVI008의 약리학, 혈장 노출 및 표적 기관 축적을 결정하는 것이었다. 시험 품목, CIVI008은 살카프로자이트 나트륨 [SNAC, 나트륨 8-[(2-하이드록시벤조일)아미노]옥타노에이트], 제조사: abcr GmbH, 독일 76187 카를스루에 임 슐레헤르트 10 소재, 카탈로그 번호: AB 304409]로 제형화된 PCSK9를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 이며, 이것은 이전에 동물과 사람에서 펩티드의 경구 생체이용가능성을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이 연구의 목적은 인간에서 추가 임상 시험을 위해 CIVI 008의 캡슐 복용량에 대한 정보를 제공하는 것이었다. 연구의 도식적 설명이 도 20에 제공되어 있다.

[0696] 그룹 할당, 연구 설계 및 용량 수준

[0697] 피하 및 경구 캡슐

그룹	투여 경로	용량 수준 A,B	캡슐의 수	복용 일수	동물의 수			
					독성		회복	
					수컷	암컷	수컷	암컷
1	피하	DPBS에서 3mg/kg CIVI 008 ^A	-	1, 15 & 29	2	2	-	-
2	경구 캡슐	10mg CIVI 008/100mg SNAC	1	매일 x 42	2	2	1	1
3	경구 캡슐	20mg CIVI 008/200mg SNAC	2	매일 x 42	2	2	1	1
4	경구 캡슐	20mg CIVI 008	2	매일 x 42	1	1		
5	경구 캡슐	200mg SNAC	2	매일 x 42	1	1		
6	경구 캡슐	0	2	매일 x 42	1	1		

[0698]

[0699] A 그룹 1 동물에게는 각 동물의 가장 최근 체중을 사용하여, 피하 경로를 통해 3mg/kg의 CIVI 008을 투여했다. 투여를 위해 CIVI 008의 계산된 용량을 Dulbecco의 인산염-완충 식염수(DPBS)의 멸균 용액에 1mL/kg의 부피로 용해했다.

[0700] B 그룹 2 내지 6 동물에게 1개의 캡슐(그룹 2) 또는 2개의 캡슐(그룹 3 내지 6)을 사용하여 그룹 지정된 캡슐을 경구 투여했다. 캡슐(들)을 카테터에 의해 위의 하부 안으로 직접적으로 투여하고 공기로 배출시켰다. 캡슐의 투여 직후에 용해를 돕기 위해 대략적으로 5mL의 물을 투여했다.

[0701] **경구 캡슐:** CIVI 008(10mg)/SNAC(100mg)을 함유하는 캡슐은, 충전 후 장용으로 코팅된 크기 4 경질 셀 젤라틴 캡슐 안으로 충전된, 균일한 건조 블렌드 제형으로 제조되었다. CIVI 008 약물 물질이 산성 분해에 민감한 것으로 알려져 있으므로 CIVI 008 약물 생성물의 장용 캡슐로의 제형이 타당하다. 크기 4 캡슐(단한 길이 14.3mm x 외부 직경 5.05mm) 내의 캡슐화는 원숭이 유문 괄약근을 통해 손상되지 않은 캡슐의 통과를 용이하게 하기 위해 선택되었다.

[0702] **약동학 및 생체분포 결과:** 도 21에 도시된 바와 같이, 각각 10mg CIVI 008 및 100mg SNAC를 함유하는 2개의 캡슐에 의한 동물의 복용량은 투여의 30분 이내에 평균 Tmax가 달성되는, 혈장에서 CIVI 008의 측정가능한 농도를 초래하였다. SNAC가 CIVI 008의 섭취를 위해 필요하게 되는 것과 일치하여, 극히 적은 CIVI 008이 SNAC 담체 없이 20mg CIVI 008을 함유하는 단일 캡슐을 투여한 대조군 동물의 혈장에서 인지되었다.

[0703] CIVI 008은 GalNac 접합된 LNA-캡머이다. 복용-후 최대 1.5시간까지 혈장 샘플에서 검출된 CIVI 008은 HPLC 분석에서 모 화합물 체류 시간을 나타내어, 약물이 장에서 온전하게 흡수되고 있음을 입증하였다. 이후 시점으로 부터의 샘플은 더 넓은 피크를 나타내어, 모 화합물과 대사산물, 즉 불완전한 당 모이어티를 가진 올리고뉴클레오티드의 혼합물을 나타낸다.

[0704] 경구로 투약될 때, CIVI 008은 간에서 초회-통과 효과에 노출되며, 이는 - GalNac 모이어티를 표적화하는 간의 존재로 인해 - 신속한 간 흡수를 유도해야 한다. 간의 흡수 용량보다 낮은 용량에서는 따라서 흡수된 약물의 대부분이 간에 축적되고 일반 순환계에는 매우 적은 약물이 나타나는 것으로 예상된다. 이 예상은 SQ(피하) 및 PO(경구) 아암에서 혈장 AUC와 간 농도(투여 기간의 종료시에 측정됨) 사이의 비교에 의해 뒷받침되었다. 구체 적으로, SQ 아암에서 혈장 AUC는 경구 복용량 아암에서의 AUC보다 정도가 2-3배 더 높은 것으로 관찰된 반면(도 22), 간 농도는 SQ와 PO 아암 사이에서 정도가 대략적으로 1배 차이가 있었다(도 23). RNA 치료제를 사용하여

간에서 표적을 억제할 때, 경구 투여와 SQ 또는 IV 투여 사이의 혈장/간 노출 비율에서 변화는 따라서 비간 조직/혈장 구획의 노출을 유의하게 감소시키고 결과적으로 비표적 조직에서 잠재적인 안전성 문제를 감소시키는 수단을 제공했다.

[0705] **약력학적 결과:** 42일 동안 CIVI 008/SNAC의 캡슐 1개 또는 2개의 매일 경구 투여는 1차 표적인 PCSK9에서 측정 가능한 감소를 야기했으며, 이는 전형적으로 투여의 2-주 후에 나타났다. 35/42일차에 PCSK9에서의 평균 백분율 감소는 기준선과 비교하여 > 60% PCSK9 감소를 달성하는 최고의 응답자로 동물 간에 다양했다(도 24). 대조군 동물(CIVI 008 단독, SNAC 단독 및 빈 캡슐)에서의 평균 PCSK9 감소는 상대적으로 작았으며, 이는 활성 아암에서 유의한 감소가 CIVI 008의 SNAC 매개된 흡수에 의해 야기되었음을 뒷받침한다.

[0706] PCSK9는 간 안으로의 콜레스테롤 유입을 담당하는 세포 표면 LDL-수용체를 음성적으로 조절한다. 따라서 PCSK9를 감소시키는 것은 약리학적으로 LDL-수용체의 양을 증가시켜, 간 안으로 유입의 증가와 혈장 LDL-콜레스테롤에서의 감소를 야기한다. PCSK9의 이 기능과 일관되게, PCSK9에서의 CIVI 008/SNAC 매개된 감소는 LDL-c에서의 측정가능한 감소를 야기하여, 투여 후 약 3-주에 시작하여 4주 이후부터 안정화되었다(도 25a). 대조군 동물(CIVI 008 단독, SNAC 단독 및 빈 캡슐)에서의 LDL-c 감소는 연구 전반에 걸쳐 기준선 값 부근에서 변동하였다(도 25b).

[0707] 도 23에 도시된 바와 같이, CIVI 008의 농도는 회복 기간 동안 간에서 감소했지만, 3-주 시점에서 여전히 측정 가능한 양으로 존재하였다. 회복 기간 전반에 걸쳐서 간에서 약물의 존재와 일관되게, 투여 종료시의 LDL 수준은 투여 후 2주 동안 유지되었고, 회복의 종료시 기준선으로 완전히 복귀하지 않았다(도 26).

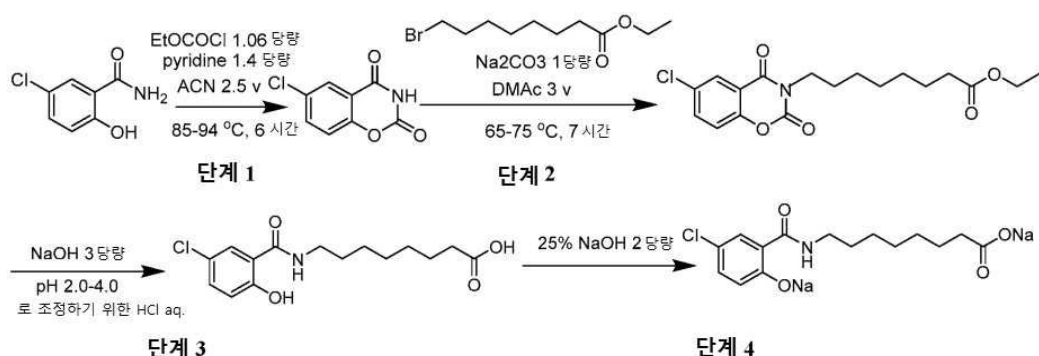
[0708] **독성 결과:** 연구는 GLP 표준에 대해 수행되었고 연구 전반에 걸쳐(투여 전, 14, 29, 42일차 및 회복의 종료) 다음 독성 매개변수를 모니터링했다: **혈액학:** 적혈구(적혈구) 계수, 헤모글로빈, 헤마토크릿, 평균 소립자 용적, 평균 소립자 혈색소, 평균 소립자 혈색소, 농도, 적혈구분포폭, 절대 망상적혈구 계수, 혈소판 계수, 백혈구(백혈구) 계수, 절대 호중구 계수, 절대 림프구 계수, 절대 단핵구 계수, 절대 호산구 계수, 절대 호염기구 계수, 절대 큰 염색되지 않은 세포 계수, 혈액 도말. **임상 화학, PCSK9 및 지질:** 요소 질소, 크레아티닌, 총 단백질, 알부민, 글로불린, 알부민:글로불린 비율, 총 빌리루빈, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제, 알라닌 아미노트랜스퍼라제, 알칼리 포스파타아제, 감마 글루타밀트랜스퍼라제, 크레아틴 키나아제, 칼슘, 무기 인, 나트륨, 칼륨, 염화물, 고밀도 지단백질, 저밀도 지단백질, 초저밀도 지단백질, 총 콜레스테롤, 트리글리세라이드.

[0709] SNAC로 제형화된 CIVI 008은 독성학적으로 유의한 임상적 관찰의 투여 후 징후 없이 내약성이 우수하였다. 투여 또는 회복 단계 동안 어떤 동물에서도 임상 화학 매개변수 또는 혈액학적 지표에 주목할만한 변화가 없었다.

[0710] 경구 캡슐 투여에 이어서 약물의 효과를 시사하는 장기 중량 변화는 없었다. 또한, 투여의 종료 및 회복의 종료시에 약물의 국소적 또는 전신적 효과를 시사하는 거시적 또는 미시적 소견은 없었다. 특히, 모든 세그먼트가 CIVI 008의 측정가능한 농도를 가졌음에도 불구하고 42일 동안 QD 경구 투여 후 장관의 임의의 세그먼트(십이지장, 공장, 회장 및 결장)에서 국소 조직병리학적 변화는 없었다.

[0711] 실시예 10

[0712] 이나트륨 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴레이트의 제조



[0713]

[0714] 이나트륨 N-(5-클로로살리실로)

[0715] -8-아미노카프릴레이트

[0716] (5-CNAC 이나트륨 염)

[0717] **단계 1:** 5-클로로-2-하이드록시-벤즈아미드(30.0g, 99.9%, 1.0당량), 아세트니트릴(90mL, 3부피), 피리딘 19.4g, 1.403당량을 반응기에 사입하고 혼합물을 8-16℃에서 10-30분 동안 교반하였다. 에틸 클로로포르메이트(20.3g, 1.07당량)를 8-16℃에서 반응기에 사입하고 반응 혼합물을 10-18℃에서 30-60분 동안 교반하였다. 그 다음 혼합물을 환류 가열하고 80-90℃에서 4시간 동안 교반하였다. 혼합물을 80-90℃ 미만의 온도에서 감압(< 1bar)에서 증류하여 3.5 부피로 농축하였다. 이어서 반응기에 아세트니트릴(45mL, 1.5 부피)을 사입하고 다시 3.5 부피로 농축한 다음 18-28℃로 냉각시켰다. 물(60mL, 2 부피)을 첨가하고 혼합물을 18-28℃에서 1-3시간 동안 교반하였다. 혼합물을 4-8℃로 냉각시키고, 침전물을 여과로 수집하고 케이크를 물(30mL, 1 부피)로 세정하였다. 습윤 케이크를 58℃에서 6시간 동안 건조하여 6-클로로-2H-1,3-벤즈옥사진-2,4(3H)-디온(31.5g, 순도 92.6%)을 92.6% 조 수율로 얻었다.

[0718] **단계 2:** 디메틸아세트아미드(150mL, 3 부피), 과립형 탄산나트륨(25.1g, 1.0당량), 6-클로로-2H-1,3-벤조옥사진-2,4(3H)-디온(50.0g, 검정에 의해 보정된 후 93.4%, 1당량) 및 에틸 8-브로모옥타노에이트(56.8g, 검정에 의해 보정된 후 99.2%, 0.95당량)를 건조하고 압력을 -0.3MPa로 감소시켰다. 교반된 혼합물을 그 다음 70℃에서 14시간 동안 가열하였다. 그 다음 혼합물을 35-45℃로 냉각시키고 침전물을 여과에 의해 수집하였다. 습윤 케이크를 반응기 1(R1)로 지정된 반응기에 사입하고, 여액을 반응기 2(R2)로 지정된 제2 반응기에 사입하였다. 에탄올(60mL)을 R1에 사입하고 습윤 케이크-에탄올 혼합물을 35-45℃에서 10-30분 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하고 여액을 R2에 이미 존재하는 것과 조합하였다. R2의 교반된 용액 내용물을 25-30℃로 냉각시키고 물(100mL, 2 부피)을 천천히 용액에 직접적으로 첨가하였다. 혼합물을 5-10℃로 냉각시키고 9.5시간 동안 유지한 후 형성된 침전물을 수집하여 에틸 8-(6-클로로-2H-1,3-벤조옥사진-2.4(3H)-디오닐)옥타노에이트(100g, 97.5% 순도)를 습윤 케이크로 얻었다.

[0719] **단계 3:** 물(240mL, 3 부피), 수산화나트륨(30g, 3.3당량) 및 에틸 8-(6-클로로-2H-1,3-벤조옥사진-2.4(3H)-디오닐)옥타노에이트(83g, 1.0당량)를 반응기(반응기 1(R1))에 사입하고 25℃에서 10분 동안 교반하였다. 교반된 혼합물을 증류와 함께 98℃에서 3시간 동안 가열하였으며 이때 출발 물질이 소모되었다. 이어서 반응 혼합물을 27℃로 냉각시켰다. 물(240mL) 및 HCl(66mL, 3.5당량)을 교반하면서 인접하는 반응기(반응기 2(R2))에 사입하고 20-25℃로 냉각시켰다. 비누화된 반응 혼합물(R1)을 5시간의 기간에 걸쳐 천천히 R2에 첨가하였고, 이로 이산화탄소의 발생 및 생성물 침전을 수반하였다. 혼합물의 pH를 50% 수산화나트륨 용액으로 pH 2-3으로 조정하고 8℃에서 3시간 동안 교반하였다. 생성물을 여과에 의해 수집하고, 물로 세정하고, 진공 하에 건조하여 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산(5-CNAC, 63g, 순도 95.7%)을 88.9% 조 수율로 얻었다.

[0720] **단계 4:** N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴산(5-CNAC)(1.0g, 1.0당량), 수산화나트륨(0.26g, 2당량) 및 물(5mL, 5 부피)을 반응기에서 조합하고 55℃에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 20℃로 냉각시키고 용액을 여과하여 불용성 고형물을 제거하였다. 여액을 감압하에 50℃ 미만으로 농축하고 습윤 케이크를 50℃에서 12시간 동안 건조하여 이나트륨 N-(5-클로로살리실로일)-8-아미노카프릴레이트(1.1g, 순도 97.9%)를 96.5% 조 수율로 얻었다.

[0721] **실시예 11**

[0722] **CIVI 008: 담체로서 5-CNAC를 사용한 사이노몰구스 원숭이에서의 CIVI 008의 경구(캡슐) 독성동역학 연구**

[0723] 이 연구의 목적은 CIVI 008의 경구 흡수를 용이하게 하는 5-CNAC[이나트륨 N-(5-코로살리실로일)-8-아미노카프릴레이트]의 능력을 결정하고 모리셔스 기원의 사이노몰구스 원숭이에게 투여될 때 CIVI 008의 가장 효율적인 경구 흡수를 제공하는 CIVI 008/5-CNAC 캡슐의 제조 방법 및 투여 패러다임을 결정하는 것이었다. 이 연구의 목적은 인간에서 추가 임상 시험을 위해 CIVI008의 캡슐 복용량에 대한 정보를 제공하는 것이었다. 연구의 개략적 개요가 도 27에 제공되어 있다.

[0724] 경구 캡슐: 다수의 상이한 캡슐을 하기에 요약된 바와 같이 제조하였다.

캡슐 그룹	CIVI 008 (mg)	5-CNAC (mg)	제조 방법	캡슐 크기
A	10	100	건식 블렌드 ¹	4
B	10	100	건식 블렌드 ¹	0
C	20	200	건식 블렌드 ¹	0
D	5	200	건식 블렌드 ¹	0
E	10	200	건식 블렌드 ¹	0
F	25	200	건식 블렌드 ¹	0
G	30	200	건식 블렌드 ¹	0
H	5	200	동결 건조됨 ²	0
I	10	200	동결 건조됨 ²	0
J	25	200	동결 건조됨 ²	0
K	30	200	동결 건조됨 ²	0

[0725]

[0726] ¹ 건조 블렌딩된 캡슐은 i) 크기 4 경질 셀 젤라틴 캡슐(단힌 길이 14.3mm x 외부 직경 5.05mm) 및 장용으로 코팅된 후 충전 또는 ii) 장용으로 코팅된 크기 0 경질 셀 젤라틴 캡슐(단힌 길이 21.7mm x 외부 직경 7.6mm) 안으로 충전된 균일한 건조 블렌딩된 제형으로부터 제조되었다

[0727] ² 동결 건조된 캡슐은 CIVI 008 및 5-CNAC를 [물]에 공동-용해하고 이어서 동결 건조하고 장용으로 코팅된 크기 0 경질 셀 젤라틴 캡슐 안으로 충전함에 의해 제조되었다

[0728] **연구 개요:** 총 10마리의 사이노몰구스 원숭이(수컷 5마리 및 암컷 5마리)에게 1주차에서 월요일 및 수요일에 각각 2 그룹 A 캡슐을 투여하고 이어서 4일간의 투여 휴지기가 이어졌다. 이 월요일 및 수요일 투여 계획은 2주차에 용량 경우마다 2 그룹 B-캡슐, 및 그 각각의 주에서 용량 경우마다 그룹 C에서 K의 1 캡슐을 사용하여 2, 3, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15 및 17주차에서 지속되었다. 투여 기간 동안 PK 분석을 위한 혈액 샘플을 용량-전 및 월요일과 수요일에 투여 후 0.5, 1.5, 3 및 5시간에 채취했다. 임상 화학 및 혈액학을 위한 샘플(실시에 1 참조)을 연구-전과 연구의 종료 시에 채취했다.

[0729] **약동학적 결과:** 도 28에 도시된 바와 같이 2개의 그룹 A 캡슐에 의한 동물의 투여는 혈장에서 CIVI 008의 측정 가능한 농도로 이어졌으며 평균 Tmax는 투여의 30분 이내에 달성되었다.

[0730] 담체로서 SNAC를 사용하는 유사한 용량의 CIVI 008(실시에 9, 도 21)과 비교하여, 5-CNAC 담체의 사용은 AUC₀₋₅뿐만 아니라 C_{max} 둘 모두에서의 증가로 이어졌으며(도 29), 이는 5-CNAC가 CIVI 008의 경구 섭취를 촉진하는데 있어 두 담체 중 더 효율적이라는 것을 나타낸다.

[0731] 연구에 사용된 캡슐은 장에서 CIVI 008/5-CNAC의 pH 의존적 방출을 촉진하기 위해 장용으로 코팅되었다. 캡슐의 크기를 크기 4(그룹 A)에서 크기 0(그룹 B)으로 증가시키는 것은 CIVI 008의 평균 혈장 PK 프로파일 또는 평균 Tmax를 변경하지 않았으며, 이는 더 큰 크기 0 캡슐이 더 작은 크기 4 캡슐과 동일한 동역학으로 위로부터 이동할 수 있음을 나타낸다.

[0732] 캡슐로 전달될 때, 공동-제형은 장에서의 착륙 부위에서 각 성분의 높은 국소 농도를 생성하며, 이는 공동-제형 약물의 흡수를 용이하게 하는 담체의 능력에 중요하다. 결과적으로 비슷한 양의 약물/담체를 1 또는 2개 캡슐에서 전달하면 약물의 흡수 효율에 영향을 미칠 수 있다. 도 30에 도시된 바와 같이, 이것이 그 경우이다. 혈장

PK 프로파일의 동역학은 매우 유사했지만, 20mg CIVI 008/200mg 5-CNAC(그룹 C 캡슐)를 함유하는 단일 캡슐은 약물/담체 양의 절반을 함유하는 각각 2개의 캡슐에서 투여된 유사한 양의 약물/담체보다 더 높은 C_{max} 및 AUC_{0-5} 를 야기했다.

[0733] 5-CNAC의 일정한 용량에서 CIVI 008의 용량을 증가시키면 AUC 및 C_{max} 용량이 최대 25mg까지 비례적으로 증가했다. 용량을 더 증가시키면 AUC 및 C_{max} 에서 용량 비례적 증가 초과를 야기하여 간 흡수가 포화상태에 도달했음을 나타낸다(도 31).

[0734] 제조 방법을 CIVI 008 및 5-CNAC의 건조 블렌딩(도 32a)에서 CIVI 008 및 5-CNAC의 공동-용해에 이은 동결-건조(도 32b)로 변경하는 것은 CIVI 008 약물의 장 흡수에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서, 캡슐이 어느 한 방법에 의해 제조되었을 때 CIVI 008의 매우 유사한 AUC 및 C_{max} 프로파일이 5mg 내지 30mg 용량 범위에 걸쳐 관찰되었다.

[0735] 실시예 12

[0736] CIVI 008: 담체로 5-CNAC를 사용하는 사이노몰구스 원숭이에서 CIVI 008의 경구(캡슐) 약리학 연구

[0737] 이 연구의 목적은 7주 동안 1일 1회 투여했을 때 혈장 PCSK9를 감소시키는 5-CNAC[이나트륨 N-(5-코로살리실로일)-8-아미노카프릴레이트]의 능력을 결정하는 것이었다. 비인간 영장류의 간에서 CIVI 008의 반감기는 2 내지 3주 사이이므로 투여의 7-주 후 간 농도는 그의 정상 상태 수준의 >80%에 도달할 것으로 예상된다.

[0738] **연구 개요:** 건조 블렌딩된 캡슐(20mg CIVI 008/200mg 5-CNAC)은 장용으로 코팅된 크기 0, 경질 셀 젤라틴 캡슐 안에 충전된, 균일한 건조 블렌딩된 제형으로부터 제조되었다. 총 10마리의 사이노몰구스 원숭이(수컷 5마리, 암컷 5마리)에게 각각 단일 캡슐을 49일 동안 매일 1회 경구 위관영양법에 의해 투여했다. 처리를 받지 않은 2마리의 동물(수컷 및 암컷)이 연구에 참조 동물로 포함되었다. 투여 기간 동안, PK 분석을 위한 혈액 샘플을 용량-전 및 연구 시작에서 투여 후 0.5, 1.5, 3 및 5시간 및 49일차에 채취했다. PCSK9 및 지질 분석을 위한 혈액 샘플은 연구-전 -2 및 -주차, 1일차에서 용량-전 및 그 후 연구의 기간 동안 매주 채취했다. 임상 화학, 응고 및 혈액학을 위한 샘플을 연구-전 -2 및 -주차와 22 및 49일차에 채취했다.

[0739] **약동학적 결과:** 도 33은 예정된 49일의 투여 중 22일차에서 PCSK9 및 LDL에서의 감소를 도시한다. 이 초기 시점에서도 PCSK-9 및 LDL에서의 유의한 감소가 동물에서 명백했으며 가장 높은 반응자는 대략적으로 60%의 혈장 LDL에서의 감소를 달성했다. PCSK9는 빠르면 8일차부터 떨어지기 시작했고 PCSK9와 LDL 둘 모두는 대부분의 동물에서 15일차에 확실하게 감소했다. 22일차에 ApoB-100은 모든 원숭이에서 유의하게 감소했으며(25%에서 45%), 5/10마리 원숭이가 검출의 하한치 미만의 수준을 가졌다.

[0740] CIVI 008에 대한 담체로서 SNAC를 사용하는 이전 실험(실시예 9, 도 25a)과 비교하여, 5-CNAC 제형화된 CIVI 008로의 투여는 LDL에서 보다 신속하고 보다 실질적인 강하를 일으켰으며(도 34), 이는 CIVI 008의 경구 흡수를 촉진하는데 있어서 5-CNAC가 SNAC보다 실질적으로 더 효율적임을 나타낸다.

[0741] ***

[0742] 참조에 의한 편입

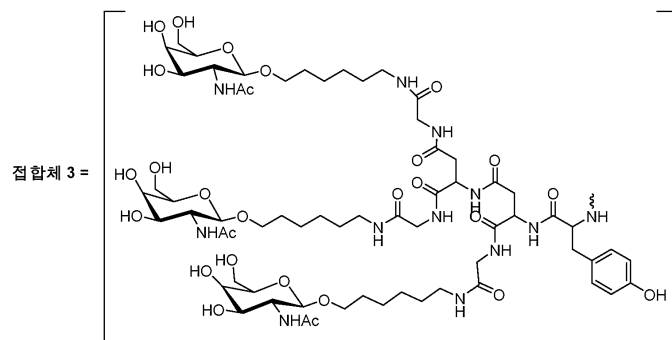
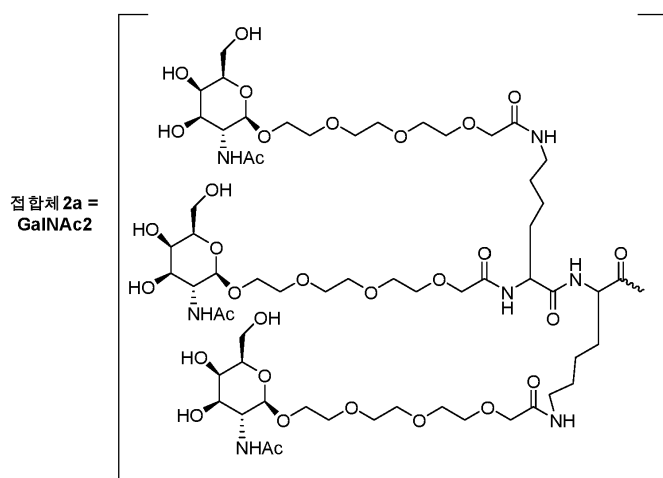
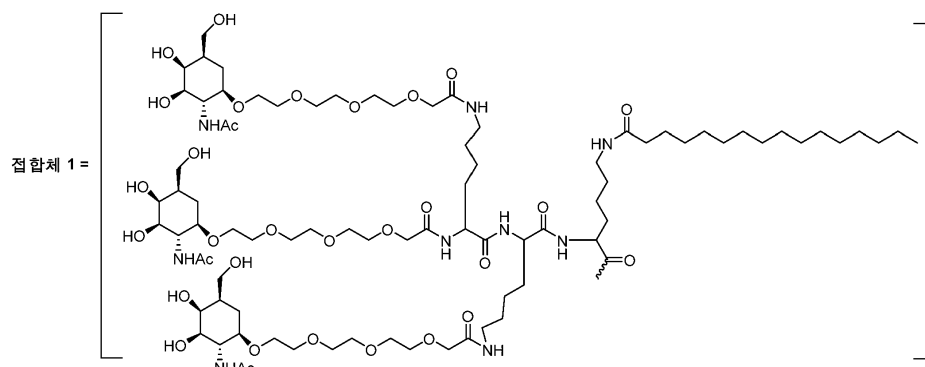
[0743] 본 출원 전체에 걸쳐서 인용될 수 있는 모든 인용된 참조(문헌 참조, 특허, 특허 출원 및 웹사이트 포함)의 내용은, 2020년 12월 11일에 공개적으로 이용가능한 버전에서, 그기에 인용된 참조와 마찬가지로 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 본 명세서에 명시적으로 포함된다. 데이터베이스 접근 번호로 식별되는 단백질 및 핵산 서열과 대상 데이터베이스 항목에 함유된 기타 정보(예를 들어, 특정 유전자은행 접근 번호에 상응하는 데이터베이스 항목에서 비서열 관련된 콘텐츠)는 참조로 포함되고 2020년 12월 11일에 공개적으로 이용가능한 상응하는 데이터베이스 발표에 해당한다.

[0744] 등가물

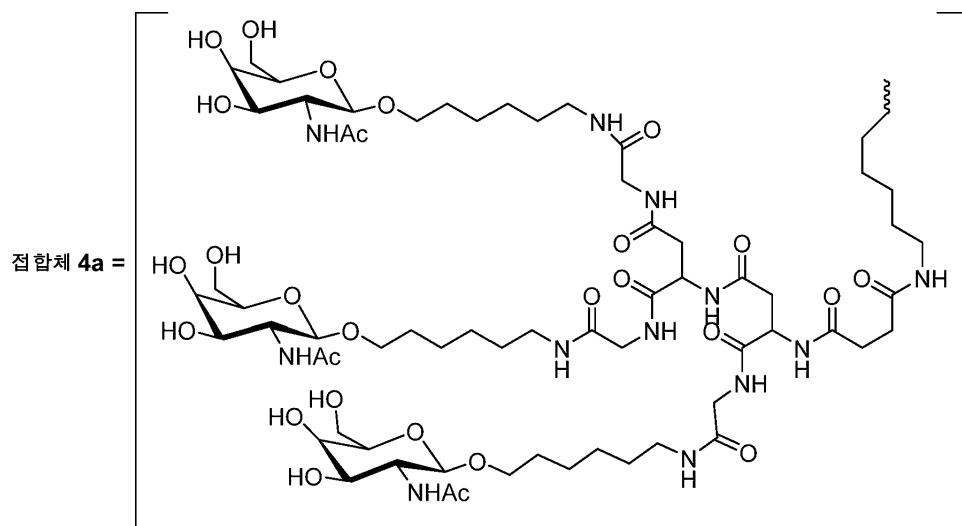
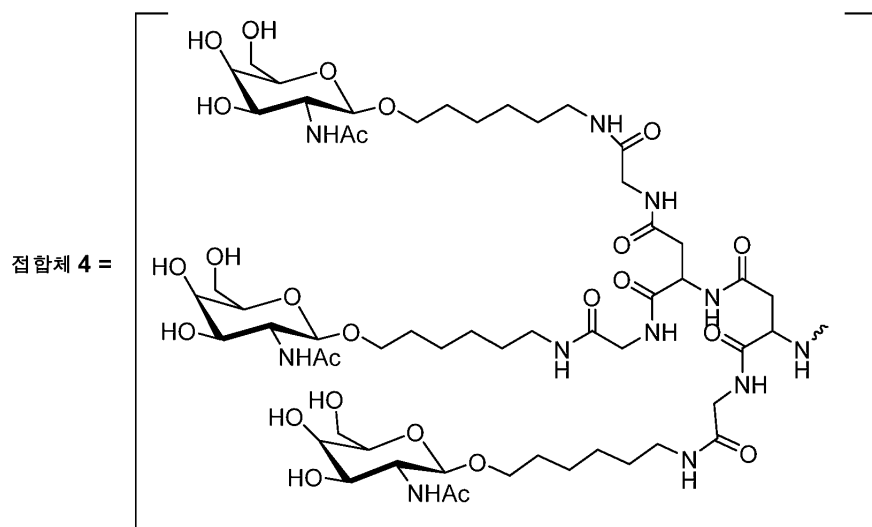
[0745] 다양한 특정 양태가 예시되고 기술되었지만, 상기 명세서는 제한적이지 않다. 발명(들)의 사상 및 범주를 벗어나지 않고 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 본 명세서를 검토하면 많은 변형이 당업자에게 명백해질 것이다.

도면

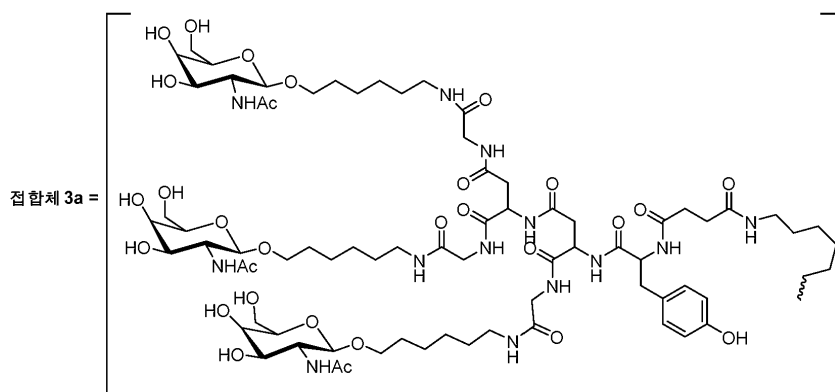
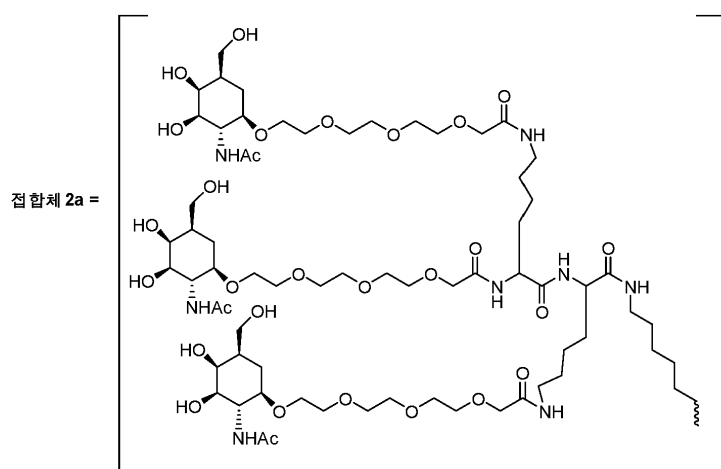
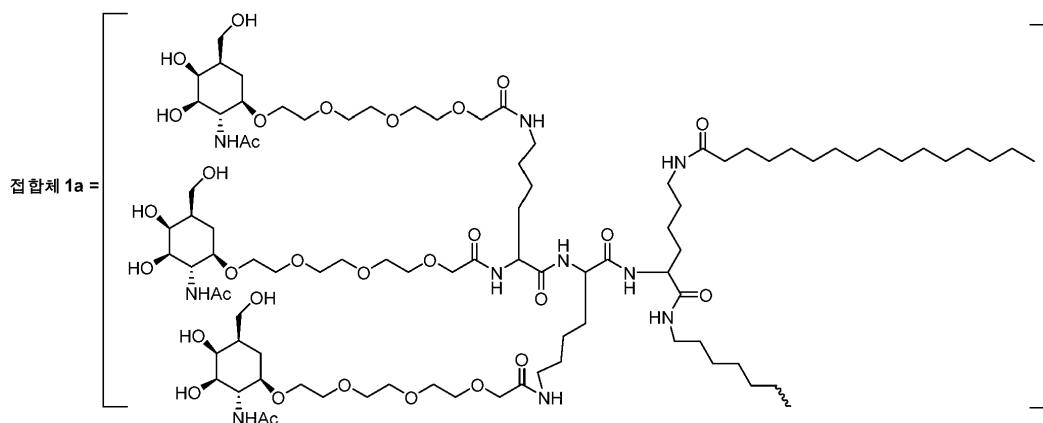
도면1a



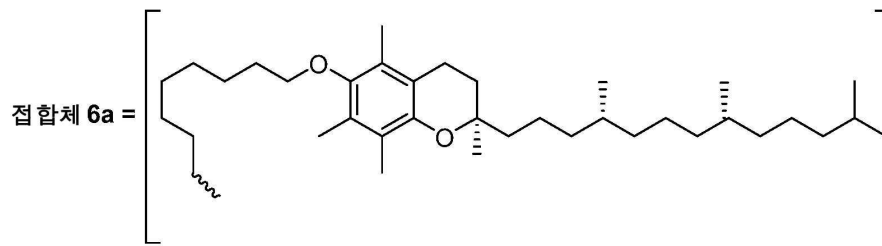
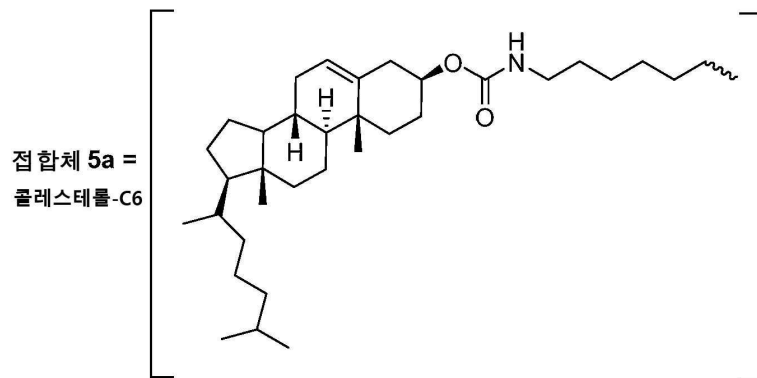
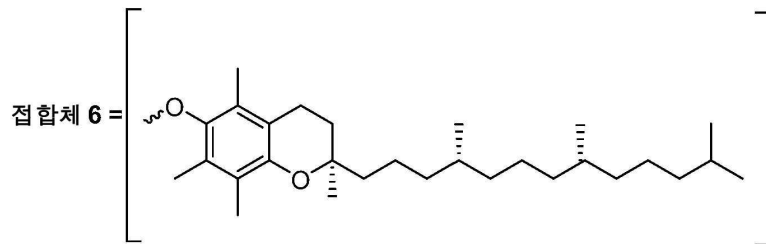
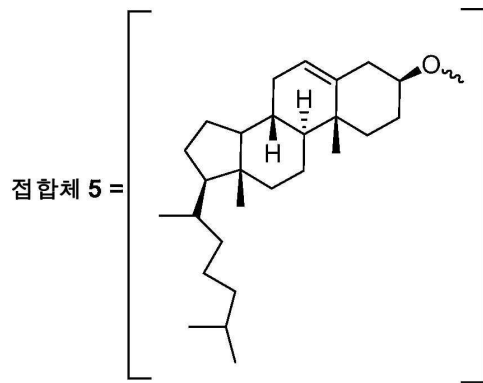
도면1b



도면1c



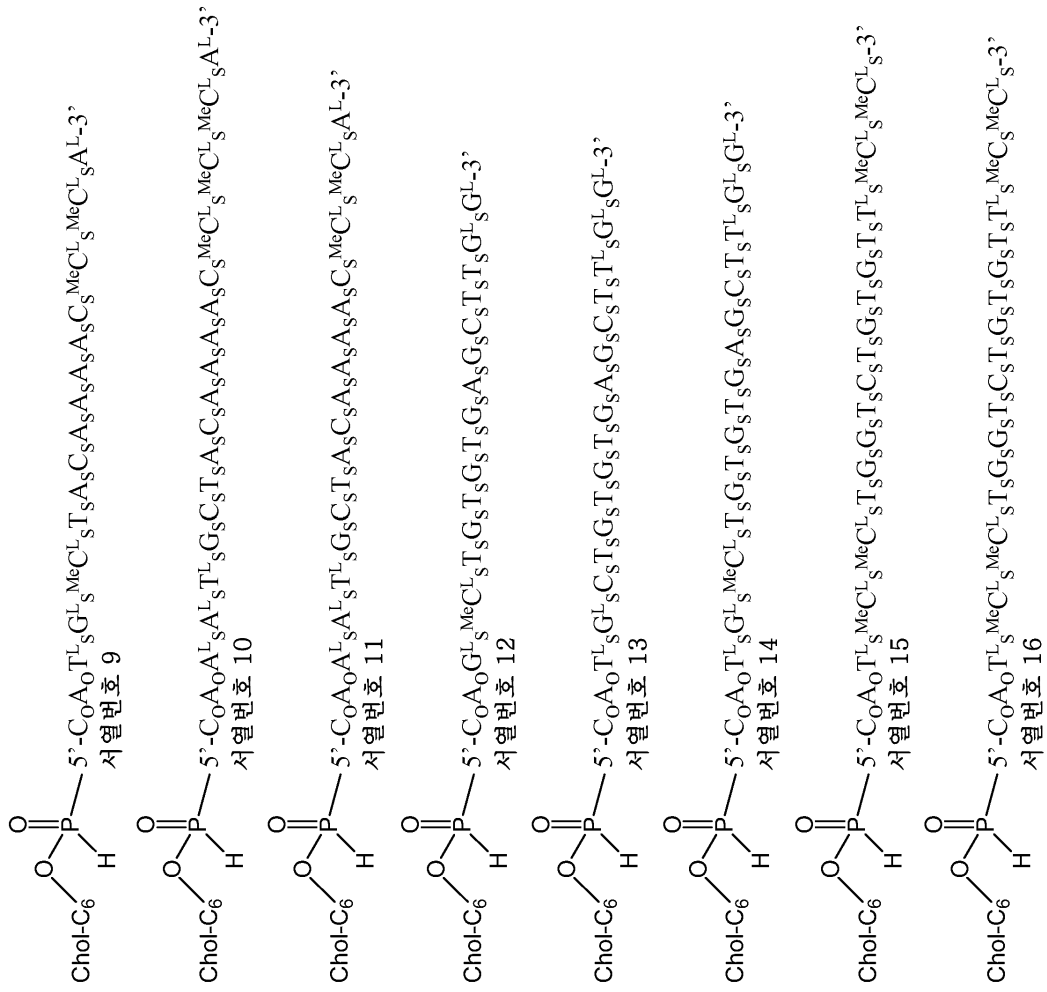
도면2



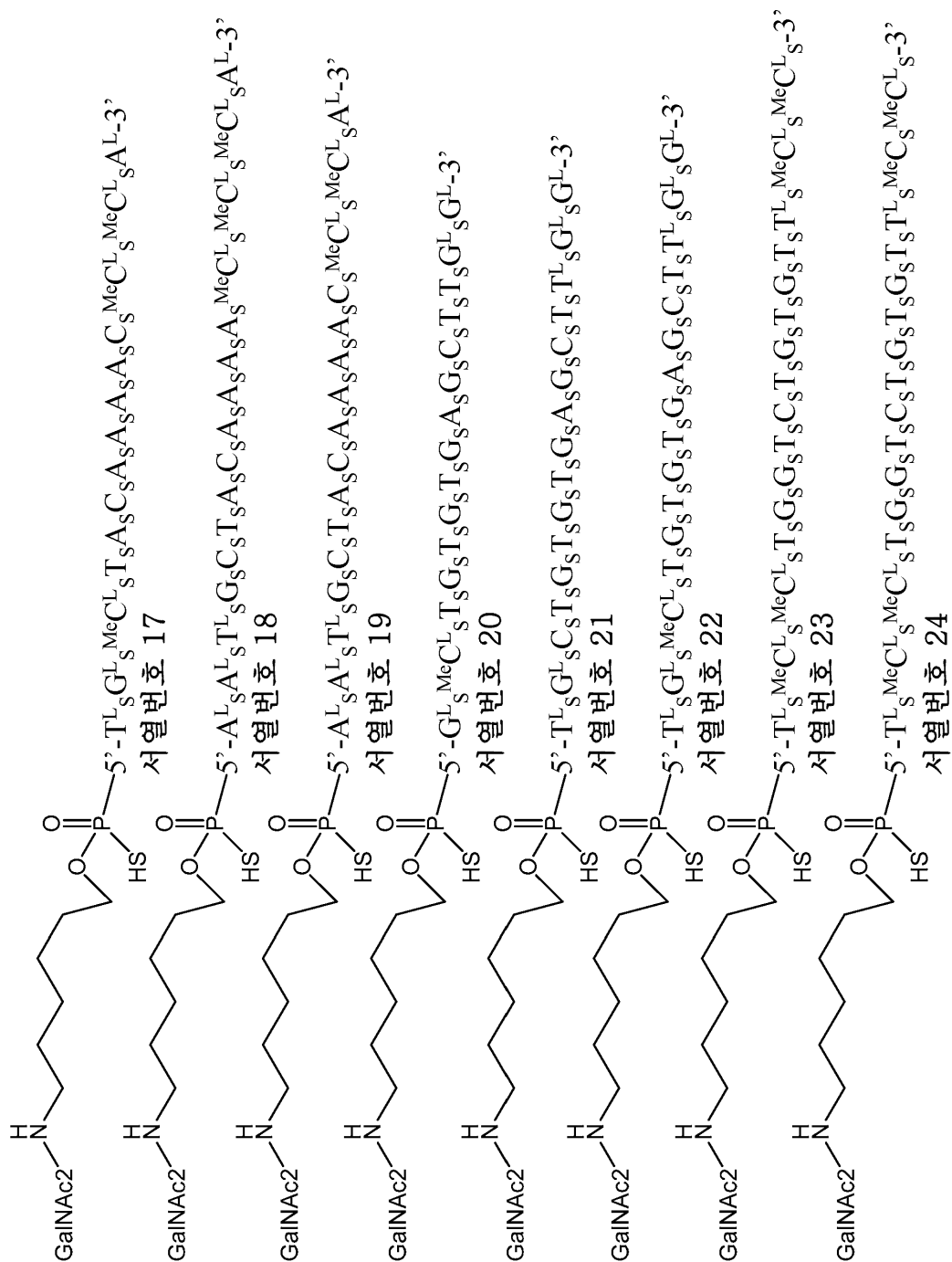
도면3

- 5'-T^L_SG^L_SMeC^L_ST_SA_SC_SA_SA_SA_SC_SMeC^L_SMeC^L_SA^L-3',
서열번호 1
- 5'-A^L_SA^L_ST^L_SG_SC_ST_SA_SC_SA_SA_SA_SA_SC_SMeC^L_SMeC^L_SA^L-3',
서열번호 2
- 5'-A^L_SA^L_ST^L_SG_SC_ST_SA_SC_SA_SA_SA_SA_SC_SMeC^L_SMeC^L_SA^L-3',
서열번호 3
- 5'-G^L_SMeC^L_ST_SG_ST_SG_ST_SG_SA_SG_SC_ST_ST_SG^L_SG^L-3',
서열번호 4
- 5'-T^L_SG^L_SC_ST_SG_ST_SG_ST_SG_SA_SG_SC_ST_ST^L_SG^L_SG^L-3',
서열번호 5
- 5'-T^L_SG^L_SMeC^L_ST_SG_ST_SG_ST_SG_SA_SG_SC_ST_ST^L_SG^L_SG^L-3',
서열번호 6
- 5'-T^L_SMeC^L_SMeC^L_ST_SG_SG_ST_SC_ST_SG_ST_SG_ST_ST^L_SMeC^L_SMeC^L_S-3',
서열번호 7
- 5'-T^L_SMeC^L_SMeC^L_ST_SG_SG_ST_SC_ST_SG_ST_SG_ST_ST^L_SMeC^L_SMeC^L_S-3',
서열번호 8

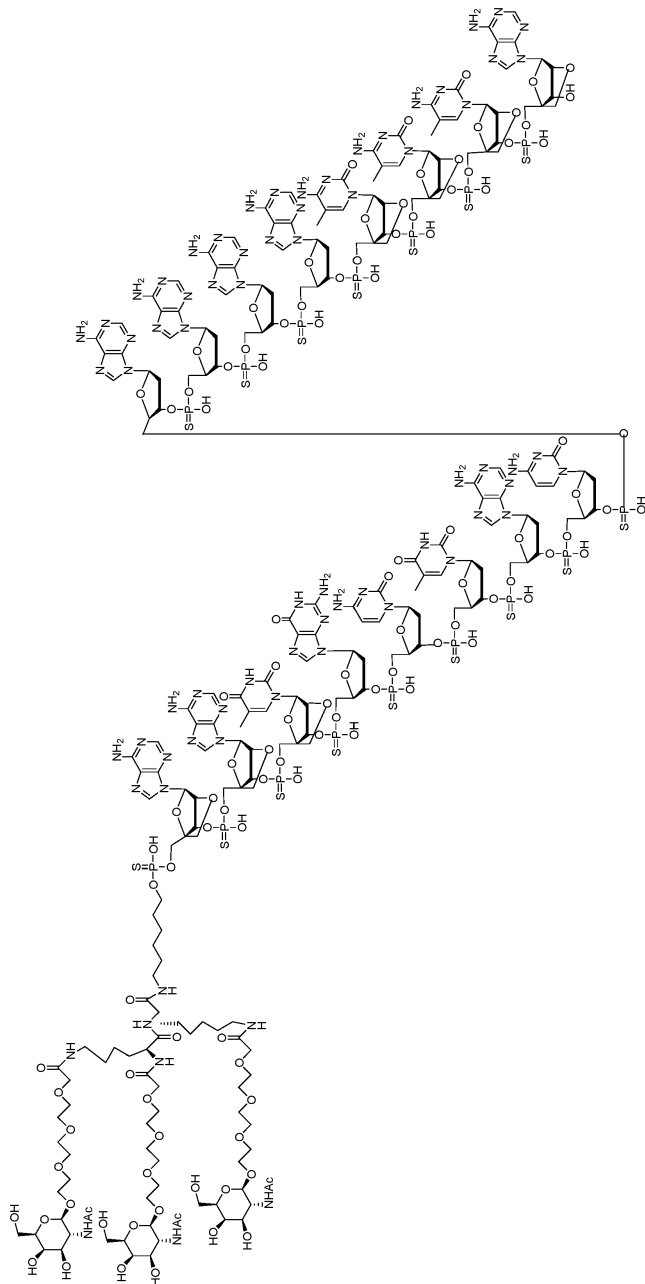
도면4



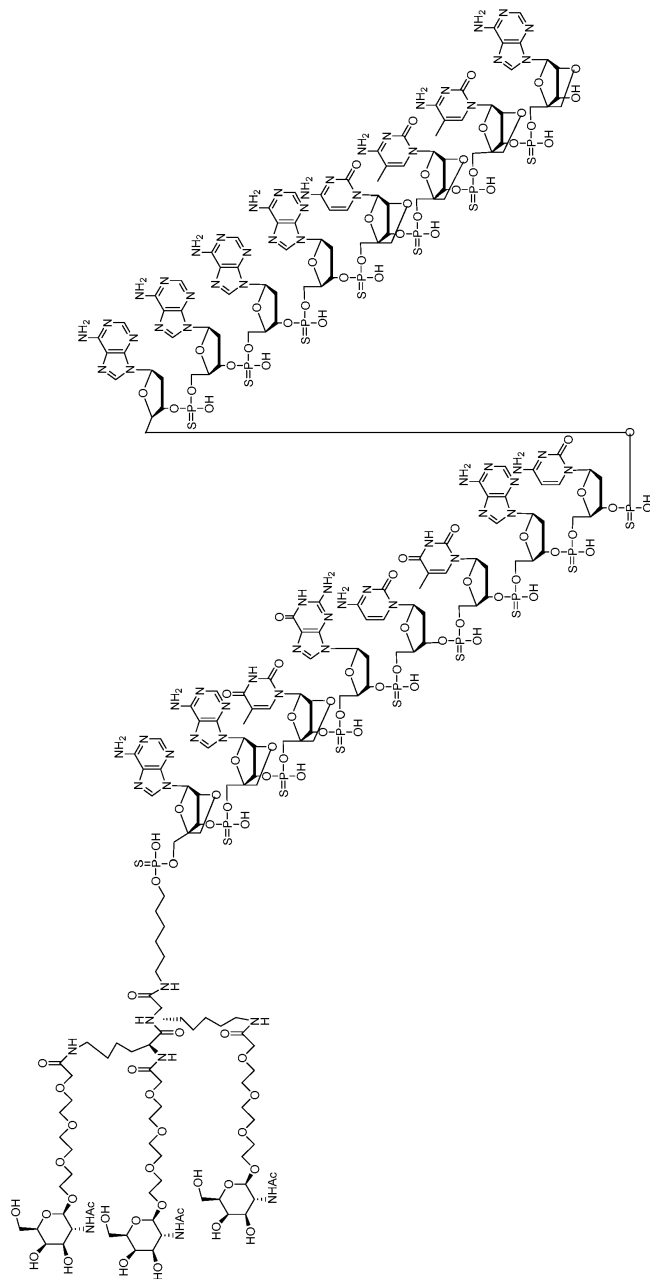
도면5a



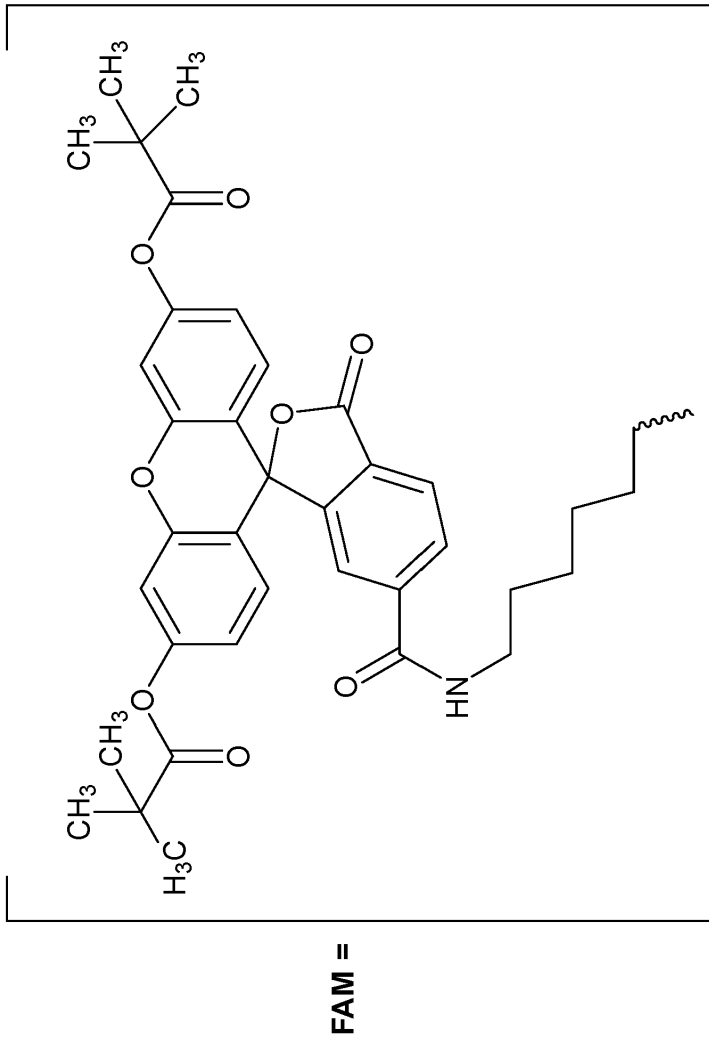
도면5b



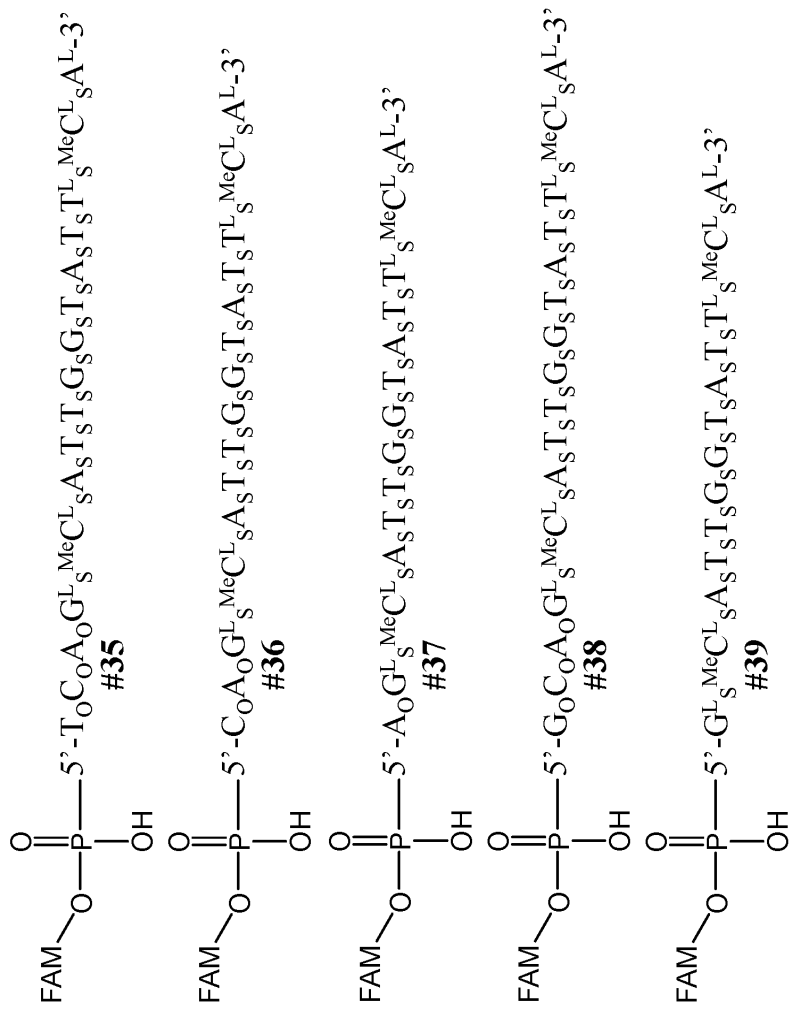
도면5c



도면6



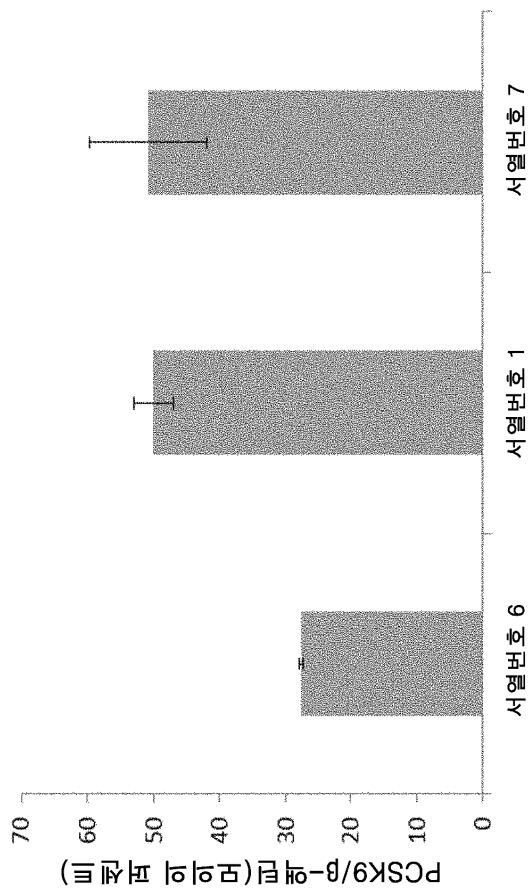
도면7



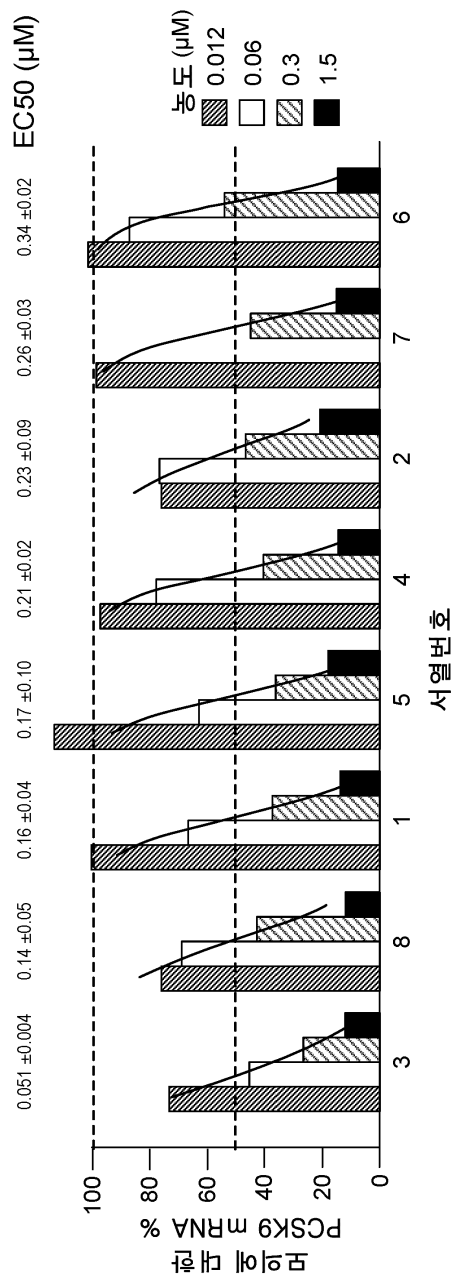
도면8



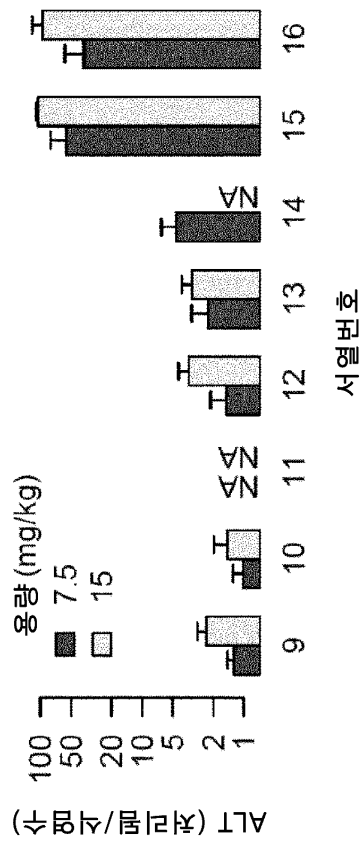
도면9



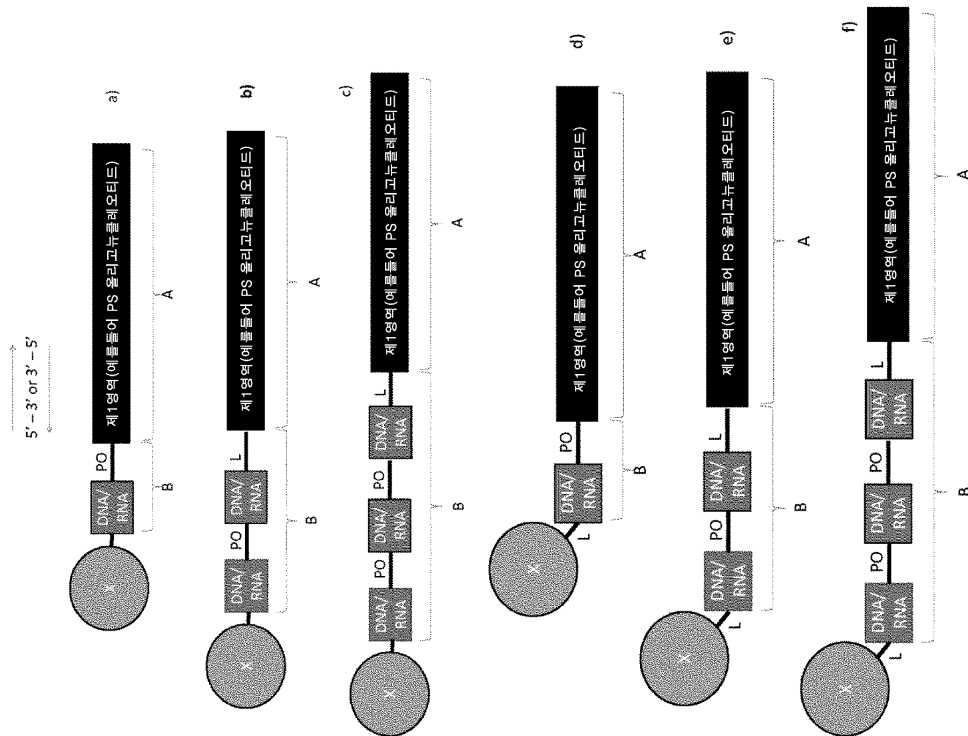
도면10



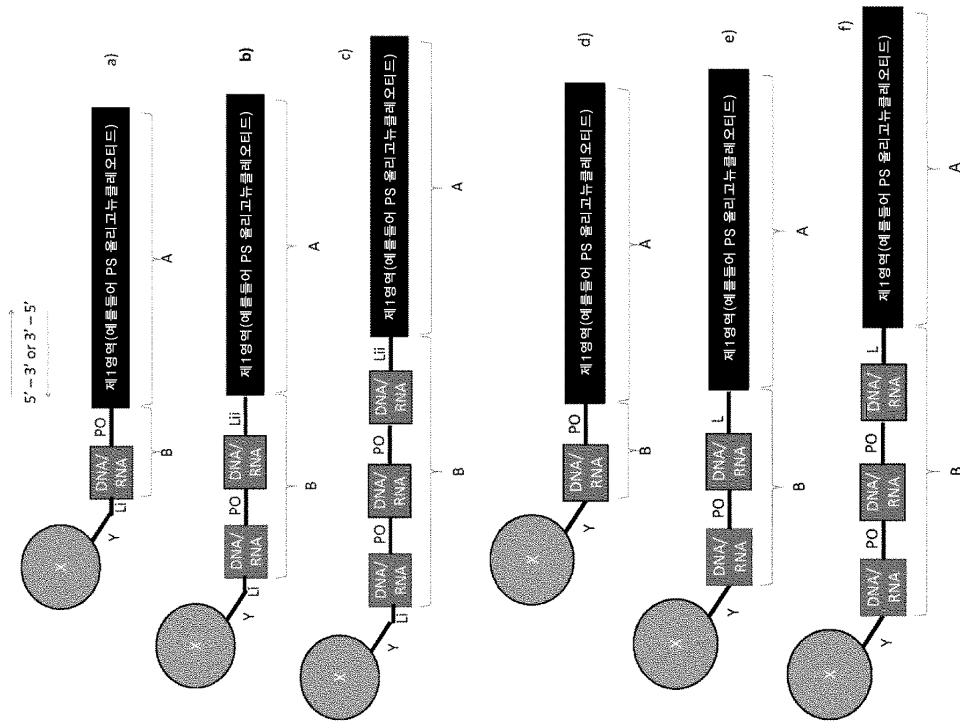
도면11



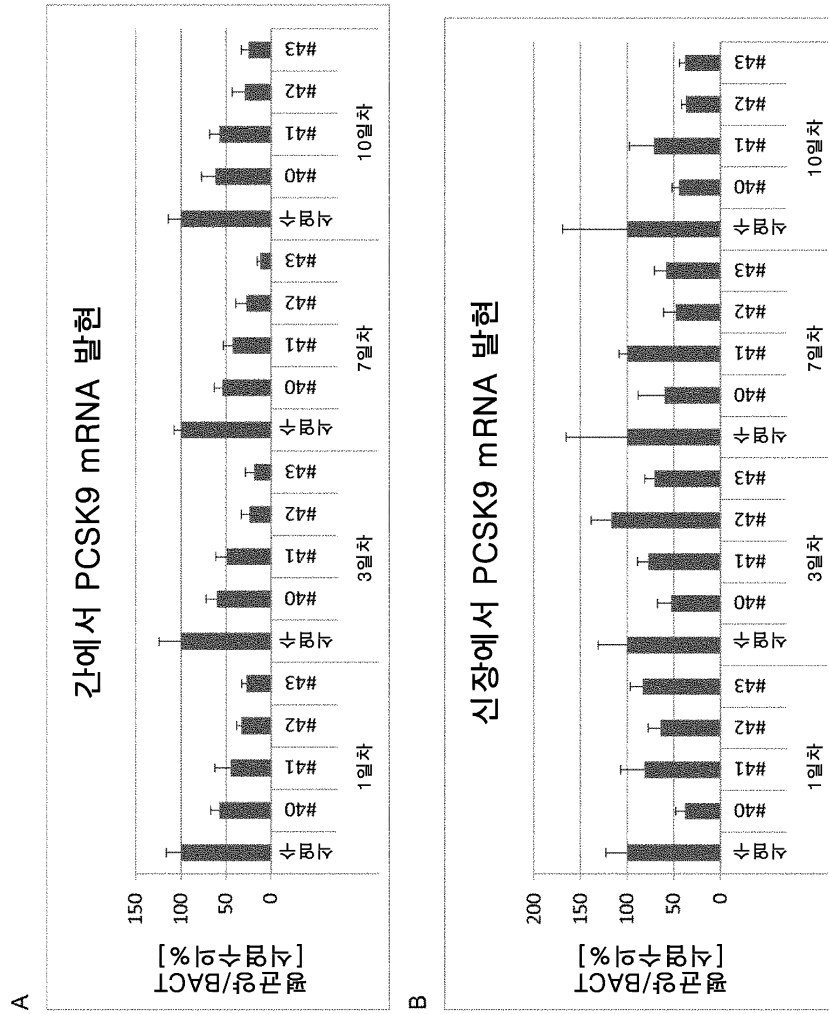
도면12



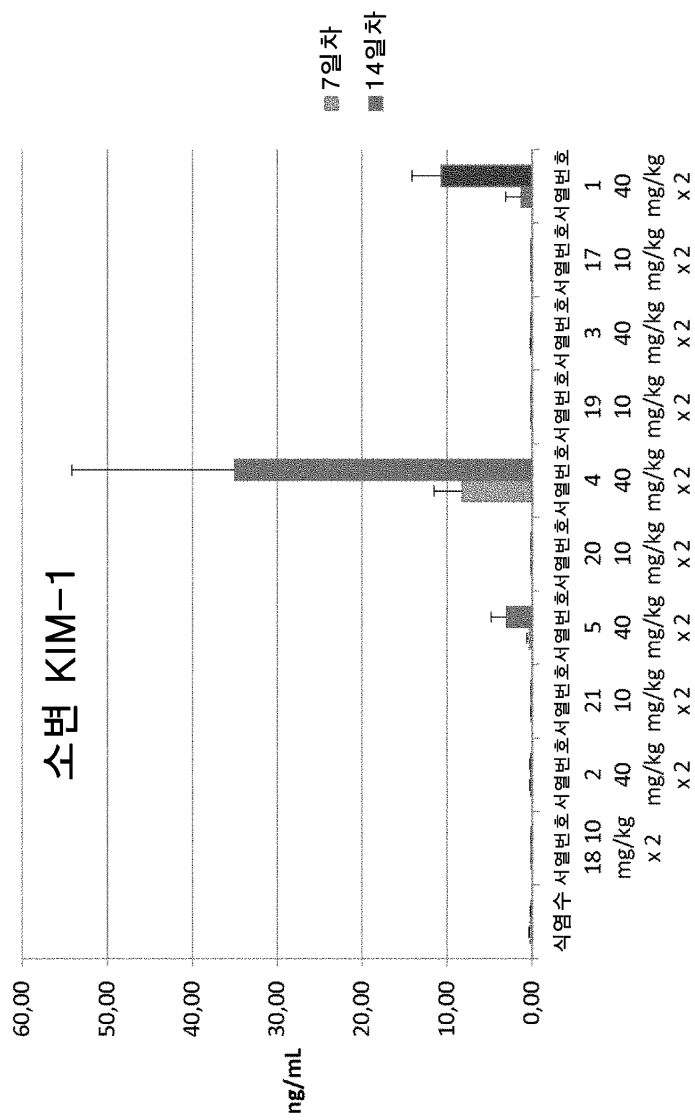
도면13



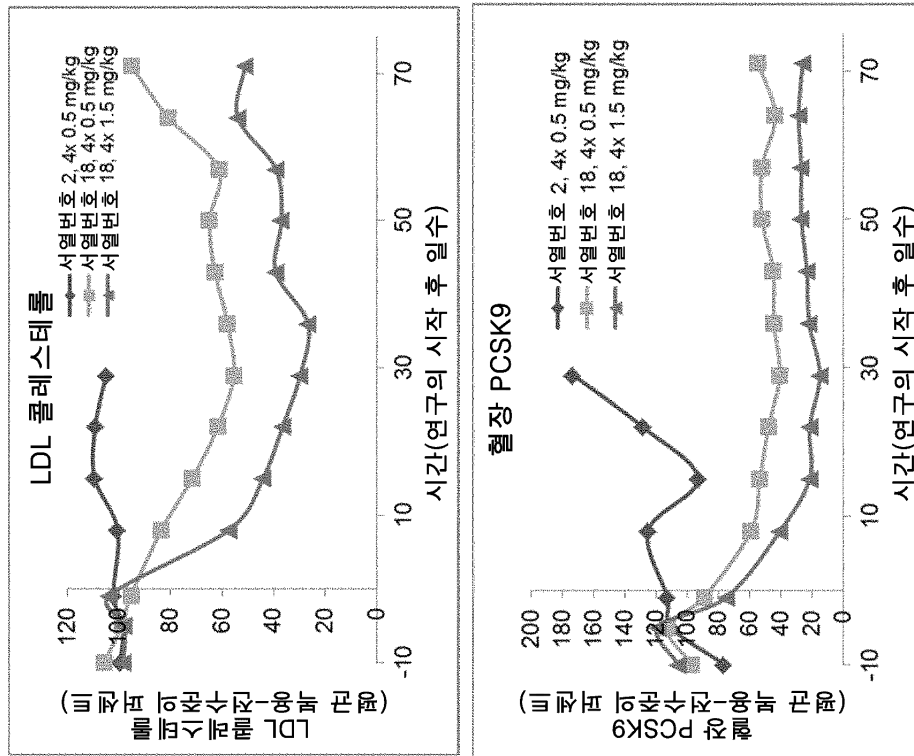
도면14



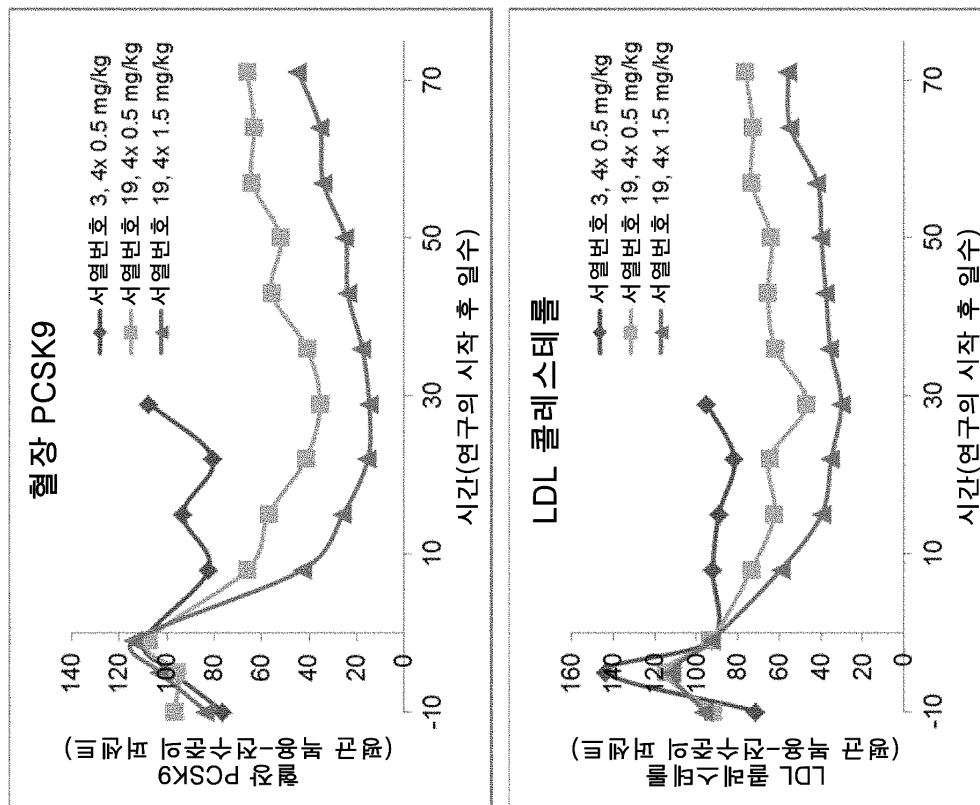
도면 15



도면16



도면17



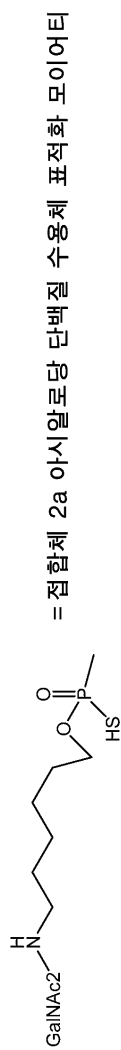
도면 18a

作品

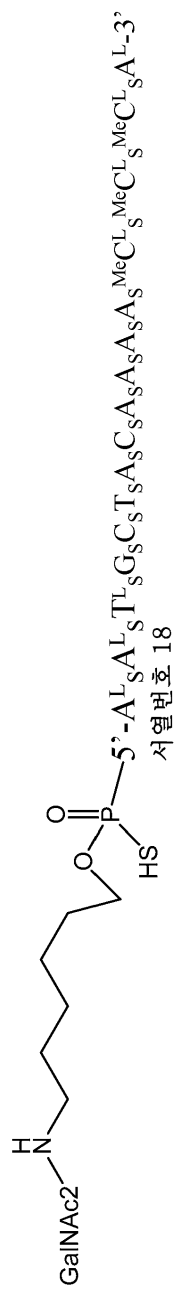
윗첨자_L = 베타-D-옥시 LNA 단위

 $\text{MeC} = 5\text{-메틸시토신 단위}$

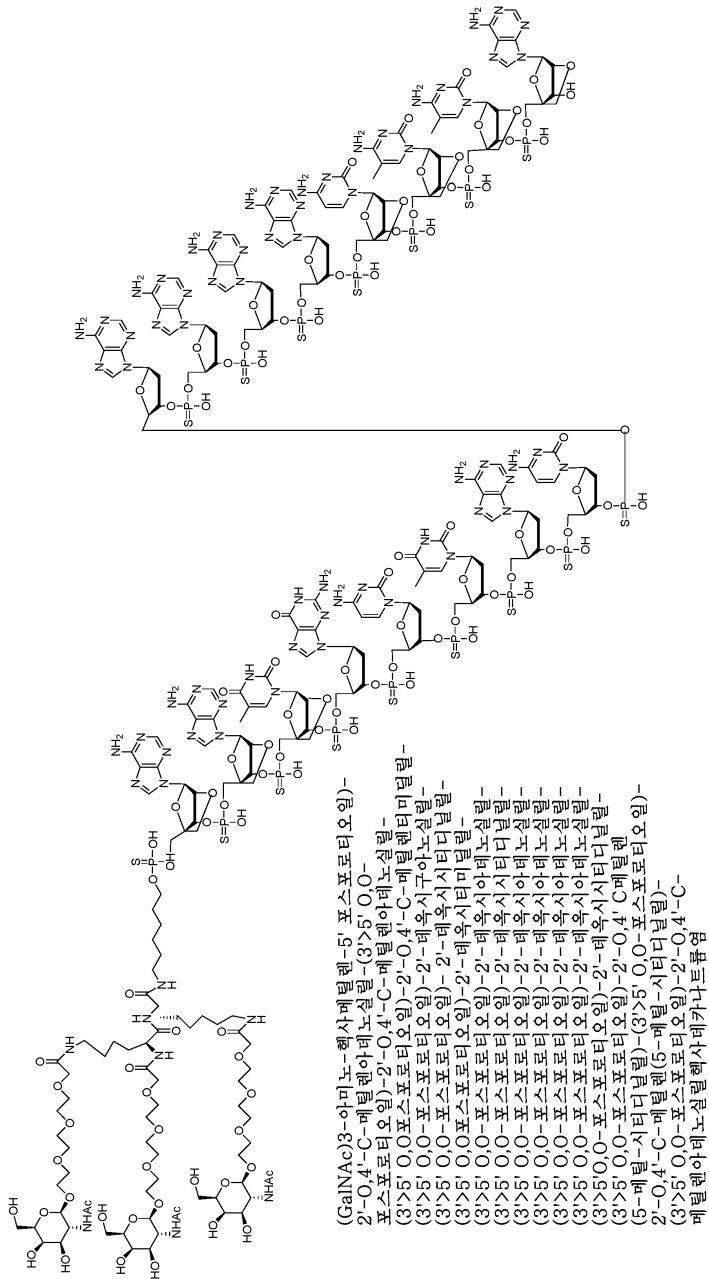
아래첨자 s = 포스포리티오에이트 인터뉴클레오시드 연결



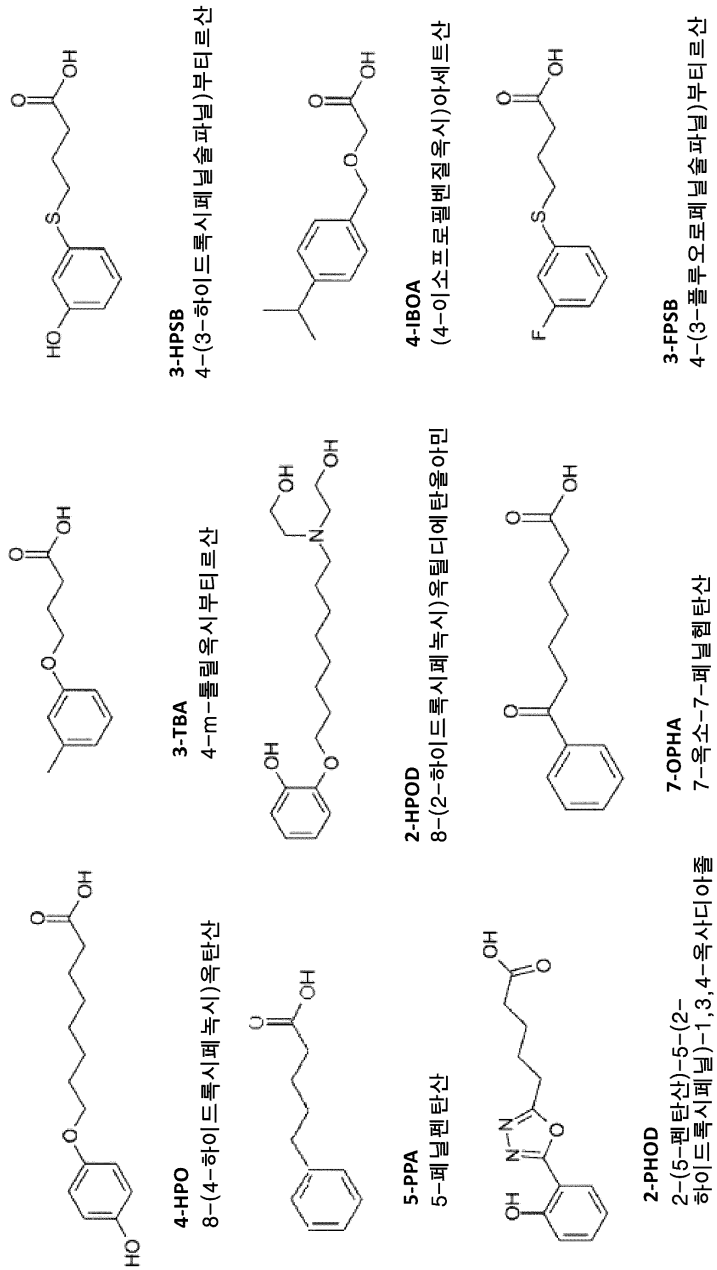
= 접합체 2a 아시알로당 단백질 수용체 표적화 모이어티

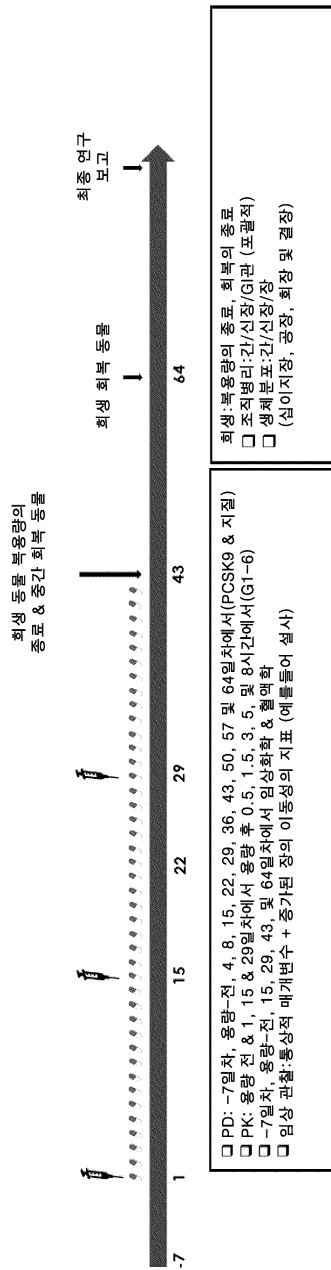


도면 18b

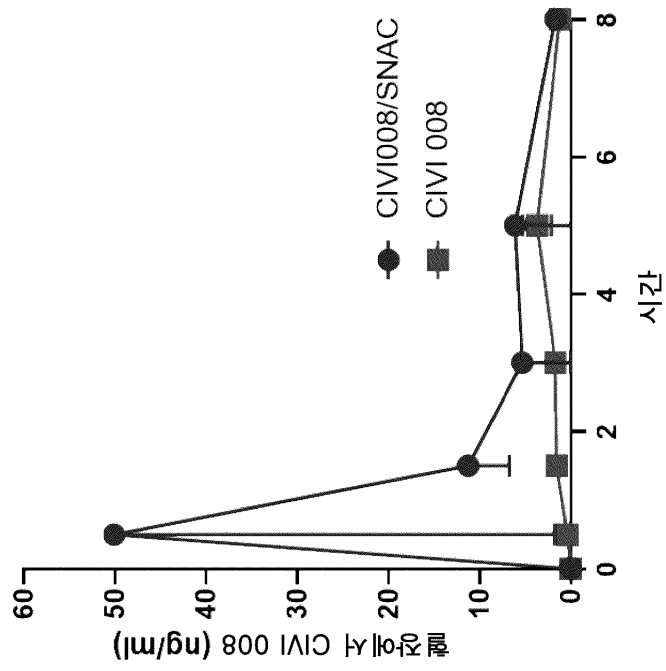


도면19

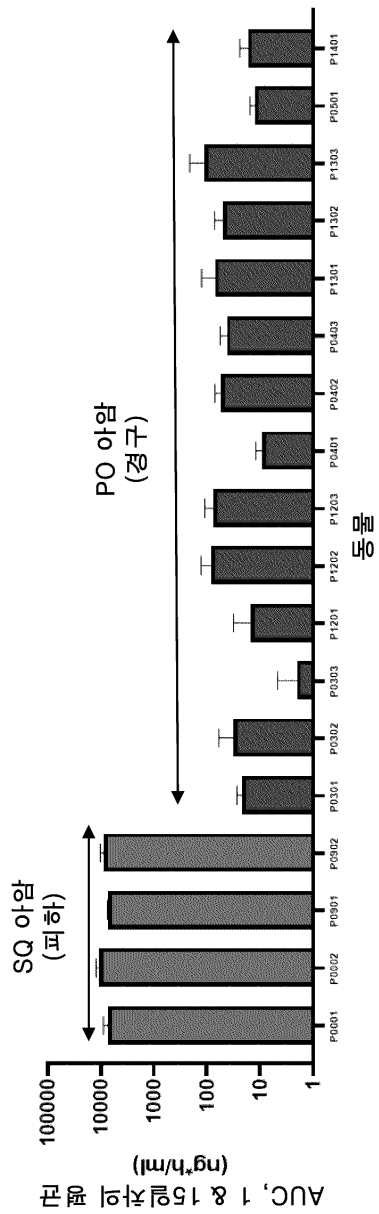




도면21



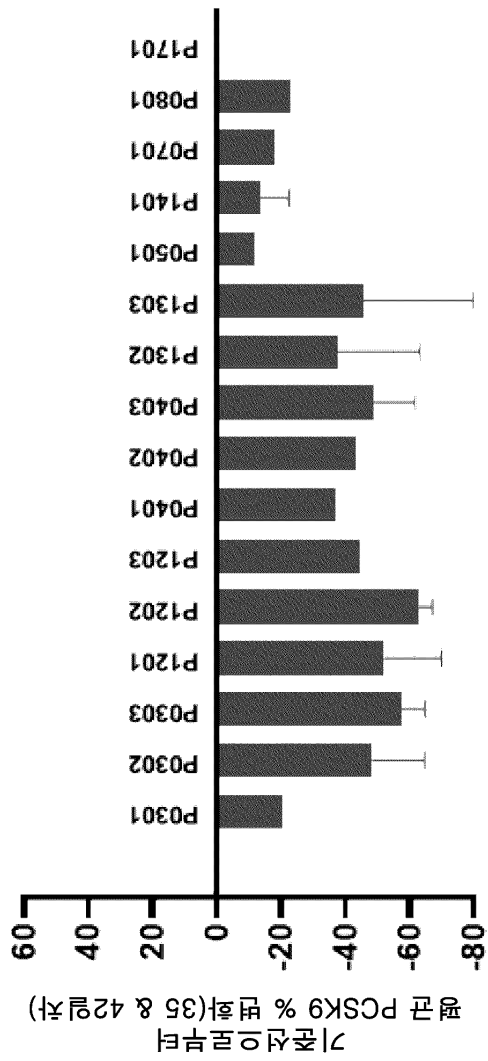
도면22



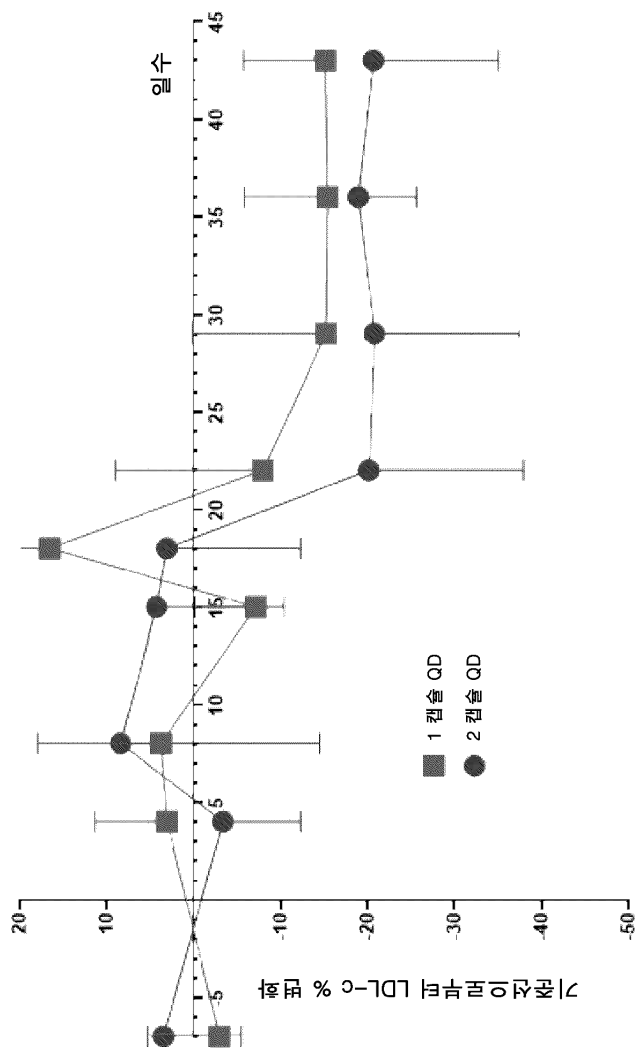
도면23

투여 그룹	투여 종료 (μg /그램 조직)	회복 종료 (μg /그램 조직)
SQ Q2W x 3	33.8 (19.1)	N.A.
1 캡슐 QD x 42	2.3 (1.2)	0.6 (0.2)
2 캡슐 QD x 42	4.0 (1.6)	0.9 (0.7)

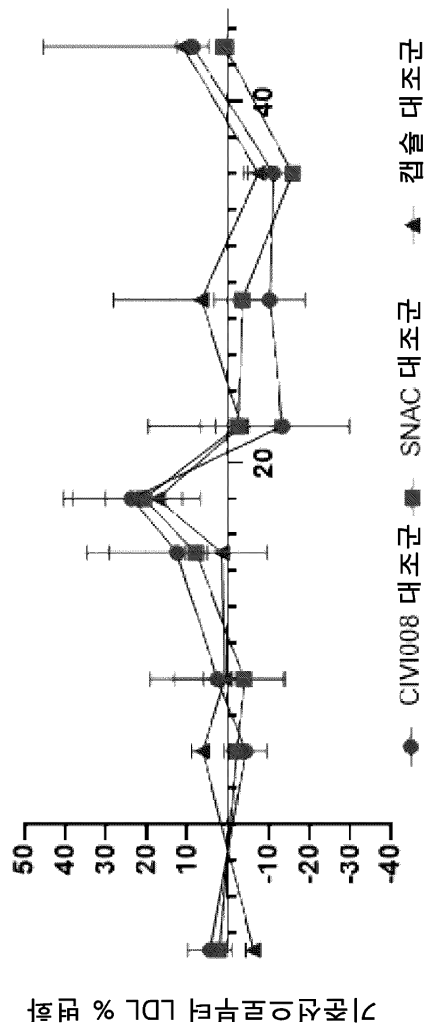
도면24



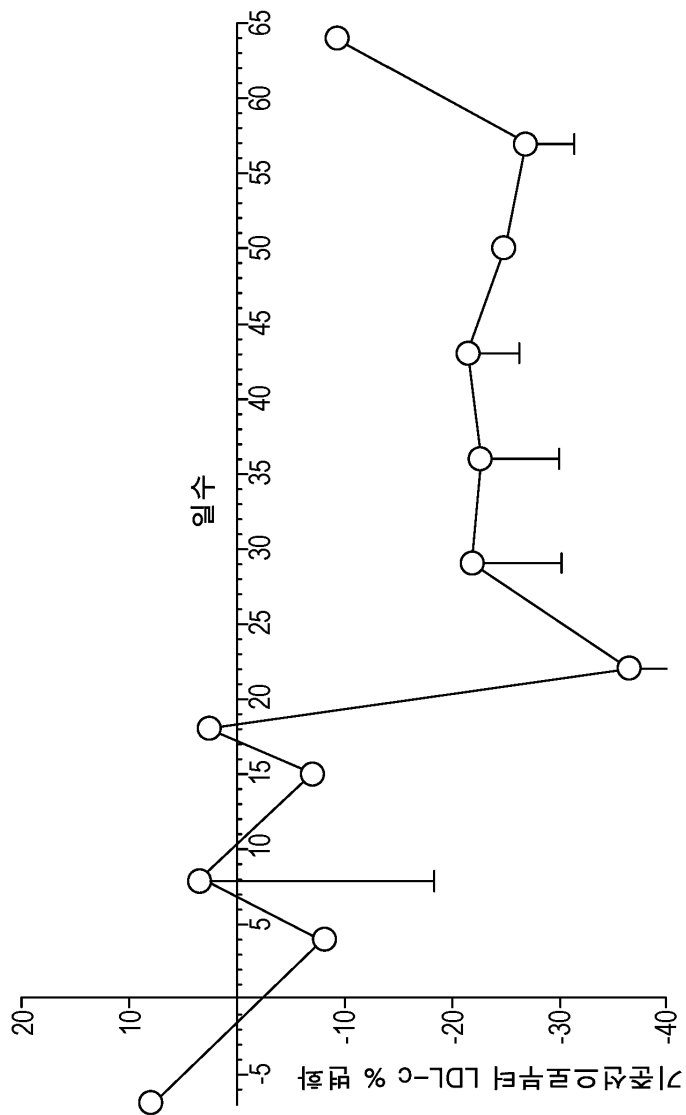
도면25a



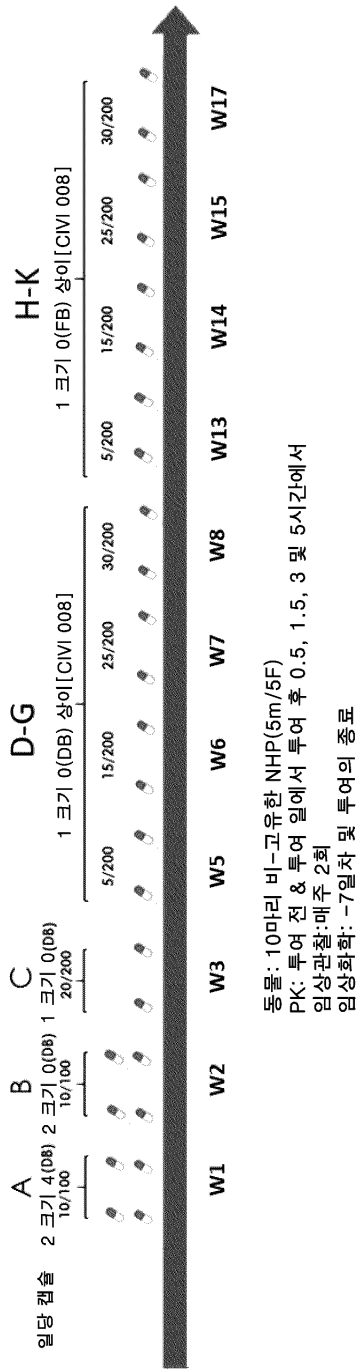
도면25b



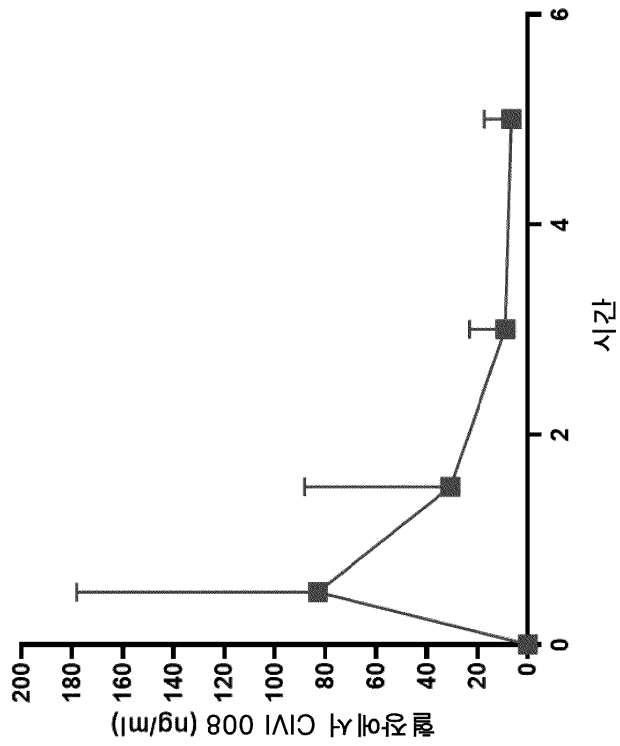
도면26



도면27



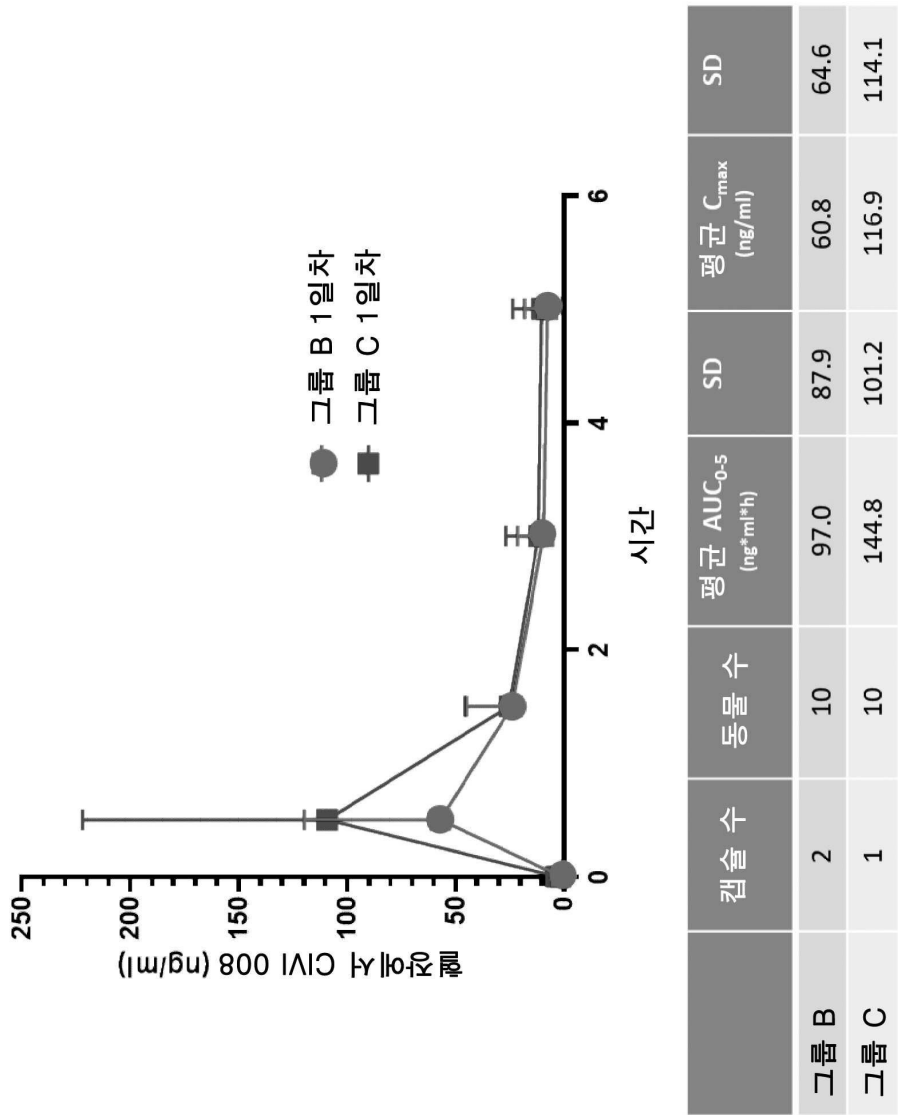
도면28



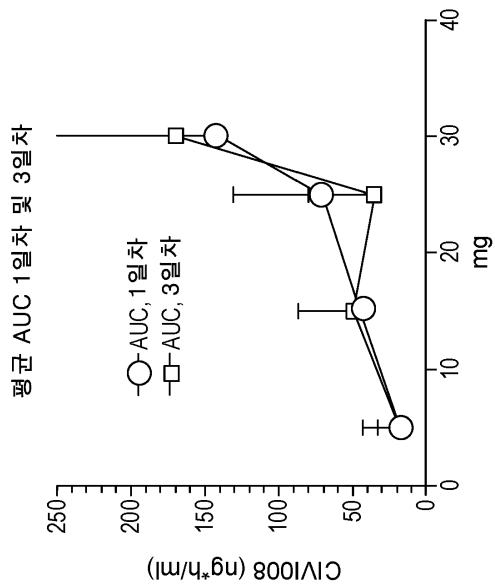
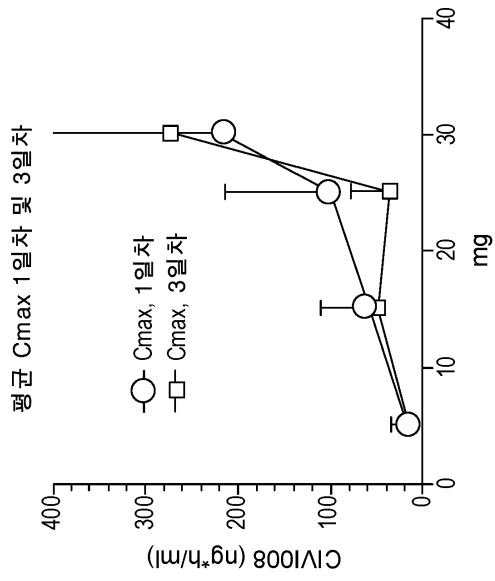
도면29

	수 목 본	평균 AUC_{0-5} (ng*ml*h)	SD	평균 C_{max} (ng/ml)	SD
CIVI008/SNAC	6	67.1	50.7	50.7	52.3
CIVI008/5-CNAC	10	122.5	98.6	106.9	91.2

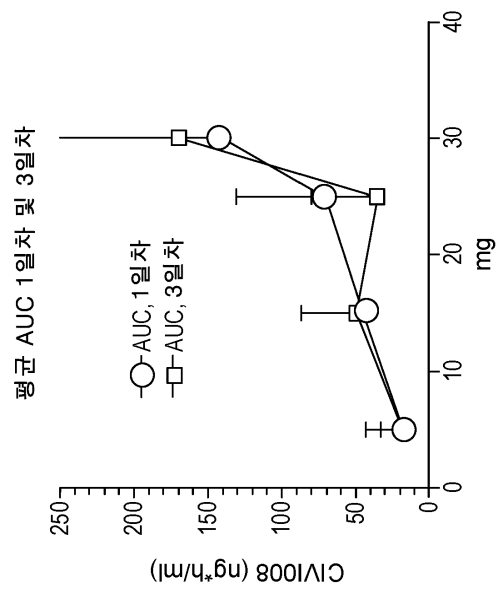
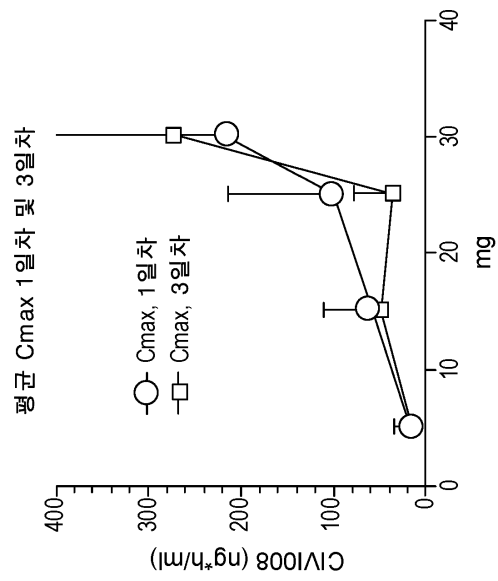
도면30



도면31

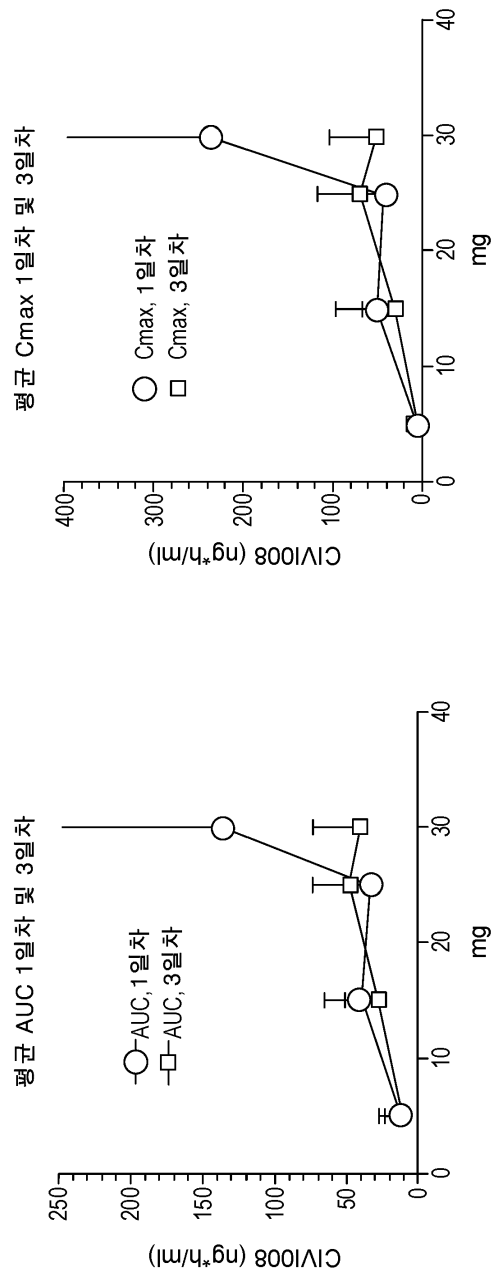


도면32a

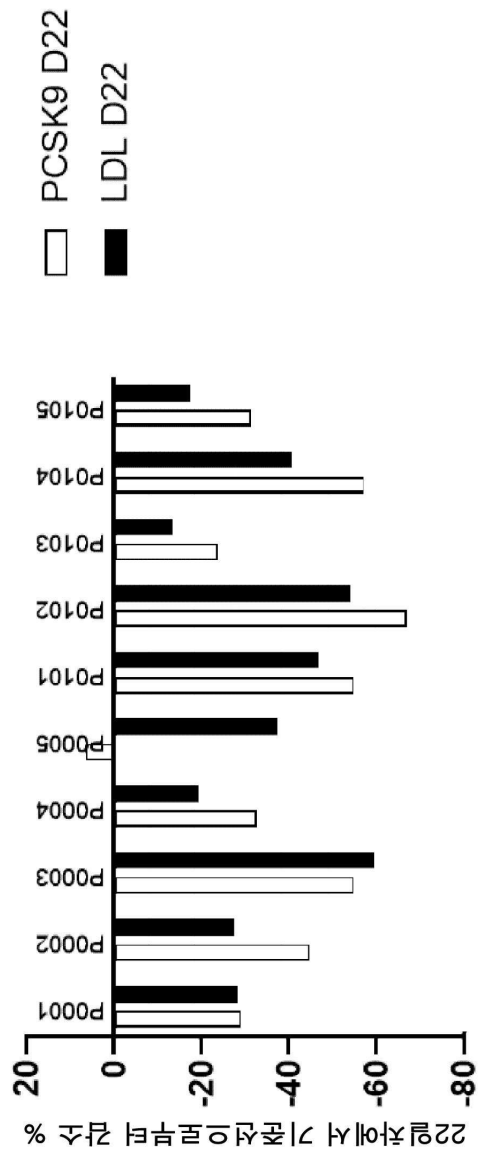


도면32b

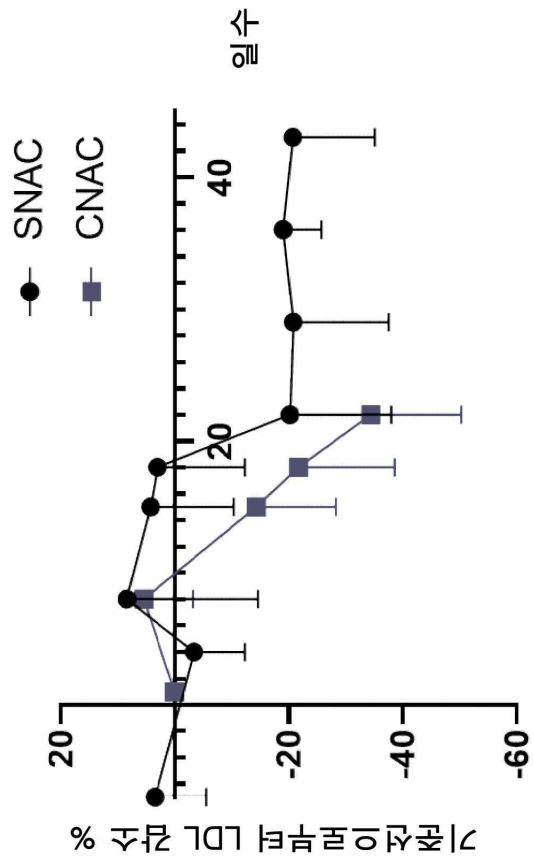
동결 건조됨



도면33



도면34



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> CiVI BIOPHARMA, INC.

<120> Oral delivery of antisense conjugates targeting PCSK9

<130> 4009.021PC04

<150> US63/124,581

<151> 2020-12-11

<150> US63/134,884

<151> 2021-01-07

<150> US63/178,340

<151> 2021-04-22

<150> US63/261,505

<151> 2021-09-22

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 1

tgctacaaaa ccca

14

<210> 2
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)

<223> LNA nucleosides
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(16)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 2

aatgctacaa aaccca

16

<210> 3
 <211> 16

<212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosides
 <220><221> misc_feature
 <222>
 (14)..(16)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<400> 3

aatgctacaa aaccca

16

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> LNA nucleosides

<400> 4

gctgtgtgag cttgg

15

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> LNA nucleosides
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosides
 <400> 5
 tgctgtgtga gcttgg

16

<210> 6
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosides
 <400> 6
 tgctgtgtga gcttgg

16

<210> 7
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <

220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 7
 tcctggtctg tgttcc
 <210> 8
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide

16

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 8
 tcctggtctg tgttcc
 <210> 9
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

16

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Cholesterol-C6

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphodiester Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(16)

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(5)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<400> 9

catgctacaa aaccca

16

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Cholesterol-C6

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphodiester Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(18)

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(5)

<223> LNA nucleosides
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(18)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

 <400> 10
 caaatgctac aaaaccca
 <210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> phosphodiester Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <
 223> LNA nucleosides
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 11
 caaatgctac aaaaccca
 <210> 12
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

18

18

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> phosphodiester Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature

 <222> (3)..(17)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> LNA nucleosides
 <400> 12
 cagctgtgtg agcttgg
 <210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> phosphodiester Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> LNA nucleosides
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(18)

17

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> LNA nucleosides
 <400> 13
 catgctgtgt gagcttgg 18
 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> phosphodiester Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> LNA nucleosides
 <400> 14
 catgctgtgt gagcttgg 18

 <210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> phosphodiester Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(18)

 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 15
 catcctgggtc tgtgttcc

 <210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> phosphodiester Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages

 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(5)

18

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 16
 catcctgggtc tgtgttcc 18
 <210> 17
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 17
 tgctacaaaa ccca 14
 <210> 18
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA nucleosides

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(16)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<400> 18

aatgctacaa aaccca

16

<210> 19

<211> 16

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> GalNAc Conj2a

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA nucleosides

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<400> 19

aatgctacaa aaccca

16

<210> 20

<211> 15

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> LNA nucleosides
 <400> 20

gctgtgtgag cttgg

15

<210> 21
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> LNA nucleosides
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosides
 <400> 21

tgctgtgtga gcttgg 16

<210> 22

<211> 16

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> GalNAc Conj2a

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> LNA nucleosides

<400> 22

tgctgtgtga gcttgg 16

<210> 23

<211> 16

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> GalNAc Conj2a

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 23
 tcctggtctg tgttcc 16
 <210> 24
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages

 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 24
 tcctggtctg tgttcc 16
 <210> 25
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleobase sequence motif
 <400> 25
 tgctacaaaa ccca 14
 <210> 26
 <211> 16

<212> DNA
 <213> ARTIFICIAL

<220><223> nucleobase sequence motif
 <400> 26
 aatgctacaa aaccca 16
 <210> 27
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> nucleobase sequence motif
 <400> 27
 gctgtgtgag cttgg 15
 <210> 28
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> nucleobase sequence motif
 <400> 28
 tgctgtgtga gcttgg 16
 <210> 29

<211> 16
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL
 <220><223> nucleobase sequence motif
 <400> 29
 tcctggtctg tgttcc 16
 <210> 30
 <211> 14
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 uggguuuugu agca 14
 <210> 31

<211> 16
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 ugguuuuuugu agcauu 16
 <210> 32
 <211> 15
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 ccaagcucac acagc 15
 <210> 33
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 ccaagcucac acagca 16
 <210> 34
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 ggaacacaga ccagga 16
 <210> 35
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221>
 misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> phosphodiester Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> FAM conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(16)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 35
 tcagcattgg tattca

16

<210> 36
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> phosphodiester Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> FAM conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(15)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 36

cagcattgggt attca

15

<210> 37

<211> 14

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> phosphodiester Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> FAM conjugate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(14)

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(14)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<400> 37

agcattggta ttca

14

<210> 38

<211> 16

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> phosphodiester Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> FAM conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(16)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 38
 gacgcattgg tattca
 <210> 39
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

16

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> FAM conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C
 <400> 39

gcattggatat tca

13

<210> 40
 <211> 13
 <212> DNA

<213> artificial

<220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> LNA nucleosides

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<400> 40

gtctgtggaa gcg

13

<210> 41

<211> 13

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Cholesterol-C6

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> LNA nucleosides

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<400> 41

gtctgtggaa gcg

13

<210> 42

<211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> phosphodiester Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> LNA nucleosides
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(15)
 <223> phosphorothioate Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 <223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<400> 42

cagtctgtgg aagcg

15

<210> 43

<211> 15

<212>

> DNA

<213> artificial
 <220><223> LNA antisense gapmer oligonucleotide conjugate
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> phosphodiester Internucleoside linkages
 <220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> LNA nucleosides

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(15)

<223> phosphorothioate Internucleoside linkages

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(15)

<223> LNA nucleosides, LNA C are 5-methyl C

<400> 43

ctgtctgtgg aagcg 15

<210> 44

<211> 13

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> nucleobase sequence motif

<400> 44

gtctgtggaa gcg 13

<210> 45

<211> 13

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

cgcuuccaca gac 13

<210> 46

<211> 3731

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 46

gtccgatggg gctctggtgg cgtgatctgc gcgcccagg cgtcaagcac ccacacccta 60

gaaggtttcc gcagcgacgt cgagcgctc atggttcag gcggcgccg ccgttcagtt 120

cagggtctga gcctggagga gtgagccagg cagtgagact ggctcgggcg ggccgggacg 180

cgtcgttgca gcagcggctc ccagctccca gccaggattc cgcgcgcccc ttcacgcgcc 240

ctgctcctga acttcagctc ctgcacagtc ctccccaccg caaggetcaa ggcgcgcgccg 300

gcgtggaccg cgcacggcct ctaggctctcc tcgccaggac agcaacctct cccctggccc	360
tcatgggcac cgtcagctcc aggcggctct ggtggccgct gccactgtct ctgctgtctg	420
tgctgtctct gggtcccgcg ggcccccgtg cgcaggagga cgaggacggc gactacgagg	480
agctgggtgct agccttgctt tccgaggagg acggcctggc cgaagcacc gagcacggaa	540
ccacagccac ctccaccgc tgcgccaagg atccgtggag gttgcctggc acctacgtgg	600
tgggtgctgaa ggaggagacc cacctctctc agtcagagcg cactgcccgc cgcctgcagg	660
cccaggtctc ccgccgggga tactcacca agatcctgca tgtcttccat ggccctcttc	720
ctggcttctt ggtgaagatg agtggcgacc tgctggagct ggccctgaag ttgccccatg	780
tcgactacat cgaggaggac tcctctgtct ttgccagag catcccgtgg aacctggagc	840
ggattacccc tcacggctac cgggcgggatg aataccagcc ccccgacgga ggcagcctgg	900
tggaggtgta tctcctagac accagcatac agagtgacca ccgggaaatc gagggcaggg	960
tcatggtcac cgacttcgag aatgtgcccg aggaggacgg gaccgccttc cacagacagg	1020
ccagcaagtg tgacagtcac ggcacccacc tggcaggggt ggtcagcggc cgggatgccg	1080
gcgtggccaa gggtgccagc atgcgcagcc tgcgctgct caactgccaa gggaagggca	1140
cggttagcgg caccctcata ggccctggag ttattcggaa aagccagctg gtccagcctg	1200
tggggccact ggtggtgctg ctgcccctgg cgggtgggta cagccgcgtc ctcaacgccg	1260
cctgccagcg cctggcgagg gctggggtcg tgctggtcac cgctgccggc aacttcgggg	1320
acgatgcctg cctctactcc ccagcctcag ctcccagggt catcacagtt ggggccacca	1380
atgcccaaga ccagccggtg accctgggga ctttggggac caactttggc cgctgtgtgg	1440
acctctttgc ccagggggag gacatcattg gtgcctccag cgactgcagc acctgctttg	1500
tgtcacagag tgggacatca caggtctgtg ccacgtggc tggcattgca gccatgatgc	1560
tgtctgccga gccggagctc accctggccg agttgaggca gagactgac cacttctctg	1620
ccaaagatgt catcaatgag gcctggttcc ctgaggacca gcgggtactg accccaacc	1680
tgggtggccg cctgcccccc agcacccatg gggcaggttg gcagctgttt tgcaggactg	1740
tatggtcagc aactcgggg cctacacgga tggccacagc cgtcgcccgc tgcgcccag	1800
atgaggagct gctgagctgc tccagtttct ccaggagtgg gaagcggcgg ggcgagcgca	1860
tggaggccca agggggcaag ctggctctgc ggcccacaa cgcttttggg ggtgagggtg	1920
tctacccat tgccaggctg tgcctgtctc ccaggccaa ctgcagcgtc cacacagctc	1980
caccagctga ggccagcatg gggacccgtg tccactgcca ccaacagggc cagtcctca	2040
caggctgcag ctcccactgg gaggtggagg accttggcac ccacaagccg cctgtgctga	2100

ggccacgagg tcagcccaac cagtgcgtgg gccacagga ggccagcatc cacgcttcct 2160

gctgccatgc cccaggtctg gaatgcaaag tcaaggagca tggaatcccg gcccctcagg 2220

agcaggtgac cgtggcctgc gaggagggct ggaccctgac tggtctgcagt gccctccctg 2280

ggacctccca cgtcctgggg gcctacgccg tagacaacac gtgtgtagtc aggagccggg 2340

acgtcagcac tacaggcagc accagcgaag gggccgtgac agccgttgcc atctgtctgcc 2400

ggagccggca cctggcgagc gcctcccagg agctccagt acagcccat cccaggatgg 2460

gtgtctgggg agggtaagg gctggggctg agctttaaaa tggttccgac ttgtccctct 2520

ctcagccctc catggcctgg cagcagggga tggggatgct tccgccttcc cggggctgct 2580

ggcctggccc ttgagtgggg cagcctccct gcctggaact cactcactct gggcgcctcc 2640

tccccagggt gaggtgccag gaagctccct cctcactgt ggggcatttc accattcaaa 2700

caggtcgagc tgtgtctggg tgctgccagc tgctccaat gtgccgatgt ccgtgggcag 2760

aatgactttt attgagctct gtgtccgtgc caggcattca atcctcaggt ctccaccaag 2820

gaggcaggat tcttcccatg gataggggag ggggcggtag gggctgcagg gacaaacatc 2880

gttggggggt gagtgtgaaa ggtgtctgat gcctcatct ccagctaact gtggagaagc 2940

ccctgggggc tccctgatta atggaggctt agctttctgg atggcatcta gccagaggct 3000

ggagacaggt gcgccccctg tggtcacagg ctgtgccttg gtttctctag ccacctttac 3060

tctgtcttat gccaggctgt gctagcaaca cccaaagggt gcctgcgggg agccatcacc 3120

taggactgac tcggcagttg gcagtgggtg atgcactgtc tcagccaacc cgtccacta 3180

cccggcaggg tacacattcg caccctact tcacagagga agaaacctgg aaccagaggg 3240

ggcgtgcctg ccaagctcac acagcaggaa ctgagccaga aacgcagatt gggctggctc 3300

tgaagccaag cctcttctta cttcacccgg ctgggctcct catttttacg ggtaacagtg 3360

aggctgggaa ggggaacaca gaccaggaag ctcggtgagt gatggcagaa cgatgcctgc 3420

aggcatggaa cttttccgt tatcaccag gcctgattca ctggcctggc ggagatgctt 3480

ctaaggcatg gtcgggggag agggccaaca actgtccctc cttgagcacc agccccacc 3540

aagcaagcag acatttatct tttgggtctg tcctctctgt tgccttttta cagccaactt 3600

ttctagacct gttttgcttt tgtaacttga agatatttat tctgggtttt gtagcatttt 3660

tattaatatg gtgacttttt aaaataaaaa caaacaacg ttgtcctaac aaaaaaaaaa 3720

aaaaaaaaa a 3731