



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119095962 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 06

(21) 申请号 202380036687.1

(22) 申请日 2023.05.03

(30) 优先权数据

63/364,260 2022.05.05 US

63/387,733 2022.12.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/066540 2023.05.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/215781 EN 2023.11.09

(71) 申请人 生物马林药物股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 查理斯·A·欧尼尔

赛培德·S·巴汉维特

大卫·瑞里·尼尔

大卫·瑞德·加柯比

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 张晨 郑霞

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

(54) 发明名称

治疗杜氏肌营养不良的方法

(57) 摘要

本文提供了使用修饰的反义寡核苷酸治疗杜氏肌营养不良或延迟其发作的方法。

权利要求书1页 说明书28页
序列表(电子公布) 附图13页

1. 一种治疗患有DMD的受试者或延迟受试者的DMD发作的方法,其包括以0.4mg/kg、0.6mg/kg、0.8mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、9mg/kg、12mg/kg或18mg/kg的剂量向所述受试者施用AON1,其中所述AON1以QW方式施用。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述AON1以QWx15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35W方式施用。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述AON1以QWx24W或QWx25W方式施用。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述AON1以QWx25W方式施用。

5. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述AON1以QWx24W方式施用。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述AON1以3mg/kg的剂量施用。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述AON1以6mg/kg的剂量施用。

8. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述AON1以9mg/kg的剂量施用。

9. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述AON1以12mg/kg的剂量施用。

10. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述AON1以18mg/kg的剂量施用。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的方法,其为治疗受试者的DMD的方法。

12. 如权利要求1-10中任一项所述的方法,其为延迟受试者的DMD发作的方法。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其还包括向所述受试者施用第二活性剂。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述第二活性剂是艾地普尔森、卡西莫森、戈洛迪森、维托拉森、SRP-5051 (Sarepta Therapeutics)、皮质类固醇诸如地夫可特、基因疗法(例如,SRP-9001、GALGT2或GNT 0004 (Sarepta Therapeutics))、基因编辑(例如,CRISPR/CAS9 (Sarepta Therapeutics))或细胞疗法(例如,CAP-1002 (Capricor Therapeutics/Nippon Shinyaku Co.Ltd.))。

治疗杜氏肌营养不良的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2022年5月5日提交的美国临时专利申请号63/364260和于2022年12月16日提交的美国临时专利申请号63/387,733的优先权权益。上文提及的申请中的每一个的公开内容以引用方式整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,所述序列表作为2023年4月26日创建的大小为11,646字节的名为“035105W0.xml”的XML文件随同提交,其以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0005] 本文提供了治疗杜氏肌营养不良 (DMD) 或延迟其发作的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向患有DMD的受试者施用修饰寡核苷酸。

背景技术

[0006] 反义寡核苷酸 (AON) 正处于许多疾病和疾患的临床 (前) 开发阶段,所述疾病和疾患包括癌症、炎症性疾患、心血管疾病以及神经变性和神经肌肉病症。它们的作用机制针对各种靶标诸如RNA酶H介导的细胞核或细胞质中靶RNA的降解,针对细胞核中的剪接调节 (外显子包含或跳跃),或针对在细胞质中通过核糖体亚基结合的空间位阻实现的翻译抑制。剪接调节或剪接转换AON首次被描述用于校正人类 β -球蛋白前体mRNA中的异常剪接 (Dominski和Kole PNAS,1993,90(18):8673-8677),目前正在研究将其用于多种遗传病症。

[0007] 已在神经肌肉病症杜氏肌营养不良 (DMD) 和贝克尔肌营养不良 (BMD) 的治疗方面对AON进行了广泛研究。杜氏肌营养不良 (DMD) 和贝克尔肌营养不良 (BMD) 是最常见的儿童期肌营养不良形式。DMD是严重的、致命的神经肌肉病症,导致12岁之前依赖轮椅支撑,并且患者通常在30岁之前死于呼吸或心力衰竭。它由一个或多个外显子的阅读移码缺失 (~67%) 或重复 (~7%) 或由2.24Mb肌营养不良蛋白基因中的点突变 (~25%) 引起,导致功能性肌营养不良蛋白的缺乏。BMD也由肌营养不良蛋白基因中的突变引起,但这些突变维持开放阅读框,产生半功能性肌营养不良蛋白,并导致通常更温和的表型和更长的寿命。

[0008] 迄今为止,已有四种AON被批准用于DMD的治疗:艾地普尔森 (eteplirsen)、戈洛迪森 (golodirsen)、卡西莫森 (casimersen) 和维托拉森 (viltolarsen)。然而,这些药物的功效有限并且各自仅被批准用于治疗一小部分DMD患者。

[0009] 因此,仍然需要治疗DMD的方法。

发明内容

[0010] 本文提供了通过向患有DMD的受试者施用修饰寡核苷酸来治疗DMD或延迟其发作的方法。在一个实施方案中,修饰寡核苷酸是反义寡核苷酸 (AON)。

附图说明

- [0011] 图1示出随时间变化的AON1血浆浓度。
- [0012] 图2示出心脏、四头肌、肝脏、横隔膜、腓肠肌和肾脏组织中的AON1浓度。
- [0013] 图3显示,经过25周的治疗,AON1在肌肉组织(四头肌、腓肠肌、心脏和横隔膜)中实现了持续的剂量依赖性外显子51跳跃。
- [0014] 图4示出心脏和四头肌中的肌营养不良蛋白wt%,并示出用AON1治疗的小鼠的总体步态评分。
- [0015] 图5显示,AON1治疗减轻hDMD de152(+/-)模型相关的肌肉病理并在25周给药后持续12周维持药理效应。
- [0016] 图6显示,AON1治疗减轻hDMD de152(+/-)模型相关的心脏病理并持续12周维持药理效应。
- [0017] 图7示出在QW、Q2W或Q4W给药后14天(实心圆)或28天(空心圆),用具有通过硫代磷酸酯基团连接至寡核苷酸的TEG的AON1(AON1 PS,9.4、18.7或37.5mg/kg)治疗的hDMD Δ 52/mdx小鼠的心脏和四头肌中的肌营养不良蛋白表达。
- [0018] 图8示出在QW、Q2W或Q4W给药后14天(实心圆)或28天(空心圆),用AON1 PS(9.4、18.7或37.5mg/kg)治疗的hDMD Δ 52/mdx小鼠的心脏中的%外显子51跳跃。
- [0019] 图9示出在给药后4周和8周,用18.7mg/kg AON1(13周QW)治疗的hDMD Δ 52/mdx小鼠的四头肌、腓肠肌、心脏和横隔膜中的%外显子51跳跃。
- [0020] 图10示出在QWx13W给药后4或8周,用AON1(18.7mg/kg)治疗的hDMD Δ 52/mdx小鼠的心脏和四头肌中的肌营养不良蛋白表达。
- [0021] 图11示出用AON1治疗的小鼠的总体步态评分。
- [0022] 图12示出AON1 PS和AON2(不具有5'-TEG基团的AON1)对人类和猴子血清中的补体参数Bb的影响。
- [0023] 图13示出AON1 PS和AON2对人类和猴子血清中的补体参数C3a的影响。
- [0024] 图14示出用AON1治疗39周的NHP的二头肌、腓肠肌和心脏组织中的外显子跳跃(实施例8)。

具体实施方式

- [0025] I. 定义
- [0026] 为了便于理解本文所阐述的公开内容,下文定义了多个术语。
- [0027] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与本领域普通技术人员通常所理解相同含义。所有专利、申请、已公布的申请和其他出版物均以引用方式整体并入。如果本文中的术语存在多个定义,则以此章节的定义为准,除非另有说明。
- [0028] 除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一种/一个(a)”、“一种/一个(an)”和“所述(the)”包括复数个指代物。
- [0029] 如本文所用,“受试者”是动物,诸如哺乳动物,包括人类,诸如患者。
- [0030] 如本文所用,生物活性是指化合物的体内活性或在体内施用化合物、组合物或其他混合物时产生的生理反应。因此,生物活性涵盖此类化合物、组合物和混合物的治疗效果和药代动力学行为。可在被设计来测试此类活性的体外系统中观察生物活性。

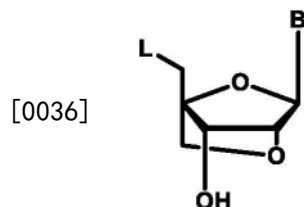
[0031] 如本文所用,治疗意指改善或以其他方式有益地改变疾病或病症的一种或多种症状的任何方式。治疗还涵盖本文的组合物的任何药物用途,诸如用于治疗DMD的用途。

[0032] 如本文所用,通过施用特定化合物或药物组合物来改善特定病症的症状是指可归因于化合物或药物组合物的施用或与其相关的任何减轻,无论是永久性的还是暂时性的、持久性的还是过渡性的。

[0033] 如本文所用,除非另有说明,否则术语“管理(manage、managing和management)”涵盖预防特定疾病或病症在曾患该疾病或病症的受试者中复发,和/或延长患有该疾病或病症的受试者保持缓解状态的时间。这些术语涵盖调节疾病或病症的阈值、发展和/或持续时间,或改变受试者对疾病或病症作出反应的方式。

[0034] II. 用于本文提供的方法中的AON

[0035] 在一个实施方案中,用于本文提供的方法中的AON与人类肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子51的一部分反向互补。在另一个实施方案中,用于本文提供的方法中的AON具有序列5'-gguaaguucugu ccaagc-3' (SEQ ID NO:1) 并且含有修饰。在另一个实施方案中,用于本文提供的方法中的AON具有序列5'-gguaaguuc*uguc*c*aagc*-3' (SEQ ID NO:2),其中c*是5-甲基胞嘧啶并且g和c*是LNA核苷酸。如本文所用,LNA核苷酸具有以下结构:



[0037] 其中B是核碱基并且L是与另一个核苷酸相连的磷酸酯或硫代磷酸酯键。

[0038] 在另一个实施方案中,用于本文提供的方法中的AON具有序列TEG-5'-gguaaguuc*uguc*c*aagc*-3',其中c*是5-甲基胞嘧啶,g和c*是LNA核苷酸,并且TEG是三乙二醇基团。在另一个实施方案中,用于本文提供的方法中的AON具有序列TEG-5'-gguaaguuc*uguc*c*aagc*-3',其中c*是5-甲基胞嘧啶,g和c*是LNA核苷酸,TEG是通过磷酸酯基团附接至5'端的三乙二醇基团,核苷间键是硫代磷酸酯键,并且非LNA核苷酸是2'-OMe核苷酸(在本文称为“AON1”)。参见WO 2022/069511 A1和US2022/0098586A1。

[0039] III. 治疗DMD的方法

[0040] 本文提供了通过向患有DMD的受试者施用修饰寡核苷酸来治疗DMD或延迟其发作的方法。在一个实施方案中,修饰寡核苷酸是反义寡核苷酸(AON)。在另一个实施方案中,AON是本文公开的AON。在另一个实施方案中,AON是AON1。在另一个实施方案中,提供了一种通过向患有DMD的受试者施用AON1来治疗DMD的方法。在另一个实施方案中,提供了一种通过向患有DMD的受试者施用AON1来延迟DMD发作的方法。

[0041] 在某些实施方案中,AON以0.4mg/kg、0.6mg/kg、0.8mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、9mg/kg、12mg/kg或18mg/kg的剂量施用。在另一个实施方案中,AON以QW方式施用。在另一个实施方案中,AON以QWx15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35W方式施用。在另一个实施方案中,AON以QWx24W或QWx25W方式施用。在另一个实施方案中,AON以QWx25W方式施用。在另一个实施方案中,AON以QWx24W方式施用。

[0042] 在某些实施方案中,AON1以0.4mg/kg、0.6mg/kg、0.8mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、

6mg/kg、9mg/kg、12mg/kg或18mg/kg的剂量施用。在另一个实施方案中,AON1以QW方式施用。在另一个实施方案中,AON1以QWx15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35W方式施用。在另一个实施方案中,AON1以QWx24W或QWx25W方式施用。在另一个实施方案中,AON1以QWx25W方式施用。在另一个实施方案中,AON1以QWx24W方式施用。

[0043] 在另一个实施方案中,AON1以6mg/kg QWx25W方式施用。在另一个实施方案中,AON1以18mg/kg QWx25W方式施用。

[0044] 在另一个实施方案中,提供了一种通过以6mg/kg QWx24W方式施用AON1来治疗DMD的方法。在另一个实施方案中,提供了一种通过以18mg/kg QWx24W方式施用AON1来治疗DMD的方法。在另一个实施方案中,提供了一种通过以6mg/kg QWx24W方式施用AON1来延迟DMD发作的方法。在另一个实施方案中,提供了一种通过以18mg/kg QWx24W方式施用AON1来延迟DMD发作的方法。

[0045] 在某些实施方案中,与治疗DMD或延迟其发作的现有方法相比,本文提供的方法产生更优异的结果。在一个实施方案中,本文提供的方法诱导相关疾病修正生物标志物(disease modifying biomarker)向正常化的方向变化。在另一个实施方案中,本文提供的方法诱导疾病相关的临床和解剖肌肉病理向正常化的方向变化。在另一个实施方案中,本文提供的方法部分或几乎完全挽救DMD表型,如在MotoRater/步态评分中所测量的。在另一个实施方案中,本文提供的方法增加肌营养不良蛋白的产生。在另一个实施方案中,本文提供的方法增加人类肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子51的跳跃。在另一个实施方案中,该方法缓解DMD的一种或多种症状。

[0046] 使用本文提供的AON缓解个体中DMD的一种或多种症状可通过以下测定中的任一种来评估:至丧失行走能力的时间延长、肌肉力量的改善、举重能力的改善、起身时间的改善、九米步行时间的改善、爬四阶梯时间的改善、腿部功能等级的改善、肺功能的改善、心脏功能的改善、生活质量的改善。这些测定中的每一种都是熟练的技术人员已知的。对于这些测定中的每一种,一旦发现测定中测量的参数的可检测改善或延长,这通常将意味着DMD的一种或多种症状已经在使用本文提供的AON的个体中缓解。如Hodgetts等人Neuromuscular Disorders 2006;16:591-602中所述,可检测的改善或延长在一个实施方案中是统计学上显著的改善或延长。可替代地,可通过测量肌纤维功能、完整性和/或存活的改善来评估DMD的一种或多种症状的缓解。在另一个实施方案中,DMD患者的一种或多种症状得到缓解和/或来自DMD患者的一种或多种肌肉细胞的一种或多种特征得到改善。此类症状或特征可在细胞、组织水平或患者自身上进行评估。

[0047] 可通过对来自患者的肌源细胞或肌肉细胞进行任何以下测定来评估来自患者的肌肉细胞的一种或多种特征的缓解:肌肉细胞对钙的摄取减少、胶原蛋白合成减少、形态改变、脂质生物合成改变、氧化应激减少和/或肌纤维功能、完整性和/或存活改善。这些参数通常使用免疫荧光和/或肌肉活检物的横截面的组织化学分析来评估。

[0048] 肌纤维功能、完整性和/或存活的改善可使用至少一种以下测定来评估:血液中肌酸激酶的可检测降低、疑似营养不良的肌肉的活检物横截面中肌纤维坏死的可检测降低和/或疑似营养不良的肌肉的活检物横截面中肌纤维直径的均匀性的可检测增加。这些测定中的每一种都是熟练的技术人员已知的。

[0049] 如Hodgetts等人(2006)所述,可在血液中检测到肌酸激酶。可检测的肌酸激酶减

少可意味着与治疗前同一DMD患者的肌酸激酶的浓度相比降低5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0050] 通常使用活检物横截面在肌肉活检物中评估肌纤维坏死的可检测减少,诸如Hodgetts等人(2006)所述。可检测的坏死减少可以是其中已经使用活检物横截面鉴定坏死的面积的5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的减少。通过与如在治疗前同一DMD患者中评估的坏死相比较来测量减少。

[0051] 通常在肌肉活检物横截面中评估肌纤维直径均匀性的可检测增加,诸如Hodgetts等人(同上)所述。通过与治疗前同一DMD患者的肌纤维直径的均匀性进行比较来测量增加。

[0052] 在一个实施方案中,本文提供的AON为所述个体提供功能性或半功能性肌营养不良蛋白,并且能够至少部分地减少所述个体中异常肌营养不良蛋白的产生。

[0053] 在一个实施方案中,为个体提供功能性或半功能性肌营养不良蛋白是指功能性或半功能性肌营养不良蛋白的产生的增加。增加功能性或半功能性肌营养不良蛋白mRNA或功能性或半功能性肌营养不良蛋白的产生是指与功能性或半功能性mRNA或功能性或半功能性肌营养不良蛋白的初始量相比可检测的增加或增加至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、160%、180%、200%或更多,如通过RT-数字微滴PCR(mRNA) (Verheul等人,PLoS ONE 2016,11(9):e0162467)或免疫荧光(Beekman等人,PLoS ONE 2014;9(9):e107494)、蛋白质印迹或毛细管西方免疫测定(Beekman等人,PLoS ONE 2018;13(4):e0195850)分析(蛋白质)可检测到的。在另一个实施方案中,所述初始量是使用本发明的化合物在细胞、器官、组织和/或个体中开始诱导肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子跳跃时功能性或半功能性mRNA或功能性或半功能性肌营养不良蛋白的量。

[0054] 减少异常肌营养不良蛋白mRNA或异常肌营养不良蛋白的产生意味着异常肌营养不良蛋白mRNA或异常肌营养不良蛋白的初始量的90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少仍可通过RT-数字微滴PCR(mRNA)或免疫荧光、蛋白质印迹或毛细管西方免疫测定(Wes)分析(蛋白质)检测到。在一个实施方案中,所述初始量是使用本发明的AON在细胞、器官、组织和/或个体中开始诱导肌营养不良蛋白前体mRNA中的外显子跳跃时异常肌营养不良蛋白mRNA或异常肌营养不良蛋白的量。异常肌营养不良蛋白mRNA或蛋白在本文中也称为功能性较差(与野生型功能性肌营养不良蛋白相比)或非功能性肌营养不良蛋白mRNA或蛋白。非功能性肌营养不良蛋白是不能结合肌动蛋白和/或DGC蛋白复合物成员的肌营养不良蛋白。非功能性肌营养不良蛋白或肌营养不良蛋白mRNA通常不具有或不编码具有蛋白质的完整C端的肌营养不良蛋白。功能性或半功能性肌营养不良蛋白mRNA或蛋白的检测可如检测异常肌营养不良蛋白mRNA或蛋白一样进行。

[0055] 一旦为DMD患者提供了功能性或半功能性肌营养不良蛋白,则DMD的至少部分原因就被消除。因此,然后将预期DMD的症状至少部分缓解,或者症状恶化的速率降低,从而导致更缓慢的减退。增强的跳跃频率还增加DMD个体的肌肉细胞中产生的功能性或半功能性肌营养不良蛋白的水平。

[0056] IV. 用于所述方法的药物组合物

[0057] 本文提供的药物组合物包含治疗有效量的一种或多种本文提供的AON以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

[0058] AON可被配制成合适的药物制剂,诸如溶液、混悬液、粉末、用于眼科或肠胃外施用

的无菌溶液或混悬液,以及透皮贴剂。通常,使用本领域众所周知的技术和程序将本文所述的AON配制成药物组合物(参见,例如,Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms,第七版1999)。

[0059] 在组合物中,将有效浓度的一种或多种化合物或药学上可接受的盐与合适的药用载剂或媒介物混合。在某些实施方案中,组合物中AON的浓度对于在施用递送治疗、预防或改善本文公开的疾病或病症的一种或多种症状和/或进展的量是有效的。

[0060] 通常,组合物被配制用于单剂量施用。为了配制组合物,将一定重量分数的化合物以有效浓度溶解、悬浮、分散或以其他方式混合在选定的媒介物中,使得所治疗的疾患得到缓解或改善。适用于施用本文提供的AON的药物载剂或媒介物包括本领域技术人员已知适用于特定施用方式的任何此类载剂。

[0061] 此外,AON可配制为组合物中的唯一药物活性成分或可与其他活性成分组合。脂质体悬浮液,包括组织靶向脂质体,也可适合作为药学上可接受的载剂。这些可根据本领域技术人员已知的方法制备。例如,可按照本领域所已知的那样制备脂质体制剂。简单来说,可通过在烧瓶内部干燥卵磷脂酰胆碱和脑磷脂酰丝氨酸(摩尔比为7:3)来形成脂质体,诸如多层囊泡(MLV)。添加本文提供的化合物在缺乏二价阳离子的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的溶液并振荡烧瓶直到脂质膜分散。洗涤所得的囊泡以除去未囊封的化合物,通过离心沉淀,然后将其重悬于PBS中。

[0062] 活性化合物以足以对所治疗的受试者发挥治疗有用作用而不产生不期望的副作用的量包含在药学上可接受的载剂中。可通过在本文所述的体外和体内系统中测试AON来凭经验确定治疗有效浓度,然后由此外推用于人类的剂量。在一些实施方案中,以一定方法施用AON以达到药物的治疗有效浓度。在一些实施方案中,使用伴随式诊断(参见,例如,Olsen D和Jorgensen J T,Front.Oncol.,2014年5月16日,4:105,doi:10.3389/fonc.2014.00105)确定活性化合物在特定受试者或受试者群体中的治疗浓度和安全性特征。

[0063] 药物组合物中AON的浓度将取决于活性化合物的吸收、组织分布、失活和排泄速率、化合物的物理化学特征、剂量时间表和所施用的量以及本领域技术人员已知的其他因素。例如,所递送的量足以改善本文公开的疾病或病症的一种或多种症状。

[0064] 在某些实施方案中,治疗有效剂量应产生约0.1ng/mL至约50-100 μ g/mL的活性成分血清浓度。在一个实施方案中,药物组合物提供约0.001mg至约2000mg化合物/千克体重/天的剂量。药物剂量单位形式被制备来提供每剂量单位形式约1mg至约1000mg并且在某些实施方案中约10至约500mg的基本活性成分或基本成分组合。

[0065] AON可一次施用,也可分成多个较小剂量以每隔一段时间施用。应当理解,精确的剂量和治疗持续时间取决于所治疗的疾病,并且可根据经验使用已知的测试方案或通过从体内或体外测试数据外推来确定。值得注意的是,浓度和剂量值也可随着待缓解的疾患的严重程度而变化。还应当理解,对于任何特定受试者,具体的剂量方案应根据个体需要和施用组合物或监督组合物施用的人员的专业判断而随时间调整,并且本文所阐述的浓度范围仅是示例性的并且不旨在限制所要求保护的组合物的范围或实践。

[0066] 因此,将有效浓度或有效量的一种或多种本文所述的AON或其药学上可接受的盐与适合全身、局部或局部区域施用的药用载剂或媒介物混合以形成药物组合物。所包含的

AON的量有效改善一种或多种症状,或用于治疗、延迟进展或预防。组合物中活性化合物的浓度将取决于活性化合物的吸收、组织分布、失活、排泄速率、剂量时间表、施用量、具体制剂以及本领域技术人员已知的其他因素。

[0067] 组合物旨在通过合适的途径施用,包括但不限于肠胃外、皮下、静脉内、肌内、腹膜内、鞘内、经皮、透皮或经颊。

[0068] 用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括以下任何组分:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇、二甲基乙酰胺或其他合成溶剂;抗微生物剂,诸如苯甲醇和对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸和亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,诸如醋酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐;以及用于调节张力的剂,诸如氯化钠或右旋糖。肠胃外制剂可封装在由玻璃、塑料或其他合适的材料制成的安瓿、注射笔(pens)、一次性注射器或者单剂量或多剂量小瓶中。

[0069] 在AON表现出溶解度不足的情况下,可使用溶解AON的方法。此类方法对于本领域技术人员来说是已知的,并且包括但不限于使用共溶剂(诸如二甲基亚砜(DMSO))、使用表面活性剂(诸如TWEEN®)或溶解在碳酸氢钠水溶液中。

[0070] 在混合或添加AON后,所得混合物可以是溶液、悬浮液、乳液等。所得混合物的形式取决于许多因素,包括预期施用方式和AON在所选载剂或媒介物中的溶解度。有效浓度足以改善所治疗的疾病、病症或疾患的症状,并且可根据经验确定。

[0071] 药物组合物以单位剂型提供以施用于人类和动物,所述单位剂型诸如包含适量AON或其药学上可接受的盐的粉末、颗粒、无菌肠胃外溶液或混悬液以及油水乳液。具有药物治疗活性的AON及其盐以单位剂型或多剂型(multipledosage form)配制和施用。如本文所用的单位剂型是指适用于人类和动物受试者并且如本领域所已知的那样单独包装的物理上离散的单位。每个单位剂量包含足以产生期望治疗效果的预先确定的量的治疗活性化合物,以及所需的药物载剂、媒介物或稀释剂。单位剂型的实例包括安瓿和注射器以及单独包装的片剂或胶囊。单位剂型可按分数或其倍数施用。多剂型是将以分开的单位剂型施用的包装在单个容器中的多个相同的单位剂型。多剂型的实例包括小瓶、片剂或胶囊的瓶,或品脱或加仑的瓶。因此,多剂型是在包装中未分开的多个单位剂量。

[0072] 还可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括包含本文提供的化合物的固体疏水性聚合物的半透过性基质,所述基质为成形制品的形式,例如膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括离子电渗贴片、聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸、L-谷氨酸和乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(诸如LUPRON DEPOT™)(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够持续超过100天释放分子,但某些水凝胶释放蛋白质的时间段较短。当囊封的化合物在体内长时间存留时,它们可因暴露于37℃的潮湿环境而变性或聚集,从而导致生物活性的丧失和其结构的可能改变。根据所涉及的作用机制,可以设计合理的稳定化策略。例如,如果发现聚集机制是通过硫代二硫化物交换实现的分子间S-S键形成,那么可通过修饰硫氢残基、从酸性溶液冻干、控制水分含量、使用适当的添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0073] 可制备所含的活性成分在0.005%至100%范围内且其余部分由无毒载剂组成的

剂型或组合物。此类组合物包括溶液、混悬液、粉末和持续释放制剂,诸如但不限于植入物和微胶囊化递送系统,以及可生物降解、可生物相容的聚合物,诸如胶原蛋白、乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、聚原酸酯、聚乳酸等。用于制备这些组合物的方法是本领域技术人员已知的。设想的组合物可包含约0.001%至100%的活性成分,在某些实施方案中,约0.1%至85%或约75-95%。

[0074] 活性AON或药学上可接受的盐可与保护化合物不被从身体中快速消除的载剂一起制备,诸如延时释放(time release)制剂或包衣。

[0075] 组合物可包含其他活性AON以获得期望的特性组合。本文提供的AON或如本文所述的其药学上可接受的盐还可有利地与一般领域中已知对治疗一种或多种上文提及的疾病或医学状况(诸如与氧化应激相关的疾病)有价值的另一种药剂一起施用以用于治疗或预防目的。应当理解,这种组合疗法构成本文提供的组合物和治疗方法的另一方面。

[0076] A. 注射液、溶液和乳液

[0077] 本文还设想了肠胃外施用,通常以注射为特征,即皮下注射、肌肉注射或静脉内注射。注射液可以常规形式制备,即制备为液体溶液或悬浮液、适合在注射前溶解或悬浮于液体中的固体形式,或乳液。在一些实施方案中,悬浮液是微粒或纳米颗粒的悬浮液。在一些实施方案中,乳液是微粒或纳米颗粒的乳液。合适的赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、甘油或乙醇。此外,如果期望,待施用的药物组合物还可包含少量无毒辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、增溶剂和其他此类剂,例如乙酸钠、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯和环糊精。本文还设想了植入缓慢释放或持续释放系统,以便维持恒定的剂量水平。简单来说,将本文提供的AON分散于固体内部基质,例如,聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸丁酯、增塑或未增塑的聚氯乙烯、增塑的尼龙、增塑的聚对苯二甲酸乙二醇酯、天然橡胶、聚异戊二烯、聚异丁烯、聚丁二烯、聚乙烯、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、硅橡胶、聚二甲基硅氧烷、有机硅碳酸酯共聚物(silicone carbonate copolymer)、亲水性聚合物诸如丙烯酸和甲基丙烯酸的酯的水凝胶、胶原蛋白、交联聚乙烯醇和交联的部分水解的聚乙酸乙烯酯,所述固体内部基质被不溶于体液的外部聚合物膜包围,所述外部聚合物膜例如聚乙烯、聚丙烯、乙烯/丙烯共聚物、乙烯/丙烯酸乙酯共聚物、乙烯/乙酸乙烯酯共聚物、硅橡胶、聚二甲基硅氧烷、氯丁橡胶、氯化聚乙烯、聚氯乙烯、氯乙烯与乙酸乙烯酯的共聚物、偏二氯乙烯、乙烯和丙烯、离聚物聚对苯二甲酸乙二醇酯、丁基橡胶、氯醚橡胶、乙烯/乙烯醇共聚物、乙烯/乙酸乙烯酯/乙烯醇三元共聚物和乙烯/乙烯基氧基乙醇共聚物。AON在释放速率控制步骤中通过外部聚合物膜扩散。此类肠胃外组合物中所含的活性AON的百分比高度依赖于其具体性质以及化合物的活性和受试者的需要。

[0078] 组合物的肠胃外施用包括静脉内、皮下和肌肉施用。用于肠胃外施用的制剂包括准备用于注射的无菌溶液、准备在临使用前与溶剂配混的无菌干燥可溶性产品(诸如冻干粉末)(包括皮下注射片剂)、准备用于注射的无菌悬浮液、准备在临使用前与媒介物配混的无菌干燥不溶性产品以及无菌乳液。溶液可以是水性的或非水性的。

[0079] 如果静脉内施用,那么合适的载剂包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS),以及包含增稠剂和增溶剂的溶液,诸如葡萄糖、聚乙二醇和聚丙二醇及其混合物。

[0080] 肠胃外制剂中使用的药学上可接受的载剂包括水性媒介物、非水性媒介物、抗微生物剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮剂和分散剂、乳化剂、掩蔽剂或螯合剂

以及其他药学上可接受的物质。

[0081] 水性媒介物的实例包括氯化钠注射液、林格氏注射液、等渗右旋糖注射液、无菌水注射液、右旋糖和乳酸林格氏注射液。非水性肠胃外媒介物包括植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油和花生油。必须将抑制细菌或抑制真菌浓度的抗微生物剂添加到包装在多剂量容器中的肠胃外制剂中,其包括苯酚或甲酚、汞剂、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵。等渗剂包括氯化钠和右旋糖。缓冲剂包括磷酸盐和柠檬酸盐。抗氧化剂包括硫酸氢钠。局部麻醉药包括盐酸普鲁卡因。悬浮和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。乳化剂包括聚山梨醇酯80 (TWEEN® 80)。金属离子的掩蔽剂或螯合剂包括EDTA。药物载剂还包括用于水混溶性媒介物的乙醇、聚乙二醇和丙二醇以及用于pH调节的氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。

[0082] 调节药物活性AON的浓度,使得注射提供有效量以产生期望的药理作用。正如本领域所已知的,确切剂量取决于受试者或动物的年龄、体重和状况。

[0083] 单位剂量的肠胃外制剂包装在安瓿、小瓶或带针头的注射器中。正如本领域所已知和实践的,所有用于肠胃外施用的制剂必须是无菌的。

[0084] 举例来说,静脉内或动脉内输注包含活性AON的无菌水溶液是有效的施用方式。另一个实施方案是根据需要注射包含活性AON的无菌水性或油性溶液或悬浮液,以产生期望的药理作用。

[0085] 注射液被设计用于局部和全身施用。通常,治疗有效剂量被配制成包含浓度为至少约0.1%w/w至最高约90%w/w或更高,诸如超过1%w/w的活性AON,到所治疗的组织。活性AON可一次施用,也可分成多个较小剂量,以便每隔一段时间施用。应当理解,精确的剂量和治疗持续时间取决于所治疗的组织,并且可根据经验使用已知的测试方案或通过从体内或体外测试数据外推来确定。值得注意的是,浓度和剂量值也可随着所治疗的个体的年龄而变化。还应当理解,对于任何特定受试者,具体的剂量方案应根据个体需要和施用制剂或监督制剂施用的人员的专业判断而随时间调整,并且本文所阐述的浓度范围仅是示例性的并且不旨在限制所要求保护的制剂的范围或实践。

[0086] AON可以微粉化或其他合适的形式悬浮,或可被衍生化以产生更易溶解的活性产物或产生前药。所得混合物的形式取决于许多因素,包括预期的施用方式和化合物在所选载剂或媒介物中的溶解度。有效浓度足以改善疾患的症状,并且可根据经验确定。

[0087] B. 冻干粉末

[0088] 本文还提供了冻干粉末,可将其重构以作为溶液、乳液和其他混合物施用。也可将其重构并配制成固体或凝胶。

[0089] 通过将本文提供的AON或其药学上可接受的盐溶解在合适的溶剂中来制备无菌冻干粉末。溶剂可包含改善粉末或由粉末制备的重构溶液的稳定性或其他药理学组分的赋形剂。可使用的赋形剂包括但不限于右旋糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他合适的剂。溶剂还可包含缓冲剂,诸如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾或本领域技术人员已知的其他此类缓冲剂,在一个实施方案中,约为中性pH。随后对溶液进行无菌过滤,然后在本领域技术人员已知的标准条件下进行冻干,得到期望的制剂。一般来说,将把所得溶液分装到小瓶中冻干。每个小瓶将包含单剂量(包括但不限于10-1000mg或100-500mg)或多剂量的化合物。冻干粉末可在适当的条件下储存,诸如约4℃至室温。

[0090] 用注射用水将该冻干粉末重构得到用于肠胃外施用的制剂。对于重构,每mL无菌水或其他合适的载剂添加约1-50mg、约5-35mg或约9-30mg的冻干粉末。精确的量取决于所选择的化合物。这样的量可根据经验确定。

[0091] C. 局部施用

[0092] 局部混合物按照用于局部区域和全身施用的描述进行制备。所得混合物可以是溶液、悬浮液、乳液等,并且被配制为乳膏、凝胶、软膏、乳液、溶液、酞剂、洗剂、混悬液、酞剂、糊剂、泡沫、气雾剂、灌洗剂、喷雾剂、栓剂、绷带、皮肤贴剂或任何其他适合局部施用的制剂。

[0093] 化合物可被配制用于局部区域或局部应用,诸如以凝胶、乳膏和洗剂的形式局部应用于皮肤和粘膜,诸如应用于眼睛,以及应用于眼睛或用于脑池内或脊柱内应用。局部施用被设想用于透皮递送,也用于施用于眼睛或粘膜,或用于吸入疗法。也可施用单独的活性化合物或其与其他药学上可接受的赋形剂的组合的鼻腔溶液。

[0094] 这些溶液,特别是旨在用于眼科使用的那些,可配制为0.01%-10%等渗溶液,pH约5-7,含适当的盐。

[0095] D. 持续释放组合物

[0096] 本文提供的AON可通过控制释放手段或通过本领域技术人员熟知的递送装置施用。实例包括但不限于美国专利号3,845,770;3,916,899;3,536,809;3,598,123;和美国专利号4,008,719、5,674,533、5,059,595、5,591,767、5,120,548、5,073,543、5,639,476、5,354,556、5,639,480、5,733,566、5,739,108、5,891,474、5,922,356、5,972,891、5,980,945、5,993,855、6,045,830、6,087,324、6,113,943、6,197,350、6,248,363、6,264,970、6,267,981、6,376,461、6,419,961、6,589,548、6,613,358、6,699,500和6,740,634中描述的那些,其中的每一个通过引用并入本文。通过使用不同比例的例如羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基质、凝胶、可透过性膜、渗透系统、多层包衣、微粒、脂质体、微球或其组合来提供期望的释放曲线,此类剂型可用于提供一种或多种活性成分的缓慢或控制释放。可容易地选择本领域的普通技术人员已知的合适的控制释放制剂(包括本文所述的那些)以与本文提供的活性成分一起使用。

[0097] 所有控制释放药物产品都有改善药物治疗,使其超过通过其非控制对应物所实现的药物治疗的共同目标。在一个实施方案中,最佳设计的控制释放制剂在医学治疗中的使用以在最短的时间内用来治愈或控制疾患的药物物质的量最小为特征。在某些实施方案中,控制释放制剂的优点包括药物活性延长、给药频率减少和受试者依从性增加。此外,控制释放制剂可用于影响起效时间或其他特征,诸如药物的血液水平,并且从而可影响副作用(例如,不良反应)的发生。

[0098] 大多数控制释放制剂被设计成最初释放一定量的药物(活性成分),以迅速产生期望的治疗效果,然后逐渐且持续地释放其他量的药物,以在延长的时间段内维持这种水平的治疗或预防效果。为了在体内维持这种恒定的药物水平,药物必须从剂型中以将替换从体内代谢和排泄的药物量的速率释放。AON的控制释放可受到各种条件,包括但不限于pH、温度、酶、水或其他生理条件或化合物的刺激。

[0099] 在某些实施方案中,AON可使用静脉内输注、可植入渗透泵、透皮贴剂、脂质体或其他施用方式来施用。在一个实施方案中,可使用泵(参见Sefton,CRC

Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201 (1987);Buchwald等人,Surgery 88:507 (1980);Saudek等人,N.Engl.J.Med.321:574 (1989)。在另一个实施方案中,可使用聚合物材料。在另一个实施方案中,控制释放系统可放置在治疗靶标附近,即,从而只需要全身剂量的一部分(参见,例如,Goodson,Medical Applications of Controlled Release,第2卷,第115-138页(1984))。

[0100] 其他控制释放系统由Langer在综述中论述(Science 249:1527-1533(1990))。可将AON分散于固体内部基质,例如,聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸丁酯、增塑或未增塑的聚氯乙烯、增塑的尼龙、增塑的聚对苯二甲酸乙二醇酯、天然橡胶、聚异戊二烯、聚异丁烯、聚丁二烯、聚乙烯、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、硅橡胶、聚二甲基硅氧烷、有机硅碳酸酯共聚物、亲水性聚合物诸如丙烯酸和甲基丙烯酸的酯的水凝胶、胶原蛋白、交联聚乙烯醇和交联的部分水解的聚乙酸乙烯酯,所述固体内部基质被不溶于体液的外部聚合物膜包围,所述外部聚合物膜例如聚乙烯、聚丙烯、乙烯/丙烯共聚物、乙烯/丙烯酸乙酯共聚物、乙烯/乙酸乙酯共聚物、硅橡胶、聚二甲基硅氧烷、氯丁橡胶、氯化聚乙烯、聚氯乙烯、氯乙烯与乙酸乙烯酯的共聚物、偏二氯乙烯、乙烯和丙烯、离聚物聚对苯二甲酸乙二醇酯、丁基橡胶、氯醚橡胶、乙烯/乙烯醇共聚物、乙烯/乙酸乙烯酯/乙烯醇三元共聚物和乙烯/乙烯基氧基乙醇共聚物。AON接着在释放速率控制步骤中通过外部聚合物膜扩散。此类肠胃外组合物中所包含的活性成分的百分比高度依赖于其具体性质以及受试者的需要。

[0101] E. 靶向制剂

[0102] 本文提供的AON或其药学上可接受的盐还可被配制成靶向待治疗受试者的特定组织、受体或其他身体区域,包括基于脂质体、重封合红细胞(resealed erythrocyte)和抗体的递送系统。许多此类靶向方法是本领域技术人员熟知的。本文设想了将所有此类靶向方法用于本发明的组合物中。对于靶向方法的非限制性实例,参见,例如美国专利号6,316,652、6,274,552、6,271,359、6,253,872、6,139,865、6,131,570、6,120,751、6,071,495、6,060,082、6,048,736、6,039,975、6,004,534、5,985,307、5,972,366、5,900,252、5,840,674、5,759,542和5,709,874。

[0103] 在一个实施方案中,基于抗体的递送系统是抗体-药物缀合物(“ADC”),例如,如Hamilton G S,Biologicals,2015年9月,43(5):318-32;Kim E G和Kim K M,Biomol.Ther.(Seoul),2015年11月,23(6):493-509;以及Peters C和Brown S,Biosci.Rep.,2015年6月12日,35(4)pii:e00225中所述,其中的每一个以引用方式并入本文。

[0104] 在一个实施方案中,脂质体悬浮液,包括组织靶向脂质体,诸如肿瘤靶向脂质体,也可适合作为药学上可接受的载剂。这些可根据本领域技术人员已知的方法制备,例如,可如美国专利号4,522,811中所述的那样制备脂质体制剂。简单来说,可通过在烧瓶内部干燥卵磷脂酰胆碱和脑磷脂酰丝氨酸(摩尔比为7:3)来形成脂质体,诸如多层囊泡(MLV)。添加本文提供的AON在缺乏二价阳离子的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的溶液并振荡烧瓶直到脂质膜分散。洗涤所得的囊泡以除去未囊封的化合物,通过离心沉淀,然后将其重悬于PBS中。

[0105] F. 制品

[0106] AON或药学上可接受的盐可包装为制品,所述制品包含包装材料、本文提供的AON或其药学上可接受的盐(用于治疗、预防或改善本文公开的疾病或病症的一种或多种症状或进展),以及标签,所述标签指示化合物或其药学上可接受的盐用于治疗、预防或改善本

文公开的疾病或病症的一种或多种症状或进展。

[0107] 本文提供的制品包含包装材料。用于包装药物产品的包装材料是本领域技术人员所熟知的。参见,例如,美国专利号5,323,907、5,052,558和5,033,252。药用包装材料的实例包括但不限于泡罩包装、瓶、管、吸入器、泵、袋、小瓶、容器、注射器、注射笔、瓶和任何适用于所选的制剂和预期的施用方式与治疗方式的包装材料。设想了本文提供的AON和组合物的广泛多种制剂。

[0108] 在某些实施方案中,本文还提供了试剂盒,当由医疗从业者使用时,所述试剂盒可简化适量AON在受试者中的施用。在某些实施方案中,本文提供的试剂盒包括容器和本文提供的AON或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药的剂型。

[0109] 在某些实施方案中,试剂盒包括容器,所述容器包含本文提供的AON或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药的剂型,在容器中包含本文所述的一种或多种其他治疗剂。

[0110] 本文提供的试剂盒还可包括用于施用AON的装置。此类装置的实例包括但不限于注射器、无针头注射器滴袋、贴片和吸入器。

[0111] 本文提供的试剂盒还可包括可用于施用一种或多种活性成分的药学上可接受的媒介物。例如,如果活性成分以必须重构才能肠胃外施用的固体形式提供,那么试剂盒可包括合适媒介物的密封容器,活性成分可溶解在所述媒介物中以形成适合肠胃外施用的无颗粒无菌溶液。药学上可接受的媒介物的实例包括但不限于:水性媒介物,包括但不限于注射用水USP、氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液以及乳酸林格氏注射液;水混溶性媒介物,包括但不限于乙醇、聚乙二醇和聚丙二醇;以及非水性媒介物,包括但不限于玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯和苯甲酸苄酯。

[0112] VII. 具有第二活性剂的组合疗法

[0113] 本文还提供了使用本文公开的AON与可用于治疗DMD或延迟其发作的其他治疗剂的组合疗法的方法。在另一个实施方案中,本文提供了使用AON1与可用于治疗DMD或延迟其发作的其他治疗剂的组合疗法的方法。在这些方法中,本文公开的AON,例如AON1,如本文其他地方所述进行施用,例如QWx24W。

[0114] 如本文所用,术语“组合”包括使用多于一种疗法(例如,一种或多种预防剂和/或治疗剂)。然而,术语“组合”的使用并不限制向患有疾病或病症的受试者施用疗法(例如,预防剂和/或治疗剂)的顺序。第一疗法(例如,预防剂或治疗剂,诸如本文提供的AON)可在向受试者施用第二疗法(例如,预防剂或治疗剂)之前(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之前)、同时或之后(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之后)施用。本文还设想了三联疗法。

[0115] 将本文公开的AON和一种或多种第二活性剂施用于受试者可通过相同或不同的施用途径同时或依次进行。用于特定活性剂的特定施用途径的适用性将取决于活性剂本身(例如,它是否可口服施用而不在进入血流之前分解)和所治疗的疾病或病症。

[0116] 本文公开的AON的施用途径与第二疗法的施用途径无关。在另一个实施方案中,本文公开的AON静脉内施用。因此,根据这些实施方案,本文公开的AON静脉内施用,并且第二

疗法可口服、肠胃外、腹膜内、静脉内、动脉内、透皮、舌下、肌内、直肠、经颊、鼻内、脂质体、通过吸入、阴道、眼内、通过导管或支架局部递送、皮下、脂肪内、关节内、鞘内或以缓慢释放剂型施用。在一个实施方案中,本文公开的AON和第二疗法通过相同的施用方式施用,例如通过IV。在另一个实施方案中,本文公开的AON通过一种施用方式(例如,通过IV)施用,而第二剂通过另一种施用方式(例如,口服)施用。

[0117] 在一个实施方案中,第二活性剂以约1至约1000mg、约5至约500mg、约10至约350mg或约50至约200mg的量通过静脉内或皮下施用并且每天施用一次或两次。第二活性剂的具体量将取决于所使用的具体的剂、所治疗或管理的疾病的类型、疾病的严重程度和阶段,以及本文提供的AON或其衍生物的量,以及同时施用于受试者的任何任选的附加活性剂。

[0118] 一种或多种第二活性成分或剂可与本文提供的AON或其衍生物一起用于本文提供的方法和组合物中。第二活性剂可以是高分子(例如,蛋白质)或小分子(例如,合成无机分子、有机金属分子或有机分子)。

[0119] 高分子活性剂的实例包括但不限于造血生长因子、细胞因子、AON以及单克隆和多克隆抗体。典型的高分子活性剂是生物分子,诸如天然存在的或合成的或重组的蛋白质。在本文用作第二活性剂的AON的具体实例包括艾地普尔森、卡西莫森、戈洛迪森、维托拉森和SRP-5051(Sarepta Therapeutics)。

[0120] 小分子的实例包括皮质类固醇,诸如地夫可特(deflazacort)。

[0121] 可与本文公开的AON组合的其他疗法包括基因疗法(例如,SRP-9001、GALGT2或GNT0004(Sarepta Therapeutics))、基因编辑(例如,CRISPR/CAS9(Sarepta Therapeutics)) and 细胞疗法(例如,CAP-1002(Capricor Therapeutics/Nippon Shinyaku Co.Ltd.))。

[0122] VIII. 实施例

[0123] 以下实施例意在说明本文提供的某些实施方案,而不是限制本公开的范围。

[0124] 实施例1

[0125] AON1在del52hDMD/mdx小鼠中施用25周

[0126] 将hDMD del52/mdx(+/+)和C57BL/6J野生型(WT)小鼠(在第1天为~7周龄)分成四组并按如下所示给药:

[0127]

组	品系	小鼠数量 (雄性/雌性/混合)	给药制品	IV 给药方案	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	终止 N (最后一次给药后)	
							4 周	12 周
1	WT	18	媒介物	QWx25W	0	8	6	12
2	del52/mdx	18	媒介物	QWx25W	0	8	6	12
3	del52/mdx	18	AON1	QWx25W	6	8	6	12
4	del52/mdx	18	AON1	QWx25W	18	8	6	12

[0128] 6mg/kg/剂的剂量等于0.92 μ mol/kg/剂(AON1的分子量为6517g/mol)。18mg/kg/剂的剂量等于2.76 μ mol/kg/剂。因此,经25W给药的AON1的总量对于6mg/kg剂量水平为150mg/kg(23.00 μ mol/kg)并且对于18mg/kg剂量水平为450mg/kg(69.00 μ mol/kg)。

[0129] 给药后,对血浆浓度、组织分布、浓度、外显子跳跃、总体步态评分和细胞保护进行

分析。结果在图1-6中示出。

[0130] 简单来说,图1示出随时间变化的AON1血浆浓度。图2示出心脏、四头肌、肝脏、横膈膜、腓肠肌和肾脏组织中的AON1浓度。图3显示,经过25周的治疗,AON1在肌肉组织(四头肌、腓肠肌、心脏和横膈膜)中实现了持续的剂量依赖性外显子51跳跃。

[0131] 图4示出心脏和四头肌中的肌营养不良蛋白wt%,并示出对于AON1的总体步态评分(平均值 $\pm$ SEM;N=16-18(基线,第29周)或10-12(第37周)。统计学显著性:与C57BL/6J媒介物相比,# $p<0.05$,### $p<0.0001$;与De152/mdx媒介物相比,* $p<0.05$,*** $p<0.0005$,**** $p<0.0001$)。经过25周的治疗,AON1改善并维持肌营养不良蛋白和步态评分。精细动作和运动步态测试的参考文献:NA Datson等人(2020),NUCLEIC ACID THERAPEUTICS.DOI:10.1089/nat.2019.0824。

[0132] 图5显示,AON1治疗减轻hDMD de152(+/-)模型相关的肌肉病理并在25周给药后持续12周维持药理效应。来自媒介物治疗小鼠的腓肠肌表现出轻度萎缩、最少坏死、最少炎症(无核细胞浸润物)和最少纤维化。相比之下,来自AON1治疗小鼠的腓肠肌表现出最少萎缩且没有其他影响。

[0133] 图6显示,AON1治疗减轻hDMD de152(+/-)模型相关的心脏病理并持续12周维持药理效应。来自媒介物治疗小鼠的心肌表现出最少萎缩、最少坏死、最少炎症(单核细胞浸润物)和最少纤维化。相比之下,来自AON1治疗小鼠的心肌表现出最少炎症(单核细胞浸润物)和最少纤维化且没有其他影响。

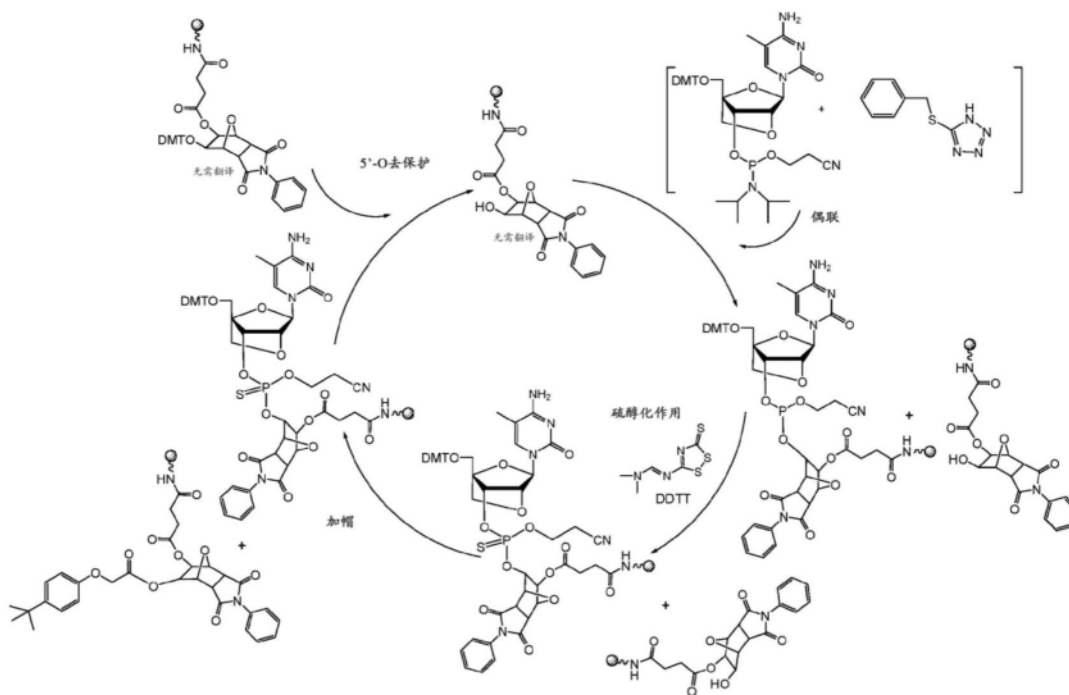
[0134] 实施例2

[0135] AON1的合成

[0136] 寡核苷酸AON1通过固相有机合成进行合成。合成过程中没有分离或表征任何中间体。在合成序列完成后,将寡核苷酸从固体支持物上裂解下来,去保护并通过超滤和制备型阴离子交换(AEX)色谱进行纯化。HPLC级分汇集后,通过第二超滤步骤对寡核苷酸AON1溶液进行浓缩和脱盐。后续的冻干和均质化提供了作为固体材料的产品AON1,其在装运前储存在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下。

[0137] 在环境温度下进行的合成循环在下文示意性地示出(出于说明目的使用第一循环)。AON1的寡核苷酸链是在固体支持物上合成的。在序列完成后,将寡核苷酸从树脂上裂解下来,纯化,并将所得溶液冻干,得到最终药物物质AON1。

[0138]



[0139] 第1阶段:固相合成

[0140] AON1的寡核苷酸部分采用平台合成通过固相有机合成来制造。合成是自动化的并且在配备有闭式塔反应器的合成器上采用耦合循环技术进行并且不涉及中间体的分离。将带有通用接头的固体支持物装入流通塔反应器中并开始合成。每个合成循环由四个按顺序进行的化学步骤组成,然后进行洗涤,直到建立全长寡核苷酸。

[0141] 步骤1去保护

[0142] 在被称为脱保护(deblocking)或去保护(deprotection)的第一步骤中,用在甲苯中的二氯乙酸处理固体支持物,以从固体支持物上的UnyLinker™中除去保护基二甲氧基三苯甲基(DMT)。在步骤1的所有后续循环中,脱保护涉及从每个顺序引入的亚磷酰胺或锁定的亚酰胺的5'-OH除去DMT保护基,以生成脱去5'-DMT(5'-DMT-off)的寡核苷酸。

[0143] 步骤2活化和偶联

[0144] 被称为“活化和偶联”的第二步骤是链延长步骤,其中将下一个核苷酸添加到序列中,从3'末端到5'末端生长。在合适的活化剂溶液(例如,在乙腈中的苄硫基四唑)的存在下,用相应的亚磷酰胺在乙腈或二氯甲烷/乙腈中的溶液处理UnyLinker™(第1循环)或脱去5'-DMT的寡核苷酸链[n](所有后续循环)的未保护醇基团,以将延长的DMT构建到寡核苷酸链[n+1]上。最后的链延长步骤使用DMT-TEG-亚磷酰胺在不进行硫化的情况下将TEG基团并入AON1的5'末端。

[0145] 步骤3氧化/硫化

[0146] 根据期望的主链化学性质,在此步骤通过硫化或氧化引入相应的硫代磷酸酯或磷酸二酯。使带有DMT(DMT-on)的寡核苷酸链[n+1]接触硫化剂(例如,在吡啶/乙腈中的5-N-(二甲基氨基)亚甲基氨基-3H-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(DDTT))或氧化剂(例如,在吡啶/水中的碘)。在AON1的制造过程中,只有最后一个循环涉及氧化步骤,所有其他循环都涉及硫化反应。

[0147] 步骤4加帽

[0148] 被称为“加帽”的第四步骤通过以下来结束合成循环:将Cap A(乙腈/2,6-二甲基吡啶/N-甲基咪唑)和Cap B(在乙腈中的叔丁基苯氧乙酰乙酸酐)的混合物添加到固体支持物上的寡核苷酸中,以防止任何未反应的5'-OH寡核苷酸链[n]在后续偶联循环中与亚磷酸胺进一步反应。这导致截短序列的形成。所有18个亚酰胺的合成循环完成后,碱基和主链保护的寡核苷酸仍然结合在固相支持物上。

[0149] 第2阶段:主链去保护

[0150] 用在乙腈中的二乙胺处理固相支持物上的寡核苷酸,导致除去硫代磷酸酯/磷酸酯主链上的 β -氰乙基保护基。反应之后使用乙腈进行洗涤步骤。

[0151] 第3阶段:碱基去保护和从树脂上裂解

[0152] 将塔与氨水/乙醇一起在室温下孵育,然后用氨水/乙醇洗涤。将合并的溶液在升高的温度下孵育。在此两步过程中,将粗寡核苷酸从固体支持物上裂解下来,并且除去核碱基保护基。将所得的溶液过滤并淬灭,将含有粗寡核苷酸的滤液溶解于去保护溶液中。

[0153] 第4阶段:通过超滤对寡核苷酸脱盐

[0154] 使用超滤膜通过超滤浓缩粗AON1的溶液。使用注射用水对所得浓缩物进行渗滤。将所得的AON1水溶液过滤。

[0155] 第5阶段:通过阴离子交换色谱纯化粗寡核苷酸

[0156] 将反应混合物稀释于磷酸钠水溶液/乙腈缓冲液中,并使用SourceTM 30Q通过阴离子交换(AEX)色谱进行纯化。

[0157] 生成模拟池并通过HPLC-UV/MS进行分析。根据分析结果,选择级分进行汇集并进行进一步的下游处理。将选定的级分合并,以提供适当纯度(>85%)和收率的产物池。再次通过HPLC-UV/MS对该最终产物池进行分析。

[0158] 第6阶段:通过超滤对寡核苷酸脱盐

[0159] 使用超滤膜通过超滤浓缩汇集的AON1溶液。使用注射用水对所得浓缩物进行渗滤。将所得的AON1水溶液过滤。

[0160] 第7阶段:呈冻干固体形式的寡核苷酸

[0161] 将来自第6阶段的浓缩溶液通过0.2 μ m膜过滤并且最后冻干以得到最终药物物质。冻干后,将材料在洁净室环境中平衡至少24小时,以在最终产物中获得稳定含水量。获得为白色至灰白色至黄色粉末的经平衡的药物物质(熔点(mp)):~265°C(DSC分解);通过离子对反相HPLC-UV/MS确定纯度为92-93%)。

[0162] 实施例3

[0163] 50mg/mL AON1的制造过程

[0164] 缓冲溶液的配制(Compounding)和任选的生物负载减少过滤

[0165] 将所需量的磷酸氢二钠十二水合物、磷酸二氢钠二水合物和氯化钠称重于总量大约80%的注射用水(WFI)中并在层流空气流(LAF)下的C级环境中搅拌。赋形剂溶解后,添加WFI至最终量。

[0166] 如果缓冲溶液的配制和药物产品溶液的配制不是在同一天进行的,那么将通过LAF下的C级中的0.45/0.2 μ m膜过滤单元对缓冲溶液进行过滤,以减少生物负载。

[0167] 溶液的平衡、配制和生物负载减少过滤

[0168] 将冻干的AON1(实施例2)在LAF下的C级环境中在室温下平衡12-24小时。平衡后,

称量冻干的AON1,并通过搅拌将其溶解于大约50%的缓冲溶液中,以避免结块。通过添加计算量的缓冲溶液,达到50mg/mL溶液的最终AON1浓度。将溶液以200至1000rpm混合20-30min,避免起泡。将配制的溶液通过无菌0.45/0.2 μ m膜过滤单元过滤,以减少生物负荷。配制和生物负荷减少过滤是在LAF下的C级环境中进行的。

[0169] 在线无菌过滤和无菌灌装

[0170] AON1溶液使用0.45/0.2 μ m过滤器通过两个连续的在线过滤单元进行无菌过滤,并且无菌填充到即用的无菌小瓶中。将小瓶盖上盖子并密封。将填充的单元储存在温度受控的冷藏室中。

[0171] AON1组合物以3mL等渗无菌、无防腐剂溶液的形式提供于单剂量小瓶中,以用于静脉内输注,浓度为50mg/mL,pH为7.0。容器封闭系统为具有氟聚合物涂覆的溴丁基橡胶塞和带翻盖的铝密封件的1型玻璃小瓶。5.25L AON1溶液的组成提供如下:

[0172] 5.25L AON1溶液的组成

组分	量	浓度(g/L)
AON1	262.5g	50
磷酸氢二钠十二水合物	27.0g	5.135
磷酸二氢钠二水合物	4.6g	0.883
氯化钠	24.5g	4.676
注射用水	qs	qs至目标体积

[0174] qs=补足

[0175] 实施例4

[0176] 在雄性和雌性de152hDMD/mdx小鼠中施用AON1 PS13周并在给药后2或4周进行评估

[0177] 总共使用120只纯合hDMD de152/mdx+/+雄性和雌性小鼠进行研究,这些小鼠在英国的Charles River饲养并由瑞士的BioLytix进行基因分型。本研究中的所有hDMD de152/mdx小鼠均源自重新衍生的种群。此外,年龄匹配的C57BL/6J(n=20)小鼠(Charles River, Germany)用作野生型(WT)对照。在为本研究设置不同组别时,小鼠按性别随机分组,其方式使得整窝小鼠不落入单一测试组,并且将基线重量纳入考量,使得在第一次治疗开始时不存在组差异。

[0178] 在每个治疗日对小鼠进行称重并相应调整剂量。整个IV注射过程每只小鼠耗时5-8分钟,实际注射时间为10-60秒。

[0179] 所有化合物均以确保等摩尔给药的浓度配制并以8mL/kg的注射体积施用。在每个治疗日对小鼠进行称重并相应调整剂量。例如,体重30g的小鼠接受240 μ L的IV注射。

[0180] 向小鼠给药AON1 PS,持续13周。在终点,即最后一次IV注射后14天或28天,用戊巴比妥钠(60mg/kg Mebunat, Orion Pharma, Finland)通过深度麻醉对小鼠实施安乐死。对小鼠进行心脏穿刺并收获心脏组织。立即将组织浸入液氮中的异戊烷中进行快速冷冻,放入在干冰上预冷的冷冻小瓶中并储存在-80℃下。通过合格的方法分析冷冻样品的%外显子跳跃和肌营养不良蛋白水平。结果在图7和8中示出。

[0181] 实施例5

[0182] 在雄性和雌性de152hDMD/mdx小鼠中施用AON1 13周并在给药后4或8周进行评估

[0183] 所有小鼠从7周龄开始每周一次(QW)在尾静脉中接受媒介物或AON1的IV注射,持续最长13周的研究持续时间。整个IV注射过程每只小鼠耗时5-8分钟,实际注射时间为60秒。化合物以特定浓度配制并以8mL/kg的注射体积施用。在每个治疗日对小鼠进行称重并相应调整剂量。例如,体重30g的小鼠接受240 μ L的IV注射。

[0184] 在生命结束时,即第85天最后一次IV注射后的4或8周(分别为第113天和第141天),通过心脏穿刺采集血液后,用PBS对小鼠进行心脏灌注,以除去组织中的血液。收集以下组织并快速冷冻:

[0185] 骨骼肌:腓肠肌(R)、四头肌(L+R);将两侧收集到一个小瓶中,这样四头肌组织就有一个样品。

[0186] 心脏的一半(解剖成每一半都有心房和心室)、整个横膈膜、肝脏(2x整个肝脏的1/3)、肾脏(R)。

[0187] 立即将所有组织浸入液氮中的异戊烷中进行快速冷冻,放入在干冰上预冷的冷冻小瓶中并储存在-80 $^{\circ}$ C下,直到进行切片。

[0188] 在来自所有组的腓肠肌、四头肌、心脏和横膈膜组织中进行外显子跳跃分析。分析工作使用合格的逆转录酶数字微滴聚合酶链式反应(RT-ddPCR)分析方法进行。hDMD外显子51跳跃百分比通过以下公式计算:

[0189]
$$\frac{(\text{人类跳跃外显子51拷贝数}/20\mu\text{L反应物})}{(\text{人类跳跃外显子51拷贝数}/20\mu\text{L反应物} + \text{人类非跳跃外显子51拷贝数}/20\mu\text{L反应物})} \times 100$$

[0190] 跳跃和非跳跃转录物的定量下限(LL0Q)是基于阈值方法。结果在图9中示出。心脏和四头肌中的肌营养不良蛋白水平在图10中示出。总体步态评分在图11中示出。

[0191] 实施例6

[0192] 进行了AON1 PS和AON2对人类和食蟹猴血清中的补体活化的影响的研究。

[0193] 用于测试制品施用的给药媒介物是具有0.7% NaCl的含水磷酸盐缓冲液(pH 6.9-7.1),其被制备并用作基线对照。称取适量的测试制品(AON1 PS或AON2)并使用搅拌/涡旋混合以10X给药浓度将其溶解为看起来澄清的溶液。没有对所测量的重量应用任何校正因子。在使用前后,将制剂冷藏(4 $^{\circ}$ C)。使用前,将所有测试制品制剂在台式机上温热至室温,持续至少30分钟。测试制品在制备后在4 $^{\circ}$ C下储存一周被视为稳定的。实际重量和稀释度记录在研究数据中。该研究未进行剂量分析;丢弃残余制剂。

[0194] 测试系统

[0195] 测试系统1:来自n=3名正常男性人类志愿者(年龄>18岁)的个体血清。

[0196] 测试系统2.来自n=3只正常雄性食蟹猴(年龄>3岁)的个体血清。

[0197] 施用途径

[0198] 这是一项体外研究并且测试制品在体外暴露于测试系统。将测试制品以一份比九份(1:9,v/v)的比率添加到测试系统中。该比率维持了测试系统的适当浓度,因此存在足够的补体控制蛋白浓度。

[0199] 给药方案

[0200] 将混合物在37 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C下孵育30 $\pm$ 2分钟,并储存在-80 $^{\circ}$ C下直到进行分析物测试。

[0201] 目标和研究方案

[0202] 本研究的目的是评估两种反义寡核苷酸(AON1 PS和AON2)在正常的男性人类和雄

性食蟹猴血清中孵育后的补体分裂产物(complement split product)活化谱。

[0203] 实验设计

[0204] 测试是通过将270 μ L测试体系与30 μ L所制备的10X测试制品在1.5mL聚丙烯微量离心机卡扣盖管中混合来进行的。一旦制备好所有混合物,就将其转移到37 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C水浴中并孵育30 $\pm$ 2分钟。混合物孵育后,将所有样品等分并冷冻于-80 $^{\circ}$ C或以下。

[0205] 补体活化的生物分析性分析

[0206] 通过ELISA检测Bb分裂产物:通过激活补体的替代途径,在因子B发生裂解时产生Bb。体外暴露于测试制品期间产生的Bb的水平可用作替代途径活化水平的量度。采用重复孔运行Bb ELISA,报告其平均值。最初在两种稀释度下评估Bb的水平,以验证该测定未被更高活化程度的样品所饱和。

[0207] 通过ELISA检测C3a分裂产物:C3a是C3在补体中心点处裂解时产生的。因此,在补体的三种途径中的任一种激活后都可导致C3a裂解。C3a的水平也很重要,因为它是一种过敏毒素。在体外暴露于测试制品期间产生的C3a的水平可用作强度足以达到该中心点的补体活化水平的量度,也可用作该活化的直接促炎结果的可能性的指标。采用重复孔运行C3a ELISA,报告其平均值。最初在两种稀释度下评估C3a的水平,以验证该测定未被更高活化程度的样品所饱和。

[0208] 结果在图12和13中示出。

[0209] 实施例7

[0210] 幼年小鼠26周毒性和生物分析研究

[0211] 在一项恢复期为13周的26周幼年毒性和毒代动力学(TK)研究中,从PND 21到PND 203,每4天一次通过IV推注向雄性CD-1小鼠(20-22只/组(主要毒性研究);6只(媒介物;用无菌盐水稀释的媒介物对照缓冲液),25-31只/组(TK);21-27只/组(恢复))给药0(媒介物对照缓冲液)、6、12或18mg/kg AON1。在PND 21和203时从AON1治疗组采集给药前(仅PND 203)、给药后0.5、1、3、8和24小时的血液进行生物分析。评估了以下参数:体重、食物消耗、发育标志(龟头包皮分离)、神经行为评估($\approx$ PND 187和281时的运动活动; $\approx$ PND 190和284时的听觉惊吓; $\approx$ PND 193和287时的Morris水迷宫)、眼科检查、临床病理学(临床化学、血液学和凝血)、肉眼尸检、器官重量和组织病理学。

[0212] 基于没有不良发现,毒性的未见不良反应水平(no observed adverse effect level,NOAEL)为18mg/kg/剂。在PND 21时,该剂量水平对应的最大观察浓度($C_{\max}$)和给药后0至24小时的浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-24})值分别为5280nmol/L和11,700h*nmol/L。在PND 203时,该剂量水平对应的 $C_{\max}$ 和 AUC_{0-24} 值分别为5860nmol/L和14,600h*nmol/L。

[0213] 实施例8

[0214] NHP 39周毒性和生物分析研究

[0215] 通过IV输注(60分钟)向雄性食蟹猴(3只/组(主要毒性研究);2只/组,0、6、12和18mg/kg QW(13周恢复))给药0(媒介物:0.9% NaCl注射液,USP)、6、12或18mg/kg QW AON1,持续39周。在不同的研究日/时间点采集血液进行生物分析/TK和补体活化分析。评估了以下参数:死亡率、临床体征、体重、食物消耗、血浆和组织(腓肠肌、心脏、股二头肌、肝脏和肾脏)中的AON1水平、组织(腓肠肌、心脏、股二头肌、肝脏和肾脏)中的外显子跳跃百分比、临床病理学(临床化学、血液学、尿液分析、尿液化学和尿液生物标志物)、补体活化指标

(Bb、C3a和sC5b-9)、眼科、ECG、器官重量和组织病理学。

[0216] 在第274天的按计划终末安乐死和计划外安乐死时,所有AON1治疗组的组织中AON1的平均浓度均可量化。平均浓度通常随着剂量从6mg/kg/剂增加至12mg/kg/剂而增加。在6至12mg/kg/剂的给药期的第274天,AON1的平均浓度的排序为肝脏、肾脏、心脏、腓肠肌和股二头肌。

[0217] 通过RT-ddPCR测量组织中的外显子跳跃。该方法量化了非跳跃的DMD(肌营养不良蛋白)转录物的数量,以及外显子51跳跃的DMD转录物的数量;并计算了外显子跳跃百分比(%跳跃)。外显子51跳跃百分比从4.5%到40.8%不等并且在高剂量组(12和18mg/kg/QW)中高于低剂量组(6mg/kg/QW)。另外参见图14。

[0218] 未观察到AON1相关的体重变化;眼科发现;兽医学观察结果;异常ECG波形或心律失常;或对PR间期、QRS持续时间、QT或校正QT(QTc)间期或心率的影响。对于施用最高至18mg/kg/剂的动物,未观察到AON1相关的临床病理学(血液学和凝血)效应。对于施用最高至18mg/kg/剂的雄性,在早期终末处死或按计划终末处死时未观察到AON1相关的宏观观察结果或器官重量影响。

[0219] 分别在给药期的第194天或第211天,各自以12或18mg/kg/剂施用的一只雄性因AON1相关的垂死状态而被处死。两种动物中的临床和兽医学观察结果类似,包括活动减少、外观消瘦以及下躯干和/或肢体凹陷或皮下水肿。临床病理学发现指示炎症、氮血症、低蛋白血症和尿蛋白升高(在一只所测量的动物中)。垂死的原因归因于肾小球性肾损伤和多系统血管炎症。计划外处死动物中的AON1相关临床病理学效应支持炎症反应、流体缺乏、可能的胃肠道损失、兴奋/生理反应和/或血小板计数中度减少,但缺乏明确的机制。计划外处死动物的显微镜发现包括肾小管变性/再生、血管变性、肥大和血管壁和/或血管周围组织的炎症,这可能导致间质性水肿、血栓形成(肺)和/或受影响组织(心脏)的局部退行性变化。水肿也可能与血清蛋白的明显降低有关,这是由肾小球改变引起的。这些发现及其后遗症与补体介导的病因一致,猴子在AON疗法的背景中易出现这种病因(Frazier Toxicol Pathol. 2015年1月;43(1):78-89)。NHP中对AON的敏感性增加的原因与食蟹猴中因子H组分的遗传学有关,据了解,其增加因子H与AON的结合。调节补体活化所需的游离因子H的量的减少消除了替代途径的关键调节剂。

[0220] 在所有剂量组(包括对照组)中均观察到涉及补体的替代和终末途径的低水平和瞬态补体活化。在大多数动物中,补体活化的增加通常在给药后72小时降低至接近给药前水平,并且在整个研究过程中活化水平呈上升趋势。两只早期终末处死的动物在第113天和第204天的Bb水平与给药前水平相比分别增加了>200%。虽然这两只动物的补体活化谱与涉及所观察到的肾脏损伤的补体一致,但其他动物也表现出所测量的补体片段的增加。由于存在多种补体调节剂,动物之间的差异可能是由于动物在开始后控制补体活化的能力上的个体差异。通过AON与因子H蛋白之间的非特异性相互作用实现的补体活化机制被认为具有非常有限的临床相关性,因为人类的补体活化发生在高得多的AON血浆浓度下(Henry Int. Immunopharmacol. 2002;2:1657-66;Henry Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications, 第2版CRC Press: Carlsbad, CA; 2008: 327-63; Shen J Pharmacol Exp Ther. 2014年12月;351(3):709-17)。

[0221] 在施用了 ≥ 6 mg/kg/剂的按计划处死的动物中观察到AON1相关的临床病理学效

应。在施用18mg/kg/剂的动物中,在给药期的第176(ALT除外)、204、211、216和218天,丙氨酸氨基转移酶(ALT)和碱性磷酸酶(ALP)活性略有增加,表明出现肝功能紊乱(hepatic disturbance)。支持炎症反应的效应包括在施用18mg/kg/剂的动物中,在给药期的第176、204、211、216和218天,白蛋白浓度轻度降低并且珠蛋白浓度有所增加(导致白蛋白:珠蛋白比率降低),以及在施用18mg/kg/剂的动物中,在给药期的第211、216和218天,触珠蛋白浓度轻度增加。此外,白蛋白通过肾脏丧失,在施用18mg/kg/剂的动物中,在给药期的第211、216和218天尿蛋白:尿肌酐比率轻度增加以及尿液中蛋白质发生率的增加也支持这一点。在施用 ≥ 6 mg/kg/剂的动物中,在给药期的第211、216、218、225、239、253、260、267和274天,微量白蛋白:肌酐比率的轻度至中度增加也支持白蛋白通过肾脏丧失。在施用18mg/kg/剂的动物中,在给药期的第211、216和218天,聚集素:肌酐比率的轻度增加支持肾脏损伤。另一个效应是在施用 ≥ 6 mg/kg/剂的动物中,在给药期的第176、204、211、216、218、225、239、253、260、267和274天,血小板计数的非剂量依赖性的轻度降低,其缺乏明确的机制。在18mg/kg QW组中,在2只动物中观察到血小板计数随时间降低,导致中度/明显的血小板减少症,但这与任何解剖病理学发现无关。在按计划处死的动物中未观察到AON1相关的凝血效应。

[0222] 在给药期的第218天施用18mg/kg/剂的两只早期终末处死动物和按计划终末处死动物的显微镜发现包括一只动物的肾小管上皮细胞的最小变性和另一只动物的肝脏中的最小混合细胞炎症,这与肝酶值升高相关。这些发现分别归因于AON1在肾小管上皮细胞或库普弗(Kupffer)细胞内的积聚。在垂死和早期处死的动物中常见的其他AON1相关发现包括心脏瓣膜中的轻微或中度单核细胞浸润物,以及若干组织中的单核浸润物的发生率增加的趋势。这些发现可能反映了与给药相关的全身性炎症和/或补体活化的存在,并且除了瓣膜变化外,被认为是猴子中常见的偶然发现的恶化。在所有动物中,与AON1的积聚相关的观察结果包括肾小管上皮细胞和库普弗细胞中的嗜碱性颗粒(通常以剂量相关方式)以及在多种组织中(但最明显的是淋巴结中)存在巨噬细胞,其特征是改变的、泡沫状的和/或轻微嗜碱性的细胞质。这种积聚似乎与施用 ≥ 12 mg/kg/剂的动物的周围组织的损伤无关,并且巨噬细胞改变在任何剂量下似乎都与损伤无关。在恢复期安乐死时,显微镜发现趋于可逆性,表现为在施用 ≥ 6 mg/kg/剂的动物的肾脏中嗜碱性颗粒最少,肝脏库普弗细胞中色素最少,并且下颌和/或肠系膜淋巴结中空泡化/含色素巨噬细胞浸润物最少至中等。此外,在各自施用12或18mg/kg/剂的一只动物的胃肠道中以及在施用18mg/kg/剂的一只动物的膀胱(在该猴子研究中未观察到移行细胞变性/空泡化)和睾丸中均观察到最少的空泡化/含色素巨噬细胞浸润物。

[0223] 基于临床病理学状况和解剖病理学发现的严重程度,就对施用AON1的雄性的健康和幸福感的总体影响而言,在给药期的第260天,未见不良反应水平(NOEL)被认为是6mg/kg/剂,这对应于17,000nmol/L的平均最大观察浓度($C_{\max}$)和36,500h*nmol/L的浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-25})。

[0224] 实施例9

[0225] 首次人体剂量选择

[0226] 临床试验(实施例10)的建议剂量和持续时间经过选择,以确保入组试验的每位儿科参与者的安全性以及直接受益的前景。

[0227] 首次人体临床研究(实施例10)包括AON1的最多至6个剂量水平的顺序评估:IV施用0.6mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、9mg/kg和12mg/kg。

[0228] 临床研究的起始剂量(实施例10)是使用雄性食蟹猴的GLP 13周重复剂量毒性研究中AON1的NOAEL(18mg/kg/周)(实施例13)确定的。根据体表面积缩放方法,18mg/kg QW的猴子NOAEL的人类等效剂量(HED)为5.8mg/kg QW。因此,0.6mg/kg的选定起始剂量提供了基于猴子的10倍安全边际,猴子被认为是危害识别更相关的物种,因为猴子对补体活化和随之而来的炎症反应(被认为是反义寡核苷酸的类别效应之一(后者是猴子非临床毒性的主要来源))更敏感(Shen J Pharmacol Exp Ther.2014年12月;351(3):709-17)。人们普遍认为,使用猴子将最大限度地提高识别任何在数量和质量上与在人类中可能预期的不良反应相似的不良反应的可能性(Farman Toxicol Pathol.2003;31:119-122)。

[0229] 鉴于与每周一次的给药间隔相比,由于AON1的血浆半衰期短,预期积聚量较低,因此每2周增加队列1A(第1部分)的剂量水平被认为是适当的,以使亚治疗剂量水平下个体参与者的暴露持续时间最少。2至2.5倍的剂量增量允许个体参与者通过非临床数据表明可能安全的剂量安全而有效地递增。在39周研究中观察到的毒理学发现与慢性给药相关,并且不预期与临床试验(实施例10)中的最初单次递增剂量相关。

[0230] 先前已证明,对于相同的mg/kg剂量,对硫代磷酸酯寡核苷酸的血浆暴露在NHP与DMD患者之间是相似的(Bosgra Nucleic Acid Ther.2019;29(6):305-322);因此,与体重缩放相比,体表面积缩放的使用为临床试验的单次递增剂量部分的起始剂量选择提供了更为保守的方法。对于临床试验的重复剂量阶段,应用直接基于体重(mg/kg)从NHP外推到人类,并提议对6、9和12mg/kg QW进行顺序评估。

[0231] 重复剂量阶段的起始剂量选择为6mg/kg QW,以使每位儿科参与者都有直接受益的前景,因为这是一个药理学活性剂量,在此剂量下,肌营养不良蛋白的表达预期在稳定状态下将>正常值的10%。DMC将审查给药队列到第4周的安全性数据并就剂量递增提出建议。

[0232] 经选择以使BMN 351治疗的潜在功效最大化且具有可管理的安全性特征的12mg/kg/周的最大剂量经慢性毒理学研究证实合理并提供信息:

[0233] • 总体而言,慢性毒理学研究(39周猴子研究(实施例8)、26周小鼠研究(实施例11)和幼年小鼠研究(实施例7))中的主要毒性信号与众所周知的硫代磷酸酯寡核苷酸的类别效应一致,这些效应均可在临床上监测。

[0234] • 在39周猴子研究中观察到剂量限制性毒性,其中NOAEL被确定为6mg/kg/周。高于在39周猴子研究中确定的NOAEL(6mg/kg/周)给药被认为是适当的,因为 ≥ 12 mg/kg QW下的剂量限制性毒性似乎与补体介导的效应一致,已知与其他临床前物种和人类相比,NHP对所述效应具有夸张的敏感性(Barbour Nephrol Dial Transplant.2013年7月;28(7):1685-93;Shen J Pharmacol Exp Ther.2014年12月;351(3):709-17)。因此,补体介导的效应应被视为危害识别,而不是提供临床安全性的边际。在39周猴子研究中的18mg/kg QW组中,在2只动物中观察到血小板计数随时间降低,导致中度/明显的血小板减少症,但这与任何解剖病理学发现无关。血小板减少在临床上是可监测的。

[0235] 根据非临床研究,肝脏、肾脏、血液系统(血小板减少症)、凝血系统和血管系统(炎症变化)被确定为人体毒性的目标器官。

[0236] 风险监测和缓解活动将通过频繁的临床和实验室监测进行,包括使用器官特异性

的毒性生物标志物、明确概述的DLT标准和研究停止标准。在数据监测委员会 (DMC) 建议是否递增剂量、递减剂量、开设新队列或扩大队列之前,将对安全性数据进行评估。

[0237] 实施例10

[0238] 用于评估AON1在患有杜氏肌营养不良的参与者中的安全性、耐受性、药代动力学和药效学的1/2期剂量递增研究

[0239] 本研究将调查通过静脉内 (IV) 输注6个递增剂量的AON1的安全性和耐受性。鉴于杜氏肌营养不良 (DMD) 的进行性,这是一项开放标签研究,所有参与者都将接受AON1。建议剂量和试验持续时间经过选择,以确保入组试验的每位儿科参与者的安全性以及直接受益的前景。待使用的药物产品在实施例3中描述。

[0240] 在猴子中进行的关键性13周GLP毒性研究中的未见不良反应水平 (NOAEL) 被确定为18mg/kg QW;因此,根据体表面积缩放方法,人类等效剂量 (HED) 为5.8mg/kg QW。因此,0.6mg/kg的选定起始剂量提供了基于猴子的10倍安全边际,猴子被认为对于危害识别更为相关,因为猴子对补体活化和随之而来的炎症反应 (反义寡核苷酸的类别效应之一) 更敏感 (Shen L, Frazer-Abel A, Reynolds PR等人 Mechanistic understanding for the greater sensitivity of monkeys to antisense oligonucleotide-mediated complement activation compared with humans. J Pharmacol Exp Ther. 2014年12月; 351(3):709-17)。低 (2至2.5倍) 剂量滴定将进一步增加早期检测任何潜在的剂量依赖性安全性信号的可能性,从而允许更早进行干预。

[0241] 根据该类分子的先前安全性经验,参与者将以6个剂量水平 (0.6mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、12mg/kg和18mg/kg) 中的每一个错开给药。在建议是否递增剂量、递减剂量、开设新队列或扩大队列之前,数据监测委员会 (DMC) 将对可用安全性数据进行评估。该设计包括在剂量递增之前仔细监测参与者的安全性,包括反义寡核苷酸 (AON) 的已知类别效应的急性安全性事件,以及在必要时实施个体和研究停止规则。

[0242] 进行该研究以通过肌营养不良蛋白表达结合安全性、耐受性和药代动力学 (PK) 来展示概念验证,以评估剂量反应并为进一步临床开发的剂量选择提供见解。研究表明,肌肉中肌营养不良蛋白的量越高,疾病表型就越不严重 (de Feraudy等人 Ann Neurol. 2021; 89(2):280-292);因此,肌营养不良蛋白表达的增加是本研究的一个有意义的结果。

[0243] 将评估血浆PK和肌肉分布,以研究剂量、血浆和肌肉暴露、外显子跳跃和肌营养不良蛋白表达之间的关系。

[0244] 在所有参与者完成12周 (队列1A,第2部分) 或24周 (队列1B、2和3) 的6mg/kg、9mg/kg和12mg/kg剂量水平的治疗后,将读取肌肉中的AON1分布、外显子跳跃和肌营养不良蛋白水平,以确定最佳耐受剂量来进行未来的临床开发。

[0245] 一旦完成这一点,参与者就可入组计划持续至少1年的长期扩展 (LTE) 研究。扩展阶段的理念是在较长的时间段内评估AON1在患有DMD的参与者中的安全性、耐受性、PK和药效学 (PD) 效应,以及纵向且可能与匹配的外部对照组相比评估参与者的功能变化。鉴于疾病的自然史,相关的扩展研究是本研究设计的必要组成部分。

目标	终点
主要	
[0246] • 评估不同剂量水平的 AON1 在患有 DMD 的参与者中的安全性和耐受性	• 不良事件/SAE/AESI 的发生率 • 体格检查 • 安全性实验室测试参数 • ECG 参数 • 超声心动图
次要	
目标	终点
[0247] • 评估 AON1 的血浆和尿液药代动力学和肌肉分布	• AON1 血浆 PK ○ AUC_{0-t} 、 AUC_{0-inf} ○ C_{max} 、 C_{trough} ○ T_{max} 、 CL 、 V_{ss} 、 $t_{1/2}$ • AON1 尿液 PK ○ Ae_{0-24hr} 、 CL_R • 第 13 周(队列 1A)或第 25 周(队列 1B、2 和 3)时肌肉中的 AON1 浓度
探索性	
[0247] • 评估 AON1 对患有 DMD 的参与者的肌肉中的外显子 51 跳跃和肌营养不良蛋白表达的影响	• 肌肉活检物中的肌营养不良蛋白表达(第 13 周(队列 1A)或第 25 周(队列 1B、2 和 3)时相对于基线的变化) • 外显子跳跃效率(来自肌肉活检物的肌营养不良蛋白信使核糖核酸(mRNA)的 RT-ddPCR)(第 13 周(队列 1A)或第 25 周(队列 1B、2 和 3)时相对于基线的变化)
• 评估对 AON1 的免疫反应	• 抗 AON1 抗体 • 抗肌营养不良蛋白抗体
• 评估 AON1 对身体功能的影响	• NSAA (第 25 周时相对于基线的变化) • 6MWT (第 25 周时相对于基线的变化)
• 评估接受 AON1 的参与者的自杀风险	• 儿童行为检核表(Child Behavior Checklist, CBCL)

[0248] 6MWT, 6分钟步行测试; AE, 不良事件; AESI, 特别关注的不良事件; AUC_{0-t} , 从时间0到最后一个时间点的浓度-时间曲线下面积; AUC_{0-inf} , 从时间0到无穷大的浓度-时间曲线下

面积;CBCL,儿童行为检核表;CL,清除率; $C_{\max}$,最大浓度; C_{trough} ,血浆谷浓度;DMD,杜氏肌营养不良;ECG,心电图;mRNA,信使核糖核酸;NSAA,北极星移动评价量表(NorthStar Ambulatory Assessment);PK,药代动力学;RT-ddPCR,逆转录酶-微滴数字聚合酶链式反应;SAE,严重不良事件; $t_{1/2}$,半衰期; $T_{\max}$,达到最大浓度的时间; V_{ss} ,稳态分布容积

[0249] 本研究是一项剂量递增研究,旨在评估6个递增剂量的IV AON1在易于发生外显子51跳跃的患有DMD的参与者中的安全性、耐受性、药代动力学和药效学。这是一项1/2期开放标签研究;没有计划进行随机化。数据将与各个参与者的基线数据进行比较。为了符合研究资格,潜在参与者必须满足方案中描述的所有资格要求,包括以下选定的关键纳入标准:

[0250] • 为男性且筛查时年龄为4至10岁

[0251] • 临床诊断为杜氏肌营养不良,由DMD基因中易于发生外显子51跳跃的所记录的肌营养不良蛋白突变导致,由中心遗传咨询师审查

[0252] • 在筛查时可走动,定义为能够在没有辅助装置的情况下独立行走并在8秒或更短的时间内完成计时的10米步行/跑步测试

[0253] • 目前不依赖日间呼吸机且预期未来一年内也不需要日间机械或无创通气

[0254] • 目前正在接受口服皮质类固醇治疗,在基线前至少12周保持稳定剂量,并且在整个研究过程中必须保持一致的剂量/给药方案,但为适应体重变化而进行的修改除外

[0255] • 基于预先规定的实验室值,肾功能正常

[0256] 选定的关键排除标准包括以下:

[0257] • 对于7岁或以上的儿童,用力呼气量(FEV_1) < 预测值的60%

[0258] • 目前或既往有肝脏或肾脏疾病

[0259] • 根据在筛查前3个月内或在筛查访视时进行的超声心动图(ECHO),左心室射血分数(LVEF) < 55%

[0260] • 进行三次的筛查心电图(ECG)上利用Fridericia方法校正的平均QT间期(QTcF) ≥ 450 毫秒

[0261] • 筛查时血小板计数 $< 150 \times 10^9/L$

[0262] • 在基线(第1天)之前的12周内接受任何外显子51跳跃疗法治疗,或在任何时间接受任何用于治疗DMD的基因疗法治疗

[0263] 符合条件的参与者将被分配到3个队列中的1个中:队列1($n=6$)、队列2($n=3$)或队列3($n=6$)。队列1的参与者进一步分为队列1A($n=3$)和队列1B($n=3$)。在队列1A(第1部分)中,参与者将接受0.6mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg和6mg/kg的单次递增剂量的AON1,然后在升级至下一个更高剂量之前,或者在6mg/kg剂量的情况下,升级至慢性给药之前评估安全性数据时,在每个剂量水平接受1周的给药假期。在队列1A(第2部分)中,参与者每周接受6mg/kg剂量的AON1,基于非临床数据,预期该剂量在稳定状态下导致大约10%的肌营养不良蛋白表达。队列1B的参与者将接受6mg/kg QW,队列2的参与者($n=6$)将接受9mg/kg QW,并且队列3的参与者($n=6$)将接受12mg/kg QW。详细的剂量递增程序如下所述。

[0264] DMC将监测安全性并提出剂量递增建议。剂量限制性毒性(DLT)标准适用于到0.6mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg和6mg/kg(仅限队列1A(第1部分))单剂量后1周进行评估的时间段。对于队列1A(第2部分)、1B、2和3,DLT标准直到队列中最后一位参与者的第4周评估都是适用的。研究停止标准适用于整个研究过程中的所有参与者。根据是否达到最大耐受剂

量 (MTD), 将招募最多18名参与者。

[0265] 对于队列1A (第1部分) 的参与者 (n=3), 将以0.6mg/kg的起始剂量施用AON1, 其中参与者的给药之间的间隔为至少9天。队列1A (第1部分) 的参与者将不在其第2周访视时接受给药。DMC将审查每位参与者到第2周的安全性数据, 并建议在不存在DLT的情况下将参与者的剂量递增至1.5mg/kg (或者如果存在DLT, 则将队列扩大至6名参与者)。队列1A (第1部分) 的参与者将在第3周接受1.5mg/kg AON1, 之后DMC将审查每位参与者到第4周的安全性数据, 并建议在不存在DLT的情况下将参与者的剂量递增至3mg/kg (或者如果存在DLT, 则将队列扩大至6名参与者)。队列1A (第1部分) 的参与者将不在其第4周访视时接受给药。队列1A (第1部分) 的参与者将在第5周接受3mg/kg AON1 (单剂量), 之后DMC将审查每位参与者到第6周的安全性数据, 并建议在不存在DLT的情况下将参与者的剂量递增至6mg/kg (或者如果存在DLT, 则将队列扩大至6名参与者)。队列1A (第1部分) 的参与者将不在其第6周访视时接受给药。队列1A (第1部分) 的参与者将在第7周接受6mg/kg AON1 (单剂量), 之后DMC将审查每位参与者到第8周的安全性数据, 并建议在不存在DLT的情况下开始第2部分, 每周以6mg/kg给药 (或者如果存在DLT, 则在第1部分中将队列扩大至6名参与者)。队列1A (第1部分) 的参与者将不在其第8周访视时接受给药。

[0266] 如果在队列1A的参与者中发生DLT, 则将以发生DLT的剂量水平招募另外3名参与者, 然后根据上文针对队列1A (第1部分) 所概述的剂量递增规则单独递增剂量。

[0267] 对于队列1A的参与者来说, 第8周后的访视将是第2部分的开始, 指定为6mg/kg QW剂量水平的基线 (第1周) 访视。队列1A (第2部分) 的参与者的6mg/kg QW的给药将间隔至少9天。在所有3名队列1A的参与者在第2部分中接受3次剂量的6mg/kg QW并且第三名参与者完成第4周评估后, DMC将审查可用安全性数据, 并且如果没有DLT, 则建议开设以6mg/kg QW剂量给药的队列1B。

[0268] 队列1B的参与者的6mg/kg QW的给药将间隔至少9天。在所有3名队列1B的参与者在第2部分中接受3次剂量的6mg/kg QW并且最后一名参与者完成第4周评估后, DMC将审查所有6名队列1的参与者的可用安全性数据, 并且如果存在不多于1种DLT, 则建议开设以9mg/kg QW给药的队列2。

[0269] 对于队列2的参与者 (n=6), 将以9mg/kg QW施用AON1, 其中参与者之间的间隔为至少9天。在所有6名队列2的参与者接受3次剂量并且最后一名参与者完成第4周评估后, DMC将审查可用安全性数据, 并且如果存在不多于1种DLT, 则建议开设以12mg/kg QW给药的队列3。

[0270] 对于队列3的所有参与者 (n=6), 将以12mg/kg QW施用AON1, 其中参与者之间的间隔为至少9天。

[0271] 如果给定队列中的2名或更多参与者经历了DLT, 则将超过MTD并且将不进行进一步的剂量递增。DMC在数据审查后可能建议扩大之前的队列、选择较低的中间剂量或停止研究。

[0272] 主要安全性评估终点在上面的“目标和终点”表格中列出。研究的次要目标包括评估AON1的血浆和尿液PK以及肌肉分布。所有参与者都将在筛查和第13周 (队列1A) 或第25周 (队列1B、2和3) 时进行肌肉活检。在队列3 (12mg/kg QW) 中的所有6名参与者完成第25周的评估后, 将对所有数据进行评估, 以确定所计划的长期扩展 (LTE) 研究的剂量, 该研究将对

所有完成本研究且所计划的持续时间为至少1年的参与者开放。LTE研究的细节将在单独的方案中指定。一旦剂量确定并且LTE研究开放招募,本研究的参与者将过渡到LTE研究,或者在其最后一剂AON1后4周进行研究完成访视。在LTE研究开放之前,将在本研究中继续进行给药和评估。

[0273] 最后一名参与者在第25周接受剂量给药后,DMC将审查所有参与者数据。根据结果和DMC建议,主办者将确定LTE研究的剂量。如果参与者在主办者确定LTE剂量的过程中完成所有按计划访视,则所述参与者被认为已完成研究。在卫生局许可或批准后,并且在参与者的场所收到IRB/EC对LTE的批准后,参与者可开始在LTE中给药。研究完成发生在参与者入组LTE之前最后一次访视的当日。在LTE研究期间,参与者将接受12mg/kg或在本研究期间确定的最高耐受剂量的AON1。

[0274] 实施例11

[0275] 雄性CD-1小鼠中AON1 26周毒性研究的评估

[0276] 将雄性CD-1小鼠(10或15只/组(主要毒性研究),以及0和18mg/kg剂量组中最多5只/组的主要毒性动物,在13周恢复期后安乐死;4(媒介物对照)和19只/组(毒代动力学(TK)))通过缓慢IV推注给药0(媒介物:0.9%氯化钠注射液,USP)、6、12或18mg/kg每周两次AON1,总持续时间为26周。在第1天和第176天的给药后0(给药后2分钟内)、0.33、1、3、8和24小时采集血液用于生物分析。评估了以下参数:死亡率、临床体征、体重、食物消耗、眼科检查、临床病理学(即,临床化学、血液学和凝血)、肉眼尸检、器官重量和组织病理学。

[0277] 生物分析和组织分布

[0278] 血浆暴露(基于 C_{max} 和 AUC_{0-24})通常以与剂量成比例的方式随着剂量的增加而增加。在多次剂量的AON1后,在雄性小鼠中未观察到积聚。

[0279] 第178天,所有治疗组中雄性小鼠组织中AON1的平均浓度均可测量。平均浓度通常随着剂量从6mg/kg/剂增加至18mg/kg/剂而增加。不同剂量水平的AON1的平均浓度的排序为:肝脏、肾脏、心脏、腓肠肌和股二头肌。

[0280] 由于病理学发现的严重程度较轻,并且每周两次最高至18mg/kg/剂的施用对动物的健康或幸福感没有影响,因此在给药期的第176天,未见不良反应水平(NOEL)为每周两次18mg/kg/剂,这对应于分别为37,700nmol/L和14,700h*nmol/L的平均最大观察浓度(C_{max})和浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-24})值。

[0281] 实施例12

[0282] 细胞色素P450抑制和诱导

[0283] 在与0.1至100 μ M AON1一起孵育的人类肝脏微粒体中评估AON1抑制CYP酶的潜力。通过每种同工酶的阳性对照(即,参考化合物)证实了测定的有效性。直接抑制CYP1A2的 IC_{50} 值为7.85 μ M,而直接抑制CYP2C8和CYP2C19的 IC_{50} 值为>100 μ M。考虑到微粒体蛋白结合后,直接抑制CYP1A2、CYP2C8和CYP2C19的未结合 IC_{50} 值分别为0.09、>1.27和>1.08 μ M,低于最大剂量18mg/kg下的预测人类血浆 C_{max} 18 μ M。尝试了AON1的血浆蛋白结合,但由于与过滤装置的非特异性结合水平高而无法评估。对CYP2B6、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4/5没有直接抑制(底物=睾酮或咪达唑仑(midazolam))。根据文献,基于硫代磷酸酯的寡核苷酸对CYP酶的抑制具有测试系统依赖性;在人类肝脏微粒体中观察到基于硫代磷酸酯的寡核苷酸对CYP酶的抑制,但在冷冻保存的人类肝细胞中未观察到这一现象(Kazmi Drug Metab Dispos.2018年8

月;46(8):1066-1074。可见于:<https://dmd.aspetjournals.org/content/dmd/46/8/1066.full.pdf>)。冷冻保存的人类肝细胞提供更具临床相关性的抑制谱,以用于在体外到体内外推基于硫代磷酸酯的寡核苷酸对CYP酶的抑制的药物-药物相互作用。鉴于AON1也是一种基于硫代磷酸酯的寡核苷酸,微粒体可能无法代表体内状况。

[0284] 为此,使用冷冻保存的人类肝细胞进行进一步研究,并证明AON1不是CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6或CYP3A4/5的直接或时间依赖性抑制剂,并且对于所评估的所有CYP, IC_{50} 值 $>100\mu M$ 。

[0285] 在与 $100\mu M$ AON1一起孵育的肝细胞中评估了诱导CYP酶的潜力。通过每种同工酶的阳性对照(即,参考化合物)证实了测定的有效性。CYP诱导的体外测定表明,AON1在转录水平上不诱导CYP1A2、CYP2B6和CYP3A4。

[0286] 实施例13

[0287] 治疗13周的雄性食蟹猴中的AON1的评估

[0288] 通过IV输注(60分钟)向雄性食蟹猴(3只/组(主要毒性研究);2只/组,0、12和18mg/kg QW(4周恢复))给药0(媒介物:0.9% NaCl注射液,USP)、6、12或18mg/kg QW AON1,持续13周。在给药前第1和85天以及给药后0.5、1、2、3、6、8和24小时采集血液进行生物分析,并在给药前、给药后1、3、6和24小时采集血液进行补体活化分析。还在第78天采集给药前样品。评估了以下参数:死亡率、临床体征、体重、食物消耗、血浆和组织(腓肠肌、心脏、股二头肌、肝脏和肾脏)中的AON1水平、组织(腓肠肌、心脏、股二头肌、肝脏和肾脏)中的外显子跳跃百分比、临床病理学(临床化学、血液学、尿液分析、尿液化学和尿液生物标志物)、补体活化指标(Bb、C3a和sC5b-9)、眼科、ECG、器官重量和组织病理学。

[0289] 通过RT-ddPCR测量组织中的外显子跳跃。该方法量化了非跳跃的DMD(肌营养不良蛋白)转录物的数量,以及外显子51跳跃的DMD转录物的数量;并计算了外显子跳跃百分比(%跳跃)。外显子51跳跃百分比从1.7%到14.4%不等,并且通常随着剂量的增加而增加。

[0290] 本公开的范围不受实施例中公开的实施方案限制,所述实施例意图作为各个方面的单一说明,并且任何等效物都在本公开的范围。除了本文中示出和描述的那些修改之外,根据前述描述,各种修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的。此类修改意图处于所附权利要求书的范围内。

[0291] 本文引用了各种参考文献如专利、专利申请和出版物,其公开内容特此以引用的方式整体并入本文。

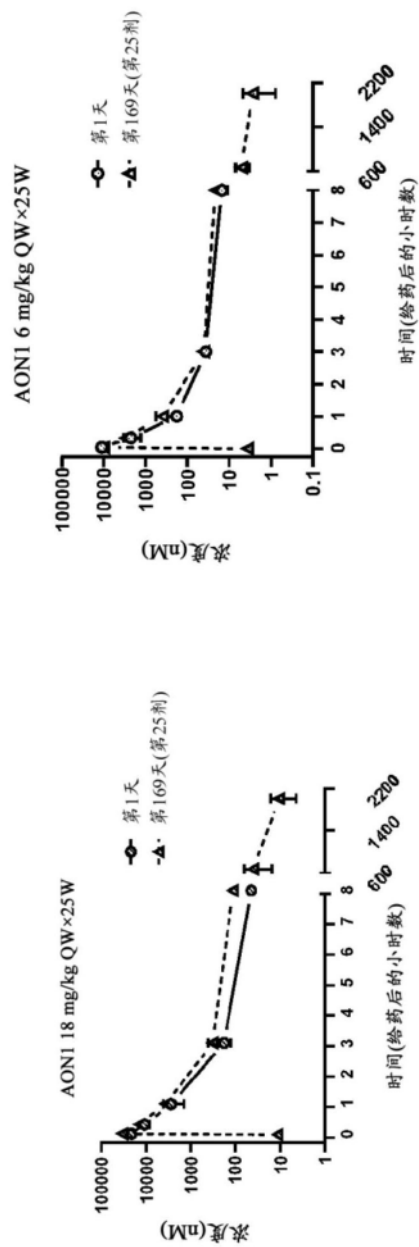


图1

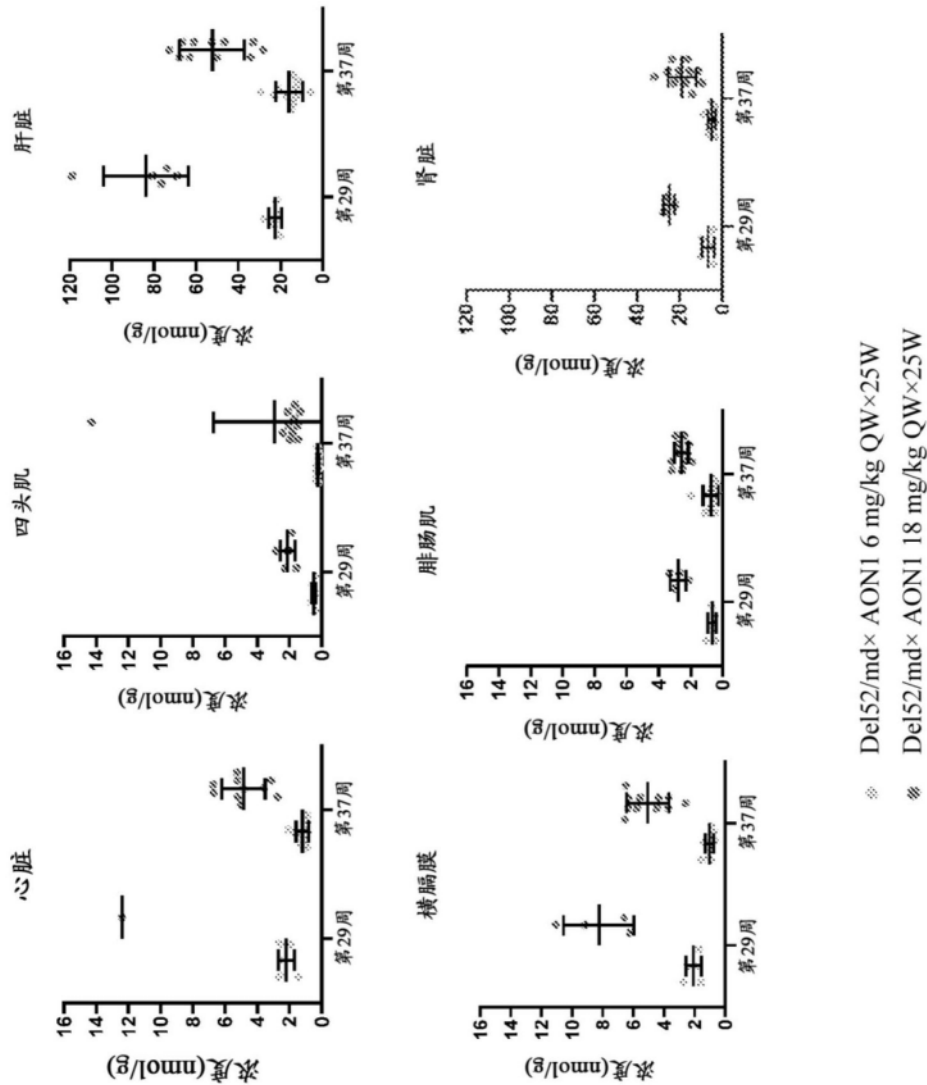
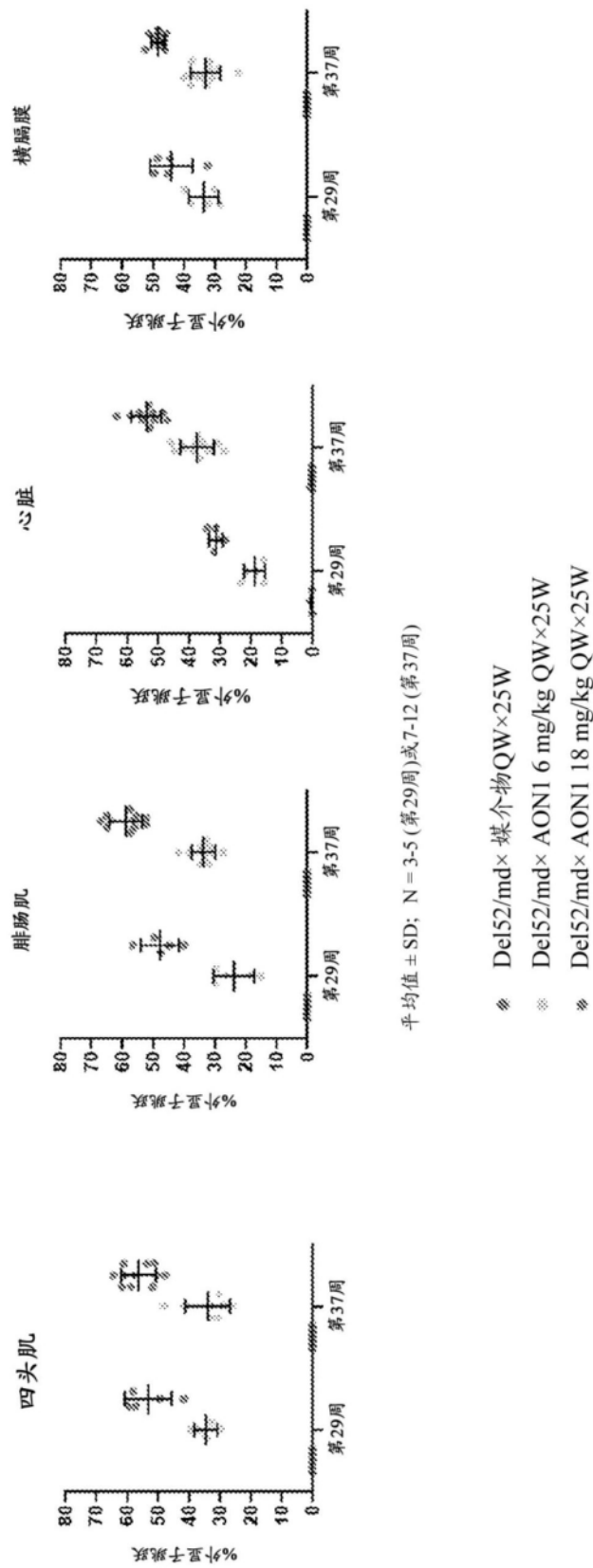


图2



平均值 ± SD; N = 3-5 (第29周)或7-12 (第37周)

图3

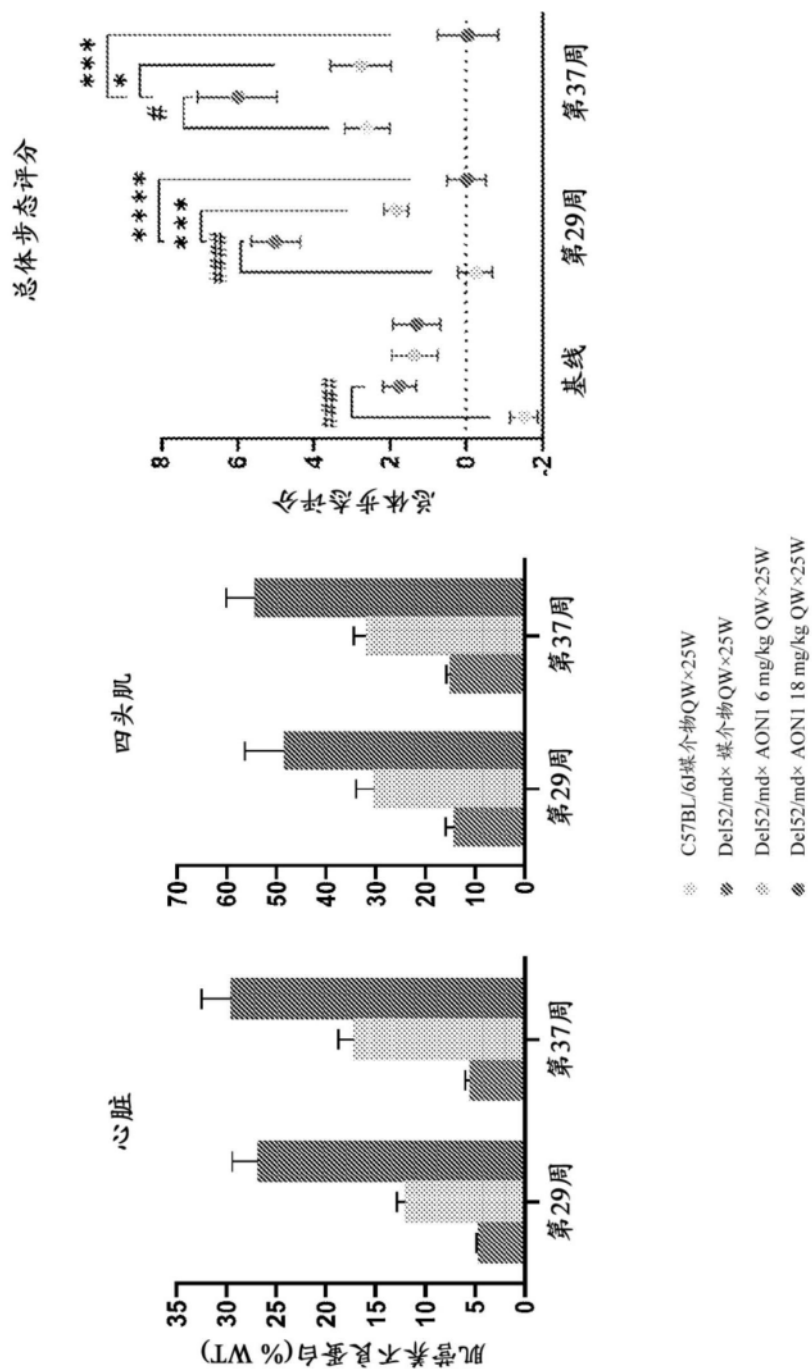
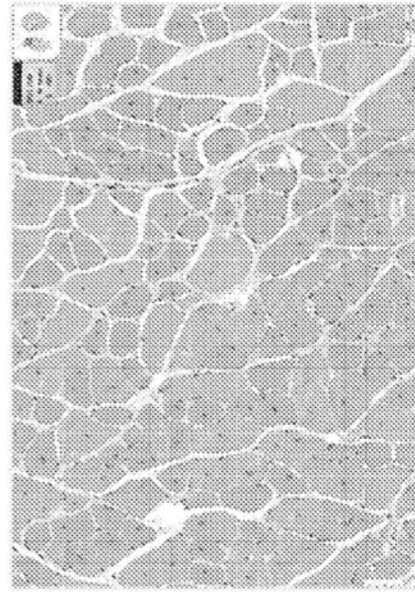
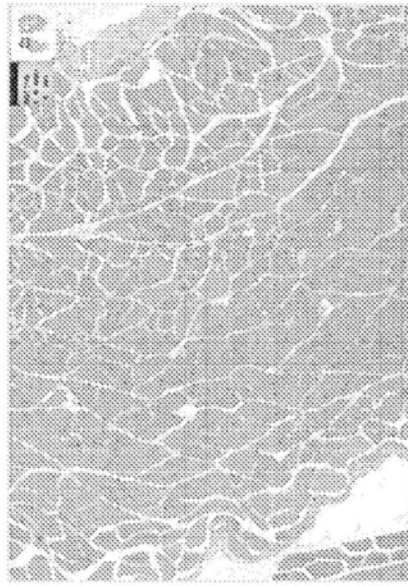


图4

hDMD del52/md $\times$ (+/+) AON1 18 mg/kg
QW, 持续25周, 在37周评估



hDMD del52/md $\times$ (+/+) 媒介物
QW, 持续25周, 在37周评估

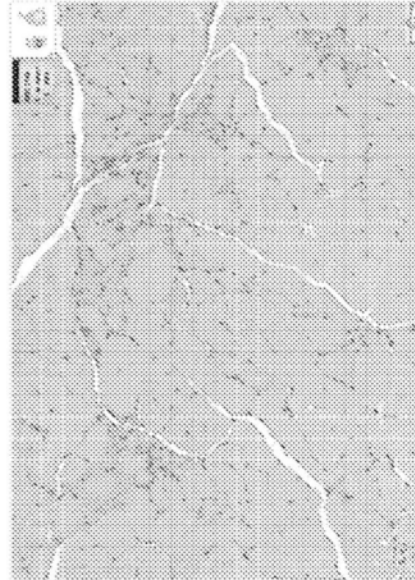


图5

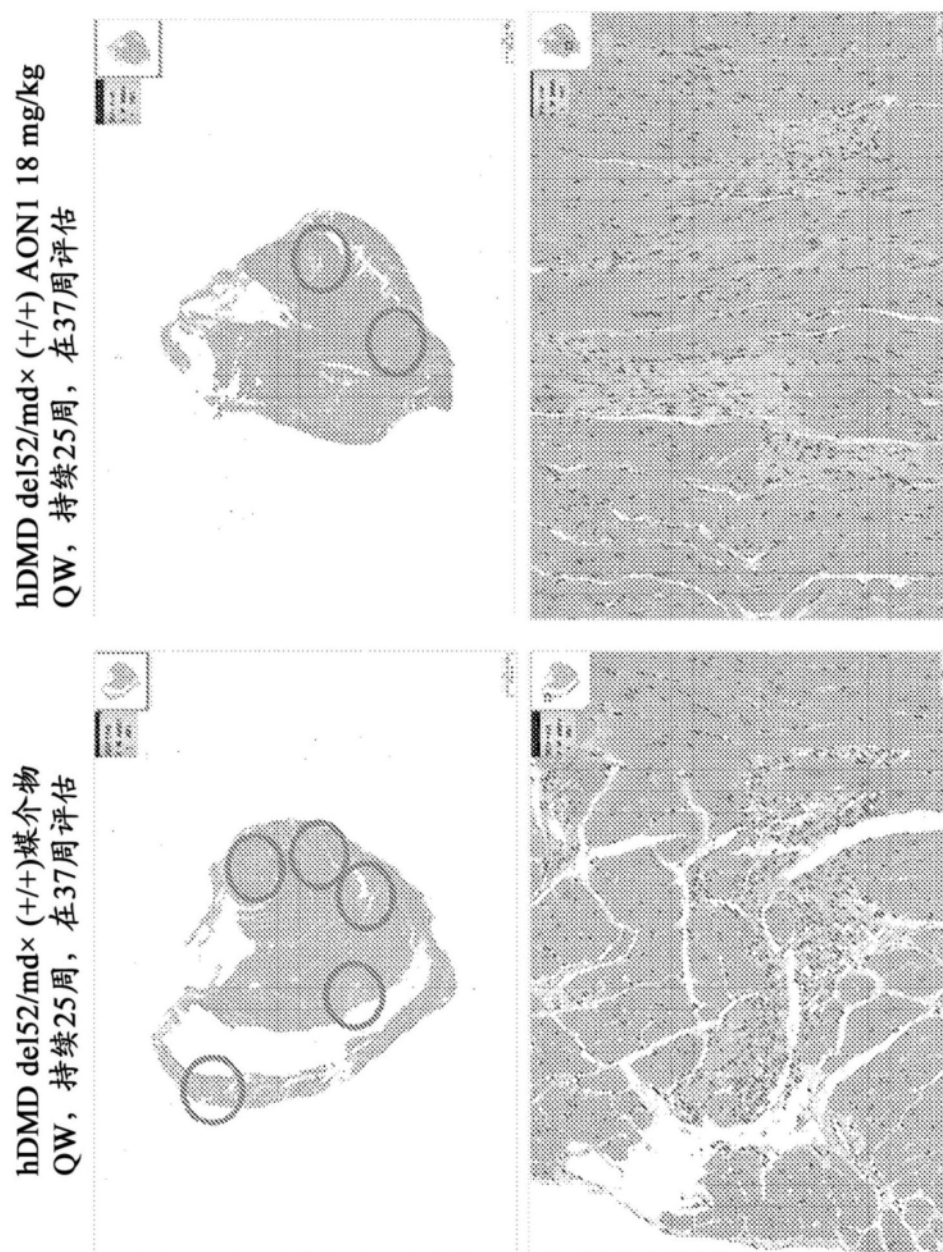


图6

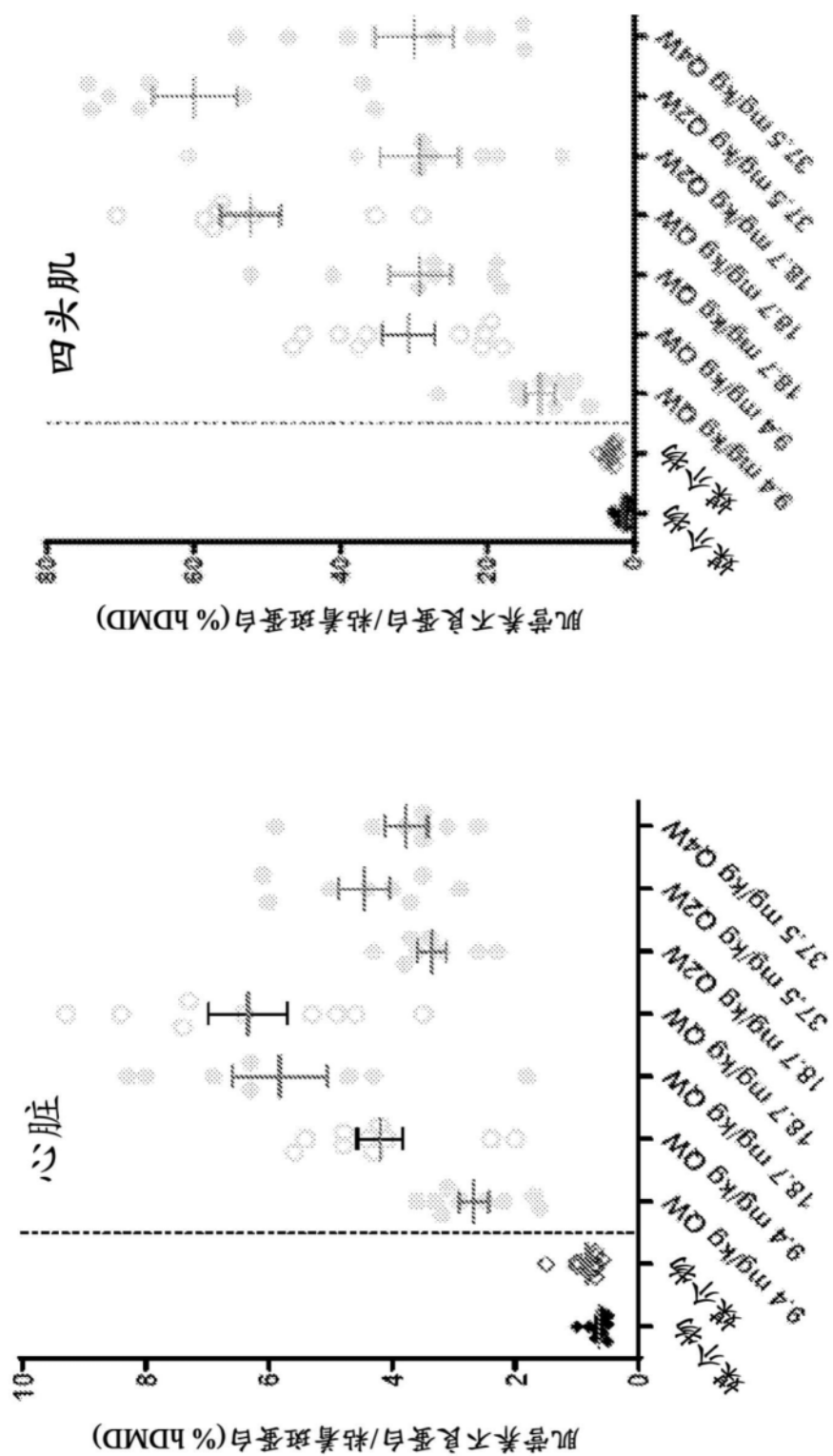


图7

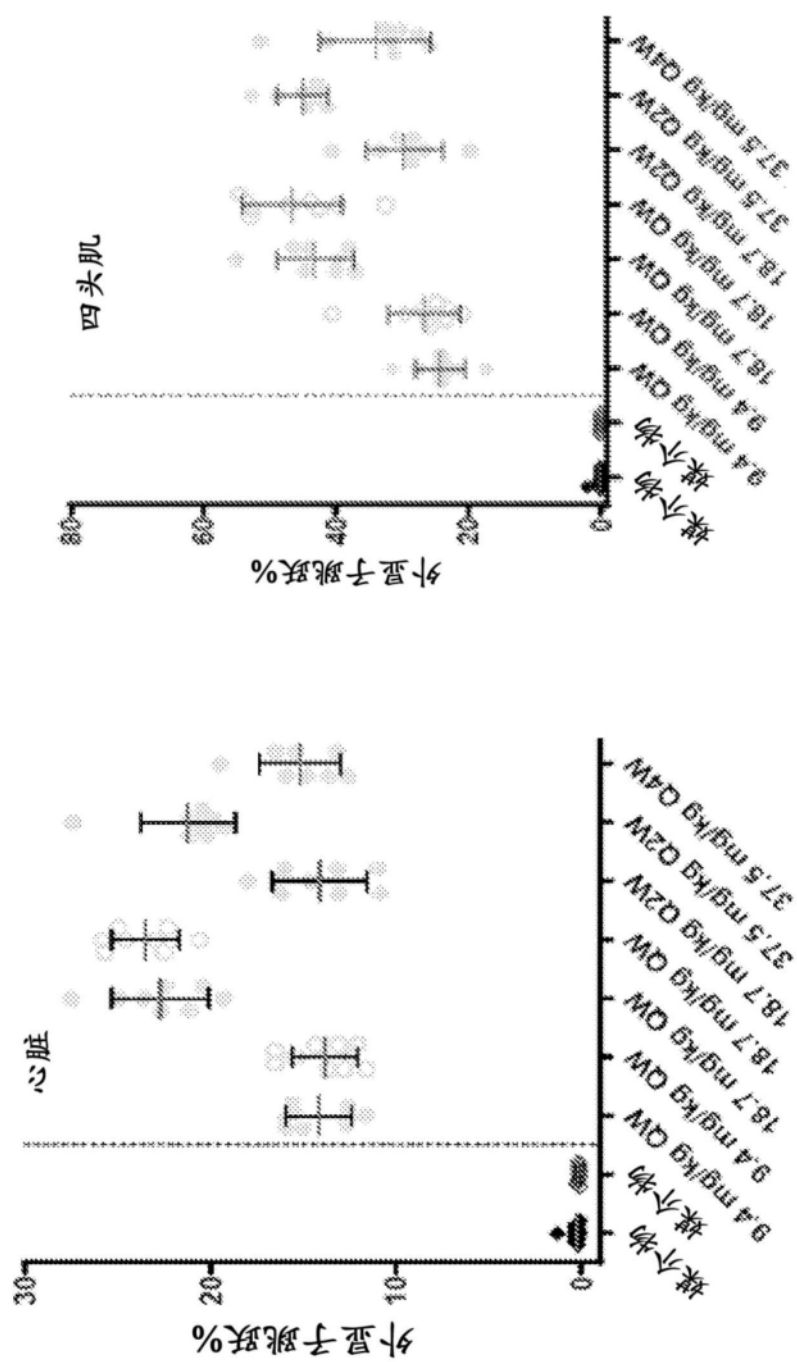


图8

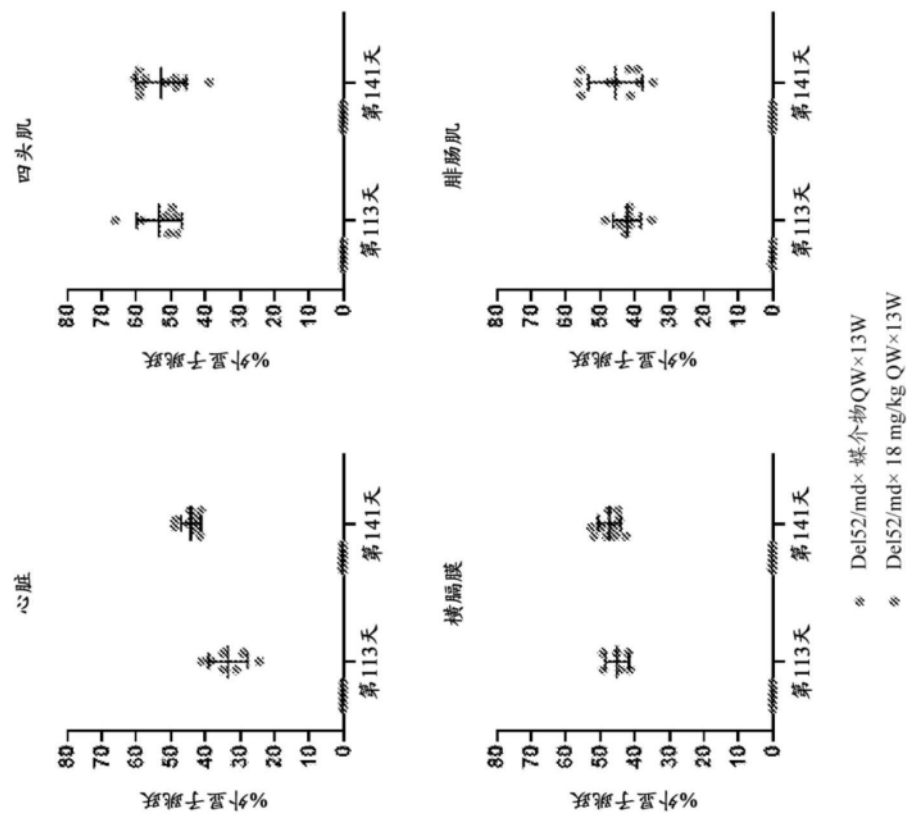


图9

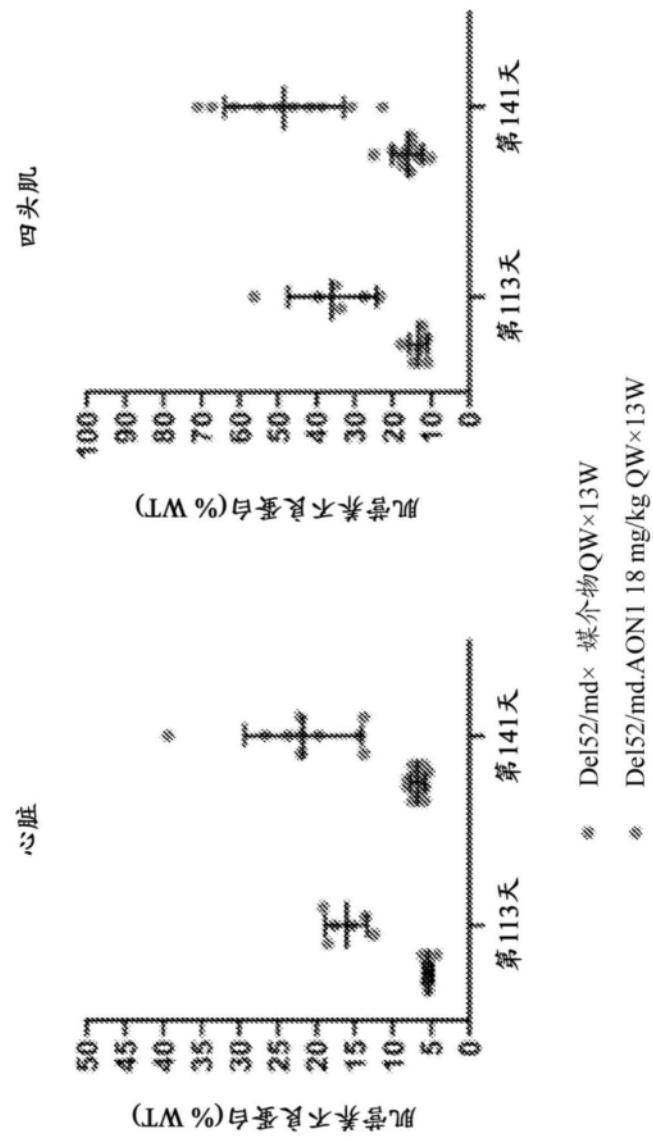


图10

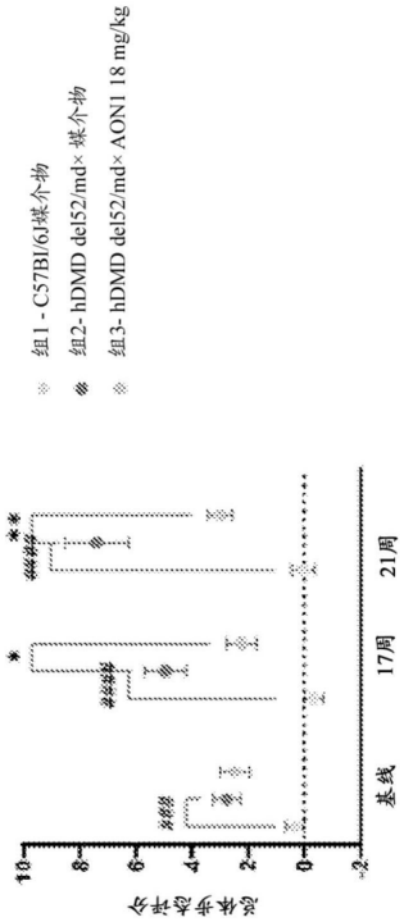


图11

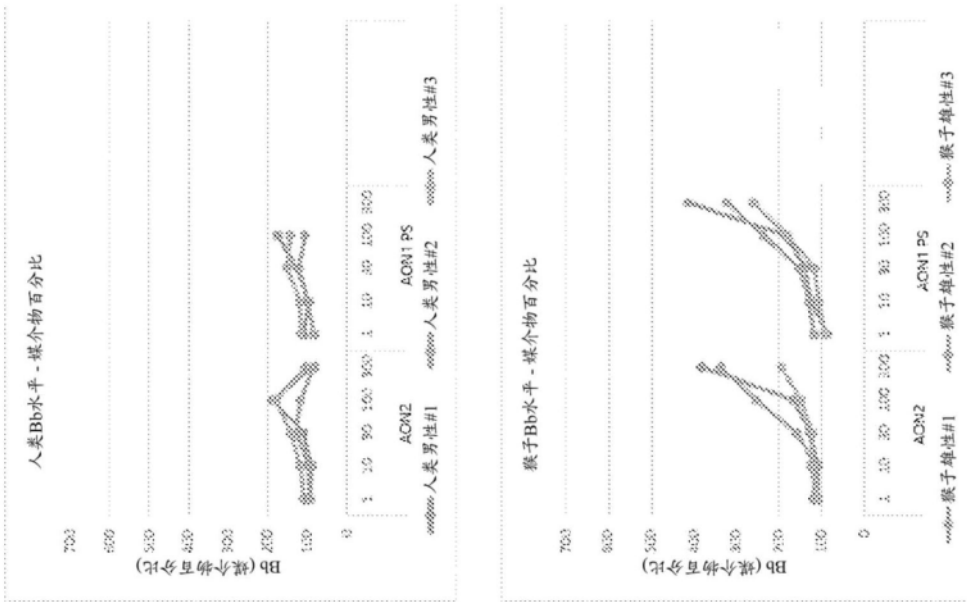


图12

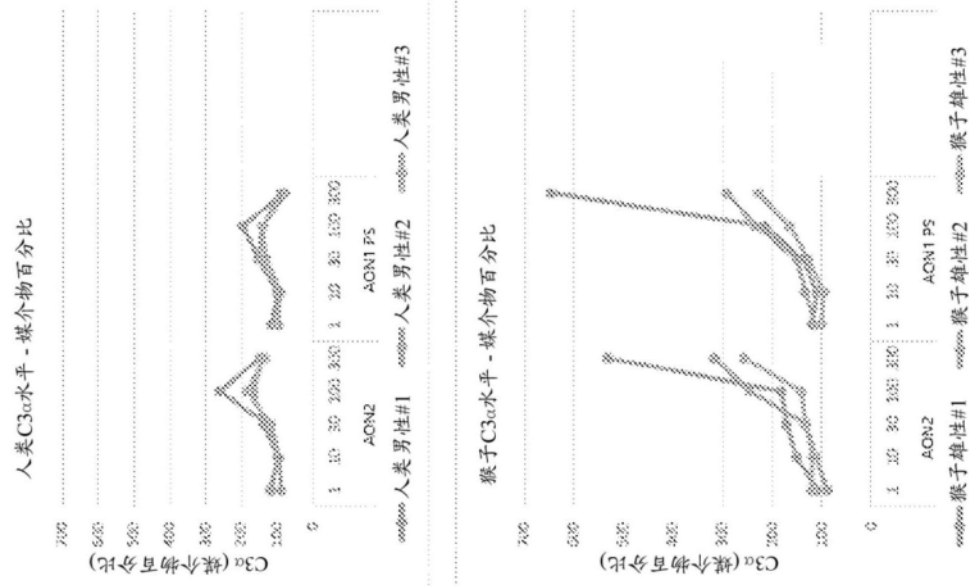


图13

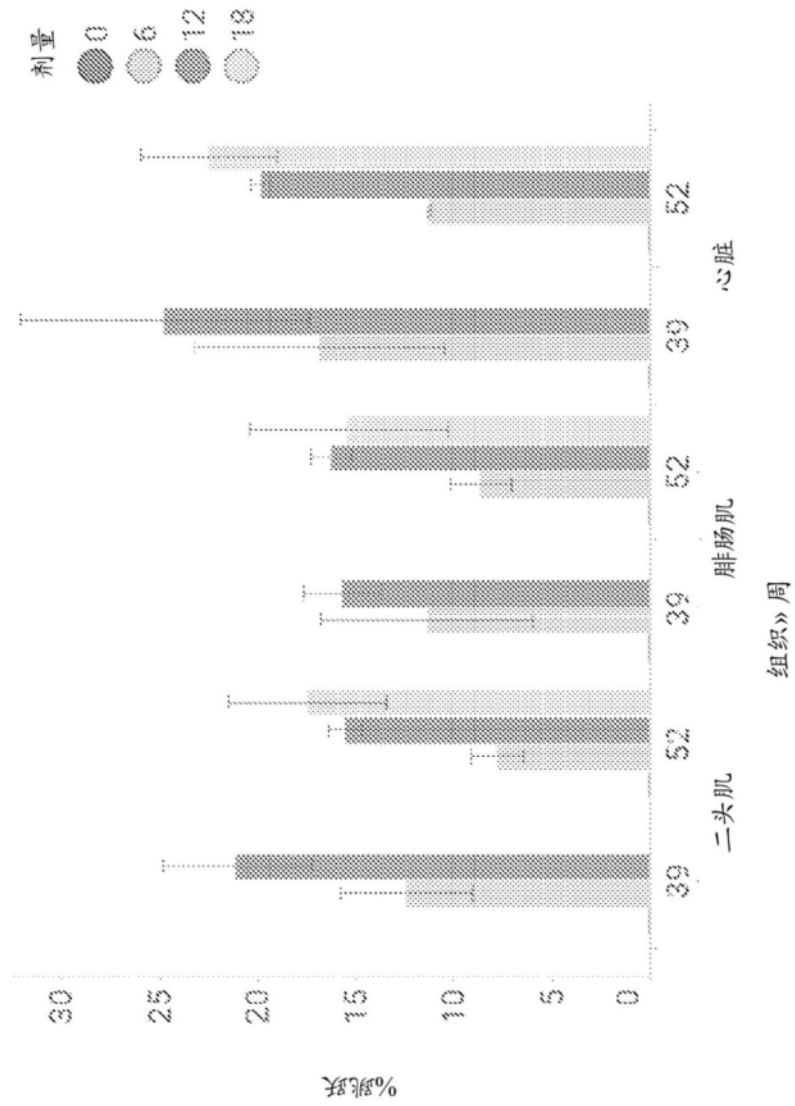


图14