

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-515011
(P2025-515011A)

(43)公表日 令和7年5月13日(2025.5.13)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	4 C 0 8 4	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	4 C 0 8 6	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全47頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-564553(P2024-564553)	(71)出願人	506136483		
(86)(22)出願日	令和5年5月3日(2023.5.3)		バイオマリン ファーマシューティカル		
(85)翻訳文提出日	令和6年11月6日(2024.11.6)		インコーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2023/066540		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4		
(87)国際公開番号	WO2023/215781		9 4 9 ノバト デジタル ドライブ 1		
(87)国際公開日	令和5年11月9日(2023.11.9)		0 5		
(31)優先権主張番号	63/364,260	(74)代理人	100107456		
(32)優先日	令和4年5月5日(2022.5.5)		弁理士 池田 成人		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100162352		
(31)優先権主張番号	63/387,733		弁理士 酒巻 順一郎		
(32)優先日	令和4年12月16日(2022.12.16)	(74)代理人	100123995		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 野田 雅一		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	(72)発明者	オニール, チャールズ エー.		
	最終頁に続く		アメリカ合衆国, カリフォルニア州,		
			ノバト, デジタル ドライブ 1 0 5 ,		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 デュシェンヌ型筋ジストロフィーを治療する方法

(57)【要約】
本明細書では、修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用してデュシェンヌ型筋ジストロフィーを治療するかまたはデュシェンヌ型筋ジストロフィーの発症を遅延させる方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DMDを有する対象を治療するかまたは対象におけるDMDの発症を遅延させる方法であって、前記対象に、AON1を0.4mg/kg、0.6mg/kg、0.8mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、9mg/kg、12mg/kg、または18mg/kgの用量で投与することを含み、前記AON1が、QW投与される、前記方法。

【請求項 2】

前記AON1が、QW×15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35W投与される、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記AON1が、QW×24WまたはQW×25W投与される、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記AON1が、QW×25W投与される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記AON1が、QW×24W投与される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記AON1が、3mg/kgの用量で投与される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記AON1が、6mg/kgの用量で投与される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記AON1が、9mg/kgの用量で投与される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

前記AON1が、12mg/kgの用量で投与される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記AON1が、18mg/kgの用量で投与される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

対象におけるDMDを治療する方法である、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

対象におけるDMDの発症を遅延させる方法である、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記対象に第2の活性剤を投与することをさらに含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

前記第2の活性剤が、エテプリルセン、カシメルセン、ゴロジルセン、ビルトラルセン、SRP-5051 (Sarepta Therapeutics)、デフラザコルトのようなコルチコステロイド、遺伝子治療剤 (例えば、SRP-9001、GALGT2、またはGNT0004 (Sarepta Therapeutics))、遺伝子編集 (例えば、CRISPR/CAS9 (Sarepta Therapeutics))、ま

50

たは細胞療法剤（例えば、CAP-1002（Capricor Therapeutics／Nippon Shinyaku Co. Ltd.））である、請求項13に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年5月5日に出願された、米国仮特許出願第63／364260号、及び2022年12月16日に出願された同第63／387,733号の優先権利益を主張する。上記の参照出願の各々の開示は、参照することによって全体が本明細書において援用される。

10

【0002】

配列表

本出願は、XMLファイルとして本明細書とともに提出される配列表を含み、当該配列表は、「035105WO.xml」という名称で、2023年4月26日に作成され、サイズは11,646バイトであり、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0003】

本明細書では、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）を治療するかまたはDMDの発症を遅延させる方法が提供される。一実施形態では、方法は、DMDを有する対象への修飾オリゴヌクレオチドの投与を含む。

20

【背景技術】

【0004】

アンチセンスオリゴヌクレオチド（AON）は、がん、炎症状態、心血管疾患ならびに神経変性及び神経筋障害を含む、多くの疾患及び状態に対して（前）臨床開発がなされている。それらの作用機序は、様々な標的、例えば、核もしくは細胞質におけるRNase Hを介した標的RNAの分解、核におけるスプライス調節（エクソンインクルージョンまたはスキッピング）、または細胞質におけるリボソームサブユニット結合の立体障害による翻訳阻害を目的としている。スプライス調節またはスプライススイッチングAONは、ヒトβ-グロビンpre-mRNAにおける異常スプライシングの修正に関して初めて記載されており（Dominski and Kole PNAS, 1993, 90（18）：8673-8677）、現在、種々の遺伝子疾患のために研究されている。

30

【0005】

AONは、神経筋疾患障害であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）及びベッカー型筋ジストロフィー（BMD）の治療において、広く研究されている。デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）及びベッカー型筋ジストロフィー（BMD）は、筋ジストロフィーのなかでも最も一般的な小児型である。DMDは、12歳までに車椅子補助が不可欠となる重症で致死的な神経筋障害であり、患者は、多くの場合、呼吸不全または心不全により30歳前に死亡する。DMDは、2.24Mbのジストロフィン遺伝子における1つ以上のエクソンのリーディングフレームシフトによる欠失（約67%）もしくは重複（約7%）、または点変異（約25%）によって引き起こされ、それにより、機能性ジストロフィンが欠如する。BMDもまたジストロフィン遺伝子の変異によって生じるが、オープンリーディングフレームは維持されており、半機能性ジストロフィンタンパク質が生成されることから、典型的にかなり軽度の表現型となり、生存時間もより長くなる。

40

【0006】

現在まで、エテプリルセン、ゴロジルセン、カシメルセン及びビルトラルセンの4つのAONがDMDの治療のために認可されている。しかしながら、これらの薬物は限られた有効性を有しており、それぞれ、ごく一部のDMD患者のみを治療するために認可されている。

【0007】

したがって、DMDを治療するための方法が継続的に必要とされている。

50

【発明の概要】

【0008】

本明細書では、DMDを有する対象に修飾オリゴヌクレオチドを投与することによって、DMDを治療するかまたはDMDの発症を遅延させる方法が提供される。一実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)である。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】経時的なAON1の血漿濃度を示す。

【図2】心臓、四頭筋、肝臓、横隔膜、腓腹筋、及び腎臓組織におけるAON1濃度を示す。

【図3】AON1が、25週間の治療により、筋組織（四頭筋、腓腹筋、心臓及び横隔膜）において持続的な用量依存的なエクソン51のスキッピングを達成したことを示す。

【図4】心臓及び四頭筋のジストロフィンの重量%を示し、AON1で治療されたマウスの総歩行スコアを示す。

【図5】AON1治療が、hDMD del52(+ / +)モデルに随伴する筋肉病変を減弱し、25週間の投与後12週間薬理学的効果を維持することを示す。

【図6】AON1治療が、hDMD del52(+ / +)モデルに随伴する心臓病変を減弱し、薬理学的効果を12週間持続することを示す。

【図7】QW、Q2WまたはQ4W投与後、14日（塗りつぶしの丸印）、または28日（白抜きの丸印）におけるチオリン酸基によってオリゴヌクレオチドに連結されたTEGを有するAON1（AON1 PS、9.4、18.7、または37.5 mg / kg）で治療したhDMD Δ52 / mdxマウスの心臓及び四頭筋のジストロフィン発現を示す。

【図8】QW、Q2WまたはQ4W投与後、14日（塗りつぶしの丸印）、または28日（白抜きの丸印）におけるAON1 PS（9.4、18.7、または37.5 mg / kg）で治療されたhDMD Δ52 / mdxマウスの心臓におけるエクソン51のスキッピング%を示す。

【図9】投与後4週間及び8週間における18.7 mg / kgのAON1（13週QW）で治療したhDMD Δ52 / mdxマウスの四頭筋、腓腹筋、心臓及び横隔膜におけるエクソン51のスキッピング%を示す。

【図10】QW x 13W投与後4週間または8週間におけるAON1（18.7 mg / kg）で治療されたhDMD Δ52 / mdxマウスの心臓及び四頭筋におけるジストロフィン発現を示す。

【図11】AON1で治療されたマウスの総歩行スコアを示す。

【図12】AON1 PS及びAON2（5'-TEG基を有さないAON1）のヒト及びサル血清中の補体パラメータBbへの影響を示す。

【図13】AON1 PS及びAON2のヒト及びサルの血清中の補体パラメータC3aへの影響を示す。

【図14】AON1で39週間治療したNHPでの二頭筋、腓腹筋及び心臓組織におけるエクソンスキッピングを示す（実施例8）。

【発明を実施するための形態】

【0010】

I. 定義

本明細書に記載される開示の理解を促すために、いくつかの用語を以下に定義する。

【0011】

別段の定義がない限り、本明細書中で使用する全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。全ての特許、出願、公開出願及び他の刊行物は、その全体が参照により援用される。本明細書の用語に複数の定義がある場合、特に明記しない限り、本節における定義が優先される。

【0012】

文脈による明確な別段の定めがない限り、単数形「a」、「an」、及び「the」に

10

20

30

40

50

は複数の指示対象が含まれる。

【0013】

本明細書で使用される場合、「対象」とは、患者などのヒトを含む哺乳動物などの動物である。

【0014】

本明細書で使用される場合、生物学的活性とは、化合物の *in vivo* 活性、または化合物、組成物、または他の混合物の *in vitro* 投与時に生じる生理学的応答を指す。したがって、生物学的活性は、そのような化合物、組成物、及び混合物の治療効果及び薬物動態学的挙動を包含する。生物学的活性は、そのような活性を検査するように設計された *in vitro* システムでも観察される場合がある。

10

【0015】

本明細書で使用される場合、治療とは、疾患または障害の症状の1つ以上が緩和されるか、別様に有益に変化する任意の方法を意味する。治療はまた、DMDを治療するための使用のような、本明細書の組成物の任意の医薬的使用も包含する。

【0016】

本明細書で使用される場合、特定の化合物または医薬組成物の投与による、特定の障害の症状の緩和とは、持続的または一時的であるか、永続的または一過性なものであるかにかかわらず、該化合物または医薬組成物の投与によるものであるか、それらの投与が関与している可能性のあるなんらかの軽減を意味する。

20

【0017】

本明細書で使用される場合、別段の指示がない限り、「管理する」、「管理すること」及び「管理」という用語は、すでに疾患または障害に罹っている対象における特定疾患または障害の再発を防ぐこと、及び／またはその疾患または障害に罹っている対象が寛解期である時間を延ばすことを包含する。この用語は、疾患または障害の閾値、発症、及び／または持続時間を調整すること、あるいは、疾患または障害に対する患者の応答を変えることを包含する。

【0018】

II. 本明細書で提供される方法において使用するためのAON

一実施形態において、本明細書で提供される方法において使用するためのAONは、ヒトジストロフィン *pre-mRNA* のエクソン51の一部に対して逆相補的である。別の実施形態では、本明細書で提供される方法において使用するためのAONは、配列5' - *g g u a a g u u c u g u c c a a g c* - 3' (配列番号1)を有し、修飾を含有する。別の実施形態では、本明細書で提供される方法において使用するためのAONは、配列

30

【化1】

5' - *g g u a a g u u c * u g u c * c * a a g c* - 3' (配列番号2)

を有し、式中、*c**は、5-メチルシトシンならびに

【化2】

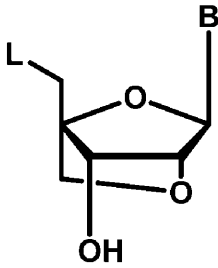
g 及び *c**

40

は、LNAヌクレオチドである。本明細書で使用される場合、LNAヌクレオチドは、以下の構造：

50

【化 3】

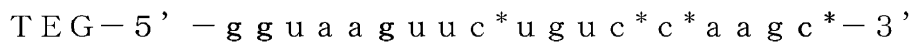


10

式中、Bは、核酸塩基であり、Lは、別のヌクレオチドへのリン酸塩またはホスホロチオエート結合である。

【0019】

別の実施形態では、本明細書で提供される方法において使用するためのAONは、配列【化4】



を有し、式中、c*は5-メチルシトシン、

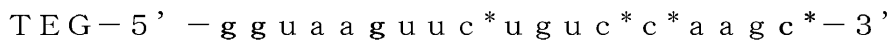
【化5】

20

g及びc*

は、LNAヌクレオチドであり、及びTEGは、トリエチレングリコール基である。別の実施形態では、本明細書で提供される方法において使用するためのAONは、配列【化6】

【化6】



を有し、式中、c*は、5-メチルシトシン、

【化7】

30

g及びc*

は、LNAヌクレオチドであり、TEGはリン酸基を介して5'末端に結合したトリエチレングリコール基であり、ヌクレオチド間結合はホスホロチオエート結合であり、非LNAヌクレオチドは2'-OMeヌクレオチド（本明細書では「AON1」と称される）である。WO2022/069511A1及びUS2022/0098586A1を参照されたい。

【0020】

40

III. DMDを治療する方法

本明細書では、DMDを有する対象に修飾オリゴヌクレオチドを投与することによって、DMDを治療するかまたはDMDの発症を遅延させる方法が提供される。一実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチド（AON）である。別の実施形態では、AONは、本明細書で開示されるAONである。別の実施形態では、AONは、AON1である。別の実施形態では、DMDを有する対象にAON1を投与することによってDMDを治療する方法が提供される。別の実施形態では、DMDを有する対象にAON1を投与することによってDMDの発症を遅延させる方法が提供される。

【0021】

ある特定の実施形態では、AONは、0.4mg/kg、0.6mg/kg、0.8mg/kg、

50

g / k g、1.5 m g / k g、3 m g / k g、6 m g / k g、9 m g / k g、12 m g / k g または 18 m g / k g の用量で投与される。別の実施形態では、A O N は、Q W 投与される。別の実施形態では、A O N は、Q W x 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または 35 W 投与される。別の実施形態では、A O N は、Q W x 24 W または Q W x 25 W 投与される。別の実施形態では、A O N は、Q W x 25 W 投与される。別の実施形態では、A O N は、Q W x 24 W 投与される。

【0022】

ある特定の実施形態では、A O N 1 は、0.4 m g / k g、0.6 m g / k g、0.8 m g / k g、1.5 m g / k g、3 m g / k g、6 m g / k g、9 m g / k g、12 m g / k g または 18 m g / k g の用量で投与される。別の実施形態では、A O N 1 は、Q W 投与される。別の実施形態では、A O N 1 は、Q W x 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または 35 W 投与される。別の実施形態では、A O N 1 は、Q W x 24 W または Q W x 25 W 投与される。別の実施形態では、A O N 1 は、Q W x 25 W 投与される。別の実施形態では、A O N 1 は、Q W x 24 W 投与される。

【0023】

別の実施形態では、A O N 1 は、6 m g / k g を Q W x 25 W 投与される。別の実施形態では、A O N 1 は、18 m g / k g を Q W x 25 W 投与される。

【0024】

別の実施形態では、A O N 1 を 6 m g / k g、Q W x 24 W で投与することによって D M D を治療する方法が提供される。別の実施形態では、A O N 1 を 18 m g / k g、Q W x 24 W で投与することによって D M D を治療する方法が提供される。別の実施形態では、A O N 1 を 6 m g / k g、Q W x 24 W で投与することによって D M D の発症を遅延させる方法が提供される。別の実施形態では、A O N 1 を 18 m g / k g、Q W x 24 W で投与することによって D M D の発症を遅延させる方法が提供される。

【0025】

特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、D M D を治療するかまたは D M D の発症を遅延させる従来の方法と比較して優れた転帰をもたらす。一実施形態では、本明細書で提供される方法は、関連疾患の修飾バイオマーカーにおいて正規化に向けた変化を誘発する。別の実施形態では、本明細書で提供される方法は、疾患関連の臨床的及び解剖学的筋病変における正規化に向けた変化を誘発する。別の実施形態では、本明細書で提供される方法は、M o t o R a t e r / 歩行スコアで測定した場合に、部分的からほぼ完全な D M D 表現型のレスキューを行う。別の実施形態では、本明細書で提供される方法は、ジストロフィン産生を増加させる。別の実施形態では、本明細書で提供される方法は、ヒトジストロフィン p r e - m R N A のエクソン 51 のスキッピングを増加させる。別の実施形態では、方法は、D M D の 1 つ以上の症状を緩和する。

【0026】

本明細書に記載される A O N を使用した個体における D M D の 1 つ以上の症状の緩和は、次のアッセイのいずれかによって評価され得る：歩行不能までの時間の延長、筋力の改善、重量物を持ち上げる能力の改善、仰臥位から起立までに要する時間の改善、9メートル歩行時間の改善、階段4段を上げるために要する時間の改善、脚機能グレードの改善、肺機能の改善、心機能の改善、生活の質の改善。これらのアッセイのそれぞれは、当業者に知られている。これらのアッセイのそれぞれについて、アッセイで測定されたパラメータの検出可能な改善または延長が認められたら、それは、本明細書で提供される A O N を使用して個体における D M D の 1 つ以上の症状が緩和されたことを意味する。検出可能な改善または延長は、一実施形態において H o d g e t t s e t a l . (N e u r o m u s c u l a r D i s o r d e r s 2006 ; 16 : 591 - 602) に記載されているような統計的に有意な改善または延長である。あるいは、D M D の 1 つ以上の症状の緩和は、筋線維の機能、完全性及び／または生存の改善を測定することによって評価され

10

20

30

40

50

得る。別の実施形態では、DMD患者の1つ以上の症状が緩和され、及び／またはDMD患者の1つ以上の筋細胞の1つ以上の特徴が改善される。そのような症状または特徴は、細胞、組織レベルまたは患者自身で評価され得る。

【0027】

患者由来の筋細胞の1つ以上の特徴の緩和は、患者由来の筋原細胞または筋細胞に対する次の試験のいずれかによって評価され得る：筋細胞によるカルシウム取り込みの減少、コラーゲン合成の減少、モルホロジーの変化、脂質生合成の変化、酸化ストレスの低下、及び／またはimproved筋線維の機能、完全性、及び／または生存の改善。これらのパラメータは、通常、筋生検の断面の免疫蛍光法及び／または組織化学的分析を使用して評価される。

10

【0028】

筋線維の機能、完全性及び／または生存の改善は、次の試験のうちの少なくとも1つを使用して評価され得る：血中のクレアチンキナーゼの検出可能な減少、ジストロフィーであると疑われる筋肉の生検断面における筋線維の壊死の検出可能な減少、及び／またはジストロフィーであると疑われる筋肉の生検断面における筋線維の直径の均一性の検出可能な増加。これらのアッセイのそれぞれは、当業者に知られている。

【0029】

クレアチンキナーゼキナーゼは、Hodgetts et al. (2006)に記載されているように血中で検出され得る。クレアチンキナーゼの検出可能な減少は、治療前の同じDMD患者におけるクレアチンキナーゼの濃度と比較して、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上の減少を意味し得る。

20

【0030】

筋線維の壊死の検出可能な減少は、一般的に筋生検で、Hodgetts et al. (2006)に記載されるように生検断面を使用して、評価する。壊死の検出可能な減少は、生検断面を使用して壊死が特定された面積の5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上の減少であり得る。この減少は、治療前の同じDMD患者で評価された壊死との比較によって測定される。

【0031】

筋線維の直径の均一性の検出可能な増加は、一般的に筋生検断面において、Hodgetts et al. (上記を参照)に記載されているように評価する。この増加は、治療前の同じDMD患者における、筋線維の直径の均一性との比較によって測定される。

30

【0032】

一実施形態において、本明細書で提供されるヒドロキシアルコキシル化AONは、当該個体に機能性または半機能性ジストロフィンタンパク質を提供し、当該個体における異常なジストロフィンタンパク質の生成を少なくとも部分的に減少させることができる。

【0033】

一実施形態において、個体に機能性または半機能性ジストロフィンタンパク質を提供するとは、機能性または半機能性ジストロフィンタンパク質の生成の増加を意味する。機能性もしくは半機能性ジストロフィンmRNAまたは機能性もしくは半機能性ジストロフィンタンパク質の生成の増加とは、機能性もしくは半機能性mRNA、または機能性もしくは半機能性ジストロフィンタンパク質の初期量と比較して、検出可能な増加または少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、160%、180%、200%以上を意味し、RTデジタルドロップレットPCR (mRNA) (Verheul et al., PLoS ONE 2016, 11 (9): e0162467) または免疫蛍光 (Beekman et al., PLoS ONE 2014; 9 (9): e107494)、ウェスタンブロット、またはキャピラリーウェスタンイムノアッセイ (Beekman et al., PLoS ONE 2018; 13 (4): e0195850) 分析 (タンパク質) によって検出可能である。別の実施形態では、当該初期量は、本明細書に記載される化合

40

50

物を使用して細胞、器官、組織及び／または個体においてジストロフィン *pre-mRNA* のエクソスキッピングの誘導を開始したときの機能性もしくは半機能性 *mRNA* または機能性もしくは半機能性ジストロフィンタンパク質の量である。

【0034】

異常なジストロフィン *mRNA* または異常なジストロフィンタンパク質の生成の低下は、異常なジストロフィン *mRNA* または異常なジストロフィンタンパク質の初期量の 90 %、80 %、70 %、60 %、50 %、40 %、30 %、20 %、10 %、5 % 以下が、RT デジタルドロップレット PCR (*mRNA*) または免疫蛍光、ウェスタンブロット、またはキャピラリーウェスタンイムノアッセイ (We s) 分析 (タンパク質) によってまだ検出可能であることを意味する。一実施形態において、当該初期量は本明細書に記載されるヒドロキシル化 AON を使用して細胞、器官、組織及び／または個体においてジストロフィン *pre-mRNA* のエクソスキッピングの誘導を開始したときの異常なジストロフィン *mRNA* または異常なジストロフィンタンパク質の量である。異常なジストロフィン *mRNA* またはタンパク質は、本明細書において、低機能性 (本明細書に先に定義されるように野生型機能性ジストロフィンタンパク質と比較して) または非機能性ジストロフィン *mRNA* またはタンパク質とも称される。非機能性ジストロフィンタンパク質は、アクチン及び／または DGC タンパク質複合体のメンバーに結合することができないジストロフィンタンパク質である。非機能性ジストロフィンタンパク質またはジストロフィン *mRNA* は、インタクトなタンパク質の C 末端を含むジストロフィンタンパク質を典型的に有しないか、またはそれをコードしていない。機能性または半機能性ジストロフィン *mRNA* またはタンパク質の検出は、異常なジストロフィン *mRNA* またはタンパク質と同様に行うことができる。

【0035】

機能性または半機能性ジストロフィンタンパク質が DMD 患者に提供されると、DMD の原因の少なくとも一部は取り除かれる。したがって、DMD の症状が少なくとも部分的に緩和されることまたは症状が悪化する速度が低下して衰退が遅くなることが期待される。スキッピング頻度の向上はまた、DMD 個体の筋細胞で産生される機能性または半機能性ジストロフィンタンパク質のレベルを上昇させる。

【0036】

IV. 方法において使用するための医薬組成物

本明細書で提供される医薬組成物は、治療上有効な量の 1 つ以上の本明細書で提供される AON 及び薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む。

【0037】

AON は、好適な薬学的調製物、例えば、溶液、懸濁液、散剤、眼投与または非経口投与のための滅菌溶液または懸濁液、ならびに経皮パッチ調製物に製剤化され得る。典型的に、本明細書に記載の AON は、当技術分野で既知の技法及び手順を使用して医薬組成物へと製剤化される (例えば、Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Seventh Edition 1999 を参照されたい)。

【0038】

組成物において、有効な濃度の 1 つ以上の化合物または薬学的に許容される塩は、好適な薬学的担体またはビヒクルと混合される。ある特定の実施形態では、組成物中の AON の濃度は、投与時に、本明細書で開示される疾患または障害の症状及び／または進行のうちの 1 つ以上を治療、予防、または緩和する量の送達に有効な濃度である。

【0039】

典型的には、組成物は、単回投薬量投与向けに製剤化される。組成物を製剤化するために、化合物の重量画分が、治療される病態が軽減または緩和されるような有効な濃度で、選択されたビヒクル中で、溶解、懸濁、分散または他の方法で混合される。本明細書で提供される AON の投与に好適な薬学的担体またはビヒクルには、特定の投与様式に好適であることが当業者に既知の任意の担体が含まれる。

【0040】

加えて、AONは、組成物中の唯一の薬学的活性成分として製剤化され得るか、または他の活性成分と組み合わせられ得る。組織標的化リポソームを含むリポソーム懸濁液も、薬学的に許容される担体として好適であり得る。これらは、当業者に既知の方法に従って調製され得る。例えば、リポソーム製剤は、当技術分野で既知のように調製され得る。簡単に言えば、多重層膜ベシクル（MLV）などのリポソームは、フラスコの内部で卵ホスファチジルコリン及び脳ホスファチジルセリン（7：3モル比）を乾燥させることによって形成され得る。二価陽イオンを欠くリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の本明細書で提供される化合物の溶液を添加し、脂質フィルムが分散するまでフラスコを振盪する。得られた小胞を洗浄して、カプセル化されていない化合物を除去し、遠心分離によってペレット化し、その後、PBS中に再懸濁する。

10

【0041】

活性化合物は、望ましくない副作用がない状態で治療される対象に治療上有用な効果を与えるのに十分な量で、薬学的に許容される担体中に含まれる。治療上有効な濃度は、本明細書に記載の *in vitro* 及び *in vivo* 系でAONを試験することによって実験的に決定され、その後、それからヒトに対する投薬量が推定され得る。いくつかの実施形態では、AONは、薬物の治療上有効な濃度を実現するような方法で投与される。いくつかの実施形態では、コンパニオン診断（例えば、Olsen D and Jorgensen JT, Front. Oncol., 2014 May 16, 4:105, doi:10.3389/fonc.2014.00105）を使用して、特定の対象

20

【0042】

医薬組成物中のAONの濃度は、活性化合物の吸収、組織分布、不活化、及び排泄速度、該化合物の物理化学的特性、投与スケジュール、及び投与量、ならびに当業者に知られているその他の要因によって決まる。例えば、送達される量は、本明細書で開示される疾患または障害の症状のうちの1つ以上を緩和するのに十分な量である。

【0043】

ある特定の実施形態では、治療に有効な投与量は、約0.1 ng/mL～約50～100 µg/mLの活性成分の血清濃度を生成する必要がある。一実施形態では、医薬組成物は、1日体重1 kg当たり約0.001 mg～約2000 mgの化合物の投与量を提供する。薬学的単位剤形は、単位剤形当たり約1 mg～約1000 mg、ある特定の実施形態では、約10～約500 mgの必須活性成分または必須成分の組み合わせを提供するために調製される。

30

【0044】

AONは、一度に投与されてもよく、またはいくつかのより少ない用量に分割して、時間間隔をおいて投与されてもよい。治療の正確な投与量及び持続時間は、治療される疾患に応じて変化し、既知の試験プロトコルを使用して、または *in vivo* もしくは *in vitro* 試験データからの外挿によって経験的に決定できることが理解されている。また、濃度及び投与量の値が、病態の重症度が緩和されるのに伴って変化し得ることに留意されたい。いずれの特定の対象に対しても、個々のニーズ、及び本組成物を投与するまたはその投与を監督する人物の専門的判断に従って、個別の投薬レジメンを経時的に調整する必要があるが、本明細書に記載の濃度範囲は例示のみであり、特許請求される組成物の範囲または実施を制限することを意図したものではないことをさらに理解されたい。

40

【0045】

したがって、有効な濃度または量の明細書に記載のAONまたはその薬学的に許容される塩のうちの1つ以上が、全身、局部、または局所投与に好適な薬学的担体またはビヒクルと混合されて、医薬組成物を形成する。AONは、1つ以上の症状を緩和するか、または治療するか、進行を遅延させるか、または予防するために有効な量に含まれる。組成物中の活性化合物の濃度は、活性化合物の吸収、組織分布、不活性化、及び排泄速度、投与スケジュール、及び投与される量、特定の製剤、ならびに当業者に既知の他の因子に依

50

存する。

【0046】

組成物は、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、髄腔内、皮膚、経皮、または頬側を含むが、これらに限定されない、適切な経路によって投与されることが意図されるものである。

【0047】

非経口、皮内、または皮下適用に使用される溶液または懸濁液は、次の成分：注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、ジメチルアセトアミド、または他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコール及びメチルパラベンなどの抗微生物剤；アスコルビン酸及び重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、及びリン酸塩などの緩衝液；ならびに塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張性の調節のための薬剤のうちのいずれかを含み得る。非経口調製物は、アンプル、ペン、使い捨てシリンジ、またはガラス、プラスチック、もしくは他の好適な材料から作製された単回もしくは反復投与バイアルに封入され得る。

【0048】

AONが不十分な溶解度を呈する場合、化合物を可溶化するための方法が使用され得る。かかる方法は、当業者に既知であり、ジメチルスルホキシド（DMSO）等の共溶媒の使用、TWEEN（登録商標）等の界面活性剤の使用、または水性重炭酸ナトリウム中での溶解が挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】

AONの混合または添加時に、結果として得られた混合物は、溶液、懸濁液、エマルジョン等であり得る。結果として得られた混合物の形態は、意図される投与様式及び選択された担体またはビヒクル中の化合物AONの溶解度を含むいくつかの因子に依存する。有効な濃度は、治療される疾患、障害、または病態の症状を緩和するのに十分な量であり、経験的に決定され得る。

【0050】

医薬組成物は、好適な量のAONまたはその薬学的に許容される塩を含有する粉末、顆粒剤、滅菌非経口溶液または懸濁液、及び油水エマルジョン等の単位剤形で、ヒト及び動物への投与のために提供される。薬学的に、治療効果のある活性AON及びその塩は、単位剤形または複数回剤形で製剤化及び投与される。本明細書で使用される単回投与形態は、ヒト及び動物対象に好適であり、当該分野で知られているように個別に包装される物理的に別個の単位を指す。各単回投与は、必要とされる薬学的担体、ビヒクル、または希釈剤を伴って、所望の治療効果を生み出すのに十分な、事前に決定された量の治療上有効な活性化合物を含有する。単回投与形態の例としては、アンプル及びシリンジならびに個別に包装された錠剤またはカプセル剤が挙げられる。単回投与形態は、その一部分ずつまたは複数で投与され得る。反復投与形態は、分割された単回投与形態で投与されることになる単一容器で包装された、複数の同一の単回投与形態である。反復投与形態の例としては、バイアル、錠剤もしくはカプセル剤のボトルまたはポイントもしくはガロンのボトルが挙げられる。したがって、反復投与形態は、包装時には分割されていない複数の単回用量のものである。

【0051】

持続放出調製物もまた調製され得る。持続放出調製物の好適な例としては、本明細書で提供される化合物を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、造形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例としては、イオントフォレシス用パッチ、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOSIT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能な微粒子）などの分解性

乳酸－グリコール酸コポリマー、及びポリ－D－（－）－3－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン－酢酸ビニル及び乳酸－グリコール酸などのポリマーは、100日間にわたる分子の放出を可能にするが、ある特定のヒドロゲルは、より短い期間でタンパク質を放出する。カプセル化された化合物は、長期間にわたって体内に残存する場合、それらは、37℃の水分への曝露の結果として変性または凝集し、生物学的活性の損失、及びそれらの構造の可能な変化をもたらす得る。関与する作用機序に応じて、安定化のために合理的な方策を講じることができる。例えば、凝集のメカニズムがチオ－ジスルフィド相互交換による分子間S－S結合形成であると分かった場合、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性溶液から凍結乾燥すること、水分含有量を制御すること、適切な添加剤を使用すること、及び特定のポリマーマトリックス組成物を開発することによって、安定化を実現することができる。

10

【0052】

非毒性担体とのバランスを保ちながら0.005%～100%の範囲の活性成分を含むする剤形または組成物が、調製され得る。そのような組成物は、溶液、懸濁液、散剤、ならびに限定されないが、埋植及びマイクロカプセル化送達システムなどの持続放出剤と、コラーゲン、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリオルトエステル、ポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーとを含む。これらの組成物を調製する方法は、当業者に既知である。企図される組成物は、約0.001%～100%の活性成分、ある特定の実施形態では、約0.185%または約75～95%の活性成分を含有している場合がある。

20

【0053】

活性AONまたは薬学的に許容される塩は、徐放剤またはコーティングなどの、体内からの急速な排出から化合物を保護する担体とともに調製され得る。

【0054】

組成物は、所望の特性の組み合わせを得るために他の活性AONを含み得る。本明細書で提供されるAON、または本明細書に記載されるようなその薬学的に許容される塩は、有利に酸化的ストレスに関連する疾患等の上記に称される疾患または医学的状態のうちの1つ以上を治療する際に有益であることが一般的に既知の別の薬理学的薬剤と一緒に、治療または予防目的のためにも投与され得る。そのような併用療法は、本明細書で提供される治療の組成物及び方法のさらなる態様を構成すると理解される。

30

【0055】

A. 注射可能薬物、溶液及び乳濁液

一般に、皮下、筋肉内、または静脈内のいずれかの注射を特徴とする非経口投与も本明細書で企図される。注射可能物は、液体の溶液または懸濁液のいずれかとしての従来の形態で、注射前に液体中の溶液または懸濁液に好適な固体形態、またはエマルジョンとして調製され得る。いくつかの実施形態では、懸濁液は、微小粒子またはナノ粒子の懸濁液である。いくつかの実施形態では、乳濁液は、微小粒子またはナノ粒子の乳濁液である。好適な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロールまたはエタノールである。加えて、所望により、投与される医薬組成物はまた、少量の非毒性補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、安定剤、溶解度向上剤、及び、例えば、酢酸ナトリウム、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン、及びシクロデキストリンなどの他の薬剤を含有してもよい。一定のレベルの投与量が維持されるように、徐放または持続放出系の埋植も、本明細書で企図される。簡潔には、本明細書で提供されるAONは、固体内部マトリックス、例えば、ポリメタクリル酸メチル、ポリメタクリル酸ブチル、可塑化または非可塑化塩化ポリビニル、可塑化ナイロン、可塑化テレフタル酸ポリエチレン、天然ゴム、ポリイソブレン、ポリイソブチレン、ポリブタジエン、ポリエチレン、エチレン－酢酸ビニルコポリマー、シリコーンゴム、ポリジメチルシロキサン、シリコーンカーボネートコポリマー、親水性ポリマー（例えば、アクリル酸及びメタクリル酸のエステルのヒドロゲル）、コラーゲン、架橋ポリビニルアルコール、及び部分的に加水分解された架橋ポリ酢酸ビニル中に分散し、これは、体液中で不溶性である、外

40

50

部ポリマー膜、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、エチレン／プロピレンコポリマー、エチレン／アクリル酸エチルコポリマー、エチレン／酢酸ビニルコポリマー、シリコーンゴム、ポリジメチルシロキサン、ネオプレンゴム、塩素化ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、酢酸ビニル、塩化ビニリデン、エチレン、及びプロピレンとの塩化ビニルのコポリマー、イオノマーポリエチレンテレフタレート、ブチルゴム、エピクロロヒドリンゴム、エチレン／ビニルアルコールコポリマー、エチレン／酢酸ビニル／ビニルアルコールターポリマー、ならびにエチレン／ビニルオキシエタノールコポリマーによって包囲されている。AONは、放出速度制御ステップにおいて外部ポリマー膜を通して拡散する。かかる非経口組成物中に含有される活性AONの割合は、その特定の性質、ならびに化合物の活性及び対象の必要性に大きく依存している。

10

【0056】

組成物の非経口投与は、静脈内、皮下、及び筋肉内投与を含む。非経口投与用の調製物としては、そのまま注射可能な滅菌溶液、使用直前に溶媒とそのまま組み合わせ可能な皮下錠剤を含む凍結乾燥粉末などの滅菌乾燥可溶性製品、そのまま注射可能な滅菌懸濁液、使用直前にビヒクルとそのまま組み合わせ可能な滅菌乾燥不溶性製品、及び滅菌乳濁液が挙げられる。溶液は、水性または非水性のいずれかであってよい。

【0057】

静脈内投与される場合、好適な担体には、生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、ならびに増粘剤及び可溶化剤、例えばグルコース、ポリエチレングリコール、及びポリプロピレングリコール、及びこれらの混合物などを含有する溶液が含まれる。

20

【0058】

非経口調製物で使用される薬学的に許容される担体には、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗微生物剤、等張剤、緩衝液、抗酸化剤、局部麻酔薬、懸濁化剤及び分散剤、乳化剤、金属イオン封鎖剤またはキレート剤、ならびに他の薬学的に許容される物質が含まれる。

【0059】

水性ビヒクルの例としては、塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、等張性デキストロース注射液、滅菌水注射液、デキストロース、及び乳酸加リンガー注射液が挙げられる。非水性非経口ビヒクルとしては、植物由来の不揮発性油、綿実油、コーン油、ゴマ油、及びピーナッツ油が挙げられる。滅菌濃度または静真菌濃度の抗微生物剤は、フェノールまたはクレゾール、水銀剤、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチル及びプロピルpヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサル、塩化ベンザルコニウム、及び塩化ベンゼトニウムを含む、反復投与容器に包装される非経口調製物に加える必要がある。等張剤は、塩化ナトリウム及びデキストロースを含む。緩衝液は、リン酸塩及びクエン酸塩を含む。抗酸化剤は、重硫酸ナトリウムを含む。局部麻酔薬は、塩酸プロカインを含む。懸濁化剤及び分散剤は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、及びポリビニルピロリドンを含む。乳化剤は、ポリソルベート80（TWEEN（登録商標）80）を含む。金属イオンの金属イオン封鎖剤またはキレート剤は、EDTAを含む。薬学的担体は、水混和性ビヒクル用のエチルアルコール、ポリエチレングリコール、及びプロピレングリコール、ならびにpH調整用の水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸、または乳酸も含む。

30

40

【0060】

薬学的に活性なAONの濃度は、注射が所望の薬理学的効果を生じるのに有効な量を提供するように調整される。正確な用量は、当該技術分野で既知であるように、対象または動物の年齢、体重、及び病態に依存する。

【0061】

単回用量非経口調製物は、アンプル、バイアル、または針付き注射器で包装される。非経口投与用の全ての調製物は、当技術分野で既知かつ実践されているように、滅菌でなければならない。

【0062】

50

例証として、活性 A O N を含有する滅菌水溶液の静脈内または動脈内注入は、有効な投与様式である。別の実施形態は、所望の薬理学的効果を得るために必要に応じて注射される活性 A O N を含有する滅菌水性もしくは油性溶液または懸濁液である。

【 0 0 6 3 】

注射可能薬物は、局所及び全身投与用に設計される。典型的には、治療に有効な投与量は、治療される組織に対して、少なくとも約 0.1 重量%～約 90 重量%以上、例えば、1 重量%超の濃度の活性 A O N を含有するように調製される。活性 A O N は、一度に投与されてもよく、またはいくつかのより少ない用量に分割して、時間間隔をおいて投与されてもよい。治療剤の正確な投与量及び持続時間は、治療される組織に応じて変化し、既知の試験プロトコルを使用して、または *i n v i v o* もしくは *i n v i t r o* 試験データからの外挿によって経験的に決定できることが理解されている。また、濃度及び投与量の値が、治療される個体の年齢によって変化し得ることに留意されたい。いずれの特定の対象に対しても、個々のニーズ、及び本製剤を投与するまたはその投与を監督する人物の専門的判断に従って、個別の投薬レジメンを経時的に調整する必要があるが、本明細書に記載の濃度範囲は例示のみであり、特許請求される製剤の範囲または実施を制限することを意図したものではないことをさらに理解されたい。

10

【 0 0 6 4 】

A O N は、微粉化された形態もしくは他の好適な形態で懸濁され得るか、またはより可溶性の活性な生成物もしくはプロドラッグを産生するために誘導体化され得る。結果として得られた混合物の形態は、意図される投与様式及び選択された担体またはビヒクル中の化合物の溶解度を含むいくつかの因子に依存する。有効な濃度は、病態の症状を緩和するのに十分なものであり、経験的に決定され得る。

20

【 0 0 6 5 】

B. 凍結乾燥粉末

投与向けに、溶液、乳濁液、及び他の混合物として再構成され得る、凍結乾燥粉末も本明細書において提供される。それらはまた、固体またはゲルとして再構成及び製剤化され得る。

【 0 0 6 6 】

無菌の凍結乾燥粉末は、本明細書で提供される A O N、またはその薬学的に許容される塩を適切な溶媒に溶解することによって調製される。溶媒は、安定性を改善する賦形剤、もしくは粉末の他の薬理学的成分、または粉末から調製される溶液調製用の溶液を含有してもよい。使用され得る賦形剤としては、デキストロース、ソルビトール、フルクトース、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、ショ糖、または他の好適な薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。溶媒はまた、クエン酸塩、リン酸ナトリウムもしくはリン酸カリウムなどの緩衝液、または当業者に知られているような他の緩衝液、一実施形態では、pH がほぼ中性の緩衝液を含有してもよい。その後の溶液の滅菌濾過、それに続く当業者に既知の標準条件下での凍結乾燥により、所望の製剤が得られる。一般に、得られた溶液は、凍結乾燥用のバイアルに分配される。各バイアルは、化合物の単回投与量 (10～1000 mg もしくは 100～500 mg を含むが、これらに限定されない) または複数回投与量を含む。凍結乾燥粉末は、約 4℃～室温などの適切な条件下で保管され得る。

30

40

【 0 0 6 7 】

この凍結乾燥粉末と注射用水との溶液調製により、非経口投与用の製剤が得られる。再構成のために、滅菌水または他の適切な担体 1 mL 当たり、約 1～50 mg、約 5～35 mg、または約 9～30 mg の凍結乾燥粉末を添加した。正確な量は、選択した化合物によって決まる。そのような量は、経験的に決定され得る。

【 0 0 6 8 】

C. 局所投与

局部混合物は、局所及び全身投与について記載されるように調製される。結果として得られた混合物は、溶液、懸濁液、エマルジョン等であり得、クリーム、ゲル、軟膏、エマ

50

ルジョン、溶液、エリキシル剤、ローション剤、懸濁液、チンキ剤、ペースト、発泡剤、エアロゾル、灌注剤、スプレー、坐薬、包帯、皮膚パッチ、または局部投与に好適な任意の他の製剤として製剤化される。

【0069】

化合物は、局所または局部適用、例えば、皮膚及び粘膜、例えば、眼への局部適用のために、ゲル、クリーム、及びローションの形態で、かつ眼への適用、または嚢内もしくはは髄腔内適用のために製剤化され得る。経皮送達用、また、眼または粘膜への投与用、あるいは吸入療法用の局所投与が企図される。活性化合物の点鼻液は、単独でまたは他の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて投与することもできる。

【0070】

これらの溶液、特に眼科用を意図した溶液は、適切な塩を含む、pHが約5～7である0.01%～10%の等張溶液として製剤化され得る。

【0071】

D. 持続放出組成物

本明細書で提供されるAONは、制御放出手段または当業者に周知である送達デバイスによって投与され得る。例としては、限定するものではないが、米国特許第3,845,770号、同第3,916,899号、同第3,536,809号、同第3,598,123号、同第4,008,719号、同第5,674,533号、同第5,059,595号、同第5,591,767号、同第5,120,548号、同第5,073,543号、同第5,639,476号、同第5,354,556号、同第5,639,480号、同第5,733,566号、同第5,739,108号、同第5,891,474号、同第5,922,356号、同第5,972,891号、同第5,980,945号、同第5,993,855号、同第6,045,830号、同第6,087,324号、同第6,113,943号、同第6,197,350号、同第6,248,363号、同第6,264,970号、同第6,267,981号、同第6,376,461号、同第6,419,961号、同第6,589,548号、同第6,613,358号、同第6,699,500号及び同第6,740,634号に記載されているものが含まれ、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に援用される。このような剤形は、様々な割合で所望の放出プロファイルを提供するために、例えば、ヒドロプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、透過性膜、浸透圧システム、多層コーティング、微小粒子、リポソーム、ミクロスフェア、またはこれらの組み合わせを使用して、1つ以上の活性成分の徐放または制御放出を提供するために使用することができる。本明細書で記載されるものを含む当業者に既知の好適な制御放出製剤は、本明細書に提供される活性成分と共に使用するために容易に選択することができる。

【0072】

全ての制御放出医薬製品は、それらの非制御の対照物が実現したものを超える薬物療法の改善という共通の目的を有する。一実施形態では、治療における最適に設計された制御放出調製物の使用は、最小限の時間で病態を治癒させるまたは制御するために用いられる最低限の薬剤物質によって特徴付けられる。ある特定の実施形態において、制御放出製剤の利点としては、薬物活性の延長、投薬頻度の低減、及び対象服薬遵守の改善が挙げられる。加えて、制御放出製剤を使用して、作用開始の時間または薬物の血中濃度などの他の特性に影響を及ぼすことができ、それゆえに、副（例えば、逆）作用の発生に影響を及ぼし得る。

【0073】

多くの制御放出製剤は、所望の治療効果を素早くもたらす量の薬物（活性成分）を最初に放出し、長期間にわたってこのレベルの治療または予防効果を維持するために、他の量の薬物を徐々にかつ継続的に放出するように設計されている。この一定の薬物レベルを体内で維持するために、薬物は、代謝されて身体から排泄される薬物の量を補うであろう速度で剤形から放出されなければならない。AONの制御された放出は、pH、温度、酵素、水、または他の生理的条件若しくは化合物を含むが、これらに限定されない種々の条件

10

20

30

40

50

により刺激を受け得る。

【0074】

ある特定の実施形態では、AONは、静脈内注射、埋植可能な浸透ポンプ、経皮パッチ、リポソーム、または他の投与様式を使用して投与され得る。一実施形態では、ポンプが使用され得る (Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989) を参照されたい。別の実施形態では、高分子材料が使用され得る。さらに別の実施形態では、制御放出システムは、治療標的に近接して配置され、すなわち、ゆえに、全身用量の画分のみが必要とされる場合がある (例えば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984) を参照されたい)。

10

【0075】

他の制御放出システムについては、Langerによって総説が論じられている (Science 249:1527-1533 (1990))。AONは、固体内部マトリックス、例えば、ポリメタクリル酸メチル、ポリメタクリル酸ブチル、可塑化または非可塑化ポリ塩化ビニル、可塑化ナイロン、可塑化テレフタル酸ポリエチレン、天然ゴム、ポリイソブレン、ポリイソブチレン、ポリブタジエン、ポリエチレン、エチレン-酢酸ビニルコポリマー、シリコーンゴム、ポリジメチルシロキサン、シリコーンカーボネートコポリマー、アクリル酸及びメタクリル酸のエステルのヒドロゲルなどの親水性ポリマー、コラーゲン、架橋ポリビニルアルコール及び部分的に加水分解された架橋ポリ酢酸ビニル中に分散し得、これは、体液中で不溶性である、外部高分子膜、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、エチレン/プロピレンコポリマー、エチレン/エチルアクリル酸コポリマー、エチレン/酢酸ビニルコポリマー、シリコーンゴム、ポリジメチルシロキサン、ネオプレンゴム、塩素化ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、酢酸ビニルとの塩化ビニルコポリマー、塩化ビニリデン、エチレン及びプロピレン、イオノマーテレフタル酸ポリエチレン、ブチルゴムエピクロロヒドリンゴム、エチレン/ビニルアルコールコポリマー、エチレン/酢酸ビニル/ビニルアルコールターポリマー、ならびにエチレン/ビニルオキシエタノールコポリマーによって包囲される。次いで、AONは、放出速度調節ステップで外部高分子膜を通して拡散する。かかる非経口組成物に含有される活性成分の割合は、それらの特定の性質、ならびに対象のニーズに大きく依存する。

20

30

【0076】

E. 標的製剤

本明細書で提供されるAONまたはその薬学的に許容される塩はまた、リポソームベース、再密封赤血球ベース、及び抗体ベースの送達システムを含む、治療される対象の特定の組織、受容体、または身体の他の領域を標的とするように製剤化され得る。多くのそのような標的化方法は、当業者には周知である。そのような標的化方法の全ては、目下の組成物での使用に関して本明細書で企図される。標的化方法の非限定的な例については、例えば、米国特許第6,316,652号、同第6,274,552号、同第6,271,359号、同第6,253,872号、同第6,139,865号、同第6,131,570号、同第6,120,751号、同第6,071,495号、同第6,060,082号、同第6,048,736号、同第6,039,975号、同第6,004,534号、同第5,985,307号、同第5,972,366号、同第5,900,252号、同第5,840,674号、同第5,759,542号、及び同第5,709,874号を参照されたい。

40

【0077】

一実施形態では、抗体ベースの送達システムは、例えば、それぞれが参照により本明細書に援用されるHamilton G S, Biologicals, 2015 September, 43 (5):318-32; Kim E G and Kim K M,

50

Biomol. Ther. (Seoul), 2015 November, 23 (6) : 493-509、及び Peters C and Brown S, Biosci. Rep., 2015 Jun. 12, 35 (4) pii: e00225 に記載されているような抗体薬物複合体 (「ADC」) であり、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0078】

一実施形態では、腫瘍標的化リポソームなどの組織標的化リポソームを含むリポソーム懸濁液も、薬学的に許容される担体として好適である場合がある。これらは、当業者に既知の方法に従って調製することができる。例えば、リポソーム製剤は、米国特許第 4, 522, 811 号に記載されているようにして調製することができる。簡単に言えば、多重層膜ベシクル (MLV) などのリポソームは、フラスコの内側で卵ホスファチジルコリン及び脳ホスファチジルセリン (7:3 モル比) を乾燥させることによって形成することができる。二価陽イオンを欠くリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の本明細書で提供される AON の溶液を添加し、脂質フィルムが分散するまでフラスコを振盪する。得られた小胞を洗浄して、カプセル化されていない化合物を除去し、遠心分離によってペレット化し、その後、PBS 中に再懸濁する。

10

【0079】

F. 製品

AON または薬学的に許容される塩は、包装材料、本明細書で開示される疾患もしくは障害の 1 つ以上の症状もしくは進行を治療、予防または緩和するために使用される本明細書で提供される AON またはその薬学的に許容される塩、及び化合物またはその薬学的に許容される塩が、本明細書で開示される疾患もしくは障害の 1 つ以上の症状もしくは進行を治療、予防または緩和するために使用されることを示すラベルを含んだ製品として包装され得る。

20

【0080】

本明細書で提供される製品は、包装材料を含んでいる。医薬製品を包装する際に使用される包装材料は、当業者には周知である。例えば、米国特許第 5, 323, 907 号、同第 5, 052, 558 号、及び同第 5, 033, 252 号を参照されたい。薬学的包装材料の例としては、プリスターパック、ボトル、チューブ、吸入器、ポンプ、袋、バイアル、容器、シリンジ、ペン、ボトル、さらに選択された製剤ならびに意図する投与様式及び治療に好適な任意の包装材料が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で提供される AON 及び組成物の幅広い製剤が企図される。

30

【0081】

ある特定の実施形態では、医療従事者が使用する際に、対象への適切な量の AON の投与を簡易にし得るキットもまた本明細書で提供される。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるキットは、容器及び、本明細書で提供される AON またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくはプロドラッグの剤形を含む。

【0082】

特定の実施形態では、キットは、本明細書で記載の 1 つ以上の他の治療薬を含む容器内に、本明細書で提供される AON またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくはプロドラッグの剤形を含む容器を含む。

40

【0083】

本明細書で提供されるキットは、AON を投与するために使用されるデバイスをさらに備えていてもよい。そのようなデバイスの例としては、シリンジ、無針注射器点滴バッグ、パッチ、及び吸入器が挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

本明細書で提供されるキットは、さらに、1 つ以上の有効成分を投与するために使用することができる薬学的に許容されるビヒクルを含み得る。例えば、活性成分が非経口投与に溶液調製される必要がある固体形態で提供される場合、キットは、非経口投与に適した微粒子を含まない滅菌溶液を形成するように活性成分がその中で溶解し得る適切なビヒ

50

クルの密閉容器を含むことができる。薬学的に許容されるビヒクルの例としては、U S P 注射用水、塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、デキストロース注射液、デキストロース及び塩化ナトリウム注射液、及び乳酸加リンガー注射液を含むがこれらに限定されない水性ビヒクル；エチルアルコール、ポリエチレングリコール、及びポリプロピレングリコールを含むがこれらに限定されない水混和性ビヒクル；ならびにトウモロコシ油、綿実油、ピーナッツ油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、及び安息香酸ベンジルを含むがこれらに限定されない非水性ビヒクル、が挙げられるが、これらに限定されない。

【0085】

V I I . 第2の活性薬剤との併用療法

また、本明細書では、D M Dを治療するかまたはD M Dの発症を遅延させるのに有用な他の治療薬と、本明細書で開示されるA O Nを使用した併用療法の方法を提供する。別の実施形態では、D M Dを治療するかまたはD M Dの発症を遅延させるのに有用な他の治療薬と、A O N 1を使用した併用療法の方法を提供する。これらの方法では、本明細書で開示されるA O N、例えばA O N 1は、本明細書の他所に記載の通り、例えばQ W x 2 4 W投与される。

【0086】

本明細書で使用される場合、用語「組み合わせて」は、2つ以上の療法剤（例えば、1つ以上の予防剤及び／または治療剤）の使用を含む。しかしながら、用語「組み合わせて」の使用は、疾患または障害を患う対象に療法剤（例えば、予防剤及び／または治療剤）が投与される順序を制限しない。第1の療法（例えば、本明細書で提供されるA O Nなどの予防薬または治療薬）は、対象への第2の療法（例えば、予防薬または治療薬）の投与の前に（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間前に）、それと同時に、またはその後に（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間後に）投与することができる。三重療法もまた、本明細書で企図される。

【0087】

本明細書で開示されるA O N及び1つ以上の第2の活性薬剤の対象への投与は、同時または順次に、同じ投与経路または異なる投与経路によって行うことができる。特定の活性薬剤に用いられる特定の投与経路の適合性は、活性薬剤自体（例えば、それが血流に入る前に分解することなく経口投与され得るかどうか）及び治療される疾患または障害に依存する。

【0088】

本発明で開示されるA O Nの投与経路は、第2の療法剤の投与経路から独立している。別の実施形態では、本発明で開示されるA O Nは、静脈内投与する。したがって、これらの実施形態によれば、本発明で開示されるA O Nは、経口投与または静脈内投与し、第2の療法剤は、経口投与、非経口投与、腹腔内投与、静脈内投与、動脈内投与、経皮投与、舌下投与、筋肉内投与、直腸投与、経口腔投与、鼻腔内投与、リポソーム投与、吸入を介した投与、膣内投与、眼内投与、カテーテルもしくはステントによる局部送達を介した投与、皮下投与、脂肪内投与、関節内投与、髄腔内投与または徐放剤形での投与をすることができる。一実施形態では、本発明で開示されるA O N及び第2の療法剤は、同じ投与様式、例えば、I Vにより投与する。別の実施形態では、本明細書で開示されるA O Nは、ある投与様式、例えばI Vによって投与されるが、第2の薬剤は、別の投与様式、例えば経口で投与される。

【0089】

一実施形態では、第2の活性薬剤は、静脈内または皮下に、約1～約1000mg、約5～約500mg、約10～約350mg、または約50～約200mgの量で1日1回

10

20

30

40

50

または2回投与される。第2の活性剤の具体的な量は、使用する具体的な薬剤、治療または管理する疾患の種類、疾患の重症度及びステージ、ならびに対象に同時に投与する、本発明で提供するAONまたはその誘導体と、いずれかの任意の追加の活性剤との量によって決まることになる。

【0090】

1つ以上の第2の活性成分または活性薬剤は、本明細書で提供される方法及び組成物において、本明細書で提供されるAONまたはその誘導体と一緒に使用される場合がある。第2の活性薬剤は、大分子（例えば、タンパク質）、または小分子（例えば、合成無機、有機金属、または有機分子）であり得る。

【0091】

大分子活性薬剤の例としては、造血成長因子、サイトカイン、AONならびにモノクローナル及びポリクローナル抗体が挙げられるが、これらに限定されない。典型的な大分子活性薬剤は、天然に存在する、または合成、または組換えタンパク質等の生体分子である。本明細書で使用するための第2の活性薬剤としてのAONの具体例としては、エテプリルセン、カシメルセン、ゴロジルセン、ビルトラルセン及びSRP-5051 (Sarepta Therapeutics) が挙げられる。

【0092】

小分子の例としては、デフラザコートのようなコルチコステロイドが挙げられる。

【0093】

本明細書で開示されるAONと組み合わせてもよい他の治療法としては、遺伝子治療剤（例えば、SRP-9001、GALGT2、またはGNT0004 (Sarepta Therapeutics)）、遺伝子編集（例えば、CRISPR/CAS9 (Sarepta Therapeutics)）、及び細胞療法剤（例えば、CAP-1002 (Caprior Therapeutics / Nippon Shinyaku Co. Ltd.)）が挙げられる。

【実施例】

【0094】

VIII. 実施例

下記の実施例は、本明細書で提供されるある特定の実施形態を例証することを意図したものであり、本開示の範囲を限定するものではない。

【0095】

実施例1

del52hDMD/mdxマウスにおけるAON1の25週間投与

【0096】

hDMD del52/mdx (+/+) 及びC57BL/6J野生型 (WT) マウス (1日目に約7週齢) を4つの群に分け、以下に示すように投与した：

10

20

30

40

50

【表 1】

群	株	マウスの数 (M/ F/混 合)	投与物	I V投与レ ジメン	用量 レベ ル (m g/ k g)	用量体 積 (m L/k g)	終了N (最終用量後)	
							4 週 間	1 2 週 間
1	野生型	1 8	ビヒク ル	QW×2 5 W	0	8	6	1 2
2	d e l 5 2 / m d x	1 8	ビヒク ル	QW×2 5 W	0	8	6	1 2
3	d e l 5 2 / m d x	1 8	AON 1	QW×2 5 W	6	8	6	1 2
4	d e l 5 2 / m d x	1 8	AON 1	QW×2 5 W	1 8	8	6	1 2

10

【0097】

6 mg / kg / 用量の用量は、0.92 μmol / kg / 用量に等しい (AON1のMWは6517 g / mol)。18 mg / kg / 用量の用量は、2.76 μmol / kg / 用量に相当する。したがって、25Wにわたり投与されるAON1の総量は、6 mg / kgの用量レベルでは150 mg / kg (23.00 μmol / kg)、18 mg / kgの用量レベルでは450 mg / kg (69.00 μmol / kg)である。

20

【0098】

投与後、血漿濃度、組織分布、濃度、エクソンスキッピング、全体的な歩行スコア、及び細胞保護を分析した。結果を図1～図6に示す。

【0099】

図1は、経時的なAON1の血漿濃度を示す。図2は、心臓、四頭筋、肝臓、横隔膜、腓腹筋、及び腎臓組織におけるAON1濃度を示す。図3は、AON1が、25週間の治療により、筋組織（四頭筋、腓腹筋、心臓及び横隔膜）において持続的な用量依存的なエクソン51のスキッピングを達成したことを示す。

30

【0100】

図4は、心臓及び四頭筋内のジストロフィンのwt %を示し、AON1の総歩行スコア（平均±SEM、N=16～18（ベースライン、29週）または10～12（37週））を示す。統計学的有意性：C57BL/6Jビヒクルと比較して、#p<0.05、###p<0.0001；Del52/mdx ビヒクルと比較して、*p<0.05、***p<0.0005、****p<0.0001）。AON1は、25週間の治療でジストロフィン及び歩行スコアを改善及び維持する。微細運動及び歩行運動検査の参照：N A D a t s o n e t a l . (2 0 2 0) , N U C I D T H E R A P E U T I C S . D O I : 1 0 . 1 0 8 9 / n a t . 2 0 1 9 . 0 8 2 4 .

40

【0101】

図5は、AON1治療が、hDMD del52 (+ / +) モデル関連の筋肉病変を減弱し、25週間の投与後12週間薬理学的効果を維持することを示す。ビヒクルで処理したマウスの腓腹筋は、軽度の萎縮、最小限の壊死、最小限の炎症（非核細胞浸潤）、及び最小限の線維症を示した。対照的に、AON1治療マウスの腓腹筋は、他の影響なしで最小限の萎縮を示した。

【0102】

図6は、AON1治療が、hDMD del52 (+ / +) モデルに随伴する心臓病変を減弱し、薬理学的効果を12週間持続することを示す。ビヒクルで処理したマウスの心筋は

50

、軽度の萎縮、最小限の壊死、最小限の炎症（非核細胞浸潤）、及び最小限の線維症を示した。対照的に、A O N 1 治療マウスの心筋は、他の影響なく、最小限の炎症（単核細胞浸潤）及び最小限の線維症を示した。

【 0 1 0 3 】

実施例 2

A O N 1 の合成

【 0 1 0 4 】

オリゴヌクレオチド、A O N 1 を固相有機合成によって合成した。合成過程中に中間体を単離または特徴付けたりすることはなかった。合成配列の完了後、オリゴヌクレオチドを固体支持体から切断し、脱保護し、限外濾過及び分取陰イオン交換（A E X）クロマトグラフィーによって精製した。H P L C 画分をプールした後、オリゴヌクレオチド A O N 1 溶液を濃縮し、第 2 の限外濾過ステップによって脱塩した。その後の凍結乾燥及び均質化により、生成物 A O N 1 が固体材料として得られ、これを出荷前に $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ で保管した。

【 0 1 0 5 】

周囲温度で行った合成サイクルを以下に概略的に示す（例示目的で第 1 のサイクルを使用）。A O N 1 のオリゴヌクレオチド鎖を固体支持体上で合成した。配列の完了後、オリゴヌクレオチドを樹脂から切断し、精製し、得られた溶液を凍結乾燥して、最終的な原薬である A O N 1 を得た。

10

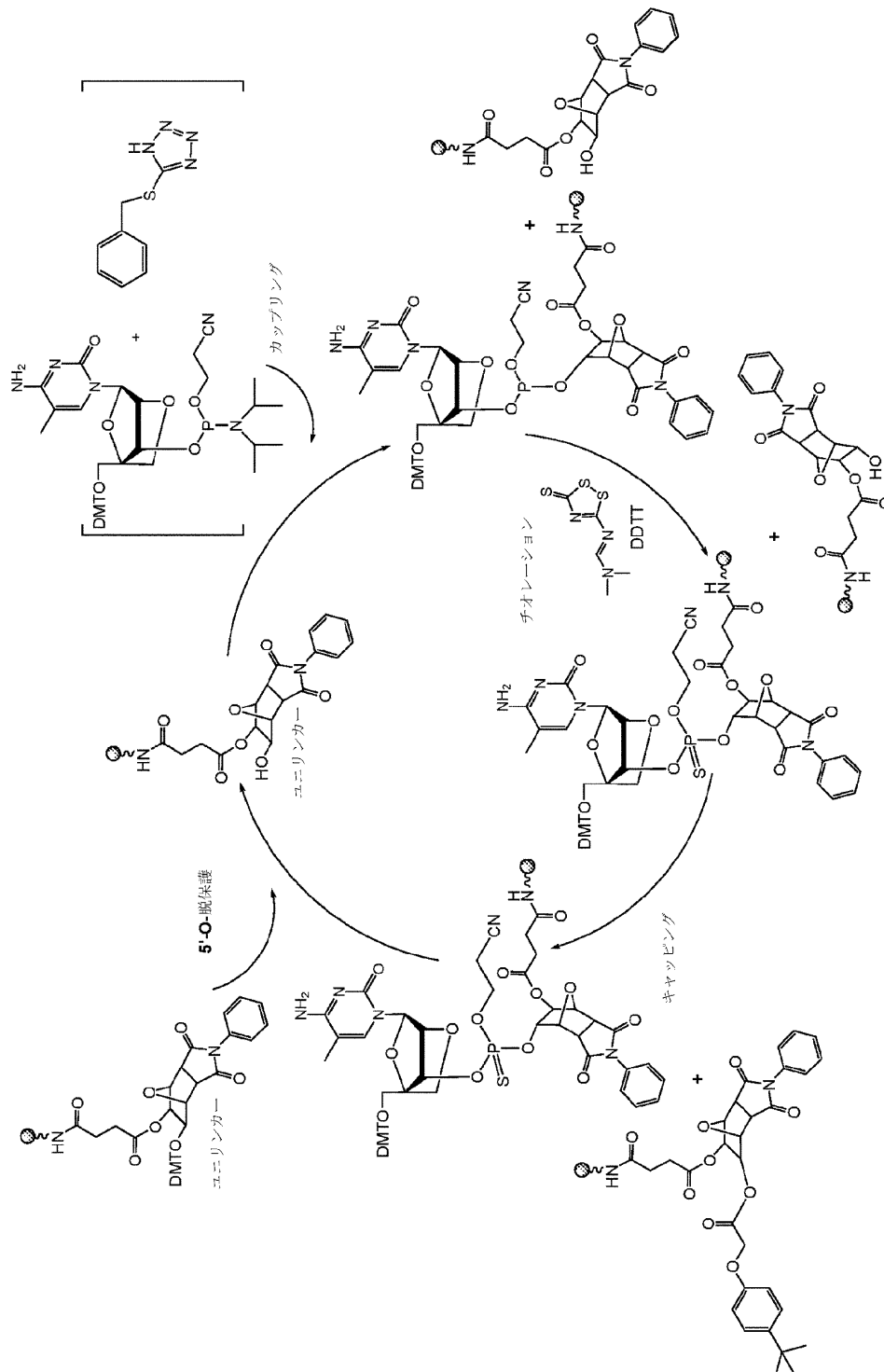
20

30

40

50

【化 8】



【0106】

ステージ1：固相合成

【0107】

AON1のオリゴヌクレオチド部分を、プラットフォーム合成を使用して固相有機合成によって製造した。合成は自動化し、密閉カラム反応器を備えた合成装置で、カップリングリサイクリング技術を使用し、中間体の単離は伴わなかった。ユニバーサルリンカーを備えた固体支持体をフロースルーカラム反応器に充填し、合成を開始した。各合成サイクルは、4つの化学ステップからなり、これらを順次実施し、続いて、完全長オリゴヌクレオチドが確立されるまで洗浄する。

【0108】

ステップ1 脱保護

【0109】

脱ブロッキングまたは脱保護として指定される第1のステップでは、固体支持体をトルエン中のジクロロ酢酸で処理して、固体支持体上のUnyLinker（商標）から保護基、ジメトキシトリチル（DMT）を除去した。ステップ1のその後のすべてのサイクルでは、脱ブロッキングは、5'-DMT-offオリゴヌクレオチドを生成するために、各連続的に導入されたホスホロアミダイト（phosphoramidite）または架橋型アミダイトの5'-OHからのDMT保護基の除去を伴った。

【0110】

ステップ2 活性化及びカップリング

【0111】

「活性化及びカップリング」と指定される第2のステップは、配列に次のヌクレオチドを付加し、3'末端から5'末端へ伸長する鎖伸長ステップであった。UnyLinker（商標）（1番目のサイクル）または5'-DMT-offオリゴヌクレオチド鎖[n]（後続の全てのサイクル）のいずれかの非保護アルコール基を、好適な活性剤溶液、例えば、アセトニトリル中のベンジルチオテトラゾールの存在下、アセトニトリルまたはジクロロメタン／アセトニトリル中の対応するホスホロアミダイトの溶液で治療し、オリゴヌクレオチド鎖[n+1]上に細長いDMTを構築した。最後の鎖伸長ステップでは、硫化せずにDMT-TEG-ホスホロアミダイトを使用して、AON1の5'末端でTEG基を組み込んだ。

【0112】

ステップ3 酸化／硫化

【0113】

所望の骨格化学に応じて、対応するホスホロチオエートまたはホスホジエステルを、硫化または酸化によってこのステップで導入した。DMT-onオリゴヌクレオチド鎖[n+1]を、硫化剤、例えば、ピリジン／アセトニトリル中の5-N-（ジメチルアミノ）メチレン]アミノ-3H-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン（DDTT）または酸化剤（例えば、ピリジン／水中のヨウ素）にさらした。AON1の製造中、最後のサイクルのみが酸化ステップを伴い、他のすべてのサイクルは硫化反応を伴う。

【0114】

ステップ4 キャッピング

【0115】

「キャッピング」と指定される第4のステップは、任意の未反応の5'-OHオリゴヌクレオチド鎖[n]が、後続のカップリングサイクルにおいてホスホロアミダイトと更に反応するのを防止するために、キャップA（アセトニトリル／2,6-ルチジン／N-メチルイミダゾール）及びキャップB（アセトニトリル中のtert-ブチルフェノキシアセチル無水酢酸）の混合物を個体支持体上のオリゴヌクレオチドに添加することにより合成サイクルを終了させた。これにより、ランケートされた配列の形成につながった。18個のアミダイト全てについての合成サイクルが完了した後、塩基及び骨格保護オリゴヌクレオチドは固相支持体上に結合し続けた。

【0116】

ステージ2：骨格の脱保護

【0117】

固相支持体上のオリゴヌクレオチドをアセトニトリル中のジエチルアミンで処理し、ホスホロチオエート／リン酸骨格上のβ-シアノエチル保護基の除去へ導いた。反応に続いて、アセトニトリルを使用した洗浄ステップを行った。

【0118】

ステージ3：塩基の脱保護及び樹脂からの切断

【0119】

10

20

30

40

50

カラムをアンモニア水／エタノールで周囲温度でインキュベートし、次いでアンモニア水／エタノールで洗浄した。合わせた溶液を高温でインキュベートした。この２つのステップの手順内で、粗オリゴヌクレオチドを固体支持体から切断し、核酸塩基保護基を除去した。得られた溶液を、脱保護溶液中に溶解した粗オリゴヌクレオチドを含有する濾液で、濾過及びクエンチした。

【 0 1 2 0 】

ステージ４：限外濾過によるオリゴヌクレオチドの脱塩

【 0 1 2 1 】

粗 A O N 1 の溶液を、限外濾過膜を使用した限外濾過によって濃縮した。注射用水を使用して、得られた濃縮物にダイアフィルトレーションを行った。得られた A O N 1 水溶液を濾過した。

10

【 0 1 2 2 】

ステージ５：陰イオン交換クロマトグラフィーによる粗オリゴヌクレオチドの精製

【 0 1 2 3 】

反応混合物をリン酸ナトリウム水溶液／アセトニトリル緩衝液中で希釈し、S O U R C E （商標） 3 0 Q を用いた陰イオン交換（A E X）クロマトグラフィーによって精製した。

【 0 1 2 4 】

モックプールを生成し、H P L C - U V / M S によって分析した。分析結果に従って、画分をプール及びさらなる下流処理のために選択した。選択した画分を結合し、適切な純度（> 8 5 %）及び収率の生成物プールを得た。この最終生成物プールを、H P L C - U V / M S によって再度分析した。

20

【 0 1 2 5 】

ステージ６：限外濾過によるオリゴヌクレオチドの脱塩

【 0 1 2 6 】

A O N 1 のプール溶液を、限外濾過膜を使用した限外濾過によって濃縮した。注射用水を使用して、得られた濃縮物にダイアフィルトレーションを行った。得られた A O N 1 水溶液を濾過した。

【 0 1 2 7 】

ステージ７：凍結乾燥固体としてのオリゴヌクレオチド

30

【 0 1 2 8 】

ステージ６で得た濃縮溶液を 0 . 2 μ m 膜を通して濾過し、最後に凍結乾燥して、最終の原薬をもたらした。凍結乾燥後、材料をクリーンルーム環境で最低 2 4 時間平衡させて、最終製品の安定した含水量を取得した。平衡化した原薬を、白色～オフホワイト～黄色の粉末として得た（m p : 約 2 6 5 ° C （D S C 分解）；イオン対逆相 H P L C - U V / M S による純度 9 2 ~ 9 3 %）。

実施例 3

【 0 1 2 9 】

5 0 m g / m L の A O N 1 を製造するためのプロセス

【 0 1 3 0 】

緩衝液の配合及び任意選択のバイオバーデン低減濾過

40

【 0 1 3 1 】

必要量のリン酸水素二ナトリウム・十二水和物、リン酸二水素ナトリウム二水和物、及び塩化ナトリウムを注射用水（W F I）の全量のおよそ 8 0 % で秤量し、グレード C の環境下、層流下（L A F）で攪拌する。賦形剤が溶解した後、W F I を最終量に添加する。

【 0 1 3 2 】

緩衝液の配合と製剤溶液の配合とが同日に行われない場合、バイオバーデンを低減するために、緩衝液を、L A F 下、グレード C の 0 . 4 5 / 0 . 2 μ m 膜フィルターユニットで濾過する。

【 0 1 3 3 】

50

溶液の平衡、配合、及びバイオバーデンの低減濾過

【0134】

凍結乾燥AON1（実施例2）をLAFの下、グレードCの環境で、室温で12～24時間平衡化する。平衡化後、凍結乾燥AON1を秤量し、凝集を避けるために攪拌することによって、およそ50%緩衝液中に溶解させる。計算された量の緩衝液を添加することによって、溶液50mg/mLの最終AON1濃度を達成する。溶液を発泡を避けることによって、200～1000rpmで20～30分間混合する。配合された溶液は、滅菌0.45/0.2μm膜フィルターユニットを通して濾過されバイオバーデンが低減される。配合及びバイオバーデンの低減濾過を、LAFの下でグレードCの環境において実施する。

10

【0135】

インライン滅菌濾過及び無菌充填

【0136】

AON1溶液を、0.45/0.2μmフィルターを使用して2つの連続するインラインフィルターユニットで滅菌濾過し、すぐに使用できる滅菌バイアルに無菌的に充填する。バイアルにキャップをして密封する。充填されたユニットは、温度制御された冷蔵倉庫に保管される。

【0137】

AON1組成物を、pH7.0で50mg/mLの濃度で静脈内注入するための3mLの等張性があり無菌で、防腐剤を含まない溶液として、単回用量バイアルに供給する。コンテナ・クロージャ・システムは、フルオロポリマーでコーティングしたプロモブチルゴム栓及びフリップオフキャップ付きアルミニウムシールを備えたタイプ1のガラスバイアルである。5.25LのAON1溶液の組成を以下に示す：

20

【0138】

【表2】

5.25LのAON1溶液の組成

構成要素	数量	濃度（g/L）
AON1	262.5 g	50
リン酸水素ナトリウム・十二水和物	27.0 g	5.135
リン酸二水素ナトリウム二水和物	4.6 g	0.883
塩化ナトリウム	24.5 g	4.676
注射用水	qs	qsで標的体積まで

30

qs＝適量

【0139】

実施例4

AON1 PSを雄及び雌のdel52hDMD/mdx マウスに13週間投与し、投与2週間または4週間後に評価した。

40

【0140】

Charles River, UKで繁殖させ、BioLytx, Switzerlandで遺伝子型同定した合計120匹のホモ接合型hDMD del52/mdx+/+雄及び雌マウスを試験のために使用した。本試験における全てのhDMD del52/mdxマウスは、再誘導されたコロニーに由来する。加えて、年齢を適合させたC57BL/6J（n＝20）マウス（Charles River, Germany）を野生型（WT）対照として使用した。本試験のために異なる群を設定する際に、初回の治療の開始でグループ差がないように、完全にマウスの同腹仔が単一の試験群に収まらないようにし、ベースラインの体重を考慮するようにマウスを性別ごとの群に無作為化した。

50

【0141】

各治療日にマウスの体重を測定し、それに応じて用量を調節した。全体のIV注射プロセスは、マウス一匹あたり5～8分を要し、実際の注射時間は10～60秒であった。

【0142】

すべての化合物は、等モルの投与を確実にする濃度で製剤化し、8 mL/kgの注射量で投与した。各治療日にマウスの体重を測定し、それに応じて用量を調節した。例えば、体重30 gのマウスは、240 µLのIV注射を受けた。

【0143】

マウスにAON1 PSを13週間投与した。最後のIV注射の14日後または28日後のエンドポイントに、マウスをペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg Mebunat, Orion Pharma, Finland) を用いた深部麻酔により安楽死させた。マウスを心臓穿刺に供し、心臓組織を採取した。組織を、液体窒素中のイソペンタンオバンマリー (isopentane au bain marie) に浸すことによって直ちに急速凍結し、ドライアイス上で予め冷却したクライオバイアルに入れ、-80℃で保存した。凍結した試料を、適格な方法によって、エクソンスキッピング%及びジストロフィンレベルについて分析した。結果が図7及び図8に示される。

【0144】

実施例5

AON1 PSを雄及び雌のdel52hDMD/mdx マウスに13週間投与し、投与2週間または4週間後に評価した。

【0145】

すべてのマウスに、7週齢から開始して、ビヒクルまたはAON1を用いた最大13週間の試験期間中、週1回 (QW) の尾静脈内IV注射を与えた。全体のIV注射プロセスは、マウス一匹あたり5～8分を要し、実際の注射時間は60秒であった。化合物を特定の濃度で配合し、8 mL/kgの注射量で投与した。各治療日にマウスの体重を測定し、それに応じて用量を調節した。例えば、体重30 gのマウスは、240 µLのIV注射を受けた。

【0146】

生存期間の終了時、85日目の最後のIV注射から4週間または8週間 (それぞれ、113日目及び141日目)、心臓穿刺による採血後、組織から血液を除去するためにマウスをPBSで経心的に灌流した。以下の組織を収集し、瞬間凍結した：

【0147】

骨格筋：腓腹筋 (R)、四頭筋 (L+R)、四頭組織が1つの試料を有するように、両側を1つのバイアル中に採取する。

【0148】

心臓の半分 (心房と心室の両方が各半分に存在するように解剖される)、横隔膜全体、肝臓 (肝臓全体の2×1/3)、腎臓 (R)。

【0149】

すべての組織を、液体窒素中のイソペンタンオバンマリー (isopentane au bain marie) に浸すことによって瞬間凍結し、ドライアイス上で予め冷却したクライオバイアルに入れ、切開まで-80℃で保存した。

【0150】

エクソンスキッピング分析を、全群からの腓腹筋、四頭筋、心臓、及び横隔膜組織で実施した。分析作業は、適格な逆転写酵素デジタルドロップレットポリメラーゼ連鎖反応 (RT-ddPCR) 分析方法を使用して行った。hDMDエクソン51のスキップの割合は、以下の式によって計算された：

【0151】

$$\left(\text{ヒトスキップエクソン51コピー} / 20 \mu\text{Lの反応} \right) / \left(\text{ヒトスキップエクソン51コピー} / 20 \mu\text{Lの反応} + \text{ヒト非スキップエクソン51コピー} / 20 \mu\text{Lの反応} \right) * 100$$

10

20

30

40

50

【0152】

スキップ及び非スキップ転写物の定量下限（LLOQ）は、閾値技法に基づいた。結果を図9に示す。心臓及び四頭筋でのジストロフィンレベルを図10に示す。総歩行スコアを図11に示す。

【0153】

実施例6

ヒト及びカニクイザルの血清における補体活性化についてAON1 PS及びAON2が与える影響の試験を実施した。

【0154】

被験物質投与のための用量ビヒクルは、0.7% NaClを含む水性リン酸緩衝液（pH 6.9～7.1）であり、これを調製し、ベースラインの対照として使用した。適切な量の被験物質（AON1 PSまたはAON2）を秤量し、攪拌／ボルテックス混合を使用して10倍の用量濃度で視覚的に透明な溶液中に溶解させた。測定された重量に補正率は適用されなかった。使用前及び使用後に製剤を冷蔵保存（4℃）した。使用前に、全ての被験物質製剤を実験台で少なくとも30分間、室温に温めた。被験物質は、調製後1週間、4℃での保存で安定しているとみなされた。実際の重量及び希釈を試験データに記録した。本試験では用量解析は行わなかった。残留製剤を廃棄した。

【0155】

試験システム

【0156】

試験システム1：n = 3人の健康男性ヒトボランティア（>18歳）からの個々の血清。

【0157】

試験システム2：n = 3の正常雄カニクイザル（>3歳）からの個々の血清。

【0158】

投与の経路

【0159】

これはin vitro試験であり、被験物質をin vitroで試験システムに曝露させた。被験物質を9部に対して1部の比（1：9、v/v）で試験システムに添加した。この比により、試験システムの適切な濃度が維持され、その結果、補体対照タンパク質の濃度が十分であった。

【0160】

投与レジメン

【0161】

混合物を37℃±2℃で30±2分間インキュベートし、分析物試験まで-80℃で保管した。

【0162】

目的及び試験プロトコル

【0163】

本試験の目的は、正常雄のヒト及びカニクイザルの血清中でインキュベートした後の2つのアンチセンスオリゴヌクレオチド（AON1 PS及びAON2）の補体分割産物活性化プロファイルを評価することであった。

【0164】

実験デザイン

【0165】

1. 5mLのポリプロピレン製微小遠心スナップキャップチューブ内で270µLの試験システムを30µLの調製した10倍の被験物質と混合することにより、試験を実施した。全ての混合物を調製したら、それらを37℃±2℃の水浴に移し、30±2分間インキュベートした。混合物をインキュベートした後、全ての試料をアリコートし、-80℃以下で凍結した。

【0166】

補体活性化の生態分析解析

【0167】

ELISAによるBb分割産物：Bbは、補体の代替経路の活性化によるB因子の切断時に生成される。試験物質への*in vitro*曝露中に産生されるBbのレベルは、代替経路活性化のレベルの尺度として機能し得る。Bb ELISAは、平均値を報告するための2連のウェルで実行される。Bbのレベルを、最初に2つの希釈で評価して、アッセイが高活性化試料によって飽和していないことを確認した。

【0168】

ELISAによるC3a分割生成物：C3aは、補体の中心点でC3が切断される際に生成される。このように、C3a切断は、3つの補体の経路のうちのいずれかの活性化後に生じ得る。またC3aのレベルは、それがアナフィラトキシンであるため重要である。試験物質への*in vitro*曝露中に産生されるC3aのレベルは、この中心点に到達するのに十分に強い補体活性化のレベルの尺度として機能し、ならびにこの活性化の直接的な炎症誘発性の結果の可能性の指標として機能し得る。C3a ELISAは、平均値を報告するための2連のウェルで実行される。C3aのレベルを、最初に2つの希釈で評価して、アッセイが高活性化試料によって飽和していないことを確認した。

10

【0169】

結果を図12及び図13に示す。

【0170】

20

実施例7

幼若マウス26週間の毒性及びバイオ分析試験

【0171】

13週間の回復を伴う26週間の若年性毒性及び毒性動態(TK)試験において、雄のCD-1マウス(20~22/群(主な毒性試験)、6(ビヒクル；滅菌生理食塩水で希釈したビヒクル対照緩衝液)、25-31/群(TK)；21~27/群(回収))には、0(ビヒクル対照緩衝液)、6、12、または18mg/kgのAON1を4日間に1回、PND21~PND203までボラスIV注射により投与した。バイオ分析のために、PND21及び203のAON1治療群から、投薬前(PND203のみ)、投薬後0.5、1、3、8、及び24時間後に血液を収集した。以下のパラメータを評価した：体重、食物摂取量、発達ランドマーク(亀頭包皮分離)、神経行動評価(PND187及び281での自発運動活性、PND190及び284での聴覚性驚愕、PND193及び287でのモリス水迷路)。眼科検査、臨床病理学(臨床化学、血液学、及び凝固)、肉眼解剖、臓器重量、及び組織病理学を含む。

30

【0172】

有害所見の欠如に基づいて、無毒性量(NOAE L)は18mg/kg/用量であった。PND21において、この用量レベルは、5280nmol/L及び11,700h*nmol/Lの(AUC_{0~24})値をそれぞれ投与後、0~24時間の濃度-時間曲線下で、最高の観測濃度(C_{max})及び面積に相当する。PND203において、この用量レベルは、5860nmol/L及び14,600h*nmol/LのそれぞれのC_{max}及びAUC_{0~24}の値に相当する。

40

【0173】

実施例8

NHP39週の毒性及びバイオ分析試験

【0174】

雄のカニクイザル(3/群(主な毒性試験)；0、6、12、及び18mg/kg QWの2/群(13週間の回復))に、0(ビヒクル：0.9% NaCl注射、USP)、6、12、または18mg/kg QW AON1を39週間、IV注入(60分)経由で投与した。異なる試験日/時点で、バイオ分析/TK、及び補体活性化分析のために血液を採取した。以下のパラメータを評価した：死亡率、臨床徴候、体重、食物摂取

50

量、血漿及び組織（腓腹筋、心臓、大腿二頭筋、肝臓、及び腎臓）中のAON1レベル、組織（腓腹筋、心臓、大腿二頭筋、肝臓、及び腎臓）のエクソンスキッピングの割合、臨床病理学（臨床化学、血液学、尿検査、尿化学、及び尿バイオマーカー）、補体活性化指標（Bb、C3a、及びsC5b-9）、眼科、ECG、臓器重量、及び組織病理学。

【0175】

組織中のAON1の平均濃度は、全てのAON1治療群において、274日目の予定された終末安楽死時及び予定外の安楽死時に数量化できた。平均濃度は、一般に、6～12 mg/kg/用量までの用量増加と共に増加した。6～12 mg/kg/用量の投薬段階の274日目のAON1の平均濃度の順位は、肝臓、腎臓、心臓、腓腹筋、及び大腿二頭筋であった。

10

【0176】

組織内のエクソンスキッピングをRT-ddPCRで測定した。この方法で、非スキップされたDMD（ジストロフィン）転写物の数及びエクソン51スキップしたDMD転写物の数を定量化し、エクソンスキッピングの割合（%スキップ）を計算した。エクソン51スキップパーセントは4.5%から40.8%まで幅があり、低用量群（6 mg/kg/QW）よりも高用量群（12及び18 mg/kg/QW）で高かった。図14も参照されたい。

【0177】

AON1関連の体重の変化なし、眼科的所見；獣医学的観察、ECG波形異常または不整脈；またはPR間隔、QRS持続時間、QTもしくは補正QT（QTc）間隔、もしくは心拍数への影響が認められた。最大18 mg/kg/用量を投与した動物では、AON1関連臨床病理学（血液学及び凝固）への影響は観察されなかった。最大18 mg/kg/用量を投与した雄では、AON1関連の巨視的観察または器官重量への影響は、早期の計画殺時または予定された計画殺時には認められなかった。

20

【0178】

12 mg/kg/用量または18 mg/kg/用量をそれぞれ投与した雄1名を、それぞれ投与期の194日目または211日目にAON1関連の瀕死状態で殺した。臨床的及び獣医学的観察は、両方の動物で類似しており、活動性の低下、細い外観、ならびに体幹下部及び／または四肢のくぼみまたは皮下浮腫を含んだ。臨床病理学的所見は、炎症、高窒素血症、低アルブミン血症、及び尿タンパクの上昇を示した（測定した1匹の動物において）。瀕死率の原因は、糸球体腎傷害及び多系統性血管炎症に起因していた。予定外の犠牲動物におけるAON1関連の臨床病理学的効果は、炎症反応、水分の欠乏、腸管喪失の可能性、興奮／生理的反応、及び／または血小板数の中程度の減少を支持し、これには明確な機構は欠けていた。予定外の殺動物の顕微鏡的所見には、腎臓小管の変性／再生、血管変性、肥大、ならびに血管壁及び／または血管周囲組織の炎症が含まれ、これは、間質浮腫、血栓症（肺）、及び／または病変組織（心臓）における局所的な変性変化をもたらした可能性がある。浮腫はまた、血清タンパク質が著しく低いことと関連してきた可能性があり、これは糸球体の変化に起因したものであった。これらの所見及びこれらの後遺症は、AON療法に関してサルが罹患しやすい補体介在性の病因と一致していた（Frazier Toxicol Pathol. 2015, Jan; 43 (1): 78-89）。NHPにおけるAONに対する感受性の増加の理由は、AONに対するH因子の結合を増加させると理解されている、カニクイザルにおけるH因子成分の遺伝学と関連付けられている。補体活性化を調節するのに必要な遊離H因子の量の減少は、代替経路の主要制御因子を除去する。

30

40

【0179】

補体の代替経路及び末端経路を伴う低いレベルで一過性の補体活性化が、対照群を含むすべての投与群で観察された。補体活性化の増加は、概して、試験の過程で活性化のレベルは上昇する傾向があったほとんどの動物で投与後72時間までに投与前のレベル近くまで減少した。早期に計画殺された2匹の動物は、それぞれ、113日目及び204日目に、投薬前のレベルと比較してBbレベルが200%超増加した。これら2匹の動物の補体

50

活性化プロファイルは、観察された腎臓損傷を伴う補体と一致していた一方で、他の動物もまた、測定した補体断片の増加を示した。動物間の差異は、多数の補体制御因子が存在することから、一度誘導された補体活性化を制御する動物の能力の個体差に起因する可能性がある。AONとH因子タンパク質との非特異的相互作用を介した補体活性化のメカニズムは、ヒト補体活性化がはるかに高いAON血漿中濃度で起こるため、臨床的な関連性が非常に限定的であることが認められた (Henry Int. Immunopharmacol. 2002; 2: 1657-66、Henry Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications, 2nd ed. CRC Press: Carlsbad, CA; 2008: 327-63、Shen J Pharmacol Exp Ther. 2014 Dec; 351 (3): 709-17)。

10

【0180】

AON1関連の臨床病理学的影響は、6mg/kg/用量以上を投与した予定された殺動物で観察された。18mg/kg/用量を投与した動物における投与段階の176日目 (ALTを除く)、204日目、211日目、216日目、及び218日目にアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 及びアルカリホスファターゼ (ALP) 活性が軽度増加したことは、肝障害を示唆した。炎症反応を裏付けた作用は、18mg/kg/用量を投与した動物における投与段階の176日目、204日目、211日目、216日目及び218日目に穏やか軽度にアルブミン濃度が減少し、グロブリン濃度が上昇し (その結果、アルブミン:グロブリン比が減少する)、18mg/kg/用量を投与した動物における投与段階の211日目、216日目、及び218日目に軽度ハプトグロビン濃度が上昇することを含んだ。さらに、アルブミンは腎臓を介して失われた。これは、18mg/kg/用量を投与した動物における投与段階の211日目、216日目、及び218日目における軽度尿タンパク:尿クレアチンの比の上昇及び尿におけるタンパク質の発生率の上昇により裏付けされる。6mg/kg/用量以上を投与した動物における投与段階の211日目、216日目、218日目、225日目、239日目、253日目、260日目、267日目、及び274日目のマイクロアルブミン:クレアチニン比が軽度から中等度に増加したことも、腎臓を介したアルブミンの損失を裏付けた。18mg/kg/用量を投与した動物における投与段階の211日目、216日目、及び218日目の軽度のクラスタリン:クレアチニン比の増加は、腎臓損傷を裏付けた。さらなる作用は、6mg/kg以上を投与した動物における投与段階の176日目、204日目、211日目、216日目、218日目、225日目、239日目、253日目、260日目、267日目、及び274日目に非用量依存的に軽度血小板数が減少したことであった。用量は、明確なメカニズムを欠いていた。中等度/顕著な血小板減少症につながる経時的な血小板数の減少が、18mg/kg QW群の2匹の動物で観察されたが、解剖病理学的所見とは関連しなかった。予定した殺動物では、AON1関連の凝固作用は観察されなかった。

20

30

【0181】

投与段階の218日目に18mg/kg/用量を投与した2匹の初期最終殺動物及び計画的殺予定動物における顕微鏡的所見は、1匹の動物における腎小管上皮のごくわずかな変性及び別の動物の肝臓における最小の混合細胞炎症を伴った。これは、肝酵素値の増加と相関していた。これらの所見は、それぞれ、腎尿細管上皮またはクッパー細胞内のAON1の蓄積に起因した。瀕死動物及び早期殺動物に共通するさらなるAON1関連所見は、心臓弁における軽度または中等度の単核細胞浸潤、及びいくつかの組織における単核浸潤の発生率の増加傾向を含んだ。これらの所見は、投与に関連する全身性炎症及び/または補体活性化の存在を反映している可能性があり、弁膜症の変化を除いて、サルで一般的に観察される偶発的所見の悪化とされた。すべての動物において、AON1の蓄積に関連する知見には、腎尿細管上皮及びクッパー細胞内の好塩基性顆粒 (一般に用量依存的に)、ならびに複数の組織内であるが、リンパ節に最も顕著である変化があり、泡沫状及び/またはわずかな好塩基性細胞質を特徴とするマクロファージの存在が含まれた。そ

40

50

の蓄積は、 12 mg/kg / 用量以上を投与した動物の周囲組織への損傷と関連しているようには見えず、マクロファージの変化は、いずれの用量でも損傷と関連しているようには見えなかった。 6 mg/kg / 用量以上を投与した動物の下顎及び／または腸間膜のリンパ節における回復期安楽死時の顕微鏡所見は、腎臓内の最小の好塩基性顆粒、肝臓のクッパー細胞の最小の色素、最小～中等度の空胞化／色素沈着したマクロファージの浸潤によって実証されるように、可逆性の傾向を示した。さらに、それぞれ 12 mg または 18 mg/kg / 用量を投与した1匹の動物の消化管及び膀胱（このサルの試験では移行細胞変性／空胞は認められなかった）及び 18 mg/kg / 用量を投与した1匹の動物の睾丸に、ごくわずかな空胞化／色素沈着したマクロファージの浸潤が認められた。

【0182】

10

臨床病理学的状態及び解剖病理学的所見の重症度に基づき、AON1を投与された雄の健康及びウェルビーイングへの全体的な影響に関して、無毒性量（NOAEL）は 6 mg/kg / 用量とみなされ、投与段階260日で、 C_{max} は投与段階の260日目に $17,000\text{ nmol/L}$ の平均最大観察濃度（ C_{max} ）及び $36,500\text{ h}\cdot\text{nmol/L}$ の濃度－時間曲線下面積（AUC₀₋₂₅）に相当した。

【0183】

実施例 9

最初のヒト用量選択

【0184】

提案された用量及び臨床試験期間（実施例10）は、安全性、及びこの試験に登録された各小児参加者への直接的な恩恵の見通しを確保するために選択した。

20

【0185】

最初のヒト臨床試験（実施例10）では、AON1の最大6つの用量レベル： IV 投与 0.6 mg/kg 、 1.5 mg/kg 、 3 mg/kg 、 6 mg/kg 、 9 mg/kg 、及び 12 mg/kg の順次的な評価を含む。

【0186】

臨床試験（実施例10）の開始用量は、雄カニクイザルにおけるGLP13週間反復投与毒性試験（ 18 mg/kg / 週）から得たAON1のNOAELを使用して決定した（実施例13）。 18 mg/kg QWのサルNOAELのヒト等価用量（HED）は、体表面積スケーリングアプローチに基づいて、 5.8 mg/kg QWである。したがって、選択された開始用量 0.6 mg/kg は、サルに基づく10倍の安全マージンを提供し、サルは補体活性化及び結果としての炎症反応に対してより感受性が高いため、危険有害性物質の特定にとってより関連性の高い種であると考えられる。これは、アンチセンスオリゴヌクレオチドのクラスエフェクトの1つとみなされる（後者はサルにおける非臨床毒性の主要原因である）（Shen J Pharmacol Exp Ther. 2014 Dec; 351 (3): 709-17）。サルを使用すると、ヒトで予想され得るものと定量的及び質的に類似している任意の有害反応を同定する可能性が最大化されることが広く受け入れられている（Farman Toxicol Pathol. 2003; 31: 119-122）。

30

【0187】

40

週1回の投与間隔と比較してAON1の血漿半減期が短いため、蓄積が低いと予想されることを考慮すると、コホート1A（パート1）の2週間ごとの用量レベルの増加は、治療量以下の用量レベルで個々の参加者の曝露期間を最小化するために適切であると考えられる。2倍から2.5倍の用量増分は、非臨床データが安全である可能性が高い用量を介して個々の参加者を安全かつ効率的に増大させることを可能にする。39週間の試験で観察された毒性所見は、慢性投与と関連しており、臨床試験における最初の単回漸増用量では予想されない（実施例10）。

【0188】

ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの血漿曝露は、同じ mg/kg 用量について、NHP患者とDMD患者との間で類似していることが以前に示されている（Bosgra

50

Nucleic Acid Ther. 2019; 29 (6) : 305-322)。したがって、体表面積スケーリングの使用は、臨床試験の単一の漸増用量部分の開始用量選択に関して、体重のスケーリングよりも保守的なアプローチを提供する。臨床試験の反復投与段階については、NHPからヒトへの直接体重ベース (mg / kg) 外挿を適用し、6、9、及び $12 \text{ mg} / \text{kg}$ QWの順次評価を提案する。

【0189】

反復投与段階の開始用量 $6 \text{ mg} / \text{kg}$ QWは、定常状態でのジストロフィンの発現が正常の10%超であると予想される薬理学的に活性な用量であるため、各小児参加者が直接的な利益を得ることができるように選択される。DMCは、4週目までの投薬コホートの安全性データを検討し、用量増加に関する推奨を行う。

【0190】

最大用量 $12 \text{ mg} / \text{kg} / \text{週}$ は、管理可能な安全性プロファイルを有するBMN351による治療の潜在的な有効性を最大化するように選択されてきており、慢性毒性研究によって正当化され、通知される：

●全体として、慢性毒性研究（39週間のサル研究（実施例8）、26週間のマウス研究（実施例11）、及び幼若マウス研究（実施例7））における主な毒性シグナルは、全て臨床的に監視可能なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの周知のクラスエフェクトと一致する。

●39週間のサルの試験で用量制限毒性が観察され、そこでのNOAELは $6 \text{ mg} / \text{kg} / \text{週}$ と決定された。39週間のサルの試験で同定されたNOAELを上回る投与量（ $6 \text{ mg} / \text{kg} / \text{週}$ ）は、 $12 \text{ mg} / \text{kg}$ QW以上の用量制限毒性が、他の前臨床種及びヒトと比較してNHPが誇張した感受性を有すると知られている補体介在性効果と一致しているように思われるため、適切であると考えられる。（Barbour Nephrol Dial Transplant. 2013 Jul; 28 (7) : 1685-93, Shen J Pharmacol Exp Ther. 2014 Dec; 351 (3) : 709-17）。したがって、補体媒介性効果は、臨床的安全性の誤差を提供するのではなく、危険性を特定するものとみなすべきである。中等度／顕著な血小板減少症につながる経時的な血小板数の減少が、39週間のサルの試験において $18 \text{ mg} / \text{kg}$ QW群の2匹の動物で観察されたが、解剖病理学的所見とは関連しなかった。血小板の減少は臨床で監視可能である。

【0191】

肝臓、腎臓、血液（血小板減少症）、凝固系、及び血管系（炎症変化）は、非臨床研究に基づいてヒト毒性の標的臓器として同定された。

【0192】

臓器特異的毒性バイオマーカーの使用、明確に概説されたDLT基準、及び試験停止基準を含めた頻繁な臨床及び実験室監視を通じて、リスクモニタリング及び軽減活動を実施する。安全性データは、データ監視委員会（DMC）が、用量増加、用量漸減、新規コホートの開放、またはコホート拡大のいずれかを推奨する前に評価する。

【0193】

実施例10

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの参加者におけるAON1の安全性、忍容性、薬物動態、及び薬力学を評価するための第1／2相用量漸増試験

【0194】

本試験では、静脈内（IV）注入を介した6つの漸増用量におけるAON1の安全性及び忍容性を調査する。デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の進行性を考慮し、本試験は非盲検試験であり、全ての参加者はAON1を受ける。提案される用量及び試験期間は、安全性、ならびに試験に登録された各小児参加者への直接的な利益の見通しを確実にするように選択される。使用すべき製剤は、実施例3に記載している。

【0195】

サルにおける重要な13週間のGLP毒素試験からの無毒性量（NOAEL）は、18

10

20

30

40

50

mg/kg QWであると決定された。したがって、ヒト等価用量（HED）は、体表面積のスケールアップアプローチに基づいて、5.8 mg/kg QWである。したがって、選択された開始用量0.6 mg/kgは、サルに基づく10倍の安全域を提供し、これは、サルが補体活性化及びアンチセンスオリゴヌクレオチドのクラスエフェクトの1つである、必然的な炎症反応に対してより感受性が高いため、危険有害性物質の特定にとってより関連していると考えられる（Shen L, Frazer-Abel A, Reynolds PR, et al. Mechanistic understanding for the greater sensitivity of monkeys to antisense oligonucleotide-mediated complement activation compared with humans. J Pharmacol Exp Ther. 2014 Dec;351(3):709-17）。低い（2～2.5倍）用量設定は、あらゆる潜在的な用量依存性安全シグナルの早期検出の可能性をさらに高め、したがって早期の介入を可能にする。

10

【0196】

各6つの用量レベル（0.6 mg/kg、1.5 mg/kg、3 mg/kg、6 mg/kg、12 mg/kg、及び18 mg/kg）における参加者の投与を、このクラスの分子を用いた以前の安全経験に基づいた間隔で交互に行う。データモニタリング委員会（DMC）は、用量増加、用量漸減、新規コホートの開放、またはコホートを拡大するかどうかを推奨する前に、利用可能な安全性データを評価する。この設計には、用量漸増前のアンチセンスオリゴヌクレオチド（AON）の既知のクラスエフェクトである急性の安全性事象を含む、参加者の安全性の慎重なモニタリング、ならびに必要なに応じて、個人及び試験中止規則の履行が含まれる。

20

【0197】

本試験は、安全性、忍容性、及び薬物動態（PK）と組み合わせたジストロフィン発現による概念実証を証明して、用量反応を評価し、さらなる臨床開発のための用量選択に関する洞察を提供するために実施されている。研究によると、筋肉内のジストロフィンの量が多いほど、疾患の表現型の重症度が低くなることが示されている（de Feraudy et al. Ann Neurol. 2021 ;89(2):280-292）。したがって、ジストロフィン発現の増加は、本試験にとって意味のある結果である。

【0198】

血漿PK及び筋肉の分布を評価して、用量、血漿及び筋曝露、エクソンスキッピング、ならびにジストロフィン発現の関係を調査する。

30

【0199】

筋肉におけるAON1分布、エクソンスキッピング、及びジストロフィンレベルの読み取りを、全ての参加者が6 mg/kg、9 mg/kg、及び12 mg/kgでの治療を12週間（コホート1A、パート2）または24週間（コホート1B、2、及び3）完了した後に行い、将来の臨床開発に実施するための最適な耐量を決定した。

【0200】

これが完了すると、参加者は、少なくとも1年の計画期間で長期延長（LTE）試験に登録することができる。延長相の原理は、DMDを有する参加者におけるAON1の安全性、忍容性、PK、及び薬力学的（PD）効果をより長期間にわたって評価すること、ならびに参加者の機能変化を長期的に評価し、場合によっては対応する外部対照群と比較することである。疾患の自然な経過を考慮すると、関連する延長試験は、この試験デザインの必要な構成要素である。

40

【表 3】

目的	エンドポイント：
原発性	
● DMDを有する参加者における様々な用量レベルでのAON1の安全性及び忍容性を評価すること	● 有害事象／SAE／AESIの発生率 ● 身体診察 ● 安全性臨床検査パラメータ ● ECGパラメータ ● 心エコー検査
副次項目	
● AON1の血漿及び尿における薬物動態ならびに筋肉分布を評価すること	● AON1血漿PK ○ AUC_{0-t}、AUC_{0-inf} ○ C_{max}、$C_{トラフ}$ ○ T_{max}、CL、V_{ss}、$t_{1/2}$ ● AON1尿PK ○ $AE_{0\sim 24時間}$、CLR ● 13週目（コホート1A）または25週目（コホート1B、2、及び3）での筋肉中のAON1濃度
探索	
● DMDを有する参加者の筋肉におけるエクソン51スキッピング及びジストロフィン発現に対するAON1の効果を評価すること	● 筋生検におけるジストロフィン発現（13週目（コホート1A）または25週目（コホート1B、2、及び3）のベースラインからの変化） ● エクソンスキッピング効率（筋生検からのジストロフィンメッセンジャーリボ核酸（mRNA）に対するRT-ddPCR）（13週目（コホート1A）または25週目（コホート1B、2、及び3）のベースラインからの変化）
● AON1に対する免疫応答を評価すること	● 抗AON1抗体 ● 抗ジストロフィン抗体
● 身体機能におけるAON1の効果を評価すること	● NSAA（25週目のベースラインからの変化） ● 6MWT（25週目のベースラインからの変化）
● AON1を受ける参加者の自殺傾向のリスクを評価すること	● 子どもの行動チェックリスト（CBCL）

10

20

30

40

50

6MWT、6分間の歩行試験；AE、有害事象；AESI、特に注目すべき有害事象； AUC_{0-t} 、時点0から最後の時間までの濃度－時間曲線下面積、 AUC_{0-inf} 、時間0から無限大までの濃度－時間曲線下面積、CBCL、子どもの行動チェックリスト、 CL 、クリアランス、 C_{max} 、最大濃度、 $C_{トラフ}$ 、トラフ血漿中濃度、DMD、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ECG、心電図。mRNA、メッセンジャーリボ核酸と、NSAA、NorthStar歩行中評価；PK、薬物動態、RT-ddPCR、逆転写酵素－液滴デジタルポリメラーゼ連鎖反応、SAE、重篤な有害事象； $t_{1/2}$ 、半減期； T_{max} 、最大濃度までの時間、 V_{ss} 、定常状態における分布容積

【0201】

本試験は、エクソン51のスキッピングに適しているDMDを有する参加者を対象としたIV AON1の6つの漸増用量の安全性、忍容性、薬物動態、及び薬力学を評価する用量漸増試験である。本試験は第1／2相非盲検試験であり、無作為化は計画されていない。データを個々の参加者のベースラインデータと比較する。本試験に適格であるためには、可能な参加者は、以下の選択された主要な選択基準を含む、プロトコルに記載される全ての適格性要件を満たす必要がある。

●スクリーニング時に男性で、かつ年齢が4～10歳である

●中心となる遺伝カウンセラーにより審査されたエクソン51スキッピングに適したDM

D 遺伝子の文書化されたジストロフィン変異に起因するデュシェンヌ型筋ジストロフィーの臨床診断

●スクリーニング時に歩行可能（支援機器なしで自立して歩行し、制限時間10メートルの歩行／走行試験を8秒以下で完了できる）と定義される

●現在、日中の換気に依存しておらず、来年中に日中の機械的換気または非侵襲的換気を必要と予想されない

●現在、ベースラインの前に少なくとも12週間安定した用量で経口コルチコステロイドによる治療を受けており、体重の変化に対応するための修正を除いて、試験全体を通して一貫した用量／用量レジメンを維持する必要がある

●事前に規定した臨床検査値に基づく正常な腎機能

【0202】

選択除外基準には以下が含まれる：

●7歳以上の小児の強制呼気量（FEV₁）＜予測値の60%

●肝臓疾患または腎臓疾患の現在または病歴

●スクリーニング前の3ヶ月以内またはスクリーニング来院時に実施された心エコー図（ECHO）に基づく左心室駆出率（LVEF）＜55%

●3回実施したスクリーニング心電図（ECG）上でのFridericia法で補正した平均QT間隔（QTcF）が450ミリ秒以上

●スクリーニング時の血小板数が $150 \times 10^9 / L$ 未満

●ベースライン（1日目）前12週間以内の任意のエクソン51スキッピング療法による治療、または任意の時点でDMDの治療のための任意の遺伝子治療による治療

【0203】

適格参加者を3つのコホート：コホート1（n=6）、コホート2（n=3）、またはコホート3（n=6）のうちの1つに割り当てる。コホート1の参加者をさらにコホート1A（n=3）とコホート1B（n=3）とに分ける。コホート1A（パート1）では、参加者はAON1の単回漸増用量を0.6mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、及び6mg/kgで受け、その後、次の高い投与量への増大の前に評価する場合、各用量レベルで1週間の休薬を行うか、または6mg/kg用量の場合は慢性投薬への増大の前に評価される。コホート1A（パート2）では、参加者は6mg/kgでAON1の週1回の用量を受け、この用量は、非臨床データに基づいて定常状態で約10%のジストロフィン発現をもたらすと予想される。コホート1Bの参加者は6mg/kg QWを受け、コホート2の参加者（n=6）は9mg/kg QWを受け、コホート3の参加者（n=6）は12mg/kg QWを受ける。具体的な用量漸増手順を下記に記載する。

【0204】

DMCは、安全性を監視し、用量漸増の推奨を行う。用量制限毒性（DLT）基準は、0.6mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、及び6mg/kgの単一用量の1週間後の評価までの期間に適用可能である（コホート1A（パート1）のみ）。コホート1A（パート2）、1B、2、及び3については、DLT基準は、コホートの最終参加者の4週目の評価まで適用可能である。試験中止基準は、試験全体を通じて全ての参加者に適用される。登録者数は、最大耐用量（MTD）に達したかどうかに応じて、最大18名の参加者の範囲となる。

【0205】

AON1は、コホート1A（パート1）の参加者（n=3）に対して0.6mg/kgの開始用量で投与され、参加者への投与間隔は少なくとも9日とする。コホート1A（パート1）参加者は、2週目の来院時に投与されない。DMCは、2週目まで各参加者の安全性データを検討し、DLTが不在の場合は、参加者に1.5mg/kgまで漸増させる（またはDLTが存在する場合は、コホートを6人の参加者に拡大する）ことを推奨する。コホート1A（パート1）の参加者は、3週目に1.5mg/kgのAON1を受ける。その後、DMCは4週目まで各参加者の安全性データを検討し、DLTが存在しな

10

20

30

40

50

い場合は参加者に $3 \text{ mg} / \text{kg}$ まで漸増させる（または DLT が存在する場合は、コホートを 6 人の参加者に拡大する）ことを推奨する。コホート 1 A（パート 1）参加者は、4 週目の来院時に投与されない。コホート 1 A（パート 1）参加者は、5 週目に $3 \text{ mg} / \text{kg}$ の AON1 を受ける。その後、DMC は、6 週目まで各参加者の安全性データを検討し、DLT が存在しない場合は、参加者に $6 \text{ mg} / \text{kg}$ まで漸増させる（または DLT が存在しない場合は、コホートを 6 人の参加者に拡大する）ことを推奨する。コホート 1 A（パート 1）参加者は、6 週目の来院時に投与されない。コホート 1 A（パート 1）参加者は、7 週目に $6 \text{ mg} / \text{kg}$ の AON1 を受ける。その後、DMC は、8 週目まで各参加者の安全性データを検討し、DLT が存在しない場合は、 $6 \text{ mg} / \text{kg}$ の毎週の投与で Part 2 を開始する（または DLT が存在しない場合は、Part 1 でコホートを 6 人の参加者に拡大する）ことを推奨する。コホート 1 A（パート 1）参加者は、8 週目の来院時に投与されない。

10

【0206】

コホート 1 A の参加者中に DLT が発生した場合、追加の 3 名の参加者を DLT が発生した用量レベルで登録し、次いで、コホート 1 A（パート 1）について上記で概説した用量漸増規則に従って個別に用量を漸増させる。

【0207】

8 週目以降の来院が、コホート 1 A 参加者についてのパート 2 の開始であり、 $6 \text{ mg} / \text{kg}$ QW の用量レベルのためにベースライン（1 週目）の来院を指定する。 $6 \text{ mg} / \text{kg}$ QW でコホート 1 A（パート 2）参加者の投与を少なくとも 9 日空ける。パート 2 でコホート 1 A の 3 名の参加者全てが $6 \text{ mg} / \text{kg}$ QW で 3 回の投与を受け、3 番目の参加者が 4 週目の評価を完了した後、DMC は利用可能な安全性データを検討し、DLT が存在しない場合は、 $6 \text{ mg} / \text{kg}$ QW で投与のためコホート 1 B を開放する推奨を行う。

20

【0208】

$6 \text{ mg} / \text{kg}$ QW でコホート 1 B 参加者の投与を少なくとも 9 日空ける。パート 2 でコホート 1 B の 3 名の参加者全てが $6 \text{ mg} / \text{kg}$ QW で 3 回の投与を受け、最後の参加者が 4 週目の評価を完了した後、DMC は全ての 6 コホート 1 の参加者について利用可能な安全性データを検討し、DLT が 1 以下の場合は、 $9 \text{ mg} / \text{kg}$ QW で投与のためコホート 2 を開放する推奨を行う。

【0209】

コホート 2 の参加者（ $n = 6$ ）に対して、AON1 を $9 \text{ mg} / \text{kg}$ QW で投与し、参加者間で少なくとも 9 日の間隔を空ける。コホート 2 の 6 名の参加者全てが 3 回の投与を受け、最後の参加者が 4 週目の評価を完了後、DMC は利用可能な安全性データを検討し、DLT が 1 以下の場合は、 $12 \text{ mg} / \text{kg}$ QW で投与のためコホート 3 を開放する推奨を行う。

30

【0210】

AON1 は、全てのコホート 3 の参加者（ $n = 6$ ）に対して $12 \text{ mg} / \text{kg}$ QW で投与され、参加者への投与間隔は少なくとも 9 日とする。

【0211】

所与のコホートにおいて 2 人以上の参加者が DLT を経験した場合、MTD は超えており、さらなる用量増加は追求されない。DMC は、データ検討後に、以前のコホートの拡大、より低い中間用量の選択、または試験の停止を推奨することができる。

40

【0212】

主要な安全性評価評価項目は、上記の「目的及び評価項目」の表に列挙される。本試験の副目的には、AON1 の血漿及び尿の PK ならびに筋内分布の評価が含まれる。スクリーニング時及び 13 週目（コホート 1 A）または 25 週目（コホート 1 B、2、及び 3）に全ての参加者は筋生検を受ける。コホート 3（ $12 \text{ mg} / \text{kg}$ QW）の参加者全 6 名が 25 週目の評価を完了した後、計画された長期延長（LTE）試験のための用量を決定するために、全てのデータを評価し、本試験を完了し、少なくとも 1 年の予定された期間を有する全ての参加者にオープンにする。LTE 試験の詳細は、別個のプロトコルで規

50

定する。用量が決定され、L T E 試験の登録が開始されると、本試験の参加者は、L T E 試験に移行するか、またはA O N 1の最終用量の4週間後に試験完了来院を行う。L T E 試験が開始されるまで、本試験における投与及び評価を継続する。

【0213】

25週目に最後の参加者がその参加者の用量を受けた後、D M Cが全ての参加者データを検討する。この結果及びD M Cの推奨に基づいて、治験依頼者はL T E 試験の用量を決定する。参加者は、治験依頼者のL T E 用量決定を経て全ての予定された来院を完了した場合、試験を完了したとみなされる。医療当局のクリアランスまたは承認に続き、参加者の施設がL T EのI R B / E C承認を受け取った後、参加者はL T Eで投薬を開始することができる。試験は、参加者がL T Eに登録する前の最後の来院日に完了する。L T E 試験中、参加者は12mg / kgまたは本試験中に決定された最高耐量でA O N 1を受ける。

10

実施例11

【0214】

雄C D - 1マウスにおけるA O N 1 26週間の毒性試験の評価

【0215】

雄のC D - 1マウス（10または15 / 群（主な毒性試験）ならびに0及び18mg / kg投与群の主な毒性動物の最大5 / 群を、13週間の回復期後に安楽死させた。4（ビヒクル対照）及び19 / 群（毒物動態学（T K））に、週2回A O N 1を合計26週間、0（ビヒクル、0.9%NaCl注射、U S P）、6、12、または18mg / kgで、ゆっくりとしたボラスI V注射経路で投与した。バイオ分析のために、1日目及び176日目の0（投与後2分以内）、投与後0.33、1、3、8、及び24時間で血液を採取した。以下のパラメータを評価した：死亡率、臨床徴候、体重、食物摂取量、眼科的検査、臨床病理学（すなわち、臨床化学、血液学、及び凝固）、肉眼解剖、臓器重量、及び組織病理学。

20

【0216】

バイオ分析及び組織分布

【0217】

血漿曝露量（C_{max}及びAUC_{0~24}に基づく）は、一般に用量比例的に用量増加と共に増加した。雄のマウスでは、A O N 1を複数回投与後の蓄積は観察されなかった。

30

【0218】

雄のマウス組織内のA O N 1の平均濃度は、すべての治療群で178日目に測定可能であった。平均濃度は、一般に、6~18mg / kg / 用量までの用量増加と共に増加した。用量レベルにわたるA O N 1の平均濃度の順位は、肝臓、腎臓、心臓、腓腹筋、及び大腿二頭筋であった。

【0219】

病理学的所見の重症度が軽度であり、週2回最大18mg / kg / 用量を投与した動物の健康または幸福に影響を与えないことにより、無毒性量（NOAEL）は週2回の18mg / kg / 用量であった。これは、投与段階の176日目に、それぞれ、37, 700nmol / L及び14, 700h * nmol / Lの平均最大観察濃度（C_{max}）及び濃度-時間曲線下面積（AUC_{0~24}）に相当した。

40

実施例12

【0220】

シトクロムP450の阻害及び誘導

【0221】

A O N 1がCYP酵素を阻害する可能性を、0.1~100μMのA O N 1でインキュベートしたヒト肝ミクロソームで評価した。アッセイの正当性を、各イソ酵素について陽性対照（すなわち、参照化合物）を用いて確認した。CYP1A2の直接阻害に関するI C₅₀値は7.85μMであり、一方でCYP2C8及びCYP2C19の直接阻害に関するI C₅₀値は>100μMであった。ミクロソームタンパク質結合を考慮した後

50

、CYP1A2、CYP2C8、及びCYP2C19の直接阻害に関する未結合のIC₅₀値はそれぞれ0.09、>1.27、及び>1.08 µMであり、これは最大用量18 mg/kgにおいて予測されるヒト血漿C_{max}の18 µMよりも低かった。AON1の血漿タンパク質結合が試みられたが、ろ過装置への高レベルの非特異的結合のために評価できることができなかった。CYP2B6、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4/5（基質=テストステロンまたはミダゾラム）の直接的な阻害はなかった。文献に基づくと、CYP酵素のホスホロチオエートベースのオリゴヌクレオチド阻害は、検査システム依存性であった。ホスホロチオエートベースのオリゴヌクレオチドによるCYP酵素の阻害は、ヒト肝ミクロソームで観察され、凍結保存ヒト肝細胞では観察されなかった（Kazmi Drug Metab Dispos. 2018 Aug; 46(8): 1066–1074. <https://dmd.aspetjournals.org/content/dmd/46/8/1066.full.pdf>で入手可能）。凍結保存ヒト肝細胞は、CYP酵素のホスホロチオエートベースのオリゴヌクレオチド阻害のための薬物-薬物相互作用のin vitro-in vivo推定に使用するための、より臨床的に関連する阻害プロファイルを提供する。AON1がホスホロチオエートベースのオリゴヌクレオチドでもあることを考慮すると、ミクロソームはin vivoの条件の代表ではない場合がある。

10

【0222】

その目的のために、凍結保存ヒト肝細胞を使用してさらなる試験を実施し、評価するすべてのCYPについてIC₅₀値>100 µMでAON1がCYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、またはCYP3A4/5の直接的または時間依存的阻害剤ではないことが実証された。

20

【0223】

CYP酵素を誘導する可能性を、100 µMのAON1でインキュベートした肝細胞で評価した。アッセイの正当性を、各イソ酵素について陽性対照（すなわち、参照化合物）を用いて確認した。CYP誘導に関するin vitroアッセイは、CYP1A2、CYP2B6、及びCYP3A4がAON1によって転写レベルで誘導されないことを示した。

実施例 13

【0224】

13週間処理した雄カニクイザルにおけるAON1の評価

30

【0225】

雄のカニクイザル（3/群（主な毒性試験）；0、12、及び18 mg/kg QWの2/群（4週間の回復））に、0（ビヒクル：0.9% NaCl注射、USP）、6、12、または18 mg/kg QWでAON1を13週間、IV注入（60分）経由で投与した。バイオ分析のために、投薬前、1日目、85日目、ならびに投薬後の0.5、1、2、3、6、8、及び24時間後に、及び補体活性化分析のために、投薬後、1、3、6、及び24時間で血液を採取した。投与前試料を78日目にも収集した。以下のパラメータを評価した：死亡率、臨床徴候、体重、食物摂取量、血漿及び組織（腓腹筋、心臓、大腿二頭筋、肝臓、及び腎臓）中のAON1レベル、組織（腓腹筋、心臓、大腿二頭筋、肝臓、及び腎臓）のエキソンスキッピングの割合、臨床病理学（臨床化学、血液学、尿検査、尿化学、及び尿バイオマーカー）、補体活性化指標（Bb、C3a、及びsC5b-9）、眼科、ECG、臓器重量、及び組織病理学。

40

【0226】

組織内のエクソンスキッピングをRT-ddPCRで測定した。この方法で、非スキップされたDMD（ジストロフィン）転写物の数及びエクソン51スキップされたDMD転写物の数を定量化し、エクソンスキッピングの割合（%スキップ）を計算した。エクソン51スキップの割合は、1.7%から14.4%と変動し、概して用量とともに増加した。

【0227】

50

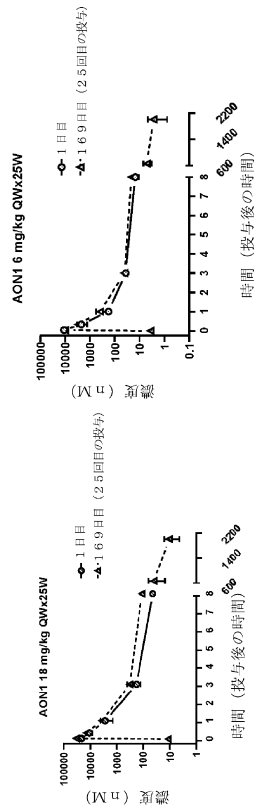
本開示は、実施例に開示される実施形態によって範囲が限定されるものではなく、実施例は、個々の態様の単なる例示として意図されるものであり、いかなる等価物も本開示の範囲内である。本明細書に示されかつ記載されるものに加えて様々な修正は、当業者にとって前述の説明から明らかであろう。そのような修正は、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれるものとする。

【0228】

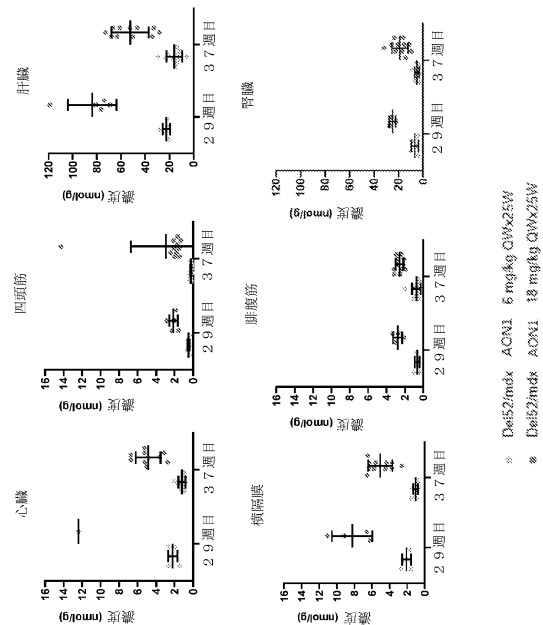
特許、特許出願、及び刊行物などの種々の参考文献が本明細書で引用されており、これらの開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【図面】

【図1】



【図2】



10

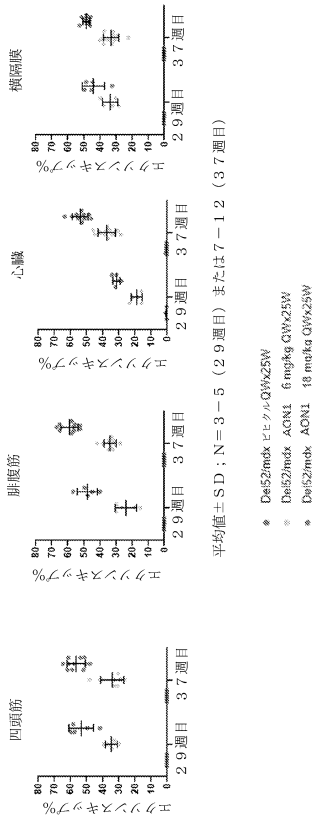
20

30

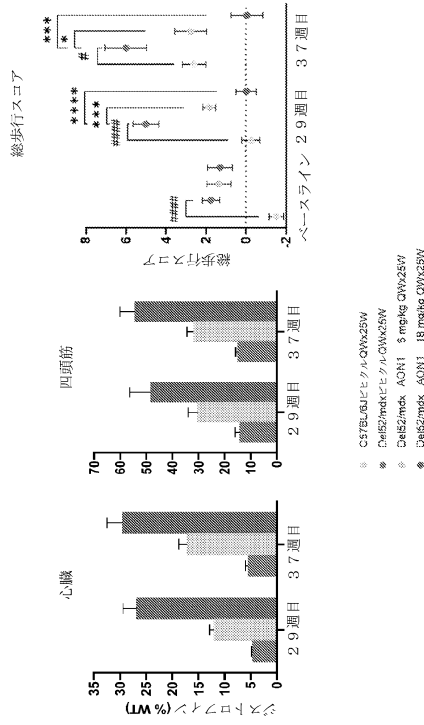
40

50

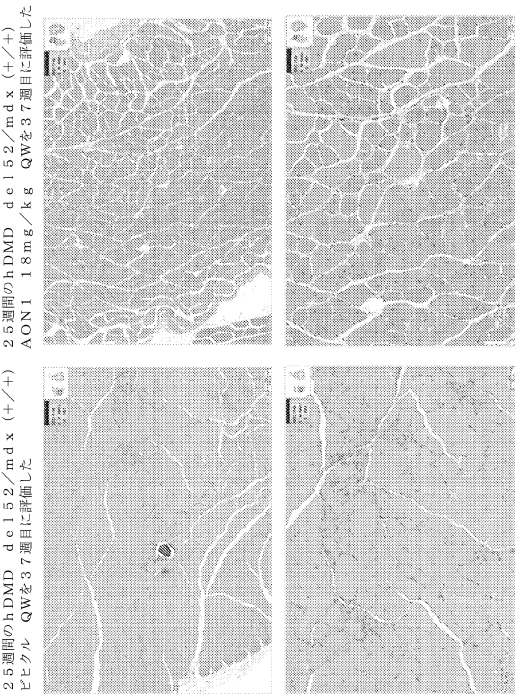
【図 3】



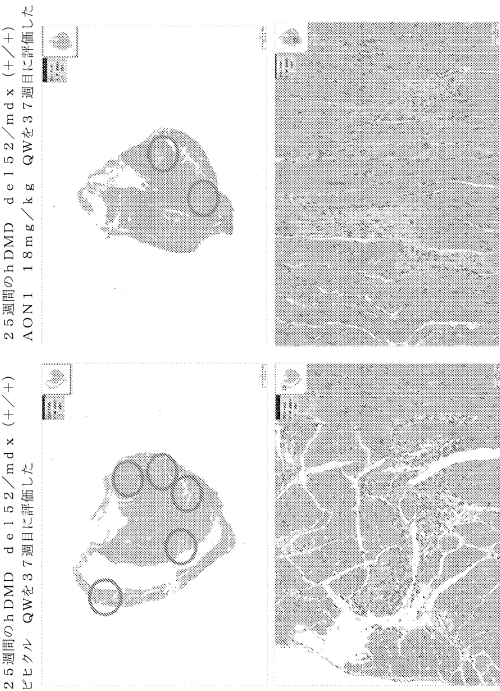
【図 4】



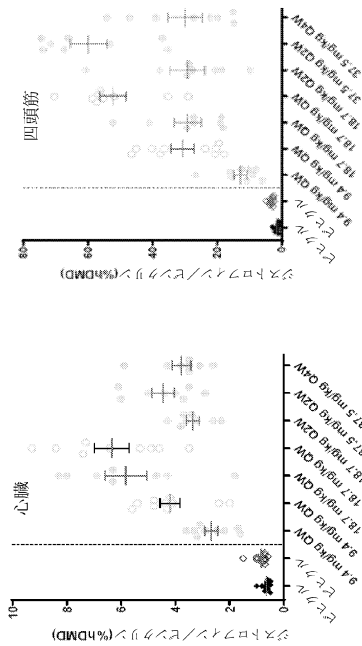
【図 5】



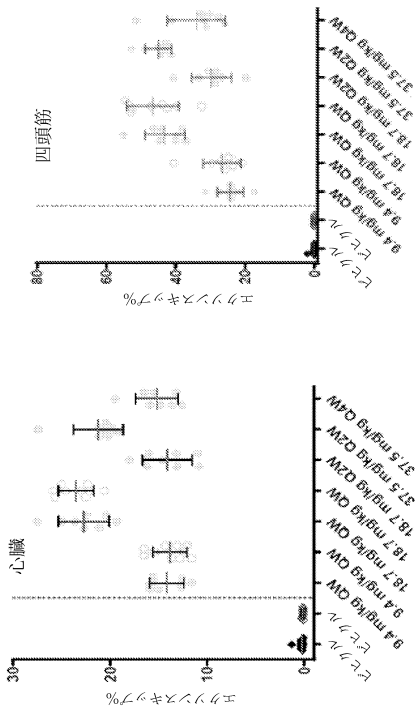
【図 6】



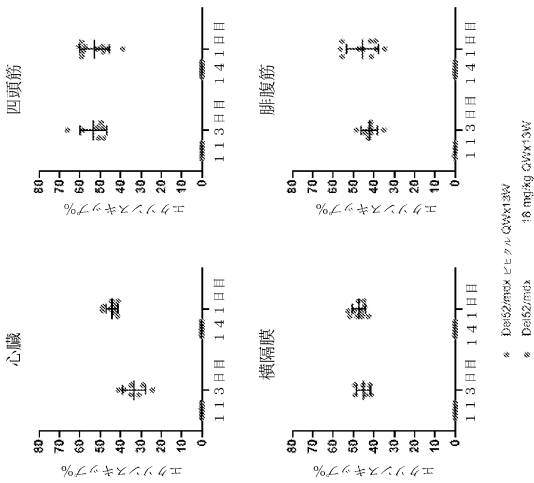
【図 7】



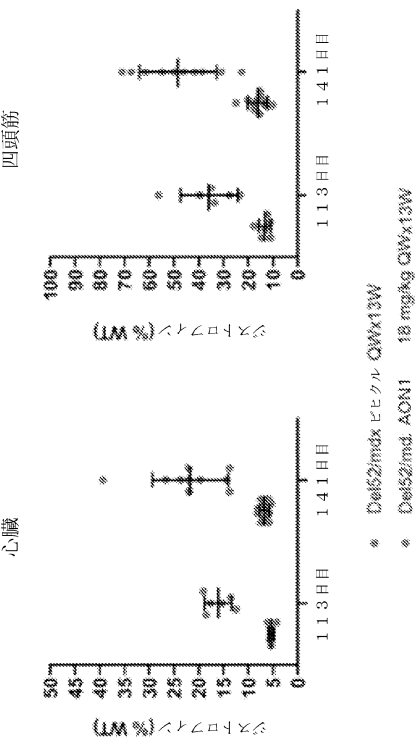
【図 8】



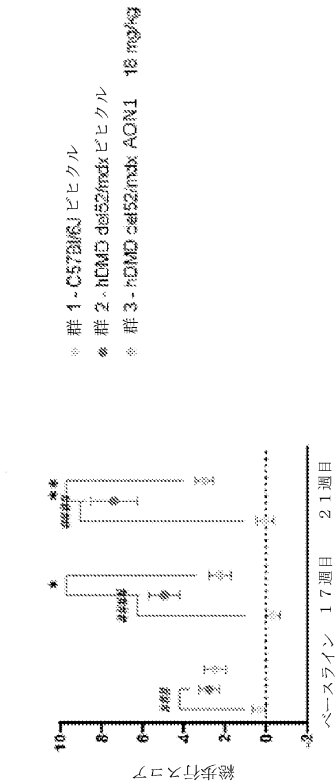
【図 9】



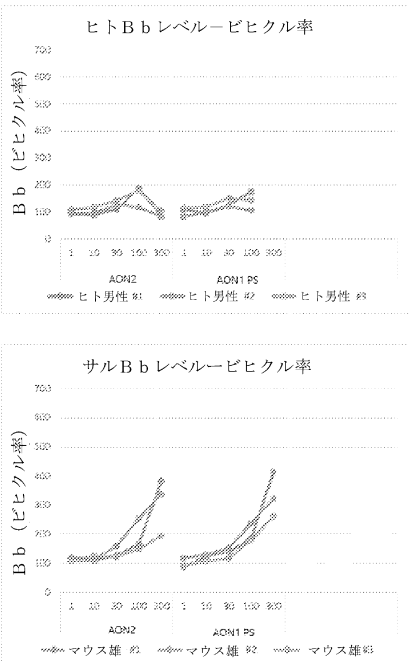
【図 10】



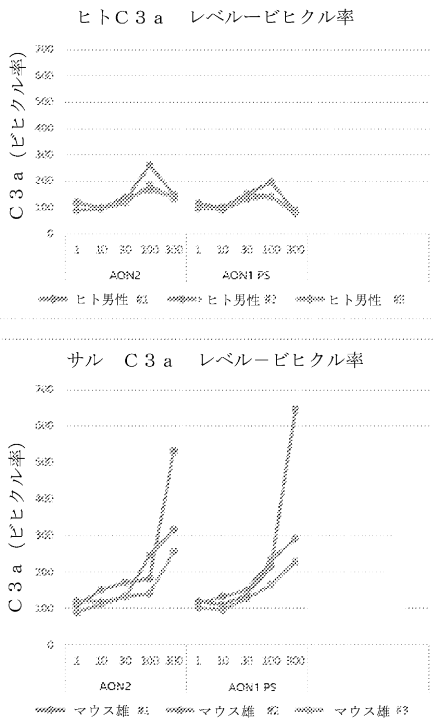
【図 1 1】



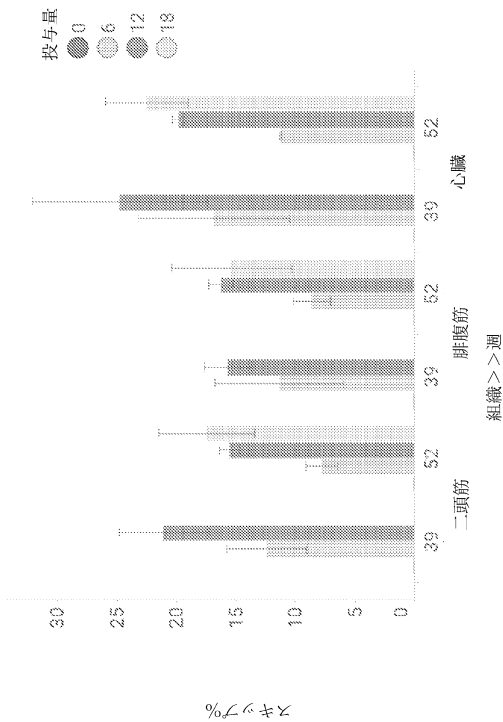
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

20

30

40

50

【配列表】

2025515011000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066540

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/089325 A1 (BIOMARIN TECHNOLOGIES BV [NL]) 7 May 2020 (2020-05-07) page 104, line 13 - line 14; sequence 15980 page 133 page 135; example 2 -----	1-14
A	VELTROP MARCEL ET AL.: "A dystrophic Duchenne mouse model for testing human antisense oligonucleotides", PLOS ONE, vol. 13, no. 2, 21 February 2018 (2018-02-21), page e0193289, XP93069469, DOI: 10.1371/journal.pone.0193289 Retrieved from the Internet: URL:https://journals.plos.org/plosone/arti cle/file?id=10.1371/journal.pone.0193289&t ype=printable> -----	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 August 2023

Date of mailing of the international search report

09/08/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, Giovanni

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2023/066540
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/066540

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020089325 A1	07-05-2020	AU 2019370937 A1	27-05-2021
		CA 3118167 A1	07-05-2020
		CN 113286887 A	20-08-2021
		EP 3874044 A1	08-09-2021
		IL 282818 A	30-06-2021
		JP 2022506219 A	17-01-2022
		KR 20210091180 A	21-07-2021
		SG 11202103938U A	28-05-2021
		US 2022025368 A1	27-01-2022
		WO 2020089325 A1	07-05-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

F I

C 1 2 N

15/09

1 1 0

C 1 2 N

15/113

Z Z N A

テーマコード (参考)

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,P
H,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,
UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ケアオブ バイオマリン ファーマシューティカル インコーポレイテッド

(72)発明者

バグワット, シュリパッド エス.

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ノバト, デジタル ドライブ 1 0 5, ケアオブ バイ
オマリン ファーマシューティカル インコーポレイテッド

(72)発明者

ニール, デイヴィッド ライリー

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ノバト, デジタル ドライブ 1 0 5, ケアオブ バイ
オマリン ファーマシューティカル インコーポレイテッド

(72)発明者

ジャコビー, デイヴィッド リード

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ノバト, デジタル ドライブ 1 0 5, ケアオブ バイ
オマリン ファーマシューティカル インコーポレイテッド

F ターム (参考)

4C084 AA19 NA05 ZA941 ZA942 ZC032 ZC751

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA94