(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112399849 A
(43)申请公布日 2021.02.23

(21)申请号 201980043482.X
(22)申请日 2019.06.26
(30)优先权数据
62/690,270 2018.06.26 US
62/739,386 2018.10.01 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2019/026393 2019.06.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/004675 JA 2020.01.02
(71)申请人 日本新药株式会社
地址 日本京都府
(72)发明人 宇野朋典 夏川隆资 江川洋一 佐藤洋平
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 沈雪
(51)Int.Cl.
A61K 31/7088(2006.01)
A61P 21/04(2006.01)
C12N 15/113(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)

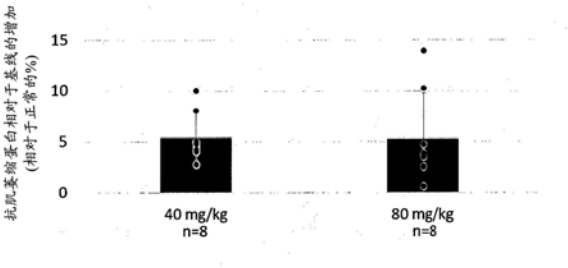
权利要求书3页 说明书53页
序列表2页 附图10页

(54)发明名称

含有反义寡核苷酸的组合物及其在迪谢内肌营养不良症的治疗中的用途

(57)摘要

本发明涉及含有反义寡核苷酸的组合物及其用于治疗迪谢内肌营养不良症的用途。本发明特别涉及在以处置的给药量进行了给药的情况下对迪谢内肌营养不良症的治疗有效的上述组合物及其用途。



CN 112399849 A

1.一种用于治疗人类患者的迪谢内肌营养不良症的医药组合物,其含有由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5'末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物,其中,

所述治疗包括:每周一次对所述人类患者以40mg/kg～80mg/kg静脉内给药反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

2.根据权利要求1所述的医药组合物,其中,

每周一次对所述人类患者以40mg/kg静脉内给药所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

3.根据权利要求1所述的医药组合物,其中,

每周一次对所述人类患者以80mg/kg静脉内给药所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

4.根据权利要求1所述的医药组合物,其中,

所述人类患者在抗肌萎缩蛋白基因中具有外显子发生了缺失的突变,所述外显子为选自外显子43-52、45-52、47-52、48-52、49-52、50-52或52中的任意外显子。

5.根据权利要求1所述的医药组合物,其中,

通过基于蛋白质印迹法或质谱分析法的测定,所述人类患者在治疗前的抗肌萎缩蛋白的表达为健康人的1%以下。

6.根据权利要求5所述的医药组合物,其中,

在所述人类患者中,在治疗前未观察到抗肌萎缩蛋白的表达。

7.根据权利要求1所述的医药组合物,其中,

所述反义低聚物的碱基部分的序列由序列号3所示的序列构成。

8.根据权利要求1所述的医药组合物,其中,

所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物为维托拉尔森或其同等产品。

9.根据权利要求1所述的医药组合物,其以2.5～500mg/ml或10～100mg/ml的浓度包含所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

10.根据权利要求1所述的医药组合物,其以25mg/ml的浓度包含所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

11.根据权利要求1所述的医药组合物,其以50mg/ml的浓度包含所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

12.根据权利要求1所述的医药组合物,其进一步包含选自等渗剂、pH调节剂及溶剂中的至少1种成分。

13.根据权利要求12所述的医药组合物,其中,

所述等渗剂为选自氯化钠、氯化钾、葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、海藻糖及甘油中的至少1种。

14.根据权利要求12或13所述的医药组合物,其中,

所述pH调节剂为选自盐酸、氢氧化钠、柠檬酸、乳酸、磷酸盐(磷酸氢钠、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾)及单乙醇胺中的至少1种。

15.根据权利要求12～14中任一项所述的医药组合物,其中,

所述溶剂为水。

16.根据权利要求1所述的医药组合物,其是包含2.5～500mg/ml或10～100mg/ml的浓度的反义低聚物、8～10mg/ml的浓度的氯化钠、且pH为7.2～7.4的水溶液。

17.根据权利要求1所述的医药组合物,其中,

通过所述治疗产生选自以下(1)～(6)中至少1种效果:

(1)与基线相比,患者的骨骼肌中的抗肌萎缩蛋白表达量的平均值在给药24周后增加至9倍以上;

(2)与基线相比,根据起立时间(TTSTAND)得到的速度的变化在给药24周后的25周时为-0.055次/秒以上;

(3)与基线相比,根据10米跑步/步行时间(TTRW)得到的速度的变化在给药24周后的25周时为-0.025米/秒以上;

(4)与基线相比,根据爬升4级台阶时间(TTCLIMB)得到的速度的变化在给药24周后的25周时为-0.060次/秒以上;

(5)与基线相比,北极星移动评价量表(NSAA)的得分的变化在给药24周后的25周时为-2.2分以上;以及

(6)与基线相比,6分钟步行试验(6MWT)的变化在给药24周后的25周时为-7.5米以上。

18.根据权利要求1所述的医药组合物,其中,

在对7～9岁的迪谢内肌营养不良症的人类患者进行了84周所述治疗的情况下,产生选自以下(1)～(6)中至少1种效果:

(1)从治疗开始至第85周,丧失起立能力的患者小于20%;

(2)从治疗开始至第85周,无法爬升4级台阶的患者小于10%;

(3)从治疗开始至第85周,丧失独立步行能力的患者小于10%;

(4)从治疗开始至第85周,没有观察到10米跑步/步行的速度随年龄增加而减慢;

(5)从治疗开始至第85周,没有观察到爬升4级台阶的速度随年龄增加而减慢;以及

(6)从治疗开始至第85周,没有观察到起立的速度随年龄增加而减慢。

19.根据权利要求1所述的医药组合物,其中,

在对10～12岁的迪谢内肌营养不良症的人类患者进行了84周所述治疗的情况下,产生选自以下(1)～(6)中至少1种效果:

(1)从治疗开始至第85周,丧失起立能力的患者小于60%;

(2)从治疗开始至第85周,无法爬升4级台阶的患者小于50%;

(3)从治疗开始至第85周,丧失独立步行能力的患者小于50%;以及

(4)从治疗开始至第85周,没有观察到10米跑步/步行的速度随年龄增加而减慢;

(5)从治疗开始至第85周,观察到爬升4级台阶的速度加快的时期;以及

(6)从治疗开始至第85周,观察到起立的速度加快的时期。

20.一种迪谢内肌营养不良症的治疗方法,该方法包括:每周一次对人类患者以反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物为40mg/kg～80mg/kg的方式静脉内给药含有所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物的医药组合物,

所述反义低聚物由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5'末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成。

21.一种用于人类患者的迪谢内肌营养不良症的治疗方法的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物，其中，所述反义低聚物由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5’末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成，

所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物以40mg/kg～80mg/kg对所述人类患者每周一次进行静脉内给药。

22.反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物在用于治疗人类患者的迪谢内肌营养不良症的医药组合物的制造中的用途，其中，所述反义低聚物由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5’末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成，

所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物以40mg/kg～80mg/kg对所述人类患者每周一次进行静脉内给药。

含有反义寡核苷酸的组合物及其在迪谢内肌营养不良症的治疗中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及能够跳读人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的反义低聚物的用法用量及包含该低聚物的医药组合物。

背景技术

[0002] 迪谢内肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy,DMD)是约3,500人新生男孩中1人发病的频率最高的遗传性进行性肌萎缩症。虽然在婴幼儿期显示出与正常人基本上没有差别的运动能力,但从4～5岁时起可观察到肌力降低。然后肌力降低发展至12岁时变得无法行走,在20多岁时因心力衰竭或呼吸衰竭导致死亡,是严重疾病。目前,没有针对DMD的有效治疗方法,迫切需要开发新型治疗药。

[0003] 已知DMD的原因是抗肌萎缩蛋白基因的变异。抗肌萎缩蛋白基因存在于X染色体,是由220万碱基对的DNA形成的巨大基因。由DNA转录至mRNA前体,再通过剪接去除内含子,合成79个外显子接合而成的mRNA。由该mRNA翻译成3,685个氨基酸,生成抗肌萎缩蛋白。抗肌萎缩蛋白与肌细胞的膜稳定性的保持有关,为了使肌细胞不容易破坏,抗肌萎缩蛋白是必需的。DMD患者的抗肌萎缩蛋白基因存在变异,因此在肌细胞中基本上无法表达具有功能的抗肌萎缩蛋白。因此,在DMD患者体内,无法保持肌细胞的结构,大量的钙离子流入肌细胞内。其结果是发生类似炎症的反应,发生纤维化,从而使肌细胞变得难以再生。

[0004] 贝克(Becker)肌营养不良症(BMD)的原因也是抗肌萎缩蛋白基因的突变,其症状虽然表现出因肌萎缩导致的肌力降低,但通常比DMD轻,肌力降低的发展慢,在多数情况下在成年期发病。可以认为DMD与BMD的临床症状的不同在于,由于变异,在抗肌萎缩蛋白的mRNA翻译为抗肌萎缩蛋白时,氨基酸可读框被破坏或保持(非专利文献1)。即,对于DMD而言,由于存在氨基酸可读框错位的变异,因此基本上不表达保持功能的抗肌萎缩蛋白,但对于BMD而言,由于变异而使外显子的一部分缺失,但保持了氨基酸可读框,因此可以产生虽然不完全但是有功能的抗肌萎缩蛋白。

[0005] 期待着外显子跳读法作为DMD的治疗方法。该方法是通过改变剪接而修复抗肌萎缩蛋白的mRNA的氨基酸可读框,从而诱导表达部分恢复了功能的抗肌萎缩蛋白的方法(非专利文献2)。成为外显子跳读的对象的氨基酸序列部分被丢失。因此,在该治疗中表达的抗肌萎缩蛋白比正常的抗肌萎缩蛋白短,但由于保持了氨基酸可读框,因此部分保持了使肌细胞稳定的功能。由此期待通过外显子跳读能使DMD表现出与更轻症状的BMD相同的症状。外显子跳读法经过基于小鼠、犬的动物实验,已经在进行对人DMD患者的临床试验。

[0006] 可以通过以5'或3'剪接点中任一者或两者、或者外显子的内部为目标的反义核酸的结合来诱导外显子跳读。外显子仅在两个剪接点通过剪接体复合体进行识别的情况下包含在mRNA中。因此,通过利用反义核酸靶向剪接点,可以诱导外显子跳读。另外可以认为,由于外显子被剪接机构所识别,因此需要将SR蛋白质结合于外显子剪接增强子(ESE),即使靶向ESE也能够诱导外显子跳读。

[0007] 抗肌萎缩蛋白基因的突变随DMD患者而不同,因此需要与基因突变的部位、种类相应的反义核酸。目前为止,西澳大利亚大学的Steve Wilton等制备了对全部79个外显子诱导外显子跳读的反义核酸(非专利文献3),荷兰的Annemieke Aartsma-Rus等制备了对39种外显子诱导外显子跳读的反义核酸(非专利文献4)。

[0008] 可以认为全部DMD患者的10%左右能够通过跳读第53位外显子(以下称为"外显子53")来治疗。近年来,已经有多个研究机构报告了对于以抗肌萎缩蛋白基因外显子53作为外显子跳读的靶点的研究(专利文献1～4;非专利文献5及6)。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:国际公开公报WO 2006/000057

[0012] 专利文献2:国际公开公报WO 2004/048570

[0013] 专利文献3:美国专利公开公报US 2010/0168212

[0014] 专利文献4:国际公开公报WO 2010/048586

[0015] 非专利文献

[0016] 非专利文献1:Monaco A.P.et al.,Genomics 1988;2:p.90-95

[0017] 非专利文献2:Matsuo M.,Brain Dev 1996;18:p.167-172

[0018] 非专利文献3:Wilton S.D.et al.,Molecular Therapy 2007:15:p.1288-96

[0019] 非专利文献4:Annemieke Aartsma-Rus et al.,(2002)Neuromuscular Disorders 12:S71-S77

[0020] 非专利文献5:Linda J.Popplewell et al.,(2010)Neuromuscular Disorders,vol.20,no.2,p.102-10

[0021] 非专利文献6:Bladen C.L.et al.,Human Mutation(2015)36:395-402

发明内容

[0022] 本发明如下所述,但并不限定于此。

[0023] <1>

[0024] 一种用于治疗人类患者的迪谢内肌营养不良症的医药组合物,其含有由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5'末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物,其中,

[0025] 所述治疗包括:每周一次对所述人类患者以40mg/kg～80mg/kg静脉内给药反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

[0026] <2>

[0027] 根据上述<1>所述的医药组合物,其中,每周一次对所述人类患者以40mg/kg静脉内给药所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

[0028] <3>

[0029] 根据上述<1>所述的医药组合物,其中,每周一次对所述人类患者以80mg/kg静脉内给药所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

[0030] <4>

[0031] 根据上述<1>所述的医药组合物,其中,所述人类患者在抗肌萎缩蛋白基因中具

有外显子发生了缺失的突变,所述外显子为选自外显子43-52、45-52、47-52、48-52、49-52、50-52或52中的任意外显子。

[0032] ＜5＞

[0033] 根据上述＜1＞所述的医药组合物,其中,所述人类患者在治疗前的抗肌萎缩蛋白的表达根据基于蛋白质印迹法(Western Blot)或质谱分析法的测定为健康人的1%以下。

[0034] ＜6＞

[0035] 根据上述＜5＞所述的医药组合物,其中,在所述人类患者中,在治疗前未观察到抗肌萎缩蛋白的表达。

[0036] ＜7＞

[0037] 根据上述＜1＞所述的医药组合物,其中,所述反义低聚物的碱基部分的序列由序列号3所示的序列构成。

[0038] ＜8＞

[0039] 根据上述＜1＞所述的医药组合物,其中,所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物为维托拉尔森(Viltolarsen)或其同等产品。

[0040] ＜9＞

[0041] 根据上述＜1＞所述的医药组合物,其以2.5～500mg/ml或10～100mg/ml的浓度包含所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

[0042] ＜10＞

[0043] 根据上述＜1＞所述的医药组合物,其以25mg/ml的浓度包含所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

[0044] ＜11＞

[0045] 根据上述＜1＞所述的医药组合物,其以50mg/ml的浓度包含所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

[0046] ＜12＞

[0047] 根据上述＜1＞所述的医药组合物,其进一步包含选自等渗剂、pH调节剂及溶剂中的至少1种成分。

[0048] ＜13＞

[0049] 根据上述＜12＞所述的医药组合物,其中,所述等渗剂为选自氯化钠、氯化钾、葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、海藻糖及甘油中的至少1种。

[0050] ＜14＞

[0051] 根据上述＜12＞或＜13＞所述的医药组合物,其中,所述pH调节剂为选自盐酸、氢氧化钠、柠檬酸、乳酸、磷酸盐(磷酸氢钠、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾)及单乙醇胺中的至少1种。

[0052] ＜15＞

[0053] 根据上述＜12＞～＜14＞中任一项所述的医药组合物,其中,所述溶剂为水。

[0054] ＜16＞

[0055] 根据上述＜1＞所述的医药组合物,其是包含2.5～500mg/ml或10～100mg/ml的浓度的反义低聚物、8～10mg/ml的浓度的氯化钠、且pH为7.2～7.4的水溶液。

[0056] ＜17＞

[0057] 根据上述＜1＞所述的医药组合物，其中，通过所述治疗产生选自以下(1)～(6)中至少1种效果：

[0058] (1)与基线相比，患者的骨骼肌中的抗肌萎缩蛋白表达量的平均值在给药24周后增加至9倍以上；

[0059] (2)与基线相比，根据起立时间(TTSTAND，time to stand)得到的速度的变化在给药24周后的25周时为-0.055次/秒以上；

[0060] (3)与基线相比，根据10米跑步/步行时间(TTRW，time to run/walk 10meters)得到的速度的变化在给药24周后的25周时为-0.025米/秒以上；

[0061] (4)与基线相比，根据爬升4级台阶时间(TTCLIMB，time to climb 4stairs)得到的速度的变化在给药24周后的25周时为-0.060次/秒以上；

[0062] (5)与基线相比，北极星移动评价量表(NSAA，North Star Ambulatory Assessment)的得分的变化在给药24周后的25周时为-2.2分以上；以及

[0063] (6)与基线相比，6分钟步行试验(6MWT，6-minute walk test)的变化在给药24周后的25周时为-7.5米以上。

[0064] ＜18＞

[0065] 根据上述＜1＞所述的医药组合物，其中，在对7～9岁的迪谢内肌营养不良症的人类患者进行了84周所述治疗的情况下，产生选自以下(1)～(6)中至少1种效果：

[0066] (1)从治疗开始至第85周，丧失起立能力的患者小于20％；

[0067] (2)从治疗开始至第85周，无法爬升4级台阶的患者小于10％；

[0068] (3)从治疗开始至第85周，丧失独立步行能力的患者小于10％；

[0069] (4)从治疗开始至第85周，没有观察到10米跑步/步行的速度随年龄增加而减慢；

[0070] (5)从治疗开始至第85周，没有观察到爬升4级台阶的速度随年龄增加而减慢；以及

[0071] (6)从治疗开始至第85周，没有观察到起立的速度随年龄增加而减慢。

[0072] ＜19＞

[0073] 根据上述＜1＞所述的医药组合物，其中，在对10～12岁的迪谢内肌营养不良症的人类患者进行了84周所述治疗的情况下，产生选自以下(1)～(6)中至少1种效果：

[0074] (1)从治疗开始至第85周，丧失起立能力的患者小于60％；

[0075] (2)从治疗开始至第85周，无法爬升4级台阶的患者小于50％；

[0076] (3)从治疗开始至第85周，丧失独立步行能力的患者小于50％；以及

[0077] (4)从治疗开始至第85周，没有观察到10米跑步/步行的速度随年龄增加而减慢；

[0078] (5)从治疗开始至第85周，观察到爬升4级台阶的速度加快的时期；以及

[0079] (6)从治疗开始至第85周，观察到起立的速度加快的时期。

[0080] ＜20＞

[0081] 一种迪谢内肌营养不良症的治疗方法，该方法包括：每周一次对人类患者以反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物为40mg/kg～80mg/kg的剂量静脉内给药含有所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物的医药组合物，

[0082] 所述反义低聚物由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5’末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成。

[0083] ＜20-1＞

[0084] 根据上述＜20＞所述的治疗方法，其中，通过所述治疗方法，产生权利要求17所述的至少1种效果、权利要求18所述的至少1种效果、或者权利要求19所述的至少1种效果。

[0085] ＜21＞

[0086] 一种用于人类患者的迪谢内肌营养不良症的治疗方法的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物，其中，所述反义低聚物由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5'末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成，

[0087] 所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物以40mg/kg～80mg/kg对所述人类患者每周一次进行静脉内给药。

[0088] ＜21-1＞

[0089] 根据上述＜21＞所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物，其中，通过所述给药，产生权利要求17所述的至少1种效果、权利要求18所述的至少1种效果、或者权利要求19所述的至少1种效果。

[0090] ＜22＞

[0091] 反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物在用于治疗人类患者的迪谢内肌营养不良症的医药组合物的制造中的用途，其中，所述反义低聚物由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5'末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成，

[0092] 所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物以40mg/kg～80mg/kg对所述人类患者每周一次进行静脉内给药。

[0093] 另外，作为其它方式，本发明如下所述，但并不限定于此。

[0094] [1]：一种用于对具有适合基于外显子53跳读的治疗的迪谢内肌营养不良症的受试者进行治疗的方法，该方法包括：

[0095] 以约40mg/kg/周的剂量对受试者静脉内给药NS-065/NCNP-01的工序。

[0096] [2]：一种用于对具有适合基于外显子53跳读的治疗的迪谢内肌营养不良症的受试者进行治疗的方法，该方法包括：

[0097] 以约80mg/kg/周的剂量对受试者静脉内给药NS-065/NCNP-01的工序。

[0098] [3]：一种用于对具有适合基于外显子53跳读的治疗的迪谢内肌营养不良症的受试者进行治疗的方法，该方法包括：

[0099] 以40mg/kg/周以上且80mg/kg/周以下的剂量对受试者静脉内给药NS-065/NCNP-01的工序。

[0100] [4]：根据[1]所述的方法，其中，给药的形式为水溶液，所述水溶液包含：

[0101] 2.5mg/mL以上且500mg/mL以下的浓度的NS-065/NCNP-01、以及

[0102] 作为等渗剂的8.55mg/mL以上且9.45mg/mL以下的浓度的氯化钠，

[0103] 该水溶液具有约7.3的pH。

[0104] [5]：根据[2]所述的方法，其中，给药的形式为水溶液，所述水溶液包含：

[0105] 2.5mg/mL以上且500mg/mL以下的浓度的NS-065/NCNP-01、以及

[0106] 作为等渗剂的8.55mg/mL以上且9.45mg/mL以下的浓度的氯化钠，

[0107] 该水溶液具有约7.3的pH。

[0108] [6]：根据[3]所述的方法，其中，给药的形式为水溶液，所述水溶液包含：

[0109] 2.5mg/mL以上且500mg/mL以下的浓度的NS-065/NCNP-01、以及

[0110] 作为等渗剂的8.55mg/mL以上且9.45mg/mL以下的浓度的氯化钠，

[0111] 该水溶液具有约7.3的pH。

[0112] [7]:一种用于在具有适合基于外显子53跳读的治疗的迪谢内肌营养不良症的受试者中诱导抗肌萎缩蛋白产生的方法,该方法包括：

[0113] 以约40mg/kg/周的剂量对受试者静脉内给药NS-065/NCNP-01的工序。

[0114] [8]:一种用于在具有适合基于外显子53跳读的治疗的迪谢内肌营养不良症的受试者中诱导抗肌萎缩蛋白产生的方法,该方法包括：

[0115] 以约80mg/kg/周的剂量对受试者静脉内给药NS-065/NCNP-01的工序。

[0116] [9]:一种用于在具有适合基于外显子53跳读的治疗的迪谢内肌营养不良症的受试者中诱导抗肌萎缩蛋白产生的方法,该方法包括：

[0117] 以40mg/kg/周以上80mg/kg/周以下的剂量对受试者静脉内给药NS-065/NCNP-01的工序。

[0118] [10]:根据[7]所述的方法,其中,给药的形式为水溶液,所述水溶液包含：

[0119] 2.5mg/mL以上且500mg/mL以下的浓度的NS-065/NCNP-01、以及

[0120] 作为等渗剂的8.55mg/mL以上且9.45mg/mL以下的浓度的氯化钠，

[0121] 该水溶液具有约7.3的pH。

[0122] [11]:根据[8]所述的方法,其中,给药的形式为水溶液,所述水溶液包含：

[0123] 2.5mg/mL以上且500mg/mL以下的浓度的NS-065/NCNP-01、以及

[0124] 作为等渗剂的8.55mg/mL以上且9.45mg/mL以下的浓度的氯化钠，

[0125] 该水溶液具有约7.3的pH。

[0126] [12]:根据[9]所述的方法,其中,给药的形式为水溶液,所述水溶液包含：

[0127] 2.5mg/mL以上且500mg/mL以下的浓度的NS-065/NCNP-01、以及

[0128] 作为等渗剂的8.55mg/mL以上且9.45mg/mL以下的浓度的氯化钠，

[0129] 该水溶液具有约7.3的pH。

[0130] 在上述[1]～[12]中,NS-065/NCNP-01(在本说明书中,也称为“维托拉尔森”)可以是其同等产品。另外,在上述[1]～[12]中,受试者可以为人类患者。

[0131] 根据本发明,可以提供具有维托拉尔森的稳定组成的用于迪谢内肌营养不良症治疗的医药组合物。另外,关于包含维托拉尔森的医药组合物,可以提供起到有效的迪谢内肌营养不良症的治疗效果且对人类患者安全的范围的维托拉尔森的用法/剂量。根据该医药组合物,能够以低副作用有效地减轻迪谢内肌营养不良症的症状。

附图说明

[0132] 图1示出了美国II期剂量设定试验NS-065/NCNP-01-201的设计。

[0133] 图2示出了使用蛋白质印迹法的骨骼肌中的de novo抗肌萎缩蛋白表达量的测定结果。

[0134] 图3示出了美国/加拿大II期剂量设定试验NS-065/NCNP-01-201的设计。

[0135] 图4示出了24周时间功能检测中相对于基线的变化的比较。在5个图表中,“维托拉尔森(Viltolarsen)”是NS-065/NCNP-01的国际通用名(INN)。

[0136] 图5示出了维托拉尔森在伯瑞坦-罗宾森(Britton-Robinson)缓冲液(pH3～11)中的稳定性评价的结果。

[0137] 图6示出了维托拉尔森在磷酸钾-硼砂缓冲液(pH 6～9)中的稳定性评价的结果。

[0138] 图7示出了121℃下的pH调节剂的探讨的结果。

[0139] 图8是表示各运动功能试验结果相对于基线的变化的图表。

[0140] 图9是表示至85周时(从初次给药起经过84周)维托拉尔森给药组(40mg/kg给药组和80mg/kg给药组)各受试患者的6分钟步行试验的结果的图表。

[0141] 图10是表示至85周时(从初次给药起经过84周)维托拉尔森给药组(40mg/kg给药组和80mg/kg给药组)各受试患者的北极星移动能力测试的得分的图表。

[0142] 图11是表示至85周时(从初次给药起经过84周)维托拉尔森给药组(40mg/kg给药组和80mg/kg给药组)各受试患者的起立时间试验的速度的结果的图表。

[0143] 图12是表示至85周时(从初次给药起经过84周)维托拉尔森给药组(40mg/kg给药组和80mg/kg给药组)各受试患者的爬升4级台阶时间试验的速度的结果的图表。

[0144] 图13是表示至85周时(从初次给药起经过84周)维托拉尔森给药组(40mg/kg给药组和80mg/kg给药组)各受试患者的10m跑步/步行时间试验的速度的结果的图表。

[0145] 图14是表示在49周时(从初次给药起经过48周)维托拉尔森给药组(40mg/kg给药组和80mg/kg给药组)各受试患者中、由WB得到的抗肌萎缩蛋白定量值的相对于基线的抗肌萎缩蛋白表达量变化与起立时间试验中相对于基线的速度变化的相关性的图表。

[0146] 图15是表示在49周时(从初次给药起经过48周)维托拉尔森给药组(40mg/kg给药组和80mg/kg给药组)各受试患者中、由WB得到的抗肌萎缩蛋白定量值的相对于基线的抗肌萎缩蛋白表达量变化与爬升4级台阶时间试验中相对于基线的速度变化的相关性的图表。

[0147] 图16是表示在49周时(从初次给药起经过48周)维托拉尔森给药组(40mg/kg给药组和80mg/kg给药组)各受试患者中、由WB得到的抗肌萎缩蛋白定量值的相对于基线的抗肌萎缩蛋白表达量变化与10m跑步/步行时间试验中相对于基线的速度变化的相关性的图表。

具体实施方式

[0148] 以下,对本发明详细地进行说明。以下的实施方式是用于说明本发明的例子,并不是将本发明仅限定于该实施方式。本发明只要不脱离其主旨即可,可以以各种方式实施。

[0149] 需要说明的是,在本说明书中以参考的方式将引用的全部文献、及公开公报、专利公报等其它专利文献引用到本说明书中。而且,本说明书包括作为本申请所要求的优先权的基础的2018年6月26日提出申请的美国临时专利申请(US62/690,270)及2018年10月1日提出申请的美国临时专利申请(US62/739,386)的说明书及附图中记载的内容。

[0150] Ⅰ.第一方式

[0151] 作为第一方式,本发明提供用于治疗迪谢内肌营养不良症的医药组合物。即,本发明的医药组合物是用于治疗人类患者的迪谢内肌营养不良症的医药组合物,其含有由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5'末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成的反义低聚物(以下,也称为"本发明的低聚物")、或者其医药上能够允许的盐或其水合物,

[0152] 上述治疗包括每周一次对上述人类患者以40mg/kg～80mg/kg静脉内给药反义低

聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

[0153] [人抗肌萎缩蛋白基因的第53位外显子]

[0154] 在本发明中，“基因”除了基因组基因以外，还包括cDNA、mRNA前体及mRNA。优选基因为mRNA前体，即pre-mRNA。

[0155] 在人基因组中，人抗肌萎缩蛋白基因存在于基因座Xp21.2。人抗肌萎缩蛋白基因具有3.0Mbp的大小，作为已知的人基因是最大的基因。但是，人抗肌萎缩蛋白基因的编码区域仅有14kb，该编码区域以79个外显子的形式分散于抗肌萎缩蛋白基因内(Roberts,RG., et al.,Genomics,16:536-538(1993))。作为人抗肌萎缩蛋白基因的转录物的pre-mRNA经过剪接而生成14kb的成熟mRNA。人的野生型抗肌萎缩蛋白基因的成熟mRNA的碱基序列是公知的(GenBank Accession No.NM_004006)。

[0156] 将人的野生型抗肌萎缩蛋白基因的外显子53的碱基序列示于序列号1。

[0157] 本发明的医药组合物含有由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5’末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成的反义低聚物(本发明的低聚物)、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

[0158] 这里，制备本发明的低聚物的目的在于，通过人抗肌萎缩蛋白基因的外显子53的跳读，将由DMD型抗肌萎缩蛋白基因编码的蛋白质改变为BMD型抗肌萎缩蛋白。因此，作为本发明的低聚物的外显子跳读的对象，抗肌萎缩蛋白基因的外显子53不仅包括野生型，也包括突变型。

[0159] 突变型的人抗肌萎缩蛋白基因的外显子53可以具体举出相对于序列号1的碱基序列具有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、99％以上、99.1％以上、99.2％以上、99.3％以上、99.4％以上、99.5％以上、99.6％以上、99.7％以上、99.8％以上、或99.9％以上的同一性的多核苷酸。在本说明书中，“多核苷酸”是指DNA或RNA。

[0160] 需要说明的是，碱基序列的同一性可以使用Karlin和Altschul的算法BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)(Proc.Natl.Acad.Sci.USA872264-2268,1990; Proc Natl Acad Sci USA 90:5873,1993)来确定。开发了基于BLAST的算法的被称为BLASTN、BLASTX的程序(Altschul SF,et al:J Mol Biol 215:403,1990)。在使用BLASTN分析碱基序列时，参数可以设为例如得分＝100、字长＝12。在使用BLAST和Gapped BLAST程序时，使用各程序的默认参数。

[0161] 在本说明书中，“互补的碱基序列”并不限定于与作为对象的碱基序列形成沃森-克里克配对(Watson-Crick pair)的碱基序列，还包括形成摆动碱基对(wobble base pair)的碱基序列。这里，沃森-克里克配对是指在腺嘌呤-胸腺嘧啶、腺嘌呤-尿嘧啶及鸟嘌呤-胞嘧啶之间可形成氢键的碱基对，摆动碱基对是指在鸟嘌呤-尿嘧啶、肌苷-尿嘧啶、肌苷-腺嘌呤及肌苷-胞嘧啶之间可形成氢键的碱基对。另外，“互补的碱基序列”可以与作为对象的碱基序列不具有100％的互补性，例如，相对于作为对象的碱基序列，可以含有1个、2个、3个、4个或5个非互补的碱基，另外，相对于作为对象的碱基序列，可以是缩短1个碱基、2个碱基、3个碱基、4个碱基或5个碱基的碱基序列。

[0162] 将由外显子53的5’末端起第36～56位核苷酸构成的序列(序列号2)及与该序列互补的碱基序列(序列号3)的例子示于以下的表1。

[0163] 表1

[0164]

5’-GAACACCTTCAGAACCGGAGG-3’	序列号2
5’-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3’	序列号3

[0165] 这里，胸腺嘧啶“T”与尿嘧啶“U”可以相互更换，无论是“T”还是“U”，均不对本发明的低聚物的外显子跳读活性产生本质上的影响，因此，在本申请中，即使序列号所示的碱基序列的“T”为“U”，也以相同的序列号表示。因此，本申请中公开的序列必然包括“T”序列及“U”序列这两者。

[0166] 因此，本发明的低聚物的碱基部分的序列可以由序列号3所示的序列构成。另外，本发明的低聚物只要能够跳读人抗肌萎缩蛋白基因的外显子53即可，可以不具有相对于靶序列100％互补的碱基序列。例如，在本发明的低聚物中，相对于作为靶序列的序列号2，可以包含1个、2个、3个、4个或5个非互补的碱基，另外，相对于作为对象的碱基序列，可以是缩短1个碱基、2个碱基、3个碱基、4个碱基或5个碱基的碱基序列。

[0167] 人抗肌萎缩蛋白基因的外显子53是否发生跳读可以通过以下方式来确认：将本发明的低聚物导入抗肌萎缩蛋白表达细胞(例如人横纹肌肉瘤细胞)，从上述抗肌萎缩蛋白表达细胞的总RNA中对人抗肌萎缩蛋白基因的mRNA的外显子53的附近区域进行RT-PCR扩增，对该PCR扩增产物进行巢式PCR或序列分析。或者，对于来自于给药了本发明的低聚物的患者的样品而言，通过利用RT-PCR、蛋白质印迹法、质谱分析法等方法测定外显子53的量，也可以确认是否发生了跳读。

[0168] 跳读效率可以通过下述方式进行计算：从受试细胞中回收人抗肌萎缩蛋白基因的mRNA，在该mRNA中，对跳读了外显子53的条带的多核苷酸量“A”和未跳读外显子53的条带的多核苷酸量“B”进行测定，基于上述“A”和“B”的测定值，按照下式进行计算。

[0169] 跳读效率(％)＝A/(A+B)×100

[0170] 作为本发明的低聚物，可以列举寡核苷酸、吗啉基低聚物、或肽核酸(Peptide Nucleic Acid:PNA)低聚物。本发明的低聚物优选为吗啉基低聚物。

[0171] 上述寡核苷酸(以下称为“本发明的寡核苷酸”)是以核苷酸为结构单元的本发明的低聚物，所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的任一种。

[0172] 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、糖部分及磷酸键部分的全部或一部分经过修饰的核苷酸。

[0173] 作为核酸碱基，可以列举例如：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。作为所述修饰碱基，可以列举例如：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(5-溴尿嘧啶)、6-氮杂嘧啶、6-烷基嘧啶(6-甲基尿嘧啶)、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5’-羧基甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、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-硫尿嘧啶、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲羰基甲基尿嘧啶、5-甲基氧基尿嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸、2-硫胞嘧啶、嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、异鸟嘌呤、吲哚、咪唑、黄嘌呤等，但并不限定于此。

[0174] 作为糖部分的修饰，可以列举例如：核糖2’位的修饰及糖的其它部分的修饰。作为

核糖2'位的修饰,可以列举例如:将核糖的2'位的-OH基取代为OR、R、R'OR、SH、SR、NH_2、NHR、NR_2、N_3、CN、F、Cl、Br、I的修饰。这里,R表示烷基或芳基,R'表示亚烷基。

[0175] 作为糖的其它部分的修饰,可以列举例如:将核糖或脱氧核糖的4'位的O取代为S而得到的糖、将糖的2'位与4'位交联而成的糖、例如LNA(锁定核酸,Locked Nucleic Acid)或ENA(2'-O,4'-C-亚乙基桥接的核酸,2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids)等,但并不限定于此。

[0176] 作为磷酸键部分的修饰,可以列举例如:将磷酸二酯键替换为硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、膦酸烷基酯键、氨基磷酸酯键、硼磷酸酯键(boranophosphate bond)(Enya et al:Bioorganic&Medicinal Chemistry,2008,18,9154-9160)的修饰(例如,参考专利再公表公报第2006/129594号及第2006/038608号)。

[0177] 作为烷基,优选为直链状或支链状的碳原子数1～6的烷基。具体而言,可以列举例如: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。该烷基可以被取代,作为所述取代基,可以列举例如:卤素、烷氧基、氰基、硝基,可以取代1～3个这些基团。

[0178] 作为环烷基,优选碳原子数5～12的环烷基。具体而言,可以列举例如:环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环癸基、环十二烷基。

[0179] 作为卤素,可以列举:氟、氯、溴、碘。

[0180] 作为烷氧基,可以列举直链状或支链状的碳原子数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。特别优选为碳原子数1～3的烷氧基。

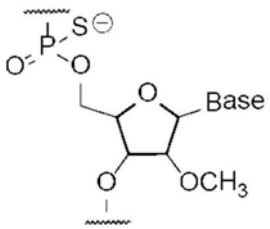
[0181] 作为芳基,优选为碳原子数6～10的芳基。具体而言,可以列举例如:苯基、α-萘基、β-萘基。特别优选为苯基。该芳基可以被取代,作为所述取代基,可以列举例如:烷基、卤素、烷氧基、氰基、硝基,可以取代1～3个这些基团。

[0182] 作为亚烷基,优选为直链状或支链状的碳原子数1～6的亚烷基。具体而言,可以列举例如:亚甲基、二亚甲基(ethylene)、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。

[0183] 作为酰基,可以列举直链状或支链状的烷酰基或芳酰基。作为烷酰基,可以列举例如: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,可以列举例如:苯甲酰基、甲苯酰基、萘甲酰基。所述芳酰基可以在能够取代的位置发生取代,可以用烷基取代。

[0184] 在本发明的低聚物为寡核苷酸的方式中,该寡核苷酸优选可以以下述通式表示的基团作为结构单元,其中,核糖的2'位的-OH基被甲氧基取代,磷酸键部分为硫代磷酸酯键。

[0185] [化学式1]

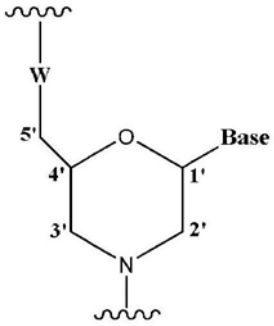
[0186] 

[0187] (式中,Base表示核酸碱基。)

[0188] 这样的寡核苷酸可以用各种自动合成装置(例如,AKTA oligopilot plus10/100(GE Healthcare))来容易地合成,或者可以委托第三方机构(例如Promega公司或Takara公司)等来制作。

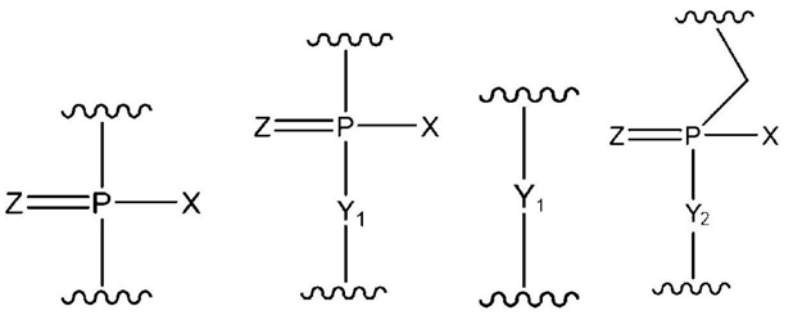
[0189] 在本发明的低聚物为吗啉基低聚物的情况下,该吗啉基低聚物可以以下述通式所表示的基团作为结构单元。

[0190] [化学式2]

[0191] 

[0192] (式中,Base与上述含义相同;W表示以下任意式所示的基团。

[0193] [化学式3]

[0194] 

[0195] (式中,X表示-CH_2R^1、-O-CH_2R^1、-S-CH_2R^1、-NR^2R^3或F;

[0196] R^1表示H、烷基;

[0197] R^2及R^3相同或不同,表示H、烷基、环烷基或芳基;

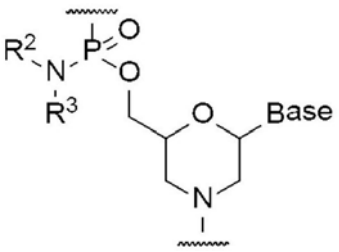
[0198] Y_1表示O、S、CH_2或NR^1;

[0199] Y_2表示O、S或NR^1;

[0200] Z表示O或S。))

[0201] 吗啉基低聚物优选为以下式所示的基团作为结构单元的低聚物(二氨基磷酸酯吗啉基低聚物(以下,称为"PMO"))。

[0202] [化学式4]

[0203] 

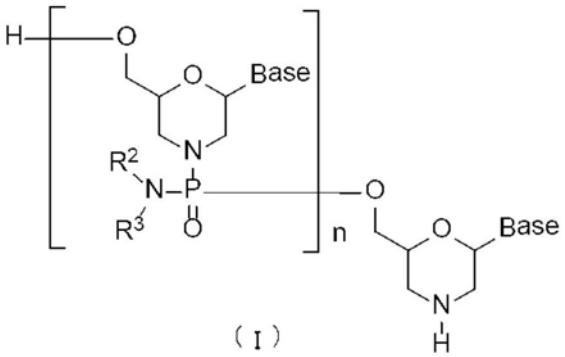
[0204] (式中,Base、R^2、R^3与上述含义相同。)

[0205] 吗啉基低聚物可以按照例如国际公开公报第1991/009033号或国际公开公报第

2009/064471号来制造。特别是PMO可以按照国际公开公报第2009/064471号中记载的方法来制造，或者按照以下所示的方法来制造。

[0206] 作为PMO的1个方式，可以列举例如下述通式(I)所示的化合物(以下称为PMO(I))。

[0207] [化学式5]

[0208] 

(I)

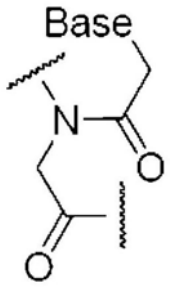
[0209] [式中，各Base、R^2、R^3与上述含义相同；

[0210] n为1～99的范围内的任意整数，优选为18～28的范围内的任意整数。]

[0211] PMO(I)可以按照公知的方法制造，使用的化合物及试剂只要是在PMO制造中通常使用的即可，没有特别限定。另外，制造可以通过液相法或固相法(使用手动或市售的固相自动合成机)来实施。在用固相法制造PMO时，从操作步骤的简化及合成的正确性的观点考虑，优选使用自动合成机的方法。

[0212] 肽核酸是以下述通式所示的基团作为结构单元的本发明的低聚物。

[0213] [化学式6]

[0214] 

[0215] [式中，Base与上述含义相同。]

[0216] 肽核酸例如可以按照以下文献来进行制造。

[0217] 1)P.E.Nielsen,M.Egholm,R.H.Berg,O.Buchardt,Science,254,1497(1991)

[0218] 2)M.Egholm,O.Buchardt,P.E.Nielsen,R.H.Berg,Jacs.,114,1895(1992)

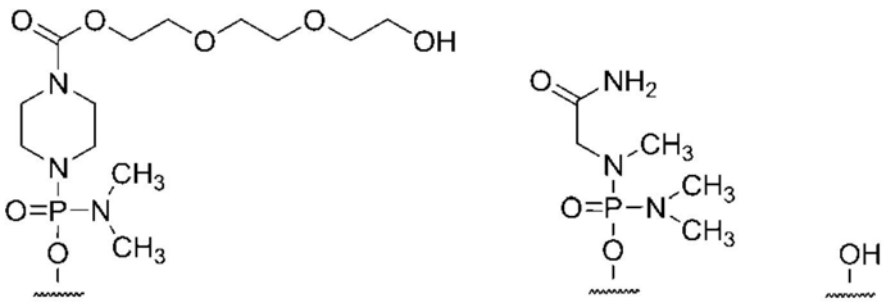
[0219] 3)K.L.Dueholm,M.Egholm,C.Behrens,L.Christensen,H.F.Hansen,T.Vulpius,K.H.Petersen,R.H.Berg,P.E.Nielsen,O.Buchardt,J.Org.Chem.,59,5767(1994)

[0220] 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)

[0221] 5)T.Koch,H.F.Hansen,P.Andersen,T.Larsen,H.G.Batz,K.Otteson,H.Orum,J.Pept.Res.,49,80(1997)

[0222] 另外，本发明的低聚物的5'末端可以是下述化学式(1)～(3)中任一种基团。优选为(3)-OH。

[0223] [化学式7]

[0224] 

(1) (2) (3)

[0225] 以下,将上述(1)、(2)及(3)所示的基团分别称为“基团(1)”、“基团(2)”及“基团(3)”。

[0226] 作为本发明低聚物的医药上能够允许的盐的例子,可以列举:钠盐、钾盐、锂盐这样的碱金属盐;钙盐、镁盐这样的碱土金属盐;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-苯乙胺盐、哌嗪盐、四甲基铵盐、三(羟甲基)氨基甲烷盐这样的有机胺盐;氢氟酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐这样的氢卤酸盐;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、乙磺酸盐这样的低级烷基磺酸盐;苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐这样的芳基磺酸盐;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、天冬氨酸盐这样的氨基酸盐等。这些盐可以用公知的方法来制造。或者,本发明的低聚物可以为其水合物的形态。

[0227] 在其它方式中,本发明的低聚物可以是维托拉尔森或其同等产品。

[0228] 维托拉尔森是NS-065/NCNP-01的国际通用名(INN)。在本说明书中,NS-065/NCNP-01也称为NS-065/NCNP-01、NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)或维托拉尔森。

[0229] NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)是用于适合基于外显子53跳读的治疗的迪谢内肌营养不良症(DMD)患者的治疗的反义寡核苷酸原料药。NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)是在美国专利第9,079,934B2号中作为“PMO No.8”而公开的化合物,碱基部分的序列由序列号35(5’-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3’、本说明书中的序列号3)表示,具有-OH的5’末端。通过参照将美国专利第9,079,934B2号的全部内容引入本说明书。另外,美国专利第9,079,934B2号公开了合成PMO No.8、即,NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的方法。

[0230] NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)具有预计提供比硫代磷酸酯寡核苷酸更高的安全性吗啉基骨架。例如,虽然因为安全上的隐患而中断了作为硫代磷酸酯寡核苷酸的drisapersen(来自于BioMarin)的开发,但作为吗啉基寡核苷酸的依特立生(eteplirsen,来自于Sarepta的Exondys51(注册商标))已被FDA批准。drisapersen及依特立生这两者用于适合基于外显子51跳读的治疗的DMD患者。美国专利第9,506,058B2号公开了依特立生,将其全部内容通过参照引入本说明书。

[0231] 如美国专利第9,079,934B2号中公开的那样,NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)被设计为在包含外显子43-52、45-52、47-52、48-52、49-52、50-52或52的特异性外显子缺失的

DMD患者中，为了生成功能性抗肌萎缩蛋白，特异性地显示出外显子53跳读活性。导致理论上可以通过跳读特定外显子来治疗的DMD的突变的例子由Aartsma-Rus等示于2002的表3。通过参照引入Aartsma-Rus等的文献的全部内容(Annemieke Aartsma-Rus,Mattie Bremmer-Bout,Anneke A.M.Janson,Johan T.den Dunnen,Gert-Jan B.van Ommen,and Judith C.T.van Deutekom,“Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy,”Neuromuscular Disorders, Vol.12,pp.S71-S77(2002))。

[0232] 维托拉尔森的“同等产品”是指维托拉尔森的仿制药或成为其有效成分的化合物。对于这样的同等产品而言，基于维托拉尔森的临床试验中确认到的安全性及有效性，对同等产品本身不经过临床试验而批准药事法规上的制造销售许可，期待具有与维托拉尔森类似的外显子53跳读活性。在某些方式中，维托拉尔森的“同等产品”包括具有与维托拉尔森相同的碱基序列、且其核酸碱基、糖部分及磷酸键部分的全部或一部分被修饰为与维托拉尔森相同或不同的产品。这些修饰的方式与上述的方式相同。另外，维托拉尔森的“同等产品”可以是游离体、医药上能够允许的盐或水合物的形式。

[0233] 2.医药组合物

[0234] 本发明的医药组合物可以是水溶液的形式。本发明的医药组合物可以以2.5～500mg/ml、5～450mg/ml、10～400mg/ml、15～350mg/ml、20～300mg/ml、20～250mg/ml、20～200mg/ml、20～150mg/ml、20～100mg/ml、20～50mg/ml、20～40mg/ml、20～30mg/ml、23～27mg/ml、24～26mg/ml或25mg/ml的浓度包含本发明的低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。或者，本发明的医药组合物可以以10～100mg/ml、15～95mg/ml、20～80mg/ml、25～75mg/ml、30～70mg/ml、35～65mg/ml、40～60mg/ml、45～55mg/ml、47～53mg/ml、48～52mg/ml、49～51mg/ml、或50mg/ml的浓度包含本发明的低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物。

[0235] 在本发明的医药组合物中，水溶液中的维托拉尔森的浓度可以变更。为了制备维托拉尔森的水溶液，例如，可以将250mg的维托拉尔森与0.5mL～100mL的水混合(相当于2.5mg/mL～500mg/mL的维托拉尔森浓度)、更优选与1mL～50mL的水混合(相当于5mg/mL～250mg/mL的维托拉尔森浓度)、最优选与5mL～10mL的水混合(相当于25mg/mL～50mg/mL的维托拉尔森浓度)。

[0236] 本发明的医药组合物的给药方式为静脉内给药。作为本发明的医药组合物可以采用的剂型，例如为注射液(包括输液)。

[0237] 本发明的医药组合物可以进一步包含选自等渗剂、pH调节剂及溶剂中的至少1种成分。

[0238] 本发明的医药组合物中包含的等渗剂可以为选自氯化钠、氯化钾、葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、海藻糖、甘油中的至少1种。

[0239] 适合包含250mg维托拉尔森的注射的10mL水溶液可以包含72.0mg以上且108.0mg以下的氯化钠(相当于氯化钠浓度7.2mg/mL～10.8mg/mL)、更优选包含81.0mg以上且99.0mg以下的氯化钠(相当于氯化钠浓度8.1mg/mL～9.9mg/mL)、最优选包含85.5mg以上且94.5mg以下的氯化钠(相当于氯化钠浓度8.55mg/mL～9.45mg/mL)作为等渗剂。

[0240] 作为等渗剂，可以使用磷酸缓冲液。作为这样的磷酸缓冲液，可以列举：柠檬酸缓

冲液、乳酸缓冲液、乙酸缓冲液等。另外，作为等渗剂，可以使用糖类(葡萄糖以外)。作为这样的糖的例子，可以列举山梨糖醇及甘露糖醇。在制备含有维托拉尔森的组合物时，可以同样地使用多种等渗剂。

[0241] 本发明的医药组合物中包含的pH调节剂可以为选自盐酸、硫酸、磷酸、乙酸、氢氧化钠、氢氧化钾、三乙醇胺、柠檬酸、乳酸、磷酸盐(磷酸氢钠、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾)、单乙醇胺中的至少1种。

[0242] 在对于本发明的低聚物、例如维托拉尔森使用磷酸缓冲剂的情况下，磷酸缓冲剂的浓度优选小于100mM。因此，本发明的医药组合物的磷酸缓冲剂的浓度调整为90mM以下、80mM以下、70mM以下、60mM以下、50mM以下、40mM以下、30mM以下、20mM以下、10mM以下或5mM以下，或者不包含磷酸缓冲液。

[0243] 本发明的医药组合物中包含的溶剂可以为水。

[0244] 适合包含维托拉尔森的注射的水溶液的pH可以为6.0以上且8.5以下、更优选为6.5以上且8.0以下、最优选为7.0以上且7.5以下。

[0245] 本发明的低聚物在宽广范围的pH中显示出稳定性，本发明的医药组合物的pH优选调整为7.0～7.5、7.0～7.4、7.1～7.5、7.1～7.4、7.2～7.5、7.2～7.4、7.3～7.5、7.3～7.4或7.3。

[0246] 另外，本发明的医药组合物可以是包含2.5～500mg/ml或10～100mg/ml的浓度的本发明的低聚物、8～10mg/ml的浓度的氯化钠、且pH为7.2～7.4的水溶液。

[0247] 或者，本发明的医药组合物可以是包含25mg/ml的浓度的本发明的低聚物、且pH调整为7.3、不包含缓冲剂的水溶液。在该医药组合物中，pH的调整可以使用盐酸和/或氢氧化钠来进行。

[0248] 作为本发明的医药组合物的例子，将美国/加拿大II期临床试验中使用的含有250mg维托拉尔森的注射用组合物示于以下的表2。以下，将表2所示的医药组合物称为“NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液250mg”。

[0249] [表2]

[0250] 表2“NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液250mg”(10mL中250mg、或同等的25mg/mL)的组成

[0251]

成分 (USP = 美国药典)	功能	数量 (每瓶)
NS-065/NCNP-01 (维托拉尔森)	原料药	250mg
氯化钠(USP 品质)	等渗剂	90mg
盐酸(USP 品质)	pH 调节剂	q.s.[1]
氢氧化钠(USP 品质)	pH 调节剂	q.s.[1]
注射用水(USP 品质)	基质	q.s.
总量		10 mL

[0252] [1]盐酸及氢氧化钠的“适量”是用于将pH调节为7.3的“充分的量”,同时是实质上不影响组合物的等渗性的量。

[0253] 需要说明的是,在“NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液250mg”的组成中,可以使注射用水及等渗剂的氯化钠的值为约一半量,使总量为5mL。这样的组成的以50mg/mL浓度含有维托拉尔森的医药组合物也包含于本发明。

[0254] 对于含有维托拉尔森的水溶液的体积而言,只要NS-065/NCNP-01及使用的等渗剂的浓度、以及维托拉尔森与使用的等渗剂之间的重量比保持与上述说明同等即可,可以进行增减。

[0255] 另外,包含维托拉尔森的组合物可以含有用于促进向肌肉组织递送维托拉尔森的载体。作为这样的载体,只要在医药上能够允许即可,没有特别限定,可以列举例如:阳离子性载体(例如,阳离子性脂质体及阳离子性聚合物)及利用了病毒包膜的载体。作为阳离子性脂质体,可以列举例如:以2-O-(2-二乙基氨基乙基)氨基甲酰基-1,3-O-二油酸甘油酯及磷脂作为必需成分的脂质体、Oligofectamine(注册商标)(Thermo Fisher Scientific公司制造)、Lipofectin(注册商标)(Thermo Fisher Scientific公司制造)、Lipofectamine(注册商标)(Thermo Fisher Scientific公司制造)、Lipofectamine(注册商标)2000(Thermo Fisher Scientific公司制造)、DMRIE-C(Thermo Fisher Scientific公司制造)、GeneSilencer(注册商标)(Gene Therapy Systems公司制造)、TransMessenger(注册商标)(QIAGEN公司制造)、TransIT-TKO®(。阳离子性聚合物的例子可以列举:JetSI(注册商标)(GeneX India Bioscience公司制造)及Jet-PEI(注册商标)(聚乙烯亚胺、GeneX India Bioscience公司制造)等。作为使用了病毒包膜的载体,可以举出例如GenomeOne(注册商标)(HVJ-E脂质体、石原产业株式会公司制造)。

[0256] 另外,本发明的医药组合物可以包含乳化辅助剂(例如,碳原子数6～22的脂肪酸、其医药上能够允许的盐、白蛋白、葡聚糖)、稳定剂(例如,胆固醇、磷脂酸)。

[0257] 在包含维托拉尔森和载体的本发明的医药组合物中,维托拉尔森与载体(即,载体/维托拉尔森)的重量比可以根据待使用的载体的种类而变更,适当地为0.1～100的范围,优选为1～50的范围,更优选为10～20的范围。

[0258] 含有维托拉尔森的水溶液可以通过静脉内点滴或点滴对患者给药。

[0259] 3.效能/效果及用法/剂量

[0260] 在将本发明的医药组合物用于治疗的情况下,可以每周一次对人类患者以40mg/kg～80mg/kg静脉内给药本发明的低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物(以下,称为“本发明的用法/剂量”)。或者,本发明的用法/剂量可以是每周一次对人类患者以40mg/kg静脉内给药本发明的低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物的用法/剂量。或者,本发明的用法/剂量可以是每周一次对人类患者以80mg/kg静脉内给药本发明的低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物的用法/剂量。这里,剂量的单位“mg/kg”中分子的“mg”是将本发明的低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物的量以毫克表示的单位,分母的“kg”表示人类患者的1千克体重。

[0261] NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液250mg是以适合基于外显子53跳读的治疗的DMD患者的治疗作为目的并用于每周一次点滴静注而开发的。美国/加拿大的II期临床试验设计为对2个剂量的维托拉尔森:40mg/kg/周及80mg/kg/周进行评价。这里,kg是患者的体重的单位。例如,对于体重40kg的患者,在40mg/kg/周的情况下,1周1次对上述患者给药1,600mg(=40mg×40)的维托拉尔森。

[0262] 4.疾患

[0263] DMD是由于抗肌萎缩蛋白基因中的功能丧失突变所导致的肌肉疾病,导致患者的肌肉中的抗肌萎缩蛋白的丧失(Hoffman等,1987)。抗肌萎缩蛋白基因位于X染色体上,显示出高的自然突变率,在研究过的全世界的群体中,DMD的发病率在活产分娩的5,000个男性中为1人。在最近的评价中表明,全球患者数据库中经过评价的7,149个DMD患者的10.1%适合基于外显子53跳读的治疗(Bladen et al.,2015)。临床症状代表性地出现在幼年的学龄期(4～6岁),患病的男孩因近端肌力降低(例如,攀爬台阶的困难性、或者跑步的困难性)而在身体上与同龄儿童相对应方面显示出困难性。从地板起立的困难性在大多数使用代表性的Gower氏动作实现站立的患者中可以观察到(即,为了实现站立而用手支撑脚、膝及大腿)(Hoffman EP,Brown RH,and Kunkel LM.(1987).Dystrophin:the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus.Cell 51,919-928.及Bladen CL,Salgado D,Monges S,Foncuberta ME,Kekou K,Kosma K,Dawkins H,Lamont L,Roy AJ,Chamova T,Guergueltcheva V,Chan S,Korngut L,Campbell C,Dai Y,Wang J,Barišić N,Brabec P,Lahdetie J,Walter MC,Schreiber-Katz O,Karcagi V,Garami M,Viswanathan V,Bayat F,Buccella F,Kimura E,Koeks Z,van den Bergen JC,Rodrigues M,Roxburgh R,Lusakowska A,Kostera-Pruszczyk A,Zimowski J,Santos R,Neagu E,Artemieva S,Rasic VM,Vojinovic D,Posada M,Bloetzer C,Jeannet PY,Joncourt F,Díaz-Manera J,Gallardo E,Karaduman AA,Topaloğlu H,El Sherif R,Stringer A,Shatillo AV,Martin AS,Peay HL,Bellgard MI,Kirschner J,Flanigan KM,Straub V,Bushby K,Verschuuren J,Aartsma-Rus A,Béroud C,Lochmüller H.(2015).The TREAT-NMD DMD Global Database:analysis of more than 7,000Duchenne muscular dystrophy mutations.Hum Mutat.36(4):395-402)。

[0264] DMD患者的肌肉组织显示出慢性炎症,伴随肌肉的变性及再生的发作,直至肌肉消瘦、损伤及早期死亡。患者代表性地在出生后至20岁时失去步行能力,至30岁时需要日常生

活中多方面的支持。该疾病通常导致青春期或成年期的早期死亡，人工呼吸器辅助装置的使用有时可将寿命延长至40岁，但极少延长至50岁。

[0265] 受试者中的DMD基因突变可以通过使用多重连接依赖式探针扩增(MLPA)来进行检测(Murugan等，2010)。通过参照引用Murugan等的该论文的全部内容(Sakthivel Murugan S.M.,Arthi Chandramohan and Bremadesam Raman Lakshmi,“Use of multiplex ligation-dependent probe amplification(MLPA)for Duchenne muscular dystrophy (DMD)gene mutation analysis,”Indian Journal of Medical Research,Vol.132, pp.303-311(September 2010).)。

[0266] 作为利用本发明的医药组合物进行治疗的对象的人类患者(以下，称为“作为本发明的对象的患者”)只要是由医生诊断为患有DMD的患者即可，没有特别限定，在某些方式中，可以是抗肌萎缩蛋白基因中具有选自外显子43-52、45-52、47-52、48-52、49-52、50-52或52中的任意外显子发生了缺失的突变的患者。

[0267] 另外，作为本发明的对象的患者的特征可以为：在使用本发明的医药组合物或本发明的低聚物的治疗前，通过基于蛋白质印迹法或质谱分析法的测定，抗肌萎缩蛋白的表达为健康人(100％)的1％以下。这里，“健康人”是指没有与抗肌萎缩蛋白相关疾病的人。健康人中的抗肌萎缩蛋白的表达量可以使用通常已知的值，也可以使用由个别健康人得到的值。另外，作为本发明的对象的患者，可以以在使用了本发明的医药组合物或本发明的低聚物的治疗前未观察到抗肌萎缩蛋白的表达作为特征。“未观察到抗肌萎缩蛋白的表达”是指，通过基于蛋白质印迹法或质谱分析法的测定，抗肌萎缩蛋白的表达量为与阴性对照相同程度的表达量、或者为检测限以下的值。另外，蛋白质印迹法及质谱分析法只要是本领域通常使用的方法即可，没有特别限定。作为蛋白质印迹法及质谱分析法的一例，可以参照本实施例中的实验方法。

[0268] 5.治疗理论

[0269] DMD是严重的遗传性肌肉损伤，最常见的是由于1个以上外显子从抗肌萎缩蛋白基因中缺失而发生框外(Out of Frame)氨基酸翻译所引起的。由此，无法表达对肌肉功能很重要的患者的功能性抗肌萎缩蛋白。贝克肌营养不良症(BMD)是重症程度低的形式的损伤，最常见发生抗肌萎缩蛋白基因中不存在1个以上外显子，但残留的外显子在框内进行氨基酸翻译的情况。通常，BMD患者的疾病发展慢，损伤的程度低。DMD患者的医学处置通常包括用于延迟四肢肌肉的症状发病的糖皮质激素处置、呼吸支持。如2018年2月的FDA的最终指导“Duchenne Muscular Dystrophy and Related Dystroph inopathies:Developing Drugs for Treatment Guidance for Industry.”(可以从https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformatio n/Guidances/UCM450229.pdf获得)所示，在DMD患者中存在大量未满足的医疗需求。

[0270] 用于治疗DMD患者的1个治疗性途径是以产生功能性抗肌萎缩蛋白而使DMD患者转变为BMD表型作为目的，使用“外显子跳读”策略。外显子跳读诱导缺失的外显子相邻的外显子的跳读，由此可以恢复氨基酸阅读框(Cirak等，2011;Voit等，2014;Yokota等，2012)。通过外显子53的跳读，可表达比正常稍短但部分保持功能活性的抗肌萎缩蛋白。NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液250mg可以期待将DMD表型转变为患者的疾病发展慢、患者的生活质量改善的更轻程度的疾病BMD(Cirak S,Arechavala-Gomeza V,Guglieri M,Feng

L,Torelli S,Anthony K,Abbs S,Garralda ME,Bourke J,Wells DJ,Dickson G,Wood MJ,Wilton SD,Straub V,Kole R,Shrewsbury SB,Sewry C,Morgan JE,Bushby K,Muntoni F.(2011).Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment:an open-label,phase 2,dose-escalation study.Lancet 378:595-605.,Voit T,Topaloglu H,Straub V,Muntoni F,Deconinck N,Campion G,De Kimpe SJ,Eagle M,Guglieri M,Hood S,Liefaard L,Lourbakos A,Morgan A,Nakielny J,Quarcoo N,Ricotti V,Rolfe K,Servais L,Wardell C,Wilson R,Wright P,Kraus JE.(2014).Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy(DEMAND II):an exploratory,randomised,placebo-controlled phase 2study.Lancet Neurol.13(10):987-96.,及Yokota T,Nakamura A,Nagata T,Saito T,Kobayashi M,Aoki Y,Echigoya Y,Partridge T,Hoffman EP,Takeda S.(2012).Extensive and Prolonged Restoration of Dystrophin Expression with Vivo-Morpholino-Mediated Multiple Exon Skipping in Dystrophic Dogs.Nucleic Acid Ther 22(5):306-15.)。

[0271] 因此,通过上述的本发明的用法/剂量对人类患者给药本发明的医药组合物,可以治疗DMD。

[0272] 这里,“治疗”是指减轻患者的DMD症状。

[0273] 按照本发明的用法剂量使用了本发明的医药组合物的治疗可以产生选自以下(1)～(6)中的至少1种效果(括号内表示平均值±标准差):

[0274] (1)与基线相比,患者的骨骼肌中的抗肌萎缩蛋白表达量的平均值在给药24周后增加至9倍以上;

[0275] (2)与基线相比,根据起立时间(TTSTAND)得到的速度的变化在给药24周后25周时为-0.055次/秒以上或0.024±0.075秒以上;

[0276] (3)与基线相比,根据10米跑步/步行时间(TTRW)得到的速度的变化在给药24周后25周时为-0.025米/秒以上或0.227±0.251米/秒以上;

[0277] (4)与基线相比,根据爬升4级台阶时间(TTCLIMB)得到的速度的变化在给药24周后25周时为-0.060次/秒以上或0.032±0.088次/秒以上;

[0278] (5)与基线相比,根据北极星移动评价量表(NSAA)的得分的变化在给药24周后25周时为-2.2分以上或0.8±2.9分以上;以及

[0279] (6)与基线相比,6分钟步行试验(6MWT)的变化在给药24周后25周时为-7.5米以上或28.9±36.3米以上。

[0280] 在上述(1)～(6)中,“基线”是指未处置患者组的平均值。另外,(2)～(6)中的“变化”是指平均值的变化。

[0281] 在某些实施方式中,在通过上述的本发明的用法/剂量对7～9岁的迪谢内肌营养不良症的人类患者给药本发明的医药组合物84周的情况下,可以产生选自以下(7)～(12)中的至少1种效果:

[0282] (7)从治疗开始至第85周,丧失起立能力的患者小于20%;

[0283] (8)从治疗开始至第85周,无法爬升4级台阶的患者小于10%;

[0284] (9)从治疗开始至第85周,丧失独立步行能力的患者小于10%;

[0285] (10)从治疗开始至第85周,没有观察到10米跑步/步行的速度随年龄增加而减慢;

[0286] (11)从治疗开始至第85周,没有观察到爬升4级台阶的速度随年龄增加而减慢;以及

[0287] (12)从治疗开始至第85周,没有观察到起立的速度随年龄增加而减慢。

[0288] 对于上述(7)～(12)的效果而言,将开始治疗的周设定为第1周,可以在第1周～第85周、第1周～第80周、第1周～第75周、第1周～第70周、第1周～第65周、第1周～第60周中的任意时间点产生。

[0289] 在某个实施方式中,通过在利用上述的本发明的用法/剂量对10～12岁的迪谢内肌营养不良症的人类患者给药本发明的医药组合物,可产生选自以下(13)～(18)中的至少1种效果:

[0290] (13)从治疗开始至第85周,丧失起立能力的患者小于60%;

[0291] (14)从治疗开始至第85周,无法爬升4级台阶的患者小于50%;

[0292] (15)从治疗开始至第85周,丧失独立步行能力的患者小于50%;以及

[0293] (16)从治疗开始至第85周,没有观察到10米跑步/步行的速度随年龄增加而减慢;

[0294] (17)从治疗开始至第85周,观察到爬升4级台阶的速度加快的时期;以及

[0295] (18)从治疗开始至第85周,观察到起立的速度加快的时期。

[0296] 对于上述(13)～(18)的效果而言,将开始治疗的周设定为第1周,可以在第1周～第85周、第1周～第80周、第1周～第75周、第1周～第70周、第1周～第65周、第1周～第60周中的任意时间点产生。

[0297] 即,本发明的医药组合物可以产生上述(1)～(18)中的至少1种效果。

[0298] II.第二方式

[0299] 本发明在其第二方式中提供一种迪谢内肌营养不良症的治疗方法(以下,称为“本发明的治疗方法”),该方法包括:

[0300] 每周一次对人类患者以反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或其水合物为40mg/kg～80mg/kg的方式静脉内给药医药组合物,

[0301] 所述医药组合物含有由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5’末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物。

[0302] 本发明的治疗方法的各构成要素的含义均与项目“I.第一方式”中对本发明的医药组合物的构成进行的说明相同。

[0303] 另外,本发明的治疗方法可以产生项目“I.第一方式”的子项目“5.治疗理论”中说明的(1)～(18)中的至少1种效果。

[0304] III.第三方式

[0305] 另外,本发明在其第三方式中提供一种用于人类患者的迪谢内肌营养不良症的治疗方法的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物(以下,称为“本发明的用途特定方式”),其中,所述反义低聚物由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5’末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成,

[0306] 所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物以40mg/kg～80mg/kg对所

述人类患者每周一次进行静脉内给药。

[0307] 本发明的用途特定方式的各构成要素的含义均与项目“I.第一方式”中对本发明的医药组合物的构成进行的说明相同。

[0308] 另外,本发明的用途特定方式可以产生项目“I.第一方式”的子项目“5.治疗理论”中说明的(1)～(18)中的至少1种效果。

[0309] IV.第四方式

[0310] 另外,本发明在其第四方式中提供反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物在用于治疗人类患者的迪谢内肌营养不良症的医药组合物的制造中的用途(以下,称为“本发明的Swiss-type用途”),其中,所述反义低聚物由与人抗肌萎缩蛋白基因第53位外显子的5’末端起第36～56位核苷酸构成的序列互补的碱基序列所构成,

[0311] 所述反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或水合物以40mg/kg～80mg/kg对所述人类患者每周一次进行静脉内给药。

[0312] 本发明的Swiss-type用途的各构成要素的含义均与项目“I.第一方式”中对本发明的医药组合物的构成进行的说明相同。

[0313] 另外,本发明的Swiss-type用途可以产生项目“I.第一方式”的子项目“5.治疗理论”中说明的(1)～(18)中的至少1种效果。

[0314] 以下,列举实施例对本发明更详细地进行说明,但本发明并不限定于实施例所示的范围。

[0315] [实施例]

[0316] [制造例]

[0317] (1)担载于氨甲基聚苯乙烯树脂的4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代嘧啶-1-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸的制造

[0318] 工序1:4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸的制造

[0319] 在氩气氛围中,将N-{1-[(2R,6S)-6-(羟甲基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]-2-氧代-1,2-二氢嘧啶-4-基}苯甲酰胺22.0g和4-二甲氨基吡啶(4-DMAP)7.04g悬浮于二氯甲烷269mL,加入琥珀酸酐5.76g,在室温下搅拌3小时。向反应液加入甲醇40mL,进行减压浓缩。使用乙酸乙酯和0.5M的磷酸二氢钾水溶液对残渣进行提取操作。按照0.5M磷酸二氢钾水溶液、水、饱和食盐水的顺序对得到的有机层进行清洗。用硫酸钠干燥得到的有机层,进行减压浓缩,得到了25.9g目标产物。

[0320] 工序2:担载于氨甲基聚苯乙烯树脂的4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代嘧啶-1-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸的制造

[0321] 将4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸23.5g溶解于吡啶(脱水)336mL,加入4-DMAP 4.28g、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐40.3g。接着,加入氨甲基聚苯乙烯树脂1%DVB交联(东京化成工业株式会社制造、A1543)25.0g、三乙胺24mL,在室温下振荡4天。反应后,滤取树脂。按照吡啶、甲醇、二氯甲烷的顺序清洗得到的树脂并进行减压干燥。向得到的树脂中加入四氢呋喃(脱水)150mL、乙酸酐15mL、2,6-二甲基吡啶15mL,在室温下振荡2小时。滤取树脂,并按照吡啶、甲醇、二氯甲烷的顺序清洗,并进行减压干燥,得到了33.7g的目标产物。

[0322] 对于该目标产物的装载量而言，通过使用公知的方法对409nm的UV吸光度进行测定来确定每1g树脂的三苯甲基摩尔量。树脂的装载量为397.4μmol/g。

[0323] UV测定条件

[0324] 仪器：U-2910(株式会社日立制作所)

[0325] 溶剂：甲磺酸

[0326] 波长：265nm

[0327] ε值：45000

[0328] (2)PMO No.8的制造

[0329] PMO No.8以外显子53中的“第36～56位”作为靶序列，5’末端的基团为“基团(3)”，碱基部分的序列以序列号3表示。

[0330] 将担载于氨甲基聚苯乙烯树脂的4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸(参考例1)2g(800μmol)转移至反应槽，添加二氯甲烷30mL，静置30分钟。进一步用二氯甲烷30mL清洗2次，然后开始下述合成循环。以成为目标化合物的碱基序列的方式在各循环中添加了期望的吗啉基单体化合物。

[0331] 表3

[0332]

步骤	试剂	量(mL)	时间(分)
1	解封闭溶液	30	2.0
2	解封闭溶液	30	2.0
3	解封闭溶液	30	2.0
4	解封闭溶液	30	2.0
5	解封闭溶液	30	2.0
6	解封闭溶液	30	2.0
7	中和溶液	30	1.5
8	中和溶液	30	1.5
9	中和溶液	30	1.5
10	中和溶液	30	1.5
11	中和溶液	30	1.5
12	中和溶液	30	1.5
13	二氯甲烷	30	0.5
14	二氯甲烷	30	0.5
15	二氯甲烷	30	0.5
16	偶联溶液B	20	0.5
17	偶联溶液A	6～11	90.0
18	二氯甲烷	30	0.5
19	二氯甲烷	30	0.5
20	二氯甲烷	30	0.5
21	封端溶液	30	3.0
22	封端溶液	30	3.0
23	二氯甲烷	30	0.5

24	二氯甲烷	30	0.5
25	二氯甲烷	30	0.5

[0333] 需要说明的是,作为解封闭溶液,使用了以三氟乙酸(2当量)与三乙胺(1当量)的混合物为3%(w/v)的方式用含有1%(v/v)的乙醇和10%(v/v)的2,2,2-三氟乙醇的二氯甲烷溶液溶解而成的溶液。作为中和溶液,使用了以N,N-二异丙基乙胺为5%(v/v)的方式用含有25%(v/v)的2-丙醇的二氯甲烷溶液溶解而成的溶液。作为偶联溶液A,使用了以吗啉基单体化合物为0.15M的方式用含有10%(v/v)的N,N-二异丙基乙胺的1,3-二甲基-2-咪唑啉酮溶解而成的溶液。作为偶联溶液B,使用了以N,N-二异丙基乙胺为10%(v/v)的方式用1,3-二甲基-2-咪唑啉酮溶解而成的溶液。作为封端溶液,使用了相对于二氯甲烷溶解有20%(v/v)的乙酸酐和30%(v/v)的2,6-二甲基吡啶而成的溶液。

[0334] 从反应容器中回收担载有上述合成的PMO的氨甲基聚苯乙烯树脂,在室温下减压干燥2小时以上。将担载于干燥的氨甲基聚苯乙烯树脂的PMO放入反应容器,加入28%氨水-乙醇(1/4)200mL,在55℃下搅拌15小时。滤去氨甲基聚苯乙烯树脂,用水-乙醇(1/4)50mL清洗。对得到的滤液进行了减压浓缩。将得到的残渣溶解于20mM的乙酸-三乙胺缓冲液(TEAA缓冲液)与乙腈的混合溶剂(4/1)100mL,用膜过滤器进行了过滤。用反相HPLC纯化得到的滤液。使用的条件如下所述。

[0335] [表4]

[0336]

色谱柱	XTerra MS18(Waters,φ50×100mm,1CV=200mL)
流速	60mL/分
柱温	室温
A液	20mM TEAA缓冲液
B液	CH_3CN
梯度	(B)conc.20→50%/9CV

[0337] 对各级分进行分析,用乙腈-水(1/1)100mL回收目标产物,添加乙醇200mL,进行减压浓缩。进一步减压干燥,得到了白色固体。向得到的固体加入10mM的磷酸水溶液300mL,使其悬浮。加入2M的磷酸水溶液10mL,搅拌15分钟。进一步加入2M的氢氧化钠水溶液15mL进行中和。进一步加入2M的氢氧化钠水溶液15mL,使其为碱性,用膜过滤器(0.45μm)进行过滤。用10mM的氢氧化钠水溶液100mL清洗杂质,以水溶液的形式得到了目标产物。

[0338] 用阴离子交换树脂柱对含有得到的目标产物的水溶液进行纯化。使用的条件如下所述。

[0339] [表5]

[0340]

色谱柱	Source 30Q (GE Healthcare, φ40×150mm, 1CV=200mL)
流速	80 mL/min
柱温	室温
A液	10mM氢氧化钠水溶液
B液	10mM氢氧化钠水溶液，1M氯化钠水溶液
梯度	(B) conc. 5→35%/15CV

[0341] 对各级分进行分析(HPLC)，以水溶液的形式得到了目标产物。向得到的水溶液添加0.1M的磷酸缓冲液(pH 6.0)225mL进行中和。用膜过滤器(0.45μm)进行过滤。接着，在下述条件下进行超滤，实施脱盐。

[0342] [表6]

[0343]

过滤器	PELLICON2 MINI FILTER PLBC 3K Regenerated Cellulose, Screen Type C
尺寸	0.1m²

[0344] 浓缩滤液，得到了约250mL的水溶液。用膜过滤器(0.45μm)对得到的水溶液进行过滤。将得到的水溶液冷冻干燥，以白色絮状固体的形式得到了1.5g的目标化合物。

[0345] ESI-TOF-MS计算值:6924.82

[0346] 测定值:6923.54

[0347] [实施例1]美国II期临床试验

[0348] 第II相剂量设定试验“NS-065/NCNP-01-201试验”在2016年12月以“IND127474”开始。本试验作为Clinical Trials.gov识别编号“NCT02740972”，以“迪谢内肌营养不良症男孩中NS-065/NCNP-01的安全性和剂量发现研究(Safety and Dose Finding Study of NS-065/NCNP-01in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy(DMD))”的标题进行。本试验的临床试验实施计划书可以由https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02740972获得，通过参照引用其全部内容。本试验的主要目的在于，在适合基于外显子53跳读的治疗的迪谢内肌营养不良症(DMD)患者中，对于以点滴静注的方式递送的高剂量(80mg/kg)及低剂量(40mg/kg)的NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的安全性进行评价。另外，还包含耐受性、肌肉功能及肌力、药物代谢动力学、以及药效学作为进一步目的。

[0349] 更具体而言，是II期多中心、2阶段、随机、安慰剂对照剂量设定试验，对4岁以上且小于10岁的DMD门诊男孩每周一次点滴给药NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)24周。包括2个剂量水平队列。阶段1用双盲方式进行了试验。患者在参加的最初4周(阶段1)，每周一次随机点滴静注NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)或安慰剂，接着，在5～24周(20周的实际药物治疗-阶段2)点滴静注NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)。在将患者登记入80mg/kg剂量队列之前，完成了来自40mg/kg剂量队列的阶段1的安全性数据的分析。结束了24周试验的患者可以接受开放延长试验。

[0350] 在定期的预定试验来院访问时，对临床有效性进行了评价。全部患者在基线时接受了二头肌活检，在第24周接受了第2次肌肉活检。

[0351] 安全性通过收集不良事件(AE)、血液及尿的实验室试验、心电图(ECG)、生命体征、以及整个试验的身体检查而进行了评价。为了对NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的药物代谢动力学进行评价，在4次试验来院访问时采集了连续血液样品。

[0352] ＜临床试验的种类：干预(临床试验)＞

[0353] • 实际登记：16个参加者。

[0354] • 分配：随机。

[0355] • 干预模型：并行分配。

[0356] • 屏蔽：4项(参加者、护理提供者、临床试验负责医生、结果评价者)。

[0357] • 主要目的：治疗。

[0358] • 实际的试验开始日：2016年12月。

[0359] • 初次结束日：2018年3月。

[0360] ＜患者组和干预＞

[0361] • 实验：NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)40mg/kg

[0362] 对于确认了具有适合基于外显子53跳读的治疗的基因缺失的DMD的6个患者，每周一次以40mg/kg剂量点滴静注NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)24周。

[0363] • 实验：NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)80mg/kg

[0364] 对于确认了具有适合基于外显子53跳读的治疗的基因缺失的DMD的6个患者，每周一次以80mg/kg剂量点滴静注NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)24周。

[0365] • 安慰剂比较剂：安慰剂

[0366] 以4周、每周1次、点滴静注的形式对各剂量组的2个或3个患者给药安慰剂，然后，进行了20周的开放标签处置。

[0367] ＜选择基准＞

[0368] • 4岁以上、且小于10岁的男性。

[0369] • 确认了具有适合通过外显子53跳读治疗进行抗肌萎缩蛋白mRNA阅读框恢复的抗肌萎缩蛋白基因的DMD突变(单个或多个)

[0370] • 无辅助装置可以独立行走

[0371] • 起立为止的时间、跑步/步行的时间、以及至提高评价的时间

[0372] • 稳定给药糖皮质激素至少3个月

[0373] ＜排除基准＞

[0374] • 临床试验药的初次给药前4周以内的急性疾病。

[0375] • 症状性心肌病的证据。(不排除调查时的无症状性心脏异常)

[0376] • 对药物疗法的严重过敏或过敏症

[0377] • 在临床试验负责医生的意见中，妨害参见临床试验的严重的行为上或认知上的问题

[0378] • 根据临床试验负责医生的意见，可能对安全性造成影响、或正确完成治疗及随访研究的可能性低、或损害临床试验结果的评价的以往或发展中的病情、病史、身体检查结果或临床检查值异常

[0379] • 目前或临床试验药给药开始前3个月以内服用其它的临床试验药。

[0380] • 在预想的最初给药NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)之前3个月以内接受过手术、或在试验期间预定接受外科手术的患者

[0381] • 以前参加过本试验的患者、或以前参加过给药NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的其它试验的患者

[0382] 再次概括来说,是对适合基于外显子53跳读的治疗、且3个月以上的糖皮质激素给药中稳定的16个男性患者以40mg/kg/周及80mg/kg/周剂量进行试验的24周2队列试验。各队列的安慰剂组患者接受了最初的4周随机期间作为不良事件(安全性结果)的对照。接着,在20周的处置期间中,安慰剂处置患者及活性处置患者这两者继续进行试验。在NS-065/NCNP-01-201试验中,以40mg/kg/周的低剂量及80mg/kg/周的高剂量这2个剂量队列给药NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液20～24周,评价了对抗肌萎缩蛋白的从头(de novo)表达造成的影响(参照图1)。试验NS-065/NCNP-01-201的目标是,基于使用蛋白质印迹法(WB)法(主要替代终点(primary surrogate end-point))测得的骨骼肌中的抗肌萎缩蛋白的从头表达,鉴定了安全且有效的剂量。次要替代终点(secondary surrogate end-point)包含de novo抗肌萎缩蛋白表达的免疫荧光(IF)染色及质谱分析法检测、以及de novo抗肌萎缩蛋白mRNA水平的RT-PCR检测。作为II期临床试验的次要终点,还包含若干功能性终点。试验NS-065/NCNP-01-201的终点如下所述。

[0383] ＜主要终点＞

[0384] • NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液的低剂量(40mg/kg/周)及高剂量(80mg/kg/周)静脉内(IV)给药的安全性及耐受性

[0385] • 在20～24周治疗后,通过蛋白质印迹法对肌肉中的抗肌萎缩蛋白的诱导进行测定,将其作为NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液的低IV剂量及高IV剂量的效果。

[0386] 在图1中示出了下半部分所示的“高剂量:80mg/kg/周”的时间序列在后面的时间从下半部分所示的“低剂量:40mg/kg/周”的时间序列中被抵消,仅在以低剂量给药确认到安全性后,开始高剂量给药。

[0387] 测定内容:

[0388] 1.通过用于mRNA分析的实时聚合酶链式反应(RT-PCR)测得的肌肉中的抗肌萎缩蛋白mRNA的诱导(20～24周时间范围的处置)

[0389] RT-PCR测定抗肌萎缩蛋白RNA的变化的剪接。在该方法中,mRNA从冷冻肌肉活检中分离,逆转录为cDNA。PCR引物被设计为与抗肌萎缩蛋白mRNA上的外显子53位点相邻。通过凝胶电泳将与经剪接的抗肌萎缩蛋白mRNA的特定版本相对应的RT-PCR条带可视化,对不同的mRNA异构体的量进行比较。在药剂与RNA靶标良好结合的情况下,外显子53被从得到的mRNA转录物中排除。

[0390] 2.通过用于蛋白质分析的蛋白质印迹法测定的在肌肉中诱导的抗肌萎缩蛋白。(20～24周时间范围的处置)

[0391] 主要的生化学结果的测定是利用免疫印迹法(蛋白质印迹法)对抗肌萎缩蛋白产生量的药物诱导性增加进行测定。抗肌萎缩蛋白免疫印迹法使用可溶解的肌肉活检冷冻切片,蛋白质经过凝胶电泳(SDS-PAGE)、对于硝酸纤维素的电印迹法(electroblotting),接着经过与用于检测抗肌萎缩蛋白的抗体的硝酸纤维素的温育,利用分子量进行分级。接下

来,将来自患者活检的抗肌萎缩蛋白的免疫印迹法信号与相同凝胶(混合DMD及正常对照)上的抗肌萎缩蛋白的标准曲线的信号进行比较。由此,提供肌肉中的抗肌萎缩蛋白含量的半定量评价。

[0392] 美国II期临床试验:有效性

[0393] 结果测定1

[0394] 对于结果测定1(即,de novo抗肌萎缩蛋白mRNA水平的RT-PCR检测),得到的结果如下所述。

[0395] [表7]

[0396] 表7

[0397]

剂量	基线 平均%(标准差)	治疗中 平均%(标准差)
40mg/kg/周	0.0 (0.0)	17.4 (7.2)
80mg/kg/周	0.0 (0.0)	43.9 (16.7)

[0398] 结果测定2

[0399] 对于结果测定2(即,使用了蛋白质印迹法的骨骼肌中的de novo抗肌萎缩蛋白表达量的测定),得到的结果表明,在基线的平均值与治疗中的平均值之间进行比较,从基线起增加19.0倍(40mg/kg/周、24周)及增加9.8倍(80mg/kg/周、24周),并且以各患者的增加率的平均值计进行计算,增加27.2倍(40及80mg/kg/周、24周)。将得到的数据总结于以下的表8及图2。[表8]

[0400] 表8

[0401]

剂量	基线 平均% (范围、标准差)	治疗中 平均% (范围、标准差)	增加倍数 1)	增加倍数 2)
40mg/kg/周	0.3 (0.1-0.4, 0.1)	5.7 (3.2-10.3, 2.4)	19.0	27.2
80mg/kg/周	0.6 (0.1-2.6, 0.8)	5.9 (1.1-14.4, 4.5)	9.8	27.2

[0402] 1)基线的平均值与治疗中的平均值的比较。

[0403] 2)各患者的平均增加率。

[0404] 与以往对于2016年由Sarepta Therapeutics公司出售的适合基于外显子51跳读的治疗的Exondys51(注册商标)(eteplirsen,依特立生)(30mg/kg/周、48及180周)的报道的恢复程度相比,由NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)带来的抗肌萎缩蛋白恢复的程度(40或80mg/kg/周、24周)即使少估计,也高约3～7倍或8.8～9.7倍。具体而言,为了比较,将

Exondys51(注册商标)(依特立生)的对应的蛋白质印迹法数据示于以下。对于给药了NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)24周的16个患者中的3人而言,抗肌萎缩蛋白水平相对于基线增加了超过10%。在给药了NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)24周的患者16例中的12例中,确认到抗肌萎缩蛋白值的3%以上的升高。Hoffman等报告,"在具有贝克型肌营养不良及异常的抗肌萎缩蛋白表型的迪谢内(正常水平的抗肌萎缩蛋白小于3%)的患者中,临床表型的重症程度与抗肌萎缩蛋白评价的结果之间存在明确的校正"(Eric P.Hoffman,et al.,"Characterization of Dystrophin in Muscle-Biopsy Specimens from Patients with Duchenne's of Becker's Muscular Dystrophy."N.Engl.J.Med.,318:1363-1368(1988))。

[0405] • 依特立生蛋白质印迹法:增加2.8倍(从0.16%至0.44%的变化(30mg/kg/周、48周))。("在得到了可评价的结果的12例中,在治疗前,抗肌萎缩蛋白浓度为健康受试者的抗肌萎缩蛋白浓度的0.16%±0.12%(平均值±标准差),在给药EXONDYS51 48周后为0.44%±0.43%(p<0.05)")(可以由https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMateria ls/PediatricAdvisoryCommittee/UCM557917.pdf获得)

[0406] • 依特立生蛋白质印迹法:3.1倍(从0.3%至0.93%的变化)(30mg/kg/周、180周)。("在指短伸肌(EDB)的活检中的蛋白质印迹法中,抗肌萎缩蛋白水平以平均值计为正常值的约0.3%,其范围为无法检测至正常值的约1%以上。""作为本申请人使用的最准确的定量方法的蛋白质印迹法中,依特立生处置起约3.5年后的平均抗肌萎缩蛋白水平为健康受试者的0.93%±0.84%(平均值±标准差))(可以从https://www.fda.gov/downloads/advisorycommittees/committeesmeetingmaterials/drugs/peripheralandcentralnervoussystemdrugsadvis orycommittee/ucm497063.pdf.获得)

[0407] • 依特立生蛋白质印迹法:180周为0.93%,范围为0%～2.47%(30mg/kg/周、180周)(Kenji Rowel Q Lim,et al.,"Eteplirsen in the treatment of Duc henne muscular dystrophy."Drug Des.Devel.Ther.,11:533-545(2017)htt ps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5338848/)。

[0408] • 进而,"对于依特立生,在第180周实施的试验中,30mg/kg和50mg/kg的周给药量对抗肌萎缩蛋白产生量的剂量反应未观察到差异。这表明该方法对于其它外显子可以不是有效的"(Kenji Rowel Q Lim,et al.,"Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy."Drug Des.Devel.Ther.,11:533-545(2017)https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5338848/)

[0409] 在与SRP-4053(戈洛迪森(golodirsen);由Sarepta公司)的比较中,对于观察到的抗肌萎缩蛋白水平的增加量,维托拉尔森显示出可获得更优异的效果,所述SRP-4053是适合基于外显子53跳读的治疗的DMD患者用的吗啉基寡核苷酸。具体而言,为了进行比较,不是将维托拉尔森给药24周,而是将给药48周后得到的与SRP-4053(戈洛迪森)对应的蛋白质印迹法数据示于以下。

[0410] • 戈洛迪森蛋白质印迹法:从0.095%至1.019%的变化(48周30mg/kg)。("在蛋白质印迹法测定(本试验的生物学主要终点)中,与正常值的0.095%(p<0.001)的平均与基线相比,抗肌萎缩蛋白的平均增加量增加至正常值的1.019%。这表明相对于基线增加10.7倍。")(可以从http://investorrelations.sare pta.com/news-releases/news-release-

details/sarepta-therapeutics-announces-positi ve-results-its-study.获得)

[0411] •戈洛迪森蛋白质印迹法:最小0.09%、最大4.30%(30mg/kg/周、48周。在25例中的2例中确认到3%以上的抗肌萎缩蛋白值的升高(22nd Internation al Congress of the World Muscle Society(3-7October 2017,St.Malo,Fra nce),http://www.google.co.jp/url?sa＝t&source＝web&cd＝2&ved＝2ahUKEwid7ZTQ9ObAhUETLwKHX3xDk8QFjABegQIARAB&url＝http%3A%2F%2Finvest orrelations.sarepta.com%2Fstatic-files%2F64d8d897-2e4a-4119-80b4-115cbae17993&usg＝AOvVaw1Amh1Mq1VauvLkPvYWfVdR)。

[0412] 美国II期临床试验:安全性

[0413] 对于以高剂量及低剂量(40mg/kg/周及80mg/kg/周)给药了NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的16例DMD患者的安全性数据,在试验的实施、数据质量、或者参加者的安全性方面不存在很大隐患。没有在36周时中止治疗的参加者。具体而言,没有严重的不良事件,没有导致中止的不良事件,也可以与药剂相关的不良事件。全部不良事件为轻度或中等程度。

[0414] [实施例2]美国/加拿大的II期临床试验

[0415] 第II期剂量设定试验“NS-065/NCNP-01-201试验”在2016年12月以“IND127474”开始。本试验作为ClinicalTrials.gov识别编号“NCT02740972”,以“迪谢内肌营养不良症男孩中NS-065/NCNP-01的安全性和剂量发现研究(Safety and Dose Finding Study of NS-065/NCNP-01in Boys With Du chenne Muscular Dystrophy(DMD)”的标题进行。本试验的临床试验实施计划书可以由https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02740972获得,通过参照引用其全部内容。本试验的主要目的在于,在适合基于外显子53跳读的治疗的迪谢内肌营养不良症(DMD)患者中,对于以点滴静注的方式递送的高剂量(80mg/kg)及低剂量(40mg/kg)的NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的安全性进行评价。另外,还包含耐受性、肌肉功能及肌力、药物代谢动力学、以及药效学作为进一步目的。

[0416] 更具体而言,是II期多中心、2阶段、随机、安慰剂对照剂量设定试验,对4岁以上且小于10岁的DMD门诊男孩每周一次点滴给药NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)24周。包括2个剂量水平队列。阶段1用双盲方式进行了试验。患者在参加的最初4周(阶段1),每周一次随机点滴静注NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)或安慰剂,接着,在5～24周(20周的实际药物治疗-阶段2)点滴静注NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)。在将患者登记入80mg/kg剂量队列之前,完成了来自40mg/kg剂量队列的阶段1的安全性数据的分析。结束了24周试验的患者可以接受开放延长试验。

[0417] 在定期的预定试验来院访问时,对临床有效性进行了评价。全部患者在基线时接受了二头肌活检,在第24周接受了第2次肌肉活检。

[0418] 安全性通过收集不良事件(AE)、血液及尿的实验室试验、心电图(ECG)、生命体征、以及整个试验的身体检查而进行了评价。为了对NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的药物代谢动力学进行评价,在4次试验来院访问时采集了连续血液样品。

[0419] ＜临床试验的种类:干预(临床试验)＞

[0420] •实际登记:16个参加者。

[0421] •分配:随机。

[0422] •干预模型:并行分配。

[0423] • 屏蔽:4项(参加者、护理提供者、临床试验负责医生、结果评价者)。

[0424] • 主要目的:治疗。

[0425] • 实际的试验开始日:2016年12月。

[0426] • 初次结束日:2018年3月。

[0427] ＜患者组和干预＞

[0428] • 实验:NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)40mg/kg

[0429] 对于确认了具有适合基于外显子53跳读的治疗的基因缺失的DMD的6个患者,每周一次以40mg/kg剂量点滴静注NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)24周。

[0430] • 实验:NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)80mg/kg

[0431] 对于确认了具有适合基于外显子53跳读的治疗的基因缺失的DMD的5个患者,每周一次以80mg/kg剂量点滴静注NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)24周。

[0432] • 安慰剂比较剂:安慰剂

[0433] 以4周、每周1次、点滴静注的形式对40mg/kg剂量组的2个患者及80mg/kg剂量组的3个患者给药安慰剂,然后,进行了20周的开放标签处置。

[0434] ＜选择基准＞

[0435] • 同意时为4岁以上,初次点滴静注时小于10岁的男性。

[0436] • 确认了具有适合通过外显子53跳读治疗进行抗肌萎缩蛋白mRNA阅读框恢复的抗肌萎缩蛋白基因的DMD突变(单个或多个)

[0437] • 无辅助装置可以独立行走

[0438] • 判断运动功能评价者为能够实施起立时间(TSTAND)、10米跑步/步行时间(TTRW)、以及爬升4级台阶时间(TTCLIMB)的评价的患者

[0439] • 稳定给药糖皮质激素至少3个月

[0440] ＜排除基准＞

[0441] • 临床试验药的初次给药前4周以内的急性疾病。

[0442] • 症状性心肌病的证据。(不排除调查时的无症状性心脏异常)

[0443] • 对药物疗法的严重过敏或过敏症

[0444] • 在临床试验负责医生的意见中,妨害参见临床试验的严重的行为上或认知上的问题

[0445] • 根据临床试验负责医生的意见,可能对安全性造成影响、或正确完成治疗及随访研究的可能性低、或损害临床试验结果的评价的以往或发展中的病情、病史、身体检查结果或临床检查值异常

[0446] • 目前或临床试验药给药开始前3个月以内服用其它的临床试验药。

[0447] • 在预想的最初给药NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)之前3个月以内接受过手术、或在试验期间预定接受外科手术的患者

[0448] • 以前参加过本试验的患者、或参加过给药NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的其它试验的患者

[0449] 再次概括来说,是对适合外显子53跳读治疗、且3个月以上的糖皮质激素给药中稳定的16个男性患者以40mg/kg/周及80mg/kg/周剂量进行试验的24周2队列试验。各队列的安慰剂组患者接受了最初的4周随机期间作为不良事件(安全性结果)的对照。接着,在20周

的处置期间中，安慰剂处置患者及活性处置患者这两者继续进行试验。在NS-065/NCNP-01-201试验中，以40mg/kg/周的低剂量及80mg/kg/周的高剂量这2个剂量队列给药250mg的NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液20～24周，评价了对抗肌萎缩蛋白的从头(de novo)表达造成的影响(参照图3)。试验NS-065/NCNP-01-201的目标是，基于使用蛋白质印迹法(WB)法(主要替代终点(primary surrogate end-point))测得的骨骼肌中的抗肌萎缩蛋白的从头表达，鉴定了安全且有效的剂量。次要替代终点(secondary surrogate end-point)包含de novo抗肌萎缩蛋白表达的免疫荧光(IF)染色及质谱分析法检测、以及de novo抗肌萎缩蛋白mRNA水平的RT-PCR检测。作为II期临床试验的次要终点，还包含若干运动功能的终点。试验NS-065/NCNP-01-201的终点如下所述。

[0450] ＜主要终点＞

[0451] • NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液250mg的低剂量(40mg/kg/周)及高剂量(80mg/kg/周)静脉内(IV)给药的安全性及耐受性

[0452] • 在20～24周治疗后，通过蛋白质印迹法对肌肉中的抗肌萎缩蛋白的诱导进行测定，将其作为NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液250mg的低IV剂量及高IV剂量的效果。

[0453] • NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的血药浓度

[0454] ＜次要终点＞

[0455] • 通过基于RT-PCR法的mRNA分析、以及基于免疫荧光染色及质谱分析法的蛋白质分析，对NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液250mg的低剂量及高剂量静注在20～24周治疗后对肌肉中的抗肌萎缩蛋白mRNA及蛋白质的诱导造成的效果进行测定，由此进行评价。

[0456] • 为了调查NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)注射液250mg的低剂量及高剂量的静脉内给药在20～24周治疗后对肌力、可活动性、以及功能性运动能力造成的影响，与对应的自然经历对照组进行比较，测定了起立时间(TSTAND)、10米跑步/步行时间(TTRW)、爬升4级台阶时间(TTCLIMB)、北极星移动评价量表(NSAA)、6分钟步行试验(6MWT)、以及定量肌肉试验(QMT)。

[0457] 在图3中示出了下半部分所示的“高剂量:80mg/kg/周”的时间序列在后面的时间从上半部分所示的“低剂量:40mg/kg/周”的时间序列中被抵消，仅在以低剂量给药确认到安全性后，开始高剂量给药。

[0458] 美国/加拿大II期临床试验次要终点:与外部的无治疗自然经历组(国际神经肌肉研究合作组(CINRG)的迪谢内型的自然经历研究(DNHS))的比较中的时间功能检查

[0459] 对于美国/加拿大II期临床试验NS-065/NCNP-01-201中登记的患者，在基线、第13周及第25周对肌肉功能进行了临床评价。在本试验的目的中，未对4周的安慰剂期间进行校正。这些评价包括若干类型的时间功能检查:从仰卧位起立的时间(TTSTAND);10米跑步/步行时间(TTRW);爬升4级台阶时间(TTCLIMB);6分钟步行试验(6MWT);以及北极星移动评价量表(NSAA)。将经时变化与CINRG DNHS中进行试验的对应患者的疾病轨迹进行了比较。

[0460] CINRG DNHS是经历数年分别跟踪440个DMD患者的试验(总试验期间约为10年)。CINRG是指国际神经肌肉研究合作组(Cooperative Internation al Neuromuscular Research Group)，是“共同具有希望给神经肌肉病患者及其家属的生活带来良好影响的共同目标的学术/研究中心的医学/科学研究人员的联盟”(http://www.cinrgresearch.org/)。DNHS表示迪谢内型的自然经历的研究(Duchenne natural

History Study)，是由CINRG(来自于http://www.cin rgresearch.org/Duchenne-Natural-history/)确立的“Duchenne muscular dystroph y(DMD)中的目前为止最大的前瞻性多中心自然经历研究”(McDonald CM,Henricson EK,Abresch RT,Han JJ,Escolar DM,Florence JM,Duong T,Arrieta A,Clemens PR,Hoffman EP,and Cnaan A,“CINRG Investigators.The cooperative international neuromuscular research group Duchenne naturalhistory study-a longitudinal investigation in the era of glucocorticoid ther apy:design of protocol and the methods used,”Muscle Nerve.,48(1),32-54(2013).、Henricson EK,Abresch RT,Cnaan A,Hu F,Duong T,Arrieta A,Han J,Escolar DM,Florence JM,Clemens PR,Hoffman EP,and McDo nald CM,“CINRG Investigators.The cooperative international neuromuscularresearch group Duchenne natural history study:glucocorticoid treatment pr eserves clinically meaningful functional milestones and reduces rate of diseas e progression as measured by manual muscle testing and other commonly us ed clinical trial outcome measures,”Muscle Nerve.,48(1),55-67(2013).以及McDonald CM,Henricson EK,Abresch RT,Duong T,Joyce NC,Hu F,Clemens PR,Hoffman EP,Cnaan A,and Gordish-Dressman H,“CINRG I nvestigators.Long-term effects of glucocorticoids on function,quality of life,and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy:a prospective c ohort study,”Lancet,391(10119),451-461(2018))。

[0461] NS-065/NCNP-01-201试验通过参加了CINRG网络的临床机构来实施。标准操作步骤(临床手册)及临床评价者培训协议与NS-065/NCNP-01-201临床试验及CINRG DNHS非常相似。相对于NS-065/NCNP-01-201，使用以下的基准来进行CINRG DNHS中登记的患者的对应(匹配)。

[0462] • 基线时的年龄为4岁至小于10.5岁的男孩。

[0463] • 具有12个月以上时间的功能测试数据的患者。

[0464] • 地域:北美(美国、加拿大)。

[0465] • 已给药类固醇至少3个月，并且在整个12/24个月的观察期间持续给药类固醇

[0466] • 给药其它临床试验

[0467] 对于与NS-065/NCNP-01-201临床试验中登记的患者相匹配的患者进行了CINRG DNHS数据库的查询，虽然未确定适合基于外显子53跳读的治疗的抗肌萎缩蛋白突变，但排除了具有外显子3-7缺失的患者及具有适合基于外显子44跳读的治疗的抗肌萎缩蛋白缺失的患者，其结果是得到了以下表9所示的69个受试者。将具有外显子3-7缺失的患者及具有适合基于外显子44跳读的治疗的抗肌萎缩蛋白缺失的患者排除的原因是，据报道这些患者显示出较轻度的症状。

[0468] 表9:由CINRG DNHS匹配到的患者

[0469]

参数	外显子53跳读 n=6	非外显子53跳读 n=63	总计 n=69
平均年龄:岁(范围)	6.8 (4.5 – 10.3)	7.4 (4.0 – 10.5)	7.3 (4.0 – 10.5)
平均体重:kg(范围)	25.0 (16.6 – 39.1)	25.6 (15.1 – 50.6)	25.6 (15.1 – 50.6)
缺失型,例数(%)			
单一缺失	2 (33%)	9 (14%)	11 (16%)
多个缺失	4 (67%)	31 (49%)	35 (51%)
单一外显子的重复	0	2 (3%)	2 (3%)
多个外显子的重复	0	3 (5%)	3 (4%)
无大的缺失/重复	0	16 (25%)	16 (23%)

[0470] *非外显子53跳读:对于2个患者,没有关于缺失型的数据。

[0471] 在表9的最上行中,“外显子53跳读”是指适合基于外显子53跳读的治疗的DMD患者,“非外显子53跳读”是指其它全部患者(其中,注意上述的排除事项)。在表9的下列中,“无大的缺失/重复”包含点突变(不适合基于外显子跳读的治疗)这样的其它类别。

[0472] 具有6MWT的数据的CINRG DNHS患者数量比其它评价项目的患者数量少。其原因在于,6MWT是在CINRG DNHS协议的后期被追加的,因此与其它时间功能检查相比,数据量受到限制。

[0473] 将NS-065/NCNP-01-201中登记的16个患者与CINRG DNHS中登记的69个患者的整个24周的疾病的轨迹进行比较,结果可知,在24周的时间范围中,自然经历比较群的患者在时间功能检查方面呈现功能降低。与此相对,NS-065/NCNP-01-201中登记的患者在24周的相同期间在时间功能检查中以平均值的形式显示出改善。这些改善中的3个达到了统计学上的显著性:TTRW(第13周及第25周);TSTAND(第25周);以及6MWT(第25周)。在40mg/kg/周及80mg/kg/周的NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的剂量之间未观察到统计学上有显著差异。

[0474] 图4(总计5个图表和1个表)示出了NS-065/NCNP-01-201中登记的患者(以蓝色实线表示为“维托拉尔森”)与CINRG DNHS中匹配到的患者(以红色虚线表示为“DNHS”)在整个24周的时间功能检查中相对于基线的变化的比较。

[0475] 在图4的5个图表中,“维托拉尔森”是NS-065/NCNP-01的国际通用名(INN)。另外,在全部的图表中,使用用于重复测定(MMRM)分析的基于限制性最大似然法(REML)的混合模型,在维托拉尔森给药组与CINRG DNHS患者组之间比较了相对于基线的变化。

[0476] (1)时间功能检查(Timed Function Test)

[0477] 时间功能检查为TTSTAND、TTRW、TTCLIMB、6MWT。TSTAND及TTRW被事先确定为单独的评价项目,基于时间及6分满分评价的量表进行了评价。TSTAND及TTRW也是NSAA的构成项目。因此,对它们进行1次测定,使用其数据作为独立型终点,进一步进行组合,作为NSAA试验的一部分来使用。对于TSTAND及TTRW与组合而成的NSAA量表的关系,在以下进一步进行说明。使用TTC LIMB,对患者爬上4级台阶所需要的时间(秒)进行了评价。应该注意的是,在上述“美国/加拿大II期临床试验”所记载的临床协议中,错误地记载了TTCLIMB试验是作为NSAA的一部分而实施的。

[0478] 6MWT是在很多疾病中得到广泛使用、已被接受的试验,其中,本试验中使用的是适合DMD的版本。可以认为,该试验是对1)功能性运动状态、以及2)对运动的综合总体反应进

行临床评价的、简单且标准化的、低技术且成本效益高的评价方式。在实施本试验时，离开25米设置2点(椎体)，委托患者在椎体间迅速且安全地步行6分钟。记录患者在6分钟内步行的总距离(米)。临床评价者测定患者在最初的50米所需要的步数和6分钟步行的总距离(米)(Craig M.McDonald,MD,Erik K.Henricson,MPH,Jay J.Han,MD,R.Ted Abresch MS,Alina Nicorici,BS,Gary L.Elfring,MS,Leone Atkinson MD,PhD,Allen Reha BS,Samit Hirawat MD,and Langdon L.Miller MD,"The6-minute Walk Test as a New Outcome Measure in Duchenne Muscular Dystrophy,"Muscle&Nerve,Vol.41,pp.500-510,April 2010,Wiley Periodicals,Inc.及Craig M.McDonald,MD,Erik K.Henricson,MPH,R.Ted Abresch,MS,Julaine Florence,PhD,Michelle Eagle,PhD,Eduard Gappmaier,PhD,Allan M.Glanzman,DPT,Robert Spiegel,MD,Jay Barth,MD,Gary Elfring,MS,Allen Reha,MS,and Stuart W.Peltz,PhD,"The 6-minute Walk Test and Other Clinical Endpoints in Duchenne Muscular Dystrophy:Reliability,Concurrent Validity,and Minimal Clinically Important Differences from a Multicenter Study,"Muscle&Nerve,Vol.48,pp.357-368,September 2013,Wiley Periodicals,Inc.)。

[0479] 定量肌肉检查(QMT)评价设计为对静态收缩时产生的肌力进行测定，是为了测定神经肌肉疾病的肌力降低而充分确立的方法。该方法中使用了CINRG定量肌肉系统(CQMS)。CQMS包含增加罹患DMD的儿童的适应性的视觉听觉反馈过程。患者被放置在具备支撑背部的机构的检查桌上，由此排除了用手稳定背部的必要性。单次实施给药(single practice administration)后，各患者完成了基于评分的QMT评价(进行2个检查，将2个值中高者用于数据分析)。QMT使用具备应变仪的直接计算机接口，以磅记录力来进行。将试验位置及试验顺序标准化。进行了以下列举的肌肉群的双边检验(Mayhew JE,Florence JM,Mayhew TP,Henricson EK,Leshner RT,Mccarter RJ,et al.,"Reliable surrogate outcome measures in multicenter clinical trials of Duchenne muscular dystrophy,"Muscle&Nerve,2007;35(1):36-42.Epub2006/09/14.)：

[0480] • 握力。

[0481] • 肘屈肌(二头肌)。

[0482] • 肘伸肌(三头肌)。

[0483] • 膝屈肌(腘绳肌)。

[0484] • 膝伸肌(四头肌)。

[0485] 对于QMT，除肘伸肌以外，在整个24周的处置期间，全部参数中观察到了强度平均值的稍微减少。但是，对于肘伸肌，观察到了强度稍有增加(改善)。在任意项目中，第25周的相对于基线的变化没有统计上的显著差异。

[0486] 强度/功能试验按照TTSTAND、TTRW、TTCLIMB、NSAA、6MWT、QMT的顺序实施。

[0487] (2)北极星移动评价量表(NSAA)

[0488] NSAA原本是为了能够至少步行10米的患有DMD的男孩而设计的，是基于临床医生的评分的包含17个项目的功能评价体系(E.S.Mazzone,S.Messina,G.Vasco,M.Main,M.Eagle,A.D'Amico,L.Doglio,L.Politano,F.Cavallaro,S.Frosini,L.Bello,F.Magri,A.Corlatti,E.Zucchini,B.Brancalion,F.Rossi,M.Ferretti,M.G.Motta,M.R.Cecio,A.Berardinelli,P.Alfieri,T.Mongini,A.Pini,G.Astrea,R.Battini,G.Comi,

E.Pegoraro,L.Morandi,M.Pane,C.Angelini,C.Bruno,M.Villanova,G.Vita,M.A.Donati,E.Bertini,and E.Mercuri,"Reliability of the North Star Ambulatory Assessment in a multicentric setting,"Neuromuscular Disorders,Vol.19,Issue 7,pp.458-461,Jul 2009,Elsevier B.V.)。启用该评价工具,对包括从地板起立、确定的爬台阶、跳跃及跑步的功能性活动进行评价。评价基于以下的3等评价尺度:2＝正常实施试验内容的能力;1＝如果有修正后的方法或辅助,则能够实施试验内容;以及0＝无法实施试验。因此,在这些评价中,总得分可以为0(完全不能步行)～34(无障碍)的范围。记录了各试验项目的得分和总得分。TSTAND及TTRW作为NSAA的一部分来实施。

[0489] • TTSTAND是作为DMD患者的标准临床检查而进行的常规试验。在该试验中,使用患者从平躺在地板上至站立所需要的时间来评价。以6分满分来评价实施试验所需要的秒数和患者如何实现站立姿势,记录分数。

[0490] • 使用TTRW评价了患者10米步行/跑步所需要的时间(以秒为单位)(包括对于走行/跑步的质量的6分满分评价量表)。

[0491] 美国/加拿大的II期临床试验:安全性

[0492] 对于给药了高剂量及低剂量的NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)(40mg/kg/周或80mg/kg/周)的16例DMD患者的安全性数据,在试验的实施、数据质量、或者参加者的安全性方面不存在很大隐患。没有在48周时中止治疗的参加者。具体而言,未确认到需要中止或减量给药NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的TEAE(治疗期间出现的不良事件)。全部不良事件(不良事件)为轻度或中等程度。

[0493] [实施例3]pH对维托拉尔森的稳定性的影响

[0494] (I)pH稳定性评价(1)

[0495] 为了调查溶液的液体性质与维托拉尔森的稳定性的关系,使用伯瑞坦-罗宾森(Britton-Robinson)缓冲液(pH 3、4、5、6、7、8、9、10或11)评价了各种pH溶液中的维托拉尔森的稳定性。

[0496] [试验条件]

[0497] 药液浓度:维托拉尔森2mg/mL

[0498] 溶解液:伯瑞坦-罗宾森缓冲液(pH 3、4、5、6、7、8、9、10或11)

[0499] 保存条件:(1)121℃(高压釜处理)下10、30或60分钟;或者

[0500] (2)80℃恒温容器中4或7天

[0501] 终点:外观(肉眼观察确认)、pH(pH计)、纯度试验(HPLC法)、回收率(残留率)(HPLC法)

[0502] HPLC条件:

[0503] 流量:每分钟1.0mL

[0504] 检测器:紫外吸收光度计(测定波长:264nm)

[0505] 色谱柱:在内径4.6mm、长度15cm的不锈钢管中填充有3.5μm的液相色谱用十八烷基甲硅烷基化硅胶(Waters,X-bridge C18)。

[0506] 柱温:60℃

[0507] 流动相:

[0508] • 将磷酸氢二钠1.42g溶于约750mL水,加入氢氧化钠水溶液调整为pH12.0后,加

入水，制成1000mL(P液)。

[0509] • 向P液700mL加入乙腈300mL，将四丁基溴化铵16.12g溶解(流动相A)。

[0510] • 向P液300mL加入乙腈300mL，将四丁基溴化铵9.67g溶解(流动相B)。

[0511] • 流动相的输送：用30分钟从流动相A/B(100vol%/0vol%)变更为(0vol%/100vol%)。

[0512] 在本实施例及以下的实施例中，作为纯度试验的值，表示将包含杂质的检测到的全部峰面积的总计设为100时，维托拉尔森的主峰面积的百分率(主峰面积百分率(%))。

[0513] [试验结果]

[0514] 将试验结果示于表10及图5。“ST”是以相同的药液浓度稀释至纯化水中的维托拉尔森水溶液，试验时每次制备(未进行保存)。其结果是，维托拉尔森在酸性范围的溶液中不稳定，但在中性～弱碱性的溶液中比较稳定。

[0515] [表10]

[0516] 表10维托拉尔森在伯瑞坦-罗宾森缓冲液(pH 3～11)中的稳定性评价结果

[0517]

测定时期		测定项目	ST	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11
制备时		外观	-	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明
		pH	-	3.15	4.10	5.09	6.09	7.08	8.03	8.99	9.87	10.49
		纯度：主峰面积百分率(%)	86.53	85.94	86.75	86.81	86.70	86.58	86.74	85.99	86.56	86.34
		回收率(残留率)(%)	100	96.6	97.5	97.9	97.6	97.8	98.7	95.1	95.8	96.5
121℃	10分	外观	-	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化
		纯度：主峰面积百分率(%)	86.49	29.71	68.72	81.19	84.04	84.91	85.08	-	-	-
		回收率(残留率)(%)	100	25.3	69.9	89.2	92.4	93.0	95.2	-	-	-
	30分	外观	-	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化
		pH	-	3.51	4.16	5.08	-	-	-	-	-	-
		纯度：主峰面积百分率(%)	86.60	15.40	56.09	77.90	81.85	82.53	82.61	81.71	78.77	75.94
		回收率(残留率)(%)	100	10.6	57.5	85.1	91.0	91.1	92.4	92.2	87.9	85.2
	60分	外观	-	-	-	-	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化
		pH	-	-	-	-	6.13	7.10	8.10	9.04	9.87	10.33
		纯度：主峰面积百分率(%)	86.61	-	-	-	78.95	79.75	79.03	77.13	73.26	68.70
		回收率(残留率)(%)	100	-	-	-	84.9	85.5	85.7	83.4	77.9	72.4
80℃	4天	外观	-	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化
		pH	-	3.51	4.16	5.08	-	-	-	-	-	-
		纯度：主峰面积百分率(%)	85.71	0.38	18.01	67.16	79.64	82.94	82.65	82.58	81.32	80.52
		回收率(残留率)(%)	100	0.1	12.1	64.4	87.7	93.5	91.8	91.7	89.4	88.0
	7天	外观	-	-	-	-	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化
		pH	-	-	-	-	6.12	7.08	8.10	9.10	9.97	10.53
		纯度：主峰面积百分率(%)	85.06	-	-	-	71.42	77.43	79.75	77.54	76.48	70.71
		回收率(残留率)(%)	100	-	-	-	78.5	86.5	88.4	84.2	82.7	75.2

[0518] (II)pH-稳定性评价(2)

[0519] 为了更详细地调查维托拉尔森的稳定pH范围，使用磷酸钾-硼砂缓冲液(pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0或9.2)评价了pH 6～9的各种pH溶液中的维托拉尔森的稳定性。

[0520] [试验条件]

[0521] 药液浓度：维托拉尔森2mg/mL

[0522] 溶解液：磷酸钾-硼砂缓冲液(pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0或9.2)

[0523] 保存条件：(1)121℃(高压釜处理)下10、30或60分钟；或者

[0524] (2)80℃恒温容器中1、4、7或14天

[0525] 终点：外观(肉眼观察确认)、pH(pH计)、纯度试验(HPLC法)、回收率(残留率)(HPLC法)

[0526] HPLC条件：

[0527] 除将柱温设为50℃以外，与(I)相同。

[0528] [试验结果]

[0529] 将试验结果示于表11及图6。其结果是,维托拉尔森在pH 7～7.5的溶液中最稳定。

[0530] [表11]

[0531] 表11维托拉尔森在磷酸钾-硼砂缓冲液(pH6～9)中的稳定性评价结果

[0532]

测定时期		测定项目	ST	pH 6	pH 6.5	pH 7	pH 7.5	pH 8	pH 8.5	pH 9	pH 9.2
制备时		外观	-	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明
		pH	-	6.02	6.50	7.00	7.51	7.99	8.49	8.99	9.18
		纯度:主峰面积百分率(%)	86.49	85.80	85.87	85.70	86.07	85.73	85.73	85.77	85.81
		回收率(残留率)(%)	100	98.0	98.7	97.5	97.4	98.8	98.5	98.4	99.3
121℃	10分	纯度:主峰面积百分率(%)	86.07	82.44	83.91	84.74	84.27	83.90	83.87	82.99	82.90
		回收率(残留率)(%)	100	93.9	95.2	96.7	95.4	95.4	93.5	93.4	95.2
	30分	纯度:主峰面积百分率(%)	86.16	79.99	80.60	81.13	80.86	80.72	79.69	78.26	77.30
		回收率(残留率)(%)	100	93.0	91.1	93.4	93.0	93.5	92.3	90.1	88.1
	60分	外观	-	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化
		pH	-	6.04	6.53	7.01	7.53	8.03	8.52	9.02	9.22
		纯度:主峰面积百分率(%)	85.69	76.22	77.33	77.59	77.47	76.79	75.71	73.03	71.42
		回收率(残留率)(%)	100	85.5	88.5	88.1	87.0	86.5	85.1	81.1	80.4
80℃	1天	纯度:主峰面积百分率(%)	86.51	81.47	83.20	84.99	84.94	85.08	84.48	83.81	83.02
		回收率(残留率)(%)	100	92.5	95.0	96.4	96.7	97.6	96.8	96.0	93.6
	4天	纯度:主峰面积百分率(%)	86.40	67.46	72.62	78.71	77.81	75.79	75.37	71.64	69.70
		回收率(残留率)(%)	100	75.6	81.6	89.7	87.9	86.2	85.4	80.5	76.5
	7天	纯度:主峰面积百分率(%)	86.12	59.16	62.98	73.62	74.22	70.30	67.95	66.52	60.86
		回收率(残留率)(%)	100	64.1	72.4	83.0	83.1	78.8	74.8	74.0	66.7
	14天	外观	-	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化
		pH	-	6.06	6.54	7.03	7.54	8.03	8.52	9.02	9.21
		纯度:主峰面积百分率(%)	86.08	39.64	50.26	60.10	62.46	55.41	53.98	49.95	-
		回收率(残留率)(%)	100	40.4	54.2	62.5	68.4	58.9	57.7	50.3	-

[0533] [实施例4]pH调节剂对制剂稳定性的影响

[0534] 本实施例的目的在于选择用于将维托拉尔森注射液调整至稳定的pH范围(pH 7～7.5)的pH调节剂。添加各种pH调节剂(10mM KH_2PO_4、10mM Na_2HPO_4、10mM KH_2PO_4-Na_2HPO_4或100mM KH_2PO_4-Na_2HPO_4),对调整为稳定pH的10mg/mL维托拉尔森溶液的稳定性进行了评价。

[0535] [试验条件]

[0536] 药液浓度:维托拉尔森10mg/mL

[0537] 药液配方:如下述表12所述

[0538] 保存条件:121℃(高压釜处理)下30～60分钟

[0539] 终点:外观(肉眼观察确认)、pH(pH计)、纯度试验(HPLC法)、回收率(残留率)(HPLC法)

[0540] [表12]

[0541] 表12药液配方

[0542]

pH 调节剂	无缓冲剂 (HCl/NaOH)	10mM KH_2PO_4	10mM Na_2HPO_4	10mM KH_2PO_4-Na_2HPO_4	100mM KH_2PO_4-Na_2HPO_4
维托拉尔森(mg)	10	10	10	10	10
氯化钠(mg)	9	9	9	9	9
磷酸二氢钾(mg)	-	1.36	-	0.27	2.72
磷酸氢二钠(mg)	-	-	1.42	1.14	11.36
0.1 mol/mL 盐酸	q.s.*	-	q.s.*	q.s.*	q.s.*
0.1 mol/mL 氢氧化钠	q.s.*	q.s.*	-	q.s.*	q.s.*
注射用水	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
总量 (mL)	1	1	1	1	1

[0543] *:将pH调整为7.3

[0544] [试验结果]

[0545] 将试验结果示于表13及图7。其结果是,维托拉尔森在无缓冲剂的情况下也与存在磷酸缓冲剂的情况同等以上的稳定。特别是在高浓度的磷酸缓冲液(本实施例中为100mM KH_2PO_4-Na_2HPO_4)中更稳定。

[0546] [表13]

[0547] 表13pH调节剂的探讨结果

[0548]

测定时期		测定项目	ST	无缓冲剂	10mM KH_2PO_4	10mM Na_2HPO_4	10mM KH_2PO_4-Na_2HPO_4	100mM KH_2PO_4-Na_2HPO_4
制备时		外观	-	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明	无色透明
		pH	-	7.32	7.32	7.33	7.30	7.32
		纯度:主峰面积百分率(%)	86.52	86.17	85.95	85.98	86.15	86.07
		回收率(残留率)(%)	100	100.0	98.7	98.9	98.8	99.0
121℃	10分	外观	-	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化
		纯度:主峰面积百分率(%)	85.79	84.78	84.47	84.41	84.30	84.01
		回收率(残留率)(%)	100	96.7	96.7	97.3	97.1	95.7
	30分	外观	-	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化
		纯度:主峰面积百分率(%)	86.52	83.41	83.35	83.42	83.57	82.57
		回收率(残留率)(%)	100	94.5	94.0	94.4	94.5	90.3
	60分	外观	-	无变化	无变化	无变化	无变化	无变化
		pH	-	7.26	7.27	7.28	7.26	7.23
		纯度:主峰面积百分率(%)	85.79	80.81	79.72	79.67	79.63	78.07
		回收率(残留率)(%)	100	92.3	89.5	91.2	91.1	87.5

[0549] [实施例5]缓冲剂与多聚体的生成的关系

[0550] 维托拉尔森有时因保存条件而形成多聚体,单体的纯度降低。在本实施例中,向添加了0.9%的作为等渗剂的氯化钠的50mg/mL的维托拉尔森药液中进一步添加各种缓冲剂

时，测定了多聚体的生成。

[0551] [试验条件]

[0552] 药液浓度：维托拉尔森50mg/mL

[0553] 保存条件：60℃恒温容器中5天

[0554] 终点：多聚体(HPLC法、SEC柱)

[0555] 分析条件：

[0556] 检测器：紫外吸收光度计(测定波长：260nm)

[0557] 色谱柱：向内径7.8mm、长度30cm的不锈钢管中填充7μm的液相色谱用苯乙烯类乙烯基聚合物凝胶，将2根该色谱柱串联连接(TSK gel G3000PWXL、7μm、7.8mm×30cm、东曹株式会社)。

[0558] 柱温：25℃

[0559] 流动相：将磷酸二氢钠二水和合物15.6g溶于水750mL，加入氢氧化钠溶液调整pH至7.3后，加入水，制成1000mL。向该液体800mL加入乙腈200mL。

[0560] 流量：维托拉尔森的单体的保持时间调整为约21分钟。

[0561] 面积测定范围：维托拉尔森的单体的峰为止的范围

[0562] [试验结果]

[0563] 将试验结果示于表14。其结果是，通过添加50mM磷酸缓冲液(磷酸二氢钠二水合物-磷酸氢二钠：$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$-Na_2HPO_4)、柠檬酸缓冲液(柠檬酸三钠二水合物)，多聚体的生成增加。

[0564] [表14]

[0565] 表14多聚体的评价结果(60℃保存)

[0566]

缓冲剂	缓冲剂浓度 (mM)	氯化钠 (mM)	多聚体量(RRT 0.95)			
			初期值	1d	2d	5d
无缓冲剂		150	N.D.	N.D.	N.D.	0.15
柠檬酸	10	150	N.D.	N.D.	0.12	0.14
	50	150	N.D.	N.D.	0.13	0.16
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	10	150	N.D.	N.D.	N.D.	0.14
	50	150	N.D.	N.D.	N.D.	0.13
磷酸	10	150	N.D.	N.D.	N.D.	0.14
	50	150	N.D.	N.D.	N.D.	0.20

[0567] [实施例6]溶解性的探讨(100mg/mL)

[0568] 实施了注射液的高浓度化的探讨。

[0569] [试验条件]

[0570] 药液：下述2种

[0571] [表15]

[0572] 表15药液(2种)

[0573]

主药浓度	100 mg/mL	
pH 调节剂	无缓冲剂 (HCl、NaOH)	10mM KH_2PO_4-Na_2HPO_4
维托拉尔森(mg)	100	100
NaCl (mg)	9	9
KH_2PO_4 (mg)	–	0.27
Na_2HPO_4 (mg)	–	1.14
0.1N HCl	q.s.*	q.s.*
0.1N NaOH	q.s.*	q.s.*
注射用水	q.s.	q.s.
总量 (mL)	1	1

[0574] *:将pH调整至7.3

[0575] 过滤器:PVDF制(Millex GV,0.22μm,33mm,Millipore)

[0576] 终点:外观(肉眼观察确认)、pH(pH计)、纯度试验(HPLC法)、过滤后的回收率(HPLC法)

[0577] [试验结果]

[0578] 将试验结果示于表16。在制备100mg/mL的维托拉尔森注射液时,溶解性、灭菌过滤器的过滤没有问题,制成了无色透明的溶液。在冷处保存后,尽管出现了粘性,但外观没有变化。根据以上情况可知,可以制备100mg/mL的注射液。

[0579] [表16]

[0580] 表16高浓度注射液的探讨结果

[0581]

药液	测定项目	过滤前	过滤后 (PVDF)
100 mg/mL 无缓冲剂	外观	无色透明	无变化
	pH	7.28	7.25
	纯度:主峰面积百分率(%)	93.31	93.52
	回收率(%)	100.0	99.0
100 mg/mL 10mM 磷酸缓冲液	外观	无色透明	无变化
	pH	7.28	7.28
	纯度:主峰面积百分率(%)	93.28	93.33
	回收率(%)	100.0	98.9

[0582] [实施例7]溶解性的探讨(50mg/mL)

[0583] 对50mg/mL的药液的溶解性进行了评价。制备药液,测定了溶解性、利用灭菌过滤器进行了过滤。

[0584] [试验条件]

[0585] 药液：

[0586] [表17]

[0587] 表17

[0588]

主药浓度	50 mg/mL
pH 调节剂	无缓冲剂 (HCl、NaOH)
维托拉尔森(g)	1300
NaCl (g)	234
0.1N HCl	q.s.*
0.1N NaOH	q.s.*
注射用水	q.s.
总量 (L)	26

[0589] *:将pH调整至7.3

[0590] 过滤器:PVDF制(Millidisk囊式过滤器、0.22μm、MCGL40S03/1个+MCGL40S03/2个、Merck公司)

[0591] 终点:外观(肉眼观察确认)、pH(pH计)、纯度试验(HPLC法)、定量(HPLC法)

[0592] [试验结果]

[0593] 将试验结果示于表18。其结果是,50mg/mL成为无色透明的溶液,过滤前后的含量没有变化。根据以上情况,50mg/mL的注射液可以制备,扩大规模也没有问题。

[0594] [表18]

[0595] 表18评价结果

[0596]

试验项目		过滤前	过滤后
外观		无色透明的液体	无色透明的液体
pH		7.3	7.4
纯度试验 (类似物质)	RRT=0.80	0.22%	0.22%
	RRT=0.85	1.74%	1.74%
	RRT=0.91	0.72%	0.70%
	RRT=1.07	2.09%	1.99%
	RRT=1.24	0.31%	0.30%
	其它的各种类似物质的总计	0.13%	0.12%
		5.39%	5.26%
定量		100.9%	100.8%

[0597] 在以下的实施例8～10中，对于从参加了实施例2的临床试验的患者得到的样品、或参加了实施例2的临床试验的患者进行了试验。

[0598] [实施例8]

[0599] 基于抗肌萎缩蛋白的质谱分析法的定量

[0600] (实验方法)

[0601] 概要:生物学分析法

[0602] 样品通过SDS-PAGE电泳进行蛋白质的分离，在凝胶内进行利用胰蛋白酶的酶消化，形成肽片段。从凝胶片中提取肽片段，使其干燥。使肽再溶解，利用基于反相柱的HPLC-MS/MS进行了抗肌萎缩蛋白的鉴定和定量。校准曲线的范围在将正常对照的抗肌萎缩蛋白质量设为100％时为1％～25％，浓度是使用细丝蛋白C(filamin C)作为标准化蛋白质，根据峰面积比而计算出。回归方程采用最小二乘法，得到了y＝mx+b(y:峰面积比、x:％抗肌萎缩蛋白)的方式。

[0603] 凝胶内消化

[0604] 用LC-MS/MS分析测定的样品是进行SDS-PAGE(SDS:十二烷基硫酸钠、PAGE:聚丙烯酸酰胺凝胶电泳)，进行基于分子量的蛋白质分离，通过凝胶内消化而得到的。各凝胶由总计11个样品构成，所述样品为:构成标准曲线的校准体(0.0％、1.0％、3.0％、10.0％、25.0％抗肌萎缩蛋白)、从加入稳定同位素标记氨基酸而培养得到的人肌管细胞中提取到的蛋白质(SILAC)12.5μg、blank、临床试验4个样品。凝胶有12个泳道，剩余1个泳道用于分子量标记。校准体将来自5种非DMD肌肉活检、2种DMD肌肉活检的蛋白质提取液混合来制备。DMD肌肉活检由宾汉姆顿(Binghamton)大学获得，完成了伦理审查。在本实施例之前，通过蛋白质印迹法(Western Blot)预先测定了各肌肉活检的抗肌萎缩蛋白量。通过冷冻切片制作装置由肌肉活检得到了厚度10μm的连续切片70片。肌肉切片转移至预先在干冰上冷却的微管(microtube)。使用加入了Thermo Scientific公司的蛋白酶和磷酸酶阻害剂的RIPA缓冲液，通过肌肉切片提取出蛋白质。提取液的蛋白质浓度使用BCA protein assay kit(Pierce)定量。对于供于电泳的样品而言，制成各样品包含50μg的蛋白质，添加12.5μg的SILAC进行调整。校准体和临床样品中加入了SILAC提取液作为求得％抗肌萎缩蛋白时的内部标准。使用NuPAGE 3-8％Tris-Acetate凝胶进行了150V 75分钟的电泳。对于同一样品，使用2片凝胶(凝胶A和凝胶B)以双复孔(duplicate)实施了凝胶电泳。完成了电泳的凝胶用甲醇:水:乙酸(50:45:5)固定30分钟，在水中进行2次交换并再水化。进行1小时考马斯蓝染色。凝胶的脱色在4℃下进行过夜。将以分子量标记计存在460kDa～268kDa范围的抗肌萎缩蛋白的凝胶切下，用水:乙腈(50:50)清洗2次。使用胰蛋白酶(Gold mass spectrometry grade,Promega Corporation)进行凝胶内消化，得到肽片段，通过减压离心进行了干燥。抗肌萎缩蛋白的肽片段在-80℃下预先保管，用于基于Q Exactive Nano-LC-MS/MS的分析。

[0605] 试验样品

[0606] 参加了临床试验的患者为16人，从各患者获得给药前后的肌肉活检。由于双复孔(duplicate)，根据32个样本进行了64个样品的分析。另外，4个样本以双复孔(duplicate)的8样品实施了实施再分析，因此分析了总计72个样品。

[0607] 基于LC-MS/MS的分析

[0608] 通过将高效液相色谱系统Dionex Ultimate 3000RSLCnano(ThermoFisher

Scientific)和质谱分析装置Q Exactive Plus(HRMS:High Resolution Mass Spectrometer)(ThermoFisher Scientific)组合而成的液相色谱质谱分析法(LC-MS/MS)对得到的肽片段进行了分析。

[0609] 干燥肽片段使用2%乙腈(ACN)+0.1%三氟乙酸(TFA)进行再溶解。向LC-MS/MS导入试样使用了注入环5μL Dinoex nanoViper sample loop(ThermoFisher Scientific)。

[0610] 在以下的条件下进行了液相色谱。

[0611] 分析柱:反相柱Acclaim Pepmap RSLC C18 15cm×75μm、粒径3μm、EASY SPRAY(Thermo Fisher)

[0612] 分析柱温:50℃

[0613] 流动相A:1%甲酸(HCOOH)、流动相B:0.1%甲酸ACN

[0614] 流速:0.500μL/min(NC)

[0615] 试样注入模式:Partial loop(loop size 5μL)

[0616] 试样注入量:1.00-4.00μL

[0617] 自动进样器温度:10℃

[0618] 执行时间:40.00分钟

[0619] [表19]

[0620] 表19NC泵梯度设定

[0621]

时间(分)	流速	%流动相A	%流动相B
0.00	0.500	99.0	1.0
6.50	0.500	99.0	1.0
26.50	0.500	65.0	35.0
26.60	0.500	10.0	90.0
29.00	0.500	10.0	90.0
29.10	0.500	99.0	1.0
40.00	0.500	99.0	1.0

[0622] 质谱分析装置在以下条件下使用。

[0623] 离子源:Thermo Fisher EASY-Spray

[0624] 离子模式:阳离子

[0625] 扫描:并行反应监控

[0626] 色谱峰宽(半峰宽):10秒钟

[0627] 最小总循环时间:40分钟

[0628] 分辨率:17,500

[0629] 自动增益控制(Automatic Gain Control)目标:1e5

[0630] 最大试样注入时间:50毫秒

[0631] 四极杆型质量检测器分离宽度:1.0m/z单位

[0632] 图谱数据:绘图

[0633] Mass允许范围:10ppm

[0634] 典型的可调参数(Typical Tunable Parameters)(Dystrophin Tune File)

[0635] 喷射电压(Spray Voltage):1.8kV

[0636] 毛细管温度(Capillary Temperature):275℃

[0637] S-Lens RF-Level:70

[0638] [表20]

[0639] 表20Mass选择列表

[0640]

肽ID	肽序列	Mass(m/z)	电荷数(z)	保留时间:开始(分)	保留时间:结束(分)
DYST_2	IFLTEQPLEGLEK	758.9165	2	18.80	20.40
DYST_2_IS	IFLTEQPLEGLE**K**^	762.9236	2	18.80	20.40
FilC_1	VAVGQEQAFSVNTR	753.3890	2	15.40	17.40
FilC_1_IS	VAVGQEQAFSVN**TR**^	756.3990	2	15.40	17.40
FilC_2	SPFVVNVAPPLDLSK	791.9456	2	20.30	22.20
FilC_2_IS	SPFVVNVAPPLDL**SK**^	795.9527	2	20.30	22.20

[0641] K^=Lys(^{13}C6,^{15}N2);R^=Arg(^{13}C6,^{15}N4)-同位素标记氨基酸

[0642] [表21]

[0643] 表21预计的保留时间

[0644]

肽ID	保留时间(分)
DYST_2	19.95
DYST_2_IS	19.95
FilC_1	16.24
FilC_1_IS	16.24
FilC_2	20.68
FilC_2_IS	20.68

[0645] 保留时间变化至±1.5分钟。

[0646] [表22]

[0647] 表22将用同一凝胶进行了电泳的样品向LC-MS/MS进行试样注入的顺序

[0648]

顺序	样品
1	分析对象以外的样品
2	分析对象以外的样品
3	空白
4	空白
5	SILAC
6	校准体抗肌萎缩蛋白0%

7	校准体抗肌萎缩蛋白1%
8	校准体抗肌萎缩蛋白3%
9	校准体抗肌萎缩蛋白10%
10	校准体抗肌萎缩蛋白25%
11	分析对象以外的样品
12	临床样品1
13	分析对象以外的样品
14	临床样品2
15	分析对象以外的样品
16	临床样品3
17	分析对象以外的样品
18	临床样品4

[0649] 分析对象以外的样品:用空白将SILAC稀释

[0650] 根据色谱图,通过Thermo Scientific公司的LC Quan version 3.0进行了数据收集。Mass的允许范围为20ppm,积分算法设为ICIS。在校准体1%或其它校准体的抗肌萎缩蛋白的峰面积为10000附近以下的情况下,注意以下事项。与校准体0%相比较,基于抗肌萎缩蛋白和细丝蛋白C而得到的肽和标记肽的峰面积比是可以信赖的数值,确认了不会对%抗肌萎缩蛋白造成干扰。

[0651] 抗肌萎缩蛋白和细丝蛋白C的峰面积是通过将与产物离子一致的峰面积进行总计而计算的。抗肌萎缩蛋白的峰面积由抗肌萎缩蛋白的1种肽片段(DYST2氨基酸序列:IFLTEQPLEGLEK(序列号4))得到。细丝蛋白C的峰面积设为细丝蛋白C的2种肽片段(FILC1氨基酸序列:VAVGQEQAFSVNTR(序列号6)、FILC2氨基酸序列:SPFVVNVAPPLDLSK(序列号8))的平均值。

[0652] [表23]

[0653] 表23

[0654]

抗肌萎缩蛋白	肽序列	MS1 (m/z)	产物离子
DYST_2	IFLTEQPLEGLEK (序列号 4)	758.9165	785.4387, 1042.5400, 1143.5870, 1256.6697
DYST_2_IS	IFLTEQPLEGLE**K**^	762.9236	793.4521, 1050.5500, 1151.5932, 1264.6708
细丝蛋白 C	肽序列	MS1 (m/z)	产物离子
FilC_1	VAVGQEQAFSVNTR (序列号 5)	753.3890	723.3784, 794.4155, 922.4741, 1051.5167
FilC_1_IS	VAVGQEQAFSVN**TR**^	756.3990	729.3985, 800.4356, 928.4942, 1057.5368
FilC_2	SPFVVNVAPPLDLSK (序列号 6)	791.9456	769.4454, 840.4825, 1053.5938, 1152.6623
FilC_2_IS	SPFVVNVAPPLDL**SK**^	795.9527	777.4596, 848.4974, 1061.6081, 1160.6765

[0655] 校准体和各临床样品中的抗肌萎缩蛋白水平(抗肌萎缩蛋白与细丝蛋白C的峰面积比)根据下式进行计算。由于从0%的校准体中也可以检测到抗肌萎缩蛋白,因此从各校准体的抗肌萎缩蛋白水平的数值中减去校准体0%的抗肌萎缩蛋白水平的数值进行校正。使用Excel的模板,按照各凝胶根据校准体求出%抗肌萎缩蛋白与抗肌萎缩蛋白水平的数值的回归直线,根据临床样品的抗肌萎缩蛋白水平的数值得到了临床样品的%抗肌萎缩蛋白。

[0656] [数学式1]

$$\text{抗肌萎缩蛋白水平} = \frac{\text{抗肌萎缩蛋白比}}{\text{细丝蛋白 C 比}}$$

[0657]

$$= \frac{\text{各样品的抗肌萎缩蛋白 / SILAC 标记体的抗肌萎缩蛋白}}{\text{各样品的细丝蛋白 C / SILAC 标记体的细丝蛋白 C}}$$

[0658] [表24]

[0659] 表24

[0660]

	LCquan		Excel	
1	DYST_2 峰面积	计算 Dyst 2 的峰面积与标记体 Dyst 2 的峰面积之比	Dyst 2 的峰面积与标记体 Dyst 2 的峰面积之比	%抗肌萎缩蛋白(通过用 Dyst 2 与标记体 Dyst 2 的峰面积比除以 FilC 与标记体 FilC 的峰面积比而得到的抗肌萎缩蛋白水平的数值和校准体的%抗肌萎缩蛋白的回归直线计算)
2	DYST_2_IS 峰面积			
3	FilC_1 峰面积	计算 FilC 1 的峰面积与标记体 FilC 1 的峰面积之比	FilC 的峰面积与标记体 FilC 的峰面积之比(左侧所述 2 个的平均值)	
4	FilC_1_IS 峰面积			
5	FilC_2 峰面积	计算 FilC 2 的峰面积与标记体 FilC 2 的峰面积之比		
6	FilC_2_IS 峰面积			

[0661] (结果)

[0662] 对于分析的各样品的%抗肌萎缩蛋白而言,根据事先规定的合格与否的基准来确定是否采用。测定的72样品中,60个样品满足基准。将测定结果示于表25及26。各样本使用双复孔(duplicate)的样品进行了试验,对于从40mg/kg给药组的2个患者(表25的患者E及F)得到的给药前后的4个样本,一个样品(凝胶B)未满足基准,因此得到的测定值为来自1个样品(凝胶A)的仅1个值。即,在40mg/kg给药组中,给药前的8个样本16个样品中,测定了14个样品。1个样品显示为1%,11个样品为定量极限以下。另外,25周时的8个样本16样品中,测定了14个样品。除了1个样本的2次测定均为定量极限以下以外,检测到了1%以上的抗肌萎缩蛋白。

[0663] 在80mg/kg给药组中,给药前的8个样本16个样品全部小于定量极限。另外,在25周时的8个样本16个样品中,全部样品检测到了定量极限以上的抗肌萎缩蛋白,平均为4.2%。

[0664] 根据以上情况,确认了通过给药40mg/kg及80mg/kg的维托拉尔森,抗肌萎缩蛋白的表达恢复。

[0665] [表25]

[0666] 表25使用DYST_2计算出的人肌肉活检的临床试验样品提取物中的抗肌萎缩蛋白浓度

[0667] • 队列1(40mg/kg给药组)

[0668]

受试患者	访问日	%抗肌萎缩蛋白(凝胶 A)	%抗肌萎缩蛋白(凝胶 B)
患者 A	给药前	BLQ	BLQ
患者 A	25 周	2.9	2.2
患者 B	给药前	BLQ	BLQ
患者 B	25 周	2.4	2.1
患者 C	给药前	BLQ	BLQ
患者 C	25 周	2.2	1.5
患者 D	给药前	1.0	BLQ
患者 D	25 周	3.2	3.4
患者 E	给药前	BLQ	NR
患者 E	25 周	1.3	NR
患者 F	给药前	BLQ	NR
患者 F	25 周	3.3	NR
患者 G	给药前	BLQ	BLQ
患者 G	25 周	2.1	1.8
患者 H	给药前	BLQ	BLQ
患者 H	25 周	BLQ	BLQ

[0669] NR:无法记载于报告中(由于仅在2个校准体处获得抗肌萎缩蛋白的峰面积,因此不满足检查合格基准。)

[0670] BLQ:定量极限(1%)以下

[0671] [表26]

[0672] 表26使用DYST_2计算出的人肌肉活检的临床试验样品提取物中的抗肌萎缩蛋白浓度

[0673] • 队列2(80mg/kg给药组)

[0674]

受试患者	访问日	%抗肌萎缩蛋白(凝胶 A)	%抗肌萎缩蛋白(凝胶 B)
患者 I	给药前	BLQ	BLQ*
患者 I	25 周	4.5	3.8
患者 J	给药前	BLQ	BLQ*
患者 J	25 周	1.8	3.5
患者 K	给药前	BLQ	BLQ
患者 K	25 周	2.2	2.6
患者 L	给药前	BLQ	BLQ
患者 L	25 周	1.1	2.2
患者 M	给药前	BLQ	BLQ
患者 M	25 周	1.3	1.3
患者 N	给药前	BLQ	BLQ
患者 N	25 周	12.2	9.3
患者 O	给药前	BLQ	BLQ
患者 O	25 周	10.2	8.6
患者 P	给药前	BLQ	BLQ
患者 P	25 周	1.6	1.3

[0675] BLQ:定量极限(1%)以下

[0676] *:由于1%抗肌萎缩蛋白校准体的峰面积值低,因此,低于3%设为定量极限以下。

[0677] [实施例9]

[0678] 运动功能试验(13、25周时(从初次给药经过12、24周时))

[0679] (实验方法)

[0680] 将本剂组的运动功能评价与作为对照的自然经历组进行了比较。自然经历组是从国际神经肌肉研究合作组(cooperative international neuromuscular research group (CINRG))实施的被称为迪谢内肌营养不良症自然经历研究(Duchenne natural history study)(CINRG DNHS)的研究中基于基线时的数据而选择的,所述国际神经肌肉研究合作组是美国的肌营养不良症的临床试验网络。

[0681] CINRG DNHS是以440个男性DMD患者作为对象的纵向的自然经历研究,收集从2006年至2016年的数据,设为基线时、第1年4次、第2年2次、随后每年1次、最长10年来医院。各次来医院时实施了时间功能检查、肌力检查、基于问卷的功能检查、肺功能检查、生活质量的评价。201试验由属于CINRG的机构实施,标准操作步骤文件(SOP)及临床评价者培训步骤文件在两次试验间一致。

[0682] 作为本试验的对照,从CINRG DNHS选择了满足以下基准的患者,所述基准包含201试验的年龄、类固醇使用情况及地域等主要登记基准。

[0683] • 具有最少12个月的时间功能检查数据[基线时的起立时间(TTSTAND)、爬升4级台阶时间(TTCLIMB)及10m跑步/步行时间(TTRW)的数据是必要的]。

[0684] • 基线时为4岁至小于10岁

[0685] • 北美(美国或加拿大)

[0686] • 最少给药3个月皮质类固醇,在整个12-24个月的观察期间继续使用。

[0687] • 没有同时登记其它外显子跳读药物的临床试验。

[0688] • 满足下述的遗传合格性基准。

[0689] (选择基准):

[0690] 具有基因检查结果的患者

[0691] 具有重复突变的患者

[0692] 具有无义突变或引起移码的微小突变的患者

[0693] (排除基准):

[0694] 在从启动子至外显子8之间具有突变的患者(有病情发展缓慢的报告(1)Hum Mutat.2018;39:1193-1202及(2)Hum Mutat.2008;29(5):728-37,因此排除)

[0695] 适合基于外显子44跳读的治疗的患者(有病情发展缓慢的报告(1),因此排除)

[0696] 具有框内突变的患者

[0697] 其结果是,65例DMD男孩患者满足上述基准,其中,9例为适合基于外显子53跳读的治疗的DMD患者(外显子53跳读组),56例为不适合基于外显子53跳读的治疗的DMD患者(非外显子53跳读组)。

[0698] [表27]

[0699] 表27维托拉尔森给药组和CINRG自然经历对照群(DNHS)的参数

[0700]

参数	维托拉尔森 n=16	DNHS 外显子 53 跳读 n=9	DNHS 非外显子 53 跳读 n=56	DNHS 总计 n=65
年龄(岁) 平均值 (最小–最大)	7.4 (4.3–9.8)	6.3 (4.5–7.8)	7.2 (4.2–9.6)	7.1 (4.2–9.6)
体重(kg) 平均值 (最小–最大)	23.0 (14.9–35.4)	21.6 (16.6–28.1)	24.4 (14.8–38.7)	24.0 (14.8–38.7)
突变型,n(%)				
适合外显子 53 跳读治疗的	16 (100)	9 (100)	0	9 (13.8)
单一外显子的缺失	0	3 (33.3)	0	3 (4.6)
多个外显子的缺失	16 (100)	6 (66.7)	0	6 (9.2)
不适合外显子 53 跳读治疗的	0	0	56 (100)	56 (86.2)
单一外显子的缺失	0	0	4 (7.1)	4 (6.2)
多个外显子的缺失	0	0	30 (53.6)	30 (46.2)
单一外显子的重复	0	0	3 (5.4)	3 (4.6)
多个外显子的重复	0	0	3 (5.4)	3 (4.6)
微小突变	0	0	16 (28.6)	16 (24.6)

[0701] (结果)

[0702] 在16例接受维托拉尔森治疗的受试者(维托拉尔森给药组)和65例CINRG DNHS的自然经历组(DNHS群)中,将13周时和25周时的相对于给药前或基线的时间功能检查[6分钟步行试验(6MWT)、起立时间(TTSTAND)的速度、爬升4级台阶时间(TTCLIMB)的速度、10米跑步/步行时间(TTRW)的速度]和北极星移动评价量表(NSAA)的变化进行了比较。

[0703] 在本实施例中使用的分析方法中,将“给药前值”或基线作为共变量,所述共变量是对结果造成影响的背景因素,使用13周时和25周时的数据作为特定受试者重复测定的值(repeated measures),进行MMRM分析。其结果是,在6分钟步行距离及10米跑步/步行时间的速度方面,本实施例的维托拉尔森给药组有显著改善。另外,在其它全部的运动功能试验中,本剂组也比自然经历的过程有所改善。

[0704] 图8是示出13周给药时(从初次给药起经过12周时)及25周给药时(从初次给药起经过24周时)的维托拉尔森给药组和CINRG自然经历对照组(DNHS)的各运动功能试验结果相对于基线的变化的图表。变化量为从基线起至13周时、25周时的变化量的最小均方(least square mean),误差线为标准误差,P值使用MMRM计算。

[0705] 维托拉尔森给药组和DNHS的各时间点的样品数为以下。

[0706] [表28]

[0707] 表28

[0708]

维托拉尔森给药组	基线	13周时	25周时
6分钟步行试验	16	15	15
北极星移动评价量表	16	15	16
起立时间	16	16	16
爬升4级台阶时间	16	16	16
10米跑步/步行时间	16	16	16

[0709] [表29]

[0710] 表29

[0711]

DNHS	基线	13周时	25周时
6分钟步行试验	21	12	13
北极星移动评价量表	22	11	15
起立时间	65	39	42
爬升4级台阶时间	65	40	42
10米跑步/步行时间	65	40	43

[0712] [实施例10]

[0713] 运动功能试验(至85周时(从初次给药经过84周时))

[0714] (实验方法)

[0715] 在初次给药1周前、以及从初次给药时(1周时)至各经过12周(13、25、37、49、61、73、85周时)的时间点测定了时间功能检查[6分钟步行试验(6MWT)、起立时间(TTSTAND)、爬升4级台阶时间(TTCLIMB)、10米跑步/步行时间(TTRW)]和北极星移动评价量表(NSAA)。201试验由属于CINRG的机构实施,运动功能试验与CINRG的DNHS所使用的标准操作步骤文件(SOP)及临床评价者培训步骤文件一致而进行。基于受试者为儿童、并且对试验实施的兴趣不持续等原因,根据试验,有无法实施的项目。

[0716] (结果)

[0717] 将结果示于图9～图16。在北极星移动评价量表中,维托拉尔森给药组的5岁以上的很多患者保持或提高了得分。根据基于意大利和英国的自然经历数据设置临床试验的患者入选基准、并研究了1、2年后的NSAA得分的变化的文献,外显子53跳读对象治疗患者的1年平均变化量为-4.1分(J Neurol Neurosurg Psychicary 87,149-55,2016)。与文献的入选基准一致的维托拉尔森给药组的患者经过48周时的变化量为+1.3分。在报告了DHNS的结果的文献(Muscle Nerve 48,55-67,2013)中,7岁至9岁的DMD患者中20％丧失起立能力,但在维托拉尔森给药组中没有相应的患者。7岁至9岁的DMD患者中10％无法爬上4级台阶,但在维托拉尔森给药组中没有相应的患者。速度虽然随年龄增加而减慢,但在维托拉尔森给药组中整体观察到速度升高。7岁至9岁的DMD患者中10％丧失独立步行能力,但在NSP中没有相应的患者。另外,10米跑步/步行时间的速度虽然随年龄增加而减慢,但在维托拉尔森给药组中整体观察到速度升高。对于基于WB的抗肌萎缩蛋白定量值的相对于基线的抗肌萎缩蛋白表达量的变化与起立时间试验、爬上4级台阶试验、10m步行/跑步试验的48周时相对于基线的速度变化,利用Excel计算了有无相关性和线性回归方程。关于起立时间试验和10

米跑步/步行试验,在抗肌萎缩蛋白表达量与速度变化方面存在显著的相关关系(P<0.05),表明随着抗肌萎缩蛋白的增加,运动功能的速度变化升高。

[0718] 工业实用性

[0719] 根据本发明,可以提供具有NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的稳定组成的用于迪谢内肌营养不良症治疗的医药组合物。另外,关于包含NS-065/NCNP-01(维托拉尔森)的医药组合物,可以提供起到有效的DMD治疗作用且对人类患者安全的范围的用法/剂量。通过该医药组合物,可以以低副作用有效地减轻迪谢内肌营养不良症的症状。

序列表

<110> 日本新药株式会社

<120> 含有反义寡核苷酸的组合物及其在迪谢内肌营养不良症的治疗中的用途

<130> G2329

<150> US 62/690,270

<151> 2018-06-26

<150> US 62/739,386

<151> 2018-10-01

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 212

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

ttgaaagaat tcagaatcag tgggatgaag tacaagaaca ccttcagaac cggaggcaac 60

agttgaatga aatgttaaag gattcaacac aatggctgga agctaaggaa gaagctgagc 120

aggtcttagg acaggccaga gccaagcttg agtcatggaa ggagggtccc tatacagtag 180

atgcaatcca aaagaaaatc acagaaacca ag 212

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

gaacaccttc agaaccggag g 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成核酸

<400> 3

cctccggttc tgaaggtgtt c 21

<210> 4

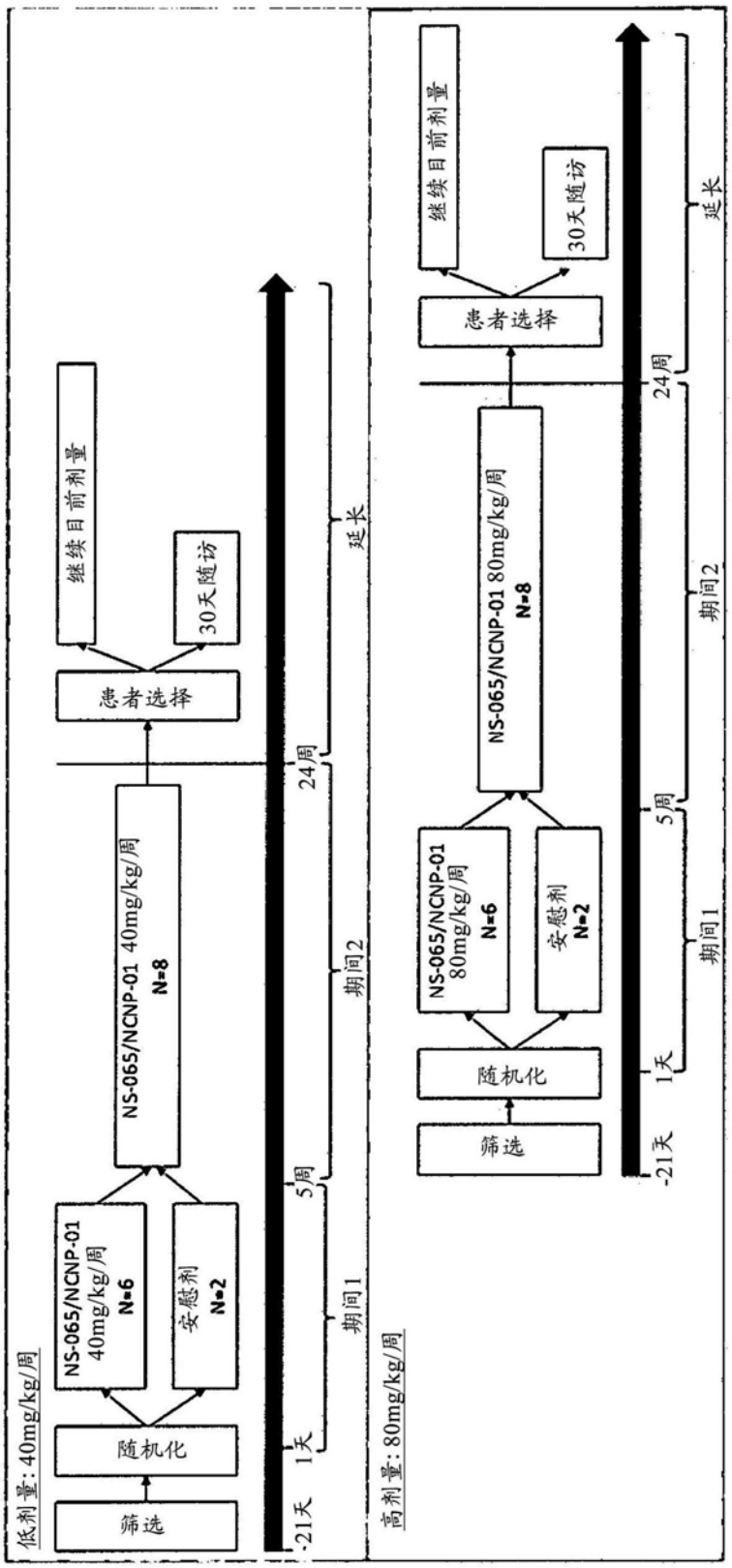
<211> 13

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽
<400> 4
Ile Phe Leu Thr Glu Gln Pro Leu Glu Gly Leu Glu Lys
1 5 10
<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成肽
<400> 5
Val Ala Val Gly Gln Glu Gln Ala Phe Ser Val Asn Thr Arg
1 5 10
<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成肽
<400> 6
Ser Pro Phe Val Val Asn Val Ala Pro Pro Leu Asp Leu Ser Lys
1 5 10 15


低剂量: 40mg/kg/周
高剂量: 80mg/kg/周
筛选
随机化
NS-065/NCNP-01 40mg/kg/周 N=6
安慰剂 N=2
NS-065/NCNP-01 40mg/kg/周 N=8
NS-065/NCNP-01 80mg/kg/周 N=6
安慰剂 N=2
NS-065/NCNP-01 80mg/kg/周 N=8
患者选择
继续目前剂量
30天随访
-21天
1天
5周
24周
期间1
期间2
延长

Mg=毫克；kg=千克

图1

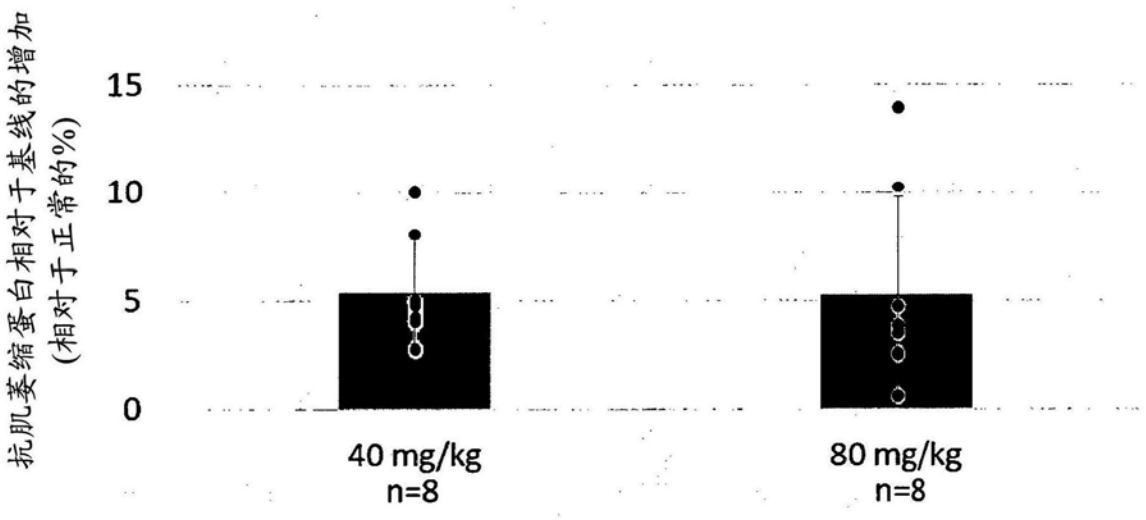
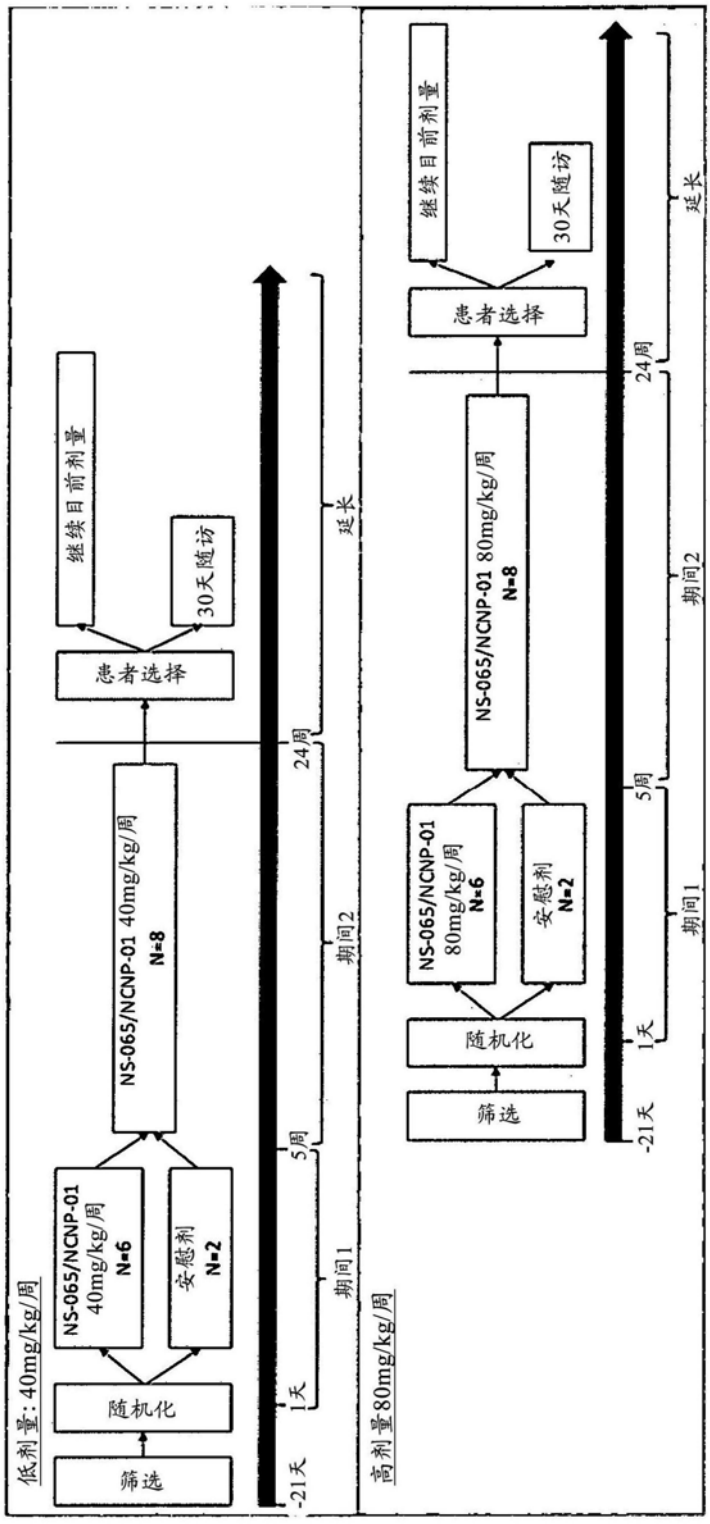
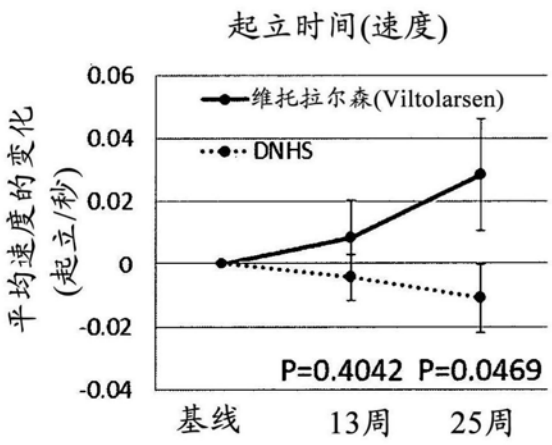


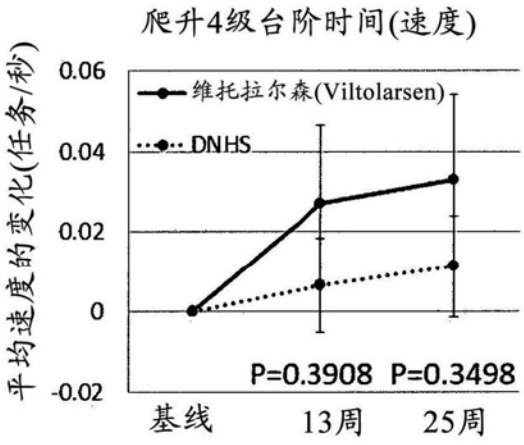
图2

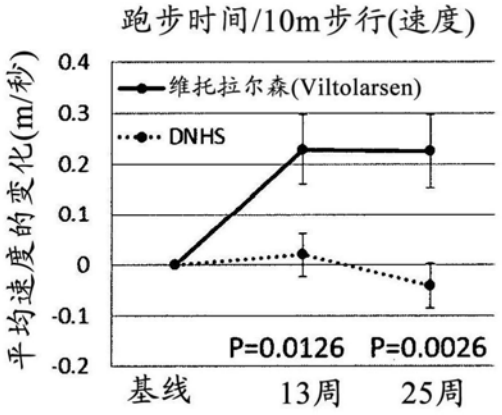

低剂量:40mg/kg/周
筛选
随机化
NS-065/NCNP-01 40mg/kg/周 N=6
安慰剂 N=2
NS-065/NCNP-01 40mg/kg/周 N=8
患者选择
继续目前剂量
30天随访
-21天
1天
5周
24周
期间1
期间2
延长
高剂量80mg/kg/周
筛选
随机化
NS-065/NCNP-01 80mg/kg/周 N=6
安慰剂 N=2
NS-065/NCNP-01 80mg/kg/周 N=8
患者选择
继续目前剂量
30天随访
-21天
1天
5周
24周
期间1
期间2
延长

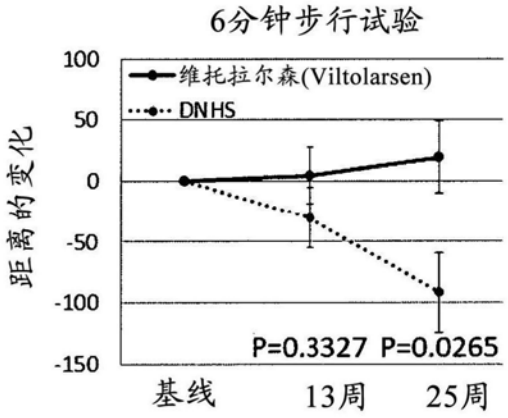
Mg=毫克；kg=千克

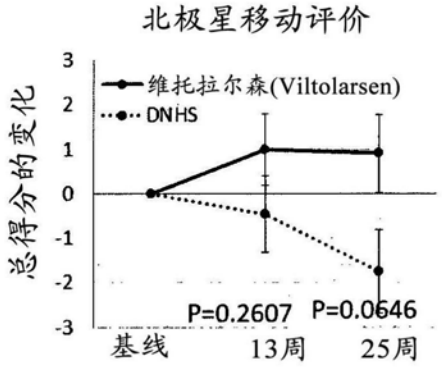
图3











相对于DNHS观察到的样品的大小

	基线	13周	25周
TTSTAND	69	43	46
TTCLIMB	69	44	45
TTRW	69	44	46
6MWT	18	14	11
NSAA	20	13	13

图4

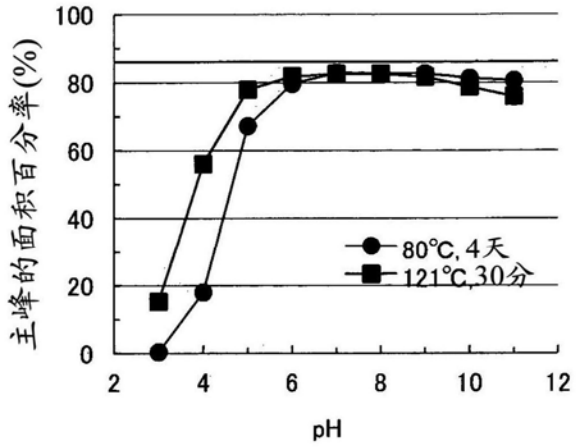

主峰的面积百分率(%)
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
12
pH
80℃,4天
121℃,30分

图5

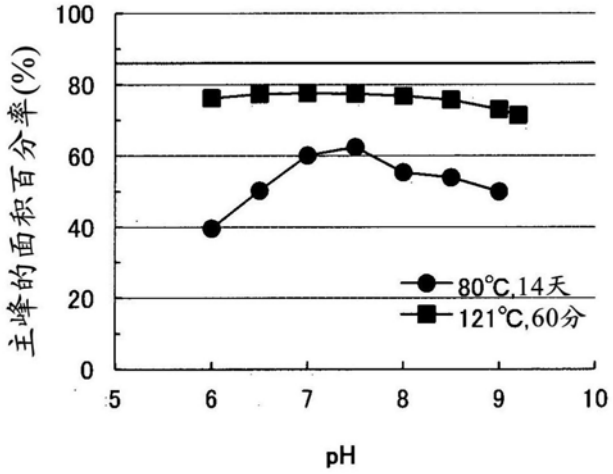

主峰的面积百分率(%)
100
80
60
40
20
0
5
6
7
8
9
10
pH
80℃,14天
121℃,60分

图6

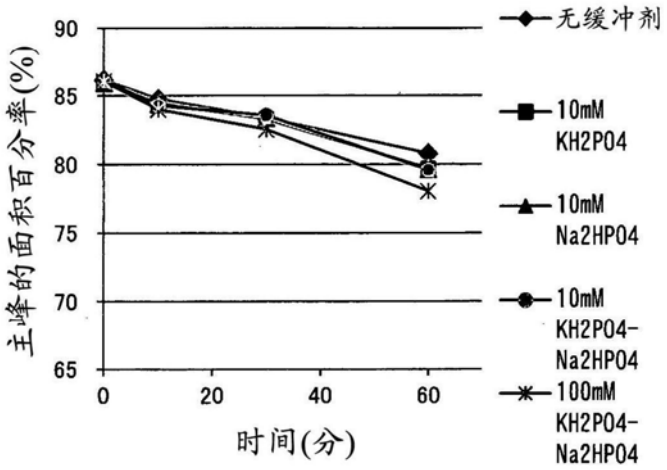
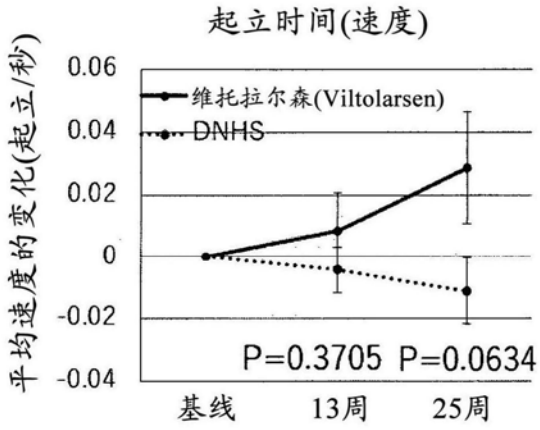
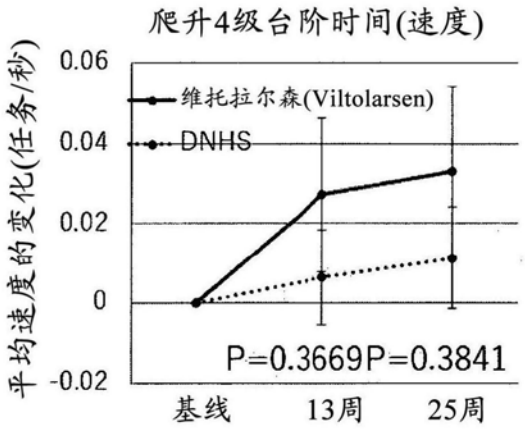
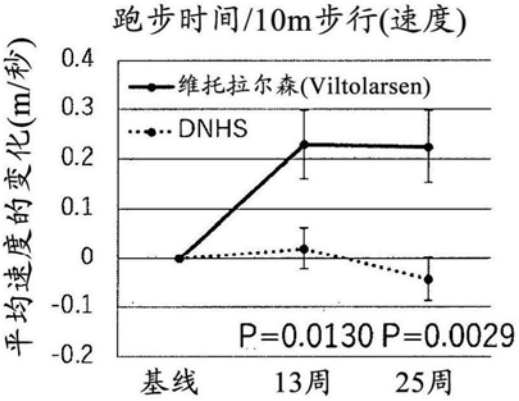
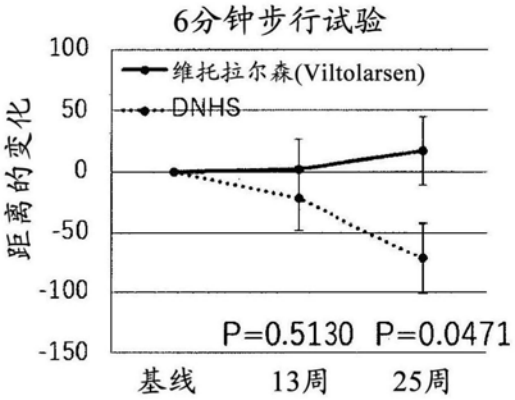

主峰的面积百分率(%)
90
85
80
75
70
65
0
20
40
60
时间(分)
无缓冲剂
10mM KH2PO4
10mM Na2HPO4
10mM KH2PO4-Na2HPO4
100mM KH2PO4-Na2HPO4

图7


起立时间(速度)
平均速度的变化(起立/秒)
0.06
0.04
0.02
0
-0.02
-0.04
维托拉尔森(Viltolarsen)
DNHS
P=0.3705 P=0.0634
基线
13周
25周


爬升4级台阶时间(速度)
平均速度的变化(任务/秒)
0.06
0.04
0.02
0
-0.02
维托拉尔森(Viltolarsen)
DNHS
P=0.3669P=0.3841
基线
13周
25周


跑步时间/10m步行(速度)
平均速度的变化(m/秒)
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
维托拉尔森(Viltolarsen)
DNHS
P=0.0130 P=0.0029
基线
13周
25周


6分钟步行试验
距离的变化
100
50
0
-50
-100
-150
维托拉尔森(Viltolarsen)
DNHS
P=0.5130 P=0.0471
基线
13周
25周

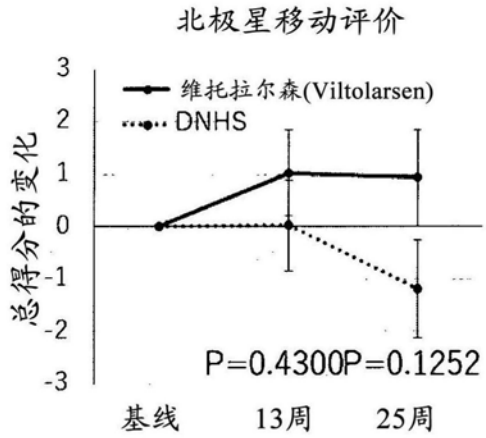

北极星移动评价
总得分的变化
3
2
1
0
-1
-2
-3
维托拉尔森(Viltolarsen)
DNHS
P=0.4300P=0.1252
基线
13周
25周

图8

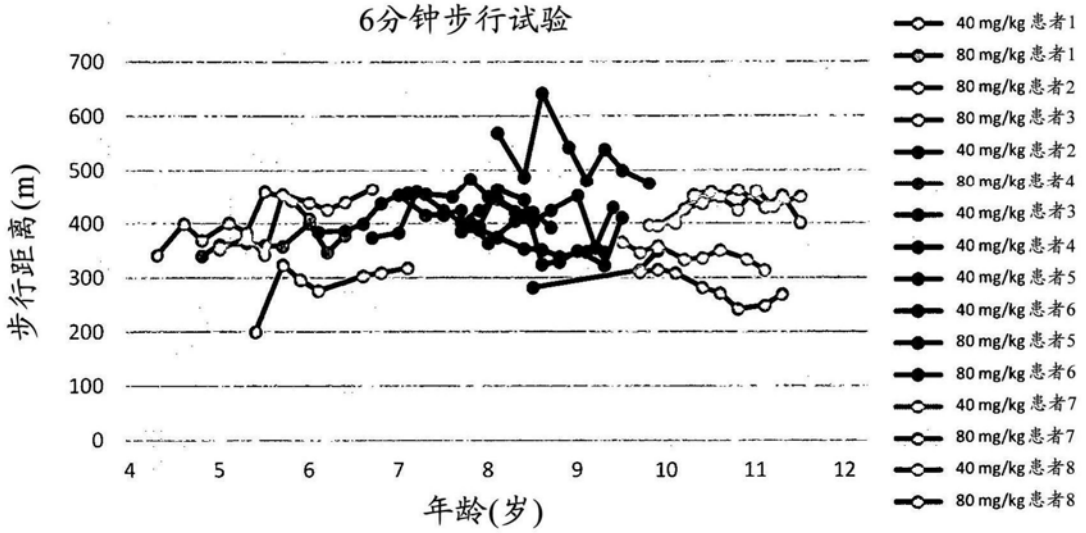

6分钟步行试验
步行距离(m)
700
600
500
400
300
200
100
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
年龄(岁)
40 mg/kg 患者1
80 mg/kg 患者1
80 mg/kg 患者2
80 mg/kg 患者3
40 mg/kg 患者2
80 mg/kg 患者4
40 mg/kg 患者3
40 mg/kg 患者4
40 mg/kg 患者5
40 mg/kg 患者6
80 mg/kg 患者5
80 mg/kg 患者6
40 mg/kg 患者7
80 mg/kg 患者7
40 mg/kg 患者8
80 mg/kg 患者8

图9

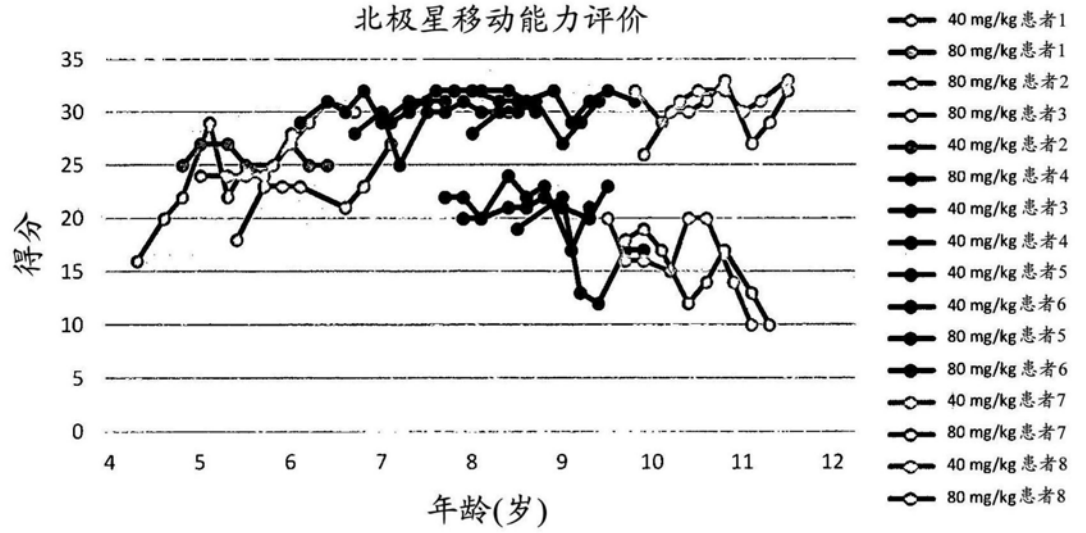

北极星移动能力评价
得分
35
30
25
20
15
10
5
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
年龄(岁)
40 mg/kg 患者1
80 mg/kg 患者1
80 mg/kg 患者2
80 mg/kg 患者3
40 mg/kg 患者2
80 mg/kg 患者4
40 mg/kg 患者3
40 mg/kg 患者4
40 mg/kg 患者5
40 mg/kg 患者6
80 mg/kg 患者5
80 mg/kg 患者6
40 mg/kg 患者7
80 mg/kg 患者7
40 mg/kg 患者8
80 mg/kg 患者8

图10

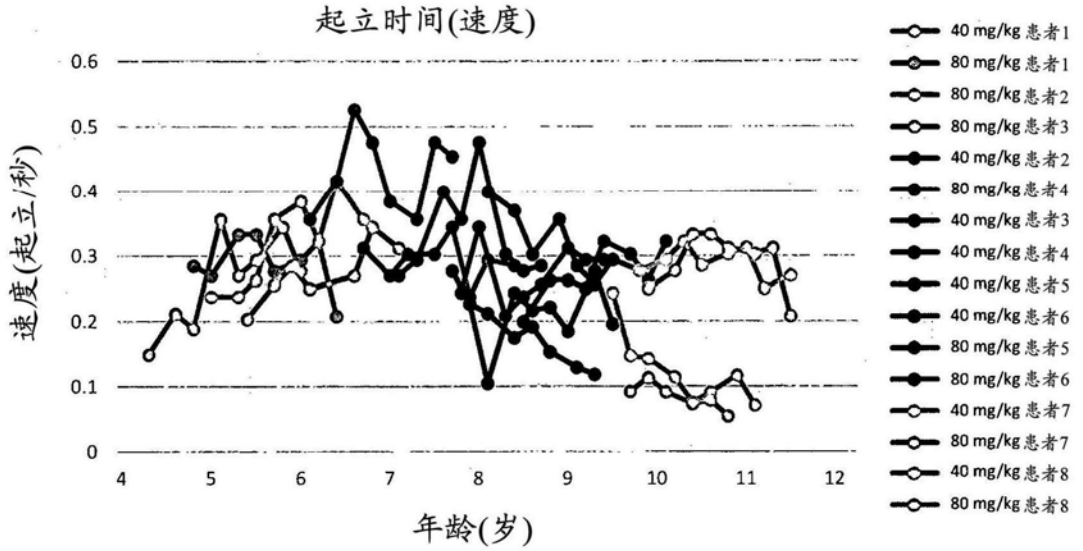

起立时间(速度)
速度(起立/秒)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
年龄(岁)
40 mg/kg 患者1
80 mg/kg 患者1
80 mg/kg 患者2
80 mg/kg 患者3
40 mg/kg 患者2
80 mg/kg 患者4
40 mg/kg 患者3
40 mg/kg 患者4
40 mg/kg 患者5
40 mg/kg 患者6
80 mg/kg 患者5
80 mg/kg 患者6
40 mg/kg 患者7
80 mg/kg 患者7
40 mg/kg 患者8
80 mg/kg 患者8

图11

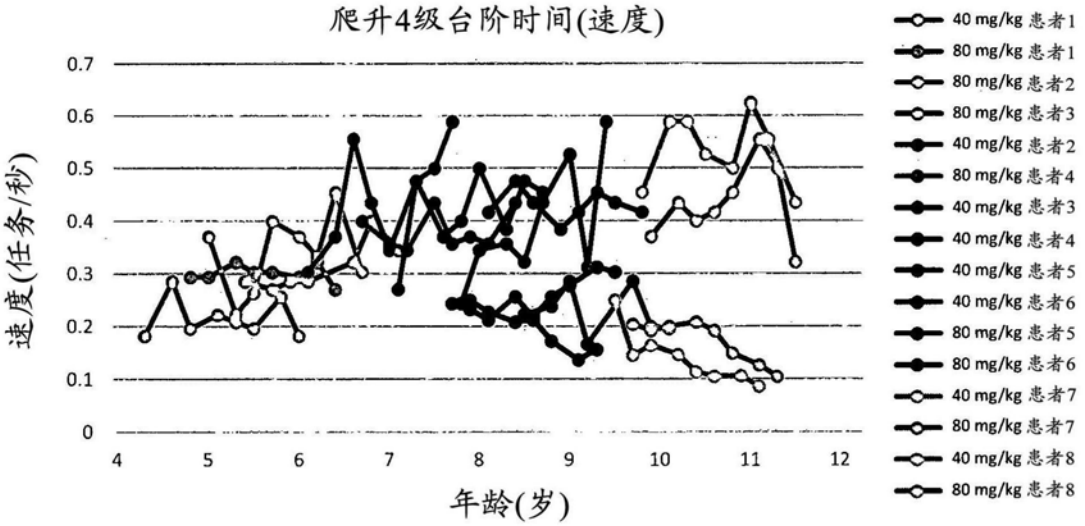

爬升4级台阶时间(速度)
速度(任务/秒)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
4
5
6
7
8
9
10
11
12
年龄(岁)
40 mg/kg 患者1
80 mg/kg 患者1
80 mg/kg 患者2
80 mg/kg 患者3
40 mg/kg 患者2
80 mg/kg 患者4
40 mg/kg 患者3
40 mg/kg 患者4
40 mg/kg 患者5
40 mg/kg 患者6
80 mg/kg 患者5
80 mg/kg 患者6
40 mg/kg 患者7
80 mg/kg 患者7
40 mg/kg 患者8
80 mg/kg 患者8

图12

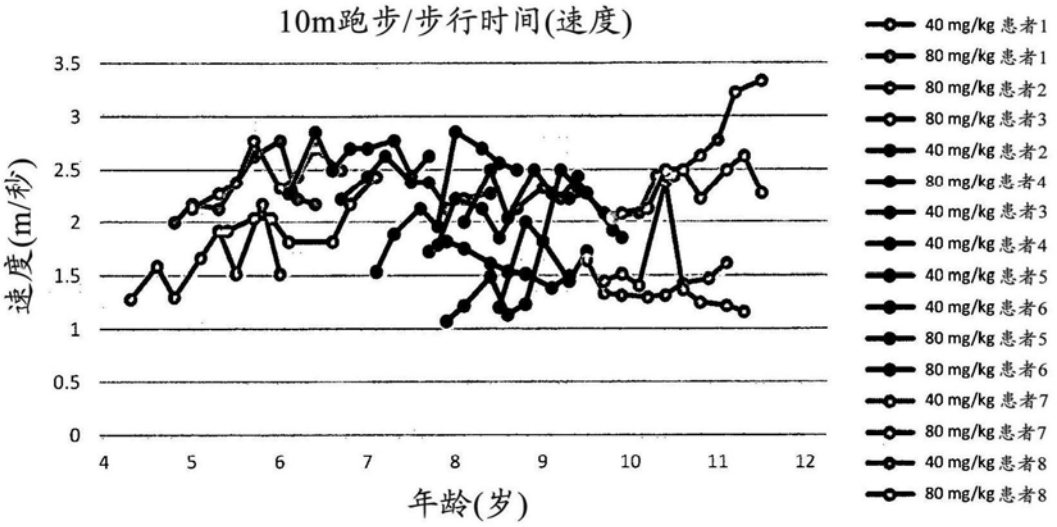

10m跑步/步行时间(速度)
速度(m/秒)
年龄(岁)
40 mg/kg 患者1
80 mg/kg 患者1
80 mg/kg 患者2
80 mg/kg 患者3
40 mg/kg 患者2
80 mg/kg 患者4
40 mg/kg 患者3
40 mg/kg 患者4
40 mg/kg 患者5
40 mg/kg 患者6
80 mg/kg 患者5
80 mg/kg 患者6
40 mg/kg 患者7
80 mg/kg 患者7
40 mg/kg 患者8
80 mg/kg 患者8

图13

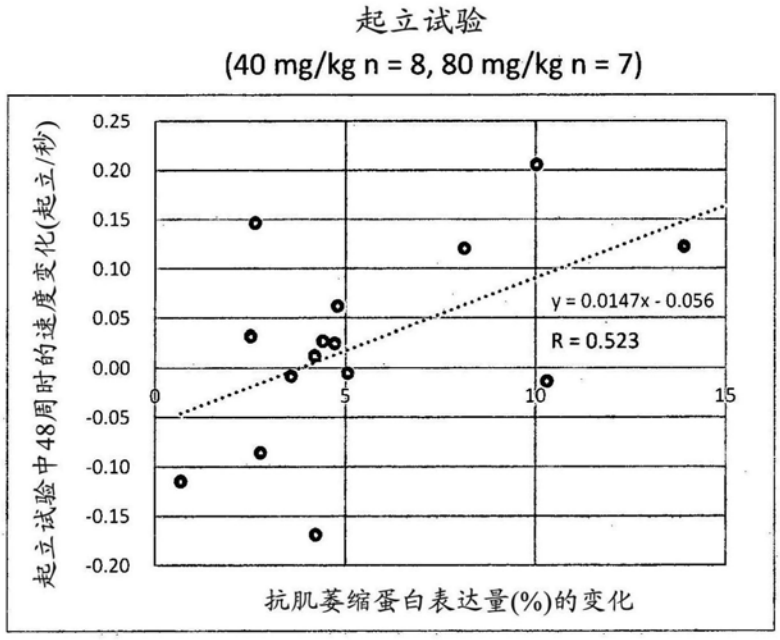

起立试验
(40 mg/kg n = 8, 80 mg/kg n = 7)
起立试验中48周时的速度变化(起立/秒)
y = 0.0147x - 0.056
R = 0.523
抗肌萎缩蛋白表达量(%)的变化

图14

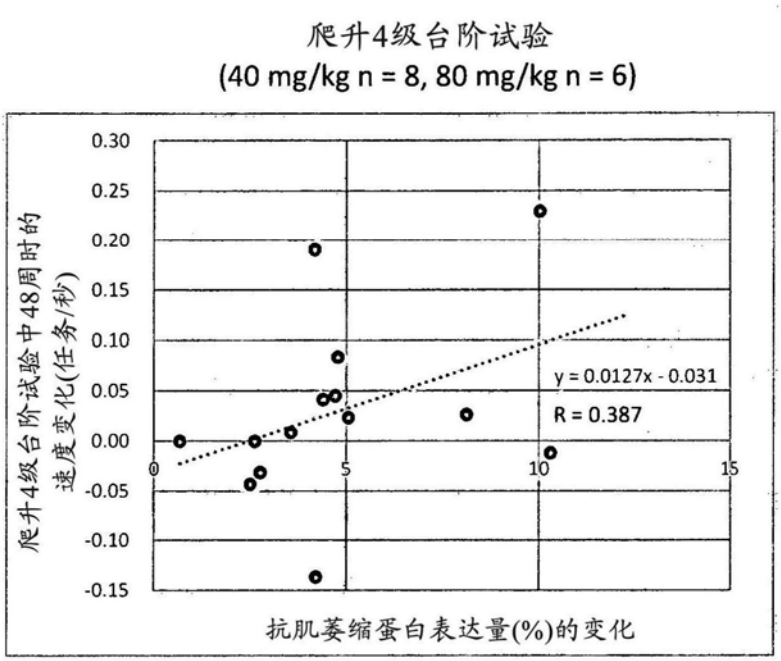

爬升4级台阶试验
(40 mg/kg n = 8, 80 mg/kg n = 6)
爬升4级台阶试验中48周时的速度变化(任务/秒)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
-0.10
-0.15
0
5
10
15
y = 0.0127x - 0.031
R = 0.387
抗肌萎缩蛋白表达量(%)的变化

图15

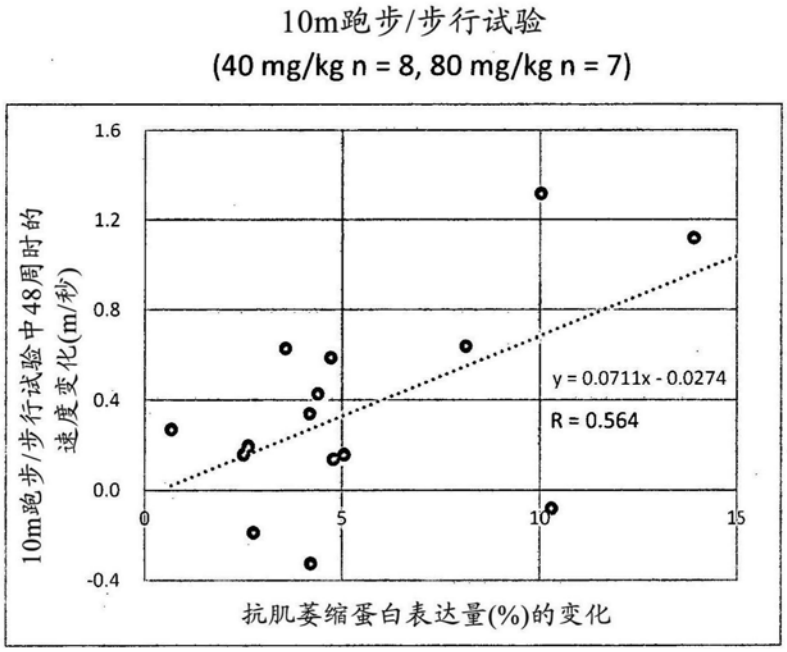

10m跑步/步行试验
(40 mg/kg n = 8, 80 mg/kg n = 7)
10m跑步/步行试验中48周时的速度变化(m/秒)
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
-0.4
0
5
10
15
y = 0.0711x - 0.0274
R = 0.564
抗肌萎缩蛋白表达量(%)的变化

图16