



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0039624
(43) 공개일자 2018년04월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7068 (2006.01) A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/7072 (2006.01) A61K 31/7076 (2006.01)
A61K 31/708 (2006.01) A61P 1/04 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7068 (2013.01)
A61K 31/513 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7001496
(22) 출원일자(국제) 2016년06월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년01월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/038110
(87) 국제공개번호 WO 2016/205671
국제공개일자 2016년12월22일
- (30) 우선권주장
62/180,914 2015년06월17일 미국(US)

- (71) 출원인
더 트러스티스 오브 컬럼비아 유니버시티 인 더 시티 오브 뉴욕
미국 10027 뉴욕주 뉴욕 웨스트 116 스트리트 535
로우 메모리얼 라이브러리 412
편다시오 호스피탈 유니버시티리 발 드헤브론-인스티튜트 디 레세르카
스페인 이-08035 바르셀로나 에디피시 디 레세르카 패세익 발 드헤브론 119-129
- (72) 발명자
히라노 미치오
미국 뉴욕주 10033 뉴욕 아파트먼트 126 카브리니 블러바드 120
가론 케이트리나
영국 쉼비1 3 알이 케임브리지 러스탕 애비뉴 아담스 하우스 19
마르띠 라몬
스페인 바르셀로나 패세익 발 드헤브론 119-129
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

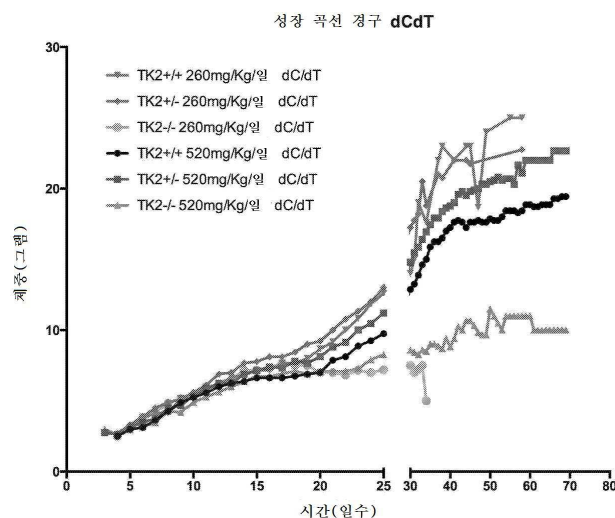
전체 청구항 수 : 총 39 항

(54) 발명의 명칭 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군을 포함하는 불균형 뉴클레오타이드 풀에 의해 야기된 질환에 대한 테옥시뉴클레오타이드 요법

(57) 요약

본 발명은 일반적으로는 인간 유전 질환, 구체적으로는 불균형 뉴클레오타이드 풀, 더 구체적으로는 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군, 및 더 구체적으로는, 티미딘 키나제 2(TK2) 결핍증을 특징으로 하는 것에 대한 약학적 요법에 관한 것이다. 약학적 요법은 적어도 하나의 테옥시뉴클레오타이드, 또는 이들의 혼합물의 투여를 수반한다. TK2 결핍증의 치료를 위해, 약학적 요법은 테옥시티미딘(dT) 또는 테옥시사이티딘(dC), 또는 이들의 혼합물 중 하나의 투여를 수반한다. 테옥시뉴클레오타이드의 이런 투여는 불균형 뉴클레오타이드 풀의 다른 장애, 특히 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군에서 발견된 것에 적용 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/7072 (2013.01)

A61K 31/7076 (2013.01)

A61K 31/708 (2013.01)

A61P 1/04 (2018.01)

A61P 1/12 (2018.01)

A61P 25/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

불균형 뉴클레오타이드 풀(unbalanced nucleotide pool)을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 대상체에게 적어도 하나의 데옥시뉴클레오사이드 또는 이의 생리적으로 기능성인 유도체를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애의 치료가 필요한 대상체에서 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 상기 질환 또는 장애는 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군은 티미딘 키나제 2 (TK2) 결핍증인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 상기 질환 또는 장애는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자 내 적어도 하나의 돌연변이를 특징으로 하는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법: *TK2*; *DGUOK*; *TYMP*; *RRM2B*; *SUCLA2*; *SUCLG1*; 및 *MPV17*.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군은 데옥시구아노신 키나제(dGK) 결핍증, 티미딘 포스포릴라제(TP) 결핍증, 및 *DGUOK*, *TYMP*, *RRM2B*, *POLG* 및 *MPV17* 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자 내 적어도 하나의 돌연변이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 대상체는 포유류인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 대상체는 인간인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은 2 이상의 데옥시뉴클레오사이드를 포함하는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 데옥시뉴클레오사이드는 데옥시피리미딘인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 데옥시피리미딘은 데옥시사이티딘(dC), 데옥시티미딘(dT) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 테옥시뉴클레오타이드는 테옥시퓨린인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 12

제19항에 있어서, 상기 테옥시퓨린은 테옥시아데노신(dA), 테옥시구아노신(dG) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 약 100mg/kg/일 내지 약 1000mg/kg/일인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 약 200mg/kg/일 내지 약 800mg/kg/일인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 약 250mg/kg/일 내지 약 400mg/kg/일인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 조성물은 하나 초과와 테옥시뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 치료적 유효량은 상기 조성물 중의 각각의 테옥시뉴클레오타이드의 약 100mg/kg/일 내지 약 1000mg/kg/일인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 조성물은 하나 초과와 테옥시뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 치료적 유효량은 상기 조성물 중의 총 테옥시뉴클레오타이드의 약 100mg/kg/일 내지 약 1000mg/kg/일인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 조성물은 하나 초과와 테옥시뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 치료적 유효량은 상기 조성물 중의 각각의 테옥시뉴클레오타이드의 약 200mg/kg/일 내지 약 800mg/kg/일인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 조성물은 하나 초과와 테옥시뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 치료적 유효량은 상기 조성물 중의 총 테옥시뉴클레오타이드의 약 200mg/kg/일 내지 약 800mg/kg/일인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 조성물은 하나 초과와 테옥시뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 치료적 유효량은 상기 조성물 중의 각각의 테옥시뉴클레오타이드의 약 250mg/kg/일 내지 약 400mg/kg/일인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 조성물은 하나 초과와 테옥시뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 치료적 유효량은 상기 조성물 중의 총 테옥시뉴클레오타이드의 약 250mg/kg/일 내지 약 400mg/kg/일인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특

징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 조성물은 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회, 1일 4회, 1일 5회 또는 1일 6회로 투여되는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 조성물은 경구, 척추강내, 장 또는 정맥내로 투여되는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 조성물은 경구로 투여되고, 소젖, 인간 모유, 영아 조제식 또는 물과 혼합된 데옥시뉴클레오사이드를 포함하는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 대상체에게 티미딘 포스포릴라제의 저해제를 투여하는 단계를 더 포함하는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 티미딘 포스포릴라제의 저해제는 티피라실인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 27

제1항에 있어서, 상기 대상체에게 사이티딘 탈아미노효소의 저해제를 투여하는 단계를 더 포함하는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 사이티딘 탈아미노효소의 저해제는 테트라하이드로유리딘[THU]인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 29

제1항에 있어서, 상기 대상체에 투여되는 상기 치료적 유효량의 상기 조성물은 시간에 따라 증가되는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 대상체에게 투여되는 상기 조성물의 제1 치료적 유효량은 조성물의 약 100mg/kg/일이고, 상기 조성물의 상기 치료적 유효량은 200mg/kg/일까지, 400mg/kg/일까지, 800mg/kg/일까지, 1000mg/kg/일까지 시간에 따라 증가되는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 31

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 32

하기 단계들을 포함하는 대상체에서 TK 결핍증의 치료를 위한 방법:

- 상기 대상체로부터 샘플을 얻는 단계로서, 상기 샘플은 핵산을 포함하는, 상기 샘플을 얻는 단계;
- 상기 대상체의 상기 핵산 내 상기 *TK2* 유전자의 서열 분석을 수행하는 단계;
- 상기 *TK2* 유전자 내 동형접합 돌연변이 또는 화합물 이형접합 돌연변이가 검출될 때 상기 대상체가 *TK2* 결핍

증을 갖는지를 결정하는 단계; 및

d. 상기 대상체에게 데옥시사이티딘(dC), 데옥시티미딘(dT), 및 이의 혼합물을 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 투여하는 단계.

청구항 33

제32항에 있어서, 하기 단계들을 더 포함하는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법:

- a. 상기 대상체로부터의 샘플 내 크레아틴 키나제 농도의 수준을 검출하는 단계;
- b. 상기 대상체의 골격근에 대해 생검을 수행하는 단계;
- c. 상기 대상체의 골격근에서 미토콘드리아 DNA 계수를 측정하는 단계; 및
- d. 다음 중 하나 이상이 검출된다면 상기 대상체가 TK2 결핍증을 갖는지를 추가로 결정하고/하거나 확인하는 단계: 상기 크레아틴 키나제 농도의 수준이 건강한 대조군에 비해 증가되거나 또는 상승됨; 상기 대상체의 상기 골격근이 섬유 크기, 가변적 근형질 액포, 변화 가능하게 증가된 결합 조직, 불균일 적색근섬유 및 사이토크롬 c 산화효소(COX) 결핍 섬유의 현저한 변화를 포함함: 및 미토콘드리아 DNA 수준이 건강한 대조군에 비해 감소됨.

청구항 34

제3항에 있어서, 상기 조성물의 상기 투여 후에, 하기 단계들을 포함하는, 상기 대상체를 모니터링하는 단계를 더 포함하는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법:

- a. 근강도 및 대조군을 관찰하는 단계;
- b. 신장 및 체중의 차이를 관찰하는 단계;
- c. 이동도를 관찰하는 단계; 및
- d. 임의의 관찰 (a) 내지 (c)가 상기 조성물의 투여 후에 증가된다면, 상기 대상체의 병태에서의 개선을 결정하고, 그리고 상기 조성물의 투여 후에 임의의 관찰 (a) 내지 (c)가 동일 또는 감소된다면, 개선이 없다는 것을 결정하는 단계.

청구항 35

제34항에 있어서, 개선이 없다는 것의 결정은 단계 (d)에서 이루어지고, 상기 조성물의 상기 치료적 유효량은 증가되는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 36

제1항에 있어서, 상기 조성물의 상기 투여 후에 상기 대상체를 역효과에 대해 모니터링하는 단계를 더 포함하되, 역효과가 관찰된다면, 상기 조성물의 상기 치료적 유효량은 감소되는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 조성물의 상기 치료적 유효량이 감소된 후에 상기 관찰된 역효과에 대해 상기 대상체를 모니터링하는 단계를 더 포함하되, 상기 역효과가 더 이상 관찰되지 않는다면, 상기 조성물의 상기 치료적 유효량은 증가되는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 38

제36항에 있어서, 역효과는 위장 불내성인, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 39

제36항에 있어서, 상기 역효과는 설사 및 복부 팽만으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 불균형 뉴클레오타이드

폴을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 정부 지원

[0002] 본 발명은 NIH에 의해 부여된 HD080642 하에 정부 지원에 의해 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 특정 권리를 가진다.

[0003] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0004] 본 출원은 2015년 6월 17일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/180,194호에 대한 우선권을 주장하며, 이는 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0005] 본 발명의 기술분야

[0006] 본 발명은 일반적으로 인간 유전 질환, 구체적으로는 불균형 뉴클레오타이드 풀(unbalanced nucleotide pool), 예를 들어, 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군, 및 더 구체적으로는, 티미딘 키나제 2(TK2) 결핍증을 특징으로 하는 질환에 대한 약학적 요법에 관한 것이다. 약학적 요법은 적어도 하나의 데옥시뉴클레오사이드, 또는 이의 혼합물의 투여를 수반한다. TK2 결핍증의 치료를 위해, 약학적 요법은 데옥시티미딘(dT) 또는 데옥시사이티딘(dC), 또는 이들의 혼합물 중 하나의 투여를 수반한다. 하나 이상의 데옥시뉴클레오사이드의 투여는 불균형 뉴클레오사이드 풀, 특히 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군에서 발견되는 것의 다른 장애에 적용 가능하다.

배경 기술

[0007] 미토콘드리아 질환은 미토콘드리아 호흡쇄(respiratory chain: RC) 및 산화적 인산화의 결함, 전자 내 에너지를 아데노신 삼인산염(ATP)으로 전환시키는 생화학적 경로에 기인하는 임상적으로 이질적인 질환이다. 호흡쇄는 미토콘드리아의 내막을 가로지르는 양성자 구배를 생성하기 위해 전자를 전달하는 4개의 다중-서브유닛-효소(복합체 I 내지 IV)로 구성되며, 복합체 V를 통한 양성자의 흐름은 ATP 합성을 유도한다(DiMauro and Schon 2003; DiMauro and Hirano 2005). 조효소 Q₁₀(CoQ₁₀)는 복합체 I 및 II로부터 복합체 III까지 전자를 실어 나르는 필수 분자이다. 호흡쇄는 2가지 계통, 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 및 핵 DNA(nDNA)에 의해 제어 중인 진행, 예를 들어 포유류 세포에서 독특하다. 결과로서, 계통 중 하나의 돌연변이는 미토콘드리아 질환을 야기할 수 있다. 대부분의 미토콘드리아 질환은 다수의 신체 기관에 영향을 미치며, 전형적으로 아동기 또는 젊은 성인 수명에서 치명적이다. 호흡쇄 활성을 향상시키기 위해 그리고 역기능 호흡쇄 효소의 독성 부산물인 활성 산소종(reactive oxygen species: ROS)을 해독하기 위한 유일한 지지 요법인 미토콘드리아 질환에 대한 효과적인 치료, 예컨대 CoQ₁₀ 및 그의 유사체의 투여는 증명되지 않았다.

[0008] 미토콘드리아 질환의 하위그룹인 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군(MDS)은 조직 내 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 복제수의 감소 및 미토콘드리아 RC 복합체의 불충분한 합성에 의해 분자적으로 특성 규명된 몇몇 유년기 뇌근육병증의 빈번한 원인이다(Hirano, *et al.* 2001). 몇몇 핵 유전자의 돌연변이는 *TK2*, *DGUOK*, *POLG*, *POLG2*, *SCLA25A4*, *MPV17*, *RRM2B*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *TYMP*, *OPA1* 및 *C10orf2 (PEO1)*을 포함하는 유아 MDS의 원인으로 확인되었다(Bourdon, *et al.* 2007; Copeland 2008; Elpeleg, *et al.* 2005; Mandel, *et al.* 2001; Naviaux and Nguyen 2004; Ostergaard, *et al.* 2007; Saada, *et al.* 2003; Sarzi, *et al.* 2007; Spinazzola, *et al.* 2006). 추가로, 이들 핵 유전자의 돌연변이는 mtDNA 고갈과 함께 또는 고갈 없이 mtDNA의 다중 결실을 야기할 수 있다(Béhin, *et al.* 2012; Garone, *et al.* 2012; Longley, *et al.* 2006; Nishino, *et al.* 1999; Paradas, *et al.* 2012; Ronchi, *et al.* 2012; Spelbrink, *et al.* 2001; Tynismaa, *et al.* 2009; Tynismaa, *et al.* 2012; Van Goethem, *et al.* 2001).

[0009] 이들 유전자 중 하나는 *TK2*인데, 이는 데옥시티미딘 일인산염(dTMP) 및 데옥시사이티딘 일인산염(dCMP)을 생성하기 위해 피리미딘 뉴클레오사이드(티미딘 및 데옥시사이티딘)의 인산화에 필요한 미토콘드리아 효소인 티미딘 키나제(TK2)를 암호화한다(Saada, *et al.* 2001). *TK2*의 돌연변이는 mDNA 복제 및 수선을 위한 빌딩 블럭인 데옥시뉴클레오타이드 삼인산염(dNTP)의 합성에 필요한 미토콘드리아 뉴클레오사이드/뉴클레오타이드 구조 경로를 손상시킨다.

- [0010] TK2 결핍증은 중증의, 엄청난 근육병을 앓고 있는, 4가지 상이한 패밀리로부터 유래된 4가지로 영향 받은 아동기에서 사다(Saada)와 동료들에 의해 2001년에 처음 설명되었다(Saada, *et al.* 2001). 평범한 초기 발생 후에, 6 내지 36개월령에 환자들은 자발적 활동의 후속적 상실과 함께 중증의 근긴장저하증인 하이퍼케미아(hyperCKemia)가 발생하였다. 상기 질환은 빠르게 진행하며, 두 환자는 3년에 기계적으로 호흡된 반면, 다른 두 환자는 보고 시점에 이미 사망하였다.
- [0011] 첫 번째 설명 후에, 6명의 추가적인 환자가 문헌에 보고되었고, 적어도 26명의 추가적인 환자가 진단되었지만 보고되지 않았는데(Alston, *et al.* 2013; Bartsaghi, *et al.* 2010; Béhin, *et al.* 2012; Blakely, *et al.* 2008; Carrozzo, *et al.* 2003; Chanprasert, *et al.* 2013; Collins, *et al.* 2009; Galbiati, *et al.* 2006; Gotz, *et al.* 2008; Leshinsky-Silver, *et al.* 2008; Lesko, *et al.* 2010; Mancuso, *et al.* 2002; Mancuso, *et al.* 2003; Marti, *et al.* 2010; Oskoui, *et al.* 2006; Paradas, *et al.* 2012; Roos, *et al.* 2014; Tulinius, *et al.* 2005; Tynismaa, *et al.* 2012; Vilà, *et al.* 2003; Wang, *et al.* 2005), 90명의 환자가 초래되었고, 53명은 남성이고 37명은 여성이었다.
- [0012] 최근에 진단된 26명의 환자는 차세대 DNA 시퀀싱을 통해 확인되었다. 이 매우 다수의 새로 확인된 사례는 TK2 결핍증이 하기 진단된 장애라는 것을 시사한다.
- [0013] TK2 결핍증은 광범위한 임상 및 분자 유전적 범위를 나타내며 대다수의 환자는 엄청난 임상 과정이 유아기에 나타나는 반면, 다른 환자는 수십년에 걸쳐 서서히 진행한다.
- [0014] 대부분의 MDS 및 미토콘드리아 장애와 같은 TK2 결핍증에 대한 치료는 지지 요법으로 제한되었다. 데옥시티미딘 일인산염(dTMP) 및 데옥시사이티딘 일인산염(dCMP)의 투여는 TK2 녹인(knock-in) 돌연변이체 마우스와 TK2 결핍증이 있는 인간 환자 둘 다의 병태를 개선시켰지만(미국 가출원 특허 제15/082,207호, 이의 전문이 본 명세서에 참고로 포함됨), 여전히 TK2 결핍증에 대한 치료적 개입에 대한 필요가 있다.
- [0015] 추가적으로, MDS의 다른 형태 및 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 다른 질환에 대한 치료에 대한 필요가 있다. 예를 들어, mtDNA 고갈 또는 다중 결실 또는 둘 다 있는 몇몇 멘델 장애는 mtDNA 복제의 결함을 야기하는 불균형 데옥시뉴클레오타이드 삼인산염을 특징으로 한다. 한 가지 이러한 장애인, *DGUOK* 돌연변이는, 데옥시 퓨린 뉴클레오타이드 데옥스구아노신 및 데옥시사이티딘을 정상적으로 인산화하여 데옥스구아노신 일인산염(dGMP) 및 데옥시사이티딘 일인산염(dCMP)을 생성하는, 미토콘드리아내 효소 데옥시구아노신 키나제를 손상시킨다. 미토콘드리아 dNTP 풀을 방해하는 다른 핵 유전자는 *TYMP*, *RRM2B*, *SUCLA2*, *SUCLG1* 및 *MPV17*을 포함한다. dNTP 풀 균형을 회복하는 요법은 마찬가지로 이들 장애를 치료하는 데 유용할 것이다.

발명의 내용

- [0016] 특정 실시형태에서, 본 발명은 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애의 치료가 필요한 대상체에게 치료적 유효량의 하나 이상의 데옥시뉴클레오타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 질환 또는 장애는 다음의 유전자 내 돌연변이를 특징으로 하는 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: *TK2*; *DGUOK*; *TYMP*; *RRM2B*; *SUCLA2*; *SUCLG1*; 및 *MPV17*.
- [0018] 바람직한 실시형태에서, 상기 장애는 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군(MDS)이다. 더 바람직한 실시형태에서, MDS는 *TK2*의 돌연변이를 특징으로 하는 근육병증 형태, *SUCLA2*의 돌연변이를 특징으로 하는 뇌척수증 형태, *TYMP*의 돌연변이를 특징으로 하는 신경위장 뇌병증 형태 및 *DGUOK*, *POLG* 및 *MPV17*의 돌연변이를 특징으로 하는 간 장애 형태의 장애를 포함한다. 가장 바람직한 실시형태에서, 상기 장애는 *TK2* 유전자의 돌연변이(들)를 특징으로 하는 티미딘 키나제 2 결핍증이다.
- [0019] 모든 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군은 데옥시뉴클레오타이드를 투여하는 단계를 포함하는 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 MDS의 예는 하기에서의 결핍증을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 데옥시구아노신 키나제(dGK)를 암호화하는 *DGUOK* 유전자; p53R2를 암호화하는 *RRM2B* 유전자, 리보뉴클레오타이드 환원효소(RNR)의 p53 유도성의 작은 서브유닛; 및 티미딘 포스포릴라제(TP)를 암호화하는 *TYMP* 유전자.

- [0020] 바람직한 실시형태에서, 데옥시뉴클레오사이드는 데옥시티미딘(dT) 또는 데옥시사이티딘(dC) 또는 이들의 혼합물이다. 데옥시아데노신(dA) 및 데옥시구아노신(dG)은 또한 단독으로 또는 함께 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 하나의 데옥시뉴클레오사이드(즉, dT, dC, dA 또는 dG) 및 임의의 4가지 데옥시뉴클레오사이드 중 둘 이상의 혼합물은 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다.
- [0021] 데옥시뉴클레오사이드(들)의 바람직한 투약량은 약 100 내지 약 1,000mg/kg/일, 더 바람직하게는 약 300 내지 약 800mg/kg/일, 및 가장 바람직하게는 약 250 내지 약 600mg/kg/일이다. 조성물이 단일 데옥시뉴클레오사이드를 포함한다면, 투약량은 단일 데옥시뉴클레오사이드의 투약량일 수 있다. 조성물이 하나 초과인 데옥시뉴클레오사이드를 포함한다면, 투약량은 조성물 중의 각각의 데옥시뉴클레오사이드의 또는 총 데옥시뉴클레오사이드의 투약량일 수 있다.
- [0022] 데옥시뉴클레오사이드(들)의 투여는 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회, 1일 4회, 1일 5회, 1일 6회까지, 바람직하게는 정기적 간격일 수 있다.
- [0023] 투여의 바람직한 방법은 경구, 척수내, 정맥내 및 장이다.
- [0024] 데옥시뉴클레오사이드(들)의 투여는 불균형 뉴클레오타이드 풀을 특징으로 하는 장애, 예를 들어, MDS가 의심되고, 환자의 수명 내내 계속되면 바로 시작하여야 한다. TK2 결핍증을 포함하는 이러한 장애의 진단을 위한 검사는 당업계에 공지되어 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 본 발명을 예시하는 목적을 위해, 본 발명의 특정 실시형태를 도면에 도시한다. 그러나, 본 발명은 도면에 도시된 실시형태의 정확한 배열 및 수단으로 제한되지 않는다.
- 도 1은 출생 후 4일부터 데옥시사이티딘(dC) 및 데옥시티미딘(dT)의 260mg/kg/일 또는 520mg/kg/일로 처리한 야생형(Tk2^{+/+} 및 Tk2^{+/-}), 및 Tk2^{-/-} 마우스의 성장 곡선을 도시한 도면. 각각의 기호는 각각의 시점에 중량의 평균을 나타낸다. 각각의 그룹의 N을 도면에 나타낸다.
- 도 2는 다음의 처리에 의한 야생형(Tk2^{+/+}) 및 Tk2^{-/-} 마우스의 생존 곡선을 도시한 도면: 출생 후 4일에 Tk2^{-/-}컷 대 Tk2^{-/-200mg/kg/일 dCMP+dTMP}, p=0.0013; Tk2^{-/-}컷 대 Tk2^{-/-260mg/kg/일 dC+dT}, p=0.0006; Tk2^{-/-}컷 대 Tk2^{-/-520mg/kg/일 dC+dT}, p<0.0001; Tk2^{-/-260mg/kg/일 dC=dT} 대 Tk2^{-/-520mg/kg/일 dCdT}, p=0.0009. 각각의 그룹의 N을 도면에 나타낸다. p-값은 만텔-콕스(Mantel-Cox) 검정에 의해 결정하였다.
- 도 3은 출생 후 13일(상부 패널) 및 출생 후 29일(하부 패널) 연령에서 야생형(Tk2^{+/+}), 및 Tk2^{-/-}, 비처리 또는 200mg/kg/일 dCMP 및 dAMP로 처리 또는 데옥시사이티딘(dC) 및 데옥시티미딘(dT)의 260mg/kg/일 또는 520mg/kg/일로 처리된 뇌 및 간 조직으로부터 단리된 미토콘드리아에서의 dNTP의 상대적 비율의 그래프를 도시한 도면.
- 도 4는 출생 후 13일 및 29일에 비처리 또는 데옥시사이티딘(dC) 및 데옥시티미딘(dT)의 260mg/kg/일 또는 520mg/kg/일로 처리된 Tk2^{-/-} 마우스에 비교한, 야생형 Tk2 마우스(Tk2^{+/+})에서의 뇌, 간, 장 및 근육 내 mtDNA/nDNA의 비를 나타내는 그래프를 도시한 도면. 데이터를 Tk2⁺에 대한 mtDNA의 백분율의 평균 ± 표준 편차(SD)로서 나타낸다. p-값을 맨-휘트니(Mann-Whitney) 검정에 의해 평가하였다. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).
- 도 5는 치료 후 30분에 비처리 야생형(Tk2^{+/+}) 마우스, 데옥시사이티딘(dC) 및 데옥시티미딘(dT) 260mg/kg/일로 처리한 야생형(Tk2^{+/+}) 마우스, 데옥시사이티딘(dC) 및 데옥시티미딘(dT)의 260mg/kg/일로 처리한 Tk2^{-/-} 마우스, 및 dCMP 및 dTMP 200mg/kg/일로 처리한 Tk2^{-/-} 마우스의 혈장 중의 dT 및 유라실을 특정한 HPLC의 결과를 도시한 그래프를 도시한 도면. 데이터를 평균 ± SD로서 표현한다.
- 도 6은 출생 후 13일에 dCMP 및 dTMP 및 THU의 400mg/kg/일, 출생 후 13일 및 29일에 데옥시사이티딘(dC) 및 데옥시티미딘(dT)의 260mg/kg/일, 또는 출생 후 29일에 데옥시사이티딘(dC) 및 데옥시티미딘(dT)의 520mg/kg/일로 처리한 Tk2^{-/-} 마우스에서 호흡쇄 효소 활성 수준의 그래프를 도시한 도면. 각각의 치료를 위해 단백질 수준에 정규화된 Tk2^{-/-} 마우스 조직 내 RCE 활성의 백분율로서 그리고 Tk2⁺에 대해 데이터를 나타낸다. p-값을 맨-

휘트니 검정에 의해 결정하였다. *p<0.05.

도 7A는 출생 후 29일에 테옥시사이티딘(dC) 및 테옥시티미딘(dT)의 260mg/kg/일 또는 520mg/kg/일로 처리한 야생형 마우스, 및 테옥시사이티딘(dC) 및 테옥시티미딘(dT)의 260mg/kg/일 또는 520mg/kg/일로 처리한 Tk2^{-/-} 마우스에서 호흡쇄 단백질의 면역블롯을 도시한 도면. 도 7B는 TK2^{+/+} 마우스에서 RCE 수준의 백분율로서 나타낸 복합체 II에 대해 정규화함 RCE 수준을 나타내는 그래프를 도시한 도면. p-값을 맨-휘트니 검정에 의해 평가하였다.

약어:CS= 시트레이트 신타제; CI= NADH-탈수소효소; CII= 숙시네이트 탈수소효소; CIII= 사이토크롬 c 환원효소; CIV= 사이토크롬 c 산화효소(COX); CI+III= NADH-사이토크롬 c 환원효소; CII + III= 숙시네이트 탈수소효소-사이토크롬 c 환원효소.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명은 TK2 결핍증을 포함하는 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군이 테옥시뉴클레오사이드로 치료될 수 있다는 놀라운 발견에 기반한다. 본 명세서의 결과에 의해 나타난 바와 같이, 테옥시뉴클레오사이드의 투여는 TK2 결핍증의 마우스 모델과 TK2 결핍증을 갖는 인간 환자 둘 다에서 병태를 크게 개선시켰다.
- [0027] 정의
- [0028] 본 명세서에 사용된 용어는 일반적으로 본 발명의 내용 및 각각의 용어가 사용되는 특정 내용 내에서 기술 분야에서의 그들의 보통의 의미를 가진다. 본 발명의 방법 및 그들의 사용하는 방법을 설명함에 있어서 실행자에게 추가적인 안내를 제공하기 위해, 본 명세서에서 이하에 또는 다른 곳에서 특정 용어가 논의된다. 게다가, 동일한 것이 한 가지 초과로 언급될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 결과적으로, 대안의 언어 및 동의어는 본 명세서에 논의되는 용어 중 임의의 하나 이상에 대해서는 아니며, 또는 용어가 본 명세서에 상술되거나 또는 논의되는지의 여부에 따라 임의의 특정 의미가 부여되는 것도 아니다. 특정 용어에 대한 유의어가 제공된다. 하나 이상의 증상의 설명은 다른 동의어의 사용을 배제하지는 않는다. 본 명세서에 논의된 임의의 용어의 예를 포함하는 본 명세서의 다른 곳에서 예시의 사용은 단지 예시적이며, 본 발명의 범주 및 의미 또는 임의의 예시된 용어를 결코 제한하지 않는다. 마찬가지로, 본 발명은 그의 바람직한 실시형태로 제한되지 않는다.
- [0029] 본 출원에서 사용되는 용어 "대상체"는 포유류를 의미한다. 포유류는 개, 고양이, 설치류, 소, 말, 돼지, 양 및 영장류를 포함한다. 따라서, 본 발명은, 예를 들어, 반려 동물, 농장 동물, 동물원 내 실험실 동물 및 야생의 동물을 치료하기 위해 수의학에서 사용될 수 있다. 본 발명은 인간 의학 분야에 특히 바람직하다.
- [0030] 본 출원에서 사용되는 용어 "환자"는 인간 대상체를 의미한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, "환자"는 불균형 뉴클레오타이드 풀, 미토콘드리아 질환, 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군 또는 TK2 결핍증을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 갖는 것으로 알려져 있거나 또는 의심된다.
- [0031] 어구 "치료적 유효량"은 대상체에서 임상적으로 유의한 병태의 개선을 야기하거나, 또는 질환 또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 지연시키거나 또는 최소화하거나 또는 완화시키거나 또는 대상체에서 생리학의 목적으로 하는 유리한 변화를 야기하는 데 충분한 양을 의미하기 위해 본 명세서에서 사용된다.
- [0032] 용어 "치료하다", "치료" 등은 질환 또는 장애의 증상 중 적어도 하나를 늦추거나, 경감시키거나, 개선하거나 또는 완화하거나 또는 그의 개시 후에 질환 또는 장애를 반전시키는 의미를 지칭한다.
- [0033] 용어 "예방하다", "예방" 등은 명시적인 질환 또는 장애 개시 전에 작용하고, 질환 또는 장애 정도가 발생하는 것을 막거나 또는 질환 또는 장애 정도를 최소화하거나 또는 그의 발생 과정을 늦추는 것을 지칭한다.
- [0034] 용어 "~가 필요한"은 불균형 뉴클레오타이드 풀, 미토콘드리아 질환, 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군, 또는 TK2 결핍증을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 갖는 것으로 알려지거나 또는 의심되거나 또는 질환 또는 장애를 가지리 위험에 있는 것으로 알려진 대상체이다.
- [0035] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "제제"는 효과를 생성하거나 또는 생성할 수 있고, 화학물질, 약제, 생물제제, 소용기 물질, 항체, 핵산, 펩타이드 및 단백질을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 물질을 의미한다.
- [0036] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "테옥시뉴클레오사이드"는 테옥시티미딘 또는 dT, 테옥시사이티딘 또는 dC, 테옥시아데노신 또는 dA, 및 테옥시구아노신 또는 dG를 의미한다. 각각에 대한 전장 명칭 및 통상적인 약어는 상호 호환적으로 사용될 것이다. 이러한 테옥시뉴클레오사이드는 또한 테옥시뉴클레오사이드의 생리적으로

기능성인 유도체를 포함한다.

- [0037] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "생리적으로 기능성인 유도체"는 테옥시뉴클레오사이드를 수득하기 위해 생체내에서 형질전환된 화합물(예를 들어, 약물 전구체)을 지칭한다. 형질전환은, 예를 들어, 혈액에서의 가수 분해를 통한 다양한 메커니즘(예를 들어, 대사 또는 화학적 과정에 의해)에 의해 일어날 수 있다. 프로드러그는 이러한 유도체이고, 프로드러그의 용도의 논의는 문헌[T. Higuchi and W. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, and in Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987]에 의해 제공 된다.
- [0038] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "역효과"는 약물의 투여에 의해 야기되는 원치않는 반응이다. 대부분의 사례에서, 테옥시뉴클레오사이드의 투여는 유해 효과를 야기하지 않았다. 가장 예상되는 역효과는 약간의 위장 불내성 일 것이다.
- [0039] 용어 "약" 또는 "대략"은 값이 측정되거나 또는 결정되는 방법에 부분적으로 의존할 당업자에 의해 결정되는 특정 값에 대한 허용 가능한 오차 범위, 즉, 측정 시스템의 제한, 즉, 특정 목적을 위해 필요한 명확함, 예컨대 약제학적 제형의 정도의 내를 의미한다. 예를 들어, "약"은 기술 분야에서 실행 당 1 또는 1 초과의 표준 편차 내를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값의 20%까지, 바람직하게는 10%까지, 더 바람직하게는 5%까지, 그리고 훨씬 더 바람직하게는 1%까지의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 과정에 대해, 상기 용어는 값의 배수적 규모 내에서, 바람직하게는 5-배 그리고 더 바람직하게는 2-배 내에서의 의미할 수 있다. 특정 값이 본 출원 및 청구범위에서 기재되는 경우, 달리 언급되지 않는 한, 용어 "약"은 특정 값에 대한 허용 가능한 오차 범위 내에서 추정되어야 한다는 것을 의미한다.
- [0040] 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군의 치료를 위한 테옥시뉴클레오타이드의 투여
- [0041] 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 고갈 증후군(MDS)은 영향 받은 조직에서 mtDNA 복제수의 감소를 특징으로 하는 몇몇 중증의 상염색체 질환을 포함한다. 대부분의 MDS 원인 핵 유전자는 mtDNA 복제 기작에 속하거나 또는 테옥시리보뉴클레오사이드 삼인산염(dNTP) 대사에 수반된 단백질을 암호화한다.
- [0042] MDS의 하나의 형태는 티미딘 키나제 결핍증 또는 TK2이다. 핵 유전자(TK2)에 의해 암호화된 TK2는 티미딘 및 테옥시사이티딘 뉴클레오사이드를 인산화하여 테옥시티미딘 일인산염(dTMP) 및 테옥시사이티딘 일인산염(dCMP)을 생성하는 미토콘드리아 기질 단백질인데, 이는 결국 미토콘드리아 DNA 합성에 필요한 테옥시뉴클레오타이드 삼인산염(dNTP)으로 전환된다. 배경기술 부문에 논의되는 바와 같이, 열성 상염색체 TK2 돌연변이는 유아 및 아동기에서 미토콘드리아 DNA(mtDNA)의 중증의 고갈이 있는 엄청난 신경근 약화뿐만 아니라 성인에서 mtDNA 다중 고갈이 있는 진행성 외안근 마비를 야기한다. 다수의 환자는 걸을 수 없으며, 일부 유형의 기계적 호흡 및 영양보급관이 필요하다. 중추 신경계는 압수, 뇌증, 인지장애 및 청력손실을 포함하는 증상과 함께 이들 장애에서 가변적으로 연루된다. 7% 미만의 환자는 42세 초과로 생존한다.
- [0043] 이렇게 진단된 환자의 임상 및 분자 유전적 발견에 기반하여, 3가지 질환 제시가 동정되었다: i) 중증의 mtDNA 고갈 및 조기 사망을 갖는 수명의 첫 해에 쇠약함의 개시와 함께 유아-개시(1세 이하) 근육병; ii) 중증의 mtDNA 고갈을 갖는 유아-개시(>1 내지 11세령) 근육병; 및 iii) 개시 시 경증의 쇠약 및 보행 상실로의 느린 진행, 호흡 부전 또는 둘 다를 갖고, 종종 mtDNA 다중 결실, 감소된 mtDNA 복제수 또는 둘 다와 관련된 청소년 또는 성인에서의 만성 진행성 외안근운동 마비를 갖는 후기 개시 근육병(≥ 12 세령). 일반적으로 문헌[Garone, *et al.*, (2016) in preparation] 참조.
- [0044] 환자로부터 배양된 섬유아세포를 이용하는 TK2 결핍증에 대한 발명 및 시험 요법을 연구하기 위한 시험은, 복제 세포가 mtDNA 고갈을 나타내지 못하였기 때문에, 성공적이지 못하였다. 대조적으로, 동형접합 Tk2 H126N 녹인 돌연변이체(Tk2^{-/-}) 마우스 모델은 인간 유아-개시 질환과 유사한 시간 기간인, 감소된 보행에 의한 10일령에 개시, 불안정한 걸음걸이, 거친 진전, 성장 지연, 및 14일 내지 16일령에 조기 사망까지 빠르게 진행되는 미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 고갈을 특징으로 하는 TK2 돌연변이에 의해 야기되는 인간 유아 뇌근육병증과 두드러지게 유사한 표현형을 나타낸다(Akman, *et al.* 2008; Dorado, *et al.* 2011).
- [0045] Tk2 녹인 마우스에 의해 본 명세서에 제시된 연구는 장기간의 경구 dC/dT 투여가 TK2 결핍증의 임상 증상의 개시를 지연시키고, 2 내지 3배만큼 마우스의 수명을 연장시켰다는 것을 나타낸다(실시예 2).
- [0046] 추가적인 실험은 조직-특이적 효과를 나타내었다. 미토콘드리아 추출물 내 dNTP 풀 수준의 측정은 dCTP가 뇌에

서 구조되었고, dTTP가 간에서 구조되었다는 것을 나타내었다(실시예 3). mtDNA 고갈의 측정은 dCMP+dTMP와 dC+dT 요법이 둘 다 간, 근육 및 조직에서 mtDNA 복제수를 구조하였다는 것을 나타내었다(실시예 4). 혈액 뇌 장벽의 형성은 뇌에서 치료 생체이용률을 위태롭게 할 수 있다는 것이 이미 추측되었다. 그럼에도 불구하고, HPLC 측정은 이들 화합물의 촉매적 생성물이 뉴클레오타이드 일인산염과 테옥시뉴클레오타이드 치료 둘 다 후에 고농도로 발견되었는데, 그들이 혈액 뇌 장벽을 가로지를 수 있다는 것을 시사한다. mtDNA 고갈 측정은 또한 장 내 mtDNA 복제수의 완전한 구조를 나타내었다.

- [0047] 따라서, Tk2 결핍증의 마우스 모델을 이용하여 본 명세서에 제시된 실험은 질환의 치료에 효과적이고 안전한 테옥시뉴클레오타이드의 투여를 나타낸다. 추가적으로, 실시예 5에 나타난 바와 같이, dT 및 dC의 투여는 환자에서 TK2 결핍증의 증상을 크게 개선시켰다.
- [0048] 따라서, 본 발명은 투여가 필요한 환자에 대한 적어도 하나의 테옥시뉴클레오타이드의 투여를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 테옥시피리미딘의 투여를 포함한다. 추가적인 실시형태에서, 테옥시피리미딘은 dC, dT 및 이들의 혼합물로부터 선택된다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 테옥시퓨린의 투여를 포함한다. 추가 실시형태에서, 테옥시퓨린은 dA, dG 및 이들의 혼합물로부터 선택된다.
- [0049] 테옥시뉴클레오타이드의 투여가 유리한 환자는 TK2 결핍증으로 진단된 환자이다. 이들 환자에서, 적어도 하나의 테옥시피리미딘, dC 또는 dT, 또는 이들의 혼합물이 투여될 것이다.
- [0050] dGMP 및 dAMP의 결핍증이 있는 *DGUK*의 열성 상염색체 돌연변이에 기인하는 테옥시구아노신 키나제(dGK)의 병행되는 결함은 전형적으로 조기 아동기-개시 간뇌증후군으로서 나타나는 mtDNA 고갈을 야기한다(Mandel, *et al.* 2001). 이들 환자는 적어도 하나의 테옥시퓨린, dG 또는 dA, 또는 이들의 혼합물의 투여가 유리하다.
- [0051] 다른 형태의 MDS뿐만 아니라 불균형 뉴클레오타이드 풀과 관련된 다른 장애는 특정 테옥시뉴클레오타이드, 즉, dA, dG, dC 또는 dT, 또는 이들의 혼합물의 투여에 의해 치료될 수 있다. 이들 장애는 (p53R2, 즉, 리보뉴클레오타이드 환원효소(RNR)의 p53 유도성 작은 서브유닛을 암호화하는) *RRM2B*와 관련된 결핍증, 및 미토콘드리아 신경위장 뇌근육병증(MNGIE)을 야기하는 (티미딘 포스포릴라제(TP)를 암호화하는) *TYMP*의 돌연변이를 포함하지만, 이들로 제한되지 않을 것이다. 미토콘드리아 dNTP 풀을 방해하는 추가적인 핵 유전자는 *SUCLA2*, *SUCLG1* 및 *MPV17*을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 이들 유전자와 관련된 장애는 또한 하나 이상의 테옥시뉴클레오타이드의 투여에 의해 치료될 수 있다.
- [0052] 추가적으로, MDS 및 다른 장애의 다른 형태의 메커니즘이 설명되기 때문에, 치료를 위한 적절한 테옥시뉴클레오타이드(들)는 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0053] 일반화된 근긴장저하, 근위근 쇠약, 이전에 획득한 운동 기술의 손실, 불량한 섭식 및 호흡 곤란을 특징으로 하는 진행성 근육 질환의 가장 전형적인 체시를 포함하는 TK2 결핍증에 대해 상기 논의한 표현형을 나타내는 환자는 질환을 확정적으로 진단하도록 검사될 수 있다.
- [0054] 임상 발표가 mtDNA 고갈 증후군에 고도로 의심스럽다면, mtDNA 고갈 증후군을 야기하는 것으로 알려진 유전자의 패널을 이용하는 분자 유전자 검사가 수행되어야 한다(Chanprasert, *et al.* 2012). *TK2* 유전자는 돌연변이가 TK2-관련 미토콘드리아 DNA 고갈 증후군을 야기하는 것으로 알려진 유일한 유전자이다. 이 검사는 서열 변이체 및 결실/복제를 위한 *TK2*의 전체 암호 및 엑손/인트론 연결 영역의 서열 분석을 포함할 수 있다. 화합물 이형접합 또는 동형접합 유해 돌연변이가 서열 분석에서 동정된다면, TK2 결핍증의 진단이 확인되고, 따라서, 대상체는 테옥시뉴클레오타이드 요법이 유리할 것이다. 서열 분석 이 두 화합물 이형접합 또는 동형접합 유해 돌연변이를 동정하지 않는다면, 결실/중복 분석은 TK2 결핍증 진단을 결정하고/하거나 확인하는 것으로 고려되어야 한다.
- [0055] TK2 결핍증 진단을 결정하고/하거나 확인하기 위한 추가적인 검사는 혈청 크레아틴 키나제(CK) 농도, 근전도 검사, 골격근 상의 조직병리학, 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 함량(복제수) 및 골격근 내 전자 전달쇄(ETC) 활성의 검사를 포함할 수 있다. 다음 중 하나 이상이 이들 검사에서 발견된다면, TK2 결핍증이 결정되고/되거나 확인된다. 건강한 대조군에 비해 상승된 CK 농도는 TK2 결핍증을 나타낼 수 있다. 골격근 생검은 수행될 수 있으며, 이어서, 골격근 내 mtDNA 함량 분석이 수행된다. 골격근 생검이 섬유 크기의 현저한 변화, 가변적 근형질 액포, 가변적 증가 결합 조직 및 불균일 적색근섬유뿐만 아니라 증가된 숙시네이트 탈수소효소(SDH) 활성 및 저내지 무 사이토크롬 c 산화효소(COX) 활성을 나타내고, mtDNA 복제수가 심하게 감소된다면(전형적으로 20% 미만의 연령- 및 조직-매칭 건강 대조군), TK2 결핍증의 진단은 결정되고/되거나 확인될 수 있다(Chanprasert, *et al.* 2012).

- [0056] 추가적으로, TK2 결핍증은 열성 상염색체 방식으로 유전된다. 따라서, 영향 받은 환자의 형제는 질환의 진단을 위해 출생 후에 가능한 빨리 검사될 수 있다.
- [0057] 모든 이들 예에서, 데옥시뉴클레오사이드 요법은 TK2 결핍증의 진단 후에 가능한 빨리 시작되어야 한다.
- [0058] 약제학적 조성물, 투여 방법 및 투약
- [0059] 본 발명은 데옥시뉴클레오사이드, 더 구체적으로는 하나 이상의 데옥시뉴클레오사이드의 투여를 포함한다.
- [0060] 가장 바람직한 투여 방법은 경구, 척추강내 및 정맥내를 포함하는 비경구이다. 데옥시뉴클레오사이드는 선택 투여를 위한 적절한 형태이어야 한다.
- [0061] 데옥시뉴클레오사이드는 액체(예컨대, 물, 조제식 또는 젓) 중에 용이하게 용해되는 반면, 유리 산 형태는 액체 중에 용이하게 용해되지 않는다.
- [0062] 투여를 위해 1종 이상의 데옥시뉴클레오사이드를 포함하는 이러한 약제학적 조성물은 치료적 유효량의 데옥시뉴클레오사이드 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 어구 "약제학적으로 허용 가능한"은 생리적으로 용인 가능한 분자 독립체 및 조성물을 지칭하고, 인간에게 투여될 때, 전형적으로 알레르기 또는 유사한 뜻밖의 반응, 예컨대 중증의 위연동이상항진, 현기증 등을 생성하지 않으며, 연방 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 또는 미국 약전에 열거되거나 또는 동물에서, 더 구체적으로는 인간에서 사용에 대해 일반적으로 인식된다. "담체"는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 약제학적 담체는 물, 및 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 유래의 오일을 포함하는 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨유 등 중의 멸균 액체, 예컨대 식염수 용액일 수 있다. 식염수 용액은 약제학적 조성물이 정맥내로 투여될 때 바람직한 담체이다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로스와 및 글리세롤 용액은 또한 액체 담체로서, 특히 주사용 용액에 대해 사용될 수 있다. 적합한 약제학적 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 벼, 가루, 백악, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은, 원한다면, 또한 소량의 습윤제 또는 유화제 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다.
- [0063] 경구 투여는 바람직한 투여 방법이다. 데옥시뉴클레오사이드는 젓(우유와 인간 모유 둘 다), 영아 조제식 및 물을 포함하지만, 이들로 제한되지 않고 인간이 소모하는 임의의 액체 형태에 첨가될 수 있다.
- [0064] 추가적으로, 경구 투여에 적합한 약제학적 조성물은 캡슐, 정제, 분말, 과립, 용액, 시럽, 현탁액(비수성 또는 수성 액체) 또는 에멀전일 수 있다. 정제 또는 경질 젤라틴 캡슐은 락토스, 전분 또는 이들의 유도체, 스테아르산마그네슘, 사카린나트륨, 셀룰로스, 탄산마그네슘, 스테아르산 또는 이의 염을 포함할 수 있다. 연질 젤라틴 캡슐은 식물성유, 왁스, 지방, 반고체 또는 액체 폴리올을 포함할 수 있다. 용액 및 시럽은 물, 폴리올 및 당을 포함할 수 있다. 경구 투여용으로 의도되는 활성제는 위장관 내 활성제의 붕괴 및/또는 흡수를 지연시키는 물질로 코팅되거나 또는 이와 혼합될 수 있다. 따라서, 지속 방출은 다수 시간에 걸쳐 달성될 수 있고, 필요하다면, 활성제는 위 내에서의 분해로부터 보호될 수 있다. 경구 투여를 위한 약제학적 조성물은 특정 pH 또는 효소 조건에 기인하여 특정 위장 위치에서 활성제의 방출을 용이하게 하도록 제형화될 수 있다.
- [0065] 혈액/뇌 장벽을 가로지르는 데옥시뉴클레오사이드의 임의의 문제를 극복하기 위해, 척추 강내 투여는 추가적인 바람직한 투여 형태이다(Galbiati, *et al.* 2006; Gotz, *et al.* 2008). 척추 강내 투여는 그것이 뇌척수액으로 도달하도록 척추관, 더 구체적으로는 지주막하 공간 내로 약물의 주사를 수반한다. 이 방법은 척추마취, 화학요법 및 통증 의약을 위해 통상적으로 사용된다. 척추 강내 투여는 요추 천자(볼루스 주사)에 의해 또는 포트-카테터 시스템(볼루스 또는 주입)에 의해 수행될 수 있다. 카테터는 요추의 박층 사이에 가장 통상적으로 삽입되며, 팁(tip)은 목적으로 하는 수준(일반적으로 L3 내지 L4)까지 외피 공간을 엮는다. 척추 강내 제형은 가장 통상적으로는 부형제로서 물 및 식염수를 사용하지만, EDTA 및 지질이 마찬가지로 사용되었다.
- [0066] 추가적인 바람직한 투여 형태는 정맥내 투여를 포함하는 비경구이다. 정맥내 투여를 포함하는 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물은 수성 및 비수성 멸균 주사용 용액 또는 현탁액을 포함하는데, 이는 항산화제, 완충제, 정균제 및 대상체의 혈액과 실질적으로 등장성인 조성물을 제공하는 용질을 함유할 수 있다. 이러한 조성물 중에 존재할 수 있는 다른 성분은 물, 알코올, 중합체, 글리세린 및 식물성유를 포함한다. 비경구 투여에 적합한 조성물은 단위 용량 또는 다회 용량 용기, 예컨대 밀봉 앰플 및 바이알 내에 제공될 수 있고, 사용 직전에 멸균 담체의 첨가만을 필요로 하는 냉동 건조된(동결건조된) 조건에 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다. 본 발명의 비경구 투약 형태를 제공하기 위해 사용될 수 있는 적

합한 비히클은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 예는 하기를 포함한다: 주사용수 USP; 수성 비히클, 예컨대 염화나트륨 주사, 링거 주사, 텍스트로스 주사, 텍스트로스 및 염화나트륨 주사, 및 젯산 링거 주사; 수산화성 비히클, 예컨대 에틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 및 폴리프로필렌 글리콜; 및 비수성 비히클, 예컨대 옥수수유, 면실유, 땅콩유, 참깨유, 에틸 올레이트, 아이소프로필 미리스테이트 및 벤질 벤조에이트.

[0067] 추가적으로, 일부 환자는 데옥시뉴클레오사이드 치료가 시작되는 시간까지 경장영양을 받을 수 있기 때문에, dN은 영양보급관 또는 다른 장 영양 수단을 통해 투여될 수 있다.

[0068] 추가적인 투여 방법은 대상체에 대한 점막, 예컨대 비강, 설하, 질, 협측 또는 직장; 또는 경피 투여를 포함한다.

[0069] 비강 및 폐 투여에 적합한 약제학적 조성물은 코를 통한 빠른 흡입에 의해 투여될 수 있는 고체 담체, 예컨대 분말을 포함할 수 있다. 비강 투여에 적합한 조성물은 액체 담체, 예컨대 스프레이 또는 점적을 포함할 수 있다. 대안적으로, 폐를 통한 직접적인 흡입은 깊은 흡입 또는 마우스피스를 통한 설치에 의해 수행될 수 있다. 이들 조성물은 활성 성분의 수성 또는 유성 용액을 포함할 수 있다. 흡입을 위한 조성물은 활성 성분의 사전 결정된 투약량을 제공하기 위해 구성될 수 있는 가압 에어로졸, 네블라이저 또는 취입기를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 특별히 적합화된 장치에서 공급될 수 있다.

[0070] 직장 투여에 적합한 약제학적 조성물은 좌약 또는 관장제로서 제공될 수 있다. 질 투여에 적합한 약제학적 조성물은 페서리, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 발포물 또는 스프레이 제형으로서 제공될 수 있다.

[0071] 경피 투여에 적합한 약제학적 조성물은 장기간의 시간에 걸쳐 수용인의 표피와 초기 접촉 시 남아있는 것으로 의도되는 별개의 패치로서 제공될 수 있다.

[0072] 데옥시뉴클레오사이드 요법은 데옥시티미딘(dT), 데옥시사이티딘(dC), 데옥시아데노신(dA) 및 데옥시구아노신(dG)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 데옥시뉴클레오사이드의 투여를 포함한다.

[0073] 당업자는 어떤 데옥시뉴클레오사이드가 결핍증에 기반하여 유리한지를 결정할 수 있다. 또한 실행자가 데옥시뉴클레오사이드의 혼합물이 투여되어야 하고 어떤 비율이어야 하는지의 여부를 결정하는 것은 기술 분야 내이다. 두 데옥시뉴클레오사이드가 투여된다면, 그들은 각각의 데옥시뉴클레오사이드, 예를 들어, dC 및 dT의 50/50 또는 약 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 25/75, 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 55/45, 60/40, 65/35, 70/30, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10 및 95/5의 비율 수 있다.

[0074] 예로서, dT 및 dC는 TK2 결핍증에 대해 동일한 양의 혼합물로 투여된다.

[0075] 치료적 유효 용량의 선택은 당업자 중 하나에게 알려질 몇몇 인자를 고려하여 당업자에 의해 결정될 것이다. 이러한 인자는 약제학적 화합물에 대한 규제 승인을 얻는 데 전형적으로 사용되는 보통의 개발 절차 동안 확립될 데옥시뉴클레오사이드, 및 그의 약동학적 매개변수, 예컨대 생체이용가능성, 대사 및 반감기의 특정 형태를 포함한다. 용량을 고려함에 있어서 추가적인 인자는 치료될 병태 또는 질환 또는 정상 개체에서 달성될 이점, 환자의 체중, 투여 경로, 투여가 급성 또는 만성인지의 여부, 동시 의약, 및 투여되는 약제학적 제제의 효능에 영향을 미치는 것으로 잘 알려진 다른 인자를 포함한다. 따라서, 정확한 용량은 당업자의 판단, 및 각각의 환자의 상황에 따라 그리고 표준 임상 기법에 따라 결정되어야 한다.

[0076] 바람직한 용량은 약 100mg/kg/일 내지 약 1,000mg/kg/일의 범위이다. 추가적인 바람직한 용량은 약 200mg/kg/일 내지 약 800mg/kg/일의 범위이다. 추가적인 바람직한 용량은 약 250mg/kg/일 내지 약 400mg/kg/일의 범위이다. 이들 투약량은 개개의 데옥시뉴클레오사이드의 또는 한 가지 초과와 데옥시뉴클레오사이드, 예를 들어, dT 및 dC의 혼합물을 갖는 조성물의 투약량이다. 예를 들어, 용량은 dT 단독의 400mg/kg/일을 포함할 수 있다. 추가 예에서, 용량은 dT의 200mg/kg/일과 dC의 200mg/kg/일의 혼합물을 포함할 수 있다. 추가 예에서, 용량은 dT와 dC의 혼합물의 400mg/kg/일을 포함할 수 있다.

[0077] 데옥시뉴클레오사이드의 투여는 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회, 1일 4회, 1일 5회, 1일 6회, 바람직하게는 정기적 간격일 수 있다. 예를 들어, 데옥시뉴클레오사이드가 1일 4회 투여될 때, 용량은 8:00 AM, 12:00 PM, 4:00 PM 및 8:00 PM일 것이다.

[0078] 용량은 또한 정맥내로 또는 척추강내로 투여된다면 저하될 수 있다. 이러한 투약을 위한 바람직한 용량 범위는 약 50mg/kg/일 내지 약 500mg/kg/일이다.

[0079] 실시예 5에 나타난 바와 같이, 용량은 대상체에서 효과를 최적화하도록 조절될 수 있다. 예를 들어, 데옥시뉴클

레오사이드는 대상체의 반응 및 내약성에 따라서, 시작까지 100mg/kg/일에서 투여될 수 있고, 이어서, 200mg/kg/일까지, 400mg/kg/일까지, 800mg/kg/일까지, 1000mg/kg/일까지 시간에 따라 증가될 수 있다.

[0080] 대상체는 투약량을 증가시키기 전에 그들의 병태의 개선에 대해 모니터링될 수 있다. 데옥시뉴클레오사이드의 치료적 투여에 대한 대상체의 반응은 대상체의 근육 강도 및 제어, 및 이동도뿐만 아니라 신장 및 중량의 변화를 관찰함으로써 모니터링될 수 있다. 투여 후에 이들 매개 변수 중 하나 이상이 증가된다면, 치료는 계속될 수 있다. 이들 매개변수 중 하나 이상이 동일하거나 또는 감소된다면, 데옥시뉴클레오사이드의 투약량은 증가될 수 있다.

[0081] 실시예에 나타낸 바와 같이, 데옥시뉴클레오사이드는 잘 용인된다. 임의의 관찰된 역효과는 부수적이며, 설사, 복부 팽만 및 기타 위장 징후였다. 대상체는 또한 임의의 역효과, 예컨대 위장 불내성, 예를 들어, 설사에 대해 모니터링될 수 있다. 투여 후에 한 가지 이상의 역효과가 관찰된다면, 투약량은 감소될 것이다. 이러한 역효과가 관찰된다면, 투약량은 증가될 수 있다. 추가적으로, 일단 투약량은 역효과의 관찰에 기인하여 감소되고, 유해 효과가 더 이상 관찰되지 않는다면, 투약량은 증가될 수 있다.

[0082] 데옥시뉴클레오사이드는 또한 다른 제제와 함께 공동투여될 수 있다. 이러한 제제는 MDS의 특정 형태의 증상을 치료하기 위한 치료 제제를 포함할 것이다. 특히, TK2 결핍증에 대해, dT 및 dC는 효소 저해제, 예컨대 테트라하이드로유리딘(사이티딘 탈아미노효소의 저해제) 및 이뮤실린 H(퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제의 저해제) 및 티피라실(티미딘 포스포릴라제의 저해제)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 아주 흔한 뉴클레오사이드 대사 효소의 저해제와 함께 공동 투여될 수 있다. 이러한 저해제는 공지되어 있으며, 일부 암의 치료에서 사용된다.

[0083] 실시예

[0084] 본 발명은 본 발명의 바람직한 실시형태를 더 완전히 이해하기 위해 제시하는 다음의 비제한적 실시예를 참고로 하여 더 양호하게 이해될 수 있다. 그들은 결코 본 발명의 광범위한 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0085] 실시예 1- 물질 및 방법

[0086] TK2 결핍증의 마우스 모델

[0087] 인간 영아 뇌근육병증과 엄격히 유사한 표현형을 나타내는 동형접합 $Tk2$ H126N 녹인 돌연변이체($Tk2^{-/-}$) 마우스는 이미 보고되었다(Akman, *et al.* 2008). 출생 후 10일과 13일 사이에, $Tk2^{-/-}$ 마우스는 감소된 보행, 불안정한 걸음걸이, 거친 진전, 성장 지연, 및 14일 내지 16일령에 조기 사망으로의 빠른 진행을 특징으로 하는 태아 뇌근육병증이 빠르게 발생한다. 마우스 모델의 분자 및 생화학적 분석은 질환의 발병이 효소 활성의 손실 및 뒤이은 dNTP 풀 불균형과 함께 뇌에서의 dTTP 수준 감소 및 간에서의 dTTP와 dCTP 수준 둘 다의 감소에 기인하며, 이는 결국, 뇌 및 척수에서 가장 우세하게 mtDNA-암호화된 서브유닛을 함유하는 호흡쇄 효소의 mtDNA 고갈 및 결함을 생성한다.

[0088] 모든 실험을 콜럼비아 유니버시티 의료 센터의 실험동물 윤리 위원회에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행하였고, 국립 보건원 실험 동물의 관리와 사용에 관한 지침에 일치되었다. 마우스를 수용하고 12-시간 명, 12-시간 암 주기로 국제 표준 조건에 따라 사육하고, 4일, 13일 및 29일령에 희생시켰다.

[0089] 기관(뇌, 척수, 간, 심장, 신장, 대퇴사두근, 폐 및 위장관)을 제거하고 나서, 아이소펜탄의 액상에서 냉각시키거나, 드라이아이스를 이용하여 그의 빙점(-160°C) 근처에서 사전 냉각시키거나 또는 10% 중성 완충 포말린 중에서 고정시키고, 표준 절차를 이용하여 파라핀 포매시켰다. 이어서, 파라핀 포매 조직을 형태 연구를 위해 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하거나 또는 보충 절차에 상세하게 기재하는 바와 같이 GFAP, COX I 또는 복합체 I 서브유닛을 이용하여 면역염색 연구에 대해 진행하였다. 이형접합과 동형접합 야생형 마우스는 둘 다 대조군($Tk2^{+/+}$)으로서 고려되는데, 임상과 생화학적 차이가 둘 다 이전에 기재되었기 때문이다(Akman, *et al.* 2008; Dorado, *et al.* 2011).

[0090] 치료 투여 및 실험 계획

[0091] $Tk2$ H126N 녹인 마우스($Tk2^{-/-}$)에 대해 매일 경구 위관영양법에 의해 소형 애완 동물(Pet-Ag)에 대해 50 μl 의 에스빌락 우유 조제식 중에 데옥시사이티딘(dC) 및 데옥시티미딘(dT)을 투여하고 나서, 출생 후 4일 내지 29일에

2회 용량, 즉, 260mg/kg/일 및 520mg/kg/일을 이용하여 대조군 야생형($Tk2^+$)에 연령 매칭시켰다. 21일령에, 마우스를 어미로부터 분리시키고, 각각 1.6mM 및 3.2mM의 등몰 용량을 이용하여 음용수 중에서 dC 및 dT의 투여에 의해 치료를 계속하였다. 비치료 $Tk2$ 돌연변이체 및 대조군 야생형 마우스의 음성 대조군의 체중을 재고, 비교를 위해 면밀히 관찰하였다.

[0092] 표현형 평가

[0093] 체중을 매일 평가하였는데, 그것은 체중 증가의 불능이 질환의 첫 번째 징후라는 것을 이미 관찰하였기 때문이다(Akman, *et al.* 2008).

[0094] dT/dC의 안전성 및 효능의 정도를 정하기 위해, 생존 시간, 질환의 발병 연령, 증상의 유형 및 중증도, 부작용의 발생 및 치료 및 비치료 $Tk2$ 마우스의 역효과에 기인하는 치료 종료의 비율을 비교하였다. 마우스의 일반 거동, 생존 시간 및 체중을 출생 후 4일에 시작해서 매일 평가하였다.

[0095] 중합효소 연장 분석에 의한 dNTP 풀

[0096] 조직을 10 용적(w/v)의 차가운 MTSE 완충제(210mM 만니톨, 70mM 수크로스, 10mM 트리스-HCl pH 7.5, 0.2mM EGTA, 0.5% BSA)에서 얼음 상에서 균질화시키고 나서, 1000g에서 5분 동안 4°C, 13,000g에서 2분 동안 4°C에서 3회 원심분리시켰다. 상청액을 60% 메탄올로 침전시키고 나서, -80°C에서 2시간 유지시키고, 3분 비등시킨 다음, -80°C에서 (1시간 내지 밤새) 저장시키고, 20,800g에서 10분 동안 4°C에서 원심분리시켰다. 건조까지 상청액을 증발시키고 나서, 펠렛을 65μl의 물 중에서 재현탁시키고 나서, 분석할 때까지 -80°C에서 저장하였다. 리보뉴클레오타이드 간섭을 최소화하기 위해, 보고한 바와 같이 총 dNTP 풀을 결정하였다(Ferraro, *et al.* 2010; Marti, *et al.* 2012a). 간략하게, 5μl의 샘플 또는 표준 dNTP와 15μl의 반응 완충제[0.025U/ml 썬모시쿼나제(ThermoSequenase) DNA 중합효소(미국 뉴저지주 피스카타웨이에 소재한 GE 헬스케어(GE Healthcare)) 또는 Taq 중합효소(미국 뉴저지주에 소재한 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)), 0.75 μM 3H-dTTP 또는 3H-dATP(모라벡 바이오케미컬스(Moravak Biochemicals)), 0.25 μM 특이적 올리고뉴클레오타이드, 40mM 트리스-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 5mM DTT]를 혼합함으로써 20μl 용적 반응을 생성하였다. 48°C에서 60분 후에, 18mL의 반응을 왓만(Whatman) DE81 필터 상에 스왑팅하고 나서, 공기 건조시키고, 5% Na₂HPO₄로 10분 동안 3회 세척하고 나서, 증류수로 1회 및 무수 에탄올로 1회 세척하였다. 남아있는 방사성을 신틸레이션 계수에 의해 결정하였다.

[0097] HPLC에 의한 뉴클레오사이드 측정

[0098] 이전에 기재한 바와 같은 구배-용리 HPLC 방법(Lopez, *et al.* 2009; Marti, *et al.* 2012b)에 의해, 약간 변형하여 데옥시티미딘(dT), 데옥시유리딘(dU), 유라실(U) 및 티민(T) 수준을 평가하였다. 간략하게, 4가지 완충제: 용리액 A(20mM 인산칼륨, pH 5.6), 용리액 B(물) 및 용리액 C(메탄올)를 이용하여 1.5mL/분의 일정한 유속(표시한 경우를 제외)에서 알티마(Alltima) C18NUC 역상 칼럼(알테크(Alltech))을 지나는 알리안스(Alliance) HPLC 시스템 내로 탈단백질화된 샘플을 주사하였다. 샘플을 다음과 같은 구배로 60분에 걸쳐 용리시켰다: 0-5분, 100% 용리액 A; 5-25분, 100-71% 용리액 A, 29% 용리액 B; 25-26분, 0-100% 용리액 C; 26-30분, 100% 용리액 C; 30-31분, 0-100% 용리액 B; 31-35분, 100% 용리액 B (1.5 - 2mL/분); 35 - 45분, 100% 용리액 B (2mL/분); 45 - 46분, 100% 용리액 B (2-1.5mL/분); 46-47분, 0-100% 용리액 C; 47-50분, 100% 용리액 C; 50-51분, 0-100% 용리액 A; 및 51-60분, 100% 용리액 A.

[0099] 용리액의 흡광도는 267nm에서 모니터링되었으며, dThd 및 dUrd 피크는 그들의 면적을 수성 표준에 의해 얻어진 교정 곡선과 비교함으로써 정량화되었다. 각각의 샘플에 대한 데옥시티미딘, 데옥시유리딘, 유라실 및 티미니 피크의 한정적 동정을 위해, 제2 분취액을 dT 및 dU를 특이적으로 제거하기 위해 과량의 정제된 이콜라이(*E. coli*) TP(시그마(Sigma))로 처리하였다. 이 방법의 검출 한계는 모든 뉴클레오사이드에 대해 0.05mmol/ℓ이다. 결과를 단백질의 nmol/mg으로서 표현하였다.

[0100] RT-qPCR: 미토콘드리아 DNA 정량화

[0101] 실시간 PCR은 단계 1 플러스 실시간 PCR 시스템(Step One Plus Real Time PCR System)(어플라이드 바이오시스템즈)에서 ddCt 방법을 이용하여 기재한 바와 같은 뮤린 COX I 유전자(mtDNA) 및 마우스 글리세르알데하이드-3-인산염 탈수소효소(GAPDH, nDNA)(미국 캘리포니아주 포스터 시티에 소재한 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 인비트로젠(Invitrogen))에 대한 프라이머 및 프로브를 이용하여 수행되었다(Dorado, *et al.* 2011). MtDNA 값은 nDNA 값에 대해 정규화하고 나서, 야생형(100%)에 백분율로서 표현하였다.

- [0102] 미토콘드리아 호흡쇄 단백질 수준
- [0103] 전체 대뇌 또는 소뇌 추출물의 30 마이크로그램을 SDS-12% PAGE 겔에서 전기 영동하고 나서, 이mun-블롯(Immun-Blot)(상표명) PVDF 막(미국 캘리포니아주 허큘레스에 소재한 바이오래드(Biorad))로 전달하고, 미토프로파일(MitoProfile)(등록상표) 항체의 총 OXPHOS 설치류 WB 항체 카테일(미국 오리건주 유젠에 소재한 미토사이언시스(MitoSciences))로 프로빙하였다. 아머삼(Amersham)(상표명) ECL 플러스 웨스턴 블롯팅 검출 시스템(영국에 소재한 GE 헬스케어 라이프 사이언시스(GE Healthcare Life Sciences))를 이용하여 퍼옥시다제-접합 마우스 항-마우스 IgG 항체(미국 미주리주 세인트루이스에 소재한 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))에 의해 단백질-항체 상호작용을 검출하였다. NIH ImageJ 1.37V 소프트웨어를 이용하여 단백질의 정량화를 수행하였다. 선택한 모든 픽셀의 회색값 합계로서 선택한 면적을 픽셀 수로 나눈 것 내에서 평균 회색값을 계산하였다.
- [0104] 분광광도계 분석에 의한 미토콘드리아 호흡쇄 효소 활성
- [0105] 이전에 기재한 바와 같은 대뇌 조직에서 미토콘드리아 RC 효소 분석을 수행하였다(DiMauro, *et al.* 1987).
- [0106] 통계학적 방법
- [0107] 그룹 당 적어도 3회의 실험의 평균 \pm SD로서 데이터를 표현한다. 게한-브레슬로우-윌콕슨(Gehan-Breslow-Wilcoxon) 검정을 사용하여 마우스의 각각의 그룹의 생존 비율을 비교하였다. 0.05 미만의 p -값은 통계적으로 유의한 것으로 고려하였다.
- [0108] 실시에 2- $Tk2^{-/-}$ 마우스에 대한 dC/dT의 투여는 $Tk2$ 결핍증 및 증가된 생존의 임상 개시를 지연시켰다
- [0109] 각각의 테옥시뉴클레오사이드(dC/dT)의 260 및 520mg/kg/일 용량을 $Tk2^{-/-}$ 마우스에 투여하였다. 테옥시뉴클레오사이드의 이들 용량은 각각 dCMP+dTMP의 400 및 800mg/kg/일의 몰 당량이었다.
- [0110] 경구 dC+dT(4일령으로부터 260 또는 520mg/kg/일)로 치료한 마우스는 출산후 21일까지 정상으로 나타났다(도 1). 21일령 후에, 260mg/kg/일 용량으로 치료한 돌연변이체 마우스($Tk2^{-/-}$ 260mg/kg/일 dC/dT)는 체중 증가가 중단되었고, 경증의 머리떨림 및 출생일 후 31 ± 4.3 일에 사망을 야기하는 쇠약이 발생되었다(도 2).
- [0111] 520mg/kg/일 dC+dT로 치료한 돌연변이체 마우스($Tk2^{-/-}$ 520 mg/Kg/일 dC/dT)는 추가 1주 동안 체중 증가가 계속되었지만, 후속적으로 $Tk2^{-/-}$ 260 mg/Kg/일 dC/dT와 유사한 악화가 나타났고, 출생 후 43 ± 10 일에 사망하였다. 이들 결과는 경구 dCMP/dTMP 치료의 200 또는 400mg/kg/일로 치료한 $Tk2^{-/-}$ 마우스에 의해 나타난 것과 비슷하다. $Tk2^{+}$ 260mg/kg/일 dC/dT 및 $Tk2^{+}$ 520mg/kg/일 dC/dT는 출생 후 60일까지 이어졌다. 부작용은 관찰되지 않았다.
- [0112] 나타낸 바와 같이, 치료한 $Tk2^{-/-}$ 의 수명은 상당히 증가되었다. 비치료 $Tk2^{-/-}$ 마우스는 13일의 평균 수명을 나타낸 반면, 치료한 마우스는 각각 260 및 520mg/kg/일 용량으로 평균 제31일 및 제40일에 생존하였다(도 2). 흥미롭게도, 마우스 중 하나는 출생 후 56일에 생존하였는데, 이는 지금까지의 $Tk2$ 녹인 마우스 모델에 대한 가장 긴 수명이었다.
- [0113] 실시에 3- 경구 dC/dT는 뇌 및 간에서 분자 이상을 개선하였다
- [0114] 미토콘드리아 추출물에서 dNTP의 측정은 $Tk2^{-/-}$ 260 mg/Kg/일 dC/dT와 $Tk2^{-/-}$ 520 mg/Kg/일 dC/dT가 둘 다 출생 후 13일에 미토콘드리아 dNTP 풀 불균형을 완전히 수정하지 않았고, 뇌에서 dCTP 결핍의 완전한 구조를 갖는 조직에서 가변적 효과를 나타낸 반면, dTTP는 간에서 수정되었다는 것을 나타내었다. 대조적으로, 뇌에서의 dTTP 및 간에서의 dCTP 결핍증은 테옥시뉴클레오사이드 보충에도 불구하고 중증으로 남아있었다(도 3).
- [0115] 출생 후 13일에 $Tk2^{-/-}$ 260 mg/Kg/일 dC/dT 및 $Tk2^{-/-}$ 520 mg/Kg/일 dC/dT 마우스에서, 치료는 심장, 간, 신장, 장 및 근육에서 mtDNA 고갈을 방지하였다(도 4). 대조적으로, mtDNA 복제수는 dC+dT의 260mg/kg/일에 의해 39% 및 520mg/kg/일에 의해 52%에 도달되는 대조군 뇌에 비해 mtDNA/nDNA와 용량 의존적 방식으로 출생 후 13일에 뇌에서 단지 부분적으로 개선되었다. HPLC에 의한 뇌에서의 염기 dT 및 유라실의 측정은 dC+dT로 또는 dCMP+dTMP로 치료한 동물에서 더 고수준을 나타내었는데(도 5), 이는 추가로 혈액 뇌 장벽을 가로지르는 테옥시뉴클레오사이드와 테옥시뉴클레오사이드 일인산염을 둘 다 나타낸다. 출생 후 29일에, mtDNA 고갈은 심장(40 및 35%), 간(46 및 45%), 신장(38 및 42%) 및 근육(24 및 35%)에서 dC+dT 요법의 260 및 520mg/kg/일에 의해 부분적으로 구조되었지만,

엄격하게는 장에서 완전히 구조되었다(82 및 84%)(도 4).

[0116] 실시예 4- 경구 dC/dT는 뇌에서의 생화학적 이상을 개선하였다

[0117] 호흡쇄 효소(RCE) 활성 및 단백질 수준은 출생 후 13일에 $TK2^{-/-} 260 \text{ mg/kg/일 dC/dT}$ 의 뇌에서 완전히 구조되었다(도 6). RCE 활성은 또한 출생 후 29일에 회복되었고, 복합체 I 활성의 단지 약간의 감소는 $TK2^{-/-} 52 \text{ mg/kg/일 dC/dT}$ 에서 관찰할 수 있었다(도 6). 뇌에서 RCE 단백질 수준은 출생 후 29일에 부분적으로 회복되었는데, $TK2^{-/-} 260 \text{ mg/kg/일 dC/dT}$ 에서보다 $TK2^{-/-} 520 \text{ mg/kg/일 dC/dT}$ 에서 더 고수준이었다(도 7). 단백질 수준의 이런 차이는 출생 후 29일에 치료된 돌연변이체 마우스의 뇌에서 mtDNA 고갈의 차이와 일치되었고, 더 고용량에 의해 관찰된 장기간의 생존을 설명할 가능성이 있었다.

[0118] 실시예 5- TK2 결핍증이 있는 환자에서 dC/dT의 투여는 효능이 있었다

[0119] 본 발명자들의 감독 및 제어 하에서 테옥시뉴클레오사이드 요법을 받은 TK2 결핍증이 있는 환자의 증상, 투약량 및 결과를 이하에 요약한다.

[0120] 환자 1

[0121] 이 환자는 2011년 2월에 미국에서 출생하였다. 그들의 증상은 저장성 및 축 늘어진 머리가 12개월에 나타났다. 그는 결코 보행하지 않았다. 그는 또한 호흡근 쇠약을 가지며, 19개월에 기계적 호흡기를 착용하였는데, 이때 그는 여전히 24시간/일이다. 그는 또한 19개월 이래로 영양관을 착용하였다.

[0122] 그는 이전에 100mg/kg/일이었고, 이어서, dCMP 및 dTMP의 200mg/kg/일이었다. 이 요법에 대해, 그는 작은 물체를 움켜잡을 수 있었고, 그의 체중은 10.4kg으로부터 19.5kg으로 증가되었다.

[0123] 2015년 10월에, 그는 dC 및 dT의 260mg/kg/일에 시작해서, dC 및 dT의 340mg/kg/일로 증가되었다. 2개월 후에, 그는 그의 손 및 머리가 더 잘 움직였고, 사람의 도움으로 5분 서있을 수 있었고, 기침을 시작하며, 그의 심박수는 더 낮았다(하루 동안 140 내지 170bpm으로부터 하루 동안 100 내지 120 bpm까지).

[0124] 2016년 3월 23일에, 용량을 dC 및 dT의 400mg/kg/일로 증가시켰다. 이 요법에 대해 6주 후에, 그는 추가 개선을 나타내었다: 그는 의자에 약 5시간/일 앉아있을 수 있고; 1.5시간 동안 "서 있는 사람(Stander)"으로 서 있었고; 작은 봉제 동물 인형을 거의 쥐고 잡았으며; 컴퓨터 버튼을 누르고; 그의 기저귀를 풀고, 그의 성기를 적셔서 개인이 그의 기저귀를 교환하는 것을 목표로 하며; 그리고 몇초 동안 그의 무릎을 구부린 채로 유지하였다.

[0125] 치료 동안 보인 유일한 역효과는 설사였다.

[0126] 환자 2

[0127] 이 환자는 1987년에 스페인에서 출생하였다. 그는 근위근 쇠약을 포함하여 3년령에 증상을 나타내기 시작하였다. 그는 13일령에 보행 능력을 상실하였고, 1일 24시간 환기시켰다. 그는 이전에 200mg/kg/일로 dAMP 및 dCMP를 취하였고, 환기 시 1일에 24 내지 22시간 체중 증가 및 감소를 나타내었다.

[0128] 그는 400mg/kg/일 dC 및 dT로 2015년 6월 이래로 테옥시뉴클레오사이드 요법 중이었고, 근강도의 개선을 나타내었고, 그의 체중 및 환기는 안정화되었고, 그는 더 양호한 삶의 질을 즐기고 있다.

[0129] 치료 동안 보인 유일한 역효과는 설사 및 모발 손실이었다.

[0130] 환자 3

[0131] 이 환자는 1985년에 스페인에서 출생하였다. 그의 증상은 얼굴, 근위 및 축 근육 쇠약과 함께 6주령에 시작되었다. 2015년 6월에 그리고 지금까지 그는 dT 및 dC의 200mg/kg/일을 시작하였고, 그의 병태는 6분 보행 시험의 개선, 일어나서 가는 시간, 및 4개 계단을 오르내림에 있어서 개선되었다.

[0132] 치료 동안 보인 유일한 역효과는 설사였다.

[0133] 환자 4

[0134] 이 환자는 2009년 2월에 스페인에서 출생하였다. 그의 증상은 성장부전 6개월에 나타났다. 그는 2015년 7월에 dC 및 dT의 230mg/kg/일에 시작되었다. 2016년 1월까지, 그는 그의 병태의 개선을 나타내었고, 더 잘 먹었다.

- [0135] 역효과는 관찰되지 않았다.
- [0136] 환자 5
- [0137] 이 환자는 1957년에 스페인에서 출생하였고, 50세에 기좌호흡 및 횡경막 쇠약의 증상이 나타나기 시작하였다. 그는 밤에 BiPAP이다. 그는 2015년 11월에 dC 및 dT의 200mg/kg/일로 시작하였다.
- [0138] 역효과는 관찰되지 않았다.
- [0139] 환자 6
- [0140] 이 환자는 2011년 10월에 스페인에서 출생하였고, 15개월에 근긴장저하 및 쇠약을 포함하는 증상이 나타나기 시작하였다. 그는 22개월에 보행이 상실되었고, 호흡근 쇠약을 가진다. 그는 16개월에 기계적 호흡을 시작하였고, 현재 1일에 BiPAP 12시간이다. 그는 이전에 100mg/kg/일에 dCMP 및 dAMP인데, 이는 400mg/kg/일로 증가되었다. 이젠 분류(Egen Klassifikation) 척도에 의해 나타낸 그의 강도는 개선되었고(28/30 내지 13/30), 그의 체중은 9.8kg에서 12.3kg으로 증가되었다.
- [0141] 그는 dC 및 dT의 400mg/kg/일에 2015년 4월에 테옥시뉴클레오사이드 요법을 시작하였다. 2015년 10월에, 이젠 분류 척도에서 그의 변화는 13/30으로부터 11/30까지였고, 그의 체중은 12.3kg으로부터 16.5kg으로 증가되었다.
- [0142] 역효과는 관찰되지 않았다.
- [0143] 환자 7
- [0144] 이 환자는 2012년 11월에 스페인에서 출생하였다. 그는 17개월에 쇠약 및 근긴장저하를 포함하는 증상을 나타내기 시작하였다. 그는 22개월에 보행이 상실되었고, 29개월에 기계적 호흡을 시작하였다. 그는 이전에 100mg/kg/일에 dCMP 및 dAMP인데, 이는 400mg/kg/일로 증가되었다. 이젠 분류 척도에 의해 나타낸 그의 강도는 개선되었고(30/30 내지 24/30), 그의 체중은 11kg에서 15.7kg으로 증가되었다.
- [0145] 그는 2015년 4월에 400mg/kg/일 dT 및 dC의 용량으로 테옥시뉴클레오사이드 요법을 시작하였다. 2015년 11월에, 이젠 분류 척도에서 그의 변화는 24/30으로부터 19/30까지였고, 그의 체중은 17kg으로부터 15.7kg으로 증가되었다.
- [0146] 역효과는 관찰되지 않았다.
- [0147] 환자 8
- [0148] 이 환자는 1989년 9월에 칠레에서 출생하였고, 11개월에 빈번한 넘어짐 및 진행성의 보행장애에 의한 증상이 나타나기 시작하였다. 그녀는 약 4세에 혼자 걷는 것의 능력을 상실하였다. 그녀는 이전에 뉴클레오타이드 요법을 하였고, 보조없는 걷기, 더 오래 서있기, 계단 오르기, 수행 중인 운동 수업, 및 개인적 필요에 대한 수행을 포함하는 그녀의 이동도에서 개선을 나타내었다.
- [0149] 그녀는 2016년 2월에 dC 및 dT의 260mg/kg/일의 용량에서 테옥시뉴클레오사이드 요법으로 전환시켰고, 이어서, 2016년 5월에 dC 및 dT의 400mg/kg/일의 용량으로 증가시켰고, 계속해서 개선을 나타내었다.
- [0150] 역효과는 관찰되지 않았다.
- [0151] 환자 9
- [0152] 이 환자는 1989년 9월에 과테말라에서 출생하였다. 그는 2015년 8월에 dC 및 dT의 130mg/kg/일을 시작하였고, 2016년 2월에 260mg/kg/일로 증가되었다. 그는 개선된 에너지를 나타내었다.

[0153] 역효과는 관찰되지 않았다.

참고문헌

Akman, *et al.* (2008) Thymidine kinase 2 (H126N) knock in mice show the essential role of balanced deoxynucleotide pools for mitochondrial DNA maintenance. *Hum. Mol. Genet.* 17:2433-2440

Alston, *et al.* (2013) Late-onset respiratory failure due to TK2 mutations causing multiple mtDNA deletions. *Neurology* 81:2051-3

Bartesaghi, *et al.* (2010) Loss of thymidine kinase 2 alters neuronal bioenergetics and leads to neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 19:1669-77

Béhin, *et al.* (2012) Adult cases of mitochondrial DNA depletion due to TK2 defect An expanding spectrum. *Neurology* 78:644-648

Blakely, *et al.* (2008) Novel mutations in the TK2 gene associated with fatal mitochondrial DNA depletion myopathy. *Neuromuscular Disorders* 18:557-560

Bourdon, *et al.* (2007) Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nature Genetics* 39:776-780

Carrozzo, *et al.* (2003) Mutation analysis in 16 patients with mtDNA depletion. *Hum. Mutat.* 21:453-454

Chanprasert, *et al.* (2013) Molecular and clinical characterization of the myopathic form of mitochondrial DNA depletion syndrome caused by mutations in the thymidine kinase (TK2) gene. *Mol. Genet. Metab.* 110:153-61

Chanprasert, *et al.* (2012) TK2-Related Mitochondrial DNA Depletion Syndrome, Myopathic Form. *GeneReviews® Internet*, December 6, 2012

Collins, *et al.* (2009) Progressive myofiber loss with extensive fibro-fatty replacement in a child with mitochondrial DNA depletion syndrome and novel thymidine kinase 2 gene mutations. *Neuromuscular Disorders* 19:784-787

[0154]

- Copeland (2008) Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Ann. Rev. Med.* 59:131-146
- DiMauro, *et al.* (1987) Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh syndrome. *Ann. Neurol.* 22:498-506
- DiMauro, Schon. (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *New England Journal of Medicine* 348:2656-2668
- DiMauro, Hirano. (2005) Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromuscul. Disord.* 15:276-286
- Dorado, *et al.* (2011) Onset and organ specificity of Tk2 deficiency depends on Tk1 down-regulation and transcriptional compensation. *Hum. Mol. Genet.* 20:155-64
- Elpeleg, *et al.* (2005) Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Hum. Genet.* 76:1081-1086
- Ferraro, *et al.* (2010) Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Research* 38:e85
- Galbiati, *et al.* (2006) New mutations in TK2 gene associated with mitochondrial DNA depletion. *Pediatr. Neurol.* 34:177-185
- Garone, *et al.* (2012). MPV17 Mutations Causing Adult-Onset Multisystemic Disorder With Multiple Mitochondrial DNA Deletions. *Arch Neurol* 69:1648-1651
- Garone, *et al.* (2014). Deoxypyrimidine monophosphate bypass therapy for thymidine kinase 2 deficiency. *EMBO Mol Med* 6:1016-1027
- Garone, *et al.* (2016) in preparation, "Phenotypic Spectrum and Retrospective Natural History of Thymidine Kinase 2 Deficiency"

[0155]

Gotz, *et al.* (2008) Thymidine kinase 2 defects can cause multi-tissue mtDNA depletion syndrome. *Brain* 131:2841-2850

Hirano, *et al.* (2001) Defects of intergenomic communication: autosomal disorders that cause multiple deletions and depletion of mitochondrial DNA. *Semin. Cell. Develop. Biol.* 12:417-427

Hirano, *et al.* (2004) MtDNA maintenance and stability genes: MNGIE and mtDNA depletion syndromes. In: Köhler, Bauer, editors. *Mitochondrial Function and Biogenetics*. Berlin: Springer-Verlag. p. 177-200

Leshinsky-Silver, *et al.* (2008) A defect in the thymidine kinase 2 gene causing isolated mitochondrial myopathy without mtDNA depletion. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 12:309-13

Lesko, *et al.* (2010) Two novel mutations in thymidine kinase-2 cause early onset fatal encephalomyopathy and severe mtDNA depletion. *Neuromuscul. Disord.* 20:198-203

Longley, *et al.* (2006). Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet.* 78:1026-1034

Lopez, *et al.* (2009) Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase deficient mice. *Human Molecular Genetics* 18:714-22

Mancuso, *et al.* (2003) Mitochondrial myopathy of childhood associated with mitochondrial DNA depletion and a homozygous mutation (T77M) in the TK2 gene. *Arch. Neurol.* 60:1007-9

Mancuso, *et al.* (2002) Mitochondrial DNA depletion: mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA. *Neurology.* 59:1197-202

Mandel, *et al.* (2001) The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nature Genet.* 29:337-341

[0156]

Martí, *et al.* (2010) Hearing loss in a patient with the myopathic form of mitochondrial DNA depletion syndrome and a novel mutation in the TK2 gene. *Pediatr. Res.* 68:151-4

Martí, *et al.* (2012a) Measurement of mitochondrial dNTP pools. *Methods Mol. Biol.* 837:135-148

Martí, *et al.* (2012b) Assessment of thymidine phosphorylase function: measurement of plasma thymidine (and deoxyuridine) and thymidine phosphorylase activity. *Methods Mol. Biol.* 837: 121-133

Naviaux, Nguyen. (2004) POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann. Neurol.* 55:706-712

Nishino, *et al.* (1999). Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283:689-692.

Oskoui, *et al.* (2006) Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch. Neurol.* 63:1122-1126.

Ostergaard, *et al.* (2007) Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 383-387

Paradas, *et al.* (2012) TK2 mutation presenting as indolent myopathy. *Neurology* 29:504-506

Ronchi, *et al.* (2012). Next-generation sequencing reveals DGUOK mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions. *Brain* 135:3404-3415.

Roos, *et al.* (2014) Mitochondrial DNA depletion in single fibers in a patient with novel TK2 mutations. *Neuromuscul. Disord.* 24:713-20

Saada, *et al.* (2001) Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nature Genet.* 29:342-344

[0157]

Saada, *et al.* (2003) Mitochondrial deoxyribonucleoside triphosphate pools in thymidine kinase 2 deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310:963-966

Sarzi, *et al.* (2007) Twinkle helicase (PEO1) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion. *Ann. Neurol.* 62: 579-587

Spelbrink, *et al.* (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature Genet.* 28:223-231

Spinazzola, *et al.* (2006) MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nature Genet.* 38:570-575

Tulinius, *et al.* (2005) Novel mutations in the thymidine kinase 2 gene (TK2) associated with fatal mitochondrial myopathy and mitochondrial DNA depletion. *Neuromuscul. Disord.* 15:412-415

Tyynismaa, *et al.* (2012) Thymidine kinase 2 mutations in autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia with multiple mitochondrial DNA deletions. *Hum. Mol. Genet.* 21:66-75

Tyynismaa, *et al.* (2009). A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 85: 290-295

Van Goethem, *et al.* (2001) Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature Genet.* 28:211-212.

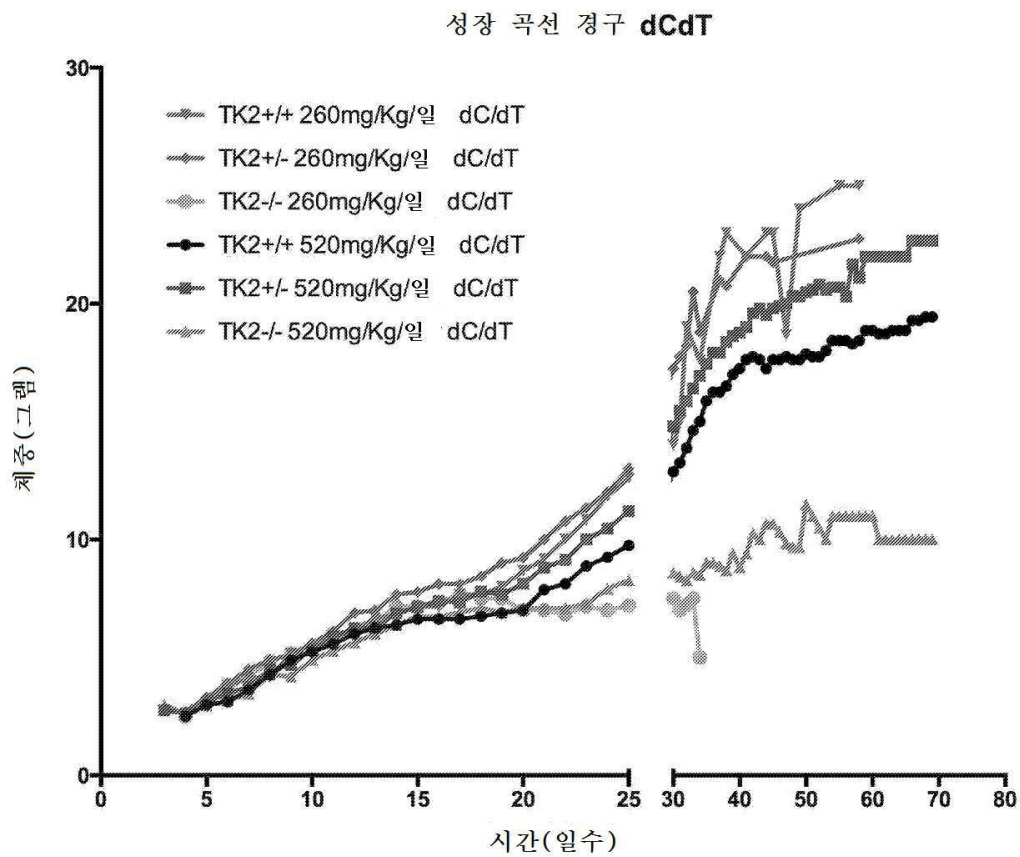
Vilà, *et al.* (2003) Reversion of mtDNA depletion in a patient with TK2 deficiency. *Neurology* 60:1203-1205

Wang, *et al.* (2005) Molecular insight into mitochondrial DNA depletion syndrome in two patients with novel mutations in the deoxyguanosine kinase and thymidine kinase 2 genes. *Mol. Genet. Metab.* 84:75-82.

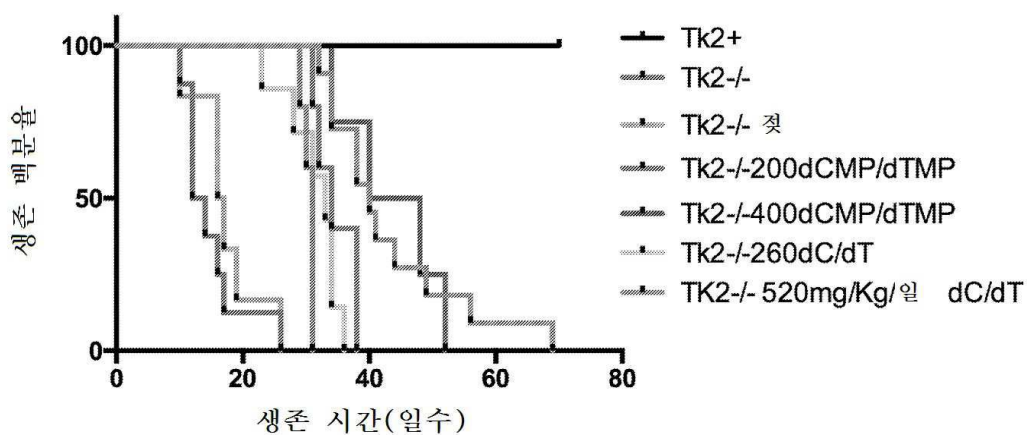
[0158]

도면

도면1



도면2

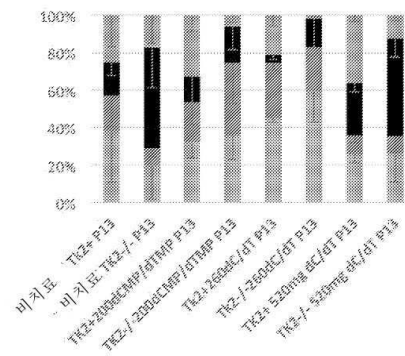
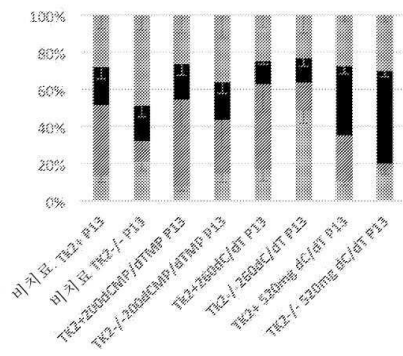


도면3

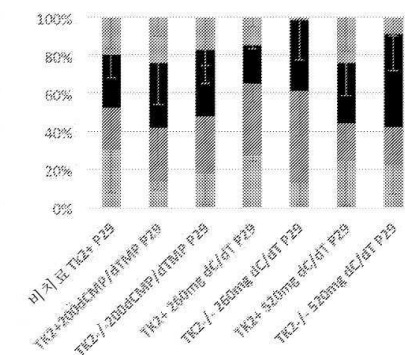
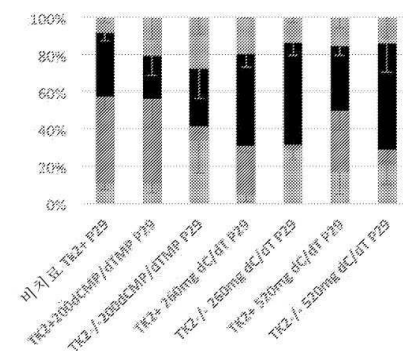
4

간

P13

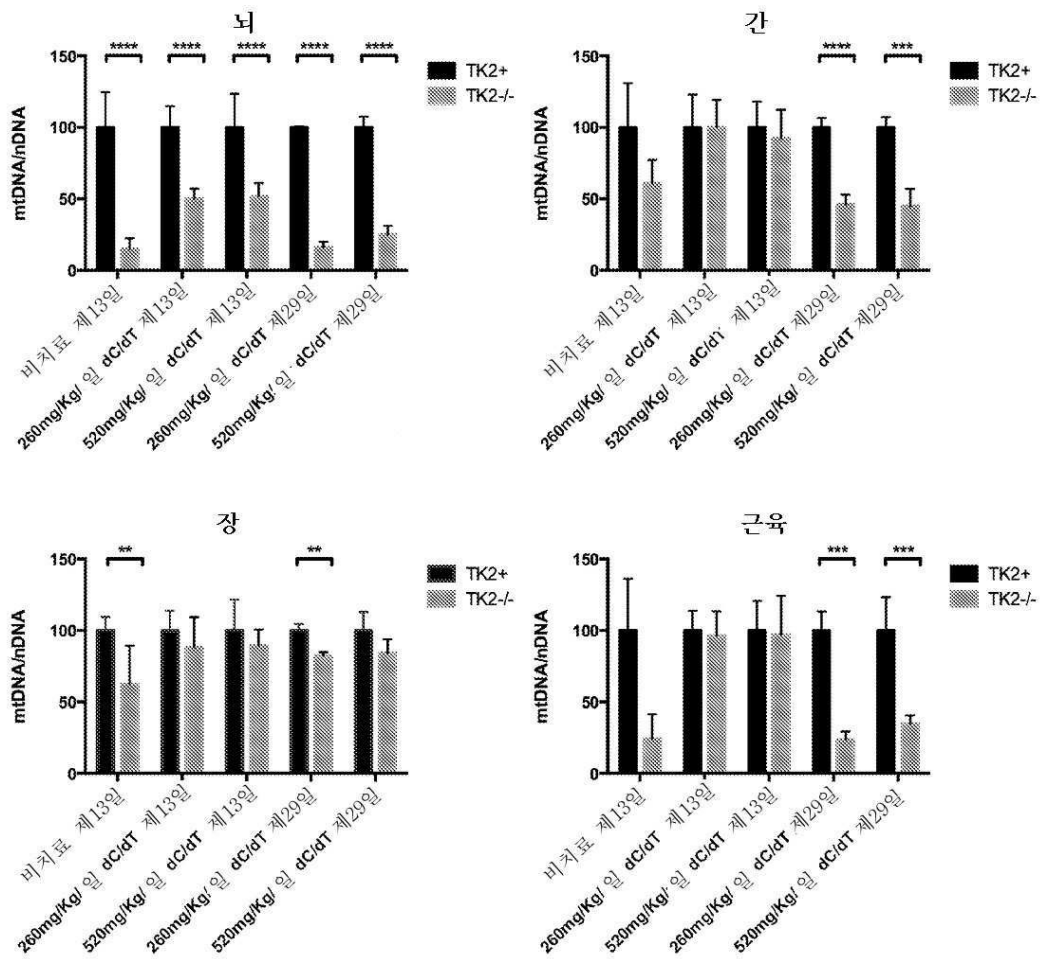


P29

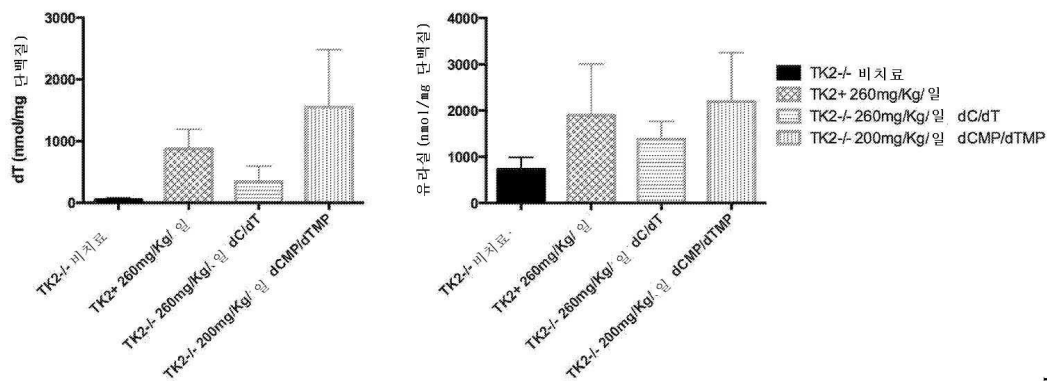


■ dATP
■ dTTP
■ dGTP
■ dCTP

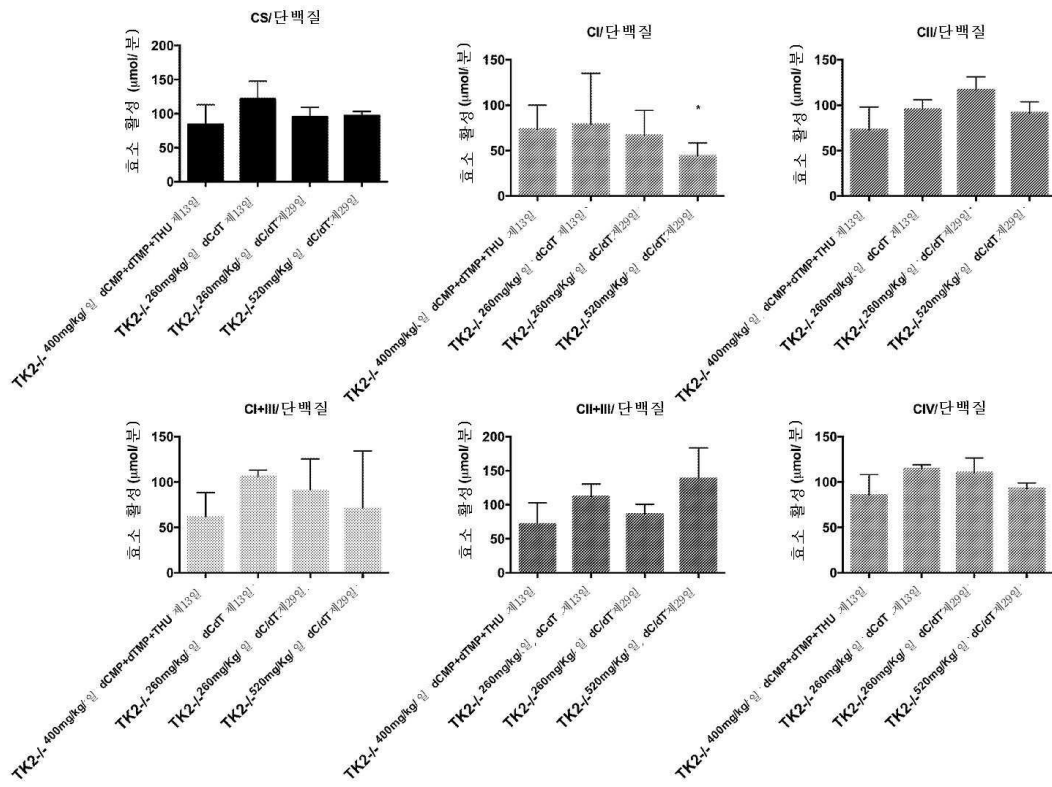
도면4



도면5



도면6



도면7

