



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117062911 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 14

(21) 申请号 202280024040.2

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22) 申请日 2022.03.30

专利代理师 秦剑

(30) 优先权数据

63/168,972 2021.03.31 US

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/022485 2022.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/212459 EN 2022.10.06

(71) 申请人 渤健马萨诸塞州股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 刘莺颖 P·孙 S·M·弗拉德特

D·L·格拉汉姆 J·C·Y·王

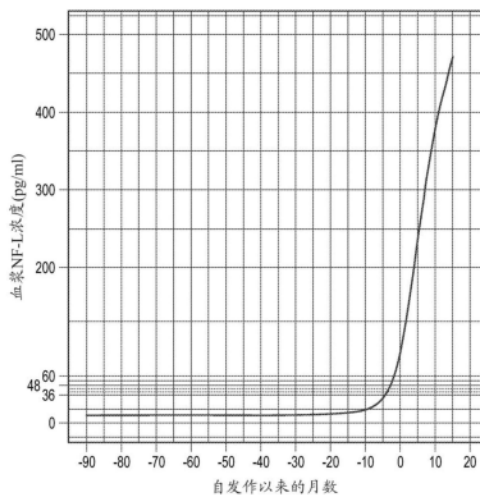
权利要求书3页 说明书18页
序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

肌萎缩性脊髓侧索硬化症的治疗

(57) 摘要

本公开提供了神经丝轻链水平在选择具有过氧化物歧化酶1(SOD1)基因的突变的受试者以用SOD1靶向反义寡核苷酸或其盐进行治疗中的用途。所述公开的方法可用于治疗肌萎缩性脊髓侧索硬化症,包括临床上症状发生前肌萎缩性脊髓侧索硬化症。



到症状发作的时间	后验中值估计						
	1个月	2个月	3个月	4个月	5个月	6个月	7个月
几何平均NF水平	73.05	58.62	47.20	38.03	32.15	27.2	23.7

1. 一种治疗有需要的人类受试者的与过氧化物歧化酶1 (SOD1) 基因的突变相关联的肌萎缩性脊髓侧索硬化症的方法, 所述方法包括向所述人类受试者施用药物组合物, 所述药物组合物包含治疗有效量的根据下式的反义寡核苷酸:

mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo Aes
Geo mCes Te (SEQ ID NO:1的核碱基序列), 其中,

A=腺嘌呤,

mC=5-甲基胞嘧啶

G=鸟嘌呤,

T=胸腺嘧啶,

e=经2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的糖,

d=2'-脱氧核糖类糖,

s=硫代磷酸酯核苷间键, 并且

o=磷酸二酯核苷间键;

或其药学上可接受的盐,

其中所述人类受试者在开始所述治疗之前具有至少44pg/ml的神经丝轻链水平。

2. 如权利要求1所述的方法, 其中所述人类受试者在开始所述治疗之前已经受至少10pg/ml的神经丝轻链水平的增加。

3. 如权利要求2所述的方法, 其中所述人类受试者在开始所述治疗之前具有等同于至少44pg/ml的血浆神经丝轻链水平的血液、血清或脑脊液神经丝轻链水平, 并且其中所述人类受试者在开始所述治疗之前已经受等同于至少10pg/ml的血浆神经丝轻链水平的增加的血液、血清或脑脊液神经丝轻链水平的增加。

4. 如权利要求2所述的方法, 其中所述人类受试者在开始所述治疗之前具有至少44pg/ml的血浆神经丝轻链水平, 并且其中所述人类受试者在开始所述治疗之前已经受至少10pg/ml的血浆神经丝轻链水平的增加。

5. 一种治疗有需要的人类受试者的与SOD1基因的突变相关联的肌萎缩性脊髓侧索硬化症的方法, 所述方法包括:

在开始治疗之前在从所述人类受试者获得的生物样品中测量至少44pg/ml的神经丝轻链水平; 以及

向所述人类受试者施用药物组合物, 所述药物组合物包含治疗有效量的根据下式的反义寡核苷酸:

mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo Aes
Geo mCes Te (SEQ ID NO:1的核碱基序列), 其中,

A=腺嘌呤,

mC=5-甲基胞嘧啶

G=鸟嘌呤,

T=胸腺嘧啶,

e=经2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的糖,

d=2'-脱氧核糖类糖,

s=硫代磷酸酯核苷间键, 并且

- o=磷酸二酯核苷间键；
或其药学上可接受的盐。
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述生物样品是血液、血清、血浆或脑脊液。
7. 如权利要求5所述的方法,其中所述生物样品是血浆。
8. 如权利要求5或6所述的方法,所述方法还包括在施用所述反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐之前,在所述人类受试者中测量等同于至少10pg/ml的血浆神经丝轻链水平的增加的血液、血清或脑脊液水平神经丝轻链水平的增加。
9. 如权利要求5至7中任一项所述的方法,所述方法还包括在施用所述反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐之前在所述人类受试者中测量至少10pg/ml的血浆神经丝轻链水平的增加。
10. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述药物组合物是通过鞘内施用来施用。
11. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述药物组合物递送约100mg固定剂量的所述反义寡核苷酸。
12. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述SOD1基因的所述突变是A4V。
13. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述SOD1基因的所述突变是A4V、H46R、G93S、A4T、G141X、D133A、V148G、N139K、G85R、G93A、V14G、C6S、I113T、D49K、G37R、A89V、E100G、D90A、T137A、E100K、G41A、G41D、G41S、G13R、G72S、L8V、F20C、Q22L、H48R、T54R、S591、V87A、T88 δ TAD、A89T、V97M、S105 δ SL、V118L、D124G、L114F、D90A、G12R、G147R、C6F、C6G、D101G、D101H、G114A、G85S、H43R、L106F、L106V、L38V或R115G。
14. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述人类受试者是肌萎缩性脊髓侧索硬化症的临床上症状发生前受试者。
15. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中先向所述人类受试者施用所述药物组合物的负荷剂量,之后施用所述药物组合物的维持剂量。
16. 如权利要求15所述的方法,其中向所述人类受试者施用三个负荷剂量,并且其中所述负荷剂量是间隔14天施用。
17. 如权利要求16所述的方法,其中所述维持剂量是在第三负荷剂量之后28天开始每28天施用。
18. 如权利要求15所述的方法,其中所述药物组合物的所述负荷剂量和所述维持剂量如下施用于所述人类受试者:
- (i) 所述药物组合物的第一负荷剂量;
 - (ii) 在所述第一负荷剂量之后14天施用所述药物组合物的第二负荷剂量;
 - (iii) 在所述第一负荷剂量之后28天施用所述药物组合物的第三负荷剂量;以及
 - (iv) 在所述第三负荷剂量之后28天或1个月施用所述药物组合物的第一维持剂量。
19. 如权利要求15所述的方法,其中所述药物组合物的所述负荷剂量和所述维持剂量如下施用于所述人类受试者:
- (i) 足以递送约100mg固定剂量的所述反义寡核苷酸的量的第一负荷剂量;
 - (ii) 足以递送约100mg固定剂量的所述反义寡核苷酸的量的第二负荷剂量,其中所述第二负荷剂量是在所述第一负荷剂量之后14天施用;

(iii) 足以递送约100mg固定剂量的所述反义寡核苷酸的量的第三负荷剂量,其中所述第三负荷剂量是在所述第一负荷剂量之后28天施用;以及

(iv) 足以递送约100mg固定剂量的所述反义寡核苷酸的量的第一维持剂量,其中所述第一维持剂量是在所述第三负荷剂量之后28天施用。

肌萎缩性脊髓侧索硬化症的治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年3月31日提交的美国临时申请号63/168,972的优先权。前述申请的内容以引用的方式整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已以ASCII格式电子提交并且特此以引用的方式整体并入。所述ASCII拷贝创建于2022年3月24日,命名为13751-0344W01_SL.txt并且大小为7,948字节。

技术领域

[0005] 本公开涉及肌萎缩性脊髓侧索硬化症的生物标志物及其治疗。

背景技术

[0006] 可溶性过氧化物歧化酶1 (SOD1) (也称为Cu/Zn过氧化物歧化酶) 是通过催化过氧化物到过氧化氢 (H_2O_2) 的歧化作用来提供针对生物分子氧化损伤的防御的一种过氧化物歧化酶 (Fridovich, *Annu. Rev. Biochem.*, 64:97-112 (1995))。过氧化物阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 是由于粒线体中的氧化磷酸化出错而产生的潜在有害的细胞副产物 (Turrens, *J. Physiol.*, 552:335-344 (2003))。

[0007] 肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (ALS, 也称为卢格里克氏病 (Lou Gehrig's disease)) 是在任一给定时间都会侵袭多达约17,000美国人的毁灭性进行性神经退行性疾病 (Mehta, P. 等人 (2018). "Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis-United States, 2015." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 67 (46):1285-1289.) 约2%的ALS病例由编码SOD1的基因的突变引起 (Bunton-Stasyshyn RKA等人, *Neuroscientist*. 2015;21:519-29)。SOD1基因的突变通常与ALS的显性遗传形式相关联,这是一种特征在于上下运动神经元选择性变性的病症 (Rowland, *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344:1688-1700 (2001))。

[0008] 认为突变体SOD1的毒性源自初始错误折叠 (功能获得型) 降低活性酶的核保护 (核中功能丧失), 该过程可能牵涉到ALS发病机制 (Sau, *Hum. Mol. Genet.*, 16:1604-1618 (2007))。ALS中运动神经元的进行性变性最终导致其死亡。当运动神经元死亡时, 大脑发起和控制肌肉运动的能力丧失。随着随意肌肉动作逐步受到影响, 处于疾病晚期的患者可能会完全瘫痪。

[0009] 仍然存在对治疗ALS的有效疗法的尚未满足的需求。因此, 本文的目的是提供用于治疗该疾病的方法。

发明内容

[0010] 本公开部分地涉及治疗具有临床症状/病征的受试者 (例如, 成人) 以及具有疾病的生物标志物证据 (例如, 至少44pg/mL的神经丝轻链水平) 的症状发生前受试者 (例如, 成人) 的与SOD1基因的突变相关联的肌萎缩性脊髓侧索硬化症。

[0011] 在一些方面中,本文提供了神经丝轻链水平为至少44pg/ml的人类受试者(例如,其中人类受试者是ALS的临床症状发生前受试者)的与SOD1基因的突变相关联的肌萎缩性脊髓侧索硬化症的治疗。

[0012] 在一个方面中,本公开涉及一种通过向人类受试者施用药物组合物来治疗有需要的人类受试者的与SOD1基因的突变相关联的肌萎缩性脊髓侧索硬化症的方法,所述药物组合物包含治疗有效量的根据下式的反义寡核苷酸:

[0013] mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo Aes Geo mCes Te (SEQ ID NO:1的核碱基序列),其中,

[0014] A = 腺嘌呤,

[0015] mC=5-甲基胞嘧啶

[0016] G=鸟嘌呤,

[0017] T=胸腺嘧啶,

[0018] e=经2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的糖,

[0019] d=2'-脱氧核糖类糖,

[0020] s=硫代磷酸酯核苷间键,并且

[0021] o=磷酸二酯核苷间键;

[0022] 或其药学上可接受的盐,

[0023] 其中所述人类受试者在开始所述治疗之前具有至少44pg/ml的神经丝轻链水平。

[0024] 在一些实施方案中,所述人类受试者在开始所述治疗之前已经受至少10pg/ml的神经丝轻链水平的增加。

[0025] 在一些实施方案中,所述神经丝轻链水平是来自所述人类受试者的生物样品(例如,血液、血清、血浆或脑脊液样品)中的水平。在一些实施方案中,所述神经丝轻链水平是血浆水平,例如,至少44pg/ml的血浆水平和/或至少10pg/ml的血浆水平增加。在一些实施方案中,所述神经丝轻链水平是等同于对应的血浆水平(例如,等同于至少44pg/ml的血浆水平或至少10pg/ml的血浆水平增加)的血液、血清或脑脊液水平。

[0026] 在一些实施方案中,所述人类受试者在开始所述治疗之前具有至少44pg/ml的神经丝轻链水平,并且其中所述人类受试者在开始所述治疗之前已经受至少10pg/ml的神经丝轻链水平的增加。

[0027] 在一些实施方案中,所述人类受试者在开始所述治疗之前具有至少44pg/ml的血浆神经丝轻链水平,并且其中所述人类受试者在开始所述治疗之前已经受至少10pg/ml的血浆神经丝轻链水平的增加。

[0028] 在另一方面中,本公开涉及一种通过以下方式治疗有需要的人类受试者的与SOD1基因的突变相关联的肌萎缩性脊髓侧索硬化症的方法:

[0029] 在开始治疗之前在从人类受试者获得的生物样品中测量至少44pg/ml的神经丝轻链水平;以及

[0030] 向所述人类受试者施用药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的根据下式的反义寡核苷酸:

[0031] mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo Aes Geo mCes Te (SEQ ID NO:1的核碱基序列),其中,

- [0032] A=腺嘌呤,
- [0033] mC=5-甲基胞嘧啶
- [0034] G=鸟嘌呤,
- [0035] T=胸腺嘧啶,
- [0036] e=经2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的糖,
- [0037] d=2'-脱氧核糖类糖,
- [0038] s=硫代磷酸酯核苷间键,并且
- [0039] o=磷酸二酯核苷间键;
- [0040] 或其药学上可接受的盐。
- [0041] 在一些实施方案中,所述生物样品是血液、血清、血浆或脑脊液。
- [0042] 在一些实施方案中,所述生物样品是血液。
- [0043] 在一些实施方案中,所述生物样品是血清。
- [0044] 在一些实施方案中,所述生物样品是血浆。
- [0045] 在一些实施方案中,所述方法还包括在施用所述反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐之前在所述人类受试者中测量至少10pg/ml的血液、血清、血浆或脑脊液神经丝轻链水平的增加。
- [0046] 在一些实施方案中,所述方法还包括在施用所述反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐之前在所述人类受试者中测量至少10pg/ml的血浆神经丝轻链水平的增加。
- [0047] 在一些实施方案中,所述方法还包括在施用所述反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐之前在所述人类受试者中测量等同于至少10pg/ml的血浆水平增加的血液、血清或脑脊液水平神经丝轻链水平的增加。
- [0048] 在本文所述任一方法的一些实施方案中,所述药物组合物是通过鞘内施用来施用。
- [0049] 在本文所述任一方法的一些实施方案中,所述药物组合物递送约100mg固定剂量的所述反义寡核苷酸。
- [0050] 在本文所述任一方法的一些实施方案中,所述SOD1基因的所述突变是A4V。
- [0051] 在本文所述任一方法的一些实施方案中,所述SOD1基因的所述突变是A4V、H46R、G93S、A4T、G141X、D133A、V148G、N139K、G85R、G93A、V14G、C6S、I113T、D49K、G37R、A89V、E100G、D90A、T137A、E100K、G41A、G41D、G41S、G13R、G72S、L8V、F20C、Q22L、H48R、T54R、S591、V87A、T888TAD、A89T、V97M、S1058SL、V118L、D124G、L114F、D90A、G12R、G147R、C6F、C6G、D101G、D101H、G114A、G85S、H43R、L106F、L106V、L38V或R115G。
- [0052] 在本文所述任一方法的一些实施方案中,所述人类受试者是肌萎缩性脊髓侧索硬化症的临床上症状发生前受试者。
- [0053] 在本文所述任一方法的一些实施方案中,先向所述人类受试者施用所述药物组合物的负荷剂量,之后施用所述药物组合物的维持剂量。
- [0054] 在先向所述人类受试者施用所述药物组合物的负荷剂量,之后施用所述药物组合物的维持剂量的一些实施方案中,向所述人类受试者施用三个负荷剂量,其中所述负荷剂量是间隔14天施用。
- [0055] 在先向所述人类受试者施用所述药物组合物的负荷剂量,之后施用所述药物组合

物的维持剂量的一些实施方案中,所述维持剂量是在第三负荷剂量之后28天开始每28天施用。

[0056] 在先向所述人类受试者施用所述药物组合物的负荷剂量,之后施用所述药物组合物的维持剂量的一些实施方案中,所述药物组合物的所述负荷剂量和所述维持剂量如下施用于所述人类受试者:

[0057] (i) 所述药物组合物的第一负荷剂量;

[0058] (ii) 在所述第一负荷剂量之后14天施用所述药物组合物的第二负荷剂量;

[0059] (iii) 在所述第一负荷剂量之后28天施用所述药物组合物的第三负荷剂量;以及

[0060] (iv) 在所述第三负荷剂量之后28天或1个月施用所述药物组合物的第一维持剂量。

[0061] 在先向所述人类受试者施用所述药物组合物的负荷剂量,之后施用所述药物组合物的维持剂量的一些实施方案中,所述药物组合物的所述负荷剂量和所述维持剂量如下施用于所述人类受试者:

[0062] (i) 足以递送约100mg固定剂量的所述反义寡核苷酸的量的第一负荷剂量;

[0063] (ii) 足以递送约100mg固定剂量的所述反义寡核苷酸的量的第二负荷剂量,其中所述第二负荷剂量是在所述第一负荷剂量之后14天施用;

[0064] (iii) 足以递送约100mg固定剂量的所述反义寡核苷酸的量的第三负荷剂量,其中所述第三负荷剂量是在所述第一负荷剂量之后28天施用;以及

[0065] (iv) 足以递送约100mg固定剂量的所述反义寡核苷酸的量的第一维持剂量,其中所述第一维持剂量是在所述第三负荷剂量之后28天施用。

[0066] 根据本文所述的任一方法,在一些实施方案中,所述人类受试者是成人,例如所述人类受试者是至少18岁,例如至少18岁、20岁、25岁、30岁、35岁、40岁、45岁、50岁、55岁、60岁、65岁或以上。

[0067] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。虽然与本文描述的那些类似或等效的方法和材料可用于本发明的实践或测试,但下文描述了示例性方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都以引用的方式整体并入。在冲突的情况下,将以包括定义的本申请为准。材料、方法和实例仅是说明性的,而不意图进行限制。

[0068] 根据以下具体实施方式和权利要求,本发明的其他特征和优点将是显而易见的。

附图说明

[0069] 图1是示出在基线下为30岁或以上且具有快速进展突变的患有临床上表现的ALS的参与者的几何平均NfL水平的基于模型的估计的图。

具体实施方式

[0070] 本公开涉及反义寡核苷酸或其盐的用途,其用于治疗具有临床症状/病征的受试者(例如,成人)以及具有疾病的生物标志物证据(例如,至少44pg/ml的神经丝轻链水平)的症状发生前受试者(例如,成人)的与SOD1基因的突变相关联的肌萎缩性脊髓侧索硬化症。

[0071] 肌萎缩性脊髓侧索硬化症

[0072] 肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)是导致皮质、脑干和脊髓内的运动神经元损失的罕见的神经退行性疾病。患者遭受延髓肌、呼吸肌和随意肌的肌肉质量、强度和功能的进行性损失。衰退是不可避免的,而死亡通常由呼吸衰竭导致,平均发生在诊断之后2至5年。尽管大多数患者患有偶发性ALS,但较小部分患者(约2%)患有由过氧化物歧化酶1(SOD1)的多种突变引起的遗传或家族形式的ALS。自从1993年初次发现这种形式的ALS(称为SOD1 ALS)以来,已报道超过180种SOD1突变会引起这种形式的ALS。肌萎缩性脊髓侧索硬化症在线遗传学数据库(Amyotrophic Lateral Sclerosis Online Genetics Database, ALSod).Institute of Psychiatry, Psychology&Neuroscience.2015年公布;Rosen, Nature, 364(6435):362(1993)。个别突变的疾病进展是可变的,其中在最严重的突变下,存活期不到15个月。

[0073] 经批准用于ALS的治疗是利芦噻唑(Rilutek®)和依达拉奉(Radicava™)。利芦噻唑提供存活期的适度增加(2至3个月),而在强度或失能方面无法显著改善。依达拉奉减弱功能性衰退,如通过修订的肌萎缩性脊髓侧索硬化症功能评级量表(Revised Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale, ALSFRS-R)所衡量。依达拉奉对存活期的效果是未知的。无法获得SOD1特异性ALS治疗。

[0074] 过氧化物歧化酶1

[0075] 过氧化物歧化酶[Cu-Zn](也称为过氧化物歧化酶1(SOD1))是在人体内由位于染色体21上的SOD1基因编码的酶。

[0076] SOD1是形成 β -桶并在每个亚基中含有分子内二硫键和双核Cu/Zn位点的32kDa同二聚体。这个Cu/Zn位点容纳铜和锌离子并且负责催化过氧化物歧化为过氧化氢和双氧。

[0077] SOD1是负责破坏身体中的游离过氧化物自由基的三种过氧化物歧化酶之一。经编码的同工酶是可溶性细胞质和粒线体膜间间隙蛋白,作为同二聚体起到将天然存在但有害的过氧化物自由基转化成分子氧和过氧化氢的作用。过氧化氢之后可由另一酶(称为过氧化氢酶)分解。

[0078] SOD1基因的至少180种突变与家族性ALS相关(Conwit RA, JNeurol Sci., 251(1-2):1-2(2006); Al-Chalabi A, Leigh PN, Curr. Opin. in Neurol., 13(4):397-405(2000); Redler RL, Dokholyan NV, Progress in Molecular Biology and Translational Science, 107:215-62(2012))。然而,野生型SOD1在细胞应力条件下也会参与大部分偶发性ALS病例,其占ALS患者的90%。人类SOD1的最频繁的突变在美国是A4V;在日本是H46R;而在冰岛是G93S。其他熟知的人类SOD1突变包括:A4V、H46R、G93S、A4T、G141X、D133A、V148G、N139K、G85R、G93A、V14G、C6S、I113T、D49K、G37R、A89V、E100G、D90A、T137A、E100K、G41A、G41D、G41S、G13R、G72S、L8V、F20C、Q22L、H48R、T54R、S591、V87A、T888TAD、A89T、V97M、S1058SL、V118L、D124G、L114F、D90A、G12R、G147R、C6F、C6G、D101G、D101H、G114A、G85S、H43R、L106F、L106V、L38V和R115G。几乎所有已知的引起ALS的SOD1突变都以显性方式起作用;SOD1基因的单个突变体拷贝足以引起该疾病。

[0079] 人类SOD1的氨基酸序列可参见UniProt P00441以及GENBANK登录号NP_000445,并且提供在下文中:

MATKAVCVLK GDGPVQGIIN FEQKESNGPV KVGWSIKGLT
 EGLHGFHVHE FGDNTAGCTS AGPHFNPLSR KHGGPKDEER
 [0080] HVGDLGNVTA DKDGVADVSI EDSVISLSGD HCIIGRTLVV
 HEKADDLGKG GNEESTKTGN AGSRLACGVI

GIAQ (SEQ ID NO:2)

[0081] 编码人类SOD1的核苷酸序列以GENBANK登录号NM_000454.4提供,并且也提供在下文中(由本公开的反义寡核苷酸识别的区域加下划线):

1 gtttggggcc agagtgggcg aggcgaggag gtctggccta taaagtagtc gcggagacgg
 61 ggtgctggtt tgcgtctag tctctgcag cgtctggggt ttccgttga gtcctcggaa
 121 ccaggacctc ggcgtggcct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgcg tgctgaaggg
 181 cgacggccca gtgcagggca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtga
 241 ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg tcatgagtt
 301 tggagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac ttaatcctc tatccagaaa
 361 acacgggtggg ccaaaggatg aagagaggca tgttggagac ttgggcaatg tgactgctga
 421 caaagatggt gtggccgatg tctctattga agattctgtg atctcactct caggagacca
 [0082] 481 ttgcatcatt ggccgcacac tgggtgtcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaagggtgg
 541 aatgaagaa agtacaaga caggaaacgc tggaaagcgt ttggcttgtg gtgtaattgg
 601 gatgccc aaacattcc cttggatgta gtctgaggcc ccttaactca tctgttatcc
 661 tgctagctgt agaaatgtat cctgataaac attaaacact gtaatcttaa aagtgtaatt
 721 gtgtgacttt ttcagagttg ctftaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact
 781 tggagatttt gtatagtttt ataaaactca gftaaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt
 841 ttgccagact taaatcacag atgggtatta aactgtcag aatttctttg tcaatcaagc
 901 ctgtgaataa aaaccctgta tggcacttat tatgaggcta ttaaagaat ccaaattcaa
 961 actaaaaaaaa aaaaaaaaaa a (SEQ ID NO:3)

[0083] SOD1反义寡核苷酸

[0084] “反义A”是5'-10'-5MOE间隙聚体(gapmer),具有序列(从5'到3') CAGGATACATTTCTACAGCT(SEQ ID NO:1),其中核苷1-5和16-20中的每一者是经2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的核苷,并且核苷6-15中的每一者是2'-脱氧核苷,其中核苷2至3、4至5、16至17和18至19之间的核苷间键是磷酸二酯键,并且核苷1至2、3至4、5至6、6至7、7至8、8至9、9至10、10至11、11至12、12至13、13至14、14至15、15至16、17至18和19至20之间的核苷间键是

硫代磷酸酯键,并且其中每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0085] 反义A通过以下化学注释来描述:mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo Aes Geo mCes Te (SEQ ID NO:1);其中,

[0086] A=腺嘌呤,

[0087] mC=5-甲基胞嘧啶

[0088] G=鸟嘌呤,

[0089] T=胸腺嘧啶,

[0090] e=经2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的糖,

[0091] d=2'-脱氧核糖类糖,

[0092] s=硫代磷酸酯核苷间键,并且

[0093] o=磷酸二酯核苷间键。

[0094] “2'-O-甲氧基乙基”(也为2'-MOE以及2'-OCH₂CH₂-OCH₃和MOE)是指呋喃糖环2'位的O-甲氧基-乙基修饰。经2'-O-甲氧基乙基修饰的糖是经修饰的糖。

[0095] “5-甲基胞嘧啶”意指由附接到5'位的甲基修饰的胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶是经修饰的核碱基。

[0096] “硫代磷酸酯键”或“硫代磷酸酯核苷间键”意指核苷之间的键,其中磷酸二酯键通过用硫原子替代一个非桥接氧原子来修饰。硫代磷酸酯键是经修饰的核苷间键。

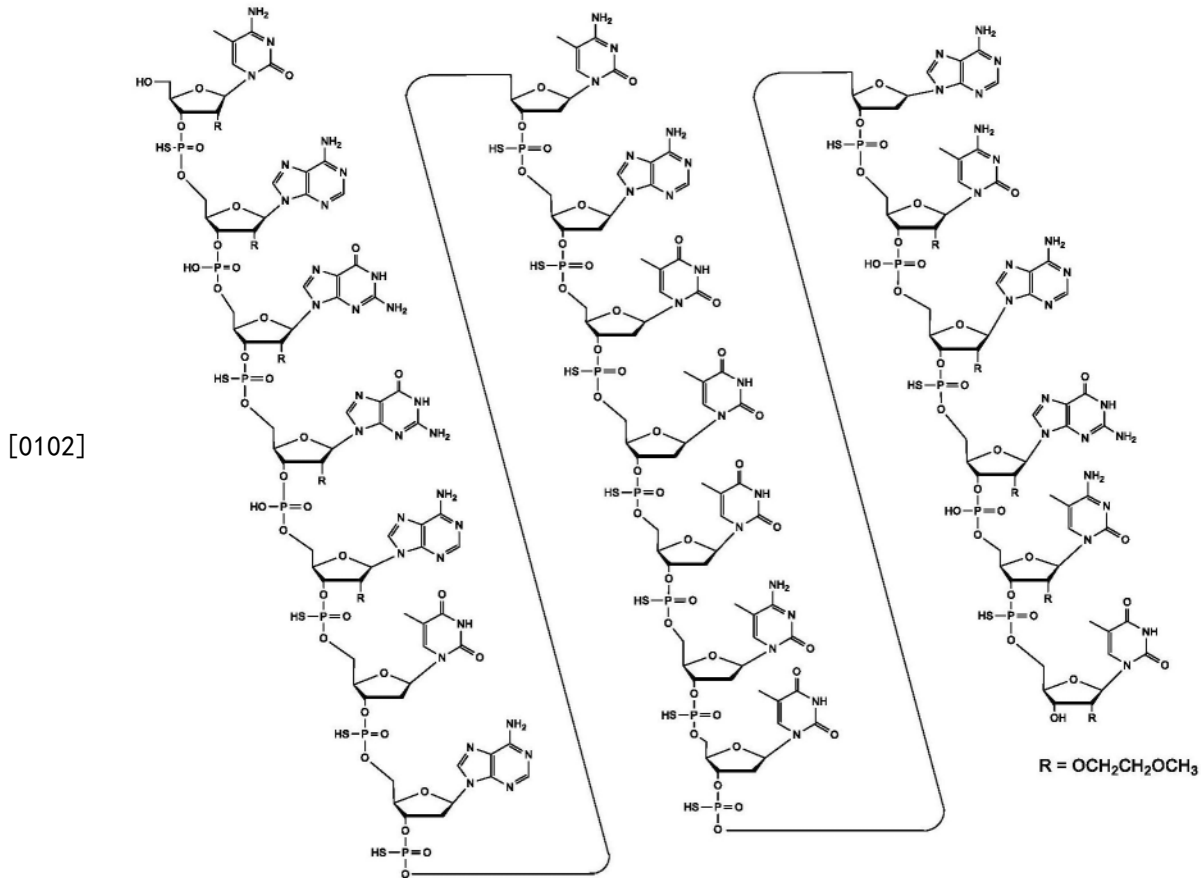
[0097] 反义A序列也可简写如下:

[0098] 5'-^{Me}CA_{P=0}GG_{P=0}ATA^{Me}CATTT^{Me}CTA^{Me}C_{P=0}AG_{P=0}^{Me}C^{Me}U-3' (SEQ ID NO:1)

[0099] 加下划线的残基是2'-MOE核苷。P=0注解反映磷酸二酯键的位置。

[0100] “2'-MOE核苷”(也为2'-O-甲氧基乙基核苷)意指包含经MOE修饰的糖部分的核苷。

[0101] 反义A通过以下化学结构来示出:



[0103] 反义A详细描述于美国专利号10,385,341中,所述专利的内容以引用的方式并入本文。

[0104] 应当理解,在溶液中(例如,在药物组合物的溶液中),反义寡核苷酸可以游离酸形式、以盐形式或其混合物形式存在。

[0105] 缀合的反义寡核苷酸

[0106] 本公开的反义寡核苷酸可共价地连接到增强所得反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一个或多个部分或缀合物。典型的缀合基团包括胆固醇部分和脂质部分。其他缀合基团包括碳水化合物、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、葱醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。反义寡核苷酸也可被修饰成具有一个或多个稳定基团,其通常附接到反义寡核苷酸的一个或两个末端以增强例如像核酸酶稳定性的性质。稳定基团中包括帽结构。这些末端修饰保护具有末端核酸的反义寡核苷酸免于核酸外切酶降解,并且可帮助递送和/或定位于细胞内。帽可存在于5'-末端(5'-帽)或3'-末端(3'-帽),或可存在于两个末端上。帽结构在本领域中是熟知的并且包括例如倒置脱氧无碱基帽。可用于对反义寡核苷酸的一端或两端加帽以赋予核酸酶稳定性的其他3'和5'稳定基团包括W0 03/004602中所公开的基团。

[0107] 用于配制药物组合物的组合物和方法

[0108] 本公开的反义寡核苷酸或其盐可与药学上可接受的活性或惰性物质混合来制备药物组合物或制剂。用于配制药物组合物的组合物和方法取决于多个标准,包括但不限于施用途径、疾病程度或将施用的剂量。

[0109] 靶向SOD1核酸的反义寡核苷酸或其盐可通过组合反义寡核苷酸或其盐与合适的

药学上可接受的稀释剂或载体来用于药物组合物中。药学上可接受的稀释剂包括磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。PBS是适合用于不经肠道递送的组合物中的稀释剂。因此,在一个实施方案中,本文描述的方法采用包含靶向SOD1核酸的反义寡核苷酸或其盐以及药学上可接受的稀释剂的药物组合物。

[0110] 本文描述的反义寡核苷酸或其盐可被配制为用于鞘内施用于受试者的药物组合物。

[0111] 包含本公开的反义寡核苷酸的药物组合物涵盖在施用于动物(包括人类)时能够提供(直接或间接)生物活性代谢物或其残基的任何药学上可接受的盐、酯或此类酯的盐或任何其他寡核苷酸。因此,例如,本公开还涉及反义寡核苷酸的药学上可接受的盐以及其他生物等效物。合适的药学上可接受的盐包括但不限于钠盐和钾盐。

[0112] 治疗方法

[0113] 本公开涉及治疗有需要的人类受试者的与人类SOD1基因的突变相关联的肌萎缩性脊髓侧索硬化症(例如,临床上症状发生前肌萎缩性脊髓侧索硬化症)的方法。所述方法包括向人类受试者施用(例如,通过鞘内施用)反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的核碱基序列由CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO:1)组成,其中核苷1-5和16-20中的每一者是经2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的核苷,并且核苷6-15中的每一者是2'-脱氧核苷,其中核苷2至3、4至5、16至17和18至19之间的核苷间键是磷酸二酯键,并且核苷1至2、3至4、5至6、6至7、7至8、8至9、9至10、10至11、11至12、12至13、13至14、14至15、15至16、17至18和19至20之间的核苷间键是硫代磷酸酯键,并且其中每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。在某些情况下,反义寡核苷酸是以约100mg或100mg的固定剂量施用。

[0114] “约”在物质的量的背景下意指所指示值的+/-10%。“约”100mg反义寡核苷酸包括90mg至110mg反义寡核苷酸。在时间单位的背景下(例如,约10天或约1周)，“约”意指+/-3天。

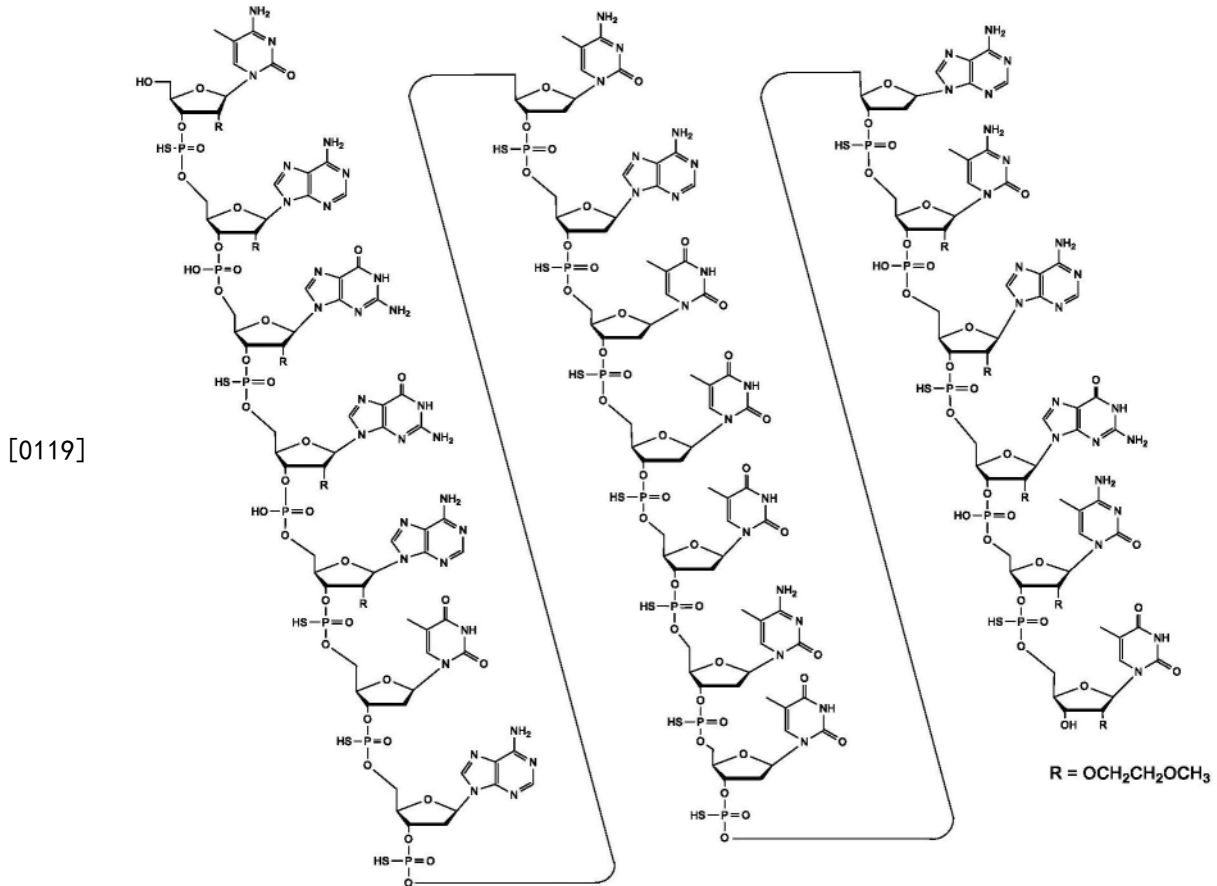
[0115] “鞘内或IT”意指施用到覆盖大脑和脊髓的蛛网膜下方的脑脊液中。

[0116] 还提供了减少具有与肌萎缩性脊髓侧索硬化症相关联的人类SOD1基因的突变的人类受试者体内的人类SOD1蛋白合成的方法。所述方法包括向人类受试者施用(例如,通过鞘内施用)反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的核碱基序列由CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO:1)组成,其中核苷1-5和16-20中的每一者是经2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的核苷,并且核苷6-15中的每一者是2'-脱氧核苷,其中核苷2至3、4至5、16至17和18至19之间的核苷间键是磷酸二酯键,并且核苷1至2、3至4、5至6、6至7、7至8、8至9、9至10、10至11、11至12、12至13、13至14、14至15、15至16、17至18和19至20之间的核苷间键是硫代磷酸酯键,并且其中每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。在某些情况下,反义寡核苷酸是以约100mg或100mg的固定剂量施用。

[0117] 还提供了降低具有与肌萎缩性脊髓侧索硬化症相关联的人类SOD1基因的突变的人类受试者体内的人类SOD1 mRNA水平的方法。所述方法包括向人类受试者施用(例如,通过鞘内施用)反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的核碱基序列由CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO:1)组成,其中核苷1-5和16-20中的每一者是经2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的核苷,并且核苷6-15中的每一者是2'-脱氧核苷,其中核苷2至3、4至5、16至17和18至19之间的核苷间键是磷酸二酯键,并且核苷1至2、3至4、5至6、6至7、7至8、8至9、9至10、10至11、11至

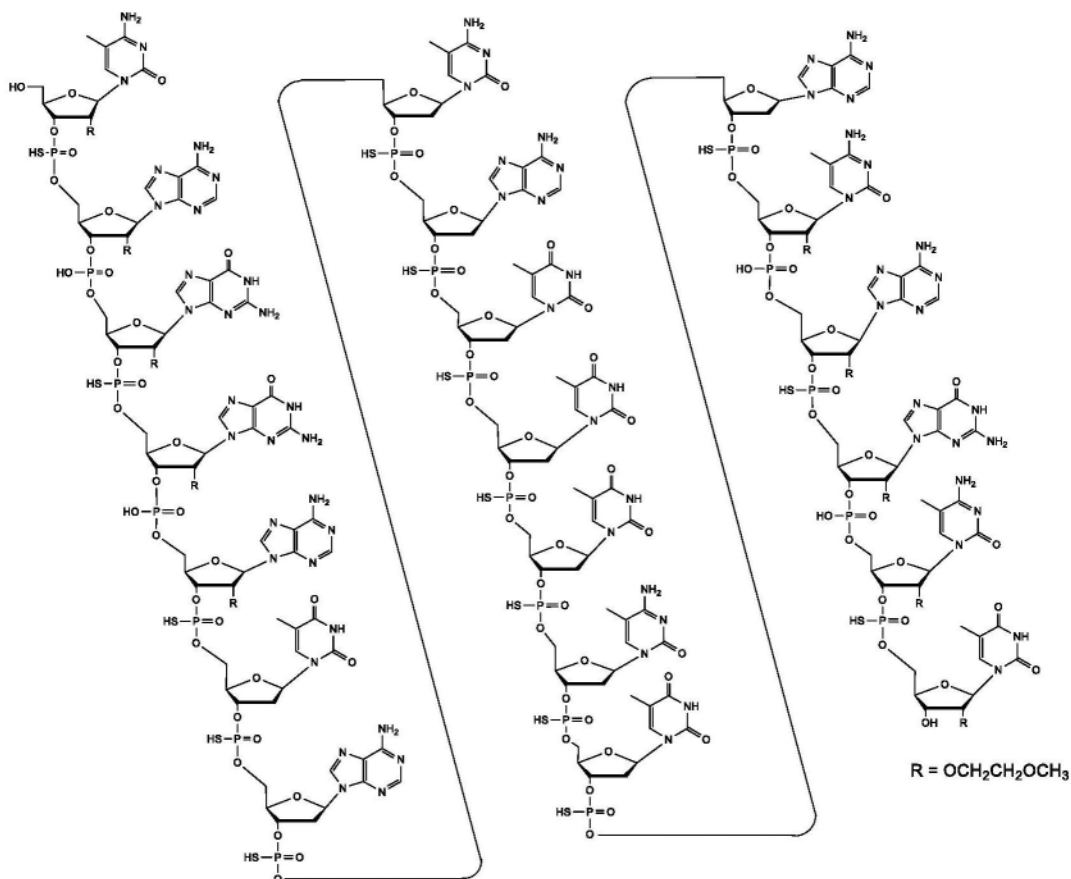
12、12至13、13至14、14至15、15至16、17至18和19至20之间的核苷间键是硫代磷酸酯键,并且其中每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。在某些情况下,反义寡核苷酸是以约100mg或100mg的固定剂量施用。

[0118] 还提供了治疗有需要的人类受试者的与SOD1基因的突变相关联的肌萎缩性脊髓侧索硬化症(例如,临床上症状发生前肌萎缩性脊髓侧索硬化症)的方法,其中所述方法需要向人类受试者施用(例如,通过鞘内施用)包含反义寡核苷酸或其盐的药物组合物,其中反义寡核苷酸具有以下结构:



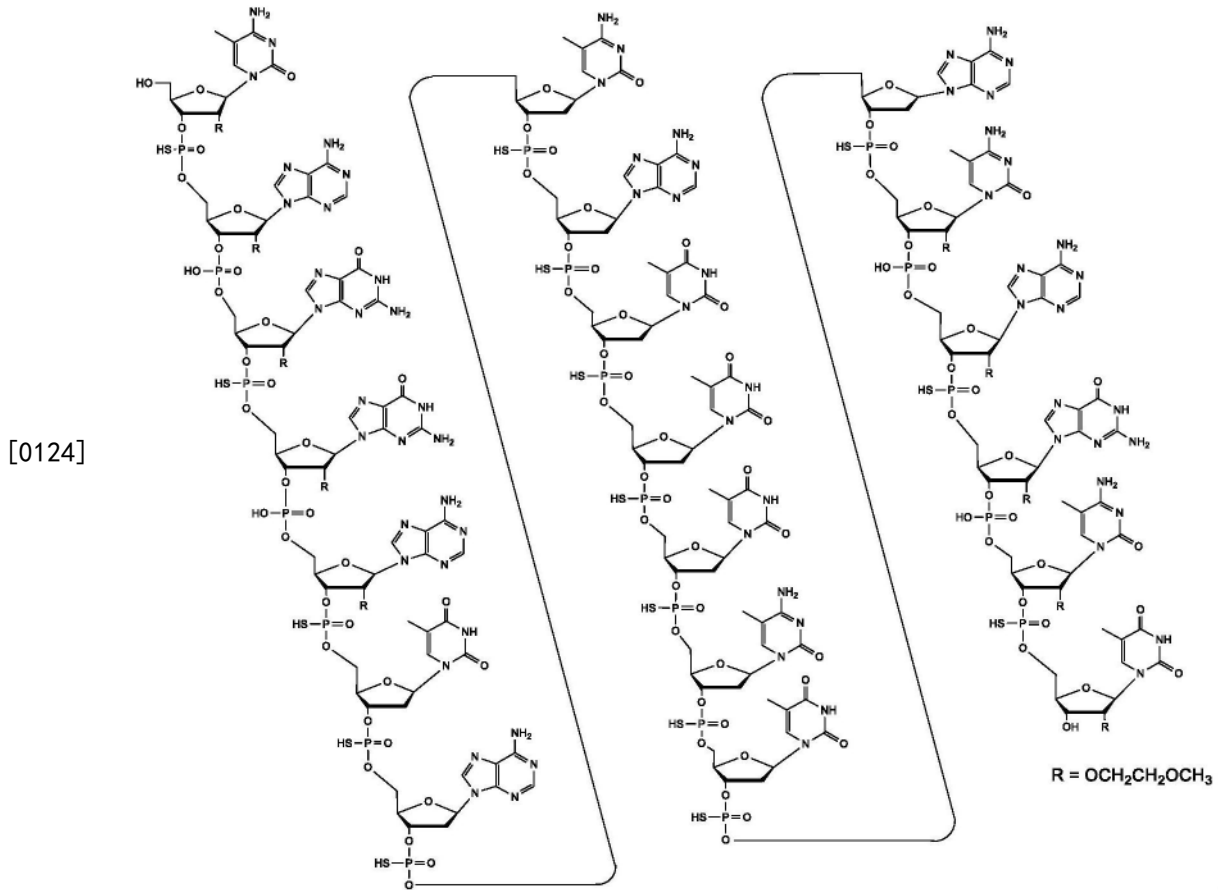
[0120] 在某些情况下,反义寡核苷酸或其盐是以等同于约100mg或100mg反义寡核苷酸的剂量施用。

[0121] 还提供了减少具有与肌萎缩性脊髓侧索硬化症相关联的人类SOD1基因的突变的人类受试者体内的人类SOD1蛋白合成的方法,其中所述方法需要向人类受试者施用(例如,通过鞘内施用)包含反义寡核苷酸或其盐的药物组合物,其中反义寡核苷酸具有以下结构:



[0122] 在某些情况下,反义寡核苷酸或其盐是以等同于约100mg或100mg反义寡核苷酸的剂量施用。

[0123] 还提供了降低具有与肌萎缩性脊髓侧索硬化症相关联的人类SOD1基因的突变的人类受试者体内的人类SOD1 mRNA水平的方法,其中所述方法需要向人类受试者施用(例如,通过鞘内施用)包含反义寡核苷酸或其盐的药物组合物,其中反义寡核苷酸具有以下结构:



[0125] 在某些情况下,反义寡核苷酸或其盐是以等同于约100mg或100mg反义寡核苷酸的剂量施用。

[0126] 在一些情况下,上述固定剂量的反义寡核苷酸或其盐是每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次施用于人类受试者。

[0127] 在一些情况下,本文描述的反义寡核苷酸是作为药物组合物的一部分施用于人类受试者。在某些实施方案中,药物组合物是以足以递送约100mg固定剂量的反义寡核苷酸的量施用于人类受试者。

[0128] 在某些实施方案中,反义寡核苷酸或其盐是作为负荷剂量施用。在一些实施方案中,反义寡核苷酸是作为维持剂量施用。在某些情况下,反义寡核苷酸是先作为负荷剂量,后作为维持剂量施用。负荷剂量可例如每周、每两周、每三周或每四周施用。维持剂量可例如在最后一次负荷剂量之后每周、每两周、每三周或每四周施用。在一些情况下,每月施用维持剂量。

[0129] “负荷剂量”意指在开始施用并达到药物(例如,反义寡核苷酸)的稳态浓度的给药阶段期间施用的剂量。

[0130] “维持剂量”意指在已达到药物(例如,反义寡核苷酸)的稳态浓度之后的给药阶段期间施用的剂量。

[0131] 在某些实施方案中,先向人类受试者施用三个负荷剂量的反义寡核苷酸或其盐,之后施用至少一个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个或更多)维持剂量。在一些情况下,三个负荷剂量是间隔两周施用。在一些情况下,三个负荷剂量是间隔14天施用。在一些情况下,一个或多个维持剂量是在第三负荷剂量之后4周开始施

用。在一些情况下,一个或多个维持剂量是在第三负荷剂量之后开始每月施用。在一些情况下,一个或多个维持剂量是在第三负荷剂量之后开始每28天施用。

[0132] SOD1突变可为人类SOD1基因的与ALS相关联的任何突变。在一些情况下,突变是缓慢进展的ALS疾病突变。在其他情况下,突变是快速进展的ALS疾病突变。在某些情况下,人类SOD1基因的突变是以下各者中的一者或多者:A4V、H46R、G93S、A4T、G141X、D133A、V148G、N139K、G85R、G93A、V14G、C6S、I113T、D49K、G37R、A89V、E100G、D90A、T137A、E100K、G41A、G41D、G41S、G13R、G72S、L8V、F20C、Q22L、H48R、T54R、S591、V87A、T888TAD、A89T、V97M、S1058SL、V118L、D124G、L114F、D90A、G12R、G147R、C6F、C6G、D101G、D101H、G114A、G85S、H43R、L106F、L106V、L38V或R115G。在一个特定实施方案中,人类受试者在人类SOD1基因中具有A4V突变。在另一特定实施方案中,人类受试者在人类SOD1基因中具有L106V突变。在另一特定实施方案中,人类受试者在人类SOD1基因中具有H46R突变。在又另一特定实施方案中,人类受试者在人类SOD1基因中具有G93S突变。

[0133] 在某些情况下,SOD1基因的突变是通过基因测试来鉴别。因此,患有或易患ALS的受试者的鉴别可通过使用本领域中已知的测定(例如像基因测序)对受试者的SOD1基因进行基因测试来进行。

[0134] 受试者对ALS的易感性的分析也可通过分析受试者的ALS家族史来进行。家族史的分析可包括记录ALS的三代谱系、审查家族成员的病历和验尸研究,以及鉴别SOD1突变的常染色体显性模式。

[0135] 在某些实施方案中,向人类受试者施用治疗有效量的反义寡核苷酸或其盐伴有监测人类受试者体内的SOD1水平,以确定人类受试者对施用反义寡核苷酸或其盐的反应。人类受试者对施用反义寡核苷酸或其盐的反应可由医师使用来确定治疗干预的程度和持续时间。在某些实施方案中,人类SOD1水平是在CSF中监测。在某些实施方案中,人类SOD1水平是在血浆中监测。在某些实施方案中,人类SOD1水平是在血液中监测。在某些实施方案中,人类SOD1水平是在血清中监测。

[0136] 在某些实施方案中,施用反义寡核苷酸或其盐导致SOD1蛋白表达有所减少。在某些实施方案中,施用反义寡核苷酸或其盐导致SOD1蛋白表达减少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%或由这些值中的任两者限定的范围。在某些实施方案中,SOD1蛋白表达的减少是CSF中的减少。在某些实施方案中,SOD1蛋白表达的减少是血浆中的减少。在某些实施方案中,SOD1蛋白表达的减少是血液中的减少。在某些实施方案中,SOD1蛋白表达的减少是血清中的减少。

[0137] 在某些实施方案中,施用反义寡核苷酸或其盐导致人类受试者的运动功能和呼吸有所改善。在某些实施方案中,施用反义寡核苷酸或其盐使运动功能和呼吸改善至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%或由这些值中的任两者限定的范围。

[0138] 在某些实施方案中,包含反义寡核苷酸或其盐的药物组合物用于制备用来治疗患有或易患ALS的人类受试者(例如,具有与ALS相关联的SOD1突变的人类受试者)的药物。

[0139] 神经丝

[0140] 本公开示出了使用神经丝轻链水平作为标志物来选择具有SOD1基因的突变的受

试者以用本文描述的反义寡核苷酸或其盐进行治疗。在一些情况下,如果受试者具有等于或大于预定阈值的神经丝轻链水平,则选择该受试者进行治疗。在一些情况下,如果受试者已经受预定最小量的神经丝轻链水平的增加,则选择该受试者进行治疗。在一些情况下,如果受试者具有等于或大于预定阈值的神经丝轻链水平并且已经受预定最小量的神经丝轻链水平的增加,则选择该受试者进行治疗。

[0141] 已描述用于测量血清中的神经丝轻链的测定(参见例如,Gaiottin o等人,PLoS ONE 8:e75091,2013;Kuhle等人,J.Neurol.Neuros urg.Psychiatry 86(3):273-279,2014)。神经丝轻链(NfL)(例如,血浆或血清NfL)浓度可例如使用以下方式来测量:即用型酶联免疫吸附测定(ELISA)稀释剂(Mabtech AB,Nacka Strand,Sweden);Gaiottino等人,PLoS ONE 8:e75091,2013中描述的电化学发光(ECL)免疫测定;或Disanto等人,Ann.Neurol.81(6):857-870,2017中描述的单分子阵列(SIMOA)方法。在Kuhl等人,Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 54(10):1655-1661,2016中已比较三种测定方法。SIMOA测定(Simoa NF-light Advantage套件)可从Quanterix Corp.(Lexington,MA,USA)商购获得。在一些实施方案中,NfL(例如,血浆或血清NfL)浓度是使用Siemens Healthineers(SHL;Erlangen,Germ any)NfL测定来测量。在一些情况下,测量总NfL(例如,磷酸化和非磷酸化)。在一些实施方案中,测量磷酸化NfL,并且在一些实施方案中,测量非磷酸化NfL。

[0142] 在一些实施方案中,如果具有SOD1基因的突变的受试者(例如,肌萎缩性脊髓侧索硬化症的临床上症状发生前受试者)具有等于或大于预定最小阈值的神经丝轻链水平(例如,至少44pg/ml的神经丝轻链水平,例如,如使用Siemens Healthineers NfL测定所确定,或使用不同测定测量的等同NfL水平),则选择该受试者进行治疗。

[0143] 在一些实施方案中,具有SOD1基因的突变的受试者(例如,肌萎缩性脊髓侧索硬化症的临床上症状发生前受试者)已经受预定最小量的神经丝轻链水平的增加(例如,至少10pg/ml的神经丝轻链水平的增加,例如,如使用Siemens Healthineers NfL测定所确定,或使用不同测定测量的等同NfL水平),则选择该受试者进行治疗。

[0144] 在一些实施方案中,具有SOD1基因的突变的受试者(例如,肌萎缩性脊髓侧索硬化症的临床上症状发生前受试者)具有等于或大于预定最小阈值的神经丝轻链水平(例如,至少44pg/ml的神经丝轻链水平,例如,如使用Siemens Healthineers NfL测定所确定,或使用不同测定测量的等同NfL水平)并且已经受预定最小量的神经丝轻链水平的增加(例如,至少10pg/ml的神经丝轻链水平的增加,例如,如使用Siemens Healthineers NfL测定所确定,或使用不同测定测量的等同NfL水平),则选择该受试者进行治疗。在一些实施方案中,不希望受到理论的约束,认为血浆NfL水平相对于基线的至少10pg/mL的变化(例如,增加)可有力地解释衰老对NfL水平的潜在影响。

[0145] 人类NF-L的氨基酸序列提供在SEQ ID NO:4以及Julien等人,Biochimica et Biophysica Acta,909:10-20(1987)、UniProtKB-P07196、NCBI参考序列:NP_006149.2和NCBI参考序列:NG_008492.1中。

[0146] SEQ ID NO:4

MSSFSYEPYYSTSYKRRYVETPRVHISSVRSYGYSTARSAYSSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGSLM
 PSLENLDLSQVA AISNDLKSIRTQEKAQLQDLNDRFASFIERVHELEQQNKVLEAELLVLRQKH
 SEPSRFRALYEQEIRDLRLAAEDATNEKQALQGEREGLEETLRNLQARYEEVLSREDAEGR
 MEARKGADEAALARA ELEKRIDSLMDEISFLKKVHEEEIAELQAQIQY AQISVEMDVTKPDLS
 [0147] AALKDIRAQYEKLA AKNMQNAEEWFKSRFTVLTESAAKNTDAVRAAKDEVSESRLLKAKT
 LEIEACRGMNEALEKQLQELEDKQNADISAMQDTINKLENELRTTKSEMARYLKEYQDLLNV
 KMALDIEIAAYRKLLEGEETRLSFTSVGSITSGYSQSSQVFGRSAYGGLQTSSYLMSTRSFPYY
 TSHVQEEQIEVEETIEAAKAEAAKDEPPSEGEAE EEEKDKEEAE EEEAAAE EEEAAKEESEEAKE
 EEEGGEGEEGETKEAE EEEKKVEGAGEEQAAKKKD

[0148] 生物样品

[0149] 适合于本文描述的方法的生物样品包括任何生物流体、细胞、组织或其部分,其包括感兴趣的分析物生物分子,例如NF蛋白或核酸(例如, RNA (mRNA))。生物样品可为例如从人类受试者获得的样本或可源自这种受试者。例如,样品可为通过活检获得的组织切片、归档生物流体或进入或适于组织培养的细胞。在一些情况下,生物样品是诸如血液、血清、血浆或脑脊液(CSF)等生物流体,或吸附到衬底(例如,玻璃、聚合物、纸)上的这种样品。如果需要,生物样品可进一步分级分离成含有特定细胞类型的部分。例如,可将血液样品分级分离为血清或含有特定类型的血液细胞(诸如红细胞或白细胞(白血球))的部分。如果需要,样品可为来自受试者的样品的组合,诸如组织和流体样品的组合。

[0150] 生物样品可从具有SOD1基因的突变(例如,本文描述的SOD1突变)的受试者获得。在某些实施方案中,受试者是肌萎缩性脊髓侧索硬化症的临床上症状发生前受试者。

[0151] 可采用任何适合于获得生物样品的方法,但示例性方法包括例如静脉切开术、细针抽吸活检程序。样品也可例如通过显微解剖(例如,激光捕获显微解剖(LCM)或激光显微解剖(LMD))来收集。

[0152] 用于获得和/或储存保留样品中分子(例如,核酸或蛋白质)的活性或完整性的样品的方法是本领域技术人员熟知的。例如,可使生物样品进一步与一种或多种其他剂(诸如,缓冲剂和/或抑制剂,包括核酸酶、蛋白酶和磷酸酶抑制剂中的一者或多者)接触,所述一种或多种其他剂保留或最小化样品中分子(例如,核酸或蛋白质)的变化。此类抑制剂包括例如螯合剂(诸如,乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇双(对氨基乙基醚)N,N,N1,N1-四乙酸(EGTA))、蛋白酶抑制剂(诸如,苯甲基磺酰氟(PMSF)、抑肽酶、亮抑酶肽、抗蛋白酶等)以及磷酸酶抑制剂(诸如,磷酸盐、氟化钠、钒酸盐等)。适合于分离分子的缓冲剂和条件是本领域技术人员熟知的并且可根据例如将表征的样品中分子的类型而变化(参见例如,Ausubel等人Current Protocols in Molecular Biology(增刊47),John Wiley&Sons,New York(1999);Harlow和Lane,Antibodies:ALaboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988);Harlow和Lane,Using Antibodies:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Press(1999);Tietz Textbook of Clinical Chemistry,第3版,Burtis和Ashwood编著W.B.Saunders,Philadelphia,(1999))。样品还可被处理来消除或最小化干扰物质的存在。例如,可将生物样品分级分离或纯化以去除不感兴趣的一种或多种材料。分级分离或纯化生物样品的方法包括但不限于层析方法,诸如液相层析、离子交换层析、尺寸排阻层析或亲和层析。为了用于本文描述的方法中,样品可呈各种物理状态。例如,样品可为

液体或固体,可溶解或悬浮于液体中,可呈乳液或凝胶,或可吸收到材料上。

[0153] 以下实施例被提供用来更好地说明要求保护的发明并且不应解释为限制本发明的范围。就提及的特定材料而言,这仅仅用于说明的目的,而不意图限制本发明。本领域技术人员可在不施展创造能力且不脱离本发明的范围的情况下开发等效手段或反应物。

[0154] 实施例

[0155] 实施例1:使用神经丝阈值来选择用SOD1反义寡核苷酸治疗的患者

[0156] 在临床上症状发生前成人SOD1突变携带者中用纵向自然史试验实施反义A(如本文所描述)的3期、随机化、安慰剂对照研究。本研究中包括的SOD1突变与高或完全外显率和快速疾病进展相关联。如果SOD1突变携带者没有患有临床上表现的ALS,则这些携带者被视为肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)的临床上症状发生前携带者。临床上表现的ALS被定义为出现明确指示出现ALS的临床症状或病征,其可由EMG发现支持。

[0157] 选择44pg/mL的血浆神经丝轻链(NfL)阈值来鉴别认为在12个月内(在达到NfL阈值之后)处于明确的ALS临床症状/病征发作的高风险的研究参与者。44pg/mL的血浆NfL阈值是基于NF轨迹模型的模拟使用症状发生前家族性肌萎缩性脊髓侧索硬化症(前fALS)样品的数据来确定,并且被选择为最小化假阳性率,同时允许在NF升高与临床发作之间有足够的时间来登记和干预。

[0158] 考虑到前fALS中血液采样的频率,在NfL水平之间存在间隙,这在许多情况下会妨碍鉴别在明确的ALS临床症状/病征发作之前多久NfL开始升高的能力。为了克服这一点,针对在基线下为30岁或以上,具有快速进展的突变的前fALS参与者,在存在临床上表现的ALS的情况下,使用贝叶斯(Bayesian)方法将Emax模型拟合到自然对数转换的NfL浓度数据。单独地,将贝叶斯威布尔模型(Bayesian Weibull model)拟合到在基线下为30岁或以上,具有快速进展突变的前fALS参与者的出现临床上表现的ALS数据的时间。NfL轨迹模型允许预测从NfL升高到出现临床上表现的ALS的时间进程。利用来自拟合模型的后验预测模拟来评估不同NfL阈值的性能。在本文中使用Siemens Healthineers (SHL) NfL测定来分析血浆NfL。

[0159] 基于以下因素而推导出44pg/mL的NfL阈值:

[0160] 1. 低假阳性率(例如,小于5%)。

[0161] 2. NfL升高到临床发作的足够的预期时间(例如,长于或等于2-3个月)以解释NfL处理时间、筛选以及到研究中的随机化。

[0162] 3. 受试者在NfL水平达到40pg/mL阈值(但未达到44pg/mL阈值)之后12个月没有显示ALS症状发作的临床经验。

[0163] 对于给定NfL阈值,在登记以及至少12个月的随访时间时NfL水平低于阈值的症状发生前携带者中评估假阳性率。如果NfL水平在基线后访视时超过阈值,并且参与者在此后至少12个月内保持为临床上症状发生前状态,则该参与者被视为假阳性。在所有患有临床上表现的ALS的参与者中评估假阴性率。如果临床上表现的ALS在达到NfL阈值之前出现,则参与者被视为假阴性。

[0164] 对于44pg/mL的NfL阈值,假阳性率为0/24(0%)并且假阴性为1/12(8.3%)。考虑但拒绝40pg/mL的阈值,这是因为假阳性率较高(1/24;4.1%),同时具有与44pg/mL相同的假阴性率。通过用44pg/mL的NfL阈值最小化假阳性率,健康受试者不会暴露于其可能不需

要或可能对其不具有临床效果的疗法。

[0165] 基于拟合的NfL轨迹模型,按月估计临床症状发作之前的几何平均NfL水平并且展示于图1中。在出现临床上表现的ALS之前三个月,预期几何平均NfL水平为约44pg/mL。对于44pg/mL的NfL阈值以及NfL相对于基线至少10pg/mL的变化,截止12个月,安慰剂患者的临床上表现的ALS的后验预测机率为77.66%。

[0166] 临床研究含有四个部分,部分A、部分B、部分C和部分D。

[0167] 部分A是自然史试验,其中参与者不接受研究治疗,即反义A或安慰剂。部分A中的参与者为至少18岁,例如在知情同意时。在筛选期间,部分A中的参与者具有小于44pg/mL的血浆NfL水平并且没有临床上表现的ALS。部分A中的参与者具有在筛选期间确认的以下SOD1突变中的一者。

[0168] p. Ala5Thr (A4T、A5T)

[0169] p. Ala5Val (A4V、A5V)

[0170] p. Cys7Phe (C6F、C7F)

[0171] p. Cys7Gly (C6G、C7G)

[0172] p. Asp102Gly (D101G、D102G)

[0173] p. Asp102His (D101H、D102H)

[0174] p. Gly115Ala (G114A、G115A)

[0175] p. Gly42Ser (G41S、G42S)

[0176] p. Gly86Arg (G85R、G86R)

[0177] p. Gly86Ser (G85S、G86S)

[0178] p. Gly94Ala (G93A、G94A)

[0179] p. His44Arg (H43R、H44R)

[0180] p. Leu107Phe (L106F、L107F)

[0181] p. Leu107Val (L106V、L107V)

[0182] p. Leu39Val (L38V、L39V)

[0183] p. Arg116Gly (R115G、R116G)

[0184] p. Val149Gly (V148G、V149G)

[0185] 上文的每个括号是指每个氨基酸取代的两种替代命名惯例。如本文别处所用,上述氨基酸取代中的每一者是通过每个括号中首先列出的变体标识符(例如,A4T)来提及。

[0186] 替代地,部分A中的参与者可具有除了由外部突变裁定委员会(Mutation Adjudication Committee)裁定纳入研究中的上文所列SOD1突变之外的SOD1突变。裁定必须确认,纳入研究中的任何其他SOD1突变具有高或完全外显率,并且与快速疾病进展相关联。

[0187] 部分B是症状发生前参与者的随机化、双盲、安慰剂对照期,所述症状发生前参与者具有大于或等于44pg/mL的血浆NfL水平,NfL相对于部分A基线至少10pg/mL的变化并且根据研究者的决定没有NfL升高的替代的可鉴别原因。血浆NfL水平达到大于或等于44pg/mL的水平且表现出NfL相对于基线至少10pg/mL的变化而没有发展成临床上表现的ALS的部分A参与者可能有资格登记在部分B中。在部分B中,将参与者以1:1(反义A:安慰剂)比率随机化以接受通过鞘内注射施用的治疗中的一者(反义A100mg或安慰剂)。部分B中的参与者

约每14天(即第1天、第15天和第29天)接受3个负荷剂量,并且此后约每28天以盲化方式通过鞘内注射接受维持剂量。

[0188] 研究的主要终点是在开始部分B的12个月内出现临床上表现的ALS的参与者的比例。研究的次要终点包括在开始部分B的24个月内出现临床上表现的ALS的参与者的比例、出现临床上表现的ALS的时间、修订的肌萎缩性脊髓侧索硬化症功能评级量表(ALSFRS-R)总评分的变化、所预测的慢肺活量(SVC)的百分比变化、无通气辅助存活期(VAFS;被定义为距离最早发生死亡或永久通气中的一者的时间)以及总体存活。

[0189] 部分C是参与者通过鞘内注射接受100mg反义A的开放标签延续研究。对发展成临床上表现的ALS的部分B参与者进行登记并监测。

[0190] 部分D是患有临床上表现的ALS的部分A参与者的随机化、双盲、安慰剂对照期。将参与者以2:1(反义A:安慰剂)比率随机化以经由鞘内注射接受100mg反义A或安慰剂。

[0191] 其他实施方案

[0192] 虽然已经结合本发明的详细描述描述了本发明,但前述描述意图进行说明而不是限制本发明的范围,所述范围是由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在所附权利要求的范围内。

序列表

<110> 渤健马萨诸塞州股份有限公司(BIOGEN MA INC.)

<120> 肌萎缩性脊髓侧索硬化症的治疗

<130> 13751-0344W01

<140>

<141>

<150> 63/168,972

<151> 2021-03-31

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成寡核苷酸"

<400> 1

caggatacat ttctacagct 20

<210> 2

<211> 154

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

```

Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln
1           5           10           15
Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val
           20           25           30
Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val
           35           40           45
His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His
           50           55           60
Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg
65           70           75           80
His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala
           85           90           95
Asp Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys
           100          105          110

```

Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly
 115 120 125
 Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg
 130 135 140
 Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln
 145 150

<210> 3

<211> 981

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

gtttggggcc agagtgggcg aggcgcggag gtctggccta taaagtagtc gcggagacgg 60
 ggtgctgggt tgcgtcgtag tctctgcag cgtctggggt ttccgttgca gtctctggaa 120
 ccaggacctc ggcgtggcct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgcg tgctgaaggg 180
 cgacggccca gtgcagggca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtga 240
 ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggctgcat ggattccatg ttcattgagtt 300
 tggagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac tttaatctc tatccagaaa 360
 acacggtggg ccaaaggatg aagagaggca tgttgagac ttgggcaatg tgactgctga 420
 caaagatggt gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca 480
 ttgcatcatt ggccgcacac tgggtgtcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaaggtgg 540
 aatgaagaa agtacaaaga caggaaacgc tggaagtcgt ttggcttgtg gtgtaattgg 600
 gatcgcccaa taaacattcc cttggatgta gtctgaggcc ccttaactca tctgttatcc 660
 tgctagctgt agaaatgtat cctgataaac attaaact gtaatcttaa aagtgtatt 720
 gtgtgacttt ttcagagttg ctttaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact 780
 tggaagatgt gtatagtttt ataaaactca gttaaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt 840
 ttgccagact taaatcacag atgggtatta aactgtcag aatttctttg tcattcaagc 900
 ctgtgaataa aaaccctgta tggcacttat tatgaggcta ttaaagaat ccaattcaa 960
 actaaaaaaaa aaaaaaaaa a 981

<210> 4

<211> 543

<212> PRT

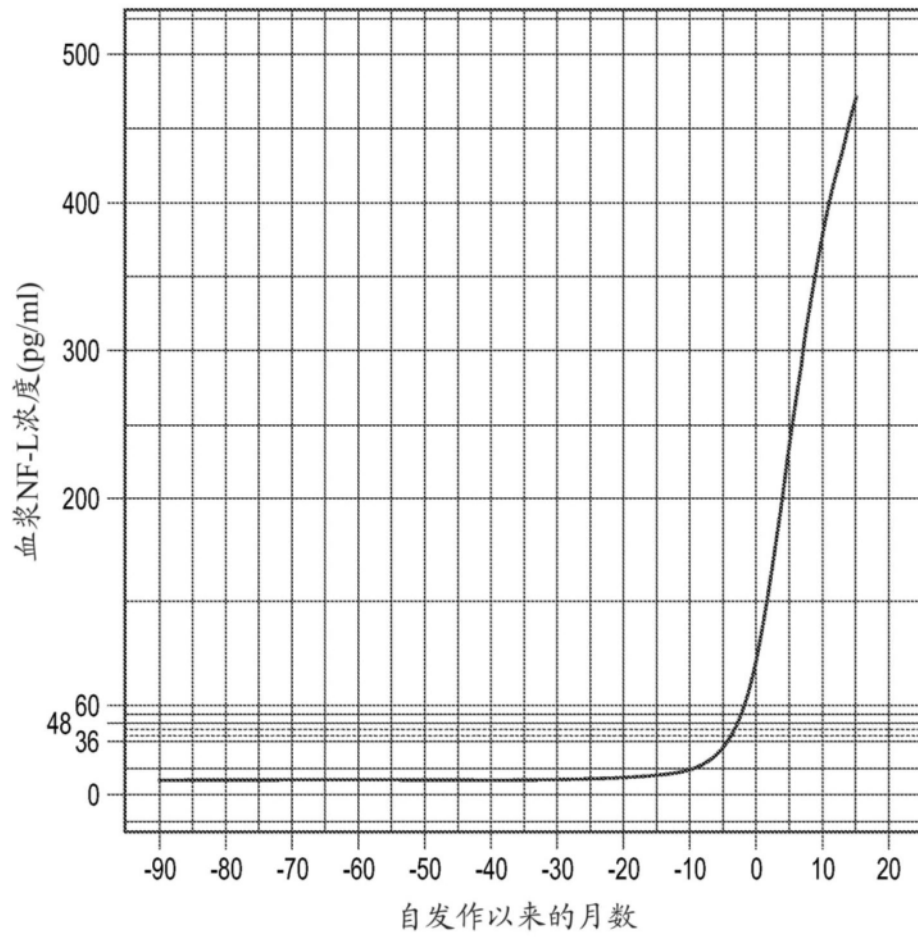
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Met Ser Ser Phe Ser Tyr Glu Pro Tyr Tyr Ser Thr Ser Tyr Lys Arg
 1 5 10 15
 Arg Tyr Val Glu Thr Pro Arg Val His Ile Ser Ser Val Arg Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Ser Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Tyr Ser Ala Pro Val Ser
 35 40 45

Ser Ser Leu Ser Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Ser Leu
 50 55 60
 Met Pro Ser Leu Glu Asn Leu Asp Leu Ser Gln Val Ala Ala Ile Ser
 65 70 75 80
 Asn Asp Leu Lys Ser Ile Arg Thr Gln Glu Lys Ala Gln Leu Gln Asp
 85 90 95
 Leu Asn Asp Arg Phe Ala Ser Phe Ile Glu Arg Val His Glu Leu Glu
 100 105 110
 Gln Gln Asn Lys Val Leu Glu Ala Glu Leu Leu Val Leu Arg Gln Lys
 115 120 125
 His Ser Glu Pro Ser Arg Phe Arg Ala Leu Tyr Glu Gln Glu Ile Arg
 130 135 140
 Asp Leu Arg Leu Ala Ala Glu Asp Ala Thr Asn Glu Lys Gln Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Gly Glu Arg Glu Gly Leu Glu Glu Thr Leu Arg Asn Leu Gln Ala
 165 170 175
 Arg Tyr Glu Glu Glu Val Leu Ser Arg Glu Asp Ala Glu Gly Arg Leu
 180 185 190
 Met Glu Ala Arg Lys Gly Ala Asp Glu Ala Ala Leu Ala Arg Ala Glu
 195 200 205
 Leu Glu Lys Arg Ile Asp Ser Leu Met Asp Glu Ile Ser Phe Leu Lys
 210 215 220
 Lys Val His Glu Glu Glu Ile Ala Glu Leu Gln Ala Gln Ile Gln Tyr
 225 230 235 240
 Ala Gln Ile Ser Val Glu Met Asp Val Thr Lys Pro Asp Leu Ser Ala
 245 250 255
 Ala Leu Lys Asp Ile Arg Ala Gln Tyr Glu Lys Leu Ala Ala Lys Asn
 260 265 270
 Met Gln Asn Ala Glu Glu Trp Phe Lys Ser Arg Phe Thr Val Leu Thr
 275 280 285
 Glu Ser Ala Ala Lys Asn Thr Asp Ala Val Arg Ala Ala Lys Asp Glu
 290 295 300
 Val Ser Glu Ser Arg Arg Leu Leu Lys Ala Lys Thr Leu Glu Ile Glu
 305 310 315 320
 Ala Cys Arg Gly Met Asn Glu Ala Leu Glu Lys Gln Leu Gln Glu Leu
 325 330 335
 Glu Asp Lys Gln Asn Ala Asp Ile Ser Ala Met Gln Asp Thr Ile Asn
 340 345 350
 Lys Leu Glu Asn Glu Leu Arg Thr Thr Lys Ser Glu Met Ala Arg Tyr

355	360	365
Leu Lys Glu Tyr Gln Asp	Leu Leu Asn Val Lys Met	Ala Leu Asp Ile
370	375	380
Glu Ile Ala Ala Tyr Arg	Lys Leu Leu Glu Gly	Glu Glu Thr Arg Leu
385	390	395
Ser Phe Thr Ser Val Gly	Ser Ile Thr Ser Gly	Tyr Ser Gln Ser Ser
405	410	415
Gln Val Phe Gly Arg Ser	Ala Tyr Gly Gly	Leu Gln Thr Ser Ser Tyr
420	425	430
Leu Met Ser Thr Arg Ser	Phe Pro Ser Tyr Tyr	Thr Ser His Val Gln
435	440	445
Glu Glu Gln Ile Glu Val	Glu Glu Thr Ile Glu	Ala Ala Lys Ala Glu
450	455	460
Glu Ala Lys Asp Glu Pro	Pro Ser Glu Gly Glu	Ala Glu Glu Glu Glu
465	470	475
Lys Asp Lys Glu Glu Ala	Glu Glu Glu Glu Ala	Ala Glu Glu Glu Glu
485	490	495
Ala Ala Lys Glu Glu Ser	Glu Glu Ala Lys Glu	Glu Glu Glu Gly Gly
500	505	510
Glu Gly Glu Glu Gly Glu	Glu Thr Lys Glu Ala	Glu Glu Glu Glu Lys
515	520	525
Lys Val Glu Gly Ala Gly	Glu Glu Gln Ala Ala	Lys Lys Lys Asp
530	535	540



	后验中值估计						
到症状发作的时间	1个月	2个月	3个月	4个月	5个月	6个月	7个月
几何平均NF水平	73.05	58.62	47.20	38.03	32.15	27.2	23.7

图1