



(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 I709406 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：104113709

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 04 月 29 日

(51)Int. Cl. : A61K31/7125(2006.01)

C07H21/00 (2006.01)

C07H1/02 (2006.01)

(30)優先權：2014/05/01 美國

61/987,396

2015/04/23 美國

62/151,909

(71)申請人：美商傑龍公司 (美國) GERON CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：雷米亞 普雷克德蘭 RAMIYA, PREMCHANDRAN H. (US)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

CN 1373768A

US 2012/0329858A1

審查人員：官速貞

申請專利範圍項數：22 項 圖式數：8 共 191 頁

(54)名稱

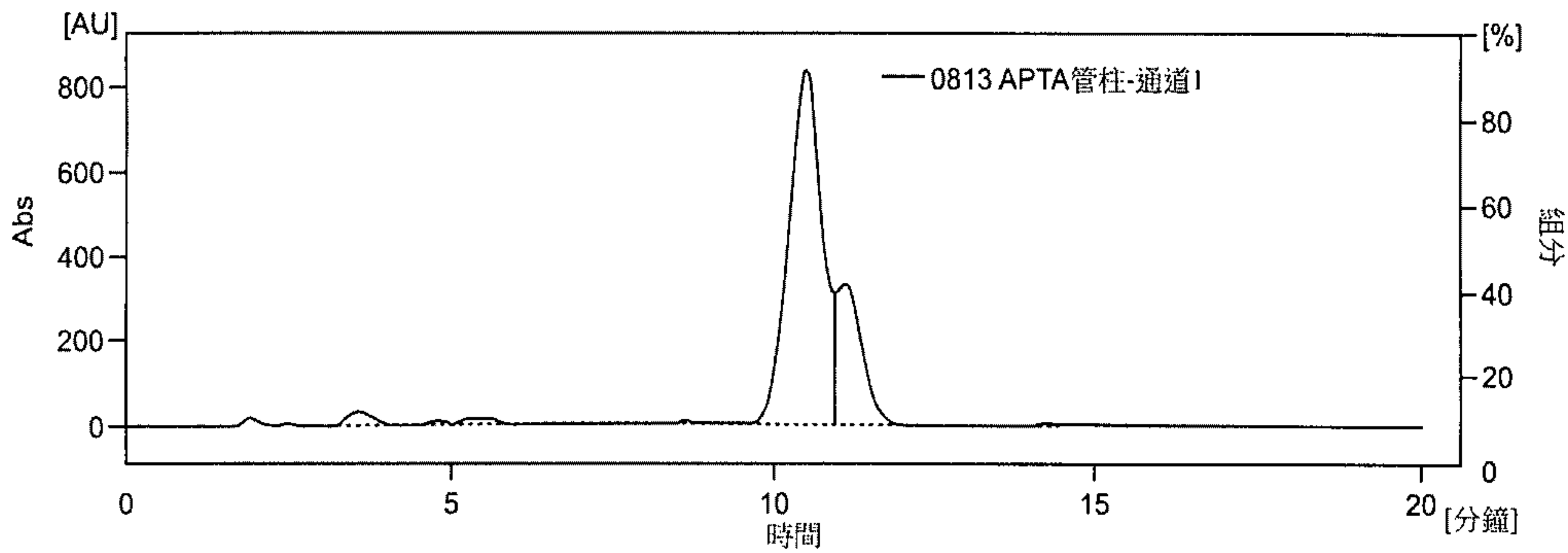
寡核酸組合物及其製備方法

(57)摘要

本揭露內容提供一種經由連續偶合循環來製備寡核苷酸之固相方法，該等循環包括至少一次二核苷酸二聚物次單元偶合於增長鏈之游離 3'-末端基團。寡核苷酸包括至少兩個藉由 N3'→P5'磷醯胺酯鍵聯接合之核苷次單元。該方法可包括以下步驟：(a)使連接於固相支撐物之末端核苷之經保護 3'胺基脫保護，該脫保護形成游離 3'胺基；(b)使該游離 3'胺基與 3'-經保護胺基-二核苷酸-5'-亞磷醯胺酯二聚物在親核催化劑存在下接觸以形成核苷間 N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯；以及(c)使該鍵聯氧化(例如硫化)。藉由標的方法產生之組合物可包括降低量之一或多種(N-x)寡核苷酸產物。亦提供包括標的寡核苷酸組合物之醫藥組合物。

The present disclosure provides a solid phase method of making oligonucleotides via sequential coupling cycles including at least one coupling of a dinucleotide dimer subunit to a free 3'-terminal group of a growing chain. The oligonucleotides include at least two nucleoside subunits joined by a N3'→P5' phosphoramidate linkage. The method may include the steps of (a) deprotecting the protected 3' amino group of a terminal nucleoside attached to a solid phase support, said deprotecting forming a free 3' amino group; (b) contacting the free 3' amino group with a 3'-protected amino-dinucleotide-5'-phosphoramidite dimer in the presence of a nucleophilic catalyst to form an internucleoside N3'→P5' phosphoramidite linkage; and (c) oxidizing (e.g., sulfurizing) the linkage. The compositions produced by the subject methods may include a reduced amount of one or more (N-x) oligonucleotide products. Also provided are pharmaceutical compositions including the subject oligonucleotide compositions.

指定代表圖：



結果表 (Uncal - 0813 APTA 管柱-通道1)

	滯留時間 [分鐘]	面積 [mV.s]	高度 [mV]	面積 [%]
1	3.557	926.835	32.478	2.2
2	4.853	248.330	7.706	0.6
3	5.427	430.800	12.110	1.0
4	8.593	12.505	0.485	0.0
5	10.503	30344.332	839.556	73.4
6	11.120	9320.006	331.485	22.6
7	14.610	41.645	1.230	0.1
總計		41324.453	1225.050	100.0

圖 1A

522-961-891
脈衝序列：s2pu1

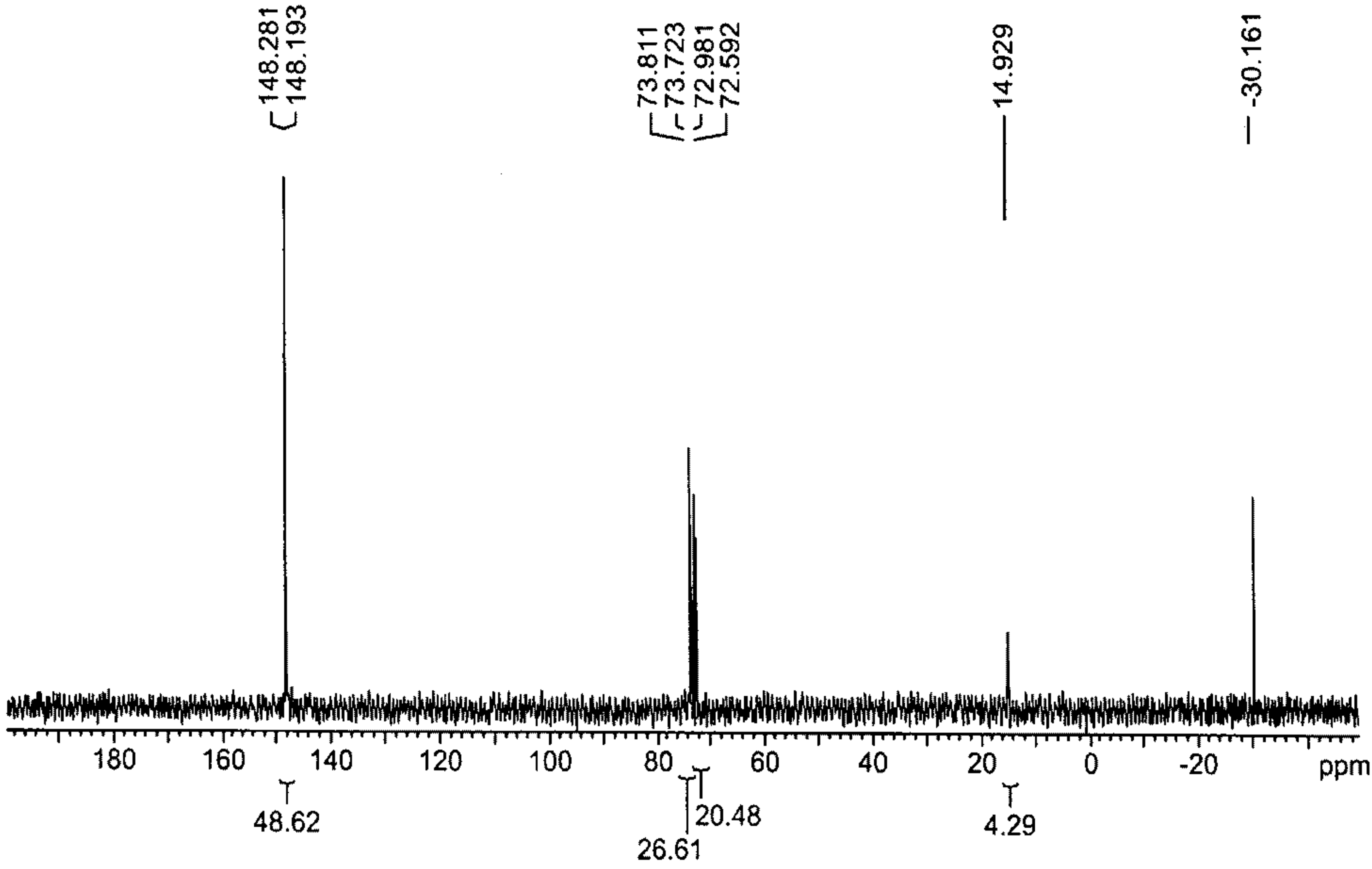
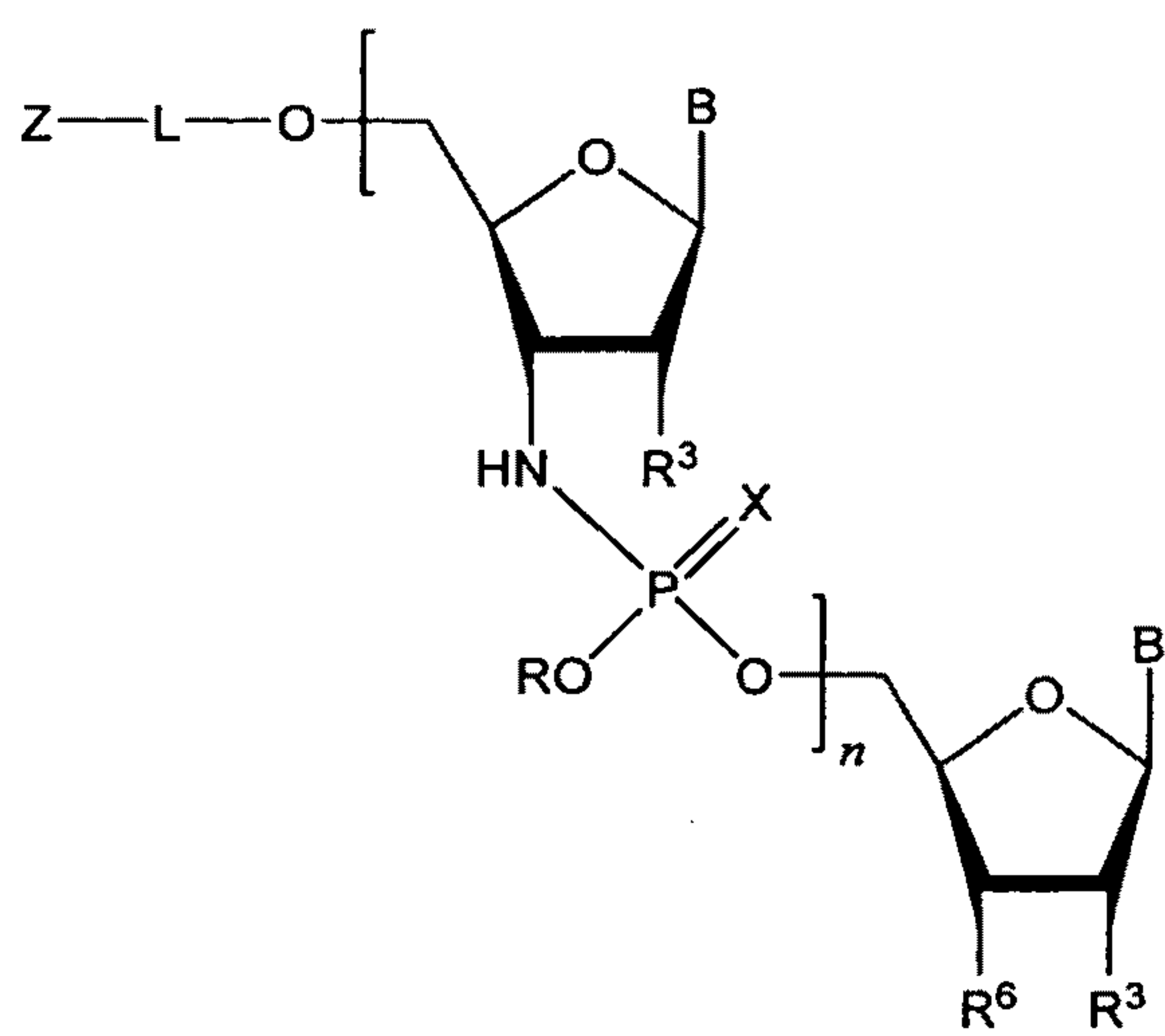


圖 1B

特徵化學式：

式(I)



式(I)

發明摘要

※申請案號：104113709

※申請日：104 年 04 月 29 日

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

寡核酸組合物及其製備方法

Oligonucleotide compositions and methods of making the same

【中文】

本揭露內容提供一種經由連續偶合循環來製備寡核苷酸之固相方法，該等循環包括至少一次二核苷酸二聚物次單元偶合於增長鏈之游離 3'-末端基團。寡核苷酸包括至少兩個藉由 N3'→P5'磷醯胺酯鍵聯接合之核苷次單元。該方法可包括以下步驟：(a)使連接於固相支撐物之末端核苷之經保護 3'胺基脫保護，該脫保護形成游離 3'胺基；(b)使該游離 3'胺基與 3'-經保護胺基-二核苷酸-5'-亞磷醯胺酯二聚物在親核催化劑存在下接觸以形成核苷間 N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯；以及(c)使該鍵聯氧化(例如硫化)。藉由標的方法產生之組合物可包括降低量之一或多種(N-x)寡核苷酸產物。亦提供包括標的寡核苷酸組合物之醫藥組合物。

【 英文 】

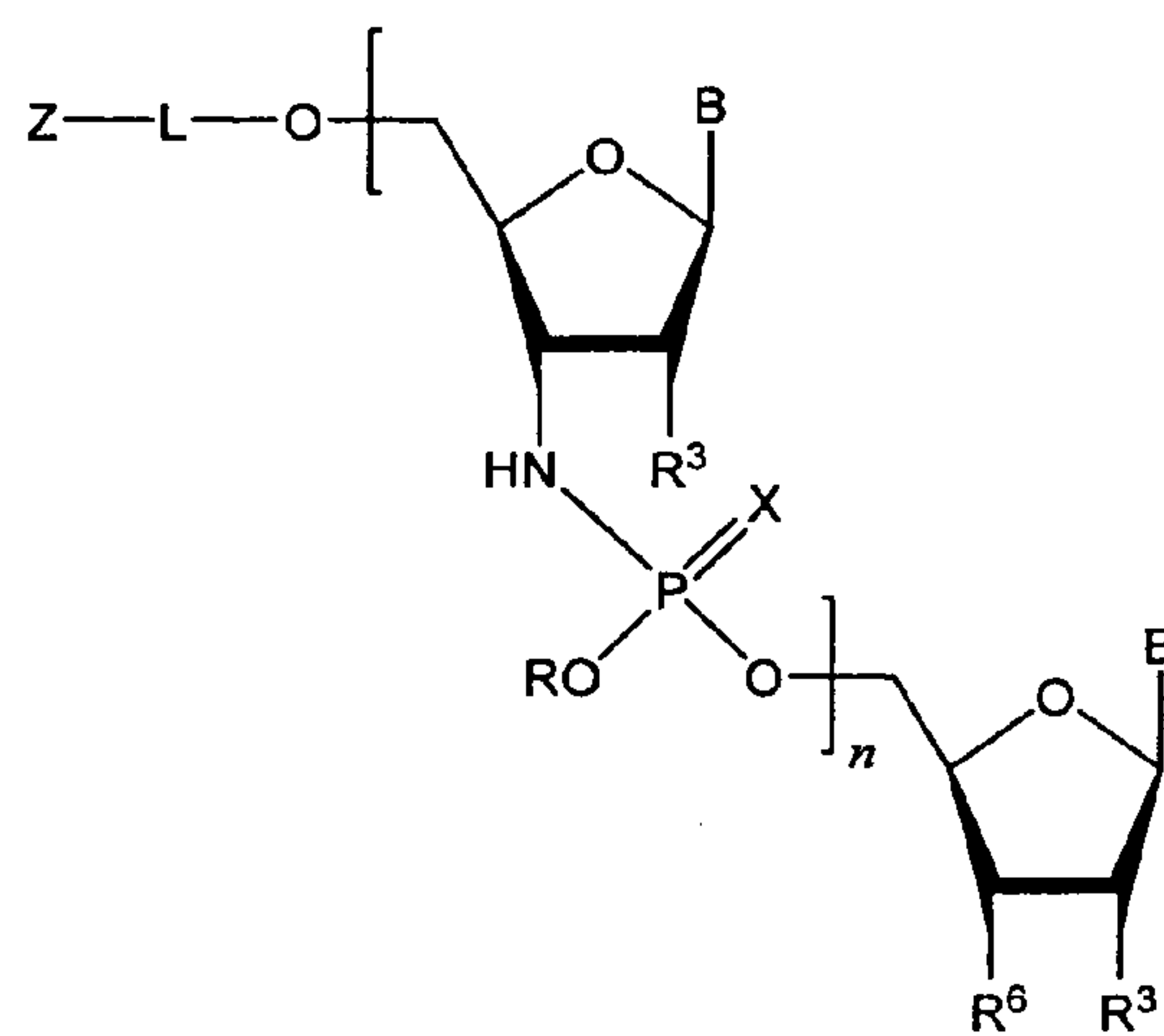
The present disclosure provides a solid phase method of making oligonucleotides via sequential coupling cycles including at least one coupling of a dinucleotide dimer subunit to a free 3'-terminal group of a growing chain. The oligonucleotides include at least two nucleoside subunits joined by a N3'→P5' phosphoramidate linkage. The method may include the steps of (a) deprotecting the protected 3' amino group of a terminal nucleoside attached to a solid phase support, said deprotecting forming a free 3' amino group; (b) contacting the free 3' amino group with a 3'-protected amino-dinucleotide-5'-phosphoramidite dimer in the presence of a nucleophilic catalyst to form an internucleoside N3'→P5' phosphoramidite linkage; and (c) oxidizing (e.g., sulfurizing) the linkage. The compositions produced by the subject methods may include a reduced amount of one or more (N-x) oligonucleotide products. Also provided are pharmaceutical compositions including the subject oligonucleotide compositions.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：式(I)



式(I)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

寡核酸組合物及其製備方法

Oligonucleotide compositions and methods of making the same

〔相關申請案之交叉參照〕

依據 35 U.S.C. § 119(e)，本申請案主張 2014 年 5 月 1 日申請之美國臨時申請案序列號 61/987,396 以及 2015 年 4 月 23 日申請之美國臨時申請案序列號 [62/151,909] (代理人參考編號 185/002X) 之申請日期的優先權，該等臨時申請案之揭露內容以引用的方式併入本文中。

【技術領域】

[0001] 本發明關於寡核苷酸組合物及其製備方法。

【先前技術】

[0002] 核酸聚合物化學已在醫藥、診斷及分析領域中，且更特定言之在反義及抗基因治療學、組合化學、分支 DNA 信號放大以及陣列基 DNA 診斷及分析之次領域中之許多發展中技術中起作用。此聚合物化學部分涉及改進諸如 DNA 之天然核酸聚合物之結合強度、特異性及核酸酶抗性。肽核酸 (PNA)、硫代磷酸酯、甲基膦酸酯及磷醯胺酯核苷間鍵聯為已應用於寡核苷酸來提供一或多種合乎

需要之性質，諸如核酸酶抗性、細胞攝取及可溶性之一些聚合物化學的實例。

[0003] 寡核苷酸 $N3' \rightarrow P5'$ 磷醯胺酯可與互補 DNA 及 RNA 股形成穩定雙鏈體，以及與 DNA 雙鏈體形成穩定三鏈體，且對核酸酶具有抗性。寡核苷酸 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代磷醯胺酯在活體外與活體內皆可用作有效反義劑。舉例而言，抑制端粒酶活性之含寡核苷酸化合物可用於治療端粒酶介導之病症，諸如癌症，因為癌細胞表現端粒酶活性，而正常人類體細胞在生物相關層面上不具有端粒酶活性。因此，製備及分離此等寡核苷酸之方法受到關注。

【發明內容】

[0004] 本揭露內容提供一種經由連續偶合循環來製備寡核苷酸之固相方法，該等循環包括至少一次二核苷酸二聚物次單元偶合於增長鏈之游離 3'-末端基團(例如 3'-羥基或 3'-胺基)。標的方法包括製備其中至少兩個核苷次單元係藉由 $N3' \rightarrow P5'$ 磷醯胺酯次單元間鍵聯接合之寡核苷酸。該方法可包括以下步驟：(a)使連接於固相支撐物之末端核苷之經保護 3'胺基脫保護，該脫保護形成游離 3'胺基；(b)使該游離 3'胺基與 3'-經保護胺基-二核苷酸-5'-亞磷醯胺酯二聚物在親核催化劑存在下接觸以形成核苷間 $N3' \rightarrow P5'$ 亞磷醯胺酯鍵聯；以及(c)使該鍵聯氧化。在一些情況下，使鍵聯氧化包括硫化以產生核苷間 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代磷醯胺酯鍵聯。

[0005] 本揭露內容之態樣包括藉由標的方法產生之包括降低量之一或多種(N-x)寡核苷酸產物的寡核苷酸組合物。在一些情況下，以一或多種(N-x)產物相對於 N 產物之重量計，降低量小於(1.9 x N)份至 100。根據標的方法製備之寡核苷酸包括具有 N 個與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元的序列之寡核苷酸，其中至少兩個核苷次單元係藉由 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。亦提供包括標的寡核苷酸組合物之醫藥組合物。

定義

[0006] 除非另外指示，否則以下術語具有以下含義。任何未定義之術語皆具有其此項技術認可之含義。

[0007] 如本文所用，術語聚核苷酸及寡核苷酸可互換使用。每當寡核苷酸由諸如「ATGUCCTG」之字母序列表示時，除非另外指示，否則應瞭解核苷酸係以自左至右之 5'→3'順序，且「A」表示去氧腺苷，「C」表示去氧胞苷，「G」表示去氧鳥苷，「T」表示胸苷，且「U」表示去氧尿苷。

[0008] 如本文所用，「核苷」包括天然核苷，包括 2'-去氧基及 2'-羥基形式，例如如 Kornberg 及 Baker, DNA Replication, 第 2 版 (Freeman, San Francisco, 1992)中所述。關於核苷之「類似物」包括具有經修飾鹼基部分及/或經修飾糖部分之合成核苷，例如由 Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, New York, 1980)大體描述。此等類

似物包括經設計以增強結合性質，例如穩定性、特異性或其類似性質之合成核苷，諸如由 Uhlmann 及 Peyman (Chemical Reviews, 90:543-584, 1990)所揭露。在一些實施例中，核苷或核苷類似物包括 3'-羥基或 3'-胺基。

[0009] 術語「鹼基」及「核苷鹼基」可互換使用，且在本文中定義包括(i)習知 DNA 及 RNA 鹼基(尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鳥嘌呤及胞嘧啶)，及(ii)經修飾鹼基或鹼基類似物(例如 5-甲基-胞嘧啶、5-溴尿嘧啶或肌苷)。鹼基類似物為分子結構模擬習知 DNA 或 RNA 鹼基之分子結構之化學物質。

[0010] 如本文所用，「嘧啶」意謂存在於天然核苷中之嘧啶，包括胞嘧啶、胸腺嘧啶及尿嘧啶；及其常見類似物，諸如含有氧基、甲基、丙炔基、甲氧基、羥基、胺基、硫基、鹵基及類似取代基之類似物。如本文所用之該術語進一步包括連接有常見保護基之嘧啶，諸如 N⁴-苯甲醯基胞嘧啶。其他常見嘧啶保護基係由 Beaucage 及 Iyer Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992)揭露。

[0011] 如本文所用，「嘌呤」意謂存在於天然核苷中之嘌呤，包括腺嘌呤、鳥嘌呤及次黃嘌呤；及其常見類似物，諸如含有氧基、甲基、丙炔基、甲氧基、羥基、胺基、硫基、鹵基及類似取代基之類似物。如本文所用之該術語進一步包括連接有常見保護基之嘌呤，諸如 N²-苯甲醯基鳥嘌呤、N²-異丁醯基鳥嘌呤、N⁶-苯甲醯基腺嘌呤及其類似物。其他常見嘌呤保護基係由 Beaucage 及 Iyer

Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992)揭露。如本文所用，作為化學名稱之組成部分之術語「-經保護-」係指此項技術認可之用於化合物之特定部分的保護基，例如關於核苷之「5'-經保護-羥基」包括三苯基甲基(亦即三苯甲基)、對大茴香基二苯基甲基(亦即單甲氧基三苯甲基或 MMT)、二-對大茴香基苯基甲基(亦即二甲氧基三苯甲基或 DMT)及其類似基團；且關於核苷鹼基之經保護核苷鹼基包括用諸如二甲基胺基甲脒(DMF)、苯甲醯基(Bz)、異丁醯基及其類似基團之基團保護雜原子。此項技術認可之保護基包括以下參考文獻中所述之保護基：Gait 編輯，Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984)；Amarnath 及 Broom, Chemical Reviews, 77:183-217, 1977；Pon 等人，Biotechniques, 6:768-775, 1988；Ohtsuka 等人，Nucleic Acids Research, 10:6553-6570, 1982；Eckstein 編輯，Oligonucleotides. and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991)；Greene 及 Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 第2版(John Wiley & Sons, New York, 1991)；Narang 編輯，Synthesis and Applications of DNA and RNA (Academic Press, New York, 1987)；Beaucage 及 Iyer Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992)及類似參考文獻。

[0012] 如本文所用，「寡核苷酸 N3'→P5'磷醯胺酯」意謂具有藉由至少一個 N3'→P5'磷醯胺酯鍵聯連接之核苷次單元之通常直鏈寡聚物。一般而言，核苷次單元包含

核苷或核苷類似物，但亦可包含具有可相容化學之更一般性部分，諸如無鹼基糖及其他烴部分，諸如以下參考文獻中所述：Newton 等人，*Nucleic Acids Research*, 21: 1155-1162 (1993)；Griffin 等人，*J. Am. Chem. Soc.*, 114: 7976-7982 (1992)；Jaschke 等人，*Tetrahedron Letters*, 34: 301-304 (1992)；Ma 等人，國際申請案 PCT / CA92/ 00423；Zon 等人，國際申請案 PCT / US90 / 06630；Durand 等人，*Nucleic Acids Research*, 18: 6353-6359 (1990)；Salunkhe 等人，*J. Am. Chem. Soc.*, 114: 8768-8772 (1992)；及其類似參考文獻。在一些情況下，該術語意謂其中所有核苷間鍵聯皆置換為 N3'→P5'磷醯胺酯鍵聯之寡核苷酸，亦即該術語包括部分以及完全「醯胺化」寡聚物。在一些情況下，其意謂其中所有核苷間鍵聯皆置換為 N3'→P5'磷醯胺酯鍵聯，且其中核苷次單元為天然核苷或其類似物之寡核苷酸。其中每個鍵聯皆為 N3'→P5'磷醯胺酯鍵聯之標的寡核苷酸 N3'→P5'磷醯胺酯(「完全醯胺化」)可包埋於其他寡核苷酸或聚核苷酸中或連接於其他寡核苷酸或聚核苷酸以形成「部分醯胺化」較大寡聚物。標的寡核苷酸 N3'→P5'磷醯胺酯可包括任何適宜 3'及/或 5'末端基團。在一些實施例中，寡核苷酸 N3'→P5'磷醯胺酯包括 3'-羥基末端基團或 3'-胺基末端基團。

[0013] 如本文所用，術語「磷酸酯」及「磷酸酯基」意欲涵蓋硫代磷酸酯基及側氧基磷酸酯基。

[0014] 如本文所用，術語「亞磷醯胺酯胺基」係指

連接於亞磷醯胺酯基團之磷原子之胺基 $--NR^4R^5$ ，且術語「亞磷醯胺酯氮」係指亞磷醯胺酯胺基之氮原子。

[0015] 「烷基」係指具有 1 至 10 個碳原子，且諸如 1 至 6 個碳原子(例如「具有 1 至 6 個碳原子之烷基」)、或 1 至 5(例如「具有 1 至 5 個碳原子之烷基」)、或 1 至 4(例如「具有 1 至 4 個碳原子之烷基」)、或 1 至 3 個碳原子(例如「具有 1 至 3 個碳原子之烷基」)之單價飽和脂族烴基。此術語例如包括直鏈及分支鏈烴基，諸如甲基(CH_3-)、乙基(CH_3CH_2-)、正丙基($CH_3CH_2CH_2-$)、異丙基($(CH_3)_2CH-$)、正丁基($CH_3CH_2CH_2CH_2-$)、異丁基($(CH_3)_2CHCH_2-$)、第二丁基($(CH_3)(CH_3CH_2)CH-$)、第三丁基($(CH_3)_3C-$)、正戊基($CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2-$)及新戊基($(CH_3)_3CCH_2-$)。

[0016] 術語「經取代烷基」係指如本文定義之烷基，其中烷基鏈中之一或多個碳原子已視情況經諸如 $-O-$ 、 $-N-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)_n-$ (其中 n 為 0 至 2)、 $-NR-$ (其中 R 為氫或烷基)之雜原子置換，且具有 1 至 5 個選自由以下組成之群之取代基：烷氧基、經取代烷氧基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、醯基、醯基胺基、醯基氧基、胺基、胺基醯基、胺基醯基氧基、氧基胺基醯基、疊氮基、氰基、鹵素、羥基、側氧基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫基芳基氧基、硫基雜芳基氧基、硫基雜環氧基、硫醇、硫基烷氧基、經取代硫基烷氧基、芳基、芳基氧基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、羥基胺

基、烷氧基胺基、硝基、-SO-烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-芳基、-SO₂-雜芳基及-NR^aR^b，其中 R^a 及 R^b 可相同或不同，且選自氫、視情況經取代烷基、環烷基、烯基、環烯基、炔基、芳基、雜芳基及雜環。在一些情況下，「經取代烷基」係指如本文定義之具有 1 至 5 個選自由以下組成之群之取代基的烷基：烷氧基、環烷基、環烯基、醯基、醯基胺基、醯基氧基、胺基、胺基醯基、胺基醯基氧基、氧基胺基醯基、疊氮基、氰基、鹵素、羥基、羧基、羧基烷基、硫醇、硫基烷氧基、芳基、芳基氧基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、磺醯胺基及-NR^aR^b，其中 R^a 及 R^b 可相同或不同，且選自氫、烷基、環烷基、烯基、環烯基、炔基、芳基、雜芳基及雜環。

[0017] 「伸烷基」係指較佳具有 1 至 6、且更佳 1 至 3 個碳原子之為直鏈或分支鏈，且視情況間插有一或多個選自-O-、-NR¹⁰-、-NR¹⁰C(O)-、-C(O)NR¹⁰-及其類似基團之基團的二價脂族烴基。此術語例如包括亞甲基(-CH₂-)、伸乙基(-CH₂CH₂-)、正伸丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、異伸丙基(-CH₂CH(CH₃)-)、(-C(CH₃)₂CH₂CH₂-)、(-C(CH₃)₂CH₂C(O)-)、(-C(CH₃)₂CH₂C(O)NH-)、(-CH(CH₃)CH₂-)及其類似基團。

[0018] 「經取代伸烷基」係指 1 至 3 個氫經如在以下「經取代」之定義中對於碳所述之取代基置換的伸烷基。

[0019] 術語「烷」係指如本文定義之烷基及伸烷基。

[0020] 術語「烷基胺基烷基」、「烷基胺基烯基」及「烷基胺基炔基」係指基團 $R'NHR''$ ，其中 R' 為如本文定義之烷基，且 R'' 為如本文定義之伸烷基、伸烯基或伸炔基。

[0021] 術語「烷芳基」或「芳烷基」係指基團-伸烷基-芳基及-經取代伸烷基-芳基，其中伸烷基、經取代伸烷基及芳基係在本文中所定義。

[0022] 「烷氧基」係指基團-O-烷基，其中烷基係如本文所定義。烷氧基例如包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、第三丁氧基、第二丁氧基、正戊氧基及其類似基團。術語「烷氧基」亦指基團烯基-O-、環烷基-O-、環烯基-O-及炔基-O-，其中烯基、環烷基、環烯基及炔基係如本文所定義。

[0023] 術語「經取代烷氧基」係指基團經取代烷基-O-、經取代烯基-O-、經取代環烷基-O-、經取代環烯基-O-及經取代炔基-O-，其中經取代烷基、經取代烯基、經取代環烷基、經取代環烯基及經取代炔基係如本文所定義。

[0024] 術語「烷氧基胺基」係指基團-NH-烷氧基，其中烷氧基係在本文中所定義。

[0025] 術語「鹵烷氧基」係指基團烷基-O-，其中烷基上之一或多個氫原子已經鹵基取代，且例如包括諸如三

氟甲氧基及其類似基團之基團。

[0026] 術語「鹵烷基」係指如上所述之經取代烷基，其中烷基上之一或多個氫原子已經鹵基取代。此等基團之實例不加限制地包括氟烷基，諸如三氟甲基、二氟甲基、三氟乙基及其類似基團。

[0027] 術語「烷基烷氧基」係指基團-伸烷基-O-烷基、伸烷基-O-經取代烷基、經取代伸烷基-O-烷基及經取代伸烷基-O-經取代烷基，其中烷基、經取代烷基、伸烷基及經取代伸烷基係如本文所定義。

[0028] 術語「烷基硫基烷氧基」係指基團-伸烷基-S-烷基、伸烷基-S-經取代烷基、經取代伸烷基-S-烷基及經取代伸烷基-S-經取代烷基，其中烷基、經取代烷基、伸烷基及經取代伸烷基係如本文所定義。

[0029] 「烯基」係指具有 2 至 6 個碳原子、且較佳 2 至 4 個碳原子，且具有至少 1 個、且較佳 1 至 2 個雙鍵不飽和位點之直鏈或分支鏈烴基。此術語例如包括雙乙烯基、烯丙基及丁-3-烯-1-基。此術語內包括順式及反式異構物或此等異構物之混合物。

[0030] 術語「經取代烯基」係指如本文定義之具有 1 至 5 個選自以下之取代基、或 1 至 3 個選自以下之取代基的烯基：烷氧基、經取代烷氧基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、醯基、醯基胺基、醯基氧基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、胺基醯基氧基、氧基胺基醯基、疊氮基、氰基、鹵素、羥基、側氧基、硫酮

基、羧基、羧基烷基、硫基芳基氧基、硫基雜芳基氧基、硫基雜環氧基、硫醇、硫基烷氧基、經取代硫基烷氧基、芳基、芳基氧基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、羥基胺基、烷氧基胺基、硝基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基及-SO₂-雜芳基。

[0031] 「炔基」係指具有 2 至 6 個碳原子、且較佳 2 至 3 個碳原子，且具有至少 1 個、且較佳 1 至 2 個參鍵不飽和位點之直鏈或分支鏈單價烴基。此等炔基之實例包括乙炔基(-C≡CH)及炔丙基(-CH₂C≡CH)。

[0032] 術語「經取代炔基」係指如本文定義之具有 1 至 5 個選自以下之取代基、或 1 至 3 個選自以下之取代基的炔基：烷氧基、經取代烷氧基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、醯基、醯基胺基、醯基氧基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、胺基醯基氧基、氧基胺基醯基、疊氮基、氰基、鹵素、羥基、側氧基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫基芳基氧基、硫基雜芳基氧基、硫基雜環氧基、硫醇、硫基烷氧基、經取代硫基烷氧基、芳基、芳基氧基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、羥基胺基、烷氧基胺基、硝基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基及-SO₂-雜芳基。

[0033] 「炔基氧基」係指基團-O-炔基，其中炔基係如本文所定義。炔基氧基例如包括乙炔基氧基、丙炔基氧

S

基及其類似基團。

[0034] 「醯基」係指基團 H-C(O)- 、烷基 -C(O)- 、經取代烷基 -C(O)- 、烯基 -C(O)- 、經取代烯基 -C(O)- 、炔基 -C(O)- 、經取代炔基 -C(O)- 、環烷基 -C(O)- 、經取代環烷基 -C(O)- 、環烯基 -C(O)- 、經取代環烯基 -C(O)- 、芳基 -C(O)- 、經取代芳基 -C(O)- 、雜芳基 -C(O)- 、經取代雜芳基 -C(O)- 、雜環基 -C(O)- 及經取代雜環基 -C(O)- ，其中烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環係如本文所定義。舉例而言，醯基包括「乙醯基」 $\text{CH}_3\text{C(O)-}$ 。

[0035] 「醯基胺基」係指基團 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 烷基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 經取代烷基、 $\text{NR}^{20}\text{C(O)}$ 環烷基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 經取代環烷基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 環烯基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 經取代環烯基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 烯基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 經取代烯基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 炔基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 經取代炔基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 芳基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 經取代芳基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 雜芳基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 經取代雜芳基、 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 雜環及 $\text{-NR}^{20}\text{C(O)}$ 經取代雜環，其中 R^{20} 為氫或烷基，且其中烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環係如本文所定義。

[0036] 「胺基羰基」或術語「胺基醯基」係指基團

$-C(O)NR^{21}R^{22}$ ，其中 R^{21} 及 R^{22} 獨立地選自由以下組成之群：氫、烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、芳基、經取代芳基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環，且其中 R^{21} 及 R^{22} 視情況與其結合之氮接合在一起以形成雜環或經取代雜環基團，且其中烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環係如本文所定義。

[0037] 「胺基羰基胺基」係指基團 $-NR^{21}C(O)NR^{22}R^{23}$ ，其中 R^{21} 、 R^{22} 及 R^{23} 係獨立地選自氫、烷基、芳基或環烷基，或其中兩個 R 基團接合以形成雜環基。

[0038] 術語「烷氧基羰基胺基」係指基團 $-NRC(O)OR$ ，其中各 R 獨立地為氫、烷基、經取代烷基、芳基、雜芳基或雜環基，其中烷基、經取代烷基、芳基、雜芳基及雜環基係如本文所定義。

[0039] 術語「鹽基氧基」係指基團烷基 $-C(O)O-$ 、經取代烷基 $-C(O)O-$ 、環烷基 $-C(O)O-$ 、經取代環烷基 $-C(O)O-$ 、芳基 $-C(O)O-$ 、雜芳基 $-C(O)O-$ 及雜環基 $-C(O)O-$ ，其中烷基、經取代烷基、環烷基、經取代環烷基、芳基、雜芳基及雜環基係如本文所定義。

[0040] 「胺基磺鹽基」係指基團 $-SO_2NR^{21}R^{22}$ ，其中 R^{21} 及 R^{22} 獨立地選自由以下組成之群：氫、烷基、經取

代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、芳基、經取代芳基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環、經取代雜環，且其中 R^{21} 及 R^{22} 視情況與其結合之氮接合在一起以形成雜環或經取代雜環基團，且烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環係如本文所定義。

[0041] 「磺醯基胺基」係指基團 $-NR^{21}SO_2R^{22}$ ，其中 R^{21} 及 R^{22} 獨立地選自由以下組成之群：氫、烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、芳基、經取代芳基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環，且其中 R^{21} 及 R^{22} 視情況與其結合之原子接合在一起以形成雜環或經取代雜環基團，且其中烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環係如本文所定義。

[0042] 「芳基」或「Ar」係指具有 6 至 18 個碳原子之具有單環(諸如存在於苯基中)或具有多個稠合環之環系統(此等芳族環系統之實例包括萘基、蒽基及茚滿基)的單價芳族碳環基團，該等稠合環可為或可不為芳族，其限制條件為連接點係經由芳族環之原子來達成。此術語例如包括苯基及萘基。除非另外由芳基取代基之定義約束，否則

此等芳基可視情況經 1 至 5 個選自以下之取代基或 1 至 3 個選自以下之取代基取代：醯基氧基、羥基、硫醇、醯基、烷基、烷氧基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、經取代烷基、經取代烷氧基、經取代烯基、經取代炔基、經取代環烷基、經取代環烯基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、醯基胺基、烷芳基、芳基、芳基氧基、疊氮基、羧基、羧基烷基、氰基、鹵素、硝基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、胺基醯基氧基、氧基醯基胺基、硫基烷氧基、經取代硫基烷氧基、硫基芳基氧基、硫基雜芳基氧基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基、-SO₂-雜芳基及三鹵甲基。在此等情況下，經 1 至 5 個取代基(例如，如本文所述)取代之芳基稱為「經取代芳基」。

[0043] 「芳基氧基」係指基團-O-芳基，其中芳基係如本文所定義，例如包括苯氧基、萘氧基及其類似基團，包括亦如本文定義之視情況經取代芳基。

[0044] 「胺基」係指基團-NH₂。

[0045] 術語「經取代胺基」係指基團-NRR，其中各 R 係獨立地選自由以下組成之群：氫、烷基、經取代烷基、環烷基、經取代環烷基、烯基、經取代烯基、環烯基、經取代環烯基、炔基、經取代炔基、芳基、雜芳基及雜環基，其限制條件為至少一個 R 不為氫。

[0046] 術語「疊氮基」係指基團-N₃。

[0047] 「羧基 (Carboxyl)」, 「羧基 (carboxy)」或「羧酸鹽」係指 $\text{-CO}_2\text{H}$ 或其鹽。

[0048] 「羧基酯 (Carboxyl ester)」或「羧基酯 (carboxy ester)」或術語「羧基烷基 (carboxyalkyl)」或「羧基烷基 (carboxylalkyl)」係指基團 -C(O)O- 烷基、 -C(O)O- 經取代烷基、 -C(O)O- 烯基、 -C(O)O- 經取代烯基、 -C(O)O- 炔基、 -C(O)O- 經取代炔基、 -C(O)O- 芳基、 -C(O)O- 經取代芳基、 -C(O)O- 環烷基、 -C(O)O- 經取代環烷基、 -C(O)O- 環烯基、 -C(O)O- 經取代環烯基、 -C(O)O- 雜芳基、 -C(O)O- 經取代雜芳基、 -C(O)O- 雜環及 -C(O)O- 經取代雜環, 其中烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環係如本文所定義。

[0049] 「(羧基酯)氧基」或「碳酸酯」係指基團 -O-C(O)O- 烷基、 -O-C(O)O- 經取代烷基、 -O-C(O)O- 烯基、 -O-C(O)O- 經取代烯基、 -O-C(O)O- 炔基、 -O-C(O)O- 經取代炔基、 -O-C(O)O- 芳基、 -O-C(O)O- 經取代芳基、 -O-C(O)O- 環烷基、 -O-C(O)O- 經取代環烷基、 -O-C(O)O- 環烯基、 -O-C(O)O- 經取代環烯基、 -O-C(O)O- 雜芳基、 -O-C(O)O- 經取代雜芳基、 -O-C(O)O- 雜環及 -O-C(O)O- 經取代雜環, 其中烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳

基、雜環及經取代雜環係如本文所定義。

[0050] 「氰基」或「腈」係指基團-CN。

[0051] 「環烷基」係指具有 3 至 10 個碳原子之具有單環或多環，包括稠合環系統、橋接環系統及螺環系統的環狀烷基。適合環烷基之實例例如包括金剛烷基、環丙基、環丁基、環戊基、環辛基及其類似基團。此等環烷基例如包括單環結構，諸如環丙基、環丁基、環戊基、環辛基及其類似基團；或多環結構，諸如金剛烷基及其類似基團。

[0052] 術語「經取代環烷基」係指具有 1 至 5 個選自以下之取代基、或 1 至 3 個選自以下之取代基之環烷基：烷基、經取代烷基、烷氧基、經取代烷氧基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、醯基、醯基胺基、醯基氧基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、胺基醯基氧基、氧基胺基醯基、疊氮基、氰基、鹵素、羥基、側氧基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫基芳基氧基、硫基雜芳基氧基、硫基雜環氧基、硫醇、硫基烷氧基、經取代硫基烷氧基、芳基、芳基氧基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、羥基胺基、烷氧基胺基、硝基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基及-SO₂-雜芳基。

[0053] 「環烯基」係指具有 3 至 10 個碳原子之具有單環或多環，且具有至少一個雙鍵、且較佳 1 至 2 個雙鍵的非芳族環狀烷基。

[0054] 術語「經取代環烯基」係指具有 1 至 5 個選自以下之取代基、或 1 至 3 個選自以下之取代基之環烯基：烷氧基、經取代烷氧基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、醯基、醯基胺基、醯基氧基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、胺基醯基氧基、氧基胺基醯基、疊氮基、氰基、鹵素、羥基、酮基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫基芳基氧基、硫基雜芳基氧基、硫基雜環氧基、硫醇、硫基烷氧基、經取代硫基烷氧基、芳基、芳基氧基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、羥基胺基、烷氧基胺基、硝基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基及-SO₂-雜芳基。

[0055] 「環炔基」係指具有 5 至 10 個碳原子之具有單環或多環，且具有至少一個參鍵的非芳族環烷基。

[0056] 「環烷氧基」係指-O-環烷基。

[0057] 「環烯基氧基」係指-O-環烯基。

[0058] 「鹵基」或「鹵素」係指氟基、氯基、溴基及碘基。

[0059] 「羥基(Hydroxy)」或「羥基(hydroxyl)」係指基團-OH。

[0060] 「雜芳基」係指在環內具有 1 至 15 個碳原子(諸如 1 至 10 個碳原子)及 1 至 10 個選自由氧、氮及硫組成之群之雜原子的芳族基團。此等雜芳基可具有單個環(諸如吡啶基、咪唑基或呋喃基)或於環系統中多個稠合環

(例如如在諸如吡啶基、喹啉基、苯并呋喃、苯并咪唑基或苯并噻吩基之基團中)，其中該環系統內之至少一個環為芳族，且該環系統內之至少一個環為芳族，其限制條件為連接點係經由芳族環之原子來達成。在某些實施例中，雜芳基之氮及/或硫環原子視情況經氧化以提供 N-氧化物($N \rightarrow O$)、亞磺醯基或磺醯基部分。此術語例如包括吡啶基、吡咯基、吡啶基、苯硫基及呋喃基。除非另外由雜芳基取代基之定義約束，否則此等雜芳基可視情況經 1 至 5 個選自以下之取代基或 1 至 3 個選自以下之取代基取代：醯基氧基、羥基、硫醇、醯基、烷基、烷氧基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、經取代烷基、經取代烷氧基、經取代烯基、經取代炔基、經取代環烷基、經取代環烯基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、醯基胺基、烷芳基、芳基、芳基氧基、疊氮基、羧基、羧基烷基、氰基、鹵素、硝基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、胺基醯基氧基、氧基醯基胺基、硫基烷氧基、經取代硫基烷氧基、硫基芳基氧基、硫基雜芳基氧基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基及-SO₂-雜芳基及三鹵甲基。在此等情況下，經 1 至 5 個取代基(例如，如本文所述)取代之雜芳基稱為「經取代雜芳基」。

[0061] 術語「雜芳烷基」係指基團-伸烷基-雜芳基，其中伸烷基及雜芳基係在本文中所定義。此術語例如包括吡啶基甲基、吡啶基乙基、吡啶基甲基及其類似基團。

[0062] 「雜芳基氧基」係指-O-雜芳基。

[0063] 「雜環 (Heterocycle)」, 「雜環 (heterocyclic)」, 「雜環烷基」及「雜環基」係指具有單個環或多個稠合環, 包括稠合環系統、橋接環系統及螺環系統, 且具有 3 至 20 個環原子, 包括 1 至 10 個雜原子的飽和或不飽和基團。此等環原子係選自由氮、硫或氧組成之群, 其中在稠合環系統中, 一或多個環可為環烷基、芳基或雜芳基, 其限制條件為連接點係經由非芳族環來達成。在某些實施例中, 雜環基團之氮及/或硫原子視情況經氧化以提供 N-氧化物、-S(O)-或-SO₂-部分。

[illegible]

[0065] 除非另外由雜環取代基之定義約束，否則此等雜環基團可視情況經 1 至 5、或 1 至 3 個選自以下之取代基取代：烷氧基、經取代烷氧基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、醯基、醯基胺基、醯基氧

基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、胺基醯基氧基、氧基胺基醯基、疊氮基、氰基、鹵素、羥基、側氧基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫基芳基氧基、硫基雜芳基氧基、硫基雜環氧基、硫醇、硫基烷氧基、經取代硫基烷氧基、芳基、芳基氧基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、羥基胺基、烷氧基胺基、硝基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基、-SO₂-雜芳基及稠合雜環。

[0066] 「雜環基氧基」係指基團-O-雜環基。

[0067] 術語「雜環基硫基」係指基團雜環-S-。

[0068] 術語「伸雜環基」係指由如本文定義之雜環形成之二價基團。

[0069] 術語「羥基胺基」係指基團-NHOH。

[0070] 「硝基」係指基團-NO₂。

[0071] 「側氧基」係指原子(=O)。

[0072] 「磺醯基」係指基團 SO₂-烷基、SO₂-經取代烷基、SO₂-烯基、SO₂-經取代烯基、SO₂-環烷基、SO₂-經取代環烷基、SO₂-環烯基、SO₂-經取代環烯基、SO₂-芳基、SO₂-經取代芳基、SO₂-雜芳基、SO₂-經取代雜芳基、SO₂-雜環及 SO₂-經取代雜環，其中烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環係如本文所定義。磺醯基例如包括甲基-SO₂-、苯基-SO₂-及 4-甲基苯基-SO₂-。

[0073] 「磺醯基氧基」係指基團-OSO₂-烷基、OSO₂-經取代烷基、OSO₂-烯基、OSO₂-經取代烯基、OSO₂-環烷基、OSO₂-經取代環烷基、OSO₂-環烯基、OSO₂-經取代環烯基、OSO₂-芳基、OSO₂-經取代芳基、OSO₂-雜芳基、OSO₂-經取代雜芳基、OSO₂-雜環及OSO₂經取代雜環，其中烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環係如本文所定義。

[0074] 術語「胺基羧基氧基」係指基團-OC(O)NRR，其中各R獨立地為氫、烷基、經取代烷基、芳基、雜芳基或雜環，其中烷基、經取代烷基、芳基、雜芳基及雜環係如本文所定義。

[0075] 「硫醇」係指基團-SH。

[0076] 「硫基」或術語「硫酮基」係指原子(=S)。

[0077] 「烷基硫基」或術語「硫基烷氧基」係指基團-S-烷基，其中烷基係如本文所定義。在某些實施例中，硫可經氧化成-S(O)-。亞砷可以一或多種立體異構物形式存在。

[0078] 術語「經取代硫基烷氧基」係指基團-S-經取代烷基。

[0079] 術語「硫基芳基氧基」係指基團芳基-S-，其中該芳基係如本文所定義，包括亦在本文中定義之視情況經取代芳基。

[0080] 術語「硫基雜芳基氧基」係指基團雜芳基-S-，其中該雜芳基係如本文所定義，包括亦如本文定義之視情況經取代芳基。

[0081] 術語「硫基雜環氧基」係指基團雜環基-S-，其中該雜環基係如本文所定義，包括亦如本文定義之視情況經取代雜環基。

[0082] 除本文揭露內容之外，術語「經取代」在用於修飾指定基團時亦可指該指定基團之一或多個氫原子各自獨立於彼此經如下定義之相同或不同取代基置換。

[0083] 除本文關於個別術語揭露之基團之外，除非另外規定，否則用於取代指定基團中之飽和碳原子上之一或多個氫(單一碳上之任何兩個氫可經=O、=NR⁷⁰、=N-OR⁷⁰、=N₂或=S置換)的取代基為-R⁶⁰、鹵基、=O、-OR⁷⁰、-SR⁷⁰、-NR⁸⁰R⁸⁰、三鹵甲基、-CN、-OCN、-SCN、-NO、-NO₂、=N₂、-N₃、-SO₂R⁷⁰、-SO₂O⁻M⁺、-SO₂OR⁷⁰、-OSO₂R⁷⁰、-OSO₂O⁻M⁺、-OSO₂OR⁷⁰、-P(O)(O⁻)₂(M⁺)₂、-P(O)(OR⁷⁰)O⁻M⁺、-P(O)(OR⁷⁰)₂、-C(O)R⁷⁰、-C(S)R⁷⁰、-C(NR⁷⁰)R⁷⁰、-C(O)O⁻M⁺、-C(O)OR⁷⁰、-C(S)OR⁷⁰、-C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰、-OC(O)R⁷⁰、-OC(S)R⁷⁰、-OC(O)O⁻M⁺、-OC(O)OR⁷⁰、-OC(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)R⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)R⁷⁰、-NR⁷⁰CO₂⁻M⁺、-NR⁷⁰CO₂R⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰及-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰，其中R⁶⁰係選自由以下組成之群：視情況經取代烷基、環烷基、雜烷

基、雜環烷基烷基、環烷基烷基、芳基、芳基烷基、雜芳基及雜芳基烷基，各 R^{70} 獨立地為氫或 R^{60} ；各 R^{80} 獨立地為 R^{70} ，或者兩個 R^{80} 連同其所鍵結之氮原子一起形成 5、6 或 7 員雜環烷基，其可視情況包括 1 至 4 個選自由 O、N 及 S 組成之群之相同或不同其他雜原子，其中 N 可具有 -H 或 C_1 - C_3 烷基取代；且各 M^+ 為具有淨單一正電荷之相對離子。各 M^+ 可獨立地為例如鹼離子，諸如 K^+ 、 Na^+ 、 Li^+ ；銨離子，諸如 $^+N(R^{60})_4$ ；或鹼土離子，諸如 $[Ca^{2+}]_{0.5}$ 、 $[Mg^{2+}]_{0.5}$ 或 $[Ba^{2+}]_{0.5}$ (下標 0.5 意謂此等二價鹼土離子之一個相對離子可為本發明化合物之離子化形式，且另一相對離子為諸如氯根之相對離子，或本文揭露之兩個離子化化合物可充當此等二價鹼土離子之相對離子，或本發明之雙重離子化化合物可充當此等二價鹼土離子之相對離子)。作為具體實例， $-NR^{80}R^{80}$ 意欲包括 $-NH_2$ 、 $-NH$ -烷基、 N -吡咯啉基、 N -哌嗪基、 $4N$ -甲基-哌嗪-1-基及 N -嗎啉基。

[0084] 除本文揭露內容之外，除非另外規定，否則「經取代」烯、炔、芳基及雜芳基中之不飽和碳原子上之氫的取代基為 $-R^{60}$ 、鹵基、 $-O^-M^+$ 、 $-OR^{70}$ 、 $-SR^{70}$ 、 $-S^-M^+$ 、 $-NR^{80}R^{80}$ 、三鹵甲基、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SO_2R^{70}$ 、 $-SO_3^-M^+$ 、 $-SO_3R^{70}$ 、 $-OSO_2R^{70}$ 、 $-OSO_3^-M^+$ 、 $-OSO_3R^{70}$ 、 $-PO_3^{-2}(M^+)_2$ 、 $-P(O)(OR^{70})O^-M^+$ 、 $-P(O)(OR^{70})_2$ 、 $-C(O)R^{70}$ 、 $-C(S)R^{70}$ 、 $-C(NR^{70})R^{70}$ 、 $-CO_2^-M^+$ 、 $-CO_2R^{70}$ 、 $-C(S)OR^{70}$ 、 $-C(O)NR^{80}R^{80}$ 、

-C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰、-OC(O)R⁷⁰、-OC(S)R⁷⁰、-OCO₂⁻M⁺、
 -OCO₂R⁷⁰、-OC(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)R⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)R⁷⁰、
 -NR⁷⁰CO₂⁻M⁺、-NR⁷⁰CO₂R⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰、
 -NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰ 及
 -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰，其中 R⁶⁰、R⁷⁰、R⁸⁰ 及 M⁺係如先前
 所定義，其限制條件為在經取代烯或炔之情況下，取代基
 不為 -O⁻M⁺、-OR⁷⁰、-SR⁷⁰ 或 -S⁻M⁺。

[0085] 除關於本文個別術語揭露之基團之外，除非
 另外規定，否則「經取代」雜烷基及環雜烷基中之氮原子
 上之氫的取代基為 -R⁶⁰、-O⁻M⁺、-OR⁷⁰、-SR⁷⁰、-S⁻M⁺、
 -NR⁸⁰R⁸⁰、三鹵甲基、-CF₃、-CN、-NO、-NO₂、
 -S(O)₂R⁷⁰、-S(O)₂O⁻M⁺、-S(O)₂OR⁷⁰、-OS(O)₂R⁷⁰、
 -OS(O)₂O⁻M⁺、-OS(O)₂OR⁷⁰、-P(O)(O⁻)₂(M⁺)₂、
 -P(O)(OR⁷⁰)O⁻M⁺、-P(O)(OR⁷⁰)(OR⁷⁰)、-C(O)R⁷⁰、
 -C(S)R⁷⁰、-C(NR⁷⁰)R⁷⁰、-C(O)OR⁷⁰、-C(S)OR⁷⁰、
 -C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰、-OC(O)R⁷⁰、
 -OC(S)R⁷⁰、-OC(O)OR⁷⁰、-OC(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)R⁷⁰、
 -NR⁷⁰C(S)R⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰、
 -NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰ 及
 -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰，其中 R⁶⁰、R⁷⁰、R⁸⁰ 及 M⁺係如先前
 所定義。

[0086] 除本文揭露內容之外，在某一實施例中，經
 取代基團具有 1、2、3 或 4 個取代基、1、2 或 3 個取代
 基、1 或 2 個取代基、或 1 個取代基。

[0087] 應瞭解在以上定義之所有經取代基團中，藉由用其自身之其他取代基定義取代基達成之聚合物(例如經取代芳基具有經取代芳基作為取代基，該取代基自身經經取代芳基取代，該經取代芳基進一步經經取代芳基取代等)不欲包括在本文中。在此等情況下，此等取代之最大數目為三。舉例而言，本文明確涵蓋之經取代芳基之連續取代形式限於經取代芳基-(經取代芳基)-經取代芳基。

[0088] 除非另外指示，否則對未在本文中明確定義之取代基之命名係藉由依次命名官能基之末端部分及鄰近於連接點之官能基來達成。舉例而言，取代基「芳基烷基氧基羰基」係指基團(芳基)-(烷基)-O-C(O)-。

[0089] 關於本文揭露之含有一或多個取代基之任何基團，當然應瞭解此等基團不含有在空間上不切實際及/或在合成上非可行之任何取代或取代樣式。此外，標的化合物包括由取代此等化合物產生之所有立體化學異構物。

[0090] 術語「醫藥學上可接受之鹽」意謂可為向諸如哺乳動物之患者投與所接受之鹽(具有相對離子之鹽對於既定劑量方案具有可接受之哺乳動物安全性)。此等鹽可來源於醫藥學上可接受之無機或有機鹼以及由醫藥學上可接受之無機或有機酸。「醫藥學上可接受之鹽」係指化合物之醫藥學上可接受之鹽，該等鹽係來源於此項技術中熟知且僅舉例而言包括鈉及其類似物之多種有機及無機相對離子；且當分子含有鹼性官能基時，該等鹽為有機或無機酸之鹽，諸如鹽酸鹽及其類似物。相關醫藥學上可接受

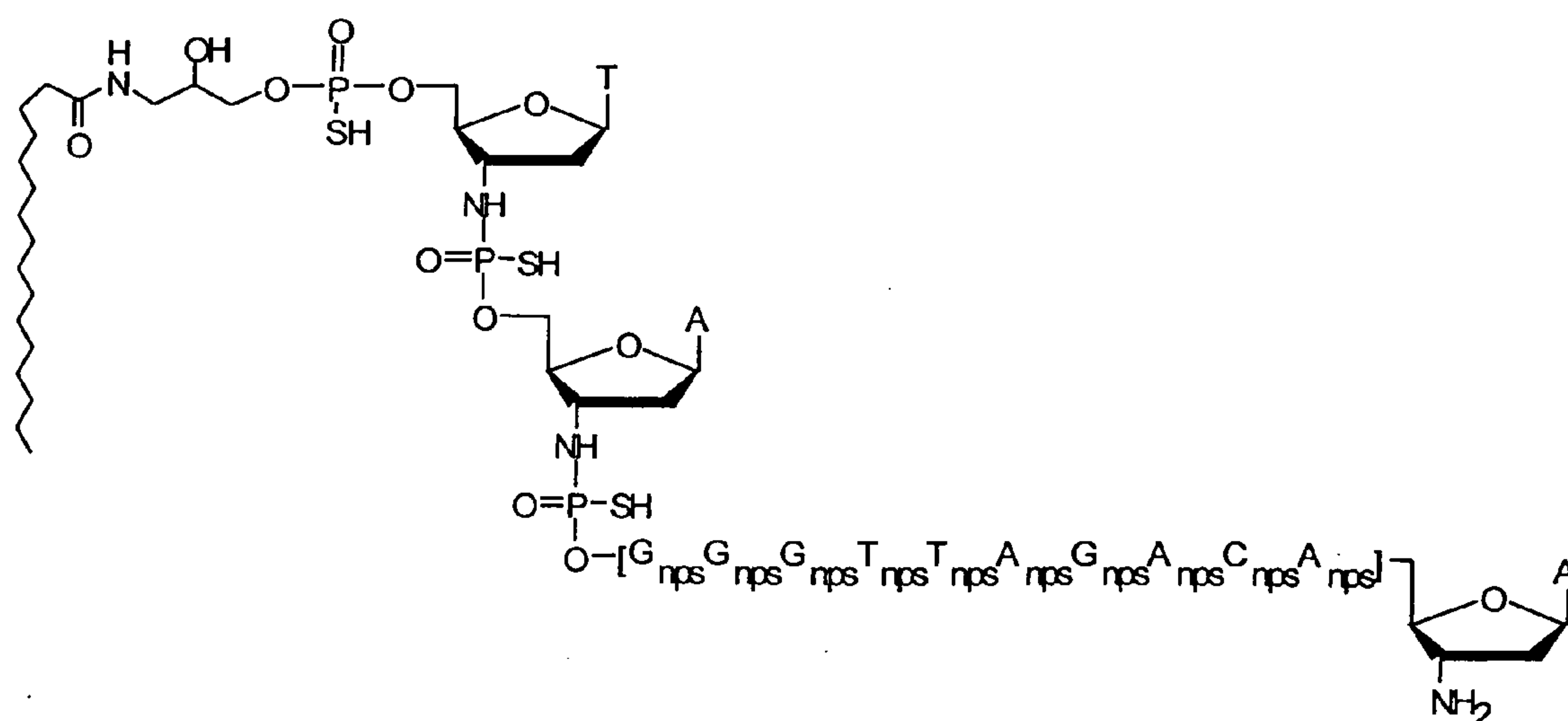
之鹽包括但不限於鋁、銨、精胺酸、鋇、苯乍生 (benzathine)、鈣、膽茶鹼、乙二胺、賴胺酸、鋰、鎂、葡甲胺、普魯卡因、鉀、鈉、緩血酸胺、N-甲基葡糖胺、N,N'-二苯甲基乙二胺、氯普魯卡因、二乙醇胺、乙醇胺、哌嗪、鋅、二異丙胺、二異丙基乙胺、三乙胺及三乙醇胺鹽。

[0091] 術語「其鹽」意謂當酸之質子經諸如金屬陽離子或有機陽離子及其類似物之陽離子置換時形成之化合物。當適用時，鹽為醫藥學上可接受之鹽，但此不為不欲向患者投與之中間化合物之鹽所需。舉例而言，本發明化合物之鹽包括其中化合物由無機或有機酸質子化以形成陽離子之鹽，其中無機或有機酸之共軛鹼作為鹽之陰離子組分。相關鹽包括但不限於鋁、銨、精胺酸、鋇、苯乍生、鈣、銻、膽茶鹼、乙二胺、鋰、鎂、葡甲胺、普魯卡因、N-甲基葡糖胺、哌嗪、鉀、鈉、緩血酸胺、鋅、N,N'-二苯甲基乙二胺、氯普魯卡因、二乙醇胺、乙醇胺、哌嗪、二異丙胺、二異丙基乙胺、三乙胺及三乙醇胺鹽。應瞭解，對於本文描繪之包括具有核苷間鍵聯之骨架的任何寡核苷酸結構，此等寡核苷酸亦可包括任何適宜鹽形式。在一些實施例中，為簡單起見，描繪核苷間鍵聯的酸性形式。在一些情況下，標的化合物之鹽為單價陽離子鹽。在某些情況下，標的化合物之鹽為二階陽離子鹽。在一些情況下，標的化合物之鹽為三價陽離子鹽。「溶劑合物」係指藉由組合溶劑分子與溶質之分子或離子形成之複合物。

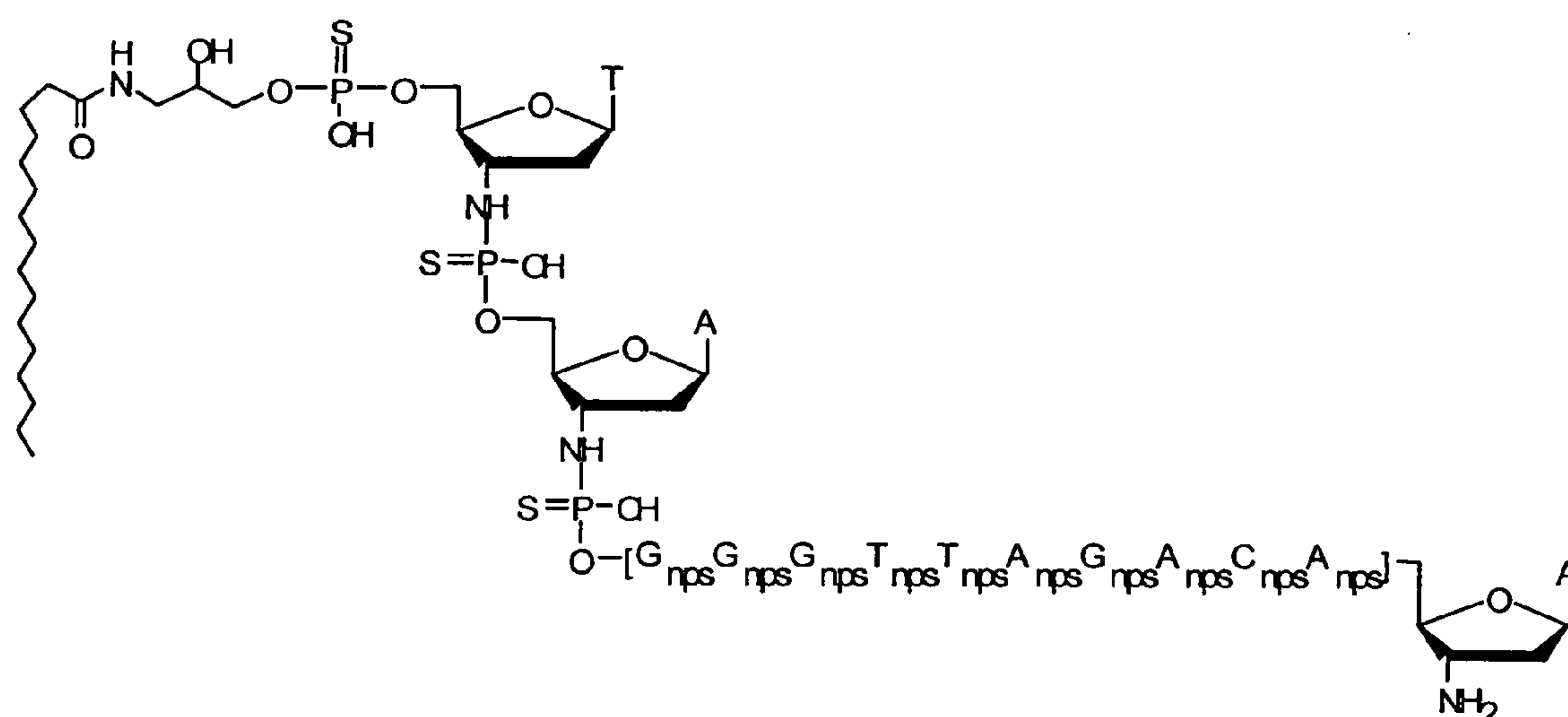
溶劑可為有機化合物、無機化合物、或兩者之混合物。溶劑之一些實例包括但不限於甲醇、*N,N*-二甲基甲醯胺、四氫呋喃、二甲亞砷及水。當溶劑為水時，形成之溶劑合物為水合物。

[0092] 「立體異構物」係指具有相同原子連接性，但在空間中之原子排列不同之化合物。立體異構物包括順式-反式異構物、*E* 及 *Z* 異構物、鏡像異構物及非鏡像異構物。

[0093] 「互變異構物」係指分子之僅在原子之電子鍵結方面及/或在質子之位置方面不同之替代性形式，諸如烯醇-酮及亞胺-烯胺互變異構物、 -NH-P(=S)(OH)-O- 及 -NH-P(=O)(SH)-O- 、或含有 -N=C(H)-NH- 環原子排列之雜芳基之互變異構形式，諸如吡啶、咪啶、苯并咪啶、三啶及四啶。一般技藝人士將認識到本文所述之基團之其他互變異構排列為可能的。舉例而言，應瞭解藉由以下結構所述之寡核苷酸：



亦涵蓋顯示鍵聯基團之一種可能之替代性互變異構排列的以下結構：



其中「nps」表示使一個核苷之 3'-碳連接於鄰近核苷之 5'-碳之硫代磷醯胺酯鍵聯 (—NH—P(=O)(SH)—O— 或 —NH—P(=S)(OH)—O—)。應瞭解即使未明確指示，標的化合物之所有互變異構形式亦皆由其中描述該化合物之基團之一種可能之互變異構排列的結構涵蓋。標的化合物之基團之任何適宜互變異構排列皆可用於描述該等化合物。

[0094] 應瞭解術語「或其鹽或溶劑合物或立體異構物」意欲包括鹽、溶劑合物及立體異構物之所有排列，諸如標的化合物之立體異構物之醫藥學上可接受之鹽的溶劑合物。應瞭解術語「或其鹽」意欲包括鹽之所有排列。應瞭解術語「或其醫藥學上可接受之鹽」意欲包括鹽之所有排列。應瞭解術語「或其溶劑合物」意欲包括溶劑合物之所有排列。應瞭解術語「或其立體異構物」意欲包括立體異構物之所有排列。應瞭解術語「或其互變異構物」意欲

包括互變異構物之所有排列。因此，舉例而言，由此可見意欲包括標的化合物之立體異構物之互變異構物的醫藥學上可接受之鹽之溶劑合物。

[0095] 「醫藥有效量」及「治療有效量」係指化合物足以治療指定病症或疾病或其一或多種症狀及/或預防該疾病或病症之發生的量。關於致腫瘤增生性病症，醫藥或治療有效量包含尤其足以導致腫瘤萎縮或降低腫瘤之生長速率的量。

[0096] 「患者」係指人類及非人類受試者，尤其哺乳動物受試者。

[0097] 如本文所用之術語「治療」意謂治療諸如哺乳動物(特別是人類)之患者之疾病或醫學病狀，此包括：(a)預防該疾病或醫學病狀發生，諸如防治性治療受試者；(b)改善該疾病或醫學病狀，諸如消除患者之該疾病或醫學病狀或導致患者之該疾病或醫學病狀之消退；(c)例如藉由減緩或遏止患者之該疾病或醫學病狀之進展來遏制該疾病或醫學病狀；或(d)減輕患者之該疾病或醫學病狀之症狀。

[0098] 如本文所用，術語「分離」意欲描述相關化合物所處之環境不同於該化合物天然存在所處之環境。「分離」意欲包括化合物處於實質上富含相關化合物及/或其中相關化合物經部分或實質上純化之樣品內。

[0099] 如本文所用，術語「實質上純化」係指化合物自其天然環境移除，且至少 60%、至少 75%、至少 80%、

至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或超過 98%與其天然與之相伴之其他組分分離。

[0100] 術語「生理條件」意欲涵蓋可與活細胞相容之彼等條件，例如可與活細胞相容之具有一定溫度、pH、鹽度等之主要水性條件。

[0101] 在進一步描述本發明之前，應瞭解本發明不限於所述特定實施例，因此所述實施例當然可變化。也應瞭解本文所用之術語僅出於描述特定實施例之目的，並且不意欲具有限制性，因為本發明之範疇將僅受限於隨附申請專利範圍。

[0102] 當提供數值範圍時，應瞭解在彼範圍之上限與下限之間的直至下限之十分之一單位之各間插值(除非上下文另外明確規定)以及在彼陳述之範圍內之任何其他陳述值或間插值皆涵蓋在本發明內。此等較小範圍之上限及下限可獨立地包括在較小範圍中，且亦涵蓋在本發明內，屬於陳述之範圍內之任何明確排除之界限。當陳述之範圍包括一個或兩個界限時，排除彼等包括之界限中之任一者或兩者的範圍亦包括在本發明中。

[0103] 應瞭解，為明確起見在單獨實施例之情形下描述之本發明之某些特徵亦可於單一實施例中組合提供。相反，為簡潔起見在單一實施例之情形下描述之本發明之各種特徵亦可單獨或以任何適合子組合提供。關於本發明之實施例之所有組合皆由本發明明確包括，且就如同各個及每個組合個別地及明確地在此等組合包括例如為作為穩定

化合物(亦即可製備、分離、表徵以及測試生物活性之化合物)之化合物之標的物的程度上經揭露一般來揭露於本文中。此外，各種實施例及其要素(例如描述此等變數之實施例中所列之化學基團的要素)之所有子組合亦由本發明明確包括，且就如同各個及每個此子組合個別地及明確地在本文中揭露一般來揭露於本文中。

[0104] 除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語皆與本發明所屬之技術中之一般技藝人士通常所理解具有相同含義。儘管類似或等效於本文所述之方法及材料之任何方法及材料皆亦可用於實施或測試本發明，但現描述相關方法及材料。本文提及之所有出版物皆以引用的方式併入本文中以揭露及描述與出版物引用之內容關聯之方法及/或材料。

[0105] 必須注意的是，除非上下文另外明確規定，否則如本文及隨附申請專利範圍中所用，單數形式「一」及「該」包括複數個指示物。應進一步注意申請專利範圍可經起草以排除任何視情況選用之要素。因此，此陳述意欲充當與敘述申請專利範圍要素關聯使用諸如「唯一」、「僅」及其類似術語之排除性術語或使用「否定性」限制的前提基礎。

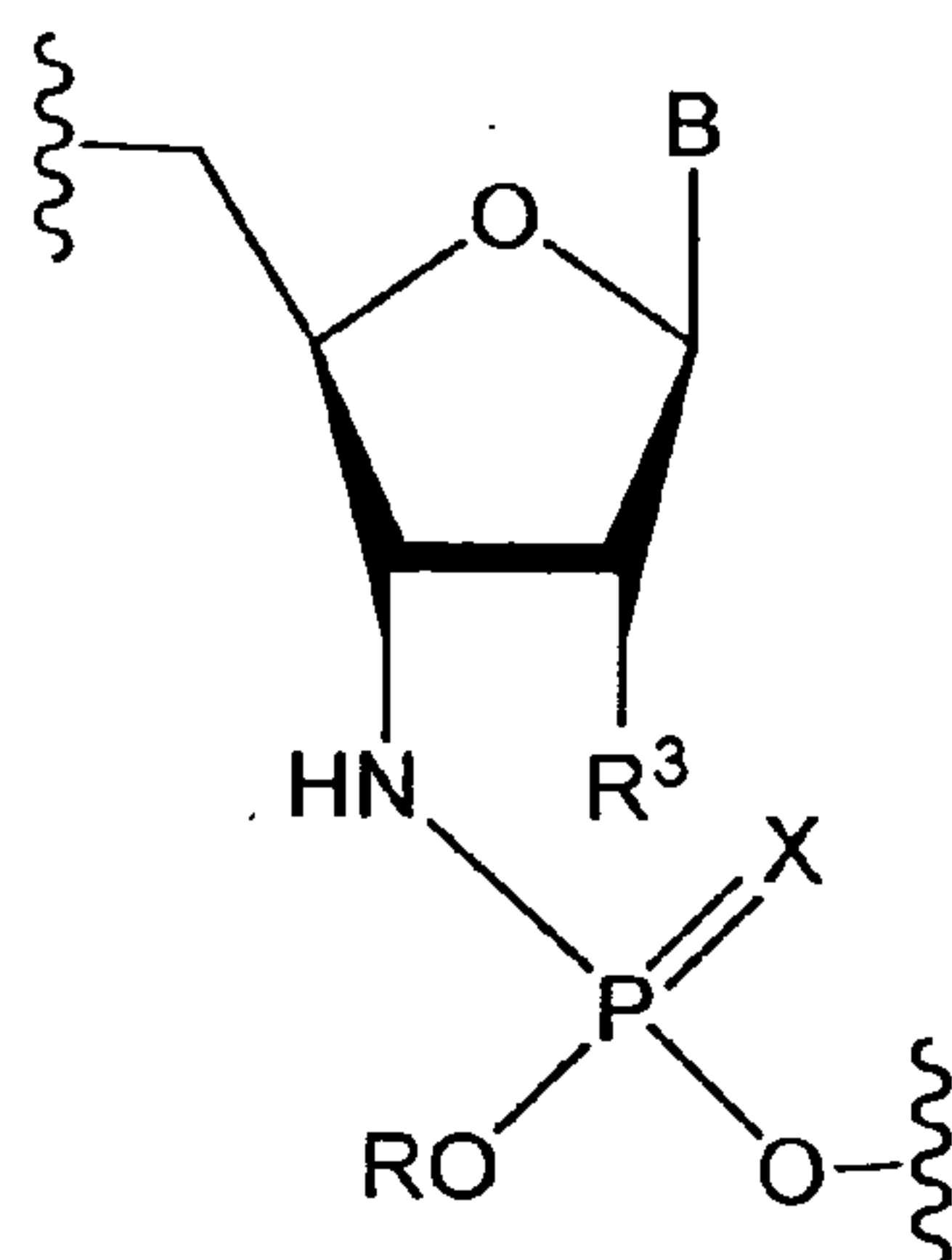
[0106] 應瞭解，為明確起見在單獨實施例之情形下描述之本發明之某些特徵亦可於單一實施例中組合提供。相反，為簡潔起見在單一實施例之情形下描述之本發明之各種特徵亦可單獨或以任何適合子組合提供。

[0107] 本文論述之出版物僅因其揭露內容在本申請案之申請日期之前而加以提供。本文中沒有內容應解釋為承認本發明由於先前發明而無權先於此出版物。此外，提供之公開日期可不同於可能需要獨立確認之實際公開日期。

[詳述]

[0108] 如上所概述，本揭露內容提供一種經由連續偶合循環來製備寡核苷酸之固相方法，該等循環包括二核苷酸二聚物偶合於增長鏈之游離 3'末端基團(例如 3'-羥基或 3'-胺基)。一般而言，合成自目標寡核苷酸序列之 5'末端進行至 3'末端，且包括至少一次二核苷酸二聚物偶合。二聚物可經由任何適宜化學偶合於增長鏈之 3'末端基團。在一些情況下，二聚物為 3'-經保護-二核苷酸-5'-亞磷醯胺酯二聚物，其中該二核苷酸可包括任何適宜核苷間鍵聯。寡核苷酸可包括一或多個磷醯胺酯次單元間鍵聯(例如側氧基-磷醯胺酯或硫代磷醯胺酯鍵聯)。

[0109] 在一些實施例中，寡核苷酸包括含有至少一個由下式定義之次單元之核苷次單元的序列：



S

其中 B 為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶、或其類似物；X 為 O 或 S；R 係選自由以下組成之群：氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基、磷酸酯保護基；且 R^3 係選自由以下組成之群：氫、 $O-R^2$ 及鹵素，其中 R^2 為 H、烷基、經取代烷基(例如 $-(CH_2)_nW(CH_2)_mH$ ，其中 n 在 1-10 之間，m 在 0-10 之間，且 W 為 O、S 或 NH)或羥基保護基。應瞭解包括藉由上式所述之次單元之一些寡核苷酸亦可以鹽形式存在。此等形式只要其可存在即意欲包括在本揭露內容之範疇內。

[0110] 相對於僅涉及核苷單體次單元偶合之方法，標的方法使得偶合循環之數目降低，且使得合成之非目標寡核苷酸產物之量降低。可視諸如目標寡核苷酸之長度及序列之多種因素來選擇用於製備目標寡核苷酸序列之逆向合成策略以便使合成之特定非目標寡核苷酸產物之量最小。

[0111] 在一些實施例中，標的方法提供製備一或多種(N-x)產物相對於相關目標寡核苷酸之量降低之組合物。

[0112] 在某些實施例中，一或多種(N-x)產物相對於相關目標寡核苷酸之量降低的本文所述之任何組合物皆為未純化的。

[0113] 如本文所用，術語「(N-x)產物」(其中 x 為整數 1 至 N-1，且 N 為目標寡核苷酸中之核苷殘基之數目)係指在標的製備方法期間產生之相較於長度為 N 個殘基之

目標寡核苷酸之序列，缺乏 x 個核苷殘基之非目標寡核苷酸。目標寡核苷酸為標的製備方法經設計以產生之產物。因此，(N-1)產物為缺乏出自目標寡核苷酸之序列之任一核苷殘基的非目標寡核苷酸。因此，在一些情況下，術語「(N-1)產物」係指多種非目標寡核苷酸產物，其各自相較於目標寡核苷酸之序列，缺乏一個核苷殘基。類似地，術語「(N-x)產物」係指多種非目標寡核苷酸產物，其各自相較於目標寡核苷酸之序列，缺乏 x 個核苷殘基。舉例而言，(N-2)產物為缺乏出自目標寡核苷酸之序列之任何兩個核苷殘基的非目標寡核苷酸。在一些情況下，相對於目標寡核苷酸序列， x 個殘基彼此鄰接。在其他情況下，相對於目標寡核苷酸序列， x 個殘基彼此不鄰接。 x 個核苷殘基可自目標序列之任何位置缺乏，且可在偶合循環期間由未反應之 3'-末端基團產生。標的方法之(N-x)產物可包括一或多種由標的合成方法獲得之其他修飾，例如部分脫保護修飾、損失核苷鹼基(例如脫嘌呤)、末端基團加帽、經由合成試劑衍生(例如由硫化試劑達成苯基乙醯化)及其類似修飾。視所用寡核苷酸合成及試劑之化學性質而定，多種經修飾寡核苷酸為可能的。除非另外指示，否則所有此等修飾皆意欲由術語(N-x)產物涵蓋。

[0114] 在一些實施例中，標的方法導致寡核苷酸合成之一或多種選自以下之非目標產物降低：部分經保護產物或部分經保護(N-x)產物，例如包括一或多種核苷鹼基保護基之寡核苷酸產物。在標的寡核苷酸組合物中，目標

寡核苷酸序列可更易於與方法之其他含寡核苷酸產物(例如(N-x)產物及缺乏核苷鹼基之產物)分離或純化。

[0115] 標的方法及組合物之實施例更詳細描述於以下章節中。

製備寡核苷酸之方法

[0116] 本揭露內容提供一種製備寡核苷酸之方法。標的方法可包括二核苷酸二聚物至少一次偶合於增長寡核苷酸鏈之游離 3'末端基團。任何適宜寡核苷酸合成方法及化學皆可用於標的製備方法中。可適合於在標的方法中使用之相關寡核苷酸合成化學及方法包括但不限於亞磷醯胺酯、H-磷酸酯、磷酸二酯、磷酸三酯、亞磷酸三酯及由 Fearon 等人在 U.S. 5,824,793 中所述者，該專利之揭露內容以全文引用的方式併入本文中。本發明化合物之寡核苷酸組分可藉由適合於所選化學類型之習知方案來合成。用於合成具有 N3'→P5'磷醯胺酯化學之寡核苷酸之相關方法包括但不限於 McCurdy 等人，(1997) Tetrahedron Letters, 38:207-210 以及 Pongracz 及 Gryaznov, (1999) Tetrahedron Letters, 49:7661-7664 中所述之彼等方法。

[0117] 相關寡核苷酸可使用標的方法，經由自目標寡核苷酸序列之 5'-末端開始，且進行至 3'-末端來進行連續偶合加以製備。5'-末端核苷次單元可經由視情況選用之連接基團或 5'-末端基團連接於任何適宜固體支撐物。接著，可使用二聚物亞磷醯胺酯或單體亞磷醯胺酯達成次

單元偶合於增長寡核苷酸鏈。或者，5'-末端二核苷酸次單元可經由視情況選用之連接基團或5'-末端基團連接於任何適宜固體支撐物。一旦第一次單元(例如單體或二聚物次單元)連接於固體支撐物，即可將次單元脫保護以產生固定之游離3'-末端基團。在一些情況下，方法包括使支撐物結合之3'-末端基團與3'-經保護-二核苷酸-5'-亞磷醯胺酯二聚物偶合。在某些實施例中，3'-末端基團為3'-羥基。在某些實施例中，3'-末端基團為3'-胺基。

[0118] 在一些情況下，方法包括以下步驟：(a)使連接於固相支撐物之末端核苷之經保護3'胺基脫保護，該脫保護形成游離3'胺基；(b)使該游離3'胺基與3'-經保護胺基-二核苷酸硫代磷醯胺酯或亞磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物在親核催化劑存在下接觸以形成核苷間N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯；以及(c)使該鍵聯氧化。

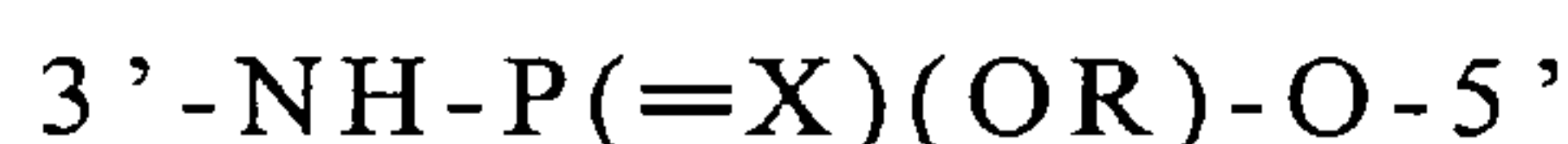
[0119] 目標寡核苷酸序列可使用逆向合成策略來合成，該策略包括二聚物次單元與單體次單元兩者連續偶合於增長寡核苷酸鏈之3'末端基團。因此，在一些實施例中，方法進一步包括以下步驟：(a)使連接於固相支撐物之末端核苷之經保護3'胺基脫保護，該脫保護形成游離3'胺基；(b)使該游離3'胺基與3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯單體在親核催化劑存在下接觸以形成核苷間N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯；以及(c)使該鍵聯氧化以產生N3'→P5'磷醯胺酯鍵聯。

[0120] 如本文所用，術語「N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵

S

聯」係指 $N3' \rightarrow P5'$ 磷醯胺酯鍵聯之磷(III)中間物。一般而言， $N3' \rightarrow P5'$ 磷醯胺酯鍵聯係藉由使 $N3' \rightarrow P5'$ 亞磷醯胺酯鍵聯氧化成磷(V)產物(例如可包括側氧基($P=O$)或硫基($P=S$)之 $N3' \rightarrow P5'$ 磷醯胺酯鍵聯)來形成。在一些情況下，氧化步驟可描述為使 $N3' \rightarrow P5'$ 亞磷醯胺酯鍵聯硫化以產生 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代磷醯胺酯鍵聯。

[0121] 如本文所用，「 $N3' \rightarrow P5'$ 磷醯胺酯」、「 $P5' \rightarrow N3'$ 磷醯胺酯」及「磷醯胺酯」係指由下式描述之核苷間次單元鍵聯：



或其互變異構物，其中 3' 及 5' 係指藉助於鍵聯連接之連續核苷之糖部分的碳原子，且其中 R 為氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基或磷酸酯保護基，且 X 為硫族元素，諸如氧或硫。應瞭解，當 R 為氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基或磷酸酯保護基時，藉由上式所述之一些核苷間次單元鍵聯亦可以鹽形式存在。此等形式只要其可存在即意欲包括在本揭露內容之範疇內。在一些情況下，當 X 為硫時，磷醯胺酯可稱為硫代磷醯胺酯。在一些情況下，當 X 為氧時，「磷醯胺酯」可稱為「側氧基磷醯胺酯」。在一些情況下，當 R 為磷酸酯保護基時，其可為烷基、烯基、芳基、芳烷基、環烷基或其經取代形式。在一些情況下，R 為含有 10 個或小於 10 個碳原子之磷酸酯保護基。在某些情況下，當 R 為磷酸酯保護基時，其為具有 1 至 6 個碳原子之烷基；吸電子 β -經取代乙基

(例如 β -三鹵甲基-、 β -氰基-、 β -磺基-或 β -硝基-取代之乙基)；吸電子經取代苯基(例如鹵基-、磺基-、氰基-或硝基-取代之苯基)；或吸電子經取代苯基乙基。在一些實施例中，當 R 為磷酸酯保護基時，其為甲基、 β -氰基乙基或 4-硝基苯基乙基。在某些實施例中，R 為氫、甲基或 β -氰基乙基。相關吸電子取代基包括但不限於鹵基、氰基、硝基、磺基或單鹵甲基、二鹵甲基或三鹵甲基及其類似基團。鹵素原子取代基通常為氟基、氯基、溴基或碘基；且在一些情況下，其為氟基或氯基。「吸電子」表示取代基傾向於吸引它作為其一部分之分子的價電子，亦即它為電負性的，例如 March, *Advanced Organic Chemistry*, 第 16-18 頁 (John Wiley, New York, 1985)。用於選擇磷酸酯保護基之指導提供於 Beaucage 及 Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992)中。為方便起見，核苷酸磷醯胺酯有時在本文中由分別用於 N3'→P5'磷醯胺酯及 P3'→N5'磷醯胺酯之下標「np」或「pn」指示。因此，「U_{np}U」為其中 3'-胺基尿苷及尿苷藉由 N3'→P5'磷醯胺酯鍵聯連接之二核苷酸。當鍵聯為側氧基-磷醯胺酯時，核苷酸側氧基-磷醯胺酯有時在本文中由分別用於 N3'→P5'硫代磷醯胺酯及 P3'→N5'硫代磷醯胺酯之下標「npo」或「opn」指示。類似地，核苷酸硫代磷醯胺酯有時在本文中由分別用於 N3'→P5'磷醯胺酯及 P3'→N5'磷醯胺酯之下標「nps」或「spn」指示。類似地，2'-氟取代基由上標「f」指示。因此，「U_{f,np}U」為二核苷酸，其中最 5' 3'-胺基-2'-氟尿苷

藉由 N3'→P5'磷醯胺酯鍵聯連接於尿苷。單一先導下標「p」指示 5'單磷酸酯，且單一拖尾下標「n」指示 3'-胺基。

[0122] 在一些情況下，核苷間次單元鍵聯係藉由下式所述：



或其互變異構物，其中 3'及 5'係指藉由鍵聯方式連接之連續核苷之糖部分的碳原子，且其中 R 為氫，且 X 為氧或硫。應瞭解對於本文所述之包括該種核苷間鍵聯之任何寡核苷酸，此等寡核苷酸亦可包括鍵聯之任何適宜鹽形式。因此，核苷間鍵聯可呈包括任何適宜相對離子之鹽形式。

[0123] 任何適宜保護基策略皆可用於標的方法中以保護鹼基、亞磷醯胺酯、磷醯胺酯、5'、2'及/或 3'基團。相關保護基包括但不限於藉由 Ohkubo 等人，*Org. Lett.*, 2010, 12 (11), 第 2496-2499 頁；以及 Beaucage 及 Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992)所述之彼等保護基。

[0124] 如本文所用，術語「磷酸酯保護基」係指可連接於寡核苷酸之含磷次單元間鍵聯之保護基。當存在時，磷酸酯保護基可阻止(亦即阻斷)在連接磷酸酯保護基所處之位置處之含磷鍵聯的反應。任何適宜含磷次單元間鍵聯(例如 P(III)及 P(V)鍵聯)皆可由標的磷酸酯保護基保護，包括但不限於亞磷醯胺酯、側氧基磷醯胺酯、硫代磷醯胺酯、磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸二酯鍵聯及其類似鍵

聯。磷酸酯保護基可連接於含磷次單元間鍵聯之可用氧原子。任何適宜保護基皆可用作磷酸酯保護基。相關磷酸酯保護基包括但不限於烷基、烯基、芳基、芳烷基、環烷基或其經取代形式，諸如具有 1 至 6 個碳原子之烷基，諸如吸電子 β -經取代乙基(β -三鹵甲基、 β -氰基-、 β -磺基-或 β -硝基-取代之乙基)；吸電子經取代苯基(例如鹵基-、磺基-、氰基-或硝基-取代之苯基)；或吸電子經取代苯基乙基、甲基、 β -氰基乙基或 4-硝基苯基乙基。在某些實施例中，磷酸酯保護基為甲基或 β -氰基乙基。相關吸電子取代基包括但不限於鹵基(例如氯基或氟基)、氰基、硝基、磺基或單鹵甲基、二鹵甲基或三鹵甲基及其類似基團。

[0125] 增長寡核苷酸鏈之 3'-末端基團可包括 3'-羥基、3'-胺基或其經保護形式。任何適宜羥基及/或胺基保護基皆可在寡核苷酸合成期間在 3'-末端基團處利用。在一些實施例中，3'末端基團為經保護 3'-胺基，且方法包括脫除或移除保護基以產生游離 3'胺基。

[0126] 如本文所用，關於單體及二聚物的術語「游離胺基」意謂可用於與進入之單體或二聚物之亞磷醯胺酯基團反應的胺基。在一些實施例中，游離胺基為一級胺。在脫保護(例如去三苯甲基)步驟之後，胺基可呈鹽形式(例如用於去三苯甲基之酸之共軛鹼的鹽)。此鹽視情況可在去三苯甲基步驟之後用諸如含 2%三乙胺或吡啶之乙腈的鹼性溶液中和。

[0127] 在一些實施例中，3'-末端基團為經保護 3'-羥

基，且方法包括脫除或移除保護基以產生游離 3'-羥基。在一些實施例中，3'-末端基團為經保護 3'-胺基，且方法包括脫除或移除保護基以產生游離 3'-胺基。經保護 3'-胺基或 3'-羥基可用三苯甲基保護基保護。在某些實施例中，三苯甲基保護基為三苯基甲基(Tr、Ph₃C-)。在某些實施例中，三苯甲基保護基為 4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMT)。

[0128] 將 3'-末端胺基或羥基脫保護可使用任何適宜方法來達成。相關方法包括但不限於藉由 Beaucage 及 Iyer, Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992)所述之彼等方法。在一些情況下，將末端核苷之經保護 3'胺基脫保護包括去三苯甲基以產生游離 3'末端基團，例如酸催化之去三苯甲基。

[0129] 一般而言，二聚物或單體次單元亞磷醯胺酯包括與連接於固體支撐物之末端核苷之 3'末端基團相同的經保護 3'-羥基或 3'-胺基。3'保護進入之次單元亞磷醯胺酯會阻止鏈之不合需要之聚合。

[0130] 任何適宜固相支撐物皆可用於標的方法中。相關固體支撐物包括但不限於由可控孔徑玻璃(CPG)製得之微粒、高度交聯聚苯乙烯(例如 NittoPhase HL 400 或 GE Primer 350)、丙烯酸共聚物、纖維素、耐綸、葡聚糖、乳膠、聚丙稀醛及其類似物，諸如以下示範性參考文獻中揭露者：Meth. Enzymol., 章節 A, 第 11-147 頁，第 44 卷 (Academic Press, New York, 1976)；美國專利第

4,678,814 號；第 4,413,070 號；及第 4,046,720 號；以及 Pon, 第 19 章, Agrawal 編輯, *Methods in Molecular Biology*, 第 20 卷, (Humana Press, Totowa, N.J., 1993)。其他相關支撐物包括聚苯乙烯珠粒；接枝有聚乙二醇之聚苯乙烯(例如 TentaGel™, Rapp Polymere, Tubingen Germany)；及其類似物。對諸如材料、孔隙度、尺寸、形狀及其類似特徵之支撐物特徵以及所用連接部分之類型的選擇取決於多種因素，諸如所用保護基、最終產物之長度、最終產物之量及其類似因素。示範性連接部分揭露於 Pon 等人, *Biotechniques*, 6:768-775 (1988)；Webb, 美國專利第 4,659,774 號；Barany 等人, 國際專利申請案 PCT/US91/06103；Brown 等人, *J. Chem. Soc. Commun.*, 1989: 891-893；Damha 等人, *Nucleic Acids Research*, 18: 3813-3821(1990)；Beattie 等人, *Clinical Chemistry*, 39: 719-722 (1993)；Maskos 及 Southern, *Nucleic Acids Research*, 20: 1679-1684 (1992)；及其類似文獻中。

[0131] 在一些實施例中，適用於標的方法中之固體支撐物包括 CPG 及接枝有聚乙二醇且具有末端胺基之聚苯乙烯(例如 TentaGel-NH₂™, Rapp Polymere, Tubingen Germany)。胺基丙基可用作 CPG 與核苷鍵聯之間的間隔子。在一些情況下，與第一核苷之 5'-羥基鍵聯的是丁二醯基，其提供可在合成之後用氨水溶液裂解之鹼不穩定性酯鍵聯。

[0132] 在脫保護之後，支撐物結合之核苷能夠與二

聚物或單體次單元亞磷醯胺酯反應以形成核苷間鍵聯。應瞭解支撐物結合之核苷可指連接於固體支撐物之單一殘基，或可指寡核苷酸鏈之連接於支撐物之末端殘基。

[0133] 任何適宜偶合化學、偶合試劑及方法皆可用於標的方法中。在標的方法之情形下進行涉及偶合條件、保護基、固相支撐物、連接基團、脫保護試劑、用以自固相支撐物裂解產物之試劑、產物純化及其類似方面之選擇的大量指導可見於例如以下之文獻中：Gait 編輯，*Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984)；Amarnath 及 Broom, *Chemical Reviews*, 第 77 卷，第 183-217 頁 (1977)；Pon 等人，*Biotechniques*, 第 6 卷，第 768-775 頁 (1988)；Ohtsuka 等人，*Nucleic Acids Research*, 第 10 卷，第 6553-6570 頁 (1982)；Eckstein 編輯 *Oligonucleotides. and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991)；Greene 及 Wuts 「*Protective Groups in Organic Synthesis*」，第 3 版，Wiley, New York 1999；Narang 編輯，*Synthesis and Applications of DNA and RNA* (Academic Press, New York, 1987)；Beaucage 及 Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992)及類似參考文獻。

[0134] 標的方法之偶合步驟可在 -20 至 200 攝氏度之溫度範圍內進行。在一些情況下，反應係在環境溫度(約 15-30 攝氏度)下進行。反應可藉由向含有(寡)核苷酸之共價連接於固體支撐物之游離胺基的反應容器中添加亞磷醯

胺酯二聚物或單體之溶液及活化劑之溶液(或含有亞磷醯胺酯二聚物或單體及活化劑之溶液)來進行。通常，相關活化劑包括親核催化劑，其置換更穩定亞磷醯胺酯胺基以形成高度反應性(及較小穩定性)中間物，該中間物又與固體支撐之寡核苷酸 N3'→P5'磷醯胺酯之游離 3'胺基反應。接著藉由諸如機械渦旋、用惰性氣體噴射等之方法來混合混合物。或者，可使二聚物或單體及活化劑之溶液流過含有固體支撐之具有游離 3'-末端基團之(寡)核苷酸的反應容器(或管柱)。單體及活化劑可經預混合，在適合合成儀之閥體中混合，在預活化容器中混合且必要時經預平衡，或其可分別添加至反應容器中。

[0135] 可用於標的方法中之相關活化劑包括但不限於四唑、5-(乙基硫基)四唑、5-(4-硝基苯基)四唑、5-(2-噻吩)四唑、三唑、氯化吡啶鎘及其類似物，例如如由 Beaucage 及 Iyer Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992)；Berner 等人，Nucleic Acids Research, 17: 853-864 (1989)；Benson, Chem. Rev. 41: 1-61 (1947)所述之活化劑。如本文所用，術語「四唑活化劑」係指為四唑或四唑之衍生物之活化劑。在一些實施例中，活化劑為四唑。適宜溶劑包括但不限於乙腈、四氫呋喃、二氯甲烷及其類似物。可小心使用無水(不含水)二聚物或單體、活化劑以及用於偶合步驟之溶劑及用於在偶合步驟之前即刻洗滌固體支撐物之溶劑。

[0136] 在偶合之後，寡核苷酸之支撐物結合之增長

5

鏈的未反應之 3'-胺基可視情況在下一脫保護步驟(例如去三苯甲基步驟)之前用適宜加帽劑加帽以使其對隨後偶合步驟具有惰性。此加帽步驟可改進製備之 HPLC 概況以使得純化更容易，且亦可改進產物之總體產率。適用於標的方法中之加帽試劑包括親電子試劑(諸如乙酸酐及異丁酸酐)、酸氯化物(諸如金剛烷基羰基氯化物、三甲基乙醯氯及其類似物)、異硫氰酸酯、氯甲酸酯等。亦適用的是亞磷醯胺酯連同活化劑一起，且繼之以氧化，且諸如異丙基-H-膦酸三乙銨之 H-膦酸鹽連同酸氯化物(諸如三甲基乙醯氯或金剛烷基羰基氯化物)一起使用。

[0137] 在一些實施例中，方法包括使核苷間 N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯氧化。如本文所用，關於含磷核苷間鍵聯之術語「氧化」及其類似術語意謂用於使鍵聯之磷原子自磷(III)形式轉化成磷(V)形式之過程或處理。核苷酸間鍵聯之氧化可使用任何適宜方法在合成中之任何適宜時點來進行。在一些實施例中，氧化係以逐步方式例如在每個偶合循環期間進行。在其他實施例中，多個核苷酸間鍵聯之氧化係在合成結束時進行。在一些情況下，使 N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯氧化(例如使用基於碘/水之氧化劑)會產生側氧基-磷醯胺酯鍵聯。在其他情況下，使 N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯氧化包括硫化以產生硫代磷醯胺酯鍵聯。硫化可使用任何適宜方法來進行。相關硫化方法包括由 Gryazonov 等人，WO2001018015 所述之方法，該專利之揭露內容以全文引用的方式併入本文中。用於本發

明中之硫化劑包括元素硫、二硫化秋蘭姆(諸如二硫化四乙基秋蘭姆)、醯基二硫化物(諸如苯甲醯甲基二硫化物)、硫磷基二硫化物(諸如 S-Tetra™)及 1,1-二側氧基-3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮。在一些實施例中，硫化可使用元素硫(S8)來進行。在某些實施例中，硫化可使用如由 Iyer 等人; J. Organic Chemistry 55:4693-4699, 1990 所述之方法，利用 Beaucage 試劑來進行。

[0138] 適用於方法中之氧化劑包括碘、氯、溴、過酸(諸如間氯苯甲酸)、氫過氧化物(諸如第三丁基氫過氧化物、乙基氫過氧化物、甲基氫過氧化物及其類似物)、臭氧、混合醯基-亞磺酸酐(諸如 3H-2,1-苯并氧硫雜環戊烷-3-酮-1-氧化物)、過硫酸鹽(諸如過硫酸鈉、過硫酸銨及過硫酸四丁銨及其類似物)、單過氧硫酸鹽(諸如 oxone™)、次氯酸鈉及/或其他次氯酸鹽、過氧化物(諸如二乙基過氧化物或雙(三甲基矽烷基)過氧化物、或過氧化氫或非水性過氧化氫等效物(諸如脲/過氧化氫複合物))等。可用於使磷(III)轉化成磷(V)之其他適用氧化劑描述於 Beaucage 及 Iyer Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992)中。

[0139] 在一些情況下，氧化劑或硫化劑可具有經歷與所要氧化併行之非所要 Arbuzov 副反應之傾向(Beaucage 及 Iyer, 以上引用)。Arbuzov 副反應可產生脫保護之磷醯胺酯，其對隨後去三苯甲基步驟之酸性條件不穩定，且導致寡核苷酸斷裂。在某些實施例中，過氧化氫用作氧化劑以使 Arbuzov 副反應最小。在某些實施例中，

S

氧化包括使寡核苷酸與 1.5%過氧化氫、3.5%水、20%吡啶及 75% THF 之溶液接觸。

[0140] 在一些實施例中，方法包括以下步驟：

(a) 使連接於固相支撐物之末端核苷之經保護 3'胺基脫保護，該脫保護形成游離 3'胺基；

(b) 使該游離 3'胺基與：

(i) 3'-經保護胺基-二核苷酸磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物；或

(ii) 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯單體；

在親核催化劑存在下反應以形成核苷間 N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯；

(c) 使該鍵聯氧化；以及

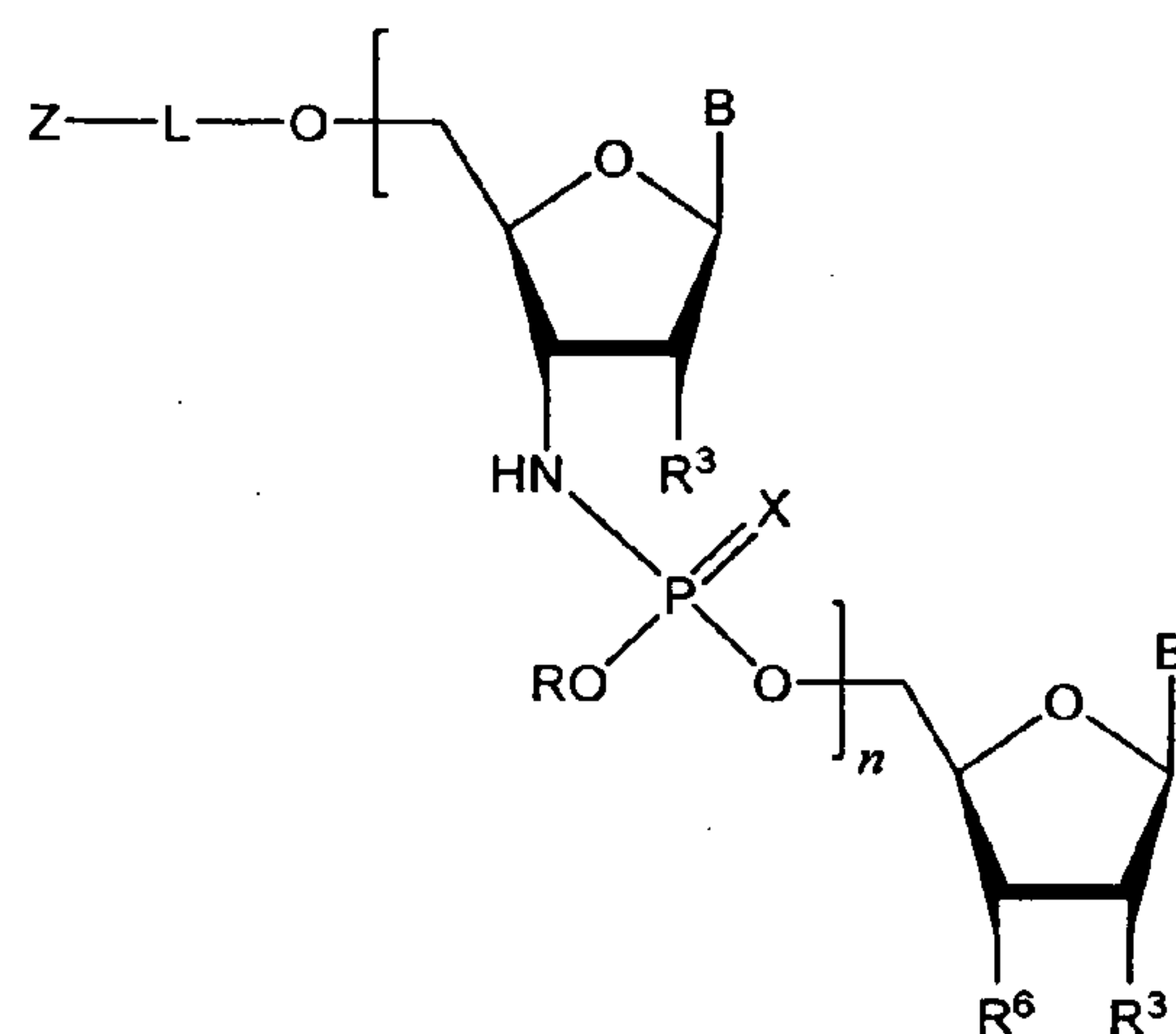
(d) 重複步驟(a)至(c)直至合成聚核苷酸，其中重複步驟(a)至(c)包括進行步驟(b)(i)至少一次。

[0141] 在一些實施例中，重複步驟(a)至(c)包括進行步驟(b)(i)兩次或兩次以上。在某些實施例中，重複步驟(a)至(c)包括進行步驟(b)(i)3次或3次以上，諸如4次或4次以上、5次或5次以上、6次或6次以上、7次或7次以上、8次或8次以上、9次或9次以上、10次或10次以上、15次或15次以上、20次或20次以上、或甚至30次或30次以上。在某些實施例中，重複步驟(a)至(c)包含在每個偶合步驟時進行步驟(b)(i)。在某些實施例中，重複步驟(a)至(c)包含在除一個偶合步驟之外的每個偶合步驟時進行步驟(b)(i)。在某些實施例中，重複步驟(a)至(c)

包括進行步驟(b)(ii)一次，且僅一次。在某些實施例中，重複步驟(a)至(c)包括進行步驟(b)(ii)兩次，且僅兩次。

[0142] 如本文所述，應瞭解術語磷醯胺酯鍵聯意欲涵蓋側氧基-磷醯胺酯鍵聯與硫代磷醯胺酯鍵聯兩者(例如如式 I 中所描繪)。在方法之某些實施例中，使核苷間 N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯氧化會產生側氧基-磷醯胺酯鍵聯。在方法之一些實施例中，使核苷間 N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯氧化包括硫化以產生硫代磷醯胺酯鍵聯。

[0143] 在方法之一些實施例中，寡核苷酸係藉由式 (I)所描述：



式(I)

其中：

各 B 獨立地為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶、或其類似物；

各 X 獨立地為氧或硫；

各 R³ 為氫、氟基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基或經保護羥基；

R^6 為胺基、羥基、經保護胺基、經保護羥基、 $-O-L-Z$ 或 $-NH-L-Z$ ；

各 L 獨立地為視情況選用之連接子；

各 Z 獨立地為 H 、脂質、支撐物、載體、寡核苷酸、聚合物、多肽、可偵測標記或標籤；

R 為氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基或磷酸酯保護基；且

n 為整數 1 至 1000。當 R 為氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基或磷酸酯保護基時，應瞭解一些式(I)寡核苷酸亦可以鹽形式存在。此等形式只要其可存在即意欲包括在本揭露內容之範疇內。

[0144] 在式(I)之一些實施例中，各 R^3 為氫。在式(I)之一些實施例中，各 R^3 為氟基。在式(I)之一些實施例中，各 R^3 為羥基。

[0145] 在式(I)之一些實施例中， R^6 為胺基。在式(I)之某些實施例中， R^6 為羥基。

[0146] 在式(I)之一些實施例中，各 R 為氫。應瞭解當 R 為氫時，磷酸酯鍵聯在諸如生理條件之水性條件下可帶電荷。因此，應瞭解式(I)寡核苷酸亦可包括鍵聯之任何適宜鹽形式。因此，式(I)之核苷間鍵聯可呈包括任何適宜相對離子之鹽形式。在式(I)之一些實施例中，各 R 為烷基或經取代烷基。在式(I)之一些實施例中，各 R 為芳基或經取代芳基。在式(I)之一些實施例中，各 R 為磷酸酯保護基。

[0147] 在式(I)之一些實施例中，Z 為 H。在式(I)之一些實施例中，Z 為脂質(例如，如本文所述)。在某些情況下，脂質為脂肪酸(例如，如本文所述)。在式(I)之一些實施例中，Z 為支撐物。在式(I)之一些實施例中，Z 為載體。在式(I)之一些實施例中，Z 為寡核苷酸。在式(I)之一些實施例中，Z 為聚合物。在某些情況下，聚合物為 PEG。在式(I)之一些實施例中，Z 為多肽。在式(I)之一些實施例中，Z 為可偵測標記。在式(I)之一些實施例中，Z 為標籤。

[0148] 在式(I)之一些實施例中，L 不存在。

[0149] 在一些實施例中，各 B 係獨立地選自 A、C、G、T 及 U 或其經保護形式。

[0150] 在式(I)之某些實施例中，n 為在 1 與 500 之間，諸如在 1 與 100 之間、在 1 與 75 之間、在 1 與 50 之間、在 1 與 40 之間、在 1 與 30 之間、在 1 與 20 之間、在 1 與 15 之間、在 1 與 10 之間、或在 4 與 10 之間的整數。在某些實施例中，n 為在 1 與 100 之間，諸如在 5 與 50 之間、在 10 與 50 之間、在 10 與 40 之間、在 10 與 30 之間、在 10 與 25 之間、在 10 與 20 之間、在 12 與 18 之間、或在 12 與 16 之間的整數。在某些實施例中，n 為 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25。

[0151] 在方法之某些實施例中，寡核苷酸包含具有與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元的序列，且其

5

中至少兩個核苷次單元係藉由 N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。

[0152] 在方法之一些實施例中，寡核苷酸包括具有在 3 個與 50 個之間的與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷連續次單元，諸如在 5 個與 40 個之間、在 10 個與 40 個之間、在 10 個與 30 個之間、在 10 個與 25 個之間、在 10 個與 20 個之間、在 12 個與 18 個之間、或在 12 個與 16 個之間的核苷次單元的序列。在某些實施例中，寡核苷酸包括具有 10 個或 10 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之連續核苷次單元的序列。在某些實施例中，寡核苷酸包括具有 7 個或 7 個以上連續核苷次單元，諸如 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 個連續核苷次單元之序列。在某些實施例中，寡核苷酸包括具有在 11 個與 18 個之間，諸如在 11 個與 16 個之間的互補於人類端粒酶之 RNA 組分之連續核苷次單元的序列。

[0153] 在方法之一些情況下，N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯係藉由以下結構所描述：



其中 R 係選自由以下組成之群：氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基及磷酸酯保護基。應瞭解，當 R 係選自由氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基及磷酸酯保護基組成之群時，藉由上式所述之一些核苷間次單元鍵聯亦可以鹽形式存在。此等形式只要其可存在即意欲包括在本揭露內容之範疇內。

[0154] 在方法之一些情況下，N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯係藉由以下結構所述：

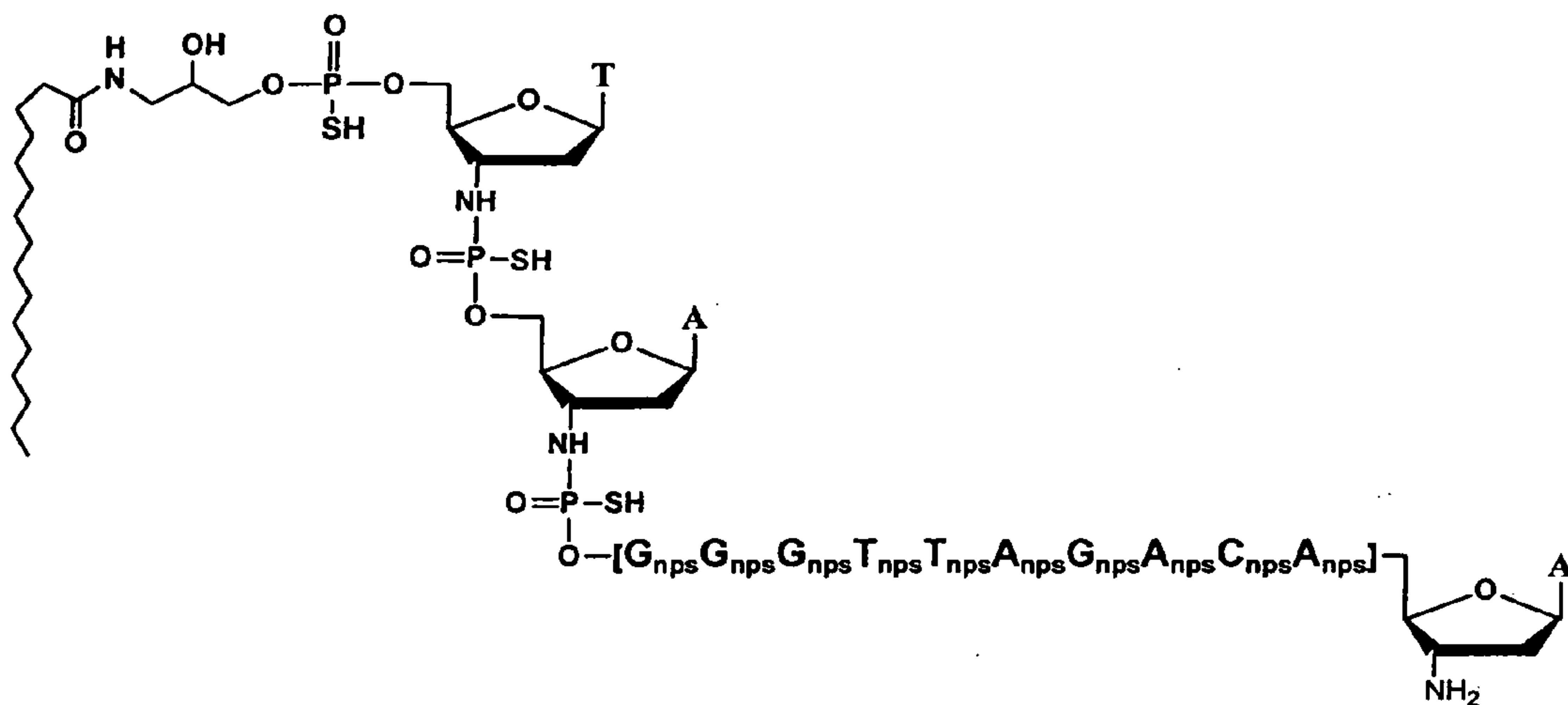


其中 R 為氫。應瞭解對於本文所述之包括該種次單元間鍵聯之任何寡核苷酸，此等寡核苷酸亦可包括鍵聯之任何適宜鹽形式。因此，次單元間鍵聯可呈包括任何適宜相對離子之鹽形式。

[0155] 在方法之一些實施例中，寡核苷酸包括序列 TAGGGTTAGACAA(SEQ ID NO:3)。在某些實施例中，TAGGGTTAGACAA(SEQ ID NO:3)序列之所有核苷酸間次單元間鍵聯皆為 N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯。在某些情況下，序列之所有 N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯皆為 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯(例如 nps 鍵聯)。在某些情況下，序列之所有 N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯皆為 N3'→P5'側氧基-磷醯胺酯次單元間鍵聯(例如 np 鍵聯)。

[0156] 在方法之一些實施例中，聚核苷酸包括 3'-胺基或 3'-羥基末端基團。在方法之某些實施例中，聚核苷酸包括 3'-胺基末端基團。在方法之某些實施例中，聚核苷酸包括 3'-羥基末端基團。

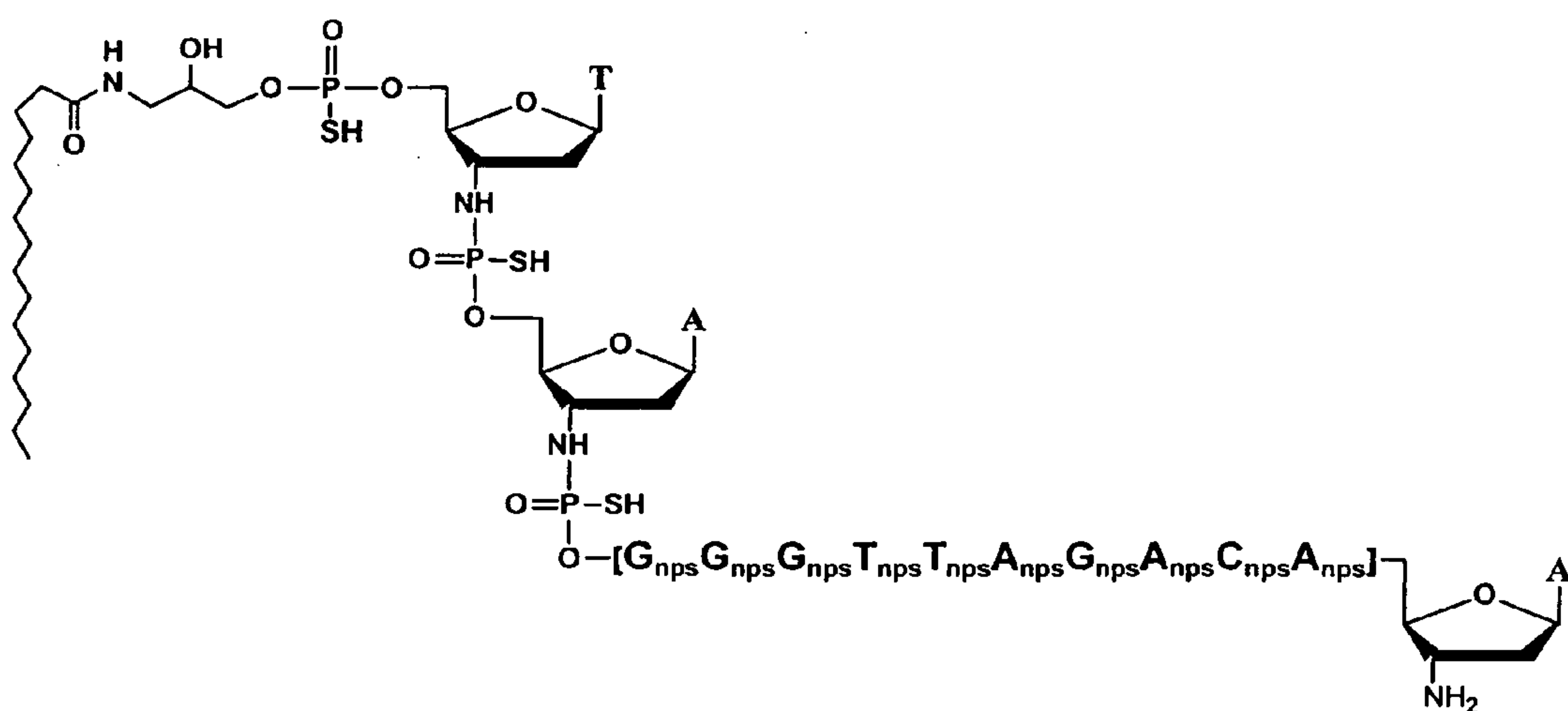
[0157] 在方法之一些實施例中，寡核苷酸係藉由以下結構所描述：



其中「nps」表示使一個核苷之 3'-碳連接於鄰近核苷之 5'-碳之硫代磷醯胺酯鍵聯(例如—NH—P(=O)(SH)—O—或其互變異構物)。

[0158] 應瞭解關於寡核苷酸之所有實施例皆亦可適用於該寡核苷酸之鹽形式。

[0159] 在方法之一些實施例中，寡核苷酸係藉由以下結構所描述：

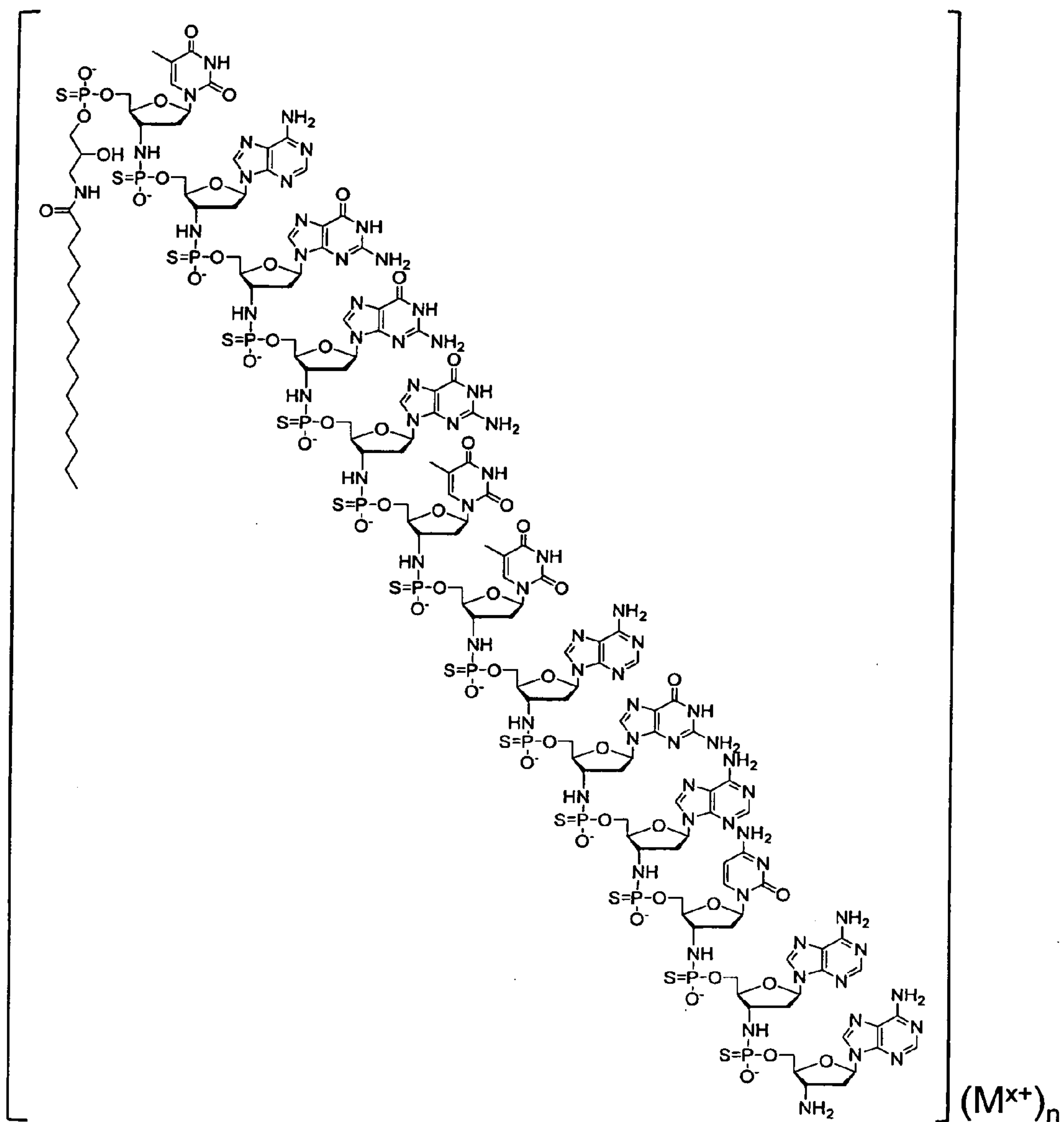


或其鹽；

其中「nps」表示使一個核苷之 3'-碳連接於鄰近核苷

之 5'-碳之硫代磷醯胺酯鍵聯(例如—NH—P(=O)(SH)—O—或其互變異構物或其鹽)。在某些實施例中，組合物包括化合物之醫藥學上可接受之鹽。在某些情況下，組合物包括化合物之鈉鹽。在某些實施例中，組合物包括化合物之二階陽離子鹽，諸如化合物之鎂鹽。在某些實施例中，組合物包括化合物之三價陽離子鹽，諸如化合物之鋁鹽。

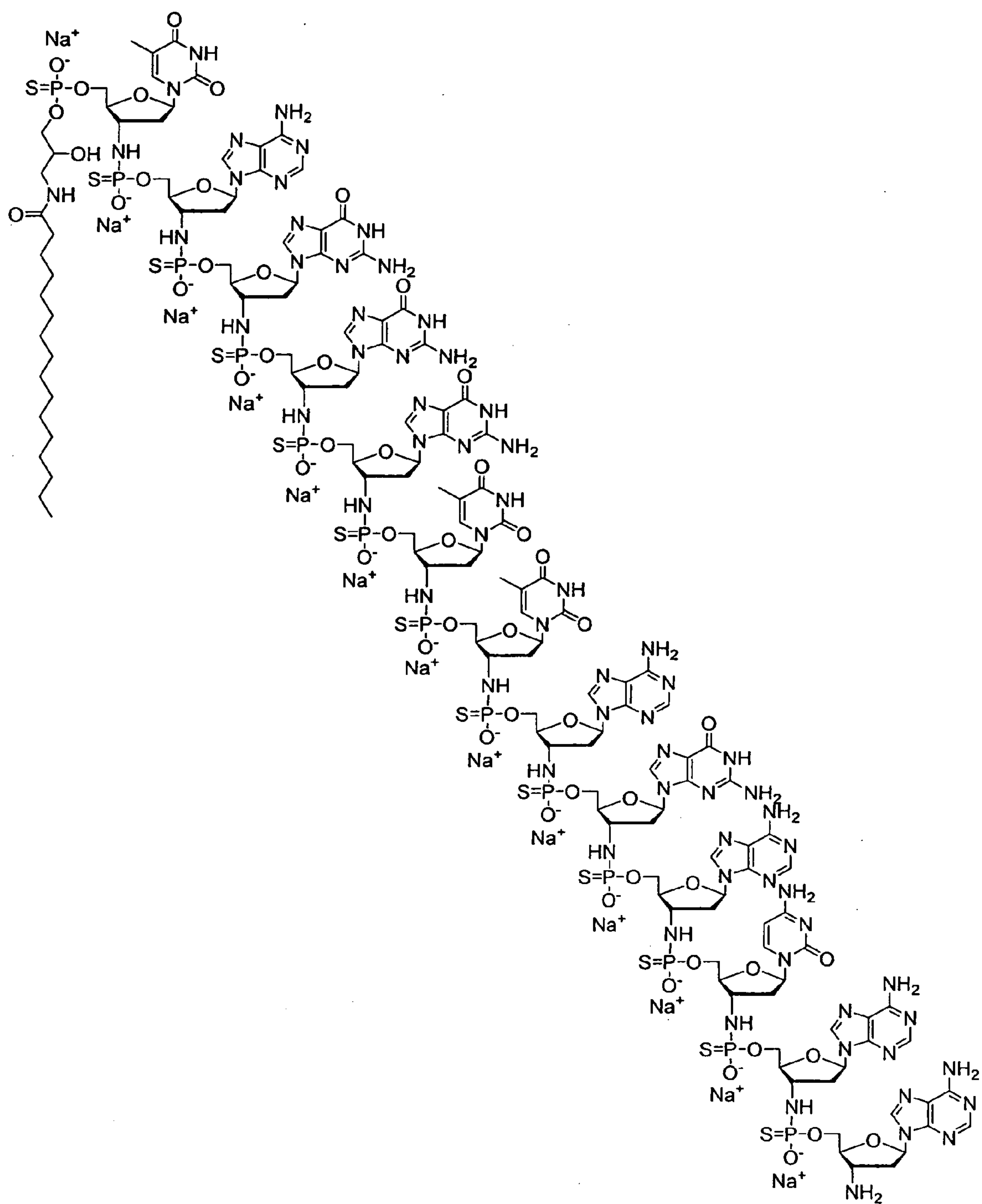
[0160] 在方法之某些實施例中，寡核苷酸係藉由以下結構所述，其中各 M^{x+} 獨立地為氫或鹽之任何適宜相對離子，各 x 獨立地為 1、2 或 3，且 n 為整數 5 至 13，諸如 5、6、7、8、9、10、11、12 或 13，諸如 n 為 13：



在某些情況下，各 x 為 1。在某些情況下，各 x 獨立地為 1 或 2。在某些情況下，各 x 獨立地為 1 或 3。在某些情況下， M^{x+} 為氫。

[0161] 在方法之某些實施例中，寡核苷酸係藉由以下結構所述，且可包括鹽之任何適宜陽離子相對離子：

[0162] 在方法之某些實施例中，寡核苷酸係藉由以下結構所述：



[0163] 在方法之某些實施例中，TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3)序列之 C11 核苷酸殘基來源於 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯單體。就「來源於」而言，其意謂相關殘基係在合成期間經由特定次單元引入。在某些情況

5

下，TAGGGTTAGACAA(SEQ ID NO:3)序列之 T1 至 A10、A12 及 A13 殘基來源於 3'-經保護胺基-二核苷酸硫代磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物。

[0164] 在一些情況下，方法包括使以下 3'-經保護胺基-二核苷酸硫代磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物及 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯單體連續偶合於固相支撐物之末端基團：TA、GG、GT、TA、GA、C 及 AA。應瞭解，為簡單起見，適用於標的方法之偶合中之經保護亞磷醯胺酯次單元可經由符號 X^1 或 X^1X^2 來描繪，其中 X^1 及 X^2 獨立地為經由任何適宜核苷間鍵聯(例如如本文所述)連接之任何適宜核苷。任何適宜合成策略皆可用於標的方法中。以下顯示一些相關策略以說明寡核苷酸目標序列之製備可如何向特定二聚物及/或單體次單元分配。

[0165] 提供示範性目標寡核苷酸序列 TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3)之由連續二聚物及/或單體次單元之以下清單表示的示範性逆向合成策略。應瞭解此策略清單並非為詳盡的，且可針對向任何適宜目標寡核苷酸合成之應用加以修改。在一些實施例中，方法包括使以下一個系列之 3'-經保護胺基-二核苷酸硫代磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物及/或 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯單體連續偶合於固相支撐物之末端基團：

[0166] TA、G、G、G、T、T、A、G、A、C、A、A

[0167] T、AG、G、G、T、T、A、G、A、C、A、A

[0168] T、A、GG、G、T、T、A、G、A、C、A、A

- [0169] T、A、G、GG、T、T、A、G、A、C、A、A
- [0170] T、A、G、G、GT、T、A、G、A、C、A、A
- [0171] T、A、G、G、G、TT、A、G、A、C、A、A
- [0172] T、A、G、G、G、T、TA、G、A、C、A、A
- [0173] T、A、G、G、G、T、T、AG、A、C、A、A
- [0174] T、A、G、G、G、T、T、A、GA、C、A、A
- [0175] T、A、G、G、G、T、T、A、G、AC、A、A
- [0176] T、A、G、G、G、T、T、A、G、A、CA、A
- [0177] T、A、G、G、G、T、T、A、G、A、C、AA
- [0178] TA、GG、G、T、T、A、G、A、C、A、A
- [0179] TA、G、GG、T、T、A、G、A、C、A、A
- [0180] TA、G、G、GT、T、A、G、A、C、A、A
- [0181] TA、G、G、G、TT、A、G、A、C、A、A
- [0182] TA、G、G、G、T、TA、G、A、C、A、A
- [0183] TA、G、G、G、T、T、AG、A、C、A、A
- [0184] TA、G、G、G、T、T、A、GA、C、A、A
- [0185] TA、G、G、G、T、T、A、G、AC、A、A
- [0186] TA、G、G、G、T、T、A、G、A、CA、A
- [0187] TA、G、G、G、T、T、A、G、A、C、AA
- [0188] T、AG、GG、T、T、A、G、A、C、A、A
- [0189] T、AG、G、GT、T、A、G、A、C、A、A
- [0190] T、AG、G、G、TT、A、G、A、C、A、A
- [0191] T、AG、G、G、T、TA、G、A、C、A、A
- [0192] T、AG、G、G、T、T、AG、A、C、A、A

[0193] T、AG、G、G、T、T、A、GA、C、A、A
[0194] T、AG、G、G、T、T、A、G、AC、A、A
[0195] T、AG、G、G、T、T、A、G、A、CA、A
[0196] T、AG、G、G、T、T、A、G、A、C、AA
[0197] T、A、GG、GT、T、A、G、A、C、A、A
[0198] T、A、GG、G、TT、A、G、A、C、A、A
[0199] T、A、GG、G、T、TA、G、A、C、A、A
[0200] T、A、GG、G、T、T、AG、A、C、A、A
[0201] T、A、GG、G、T、T、A、GA、C、A、A
[0202] T、A、GG、G、T、T、A、G、AC、A、A
[0203] T、A、GG、G、T、T、A、G、A、CA、A
[0204] T、A、GG、G、T、T、A、G、A、C、AA
[0205] T、A、G、GG、TT、A、G、A、C、A、A
[0206] T、A、G、GG、T、TA、G、A、C、A、A
[0207] T、A、G、GG、T、T、AG、A、C、A、A
[0208] T、A、G、GG、T、T、A、GA、C、A、A
[0209] T、A、G、GG、T、T、A、G、AC、A、A
[0210] T、A、G、GG、T、T、A、G、A、CA、A
[0211] T、A、G、GG、T、T、A、G、A、C、AA
[0212] T、A、G、G、GT、TA、G、A、C、A、A
[0213] T、A、G、G、GT、T、AG、A、C、A、A
[0214] T、A、G、G、GT、T、A、GA、C、A、A
[0215] T、A、G、G、GT、T、A、G、AC、A、A
[0216] T、A、G、G、GT、T、A、G、A、CA、A

- [0217] T、A、G、G、GT、T、A、G、A、C、AA
- [0218] T、A、G、G、G、TT、AG、A、C、A、A
- [0219] T、A、G、G、G、TT、A、GA、C、A、A
- [0220] T、A、G、G、G、TT、A、G、AC、A、A
- [0221] T、A、G、G、G、TT、A、G、A、CA、A
- [0222] T、A、G、G、G、TT、A、G、A、C、AA
- [0223] T、A、G、G、G、T、TA、GA、C、A、A
- [0224] T、A、G、G、G、T、TA、G、AC、A、A
- [0225] T、A、G、G、G、T、TA、G、A、CA、A
- [0226] T、A、G、G、G、T、TA、G、A、C、AA
- [0227] T、A、G、G、G、T、T、AG、AC、A、A
- [0228] T、A、G、G、G、T、T、AG、A、CA、A
- [0229] T、A、G、G、G、T、T、AG、A、C、AA
- [0230] T、A、G、G、G、T、T、A、GA、CA、A
- [0231] T、A、G、G、G、T、T、A、GA、C、AA
- [0232] TA、GG、GT、T、A、G、A、C、A、A
- [0233] TA、GG、G、TT、A、G、A、C、A、A
- [0234] TA、GG、G、T、TA、G、A、C、A、A
- [0235] TA、GG、G、T、T、AG、A、C、A、A
- [0236] TA、GG、G、T、T、A、GA、C、A、A
- [0237] TA、GG、G、T、T、A、G、AC、A、A
- [0238] TA、GG、G、T、T、A、G、A、CA、A
- [0239] TA、GG、G、T、T、A、G、A、C、AA
- [0240] TA、G、GG、TT、A、G、A、C、A、A

- [0241] TA、G、GG、T、TA、G、A、C、A、A
- [0242] TA、G、GG、T、T、AG、A、C、A、A
- [0243] TA、G、GG、T、T、A、GA、C、A、A
- [0244] TA、G、GG、T、T、A、G、AC、A、A
- [0245] TA、G、GG、T、T、A、G、A、CA、A
- [0246] TA、G、GG、T、T、A、G、A、C、AA等。
- [0247] TA、GG、GT、TA、G、A、C、A、A
- [0248] TA、GG、GT、T、AG、A、C、A、A
- [0249] TA、GG、GT、T、A、GA、C、A、A
- [0250] TA、GG、GT、T、A、G、AC、A、A
- [0251] TA、GG、GT、T、A、G、A、CA、A
- [0252] TA、GG、GT、T、A、G、A、C、AA等
- [0253] TA、GG、GT、TA、GA、C、A、A
- [0254] TA、GG、GT、TA、G、AC、A、A
- [0255] TA、GG、GT、TA、G、A、CA、A
- [0256] TA、GG、GT、TA、G、A、C、AA等
- [0257] TA、G、GG、TT、AG、AC、A、A
- [0258] TA、G、GG、TT、AG、A、CA、A
- [0259] TA、G、GG、TT、AG、A、C、AA
- [0260] TA、G、G、GT、TA、GA、CA、A
- [0261] TA、G、G、GT、TA、GA、C、AA
- [0262] TA、G、G、GT、TA、GA、CA、A
- [0263] TA、G、G、G、TT、AG、AC、AA
- [0264] TA、G、GG、T、TA、GA、CA、A

[0265] TA、G、GG、T、TA、GA、C、AA

[0266] TA、G、GG、T、TA、G、AC、AA等

[0267] T、A、G、GG、TT、AG、AC、AA

[0268] T、A、GG、G、TT、AG、AC、AA

[0269] T、AG、G、G、TT、AG、AC、AA

[0270] TA、G、G、G、TT、AG、AC、AA

[0271] T、AG、G、GT、T、AG、AC、AA等

[0272] T、AG、GG、T、T、AG、AC、AA等

[0273] T、AG、GG、TT、A、G、AC、AA等

[0274] T、AG、GG、TT、AG、A、C、AA等

[0275] T、AG、GG、TT、AG、AC、A、A

[0276] T、AG、GG、TT、AG、AC、AA

[0277] TA、G、GG、TT、AG、AC、AA

[0278] TA、GG、G、TT、AG、AC、AA

[0279] TA、GG、GT、T、AG、AC、AA

[0280] TA、GG、GT、TA、G、AC、AA

[0281] TA、GG、GT、TA、GA、C、AA或

[0282] TA、GG、GT、TA、GA、CA、A。

[0283] 在一些實施例中，方法包括使一系列 3'-經保護胺基-二核苷酸硫代磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物及/或 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯單體連續偶合於固相支撐物之末端基團，其中至少合成之末次偶合為二聚物偶合。在某些實施例中，倒數第二次偶合及末次偶合為二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為偶數時，方法包括 N/2 次

5

二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為偶數時，方法包括 $N/2-1$ 次二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為偶數時，方法包括 $N/2-2$ 次二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為偶數時，方法包括 $N/2-3$ 次二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為偶數時，方法包括 $N/2-4$ 次二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為偶數時，方法包括 $N/2-5$ 次二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為奇數時，方法包括 $N/2-1$ 次二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為奇數時，方法包括 $N/2-2$ 次二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為奇數時，方法包括 $N/2-3$ 次二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為奇數時，方法包括 $N/2-4$ 次二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為奇數時，方法包括 $N/2-5$ 次二聚物偶合。在某些情況下，當 N 為奇數時，方法包括 $N/2-6$ 次二聚物偶合。舉例而言，使以下系列之 3'-經保護胺基-二核苷酸硫代磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物及/或 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯單體連續偶合於固相支撐物之末端基團：

[0284] T、A、G、G、G、T、T、A、G、A、C、AA

[0285] T、A、G、G、G、T、T、A、G、AC、AA

[0286] T、A、G、G、G、T、T、A、GA、C、AA

[0287] T、A、G、G、G、T、T、AG、A、C、AA

[0288] T、A、G、G、G、T、TA、G、A、C、AA

[0289] T、A、G、G、G、TT、A、G、A、C、AA

[0290] T、A、G、G、GT、T、A、G、A、C、AA

[0291] T、A、G、GG、T、T、A、G、A、C、AA

[0292] T、A、GG、G、T、T、A、G、A、C、AA

[0293] T、AG、G、G、T、T、A、G、A、C、AA

[0294] TA、G、G、G、T、T、A、G、A、C、AA 等

[0295] T、A、G、G、G、T、T、AG、AC、AA

[0296] T、A、G、G、G、TT、AG、AC、AA

[0297] T、A、G、GG、TT、AG、AC、AA

[0298] T、AG、GG、TT、AG、AC、AA

[0299] TA、G、GG、TT、AG、AC、AA

[0300] TA、GG、G、TT、AG、AC、AA

[0301] TA、GG、GT、T、AG、AC、AA

[0302] TA、GG、GT、TA、G、AC、AA

[0303] TA、GG、GT、TA、GA、C、AA。

[0304] 在方法之一些實施例中，3'-經保護胺基-二核苷酸硫代磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物係藉由式 X^1X^2 所描述，其中 X^1 及 X^2 係獨立地選自經保護腺嘌呤、經保護胞嘧啶、經保護鳥嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶。

脂質修飾之寡核苷酸

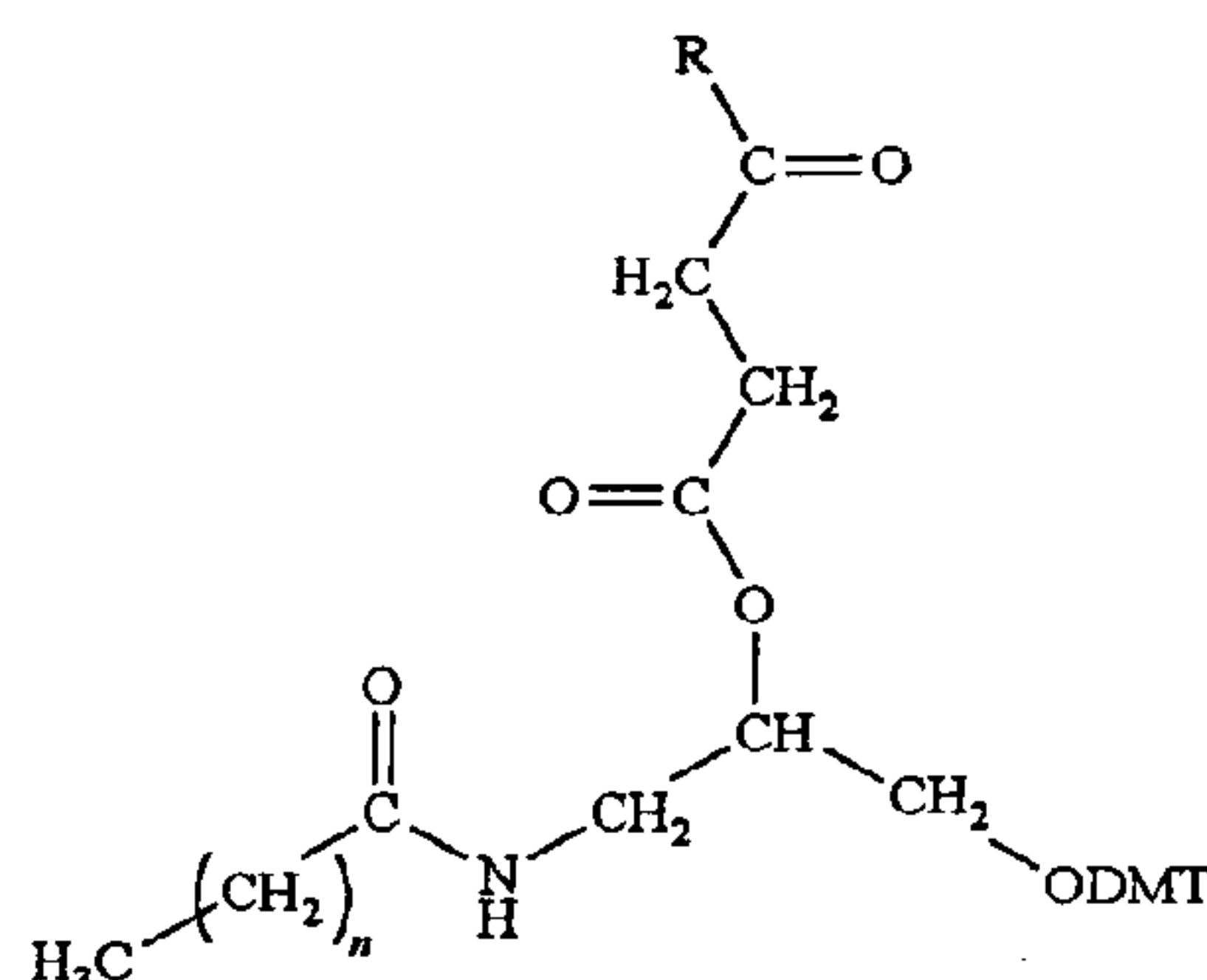
[0305] 視所選鍵聯之性質而定，多種合成方法可用於使脂質部分 L' 結合於寡核苷酸，包括 Mishra 等人，(1995) *Biochemica et Biophysica Acta*, 1264:229-237；Shea 等人，(1990) *Nucleic Acids Res.* 18:3777-3783；以及 Rump 等人，(1998) *Bioconj. Chem.* 9:341-349 中所述之方法。其中脂質部分係結合在寡核苷酸之 5'或 3'末端之化合

物的合成可經由在適當末端使用可與羧酸、酸氯化物、酸酐及活性酯反應之適合官能基，在一些情況下使用胺基來達成。硫醇基團亦可用作官能基(參見 Kupihar 等人, (2001) *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 9:1241-1247)。具有不同鏈長度之胺基修飾劑與硫醇修飾劑兩者均可購得以用於寡核苷酸合成。具有 N3'→P5'磷醯胺酯(例如 N3'→P5'硫代磷醯胺酯)鍵聯之寡核苷酸含有 3'-胺基(而非見於大多數習知寡核苷酸化學中之 3'-羥基)，且因此此等寡核苷酸為脂質基團結合於寡核苷酸之 3'末端提供獨特機會。

[0306] 各種方法可用於使脂質基團連接於具有 N3'→P5'磷醯胺酯(例如 N3'→P5'硫代磷醯胺酯)化學之寡核苷酸之末端(參見例如表 2 之 3-棕櫚醯胺基-1-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2-O-丁二醯基丙二醇連接子)。對於連接於 3'末端，可藉由使完全經保護之固體支撐物結合之寡核苷酸的游離 3'-胺基與相應酸酐反應，隨後用氨脫保護並純化來合成結合之化合物。或者，使用諸如碳化二亞胺、HBTU 或碘化 2-氯-1-甲基吡啶鎘之偶合劑使脂質之羧酸偶合於支撐物結合之寡核苷酸之游離 3'-胺基可用於結合脂質基團。此兩種方法在脂質與寡核苷酸之間形成醯胺鍵。亦可使用在鏈延長期間偶合於寡核苷酸之脂質之亞磷醯胺酯衍生物使脂質連接於寡核苷酸。此方法產生連接脂質及寡核苷酸之磷醯胺酯(例如硫代磷醯胺酯)鍵聯(由丙基-棕櫚醯基及 2-羥基-丙基-棕櫚醯基化合物示範)。另一方法

涉及完全經保護之支撐物結合之寡核苷酸的游離 3'-胺基與適合脂質醛反應，隨後用氰基硼氫化鈉還原，此產生胺鍵聯。

[0307] 對於連接於 5'末端，可使用經改質含脂質固體支撐物，隨後如 Pongracz 及 Gryaznov (1999)中所述在 5'至 3'方向上合成寡核苷酸來合成寡核苷酸。以下提供經改質支撐物之一實例。在其中 $n=14$ 之情況下，脂肪酸為棕櫚酸：3-胺基-1,2-丙二醇與棕櫚醯氯反應，隨後二甲氧基三苯甲基化及丁二醯基化提供用於偶合於固體支撐物之中間物。R 可為長鏈烷基胺可控孔徑玻璃。



適用於製備寡核苷酸之二聚物

[0308] 在製備寡核苷酸之方法之一些實施例中，方法包括使支撐物結合之游離 3'-末端基團(例如 3'-羥基或 3'-胺基)與二核苷酸二聚物次單元接觸以形成次單元間鍵聯。一般而言，二核苷酸二聚物之 3'經保護，且包括能夠與 3'-末端基團偶合之 5'-基團。在一些實施例中，二核苷酸二聚物包括 5'-亞磷醯胺酯。二核苷酸二聚物可包括 3'-經保護胺基或 3'-經保護羥基。在一些實施例中，二核苷

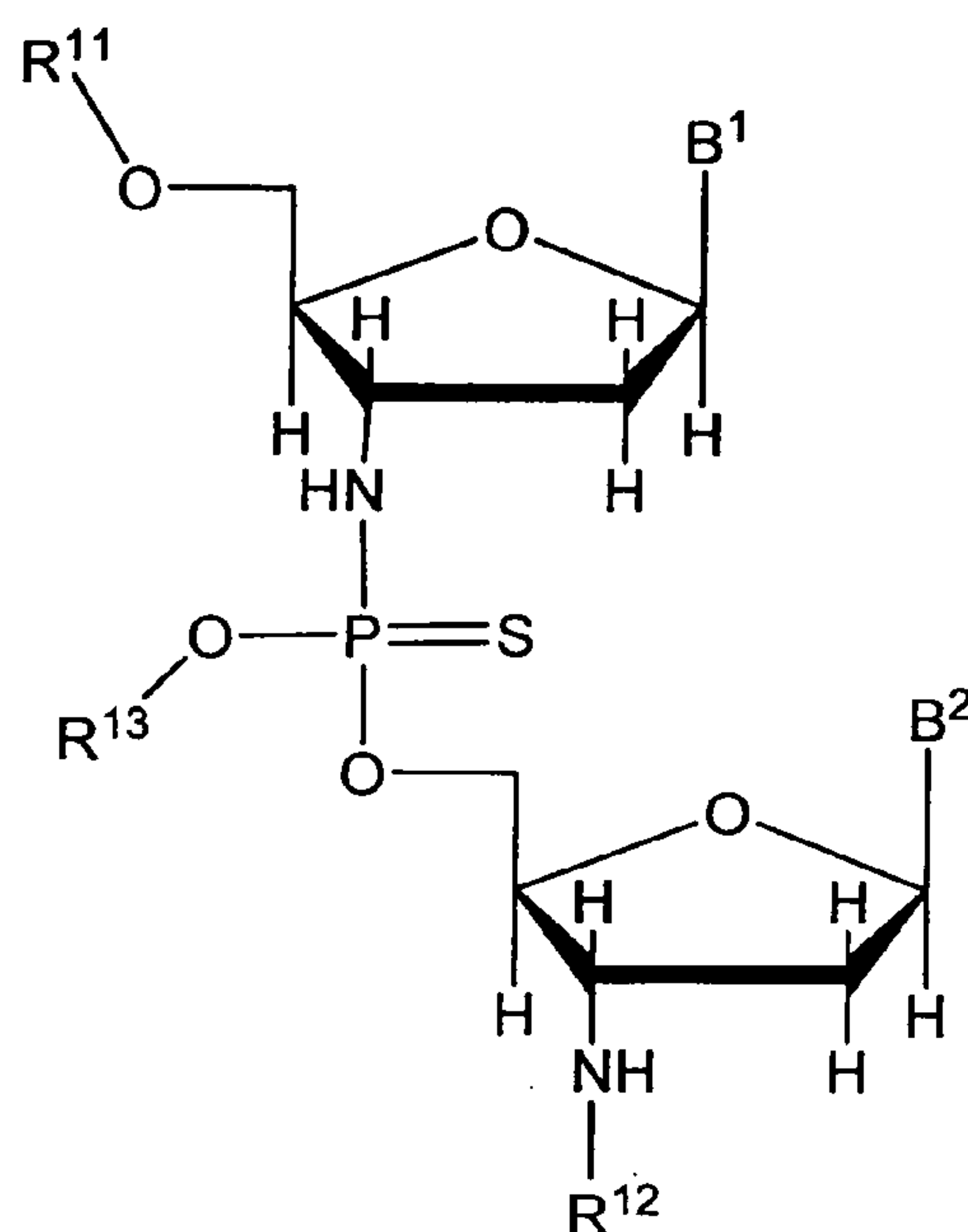
5

酸係藉由式 X^1X^2 所描述，其中 X^1 及 X^2 獨立地為經由任何適宜核苷間鍵聯(例如如本文所述)連接之任何適宜核苷(例如 A、C、G、T 或 U 或其經保護形式)。二核苷酸可在兩個核苷之間包括任何適宜核苷間鍵聯。適用於二核苷酸二聚物中之相關核苷間鍵聯包括但不限於磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷醯胺酯、磷醯胺酯(例如硫代磷醯胺酯)及硫代磷酸酯鍵聯。

[0309] 在一些情況下，二核苷酸二聚物為 3'-經保護-二核苷酸-5'-亞磷醯胺酯二聚物或其合成前驅體，其中該二核苷酸係藉由式 X^1X^2 所描述，其中 X^1 及 X^2 係獨立地選自 A、C、G、T 及 U 或其經保護形式，且其中 X^1 及 X^2 係經由磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷醯胺酯、磷醯胺酯(例如硫代磷醯胺酯)或硫代磷酸酯鍵聯或其經保護形式連接。

[0310] 在製備寡核苷酸之方法之一些實施例中，方法包括使支撐物結合之游離 3'-胺基與 3'-經保護胺基-二核苷酸磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物接觸以形成核苷間 N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯。任何適宜 3'-經保護胺基-二核苷酸磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物或其合成前驅體皆可適用於標的方法中。在一些情況下，二聚物可由以下一個序列表示：AA、AC、AG、AT、AU、CA、CC、CG、CT 或 CU、GA、GC、GG、GT 或 GU、TA 或 UA、TC 或 UC、TG 或 UG 及 TT 或 UU。在一些情況下，二聚物包括經保護 2'-羥基。

[0311] 在某些實施例中，二核苷酸二聚物為藉由式(II)所描述之二核苷酸硫代磷醯胺酯化合物：



式(II)

其中 B^1 及 B^2 各自獨立地為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶、或其類似物； R^{11} 為氫、保護基或亞磷醯胺酯基團； R^{12} 為氫或保護基；且 R^{13} 為氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基或保護基。在一些情況下， B^1 及/或 B^2 包括核苷鹼基保護基。應瞭解，當 R^{13} 為氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基或保護基時，藉由式(II)所述之一些二核苷酸二聚物亦可以鹽形式存在。此等形式只要其可存在即意欲包括在本揭露內容之範疇內。

[0312] 在式(II)之一些實施例中， R^{11} 為氫。在式(II)之一些實施例中， R^{11} 為保護基。任何適宜保護基皆可適用於式(II)標的二聚物中。在式(II)之一些實施例中， R^{11} 為基於乙醯丙酸酯之保護基。在式(II)之一些實施例中，

R^{11} 為乙醯丙酸酯保護基(即 $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$)。在式(II)之一些實施例中， R^{11} 為 5'-亞磷醯胺酯基團。

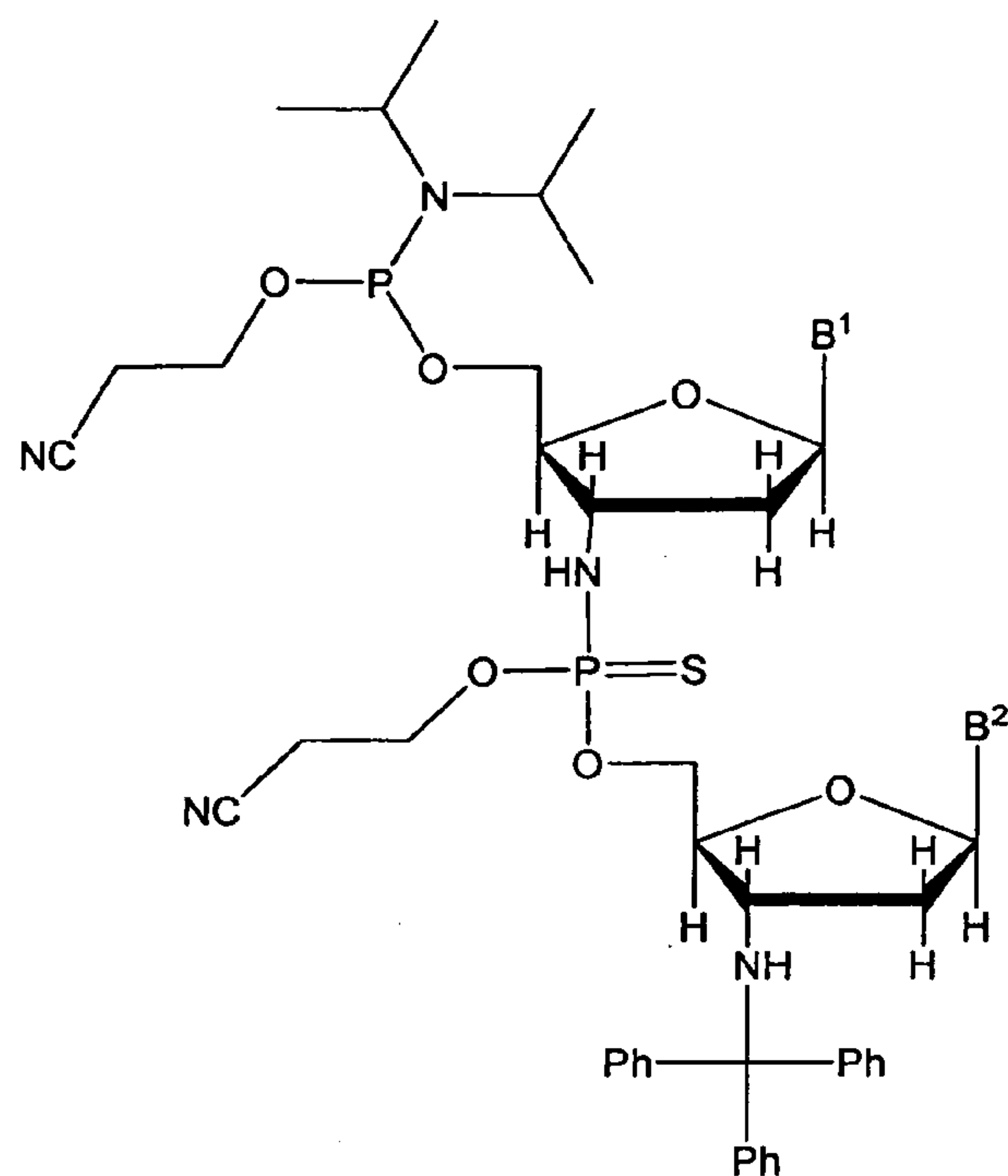
[0313] 在式(II)之一些實施例中， R^{12} 為氫。在式(II)之一些實施例中， R^{12} 為保護基。在某些實施例中， R^{12} 為三苯甲基(例如三苯基甲基(Trt)、單甲氧基三苯基甲基(MMT)或二甲氧基三苯基甲基(DMT))。在式(II)之一些實施例中， R^{12} 為 Trt 保護基。

[0314] 在式(II)之一些實施例中， R^{12} 為光可裂解保護基。任何適宜光可裂解保護基皆可適用於製備標的二核苷酸二聚物及其合成前驅體。在式(II)之一些實施例中， R^{12} 為經取代 9-苯基黃嘌呤-9-基保護基，諸如硝基、氟基、甲基、三氟甲基及/或甲氧基取代之 9-苯基黃嘌呤-9-基保護基。在式(II)之一些實施例中， R^{12} 為 9-苯基黃嘌呤-9-基保護基(即 9-(9-苯基)氧雜蒽基)。

[0315] 在式(II)之一些實施例中， R^{11} 為乙醯丙醯基保護基，且 R^{12} 為三苯甲基保護基。

[0316] 在式(II)之一些實施例中， R^{13} 為氫。在式(II)之一些實施例中， R^{13} 為保護基。在某些實施例中， R^{13} 為 2-氰基-乙基。

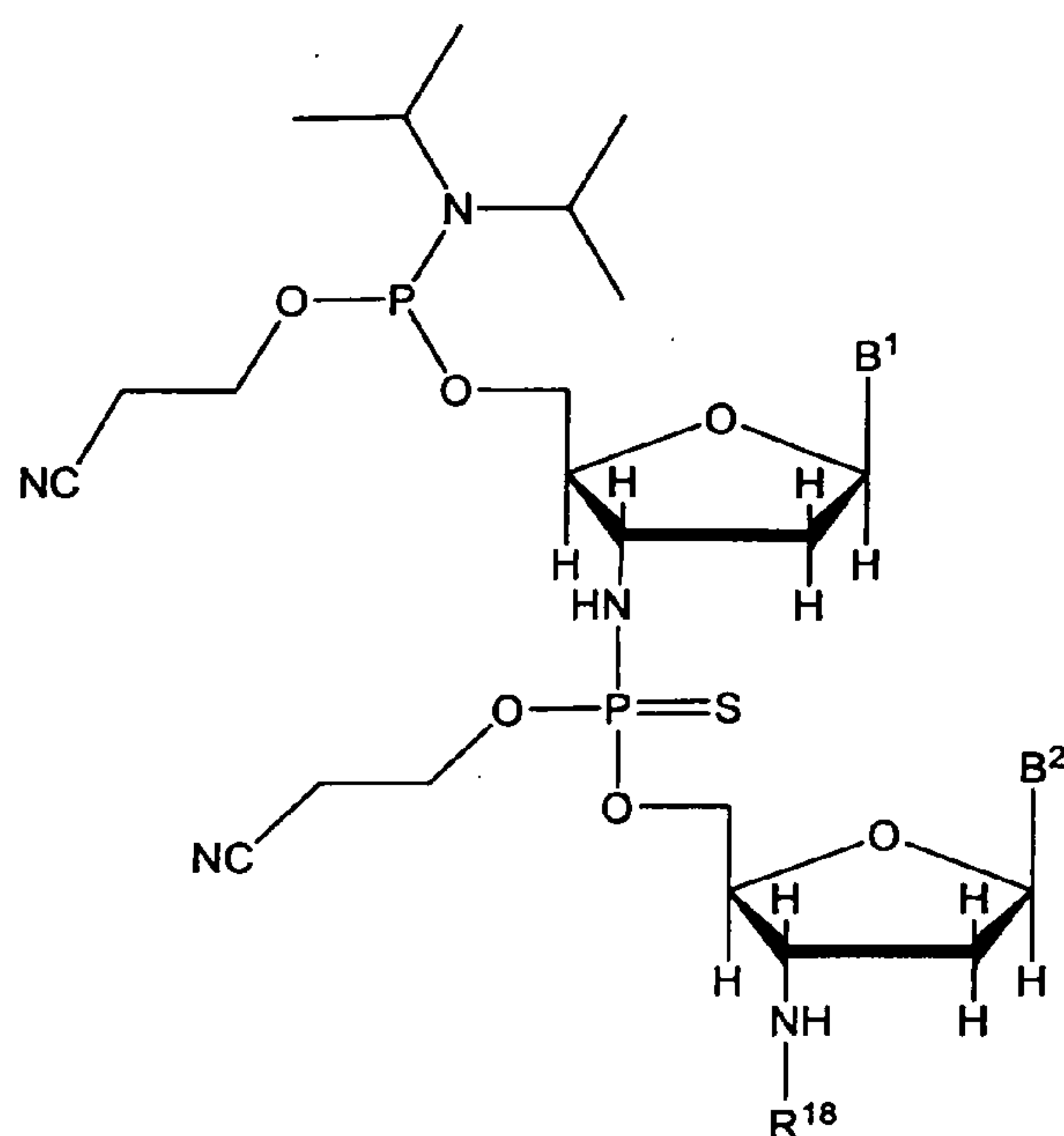
[0317] 在某些實施例中，3'-經保護胺基-二核苷酸磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物係藉由式(III)所描述：



式(III)

其中 B^1 及 B^2 各自獨立地為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶或其類似物。在一些情況下， B^1 及/或 B^2 包括核苷鹼基保護基。

[0318] 在某些實施例中，3'-經保護胺基-二核苷酸磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺二聚物係藉由式(III)所述：



式(IV)

其中 B^1 及 B^2 各自獨立地為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶或其類似物；且 R^{18} 為三苯甲基保護基(諸如 Trt、DMT 或 MMT)或 9-苯基黃嘌呤-9-基保護基。

[0319] 在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 及 B^2 係各自獨立地選自經保護腺嘌呤、經保護胞嘧啶、經保護鳥嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 及 B^2 係各自獨立地選自 A(Bz)、A(DMF)、C(Bz)、G(異丁醯基)、T 及 U。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 A(Bz)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 A(DMF)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 C(Bz)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 G(異丁醯基)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 T 或 U。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^2 為 A(Bz)或 A(DMF)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^2 為 C(Bz)。在式(II)或(III)

之一些實施例中， B^2 為 G(異丁醯基)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^2 為 T 或 U。

[0320] 在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 A(Bz)或 A(DMF)且 B^2 為 A(Bz)或 A(DMF)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 A(Bz)或 A(DMF)且 B^2 為 C(Bz)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 A(Bz)或 A(DMF)且 B^2 為 G(異丁醯基)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 A(Bz)或 A(DMF)且 B^2 為 T 或 U。

[0321] 在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 C(Bz)且 B^2 為 A(Bz)或 A(DMF)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 C(Bz)且 B^2 為 C(Bz)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 C(Bz)且 B^2 為 G(異丁醯基)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 C(Bz)且 B^2 為 T 或 U。

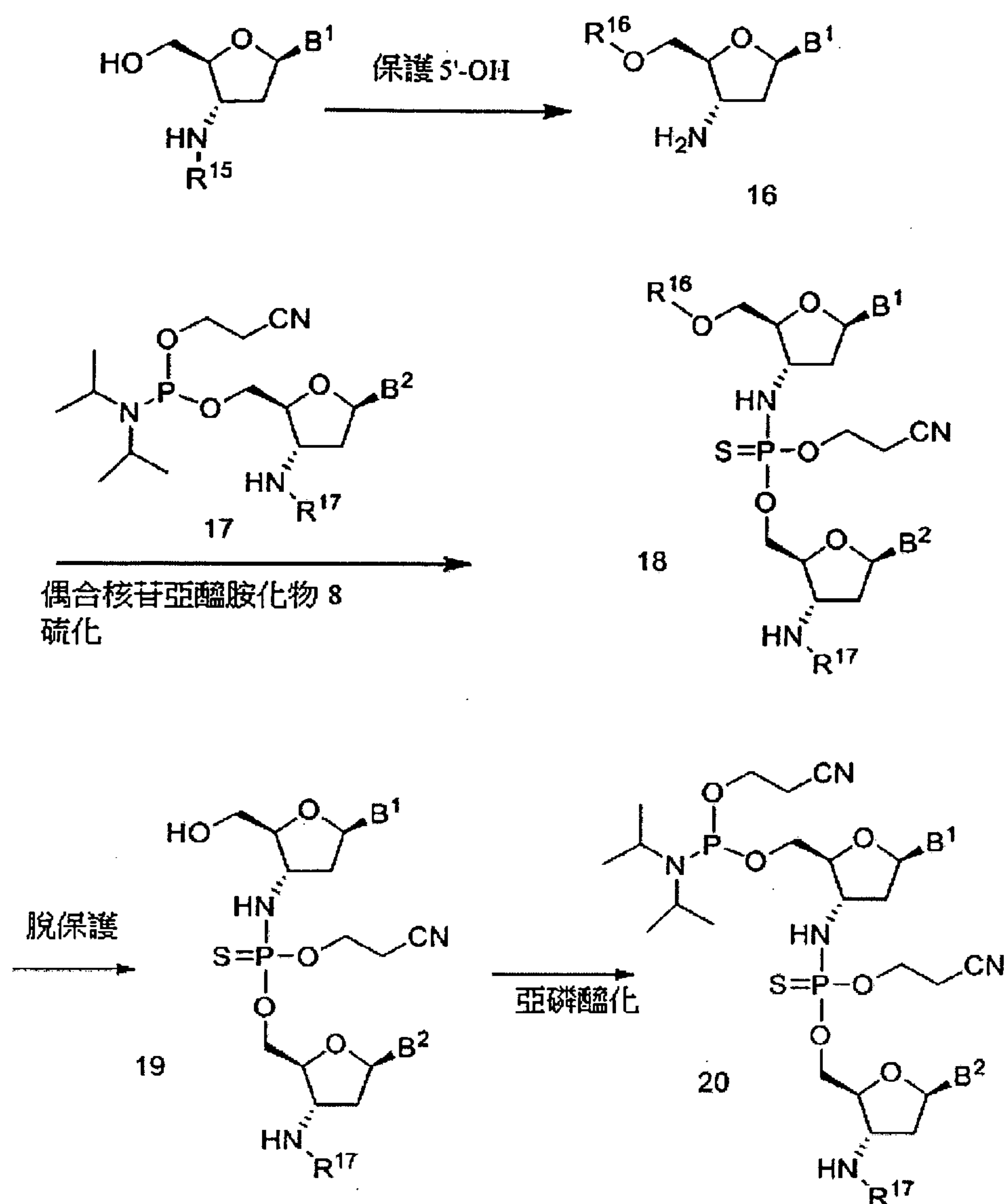
[0322] 在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 G(異丁醯基)且 B^2 為 A(Bz)或 A(DMF)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 G(異丁醯基)且 B^2 為 C(Bz)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 G(異丁醯基)且 B^2 為 G(異丁醯基)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 G(異丁醯基)且 B^2 為 T 或 U。

[0323] 在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 T 或 U 且 B^2 為 A(Bz)或 A(DMF)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 T 或 U 且 B^2 為 C(Bz)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 T 或 U 且 B^2 為 G(異丁醯基)。在式(II)或(III)之一些實施例中， B^1 為 T 或 U 且 B^2 為 T 或 U。應瞭

解，本文所述之任何式(II)或(III)之實施例皆亦可應用於式(IV)。

[0324] 本文所述之任何二聚物皆可適合於在標的方法中使用。標的二聚物可根據任何適宜方法自任何適宜核苷單體製備。適用於製備標的核苷二聚物之相關核苷單體包括但不限於描繪於本文揭露之合成流程中之單體 16、17、12 及 13。相關二核苷酸二聚物包括適用於製備標的亞磷醯化二核苷酸二聚物之非亞磷醯化二聚物，諸如適用於製備諸如 20 之亞磷醯化二核苷酸二聚物之二聚物 18 及 19、或適用於製備諸如 15 之亞磷醯化二核苷酸二聚物之二聚物 14。

[0325] 在一些實施例中，式(III)及(IV)二聚物係經由以下流程中描繪之方法製備：



其中 B¹ 及 B² 各自獨立地為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶或其類似物；R¹⁵ 為氫或胺基保護基；R¹⁷ 為胺基保護基；且 R¹⁶ 為羥基保護基。在某些實施例中，R¹⁵ 為氫。在單體 16 之某些實施例中，R¹⁶ 為矽烷基。在單體 16 之某些實施例中，R¹⁶ 為 TBDMS(第三丁基二甲基矽烷基)。在單體 17 之某些實施例中，R¹⁷ 為三苯甲基(Trt)。在單體 17 之某些實施例中，R¹⁷ 為單甲氧基三苯甲基

(MMT)。

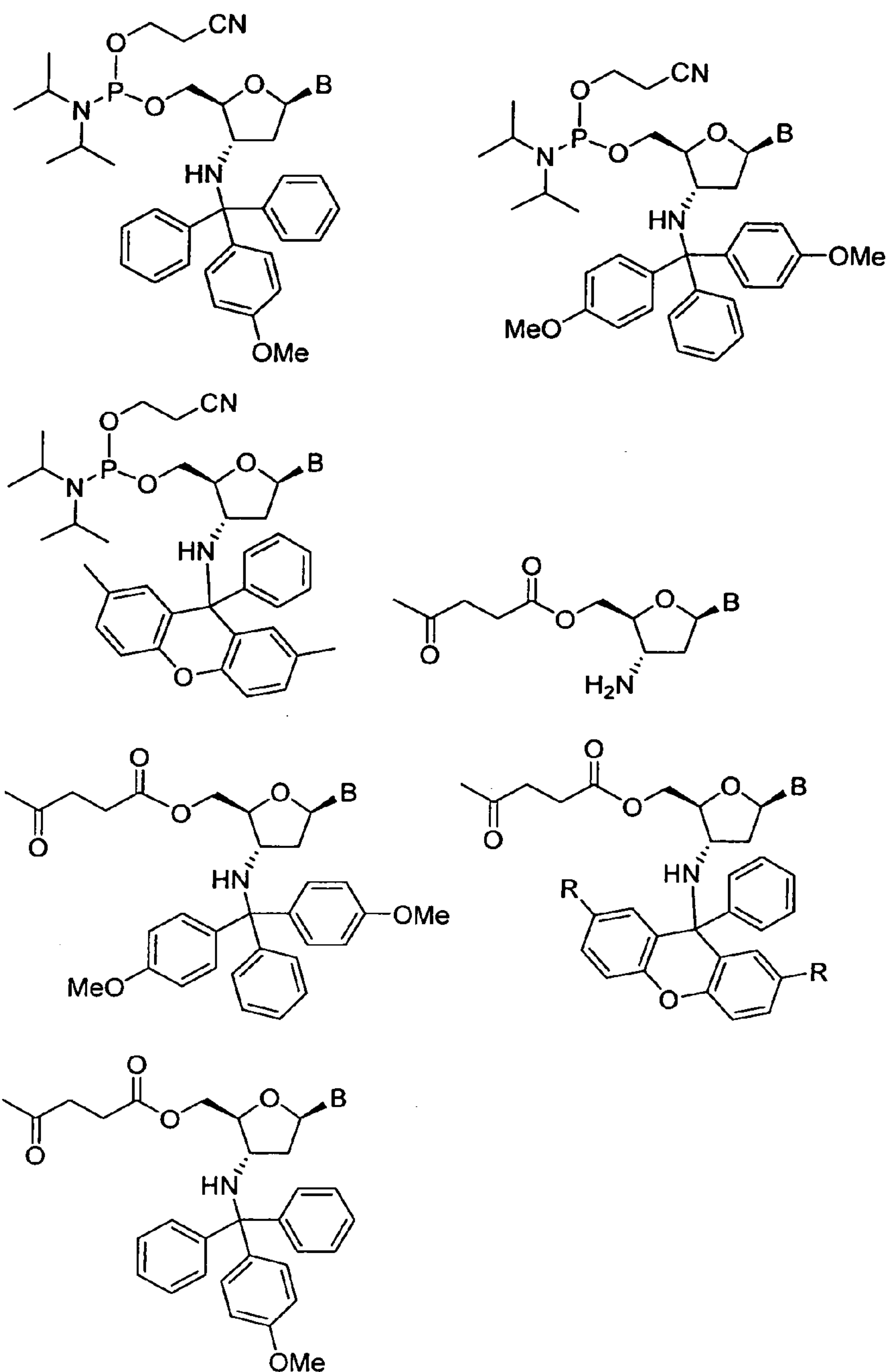
[0326] 在單體 17 之某些實施例中， R^{17} 為二甲氧基三苯甲基(DMT)。在單體 17 之某些實施例中， R^{17} 為 9-苯基黃嘌呤-9-基。在二聚物 18-20 之某些實施例中， R^{17} 為三苯甲基(Trt)。在二聚物 18-20 之某些實施例中， R^{17} 為單甲氧基三苯甲基(MMT)。在二聚物 18-20 之某些實施例中， R^{17} 為二甲氧基三苯甲基(DMT)。在二聚物 18-20 之某些實施例中， R^{17} 為 9-苯基黃嘌呤-9-基。

在一些實施例中，式(III)及(IV)二聚物係經由以下流程中描繪之方法製備，其中單體 13 係經由單體 12 自 11 製備，且與核苷亞醯胺化物偶合以產生二聚物 14，其經轉化成二聚物 15：



其中 B^1 及 B^2 各自獨立地為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶或其類似物；且 R^{13} 及 R^{14} 各自獨立地為保護基。在單體 12 及 13 之某些實施例中， R^{13} 為三苯甲基。在單體 12 及 13 之某些實施例中， R^{13} 為 9-苯基黃嘌呤-9-基。在二聚物 14 及 15 之某些實施例中， R^{14} 為三苯甲基。在二聚物 14 及 15 之某些實施例中， R^{14} 為二甲氧基三苯甲基。在二聚物 14 及 15 之某些實施例中， R^{14} 為單甲氧基三苯甲基。在二聚物 14 及 15 之某些實施例中， R^{14} 為 9-苯基黃嘌呤-9-基。

適用於根據本文所述之方法製備標的二核苷酸二聚物之相關單體包括但不限於：



其中 B 為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶或其類似物，且 R 為氫或烷基(例如甲基)或鹵素(例如溴基)。在某些情況下，B 係選自 A(Bz)、G(iBu)、T、A(DMF)、C(Bz)或 U。

寡核苷酸組合物

[0327] 除目標寡核苷酸之外，可在寡核苷酸合成期間產生多種非目標寡核苷酸合成產物。可存在於寡核苷酸製劑中之次要產物包括但不限於缺失產物(例如缺乏一或多個核苷殘基之產物)、包括一或多種保護基之產物、終止產物(例如包括加帽寡核苷酸鏈之產物)、缺乏一或多個核苷鹼基之產物、包括部分氧化亞磷醯胺酯鍵聯之產物及包括部分硫化鍵聯之產物。如本文所用，目標寡核苷酸係指相關寡核苷酸序列，其為製備方法之目標產物。如本文所用，術語「非目標產物」及「次要產物」可互換使用，且係指不為目標產物，且可在目標寡核苷酸合成之循環期間及之後存在之任何含寡核苷酸產物。

[0328] 標的方法提供包括純度提高之目標寡核苷酸之組合物。在一些實施例中，組合物包括 50 重量%或 50 重量%以上之目標寡核苷酸，諸如約 55 重量%或 55 重量%以上、約 60 重量%或 60 重量%以上、約 65 重量%或 65 重量%以上、約 70 重量%或 70 重量%以上、約 75 重量%或 75 重量%以上、約 80 重量%或 80 重量%以上、約 85 重量%或 85 重量%以上、約 90 重量%或 90 重量%以上、或甚至約 95 重量%或 95 重量%以上之目標寡核苷酸。在某些實施例中，組合物包括 50 重量%或 50 重量%以上之目標寡核苷酸。在某些實施例中，組合物包括 55 重量%或 55 重量%以上之目標寡核苷酸。在某些實施例中，組合物包括 60 重量%或 60 重量%以上之目標寡核苷酸。在

某些實施例中，組合物包括 65 重量%或 65 重量%以上之目標寡核苷酸。在某些實施例中，組合物包括 70 重量%或 70 重量%以上之目標寡核苷酸。在某些實施例中，組合物包括 75 重量%或 75 重量%以上之目標寡核苷酸。在某些實施例中，組合物包括 80 重量%或 80 重量%以上之目標寡核苷酸。在某些實施例中，組合物包括 85 重量%或 85 重量%以上之目標寡核苷酸。在某些實施例中，組合物包括 90 重量%或 90 重量%以上之目標寡核苷酸。在某些實施例中，組合物包括 95 重量%或 95 重量%以上之目標寡核苷酸。

[0329] 在一些實施例中，標的方法提供 95%或 95%以上，諸如 96%或 96%以上、97%或 97%以上、98%或 98%以上、或甚至 98%或 98%以上之偶合效率。

[0330] 在一些實施例中，標的方法提供比僅使用單體次單元進行之對照合成之平均偶合效率高 0.5%或 0.5%以上，諸如 0.75%或 0.75%以上、1.0%或 1.0%以上、1.25%或 1.25%以上、1.5%或 1.5%以上、1.75%或 1.75%以上、2.0%或 2.0%以上、2.5%或 2.5%以上、或甚至 3.0%或 3.0%以上的平均偶合效率。在某些實施例中，標的方法提供 96%或大於 96%之偶合效率。在某些實施例中，標的方法提供比僅使用單體次單元進行之對照合成之偶合效率高 2%或大於 2%的偶合效率。

[0331] 在合成之後，標的組合物可經受一或多個純化步驟(例如 HPLC 層析、親和層析、離子交換層析、凝

膠過濾等)例如以自目標寡核苷酸移除一或多種次要產物。應瞭解，在標的組合物中，藉由標的製備方法提供之次要產物之量降低及/或目標寡核苷酸之量增加可指在合成後即刻以及在已進行任何進一步純化或分離步驟(例如HPLC層析)之前獲得之此等量及純度。因此，在一些情況下，標的組合物可稱為合成製劑，例如未純化之合成製劑。就未純化而言，其意謂未已對組合物進行層析純化步驟。層析純化係指包括使目標聚核苷酸吸附於層析支撐物，以及隨後溶離目標聚核苷酸之任何適宜純化方法。在一些情況下，層析純化係指反相層析純化。

[0332] 標的方法提供包括降低量之一或多種次要產物之組合物。就降低量而言，其意謂相對於對照合成，例如其中寡核苷酸係僅使用單體偶合製備之合成，次要產物相對於目標寡核苷酸，在組合物中之以重量計之量得以降低。在一些實施例中，降低量之次要產物為目標寡核苷酸之以重量計之量的約 20%或小於 20%，諸如目標寡核苷酸之以重量計之量的約 15%或小於 15%、約 10%或小於 10%、或約 5%或小於 5%。在某些實施例中，降低量之次要產物為目標寡核苷酸之以重量計之量的 20%或小於 20%，諸如目標寡核苷酸之以重量計之量的 15%或小於 15%、10%或小於 10%、9%或小於 9%、8%或小於 8%、7%或小於 7%、6%或小於 6%、5%或小於 5%、4%或小於 4%、3%或小於 3%、2%或小於 2%、或甚至 1%或小於 1%。在某些實施例中，次要產物為(N-x)產物。

[0333] 標的製備方法可提供一或多種(N-x)產物相對於相關目標寡核苷酸之量降低之組合物，其中 x 為整數 1 至 N-1，且 N 為目標寡核苷酸中之核苷殘基之數目。因此，(N-1)產物可指相較於目標寡核苷酸(例如 N 產物)，缺乏任一核苷酸殘基之任何及所有寡核苷酸產物。因此，(N-2)產物係指相較於目標寡核苷酸(例如 N 產物)，缺乏任何兩個核苷酸殘基之任何及所有寡核苷酸產物。在某些實施例中，次要產物為(N-1)產物。在某些實施例中，次要產物為(N-2)產物。在某些實施例中，次要產物為(N-3)產物。在某些實施例中，次要產物為(N-4)產物。在某些實施例中，次要產物為(N-5)產物。在某些實施例中，次要產物為(N-6)產物。在某些實施例中，次要產物為(N-7)產物。

[0334] 在某些實施例中，一或多種(N-x)產物相對於相關目標寡核苷酸之量降低的本文所述之任何組合物為未純化的。

[0335] 在一些實施例中，標的組合物包括(N-1)產物與目標寡核苷酸產物之低比率。在一些情況下，以(N-1)產物相對於目標寡核苷酸之重量計，低比率為小於(2.0 x N)份至 100 份，其中 N 係指目標寡核苷酸序列中之核苷酸殘基之數目。在某些實施例中，以(N-1)產物相對於目標寡核苷酸之重量計，比率為小於(1.9 x N)份至 100 份，諸如以(N-1)產物相對於目標寡核苷酸之重量計，小於(1.8 x N)份至 100、小於(1.7 x N)份至 100、小於(1.6 x N)份至

100、小於(1.5 x N)份至 100、小於(1.4 x N)份至 100、小於(1.3 x N)份至 100、小於(1.2 x N)份至 100、小於(1.1 x N)份至 100、小於(1.0 x N)份至 100、小於(0.9 x N)份至 100、小於(0.8 x N)份至 100、小於(0.7 x N)份至 100、小於(0.6 x N)份至 100、小於(0.5 x N)份至 100、小於(0.4 x N)份至 100、小於(0.3 x N)份至 100、小於(0.2 x N)份至 100、或甚至小於(0.1 x N)份至 100 份。在某些實施例中，以(N-1)產物相對於目標寡核苷酸之重量計，標的組合物包括小於(1.5 x N)份至 100 份之低比率。在某些實施例中，以(N-1)產物相對於目標寡核苷酸之重量計，標的組合物包括小於(1.2 x N)份至 100 份之低比率。在某些實施例中，以(N-1)產物相對於目標寡核苷酸之重量計，標的組合物包括小於(1.0 x N)份至 100 份之低比率。在某些實施例中，以(N-1)產物相對於目標寡核苷酸之重量計，標的組合物包括小於(0.5 x N)份至 100 份之低比率。

[0336] 在一些實施例中，標的組合物包括(N-2)產物與目標寡核苷酸產物之低比率。在一些情況下，以(N-2)產物相對於目標寡核苷酸之重量計，低比率為小於(2.0 x N)份至 100 份，其中 N 係指目標寡核苷酸序列中之核苷酸殘基之數目。在某些實施例中，以(N-2)產物相對於目標寡核苷酸之重量計，比率為小於(1.9 x N)份至 100 份，諸如以(N-2)產物相對於目標寡核苷酸之重量計，小於(1.8 x N)份至 100、小於(1.7 x N)份至 100、小於(1.6 x N)份至 100、小於(1.5 x N)份至 100、小於(1.4 x N)份至 100、小

於 $(1.3 \times N)$ 份至 100、小於 $(1.2 \times N)$ 份至 100、小於 $(1.1 \times N)$ 份至 100、小於 $(1.0 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.9 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.8 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.7 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.6 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.5 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.4 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.3 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.2 \times N)$ 份至 100、或甚至小於 $(0.1 \times N)$ 份至 100 份。在某些實施例中，以 $(N-2)$ 產物相對於目標寡核苷酸之重量計，標的組合物包括小於 $(1.5 \times N)$ 份至 100 份之低比率。在某些實施例中，以 $(N-2)$ 產物相對於目標寡核苷酸之重量計，標的組合物包括小於 $(1.2 \times N)$ 份至 100 份之低比率。在某些實施例中，以 $(N-1)$ 產物相對於目標寡核苷酸之重量計，標的組合物包括小於 $(1.0 \times N)$ 份至 100 份之低比率。在某些實施例中，以 $(N-2)$ 產物相對於目標寡核苷酸之重量計，標的組合物包括小於 $(0.5 \times N)$ 份至 100 份之低比率。

[0337] 在一些實施例中，標的組合物包括之 $(N-1)$ 產物之量為組合物中之總非目標寡核苷酸的 20% 或小於 20%，諸如總非目標寡核苷酸之 15% 或小於 15%、10% 或小於 10%、或甚至 5% 或小於 5%。

[0338] 可使用本文所述之方法製備廣泛多種寡核苷酸組合物中之任一者。多種類別及類型之寡核苷酸係為使用標的方法(例如如本文所述)進行製備所關注。適於根據標的方法製備之寡核苷酸包括但不限於反義寡核苷酸、RNA 寡核苷酸、siRNA 寡核苷酸、RNAi 寡核苷酸、DNA 適體、微小 RNA 及其類似物。

與端粒酶之 RNA 組分互補之寡核苷酸

[0339] 本揭露內容之態樣包括包括與人類端粒酶之 RNA 組分互補之寡核苷酸的化合物及組合物及其製備方法。化合物可以高效能抑制細胞中之端粒酶活性，且具有細胞攝取特徵。

[0340] 如上所概述，標的方法提供合成之非目標寡核苷酸產物之量降低。在某些情況下，標的方法提供合成之目標寡核苷酸產物之量增加。在一些實施例中，標的方法提供製備一或多種(N-x)產物相對於相關目標寡核苷酸之量降低之組合物。表 1 闡述一些非目標寡核苷酸產物之相關量。

[0341] 在某些實施例中，一或多種(N-x)產物相對於相關目標寡核苷酸之量降低的本文所述之任何組合物為未純化的。

[0342]

表 1. 寡核苷酸產物在組合物中之相關含量。標的組合物可在表 1 中指示之含量下包括一或多種以下組分。

產物	組合物% (以重量計)	相對於目標之 臨限量 (以重量計)	相對於目標(以重 量計)寡聚物之範 圍	相對於目標(以重 量計)伊 美司他之範圍
目標	50%或 50%以上、 55%或 55%以上、 60%或 60%以上、 65%或 65%以上、 70%或 70%以上、 75%或 75%以上、 80%或 80%以上、 85%或 85%以上、 90%或 90%以上、 95%或 95%以上	N/A	N/A	N/A
(N-1)產物(包括 其衍生物，諸如 苯基乙醯基及 iBu 衍生物) (例如在峰 1 後 (N-1)產物)	小於 11% 小於 10% 小於 9% 小於 8% 小於 7% 小於 6% 小於 5% 小於 4% 小於 3% 小於 2% 小於 1% 小於 0.5%	小於(1.9 x N)份 至 100、小於(1.8 x N)份至 100、 小於(1.7 x N)份 至 100、小於(1.6 x N)份至 100、 小於(1.5 x N)份 至 100、小於(1.4 x N)份至 100、 小於(1.3 x N)份 至 100、小於(1.2 x N)份至 100、 小於(1.1 x N)份 至 100、小於(0.9 x N)份至 100、 小於(0.8 x N)份 至 100、小於(0.7 x N)份至 100、 小於(0.6 x N)份 至 100、 小於(0.5 x N)份 至 100、小於(0.4 x N)份至 100、 小於(0.3 x N)份 至 100、小於(0.2 x N)份至 100、 小於(0.1 x N)份 至 100	自約(0.1 x N)至 約(0.5 x N)份(以 100 份計)、自約 (0.1 x N)至約(0.4 x N)份(以 100 份 計)、自約(0.2 x N)至約(0.3 x N) 份(以 100 份計) 、 約(0.1 x N)份(以 100 份計)、約(0.2 x N)份(以 100 份 計)、約(0.3 x N) 份(以 100 份計) 、約(0.4 x N)份 (以 100 份計)、約 (0.5 x N)份(以 100 份計)，	自約 1 至約 20 份(以 100 份計))、自約 1 至約 10 份(以 100 份 計)、自約 1 至 約 8 份(以 100 份計)、自約 1 至約 6 份(以 100 份計)、自 約 1 至約 5 份 (以 100 份計)、 自約 2 至約 4 份(以 100 份計))、 約 1 份(以 100 份計)、約 2 份 (以 100 份計) 、約 3 份(以 100 份計)、約 4 份 (以 100 份計) 、約 5 份(以 100 份計) 小於 1 份(以 4 份計)、小於 1 份(以 5 份計) 、小於 1 份(以 6 份計)、小於 1 份(以 7 份計) 、小於 1 份(以

				8 份計)、小於 1 份(以 9 份計)、小於 1 份(以 10 份計)、小於 1 份(以 20 份計)、小於 1 份(以 25 份計)、小於 1 份(以 100 份計)
個別或組合之 (N-2) 及 (N-3) 產物(包括其衍生物, 諸如苯基乙醯基及 iBu 衍生物)(例如在峰 2+3+4 後, 或在峰 3+4 後, 或在峰 2、3 或 4 後)	4%或 4%以上 6%或 6%以上 8%或 8%以上 10%或 10%以上 12%或 12%以上 14%或 14%以上 16%或 16%以上 18%或 18%以上 20%或 20%以上 25%或 25%以上 小於 25% 小於 20% 小於 18% 小於 16% 小於 14% 小於 12% 小於 10%	至少(1.0 x N)份至 100、至少(1.5 x N)份至 100、至少(2.0 x N)份至 100、至少(2.5 x N)份至 100、至少(3.0 x N)份至 100、至少(3.3 x N)份至 100 小於(3.3 x N)份至 100、小於(3.0 x N)份至 100、小於(2.5 x N)份至 100、小於(2.0 x N)份至 100、小於(1.5 x N)份至 100、小於(1.0 x N)份至 100	自約(1.0 x N)至約(5.0 x N)份(以 100 份計)、自約(2.0 x N)至約(5.0 x N)份(以 100 份計)、自約(2.5 x N)至約(4.0 x N)份(以 100 份計)、自約(3.0 x N)至約(4.0 x N)份(以 100 份計)、自約(3.0 x N)至約(3.5 x N)份(以 100 份計) 約(1.0 x N)份(以 100 份計)、約(1.5 x N)份(以 100 份計)、約(2.0 x N)份(以 100 份計)、約(2.5 x N)份(以 100 份計)、約(3.0 x N)份(以 100 份計)、約(3.3 x N)份(以 100 份計)、約(3.5 x N)份(以 100 份計)	自約 5 至約 50 份(以 100 份計)、自約 10 至約 50 份(以 100 份計)、自約 20 至約 50 份(以 100 份計)、自約 30 至約 50 份(以 100 份計)、自約 5 至約 40 份(以 100 份計)、自約 5 至約 30 份(以 100 份計)、自約 5 至約 20 份(以 100 份計)、自約 10 至約 20 份(以 100 份計)、約 10 份(以 100 份計)、約 15 份(以 100 份計)、約 20 份(以 100 份計)、約 25 份(以 100 份計)、約 30 份(以 100 份計)、約 35 份(以 100 份計)、約 40 份(以 100 份計)、約 45 份(以 100 份計)、約 50 份(以 100 份計) 至少 5 份(以 100 份計)、至少 10 份(以 100 份計)、至少 12 份(以 100 份計)、至少 14 份(

				以 100 份計)、至少 15 份(以 100 份計)、至少 20 份(以 100 份計)、至少 30 份(以 100 份計)、至少 40 份(以 100 份計)
總非目標寡核苷酸	45%或小於 45%、40%或小於 40%、35%或小於 35%、30%或小於 30%、25%或小於 25%、20%或小於 20%	小於(8.5 x N)份至 100、小於(8.0 x N)份至 100、小於(7.5 x N)份至 100、小於(7.0 x N)份至 100、小於(6.5 x N)份至 100、小於(6.0 x N)份至 100、小於(5.5 x N)份至 100、小於(5.0 x N)份至 100、小於(4.5 x N)份至 100、小於(4.0 x N)份至 100、小於(3.5 x N)份至 100、小於(3.0 x N)份至 100、小於(2.5 x N)份至 100、小於(2.0 x N)份至 100、小於(1.5 x N)份至 100、小於(1.0 x N)份至 100	自約(0.4 x N)至約(5.0 x N)份(以 100 份計)、自約(0.8 x N)至約(4.0 x N)份(以 100 份計)、自約(1.6 x N)至約(4.0 x N)份(以 100 份計)、自約(1.6 x N)至約(2.5 x N)份(以 100 份計) 約(1.9 x N)份至 100 至少(1.0 x N)份(每 100)、至少(1.5 x N)份(每 100)、至少(2.0 x N)份(每 100)	自約 5 至約 50 份(以 100 份計)、自約 10 至約 50 份(以 100 份計)、自約 20 至約 50 份(以 100 份計)、自約 20 至約 40 份(以 100 份計)、自約 20 至約 30 份(以 100 份計)、 約 25 份(以 100 份計) 至少 10 份(以 100 份計)、至少 15 份(以 100 份計)、至少 20 份(以 100 份計)、至少 25 份(以 100 份計)、 小於 40 份(以 100 份計)、小於 30 份(以 100 份計)、小於 25 份(以 100 份計)、小於 20 份(以 100 份計)、小於 15 份(以 100 份計)

[0343] 在某些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於(2.0 x N)重量份至 100 重量份之(N-1)產物，其中該化合物包括具有含 N 個與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元的序列之聚核苷酸，其中至少兩個核苷次單

元係藉由 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。在某些實施例中，以 (N-1) 產物相對於 N 產物之重量計，比率為小於小於 $(1.9 \times N)$ 份至 100 份，諸如以 (N-1) 產物相對於 N 產物之重量計，小於 $(1.8 \times N)$ 份至 100、小於 $(1.7 \times N)$ 份至 100、小於 $(1.6 \times N)$ 份至 100、小於 $(1.5 \times N)$ 份至 100、小於 $(1.4 \times N)$ 份至 100、小於 $(1.3 \times N)$ 份至 100、小於 $(1.2 \times N)$ 份至 100、小於 $(1.1 \times N)$ 份至 100、小於 $(1.0 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.9 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.8 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.7 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.6 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.5 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.4 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.3 \times N)$ 份至 100、小於 $(0.2 \times N)$ 份至 100、或甚至小於 $(0.1 \times N)$ 份至 100 份。

[0344] 在一些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於每 4 重量份 1 重量份之 (N-1) 產物 (諸如相對於化合物，小於每 5 重量份 1 重量份、小於每 6 重量份 1 重量份、小於每 7 重量份 1 重量份、小於每 8 重量份 1 重量份、小於每 9 重量份 1 重量份、小於每 10 重量份 1 重量份、小於每 15 重量份 1 重量份、小於每 20 重量份 1 重量份、小於每 25 重量份 1 重量份、小於每 50 重量份 1 重量份、小於每 100 重量份 1 重量份之 (N-1) 產物)，其中該化合物包含具有含 10 個或 10 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元的序列之聚核苷酸，其中至少兩個核苷次單元係藉由 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代磷醯胺酯或側氧基磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。在某些實施例中，聚核苷酸具有含

10 個或 10 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元，諸如 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個或 20 個以上核苷次單元的序列。

[0345] 在某些情況下，聚核苷酸包括含 13 個或 13 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元，諸如 15 個或 15 個以上、20 個或 20 個以上、30 個或 30 個以上、50 個或 50 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元的序列。

[0346] 在某些實施例中，聚核苷酸包括具有 7 個或 7 個以上互補於人類端粒酶之 RNA 組分之核苷次單元，諸如 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 個互補於人類端粒酶之 RNA 組分之核苷次單元的序列。在某些實施例中，聚核苷酸包括具有在 11 個與 18 個之間的互補於人類端粒酶之 RNA 組分之核苷次單元，諸如在 11 個與 16 個之間的互補於人類端粒酶之 RNA 組分之連續核苷次單元的序列。

[0347] 在一些實施例中，聚核苷酸包括在 3 個與 50 個之間的與人類端粒酶之 RNA 組分互補之連續核苷次單元，諸如在 5 個與 40 個之間、在 10 個與 40 個之間、在 10 個與 30 個之間、在 10 個與 25 個之間、在 10 個與 20 個之間、或在 12 個與 15 個之間的核苷次單元。在某些實施例中，寡核苷酸包括具有 10 個或 10 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之連續核苷次單元的序列。在某些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於每 10 重量份 1

重量份之(N-1)產物。在某些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於每 20 重量份 1 重量份之(N-1)產物。在某些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於每 25 重量份 1 重量份之(N-1)產物。在某些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於每 30 重量份 1 重量份之(N-1)產物。在某些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於每 50 重量份 1 重量份之(N-1)產物。

[0348] 在一些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於每 4 重量份 1 重量份之任何(N-x)產物，諸如相對於化合物，小於每 5 重量份 1 重量份、小於每 6 重量份 1 重量份、小於每 7 重量份 1 重量份、小於每 8 重量份 1 重量份、小於每 9 重量份 1 重量份、小於每 10 重量份 1 重量份、小於每 20 重量份 1 重量份、小於每 25 重量份 1 重量份、小於每 30 重量份 1 重量份、或甚至小於每 50 重量份 1 重量份之任何(N-x)產物。

[0349] 在一些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於總共每 100 重量份 40 重量份之(N-x)含聚核苷酸產物，諸如相對於化合物，小於每 100 重量份 35 重量份、小於每 100 重量份 30 重量份、小於每 100 重量份 25 重量份、小於每 100 重量份 20 重量份、或甚至小於每 100 重量份 15 重量份之(N-x)含聚核苷酸產物。

[0350] 在一些實施例中，組合物具有相對於化合物，至少每 100 重量份 5 重量份之(N-2)及(N-3)產物，諸如相對於化合物，至少每 100 重量份 10 重量份、至少每

100 重量份 12 重量份、至少每 100 重量份 14 重量份、至少每 100 重量份 15 重量份、至少每 100 重量份 20 重量份、至少每 100 重量份 30 重量份、或至少每 100 重量份 40 重量份之 (N-2) 及 (N-3) 產物。

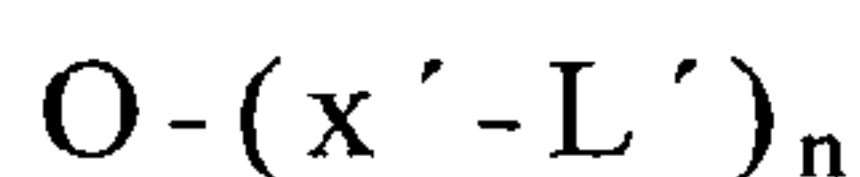
[0351] 在一些實施例中，組合物具有 (N-x) 含聚核苷酸產物之以下概況：

相對於 N 產物，小於每 4 重量份 1 重量份之 (N-1) 產物；及

相對於 N 產物，至少每 100 重量份 10 重量份之 (N-2) 及 (N-3) 產物。

[0352] 在某些實施例中，寡核苷酸 N 產物包含在 (N-1) 產物中不存在之 3'-末端核苷次單元。

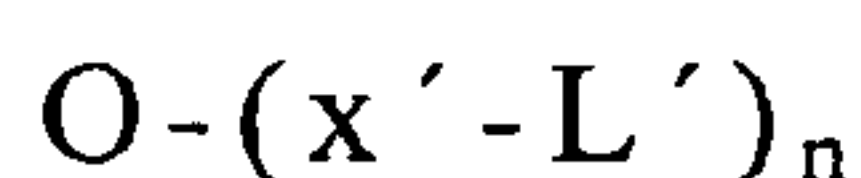
[0353] 寡核苷酸化合物可藉由下式所描述：



其中 O 表示包括具有與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元的序列之寡核苷酸，x' 為視情況選用之連接子基團，L' 表示脂質部分，且 n 為整數 1-5。

[0354] 因此，化合物之設計需要選擇兩種實體 O 及 L'，以及確定此等實體之間的結構鍵聯，此可涉及視情況選用之連接子基團 x'。

[0355] 在一些實施例中，寡核苷酸化合物可藉由下式所述：



其中 O 表示包括具有互補於人類端粒酶之 RNA 組分

之核苷次單元的序列之寡核苷酸， x' 為視情況選用之連接子基團， L' 表示脂質部分，且 n 為 1，諸如式(I)寡核苷酸或其鹽，其中在式(I)中， Z 為脂質部分， L 為視情況選用之連接子，且 B 基團對應於具有互補於人類端粒酶之 RNA 組分之核苷次單元的序列。

[0356] 寡核苷酸組分 O 可視為化合物之「效應物」組分，因為此組分藉由結合端粒酶之 RNA 組分來實現對端粒酶之抑制。因此，選擇 O 之序列以使其包括與端粒酶 RNA 之序列(其顯示於 SEQ ID NO:1 中)互補之區域。在理論上可使與端粒酶 RNA 組分互補之區域靶向端粒酶 RNA 之任何部分，但端粒酶 RNA 之特定區域為抑制性寡核苷酸之較佳目標。一個較佳目標區域為跨越 SEQ ID NO:1 之核苷酸 30-67 之區域，其包括「模板區域」，亦即具有跨越 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 46-56 之序列 5'-CUAACCCUAAC-3'(SEQ ID NO: 2)的含 11 個核苷酸之區域。模板區域起指定端粒酶添加至染色體末端，且為端粒酶之活性所必需之端粒重複序列的作用(參見 Chen 等人, Cell 100:503-514, 2000; Kim 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98(14):7982-7987, 2001)。因此，含有包含與模板區域之全部或一部分互補之序列的寡核苷酸部分之本發明化合物為特別較佳的。另一較佳目標區域為跨越 hTR 之核苷酸 137-179 之區域(參見 Pruzan 等人, Nucl. Acids Research, 30:559-588, 2002)。在此區域內，跨越 141-153 之序列為較佳目標。PCT 公開案 WO 98 / 28442 描述長度

為至少 7 個核苷酸之寡核苷酸抑制端粒酶之用途，其中寡核苷酸經設計以互補於 hTR 序列之在模板區域外部之可及部分，包括 hTR 之核苷酸 137-196、290-319、及 350-380。

[0357] O 之靶向 hTR 序列之區域較佳精確互補於相應 hTR 序列。儘管可容忍錯配，但在某些情況下，預期其會降低所得寡核苷酸結合物之特異性及活性。在特定實施例中，因此選擇寡核苷酸 O 之鹼基序列以包括具有至少 5 個與端粒酶 RNA 精確互補之核苷酸之序列，且若採用長度增加之互補序列，諸如至少 8 個、至少 10 個、至少 12 個、至少 13 個或至少 15 個與端粒酶 RNA 精確互補之核苷酸，則可獲得對端粒酶之抑制作用增強。在其他實施例中，寡核苷酸之序列包括具有至少 5 個至 20 個、至少 8 個至 20 個、至少 10 個至 20 個、或至少 10 個至 15 個與端粒酶 RNA 序列精確互補之核苷酸的序列。當寡核苷酸 O 之全長經選擇以與端粒酶 RNA 互補時，可獲得最佳端粒酶抑制活性。然而，寡核苷酸組分之全長不必精確互補於目標序列，且寡核苷酸序列可包括不互補於目標序列之區域。可添加此等區域例如以對化合物賦予其他性質，該等區域諸如有助於純化之序列。若寡核苷酸組分 O 欲包括不與目標序列互補之區域，則此等區域可位於 5'末端或 3'末端中之一者或兩者。在使具有精確互補性之區域靶向模板區域之情況下，可用在 5'末端接合有端粒酶樣(富含 G)序列之具有精確互補性之短(5-8 個核苷酸)區域達成有效

端粒酶抑制。

[0358] 與人類端粒酶 RNA 互補，且可作為寡核苷酸組分 O 之一部分包括，或可用作整個寡核苷酸組分 O 之示範性序列包括以下：

[0359] hTR 互補序列(美國公開案 2012329858 之寡核苷酸序列 SEQ ID NO:1 之區域)

[0360] GGGUUGCGGA GGGUGGGCCU
GGGAGGGGUG GUGGCCAUUU UUUGUCU AAC
CCU AACUGAG AAGGGCGUAG GCGCCGUGCU
UUUGCUCCCC GCGCGCUGUU UUUCUCGCUG
ACUUUCAGCG GCGGGAAG CCUCGGCCUG
CCGCCUCCA CCGUUCAUUC UAGAGCAAAC
AAAAAUGUC AGCUGCUGGC CCGUUCGCCC
CUCCCGGGGA CCUGCGGCGG GUCGCCUGCC
CAGCCCCGA ACCCGCCUG GAGGCCGCGG
UCGGCCCGGG GCUUCUCCGG AGGCACCCAC
UGCCACCGCG AAGAGUUGGG CUCUGUCAGC
CGCGGGUCUC UCGGGGGCGA GGGCGAGGUU
CAGGCCUUUC AGGCCGCAGG AAGAGGAACG
GAGCGAGUCC CCGCGCGCGG CGCGAUUCCC
UGAGCUGUGG GACGUGCACC CAGGACUCGG
CUCACACAUG C (SEQ ID NO: 1)

[0361] GCTCTAGAATGAACGGTGGAAGGCGGCAGG
137-166 (SEQ ID NO: 6)

- [0362] GTGGAAGGCGGCAGG 137-151 (SEQ ID NO: 7)
- [0363] GGAAGGCGGCAGG 137-149 (SEQ ID NO: 8)
- [0364] GTGGAAGGCGGCA 139-151 (SEQ ID NO: 9)
- [0365] GTGGAAGGCGG 141-151 (SEQ ID NO: 10)
- [0366] CGGTGGAAGGCGG 141-153 (SEQ ID NO: 11)
- [0367] ACGGTGGAAGGCG 142-154 (SEQ ID NO: 12)
- [0368] AACGGTGGAAGGCGGC 143-155 (SEQ ID NO: 13)
- [0369] ATGAACGGTGGAAGGCGG 144-158 (SEQ ID NO: 14)
- [0370] ACATTTTTTGTCTCTAG 160-179 (SEQ ID NO: 15)
- [0371] TAGGGTTAGACAA 42-54 (SEQ ID NO: 3)
- [0372] GTTAGGGTTAG 46-56 (SEQ ID NO: 4)
- [0373] GTTAGGGTTAGAC 44-56 (SEQ ID NO: 16)
- [0374] GTTAGGGTTAGACAA 42-56 (SEQ ID NO: 17)
- [0375] GGGTTAGAC 44-52
- [0376] CAGTTAGGG 50-58
- [0377] CCCTTCTCAGTT 54-65 (SEQ ID NO: 18)
- [0378] CGCCCTTCTCAG 56-67 (SEQ ID NO: 19)
- [0379] 在一些實施例中，聚核苷酸包含選自由以下組成之群之序列： GTTAGGGTTAG(SEQ ID NO:4)； TAGGGTTAGACAA(SEQ ID NO:3)；及 CAGTTAGGGTTAG

(SEQ ID NO:5)。

[0380] O 組分之合成中使用之核苷間鍵聯的類型可選自任何可用寡核苷酸化學，包括但不限於磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、P3'→N5'磷醯胺酯、N3'→P5'磷醯胺酯、N3'→P5'硫代磷醯胺酯及硫代磷酸酯鍵聯。

[0381] 在一些實施例中，寡核苷酸組分 O 具有至少一個 N3'→P5'磷醯胺酯(例如 N3'→P5'硫代磷醯胺酯)鍵聯。在某些實施例中，與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元係皆藉由 N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。在某些情況下，N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯為 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯。在某些情況下，N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯為 N3'→P5'側氧基-磷醯胺酯次單元間鍵聯。

[0382] 在某些情況下，N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯具有以下結構：



其中 R 係選自由以下組成之群：氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基及磷酸酯保護基。應瞭解包括藉由上式所述之次單元間鍵聯之一些寡核苷酸組分 O 亦可以鹽形式存在，其中 R 係選自由氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基及磷酸酯保護基組成之群。此等形式只要其可存在即意欲包括在本揭露內容之範疇內。

[0383] 在一些情況下，N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯係藉由以下結構所述：



其中 R 為氫。應瞭解對於本文所述之包括該種次單元間鍵聯之任何寡核苷酸組分 O，此等寡核苷酸組分 O 亦可包括鍵聯之任何適宜鹽形式。因此，次單元間鍵聯可呈包括任何適宜相對離子之鹽形式。

[0384] 本發明化合物在於細胞中產生端粒酶抑制方面比非結合於脂質組分之相應寡核苷酸更有效。咸信脂質組分 L'起增強細胞攝取化合物之作用，特別是在促進穿過細胞膜方面。儘管此發生所依之機制尚未完全闡明，但一種可能性為脂質組分可促進化合物與細胞膜結合成單一分子或聚集體(微胞)形式，隨後進行內化。然而，對精確機制之理解不為利用本發明所需。

[0385] 脂質組分可為相較於未修飾寡核苷酸，提供細胞攝取增強之任何脂質或脂質衍生物。較佳脂質為烴、脂肪(例如甘油酯、脂肪酸及脂肪酸衍生物，諸如脂肪醯胺)及固醇。當脂質組分為烴時，L 組分可為經取代或未經取代之環烴或脂族直鏈或分支烴，該烴可為飽和或不飽和的。較佳實例為完全飽和或多不飽和之直鏈未分支烴。烴鏈之長度可自 C2-C30 變化，但最佳端粒酶抑制可用 C8-C22 碳鏈獲得。以下列出飽和烴(烷)之較佳實例：

[0386] 系統名稱/碳鏈

[0387] 十四烷 C₁₄H₃₀

[0388] 十五烷 C₁₅H₃₂

[0389] 十六烷 C₁₆H₃₄

[0390] 十七烷 $C_{17}H_{36}$

[0391] 十八烷 $C_{18}H_{38}$

[0392] 十九烷 $C_{19}H_{40}$

[0393] 二十烷 $C_{20}H_{42}$

[0394] 亦可選擇烴之單不飽和及多不飽和形式(烯及多烯，諸如二烯及三烯)，其中具有一個至三個雙鍵之化合物為較佳的，但可採用具有更多雙鍵之化合物。亦可利用炔(含有一或多個參鍵)及烯炔(參鍵及雙鍵)。

[0395] 烴之經取代形式可用於本發明化合物中，其中在活體內及在活體外為惰性之取代基為較佳的。一特別較佳之取代基為氟。多氟化烴之示範性通用結構包括： $CF_3(CF_2)_n-(CH_2)_m$ -其中 m 為至少 1，較佳至少 2，且 $n=1-30$ ，諸如氟十三烷： $CF_3(CF_2)_9(CH_2)_3$ ；以及 $CH_3(CH_2)_a(CF_2)_b(CH_2)_c$ -其中 a 、 b 及 c 獨立地為 1-30。

[0396] 其他適合脂質組分包括簡單脂肪酸及脂肪酸衍生物、甘油酯以及更複雜脂質，諸如固醇，例如膽固醇。脂肪酸及其衍生物可為完全飽和的或單不飽和或多不飽和的。碳鏈之長度可自 $C2-C30$ 變化，但最佳端粒酶抑制可用 $C8-C22$ 碳鏈獲得。以下列出飽和脂肪酸之較佳實例：

[0397] 系統名稱/俗名/碳鏈

[0398] 十四酸 肉豆蔻酸 14:0

[0399] 十六酸 棕櫚酸 16:0

[0400] 十八酸 硬脂酸 18:0

[0401] 二十酸 花生酸 20:0

[0402] 亦可採用脂肪酸之單不飽和及多不飽和形式，其中具有一個至三個雙鍵之化合物為較佳的，但亦可採用具有更多雙鍵之化合物。可採用之常見單不飽和及多不飽和脂肪酸之實例包括：

[0403] 系統名稱/俗名/碳鏈

[0404] 順式-9-十六酸 棕櫚油酸 16:1(n-7)

[0405] 順式-6-十八酸 芹子酸 18:1 (n-12)

[0406] 順式-9-十八酸 油酸 18:1 (n-9)

[0407] 9,12-十八碳二烯酸 亞麻油酸 18:2 (n-6)

[0408] 6,9,12-十八碳三烯酸 γ -亞麻油酸 18:3 (n-6)

[0409] 9,12,15-十八碳三烯酸 α -亞麻油酸 18:3 (n-3)

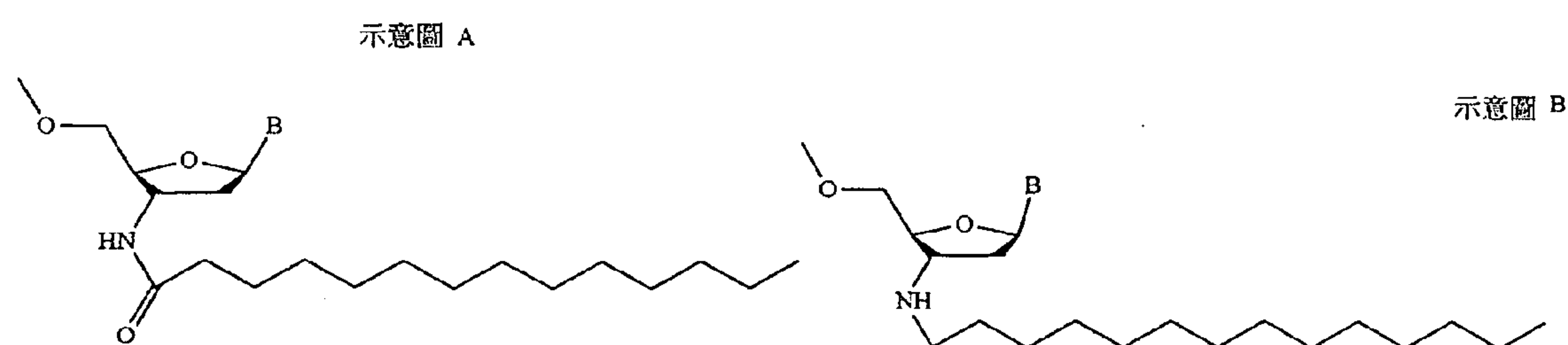
[0410] 5,8,11,14-二十碳四烯酸 花生油酸 20:4 (n-6)

[0411] 在碳鏈中具有一或多個參鍵之脂肪酸以及分支脂肪酸亦可用於本發明化合物中。脂肪酸之經取代形式可用於本發明化合物中。如同烴基團一般，在活體內及在活體外為惰性之取代基為較佳的，其中氟為特別較佳的。適用於本發明中之脂肪酸之多氟化衍生物的示範性通用結構為： $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n-(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ 其中 m 為至少 1，較佳至少 2，且 $n=1-30$ ；以及 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)_c\text{CO}-$ 其中 a 、 b 及 c 獨立地為 1-30。

[0412] 在一些情況下，在一個與五個之間的 L' 組分 ($n=1-5$)係視情況經由連接子共價連接於 O 組分。更通常地，利用 1 個或 2 個 L' 組分 ($n=1$ 或 2)。當一個以上 L' 組

分連接於 O 組分時，各 L'組分係獨立地加以選擇。

[0413] 應瞭解描述為具有指定烴作為 L'部分之本發明化合物及描述為具有指定脂肪酸(具有與指定烴相同之碳原子數目)之化合物係密切相關的，且僅在使 L'部分接合於寡核苷酸之鍵結之性質方面而在結構上不同，此又為用於產生化合物之合成程序之結果。舉例而言，且如以下更詳細所描述，當合成具有結合於寡核苷酸(具有磷醯胺酯或硫代磷醯胺酯核苷間鍵聯)之 3'-胺基末端之 L'部分的化合物時，使用脂肪酸之醛形式(脂肪醛)作為起始物質導致在脂質鏈與寡核苷酸之間形成胺鍵聯，以使脂質基團以烴形式呈現。相反，使用相同脂肪酸之羧酸、酸酐或酸氯化物形式導致形成醯胺酯鍵聯，以使脂質基團以脂肪酸衍生物形式呈現，詳言之在此情況下以脂肪醯胺形式呈現(如以上定義章節中所指示，為簡單起見，術語「脂肪酸」在描述結合之 L'基團時在本文中廣泛用於包括脂肪酸衍生物，包括脂肪醯胺)。此說明於描繪磷醯胺酯寡核苷酸之 3'-胺基末端接合於 C14 脂質組分之以下示意圖中。在示意圖 A 中，L'為十四酸(肉豆蔻酸)，其中 L'基團與 O 基團之間的連接為醯胺。在示意圖 B 中，L'為十四烷，且 L'基團與 O 基團之間的連接為胺。

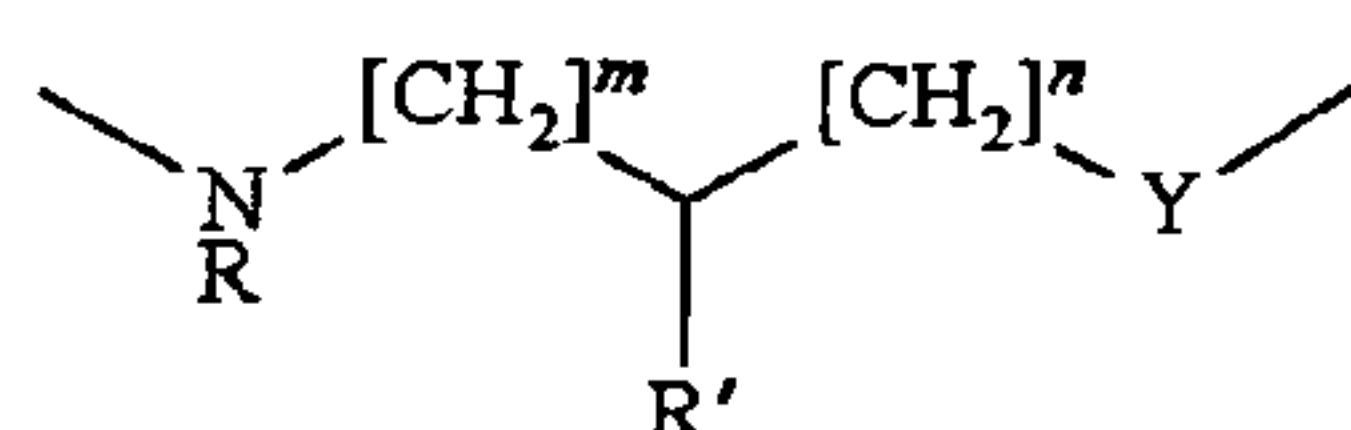


[0414] O 組分與 L'組分之間的鍵聯可為直接鍵聯，或可經由視情況選用之連接子部分，例如 x'或式(I)之視情況選用之連接子 L。連接子基團可用於促進化合物之化學合成。無論連接子基團是否用於介導 O 組分及 L'組分之結合，在寡核苷酸組分 O 上皆存在 L'組分可適宜地結合之多個位點。適合鍵聯點包括寡核苷酸之 5'及 3'末端、一或多個糖環、核苷間骨架及核苷鹼基。在一些情況下，L'部分係連接於寡核苷酸之 3'或 5'末端。

[0415] 若 L'組分欲連接於 3'末端，則可直接連接於 3'取代基，在較佳磷醯胺酯及硫代磷醯胺酯寡核苷酸之情況下，該 3'取代基為 3'-胺基，且在諸如習知磷酸二酯寡核苷酸之其他情況下，該 3'取代基為 3-羥基。或者，L'部分可經由 3'-連接之磷酸酯基團連接，其中十六烷烴係經由 O-烷基連接子連接於硫代磷醯胺酯寡核苷酸之 3'磷酸酯基。若 L'部分欲連接於 5'末端，則其可經由 5'-連接之磷酸酯基團連接。與 O 部分上之鹼基連接可經由任何適合原子達成，例如與鳥苷之 N2 胺基連接。當 $n > 1$ 以使複數個脂質部分欲連接於 O 組分時，個別選擇之 L'組分可連接在任何適合位點處。舉例而言，一個 L'基團可連接於各末端，各個 L'基團可連接於鹼基，或兩個或兩個以上 L'基團可連接在一個末端。

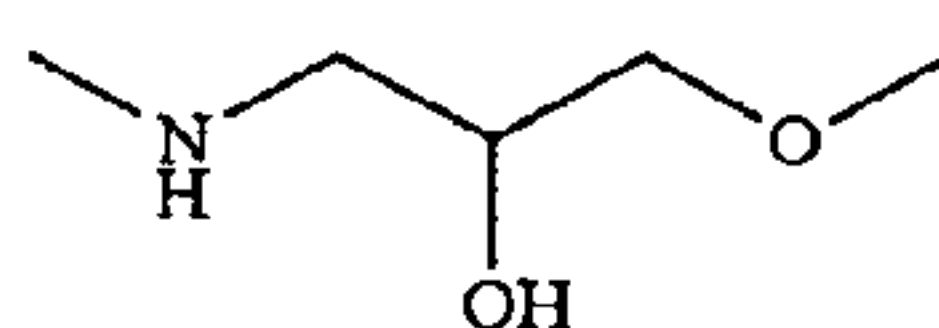
[0416] 視情況選用之連接子組分 x 可用於接合化合物之 O 組分及 L 組分。應理解，視情況選用之連接子(例如，x'或式(I)之 L)可經由末端磷酸之基連接至聚核苷酸

(例如，O)，例如 3'-連接或 5'-連接之磷酸酯基。若欲採用連接子，則將其併入如本文所述之合成程序中。適合連接子基團之實例包括分別可由以下通用結構描繪之胺基甘油及 O-烷基甘油型連接子：

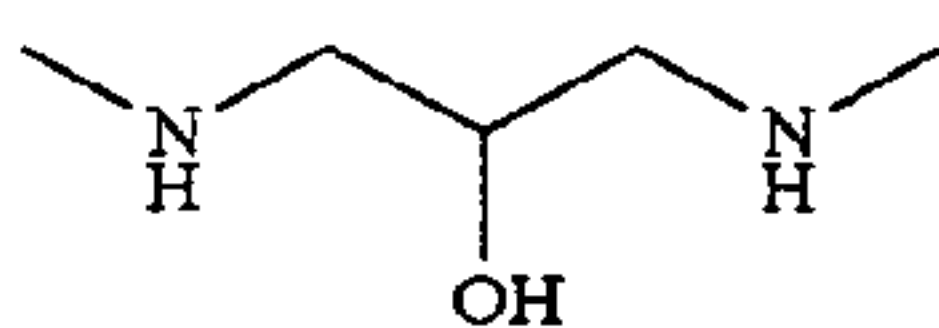


[0417] 其中 $\text{R}'=\text{H}$ 、 OH 、 NH_2 或 SH ； $\text{Y}=\text{O}$ 、 S 或 NR ； $\text{R}=\text{H}$ 、烷基或經取代烷基；且 n 及 m 獨立地為在 1-18 之間的整數。

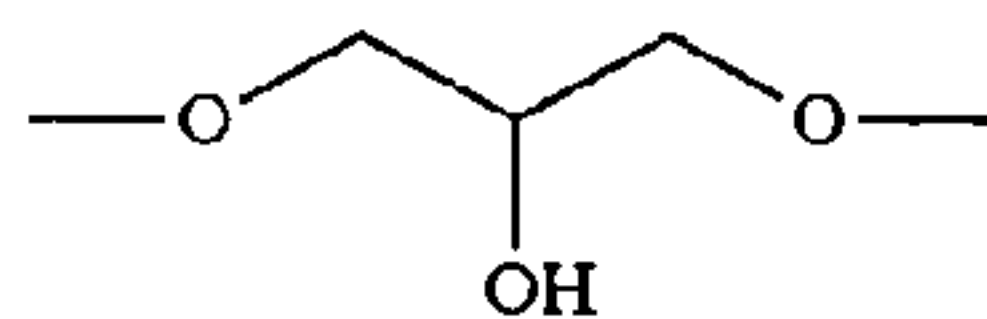
[0418] 適合連接子之具體實例為胺基甘油連接子，其中 $\text{R}'=\text{OH}$ ， $\text{Y}=\text{O}$ ，且 m 及 n 各自為 1：



[0419] 雙-胺基甘油連接子，其中 $\text{R}'=\text{OH}$ ， $\text{Y}=\text{NH}$ ，且 m 及 n 各自為 1：



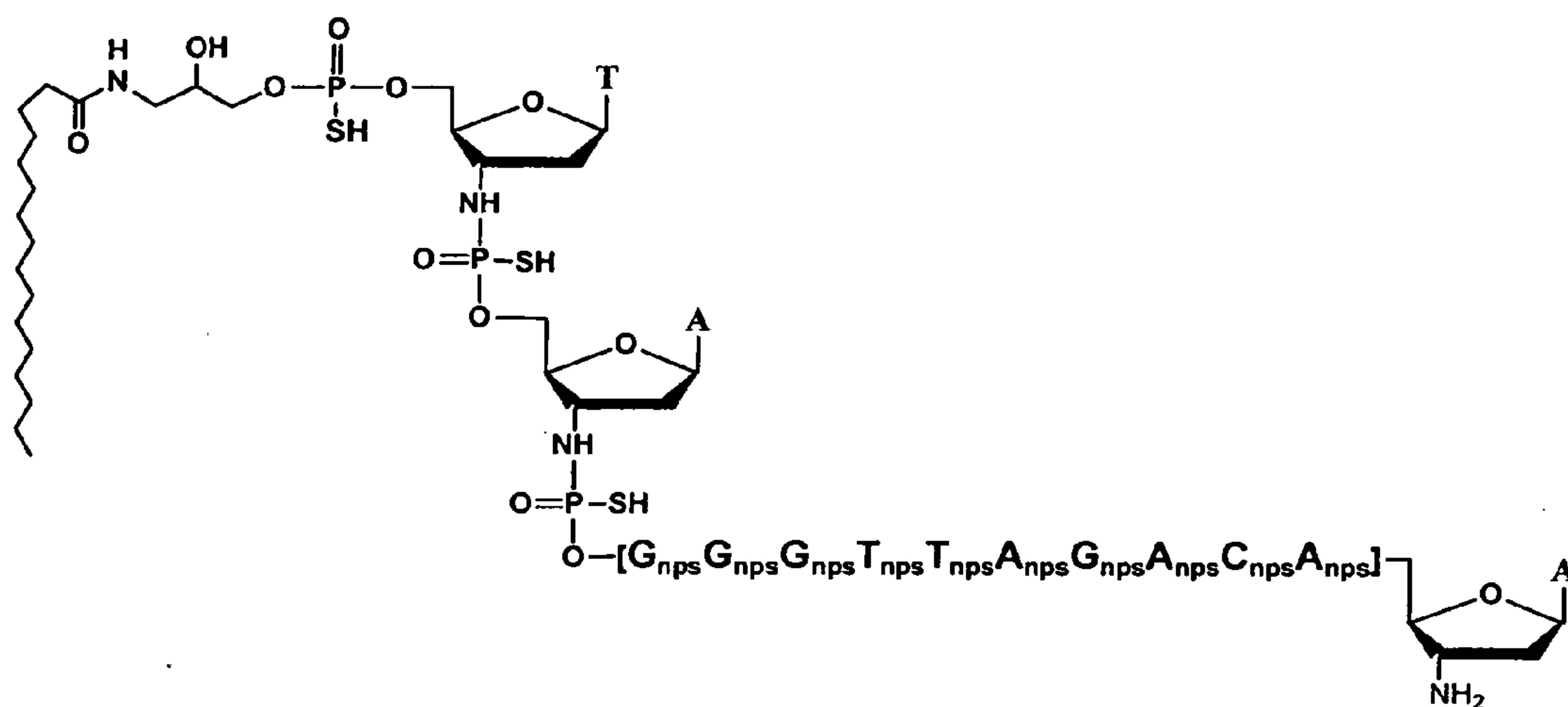
[0420] 以及 O-烷基甘油連接子，其中 $\text{R}=\text{H}$ ：



[0421] 可根據標的方法製備之示範性脂質修飾之寡核苷酸包括 Gryaznov 等人之美國申請案 US20120329858 「Modified oligonucleotides for telomerase inhibition」之圖 1(例如圖 1A-1DD)中所述的彼等化合物，該申請案之揭

露內容以全文引用的方式併入本文中。

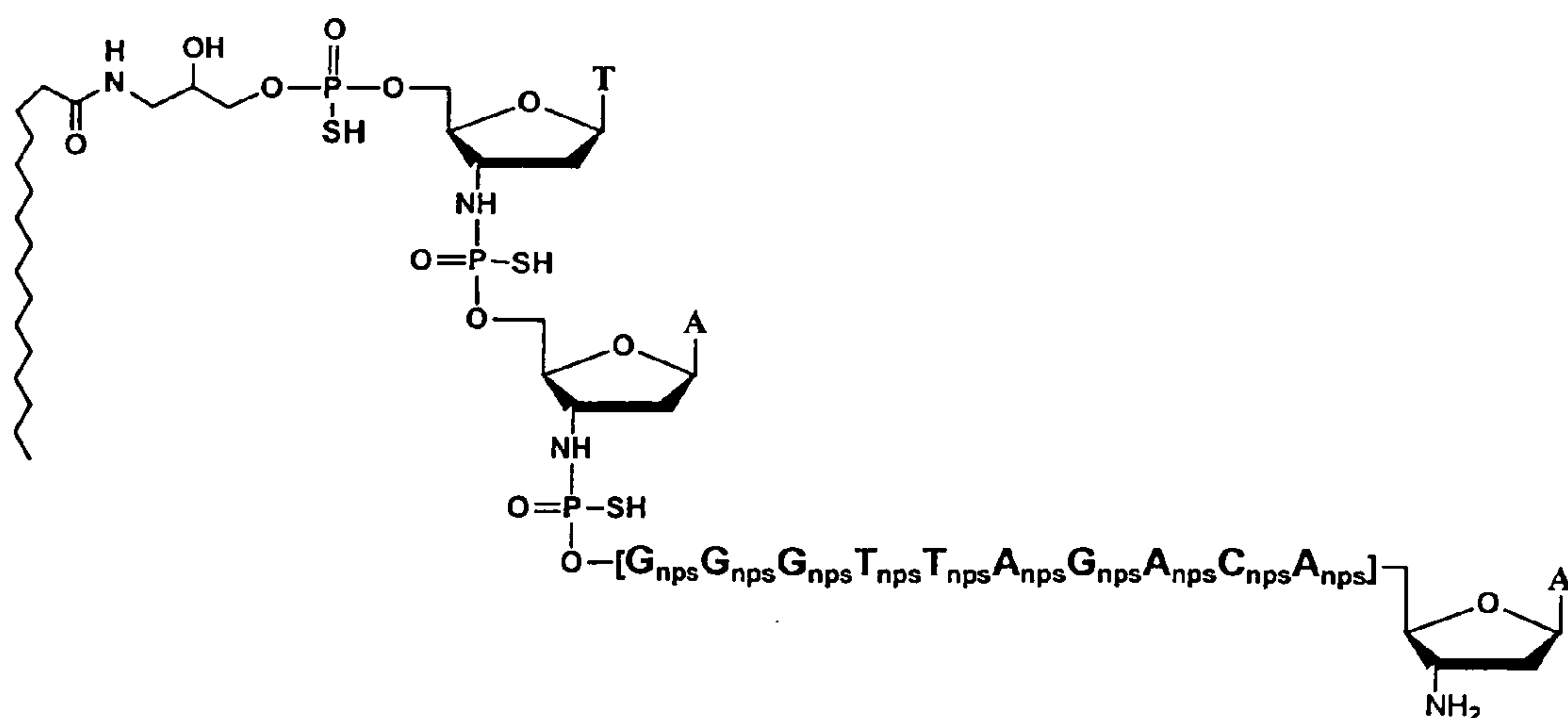
[0422] 在某些實施例中，組合物包括藉由以下結構所描述之化合物：



其中「nps」表示使一個核苷之 3'-碳連接於鄰近核苷之 5'-碳之硫代磷醯胺酯鍵聯(例如 $-\text{NH}-\text{P}(=\text{O})(\text{SH})-\text{O}-$)。

[0423] 應瞭解關於化合物之所有實施例皆亦可適用於該化合物之鹽形式。

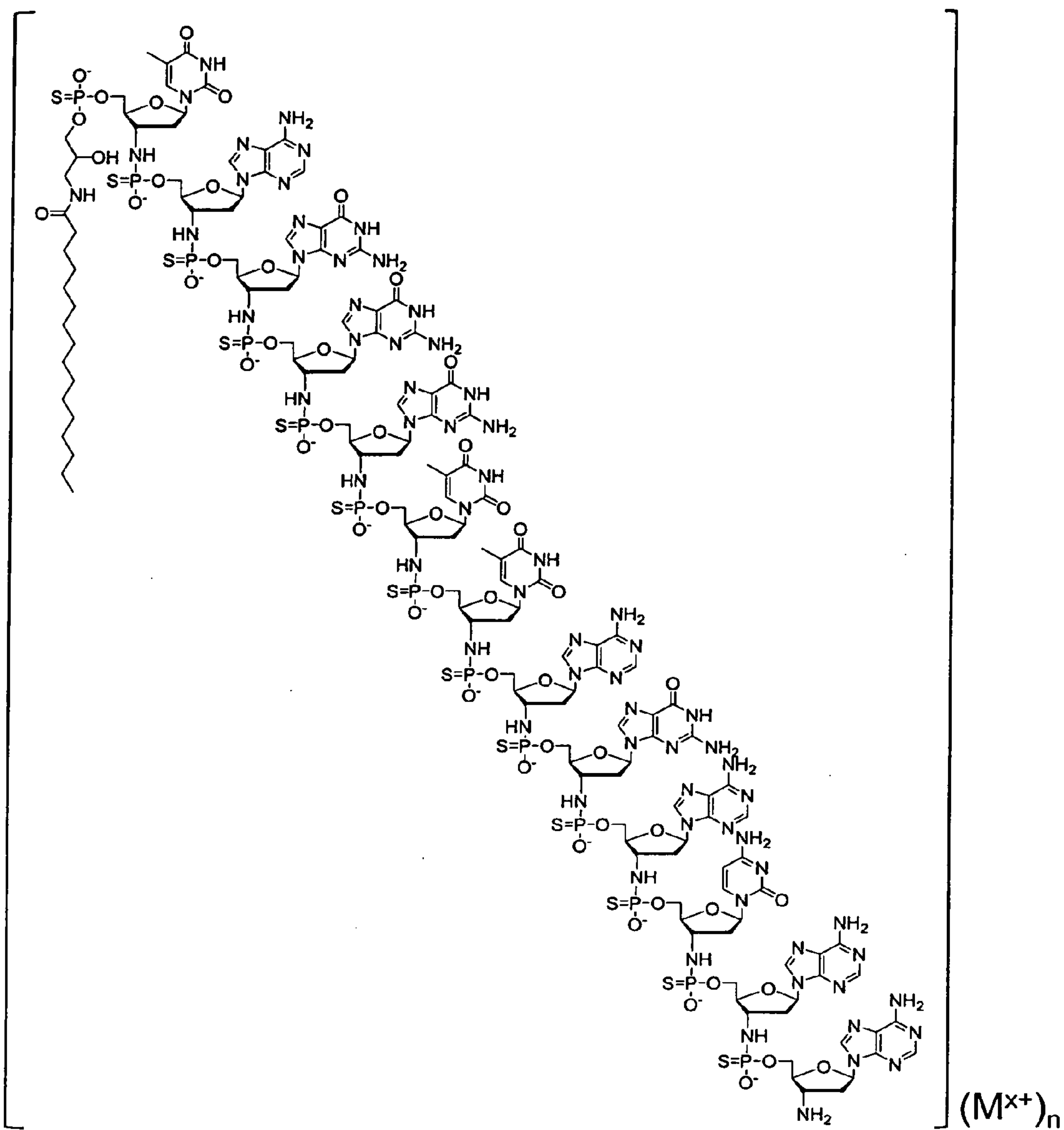
[0424] 在某些實施例中，組合物包括藉由以下結構所描述之化合物：



或其鹽；

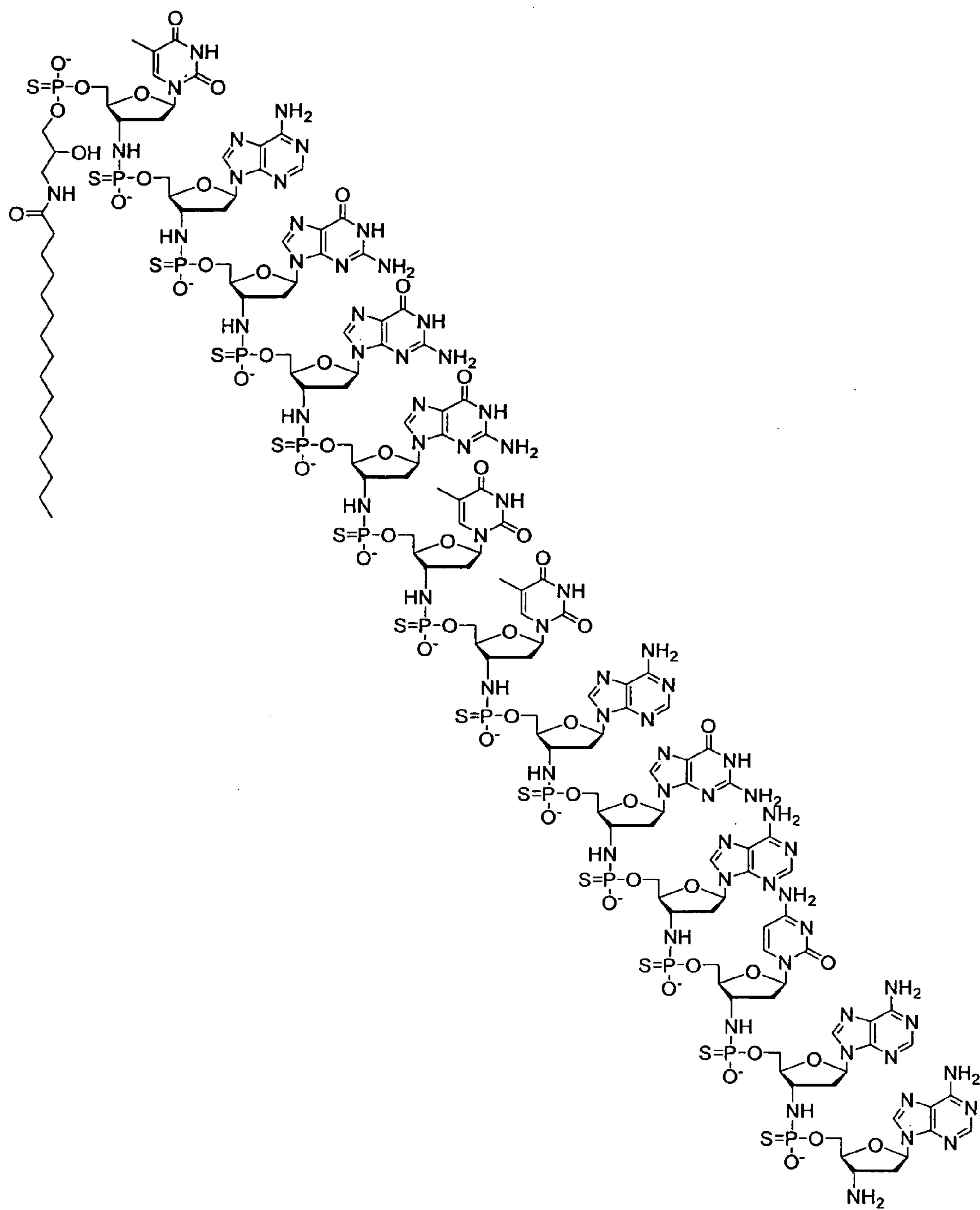
其中「nps」表示使一個核苷之 3'-碳連接於鄰近核苷之 5'-碳之硫代磷醯胺酯鍵聯(例如—NH—P(=O)(SH)—O—或其互變異構物或其鹽)。在某些實施例中，組合物包括化合物之醫藥學上可接受之鹽。在某些情況下，組合物包括化合物之鈉鹽。在某些實施例中，組合物包括化合物之二階陽離子鹽，諸如化合物之鎂鹽。在某些實施例中，組合物包括化合物之三價陽離子鹽，諸如化合物之鋁鹽。

[0425] 在某些實施例中，組合物包括藉由以下結構所述之寡核苷酸，其中各 M^{x+} 獨立地為氫或鹽之任何適宜相對離子，各 x 獨立地為 1、2 或 3，且 n 為整數 5 至 13，諸如 5、6、7、8、9、10、11、12 或 13，諸如 n 為 13：

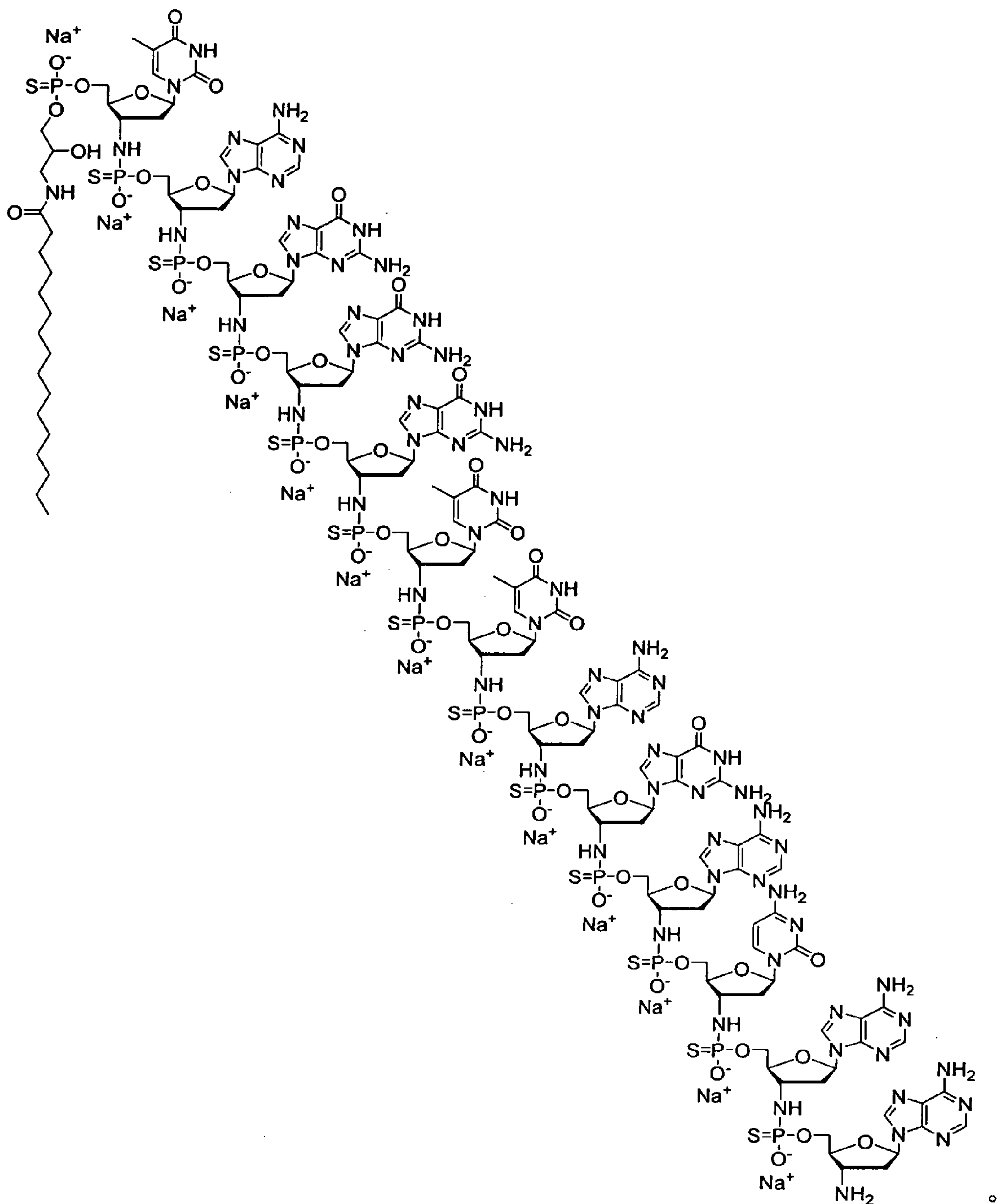


在某些情況下，各 x 為 1。在某些情況下，各 x 獨立地為 1 或 2。在某些情況下，各 x 獨立地為 1 或 3。在某些情況下， M^{x+} 為氫。

[0426] 在某些實施例中，組合物包括藉由以下結構所述之寡核苷酸，且可包括鹽之任何適宜陽離子相對離子：



[0427] 在某些實施例中，組合物包括藉由以下結構所描述之化合物：



[0428] 亦提供包括含寡核苷酸化合物之化合物活性醫藥成分組合物。如本文所用，活性醫藥成分係指使用標的製備方法產生之組合物，其中該組合物可視情況在合成後經受一或多個進一步純化步驟。一般而言，活性醫藥成

分為適於調配成藥物組合物之組合物。在一些情況下，在合成後不純化化合物活性醫藥成分組合物，以使組合物之含寡核苷酸組分反映在寡核苷酸合成期間產生之彼等產物。

[0429] 在一些實施例中，化合物活性醫藥成分具有小於 9 重量%之(N-1)產物，其中化合物包含具有含 10 個或 10 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元之序列的聚核苷酸，其中至少兩個核苷次單元係藉由 N3'→P5'硫代磷醯胺酯或側氧基磷醯胺酯次單元間鍵聯(例如如本文所述)接合。

[0430] 在一些實施例中，化合物活性醫藥成分具有小於 9 重量%之(N-1)產物，其中化合物或其醫藥學上可接受之鹽包含具有含 10 個或 10 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元之序列的聚核苷酸，其中至少兩個核苷次單元係藉由 N3'→P5'硫代磷醯胺酯或側氧基磷醯胺酯次單元間鍵聯(例如如本文所述)接合。

[0431] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元係皆藉由 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。

[0432] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯具有以下結構：



其中 R 係選自由以下組成之群：氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基及磷酸酯保護基。當 R 係選自由

5

氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基及磷酸酯保護基組成之群時，應瞭解藉由上式所述之一些次單元間鍵聯亦可以鹽形式存在。此等形式只要其可存在即意欲包括在本揭露內容之範疇內。

[0433] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯具有以下結構：



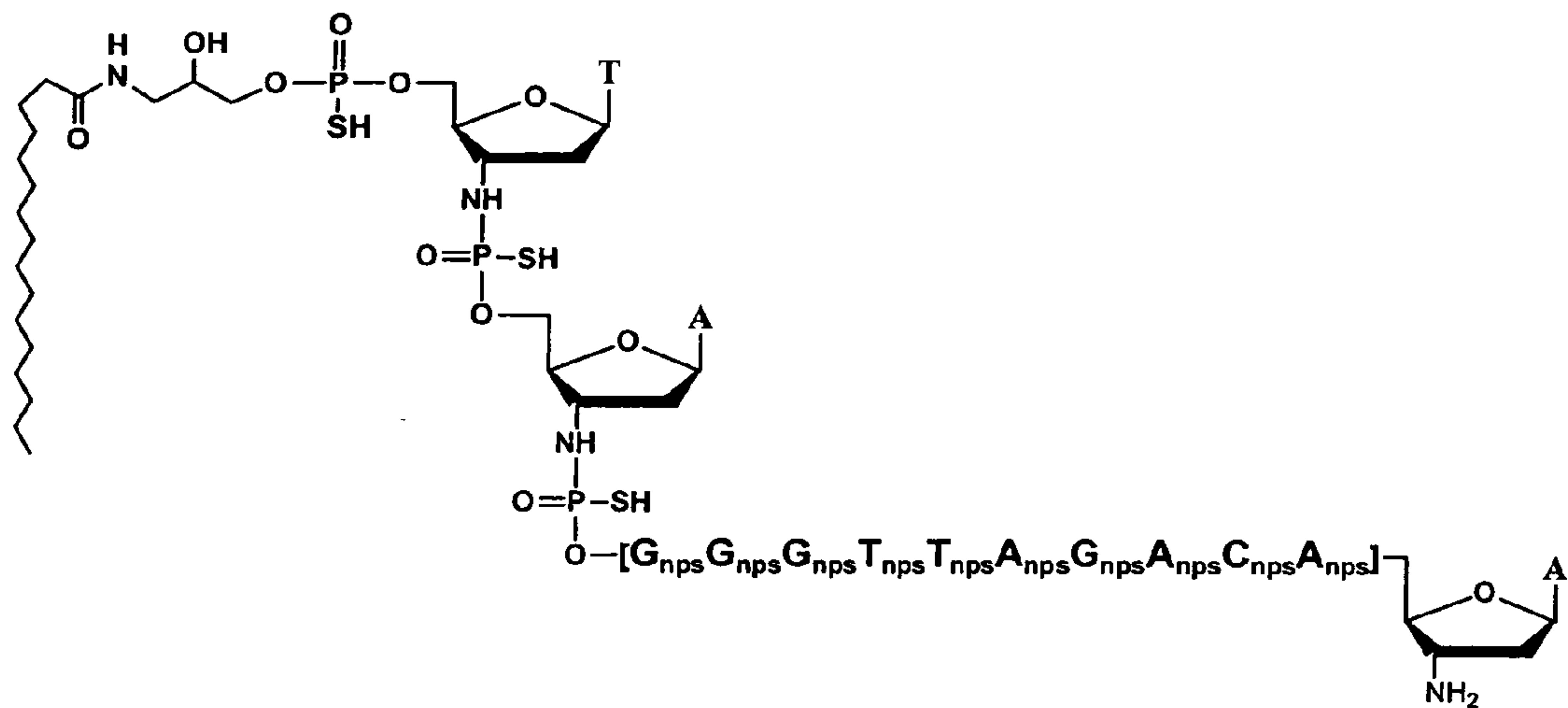
其中 R 為氫。應瞭解對於本文所述之包括該種次單元間鍵聯之任何化合物活性醫藥成分，此等化合物活性醫藥成分亦可包括鍵聯之任何適宜醫藥學上可接受之鹽形式。因此，次單元間鍵聯可呈包括鹽之任何適宜相對離子之醫藥學上可接受之鹽形式。

[0434] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，聚核苷酸包含在 10 個與 50 個之間的與人類端粒酶之 RNA 組分互補之連續核苷次單元(例如如本文所述)。

[0435] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，聚核苷酸包含選自由以下組成之群之序列：GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:4)；TAGGGTTAGACAA(SEQ ID NO:3)；及 CAGTTAGGGTTAG(SEQ ID NO:5)。

[0436] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，聚核苷酸包括 3'胺基或 3'-羥基末端基團。在化合物活性醫藥成分之某些實施例中，聚核苷酸包括 3'胺基末端基團。在化合物活性醫藥成分之某些實施例中，聚核苷酸包括 3'-羥基末端基團。

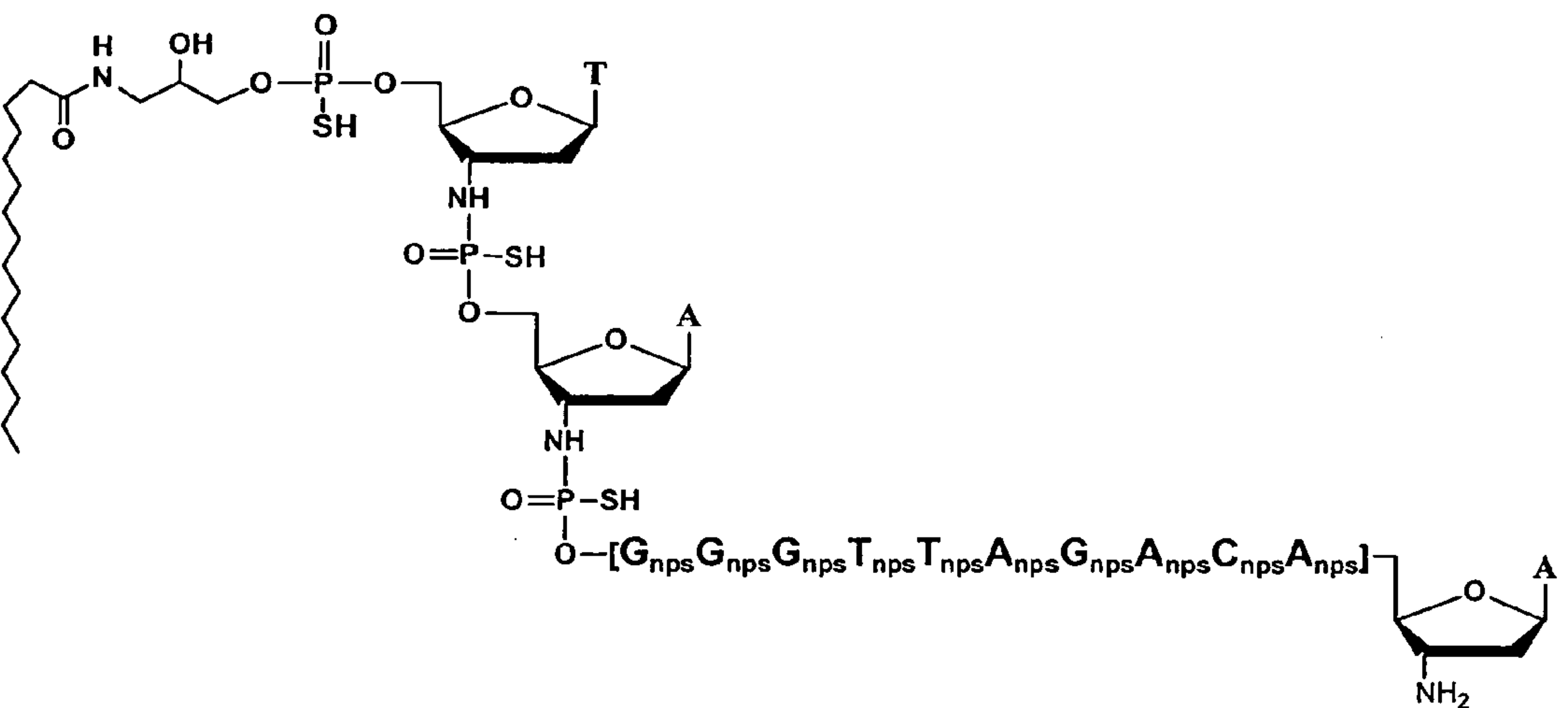
[0437] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，化合物具有結構：



其中「nps」表示使一個核苷之 3'-碳連接於鄰近核苷之 5'-碳之硫代磷醯胺酯鍵聯—NH—P(=O)(SH)—O—。

[0438] 應瞭解關於化合物活性醫藥成分之所有實施例皆亦可適用於該化合物活性醫藥成分之鹽形式。

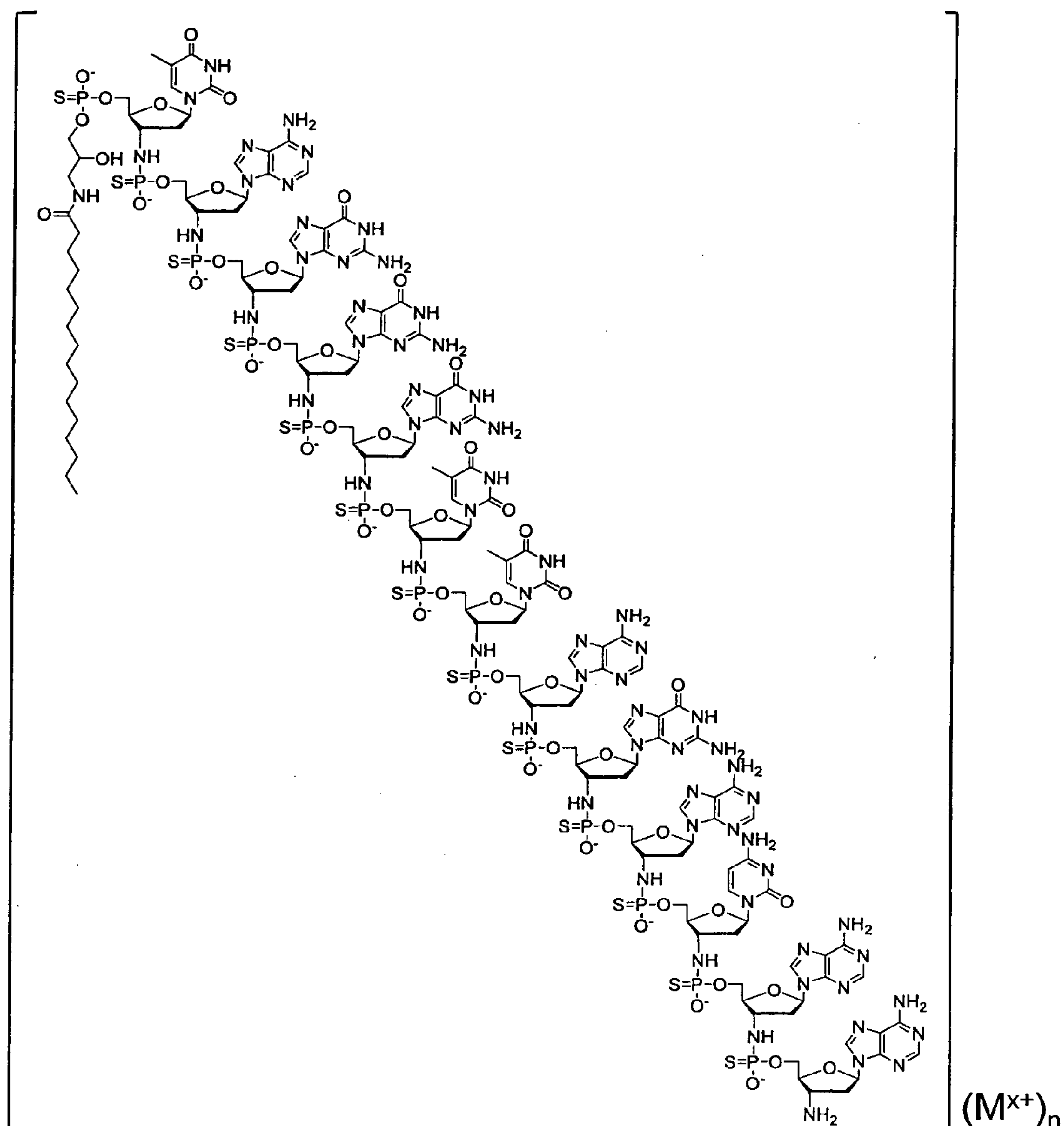
[0439] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，化合物具有結構：



或其醫藥學上可接受之鹽；

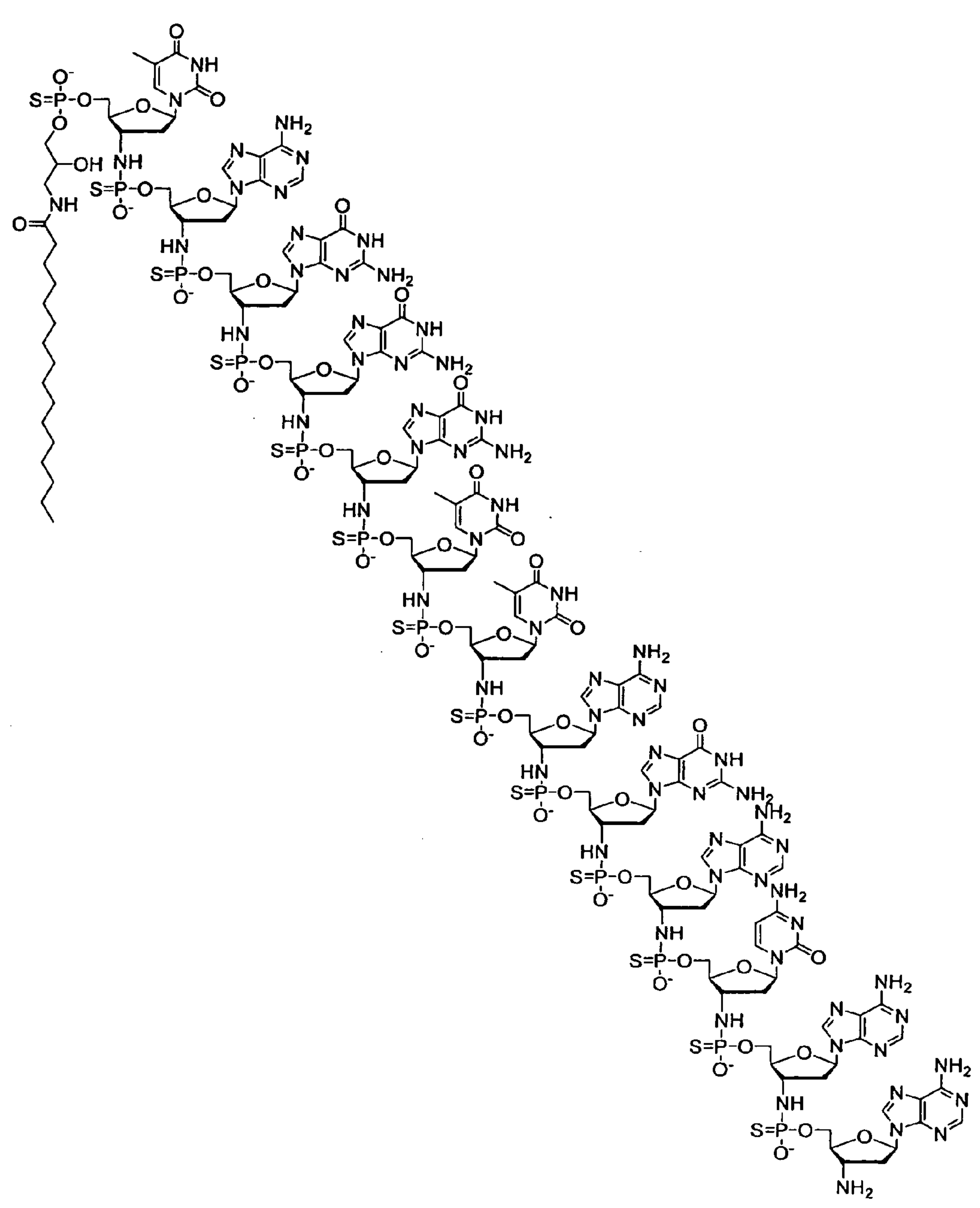
其中「nps」表示使一個核苷之 3'-碳連接於鄰近核苷之 5'-碳之硫代磷醯胺酯鍵聯—NH—P(=O)(SH)—O—(或如本文所述的其互變異構物或其醫藥學上可接受之鹽)。在化合物活性醫藥成分之某些實施例中，組合物包括化合物之鈉鹽。在某些實施例中，組合物包括化合物之二階陽離子鹽，諸如化合物之鎂鹽。在某些實施例中，組合物包括化合物之三價陽離子鹽，諸如化合物之鋁鹽。

[0440] 在化合物活性醫藥成分之某些實施例中，化合物係藉由以下結構所述，其中各 M^{x+} 獨立地為氫或鹽之任何適宜相對離子，各 x 獨立地為 1、2 或 3，且 n 為整數 5 至 13，諸如 5、6、7、8、9、10、11、12 或 13，諸如 n 為 13：

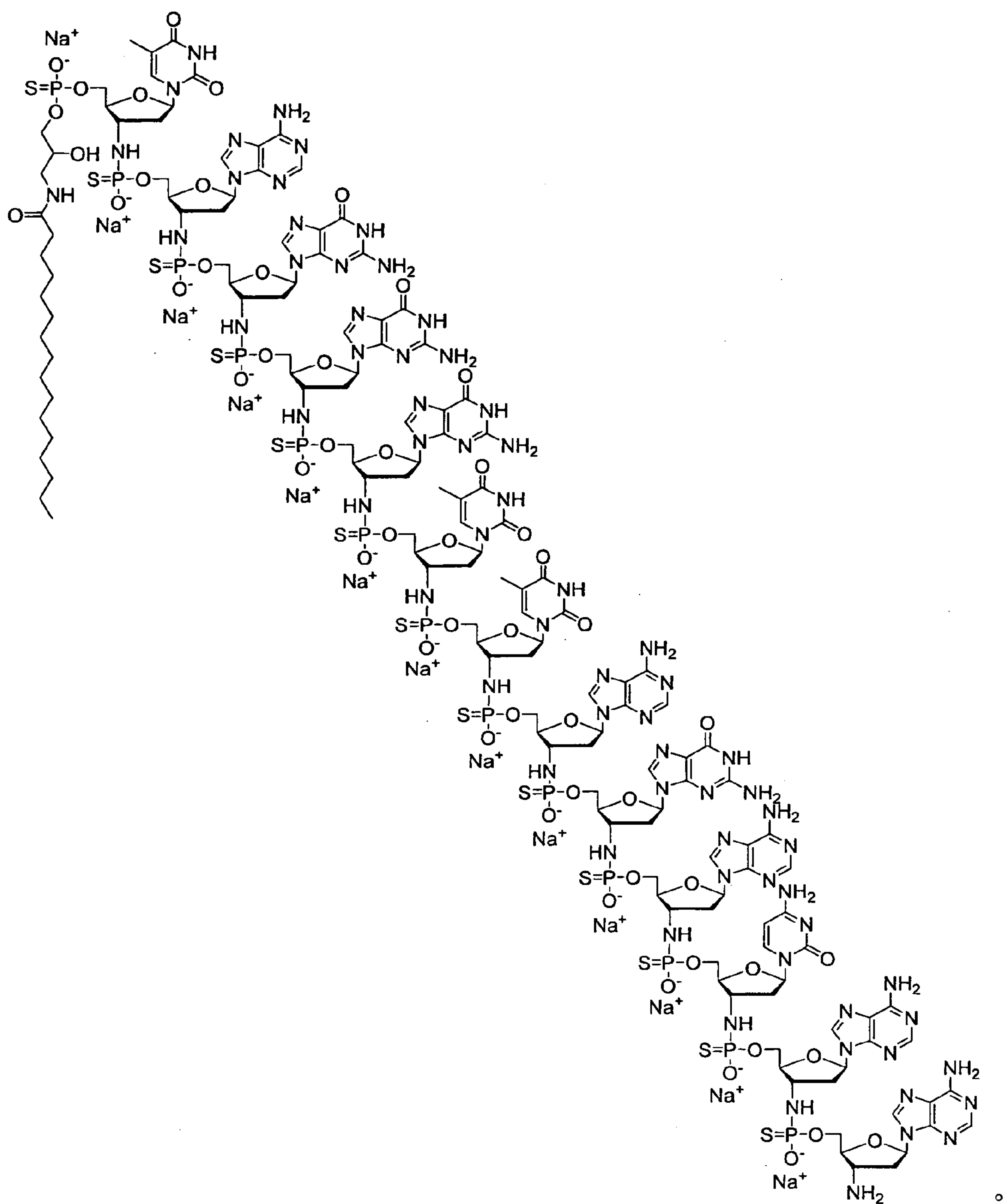


在某些情況下，各 x 為 1。在某些情況下，各 x 獨立地為 1 或 2。在某些情況下，各 x 獨立地為 1 或 3。在某些情況下， M^{x+} 為氫。

[0441] 在化合物活性醫藥成分之某些實施例中，化合物係藉由以下結構所述，且可包括鹽之任何適宜陽離子相對離子：



[0442] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，化合物係藉由以下結構所描述：



[0443] 在一些實施例中，化合物活性醫藥成分具有小於 9 重量%之(N-1)產物，諸如小於 8 重量%、小於 7 重量%、小於 6 重量%、小於 5 重量%、小於 4 重量%、小於 3 重量%、小於 2 重量%、或甚至小於 1 重量%之(N-1)產

5

物。在某些實施例中，化合物活性醫藥成分具有小於 5 重量%之(N-1)產物。在某些實施例中，化合物活性醫藥成分具有小於 2 重量%之(N-1)產物。

[0444] 在一些實施例中，活性醫藥成分具有小於 9 重量%之任何(N-x)產物，諸如小於 8 重量%、小於 7 重量%、小於 6 重量%、小於 5 重量%、小於 4 重量%、小於 3 重量%、小於 2 重量%、或甚至小於 1 重量%之任何(N-x)產物。

[0445] 在一些實施例中，化合物活性醫藥成分具有小於總共 9 重量%之(N-x)含聚核苷酸產物，諸如小於總共 8 重量%、小於總共 7 重量%、小於總共 6 重量%、小於總共 5 重量%、小於總共 4 重量%、小於總共 3 重量%、小於總共 2 重量%、或甚至小於總共 1 重量%之(N-x)含聚核苷酸產物。

[0446] 在一些實施例中，化合物活性醫藥成分具有(N-x)含聚核苷酸產物之以下概況：

相對於 N 產物，小於每 4 重量份 1 重量份之(N-1)產物；及

相對於 N 產物，至少每 100 重量份 10 重量份之(N-2)及(N-3)產物。

調配物

[0447] 亦提供包括寡核苷酸組合物(例如如本文所述)之醫藥組合物。寡核苷酸組合物(例如如本文所述)亦可調

配成醫藥組合物以抑制與目標基因之過度表現相關之疾病病狀中的細胞中之轉錄或轉譯。

[0448] 在一些實施例中，醫藥組合物包括於醫藥學上可接受之賦形劑中調配之寡核苷酸組合物(例如如本文所述)。在某些實施例中，寡核苷酸組合物為具有小於 9 重量%之(N-1)產物之化合物活性醫藥成分，其中化合物包含具有含 10 個或 10 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元之序列的聚核苷酸，其中至少兩個核苷次單元係藉由 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。

[0449] 本發明提供可特異性且有效抑制端粒酶活性，且可因此用於抑制諸如腫瘤細胞之端粒酶陽性細胞之增殖的化合物。極廣泛多種癌細胞已顯示呈端粒酶陽性，包括來自以下癌症之細胞：皮膚癌、結締組織癌、脂肪癌、乳癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、子宮頸癌、子宮癌、腎癌、膀胱癌、結腸癌、前列腺癌、中樞神經系統(CNS)癌、視網膜癌及血液學腫瘤(諸如骨髓瘤、白血病及淋巴瘤)。相關癌症包括但不限於骨髓纖維化、血小板增多症、脊髓發育不良症候群及骨髓性白血病。

[0450] 標的化合物可用於治療血液學惡性腫瘤及骨髓增生性病變，包括但不限於原發性血小板增多症(ET)、真性紅細胞增多症(PV)、慢性骨髓性白血病(CML)、骨髓纖維化(MF)、慢性中性粒細胞白血病、慢性嗜酸性白血病及急性骨髓性白血病(AML)。標的化合物可用於治療骨髓發育不良症候群，其包括諸如以下之疾病：難治性貧血、

伴有母細胞過量之難治性貧血、伴有多譜系發育不良之難治性血細胞減少症、伴有單譜系發育不良之難治性血細胞減少症及慢性骨髓單核細胞性白血病(CMML)。標的化合物可用於治療血液學疾病，諸如 2013 年 11 月 15 日申請之 PCT 專利申請案第 PCT / US13 / 070437 號中所述之疾病，該申請案之揭露內容以全文引用的方式併入本文中。

[0451] 因此，本文提供之化合物廣泛適用於治療廣泛範圍之惡性腫瘤。更重要的是本發明化合物可有效提供在較高程度上區分惡性細胞與正常細胞之治療，從而避免伴隨依賴於不加區分地殺死分裂細胞之藥劑之大多數當前化學治療方案存在的許多不良副作用。此外，本發明化合物比等效未結合寡核苷酸更有效，此意謂其可在較低劑量下投與，從而提供安全性增強及治療成本顯著降低。因此，本發明之一個態樣為一種治療患者之癌症之方法，其包含向該患者投與治療有效劑量之本發明化合物。包括本發明化合物之端粒酶抑制劑可連同包括手術移除原發性腫瘤、化學治療劑及放射治療之其他癌症治療方法一起加以採用。因此，本發明係關於本文提供之用作藥劑之化合物及組合物。本發明亦係關於本文提供之用於治療或預防上文提及之任一惡性腫瘤的化合物及組合物。

[0452] 對於治療應用，本發明化合物係以治療有效量與醫藥學上可接受之載劑一起調配。一或多種本發明化合物(例如具有不同 L'或 O 組分)可包括在任何既定調配物中。醫藥載劑可為固體或液體。液體載劑可用於製備溶

液、乳液、懸浮液及加壓組合物。將化合物溶解或懸浮於醫藥學上可接受之液體賦形劑中。用於非經腸投與寡核苷酸製劑之液體載劑之適合實例包括水(其可含有添加劑，例如纖維素衍生物，較佳羧甲基纖維素鈉溶液)、磷酸鹽緩衝鹽水溶液(PBS)、醇(包括一元醇及多元醇，例如二醇)及其衍生物、以及油(例如分餾椰子油及花生油)。液體載劑可含有其他適合醫藥添加劑，包括但不限於以下：增溶劑、懸浮劑、乳化劑、緩衝劑、增稠劑、著色劑、黏度調控劑、防腐劑、穩定劑及容積莫耳滲透濃度調控劑。

[0453] 對於非經腸投與化合物，載劑亦可為油性酯，諸如油酸乙酯及肉豆蔻酸異丙酯。無菌載劑適用於供非經腸投與之無菌液體形式組合物中。

[0454] 無菌液體醫藥組合物、溶液或懸浮液可藉由例如腹膜內注射、皮下注射、靜脈內或以表面方式來利用。寡核苷酸亦可血管內或經由血管支架來投與。

[0455] 用於加壓組合物之液體載劑可為鹵素化烴或其他醫藥學上可接受之推進劑。此等加壓組合物亦可經脂質囊封以經由吸入進行傳遞。對於藉由鼻內或支氣管內吸入或吹入進行之投與，寡核苷酸可調配成可接著以氣霧劑形式利用之水溶液或部分水溶液。

[0456] 化合物可藉由與醫藥學上可接受之含有活性化合物之媒劑一起調配以溶液、乳膏劑或洗劑形式局部投與。

[0457] 本發明之醫藥組合物可以任何可接受之劑型

S

經口投與，包括但不限於呈膠囊、錠劑、散劑或顆粒劑形式以及呈於水或非水性介質中之懸浮液或溶液形式之調配物。包含本發明之寡核苷酸之醫藥組合物及/或調配物可包括載劑、潤滑劑、稀釋劑、增稠劑、調味劑、乳化劑、分散助劑或黏合劑。在供經口使用之錠劑之情況下，通常使用之載劑包括乳糖及玉米澱粉。亦可添加潤滑劑，諸如硬脂酸鎂。對於以膠囊形式進行之經口投與，適用稀釋劑包括乳糖及乾燥玉米澱粉。當水性懸浮液為經口使用所需時，使活性成分與乳化劑及懸浮劑組合。必要時，亦可添加某些甜味劑、調味劑或著色劑。

[0458] 儘管本發明化合物具有優越細胞及組織滲透特徵，但其可經調配以提供甚至更大益處，例如於脂質體載劑中調配。使用脂質體來促進細胞攝取係例如描述於美國專利第 4,897,355 號及美國專利第 4,394,448 號中。眾多出版物描述脂質體之調配及製備。化合物亦可藉由與其他滲透增強劑，諸如上述脂質部分之未結合形式，包括脂肪酸及其衍生物混合來調配。實例包括油酸、月桂酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕櫚酸、硬脂酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、二癸酸酯、三癸酸酯、蓖麻醇酸酯、單油酸甘油酯(亦稱為 1-單油醯基-外消旋-甘油)、二月桂酸甘油酯、辛酸、花生四烯酸、1-單癸酸甘油酯、1-十二基氮雜環庚-2-酮、醯基肉鹼、醯基膽鹼、單甘油酯及二甘油酯及其生理可接受之鹽(亦即油酸鹽、月桂酸鹽、癸酸鹽、肉豆蔻酸鹽、棕櫚酸鹽、硬脂酸鹽、亞油酸鹽等)。

[0459] 可使用包含一或多種滲透增強劑之複雜調配物。舉例而言，膽鹽可與脂肪酸組合用於製備複雜調配物。示範性組合包括通常在約 0.5 至 2% 之濃度下使用之鵝去氧膽酸(CDCA)與通常在約 0.5 至 5% 之濃度下使用之癸酸鈉或月桂酸鈉組合。

[0460] 包含本發明之寡核苷酸之醫藥組合物及/或調配物亦可包括螯合劑、界面活性劑及非界面活性劑。螯合劑包括但不限於乙二胺四乙酸(EDTA)二鈉、檸檬酸、水楊酸鹽(例如水楊酸鈉、5-甲氧基水楊酸鹽及高香蘭酸鹽)、膠原蛋白之 N-醯基衍生物、月桂基聚氧乙烯醚-9(laureth-9)及 β -二酮之 N-胺基醯基衍生物(烯胺)。界面活性劑包括例如月桂基硫酸鈉、聚氧化乙烯-9-月桂基醚及聚氧化乙烯-20-十六基醚；及全氟化學乳液，諸如 FC-43。非界面活性劑包括例如不飽和環脲、1-烷基-氮雜環-烷酮及 1-烯基氮雜環-烷酮衍生物、以及非類固醇消炎劑，諸如雙氯芬酸鈉、吲哚美辛(indomethacin)及苯基丁氮酮。

[0461] 因此，在本發明之另一態樣中，提供一種調配醫藥組合物之方法，該方法包括提供如本文所述之化合物，以及組合該化合物與醫藥學上可接受之賦形劑。較佳地，化合物係在如下定義之醫藥純度下提供。方法可進一步包含在添加賦形劑之前或之後向化合物中添加滲透增強劑。

[0462] 醫藥組合物可符合醫藥純度標準。在一些情

5

況下，對於用作醫藥製劑中之活性成分，標的化合物係經純化以離開於其中製備其之混合物中存在的反應性或潛在免疫原性組分。

[0463] 醫藥組合物可以單劑量單位或多劑量單位加以等分及包裝。用寡核苷酸化合物治療之劑量要求隨採用之特定組合物、投與途徑、呈現之症狀之嚴重性、化合物之形式及所治療之特定受試者而變化。

[0464] 本發明之醫藥組合物可以有效達成在臨床上合乎需要之結果的調配物及量向受試者投與。對於治療癌症，合乎需要之結果包括腫瘤團塊減小(如藉由觸診或成像所確定；例如藉由放射線攝影術、放射核苷酸掃描、CAT 掃描或 MRI)、腫瘤生長速率降低、轉移形成速率降低(如例如藉由對生檢體試樣之組織化學分析所確定)、生物化學標記降低(包括諸如 ESR 之一般性標記及諸如血清 PSA 之腫瘤特異性標記)、以及生活品質改進(如藉由例如 Karnofsky 計分之臨床評估所確定)、進展時間增加、無疾病存活及總體存活。

[0465] 為達成此等效應所需之每劑化合物之量及劑量之數目將視許多因素而變化，該等因素包括疾病指征、所治療之患者之特徵及投與模式。在一些情況下，調配物及投與途徑將提供在疾病部位處之化合物局部濃度在 1 μM 與 1 nM 之間。

[0466] 一般而言，化合物係在提供有效結果，而不導致任何有害或不良副作用之濃度下投與。該種濃度可藉

由投與單一單位劑量，或藉由全天在適合間隔下投與分成適宜次單位之劑量來達成。

效用

[0467] 本發明之例如如上所述之方法及組合物適用於多種應用中。相關應用包括但不限於：治療應用、診斷應用、研究應用及篩檢應用，如以下更詳細所評述。

[0468] 標的化合物適用於多種治療應用中。在一些實施例中，產生寡核苷酸之方法應用於製備提供治療益處之寡核苷酸。可使用本發明組合物治療之疾病之類型為無限的。舉例而言，組合物可用於治療許多遺傳性疾病。在一些實施例中，標的方法及組合物具有反義應用。在一些實施例中，標的方法及組合物具有抗基因應用。在某些實施例中，標的方法及組合物具有端粒酶抑制應用，諸如美國專利 6,835,826 及美國公開案 20120329858 中所述之應用，該專利及該公開案之揭露內容以全文引用的方式併入本文中。

標的化合物及方法可用於多種診斷應用中，包括但不限於開發臨床診斷劑，例如活體外診斷劑或活體內腫瘤成像劑。此等應用適用於診斷或確認對疾病病狀或其易感性之診斷。方法亦適用於監測先前已診斷有疾病之患者之疾病進展及/或對治療之反應。

【圖式簡單說明】

[0469] 圖 1A 及 1B 顯示 TA 二聚物硫代磷醯胺酯(化合物 7e，流程 1)之 HPLC 層析圖(A)及 ^{31}P NMR 光譜(B)。

[0470] 圖 2A 及 2B 顯示 AA 二聚物硫代磷醯胺酯(化合物 7a，流程 1)之 HPLC 層析圖(A)及 ^{31}P NMR 光譜(B)。

[0471] 圖 3A 及 3B 顯示 GG 二聚物硫代磷醯胺酯(化合物 7c，流程 1)之 HPLC 層析圖(A)及 ^{31}P NMR 光譜(B)。

[0472] 圖 4A 及 4B 顯示 GT 二聚物硫代磷醯胺酯(化合物 7d，流程 1)之 HPLC 層析圖(A)及 ^{31}P NMR 光譜(B)。

[0473] 圖 5A 及 5B 顯示 GA 二聚物硫代磷醯胺酯(化合物 7b，流程 1)之 HPLC 層析圖(A)及 ^{31}P NMR 光譜(B)。

[0474] 圖 6A 及 6B 顯示二聚物醯胺化物 TA、AA、GA、GT 及 GG 之 LCMS 跡線。

[0475] 圖 7 顯示使用單體偶合策略在 140 μmol 規模上合成伊美司他(imetelstat)之產物之 HPLC 層析圖。

[0476] 圖 8 顯示使用二聚物嵌段偶合策略在 140 μmol 規模上合成伊美司他之產物之 HPLC 層析圖。

【實施方式】

[0477] 提供以下實例以便向一般技藝人士提供如何

製備及使用本發明物之完全揭露及描述，且以下實例不欲限制發明者視為其發明物之事物的範疇，亦不欲表示以下實驗為進行之所有或僅有實驗。已努力確保關於所用數值(例如量、溫度等)之準確性，但應慮及一些實驗誤差及偏差。除非另外指示，否則份為重量份，分子量為重量平均分子量，溫度係以攝氏度表示，且壓力為大氣壓或接近大氣壓。就「平均」而言，其意謂算術平均值。可使用標準縮寫，例如 bp，鹼基對；kb，千鹼基；pl，皮升；s 或 sec，秒；min，分鐘；h 或 hr，小時；aa，胺基酸；kb，千鹼基；bp，鹼基對；nt，核苷酸；i.m.，肌肉內；i.p.，腹膜內；s.c.，皮下；及其類似縮寫。

一般性合成程序

[0478] 提供通常已知之適用於合成揭露之化合物的化學合成流程及條件之許多一般性參考書目為可用的(參見例如 Smith 及 March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 第 5 版, Wiley-Interscience, 2001；或 Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis*, 第 4 版, New York: Longman, 1978)。

[0479] 如本文所述之化合物可藉由此項技術中已知之任何純化方案純化，包括層析，諸如 HPLC、製備型薄層層析、急驟管柱層析及離子交換層析。可使用任何適合固定相，包括正相及逆相以及離子樹脂。在某些實施例

S

中，揭露之化合物係經由矽膠及/或氧化鋁層析純化。參見例如 *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 第2版, L. R. Snyder 及 J. J. Kirkland 編, John Wiley and Sons, 1979; 以及 *Thin Layer Chromatography*, E. Stahl 編, Springer-Verlag, New York, 1969。

[0480] 在用於製備標的化合物之任何方法期間，可能有必要及/或需要保護涉及之任何分子上之敏感性或反應性基團。此可藉助於如標準著作中所述之習知保護基來達成，該等著作諸如 J. F. W. McOmie, 「Protective Groups in Organic Chemistry」, Plenum Press, London and New York 1973; T. W. Greene 及 P. G. M. Wuts, 「Protective Groups in Organic Synthesis」, 第3版, Wiley, New York 1999; 「The Peptides」; 第3卷 (編輯: E. Gross 及 J. Meienhofer), Academic Press, London and New York 1981; 「Methoden der organischen Chemie」, Houben-Weyl, 第4版, 第15/1卷, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974; H.-D. Jakubke 及 H. Jescheit, 「Aminosäuren, Peptide, Proteine」, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, and Basel 1982; 及/或 Jochen Lehmann, 「Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide and Derivate」, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974。保護基可在適宜隨後階段使用此項技術中已知之方法來移除。

[0481] 標的化合物可使用市售起始物質及/或藉由習

知合成方法製備之起始物質，經由多種不同合成途徑來合成。在以下流程中描述可用於合成本文揭露之化合物之合成途徑的多個實例。

實例 1

[0482] 使用二聚亞磷醯胺酯合成伊美司他鈉。

[0483] 伊美司他鈉係使用固體支撐物(可控孔徑玻璃或聚合物固體支撐物)及單體亞磷醯胺酯(諸如 A^{Bz} 或 A^{dmf}、C、G^{iBu} 及 T 亞磷醯胺化物)按以下序列合成：

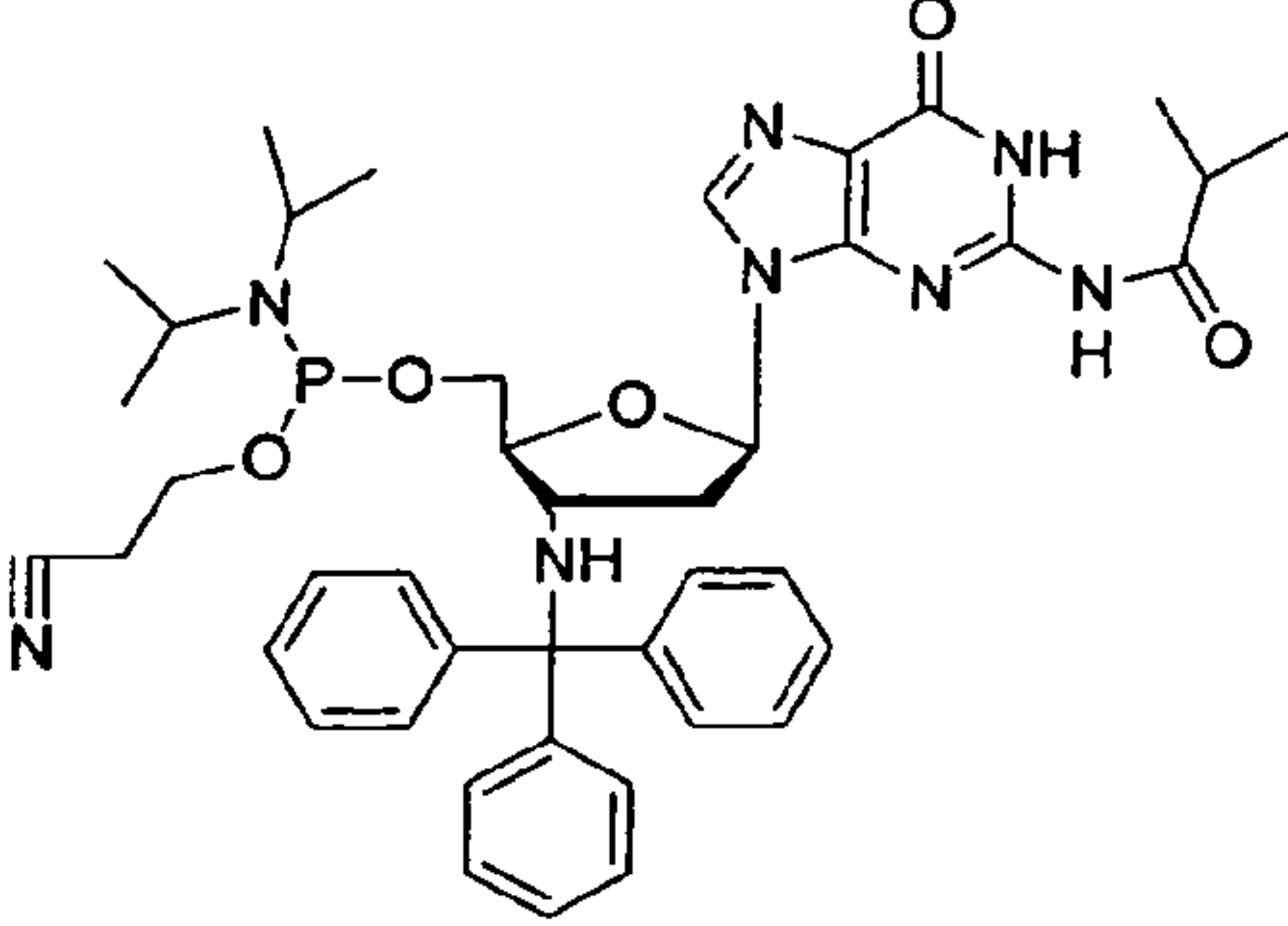
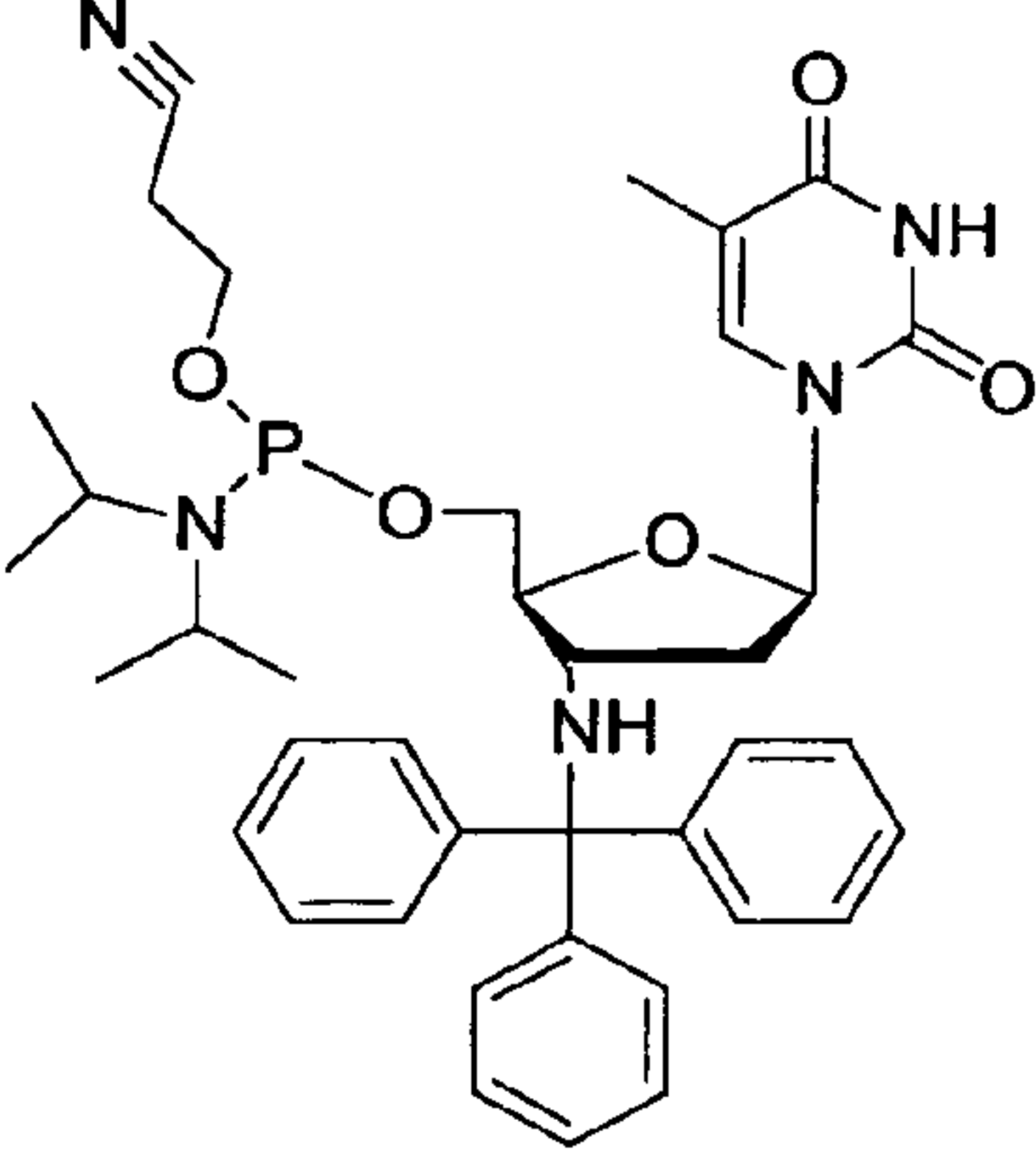
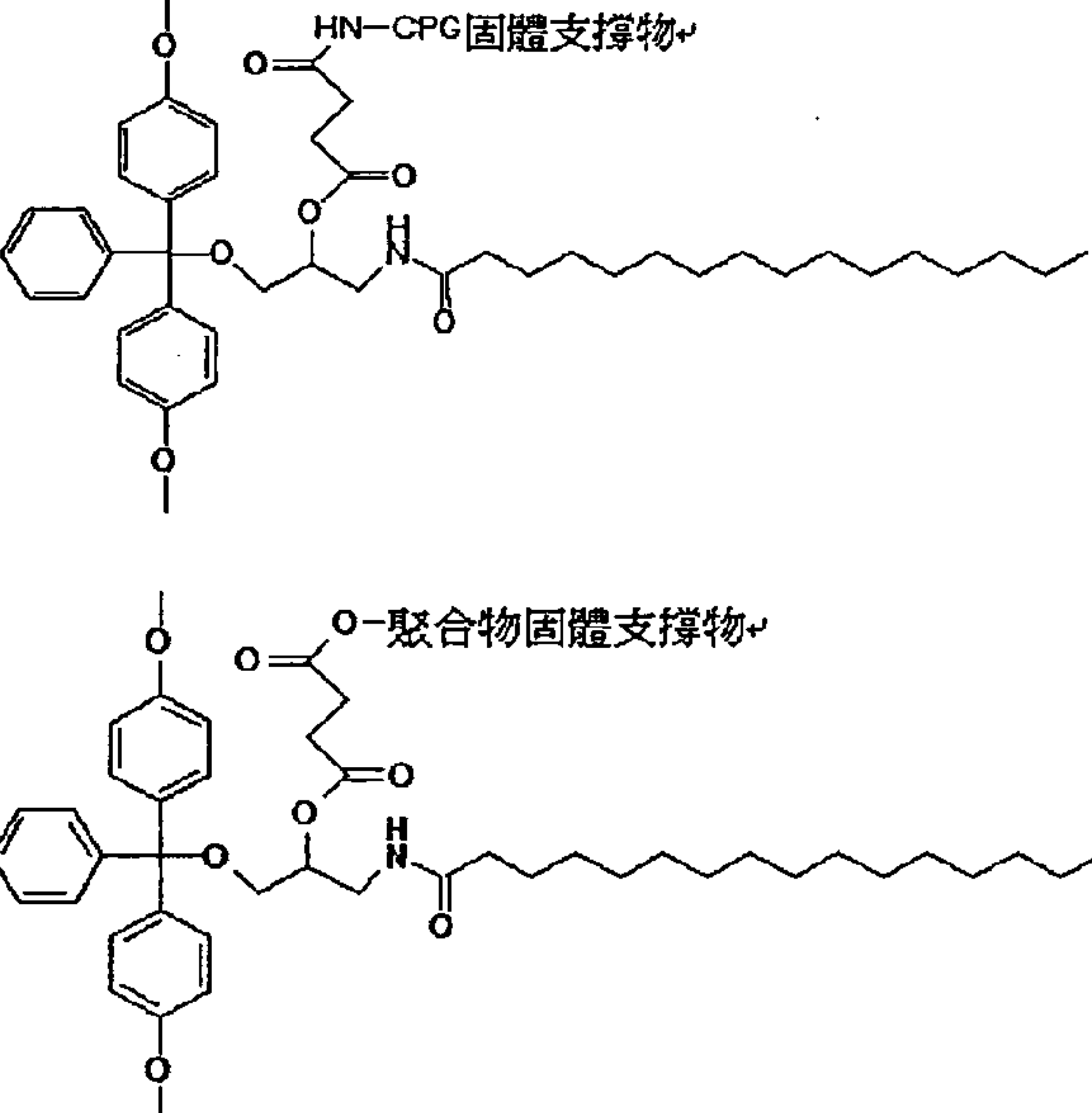
5’R-TAGGGTTAGACAA-NH₂-3’(SEQ ID NO:3)，其中 R=脂質連接子基團

[0484]

表 2：亞磷醯胺化物及固體支撐物之結構

縮寫名稱	描述	結構
亞磷醯胺化物 A ^{dmf}	3'-三苯甲基胺基-N ₆ -二甲基甲脒基-2',3'-二去氧腺苷-5'-(2-氰基乙基)-N,N-二異丙基亞磷醯胺酯	
亞磷醯胺化物 A ^{dmf} (MMT)	3'-單甲氧基三苯甲基胺基-N ₆ -二甲基甲脒基-2',3'-二去氧腺苷-5'-(2-氰基乙基)-N,N-二異丙基亞磷醯胺	

縮寫名稱	描述	結構
亞醯胺化物 A ^{dmf} (9-苯基黃嘌呤-9-基)	3'-(二甲基取代之 9-苯基黃嘌呤-9-基)胺基-N ₆ -二甲基甲脒基-2',3'-二去氧腺苷-5'-(2-氰基乙基)-N,N-二異丙基亞磷醯胺	
亞醯胺化物 A ^{dmf} (DMT)	3'-二甲氧基三苯甲基胺基-N ₆ -二甲基甲脒基-2',3'-二去氧腺苷-5'-(2-氰基乙基)-N,N-二異丙基亞磷醯胺	
亞醯胺化物 A ^{Bz}	3'-三苯甲基胺基-N ₆ -苯甲醯基-2',3'-二去氧腺苷-5'-(2-氰基乙基)-N,N-二異丙基亞磷醯胺	
亞醯胺化物 C(Bz)	3'-三苯甲基胺基-N-苯甲醯基-2',3'-二去氧胞苷 5'-(2-氰基乙基)-N,N-二異丙基亞磷醯胺	

縮寫名稱	描述	結構
亞磷酰胺化 物 G(iBu)	3'-三苯甲基胺基-N2-異丁醯 基-2', 3'-二去氧烏苷-5'-(2- 氰基乙基)-N,N-二異丙基亞 磷醯胺酯	
亞磷酰胺化 物 T	3'-三苯甲基胺基-3'-去氧胸 苷 5'-(2-氰基乙基)-N,N-二異 丙基亞磷醯胺酯	
棕櫚醯基 - 胺基 甘 油 - 固 體 支撐物 或 NittoPhas eHL 棕櫚 醯基 400 聚合物固 體支撐物	3-棕櫚醯胺基-1-O-(4,4'-二 甲氧基三苯甲基)-2-O-丁二 醯基丙二醇可控孔徑玻璃支 撐物 3-棕櫚醯胺基-1-O-(4,4'-二 甲氧基三苯甲基)-2-O-丁二 醯基丙二醇聚合物固體支撐 物	

[0485] 伊美司他骨架為類似於起始亞磷醯胺酯之 NPS，且因此偶合效率為約 92%。利用二聚物亞磷醯胺酯使得偶合步驟較少，此可導致在合成之後在中間階段之產率及純度較高。使用如合成流程 1 中所述之方法如以下所示來製備以下二聚物亞磷醯胺酯。

TA、AA、GA、GG 及 GT。

[0486] 合成二聚物亞磷醯胺酯需要 A、G 及 T 核苷之三種單體醯胺化物(4a 至 4c，流程 1)及三種 5'-TBDMS-3'-胺基核苷中間物(3a 至 3c，流程 1)。TBDMS 為第三丁基二甲基矽烷基。自以下兩個種類之起始物質製備中間物(3a 至 3c，流程 1)：5'-OH-3'-NH-Tr-2'-去氧-N-苯甲醯基腺苷(1a)、5'-OH-3'-NH-Tr-2'-去氧-N-異丁醯基鳥苷(1b)及 5'-OH-3'-胺基-胸苷(2)。Tr 或 Trt 係指三苯甲基。

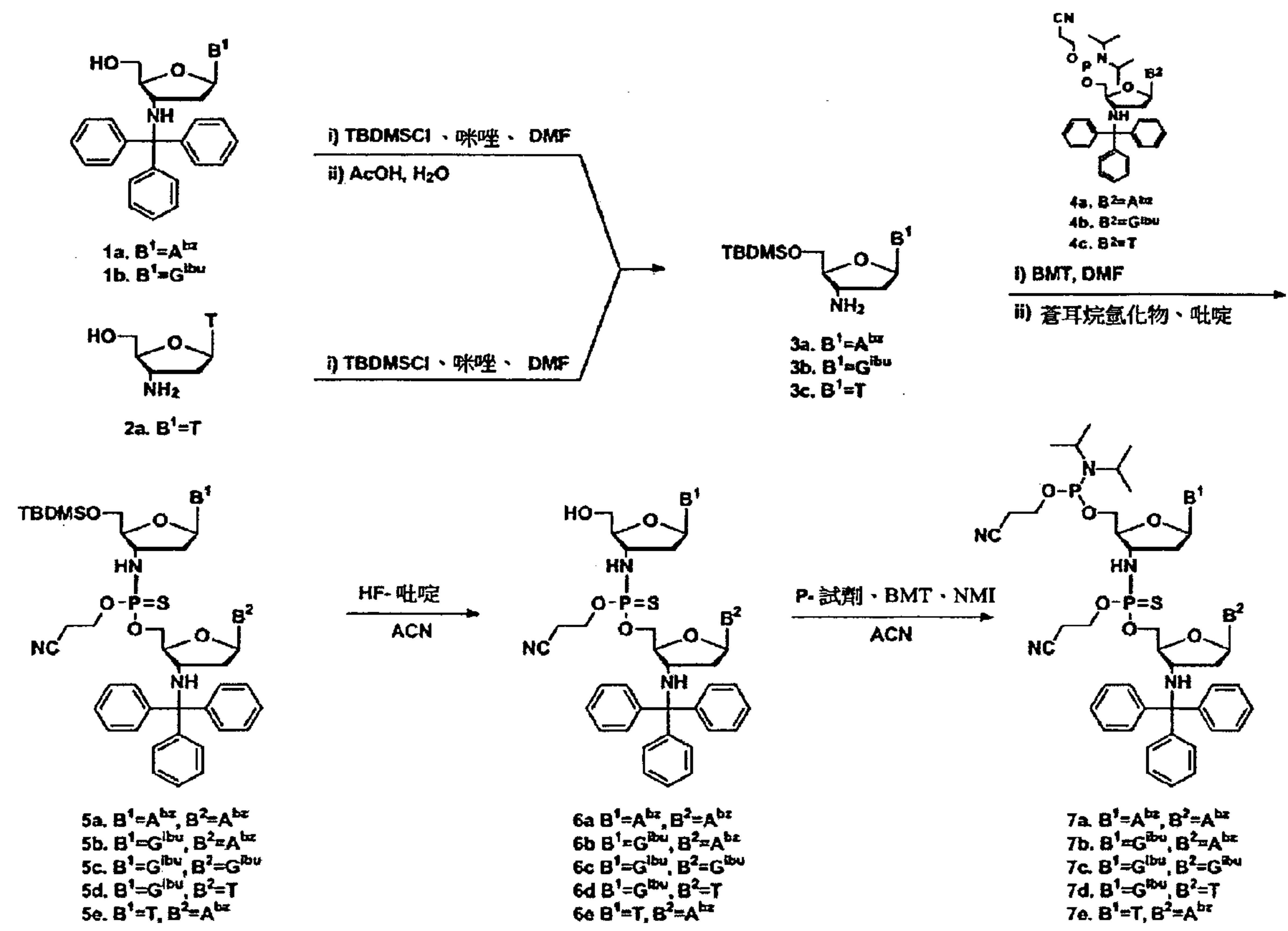
[0487] 使用第三丁基二甲基矽烷基氯化物及咪唑在 DMF(N,N-二甲基甲醯胺)中用 TBDMS 基團保護 1a 及 1b 之 5'-羥基，接著藉由用乙酸在水中處理來使在 3'-胺基位置處之三苯甲基脫保護。使用苯甲基巯基四唑(BMT)作為活化劑在二甲基甲醯胺中使所得中間物 3a 至 3c 與相應醯胺化物 4a 至 4c 偶合，且隨後使用蒼耳烷氯化物及吡啶進行硫化(P III 至 P V)(流程 1)。一般而言，硫化反應易於完成。偶合反應之結果視水分、反應時間及醯胺化物之當量而變化。使用氮氣或氬氣及快速偶合反應之無水條件為合乎需要的，因為較長反應時間會產生更多副產物，諸如 P(V)氧化產物。二聚物之 P(III)中間物具有不同穩定性。TA 中間物足夠穩定用以藉由 TLC 及 HPLC 來監測反應完成。其他 P(III)中間物不足夠穩定用以監測偶合反應，且在硫化完成之後檢查反應完成(流程 1)。二聚物 AA、GA、GG 及 GT 之 P(V)物質更穩定。對於 TA 二聚物(5e)，1.3 當量之醯胺化物(4c)用於偶合，而其他四種二聚

物(5a~5d)需要約 3 當量之醯胺化物(4a 及 4b)(流程 1)。醯胺化物單體 4a-4c 係藉由修改美國專利 5,859,233 中所述之方法製備。

[0488]

流程 1. 二聚物醯胺化物之合成流程

(P-試劑為氰基乙氧基-雙(N,N-二異丙基胺基)磷)



[0489] 使用 HF·吡啶在乙腈中使在 5'-羥基處之 TBDMS 保護基脫保護，且在 BMT 及 N-甲基咪唑(NMI)存在下用亞磷醯化試劑進行最終亞磷醯化以製備二聚物硫代磷醯胺酯 7a 至 7e(流程 1)。藉由管柱層析純化最終產物(7)及三種中間物(3、5、6)。用各種量的所得最終醯胺化物進行之反應的步驟產率及總體產率列於表 3 中。五種二

聚物醯胺化物之分析結果之概述顯示於表 4 中。

[0490]

表 3. 二聚物合成之產率

二聚物 (量)	5'-TBDMS-3'- 胺基核苷	5'-TBDMS-3'-NH-Tr- 二 聚物	5'-OH-3'-NH-Tr 二聚物	二聚物醯 胺化物	總體產 率(%)
TA (2.9 g)	58 %	91 %	71 %	51 %	19.1 %
AA (1.7 g)	58 %	82 %	70 %	47 %	15.6 %
GA (3.4 g)	58 %	77 %	60 %	55 %	14.7 %
GG (1.9 g)	58 %	67 %	57 %	38 %	8.4 %
GT (1.8 g)	58 %	99 %	42 %	38 %	9.2 %

[0491]

表 4. 二聚物分析之概述

二聚物	根 據 HPLC 之 純度	³¹ P-NMR	LCMS(計算值)	量(g)
TA	96.0 %	148.281(s), 148.193(s), 73.811(s), 73.723(s), 72.981(s), 72.592(s)	1169.4 (1169.23)	2.9
AA	95.8 %	148.262(m), 74.034(m), 72.774(d), 72.267(d)	1282.5 (1282.35)	1.7
GG	94.5 %	148.156(m), 74.244(s), 73.993(s), 72.912(s), 72.761(s)	1268.5 (Na) (1246.32)	1.9
GT	95.3 %	148.159(m), 73.993(s), 73.811(s), 73.295(s), 73.100(s)	1151.4 (1151.22)	1.8
GA	96.2 %	148.168(m), 148.011(s), 74.175(s), 73.942(s), 73.170(s), 72.906(s)	1264.5 (1264.33)	3.4

[0492]

二聚物硫代磷醯胺酯之合成程序

[0493] 1) 製備 5'-TBDMS-3'-胺基核苷(針對腺苷及鳥
苷)。

[0494] a) 將 5'-OH-3'-NH-Tr-2'-去氧核苷(1.0 當量)及
咪唑(5.0 當量)溶解於 DMF 中，且加熱至 60℃。

[0495] b) 添加 TBDMSCl(1.2 當量)至加熱溶液中，接著在 60°C 下攪拌 1 小時。

[0496] c) 添加飽和 NaHCO_3 水溶液至反應混合物中，接著用乙酸乙酯萃取。

[0497] d) 有機層用飽和 NaHCO_3 水溶液及鹽水溶液洗滌。

[0498] e) 添加無水 Na_2SO_4 至分離之有機層中以進行乾燥，接著過濾。

[0499] f) 濃縮濾液。

[0500] g) 添加 80%乙酸水溶液至濃縮反應混合物中，接著在環境溫度下攪拌 1 小時。

[0501] h) 藉由過濾移除產物固體，接著添加飽和 NaHCO_3 水溶液至濾液中，接著藉由乙酸乙酯萃取四次。

[0502] i) 有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥，接著藉由過濾移除固體。

[0503] j) 濃縮濾液，接著藉由管柱層析(溶離劑：乙酸乙酯:甲醇 = 9:1 → 5:1)純化。

[0504] k) 獲得呈白色固體狀之 5'-TBDMS-3'-胺基-2'-去氧核苷。

[0505] 2) 製備 5'-TBDMS-3'-胺基核苷(針對胸苷)。

[0506] a) 將 5'-OH-3'-胺基-2'-去氧核苷(1.0 當量)及咪唑(5.0 當量)溶解於 DMF 中，且加熱至 60°C。

[0507] b) 添加 TBDMSCl(1.2 當量)至加熱溶液中，接著在 60°C 下攪拌 1 小時。

[0508] c) 添加飽和 NaHCO_3 水溶液至反應混合物中，接著用乙酸乙酯萃取四次。

[0509] d) 添加無水 Na_2SO_4 至有機層中以進行乾燥，且過濾。

[0510] e) 濃縮濾液。

[0511] f) 濃縮粗混合物藉由管柱層析(溶離劑:乙酸乙酯:甲醇=15:1 $\rightarrow$ 5:1)純化。

[0512] g) 獲得呈白色固體狀之 5'-TBDMS-3'-胺基胸苷。

[0513] 3) 製備 5'-TBDMS-3'-NH-Tr 二聚物

[0514] a) 為移除水分，使 5'-TBDMS-3'-胺基核苷(1.0 當量)及 BMT(苯甲基巯基四唑，1.0~5.0 當量)與乙腈共沸三次，接著在環境溫度下在 N_2 氛圍下溶解於 DMF 中。

[0515] b) 逐滴添加含單體醯胺化物(3.0 當量)之 DMF(使用最小量以溶解單體醯胺化物)至反應溶液中，接著在環境溫度下在氮氣氛圍下攪拌 1 小時。根據美國專利 5,859,233 中所述之方法製備單體醯胺化物。

[0516] c) 添加蒼耳烷氫化物(2.0 當量)及吡啶(4.0 當量)至反應溶液中，接著在環境溫度下在氮氣氛圍下攪拌 1 小時。

[0517] d) 添加飽和 NaHCO_3 水溶液至反應混合物中，接著用乙酸乙酯萃取。

[0518] e) 水層用乙酸乙酯萃取。

[0519] f) 合併分離之有機層，接著用飽和 NaHCO_3 水

溶液及鹽水溶液洗滌。

[0520] g) 添加無水 Na_2SO_4 至有機層中以進行乾燥，且過濾，接著濃縮濾液。

[0521] h) 濃縮粗混合物藉由管柱層析(溶離劑:乙酸乙酯:甲醇=1.5:1 → 僅 EA)純化。

[0522] i) 獲得呈淺黃色固體狀之 5'-TBDMS-3'-NH-Tr 二聚物。

[0523] 4) 製備 5'-OH-3'-NH-Tr 二聚物

[0524] a) 在氮氣氛圍下將 5'-TBDMS-3'-NH-Tr 二聚物(1.0 當量)溶解於 ACN(20 mL)中，接著在環境溫度下在攪拌下添加 HF-吡啶溶液，持續 1.5 小時。

[0525] b) 添加飽和 NaHCO_3 水溶液至反應混合物中，接著用乙酸乙酯萃取。

[0526] c) 分離之有機層用飽和 NaHCO_3 水溶液及鹽水溶液洗滌。

[0527] d) 添加無水 Na_2SO_4 至有機層中以進行乾燥及過濾，接著濃縮濾液。

[0528] e) 濃縮粗混合物藉由管柱層析(溶離劑:乙酸乙酯、甲醇、二氯甲烷共溶劑)純化

[0529] f) 獲得呈白色固體狀之 5'-OH-3'-NH-Tr 二聚物。

[0530] 5) 製備二聚物硫代磷醯胺酯(二聚物醯胺化物)

[0531] A) 為移除任何水分，使 5'-羥基-3'-NH-Tr 二聚物與乙腈共沸三次，接著在環境溫度下在氮氣氛圍下溶

解於 ACN 中。

[0532] b) 添加 BMT(1.3 當量)、NMI(N-甲基咪唑，0.3 當量)及亞磷醯化試劑(2.0 當量)至反應溶液中，接著在環境溫度下攪拌 1 小時。

[0533] c) 添加飽和 NaHCO_3 水溶液至反應混合物中，接著用乙酸乙酯萃取。

[0534] d) 分離之有機層用鹽水溶液洗滌。

[0535] e) 添加無水 Na_2SO_4 至有機層中以進行乾燥及過濾，接著濃縮濾液。

[0536] f) 將濃縮反應混合物溶解於二氯甲烷(10 mL)中，接著添加己烷以沈澱固體。

[0537] g) 傾析上層溶液以移除過量亞磷醯化試劑。(重複傾析過程 5 次)。

[0538] h) 剩餘固體藉由管柱層析(溶離劑：乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷共溶劑)純化

[0539] i) 獲得呈白色固體狀之二聚物。

[0540]

利用二聚物醯胺化物進行之伊美司他合成

[0541] 五種二聚物醯胺化物替代單體醯胺化物用作用於合成伊美司他之構築嵌段，且將結果與自單體之醯胺化物獲得之結果進行比較。對於 C 核苷偶合至伊美司他中，如以下序列中所描繪使用單體構築嵌段。使用 Akta Oligopilot 100 在 140 μmol 規模下進行合成。

[0542] 5'R-TAGGGTTAGA C AA-NH₂ 3'(SEQ ID NO: 3)

[0543] 二聚物醯胺化物用作用以製備伊美司他之構築嵌段。使用表 5A 及 5B 中所列之試劑及合成參數，使如上所示之五種二聚物醯胺化物(AA、TA、GG、GA 及 GT)及一種單體醯胺化物(C)偶合以在低裝載量 CPG(PALM 0051，64.6 μmol /g)上製備伊美司他序列。偶合時間為 500 秒，且使用 10 當量之亞醯胺化物。在固相合成之後，支撐物用乙醇銨溶液(NH₄OH:EtOH=3:1 (v/v))在 65℃下處理 15 小時。粗產物藉由蒸發溶劑加以分離，且藉由 UV 光譜術及 HPLC 加以分析。

[0544]

表 5. 用於寡核苷酸合成之示範性合成參數(A)及試劑組成(B)。ACN 為乙腈。DCA 為二氯乙酸。PADS 為苯基乙醯基二硫化物。ETT 為 5-乙硫基-1H-四唑。

A

步驟	試劑	時間	RPM	M
1	洗滌	3.5	300	□
2	充氣	4.0	400	
3	去封閉	3.4	250	□
4	去封閉	2.0	250	□
5	等待	60.0		
6	洗滌	12.0	350	□
7	活化	3.0	250	
8	偶合			
9	等待	300.0		
10	偶合			
11	活化	1.3	150	
12	等待	200.0		
13	洗滌	3.0	300	□
14	氧化	10.0	350	
15	等待	300.0		
16	氧化	10.0	350	
17	等待	300.0		
18	洗滌	6.0	350	□
19	加帽A	3.0	200	
20	加帽B	1.5	150	
21	等待	1.5		
22	加帽A	1.5	150	
23	加帽B	1.5	150	
24	等待	1.5		
25	洗滌	4.0	350	□

B

試劑名稱	組成
去封閉	含5% DCA之甲苯
亞醯胺化物	0.2 M於ACN中
活化劑	含0.5 M ETT之ACN
硫醇化	含0.2M PADS之ACN:LTD=1:1
加帽A	20% NMI於ACN上
加帽B	IBUA:LTD:ACN=1:1:8
DEA	含20% DEA之ACN

[0545] 使用 Akta Oligopilot 100，利用單體嵌段方法及二聚物嵌段方法在 140 μmol 規模上進行合成操作。用於合成操作之合成條件類似於表 5A-B 中所列之條件。

[0546]

表 6. 用於 140 μmol 規模合成之合成參數(AKTA Oligopilot 100)

參數		使用單體進行之伊美司他合成	使用二聚物進行之伊美司他合成
去封閉(含 5% DCA 之甲苯)	CT(分鐘)	3 分鐘(第 2 個 6 分鐘)	3 分鐘
	CV	11.2 CV	
	線性流速(cm / h)	450 cm/h	
偶合	醯胺化物	0.1 M，2.5 當量 (最後 2 個：3.0 當量)	0.1 M，2.5 當量 (末個 AA:3.0 當量)
	活化劑	0.5 M ETT(醯胺化物:活化劑，4:6)	
	第 1 偶合	雙重偶合	
	流通之 CT(分鐘)	1.8 分鐘	
	再循環之 CT(分鐘)	1.8 分鐘(第 1：4 分鐘)	
硫醇化(含 0.1 M PADS 之 AN:LTD = 9:1)	CT(分鐘)	5.27 分鐘	
	CV	3.5 CV	
	線性流速(cm / h)	80 cm/h	
加帽 (加帽 A：含 20% NMI 之 AN，加帽 B：IBUA:LTD:AN = 1:1:8)	CT(分鐘)	1 分鐘(第 1：2 分鐘)	
	CV	1 CV(第 1：2 CV)	
	線性流速(cm / h)	120 cm/h	
DEA(含 20% DEA 之 AN)	CT(分鐘)	10 分鐘	
	CV	4.3 CV	
	線性流速(cm / h)	52 cm/h	

[0547] 藉由 HPLC-MS 對寡核苷酸分析顯示當五種二聚物嵌段用於合成時，FLP(全長產物)純度得以顯著提高，根據 HPLC 得到 72%純度，如表 7 及 8 中所概述。使用單體嵌段製備之粗寡聚物僅顯示 45% FLP 純度。此外，總 OD(光密度)自 5,299 增加超過兩倍達到 11,623，從而得到粗產量 3.34 g / mmol。(N-1)產物含量及 PO 含量分別自 11.2%及 20%降低至 2.4%及 5%。

[0548] 使用二聚物嵌段之一優勢包括產生時間縮短，且在固相合成期間使用之溶劑之量降低。

[0549]

表 7. 140 μmol 規模合成之分析結果

屬性		使用單體醯胺化物進行之伊美司他合成	使用二聚物醯胺化物進行之伊美司他合成
HPLC	FLP	44.4 %	74.0 %
	在峰 1 後(N-1)產物	11.0 %	2.4%
UV	TOD	5299	11623
	重量(mg)	213 mg	468 mg
	g/mmol	1.52	3.34
LC/MS	FLP	70.3 %	71.9 %
	n-117	3.3 %	16.4 %
	n-133	6.5 %	6.7 %
	n-16	19.9 %	5.0 %

[0550] 自 5'-羥基-3'-胺基核苷或 5'-羥基-3'-三苯甲基胺基核苷成功完成五種二聚物醯胺化物之合成，其中產率為 9%至 19%，從而得到 1.7 公克至 3.4 公克。未充分研究各步驟之反應條件之最佳化。在 140 μmol 規模上進行伊美司他之二聚物嵌段合成，且將結果與自使用單體醯胺化物進行之合成獲得之資料進行比較。顯示用於製備伊美司他之二聚物嵌段策略會提供實質性改進，因為例如在 140 μmol 規模上，純度及產率得以顯著改進(HPLC 純度：二聚物 74.0%(圖 8)，單體 44.4%(圖 7)，根據 TOD(總光密度)之粗產量：二聚物 468 mg，單體 213 mg)。此外，產生較低量之 npo 鍵聯，因為在使用二聚物進行之合成中存在較少偶合步驟。

[0551] 二聚物之偶合效率(140 μmol 規模合成)顯示二

聚物合成具有 96%偶合效率，而單體合成為 94%。因為對於二聚物，僅存在七次偶合，所以二聚物之 FLP 為 71.6%，此接近於在 72%下之理論計算之全長產物，且偶合 13 次之單體報導 FLP 45.6%對在 44%下之理論預測值。

[0552]

表 8. 140 μ mol 規模合成之結果之分析

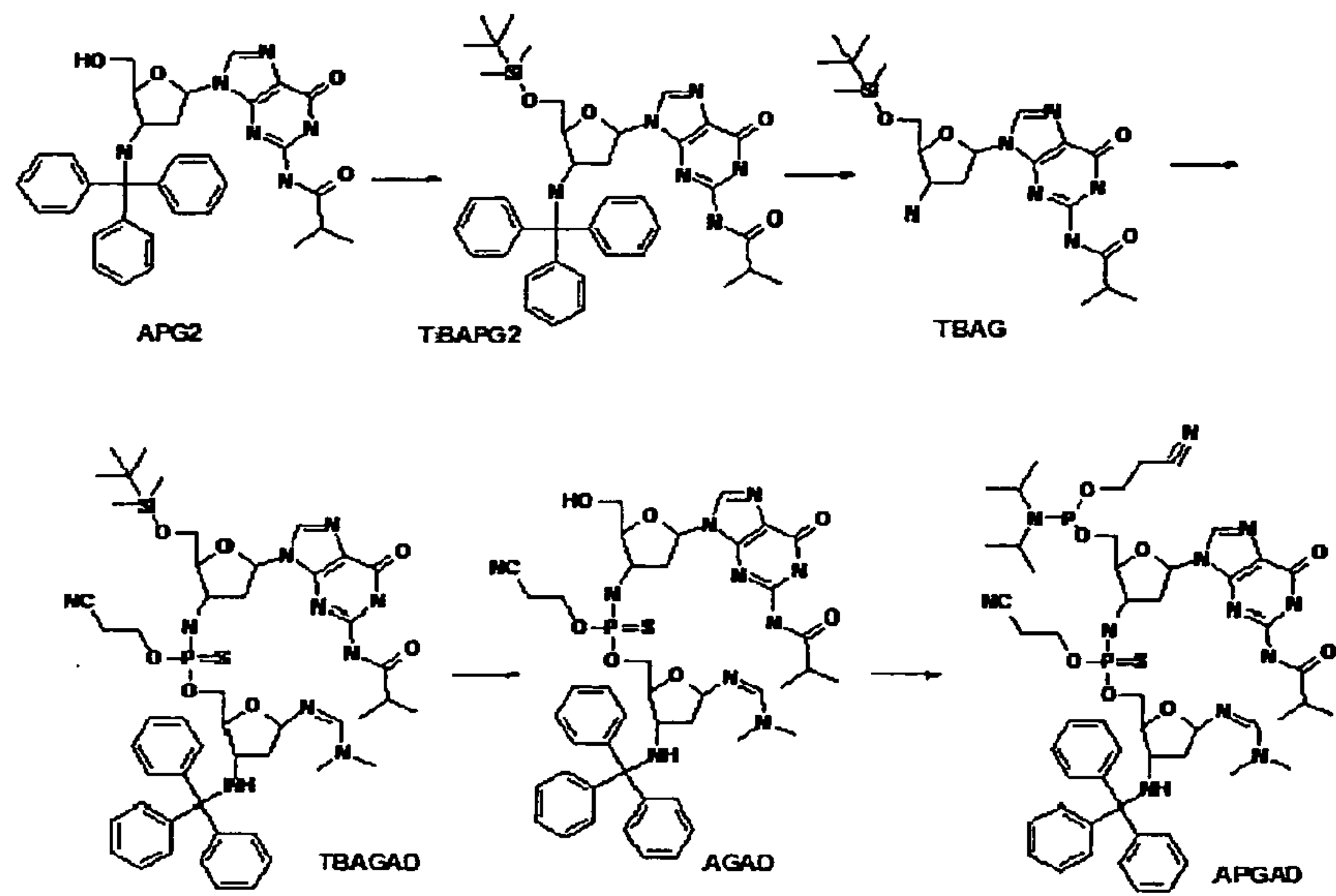
單體合成之產物	滯留時間 (分鐘)	單體合成 面積%	二聚物合成之產物	滯留時間 (分鐘)	二聚物合成 面積%
目標	38.2	44.4	目標	37.9	74.0
在峰1後 N-1 (N-G)	39.8	11.0	在峰1後 N-1 (N-C)	39.8	2.5
在峰2後 N-2+iBu、N-2、 N-G+苯基乙醯基	41.2	6.3	在峰2後 N-2+iBu、N-2、 N-G+苯基乙醯基	41.3	3.9
在峰3後 N-2+苯基乙醯基、 N-3 (N-A-A-C)	42.9	6.9	在峰3後 N-2+苯基乙醯基、 N-3 (N-A-A-C)	42.4	5.1
在峰4後 N-3+苯基乙醯基	44.7	6.0	在峰4後 N-3+苯基乙醯基	44.5	1.6
總非目標寡核苷酸	39.8 – 54.7	49.5	總非目標寡核苷酸	39.7 – 53.1	19.8

「+苯基乙醯基」表示由用氧化試劑進行之反應獲得之產物

[0553] 利用較少偶合步驟進行之伊美司他合成提供之全長產物純度與產率兩者均實質上較高。對雜質之解析提供較易於純化伊美司他，其中在 HPLC 中存在較小量之緊密接近於主峰流動之次要產物以產生伊美司他之純度較高之組合物。此提高合乎降低用於製造伊美司他鈉之商品成本之需要，例如當在製造規模下執行時，商品成本可減少 30-40%。

[0554]

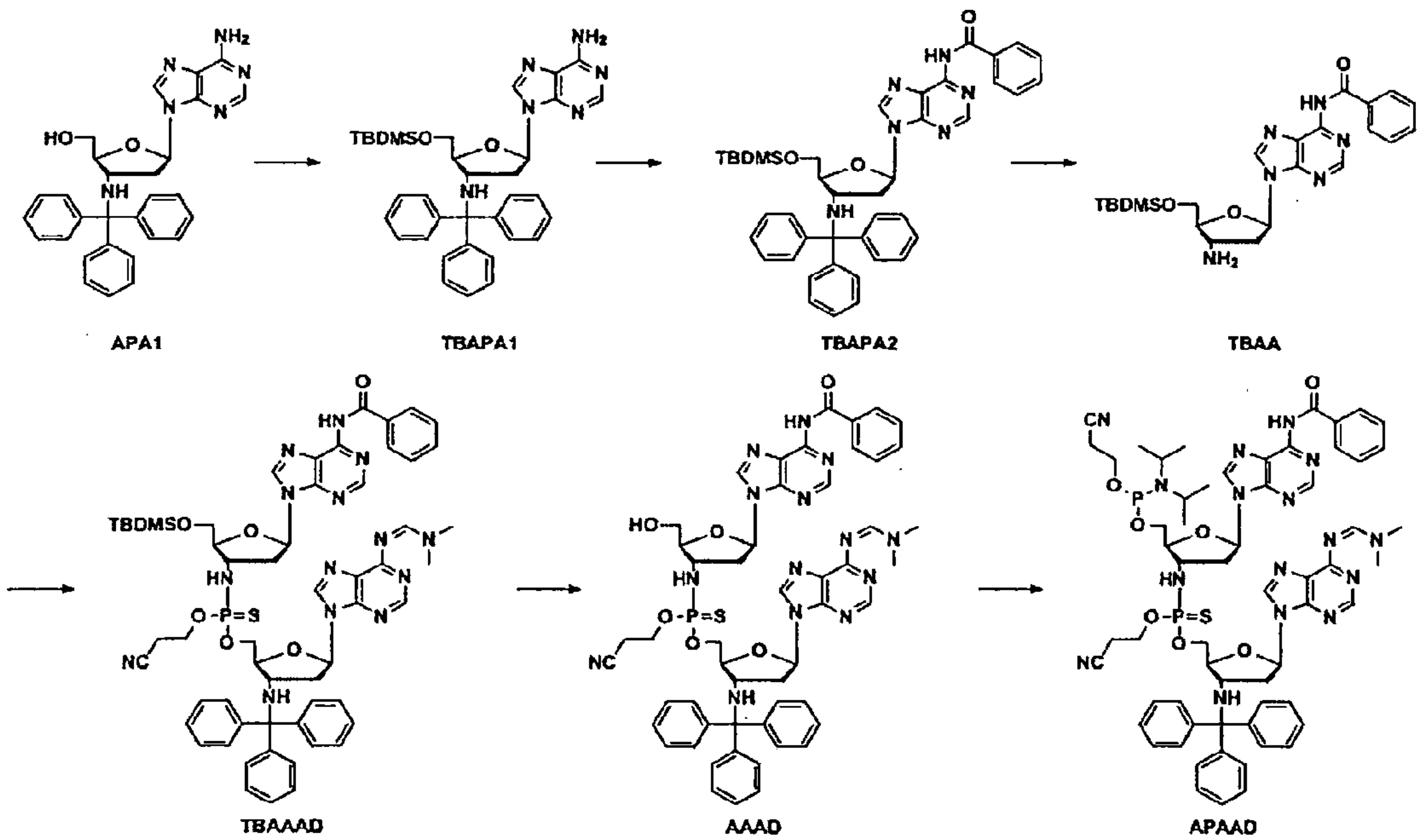
流程 2. GA 二聚物醯胺化物之合成流程



[0555] 根據本文所述之方法，經由流程 2 中所示之步驟，自 300 g APG2 製備 85 g TBAG。

[0556]

流程 3. AA 二聚物醯胺化物之合成流程



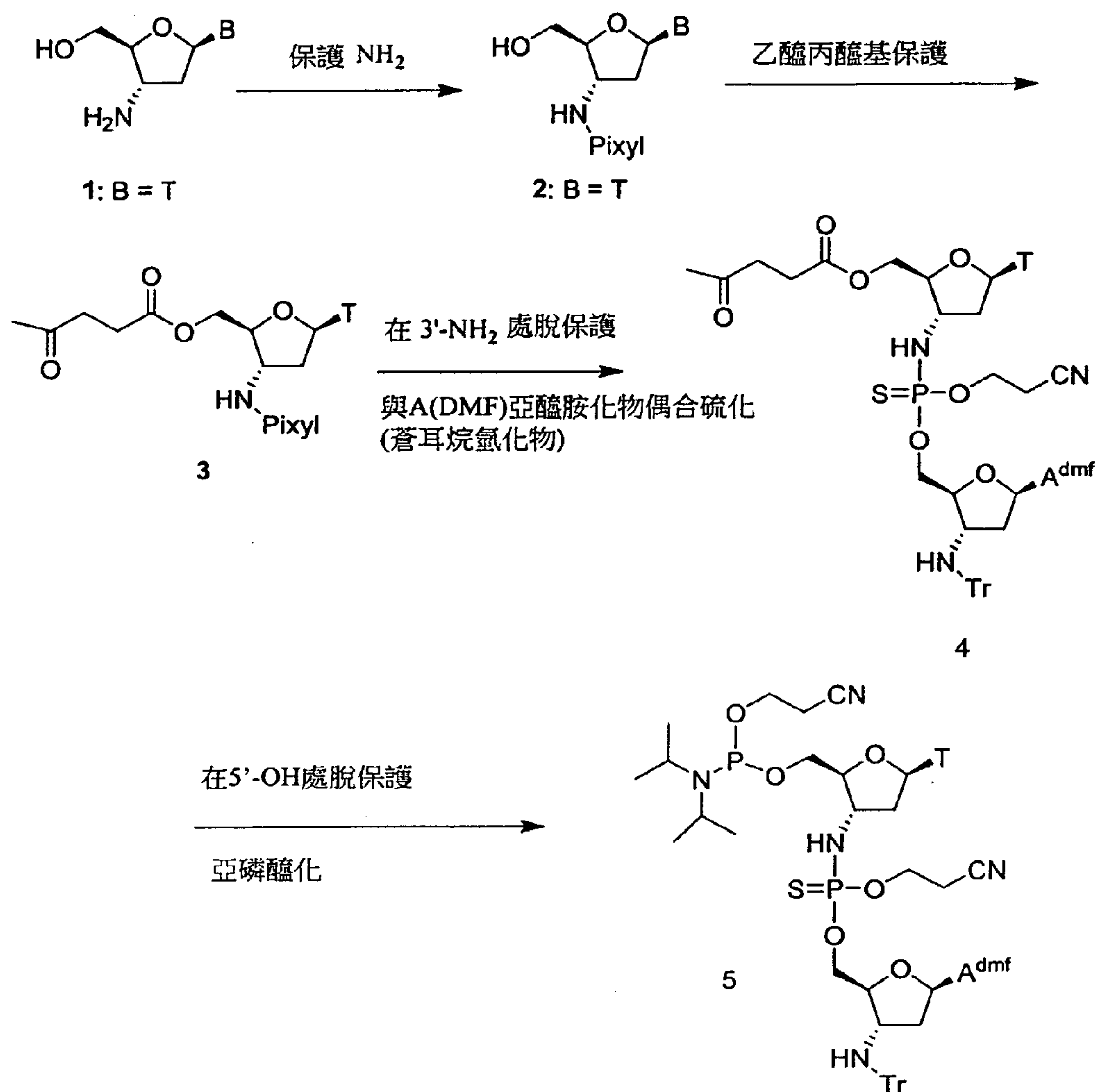
[0557] 根據本文所述之方法，經由流程 3 中所示之步

S

驟，自 800 g 粗 APA1(純度：46%)獲得 430 g TBAPA1。

[0558]

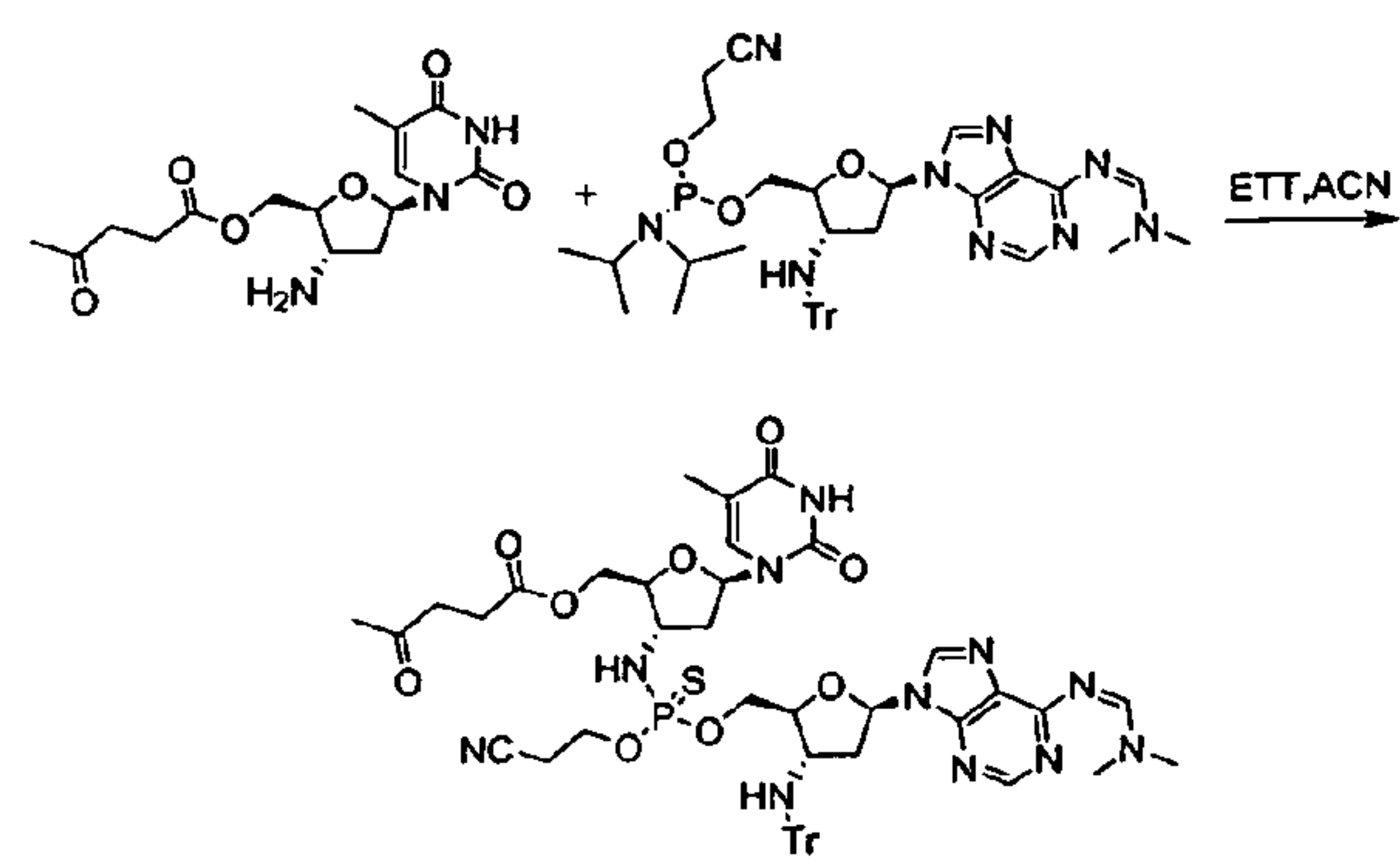
流程 4. TA 二聚物醯胺化物之合成。



[0559] 已根據本文所述之方法，經由流程 4 中所示之步驟，在自 100 mg 至 1 g 之合成規模下製備 TA 二聚物醯胺化物(5)。

[0560]

流程 5. 在二聚物醯胺化物合成期間之偶合及硫化



[0561]

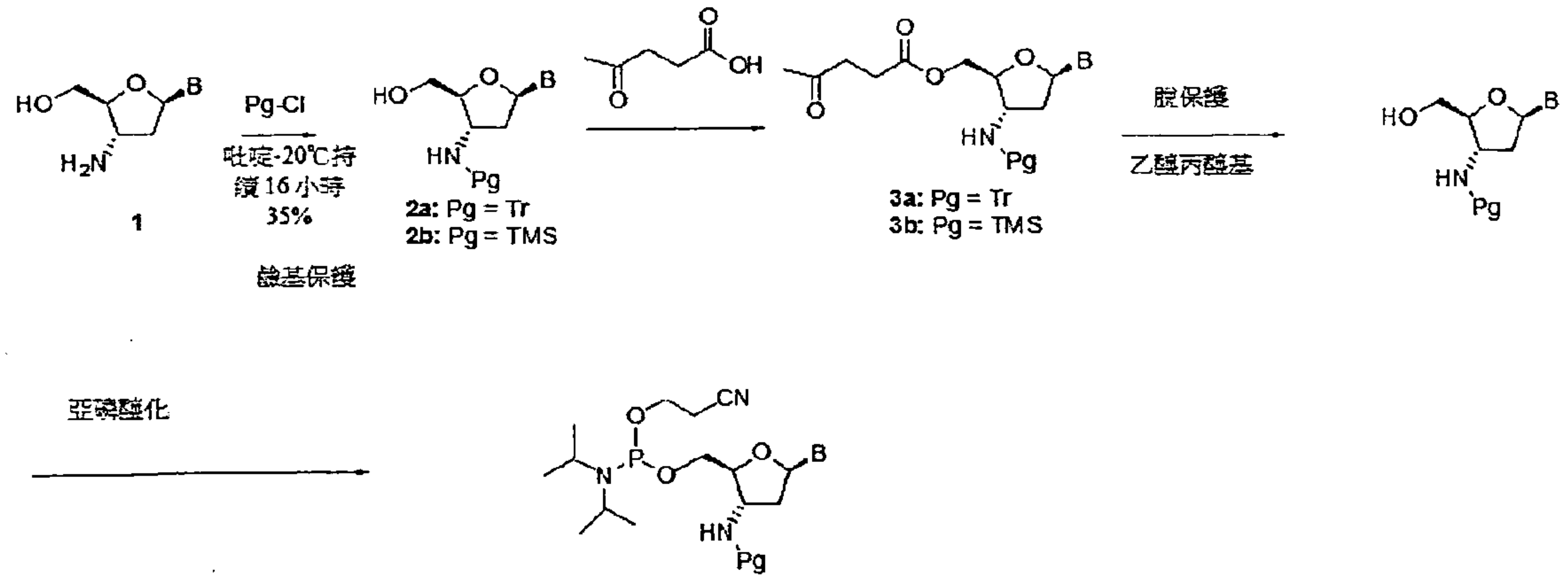
表 9. 在二聚物醯胺化物合成期間之偶合及硫化

條目	起始物質	試劑之莫耳當量	溶劑類型及量	反應時間/溫度	產物產生重量	分析
1	100 mg	ETT(1.0當量)、蒼耳烷氫化物(2.0當量)、吡啶(1.5 mL)	乙腈 (5.0 mL)	室溫持續 3+2小時。	300 mg (粗)	LCMS
2	100 mg	0.4 M ETT(2.0 mL)、蒼耳烷氫化物(1.2當量)、吡啶(2.0 mL)	純	室溫持續 3+2小時。	350 mg (粗)	LCMS

[0562] 在化合物之一些實施例中，B¹ 為 T 或 U，且 B² 為 U。

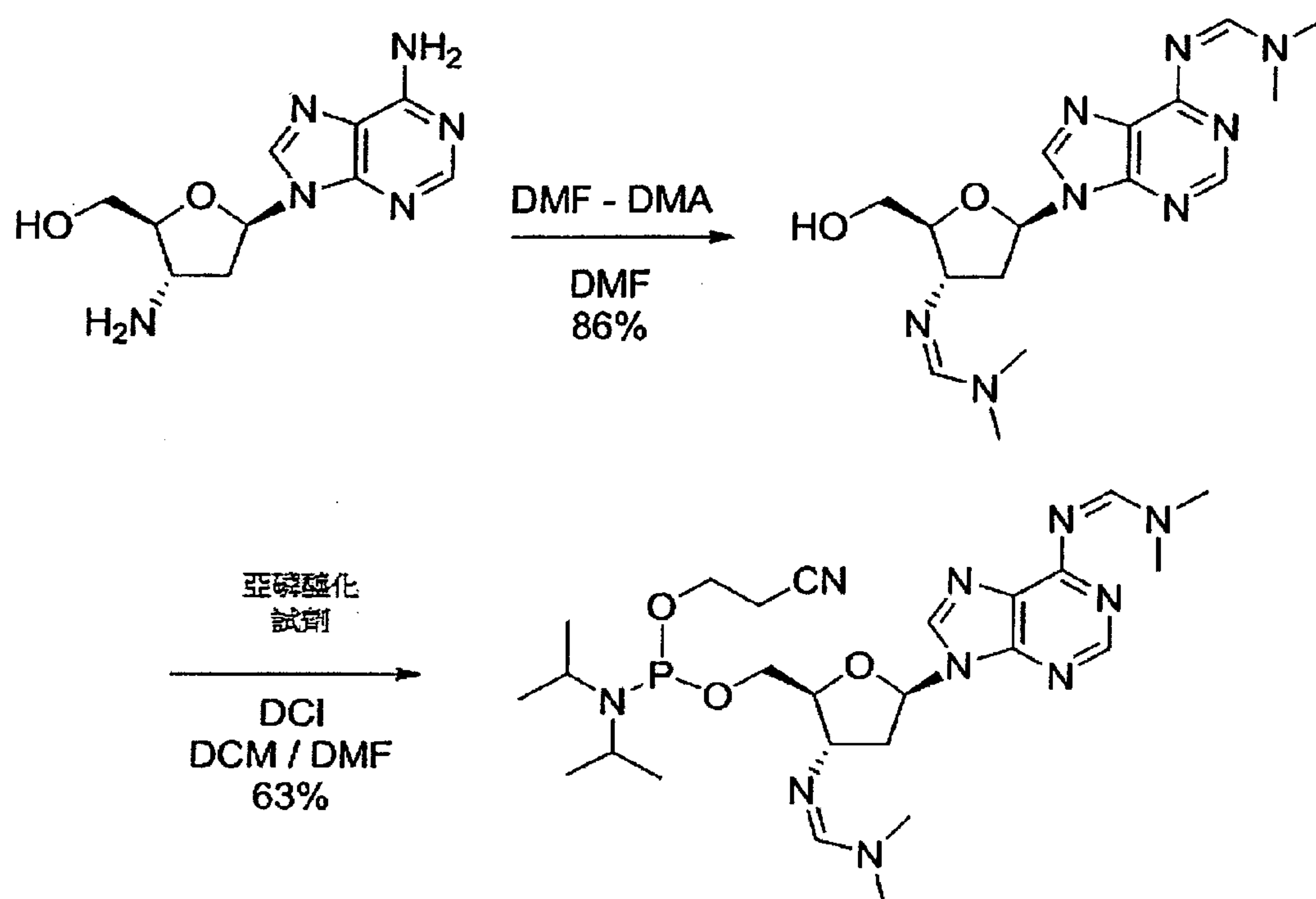
[0563]

流程 6：合成乙醯丙酸酯保護之單體



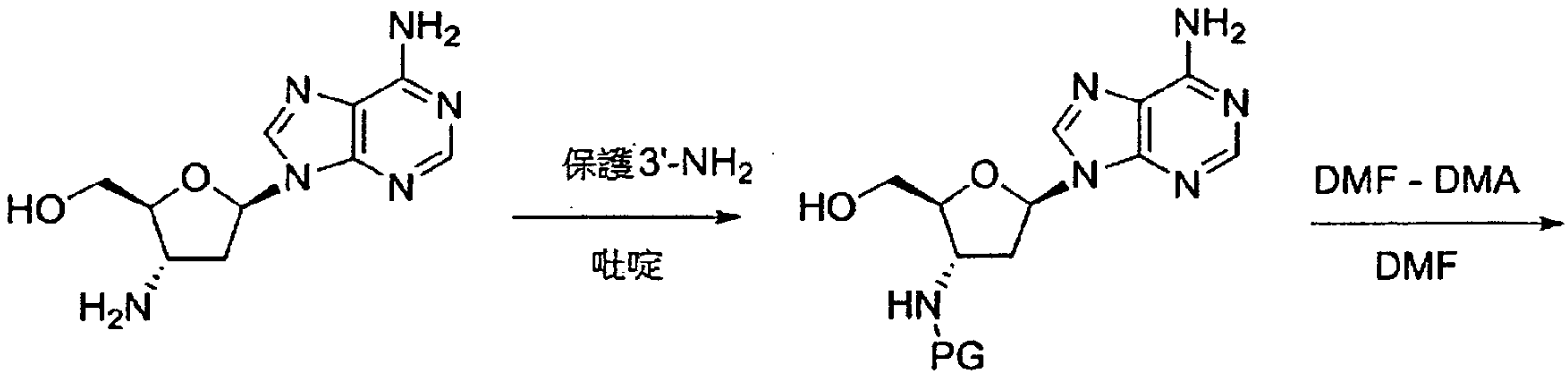
[0564]

流程 7：合成雙 DMF A 亞醯胺化物

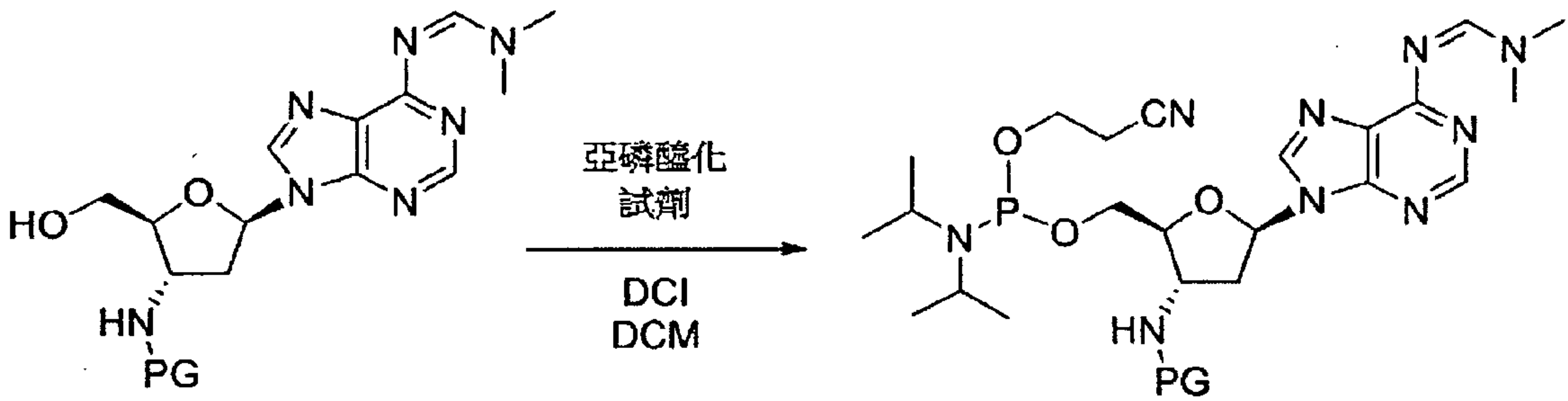


[0565]

流程 8：用於 MMT、DMT 及 9-苯基黃嘌呤-9-基單體 (A 亞
醯胺化物)之合成流程：



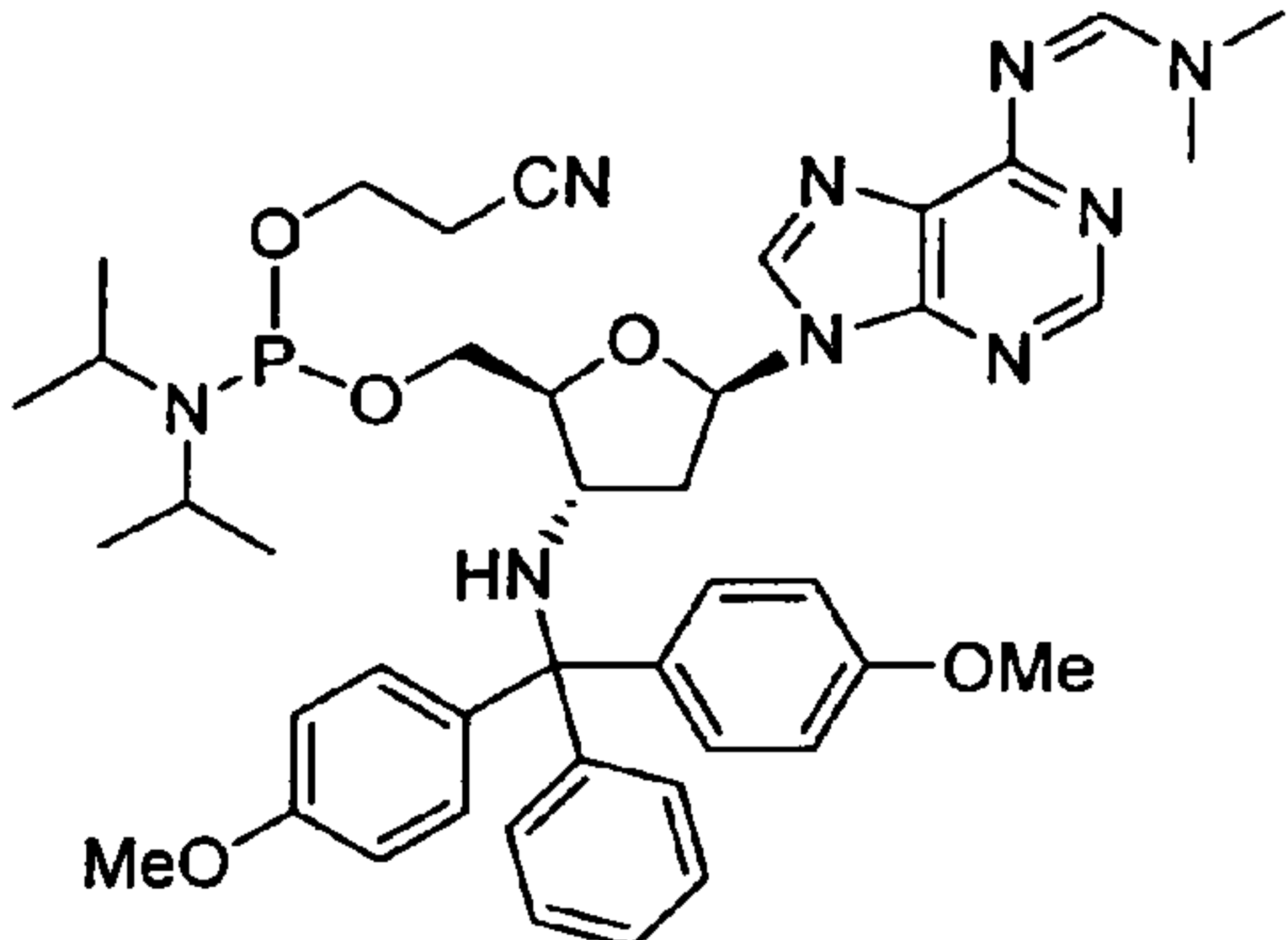
PG: MMT, DMT, 9-苯基黃嘌呤-9-基



PG: MMT, DMT, 9-苯基黃嘌呤-9-基

PG: MMT, DMT, 9-苯基黃嘌呤-9-基

亞醯胺化物 A ^{dmf} (MMT)	3'-單甲氧基三苯甲基胺 基-N ₆ -二甲基甲脒基 -2',3'-二去氧腺苷-5'-(2- 氰基乙基)-N,N-二異丙基 亞磷醯胺	
亞醯胺化物 A ^{dmf} (9-苯基 黃嘌呤-9-基)	3'-(二甲基取代之 9-苯基 黃嘌呤-9-基)胺基-N ₆ -二 甲基甲脒基-2',3'-二去氧 腺苷-5'-(2-氰基乙 基)-N,N-二異丙基亞磷醯 胺	

亞醯胺化物 A^{dmf} (DMT)	3'-Di 甲氧基三苯甲基胺 基-N ₆ -二甲基甲脒基 -2',3'-二去氧腺苷-5'-(2- 氰基乙基)-N,N-二異丙基 亞磷醯胺	
--------------------------	---	---

[0566] 儘管本發明已關於其具體實施例加以描述，但熟習此項技術者應瞭解的是可在不脫離本發明之真實精神及範疇下進行各種變化且可用等效物進行替代。此外，可進行許多修改以使特定情況、材料、物質組成、方法、一或多個方法步驟適合於本發明之目標、精神及範疇。所有此等修改皆意欲在隨附於此之申請專利範圍之範疇內。

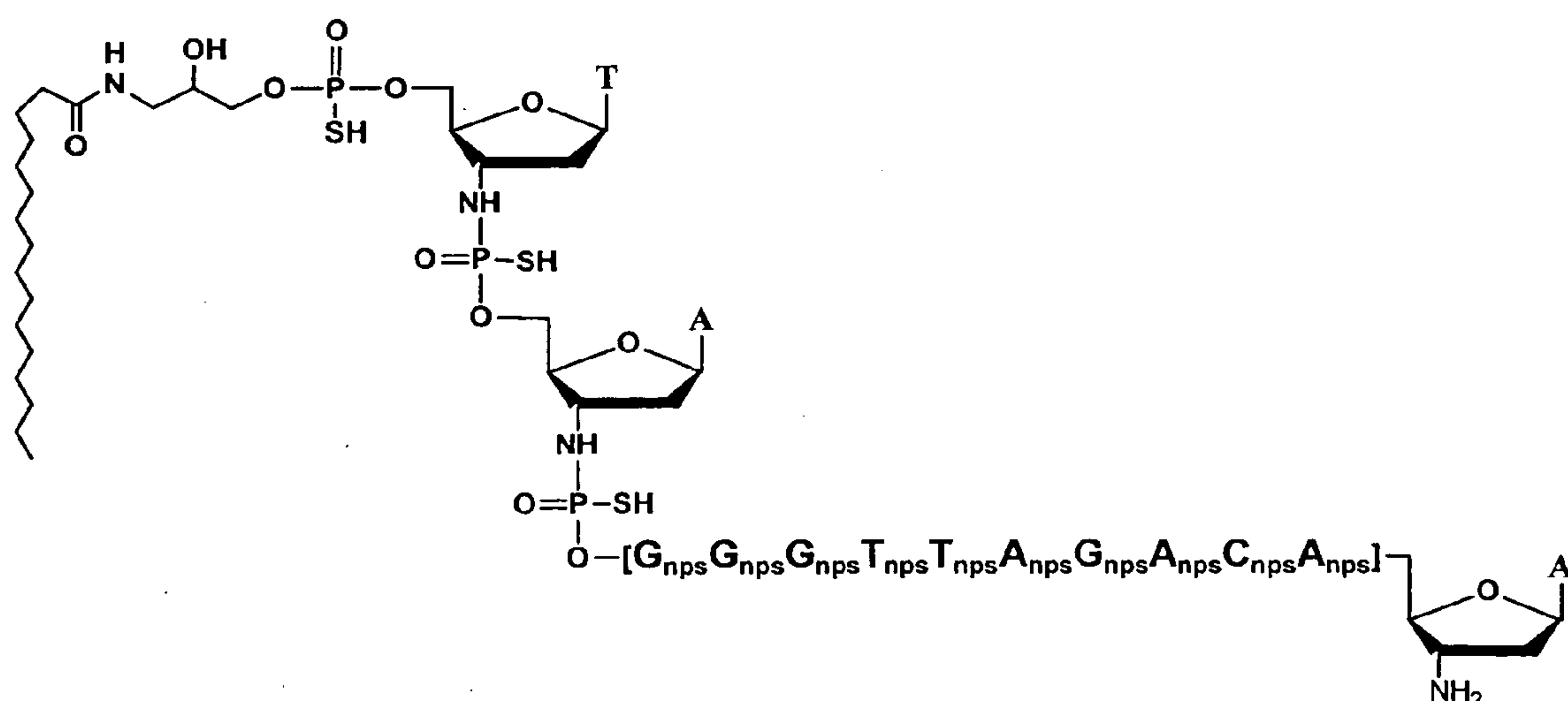
實施例

[0567] 本揭露內容提供一種組合物，其具有相對於化合物或其鹽，小於每 4 重量份 1 重量份之(N-1)產物，其中該化合物包括具有含 10 個或 10 個以上核苷次單元之序列之聚核苷酸，且至少兩個該等核苷次單元係藉由 N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。在組合物之一些實施例中，N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯為具有結構： $3'—NH—P(S)(OR)—O—5'$ 之 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯，其中 R 係選自由氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基及磷酸酯保護基組成之群；或其鹽。

[0568] 在組合物之一些實施例中，化合物包括具有含

10 個或 10 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元的序列之聚核苷酸。在組合物之一些實施例中，聚核苷酸包括含有 13 個或 13 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元的序列。在組合物之一些實施例中，聚核苷酸包括在 3 個與 50 個之間的與人類端粒酶之 RNA 組分互補之連續核苷次單元。在組合物之一些實施例中，與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元係皆藉由 N3'→P5' 磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。在組合物之一些實施例中，聚核苷酸包括選自由以下組成之群之序列：GTTAGGGTTAG(SEQ ID NO:4)、TAGGGTTAGACAA(SEQ ID NO:3)及 CAGTTAGGGTTAG(SEQ ID NO:5)。在組合物之一些實施例中，聚核苷酸包括 3' 胺基或 3'-羥基末端基團。

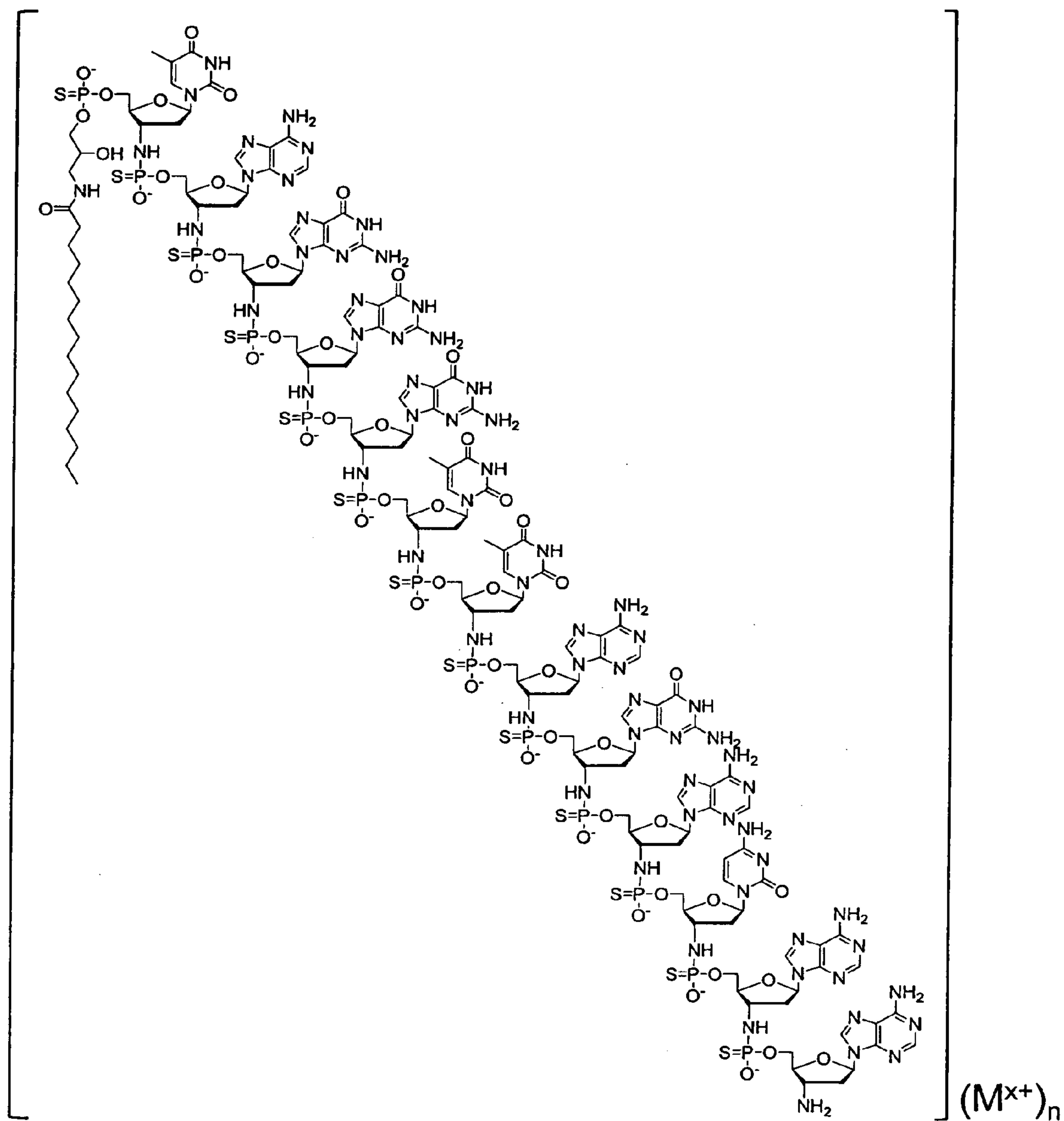
[0569] 在組合物之一些實施例中，化合物具有結構：



或其鹽；其中「nps」表示使一個核苷之 3'-碳連接於鄰近核苷之 5'-碳之硫代磷醯胺酯鍵聯—NH—P(=O)(SH)—

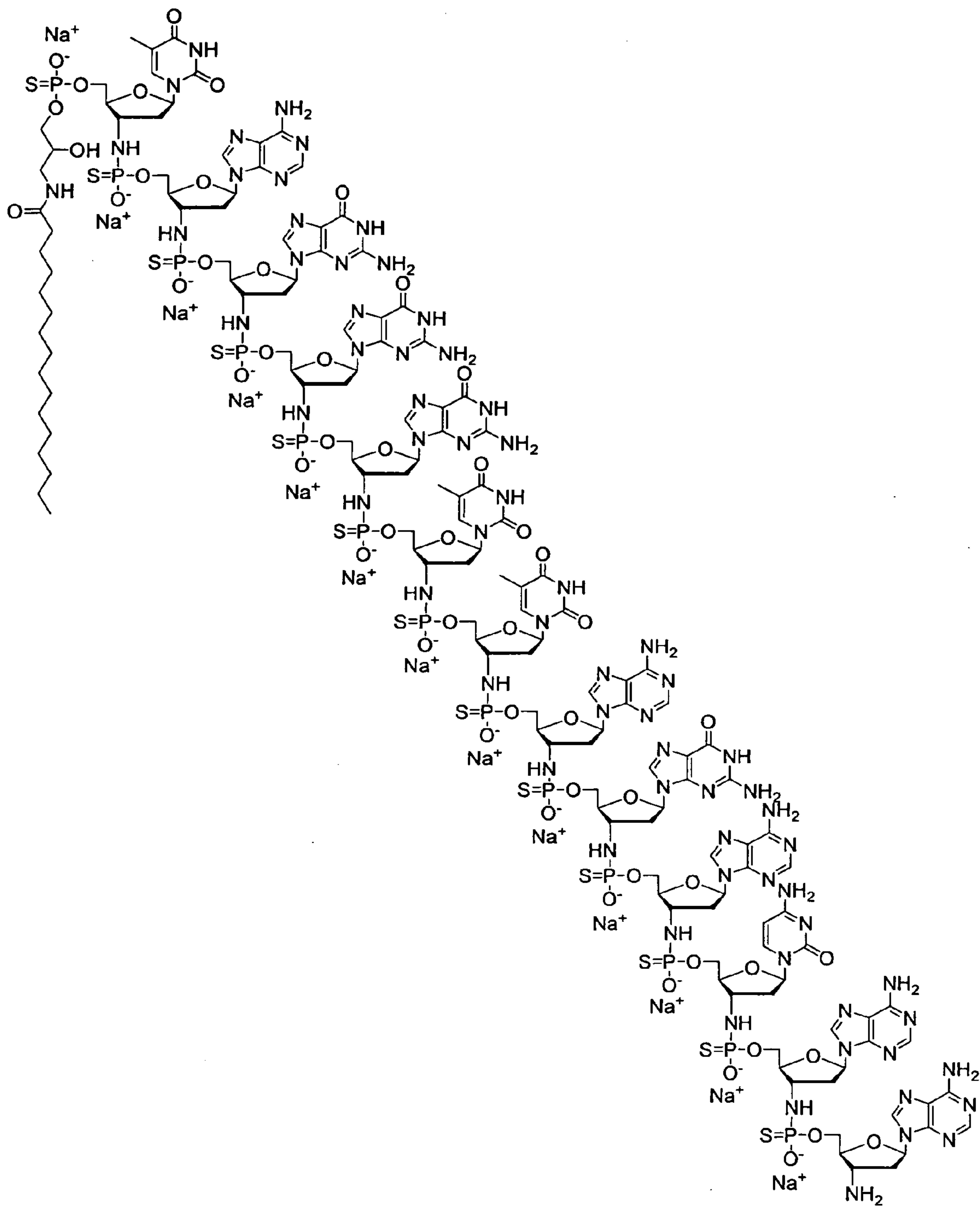
O—。在組合物之一些實施例中，鹽為醫藥學上可接受之鹽。

[0570] 在組合物之一些實施例中，化合物具有結構：



其中各 M^{x+} 獨立地為氫或鹽之相對離子，各 x 獨立地為 1、2 或 3，且 n 為整數 5 至 13。在某些情況下， M^{x+} 為氫。

[0571] 在組合物之一些實施例中，化合物具有結構：



[0572] 在一些實施例中，組合物具有相對於化合物，
小於每 6 重量份 1 重量份之 (N-1) 產物。在一些實施例
中，組合物具有相對於化合物，小於每 10 重量份 1 重量 5

份之(N-1)產物。在一些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於每 20 重量份 1 重量份之(N-1)產物。在一些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於每 4 重量份 1 重量份之任何(N-x)產物。在一些實施例中，組合物具有相對於化合物，小於每 100 重量份 40 總重量份之(N-x)含聚核苷酸產物。在一些實施例中，組合物具有(N-x)含聚核苷酸產物之以下概況：相對於產物，小於每 4 重量份 1 重量份之(N-1)產物；相對於化合物，至少每 100 重量份 10 重量份之(N-2)及(N-3)產物。

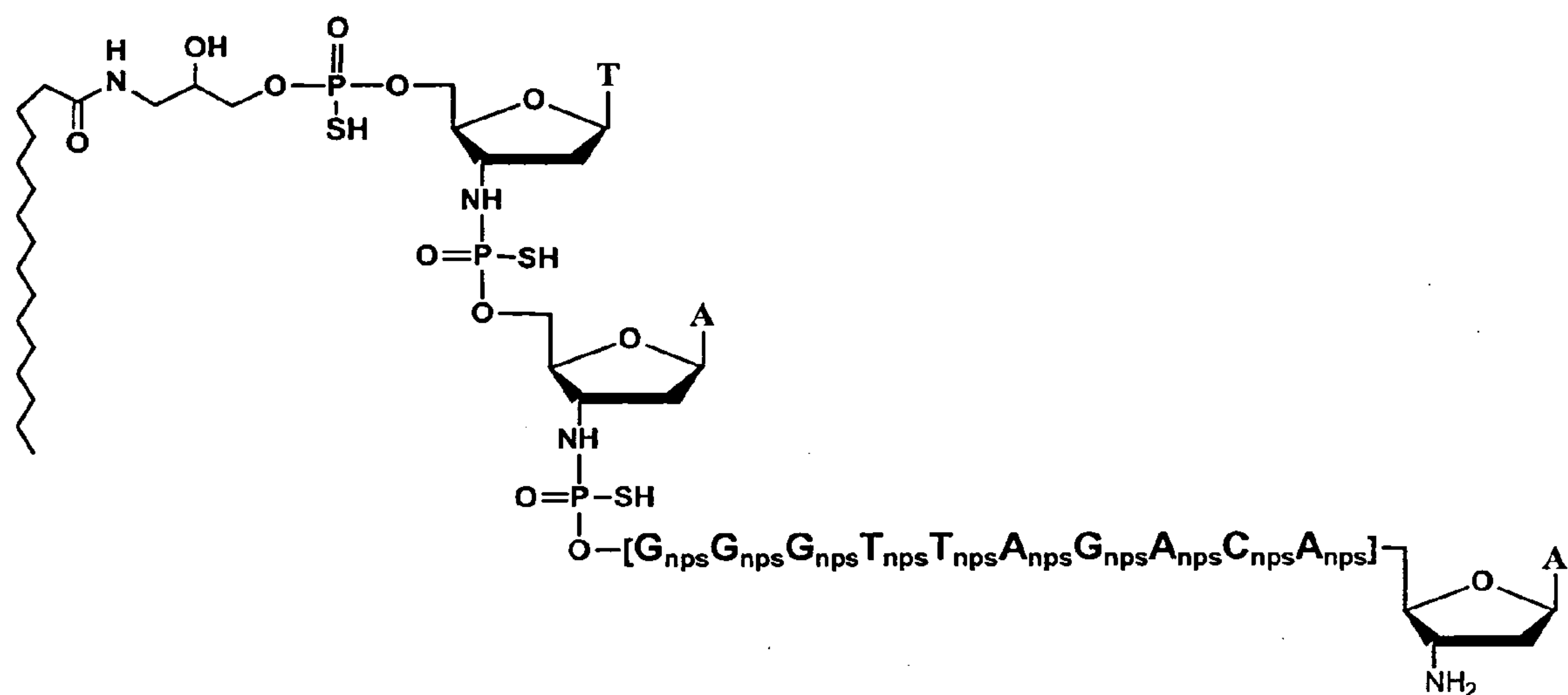
[0573] 本揭露內容提供一種小於 11 重量%之(N-1)產物之化合物活性醫藥成分，其中化合物或其醫藥學上可接受之鹽包括具有含 10 個或 10 個以上與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元之序列的聚核苷酸，其中至少兩個核苷次單元係藉由 N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。

[0574] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，與人類端粒酶之 RNA 組分互補之核苷次單元係皆藉由 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯為具有結構：3'—NH—P(S)(OR)—O—5'之硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯，其中 R 係選自由氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基及磷酸酯保護基組成之群；或其醫藥學上可接受之鹽。

[0575] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，聚核

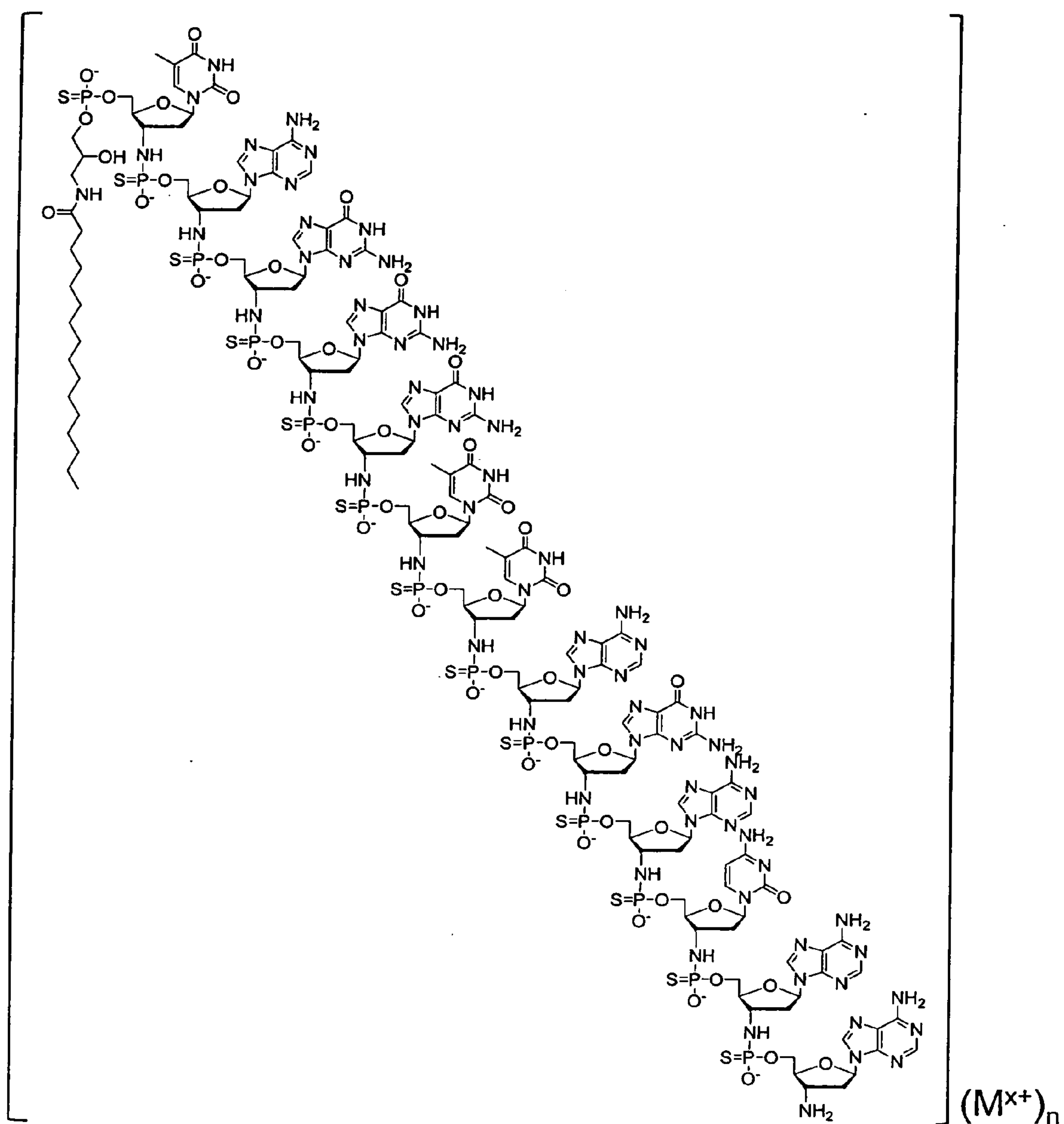
核苷酸包括在 10 個與 50 個之間的與人類端粒酶之 RNA 組分互補之連續核苷次單元。在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，聚核苷酸包括選自由以下組成之群之序列：GTTAGGGTTAG(SEQ ID NO:4)；TAGGGTTAGACAA(SEQ ID NO:3)；及 CAGTTAGGGTTAG(SEQ ID NO:5)。在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，聚核苷酸包括 3' 胺基或 3'-羥基末端基團。

[0576] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，化合物具有結構：



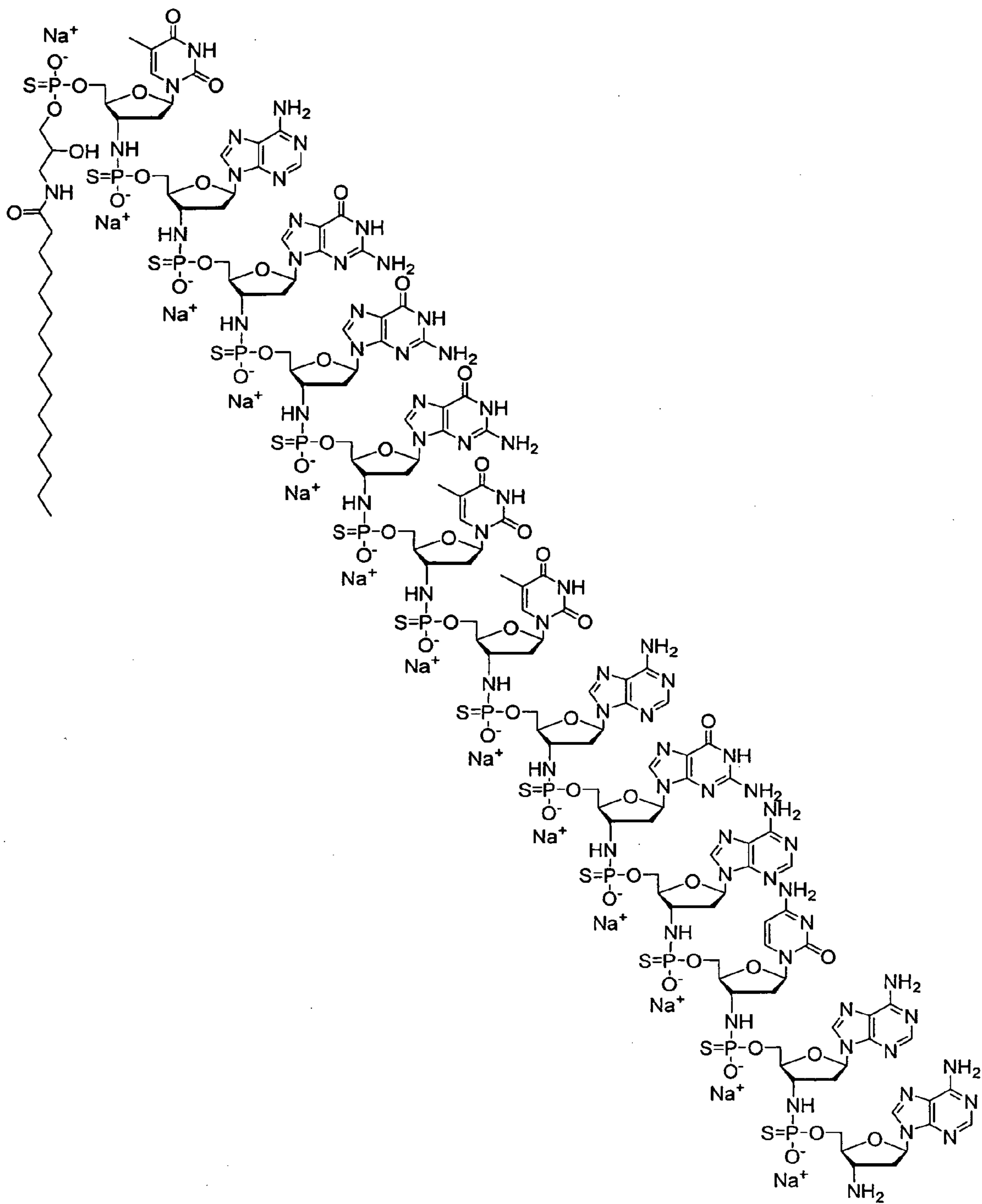
或其醫藥學上可接受之鹽；其中「nps」表示使一個核苷之 3'-碳連接於鄰近核苷之 5'-碳之硫代磷醯胺酯鍵聯—NH—P(=O)(SH)—O—。

[0577] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，化合物具有結構：



其中各 M^{x+} 獨立地為氫或醫藥學上可接受之鹽之相對離子，各 x 獨立地為 1、2 或 3，且 n 為整數 5 至 13。在某些情況下， M^{x+} 為氫。

[0578] 在化合物活性醫藥成分之一些實施例中，化合物具有結構：



[0579] 在一些實施例中，化合物活性醫藥成分具有小於 9 重量%之(N-1)產物。在一些實施例中，化合物活性醫藥成分具有小於 5 重量%之(N-1)產物。在一些實施例中，化合物活性醫藥成分具有小於 11%之任何(N-x)產物。在

5

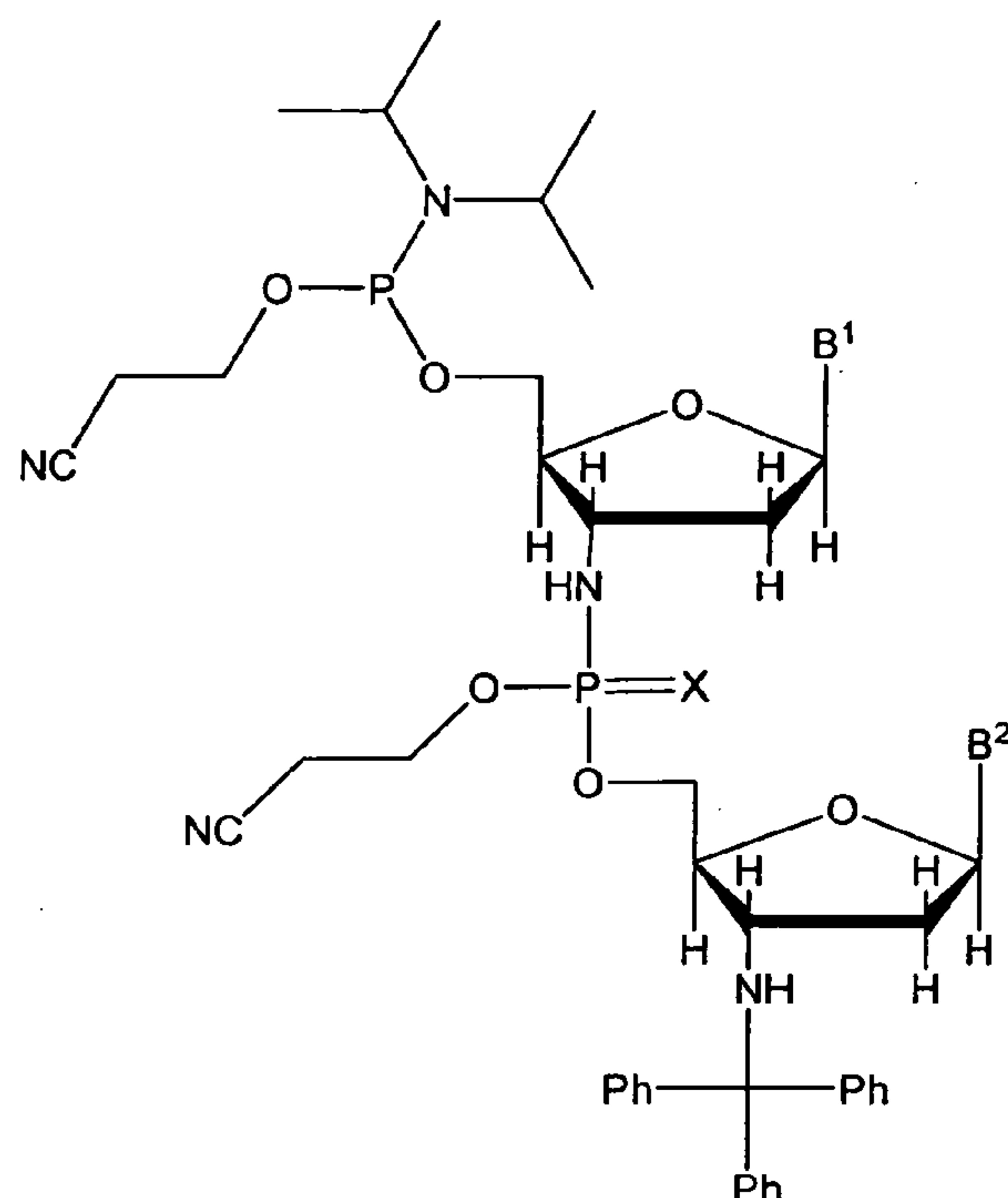
一些實施例中，化合物活性醫藥成分具有小於 45 總重量 % 之 (N-x) 含聚核苷酸產物。在一些實施例中，化合物活性醫藥成分具有 (N-x) 含聚核苷酸產物之以下概況：小於 5 重量 % 之 (N-1) 產物；以及至少 10 重量 % 之 (N-2) 及 (N-3) 產物。

[0580] 亦提供一種醫藥組合物，其包括於醫藥學上可接受之賦形劑中調配之組合物(例如本文所述之任一實施例之組合物)。亦提供一種醫藥組合物，其包括於醫藥學上可接受之賦形劑中調配之化合物活性醫藥成分(例如本文所述之任一實施例之化合物活性醫藥成分)。

[0581] 本揭露內容提供一種合成聚核苷酸之方法。在一些實施例中，方法包括以下步驟：(a) 將連接於固相支撐物之末端核苷之經保護 3' 胺基脫保護，該脫保護形成游離 3' 胺基；(b) 使該游離 3' 胺基與 3'-經保護胺基-二核苷酸磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺二聚物在親核催化劑存在下接觸以形成核苷間 N3'→P5' 亞磷醯胺鍵聯；以及(c) 使該鍵聯氧化。

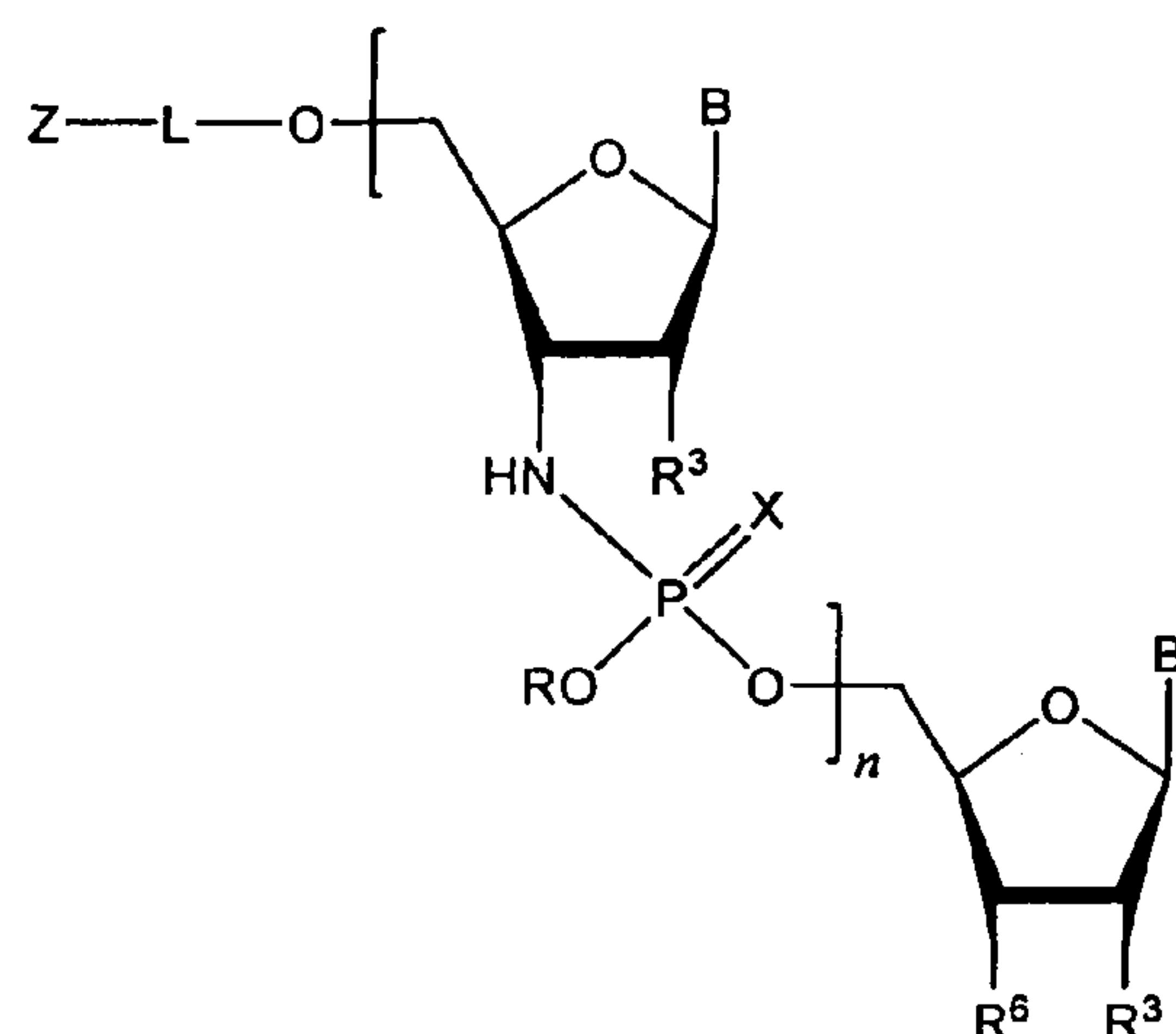
[0582] 在一些實施例中，方法還包括：(a) 將連接於固相支撐物之末端核苷之經保護 3' 胺基脫保護，該脫保護形成游離 3' 胺基；(b) 使該游離 3' 胺基與 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺單體在親核催化劑存在下接觸以形成核苷間 N3'→P5' 亞磷醯胺鍵聯；以及(c) 使該鍵聯氧化。在方法之一些實施例中，使鍵聯氧化包括硫化以產生硫代磷醯胺酯鍵聯。在方法之一些實施例中，使鍵聯氧化產生側氧基磷醯胺酯鍵聯。

[0583] 在方法之一些實施例中，3'-經保護胺基-二核苷酸磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺二聚物具有式：



其中 X 為 O 或 S，且 B¹ 及 B² 各自獨立地為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶或其類似物。在方法之一些實施例中，B¹ 及 B² 係各自獨立地選自經保護腺嘌呤、經保護胞嘧啶、經保護鳥嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶。在方法之一些實施例中，B¹ 及 B² 係各自獨立地選自 A(Bz)、A(DMF)、C(Bz)、G(異丁醯基)、T 及 U。在方法之一些實施例中，X 為 S。

[0584] 在方法之一些實施例中，聚核苷酸具有式：



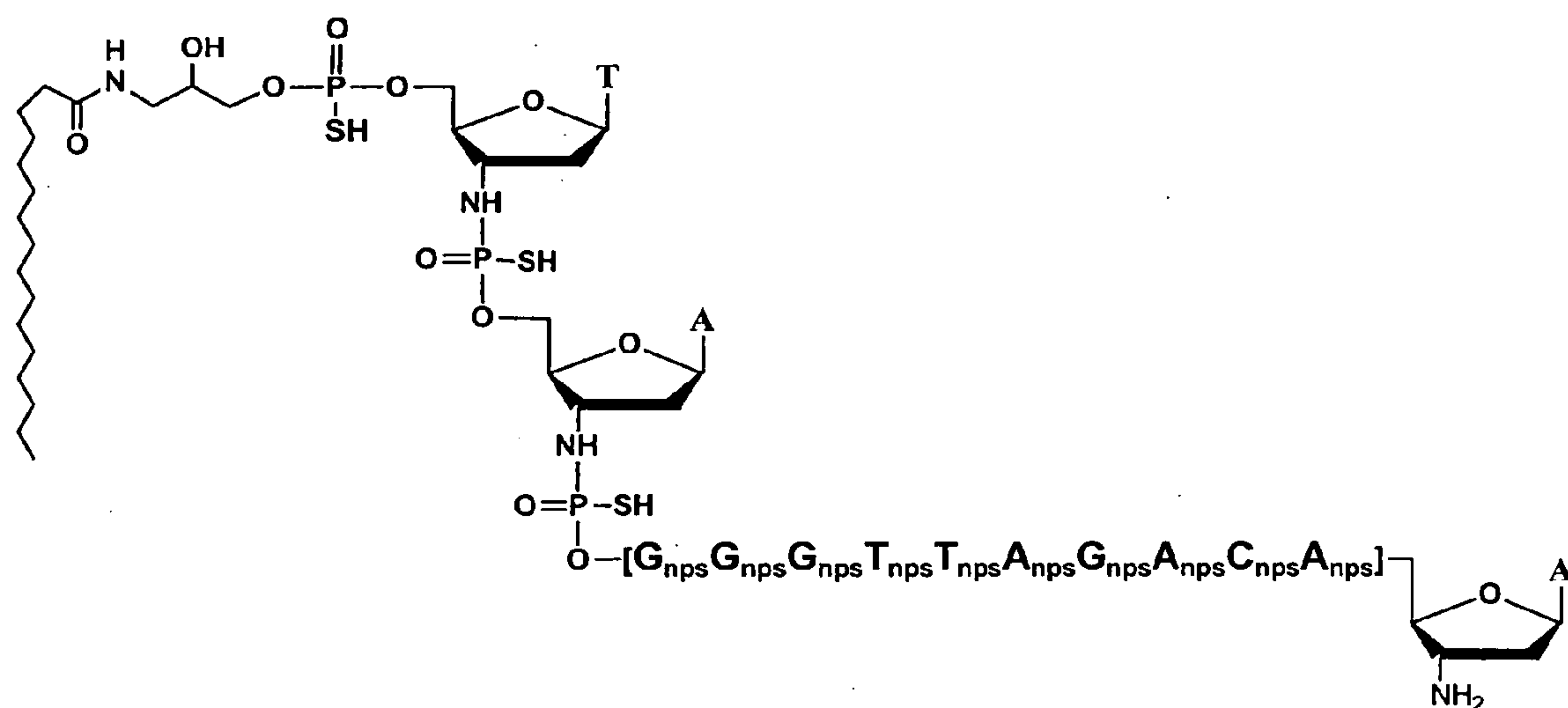
其中：各 B 獨立地為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶或其類似物；各 X 獨立地為氧或硫；各 R³ 為氫、氟基或羥基、烷氧基、經取代烷氧基或經保護羥基；L 為視情況選用之連接子；Z 為 H、脂質、支撐物、載體、寡核苷酸、PEG、多肽、可偵測標記或標籤；R⁶ 為胺基、羥基、經保護胺基、經保護羥基、-O-L-Z 或 -NH-L-Z；R 為氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基及磷酸酯保護基；且 n 為整數 1 至 1000；或其鹽；且方法包含以下步驟：(a)將連接於固相支撐物之末端核苷之經保護 3'胺基脫保護，該脫保護形成游離 3'胺基；(b)使該游離 3'胺基與 3'-經保護胺基-二核苷酸磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺二聚物；或

(ii)3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺單體；在親核催化劑存在下反應以形成核苷間 N3'→P5'亞磷醯胺鍵聯；(c)使該鍵聯氧化；以及(d)重複步驟(a)至(c)直至合成該聚核苷酸，其中重複步驟(a)至(c)包括進行步驟(b)(i)至少一次。

[0585] 在方法之一些實施例中，使鍵聯氧化包含硫化

以產生硫代磷醯胺酯鍵聯。在方法之一些實施例中，使鍵聯氧化產生側氧基磷醯胺酯鍵聯。在方法之一些實施例中，聚核苷酸包含具有與互補人類端粒酶之 RNA 組分之核苷次單元的序列，且其中至少兩個核苷次單元係藉由 N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。在方法之一些實施例中，N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯為具有結構：3'—NH—P(S)(OR)—O—5'之 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯，其中 R 係選自由氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基及磷酸酯保護基組成之群；或其鹽。

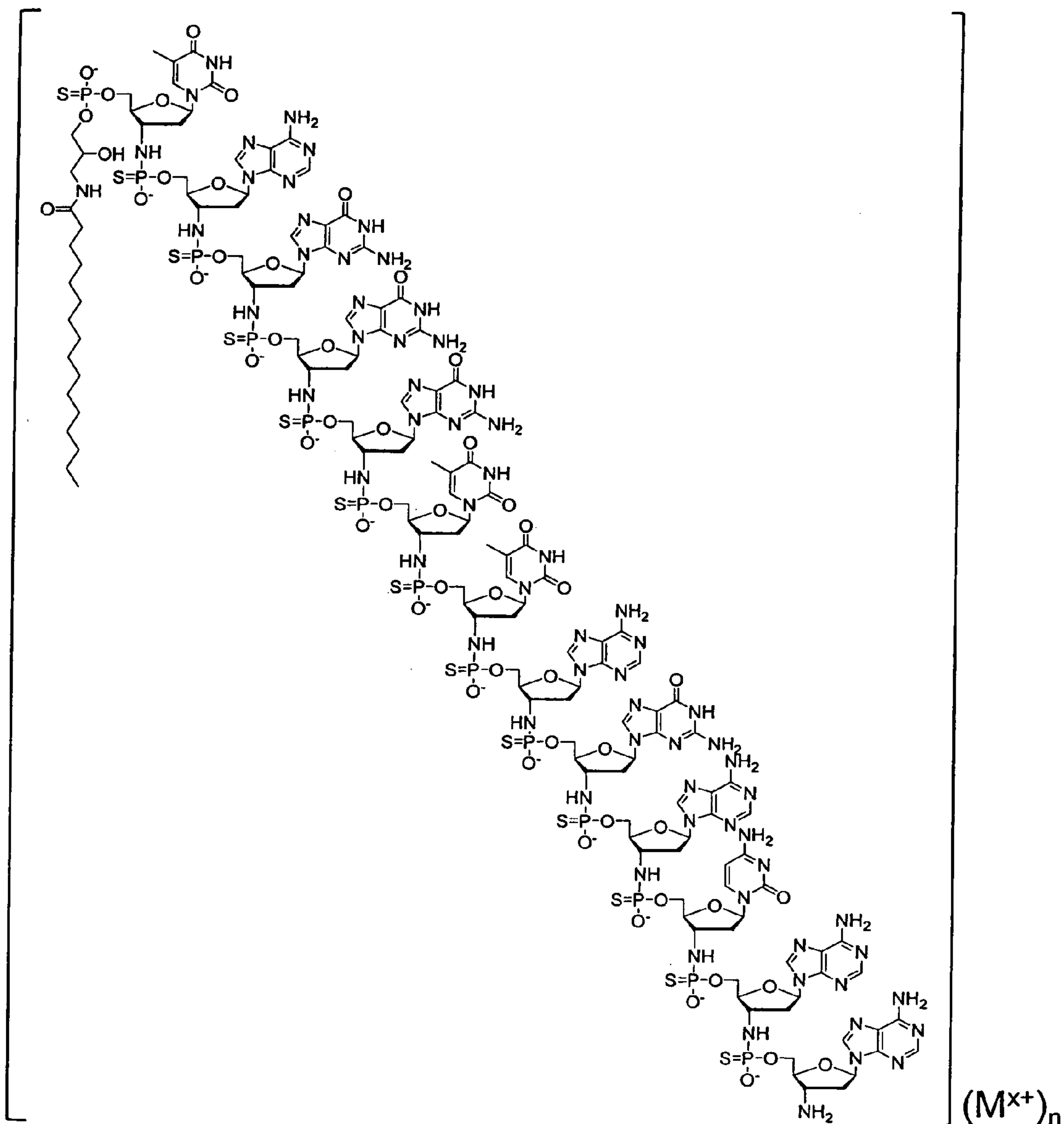
[0586] 在方法之一些實施例中，聚核苷酸包括序列 TAGGGTTAGACAA。在方法之一些實施例中，TAGGGTTAGACAA 序列之所有核苷酸間次單元間鍵聯皆為 N3'→P5'磷醯胺酯次單元間鍵聯。在方法之一些實施例中，聚核苷酸具有結構：



或其鹽；其中「nps」表示使一個核苷之 3'-碳連接於鄰近核苷之 5'-碳之硫代磷醯胺酯鍵聯—NH—P(=O)(SH)—

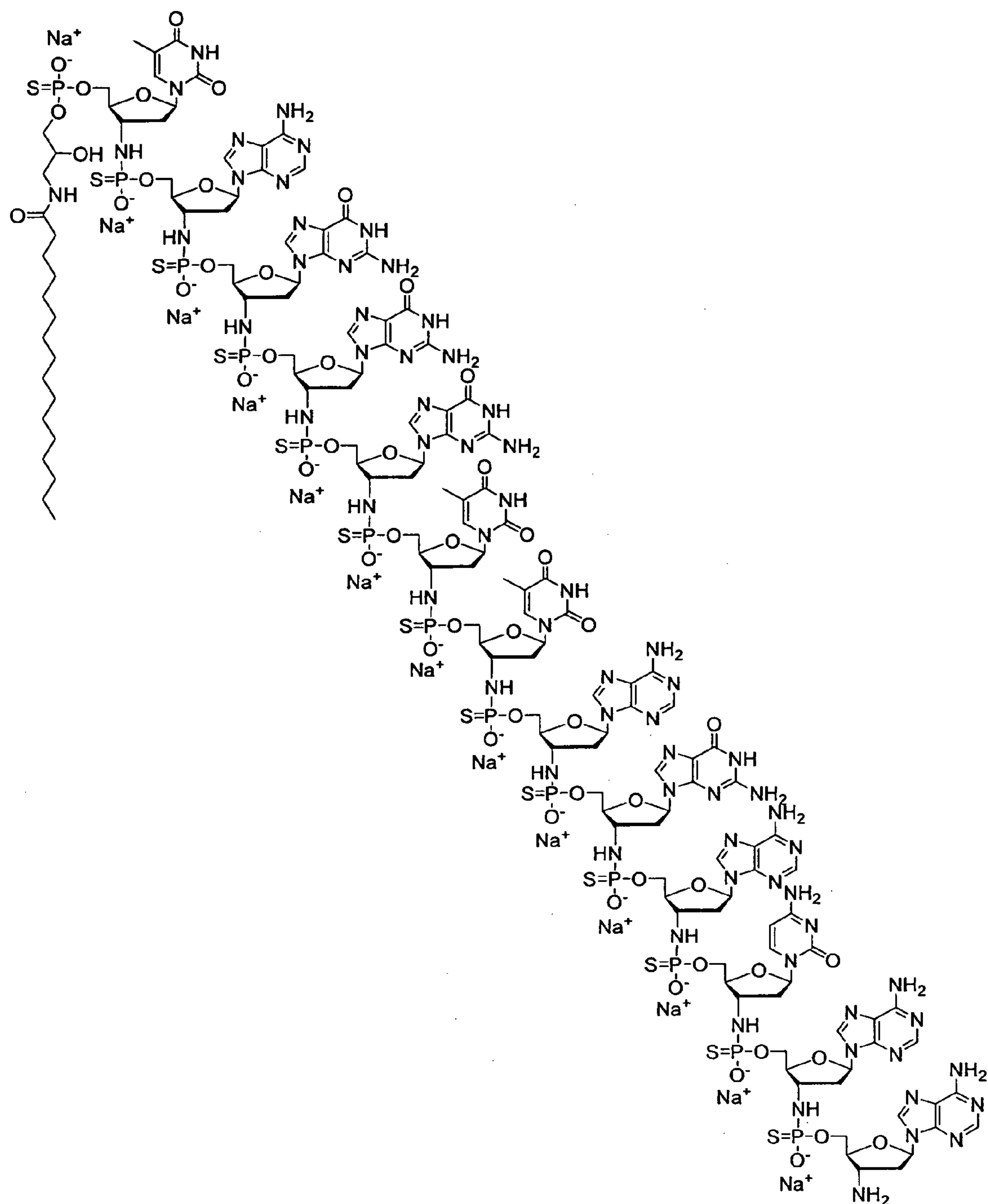
O—。

[0587] 在方法之一些實施例中，聚核苷酸具有結構：



其中各 M^{x+} 獨立地為氫或醫藥學上可接受之鹽之相對離子，各 x 獨立地為 1、2 或 3，且 n 為整數 5 至 13。在某些情況下， M^{x+} 為氫。

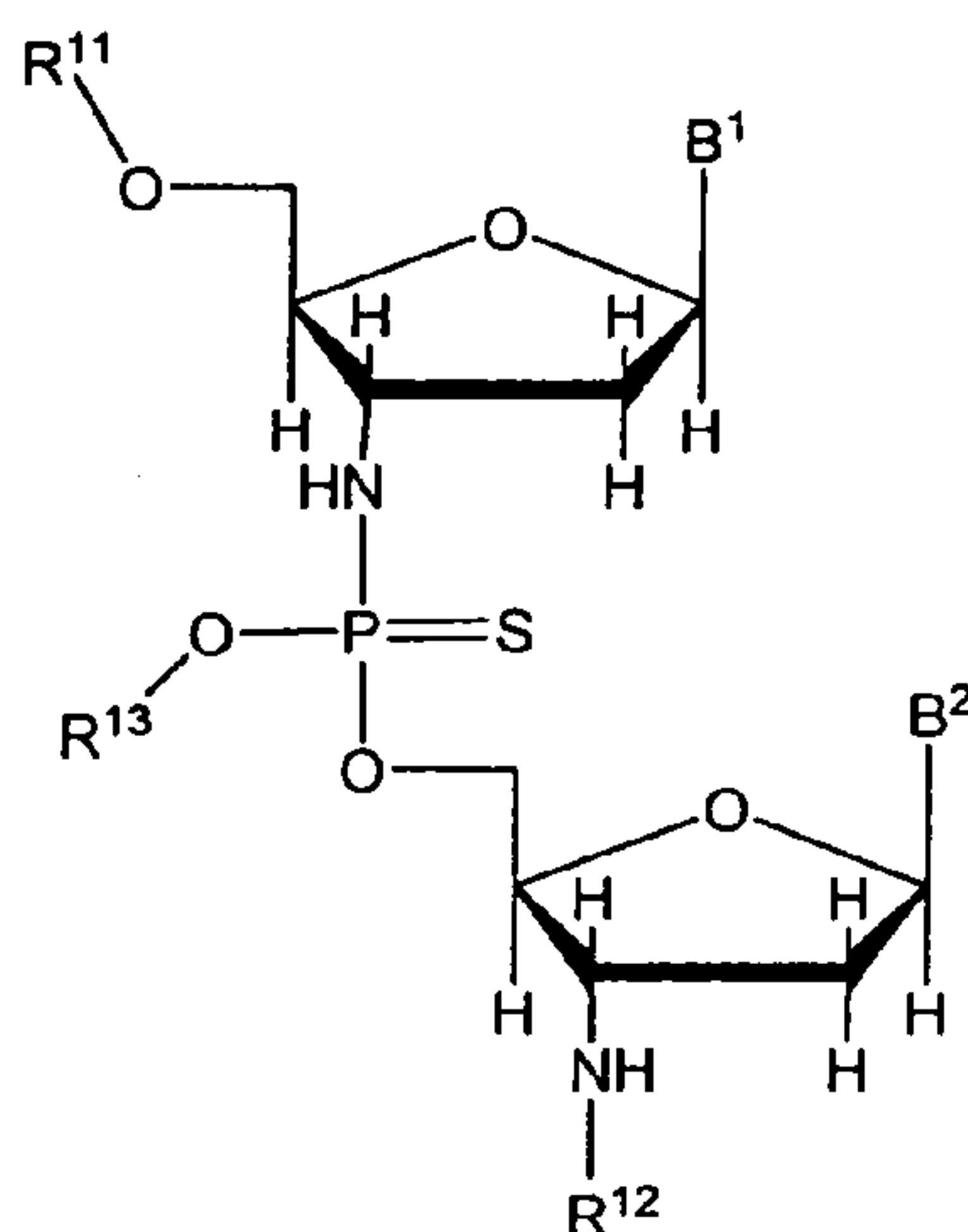
[0588] 在方法之一些實施例中，聚核苷酸具有結構：



5

GG、GT、TA、GA 和 AA 以及 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺單體 C 連續偶合於固相支撐物。在方法之一些實施例中，3'-經保護胺基-二核苷酸亞磷醯胺-5'-亞磷醯胺二聚物係藉由式 X^1X^2 所述，其中 X^1 及 X^2 係獨立地選自經保護腺嘌呤、經保護胞嘧啶、經保護鳥嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶。在方法之一些實施例中，3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺二聚物係選自經保護腺嘌呤、經保護胞嘧啶、經保護鳥嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶。

[0590] 本揭露內容提供一種藉由式(II)所述之二核苷酸硫代磷醯胺酯化合物：



式(II)

其中： B^1 及 B^2 各自獨立地為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶或其類似物； R^{11} 為氫、保護基或亞磷醯胺基團；且 R^{12} 及 R^{13} 各自獨立地為氫或保護基；或其鹽。

[0591] 在化合物之一些實施例中， B^1 及 B^2 係各自獨立地選自經保護腺嘌呤、經保護胞嘧啶、經保護鳥嘌呤、

胸腺嘧啶及尿嘧啶。在化合物之一些實施例中， B^1 及 B^2 係各自獨立地選自 $A(Bz)$ 、 $A(DMF)$ 、 $C(Bz)$ 、 G (異丁醯基)、 T 及 U 。在化合物之一些實施例中， R^{11} 為 5'-亞磷醯胺； R^{12} 為保護基，且 R^{13} 為保護基。在化合物之一些實施例中， B^1 為 $A(Bz)$ 或 $A(DMF)$ ，且 B^2 為 $A(Bz)$ 或 $A(DMF)$ 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 $A(Bz)$ 或 $A(DMF)$ ，且 B^2 為 $C(Bz)$ 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 $A(Bz)$ 或 $A(DMF)$ ，且 B^2 為 G (異丁醯基)。在化合物之一些實施例中， B^1 為 $A(Bz)$ 或 $A(DMF)$ ，且 B^2 為 T 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 $A(Bz)$ 或 $A(DMF)$ ，且 B^2 為 U 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 $C(Bz)$ ，且 B^2 為 $A(Bz)$ 或 $A(DMF)$ 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 $C(Bz)$ ，且 B^2 為 $C(Bz)$ 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 $C(Bz)$ ，且 B^2 為 G (異丁醯基)。在化合物之一些實施例中， B^1 為 $C(Bz)$ ，且 B^2 為 T 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 $C(Bz)$ ，且 B^2 為 U 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 G (異丁醯基)，且 B^2 為 $A(Bz)$ 或 $A(DMF)$ 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 G (異丁醯基)，且 B^2 為 $C(Bz)$ 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 G (異丁醯基)，且 B^2 為 G (異丁醯基)。在化合物之一些實施例中， B^1 為 G (異丁醯基)，且 B^2 為 T 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 G (異丁醯基)，且 B^2 為 U 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 T 或 U ，且 B^2 為 $A(Bz)$ 或 $A(DMF)$ 。在化合物之一些實施例中， B^1 為 T 或 U ，且 B^2 為 $C(Bz)$ 。在化合物之一些實施

例中， B^1 為 T 或 U，且 B^2 為 G(異丁醯基)。在化合物之一些實施例中， B^1 為 T 或 U，且 B^2 為 T。在化合物之一些實施例中， B^1 為 T 或 U，且 B^2 為 U。

[0592] 以上指示之實施例之所有可能的組合皆視為納入本發明之範疇內。

序列表

<110>	傑龍公司 (Geron Corporation)	
<120>	寡核苷酸組合物及其製備方法	
<140>	TW 104113709	
<141>	2015-04-29	
<150>	US 61/987,396	
<151>	2014-05-01	
<150>	US 62/151,909	
<151>	2015-04-23	
<160>	19	
<170>	用於Windows之FastSEQ 4.0版	
<210>	1	
<211>	451	
<212>	RNA	
<213>	智人	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	1	
ggguugcgga	gggugggccu	gggaggggug
guggccauuu	uuugucuaac	ccuaacugag
60		
aagggcguag	gcgccgugcu	uuugcucccc
gcgcgcuguu	uuucucgcug	acuuucagcg
120		
ggcggaaaag	ccucggccug	ccgccuucca
ccguucauuc	uagagcaaac	aaaaaauguc
180		
agcugcuggc	ccguucgccc	cucccgggga
ccugcggcgg	gucgccugcc	cagcccccca
240		
accccgccug	gaggccgcgg	ucggccccggg
gcuucuccgg	aggcaccac	ugccaccgcg
300		
aagaguuggg	cucugucagc	cgcgggucuc
ucgggggcga	ggcgagguu	caggccuuuc
360		
aggccgcagg	aagagggaacg	gagcgagucc
ccgcgcgcgg	cgcgauuccc	ugagcugugg
420		
gacgugcacc	caggacucgg	cucacacaug
c		451
<210>	2	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	2	
cuaaccuaa	c	11
<210>	3	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	3	
tagggttaga	caa	13
<210>	4	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	4	
gtagggtta	g	11
<210>	5	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 5 cagttagggg tag	13
<210> 6 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 6 gctctagaat gaacgggtgga aggcgggcagg	30
<210> 7 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 7 gtggaaggcg gcagg	15
<210> 8 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 8 ggaaggcggc agg	13
<210> 9 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 9 gtggaaggcg gca	13
<210> 10 <211> 11 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 10 gtggaaggcg g	11
<210> 11 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 11 cgggtggaagg cgg	13
<210> 12 <211> 13	

<212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 12 acggtggaag gcg	13
<210> 13 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 13 aacggtggaa ggcggc	16
<210> 14 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 14 atgaacggtg gaaggcgg	18
<210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 15 acattttttg tttgctctag	20
<210> 16 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 16 gttagggtta gac	13
<210> 17 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 17 gttagggtta gacaa	15
<210> 18 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成聚核苷酸	
<400> 18 cccttctcag tt	12

<210> 19
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 19
cgcccttctc ag

12

申請專利範圍

1. 一種合成聚核苷酸之方法，該聚核苷酸具有至少兩個藉由 $N3' \rightarrow P5'$ 側氧基磷醯胺酯次單元間鍵聯或 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯接合之核苷次單元，該方法包括以下步驟：

(a) 使連接於固相支撐物之末端經保護 3'胺基核苷之經保護 3'胺基脫保護，該脫保護形成游離 3'胺基；

(b) 使該游離 3'胺基與 3'-經保護胺基-二核苷酸磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物在親核催化劑存在下接觸以形成核苷間 $N3' \rightarrow P5'$ 亞磷醯胺酯鍵聯；以及

(c) 使該鍵聯氧化以產生 $N3' \rightarrow P5'$ 側氧基磷醯胺酯次單元間鍵聯或 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其進一步包括：

(a) 使連接於固相支撐物之末端經保護 3'胺基核苷之經保護 3'胺基脫保護，該脫保護形成游離 3'胺基；

(b) 使該游離 3'胺基與 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯單體在親核催化劑存在下接觸以形成核苷間 $N3' \rightarrow P5'$ 亞磷醯胺酯鍵聯；以及

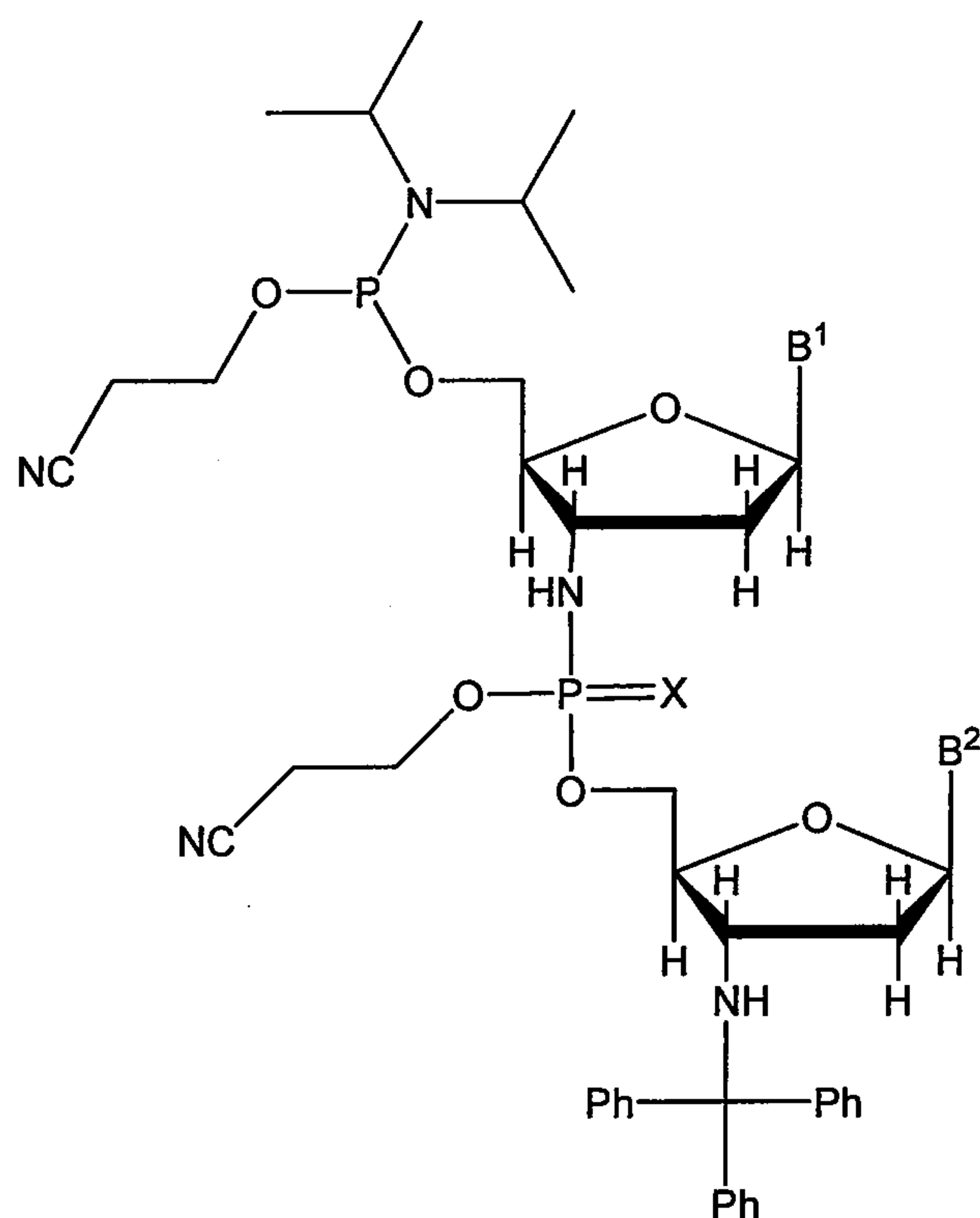
(c) 使該鍵聯氧化。

3. 如申請專利範圍第 1 項及第 2 項中任一項之方法，其中使該鍵聯氧化包括硫化以產生 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代磷醯胺酯鍵聯。

4. 如申請專利範圍第 1 項及第 2 項中任一項之方法，其中使該鍵聯氧化產生 $N3' \rightarrow P5'$ 側氧基磷醯胺酯鍵

聯。

5. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 3'-經保護胺基-二核苷酸磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物具有式：



其中 X 為 O 或 S，且 B¹ 及 B² 各自獨立地為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶。

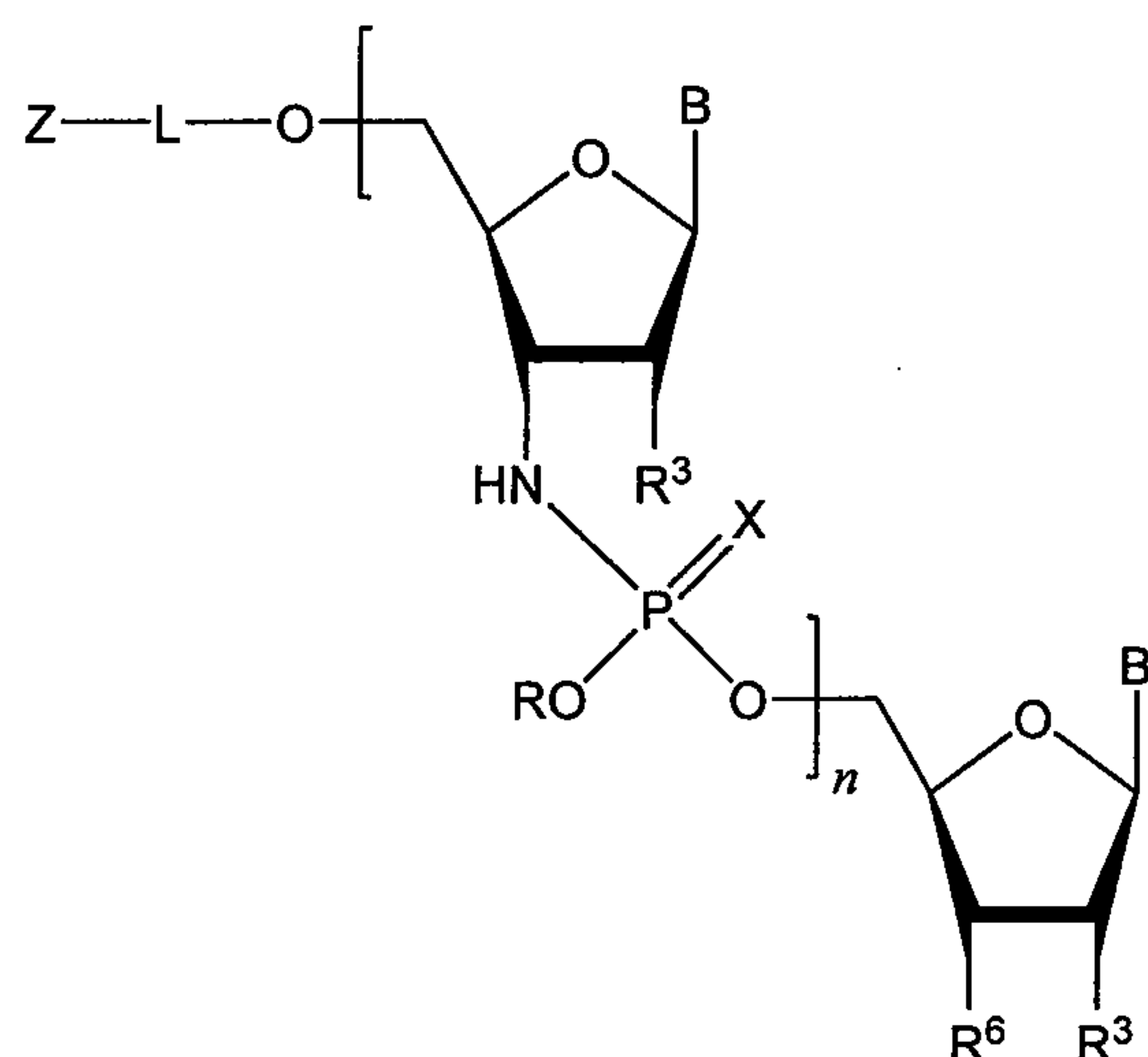
6. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該 B¹ 及 B² 係各自獨立地選自經保護腺嘌呤、經保護胞嘧啶、經保護鳥嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶。

7. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該 B¹ 及 B² 係各自獨立地選自 A(Bz)、A(DMF)、C(Bz)、G(異丁醯基)、T 及 U。

8. 如申請專利範圍第 5 項至第 7 項中任一項之方法，其中 X 為 S。

9. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該聚核苷酸

具有式：



其中：

各 B 獨立地為嘌呤、經保護嘌呤、嘧啶或經保護嘧啶；

各 X 獨立地為氧或硫；

各 R³ 為氫、氟基、或羥基、烷氧基、經取代烷氧基或經保護羥基；

L 為視情況選用之連接子；

Z 為 H、脂質、支撐物、載體、寡核苷酸、PEG、多肽、可偵測標記或標籤；

R⁶ 為胺基、羥基、經保護胺基、經保護羥基、-O-L-Z 或 -NH-L-Z；

R 為氫、烷基、經取代烷基、芳基、經取代芳基或磷酸酯保護基；且

n 為整數 1 至 1000；或其鹽；

且該方法包括以下步驟：

(a) 使連接於固相支撐物之末端核苷之經保護 3'胺基

脫保護，該脫保護形成游離 3'胺基；

(b) 使該游離 3'胺基與：

(i) 3'-經保護胺基-二核苷酸磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物；或

(ii) 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯單體；

在親核催化劑存在下反應以形成核苷間 N3'→P5'亞磷醯胺酯鍵聯；

(c) 使該鍵聯氧化；以及

(d) 重複步驟(a)至(c)直至合成該聚核苷酸，其中重複步驟(a)至(c)包括進行步驟(b)(i)至少一次。

10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中使該鍵聯氧化包括硫化以產生 N3'→P5'硫代磷醯胺酯鍵聯。

11. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中使該鍵聯氧化產生 N3'→P5'側氧基磷醯胺酯鍵聯。

12. 如申請專利範圍第 9 項至第 11 項中任一項之方法，其中該聚核苷酸包含核苷次單元的序列，且其中至少兩個該等核苷次單元係藉由 N3'→P5'側氧基磷醯胺酯次單元間鍵聯或 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯接合。

13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該 N3'→P5'側氧基磷醯胺酯次單元間鍵聯或 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯為具有以下結構之 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯：



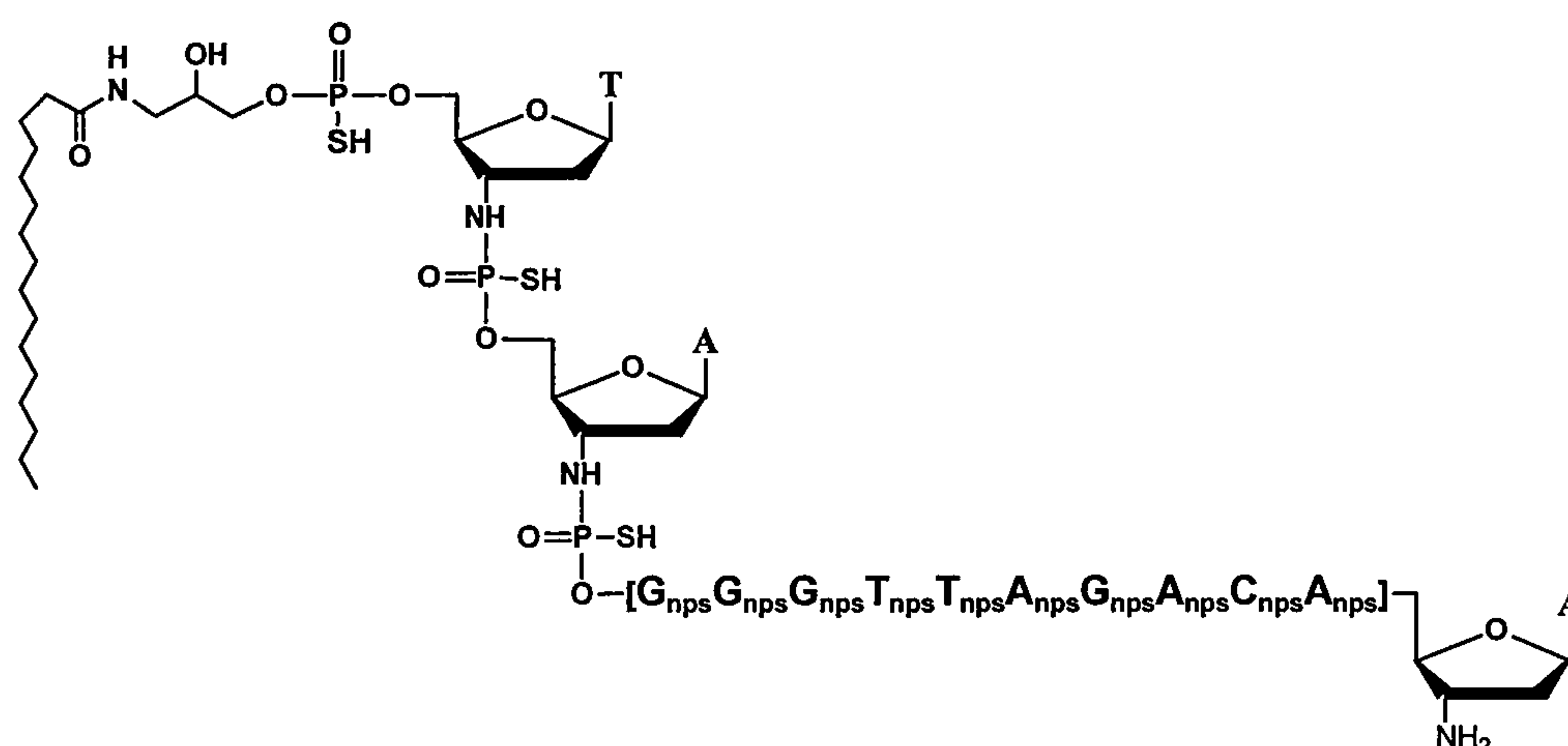
其中 R 係選自由以下組成之群：氫、烷基、經取代烷

基、芳基、經取代芳基及磷酸酯保護基；或其鹽。

14. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該聚核苷酸包含序列 TAGGGTTAGACAA。

15. 如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該 TAGGGTTAGACAA 序列之所有該等核苷酸間次單元間鍵聯皆為 N3'→P5'側氧基磷醯胺酯次單元間鍵聯或 N3'→P5'硫代磷醯胺酯次單元間鍵聯。

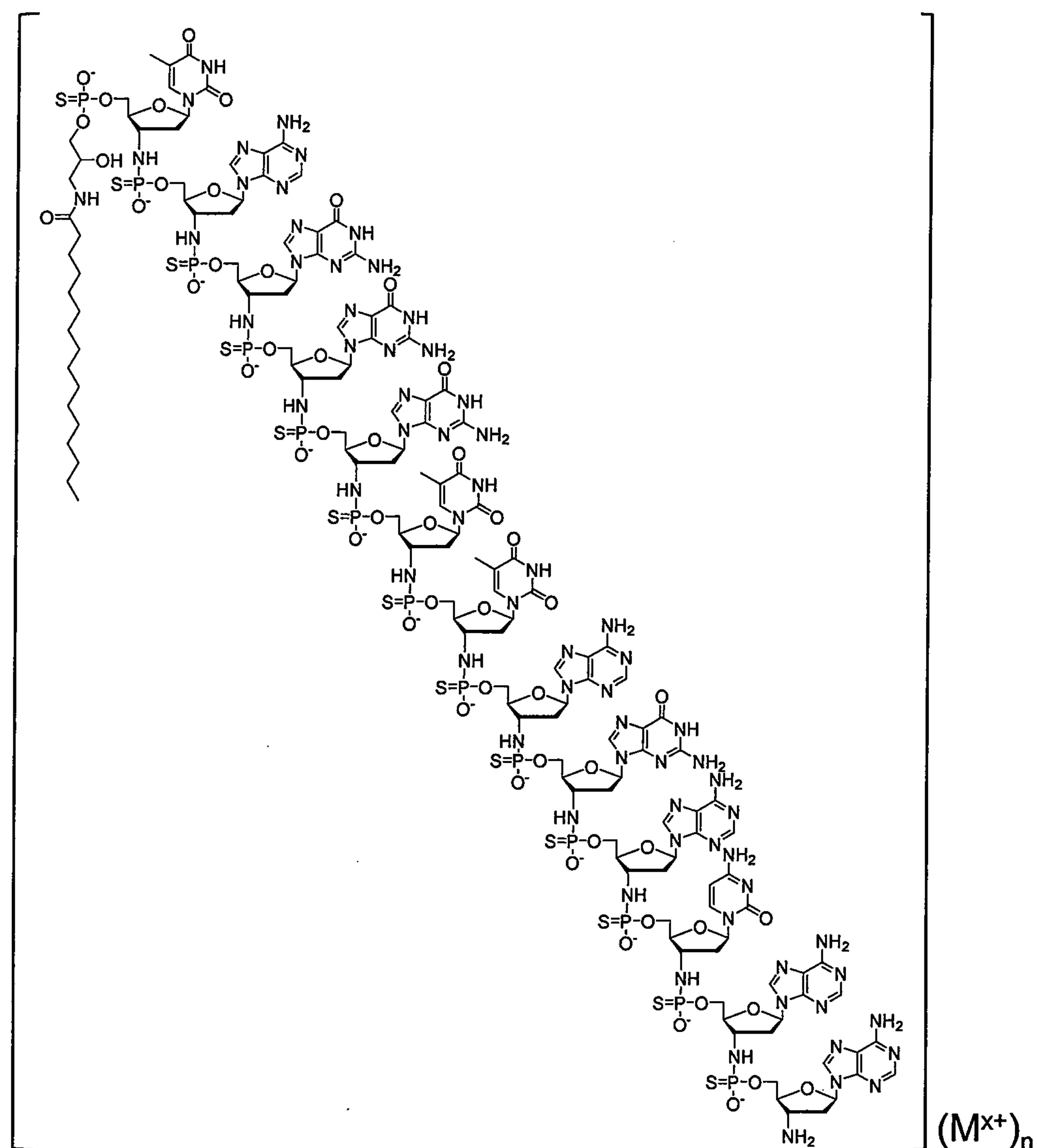
16. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該聚核苷酸具有結構：



或其鹽；

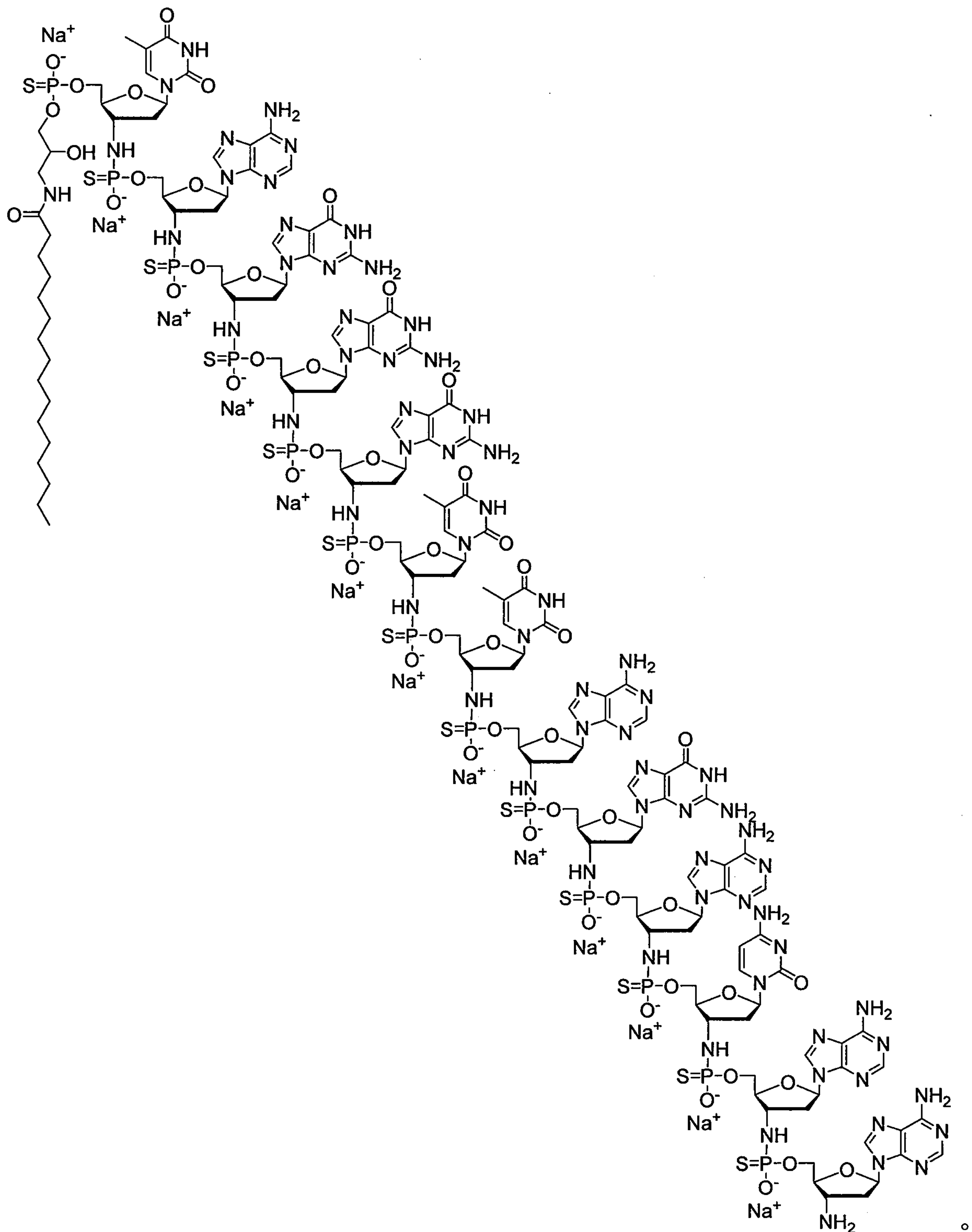
其中「nps」表示使一個核苷之 3'-碳連接於鄰近核苷之 5'-碳之硫代磷醯胺酯鍵聯—NH—P(=O)(SH)—O—。

17. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該聚核苷酸具有結構：



其中各 M^{x+} 獨立地為氫或醫藥學上可接受之鹽之相對離子， M^{x+} 之各 x 獨立地為 1、2 或 3，且 n 為整數 5 至 13。

18. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該聚核苷酸具有結構：



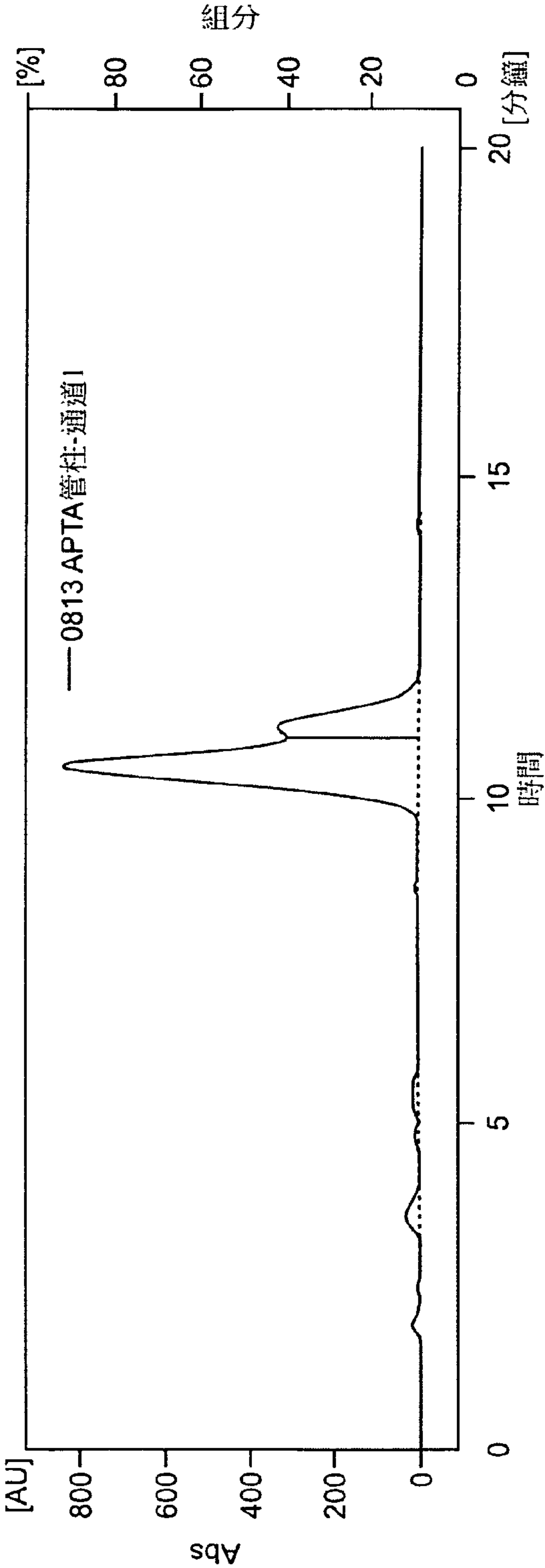
19. 如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該 TAGGGTTAGACAA 序列之 C11 核苷酸殘基來源於 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯單體。

20. 如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該方法包

括使以下 3'-經保護胺基-二核苷酸硫代磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物 TA、GG、GT、TA、GA 及 AA 以及 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯單體 C 連續偶合於該固相支撐物。

21. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 3'-經保護胺基-二核苷酸亞磷醯胺酯-5'-亞磷醯胺酯二聚物係藉由式 X^1X^2 所描述，其中 X^1 及 X^2 係獨立地選自經保護腺嘌呤、經保護胞嘧啶、經保護鳥嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶。

22. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 3'-經保護胺基核苷-5'-亞磷醯胺酯二聚物係選自經保護腺嘌呤、經保護胞嘧啶、經保護鳥嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶。



圖式

結果表 (Uncal - 0813 APTA 管柱-通道 I)

	滯留時間 [分鐘]	面積 [mV.s]	高度 [mV]	面積 [%]
1	3.557	926.835	32.478	2.2
2	4.853	248.330	7.706	0.6
3	5.427	430.800	12.110	1.0
4	8.593	12.505	0.485	0.0
5	10.503	30344.332	839.556	73.4
6	11.120	9320.006	331.485	22.6
7	14.610	41.645	1.230	0.1
	總計	41324.453	1225.050	100.0

圖 1A

522-961-891
脈衝序列：s2pul

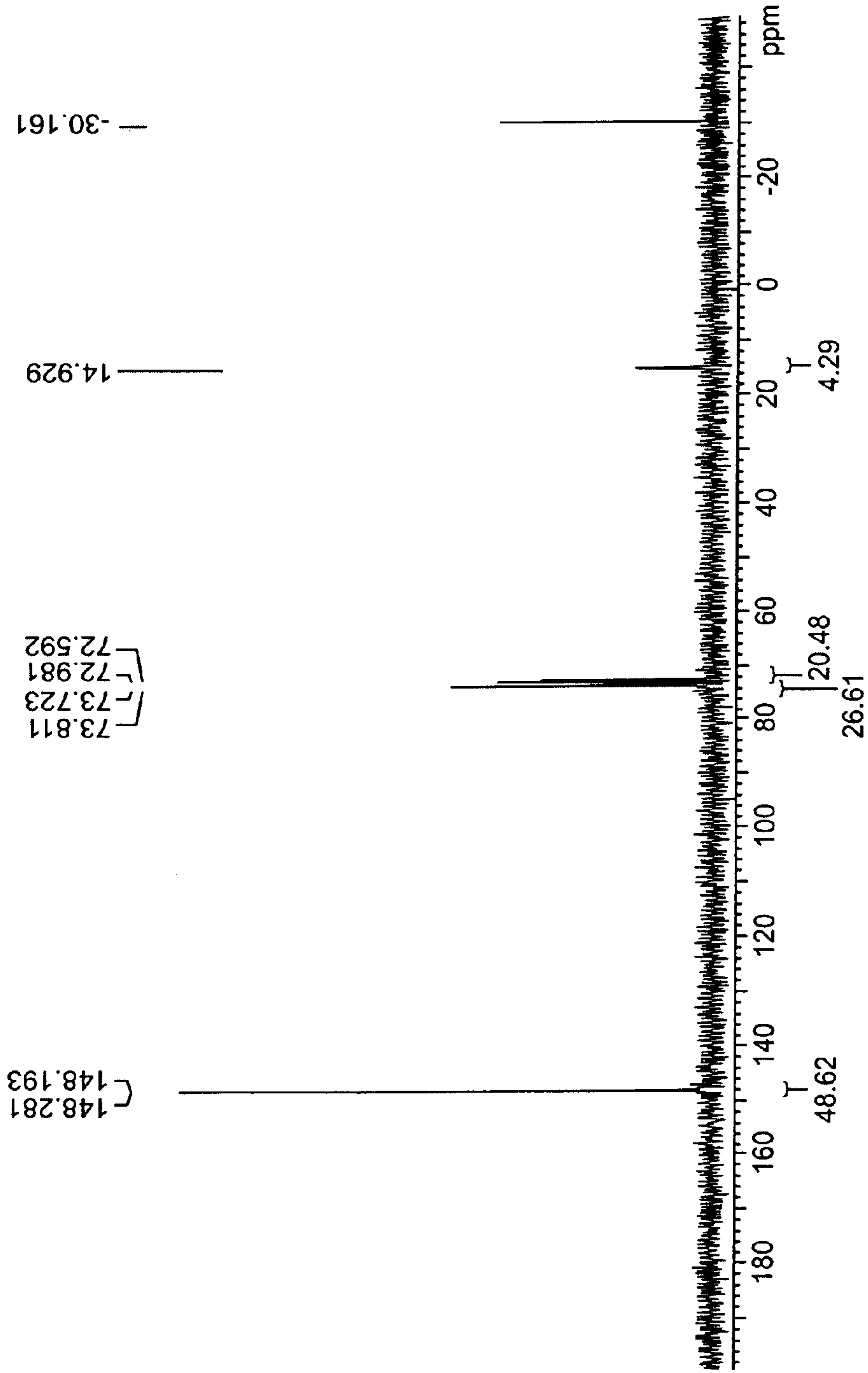
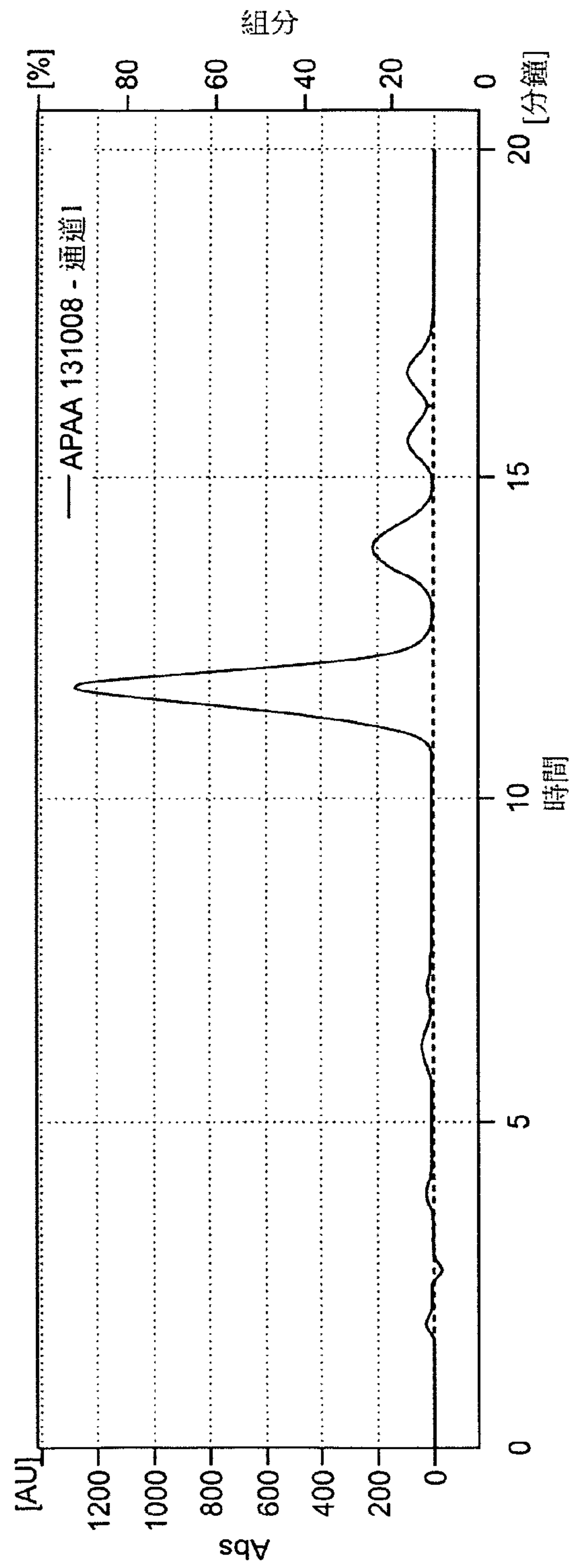


圖 1B



結果表(UncaI - APAA 131008 - 通道1)

	滯留時間 [分鐘]	面積 [mV.s]	高度 [mV]	面積 [%]
1	3.890	683.024	21.161	0.9
2	6.157	1547.356	37.841	2.1
3	7.043	832.950	15.650	1.1
4	9.713	33.979	0.981	0.0
5	11.740	53142.367	1282.119	71.5
6	13.903	10883.314	214.185	14.6
7	15.543	3501.138	93.342	4.7
8	16.587	3742.492	93.843	5.0
	總計	74366.620	1759.121	100.0

圖 2A

530-036-602_APAA

脈衝序列 : s2pul

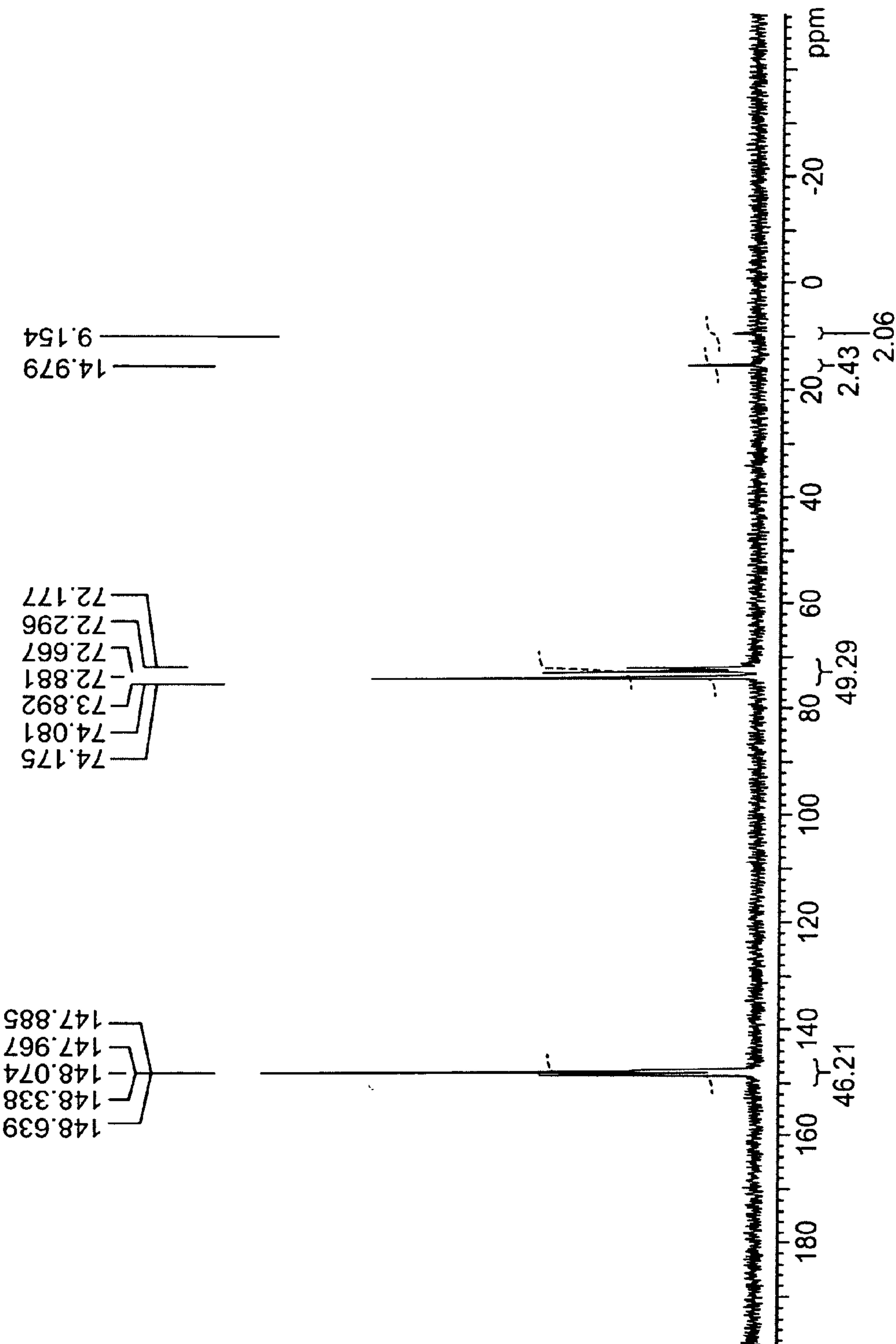
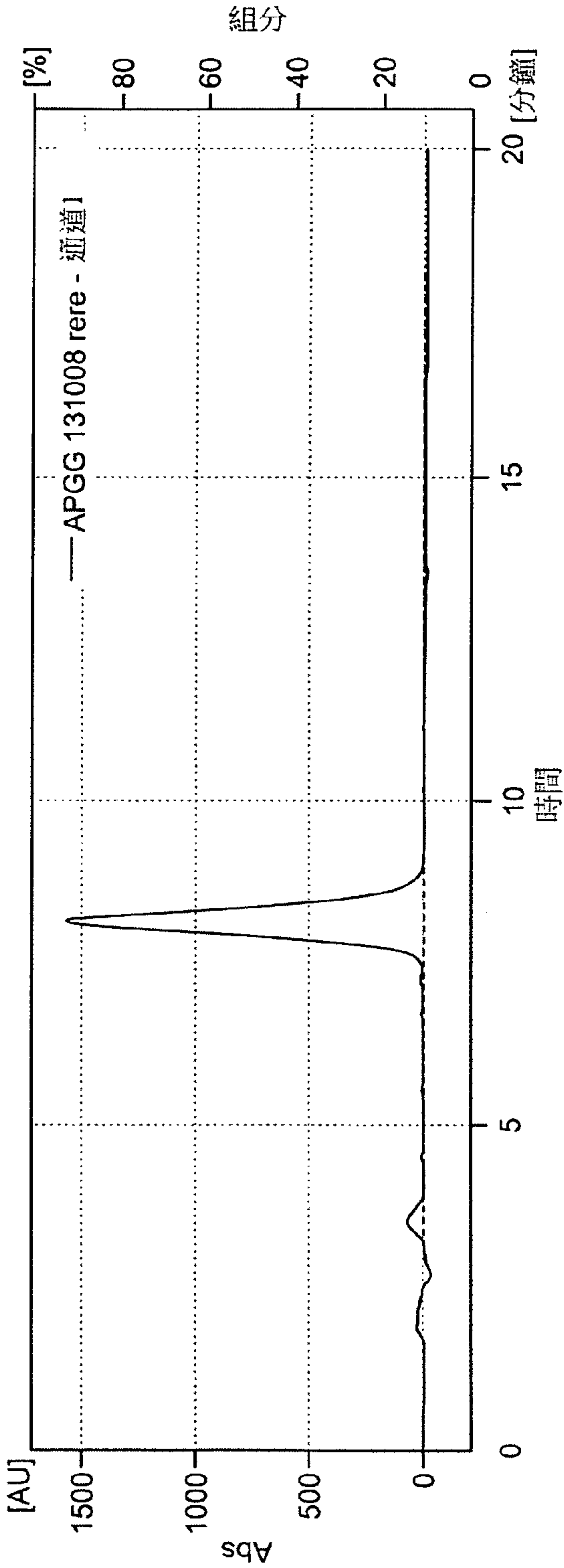


圖 2B



結果表(Uncal - APGG 131008 rere - 通道 I)

	滯留時間 [分鐘]	面積 [mV.s]	高度 [mV]	面積 [%]
1	3.530	1726.515	70.546	3.6
2	4.473	167.636	5.052	0.3
3	5.543	111.014	4.805	0.2
4	6.220	84.336	3.982	0.2
5	7.487	387.810	16.415	0.8
6	8.120	45390.847	1580.744	94.5
7	10.147	31.679	1.149	0.1
8	11.213	111.591	3.775	0.2
	總計	48011.427	1686.468	100.0

圖 3A

530-036-612_APGG
脈衝序列：s2pul

148.244
148.105
148.068

74.244
73.893
72.912
72.751

14.885

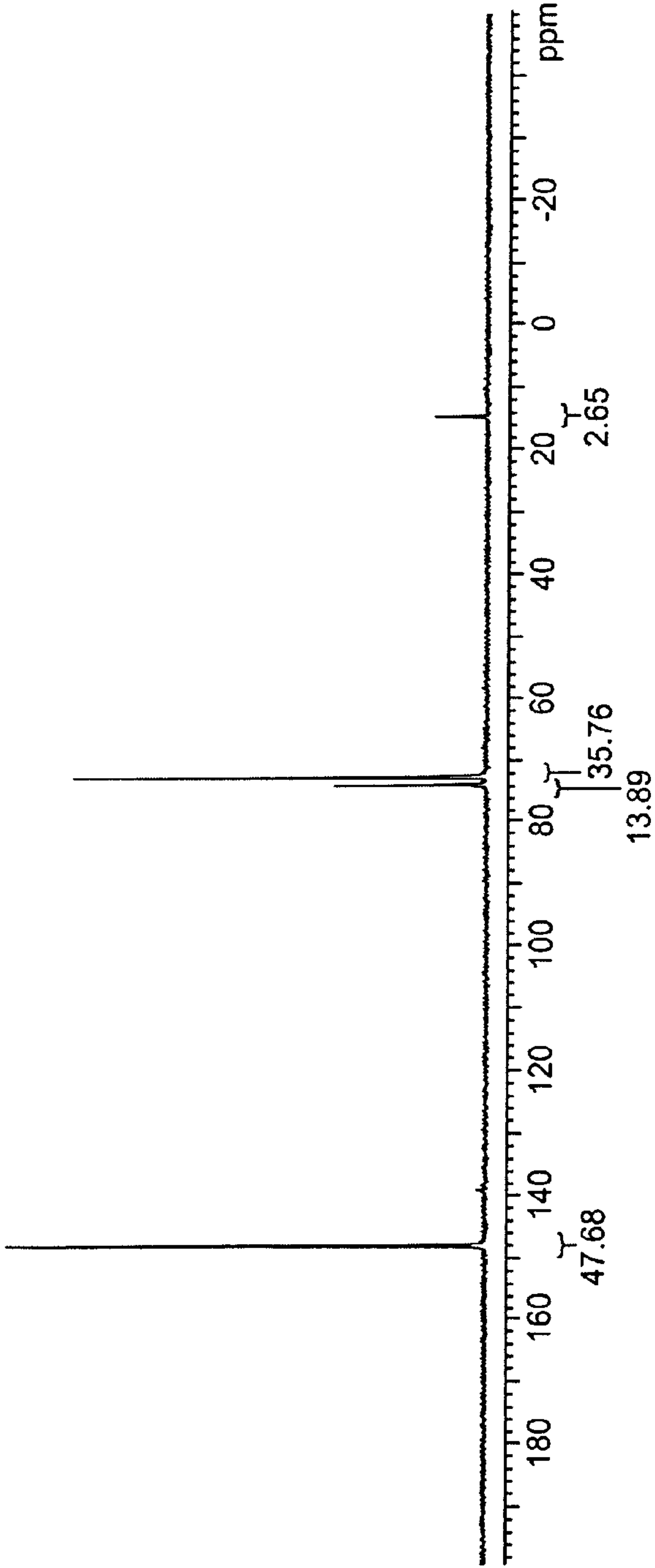
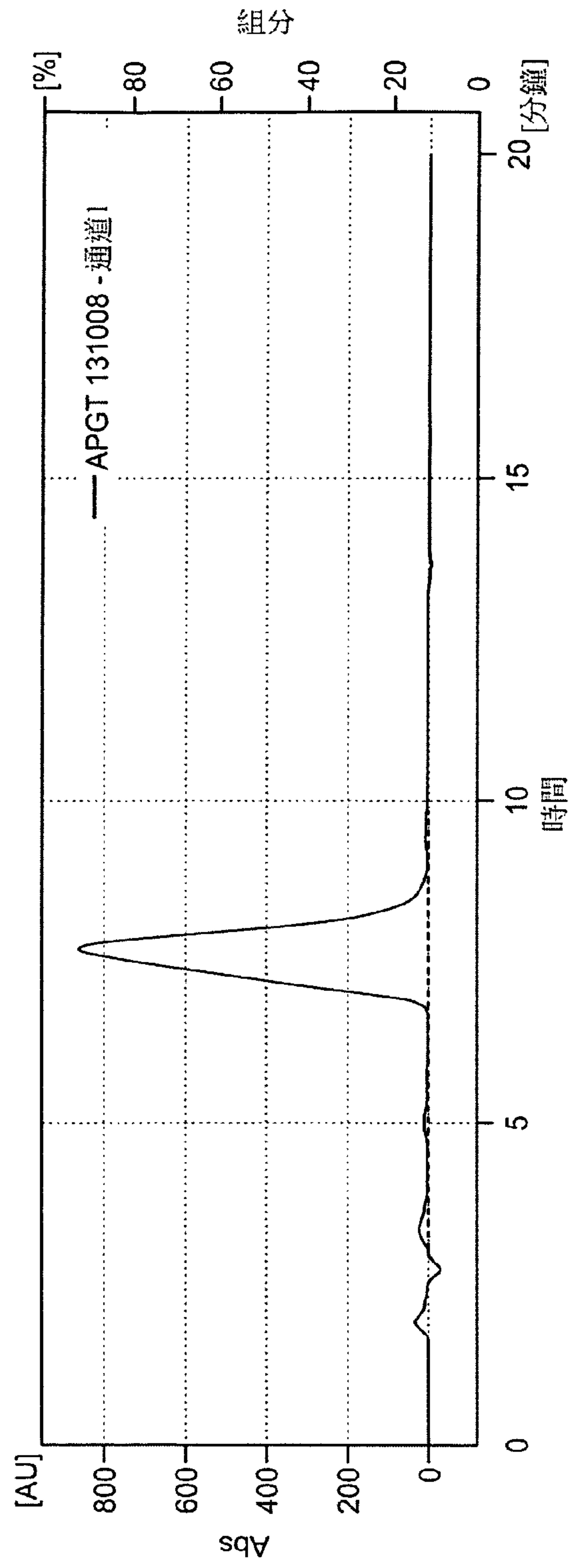


圖 3B



結果表(Uncal - APGT 131008 - 通道I)

	滯留時間 [分鐘]	面積 [mV.s]	高度 [mV]	面積 [%]
1	3.333	944.000	23.530	2.1
2	4.980	412.032	9.308	0.9
3	5.543	321.186	6.399	0.7
4	7.650	42081.239	864.466	95.3
5	9.353	388.891	5.485	0.9
	總計	44147.348	909.188	100.0

圖 4A

530-036-613_APGT
脈衝序列: s2pu1

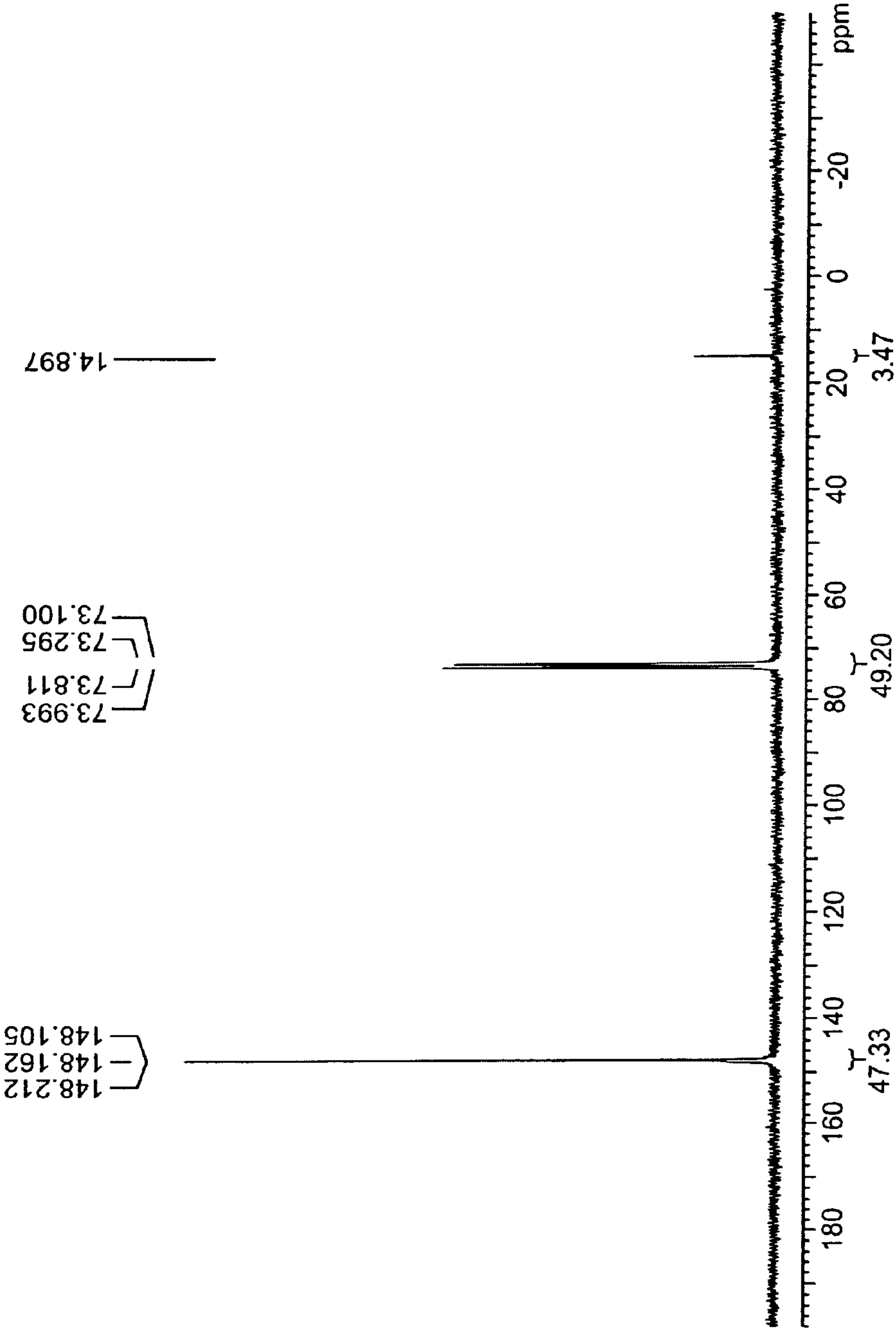
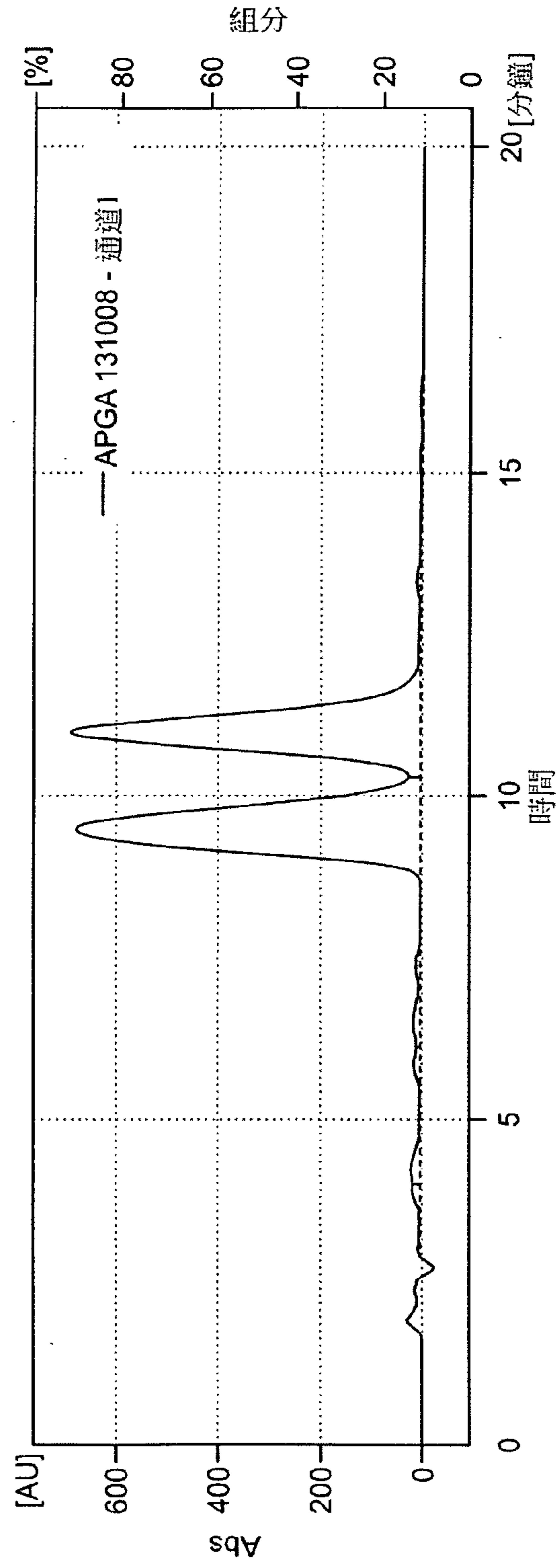


圖 4B



結果表 (Uncal - APT 131008 - 通道1)

	滯留時間 [分鐘]	面積 [mV.s]	高度 [mV]	面積 [%]
1	3.940	244.344	14.351	0.4
2	4.233	539.181	16.577	0.9
3	5.843	297.336	10.208	0.5
4	6.467	496.091	13.150	0.8
5	7.343	245.806	7.818	0.4
6	9.463	30522.359	670.507	51.8
7	10.980	26153.247	679.925	44.4
8	13.297	175.913	5.393	0.3
9	15.070	90.029	2.819	0.2
10	16.083	106.327	2.935	0.2
	總計	58870.634	1423.682	100.0

圖 5A

530-036-606_APGA
脈衝序列: s2pul

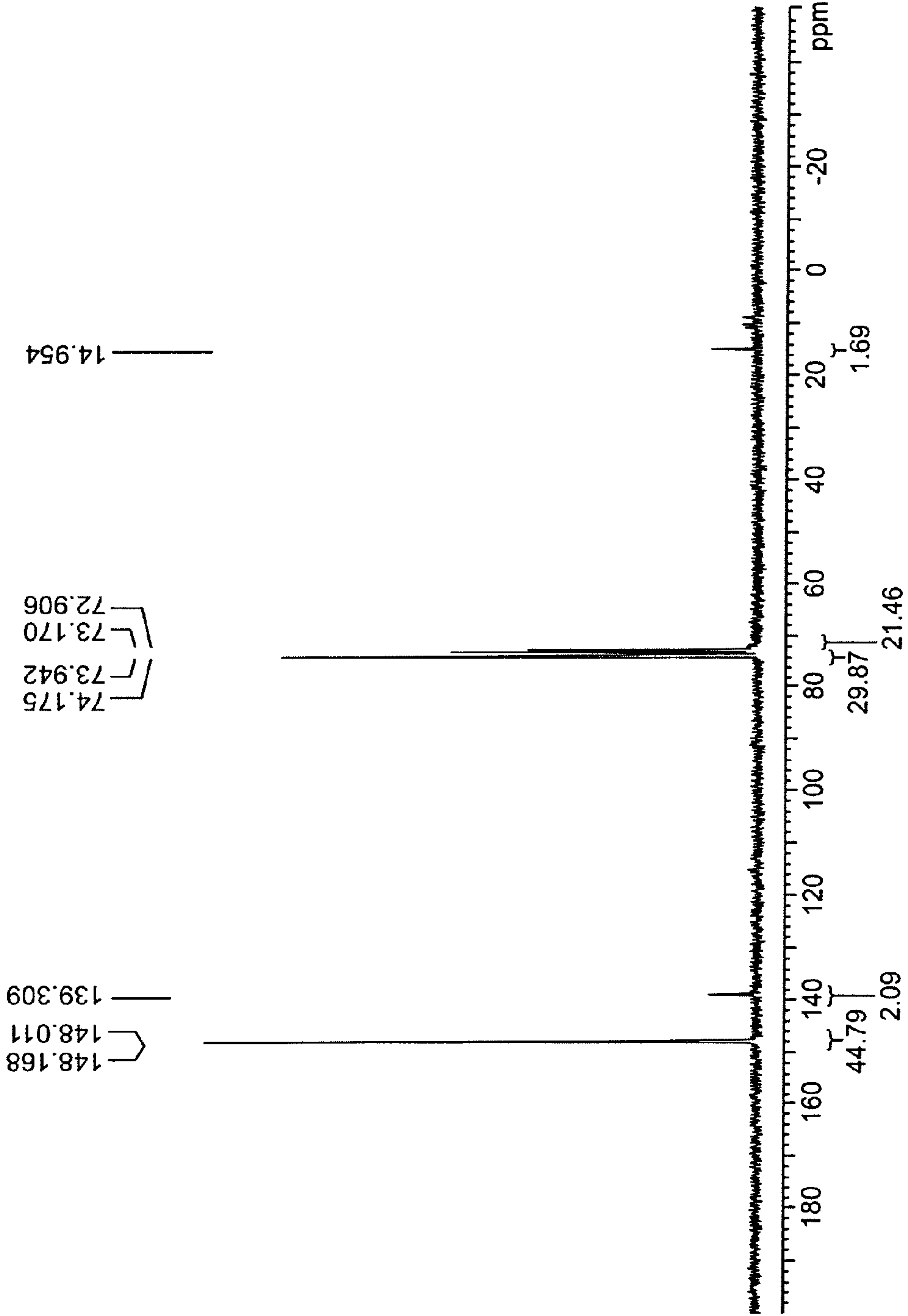
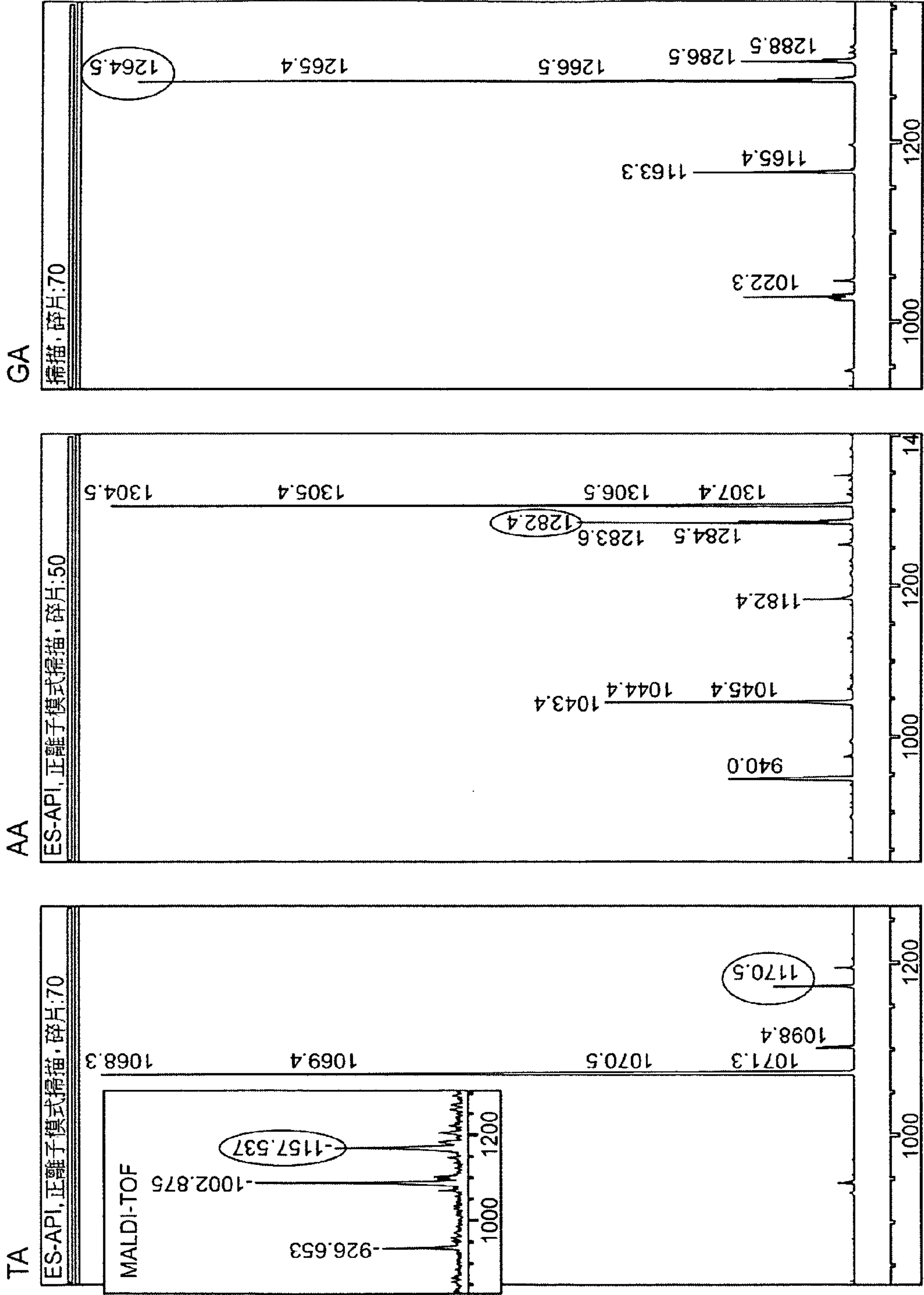
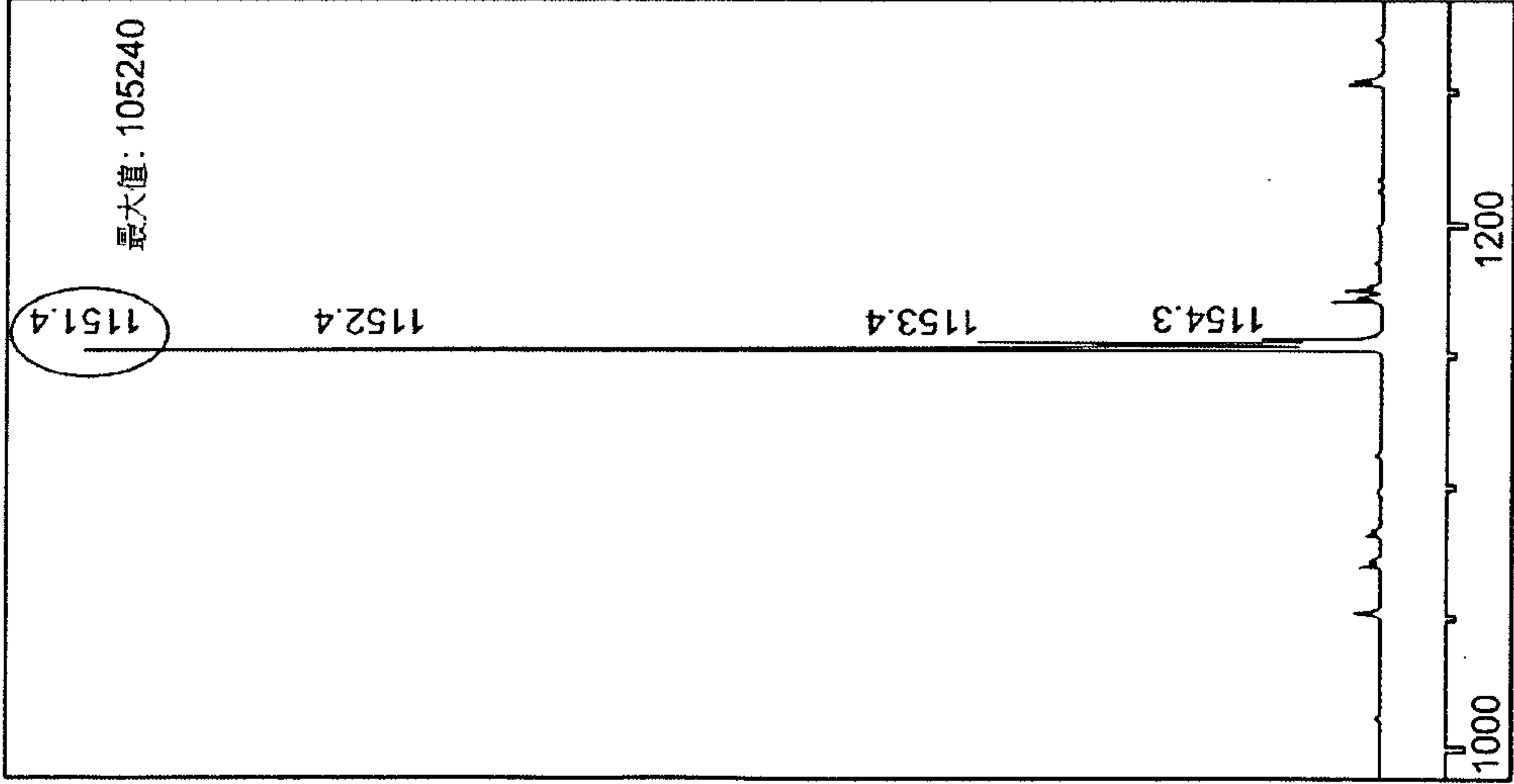


圖 5B

圖 6A



GT



GG

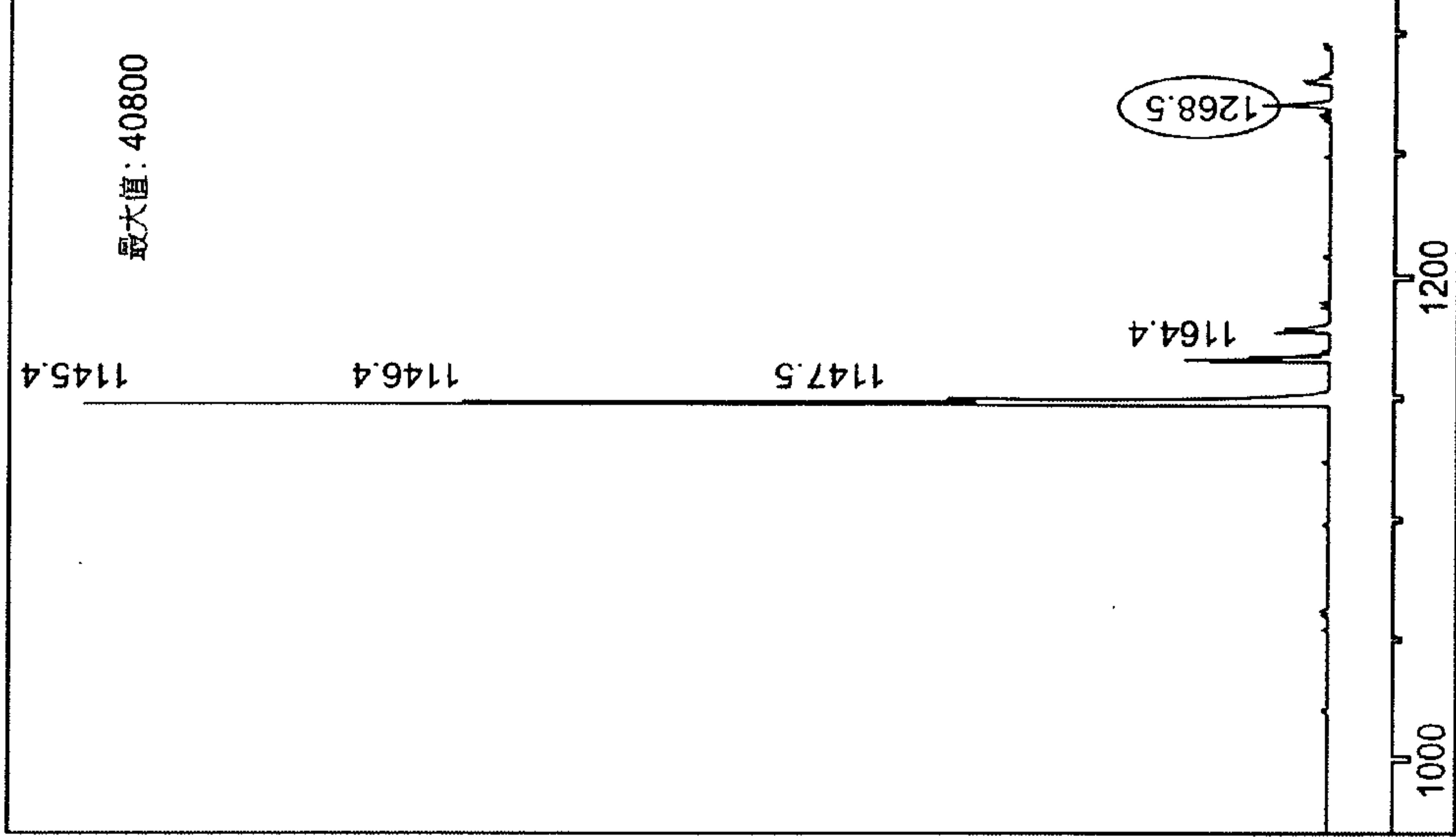
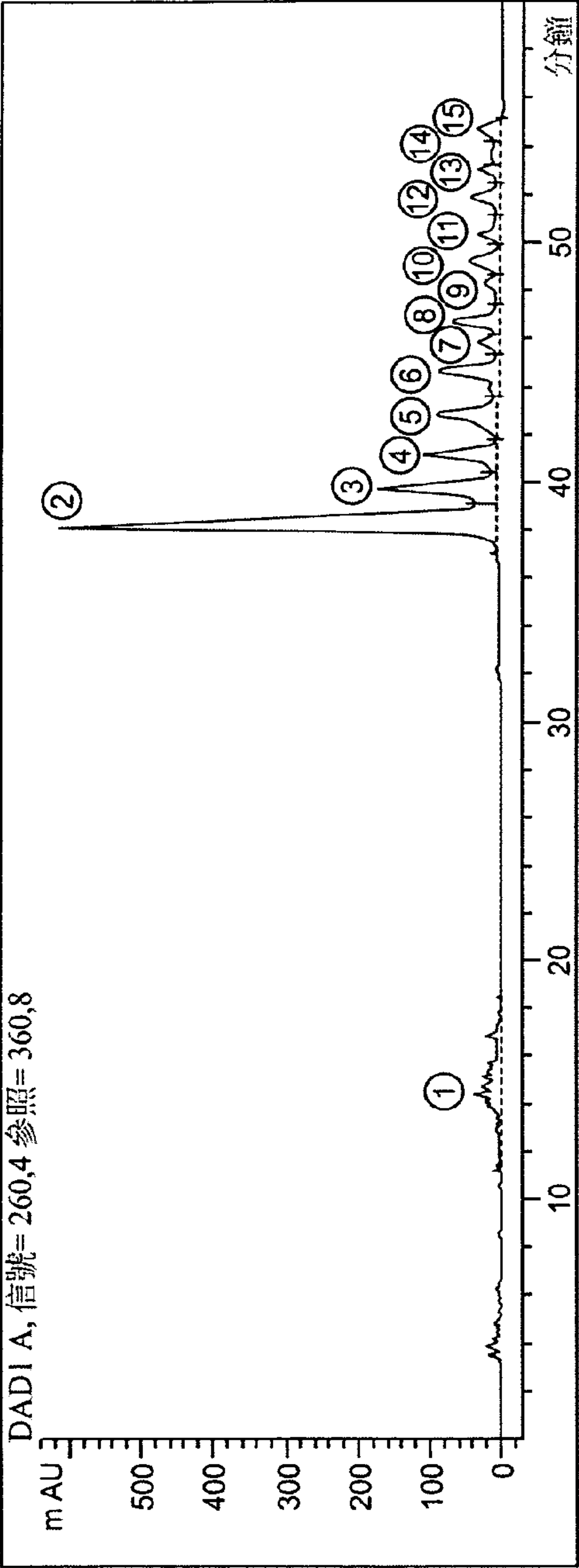


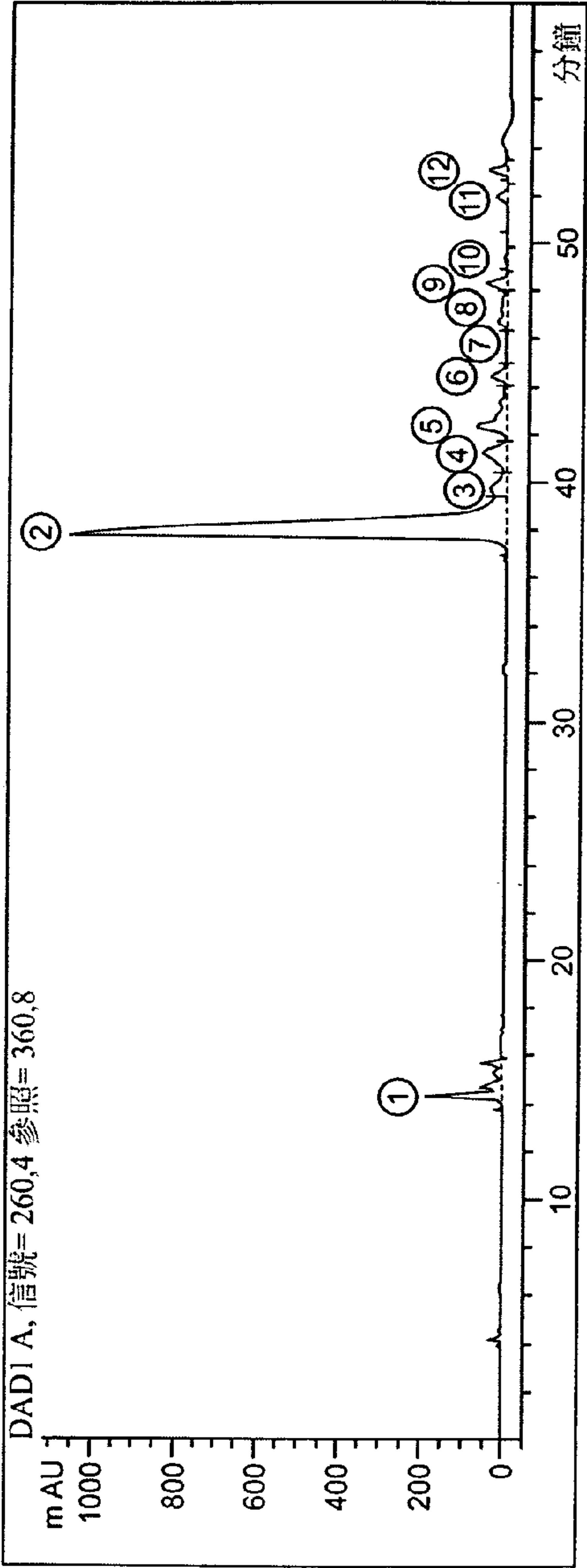
圖 6B



信號1: DADI A, 信號= 260,4 參照= 360,8

峰編號	滯留時間 [分鐘]	類型	寬度 [分鐘]	面積 [mAU*s]	高度 [mAU]	面積%
1	14.351	MM	1.3428	3049.04346	37.84385	6.1692
2	38.185	MF	0.6051	2.19306e4	604.03412	44.3729
3	39.756	MF	0.5388	5442.11719	168.33372	11.0112
4	41.191	MF	0.4944	3098.60327	104.45583	6.2695
5	42.867	MF	0.6396	3392.55371	88.39773	6.8643
6	44.667	MF	0.5744	2941.21948	85.34209	5.9511
7	45.869	MF	0.4522	756.01624	27.86593	1.5297
8	46.732	MF	0.4561	1895.68347	69.27336	3.8356
9	48.335	MF	0.5734	743.65094	21.61706	1.5047
10	49.248	MF	0.5933	1568.34546	44.05754	3.1733
11	50.315	MF	0.4816	928.79987	32.14064	1.8793
12	51.866	MF	0.5346	1350.28284	42.09404	2.7321
13	53.023	MF	0.3815	750.43585	32.78460	1.5184
14	53.607	MF	0.7460	613.24054	13.69989	1.2408
15	54.707	FM	0.5027	962.75043	31.92237	1.9480
總計:				4.94233e4	1403.86277	

圖 7



信號1: DAD1A, 信號= 260,4 參照= 360,8

峰編號	滯留時間 [分鐘]	類型	寬度 [分鐘]	面積 [mAU*s]	高度 [mAU]	面積%
1	14.297	MM	0.3289	3623.52319	183.63403	6.1565
2	37.881	MF	0.6886	4.35741e4	1054.70142	74.0343
3	39.764	FM	0.6084	1453.00427	39.80315	2.4687
4	41.269	FM	0.6541	2267.20410	57.76622	3.8521
5	42.377	MF	0.6595	3004.52759	75.93487	5.1048
6	44.469	FM	0.4059	953.07678	39.13720	1.6193
7	45.981	FM	0.6801	134.64066	3.29974	0.2288
8	46.754	MF	0.8563	1150.84033	22.39912	1.9553
9	48.331	FM	0.3501	1082.63159	51.54351	1.8394
10	49.313	MM	0.4398	186.19765	7.05598	0.3164
11	51.937	MM	0.4624	659.89532	23.78648	1.1212
12	53.050	MM	0.2866	766.97327	44.60481	1.3031
總計:				5.88566e4	1603.66652	

圖 8