



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202304471 A

(43)公開日：中華民國 112 (2023) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：111112225

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 03 月 30 日

(51)Int. Cl.：

A61K31/7088(2006.01)

C12N15/113 (2010.01)

A61P25/28 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

(30)優先權：2021/03/31

美國

63/168,972

(71)申請人：美商百健MA公司(美國) BIOGEN MA INC. (US)

美國

(72)發明人：劉鶯穎 LIU, YINGYING (CN)；孫鵬 SUN, PENG (US)；弗拉代特 史蒂芬妮 密

里洛 FRADETTE, STEPHANIE MELILLO (US)；葛拉漢 丹尼爾 萊澤塔

GRAHAM, DANIELLE LEEZETTA (US)；黃進宜 WONG, JANICE CHUN YEE

(CA)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：1 共 39 頁

(54)名稱

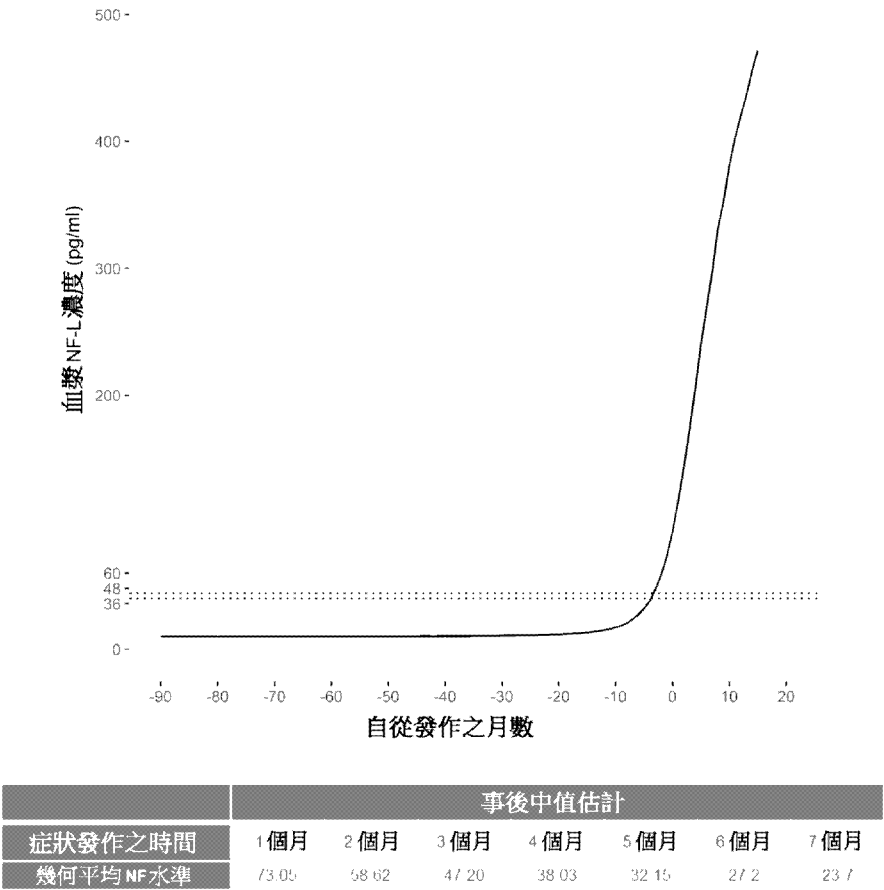
肌肉萎縮性脊髓側索硬化症之治療

(57)摘要

本揭示案提供神經絲輕鏈水準用於選擇具有過氧化物歧化酶 1 (SOD1)基因突變之個體以用 SOD1 靶向反義寡核苷酸或其鹽進行治療的用途。該等所揭示方法可用於治療肌肉萎縮性脊髓側索硬化症，包括臨床上症狀發生前肌肉萎縮性脊髓側索硬化症。

The disclosure provides the use of neurofilament light chain levels for selecting a subject with a mutation in the superoxide dismutase 1 (SOD1) gene for treatment with a SOD1-targeting antisense oligonucleotide or salt thereof. The disclosed methods can be used in the treatment amyotrophic lateral sclerosis, including clinically presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis.

指定代表圖：



【圖 1】

【發明摘要】

【中文發明名稱】肌肉萎縮性脊髓側索硬化症之治療

【英文發明名稱】TREATMENT OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

【中文】

本揭示案提供神經絲輕鏈水準用於選擇具有過氧化物歧化酶 1 (SOD1)基因突變之個體以用 SOD1 靶向反義寡核苷酸或其鹽進行治療的用途。該等所揭示方法可用於治療肌肉萎縮性脊髓側索硬化症，包括臨床上症狀發生前肌肉萎縮性脊髓側索硬化症。

【英文】

The disclosure provides the use of neurofilament light chain levels for selecting a subject with a mutation in the superoxide dismutase 1 (SOD1) gene for treatment with a SOD1-targeting antisense oligonucleotide or salt thereof. The disclosed methods can be used in the treatment amyotrophic lateral sclerosis, including clinically presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis.

【指定代表圖】圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】肌肉萎縮性脊髓側索硬化症之治療

【英文發明名稱】TREATMENT OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

【技術領域】

【0001】 本揭示案係關於肌肉萎縮性脊髓側索硬化症之生物標記物及其治療。

【先前技術】

【0002】 可溶性過氧化物歧化酶 1 (SOD1) (亦稱為 Cu/Zn 過氧化物歧化酶)係藉由催化過氧化物至過氧化氫(H_2O_2)之歧化作用來提供針對生物分子氧化損傷之防禦的一種過氧化物歧化酶 (Fridovich, *Annu. Rev. Biochem.*, 64:97-112 (1995))。過氧化物陰離子(O^{2-})係主要由粒線體中之氧化磷酸化錯誤產生之潛在有害的細胞副產物(Turrens, *J. Physiol.*, 552:335-344 (2003))。

【0003】 肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS, 亦稱為路格裡克氏病(Lou Gehrig's disease))係在任一給定時間侵襲多達約 17,000 美國人之毀滅性進行性神經變性疾病(Mehta, P.等人(2018). 「Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis - United States, 2015.」 *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 67(46): 1285-1289)。)約 2%之 ALS 病例由編碼 SOD1 之基因突變引起(Bunton-Stasyshyn RKA 等人, *Neuroscientist*. 2015;21:519-29)。SOD1 基因突變通常與 ALS 之顯性遺傳形式相關, ALS 係特徵在於上下運動神經元選擇性變性之病症 (Rowland, *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344:1688-1700 (2001))。

【0004】 認為突變體 SOD1 之毒性源自初始錯誤折疊(功能獲得型)降低活性酶之核保護(核中功能喪失), 該過程可能與 ALS 發病機制相關(Sau, *Hum. Mol. Genet.*, 16:1604-1618 (2007))。ALS 中運動神經元之進行性變性最終導致其死亡。當運動神經元死亡時, 大腦起始及控制肌肉運動之能力喪失。隨著隨意肌肉動

作逐步受影響，處於疾病晚期之患者可能會完全癱瘓。

【0005】 業內仍迫切地需要可有效地治療 ALS 之療法。因此，本文之目標係提供治療該疾病之方法。

【發明內容】

【0006】 本揭示案部分地係關於治療具有臨床症狀/徵象之個體(例如成人)及具有疾病之生物標記物證據(例如至少 44 pg/mL 之神經絲輕鏈水準)之症狀發生前個體(例如成人)的與 SOD1 基因突變相關之肌肉萎縮性脊髓側索硬化症。

【0007】 在一些態樣中，本文提供神經絲輕鏈水準為至少 44 pg/ml 之人類個體(例如其中人類個體為 ALS 之臨床上症狀發生前個體)的與 SOD1 基因突變相關之肌肉萎縮性脊髓側索硬化症的治療。

【0008】 在一個態樣中，本揭示案係關於藉由向人類個體投與醫藥組合物來治療有需要之人類個體之與 SOD1 基因突變相關之肌肉萎縮性脊髓側索硬化症的方法，該醫藥組合物包含治療有效量之下式之反義寡核苷酸：

mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo Aes
Geo mCes Te (SEQ ID NO:1 之核鹼基序列)，其中

A = 腺嘌呤，

mC = 5-甲基胞嘧啶

G = 鳥嘌呤，

T = 胸腺嘧啶，

e = 2'-O-甲氧基乙基核糖修飾之糖，

d = 2'-去氧核糖糖，

s = 硫代磷酸酯核苷間鍵聯，且

o = 磷酸二酯核苷間鍵聯；

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中人類個體在開始治療之前具有至少 44 pg/ml 之神經絲輕鏈水準。

【0009】 在一些實施例中，人類個體在開始治療之前已經受至少 10 pg/ml 之神經絲輕鏈水準增加。

【0010】 在一些實施例中，神經絲輕鏈水準係來自人類個體之生物樣品(例如血液、血清、血漿或腦脊液樣品)中之水準。在一些實施例中，神經絲輕鏈水準係血漿水準，例如至少 44 pg/ml 之血漿水準及/或至少 10 pg/ml 之血漿水準增加。在一些實施例中，神經絲輕鏈水準係等效於相應血漿水準(例如等效於至少 44 pg/ml 之血漿水準或至少 10 pg/ml 之血漿水準增加)之血液、血清或腦脊液水準。

【0011】 在一些實施例中，人類個體在開始治療之前具有至少 44 pg/ml 之神經絲輕鏈水準，且其中人類個體在開始治療之前已經受至少 10 pg/ml 之神經絲輕鏈水準增加。

【0012】 在一些實施例中，人類個體在開始治療之前具有至少 44 pg/ml 之血漿神經絲輕鏈水準，且其中人類個體在開始治療之前已經受至少 10 pg/ml 之血漿神經絲輕鏈水準增加。

【0013】 在另一態樣中，本揭示案係關於藉由以下方式治療有需要之人類個體之與 SOD1 基因突變相關之肌肉萎縮性脊髓側索硬化症的方法：

在開始治療之前在自人類個體獲得之生物樣品中量測至少 44 pg/ml 之神經絲輕鏈水準；及

向人類個體投與醫藥組合物，其包含治療有效量之下式之反義寡核苷酸：

mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo Aes Geo mCes Te (SEQ ID NO:1 之核鹼基序列)，其中

A = 腺嘌呤，

mC = 5-甲基胞嘧啶

G = 鳥嘌呤，

T = 胸腺嘧啶，

e = 2'-O-甲氧基乙基核糖修飾之糖，

d = 2'-去氧核糖糖，

s = 硫代磷酸酯核苷間鍵聯，且

o = 磷酸二酯核苷間鍵聯；

或其醫藥學上可接受之鹽。

【0014】 在一些實施例中，生物樣品係血液、血清、血漿或腦脊液。

【0015】 在一些實施例中，生物樣品係血液。

【0016】 在一些實施例中，生物樣品係血清。

【0017】 在一些實施例中，生物樣品係血漿。

【0018】 在一些實施例中，該方法進一步包括在投與反義寡核苷酸或其醫藥學上可接受之鹽之前在人類個體中量測至少 10 pg/ml 之血液、血清、血漿或腦脊液神經絲輕鏈水準增加。

【0019】 在一些實施例中，該方法進一步包括在投與反義寡核苷酸或其醫藥學上可接受之鹽之前在人類個體中量測至少 10 pg/ml 之血漿神經絲輕鏈水準增加。

【0020】 在一些實施例中，該方法進一步包括在投與反義寡核苷酸或其醫藥學上可接受之鹽之前在人類個體中量測等效於至少 10 pg/ml 之血漿水準增加之血液、血清或腦脊液水準神經絲輕鏈水準增加。

【0021】 在本文所述任一方法之一些實施例中，醫藥組合物係藉由鞘內投與來投與。

【0022】 在本文所述任一方法之一些實施例中，醫藥組合物遞送約 100 mg 固定劑量之反義寡核苷酸。

【0023】 在本文所述任一方法之一些實施例中，SOD1 基因突變係 A4V。

【0024】 在本文所述任一方法之一些實施例中，SOD1 基因突變係 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、T88δTAD、A89T、V97M、S105δSL、V118L、D124G、L114F、D90A、G12R、G147R、C6F、C6G、D101G、D101H、G114A、G85S、H43R、L106F、L106V、L38V 或 R115G。

【0025】 在本文所述任一方法之一些實施例中，人類個體為肌肉萎縮性脊髓側索硬化症之臨床上症狀發生前個體。

【0026】 在本文所述任一方法之一些實施例中，向人類個體投與醫藥組合物之負載劑量，然後投與醫藥組合物之維持劑量。

【0027】 在向人類個體投與醫藥組合物之負載劑量、然後投與醫藥組合物之維持劑量之一些實施例中，向人類個體投與三個負載劑量，其中負載劑量係間隔 14 天投與。

【0028】 在向人類個體投與醫藥組合物之負載劑量、然後投與醫藥組合物之維持劑量之一些實施例中，維持劑量係在第三負載劑量後 28 天開始每 28 天投與。

【0029】 在向人類個體投與醫藥組合物之負載劑量、然後投與醫藥組合物之維持劑量之一些實施例中，醫藥組合物之負載劑量及維持劑量係如下投與人類個體：

- (i) 醫藥組合物之第一負載劑量；
- (ii) 在第一負載劑量後 14 天投與醫藥組合物之第二負載劑量；
- (iii) 在第一負載劑量後 28 天投與醫藥組合物之第三負載劑量；及
- (iv) 在第三負載劑量後 28 天或 1 個月投與醫藥組合物之第一維持劑量。

【0030】 在向人類個體投與醫藥組合物之負載劑量、然後投與醫藥組合物之維持劑量之一些實施例中，醫藥組合物之負載劑量及維持劑量係如下投與人類個體：

- (i) 足以遞送約 100 mg 固定劑量之反義寡核苷酸之量的第一負載劑量；
- (ii) 足以遞送約 100 mg 固定劑量之反義寡核苷酸之量的第二負載劑量，其中第二負載劑量係在第一負載劑量後 14 天投與；
- (iii) 足以遞送約 100 mg 固定劑量之反義寡核苷酸之量的第三負載劑量，其中第三負載劑量係在第一負載劑量後 28 天投與；及
- (iv) 足以遞送約 100 mg 固定劑量之反義寡核苷酸之量的第一維持劑量，其中第一維持劑量係在第三負載劑量後 28 天投與。

【0031】 根據本文所述之任一方法，在一些實施例中，人類個體係成人，例如人類個體係至少 18 歲，例如至少 18 歲、20 歲、25 歲、30 歲、35 歲、40 歲、45 歲、50 歲、55 歲、60 歲、65 歲或以上。

【0032】 除非另有定義，否則本文所用之所有技術及科學術語皆具有與熟習本發明所屬領域技術者通常理解之含義相同之含義。儘管類似或等效於本文所述方法及材料之方法及材料可用於本發明之實踐或測試中，但下文闡述例示性方法及材料。本文所提及之所有公開案、專利申請案、專利及其他參考文獻之全文皆以引用方式併入。倘若出現衝突，則以本說明書(包括定義)為準。材料、方法及實例僅具有說明性且不欲具有限制性。

【0033】 根據以下詳細描述及申請專利範圍將明瞭本發明之其他特徵及優點。

【圖式簡單說明】

【0034】

圖 1 係繪示在基線時為 30 歲或以上且具有快速進展突變之患有臨床上表現之

ALS 之參與者之幾何平均 NFL 水準之基於模型之估計的圖。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

【0035】 本申請案主張於 2021 年 3 月 31 日提出申請之美國臨時申請案第 63/168,972 號之優先權。前述申請案之內容之全文皆以引用方式併入本文中。

序列表

【0036】 本申請案含有序列表，其已以 ASCII 格式電子提交且特此以引用方式整體併入。該 ASCII 拷貝創建於 2022 年 3 月 24 日，命名為 13751-0344TW1_SL.txt 且大小為 7,926 個位元組。

【0037】 本揭示案係關於反義寡核苷酸或其鹽之用途，其用於治療具有臨床症狀/徵象之個體(例如成人)及具有疾病之生物標記物證據(例如至少 44 pg/ml 之神經絲輕鏈水準)之症狀發生前個體(例如成人)的與 SOD1 基因突變相關之肌肉萎縮性脊髓側索硬化症。

肌肉萎縮性脊髓側索硬化症

【0038】 肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)係導致皮質、腦幹及脊髓內之運動神經元損失之罕見神經變性疾病。患者患有延髓肌、呼吸肌及隨意肌之肌肉質量、強度及功能之進行性損失。衰退係不可避免的，且死亡通常來自呼吸衰竭，平均發生在診斷後 2 至 5 年。儘管大多數患者患有偶發性 ALS，但較小部分患者(約 2%)具有由多個過氧化物歧化酶 1 (SOD1)突變引起之遺傳或家族形式之 ALS。自從 1993 年初次發現此形式之 ALS (稱為 SOD1 ALS)，已報導超過 180 個 SOD1 突變引起此形式之 ALS。肌肉萎縮性脊髓側索硬化症在線遺傳學資料庫(Amyotrophic Lateral Sclerosis Online Genetics Database, ALSoD). Institute of Psychiatry, Psychology & Neuroscience. 2015 年公開; Rosen, *Nature*, 364(6435):362 (1993))。個別突變之疾病進展係可變的，其中最嚴重突變情況下之存活期不到

15 個月。

【0039】 經批准用於 ALS 之治療係利蘆噻唑(riluzole，Rilutek®)及依達拉奉(edaravone，Radicava™)。利蘆噻唑提供存活期之適度增加(2 至 3 個月)而不展示強度或失能之改良。依達拉奉減弱功能性衰退，如藉由修訂的肌肉萎縮性脊髓側索硬化症功能評級量表(Revised Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale，ALSFRS-R)所量測。依達拉奉對存活之效應係未知的。無法獲得 SOD1 特異性 ALS 治療。

過氧化物歧化酶 1

【0040】 過氧化物歧化酶[Cu-Zn] (亦稱為過氧化物歧化酶 1 (SOD1))係人類中由位於染色體 21 上之 SOD1 基因編碼之酶。

【0041】 SOD1 係形成 β -桶且在每一次單元中含有分子內二硫鍵及雙核 Cu/Zn 位點之 32 kDa 同二聚體。此 Cu/Zn 位點容納銅及鋅離子且負責催化過氧化物自身氧化還原成過氧化氫及雙氧。

【0042】 SOD1 係負責破壞身體中之游離過氧化物自由基之三種過氧化物歧化酶中之一者。經編碼同功酶係可溶性細胞質及粒線體膜間空間蛋白，作為同二聚體起將天然但有害之過氧化物自由基轉化成分子氧及過氧化氫之作用。過氧化氫隨後可由另一酶(稱為過氧化氫酶)分解。

【0043】 SOD1 基因之至少 180 個突變與家族性 ALS 相關(Conwit RA, *J Neurol 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 在細胞應力條件下亦參與大部分偶發性 ALS 病例，其佔 ALS 患者之 90%。人類 SOD1 之最頻繁突變在美國係 A4V；在日本係 H46R；且在冰島係 G93S。其他熟知之人類 SOD1 突變包括：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、T88δTAD、A89T、V97M、S105δSL、V118L、D124G、L114F、D90A、G12R、G147R、C6F、C6G、D101G、D101H、G114A、G85S、H43R、L106F、L106V、L38V 及 R115G。幾乎所有已知之引起 ALS 之 SOD1 突變皆以顯性方式起作用；SOD1 基因之單個突變體拷貝足以引起該疾病。

【0044】 人類 SOD1 之胺基酸序列可參見 UniProt P00441 及 GENBANK 登錄號 NP_000445，且提供於下文中：

MATKAVCVLK GDGPVQGIIN FEQKESNGPV KVGWSIKGLT EGLHGFHVHE
FGDNTAGCTS AGPHFNPLSR KHGGPKDEER HVGDLGNVTA DKDGVADVSI
EDSVISLSGD HCHIGRTLTVV HEKADDLGKG GNEESTKTGN AGSRLACGVI
GIAQ (SEQ ID NO:2)

【0045】 編碼人類 SOD1 之核苷酸序列以 GENBANK 登錄號 NM_000454.4 提供，且亦提供於下文中(由本揭示案之反義寡核苷酸識別之區域加下劃線)：

1 gtttggggcc agagtgggcg aggcgcggag gtctggccta taaagtagtc gcggagacgg
61 ggtgctggtt tgcgtcgtag tctcctgcag cgtctggggt ttccgttgca gtcctcgga
121 ccaggacctc ggcgtagcct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgctg tctgaaggg
181 cgacggccca gtgcagggca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtga
241 ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg ttcagtgtt
301 tggagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtctctac tttaatectc tatccagaaa
361 acacgggtggg ccaaaggatg aagagaggca tgttgagac ttgggcaatg tgactgtga
421 caaagatggg tgggccgatg tgtctatga agattctgtg atctcactct caggagacca
481 ttgcatcatt ggccgcacac tgggtgtcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaagggtg
541 aaatgaagaa agtacaaga caggaaacgc tggaaagcgt ttggcttgtg gtgtaattgg
601 gatgcccaca taaacattcc ctggatgta gtctgagccc ccttaactca tctgttatcc
661 tgctagctgt agaaatgat cctgataaac attaaacact gtaattctaa aagtgtatt
721 gtgtgacttt ttcagagttg ctttaaagta cctglagtga gaaactgatt tatgacact
781 tggagagattt gtatagtttt ataaaactca gttaaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt
841 ttccagact taaatcacag atgggtatta aactgtcag aatttcttg tcaattcaagc
901 ctgtgaataa aaacctgta tggcacttat tatgaggcta ttaaagaat ccaaattcaa
961 actaaaaaaaa aaaaaaaaaa a (SEQ ID NO:3)

SOD1 反義寡核苷酸

【0046】 「反義 A」係 5-10-5 MOE 間隙聚體 (gapmer)，具有 CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO:1)之序列(5'至 3')，其中核苷 1-5 及 16-20 中之每一者係 2'-O-甲氧基乙基核糖修飾之核苷，且核苷 6-15 中之每一者係 2'-去氧核苷，其中核苷 2 至 3、4 至 5、16 至 17 及 18 至 19 之間的核苷間鍵聯係磷酸二酯鍵聯，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 及 19 至 20 之間的核苷間鍵聯係硫代磷酸酯鍵聯，且其中每一胞嘧啶係 5-甲基胞嘧啶。

【0047】 反義 A 係藉由以下化學注釋來闡述：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

A = 腺嘌呤，

mC = 5-甲基胞嘧啶

G = 鳥嘌呤，

T = 胸腺嘧啶，

e = 2'-O-甲氧基乙基核糖修飾之糖，

d = 2'-去氧核糖糖，

s = 硫代磷酸酯核苷間鍵聯，且

o = 磷酸二酯核苷間鍵聯。

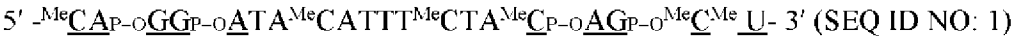
【0048】 「2'-O-甲氧基乙基」(亦為 2'-MOE 及 2'-OCH₂CH₂-OCH₃ 及 MOE)係指呋喃糖環 2'位之 O-甲氧基-乙基修飾。2'-O-甲氧基乙基修飾之糖係經修飾之糖。

【0049】 「5-甲基胞嘧啶」意指經連接至 5'位之甲基修飾之胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶係經修飾之核鹼基。

【0050】 「硫代磷酸酯鍵聯」或「硫代磷酸酯核苷間鍵聯」意指核苷之間的

鍵聯，其中磷酸二酯鍵藉由用硫原子替代一個非橋接氧原子來修飾。硫代磷酸酯鍵聯係經修飾之核苷間鍵聯。

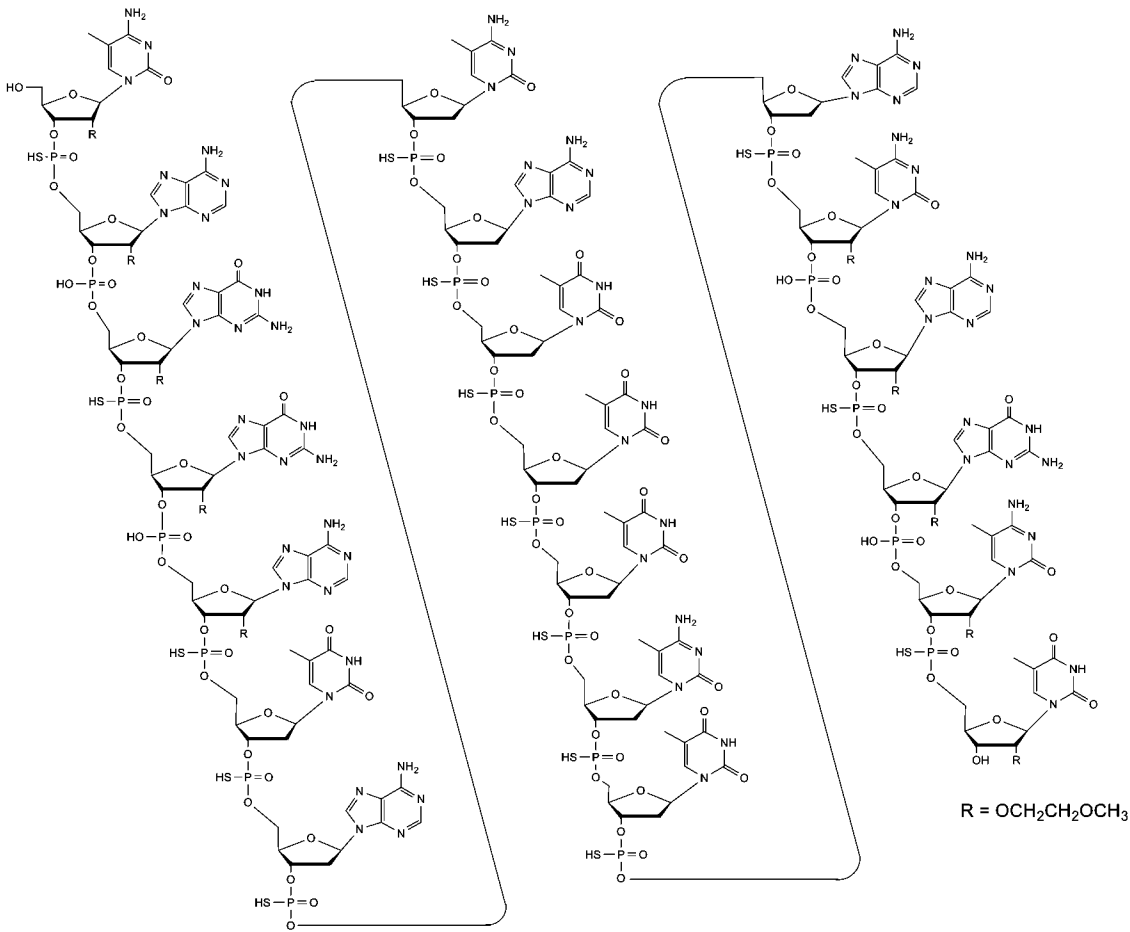
【0051】 反義 A 序列亦可簡寫如下：



加下劃線之殘基係 2'-MOE 核苷。P=O 注解反映磷酸二酯鍵聯之位置。

【0052】 「2'-MOE 核苷」(亦為 2'-O-甲氧基乙基核苷)意指包含 MOE 修飾之糖部分之核苷。

【0053】 反義 A 係藉由以下化學結構來繪示：



【0054】 反義 A 詳細闡述於美國專利第 10,385,341 號中，該專利之內容以引用方式併入本文中。

【0055】應理解，在溶液中(例如在醫藥組合物之溶液中)，反義寡核苷酸可以游離酸形式、以鹽形式或其混合物形式存在。

所結合反義寡核苷酸

【0056】 本揭示案之反義寡核苷酸可共價連接至增強所得反義寡核苷酸之活性、細胞分佈或細胞攝取之一或多個部分或結合物。典型結合基團包括膽固醇部分及脂質部分。其他結合基團包括碳水化合物、磷脂、生物素、啡嗪、葉酸、菲啶、蔥醌、吡啶、螢光素、羅丹明、香豆素及染料。反義寡核苷酸亦可經修飾以具有一或多個穩定基團，其通常連接至反義寡核苷酸之一或兩個末端以增強多種性質，例如核酸酶穩定性。穩定基團包括帽結構。該等末端修飾保護具有末端核酸之反義寡核苷酸免於外核酸酶降解，且可幫助遞送及/或定位於細胞內。帽可存在於 5'-末端(5'-帽)或 3'-末端(3'-帽)，或可存在於兩個末端上。帽結構為此項技術中所熟知且包括例如倒置去氧無鹼基帽。可用於對反義寡核苷酸之一或兩端加帽以賦予核酸酶穩定性之其他 3'及 5'穩定基團包括 WO 03/004602 中所揭示之基團。

用於調配醫藥組合物之組合物及方法

【0057】 本揭示案之反義寡核苷酸或其鹽可與醫藥學上可接受之活性或惰性物質混合來製備醫藥組合物或調配物。用於調配醫藥組合物之組合物及方法取決於多個標準，包括(但不限於)投與途徑、疾病之程度或欲投與之劑量。

【0058】 靶向 SOD1 核酸之反義寡核苷酸或其鹽可藉由組合反義寡核苷酸或其鹽與適宜醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑用於醫藥組合物中。醫藥學上可接受之稀釋劑包括磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。PBS 係適用於欲非經腸遞送之組合物中之稀釋劑。因此，在一個實施例中，本文所述之方法採用包含靶向 SOD1 核酸之反義寡核苷酸或其鹽及醫藥學上可接受之稀釋劑的醫藥組合物。

【0059】 本文所述之反義寡核苷酸或其鹽可調配為用於鞘內投與個體之醫藥組合物。

【0060】 包含本揭示案之反義寡核苷酸之醫藥組合物涵蓋在投與動物(包括

人類)時能夠提供(直接或間接)生物活性代謝物或其殘基之任何醫藥學上可接受之鹽、酯或該等酯之鹽或任何其他寡核苷酸。因此，例如，本揭示案亦係關於反義寡核苷酸之醫藥學上可接受之鹽及其他生物等效物。適宜醫藥學上可接受之鹽包括(但不限於)鈉鹽及鉀鹽。

治療方法

【0061】 本揭示案係關於治療有需要之人類個體之與人類 SOD1 基因突變相關之肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(例如臨床上症狀發生前肌肉萎縮性脊髓側索硬化症)的方法。該方法涉及向人類個體投與(例如藉由鞘內投與)反義寡核苷酸，其中反義寡核苷酸之核鹼基序列係由 CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO:1)組成，其中核苷 1-5 及 16-20 中之每一者係 2'-O-甲氧基乙基核糖修飾之核苷，且核苷 6-15 中之每一者係 2'-去氧核苷，其中核苷 2 至 3、4 至 5、16 至 17 及 18 至 19 之間的核苷間鍵聯係磷酸二酯鍵聯，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 及 19 至 20 之間的核苷間鍵聯係硫代磷酸酯鍵聯，且其中每一胞嘧啶係 5-甲基胞嘧啶。在某些情況下，反義寡核苷酸係以約 100 mg 或 100 mg 之固定劑量投與。

【0062】 「約」在物質之量之背景中意指所指示值之 $\pm 10\%$ 。「約」100 mg 反義寡核苷酸包括 90 mg 至 110 mg 反義寡核苷酸。在時間單位之背景中(例如約 10 天或約 1 週)，「約」意指 ± 3 天。

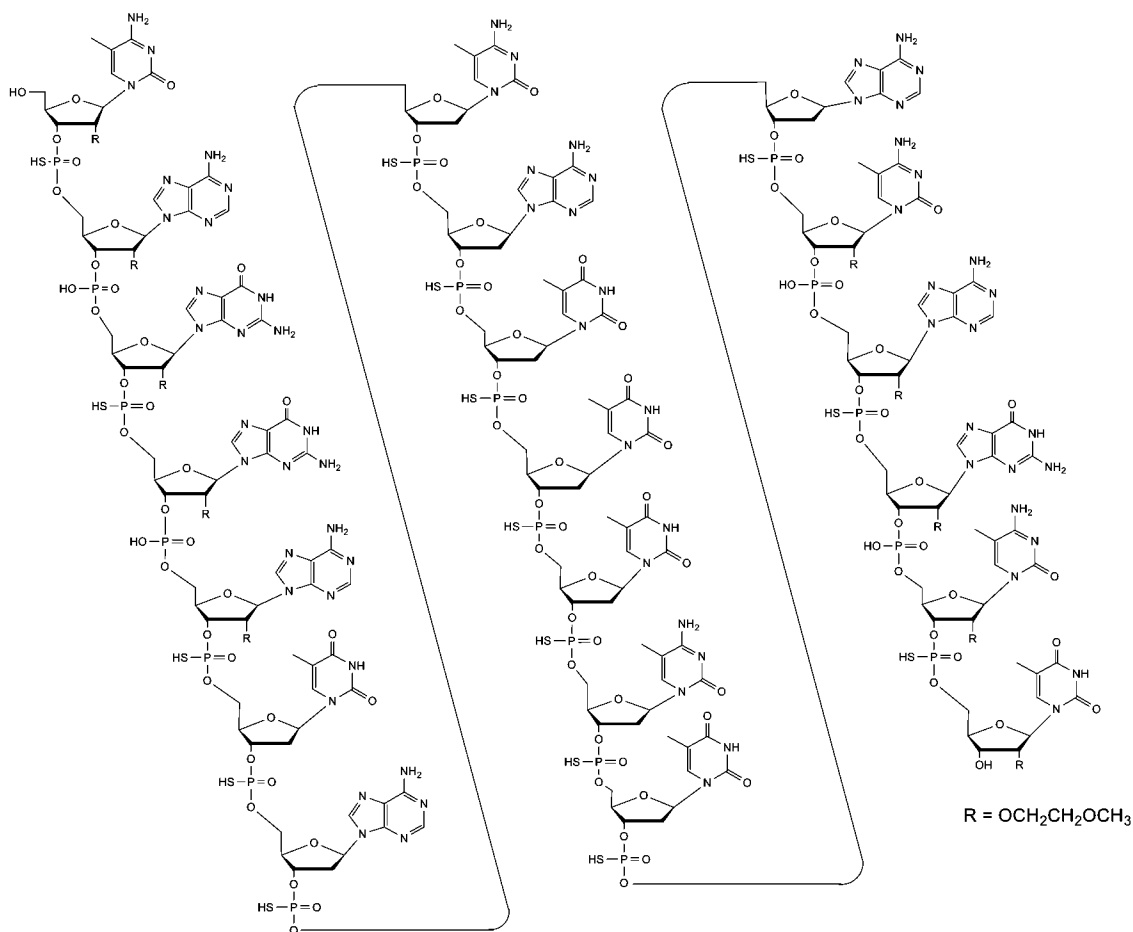
【0063】 「鞘內或 IT」意指投與至覆蓋大腦及脊髓之蛛網膜下方之腦脊液中。

【0064】 亦提供減少具有與肌肉萎縮性脊髓側索硬化症相關之人類 SOD1 基因突變之人類個體中之人類 SOD1 蛋白合成的方法。該方法涉及向人類個體投與(例如藉由鞘內投與)反義寡核苷酸，其中反義寡核苷酸之核鹼基序列係由 CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO:1)組成，其中核苷 1-5 及 16-20 中之

每一者係 2'-O-甲氧基乙基核糖修飾之核苷，且核苷 6-15 中之每一者係 2'-去氧核苷，其中核苷 2 至 3、4 至 5、16 至 17 及 18 至 19 之間的核苷間鍵聯係磷酸二酯鍵聯，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 及 19 至 20 之間的核苷間鍵聯係硫代磷酸酯鍵聯，且其中每一胞嘧啶係 5-甲基胞嘧啶。在某些情況下，反義寡核苷酸係以約 100 mg 或 100 mg 之固定劑量投與。

【0065】 亦提供降低具有與肌肉萎縮性脊髓側索硬化症相關之人類 SOD1 基因突變之人類個體中之人類 SOD1 mRNA 水準的方法。該方法涉及向人類個體投與(例如藉由鞘內投與)反義寡核苷酸，其中反義寡核苷酸之核鹼基序列係由 CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO:1)組成，其中核苷 1-5 及 16-20 中之每一者係 2'-O-甲氧基乙基核糖修飾之核苷，且核苷 6-15 中之每一者係 2'-去氧核苷，其中核苷 2 至 3、4 至 5、16 至 17 及 18 至 19 之間的核苷間鍵聯係磷酸二酯鍵聯，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 及 19 至 20 之間的核苷間鍵聯係硫代磷酸酯鍵聯，且其中每一胞嘧啶係 5-甲基胞嘧啶。在某些情況下，反義寡核苷酸係以約 100 mg 或 100 mg 之固定劑量投與。

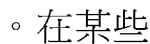
【0066】 亦提供治療有需要之人類個體之與 SOD1 基因突變相關之肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(例如臨床上症狀發生前肌肉萎縮性脊髓側索硬化症)的方法，其中該方法需要向人類個體投與(例如藉由鞘內投與)包含反義寡核苷酸或其鹽之醫藥組合物，其中反義寡核苷酸具有以下結構：



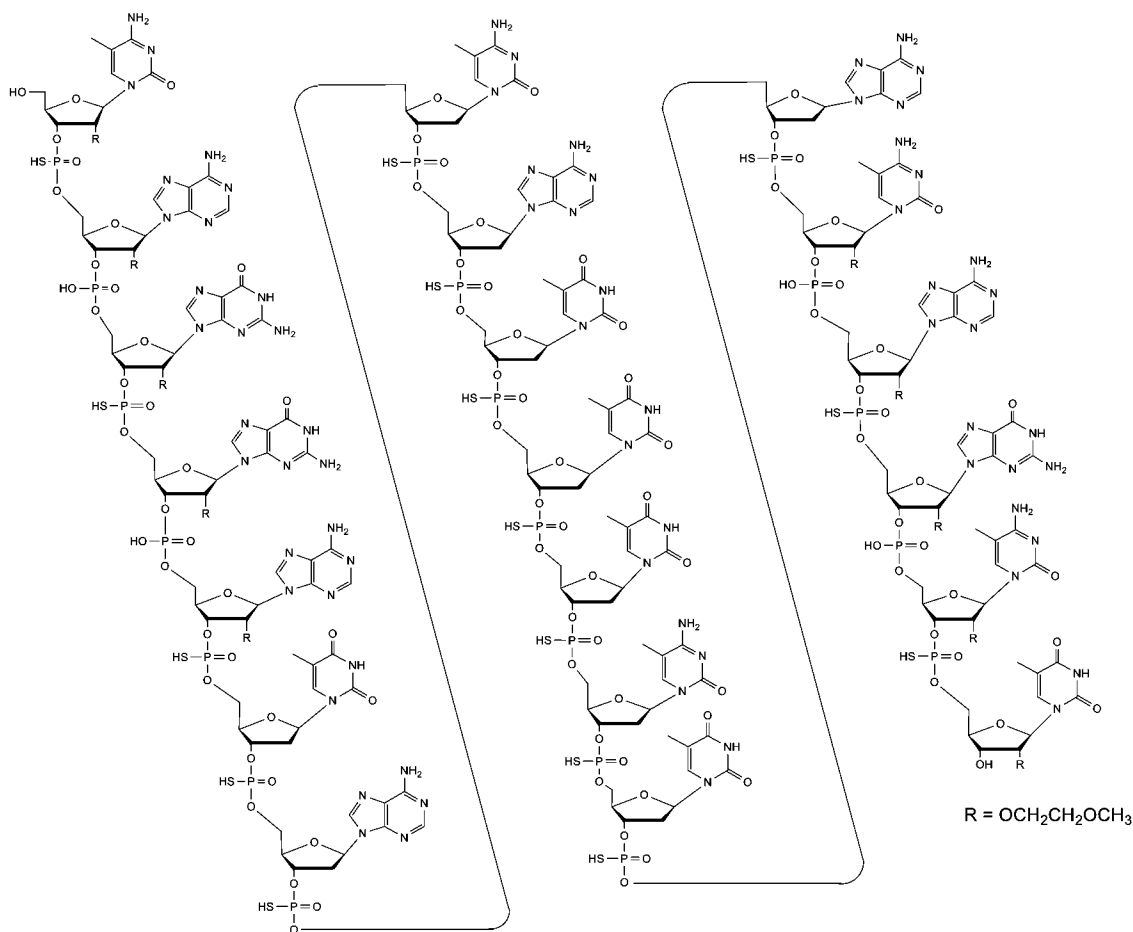
。在某些

情況下，反義寡核苷酸或其鹽係以等效於約 100 mg 或 100 mg 反義寡核苷酸之劑量投與。

【0067】 亦提供減少具有與肌肉萎縮性脊髓側索硬化症相關之人類 SOD1 基因突變之人類個體中之人類 SOD1 蛋白合成的方法，其中該方法需要向人類個體投與(例如藉由鞘內投與)包含反義寡核苷酸或其鹽之醫藥組合物，其中反義寡核苷酸具有以下結構：



【0068】 亦提供降低具有與肌肉萎縮性脊髓側索硬化症相關之人類 SOD1 基因突變之人類個體中之人類 SOD1 mRNA 水準的方法，其中該方法需要向人類個體投與(例如藉由鞘內投與)包含反義寡核苷酸或其鹽之醫藥組合物，其中反義寡核苷酸具有以下結構：



。在某些情況下，反義寡核苷酸或其鹽係以等效於約 100 mg 或 100 mg 反義寡核苷酸之劑量投與。

【0069】 在一些情況下，上述固定劑量之反義寡核苷酸或其鹽係每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四週一次投與人類個體。

【0070】 在一些情況下，本文所述之反義寡核苷酸係作為醫藥組合物之一部分投與人類個體。在某些實施例中，醫藥組合物係以足以遞送約 100 mg 固定劑量之反義寡核苷酸之量投與人類個體。

【0071】 在某些實施例中，反義寡核苷酸或其鹽係作為負載劑量投與。在一些實施例中，反義寡核苷酸係作為維持劑量投與。在某些情況下，反義寡核苷酸係作為負載劑量及隨後維持劑量投與。負載劑量可例如每週、每兩週、每三週或每四週投與。維持劑量可例如在末次負載劑量後每週、每兩週、每三週或每四週投與。在一些情況下，每月投與維持劑量。

【0072】 「負載劑量」意指在開始投與且達成藥物(例如反義寡核苷酸)之穩態濃度之給藥期中投與之劑量。

【0073】 「維持劑量」意指在達成藥物(例如反義寡核苷酸)之穩態濃度後之給藥期中投與之劑量。

【0074】 在某些實施例中，向人類個體投與三個負載劑量之反義寡核苷酸或其鹽，然後投與至少一個(例如 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個或更多個)維持劑量。在一些情況下，三個負載劑量係間隔兩週投與。在一些情況下，三個負載劑量係間隔 14 天投與。在一些情況下，一或多個維持劑量係在第三負載劑量後 4 週開始投與。在一些情況下，一或多個維持劑量係在第三負載劑量後開始每月投與。在一些情況下，一或多個維持劑量係在第三負載劑量後開始每 28 天投與。

【0075】 SOD1 突變可為人類 SOD1 基因之與 ALS 相關之任何突變。在一些情況下，突變係緩慢進展之 ALS 疾病突變。在其他情況下，突變係快速進展之 ALS 疾病突變。在某些情況下，人類 SOD1 基因突變係以下中之一或多者：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、S59I、V87A、T88δTAD、A89T、V97M、S105δSL、V118L、D124G、L114F、D90A、G12R、G147R、C6F、C6G、D101G、D101H、G114A、G85S、H43R、L106F、L106V、L38V 或 R115G。在一個具體實施例中，人類個體在人類 SOD1 基因中具有 A4V 突變。在另一具體實施例中，人類個體在人類 SOD1 基因中具有 L106V 突變。在另一具體實施例中，人類個體在人類 SOD1 基因中具有 H46R 突變。在另一具體實施例中，人類個體在人類 SOD1 基因中具有 G93S 突變。

【0076】 在某些情況下，SOD1 基因突變係藉由遺傳測試來鑑別。因此，患有

或易患 ALS 之個體之鑑別可藉由使用此項技術中已知之分析(例如遺傳測序)對個體之 *SOD1* 基因進行遺傳測試來實施。

【0077】 個體對 ALS 易感性之分析亦可藉由分析個體之 ALS 家族史來實施。家族史之分析可包括記載 ALS 之三代系譜、審查家族成員之病歷及剖檢研究及鑑別 *SOD1* 突變之常染色體顯性模式。

【0078】 在某些實施例中，向人類個體投與治療有效量之反義寡核苷酸或其鹽伴有監測人類個體中之 *SOD1* 水準，以確定人類個體對投與反義寡核苷酸或其鹽之反應。人類個體對投與反義寡核苷酸或其鹽之反應可由醫師用於確定治療干預之量及持續時間。在某些實施例中，人類 *SOD1* 水準係在 CSF 中監測。在某些實施例中，人類 *SOD1* 水準係在血漿中監測。在某些實施例中，人類 *SOD1* 水準係在血液中監測。在某些實施例中，人類 *SOD1* 水準係在血清中監測。

【0079】 在某些實施例中，投與反義寡核苷酸或其鹽可減少 *SOD1* 蛋白表現。在某些實施例中，投與反義寡核苷酸或其鹽可使 *SOD1* 蛋白表現減少至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%或由該等值中之任兩者定義之範圍。在某些實施例中，*SOD1* 蛋白表現之減少係 CSF 中之減少。在某些實施例中，*SOD1* 蛋白表現之減少係血漿中之減少。在某些實施例中，*SOD1* 蛋白表現之減少係血液中之減少。在某些實施例中，*SOD1* 蛋白表現之減少係血清中之減少。

【0080】 在某些實施例中，投與反義寡核苷酸或其鹽可改良人類個體之運動功能及呼吸。在某些實施例中，投與反義寡核苷酸或其鹽使運動功能及呼吸改良至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%或由該等值中之任兩者定義之範圍。

【0081】 在某些實施例中，包含反義寡核苷酸或其鹽之醫藥組合物用於製備

用來治療患有或易患 ALS 之人類個體(例如具有與 ALS 相關之 SOD1 突變之人類個體)的藥物。

神經絲

【0082】 本揭示案說明神經絲輕鏈水準作為標記物用於選擇具有 SOD1 基因突變之個體以用本文所述之反義寡核苷酸或其鹽進行治療的使用。在一些情況下，若個體具有等於或大於預定臨限值之神經絲輕鏈水準，則選擇該個體進行治療。在一些情況下，若個體已經受預定最小量之神經絲輕鏈水準增加，則選擇該個體進行治療。在一些情況下，若個體具有等於或大於預定臨限值之神經絲輕鏈水準且已經受預定最小量之神經絲輕鏈水準增加，則選擇該個體進行治療。

【0083】 已闡述用於量測血清中之神經絲輕鏈之分析(參見例如 Gaiottino 等人，PLoS ONE 8: e75091, 2013；Kuhle 等人，J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 86(3): 273-279, 2014)。神經絲輕鏈(NfL) (例如血漿或血清 NfL)濃度可例如使用以下來量測：即用型酶聯免疫吸附分析(ELISA)稀釋劑(Mabtech AB, Nacka Strand, Sweden)；Gaiottino 等人，PLoS ONE 8: e75091, 2013 中所述之電化學發光(ECL)免疫分析；或 Disanto 等人，Ann. Neurol. 81(6): 857-870, 2017 中所述之單分子陣列(SIMOA)方法。在 Kuhl 等人，Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 54 (10): 1655-1661, 2016 中已比較三種分析方法。SIMOA 分析(Simoa NF-light Advantage 套組)可自 Quanterix Corp. (Lexington, MA, USA)購得。在一些實施例中，NfL (例如血漿或血清 NfL)濃度係使用 Siemens Healthineers (SHL; Erlangen, Germany) NfL 分析來量測。在一些情況下，量測總 NfL (例如磷酸化及非磷酸化)。在一些實施例中，量測磷酸化 NfL，且在一些實施例中，量測非磷酸化 NfL。

【0084】 在一些實施例中，若具有 SOD1 基因突變之個體(例如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症之臨床上症狀發生前個體)具有等於或大於預定最小臨限值之神經

絲輕鏈水準(例如至少 44 pg/ml 之神經絲輕鏈水準，例如如使用 Siemens Healthineers NfL 分析所測定，或使用不同分析量測之等效 NfL 水準)，則選擇該個體進行治療。

【0085】 在一些實施例中，具有 SOD1 基因突變之個體(例如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症之臨床上症狀發生前個體)已經受預定最小量之神經絲輕鏈水準增加(例如至少 10 pg/ml 之神經絲輕鏈水準增加，例如如使用 Siemens Healthineers NfL 分析所測定，或使用不同分析量測之等效 NfL 水準)，則選擇該個體進行治療。

【0086】 在一些實施例中，具有 SOD1 基因突變之個體(例如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症之臨床上症狀發生前個體)具有等於或大於預定最小臨限值之神經絲輕鏈水準(例如至少 44 pg/ml 之神經絲輕鏈水準，例如如使用 Siemens Healthineers NfL 分析所測定，或使用不同分析量測之等效 NfL 水準)且已經受預定最小量之神經絲輕鏈水準增加(例如至少 10 pg/ml 之神經絲輕鏈水準增加，例如如使用 Siemens Healthineers NfL 分析所測定，或使用不同分析量測之等效 NfL 水準)，則選擇該個體進行治療。在一些實施例中，不希望受限於理論，認為血漿 NfL 水準自基線之至少 10 pg/mL 之變化(例如增加)可有力地解釋衰老對 NfL 水準之潛在效應。

【0087】 人類 NF-L 之胺基酸序列提供於 SEQ ID NO:4 及 Julien 等人，*Biochimica et Biophysica Acta*, 909:10-20 (1987)、UniProtKB - P07196、NCBI 參考序列：NP_006149.2 及 NCBI 參考序列：NG_008492.1 中。

SEQ ID NO:4

MSSFSYEPYYSTSYKRRYVETPRVHISSVRSGYSTARSAYSSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGSLMPLENL
DLSQVAAISNDLKSIRTQEKAQLQDLNDRFASFIERVHIELEQQNKVLEAELLVLRQKIHSEPSRFRALYE
QEIRDLRLAAEDATNEKQALQGEREGLFEETLRNTQARYEEFEVLSREDAEGRI.MEARKGADFAAI.ARA
ELEKRIDSLMDEISFLKKVHEEEIAELQAQIQYAQISVEMDVTKPDLAALKDIRAQYEKLAAKNMQNA
EEWFKSRFTVLTESAAKNTDAVRAAKDEVSESRRLKAKTLEIEACRGMNEALEKQLQELEDKQNADI
SAMQDTINKLENELRTTKSEMARYLKEYQDLLNVKMALDIEIAAYRKLEGEETRLSFTSVGSITSGYS
QSSQVTFGRSAYGGLQTSSYLMSTRSFPSYYTSHVQEEQIEVEETIEAAKALEAKDEPPSEGEAELEEKDK
EEAELEEAALIEELAAKLESELEAKEEEGGEGEGEGEETKEAELEEKKVEGAGEEQAAKKKD

生物樣品

【0088】 適用於本文所述方法之生物樣品包括任何生物流體、細胞、組織或其部分，其包括所關注分析物生物分子，例如 NF 蛋白或核酸(例如 RNA (mRNA))。生物樣品可為例如自人類個體獲得之樣本或可源自自該個體。舉例而言，樣品可為藉由生檢獲得之組織切片、歸檔生物流體或置於或適於組織培養之細胞。在一些情況下，生物樣品係諸如血液、血清、血漿或腦脊液(CSF)之生物流體，或吸附至基板(例如玻璃、聚合物、紙)上之該樣品。若期望，生物樣品可進一步分級分離成含有特定細胞類型之部分。舉例而言，血液樣品可分級分離成血清或含有特定類型之血球(例如紅血球或白血球(white blood cell、leukocyte))之部分。若期望，樣品可為個體樣品之組合，例如組織及流體樣品之組合。

【0089】 生物樣品可自具有 SOD1 基因突變(例如本文所述之 SOD1 突變)之個體獲得。在某些實施例中，個體為肌肉萎縮性脊髓側索硬化症之臨床上症狀發生前個體。

【0090】 可採用任何適於獲得生物樣品之方法，包括例如靜脈切開術、細針抽吸生檢程序。樣品亦可例如藉由顯微解剖(例如雷射收穫顯微解剖(LCM)或雷射顯微解剖(LMD))來收集。

【0091】 用於獲得及/或儲存樣品以保留樣品中分子(例如核酸或蛋白質)之活性或完整性之方法為熟習此項技術者所熟知。舉例而言，可使生物樣品進一步

與一或多種其他劑(例如緩衝劑及/或抑制劑，包括核酸酶、蛋白酶及磷酸酶抑制劑中之一或多者)接觸，該一或多種其他劑保留或最小化樣品中分子(例如核酸或蛋白質)之變化。該等抑制劑包括例如螯合劑(例如乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇雙(對胺基乙基醚) N,N,N1,N1-四乙酸(EGTA))、蛋白酶抑制劑(例如苯基甲基磺醯氟(PMSF)、抑肽酶、白抑肽酶、抗蛋白酶素及諸如此類)及磷酸酶抑制劑(例如磷酸鹽、氟化鈉、鈳酸鹽及諸如此類)。適於分離分子之緩衝劑及條件為熟習此項技術者所熟知且可端視例如欲表徵之樣品中分子之類型而變化(參見例如 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology* (增刊 47), John Wiley & Sons, New York (1999) ; Harlow 及 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988) ; Harlow 及 Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1999) ; Tietz *Textbook of Clinical Chemistry* , 第 3 版, Burtis 及 Ashwood 編輯, W.B. Saunders, Philadelphia, (1999))。樣品亦可經處理以消除或最小化干擾物質之存在。舉例而言，可將生物樣品分級分離或純化以去除不受關注之一或多種材料。分級分離或純化生物樣品之方法包括(但不限於)層析方法，例如液相層析、離子交換層析、粒徑排阻層析或親和層析。為用於本文所述之方法中，樣品可呈多種物理狀態。舉例而言，樣品可為液體或固體，可溶解或懸浮於液體中，可呈乳液或凝膠形式，或可吸附至材料上。

【0092】 提供以下實例以較佳地說明所主張發明且不應理解為限制本發明之範圍。就提及之具體材料而言，其僅出於說明之目的且不欲限制本發明。熟習此項技術者可在不行使發明能力且不背離本發明範圍的情況下開發等效方法或反應物。

實例

實例 1：使用神經絲臨限值來選擇用 SOD1 反義寡核苷酸治療之患者

【0093】 在臨床上症狀發生前成人 SOD1 突變攜帶者中使用縱向自然史試驗

實施反義 A (如本文所述)之 3 期、隨機化、安慰劑對照研究。本研究包括之 SOD1 突變與高或完全外顯率及快速疾病進展相關。若 SOD1 突變攜帶者未患臨床上表現之 ALS，則該等攜帶者視為肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之臨床上症狀發生前的。臨床上表現之 ALS 定義為出現明確指示出現 ALS 之臨床症狀或徵象，其可由 EMG 發現支持。

【0094】 選擇 44 pg/mL 之血漿神經絲輕鏈(NfL)臨限值來鑑別認為在 12 個月內(達到 NfL 臨限值後)具有明確 ALS 臨床症狀/徵象發作高風險之研究參與者。44 pg/mL 之血漿 NfL 臨限值係基於 NF 軌跡模型之模擬使用症狀發生前家族性肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(前 fALS)樣品之數據來確定，且經選擇以最小化假陽性率，同時允許在 NF 升高與臨床發作之間有足夠的時間來登記及干預。

【0095】 鑑於前 fALS 中血液採樣之頻率，在 NfL 水準之間有間隙，此在許多情形下會妨礙鑑別在明確 ALS 臨床症狀/徵象發作之前多久 NfL 開始升高之能力。為克服此問題，使用貝葉斯(Bayesian)方法將 Emax 模型擬合至自然對數轉換之 NfL 濃度數據用於患有臨床上表現之 ALS 之前 fALS 參與者，其在基線時為 30 歲或以上且具有快速進展之突變。單獨地，將貝葉斯威布爾模型(Bayesian Weibull model)擬合至在基線時為 30 歲或以上且具有快速進展突變之前 fALS 參與者的出現臨床上表現之 ALS 數據之時間。NfL 軌跡模型允許推算自 NfL 升高至出現臨床上表現之 ALS 之時間進程。利用來自擬合模型之事後預測模擬來評估不同 NfL 臨限值之效能。在本文中使用 Siemens Healthineers (SHL) NfL 分析來分析血漿 NfL。

【0096】 基於以下要素推導出 44 pg/mL 之 NfL 臨限值：

1. 低假陽性率(例如小於 5%)。
2. NfL 升高至臨床發作之足夠預期時間(例如長於或等於 2-3 個月)以解釋 NfL 處理時間、篩選及隨機化至研究中。

3. 個體在 NfL 水準達到 40 pg/mL 臨限值(但未達到 44 pg/mL 臨限值)後 12 個月未顯示 ALS 症狀發作之臨床經驗。

【0097】 對於給定 NfL 臨限值，在登記及至少 12 個月之隨訪時間時 NfL 水準低於臨限值之症狀發生前攜帶者中評估假陽性率。若 NfL 水準在基線後訪視時超過臨限值，且參與者在此後至少 12 個月保持為臨床上症狀發生前，則該參與者視為假陽性。在所有患有臨床上表現之 ALS 之參與者中評估假陰性率。若臨床上表現之 ALS 係在達到 NfL 臨限值之前出現，則參與者視為假陰性。

【0098】 對於 44 pg/mL 之 NfL 臨限值，假陽性率為 0/24 (0%)且假陰性為 1/12 (8.3%)。考慮但拒絕 40 pg/mL 之臨限值，此乃因假陽性率較高(1/24；4.1%)，同時具有與 44 pg/mL 相同之假陰性率。藉由使用 44 pg/mL 之 NfL 臨限值最小化假陽性率，健康個體不會暴露於其可能不需要或可能對其不具臨床效應之療法。

【0099】 基於擬合之 NfL 軌跡模型，按月估計臨床症狀發作前之幾何平均 NfL 水準且展示於圖 1 中。在出現臨床上表現之 ALS 前三個月，預期幾何平均 NfL 水準為約 44 pg/mL。對於 44 pg/mL 之 NfL 臨限值及至少 10 pg/mL 之 NfL 自基線之變化，截至 12 個月，安慰劑患者之臨床上表現之 ALS 之事後預測機率係 77.66%。

【0100】 臨床研究含有四個部分，部分 A、部分 B、部分 C 及部分 D。

【0101】 部分 A 係自然史試驗，其中參與者不接受研究治療，即反義 A 或安慰劑。部分 A 中之參與者為至少 18 歲，例如在知情同意時。在篩選期間，部分 A 中之參與者具有小於 44 pg/mL 之血漿 NfL 水準且無臨床上表現之 ALS。部分 A 中之參與者具有在篩選期間確認之以下 SOD1 突變中之一者。

p.Ala5Thr (A4T、A5T)

p.Ala5Val (A4V、A5V)

p.Cys7Phe (C6F、C7F)

p.Cys7Gly (C6G、C7G)

p.Asp102Gly (D101G、D102G)

p.Asp102His (D101H、D102H)

p.Gly115Ala (G114A、G115A)

p.Gly42Ser (G41S、G42S)

p.Gly86Arg (G85R、G86R)

p.Gly86Ser (G85S、G86S)

p.Gly94Ala (G93A、G94A)

p.His44Arg (H43R、H44R)

p.Leu107Phe (L106F、L107F)

p.Leu107Val (L106V、L107V)

p.Leu39Val (L38V、L39V)

p.Arg116Gly (R115G、R116G)

p.Val149Gly (V148G、V149G)

【0102】 上文之每一括號係指每一胺基酸取代之兩種替代命名慣例。如本文別處所用，上述胺基酸取代中之每一者係藉由每一括號中首先列出之變異體標識符(例如 A4T)來提及。

【0103】 替代地，部分 A 中之參與者可具有除由外部突變裁定委員會 (Mutation Adjudication Committee) 裁定納入研究中之上文所列 SOD1 突變外的 SOD1 突變。裁定必須確認，納入研究中之任何其他 SOD1 突變具有高或完全外顯率，且與快速疾病進展相關。

【0104】 部分 B 係症狀發生前參與者之隨機化、雙盲、安慰劑對照時段，該等症狀發生前參與者具有大於或等於 44 pg/mL 之血漿 NfL 水準、至少 10 pg/mL 之 NfL 自部分 A 基線變化且根據研究者之決定無 NfL 升高之替代性可鑑別原

因。血漿 NfL 水準達到大於或等於 44 pg/mL 之水準且展現至少 10 pg/mL 之 NfL 自基線變化及未患臨床上表現之 ALS 的部分 A 參與者可合格地登記於部分 B 中。在部分 B 中，將參與者以 1:1 (反義 A:安慰劑)比率隨機化以接受藉由鞘內注射投與之治療中之一者(反義 A 100 mg 或安慰劑)。部分 B 中之參與者約每 14 天(即第 1 天、第 15 天及第 29 天)接受 3 個負載劑量，且此後約每 28 天以盲化方式藉由鞘內注射接受維持劑量。

【0105】 研究之主要終點係在開始部分 B 之 12 個月內出現臨床上表現之 ALS 的參與者之比例。研究之次要終點包括在開始部分 B 之 24 個月內出現臨床上表現之 ALS 的參與者之比例、出現臨床上表現之 ALS 之時間、修訂的肌肉萎縮性脊髓側索硬化症功能評級量表(ALSFRS-R)總評分之變化、所預測緩慢肺活量(SVC) %之變化、無通氣輔助存活期(VAFS；定義為最早發生死亡或永久通氣中之一者之時間)及總體存活。

【0106】 部分 C 係其中參與者藉由鞘內注射接受 100 mg 反義 A 之開放標記擴展研究。對罹患臨床上表現之 ALS 之部分 B 參與者進行登記並監測。

【0107】 部分 D 係患有臨床上表現之 ALS 之部分 A 參與者之隨機化、雙盲、安慰劑對照時段。將參與者以 2:1 (反義 A:安慰劑)比率隨機化以經由鞘內注射接受 100 mg 反義 A 或安慰劑。

其他實施例

【0108】 儘管已結合詳細描述闡述本發明，但前述描述意欲說明且不限制本發明之範圍，本發明之範圍係由隨附申請專利範圍之範圍來定義。其他態樣、優點及修改在隨附申請專利範圍之範圍內。

【序列表】

<110> 美商百健MA公司(BIOGEN MA INC.)

<120> 肌肉萎縮性脊髓側索硬化症之治療

<130> 13751-0344TW1

<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>

<223> 人工序列之描述：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
ggtgctggtt tgcgtcgtag tctcctgcag cgtctggggt ttccgttgca gtccctcgaa		120
ccaggacctc ggcgtaggcct agcgagtat ggcgacgaag gccgtgtgctg tgctgaaggg		180
cgacggccca gtgcagggca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtga		240
ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg ttcattgagtt		300
tggagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac tttaatcctc tatccagaaa		360
acacgggtggg ccaaaggatg aagagaggca tgttggagac ttgggcaatg tgactgctga		420
caaagatggt gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca		480
ttgcatcatt ggccgcacac tgggtgtcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaagggtg		540

aaatgaagaa agtacaaaga caggaaacgc tggaaagtcgt ttggcttgtg gtgtaattgg600

gatcgcccaa taaacattcc cttggatgta gctgagggcc ccttaactca tctgttatcc660

tgctagctgt agaaatgtat cctgataaac attaaacact gtaatcttaa aagtgtlaatt720

gtgtgacttt ttcagagtig ctttaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact780

tggaagatit gtatagtitt ataaaactca gttaaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt840

ttgccagact taaatcacag atgggtatta aacttgtcag aatttctttg tcattcaagc900

ctgtgaataa aaacctgta tggcacttat tatgaggcta ttaaaagaat ccaaattcaa960

actaaaaaaaa aaaaaaaaaa a981

<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

151015

Arg Tyr Val Glu Thr Pro Arg Val His Ile Ser Ser Val Arg Ser Gly

202530

Tyr Ser Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Tyr Ser Ala Pro Val Ser

354045

Ser Ser Leu Ser Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Ser Leu

505560

Met Pro Ser Leu Glu Asn Leu Asp Leu Ser Gln Val Ala Ala Ile Ser

65707580

Asn Asp Leu Lys Ser Ile Arg Thr Gln Glu Lys Ala Gln Leu Gln Asp

859095

Leu Asn Asp Arg Phe Ala Ser Phe Ile Glu Arg Val His Glu Leu Glu

100105110

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					400
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					480
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

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種治療有需要之人類個體之與過氧化物歧化酶 1 (SOD1)基因突變相關之肌肉萎縮性脊髓側索硬化症的方法，該方法包括向該人類個體投與醫藥組合物，該醫藥組合物包含治療有效量之下式之反義寡核苷酸：

mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo
Aes Geo mCes Te (SEQ ID NO:1 之核鹼基序列)，其中

A = 腺嘌呤，

mC = 5-甲基胞嘧啶

G = 鳥嘌呤，

T = 胸腺嘧啶，

e = 2'-O-甲氧基乙基核糖修飾之糖，

d = 2'-去氧核糖糖，

s = 硫代磷酸酯核苷間鍵聯，且

o = 磷酸二酯核苷間鍵聯；

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中該人類個體在開始該治療之前具有至少 44 pg/ml 之神經絲輕鏈水準。

【請求項 2】 如請求項 1 之方法，其中該人類個體在開始該治療之前已經受至少 10 pg/ml 之神經絲輕鏈水準增加。

【請求項 3】 如請求項 2 之方法，其中該人類個體在開始該治療之前具有等效於至少 44 pg/ml 之血漿神經絲輕鏈水準之血液、血清或腦脊液神經絲輕鏈水準，且其中該人類個體在開始該治療之前已經受等效於至少 10 pg/ml 之血漿神經絲輕鏈水準增加的血液、血清或腦脊液神經絲輕鏈水準增加。

【請求項 4】 如請求項 2 之方法，其中該人類個體在開始該治療之前具有至少 44 pg/ml 之血漿神經絲輕鏈水準，且其中該人類個體在開始該治療之前已經

受至少 10 pg/ml 之血漿神經絲輕鏈水準增加。

【請求項 5】 一種治療有需要之人類個體之與 SOD1 基因突變相關之肌肉萎縮性脊髓側索硬化症的方法，該方法包括：

在開始治療之前在自該人類個體獲得之生物樣品中量測至少 44 pg/ml 之神經絲輕鏈水準；及

向該人類個體投與醫藥組合物，其包含治療有效量之下式之反義寡核苷酸：

mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo Aes Geo mCes Te (SEQ ID NO:1 之核鹼基序列)，其中

A = 腺嘌呤，

mC = 5-甲基胞嘧啶

G = 鳥嘌呤，

T = 胸腺嘧啶，

e = 2'-O-甲氧基乙基核糖修飾之糖，

d = 2'-去氧核糖糖，

s = 硫代磷酸酯核苷間鍵聯，且

o = 磷酸二酯核苷間鍵聯；

或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 6】 如請求項 5 之方法，其中該生物樣品係血液、血清、血漿或腦脊液。

【請求項 7】 如請求項 5 之方法，其中該生物樣品係血漿。

【請求項 8】 如請求項 5 或 6 之方法，其進一步包括在投與該反義寡核苷酸或其醫藥學上可接受之鹽之前，在該人類個體中量測等效於至少 10 pg/ml 之血漿神經絲輕鏈水準增加的血液、血清或腦脊液水準神經絲輕鏈水準增加。

- 【請求項 9】 如請求項 5 至 7 中任一項之方法，其進一步包括在投與該反義寡核苷酸或其醫藥學上可接受之鹽之前，在該人類個體中量測至少 10 pg/ml 之血漿神經絲輕鏈水準增加。
- 【請求項 10】 如前述請求項中任一項之方法，其中該醫藥組合物係藉由鞘內投與來投與。
- 【請求項 11】 如前述請求項中任一項之方法，其中該醫藥組合物遞送約 100 mg 固定劑量之該反義寡核苷酸。
- 【請求項 12】 如前述請求項中任一項之方法，其中該 SOD1 基因之突變係 A4V。
- 【請求項 13】 如前述請求項中任一項之方法，其中該 SOD1 基因之突變係 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、S59I、V87A、T88S、TAD、A89T、V97M、S105S、V118L、D124G、L114F、D90A、G12R、G147R、C6F、C6G、D101G、D101H、G114A、G85S、H43R、L106F、L106V、L38V 或 R115G。
- 【請求項 14】 如前述請求項中任一項之方法，其中該人類個體為肌肉萎縮性脊髓側索硬化症之臨床上症狀發生前個體。
- 【請求項 15】 如前述請求項中任一項之方法，其中向該人類個體投與該醫藥組合物之負載劑量，然後投與該醫藥組合物之維持劑量。
- 【請求項 16】 如請求項 15 之方法，其中向該人類個體投與三個負載劑量，且其中該等負載劑量係間隔 14 天投與。
- 【請求項 17】 如請求項 16 之方法，其中該等維持劑量係在該第三負載劑量後 28 天開始每 28 天進行投與。

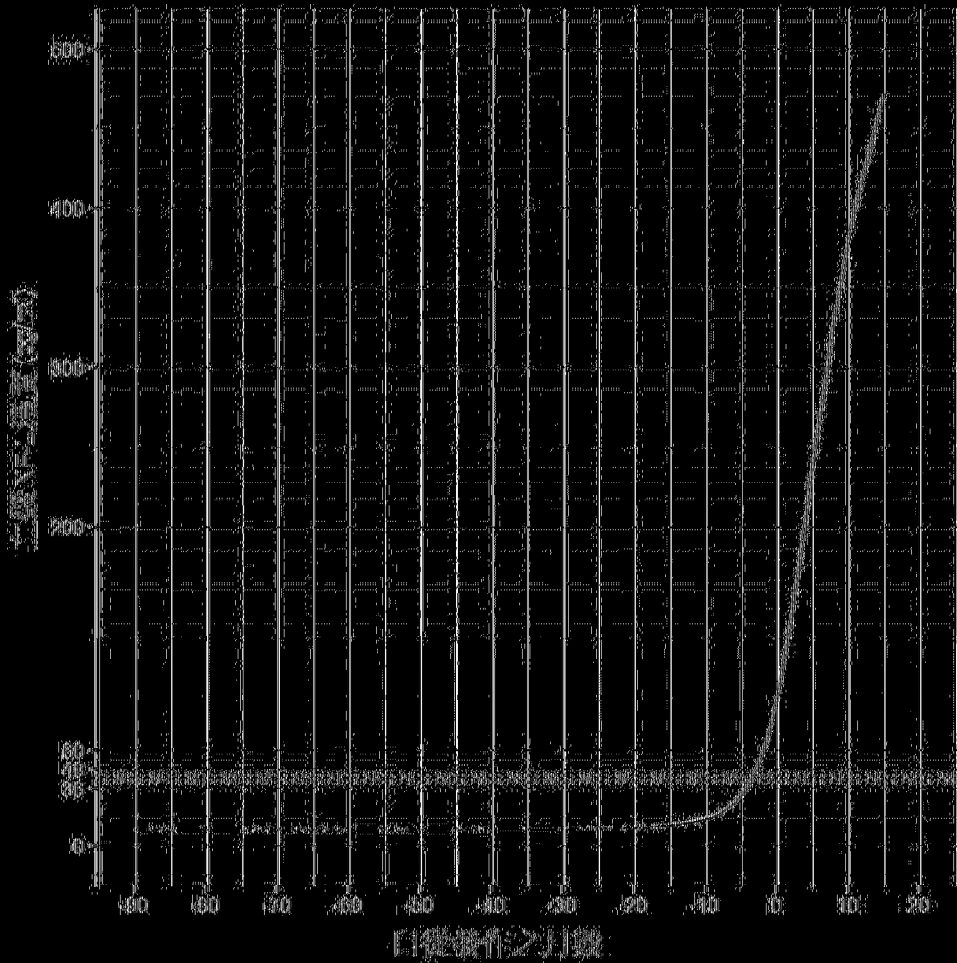
【請求項 18】 如請求項 15 之方法，其中該醫藥組合物之該等負載劑量及該等維持劑量係如下投與該人類個體：

- (i) 該醫藥組合物之第一負載劑量；
- (ii) 在該第一負載劑量後 14 天投與該醫藥組合物之第二負載劑量；
- (iii) 在該第一負載劑量後 28 天投與該醫藥組合物之第三負載劑量；及
- (iv) 在該第三負載劑量後 28 天或 1 個月投與該醫藥組合物之第一維持劑量。

【請求項 19】 如請求項 15 之方法，其中該醫藥組合物之該等負載劑量及該等維持劑量係如下投與該人類個體：

- (i) 足以遞送約 100 mg 固定劑量之該反義寡核苷酸之量的第一負載劑量；
- (ii) 足以遞送約 100 mg 固定劑量之該反義寡核苷酸之量的第二負載劑量，其中該第二負載劑量係在該第一負載劑量後 14 天投與；
- (iii) 足以遞送約 100 mg 固定劑量之該反義寡核苷酸之量的第三負載劑量，其中該第三負載劑量係在該第一負載劑量後 28 天投與；及
- (iv) 足以遞送約 100 mg 固定劑量之該反義寡核苷酸之量的第一維持劑量，其中該第一維持劑量係在該第三負載劑量後 28 天投與。

|(發明圖式)|



口徑減小之時間							
口徑減小之時間	100	200	300	400	500	600	700
口徑減小之距離	73.05	85.02	97.20	108.08	118.15	127.2	135.7

|(圖 1)|