



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I837102 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：107136614

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 17 日

(51)Int. Cl. : A61K31/7088(2006.01)

C12N15/113 (2010.01)

A61K47/64 (2017.01)

(30)優先權：2017/10/17 美國

62/573,379

(71)申請人：美商薩羅塔治療公司(美國) SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (US)

美國

美國麻省理工學院(美國) MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

(US)

美國

(72)發明人：沃夫 賈斯汀 M WOLFE, JUSTIN M. (US)；菲德森 科林 M FADZEN, COLIN M. (US)；朱 志寧 CHOO, ZI-NING (US)；霍登 蕾貝卡 L HOLDEN, REBECCA L. (US)；姚 莫妮卡 YAO, MONICA (US)；韓森 甘納 J HANSON, GUNNAR J. (US)；潘特盧特 布萊德利 L PENTELUTE, BRADLEY L. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2012/150960A1

WO 2014/124952A1

審查人員：方冠岳

申請專利範圍項數：21 項 圖式數：3 共 68 頁

(54)名稱

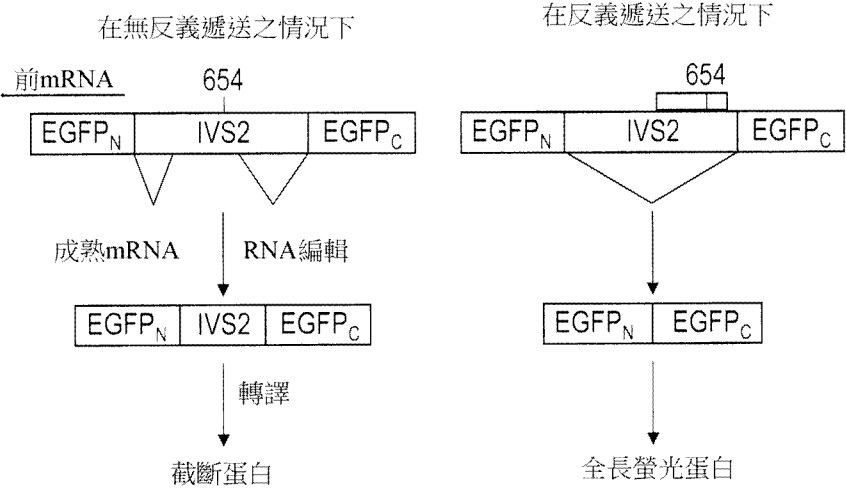
用於反義遞送之細胞穿透肽

(57)摘要

本發明提供寡核苷酸、細胞穿透肽及肽-寡核苷酸結合物。本發明亦提供治療有需要之受試者之肌肉疾病、病毒感染或細菌感染之方法，該方法包含向該受試者投與本文中所描述之寡核苷酸、肽及肽-寡核苷酸結合物。

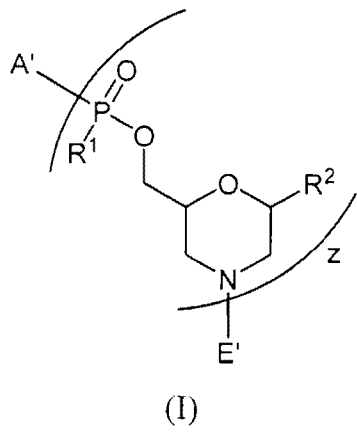
Provided herein are oligonucleotides, cell penetrating peptides, and peptide-oligonucleotide-conjugates. Also provided herein are methods of treating a muscle disease, a viral infection, or a bacterial infection in a subject in need thereof, comprising administering to the subject oligonucleotides, peptides, and peptide-oligonucleotide-conjugates described herein.

指定代表圖：



【圖1D】

特徵化學式：





I837102

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於反義遞送之細胞穿透肽

【英文發明名稱】

CELL-PENETRATING PEPTIDES FOR ANTISENSE DELIVERY

【中文】

本發明提供寡核苷酸、細胞穿透肽及肽-寡核苷酸結合物。本發明亦提供治療有需要之受試者之肌肉疾病、病毒感染或細菌感染之方法，該方法包含向該受試者投與本文中所描述之寡核苷酸、肽及肽-寡核苷酸結合物。

【英文】

Provided herein are oligonucleotides, cell penetrating peptides, and peptide-oligonucleotide-conjugates. Also provided herein are methods of treating a muscle disease, a viral infection, or a bacterial infection in a subject in need thereof, comprising administering to the subject oligonucleotides, peptides, and peptide-oligonucleotide-conjugates described herein.

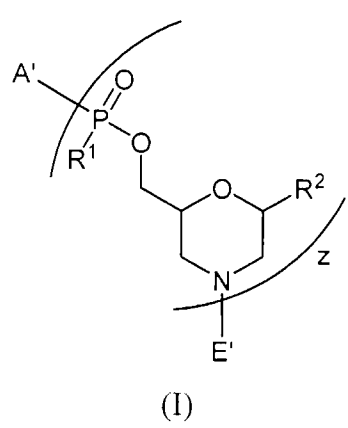
【指定代表圖】

圖1D

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於反義遞送之細胞穿透肽

【英文發明名稱】

CELL-PENETRATING PEPTIDES FOR ANTISENSE DELIVERY

【技術領域】

【先前技術】

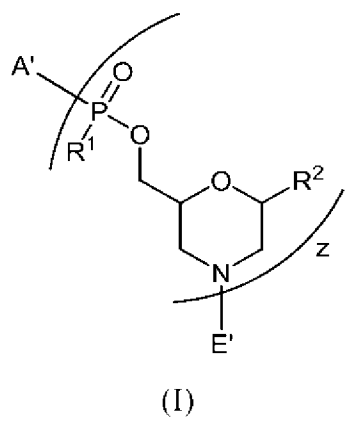
【0001】 反義技術提供用於調變一或多種特定基因產物(包括替代剪接產物)之表現之方式，且該技術唯一地適用於許多治療性、診斷性及研究應用。反義技術隱含之原理為：與靶標核酸雜交之反義化合物(例如，寡核苷酸)經由許多反義機制中之任一者調變諸如轉錄、剪接或轉譯之基因表現活性。反義化合物之序列特異性使得其作為用於靶標驗證及基因功能化以及選擇性地調變與疾病有關之基因之表現之療法的有吸引力的工具。

【0002】 儘管已在反義技術領域中作出顯著進展，但在此項技術中仍需要具有經改良反義或反基因效能之寡核苷酸及肽-寡核苷酸結合物。

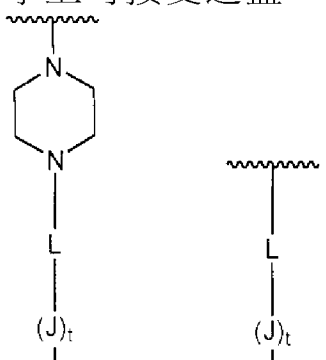
【發明內容】

【0003】 本發明提供包含共價鍵結至細胞穿透肽(CPP)之寡核苷酸的肽-寡核苷酸結合物。本發明亦提供治療有需要之受試者之疾病的方法，其包含向受試者投與本文中所描述之肽-寡核苷酸結合物。

【0004】 因此，在一個態樣中，本文提供式I之肽-寡核苷酸結合物：



或其醫藥學上可接受之鹽，

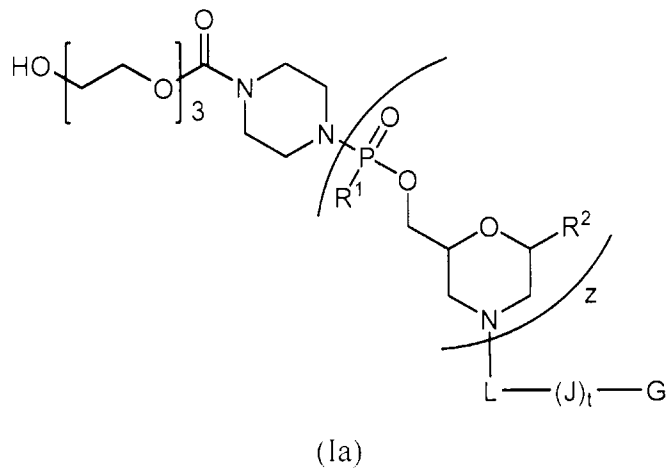


其中L藉由醯胺鍵共價鍵聯至J之胺基端，且L為-C(O)(CH₂)₁₋₆-C₁₋₆-雜芳基-(CH₂)₁₋₆C(O)；

各J在每次出現時獨立地選自由以下組成之群：精胺酸、甘胺酸、白胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸、離胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、脯胺酸、纈胺酸、異白胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、組胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸及蘇胺酸；且

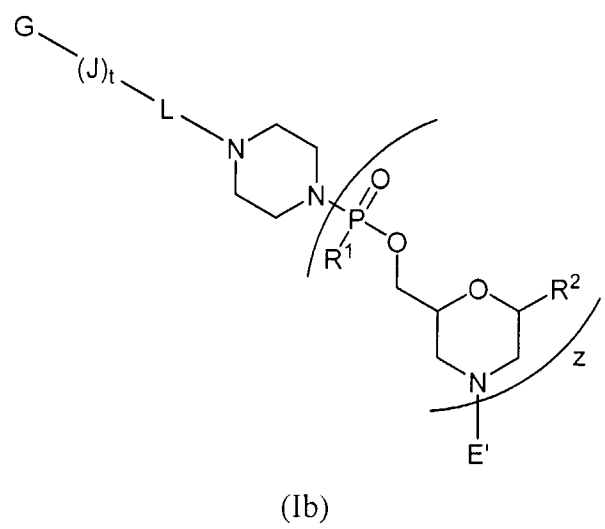
t為5至27；
其中至少一個J為精胺酸。

【0005】 在一個實施例中，L為-C(O)(CH₂)₁₋₆-三唑-(CH₂)₁₋₆C(O)。
在一個實施例中，式I之肽-寡核苷酸結合物為式Ia之肽-寡核苷酸結合物：



或其醫藥學上可接受之鹽，
其中(J)_t-G為如上文所定義之細胞穿透肽。

【0006】 在另一實施例中，式I之肽-寡核苷酸結合物為式Ib之肽-寡核苷酸結合物：



或其醫藥學上可接受之鹽，
其中(J)_t-G為如上文所定義之細胞穿透肽。

【0007】 在再一態樣中，本文提供治療有需要之受試者之肌肉疾病、病毒感染或細菌感染之方法，其包含向受試者投與本發明之肽-寡核苷酸結合物。

【圖式簡單說明】

【0008】

圖1A展示用於比較CPP有效性與所附著之螢光團或用於外顯子跳躍之功能性PMO的工作流。**圖1B**展示PMO (一種類型之反義寡核苷酸)之基本結構。**圖1C**展示如本文所提供之PMO(SEQ ID NO: 65)及Cy5.5之結構的比較。**圖1D**展示用於功能性外顯子跳躍之eGFP分析的描述。**圖1E**展示十三個CPP與Cy5.5貨物或PMO IVS2-654貨物之比較。

圖2A展示研發用於反義遞送之計算上衍生之肽序列的工作流方案，以及基於測試組之模型的效能量度。**圖2B**展示五個預測PMO載體(PPC)及兩個預測陰性序列(NS)之圖表(依出現順序分別為SEQ ID NO: 66-72)。**圖2C**展示用含血清培養基中之PPC及NS中之每一者以5 μ M之濃度處理的eGFP HeLa細胞之平均螢光強度。

圖3A展示溫度對PPC之攝取的影響。**圖3B**展示細胞鬆弛素D對PPC之攝取的影響。

【實施方式】

【0009】

相關申請案之交叉參考

本申請案主張2017年10月17日申請之美國臨時申請案第62/573,379號之權益，該臨時申請案以全文引用之方式併入本文中。

【0010】 許多醫藥學活性化合物(諸如蛋白質及核酸)之有效胞內遞送為藥物遞送領域中之一項突出挑戰。許多較巨大分子不能跨越質膜，且通常最終被截留在核內體中且在溶酶體中降解。在過去的幾十年，已開發出多個途徑以促進較巨大分子之胞溶質遞送，包括用高密度電荷使分子增壓，使分子與諸如脂質體或奈米粒子之遞送媒劑複合，及與細胞穿透肽結合。

【0011】 由於發現來自HIV-1之反活化轉錄活化劑(TAT)之二十個胺

基酸片段使得蛋白質跨越質膜，據報導數百細胞穿透肽(CPP)提高進入細胞質。此等肽衍生自許多天然源，諸如病毒蛋白、DNA結合蛋白、信號肽及抗菌生物肽。另外，CPP已經合理地設計且自DNA編碼之肽庫中識別。CPP序列呈現各種各樣的物理化學性質且介於高度陽離子性至兩親性至疏水性的範圍內。為證實肽為細胞穿透肽，傳統的實驗已包括流式細胞測量術及使用螢光團標記之CPP的活細胞共焦成像(參見例如圖1A、圖1B、圖1C、圖1D、圖1E及圖2C)。雖然此等實驗提供細胞穿透之證據，但其未能解決CPP是否適用於遞送特定巨分子貨物之問題。儘管如此，但CPP已用以改良肽、酶、抗體、寡核苷酸、奈米粒子及化學治療劑之細胞遞送。

【0012】 CPP之一個有前景的應用為遞送二胺基磷酸酯嗎啉基寡核苷酸(phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides；PMO)。PMO為中性電荷的反義治療劑，其中核糖經亞甲基嗎啉環替換且磷酸二酯主鏈經二胺基磷酸酯主鏈替換。PMO結合至前mRNA且可經由被稱為「外顯子跳躍」之方法改變基因剪接。近年來，PMO伊特普森(Eteplirsen)變成藉由肌縮蛋白基因之跳躍外顯子51治療杜興氏肌肉萎縮症(Duchenne muscular dystrophy；DMD)之根本遺傳性病因的第一且唯一經FDA審批通過之療法。

【0013】 儘管諸如伊特普森之PMO治療劑顯示重要的前景，但由於胞內遞送有限，所需劑量通常為每週多公克。在CPP與PMO之間產生結合已為提高遞送之一個有效途徑。O'Donovan等人已查看十六種不同CPP-PMO結合物之適中庫且Moulton等人已識別出已改良用於DMD之PMO貨物之遞送的富含精胺酸肽。然而，尚未對促進PMO遞送之CPP特徵進行系

統性研究。

【0014】 本文提供包含共價鍵結至細胞穿透肽之寡核苷酸的肽-寡核苷酸結合物。本發明亦提供治療有需要之受試者之疾病的方法，其包含向受試者投與本文中所描述之肽-寡核苷酸結合物。本文所描述之寡核苷酸及由此肽-寡核苷酸結合物顯示相對於原生寡核苷酸或未修飾寡核苷酸對於DNA及RNA之更強親和性而不損害序列選擇性。在一些實施例中，本發明之寡核苷酸使由RNase H之裂解降至最低或防止RNase H之裂解。在一些實施例中，本發明之反義寡核苷酸不活化RNase H。

【0015】 本文所描述之肽賦予其對應肽-寡核苷酸結合物：降低毒性、增強寡核苷酸之活性、改良藥物動力學及組織分佈、改良細胞遞送，且賦予可信賴的活體內分佈及可控制的活體內分佈兩者。

【0016】

定義

下文列舉用於描述本發明之各種術語之定義。此等定義適用於術語，因為其單獨地或作為較大群組的一部分而用於整個本說明書及申請專利範圍中，除非在特定情況下以其他方式加以限制。

【0017】 術語「約(about)」應為一般熟習此項技術者理解，且將在其使用之上下文中在一定程度上變化。如本文所使用，當提及可量測值，諸如量、持續時間及其類似者時，術語「約」意謂涵蓋自指定值之 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ (包括 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 及 $\pm 0.1\%$)之變化，因此變化係適於執行所揭示之方法。

【0018】 術語「烷基(alkyl)」係指在某些實施例中分別地含有一個至六個碳原子或一個至八個碳原子之飽和烴部分、直鏈烴部分或分支鏈烴

部分。C₁₋₆烷基部分之實例包括(但不限於)甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、第三丁基、新戊基、正己基部分；且C₁₋₈烷基部分之實例包括(但不限於)甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、第三丁基、新戊基、正己基、庚基及辛基部分。

【0019】 烷基取代基中之碳原子數目可由前綴「C_{x-y}」指示，其中x為取代基中碳原子之最小數目且y為最大數目。同樣，C_x鏈意謂含有x個碳原子之烷基鏈。

【0020】 除非另外陳述，否則本身或與另一術語組合的術語「雜烷基」意謂由所陳述數目之碳原子及一個或兩個選自由O、N及S組成之群之雜原子組成的穩定直鏈或分支鏈烷基，且其中氮及硫原子可視情況經氧化且氮雜原子可視情況經四級銨化。該等雜原子可置放於雜烷基之任何位置處，包括在雜烷基之其餘部分與其所附接至之片段之間，以及附接至雜烷基中之最遠端碳原子。實例包括：-O-CH₂-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-CH₂-OH、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃及-CH₂-CH₂-S(=O)-CH₃。至多兩個雜原子可為連續的，諸如-CH₂-NH-OCH₃或-CH₂-CH₂-S-S-CH₃。

【0021】 除非另外陳述，否則單獨或與其他術語組合使用之術語「芳基」意謂含有一或多個環(通常一個、兩個或三個環)之碳環芳族系統，其中此類環可以側接方式附接在一起(諸如聯苯)或可經稠合(諸如萘)。芳基之實例包括苯基、萘基及蒽基。在各種實施例中，芳基之實例可包括苯基(例如，C₆芳基)及聯苯基(例如，C₁₂芳基)。在一些實施例中，芳基具有六個至十六個碳原子。在一些實施例中，芳基具有六個至十二個碳原子(例如，C₆₋₁₂芳基)。在一些實施例中，芳基具有六個碳原子(例如，C₆芳基)。

【0022】如本文所使用，術語「雜芳基(heteroaryl或 heteroaromatic)」係指具有芳族特徵之雜環。雜芳基取代基可由碳原子數定義，例如C₁₋₉雜芳基指示雜芳基中包括之碳原子數而不包括雜原子數。舉例而言，C₁₋₉雜芳基將包括額外一個至四個雜原子。多環雜芳基可包括一或多個部分飽和之環。雜芳基之非限制性實例包括：吡啶基、吡嗪基、嘧啶基(包括例如2-嘧啶基及4-嘧啶基)、噻嗪基、噻吩基、呋喃基、吡咯基(包括例如2-吡咯基)、咪唑基、噻唑基、噁唑基、吡唑基(包括例如3-吡唑基及5-吡唑基)、異噻唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,3,4-三唑基、四唑基、1,2,3-噻二唑基、1,2,3-噁二唑基、1,3,4-噻二唑基及1,3,4-噁二唑基。

【0023】多環雜環及雜芳基之非限制性實例包括吡啶基(包括例如3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基及7-吡啶基)、二氫吡啶基、喹啉基、四氫喹啉基、異喹啉基(包括例如1-異喹啉基及5-異喹啉基)、1,2,3,4-四氫異喹啉基、吡啶基、喹啉基(包括例如2-喹啉基及5-喹啉基)、喹唑啉基、酞嗪基、1,8-萘啶基、1,4-苯并二噁烷基、香豆素(coumarin)、二氫香豆素、1,5-萘啶基、苯并呋喃基(包括例如3-苯并呋喃基、4-苯并呋喃基、5-苯并呋喃基、6-苯并呋喃基及7-苯并呋喃基)、2,3-二氫苯并呋喃基、1,2-苯并異噁唑基、苯并噻吩基(包括例如3-苯并噻吩基、4-苯并噻吩基、5-苯并噻吩基、6-苯并噻吩基及7-苯并噻吩基)、苯并噁唑基、苯并噻唑基(包括例如2-苯并噻唑基及5-苯并噻唑基)、嘌呤基、苯并咪唑基(包括例如2-苯并咪唑基)、苯并三唑基、硫代黃嘌呤基、呋唑基、呋啉基、吡啶基、吡咯聯啶基及噻嗪基。

【0024】術語「保護基」或「化學保護基」係指封閉化合物之一些

或所有反應性部分且防止此類部分參與化學反應的化學部分直至去除保護基，例如T.W. Greene, P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第3版. John Wiley & Sons (1999)中所列舉且描述之彼等部分。其可為有利的(在採用不同保護基團之情況下)，每一(不同)保護基為藉由不同方式可去除的。在完全不同反應條件下裂解之保護基允許此類保護基之差異去除。舉例而言，保護基可藉由酸、鹼及氫解來去除。諸如三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、縮醛及第三丁基二甲基矽烷基之基團為酸不穩定的且可用於在經Cbz基團(其可經氫解去除)及Fmoc基團(其為鹼不穩定的)保護之胺基存在下保護羧基及羥基反應性部分。羧酸部分可用諸如(但不限於)甲基或乙基之鹼不穩定基團來封閉，且羥基反應性部分可在用酸不穩定基團(諸如，胺基甲酸第三丁酯或均為酸及鹼穩定但可水解去除之胺基甲酸酯)封閉之胺存在下用諸如乙醯基之鹼不穩定基團來封閉。

【0025】 羧酸反應性部分及羥基反應性部分亦可用諸如苯甲基之可水解去除保護基團封閉，而胺基可用諸如Fmoc之鹼不穩定基團封閉。用於合成式(I)之化合物之尤其有用胺保護基為三氟乙醯胺。羧酸反應性部分可用諸如2,4-二甲氧基苯甲基之氧化可去除保護基封閉，而共存胺基可用氟不穩定胺基甲酸矽烷酯封閉。

【0026】 烯丙基封閉基團適用於酸保護基及鹼保護基存在下，由於前者穩定且隨後可藉由金屬或 π -酸(π -acid)催化劑去除。舉例而言，封閉烯丙基之羧酸可用鈹(0)催化之反應在酸不穩定之胺基甲酸第三丁酯或鹼不穩定之乙酸酯胺保護基存在下脫除保護基。保護基之又一個形式為化合物或中間物可附接之樹脂。只要殘餘物附接至樹脂，則官能基經封閉且不

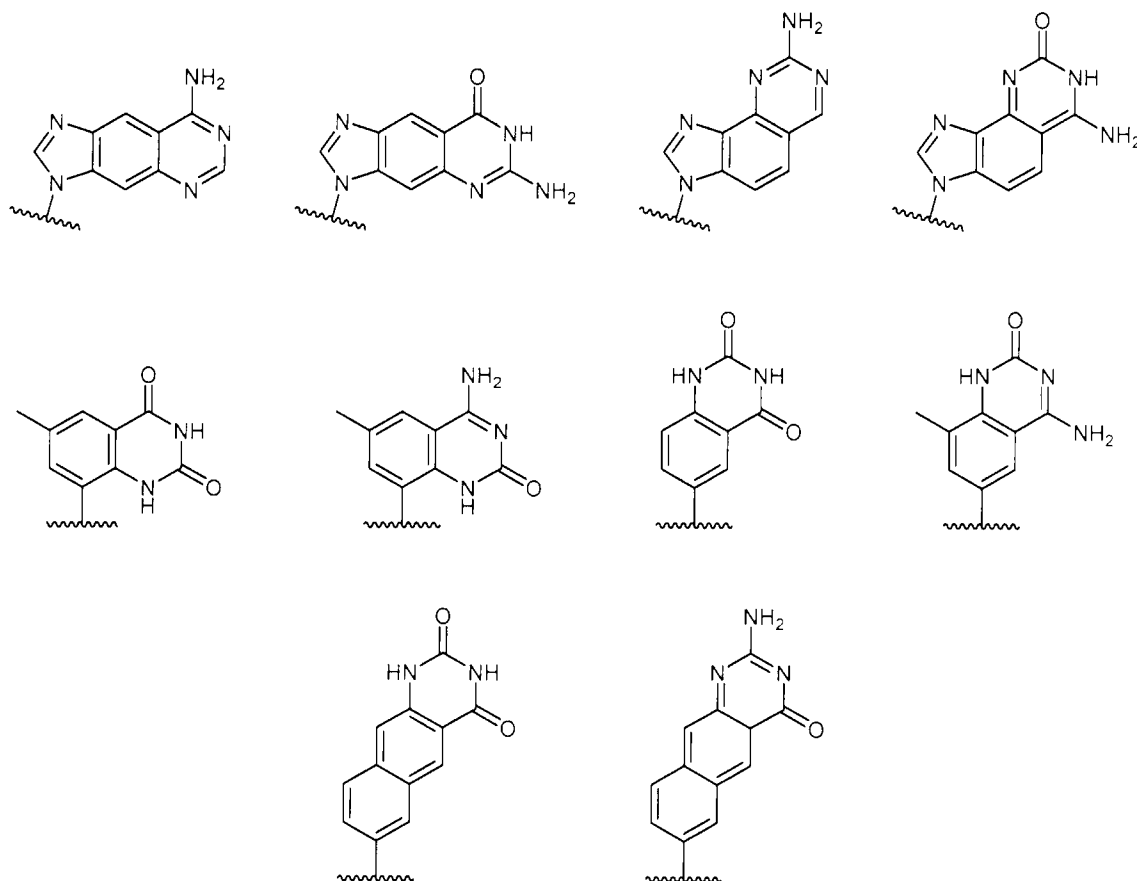
能反應。一旦自樹脂釋放，官能基可用於反應。

【0027】術語「核鹼基」、「鹼基配對部分(base-pairing moiety)」、「核鹼基配對部分(nucleobase-pairing moiety)」或「鹼」係指核苷、核苷酸及/或嗎啉基亞基之雜環部分。核鹼基可為天然存在核鹼基或可為經修飾之核鹼基或此等天然存在核鹼基之類似物，例如，核鹼基之一或多個氮原子可在每次出現時獨立地經碳置換。例示性類似物包括：次黃嘌呤(核苷肌苷之鹼基組分)、2,6-二氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、經C5-丙炔基修飾之嘧啶、10-(9-(胺基乙氧基)啡噁嗪基)(G形夾)及其類似者。

【0028】鹼基配對部分之另外實例包括(但不限於)：尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤及使其各別胺基藉由鹼基保護基保護之次黃嘌呤(肌苷)、2-氟尿嘧啶、2-氟胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、氮雜胞嘧啶、諸如假異胞嘧啶及假尿嘧啶之嘧啶類似物及諸如8-經取代嘌呤、黃嘌呤或次黃嘌呤(後兩者為天然降解產物)之其他經修飾之核鹼基。亦涵蓋揭示於Chiu及Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048, Limbach等人，Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196以及 Revankar及Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, 第7卷, 313 中之經修飾之核鹼基，其內容以引用之方式併入本文中。

【0029】鹼基配對部分之另外實例包括(但不限於)其中已添加一或多個苯環之大小經擴增之核鹼基。涵蓋描述於Glen Research catalog(www.glenresearch.com)；Krueger AT等人，Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150；Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943；Benner S.A.等人，Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543；Romesberg, F.E. 等人, Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733；Hirao, I., Curr. Opin.

Chem. Biol., 2006, 10, 622-627 (其內容以引用之方式併入本文中)中之核鹼基替代作為適用於合成本文所描述之寡聚物。大小經擴增之核鹼基之實例展示如下：



【0030】術語「寡核苷酸」或「寡聚物」係指包含複數個經連接核苷、核苷酸或核苷及核苷酸兩者之組合的化合物。在本文所提供之具體實施例中，寡核苷酸為嗎啉基寡核苷酸。

【0031】片語「嗎啉基寡核苷酸」或「PMO」係指藉由胺基磷酸酯鍵或二胺基磷酸酯鍵使嗎啉基亞基連接在一起、一個亞基之嗎啉基氮接合至鄰近亞基之5'-環外碳之經修飾之寡核苷酸。各嗎啉基亞基包含藉由核鹼基特異性氫鍵有效地與靶標中之核鹼基結合之核鹼基配對部分。

【0032】術語「反義寡聚物」、「反義化合物」及「反義寡核苷酸」可互換地使用，且指代允許鹼基配對部分與核酸(通常RNA)中之靶標序列

藉由Watson-Crick鹼基配對雜交以形成核酸：在靶標序列內之寡聚物異雙螺旋的亞基(各攜帶有藉由亞基間鍵連接之鹼基配對部分)之序列。寡聚物可具有與靶標序列準確(完美的)互補序列或幾乎(充分)互補序列，靠近寡聚物末端之序列變化一般比內部中之變化更佳。

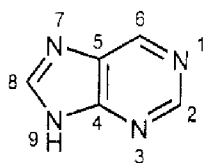
【0033】 此類反義寡聚物可經設計以阻斷或抑制mRNA之轉譯或抑制/更改天然或異常前mRNA剪接過程，且可稱為「針對於」或「靶向於」與其雜交之靶標序列。靶標序列通常為包括mRNA、轉譯遏制寡聚物之AUG起始密碼子或預處理mRNA、剪接遏制寡聚物(SSO)之剪接位點的區域。用於剪接位點之靶標序列可包括具有經預處理之mRNA中之正常剪接受體點之下游其5'端1至約25個鹼基對的mRNA序列。在各種實施例中，靶標序列可為經預處理之mRNA之任何區域，該mRNA包括剪接位點或完全含於外顯子編碼序列內或跨越剪接受體位點或供體位點。寡聚物更一般化地稱為「靶向針對」生物學相關靶標(諸如，蛋白質、病毒或細菌)，當其以上文所描述之方式靶向針對靶標之核酸時。

【0034】 當每一分子中之足夠數目個對應位置由可彼此經氫結合之核苷酸佔據時，反義寡核苷酸及靶標RNA彼此互補，使得穩定結合及特異性結合發生在寡核苷酸與靶標之間。因此，「可特異性雜交」及「互補」為用於指示互補或精確配對之充分程度使得穩定結合及特異性結合發生在寡核苷酸與靶標之間的術語。在此項技術中應理解，寡核苷酸之序列不需要與其可特異性雜交之靶標序列100%互補。當寡核苷酸與靶標分子之結合用靶標RNA之正常功能干擾時，寡核苷酸可特異性雜交，且存在充分互補之程度以避免反義寡核苷酸與非靶標序列在需要特異性結合之條件下(亦即，在生理學條件下，在活體內檢定或治療性處理之情況下及在

活體外檢定之情況下，在執行檢定之條件下)之非特異性結合。

【0035】寡核苷酸亦可包括核鹼基(此項技術中通常簡稱為「鹼基」)修飾或取代。含有經修飾之或經取代之鹼基之寡核苷酸包括寡核苷酸，該等寡核苷酸中一或多種最常發現於核酸中之嘌呤鹼基或嘧啶鹼基用較少常用或非天然鹼基替換。在一些實施例中，核鹼基在嘌呤鹼基之N9原子處或在嘧啶鹼基之N1原子處共價連接至核苷酸或核苷之嗎啉環。

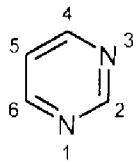
【0036】嘌呤鹼基包含稠合於咪唑環之嘧啶環，如藉由通式所描述：



嘌呤

【0037】腺嘌呤及鳥嘌呤為最常發現於核酸中之兩種嘌呤核鹼基。此等可經其他天然存在之嘌呤(包括但不限於，N6-甲基腺嘌呤、N2-甲基鳥嘌呤、次黃嘌呤及7-甲基鳥嘌呤)取代。

【0038】嘧啶鹼基包含六員嘧啶環，如藉由通式所描述：



嘧啶

【0039】胞嘧啶、尿嘧啶及胸腺嘧啶為最常發現於核酸中之嘧啶鹼基。此等可經其他天然存在之嘧啶(包括但不限於，5-甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶、假尿嘧啶及4-硫尿嘧啶)取代。在一個實施例中，本文所描述之寡核苷酸含有代替尿嘧啶之胸腺嘧啶鹼基。

【0040】其他經修飾或經取代之鹼基包括(但不限於)2,6-二胺基嘌

呤、乳清酸(orotic acid)、阿格嗎特啉(agmatidine)、賴西啉(lysidine)、2-硫代嘧啶(例如2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶)、G形夾及其衍生物、5-經取代嘧啶(例如5-鹵代尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-胺基甲基尿嘧啶、5-羥甲基尿嘧啶、5-胺基甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶、Super T)、7-去氮鳥嘌呤、7-去氮腺嘌呤、7-氮雜-2,6-二胺基嘌呤、8-氮雜-7-去氮鳥嘌呤、8-氮雜-7-去氮腺嘌呤、8-氮雜-7-去氮-2,6-二胺基嘌呤、Super G、Super A，及N4-乙基胞嘧啶或其衍生物；N2-環戊基鳥嘌呤(cPent-G)、N2-環戊基-2-胺基嘌呤(cPent-AP)及N2-丙基-2-胺基嘌呤(Pr-AP)、假尿嘧啶或其衍生物；以及簡併或通用鹼基，如2,6-二氟甲苯或不存在鹼，如無鹼基位點(例如1-去氧核苷、1,2-二去氧核糖、1-去氧-2-O-甲基核糖；或其中環氧已經氮置換之吡咯啉衍生物(氮雜核糖))。假尿嘧啶為尿嘧啶之天然存在之異構化型式，其在尿苷中具有C-糖苷而非非常規N-糖苷。

【0041】 某些經修飾或經取代核鹼基特別適用於增加本發明之反義寡核苷酸之結合親和性。此等核鹼基包括在5-經取代之嘧啶、6-氮雜嘧啶及在N-2、N-6及0-6經取代之嘌呤，其包括2-胺基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶及5-丙炔基胞嘧啶。在各種實施例中，核鹼基可包括5-甲基胞嘧啶取代，已展示該等取代增加核酸雙螺旋穩定性0.6°C至1.2°C。

【0042】 在一些實施例中，經修飾或經取代之核鹼基適用於便於反義寡核苷酸之純化。舉例而言，在某些實施例中，反義寡核苷酸可含有三個或更多個(例如，3、4、5、6或更多個)連續鳥嘌呤鹼基。在某些反義寡核苷酸中，一串三個或更多個連續鳥嘌呤鹼基可引起寡核苷酸之凝聚，使純化複雜。在此類反義寡核苷酸中，連續鳥嘌呤中之一或多者可經次黃嘌呤

呤取代。用於一串三個或更多個連續鳥嘌呤鹼基中之一或多個鳥嘌呤之次黃嘌呤之取代可降低反義寡核苷酸之凝聚，由此便於純化。

【0043】 本文提供之寡核苷酸經合成且不包括生物學來源之反義組合物。本發明之分子亦可與其他分子、分子結構或化合物之混合物(例如，脂質體、受體靶向分子、經口調配物、直腸調配物、局部調配物或其他調配物)混合、囊封、結合或以其他方式聯合使用，以用於輔助攝取、分佈或吸收或其組合。

【0044】 術語「互補(complementary)」及「互補性(complementarity)」係指藉由鹼對法則(base-pairing rules)具有相關之寡核苷酸(亦即，核苷酸序列)。舉例而言，序列「T-G-A (5'-3')」與序列「T-C-A (5'-3')」互補。互補性可為「部分的」，其中僅一些核酸之鹼基係會根據鹼對法則匹配。或，核酸之間可存在「完全」、「總體」或「完美」(100%)的互補。核酸股間之互補程度對核酸股間雜交之效率及強度具有顯著影響。雖然通常期待完美的互補，但關於標靶RNA的一些實施例則可包括一或多個(但較佳地6、5、4、3、2或1個)錯配。此類雜交係反義寡聚物與標靶序列以「幾乎」或「實質上」互補以及準確互補狀態下發生。在一些實施例中，寡聚物與靶標序列以約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%互補性進行雜交。寡聚物內任何位置處都可包括變化。在某些實施例中，靠近寡聚物末端之序列變化通常優於寡聚物內部之變化，且如果係存在通常在5'-端、3'-端或兩個末端之約6、5、4、3、2或1個核苷酸內。

【0045】 術語「肽」係指包含複數個經連接胺基酸之化合物。本文所提供之肽被認為是細胞穿透肽。

【0046】術語「細胞穿透肽」及「CPP」可互換地使用，且係指陽離子型細胞穿透肽，亦稱為轉運肽、載體肽或肽轉導結構域。本文所提供之肽具有誘導細胞穿透至特定細胞培養群體100%細胞中之性能且致使經全身投與後在活體內之多個組織內的大分子移位。在各種實施例中，本發明之CPP實施例包括如下文進一步描述之富含精胺酸的肽。

【0047】術語「治療」係指使用於改善疾病之一或多個特異性程序的應用。在某些實施例中，特異性程序係投與一或多種醫藥劑。個體(例如，哺乳動物，諸如人類)或細胞之「治療」為用於試圖更改個體或細胞之天然病程之任何類型的干預。治療包括(但不限於)投與醫藥組合物，且可以預防性執行或在病理性事件之初始或接觸病原體之後執行。治療包括對疾病或病況之症狀或病變之任何所期待的效果，且可包括例如被治療之疾病或病況之一或多個可量測標記中之極小改變或改善。本發明亦包括「預防性」治療，其可針對降低被治療疾病或病況之進程速率，延緩疾病或病況之發作或降低其發作之嚴重性。

【0048】「有效量」或「治療有效量」係指呈單次劑量或以一系列劑量之部分投與哺乳動物受試者治療性化合物(諸如，反義寡聚物)之一定量，該量有效地產生所期待的治療性效果。

【0049】術語「改善」意謂減輕至少一個病況或疾病指標之嚴重性。在某些實施例中，改善包括延遲或減緩一或多個病況或疾病指標之進程。指標之嚴重程度可藉由熟習此項技術者已知之主觀量測或客觀量測來測定。

【0050】如本文所使用，「醫藥學上可接受之鹽」係指所揭示寡核苷酸之衍生物，其中母體寡核苷酸係藉由將現有酸或鹼部分轉換為其鹽形

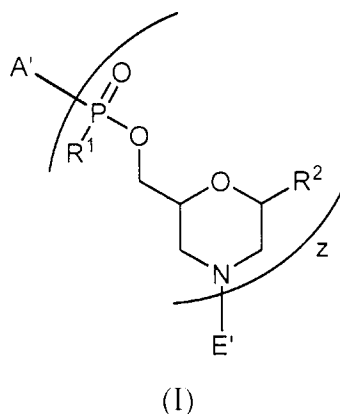
式而經修飾。適合之鹽之清單可見於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, 第1418頁及Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), 其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。

【0051】

肽-寡核苷酸結合物

本文提供以化學方式鍵聯至細胞穿透肽之寡核苷酸。細胞穿透肽會增強寡核苷酸之活性、細胞分佈或細胞攝取。特定言之，細胞穿透肽為直鏈或非環狀肽。在一些實施例中，CPP為富含精胺酸之肽。寡核苷酸可另外以化學方式鍵聯至一或多個雜烷基部分(例如，聚乙二醇)，該等雜烷基部分進一步增強寡核苷酸之活性、細胞分佈或細胞攝取。在一個例示性實施例中，例如富含精胺酸之多肽地多肽在其N端或C端殘基處共價連接至寡核苷酸之任一端或兩個端。

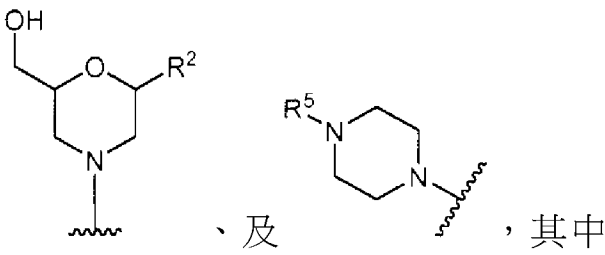
【0052】 因此，在一個態樣中，本發明提供式I之肽-寡核苷酸結合物：



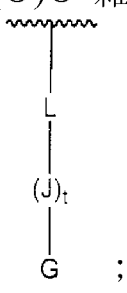
或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

A'選自-NHCH₂C(O)NH₂、-N(C₁₋₆-烷基)CH₂C(O)NH₂、



R^5 為 $-C(O)(O\text{-烷基})_x\text{-OH}$ ，其中 x 為3-10且各烷基在每次出現時獨立地為 C_{2-6} 烷基，或 R^5 選自 $-C(O)C_{1-6}$ 烷基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、 $-(C_{1-6}\text{-烷基})R^6$ 、 $-(C_{1-6}\text{-雜烷基})\text{-}R^6$ 、芳基- R^6 、雜芳基- R^6 、 $-C(O)O\text{-}(C_{1-6}\text{-烷基})\text{-}R^6$ 、 $-C(O)O\text{-芳基}\text{-}R^6$ 、 $-C(O)O\text{-雜芳基}\text{-}R^6$ ，及



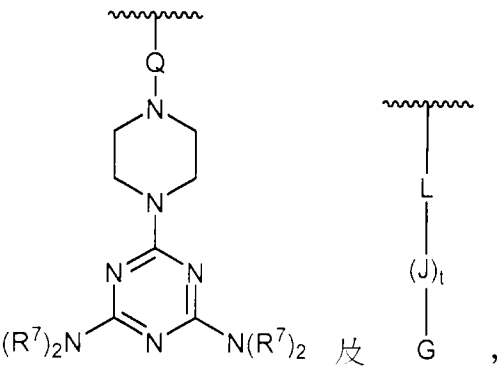
其中 R^6 選自OH、SH及 NH_2 ，或 R^6 為共價連接至固體撐體之O、S或NH；

各 R^1 獨立地選自OH及 $-NR^3R^4$ ，其中各 R^3 及 R^4 在每次出現時獨立地為 $-C_{1-6}$ -烷基；

各 R^2 獨立地選自H、核鹼基及經化學保護基團官能化之核鹼基，其中核鹼基在每次出現時獨立地包含選自吡啶、嘧啶、三嗪、嘌呤及去氮-嘌呤之 C_{3-6} -雜環；

z 為8至40；且

E' 選自H、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)C_{1-6}$ 烷基、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、三甲氧基三苯甲基、



其中

Q為-C(O)(CH₂)₆C(O)-或-C(O)(CH₂)₂S₂(CH₂)₂C(O)-，且

R⁷為-(CH₂)₂OC(O)N(R⁸)₂，其中R⁸為-(CH₂)₆NHC(=NH)NH₂，且

其中L藉由醯胺鍵共價連接至J之胺基端，且L為-C(O)(CH₂)₁₋₆-C₁₋₆-雜芳基-(CH₂)₁₋₆C(O)；

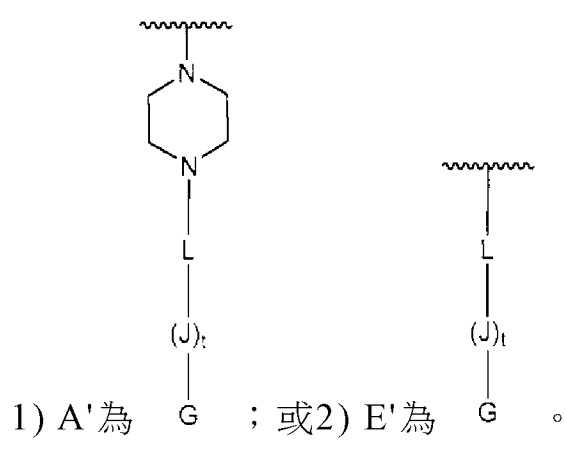
t為5至27；

各J在每次出現時獨立地選自由以下組成之群：精胺酸、甘胺酸、白胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸、離胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、脯胺酸、纈胺酸、異白胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、組胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸及蘇胺酸；

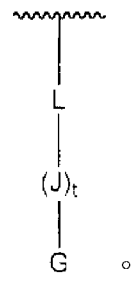
其中至少一個J為精胺酸；

G藉由醯胺鍵共價連接至J之羧基端，且G選自H、-C(O)C₁₋₆-烷基、苯甲醯基及硬脂醯基；且

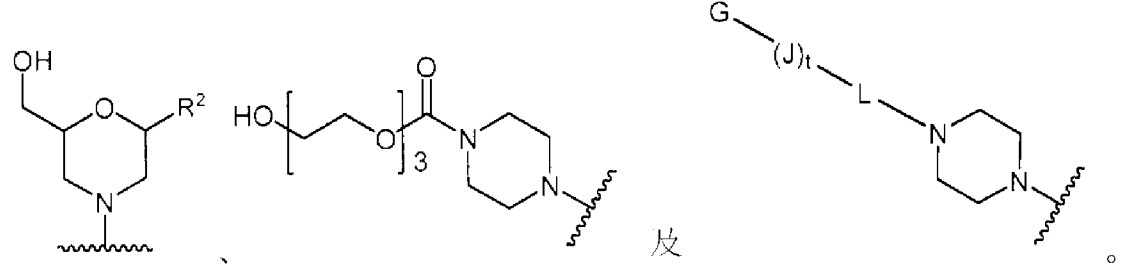
其中以下條件中之至少一者為真實的：



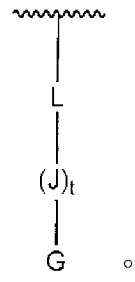
【0053】 在一個實施例中，E'選自H、-C₁₋₆-烷基、-C(O)C₁₋₆-烷基、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、三甲氧基三苯甲基，及



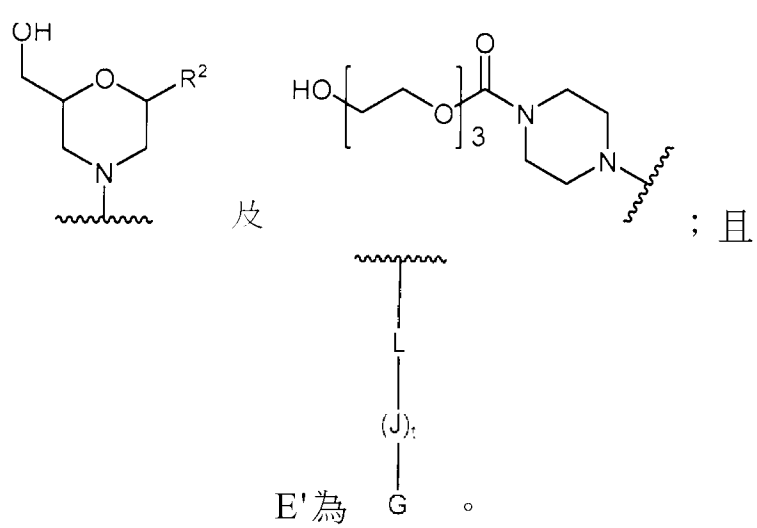
【0054】 在又另一實施例中，A'選自-N(C₁₋₆-烷基)CH₂C(O)NH₂、



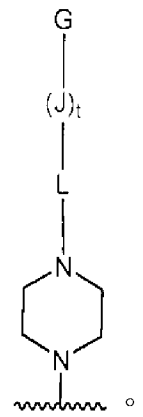
【0055】 在另一實施例中，E'選自H、-C(O)CH₃、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基，及



【0056】 在再一實施例中，A'選自-N(C₁₋₆-烷基)CH₂C(O)NH₂、



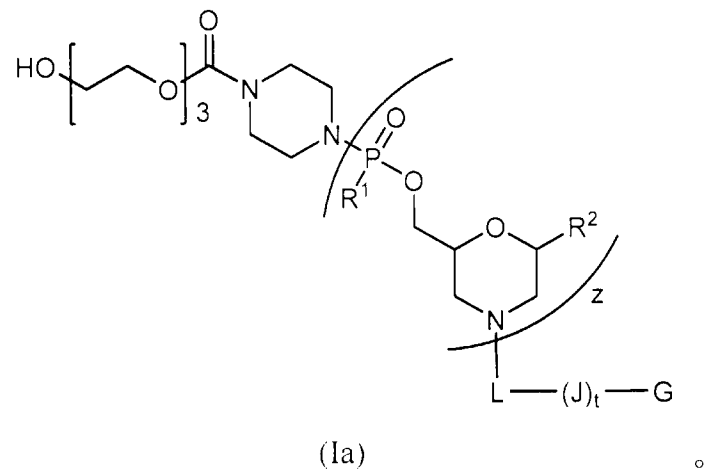
【0057】 在又另一實施例中，A' 為



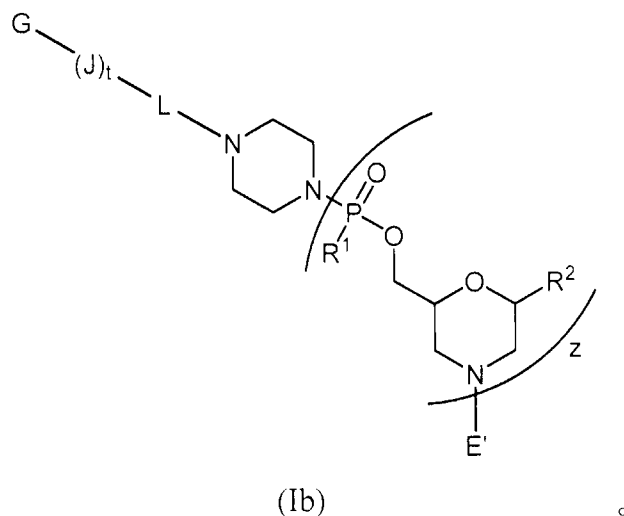
【0058】 在另一實施例中，E' 選自H、-C(O)CH₃、三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基、苯甲醯基及硬脂醯基。

【0059】 在又另一實施例中，E' 選自H及-C(O)CH₃。

【0060】 在再一實施例中，式I之肽-寡核苷酸結合物為式Ia之肽-寡核苷酸結合物：



【0061】 在另一實施例中，式I之肽-寡核苷酸結合物為式Ib之肽-寡核苷酸結合物：



【0062】 在式I及Ib之一實施例中，E'選自H、C₁₋₆烷基、-C(O)CH₃、苯甲醯基及硬脂醯基。

【0063】 在式I及Ib之另一實施例中，E'選自H及-C(O)CH₃。

【0064】 在式I、Ia及Ib之一實施例中，各J獨立地選自甘胺酸、丙胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、離胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、脯胺酸、纈胺酸、精胺酸及蘇胺酸。

【0065】 在式I、Ia及Ib之另一實施例中，各J獨立地選自精胺酸、離胺酸及麩醯胺酸。

【0066】 在式I、Ia及Ib之另一實施例中，各J獨立地選自甘胺酸、白胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、甲硫胺酸、色胺酸、麩醯胺酸、脯胺酸、離胺酸、精胺酸及纈胺酸。

【0067】 在式I、Ia及Ib之另一實施例中，各J獨立地選自精胺酸、異白胺酸、脯胺酸、白胺酸、苯丙胺酸及甘胺酸。

【0068】 在式I、Ia及Ib之再一實施例中，各J獨立地選自甘胺酸、精胺酸、脯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、離胺酸及白胺酸。

【0069】 在式I、Ia及Ib之又另一實施例中，各J獨立地選自丙胺酸、白胺酸、色胺酸、離胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、脯胺酸及精胺酸。

【0070】 在式I、Ia及Ib之再一實施例中，各R¹為N(CH₃)₂。

【0071】 在式I、Ia及Ib之又另一實施例中，各R²為核鹼基，其中核鹼基在每次出現時獨立地包含選自吡啶、嘧啶、三嗪、嘌呤及去氮-嘌呤之C₄₋₆雜環。

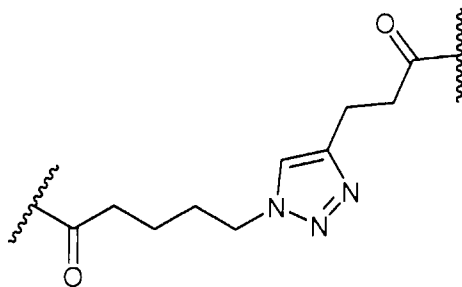
【0072】 在式I、Ia及Ib之又另一實施例中，各R²為核鹼基，其中核鹼基在每次出現時獨立地包含選自嘧啶、嘌呤及去氮嘌呤之C₄₋₆雜環。

【0073】 在式I、Ia及Ib之再一實施例中，各R²為在每次出現時獨立地選自以下之核鹼基：腺嘌呤、2,6-二胺基嘌呤、7-去氮腺嘌呤、鳥嘌呤、7-去氮鳥嘌呤、次黃嘌呤、胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶及次黃嘌呤。

【0074】 在式I、Ia及Ib之又另一實施例中，各R²為在每次出現時獨立地選自以下之核鹼基：腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶及次黃嘌呤。

【0075】 在式I、Ia及Ib之另一實施例中，L為-C(O)(CH₂)₁₋₆-三唑-(CH₂)₁₋₆C(O)-。

【0076】 在式I、Ia及Ib之另一實施例中，L為



【0077】 在式I、Ia及Ib之另一實施例中，G選自H、C(O)CH₃、苯甲醯基及硬脂醯基。

【0078】在式I、Ia及Ib之再一實施例中，G為H或-C(O)CH₃。

【0079】在式I、Ia及Ib之又另一實施例中，G為H。

【0080】在式I、Ia及Ib之又另一實施例中，G為-C(O)CH₃。

【0081】在式I、Ia及Ib之另一實施例中，J為RRRRRRRRRRRRR
(SEQ ID NO: 1)、GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO:
2)、RRIRPRPPRLPRPRPRPLPFPRPG (SEQ ID NO: 3)、RKKRRQRRR
(SEQ ID NO: 4)、RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 5)、
GRPRESGKKRKRRLKP (SEQ ID NO: 6)、
ALWKTLLKKVLKAPKKKKRKV (SEQ ID NO: 7)、RRIPNRRPRR (SEQ ID
NO: 8)、TRRQRTRRARRNR (SEQ ID NO: 9)、
HARIKPTFRRLKWKYKGKFW (SEQ ID NO: 10)、
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (SEQ ID NO: 11)、
LRRERQSRLRRERQSR (SEQ ID NO: 12)、RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO:
13)、RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 14)、
KRARNTEAARRSRARKLQRMKQ (SEQ ID NO: 15)、
RHIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 16)、RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO:
17)、KMTRAQRRAAARRNRWTAR (SEQ ID NO: 18)、
RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO: 19)、KQINNWFINQRKRHWK
(SEQ ID NO: 20)、KLWMRWYSPTRRYG (SEQ ID NO: 21)、
RRWWRRWRR (SEQ ID NO: 22)、SQIKIWFQNKRAKIKK (SEQ ID NO:
23)、GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 24)、
TRRNKRNRRIQEQLNRK (SEQ ID NO: 25)、GKRKKKGKLGKKRDP (SEQ
ID NO: 26)、RQVTIWFQNRRVKEKK (SEQ ID NO: 27)、RLRWR (SEQ ID
NO: 28)、PPRPPRPPRPPRPPR (SEQ ID NO: 29)、CAYHRLRRC (SEQ ID
NO: 30)、SRRARRSPRHLGSG (SEQ ID NO: 31)、PPRPPRPPRPPR (SEQ
ID NO: 32)、NAKTRRHERRRKLAIER (SEQ ID NO: 33)、
VKRGLKLRHVRPRVTRMDV (SEQ ID NO: 34)、
LYKKGPAKKGRPPLRGWFH (SEQ ID NO: 35)、
TAKTRYKARRAELIAERR (SEQ ID NO: 36)、KGTYKKKLMRIPLKGT
(SEQ ID NO: 37)、PPRPPRPPR (SEQ ID NO: 38)、
RASKRDGSWVKKLHRILE (SEQ ID NO: 39)、

TRSSRAGLQWPVGRVHRLLRK (SEQ ID NO: 40) 、
FKIYDKKVRTRVVKH (SEQ ID NO: 41) 、VRLPPPVRLLLLPPPVRLPPP (SEQ
ID NO: 42) 、GPFHFYQFLFPPV (SEQ ID NO: 43) 、PLILLRLLRGQF (SEQ
ID NO: 44) 、YTAIAWVKAFIRKLRLK (SEQ ID NO: 45) 、
KETWWETWWTEWSQPKKRKV (SEQ ID NO: 46) 、
LIRLWSHLIHIWFQNRRLKWKKK (SEQ ID NO: 47) 、
VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN (SEQ ID NO: 48) 、
MDAQTRRRERRAEKQAQWKAAN (SEQ ID NO: 49) 、
GSPWGLQHHPRT (SEQ ID NO: 50) 、KLALKALKALKAALKLA (SEQ
ID NO: 51) 、IPALK (SEQ ID NO: 52) 、VPALR (SEQ ID NO: 53) 、
LLIILRRRIRKQAHAAHSK (SEQ ID NO: 54) 、IAWVKAFIRKLRLKGPLG
(SEQ ID NO: 55) 、AAVLLPVLLAAPVQRKRQKLP (SEQ ID NO: 56) 、
TSPLNIHNGQKL (SEQ ID NO: 57) 、VPTLK (SEQ ID NO: 58)或VSALK
(SEQ ID NO: 59)。

【0082】在式I、Ia及Ib之又一實施例中，J為RRRRRRRRRRRRR
(SEQ ID NO: 1)、GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID
NO: 2)、RRIRPRPPRLPRPRPLPFPRPG (SEQ ID NO: 3)、
RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4)、RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 5)、
GRPRESGKKRKRRLKP (SEQ ID NO: 6)、
ALWKTLLKKVLKAPKKRKV (SEQ ID NO: 7)、RRIPNRRPRR (SEQ ID
NO: 8)、TRRQRTRRARRNR (SEQ ID NO: 9)、
HARIKPTFRRLKWKYKGKFW (SEQ ID NO: 10)、
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (SEQ ID NO: 11)、
LRRERQSRLRRERQSR (SEQ ID NO: 12)、RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO:
13)、RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 14)、
KRARNTEAARRSRARKLQRMKQ (SEQ ID NO: 15)、
RHIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 16)、RRRRRRRRR (SEQ ID NO:
17)、KMTRAQRRAAARRNRWTAR (SEQ ID NO: 18)、
RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO: 19)、KQINNWFNQRKRHWK
(SEQ ID NO: 20)、KLWMRWYSPTRRYG (SEQ ID NO: 21)、
RRWWRRWRR (SEQ ID NO: 22)、SQIKIWFQNKRAKIKK (SEQ ID NO:

23) 、GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 24) 、
TRRNKRNR IQEQLNRK (SEQ ID NO: 25) 、GKRKKKGKLGKKRDP (SEQ
ID NO: 26) 、RQVTIWFQNRRVKEKK (SEQ ID NO: 27) 、RLRWR (SEQ ID
NO: 28) 、PPRPPRPPRPPRPPR (SEQ ID NO: 29) 、CAYHRLRRC (SEQ ID
NO: 30) 、SRRARRSPRHLGSG (SEQ ID NO: 31) 、PPRPPRPPRPPR (SEQ
ID NO: 32) 、NAKTRRHERRRKLAIER (SEQ ID NO: 33) 、
VKRGLKLRHVRPRVTRMDV (SEQ ID NO: 34) 、
LYKKGPAKKGRPPLRGWFH (SEQ ID NO: 35) 、
TAKTRYKARRAELIAERR (SEQ ID NO: 36)或KGTYKKKLMRIPLKGT
(SEQ ID NO: 37)。

【0083】在式I、Ia及Ib之又另一實施例中，J為RRRRRRRRRRRRR
(SEQ ID NO: 1)、GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO:
2)、RRIRPRPPRLPRPRPRPLPFPRPG (SEQ ID NO: 3)、RKKRRQRRR
(SEQ ID NO: 4)、RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 5)、
GRPRESGKKRKRRLKP (SEQ ID NO: 6) 或
ALWKTLLKKVLKAPKKKRKV (SEQ ID NO: 7)。

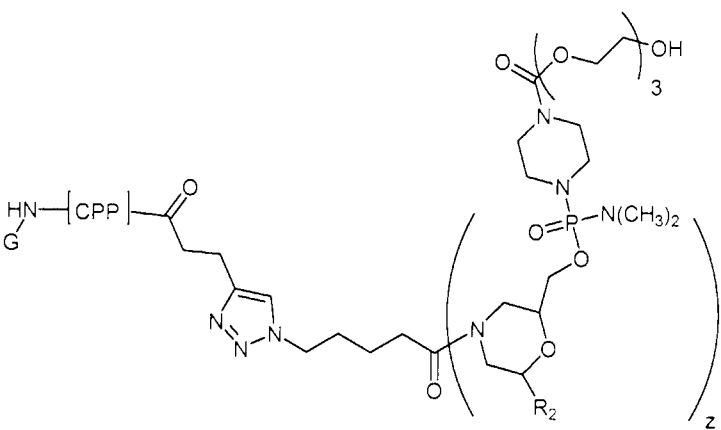
【0084】在式I、Ia及Ib之又另一實施例中，寡核苷酸肽結合物展現
與非結合寡核苷酸相比攝取上之至少兩倍改良。

【0085】在一實施例中，寡核苷酸肽結合物展現與非結合寡核苷酸
相比攝取上之至少五倍改良。

【0086】在另一實施例中，寡核苷酸肽結合物展現與相應的Cy5.5
肽結合物相比攝取上之改良。

【0087】在又另一實施例中，寡核苷酸包含具有與RNA靶標互補之
序列的靶向序列。在一特定實施例中，RNA靶標為細胞RNA靶標。在另
一特定實施例中，靶向序列具有充分互補序列以結合至RNA靶標。在又
一特定實施例中，靶向序列具有與RNA靶標互補的完美序列。

【0088】本發明之代表性肽-寡核苷酸結合物包括尤其以下結構之肽
-寡核苷酸結合物：



(IV)

或其醫藥學上可接受之鹽，其中

G為H或-C(O)CH₃，其中G藉由醯胺鍵共價連接至肽之羧基端；

R²為在每次出現時獨立地選自以下之核鹼基：腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶及次黃嘌呤；

z為8至40；且

CPP在每次出現時獨立地選自：RRRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 1)、GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 2)、RRIRPRPPRLPRPRPRPLPFPRPG (SEQ ID NO: 3)、RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4)、RRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 5)、GRPRESGKKRKRKRLKP (SEQ ID NO: 6)、ALWKTLLKKVLKAPKKRKV (SEQ ID NO: 7)、RRIPNRRPRR (SEQ ID NO: 8)、TRRQRTRRARRNR (SEQ ID NO: 9)、HARIKPTFRRLKWKYKGKFW (SEQ ID NO: 10)、GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (SEQ ID NO: 11)、LRRERQSRLRRERQSR (SEQ ID NO: 12)、RRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 13)、RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 14)、KRARNTEAARRSRARKLQRMKQ (SEQ ID NO: 15)、RHIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 16)、RRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 17)、KMTRAQRRAAARRNRWTAR (SEQ ID NO: 18)、RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO: 19)、KQINNWFNQRKRHWK (SEQ ID NO: 20)、KLWMRWYSPTRRYG (SEQ ID NO: 21)、RRWWRRWRR (SEQ ID NO: 22)、SQIKIWFQNKRKRAIKK (SEQ ID NO: 23)、GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 24)、TRRNKRNRRIQEQLNRK (SEQ ID NO: 25)、GKRKKKGKLGKKRDP (SEQ ID NO: 26)。

ID NO: 26) 、RQVTIWFQNRRVKEKK (SEQ ID NO: 27) 、RLRWR (SEQ ID NO: 28) 、PPRPPRPPRPPRPPR (SEQ ID NO: 29) 、CAYHRLRRC (SEQ ID NO: 30) 、SRRARRSPRHLGSG (SEQ ID NO: 31) 、PPRPPRPPRPPR (SEQ ID NO: 32) 、NAKTRRHERRRKLAIER (SEQ ID NO: 33) 、VKRGLKLRHVRPRVTRMDV (SEQ ID NO: 34) 、LYKKGPAKKGRPPLRGWFH (SEQ ID NO: 35) 、TAKTRYKARRAELIAERR (SEQ ID NO: 36) 、KGTYKKKLMRIPLKGT (SEQ ID NO: 37) 、PPRPPRPPR (SEQ ID NO: 38) 、RASKRDGSWVKKLHRILE (SEQ ID NO: 39) 、TRSSRAGLQWPVGRVHRLLRK (SEQ ID NO: 40) 、FKIYDKKVRTRVVKH (SEQ ID NO: 41) 、VRLPPPVRLLPPPVRLLPPP (SEQ ID NO: 42) 、GPFHFYQFLFPPV (SEQ ID NO: 43) 、PLILLRLLRGQF (SEQ ID NO: 44) 、YTAIAWVKAFIRKLRLK (SEQ ID NO: 45) 、KETWWETWWTEWSQPKKRKV (SEQ ID NO: 46) 、LIRLWSHLIHIWFQNRRLLKWKKK (SEQ ID NO: 47) 、VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN (SEQ ID NO: 48) 、MDAQTRRRERRAEKQAQWKAAN (SEQ ID NO: 49) 、GSPWGLQHHPRT (SEQ ID NO: 50) 、KLALKALKALKAAALKLA (SEQ ID NO: 51) 、IPALK (SEQ ID NO: 52) 、VPALR (SEQ ID NO: 53) 、LLIILRRRIRKQAHASK (SEQ ID NO: 54) 、IAWVKAFIRKLRLKGPLG (SEQ ID NO: 55) 、AAVLLPVLLAAPVQRKRQKLP (SEQ ID NO: 56) 、TSPLNIHNGQKL (SEQ ID NO: 57) 、VPTLK (SEQ ID NO: 58)或VSALK (SEQ ID NO: 59)。

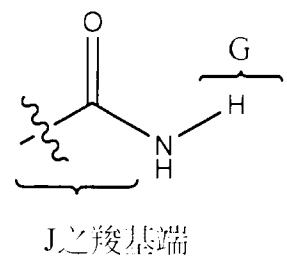
【0089】 在本發明之肽-寡核苷酸結合物之一個實施例中，G為H。

【0090】 在本發明之肽-寡核苷酸結合物之另一實施例中，G為-C(O)CH₃。

【0091】 在一實施例中，L共價連接至肽之羧基端，且G共價連結至肽之胺基端。

【0092】 如本文中所使用，「G藉由醯胺鍵共價連接至J之羧基端」指示J之羧基端(-COOH)經由N(H)基團共價鍵結至不同G，其中J之羧基端

之羥基經N(H)替換。舉例而言，當G為H時，以下結構藉由J及G形成：



【0093】 在一些實施例中，本文中所描述之肽-寡核苷酸結合物為未溶劑化的。在其他實施例中，肽-寡核苷酸結合物中之一或多者呈溶劑化形式。如此項技術中已知，溶劑合物可為醫藥學上可接受之溶劑中之任一者，諸如水、乙醇及其類似者。

【0094】 儘管式I、Ia、Ib及II之肽-寡核苷酸結合物以其中性形式描繪，但在一些實施例中，此等肽-寡核苷酸結合物以醫藥學上可接受之鹽形式使用。

【0095】

寡核苷酸

基於嗎啉基之亞基之重要特性包括：1)能夠由穩定、不帶電或帶正電主鏈鍵聯以寡聚形式連接；2)能夠負載核苷酸鹼(例如腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、胸苷、尿嘧啶、5-甲基-胞嘧啶及次黃嘌呤)以使得所形成之聚合物可於互補序列鹼標靶核酸雜交，包括靶標RNA，相對較短的寡核苷酸(例如，10-15個鹼)之T_M值高於約45℃；3)寡核苷酸有效地或被動地轉運至哺乳動物細胞中之能力；際4)寡核苷酸及寡核苷酸:RNA異雙螺旋分別抵抗RNA酶及RNase H降解之能力。

【0096】 形成於寡聚物與靶標序列之間的雙螺旋之穩定性為結合T_M與雙螺旋對細胞酶促裂解之易感性的函數。寡聚物關於互補序列RNA之

T_M 可藉由習知方法來量測，該等方法諸如由Hames等人，Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, 1985,第107-108頁所描述或如Miyada C. G.及Wallace R. B., 1987, Oligomer Hybridization Techniques, Methods Enzymol. 第154卷，第94-107頁中所描述之彼等。在某些實施例中，反義寡聚物可具有高於體溫且在一些實施例中高於約45°C或50°C之結合 T_M (關於互補序列RNA)。亦包括在60°C至80°C或更高範圍內之 T_M 。根據公認原理：寡聚物(關於基於互補RNA雜交)之 T_M 可藉由增加雙螺旋中之C:G配對鹼基之比率或藉由增加異雙螺旋之長度(鹼基對長度)或兩者來增加。同時，出於最佳化細胞攝取之目的，限制寡聚物之大小可為有利的。出於此原因，本發明之化合物包括在25個鹼基或更小之長度下展示高 T_M (45°C至50°C或更高)之化合物。

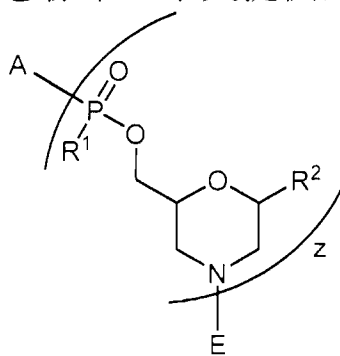
【0097】寡聚物之長度可變化，只要其能夠選擇性地結合至在前mRNA分子內之意欲位置。此類序列之長度可根據本文所描述之選擇程序來測定。大體而言，寡核苷酸應為約8個核苷酸長度至多約50個核苷酸長度。舉例而言，寡核苷酸之長度(z)可為8至38、8至25、15至25、17至21或約18。然而應瞭解，在此範圍內之任何長度之核苷酸可在本文所描述之方法中使用。

【0098】在一些實施例中，反義寡核苷酸含有鹼基修飾或取代。舉例而言，可選擇某些核鹼基以增加本文所描述之反義寡核苷酸之結合親和性。此等核鹼基包括5-經取代之嘧啶、6-氮雜嘧啶及N-2、N-6及O-6經取代之嘌呤，其包括2-胺基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶及2,6-二胺基嘌呤。5-甲基胞嘧啶取代已經展示增加核酸雙螺旋穩定性0.6-1.2°C，且可併入至本文中所描述之反義寡核苷酸中。在一個實施例

中，寡核苷酸之至少一個嘧啶鹼基包含5-經取代嘧啶鹼基，其中嘧啶鹼基選自由以下組成之群：胞嘧啶、胸腺嘧啶及尿嘧啶。在一個實施例中，5-經取代嘧啶鹼基為5-甲基胞嘧啶。在另一實施例中，寡核苷酸之至少一個嘌呤鹼基包含N-2、N-6經取代之嘌呤鹼基。在一個實施例中，N-2、N-6經取代之嘌呤鹼基為2,6-二胺基嘌呤。

【0099】 基於嗎啉基之寡聚物(包括反義寡聚物)詳述於例如美國專利第5,698,685號；第5,217,866號；第5,142,047號；第5,034,506號；第5,166,315號；第5,185,444號；第5,521,063號；第5,506,337號及申請中之美國專利申請案第12/271,036號；第12/271,040號；及PCT公開案第WO/2009/064471號 及 第WO/2012/043730號 以及Summerton等人，1997，Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 7, 187-195中，該等文獻以全文引用之方式併入本文中。

【0100】 因此在一個態樣中，本文提供式II之寡核苷酸：

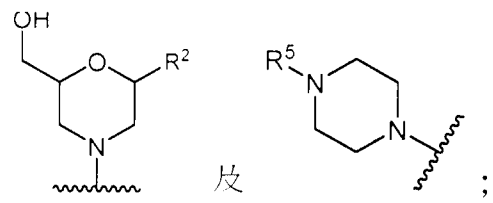


(II)

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

A選自由以下組成之群：OH、-NHCH₂C(O)NH₂、-N(C₁₋₆-烷基)CH₂C(O)NH₂、



R⁵為-C(O)(O-烷基)_xOH，其中x為3-10且各烷基在每次出現時獨立地為-C₂₋₆烷基，或R⁵選自由以下組成之群：-C(O)C₁₋₆-烷基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、-C₁₋₆-烷基-R⁶、-C₁₋₆-雜烷基-R⁶、-芳基-R⁶、-雜芳基-R⁶、-C(O)O-C₁₋₆-烷基-R⁶、-C(O)O-芳基-R⁶及-C(O)O-雜芳基-R⁶；

R⁶選自由以下組成之群：OH、SH及NH₂，或R⁶為共價連接至固體撐體之O、S或NH；

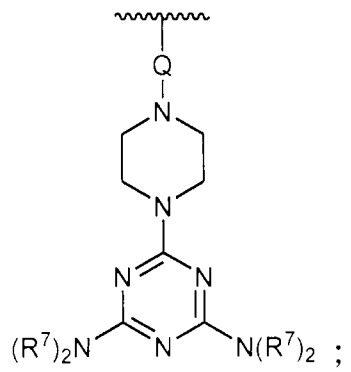
各R¹獨立地為OH或-NR³R⁴；

各R³及R⁴在每次出現時獨立地為-C₁₋₆烷基；

各R²在每次出現時獨立地選自由以下組成之群：H、核鹼基及用化學保護基團官能化之核鹼基，其中核鹼基在每次出現時獨立地包含選自吡啶、嘧啶、三嗪、嘌呤及去氫嘌呤之C₃₋₆雜環；

z為8至40；

E選自由以下組成之群：H、-C₁₋₆-烷基、-C(O)C₁₋₆-烷基、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、三甲氧基三苯甲基，及

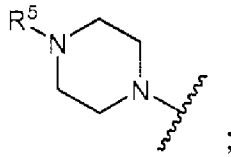


Q為-C(O)(CH₂)₆C(O)-或-C(O)(CH₂)₂S₂(CH₂)₂C(O)-；

R^7 為 $-(CH_2)_2OC(O)N(R^8)_2$ ；

R^8 為 $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ 。

【0101】 在式II之一個實施例中，A 為



E 選自由以下組成之群：H、 $-C(O)CH_3$ 、苯甲醯基及硬脂醯基；

R^5 為 $-C(O)(O-烷基)_x-OH$ ，其中各烷基在每次出現時獨立地為 $-C_{2-6}$ 烷基、三苯甲基及4-甲氧基三苯甲基；且

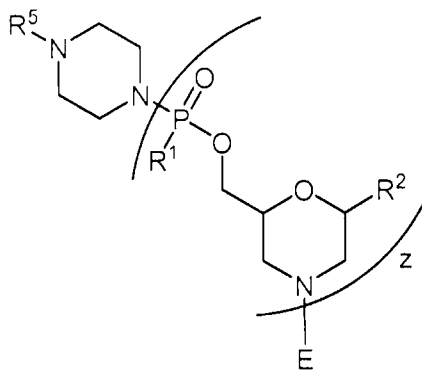
各 R^2 為核鹼基，其中核鹼基在每次出現時獨立地包含選自由以下組成之群的 C_{4-6} 雜環：吡啶、嘧啶、嘌呤及去氮嘌呤。

【0102】 在式II之另一個實施例中， R^5 為 $C(O)(O-CH_2CH_2)_3-OH$ ；

且

各 R^2 獨立地為核鹼基，其中核鹼基在每次出現時獨立地包含嘧啶或嘌呤。

【0103】 在再一實施例中，式II之寡核苷酸為式IIa之寡核苷酸：



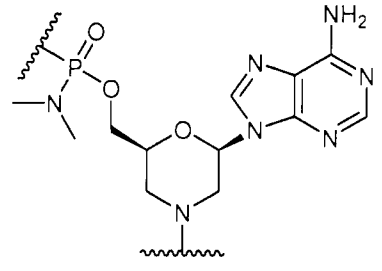
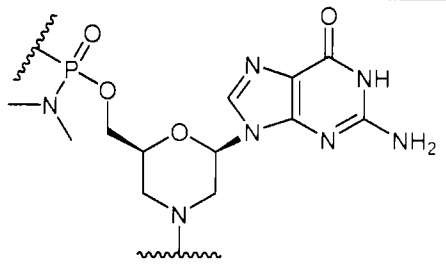
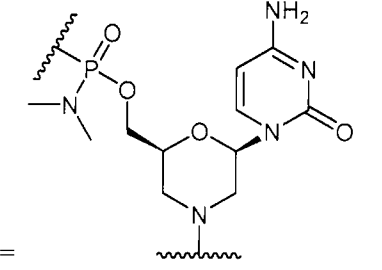
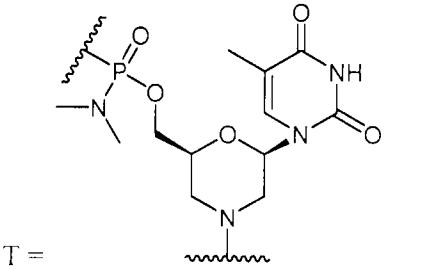
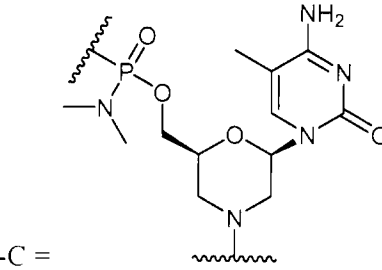
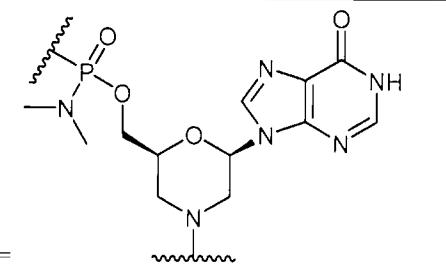
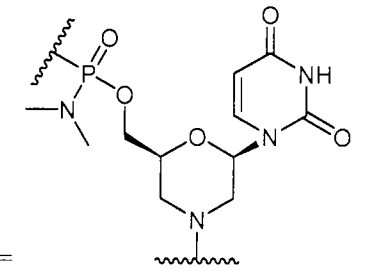
(IIa)

【0104】 在式II及IIa之一實施例中， R^2 在每次出現時獨立地為腺嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、鳥嘌呤、次黃嘌呤、胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶及次黃嘌呤；且

各R¹為-N(CH₃)₂。

【0105】 表1中所提供的為如本文所描述之核苷酸部分之各種實施例。

表1：核苷酸部分之各種實施例。

A = 	G = 
C = 	T = 
5-Me-C = 	I = 
U = 	

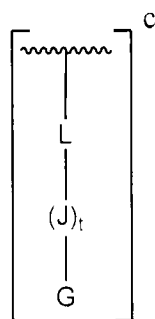
【0106】 在一些實施例中，本文所描述之寡核苷酸為未溶劑化的。在其他實施例中，寡核苷酸中之一或多者呈溶劑化形式。如此項技術中已知，溶劑合物可為醫藥學上可接受之溶劑中之任一者，諸如水、乙醇及其類似者。

【0107】 儘管式II及IIa之寡核苷酸以其中性形式描繪，但在一些實施例中，此等寡核苷酸以醫藥學上可接受之鹽形式使用。

【0108】

肽

本文中所提供之寡核苷酸包括與CPP結合之寡核苷酸部分。特定言之，細胞穿透肽為直鏈或非環狀肽。在一些實施例中，CPP可具有理論的正淨電荷。在一些實施例中，正淨電荷可為1-12整數。此類CPP之呈現展示於以下：



其中c為1至12之整數。

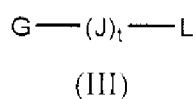
【0109】 在一些實施例中，CPP可為有效地增強轉運化合物至細胞中之富含精胺酸之肽轉運部分。轉運部分在一些實施例中附接至寡聚物之末端。肽具有誘導細胞穿透在30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100% (包括其間之所有整數)內之特定細胞培養群體之細胞的性能，且允許在全身投與後在活體內之多個組織內的大分子移位。在一個實施例中，細胞穿透肽可為富含精胺酸之肽轉運體。

【0110】 相對於在無經附接轉運部分存在下之寡聚物之攝取，已展示如上文所描述之轉運部分極大地增強經附接寡聚物之細胞進入。相對於未結合化合物，可增強攝取至少兩倍，且在一些實施例中十倍。在一些實施例中，相對於CPP-Cy5.5結合物，可增強攝取至少兩倍，且在一些實施

例中，十倍。

【0111】 富含精胺酸之肽轉運體(亦即，細胞穿透肽)之使用特別適用於實踐本發明。已展示某些肽轉運體對將反義化合物遞送至包括肌肉細胞之原代細胞中為高度有效的。此外，本文中所描述之肽轉運體在與反義PMO結合時，顯示改變數個基因轉錄物之剪接的增強能力。

【0112】 因此，在一個態樣中，本文提供式III之肽：



或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

t為5至27；

各J在每次出現時獨立地選自由以下組成之群：精胺酸、甘胺酸、白胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸、離胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、脯胺酸、纈胺酸、異白胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、組胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸及蘇胺酸；

其中至少一個J為精胺酸；

G藉由醯胺鍵共價連接至J之羧基端，且G選自H、-C(O)C₁₋₆-烷基、苯甲醯基及硬脂醯基；且

L為-C(O)(CH₂)₁₋₆-C₁₋₆-雜芳基-(CH₂)₁₋₆C(O)，其可共價與連接固體撐體。

【0113】 在一實施例中，各J獨立地選自甘胺酸、丙胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、離胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、脯胺酸、纈胺酸、精胺酸及蘇胺酸。

【0114】 在另一實施例中，各J獨立地選自精胺酸、離胺酸及麩醯

胺酸。

【0115】 在另一實施例中，各J獨立地選自甘胺酸、白胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、甲硫胺酸、色胺酸、麩醯胺酸、脯胺酸、離胺酸、精胺酸及纈胺酸。

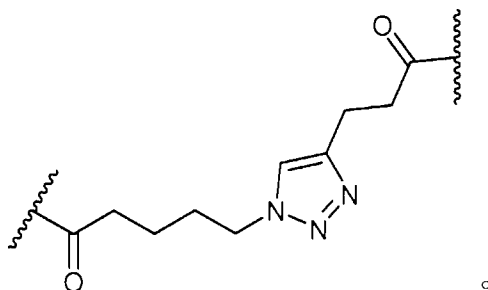
【0116】 在另一實施例中，各J獨立地選自精胺酸、異白胺酸、脯胺酸、白胺酸、苯丙胺酸及甘胺酸。

【0117】 在再一實施例中，各J獨立地選自甘胺酸、精胺酸、脯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、離胺酸及白胺酸。

【0118】 在又另一實施例中，各J獨立地選自丙胺酸、白胺酸、色胺酸、離胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、脯胺酸及精胺酸。

【0119】 在再一實施例中，L為 $-C(O)(CH_2)_{1-6}-C_{1-6}$ -雜芳基- $(CH_2)_{1-6}C(O)$ 。

【0120】 在另一實施例中，L為



【0121】 在又另一實施例中，G選自由以下組成之群：H、 $C(O)CH_3$ 、苯甲醯基及硬脂醯基。

【0122】 在再一實施例中，G為 $C(O)CH_3$ 或H。

【0123】 在另一實施例中，G為 $C(O)CH_3$ 。

【0124】 在另一實施例中，G為H。

【0125】 在又另一實施例中，G藉由醯胺鍵共價連接至J之羧基端。

在另一實施例中，L藉由醯胺鍵共價連接至J之胺基端。

【0126】 在一些實施例中，本文所描述之肽為未溶劑化的。在其他實施例中，肽中之一或多者呈溶劑化形式。如此項技術中已知，溶劑合物可為醫藥學上可接受之溶劑中之任一者，諸如水、乙醇及其類似者。

【0127】 儘管式III之肽以其中性形式描繪，但在一些實施例中，此等寡核苷酸以醫藥學上可接受之鹽形式使用。

【0128】

方法

本文提供治療有需要之受試者之肌肉疾病、病毒感染或細菌感染的方法，其包含向受試者投與式I、Ia或Ib之肽-寡核苷酸結合物。

【0129】 因此，在一個態樣中，本發明提供一種治療有需要之受試者之肌肉疾病、病毒性感染或細菌性感染的方法，其包含向受試者投與本發明之肽核苷酸結合物。

【0130】 在一個實施例中，肌肉疾病為杜興氏肌肉萎縮症。

【0131】 在另一實施例中，病毒感染由選自由以下組成之群的病毒引起：馬堡病毒(marburg virus)、伊波拉病毒(ebolavirus)、流感病毒及登革熱病毒(dengue virus)。

【0132】 在另一實施例中，細菌性感染由結核分枝桿菌引起。

【0133】 受試者在本文中通常考慮為人類。然而，受試者可為需要治療之任何哺乳動物。由此，本文所描述之方法可應用於人類及獸醫應用兩者。

【0134】

投藥/劑量

治療性組合物之調配物及其隨後投藥(給藥)係在此項技術中之彼等之

技能內。給藥視待治療之疾病病況之嚴重程度及反應而定，其中治療之病程持續數天至數月或直至達成疾病病況之充分減弱。最佳給藥時程可由病患體內之藥物堆積之量測值來計算。

【0135】一般此項技術者可容易地判定最佳劑量、給藥方法及重複率。最佳劑量可視個體寡聚物之相對濃度而變化，且可大體上基於EC₅₀ (被認為為在活體外及活體內動物模式中有效)來評估。大體而言，劑量為0.01 µg/kg體重至100 g/kg體重，且可每天一次或更多次，每週一次或更多次、每月一次或更多次或每年一次或更多次或甚至每2年至20年一次給出。基於所量測滯留時間及體液或組織中之藥物之濃度，一般熟習此項技術者可容易地評估給藥之重複率。在成功治療之後，可能需要使病患進行維持治療以防止疾病病況再發，其中以維持劑量(介於0.01 µg/kg體重至100 g/kg體重之範圍內，每天一次或更多次至每20年一次)投與寡聚物。

【0136】在一些實施例中，寡核苷酸(式II或IIa之寡核苷酸)經單獨投與。

【0137】在一些實施例中，以治療有效量或治療劑量投與寡核苷酸。「治療有效量」為式II或IIa之寡核苷酸在投與患者本身時有效治療肌肉疾病、病毒感染或細菌感染的量。在特定個例中證明為特定受試者之「治療有效量」的量，可能對於類似研究中之疾病或病況治療之患者不為100%有效，儘管此類劑量被熟習從業者認為「治療有效量」。對應於治療有效量之寡核苷酸之量很大程度上視疾病之類型、疾病之階段、被治療患者之年齡及其他事實而定。

【0138】在不同實施例中，根據式II或IIa之寡核苷酸及所使用之有效量，該等寡核苷酸可調節涉及肌肉疾病、病毒感染或細菌感染之基因的

表現。

【0139】雖然式II或IIa之寡核苷酸之量應會產生有效治療肌肉疾病、病毒感染或細菌感染，但該等量對於患者較佳不會過度有毒的(亦即，該等量較佳在如醫學指導原則判定之毒性限制內)。在一些實施例中，為預防過量的毒性或提供更有效的治療肌肉疾病、病毒感染或細菌感染，或其中之兩者，限制條件為對總投與劑量之限制。通常，本文中考慮之量為每天的；然而，本文中亦考慮半天及兩天或三天之週期。

【0140】不同給藥方案可用於治療肌肉疾病、病毒感染或細菌感染。在一些實施例中，日劑量(諸如，上文所描述之例示性劑量中之任一者)投與一日一次、兩次、三次或四次持續三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天或十天。視受治療之疾病之階段及嚴重度而定，可採用較短治療時間(例如，多達五天)以及高劑量，或可採用較長治療時間(例如，十天或更多天，或週，或月或更長)以及較低劑量。在一些實施例中，每隔一天投與一日一次或一日兩次劑量。

【0141】式II及IIa之寡核苷酸或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物形式、呈純形式或合適的醫藥組合物形式可經由此項技術中已知之公認的投與模式或藥劑中之任一者投與。寡核苷酸可例如經口、經鼻、非經腸(靜脈內、肌肉內或皮下)、局部、經皮、陰道內、膀胱內、腦池內(intracistemally)或經直腸投與。劑型可例如為固體、半固體、凍乾粉末或液體劑型，諸如錠劑、丸劑、軟彈性膠囊或硬明膠膠囊、粉末、溶液、懸浮液、栓劑、噴霧劑或類似者，例如呈適合於精確劑量之簡單投與之單位劑型。特定投與途徑為經口，尤其其中可根據待治療之疾病之嚴重度調整便利的日劑量方案之途徑。

【0142】助劑及佐劑包括例如保持劑、潤濕劑、懸浮劑、甜味劑、調味劑、芳香劑、乳化劑及調劑。防止微生物之作用大體上可藉由各種抗細菌藥劑或抗真菌藥劑(諸如，對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、山梨酸及其類似者)來提供。亦可包括等滲藥劑，諸如糖、氯化鈉及其類似者。可注射醫藥形式之延長吸收可藉由使用延緩吸收之藥劑(例如，單硬脂酸鋁及明膠)來實現。助劑亦可包括潤濕劑、乳化劑、pH緩衝劑及抗氧化劑，諸如檸檬酸、脫水山梨糖醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、丁基化羥基甲苯及其類似者。

【0143】可用溶衣及殼層(諸如，腸溶衣及此項技術中熟知的其他者)來製備固體劑型。其可含有鈍化藥劑且可具有其以經延緩方式釋放一或多種活性寡核苷酸在腸道之某一部分中的此類組合物。可使用之包埋組合物之實例為聚合物質及蠟。適當時，活性寡核苷酸亦可呈具有以上提及之賦形劑中之一或多者的微囊封形式。

【0144】用於經口投與之液體劑型包括醫藥學上可接受之乳化液、溶液、懸浮液、糊漿及酏劑。例如藉由將本文所描述之結合物或其醫藥學上可接受之鹽及視情況選用之醫藥學上佐劑溶解、分散等等在載劑(諸如，水、鹽水、水性右旋糖、甘油、乙醇及其類似者)、增溶劑及乳化劑(例如，乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺)、油(特定言之，棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇及脫水山梨糖醇之脂肪酸酯)或此等物質之混合物及其類似者中從而形成溶液或懸浮液來製備此類劑型。

【0145】一般而言，根據預期的投與模式，醫藥學上可接受之組合

物將含有約1重量%至約99重量%之本文中所描述之寡核苷酸，或其醫藥學上可接受之鹽，及99重量%至1重量%之醫藥學上可接受之賦形劑。在一個實例中，組合物將為在約5重量%及約75重量%之間的本文中所描述之寡核苷酸，或其醫藥學上可接受之鹽，且其餘為合適之醫藥賦形劑。

【0146】 製備此類劑型之實際方法為熟習此項技術者已知或將顯而易見的。參照(例如) Remington's Pharmaceutical Sciences 第18版(Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990)。

【0147】

套組

在其他實施例中，提供套組。本發明之套組包括包含寡核苷酸、肽、肽-寡核苷酸結合物或本發明之組合物的一或多種封裝。在一些實施例中，套組包含根據式I、Ia或Ib之肽-寡核苷酸結合物，或其醫藥學上可接受之鹽。在其他實施例中，套組包含根據式II或IIa之寡核苷酸，或其醫藥學上可接受之鹽。在另其他實施例中，套組包含根據式III之肽，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0148】 片語「封裝」意謂含有本文中提出之寡核苷酸或組合物之任何容器。在一些實施例中，封裝可為盒或包裹。用於封裝醫藥產品之封裝材料為熟習此項技術者所熟知。醫藥封裝材料之實例包括(但不限於)瓶子、管、吸入器、泵、袋、小瓶、包裝箱、針筒、瓶子及適用於所選調配物及意欲投與及治療模式之任何封裝材料。

【0149】 套組亦可含有並不含於封裝內但附接至封裝之外部之物件，例如吸液管。

【0150】 套組可另外含有用於向病患投與本發明之寡核苷酸或組合

物之說明書。套組亦可包含由諸如美國食品與藥物管理局(the United States Food and Drug Administration)之調控機構審批通過的本文中寡核苷酸之用途的說明書。套組亦可含有寡核苷酸之標記或產品插入件。封裝或任何產品插頁或兩者可自身由調控機構審批通過。套組可包括封裝中之呈固相或呈液相(諸如，提供之緩衝液)之寡核苷酸。套組亦可包括用於製備用以進行該等方法之溶液的緩衝液及用於將液體自一個容器轉移至另一個容器的吸液管。

【0151】

實例

已出於說明之目的在下文闡述實例且描述本發明之某些特定實施例。然而，申請專利範圍之範疇不以任何方式受本文中所闡述之實例限制。對所揭示實施例之各種改變及修飾對熟習此項技術者將為顯而易見的，且可在不脫離本發明之精神及所附申請專利範圍之範疇的情況下作出此類改變及修飾(包括(但不限於)與本發明之化學結構、取代基、衍生物、調配物或方法相關之彼等)。本文中之流程之結構中的變數之定義與本文中所呈現之式中之對應位置之彼等相稱。

【0152】 細胞穿透肽可促使較大的治療相關分子(包括蛋白質及寡核苷酸)之胞內遞送。儘管在文獻中描述了數百個來源於天然及合理設計兩者之CPP序列，但任何給定序列之性能依賴於其與關注貨物之良好匹配。當前實驗專門聚焦於用於遞送二胺基磷酸酯嗎啉基寡核苷酸(PMO)之CPP，一種近年來經FDA批准用於治療杜興氏肌肉萎縮症之引人注目類之反義治療劑。本文中已描述用於遞送PMO貨物相對於螢光團貨物之已知CPP之性能中的廣泛差異。因此，使用計算方法預測哪些肽序列將執行對

PMO遞送之最佳特異性將係確定活性CPP-PMO結合物之有效方法。

【0153】 發現或預測有效遞送特定貨物之CPP仍係突出的挑戰。一種預測CPP序列之方法係藉由構建在CPP之實驗性資料集上訓練之計算模型。先前已描述具有支持向量機(support vector machines)及基於物理化學性質、胺基酸組成及二肽組成之N對1類神經網路的CPP預測。此等模型在自若干論文收集之CPP序列上訓練，其採用不同道實驗設計(細胞株、濃度等)且主要使用螢光貨物以量測細胞穿透。因此，此等模型並不捕獲影響既定遞送問題之CPP選擇的貨物特定標準。

【0154】 使用文獻CPP序列之六十四種CPP-PMO結合物係經合成且在基於螢光之報導分析中評估結合物之功能性外顯子跳躍，以便產生用於計算模型之庫。來自此庫之外顯子跳躍資料隨後用於擬合隨機決策森林分類器(random decision forest classifier)以預測給定肽在與PMO結合時是否增強外顯子跳躍至少三倍。最後，在報導分析中評估七種先前未報導之肽序列(稱為「PPC」)以驗證計算模型。經計算預測之序列中的一者相比於80%之經測試文獻CPP進行對PMO之更好特異性遞送。此等結果強調將CPP序列調適至關注貨物之重要性，及機器學習發現具有特定功能之肽序列的能力。

【0155】

實例1：用於肽製備及純化之通用方法

快速流動肽合成

【0156】 使用自動化流動肽合成器合成0.1-mmol級別之肽。將ChemMatrix Rink Amide HYR樹脂(200mg)裝載至維持於90℃下之反應器中。所有反應劑在引入至反應器中之前用HPLC泵以80 mL/min流動通

過維持於90℃下之不鏽鋼環。對於各偶合，將含有0.2 M胺基酸及0.2 M HATU於DMF中之10 mL溶液與200 µL二異丙基乙胺混合且遞送至反應器中。使用10.4 mL 20% (v/v)哌啶完成Fmoc去除。在各步驟之間，使用15 mL DMF洗去反應器。最終偶合用4-戊炔酸，而非胺基酸但使用相同的條件進行。完成合成之後，用DCM洗滌樹脂3次且在真空下乾燥。

【0157】

肽裂解及去保護

藉由用6 mL反應劑K (82.5%三氟乙酸、5%苯酚、5%水、5%苯硫基甲烷及2.5% 1,2-乙二硫醇(EDT))處理，使各肽同時進行整體側鏈去保護及自樹脂中裂解。在室溫下保持裂解16小時以確保完成去除Pbf。過濾裂解混合物以去除樹脂且藉由使N₂鼓泡通過混合物來蒸發。隨後添加約35 mL冷醚且經由離心三分鐘使粗產物集結。再重複此醚研磨及離心兩次。在第三次洗滌之後，將集結粒再溶解於50%水及50%乙腈中且凍乾。

【0158】

肽純化

【0159】 溶劑A：水，含有0.1% TFA

【0160】 溶劑B：乙腈，含有0.1% TFA

【0161】 將凍乾肽溶解於最小體積之行動相(95% A，5% B)中。將溶液裝載至附接至基於質量之純化系統的逆相HPLC管柱(Agilent Zorbax SB C18管柱：9.4×250 mm，5 µm或Agilent Zorbax SB C3管柱：9.4×250 mm，5 µm)上。線性梯度以0.5% B/min自5% B運行至55% B。使用關於來自儀器之各溶離份的質量資料，僅合並且凍乾純溶離份。溶離份合併物之純度藉由LC-MS確認。

【0162】 使用實例1之方案，合成表2之肽。

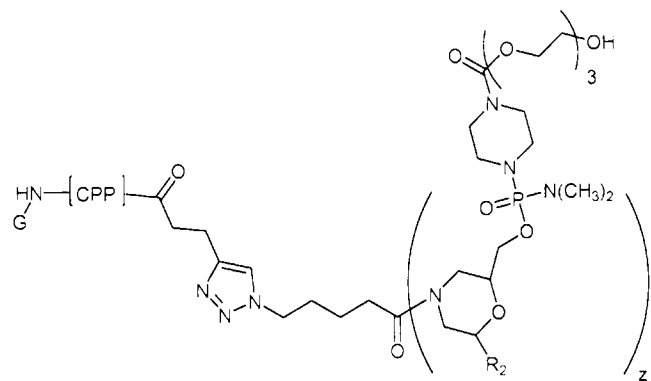
表2：細胞穿透肽

CPP名稱	CPP類別	SEQ ID NO:	胺基酸序列	理論淨電荷
精胺酸-12	陽離子性	1	RRRRRRRRRRRR	12
MPG	兩親性(陽離子I)	2	GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQP KKKRKV	5
Bac7	富含脯胺酸	3	RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPG	9
TAT	陽離子性	4	RKKRRQRRR	8
精胺酸-10	陽離子性	5	RRRRRRRRRR	10
DPV6	陽離子性	6	GRPRESGKKRKRKRLKP	9
S413-PVrev	兩親性	7	ALWKTLLKKVLKAPKKKRKV	9
HRSV	陽離子性	8	RRIPNRRPRR	6
HTLV-II Rex	陽離子性	9	TRRQTRRARNR	8
L-2	兩親性	10	HARIKPTFRRLKWKYKGKFW	9
蜂毒肽	兩親性	11	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRK RQQ	5
DPV15	陽離子性	12	LRRERQSRLRRERQSR	6
精胺酸-9	陽離子性	13	RRRRRRRRR	9
穿透蛋白	陽離子性	14	RQIKIWFQNRRMKWKK	7
酵母菌GCN4	陽離子性	15	KRARNTAAARRSRARKLQRMK Q	9
PDX-1	陽離子性	16	RHIKIWFQNRRMKWKK	8
精胺酸-8	陽離子性	17	RRRRRRRRR	8
BMV Gag	陽離子性	18	KMTRAQRRAAARRNRWTAR	8
SynB1	兩親性	19	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	6
Knotted-1	陽離子性	20	KQINNWFINQRKRHWK	6
IVV-14	疏水性	21	KLWMRWYSPTTRYG	4
W/R	兩親性(陽離子性II)	22	RRWWRRWRR	6
鋸齒蛋白-2 (Engrailed-2)	陽離子性	23	SQIKIWFQNKRAKIKK	6
DPV15b	陽離子性	24	GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR	7
酵母菌PrP6	陽離子性	25	TRRNKRNRIQEQLNRK	6
DPV7	陽離子性	26	GKRKKKGKLGKKRDP	8
HoxA-13	陽離子性	27	RQVTIWFQNRRVKEKK	5
AIP6	兩親性(富含脯胺酸)	28	RLRWR	3
(PPR)5	陽離子性	29	PPRPPRPPRPPRPPR	5
CAYH	-	30	CAYHRLRRC	4
DPV10	陽離子性	31	SRRARRSPRHLGSG	6
(PPR)4	兩親性(富含脯胺酸)	32	PPRPPRPPRPPR	4
P22 N	陽離子性	33	NAKTRRHERRRKLAIER	7
DPV1047	陽離子性	34	VKRGLKLRHVRPRVTRMDV	7
SVM4	兩親性(陽離子性)	35	LYKKGPAKKGRPPLRGWFH	7
φ21N(12-29)	陽離子性	36	TAKTRYKARRAELIAERR	5
SVM3	兩親性(陽離子性)	37	KGTYKKKLMRIPLKGT	6

(PPR)3	兩親性(富含脯胺酸)	38	PPRPPRPPR	3
SVM2	-	39	RASKRDGSWVKKLHRILE	5
Buforin 2	兩親性	40	TRSSRAGLQWPVGRVHRLLRK	7
SVM1	-	41	FKIYDKKVRTRVVKH	6
SAP	兩親性(富含脯胺酸)	42	VRLPPPVRLLLLPPV	3
435b	疏水性	43	GPFHFYQFLFPPV	1
Pept1	疏水性	44	PLILLRLLRGQF	2
YTA2	-	45	YTAIAWVKAFIRKLRLK	5
Pep-1	兩親性(陽離子I)	46	KETWWETWWTEWSQPKKRKV	2
EB-1	兩親性(陽離子II)	47	LIRLWSHLIHIWFQNRRLKWKK K	9
Pyrrhocorin	富含脯胺酸	48	VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN	3
λN(1-22)	陽離子性	49	MDAQTRRRERRAEKQAQWKA AN	4
439a	疏水性	50	GSPWGLQHHPRT	3
MAP	兩親性(陽離子II)	51	KLALKALKALKAALKLA	5
Bip	疏水性	52	IPALK	1
Bip	疏水性	53	VPALR	1
pVEC	兩親性(I)	54	LLIILRRRIRKQAHASK	8
YTA4	-	55	IAWVKAFIRKLRLKGPLG	5
K-FGF + NLS	兩親性	56	AAVLLPVLLAAPVQRKRQKLP	4
HN-1	疏水性	57	TSPLNIHNGQKL	2
Bip	疏水性	58	VPTLK	1
Bip	疏水性	59	VSALK	1
VT5	兩親性(β摺疊)	60	DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKG DPKPD	0
運輸蛋白10	兩親性(陽離子II)	61	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	4
SAP(E)	兩親性(富含脯胺酸)	62	VELPPPVELPPPVELPPP	-3
CADY	兩親性(陽離子II)	63	GLWRALWRLRLSLWRLWLRA	5
PreS2-TLM	兩親性	64	PLSSIFSRIGDP	0

【0163】

實例2：肽結合



將5-疊氮戊酸偶合至PMO之程序

【0164】 將PMO IVS-654 (R₂ = 5'-GCT ATT ACC TTA ACC CAG-
第 47 頁(發明說明書)

C216398PBX20190305C.docx

3'; $z = 18$ (SEQ ID NO: 65)) (200 mg, 32 μmol)溶解於600 μL DMSO中。向溶液中添加含有4當量之用HBTU (含320 μL 之0.4 M HBTU的DMF, 128 μmol)及含DIEA (22.3 μL , 128 μmol)之244 μL DMF活化之5-疊氮戊酸(13.6 μL , 128 μmol)的溶液(最終反應物體積=1.2 mL)。反應在用1 mL水及2 mL氫氧化銨淬滅之前進行25分鐘。氫氧化銨將水解在反應過程期間形成之任何酯。在1小時之後, 溶液經稀釋至40 mL且使用逆相HPLC (Agilent Zorbax SB C3管柱: 21.2 $\times$ 100 mm, 5 μm)及歷經58分鐘(1 % B/min)自2%至60% B (溶劑A: 水; 溶劑B: 乙腈)的線性梯度來純化。使用關於來自儀器之各溶離份的質量資料, 僅合並且凍乾純溶離份。溶離份合併物之純度藉由LC-MS確認。冷凍乾燥得到171 mg乾粉(84%產率)。

【0165】

用於藉由疊氮化物/炔烴胡伊斯根環加成(*Huisgen Cycloaddition*)之PMO-肽結合的通用程序

將20 mL具有隔墊帽之閃爍瓶填充有肽炔烴(1.1 μmol)、ISV2-654疊氮化物(0.95 μmol)及溴化銅(0.05 mmol)。在經由隔墊添加約1 mL DMF之前用氮氣淨化小瓶5分鐘以確保去除氧。使反應混合物渦旋1分鐘。在2小時之後, 反應混合物用10 mL之50 mM Tris (pH 8)稀釋, 且裝載至逆相HPLC管柱(Agilent Zorbax SB C3 9.4 $\times$ 50 mm, 5 μm)上。使用歷經20分鐘自5至45% B之線性梯度進行層析。溶劑A: 5 mM乙酸銨, pH = 8於水中; 溶劑B: 5 mM乙酸銨pH = 8於90%乙腈10%水中。使用關於來自儀器之各溶離份的質量資料, 僅合並且凍乾純溶離份。溶離份合併物之純度藉由LC-MS確認。

【0166】

實例3：計算設計

隨機森林分類器超參數經由格點搜尋在用五重交叉驗證估算之分類精確度下進行優化。所選擇之特徵數目、樹之數目及最大樹深度分別為五、十及五。圖2A中給出關於二十個序列之留存測試組之分類器評估的效能量度。

【0167】 效能量度定義於以下，其中TP係指真陽性，TN係指真陰性，FP係指偽陽性，且FN係指假陰性。

$$\begin{aligned} \text{準確率} &= \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \\ \text{精確率} &= \frac{TP}{TP + FP} \\ \text{召回率} &= \frac{TP}{TP + FN} \end{aligned}$$

【0168】 計算各肽序列之十九個特徵，其中之一者為肽分子量。其餘十八個特徵來源於六個胺基酸物理化學描述詞，其藉由對22個天然及593個非天然胺基酸計算之384種分子性質的因子分析來產生的。對於各肽序列，此等六個描述詞在五個N端殘基、五個C端殘基及完整肽序列中經平均化。

【0169】 CPP序列基於其相對於非結合PMO是否在eGFP螢光中呈現超過三倍變化來歸類為陽性或陰性實例。四十四個序列用作隨機森林模型之訓練組且二十個序列留存以用作測試組以評估該模型恰當地擬合資料所到達之程度且可成功地預測序列之外顯子跳躍活性。該模型之效能量度展示於圖2A中。

【0170】 為以實驗方式驗證，隨機肽序列藉由選擇肽長度及胺基酸組成以與在CPP庫之訓練資料集中所觀測之分佈成比例的概率來產生。在隨機肽中，五個陽性序列經預測導致eGFP螢光超過三倍增加且兩個經預

測為陰性序列(NS)。選擇更多陽性序列以產生用於PMO遞送之新穎肽序列，其已稱為經預測PMO載體(PPC)。此等PPC藉由固相肽合成來合成，與PMO IVS2-654結合，且藉由RP-HPLC純化。結果展示於圖2A及圖2B中。

【0171】

實例4：流式細胞測量術

為測試PMO-CPP結合物之庫，實施對GFP螢光之流式細胞測量術分析。為測試CPP，將HeLa 654細胞維持在37°C及5% CO₂下之補充有10% (v/v)胎牛血清(FBS)及1% (v/v)青黴素-鏈黴素之MEM中。在經磷酸鹽緩衝之血清(PBS)中製備各PMO-CPP結合物之儲備液。儲備液之濃度藉由量測260 nm下之吸光率且使用168,700 L mol⁻¹ cm⁻¹之消光係數來測定。在37°C及5% CO₂下，將細胞與濃度為5 μM之每一種相應結合物一起培育在補充有10%FBS及1%青黴素-鏈黴素之MEM中22小時。接著，抽吸處理培養基，將細胞與胰蛋白酶-EDTA 0.25%在37°C及5% CO₂下一起培育15 min，用PBS洗滌1次，且再懸浮於具有2% FBS及2 μg/mL碘化丙錠之PBS中。

【0172】 在BD LSRII流式細胞儀上進行流式細胞測量術分析。將門應用於資料以排除對碘化丙錠為高度陽性或具有充分不同於主要細胞群之正向/側面散射讀數的細胞。各直方圖含有至少10,000門控事件。結果展示於圖1E、圖2C及表3中。

表3：與非結合PMO相比之細胞穿透肽-寡聚物結合物

CPP名稱	相對於PMO之活性	CPP名稱	相對於PMO之活性
精胺酸-12	10.4	P22 N	2.4
MPG	7.5	DPV1047	2.4
Bac7	6.1	SVM4	2.2
TAT	6.0	φ21N(12-29)	2.1

精胺酸-10	5.8	SVM3	2.1
DPV6	5.4	(PPR)3	1.9
S413-PVrev	5.2	SVM2	1.9
HRSV	4.9	Buforin 2	1.9
HTLV-II Rex	4.7	SVM1	1.7
L-2	4.6	SAP	1.7
蜂毒肽	4.5	435b	1.7
DPV15	4.3	Pept1	1.7
精胺酸-9	4.2	YTA2	1.5
穿透蛋白	4.2	Pep-1	1.4
酵母菌GCN4	4.2	EB-1	1.4
PDX-1	4.1	Pyrrhocoricin	1.4
精胺酸-8	4.0	λN(1-22)	1.4
BMV Gag	3.9	439a	1.3
SynB1	3.9	MAP	1.3
Knotted-1	3.8	Bip	1.3
IVV-14	3.7	Bip	1.3
W/R	3.5	pVEC	1.2
鋸齒蛋白-2	3.4	YTA4	1.2
DPV15b	3.3	K-FGF + NLS	1.2
酵母菌PrP6	3.3	HN-1	1.2
DPV7	3.2	Bip	1.2
HoxA-13	3.1	Bip	1.1
AIP6	2.9	VT5	0.8
(PPR)5	2.7	運輸蛋白10	0.8
CAYH	2.6	SAP(E)	0.8
DPV10	2.5	CADY	0.6
(PPR)4	2.4	PreS2-TLM	0.6

【0173】

實例5：抑制劑實驗

為抑制各種內飲機制，進行脈衝-追蹤實驗。簡言之，將HeLa 654細胞以5,000個細胞/孔之密度接種於96孔盤中的補充有10% FBS及1%青黴素-鏈黴素之MEM中。第二天，該等細胞用指定濃度之每一種抑制劑處理。30分鐘後，PMO-肽結合物以5 μM之濃度添加至各孔中。在37℃及5% CO₂下培育3小時之後，治處理培養基用新製培養基(無抑制劑或PMO-肽)替換且使細胞在37℃及5% CO₂下再生長22小時。對於4℃實驗，在接種後的當天，將細胞在4℃下預培育30分鐘，之後將PMO-肽結合物以5

μM 之濃度添加至各孔中。在 4°C 下培育3小時之後，處理培養基用新製培養基替換且使細胞在 37°C 及5% CO_2 下再生長22小時。隨後如上文所描述進行樣本製備及流式細胞測量術。除用20 μM 細胞鬆弛素D及200 nM渥曼青黴素(wortmannin)處理之外，各直方圖含有至少2,000個門控事件。結果展示於圖3A及圖3B中。

【0174】 雖然eGFP螢光在用許多抑制劑預培育之後相對不變，但用細胞鬆弛素D預培育導致eGFP螢光顯著降低。細胞鬆弛素D結合於肌動蛋白微絲之帶倒鉤的快速生長端，此防止肌動蛋白單體之組裝及拆解。此不僅影響細胞之細胞骨架，而且影響膜褶皺且重組以促進巨胞飲之能力。雖然eGFP螢光降低可能係由於外顯子跳躍路徑下游之影響，但此等結果表明巨胞飲在當前結合物之內化中發揮重要作用。

【0175】

參考文獻之併入

貫穿本申請案所引用之所有參考文獻(包括文獻參考、頒予之專利、公開之專利申請案及同在申請中之專利申請案)之全部內容在此以全文引用之方式明確地併入本文中。除非另外定義，否則本文所用之所有技術術語及科學術語與一般熟悉此項技術者通常已知之含義一致。

【0176】

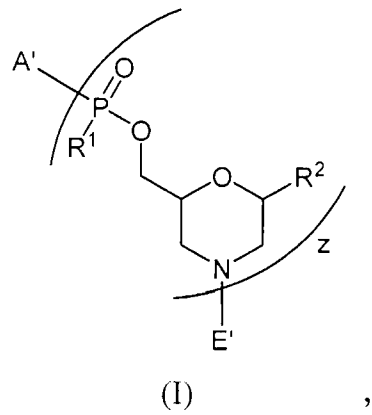
等效物

熟習此項技術者應認識到或能夠僅使用常規實驗來確定本文中所描述之本發明之具體實施例之許多等效物。希望此類等效物被以下申請專利範圍涵蓋。

【發明申請專利範圍】

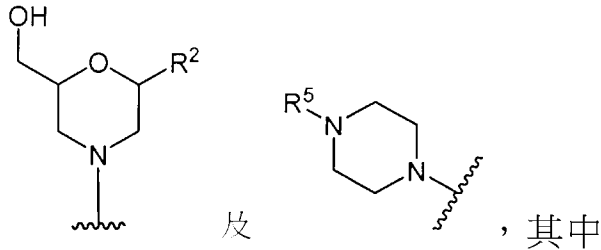
【請求項1】

一種具有下式I之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物：

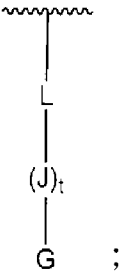


其中：

A'選自-NHCH₂C(O)NH₂、-N(C₁₋₆-烷基)CH₂C(O)NH₂、



R⁵為-C(O)(O-烷基)_x-OH，其中x為3至10且各烷基在每次出現時獨立地為C₂₋₆烷基，或R⁵選自-C(O)C₁₋₆烷基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、-(C₁₋₆-烷基)R⁶、-(C₁₋₆-雜烷基)-R⁶、芳基-R⁶、雜芳基-R⁶、-C(O)O-(C₁₋₆-烷基)-R⁶、-C(O)O-芳基-R⁶、-C(O)O-雜芳基-R⁶，及

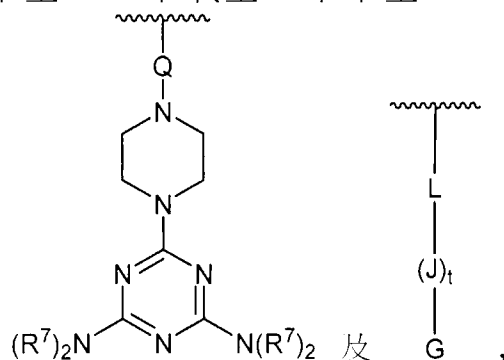


其中R⁶選自OH、SH及NH₂，或R⁶為共價連接至固體撐體之O、S或

各R¹獨立地選自OH及-NR³R⁴，其中各R³及R⁴在每次出現時獨立地為-C₁₋₆-烷基；

z為8至40；目

E'選自H、-C₁₋₆-烷基、-C(O)C₁₋₆-烷基、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯
 甲基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、三甲氧基三苯甲基、



Q為-C(O)(CH₂)₆C(O)-或-C(O)(CH₂)₂S₂(CH₂)₂C(O)-，且

R^7 為 $-(CH_2)_2OC(O)N(R^8)_2$ ，其中 R^8 為 $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ ，且

其中L藉由醯胺鍵共價連接至J之胺基端，且L為-C(O)(CH₂)₁₋₆-C₁₋₆-雜芳基-(CH₂)₁₋₆-C(O)-；

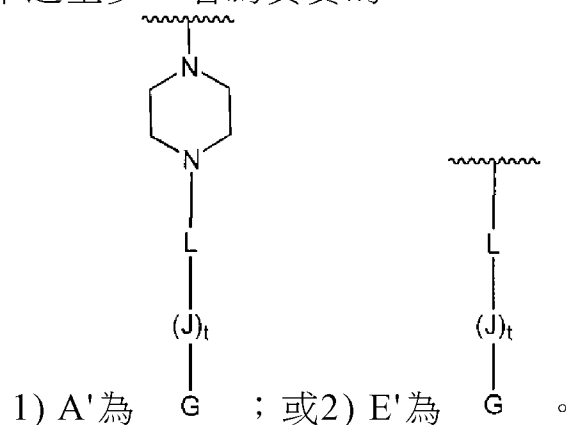
t為5至27；

各J在每次出現時獨立地選自由以下組成之群：精胺酸、甘胺酸、白胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸、離胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、脯胺酸、纈胺酸、異白胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、組胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸及蘇胺酸；

其中至少一個J為精胺酸；

G藉由醯胺鍵共價連接至J之羧基端，且G選自H、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -烷基、
 苯甲醯基及硬脂醯基；且

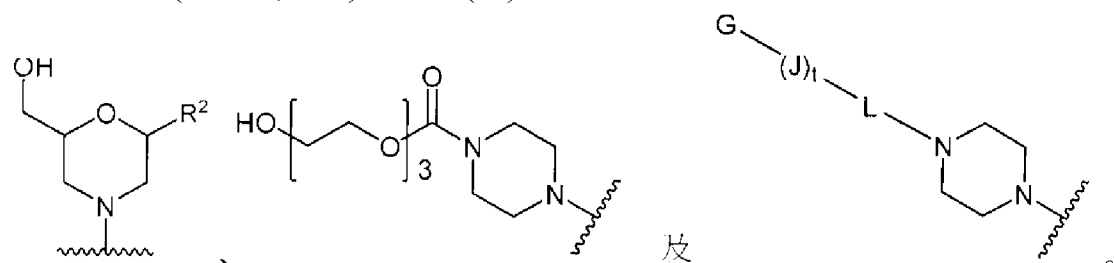
其中以下條件中之至少一者為真實的：



【請求項2】

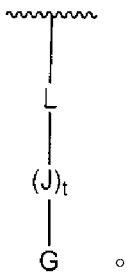
如請求項1之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中

A'選自 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{-烷基})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、



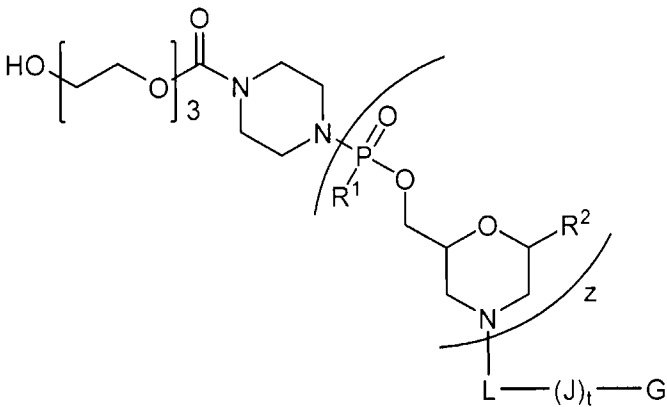
【請求項3】

如請求項1至2中任一項之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之
 鹽或水合物，其中E'選自H、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯甲
 基、4-甲氧基三苯甲基，及

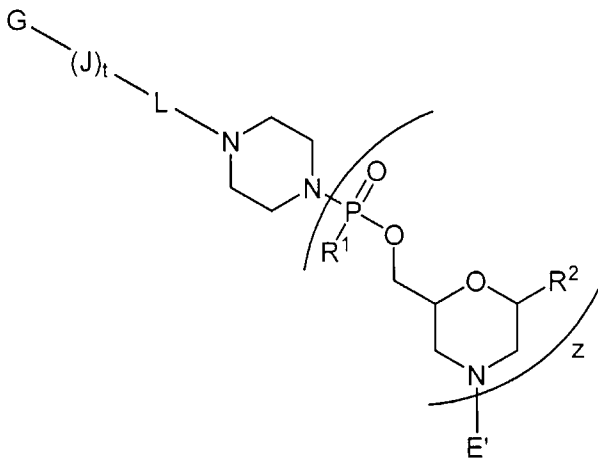


【請求項4】

如請求項1之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中該式I之肽-寡核苷酸結合物為選自以下之肽-寡核苷酸結合物：



(Ia)；及



(Ib)

其中E'選自H、C₁₋₆-烷基、-C(O)CH₃、苯甲醯基及硬脂醯基。

【請求項5】

如請求項4之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中該肽-寡核苷酸結合物具有式(Ia)。

【請求項6】

如請求項4之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中該肽-寡核苷酸結合物具有式(Ib)。

【請求項7】

如請求項1、2及4中任一項之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中各J獨立地選自甘胺酸、丙胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、離胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、脯胺酸、纈胺酸、精胺酸及蘇胺酸。

【請求項8】

如請求項1、2及4中任一項之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中各J為精胺酸。

【請求項9】

如請求項1、2及4中任一項之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中各R¹為N(CH₃)₂。

【請求項10】

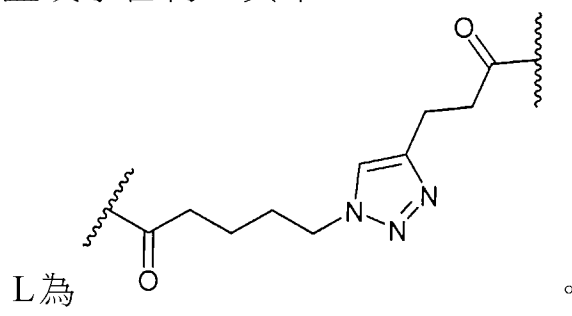
如請求項1、2及4中任一項之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中各R²為核鹼基，在每次出現時獨立地選自由以下組成之群：腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶及次黃嘌呤。

【請求項11】

如請求項1、2及4中任一項之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中L為-C(O)(CH₂)₁₋₆-三唑-(CH₂)₁₋₆C(O)-。

【請求項12】

如請求項1、2及4中任一項之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中



【請求項13】

如請求項1、2及4中任一項之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中G選自H、C(O)CH₃、苯甲醯基及硬脂醯基。

【請求項14】

如請求項1、2及4中任一項之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中G為-C(O)CH₃。

【請求項15】

如請求項1之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，其中J為RRRRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 1)、GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 2)、RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPG (SEQ ID NO: 3)、RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4)、RRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 5)、GRPRESGKKRKRKRLKP (SEQ ID NO: 6)、ALWKTLLKKVLKAPKKKRKV (SEQ ID NO: 7)、RRIPNRRPRR (SEQ ID NO: 8)、TRRQRTRRARRNR (SEQ ID NO: 9)、HARIKPTFRRLKWKYKGKFW (SEQ ID NO: 10)、GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (SEQ ID NO: 11)、LRRERQSRLRRERQSR (SEQ ID NO: 12)、RRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 13)、RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 14)、

KRARNTAAARRSRARKLQRMKQ (SEQ ID NO: 15) 、
RHIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 16) 、RRRRRRRR (SEQ ID NO:
17) 、KMTRAQRRAAARRNRWTAR (SEQ ID NO: 18) 、
RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO: 19) 、KQINNWFINQRKRHWK
(SEQ ID NO: 20) 、KLWMRWYSPTRRYG (SEQ ID NO: 21) 、
RRWWRRWRR (SEQ ID NO: 22) 、SQUIKIWFQNKRAKIKK (SEQ ID NO:
23) 、GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 24) 、
TRRNKRNRRIQEQLNRK (SEQ ID NO: 25) 、GKRKKKGKLGKKRDP (SEQ
ID NO: 26) 、RQVTIWFQNRRVKEKK (SEQ ID NO: 27) 、RLRWR (SEQ ID
NO: 28) 、PPRPPRPPRPPRPPR (SEQ ID NO: 29) 、CAYHRLRRC (SEQ ID
NO: 30) 、SRRARRSPRHLGSG (SEQ ID NO: 31) 、PPRPPRPPRPPR (SEQ
ID NO: 32) 、NAKTRRHERRRKLAIER (SEQ ID NO: 33) 、
VKRGLKLRHVRPRVTRMDV (SEQ ID NO: 34) 、
LYKKGPAKKGRPPLRGWFH (SEQ ID NO: 35) 、
TAKTRYKARRAELIAERR (SEQ ID NO: 36) 、KGTYKKKLMRIPLKGT
(SEQ ID NO: 37) 、PPRPPRPPR (SEQ ID NO: 38) 、
RASKRDGSWVKKLHRILE (SEQ ID NO: 39) 、
TRSSRAGLQWPVGRVHLLRK (SEQ ID NO: 40) 、
FKIYDKKVRTRVVKH (SEQ ID NO: 41) 、VRLPPPVRLLPPPVRLLPPP (SEQ
ID NO: 42) 、GPFHFYQFLFPPV (SEQ ID NO: 43) 、PLILLRLLRGQF (SEQ
ID NO: 44) 、YTAIAWVKAFIRKLRK (SEQ ID NO: 45) 、
KETWWETWWTEWSQPKKRKV (SEQ ID NO: 46) 、
LIRLWSHLIHIWFQNRRLKWKKK (SEQ ID NO: 47) 、

VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN (SEQ ID NO: 48) 、
MDAQTRRRERRAEKQAQWKAAN (SEQ ID NO: 49) 、
GSPWGLQHHPRT (SEQ ID NO: 50) 、KLALKALKALKAALKLA (SEQ
ID NO: 51) 、IPALK (SEQ ID NO: 52) 、VPALR (SEQ ID NO: 53) 、
LLIILRRRIRKQAHAAHSK (SEQ ID NO: 54) 、IAWVKAFIRKLRKGPLG
(SEQ ID NO: 55) 、AAVLLPVLLAAPVQRKRQKLP (SEQ ID NO: 56) 、
TSPLNIHNGQKL (SEQ ID NO: 57) 、VPTLK (SEQ ID NO: 58)或VSALK
(SEQ ID NO: 59)。

【請求項16】

如請求項1、2、4及15中任一項之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上
可接受之鹽或水合物，其中J為RRRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 1) 、
GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 2) 、
RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPG (SEQ ID NO: 3) 、RKKRRQRRR (SEQ
ID NO: 4) 、RRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 5) 、GRPRESGKKRKRKRLKP
(SEQ ID NO: 6)或ALWKTLLKKVLKAPKKKKRKV (SEQ ID NO: 7)。

【請求項17】

一種組合物，其包含如請求項1至16中任一項之肽-寡核苷酸結合物
或其醫藥學上可接受之鹽或水合物，及至少一種醫藥學上可接受之載劑。

【請求項18】

一種如請求項1至16中任一項之肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可
接受之鹽或水合物或如請求項17之組合物之用途，其用於製造供治療有需
要之受試者之肌肉疾病、病毒感染或細菌感染用的藥物。

【請求項19】

如請求項18之用途，其中該肌肉疾病為杜興氏肌肉失養症(Duchenne Muscular Dystrophy)。

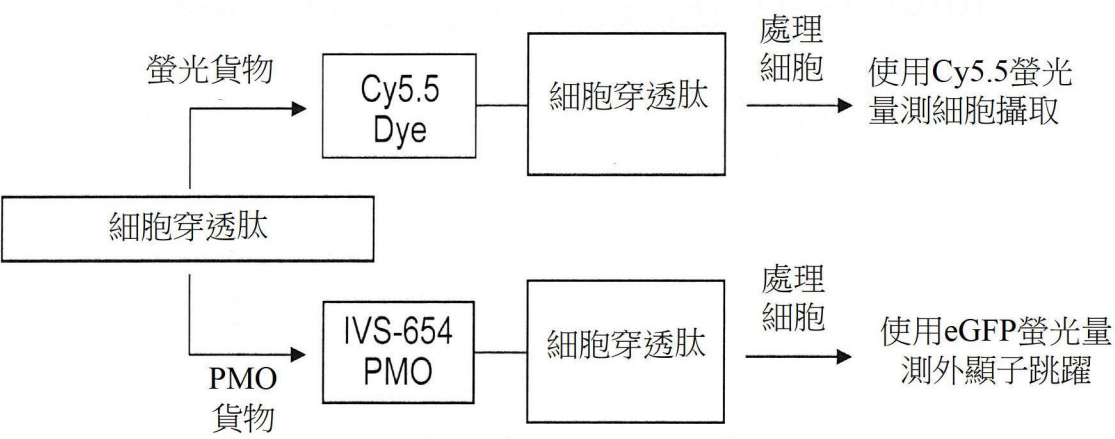
【請求項20】

如請求項18之用途，其中該病毒感染由選自由以下組成之群的病毒引起：馬堡病毒(marburg virus)、伊波拉病毒(ebola virus)、流感病毒及登革熱病毒(dengue virus)。

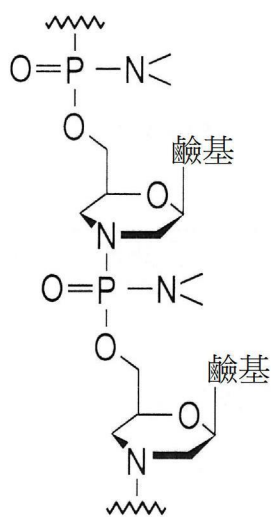
【請求項21】

如請求項18之用途，其中該細菌性感染由結核分枝桿菌引起。

【發明圖式】



【圖1A】

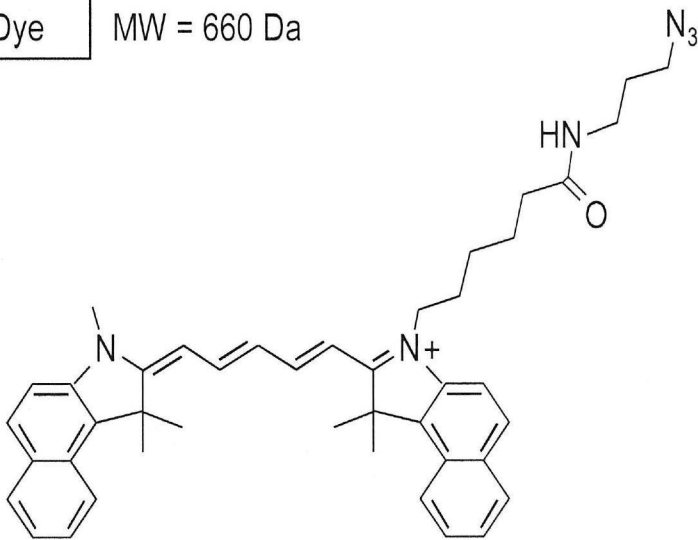


【圖1B】

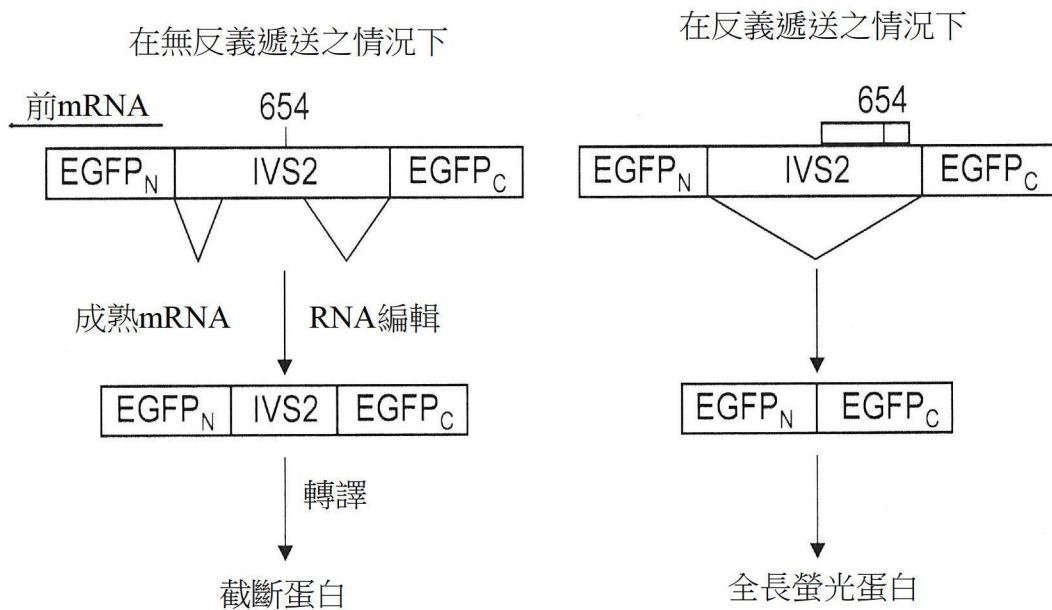
MW = 6337 Da



MW = 660 Da

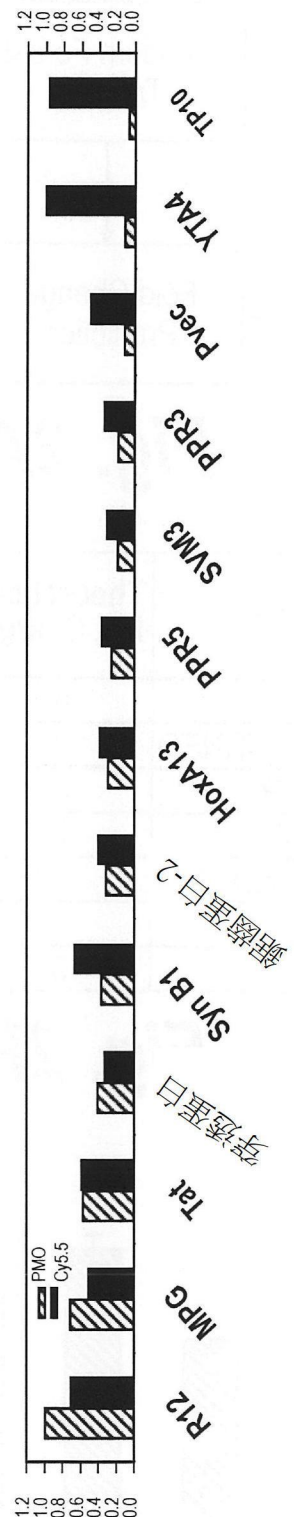


【圖1C】



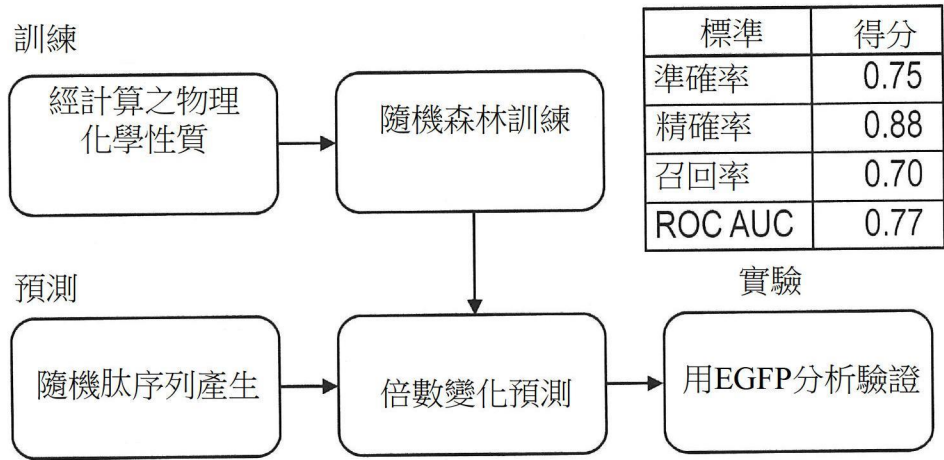
【圖1D】

標準化GFP發光



標準化GFP發光

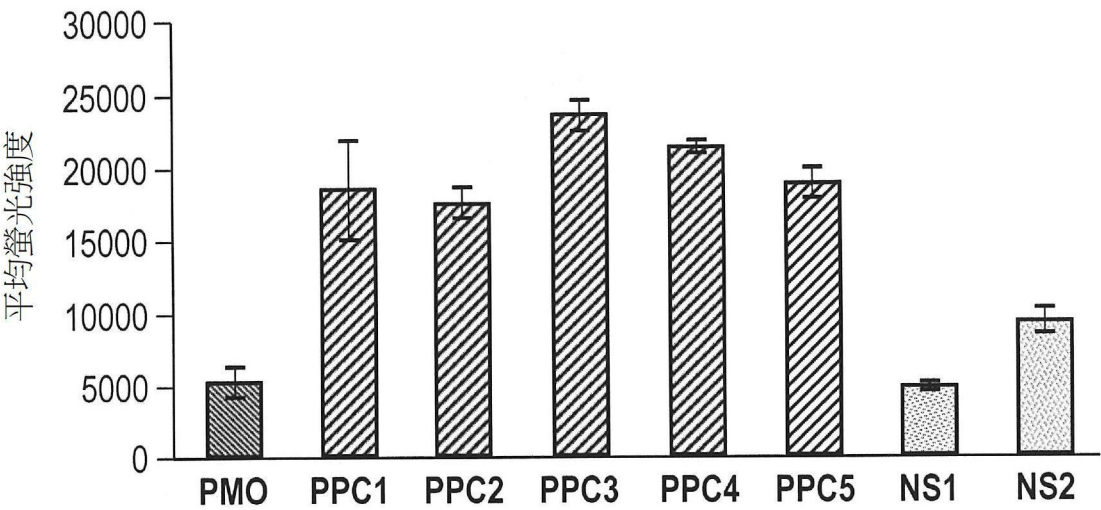
【圖1E】



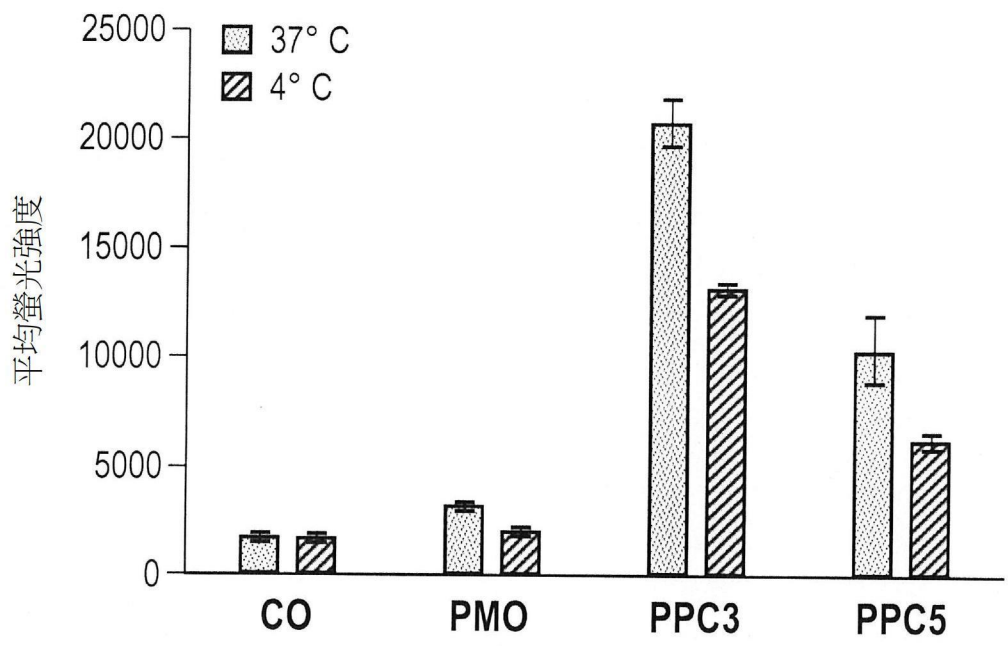
【圖2A】

名稱	序列	理論淨電荷	經預測倍數變化> 3	實驗倍數變化
PPC1	KQPRIPKRKK	6	是	3.4
PPC2	LKKRRKLPKKKPIRNEQ	8	是	3.3
PPC3	KKYRGRKRHPR	8	是	4.4
PPC4	APKRKKLKKRF	7	是	4
PPC5	GRAARAPGRRKQ	5	是	3.5
NS1	HDLPKGG	1	否	0.9
NS2	AGSHRRL	3	否	1.8

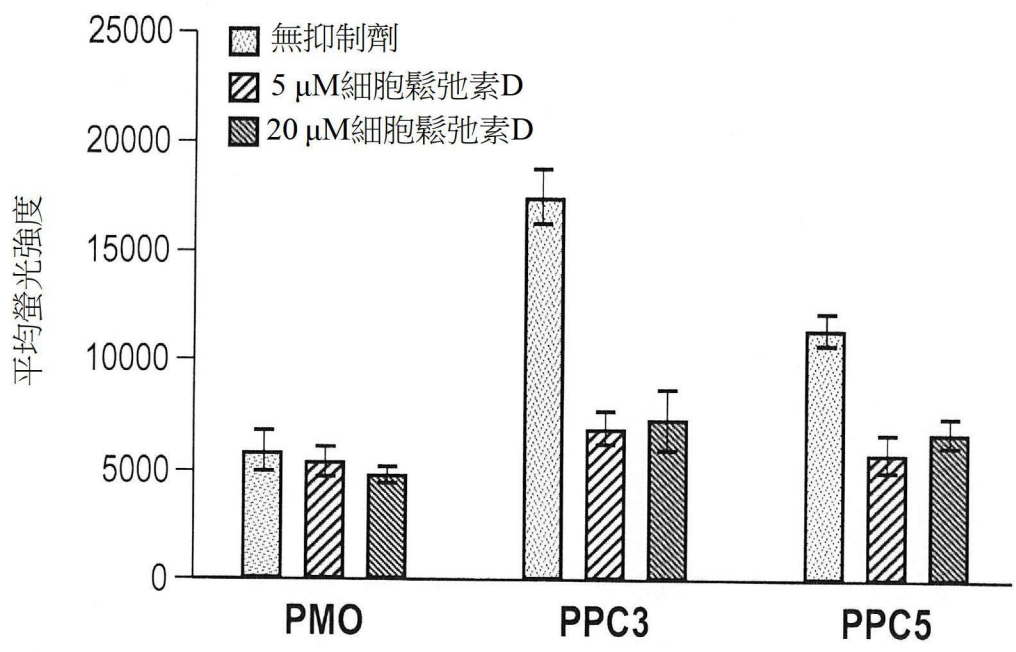
【圖2B】



【圖2C】



【圖3A】



【圖3B】