



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118475355 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 09

(21) 申请号 202280047890.4

(22) 申请日 2022.07.08

(30) 优先权数据

2021-113563 2021.07.08 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.01.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/027104 2022.07.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/282345 JA 2023.01.12

(71) 申请人 日本新药株式会社

地址 日本京都府

(72) 发明人 堀内贵至

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277

专利代理师 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.

A61K 31/70 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

A61P 39/02 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01)

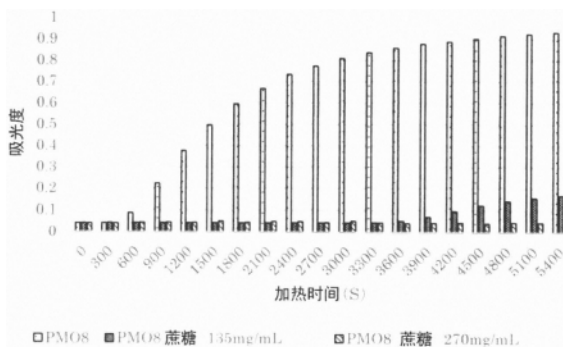
权利要求书2页 说明书22页
序列表(电子公布) 附图10页

(54) 发明名称

肾毒性减轻剂

(57) 摘要

[课题]一实施方式中,本发明的课题在于提供:包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性减轻剂、用于减轻该药物组合物的肾毒性的方法。[解决手段]一实施方式中,本发明涉及肾毒性减轻剂,其为包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性减轻剂,所述肾毒性减轻剂包含不为葡萄糖的糖,且以上述药物组合物中的糖的浓度成为1mg/mL~400mg/mL的量来使用。



1. 一种肾毒性减轻剂,其为包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性减轻剂,所述肾毒性减轻剂包含不为葡萄糖的糖,且以所述药物组合物中的糖的浓度成为1mg/mL ~ 400mg/mL的量来使用。

2. 根据权利要求1所述的肾毒性减轻剂,其以所述药物组合物中的糖的浓度成为5mg/mL ~ 340mg/mL的量来使用。

3. 根据权利要求1或2所述的肾毒性减轻剂,其中,所述药物组合物中的反义低聚物的浓度为0.5mg/mL ~ 200mg/mL。

4. 一种肾毒性减轻剂,其为包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性减轻剂,所述肾毒性减轻剂包含不为葡萄糖的糖,且以设反义低聚物为1时糖的重量比成为0.05 ~ 30的量来使用。

5. 根据权利要求4所述的肾毒性减轻剂,其以设反义低聚物为1时糖的重量比成为0.1 ~ 13.3的量来使用。

6. 根据权利要求1 ~ 5中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,糖为二糖类的糖。

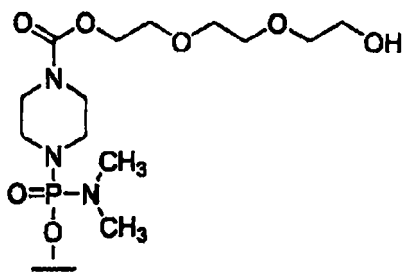
7. 根据权利要求1 ~ 6中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,糖为蔗糖。

8. 根据权利要求1 ~ 6中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,糖为海藻糖。

9. 根据权利要求1 ~ 8中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,反义低聚物为吗啉代低聚物。

10. 根据权利要求1 ~ 9中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,反义低聚物为磷酸二胺吗啉代低聚物。

11. 根据权利要求1 ~ 10中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,反义低聚物的5' 末端为下述化学式(1) ~ (2)中任意的基团:



(1)



(2)

12. 根据权利要求1 ~ 11中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,所述反义低聚物在其碱基序列中包含4个连续的嘌呤碱基。

13. 根据权利要求12所述的肾毒性减轻剂,其中,所述4个连续的嘌呤碱基中的至少2个为鸟嘌呤。

14. 根据权利要求1 ~ 13中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,所述反义低聚物包含选自自由序列号1 ~ 12组成的组中的碱基序列。

15. 一种用于减轻包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性的方法,其包括:以所述药物组合物中的糖的浓度成为1mg/mL ~ 400mg/mL的量添加不为葡萄糖的糖。

16. 一种用于在给予了反义低聚物的对象中减轻反义低聚物的肾毒性的方法,其包括

向所述对象给予不为葡萄糖的糖,以设反义低聚物为1时糖的重量比成为0.05~30的量来给予。

17.一种药物组合物,其为包含反义低聚物的减轻了肾毒性的药物组合物,其以1mg/mL~400mg/mL的浓度包含肾毒性减轻剂,所述肾毒性减轻剂包含不为葡萄糖的糖。

肾毒性减轻剂

技术领域

[0001] 本发明涉及:包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性减轻剂、用于减轻该药物组合物的肾毒性的方法、包含反义低聚物的减轻了肾毒性的药物组合物等。

背景技术

[0002] 反义低聚物是与作为靶标的mRNA和mRNA前体序列特异性杂交的核酸。反义低聚物通过mRNA和mRNA前体的分解、外显子跳跃、外显子包含、翻译抑制等而发挥其作用,并用作一些疾病的治疗药。例如,日本特开2015-91229(专利文献1)公开了一种反义核酸,其通过使具有SVA型逆转录转座子的插入突变的Fukutin基因的异常剪接正常化,从而能够治疗福山型肌营养不良症等。

[0003] 然而,关于反义低聚物,已知的是:例如吗啉代低聚物聚集于肾脏(非专利文献1、图2);给予吗啉代低聚物而表现出肾毒性(非专利文献2、图3、表5);给予吗啉代低聚物而在肾脏肾小管中确认到嗜碱性物质(非专利文献3、图1)。避免该肾毒性和肾小管内的嗜碱性物质的出现的方法不明确。另一方面,已知的是:对于相较于单体形态而言在聚集体形态下具有更高毒性的寡核苷酸,通过使用使聚集崩解的甘露醇等化学物种并进行加热,从而能够抑制在治疗用寡核苷酸制剂中形成多聚体(专利文献2);液体制剂中的糖、糖醇类抑制寡核苷酸的聚集(专利文献3)。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特开2015-91229

[0007] 专利文献2:国际公开2002/036767

[0008] 专利文献3:国际公开2010/009038

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1:Heemskerk HA,de Winter CL,de Kimpe SJ,van Kuik-Romeijn P,Heuvelmans N,Platenburg GJ,van Ommen GJ,van Deutekom JC,Aartsma-Rus A. In vivo comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping. *J Gene Med.* 2009 Mar;11(3):257-66. doi:10.1002/jgm.1288.

[0011] 非专利文献2:Sazani P,Ness KP,Weller DL,Poage D,Nelson K,Shrewsbury AS. Chemical and mechanistic toxicology evaluation of exon skipping phosphorodiamidate morpholino oligomers in mdx mice. *Int J Toxicol.* 2011 May;30(3):322-33. doi:10.1177/1091581811403504. Epub 2011 May 3.

[0012] 非专利文献3:Carver MP,Charleston JS,Shanks C,Zhang J,Mense M,Sharma AK,Kaur H,Sazani P. Toxicological Characterization of Exon Skipping Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers (PMOs) in Non-human Primates. *J Neuromuscul Dis.* 2016 Aug 30;3(3):381-393. doi:10.3233/JND-160157.

发明内容

[0013] 发明要解决的问题

[0014] 以往,已知含有反义低聚物的药物组合物存在肾毒性的问题。在这样的状况下,期望提供经改善的包含反义低聚物的药物组合物。

[0015] 用于解决问题的方案

[0016] 即,本发明提供:以下记载的包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性减轻剂、用于减轻该药物组合物的肾毒性的方法、包含反义低聚物的减轻了肾毒性的药物组合物等。

[0017] (1) 一种肾毒性减轻剂,其为包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性减轻剂,所述肾毒性减轻剂包含不为葡萄糖的糖,且以上述药物组合物中的糖的浓度成为1mg/mL ~ 400mg/mL的量来使用。

[0018] (2) 根据(1)所述的肾毒性减轻剂,其中,以上述药物组合物中的不为葡萄糖的糖的浓度成为5mg/mL ~ 340mg/mL的量来使用。

[0019] (3) 根据(1)或(2)所述的肾毒性减轻剂,其中,上述药物组合物中的反义低聚物的浓度为0.5mg/mL ~ 200mg/mL。

[0020] (4-1) 一种肾毒性减轻剂,其为包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性减轻剂,所述肾毒性减轻剂包含不为葡萄糖的糖,且以设反义低聚物为1时糖的重量比成为0.05 ~ 30的量来使用。

[0021] (4-2) 根据(4-1)所述的肾毒性减轻剂,其中,上述药物组合物和肾毒性减轻剂分别进行给予。

[0022] (5) 根据(4-1)或(4-2)所述的肾毒性减轻剂,其中,以设反义低聚物为1时糖的重量比成为0.1 ~ 13.3的量来使用。

[0023] (6) 根据(1) ~ (5)中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,糖为二糖类的糖。

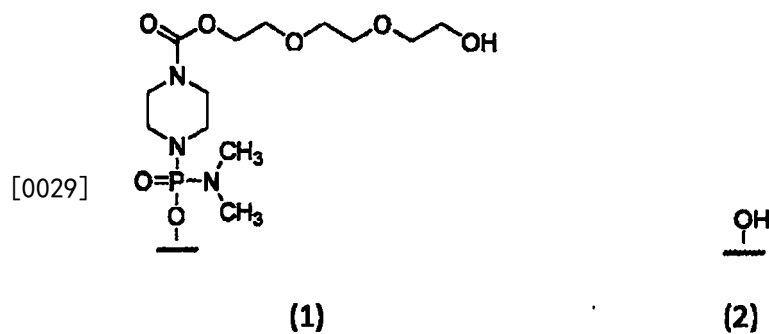
[0024] (7) 根据(1) ~ (6)中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,糖为蔗糖。

[0025] (8) 根据(1) ~ (6)中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,糖为海藻糖。

[0026] (9) 根据(1) ~ (8)中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,反义低聚物为吗啉代低聚物。

[0027] (10) 根据(1) ~ (9)中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,反义低聚物为磷酸二胺吗啉代低聚物。

[0028] (11) 根据(1) ~ (10)中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,反义低聚物的5'末端为下述化学式(1) ~ (2)中的任意的基团:



[0030] (12) 根据(1) ~ (11)中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,上述反义低聚物在其碱

基序列中包含4个连续的嘌呤碱基。

[0031] (13) 根据(12)所述的肾毒性减轻剂,其中,上述4个连续的嘌呤碱基中的至少2个为鸟嘌呤。

[0032] (14) 根据(1)~(13)中任一项所述的肾毒性减轻剂,其中,上述反义低聚物包含选自自由序列号1~12组成的组中的碱基序列。

[0033] (15-1) 一种用于减轻包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性的方法,其包括:以上述药物组合物中的糖的浓度成为1mg/mL~400mg/mL的量添加不为葡萄糖的糖。

[0034] (15-2) 根据(15-1)所述的方法,其中,以上述药物组合物中的糖的浓度成为5mg/mL~340mg/mL的量添加不为葡萄糖的糖。

[0035] (15-3) 根据(15-1)或(15-2)所述的方法,其中,上述药物组合物中的反义低聚物的浓度为0.5mg/mL~200mg/mL。

[0036] (16-1) 一种用于在给予了反义低聚物的对象中减轻反义低聚物的肾毒性的方法,其包括向上述对象给予不为葡萄糖的糖,以设反义低聚物为1时糖的重量比成为0.05~30的量来给予。

[0037] (16-2) 根据(16-1)所述的方法,其中,上述反义低聚物和上述糖分别进行给予。

[0038] (16-3) 根据(16-1)或(16-2)所述的方法,其中,以设反义低聚物为1时糖的重量比成为0.1~13.3的量来使用糖。

[0039] (17-1) 一种药物组合物,其为包含反义低聚物的减轻了肾毒性的药物组合物,其以1mg/mL~400mg/mL的浓度包含肾毒性减轻剂,所述肾毒性减轻剂包含不为葡萄糖的糖。

[0040] (17-2) 根据(17-1)所述的药物组合物,其以5mg/mL~340mg/mL的浓度包含肾毒性减轻剂,所述肾毒性减轻剂包含不为葡萄糖的糖。

[0041] (17-3) 根据(17-1)或(17-2)所述的药物组合物,其中,上述药物组合物中的反义低聚物的浓度为0.5mg/mL~200mg/mL。

[0042] (18) 根据(15-1)~(17-3)中任一项所述的方法或药物组合物,其中,糖为二糖类的糖。

[0043] (19) 根据(15-1)~(18)中任一项所述的方法或药物组合物,其中,糖为蔗糖。

[0044] (20) 根据(15-1)~(18)中任一项所述的方法或药物组合物,其中,糖为海藻糖。

[0045] (21) 根据(15-1)~(20)中任一项所述的方法或药物组合物,其中,反义低聚物为吗啉代低聚物。

[0046] (22) 根据(15-1)~(21)中任一项所述的方法或药物组合物,其中,反义低聚物为磷酸二胺吗啉代低聚物。

[0047] (23) 根据(15-1)~(22)中任一项所述的方法或药物组合物,其中,反义低聚物的5'末端为下述化学式(1)~(2)中任意的基团:

- [0070] 图17示出表22所示的条件下的620nm处的吸光度测定值。
[0071] 图18示出表23所示的条件下的620nm处的吸光度测定值。
[0072] 图19示出表24所示的条件下的620nm处的吸光度测定值。

具体实施方式

[0073] 一实施方式中,本发明涉及包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性减轻剂。本说明书中,“肾毒性减轻剂”是指:用于减轻包含反义低聚物的药物组合物可能具有的肾毒性或者成为其原因的现象(嗜碱性物质的蓄积等)的药剂。所给予的反义低聚物在排泄的过程中高浓度地分布于肾脏并蓄积,因此有时在肾脏和/或肾脏肾小管的管腔内会观察到嗜碱性物质。肾毒性是指:由于肾脏中的反义低聚物的蓄积进一步加剧,使组织发生损伤、或肾功能降低。肾脏的组织损伤已知会导致例如肾小管扩张、及发生坏死,广泛知晓的是肾功能的降低导致例如血尿素氮(BUN)值、和血肌酐(Cre)值上升。通过减轻反义低聚物的肾毒性而可以提供包含高用量的反义低聚物的药物组合物、使用了该药物组合物的用于治疗疾病的方法。

[0074] 对于肾毒性减轻效果的有无,可以例如分别利用脲酶、GIDH法和酶法如实施例所述那样测定例如血尿素氮(BUN)值、和血肌酐(Cre)值从而确定。例如,与未给予肾毒性减轻剂的情况相比,给予了肾毒性减轻剂的情况下BUN值和/或Cre值例如在降低5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、或50%以上时,可以确定为具有肾毒性减轻效果。

[0075] 一实施方式中,本发明的肾毒性减轻剂可以由糖(葡萄糖除外)构成或含糖(葡萄糖除外)。糖例如可以为二糖以上的糖,也可以为二糖类的糖。作为糖的例子,没有限定,可列举蔗糖、乳糖、乳果糖、海藻糖、麦芽糖、异麦芽糖等二糖;棉子糖、松三糖、麦芽三糖等三糖;半乳糖、甘露糖、果糖、核糖、木糖、阿拉伯糖及来苏糖等单糖。一实施方式中,糖为蔗糖或包含蔗糖。另一实施方式中,糖为海藻糖或包含海藻糖。

[0076] 本发明的肾毒性减轻剂含糖以外的成分的情况下,肾毒性减轻剂也可以在糖中适宜配混药物可接受的载体或添加剂(和任选本发明的肾毒性减轻剂)来进行制剂化。具体而言,可以制成片剂、包衣片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、液体制剂、悬浮剂、乳剂等经口服制剂;注射剂、输液、栓剂、软膏、贴片剂等非经口服制剂。优选为非经口服制剂。注射剂也可以制成冷冻干燥制剂。对于载体或添加剂的配混比例,基于药物领域中通常采用的范围进行适宜设定即可。能配混的载体或添加剂没有特别限制,例如可列举出水、生理盐水、其他水性溶剂、水性或油性基剂等各种载体、赋形剂、结合剂、pH调节剂、崩解剂、吸收促进剂、润滑剂、着色剂、矫味剂、香料等各种添加剂。

[0077] 作为片剂、胶囊剂等中能够混合的添加剂,例如可使用明胶、玉米淀粉、黄蓍胶、阿拉伯胶之类的结合剂、结晶性纤维素之类的赋形剂、玉米淀粉、明胶、藻酸等之类的膨化剂、硬脂酸镁之类的润滑剂、蔗糖、乳糖或糖精之类的甜味剂、薄荷、白珠树油或樱桃之类的香味剂等。配药单位形态为胶囊的情况下,上述类型的材料中可以进一步含有油脂之类的液状载体。用于注射的无菌组合物可以依据通常的制剂业务(例如使有效成分溶解或悬浮于注射用水、天然植物油等溶剂中等)来制备。作为注射用的水性液体,例如,使用生理盐水、包含葡萄糖和其他辅助药的等渗液(例如,氯化钠等)等,也可以与适合的溶解辅助剂例如醇(例、乙醇)、多元醇(例、丙二醇、聚乙二醇)、非离子性表面活性剂(例、聚山梨醇酯80TM、

HCO-50)等组合使用。作为油性液体,例如使用芝麻油、大豆油等,也可以与作为溶解辅助剂的苯甲酸苄酯、苄醇等组合使用。另外,也可以与缓冲剂(例如,磷酸盐缓冲液、乙酸钠缓冲液)、无痛化剂(例如,苯扎氯铵、盐酸普鲁卡因等)、稳定剂(例如,人血清白蛋白、聚乙二醇等)、保存剂(例如,苄醇、苯酚等)、抗氧化剂等进行配混。进而,也可以制成冷冻干燥制剂。

[0078] 本说明书中,反义低聚物也可以是寡核苷酸、吗啉代低聚物、或肽核酸(Peptide Nucleic Acid:PNA)低聚物中的任意者(以下分别称为“本说明书中记载的反义寡核苷酸”、“本说明书中记载的反义吗啉代低聚物”、或“本说明书中记载的反义肽核酸低聚物”)。

[0079] 反义寡核苷酸是以核苷酸作为构成单元的反义低聚物,上述核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、或修饰核苷酸中的任意者。

[0080] 修饰核苷酸是指:构成核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸的核酸碱基、糖部分、和磷酸键部分的全部或一部分被修饰所得者。

[0081] 作为核酸碱基,例如可以列举出腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、或它们的修饰碱基。作为上述修饰碱基,例如可列举出假尿嘧啶、3-甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、5-烷基胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)、5-烷基尿嘧啶(例如,5-乙基尿嘧啶)、5-卤代尿嘧啶(例如,5-溴尿嘧啶)、6-氮杂嘧啶、6-烷基嘧啶(例如,6-甲基尿嘧啶)、2-硫代尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、1-甲基腺嘌呤、1-甲基次黄嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲基羰基甲基尿嘧啶、5-甲基氧基尿嘧啶、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、2-甲基硫代-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸、2-硫代胞嘧啶、嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、异鸟嘌呤、吡啶、咪唑、黄嘌呤等,但不限于于这些。

[0082] 作为糖部分的修饰,例如可以列举出核糖的2'位的修饰和糖的其他部分的修饰。作为核糖的2'位的修饰,例如可以列举出将核糖的2'位的-OH基置换为-OR、-R、-R' OR、-SH、-SR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-N₃、-CN、-F、-Cl、-Br、-I的修饰。此处,R表示烷基或芳基。R'表示亚烷基。

[0083] 作为糖的其他部分的修饰,例如可列举出将核糖或脱氧核糖的4'位的O置换为S的修饰,使糖的2'位和4'位进行桥联的修饰,例如,LNA(Locked Nucleic Acid,锁核酸)或ENA(2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids,2'-O,4'-C-亚乙基-桥核酸)等,但不限于于这些。

[0084] 作为磷酸键部分的修饰,例如可以列举出使磷酸二酯键置换为硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、膦酰胺键、硼烷磷酸酯键(例如,参照Enya et al: Bioorganic&Medicinal Chemistry,2008,18,9154-9160)的修饰(例如,参照日本再公表专利公报第2006/129594号和日本再公表专利公报第2006/038608号)。

[0085] 本说明书中,作为烷基,优选直链状或支链状的碳数1~6的烷基。具体而言,例如可列举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、正己基、异己基。该烷基可以进行了取代,作为上述取代基,例如可以列举出卤素、烷氧基、氰基、硝基,也可以由这些取代了1~3个。

[0086] 本说明书中,作为环烷基,优选碳数3~12的环烷基。具体而言,例如可列举出环丙

基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环癸基、环十二烷基。

[0087] 本说明书中,作为卤素,可以列举出氟、氯、溴、碘。

[0088] 本说明书中,作为烷氧基,可以列举出直链状或支链状的碳数1~6的烷氧基,例如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、异戊氧基、正己氧基、异己氧基等。特别优选碳数1~3的烷氧基。

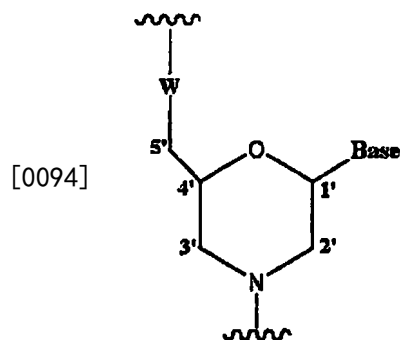
[0089] 本说明书中,作为芳基,优选碳数6~10的芳基。具体而言,例如可以列举出苯基、 α -萘基、 β -萘基。特别优选苯基。该芳基可以被取代,作为上述取代基,例如可以列举出烷基、卤素、烷氧基、氰基、硝基,这些也可以取代了1~3个。

[0090] 本说明书中,作为亚烷基,优选直链状或支链状的碳数1~6的亚烷基。具体而言,例如可以列举出亚甲基、亚乙基、三亚甲基、四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基、2-(乙基)三亚甲基、1-(甲基)四亚甲基。

[0091] 本说明书中,作为酰基,可以列举出直链状或支链状的烷酰基或芳酰基。作为烷酰基,例如可列举出甲酰基、乙酰基、2-甲基乙酰基、2,2-二甲基乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、2,2-二甲基丙酰基、己酰基等。作为芳酰基,例如可以列举出苯甲酰基、甲苯甲酰基、萘甲酰基。上述芳酰基可以在能取代的位置被取代,也可以被烷基取代。

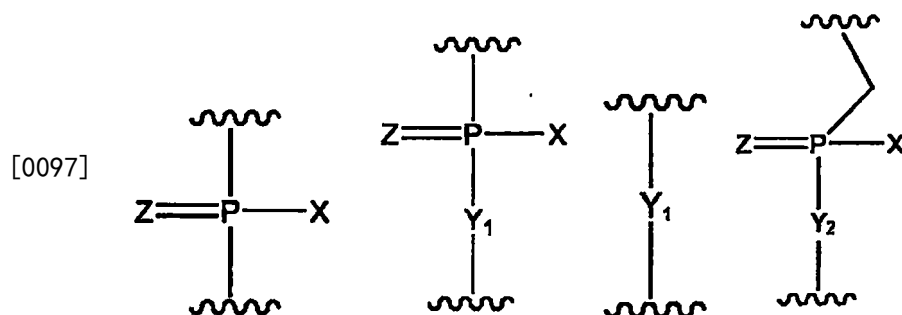
[0092] 本说明书中记载的反义寡核苷酸可以使用各种自动合成装置(例如,AKTA oligopilot plus 10/100(GE Healthcare))容易地合成,或者,也可以委托第三方机构(例如,Promega公司或Takara公司)等来制作。

[0093] 本说明书中记载的反义吗啉代低聚物是以下述通式所示的基团作为构成单元的反义低聚物。



[0095] (式中,Base表示核酸碱基;

[0096] W表示以下任意式所示的基团。



[0098] (式中,X表示 $-\text{CH}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{NR}^2\text{R}^3$ 、或F;

[0099] R^1 表示H、烷基;

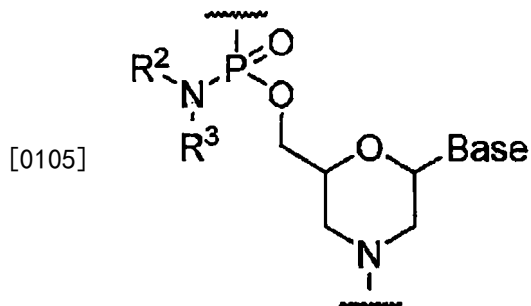
[0100] R^2 和 R^3 相同或不同,表示H、烷基、环烷基、或芳基;

[0101] Y_1 表示O、S、 CH_2 、或 NR^1 ；

[0102] Y_2 表示O、S、或 NR^1 ；

[0103] Z表示O或S。))

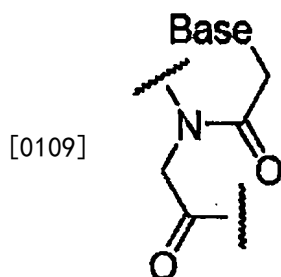
[0104] 本说明书中,吗啉代低聚物优选为以下式所示的基团作为构成单元的低聚物(磷酸二胺吗啉代低聚物(以下称为“PMO”))。



[0106] (式中,Base、 R^2 、 R^3 与上述含义相同。)

[0107] 吗啉代低聚物例如可以依据国际公开公报第1991/009033号、或国际公开公报第2009/064471号中记载的方法而制造。特别是,PMO可以依据国际公开公报第2009/064471号、或国际公开公报第2013/100190号中记载的方法而制造。

[0108] 本说明书中记载的反义肽核酸低聚物是以下述通式所示的基团作为构成单元的反义低聚物。



[0110] (式中,Base与上述含义相同。)

[0111] 肽核酸低聚物例如可以依据以下的文献而制造。

[0112] 1) P.E.Nielsen, M.Egholm, R.H.Berg, O.Buchardt, Science, 254, 1497 (1991) 2) M.Egholm, O.Buchardt, P.E.Nielsen, R.H.Berg, JACS, 114, 1895 (1992)

[0113] 3) K.L.Dueholm, M.Egholm, C.Behrens, L.Christensen, H.F.Hansen, T.Vulpius, K.H.Petersen, R.H.Berg, P.E.Nielsen, O.Buchardt, J.Org.Chem., 59, 5767 (1994)

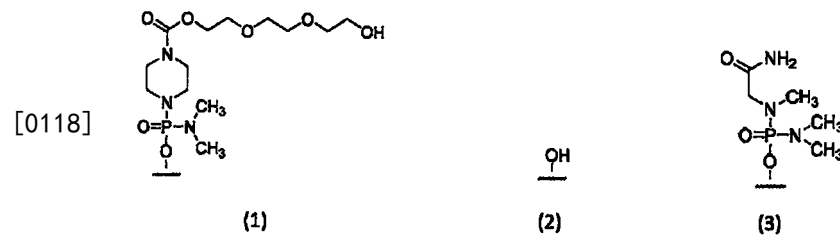
[0114] 4) L.Christensen, R.Fitzpatrick, B.Gildea, K.H.Petersen, H.F.Hansen, T.Koch, M.Egholm, O.Buchardt, P.E.Nielsen, J.Coull, R.H.Berg, J.Pept.Sci., 1, 175 (1995) 5) T.Koch, H.F.Hansen, P.Andersen, T.Larsen, H.G.Batz, K.Otteson, H.Orum, J.Pept.Res., 49, 80 (1997)

[0115] 本说明书中记载的反义低聚物可以为其药物可接受的盐的形态、水合物的形态、或药物可接受的盐的水合物的形态。

[0116] 作为本说明书中记载的反义低聚物的药物可接受的盐的例子,可列举出钠盐、钾盐、锂盐之类的碱金属盐、钙盐、镁盐之类的碱土金属盐;铝盐、铁盐、锌盐、铜盐、镍盐、钴盐等金属盐;铵盐;叔辛胺盐、二苄胺盐、吗啉盐、葡萄糖胺盐、苯基甘氨酸烷基酯盐、乙二胺盐、

N-甲基葡糖胺盐、胍盐、二乙胺盐、三乙胺盐、二环己胺盐、N,N'-二苄基乙二胺盐、氯普鲁卡因盐、普鲁卡因盐、二乙醇胺盐、N-苄基-苄乙基胺盐、哌嗪盐、四甲基铵盐、三(羟基甲基)氨基甲烷盐之类的有机胺盐；氢氟酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐之类的氢卤酸盐；硝酸盐、高氯酸盐、硫酸盐、磷酸盐等无机酸盐；甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐、乙磺酸盐之类的低级烷烃磺酸盐；苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐之类的芳基磺酸盐；乙酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、草酸盐、马来酸盐等有机酸盐；甘氨酸盐、赖氨酸盐、精氨酸盐、鸟氨酸盐、谷氨酸盐、天冬氨酸盐之类的氨基酸盐等。这些盐可以利用公知的方法制造。或者，本说明书中记载的反义低聚物也可以处于其水合物的形态。

[0117] 本说明书中记载的反义低聚物的5'末端可以为下述化学式(1)~(3)中任意的基团。优选为(1)或(2)中任意的基团。



[0119] 以下，将上述(1)、(2)、和(3)所示的基团分别称为“基团(1)”、“基团(2)”、和“基团(3)”。

[0120] 本说明书中记载的反义低聚物的碱基序列没有限定，例如其碱基序列中可以包含4个连续的嘌呤碱基。另外，4个连续的嘌呤碱基中的至少2个可以为鸟嘌呤。

[0121] 一实施方式中，本说明书中记载的反义低聚物包含下述碱基序列或由下述碱基序列形成：(i) 选自由序列号1~12组成的组中的碱基序列、(ii) 相对于选自由序列号1~12组成的组中的碱基序列具有80%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上的序列同一性的碱基序列、或(iii) 在选自由序列号1~12组成的组中的碱基序列中添加、缺失、或置换了1个或多个碱基而得到的碱基序列。

[0122] 本说明书中碱基序列的“同一性”是指在将2个碱基序列进行比对的情况下一致的碱基的比例。序列同一性可以使用FASTA(Science 227(4693):1435-1441,(1985))、基于Carlin和Arthur的算法BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 872264-2268,1990;Proc Natl Acad Sci USA 90:5873,1993)来确定。开发出了基于BLAST的算法的被称为blastn、blastx、tblastn、tblastx的程序(Altschul SF, et al: J Mol Biol 215:403,1990)。使用blastn来对碱基序列进行解析的情况，参数例如score=100、wordlength=12。使用BLAST和Gapped BLAST程序的情况，使用各程序的缺省参数。

[0123] 本说明书中，添加、缺失、或置换了1个或多个碱基的碱基序列中的多个为2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个。

[0124] 一实施方式中，本说明书中记载的反义低聚物是以在Fukutin基因的基因组序列(GenBank ACCESSION:AB038490)中插入有SVA型逆转录转座子序列(GenBank ACCESSION:AB185332)的插入突变型Fukutin基因的基因组序列(序列号13)的第115937位~第115981位的范围作为靶序列的反义低聚物，或者不以该范围作为靶序列。作为以序列号13的第

115937位~第115981位的范围作为靶序列的反义低聚物的例子,可列举出包含选自由序列号1~7组成的组中的碱基序列的反义低聚物。作为不以序列号13的第115937位~第115981位的范围作为靶序列的反义低聚物的例子,可列举出包含选自由序列号8~12组成的组中的碱基序列的反义低聚物。

[0125] 一实施方式中,本说明书中记载的反义低聚物是结合有功能性肽、例如细胞穿膜肽(CPP)的缀合物。本说明书中可以使用公知的功能性肽或市售的功能性肽。本说明书中可以使用功能性肽例如包括:国际公开第2008/036127号小册子中公开的富含精氨酸的肽;或国际公开第2009/005793号小册子中公开的靶向脏器的肽、例如RXR、RBR等;或国际公开第2012/150960号小册子中公开的包含氨基酸亚基的肽。细胞穿膜肽(CPP)表示能够通过哺乳动物细胞的细胞膜、从而能够改善细胞药物递送的10~约30个氨基酸的短的肽序列(例如,可以参照Hum Mol Genet.2011 Aug 15;20(16):3151-3160;Pharmacology&Therapeutics 154(2015)78-86)。本说明书中可以使用公知的CPP或市售的CPP。本说明书中可以使用CPP例如包括Pharmacology&Therapeutics 154(2015)78-86的80页的表1中列举的CPP,例如可列举出TAT(48-60)、穿膜肽(Penetratin)、聚精氨酸、Oct4、WT1-pTj、DPV3、转运素、MAP、VP22、Rep1、KW、KFGF、FGF12、整合素β3肽、C105Y、TP2;日本特表2017-500856说明书(国际公开第2015/089487号小册子)的第[0085]段、表1中列举的CPP、例如DPV10/6、DPV15b、YM-3、Tat、LR11、C45D18、Lyp-1、Lyp-2、BMV GAG、hLF1-22、C45D18、LR20等。CPP例如由Funakoshi,Co.,Ltd.市售。本说明书中可以使用TAT(Funakoshi,Co.,Ltd.)、穿膜肽(Funakoshi,Co.,Ltd.)等市售的CPP、或公知的CPP、例如R8等。本说明书中可以使用优选的CPP例如包括hLIMK、TAT、穿膜肽、R8等(可以参照国际公开第2016/187425号小册子、国际公开第2018/118662号小册子、国际公开第2018/118599号小册子、国际公开第2018/118627号小册子、EBioMedicine 45(2019)630-645等)。CPP可以直接结合于本说明书的反义低聚物,或者也可以借助能够与反义低聚物结合的连接体来结合CPP。本说明书中可以使用公知的连接体。这样的连接体例如包括日本特表2017-500856说明书(国际公开第2015/089487号小册子)、国际公开第2015/089487号小册子、国际公开第2009/073809号小册子、国际公开第2013/075035号小册子、国际公开第2015/105083号小册子、国际公开第2014/179620号小册子、国际公开第2015/006740号小册子、国际公开第2017/010575号小册子等中记载的连接体。本说明书中可以使用优选的连接体例如包括能通过4-马来酰亚胺丁酸、二硫键与本说明书的功能性肽或反义低聚物结合的连接体等。本说明书的缀合物可以利用本领域技术人员公知的方法来制备。

[0126] 本说明书中记载的药物组合物可以适宜配混药物可接受的载体或添加剂(和任选本发明的糖)而制剂化。对于药物组合物,就药物可接受的载体或添加剂和制剂化而言,除了反义核酸为有效成分之外,与本发明的肾毒性减轻剂中记载的同样。

[0127] 一实施方式中,本发明的肾毒性减轻剂以本说明书记载的药物组合物中的糖的浓度成为1mg/mL~400mg/mL、例如5mg/mL~340mg/mL的量来使用和/或添加至药物组合物中。一实施方式中,本发明的肾毒性减轻剂例如以上述药物组合物中的糖的浓度成为1mg/mL以上、2.5mg/mL以上、3mg/mL以上、4mg/mL以上、5mg/mL以上、10mg/mL以上、15mg/mL以上、20mg/mL以上、30mg/mL以上或40mg/mL以上的量来使用和/或添加至药物组合物中。另外,本发明的肾毒性减轻剂例如以上述药物组合物中的糖的浓度成为400mg/mL以下、350mg/mL以

下、340mg/mL以下、335mg/mL以下、330mg/mL以下、300mg/mL以下、250mg/mL以下或200mg/mL以下的量来使用和/或添加至药物组合物中。

[0128] 一实施方式中,本说明书记载的药物组合物中的反义低聚物的浓度为0.5mg/mL~200mg/mL、例如16mg/mL~130mg/mL。一实施方式中,本说明书记载的药物组合物中的反义低聚物的浓度可以为0.5mg/mL以上、1mg/mL以上、2mg/mL以上、3mg/mL以上、4mg/mL以上、5mg/mL以上、10mg/mL以上或16mg/mL以上,可以为200mg/mL以下、180mg/mL以下、150mg/mL以下、140mg/mL以下或130mg/mL以下。

[0129] 一实施方式中,本发明涉及肾毒性减轻剂,其为包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性减轻剂,所述肾毒性减轻剂含糖,且以设反义低聚物为1时糖的重量比成为0.05~30、例如0.1~13.3的量来使用。包含反义低聚物的药物组合物和糖如上所述。一实施方式中,本发明的肾毒性减轻剂以设反义低聚物为1时糖的重量比成为0.05以上、0.1以上、0.15以上、0.2以上、0.3以上、0.4以上、0.5以上、0.6以上、0.7以上、0.8以上、0.9以上、1以上、2以上、或5以上的量来使用。一实施方式中,本发明的肾毒性减轻剂以设反义低聚物为1时糖的重量比成为30以下、25以下、20以下、15以下、13.3以下或10以下的量来使用。

[0130] 一实施方式中,本发明的肾毒性减轻剂包含于本说明书中记载的药物组合物中,与本说明书中记载的药物组合物一起进行给予。例如,将本说明书中记载的反义低聚物任选与葡萄糖等载体一起冷冻干燥后溶解于注射用水等溶剂中,将由此得到的药物组合物和本说明书中记载的肾毒性减轻剂混合,然后可以任选通过溶剂调节量并向对象进行给予。另外,例如,将本说明书中记载的反义低聚物与本发明的肾毒性减轻剂一起冷冻干燥后溶解于注射用水等溶剂中而制成药物组合物,然后任选通过溶剂调节量并向对象进行给予。

[0131] 另一实施方式中,本发明的肾毒性减轻剂不含于本说明书中记载的药物组合物中,与本说明书中记载的药物组合物分别(同时或依次)进行给予。例如,也可以分别将本说明书中记载的反义低聚物的冷冻干燥剂溶解于注射用水等溶剂而成的药物组合物和本说明书中记载的肾毒性减轻剂给予于对象。本说明书中,将肾毒性减轻剂和药物组合物“同时”进行给予是指:在同一时间点进行肾毒性减轻剂和药物组合物的给予。本说明书中,将肾毒性减轻剂和药物组合物“依次”给予是指在不同的时间点进行给予。具体而言,可以在肾毒性减轻剂之前或之后进行给予,此时的肾毒性减轻剂与药物组合物的给予间隔没有限定,例如可以为数分钟、数小时、或一天左右。

[0132] 本说明书中,作为给予药物组合物和/或肾毒性减轻剂的对象,没有限定,例如可列举出哺乳动物、例如人等灵长类、大鼠、小鼠、和褐家鼠等实验动物、猪、牛、马、和羊等家畜动物等,优选为人。

[0133] 作为给予药物组合物和/或肾毒性减轻剂时的用量,可以在考虑药物组合物中所含的反义低聚物和肾毒性减轻剂中所含的糖的种类、药物组合物和肾毒性减轻剂的剂型、年龄、体重等对象的状态、给予路径、疾病的性质和症状的基础上来进行调整,作为反义低聚物的量,例如可以设为每1天0.1mg~10g/人的范围内、例如1mg~1g/人的范围内、例如10mg~100mg/人的范围内,作为糖的量,例如可以设为每1天0.1mg~200g/人的范围内、例如1mg~100g/人的范围内、例如10mg~50g/人的范围内、例如100mg~50g/人的范围内、例如100mg~40g/人的范围内、例如100mg~30g/人的范围内、例如100mg~20g/人的范围内、例如1g~20g/人的范围内、例如2g~20g/人的范围内、例如1g~10g/人的范围内、例如

100mg ~ 1g/人的范围内。给予次数和给予频率没有限定,例如可以以1天1次至2、3次的给予次数、隔开1天至2、3天的间隔进行给予。另外,例如也可以仅给予1次,也可以在其数天后再一次给予并总计给予2次。

[0134] 一实施方式中,本发明涉及用于减轻包含反义低聚物的药物组合物的肾毒性的方法、或用于生产包含反义低聚物的减轻了肾毒性的药物组合物的方法,其包括:以上述药物组合物中的糖的浓度成为1mg/mL ~ 400mg/mL的量添加糖。本实施方式中,对于反义低聚物、药物组合物、糖、药物组合物中的糖的浓度等,如本说明书中记载所述。

[0135] 一实施方式中,本发明涉及:用于在给予了反义低聚物或包含反义低聚物的药物组合物的对象中减轻反义低聚物的肾毒性的方法,其包括向上述对象给予糖或肾毒性减轻剂,以设反义低聚物为1时糖的重量比成为0.05 ~ 30的量来进行给予。本实施方式中,对于反义低聚物、药物组合物、糖、肾毒性减轻剂、设反义低聚物为1时的糖的重量比等,如本说明书中记载所述。

[0136] 一实施方式中,本发明涉及药物组合物,其为包含反义低聚物的减轻了肾毒性的药物组合物,其以1mg/mL ~ 400mg/mL的浓度含有包含糖的肾毒性减轻剂。本实施方式中,对于反义低聚物、药物组合物、糖、药物组合物中的糖的浓度等,如本说明书中记载所述。

[0137] 实施例

[0138] [实施例1:反义低聚物(PMO)的制造]

[0139] 依据国际公开公报W02013/100190所述的方法,合成了表1所示的反义低聚物(PMO No.1 ~ 12(序列号1 ~ 12))。也示出各反义低聚物的分子量的理论值和基于ESI-TOF-MS的实测值。

[0140] [表1]

[0141] 表1合成的反义低聚物(PMO No.1 ~ 12)

[0142]

PMO No.	序列	5' 末端	分子量		序列号
			理论值	实测值	
1	GCTCGGCATCAGAGGGAGACCG	基团(2)	7353.55	7353.93	1
2	CTCGGCATCAGAGGGAGACC	基团(2)	6643.31	6643.91	2
3	CGGCATCAGAGGGAGAC	基团(2)	5682.99	5682.27	3
4	CCTTGGCTCGGCATCAGAGG	基团(2)	6625.29	6625.31	4
5	CATCAGAGGGAGACCGTGTA	基团(2)	7021.45	7021.88	5
6	CTCGTGATCAGAGGGAGACC	基团(2)	6973.42	6974.13	6
7	CTCGCATCAGAGGGAGACC	基团(2)	6288.19	6287.87	7
8	AGGAGGGCAGCGAACTCCTGGTTGT	基团(2)	8383.90	8383.85	8
9	GTGGTTGAGCCAGAAGCTGGGAATT	基团(2)	8422.91	8422.85	9
10	GTTGCCTCCGGTCTGAAGGTGTTTC	基团(1)	8643.00	8642.94	10
11	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	基团(1)	7580.66	7580.17	11
12	CCTCCGGTCTGAAGGTGTTTC	基团(2)	6921.39	6921.66	12

[0143] 上述表中的“基团(1)”和“基团(2)”如下所述。

给药液量 (mL/kg)	PMO 浓度 (mg/mL)	蔗糖浓度 (mg/mL)	蔗糖/ PMO量比	BUN (mg/dL)	BUN (mg/dL) 标准偏差	Cre (mg/dL)	Cre (mg/dL) 标准偏差
-	-	-	-	34.7	1.7	0.13	0.01
10	50	0	0	253.1	10.2	1.81	0.05
10	50	5	0.1	238.0	8.8	1.68	0.22
10	50	10	0.2	255.4	37.6	1.26	0.49
10	50	20	0.4	217.5	32.5	0.90	0.38
10	50	50	1	64.0	9.0	0.16	0.01
10	50	100	2	33.8	1.5	0.10	0.01

[0155] -:未给予

[0156] [表3]

[0157] 表3给予反义低聚物 (PMO No.9) 时的BUN值和Cre值

给药液量 (mL/kg)	PMO 浓度 (mg/mL)	蔗糖浓度 (mg/mL)	蔗糖/ PMO量比	BUN (mg/dL)	BUN (mg/dL) 标准偏差	Cre (mg/dL)	Cre (mg/dL) 标准偏差
-	-	-	-	29.8	3.6	0.11	0.02
12	16.667	0	0	186.6	59.8	0.80	0.57
12	16.667	16.667	1	158.1	87.3	0.96	0.56
12	16.667	41.667	2.5	75.2	75.2	0.30	0.30
12	16.667	83.333	5	30.4	3.2	0.13	0.04
12	16.667	166.667	10	29.8	2.4	0.10	0.01
12	25	0	0	192.9	58.4	0.86	0.46
12	25	83.333	3.333	31.0	2.0	0.10	0.02
12	25	166.667	6.667	28.3	3.6	0.11	0.02
12	25	333.333	13.333	31.8	2.4	0.12	0.01

[0159] -:未给予

[0160] [表4]

[0161] 表4给予反义低聚物 (PMO No.8) 时的肾脏的病理组织学检查

给药液量 (mL/kg)	PMO 浓度 (mg/mL)	蔗糖浓度 (mg/mL)	蔗糖/ PMO量比	肾小管内的 嗜碱性物质	肾小管的 扩张	髓质外带 内层的肾 小管坏死
-	-	-	-	-	-	-
10	50	0	0	2+ (3/3)	3+ (3/3)	± (3/3)
10	50	20	0.4	2+ (3/3)	3+ (3/3)	1+ (1/3) ± (2/3)
10	50	50	1	1+ (3/3)	2+ (1/3) 1+ (2/3)	± (1/3)
10	50	100	2	± (3/3)	-	-

[0162] [0163]

[0164] -:无变化

[0165] ±:变化非常微弱,可认为器官/组织功能正常

[0166] 1+:变化明确,但其分布或程度有限,可认为对器官/组织的功能几乎没有造成影响

[0167] 2+:明确且广泛地观察到变化,认为对器官/组织的功能造成了一定程度的影响

[0168] 3+:变化显著,认为对器官/组织的功能造成了明确的影响

[0169] 以上结果表明,蔗糖减轻了由给予反义低聚物带来的肾毒性。

[0170] [实施例3:基于蔗糖的肾毒性减轻作用的评价]

[0171] 对于表1所示的反义低聚物中的PMO No.11(序列号11),为了验证在药物用途中的有用性,进行了肾脏中的安全性评价。

[0172] (1)评价方法

[0173] 将PMO No.11的反义低聚物溶解于生理盐水,制作以表5记载的浓度包含反义低聚物且不含蔗糖的对照给药液。

[0174] 接着,将PMO No.11的反义低聚物和蔗糖溶解于生理盐水,制作以表5记载的浓度包含反义低聚物和蔗糖的给药液。

[0175] 将这些给药液向C57BL/6J雄性6周龄小鼠(N=5)的尾静脉内以20mL/kg进行给予。次日,对小鼠进行解剖检查,制作肾脏的福尔马林固定石蜡包埋标本。对将标本薄切而得到的切片进行苏木精-油红染色,实施病理组织学检查。与给予了不含蔗糖的给药液的小鼠相比,在给予了包含蔗糖的给药液的小鼠中在肾脏的病理组织学检查中观察到毒性所见得到改善的情况下,判定为肾毒性减轻。

[0176] (2)评价结果

[0177] 对于进行了试验的反义低聚物,在给予了包含蔗糖的给药液的小鼠中,在肾脏的病理组织学检查中观察到毒性所见得到改善,因此确认蔗糖减轻了肾毒性。将结果示于表5。

[0178] [表5]

[0179] 表5给予反义低聚物(PMO No.11)时的肾脏的病理组织学检查中的毒性所见

给药液量 (mL/kg)	PMO浓度 (mg/mL)	蔗糖浓度 (mg/mL)	蔗糖/ PMO量比	髓质外带外层的 肾小管坏死	髓质外带内层的 出血/淤血
20*	0	0	0	-	-
20	130	0	0	± (3/5)	± (2/5)
20	130	200	1.538	± (1/5)	-

[0180] *:给予生理盐水

[0182] -:无变化

[0183] ±:变化非常微弱,可认为器官/组织的功能正常

[0184] 以上结果表明,蔗糖减轻了由给予反义低聚物带来的肾毒性。

[0185] [实施例4:基于蔗糖的析出抑制作用的评价]

[0186] 对于表1所示的反义低聚物中的PMO No.8、9、10、11,为了进一步验证在药物用途中的有用性,对模拟尿中的离子存在下的析出量及基于蔗糖的析出抑制作用进行了评价。

如果在生物体内通过抑制析出而减轻反义低聚物在肾脏中的蓄积,则预测可实现肾毒性的减轻。

[0187] 试验方法

[0188] 将各反义低聚物溶解于注射用水或蔗糖水溶液中,与模拟尿的包含氯化钾和氯化钠的水溶液混合。将评价的条件(溶液的组成)示于表6~13。使用孔板读取器Infinite F200 Pro(TECAN公司制)将混合的溶液在37°C加热条件下测定620nm处的吸光度。在模拟尿中的反义低聚物的析出的情况下,反义低聚物的浓度、氯化钾浓度和氯化钠浓度根据反义低聚物的给予量、尿量发生变动,因此根据序列设定了使用注射用水作为介质而观察到析出的条件。在由得到的条件仅将介质变更为蔗糖水溶液的条件下测定,进行两个条件下得到的吸光度的比较。吸光度上升的情况下,判断为观察到析出,评价了观察到析出所需的时间和吸光度上升值。将蔗糖水溶液作为介质的情况下,与将注射用水作为介质的情况相比,观察到析出所需的时间慢或者吸光度上升值小的情况下,判断为有析出抑制作用。

[0189] [表6]

[0190] 表6 PMO No.8时的基于蔗糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	蔗糖 (mg/mL)
8	16.5	100	77	0
8	16.5	100	77	135
8	16.5	100	77	270

[0192] [表7]

[0193] 表7 PMO No.8时的基于蔗糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	蔗糖 (mg/mL)
8	14.667	200	154	0
8	14.667	200	154	120

[0195] [表8]

[0196] 表8 PMO No.8时的基于蔗糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	蔗糖 (mg/mL)
8	16.5	100	77	0
8	16.5	100	77	90
8	16.5	100	77	72
8	16.5	100	77	45

[0198] [表9]

[0199] 表9 PMO No.9时的基于蔗糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	蔗糖 (mg/mL)
[0200] 9	12.375	100	77	0
9	12.375	100	77	135
9	12.375	100	77	270

[0201] [表10]

[0202] 表10 PMO No.9时的基于蔗糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	蔗糖 (mg/mL)
[0203] 9	12.375	200	154	0
9	12.375	200	154	120

[0204] [表11]

[0205] 表11 PMO No.9时的基于蔗糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	蔗糖 (mg/mL)
[0206] 9	12.375	100	77	0
9	12.375	100	77	90
9	12.375	100	77	72
9	12.375	100	77	45

[0207] [表12]

[0208] 表12 PMO No.10时的基于蔗糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	蔗糖 (mg/mL)
[0209] 10	110	1500	385	0
10	110	1500	385	75
10	110	1500	385	120

[0210] [表13]

[0211] 表13 PMO No.11时的基于蔗糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	蔗糖 (mg/mL)
[0212] 11	110	1800	462	0
11	110	1800	462	120
11	110	1800	462	60

[0213] 试验结果

[0214] 对于进行了试验的各反义低聚物,在全部的以蔗糖水溶液为介质的情况下,观察到析出所需的时间均延迟、抑制了吸光度的上升,因此表明蔗糖抑制了反义低聚物的析出。关于各结果,示于图5~12。

[0215] 以上结果表明,蔗糖抑制反义低聚物在尿中的析出。

[0216] [实施例5:基于蔗糖及海藻糖的肾毒性减轻作用的评价]

[0217] 对于表1所示的反义低聚物中的PMO No.1、8、9(序列号1、8、9),为了验证在药物用途中的有用性,进行了肾脏中的安全性评价。

[0218] (1)评价方法

[0219] 将PMO No.1、8、9的各反义低聚物溶解于包含0.9%的氯化钠的注射用水,制作以表14~17记载的浓度包含各反义低聚物且不含蔗糖及海藻糖的对照给药液。

[0220] 接着,将PMO No.1的反义低聚物溶解于包含0.9%的氯化钠的注射用水,进而,加入将蔗糖(富士胶片 and 光纯药制)用生理盐水溶解而形成的溶液,制作分别以表14记载的浓度包含反义低聚物和蔗糖的给药液。另外,将PMO No.1、8、9的各反义低聚物溶解于包含0.9%的氯化钠的注射用水,进而加入将海藻糖(富士胶片 and 光纯药制)用生理盐水溶解而形成的溶液,制作分别以表15~17记载的浓度包含各反义低聚物和海藻糖的给药液。

[0221] 将这些给药液向C57BL/6J雄性6周龄小鼠(N=2~3)的尾静脉内以20mL/kg进行给予。次日,由小鼠回收血清,利用脲酶·GIDH法测定血尿素氮(BUN)值,利用酶法测定血肌酐(Cre)值,使用生化学自动分析装置JCA-BM8060(日本电子制)进行测定。与给予了不含蔗糖及海藻糖的给药液的小鼠相比,给予了包含蔗糖或海藻糖的给药液的小鼠中BUN值及Cre值这两个值降低的情况下,判定为肾毒性减轻。

[0222] (2)评价结果

[0223] 对于进行了试验的各反义低聚物,给予了包含蔗糖或海藻糖的给药液的小鼠中,BUN值及Cre值这两个值下降,因此确认蔗糖及海藻糖减轻了肾毒性。将结果示于表14~17。

[0224] [表14]

[0225] 表14给予反义低聚物(PMO No.1)时的BUN值和Cre值

给药液量 (mL/kg)	PMO浓度 (mg/mL)	蔗糖浓度 (mg/mL)	蔗糖/ PMO量比	BUN (mg/dL)	BUN (mg/dL) 标准偏差	Cre (mg/dL)	Cre (mg/dL) 标准偏差
-	-	-	-	29.4	1.7	0.1	0.02
20	300	0	0	221.8	122.3	0.91	0.69
20	300	300	1	32.5	7.4	0.11	0.03
20	300	1000	3.333	28.3	1.2	0.09	0.02

[0226] -:未给予

[0227] [表15]

[0228] 表15给予反义低聚物(PMO No.1)时的BUN值和Cre值

	给药液量 (mL/kg)	PMO 浓度 (mg/mL)	海藻糖 浓度 (mg/mL)	海藻糖/ PMO量比	BUN (mg/dL)	BUN (mg/dL) 标准偏差	Cre (mg/dL)	Cre (mg/dL) 标准偏差
[0230]	-	-	-	-	29.4	1.7	0.1	0.02
	20	300	0	0	221.8	122.3	0.91	0.69
	20	300	300	1	32.5	7.4	0.11	0.03
	20	300	1000	3.333	28.3	1.2	0.09	0.02
	20	300	1500	5	28.3	1.2	0.09	0.02

[0231] -:未给予

[0232] [表16]

[0233] 表16给予反义低聚物 (PMO No.8) 时的BUN值和Cre值

	给药液量 (mL/kg)	PMO 浓度 (mg/mL)	海藻糖 浓度 (mg/mL)	海藻糖/ PMO量比	BUN (mg/dL)	BUN (mg/dL) 标准偏差	Cre (mg/dL)	Cre (mg/dL) 标准偏差
[0234]	-	-	-	-	26.6	0.8	0.11	0.01
	20	500	0	0	251.4	14.6	2.39	0.17
	20	500	2000	4	25.8	4.1	0.13	0.03
	20	500	4000	8	25.9	2.5	0.09	0.02

[0235] -:未给予

[0236] [表17]

[0237] 表17给予反义低聚物 (PMO No.9) 时的BUN值和Cre值

	给药液量 (mL/kg)	PMO 浓度 (mg/mL)	海藻糖 浓度 (mg/mL)	海藻糖/ PMO量比	BUN (mg/dL)	BUN (mg/dL) 标准偏差	Cre (mg/dL)	Cre (mg/dL) 标准偏差
[0238]	-	-	-	-	26.6	0.8	0.11	0.01
	20	200	0	0	182.5	43.8	0.64	0.33
	20	200	300	1.5	25.6	1.5	0.10	0.03
	20	200	1000	5	25.1	1.0	0.12	0.01

[0239] -:未给予

[0240] [实施例6:基于蔗糖的析出抑制作用的评价]

[0241] 对于表1所示的反义低聚物中的PMO No.1、2、7,为了进一步验证在药物用途中的有用性,评价了模拟尿中的离子存在下的析出量及基于蔗糖的析出抑制作用。如果在生物体内通过抑制析出而减轻反义低聚物在肾脏中的蓄积,则预测可实现肾毒性的减轻。

[0242] 试验方法

[0243] 将各反义低聚物溶解于注射用水或蔗糖水溶液,与模拟尿的包含氯化钾及氯化钠的水溶液混合。将进行评价的条件(溶液的组成)示于表18~20。将混合而得的溶液用孔板

读取器Infinite F200 Pro (TECAN公司制) 在37°C加热条件下测定620nm下的吸光度。在模拟尿中的反义低聚物的析出的情况下,反义低聚物的浓度、氯化钾浓度及氯化钠浓度根据反义低聚物的给药量、尿量而发生变动,因此根据序列设定了使用注射用水作为介质而观察到析出的条件。在由得到的条件仅将介质变更为蔗糖水溶液的条件下测定,进行两个条件下得到的吸光度的比较。吸光度上升的情况下,判断为观察到析出,评价了观察到析出所需的时间和吸光度上升值。以蔗糖水溶液为介质的情况下,与以注射用水为介质的情况相比,观察到析出所需的时间慢或吸光度上升值小的情况下,判定为有析出抑制作用。

[0244] [表18]

[0245] 表18 PMO No.1时的基于蔗糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	蔗糖 (mg/mL)
[0246] 1	24.75	100	77	0
1	24.75	100	77	135
1	24.75	100	77	45

[0247] [表19]

[0248] 表19 PMO No.2时的基于蔗糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	蔗糖 (mg/mL)
[0249] 2	49.5	100	77	0
2	49.5	100	77	135
2	49.5	100	77	45

[0250] [表20]

[0251] 表20 PMO No.7时的基于蔗糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	蔗糖 (mg/mL)
[0252] 7	264	400	154	0
7	264	400	154	120
7	264	400	154	80

[0253] 试验结果

[0254] 对于进行了试验的各反义低聚物,在全部的以蔗糖水溶液为介质的情况下,观察到析出所需的时间均延迟、抑制了吸光度的上升,因此表明蔗糖抑制了反义低聚物的析出。关于各结果,示于图13~15。

[0255] 以上结果表明,蔗糖抑制反义低聚物在尿中的析出。

[0256] [实施例7:基于海藻糖的析出抑制作用的评价]

[0257] 对于表1所示的反义低聚物中的PMO No.1、2、7、8,为了进一步验证在药物用途中的有用性,评价了模拟尿中的离子存在下的析出量及基于海藻糖的析出抑制作用。如果在生物体内通过抑制析出而减轻反义低聚物在肾脏中的蓄积,则预测可实现肾毒性的减轻。

[0258] 试验方法

[0259] 将各反义低聚物溶解于注射用水或海藻糖水溶液,与模拟尿的包含氯化钾及氯化钠的水溶液混合。将进行评价的条件(溶液的组成)示于表21~24。将混合而得的溶液用孔板读取器Infinite F200 Pro (TECAN公司制)在37°C加热条件下测定620nm下的吸光度。在模拟尿中的反义低聚物的析出的情况下,反义低聚物的浓度、氯化钾浓度及氯化钠浓度根据反义低聚物的给药量、尿量而发生变动,因此根据序列设定了使用注射用水作为介质而观察到析出的条件。在由得到的条件仅将介质变更为海藻糖水溶液的条件下测定,进行两条件下得到的吸光度的比较。吸光度上升的情况下,判断为观察到析出,评价了观察到析出所需的时间和吸光度上升值。在以海藻糖水溶液为介质的情况下,与以注射用水为介质的情况相比,观察到析出所需的时间慢或吸光度上升值小的情况下,判定为有析出抑制作用。

[0260] [表21]

[0261] 表21 PMO No.1时的基于海藻糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	海藻糖 (mg/mL)
[0262] 1	24.75	100	77	0
1	24.75	100	77	45
1	24.75	100	77	90
1	24.75	100	77	135

[0263] [表22]

[0264] 表22 PMO No.2时的基于海藻糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	海藻糖 (mg/mL)
[0265] 2	49.5	100	77	0
2	49.5	100	77	45

[0266] [表23]

[0267] 表23 PMO No.7时的基于海藻糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	海藻糖 (mg/mL)
[0268] 7	264	400	154	0
7	264	400	154	80

[0269] [表24]

[0270] 表24 PMO No.8时的基于海藻糖的析出抑制评价条件

PMO No.	PMO (mg/mL)	KCl (mmol/mL)	NaCl (mmol/mL)	海藻糖 (mg/mL)
[0271] 8	16.5	100	77	0
8	16.5	100	77	45
8	16.5	100	77	90
8	16.5	100	77	135

[0272] 试验结果

[0273] 对于进行了试验的各反义低聚物,在全部的以海藻糖水溶液为介质的情况下,观察到析出所需的时间延迟、吸光度最大时的上升幅度得到抑制,因此表明海藻糖抑制了反义低聚物的析出。关于各结果,示于图16~19。

[0274] 以上结果表明,海藻糖抑制反义低聚物在尿中的析出。

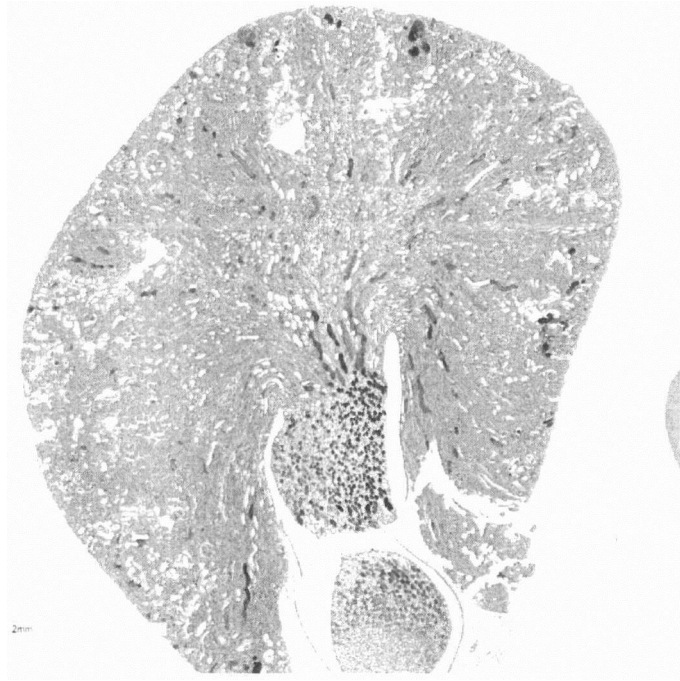


图1

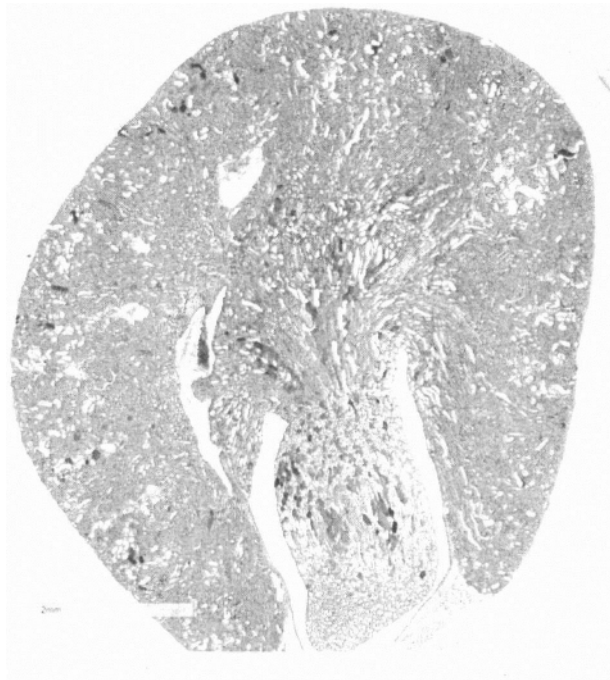


图2



图3



图4

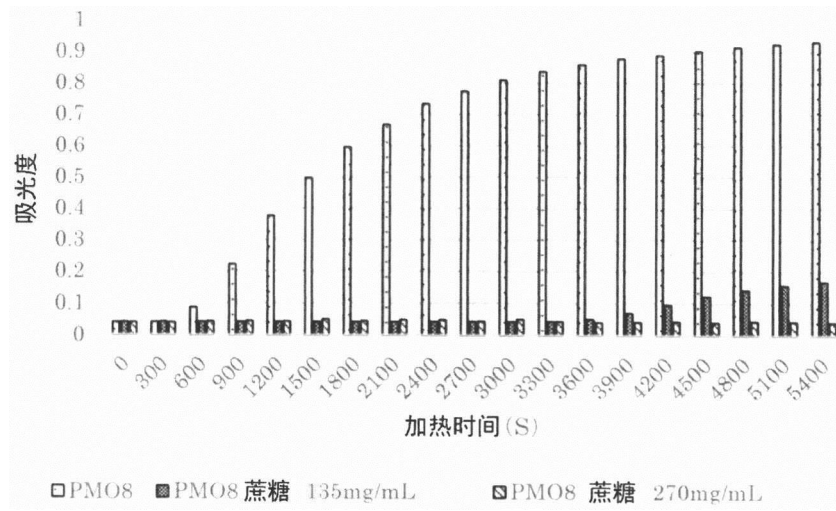


图5

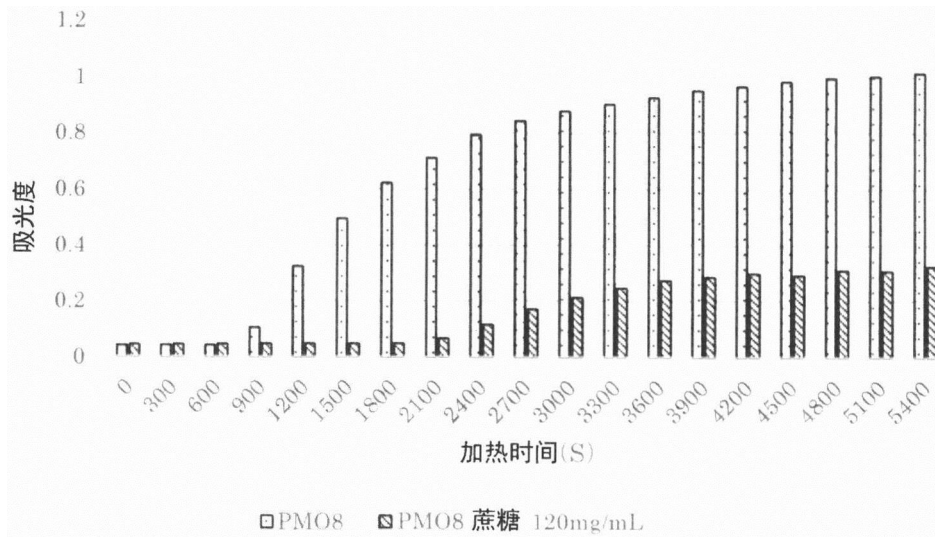


图6

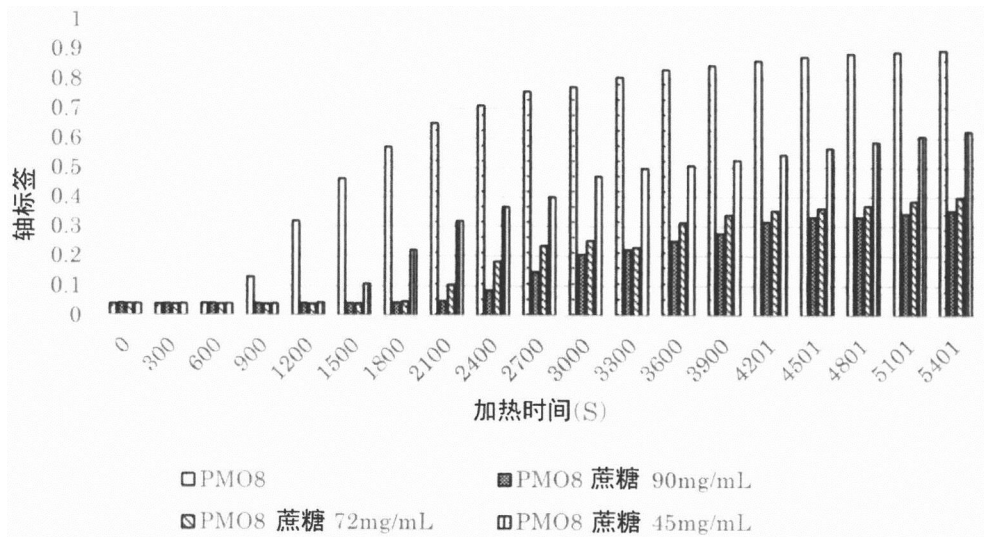


图7

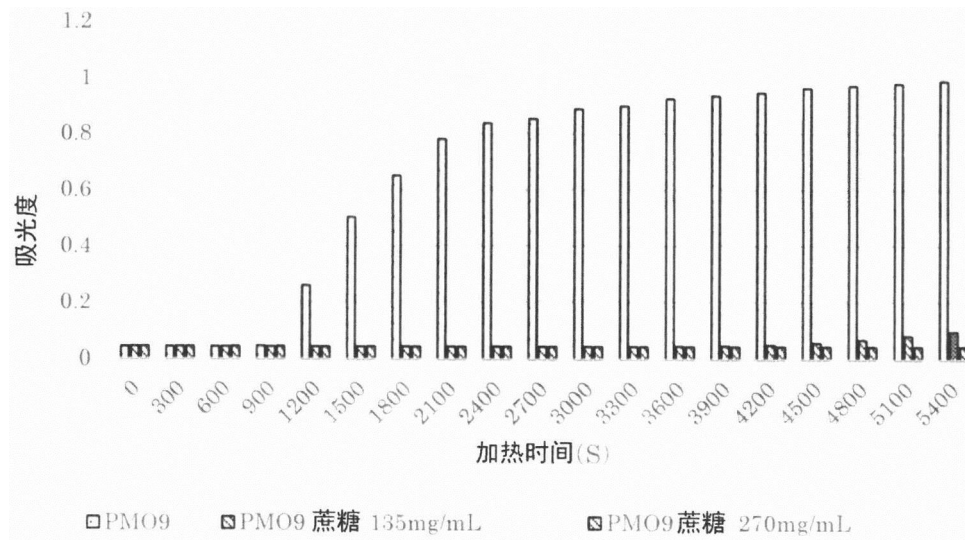


图8

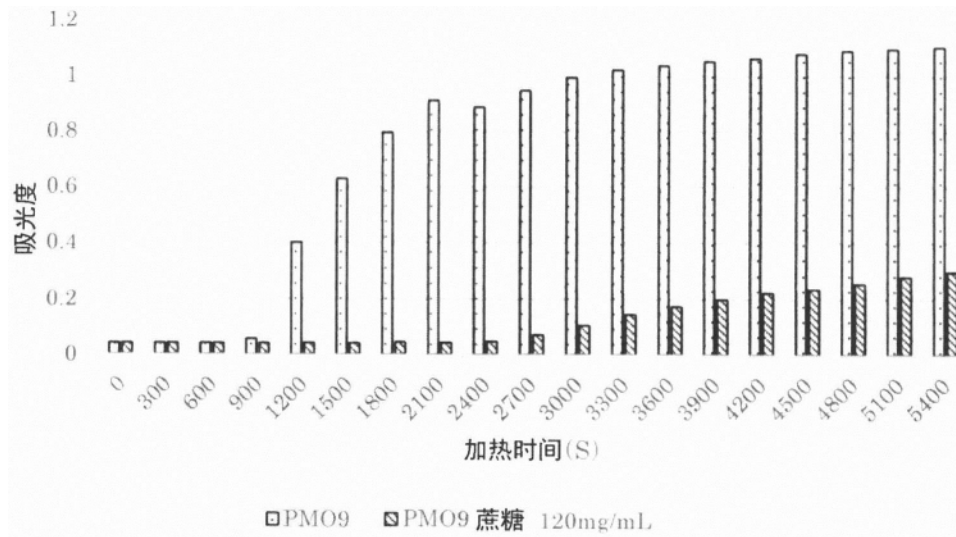


图9

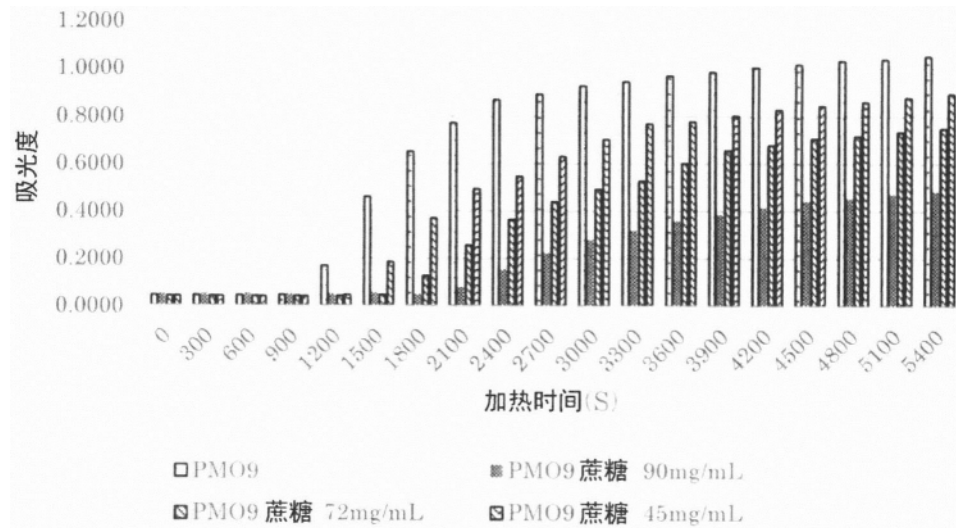


图10

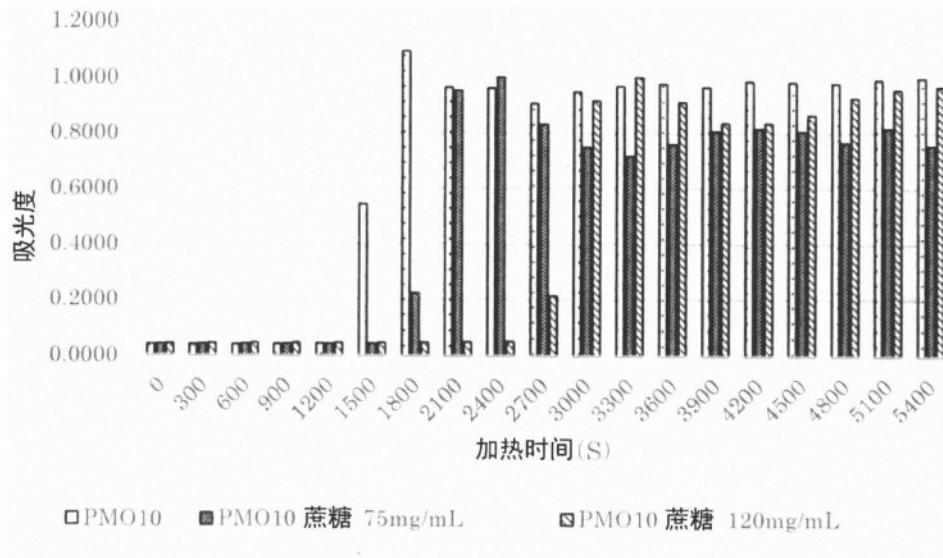


图11

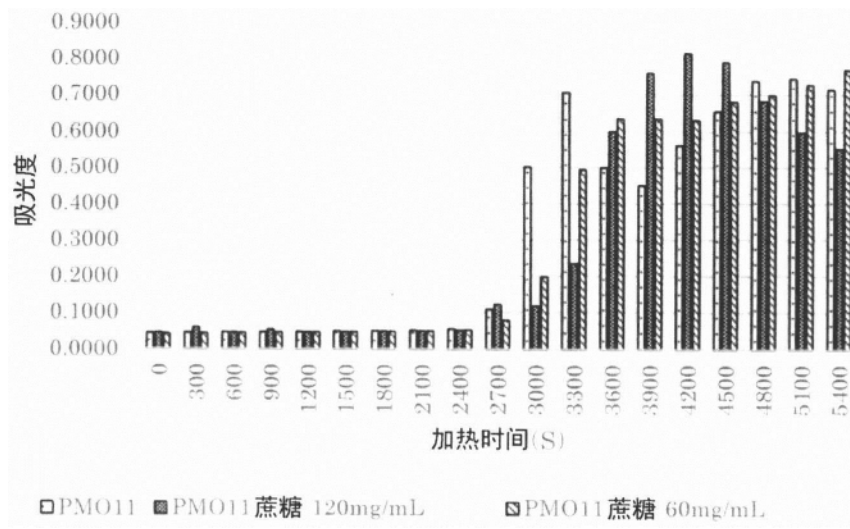


图12

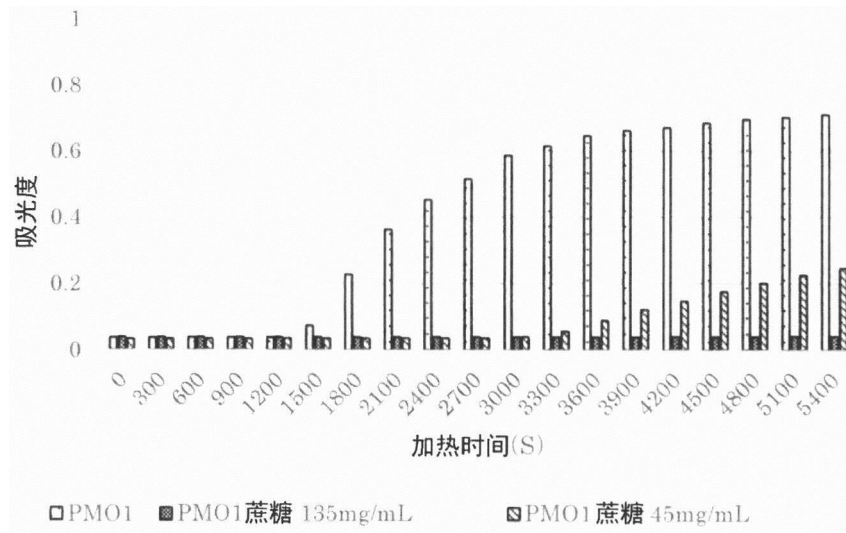


图13

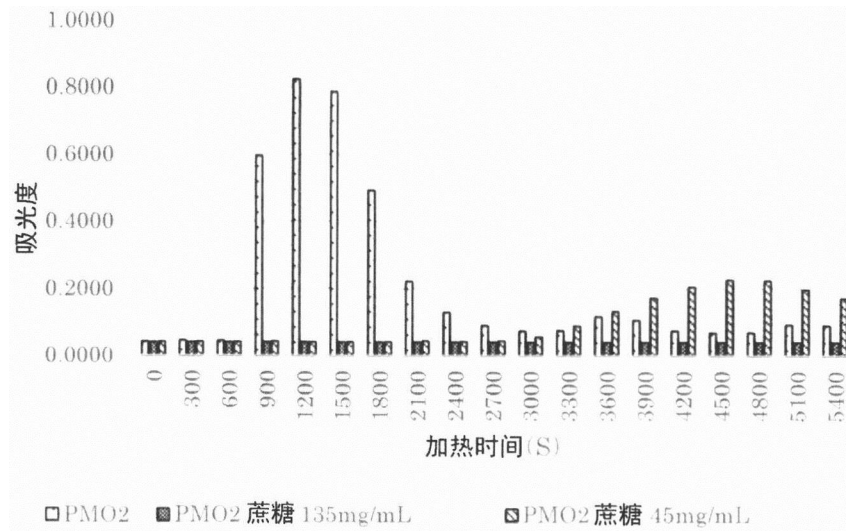


图14

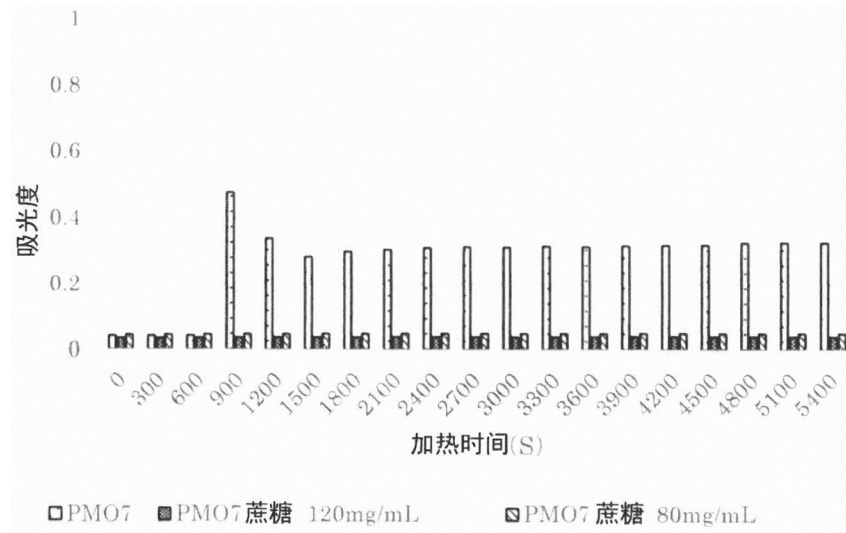


图15

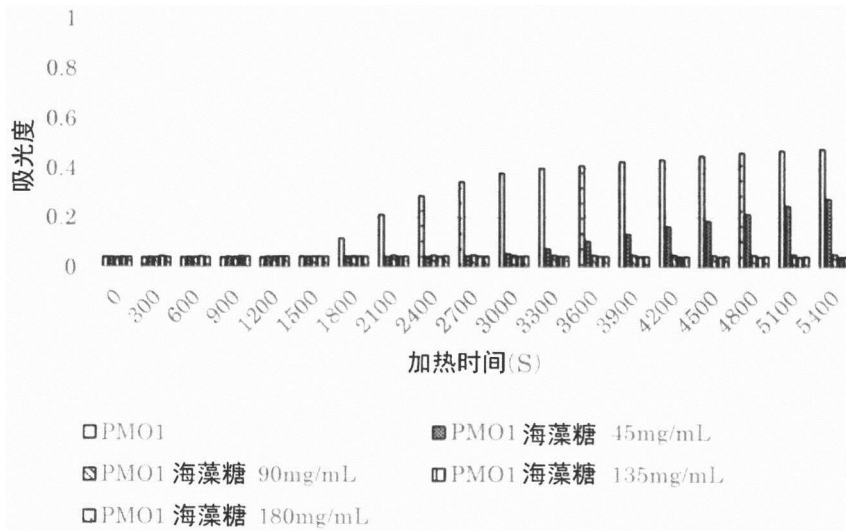


图16

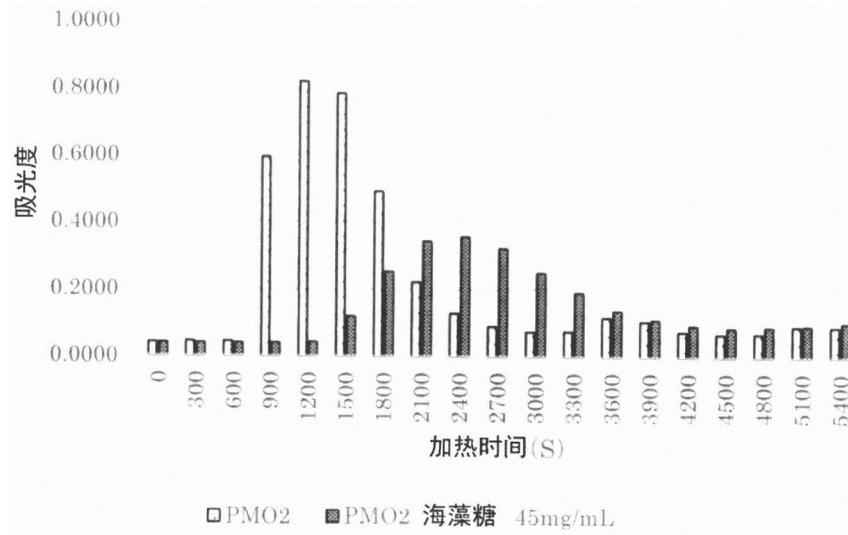


图17

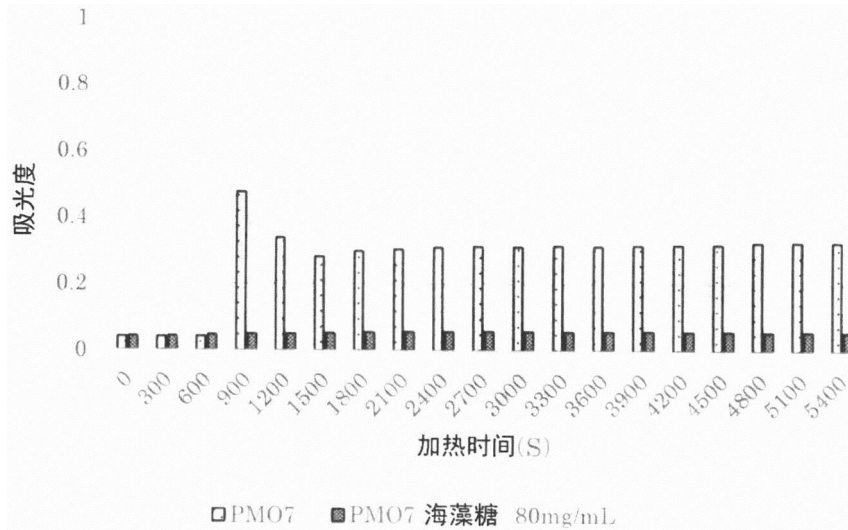


图18

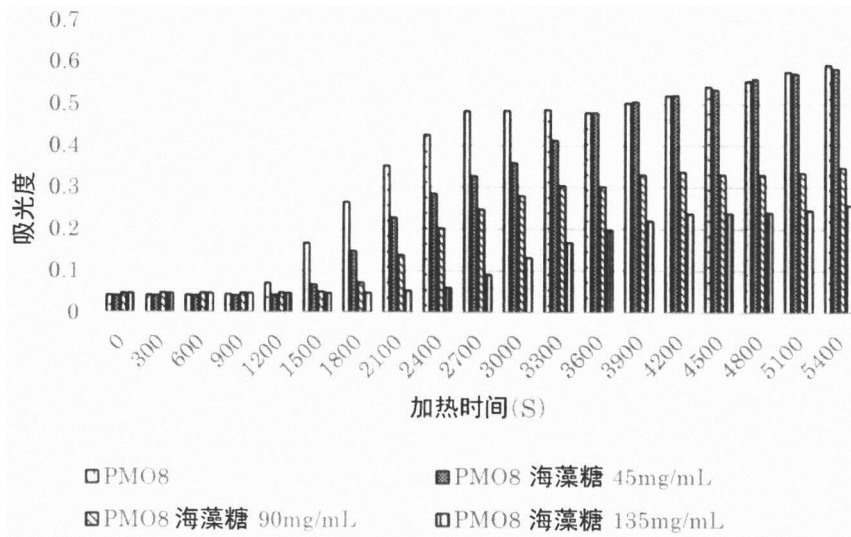


图19