



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0006069
(43) 공개일자 2025년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7088 (2013.01)
A61P 21/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7036300
(22) 출원일자(국제) 2023년05월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/066540
(87) 국제공개번호 WO 2023/215781
국제공개일자 2023년11월09일
(30) 우선권주장
63/364,260 2022년05월05일 미국(US)
63/387,733 2022년12월16일 미국(US)

(71) 출원인
바이오마린 파머수티컬 인크.
미합중국, 캘리포니아 94949, 노바토, 디지털 드
라이브 105
(72) 발명자
오닐 찰스 에이.
미국, 캘리포니아 94949, 노바토, 105 디지털 드
라이브, 씨/오 바이오마린 파머수티컬 인크.
바그왓 슈리팻 에스.
미국, 캘리포니아 94949, 노바토, 105 디지털 드
라이브, 씨/오 바이오마린 파머수티컬 인크.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

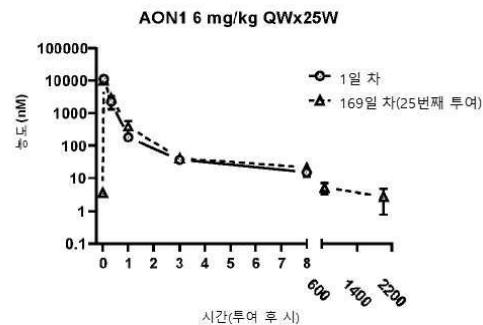
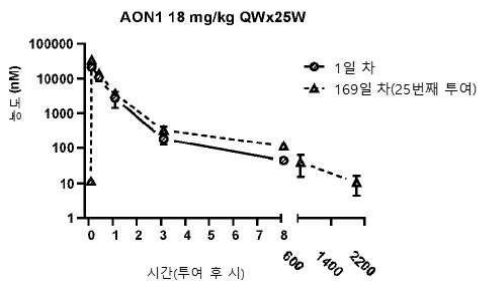
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 뒤시엔스 근이영양증을 치료하는 방법

(57) 요약

변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 뒤시엔스 근이영양증을 치료하거나 이의 발병을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2310/3231 (2013.01)
C12N 2310/3341 (2013.01)
C12N 2310/351 (2013.01)

(72) 발명자

닐 데이빗 라일리

미국, 캘리포니아 94949, 노바토, 105 디지털 드라
이브, 씨/오 바이오마린 파머수티컬 인크.

자코비 데이빗 레이드

미국, 캘리포니아 94949, 노바토, 105 디지털 드라
이브, 씨/오 바이오마린 파머수티컬 인크.

명세서

청구범위

청구항 1

DMD를 앓는 대상을 치료하거나 대상에서 DMD의 발병을 지연시키는 방법으로서, AON1을 상기 대상에게 0.4 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.8 mg/kg, 1.5 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 9 mg/kg, 12 mg/kg 또는 18 mg/kg의 용량으로 투여하는 단계를 포함하되, 상기 AON1은 QW로 투여되는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 AON1은 QW x 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35W로 투여되는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 AON1은 QW x 24W 또는 QW x 25W로 투여되는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AON1은 QW x 25W 투여되는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AON1은 QW x 24W 투여되는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AON1은 3 mg/kg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AON1은 6 mg/kg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AON1은 9 mg/kg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AON1은 12 mg/kg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AON1은 18 mg/kg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 대상에서 DMD를 치료하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 대상에서 DMD의 발병을 지연시키는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상에게 제2 활성제를 투여하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 제2 활성제는 에테플러센, 카시머센, 글로더센, 빌톨라센, SRP-5051(Sarepta

Therapeutics), 코티코스테로이드 예컨대 데플라자코트, 유전자 치료제[예를 들어, SRP-9001, GALGT2 또는 GNT 0004(Sarepta Therapeutics)], 유전자 편집[예를 들어, CRISPR/CAS9(Sarepta Therapeutics)] 또는 세포 치료제 [예를 들어, CAP-1002(Capricor Therapeutics/Nippon Shinyaku Co. Ltd.)]인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2022년 5월 5일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/364260호 및 2022년 12월 16일에 출원된 제 63/387,733호에 대해 우선권의 이익을 주장한다. 위에 언급된 각 출원의 개시 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 2023년 4월 26일에 생성되고 크기가 11,646 바이트인, '035105W0.xml'이라는 명칭의 XML 파일로서 여기에 제출되는 서열 목록을 함유하고, 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0005] 기술분야

[0006] 뒤시엔느 근이영양증[Duchenne muscular dystrophy, DMD]을 치료하거나 이의 발병을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다. 일 구현예에서, 본 방법은 DMD를 앓는 대상에게 변형된 올리고뉴클레오타이드를 투여하는 것을 포함한다.

배경 기술

[0007] 안티센스 올리고뉴클레오타이드(Antisense oligonucleotide, AON)는 암, 염증성 병태, 심혈관 질환 및 신경변성 및 신경근 장애를 포함하는 많은 질환 및 병태에 대해 (전)임상 개발 중에 있다. 이들의 작용 기전은 다양한 표적, 예컨대 핵 또는 세포질에서 표적 RNA의 RNA분해요소H-매개 분해, 핵에서의 스플라이스 조절(엑손 포함 또는 도약) 또는 세포질에서 리보솜 소단위 결합의 입체 장애에 의한 번역 억제를 목표로 한다. 스플라이스-조절 또는 스플라이스-스위칭 AON은 인간 β -글로빈 pre-mRNA에서 비정상적인 스플라이싱의 교정에 대해 처음 기재되었고[문헌(Dominski and Kole PNAS, 1993, 90(18):8673-8677)], 현재 다양한 유전 질환에 대해 연구되고 있다.

[0008] AON은 신경근 장애인 뒤시엔느 근이영양증[DMD] 및 베커 근이영양증[Becker muscular dytrophy, BMD]의 치료에서 광범위하게 연구되어 왔다. 뒤시엔느 근이영양증[DMD] 및 베커 근이영양증[BMD]은 근이영양증의 가장 흔한 유아기 형태이다. DMD는 심각하고 치명적인 신경근 장애로서, 12세 이전에 휠체어 지원에 의존하게 되고, 환자는 종종 호흡부전 또는 심부전으로 인해 30세 이전에 사망한다. 이는 하나 이상의 엑손의 해독틀 이동 결실(약 67%) 또는 중복(약 7%)에 의해, 또는 2.24 Mb 디스트로핀 유전자의 점 돌연변이(약 25%)로 인해 발생하고, 그 결과 기능성 디스트로핀의 부재를 초래한다. BMD는 또한 디스트로핀 유전자의 돌연변이에 의해 유발되지만, 이들은 개방형 해독틀을 유지하고 반기능성[semi-functional] 디스트로핀 단백질을 생성하여, 전형적으로 표현형이 훨씬 더 경증이고 수명이 더 길다.

[0009] 현재까지 DMD의 치료를 위해 4가지 AON, 즉 에테플러센, 골로더센, 카시머센 및 빌톨라센이 승인되었다. 그러나 이들 약물은 제한된 효능을 가지고 적은 비율의 DMD 환자만을 치료하기 위해 각각 승인된 상태다.

[0010] 따라서, DMD를 치료하는 방법에 대한 지속적인 필요가 있다.

발명의 내용

[0011] 변형된 올리고뉴클레오타이드를 DMD를 앓는 대상에게 투여함으로써 DMD 를 치료하거나 이의 발병을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다. 일 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON)이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 시간에 따른 AON1의 혈장 농도를 나타낸다.

도 2는 심장, 사두근, 간, 횡격막, 비복근 및 신장 조직에서의 AON1 농도를 나타낸다.

도 3은 AON1이 25주의 치료로 근육 조직(사두근, 비복근, 심장 및 횡격막)에서 지속적 용량 의존적 엑손 51 도약을 달성하였음을 나타낸다.

도 4는 심장 및 사두근에서의 디스트로핀 중량%를 나타내고, AON1로 처리된 마우스에 대한 전반적인 보행 점수를 나타낸다.

도 5는 AON1 처리가 hDMD de152(+/-) 모델-관련 근육 병리를 약화시키고, 25주 투여 후 12주 동안 약리학적 효과를 지속시킴을 나타낸다.

도 6은 AON1 처리가 hDMD de152(+/-) 모델-관련 심장 병리를 약화시키고 12주 동안 약리학적 효과를 지속시킴을 나타낸다.

도 7은 QW, Q2W 또는 Q4W 투여 후 14일(속이 찬 원) 또는 28일(속이 빈 원)에 싸이오포스페이트기(AON1 PS, 9.4, 18.7 또는 37.5 mg/kg)에 의해 올리고뉴클레오타이드에 연결된 TEG를 갖는 AON1으로 처리된 hDMD Δ 52/mdx 마우스의 심장 및 사두근에서의 디스트로핀 발현을 나타낸다.

도 8은 QW, Q2W 또는 Q4W 투여 후 14일(속이 찬 원) 또는 28일(속이 빈 원)에 AON1 PS(9.4, 18.7 또는 37.5 mg/kg)로 처리된 hDMD Δ 52/mdx 마우스의 심장에서 엑손 51 도약 %를 나타낸다.

도 9는 투여 후 4주 및 8주에 18.7 mg/kg AON1(13주 QW)로 처리된 hDMD Δ 52/mdx 마우스의 사두근, 비복근, 심장 및 횡격막에서 엑손 51 도약 %를 나타낸다.

도 10은 QW x 13W 투여 후 4주 또는 8주에 AON1(18.7 mg/kg)로 처리된 hDMD Δ 52/mdx 마우스의 심장 및 사두근에서의 디스트로핀 발현을 나타낸다.

도 11은 AON1로 처리된 마우스에 대한 전반적인 보행 점수를 나타낸다.

도 12는 인간 및 원숭이 혈청에서의 보체 매개변수 Bb에 대한 AON1 PS 및 AON2(5'-TEG기가 없는 AON1)의 효과를 나타낸다.

도 13은 인간 및 원숭이 혈청에서 보체 매개변수 C3a에 대한 AON1 PS 및 AON2의 효과를 나타낸다.

도 14는 AON1로 39주 동안 처리된 NHP에 대한 이두근, 비복근 및 심장 조직에서 엑손 도약을 나타낸다(실시예 8).

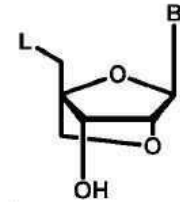
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] I. 정의
- [0014] 본원에 제시된 개시의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어를 아래에 정의한다.
- [0015] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 당업자에 의해서 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 모든 특허, 출원, 공개 출원 및 기타 출판물은 그 전체가 참조로 포함된다. 본원에서 용어에 대한 정의가 여러 개 있는 경우, 달리 언급하지 않는 한 이 섹션에 있는 것이 우선한다.
- [0016] 단수 형태는 문맥에서 분명히 다르게 지시되지 않는 한, 복수의 언급대상을 포함한다.
- [0017] 본원에 사용되는, '대상'은 동물, 예컨대 인간, 예컨대 환자를 포함하는 포유동물이다.
- [0018] 본원에 사용되는 생물학적 활성은 화합물의 생체내 활성 또는 화합물, 조성물 또는 기타 혼합물의 생체내 투여 시 생기는 생리학적 반응을 지칭한다. 생물학적 활성은, 따라서, 이러한 화합물, 조성물 및 혼합물의 치료 효과 및 약동학적 거동을 포괄한다. 생물학적 활성은 이러한 활성을 시험하도록 설계된 시험관내 시스템에서 관찰될 수 있다.
- [0019] 본원에 사용되는 치료는 질환 또는 장애의 증상 중 하나 이상이 개선되거나 달리 유익하게 바뀌는 임의의 방식을 의미한다. 치료는 또한 본원의 조성물의 임의의 약학적 용도, 예컨대 DMD를 치료하기 위한 용도를 포괄한다.
- [0020] 본원에 사용되는 특정한 화합물 또는 약학 조성물의 투여에 의한 특정한 장애 증상의 개선은, 영구적이든 또는 일시적이든, 지속적이든 또는 일시적이든, 화합물 또는 약학 조성물의 투여로 인하거나 이와 관련될 수 있는 임의의 완화를 지칭한다.
- [0021] 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용되는 용어 '관리하다', '관리하는' 및 '관리'는 특정 질환 또는 장애를 이

미 았았던 대상에서 그 질환 또는 장애의 재발을 예방하고/하거나 질환 또는 장애를 았았던 대상이 관해 상태로 유지되는 시간을 연장하는 것을 포괄한다. 용어는 질환 또는 장애의 역치, 발달 및/또는 지속을 조절하거나 대상이 질환 또는 장애에 반응하는 방식을 변화시키는 것을 포괄한다.

[0022] II. 본원에 제공되는 방법에 사용하기 위한 AON

[0023] 일 구현예에서, 본원에 제공되는 방법에 사용하기 위한 AON은 인간 디스트로핀 pre-mRNA의 엑손 51의 일부에 대해 역상보적이다. 또 다른 구현예에서, 본원에 제공되는 방법에 사용하기 위한 AON은 서열 5'-gguaaguucuguccaagc-3'(서열 번호 1)을 갖고 변형을 함유한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 제공되는 방법에 사용하기 위한 AON은 서열 5'-**gguaaguuc*uguc*c*aagc***-3'(서열 번호 2)을 갖되, c*는 5-메틸사이토신이고 **g** 및 **c***는 LNA 뉴클레오타이드이다. 본원에 사용되는 LNA 뉴클레오타이드는 다음 구조를 갖는다.



[0024] 식에서, B는 핵염기이고, L은 또 다른 뉴클레오타이드에 대한 포스페이트 또는 포스포로싸이오에이트 연결이다.

[0026] 또 다른 구현예에서, 본원에 제공되는 방법에 사용하기 위한 AON은 서열 TEG-5'-**gguaaguuc*uguc*c*aagc***-3'을 갖되, c*는 5-메틸사이토신이고, **g** 및 **c***는 LNA 뉴클레오타이드이고, TEG는 트라이-에틸렌 글리콜기이다. 또 다른 구현예에서, 본원에 제공되는 방법에 사용하기 위한 AON은 서열 TEG-5'-**gguaaguuc*uguc*c*aagc***-3'을 갖되, c*는 5-메틸사이토신이고, **g** 및 **c***는 LNA 뉴클레오타이드이고, TEG는 포스페이트기를 통해 5' 말단에 부착된 트라이-에틸렌 글리콜기이고, 인터뉴클레오사이드 연결은 포스포로싸이오에이트 연결이고, 비-LNA 뉴클레오타이드는 2'-OMe 뉴클레오타이드이다(본원에서 'AON1'로 지칭됨). WO 2022/069511 A1 및 US 2022/0098586 A1을 참조한다.

[0027] III. DMD를 치료하는 방법

[0028] 변형된 올리고뉴클레오타이드를 DMD를 았는 대상에게 투여함으로써 DMD를 치료하거나 이의 발병을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다. 일 구현예에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON)이다. 또 다른 구현예에서, AON은 본원에 개시된 AON이다. 또 다른 구현예에서, AON은 AON1이다. 또 다른 구현예에서, DMD를 았는 대상에게 AON1을 투여함으로써 DMD를 치료하는 방법이 제공된다. 또 다른 구현예에서, DMD를 았는 대상에게 AON1을 투여함으로써 DMD의 발병을 지연시키는 방법이 제공된다.

[0029] 특정 구현예에서, AON은 0.4 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.8 mg/kg, 1.5 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 9 mg/kg, 12 mg/kg 또는 18 mg/kg의 용량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, AON은 QW로 투여된다. 또 다른 구현예에서, AON은 QW x 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35W로 투여된다. 또 다른 구현예에서, AON은 QW x 24W 또는 QW x 25W로 투여된다. 또 다른 구현예에서, AON은 QW x 25W로 투여된다. 또 다른 구현예에서, AON은 QW x 24W로 투여된다.

[0030] 특정 구현예에서, AON1은 0.4 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.8 mg/kg, 1.5 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 9 mg/kg, 12 mg/kg 또는 18 mg/kg의 용량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, AON1은 QW로 투여된다. 또 다른 구현예에서, AON1은 QW x 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35W로 투여된다. 또 다른 구현예에서, AON1은 QW x 24W 또는 QW x 25W로 투여된다. 또 다른 구현예에서, AON1은 QW x 25W로 투여된다. 또 다른 구현예에서, AON1은 QW x 24W로 투여된다.

[0031] 또 다른 구현예에서, AON1은 6 mg/kg QW x 25W로 투여된다. 또 다른 구현예에서, AON1은 18 mg/kg QW x 25W로 투여된다.

[0032] 또 다른 구현예에서, 6 mg/kg QW x 24W로 AON1을 투여함으로써 DMD를 치료하는 방법이 제공된다. 또 다른 구현예에서, 18 mg/kg QW x 24W로 AON1을 투여함으로써 DMD를 치료하는 방법이 제공된다. 또 다른 구현예에서, 6 mg/kg QW x 24W로 AON1을 투여함으로써 DMD의 발병을 지연시키는 방법이 제공된다. 또 다른 구현예에서, 18 mg/kg QW x 24W로 AON1을 투여함으로써 DMD의 발병을 지연시키는 방법이 제공된다.

[0033] 특정 구현예에서, 본원에 제공되는 방법은 DMD를 치료하거나 이의 발병을 지연시키는 이전의 방법과 비교하여

우수한 결과를 낳는다. 일 구현예에서, 본원에 제공되는 방법은 생체표지자를 변형시키는 관련 질환의 정상화를 향한 변화를 유도한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 제공되는 방법은 질환 관련 임상 및 해부학적 근육 병리학에서 정상화를 향한 변화를 유도한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 제공되는 방법은 운동 능력 측정 시스템/보행 점수에서 측정된 바와 같이 DMD 표현형의 부분적 내지 거의 완전한 구조를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 제공되는 방법은 디스트로핀의 생성 증가를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 제공되는 방법은 인간 디스트로핀 pre-mRNA의 엑손 51의 도약 증가를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 방법은 DMD의 증상(들) 중 하나 이상을 완화시킨다.

[0034] 본원에 제공되는 AON을 사용하여 개체에서 DMD의 증상(들) 중 하나 이상을 완화시키는 것은 다음의 검정 중 임의의 것에 의해 평가될 수 있다. 걷기 능력 상실까지의 시간 연장, 근력 개선, 무거운 것을 드는 능력 개선, 바닥에서 일어나는 데 걸리는 시간 개선, 9미터 걷기 시간 개선, 4계단을 오르는 데 걸리는 시간 개선, 다리 기능 등급의 개선, 폐 기능의 개선, 심장 기능의 개선, 또는 삶의 질의 개선. 이들 검정 각각은 당업자에게 공지되어 있다. 이들 검정 각각에 대해, 검정에서 측정된 매개변수의 검출 가능한 개선 또는 연장이 발견되면, 이는 본원에 제공되는 AON을 사용하여 DMD의 증상 중 하나 이상이 개체에서 완화되었음을 일반적으로 의미할 것이다. 일 구현예에서 검출 가능한 개선 또는 연장은 문헌[Hodgetts et al. *Neuromuscular Disorders* 2006; 16: 591-602]에 기재된 통계적으로 유의미한 개선 또는 연장이다. 또한, DMD의 증상(들) 중 하나 이상의 완화는 근섬유 기능, 무결성 및/또는 생존의 개선을 측정함으로써 평가될 수 있다. 또 다른 구현예에서, DMD 환자의 증상(들) 중 하나 이상이 완화되고/되거나 DMD 환자에서 하나 이상의 근육 세포의 하나 이상의 특징(들)이 개선된다. 이러한 증상이나 특징은 세포, 조직 수준 또는 환자 자신에서 평가될 수 있다.

[0035] 환자의 근육 세포의 하나 이상의 특징의 완화는 환자의 근원 세포 또는 근육 세포에 대한 다음 검정 중 임의의 것에 의해 평가될 수 있다. 근육 세포의 칼슘 흡수 감소, 콜라겐 합성 감소, 형태 변경, 지질 생합성 변경, 산화 스트레스 감소 및/또는 근섬유 기능, 무결성 및/또는 생존 개선. 이들 매개변수는 일반적으로 근육 생검 단면의 면역형광 및/또는 조직화학적 분석을 사용하여 평가된다.

[0036] 근섬유 기능, 무결성 및/또는 생존의 개선은 다음 검정 중 적어도 하나를 사용하여 평가될 수 있다. 혈액 내 크레아틴 인산화효소의 검출 가능한 감소, 이영양증인 것으로 의심되는 근육의 생검 단면에서 근섬유 피사의 검출 가능한 감소, 및/또는 이영양증인 것으로 의심되는 근육의 생검 단면에서 근섬유 직경의 균질성의 검출 가능한 증가. 이들 검정 각각은 당업자에게 공지되어 있다.

[0037] 크레아틴 인산화효소는 문헌[Hodgetts et al. (2006)]에 기재된 바와 같이 혈액에서 검출될 수 있다. 크레아틴 인산화효소의 검출 가능한 감소는 치료 전 동일한 DMD 환자에서 크레아틴 인산화효소 농도와 비교하여 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 의미할 수 있다.

[0038] 근섬유 피사의 검출 가능한 감소는 예컨대 문헌[Hodgetts et al. (2006)]에 기재된 바와 같은 근육 생검에서 생검 단면을 사용하여 일반적으로 평가된다. 피사의 검출 가능한 감소는 생검 단면을 사용하여 피사가 식별된 면적의 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소일 수 있다. 감소는 치료 전 동일한 DMD 환자에서 평가된 피사와 비교하여 측정된다.

[0039] 근섬유 직경의 균질성의 검출 가능한 증가는, 예컨대 문헌[Hodgetts et al.](위에 언급됨)에 기재된 바와 같이, 근육 생검 단면에서 평가된다. 증가는 치료 전 동일한 DMD 환자의 근섬유 직경의 균질성과 비교하여 측정된다.

[0040] 일 구현예에서, 본원에 제공되는 AON은 상기 개체에게 기능성 또는 반기능성[semi-functional] 디스트로핀 단백질을 제공하고, 상기 개체에서 이상 디스트로핀 단백질의 생성을 적어도 부분적으로 감소시킬 수 있다.

[0041] 일 구현예에서, 개체에게 기능성 또는 반기능성 디스트로핀 단백질을 제공하는 것은 기능성 또는 반기능성 디스트로핀 단백질의 생성 증가를 의미한다. 기능성 또는 반기능성 디스트로핀 mRNA, 또는 기능성 또는 반기능성 디스트로핀 단백질의 생성 증가는 RT-디지털 액적 PCR(mRNA)(문헌[Verheul et al., *PLoS ONE* 2016, 11(9):e0162467]) 또는 면역형광(문헌[Beekman et al., *PLoS ONE* 2014; 9(9): e107494]), 웨스턴 블롯, 또는 모세혈관 웨스턴 면역검정(문헌[Beekman et al., *PLoS ONE* 2018; 13(4): e0195850]) 분석(단백질)에 의해 검출 가능한 바와 같이, 기능성 또는 반기능성 mRNA, 또는 기능성 또는 반기능성 디스트로핀 단백질의 초기 양과 비교하여, 검출 가능한 증가 또는 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 140%, 160%, 180%, 200% 이상을 의미한다. 또 다른 구현예에서, 상기 초기 양은 본 발명의 화합물을 사용하여 세포, 기관, 조직 및/또는 개체에서 디스트로핀 pre-mRNA의 엑손 도약을 유도 개시할 때의 기능성 또는 반기능성 mRNA, 또는 기능성 또는 반기능성 디스트로핀 단백질의 양이다.

- [0042] 이상 디스트로핀 mRNA 또는 이상 디스트로핀 단백질의 생성 감소는 RT-디지털 액적 PCR(mRNA) 또는 면역형광, 웨스턴 블롯 또는 모세혈관 웨스턴 면역검정(Wes) 분석(단백질)에 의해 이상 디스트로핀 mRNA, 또는 이상 디스트로핀 단백질의 초기 양의 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% 이하가 여전히 검출 가능하다는 것을 의미한다. 일 구현예에서, 상기 초기 양은 본 발명의 AON을 사용하여 세포, 기관, 조직 및/또는 개체에서 디스트로핀 pre-mRNA의 엑손-도약을 유도 개시할 때의 이상 디스트로핀 mRNA 또는 이상 디스트로핀 단백질의 양이다. 이상 디스트로핀 mRNA 또는 단백질은 또한 본원에서 덜 기능성(야생형 기능성 디스트로핀 단백질과 비교하여) 또는 비기능성 디스트로핀 mRNA 또는 단백질로 지칭되기도 한다. 비기능성 디스트로핀 단백질은 액틴 및/또는 DGC 단백질 복합체의 구성원에 결합할 수 없는 디스트로핀 단백질이다. 비기능성 디스트로핀 단백질 또는 디스트로핀 mRNA는 전형적으로 단백질의 온전한 C-말단이 있는 디스트로핀 단백질을 갖지 않거나 암호화하지 않는다. 기능성 또는 반기능성 디스트로핀 mRNA 또는 단백질의 검출은 이상 디스트로핀 mRNA 또는 단백질에서와 같이 수행될 수 있다.
- [0043] DMD 환자에게 기능성 또는 반기능성 디스트로핀 단백질이 제공되면, DMD 원인의 적어도 일부가 제거된다. 따라서, DMD의 증상이 적어도 부분적으로 완화되거나 증상이 악화되는 속도가 감소하여 더 느린 쇠퇴를 초래할 것임이 예상될 것이다. 강화된 도약 빈도는 또한 DMD 개체의 근육 세포에서 생성된 기능적 또는 반기능적 디스트로핀 단백질의 수준을 증가시킨다.
- [0044] IV. 방법에 사용하기 위한 약학 조성물
- [0045] 본원에 제공되는 약학 조성물은 본원에 제공되는 AON 중 하나 이상의 치료 유효량 및 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 함유한다.
- [0046] AON은 적절한 약학적 제제 예컨대 용액, 현탁액, 산제, 안과용 또는 비경구 투여용 멸균 용액 또는 현탁액으로 뿐만 아니라, 경피 패취 제제로 제형화될 수 있다. 전형적으로, 본원에 기재된 AON은 당업계에 주지된 기술 및 절차를 사용해서 약학 조성물로 제형화된다(예를 들어, 문헌[Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Seventh Edition 1999] 참조).
- [0047] 조성물에서, 하나 이상의 화합물 또는 약학적으로 허용되는 염의 유효 농도는 적합한 약학적 담체 또는 비히클과 혼합된다. 특정 구현예에서, 조성물 내 AON의 농도는, 투여 시, 본원에 개시된 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상 및/또는 진행을 치료, 예방 또는 개선하는 양의 전달에 효과적이다.
- [0048] 전형적으로, 조성물은 단일 용량 투여용으로 제형화된다. 조성물을 제형화하기 위하여, 화합물의 중량 분획은, 치료되는 병태가 개선 또는 완화되도록 유효 농도에서 선택된 비히클 내에 용해, 현탁, 분산 또는 달리 혼합된다. 본원에 제공되는 AON의 투여에 적합한 약학적 담체 또는 비히클은 특정 투여 방식에 적합하도록 당업자에게 공지된 임의의 이러한 담체를 포함한다.
- [0049] 또한, AON은 조성물 중 유일한 약학적 유효 성분으로서 제형화될 수 있거나 다른 유효 성분과 조합될 수 있다. 조직 표적화 리포솜을 포함하는 리포솜 현탁액은 또한 약학적으로 허용되는 담체로서 적합할 수 있다. 이들은 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 리포솜 제형은 당업계에 공지된 대로 따라 제조될 수 있다. 간략하게, 다층 소포[multilamellar vesicle, MLV]와 같은 리포솜은 플라스크 내에서 난 포스파티딜 콜린 및 뇌 포스파티딜 세린(7:3 몰비)을 건조시켜 형성될 수 있다. 2가 양이온이 없는 인산염 완충 식염수[phosphate buffered saline, PBS] 중 본원에 제공된 화합물의 용액이 첨가되고 플라스크는 지질막이 분산될 때까지 진탕된다. 생성된 소포는 세척되어 캡슐화되지 않은 화합물을 제거하고, 원심분리에 의해 펠릿화된 다음, PBS에서 재현탁된다.
- [0050] 활성 화합물은 치료되는 대상에서 바람직하지 않은 부작용의 부재 시 치료적으로 유용한 효과를 발휘하는 데 충분한 양으로 약학적으로 허용되는 담체에 포함된다. 치료 유효 농도는 본원에 기재된 시험관내 및 생체내 시스템에서 AON을 시험함으로써 경험적으로 결정된 다음, 이로부터 인간을 위한 용량을 추론할 수 있다. 일부 구현예에서, AON은 약물의 치료 유효 농도를 달성하기 위한 방법으로 투여된다. 일부 구현예에서, 동반 진단(예를 들어, 문헌[Olsen D and Jorgensen J T, Front. Oncol., 2014 May 16, 4:105, doi: 10.3389/fonc.2014.00105] 참조)은 특정 대상 또는 대상 집단에서 활성 화합물의 치료 농도 및 안전성 프로파일을 결정하는 데 사용된다.
- [0051] 약학 조성물 내 AON의 농도는, 활성 화합물의 흡수, 조직 분포, 비활성화 및 배설물, 화합물의 물리화학적 특징, 투여 일정, 및 투여량뿐만 아니라 당업자에게 공지된 기타 요인에 좌우될 것이다. 예를 들어, 전달되는 양은 본원에 개시된 질환 또는 장애의 증상 중 하나 이상을 개선하기에 충분하다.

- [0052] 특정 구현예에서, 치료 유효 용량은 약 0.1 ng/mL 내지 약 50-100 μ g/mL의 유효 성분의 혈청 농도를 생성해야 한다. 일 구현예에서, 약학 조성물은 1일당 체중 킬로그램당 약 0.001 mg내지 약 2000 mg의 화합물의 용량을 제공한다. 약학적 단위 제형은 제조되어 단위 제형당 약 1 mg 내지 약 1000 mg 및 특정 구현예에서, 약 10 내지 약 500 mg의 필수 유효 성분 또는 필수 성분의 조합을 제공한다.
- [0053] AON은 한 번에 투여될 수 있거나 시간 간격으로 투여될 다수의 더 작은 용량으로 나누어질 수 있다. 정확한 용량 및 치료 지속 기간은 치료 중인 질환의 함수이고 공지된 시험 프로토콜을 사용하거나 생체내 또는 시험관내 시험 데이터에서 추론하여 경험적으로 결정될 수 있는 것으로 이해된다. 농도 및 용량 값은 또한 완화될 병태의 중증도에 따라 다를 수 있음에 유의해야 한다. 임의의 특정 대상에 대하여, 개인의 필요 및 조성물을 투여하거나 그 투여를 감독하는 개인의 전문가적 판단에 따라서 시간 경과에 따라 특정 용량 용법이 조정되어야 하고, 본원에 제시된 농도 범위는 단지 예시적인 것이며 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하려는 것이 아님이 더 이해되어야 한다.
- [0054] 따라서, 본원에 기재된 하나 이상의 AON 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효 농도 또는 유효량은 전신, 국소 또는 국부 투여를 위한 적합한 약학적 담체 또는 비히클과 혼합되어 약학 조성물을 형성한다. AON은 하나 이상의 증상 개선, 또는 치료, 진행 지연, 또는 예방에 유효한 양으로 포함된다. 조성물 중의 활성 화합물의 농도는 활성 화합물의 흡수, 조직 분포, 비활성화, 배설률, 투여 일정, 투여량, 특정 제형뿐만 아니라 당업자에게 공지된 기타 인자에 좌우될 것이다.
- [0055] 조성물은 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 복강내, 경막내, 피부, 경피 또는 구강을 포함하지만 이에 제한되지 않는 적합한 경로에 의해 투여되도록 의도된다.
- [0056] 비경구, 진피내 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음 성분 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜, 다이메틸아세트아마이드 또는 기타 합성 용매; 향미생물제, 예컨대 벤질 알코올 및 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코브산 및 중아황산소듐; 킬레이트제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA); 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 및 포스페이트; 및 긴장성 조절제, 예컨대, 염화소듐 또는 텍스트로스. 비경구 제제는 유리, 플라스틱 또는 기타 적합한 재료로 만들어진 앰플, 펜, 일회용 주사기 또는 단회 또는 다회 투여 바이알에 봉입될 수 있다.
- [0057] AON이 불충분한 용해도를 나타내고 있는 경우에, AON을 가용화시키는 방법이 사용될 수 있다. 이러한 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 공용매, 예컨대 다이메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO)를 사용하는 것, 표면활성제, 예컨대 TWEEN®을 사용하는 것, 또는 수성 중탄산소듐 중 용해를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0058] AON(들)의 혼합 또는 첨가 시, 생성된 혼합물은 용액, 현탁액, 유제 등일 수 있다. 생성된 혼합물의 형태는 선택된 담체 또는 비히클 중 AON의 의도된 투여 방식 및 용해도를 포함하는 다수의 인자에 좌우된다. 유효 농도는 치료되는 질환, 장애 또는 병태의 증상을 개선하는 데 충분하고 경험적으로 결정될 수 있다.
- [0059] 약학 조성물은 적합한 양의 AON 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 함유하는 산제, 과립제, 멸균 비경구 용액 또는 현탁액, 및 유수 유제와 같은 단위 제형으로 인간 및 동물에게 투여하기 위하여 제공된다. 약학적으로 치료 활성 AON 및 이의 염은 단위 제형 또는 다회 제형으로 제형화되고 투여된다. 본원에 사용되는 단위 제형은 인간 및 동물 대상에게 적합한 물리적으로 별개의 단위 및 당업계에 공지된 바와 같이 개별적으로 포장된 단위를 지칭한다. 각 단위 용량은 요구된 약학적 담체, 비히클 또는 희석제와 함께 목적 치료 효과를 생성하는 데 충분한 치료 활성 화합물의 사전에 결정된 양을 함유한다. 단위 제형의 예는 앰플 및 주사기 및 개별적으로 포장된 정제 또는 캡슐제를 포함한다. 단위 제형은 이의 분획으로 또는 다회로 투여될 수 있다. 다회 제형은 분리된 단위 제형으로 투여되도록 하는 단일 용기 내에 포장된 복수의 동일한 단위 제형이다. 다회 제형의 예는 바이알, 정제 또는 캡슐제의 병 또는 파인트 또는 갤런의 병을 포함한다. 따라서, 다회 제형은 포장으로 분리되지 않은 다수의 단위 용량이다.
- [0060] 서방형 제제가 또한 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 본원에 제공되는 화합물을 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 매트릭스는 정형화된 물품, 예컨대, 필름, 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방형 매트릭스의 예는 이온영동 패취, 폴리에스터, 하이드로젤[예를 들어, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트)], 또는 폴리(바이닐알코올)], 폴리락타이드, L-글루탐산과 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-바이닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체 예컨대 LUPRON DEPOT™(락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사 가능한 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시뷰티르산을 포

함한다. 에틸렌-바이닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일 넘게 분자를 방출할 수 있게 하는 반면, 특정 하이드로젤은 더 짧은 기간 동안 단백질을 방출한다. 캡슐화된 화합물이 장시간 동안 신체 내에 잔류하는 경우, 이는 37 °C에서 수분에 노출시킨 결과로서 변성되거나 응집될 수 있고, 생물학적 활성의 손실 및 그들 구조의 가능한 변화를 초래할 수 있다. 합리적인 전략은 관여된 작용 기전에 따라 안정화를 위해 고안될 수 있다. 예를 들어, 응집 기전이 싸이오-다이설파이드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견된 경우, 안정화는 설프하이드릴 잔기를 변형시키고, 산성 용액에서 동결 건조시키고, 적절한 첨가제를 사용해서 수분 함량을 제어하고, 특정 중합체 매트릭스 조성물을 개발함으로써 달성될 수 있다.

[0061] 0.005% 내지 100% 범위의 유효 성분과 비독성 담체로 이루어진 잔부를 함유하는 투여 제형 또는 조성물이 제조될 수 있다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 산제 및 서방형 제형, 예컨대, 이식물 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템, 및 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 콜라겐, 에틸렌 바이닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 폴리오에스터, 폴리락트산 및 기타를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들 조성물의 제제를 위한 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 고려되는 조성물은 약 0.001% 100%, 특정 구현예에서, 약 0.1 85% 또는 약 75-95%의 유효 성분을 함유할 수 있다.

[0062] 활성 AON 또는 약학적으로 허용되는 염은 신체에서의 신속한 제거에 대하여 화합물을 보호하는 담체, 예컨대, 시한 방출 제형 또는 코팅으로 제조될 수 있다.

[0063] 조성물은 특성의 목적 조합을 수득하기 위해 다른 활성 AON을 포함할 수 있다. 본원에 제공되는 AON 또는, 본원에 기재된 바와 같은 이의 약학적으로 허용되는 염은, 위에서 언급된 질환 또는 의학적 병태, 예컨대 산화 스트레스와 관련된 질환 중 하나 이상을 치료하는 데 가치있는 것으로 일반적인 분야에 공지된 또 다른 약리학 제제와 함께 치료 목적 또는 예방 목적을 위하여 유리하게 투여될 수 있다. 이러한 병용 요법은 본원에 제공되는 조성물 및 치료 방법의 추가 양태를 구성하는 것으로 이해되어야 한다.

[0064] A. 주사제, 용액 및 유제

[0065] 피하로, 근육내로 또는 정맥내로 주사를 일반적으로 특징으로 하는 비경구 투여가 또한 본원에 고려된다. 주사제는 액체 용액 또는 현탁액, 주사 전 액체 중 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태로서, 또는 유제로서 통상의 형태로 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 현탁액은 마이크로입자 또는 나노입자의 현탁액이다. 일부 구현예에서, 유제는 마이크로입자 또는 나노입자의 유제이다. 적합한 부형제는, 예를 들어, 물, 생리식염수, 텍스트로스, 글리세롤 또는 에탄올이다. 추가로, 원한다면, 투여될 약학 조성물은 또한 비독성 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정제, 용해도 증강제, 및 기타 작용제, 예컨대 예를 들어, 아세트산소듐, 소비탄 모노라우레이트, 트라이에탄올아민 올레이트 및 사이클로덱스트린을 소량 함유할 수 있다. 일정한 수준의 용량이 유지되도록 서방출 또는 지속 방출 시스템의 이식이 또한 본원에 고려된다. 간략하게, 본원에 제공되는 AON은 체액에 불용성인 외부 중합체막, 예를 들어, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 에틸렌/프로필렌 공중합체, 에틸렌/에틸 아크릴레이트 공중합체, 에틸렌/바이닐아세테이트 공중합체, 실리콘 고무, 폴리다이메틸 실록세인, 네오프렌 고무, 염소화 폴리에틸렌, 폴리염화바이닐, 바이닐 아세테이트와의 염화바이닐 공중합체, 염화바이닐리덴, 에틸렌 및 프로필렌, 아이오노머 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 뷰틸 고무 에피클로로하이드린 고무, 에틸렌/바이닐 알코올 공중합체, 에틸렌/바이닐 아세테이트/바이닐 알코올 삼원중합체 및 에틸렌/바이닐옥시에탄올 공중합체에 의해 둘러싸여 있는 고형 내부 매트릭스, 예를 들어, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리뷰틸메타크릴레이트, 가소화 또는 경질 폴리염화바이닐, 가소화 나일론, 가소화 폴리에틸렌테레프탈레이트, 천연 고무, 폴리아이소프렌, 폴리아이소뷰틸렌, 폴리뷰타다이엔, 폴리에틸렌, 에틸렌-바이닐아세테이트 공중합체, 실리콘 고무, 폴리다이메틸실록세인, 실리콘 카보네이트 공중합체, 친수성 중합체, 예컨대 아크릴산 및 메타크릴산의 에스터의 하이드로젤, 콜라겐, 가교된 폴리바이닐알코올 및 가교된 부분 가수분해된 폴리바이닐아세테이트에 분산될 수 있다. AON은 방출 속도 조절 단계에서 외부 중합체막을 통해 확산된다. 이러한 비경구 조성물 내에 함유된 활성 AON의 백분율은 이의 특정 본성뿐만 아니라 화합물의 활성 및 대상의 필요에 크게 좌우된다.

[0066] 조성물의 비경구 투여는 정맥내, 피하 및 근육내 투여를 포함한다. 비경구 투여용 제제는 피하 정제, 주사용으로 준비된 멸균된 현탁액, 사용 직전에 비히클과 조합될 준비가 된 멸균된 건조 불용성 생성물 및 멸균된 유제를 포함하여 주사용으로 준비된 멸균된 용액, 멸균된 건조 가용성 생성물, 예컨대 사용 직전에 용매와 조합될 준비가 된 동결 건조된 산제를 포함한다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0067] 정맥내로 투여되는 경우, 적합한 담체는 생리식염수 또는 인산염 완충 식염수(PBS), 및 증점제 및 가용화제, 예컨대 글루코스, 폴리에틸렌 글리콜, 및 폴리프로필렌 글리콜 및 이의 혼합물을 함유하는 용액을 포함한다.

- [0068] 비경구 제제에 사용되는 약학적으로 허용되는 담체는 수성 비히클, 비수성 비히클, 항미생물제, 등장화제, 완충제, 항산화제, 국부 마취제, 현탁제 및 분산제, 유화제, 봉쇄제 또는 킬레이트제 및 기타 약학적으로 허용되는 물질을 포함한다.
- [0069] 수성 비히클의 예는 염화소듐 주사, 링거 주사, 등장성 텍스트로스 주사, 멸균수 주사, 텍스트로스 및 락테이트화된 링거 주사를 포함한다. 비수성 비경구 비히클은 식물성 기원의 고정유, 면실유, 옥수수유, 참깨유 및 땅콩유를 포함한다. 정균적 또는 정진균적 농도의 항미생물제는 페놀 또는 크레솔, 머큐리얼, 벤질 알코올, 클로로뷰탄올, 메틸 및 프로필 p 하이드록시벤조산 에스터, 타이메로살, 염화벤잘코늄 및 염화벤제토늄을 포함하는 다회 용량 용기에 포장된 비경구 제제에 첨가되어야 한다. 등장화제는 염화소듐 및 텍스트로스를 포함한다. 완충제는 포스페이트 및 시트레이트를 포함한다. 항산화제는 소듐 바이설파이트를 포함한다. 국부 마취제는 프로카인 하이드로클로라이드를 포함한다. 현탁화제 및 분산제는 소듐 카복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리돈을 포함한다. 유화제는 폴리솔베이트 80(TWEEN® 80)을 포함한다. 금속 이온의 봉쇄제 또는 킬레이트제는 EDTA를 포함한다. 약학적 담체는 또한 수산화성 비히클용 에틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜 및 pH 조정용 수산화소듐, 염산, 시트르산 또는 락트산을 포함한다.
- [0070] 약학적 활성 AON의 농도는 주사가 목적 약리적 효과를 내기 위한 유효량을 제공하도록 조정된다. 정확한 용량은 당분야에 공지되어 있는 바와 같이 대상 또는 동물의 연령, 체중 및 병태에 좌우된다.
- [0071] 단위 용량 비경구 제제는 애플, 바이알 또는 바늘이 있는 주사기에 포장된다. 비경구 투여용 모든 제제는 당분야에 공지되고 실시된 바와 같이 멸균되어야 한다.
- [0072] 예시적으로, 활성 AON을 함유하는 멸균된 수용액의 정맥내 또는 동맥내 주입은 유효한 투여 방식이다. 또 다른 구현예는 목적 약리적 효과를 내기 위해 필요에 따라 주사된 활성 AON을 함유하는 멸균된 수용액 또는 유성 용액 또는 현탁액이다.
- [0073] 주사제는 국부 및 전신 투여용으로 설계된다. 전형적으로, 치료 유효 용량은 치료되는 조직(들)에 대해 적어도 약 0.1% w/w에서 최대 약 90% w/w 이상, 예컨대 1% w/w 초과 활성 AON의 농도를 함유하도록 제형화된다. 활성 AON은 한 번에 투여될 수 있거나 시간 간격으로 투여될 다수의 더 작은 용량으로 나누어질 수 있다. 정확한 용량 및 치료의 지속시간은 치료 중인 조직의 함수이고 공지된 시험 프로토콜을 사용하거나 생체내 또는 시험관내 시험 데이터로부터 추론하여 경험적으로 결정될 수 있는 것으로 이해된다. 농도 및 용량 값은 또한 치료되는 개체의 연령에 따라 변할 수 있음을 주목해야 한다. 임의의 특정 대상에 대하여, 개인의 필요 및 제형을 투여하거나 그 투여를 감독하는 개인의 전문가적 판단에 따라서 시간 경과에 따라 특정 용량 용법이 조정되어야 하고, 본원에 제시된 농도 범위는 단지 예시적인 것이며 청구된 제형의 범위 또는 실시를 제한하려는 것이 아님이 더 이해되어야 한다.
- [0074] AON은 미분화된 형태 또는 기타 적합한 형태에서 현탁화될 수 있거나 더 많은 가용성 활성 생성물을 생성하거나 전구약물을 생성하기 위해 유도체화될 수 있다. 생성된 혼합물의 형태는 선택된 담체 또는 비히클 중 화합물의 의도된 투여 방식 및 용해도를 포함하는 다수의 인자에 좌우된다. 유효 농도는 병태의 증상을 개선하는 데 충분하고 경험적으로 결정될 수 있다.
- [0075] B. 동결 건조된 분말
- [0076] 용액, 유제 및 기타 혼합물로서 투여하기 위하여 재구성될 수 있는 동결 건조된 분말이 본원에 또한 제공된다. 이들은 또한 고체 또는 젤로서 재구성되고 제형화될 수 있다.
- [0077] 멸균 동결 건조된 분말은 적합한 용매 중에서 본원에 제공되는 AON 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 용해시킴으로써 제조된다. 용매는 안정성을 증진시키는 부형제, 또는 분말 또는 분말에서 제조되는 재구성된 용액의 기타 약리학적 성분을 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는 텍스트로스, 솔비톨, 프럭토스, 옥수수 시럽, 자일리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스 또는 기타 적합한 작용제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 용매는 또한 완충제, 예컨대 시트레이트, 소듐 또는 포타슘 포스페이트 또는 당업자에게 공지된 기타 이러한 완충제를 함유할 수 있고, 일 구현예에서, 약 중성 pH이다. 후속적으로 용액을 멸균 여과한 후 당업자에게 공지된 표준 조건하에서 동결 건조시켜 목적 제형을 제공한다. 일반적으로, 생성된 용액은 동결 건조용 바이알에 배분될 것이다. 각각의 바이알은 단일 용량(10-1000 mg 또는 100-500 mg을 포함하지만 이에 제한되지 않음) 또는 화합물의 다회 용량을 함유할 것이다. 동결 건조된 분말은 약 4 °C 내지 실온과 같은 적절한 조건하에 보관될 수 있다.

- [0078] 주사용수를 이용한 이 동결 건조된 분말의 재구성은 비경구 투여에 사용하기 위한 제형을 제공한다. 재구성을 위하여, 약 1-50 mg, 약 5-35 mg, 또는 약 9-30 mg의 동결 건조된 분말을 멸균수 또는 기타 적합한 담체 mL당 첨가한다. 정확한 양은 선택된 화합물에 따라 좌우된다. 이러한 양은 경험적으로 결정될 수 있다.
- [0079] C. 국소 투여
- [0080] 국소 혼합물은 국부 투여 및 전신 투여에 대해 기재된 바와 같이 제조된다. 생성된 혼합물은 용액, 현탁액, 유제 등일 수 있고, 크림제, 겔제, 연고제, 유제, 용액, 엘릭서제, 로션제, 현탁제, 틴크제, 페이스트제, 폼, 에어로솔제, 관류제, 스프레이제, 좌제, 붕대, 피부 패취제 또는 국소 투여에 적합한 기타 제형으로서 제형화된다.
- [0081] 화합물은 피부 및 점막, 예컨대 눈의 국소 적용과 같은 국부 또는 국소 적용을 위하여 겔제, 크림제 및 로션제의 형태로, 그리고 눈의 적용 또는 낭내 또는 척수 적용을 위하여 제형화될 수 있다. 국소 투여는 경피 전달을 위하여 그리고 또한 눈 또는 점막에의 투여를 위하여, 또는 흡입 치료법을 위하여 고려된다. 활성 화합물 단독의 비강 용액 또는 기타 약학적으로 허용되는 부형제와 조합한 비강 용액이 또한 투여될 수 있다.
- [0082] 이들 용액, 특히 안과용 용도로 의도된 것은 적절한 염과 함께 pH 약 5-7, 0.01%-10%의 등장성 용액으로서 제형화될 수 있다.
- [0083] D. 지속 방출 조성물
- [0084] 본원에 제공되는 AON은 당업자에게 주지된 제어 방출 수단 또는 전달 장치에 의해 투여될 수 있다. 예는, 미국 특허 제3,845,770호, 제3,916,899호, 제3,536,809호, 제3,598,123호, 및 미국 특허 제4,008,719호, 제5,674,533호, 제5,059,595호, 제5,591,767호, 제5,120,548호, 제5,073,543호, 제5,639,476호, 제5,354,556호, 제5,639,480호, 제5,733,566호, 제5,739,108호, 제5,891,474호, 제5,922,356호, 제5,972,891호, 제5,980,945호, 제5,993,855호, 제6,045,830호, 제6,087,324호, 제6,113,943호, 제6,197,350호, 제6,248,363호, 제6,264,970호, 제6,267,981호, 제6,376,461호, 제6,419,961호, 제6,589,548호, 제6,613,358호, 제6,699,500호 및 제6,740,634호에 기재된 것을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니고, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다. 이러한 제형은 다양한 비율로 목적 방출 프로파일을 제공하기 위하여, 예를 들어, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 기타 중합체 매트릭스, 젤, 침투막, 삼투 시스템, 다층 코팅, 미립자, 리포솜, 미소구체, 또는 이의 조합을 사용하는 하나 이상의 유효 성분의 서방성 또는 방출 제어를 제공하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 것을 포함하는 당업자에게 공지된 적합한 제어 방출 제형은, 본원에 제공되는 유효 성분과 함께 사용하기 위해 쉽게 선택될 수 있다.
- [0085] 모든 제어 방출 약학적 생성물은 그들의 비제어 대응품에 의해 달성된 것보다 개선한 약물 요법이라는 공통된 목표를 갖는다. 일 구현예에서, 의학 치료에 최적으로 설계된 방출 제어 제제의 사용은 최소의 시간량에서 병태를 치유 또는 조절하는 데 사용되는 최소의 약물 물질을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, 조절 방출 제형의 이점은 약물의 연장된 활성, 감소된 용량 빈도 및 증가된 대상 순응성을 포함한다. 또한, 조절 방출 제형은 작용의 개시 시간 또는 약물의 혈중 농도와 같은 기타 특성에 영향을 주기 위해 사용될 수 있고, 따라서, 부작용(예를 들어, 유해효과)의 발생에 영향을 줄 수 있다.
- [0086] 대부분의 제어 방출 제형은 처음에 목적 치료 효과를 즉시 생성하는 약물(유효 성분)의 양을 방출하고, 장기간에 걸쳐서 이 수준의 치료 또는 예방 효과를 유지시키기 위해 약물의 다른 양을 점차적이고 지속적으로 방출하도록 설계된다. 신체에 이 일정 수준의 약물을 유지하기 위해, 약물은 신체에서부터 대사되고 배출되는 약물의 양을 대체할 속도로 제형에서부터 방출되어야 한다. AON의 제어 방출은 pH, 온도, 효소, 물, 또는 기타 생리적 조건 또는 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 조건에 의해 자극될 수 있다.
- [0087] 특정 구현예에서, AON은 정맥내 주입, 이식 가능 삼투 펌프, 경피 패취, 리포솜, 또는 기타 투여 방식을 사용하여 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 펌프가 사용될 수 있다(문헌[Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)] 참조). 또 다른 구현예에서, 중합체성 물질이 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 제어 방출 시스템은 치료 표적 부근에 배치될 수 있고, 즉, 따라서 전체 용량의 분획만 필요로 한다(예를 들어, 문헌[Goodson, Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984)] 참조).
- [0088] 다른 제어 방출 시스템은 레인저(문헌[Science 249:1527-1533 (1990)])에 의한 검토에서 논의된다. AON은 체액에 불용성인 외부 중합체막, 예를 들어, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 에틸렌/프로필렌 공중합체, 에틸렌/에틸 아

크릴레이트 공중합체, 에틸렌/바이닐아세테이트 공중합체, 실리콘 고무, 폴리다이메틸 실록세인, 네오프렌 고무, 염소화 폴리에틸렌, 폴리염화바이닐, 바이닐 아세테이트와의 염화바이닐 공중합체, 염화바이닐리텐, 에틸렌 및 프로필렌, 아이오노머 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 뷰틸 고무 에피클로로하이드린 고무, 에틸렌/바이닐 알코올 공중합체, 에틸렌/바이닐 아세테이트/바이닐 알코올 삼원중합체 및 에틸렌/바이닐옥시에탄올 공중합체에 의해 둘러싸여 있는 고형 내부 매트릭스, 예를 들어, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리부틸메타크릴레이트, 가소화 또는 경질 폴리염화바이닐, 가소화 나일론, 가소화 폴리에틸렌테레프탈레이트, 천연 고무, 폴리아이소프렌, 폴리아이소부틸렌, 폴리부타다이엔, 폴리에틸렌, 에틸렌-바이닐아세테이트 공중합체, 실리콘 고무, 폴리다이메틸 실록세인, 실리콘 카보네이트 공중합체, 친수성 중합체, 예컨대 아크릴산 및 메타크릴산의 에스터의 하이드로젤, 콜라겐, 가교된 폴리바이닐알코올 및 가교된 부분 가수분해된 폴리바이닐아세테이트에 분산될 수 있다. 그런 다음 AON은 방출 속도 조절 단계에서 외부 중합체성 막을 통해 확산된다. 이러한 비경구 조성물에 함유된 유효 성분의 백분율은 이의 특정 본성뿐만 아니라 대상의 필요에 크게 좌우된다.

[0089] E. 표적화된 제형

[0090] 본원에 제공되는 AON, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 또한 리포솜, 재봉합된 적혈구, 및 항체 기반 전달 시스템을 포함하여 치료될 대상의 신체의 특정 조직, 수용체 또는 기타 영역에 표적화되도록 제형화될 수 있다. 많은 이러한 표적화 방법은 당업자에게 주지되어 있다. 모든 이러한 표적화 방법은 본 조성물에 사용하기 위해 본원에서 고려된다. 표적화 방법의 비제한적인 예에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 제6,316,652호, 제 6,274,552호, 제6,271,359호, 제6,253,872호, 제6,139,865호, 제6,131,570호, 제6,120,751호, 제 6,071,495호, 제6,060,082호, 제6,048,736호, 제6,039,975호, 제6,004,534호, 제5,985,307호, 제5,972,366호, 제5,900,252호, 제5,840,674호, 제5,759,542호 및 제5,709,874호를 참조한다.

[0091] 일 구현예에서, 항체 기반 전달 시스템은, 예를 들어, 이들 각각이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Hamilton G S, Biologicals, 2015 September, 43(5):318-32; Kim E G and Kim K M, Biomol. Ther. (Seoul), 2015 November, 23(6):493-509; 및 Peters C and Brown S, Biosci. Rep., 2015 Jun. 12, 35(4) pii: e00225]에 기재된 항체 약물 접합체[antibody-drug conjugate, 'ADC']이다.

[0092] 일 구현예에서, 중앙 표적화 리포솜과 같은 조직 표적화 리포솜을 포함하는 리포솜 현탁액은 또한 약학적으로 허용되는 담체로서 적합할 수 있다. 이들은 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제4,522,811호에 기재된 바와 같이 리포솜 제형이 제조될 수 있다. 간략하게, 다층 소포[MLV]와 같은 리포솜은 플라스크의 내에서 난 포스파티딜 콜린 및 뇌 포스파티딜 세린(7:3 몰비)을 건조시킴으로써 형성될 수 있다. 2가 양이온이 없는 인산염 완충 식염수[PBS] 중 본원에 제공된 AON의 용액이 첨가되고 플라스크는 지질막이 분산될 때까지 진탕된다. 생성된 소포는 세척되어 캡슐화되지 않은 화합물을 제거하고, 원심분리에 의해 펠릿화된 다음, PBS에서 재현탁된다.

[0093] F. 제조 물품

[0094] AON 또는 약학적으로 허용되는 염은 본원에 개시된 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상 또는 진행의 치료, 예방 또는 개선에 사용되는 본원에 제공되는 AON 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 본원에 개시된 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상 또는 진행의 치료, 예방 또는 개선에 사용되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 나타내는 라벨을 포함하는 제품으로서 포장될 수 있다.

[0095] 본원에 제공되는 제품은 포장 재료를 포함한다. 의약품 포장에 사용하기 위한 포장 재료는 당업자에게 주지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,323,907호, 제5,052,558호 및 제5,033,252호를 참조한다. 약학적 포장 재료의 예는 선택된 제형 및 의도된 투여 및 치료 방식에 적합한 블리스터 팩, 병, 튜브, 흡입기, 펌프, 백, 바이알, 용기, 주사기, 펜, 병 및 임의의 포장 재료를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본원에 제공되는 AON 및 조성물의 다수의 제형이 고려된다.

[0096] 특정 구현예에서, 의료진이 사용할 때, 대상에게 적절한 양의 AON을 투여하는 것을 단순화할 수 있는 키트가 또한 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에 제공되는 키트는 용기 및 본원에 제공되는 AON 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 전구약물의 제형을 포함한다.

[0097] 특정 구현예에서, 키트는 본원에 기재된 하나 이상의 기타 치료제(들)를 포함하는 용기 내에, 본원에 제공되는 AON 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 전구약물의 제형을 포함하는 용기를 포함한다.

[0098] 본원에 제공되는 키트는 AON을 투여하는 데 사용되는 장치를 더 포함할 수 있다. 이러한 장치의 예는 주사기,

바늘 없는 주사기 드립 백, 패취 및 흡입기를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0099] 본원에 제공되는 키트는 하나 이상의 유효 성분을 투여하는 데 사용될 수 있는 약학적으로 허용되는 비히클을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 유효 성분이 비경구 투여를 위해 제구성되어야 하는 고체 형태로 제공되는 경우, 키트는 유효 성분이 용해되어 비경구 투여에 적합한 미립자 유리 멸균 용액을 형성할 수 있는 적합한 비히클의 밀봉 용기를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 비히클의 예는 주사용수 USP, 염화소듐 주사, 링거 주사, 텍스트로스 주사, 텍스트로스 및 염화소듐 주사 및 락트산 링거 주사를 포함하지만 이에 제한되지 않는 수성 비히클; 에틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜을 포함하지만 이에 제한되지 않는 수혼화성 비히클; 및 옥수수유, 면실유, 땅콩유, 참깨유, 에틸 올레이트, 아이소프로필 미리스테이트 및 벤질 벤조에이트를 포함하지만 이에 제한되지 않는 비수성 비히클을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0100] VII. 제2 활성제와의 병용 요법

[0101] 또한, DMD를 치료하거나 이의 발병을 지연시키는 데 유용한 다른 치료제와 본원에 개시된 AON을 사용하는 병용 요법의 방법이 본원에 제공된다. 또 다른 구현예에서, DMD를 치료하거나 이의 발병을 지연시키는 데 유용한 다른 치료제와 AON1을 사용하는 병용 요법의 방법이 본원에 제공된다. 이들 방법에서, 본원에 개시된 AON, 예를 들어, AON1은 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이 예를 들어, QW x 24W 투여된다.

[0102] 본원에 사용되는 용어 '병용하여'는 하나보다 많은 요법(예를 들어, 하나 이상의 예방제 및/또는 치료제)의 사용을 포함한다. 그러나, 용어 '병용하여'의 사용은 요법(예를 들어, 예방제 및/또는 치료제)이 질환 또는 장애를 가진 대상에게 투여되는 순서를 제한하지는 않는다. 제1 요법(예를 들어, 예방제 또는 치료제, 예컨대 본원에 제공되는 AON)은 대상에게 제2 요법(예를 들어, 예방제 또는 치료제)을 투여하기 이전에(예를 들어, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24 시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 전), 투여와 동시에, 또는 투여 이후에(예를 들어, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 후) 투여될 수 있다. 삼중 요법이 또한 본원에 고려된다.

[0103] 대상에게 본원에 개시된 AON 및 하나 이상의 제2 활성제를 투여하는 것은 동일하거나 상이한 투여 경로에 의해서 동시에 또는 순차적으로 일어날 수 있다. 특정 활성제를 위해 사용되는 특정 투여 경로의 적합성은 활성제 자체(예를 들어, 혈류로 들어가기 전에 분해되지 않고 경구 투여될 수 있는지 여부) 및 치료하고자 하는 질환 및 장애에 좌우될 것이다.

[0104] 본원에 개시된 AON의 투여 경로는 제2 요법의 투여 경로와 독립적이다. 또 다른 구현예에서, 본원에 개시된 AON은 정맥내로 투여된다. 따라서, 이들 구현예에 따라서, 본원에 개시된 AON은 정맥내로 투여되고 제2 요법은 경구로, 비경구로, 복막내로, 정맥내로, 동맥내로, 경피로, 설하로, 근육내로, 직장내로, 경협측으로, 비강내로, 리포솜으로, 흡입을 통해서, 질로, 안구내로, 카테터 또는 스텐트에 의한 국부 전달을 통해서, 피하로, 지방내로, 관절내로, 척추강내로, 또는 서방형 제형으로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 개시된 AON 및 제2 요법은 동일한 투여 방식에 의하여, 예를 들어, IV에 의해 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본원에 개시된 AON은 하나의 투여 방식, 예를 들어, IV에 의하여 투여되고, 한편, 제2 작용제는 또 다른 투여 방식, 예를 들어, 경구로 투여된다.

[0105] 일 구현예에서, 제2 활성제는 약 1 내지 약 1000 mg, 약 5 내지 약 500 mg, 약 10 내지 약 350 mg, 또는 약 50 내지 약 200 mg의 양으로 정맥내 또는 피하로, 1일 1회 또는 2회 투여된다. 제2 활성제의 구체적인 양은 사용되는 구체적인 작용제, 치료 또는 관리 중인 질환의 유형, 질환의 중증도 및 병기, 및 본원에 제공되는 AON 또는 이의 유도체, 및 대상에게 동시에 투여되는 임의의 추가 활성제의 양에 좌우될 것이다.

[0106] 하나 이상의 제2 유효 성분 또는 활성제가 본원에 제공되는 방법 및 조성물에서 본원에 제공되는 AON 또는 이의 유도체와 함께 사용될 수 있다. 제2 활성제는 거대 분자(예를 들어, 단백질) 또는 소분자(예를 들어, 합성 무기, 유기금속성 또는 유기 분자)일 수 있다.

[0107] 거대 분자 활성제의 예는 조혈 성장 인자, 사이토카인, AON 및 단클론 및 다클론 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 전형적인 거대 분자 활성제는 천연 유래 또는 합성 또는 재조합 단백질과 같은 생체 분자이다. 제2 활성제로서 본원에 사용하기 위한 AON의 구체적인 예는 에테플러센, 카시머센, 골로더센, 빌톨라센 및 SRP-5051(Sarepta Therapeutics)을 포함한다.

[0108] 소분자의 예는 데플라자코트와 같은 코티코스테로이드를 포함한다.

[0109] 본원에 개시된 AON과 병용될 수 있는 다른 요법은 유전자 치료제[예를 들어, SRP-9001, GALGT2 또는 GNT 0004(Sarepta Therapeutics)], 유전자 편집[예를 들어, CRISPR/CAS9(Sarepta Therapeutics)] 및 세포 치료제 [예를 들어, CAP-1002(Capricor Therapeutics/Nippon Shinyaku Co. Ltd.)]를 포함한다.

[0110] VIII. 실시예

[0111] 아래 실시예는 본원에 제공되는 특정 구현예를 설명하고 본 개시의 범위를 제한하지 않도록 의도된다.

[0112] 실시예 1

[0113] **del52hDMD/mdx 마우스에 25주 동안 투여된 AON1**

[0114] hDMD del52/mdx(+/+) 및 C57BL/6J 야생형[wild-type, WT] 마우스(1일 차에 약 7주령)를 네 개의 군으로 나누고 아래와 같이 투여했다.

군	군 주	마우스 수 (M/F/혼합)	투여 물품	IV 용량 용법	용량 수준(mg/kg)	용량 부피(mL/kg)	종결 N(최종 투여 후)	
							4주	12주
1	WT	18	비히클	QW x 25W	0	8	6	12
2	del52/mdx	18	비히클	QW x 25W	0	8	6	12
3	del52/mdx	18	AON1	QW x 25W	6	8	6	12
4	del52/mdx	18	AON1	QW x 25W	18	8	6	12

[0115]

[0116] 6 mg/kg/용량의 용량은 0.92 $\mu\text{mol/kg}$ /용량과 동일하다(AON1의 MW는 6517 g/mol임). 18 mg/kg/용량의 용량은 2.76 $\mu\text{mol/kg}$ /용량과 동일하다. 따라서, 25W에 걸쳐 투여된 AON1의 총량은 6 mg/kg 용량 수준의 경우 150 mg/kg(23.00 $\mu\text{mol/kg}$)이고, 18 mg/kg 용량 수준의 경우 450 mg/kg(69.00 $\mu\text{mol/kg}$)이다.

[0117] 투여 후, 혈장 농도, 조직 분포, 농도, 엑손 도약, 전반적인 보행 점수 및 세포 보호를 분석했다. 결과는 도 1-6에 나타내었다.

[0118] 간략하게, **도 1**은 시간에 따른 AON1의 혈장 농도를 나타낸다. **도 2**는 심장, 사두근, 간, 횡격막, 비복근 및 신장 조직에서의 AON1 농도를 나타낸다. **도 3**은 AON1이 25주의 치료로 근육 조직(사두근, 비복근, 심장 및 횡격막)에서 지속적 용량 의존적 엑손 51 도약을 달성하였음을 나타낸다.

[0119] **도 4**는 심장 및 사두근에서의 디스트로핀 중량%를 나타내고, AON1[평균 $\pm$ SEM; N = 16-18(기준선, 29주) 또는 10-12(37주)]에 대한 전반적인 보행 점수를 나타낸다. 통계적 유의성: C57BL/6J 비히클과 비교하여 $\#p < 0.05$, $###p < 0.0001$; Del52/mdx 비히클과 비교하여 $*p < 0.05$, $***p < 0.0005$, $****p < 0.0001$. AON1은 25주의 치료로 디스트로핀과 보행 점수를 개선하고 유지한다. 소근육 운동 및 운동학적 보행 시험에 대한 참고 문헌: 문헌[NA Datson et al. (2020), NUCLEIC ACID THERAPEUTICS. DOI: 10.1089/nat.2019.0824.]

[0120] **도 5**는 AON1 처리가 hDMD del52(+/+) 모델-관련 근육 병리를 약화시키고, 25주 투여 후 12주 동안 약리학적 효과를 지속시킴을 나타낸다. 비히클 처리된 마우스의 비복근은 경미한 위축, 최소 괴사, 최소 염증(비핵 세포 침윤물) 및 최소 섬유증을 보였다. 대조적으로, AON1 처리된 마우스의 비복근은 다른 효과 없이 최소한의 위축을 보였다.

[0121] **도 6**은 AON 처리가 hDMD del52(+/+) 모델-관련 심장 병리를 약화시키고 12주 동안 약리학적 효과를 지속시킴을 나타낸다. 비히클 처리된 마우스의 심장 근육은 최소 위축, 최소 괴사, 최소 염증(단핵 세포 침윤물) 및 최소 섬유증을 보였다. 대조적으로, AON1 처리된 마우스의 심장 근육은 다른 효과 없이 최소 염증(단핵 세포 침윤물) 및 최소 섬유증을 보였다.

[0122] 실시예 2

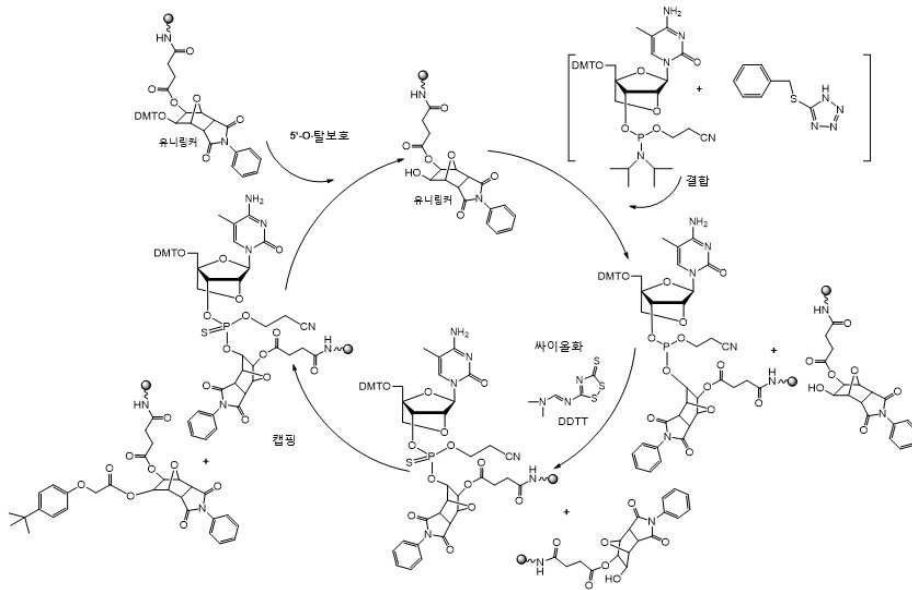
[0123] **AON1의 합성**

[0124] 올리고뉴클레오타이드, AON1은 고체 상 유기 합성에 의해 합성되었다. 합성 과정에서 중간체가 분리되거나 특성 분석되지 않았다. 합성 과정이 완료된 후, 올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체에서 절단하고, 초미세여과 및 분취용 음이온 교환[anion exchange, AEX] 크로마토그래피에 의해 탈보호 및 정제했다. HPLC 분석을 풀링한 후, 올리고뉴클레오타이드 AON1 용액을 농축시키고, 제2 초미세여과 단계에 의해 탈염시켰다. 후속 동결 건조 및 균

질화는 생성물 AON1을 배송 전에 -20 ± 5 °C에서 보관된 고체 물질로 제공했다.

[0125]

주변 온도에서 수행된 합성 주기는 (예시적인 목적을 위해 제1 주기를 사용하여) 아래에 개략적으로 나타낸다. AON1의 올리고뉴클레오타이드 사슬을 고체 지지체상에서 합성했다. 과정의 완료 후, 올리고뉴클레오타이드를 수지에서 절단하고, 정제하고, 생성된 용액을 동결 건조시켜 최종 원료의약품인 AON1을 수득했다.



[0126]

1단계: 고체 상 합성

[0127]

[0128]

AON1의 올리고뉴클레오타이드 모이어티는 플랫폼 합성을 사용하여 고체 상 유기 합성에 의해 제조되었다. 합성은 자동화되고, 결합 재활용 기술을 사용한 폐쇄 칼럼 반응을 장착하고 중간체의 분리를 수반하지 않는 합성기에서 수행했다. 범용 링커를 갖는 고체 지지체를 관통형 칼럼 반응기에 포장하고 합성을 개시했다. 각 합성 주기는 네 개의 화학적 단계로 구성되고, 전장 올리고뉴클레오타이드가 확립될 때까지 순차적으로 수행한 다음 세척했다.

[0129]

1단계 탈보호

[0130]

탈차단 또는 탈보호로 지정된 제1 단계에서, 고체 지지체를 톨루엔 중의 다이클로로아세트산으로 처리하여, 보호기인 다이메톡시 트라이틸(dimethoxy trityl, DMT)을 고체 지지체상의 UnyLinker™에서 제거했다. 1단계의 모든 나중 주기에서 탈차단은 각각 순차적으로 도입된 포스포라미다이트 또는 잠긴 아미다이트의 5'-OH에서 DMT 보호기를 제거하여 5'-DMT-오프 올리고뉴클레오타이드를 생성했다.

[0131]

2단계 활성화 및 결합

[0132]

'활성화 및 결합'으로 지정된 제2 단계는 3' 말단에서 5' 말단으로 성장하는 서열에 다음 뉴클레오타이드를 추가하는 사슬 연장 단계였다. UnyLinker™(제1 주기) 또는 5'-DMT-오프 올리고뉴클레오타이드 사슬[n](모든 다음 주기)의 비보호된 알콜기를 적합한 활성화제 용액, 예를 들어, 아세트로나이트릴 중 벤질싸이오테트라졸의 존재하에 아세트로나이트릴 또는 다이클로로메테인/아세트로나이트릴 중 상응하는 포스포라미다이트의 용액으로 처리하여 올리고뉴클레오타이드 사슬[n+1]상에 연장된 DMT를 구축했다. 최종 사슬 연장 단계는 황화 없이 DMT-TEG-포스포로아미다이트를 사용하여 AON1의 5' 말단에서 TEG기를 통합했다.

[0133]

3단계 산화/황화

[0134]

목적 골격 화학에 따라, 상응하는 포스포로싸이오에이트 또는 포스포다이에스터를 이 단계에서 황화 또는 산화에 의해 도입했다. DMT-온 올리고뉴클레오타이드 사슬[n+1]을 황화제, 예를 들어 피리딘/아세트로나이트릴 중 5-N-(다이메틸아미노)메틸렌]아미노-3H-1,2,4-다이싸이아졸-5-싸이온((Dimethylamino)methylene]amino-3H-1,2,4-dithiazole-5-thione, DDTT) 또는 산화제(예를 들어 피리딘/물 중 아이오딘)로 처리했다. 마지막 주기만이 AON1의 제조 동안 산화 단계를 포함했고 다른 모든 주기는 황화 반응을 포함한다.

[0135]

4단계 캡핑

[0136]

'캡핑'으로 지정된 4단계는 임의의 미반응 5'-OH 올리고뉴클레오타이드 사슬[n]이 후속 결합 주기에서 포스포라

미다이트와 추가로 반응하는 것을 방지하기 위해, 캡 A(아세트나이트릴/2,6-루티딘/N-메틸이미다졸) 및 캡 B(아세트나이트릴 중 삼차-부틸페녹시아세틸 아세트산 무수물)의 혼합물을 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드에 첨가함으로써 합성 주기를 완료했다. 이것은 절두된 서열의 형성을 초래했다. 모든 18개의 아미다이트에 대한 합성 주기가 완료된 후, 염기 및 골격 보호된 올리고뉴클레오타이드는 고체 상 지지체상에 결합된 채로 유지했다.

[0137] **2단계: 골격 탈보호**

[0138] 고체 상 지지체상의 올리고뉴클레오타이드는 아세트나이트릴에서 다이에틸아민으로 처리하여 포스포로싸이오에이트/포스페이트 골격에서 β -사이아노에틸 보호기를 제거했다. 반응 후 아세트나이트릴을 사용하여 세척하는 단계를 수행했다.

[0139] **3단계: 수지에서의 염기 탈보호 및 절단**

[0140] 칼럼을 주변 온도에서 수성 암모니아/에탄올과 인큐베이션한 후 수성 암모니아/에탄올로 세척했다. 합한 용액을 승온에서 인큐베이션했다. 이 2단계 절차 내에서, 미정제 올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체에서 절단하고 핵 염기 보호기를 제거했다. 생성된 용액을 여과하고, 미정제 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 여과액으로, 탈보호 용액에 용해시켜 켄칭했다.

[0141] **4단계: 초미세여과에 의한 올리고뉴클레오타이드의 탈염**

[0142] 미정제 AON1의 용액을 초미세여과막을 사용하여 초미세여과에 의해 농축시켰다. 생성된 농축액을 주사용수를 사용하여 희석여과했다. 생성된 AON1 수용액을 여과했다.

[0143] **5단계: 음이온 교환 크로마토그래피에 의한 미정제 올리고뉴클레오타이드의 정제**

[0144] 반응 혼합물을 수성 인산소듐/아세트나이트릴 완충 용액에 희석했고, 음이온 교환[AEX] 크로마토그래피에 의해 Source™ 30Q로 정제했다.

[0145] 모의 풀을 생성하고 HPLC-UV/MS로 분석했다. 분석 결과에 따라 풀링 및 추가 하류 공정을 위해 분획을 선택했다. 선택된 분획을 합하여 적절한 순도(> 85%) 및 수율의 생성물 풀을 수득했다. 이 최종 생성물 풀을 HPLC-UV/MS로 다시 분석했다.

[0146] **6단계: 초미세여과에 의한 올리고뉴클레오타이드의 탈염**

[0147] AON1의 풀링된 용액을 초미세여과막을 사용하여 초미세여과에 의해 농축시켰다. 생성된 농축액을 주사용수를 사용하여 희석여과했다. 생성된 AON1 수용액을 여과했다.

[0148] **7단계: 동결 건조된 고체로서의 올리고뉴클레오타이드**

[0149] 6단계의 농축 용액을 0.2 μ m 막을 통해 여과하고 마지막으로 동결 건조하여 최종 원료의약품을 수득했다. 동결 건조 후, 물질을 최소 24시간 동안 청정실 환경에서 평형화시켜, 최종 생성물에서 안정한 물 함량을 수득했다. 평형화된 원료의약품은 백색 내지 회백색 내지 황색 분말[mp: 약 265 °C(DSC 분해)]; 이온-쌍 역상 HPLC-UV/MS에 의한 순도 92-93%]로서 수득했다.

[0150] **실시예 3**

[0151] **50 mg/mL AON1의 제조 공정**

[0152] **완충 용액의 배합 및 임의의 바이오버든 감소 여과**

[0153] 필요한 양의 인산수소이소듐 12수화물, 인산이수소소듐 2수화물 및 염화소듐을 주사용수[water for injection, WFI]의 총량의 대략 80%에서 칭량하고, C등급 환경에서 층류 공기 흐름[laminar air flow, LAF]하에 교반했다. 부형제를 용해시킨 후, WFI를 최종 양으로 첨가한다.

[0154] 완충 용액의 배합 및 완제의약품 용액의 배합이 동일한 날에 일어나지 않는 경우, 완충 용액은 LAF하에 C등급에서 0.45/0.2 μ m 막 필터 단위를 통해 바이오버든 감소를 위해 여과한다.

[0155] **용액의 평형화, 배합 및 바이오버든 감소 여과**

[0156] 동결 건조된 AON1(실시예 2)을 C등급 환경에서 LAF하에 실온에서 12-24시간 동안 평형화시켰다. 평형화 후, 동결 건조된 AON1을 칭량하고, 응집을 피하기 위해 교반함으로써 대략 50% 완충 용액에 용해시켰다. 50 mg/mL 용

액의 최종 AON1 농도는 계산된 양의 완충 용액을 첨가함으로써 도달된다. 거품 형성을 피함으로써 200 내지 1000 rpm으로 20-30분 동안 혼합한다. 배합된 용액을 멸균 0.45/0.2 μm 막 필터 단위를 통해 바이오버튼 감소 여과했다. 배합 및 바이오버튼 감소 여과는 C등급 환경에서 LAF하에 수행된다.

[0157] 인라인 멸균 여과 및 무균 충전

[0158] AON1 용액을 0.45/0.2 μm 필터를 사용하여 두 개의 연속적인 인라인 필터 단위를 통해 멸균 여과하고 멸균 바이알을 즉시 사용할 수 있도록 무균 상태로 채웠다. 바이알은 캡핑하고 밀봉한다. 채워진 단위는 제어된 온도의 냉장 보관실에 보관된다.

[0159] AON1 조성물을 pH 7.0에서 50 mg/mL의 농도로 정맥내 주입을 위한 3 mL 등장성 멸균 방부제 무함유 용액으로서 단일 용량 바이알에 공급했다. 용기 덮개 시스템은 볼소 중합체로 코팅된 브로모뷰틸 고무 마개 및 플립오프 캡이 있는 알루미늄 마개가 있는 유형 1 유리 바이알이다. 5.25 L의 AON1 용액의 조성이 아래에 제공된다.

[0160] 5.25 L의 AON1 용액의 조성

성분	양	농도(g/L)
AON1	262.5 g	50
인산수소이소듐 12수화물	27.0 g	5.135
인산이수소소듐 2수화물	4.6 g	0.883
염화소듐	24.5 g	4.676
주사용수	qs	표적 부피에 대한 qs

[0161] qs = 충분양

[0162] 실시예 4

[0163] 투여 후 2주 또는 4주에 평가한 수컷 및 암컷 *de152hDMD/mdx* 마우스에서 13주 동안 투여되는 AON1 PS

[0164] 영국 Charles River에서 교배하고 스위스 BioLytix에서 유전자형 분석한 총 120마리의 동형 hDMD *de152/mdx* +/- 수컷 및 암컷 마우스가 시험에 사용되었다. 이 시험의 모든 hDMD *de152/mdx* 마우스는 재유도된 콜로니에서 유래했다. 또한, 연령 일치 C57BL/6J(n = 20) 마우스(Charles River, 독일)를 야생형[WT] 대조군으로 사용했다. 이 시험을 위해 다른 군을 설정할 때, 마우스의 완전한 한배 새끼가 단일 시험군에 포함되지 않고 기준선 체중을 고려하는 방식으로 마우스를 성별 당 군으로 무작위배정하여 첫 번째 처리 시작 시 군 차이가 없도록 했다.

[0165] 각 처리 일에 마우스를 칭량하고 이에 따라 용량을 조정했다. 전체 IV 주사 과정은 마우스당 5-8분이 소요되었고, 실제 주사 시간은 10-60초였다.

[0166] 모든 화합물은 등물 투여가 보장되는 농도로 제형화했고, 8 mL/kg의 주입 부피로 투여했다. 각 처리 일에 마우스를 칭량하고 이에 따라 용량을 조정했다. 예를 들어, 체중이 30 g인 마우스는 240 μL 의 IV 주사를 투여 받았다.

[0167] 마우스에 13주 동안 AON1 PS를 투여했다. 마지막 IV 주사 후 14일 차 또는 28일 차의 종점에서, 마우스를 소듐 펜토바비탈(60 mg/kg Mebunat, Orion Pharma, 핀란드)을 사용한 심부 마취에 의해 안락사시켰다. 마우스를 심장 천자하고 심장 조직을 채취했다. 조직은 액체 질소의 아이소펜테인 이중 냄비에 담가 즉시 급속 냉동시키고 드라이 아이스에서 미리 냉각된 냉동 바이알에 넣고 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관했다. 냉동된 샘플을 적격 방법에 의해 엑손 도약% 및 디스트로핀 수준에 대해 분석했다. 결과는 도 7 및 도 8에 나타낸다.

[0168] 실시예 5

[0169] 투여 후 4주 또는 8주에 평가한 수컷 및 암컷 *de152hDMD/mdx* 마우스에서 13주 동안 투여되는 AON1

[0170] 모든 마우스는 7주령에 시작하여 비히클 또는 AON1로 최대 13주의 시험 기간 동안 주당 한 번[QW] 꼬리 정맥에 IV 주사를 투여받았다. 전체 IV 주사 과정은 마우스당 5-8분이 소요되었고, 실제 주사 시간은 60초였다. 화합물을 특정 농도로 제형화하고 8 mL/kg의 주입 부피로 투여했다. 각 처리 일에 마우스를 칭량하고 이에 따라 용량을 조정했다. 예를 들어, 체중이 30 g인 마우스는 240 μL 의 IV 주사를 투여받았다.

- [0172] 85일 차에 마지막 IV 주사 후 4주 또는 8주(각각 113일 차 및 141일 차)의 수명 말기에, 심장 천자를 통한 혈액 수집 후에, 조직에서 혈액을 제거하기 위해 마우스에게 PBS를 경심 관류시켰다. 다음 조직을 수집하고 급속 동결시켰다.
- [0173] 골격근: 비복근(R), 사두근(L+R); 사두근 조직이 하나의 샘플이 되도록 양면을 하나의 바이알에 수집한다.
- [0174] 심장의 절반(각 절반에 심방과 심실이 모두 존재하도록 절개됨), 전체 횡격막, 간(2 x 전체 간의 1/3), 신장(R).
- [0175] 모든 조직은 액체 질소의 아이소펜테인 이중 냄비에 담가 즉시 급속 냉동시키고 드라이 아이스에서 미리 냉각된 냉동 바이알에 넣고 절단할 때까지 -80 °C에서 보관했다.
- [0176] 모든 군의 비복근, 사두근, 심장 및 횡격막 조직에서 엑손 도약 분석을 수행했다. 분석 작업은 적절한 역전효소 디지털 액적 중합효소 연쇄 반응[reverse transcriptase digital droplet polymerase chain reaction, RT-ddPCR] 분석 방법을 사용하여 수행하였다. hDMD 엑손 51 도약 백분율은 다음 공식에 의해 계산되었다.
- [0177]
$$(\text{인간 도약 엑손 51 사본}/20 \mu\text{L 반응물})/(\text{인간 도약 엑손 51 사본}/20 \mu\text{L 반응물} + \text{인간 미도약 엑손 51 사본}/20 \mu\text{L 반응물}) \times 100$$
- [0178] 도약 및 미도약 전사체에 대한 정량화 하한[lower limit of quantitation, LLOQ]은 임계값 접근법을 기반으로 했다. 결과는 도 9에 나타낸다. 심장 및 사두근에서의 디스트로핀 수준을 도 10에 나타낸다. 전반적인 보행 점수는 도 11에 나타낸다.
- [0179] **실시예 6**
- [0180] **인간 및 사이노몰구스 원숭이 혈청에서의 보체 활성화에 대한 AON1 PS 및 AON2의 효과에 대한 시험을 수행했다.**
- [0181] 시험 물품 투여를 위한 투여 비히클은 0.7% NaCl을 갖는 수성 인산염 완충제(pH 6.9-7.1)였고, 이를 제조하고 기준선 대조군으로서 사용했다. 적절한 양의 시험 물품(AON1 PS 또는 AON2)을 칭량하고, 교반/와류 혼합을 사용하여 10X 용량 농도로 시각적으로 투명한 용액에 용해시켰다. 측정된 무게에 보정 계수는 적용되지 않았다. 제형은 사용 전후에 냉장 보관했다(4 °C). 사용 전에, 모든 시험 물품 제형을 적어도 30분 동안 벤치탑상에서 실온까지 가온했다. 시험 물품은 제조 후 1주일 동안 4 °C로 보관하여 안정한 것으로 간주했다. 실제 중량 및 희석액을 시험 데이터에 기록했다. 이 시험에 대해 용량 분석이 발생하지 않았고, 잔류 제형은 폐기했다.
- [0182] 시험 시스템
- [0183] 시험 시스템 1: n = 3명의 정상 남성 인간 지원자(> 18세)에서의 개별 혈청.
- [0184] 시험 시스템 2. n = 3 정상 수컷 사이노몰구스 원숭이(> 3세)에서의 개별 혈청.
- [0185] 투여 경로
- [0186] 이는 시험관내 시험이었고, 시험 물품은 시험관내에서 시험 시스템에 노출되었다. 시험 물품을 1부 대 9부의 비율(1:9, v/v)로 시험 시스템에 첨가했다. 이 비율은 시험 시스템의 적절한 농도를 유지하여 보체 대조군 단백질의 농도가 충분했다.
- [0187] 용량 용법
- [0188] 혼합물을 37 °C ± 2 °C에서 30 ± 2분 동안 인큐베이션하고 분석물 시험이 있을 때까지 -80 °C에서 보관했다.
- [0189] 목표 및 시험 프로토콜
- [0190] 본 시험의 목적은 정상 남성 인간 및 사이노몰구스 원숭이 혈청에서의 인큐베이션 후 두 개의 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON1 PS 및 AON2)에 대한 보체 분할 생성물 활성화 프로파일을 평가하는 것이었다.
- [0191] 실험 설계
- [0192] 1.5 mL 폴리프로필렌 마이크로원심분리 스냅 캡관에서 270 μL의 시험 시스템을 30 μL의 제조된 10X 시험 물품과 혼합함으로써 시험을 수행했다. 모든 혼합물이 제조되면 이들을 37 °C ± 2 °C 수조로 옮기고 30 ± 2분 동안 인큐베이션했다. 혼합물을 인큐베이션한 후, 모든 샘플을 분취하고 -80 °C 이하에서 동결시켰다.
- [0193] 보체 활성화의 생분석적 분석

- [0194] ELISA에 의한 Bb 분할 생성물: 보체의 대체 경로의 활성화에 의한 인자 B 절단시 Bb가 생성된다. 시험 물품에 대한 시험관내 노출 동안 생성된 Bb의 수준은 대체 경로 활성화 수준의 척도로 작용할 수 있다. Bb ELISA는 평균 값이 보고된 중복 웰로 실행된다. 초기에 2회 회석에서 Bb의 수준을 평가하여 더 높은 활성화 샘플에 의해 검정이 포화되지 않았음을 확인했다.
- [0195] ELISA에 의한 C3a 분할 생성물: C3a는 보체의 중심점에서 C3 절단시 생성된다. 이와 같이, C3a 절단은 보체의 3개의 경로 중 임의의 경로의 활성화 후에 발생할 수 있다. C3a의 수준은 또한 아나필라톡신이기 때문에 중요하다. 시험 물품에 대한 시험관내 노출 동안 생성된 C3a의 수준은 이 중심점에 도달하기에 충분히 강한 보체 활성화 수준의 척도로서 작용할 수 있을 뿐만 아니라, 이 활성화의 직접적인 염증 촉진성 결과의 가능성의 지표로서 작용할 수 있다. C3a ELISA는 평균 값이 보고된 중복 웰로 실행된다. 초기에 2회 회석에서 C3a의 수준을 평가하여 더 높은 활성화 샘플에 의해 검정이 포화되지 않았음을 확인했다.
- [0196] 결과는 도 12 및 도 13에 나타낸다.
- [0197] 실시예 7
- [0198] 유년기 마우스 26주 독성 및 생분석 시험
- [0199] 13주 회복을 갖는 26주 유년기 독성 및 독성동태[toxicokinetic, TK] 시험에서, 수컷 CD-1 마우스[20-22/군(주요 독성 연구); 6(비히클; 멸균 식염수로 희석된 비히클 대조군 완충액), 25-31/군(TK); 21-27/군(회복)]에 0(비히클 대조군 완충제), 6, 12, 또는 18 mg/kg의 AON1을 4일에 한 번씩 PND 21에서 PND 203까지 볼루스 IV 주사를 통해 투여했다. 생분석을 위해 투여 전(PND 203에만 해당), 투여 후 0.5, 1, 3, 8 및 24시간에 PND 21 및 203에서 AON1 처리된 군에서 혈액을 수집했다. 다음 매개변수를 평가했다. 체중, 음식 섭취, 발달 표식자(귀두 포피 분리), 신경행동 평가(≍ PND 187 및 281에서 운동 활성; ≍ PND 190 및 284 청각 경련; ≍ PND 193 및 287 모리스 수중 미로), 안과 검사, 임상 병리학(임상 화학, 혈액학 및 응고), 총체 부검, 장기 중량, 및 조직 병리학.
- [0200] 이상 소견의 결여에 근거하여, 최대 무독성 용량[no observed adverse effect level, NOAEL]은 18 mg/kg/용량이었다. PND 21에서 이 용량 수준은 각각 5280 nmol/L 및 11,700 h* nmol/L의 투여 0 내지 24시간 후(AUC₀₋₂₄) 값에서 최대 관찰된 농도(C_{max}) 및 농도-시간 곡선 아래 면적에 상응한다. PND 203에서 이 용량 수준은 각각 5860 nmol/L 및 14,600 h* nmol/L의 C_{max} 및 AUC₀₋₂₄ 값에 상응한다.
- [0201] 실시예 8
- [0202] NHP 39주 독성 및 생분석 시험
- [0203] 수컷 사이노몰구스 원숭이[3/군(주요 독성 시험); 0, 6, 12, 및 18 mg/kg QW의 경우 2/군(13주 회복)]를 39주 동안 0(비히클: 0.9% NaCl 주입, USP), 6, 12, 또는 18 mg/kg의 QW AON1과 IV 주입(60분)을 통해 투여했다. 생분석/TK 및 보체 활성화 분석을 위해 상이한 시험 일/시점에 혈액을 수집했다. 다음 매개변수를 평가했다. 사망률, 임상 징후, 체중, 음식 섭취, 혈장 및 조직(비복근, 심장, 대퇴이두근, 간 및 신장)에서의 AON1 수준, 조직(비복근, 심장, 대퇴이두근, 간 및 신장)에서의 엑손 도약 백분율, 임상 병리학(임상 화학, 혈액학, 소변검사, 소변 화학 및 소변 생체표지자), 보체 활성화 지표(Bb, C3a 및 sC5b-9), 안과학, ECG, 장기 중량 및 조직병리학.
- [0204] 조직에서 AON1의 평균 농도는 274일 차에 예정된 최종 안락사 및 예정되지 않은 안락사에서 모든 AON1-처리된 군에서 정량화할 수 있었다. 평균 농도는 일반적으로 용량이 6 내지 12 mg/kg/용량으로 증가함에 따라 증가했다. 6 내지 12 mg/kg/용량 투여 단계의 274일 차에 AON1 평균 농도의 순위는 간, 신장, 심장, 비복근 및 대퇴이두근이었다.
- [0205] 조직에서 엑손 도약을 RT-ddPCR로 측정했다. 방법은 미도약된 DMD(디스트로핀) 전사체의 수, 및 엑손 51-도약된 DMD 전사체의 수를 정량화하고, 엑손 도약 백분율(도약 %)을 계산했다. 엑손 51 도약 백분율은 4.5% 내지 40.8%로 다양했고 저용량 군(6 mg/kg/QW)보다 고용량 군(12 및 18 mg/kg/QW)에서 더 높았다. 도 14를 또한 참조한다.
- [0206] AON1-관련 체중 변화는 없었고; 안과적 소견; 수의학적 관찰; 비정상적인 ECG 파형 또는 부정맥; 또는 PR 간격, QRS 지속기간, QT 또는 보정된 QT[corrected QT, QTc] 간격, 또는 심박수에 대한 효과가 관찰되었다. 18 mg/kg/용량까지 투여된 동물에 대해서는 AON1-관련 임상 병리학(혈액학 및 응고) 효과가 관찰되지 않았다. 18 mg/kg/용량까지 투여된 수컷에 대한 조기 말기 희생 또는 예정된 말기 희생에서 AON1-관련 거시적 관찰 또는 장

기 중량 효과는 관찰되지 않았다.

- [0207] 각 12 또는 18 mg/kg/용량으로 투여된 한 마리의 수컷을 각 투여 단계의 194일 차 또는 211일 차에 AON1-관련 빈사 상태에서 희생시켰다. 임상 및 수의학적 관찰은 두 동물에서 유사했고 활동 감소, 마른 외관 및 하부 몸통 및/또는 사지의 함요형성 또는 피하 부종을 포함했다. 임상 병리 소견은 염증, 질소혈증, 저알부민혈증 및 비뇨기 단백질 증가(이것이 측정되는 한 마리의 동물에서)을 나타냈다. 빈사성의 원인은 사구체 신장 손상 및 다전신성 혈관 염증에 기인했다. 예정되지 않은 희생 동물에서 AON1-관련 임상 병리 효과는 염증 반응, 체액 결핍, 가능한 위장 손실, 흥분/생리학적 반응 및/또는 명확한 기전이 없는 적당히 감소된 혈소판 수를 뒷받침했다. 예정되지 않은 희생 동물에 대한 현미경 검사 소견은 신장 세뇨관 변성/재생, 혈관 변성, 비대, 및 혈관벽 및/또는 혈관주위 조직의 염증을 포함하고, 이는 영양받은 조직(심장)에서 간질성 부종, 혈전증(폐), 및/또는 국소화된 변성 변화를 초래했을 수 있다. 부종은 또한 사구체 변화로 인해 현저히 낮은 혈청 단백질과 관련될 수 있다. 이들 소견 및 이의 후유증은 AON 치료제(문헌[Frazier Toxicol Pathol. 2015 Jan;43(1):78-89])의 맥락에서 원숭이가 앓기 쉬운 보체 매개 병인과 일치했다. NHP에서 AON에 대한 민감성이 증가한 이유는 사이노몰구스 원숭이에서 인자 H 성분의 유전학과 관련 있고, 이는 AON에 대한 인자 H의 결합을 증가시키는 것으로 이해된다. 보체 활성화를 조절하는 데 필요한 유리 인자 H의 양의 감소는 대체 경로의 주요 조절자를 제거한다.
- [0208] 보체의 대체 및 말단 경로를 포함하는 저수준 및 일시적 보체 활성화가 대조군을 포함하는 모든 투여군에서 관찰되었다. 보체 활성화의 증가는 일반적으로 대부분의 동물에서 투여 후 72시간까지 거의 투여 전 수준으로 감소했고 시험 과정에 걸쳐 활성화 수준이 증가하는 경향이 있다. 조기 말기 희생된 동물 두 마리는 투여 전 수준과 비교하여 각 113일 차 및 204일 차에 Bb 수준이 > 200% 증가했다. 이들 두 마리 동물에 대한 보체 활성화 프로파일은 관찰된 신장 손상과 관련된 보체와 일치하지만, 다른 동물 또한 측정된 보체 단편의 증가를 보였다. 동물 간의 차이는 다수의 보체 조절자가 있기 때문에 보체 활성화가 개시되면 이를 제어하는 동물의 능력에 대한 개개의 차이로 인한 것일 수 있다. AON 및 인자 H 단백질 사이의 비특이적 상호 작용을 통한 보체 활성화 기전은 인간 보체 활성화가 훨씬 더 높은 AON 혈장 농도에서 발생하기 때문에 임상적 관련성이 매우 제한적인 것으로 관찰되었다(문헌[Henry Int. Immunopharmacol. 2002;2:1657-66; Henry Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications, 2nd ed. CRC Press: Carlsbad, CA; 2008:327-63; Shen J Pharmacol Exp Ther. 2014 Dec;351(3):709-17]).
- [0209] AON1-관련 임상 병리 효과는 ≥ 6 mg/kg/용량 투여된 예정된 희생 동물에서 관찰되었다. 18 mg/kg/용량이 투여된 동물에서 투여 단계의 176일 차(알라닌 아미노기전이효소[alanine aminotransferase, ALT] 제외), 204, 211, 216 및 218일 차에 약간 증가된 ALT 및 알칼리성 인산분해효소[alkaline phosphatase, ALP] 활성은 간 장애를 시사했다. 염증 반응을 뒷받침하는 효과는 18 mg/kg/용량을 투여한 동물에서 투여 단계의 176, 204, 211, 216 및 218일 차에 약간 감소된 알부민 농도 및 증가된 글로불린 농도(이는 감소된 알부민:글로불린 비를 초래함)를 포함했고, 18 mg/kg/용량을 투여한 동물에서 투여 단계의 211, 216 및 218일 차에 약간 증가된 합토크로빈 농도를 포함했다. 또한, 알부민이 신장을 통해 소실되었는데, 이는 18 mg/kg/용량이 투여된 동물에서 투여 단계 211, 216, 및 218일 차에 약간 증가된 소변 단백질:소변 크레아티닌 비 및 소변 내 단백질의 발병률 증가에 의해 뒷받침된다. ≥ 6 mg/kg/용량이 투여된 동물에서 투여 단계 211, 216, 218, 225, 239, 253, 260, 267, 및 274일 차에 약간 내지 적당히 증가된 마이크로알부민:크레아티닌 비는 또한 신장을 통한 알부민 손실을 뒷받침했다. 18 mg/kg/용량이 투여된 동물에서 투여 단계 211, 216 및 218일 차에 약간 증가된 클러스테린:크레아티닌 비는 신장 손상을 뒷받침했다. 추가적인 효과는 ≥ 6 mg/kg/용량이 투여된 동물에서 투여 단계의 176, 204, 211, 216, 218, 225, 239, 253, 260, 267, 및 274일 차에 용량 비의존적이고 약간 감소된 혈소판 수이고, 이는 명확한 기전이 없었다. 보통의/현저한 혈소판 감소증으로 이어지는 혈소판 수의 감소는 18 mg/kg QW군의 동물 두 마리에서 관찰되었지만 임의의 해부학적 병리 소견과는 관련이 없었다. 예정된 희생 동물에서는 AON1-관련 응고 효과가 관찰되지 않았다.
- [0210] 투여 단계의 218일 차에 18 mg/kg/용량이 투여된 조기 말기 희생 동물 두 마리 및 예정된 말기 희생 동물에서의 현미경 검사 소견은 한 마리 동물에서의 신장 세뇨관 상피의 최소 변성 및 또 다른 동물의 간에서의 최소 혼합 세포 염증을 수반했고, 이는 증가된 간 효소 값과 상관관계가 있었다. 소견은 각 신장 세뇨관 상피 또는 쿠퍼 세포 내에 AON1의 축적으로 인한 것이었다. 빈사 상태 및 조기 희생 동물에서 일반적인 추가 AON1-관련 소견에는 심장 판막에서 경미하거나 보통의 단핵 세포 침윤 및 여러 조직에서 단핵 세포 침윤의 발병률이 증가하는 경향이 포함되었다. 이들 소견은 투여와 관련된 전신 염증 및/또는 보체 활성화의 존재를 반영했을 가능성이 있고 판막 변화를 제외하고 원숭이에서 공통적으로 관찰되는 우발적 소견의 악화로 간주되었다. 모든 동물에서, AON1의 축적과 관련된 관찰은 신장 세뇨관 상피 및 쿠퍼 세포에서의 호염기성 과립(일반적으로 용량 관련 방식으로)

및 다수의 조직, 가장 주목할 만하게는 림프절에서의 변경된 포말성 및/또는 약간 호염기성 세포질을 특징으로 하는 대식세포의 존재를 포함했다. 축적은 ≥ 12 mg/kg/용량이 투여된 동물의 주변 조직에 대한 손상과 관련이 없는 것으로 보였고 대식세포 변경은 어떤 용량에서도 손상과 관련이 없는 것으로 보였다. 회복 안락사 시, ≥ 6 mg/kg/용량이 투여된 동물의 신장에서 최소 호염기성 과립, 간의 쿠퍼 세포의 최소 색소, 및 아래턱 및/또는 장간막 림프절에서 최소 내지 보통의 액포성/색소성 대식세포 침윤물에 의해 입증된 바와 같이 현미경 검사 소견은 가역성을 향한 경향을 보였다. 또한, 최소 액포성/색소성 대식세포 침윤물은 각 12 또는 18 mg/kg/용량이 투여된 한 마리 동물의 위장관 및 방광(이 원숭이 시험에서 이행 세포 변성/액포 형성이 관찰되지 않음) 및 18 mg/kg/용량이 투여된 한 마리 동물의 고환에서 관찰되었다.

[0211] AON1을 투여받은 남성의 건강 및 웰빙에 대한 전반적인 영향의 관점에서 임상 병리 상태 및 해부학적 병리 소견의 중증도에 기초하여, 최대 무독성 용량[NOAEL]은 6 mg/kg/용량으로 간주되었고, 이는 17,000 nmol/L의 평균 최대 관찰 농도(C_{max}) 및 투여 단계 260일 차에 36,500 h*nmol/L의 농도-시간 곡선 아래 면적(AUC_{0-25})에 상응한다.

[0212] 실시예 9

[0213] 인간 최초 용량 선택

[0214] 임상시험(실시예 10)의 제안된 용량 및 기간은 안전성뿐만 아니라 시험에 등록된 각 소아 참가자에게 직접적인 유익성의 가능성을 보장하기 위해 선택했다.

[0215] 제1 인간 임상시험(실시예 10)은 AON1의 6개 용량 수준, 즉 IV 투여된 0.6 mg/kg, 1.5 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 9 mg/kg, 및 12 mg/kg까지의 순차적 평가를 포함한다.

[0216] 임상시험(실시예 10)의 시작 용량은 수컷 사이노몰구스 원숭이(18 mg/kg/주)에서 GLP 13주 반복-용량 독성 시험에서의 AON1의 NOAEL을 사용하여 결정했다(실시예 13). 18 mg/kg QW의 원숭이 NOAEL의 인간 등가 용량[Human Equivalent Dose, HED]은 체표면적 스케일링 접근법에 기초하여 5.8 mg/kg QW이다. 따라서, 선택된 시작 용량 0.6 mg/kg은 원숭이를 기준으로 10배의 안전역을 제공하고, 이는 원숭이가 보체 활성화 및 이에 따른 염증 반응에 더 민감하기 때문에, 위험 확인을 위한 더 적절한 중으로 간주되며, 이는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 클래스 효과 중 하나로 간주된다(후자는 원숭이에서 비임상 독성의 일차 공급원임)(문헌[Shen J Pharmacol Exp. Ther. 2014 Dec;351(3):709-17]). 원숭이를 사용하면 인간에서 예상할 수 있는 것과 양적 및 질적으로 유사한 임의의 이상 반응을 식별할 가능성을 최대화할 수 있다는 것은 널리 받아들여진다(문헌[Farman Toxicol Pathol. 2003;31:119-122]).

[0217] 매주 1회의 투여 간격과 비교하여 AON1의 짧은 혈장 반감기로 인해 예상되는 낮은 축적을 감안할 때, 코호트 1A(파트 1)에 대해 2주마다 투여 수준을 증가시키는 것은 치료 용량 수준 이하에서 개별 참가자에 대한 노출 기간을 최소화하기에 적절한 것으로 간주된다. 2 내지 2.5배 용량 증가는 비임상 데이터가 안전할 가능성이 있음을 나타내는 용량을 통해 개별 참가자의 안전하고 효율적인 증가를 허용한다. 39주 차 시험에서 관찰된 독성학 소견은 만성 투여와 관련되고 임상시험에서 초기 단일 증가 용량으로는 예상되지 않는다(실시예 10).

[0218] 포스포로싸이오에이트 올리고뉴클레오타이드에 대한 혈장 노출은 동일한 mg/kg 용량에 대해 NHP 및 DMD 환자 사이에서 유사한 것으로 이전에 나타났고(문헌[Bosgra Nucleic Acid Ther. 2019;29(6):305-322]), 따라서, 체표면적 스케일링의 사용은 체중 스케일링보다 임상시험의 단일 증가 용량 부분에 대한 시작 용량 선택을 위한 보다 보수적인 접근법을 제공한다. 임상시험의 반복 용량 단계의 경우 NHP에서 인간에 대해 직접 체중 기반(mg/kg) 추론법을 적용하고 6, 9 및 12 mg/kg QW의 순차적 평가를 제안한다.

[0219] 정상 상태에서 디스트로핀 발현이 정상 $> 10\%$ 일 것으로 예상되는 약리학적 활성 용량이기 때문에, 각 소아 참가자에게 직접적인 유익성이 있을 가능성이 있도록 반복 용량 단계에 대한 6 mg/kg QW의 시작 용량을 선택한다. DMC는 4주 차에 걸쳐 투여 코호트에 대한 안전성 데이터를 검토하고 용량 증가에 대한 권장 사항을 제공할 것이다.

[0220] 관리 가능한 안전성 프로파일을 갖는 BMN 351을 사용한 치료의 잠재적인 유효성을 최대화하기 위해 선택된 12 mg/kg/주의 최대 용량은 만성 독성학 시험에 의해 정당화되고 확인된다.

[0221] • 전반적으로, 만성 독성학 시험[39주 원숭이 시험(실시예 8), 26주 마우스 시험(실시예 11), 및 유년기 마우스 시험(실시예 7)]에서의 주요 독성 신호는 모두 임상적으로 모니터링 가능한 포스포로싸이오에이트 올리고뉴클레오타이드에 의해 유도된다.

고뉴클레오타이드의 주지된 클래스 효과와 일치한다.

- [0222] • 용량 제한 독성이 39주 원숭이 시험에서 관찰되었고, 여기서 NOAEL은 6 mg/kg/주인 것으로 결정되었다. 39주 원숭이 시험에서 확인한 NOAEL 초과 투여(6 mg/kg/주)는 ≥ 12 mg/kg QW에서의 용량 제한 독성이 NHP가 다른 전임상 종 및 인간과 비교하여 과장된 민감성을 갖는 것으로 공지된 보체 매개 효과와 일치하는 것으로 나타나므로 적절한 것으로 간주한다(문헌[Barbour Nephrol Dial Transplant. 2013 Jul;28(7):1685-93; Shen J Pharmacol Exp Ther. 2014 Dec;351(3):709-17]). 이와 같이 보체 매개 효과는 임상 안전역을 제공하는 것보다 위험 식별로 간주해야 한다. 보통의/현저한 혈소판 감소증으로 이어지는 시간 경과에 따른 혈소판 수의 감소는 39주 원숭이 시험의 18 mg/kg QW군의 동물 두 마리에서 관찰되었지만 임의의 해부학적 병리 소견과는 관련 없다. 혈소판 감소는 진료 현장에서 모니터링할 수 있다.
- [0223] 비임상시험을 바탕으로 간, 신장, 혈액학적(혈소판 감소증), 및 응고계, 혈관계(염증성 변화)를 인체 독성 표적 기관으로 확인했다.
- [0224] 위해성 모니터링 및 완화 활동은 기관 특이적 독성 생체표지자 사용, 명확하게 요약된 DLT 기준 및 시험 중단 기준을 포함한 빈번한 임상 및 실험실 모니터링을 통해 수행할 것이다. 안전성 데이터는 데이터모니터링위원회 [Data Monitoring Committee, DMC]가 용량 증량, 용량 감량, 신규 코호트 개설, 또는 코호트 확대를 권고하기 전에 평가할 것이다.
- [0225] **실시예 10**
- [0226] **뒤시엔느 근이영양증 참가자에서 AON1의 안전성, 내약성, 약동학 및 약력학을 평가하기 위한 1/2상 용량 증량 시험**
- [0227] 이 시험은 정맥내[intravenous, IV] 주입을 통한 6가지의 증량 용량에서 AON1의 안전성 및 내약성을 조사할 것이다. 뒤시엔느 근이영양증[DMD]의 진행성을 감안할 때, 이는 공개 라벨 시험이고 모든 참가자는 AON1을 투여받는다. 제안된 용량 및 시험 기간은 시험에 등록된 각 소아 참가자에게 직접적인 유익성의 가능성을 제공할 뿐만 아니라 안전성을 보장하기 위해 선택한다. 사용될 완제의약품은 실시예 3에 기재되어 있다.
- [0228] 원숭이에서 중추적인 13주 GLP 독성 시험에서 최대 무독성 용량[NOAEL]은 18 mg/kg QW인 것으로 결정되었고, 따라서, 인간 등가 용량[HED]은 체표면적 스케일링 접근법에 기초하여 5.8 mg/kg QW이다. 따라서, 0.6 mg/kg의 선택된 시작 용량은 원숭이를 기준으로 10배의 안전역을 제공하고, 이는 위험 확인에 더 관련되는 것으로 여겨지며, 이는 원숭이가 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 클래스 효과 중 하나인 보체 활성화 및 이에 따른 염증 반응에 민감하기 때문이다(문헌[Shen L, Frazer-Abel A, Reynolds PR, et al. Mechanistic understanding for the greater sensitivity of monkeys to antisense oligonucleotide-mediated complement activation compared with humans. J Pharmacol Exp Ther. 2014 Dec;351(3):709-17]). 낮은(2 내지 2.5배) 용량 적정은 임의의 잠재적인 용량 의존적 안전성 신호의 조기 검출 가능성을 더 증가시켜 조기 중재를 허용할 것이다.
- [0229] 각 6가지 용량 수준(0.6 mg/kg, 1.5 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 12 mg/kg, 및 18 mg/kg)에서 참가자의 투여는 이 클래스의 분자에 대한 이전의 안전성 경험에 기초한 간격으로 시간차를 둘 것이다. 데이터모니터링위원회 [DMC]는 용량 증량, 용량 감량, 신규 코호트 개설, 또는 코호트 확대 등을 권고하기 전에 이용 가능한 안전성 데이터를 평가할 것이다. 이 설계는 용량 증량 전에 안티센스 올리고뉴클레오타이드(AON)의 공지된 클래스 효과인 급성 안전성 사례를 포함한 참가자 안전성의 주의 깊은 모니터링 및 필요한 경우, 개별 및 시험 중단 규칙의 구현이 포함된다.
- [0230] 용량 반응을 평가하고 추가 임상 개발을 위한 용량 선택에 대한 통찰력을 제공하기 위해 안전성, 내약성 및 약동학[pharmacokinetics, PK]과 함께 디스트로핀 발현을 통한 개념 증명을 입증하기 위해 시험을 수행하고 있다. 시험에 따르면 근육에서 디스트로핀의 양이 더 많을수록 질환 표현형이 덜 중증이 된다(문헌[de Feraudy et al. Ann Neurol. 2021;89(2):280-292]); 따라서, 디스트로핀 발현의 증가는 이 시험에서 의미 있는 결과이다.
- [0231] 혈장 PK 및 근육 분포는 용량, 혈장 및 근육 노출, 엑손 도약, 및 디스트로핀 발현 사이의 관계를 조사하기 위해 평가할 것이다.
- [0232] 근육에서의 AON1 분포, 엑손 도약, 및 디스트로핀 수준의 관독은 모든 참가자가 6 mg/kg, 9 mg/kg, 및 12 mg/kg 용량 수준에서 12(코호트 1A, 파트 2) 또는 24주(코호트 1B, 2, 및 3) 치료를 완료한 후에 발생되어 향후 임상 개발로 진행하기 위한 최적의 내약성 용량(들)을 결정할 것이다.

[0233]

이것이 완료되면, 참가자는 계획된 기간이 적어도 1년인 장기 연장[long term extension, LTE] 시험에 등록할 수 있다. 연장 단계에 대한 근거는 더 긴 기간에 걸쳐 DMD를 앓는 참가자에서 AON1의 안전성, 내약성, PK 및 약력학[pharmacodynamic, PD] 효과를 평가할 뿐만 아니라, 종방향으로 참가자 기능 변화를 평가하고 잠재적으로 짝지어진 외부 대조군과 비교하는 것이다. 질환의 자연사를 감안할 때 관련된 연장 시험은 이 시험 설계의 필수 구성 요소이다.

목적	평가변수
일차	
DMD를 앓는 참가자에서 상이한 용량 수준에서 AON1의 안전성 및 내약성을 평가하기 위함	- 이상 사례/SAE/AESI의 발생률 - 신체검사 - 실험실 안전 시험 매개변수 - ECG 매개변수 - 심장초음파검사
이차	
AON1의 혈장 및 소변 약동학 및 근육 분포를 평가하기 위함	- AON1 혈장 PK AUC_{0-t}, AUC_{0-inf} C_{max}, C_{trough} T_{max}, CL, V_{ss}, $t_{1/2}$ - AON1 소변 PK $A_{eq-24시간}$, CL_R 13주차(코호트 1A) 또는 25주차(코호트 1B, 2 및 3)에 근육 내 AON1 농도
탐색	
DMD를 앓는 참가자에서 근육에서의 엑손 51 도약 및 디스트로핀 발현에 대한 AON1의 효과를 평가하기 위함	- 근육 생검에서의 디스트로핀 발현[13주차(코호트 1A) 또는 25주차(코호트 1B, 2 및 3)에 기준선에서의 변화] - 엑손 도약 효율(근육 생검에서의 디스트로핀 메신저 라이보핵산[messenger ribonucleic acid, mRNA]상의 RT-ddPCR)[13주차(코호트 1A) 또는 25주차(코호트 1B, 2 및 3)에 기준선에서의 변화]
AON1에 대한 면역 반응을 평가하기 위함	- 항-AON1 항체 - 항-디스트로핀 항체
AON1이 물리적 기능에 미치는 영향을 평가하기 위함	- NSAA(25주차에 기준선에서의 변화) 6MWT(25주차에 기준선에서의 변화)
AON1을 투여받는 참가자의 자살 위험을 평가하기 위함	아동 행동 평가 척도[Child Behavior Checklist, CBCL]

[0234]

[0235]

6MWT, 6분 보행 시험; AE, 이상 사례; AESI, 특별 관심 대상 이상 사례; AUC_{0-t} , 시간 0에서 마지막 시점까지의 농도-시간 곡선 아래 면적; AUC_{0-inf} , 시간 0에서 무한대 시간까지의 농도-시간 곡선 아래 면적; CBCL, 아동 행동 평가 척도; CL, 청소율; C_{max} , 최대 농도; C_{trough} , 최저 혈장 농도; DMD, 뒤시엔느 근이영양증; ECG, 심전도; mRNA, 메신저 라이보핵산; NSAA, NorthStar 보행 평가; PK, 약동학; RT-ddPCR, 역전사효소 디지털 액적 증합효소 연쇄 반응; SAE, 중대한 이상 사례; $t_{1/2}$, 반감기; T_{max} , 최대 농도까지의 시간; V_{ss} , 정상 상태에서 분포 용적

[0236]

이 시험은 엑손 51 도약을 적용할 수 있는 DMD를 앓는 참가자에서 IV AON1의 6가지 증량 용량의 안전성, 내약성, 약동학 및 약력학을 평가하기 위한 용량 증량 시험이다. 이는 1/2상 공개 라벨 시험이고 무작위배정은 계획하지 않는다. 데이터는 개별 참가자의 기준선 데이터와 비교한다. 시험에 적격하려면 잠재적 참가자는 다음

선택된 주요 포함 기준을 포함하여 임상시험계획에 기재된 모든 자격 요건을 충족해야 한다.

- [0237] • 선별에서 남성이자 4세에서 10세
- [0238] • 중양 유전 상담자에 의해 검토된 엑손 51 도약을 적용할 수 있는 DMD 유전자에서의 디스트로핀 돌연변이 기록으로 인한 뒤시엔느 근이영양증의 임상 진단
- [0239] • 보조 장치 없이 독립적으로 걸을 수 있고 8초 이하로 적정한 10미터 걷기/달리기 시험을 완료할 수 있는 것으로 정의된 선별 시 이동성
- [0240] • 현재 주간 호흡기에 의존하지 않으며 다음 연도 내에 주간 기계적 또는 비침습적 환기가 필요하지 않을 것으로 예상됨
- [0241] • 현재 경구 코티코스테로이드로 치료를 받고 있고, 기준선 이전에 적어도 12주 동안 안정적인 용량으로 치료를 받고 있고, 체중 변화를 수용하기 위한 수정을 제외하고는 시험 전반에 걸쳐 일관된 용량/용량 용법으로 유지되어야 함
- [0242] • 사전 지정된 실험실 값에 기반한 정상 신장 기능
- [0243] 선택된 주요 제외 기준은 다음을 포함한다.
- [0244] • 7세 이상 아동의 경우, 강제 호기량[forced expiratory volume, FEV₁] < 예측치의 60%
- [0245] • 현재의 간 또는 신장 질환 또는 이의 병력
- [0246] • 선별 전 또는 선별 방문 시 3개월 이내에 수행한 심초음파상[echocardiogram, ECHO]을 기준으로 좌심실 박출률[left ventricular ejection fraction, LVEF] < 55%
- [0247] • 3회 수행한 심전도[ECG]에서 프리데리시아 방법으로 보정된 QT 간격[QT interval corrected with Fridericia's method, QTcF] 평균 ≥ 450 msec
- [0248] • 선별에서 < 150 x 10⁹/L의 혈소판 수
- [0249] • 기준선(1일 차)의 12주 전에 임의의 엑손 51 도약 요법 또는 임의의 시점에 DMD의 치료를 위한 임의의 유전자 치료제를 이용한 치료
- [0250] 적격 참가자는 코호트 1(n=6), 코호트 2(n=3) 또는 코호트 3(n=6)의 3개 코호트 중 1개에 배정될 것이다. 코호트 1 참가자는 코호트 1A(n=3)와 코호트 1B(n=3)로 더 구분된다. 코호트 1A(파트 1)에서, 참가자는 0.6 mg/kg, 1.5 mg/kg, 3 mg/kg 및 6 mg/kg의 AON1의 단일 증가 용량을 받게 되고, 이어서 안전성 데이터가 다음 더 높은 용량으로 증량시키기 전에 평가되거나, 6 mg/kg 용량의 경우에 만성 용량으로 증량시키기 전에 평가되는 경우에 1주 투여 휴일에 의해 각 용량 수준에서 투여받게 될 것이다. 코호트 1A(파트 2)에서, 참가자는 비임상 데이터에 기초하여 정상 상태에서 대략 10%의 디스트로핀 발현을 초래할 것으로 예상되는 용량인 6 mg/kg의 AON1을 매주 투여받는다. 코호트 1B 참가자는 6 mg/kg QW를, 코호트 2 참가자(n=6)는 9 mg/kg QW를, 코호트 3 참가자(n=6)는 12 mg/kg QW를 투여받을 것이다. 상세한 용량 증량 절차는 아래에 기재되어 있다.
- [0251] DMC는 안전성을 모니터링하고 용량 증량 권장 사항을 제공한다. 용량 제한 독성[Dose-limiting toxicity, DLT] 기준은 0.6 mg/kg, 1.5 mg/kg, 3 mg/kg 및 6 mg/kg의 단일 용량 후 1주 평가를 통한 기간에 적용 가능하다[코호트 1A(파트 1)만]. 코호트 1A(파트 2), 1B, 2, 및 3의 경우 코호트 내 최종 참가자의 4주 차 평가를 통해 DLT 기준을 적용할 수 있다. 시험 중단 기준은 모든 참가자에 대해 시험 전반에 걸쳐 적용 가능하다. 최대 허용 용량[maximum tolerated dose, MTD]에 도달했는지 여부에 따라 최대 18명의 참가자를 등록할 것이다.
- [0252] AON1은 코호트 1A(파트 1) 참가자(n = 3)에 대해 0.6 mg/kg의 시작 용량으로 투여하고, 참가자의 투여 사이에 적어도 9일의 간격이 있다. 코호트 1A(파트 1) 참가자는 2주 차 방문 시 투여하지 않을 것이다. DMC는 2주 차까지 각 참가자의 안전성 데이터를 검토하고 DLT가 없는 경우 참가자에게 1.5 mg/kg으로 증량(또는 DLT가 있는 경우 6명의 참가자로 코호트 확대)할 것을 권장한다. 코호트 1A(파트 1) 참가자는 3주 차에 1.5 mg/kg의 AON1을 투여 받게 되고, 그 후 DMC는 4주 차까지 각 참가자의 안전성 데이터를 검토하고 DLT가 없는 경우 참가자에게 3

mg/kg으로 증량하도록 (또는 DLT가 있는 경우 6명의 참가자로 코호트를 확대하도록) 권고할 것이다. 코호트 1A(파트 1) 참가자는 4주 차 방문 시 투여받지 않을 것이다. 코호트 1A(파트 1) 참가자는 5주 차에 3 mg/kg의 AON1(단일 용량)을 투여받게 되고, 그 후 DMC는 6주 차까지 각 참가자의 안전성 데이터를 검토하고 DLT가 없는 경우 참가자에게 6 mg/kg으로 증량하도록 (또는 DLT가 있는 경우 6명의 참가자로 코호트를 확대하도록) 권고할 것이다. 코호트 1A(파트 1) 참가자는 6주 차 방문 시 투여받지 않을 것이다. 코호트 1A(파트 1) 참가자는 7주 차에 6 mg/kg의 AON1(단일 용량)을 투여받게 되고, 그 후 DMC는 8주 차까지 각 참가자의 안전성 데이터를 검토하고 DLT가 없는 경우 매주 6 mg/kg으로 투여하여 파트 2를 개시하도록 (또는 DLT가 있는 경우 파트 1에서 6명의 참가자로 코호트를 확대하도록) 권장할 것이다. 코호트 1A(파트 1) 참가자는 8주 차 방문 시 투여받지 않을 것이다.

[0253] DLT가 코호트 1A 참가자 중에 발생하는 경우, 추가적인 참가자 3명을 DLT가 발생한 용량 수준에서 등록한 다음, 코호트 1A(파트 1)에 대해 위에 요약된 용량 증량 규칙에 따라 개별적으로 용량 증량된다.

[0254] 8주 차 이후의 방문은 코호트 1A 참가자에 대한 파트 2의 시작일 것이고, 6 mg/kg QW 용량 수준에 대한 기준선(1주 차) 방문으로 지정된다. 6 mg/kg QW에서 코호트 1A(파트 2) 참가자의 투여는 적어도 9일 간격으로 떨어질 것이다. 모든 3명의 코호트 1A 참가자가 파트 2에서 6 mg/kg QW로 3회 용량을 투여받고 세 번째 참가자가 4주 차 평가를 완료한 후, DMC는 이용 가능한 안전성 데이터를 검토하고, DLT가 없는 경우 6 mg/kg QW로 투여하기 위해 코호트 1B를 개방할 것을 권고할 것이다.

[0255] 6 mg/kg QW에서 코호트 1B 참가자의 투여는 적어도 9일 간격으로 떨어질 것이다. 모든 3명의 코호트 1B 참가자가 파트 2에서 6 mg/kg QW로 3회 용량을 투여받고 마지막 참가자가 4주 차 평가를 완료한 후, DMC는 모든 6명의 코호트 1 참가자에 대해 이용 가능한 안전성 데이터를 검토하고 DLT가 1개 이하인 경우 9 mg/kg QW로 투여하기 위해 코호트 2를 개방할 것을 권고할 것이다.

[0256] AON1은 코호트 2 참가자(n = 6)에 대해 9 mg/kg QW로 투여하고, 참가자의 투여 사이에 적어도 9일의 간격이 있을 것이다. 모든 6명의 코호트 2 참가자가 3회 용량을 투여 받고 마지막 참가자가 4주 차 평가를 완료한 후, DMC는 이용 가능한 안전성 데이터를 검토하고 DLT가 1개 이하인 경우 12 mg/kg QW로 투여하기 위해 코호트 3을 개방할 것을 권고할 것이다.

[0257] AON1은 코호트 3의 모든 참가자(n = 6)에 대해 12 mg/kg QW로 투여하고, 참가자의 투여 사이에 적어도 9일의 간격이 있을 것이다.

[0258] 2명 이상의 참가자가 주어진 코호트에서 DLT를 경험하는 경우, MTD가 초과되었을 것이고, 추가적인 용량 증량은 추구되지 않을 것이다. DMC는 데이터 검토 후, 이전 코호트를 확대하거나, 중간 용량을 낮추거나, 시험을 중단할 것을 권고할 수 있다.

[0259] 일 차 안전성 평가 평가변수는 위의 '목적 및 평가변수' 표에 나열되어 있다. 시험의 이차 목적은 혈장 및 소변 PK 및 AON1의 근육 분포의 평가를 포함한다. 모든 참가자는 선별 및 13주 차(코호트 1A) 또는 25주 차(코호트 1B, 2 및 3)에 근육 생검을 받을 것이다. 코호트 3(12 mg/kg QW)의 모든 6명의 참가자가 25주 차 평가를 완료한 후, 모든 데이터를 평가하여 계획된 장기 연장[LTE] 시험을 위한 용량(들)을 결정할 것이고, 이는 이 시험을 완료하고 계획된 기간이 적어도 1년인 모든 참가자에게 개방될 것이다. LTE 시험의 세부 사항은 별도의 임상시험 계획에 명시될 것이다. 용량(들)이 결정되고 LTE 시험이 등록을 위해 개방되면, 이 시험의 참가자는 LTE 시험으로 전환하거나 AON1의 최종 투여 4주 후에 이들의 시험 완료 방문을 할 것이다. LTE 시험이 개방될 때까지, 투여 및 평가는 이 시험에서 계속될 것이다.

[0260] 마지막 참가자가 25주 차에 용량을 투여 받은 후, DMC는 모든 참가자 데이터를 검토할 것이다. 결과 및 DMC 권고 사항에 기초하여, 임상시험의뢰자는 LTE 시험을 위한 용량(들)을 결정할 것이다. LTE에 대한 용량(들)의 임상시험의뢰자의 결정을 통해 모든 예정된 방문을 완료한 경우 참가자는 시험을 완료한 것으로 간주한다. 보건 당국 허가 또는 승인 후, 및 참가자의 시험기관이 LTE에 대한 IRB/EC 승인을 받은 후에, 참가자는 LTE에서 투여를 시작할 수 있다. 참가자가 LTE에 등록하기 전 마지막 방문 날짜에 시험을 완료한다. LTE 시험 동안, 참가자는 12 mg/kg의 AON1 또는 이 시험 동안 결정된 최고 허용 용량(들)을 투여받을 것이다.

[0261] 실시예 11

[0262] 수컷 CD-1 마우스에서의 AON1 26주 독성 시험의 평가

[0263] 수컷 CD-1 마우스[10 또는 15/군(주요 독성 시험)] 및 13주 회복 단계 후에 안락사된 0 및 18 mg/kg 용량군 중

의 5/군까지의 주요 독성 동물; 4(비히클 대조군) 및 19/군(독성동태[toxicokinetic, TK])을 총 26주의 기간 동안 0(비히클: 0.9% NaCl 주입, USP), 6, 12, 또는 18 mg/kg을 매주 2회 AON1과 함께 저속 볼루스 IV 주사를 통해 투여했다. 생분석을 위해 1일 차 및 176일 차의 투여 후 0(투여 후 2분 이내), 0.33, 1, 3, 8 및 24시간에 혈액을 수집했다. 다음 매개변수를 평가했다. 사망률, 임상 징후, 체중, 음식 섭취, 안과 검사, 임상 병리학(즉, 임상 화학, 혈액학 및 응고), 총체 부검, 장기 중량, 및 조직병리학.

[0264] 생분석 및 조직 분포

[0265] 혈장 노출(C_{max} 및 AUC_{0-24} 에 기초함)은 일반적으로 용량 비례 방식으로 용량이 증가함에 따라 증가했다. AON1의 다회 투여 이후 수컷 마우스에서는 축적이 관찰되지 않았다.

[0266] 수컷 마우스 조직에서 AON1의 평균 농도는 모든 처리군에서 178일 차에 측정 가능했다. 평균 농도는 일반적으로 용량이 6 내지 18 mg/kg/용량으로 증가함에 따라 증가했다. 용량 수준에 걸쳐 AON1의 평균 농도의 순위는 간, 신장, 심장, 비복근 및 대퇴이두근이었다.

[0267] 매주 2회 최대 18 mg/kg/용량을 투여한 동물의 건강 및 웰빙에 대한 영향의 부족 및 해부학적 병리 소견의 경증의 중증도로 인해, 최대 무독성 용량[NOAEL]은 매주 2회 18 mg/kg/용량이었고, 이는 투여 단계 176일 차에 각 37,700 nmol/L 및 14,700 h*nmol/L의 평균 최대 관찰 농도(C_{max}) 및 농도-시간 곡선 아래 면적(AUC_{0-24})에 상응한다.

[0268] 실시예 12

[0269] 사이토크롬 P450 억제 및 유도

[0270] AON1이 CYP 효소를 억제하는 가능성을 0.1 내지 100 μ M AON1과 함께 인큐베이션된 인간 간 미세소체에서 평가했다. 검정의 타당성은 각 동종효소에 대한 양성 대조군(즉, 참조 화합물)으로 확인했다. CYP1A2의 직접적인 억제에 대한 IC_{50} 값은 7.85 μ M인 반면, CYP2C8 및 CYP2C19의 직접적인 억제에 대한 IC_{50} 값은 > 100 μ M이었다. 미세소체 단백질 결합을 고려한 후, CYP1A2, CYP2C8 및 CYP2C19의 직접적인 억제에 대한 미결합 IC_{50} 값은 각 0.09, > 1.27 및 > 1.08 μ M이었으며, 이는 18 mg/kg의 최대 용량에서 18 μ M의 예측된 인간 혈장 C_{max} 보다 낮았다. AON1의 혈장 단백질 결합을 시도했고 여과 장치에 대한 높은 수준의 비특이적 결합으로 인해 평가할 수 없었다. CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4/5(기질 = 테스토스테론 또는 미다졸람)의 직접적인 억제는 없었다. 문헌에 기초하여, CYP 효소의 포스포로싸이오에이트 기반 올리고뉴클레오타이드 억제는 시험 시스템 의존적이었고, 포스포로싸이오에이트 기반 올리고뉴클레오타이드에 의한 CYP 효소의 억제는 인간 간 미세소체에서 관찰되었고 냉동보존된 인간 간세포에서 관찰되지 않았다(문헌[Kazmi Drug Metab Dispos. 2018 Aug;46(8):1066-1074.] <https://dmd.aspetjournals.org/content/dmd/46/8/1066.full.pdf>에서 이용 가능). 냉동보존된 인간 간세포는 CYP 효소의 포스포로싸이오에이트 기반 올리고뉴클레오타이드 억제를 위한 약물-약물 상호작용의 시험관 내 내지 생체내 추론에 사용하기 위한 보다 임상적으로 관련된 억제 프로파일을 제공한다. AON1이 또한 포스포로싸이오에이트 기반 올리고뉴클레오타이드임을 감안하여, 미세소체는 생체내 조건을 나타내지 않을 수 있다.

[0271] 이를 위해, 동결보존된 인간 간세포를 사용한 추가 조사를 수행했고, AON1이 평가된 모든 CYP에 대해 100 μ M 초과인 IC_{50} 값을 갖는 CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 또는 CYP3A4/5의 직접 또는 시간 의존성 억제제가 아님을 입증했다.

[0272] CYP 효소를 유도하는 잠재력은 100 μ M AON1과 함께 인큐베이션된 간세포에서 평가했다. 검정의 타당성은 각 동종효소에 대한 양성 대조군(즉, 참조 화합물)으로 확인했다. CYP 유도에 대한 시험관내 검정은 CYP1A2, CYP2B6 및 CYP3A4가 전사 수준에서 AON1에 의해 유도되지 않았다.

[0273] 실시예 13

[0274] 13주 동안 처리된 수컷 사이노물구스 원숭이에서 AON1의 평가

[0275] 수컷 사이노물구스 원숭이[3/군(주요 독성 시험); 0, 12, 및 18 mg/kg QW 의 경우 2/군(4주 회복)]를 13주 동안 0(비히클: 0.9% NaCl 주입, USP), 6, 12, 또는 18 mg/kg의 QW AON1과 IV 주입(60분)을 통해 투여했다. 생분석을 위해 1일 차 및 85일 차에 투여 전, 및 투여 후 0.5, 1, 2, 3, 6, 8 및 24시간에, 및 보체 활성화 분석을 위해 투여 전, 투여 후 1, 3, 6 및 24시간에 혈액을 수집했다. 투여 전 샘플을 또한 78일 차에 수집했다. 다음 매개변수를 평가했다. 사망률, 임상 징후, 체중, 음식 섭취, 혈장 및 조직(비복근, 심장, 대퇴이두근, 간 및

신장)에서의 AON1 수준, 조직(비복근, 심장, 대퇴이두근, 간 및 신장)에서의 엑손 도약 백분율, 임상 병리학(임상 화학, 혈액학, 소변검사, 소변 화학 및 소변 생체표지자), 보체 활성화 지표(Bb, C3a 및 sC5b-9), 안과학, ECG, 장기 중량 및 조직병리학.

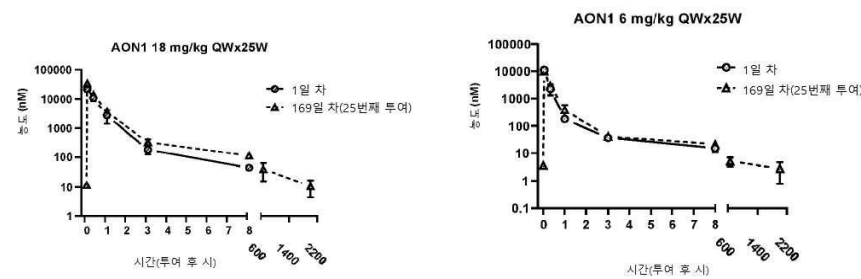
[0276] 조직에서 엑손 도약을 RT-ddPCR로 측정했다. 방법은 미도약된 DMD(디스트로핀) 전사체의 수, 및 엑손 51-도약된 DMD 전사체의 수를 정량화하고, 엑손 도약 백분율(도약 %)을 계산했다. 엑손 51 도약 백분율은 1.7% 내지 14.4%로 다양했고 일반적으로 용량에 따라 증가했다.

[0277] 본 개시는 개별 양태의 단일 예시로서 의도된 실시예에 개시된 구현예에 의해 범위가 제한되지 않고, 임의의 등가물이 본 개시의 범위 내에 있다. 본원에 제시되고 기재된 것 이외에 다양한 변형이 전술한 설명에서 당업자에게 자명해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

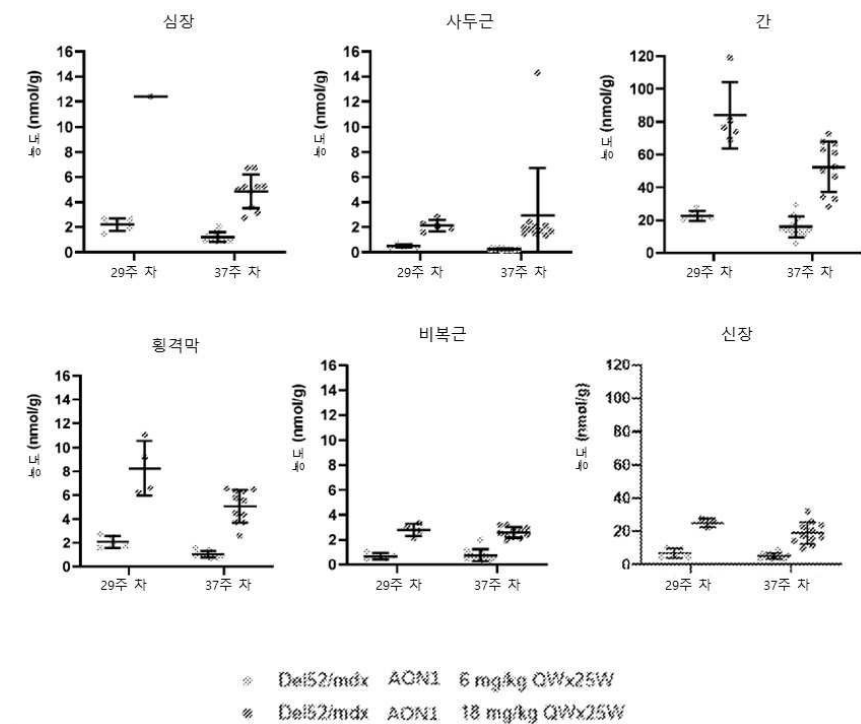
[0278] 특허, 특허 출원 및 출판물이 포함된 다양한 참고 문헌이 본원에 언급되고, 이들의 개시는 이로써 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

도면

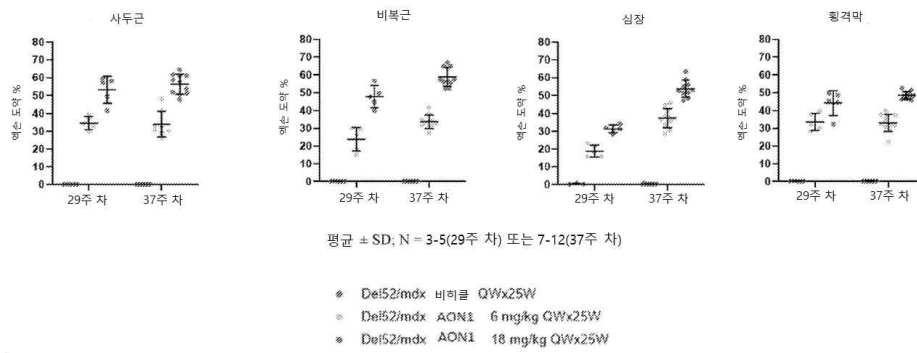
도면1



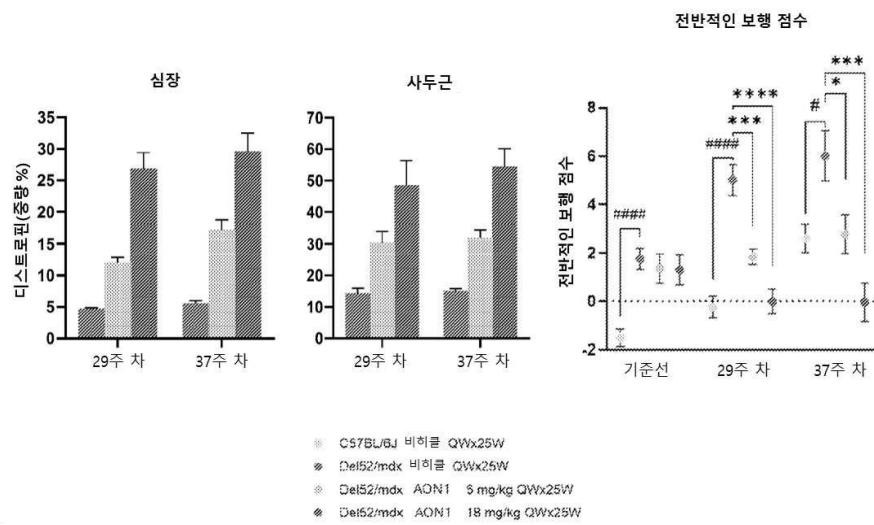
도면2



도면3

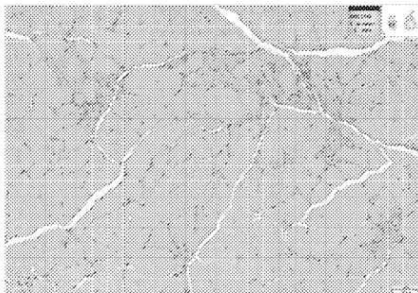
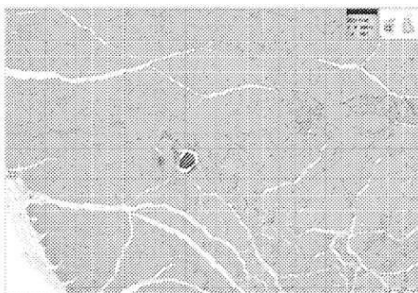


도면4

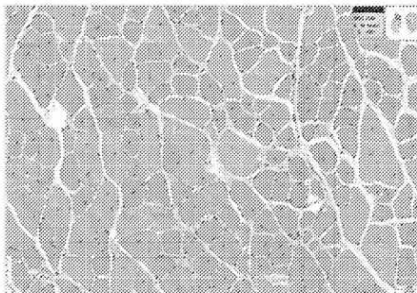
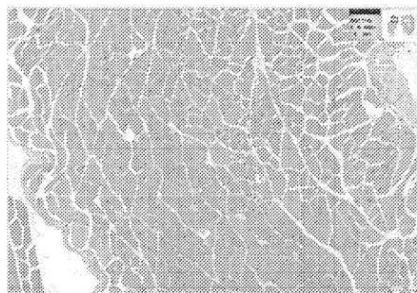


도면5

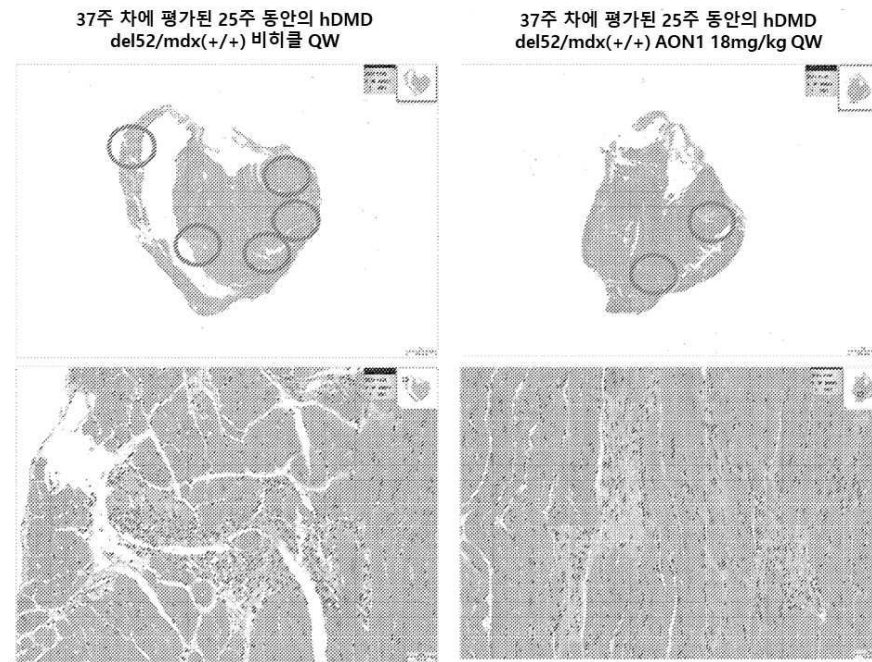
37주 차에 평가된 25주 동안의 hMDM
del52/mdx(+/+) 비히클 QW



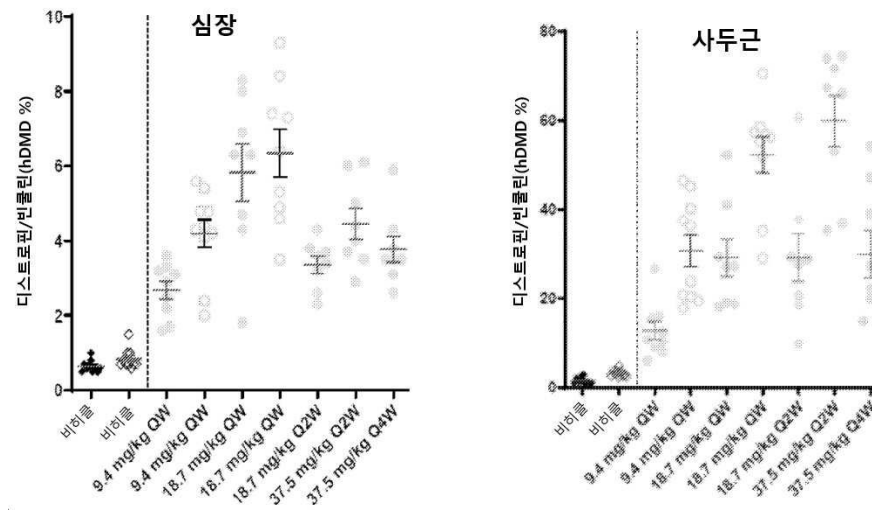
37주 차에 평가된 25주 동안의 hMDM
del52/mdx(+/+) AON1 18mg/kg QW



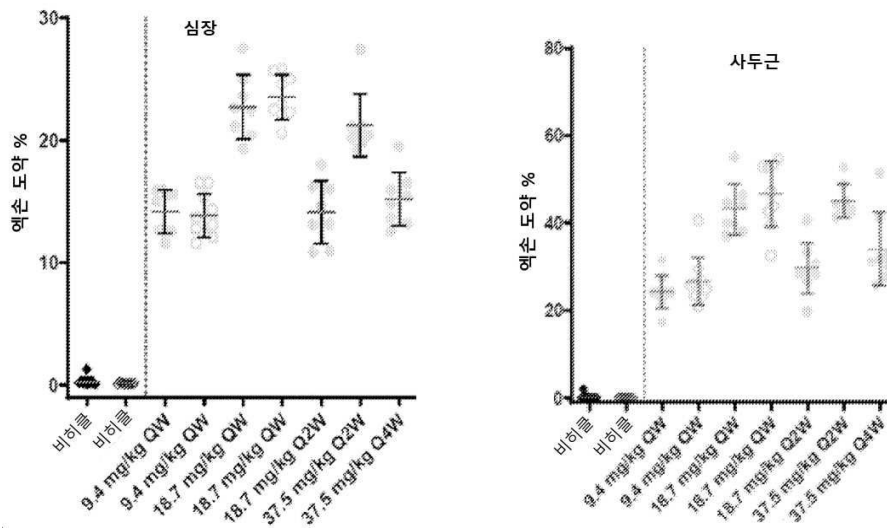
도면6



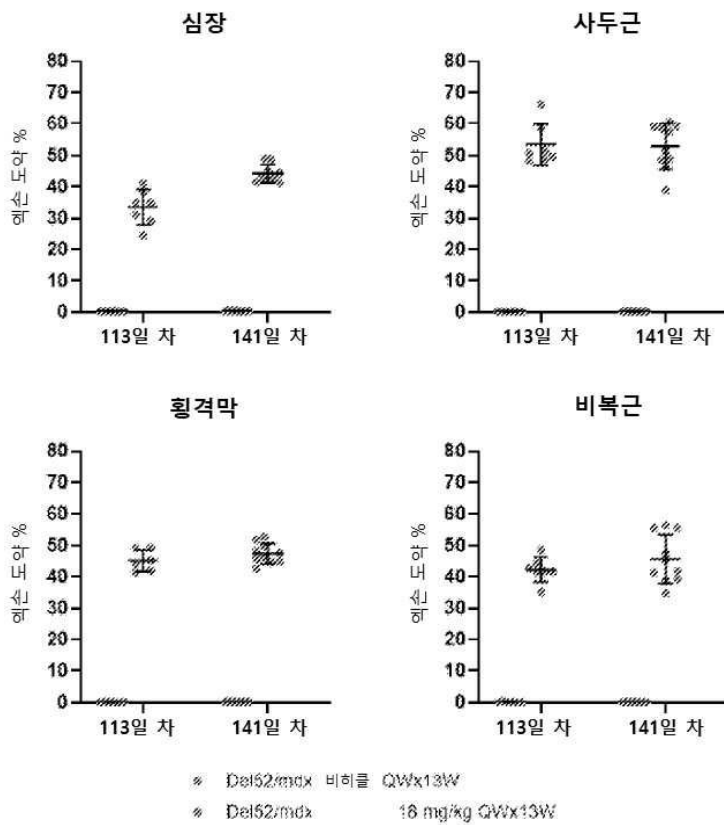
도면7



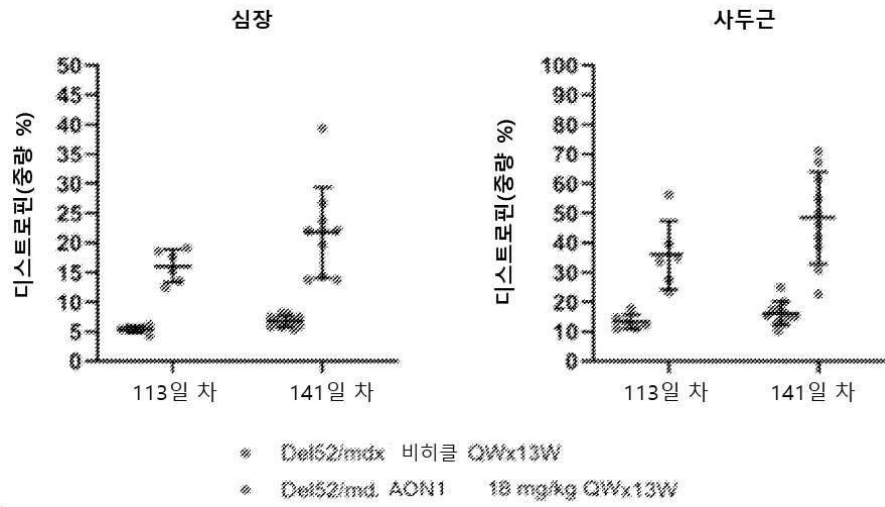
도면8



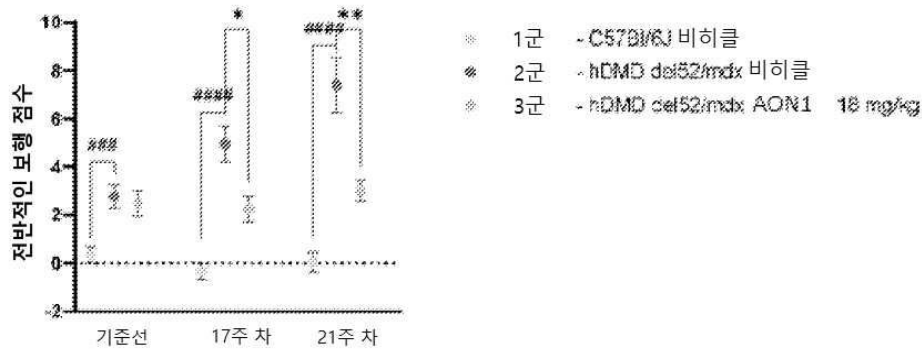
도면9



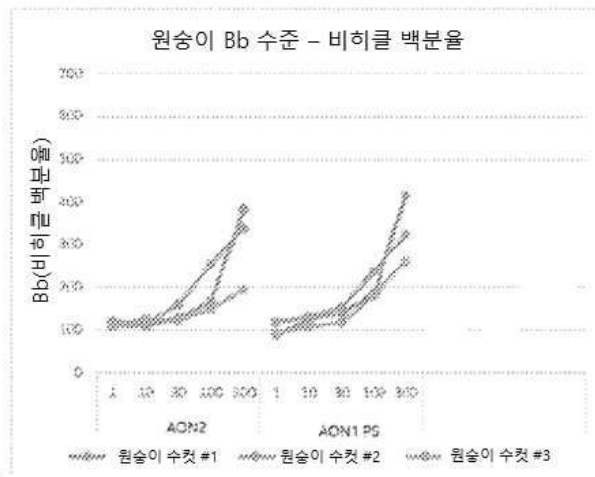
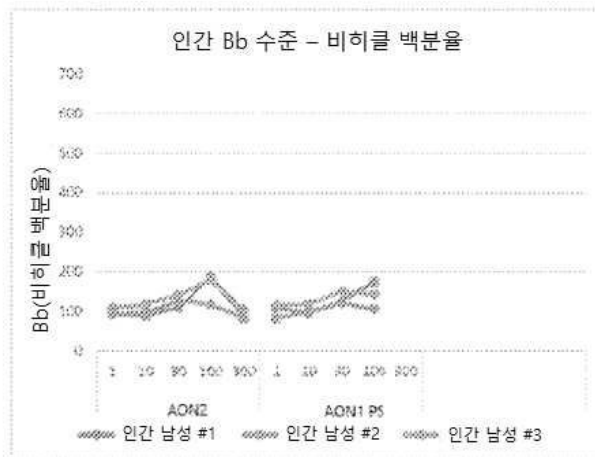
도면10



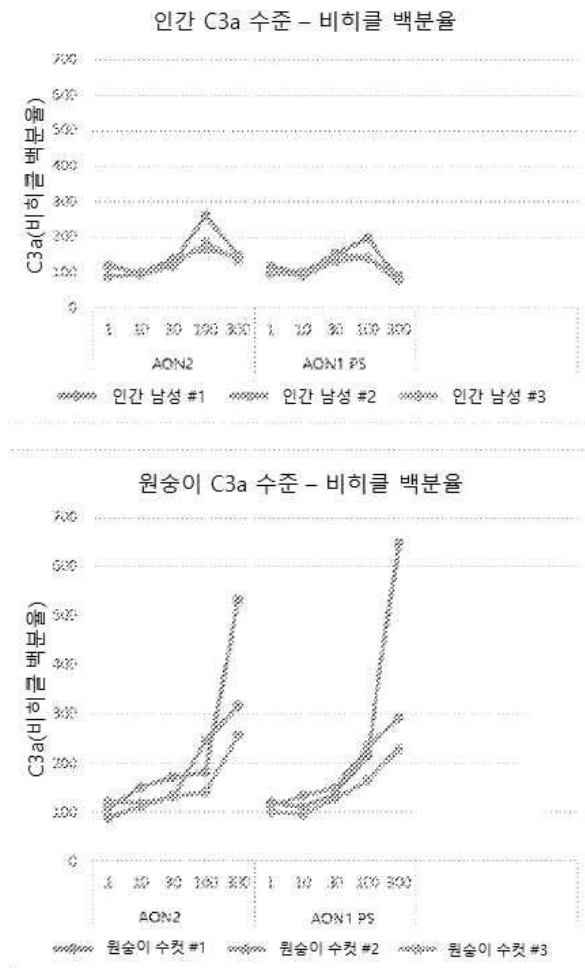
도면11



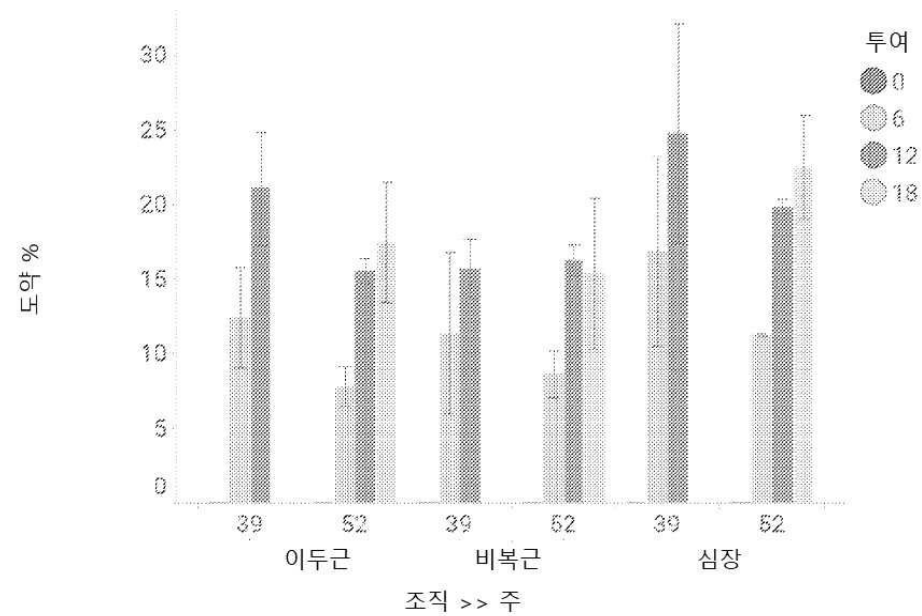
도면12



도면13



도면14



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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