

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0046069  
(43) 공개일자 2020년05월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 31/7105** (2006.01) **A61K 31/5377**  
 (2006.01)  
**A61P 21/00** (2006.01) **C12N 15/11** (2006.01)  
 (52) CPC특허분류  
**A61K 31/7105** (2013.01)  
**A61K 31/5377** (2013.01)  
 (21) 출원번호 10-2020-7008557  
 (22) 출원일자(국제) 2018년08월31일  
 심사청구일자 없음  
 (85) 번역문제출일자 2020년03월24일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2018/049151  
 (87) 국제공개번호 WO 2019/046755  
 국제공개일자 2019년03월07일  
 (30) 우선권주장  
 62/553,094 2017년08월31일 미국(US)  
 (뒷면에 계속)

(71) 출원인  
 사렙타 제너퓨틱스 인코퍼레이티드  
 미국 매사추세츠 02142, 캠브리지, 215 퍼스트 스트리트  
 (72) 발명자  
 카에 에드워드 엠.  
 미국 매사추세츠 02142, 캠브리지, 215 퍼스트 스트리트  
 (74) 대리인  
 특허법인한얼

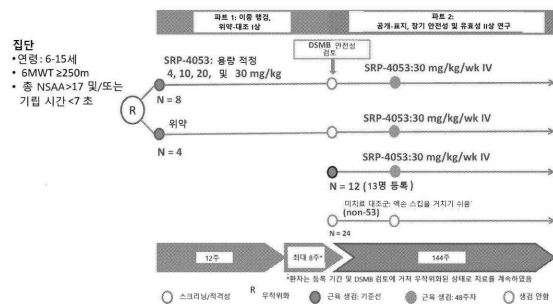
전체 청구항 수 : 총 130 항

## (54) 발명의 명칭 근디스트로피를 치료하는 방법

## (57) 요약

본 개시는 특히 근디스트로피를 치료하는 개선된 조성물 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 개시는 유효량의 골로디르센을 투여함으로써 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 DMD 유전자에서의 돌연변이를 갖는 뒤시엔느 근디스트로피 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

**A61P 21/00** (2018.01)

**C12N 15/111** (2013.01)

*C12N 2310/11* (2013.01)

*C12N 2310/3233* (2013.01)

*C12N 2320/33* (2013.01)

(30) 우선권주장

62/565,824 2017년09월29일 미국(US)

62/725,129 2018년08월30일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 뒤시엔느 근디스트로피(DMD) 유전자의 돌연변이를 갖는, DMD의 치료를 필요로 하는 환자에서 DMD를 치료하는 방법으로서, 글로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 4 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 10 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 20 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 30 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 40 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 50 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 단회 용량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 1주 1회 투여되는 방법.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 용량이 주입에 의해 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 용량이 35~60분의 기간에 걸쳐 주입에 의해 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 13

제8항에 있어서, 용량이 피하 주사에 의해 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 최대 40세인 방법.

#### 청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 최대 30세인 방법.

#### 청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 최대 21세인 방법.

#### 청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 1세 내지 21세인 방법.

#### 청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 5세 내지 21세인 방법.

#### 청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 6세 내지 15세인 방법.

#### 청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 엑손 3 내지 52, 4 내지 52, 5 내지 52, 6 내지 52, 9 내지 52, 10 내지 52, 11 내지 52, 13 내지 52, 14 내지 52, 15 내지 52, 16 내지 52, 17 내지 52, 19 내지 52, 21 내지 52, 23 내지 52, 24 내지 52, 25 내지 52, 26 내지 52, 27 내지 52, 28 내지 52, 29 내지 52, 30 내지 52, 31 내지 52, 32 내지 52, 33 내지 52, 34 내지 52, 35 내지 52, 36 내지 52, 37 내지 52, 38 내지 52, 39 내지 52, 40 내지 52, 41 내지 52, 43 내지 52, 42 내지 52, 45 내지 52, 47 내지 52, 48 내지 52, 49 내지 52, 50 내지 52, 54 내지 58, 54 내지 61, 54 내지 63, 54 내지 64, 54 내지 66, 54 내지 76, 54 내지 77, 및 엑손 52로 구성되는 군으로부터 선택되는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는 방법.

#### 청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 만성 투여되는 방법.

#### 청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 적어도 48주 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 1년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 2년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 3년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 4년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 5년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 10년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 20년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 30년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 골로디르센의 투여 전 적어도 6개월 동안 코르티코스테로이드의 안정 용량을 투여 받은 방법.

#### 청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 골로디르센의 투여 전 적어도 6개월 동안 코르티코스테로이드의 안정 용량을 투여 받고 골로디르센의 투여 동안 코르티코스테로이드를 유지하는 방법.

#### 청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 50 mg/ml의 강도를 갖는 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 36

제33항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 50 mg/ml의 강도를 갖는 약학 조성물로 제형화되며 100 mg/2 ml의 투여형으로 제공되는 방법.

#### 청구항 37

제33항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 50 mg/ml의 강도를 갖고 500 mg/2 ml의 투여형으로 제공되는 방법.

#### 청구항 38

제35항 또는 제36항에 있어서, 투여형이 단위 용량 바이알에 함유되는 방법.

#### 청구항 39

제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 40

제38항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체가 포스페이트-완충 용액인 방법.

#### 청구항 41

엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 뒤시엔스 근디스트로피(DMD) 유전자의 돌연변이를 갖는, 엑손 스킵의 유도를 필요로 하는 DMD 환자에서 엑손 스킵을 유도하기 위해 mRNA 해독틀을 복원하는 방법으로서, 골로디르센 또는 이의 약학

적으로 허용 가능한 염의 용량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 42

제40항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 4 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 43

제40항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 10 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 44

제40항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 20 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 45

제40항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 30 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 46

제40항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 40 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 47

제40항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 50 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 48

제40항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 단회 용량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 49

제40항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 1주 1회 투여되는 방법.

#### 청구항 50

제40항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 51

제49항에 있어서, 용량이 주입에 의해 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 52

제50항에 있어서, 용량이 35~60분의 기간에 걸쳐 주입에 의해 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 53

제47항에 있어서, 용량이 피하 주사에 의해 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 최대 40세인 방법.

#### 청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 최대 30세인 방법.

#### 청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 최대 21세인 방법.

#### 청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 1세 내지 21세인 방법.

#### 청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 5세 내지 21세인 방법.

#### 청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 6세 내지 15세인 방법.

#### 청구항 60

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 엑손 3 내지 52, 4 내지 52, 5 내지 52, 6 내지 52, 9 내지 52, 10 내지 52, 11 내지 52, 13 내지 52, 14 내지 52, 15 내지 52, 16 내지 52, 17 내지 52, 19 내지 52, 21 내지 52, 23 내지 52, 24 내지 52, 25 내지 52, 26 내지 52, 27 내지 52, 28 내지 52, 29 내지 52, 30 내지 52, 31 내지 52, 32 내지 52, 33 내지 52, 34 내지 52, 35 내지 52, 36 내지 52, 37 내지 52, 38 내지 52, 39 내지 52, 40 내지 52, 41 내지 52, 43 내지 52, 42 내지 52, 45 내지 52, 47 내지 52, 48 내지 52, 49 내지 52, 50 내지 52, 54 내지 58, 54 내지 61, 54 내지 63, 54 내지 64, 54 내지 66, 54 내지 76, 54 내지 77, 및 엑손 52로 구성되는 군으로부터 선택되는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는 방법.

#### 청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 만성 투여되는 방법.

#### 청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 적어도 48주 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 63

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 1년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 2년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 3년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 4년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 5년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 10년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 69

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 20년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 골로디르센이 30년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 골로디르센의 투여 전 적어도 6개월 동안 코르티코스테로이드의 안정 용량을 투여 받은 방법.

#### 청구항 72

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 골로디르센의 투여 전 적어도 6개월 동안 코르티코스테로이드의 안정 용량을 투여 받고 골로디르센의 투여 동안 코르티코스테로이드를 유지하는 방법.

#### 청구항 73

제1항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 74

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 75

제1항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 50 mg/ml의 강도를 갖는 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 76

제72항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 50 mg/ml의 강도를 갖는 약학 조성물로 제형화되며 100 mg/2 ml의 투여형으로 제공되는 방법.

#### 청구항 77

제72항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 50 mg/ml의 강도를 갖고 500 mg/2 ml의 투여형으로 제공되는 방법.

#### 청구항 78

제74항 또는 제75항에 있어서, 투여형이 단회 용량 바이알에 함유되는 방법.

#### 청구항 79

제72항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 80

제77항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체가 포스페이트-완충 용액인 방법.

#### 청구항 81

제40항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 엑손 스킵이 역전사 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR)에 의해 측정되는 방법.

#### 청구항 82

제1항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에서 디스트로핀 생성을 증가시키는 방법.

#### 청구항 83

제80항에 있어서, 디스트로핀 생성이 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정되는 방법.

#### 청구항 84

제80항에 있어서, 디스트로핀 생성이 면역조직화학(IHC)에 의해 측정되는 방법.

#### 청구항 85

엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 뒤시엔느 근디스트로피(DMD) 유전자의 돌연변이를 갖는, 디스트로핀 생성의 증가를 필요로 하는 DMD 환자에서 디스트로핀 생성을 증가시키는 방법으로서, 글로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 86

제80항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 4 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 87

제80항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 10 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 88

제80항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 20 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 89

제80항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 30 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 90

제80항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 40 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 91

제80항에 있어서, 용량이 환자의 체중을 기준으로 50 mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 92

제80항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 단회 용량으로 투여되는 방법.

#### 청구항 93

제80항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 1주 1회 투여되는 방법.

#### 청구항 94

제80항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 95

제89항에 있어서, 용량이 주입에 의해 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 96

제90항에 있어서, 용량이 35~60분의 기간에 걸쳐 주입에 의해 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 97

제89항에 있어서, 용량이 피하 주사에 의해 정맥내 투여되는 방법.

#### 청구항 98

제1항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 최대 40세인 방법.

#### 청구항 99

제1항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 최대 30세인 방법.

#### 청구항 100

제1항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 최대 21세인 방법.

#### 청구항 101

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 1세 내지 21세인 방법.

#### 청구항 102

제1항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 5세 내지 21세인 방법.

#### 청구항 103

제1항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 6세 내지 15세인 방법.

#### 청구항 104

제1항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 엑손 3 내지 52, 4 내지 52, 5 내지 52, 6 내지 52, 9 내지 52, 10 내지 52, 11 내지 52, 13 내지 52, 14 내지 52, 15 내지 52, 16 내지 52, 17 내지 52, 19 내지 52, 21 내지 52, 23 내지 52, 24 내지 52, 25 내지 52, 26 내지 52, 27 내지 52, 28 내지 52, 29 내지 52, 30 내지 52, 31 내지 52, 32 내지 52, 33 내지 52, 34 내지 52, 35 내지 52, 36 내지 52, 37 내지 52, 38 내지 52, 39 내지 52, 40 내지 52, 41 내지 52, 43 내지 52, 42 내지 52, 45 내지 52, 47 내지 52, 48 내지 52, 49 내지 52, 50 내지 52, 54 내지 58, 54 내지 61, 54 내지 63, 54 내지 64, 54 내지 66, 54 내지 76, 54 내지 77, 및 엑손 52로 구성되는 군으로부터 선택되는 DMD 유전자의 돌연변이를 갖는 방법.

#### 청구항 105

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 글로디르센이 만성 투여되는 방법.

#### 청구항 106

제1항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 글로디르센이 적어도 48주 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 107

제1항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 글로디르센이 1년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 108

제1항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 글로디르센이 2년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 109

제1항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 글로디르센이 3년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 110

제1항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 글로디르센이 4년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 111

제1항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 글로디르센이 5년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 112

제1항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 글로디르센이 10년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 113

제1항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 글로디르센이 20년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 114

제1항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에 글로디르센이 30년 초과 동안 투여되는 방법.

#### 청구항 115

제1항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 골로디르센의 투여 전 적어도 6개월 동안 코르티코스테로이드의 안정 용량을 투여 받은 방법.

#### 청구항 116

제1항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 골로디르센의 투여 전 적어도 6개월 동안 코르티코스테로이드의 안정 용량을 투여 받고 골로디르센의 투여 동안 코르티코스테로이드를 유지하는 방법.

#### 청구항 117

제1항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 118

제1항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 119

제1항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 50 mg/ml의 강도를 갖는 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 120

제113항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 50 mg/ml의 강도를 갖는 약학 조성물로 제형화되며 100 mg/2 ml의 투여형으로 제공되는 방법.

#### 청구항 121

제113항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 50 mg/ml의 강도를 갖고 500 mg/2 ml의 투여형으로 제공되는 방법.

#### 청구항 122

제112항 또는 제113항에 있어서, 투여형이 단위 용량 바이알에 함유되는 방법.

#### 청구항 123

제111항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물로 제형화되는 방법.

#### 청구항 124

제117항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체가 포스페이트-완충 용액인 방법.

#### 청구항 125

제80항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 디스트로핀 생성이 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정되는 방법.

#### 청구항 126

제80항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 디스트로핀 생성이 면역조직화학(IHC)에 의해 측정되는 방법.

#### 청구항 127

제1항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 골로디르센의 투여 전에 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 DMD 유전자의 돌연변이를 가짐을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

## 청구항 128

엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 뒤시엔느 근디스트로피(DMD) 유전자의 돌연변이를 갖는, DMD의 치료를 필요로 하는 환자에서 DMD의 치료에 사용하기 위한 것으로서, 치료가 1주 1회 30 mg/kg의 단회 정맥내 용량의 에테플리르센을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

## 청구항 129

엑손 스킵의 유도를 필요로 하는 뒤시엔느 근디스트로피(DMD) 환자에서 엑손 스킵을 유도하기 위해 mRNA 해독률을 복원하는 데 사용하기 위한 것으로서, 치료가 1주 1회 30 mg/kg의 단회 정맥내 용량의 에테플리르센을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

## 청구항 130

엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 DMD 유전자의 돌연변이를 갖고, 디스트로핀 생성의 증가를 필요로 하는 뒤시엔느 근디스트로피(DMD) 환자에서 디스트로핀 생성을 증가시키는 데 사용하기 위한 것으로서, 치료가 1주 1회 30 mg/kg의 단회 정맥내 용량의 에테플리르센을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 환자에서 근디스트로피를 치료하는 개선된 방법에 관한 것이다. 이는 또한 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 53 스킵을 촉진하기 적합한 조성물을 제공한다.

### 배경 기술

[0002] 다양한 유전 질병에서, 유전자의 궁극적 발현에 대한 돌연변이의 효과는 스플라이싱 공정 동안 표적화된 엑손 스킵 공정을 통해 조절될 수 있다. 보통 기능적 단백질이 내부 돌연변이로 인해 조기 종결되는 경우, 안티센스 기술을 통해 일부 기능적 단백질 생성을 복원하는 수단은 스플라이싱 공정 동안의 개입을 통해 가능한 것으로 나타났으며, 질병-유도 돌연변이와 연관되는 엑손이 일부 유전자로부터 특이적으로 결실될 수 있는 경우, 원상태 단백질과 유사한 생물학적 특성을 갖거나 엑손과 연관된 돌연변이에 의해 유도되는 질병을 완화하기 충분한 생물학적 활성을 갖는 단축된 단백질 산물이 때때로 생성될 수 있다(예컨대, 문헌[Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Aartsma-Rus, Janson et al. 2004] 참고).

[0003] 뒤시엔느 근디스트로피(DMD)는 단백질 디스트로핀의 발현의 결함에 의해 유도된다. 디스트로핀은 막대형 세포질 단백질이며, 근육 섬유의 세포골격을 세포막을 통해 주변 세포의 기질로 연결하는 단백질 복합체의 중추적 부분이다. 디스트로핀은 근육 섬유에서 중요한 구조적 역할을 담당하여, 세포외 기질 및 세포골격을 연결한다. N-말단 영역은 액틴에 결합하는 반면, C-말단 끝은 근육속막에 걸쳐 있는 디스트로핀 당단백질 복합체(DGC)의 일부이다. mdx 마우스의 디스트로핀-결핍 근육 섬유는 수축-유도 근육속막 파열에 대해 증가된 감수성을 보이는 것으로 나타났다(문헌[Petrof et al. 1993; Cirak et al. 2012] 참고).

[0004] 단백질을 인코딩하는 유전자는 2백만 개 뉴클레오티드를 초과하는 DNA에 걸쳐 퍼져 있는 79개 엑손을 함유한다. 엑손의 해독률을 변화시키거나, 정지 코돈을 도입하거나, 프레임 엑손 또는 엑손들 밖으로의 전체 제거, 또는 하나 이상의 엑손의 중복을 특징으로 하는 임의의 엑손 돌연변이는 기능적 디스트로핀의 생성을 손상시켜 DMD를 일으킬 가능성이 있다.

[0005] 질병 개시는 출생 시 상승된 크레아틴 키나제 수준을 갖는 것으로 보고될 수 있고, 생애 첫 해에 상당한 운동 결손이 존재할 수 있다. 7세 또는 8세 경, 대부분의 DMD 환자는 점점 더 보행이 어려워지고, 바닥에서 기립하거나 계단을 오르는 능력을 잃어간다; 10세 내지 14세경, 대부분은 휠체어에 의존한다. DMD는 일관되게 치명적이다; 이환된 개인은 전형적으로 십대 후반 또는 20대 초반에 호흡기 및/또는 심장 부전으로 사망한다. DMD의 계속적 진행은 질병의 모든 단계에 치료적 개입을 허용한다; 그러나, 치료는 현재 글루코코르티코이드에 제한되며, 이는 체중 증가, 행동 변화, 사춘기 변화, 골다공증, 쿠싱양 안색, 성장 억제, 및 백내장을 포함하는 여러 부작용과 연관된다. 결과적으로, 상기 질병의 근본적인 원인을 치료하기 위해 더 우수한 치료법을 개발하

는 것은 필수적이다.

- [0006] 덜 심각한 형태의 근디스트로피인 베커 근디스트로피(BMD)는 전형적으로 하나 이상의 엑손의 결실인 돌연변이가 전체 디스트로핀 전사체를 따라 정확한 해독들을 생성하여 mRNA의 단백질로의 번역이 조기 종결되지 않도록 하는 경우 일어나는 것으로 확인되었다. 돌연변이된 디스트로핀 프리-mRNA의 가공에서 상류 및 하류 엑손의 연결이 유전자의 정확한 해독들을 유지하는 경우, 그 결과 mRNA가 일부 활성을 보유하는 짧은 내부 결실을 갖는 단백질을 코딩화하여, 베커 표현형을 유도한다.
- [0007] 여러 해 동안, 디스트로핀 단백질의 해독들을 변경하지 않는 엑손 또는 엑손들의 결실은 BMD 표현형을 일으키는 반면, 프레임-이동을 유도하는 엑손 결실은 DMD를 일으킬 것으로 알려졌다(Monaco, Bertelson et al. 1988). 일반적으로, 해독들을 변화시키고 이에 따라 적절한 단백질 번역을 손상시키는 점 돌연변이 및 엑손 결실을 포함하는 디스트로핀 돌연변이는 DMD를 일으킨다. 또한 일부 BMD 및 DMD 환자가 여러 엑손을 커버하는 엑손 결실을 가짐이 주지되어야 한다.
- [0008] DMD의 치료를 위해 스플라이스 스위칭 올리고뉴클레오티드(SSO)의 안전성 및 유효성을 평가하는 최근 임상 시험은 스플라이소좀의 입체적 차단에 의해 프리-mRNA의 대안적 스플라이싱을 유도하는 SSO 기술에 기반한다(Cirak et al., 2011; Goemans et al., 2011; Kinali et al., 2009; van Deutekom et al., 2007). 그러나 이러한 성공에도 불구하고, DMD를 치료하기 위해 이용 가능한 약리학적 옵션은 제한된다.
- [0009] 따라서, 환자에서 디스트로핀을 생성하고 근디스트로피, 예컨대 DMD 및 BMD를 치료하기 위한 개선된 조성물 및 방법에 대한 필요성이 남아있다.

### 발명의 내용

- [0010] 본 개시는 적어도 부분적으로, 엑손 53을 스킵하는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 골로디르센으로의 치료가 환자에서 기준선 대비 디스트로핀 단백질을 유의미하게 증가시켰음을 나타내는 임상 증거에 기반한다. 또한, 엑손 스킵 및 신생 디스트로핀 단백질 간 양의 상관관계가 관찰되었다.
- [0011] 따라서, 일부 양태에서, 본 개시는 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 뒤시엔스 근디스트로피(DMD) 유전자의 돌연변이를 갖는, DMD의 치료를 필요로 하는 환자에서 DMD를 치료하는 방법으로서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0012] 일부 양태에서, 본 개시는 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 뒤시엔스 근디스트로피(DMD) 유전자의 돌연변이를 갖는, 엑손 스킵의 유도를 필요로 하는 DMD 환자에서 엑손 스킵을 유도하기 위해 mRNA 해독들을 복원하는 방법으로서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0013] 일부 양태에서, 본 개시는 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 뒤시엔스 근디스트로피(DMD) 유전자의 돌연변이를 갖는, 디스트로핀 생성의 증가를 필요로 하는 DMD 환자에서 디스트로핀 생성을 증가시키는 방법으로서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0014] 일부 양태에서, 용량은 환자의 체중을 기준으로 4 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 또는 50 mg/kg의 투여량으로 투여된다.
- [0015] 일부 양태에서, 용량은 단회 용량으로 투여된다. 일부 양태에서, 용량은 1주 1회 투여된다. 일부 양태에서, 용량은 정맥내 투여된다. 일부 양태에서, 용량은 주입에 의해 정맥내 투여된다. 일부 양태에서, 용량은 35~60분의 기간에 걸쳐 주입에 의해 정맥내 투여된다. 일부 양태에서, 용량은 피하 주사에 의해 정맥내 투여된다.
- [0016] 일부 양태에서, 환자는 최대 40세, 최대 30세, 또는 최대 21세이다. 일부 양태에서, 환자는 1 내지 21세이다. 일부 양태에서, 환자는 5 내지 21세이다. 일부 양태에서, 환자는 6 내지 15세이다.
- [0017] 일부 양태에서, 본 개시는 임의의 상기 또는 관련 양태에 따른 방법을 제공하며, 여기서 환자는 엑손 3 내지 52, 4 내지 52, 5 내지 52, 6 내지 52, 9 내지 52, 10 내지 52, 11 내지 52, 13 내지 52, 14 내지 52, 15 내지 52, 16 내지 52, 17 내지 52, 19 내지 52, 21 내지 52, 23 내지 52, 24 내지 52, 25 내지 52, 26 내지 52, 27 내지 52, 28 내지 52, 29 내지 52, 30 내지 52, 31 내지 52, 32 내지 52, 33 내지 52, 34 내지 52, 35 내지 52, 36 내지 52, 37 내지 52, 38 내지 52, 39 내지 52, 40 내지 52, 41 내지 52, 43 내지 52, 42 내지 52, 45 내지 52, 47 내지 52, 48 내지 52, 49 내지 52, 50 내지 52, 54 내지 58, 54 내지 61, 54 내지 63, 54 내지 64, 54 내지 66, 54 내지 76, 54 내지 77, 및 엑손 52를 포함하는 군으로부터 선택되는 DMD 유전자의 돌연변이

를 갖는다.

- [0018] 일부 양태에서, 본 개시는 임의의 상기 또는 관련 양태에 따른 방법을 제공하며, 여기서 환자는 골로디르센을 만성 투여받는다. 일부 양태에서, 환자는 적어도 48주 동안 골로디르센을 투여받는다. 일부 양태에서, 환자는 1년 초과, 2년 초과, 3년 초과, 4년 초과, 5년 초과, 10년 초과, 20년 초과, 또는 30년 초과 동안 골로디르센을 투여받는다.
- [0019] 일부 양태에서, 본 개시는 임의의 상기 또는 관련 양태에 따른 방법을 제공하며, 여기서 환자는 골로디르센의 투여 전 적어도 6개월 동안 코르티코스테로이드의 안정 용량을 투여 받는다. 일부 양태에서, 환자는 골로디르센의 투여 전 적어도 6개월 동안 코르티코스테로이드의 안정 용량을 투여 받으며 골로디르센의 투여 동안 코르티코스테로이드를 유지한다.
- [0020] 일부 양태에서, 본 개시는 임의의 상기 또는 관련 양태에 따른 방법을 제공하며, 여기서 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 약학 조성물로 제형화된다. 일부 양태에서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 50 mg/mL의 강도를 갖는 약학 조성물로 제형화된다. 일부 양태에서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 50 mg/mL의 강도를 갖는 약학 조성물로 제형화되며 100 mg/2 mL의 투여형으로 제공된다. 일부 양태에서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 50 mg/mL의 강도를 갖는 약학 조성물로 제형화되며 500 mg/2 mL의 투여형으로 제공된다. 일부 양태에서, 투여형은 단회-사용 바이알에 함유된다.
- [0021] 일부 양태에서, 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물로 제형화된다. 일부 양태에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 포스페이트-완충 용액이다.
- [0022] 일부 양태에서, 본 개시는 임의의 상기 또는 관련 양태에 따른 방법을 제공하며, 여기서 엑손 스킵은 역전사 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR)에 의해 측정된다.
- [0023] 일부 양태에서, 본 개시는 임의의 상기 또는 관련 양태에 따른 방법을 제공하며, 여기서 방법은 환자에서 디스트로핀 생성을 증가시킨다. 일부 양태에서, 디스트로핀 생성은 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정된다. 일부 양태에서, 디스트로핀 생성은 면역조직화학(IHC)에 의해 측정된다.
- [0024] 일부 양태에서, 본 개시는 임의의 상기 또는 관련 양태에 따른 방법을 제공하며, 환자가 골로디르센의 투여 전에 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 DMD 유전자의 돌연변이를 가짐을 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0025] 일부 양태에서, 본 개시는 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 뒤시엔스 근디스트로피(DMD) 유전자의 돌연변이를 갖는, DMD의 치료를 필요로 하는 환자에서 DMD의 치료에 사용하기 위한 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며, 여기서 치료는 1주 1회 30 mg/kg의 단회 정맥내 용량의 에테플리르센을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0026] 일부 양태에서, 본 개시는 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 뒤시엔스 근디스트로피(DMD) 유전자의 돌연변이를 갖는, 엑손 스킵의 유도를 필요로 하는 DMD 환자에서 엑손 스킵을 유도하기 위해 mRNA 해독물을 복원하는 데 사용하기 위한 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며, 여기서 치료는 1주 1회 30 mg/kg의 단회 정맥내 용량의 에테플리르센을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0027] 일부 양태에서, 본 개시는 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 뒤시엔스 근디스트로피(DMD) 유전자의 돌연변이를 갖는, 디스트로핀 생성의 증가를 필요로 하는 DMD 환자에서 디스트로핀 생성을 증가시키는 데 사용하기 위한 골로디르센 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며, 여기서 치료는 1주 1회 30 mg/kg의 단회 정맥내 용량의 에테플리르센을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 DMD 환자 연구 설계에서 SRP-4053의 I/II상 연구의 플로우차트 요약이다.
- 도 2는 상기 연구에서 25명 환자 각각에 대한 RT-PCR 데이터(기준선 및 SRP-4053 치료 후 48주차)를 도시한다.
- 도 3은 상기 연구에서 25명 환자 각각에 대한 웨스턴 블롯 데이터(기준선 및 SRP-4053 치료 후 48주차)를 도시한다.
- 도 4a는 전체 근육 섬유를 나타내기 위해 라미닌에 대해 염색된 기준선 및 치료시의 단일 환자로부터의 근육 생검의 면역형광 염색(Ex 1)을 도시한다.

도 4b는 디스트로핀에 대해 염색된 도 4a로부터의 근육 생검의 섹션(1~3)의 면역형광 염색을 도시한다.

도 5a는 전체 근육 섬유를 나타내기 위해 라미닌에 대해 염색된 기준선 및 치료시의 단일 환자로부터의 근육 생검의 면역형광 염색(Ex 2)을 도시한다.

도 5b는 디스트로핀에 대해 염색된 도 5a로부터의 근육 생검 섹션(1~3)의 면역형광 염색을 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 개시의 구현에는 인간 디스트로핀 유전자에서 엑손 53 스킵을 유도하기 위해 특이적으로 설계된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 골로디르센을 투여하여, DMD와 같은 근디스트로피를 치료하는 방법에 관한 것이다. 디스트로핀은 근육 기능에서 중추적 역할을 담당하며, 다양한 근육-관련 질병이 상기 유전자의 돌연변이된 형태를 특징으로 한다. 따라서 소정 구현예에서, 본원에서 기재된 방법은 인간 디스트로핀 유전자의 돌연변이된 형태에서, 예컨대 DMD에서 확인되는 돌연변이된 디스트로핀 유전자에서 엑손 53 스킵을 유도하기 위해 사용될 수 있다.

[0030] 따라서 본 개시는 환자에서 엑손 53 스킵을 유도하여 DMD와 같은 근디스트로피를 치료하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 개시는 DMD 환자에서 엑손 스킵을 유도하기 위해 mRNA 해독를 복원하는 방법에 관한 것이다. 본 개시는 또한 DMD 환자에서 디스트로핀 생성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0031] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 기재된 것들과 유사하거나 동등한 모든 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 평가에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 기재된다. 본 발명의 목적을 위해, 하기 용어가 아래에서 정의된다.

### I. 정의

[0033] "약"이란 참조 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이 대비 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1%만큼 변화하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0034] 대상체 또는 환자에 관해 본원에서 사용되는 "엑손 53 스킵을 겪기 쉬운"은 디스트로핀 유전자의 엑손 53을 스킵하지 않고, 해독들이 프레임을 벗어나도록 유도하여 프리-mRNA의 번역을 손상시킴으로써 대상체 또는 환자가 디스트로핀을 생성하지 못하게 하는, 디스트로핀 유전자에서의 하나 이상의 돌연변이를 갖는 대상체 및 환자를 포함하려는 것이다. 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 디스트로핀 유전자의 하기 엑손에서 돌연변이의 비제한적 예에는, 예컨대, 엑손 3 내지 52, 4 내지 52, 5 내지 52, 6 내지 52, 9 내지 52, 10 내지 52, 11 내지 52, 13 내지 52, 14 내지 52, 15 내지 52, 16 내지 52, 17 내지 52, 19 내지 52, 21 내지 52, 23 내지 52, 24 내지 52, 25 내지 52, 26 내지 52, 27 내지 52, 28 내지 52, 29 내지 52, 30 내지 52, 31 내지 52, 32 내지 52, 33 내지 52, 34 내지 52, 35 내지 52, 36 내지 52, 37 내지 52, 38 내지 52, 39 내지 52, 40 내지 52, 41 내지 52, 43 내지 52, 42 내지 52, 45 내지 52, 47 내지 52, 48 내지 52, 49 내지 52, 50 내지 52, 54 내지 58, 54 내지 61, 54 내지 63, 54 내지 64, 54 내지 66, 54 내지 76, 54 내지 77, 또는 엑손 52의 결실이 포함된다. 환자가 엑손 스킵을 겪기 쉬운 디스트로핀 유전자에서의 돌연변이를 갖는지 여부의 결정은 확실히 당업자의 기술 범위 내에 있다(예컨대, 문헌[Aartsma-Rus et al. (2009) Hum Mutat. 30:293-299, Gurvich et al., Hum Mutat. 2009; 30(4) 633-640, 및 Fletcher et al. (2010) Molecular Therapy 18(6) 1218-1223] 참고).

[0035] 용어 "안티센스 올리고머" 및 "안티센스 화합물" 및 "안티센스 올리고뉴클레오타이드" 및 "올리고머" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 본 개시에서 상호 교환적으로 사용되며 서브유닛간 결합에 의해 연결되는 고리형 서브유닛 서열을 나타내며, 각각의 고리형 서브유닛은 다음으로 구성된다: (i) 리보스 당 또는 이의 유도체; 및 (ii) 염기쌍-형성 모이어티의 구조가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 핵산(전형적으로 RNA)에서 표적 서열에 상보적인 염기 서열을 형성하여 표적 서열 내 핵산:올리고머 헤테로듀플렉스를 형성하도록, (i)에 결합되는 염기쌍-형성 모이어티. 소정 구현예에서, 올리고머는 PMO이다. 다른 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 포스포로티오에이트이다. 다른 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 펩타이드 핵산(PNA), 잠긴 핵산(LNA), 또는 가교 핵산(BNA), 예컨대 2'-O,4'-C-에틸렌-가교 핵산(ENA)이다.

[0036] 용어 "상보적" 및 "상보성"은 왓슨-크릭 염기쌍-형성 규칙에 의해 서로 관련되는 2개 이상의 올리고머(즉, 각각 뉴클레오타이드 서열을 포함함)를 나타낸다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 서열 "T-G-A(5'→3')는 뉴클레오타이드 서열 "A-C-T(3'→5')와 상보적이다. 상보성은 "부분적"일 수 있고, 여기서는 주어진 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드의 전체 미만이 염기쌍 형성 규칙에 따라 다른 뉴클레오타이드 서열과 매칭된다. 예를 들어, 일부

구현예에서, 주어진 뉴클레오타이드 서열 및 다른 뉴클레오타이드 서열 간 상보성은 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95%일 수 있다. 또는, 계속 예를 들면, 주어진 뉴클레오타이드 서열 및 다른 뉴클레오타이드 서열 간 "완전한" 또는 "완벽한"(100%) 상보성이 존재할 수 있다. 뉴클레오타이드 서열 간 상보성 정도는 서열 간 혼성화 효율 및 강도에 상당한 영향을 미친다.

[0037] "디스트로핀"은 막대형 세포질 단백질이며, 근육 섬유의 세포골격을 세포막을 통해 주변 세포의 기질로 연결하는 단백질 복합체의 중추적 부분이다. 디스트로핀은 여러 기능적 도메인을 함유한다. 예를 들어, 디스트로핀은 대략 아미노산 14~240에서의 액틴 결합 도메인 및 대략 아미노산 253~3040에서의 중앙 막대 도메인을 함유한다. 이러한 대형 중앙 도메인은 약 109개 아미노산의 24개 스펙트린-유사 삼중-나선 요소에 의해 형성되며, 이는 알파-액티닌 및 스펙트린과 상동성을 갖는다. 반복물은 전형적으로 한지 영역으로도 언급되는, 4개의 프롤린-풍부 비-반복 절편에 의해 단속된다. 반복물 15 및 16은 디스트로핀의 단백질 분해 절단에 대한 주요 부위를 제공하는 것으로 나타나는 18개 아미노산 신장부에 의해 분리된다. 대부분의 반복물 간 서열 동일성은 10~25% 범위이다. 하나의 반복물은 3개의 알파-나선: 1, 2 및 3을 함유한다. 알파-나선 1 및 3은 각각 7회 나선 회전에 의해 형성되며, 소수성 계면을 통해 코일링된-코일로 상호작용할 수 있다. 알파-나선 2는 보다 복잡한 구조를 가지며 글리신 또는 프롤린 잔기에 의해 분리되는 4회 및 3회의 나선 회전 절편에 의해 형성된다. 각각의 반복물은 2개의 엑손에 의해 인코딩되며, 전형적으로 알파-나선 2의 첫 번째 부분에서 아미노산 47 및 48 간 인트론에 의해 단속된다. 다른 인트론은 보통 나선-3에 걸쳐 산란되어 있는, 반복물 내 상이한 위치에서 확인된다. 디스트로핀은 또한 점균류(*Dictyostelium discoideum*) 알파-액티닌의 C-말단 도메인과 상동성을 나타내는 시스테인-풍부 절편(즉, 280개 아미노산 내 15개 시스테인)을 포함하는 대략 아미노산 3080~3360에 시스테인-풍부 도메인을 함유한다. 카복시-말단 도메인은 대략 아미노산 3361~3685에 있다.

[0038] 디스트로핀의 아미노-말단은 F-액틴에 결합하며 카복시-말단은 근육속막에서 디스트로핀-연합 단백질 복합체(DAPC)에 결합한다. DAPC에는 디스트로글리칸, 사르코글리칸, 인테그린 및 카베올린이 포함되며, 임의의 이들 성분에서의 돌연변이는 상염색체 유전 근디스트로피를 유도한다. 디스트로핀이 부재하는 경우 DAPC는 탈안정화되며, 이는 구성원 단백질의 수준을 감소시키고 결국 진행성 섬유 손상 및 막 누출을 야기한다. 다양한 형태의 근디스트로피, 예컨대 뒤시엔느 근디스트로피(DMD) 및 베커 근디스트로피(BMD)에서, 근육 세포는 주로 부정확한 스플라이싱을 야기하는 유전자 서열의 돌연변이로 인해, 변경되고 기능적으로 결함이 있는 형태의 디스트로핀을 생성하거나 디스트로핀을 전혀 생성하지 않는다. 결함이 있는 디스트로핀 단백질의 우세한 발현, 또는 디스트로핀 또는 디스트로핀-유사 단백질의 완벽한 부재는 상기 주지된 바와 같이, 근육 변성의 빠른 진행을 야기한다. 이에 관해, "결함이 있는" 디스트로핀 단백질은 당분야에 알려진 바와 같이 DMD 또는 BMD를 갖는 소정 대상체에서 생성되는 디스트로핀 형태, 또는 검출 가능한 디스트로핀의 부재를 특징으로 할 수 있다.

[0039] "엑손"은 단백질을 인코딩하는 정의된 핵산 구획, 또는 프리-가공된(또는 전구체) RNA의 어느 부분이 스플라이싱에 의해 제거된 후 RNA 분자의 성숙 형태로 제시되는 핵산 서열을 나타낸다. 성숙 RNA 분자는 메신저 RNA(mRNA) 또는 비-코딩 RNA의 기능적 형태, 예컨대 rRNA 또는 tRNA일 수 있다. 인간 디스트로핀 유전자는 약 79개 엑손을 갖는다.

[0040] "인트론"은 단백질로 번역되지 않는(유전자 내의) 핵산 영역을 나타낸다. 인트론은 전구체 mRNA(프리-mRNA)로 전사되고, 이후 성숙 RNA의 형성 동안 스플라이싱에 의해 제거되는 비-코딩 구획이다.

[0041] "유효량" 또는 "치료 유효량"은 단위 용량으로 또는 일련의 용량의 일부로서, 포유류 대상체에 투여되는, 치료 화합물, 예컨대 글로디르센을 포함하는 안티센스 올리고머의 양을 나타내며, 이는 요망되는 치료 효과를 일으키는 데 효과적이다. 안티센스 올리고머에 있어서, 상기 효과는 디스트로핀의 생성을 증가시키기 위해 선택된 표적 서열의 번역 또는 천연 스플라이스-가공, 또는 엑손 스킵을 억제하여 유발될 수 있다.

[0042] 일부 구현예에서, 유효량은 대상체를 치료하기 위한 시기 동안, 안티센스 올리고머, 또는 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 적어도 약 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg 또는 적어도 20 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 대상체에서 디스트로핀-양성 섬유의 수를 증가시키기 위해, 안티센스 올리고머, 또는 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 적어도 약 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg 또는 적어도 20 mg/kg이다. 다양한 구현예에서, 유효량은 적어도 약 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 20 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 25 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 또는 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 약 30 mg/kg 또는 약 50 mg/kg이다.

[0043] 다양한 구현예에서, 유효량은 대상체에서 디스트로핀의 생성을 증가시키기 위해, 안티센스 올리고머, 또는 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 적어도 약 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg 또는 적어도 20 mg/kg이다. 다양한 구

현예에서, 유효량은 적어도 약 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 20 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 25 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 또는 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 약 30 mg/kg 또는 약 50 mg/kg이다.

[0044] 소정 구현예에서, 유효량은 건강한 동년배 대비 환자에서, 예를 들어 6 MWT에서, 보행 거리를 안정화하거나, 유지하거나, 20% 결손으로부터 개선하기 위해, 안티센스 올리고머, 또는 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물의 적어도 약 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg 또는 적어도 20 mg/kg이다. 다양한 구현예에서, 유효량은 적어도 약 4 mg/kg, 적어도 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 20 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 25 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 또는 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 약 30 mg/kg 또는 약 50 mg/kg이다.

[0045] 소정 구현예에서, 유효량은 대상체에서 디스트로핀-양성 섬유의 수를 증가시키기 위해 적어도 24주, 적어도 36주, 또는 적어도 48주 동안 적어도 약 4 mg/kg, 10 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 또는 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 소정 구현예에서, 대상체에서 디스트로핀-양성 섬유의 증가는 정상 대비 적어도 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%까지이다. 일부 구현예에서, 치료는 디스트로핀-양성 섬유의 수를 환자에서 정상 대비 20~60%, 또는 30~50%까지 증가시킨다.

[0046] 소정 구현예에서, 유효량은 건강한 동년배 대비 환자에서, 예를 들어 6 MWT에서, 보행 거리를 안정화하거나 20% 결손으로부터 개선하기 위해, 적어도 24주, 적어도 36주, 또는 적어도 48주 동안 적어도 약 4 mg/kg, 적어도 약 10 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 또는 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다.

[0047] 다양한 구현예에서, 유효량은 환자에서 디스트로핀 생성을 증가시키기 위해 적어도 24주, 적어도 36주, 또는 적어도 48주 동안 적어도 약 4 mg/kg, 적어도 약 10 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 또는 약 30 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 증가된 디스트로핀 생성은 건강한 동년배 대비 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%, 1%, 1.01%, 1.5%, 2%, 2.01%, 2.5%, 3%, 3.01%, 3.5%, 4%, 4.01%, 4.5%, 5%, 5.01%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 10.5%, 11%, 11.5%, 12%, 12.5%, 13%, 13.5%, 14%, 14.5%, 15%, 15.5%, 16%, 16.5%, 17%, 17.5%, 18%, 18.5%, 19%, 19.5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 60%이다. 소정 구현예에서, 디스트로핀 생성의 증가는 건강한 동년배 대비 약 0.1% 내지 0.5%, 0.5% 내지 0.9%, 0.8% 내지 1%, 0.9% 내지 1.2%, 0.9% 내지 1.0%, 0.9% 내지 1.01%, 1% 내지 1.01%, 1% 내지 1.5%, 1.5% 내지 2%, 1.9% 내지 2.0%, 1.9% 내지 2.01%, 2% 내지 2.01%, 2% 내지 2.5%, 2.5% 내지 3%, 2.9% 내지 3.0%, 2.9% 내지 3.01%, 2% 내지 3.01%, 3% 내지 3.5%, 3.5% 내지 4%, 4% 내지 4.5%, 4.5% 내지 5%, 5% 내지 6%, 6% 내지 7%, 7% 내지 8%, 8% 내지 9%, 9% 내지 10%, 1% 내지 2%, 1% 내지 3%, 1% 내지 5%, 2% 내지 4%, 2% 내지 5%, 4% 내지 6%, 5% 내지 8%, 8% 내지 10%, 1% 내지 5%, 2% 내지 6%, 3% 내지 7%, 4% 내지 8%, 5% 내지 10%, 10% 내지 12%, 12% 내지 15%, 15% 내지 20%, 17% 내지 20%, 20% 내지 22%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 또는 30% 내지 35%만큼일 수 있다.

[0048] "증강시킨다" 또는 "증강시키는" 또는 "증가시킨다" 또는 "증가시키는" 또는 "자극하다" 또는 "자극하는"이란 일반적으로, 예를 들어 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 부재 또는 대조군 화합물에 의해 유도되는 반응 대비 세포 또는 대상체에서 더 큰 생리적 반응(즉, 하류 효과)을 일으키거나 유도하는 골로디르센을 포함하는 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 또는 이의 약학 조성물의 능력을 나타낸다. 측정 가능한 생리적 반응에는 당분야에서의 이해 및 본원의 설명으로부터 자명한 반응들 중에서도 특히, 디스트로핀 단백질의 기능성 형태의 증가된 발현(또는 생성), 또는 근육 조직에서 증가된 디스트로핀-관련 생물학적 활성이 포함될 수 있다. 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%만큼 근육 기능의 증가 또는 개선을 포함하는, 증가된 근육 기능이 또한 측정될 수 있다. 근육 섬유의 약 1%, 2%, 5%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%에서의 증가된 디스트로핀 발현을 포함하는, 기능적 디스트로핀을 발현하는 근육 섬유의 백분율이 또한 측정될 수 있다. 예를 들어, 25~30%의 섬유가 디스트로핀을 발현하는 경우, 약 40%의 근육 기능 개선이 일어날 수 있는 것으로 나타났다(예컨대, 문헌[DelloRusso et al, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002] 참고). 일부 구현예에서, 증가된 디스트로핀 생성은 건강한 동년배 대비 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%, 1%, 1.01%, 1.5%, 2%, 2.01%, 2.5%, 3%, 3.01%, 3.5%, 4%, 4.01%, 4.5%, 5%, 5.01%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 10.5%, 11%, 11.5%, 12%, 12.5%, 13%, 13.5%, 14%, 14.5%, 15%, 15.5%, 16%, 16.5%, 17%, 17.5%, 18%, 18.5%, 19%, 19.5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 60%이다. 소정 구현예에서, 디스트로핀 생성의 증가는 건강한 동년배 대비 약 0.1% 내지 0.5%, 0.5% 내지 0.9%, 0.8% 내지 1%, 0.9% 내지 1.2%, 0.9% 내지 1.0%, 0.9% 내지 1.01%, 1% 내지

1.01%, 1% 내지 1.5%, 1.5% 내지 2%, 1.9% 내지 2.0%, 1.9% 내지 2.01%, 2% 내지 2.01%, 2% 내지 2.5%, 2.5% 내지 3%, 2.9% 내지 3.0%, 2.9% 내지 3.01%, 2% 내지 3.01%, 3% 내지 3.5%, 3.5% 내지 4%, 4% 내지 4.5%, 4.5% 내지 5%, 5% 내지 6%, 6% 내지 7%, 7% 내지 8%, 8% 내지 9%, 9% 내지 10%, 1% 내지 2%, 1% 내지 3%, 1% 내지 5%, 2% 내지 4%, 2% 내지 5%, 4% 내지 6%, 5% 내지 8%, 8% 내지 10%, 1% 내지 5%, 2% 내지 6%, 3% 내지 7%, 4% 내지 8%, 5% 내지 10%, 10% 내지 12%, 12% 내지 15%, 15% 내지 20%, 17% 내지 20%, 20% 내지 22%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 또는 30% 내지 35%만큼일 수 있다. 본원에서 사용되는 "증가된 디스트로핀 생성", "디스트로핀의 생성 증가" 등은 대상체에서 디스트로핀, 디스트로핀-유사 단백질, 또는 기능적 디스트로핀 단백질 중 적어도 하나의 생성 증가를 나타낸다.

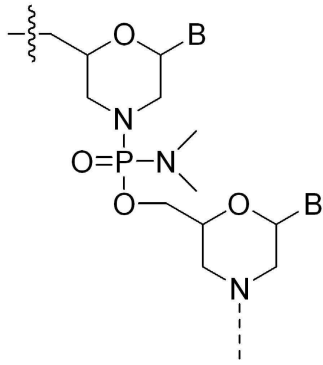
[0049] "증가된" 또는 "증강된" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의미한" 양이며, 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 부재(제제의 부재) 또는 대조군 화합물에 의해 생성되는 양의 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50배 이상(예컨대, 500, 1000배)(모든 정수 및 그 사이 그리고 1을 초과하는 소수점 포함), 예컨대, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등)인 증가가 포함될 수 있다.

[0050] 용어 "감소시킨다" 또는 "억제한다"는 일반적으로 본 발명의 하나 이상의 안티센스 화합물이 진단 분야의 일상적 기법에 따라 측정되는, 관련 생리 또는 세포 반응, 예컨대 본원에서 기재된 질병 또는 질환의 증상을 "감소시키는" 능력에 관한 것일 수 있다. 관련 생리 또는 세포 반응(생체내 또는 시험관내)은 당업자에게 명확할 것이며, 근디스트로피의 증상 또는 병리의 감소, 또는 디스트로핀의 결함이 있는 형태, 예컨대 DMD 또는 BMD를 갖는 개인에서 발견되는 디스트로핀의 변경된 형태의 발현 감소가 포함될 수 있다. 반응에서 "감소시킨다"는 안티센스 화합물의 부재 또는 대조군 조성물에 의해 일어나는 반응에 비해 통계적으로 유의미할 수 있고, 그 사이의 모든 정수를 포함하여, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 감소가 포함될 수 있다.

[0051] 본원에서 사용되는 용어 "기능" 및 "기능적" 등은 생물학적, 효소적, 또는 치료적 기능을 나타낸다.

[0052] "기능적" 디스트로핀 단백질은 일반적으로 DMD 또는 BMD를 갖는 소정 대상체에 존재하는 디스트로핀 단백질의 변경되거나 "결함이 있는" 형태에 비해 전형적으로 근디스트로피에 달리 특징적인 근육 조직의 진행성 분해를 감소시키기 충분한 생물학적 활성을 갖는 디스트로핀 단백질을 나타낸다. 소정 구현예에서, 기능적 디스트로핀 단백질은 당분야의 일상적 기법에 따라 측정할 때, 야생형 디스트로핀의 시험관내 또는 생체내 생물학적 활성의 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%(그 사이의 모든 정수 포함)를 가질 수 있다. 하나의 예로서, 시험관내 근육 배양에서 디스트로핀-관련 활성은 근육대롱 크기, 근원섬유 조직(또는 해체), 수축 활성, 및 아세틸콜린 수용체의 자연적 클러스터링(예컨대, 문헌[Brown et al., Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999] 참고)에 따라 측정될 수 있다. 동물 모델은 또한 질병의 발병기전을 연구하기 위한 귀중한 자원이며, 디스트로핀-관련 활성을 평가하기 위한 수단을 제공한다. DMD 연구를 위한 2가지 가장 널리 사용되는 동물 모델은 mdx 마우스 및 골든 레트리버 근디스트로피(GRMD) 개이며, 둘 다 디스트로핀 음성이다(예컨대, 문헌[Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003] 참고). 이들 및 다른 동물 모델은 다양한 디스트로핀 단백질의 기능적 활성을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 디스트로핀의 절단된 형태, 예컨대 본 개시의 소정 엑손-스킵 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 생성되는 형태가 포함된다.

[0053] 용어 "모르폴리노", "모르폴리노 올리고머", 또는 "PMO"는 하기 일반 구조의 포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고머를 나타내며:



B = 뉴클레오염기

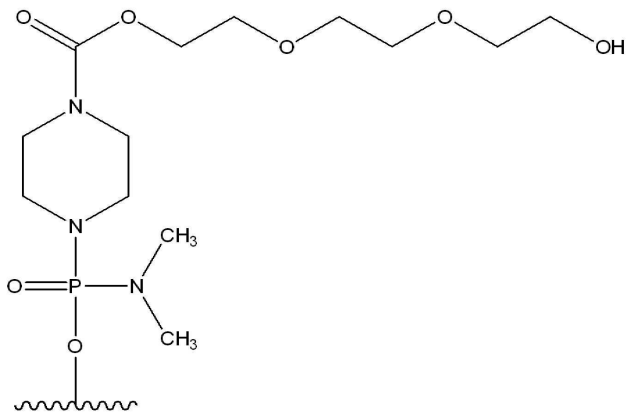
[0054]

[0055]

문헌[Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997)]의 도 2에 기재된 바와 같다. 본원에서 기재된 바와 같은 모르폴리노는 상기 일반 구조의 모든 입체이성질체(및 이의 혼합물) 및 구성을 포함하려는 것이다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조, 및 결합 특징은 모두 본원에 참조로 포함되는 U.S. 특허 번호 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,521,063, 5,506,337, 8,076,476, 및 8,299,206에 상세히 기재되어 있다. 소정 구현예에서, 모르폴리노는 그 안정성 및/또는 용해도를 증가시키기 위해 올리고머의 5' 및 3' 말단에 "꼬리" 모이어티가 컨주게이션된다. 예시적인 꼬리에는 다음이 포함된다:

[0056]

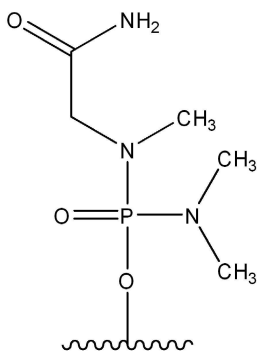
(1)



[0057]

[0058]

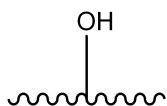
(2)



[0059]

[0060]

(3)



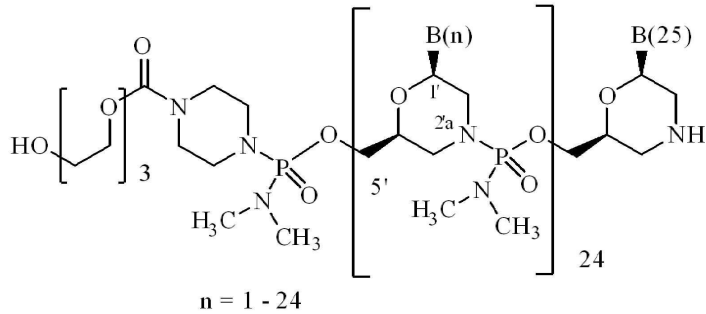
[0061]

[0062]

또한 코드명 "SRP-4053"으로도 알려진 "콜로디르센"은 염기 서열 5'- GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3' (SEQ ID

NO: 1)을 갖는 PMO이다. 콜로디르센은 CAS 등록 번호 1422959-91-8로 등록되어 있다. 화학명에는 전체-*P*-암보-[*P*,2',3'-트리테옥시-*P*-(디메틸아미노)-2',3'-이미노-2',3'-세코](2'a→5')(G-T-T-G-C-C-T-C-C-G-G-T-T-C-T-G-A-A-G-G-T-G-T-T-C) 5'-[4-({2-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]에톡시}카보닐)-*N,N*-디메틸피페라진-1-포스폰아미데이트]가 포함된다.

[0063] 콜로디르센은 하기 구조를 갖는다:

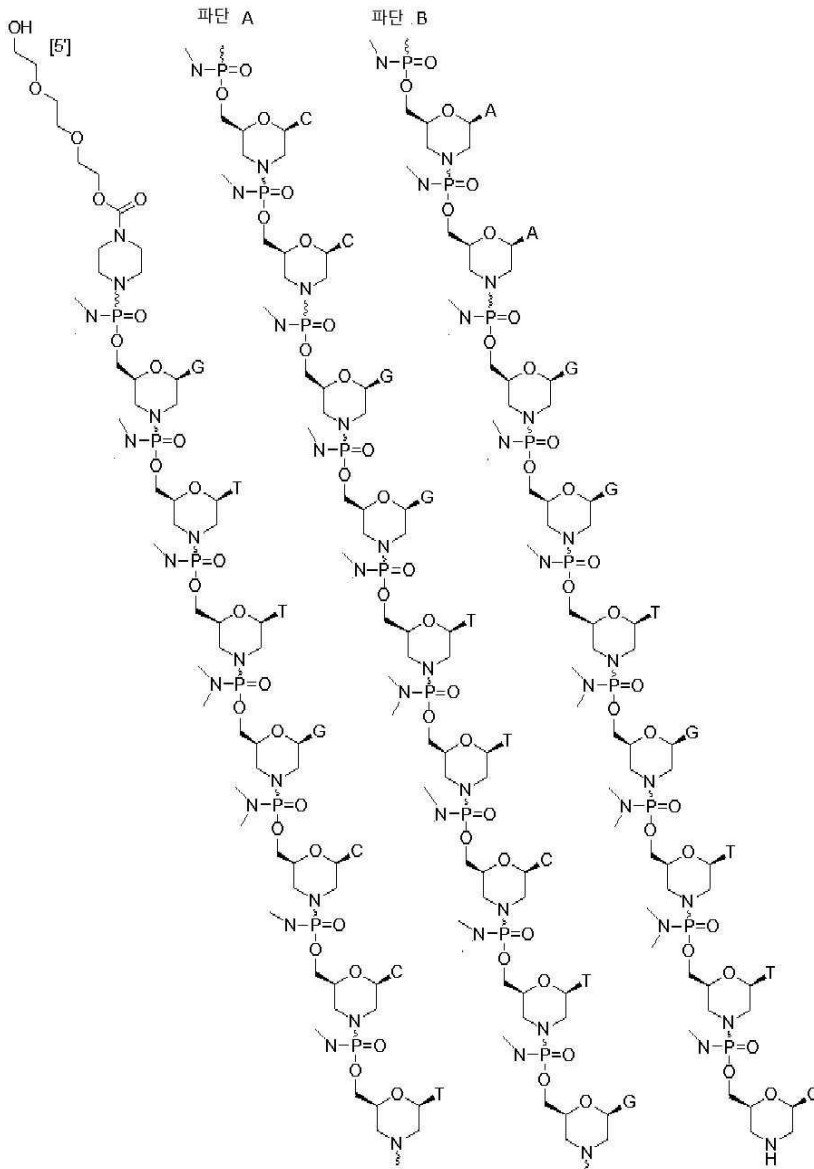


B(1-25):

G-T-T-G-C-C-T-C-C-G-G-T-T-C-T-G-A-A-G-G-T-G-T-T-C

[0064]

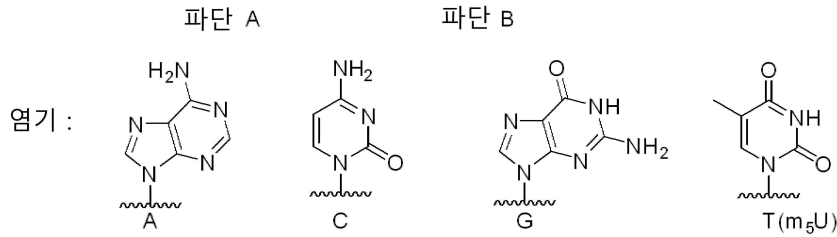
[0065] 또한 하기 화학 구조에 의해 나타낸다:



[0066]

[0067] 5' 말단에서 3' 말단으로의 염기 서열

[0068] GTTGCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC

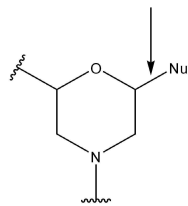


[0069]

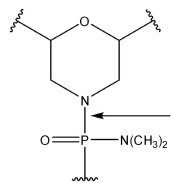
[0070] 명확성을 위해, 예를 들어, 콜로디르센의 상기 구조를 포함하는 본 개시의 구조는 5'부터 3'까지 연속적이며, 컴팩트한 형태로 전체 구조의 도시의 편의성을 위해, "파단 A" 및 "파단 B"로 표시된 다양한 예시 파단이 포함되었다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 예를 들어, "파단 A"의 각각의 표시는 이들 지점에서 구조 예시의 계속을 나타낸다. 당업자는 이것이 상기 구조에서 "파단 B"의 각 경우에 대해서도 해당됨을 이해한다. 그러나, 예시 파단은 어느 것도 상기 구조의 실제 중단을 나타내는 것이 아니며 당업자가 이를 의미하는 것으로 이해해서는 안된다.

[0071] 본원에서 사용되는 구조식 내에서 사용되는 괄호 세트는 괄호 사이의 구조 특징이 반복됨을 나타낸다. 일부 구현예에서, 사용되는 괄호는 "[" 및 "]"일 수 있고, 소정 구현예에서, 반복 구조 특징을 나타내기 위해 사용되는 괄호는 "(" 및 ")"일 수 있다. 일부 구현예에서, 괄호 내 구조 특징의 반복 열거 횟수는 괄호 밖에 나타낸 수, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7 등이다. 다양한 구현예에서, 괄호 사이 구조 특징의 반복 열거 횟수는 괄호 밖에 나타낸 변수, 예컨대 "Z"에 의해 나타낸다.

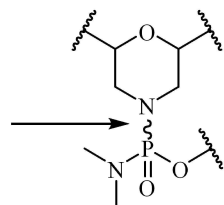
[0072] 본원에서 사용되는 직선 결합 또는 구불구불한 결합 구조식 내의 키랄 탄소 또는 인 원자에 대해 그려진 결합은 키랄 탄소 또는 인의 입체화학이 정의되어 있지 않고 키랄 중심의 모든 형태를 포함하려는 것임을 나타낸다. 이러한 예시의 예를 아래에 도시한다:



[0073]



[0074]



[0075]

[0076] 본원에서 사용되는 어구 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여되는"은 장 및 국소 투여 이외의, 보통 주사에 의한, 투여 방식을 의미하며, 비제한적으로 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 낭내, 안구내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 경피부, 관절내, 낭하, 지주막하, 척추내 및 흉골내 주사 및 주입이 포함된다.

[0077] 어구 "약학적으로 허용 가능한"은 성분 또는 조성물이 제형물에 포함되는 다른 성분 및/또는 이로 치료받는 대상체와 화학적으로 및/또는 독성학적으로 상용성이어야 함을 의미한다.

[0078] 본원에서 사용되는 어구 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 유형의 무독성, 비활성 고체, 반고체 또는 액

체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질 또는 제형 보조제를 의미한다. 약학적으로 허용 가능한 담체로 작용할 수 있는 물질의 일부 예는 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 이의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말화 트래거캔스; 맥아; 젤라틴; 활석; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일, 예컨대 땅콩 오일, 면실유, 잇꽃유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예컨대 마그네슘 하이드록시드 및 알루미늄 하이드록시드; 알긴산; 발열원-비함유수; 등장성 식염수; 링거 용액; 에틸 알코올, 및 포스페이트 완충 용액뿐만 아니라 다른 무독성 상용성 윤활제, 예컨대 나트륨 라우릴 설페이트 및 마그네슘 스테아레이트, 뿐만 아니라 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 풍미제 및 향료 제제, 보존제 및 항산화제가 또한 제형자의 판단에 따라 조성물에 존재할 수 있다.

[0079] 용어 디스트로핀 합성 또는 생성의 "복원"은 일반적으로 본원에서 기재된 바와 같은 안티센스 올리고머로의 치료 후 근디스트로핀 환자에서 디스트로핀의 절단된 형태를 포함하는 디스트로핀 단백질의 생성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 치료는 환자에서 디스트로핀 생성을 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%(이들 사이의 모든 정수 포함)만큼 증가시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 디스트로핀-양성 섬유의 수를 대상체에서 정상적 적어도 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 95% 내지 100%까지 증가시킨다. 다른 구현예에서, 치료는 디스트로핀-양성 섬유의 수를 대상체에서 정상적 약 20% 내지 약 60%, 또는 약 30% 내지 약 50%까지 증가시킨다. 치료 후 환자에서 디스트로핀-양성 섬유의 퍼센트는 알려진 기법을 사용하여 근육 생검에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 근육 생검은 적합한 근육, 예컨대 환자에서 상완 이두근으로부터 취해질 수 있다.

[0080] 양성 디스트로핀 섬유 백분율 분석은 치료-전 및/또는 치료-후 또는 치료 과정에 걸친 시점에 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료-후 생검은 치료-전 생검으로부터의 반대쪽 근육으로부터 취해진다. 치료-전 및 치료-후 디스트로핀 발현 연구는 디스트로핀에 대한 임의의 적합한 검정을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역조직화학 검출은 디스트로핀에 대한 마커인 항체, 예컨대 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 사용하여 근육 생검으로부터 조직 구획 상에서 수행된다. 예를 들어, 디스트로핀에 대해 고도 민감성 마커인 MANDYS106 항체가 사용될 수 있다. 임의의 적합한 이차 항체가 사용될 수 있다.

[0081] 일부 구현예에서, 디스트로핀-양성 섬유의 퍼센트는 양성 섬유의 수를 계수되는 전체 섬유로 나누어 계산된다. 정상 근육 샘플은 100% 디스트로핀-양성 섬유를 갖는다. 따라서, 디스트로핀-양성 섬유의 퍼센트는 정상 대비 백분율로 표현될 수 있다. 치료전 근육뿐만 아니라 복귀 섬유에서 미량 수준의 디스트로핀의 존재를 제어하기 위해, 치료-후 근육에서 디스트로핀-양성 섬유를 계수할 때 각각의 환자로부터 치료-전 근육 구획을 사용하여 기준선이 설정될 수 있다. 이는 상기 환자에서 치료-후 근육 구획에서 디스트로핀-양성 섬유를 계수하기 위한 역치로 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 항체-염색 조직 구획은 또한 Bioquant 이미지 분석 소프트웨어(Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN)를 사용하여 디스트로핀 정량을 위해 사용될 수 있다. 전체 디스트로핀 형광 신호 세기는 정상 대비 백분율로 보고될 수 있다. 또한, 모노클로날 또는 폴리클로날 항-디스트로핀 항체를 이용하는 웨스턴 블롯 분석이 디스트로핀 양성 섬유 백분율을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, Novacastra의 항-디스트로핀 항체 NCL-Dys1이 사용될 수 있다. 디스트로핀-양성 섬유 백분율은 또한 사르코글리칸 복합체( $\beta$ ,  $\gamma$ )의 성분 및/또는 뉴런 NOS의 발현을 결정하여 분석될 수 있다.

[0082] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머, 예컨대 골로디르센으로의 치료는 치료 없이 예상될 DMD 환자에서의 진행성 호흡기 근육 기능이상 및/또는 부전을 늦추거나 감소시킨다. 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머로의 치료는 치료 없이 예상될 환기 보조에 대한 필요성을 감소시키거나 제거할 수 있다. 일부 구현예에서, 질병 과정을 추적하기 위한 호흡기 기능의 측정뿐만 아니라 가능한 치료 개입의 평가에는 최대 흡기압(MIP), 최대 호기압(MEP) 및 강제 폐활량(FVC)이 포함된다. MIP 및 MEP는 개인이 흡기 및 호기 동안 각각 생성할 수 있는 압력 수준을 측정하며, 호흡기 근육 강도의 민감한 척도이다. MIP는 횡경막 근육 쇠약의 척도이다.

[0083] 일부 구현예에서, MEP는 MIP 및 FVC를 포함하는 다른 폐 기능 평가에서 변화 전에 감소할 수 있다. 소정 구현예에서, MEP는 호흡기 기능부전의 초기 표시자일 수 있다. 소정 구현예에서, FVC는 최대 흡기 후 강제 호기 동안 배출되는 전체 공기 부피를 측정하기 위해 사용될 수 있다. DMD 환자에서, FVC는 십대 초반까지 신체 성장과 함께 증가한다. 그러나, 성장이 느려지거나 질병 진행에 의해 방해받고 근육 쇠약이 진행됨에 따라, 폐활량이 감소기에 들어가 10세 내지 12세 후 매년 약 8 내지 8.5%의 평균 속도로 감소한다. 소정 구현예에서, 예측 MIP(%) (체중에 대해 조정된 MIP), 예측 MEP(%) (연령에 대해 조정된 MEP) 및 예측 FVC(%) (연령 및 신장에 대해 조정된 FVC)는 지지 분석이다.

- [0084] 본원에서 사용되는 "대상체" 또는 "환자"에는 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 치료받을 수 있는 증상을 나타내거나 증상을 나타낼 위험에 처한 임의의 동물, 예컨대 DMD 또는 BMD, 또는 이러한 질환과 연관된 임의의 증상(예컨대, 근육 섬유 손실)을 갖거나 가질 위험에 처한 대상체가 포함된다. 적합한 대상체(환자)에는 실험실 동물(예컨대 마우스, 래트, 토끼, 또는 기니피그), 농장 동물, 및 가축 또는 애완 동물(예컨대 고양이 또는 개)이 포함된다. 비-인간 영장류, 및 바람직하게는 인간 환자가 포함된다. 또한 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 디스트로핀 유전자의 돌연변이를 갖는 대상체에서 디스트로핀을 생성하는 방법이 포함된다.
- [0085] 본원에서 사용되는 "소아 환자"는 경계를 포함하여 1 내지 21세 환자이다.
- [0086] 본원에서 사용되는 어구 "전신 투여", "전신 투여되는", "말초 투여" 및 "말초 투여되는"은 이것이 환자의 시스템에 들어감에 따라 대사 및 다른 유사 공정을 거치도록 하는, 직접 중추 신경계 내로 투여되는 것이 아닌 화합물, 약물 또는 다른 물질의 투여, 예를 들어, 피하 투여를 의미한다.
- [0087] 본원에서 사용되는 "만성 투여"는 연속적이고, 정기적인, 장기 치료 투여, 즉 실질적인 중단이 없는 주기적 투여를 나타낸다. 예를 들어, 환자에서 근디스트로피를 치료하는 목적을 위해, 적어도 수 주 또는 수 개월 또는 수 년의 시기 동안 매일 투여한다. 예를 들어, 환자에서 근디스트로피를 치료하는 목적을 위해, 적어도 수 개월 또는 수 년의 시기 동안 매주 투여한다(예컨대, 적어도 6주 동안 매주, 적어도 12주 동안 매주, 적어도 24주 동안 매주, 적어도 48주 동안 매주, 적어도 72주 동안 매주, 적어도 96주 동안 매주, 적어도 120주 동안 매주, 적어도 144주 동안 매주, 적어도 168주 동안 매주, 적어도 180주 동안 매주, 적어도 192주 동안 매주, 적어도 216주 동안 매주, 또는 적어도 240주 동안 매주).
- [0088] 본원에서 사용되는 "주기적 투여"는 용량 간 간격을 갖는 투여를 나타낸다. 예를 들어, 주기적 투여에는 반복될 수 있는 고정 간격마다의 투여(예컨대, 매주, 매월)가 포함된다.
- [0089] 본원에서 사용되는 "위약"은 치료 효과를 갖지 않고 대조군으로 사용될 수 있는 성분을 나타낸다.
- [0090] 본원에서 사용되는 "위약 대조군"은 조합 치료법, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 비-스테로이드성 소염 화합물, 및/또는 또 다른 약학 조성물이 아닌 위약을 제공받는 대상체 또는 환자를 나타낸다. 위약 대조군은 대상체 또는 환자와 동일한 돌연변이 상태를 갖거나, 유사한 연령이거나, 유사한 보행 능력을 갖거나, 및/또는 동일한 동시 투약(스테로이드 등을 포함)을 제공받을 수 있다.
- [0091] 어구 "표적화 서열", "염기 서열", 또는 "뉴클레오타이드 서열"은 표적 프리-mRNA에서 뉴클레오타이드 서열과 상보적인 올리고머의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 본 개시의 일부 구현예에서, 표적 프리-mRNA에서 뉴클레오타이드 서열은 H53A(+36+60)로 명명된 디스트로핀 프리-mRNA에서의 엑손 53 어닐링 부위이다.
- [0092] 대상체(예컨대 포유류, 예컨대 인간) 또는 세포의 "치료"는 대상체 또는 세포의 자연적 과정을 변경하려는 시도로 사용되는 임의의 유형의 개입이다. 치료에는 비제한적으로 올리고머 또는 이의 약학 조성물의 투여가 포함되며, 예방적으로 또는 병리적 사건의 개시 또는 병인 제거와의 접촉에 뒤이어 수행될 수 있다. 치료에는 소정 형태의 근디스트로피에서와 같이, 디스트로핀 단백질과 연관된 질병 또는 질환의 증상 또는 병리에 대한 임의의 요망되는 효과가 포함되며, 예를 들어 치료받고 있는 질병 또는 질환의 하나 이상의 측정 가능한 마커의 최소 변화 또는 개선이 포함될 수 있다. 또한, 치료받고 있는 질병 또는 질환의 진행 속도 감소, 그 질병 또는 질환의 개시 지연, 또는 그러한 개시의 중증도 감소에 대해 유도될 수 있는 "예방적" 치료가 포함된다. "치료" 또는 "예방"이 반드시 질병 또는 질환, 또는 이의 연관된 증상의 완전한 박멸, 근치, 또는 예방을 나타내는 것은 아니다.
- [0093] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머로 치료는 치료 없이 예상될 또는 치료 없이 예상될 디스트로핀 생성을 증가시키고, 질병 진행을 지연하고, 보행 손실을 늦추거나 감소시키고, 근육 염증을 감소시키고, 근육 손상을 감소시키고, 근육 기능을 개선하고, 폐 기능 손실을 감소시키고, 및/또는 근육 재생을 증강시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 질병 진행을 유지하거나, 지연하거나, 늦춘다. 일부 구현예에서, 치료는 보행을 유지하거나 보행 손실을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 폐 기능을 유지하거나 폐 기능의 손실을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 치료는, 예를 들어, 6분 보행 평가(6MWT)에 의해 측정되는, 환자에서의 안전한 보행 거리를 유지하거나 증가시킨다. 일부 구현예에서, 치료는 10미터를 걷는 데/뛰는 데 걸리는 시간을 유지하거나 감소시킨다(즉, 10미터 보행/구보 평가). 일부 구현예에서, 치료는 바로 누웠다가 기립하는 데 걸리는 시간을 유지하거나 감소시킨다(즉, 기립까지의 시간 평가). 일부 구현예에서, 치료는 4개의 표준 계단을 올라가는 데 걸리는 시간을 유지하거나 감소시킨다(즉, 4-계단 오름 평가). 일부 구현예에서, 치료는, 예를 들어 MRI(예컨대, 다리 근육의 MRI)에 의해 측정되는, 환자에서의 근육 염증을 유지하거나 감소시킨다. 일부 구현예에서, MRI는 T2 및/

또는 지방 분율을 측정하여 근육 변성을 확인한다. MRI는 염증, 부종, 근육 부상 및 지방 침윤에 의해 유도되는 근육 구조 및 조성 변화를 확인할 수 있다.

[0094] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머로의 치료는 디스트로핀 생성을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 증가된 디스트로핀 생성은 건강한 동년배 대비 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%, 1%, 1.01%, 1.5%, 2%, 2.01%, 2.5%, 3%, 3.01%, 3.5%, 4%, 4.01%, 4.5%, 5%, 5.01%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 10.5%, 11%, 11.5%, 12%, 12.5%, 13%, 13.5%, 14%, 14.5%, 15%, 15.5%, 16%, 16.5%, 17%, 17.5%, 18%, 18.5%, 19%, 19.5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 60%이다. 소정 구현예에서, 디스트로핀 생성의 증가는 건강한 동년배 대비 약 0.1% 내지 0.5%, 0.5% 내지 0.9%, 0.8% 내지 1%, 0.9% 내지 1.2%, 0.9% 내지 1.0%, 0.9% 내지 1.01%, 1% 내지 1.01%, 1% 내지 1.5%, 1.5% 내지 2%, 1.9% 내지 2.0%, 1.9% 내지 2.01%, 2% 내지 2.01%, 2% 내지 2.5%, 2.5% 내지 3%, 2.9% 내지 3.0%, 2.9% 내지 3.01%, 2% 내지 3.01%, 3% 내지 3.5%, 3.5% 내지 4%, 4% 내지 4.5%, 4.5% 내지 5%, 5% 내지 6%, 6% 내지 7%, 7% 내지 8%, 8% 내지 9%, 9% 내지 10%, 1% 내지 2%, 1% 내지 3%, 1% 내지 5%, 2% 내지 4%, 2% 내지 5%, 4% 내지 6%, 5% 내지 8%, 8% 내지 10%, 1% 내지 5%, 2% 내지 6%, 3% 내지 7%, 4% 내지 8%, 5% 내지 10%, 10% 내지 12%, 12% 내지 15%, 15% 내지 20%, 17% 내지 20%, 20% 내지 22%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 또는 30% 내지 35%만큼일 수 있다.

[0095] 소정 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고머로의 치료는 디스트로핀 생성을 증가시키고 치료 없이 예상될 보행 손실을 늦추거나 감소시킨다. 예를 들어, 치료는 대상체에서 보행 능력을 안정화하거나, 유지하거나, 개선하거나, 증가시킬 수 있다(예컨대, 보행 안정화). 일부 구현예에서, 치료는, 예를 들어, McDonald 등(본원에 참조로 포함된 문헌[Muscle Nerve, 2010; 42:966-74])에 의해 기재되는 6분 보행 평가(6MWT)에 의해 측정되는, 환자에서의 안정한 보행 거리를 유지하거나 증가시킨다. 6분 보행 거리(6MWD)의 변화는 절대값, 백분율 변화 또는 예측% 값의 변화로 표현될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료는 건강한 동년배 대비 대상체에서 20% 결손으로부터 6MWT에서 안정한 보행 거리를 유지하거나 개선한다. 건강한 동년배의 전형적인 수행 대비 6MWT에서 DMD 환자의 수행은 예측% 값을 계산하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 예측 6MWD(%)는 남성에 대해 하기 공식을 사용하여 계산될 수 있다:  $196.72 + (39.81 \times \text{연령}) - (1.36 \times \text{연령}^2) + (132.28 \times \text{신장(미터)})$ . 여성에 있어서, 예측 6MWD(%)는 하기 공식을 사용하여 계산될 수 있다:  $188.61 + (51.50 \times \text{연령}) - (1.86 \times \text{연령}^2) + (86.10 \times \text{신장(미터)})$ (본원에 참조로 포함되는 문헌[Henricson et al. PLoS Curr., 2012, version 2]).

[0096] 일부 구현예에서, 안티센스 올리고머로의 치료는 환자에서의 안정한 보행 거리를 기준선으로부터 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 또는 50 미터(사이의 모든 정수 포함) 초과까지 증가시킨다. 일부 구현예에서, 증가된 디스트로핀 생성은 건강한 동년배 대비 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%, 1%, 1.01%, 1.5%, 2%, 2.01%, 2.5%, 3%, 3.01%, 3.5%, 4%, 4.01%, 4.5%, 5%, 5.01%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 10.5%, 11%, 11.5%, 12%, 12.5%, 13%, 13.5%, 14%, 14.5%, 15%, 15.5%, 16%, 16.5%, 17%, 17.5%, 18%, 18.5%, 19%, 19.5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 60%이다. 소정 구현예에서, 디스트로핀 생성의 증가는 건강한 동년배 대비 약 0.1% 내지 0.5%, 0.5% 내지 0.9%, 0.8% 내지 1%, 0.9% 내지 1.2%, 0.9% 내지 1.0%, 0.9% 내지 1.01%, 1% 내지 1.01%, 1% 내지 1.5%, 1.5% 내지 2%, 1.9% 내지 2.0%, 1.9% 내지 2.01%, 2% 내지 2.01%, 2% 내지 2.5%, 2.5% 내지 3%, 2.9% 내지 3.0%, 2.9% 내지 3.01%, 2% 내지 3.01%, 3% 내지 3.5%, 3.5% 내지 4%, 4% 내지 4.5%, 4.5% 내지 5%, 5% 내지 6%, 6% 내지 7%, 7% 내지 8%, 8% 내지 9%, 9% 내지 10%, 1% 내지 2%, 1% 내지 3%, 1% 내지 5%, 2% 내지 4%, 2% 내지 5%, 4% 내지 6%, 5% 내지 8%, 8% 내지 10%, 1% 내지 5%, 2% 내지 6%, 3% 내지 7%, 4% 내지 8%, 5% 내지 10%, 10% 내지 12%, 12% 내지 15%, 15% 내지 20%, 17% 내지 20%, 20% 내지 22%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 또는 30% 내지 35%만큼일 수 있다.

[0097] DMD 환자에서 근육 기능의 손실은 정상 아동기 성장 및 발달을 배경으로 일어날 수 있다. 실제로, DMD를 갖는 어린이가 어릴수록 진행성 근육 손상에도 불구하고 약 1년 과정에 걸쳐 6MWT 동안 보행하는 거리 증가를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, DMD 환자로부터의 6MWD가 전형적으로 발달 중인 대조군 대상체 그리고 연령 및 성별 매칭된 대상체로부터의 기존 정규 데이터와 비교된다. 일부 구현예에서, 정상 성장 및 발달이 정규 데이터에 피팅된 연령 및 신장 기준 공식을 사용해서 설명될 수 있다. 이러한 공식이 DMD를 갖는 대상체에서 6MWD를 예측 퍼센트(예측%) 값으로 전환하는 데 사용될 수 있다. 소정 구현예에서, 예측% 6MWD 데이터 분석은 정상 성장 및 발달을 설명하는 방법을 나타내며, 초기 연령(예컨대, 7세 이하)에서의 기능 획득이 DMD를 갖는 환자에서의 능력 개선보다 안정하게 나타남을 보일 수 있다(본원에서 참조로 나타내는 문헌[Henricson et al. PLoS Curr.,

2012, version 2]).

- [0098] 상이한 안티센스 분자를 구별하기 위해 안티센스 분자 명명 시스템이 제안되고 공개되었다(문헌[Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654] 참고). 상기 명명은 특히 모두 아래에 나타난 바와 같은 동일한 표적 영역에 대해, 몇몇 약간 상이한 안티센스 분자를 평가할 때 관련된다:
- [0099] H#A/D(x:y).
- [0100] 첫 번째 문자는 종을 나타낸다(예컨대 H: 인간, M: 무린, C: 개). "#"은 표적 디스트로핀 엑손 번호를 나타낸다. "A/D"는 각각 엑손의 시작 및 끝에서의 수신체 또는 공여체 스플라이스 부위를 나타낸다. (x y)는 어닐링 좌표를 나타내며, 여기서 "-" 또는 "+"는 각각 인트론 또는 엑손 서열을 나타낸다. 예를 들어, A(-6+18)은 표적 엑손 앞 인트론의 마지막 6개 염기 및 표적 엑손의 처음 18개 염기를 나타낼 것이다. 가장 가까운 스플라이스 부위는 이들 좌표에 "A"가 선행할 수신체일 것이다. 공여체 스플라이스 부위에서 어닐링 좌표의 기제는 D(+2-18)일 수 있고, 여기서 마지막 2개 엑손 염기 및 처음 18개 인트론 염기가 안티센스 분자의 어닐링 부위에 해당한다. A(+65+85)로 나타낼 전체 엑손 어닐링 좌표는, 즉 그 엑손의 시작으로부터 65번째와 85번째 뉴클레오타이드 사이의 부위이다.
- [0101] **II. 안티센스 올리고뉴클레오타이드**
- [0102] 엑손 53의 스킵을 일으키기 위한 디스트로핀 유전자의 프리-mRNA를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 본 개시의 방법에 따라 사용된다.
- [0103] 이러한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 mRNA의 번역을 차단하거나 억제하도록 또는 천연 프리-mRNA 스플라이스 가공을 억제하도록 설계될 수 있고, 이것이 혼성화하는 표적 서열"에 대해 유도되는" 또는 이"에 대해 표적화되는" 것으로 언급될 수 있다. 표적 서열은 전형적으로 mRNA의 AUG 시작 코돈, 번역 억제 올리고머, 또는 프리-가공된 mRNA의 스플라이스 부위, 스플라이스 억제 올리고머(SSO)를 포함하는 영역이다. 스플라이스 부위에 대한 표적 서열에는 프리가공된 mRNA의 정상 스플라이스 수신체 접합부의 하류 1개 내지 약 25개 염기쌍에 5' 말단을 갖는 mRNA 서열이 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 스플라이스 부위를 포함하거나 전적으로 엑손 코딩 서열 내에 함유되거나 스플라이스 수신체 또는 공여체 부위에 걸쳐 있는 프리가공된 mRNA의 임의의 영역일 수 있다. 올리고머는 상술된 방식으로 표적의 핵산에 대해 표적화되는 경우, 보다 일반적으로 생물학적으로 관련된 표적, 예컨대 단백질, 바이러스, 또는 박테리아"에 대해 표적화된" 것으로 언급된다.
- [0104] 소정 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 53 표적 영역과 특이적으로 혼성화하며 엑손 53 스킵을 유도한다. 소정 구현예에서, 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 53 표적 영역과 혼성화하고 엑손 53 스킵을 유도하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고머(PMO)이다.
- [0105] 소정 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 골로디르센이다.
- [0106] 골로디르센은 천연 핵산 구조의 재설계인 포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고머(PMO)로 불리는 독특한 클래스의 신규 합성 안티센스 RNA 치료제에 속한다. 골로디르센은 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 53 표적 영역과 혼성화하며 엑손 53 스킵을 유도하는 PMO이다. 골로디르센은 상기 인용된 참고문헌, 및 추가로 그 전문이 본원에 참조로 명시적으로 포함되는 국제 특허 출원 일련 번호 PCT/US17/40318에 상세히 나타난 방법을 이용하여, 단계식 고상 합성에 의해 생성될 수 있다.
- [0107] PMO는 생체내 비임상 관찰에 기반하여 잠재적인 임상적 장점을 제공한다. PMO는 생체내 안정성을 확보하기 위해 이를 뉴클레아제에 의한 효소 분해로부터 보호하는 RNA의 당 고리에 대한 개질을 포함한다. PMO는 RNA, DNA 및 여러 다른 합성 안티센스 RNA 올리고뉴클레오타이드에서 확인되는 5-원 리보푸라노실 고리를 대체하는 6-원 합성 모르폴리노 고리의 사용을 통해 부분적으로 천연 핵산 및 다른 안티센스 올리고뉴클레오타이드 클래스와 구별된다.
- [0108] PMO에 특이적인 비하전 포스포로디아미테이트 결합은 단백질에 대한 표적을 벗어난 결합을 감소시킬 수 있는 것으로 여겨진다. PMO는 다른 임상-단계 합성 안티센스 RNA 올리고뉴클레오타이드에서 사용되는 음으로 하전된 포스포로티오에이트 결합 대신 각각의 모르폴리노 고리를 연결하는 비하전 포스포로디아미테이트 결합을 갖는다.
- [0109] DMD 유전자에서 프레임을 벗어난 돌연변이에 의해 유도되는 DMD의 치료에 대한 잠재적 치료 접근이 프레임-내 돌연변이에 의해 유도되는, BMD로 알려진 더 온건한 형태의 디스트로핀병증에 의해 제시된다. 프레임을 벗어난 돌연변이를 프레임-내 돌연변이로 전환하는 능력은 가상적으로 mRNA 해독률을 보존하고 내부적으로 단축되었지

만 아직 기능적인 디스트로핀 단백질을 생성할 것이다. 골로디르센은 이를 달성하기 위해 설계되었다.

- [0110] 골로디르센은 디스트로핀 프리-mRNA를 표적화하며 엑손 53 스킵을 유도하여, 성숙, 스플라이스된 mRNA 전사체로부터 엑손 53이 제외되거나 이를 스킵된다. 엑손 53을 스킵함으로써, 손상된 해독틀이 프레임-내 돌연변이로 복원된다. DMD는 다양한 유전적 서브타입으로 이루어지는 한편, 골로디르센은 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 53을 스킵하도록 특이적으로 설계되었다. 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 DMD 돌연변이에는 엑손 53에 근접한 엑손의 결실이 포함되며(즉, 엑손 52 또는 엑손 54의 결실 포함), DMD 환자의 하위군(8%)을 포함한다.
- [0111] 골로디르센의 25개 뉴클레오타이드의 서열은 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 53 내의 특이적 표적 서열과 상보적으로 설계된다. 골로디르센 내 각각의 모르폴리노 고리는 DNA에서 확인되는 4개의 헤테로사이클릭 뉴클레오타이드(아데닌, 시토신, 구아닌, 및 티민) 중 하나에 연결된다.
- [0112] 표적화된 프리-mRNA 서열과 골로디르센의 혼성화는 프리-mRNA 스플라이싱 복합체의 형성을 방해하며 성숙 mRNA로부터 엑손 53을 결실시킨다. 골로디르센의 구조 및 입체형태는 상보적 서열과의 서열-특이적 염기쌍 형성을 허용한다. 예를 들어, 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51을 스킵하도록 설계된 PMO인 에테플리르센은 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51에 함유된 상보적 서열과 서열-특이적 염기쌍 형성을 허용한다.
- [0113] 엑손 스킵을 사용하는 디스트로핀 해독틀의 복원
- [0114] 79개 엑손을 모두 함유하는 정상 디스트로핀 mRNA는 정상 디스트로핀 단백질을 생성할 것이다.
- [0115] 디스트로핀 유전자로부터 전체 엑손이 소실된 디스트로핀 mRNA는 전형적으로 DMD를 유도할 것이다.
- [0116] 또 다른 엑손 스킵 PMO인 에테플리르센은 엑손 51을 스킵하여 mRNA 해독틀을 복원한다. 엑손 49는 완전한 코돈으로 종료되며 엑손 52는 코돈의 첫 번째 뉴클레오타이드로 시작되므로, 엑손 스킵에 의한 엑손 51의 결실은 해독틀을 복원하여, 온전한 디스트로글리칸 결합 부위를 갖는 내부적으로 단축된 디스트로핀 단백질을 생성하게 된다.
- [0117] 디스트로핀 mRNA 개방 해독틀을 복원하기 위해 엑손 스킵을 사용하여 DMD 표현형을 완화시킬 가능성은 비임상 연구에 의해 뒷받침된다. DMD의 디스트로핀 동물 모델에서의 여러 연구는 엑손 스킵에 의한 디스트로핀의 복원이 근육 강도 및 기능의 신뢰할 만한 개선을 야기함을 나타내었다(Sharp 2011; Yokota 2009; Wu 2008; Wu 2011; Barton-Davis 1999; Goyenvalle 2004; Gregorevic 2006; Yue 2006; Welch 2007; Kawano 2008; Reay 2008; van Putten 2012). 이의 강력한 예는 엑손 스킵(PMO 사용) 치료법 후 디스트로핀 수준이 동일한 조직에서의 근육 기능과 비교된 연구로부터 나온다. 디스트로픽 *mdx* 마우스에서, 마우스-특이적 PMO로 처리된 앞정강근(TA)은 스트레스-유도 수축 후 이의 최대 힘 능력의 약 75%를 유지한 반면, 미처리 반대쪽 TA 근육은 이의 최대 힘 능력의 약 25%만을 유지하였다( $p < 0.05$ )(Sharp 2011). 또 다른 연구에서, 3마리 디스트로픽 *CXMD* 개가 5 내지 7주 동안 1주 1회 또는 22주 동안 2주 1회 이의 유전적 돌연변이에 대한 PMO-특이적 제제를 사용하여 (2~5월령에) 엑손-스킵 치료법을 제공받았다. 엑손-스킵 치료법 후, 3마리 개는 모두 골격근 내 디스트로핀의 광범위한, 신체에 걸친 발현을 실증했을 뿐만 아니라 기준선 대비 보행을 유지하거나 개선하였다(15 m 구보 평가). 대조적으로, 미처리 연령-매칭된 *CXMD* 개는 연구 과정에 걸쳐 보행의 현저한 감소를 나타내었다(Yokota 2009).
- [0118] PMO는 *mdx* 마우스에서 그리고 전체 인간 DMD 전사체를 발현하는, 인간화된 DMD(hDMD) 마우스 모델에서 모두 포스포티오에이트보다 등물 농도에서 더 많은 엑손 스킵 활성을 갖는 것으로 나타났다(Heemskirk 2009). 정상 인간 골격근 세포 또는 엑손 51 스킵을 겪기 쉬운 상이한 돌연변이를 갖는 DMD 환자로부터의 근육 세포에서 역전사 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR) 및 웨스턴 블롯(WB)을 사용하는 시험관내 실험에서, 에테플리르센(PMO)이 엑손 51 스킵의 강력한 유도제로 확인되었다. 에테플리르센-유도 엑손 51 스킵은 hDMD 마우스 모델에서 생체내 확인되었다(Arechavala-Gomez 2007).
- [0119] 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 53 표적 영역과 특이적으로 혼성화하며 엑손 53 스킵을 유도하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 효과를 분석하기 위한 임상 결과에는 디스트로핀 양성 섬유(PDPF) 퍼센트의 기준선으로부터의 증가, 6분 보행 평가(6MWT), 보행 손실(LOA), 북극성 보행 평가(NSAA), 폐 기능 평가(PFT), 외부 도움 없이 (바로 누운 위치로부터) 기립하는 능력, 신생 디스트로핀 생성 및 다른 기능적 척도가 포함된다.
- [0120] 골로디르센이 임상 연구에서 연구되었다.
- [0121] 연구 4053-101
- [0122] 연구 4053-101은 DMD 환자에서 SRP-4053(골로디르센)의 I/II상 연구이다. 상기 연구는 엑손 53 스킵을 겪기 쉬

운 뒤시엔느 근디스트로피 환자에서 SRP-4053의 2-부분, 무작위화, 이중-맹검, 위약-대조, 용량-적정, 안전성, 관용성, 및 약동학 연구(파트 1)에 이어지는 공개-표지 유효성 및 안전성 평가(파트 2)이다. 일차 결과 척도에는 유해 사례의 발생률[시간 프레임: 대략 12주(파트 1)], 기준선으로부터의 6분 보행 평가(6MWT)의 변화[시간 프레임: 144주(파트 2)], 및 디스트로핀-양성 섬유의 백분율[시간 프레임: 48주(파트 2)]이 포함된다. 이차 결과 척도에는 혈장 중 약물 농도[시간 프레임: 대략 12주(파트 1)], 예측 최대 흡기압(MIP)(%), 예측 최대 호기압(MEP)(%)[시간 프레임: 144주(파트 2)]가 포함된다. 상기 연구의 추가 상세사항은 [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)(NCT02310906)에서 확인된다.

### [0123] III. 제형물 및 투여 방식

[0124] 소정 구현예에서, 본 개시는 본원에서 기재된 바와 같은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 치료적 전달에 적합한 제형물 또는 약학 조성물을 제공한다. 따라서 소정 구현예에서, 본 개시는 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체(첨가제) 및/또는 희석제와 함께 제형화된, 본원에서 기재된 치료 유효량의 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 약학적으로 허용 가능한 조성물을 제공한다. 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 단독 투여될 수 있지만, 화합물을 약학 제형물(조성물)로서 투여하는 것이 바람직하다.

[0125] 핵산 분자의 전달을 위한 방법은, 예를 들어, 문헌[Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; 및 Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivan et al., PCT WO 94/02595]에 기재되어 있다. 이들 및 다른 프로토콜은 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 비롯하여 사실상 모든 핵산 분자의 전달을 위해 이용될 수 있다.

[0126] 아래에 상세히 나타낸 바와 같이, 본 개시의 약학 조성물은 하기와 같이 이루어진 것들을 포함하여, 고체 또는 액체 형태로의 투여를 위해 특별히 제형화될 수 있다: (1) 경구 투여, 예를 들어, 드랜치(수용액 또는 비-수용액 또는 현탁액), 정제, 예컨대, 협착, 설하, 및 전신 흡수를 목표로 하는 것들, 허로의 적용을 위한 볼루스, 분말, 과립, 페이스트; (2) 예를 들어, 멸균 용액 또는 현탁액, 또는 지속-방출 제형물로서의, 예를 들어, 피하, 근육내, 정맥내 또는 경막외 주사에 의한 비경구 투여; (3) 예를 들어, 크림, 연고, 또는 피부에 적용되는 제어-방출 패치 또는 스프레이로서의 국소 적용; (4) 예를 들어, 질 좌약, 크림 또는 폼으로서의, 질내 또는 직장내; (5) 설하; (6) 눈; (7) 경피부; 또는 (8) 비강.

[0127] 약학적으로 허용 가능한 담체로 작용할 수 있는 물질의 일부 예에는 비제한적으로 다음이 포함된다: (1) 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; (2) 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스, 및 이의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말화된 트래거캔스; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 활석; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; (9) 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 잇꽃유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; (10) 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; (11) 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; (12) 에스테르, 예컨대 에틸 올레레이트 및 에틸 라우레이트; (13) 한천; (14) 완충제, 예컨대 마그네슘 하이드록시드 및 알루미늄 하이드록시드; (15) 알긴산; (16) 발열원-비함유수; (17) 등장성 식염수; (18) 링거 용액; (19) 에틸 알코올; (20) pH 완충 용액; (21) 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리무수물; 및 (22) 약학 제형물에서 이용되는 다른 무독성 상용성 성분.

[0128] 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드와의 제형화에 적합한 제제의 추가적인 비제한적 예에는 PEG 컨주게이션된 핵산, 인지질 컨주게이션된 핵산, 친유성 모이어티를 함유하는 핵산, 포스포포티오에이트, 다양한 조직 내로의 약물 진입을 증강시킬 수 있는 P-당단백질 억제제(예컨대 Pluronic P85); 생분해성 중합체, 예컨대 삼입 후 지속 방출 전달을 위한 폴리(DL-락티드-코글리콜리드) 마이크로스피어(Emerich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; 및 로딩된 나노입자, 예컨대 혈액 뇌 장벽을 통해 약물을 전달할 수 있고 뉴런 흡수 기전을 변경할 수 있는 폴리부틸시아노아크릴레이트로 생성된 것들이 포함된다(Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

[0129] 본 개시는 또한 폴리(에틸렌 글리콜) 지질을 함유하는 표면-개질 리포솜(PEG-개질, 분기형 및 비분기형 또는 이의 조합, 또는 장기-순환 리포솜 또는 스텔스 리포솜)을 포함하는 조성물의 사용을 특징으로 한다. 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 또한 다양한 분자량의 공유 부착된 PEG 분자를 포함할 수 있다. 이들 제형물은 표적 조직에서 약물의 축적을 증가시키는 방법을 제공한다. 상기 클래스의 약물 담체는 단핵 식세포 시스템(MPS 또는 RES)에 의한 오프소닌화 및 제거에 저항함으로써, 더 긴 혈액 순환 시간 및 캡슐화된 약물에 대해 증강된 조직 노출을 가능하게 한다(Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). 이러한 리포솜은 추정키로는 혈관외유출 및 신혈관형성된 표적 조직 내 포획에 의해, 종양에 선택적으로 축적되는 것으로 나타났다(Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al.,

1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). 장기-순환 리포솜은 특히 MPS의 조직에 축적되는 것으로 알려진 통상적인 양이온성 리포솜에 비해, DNA 및 RNA의 약동학 및 약력학을 증강시킨다(Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi et al., 국제 PCT 공개 번호 WO 96/10391; Ansell et al., 국제 PCT 공개 번호 WO 96/10390; Holland et al., 국제 PCT 공개 번호 WO 96/10392). 장기-순환 리포솜은 또한 대사적으로 공격적인 MPS 조직, 예컨대 간 및 비장에서의 축적을 배제하는 이의 능력에 기반하여, 양이온성 리포솜에 비해 더 큰 정도로 약물을 뉴클레아제 분해로부터 보호할 수 있다.

[0130] 추가 구현예에서, 본 개시에는 U.S. 특허 번호 6,692,911, 7,163,695 및 7,070,807에 기재된 바와 같이 전달을 위해 생성된 안티센스 올리고뉴클레오티드 약학 조성물이 포함된다. 이에 관해, 하나의 구현예에서, 본 개시는 단독으로 또는 PEG(예컨대, 분기형 또는 비분기형 PEG 또는 둘 모두의 혼합물)와의 조합으로, PEG 및 표적화 모이어티 또는 가교제와 조합된 임의의 상기 물질과의 조합으로 라이신 및 히스티딘의 공중합체(HK)를 포함하는 조성물에 본 개시의 올리고머를 제공한다(U.S. 특허 번호 7,163,695, 7,070,807, 및 6,692,911에 기재된 바와 같음). 소정 구현예에서, 본 개시는 글루콘산-개질 폴리히스티딘 또는 글루코닐화-폴리히스티딘/트랜스페린-폴리라이신을 포함하는 약학 조성물에 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 당업자는 또한 His 및 Lys과 유사한 특성을 갖는 아미노산이 조성물 내에서 치환될 수 있음을 인식할 것이다.

[0131] 본원에서 기재된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 소정 구현예는 염기성 작용기, 예컨대 아미노 또는 알킬아미노를 함유할 수 있고, 이에 따라 약학적으로 허용 가능한 산과 약학적으로 허용 가능한 염을 형성할 수 있다. 이에 관해 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 본 개시의 화합물의 화합물의 비교적 무독성인, 무기 및 유기 산 부가 염을 나타낸다. 이들 염은 투여 비히클 또는 투여형 제조 공정에서 원 위치에서, 또는 자유 염기 형태의 본 개시의 정제된 화합물을 적합한 유기 산 또는 무기 산과 별도로 반응시키고, 후속 정제 동안 이렇게 형성된 염을 분리하여 제조될 수 있다. 대표 염에는 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 설페이트, 바이설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 아세테이트, 말레레이트, 올레레이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 라우레이트, 벤조에이트, 락테이트, 포스페이트, 토실페이트, 시트레이트, 말레레이트, 푸마레이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 나프틸레이트, 메실레이트, 글루코헵토네이트, 락토바이오네이트, 및 라우릴설페네이트 염 등이 포함된다(예컨대, 문헌[Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19] 참고).

[0132] 본 발명의 주제인 안티센스 올리고뉴클레오티드의 약학적으로 허용 가능한 염에는 화합물의 통상적인 무독성 염 또는 사차 암모늄 염, 예컨대 무독성 유기 또는 무기 산으로부터의 염이 포함된다. 예를 들어, 이러한 통상적인 무독성 염에는 무기 산, 예컨대 염화수소산, 브롬화수소산, 황산, 설파산, 인산, 질산 등으로부터 유래되는 염; 및 유기 산, 예컨대 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 팔미트산, 말레산, 하이드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 설파닐산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 툴루엔설페산, 메탄설페산, 에탄 디설페산, 옥살산, 이소티온산 등으로부터 제조된 염이 포함된다.

[0133] 소정 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 산성 작용기를 함유할 수 있고, 이에 따라 약학적으로 허용 가능한 염기와 약학적으로 허용 가능한 염을 형성할 수 있다. 이러한 경우에서 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 본 개시의 화합물의 비교적 무독성인, 무기 및 유기 염기 부가 염을 나타낸다. 이들 염은 마찬가지로 투여 비히클에서 또는 투여형 제조 공정에서 원 위치에서, 또는 자유 산 형태인 정제 화합물을 적합한 염기, 예컨대 약학적으로 허용 가능한 금속 양이온의 하이드록시드, 카보네이트 또는 바이카보네이트와, 암모니아와, 또는 약학적으로 허용 가능한 유기 염차, 이차 또는 삼차 아민과 별도로 반응시켜 제조될 수 있다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토염에는 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 및 알루미늄 염 등이 포함된다. 염기 부가 염의 형성에 유용한 대표적인 유기 아민에는 에틸아민, 디에틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진 등이 포함된다(예컨대, 상기 문헌[Berge et al.] 참고).

[0134] 수화제, 유화제 및 윤활제, 예컨대 나트륨 라우릴 설페이트 및 마그네슘 스테아레이트뿐만 아니라 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 풍미제 및 향료 제제, 보존제 및 향산화제가 또한 조성물에 존재할 수 있다.

[0135] 약학적으로 허용 가능한 향산화제의 예에는 다음이 포함된다: (1) 수용성 향산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 나트륨 바이설페이트, 나트륨 메타바이설페이트, 나트륨 설파이트 등; (2) 유용성 향산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이트화제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등.

[0136] 본 개시의 제형물에는 경구, 비강, 국소(흡착 및 설하 포함), 직장, 질 및/또는 비경구 투여에 적합한 것들이

포함된다. 제형물은 단위 투여형으로 편리하게 제공될 수 있고 제약학 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여형으로 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료받는 숙주, 특정 투여 방식에 따라 변할 것이다. 단일 투여형으로 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 일으키는 화합물의 양일 것이다. 일반적으로, 100% 중, 상기 양은 약 0.1% 내지 약 99%, 바람직하게는 약 5% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 10% 내지 약 30%의 활성 성분의 범위일 것이다.

[0137] 소정 구현예에서, 본 개시의 제형물은 사이클로덱스트린, 셀룰로스, 리포솜, 마이셀 형성제, 예컨대, 담즙산, 및 중합체성 담체, 예컨대, 폴리에스테르 및 폴리무수물로부터 선택되는 부형제; 및 본 개시의 올리고머를 포함한다. 소정 구현예에서, 상기 언급된 제형물은 본 개시의 올리고머를 경구로 생체 이용 가능하게 만든다.

[0138] 이들 제형물 또는 약학 조성물을 제조하는 방법에는 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 담체, 및 선택적으로 하나 이상의 보조 성분과 연합시키는 단계가 포함된다. 일반적으로, 제형물은 본 개시의 화합물을 액체 담체, 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 다와 균일하고 친밀하게 연합시킨 후, 필요한 경우 산물을 형성화하여 제조된다.

[0139] 경구 투여에 적합한 본 개시의 제형물은 캡슐, 카세, 알약, 정제, 로젠지(품미가미 기재, 보통 수크로스 및 아카시아 또는 트래거캔스를 사용함), 분말, 과립의 형태, 또는 수성 또는 비수성 액체 중 용액 또는 현탁액, 또는 수중유 또는 유중수 액체 에멀전, 또는 엘릭서 또는 시럽, 또는 향정(비활성 기재, 예컨대 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아를 사용함) 및/또는 구강 세척제 등으로 있을 수 있고, 각각 활성 성분으로서 소정량의 본 개시의 화합물을 함유한다. 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 또한 볼루스, 연질약 또는 페이스트로 투여될 수 있다.

[0140] 경구 투여를 위한 본 개시의 고체 투여형(캡슐, 정제, 알약, 당의정, 분말, 과립, 트로키 등)에서, 활성 성분은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체, 예컨대 나트륨 시트레이트 또는 이칼슘 포스페이트, 및/또는 임의의 하기 물질과 혼합될 수 있다: (1) 충전제 또는 증량제, 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 및/또는 규산; (2) 결합제, 예컨대, 카복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아; (3) 습윤제, 예컨대 글리세롤; (4) 봉해제, 예컨대 한천-한천, 칼슘 카보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 소정 실리케이트, 및 나트륨 카보네이트; (5) 용액 완연제, 예컨대 파라핀; (6) 흡수 가속 화제, 예컨대 사차 암모늄 화합물 및 계면활성제, 예컨대 폴록사머 및 나트륨 라우릴 설페이트; (7) 수화제, 예컨대, 세틸 알코올, 글리세롤 모노스테아레이트, 및 비이온성 계면활성제; (8) 흡수제, 예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예컨대 활석, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 설페이트, 아연 스테아레이트, 나트륨 스테아레이트, 스테아르산, 및 이의 혼합물; (10) 착색제; 및 (11) 제어 방출 제제, 예컨대 크로스포비돈 또는 에틸 셀룰로스. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 약학 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 약학 조성물이 또한 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질-셀 젤라틴 캡슐에서 충전제로 이용될 수 있다.

[0141] 정제는 선택적으로 하나 이상의 보조 성분과 함께, 압축 또는 성형에 의해 제조될 수 있다. 압축 정제는 결합제(예컨대, 젤라틴 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로스), 윤활제, 비활성 회석제, 보존제, 봉해제(예를 들어, 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 가교 나트륨 카복시메틸 셀룰로스), 표면-활성제 또는 분산제를 사용하여 제조될 수 있다. 성형 정제는 불활성 액체 회석제로 가습된 분말 화합물의 혼합물을 적합한 기계에서 성형하여 제조될 수 있다.

[0142] 본 개시의 약학 조성물의 정제, 및 다른 고체 투여형, 예컨대 당의정, 캡슐, 알약 및 과립은 선택적으로 눈금이 새겨지거나 코팅 및 셀, 예컨대 장용성 코팅 및 약학-제형 분야에서 잘 알려진 다른 코팅과 함께 제조될 수 있다. 이들은 또한, 예를 들어, 다양한 비의 하이드록시프로필메틸 셀룰로스를 사용하여 내부의 활성 성분의 서방성 또는 제어 방출을 제공하여 요망되는 방출 프로파일, 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 마이크로스피어를 제공하기 위해 제형화될 수 있다. 이들은 신속 방출을 위해 제형화될 수 있으며, 예컨대 냉동-건조될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 멸균수 중에 용해될 수 있는 멸균 고체 약학 조성물의 형태로 멸균화 제제, 또는 사용 직전에 일부 다른 멸균 주사용 매질을 포함함으로써 멸균화될 수 있다. 이들 약학 조성물은 또한 선택적으로 불투명화제를 함유할 수 있고 이들이 활성 성분(들)만, 또는 우선적으로 위장관의 특정 부분에서, 선택적으로 지연되는 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예에는 중합체성 성분 및 왁스가 포함된다. 활성 성분은 또한 적절한 경우 하나 이상의 상술된 부형제를 갖는, 마이크로-캡슐화 형태일 수 있다.

- [0143] 본 개시의 화합물의 경구 투여를 위한 액체 투여형에는 약학적으로 허용 가능한 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서가 포함된다. 활성 성분에 부가하여, 액체 투여형은 당분야에서 일반적으로 사용되는 비활성 희석제, 예컨대, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0144] 비활성 희석제 외에, 경구 약학 조성물에는 또한 아주반트, 예컨대 수화제, 유화제 및 현탁화제, 감미제, 풍미제, 착색제, 향료 제제 및 보존제가 포함될 수 있다.
- [0145] 활성 화합물에 부가하여, 현탁액은, 예를 들어, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미세결정성 셀룰로스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 한천-한천 및 트래거캔스, 및 이의 혼합물과 같은 현탁화제를 함유할 수 있다.
- [0146] 직장 또는 질 투여를 위한 제형물은 본 개시의 하나 이상의 화합물을, 예를 들어, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌약 왁스 또는 살리실레이트를 포함하고 실온에서 고체이지만 체온에서 액체여서 직장 및 질 강에서 용융되어 활성 화합물을 방출할 하나 이상의 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합함으로써 제조될 수 있는 좌약으로 제공될 수 있다.
- [0147] 본원에서 제공되는 올리고머의 국소 또는 경피 투여를 위한 제형물 또는 투여형에는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제가 포함된다. 활성 안티센스 올리고뉴클레오티드는 약학적으로 허용 가능한 담체와, 그리고 요구될 수 있는 임의의 보존제, 완충액, 또는 추진제와 멸균 조건 하에 혼합될 수 있다. 연고, 페이스트, 크림 및 젤은 본 개시의 활성 화합물에 부가하여, 부형제, 예컨대 동물 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트래거캔스, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 활석 및 아연 옥시드, 또는 이의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0148] 분말 및 스프레이는 본 개시의 올리고머에 부가하여, 부형제, 예컨대 락토스, 활석, 규산, 알루미늄 하이드록시드, 칼슘 실리케이트 및 폴리아미드 분말, 또는 이들 성분의 혼합물을 함유할 수 있다. 스프레이는 추가로 통상적인 추진제, 예컨대 클로로플루오로하이드로카본 및 휘발성 비지환 탄화수소, 예컨대 부탄 및 프로판올을 함유할 수 있다.
- [0149] 경피 패치는 신체로 본 개시의 올리고머의 제어 전달을 제공하는 추가 장점을 갖는다. 이러한 투여형은 적절한 매질 중 올리고머를 용해시키거나 분산하여 제조될 수 있다. 흡수 증강제는 또한 피부를 통한 제제의 플럭스를 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 이러한 플럭스 속도는 당분야에 알려진 방법들 중에서 특히, 막 제어 속도를 제공하거나 중합체 매트릭스 또는 겔에 제제를 분산하여 제어될 수 있다.
- [0150] 비경구 투여에 적합한 약학 조성물은 당, 알코올, 항산화제, 완충액, 정균제, 제형물을 의도되는 수신체의 혈액과 등장성으로 만드는 용질 또는 현탁화제 또는 증점제를 함유할 수 있는, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 멸균 등장성 수용액 또는 비수용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전, 또는 사용 직전에 멸균 주사용 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말과의 조합으로 본 개시의 하나 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 본 개시의 약학 조성물에서 이용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예에는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브유, 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트가 포함된다. 적절한 유통성은, 예를 들어, 코팅 물질, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0151] 이들 약학 조성물은 또한 아주반트, 예컨대 보존제, 수화제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 본 발명의 주제인 안티센스 올리고뉴클레오티드에 대한 미생물의 작용 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 도입에 의해 확보될 수 있다. 또한 등장성 제제, 예컨대 당, 나트륨 클로라이드 등을 조성물 내에 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사용 약학 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연하는 제제, 예컨대 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 도입에 의해 일으킬 수 있다.
- [0152] 일부 경우에서, 약물의 효과를 연장하기 위해, 피하 또는 근육내 주사로 약물의 흡수를 늦추는 것이 바람직할 수 있다. 이는 당분야에 알려진 방법들 중, 낮은 수용해도를 갖는 결정형 또는 무정형 물질의 액체 현탁액의 사용에 의해 달성될 수 있다. 이어서 약물의 흡수 속도는 그 용해 속도에 의존하며, 이는 다시 결정 크기 및 결정 형태에 의존할 수 있다. 대안적으로, 비경구-투여 약물 형태의 지연된 흡수는 오일 비히클 중 약물을 용해시키

거나 현탁하여 달성된다.

- [0153] 주사용 데포 형태는 생분해성 중합체, 예컨대 폴리락티드-폴리글리콜리드 중 본 발명의 주제인 안티센스 올리고뉴클레오티드의 마이크로캡슐화 매트릭스를 형성하여 제조될 수 있다. 올리고머 대 중합체의 비, 및 이용되는 특정 중합체의 성질에 따라, 올리고머 방출 속도가 제어될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예에는 폴리(오르소에스테르) 및 폴리(무수물)이 포함된다. 데포 주사용 제형물은 또한 신체 조직과 상용성인 리포솜 또는 마이크로에멀전에 약물을 넣어 제조될 수 있다.
- [0154] 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드가 인간 및 동물에 약제로서 투여되는 경우, 이들은 자체로 또는 예를 들어 약학적으로 허용 가능한 담체와의 조합으로 0.1 내지 99%(보다 바람직하게는 10 내지 30%)의 활성 성분을 함유하는 약학 조성물로 주어질 수 있다.
- [0155] 상기 주지된 바와 같이, 본 개시의 제형물 또는 제조물은 경구, 비경구, 국소, 또는 직장으로 제공될 수 있다. 이들은 전형적으로 각각의 투여 경로에 적합한 형태로 주어진다. 예를 들어, 이들은 정제 또는 캡슐 형태로 주사, 주입 또는 흡입에 의한 주사, 흡입, 눈 로션, 연고, 좌약 등의 투여에 의해; 로션 또는 연고에 의해 국소로; 그리고 좌약에 의해 직장투여된다.
- [0156] 선택되는 투여 경로에 상관없이, 적합한 수화 형태로 사용될 수 있는 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및/또는 본 개시의 약학 조성물은 당업자에게 알려진 통상적인 방법에 의해 약학적으로 허용 가능한 투여형으로 제형화될 수 있다. 본 개시의 약학 조성물에서 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 허용 불가능한 독성 없이 특정 환자, 조성물, 투여 방식에 대해 요망되는 치료 반응을 달성하는 데 효과적인 활성 성분의 양을 수득하기 위해 변화될 수 있다.
- [0157] 선택된 투여량 수준은 이용되는 본 개시의 특정 올리고머, 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 이용되는 특정 올리고머의 배출 또는 대사 속도, 흡수 속도 및 정도, 치료 기간, 이용되는 특정 올리고머와 조합으로 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적인 건강 및 사전 병력 및 의학 분야에 널리 알려진 유사 요인을 포함하는 다양한 요인에 의존할 것이다.
- [0158] 당분야의 일반 기술 수준의 의사 또는 수의사는 요구되는 약학 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 요망되는 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 것보다 낮은 수준으로 약학 조성물에서 이용되는 본 개시의 화합물의 용량을 시작하고 요망되는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 개시의 화합물의 적합한 1일 용량은 치료 효과를 일으키는 데 효과적인 최저 용량인 화합물의 양일 것이다. 이러한 유효 용량은 일반적으로 상술된 요인에 의존할 것이다. 나타내는 효과를 위해 사용되는 경우, 일반적으로 환자에 대한 본 개시의 화합물의 경구, 정맥내, 뇌실내 및 피하 용량은 1일 체중 1 kg 당 약 0.0001 내지 약 100 mg 범위일 것이다.
- [0159] 일부 구현예에서, 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 약 4~160 mg/kg, 10~160 mg/kg, 또는 20~160 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 경우에서, 160 mg/kg 초과 용량이 필요할 수 있다. 일부 구현예에서, 비경구 용량, 예컨대, i.v. 투여는 약 0.5 mg 내지 160 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 그 사이의 모든 정수를 포함하여, 약 4 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 17 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33 mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43 mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg, 50 mg/kg, 51 mg/kg, 52 mg/kg, 53 mg/kg, 54 mg/kg, 55 mg/kg, 56 mg/kg, 57 mg/kg, 58 mg/kg, 59 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 105 mg/kg, 110 mg/kg, 115 mg/kg, 120 mg/kg, 125 mg/kg, 130 mg/kg, 135 mg/kg, 140 mg/kg, 145 mg/kg, 150 mg/kg, 155 mg/kg, 160 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 30 mg/kg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 40 mg/kg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 60 mg/kg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 80 mg/kg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 160 mg/kg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 올리고머는 50 mg/kg으로 투여된다.
- [0160] 요망되는 경우, 활성 화합물의 유효 1일 용량은 선택적으로 단위 투여형으로, 하루에 걸쳐 적절한 간격으로 개별적으로 투여되는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 이상의 하위-용량으로 투여될 수 있다. 소정 경우에서, 투여는 1일 당 1개 투여이다. 소정 구현예에서, 투여는 기능적 디스트로핀 단백질의 요망되는 발현을 유지하기 위해, 필요에 따라, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일마다, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 주마다, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개월마다 하나 이상의 투여이다. 소정 구현예에서, 투여

는 1주 당 1개 투여이다. 소정 구현예에서, 투여는 2주마다 하나 이상의 투여이다. 일부 구현예에서, 투여는 2주마다 1개 투여이다. 다양한 구현예에서, 투여는 1개월마다 하나 이상의 투여이다. 소정 구현예에서, 투여는 1개월마다 1개 투여이다.

[0161] 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 4 mg/kg으로 매주 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 10 mg/kg으로 매주 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 20 mg/kg으로 매주 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 30 mg/kg으로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 40 mg/kg으로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 60 mg/kg으로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 80 mg/kg으로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 100 mg/kg으로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 160 mg/kg으로 매주 투여된다. 본원에서 사용되는 매주는 1주마다의 당분야에서 수용되는 의미를 갖는 것으로 이해된다.

[0162] 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 4 mg/kg으로 격주로 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 10 mg/kg으로 격주로 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 20 mg/kg으로 격주로 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 30 mg/kg으로 격주로 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 40 mg/kg으로 격주로 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 60 mg/kg으로 격주로 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 80 mg/kg으로 격주로 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 100 mg/kg으로 격주로 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 160 mg/kg으로 격주로 투여된다. 본원에서 사용되는 격주는 2주마다의 당분야에서 수용되는 의미를 갖는 것으로 이해된다.

[0163] 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 4 mg/kg으로 3주마다 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 10 mg/kg으로 3주마다 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 20 mg/kg으로 3주마다 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 30 mg/kg으로 3주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 40 mg/kg으로 3주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 60 mg/kg으로 3주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 80 mg/kg으로 3주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 100 mg/kg으로 3주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 160 mg/kg으로 3주마다 투여된다. 본원에서 사용되는 3주마다는 3주 1회의 당분야에서 수용되는 의미를 갖는 것으로 이해된다.

[0164] 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 4 mg/kg으로 매월 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 10 mg/kg으로 매월 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 20 mg/kg으로 매월 투여된다. 다양한 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 30 mg/kg으로 매월 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 40 mg/kg으로 매월 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 60 mg/kg으로 매월 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 80 mg/kg으로 매월 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 100 mg/kg으로 매월 투여된다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 160 mg/kg으로 매월 투여된다. 본원에서 사용되는 매월은 1개월마다의 당분야에서 수용되는 의미를 갖는 것으로 이해된다.

[0165] 당분야에서 이해되는 바와 같이, 매주, 격주로, 3주마다, 또는 매월 투여는 상기 논의된 바와 같은 하나 이상의 투여 또는 하위-용량일 수 있다.

[0166] 핵산 분자는 비제한적으로 리포좀 내 캡슐화, 이온이동법에 의해, 또는 다른 비히클, 예컨대 본원에서 기재되고 당분야에 알려진 바와 같은 하이드로겔, 사이클로덱스트린, 생분해성 나노캡슐, 및 생체접착성 마이크로스피어 내로의 포함에 의한 것을 포함하는, 당업자에게 알려진 다양한 방법에 의해 세포에 투여될 수 있다. 소정 구현예에서, 마이크로유화 기술이 친유성(수불용성) 약학 제제의 생체이용률을 개선하기 위해 이용될 수 있다. 예에는 트리메트린(Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991 및 REV 5901 (Sheen, P. C., et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991)이 포함된다. 여러 이점 중에서 특히, 마이크로유화는 순환계 대신 림프계의 흡수를 우선적으로 유도하여 증강된 생체이용률을 제공함으로써 간을 우회하고, 간담도 순환에서 화합물의 파괴를 방지한다.

[0167] 본 개시의 하나의 양태에서, 제형물은 본원에서 기재된 바와 같은 올리고머로부터 형성되는 마이셀 및 적어도 하나의 양친매성 담체를 함유하며, 여기서 마이셀은 약 100 nm 미만의 평균 지름을 갖는다. 보다 바람직한 구현예는 약 50 nm 미만의 평균 지름을 갖는 마이셀을 제공하며, 더욱 바람직한 구현예는 약 30 nm 미만, 또는 심지어

어 약 20 nm 미만의 평균 지름을 갖는 마이셀을 제공한다.

- [0168] 모든 적합한 양친매성 담체가 고려되는 경우, 본원에서 바람직한 담체는 일반적으로 일반적으로-안전하게-인식되는(GRAS) 상태를 가지며, 본 개시의 화합물을 가용화하고 용액이 복합 수상(예컨대 인간 위장관에서 확인되는 것)과 접촉하게 되는 경우 이후 단계에서 이를 미세유화할 수 있는 것들이다. 보통, 이들 요건을 충족하는 양친매성 성분은 2-20의 HLB(친수성 대 친유성 밸런스) 값을 가지며, 이의 구조는 C-6 내지 C-20 범위의 직쇄 지방족 라디칼을 함유한다. 예는 폴리에틸렌-글리콜화 지방 글리세리드 및 폴리에틸렌 글리콜이다.
- [0169] 양친매성 담체의 예에는 포화 및 단일불포화 폴리에틸렌글리콜화 지방산 글리세리드, 예컨대 다양한 전체 또는 부분 수소화 식물성 오일로부터 수득되는 것들이 포함된다. 이러한 오일은 유리하게는 트리-, 디-, 및 모노-지방산 글리세리드 및 대응하는 지방산의 디- 및 모노-폴리에틸렌글리콜 에스테르로 구성될 수 있고, 특히 바람직한 지방산 조성물에는 카프르산 4~10, 카프르산 3~9, 라우르산 40~50, 미리스트산 14~24, 팔미트산 4~14 및 스테아르산 5~15%가 포함된다. 또 다른 유용한 클래스의 양친매성 담체에는 포화 또는 단일-불포화 지방산(SPAN-시리즈) 또는 대응하는 에톡실화 유사체(TWEEN-시리즈)와 함께 부분 에스테르화 소르비탄 및/또는 소르비톨이 포함된다.
- [0170] 겔루시르(Gelucire)-시리즈, 라브라필(Labrafil), 라브라솔(Labrasol), 또는 라우로글리콜(Lauroglycol)(모두 Gattefosse Corporation, Saint Priest, France에서 제조되고 공급됨), PEG-모노-올레에이트, PEG-디-올레에이트, PEG-모노-라우레이트 및 디-라우레이트, 레시틴, 폴리소르베이트 80 등(미국 및 전세계 여러 회사에서 제조되고 공급됨)을 포함하는 상업적으로 이용 가능한 양친매성 담체가 특히 유용할 수 있다.
- [0171] 소정 구현예에서, 전달은 적합한 숙주 세포 내로 본 개시의 약학 조성물을 도입하기 위한 리포솜, 나노캡슐, 마이크로입자, 마이크로스피어, 지질 입자, 소포 등의 사용에 의해 일어날 수 있다. 특히, 본 개시의 약학 조성물은 지질 입자, 리포솜, 소포, 나노스피어, 나노입자 등에 캡슐화되어 전달을 위해 제형화될 수 있다. 이러한 전달 비히클의 제형화 및 용도는 알려진 통상적 기법을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0172] 본 개시에서 사용하는 데 적합한 친수성 중합체는 물에 쉽게 용해되며, 소포-형성 지질에 공유 부착될 수 있고, 생체내에서 독성 효과 없이 관용되는(즉, 생체적합성인) 것들이다. 적합한 중합체에는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리락트산(폴리락티드로도 명명됨), 폴리글리콜산(폴리글리콜리드로도 명명됨), 폴리락트산-폴리글리콜산 공중합체, 및 폴리비닐 알코올이 포함된다. 소정 구현예에서, 중합체는 약 100 또는 120달톤 내지 최대 약 5,000 또는 10,000달톤, 또는 약 300달톤 내지 약 5,000달톤의 분자량을 갖는다. 다른 구현예에서, 중합체는 약 100 내지 약 5,000달톤의 분자량을 갖거나, 약 300 내지 약 5,000달톤의 분자량을 갖는 폴리에틸렌글리콜이다. 소정 구현예에서, 중합체는 750달톤의 폴리에틸렌글리콜(PEG(750))이다. 중합체는 또한 내부의 단량체 수에 의해 정의될 수 있고; 본 개시의 바람직한 구현예는 적어도 약 3개 단량체의 중합체, 예컨대 3개 단량체로 구성되는 PEG 중합체(대략 150달톤)를 이용한다.
- [0173] 본 개시에서 사용하는 데 적합할 수 있는 다른 친수성 중합체에는 폴리비닐피롤리돈, 폴리메톡사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리하이드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리디메틸아크릴아미드, 및 유도체화 셀룰로스, 예컨대 하이드록시메틸셀룰로스 또는 하이드록시에틸셀룰로스가 포함된다.
- [0174] 소정 구현예에서, 본 개시의 제형물은 폴리아미드, 폴리카보네이트, 폴리알킬렌, 아크릴산 및 메타크릴산 에스테르의 중합체, 폴리비닐 중합체, 폴리글리콜리드, 폴리실록산, 폴리우레탄 및 이의 공중합체, 셀룰로스, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리스티렌, 락트산 및 글리콜산의 중합체, 폴리무수물, 폴리(오르소)에스테르, 폴리(부트산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카프로락톤), 다당류, 단백질, 폴리히알루론산, 폴리시아노아크릴레이트, 및 이의 배합물, 혼합물, 또는 공중합체로 구성되는 군으로부터 선택되는 생체적합성 중합체를 포함한다.
- [0175] 사이클로텍스트린은 각각 그리스 문자  $\alpha$ ,  $\beta$ , 또는  $\gamma$ 로 명명되는, 6, 7 또는 8개 글루코스 단위로 구성되는 고리형 다당류이다. 글루코스 단위는  $\alpha$ -1,4-글루코시드계 결합에 의해 연결된다. 당 단위의 의자형 입체형태의 결과로서, 모든 이차 하이드록실기(C-2, C-3에서)는 고리의 한 쪽에 배치되는 반면, C-6에서 모든 일차 하이드록실기는 다른 쪽에 위치한다. 그 결과, 외부면은 친수성이어서, 사이클로텍스트린을 수용성으로 만든다. 대조적으로, 사이클로텍스트린의 내강은 원자 C-3 및 C-5의 수소에 의해, 그리고 에테르-유사 산소에 의해 라이닝되므로 소수성이다. 이들 매트릭스는, 예를 들어 스테로이드 화합물, 예컨대 17 $\alpha$ -에스트라디올을 포함하는 다양한 비교적 소수성인 화합물과의 복합화를 허용한다(예컨대, 문헌[van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)] 참고). 복합화는 반 데르 발스 상호작용에 의해 및 수소 결합 형성에 의해 일어난다. 사이클로텍스트린 화학의 일반 개론에 대해서는, 문헌[Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822

(1994)]을 참고한다.

- [0176] 사이클로텍스트린 유도체의 물리-화학적 특성은 치환 종류 및 정도에 크게 의존한다. 예를 들어, 이의 수중 용해도는 불용성(예컨대, 트리아세틸-베타-사이클로텍스트린) 내지 147% 가용성(w/v)(G-2-베타-사이클로텍스트린)의 범위이다. 또한, 이들은 여러 유기 용매에서 가용성이다. 사이클로텍스트린의 특성은 이의 용해도를 증가시키거나 감소시킴으로써 다양한 제형물 성분의 용해도에 대한 제어를 가능하게 한다.
- [0177] 여러 사이클로텍스트린 및 이의 제조 방법이 기재되었다. 예를 들어, Parmeter (I) 등(U.S. 특허 번호 3,453,259) 및 Gramera 등(U.S. 특허 번호 3,459,731)은 전기중성 사이클로텍스트린을 기재한다. 다른 유도체에는 양이온성 특성을 갖는 사이클로텍스트린[Parmeter (II), U.S. 특허 번호 3,453,257], 불용성 가교 사이클로텍스트린(Solms, U.S. 특허 번호 3,420,788), 및 음이온성 특성을 갖는 사이클로텍스트린[Parmeter (III), U.S. 특허 번호 3,426,011]이 포함된다. 음이온성 특성을 갖는 사이클로텍스트린 유도체 중에서, 카복실산, 아인산, 포스핀산, 포스포산, 인산, 티오포스포산, 티오설파산, 및 설파산이 모체 사이클로텍스트린에 부가되었다 [상기 문헌[Parmeter (III)] 참고]. 또한, 설포알킬 에테르 사이클로텍스트린 유도체가 Stella 등에 의해 기재되었다(U.S. 특허 번호 5,134,127).
- [0178] 리포솜은 수성 내부 분획을 봉입하는 적어도 하나의 지질 이중층막으로 구성된다. 리포솜은 막 유형 및 크기를 특징으로 할 수 있다. 소형 단층 소포(SUV)는 단일 막을 가지며 전형적으로 지름이 0.02 및 0.05  $\mu\text{m}$  범위이며; 대형 단층 소포(LUV)는 전형적으로 0.05  $\mu\text{m}$  초과이다. 올리고층 대형 소포 및 다층 소포는 보통 동심의, 여러 막층을 가지며, 전형적으로 0.1  $\mu\text{m}$  초과이다. 몇몇 비동심 막을 갖는 리포솜, 즉 대형 소포 내에 함유된 몇몇 소형 소포는 다소포성 소포로 명명된다.
- [0179] 본 개시의 하나의 양태는 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 함유하는 리포솜을 포함하는 제형물에 관한 것이며, 여기서 리포솜막은 증가된 운반능을 갖는 리포솜을 제공하도록 제형화된다. 대안적으로 또는 부가적으로, 본 개시의 화합물은 리포솜의 리포솜 이중층 내에 함유되거나 이중층 상에 흡착될 수 있다. 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 지질 계면활성제로 응집되고 리포솜의 내부 공간 내에서 운반될 수 있다; 이러한 경우, 리포솜 막은 활성 제제-계면활성제 응집물의 손상 효과에 저항하도록 제형화된다.
- [0180] 본 개시의 하나의 구현예에 따르면, 리포솜의 지질 이중층은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 사슬이 지질 이중층의 내부 표면으로부터 리포솜에 의해 캡슐화된 내부 공간 내로 연장되고, 지질 이중층의 외부로부터 주변 환경으로 연장되도록 PEG로 유도체화된 지질을 함유한다.
- [0181] 본 개시의 리포솜 내에 함유되는 활성 제제는 가용화된 형태이다. 계면활성제 및 활성 제제의 응집물(예컨대 관심 활성 제제를 함유하는 에멀전 또는 마이셀)은 본 개시에 따른 리포솜의 내부 공간 내에 가두어질 수 있다. 계면활성제는 활성 제제를 분산시키고 가용화하는 작용을 하며, 비제한적으로 다양한 사슬 길이의 생체적합성 라이소포스파티딜콜린(LPG)(예컨대 약 C14 내지 약 C20)을 포함하는 임의의 적합한 지방족, 지환족 또는 방향족 계면활성제로부터 선택될 수 있다. 중합체-유도체화 지질, 예컨대 PEG-지질은 또한 이들이 마이셀/막 융합을 억제하는 작용을 할 것이므로, 그리고 계면활성제 분자에 대한 중합체의 첨가가 계면활성제의 CMC를 감소시키고 마이셀 형성을 보조할 것이므로 마이셀 형성을 위해 이용될 수 있다. 마이크로몰 농도 범위의 CMO를 갖는 계면활성제가 바람직하다; 더 높은 CMC의 계면활성제가 본 개시의 리포솜 내에 가두어진 마이셀을 제조하기 위해 이용될 수 있다.
- [0182] 본 개시에 따른 리포솜은 당분야에 알려진 임의의 다양한 기법에 의해 제조될 수 있다. 예컨대, 문헌[U.S. 특허 번호 4,235,871; 공개 PCT 출원 WO 96/14057; New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104; Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993]을 참고한다. 예를 들어, 본 개시의 리포솜은 친수성 중합체로 유도체화된 지질을 사전형성된 리포솜 내로 확산시켜, 예컨대 사전형성된 리포솜을 리포솜에서 요망되는 유도체화된 지질의 최종 몰%에 해당하는 지질 농도로 지질-그래프트 중합체로 이루어진 마이셀에 노출시켜 제조될 수 있다. 친수성 중합체를 함유하는 리포솜은 또한 당분야에 알려진 바와 같이, 균질화, 지질-부분 수화, 또는 압출 기법에 의해 형성될 수 있다.
- [0183] 또 다른 예시적인 제형화 절차에서, 활성 제제는 먼저 소수성 분자를 쉽게 가용화하는 라이소포스파티딜콜린 또는 다른 낮은 CMC 계면활성제(중합체 그래프트 지질 포함) 중 초음파분쇄에 의해 분산된다. 이어서 생성되는 활성 제제의 마이셀 현탁액이 적합한 몰%의 중합체-그래프트 지질, 또는 콜레스테롤을 함유하는 건조 지질 샘플을 재수화하기 위해 사용된다. 이어서 지질 및 활성 제제 현탁액은 당분야에 알려진 바와 같은 압출 기법을 사용하여

여 리포솜으로 형성되며, 생성된 리포솜은 표준 칼럼 분리에 의해 캡슐화되지 않은 용액으로부터 분리된다.

[0184] 본 개시의 하나의 양태에서, 리포솜은 선택된 크기 범위 내의 실질적으로 균일한 크기를 갖도록 제조된다. 하나의 효과적인 크기 조정 방법에는 선택된 균일한 포어 크기를 갖는 일련의 폴리카보네이트 막을 통해 리포솜의 수성 현탁액을 압출하는 단계가 관여된다; 막의 포어 크기는 대략 그 막을 통한 압출에 의해 제조되는 리포솜의 최대 크기에 해당할 것이다. 예컨대, U.S. 특허 번호 4,737,323(1988년 4월 12일)을 참고한다. 소정 구현예에서, 시약, 예컨대 DharmaFECT® 및 Lipofectamine®이 폴리뉴클레오티드 또는 단백질을 세포 내로 도입하기 위해 이용될 수 있다.

[0185] 본 개시의 제형물의 방출 특징은 캡슐화 물질, 캡슐화된 약물의 농도, 및 방출 개질제의 존재에 의존한다. 예를 들어, 방출은, 예를 들어 위에서와 같이 낮은 pH에서만, 또는 장에서와 같이 더 높은 pH에서만 방출하는 pH 민감성 코팅을 사용하여, pH 의존적이 되도록 조작될 수 있다. 장용성 코팅은 위를 통과할 때까지 방출이 일어나는 것을 방지하기 위해 사용될 수 있다. 상이한 물질에 캡슐화된 시안아미드의 혼합물 또는 다중 코팅이 위에서와 같이 방출에 이어 장에서의 이후 방출을 수득하기 위해 사용될 수 있다. 방출은 또한 물 흡수 또는 캡슐로부터의 확산에 의한 약물 방출을 증가시킬 수 있는, 염 또는 포어 형성제의 도입에 의해 조작될 수 있다. 약물의 용해도를 개질하는 부형제가 또한 방출 속도를 제어하기 위해 사용될 수 있다. 매트릭스의 분해 또는 매트릭스로부터의 방출을 증강시키는 제제가 또한 포함될 수 있다. 이들은 화합물에 따라 약물에 첨가될 수 있거나, 별도로 상으로서(즉, 미립자로서) 첨가될 수 있거나, 중합체상에 공동-용해될 수 있다. 대부분의 경우, 양은 0.1 내지 30%(중합체 w/w)이다. 분해 증강제의 유형에는 무기 염, 예컨대 암모늄 설페이트 및 암모늄 클로라이드, 유기 산, 예컨대 시트르산, 벤조산, 및 아스코르브산, 무기 염기, 예컨대 나트륨 카보네이트, 칼륨 카보네이트, 칼슘 카보네이트, 아연 카보네이트, 및 아연 하이드록시드, 및 유기 염기, 예컨대 프로타민 설페이트, 스페르민, 콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민, 및 트리에탄올아민 및 계면활성제, 예컨대 Tween® 및 Pluronic®이 포함된다. 매트릭스에 마이크로구조를 부가하는 포어 형성제(즉, 수용성 화합물, 예컨대 무기 염 및 당)가 미립자로 첨가된다. 범위는 전형적으로 1 내지 30%(중합체 w/w)이다.

[0186] 흡수는 또한 내장에서 입자의 체류 시간을 변경하여 조작될 수 있다. 이는, 예를 들어 캡슐화 물질로서 점막 접착 중합체를 선택하거나 또는 이것으로 입자를 코팅함으로써 달성될 수 있다. 예에는 자유 카복실기를 갖는 대부분의 중합체, 예컨대 키토산, 셀룰로스, 특히 폴리아크릴레이트가 포함된다(본원에서 사용되는 폴리아크릴레이트는 아크릴레이트기 및 개질 아크릴레이트기를 포함하는 중합체, 예컨대 시아노아크릴레이트 및 메타크릴레이트를 나타냄).

[0187] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 수술적 또는 의학적 장치 또는 삽입물에 의해 방출되도록 이루어지거나 그 내부에 함유되도록 제형화될 수 있다. 소정 양태에서, 삽입물은 안티센스 올리고뉴클레오티드로 코팅되거나 달리 처리될 수 있다. 예를 들어, 하이드로겔, 또는 다른 중합체, 예컨대 생체적합성 및/또는 생분해성 중합체가 본 개시의 약학 조성물로 삽입물을 코팅하기 위해 사용될 수 있다(즉, 조성물이 하이드로겔 또는 다른 중합체에 의해 의학 장치와 함께 사용되도록 이루어질 수 있음). 제제로 의학 장치를 코팅하기 위한 중합체 및 공중합체는 당 분야에 잘 알려져 있다. 삽입물의 예에는 비제한적으로 스텐트, 약물-용출 스텐트, 봉합, 보철, 혈관 카테터, 투석 카테터, 혈관 그래프트, 보철 심장 밸브, 심장 박동기, 삽입형 제세동기, IV 바늘, 뼈 고정 및 형성을 위한 장치, 예컨대 핀, 나사, 플레이트, 및 다른 장치, 및 상처 치유를 위한 인공 조직 매트릭스가 포함된다.

[0188] 본원에서 기재된 방법에 부가하여, 본 개시에 따라 사용하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 다른 약제와 유사하게, 인간 또는 수의학 의약에서 사용하기 위한 임의의 편리한 방식으로 투여하기 위해 제형화될 수 있다. 안티센스 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 이의 해당하는 제형물은 단독으로 또는 근디스트로피의 치료에서 다른 치료 전략, 예컨대 근모세포 이식, 줄기 세포 치료법, 아미노글리코시드 항생제, 프로테아좀 억제제의 투여, 및 상향-조절 치료법(예컨대, 디스트로핀의 상염색체 파라로그인 유티로핀의 상향조절)과의 조합으로 투여될 수 있다.

[0189] 일부 구현예에서, 추가 치료제가 본 개시의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 투여 전에, 이와 동시에, 또는 후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 스테로이드 및/또는 항생제와의 조합으로 투여될 수 있다. 소정 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 배경 스테로이드 이론(예컨대, 간헐적 또는 만성/연속 배경 스테로이드 치료법) 상의 환자에게 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 환자는 안티센스 올리고머의 투여 전에 코르티코스테로이드로 치료받았고 스테로이드 치료법을 계속 제공받는다. 일부 구현예에서, 스테로이드는 글루코코르티코이드 또는 프레드니손이다.

[0190] 숙련된 실시자는 임의의 특정 동물 및 질환에 대한 최적 투여 경로 및 임의의 투여량을 쉽게 결정할 수 있을 것

이므로 기재된 투여 경로는 지침으로만 의도된다. 시험관내 및 생체내 모두에서 세포 내로 기능적 신규 유전 물질을 도입하기 위한 여러 접근이 시도되었다(Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280). 이들 접근에는 다음과 같은 것들이 포함된다: 발현될 유전자의 개질 레트로바이러스 내로의 통합(Friedmann (1989) 상기 문헌; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), suppl.: 5074S-5079S); 비-레트로바이러스 벡터(예컨대, 아데노-연관 바이러스 벡터) 내로의 통합(Rosenfeld, et al. (1992) Cell, 68:143-155; Rosenfeld, et al. (1991) Science, 252:431-434); 또는 리포솜을 통한 이중성 프로모터-인핸서 요소에 연결된 트랜스유전자의 전달(Friedmann (1989), 상기 문헌; Brigham, et al. (1989) Am. J. Med. Sci., 298:278-281; Nabel, et al. (1990) Science, 249:1285-1288; Hazinski, et al. (1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209; 및 Wang and Huang(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855); 리간드-특이적, 양이온-기반 수송 시스템으로의 커플링(Wu and Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) 또는 네이키드 DNA, 발현 벡터의 사용(Nabel et al. (1990), 상기 문헌); Wolff et al. (1990) Science, 247:1465-1468). 트랜스유전자의 조직 내로의 직접 주사는 편재된 발현만을 일으킨다(Rosenfeld (1992) 상기 문헌); Rosenfeld et al. (1991) 상기 문헌; Brigham et al. (1989) 상기 문헌; Nabel (1990) 상기 문헌; 및 Hazinski et al. (1991) 상기 문헌). Brigham 등의 그룹(Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 및 Clinical Research (1991) 39(초록))은 DNA 리포솜 복합체의 정맥내 또는 기관내 투여 후 마우스 폐에서만 생체내 전달감염을 보고하였다. 인간 유전자 치료법 절차의 리뷰 기사의 예는 문헌[Anderson, Science (1992) 256:808-813]이다.

[0191] 추가 구현예에서, 본 개시의 약학 조성물은 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Han *et al.*, Nat. Comms. 7, 10981 (2016)]에 제공된 바와 같은 탄수화물을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 약학 조성물은 5%의 6탄당 탄수화물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 약학 조성물은 5%의 글루코스, 5%의 프룩토스, 또는 5%의 만노스를 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, 본 개시의 약학 조성물은 2.5%의 글루코스 및 2.5%의 프룩토스를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 약학 조성물은 5 부피%의 양으로 존재하는 아라비노스, 5 부피%의 양으로 존재하는 글루코스, 5 부피%의 양으로 존재하는 소르비톨, 5 부피%의 양으로 존재하는 갈락토스, 5 부피%의 양으로 존재하는 프룩토스, 5 부피%의 양으로 존재하는 자일리톨, 5 부피%의 양으로 존재하는 만노스, 각각 2.5 부피%의 양으로 존재하는 글루코스 및 프룩토스의 조합, 및 5.7 부피%의 양으로 존재하는 글루코스, 2.86 부피%의 양으로 존재하는 프룩토스, 및 1.4 부피%의 양으로 존재하는 자일리톨의 조합으로부터 선택되는 탄수화물을 포함할 수 있다.

#### [0192] IV. 키트

[0193] 본 개시는 또한 유전 질병(예컨대, DMD)을 갖는 환자의 치료를 위한 키트를 제공하며, 이 키트는 사용 지침과 함께 적합한 용기에 패키징되는 적어도 안티센스 분자(예컨대, 골로디르센)를 포함한다. 키트는 또한 부차적인 시약, 예컨대 완충액, 안정화제 등을 함유할 수 있다. 당업자는 상기 방법의 적용이 여러 다른 질병의 치료에서 사용하는 데 적합한 안티센스 분자를 확인하기 위한 다양한 용도를 가짐을 이해한다.

#### [0194] 실시예

[0195] 모든 실시예는 SRP-4053의 안전성 및 유효성을 평가하는 하기 진행 중인 인간-최초 임상 시험으로부터 유래된다. 본원에서 보고된 결과는 연구의 파트 2 동안 48주차에 수득하였다.

#### [0196] DMD 환자에서 SRP-4053의 I/II상 연구

[0197] ClinicalTrials.gov 식별자: NCT02310906

[0198] 이는 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 결실을 갖는 뒤시엔느 근디스트로피(DMD) 환자에서 SRP-4053의 안전성, 관용성, 유효성, 및 약동학을 평가하기 위한 인간-최초, 다회-용량 2-파트 연구이다.

[0199] 연구 유형: 개입

[0200] 연구 설계: 할당: 무작위화

[0201] 개입 모델: 병렬 지정

[0202] 마스킹: 4중(참가자, 케어 제공자, 연구책임자, 결과 평가자)

[0203] 일차 목적: 치료

[0204] 공식 명칭: 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 뒤시엔느 근디스트로피 환자에서 SRP-4053의 2-파트, 무작위화, 이중-맹검, 위약-대조, 용량-적정, 안전성, 관용성, 및 약동학 연구(파트 1)에 이어 공개-표지 유효성 및 안전성 평가

(파트 2)

물질 및 방법

연구 약물

원료 의약품, 골로디르센(즉 SRP-4053)은 본원에서 기재된 화학 구조의 PMO로, Sarepta Therapeutics, Inc.에 서 공급받았다. 골로디르센 완제 의약품을 단회-사용 바이알에 공급되는 멸균, 등장성, 포스페이트-완충 수용액 으로 50 mg/ml 농도로 제형화하였다. 완제 의약품을 임상 환경에서 IV 주입을 통한 투여 전에 일반 식염수(0.9% 나트륨 클로라이드 주사)로 희석하였다.

환자: 적격성

적격 환자는 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 DMD 유전자의 프레임을 벗어난 결실을 가지며 6 내지 15세였다.

포함 기준:

- DMD로 진단되고, 유전형으로 확인됨.
- 온전한 오른쪽 및 왼쪽 이두근 또는 대안적으로 위팔 근육 그룹.
- 안정한 폐 및 심장 기능.
- 연구 프로토콜에 명시된 바와 같은 6MWT, 복극성 보행 평가, 및 기립(Gowers) 평가 상의 최소 수행.
- 적어도 6개월 동안 안정 용량의 코르티코스테로이드 유지.

제외 기준:

- 실험 제제 BMN-195(SMT C1100) 또는 PR0053으로의 이전 치료.
- 연구 진입 전 12주 내에 임의의 다른 실험 치료를 이용한 현재 또는 이전 치료.
- 지난 3개월 내 대수술.
- 다른 임상적으로 유의미한 병의 존재.
- 지난 3개월 내 물리 치료 요법의 큰 변화.

다른 포함 및 제외 기준을 적용할 수 있다.

연구 설계

연구 설계의 요약은 도 1 및 바로 아래의 표에 나타낸다.

| 군(arm)                                                                        | 지정된 개입                 |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 실험: 파트 1, 파트 2 SRP-4053<br>대략 8개 유전형으로 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 DMD 환자를 확인하였음          | 약물: SRP-4053           |
| 위약 비교측정기: 파트 1 위약, 파트 2 SRP-4053<br>대략 4개 유전형으로 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 DMD 환자를 확인하였음 | 약물: 위약<br>약물: SRP-4053 |
| 실험: 파트 2 SRP-4053<br>대략 24개 유전형으로 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 DMD 환자를 확인하였음               | 약물: SRP-4053           |
| 개입 없음: 파트 2 미처리 대조군<br>최대 24개 유전형으로 엑손 53 스킵을 겪게되지 않는 결실을 갖는 DMD 환자를 확인하였음    |                        |

상세한 설명:

**파트 1:** 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 결실을 갖는 유전형-확인된 DMD 환자에서 SRP-4053의 4개 용량 수준의 안전 성, 관용성 및 약동학을 평가하기 위한 무작위화, 위약-대조 용량-적정.

스크리닝/기준선:

엑손 53을 겪기 쉬운 돌연변이 스크리닝으로 확인된 DMD 환자가 4 내지 6주 스크리닝 기간에 참여하여 적격성을

확인하였다. 치료-전 다리 근육 MRI 및 근육 MRS(MRS 능력을 가진 선택 기관에서)를 수행하고 피부 및 근육 생검을 수득하였다. 기능적 평가(6분 보행 평가[6MWT], 북극성 보행 평가[NSAA], 및 다른 기능적 측정을 수행하였고 잠재적인 질병-관련 바이오마커에 대한 혈액 샘플을 채취하였다. 폐 기능 평가(PFT), 심전도(ECHO), 및 ECG를 또한 스크리닝 동안 수행하였다.

용량 적정:

SRP-4053 또는 위약을 제공받도록 환자를 무작위화하였다(2:1). 환자는 각각 적어도 2주 동안, 위약 또는 증량 용량 수준으로 SRP-4053의 매주 IV 주입을 제공받았다: 1~2주차에 4 mg/kg/주; 3~4주차에 10 mg/kg/주; 5~6주차에 20 mg/kg/주; 및 7주차에 30 mg/kg/주로 시작. 일단 마지막 환자가 30 mg/kg으로 두 번째 용량을 제공받으면, 독립적 DMC가 파트 2에서의 투여를 개시하기 전에 파트 1의 누적 안전성 데이터를 검토하였다. DMC는 파트 1로부터의 안전성 데이터를 검토하였고 연구의 공개-표지 구획(파트 2)에서 1주 1회 30 mg/kg IV 주입을 진행하도록 권고하였다.

**파트 2:** 엑손 53 스킵을 겪게되지 않는 결실을 갖는 미치료 대조군 DMD 환자 대비, 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 결실을 갖는 새로 등록된 DMD 환자와 함께, 파트 1로부터의 환자에서 SRP-4053의 공개-표지 평가.

파트 2는 엑손 53 스킵을 겪게되지 않는 돌연변이를 갖는 DMD 환자의 미치료 동시 대조군 대비 환자에서 1주 1회 SRP-4053 30 mg/kg IV 주입의 안전성 및 유효성의 144주, 공개-표지 평가이다.

스크리닝/기준선:

파트 1로부터의 환자(SRP-4053 및 위약 둘 다)가 파트 2를 계속하였다. 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 결실을 갖는 새로운 DMD 환자가 치료군에서 총 25명의 환자에 대해 공개-표지 SRP-4053 치료를 위해 등록하였다. 다르게는 적격성 기준에 부합하는 엑손 53 스킵을 겪게되지 않는 결실을 갖는 최대 24명의 DMD 환자가 또한 파트 2에 등록하여 미치료 대조군으로 작용하였다. 모든 신규 파트 2 환자의 적격성을 4 내지 6주 스크리닝 기간 동안 확인한다.

144주 동안의 공개-표지 치료:

파트 2에서, 치료군의 모든 환자는 144주 동안 IV 주입으로 1주 1회 30 mg/kg의 SRP-4053을 제공받는다. 신규 파트 2 치료 환자는 기준선에서 피부 및 근육 생검을 받으며, 모든 치료 환자는 파트 2의 48주차에 두 번째 근육 생검을 거치도록 요청된다. 환자는 또한 기능적 평가(파트 1에 대한 상기 내용과 같이) 및 PFT를 거치며, 12 내지 24주마다 ECG를 받는다. 유해 사례 및 동시 투약을 연구 과정에 걸쳐 계속 모니터링하고 수집한다. 연구 적격성이 확인된 후, 미치료 대조군의 환자는 신체 검사 및 실험실 평가의 생략된 일정, 및 PK 샘플채집 또는 생검 없음을 제외하고, 파트 2에서 치료 환자와 동일한 연구 절차를 거친다.

일차 결과 척도:

- 유해 사례 발생률[시간 프레임: 대략 12주(파트 1)]
- 임상 실험실 비정상성(혈액학, 화학, 응고, 소변검사)의 발생률[시간 프레임: 대략 12주(파트 1)]
- 활력 징후 및 신체 검사에서 비정상성의 발생률[시간 프레임: 대략 12주(파트 1)]
- ECG 및 ECHO에 대한 비정상성의 발생률[시간 프레임: 대략 12주(파트 1)]
- 기준선으로부터 6분 보행 평가(6MWT)의 변화[시간 프레임: 기준선부터 144주차까지(파트 2)]
- 웨스턴 블롯에 의해 결정되는 디스트로핀 단백질 수준[시간 프레임: 기준선부터 48주차까지(파트 2)]

이차 결과 척도:

- 혈장 중 약물 농도[시간 프레임: 대략 12주(파트 1)]
- 폐 기능 평가[시간 프레임: 기준선부터 144주차까지(파트 2)]
- 최대 호기압(MEP) %, 최대 흡기압(MIP) %
- IHC에 의해 결정되는 디스트로핀-양성 섬유의 백분율[시간 프레임: 기준선부터 48주차까지(파트 2)]
- 엑손 53 스킵[시간 프레임: 기준선부터 48주차까지(파트 2)]

[0251] 다른 결과 척도:

[0252] · 유해 사례의 발생률[시간 프레임: 144주(파트 2)]

[0253] · 임상 실험실 비정상성(혈액학, 화학, 응고, 소변분석)의 발생률[시간 프레임: 144주(파트 2)]

[0254] · 활력 징후 및 신체 검사에서 비정상성의 발생률[시간 프레임: 144주(파트 2)]

[0255] · ECG 및 ECHO 상의 비정상성의 발생률[시간 프레임: 144주(파트 2)]

[0256] · 면역원성[시간 프레임: 144주(파트 2)]

[0257] **실시예 1: 생화학적 유효성 평가**

[0258] 기준선 및 치료시 상완 이두근의 패어링된 근육 생검을 정맥내 주입에 의해 매주 투여되는 30 mg/kg SRP-4053의 안전성, 관용성 및 디스트로핀 생성을 평가하는 다기관 인간-최초 시험에 참여하는 25명의 환자로부터 획득하였다(ClinicalTrials.gov 식별자: NCT02310906). 각각의 수술을 위해, 2개의 근육 절편: A 블록 및 B 블록을 절제하였다. A 및 B 블록을 모든 검정을 위해 별도 분석하였다.

[0259] 근육 생검을 최적화된 방법에 의해 검사하여 디스트로핀 단백질량(웨스턴 블롯, 일차 생물학적 종결점) 및 엑손 스킵(RT-PCR)을 평가하였다. 신규 자동화 이미지 분석(MuscleMap™)은 디스트로핀의 편재(평균 섬유 세기)를 평가하기 위해 면역조직화학을 사용하였다.

[0260] 웨스턴 블롯 분석을 위해: A 및 B 블록을 2개씩 겔 상에 = 평균 4개 평가로 수행하였다.

[0261] RT-PCR 분석을 위해: A 및 B 블록을 4개씩 = 평균 8개 평가로 수행하였다.

[0262] IHC 분석을 위해: A 및 B 블록을 레벨 1 및 2 상에 = 평균 4개 평가로 수행하였다.

[0263] 기준선 특징:

[0264] 글로디르센 치료 코호트에서 25명 환자의 기준선 특징을 표 1에 요약한다. 엑손 53 스킵을 겪기 쉬운 5개의 상이한 유전형(45-52; 48-52; 49-52; 50-52; 및 52에서의 돌연변이 결실)을 나타내었다. 17명의 환자는 SRP-4053 치료로의 전환 전에 연구의 파트 1에서 위약을 최초 제공받았거나 SRP-4053 치료를 위한 연구의 파트 2에 등록하였다. 8명의 환자는 연구의 파트 1 및 파트 2에서 SRP-4053을 제공받았다. 총 25명의 환자가 SRP-4053을 제공받았다.

**표 1**

[0265] 기준선 인구학 및 질병 특징

|                               |                    | 위약 → SRP-4053 & 파트 2만<br>(N = 17) | SRP-4053, 파트 1 & 2<br>(N = 8)  | 전체가 치료받음<br>(N = 25)           |
|-------------------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 연령                            | 평균(SD)<br>Min, max | 8.0(2.24)<br>6, 13                | 8.6(2.07)<br>7, 13             | 8.2(2.16)<br>6, 13             |
| 기준선 체중<br>(kg) <sup>(1)</sup> | 평균(SD)<br>Min, max | 26.44(7.922)<br>17.1, 48.5        | 31.94(10.925)<br>21.0, 49.0    | 28.20(9.139)<br>17.1, 49.0     |
| 기준선 6MWT<br>거리 <sup>(2)</sup> | 평균(SD)<br>Min, max | 404.91(57.686)<br>333.0, 512.0    | 401.25(58.230)<br>290.0, 469.0 | 403.74(56.661)<br>290.0, 512.0 |
| 돌연변이                          | 45 - 52            | 5(29.4%)                          | 3(37.5%)                       | 8(32.0%)                       |
|                               | 48 - 52            | 4(23.5%)                          | 1(12.5%)                       | 5(20.0%)                       |
|                               | 49 - 52            | 3(17.6%)                          | 2(25.0%)                       | 5(20.0%)                       |
|                               | 50 - 52            | 3(17.6%)                          | 1(12.5%)                       | 4(16.0%)                       |
|                               | 52                 | 2(11.8%)                          | 1(12.5%)                       | 3(12.0%)                       |

[0266] 1. 기준선은 연구 약물(위약 또는 SRP-4053)의 첫 번째 용량 전의 마지막 기록 값임

[0267] 2. 기준선은 연구 약물(위약 또는 SRP-4053)의 첫 번째 용량 전 마지막 방문에 대한 1일 및 2일차의 평균임

[0268] 엑손 스킵의 결정:

[0269] RT-PCR 분석:

[0270] 엑손 스킵을 연구 설계에 따라 기준선 및 48주차에 RT-PCR에 의해 측정하였다. RT-PCR 분석을 위해, 제조업체의 프로토콜에 따라 Trizol 시약 키트를 사용하여 세포로부터 RNA를 단리하였다. RNA의 농도 및 순도를 NanoDrop을 사용하여 결정하였다. 엑손 53 스킵을 표 2에 따라 돌연변이 페어링된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 RT-PCR에 의해 측정하였다.

표 2

[0271] 엑손 53 스킵의 검출을 위한 프라이머

| 프라이머 | 프라이머 명칭       | 일차 프라이머 서열(5'-3')       | 크기(bp) | Tm(℃) |
|------|---------------|-------------------------|--------|-------|
| 정방향  | 44-52 #2 센스   | TGGCGGCGTTTTCATTATGA    | 20     | 58.55 |
| 역방향  | 44-52 #2 안티센스 | GGACGCCTCTGTTCCAAATC    | 20     | 58.91 |
| 정방향  | 47-52 #2 센스   | 5'-CGCCAGGGAATTCTCAAACA | 20     | 58.47 |
| 역방향  | 47-52 #2 안티센스 | 5'-TTTGGGCAGCGGTAATGAG  | 20     | 58.83 |
| 정방향  | 50-53 #1 센스   | 5'-CTCTGAGTGAAGGCGGTAA  | 20     | 59.1  |
| 역방향  | 50-53 #1 안티센스 | 5'-ACCTGCTCAGCTTCTTCCTT | 20     | 58.94 |

[0272] 스킵한 및 스킵하지 않은 산물은 표 3에 따른 앰플리콘 크기를 생성하였다.

표 3

[0273] 각각의 환자 돌연변이에 대한 엑손 53을 스킵한 및 스킵하지 않은 앰플리콘 산물 크기의 요약

| 결실    | 프라이머  | 스킵하지 않은<br>(bp) | 스킵함<br>(bp) |
|-------|-------|-----------------|-------------|
| 45-52 | 44-54 | 429             | 217         |
| 48-52 | 44-54 | 903             | 691         |
|       | 47-54 | 306             | 94          |
| 49-52 | 47-54 | 492             | 280         |
| 50-52 | 47-54 | 594             | 382         |
| 52    | 51-54 | 414             | 202         |
|       | 47-54 | 916             | 704         |

[0274] RNA로 RT-PCR을 거친 후, 겔 모세관 전기영동을 사용하는 LabChip GX를 사용하여 샘플을 분석하였다. 엑손 스킵(%)을 하기 공식을 사용하여 계산하였다: (스킵한 밴드에 대한 곡선 하 면적)/(스킵한 및 스킵하지 않은 밴드에 대한 곡선 하 면적의 합)×100.

[0275] RT-PCR 결과의 요약을 표 4에 나타낸다. SRP-4053의 적어도 48개의 매주 용량을 제공받은 25명의 환자 모두가 엑손 스킵에서 기준선 수준 대비 증가를 나타내었다(p<0.001).

표 4

[0276] RT-PCR 결과로 DMD 환자에서 엑손 스킵을 확인함

| RT-PCR 결과            |                      |                   |            |
|----------------------|----------------------|-------------------|------------|
|                      | 파트 2/P1 환자<br>48~51주 | 파트 1 환자<br>60~76주 | 모든 환자      |
| 기준선으로부터 0.1 초과 증가 없음 | 0                    | 0                 | 0          |
| 기준선으로부터 0.1 초과 증가    | 17(100.0%)           | 8(100.0%)         | 25(100.0%) |

| 95% CI        | (80.5%, 100.0%) | (63.1%, 100.0%) | (86.3%, 100.0%) |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 기준선으로부터 감소    | 0               | 0               | 0               |
| 기준선으로부터 변화 없음 | 0               | 0               | 0               |
| 기준선으로부터 증가    | 17(100.0%)      | 8(100.0%)       | 25(100.0%)      |
| P-값           | <0.001          | 0.008           | <0.001          |
| 배율 증가         | -               | -               | 7.3             |

[0277] 도 2는 엑손 스킵에서 기준선 수준 대비 증가가 존재한다( $p < 0.001$ )는 결정으로 이어진 연구에서 25명의 환자 각각에 대한 RT-PCR 데이터(기준선 및 SRP-4053 치료 후 48주차)를 나타낸다.

[0278] 디스트로핀 생성의 결정: 웨스턴 블롯 분석

[0279] 웨스턴 블롯 분석을 위해, 133  $\mu$ l의 완충액 중 대략 5 mm 지름으로 9 대  $18 \times 20 \mu$ m 조직 구획의 비로 조직을 균질화 완충액(4% SDS, 4 M 요소, 125 mM 트리스-HCl(pH 6.8))으로 균질화하였다. 해당 용해액을 수집하고 제조업체의 지침(BioRad Cat. 500-0122)에 따라 RC DC 단백질 검정 키트를 사용하여 단백질 정량을 거쳤다. 조직 추출물 샘플을 BSA 표준 곡선의 범위 내에 속하도록 균질화 완충액을 사용해서 1:10으로 희석하였다. 28  $\mu$ l의 샘플이 40  $\mu$ g의 단백질, 1X 최종 농도 NuPAGE LDS 샘플 완충액(Life Technologies Cat. NP0008, Carlsbad, California, USA), 및 1X 최종 농도 NuPAGE 환원제(10x)(Life Technologies Cat. NP0004)를 함유하도록 샘플을 제조하였다. 105°C에서 5분 동안 단백질 샘플을 가열한 후, 샘플을 원심분리하고 레인 당 40  $\mu$ g의 총 단백질 부하로 상청액을 NuPAGE Novex 12웰, 1 mm, 미니 3~8% 폴리아크릴아미드 트리스-아세테이트 겔(Life Technologies Cat. EA0375) 상으로 로딩하였다. 전방 염료가 겔에서 빠져나갈 때까지 겔을 실온에서 150볼트로 걸었다. NuPAGE 전달 완충액(Life Technologies NP006-1), 10% 메탄올 및 0.1% NuPAGE 향산화제(Life Technologies NP0005)를 사용하여 30볼트로 실온에서 75분 동안 생성 단백질 겔을 PVDF 막(Life Technologies Cat. LC2007)으로 옮겼다.

[0280] 단백질 전달 후, PVDF 막을 TTBS 완충액(1X TBS(Amresco Cat. J640-4L), 0.1%(v/v) tween-20) 중에 침지시켰다. 막을 차단 완충액(TTBS 중 5%(w/v) 무지방 건조유(Lab Scientific Cat. M0841))으로 옮기고 온화하게 락킹하며 4°C에서 하룻밤 동안 침지시켰다. 차단 후, 차단 완충액을 사용하여 1:20으로 희석된 DYS1(Leica Cat. NCL-DYS1) 중 실온에서 60분 동안, 또는 차단 완충액으로 1:100,000으로 희석된 항- $\alpha$ -액티닌 항체(Sigma-Aldrich Cat. NA931V) 중 실온에서 20분 동안 막을 인큐베이션한 후, 6회 세척하였다(각각 TTBS로 5분). 홀스래디쉬 퍼옥시다제(GE Healthcare Cat. NA931V)에 컨주게이션된 항-마우스 IgG를 차단 완충액을 사용하여 1:40,000으로 희석하고 막에 45분(DYS1) 또는 15분( $\alpha$ -액티닌) 동안 첨가한 후, 다시 6회 세척하였다. ECL Prime Western 검출 키트(GE Healthcare Cat. RPN2232)를 사용하여, 필름을 겔에 노출시키고 이에 따라 현상하였다. 현상된 필름을 스캐닝하고 ImageQuant TL Plus 소프트웨어(version 8.1)를 사용하여 분석하고 Graphpad 소프트웨어를 사용하여 선형 회귀 분석을 수행하였다.

[0281] 각각의 웨스턴 블롯 겔에는 일반 조직에서 추출되고 4%, 2%, 1%, 0.5%, 0.25%의 최종 정상 대조군에 대해 DMD 조직 추출물 내로 스파이크 처리된 전체 단백질을 사용하여 생성된 5점 디스트로핀 표준 곡선이 포함된다(예를 들어, 도 5a 및 5b 참고). 표준 곡선 샘플을 상술된 바와 같이 가공하였다. 디스트로핀 밴드 세기를 겔 표준 곡선과 비교하여 디스트로핀 단백질 수준을 정상 대조군 디스트로핀 수준의 비율(NC%)로 결정하였다.

[0282] 웨스턴 블롯에 의해 측정되는 정상 디스트로핀 단백질의 평균 %는 기준선에서의 0.09%에서부터 치료시의 1.02% (범위 0.09~4.3%)까지 증가하여 기준선으로부터 +0.93%의 평균 변화를 나타내었다( $p < 0.001$ ).

[0283] 웨스턴 블롯 결과의 요약을 표 5에 나타낸다. 환자는 웨스턴 블롯에 의해 측정할 때 디스트로핀 단백질에서 기준선 대비 통계적으로 유의미한 증가를 실증하였다.

## 표 5

[0284] 웨스턴 블롯 결과로 DMD 환자에서의 디스트로핀 생성을 확인함

| 웨스턴 블롯 결과 |                        |                      |       |
|-----------|------------------------|----------------------|-------|
|           | 파트 2 환자<br>약 48~51주 투여 | 파트 1 환자<br>60~76주 투여 | 모든 환자 |

| n                  | 17         | 8          | 25         |
|--------------------|------------|------------|------------|
| 기준선 평균 정상 %(SD)    | 0.09(0.06) | 0.10(0.09) | 0.09(0.07) |
| 치료시 평균 정상 %(SD)    | 0.84(0.64) | 1.40(1.57) | 1.02(1.03) |
| 기준선으로부터의 평균 변화(SD) | 0.75(0.67) | 1.29(1.51) | 0.92(1.01) |
| P-값                | <0.001     | 0.008      | P < 0.001  |
| 배율 증가              | -          | -          |            |

[0285] 도 3은 디스트로핀 단백질에서 기준선 대비 통계적으로 유의미한 증가가 존재한다는 결정으로 이어진 연구에서 25명의 환자 각각에 대한 웨스턴 블롯 데이터(기준선 및 SRP-4053 치료 후 48주차)를 나타낸다.

[0286] 엑손 스킵 및 신생 디스트로핀 단백질 간 양의 상관관계가 관찰되었다(Spearman-r = 0.500, p = 0.011).

[0287] 평균 섬유 세기의 분석은 신생 디스트로핀에서 기준선을 초과하는 통계적으로 유의미한 증가(p<0.001) 및 디스트로핀이 근육속막에 정확히 편재되었음(도 4a~5b)을 실증하였다.

[0288] 엑손 스킵 및 근육속막 디스트로핀 편재가 모든 환자에서 관찰되었다.

[0289] IHC-양성 디스트로핀 섬유(%)를 표 6에 나타낸다. 모든 환자는 IHC에 의해 측정되는 양성 디스트로핀 섬유의 퍼센트에서 기준선을 초과하는 통계적으로 유의미한 증가를 실증하였다.

### 표 6

#### IHC 결과

[0290]

| PDPF<br>기준선/미치료<br>(SD) | PDPF<br>치료시<br>(SD) | P값     |
|-------------------------|---------------------|--------|
| 2.7%                    | 15.5%               | <0.001 |

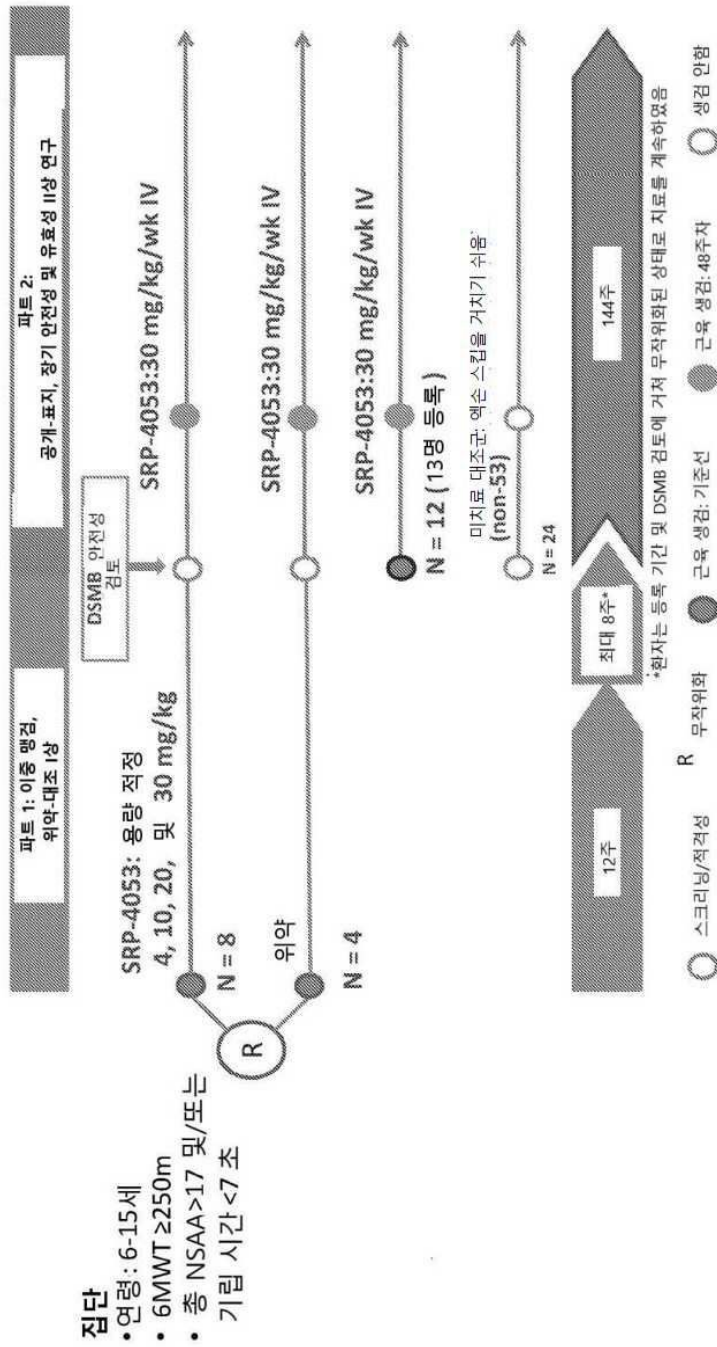
[0291] 표 5 및 6 그리고 도 4a~5b에서 알 수 있듯이, 웨스턴 블롯 PDPF 및 세기와 연관되며, 이는 SRP-4053으로의 치료로 유도되는 DMD 환자에서의 디스트로핀 생성을 나타낸다.

[0292] \*\*\*\*\*

[0293] 본 명세서에서 인용되는 모든 간행물 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물 또는 특허 출원이 참조로 포함됨을 구체적이고 개별적으로 나타낸 바와 같이 본원에 참조로 포함된다.

도면

도면1



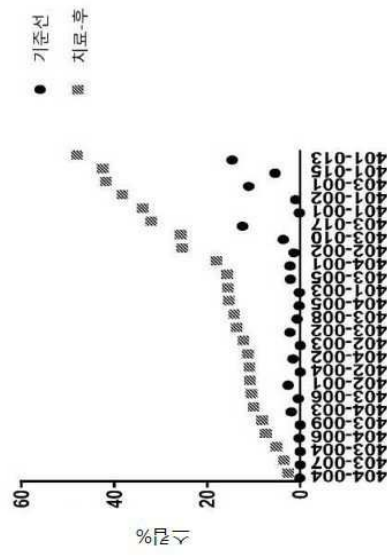
도면2

## 엑손 스킵

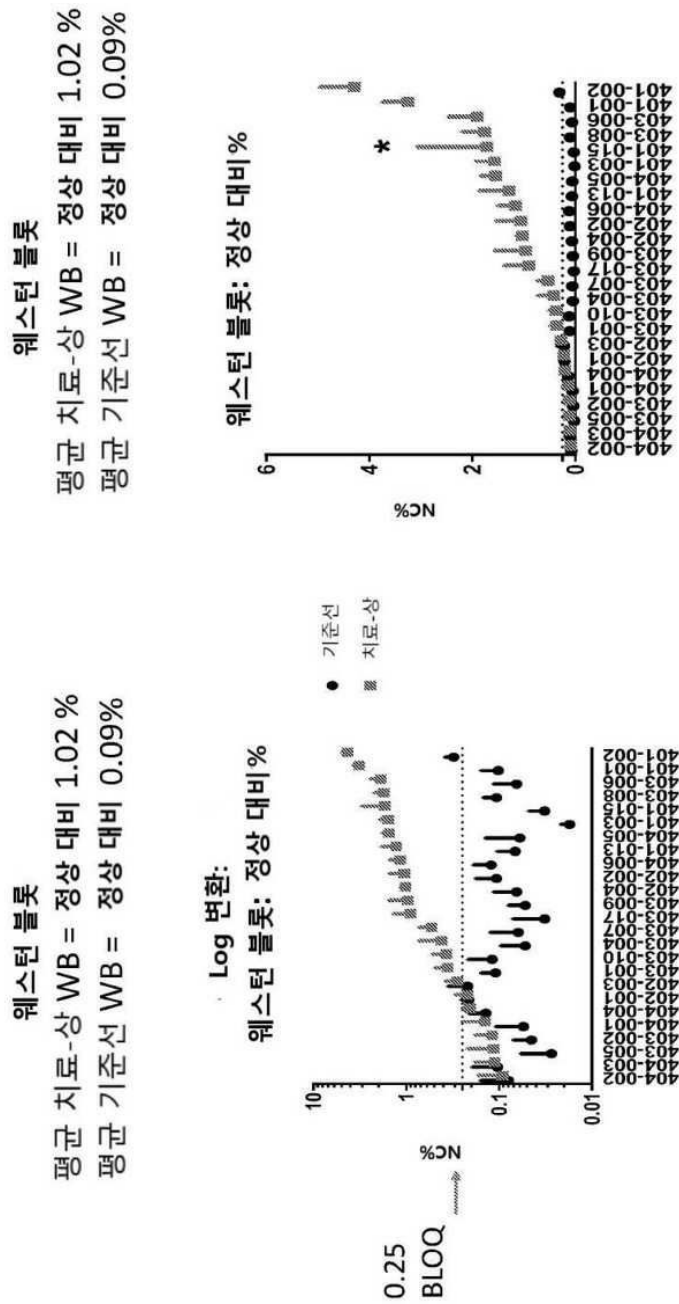
평균 치료시 PCR = 18.95 % 스킵

평균 기준선 PCR = 2.59% 스킵

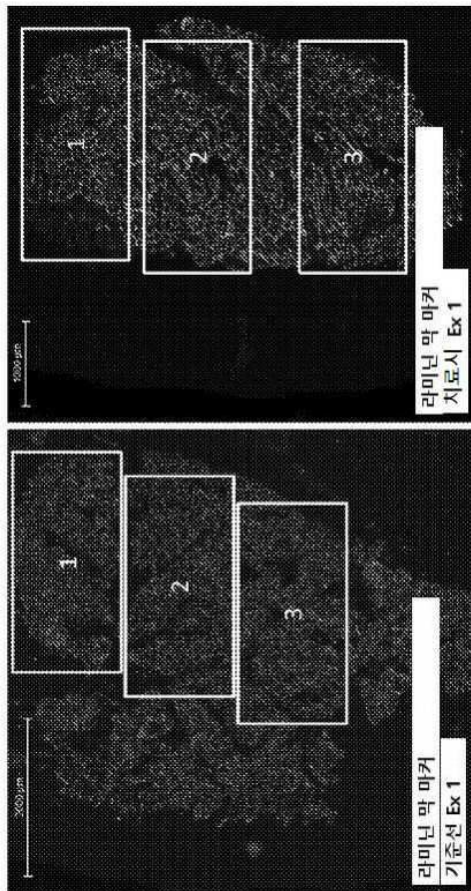
## PCR: 엑손 스킵%



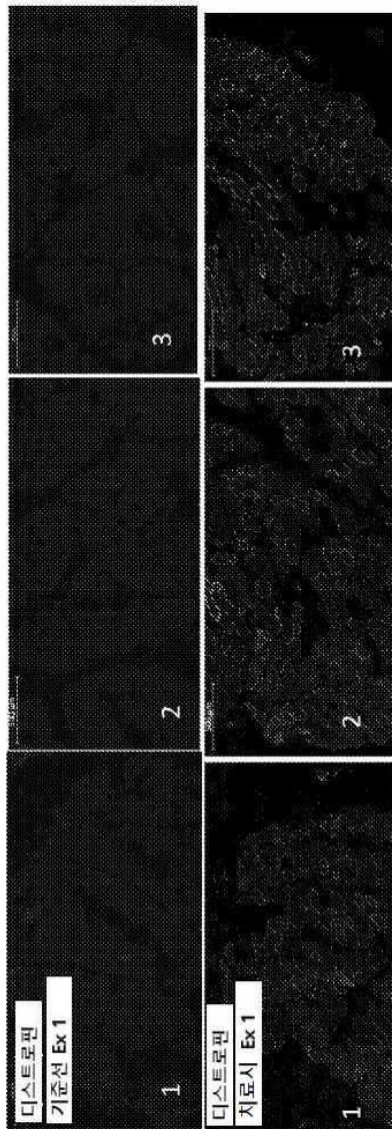
도면3



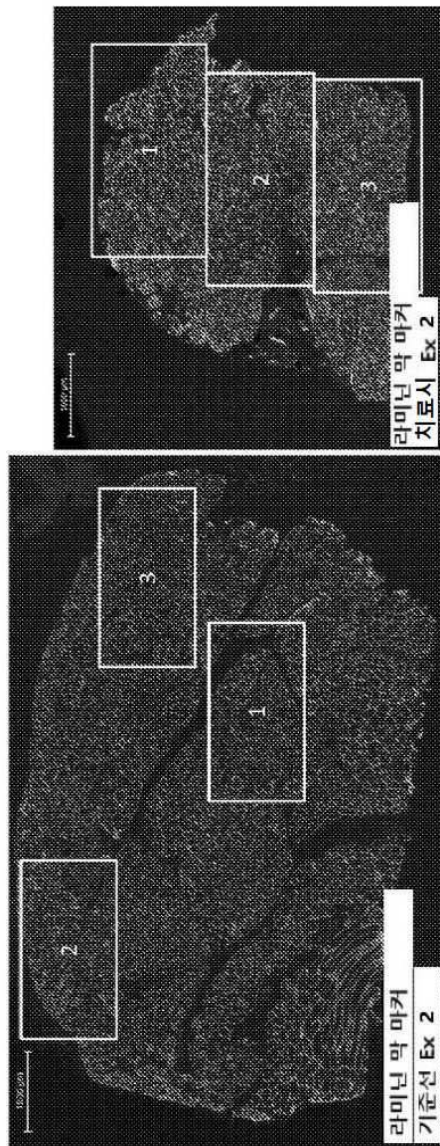
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

- <110> SAREPTA THERAPEUTICS, Inc.
- <120> METHODS FOR TREATING MUSCULAR DYSTROPHY
- <130> IPA200150-US
- <150> 62/553,094
- <151> 2017-08-31
- <150> 62/565,824
- <151> 2017-09-29
- <150> 62/725,129
- <151> 2018-08-30

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> Golodirsen

<400> 1

gttgcctccg gttctgaagg tggtc

25