



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2019-0017063  
(43) 공개일자 2019년02월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)  
C12N 15/113 (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 48/005 (2013.01)  
A61K 48/0058 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7003809(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년06월17일  
심사청구일자 2017년02월08일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7011876  
원출원일자(국제) 2010년06월17일  
심사청구일자 2017년05월29일
- (85) 번역문제출일자 2019년02월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/039077
- (87) 국제공개번호 WO 2010/148249  
국제공개일자 2010년12월23일
- (30) 우선권주장  
61/218,031 2009년06월17일 미국(US)

- (71) 출원인  
바이오젠 엠에이 인코포레이티드  
미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 비니 스트리트 225  
콜드스프링하버리보리토리  
미국 뉴욕주 11724, 월드 스프링 하버, 원 병타운 로드
- (72) 발명자  
메네트, 씨., 프랑크  
미국 캘리포니아 92009, 1347 캐신스 스트리트 칼 스버드  
홍 젠  
미국 캘리포니아 92129, 8563 겔웨이 플레이스 샌 디에고  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준

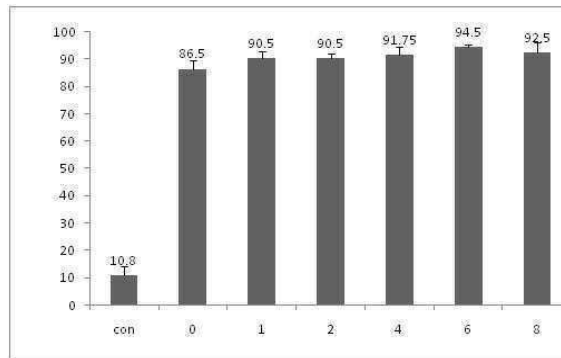
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **대상에게서 SMN 2 스플라이싱을 조정하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 명세서에는 대상에게서 SMN2 mRNA의 스플라이싱을 조정하는 화합물, 조성물 및 방법이 기술된다. 또한, 척수 근위축증을 비롯한 질환 및 장애의 치료를 위한 약제의 제조에 있어 기술된 화합물 및 조성물의 용도를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 9/0019* (2013.01)

*C12N 15/113* (2013.01)

*A61K 2121/00* (2013.01)

*C12N 2310/11* (2013.01)

*C12N 2320/33* (2013.01)

(72) 발명자

**리고 프랑크**

미국 캘리포니아 92010, 2508 매런 로드 칼스버드

**크레이너 아드리안 알.**

미국 뉴욕 22746, 4 화이트 파인 코트 헌팅턴 스퀘어

**후아 이민**

미국 뉴욕 11753, 48 더블유 16번 스트리트 체리초

**파시니, 마르코, 에이.**

미국 매사추세츠 05145, 14 나이팅게일 드리아브  
쉬류스베리

**쉬해버딘 럽야**

미국 매사추세츠 02135, 1933 커먼웰스 애버뉴 브  
라이턴

**칭 성 에이치.**

미국 매사추세츠 01760, 10 제니스 서클 내틱

**클리거 캐더린 더블유.**

미국 매사추세츠 01776, 54 보우이취 로드 서드베  
리

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 척수성 근위축증(spinal muscular atrophy; SMA)이 있는 인간 대상체를 치료하기 위한 제약 조성물이며,

상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 18개의 연결된 뉴클레오시드로 이루어지고, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 1의 핵염기 서열로 이루어진 핵염기 서열을 가지며,

상기 올리고뉴클레오티드의 각 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이고, 상기 올리고뉴클레오티드의 각 뉴클레오시드는 2'-O-메톡시에틸 뉴클레오시드이며,

상기 제약 조성물은 인간 대상체의 수막공간 내로 볼루스 주사에 의해 투여되는 것인, 제약 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 인간 대상체가 I형 SMA가 있는, 제약 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 인간 대상체가 II형 SMA가 있는, 제약 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 인간 대상체가 III형 SMA가 있는, 제약 조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 첫번째 용량이 대상체의 출생 1주일 이내에 투여되는 것인, 제약 조성물.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 첫번째 용량이 대상체의 출생 1개월 이내에 투여되는 것인, 제약 조성물.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 첫번째 용량이 대상체의 출생 3개월 이내에 투여되는 것인, 제약 조성물.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 첫번째 용량이 대상체의 출생 6개월 이내에 투여되는 것인, 제약 조성물.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 첫번째 용량이 대상체가 1 내지 2세령일 때 투여되는 것인, 제약 조성물.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 첫번째 용량이 대상체가 1 내지 15세령일 때 투여되는 것인, 제약 조성물.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 대상체 체중 kg 당 안티센스 올리고뉴클레오티드 0.01 내지 10 mg의 용량으로 투여되는 것인, 제약 조성물.

**청구항 12**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 5 내지 20 mg의 용량으로 투여되는 것인, 제약 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] [서열목록]

[0002] 본 출원은 전자적 형태로 서열목록과 함께 제출된다. 서열목록은 5 Kb 크기의, 2010년 6월 17일자로 생성된, 파일명 20100617\_CORE0086WOSEQ.txt의 파일로서 제공된다. 서열목록의 전자적 형태 내 정보는 온전히 본 명세서에 참고로서 포함된다.

[0003] 본 발명은 대상에게서 SMN2 mRNA의 스플라이싱을 조정하는 화합물, 조성물 및 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 척수근위축증을 비롯한 질환 및 장애의 치료를 위한 약제의 제조에 있어 기술된 화합물 및 조성물의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0004] 일차 전사체 또는 프리-mRNA로 알려진, 새롭게 합성된 진핵 mRNA 분자는 번역 전에 프로세싱된다. 프리-mRNAs의 프로세싱에는 전사체의 3' 말단에 5' 메틸화 캡 및 대략 200-250 염기의 폴리(A) 꼬리의 첨가가 포함된다. 프리-mRNA로부터 mRNA의 프로세싱은 또한 종종 프리-mRNA의 스플라이싱을 포함하는데, 이는 90-95%의 포유동물 mRNAs의 성숙에서 야기된다. 인트론 (또는 개재 서열)은 성숙 mRNA의 코딩 서열 내에 포함되지 않는 프리-mRNA (또는 이를 코딩하는 DNA)의 영역이다. 엑손은 성숙 mRNA 내 잔존하는 일차 전사체의 영역이다. 엑손은 함께 스플라이싱되어 성숙 mRNA 서열을 형성한다. 스플라이스 연결은 또한 종종 "5' 스플라이스 부위" 또는 "스플라이스 공여 부위"로 불리는 연결의 5' 측면과 "3' 스플라이스 부위" 또는 "스플라이스 수용 부위"로 불리는 연결의 3' 측면을 갖는 스플라이스 부위로 언급된다. 스플라이싱에서, 상류 엑손의 3' 말단은 하류 엑손의 5' 말단에 연결된다. 따라서 스플라이싱되지 않은 프리-mRNA는 인트론의 5' 말단에서 엑손/인트론 연결 및 인트론의 3' 말단에서 인트론/엑손 연결을 갖는다. 인트론이 제거된 후, 엑손은 종종 성숙 mRNA 내 엑손/엑손 연결 또는 경계로 언급되는 부위에 인접한다. 잠재적 스플라이스 부위는 덜 빈번하게 사용되는 하지만, 통상의 스플라이스 부위가 차단되거나 이용가능하지 않을 때 사용되는 부위이다. 다른 조합의 엑손들의 스플라이싱으로 정의되는, 대체 스플라이싱은 종종 단일 유전자로부터 다중 mRNA 전사체를 생성한다.

[0005] 점 돌연변이로부터 유래하는 인간의 유전적 질환의 최대 50%는 비정상적 프리-mRNA 프로세싱을 초래한다. 이러한 점 돌연변이는 통상의 스플라이스 부위를 파괴하거나 새로운 스플라이스 부위를 생성하여, 다른 조합의 엑손 또는 엑손 내 결손을 갖는 mRNA 전사체를 야기한다. 점 돌연변이는 또한 잠재적 스플라이스 부위의 활성화 또는 조절 시스 요소 (즉, 스플라이싱 인핸서 또는 사일렌서)의 파괴를 초래할 수 있다 (Cartegni 등, Nat. Rev. Genet., 2002, 3, 285-298; Drawczak 등, Hum. Genet., 1992, 90, 41-54). 스플라이싱을 재지정하여 바람직한 스플라이스 생성물을 얻기 위해 몇몇 유전적 질환에서 이상 스플라이싱을 유도하는 돌연변이를 표적하는데 안티센스 올리고뉴클레오티드가 사용되고 있다 (Kole, Acta Biochimica Polonica, 1997, 44, 231-238).

[0006] 안티센스 화합물은 또한 Bcl-x 프리-mRNA의 긴 형태 및 짧은 형태와 같은 자연 발생적인 교대 스플라이스 변이체의 비율을 조정하거나 (미국특허 제6,172,216호; 미국특허 제6,214,986호; Taylor 등, Nat. Biotechnol. 1999, 17, 1097-1100) 전성숙 종결 코돈을 포함하는 특정 엑손의 스킵핑 (skipping)을 강제하는데 사용되고 있다 (Wilton 등, Neuromuscul. Disord., 1999, 9, 330-338). 미국특허 제5,627,274호 및 국제특허공개 제 W094/26887호는 RNase H를 활성화시키지 않는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하여 돌연변이를 포함하는 프리-mRNA 분자에서의 이상 스플라이싱을 제거하기 위한 조성물 및 방법을 기술한다.

[0007] 근위 척수근위축증 (SMA)은 척수 운동 뉴런의 소실을 특징으로 하는 유전적, 신경변성 질환이다. SMA는 조기에 발병하는 보통염색체 열성 질환으로 현재 유아 사망의 주된 요인이다. SMA의 중증도는 환자마다 다르고 3개의 유형으로 구분되고 있다. 유형 I SMA는 출생 시 또는 6개월 이내에 발병하는 가장 심각한 형태로 전형적으로 2

살 이내에 사망에 이른다. 유형 I SMA를 갖는 아동은 앉거나 걸을 수 없다. 유형 II SMA는 중간 형태로 이 환자는 앉을 수는 있지만 서있거나 걸을 수는 없다. 이 질환의 만성 형태인, 유형 III SMA를 갖는 환자는 전형적으로 생후 18개월 이후에 SMA를 발병한다 (Lefebvre 등, Hum. Mol. Genet., 1998, 7, 1531-1536).

[0008] SMA의 분자적 소지는, 생물발생 (biogenesis) 및 재이용에 관여하는 것으로 생각되는 다중-단백질 복합체의 일부분인 단백질, SMN 말단소체 (Telomeric)로도 알려질 수 있는, 생존 운동 뉴런 유전자 1 (SMN1) 카피 모두의 소실에 의해 야기된다. SMN 중심체 (Centromeric)로도 알려질 수 있는, 거의 동일한 유전자 SMN2는 염색체 5q13 상의 복제 영역에 존재하고 질환 중증도를 조정한다. 정상 SMN1 유전자의 발현은 단지 생존 운동 뉴런 (SMN) 단백질의 발현을 초래한다. SMN1 및 SMN2가 동일한 단백질을 코딩하는 가능성을 갖는다고 하더라도, SMN2는 엑손 7의 위치 +6에서 일시적인 침묵 돌연변이를 포함하고, 이는 SMN2 전사체 내 엑손 7의 비효율적인 포함을 초래한다. 따라서, SMN2의 지배적인 형태는 엑손 7이 결손되어 불안정하고 불활성인, 절두된 (truncated) 변형이다 (Cartegni and Krainer, Nat. Genet., 2002, 30, 377-384). SMN2 유전자의 발현은 대략 10-20%의 SMN 단백질 및 80-90%의 불안정/비-기능성 SMN델타7 단백질을 생성한다. SMN 단백질은 스플라이세오솜의 조립에 잘 확립된 역할을 담당하고 뉴런의 축삭 및 신경 종말에서 mRNA 통행 (trafficking)을 매개할 수도 있다.

[0009] 안티센스 기술은 교대 스플라이스 생성물을 비롯한 하나 이상의 특정 유전자 생성물의 발현을 조정하는데 효과적인 수단이고, 치료, 진단 및 연구 적용에 특히 유용하다. 안티센스 기술 이면의 원리는 표적 핵산에 혼성화하여 수많은 안티센스 기작 중 하나를 통한 전사, 스플라이싱 또는 번역과 같은 유전자 발현 활성을 조정하는 안티센스 화합물이다. 안티센스 화합물의 서열 특이성은 질환에 관여하는 유전자의 발현을 선택적으로 조정하는 치료제로서 뿐만 아니라, 표적 확인 및 유전자 작용화를 위한 수단으로서 이들을 매우 매력적으로 만든다.

[0010] SMN2에 상보적인 특정 안티센스 화합물은 당해 기술분야에 알려져 있다. 예를 들면, WO 2007/002390; US 61/168,885; Hua 등, American J. of Human Genetics (April 2008) 82, 1-15; Singh 등, RNA Bio. 6:3, 1-10 (2009)을 참고하십시오. 본 명세서에 기술된 특정 안티센스 화합물 및 방법은 당해 기술분야에 공지된 이러한 화합물 및 방법과 비교하여 바람직한 특성을 갖는다. SMN2의 스플라이싱을 조정하도록 고안된 키메라 펩티드 핵산 분자가 기술되어 있다 (WO 02/38738; Cartegni 및 Krainer, Nat. Struct. Biol., 2003, 10, 120-125).

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 특정 실시양태에서, 본 발명은 인간 SMN2 프리-mRNA를 코딩하는 핵산의 인트론 7에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물을 대상에게 투여하고, 상기 안티센스 화합물이 뇌척수액 내로 투여되는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 투여는 수막공간 내로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 투여는 뇌의 뇌척수액 내로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 투여는 볼루스 주사를 포함한다. 특정 실시양태에서, 투여는 전달 펌프를 이용한 주입을 이용한다.

[0012] 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 대상의 체중 kg당 0.01 내지 10 mg의 안티센스 화합물의 용량으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 용량은 대상의 체중 kg당 0.01 내지 10 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 용량은 대상의 체중 kg당 0.01 내지 5 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 용량은 대상의 체중 kg당 0.05 내지 1 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 용량은 대상의 체중 kg당 0.01 내지 0.5 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 용량은 대상의 체중 kg당 0.05 내지 0.5 mg의 안티센스 화합물이다.

[0013] 특정 실시양태에서, 용량은 매일 투여된다. 특정 실시양태에서, 용량은 매주 투여된다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 지속적으로 투여되고 용량은 하루에 투여되는 양이다. 특정 실시양태에서, 방법은 유도기 동안 적어도 하나의 유도 용량을 투여하고 유지기 동안 적어도 하나의 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 유도 용량은 대상의 체중 kg당 0.05 내지 5.0 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 유지 용량은 대상의 체중 kg당 0.01 내지 1.0 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 유도기의 기간은 적어도 1주일이다. 특정 실시양태에서, 유지기의 기간은 적어도 1주일이다. 특정 실시양태에서, 각각의 유도 용량 및 각각의 유지 용량은 단일 주사를 포함한다. 특정 실시양태에서, 각각의 유도 용량 및 각각의 유지 용량은 독립적으로 2회 이상의 주사를 포함한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 적어도 1주일의 치료기간에 걸쳐서 적어도 2회 투여된다. 특정 실시양태에서, 치료기간은 적어도 1개월이다. 특정 실시양태에서, 치료기간은 적어도 2개월이다. 특정 실시양태에서, 치료기간은 적어도 4개월이다. 특정 실시양

태에서, 유도 용량은 1회 이상의 볼루스 주사에 의해 투여되고 유지 용량은 주입 펌프를 이용해 투여된다.

- [0014] 특정 실시양태에서, 방법은 안티센스 화합물의 내약성 및/또는 효과를 평가하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 용량 또는 빈도는 안티센스 화합물의 투여가 내성적이지 않다는 징후 이후에 감소된다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 용량 또는 빈도는 안티센스 화합물의 투여가 효과적이라는 징후 이후에 유지 또는 감소된다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 용량은 안티센스 화합물의 투여가 효과적이지 않다는 징후 이후에 증가된다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 빈도 또는 투여는 안티센스 화합물의 투여가 효과적이라는 징후 이후에 감소된다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 빈도 또는 투여는 안티센스 화합물의 투여가 효과적이지 않다는 징후 이후에 증가된다.
- [0015] 특정 실시양태에서, 방법은 안티센스 화합물 및 적어도 하나의 다른 치료제의 동시-투여를 포함한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물 및 적어도 하나의 다른 치료제는 동시에 동시-투여된다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 적어도 하나의 다른 치료제의 투여 전에 투여된다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 적어도 하나의 다른 치료제의 투여 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 다른 치료제는 발프로산, 밀루졸, 히드록시우레아, 및 부티레이트의 하나 이상의 투여를 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 다른 치료제는 트리코스타틴-A의 투여를 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 다른 치료제는 줄기세포의 투여를 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 다른 치료제는 유전자요법을 포함한다. 특정 실시양태에서, 유전자요법은 CSF에 투여되고 안티센스 화합물은 전신성으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 유전자요법은 CSF에 투여되고 안티센스 화합물은 전신성으로 CSF에 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 초기에는, 안티센스 화합물이 전신성으로 CSF에 투여되고, 이어서 CSF에 유전자요법 투여 및 안티센스 화합물의 전신 투여를 포함하는 치료 요법을 제공한다. 이러한 특정 실시양태에서, 대상은 초기 치료 시점에 유아이다. 이러한 특정 실시양태에서, 대상은 2세 미만이다. 특정 실시양태에서, 대상이 유전자요법에 충분한 연령이 될 때까지 안티센스 화합물은 대상의 CNS에 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 전신성으로 온몸에 투여된다.
- [0016] 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 약 0.01 mg/ml, 약 0.05 mg/ml, 약 0.1 mg/ml, 약 0.5 mg/ml, 약 1 mg/ml, 약 5 mg/ml, 약 10 mg/ml, 약 50 mg/ml, 또는 약 100 mg/ml의 농도로 투여된다.
- [0017] 특정 실시양태에서, 대상에게서 운동 뉴런 내 SMN2 mRNA의 엑손 7의 포함이 증가한다. 특정 실시양태에서, 대상에게서 운동 뉴런 내 SMN2 폴리펩티드의 엑손 7 아미노산의 포함이 증가한다.
- [0018] 특정 실시양태에서, 본 발명은 인간 SMN2를 코딩하는 핵산의 인트론 7에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물을 대상에게 투여하여 대상에게서 운동 뉴런 내 SMN2 mRNA의 엑손 7의 포함을 증가시키는 단계를 포함하는, 대상에게서 운동 뉴런 내 SMN2 mRNA의 엑손 7의 포함을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0019] 특정 실시양태에서, 본 발명은 인간 SMN2를 코딩하는 핵산의 인트론 7에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물을 대상에게 투여하여 대상에게서 운동 뉴런 내 SMN2 폴리펩티드의 엑손 7 아미노산의 포함을 증가시키는 단계를 포함하는, 대상에게서 운동 뉴런 내 SMN2 폴리펩티드의 엑손 7 아미노산의 포함을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0020] 특정 실시양태에서, 대상은 SMA를 갖는다. 특정 실시양태에서, 대상은 유형 I SMA를 갖는다. 특정 실시양태에서, 대상은 유형 II SMA를 갖는다. 특정 실시양태에서, 대상은 유형 III SMA를 갖는다.
- [0021] 특정 실시양태에서, 제1 용량은 자궁 내 태아에게 투여된다. 특정 실시양태에서, 제1 용량은 혈액뇌장벽의 완벽한 형성 전에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제1 용량은 대상의 출생 1주일 이내에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제1 용량은 대상의 출생 1개월 이내에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제1 용량은 대상의 출생 3개월 이내에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제1 용량은 대상의 출생 6개월 이내에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제1 용량은 1 내지 2세 사이에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제1 용량은 대상이 1 내지 15세 사이일 때 투여된다. 특정 실시양태에서, 제1 용량은 대상이 15세를 초과할 때 투여된다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 대상은 포유동물이다. 특정 실시양태에서, 대상은 인간이다.
- [0023] 특정 실시양태에서, 방법은 SMA를 갖는 대상을 동정하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 대상의 하나의 이상의 근육의 전기활성을 측정하여 대상을 동정한다. 특정 실시양태에서, 그 대상이 자신의 SMN1 유전자 내에 돌연변이를 갖는지 여부를 결정하기 위한 유전적 검사에 의해 대상을 동정한다. 특정 실시양태에서, 근육 생검에 의해 대상을 동정한다.



- [0024] 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 투여는 엑손 7을 갖는 SMN2 mRNA의 양을 적어도 10% 증가시킨다. 특정 실시양태에서, 엑손 7을 갖는 SMN2 mRNA의 양적 증가는 적어도 20%이다. 특정 실시양태에서, 엑손 7을 갖는 SMN2 mRNA의 양적 증가는 적어도 50%이다. 특정 실시양태에서, 엑손 7을 갖는 SMN2 mRNA의 양적 증가는 적어도 70%이다.
- [0025] 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 투여는 엑손 7 아미노산을 갖는 SMN2 폴리펩티드의 양을 적어도 10% 증가시킨다. 특정 실시양태에서, 엑손 7 폴리펩티드를 갖는 SMN2 mRNA의 양적 증가는 적어도 20%이다. 특정 실시양태에서, 엑손 7 폴리펩티드를 갖는 SMN2 mRNA의 양적 증가는 적어도 50%이다. 특정 실시양태에서, 엑손 7 폴리펩티드를 갖는 SMN2 mRNA의 양적 증가는 적어도 70%이다.
- [0026] 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 투여는 대상에게서 SMA의 적어도 하나의 증상을 개선한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 투여는 대상에게서 운동 기능을 개선한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 투여는 대상에게서 운동 기능의 소실을 지연 또는 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 투여는 호흡 기능을 개선한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물의 투여는 생존율을 개선한다.
- [0027] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 적어도 하나의 뉴클레오시드는 변형된 당 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 당 모이어티는 2'-메톡시에틸 당 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본질적으로 안티센스 올리고뉴클레오티드의 각각의 뉴클레오시드는 변형된 당 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 변형된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드 모두는 동일한 당 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 각각의 변형된 당 모이어티는 2'-메톡시에틸 당 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 각각의 뉴클레오시드는 변형된 당 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 뉴클레오시드 모두는 동일한 당 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 각각의 변형된 당 모이어티는 2'-메톡시에틸 당 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 결합이다. 특정 실시양태에서, 각각의 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 결합이다.
- [0028] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 10 내지 25개의 연결된 뉴클레오시드로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 12 내지 22개의 연결된 뉴클레오시드로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 15 내지 20개의 연결된 뉴클레오시드로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 18개의 연결된 뉴클레오시드로 이루어진다.
- [0029] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 인간 SMN2를 코딩하는 핵산에 대해 적어도 90% 상보적이다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 인간 SMN2를 코딩하는 핵산에 대해 완전히 상보적이다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호: 1의 뉴클레오염기 서열의 적어도 10개의 연속된 뉴클레오염기를 포함하는 뉴클레오염기 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호: 1의 뉴클레오염기 서열의 15개 연속된 뉴클레오염기를 포함하는 뉴클레오염기 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호: 1의 뉴클레오염기 서열을 포함하는 뉴클레오염기 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열번호: 1의 뉴클레오염기 서열로 이루어진 뉴클레오염기 서열을 갖는다.
- [0030] 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 컨주게이트 기(conjugate group) 또는 말단기를 포함한다.
- [0031] 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진다.
- [0032] 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 또한 전신적으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 전신 투여는 정맥내 또는 복강내 주사에 의한다. 특정 실시양태에서, 전신 투여 및 중추신경계 내로의 투여는 동시에 수행된다. 특정 실시양태에서, 전신 투여 및 중추신경계 내로의 투여는 다른 시점에 수행된다.
- [0033] 특정 실시양태에서, 본 발명은 단독으로 또는 CSF 내로의 전달과 병용하여, 안티센스 화합물의 전신 투여를 제공한다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 전신적으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 피하로 투여된다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 정맥내로 투여된다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 근육내 주사에 의해 투여된다.
- [0034] 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 CSF에 직접적 (예컨대, IT 및/또는 ICV 주사 및/또는 주입) 및 전신적으로 모두 투여된다.
- [0035] 특정 실시양태에서, 본 발명은 15 내지 20개의 연결된 뉴클레오시드로 이루어지고 그의 전체 길이에 있어서 서열번호: 7에 100% 상보적인 뉴클레오염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 적어도 1회 용량의 안티

센스 화합물을, SMA와 관련된 적어도 하나의 증상을 갖는 대상에게 투여하는 방법으로, 상기 각각의 뉴클레오시드가 2' MOE 변형된 뉴클레오시드이고; CSF에 투여되는 적어도 1회의 용량이 0.1 mg/kg과 5 mg/kg 사이인 방법을 제공한다. 이러한 특정 실시양태에서, 용량은 0.5 mg/kg과 2 mg/kg 사이이다. 특정 실시양태에서, 적어도 1회의 용량은 볼루스 주사에 의해 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 용량은 일시 수막공간내 주사에 의해 투여된다. 이러한 실시양태에서, 적어도 1회의 제2 용량이 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 2주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 4주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 8주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 12주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 16주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 20주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 대상은 제1 용량 투여 시점에 2세 미만이다. 특정 실시양태에서, 대상은 2세와 15세 사이이다. 특정 실시양태에서, 대상은 15세와 30세 사이이다. 특정 실시양태에서, 대상은 30세보다 많다. 특정 실시양태에서, SMA와 관련된 적어도 하나의 증상은 감소되고 그의 진행은 느려진다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 ISIS396443이다.

[0036] 특정 실시양태에서, 본 발명은 15 내지 20개의 연결된 뉴클레오시드로 이루어지고 그의 전체 길이에 걸쳐서 서열번호: 7에 100% 상보적인 뉴클레오염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 적어도 1회 용량의 안티센스 화합물을, SMA와 관련된 적어도 하나의 증상을 갖는 대상에게 투여하는 방법으로, 상기 각각의 뉴클레오시드가 2' MOE 변형된 뉴클레오시드이고; 적어도 1회 용량이 전신적으로 투여되는 방법을 제공한다. 이러한 특정 실시양태에서, 적어도 1회 용량은 볼루스 주사에 의해 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 용량은 볼루스 피하 주사에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 투여되는 용량은 0.5 mg/kg과 50 mg/kg 사이이다. 특정 실시양태에서, 용량은 1 mg/kg과 10 mg/kg 사이이다. 특정 실시양태에서, 용량은 1 mg/kg과 5 mg/kg 사이이다. 특정 실시양태에서, 용량은 0.5 mg/kg과 1 mg/kg 사이이다. 특정 실시양태에서, 적어도 1회의 제2 용량이 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 2주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 4주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 8주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 12주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 16주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제2 용량은 제1 용량 투여하고 적어도 20주 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 대상은 제1 용량 투여 시점에 2세 미만이다. 특정 실시양태에서, 대상은 2세와 15세 사이이다. 특정 실시양태에서, 대상은 15세와 30세 사이이다. 특정 실시양태에서, 대상은 30세보다 많다. 특정 실시양태에서, SMA와 관련된 적어도 하나의 증상은 감소되고 그의 진행은 느려진다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 ISIS396443이다.

[0037] 특정 실시양태에서, 본 발명은 15 내지 20개의 연결된 뉴클레오시드로 이루어지고 그의 전체 길이에 걸쳐서 서열번호: 7에 100% 상보적인 뉴클레오염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물의 CSF로의 적어도 1회의 용량 및 적어도 1회의 전신 용량을, SMA와 관련된 적어도 하나의 증상을 갖는 대상에게 투여하는 방법으로, 상기 각각의 뉴클레오시드가 2' MOE 변형된 뉴클레오시드인 방법을 제공한다. 이러한 특정 실시양태에서, CSF 용량은 0.1 mg/kg과 5 mg/kg 사이이다. 특정 실시양태에서, 전신 용량은 0.5 mg/kg과 50 mg/kg 사이이다. 특정 실시양태에서, 적어도 1회의 CSF 용량은 볼루스 주사에 의해 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 적어도 1회의 CSF 용량은 일시 수막공간내 주사에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 적어도 1회의 전신 용량은 볼루스 주사에 의해 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 적어도 1회의 전신 용량은 피하 주사에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, CSF 용량 및 전신 용량은 동시에 투여된다. 특정 실시양태에서, CSF 용량 및 전신 용량은 다른 시점에 투여된다. 특정 실시양태에서, 대상은 제1 용량 투여 시점에 2세 미만이다. 특정 실시양태에서, 대상은 2세와 15세 사이이다. 특정 실시양태에서, 대상은 15세와 30세 사이이다. 특정 실시양태에서, 대상은 30세보다 많다. 특정 실시양태에서, SMA와 관련된 적어도 하나의 증상은 감소되고 그의 진행은 느려진다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 ISIS396443이다.

[0038] 특정 실시양태에서, 본 발명은 15 내지 20개의 연결된 뉴클레오시드로 이루어지고 그의 전체 길이에 걸쳐서 서열번호: 7에 100% 상보적인 뉴클레오염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물의 적어도 하나의 전신 용량을, SMA와 관련된 적어도 하나의 증상을 갖는 대상에게 투여하는 방법으로, 상기 각각의 뉴클레오시드가 2' MOE 변형된 뉴클레오시드이고; 적어도 1회 용량의 유전자요법 제제인 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 전신 용량은 0.5 mg/kg과 50 mg/kg 사이이다. 특정 실시양태에서, 적어도 1회의 전신 용량은 볼루스 주사에 의해 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 적어도 1회의 전신 용량은 피하 주사에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 전신 용량 및 유전자요법 제제는 동시에 투여된다. 특정 실시양태에서, 전신 용량 및 유전자요법 제제는 다른 시점에 투여된다. 특정 실시양태에서, 유전자요법 제제는 CSF에 투여된다.



이러한 특정 실시양태에서, 유전자요법 제제는 수막공간내 주사 및/또는 주입에 의해 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 유전자요법 제제는 뇌혈관내 주사 및/또는 주입에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 대상은 제1 용량 투여 시점에 2세 미만이다. 특정 실시양태에서, 대상은 2세와 15세 사이이다. 특정 실시양태에서, 대상은 15세와 30세 사이이다. 특정 실시양태에서, 대상은 30세보다 많다. 특정 실시양태에서, SMA와 관련된 적어도 하나의 증상은 감소되고 그의 진행은 느려진다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 ISIS396443 이다.

[0039] 특정 실시양태에서, 본 발명은 SMA와 관련된 적어도 하나의 증상을 갖는 대상을 선발하고 상기 방법들 중 어느 하나에 따라 안티센스 화합물을 투여하는 방법을 제공한다. 이러한 특정 실시양태에서, SMA의 적어도 하나의 증상은 투여 후 평가된다. 이러한 특정 실시양태에서, SMA의 적어도 하나의 증상은 개선된다. 이러한 특정 실시양태에서, SMA의 적어도 하나의 증상은 진행되지 않거나 안티센스 화합물의 투여를 받지 않은 대상에 비해 더 느리게 진행된다.

[0040] 특정 실시양태에서, 본 발명은 상기 방법들 중 어느 하나에 사용하기 위한, 인간 SMN2를 코딩하는 핵산의 인트론 7에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 생존 운동 뉴런 1 (SMN1)과 관련된 질환 또는 상태를 치료하는데 사용하기 위한 이러한 화합물을 제공한다.

[0041] 특정 실시양태에서, 본 발명은 상기 방법들 중 어느 하나에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어 인간 SMN2를 코딩하는 핵산의 인트론 7에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물의 용도를 제공한다. 특정 실시양태에서, 약제는 생존 운동 뉴런 1 (SMN1)과 관련된 질환 또는 상태를 치료하기 위한 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0042] 전술한 포괄적인 기술 및 하기 상세한 설명 모두는 단지 예시적이고 설명적인 것으로, 청구된 바와 같은 발명을 제한하는 것은 아니라고 이해된다. 본 명세서에서, 단수의 사용은 특별하게 달리 지시되지 않는 한 복수를 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "또는"의 사용은 달리 지시되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 나아가, "포함하는" 뿐만 아니라 "포함하다" 및 "포함되다"와 같은 다른 유형의 사용이 제한되는 것은 아니다. 또한, "요소" 또는 "구성요소"와 같은 용어는 달리 지시되지 않는 한, 하나의 단위를 포함하는 요소 및 구성성분과 하나 이상의 소단위를 포함하는 요소 및 구성성분 모두를 포함한다.

[0043] 본 명세서에 사용된 항목 표제는 단지 구조적 목적을 위한 것으로 기술된 대상으로 제한하는 것으로 해석되지 않는다. 특히, 특허 출원, 기사, 문고 및 논문을 비롯한 본 출원에 언급된 모든 문헌들, 또는 문헌의 일부분은 임의의 목적을 위해 온전히 그대로 참조로서 본 명세서에 명백히 포함된다.

### [0045] I. 정의

[0046] 특별한 정의가 제공되지 않는 한, 본 명세서에 기술된 분석화학, 합성유기화학, 및 의학 및 약화학과 관련하여 사용된 명명과, 그의 절차 및 기술은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며 통상적으로 사용된다. 표준 기술이 화학적 합성 및 화학적 분석에 사용될 수 있다. 이러한 특정 기술 및 절차는 예를 들면, 임의의 목적을 위해 참조로서 본 명세서에 포함되는, 문헌들 ("Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Edited by Sangvi and Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; "Remington's Pharmacological Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18th edition, 1990; and "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications" Edited by Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Florida; and Sambrook 등, "Molecular Cloning, A laboratory Manual", 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)에서 확인할 수 있다. 허용되는 경우에, 본 명세서 내 전체에 언급된 모든 특허, 출원, 공개된 출원 및 기타 간행물 및 기타 데이터는 온전히 그대로 참조로서 포함된다.

[0047] 달리 지시되지 않는 한, 하기 용어들은 하기 의미를 갖는다:

[0048] "뉴클레오시드"는 헤테로사이클릭 염기 모이어티 및 당 모이어티를 포함하는 화합물을 의미한다. 뉴클레오시드에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 자연 발생적인 뉴클레오시드, 변형된 뉴클레오시드, 및 모방 염기 및/또는 당 기를 갖는 뉴클레오시드가 포함된다. 뉴클레오시드는 임의의 다양한 치환기로 변형될 수 있다.

[0049] "당 모이어티"는 천연 또는 변형된 당 또는 당 대응물을 의미한다.

- [0050] "천연 당"은 DNA (2'-H) 또는 RNA (2'-OH)의 리보퓨라노스 모이어티를 의미한다.
- [0051] "변형된 당"은 천연 당의 치환기와 다른 적어도 하나의 치환기를 포함하는 리보퓨라노스 모이어티를 의미한다.
- [0052] "당 대용물"은 뉴클레오시드의 당을 치환할 수 있는 리보퓨라노스와 다른 구조를 의미한다. 당 대용물의 예시에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 개환 고리 시스템, 6-원 고리, 산소가 황 또는 질소로 대체된 당이 포함된다. 예를 들면, 당 대용물에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 몰포리노스 및 4'-티오-함유 당이 포함된다.
- [0053] "뉴클레오염기"는 뉴클레오시드의 헤테로사이클릭 염기 부분을 의미한다. 뉴클레오염기는 자연 발생적이거나 변경된 것일 수 있다. 특정 실시양태에서, 뉴클레오염기는 임의의 원자 또는 다른 핵산의 뉴클레오염기에 수소 결합할 수 있는 원자의 기를 포함할 수 있다.
- [0054] "뉴클레오티드"는 인산염 연결 기를 포함하는 뉴클레오시드를 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 뉴클레오티드에는 뉴클레오티드가 포함된다.
- [0055] "변형된 뉴클레오시드"는 자연 발생적인 RNA 또는 DNA 뉴클레오시드와 비교하여 적어도 하나의 변경을 포함하는 뉴클레오시드를 의미한다. 이러한 변형은 당 모이어티 및/또는 뉴클레오염기에서 이루어질 수 있다.
- [0056] "바이사이클릭 뉴클레오시드" 또는 "BNA"는 뉴클레오시드의 당 모이어티가 당 고리의 2개 탄소 원자를 연결하는 가교를 포함하여, 바이사이클릭 당 모이어티를 형성하는 것을 의미한다.
- [0057] "4'-2' 바이사이클릭 뉴클레오시드"는 당 고리의 2' 탄소 원자 및 4' 탄소 원자를 연결하는 퓨라노스 고리의 2개 탄소 원자를 연결하는 가교를 포함하는 퓨라노스 고리를 포함하는 바이사이클릭 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0058] "2' -변형된" 또는 "2-치환된"은 H 또는 OH와 다른 치환기를 포함하는 2' -위치에 당을 포함하는 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0059] "2' -OMe" 또는 "2' -OCH<sub>3</sub>" 또는 "2' -O-메틸"은 각각 당 고리의 2' 위치에 -OCH<sub>3</sub> 기를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0060] "MOE" 또는 "2-MOE" 또는 "2' -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>" 또는 "2' -O-메톡시에틸" 각각은 당 고리의 2' 위치에 -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> 기를 포함하는 당을 포함하는 뉴클레오시드를 의미한다.
- [0061] "올리고뉴클레오티드"는 복수 개의 연결된 뉴클레오시드를 포함하는 화합물을 의미한다. 특정 실시양태에서, 복수 개의 뉴클레오시드의 하나 이상이 변형된다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 리보뉴클레오시드 (RNA) 및/또는 데옥시리보뉴클레오시드 (DNA)를 포함한다.
- [0062] "올리고뉴클레오시드"는 뉴클레오시드간 결합의 어느 것도 인 원자를 포함하지 않는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드에는 올리고뉴클레오시드가 포함된다.
- [0063] "변형된 올리고뉴클레오티드"는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드 및/또는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드간 결합을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [0064] "뉴클레오시드간 결합"은 올리고뉴클레오티드의 인접한 뉴클레오시드들 사이의 공유 결합을 의미한다.
- [0065] "자연 발생적인 뉴클레오시드간 결합"은 3' 내지 5' 포스포다이에스테르 결합을 의미한다.
- [0066] "변형된 뉴클레오시드간 결합"은 자연 발생적인 뉴클레오시드간 결합과는 다른 임의의 뉴클레오시드간 결합을 의미한다.
- [0067] "올리고머 화합물"은 올리고뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 의미한다. 특정 실시양태에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오티드로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 올리고머 화합물은 추가로 하나 이상의 공액기 및/또는 말단기를 포함한다.
- [0068] "안티센스 화합물"은 적어도 그의 일부분이 그것이 혼성화하는 표적 핵산에 적어도 부분적으로 상보적인 올리고머 화합물을 의미하고, 이러한 혼성화는 적어도 하나의 안티센스 활성을 나타낸다.
- [0069] "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 올리고머 화합물이 올리고뉴클레오티드로 이루어진 안티센스 화합물을 의미한다.

- [0070] "안티센스 활성"은 그의 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 혼성화에 기인한 임의의 검출가능 및/또는 측정가능한 효과를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 이러한 안티센스 활성은 핵산 또는 단백질의 양적 증가 또는 감소이다. 특정 실시양태에서, 이러한 안티센스 활성은 핵산 또는 단백질의 스플라이스 변형체의 비율에 있어서의 변화이다. 특정 실시양태에서, 이러한 안티센스 활성은 세포 및/또는 대상에게서 표현형적 변화이다.
- [0071] 안티센스 활성의 "검출" 또는 "측정"은 직접적 또는 간접적일 수 있다. 예를 들면, 특정 실시양태에서, 안티센스 활성은 표적 핵산 또는 단백질의 양 또는 표적 핵산 또는 단백질의 스플라이스 변형체의 상대적 양을 검출 및/또는 측정함으로써 평가된다. 특정 실시양태에서, 안티센스 활성은 세포 또는 동물에서 표현형적 변화를 관찰함으로써 검출된다. 임의의 활성, 또는 효과와 관련하여, 용어 "검출" 및 "측정"은 검출 또는 측정용 검사가 수행되는 것을 의미한다. 이러한 검출 및/또는 측정은 제로 (0) 값을 포함할 수 있다. 따라서, 비록 검출 또는 측정용 검사가 어떠한 활성도 발견하지 못한다고 하더라도 (활성 제로), 그럼에도 활성을 검출 또는 측정하는 단계는 수행되어 졌다.
- [0072] "표적 핵산"은 그의 발현, 양 또는 활성이 안티센스 화합물에 의해 조정될 수 있는 임의의 핵산 분자를 지칭한다.
- [0073] "표적 mRNA"는 단백질을 코딩하는 자유-선택된 RNA 분자를 의미한다.
- [0074] "표적 프리-mRNA"는 mRNA로 완전히 프로세스되지 않은 자유-선택된 RNA 전사체를 의미한다. 특히, 프리-mRNA는 하나 이상의 인트론을 포함한다.
- [0075] "표적 단백질"은 표적 핵산에 의해 코딩되는 단백질을 의미한다.
- [0076] "조정"은 기능 또는 활성의 교란을 의미한다. 특정 실시양태에서, 조정은 유전자 발현의 증가를 의미한다. 특정 실시양태에서, 조정은 유전자 발현의 감소를 의미한다.
- [0077] "발현"은 그에 의해 유전자의 코딩된 정보가 세포 내에 존재하고 작동하는 구조 내로 전환되는 임의의 기능 및 단계를 의미한다.
- [0078] "뉴클레옴기 서열"은 임의의 당, 결합, 및/또는 뉴클레옴기 변경과는 무관하게, 5' 내지 3' 방향으로 인접한 뉴클레옴기의 순서를 의미한다.
- [0079] "인접한 뉴클레옴기"는 각각의 핵산 내에서 서로에게 바로 인접한 뉴클레옴기를 의미한다.
- [0080] "뉴클레옴기 상보성"은 수소 결합을 통해 비-공유적으로 한 쌍이 되는 2개의 뉴클레옴기의 능력을 의미한다.
- [0081] "상보적인"은 제1 핵산이 엄격한 혼성화 조건 하에서 제2 핵산에 혼성화할 수 있는 것을 의미한다. 예를 들면, 만약 안티센스 화합물이 엄격한 혼성화 조건 하에서 표적 핵산에 혼성화할 수 있다면 이 안티센스 화합물은 그의 표적 핵산에 상보적이다.
- [0082] "완전히 상보적인"은 제1 핵산의 각각의 뉴클레옴기가 제2 핵산 내 각각의 대응하는 인접한 위치에서 뉴클레옴기와 쌍을 이룰 수 있는 것을 의미한다.
- [0083] 안티센스 화합물의 "상보성 비율"은 표적 핵산의 동일-길이 위치에서 상보적인 안티센스 화합물의 뉴클레옴기의 비율을 의미한다. 상보성 비율은 표적 핵산 내 대응하는 인접한 위치에서 뉴클레옴기에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드의 뉴클레옴기 개수를 안티센스 화합물의 총 길이로 나누어 계산한다.
- [0084] "동일성 비율"은 제1 핵산 내 뉴클레옴기의 총 개수로 나눈, 제2 핵산 내 대응하는 위치에서 뉴클레옴기와 동일한 제1 핵산 내 뉴클레옴기 개수를 의미한다.
- [0085] "혼성화"는 뉴클레옴기 상동성을 통해 일어나는 상보적인 핵산들의 어닐링을 의미한다.
- [0086] "부정합"은 제2 핵산의 대응하는 위치에서 뉴클레옴기와 쌍을 이룰 수 없는 제1 핵산의 뉴클레옴기를 의미한다.
- [0087] "동일한 뉴클레옴기 서열"은 뉴클레옴기에 대한 임의의 화학적 변형과 무관하게, 동일한 뉴클레옴기 서열을 갖는 것을 의미한다.
- [0088] "다른 변형" 또는 "다르게 변형된"은 변경의 부재를 비롯한, 서로 다른 뉴클레옴기 변형 또는 뉴클레옴기간 결합을 지칭한다. 따라서, 예를 들면, DNA 뉴클레옴기가 비변형임에도 불구하고, MOE 뉴클레옴기 및 비변

형된 DNA 뉴클레오타이드는 다르게 변형된다. 유사하게, 이들 모두가 자연-발생적인 비변형 뉴클레오타이드임에도 불구하고, DNA 및 RNA는 다르게 변형된다. 동일하지만 다른 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드는 달리 지시되지 않는 한, 다르게 변형되지 않는다. 예를 들면, 2'-OMe 변형된 당 및 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 및 2'-OMe 변형된 당 및 티민 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드는 다르게 변형된다.

- [0089] "동일한 변형"은 서로 동일한 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드간 결합 (비변형된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드간 결합 포함)을 의미한다. 따라서, 예를 들면, 2개의 비변형된 DNA 뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드가 비변형임에도 불구하고 동일한 변형을 갖는다.
- [0090] "변형의 유형" 또는 "유형"의 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 변형을 의미하고 변형 및 비변형 뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, 달리 지시되지 않는 한, "제1 유형의 변형을 갖는 뉴클레오타이드"는 임의의 비변형된 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0091] 올리고뉴클레오타이드의 "분리된 영역"은 그 영역 내 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드간 결합 모두가 동일한 변형을 포함하고; 임의의 이웃하는 부분의 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드간 결합이 적어도 하나의 다른 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 부분을 의미한다.
- [0092] "모티프"는 올리고뉴클레오타이드 내 변형 및/또는 비변형된 뉴클레오타이드, 당, 및/또는 뉴클레오타이드간 결합의 양상을 의미한다.
- [0093] "완전히 변형된 올리고뉴클레오타이드"는 각각의 뉴클레오타이드, 각각의 당, 및/또는 각각의 뉴클레오타이드간 결합이 변형된 것을 의미한다.
- [0094] "균일하게 변형된 올리고뉴클레오타이드"는 각각의 뉴클레오타이드, 각각의 당, 및/또는 각각의 뉴클레오타이드간 결합이 변형된 올리고뉴클레오타이드 전체에서 동일한 변형을 갖는 것을 의미한다.
- [0095] "교대 모티프"는 (AB)<sub>n</sub>A<sub>m</sub> 양상으로 변형된 뉴클레오타이드의 적어도 4개의 분리된 영역을 갖는 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 부분을 의미하는데, 상기에서 A는 제1 유형의 변형을 갖는 뉴클레오타이드의 영역을 나타내고; B는 다른 유형의 변형을 갖는 뉴클레오타이드의 영역을 나타내며; n은 2-15이고; m은 0 또는 1이다. 따라서, 특정 실시양태에서, 교대 모티프는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 이상의 교대 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 각각의 A 영역 및 각각의 B 영역은 독립적으로 1 내지 4개의 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0096] "대상"은 치료 또는 요법을 위해 선발된 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다.
- [0097] "이를 필요로 하는 대상"은 요법 또는 치료가 필요한 것으로 확인된 대상을 의미한다. 이러한 실시양태에서, 대상은 SMA를 갖거나 SMA가 발병한 하나 이상의 징후를 갖는다.
- [0098] "투여하는"은 대상에게 약학적 제제 또는 조성물을 공급하는 것을 의미하고, 이로 제한되는 것은 아니지만, 의학 전문가에 의한 투여 및 자가-투여를 포함한다.
- [0099] "비경구 투여"는 주사 또는 주입을 통한 투여를 의미한다.
- [0100] 비경구 투여에는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 피하 투여, 정맥내 투여, 또는 근육내 투여가 포함된다.
- [0101] "전신 투여"는 활성의 의도된 좌위 이외의 다른 부위로의 투여를 의미한다. 전신 투여의 예시는 피하 투여 및 정맥내 투여, 및 복강내 투여이다.
- [0102] "피하 투여"는 피부 바로 아래로의 투여를 의미한다.
- [0103] "정맥내 투여"는 정맥 내로의 투여를 의미한다.
- [0104] "뇌척수액" 또는 "CSF"는 뇌 및 척수 주변의 공간을 채우고 있는 체액을 의미한다.
- [0105] "뇌척수액 내로의 투여"는 CSF 내로 직접 물질을 전달하는 임의의 투여를 의미한다.
- [0106] "뇌혈관내" 또는 "ICV"는 뇌의 심실계 내로의 투여를 의미한다.
- [0107] "수막공간내" 또는 "IT"는 뇌와 척수를 뒤덮고 있는 거미막 아래의 CSF 내로의 투여를 의미한다. 약학적 제제가 척수 주변의 집 (sheath) 내로 주사되는 경우에, IT 주사는 척수의 막 (theca)을 통해 거미막밑공간 내로 수행된다.

- [0108] "유도기"는 그동안에 투여가 개시되고 활성 약학적 제제의 항정상태 농도가 표적 조직 내에서 달성되는 투약기이다. 예를 들면, 유도기는 그동안에 안티센스 올리고뉴클레오티드의 항정상태 농도가 간에서 달성되는 투약기이다.
- [0109] "유지기"는 약물의 표적 조직 항정상태 농도가 달성된 이후의 투약기를 의미한다.
- [0110] "지속시간"은 활성 또는 결과가 지속되는 동안의 기간을 의미한다. 예를 들면, 유도기의 지속시간은 그동안에 유도 용량이 투여되는 기간을 의미한다.
- [0111] "유지 용량"은 유지기 동안에 단일 투여로 투여되는 용량을 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "유도 용량"은 유도기 동안에 단일 용량으로 투여되는 용량을 의미한다.
- [0112] "동시-투여"는 대상에게 2 이상의 약학적 제제의 투여를 의미한다. 2 이상의 약학적 제제는 단일 약학적 조성물, 또는 별개의 약학적 조성물일 수 있다. 2 이상의 약학적 제제 각각은 동일하거나 다른 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 동시-투여에는 동시 또는 연속 투여가 포함된다.
- [0113] "요법"은 질환 치료 방법을 의미한다. 특정 실시양태에서, 요법에는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 수술 요법, 화학 요법, 및 물리적 중재, 예컨대 보조호흡, 튜브영양, 및 체력을 증강시키기 위한 물리요법이 포함된다.
- [0114] "치료"는 질환의 치료 또는 개선을 위해 사용되는 하나 이상의 특정 절차의 적용을 의미한다. 특정 실시양태에서, 특정 절차는 하나 이상의 약학적 제제의 투여이다.
- [0115] "개선"은 상태 또는 질환의 적어도 하나의 징후의 중증도가 감소하는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, 개선은 상태 또는 질환의 적어도 하나의 징후의 진행에 있어서 지연 또는 둔화를 포함한다. 징후의 중증도는 당해 기술분야의 숙련자에게 알려진 주관적 또는 객관적 기준에 의해 결정될 수 있다.
- [0116] "발병의 예방"은 질환 또는 상태가 발병할 위험에 있는 대상에게서 상태 또는 질환의 발병을 예방하는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 상태가 발병할 위험에 있는 대상은 질환 또는 상태가 이미 발병한 대상에게 제공된 치료와 유사한 치료를 받는다.
- [0117] "발병의 지연"은 질환 또는 상태가 발병할 위험에 있는 대상에게서 상태 또는 질환의 발병을 지연시키는 것을 의미한다.
- [0118] "진행의 둔화"는 질환 또는 상태와 관련된 적어도 하나의 증상의 중증도가 덜 빠르게 악화되는 것을 의미한다.
- [0119] "엑손 7 아미노산"은 SMN RNA의 엑손 7에 대응하는 SMN 단백질의 일부분을 의미한다. 엑손 7 아미노산은 엑손 7이 스플라이싱 동안에 배제되지 않는 경우에 SMN RNA로부터 발현되는 SMN 단백질 내에 존재한다.
- [0120] "SMN 단백질"은 정상의 전장 생존 운동 뉴런 단백질을 의미한다. 엑손 7이 성숙 mRNA 내에 존재하고 엑손 7 아미노산이 SMN 단백질 내에 존재한다면, SMN은 SMN1 유전자 또는 SMN2 유전자로부터 발현될 수 있다.
- [0121] "용량"은 단일 투여로 제공된 약학적 제제의 특정 양 또는 시간의 경과에 따른 특정된 양을 의미한다. 특정 실시양태에서, 용량은 2 이상의 볼루스, 정제 또는 주사로 투여될 수 있다. 예를 들면, 특정 실시양태에서, 피하 또는 수막공간내 또는 ICV 투여가 바람직한 경우, 요구되는 용량은 단일 주사에 의해 용이하게 수용되지 않는 부피를 요구한다. 이러한 실시양태에서, 2회 이상의 주사가 요구되는 용량을 달성하기 위해 사용될 수 있다. 연속 주입의 설정 시, 용량은 시간의 단위당 전달되는 약학적 제제의 양으로 표현될 수 있다.
- [0122] "투약 단위"는 약학적 제제가 제공되는 형태를 의미한다. 특정 실시양태에서, 투약 단위는 동결건조된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 바이알이다. 특정 실시양태에서, 투약 단위는 재구성된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 바이알이다.
- [0123] "치료학적 유효량"은 동물에게 치료학적 이익을 제공하는 약학적 제제의 양을 의미한다.
- [0124] "약학적 조성물"은 약학적 제제를 포함하는 개인에게 투여하기에 적합한 물질의 혼합물을 의미한다. 예를 들면, 약학적 조성물은 변형된 올리고뉴클레오티드 및 멸균 수성 용액을 포함할 수 있다.
- [0125] "허용가능한 안정성 프로파일"은 임상적으로 허용가능한 한계 내에 속하는 부작용의 양상을 의미한다.



[0126] "부작용"은 요구되는 효과 이외의 다른 치료에 기인한 생리학적 반응을 의미한다.

[0128] 1. 특정 변형된 올리고뉴클레오타이드

[0129] 특정 실시양태에서, 본 발명은 DNA 또는 RNA와 같은 자연 발생적인 올리고머의 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 하나 이상의 변형을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 방법 및 조성물을 제공한다. 이러한 변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 바람직한 특성을 보유할 수 있다. 이러한 특정 변형은 예를 들면 그의 표적 핵산에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 친화력을 증가시키고, 하나 이상의 뉴클리아제에 대한 그의 내성을 증가시키고/시키거나 올리고뉴클레오타이드의 약물동력학 또는 조직 분포를 변경함으로써 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 활성을 변경한다. 특정 실시양태에서, 이러한 변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드 결합 및/또는 하나 이상의 공액기를 포함한다.

[0131] a. 특정 변형된 뉴클레오타이드

[0132] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 이러한 변형된 뉴클레오타이드는 변형된 당 및/또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 내 이러한 변형된 뉴클레오타이드의 도입은, 이로 제한되는 것은 아니지만, 뉴클리아제 분해에 대한 증가된 내성, 및/또는 개선된 독성 및/또는 변형된 올리고뉴클레오타이드의 유입 특성을 비롯한, 표적 핵산에 대한 증가된 친화력 및/또는 증가된 안정성을 초래한다.

[0134] i. 특정 뉴클레오타이드

[0135] 뉴클레오타이드의 자연 발생적인 염기 부분은 헤테로사이클릭 염기, 전형적으로 퓨린 및 피리미딘이다. 퓨린 뉴클레오타이드 아데닌 (A) 및 구아닌 (G)과, 피리미딘 뉴클레오타이드 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)과 같은 "비변형된" 또는 "천연" 뉴클레오타이드에 더하여, 당해 기술분야의 숙련자에게 공지된 많은 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 모방체가 본 명세서에 기술된 화합물 내로의 도입에 적용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 변형된 뉴클레오타이드는, 예를 들면 7-디아자퓨린, 5-메틸시토신, 또는 G-클램프 (G-clamp)와 같이, 구조적으로 모 뉴클레오타이드와 상당히 유사한 뉴클레오타이드이다. 특정 실시양태에서, 뉴클레오타이드 모방체에는, 예를 들면 트리사이클릭 폐쇄사진 뉴클레오타이드 모방체와 같은 더욱 복잡한 구조가 포함된다. 상기에 언급된 변형된 뉴클레오타이드의 제조를 위한 방법은 당해 기술분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다.

[0137] ii. 특정 변형된 당 및 당 대응물

[0138] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 천연 당에 비해 당 모이어티가 변형된 하나 이상의 뉴클레오타이드를 선택적으로 포함할 수 있다. 이러한 당 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 증가된 뉴클리아제 안정성, 증가된 결합 친화력 또는 일부 다른 유익한 생물학적 특성을 가질 수 있다. 이러한 변형에는, 제한 없이, 치환기의 첨가, 바이사이클릭 핵산 (BNA)을 형성하기 위한 비-이중 (non-geminal) 고리 원자의 가교, 리보실 고리 산소 원자의 S, N(R), 또는 C(R<sub>1</sub>)(R<sub>2</sub>) (R = H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬 또는 보호기) 및 예를 들면 2'-F-5'-메틸 치환된 뉴클레오타이드와 같은 이들의 조합의 대체 (다른 기술된 5',2'-비스 치환된 뉴클레오타이드에 대한 2008년 8월 21일자로 공개된 PCT 국제특허공개 제WO 2008/101157호 참조) 또는 2'-위치에서 추가의 치환을 갖는 리보실 고리 산소 원자의 S로의 대체 (2006년 6월 16일자로 공개된, 미국특허공개 제2005-0130923호 참조) 또는 대안적으로 BNA의 5'-치환 (예를 들면 5'-메틸 또는 5'-비닐기로 치환된 LNA가 기술된, 2007년 11월 22일자로 공개된 PCT 국제특허공개 제WO 2007/134181호 참조)이 포함된다.

[0139] 변형된 당 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드의 예시에는, 제한 없이, 5'-비닐, 5'-메틸 (R 또는 S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH<sub>3</sub> 및 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> 치환기를 포함하는 뉴클레오타이드가 포함된다. 2'-위치에서 치환기는 또한 알릴, 아미노, 아지도, 티오, 0-알릴, 0-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬, OCF<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), 및 O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) (여기서, 각각의 R<sub>m</sub> 및 R<sub>n</sub>은 독립적으로 H 또는 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬임)로부터 선택될 수 있다.

- [0140] 바이사이클릭 핵산 (BNAs)의 예시에는, 제한 없이, 4' 및 2' 리보실 고리 원자 사이에 가교를 포함하는 뉴클레오시드가 포함된다. 특정 실시양태에서, 본 명세서에 제공된 안티센스 화합물에는 가교가 하기 식 중의 하나를 포함하는 하나 이상의 BNA 뉴클레오시드가 포함된다: 4' - $\beta$ -D-(CH<sub>2</sub>)-O-2' ( $\beta$ -D-LNA); 4' -(CH<sub>2</sub>)-S-2' ; 4' - $\alpha$ -L-(CH<sub>2</sub>)-O-2' ( $\alpha$ -L-LNA); 4' -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4' -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (PCT/US2008/068922 참조); 4' -CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' 및 4' -C-H(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' (미국특허 제7,399,845호, 2008년 7월 15일자로 허여됨); 4' -CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2 (PCT/US2008/ 064591 참조); 4' -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (미국특허공개 제2004-0171570호, 2004년 9월 2일자로 공개됨); 4' -CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2' (미국특허 제7,427,672호, 2008년 9월 23일자로 허여됨); 4' -CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)-2' 및 4' -CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' (PCT/US2008/066154 참조); 상기에서 R은 독립적으로 H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, 또는 보호기임.
- [0141] 특정 실시양태에서, 본 발명은 바이사이클릭 당 모이어티가 아닌 변형된 당 모이어티를 포함하는 변형된 뉴클레오시드를 제공한다. 이러한 특정 변형된 뉴클레오시드는 공지되어 있다. 특정 실시양태에서, 뉴클레오시드의 당 고리는 임의의 위치에서 변형될 수 있다. 본 발명에 유용한 당 변형의 예시에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 하기로 구성된 군으로부터 선택된 당 치환기를 포함하는 화합물이 포함된다: OH, F, O-알킬, S-알킬, N-알킬, 또는 O-알킬-O-알킬 (여기서, 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 알킬 또는 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>10</sub> 알케닐 및 알키닐일 수 있음. 이러한 특정 실시양태에서, 이러한 치환기는 당의 2' 위치에 존재한다.
- [0142] 특정 실시양태에서, 변형된 뉴클레오시드는 당의 2' 위치에서 치환기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 치환기는: 할로젠화물 (이로 제한되는 것은 아니지만, F를 포함함), 알릴, 아미노, 아지도, 티오, O-알릴, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬, -OCF<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), 또는 O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) (여기서, 각각의 R<sub>m</sub> 및 R<sub>n</sub>은 독립적으로 H 또는 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬임)로부터 선택된다.
- [0143] 특정 실시양태에서, 본 발명에 사용하기에 적합한 변형된 뉴클레오시드는: 2'-메톡시에톡시, 2'-O-메틸 (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-플루오로 (2'-F)이다.
- [0144] 특정 실시양태에서, 2' 위치에서 치환기를 갖는 변형된 뉴클레오시드는: O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>C(=O)N(H)CH<sub>3</sub> 및 O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (여기서, n 및 m은 1 내지 약 10임)로부터 선택된다. 다른 2'-당 치환기에는: C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub> 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 알키닐, 알카릴, 아르알킬, O-알카릴 또는 O-아르알킬, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알카릴, 아미노알킬아미노, 폴리-알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단기, 리포터기, 인터칼레이터, 올리고머 화합물의 약물동력학적 특성을 개선하기 위한 기 또는 약력학적 특성을 개선하기 위한 기 및 유사한 특성을 갖는 다른 치환기가 포함된다.
- [0145] 특정 실시양태에서, 변형된 뉴클레오시드는 2'-MOE 측쇄를 포함한다 (Baker 등, J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). 2'-O-메틸, O-프로필, 및 O-아미노프로필과 같은 이러한 2'-MOE 치환은 비변형된 뉴클레오시드 및 다른 변형된 뉴클레오시드에 비해 개선된 결합 친화력을 갖는 것으로 기술된다. 2'-MOE 치환기를 갖는 올리고뉴클레오티드는 또한 *in vivo* 사용을 위한 유망한 특징을 갖는 유전자 발현의 안티센스 억제제인 것으로 나타내어질 수 있다 (Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann 등, Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann 등, Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; and Altmann 등, Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926).
- [0146] 특정 실시양태에서, 2'-당 치환기는 아라비노 (위) 위치 또는 리보 (아래) 위치이다. 이러한 특정 실시양태에서, 2'-아라비노 변형은 2'-F 아라비노 (FANA)이다. 유사한 변형이 또한 당 위의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오시드 위에서 또는 2'-5' 결합된 올리고뉴클레오티드 내에서 당의 3' 위치 또는 5' 말단 뉴클레오티드의 5' 위치에서 이루어질 수 있다.
- [0147] 특정 실시양태에서, 본 발명에 사용하기에 적합한 뉴클레오시드는 리보퓨라노실 당 대신에 사이클로부틸과 같은 당 대용물을 포함한다. 이러한 변형된 당 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국특허에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 제4,981,957호; 제5,118,800호; 제5,319,080호; 제5,359,044호; 제5,393,878호; 제5,446,137호; 제5,466,786호; 제5,514,785호; 제5,519,134호; 제5,567,811호; 제5,576,427호; 제5,591,722호; 제5,597,909호; 제5,610,300호; 제5,627,053호; 제5,639,873호; 제5,646,265호; 제5,658,873호;

제5,670,633호; 제5,792,747호; 및 제5,700,920호가 포함되며, 이들 각각은 온전히 그대로 참조로서 본 명세서에 포함된다.

[0148] 특정 실시양태에서, 본 발명은 당의 2'-위치에서 변형을 포함하는 뉴클레오시드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 당의 5'-위치에서 변형을 포함하는 뉴클레오시드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 당의 2'-위치 및 5'-위치에서 변형을 포함하는 뉴클레오시드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 변형된 뉴클레오시드는 올리고뉴클레오티드 내로의 도입에 유용할 수 있다. 특정 실시양태에서, 변형된 뉴클레오시드는 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에서 올리고뉴클레오시드 내로 도입된다.

[0150] b. 특정 뉴클레오시드간 결합

[0151] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드간 결합을 선택적으로 포함할 수 있다. 결합 기의 2개 주요 종류는 인 원자의 존재 또는 부재에 의해 정의된다. 대표적인 인 함유 결합 기에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 포스포다이에스테르 (P=O), 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 포스포라미데이트, 및 포스포로티오에이트 (P=S)가 포함된다. 대표적인 비-인 함유 결합 기에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 메틸렌메틸이미노 (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-), 티오다이에스테르 (-O-C(O)-S-), 티오노카바메이트 (-O-C(O)(NH)-S-); 실록산 (-O-Si(H)<sub>2</sub>-O-); 및 N,N'-다이메틸히드라진 (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-)이 포함된다. 비-인 결합 기를 갖는 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오시드로 언급된다. 천연 포스포다이에스테르 결합에 비해, 변형된 결합은 올리고뉴클레오티드의 뉴클리아제 내성을 변경, 전형적으로 증가시키는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 키랄 원자를 갖는 결합은 라세믹 혼합물로서, 별개의 에난티오머로서 제조될 수 있다. 대표적인 키랄 결합에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 알킬포스포네이트 및 포스포로티오에이트가 포함된다. 인-함유 및 비-인-함유 결합의 제조방법은 당해 기술분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다.

[0152] 본 명세서에 기술된 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 비대칭 중심을 포함하여 에난티오머, 부분입체 이성질체, 및 절대적 입체화학 측면에서, 당 아노머의 경우에는 (R) 또는 (S)로, 아미노산 등의 경우에는 (D) 또는 (L)로서 정의될 수 있는, 다른 입체이성질체 형상을 생성한다. 이러한 가능한 이성질체뿐만 아니라 이들의 라세미체 및 광학적으로 순수한 형태 모두 본 명세서에 제공된 안티센스 화합물 내에 포함된다.

[0153] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드간 결합을 포함한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 적어도 2개의 변형된 뉴클레오시드간 결합을 포함한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 적어도 3개의 변형된 뉴클레오시드간 결합을 포함한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 적어도 10개의 변형된 뉴클레오시드간 결합을 포함한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 각각의 뉴클레오시드간 결합은 변형된 뉴클레오시드간 결합이다. 특정 실시양태에서, 이러한 변형된 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이다.

[0155] c. 길이

[0156] 특정 실시양태에서, 본 발명은 다양한 범위의 임의의 길이의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 X-Y 결합된 뉴클레오시드를 포함하거나 이로 이루어진 안티센스 화합물 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공한다 (여기서, X < Y라면, X 및 Y는 각각 독립적으로 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50으로부터 선택됨). 예를 들면, 특정 실시양태에서, 본 발명은 하기를 포함하거나 이로 이루어진 안티센스 화합물 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공한다: 8-9, 8-10, 8-11, 8-12, 8-13, 8-14, 8-15, 8-16, 8-17, 8-18, 8-19, 8-20, 8-21, 8-22, 8-23, 8-24, 8-25, 8-26, 8-27, 8-28, 8-29, 8-30, 9-10, 9-11, 9-12, 9-13, 9-14, 9-15, 9-16, 9-17, 9-18, 9-19, 9-20, 9-21, 9-22, 9-23, 9-24, 9-25, 9-26, 9-27, 9-28, 9-29, 9-30, 10-11, 10-12, 10-13, 10-14, 10-15, 10-16, 10-17, 10-18, 10-19, 10-20, 10-21, 10-22, 10-23, 10-24, 10-25, 10-26, 10-27, 10-28, 10-29, 10-30, 11-12, 11-13, 11-14, 11-15, 11-16, 11-17, 11-18, 11-19, 11-20, 11-21, 11-22, 11-23, 11-24, 11-25, 11-26, 11-27, 11-28, 11-29, 11-30, 12-13, 12-14, 12-15, 12-16, 12-17, 12-18, 12-19, 12-20, 12-21, 12-22, 12-23, 12-24, 12-25, 12-26, 12-27, 12-28, 12-29, 12-30, 13-14, 13-15, 13-16, 13-17, 13-18, 13-19, 13-20, 13-21, 13-22, 13-23, 13-24, 13-25, 13-26, 13-27, 13-28, 13-29, 13-30, 14-15, 14-16, 14-17, 14-18, 14-19, 14-20, 14-21,

14-22, 14-23, 14-24, 14-25, 14-26, 14-27, 14-28, 14-29, 14-30, 15-16, 15-17, 15-18, 15-19, 15-20, 15-21, 15-22, 15-23, 15-24, 15-25, 15-26, 15-27, 15-28, 15-29, 15-30, 16-17, 16-18, 16-19, 16-20, 16-21, 16-22, 16-23, 16-24, 16-25, 16-26, 16-27, 16-28, 16-29, 16-30, 17-18, 17-19, 17-20, 17-21, 17-22, 17-23, 17-24, 17-25, 17-26, 17-27, 17-28, 17-29, 17-30, 18-19, 18-20, 18-21, 18-22, 18-23, 18-24, 18-25, 18-26, 18-27, 18-28, 18-29, 18-30, 19-20, 19-21, 19-22, 19-23, 19-24, 19-25, 19-26, 19-29, 19-28, 19-29, 19-30, 20-21, 20-22, 20-23, 20-24, 20-25, 20-26, 20-27, 20-28, 20-29, 20-30, 21-22, 21-23, 21-24, 21-25, 21-26, 21-27, 21-28, 21-29, 21-30, 22-23, 22-24, 22-25, 22-26, 22-27, 22-28, 22-29, 22-30, 23-24, 23-25, 23-26, 23-27, 23-28, 23-29, 23-30, 24-25, 24-26, 24-27, 24-28, 24-29, 24-30, 25-26, 25-27, 25-28, 25-29, 25-30, 26-27, 26-28, 26-29, 26-30, 27-28, 27-29, 27-30, 28-29, 28-30, 또는 29-30개의 결합된 뉴클레오타이드.

[0157] 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 화합물 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 15개 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 화합물 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 16개 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 화합물 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 17개 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 화합물 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 18개 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 화합물 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 19개 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 화합물 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 20개 뉴클레오타이드 길이이다.

[0159] d. 특정 올리고뉴클레오타이드 모티프

[0160] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 그의 길이를 따라 특정 방향으로 배열된 화학적으로 변형된 소단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 완전히 변형된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 균일하게 변형된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 균일하게 변형되고 각각의 뉴클레오타이드는 2'-MOE 당 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 균일하게 변형되고 각각의 뉴클레오타이드는 2'-OMe 당 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 균일하게 변형되고 각각의 뉴클레오타이드는 모르폴리노 당 모이어티를 포함한다.

[0161] 특정 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 교대 모티프를 포함한다. 이러한 특정 실시양태에서, 교대 변형 유형은 2'-MOE, 2'-F, 바이사이클릭 당-변형된 뉴클레오타이드, 및 DNA (비변형된 2'-데옥시) 중에서 선택된다. 이러한 특정 실시양태에서, 각각의 교대 영역은 단일 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0162] 특정 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 제1 유형의 뉴클레오타이드의 하나 이상의 블록 및 제2 유형의 뉴클레오타이드의 하나 이상의 블록을 포함한다.

[0163] 특정 실시양태에서, 교대 모티프 내 하나 이상의 교대 영역은 단일 뉴클레오타이드의 유형 이상을 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 올리고머 화합물은 하기 뉴클레오타이드 모티프의 임의의 하나 이상의 영역을 포함할 수 있다:

[0164] Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>;

[0165] Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub>;

[0166] Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub>;

[0167] Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub>;

[0168] Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>;

[0169] Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub>;

[0170] Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>;

[0171] Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>;

- [0172] Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub>Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>; 또는
- [0173] Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub>Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>2</sub> Nu<sub>1</sub> Nu<sub>1</sub>;
- [0174] 상기에서, Nu<sub>1</sub>은 제1 유형의 뉴클레오시드이고 Nu<sub>2</sub>는 제2 유형의 뉴클레오시드이다. 특정 실시양태에서, Nu<sub>1</sub> 및 Nu<sub>2</sub>의 하나는 2'-MOE 뉴클레오시드이고 Nu<sub>1</sub> 및 Nu<sub>2</sub>의 다른 하나는: 2'-OMe 변형된 뉴클레오시드, BNA, 및 비변형된 DNA 또는 RNA 뉴클레오시드로부터 선택된다.
- [0176] 2. 올리고머 화합물
- [0177] 특정 실시양태에서, 본 발명은 올리고머 화합물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오티드로만 구성된다. 특정 실시양태에서, 올리고머 화합물은 올리고뉴클레오티드 및 하나 이상의 공액기 및/또는 말단기를 포함한다. 이러한 공액기 및/또는 말단기는 상기에서 논의된 임의의 화학적 모티프를 포함하는 올리고뉴클레오티드에 추가될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 교대 뉴클레오시드의 영역을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 올리고머 화합물은 말단기를 포함할 수 있다.
- [0179] a. 특정 공액기
- [0180] 특정 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 공액기의 부착에 의해 변형된다. 일반적으로, 공액기는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 약력학, 약물동력학, 안정성, 결합, 흡수, 세포 분포, 세포 유입, 하전 및 소거를 비롯한, 부착된 올리고머 화합물의 하나 이상의 특성을 변경한다. 공액기는 화학 분야에서 통상적으로 사용되고 모 화합물, 예컨대 올리고뉴클레오티드와 같은 올리고머 화합물에 직접적으로 또는 선택적 공액 결합 모이어티 또는 공액 결합기를 통해 결합된다. 공액기에는, 제한 없이, 인터칼레이터, 리포터 분자, 폴리아민, 폴리아마이드, 폴리에틸렌 글리콜, 티오에테르, 폴리에테르, 콜레스테롤, 티오펜콜레스테롤, 콜산 모이어티, 염산, 지질, 인지질, 바이오틴, 페나진, 페난쓰리딘, 안쓰라퀴논, 아다만탄, 아크리딘, 플루오르세인, 로다민, 쿠마린 및 염료가 포함된다. 특정 공액기는, 예를 들면: 콜레스테롤 모이어티 (Letsinger 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), 콜산 (Manoharan 등, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), 티오에테르, 예를 들어, 헥실-S-트리틸티올 (Manoharan 등, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan 등, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), 티오펜콜레스테롤 (Oberhauser 등, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), 지방족 사슬, 예를 들어, 도-데칸-디올 또는 운데실 잔기 (Saison-Behmoaras 등, EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov 등, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk 등, Biochimie, 1993, 75, 49-54), 인지질, 예를 들어, 다이-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸-암모늄 1,2-다이-O-헥사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트 (Manoharan 등, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea 등, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 쇄 (Manoharan 등, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), 또는 아다만탄 아세트산 (Manoharan 등, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), 팔미틸 모이어티 (Mishra 등, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 (Crooke 등, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937)가 이전에 기술되어 있다.
- [0181] 특정 실시양태에서, 공액기에는 활성 약물 물질, 예를 들면, 아스피린, 와파린, 페닐부타존, 이부프로펜, 수프로펜, 펜-부펜, 케토프로펜, (S)-(+)-프라노프로펜, 카르프로펜, 단실사르코신, 2,3,5-트리아오도벤조산, 플루페남산, 폴린산, 벤조티아디아지드, 클로로티아지드, 다이아제핀, 인도-메티신, 바르비투레이트, 세팔로스포린, 황 약물, 항당뇨병제, 항균제 또는 항생제가 포함된다. 올리고뉴클레오티드-약물 접합체 및 이의 제조는 미국 특허출원 제09/334,130호에 기술되어 있다.
- [0182] 올리고뉴클레오티드 접합체의 제조를 교시하는 대표적인 미국특허에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 미국특허 제4,828,979호; 제4,948,882호; 제5,218,105호; 제5,525,465호; 제5,541,313호; 제5,545,730호; 제5,552,538호; 제5,578,717호; 제5,580,731호; 제5,580,731호; 제5,591,584호; 제5,109,124호; 제5,118,802호; 제5,138,045호; 제5,414,077호; 제5,486,603호; 제5,512,439호; 제5,578,718호; 제5,608,046호; 제4,587,044호; 제4,605,735호; 제4,667,025호; 제4,762,779호; 제4,789,737호; 제4,824,94호1; 제4,835,263호; 제4,876,335호; 제4,904,582호; 제4,958,013호; 제5,082,830호; 제5,112,963호;



제5,214,136호; 제5,082,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,245,022호; 제5,254,469호;  
 제5,258,506호; 제5,262,536호; 제5,272,250호; 제5,292,873호; 제5,317,098호; 제5,371,241호,  
 제5,391,723호; 제5,416,203호, 제5,451,463호; 제5,510,475호; 제5,512,667호; 제5,514,785호;  
 제5,565,552호; 제5,567,810호; 제5,574,142호; 제5,585,481호; 제5,587,371호; 제5,595,726호;  
 제5,597,696호; 제5,599,923호; 제5,599,928호 및 제5,688,941호가 포함된다.

[0183] 공액기는 올리고뉴클레오티드의 양 말단 (말단 공액기) 중 어느 하나 또는 모두 및/또는 임의의 내부 위치에 부착될 수 있다.

[0185] b. 말단기

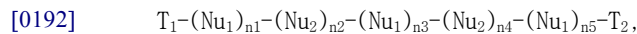
[0186] 특정 실시양태에서, 올리고머 화합물은 한쪽 또는 양 말단 모두에 말단기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 말단기는 상기에 기술된 임의의 공액기를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 말단기는 부가적인 뉴클레오시드 및/또는 역 어베이지 (inverted abasic) 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 말단기는 안정화기이다.

[0187] 특정 실시양태에서, 올리고머 화합물은, 예를 들면 뉴클리아제 안정성과 같은 특성을 증강시키는 하나 이상의 말단 안정화기를 포함한다. 안정화기 내에는 캡 구조가 포함된다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 " 캡 구조 " 또는 " 말단 캡 모이어티 " 는 올리고머 화합물의 한쪽 또는 양쪽 말단에 부착될 수 있는 화학적 변형을 지칭한다. 이러한 특정 말단 변형은 엑소뉴클리아제 분해로부터 말단 핵산 모이어티를 갖는 올리고머 화합물을 보호하고, 세포 내로의 전달 및/또는 국소화를 촉진할 수 있다. 캡은 5' -말단 (5' -캡) 또는 3' -말단 (3' -캡)에 존재할 수 있거나 양쪽 말단에 존재할 수 있다. (상세하게는, Wincott 등, 국제특허공개 제WO 97/26270호; Beaucage and Tyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925; 미국특허공개 제2005/0020525호; 및 제WO 03/004602호를 참조하십시오.)

[0188] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 부가적인 뉴클레오시드는 올리고머 화합물의 올리고뉴클레오티드의 한쪽 또는 양쪽 말단에 부가된다. 이러한 부가적인 말단 뉴클레오시드는 본 명세서에서 말단-기 뉴클레오시드로 언급된다. 이중-가닥 화합물에서, 이러한 말단-기 뉴클레오시드는 말단 (3' 및/또는 5') 돌출부 (overhangs)이다. 이중-가닥 안티센스 화합물의 설정에서, 이러한 말단-기 뉴클레오시드는 표적 핵산에 상보적이거나 상보적이지 않을 수 있다. 특정 실시양태에서, 말단기는 비-뉴클레오시드 말단기이다. 이러한 비-말단기는 뉴클레오시드 이외의 임의의 말단기일 수 있다.

[0190] c. 올리고머 화합물 모티프

[0191] 특정 실시양태에서, 본 발명의 올리고머 화합물은 하기 모티프를 포함한다:



[0193] 상기에서:

[0194]  $Nu_1$ 은 제1 유형의 뉴클레오시드이고;

[0195]  $Nu_2$ 는 제2 유형의 뉴클레오시드이고;

[0196]  $n1$  및  $n5$ 의 각각은 독립적으로 0 내지 3이고;

[0197]  $n2$  더하기  $n4$ 의 합은 10과 25 사이이고;

[0199]  $*n3$ 은 0 내지 5이고;

[0200]  $T_1$  및  $T_2$  각각은 독립적으로 H, 하이드록실 보호기, 선택적으로 결합된 공액기 또는 캐핑기임.

[0201] 이러한 특정 실시양태에서,  $n2$  및  $n4$ 의 합은 13 또는 14이고;  $n1$ 은 2이고;  $n3$ 은 2 또는 3이고;  $n5$ 는 2이다. 이러한 특정 실시양태에서, 본 발명의 올리고머 화합물은 하기 표 A로부터 선택된 모티프를 포함한다.

[0202] [표 A]

표 A				
n1	n2	n3	n4	n5
2	16	0	0	2
2	2	3	11	2
2	5	3	8	2
2	8	3	5	2
2	11	3	2	2
2	9	3	4	2
2	10	3	3	2
2	3	3	10	2
2	4	3	9	2
2	6	3	7	2
2	7	3	6	2
2	8	6	2	2
2	2	2	12	2
2	3	2	11	2
2	4	2	10	2
2	5	2	9	2
2	6	2	8	2
2	7	2	7	2
2	8	2	6	2
2	9	2	5	2
2	10	2	4	2
2	11	2	3	2
2	12	2	2	2

[0203]

[0204] 표 A은 예시를 의도하는 것으로, 본 발명을 제한하는 것이 아니다. 표 A에 묘사된 올리고머 화합물 각각은 20 개 뉴클레오타이드를 포함한다. 더 많거나 더 적은 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고머 화합물이 n1-n5의 하나 이상에 대해 상이한 개수의 뉴클레오타이드를 선택함으로써 용이하게 고안될 수 있다. 특정 실시양태에서, Nu<sub>1</sub> 및 Nu<sub>2</sub> 각각은: 2'-MOE, 2'-OMe, DNA, 및 바이사이클릭 뉴클레오타이드로부터 선택된다.

[0206] 3. 안티센스

[0207] 특정 실시양태에서, 본 발명의 올리고머 화합물은 안티센스 화합물이다. 따라서, 이러한 실시양태에서, 올리고머 화합물은 표적 핵산과 혼성화하여 안티센스 활성을 나타낸다.

[0209] a. 혼성화

[0210] 특정 실시양태에서, 본 발명은 특이적 결합이 요구되는 조건 하에서, 즉 *in vivo* 분석 또는 치료적 처치의 경우에 생리학적 조건 하에서, 그리고 분석이 *in vitro*로 수행되는 경우의 조건 하에서 비-표적 핵산 서열에 안티센스 화합물의 비-특이적 결합을 회피하기에 충분한 수준의 상보성을 가질 때 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 안티센스 화합물을 제공한다.

[0211] 따라서, "엄격한 혼성화 조건" 또는 "엄격한 조건"은 안티센스 화합물이 최소한의 개수의 다른 서열이 아닌 표적 서열에 혼성화하게 하는 조건을 의미한다. 엄격한 조건은 서열-의존적이고 다른 상황 하에서는 달라질 것이며, 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 표적 서열에 혼성화하게 하는 "엄격한 조건"은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 특징 및 조성과 이들이 조사되는 분석에 의해 결정된다.

[0212] 뉴클레오티드 친화력 변형의 도입은 비변형된 화합물에 비해 더 많은 수의 부정합을 허용할 수 있음이 당해 기술분야에서 이해된다. 유사하게, 특정 뉴클레오티드 서열은 다른 뉴클레오티드 서열보다 부정합에 더욱 내성일 수 있다. 당해 기술분야의 숙련자는 예컨대 용해 온도 ( $T_m$ )를 결정함으로써 올리고뉴클레오티드들 사이, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산 사이의 부정합의 적절한 개수를 결정할 수 있다.  $T_m$  또는  $\Delta T_m$ 은 당해 기술분야의 숙련자에게 통상적인 기술에 의해 계산될 수 있다. 예를 들면, 문헌 (Freier 등, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 22: 4429-4443)에 기재된 기술은 당해 기술분야의 숙련자가 RNA:DNA 두가닥의 용해 온도를 증가시키는 이들의 능력에 대한 뉴클레오티드 변형의 평가를 가능케 한다.

[0214] b. 프리-mRNA 프로세싱

[0215] 특정 실시양태에서, 본 명세서에 제공된 안티센스 화합물은 프리-mRNA에 상보적이다. 특정 실시양태에서, 이러한 안티센스 화합물은 프리-mRNA의 스플라이싱을 변경한다. 이러한 특정 실시양태에서, 표적 프리-mRNA에 대응하는 성숙 mRNA의 일 변형체 대 그 성숙 mRNA의 다른 변형체의 비율이 변경된다. 이러한 특정 실시양태에서, 표적 프리-mRNA로부터 발현된 단백질의 일 변형체 대 그 단백질의 다른 변형체의 비율이 변경된다. 프리-mRNA의 스플라이싱을 변경하는데 사용될 수 있는 특정 올리고머 화합물 및 뉴클레오티드 서열은, 예를 들면 미국특허 제6,210,892호; 제5,627,274호; 제5,665,593호; 제5,916,808호; 제5,976,879호; 미국특허 공개 제 2006/0172962호; 제2007/002390호; 제2005/0074801호; 제2007/0105807호; 제2005/0054836호; 국제특허 공개 제 WO2007/090073호; 제WO2007/047913호, 문헌 (Hua 등, *PLoS Biol* 5(4): e73; Vickers 등, *J. Immunol.* 2006 Mar 15; 176(6): 3652-61; and Hua 등, *American J. of Human Genetics* (April 2008) 82, 1-15)에서 확인할 수 있으며, 이들 각각은 임의의 목적을 위해 온전히 그대로 참조로서 본 명세서에 포함된다. 특정 실시양태에서, 스플라이싱을 변경하는 안티센스 서열은 본 발명의 모티프에 따라 변형된다.

[0216] 안티센스는 하나 이상의 특이적 유전자 산물의 발현을 조정하기 위한 효과적인 수단으로 수많은 치료적, 진단적, 및 연구적 응용에 특히 유용하다. 표적 점유에 근거한 안티센스 기작을 비롯해, 안티센스 작용 기작을 통해 유전자 발현을 조정하는데 유용한 안티센스 화합물이 본 명세서에 제공된다. 일 태양에서, 본 명세서에 제공된 안티센스 화합물은 표적 유전자의 스플라이싱을 조정한다. 이러한 조정에는 엑손 포함을 촉진 또는 억제하는 것이 포함된다. 엑손성 스플라이싱 인핸서, 엑손성 스플라이싱 사일렌서, 인트론성 스플라이싱 인핸서 및 인트론성 스플라이싱 사일렌서를 포함하는, 프리-mRNA 분자 내에 존재하는 *시스* 스플라이싱 조절 요소를 표적하는 안티센스 화합물이 또한 본 명세서에 제공된다. *시스* 스플라이싱 조절 요소의 파괴는 스플라이스 부위 선별을 변경시켜 스플라이스 산물의 조성 내에 변경을 유도할 수 있는 것으로 생각된다.

[0217] 진핵 프리-mRNAs의 프로세싱은 적절한 mRNA 스플라이싱을 달성하기 위해 다수의 신호 및 단백질 인자를 요구하는 복잡한 과정이다. 스플라이세오솜에 의한 엑손 한정선 인트론-엑손 경계를 정의하는 더 많은 정준 (canonical) 스플라이싱 신호를 요구한다. 이러한 하나의 부가적인 신호는 *시스*-작용 조절 인핸서 및 사일렌서 서열에 의해 제공된다. 엑손성 스플라이싱 인핸서 (ESE), 엑손성 스플라이싱 사일렌서 (ESS), 인트론성 스플라이싱 인핸서 (ISE) 및 인트론 스플라이싱 사일렌서 (ISS)는, 이들의 작용 부위 및 방식에 따라서, 스플라이스 공여 부위 또는 스플라이스 수용 부위의 사용을 억제 또는 강화하는 것으로 동정되었다 (Yeo 등 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(44):15700-15705). 이들 조절 서열에 대한 특이적 단백질의 결합 (트랜스 인자)은 특정 스플라이스 부위의 사용을 촉진 또는 억제하여 스플라이싱 산물의 비율을 조정하는, 스플라이싱 프로세스를 지시한다 (Scamborova 등 2004, *Mol. 세포. Biol.* 24(5): 1855-1869; Hovhannisyan and Carstens, 2005, *Mol. 세포. Biol.* 25(1): 250-263; Minovitsky 등 2005, *Nucleic Acids Res.* 33(2): 714-724).

[0219] 4. 약학적 조성물

[0220] 특정 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 안티센스 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 이러한 약학적 조성물은 멸균 식염수 용액 및 하나 이상의 안티센스 화합물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 약학적 조성물은 멸균 식염수 용액 및 하나 이상의 안티센스 화합물로 이루어진다.

[0221] 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 약학적 조성물 또는 제형의 제조를 위해 약학적으로 허용가능한 활성 및 /또는 불활성 물질과 혼합될 수 있다. 약학적 조성물의 제형을 위한 조성 및 방법은, 이로 제한되는 것은 아니지만, 투여 경로, 질환의 정도, 또는 투여되는 용량을 비롯한 다수의 기준에 따라 달라진다.

- [0222] 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 이러한 올리고머 화합물을 적합한 약학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체와 배합함으로써 약학적 조성물 내에 사용될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 희석제에는 인산염-완충 식염수 (PBS)가 포함된다. PBS는 비경구로 전달되는 조성물 내에 사용하기에 적합한 희석제이다. 따라서, 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물 및 약학적으로 허용가능한 희석제를 포함하는 약학적 조성물이 본 명세서에 기술된 방법에 사용된다. 특정 실시양태에서, 약학적으로 허용가능한 희석제는 PBS이다.
- [0223] 안티센스 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 임의의 약학적으로 허용가능한 염, 에스테르, 또는 이러한 에스테르의 염을 포함한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 인간을 비롯한 동물에 투여 시, 생물학적 활성 대사산물 또는 그의 잔여물을 (직접적으로 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, 예를 들면, 본 명세서는 또한 안티센스 화합물의 약학적으로 허용가능한 염, 전구약물, 이러한 전구약물의 약학적으로 허용가능한 염, 및 다른 생등가물 (bioequivalents)에 관한 것이다. 적합한 약학적으로 허용가능한 염에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 나트륨염 및 칼륨염이 포함된다.
- [0224] 전구약물은 체내의 내인성 뉴클리아제에 의해 절단되는 올리고머 화합물의 한쪽 또는 양쪽 말단에 추가적인 뉴클레오시드의 도입을 포함할 수 있고, 이는 활성 안티센스 올리고머 화합물을 형성한다.
- [0225] 지질-계 벡터가 다양한 방법으로 핵산 요법에 사용되고 있다. 예를 들면, 하나의 방법에서, 핵산은 양이온성 지질 및 중성 지질의 혼합물로 만들어진 미리 형성된 리포솜 또는 리포플렉스 내로 도입된다. 다른 방법에서, 모노- 또는 폴리-양이온 지질과의 DNA 복합체는 중성 지질의 부재 하에서 형성된다.
- [0226] 특정 제조는 문헌 [Akinc 등, *Nature Biotechnology* **26**, 561-569 (01 May 2008)]에 기술되며, 이는 온전히 그 대로 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0228] 5. 대상에의 투여
- [0229] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 안티센스 화합물을 포함하는 약학적 조성물이 대상에게 투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 약학적 조성물은 주사에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 약학적 조성물은 주입에 의해 투여된다.
- [0230] 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 주사 또는 주입에 의해 CSF 내로 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 직접적 주사 또는 주입에 의해 척추 내로 투여된다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 주사 또는 주입에 의해 뇌 내로 투여된다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 척추 조직 자체 내가 아닌 수막 공간내로 주사 또는 주입에 의해 투여된다. 이론에 의해 제한되지 않으면서, 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 주변 CSF 내로 방출되어 척수 실질 내로 침투할 수 있다. 수막공간내 전달의 추가적인 이점은 수막공간내 경로가 인간에게 이미 일상적으로 사용되는 요추천자 (즉, 척추천자) 투여와 유사하다는 점이다.
- [0231] 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 뇌혈관내 (ICV) 주사 또는 주입에 의해 투여된다. 하나 이상의 안티센스 화합물을 포함하는 약학적 조성물의 뇌혈관내 또는 뇌실내 전달은 뇌척수액 (CSF)으로 채워져 있는, 임의의 하나 이상의 뇌의 심실 내로 수행될 수 있다. CSF는 심실을 채우는 투명한 유액으로, 거미막밑공간 내에 존재하며, 뇌 및 척수를 둘러싸고 있다. CSF는 맥락얼기에 의해 심실 내로 뇌에 의해 그리고 조직 유액의 삼출 또는 전파를 통해 생산된다. 맥락얼기는 외측 심실의 바닥과 제3 및 제4 심실의 천장을 연결하는 구조이다. 한 연구는 이들 구조가 하루에 4배의 중추신경계 공간을 채우기 위한 양과 일치하는 일일 400-600 cc의 유액을 생산할 수 있음을 보고하였다. 성인 인간에서, 이 유액의 부피는 125 내지 150 ml (4-5 oz)인 것으로 계산되었다. CSF는 계속적으로 형성되고, 순환되고 흡수된다. 한 연구는 대략 430 내지 450 ml (거의 2컵)의 CSF가 매일 생산될 수 있음을 보고하였다. 한 계산은 성인 인간에서는 분당 대략 0.35 ml, 유아 인간에서는 분당 0.15 ml의 양이 생산되는 것으로 평가하였다. 외측 심실의 맥락얼기가 대부분의 CSF를 생산한다. 이는 폰로공 (foramina of Monro)을 통해 제3 심실로 유입되는데, 여기서 CSF는 제3 심실로부터 생산에 의해 부가되고 중간뇌수도관 (aqueduct of Sylvius)을 통해 제4 심실로 지속적으로 유입된다. 제4 심실은 더 많은 CSF를 부가하고; 이어서 유액이 마장디공 및 루시카공 (foramina of Magendie and Luschka)을 통해 거미막밑공간 내로 이동한다. 그 후에 뇌의 기저 전체를 순환하고, 척수 주변과 대뇌반구 위쪽에 상향으로 흘러 내려간다. CSF는 지주막 용모 및 두개내 혈관 굴 (sinuses)을 통해 혈액 내로 흘러든다.
- [0232] 특정 실시양태에서, 이러한 약학적 조성물은 전신적으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 피하



로 투여된다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 정맥내로 투여된다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 근육내 주사에 의해 투여된다.

[0233] 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 CSF (예, IT 및/또는 ICV 주사 및/또는 주입)에 직접적으로 및 전신적으로 모두 투여된다.

[0234] 특정 실시양태에서, 전신적으로 안티센스 화합물은 뉴런으로 유입된다. 특정 실시양태에서, 전신적으로 투여된 안티센스 화합물은 특히 혈액뇌장벽이 완전히 형성되지 않은 어린 대상 (예, 자궁 내 대상 및/또는 신생아 대상)에게서, 혈액뇌장벽을 투과할 수 있다. 특정 실시양태에서, 전신적으로 투여된 안티센스 화합물의 일부 양은 혈액뇌장벽이 완전히 형성되지 않은 대상에게서도 신경세포에 의해 섭취될 수 있다. 예를 들면, 안티센스 화합물은 신경근 연결 (역방향 섭취)에서 또는 그 근처의 뉴런 내로 유입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 역방향 섭취는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 운동 뉴런을 비롯한 뉴런 내부에서 안티센스 활성을 초래하며, 뉴런 내부에서 안티센스 활성에 의한 치료적 이익을 제공한다.

[0235] 특정 실시양태에서, 전신 투여는 뉴런 이외의 세포 및/또는 조직 내에서 발생하는 안티센스 활성에 의한 치료적 이익을 제공한다. 증거가 뉴런 내부의 기능적 SMN이 정상적인 뉴런 기능을 위해 요구됨을 제시하지만, 다른 세포 및 조직 내에서 감소된 기능성 SMN의 결과는 충분히 규명되지 않았다. 특정 실시양태에서, 비-뉴런성 세포 내에서 안티센스 활성은 그러한 비-뉴런성 세포 내 SMN 기능의 복구를 초래하고, 이는 결과적으로 치료적 이익을 가져온다.

[0236] 특정 실시양태에서, 뉴런 내부의 SMN 기능이 개선되든 아니든, 비-뉴런성 세포 내 개선된 SMN 기능은 개선된 뉴런성 세포 기능을 제공한다. 예를 들면, 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물의 전신 투여는 근육 세포 내에서 안티센스 활성을 초래한다. 근육 세포에서의 이러한 안티센스 활성은 근육 세포와 관련된 운동-뉴런 또는 일반적으로 뉴런에 이익을 제공할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 복구된 SMN 기능을 갖는 근육 세포는 뉴런성 생존력 및/또는 기능을 개선하는 인자를 제공할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 안티센스 활성은 뉴런 내부에서 안티센스 화합물로부터 발생하는 안티센스 활성으로부터의 이익과 독립적이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물의 전신 투여는 뉴런과 직접적으로 관련되지 않은 세포를 포함하는, 다른 비-뉴런성 세포 내에서 안티센스 활성을 초래한다. 비-뉴런성 세포 내의 이러한 안티센스 활성은 뉴런의 기능을 개선할 수 있다. 예를 들면, 비-뉴런성 세포 (예, 간 세포) 내의 안티센스 활성은 뉴런의 기능을 개선하는 인자를 생산하는 세포를 초래할 수 있다. 주의: 용어 "안티센스 활성"은 직접적 및 간접적 활성을 포함하기 때문에, 비록 안티센스 화합물이 뉴런 내에 유입되지 않더라도 뉴런 기능에 대한 이익은 "안티센스 활성"이다.

[0237] 특정 실시양태에서, 약학적 조성물의 전신 투여는 뉴런 내 직접적 및 간접적 안티센스 활성과 독립적인 치료적 이익을 초래한다. 전형적으로, SMA의 설정에서, 뉴런 기능이 감소하여 유의미한 증상을 가져온다. 추가적인 증상은 다른 세포에서 감소된 SMN 활성으로부터 초래될 수 있다. 이러한 특정 증상은 감소된 뉴런 기능으로부터 증상의 상대적 중증도에 의해 은폐될 수 있다. 특정 실시양태에서, 전신 투여는 비-뉴런성 세포에서 복구 또는 개선된 SMN 기능을 초래한다. 이러한 특정 실시양태에서, 비-뉴런성 세포에서 이러한 복구 또는 개선된 SMN 기능은 치료적 이익을 갖는다. 예를 들면, 특정 경우에, SMA를 갖는 대상은 감소된 성장을 갖는다. 이러한 감소된 성장은 뉴런성 세포에서 감소된 기능의 결과이지 않을 수 있다. 실제로, 감소된 성장은 뇌하수체와 같은 다른 기관에서 세포의 손상된 기능과 관련될 수 있고/있거나 신체의 전체 세포에 걸쳐서 SMN 결핍의 결과일 수 있다. 이러한 실시양태에서, 전신 투여는 뇌하수체 세포 및/또는 다른 세포에서 개선된 SMN 활성을 초래하여 성장을 향상시킬 수 있다. 특정 경우에, CSF에의 투여는 대상의 더 긴 생존을 가능케 하기에 충분한 뉴런 기능을 복구하지만, 전형적으로 이러한 증상이 발현되기 전에 대상이 사망하기 때문에 종래에 알려지지 않은 하나 이상의 증상이 존재한다. 이러한 특성의 응급 증상은 치명적일 수 있다. 특정 실시양태에서, 응급 증상은 전신 투여에 의해 치료된다. 기작에 상관없이, 특정 실시양태에서, 이로 제한되는 것은 아니지만, 손상된 뉴런 기능과 관련된 더욱 심각한 증상에 의해 이전에는 은폐된 증상을 포함하는, SMA의 다양한 증상이 전신 투여에 의해 치료될 수 있다.

[0238] 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물의 전신 투여는 근육 세포에서 SMN 활성을 증가시킨다. 특정 실시양태에서, 근육 세포에서 이러한 개선된 SMN 활성은 치료적 이익을 제공한다. 근육에서만 개선된 SMN 활성은 치료적 이익을 제공하기에 충분하지 않은 것으로 보고되었다 (예: Gravrilinea, 등, Hum Mol Genet 2008 17(8): 1063-1075). 특정 실시양태에서, 본 발명은 근육에서 SMN 기능을 개선하고 치료적 이익을 제공하는 방법을 제공한다. 특정 경우에, 치료적 이익은 다른 세포 (단독 또는 근육 세포와 함께)에서 개선된 SMN 기능에 기인할 수 있다. 특정 실시양태에서, 근육에서만 개선된 SMN 기능은 이익을 제공할 수 있다.



[0239] 특정 실시양태에서, 전신 투여는 개선된 생존율을 나타낸다.

[0241] 6. 척수근위축증 (SMA)

[0242] SMA는 척추 운동 뉴런의 퇴화를 특징으로 하는 유전적 장애이다. SMA는 SMN1 유전자의 기능적 카피 모두의 동형접합 소실에 의해 야기된다. 그러나, SMN2 유전자는 SMN1과 동일한 단백질을 코딩할 가능성이 있어 SMA 환자의 유전적 결함을 극복한다. SMN2는 엑손 7의 위치 +6에서 번역적 침묵 돌연변이 (C→T)를 포함하여, SMN2 전사체 내 엑손 7의 불충분한 포함을 초래한다. 그러므로, 엑손 7이 결손된, SMN2의 주된 형태는 불안정하고 불활성이다. 따라서, 엑손 7을 포함하는 SMN2 전사체의 비율이 증가하도록 SMN2 스플라이싱을 조정할 수 있는 치료적 화합물은 SMA의 치료에 유용할 것이다.

[0243] 특정 실시양태에서, 본 발명은 프리-mRNA 코딩 SMN2에 상보적인 안티센스 화합물을 제공한다. 이러한 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 SMN2의 스플라이싱을 변경한다. SMN2의 스플라이싱을 변경하기에 유용한 특정 서열 및 영역은 국제특허출원 제PCT/US06/024469호에서 확인할 수 있으며, 이는 임의의 목적을 위해 온전히 그대로 참조로서 본 명세서에 포함된다. 특정 실시양태에서, 본 명세서에 기술된 임의의 모티프를 포함하는 올리고머 화합물은 SMN2의 인트론 7에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 이러한 특정 뉴클레오타이드 서열은 하기 표에 비-제한적으로 예시된다.

서열	길이	서열번호
TGCTGGCAGACTTAC	15	3
CATAATGCTGGCAGA	15	4
TCATAATGCTGGCAG	15	5
TTCATAATGCTGGCA	15	6
TTTCATAATGCTGGC	15	2
ATTCACCTTCATAATGCTGG	20	7
TCACCTTCATAATGCTGG	18	1
CTTTCATAATGCTGG	15	8
TCATAATGCTGG	12	9
ACTTTCATAATGCTG	15	10
TTCATAATGCTG	12	11
CACTTTCATAATGCT	15	12
TTTCATAATGCT	12	13
TCACCTTCATAATGC	15	14
CTTTCATAATGC	12	15
TTCACCTTCATAATG	15	16
ACTTTCATAATG	12	17
ATTCACCTTCATAAT	15	18
CACTTTCATAAT	12	19
GATTCACCTTCATAA	15	20
TCACCTTCATAA	12	21
TTCACCTTCATA	12	22
ATTCACCTTCAT	12	23
AGTAAGATTCACCTT	15	24

[0244]

[0245] 본 발명의 안티센스 화합물은 인간과 같은 대상에게서 SMN2의 발현을 조정하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 대상은 척수근위축증을 갖는다. 이러한 특정 대상에게서, SMN1 유전자는 부재이거나 아니면 충분한 양의 기능성 SMN 단백질을 생산하지 못한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 안티센스 화합물은 SMN2의 스플라이싱을 효과적으로 조정하여, SMN2 mRNA 내 및 궁극적으로는 엑손 7에 대응하는 아미노산을 포함하는 SMN2 단백질 내에서 엑손 7 포함의 증가를 초래한다. 이러한 교대 SMN2 단백질은 야생형 SMN 단백질과 유사하다. SMN2 mRNA의 발현 또는 발현의 단백질을 산물을 효과적으로 조정하는 본 발명의 안티센스 화합물을 활성 안티센스 화합물로 간주한다.

[0246]

SMN2 발현의 조정은 동물의 세포; 조직; 또는 장기를 포함하거나 포함하지 않을 수 있는, 체액 내에서 측정될 수 있다. 체액(예: 가래, 혈청, CSF), 조직(예: 생검), 또는 장기와 같은 분석용 시료를 얻는 방법, 및 분석을 가능케 하는 시료의 준비 방법은 당해 기술분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다. RNA 및 단백질 수준의 분석을 위한 방법은 상기에 기술되어 있고 당해 기술분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다. 치료 효과는 당해 기술분

아에 공지된 통상의 임상적 방법에 의해, 본 발명의 하나 이상의 화합물과 접촉된 동물로부터 수집된, 상기에 언급된 유액, 조직 또는 장기 내 표적 유전자 발현과 관련된 바이오마커를 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0247] 체액, 장기 또는 조직이 본 발명의 안티센스 화합물 또는 조성물의 하나 이상의 유효량과 접촉되는 방법이 또한 고려된다. 체액, 장기 또는 조직은 체액, 장기 또는 조직의 세포 내에서 SMN2 발현을 초래하는 본 발명의 하나 이상의 화합물과 접촉될 수 있다. 당해 기술분야의 숙련자에게 통상적인 방법에 의해 표적 핵산 또는 이들의 산물에 대한 안티센스 화합물 또는 화합물 또는 조성물의 조정 효과를 모니터링함으로써 유효량을 결정할 수 있다.

[0248] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 임의의 방법에서 사용하기 위해 본 명세서에 기술된 바와 같은 안티센스 화합물을 제공한다. 예를 들면, 본 발명은 척수근위축증 (SMA)와 같은 생존 운동 뉴런 단백질 (SMN)과 관련된 질환 또는 상태를 치료하는데 사용하기 위한, 인간 SMN2를 코딩하는 핵산에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물을 제공한다. 추가의 예시로서, 본 발명은 중추신경계 (CNS) 또는 CSF 내로 안티센스 화합물을 직접 투여함으로써 생존 운동 뉴런 단백질 (SMN)과 관련된 질환 또는 상태를 치료하는데 사용하기 위한, 인간 SMN2를 코딩하는 핵산에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물을 제공한다.

[0249] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 임의의 방법에 사용하기 위한 치료제의 제조에 있어 본 명세서에 기술된 바와 같은 안티센스 화합물의 용도를 제공한다. 예를 들면, 본 발명은 척수근위축증 (SMA)과 같은 생존 운동 뉴런 단백질 (SMN)과 관련된 질환 또는 상태를 치료하기 위한 치료제의 제조에 있어서 인간 SMN2를 코딩하는 핵산에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물의 용도를 제공한다. 추가의 예시로서, 본 발명은 중추신경계 (CNS) 또는 CSF 내로 안티센스 화합물을 직접 투여함으로써 생존 운동 뉴런 단백질 (SMN)과 관련된 질환 또는 상태를 치료하기 위한 치료제의 제조에 있어서 인간 SMN2를 코딩하는 핵산에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 화합물을 제공한다.

[0250] 특정 실시양태에서, 본 명세서에 기술된 임의의 모티프를 포함하는 올리고머 화합물은 SMN2의 엑손 7에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0251] 특정 실시양태에서, 본 명세서에 기술된 임의의 모티프를 포함하는 올리고머 화합물은 SMN2의 엑손 6에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0252] 특정 실시양태에서, 안티센스 화합물은 서열: TCACTTCATAATGCTGG (서열번호: 1)의 적어도 10개 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이러한 서열의 적어도 11개 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이러한 서열의 적어도 12개 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이러한 서열의 적어도 13개 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이러한 서열의 적어도 14개 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이러한 서열의 적어도 15개 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이러한 서열의 적어도 16개 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이러한 서열의 적어도 17개 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이러한 서열의 뉴클레오티드로 이루어진 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 10-18개의 연결된 뉴클레오티드로 이루어지고 서열: TCACTTCATAATGCTGG (서열번호: 1)의 같은 길이와 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0254] 7. 특정 대상

[0255] 특정 실시양태에서, 대상은 하나 이상의 SMA 징후를 갖는다. 특정 실시양태에서, 대상은 하나 이상의 근육의 감소된 전기활성을 포함한다. 특정 실시양태에서, 대상은 돌연변이 SMN1 유전자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 대상의 SMN1 유전자는 부재이거나 기능성 SMN 단백질을 생산할 수 없다. 특정 실시양태에서, 대상은 유전적 검사에 의해 진단된다. 특정 실시양태에서, 대상은 근육 생검에 의해 동정된다. 특정 실시양태에서, 대상은 똑바로 앉을 수 없다. 특정 실시양태에서, 대상은 서거나 걸을 수 없다. 특정 실시양태에서, 대상은 호흡

및/또는 식사에 대한 보조가 요구된다. 특정 실시양태에서, 대상은 근육 및/또는 근육 생김의 전기생리학적 측정에 의해 동정된다.

[0256] 특정 실시양태에서, 대상은 SMA 유형 I을 갖는다. 특정 실시양태에서, 대상은 SMA 유형 II를 갖는다. 특정 실시양태에서, 대상은 SMA 유형 III을 갖는다. 특정 실시양태에서, 대상은 자궁 내에서 SMA를 갖는 것으로 진단된다. 특정 실시양태에서, 대상은 출생 후 1주일 이내에 SMA를 갖는 것으로 진단된다. 특정 실시양태에서, 대상은 출생 후 1개월 이내에 SMA를 갖는 것으로 진단된다. 특정 실시양태에서, 대상은 3개월의 연령에 SMA를 갖는 것으로 진단된다. 특정 실시양태에서, 대상은 6개월의 연령에 SMA를 갖는 것으로 진단된다. 특정 실시양태에서, 대상은 1살의 연령에 SMA를 갖는 것으로 진단된다. 특정 실시양태에서, 대상은 1 및 2살 사이의 연령에 SMA를 갖는 것으로 진단된다. 특정 실시양태에서, 대상은 1 및 15살 사이의 연령에 SMA를 갖는 것으로 진단된다. 특정 실시양태에서, 대상의 연령이 15살을 초과할 때 대상은 SMA를 갖는 것으로 진단된다.

[0257] 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 제1 용량의 약학적 조성물은 자궁 내로 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 제1 용량은 혈액뇌장벽의 완전한 발달 이전에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제1 용량은 대상의 자궁 내에 전신적으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 제1 용량은 혈액뇌장벽의 형성 후에 자궁 내로 투여된다. 특정 실시양태에서, 제1 용량은 CSF에 투여된다.

[0258] 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 제1 용량의 약학적 조성물은 대상의 연령이 1주 미만일 때 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 제1 용량의 약학적 조성물은 대상의 연령이 1개월 미만일 때 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 제1 용량의 약학적 조성물은 대상의 연령이 3개월 미만일 때 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 제1 용량의 약학적 조성물은 대상의 연령이 6개월 미만일 때 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 제1 용량의 약학적 조성물은 대상의 연령이 1세 미만일 때 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 제1 용량의 약학적 조성물은 대상의 연령이 2세 미만일 때 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 제1 용량의 약학적 조성물은 대상의 연령이 15세 미만일 때 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 제1 용량의 약학적 조성물은 대상의 연령이 15세보다 많을 때 투여된다.

[0260] 8. 특정 용량

[0261] 특정 실시양태에서, 본 발명은 투여량 및 투여 빈도를 제공한다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 볼루스 주사로서 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 볼루스 주사의 용량은 대상의 체중 1 kg당 0.01 내지 25 mg의 안티센스 화합물이다. 이러한 특정 실시양태에서, 볼루스 주사의 용량은 대상의 체중 1 kg당 0.01 내지 10 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 용량은 대상의 체중 1 kg당 0.05 내지 5 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 용량은 대상의 체중 1 kg당 0.1 내지 2 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 용량은 대상의 체중 1 kg당 0.5 내지 1 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 이러한 용량은 매달 2회 투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 용량은 매달 투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 용량은 매 2개월마다 투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 용량은 매 6개월마다 투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 용량은 CSF 내로 볼루스 주사에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 용량은 수막공간내 볼루스 주사에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 용량은 볼루스 전신 주사 (예: 피하, 근육내, 또는 정맥내 주사)에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 대상은 CSF 내로의 볼루스 주사 및 볼루스 전신 주사를 투여받는다. 이러한 실시양태에서, CSF 볼루스 및 전신 볼루스의 용량은 동일하거나 서로 다를 수 없다. 특정 실시양태에서, CSF 및 전신 용량은 다른 빈도로 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 적어도 1회의 볼루스 수막공간내 주사 및 적어도 1회의 볼루스 피하 주사를 포함하는 투여 요법을 제공한다.

[0262] 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 연속 주입에 의해 투여된다. 이러한 연속 주입은 CSF 내로의 약학적 조성물을 전달하는 주입 펌프에 의해 수행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 주입 펌프는 약학적 조성물을 IT 또는 ICV로 전달한다. 이러한 특정 실시양태에서, 투여되는 용량은 하루에 대상의 체중 1 kg당 0.05 및 25 mg의 안티센스 화합물 사이이다. 특정 실시양태에서, 투여되는 용량은 하루에 대상의 체중 1 kg당 0.1 내지 10 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 투여되는 용량은 하루에 대상의 체중 1 kg당 0.5 내지 10 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 투여되는 용량은 하루에 대상의 체중 1 kg당 0.5 내지 5 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 투여되는 용량은 하루에 대상의 체중 1 kg당 1 내지 5 mg의 안티센스 화합물이다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 CNS 내로의 주입 및 적어도 1회의 볼루스 전신 주사를 포함하는 투여 요법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 CNS 내로의 주입 및 적어도 1회의 볼루스 피하 주사를 포함하는 투여 요법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 볼루스에 의한 주입에 의하면, 용량은 CNS 조직 1 g당 0.1 내

지 100 mg의 안티센스 화합물의 농도를 달성하거나 유지하도록 조절된다. 특정 실시양태에서, 볼루스에 의하든 주입에 의하든, 용량은 CNS 조직 1 g당 1 내지 10 mg의 안티센스 화합물의 농도를 달성하거나 유지하도록 조절된다. 특정 실시양태에서, 볼루스에 의하든 주입에 의하든, 용량은 CNS 조직 1 g당 0.1 내지 1 mg의 안티센스 화합물의 농도를 달성하거나 유지하도록 조절된다.

[0263] 특정 실시양태에서, 대상에의 투여는 유도기 및 유지기로 구분된다. 이러한 특정 실시양태에서, 유도기 동안 투여되는 용량은 유지기 동안 투여되는 용량을 초과한다. 특정 실시양태에서, 유도기 동안 투여되는 용량은 유지기 동안 투여되는 용량 미만이다. 특정 실시양태에서, 유도기는 볼루스 주사에 의해 달성되고 유지기는 연속 주입에 의해 달성된다.

[0264] 특정 실시양태에서, 본 발명은 단독으로 또는 CSF 내로의 전달과 함께, 안티센스 화합물의 전신 투여를 제공한다. 특정 실시양태에서, 전신 투여를 위한 용량은 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 전신 투여를 위한 용량은 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 전신 투여를 위한 용량은 0.5 mg/kg 내지 100 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 전신 투여를 위한 용량은 1 mg/kg 내지 100 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 전신 투여를 위한 용량은 1 mg/kg 내지 50 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 전신 투여를 위한 용량은 1 mg/kg 내지 25 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 전신 투여를 위한 용량은 0.1 mg/kg 내지 25 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 전신 투여를 위한 용량은 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 전신 투여를 위한 용량은 1 mg/kg 내지 10 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 전신 투여를 위한 용량은 1 mg/kg 내지 5 mg/kg이다. 전신 및 CFS 전달 모두를 포함하는 특정 실시양태에서, 이들 2가지 경로를 위한 용량은 독립적으로 결정된다.

[0266] a. 적합한 인간 용량의 계산

[0267] 특정 실시양태에서, 대상은 인간이다. 특정 실시양태에서, 인간 용량은 본 명세서에 기술된 바와 같은, 동물 실험으로부터 얻은 결과로부터 계산 또는 추정된다. 특정 실시양태에서, 인간 용량은 본 명세서에 기술된 바와 같은, 원숭이 및/또는 마우스 실험으로부터 얻은 결과로부터 계산 또는 추정된다. 특정 실시양태에서, 인간 용량은 본 명세서에 기술된 바와 같은, 마우스 실험으로부터 얻은 결과로부터 계산 또는 추정된다. 특정 실시양태에서, 적합한 인간 용량은 뇌 중량 및/또는 뇌척수액 (CSF) 교체율의 정보와 함께 마우스로부터 얻은 약물동력학 결과를 이용하여 계산될 수 있다. 예를 들면, 마우스 뇌 중량은 대략 0.4 g으로, 이는 그의 체중의 대략 2%이다. 인간에서, 평균 뇌 중량은 1.5 kg으로 이는 체중의 대략 2.5%이다. 특정 실시양태에서, CSF 내로의 투여는 뇌 조직에서의 섭취를 통한 일부 화합물의 제거 및 후속적인 대사를 초래한다. 계수 인자로서 인간 대 마우스 체중의 비율을 이용하여 뇌 조직을 통한 제거 및 소거의 추정값이 계산될 수 있다. 부가적으로, CSF 교대율은 CSF로부터 혈액 내로의 화합물의 제거를 추정하는데 사용될 수 있다. 마우스 CSF 교대율은 일일 대략 10-12회이다 (0.04 mL, 0.325  $\mu$ L/분으로 생산됨). 인간 CSF 교대율은 일일 대략 4회이다 (100-160 mL, 350 내지 400  $\mu$ L/분으로 생산됨). 따라서, 소거율 및 투여 요건은 뇌 중량 제거 계수, 및/또는 CSF 교대 계수를 기준으로 할 수 있다. 외삽에 의해 추정된 인간 CSF 소거율은 마우스에서의 용량에 근접한 인간에서의 등가 용량을 추정하는데 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, 뇌 중량 및 CSF 교대율에 근거한 조직 대사에 있어서의 차이를 설명하는 인간 용량이 추정될 수 있다. 이러한 계산 및 추정 방법은 당해 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있다.

[0268] 비-제한적인 예시로서, 특정 실시양태에서, mg/kg 마우스 용량에 특정 화합물의 결정된 소거율 및 제거율에 따라 약 0.25 내지 약 1.25의 계수를 곱함으로써 바람직한 마우스 용량으로부터 등가의 인간 용량을 추정할 수 있다. 따라서, 예를 들면, 특정 실시양태에서, 20 g 마우스에 대한 0.01 mg 용량에 등가인 인간 용량은 70 kg 인간의 경우 약 8.75 mg 내지 약 43.75 mg 총 용량의 범위일 것이다. 유사하게, 특정 실시양태에서, 4 g의 갓 태어난 마우스에 대한 0.01 mg 용량에 등가인 인간 용량은 3 kg 신생아의 경우 약 1.9 mg 내지 약 9.4 mg 총 용량의 범위일 것이다. 이러한 예시적인 용량은 숙련자가 적합한 인간 용량을 어떻게 결정할 수 있는지를 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명을 제한하기 위한 것으로 의도되지 않는다.

[0269] 특정 실시양태에서, (단독으로 또는 CSF 전달과 함께 투여되든 아니든) 전신 전달을 위한 인간 용량은 본 명세서에 기술된 바와 같은, 동물 실험으로부터 얻은 데이터로부터 계산 또는 추정된다. 전형적으로, 전신 투여에 적합한 인간 용량 (mg/kg)은 동물에서의 유효량의 0.1 및 10배 사이이다. 따라서, 단지 예를 들면, 2 g의 갓 태어난 마우스에서 50  $\mu$ g의 피하 용량은 25 mg/kg의 용량이다. 인간에 대한 대응 용량은 2.5 mg/kg과 250 mg/kg의 사이인 것으로 예상된다. 3 kg의 유아의 경우, 대응 용량은 7.5 mg과 750 mg 사이이다. 25 kg의 소아



의 경우, 대응 용량은 62.5 mg 내지 6250 mg이다.

[0271] 9. 치료 요법

[0272] 특정 실시양태에서, 상기 투여량, 투여 빈도, 투여 경로, 유도기 및 유지기, 및 제1 용량의 시점은 SMA를 갖는 대상에 대한 투여 요법을 제공하도록 조합된다. 이러한 투여 요법은 약학적 조성물의 투여로 인해 하나 이상의 SMA 증상의 개선을 제공하고/하거나 독성 또는 부작용을 감소시키도록 선택되고 조절될 수 있다. 특정 실시양태에서, 대상은 자궁 내 태아이거나 신생아이다. 이러한 실시양태에서, 특히 연속 주입에 의한, 약학적 조성물의 투여는 특정 시험감염을 나타낸다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명은 대상이 자궁 내 태아이거나 매우 어릴 때에는 볼루스 투여에 의해 약학적 조성물이 투여되지만, 이후에 대상이 나이가 들고 주입 펌프의 이식이 더욱 실용적일 때에는 이식된 주입 펌프를 통한 연속 주입에 의한 약학적 조성물의 투여를 제공한다. 또한, 특정 실시양태에서, 대상이 성장함에 따라, 절대 용량은 같거나 유사한 용량 : 체중 비율을 달성하도록 증가된다. 하기 표는 치료 요법을 예시하기 위한 것으로 당해 기술분야의 숙련자에 의해 용이하게 달성되는 치료의 가능한 조합을 한정하는 것으로 의도되지 않는다.

투여기간	제 1	제 2	제 3	제 4	제 5
요법 1					
대상 연령	자궁 내, 혈액뇌장벽 성 전	자궁 내, 혈액뇌장벽 성 전	> 1 주	6 개월	1.5 세
투여량	50 µg	50 µg	100 µg	10 µg/day	50 µg/day
빈도	단일 투여	단일 투여	매월	계속	계속
투여 경로	전신 주사	IT 주사	IT 주사	IT 주입	IT 주입
지속기간	N/A	N/A	6 개월	1 년	진행 중
요법 2					
대상 연령	자궁 내, 혈액뇌장벽 성 후	> 1 주	6 개월	1.5 세	N/A
투여량	50 µg	100 µg	5 mg/day	10 mg/day	N/A
빈도	단일 투여	매월	계속	계속	N/A
투여 경로	ICV 주사	ICV 주사	ICV 주입	ICV 주입	N/A
지속기간	N/A	6 개월	1 년	진행 중	N/A
요법 3					
대상 연령	> 1 week	6 months	1.5 years	2.5 years*	
투여량	100 µg	500 µg/day	20 mg/day	20mg/day	100 mg
빈도	매월 2회	계속	계속	계속	매월 2회
투여 경로	ICV 주사	ICV 주입	ICV 주입	ICV 주입	IP
지속기간	6 개월	1 년	1 년	진행 중	진행 중

[0273]

[0274] \* 주목: 요법 3에서 4<sup>th</sup> 투여 기간은 주기적 전신 투여와 병용된 연속적 CSF 주입을 예시하는 것임. 이러한 치료 요법은 예시적인 것으로 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않음.

[0276] 특정 실시양태에서, 투여 요법은 단독 또는 CSF 내로의 투여와 병용하는, 전신 투여를 포함한다 (예를 들면, 상기 요법 3). 하기 표는 이러한 요법을 예시한다.



전신 투여			CSF 투여		
용량	경로	빈도	용량	경로	빈도
1-5 mg/kg	피하	매주	5 - 10 mg/kg	볼루스 IT	매월
1-5 mg/kg	피하	매월	1-5 mg/kg	볼루스 ICV	2 개월
10 - 50 mg/kg	피하	매월	0.5 - 1 mg/kg	볼루스 IT	6 개월
0.5 - 2.5 mg/kg	피하	매월	10 mg/kg/day	IT 주입	6개월마다 7일간 계속됨
0.1 - 1.0 mg/kg	피하	매월	none		
none			0.5 - 1 mg/kg	볼루스 IT	6 개월

[0277]

[0278]

이러한 치료 요법은 예시적인 것으로 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 당해 기술분야의 숙련자는 상태의 중증도 및 대상의 전반적인 건강상태 및 연령과 같은 다양한 요인들을 근거로 본 명세서의 기재에 비추어 용량 및 전달의 적합한 조합을 선택할 수 있을 것이다.

[0280]

10. 동시-투여

[0281]

특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 SMA의 치료 및/또는 SMA와 관련된 하나 이상의 증상을 치료하기 위한 적어도 하나의 다른 약학적 조성물과 함께 동시-투여된다. 특정 실시양태에서, 이러한 다른 약학적 조성물은 트리코스타틴-A, 발프로산, 락루졸, 히드록시우레아, 및 부티레이트 또는 부티레이트 유도체로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 트리코스타틴 A와 동시-투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 퀴나졸린의 유도체, 예를 들면 문헌 (Thurmond, 등, J. Med Chem. 2008, 51, 449-469)에 기술된 것들과 동시-투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 적어도 하나의 다른 약학적 조성물은 같은 시기에 동시-투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 적어도 하나의 다른 약학적 조성물은 다른 시기에 동시-투여된다.

[0282]

특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 유전자요법 제제와 동시-투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 유전자요법 제제는 CSF로 투여되고 본 발명의 약학적 조성물은 전신적으로 투여된다. 이러한 특정 실시양태에서, 유전자요법 제제는 CSF로 투여되고 본 발명의 약학적 조성물은 CSF로 및 전신적으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 유전자요법 제제는 같은 시기에 동시-투여된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물 및 유전자요법 제제는 다른 시기에 동시-투여된다. SMA 치료에 대한 특정 유전자요법 접근법이 보고되었다 (예: Coady 등, PLoS ONE 2008 3(10): e3468; Passini 등, J Clin Invest 2010 Apr 1, 120(4): 1253-64).

[0283]

특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 SMA를 위한 적어도 하나의 다른 치료제와 동시-투여된다. 특정 실시양태에서, SMA를 위한 이러한 다른 치료제는 수술이다. 특정 실시양태에서, 이러한 다른 치료제는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 기침요법과 같이, 호흡에 필요한 근육을 강화시키도록 고안된 운동을 포함하는 물리요법이다. 특정 실시양태에서, 다른 치료제는 호흡을 보조하기 위한 영양 튜브 또는 장치와 같은, 물리적 중재이다.

[0284]

특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 약학적 조성물의 원치 않는 부작용을 감소시키는 하나 이상의 다른 약학적 조성물과 동시-투여된다.

[0286]

11. 표현형적 효과

[0287]

특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 적어도 하나의 약학적 조성물의 투여는 대상에게서 표현형적 변화를 초래한다. 특정 실시양태에서, 이러한 표현형적 변화에는, 이들로 제한되는 것은 아니지만: 엑손 7을 포함하는 SMN mRNA의 절대량의 증가; 엑손 7이 결손된 SMN mRNA에 대한 엑손 7을 포함하는 SMN mRNA의 비율의 증가; 엑손 7을 포함하는 SMN 단백질의 절대량의 증가; 엑손 7이 결손된 SMN 단백질에 대한 엑손 7을 포함하는 SMN 단백질의 비율의 증가; 근육 강도의 개선, 적어도 하나의 근육에서의 전기활성의 개선; 호흡 개선; 체중 증가; 및 생존율이 포함된다. 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 표현형적 변화가 대상의 운동 뉴런에서 검출된다. 특정 실시양

태에서, 본 발명에 따른 적어도 하나의 약학적 조성물의 투여는 대상이 일어나 앓고, 서고/서거나 걷을 수 있게 한다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 적어도 하나의 약학적 조성물의 투여는 대상이 도움없이 먹고, 마시고/마시거나 호흡할 수 있게 한다. 특정 실시양태에서, 치료 효능은 근육의 전기생리학적 평가에 의해 평가된다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여는 SMA의 적어도 하나의 증상을 개선하고 염증성 효과가 거의 없다. 이러한 특정 실시양태에서, 염증성 효과의 부재는 치료 시 Aif1 수준의 유의미한 증가의 부재에 의해 결정된다.

[0288] 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 적어도 하나의 약학적 조성물의 투여는 SMA의 적어도 하나의 증상의 개시를 지연시킨다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 적어도 하나의 약학적 조성물의 투여는 SMA의 적어도 하나의 증상의 진행을 둔화시킨다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 적어도 하나의 약학적 조성물의 투여는 SMA의 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시킨다.

[0289] 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 적어도 하나의 약학적 조성물의 투여는 원치 않는 부작용을 초래한다. 특정 실시양태에서, 원치 않는 부작용을 예방하면서 증상의 바람직한 개선을 유발하는 치료 요법이 확인된다.

[0291] 12. 투약 단위

[0292] 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위한 투약 단위로 제조된다. 이러한 특정 투약 단위는 0.01 mg 내지 100 mg으로부터 선택되는 농도이다. 이러한 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 0.01 mg, 0.1 mg, 0.5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 및 200 mg으로부터 선택되는 안티센스 화합물의 용량을 포함한다. 특정 실시양태에서, 약학적 조성물은 0.1 mg, 0.5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 25 mg, 및 50 mg으로부터 선택되는 올리고뉴클레오티드의 용량을 포함한다.

[0294] 13. 키트

[0295] 특정 실시양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 약학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 특정 실시양태에서, 이러한 키트는 전달 수단, 예를 들면 주사기 또는 주입 펌프를 추가로 포함한다.

[0296] 참조에 의한 비제한적인 기재 및 포함

[0298] 본 명세서에 기재된 특정 화합물, 조성물 및 방법이 특정 실시양태에 따라 구체적으로 기재되었다고 하더라도, 하기 실시예는 단지 본 명세서에 기재된 화합물을 예시하기 위해 제공되는 것으로 이를 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서에 언급된 각각의 참조, GenBank 등재 번호 등은 온전히 그대로 참조로서 본 명세서에 포함된다.

[0299] 이 출원에 첨부된 서열목록이 요구되는 바와 같이 "DNA" 또는 "RNA"로서 각각의 서열을 식별한다고 하더라도, 실제로, 이들 서열은 화학적 변형의 임의의 조합으로 변형될 수 있다. 당해 기술분야의 숙련자는 변형된 올리고뉴클레오티드를 기술하기 위한 "DNA" 또는 "RNA"로서 이러한 지정이, 특정 경우에, 자의적임을 쉽게 이해할 것이다. 예를 들면, 2'-OH 당 모이어티 및 티민 염기를 포함하는 뉴클레오시드를 포함하는 올리고뉴클레오티드는 변형된 당을 갖는 DNA (DNA의 천연 2'-H에 대해 2'-OH)로서 또는 변형된 염기를 갖는 RNA (RNA의 천연 우라실에 대해 티민 (메틸화 우라실))로서 기술될 수 있다.

[0300] 따라서, 이로 제한되는 것은 아니지만, 서열목록 내의 것들을 비롯한, 본 명세서에 제공된 핵산 서열은, 이로 제한되는 것은 아니지만, 변형된 뉴클레오티드를 갖는 이러한 핵산을 포함하는 천연 또는 변형된 RNA 및/또는 DNA의 임의의 조합을 포함하는 핵산을 포함하는 것으로 의도된다. 추가의 예시로서 제한 없이, 뉴클레오티드 서열 "ATCGATCG"를 갖는 올리고머 화합물은 이로 제한되는 것은 아니지만, 서열 "AUCGAUCG"을 갖는 것들과 같이 RNA 염기를 포함하는 화합물, "AUCGATCG"와 같이 일부 DNA 염기 및 일부 RNA 염기를 갖는 화합물, 및 "AT<sup>me</sup>CGAUCG" (상기에서, <sup>me</sup>C는 5-위치에 메틸기를 포함하는 시토신 염기를 나타냄)와 같이 다른 변형된 염기를 갖는 올리고머 화합물을 포함하는, 변형되거나 변형되지 않은, 임의의 이러한 뉴클레오티드 서열을 갖는 임의의 올리고머 화합물을 포함한다.

**발명의 효과**

- [0302] 본 발명은 대상에게서 SMN2 mRNA의 스플라이싱을 조정하는 화합물, 조성물을 이용함으로써 유전자 발현을 선택적으로 조정하는 치료제로 유용한 효과가 있다.
- [0303] 또한, 본 발명은 척수근위축증을 비롯한 질환 및 장애의 치료에 유용하다.

**도면의 간단한 설명**

- [0305] 도 1은 엑손 7을 포함하는 SMN2의 비율 (y-축)을 7일간의 처리 종료 후 0, 2, 4, 6, 및 8주째 (x-축)에 평가한, 실시예 4에서 논의된 작용의 지속시간 연구로부터 얻은 결과를 나타낸다. "0"주째 시료는 처리 종료 1일 후에 취해진다. CON은 식염수 처리된 마우스를 나타낸다. 0 내지 6개월의 다른 시점에서 대조군 식염수 처리된 마우스 중에서 % 포함에 차이를 나타내지 않았다.
- 도 2는 엑손 7을 포함하는 SMN2의 비율을 7일간의 처리 종료 후 0, 0.5, 1, 2, 5, 및 6개월째에 평가한, 실시예 4에서 논의된 작용의 지속시간 연구로부터 얻은 결과를 나타낸다. "0"개월째 시료는 처리 종료 1일 후에 취해진다. CON은 식염수 처리된 마우스를 나타낸다. 0 내지 6개월의 다른 시점에서 대조군 식염수 처리된 마우스 중에서 % 포함에 차이를 나타내지 않았다.
- 도 3은 타이완 균주 SMA 마우스의 꼬리-구간에 ISIS396443의 배아 투여의 효과를 측정된 실시예 6에 논의된 실험으로부터 얻은 결과를 나타낸다. 도 3A는 첫 번째 이러한 실험을 나타내고, 도 3B는 지지된 바와 같이 비교를 위해 정상 마우스에 대한 결과를 포함하는, 안티센스 화합물의 다른 농도를 검사한 반복 실험을 나타낸다.
- 도 4는 실시예 7에 논의된 웨스턴 블롯으로부터 얻은 결과를 나타낸다. Y 축은 엑손 7을 포함하는 다양한 시료에서 SMN의 비율이다.
- 도 5 및 6은 실시예 7에서 논의된 실험으로부터 얻은 결과를 나타낸다. 다수의 SMA 마우스 (타이완 균주)의 평가는 안티센스 화합물 또는 대조군 올리고뉴클레오타이드를 이용한 치료에 따라 수행되었다.
- 도 7은 실시예 7에 논의된 실험으로부터 얻은 생존 곡선을 나타낸다.
- 도 8은 실시예 7에 논의된 바와 같이, 안티센스 화합물 또는 대조군 올리고뉴클레오타이드를 이용한 치료에 따라 척수의 다른 부분에서 운동 뉴런 개수의 평가로부터 얻은 결과를 나타낸다.
- 도 9는 실시예 7에 논의된 바와 같이, 안티센스로 처리된 동물에서 전장 SMN RNA (엑손 7 포함)의 평가로부터 얻은 결과를 나타낸다.
- 도 10은 동물이 (1) 비처리군; (2) 출생 시 단일 용량의 안티센스 화합물 처리군 (P0일째); 또는 (3) P0일째 제1 용량 및 21일째 (P21) 제2 용량 처리군인 실시예 7에 논의된 실험으로부터 얻은 생존 곡선을 나타낸다.
- 도 11은 제2 용량을 투여받은 동물과 단지 제1 용량만을 투여받은 동물을 비교하는 실시예 7에 논의된 실험으로부터 얻은 생존 곡선을 나타낸다.
- 도 12는 안티센스 화합물이 수막공간내 주입에 의해 원숭이에게 투여되고 화합물의 농도가 96시간 후에 다른 조직에서 평가된 실시예 9에 논의된 실험으로부터 얻은 결과를 나타낸다.
- 도 13은 안티센스 화합물의 다른 용량이 피하 주사에 의해 중증 SMA 마우스에 투여된 실시예 12에 논의된 실험으로부터 얻은 생존 곡선을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0306] 실시예 1: SMN2를 표적하는 안티센스 화합물
- [0307] 하기 올리고뉴클레오타이드를 이전에 보고된 표준 기술을 이용하여 합성하였다.

참조 #	서열	길이	화학	서열번호
ISIS396443	TCACITTCATAATGCTGG	18	전장 2'-MOE; 전장 PS	1
ISIS396449	TTCATAATGCTGGC	15	전장 2'-MOE; 전장 PS	2

[0308]

- [0309] PS = 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 결합
- [0311] **실시예 2: Snn<sup>-/-</sup> SMN 형질전환**
- [0312] 상기에 기술된 안티센스 화합물을 이용한 치료 효과 및 안정성을 적합한 동물 모델에서 검사할 수 있다. 예를 들면, 인간 질환과 가장 유사한 것처럼 보이는 동물 모델에는 높은 발생률의 특정 질환이 자연 발생적으로 발병하거나 그렇게 되도록 유도된 동물 종이 포함된다.
- [0313] 구체적으로, SMA에 대한 동물 모델은 공지되어 있다. 상기에 설명한 바와 같이, 보통염색체 열성 신경근 장애인 SMA의 분자적 원리는 생존 운동 뉴런 유전자 1 (SMN1)의 동형접합 소실이다. SMN2로 불리는, SMN1 유전자의 거의 동일한 카피가 인간에서 발견되고 질환 중증도를 조정한다. 인간과는 달리, 마우스는 SMN1과 동등한 단일 유전자 (Snn)를 갖는다. 이 유전자의 동형접합 소실은 배아에 치명적으로 대규모의 세포 사멸을 초래하고, 이는 Snn 유전자 산물이 세포 생존 및 기능에 필수적임을 나타낸다. SMN 결손 마우스 내로 2 카피 SMN2의 도입은 배아 치사율을 구조하여, SMA 표현형을 갖는 마우스를 생성한다 (Monani 등, *Hum. Mol. Genet.* (2000) 9: 333-339). 운동 뉴런에서 SMN 단백질이 충분히 생산되기 때문에 고 카피수의 SMN2는 마우스를 구조한다. 또한, 인간 SMN2를 발현하는 형질전환 마우스계를 보고하는 문헌 (Hsieh-Li, 등, *Nat. Genet.* (2000) 24: 66-70)을 참조하시오. 구체적으로, Snn<sup>-/-</sup> 배경에서 SMN2를 보유하는 형질전환 마우스는 SMA 환자의 것과 유사하게 척수 및 골격근에서 병리학적 변화를 나타내었다. 이들 마우스에서의 병리학적 변화의 중증도는 엑손 7에 의해 코딩되는 영역을 포함하는 SMN 단백질과 관련되어 있다. 1 카피의 Snn이 결손된 이형접합 마우스를 Snn<sup>-/+</sup>로 명명하고 SMA, 유형 III의 덜 중한 형태에 대한 모델이다.
- [0314] SMA 표현형의 중증도는 마우스에서 인간 SMN2의 카피 수의 함수이다. "타이완" 균주는 4 카피의 인간 SMN2를 가져, 유형 I 또는 유형 II와 유사한, 중등 내지 심각한 SMA 표현형을 갖는 마우스를 생성한다.
- [0315] 델타-7 마우스 (Snn<sup>-/-</sup>, hSMN2<sup>+/+</sup>, SMNΔ7<sup>+/+</sup>)는 또한 마우스 Snn이 결실되고 인간 SMN2를 발현한다. 델타 7 마우스는 더욱 심각한 표현형을 나타내고 출생 후, 전형적으로 출생 약 15-20일 후에 바로 죽는다.
- [0317] **실시예 3: Snn<sup>-/-</sup> SMN2 (타이완 균주)에서 *in vivo* 안티센스 화합물의 전신 투여**
- [0318] 타이완 마우스를 5일간 매일 1회씩 식염수 또는 ISIS396443 또는 부정합 안티센스 올리고뉴클레오티드 대조군의 35 mg/kg을 복강내 주사로 처리하고 2일 후 7일째에 희생시켰다. 간 및 신장을 적출하고 RNA를 표준 기술을 이용하여 분리하였다. 엑손 7을 보유 또는 보유하지 않은 SMN2를 RT-PCR로 가시화하였다. ISIS396443의 투여는 식염수 및 부정합 대조군 처리 동물에 비해 간 및 신장으로부터 SMN2에서 엑손 7 포함의 실질적인 증가를 초래하였다.
- [0320] **실시예 4: Snn<sup>-/-</sup> SMN2 (타이완 균주)에서 *in vivo* 안티센스 화합물의 뇌혈관내 (ICV) 투여**
- [0321] 타이완 마우스에 7일간 매일 식염수 또는 150 mg의 ISIS396443을 ICV로 주사하였다. 마우스를 8일째에 희생시키고 뇌 및 척수로부터 RNA를 추출하였다. RT-PCR 분석은 ISIS396443으로 처리된 동물로부터 얻은 뇌 및 척수 시료에서 엑손 7 포함의 실질적인 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 엑손 7의 배체가 SMA 표현형과 관련되기 때문에 SMN을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 이용한 ICV 치료가 SMA 상태를 복구할 수 있음을 나타낸다.
- [0323] 용량-반응
- [0324] 타이완 마우스에 7일간 매일 식염수 또는 10, 50, 100, 또는 150 mg의 ISIS396443을 ICV로 주사하고 (각 처리군에 마우스 5마리) 8일째에 희생시켰다. RNA를 분리하고 RT-PCR로 분석하였다. 10 mg 처리군은 중등의 엑손 7 포함을 나타내었다. 50 mg, 100 mg, 및 150 mg 처리군 모두는 실질적인 엑손 7 포함을 나타내었다.
- [0326] 반응의 지속시간



[0327] 효과의 지속시간을 결정하기 위해, 24마리 마우스에 7일간 매일 50 mg의 ISIS396443을 ICV로 주사하였다. 4마리 마우스를 최종 투여 시점 (시점 0)에 희생시키고 4마리 마우스를 1주, 2주, 4주 및 8주 각각에 희생시켰다. 도 1에 나타난 바와 같이, 모든 처리된 마우스는 8주째에 효과를 갖는 다른 군과 차이를 나타내지 않으면서 RT-PCR에 의해 상당한 엑손 7 포함을 나타내었다:

[0328] 이러한 결과는 7주간 50 mg/일로 ISIS396443의 ICV 투여가 적어도 8주간의 하기 처리에 효과적임을 나타낸다.

[0329] 더 긴 시점을 조사하기 위해 실험을 반복하였다. 유형 III 마우스를 7일간 50 µg/일로 ISIS396443의 ICV 주입으로 처리하였다. 7일의 주입 기간이 종료된 후 0, 0.5, 1, 2, 4, 및 6개월째에 마우스를 희생시켰다. RNA를 척수로부터 추출하고 노던 블롯으로 분석하였다. 하기 그래프에 나타난 바와 같이, 도 2에 나타난 바와 같이, ISIS396443 주입 효과는 주입 후 6개월간 지속되었다. 이러한 효과의 긴 지속시간은 몇몇 가능한 설명을 제공한다. 이는 ISIS396443의 안정성, 교정된 SMN 단백질의 안정성 및/또는 화합물의 소실 이후에도 대사되기에 충분히 높은 용량, 이익을 제공하도록 지속된 잔여 용량을 반영할 수 있다. 따라서, 이러한 결과는 드문 용량뿐만 아니라 더 낮은 용량의 투여를 지지할 수 있다.\_\_\_\_

[0331] **실시예 5 - 계속적 뇌혈관내 (ICV) 주입에 의한 안티센스 화합물의 투여**

[0332] 미세-삼투압 펌프 (Azlet Osmotic Pumps, Cupertino, CA, USA)를 사용하여, ISIS396443을 인간 *SMN2* 형질전이 유전자를 갖는 성체 유형-III *Smn*<sup>+/−</sup> 또는 *Smn*<sup>−/−</sup> SMA 마우스 (타이완 균주)의 우측 외측 심실을 통해 뇌척수액 (CSF) 내로 전달하였다. 용량-반응 연구에서 ISIS396443의 뇌혈관내 (ICV) 주입이 식염수-처리된 마우스에서의 ~10%에 비해 척수에서 ~90%의 *SMN2* 엑손 7 포함을 증가시킴을 나타내었다. 웨스턴 블롯 및 면역조직화학적 분석은 척수 운동 뉴런에서 인간 형질전환 SMN 단백질의 강력한 증가를 입증하였다. 이러한 결과는 엑손 7의 배제가 SMA 표현형과 관련되어 있기 때문에 안티센스 올리고뉴클레오타이드 ISIS396443의 CNS 주입은 SMA 상태를 구조할 수 있음을 나타낸다.

[0334] **실시예 6: 배아 투여**

[0335] 20 mg 또는 10 mg의 ISIS396443의 단일 ICV 주사를 임신 15일째 (E15)에 배아 타이완 마우스에 투여하였다. 출생 후 7일째 (P7)에 동물을 희생시켰다. RNA를 요추 척수로부터 분리하고 RT-PCR로 분석하였다. ISIS396443의 단일 배아 투여는 상당한 엑손 7 포함을 초래하였다. 이러한 결과는 엑손 7의 배제가 SMA 표현형과 관련되어 있기 때문에 안티센스 올리고뉴클레오타이드 ISIS396443을 이용한 자궁 내 치료가 SMA 상태를 구조할 수 있음을 나타낸다.

[0336] 상기 실험을 반복하고 동물을 11주째에 희생시켰다. 비처리된 타이완 마우스에서는 괴사성 꼬리가 발생하였고, 이는 초과 시간을 단축시켰다. 도 3A에 나타난 바와 같이, 20 mg의 ISIS396443의 단일 배아 주사는 꼬리 분해의 개시를 유의미하게 지연시켰다. 이러한 결과는 SMN을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용한 배아 치료가 SMA의 발병을 지연시킴을 나타내는 것이다.

[0337] 검사 용량을 20 mg 및 10 mg의 ISIS396443으로 하고 비교용으로 정상 마우스가 연구에 포함된 것을 제외하고는, 상기 결과를 동일한 조건을 이용한 다른 연구에서 확인하였다. 실험으로부터 얻은 결과를 도 3B에 나타내었다.

[0339] **실시예 7: 델타-7 마우스 모델에서 *In vivo* 투여**

[0340] 이형접합체 (*SMN*<sup>+/-</sup>, *hSMN2*<sup>+/+</sup>, *SMNΔ*<sup>+/+</sup>) 혈통 한 쌍을 교배시키고, 출생일 (P0)에, 갓 태어난 새끼를 ISIS396443 (18-머, 서열번호. 1), ISIS396449 (15-머, 서열번호. 2), ISIS387954 (20-머, 서열번호. 7) 또는 스크램블된 대조군 ASO (ISIS439273; 18-머)로 처리하였다. 마우스에 8 mg의 총 용량 (각각의 외측 심실 내에 4 mg)을 대뇌 외측 심실 내에 양쪽으로 주사하였다. 모든 주사는 문헌 (Passini et al, *J. Virol.* (2001) 75: 12382-12392)에 기술된 바와 같이 아주 가늘게 늘린 유리 미세피펫 바늘을 이용해 수행하였다. 주사 후, 새끼들의 발가락을 자르고 유전형질을 분석하여 (Le 등, *Hum. Mol. Genet.* (2005) 14: 845-857) SMA (*SMN*<sup>-/-</sup>, *hSMN2*<sup>+/+</sup>, *SMNΔ*<sup>+/+</sup>), 이형접합체, 및 야생형 (*SMN*<sup>+/+</sup>, *hSMN2*<sup>+/+</sup>, *SMNΔ*<sup>+/+</sup>) 마우스를 식별하였다. 한 배에서 태어난 새끼 모두를 7마리 새끼로 골라내어 생존율에 대한 한 배에서 태어난 새끼 규모를 제어하였다. 한 배에서 태어난 새끼들 중



일부에는 주사하지 않아 비처리 대조군 그룹을 형성하였다.

- [0341] 18-머의 광범위한 분포 SMA 마우스에서 주사 14일 경과 후에 가슴, 요추, 및 척수 경부 영역을 포함하는 척수에서 검출되었다. 또한, ChAT를 이용한 동시-국소화 연구는 척수에서 ISIS396443에 의해 표적된 세포의 상당한 대다수가 운동 뉴런이었음을 확인하였다. 대조군 및 비처리 마우스에서는 아무런 신호가 검출되지 않았다. \_
- [0342] 14일째의 웨스턴 블롯 분석은 비처리 SMA 대조군의 10%와 비교하여, 뇌 및 척수에서 SMN의 양이 40-60% 야생형 수준이었음을 나타내었다. ASO의 스크램블 버전으로 처리된 대조군 마우스에서는 배경을 초과하는 어떠한 신호도 검출되지 않았다. 웨스턴 블롯의 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0343] SMA ASOs로 처리된 SMA 마우스 역시 비처리 SMA 마우스 또는 스크램블 ASO로 처리된 SMA 마우스와 비교하여 ASO의 길이에 상관없이 체중, 보행 기능 (직립 반사 및 쥐는 힘), 및 공동작용 (뒷다리 탈구)에 있어 현저한 증가를 나타내었다. 비처리 SMA 마우스와 비교하여 스크램블 ASO로 처리된 SMA 마우스에서는 체중, 보행 기능 (직립 반사 및 쥐는 힘), 또는 공동작용에 있어 어떠한 유의미한 증가도 관찰되지 않았다. 결과를 도 5 및 6에 나타내었다.
- [0344] 중요하게도, ASO의 길이와 상관없이 ASOs로 처리된 SMA 마우스는 도 7에 나타난 바와 같이 정중 생존율에 있어 유의미한 증가를 양산하였다. 출생 후 생존율은 비처리 SMA 대조군의 16.0일과 비교하여 31.5일 (15-머), 27.0일 (18-머), 및 28.0일 (20-머)이었다. 반면, SMA 마우스 18-머 스크램블 대조군으로 처리된 SMA 마우스는 개선된 생존율이 나타나지 않았다. 이러한 결과는 SMN 치료를 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 이용한 처리가 SMA 이환된 대상의 수명을 증가시킴을 입증하는 것이다.
- [0345] SMA ASOs는 또한 도 8에 나타난 바와 같이 척수에서 운동 뉴런 세포의 개수를 증가시킨다.
- [0346] SMN RNA를 RT-PCR로 측정하였다. SMA ASOs로 처리된 동물은 비처리 SMA 마우스에 비해 증가된 SMN RNA 수준을 가지고 있다. 비처리 SMA 마우스 대비 20-머 ASO로 처리된 마우스로부터 얻은 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0347] 생존율이 제2 용량의 투여에 의해 더욱 증가될 수 있는지 여부를 결정하기 위하여, 상기 실험을 21일째에 20 mg의 부가적인 용량으로 반복하였다. 결과를 도 10에 나타내었다. 상기 그래프는 0일째의 8 mg의 제1 용량의 효과를 나타낸다. P21일째에, 처리된 마우스의 절반에서 제2 처리가 제공되었다.
- [0348] 제1 처리만을 투여받은 마우스와 비교하여 제2 용량의 효과를 도 11에 나타내었다. 이 결과는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 이용한 제2 ICV 처리가 생존율을 더욱 증가시킴을 나타내는 것이다.

[0350] **실시예 8: SMA 유형 III 마우스에서의 활성화**

[0351] 2종의 안티센스 화합물 및 1종의 대조군 화합물을 SMA 마우스 모델에서 검사하였다. 화합물을 하기 표에 기술하였다.

타이완 균주 SMA 마우스에서 검사된 화합물			
ISIS#	서열	설명	서열번호
396443	TCACTTTCATAATGCTGG	균일 2'-MOE, 전장 PS; 18-머; 인간 SMN2의 인트론 7에 상보적	1
449220	ATTCACTTTCATAATGCTGG	균일 2-OMe; 전장 PS; 20-머; 인간 SMN2의 인트론 7에 상보적	3
439272	TTAGTPTTAATCACGCTCG	균일 2'-MOE; 전장 PS; 18-머; 대조군 서열	4

- [0352]
- [0353] SMA 유형 III 마우스의 타이완 균주를 잭슨 레보라토리 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine)로부터 입수하였다. 이들 마우스는 마우스 SMN이 결손되고 인간 SMN2에 동형접합이다 (mSMN -/-; hSMN2 +/+). 이들 마우스는 문헌 (Hsieh-Li HM, 등, *Nature Genet.* 24, 66-70, 2000)에 기술되어 있다.
- [0354] 하루에 인산염 완충 식염수 (PBS) 내 3, 10, 30, 또는 100 µg의 ISIS396443 또는 ISIS449220, 또는 하루에 인산염 완충 식염수 (PBS) 내 30 또는 100 µg의 대조군 화합물 ISIS439272를 마우스에 처리하였다. 대조군 마우스에는 PBS를 단독으로 처리하였다 (용량 0). 모든 처리는 아즐렛 (Azlet) 1007D 삼투압 펌프를 사용하여 뇌혈관내 (ICV) 주입에 의해 투여하였다. 각각의 용량에 대해 5마리씩 존재하지만, 연구가 종결되기 전에 ISIS449220의 가장 높은 용량부터 이들 마우스의 2마리를 희생시켰다. 9일째에 동물을 희생시키고 (최종 투여

후 2일째) 척수의 뇌 및 요추 절편을 각각의 동물로부터 수집하였다. 각 시료에 대해 실시간 PCR을 수행하여 엑손 7을 포함하는 인간 SMN2 메시지의 양 ((+)엑손 7)과 엑손 7이 결손된 인간 SMN2 메시지의 양 ((-)엑손 7)을 결정하였다. 또한 실시간 PCR을 수행하여 동종이식 염증인자 (AIF1) 및 글리세르알데하이드 3-포스페이트 디하이드로게나제 (GADPH)의 발현 수준을 결정하였다.

[0355] (+)엑손 7 및 (-)엑손 7의 발현 수준을 GADPH 수준으로 표준화하였다. 이어서 표준화된 발현 수준을 PBS 처리된 대조군 마우스로부터 얻은 GADPH-표준화 수준으로 나누었다. 그로부터 얻은 배수-대조군 값을 하기 표 17에 나타내었다. 결과는 3마리의 생존 마우스를 나타내는, ISIS449220의 가장 높은 용량을 제외하고는, 각 그룹 내 모든 5마리 마우스에 대해 대조군의 평균 배수를 나타낸다.

[0356] ISIS396443의 투여는 엑손 7의 포함에 있어 현저한 증가를 초래하였다. 10 µg/일에서, ISIS396443은 비처리 대조군에 비해 뇌에서는 거의 2배 (1.8배), 요추 척수에서는 2배 이상의 SMN2 메시지를 보유하는 엑손 7을 나타내었다.

화합물	용량 (µg/일)	뇌		요추 척수	
		(+)엑손 7	(-)엑손 7	(+)엑손 7	(-)엑손 7
396443 (2'-MOE)	0	1.0	1.0	1.0	1.0
	3	1.3	1.0	1.4	1.0
	10	1.8	0.7	2.1	0.6
	30	2.4	0.6	3.4	0.3
	100	3.0	0.3	3.8	0.1
449220 (2'-OMe)	0	1.0	1.0	1.0	1.0
	3	0.9	1.1	1.0	1.1
	10	1.0	1.1	1.0	1.2
	30	1.0	1.2	1.1	1.2
	100*	1.0	1.0	1.2	1.1
439272 대조군	0	1.0	1.0	1.0	1.0
	30	1.0	1.1	0.9	1.1
	100	1.0	1.0	1.0	1.0

[0357] \* 이 용량에 대해서는 단지 3마리 마우스로부터 얻은 결과임

[0360] 동종이식 염증인자 (AIF1)의 발현을 염증의 척도로서 검사하였다. GADPH에 대한 모든 시료의 표준화 후, 각 처리 그룹의 AIF1 비율을 PBS 대조군의 값으로 나누었다. ISIS396443은 가장 높은 용량에서도 AIF1의 발현을 증가시키지 않았다. ISIS449220은 뇌 및 요추 척수 모두에서 AIF1 발현을 증가시켰다. 표 18의 결과는 3마리의 생존 마우스를 나타내는, ISIS449220의 가장 높은 용량을 제외하고는, 각 그룹 내 모든 5마리 마우스에 대해 대조군의 평균 배수를 나타낸다.

화합물	용량 (µg/일)	AIF-1/GADPH	
		뇌	요추
396443 (2'-MOE)	0	1.0	1.0
	3	1.0	1.0
	10	1.1	1.2
	30	1.0	1.0
	100	0.9	1.0
449220 (2'-OMe)	0	1.0	1.0
	3	1.0	1.0
	10	1.0	1.8
	30	1.2	2.9
	100*	1.8	3.3
439272 대조군	0	0.9	0.9
	30	0.9	1.0
	100	0.9	1.2

[0361] - 35 -

[0362] \* 이 용량에 대해서는 단지 3마리 마우스로부터 얻은 결과임

[0364] **실시예 9: 원숭이에의 투여**

[0365] 사이노몰거스 (Cynomolgus) 원숭이를 대상으로 다른 투여 용량 및 경로에서 ISIS395443의 분포를 평가하였다. ISIS396443을 2마리 원숭이에게 투여하였다. 1마리 원숭이에는 ICV 주입으로 3 mg의 용량을 투여하였고 다른 1마리 원숭이에는 IT 주입으로 3 mg의 용량을 투여하였다. 2 경우의 주입 모두 24시간에 걸쳐서 전달되었다. 원숭이들을 희생시키고 주입기의 종료 96시간 후에 조직을 채취하였다. ISIS396443의 농도를 척수의 경부, 가슴, 및 요추 절편으로부터 얻은 시료에서 측정하였다. 결과를 하기 표에 나타내었다.

동물 #	용량	경로	조직	ISIS396443의 농도 ( $\mu\text{g/g}$ )
1	24시간에 걸쳐 3 mg	ICV 주입	경부	21.5
			가슴	9.4
			요추	23.9
2	24시간에 걸쳐 3 mg	IT 주입	경부	12.5
			가슴	22.6
			요추	42.6

[0366] 사이노몰거스 원숭이는 대략 3 kg으로, 이 용량은 약 1 mg/kg이다.

[0368] ISIS39644의 분포를 더욱 평가하기 위하여, 26마리 원숭이를 하기 표에 나타난 바와 같이 6 그룹으로 나누었다.

그룹	용량	경로	화합물의 농도 ( $\text{mg/ml}$ )	주입 지속시간	희생된 시기	원숭이 마리수
1	0	ICV	0	14일	19일째	2M/2F
2	3 mg	ICV	0.09	14일	19일째	2M/2F
3	3 mg	IT	1.25	1일	6일째	3M/2F
4	3 mg	IT	0.42	3일	8일째	2M/2F
5	3 mg	IT	0.18	7일	12일째	3M/2F
6	3 mg	IT	0.09	14일	19일째	2M/2F

[0369] 모든 그룹에 대한 주입 속도는 100  $\mu\text{l}$ /시간이었다. 모든 원숭이는 식염수만을 투여한 그룹 1을 제외하고는, 식염수 중의 총 3 mg의 ISIS39644를 투여하였다. 원숭이들을 희생시키고 주입 종료 5일 후에 조직을 채취하였다.

[0371] 원숭이로부터 얻은 조직 시료 내 ISIS39644의 농도를 표준 기술을 이용하여 평가하였다. 결과를 요약하여 도 12의 그래프에 나타내었다. 시료를 또한 조직학적으로 평가하였다. 조직학에서는 ISIS396443 처리 및 만성적인 존재의 임의의 역효과가 나타나지 않았다. 푸르킨에 세포 소실의 증거가 나타나지 않았다.

[0372] 신속한 주입이 더딘 주입보다 더 ISIS396443을 유지하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 더 신속한 주입 속도 또는 볼루스 주사가 특정 실시양태에서 바람직할 수 있음을 제안한다. 볼루스 투여는 주입에 비해 특정한 실용적인 이점을 가지기 때문에, 특정 실시양태에서, 이는 CSF 내로의 투여의 바람직한 방법이다. 특정 실시양태에서, CSF 내로의 투여의 바람직한 방법은 볼루스 IT 주사에 의한 것이다.

[0374] **실시예 10: 중증 SMA 마우스 모델의 제조 및 ICV 처리**

[0375] 중증 SMA 표현형을 갖는 마우스 (sSMA 마우스)를 제조하였다. 동형접합 sSMA 마우스는 2 카피의 인간 SMN2를 보유하지만 마우스 SMN은 보유하지 않는다. 평균 수명은 약 10일이다. 또한, SMA 마우스는 더 작고 더 짧은 꼬리를 갖는다. 이형접합체는 마우스 SMN을 보유하고 정상적으로 발육한다.

[0376] 이들 sSMA 마우스에서 안티센스 화합물의 효과를 연구하기 위하여, 20  $\mu\text{g}$ 의 ISIS396443을 P1째에 ICV로 주사하였다. 처리 결과, 평균 생존일이 9.9일 (식염수 처리된 대조군)에서 16.7일로 증가하였다. RT-PCR 분석은 처리된 마우스로부터 얻은 조직 내에서 전장의 SMN RNA의 증가를 나타내었다.

[0378] **실시예 11: ISIS 396443의 전신 투여**

[0379] sSMA 마우스 및 건강한 이형접합체 대조군 마우스를 하기와 같이 그룹으로 나누어 일시 ICV 주사 및/또는 볼루스 피하 주사 (SC)에 의한 ISIS396443의 효과를 연구하였다:

[0380] 그룹 1 - ICV + SC

[0381] 20 µg의 1회 ICV 주사가 P1 또는 P2 (출생 후 1일째 또는 2일째)에 전달되고; 및 50 µg/g의 2회 피하 주사가 P0 및 P3 사이에 전달됨.

[0382] 그룹 2 - SC + SC

[0383] 50 µg/g의 2회 SC 주사가 P0 및 P3 사이에 전달되고; 50 µg/g의 1회 피하 주사가 P5 및 P6 사이에 전달되며; 50 µg/g의 피하 주사가 P9 및 P10 사이에 전달됨.

[0384] 그룹 3 - SC

[0385] 50 µg/g의 2회 SC 주사가 P0 및 P3 사이에 전달됨.

[0386] 그룹 4 - SMA 식염수 대조군

[0387] 식염수의 1회 ICV 주사가 P1 또는 P2 사이에 전달되고; 식염수의 2회 피하 주사가 P0 및 P3 사이에 전달됨.

[0388] 그룹 5 - 이형접합 대조군

[0389] 20 µg의 1회 ICV 주사가 P1 또는 P2 사이에 전달되고; 50 µg/g의 2회 피하 주사가 이형접합 마우스의 P0 및 P3 사이에 전달됨.

[0391] 각 그룹에는 14 내지 22마리의 마우스가 포함되었다. 각 마우스에 대한 생존율 (일수로 계산됨)을 하기 표에 나타내었다. 이 연구에서 다수의 마우스가 본 특허 출원이 작성되고 있는 시점에 모두 생존하였다. 따라서, ">"에 의해 진행되는 값은 마우스가 그 일수만큼 생존하였고 여전히 살아있음을 나타내는 것이다.

마우스	그룹 1 ICV+SC	그룹 2 SC+SC	그룹 3 SC	그룹 4 식염수	그룹 5 이형접합체
1	> 141	> 130	> 103	8	> 146
2	> 141	127	94	8	> 146
3	22	> 114	61	8	> 146
4	> 140	73	> 103	8	> 146
5	117	27	> 103	8	> 145
6	> 124	27	> 103	8	> 145
7	> 111	18	34	8	> 145
8	> 111	> 102	26	8	> 145
9	> 111	> 98	31	8	> 145
10	> 111	> 98	69	9	> 144
11	29	> 102	69	9	> 144
12	> 110	> 102	67	9	> 144
13	> 110	> 102	> 91	9	> 144
14	> 110	> 102	> 90	9	> 143
15	> 110	ND	> 90	9	> 143
16	> 108	ND	> 90	9	> 143
17	> 108	ND	> 90	10	> 129
18	> 109	ND	86	10	> 129
19	18	ND	> 75	10	> 129
20	ND	ND	69	10	ND
21	ND	ND	18	11	ND
22	ND	ND	> 71	12	ND
23	ND	ND	ND	12	ND
24	ND	ND	ND	13	ND
25	ND	ND	ND	13	ND
26	ND	ND	ND	14	ND

[0392]

[0393] 실시예 12: 투여의 용량-반응

[0394] 피하로 ISIS396443의 다른 용량을 투여받은 sSMA 마우스의 생존율을 하기 투여 그룹으로 나누어 평가하였다.



- [0395] 그룹 1-SC400 (80 mg/kg 내지 180 mg/kg의 용량 범위)
- [0396] 마우스당 총 400  $\mu\text{g}$ 의 2회 SC 주사가 P0 및 P3 사이에 전달되는데, 제1 용량은 P0 또는 P1에서 150  $\mu\text{g}$  (3  $\mu\text{l}$ 의 부피)이었고 제2 용량은 P2 또는 P3에 전달된 250  $\mu\text{g}$ 이었다 (5  $\mu\text{l}$ 의 부피).
- [0397] 그룹 2-SC200 (40 mg/kg 내지 90 mg/kg의 용량 범위)
- [0398] 마우스당 총 200  $\mu\text{g}$ 의 2회 SC 주사가 P0 및 P3 사이에 전달되는데, 제1 용량은 P0-P1에서 75  $\mu\text{g}$ 이었고 (1.5  $\mu\text{l}$ 의 부피) 제2 용량은 P2 또는 P3에 전달된 125  $\mu\text{g}$ 이었다 (2.5  $\mu\text{l}$ 의 부피).
- [0399] 그룹 3-SC100 (20 mg/kg 내지 45 mg/kg의 용량 범위)
- [0400] 마우스당 총 100  $\mu\text{g}$ 의 2회 SC 주사가 P0 및 P3 사이에 전달되는데, 제1 용량 P0 또는 P1에서 40  $\mu\text{g}$ 이었고 (2  $\mu\text{l}$ 의 부피) 제2 용량은 P2 또는 P3에 전달된 60  $\mu\text{g}$ 이었다 (3  $\mu\text{l}$ 의 부피).
- [0401] 그룹 4-SMA 식염수 (음성 대조군)
- [0402] 식염수의 2회 SC 주사가 P0 및 P3 사이에 전달되는데, 제1 용량은 P0 또는 P1에 (5  $\mu\text{l}$ 의 부피), 제2 용량은 P2 또는 P3에 (5  $\mu\text{l}$ 의 부피) 전달되었다.
- [0403] 그룹 5 - 이형접합 대조군 (양성 대조군)
- [0404] 어떠한 처리도 하지 않은 마우스.

[0406] 각 그룹에는 14 내지 26마리의 마우스가 포함되었다. 각 마우스에 대한 생존율 (일수로 계산됨)을 하기 표에 나타내었다. 이 연구에서 다수의 마우스가 본 특허 출원이 작성되고 있는 시점에 모두 생존하였다. 따라서, ">"에 의해 진행되는 값은 마우스가 그 일수만큼 생존하였고 여전히 살아있음을 나타내는 것이다.

마우스	그룹 1 SC400	그룹 2 SC200	그룹 3 SC100	그룹 4 식염수	그룹 5 이형접합체
1	> 82	>93	11	8	> 87
2	> 82	>91	11	8	> 87
3	> 82	>91	11	9	> 87
4	> 82	> 91	11	9	> 87
5	> 82	14	11	9	> 87
6	> 82	25	12	9	> 87
7	> 82	92	18	9	> 86
8	> 82	>93	19	9	> 86
9	> 82	>93	22	9	> 86
10	> 82	> 90	69	9	> 86
11	> 82	> 90	> 77	9	> 86
12	> 80	> 91	> 77	10	> 86
13	> 80	> 91	> 77	10	> 86
14	25	> 90	> 77	10	> 86
15	ND	> 90	> 75	10	> 85
16	ND	> 90	> 74	11	> 85
17	ND	86	> 74	11	> 85
18	ND	> 90	> 74	12	ND
19	ND	> 52	> 74	12	ND
20	ND	ND	> 74	13	ND
21	ND	ND	> 74	13	ND
22	ND	ND	>71	13	ND
23	ND	ND	>49	13	ND
24	ND	ND	>49	14	ND
25	ND	ND	>49	15	ND
26	ND	ND	23	ND	ND

[0407]

[0408] 실시예 13: ICV 주입 대 ICV 블루스

[0409] 뇌혈관내 블루스 주사 (ICV 블루스)에 의한 투여를 계속적 뇌혈관내 주입 (ICV 주입)에 의한 투여와 비교하였다. SMA 유형 III 형질전환 마우스에 ISIS387954를 투약하였다. ICV 주입 마우스에는 0 (PBS 대조군), 87.5  $\mu\text{g}$ , 175  $\mu\text{g}$ , 350  $\mu\text{g}$ , 또는 700  $\mu\text{g}$ 의 총 용량이 7일에 걸쳐 주입되게 투여하고 그로부터 2일 후에 동물을 희생시켰다. ICV 블루스 마우스에는 단일 ICV 주사로 0 (PBS 대조군), 87.5  $\mu\text{g}$ , 175  $\mu\text{g}$ , 350  $\mu\text{g}$ , 또는



700  $\mu\text{g}$ 의 동일 총 용량을 투여하고 그로부터 9일 후에 동물을 희생시켰다. 각 그룹에는 5마리 마우스가 존재하였다. RNA를 요추 척수로부터 추출하여 실시간 PCR로 분석하였다. 인트론 7 포함을 식염수-처리된 대조군에 대해 표준화하였다. 결과를 하기 표에 요약하였다.

그룹	용량	PBS에 대한 인트론 7 포함의 배수 증가
1	PBS (대조군)	1.0
2	7일에 걸쳐 ICV 주입에 의한 87.5 $\mu\text{g}$	2.1
3	7일에 걸쳐 ICV 주입에 의한 175 $\mu\text{g}$	2.4
4	7일에 걸쳐 ICV 주입에 의한 350 $\mu\text{g}$	3.2
5	7일에 걸쳐 ICV 주입에 의한 700 $\mu\text{g}$	3.6
6	PBS (대조군)	1.0
7	ICV 볼루스에 의한 87.5 $\mu\text{g}$	3.1
8	ICV 볼루스에 의한 175 $\mu\text{g}$	3.7
9	ICV 볼루스에 의한 350 $\mu\text{g}$	3.8
10	ICV 볼루스에 의한 700 $\mu\text{g}$	3.8

[0410]

[0411]

이 실험에서, 동일한 용량이 7일에 걸쳐 ICV 주입에 의해 전달될 때보다 ICV 볼루스 주사에 의해 전달될 때 더 우수한 활성을 나타내었다.

[0412]

또한 실시간 PCR을 수행하여 동종이식 염증인자 (AIF1)의 발현 수준을 결정함으로써 염증을 평가하였다. 처리된 마우스 유래 시료 중 어느 것에서도 대조군 마우스와 유의미한 차이가 나타나지 않았다.

[0414]

**실시예 14: ICV 볼루스에 의한 용량-반응**

[0415]

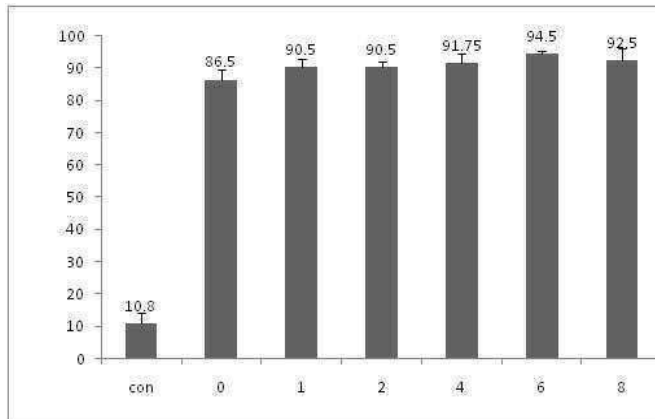
뇌혈관내 볼루스에 의한 투여를 부가적인 용량에서 검사하였다. 실시예 13에 기재된 바와 같이 형질전환 마우스에 0, 10.9  $\mu\text{g}$ , 21.9  $\mu\text{g}$ , 43.4  $\mu\text{g}$ , 87.5  $\mu\text{g}$ , 또는 175  $\mu\text{g}$ 의 ISIS387954를 단일 볼루스 ICV 주사에 의해 투여하고 그로부터 9일 후에 동물을 희생시켰다. 뇌 및 요추 척수로부터 시료를 채취하였다. RNA를 준비하여 인트론 7 포함의 변화 및 AIF1의 변화에 대해 RT-PCR로 분석하였다. 시료 중 어느 것도 대조군에 비해 AIF1의 변화를 나타내지 않았다. 인트론 7 포함의 결과를 하기 표에 요약하였다. ED<sub>50</sub>은 대략 22  $\mu\text{g}$ 이다.

그룹	용량	PBS에 대한 인트론 7 포함의 배수 증가	
		뇌	요추 척수
1	PBS (대조군)	1.0	1.0
2	ICV 볼루스에 의한 10.9 $\mu\text{g}$	2.4	2.2
3	ICV 볼루스에 의한 21.9 $\mu\text{g}$	2.8	2.7
4	ICV 볼루스에 의한 43.4 $\mu\text{g}$	3.2	3.4
5	ICV 볼루스에 의한 87.5 $\mu\text{g}$	3.5	3.4
6	ICV 볼루스에 의한 175 $\mu\text{g}$	4.4	3.7

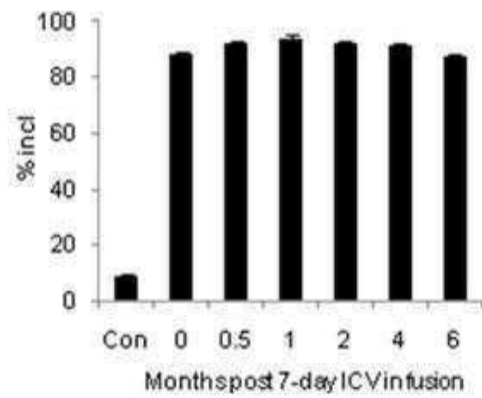
[0416]

도면

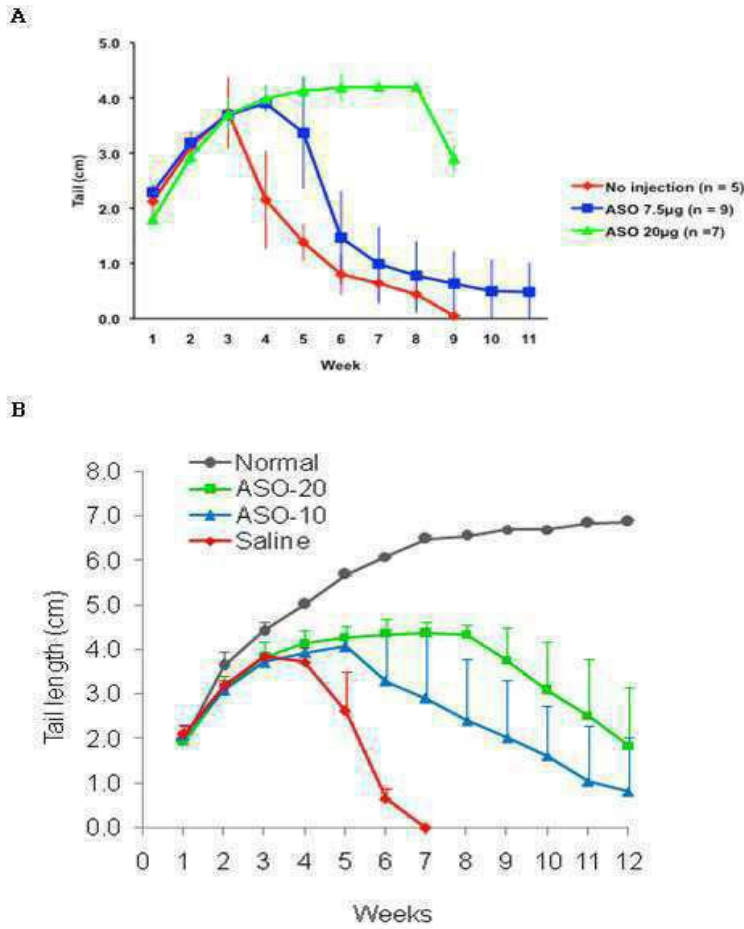
도면1



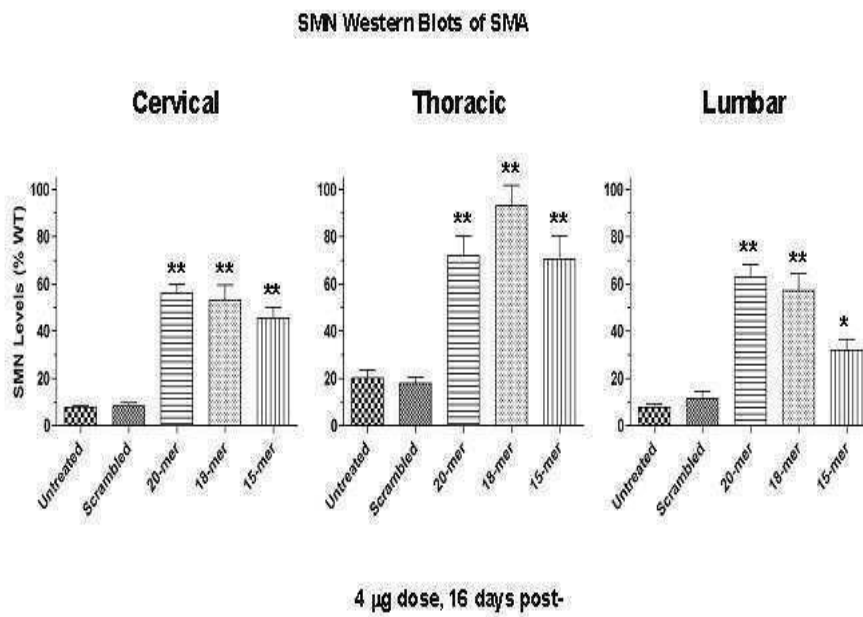
도면2



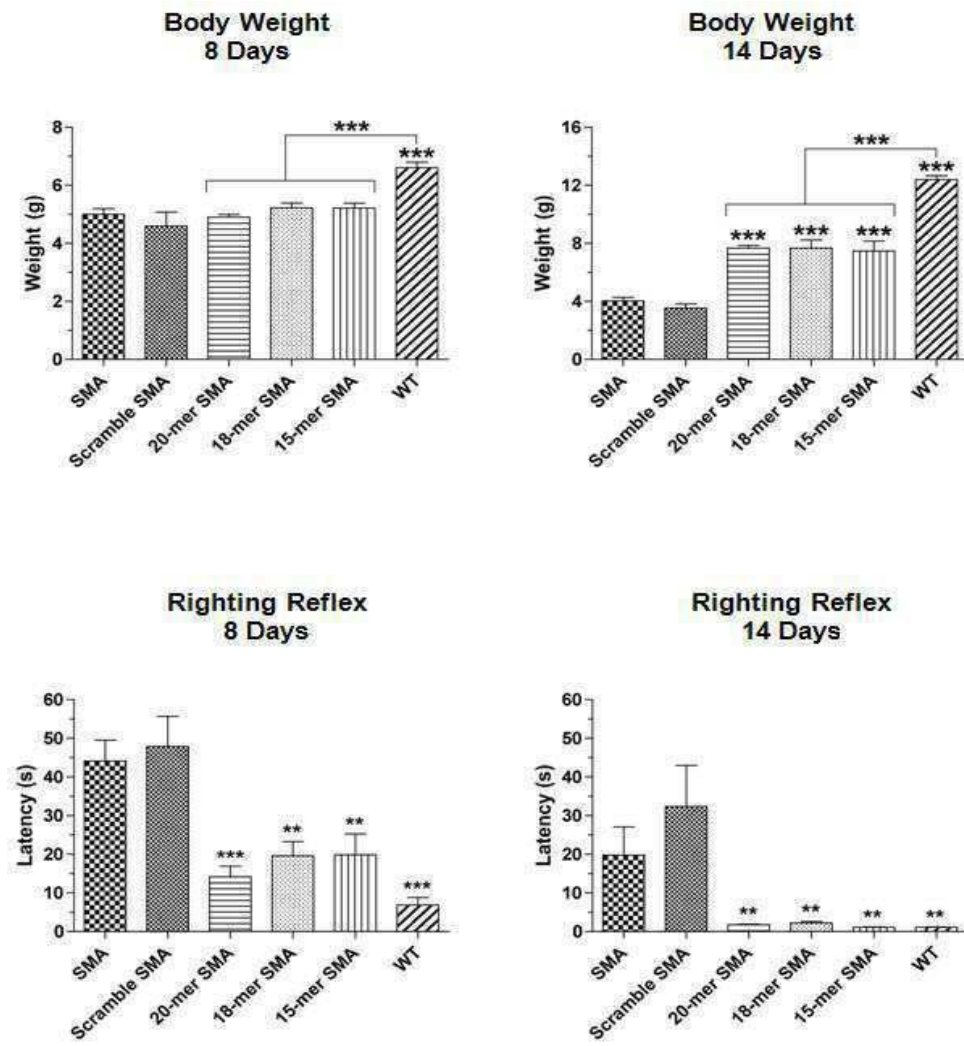
도면3



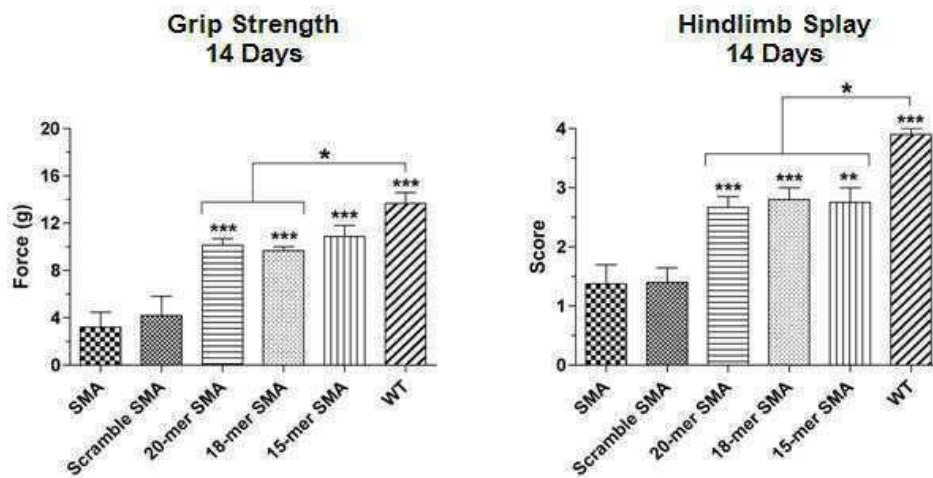
도면4



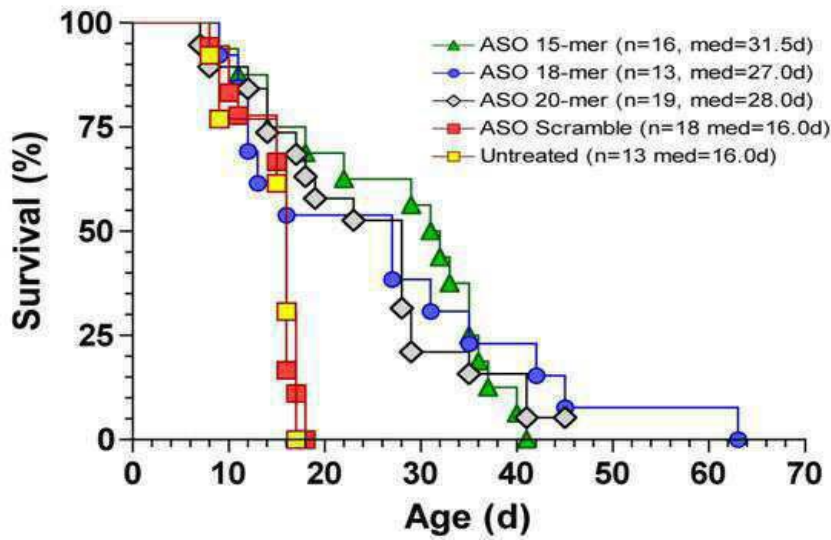
도면5



도면6

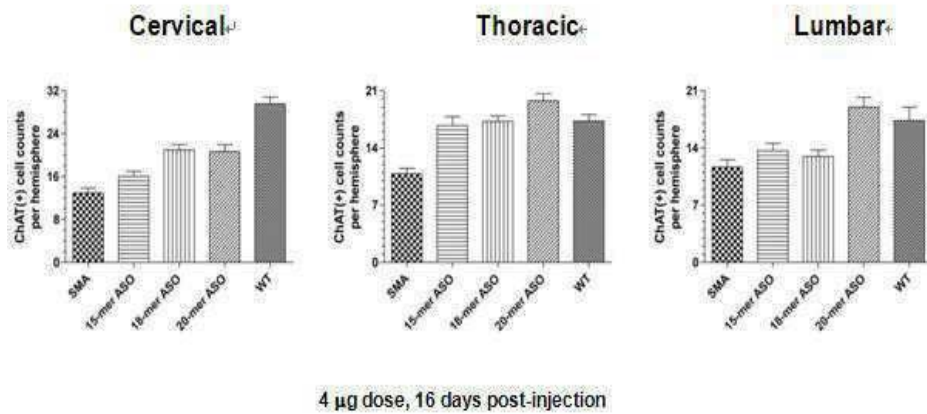


도면7

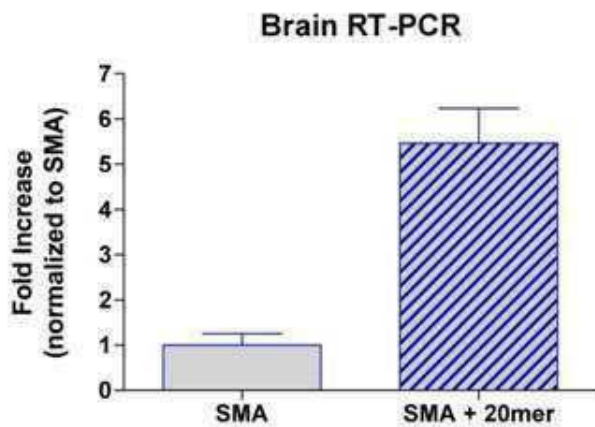


도면8

ASO Treatment Increases Motor Neuron Cell Counts in the Spinal Cord



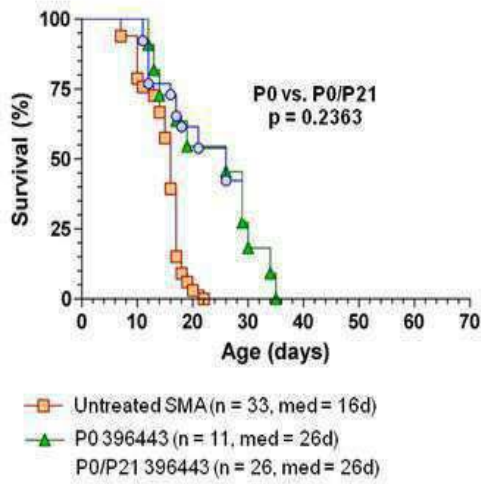
도면9



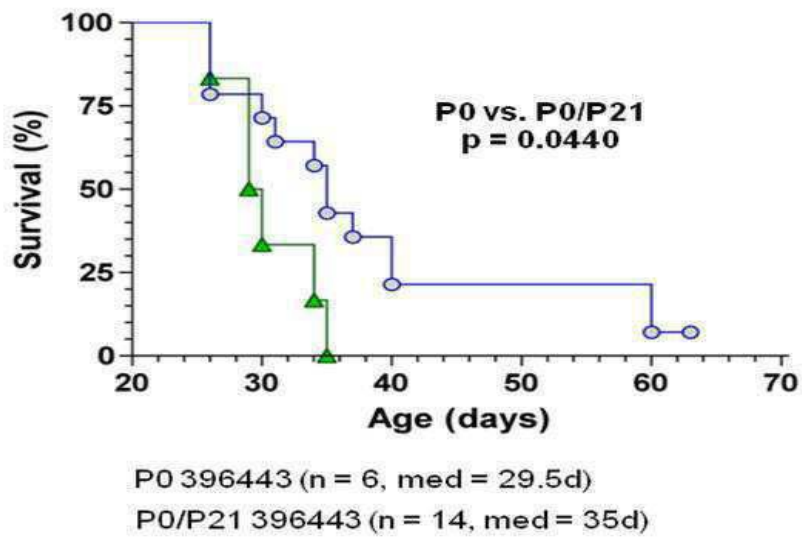


도면10

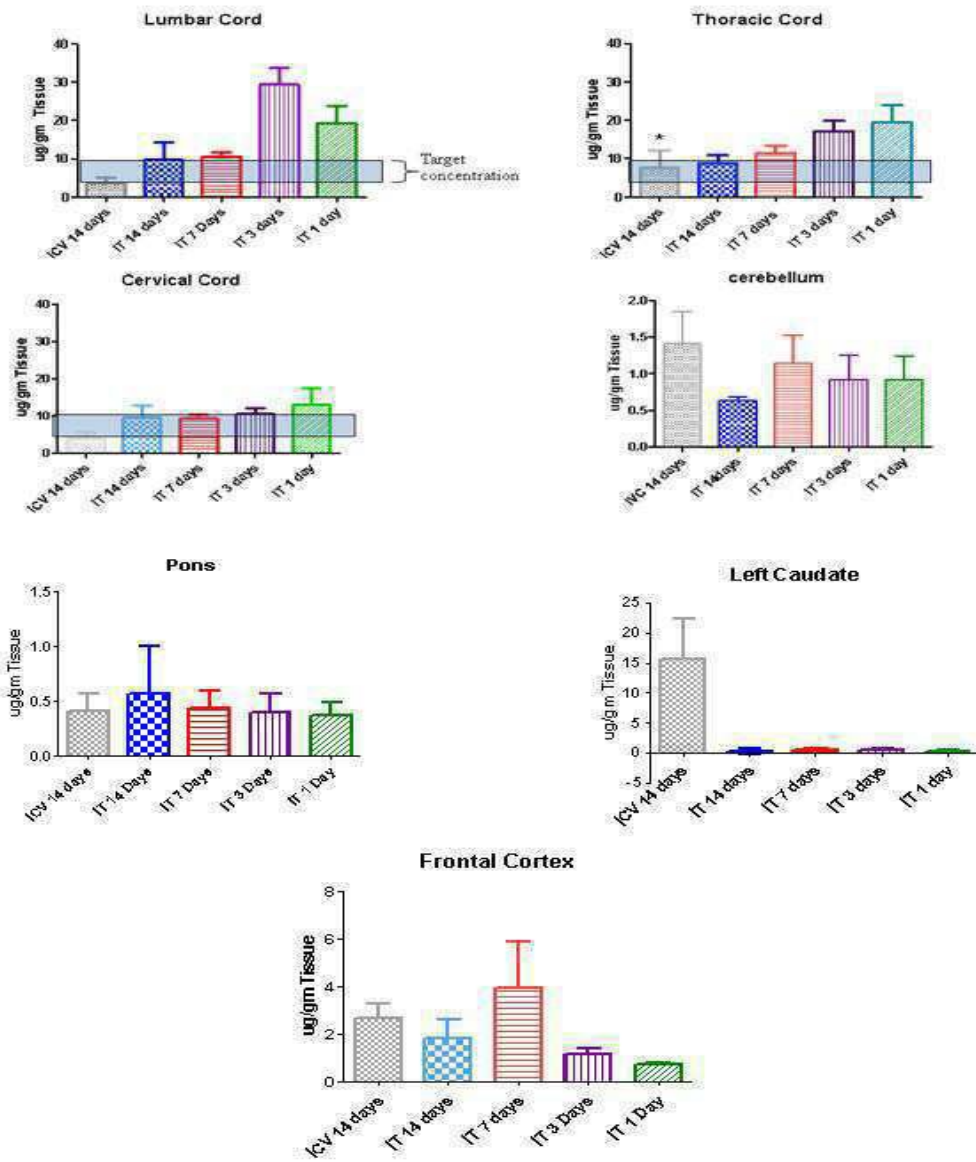
Injections of 396443 at P0 (8 ug) and P21 (20 ug) vs. P0 alone (8 ug)



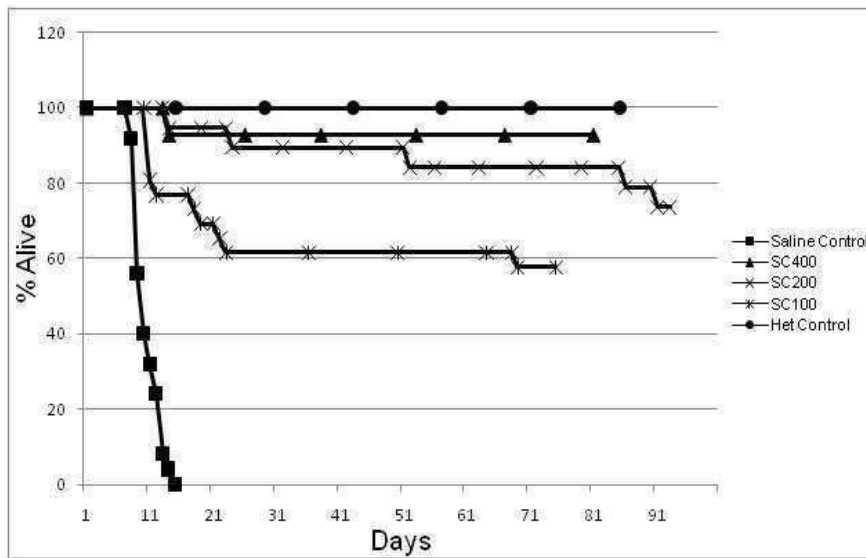
도면11



도면12



도면13



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

Genzyme Corporation

Cold Spring Harbor Laboratory

C. Frank Bennett

Gene Hung

Frank Rigo

Adrian R. Krainer

Yimin Hua

Marco Passini

Lamya Shihabuddin

Seng H. Cheng

Katherine W. Klinger

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATION

OF SMN2 SPLICING

<130> CORE0086WO

<150> 61/218,031

<151> 2009-06-17

<160> 24

<170>

FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 1  
 tcactttcat aatgctgg 18  
 <210> 2  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 2  
 tttcataatg ctggc 15  
 <210> 3  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400>  
 > 3  
 tgctggcaga cttac 15  
 <210> 4  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 4  
 cataatgctg gcaga 15  
 <210> 5  
 <211> 15  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 5  
 tcataatgct ggcag 15  
 <210> 6  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 6  
 ttcataatgc tggca 15  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 7  
 attcactttc ataatgctgg 20  
 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 8  
 ctttcataat gctgg 15  
 <210> 9  
 <211> 12  
 <212>  
 > DNA  
 <213> Artificial Sequence



<220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 9  
 tcataatgct gg 12  
 <210> 10  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 10  
 actttcataa tgctg 15  
 <210> 11  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 11  
 ttcataatgc tg 12  
  
 <210> 12  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 12  
 cactttcata atgct 15  
 <210> 13  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 13  
 ttccataatg ct 12

<210> 14  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 14  
 tcactttcat aatgc 15

<210> 15  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 15  
 ctttcataat gc 12

<210> 16  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 16  
 ttcactttca taatg 15

<210> 17  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 17

actttcataa tg	12
<210> 18	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 18	
attcactttc ataataat	15
<210> 19	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 19	
cactttcata at	12
<210> 20	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 20	
gattcacttt cataa	15
<210> 21	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 21	
tcactttcat aa	12

<210> 22  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 22  
 ttcactttca ta 12  
 <210> 23  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 23  
 attcactttc at 12  
  
 <210> 24  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Oligonucleotide  
 <400> 24  
 agtaagattc acttt 15