(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191669 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.04

(22) Дата подачи заявки
2019.12.12

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61P 25/14 (2006.01)

(54) СОСТАВЫ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

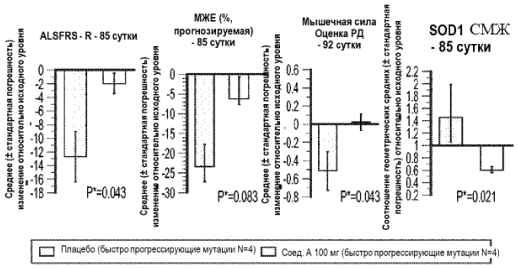
(31) **62/779,916; 62/807,603; 62/840,879**
(32) **2018.12.14; 2019.02.19; 2019.04.30**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/065936**
(87) **WO 2020/123783 2020.06.18**

(71) Заявитель:
БАЙОДЖЕН МА ИНК.; АЙОНИС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Несторов Иван Александров, Фергюсон Тоби, Норрис Дэниел А. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены режимы дозирования антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на SOD1, и их солей. Эти режимы дозирования находят применение при лечении субъектов, имеющих боковой амиотрофический склероз или подверженных риску развития бокового амиотрофического склероза.



*На основании критерия Крускала-Уоллиса

202191669 A1

202191669 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568057EA/026

СОСТАВЫ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Эта заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/779916, поданной 14 декабря 2018 г., № 62/807603, поданной 19 февраля 2019 г., и № 62/840879, поданной 30 апреля 2019 г., содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка в целом относится к режимам дозирования для клинического применения антисмысловых олигонуклеотидов или их солей, которые снижают экспрессию супероксиддисмутазы 1 (SOD1) у субъекта-человека, нуждающегося в этом, например, у взрослых с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), у которых есть подтвержденная мутация гена SOD1 человека. Такие способы полезны для лечения, предотвращения или уменьшения интенсивности БАС путем ингибирования экспрессии SOD1.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Растворимый фермент SOD1 (также известный как супероксиддисмутаза Cu/Zn) представляет собой одну из супероксиддисмутаз, которая обеспечивает защиту биомолекул от окислительного повреждения, катализируя дисмутацию супероксида в пероксид водорода (H_2O_2) (Fridovich, *Annu. Rev. Biochem.*, 64:97-112 (1995)). Супероксидный анион (O^{2-}) представляет собой потенциально опасный клеточный побочный продукт, образующийся в основном из-за ошибок окислительного фосфорилирования в митохондриях (Turrens, J. *Physiol.*, 552:335-344 (2003))

Боковой амиотрофический склероз (БАС, также известный как болезнь Лу Герига) представляет собой разрушительное прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, поражающее до 30000 американцев в любой момент времени. Мутации в гене SOD1 связаны с доминантно наследуемой формой БАС, заболеванием, характеризующимся избирательной дегенерацией верхних и нижних двигательных нейронов (Rowland, *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344:1688-1700 (2001)). Существует тесная генетическая связь между семейным БАС и миссенс-мутациями в гене SOD1 (Rosen, *Nature*, 362:59-62 (1993)).

Считается, что токсичность мутантного SOD1 возникает из-за начального неправильного свертывания (приобретения функции), снижающего ядерную защиту от активного фермента (потеря функции в ядрах), процесса, который может быть вовлечен в патогенез БАС (Sau, *Hum. Mol. Genet.*, 16:1604-1618 (2007)). Прогрессирующая дегенерация двигательных нейронов при БАС в конечном итоге приводит к их гибели. Когда двигательные нейроны погибают, способность головного мозга инициировать и контролировать движения мышц теряется. При прогрессивном поражении произвольной мышечной деятельности пациенты на более поздних стадиях заболевания могут быть

полностью парализованы.

На данный момент наблюдается недостаток доступных вариантов для лечения нейродегенеративных заболеваний. Следовательно, целью данного изобретения является обеспечение способов для лечения таких заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение частично относится к режимам дозирования антисмысловых олигонуклеотидов, которые снижают экспрессию супероксиддисмутазы 1 (SOD1), и применению таких антисмысловых олигонуклеотидов или их солей для ингибирования экспрессии SOD1 и для лечения, предотвращения или уменьшения интенсивности БАС у субъекта-человека с мутацией в гене SOD1.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене супероксиддисмутазы 1 человека (SOD1), у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту-человеку (например, путем интратекального введения) фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг или 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене SOD1 человека, у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту-человеку (например, путем интратекального введения) фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 60 мг или 60 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене SOD1

человека, у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту-человеку (например, путем интратекального введения) фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 40 мг или 40 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене SOD1 человека, у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту-человеку (например, путем интратекального введения) фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 20 мг или 20 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В пятом аспекте в изобретении предложен способ снижения синтеза белка SOD1 человека или уровней мРНК SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым амиотрофическим склерозом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг или 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В шестом аспекте в изобретении предложен способ снижения синтеза белка SOD1 человека или уровней мРНК SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым амиотрофическим склерозом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 60 мг или 60 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В седьмом аспекте в изобретении предложен способ снижения синтеза белка SOD1 человека или уровней мРНК SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым амиотрофическим склерозом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 40 мг или 40 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В восьмом аспекте в изобретении предложен способ снижения синтеза белка SOD1 человека или уровней мРНК SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым амиотрофическим склерозом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 20 мг или 20 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12,

12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных аспектов мутация в гене SOD1 представляет собой A4V, H46R, G93S, A4T, G141X, D133A, V148G, N139K, G85R, G93A, V14G, C6S, I113T, D49K, G37R, A89V, E100G, D90A, T137A, E100K, G41A, G41D, G41S, G13R, G72S, L8V, F20C, Q22L, H48R, T54R, S591, V87A, T88deltaTAD, A89T, V97M, S105deltaSL, V118L, D124G, L114F, D90A, G12R или G147R. В одном варианте осуществления мутация в гене SOD1 представляет собой A4V. В другом варианте осуществления мутация в гене SOD1 представляет собой H46R. В еще одном варианте осуществления мутация в гене SOD1 представляет собой G93S.

В некоторых вариантах осуществления мутация в гене SOD1 человека определяется с помощью генетического теста.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают определение мутации в гене SOD1 человека с помощью генетического теста.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту-человеку по меньшей мере 5 раз (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 раза) в течение четырех месяцев.

В некоторых вариантах осуществления субъекту-человеку вводят ударную дозу или ударные дозы фармацевтической композиции, за которыми следует поддерживающая доза или поддерживающие дозы. В некоторых случаях вводят три ударные дозы, причем вторую ударную дозу вводят через приблизительно две недели после или через две недели после первой ударной дозы, а третью ударную дозу вводят через приблизительно две недели после или через две недели после второй ударной дозы (например, ударные дозы вводят на 1 сутки, 15 сутки и 29 сутки). В некоторых случаях поддерживающие дозы вводят приблизительно каждые 4 недели или 4 недели, начиная через 4 недели после третьей ударной дозы (*например*, в течение 1 месяца, 2 месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев).

В некоторых вариантах осуществления субъекту-человеку вводят три ударные дозы фармацевтической композиции, за которыми следует по меньшей мере одна (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) поддерживающая доза. В некоторых случаях три ударные дозы вводят с интервалом в приблизительно две недели или две недели. В некоторых случаях три ударные дозы вводят с интервалом в приблизительно 14 суток или 14 суток. В некоторых случаях поддерживающую дозу/дозы вводят, начиная через приблизительно 4 недели или через 4 недели после третьей ударной дозы. В некоторых случаях поддерживающую дозу/дозы вводят каждый месяц, начиная через один месяц после третьей ударной дозы. В некоторых случаях поддерживающую дозу/дозы вводят каждые 28 суток, начиная через 28 суток после третьей ударной дозы.

В некоторых вариантах осуществления ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

(i) первая ударная доза фармацевтической композиции;

(ii) вторая ударная доза фармацевтической композиции, вводимая через 14 суток после первой ударной дозы;

(iii) третья ударная доза фармацевтической композиции, вводимая через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) первая поддерживающая доза фармацевтической композиции, вводимая через 28 суток или 1 месяц после третьей ударной дозы.

В некоторых вариантах осуществления ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

(i) первая ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы 100 мг антисмыслового олигонуклеотида;

(ii) вторая ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем вторую ударную дозу вводят через 14 суток после первой ударной дозы;

(iii) третья ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем третью ударную дозу вводят через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) третья поддерживающая доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем первую поддерживающую дозу вводят через 28 суток после третьей ударной дозы.

В некоторых вариантах осуществления ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

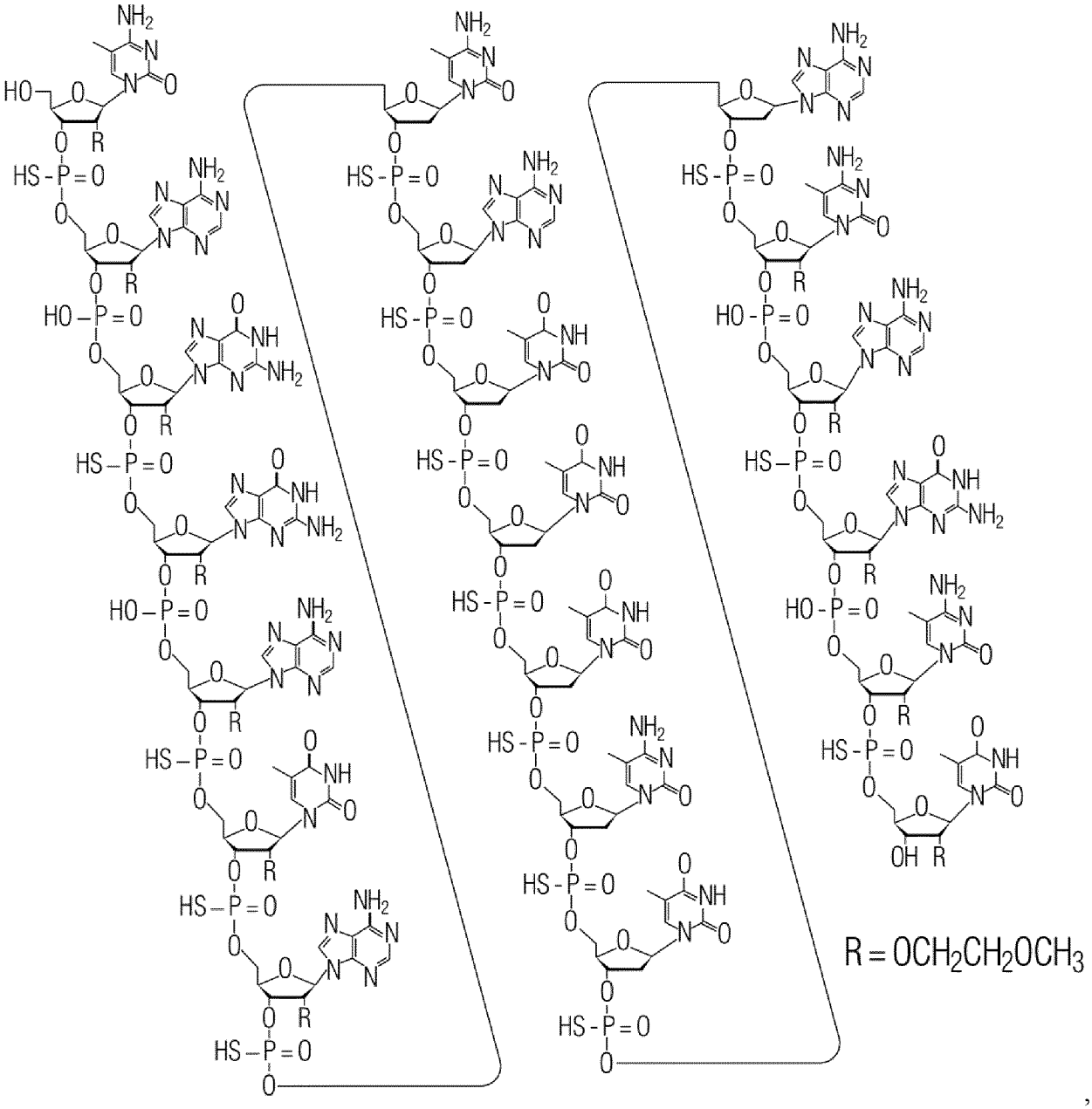
(i) первая ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы 100 мг антисмыслового олигонуклеотида;

(ii) вторая ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем вторую ударную дозу вводят через 14 суток после первой ударной дозы;

(iii) третья ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем третью ударную дозу вводят через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) первая поддерживающая доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем первую поддерживающую дозу вводят через 1 месяц после третьей ударной дозы.

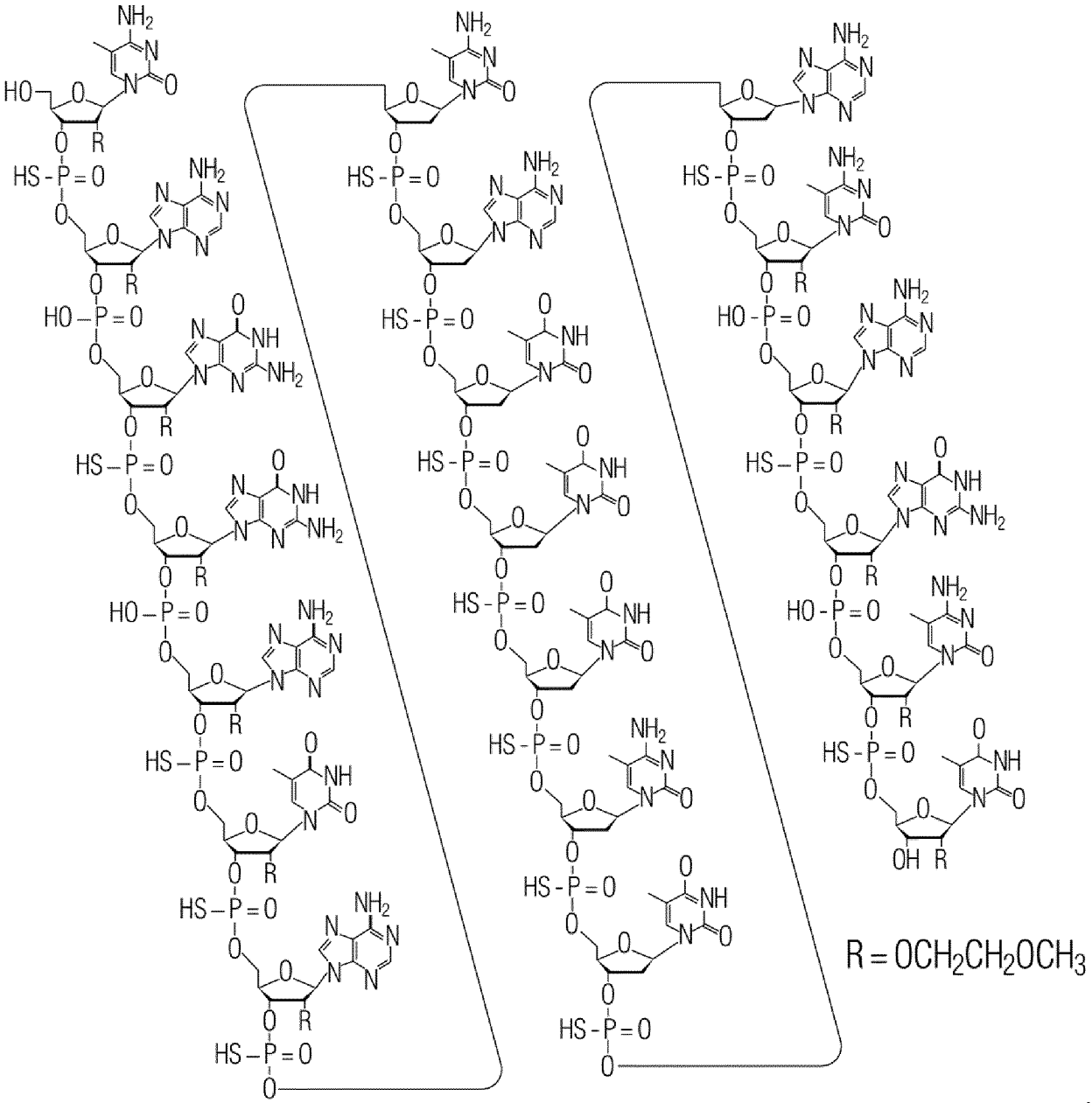
В девятом аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене SOD1, у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной 100 мг антисмыслового олигонуклеотида. 105,9 мг соединения А (т. е. нонадеканатриевой соли ISIS 666853) эквивалентно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида. Вводимая фармацевтическая композиция может содержать антисмысловой олигонуклеотид, одну или более солей антисмыслового олигонуклеотида или их смеси.

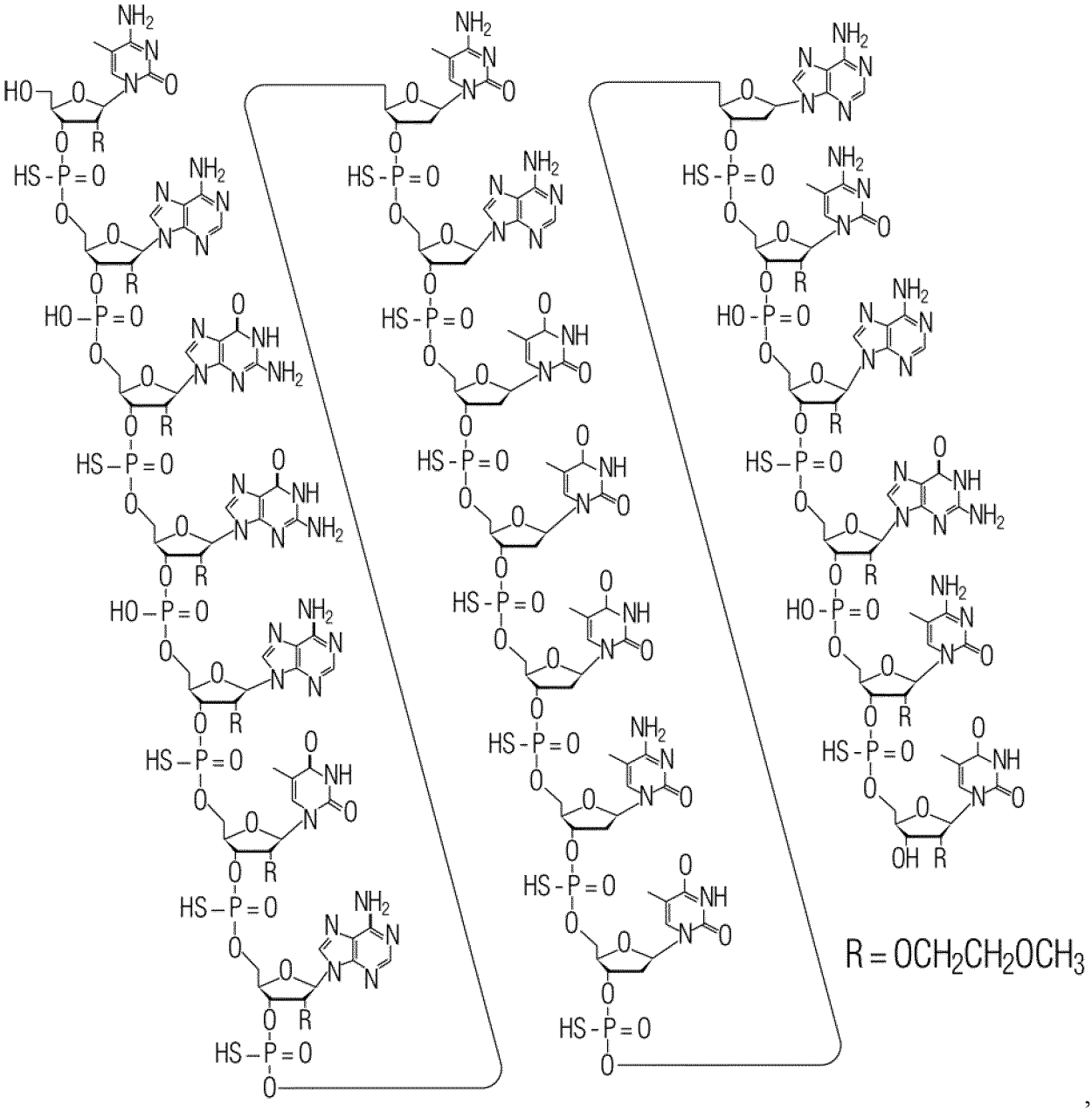
В десятом аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене SOD1, у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной 60 мг антисмыслового олигонуклеотида. 63,5 мг соединения А эквивалентно 60 мг антисмыслового олигонуклеотида. Вводимая фармацевтическая композиция может содержать антисмысловой олигонуклеотид, одну или более солей антисмыслового олигонуклеотида или их смеси.

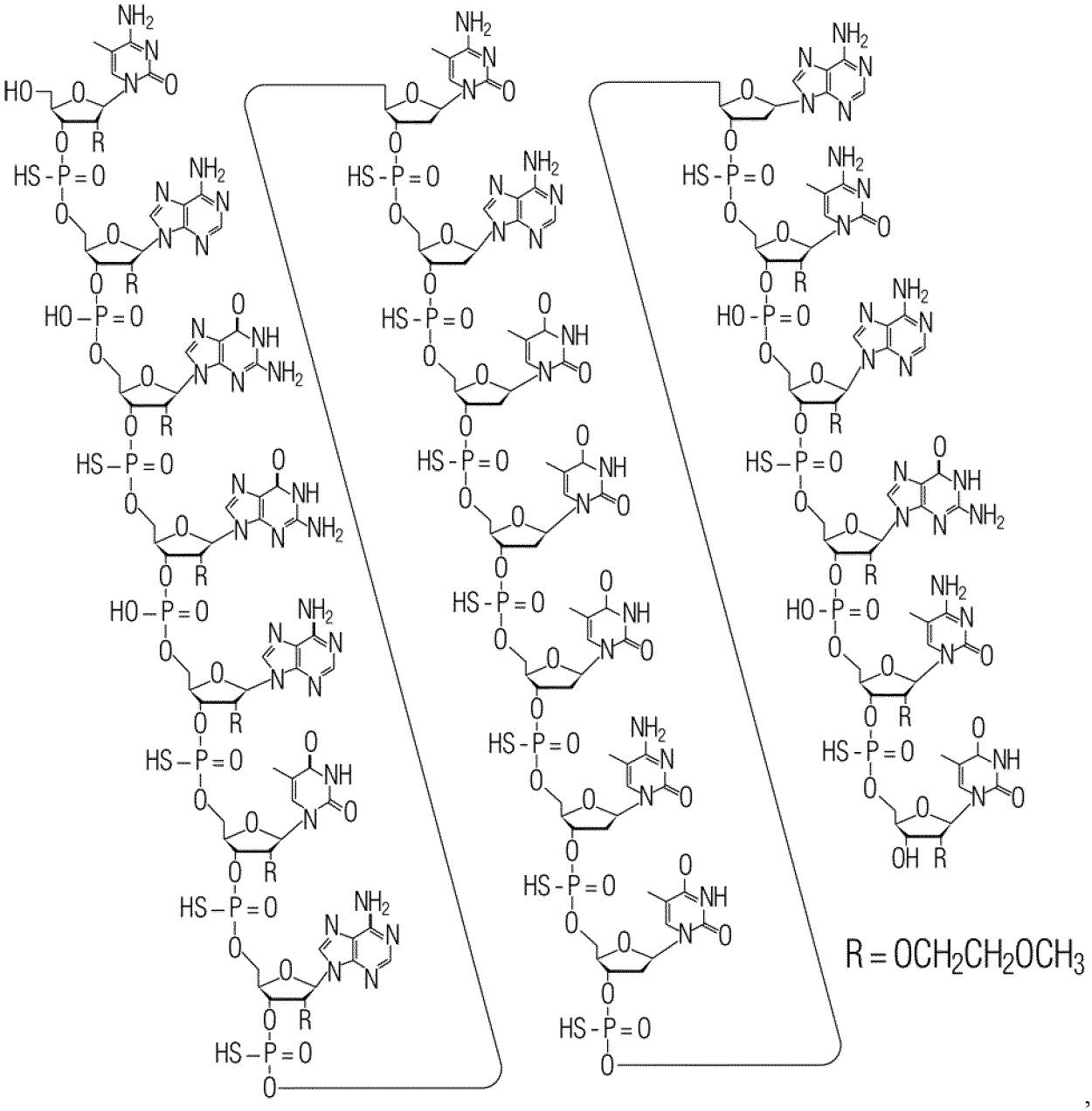
В одиннадцатом аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене SOD1, у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной 40 мг антисмыслового олигонуклеотида. 42,3 мг соединения А эквивалентно 40 мг антисмыслового олигонуклеотида. Вводимая фармацевтическая композиция может содержать антисмысловой олигонуклеотид, одну или более солей антисмыслового олигонуклеотида или их смеси.

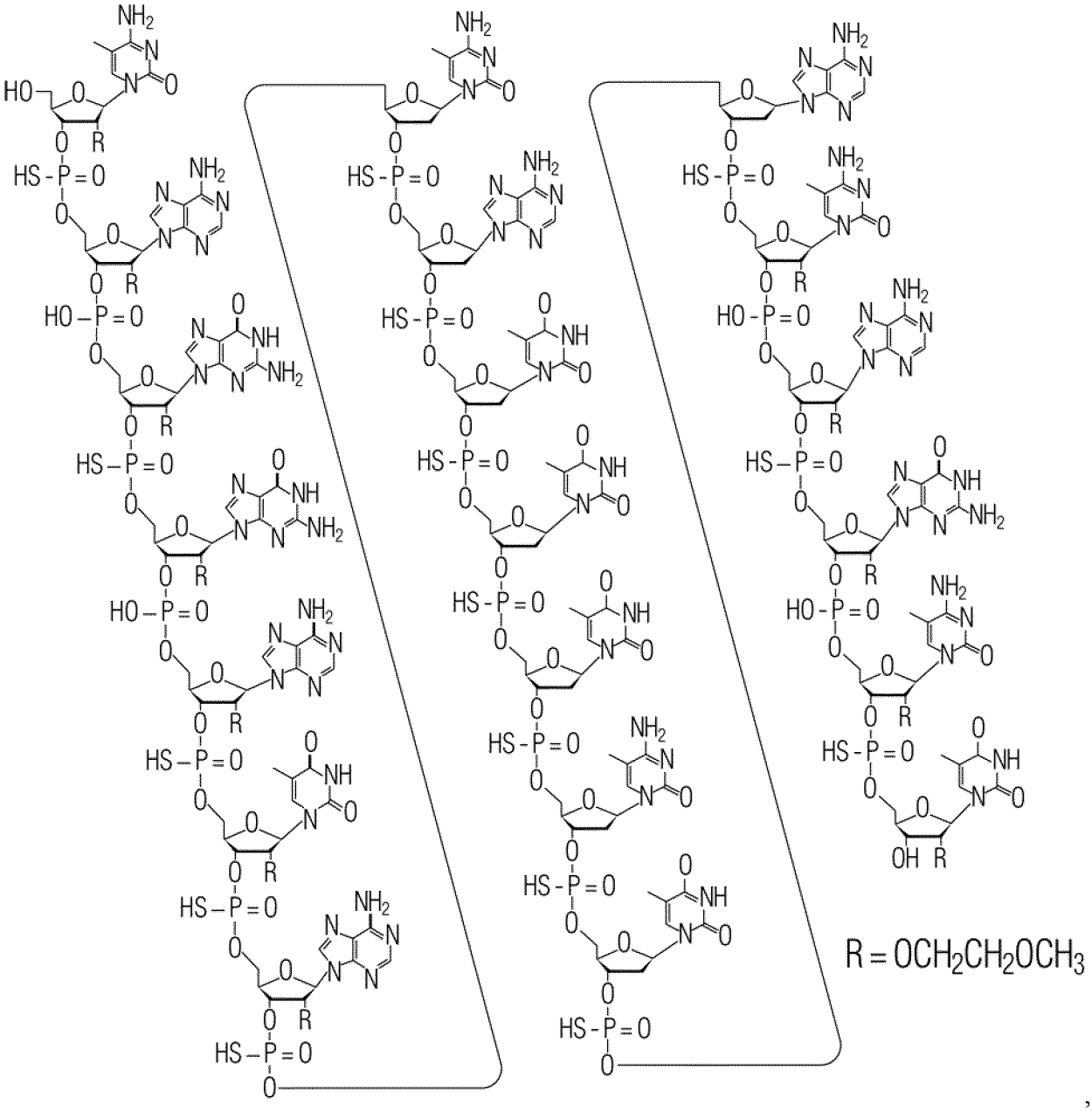
В двенадцатом аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене SOD1, у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной 20 мг антисмыслового олигонуклеотида. 21,2 мг соединения А эквивалентно 20 мг антисмыслового олигонуклеотида. Вводимая фармацевтическая композиция может содержать антисмысловой олигонуклеотид, одну или более солей антисмыслового олигонуклеотида или их смеси.

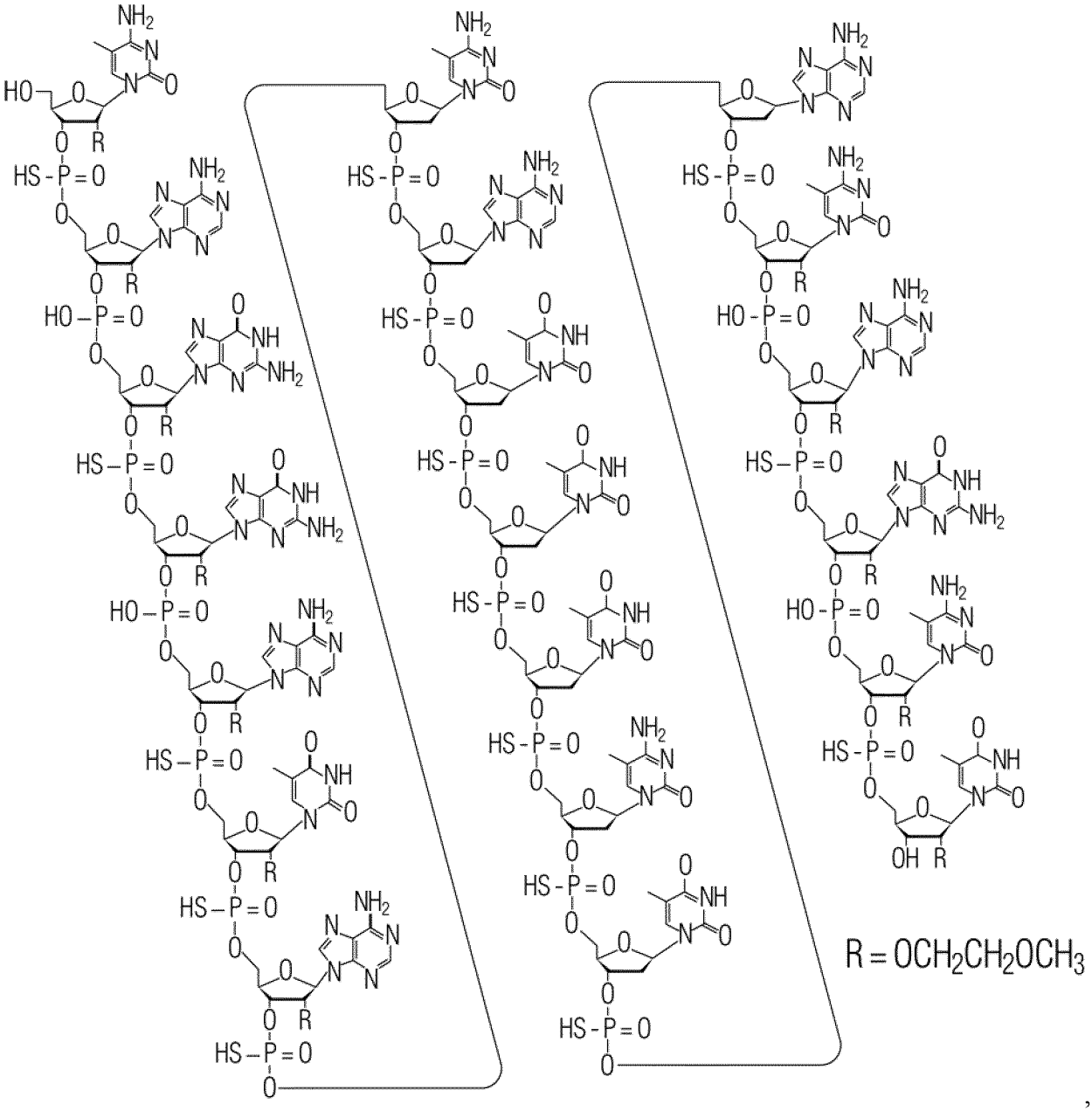
В тринадцатом аспекте в изобретении предложен способ снижения синтеза белка SOD1 человека или уровней мРНК SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым амиотрофическим склерозом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной 100 мг антисмыслового олигонуклеотида. 105,9 мг соединения А эквивалентно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида. Вводимая фармацевтическая композиция может содержать антисмысловой олигонуклеотид, одну или более солей антисмыслового олигонуклеотида или их смеси.

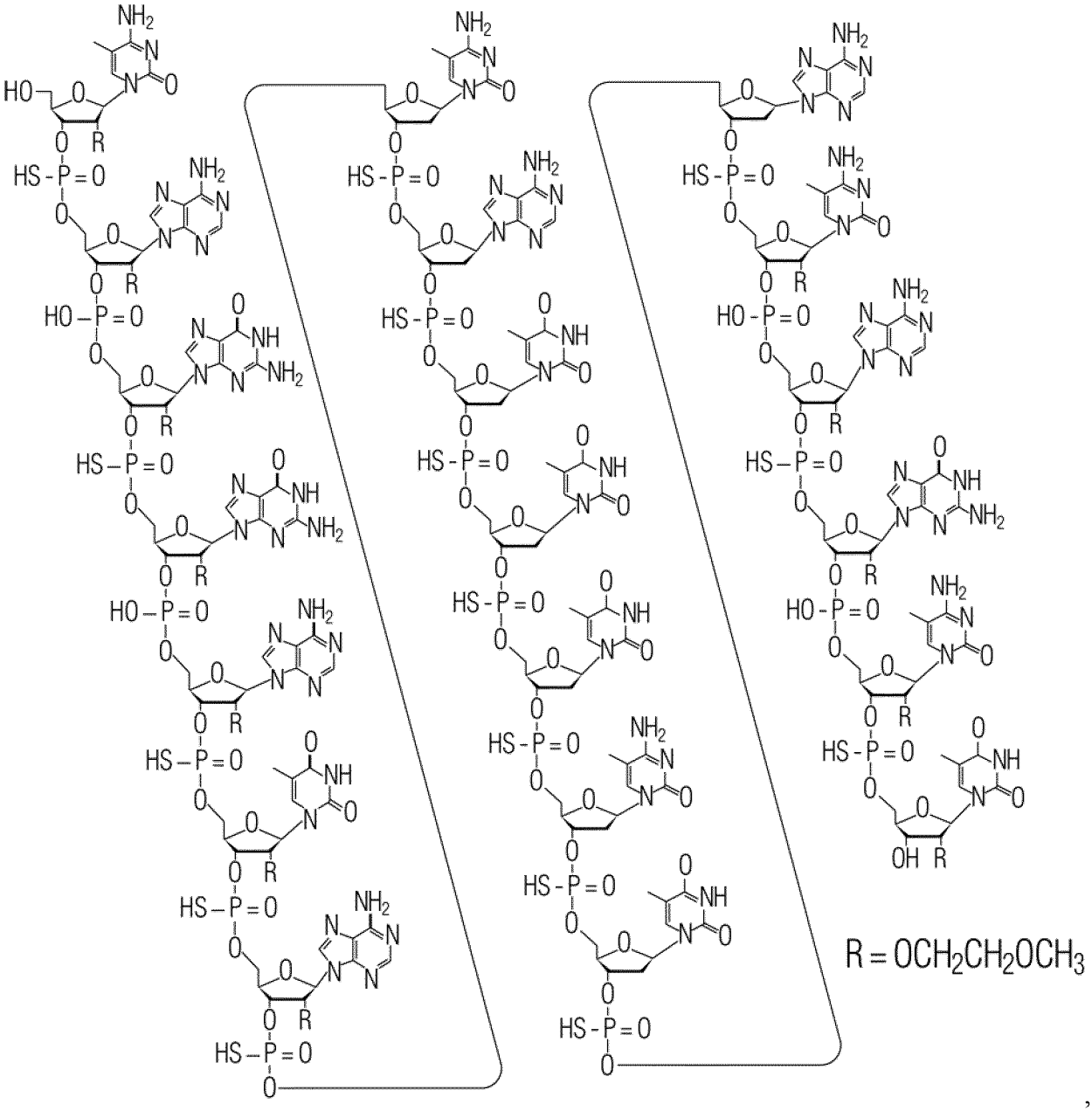
В четырнадцатом аспекте в изобретении предложен способ снижения синтеза белка SOD1 человека или уровней мРНК SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым амиотрофическим склерозом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной 60 мг антисмыслового олигонуклеотида. 63,5 мг соединения А эквивалентно 60 мг антисмыслового олигонуклеотида. Вводимая фармацевтическая композиция может содержать антисмысловой олигонуклеотид, одну или более солей антисмыслового олигонуклеотида или их смеси.

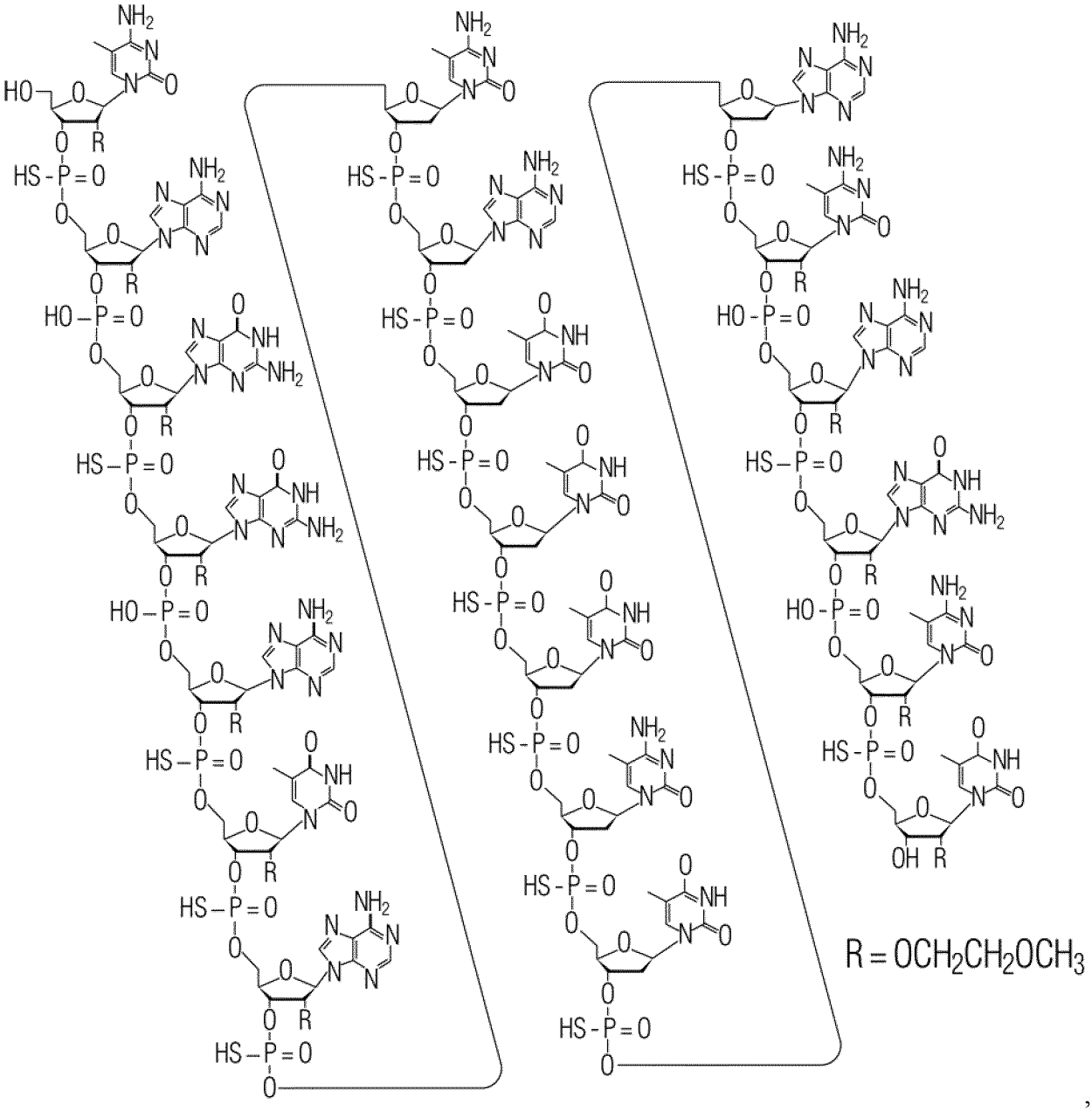
В пятнадцатом аспекте в изобретении предложен способ снижения синтеза белка SOD1 человека или уровней мРНК SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым амиотрофическим склерозом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной 40 мг антисмыслового олигонуклеотида. 42,3 мг соединения А эквивалентно 40 мг антисмыслового олигонуклеотида. Вводимая фармацевтическая композиция может содержать антисмысловой олигонуклеотид, одну или более солей антисмыслового олигонуклеотида или их смеси.

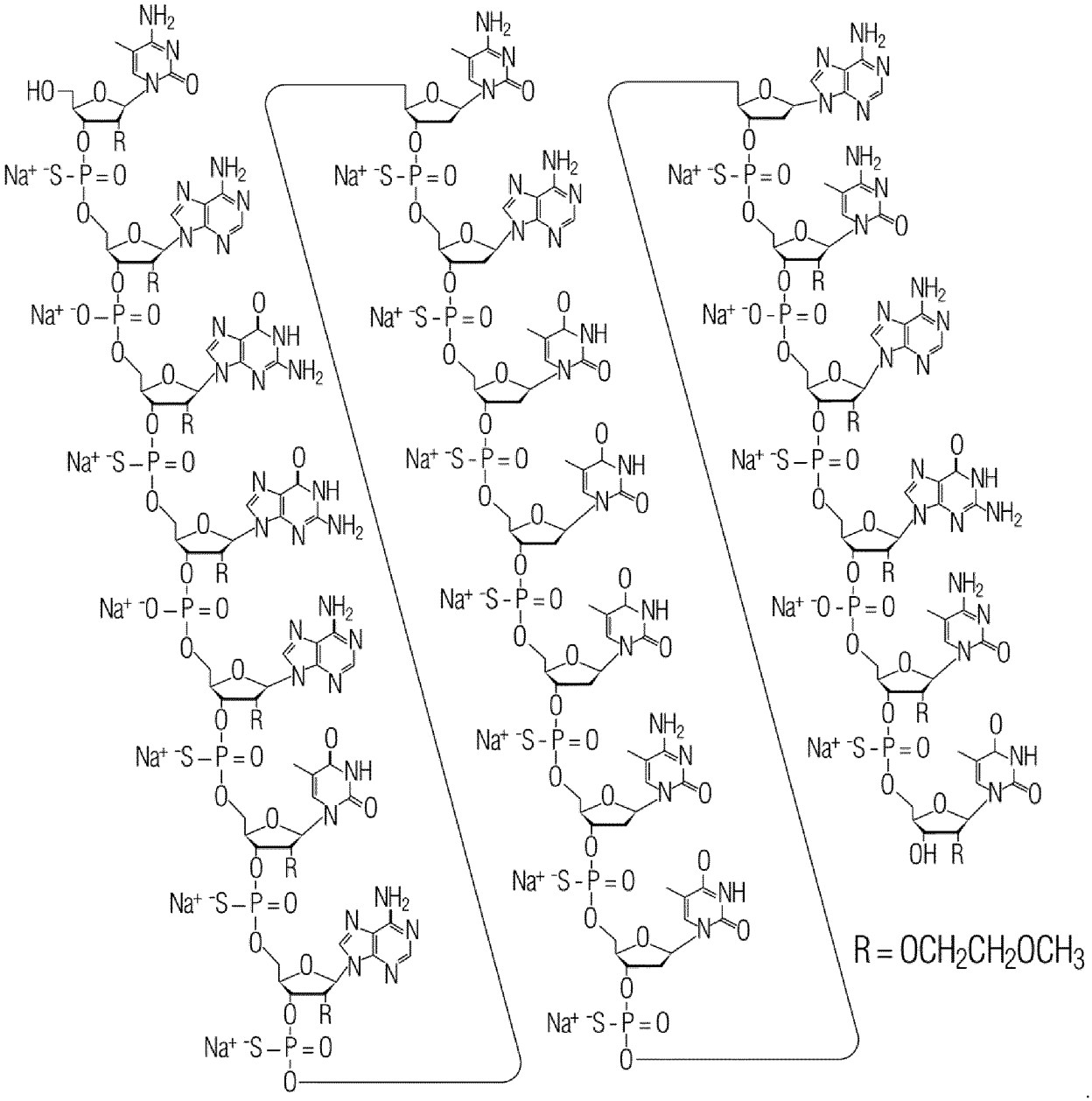
В шестнадцатом аспекте в изобретении предложен способ снижения синтеза белка SOD1 человека или уровней мРНК SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым амиотрофическим склерозом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной 20 мг антисмыслового олигонуклеотида. 21,2 мг соединения А эквивалентно 20 мг антисмыслового олигонуклеотида. Вводимая фармацевтическая композиция может содержать антисмысловой олигонуклеотид, одну или более солей антисмыслового олигонуклеотида или их смеси.

В некоторых вариантах осуществления субъекту-человеку вводят соль антисмыслового олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления соль представляет собой натриевую соль. В некоторых вариантах осуществления соль антисмыслового олигонуклеотида имеет следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных аспектов мутация в гене SOD1 представляет собой A4V, H46R, G93S, A4T, G141X, D133A, V148G, N139K, G85R, G93A, V14G, C6S, I113T, D49K, G37R, A89V, E100G, D90A, T137A, E100K, G41A, G41D, G41S, G13R, G72S, L8V, F20C, Q22L, H48R, T54R, S591, V87A, T88deltaTAD, A89T, V97M, S105deltaSL, V118L, D124G, L114F, D90A, G12R или G147R. В одном варианте осуществления мутация в гене SOD1 представляет собой A4V. В другом варианте осуществления мутация в гене SOD1 представляет собой H46R. В еще одном варианте осуществления мутация в гене SOD1 представляет собой G93S.

В некоторых вариантах осуществления мутация в гене SOD1 человека определяется с помощью генетического теста.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают определение мутации в гене SOD1 человека с помощью генетического теста.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят

субъекту-человеку по меньшей мере 5 раз в течение четырех месяцев.

В некоторых вариантах осуществления субъекту-человеку вводят ударную дозу или ударные дозы фармацевтической композиции, за которыми следует поддерживающая доза или поддерживающие дозы. В некоторых случаях вводят три ударные дозы, причем ударные дозы разделены с интервалом в две недели, например, на 1 сутки, 15 сутки и 29 сутки. В некоторых случаях поддерживающие дозы вводят каждые 4 недели, начиная через 4 недели после третьей ударной дозы (*например*, в течение 1 месяца, 2 месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев).

В некоторых вариантах осуществления субъекту-человеку вводят три ударные дозы фармацевтической композиции, за которыми следует по меньшей мере одна (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) поддерживающая доза. В некоторых случаях три ударные дозы вводят с интервалом в две недели. В некоторых случаях три ударные дозы вводят с интервалом в 14 суток. В некоторых случаях поддерживающую дозу/дозы вводят каждые 4 недели, начиная через 4 недели после третьей ударной дозы. В некоторых случаях поддерживающую дозу/дозы вводят каждый месяц, начиная через один месяц после третьей ударной дозы. В некоторых случаях поддерживающую дозу/дозы вводят каждые 28 суток, начиная через 28 суток после третьей ударной дозы.

В некоторых вариантах осуществления ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

(i) первая ударная доза фармацевтической композиции;

(ii) вторая ударная доза фармацевтической композиции, вводимая через 14 суток после первой ударной дозы;

(iii) третья ударная доза фармацевтической композиции, вводимая через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) первая поддерживающая доза фармацевтической композиции, вводимая через 28 суток или 1 месяц после третьей ударной дозы.

В некоторых вариантах осуществления ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

(i) первая ударная доза, эквивалентная 100 мг антисмыслового олигонуклеотида;

(ii) вторая ударная доза, эквивалентная 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем вторую ударную дозу вводят через 14 суток после первой ударной дозы;

(iii) третья ударная доза, эквивалентная 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем третью ударную дозу вводят через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) первая поддерживающая доза, эквивалентная 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем первую поддерживающую дозу вводят через 28 суток после третьей ударной дозы.

В некоторых вариантах осуществления ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

(i) первая ударная доза, эквивалентная 100 мг антисмыслового олигонуклеотида;

(ii) вторая ударная доза, эквивалентная 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем вторую ударную дозу вводят через 14 суток после первой ударной дозы;

(iii) третья ударная доза, эквивалентная 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем третью ударную дозу вводят через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) первая поддерживающая доза, эквивалентная 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем первую поддерживающую дозу вводят через 1 месяц после третьей ударной дозы.

В другом аспекте изобретение относится к шприцу или насосу, содержащему стерильный препарат антисмыслового олигонуклеотида. Шприц или насос приспособлен для интратекального введения антисмыслового олигонуклеотида в фиксированной дозе 20 мг, 40 мг, 60 мг или 100 мг. Последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированные 2'-О-метоксиэтилрибозные нуклеозиды, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозиды, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

Если не указано иное, все употребляемые в настоящем документе технические и научные термины имеют то же значение, которое, как правило, подразумевается средним специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описываются в данном документе, могут применяться на практике или при испытании настоящего изобретения, иллюстративные способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. В случае противоречия настоящая заявка, включающая определения, будет иметь преимущественную силу. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не имеют ограничительного характера.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и из формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 представлено графическое изображение средней продолжительности заболевания (годы от появления симптомов) для пациентов с различными мутациями SOD1 человека.

На фиг. 2 представлено дозозависимое увеличение концентраций соединения А в спинномозговой жидкости (СМЖ), наблюдаемое в когортах с многократной нарастающей дозой (МНД). Верхняя пунктирная линия представляет дозу 100 мг; следующие две пунктирные линии - дозы 60 и 40 мг, а самая нижняя пунктирная линия представляет дозу

20 мг.

На фиг. 3 показано дозозависимое снижение концентраций SOD1 в СМЖ, наблюдаемое в когортах с МНД. На 85 сутки исследования верхний кружок соответствует 20 мг; следующий кружок ниже - плацебо; следующий кружок ниже - 60 мг; следующий кружок ниже - 40 мг; и самый нижний кружок - 100 мг соединения А.

На фиг. 4А представлен график изменения средних значений, рассчитанных методом наименьших квадратов, относительно исходного уровня в пересмотренной функциональной шкале оценки бокового амиотрофического склероза (ALFSFRS-R - англ.: Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale-Revised) у пациентов в когортах с МНД. На 85 сутки исследования верхний кружок соответствует 40 мг соединения А; следующий кружок ниже - 100 мг соединения А; следующий кружок ниже - 60 мг соединения А; следующий кружок ниже - 20 мг соединения А; и самый нижний кружок - плацебо.

На фиг. 4В представлен график изменения средних значений, рассчитанных методом наименьших квадратов, относительно исходного уровня (90% ДИ) в процентах от прогнозируемой медленной жизненной емкости (МЖЕ) у пациентов в когортах с МНД. На 85 сутки исследования верхний кружок соответствует 60 мг соединения А; следующий кружок ниже - 40 мг соединения А; следующий кружок ниже - 100 мг соединения А; следующий кружок ниже - 20 мг соединения А; и самый нижний кружок - плацебо.

На фиг. 4С представлен график изменения средних значений, рассчитанных методом наименьших квадратов, относительно исходного уровня (90% ДИ) в общей оценке ручной динамометрии (РД) у пациентов в когортах с МНД. На 92 сутки исследования верхний кружок соответствует 40 мг соединения А; следующий кружок ниже - 100 мг соединения А; следующий кружок ниже - 60 мг соединения А; следующий кружок ниже - 20 мг соединения А; и самый нижний кружок - плацебо.

На фиг. 5 показаны изменения ALSFRS-R, МЖЕ, оценки РД и уровня SOD1 в СМЖ относительно исходного уровня на 85 сутки у пациентов с быстро прогрессирующими мутациями, получающих либо плацебо, либо 100 мг соединения А.

На фиг. 6 показаны изменения ALSFRS-R, МЖЕ, оценки РД и уровня SOD1 в СМЖ относительно исходного уровня на 85 сутки у пациентов с быстро прогрессирующими мутациями, получающих либо плацебо, либо 100 мг соединения А.

На фиг. 7 показано влияние лечения 100 мг соединения А на уровни pNFH относительно исходного уровня на 85 сутки у пациентов с быстро прогрессирующими мутациями SOD1.

На фиг. 8 показано влияние лечения 100 мг соединения А на уровни pNFH относительно исходного уровня на 85 сутки у пациентов с быстро прогрессирующими мутациями SOD1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к режимам дозирования антисмысловых олигонуклеотидов или их солей, которые снижают экспрессию супероксиддисмутазы 1

(SOD1), и применению таких антисмысловых олигонуклеотидов или их солей для лечения, предотвращения или уменьшения интенсивности бокового амиотрофического склероза (БАС) у взрослых, имеющий мутацию гена SOD1 человека.

Определения

«2'-О-метоксиэтил» (также 2'-MOE и 2'-OCH_2CH_2-OCH_3 и MOE) относится к О-метоксиэтильной модификации в положении 2' фуранозильного кольца. 2'-О-метоксиэтил-модифицированный сахар представляет собой модифицированный сахар.

«2'-MOE-нуклеозид» (также 2'-О-метоксиэтил-нуклеозид) означает нуклеозид, содержащий MOE-модифицированный сахарный фрагмент.

«5-метилцитозин» означает цитозин, модифицированный метильной группой, присоединенной в положении 5'. 5-метилцитозин представляет собой модифицированное азотистое основание.

«Фосфоротиоатная связь» означает связь между нуклеозидами, в которой фосфодиэфирная связь модифицирована путем замены одного из немостиковых атомов кислорода атомом серы. Фосфоротиоатная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь.

«Приблизительно» в контексте количества вещества означает +/- 10% от указанного значения. Таким образом, приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида включает от 90 до 110 мг антисмыслового олигонуклеотида. В контексте временных единиц, например, приблизительно 10 суток или приблизительно 1 неделя, «приблизительно» означает +/- 3 суток.

«Интратекальный или ИТ» означает введение в спинномозговую жидкость под паутинной оболочкой, которая покрывает головной и спинной мозг.

«Ударная доза» означает дозу, вводимую во время фазы дозирования, во время которой начинается введение и достигается равновесная концентрация лекарственного средства (например, антисмыслового олигонуклеотида).

«Поддерживающая доза» означает дозу, вводимую во время фазы дозирования после достижения равновесной концентрации лекарственного средства (например, антисмыслового олигонуклеотида).

«Фиксированная доза» относится к предопределенному количеству антисмыслового олигонуклеотида (например, 20 мг, 40 мг, 60 мг, 100 мг), предназначенному для достижения желаемой терапевтической концентрации (например, равновесной концентрации) или эффекта у субъекта.

Боковой амиотрофический склероз

Боковой амиотрофический склероз (БАС) - редкое нейродегенеративное заболевание, приводящее к потере двигательных нейронов коры головного мозга, ствола головного мозга и спинного мозга. Пациенты страдают от прогрессирующей потери мышечной массы, силы и функции бульбарных, дыхательных и произвольных мышц. Ухудшение здоровья является неизбежным, и смерть, обычно вследствие дыхательной недостаточности, наступает в среднем от 2 до 5 лет после постановки диагноза. Хотя

большинство пациентов страдают спорадическим БАС, меньшая часть пациентов, приблизительно 2%, имеет наследственную или семейную форму БАС, вызванную различными мутациями супероксиддисмутазы 1 (SOD1). Сообщается, что более 180 мутаций SOD1 вызывают эту форму БАС (называемую SOD1 БАС) с момента ее первоначального открытия в 1993 году. Генетическая онлайн база данных бокового амиотрофического склероза (ALSoD). Институт психиатрии, психологии и неврологии. Публикация 2015 г.; Rosen, *Nature*, 364(6435):362 (1993)). Прогрессирование заболевания для отдельных мутаций варьируется, с выживаемостью менее 15 месяцев при наиболее тяжелых мутациях. Хотя механизм, посредством которого мутации вызывают SOD1 БАС, неизвестен, убедительные данные предполагают, что токсическое усиление функции, а не потеря активности SOD1, является триггером, который запускает каскад событий, приводящих к гибели двигательных нейронов (Bruijn et al., *Science*, 281(5384):1851-4 (1998)).

Разрешенными средствами для лечения БАС являются рилузол (Rilutek®) и эдаравон (Radicava™). Рилузол обеспечивает умеренное увеличение выживаемости (от 2 до 3 месяцев) без заметного увеличения силы или инвалидности. Эдаравон уменьшает снижение функциональных возможностей, измеренных с помощью пересмотренной функциональной шкалы оценки бокового амиотрофического склероза (ALSFRS-R). Влияние эдаравона на выживаемость неизвестно. Доступные специфические средства для лечения SOD1 БАС отсутствуют.

Супероксиддисмутаза 1

Супероксиддисмутаза [Cu-Zn], также известная как супероксиддисмутаза 1 (SOD1), представляет собой фермент, который у человека кодируется геном SOD1, расположенным на хромосоме 21.

SOD1 представляет собой гомодимер 32 кДа, который образует β-бочку и содержит внутримолекулярную дисульфидную связь и биядерный центр Cu/Zn в каждой субъединице. Этот центр Cu/Zn содержит ион меди и цинка и отвечает за катализ диспропорционирования супероксида до перекиси водорода и дикислорода.

SOD1 представляет собой одну из трех супероксиддисмутаз, ответственных за разрушение свободных супероксидных радикалов в организме. Кодируемый изофермент представляет собой растворимый цитоплазматический и митохондриальный белок внутримембранного пространства, действующий как гомодимер для преобразования встречающихся в природе, но вредных супероксидных радикалов в молекулярный кислород и перекись водорода. Затем перекись водорода может расщепляться другим ферментом, называемым каталазой.

По крайней мере 180 мутаций в гене SOD1 были связаны с семейным БАС (Conwit RA, *J Neurol Sci*., 251 (1-2):1-2 (2006); Al-Chalabi A, Leigh PN, *Curr.Opin. in Neurol*., 13(4):397-405 (2000); Redler RL, Dokholyan NV, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 107:215-62 (2012)). Однако SOD1 дикого типа в условиях клеточного стресса также связан со значительной частью спорадических случаев БАС, которые

составляют 90% пациентов с БАС. Наиболее частыми мутациями SOD1 человека в США являются A4V; H46R в Японии; и G93S в Исландии. Другие хорошо известные мутации SOD1 человека включают: A4T, G141X, D133A, V148G, N139K, G85R, G93A, V14G, C6S, I113T, D49K, G37R, A89V, E100G, D90A, T137A, E100K, G41A, G41D, G41S, G13R, G72S, L8V, F20C, Q22L, H48R, T54R, S591, V87A, T88deltaTAD, A89T, V97M, S105deltaSL, V118L, D124G, L114F, D90A, G12R и G147R. Существует значительная гетерогенность продолжительности заболевания, основанная на мутации SOD1 (см. **фиг. 1**). Практически все известные мутации SOD1, вызывающие БАС, действуют доминантным образом; одной мутантной копии гена SOD1 достаточно, чтобы вызвать заболевание.

Аминокислотная последовательность SOD1 человека может быть найдена в UniProt P00441 и в GENBANK под номером доступа NP_000445 и представлена ниже:

MATKAVCVLK GDGPVQGIIN FEQKESNGPV KVWGSIKGLT EGLHGFHVHE FGDNTAGCTS AGPHFNPLSR KHGGPKDEER HVGDLGNVTA DKDGVADVSI EDSVISLSGD HCIIGRTLVV HEKADDLGKG GNEESTKTGN AGSRLACGVI

GIAQ (**SEQ ID NO:2**)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая SOD1 человека, предоставлена под номером доступа GENBANK NM_000454.4, а также представлена ниже (область, распознаваемая антисмысловым олигонуклеотидом по этому изобретению, подчеркнута):

1 gtttggggcc agagtgggcg aggcgcggag gtctggccta taaagtagtc gcggagacgg

61 ggtgctggtt tgcgtcgtag tctcctgcag cgtctggggt ttccgttgca gtcctcggaa

121 ccaggacctc ggcgtggcct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgcg tgctgaaggg

181 cgacggccca gtgcagggca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtgaa

241 ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg ttcatgagtt

301 tggagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac tttaatcctc tatccagaaa

361 acacggtggg ccaaaggatg aagagaggca tgttggagac ttgggcaatg tgactgctga

421 caaagatggt gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca

481 ttgcatcatt ggccgcacac tggtggtcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaaggtgg

541 aaatgaagaa agtacaaaga caggaaacgc tggaagtcgt ttggcttgtg gtgtaattgg

601 gatcgcccaa taaacattcc cttggatgta gtctgaggcc ccttaactca tctgttatcc

661 tgct<u>agctgt agaaatgtat cctg</u>ataaac attaaacact gtaatcttaa aagtgtaatt

721 gtgtgacttt ttcagagttg ctttaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact

781 tggaagattt gtatagtttt ataaaactca gttaaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt

841 ttgccagact taaatcacag atgggtatta aacttgtcag aatttctttg tcattcaagc

901 ctgtgaataa aaaccctgta tggcacttat tatgaggcta ttaaaagaat ccaaattcaa

961 actaaaaaaa aaaaaaaaaa a (**SEQ ID NO:3**)

<u>ISIS 666853</u>

ISIS 666853 представляет собой гэпмер 5-10-5 MOE, имеющий последовательность (от 5 'до 3') CAGGATACATTTCTACAGCT (**SEQ ID NO:1**), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированные 2'-О-метоксиэтилрибозные нуклеозиды, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозиды,

причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи и межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфоротиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин. ISIS 666853 описывают следующим химическим обозначением: mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo Aes Geo mCes Te; где,

A=аденин,

mC=5-метилцитозин

G=гуанин,

T=тимин,

e=модифицированный 2'-O-метоксиэтилрибозный сахар,

d=2’-дезоксирибозный сахар,

s=фосфоротиоатная межнуклеозидная связь и

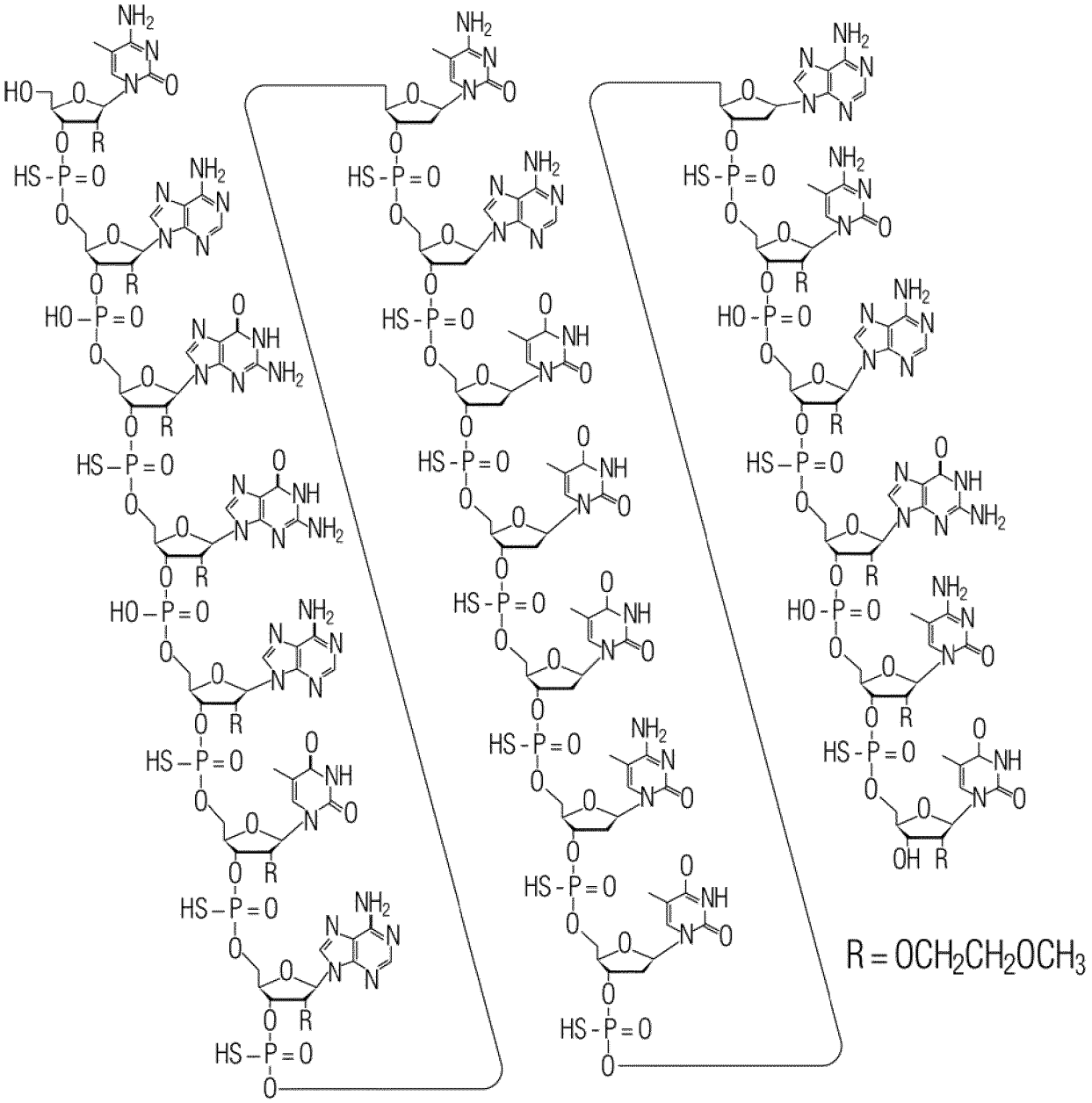
o=фосфодиэфирная межнуклеозидная связь.

Последовательность ISIS 666853 также можно записать сокращенно следующим образом:

5′ -$^{Me}\underline{CA}_{P=O}\underline{GG}_{P=O}\underline{A}TA^{Me}CATTT^{Me}CTA^{Me}\underline{C}_{P=O}\underline{AG}_{P=O}{}^{Me}\underline{C}^{Me}\underline{U}$- 3′

Подчеркнутые остатки представляют собой 2'-MOE нуклеозиды. Аннотация P=O отражает расположение фосфатно-диэфирных связей.

ISIS 666853 имеет следующую химическую структуру:

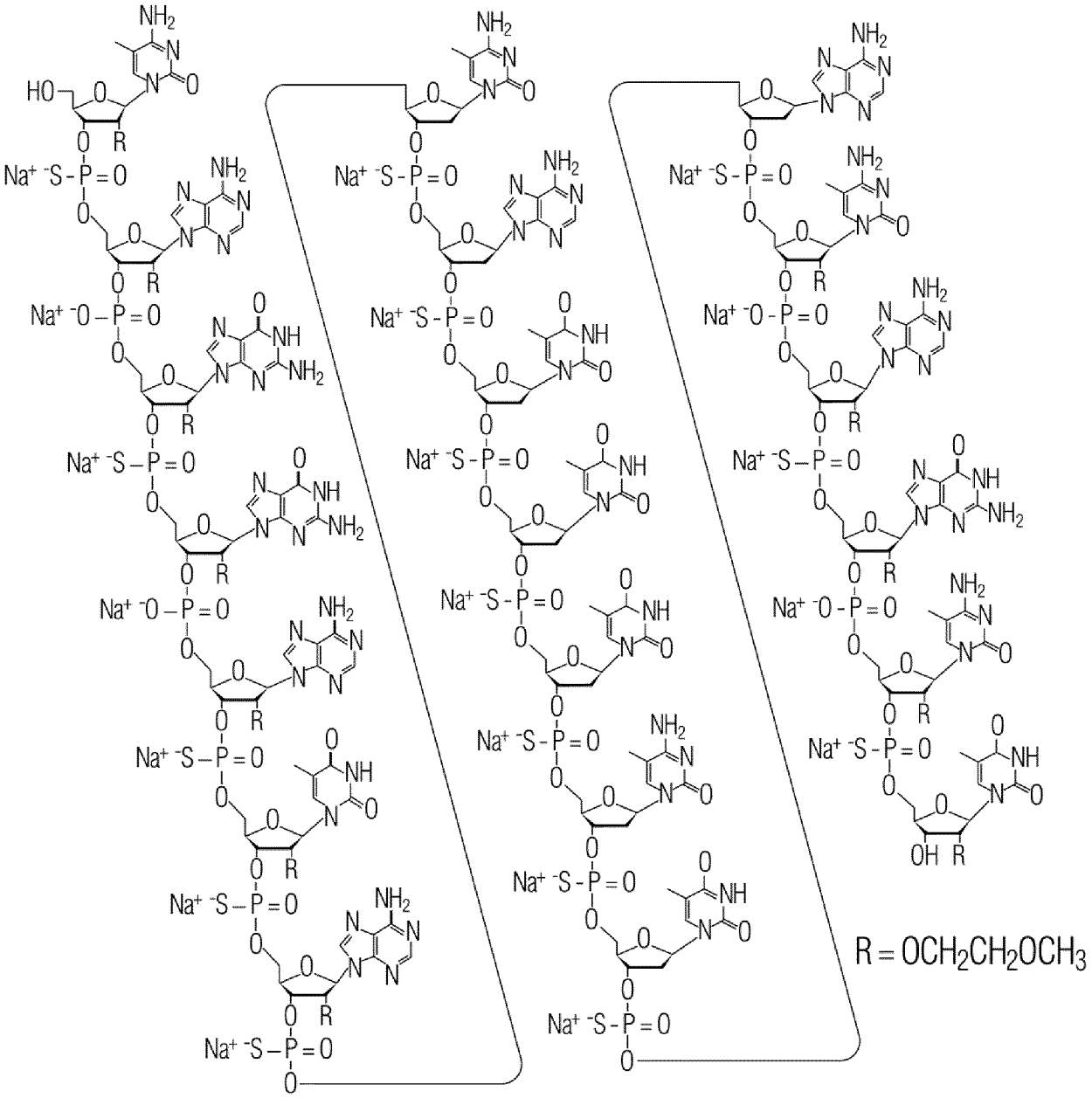


Следует понимать, что в растворе антисмысловой олигонуклеотид может существовать в форме свободной кислоты, в форме соли или их смеси.

Нонадеканатриевая соль ISIS 666853 («соединение А»)

Соединение А представляет собой нонадеканатриевую соль ISIS 666853, антисмысловой олигонуклеотид, являющийся ингибитором матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) SOD1, который снижает уровни белка SOD1 у субъектов с SOD1 БАС. Уменьшение мРНК SOD1 и, следовательно, токсичного белка SOD1 может обеспечить терапевтический эффект для субъектов с SOD1 БАС.

Структура соединения А представлена ниже:



.

Молекулярная формула соединения А: $C_{230}H_{298}N_{72}Na_{19}O_{123}P_{19}S_{15}$ с молекулярной массой 7545,59 а. е. м.

Соединение А комплементарно части 3'-нетранслируемой области (3'UTR) мРНК SOD1 человека, связываясь путем спаривания оснований по Уотсону-Крику. Гибридизация (связывание) соединения А с родственной мРНК приводит к опосредованной РНКазой-Н1 деградации мРНК для SOD1 и, таким образом, снижает объем синтеза белка SOD1. РНКаза Н представляет собой повсеместно экспрессируемый фермент (нуклеазу), который распознает гетеродуплекс дезоксирибонуклеиновая кислота-рибонуклеиновая кислота (ДНК-РНК) и расщепляет цепь РНК этого дуплекса. Связываясь с областью 3'-UTR мРНК SOD1, соединение А избирательно нацеливает РНКазу Н1 на мРНК SOD1 и способствует ее расщеплению, что приводит к снижению экспрессии как SOD1 дикого типа, так и мутантных вариантов SOD1.

Соединение А значительно увеличивало медиану выживаемости трансгенных

мышей SOD1 G93A (Mantel-Cox, p <0,01). Оно также вызывало дозозависимую защиту нервно-мышечной функции, измеренной по суммарному потенциалу действия мышцы у трансгенных мышей SOD1 G93A.

Конъюгированные антисмысловые олигонуклеотиды

Антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть ковалентно связаны с одним или более фрагментами или конъюгатами, которые усиливают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение образующихся антисмысловых олигонуклеотидов. Типичные конъюгатные группы включают фрагменты холестерина и фрагменты липидов. Дополнительные конъюгатные группы включают углеводы, фосфолипиды, биотин, феназин, фолат, фенантридин, антрахинон, акридин, флуоресцеины, родамины, кумарины и красители. Антисмысловые олигонуклеотиды также можно модифицировать так, чтобы они имели одну или более стабилизирующих групп, которые обычно присоединены к одному или обоим концам антисмысловых олигонуклеотидов для усиления таких свойств, как, например, стабильность в присутствии нуклеаз. В стабилизирующие группы входят кэп-структуры. Эти концевые модификации защищают антисмысловой олигонуклеотид, содержащий концевую нуклеиновую кислоту, от деградации экзонуклеазами и могут способствовать доставке и/или локализации в клетке. Кэп может присутствовать на 5'-конце (5'-кэп) или на 3'-конце (3'-кэп) или может присутствовать на обоих концах. Кэп-структуры хорошо известны в данной области техники и включают, например, инвертированные дезоксиабазические кэпы. Дополнительные 3’ и 5' стабилизирующие группы, которые можно использовать для кэпирования одного или обоих концов антисмыслового олигонуклеотида для придания стабильности в присутствии нуклеаз, включают группы, раскрытые в WO 03/004602.

Композиции и способы составления фармацевтических композиций

Антисмысловые олигонуклеотиды или их соли по настоящему изобретению могут быть смешаны с фармацевтически приемлемыми активными или инертными веществами для приготовления фармацевтических композиций или составов. Композиции и способы составления фармацевтических композиций зависят от ряда критериев, включая, но не ограничиваясь ими, способ введения, степень тяжести заболевания или дозу, которую необходимо ввести.

Антисмысловой олигонуклеотид или его соль, нацеленные на нуклеиновую кислоту SOD1, можно использовать в фармацевтических композициях путем комбинирования антисмыслового олигонуклеотида или его соли с подходящим фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем. Фармацевтически приемлемый разбавитель включает фосфатно-солевой буфер (ФСБ). ФСБ представляет собой разбавитель, подходящий для использования в композициях, предназначенных для парентеральной доставки. Соответственно, в одном варианте осуществления, в описанных в настоящем документе способах, используется фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигонуклеотид или его соль, нацеленные на нуклеиновую кислоту SOD1, и фармацевтически приемлемый разбавитель.

Антисмысловой олигонуклеотид или его соль, описанные в настоящем документе, могут быть составлены в виде фармацевтической композиции для интратекального введения субъекту.

Фармацевтические композиции, содержащие антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению, включают любые фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры или соли таких сложных эфиров, или любой другой олигонуклеотид, которые при введении животному, включая человека, способны обеспечивать (прямо или косвенно) биологически активный метаболит или его остаток. Соответственно, например, раскрытие также относится к фармацевтически приемлемым солям антисмысловых олигонуклеотидов и другим биоэквивалентам. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают, помимо прочего, соли натрия и калия.

Способы лечения

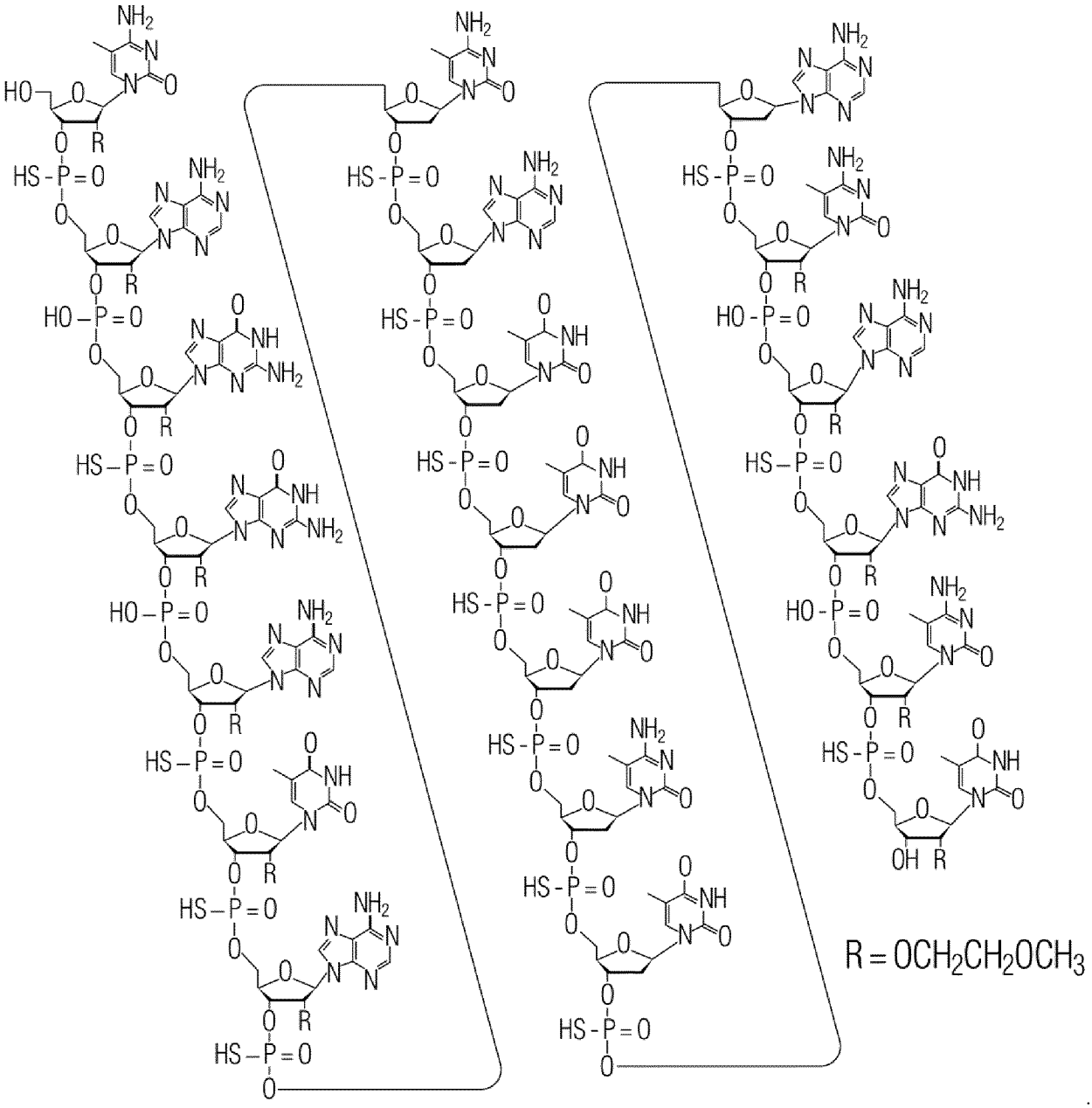
Настоящее изобретение относится к способам лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене SOD1 человека, у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фиксированной дозы антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированные 2'-О-метоксиэтилрибозные нуклеозиды, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозиды, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин. В некоторых случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 100 мг или 100 мг. В других случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 60 мг или 60 мг. В еще других случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 40 мг или 40 мг. В некоторых других случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 20 мг или 20 мг. В некоторых случаях фиксированная доза натриевой соли антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 105,9 мг или 105,9 мг. В других случаях фиксированная доза натриевой соли антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 63,5 мг или 63,5 мг. В еще других случаях фиксированная доза натриевой соли антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 42,3 мг или 42,3 мг. В некоторых других случаях фиксированная доза натриевой соли антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 21,2 мг или 21,2 мг.

Также предложены способы снижения синтеза белка SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым амиотрофическим склерозом. Способ включает введение субъекту-человеку путем

интратекального введения фиксированной дозы антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированные 2'-О-метоксиэтилрибозные нуклеозиды, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозиды, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин. В некоторых случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 100 мг или 100 мг. В других случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 60 мг или 60 мг. В еще других случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 40 мг или 40 мг. В некоторых других случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 20 мг или 20 мг.

Также предложены способы снижения уровней мРНК SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым амиотрофическим склерозом. Способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фиксированной дозы антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированные 2'-О-метоксиэтилрибозные нуклеозиды, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозиды, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин. В некоторых случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 100 мг или 100 мг. В других случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 60 мг или 60 мг. В еще других случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 40 мг или 40 мг. В некоторых других случаях фиксированная доза антисмыслового олигонуклеотида составляет приблизительно 20 мг или 20 мг.

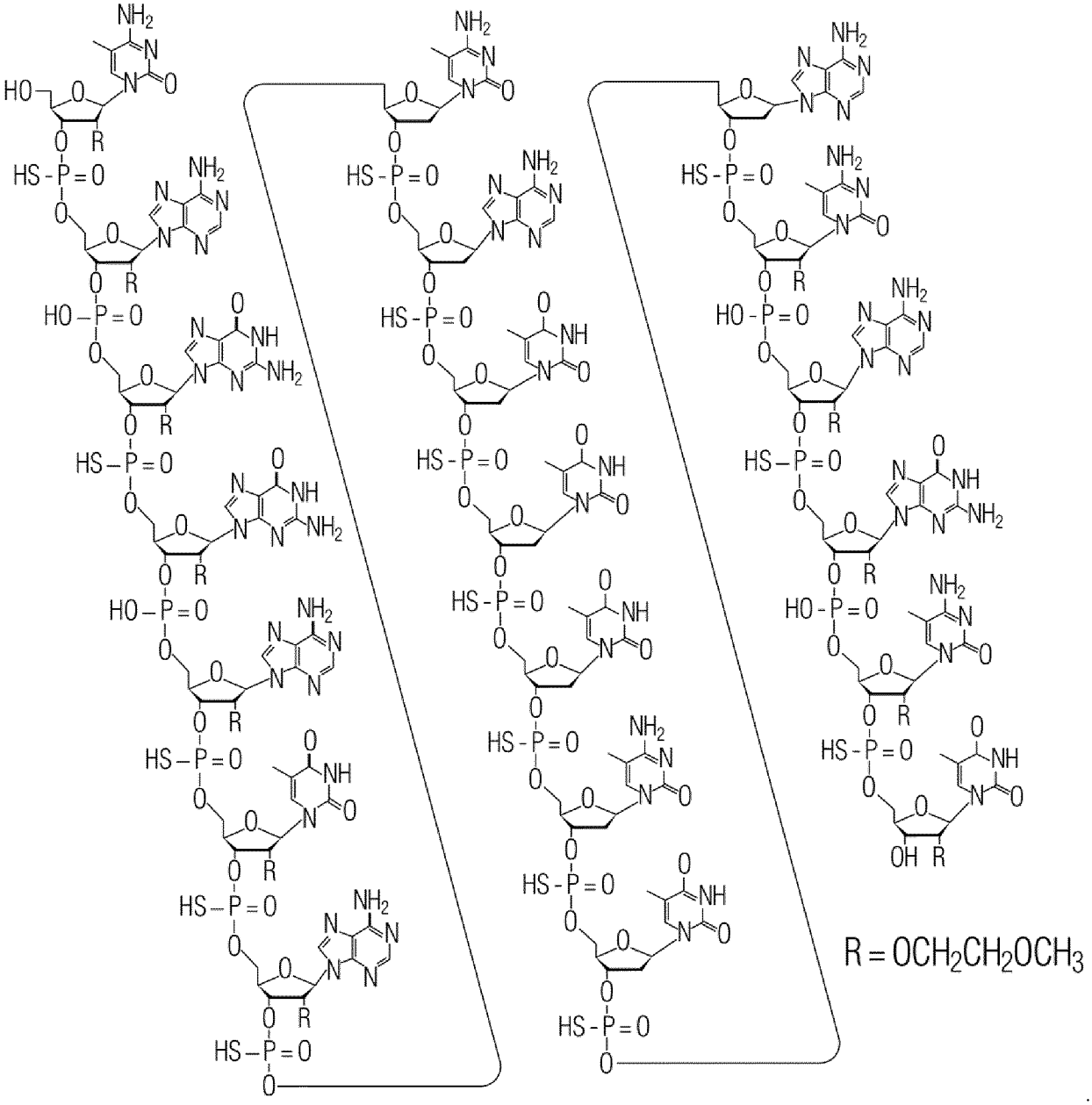
Также предложены способы лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене SOD1, у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



В некоторых случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 100 мг или 100 мг антисмыслового олигонуклеотида. В других случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 60 мг или 60 мг антисмыслового олигонуклеотида. В других случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 40 мг или 40 мг антисмыслового олигонуклеотида. В других случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 20 мг или 20 мг антисмыслового олигонуклеотида.

Также предложены способы снижения синтеза белка SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым амиотрофическим склерозом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой

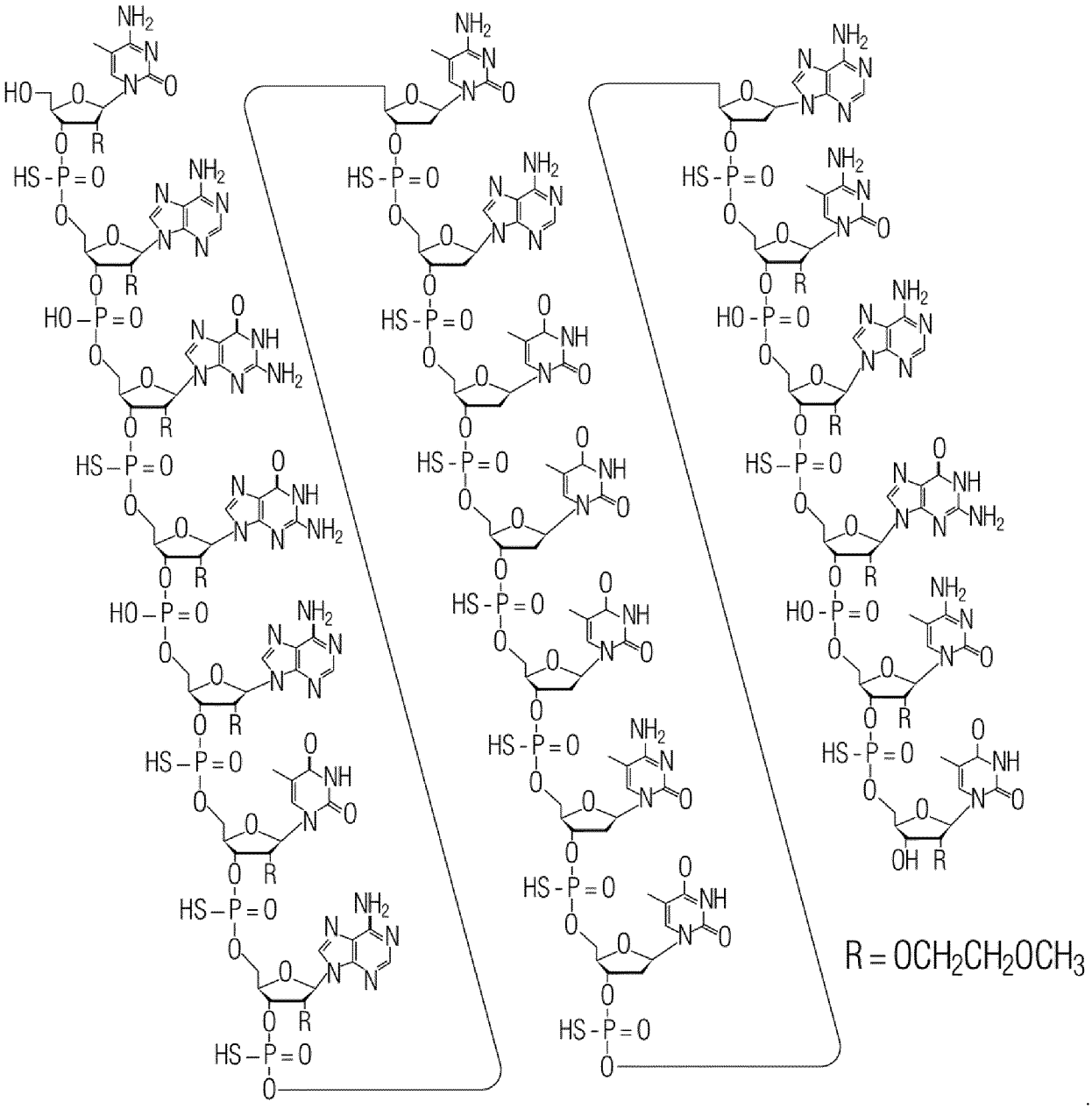
олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



В некоторых случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 100 мг или 100 мг антисмыслового олигонуклеотида. В других случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 60 мг или 60 мг антисмыслового олигонуклеотида. В других случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 40 мг или 40 мг антисмыслового олигонуклеотида. В других случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 20 мг или 20 мг антисмыслового олигонуклеотида.

Также предложены способы снижения уровней мРНК SOD1 человека у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1 человека, связанную с боковым

амиотрофическим склерозом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



В некоторых случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 100 мг или 100 мг антисмыслового олигонуклеотида. В других случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 60 мг или 60 мг антисмыслового олигонуклеотида. В других случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 40 мг или 40 мг антисмыслового олигонуклеотида. В других случаях антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 20 мг или 20 мг антисмыслового олигонуклеотида.

В некоторых случаях указанную выше фиксированную дозу антисмыслового олигонуклеотида или его соли вводят субъекту-человеку один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели.

В некоторых случаях описанный в настоящем документе антисмысловой олигонуклеотид вводят субъекту-человеку как часть фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту-человеку в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы (т. е. эквивалента) приблизительно 20 мг антисмыслового олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту-человеку в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 40 мг антисмыслового олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту-человеку в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 60 мг антисмыслового олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту-человеку в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления указанную выше фиксированную дозу антисмыслового олигонуклеотида или его соли вводят в качестве ударной дозы (доз). В некоторых вариантах осуществления указанную выше фиксированную дозу антисмыслового олигонуклеотида вводят в качестве поддерживающей дозы (доз). В некоторых случаях указанную выше фиксированную дозу антисмыслового олигонуклеотида вводят в качестве ударной дозы (доз) с последующей поддерживающей дозой(-ами). Ударную дозу(-ы) можно вводить, например, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. Поддерживающую дозу(-ы) можно вводить, например, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели после последней ударной дозы. В некоторых случаях поддерживающую дозу(-ы) вводят каждый месяц.

В некоторых вариантах осуществления субъекту-человеку вводят три ударные дозы антисмыслового олигонуклеотида или его соли, за которыми следует по меньшей мере одна (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более) поддерживающая доза. В некоторых случаях три ударные дозы вводят с интервалом в две недели. В некоторых случаях три ударные дозы вводят с интервалом в 14 суток. В некоторых случаях поддерживающую дозу/дозы вводят, начиная через 4 недели после третьей ударной дозы. В некоторых случаях поддерживающую дозу/дозы вводят каждый месяц, начиная после третьей ударной дозы. В некоторых случаях поддерживающую дозу/дозы вводят каждые 28 суток, начиная после третьей ударной дозы.

Мутация в SOD1 может представлять собой любую мутацию в гене SOD1 человека, которая связана с БАС. В некоторых случаях мутация представляет собой медленно прогрессирующую мутацию, вызывающую заболевание БАС. В других случаях мутация представляет собой быстро прогрессирующую мутацию, вызывающую заболевание БАС.

В некоторых случаях мутация в гене SOD1 человека представляет собой одну или более из следующих мутаций: A4V, H46R, G93S, A4T, G141X, D133A, V148G, N139K, G85R, G93A, V14G, C6S, I113T, D49K, G37R, A89V, E100G, D90A, T137A, E100K, G41A, G41D, G41S, G13R, G72S, L8V, F20C, Q22L, H48R, T54R, S591, V87A, T88deltaTAD, A89T, V97M, S105deltaSL, V118L, D124G, L114F, D90A, G12R или G147R. В одном конкретном варианте осуществления у субъекта-человека есть мутация A4V в гене SOD1 человека. В другом конкретном варианте осуществления у субъекта-человека есть мутация H46R в гене SOD1 человека. В еще одном конкретном варианте осуществления у субъекта-человека есть мутация G93S в гене SOD1 человека.

В некоторых случаях мутация в гене SOD1 определяется с помощью генетического теста.

В некоторых случаях описанные выше способы включают определение мутации в гене SOD1 с помощью генетического теста.

В некоторых вариантах осуществления введение терапевтически эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида или его соли (например, соединения A) человеку сопровождается контролем уровней SOD1 у субъекта-человека для определения реакции человека на введение антисмыслового олигонуклеотида или его соли. Реакция субъекта-человека на введение антисмыслового олигонуклеотида или его соли может использоваться врачом для определения объема и продолжительности терапевтического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления уровни SOD1 человека контролируют в СМЖ. В некоторых вариантах осуществления уровни SOD1 человека контролируют в плазме.

В некоторых вариантах осуществления введение антисмыслового олигонуклеотида или его соли (например, соединения A) приводит к снижению экспрессии белка SOD1. В некоторых вариантах осуществления введение антисмыслового олигонуклеотида или его соли (например, соединения A) приводит к снижению экспрессии белка SOD1 по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99%, или диапазон, определяемый любыми двумя из этих значений. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии белка SOD1 представляет собой снижение в СМЖ. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии белка SOD1 представляет собой снижение в плазме.

В некоторых вариантах осуществления введение антисмыслового олигонуклеотида или его соли (например, соединения A) приводит к улучшению двигательной функции и дыхания у субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления введение антисмыслового олигонуклеотида или его соли улучшает двигательную функцию и дыхание по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% или диапазон, определяемый любыми двумя из этих значений.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие антисмысловой олигонуклеотид или его соль (например, соединение A), используют для приготовления лекарственного средства для лечения человека, страдающего или

предрасположенного к БАС (например, человека, имеющего мутацию в SOD1, связанную с БАС).

Устройства доставки

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид или его соль (*например,*, соединение А) вводят субъекту-человеку с помощью шприца для интратекальной доставки. В других вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид или его соль (*например,*, соединение А) вводят субъекту-человеку с помощью насоса для интратекальной доставки. Таким образом, в настоящем изобретении также предложен насос или шприц, содержащий стерильный препарат антисмыслового олигонуклеотида или его соли (*например,* соединения А). Шприц или насос может быть выполнен с возможностью интратекального введения антисмыслового олигонуклеотида или его соли. В некоторых случаях шприц или насос доставляет фиксированную дозу(-ы) (*например,* приблизительно 20 мг или 20 мг, приблизительно 40 мг или 40 мг, приблизительно 60 мг или 60 мг, или приблизительно 100 мг или 100 мг) антисмыслового олигонуклеотида. В настоящем изобретении также предложен насос или шприц, содержащий стерильный препарат фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль (например, соединение А). Шприц или насос может быть выполнен с возможностью интратекального введения фармацевтической композиции. В некоторых случаях шприц или насос доставляет фиксированную дозу(-ы) (*например,* приблизительно 20 мг или 20 мг, приблизительно 40 мг или 40 мг, приблизительно 60 мг или 60 мг, или приблизительно 100 мг или 100 мг) антисмыслового олигонуклеотида фармацевтической композиции. В конкретном варианте осуществления насос или шприц содержит стерильный препарат антисмыслового олигонуклеотида или его соли, причем шприц или насос выполнен с возможностью интратекального введения антисмыслового олигонуклеотида или его соли (например, соединения А) при фиксированной дозе 20 мг, 40 мг, 60 мг или 100 мг антисмыслового олигонуклеотида.

Анализы

Выделение РНК

Анализ РНК можно проводить на общей клеточной РНК или поли(А) + мРНК. РНК получают с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, например, с использованием реагента TRIZOL (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) в соответствии с протоколами, рекомендованными производителем.

Анализ ингибирования целевых уровней или экспрессии

Ингибирование уровней или экспрессии нуклеиновой кислоты SOD1 может быть проанализировано множеством способов, известных в данной области техники. Например, уровни целевой нуклеиновой кислоты можно количественно определить, например, с помощью нозерн-блоттинга, конкурентной полимеразной цепной реакции (ПЦР) или количественной ПЦР в реальном времени. Анализ РНК можно проводить на общей клеточной РНК или поли(А) + мРНК. Способы выделения РНК хорошо известны в данной области техники. Нозерн-блоттинг также является обычным в данной области техники.

Количественная ПЦР в реальном времени может быть легко выполнена с использованием коммерчески доступного секвенатора ABI PRISM 7600, 7700 или 7900, доступного от компании PE-Applied Biosystems, (Фостер-Сити, Калифорния) и используемого в соответствии с инструкциями производителя.

Количественный анализ уровней целевой РНК с помощью ПЦР в реальном времени

Количественное определение уровней РНК SOD1 может быть выполнено с помощью количественной ПЦР в реальном времени с помощью секвенатора ABI PRISM 7600, 7700 или 7900 (PE-Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя. Способы количественной ПЦР в реальном времени хорошо известны в данной области техники.

Перед ПЦР в реальном времени выделенную РНК подвергают реакции обратной транскриптазы (ОТ), которая дает комплементарную ДНК (кДНК), которая затем используется в качестве субстрата для амплификации ПЦР в реальном времени. Реакции ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени выполняют последовательно в одной лунке для пробы. Реагенты для ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени получали от компании Invitrogen (Карлсбад, Калифорния). Реакции ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени проводили с помощью способов, хорошо известных специалистам в данной области техники.

Целевые количества гена (или РНК), полученные с помощью ПЦР в реальном времени, нормализовали с использованием либо уровня экспрессии гена, экспрессия которого постоянна, такого как циклофилин А, либо путем количественного определения общей РНК с помощью реагента RIBOGREEN (Invitrogen, Inc. Карлсбад, Калифорния). Экспрессию циклофилина А количественно определяли с помощью ПЦР в реальном времени, проводя ее одновременно с мишенью, мультиплексированием или отдельно. Общую РНК количественно определяли с помощью реагента для количественной оценки РНК RIBOGREEN (Invitrogen, Inc. Юджин, Орегон). Способы количественной оценки РНК с помощью реагента RIBOGREEN описаны в Jones, L.J., et al, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374). Прибор CYTOFLUOR 4000 (PE Applied Biosystems) использовали для измерения флуоресценции RIBOGREEN.

Зонды и праймеры предназначены для гибридизации с нуклеиновой кислотой SOD1. Способы конструирования зондов и праймеров для ПЦР в реальном времени хорошо известны в данной области техники и могут включать использование программного обеспечения, такого как PRIMER EXPRESS (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния).

Анализ уровней белка

Антисмысловое ингибирование нуклеиновых кислот SOD1 можно оценить путем измерения уровней белка SOD1. Уровни белка SOD1 можно оценивать или количественно определять различными способами, хорошо известными в данной области техники, такими как иммунопреципитация, вестерн-блоттинг (иммуноблоттинг), твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), количественные анализы белков, анализы активности белков (например, анализ активности каспазы), иммуногистохимия, иммуноцитохимия или

сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS - англ.: fluorescence activated cell sorting). Антитела, направленные на мишень, могут быть определены и получены из различных источников, таких как каталог антител MSRS (Aerie Corporation, Бирмингем, Мичиган), или могут быть получены с помощью общепринятых способов получения моноклональных или поликлональных антител, хорошо известных в данной области техники. Антитела, применимые для обнаружения SOD1 человека, коммерчески доступны.

Тестирование мутаций SOD1

Одной из основных генетических причин БАС является мутация(-и) в гене *SOD1* человека. Соответственно, определение субъекта, страдающего или подверженного БАС, может быть выполнено путем генетического тестирования гена *SOD1* субъекта с помощью анализов, известных в данной области техники, таких как, *например,* генетическое секвенирование. В данной области техники известно, что по меньшей мере 180 мутаций в SOD1 человека связаны с БАС.

Анализ предрасположенности субъекта к заболеванию БАС также может быть выполнен путем анализа семейного анамнеза субъекта на БАС. Анализ семейного анамнеза может включать в себя родословную трех поколений, документирующую БАС, обзор медицинских карт и патологоанатомические исследования членов семьи, а также определение аутосомно-доминантного механизма передачи мутации SOD1.

Следующие примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1: дизайн исследования

Соединение А изучали в рамках продолжающихся клинических исследований. Исследования включают рандомизированное плацебо-контролируемое исследование с однократной нарастающей дозой (ОНД) и многократной нарастающей дозой (МНД) у пациентов с SOD1 БАС. В части МНД участники получали 5 доз исследуемого лекарственного вещества в течение примерно 3 месяцев. Пятьдесят участников были рандомизированы (3:1 на когорту) для получения 20 мг, 40 мг, 60 мг или 100 мг соединения А или плацебо. От 1 до 4 участников, получавших соединение А, на когорту имели задокументированную мутацию SOD1, которая *априори* была признана быстро прогрессирующей (в основном A4V).

Пример 2: профиль безопасности

В исследовании 66 из 70 пациентов (94%) испытали по меньшей мере 1 нежелательное явление (НЯ), большинство из которых были классифицированы как легкие или умеренные. Наиболее частыми НЯ, возникающими у $\geq$ 3 участников, получавших соединение А, были головная боль (n=16), боль во время процедуры (n=14) и постпункционный синдром (n=13). У семи пациентов возникли серьезные нежелательные явления (СНЯ), 3 из которых привели к летальному исходу. В группе с наивысшей дозой (соединение А 100 мг) о СНЯ не сообщалось. У шести субъектов были СНЯ, которые были оценены как не связанные с соединением А и которые были сочтены связанными с БАС или

сопутствующими заболеваниями. Все летальные исходы были оценены как не связанные. Один пациент имел СНЯ в виде увеличения количества лейкоцитов в СМЖ и увеличения белка в СМЖ, оцененные как относящиеся к соединению А. Эти лабораторные отклонения устранились, несмотря на продолжение приема соединения А, и пациент завершил исследование. О серьезных нежелательных явлениях не сообщалось в самой высокой испытанной дозе, 100 мг.

Пример 3: фармакокинетика и фармакодинамика

Дозозависимое увеличение концентраций соединения А в плазме (не показано) и СМЖ наблюдалось в когортах ОНД (не показано) и МНД (**фиг. 2**). Концентрация соединения А в плазме была пропорциональна дозе, измеренной на 1 сутки и 85 сутки, в то время как воздействие соединения А в СМЖ показало ответ, меньший, чем дозозависимый ответ. Снижение относительно исходного уровня концентраций SOD1 в СМЖ наблюдалось при уровне многократной дозы 40 мг и выше (т. е. 60 мг и 100 мг), которое увеличивалось с увеличением количества дозировки, с максимальным средним снижением на 36% в группе с многократной дозой 100 мг (**фиг. 3**). Уменьшение относительно исходного уровня SOD1 в СМЖ наблюдалось у всех участников в группе с дозой 100 мг. Максимальное снижение SOD1 наблюдалось во время или сразу после последней дозы, что указывает на то, что непрерывное дозирование свыше 5 доз может привести к дополнительному снижению. Моделирование, основанное на данных доклинических исследований, позволяет предположить, что 100 мг соединения А эффективно снижает уровни SOD1 в спинном мозге на >99% и примерно на 25-30% в коре головного мозга.

Пример 4: клинические наблюдения

Эффективность оценивали в нескольких временных точках по нескольким шкалам, включая пересмотренную функциональную шкалу оценки бокового амиотрофического склероза (ALFSFRS-R), шкалу медленной жизненной емкости (МЖЕ) и шкалу ручной динамометрии (РД). Во всех когортах группы, получавшие соединение А, имели более высокие, *т. е.* лучшие, баллы по сравнению с группами, получавшими плацебо (**фиг. 4А-4С**). Среднее изменение баллов ALSFRS-R относительно исходного уровня на 85 сутки для участников, получавших соединение А в группе с дозой 100 мг (N=10), составило -1,1 по сравнению с -5,6 для участников, получавших плацебо (N=12); разница в 4,4 балла. У участников с мутациями SOD1, которые, как известно, быстро прогрессируют, *например,* A4V, наблюдалась заметная разница между участниками, получавшими соединение А в группе с дозой 100 мг, и участниками, получавшими плацебо. У этих участников с быстрой прогрессией средняя разница в изменении ALSFRS-R относительно исходного уровня на 85 день приблизилась к 10 баллам (**фиг. 5**). Эффект лечения, по-видимому, согласуется по нескольким клиническим шкалам и снижению SOD1 в СМЖ как у участников с быстрой прогрессией (**фиг. 5**), так и у участников с не быстрой прогрессией (**фиг. 6**). Для сравнения, разница для ALSFRS-R через 6 месяцев составила 2,5 балла в опорном исследовании эдаравона при БАС.

В целом исследование продемонстрировало, что соединение А является безопасным

и эффективным средством для лечения для субъектов с SOD1 БАС. Это наиболее убедительно подтверждается результатами у субъектов, получавших соединение А, с быстро прогрессирующими подтипами мутаций (в основном A4V), особенно в группе с дозой 100 мг, для которых можно было бы ожидать быстрого ухудшения здоровья в отсутствие эффективного лечения. Как отмечалось выше, эффективность оценивали в нескольких временных точках по нескольким шкалам, включая пересмотренную функциональную шкалу оценки бокового амиотрофического склероза (ALSFRS-R), медленную жизненную емкость (МЖЕ) и ручную динамометрию (РД). Результаты показывают гораздо меньшее снижение для каждой из 3 конечных точек клинической функции в группе с дозой 100 мг соединения А, по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Пример 5: уровни фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов (pNFH) в СМЖ

У пациентов с быстро прогрессирующими мутациями SOD1 лечение соединением А приводило к снижению уровней pNFH в СМЖ и замедлению клинического ухудшения состояния по сравнению с плацебо. Большая разница в уровнях pNFH на 85 день между группами, получавшими соединение А 100 мг и плацебо, наблюдалась у пациентов с быстро прогрессирующими мутациями SOD1 (**фиг. 7**) по сравнению с пациентами с другими мутациями SOD1 (**фиг. 8**).

Другие варианты осуществления

Хотя настоящее изобретение было изложено в сочетании с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в рамках объема следующей формулы изобретения.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене супероксиддисмутазы 1 (SOD1), у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

2. Способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене супероксиддисмутазы 1 (SOD1), у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 60 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин

3. Способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене супероксиддисмутазы 1 (SOD1), у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 40 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

4. Способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене супероксиддисмутазы 1 (SOD1), у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 20 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

5. Способ снижения синтеза белка супероксиддисмутазы 1 (SOD1) у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1, связанную с боковым амиотрофическим склерозом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

6. Способ снижения синтеза белка супероксиддисмутазы 1 (SOD1) у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1, связанную с боковым амиотрофическим склерозом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 60 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

7. Способ снижения синтеза белка супероксиддисмутазы 1 (SOD1) у субъекта-

человека, имеющего мутацию в гене SOD1, связанную с боковым амиотрофическим склерозом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 40 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

8. Способ снижения синтеза белка супероксиддисмутазы 1 (SOD1) у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1, связанную с боковым амиотрофическим склерозом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 20 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что мутация в гене SOD1 представляет собой A4V.

10. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что мутация в гене SOD1 представляет собой A4V, H46R, G93S, A4T, G141X, D133A, V148G, N139K, G85R, G93A, V14G, C6S, I113T, D49K, G37R, A89V, E100G, D90A, T137A, E100K, G41A, G41D, G41S, G13R, G72S, L8V, F20C, Q22L, H48R, T54R, S591, V87A, T88deltaTAD, A89T, V97M, S105deltaSL, V118L, D124G, L114F, D90A, G12R или G147R.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что мутацию в гене SOD1 определяют с помощью генетического теста.

12. Способ по любому из пп. 1-10, включающий определение мутации в гене SOD1 с помощью генетического теста.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят субъекту-человеку по меньшей мере 5 раз в течение четырех месяцев.

14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что субъекту-человеку вводят ударные дозы фармацевтической композиции с последующими поддерживающими дозами

фармацевтической композиции.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что субъекту-человеку вводят три ударные дозы, и причем ударные дозы вводят с интервалом в две недели.

16. Способ по п. 14, отличающийся тем, что поддерживающие дозы вводят каждые 4 недели, начиная через 4 недели после третьей ударной дозы.

17. Способ по п. 14, отличающийся тем, что ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

(i) первая ударная доза фармацевтической композиции;

(ii) вторая ударная доза фармацевтической композиции, вводимая через 14 суток после первой ударной дозы;

(iii) третья ударная доза фармацевтической композиции, вводимая через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) первая поддерживающая доза фармацевтической композиции, вводимая через 28 суток или 1 месяц после третьей ударной дозы.

18. Способ по п. 14, отличающийся тем, что ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

(i) первая ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида;

(ii) вторая ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем вторую ударную дозу вводят через 14 суток после первой ударной дозы;

(iii) третья ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем третью ударную дозу вводят через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) первая поддерживающая доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем первую поддерживающую дозу вводят через 28 суток после третьей ударной дозы.

19. Способ по п. 14, отличающийся тем, что ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

(i) первая ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида;

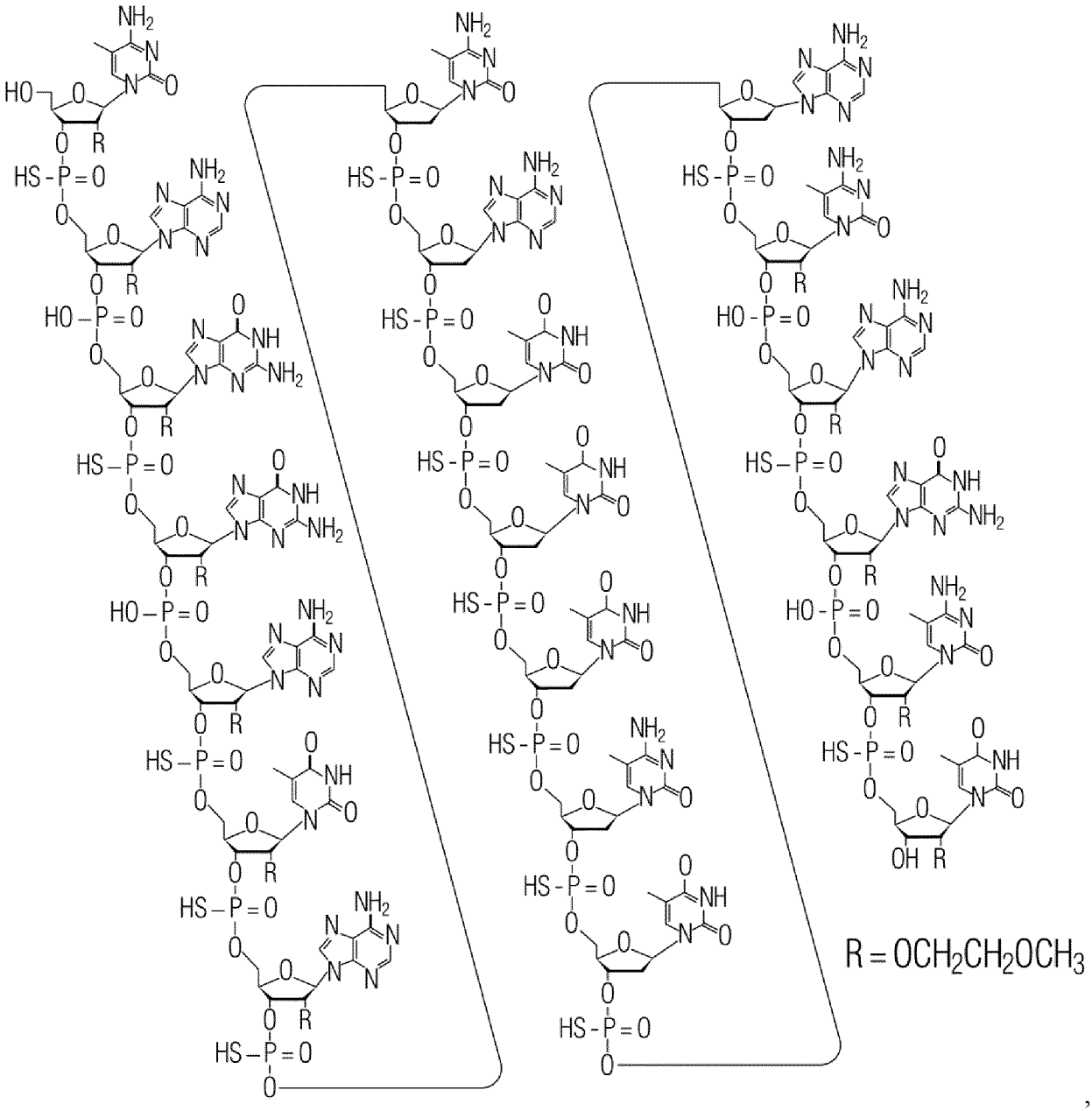
(ii) вторая ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем вторую ударную дозу вводят через 14 суток после первой ударной дозы;

(iii) третья ударная доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем третью ударную дозу вводят через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) первая поддерживающая доза в количестве, достаточном для доставки фиксированной дозы приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем первую поддерживающую дозу вводят через 1 месяц после третьей ударной дозы.

20. Шприц или насос, содержащий стерильный препарат антисмыслового олигонуклеотида, причем шприц или насос выполнен с возможностью интратекального введения антисмыслового олигонуклеотида в фиксированной дозе приблизительно 20 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 60 мг или приблизительно 100 мг, причем последовательность азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида состоит из CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 1), причем каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный нуклеозид, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой фосфодиэфирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и причем каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

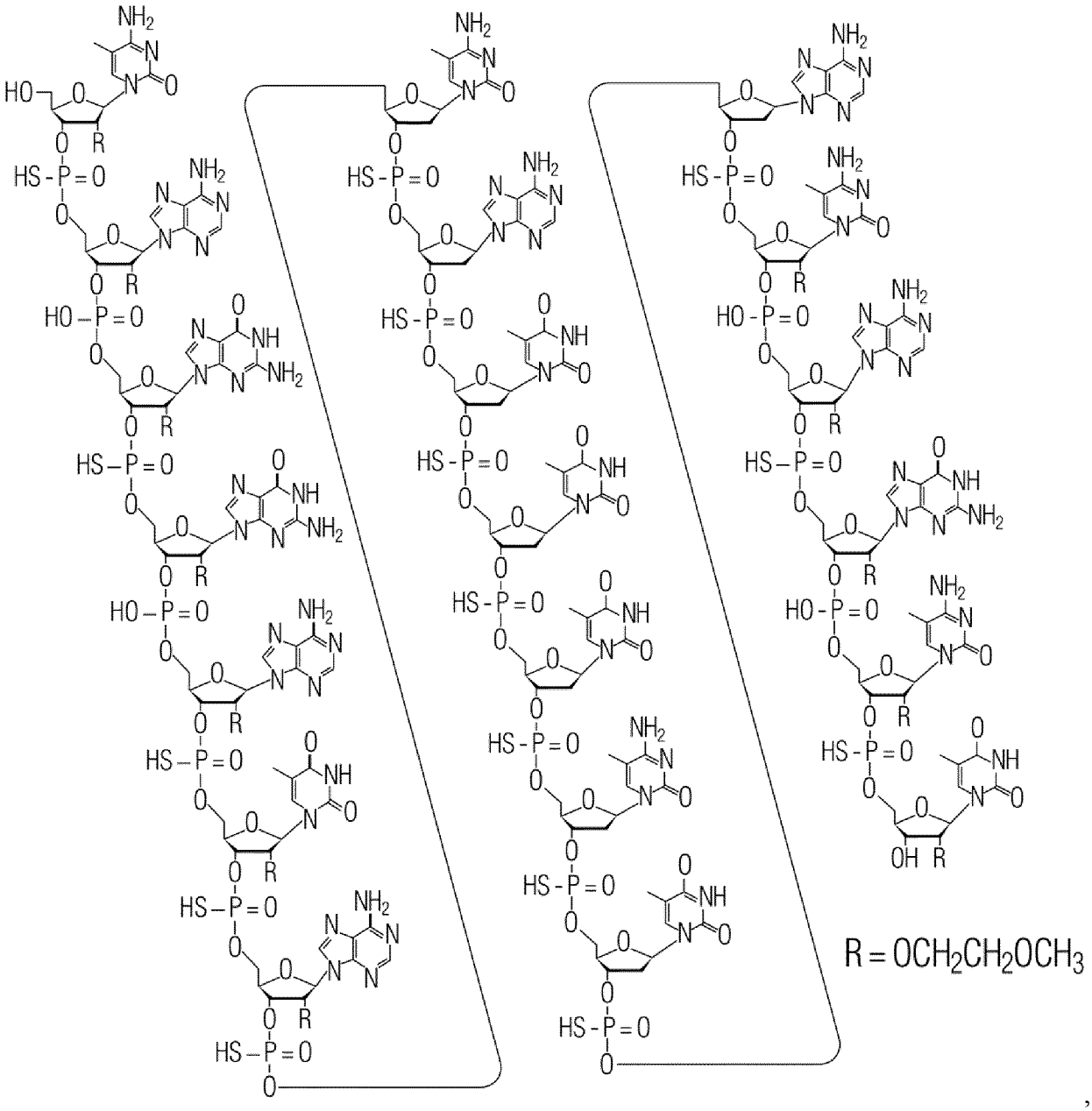
21. Способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене супероксиддисмутазы 1 (SOD1), у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида.

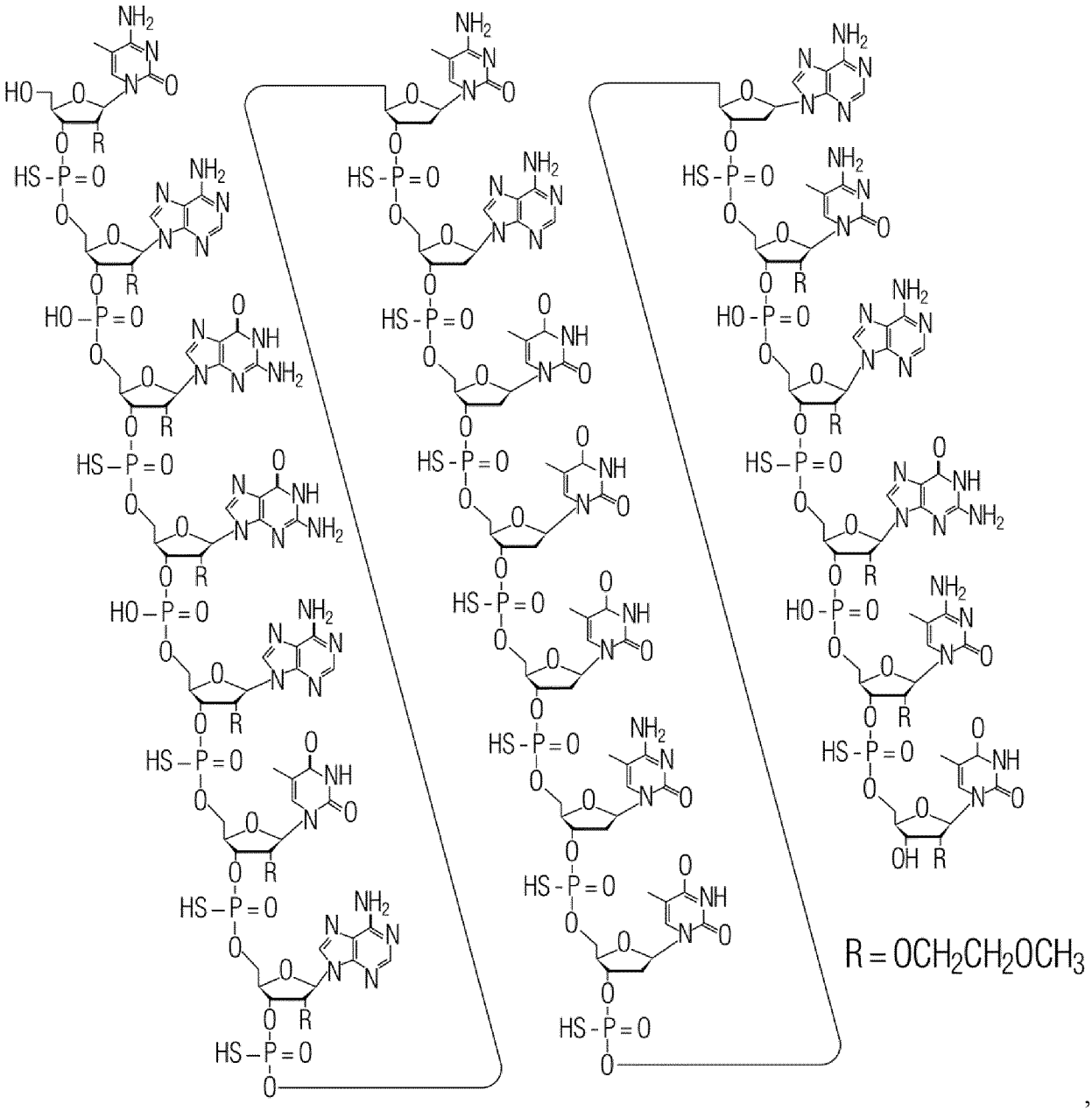
22. Способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене супероксиддисмутазы 1 (SOD1), у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 60 мг антисмыслового олигонуклеотида.

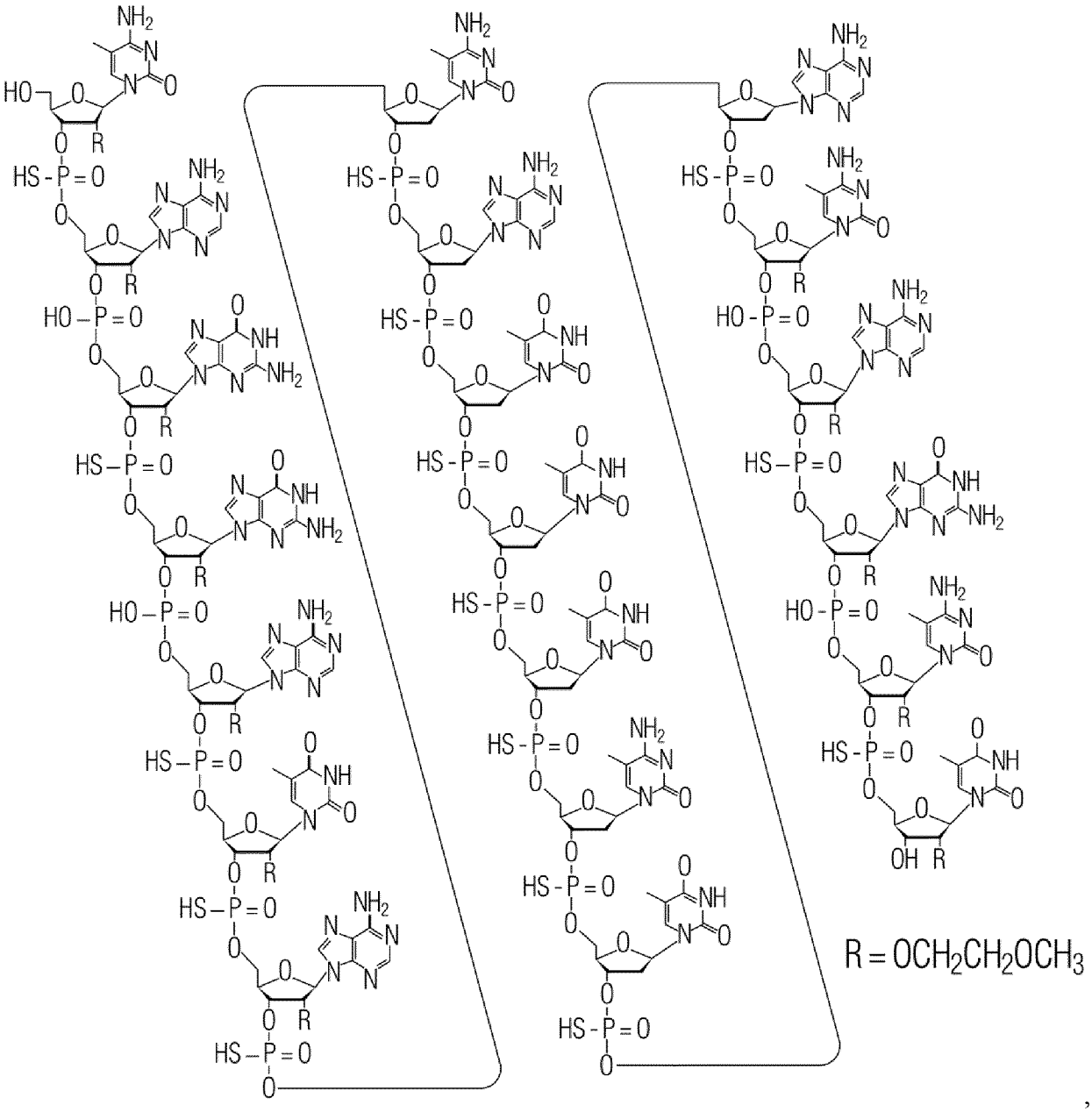
23. Способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене супероксиддисмутазы 1 (SOD1), у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 40 мг антисмыслового олигонуклеотида.

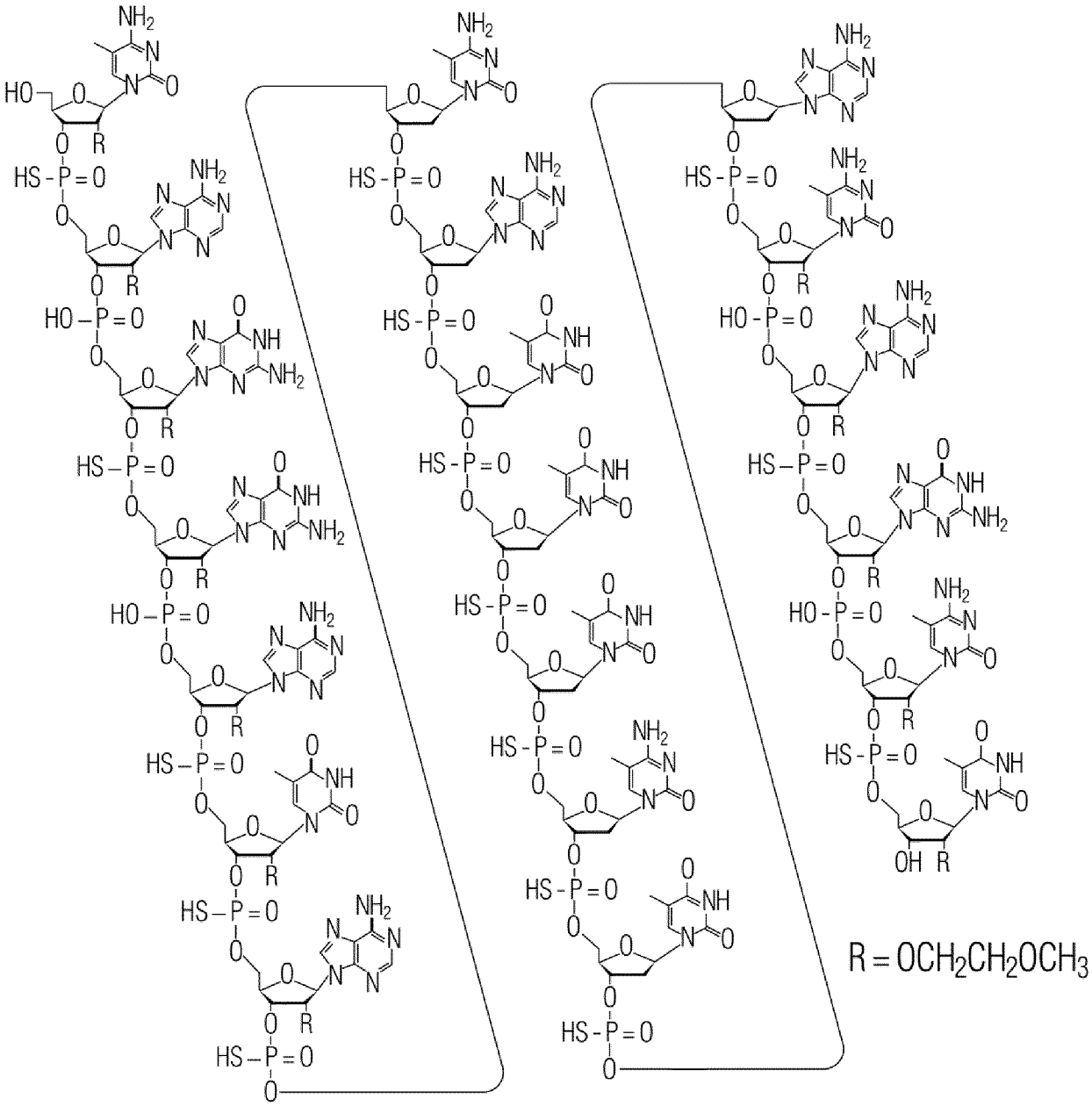
24. Способ лечения или предотвращения бокового амиотрофического склероза, связанного с мутацией в гене супероксиддисмутазы 1 (SOD1), у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 20 мг антисмыслового олигонуклеотида.

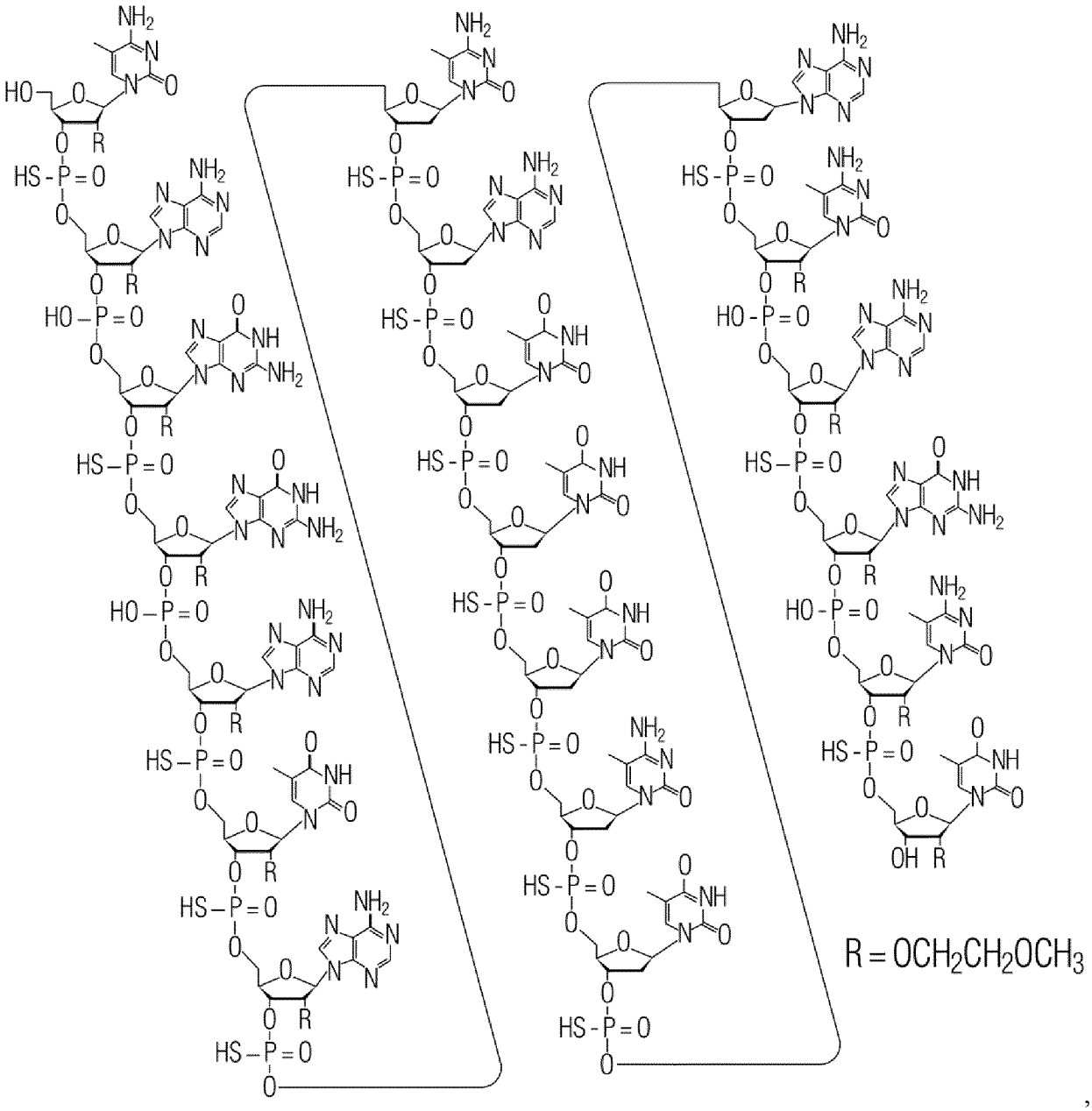
25. Способ снижения синтеза белка супероксиддисмутазы 1 (SOD1) у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1, связанную с боковым амиотрофическим склерозом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида.

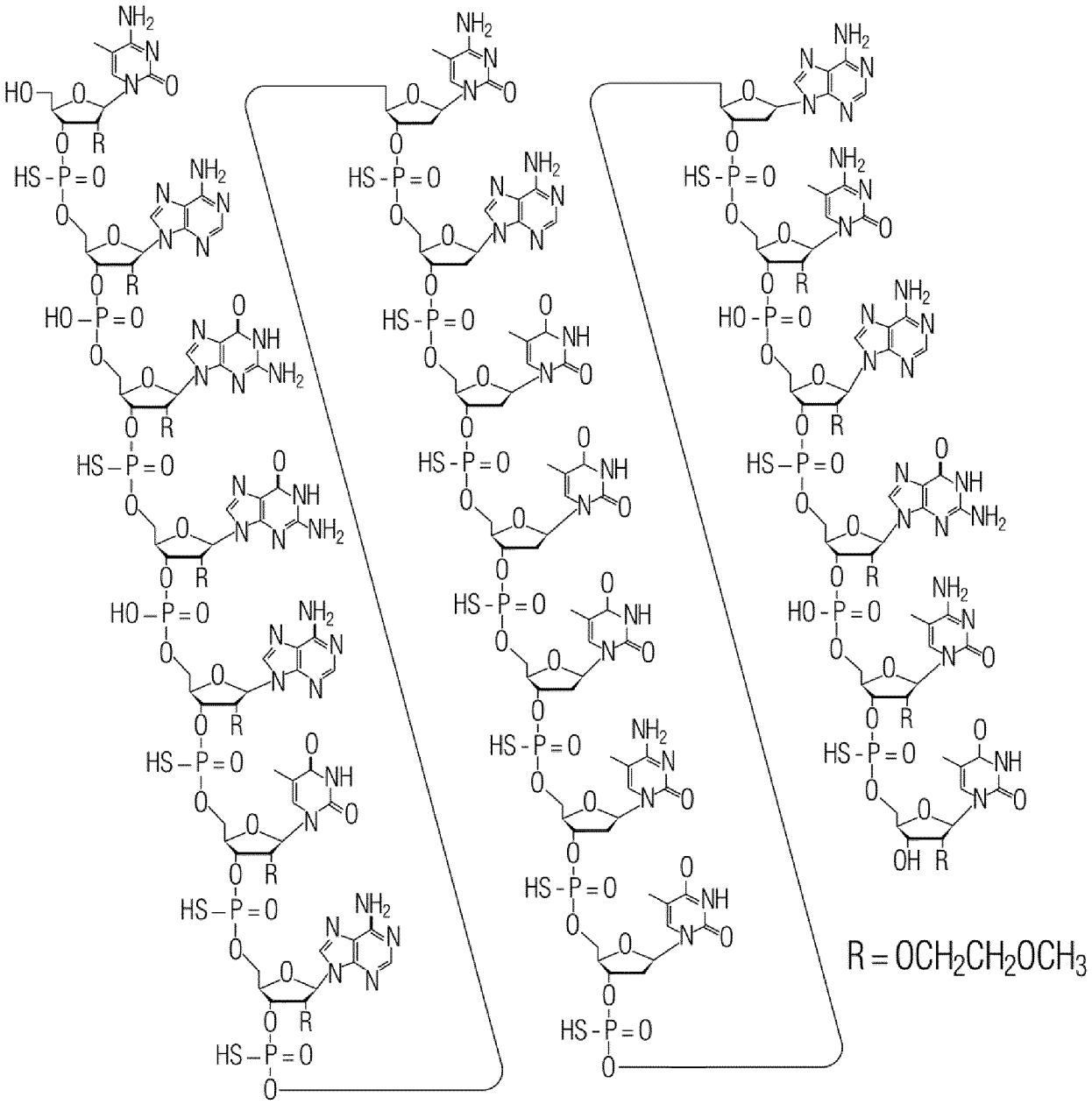
26. Способ снижения синтеза белка супероксиддисмутазы 1 (SOD1) у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1, связанную с боковым амиотрофическим склерозом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 60 мг антисмыслового олигонуклеотида.

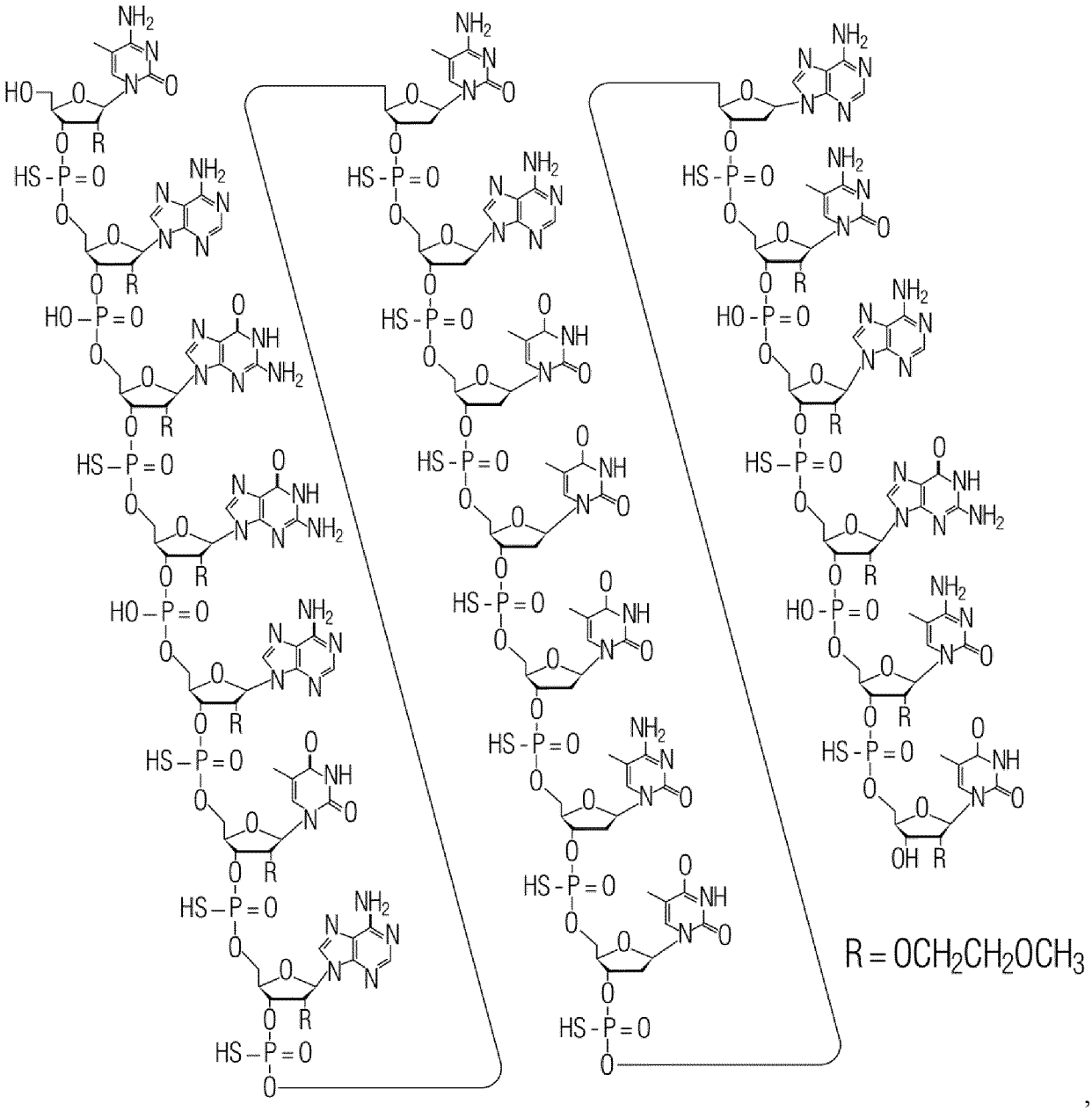
27. Способ снижения синтеза белка супероксиддисмутазы 1 (SOD1) у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1, связанную с боковым амиотрофическим склерозом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 40 мг антисмыслового олигонуклеотида.

28. Способ снижения синтеза белка супероксиддисмутазы 1 (SOD1) у субъекта-человека, имеющего мутацию в гене SOD1, связанную с боковым амиотрофическим склерозом, причем способ включает введение субъекту-человеку путем интратекального введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид или его соль, причем антисмысловой олигонуклеотид имеет следующую структуру:



,

и причем антисмысловой олигонуклеотид или его соль вводят в дозе, эквивалентной приблизительно 20 мг антисмыслового олигонуклеотида.

29. Способ по любому из пп. 21-28, отличающийся тем, что мутация в гене SOD1 представляет собой A4V.

30. Способ по любому из пп. 21-28, отличающийся тем, что мутация в гене SOD1 представляет собой A4V, H46R, G93S, A4T, G141X, D133A, V148G, N139K, G85R, G93A, V14G, C6S, I113T, D49K, G37R, A89V, E100G, D90A, T137A, E100K, G41A, G41D, G41S, G13R, G72S, L8V, F20C, Q22L, H48R, T54R, S591, V87A, T88deltaTAD, A89T, V97M, S105deltaSL, V118L, D124G, L114F, D90A, G12R или G147R.

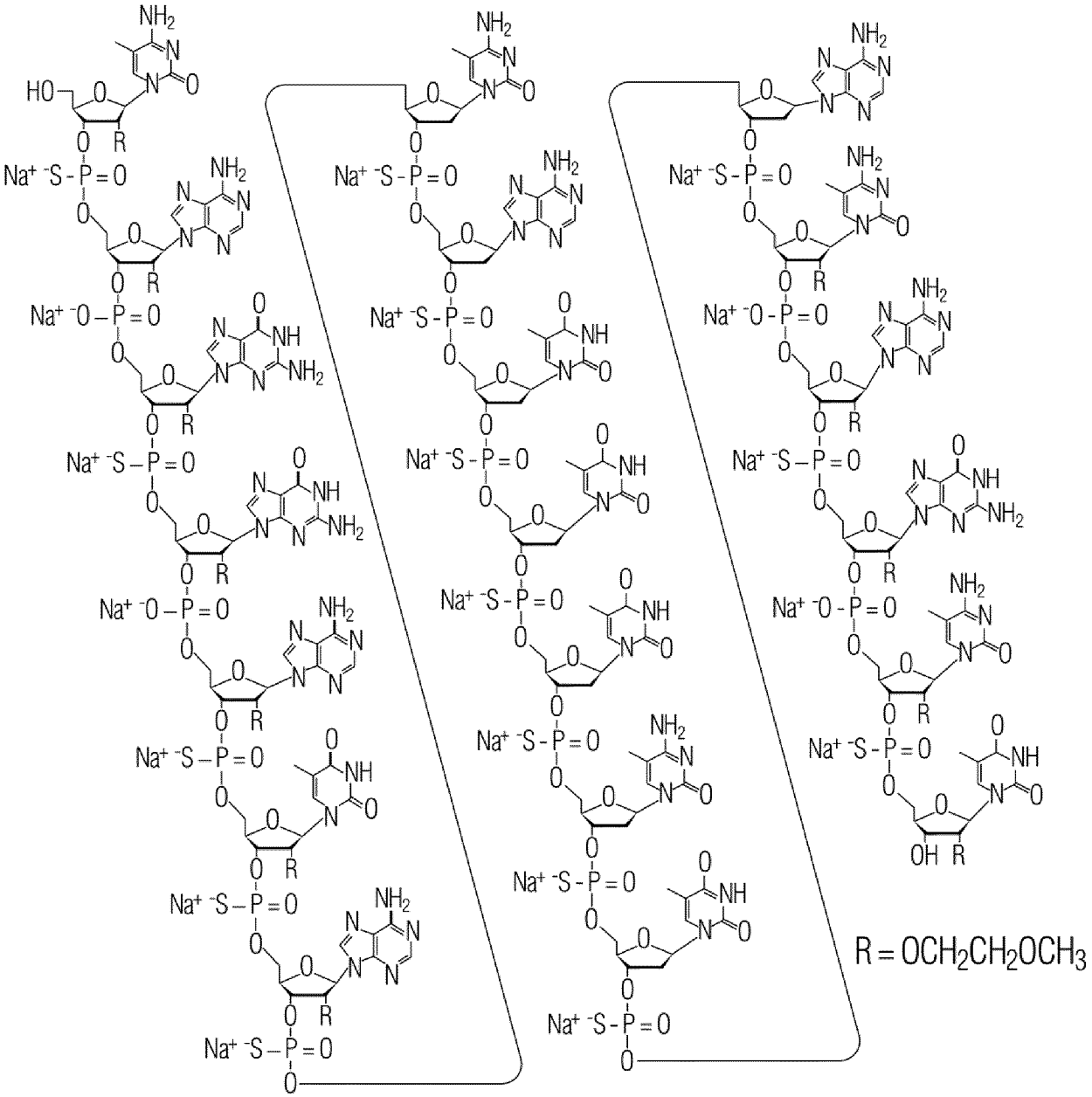
31. Способ по любому из пп. 21-30, отличающийся тем, что мутацию в гене SOD1 определяют с помощью генетического теста.

32. Способ по любому из пп. 21-30, включающий определение мутации в гене SOD1 с помощью генетического теста.

33. Способ по любому из пп. 21-32, отличающийся тем, что субъекту-человеку вводят соль антисмыслового олигонуклеотида.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что соль представляет собой натриевую соль.

35. Способ по п. 33, отличающийся тем, что соль антисмыслового олигонуклеотида имеет следующую структуру:



.

36. Способ по любому из пп. 21-35, отличающийся тем, что субъекту-человеку вводят ударные дозы фармацевтической композиции с последующими поддерживающими дозами фармацевтической композиции.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что субъекту-человеку вводят три ударные дозы, и причем ударные дозы вводят с интервалом в две недели.

38. Способ по п. 36, отличающийся тем, что поддерживающие дозы вводят каждые

4 недели, начиная через 4 недели после третьей ударной дозы.

39. Способ по п. 36, отличающийся тем, что ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

(i) первая ударная доза фармацевтической композиции;

(ii) вторая ударная доза фармацевтической композиции, вводимая через 14 суток после первой ударной дозы;

(iii) третья ударная доза фармацевтической композиции, вводимая через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) первая поддерживающая доза фармацевтической композиции, вводимая через 28 суток или 1 месяц после третьей ударной дозы.

40. Способ по п. 36, отличающийся тем, что ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

(i) первая ударная доза, эквивалентная приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида;

(ii) вторая ударная доза, эквивалентная приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем вторую ударную дозу вводят через 14 суток после первой ударной дозы;

(iii) третья ударная доза, эквивалентная приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем третью ударную дозу вводят через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) первая поддерживающая доза, эквивалентная приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем первую поддерживающую дозу вводят через 28 суток после третьей ударной дозы.

41. Способ по п. 36, отличающийся тем, что ударные дозы и поддерживающие дозы фармацевтической композиции вводят субъекту-человеку следующим образом:

(i) первая ударная доза, эквивалентная приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида;

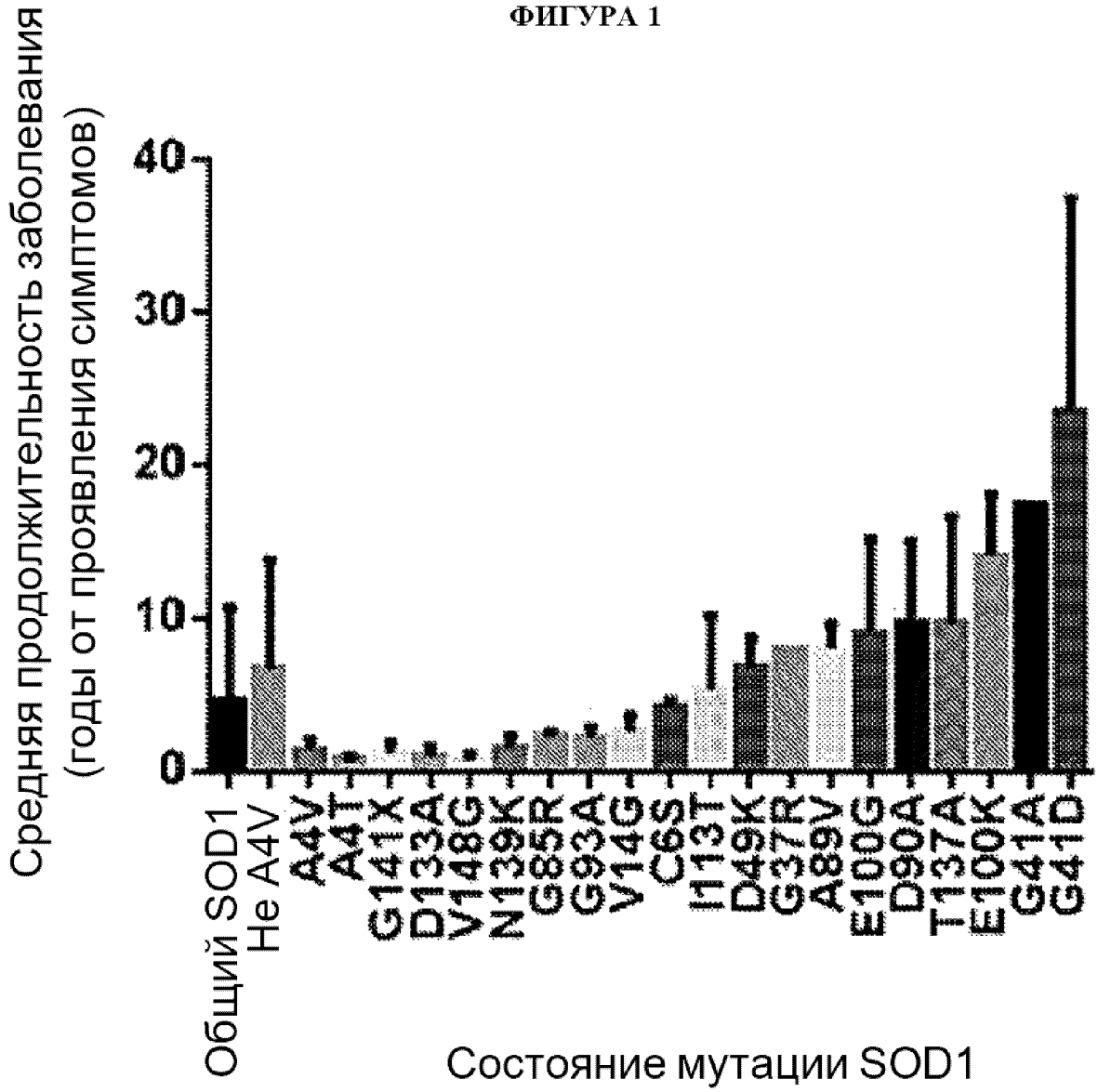
(ii) вторая ударная доза, эквивалентная приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем вторую ударную дозу вводят через 14 суток после первой ударной дозы;

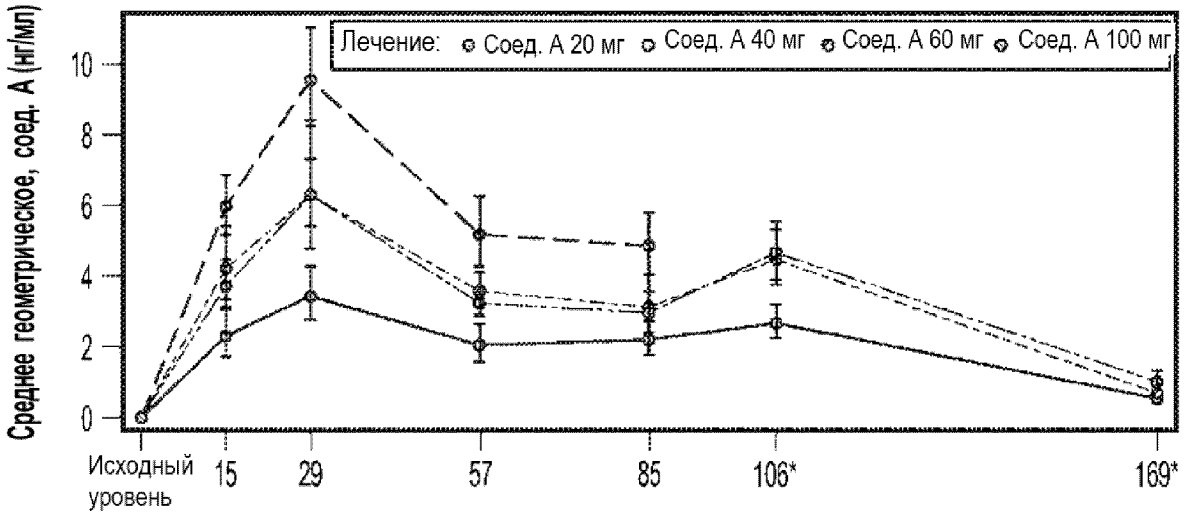
(iii) третья ударная доза, эквивалентная приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем третью ударную дозу вводят через 28 суток после первой ударной дозы; и

(iv) первая поддерживающая доза, эквивалентная приблизительно 100 мг антисмыслового олигонуклеотида, причем первую поддерживающую дозу вводят через 1 месяц после третьей ударной дозы.

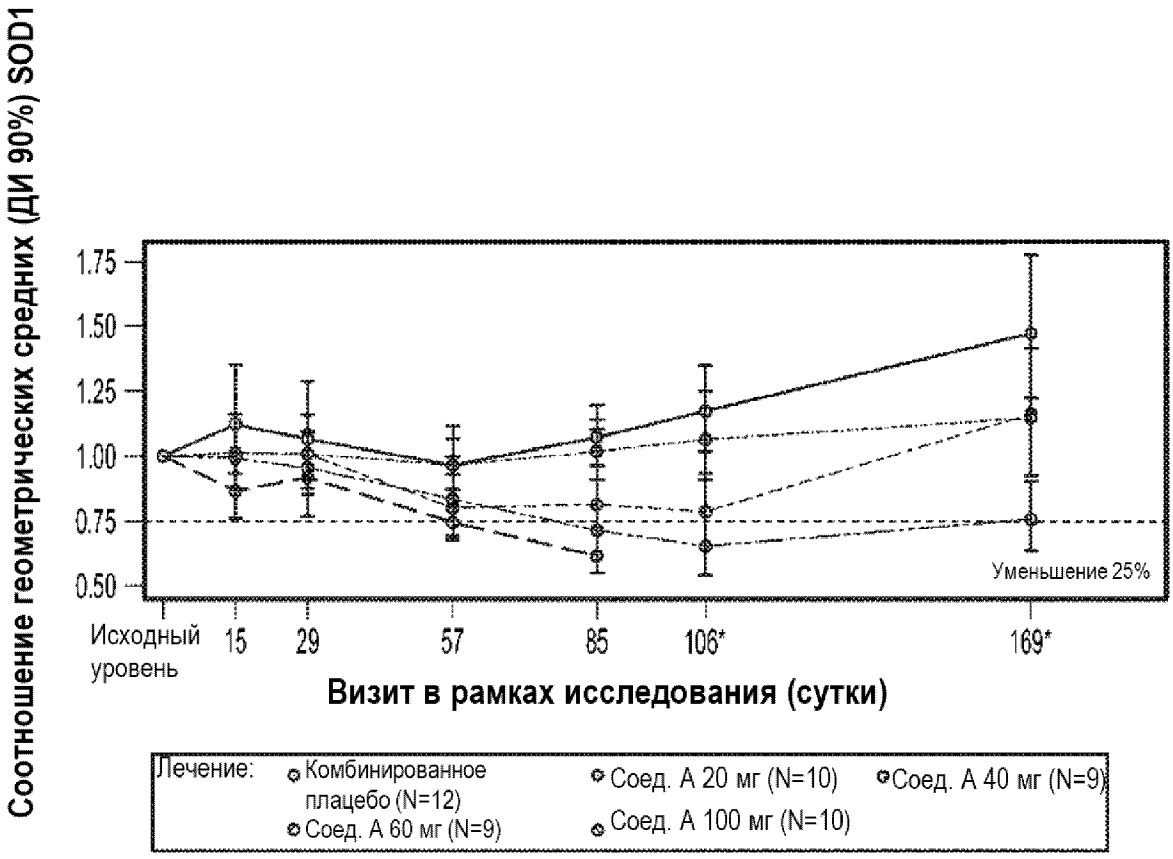
По доверенности

ФИГУРА 1

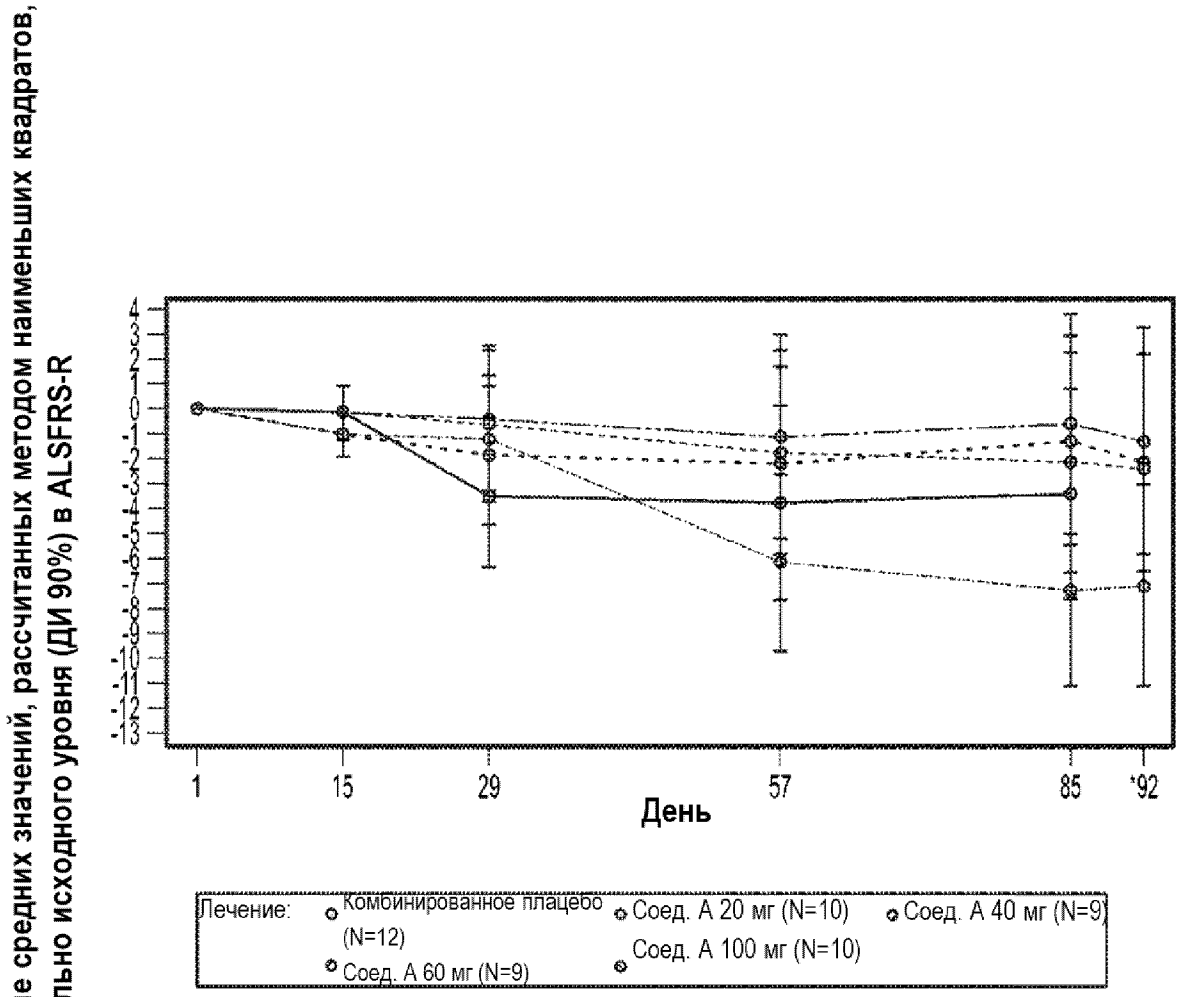

Средняя продолжительность заболевания
(годы от проявления симптомов)
40
30
20
10
0
Общий SOD1
Не A4V
A4V
A4T
G141X
D133A
V148G
N139K
G85R
G93A
V14G
C6S
H113T
D49K
G37R
A89V
E100G
D90A
T137A
E100K
G41A
G41D
Состояние мутации SOD1


Среднее геометрическое, соед. А (нг/мл)
10
8
6
4
2
0
Лечение:
Соед. А 20 мг
Соед. А 40 мг
Соед. А 60 мг
Соед. А 100 мг
Исходный уровень
15
29
57
85
106*
169*

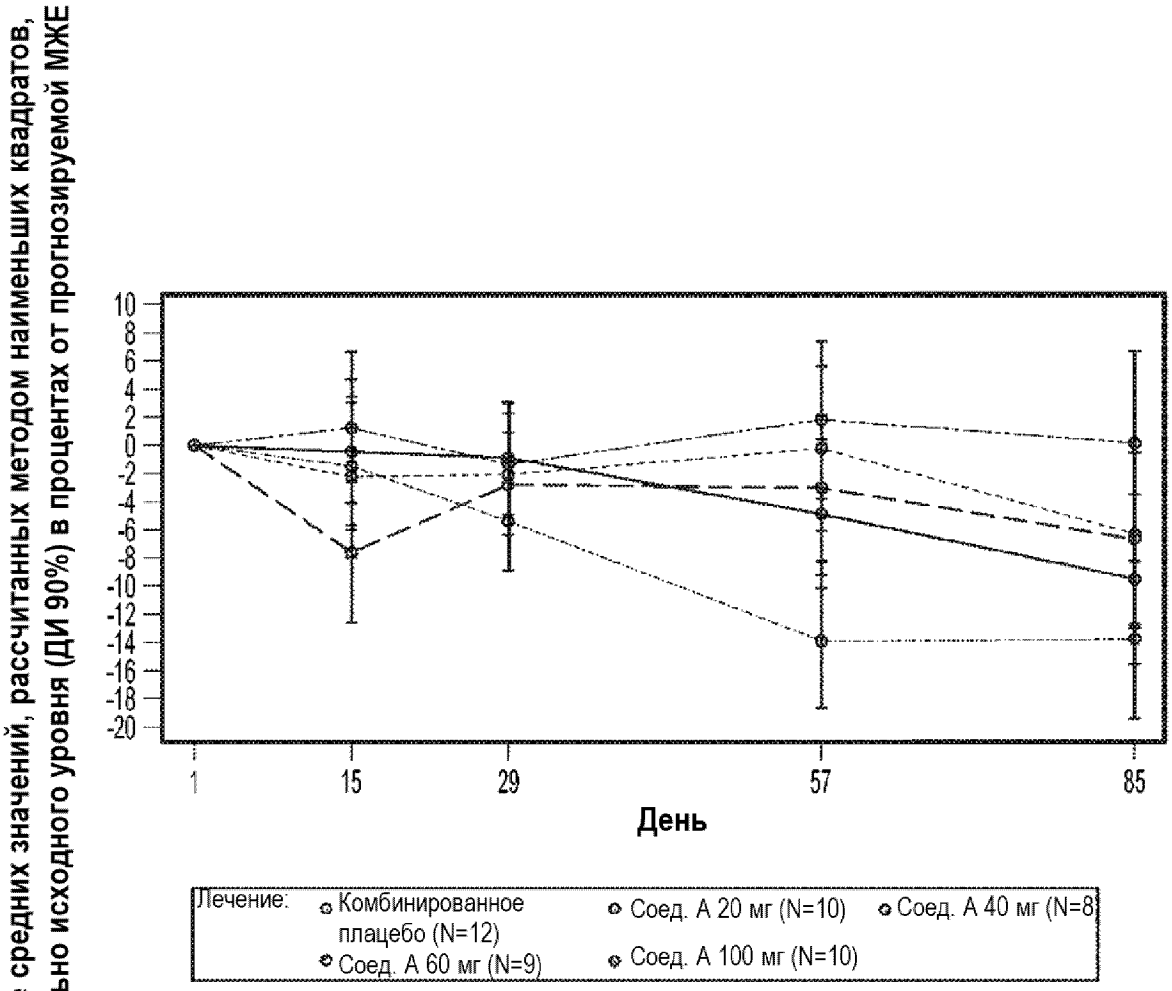
ФИГУРА 2


Соотношение геометрических средних (ДИ 90%) SOD1
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
Уменьшение 25%
Исходный уровень
15
29
57
85
106*
169*
Визит в рамках исследования (сутки)
Лечение:
Комбинированное плацебо (N=12)
Соед. А 20 мг (N=10)
Соед. А 40 мг (N=9)
Соед. А 60 мг (N=9)
Соед. А 100 мг (N=10)

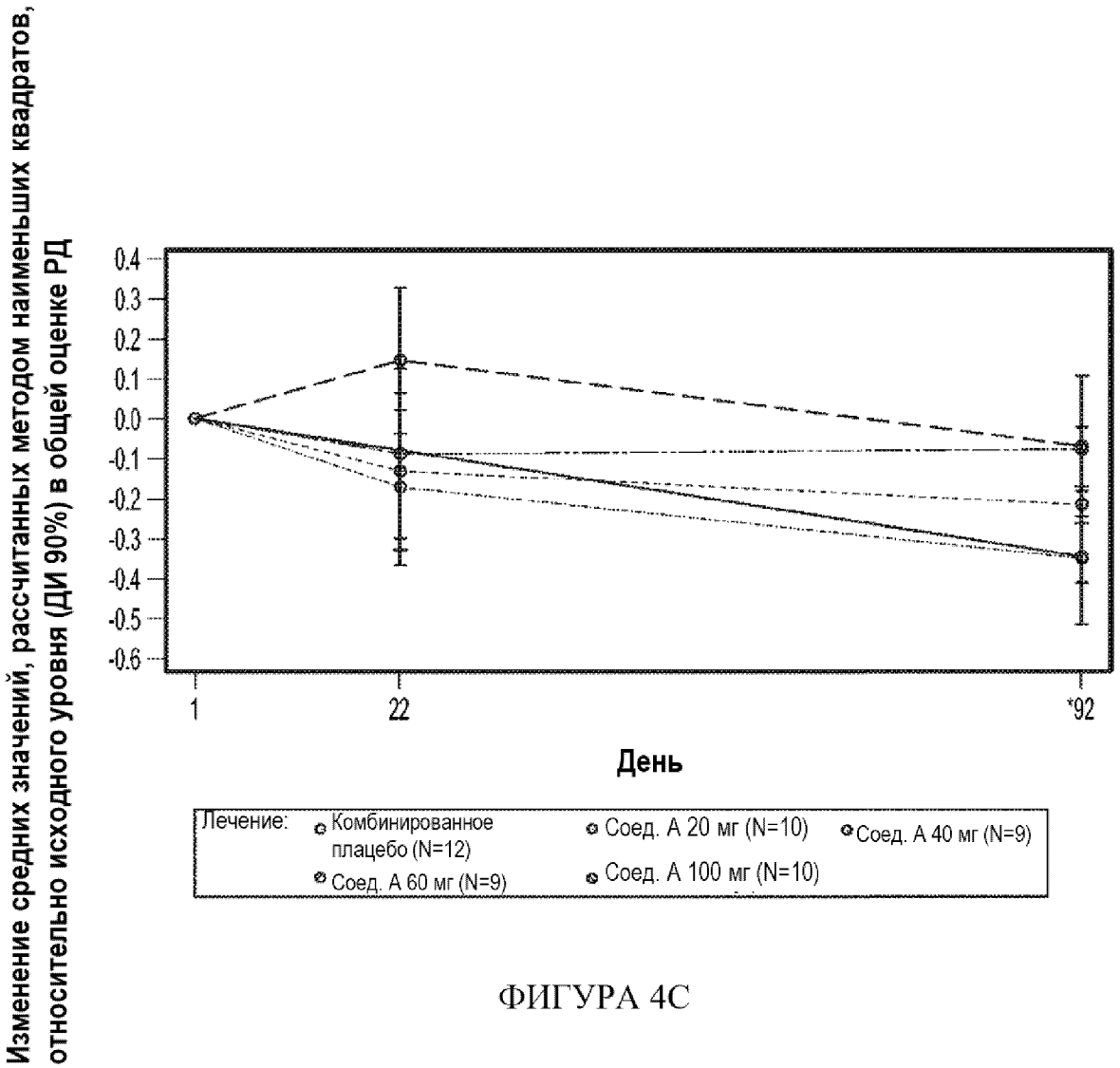
ФИГУРА 3


Изменение средних значений, рассчитанных методом наименьших квадратов, относительно исходного уровня (ДИ 90%) в ALSFRS-R
1
15
29
57
85
*92
День
Лечение:
Комбинированное плацебо (N=12)
Соед. А 20 мг (N=10)
Соед. А 40 мг (N=9)
Соед. А 60 мг (N=9)
Соед. А 100 мг (N=10)

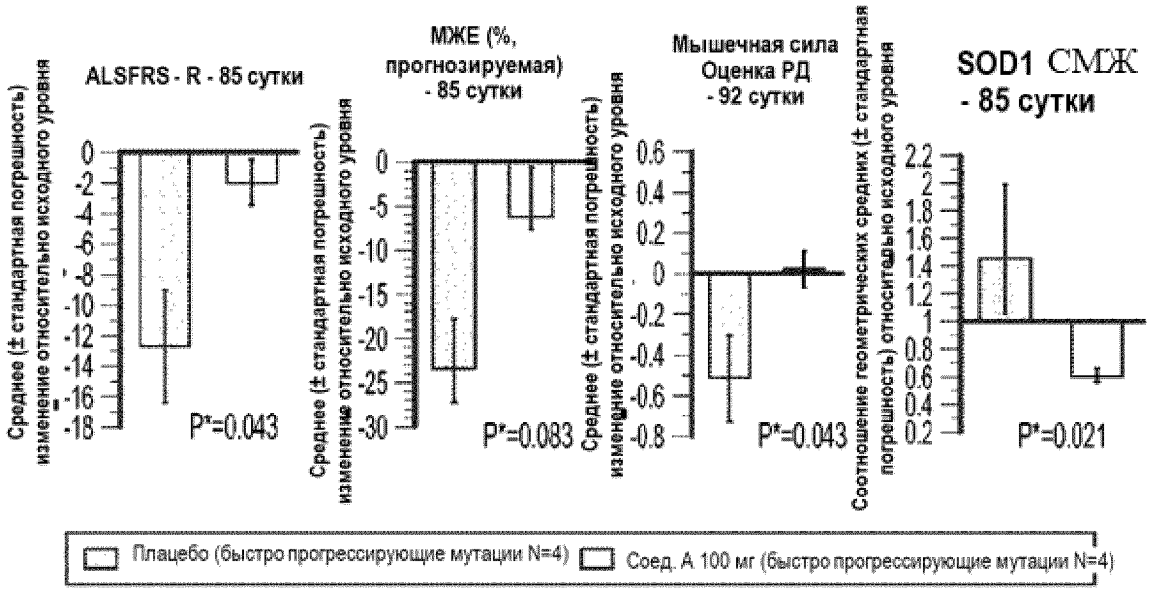
ФИГУРА 4А


Изменение средних значений, рассчитанных методом наименьших квадратов, относительно исходного уровня (ДИ 90%) в процентах от прогнозируемой МЖЕ
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
-16
-18
-20
1
15
29
57
85
День
Лечение:
Комбинированное плацебо (N=12)
Соед. А 20 мг (N=10)
Соед. А 40 мг (N=8
Соед. А 60 мг (N=9)
Соед. А 100 мг (N=10)

ФИГУРА 4В

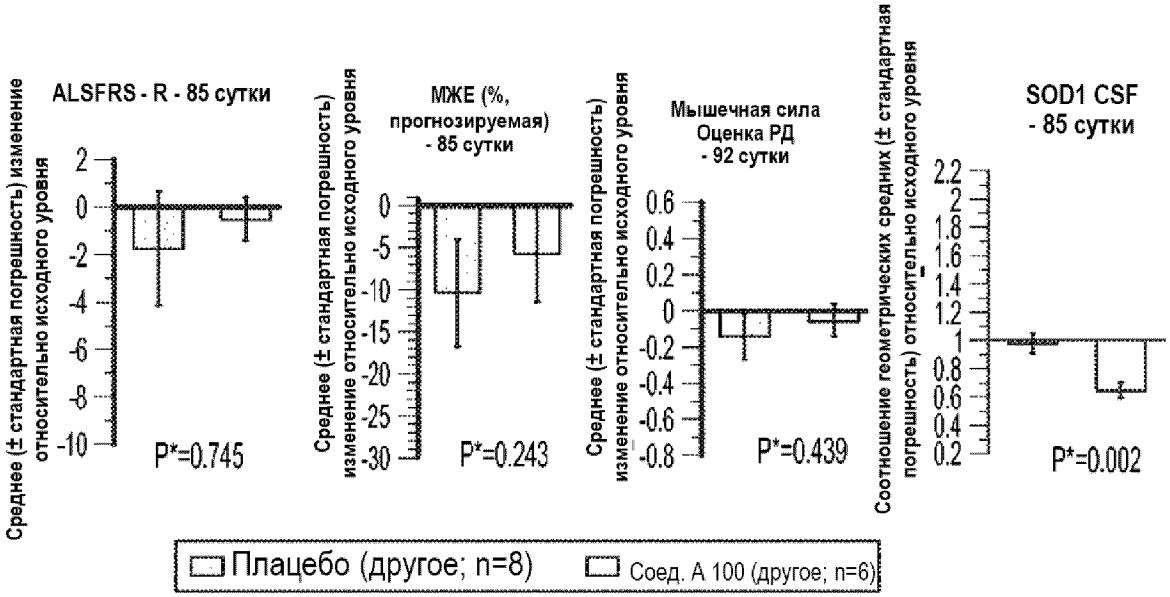

Изменение средних значений, рассчитанных методом наименьших квадратов, относительно исходного уровня (ДИ 90%) в общей оценке РД
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
-0.6
1
22
*92
День
Лечение:
Комбинированное плацебо (N=12)
Соед. А 20 мг (N=10)
Соед. А 40 мг (N=9)
Соед. А 60 мг (N=9)
Соед. А 100 мг (N=10)

ФИГУРА 4С



*На основании критерия Крускала-Уоллиса

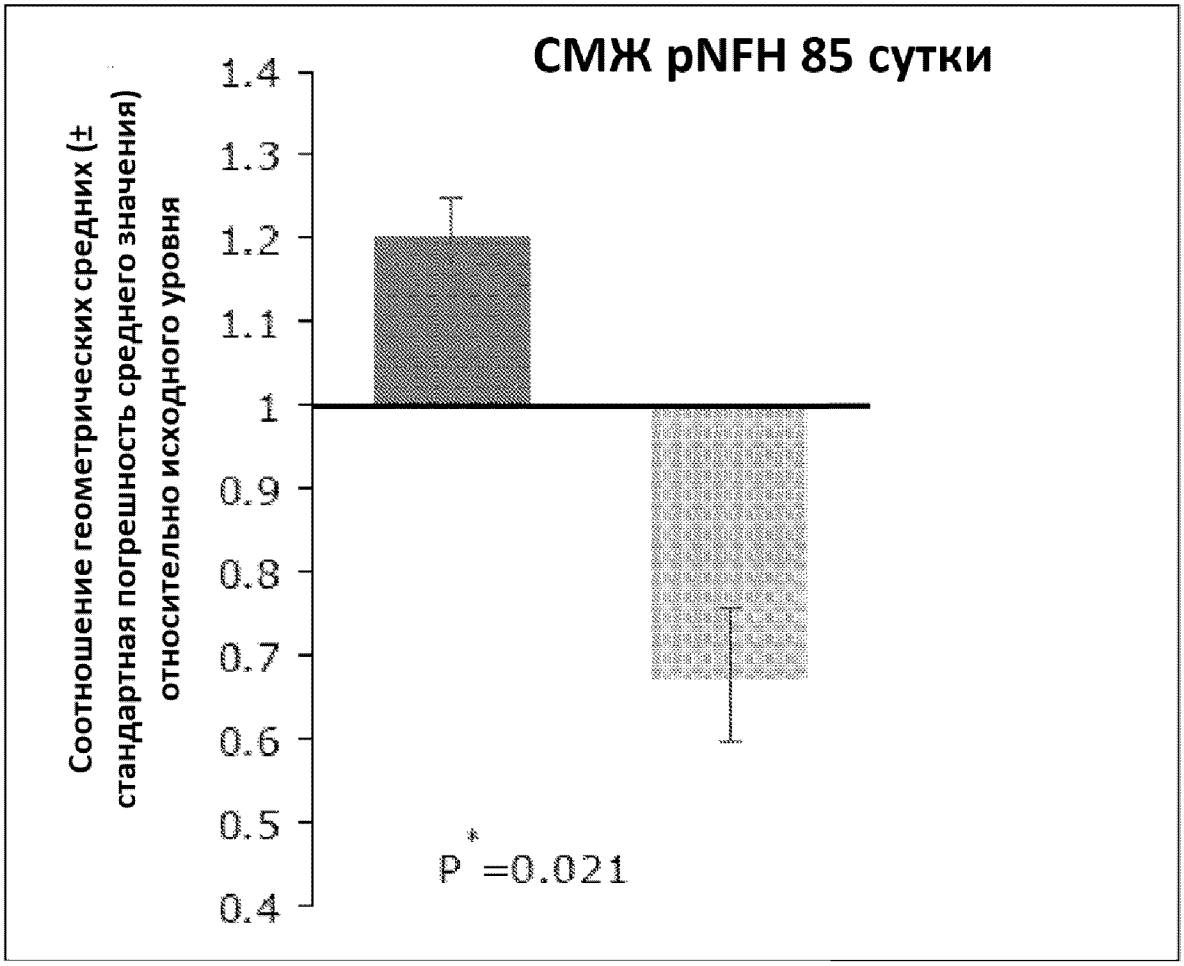
ФИГУРА 5



*На основании критерия Крускала-Уоллиса

ФИГУРА 6

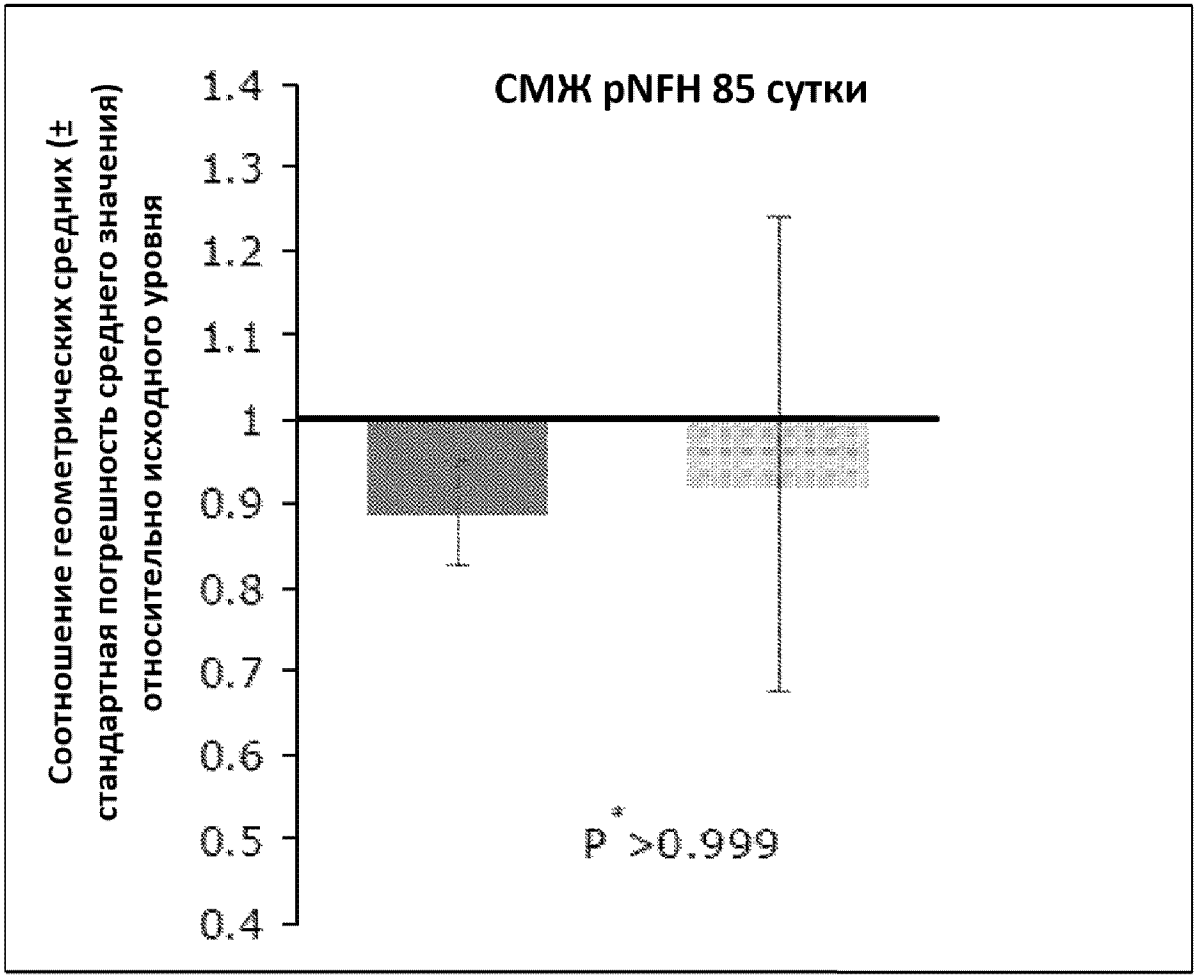
ФИГУРА 7



Плацебо (быстро прогрессирующие мутации N=4)

Соед. А 100 мг (быстро прогрессирующие мутации N=4)

ФИГУРА 8



Плацебо (другое; n=8) Соед. А 100 мг (другое; n=6)

*На основании критерия Крускала-Уоллиса