



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202035695 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：108145500

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 12 日

(51)Int. Cl.：

*C12N15/113 (2010.01)**A61K47/64 (2017.01)**A61K47/68 (2017.01)**C07K7/06 (2006.01)**C07K7/08 (2006.01)*

(30)優先權：2018/12/13 美國

62/779,028

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

美國

(72)發明人：斯尼爾 佛德瑞克 喬瑟夫 SCHNELL, FREDERICK JOSEPH (US)；蔡 寶忠 CAI, BAOZHONG (US)；迪賽 安庫 DESAI, ANKUR (US)；貝斯特威克 理查 K BESTWICK, RICHARD K. (US)

(74)代理人：陳長文

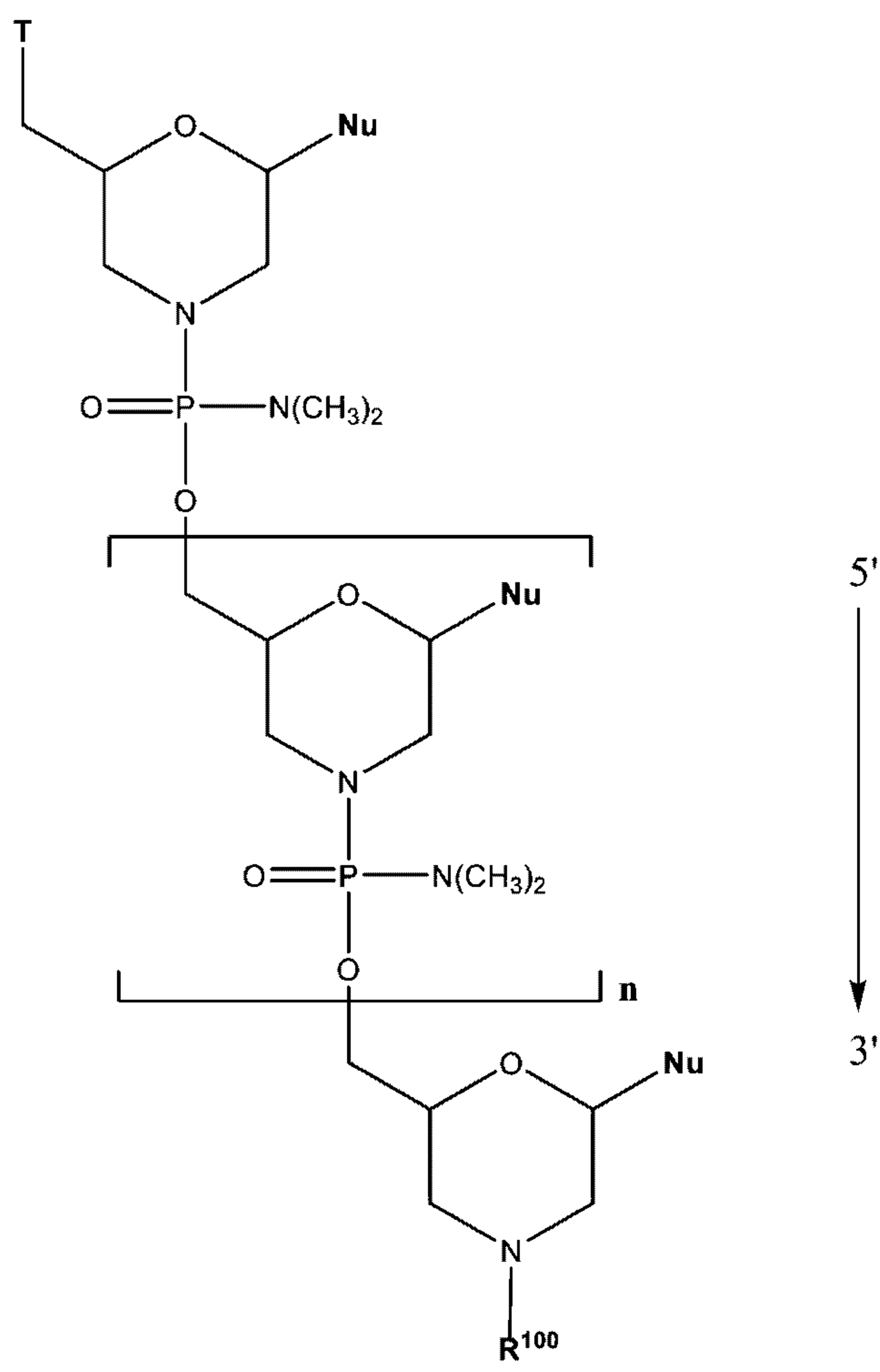
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：0 共 151 頁

(54)名稱

用於肌營養不良之外顯子跳躍寡聚體軛合物

(57)摘要

本文描述了與人肌養蛋白基因中選定的靶位點互補以誘導外顯子 50 跳躍的反義寡聚體。在多個方面中，描述了根據式(I)之反義寡聚體：

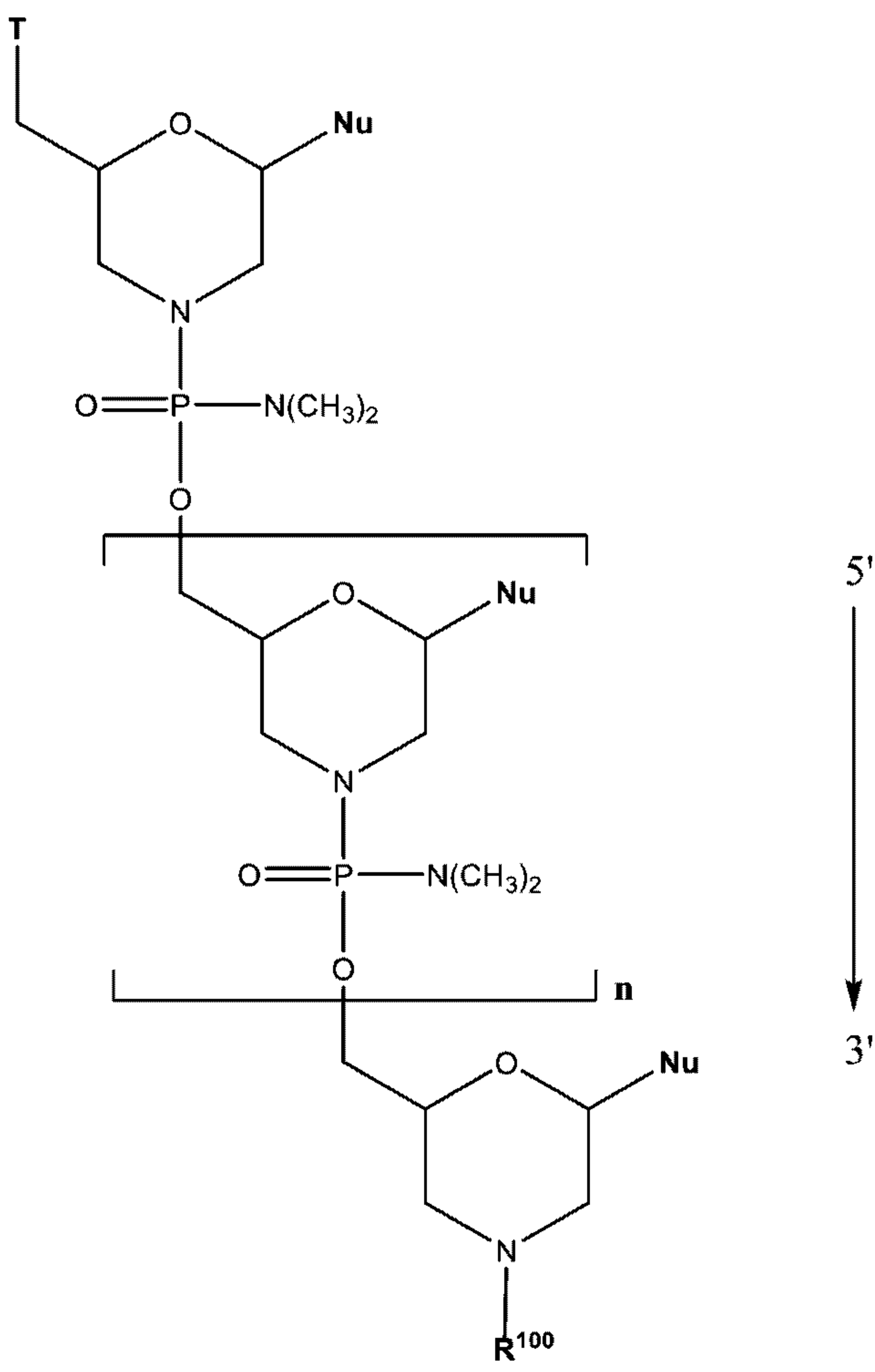


(I)

(I)

或其藥學上可接受的鹽，其中 T、Nu、n 和 R¹⁰⁰ 在本文中進行了定義。

Antisense oligomers complementary to a selected target site in the human dystrophin gene to induce exon 50 skipping are described. In various aspects, antisense oligomers are described according to Formula (I):



(I)

(I)

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein **T**, **Nu**, **n**, and **R¹⁰⁰** are defined herein.

特徵化學式：



202035695

【發明摘要】

【中文發明名稱】

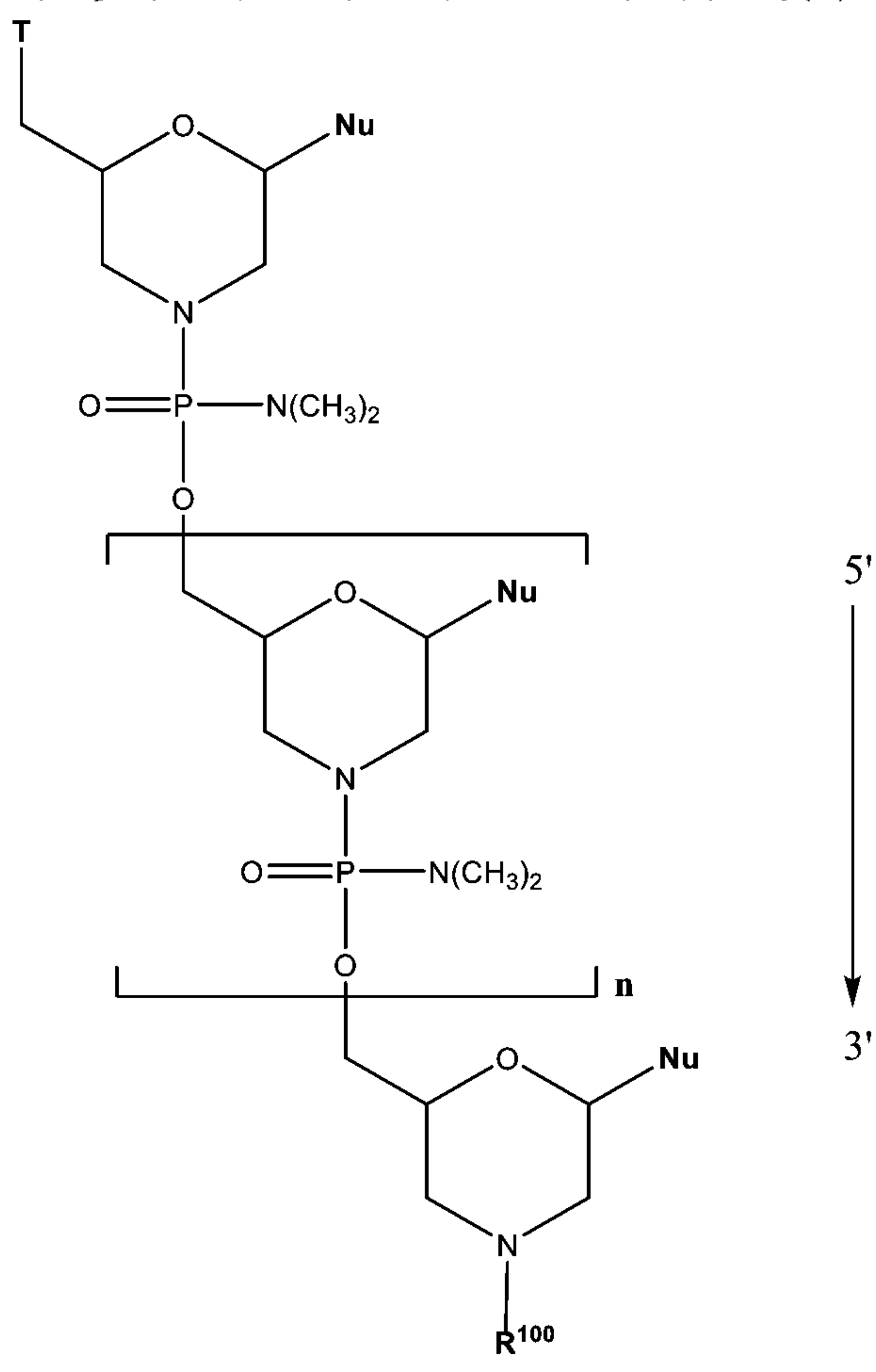
用於肌營養不良之外顯子跳躍寡聚體軛合物

【英文發明名稱】

EXON SKIPPING OLIGOMER CONJUGATES FOR MUSCULAR DYSTROPHY

【中文】

本文描述了與人肌養蛋白基因中選定的靶位點互補以誘導外顯子50跳躍的反義寡聚體。在多個方面中，描述了根據式(I)之反義寡聚體：

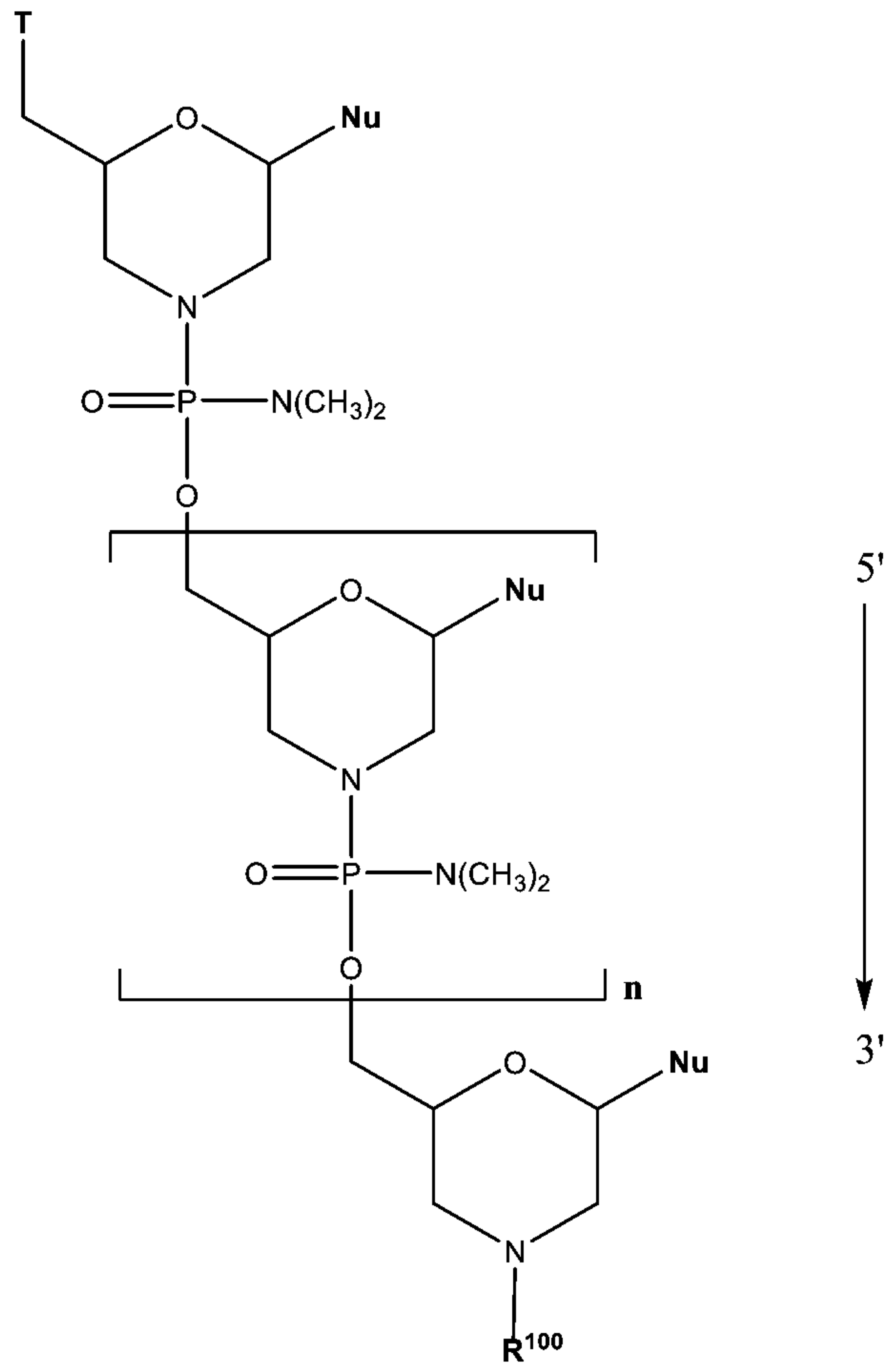


(I)

或其藥學上可接受的鹽，其中T、Nu、n和R¹⁰⁰在本文中進行了定義。

【英文】

Antisense oligomers complementary to a selected target site in the human dystrophin gene to induce exon 50 skipping are described. In various aspects, antisense oligomers are described according to Formula (I):



(I)

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein **T**, **Nu**, **n**, and **R¹⁰⁰** are defined herein.

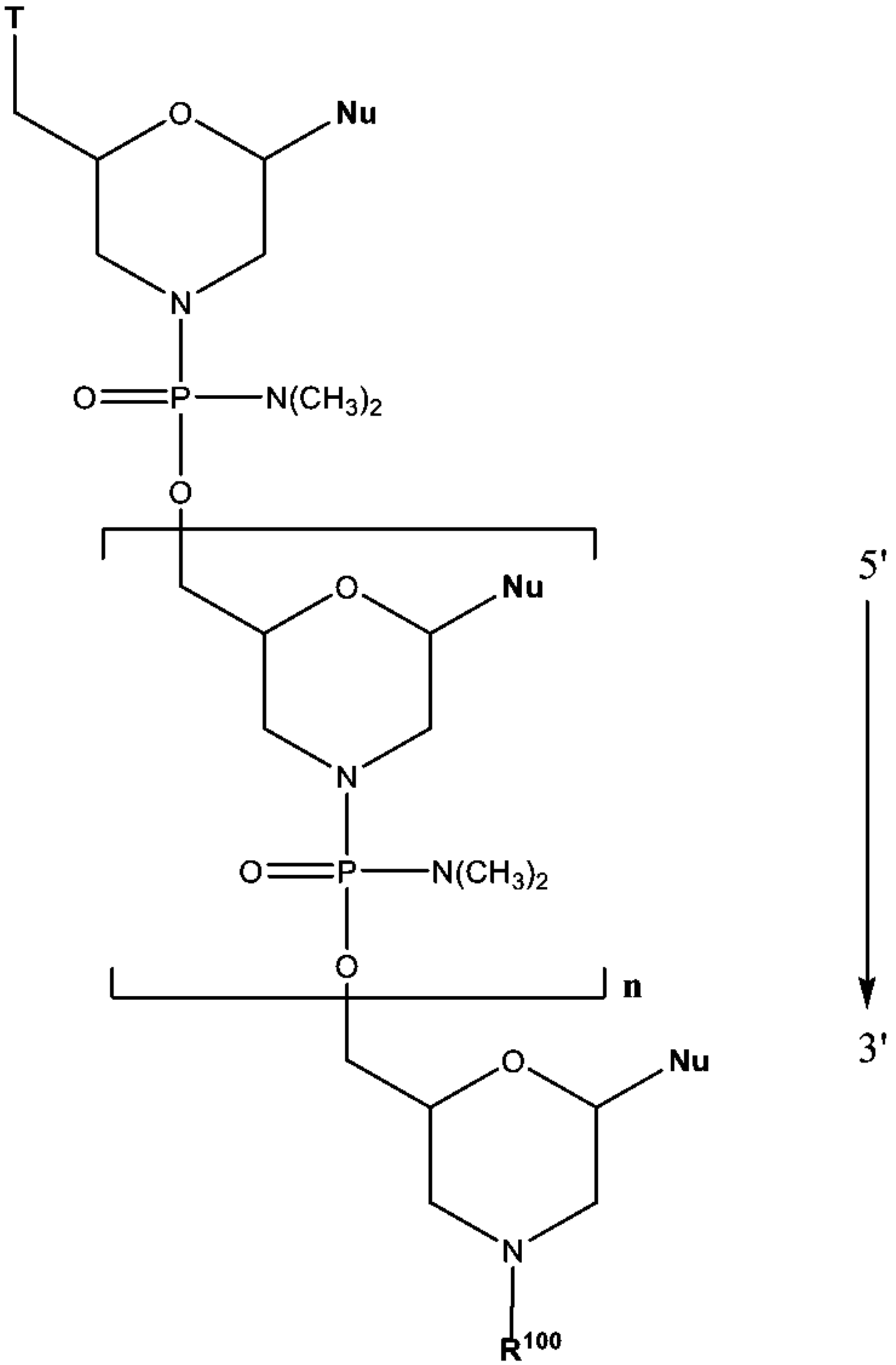
【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



(I)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於肌營養不良之外顯子跳躍寡聚體軛合物

【英文發明名稱】

EXON SKIPPING OLIGOMER CONJUGATES FOR MUSCULAR DYSTROPHY

【技術領域】

【0001】 本揭露涉及適合於人肌養蛋白基因中外顯子50跳躍的新型反義寡聚體及其藥物組成物。本揭露還提供了使用新型反義寡聚體誘導外顯子50跳躍之方法，在具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變的受試者中產生肌養蛋白之方法，以及用於治療具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變的受試者之方法。

【先前技術】

【0002】 杜興氏肌肉失養症(Duchenne muscular dystrophy(DMD))係由蛋白質肌養蛋白的表現缺陷引起的。編碼此蛋白質的基因含有79個外顯子，分佈在DNA的超過200萬個核苷酸中。任何外顯子突變(該等突變改變外顯子的閱讀框、或者引入終止密碼子、或者特徵在於去除一個或多個完整的異讀框外顯子(entire out of frame exon)或複製一個或多個外顯子)都可能破壞功能性肌養蛋白的產生，從而導致DMD。

【0003】 已發現出現了一種不太嚴重的肌營養不良形式，即貝克肌營養不良(Becker muscular dystrophy(BMD))，其中突變(通常是一個或多個外顯子的缺失)產生沿著整個肌養蛋白轉錄物的正確閱讀框，以使得不會過早終止mRNA到蛋白質的翻譯。如果在經突變的肌養蛋白先質

mRNA的加工過程中上游和下游外顯子的連接維持了該基因的正确閱讀框，則結果係編碼具有短内部缺失的蛋白質的mRNA保留了一些活性，從而形成貝克(Becker)表型。

【0004】 需要適合於外顯子50跳躍的反義寡聚體和可用於產生肌養蛋白及治療DMD的治療方法的相應藥物組成物。

【發明內容】

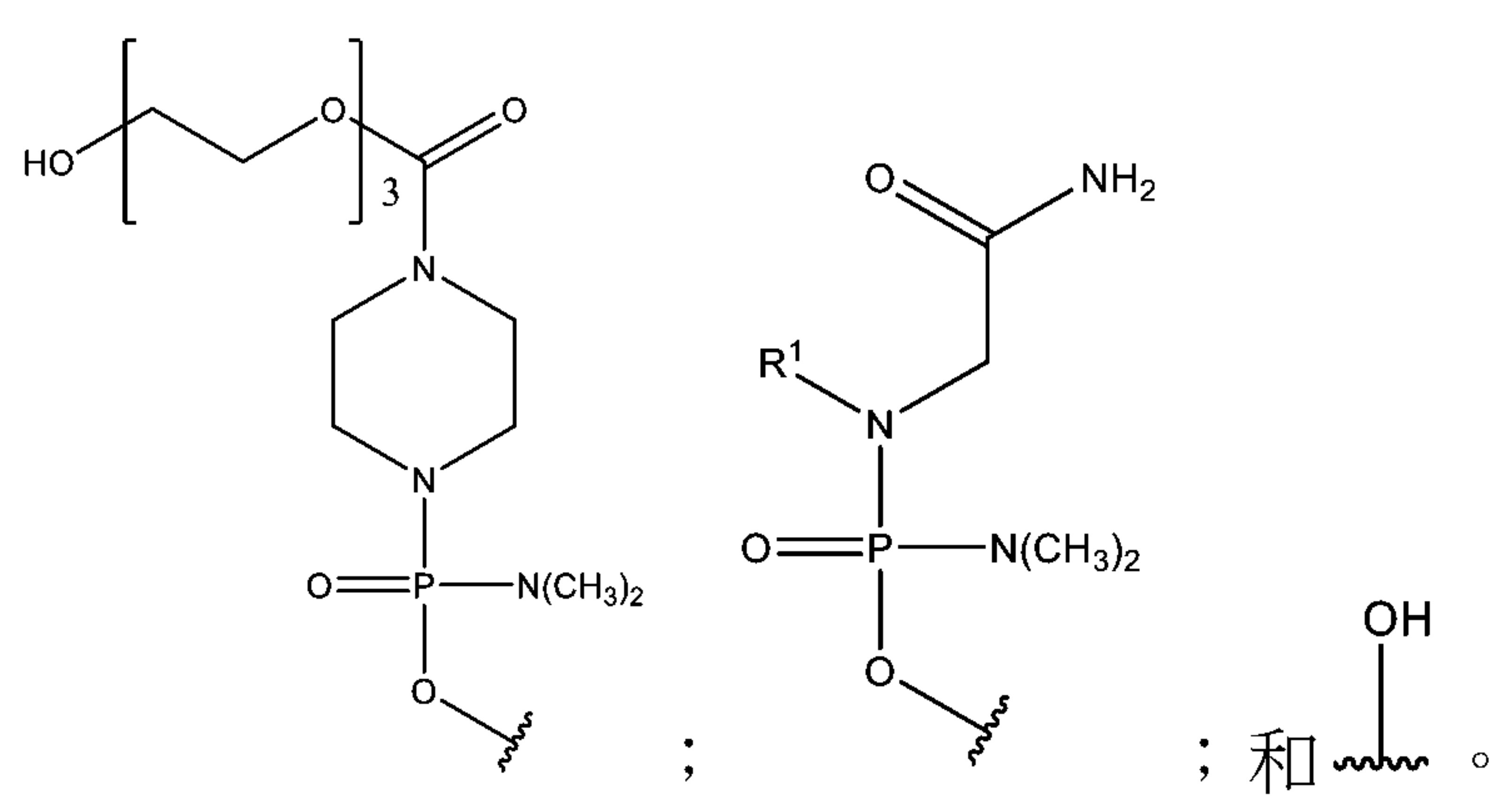
【0005】 反義寡聚體或其藥學上可接受的鹽能夠結合選定的靶標以誘導人肌養蛋白基因中的外顯子跳躍，其中該反義寡聚體包含與肌養蛋白先質mRNA的外顯子50靶標區域(稱為退火位點)互補的鹼基序列，其中該鹼基序列和退火位點選自：

退火位點	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

其中T係胸腺嘧啶或尿嘧啶。在一方面，每個T係胸腺嘧啶。

【0006】 在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、或SEQ ID NO: 9。在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於SEQ ID NO: 3中的核鹼基。

【0007】 在一方面，該反義寡聚體含有附接至該反義寡聚體的5'端的T部分，其中該T部分選自：



【0008】 在某些實施方式中，該反義寡聚體軀合至一種或多種細胞穿透肽(本文中稱為「**CPP**」)。在某些實施方式中，一種或多種**CPP**附接至該反義寡聚體的末端。在某些實施方式中，至少一種**CPP**附接至該反義寡聚體的5'末端。在某些實施方式中，至少一種**CPP**附接至該反義寡聚體的3'末端。在某些實施方式中，第一**CPP**附接至該反義寡聚體的5'末端，並且第二**CPP**附接至該反義寡聚體的3'末端。

【0009】 在一些實施方式中，該**CPP**係富含精胺酸的肽。術語「富含精胺酸的」係指具有至少2個(以及較佳的是2、3、4、5、6、7或8個)精胺酸殘基的**CPP**，每個殘基視需要被一個或多個不帶電荷的疏水性殘基分開，並且視需要含有約6-14個胺基酸殘基。如以下所解釋的，**CPP**較佳的是在其羧基末端藉由連接子(linker)也可以是一個或多個胺基酸)與反義寡核苷酸的3'和/或5'端連接，並且還較佳的是在其胺基末端被取代基R^a封端，其中R^a選自H、醯基、乙醯基、苯甲醯基、或硬脂醯基。在一些實施方式中，R^a係乙醯基。

【0010】 如下表中所示，本文使用的**CPP**的非限制性實例包括-(RXR)₄-R^a(SEQ ID NO: 15)、-R-(FFR)₃-R^a(SEQ ID NO: 16)、-B-X-(RXR)₄-R^a(SEQ ID NO: 17)、-B-X-R-(FFR)₃-R^a(SEQ ID NO: 18)、-GLY-R-(FFR)₃-R^a(SEQ ID NO: 19)、-GLY-R₅-R^a(SEQ ID NO: 20)、-

R₅-R^a(SEQ ID NO: 21)、-GLY-R₆-R^a(SEQ ID NO: 11)和-R₆-R^a(SEQ ID NO: 10)，其中R^a選自H、鹼基、乙鹼基、苯甲鹼基、和硬脂鹼基，並且其中R係精胺酸，X係6-胺基己酸，B係β-丙胺酸，F係苯丙胺酸，並且GLY(或G)係甘胺酸。CPP「R₅(SEQ ID NO: 21)」意指經由鹼胺鍵(而不是單個取代基，例如R⁵(SEQ ID NO: 21))連接在一起的五個(5)精胺酸殘基的肽。CPP「R₆(SEQ ID NO: 10)」意指經由鹼胺鍵(而不是單個取代基，例如R⁶(SEQ ID NO: 10))連接在一起的六個(6)精胺酸殘基的肽。在一些實施方式中，R^a係乙鹼基。

【0011】 [表1]中提供了示例性CPP(SEQ ID NO: 10、11、和15-21)。

表1：示例性細胞穿透肽		
名稱	序列	SEQ ID NO：
R ₆ G	RRRRRRG	11
R ₆	RRRRRR	10
(RXR) ₄	RXRRXRRXRRXR	15
(RFF) ₃ R	RFFRFFRFFR	16
(RXR) ₄ XB	RXRRXRRXRRXRXB	17
(RFF) ₃ RXB	RFFRFFRFFRXB	18
(RFF) ₃ RG	RFFRFFRFFRG	19
R ₅ G	RRRRRG	20
R ₅	RRRRR	21
R係精胺酸；X係6-胺基己酸；B係β-丙胺酸；F係苯丙胺酸；G係甘胺酸		

【0012】 CPP、其合成以及軛合至寡聚體的方法進一步描述於美國申請公開案號US 2012/0289457和國際專利申請公開案號WO 2004/097017、WO 2009/005793、和WO 2012/150960中，該等文獻的揭露內容藉由引用以其整體併入本文。

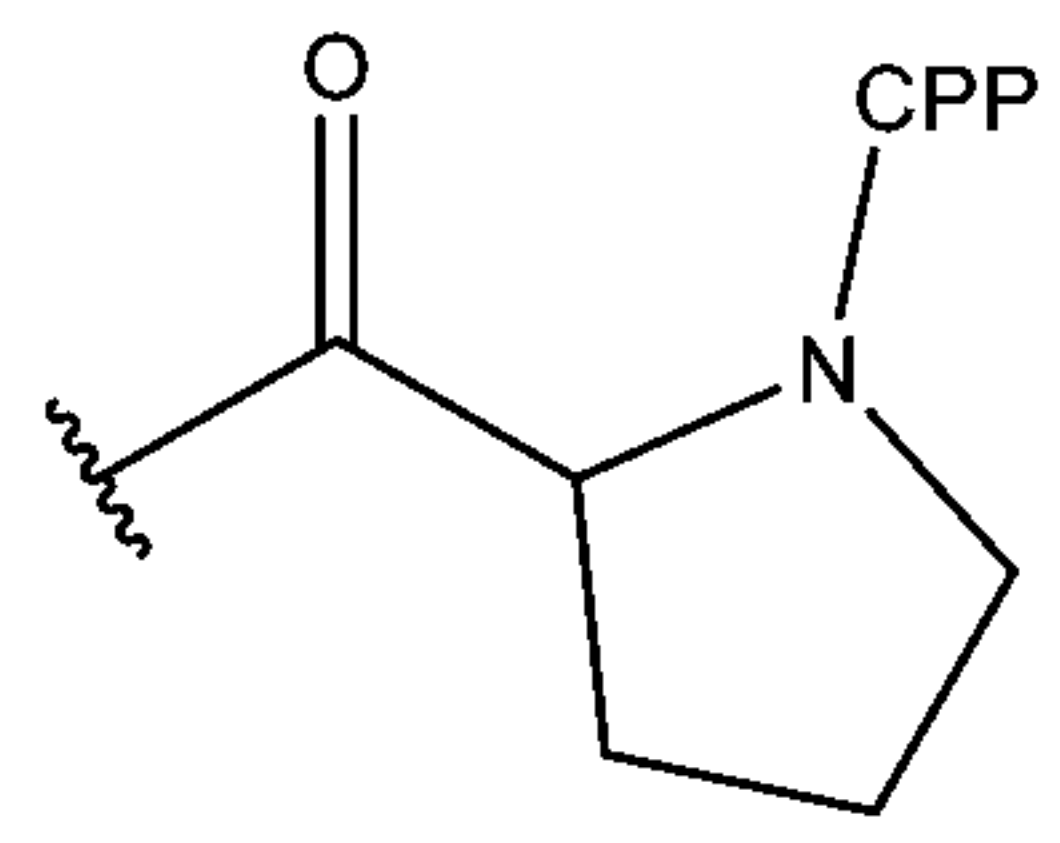
【0013】 在一些實施方式中，反義寡核苷酸包含取代基「Z」，其被定義為CPP和連接子的組合。該連接子將CPP在其羧基末端橋接至寡核

苷酸的3'端和/或5'端。在多個實施方式中，反義寡核苷酸可僅包含一個連接至寡聚體的3'端的**CPP**。在其他實施方式中，反義寡核苷酸可僅包含一個連接至寡聚體的5'端的**CPP**。

【0014】 Z內的連接子可包含例如1、2、3、4或5個胺基酸。

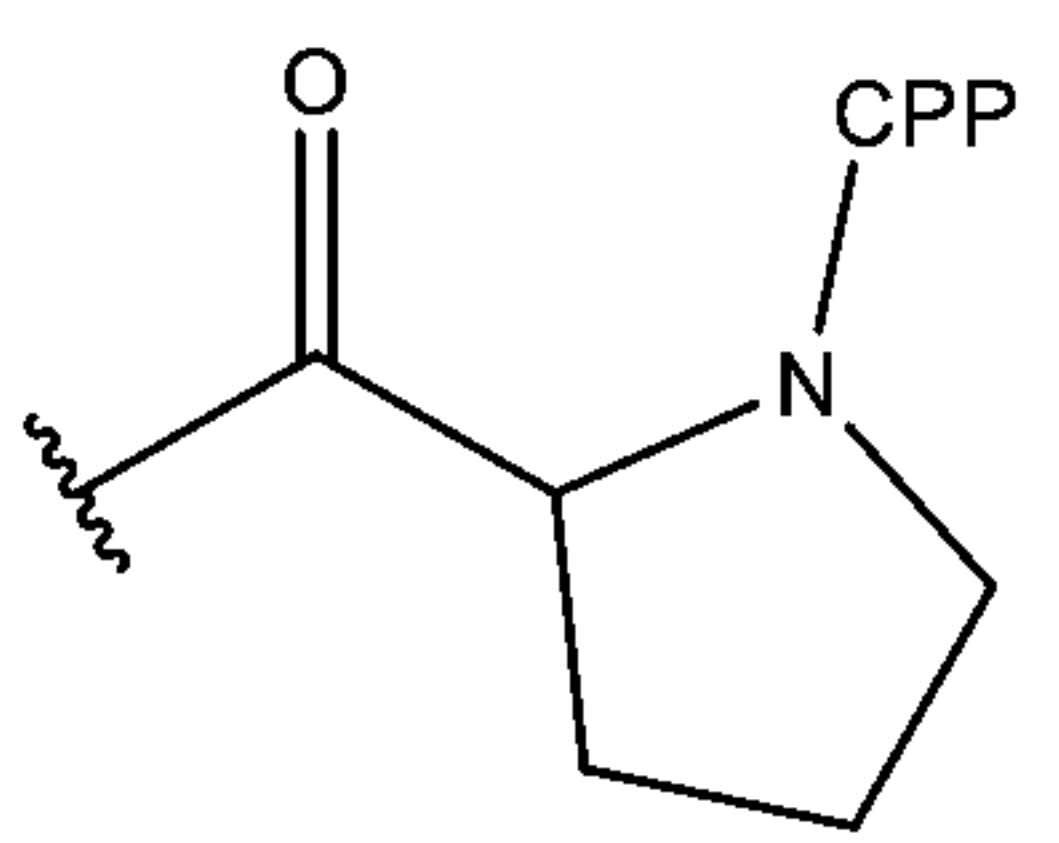
【0015】 在具體的實施方式中，Z選自：

- C(O)(CH₂)₅NH-CPP；
- C(O)(CH₂)₂NH-CPP；
- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP；
- C(O)CH₂NH-CPP；以及如下式：



其中該**CPP**藉由在**CPP**羧基末端的醯胺鍵附接至連接子部分。

【0016】 在多個實施方式中，該**CPP**係本文所述和表1中所示的富含精胺酸的肽。在多個實施方式中，該富含精胺酸的**CPP**係-R₅-R^a(即五個精胺酸殘基；SEQ ID NO: 21)，其中R^a選自H、醯基、乙醯基、苯甲醯基、和硬脂醯基。在某些實施方式中，R^a係乙醯基。在多個實施方式中，該**CPP**係SEQ ID NO: 21，並且該連接子選自由以下各項組成之群組： -C(O)(CH₂)₅NH-、-C(O)(CH₂)₂NH-、-C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-、-

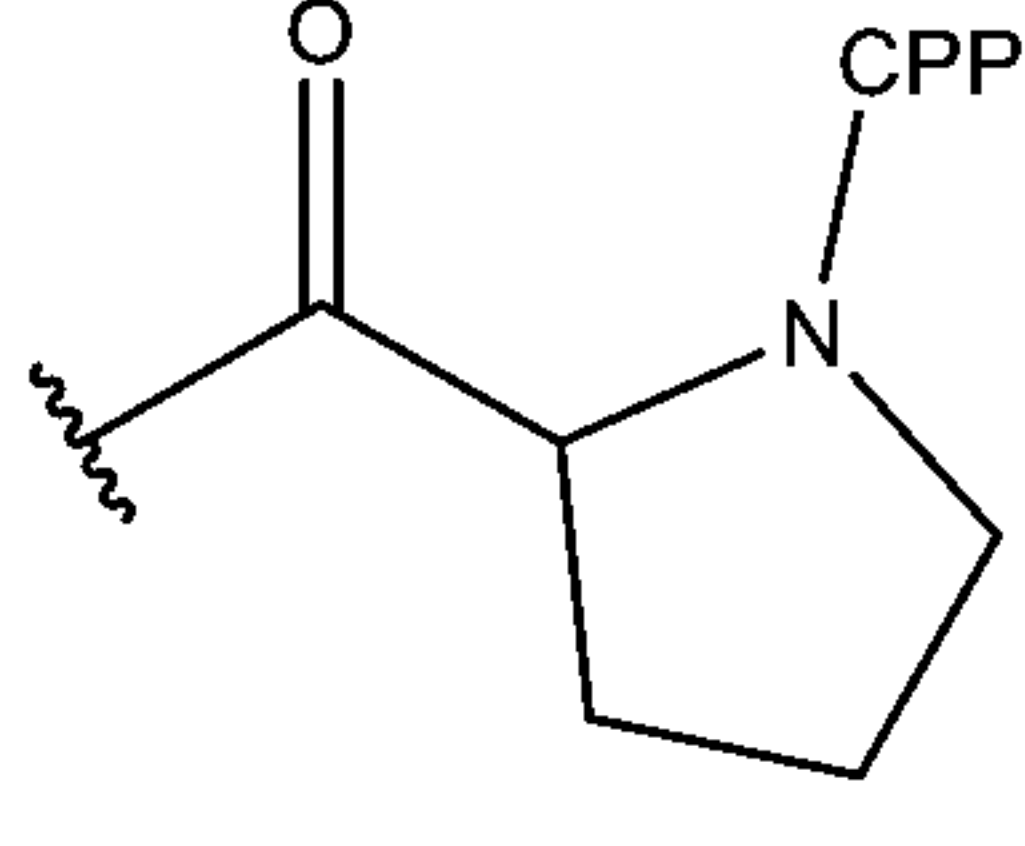


C(O)CH₂NH-、和。在一些實施方式中，該連接子包含1、2、3、4或5個胺基酸。

【0017】 在一些實施方式中，該**CPP**係SEQ ID NO: 21並且該連接

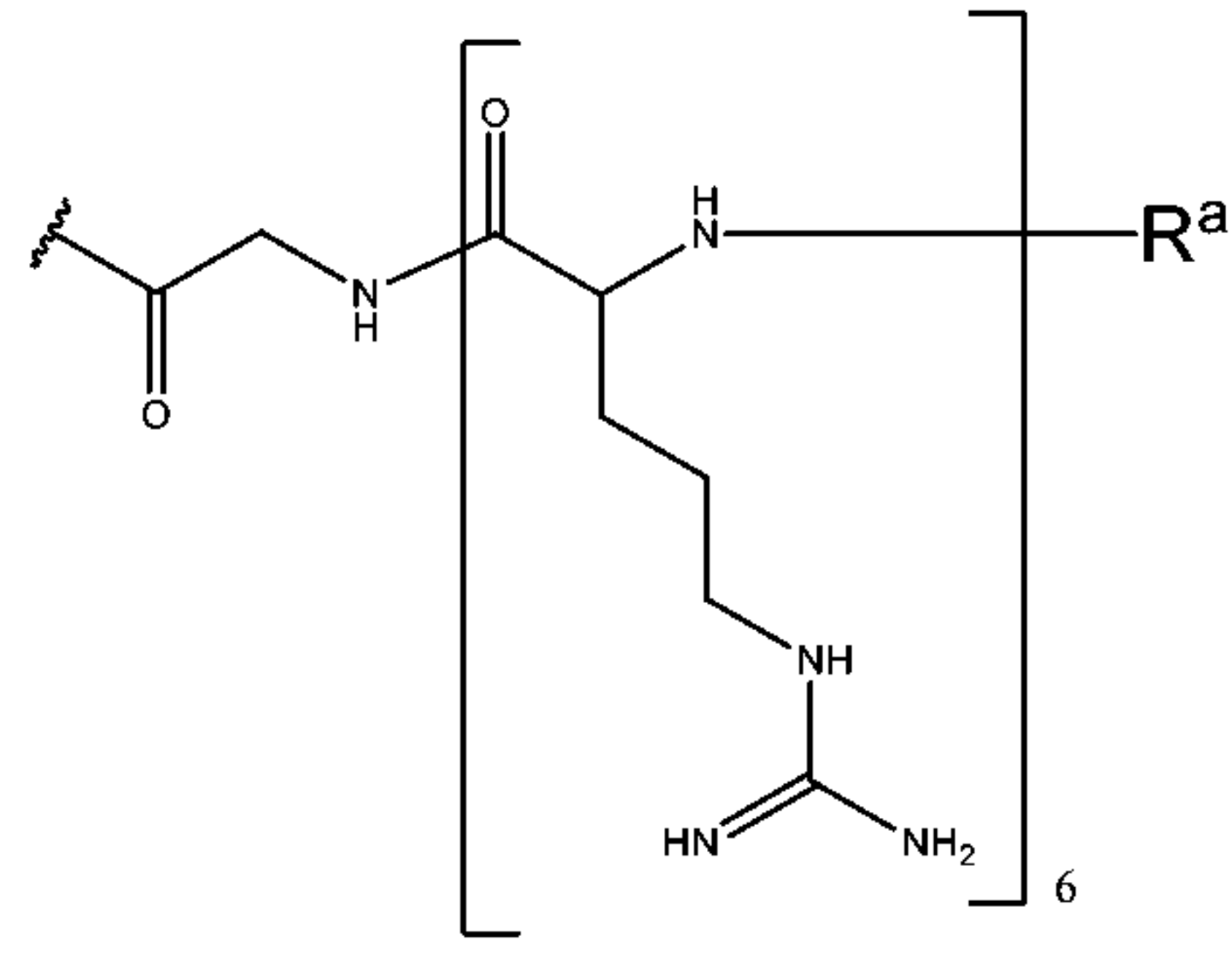
子係Gly。在一些實施方式中，該CPP係SEQ ID NO: 20。

【0018】 在某些實施方式中，該富含精胺酸的CPP係-R₆-R^a(即六個精胺酸殘基；SEQ ID NO: 10)，其中R^a選自H、鹼基、乙鹼基、苯甲鹼基、和硬脂鹼基。在某些實施方式中，R^a係乙鹼基。在多個實施方式中，該CPP選自SEQ ID NO: 10、15、或16，並且該連接子選自由以下各項組成之群組：

-C(O)(CH₂)₅NH-、-C(O)(CH₂)₂NH-、、C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-、-C(O)CH₂NH-、和。在一些實施方式中，該連接子包含1、2、3、4或5個胺基酸。

【0019】 在一些實施方式中，該CPP係SEQ ID NO: 10並且該連接子係Gly。在一些實施方式中，該CPP係SEQ ID NO: 11。

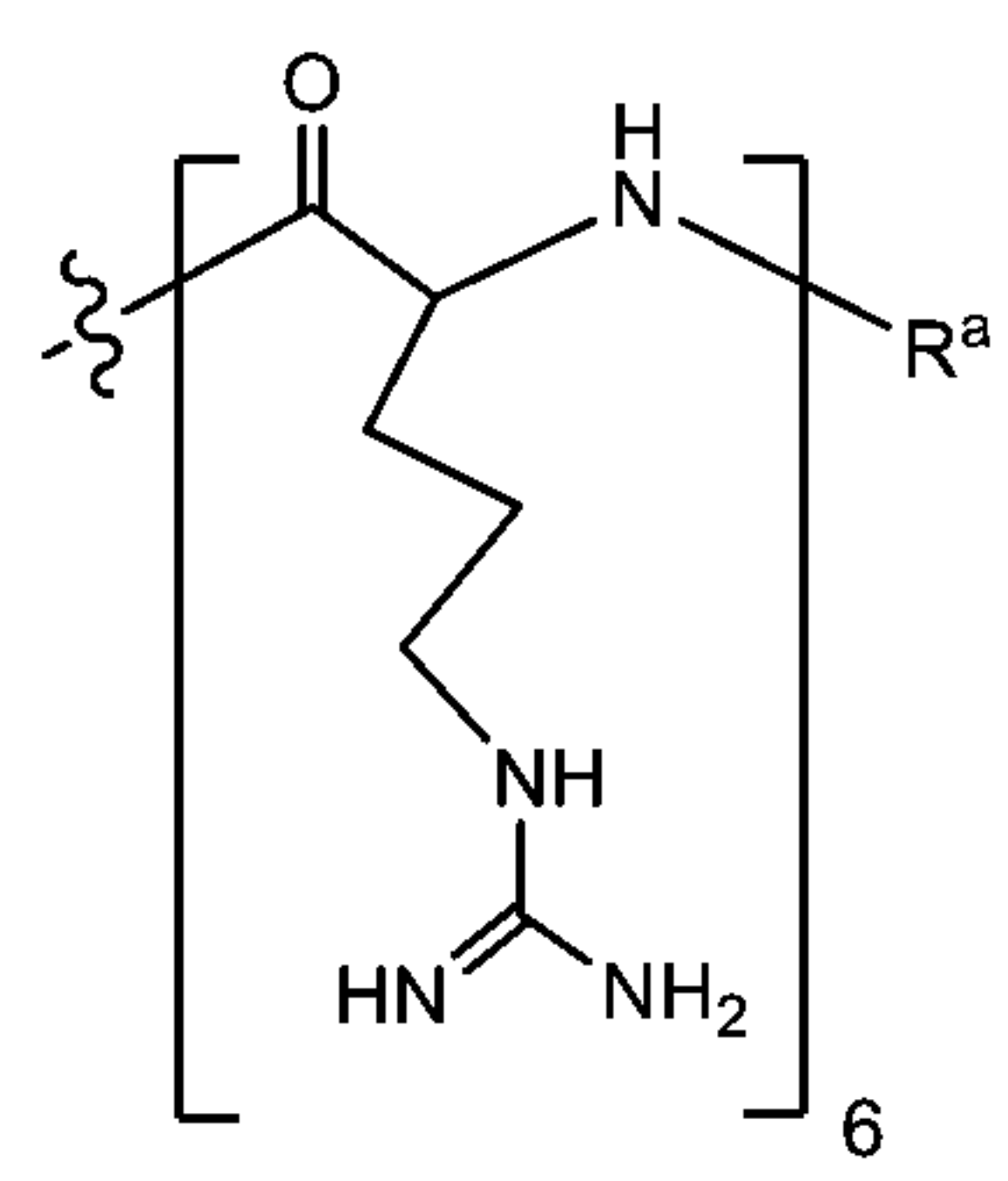
【0020】 在某些實施方式中，Z係在寡聚體的5'和/或3'端與本揭露的反義寡聚體共價鍵合的-C(O)CH₂NH-R₆-R^a(「R₆」被揭露為SEQ ID NO: 10)，其中R^a係H、鹼基、乙鹼基、苯甲鹼基、或硬脂鹼基，以封端R₆(SEQ ID NO: 10)的胺基末端。在某些實施方式中，R^a係乙鹼基。在該等非限制性實例中，該CPP係-R₆-R^a(SEQ ID NO: 10)並且該連接子係-C(O)CH₂NH-(即GLY)。Z = -C(O)CH₂NH-R₆-R^a(「R₆」被揭露為SEQ ID NO: 10)的這一具體實例還藉由以下結構例示：



其中R^a選自H、鹼基、乙鹼基、苯甲鹼基、和硬脂鹼基。在一些實施方式

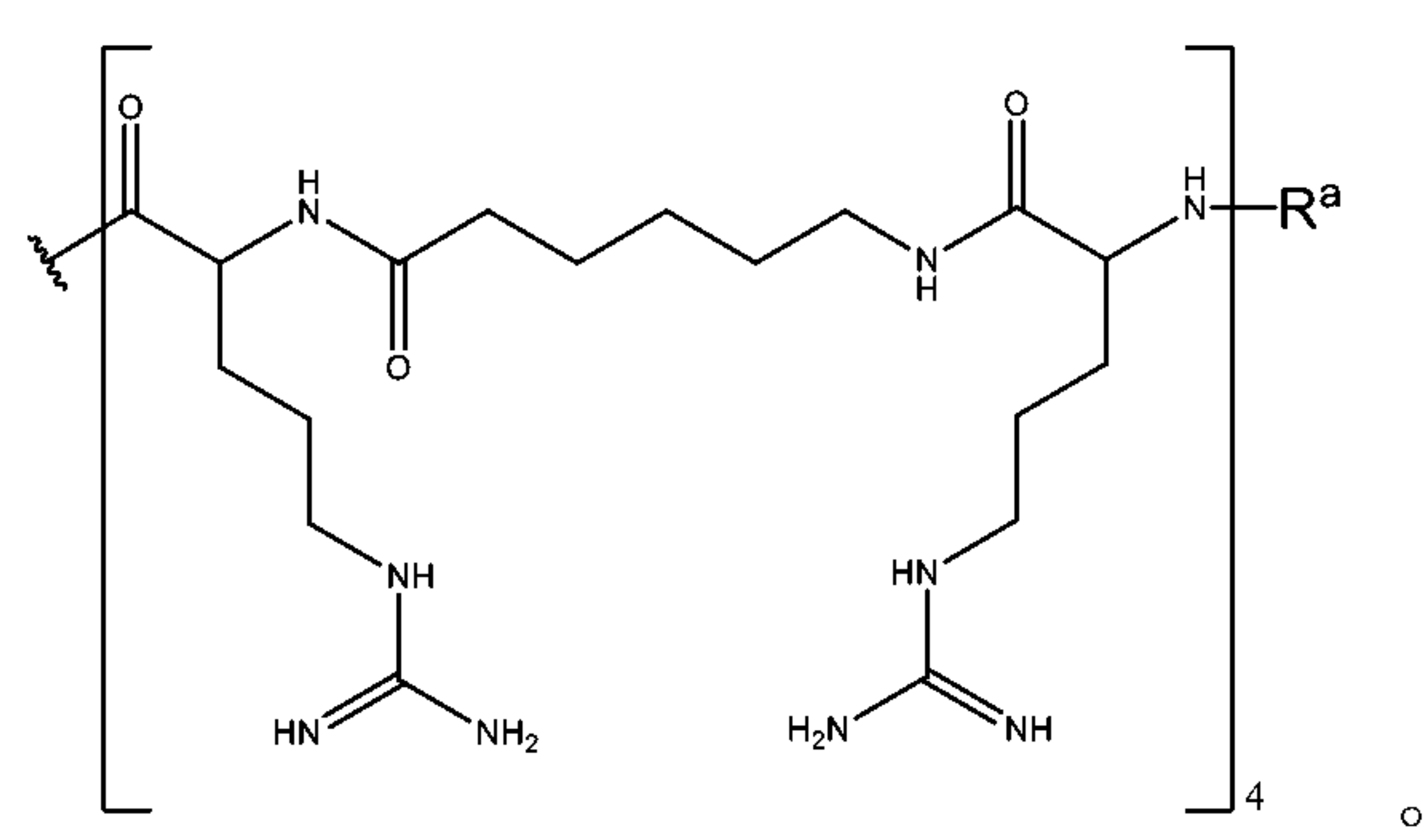
中， R^a 係乙醯基。

【0021】 在多個實施方式中，該CPP係- R_6 - R^a (SEQ ID NO: 10)，也例示為下式：

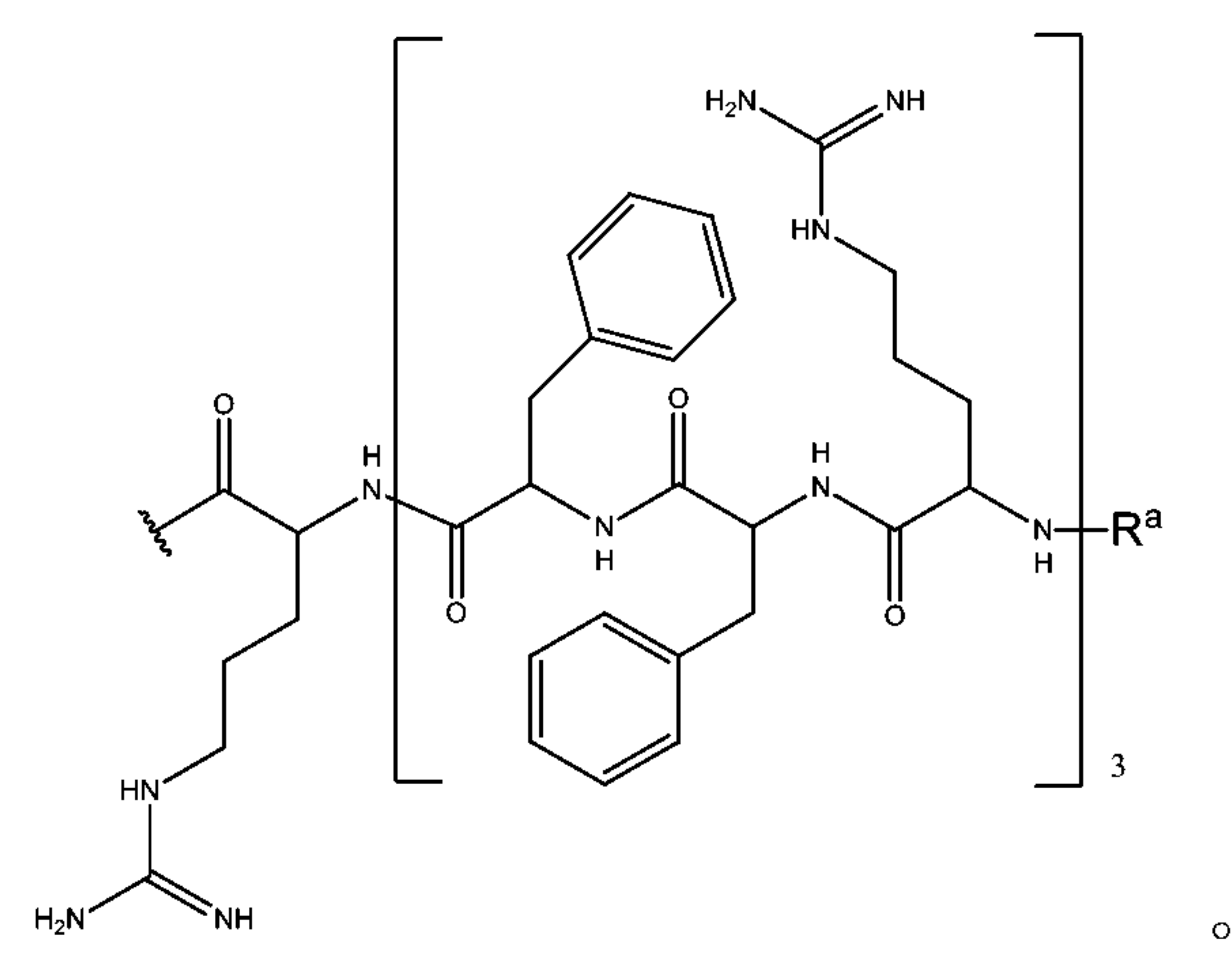


其中 R^a 選自H、醯基、乙醯基、苯甲醯基、和硬脂醯基。在某些實施方式中，該CPP係SEQ ID NO: 11。在一些實施方式中， R^a 係乙醯基。

【0022】 在一些實施方式中，該CPP係-(RXR)₄- R^a (SEQ ID NO: 15)，也例示為下式：

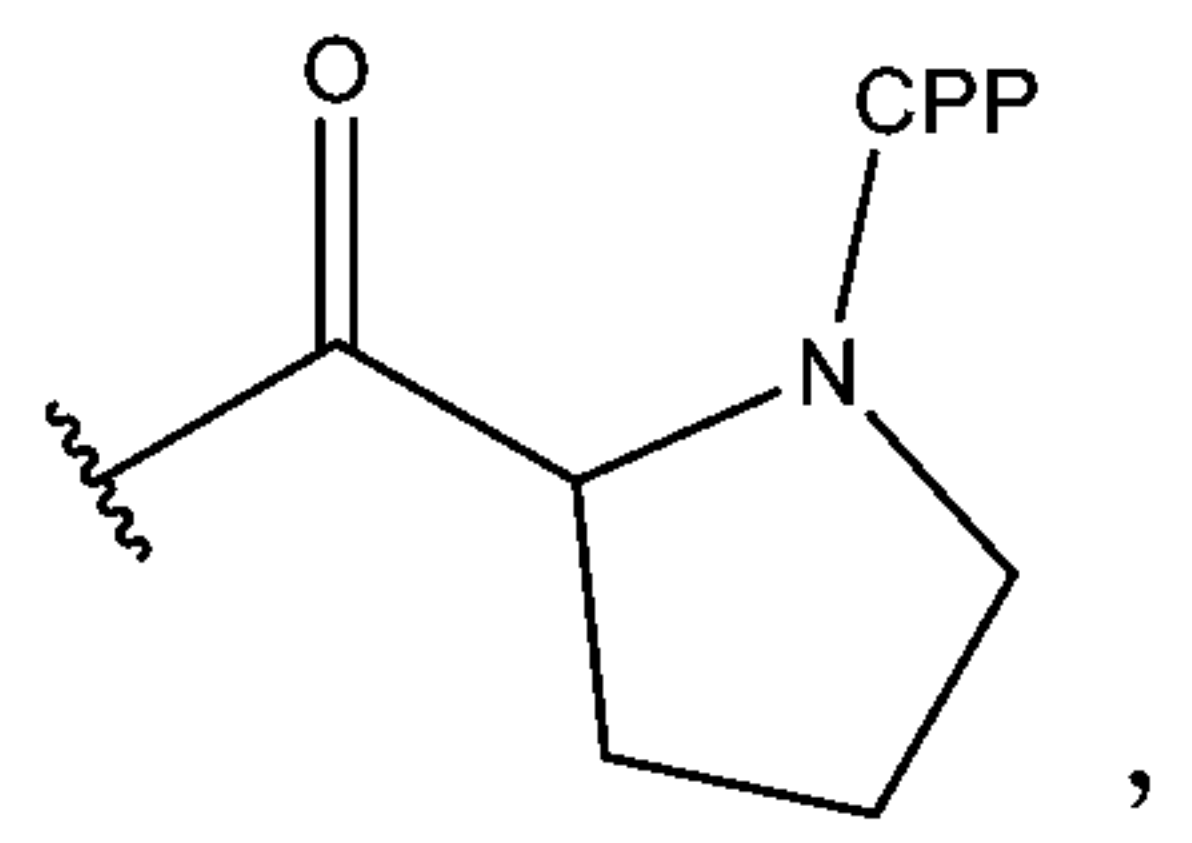


【0023】 在多個實施方式中，該CPP係-R-(FFR)₃- R^a (SEQ ID NO: 16)，也例示為下式：

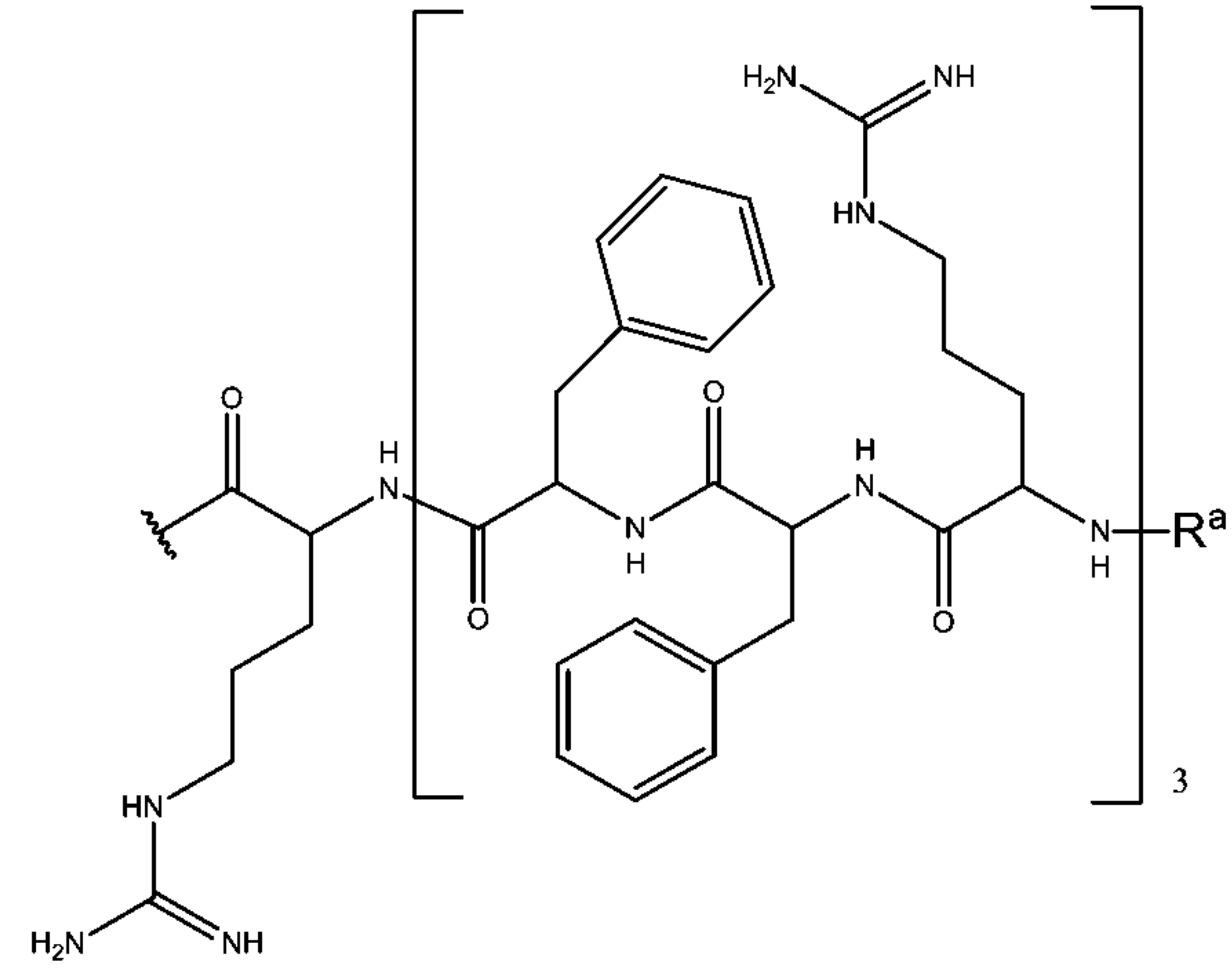


【0024】 在多個實施方式中，Z選自：

- C(O)(CH₂)₅NH-CPP；
- C(O)(CH₂)₂NH-CPP；
- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP；
- C(O)CH₂NH-CPP，以及如下式：

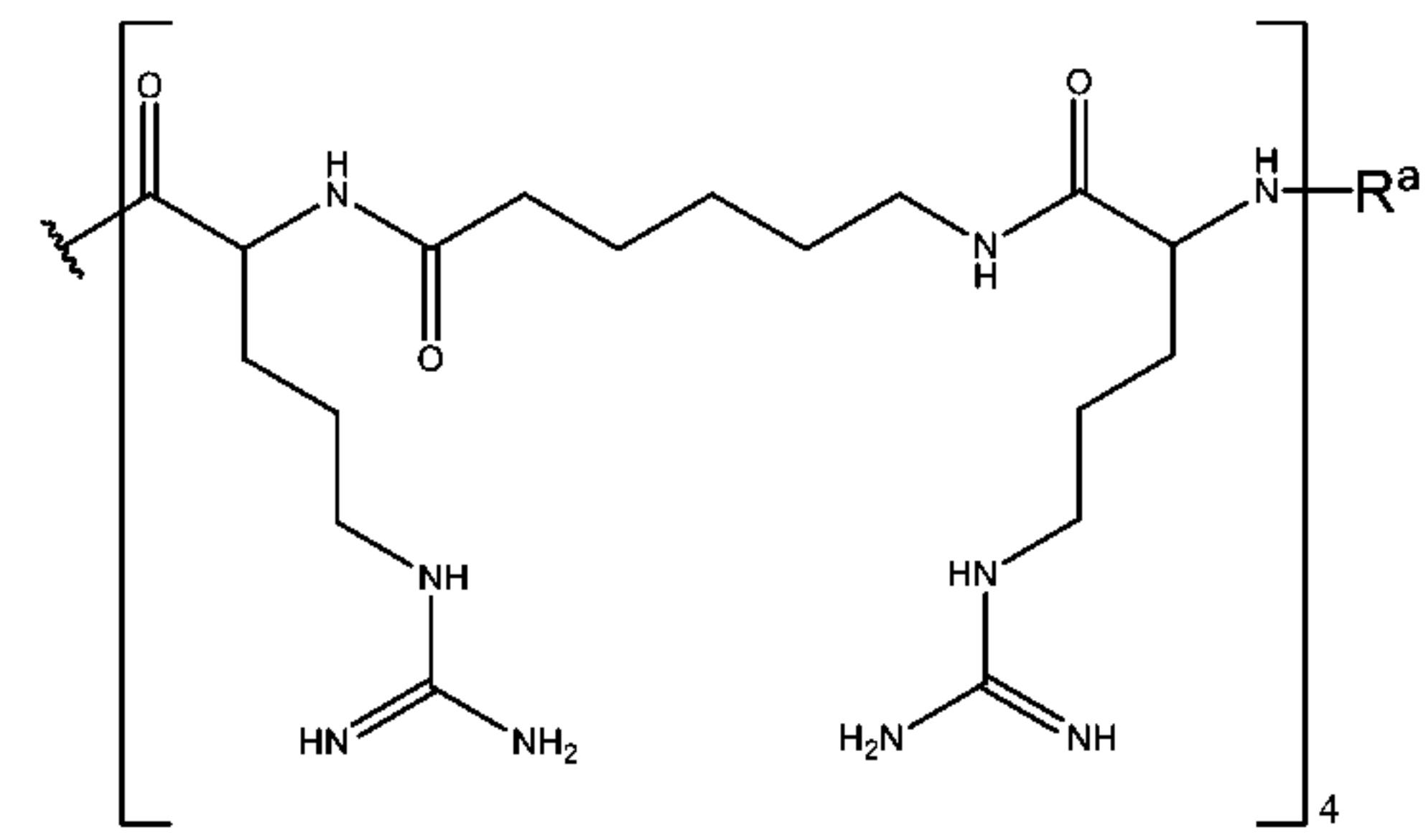


其中該CPP藉由在CPP羧基末端的醯胺鍵附接至連接子部分，並且其中該CPP選自：

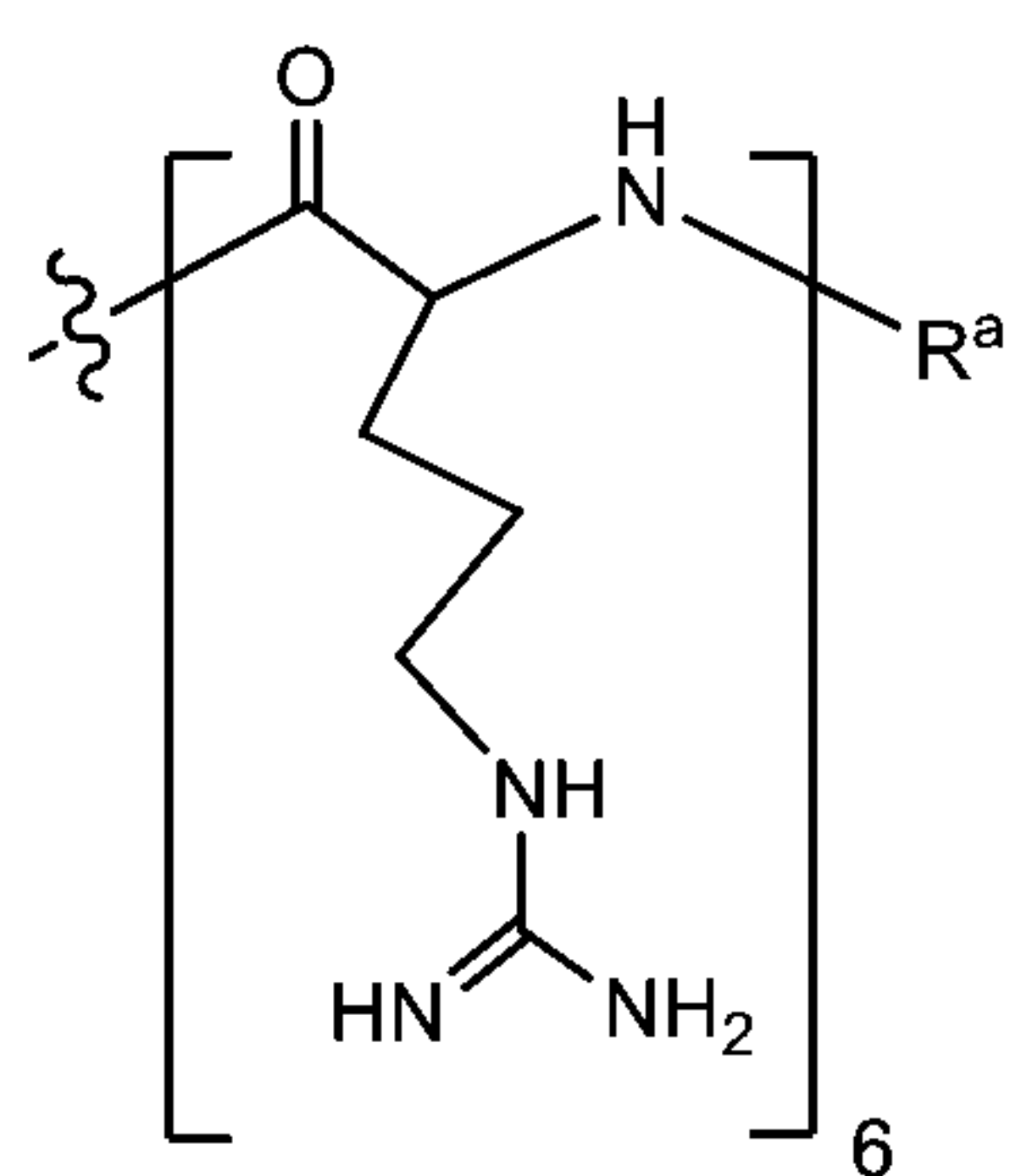


、 (-R-(FFR)₃-R^a)(SEQ ID NO:

16)、



、 (- (RXR)₄-R^a)(SEQ ID NO: 15) 、



、和 $(-R_6-R^a)$ (SEQ ID NO: 10)。在一些實施方式中， R^a 係乙醯基。

【0025】 在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於SEQ ID NO. 3。

【0026】 在一些方面，經修飾的反義寡聚體的核鹼基連接至咪啉代環結構，其中該等咪啉代環結構藉由含磷的亞基間鍵連接，該等亞基間鍵將一個環結構的咪啉代氮與相鄰環結構的5'環外碳相連。

【0027】 在一些方面，該反義寡聚體的核鹼基連接至肽核酸(PNA)，其中磷酸-糖多核苷酸骨架被連接有核鹼基的柔性假肽聚合物代替。

【0028】 在一些方面，該反義寡聚體的核鹼基的至少一個連接至鎖核酸(LNA)，其中該鎖核酸結構係經過化學修飾的核苷酸類似物，其中核糖部分具有連接2'氧和4'碳的額外橋。

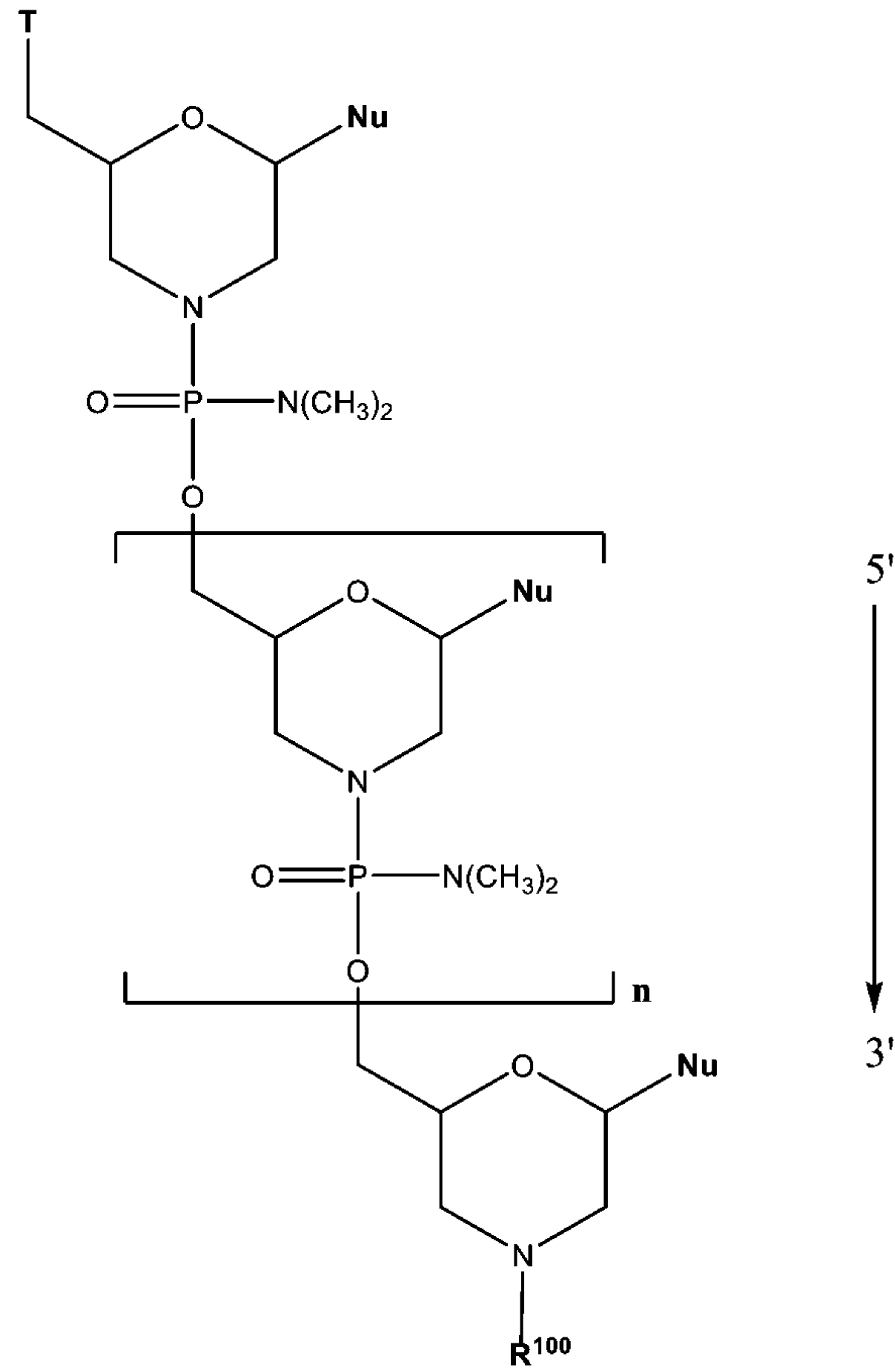
【0029】 在一些方面，該反義寡聚體的核鹼基的至少一個連接至橋接核酸(BNA)，其中藉由向呋喃糖骨架中引入另外的橋接結構來限制或鎖定糖構象。在一些方面，該反義寡聚體的核鹼基的至少一個連接至2'-O,4'-C-乙烯-橋接核酸(ENA)。

【0030】 在一些方面，該經修飾的反義寡聚體可含有解鎖核酸(UNA)亞基。UNA和UNA寡聚體係RNA的類似物，其中該亞基的C2'-C3'鍵已被切割。

【0031】 在一些方面，該經修飾的反義寡聚體含有一個或多個硫代磷酸酯(或S-寡聚物)，其中一個非橋接氧被硫代替。在一些方面，該經修飾的反義寡聚體含有一個或多個2' O-甲基、2' O-MOE、MCE、和2'-F，其中核糖的2'-OH分別被甲基、甲氧基乙基、2-(N-甲基胺基甲醯基)乙基、或氟基團取代。

【0032】 在一些方面，該經修飾的反義寡聚體係三環DNA(tc-DNA)，其係受約束的DNA類似物，其中藉由引入環丙烷環來修飾每個核苷酸，以限制骨架的構象柔性並優化扭轉角 γ 的骨架幾何形狀。

【0033】 在多個方面中，本揭露提供了根據式 (I) 之反義寡聚體：

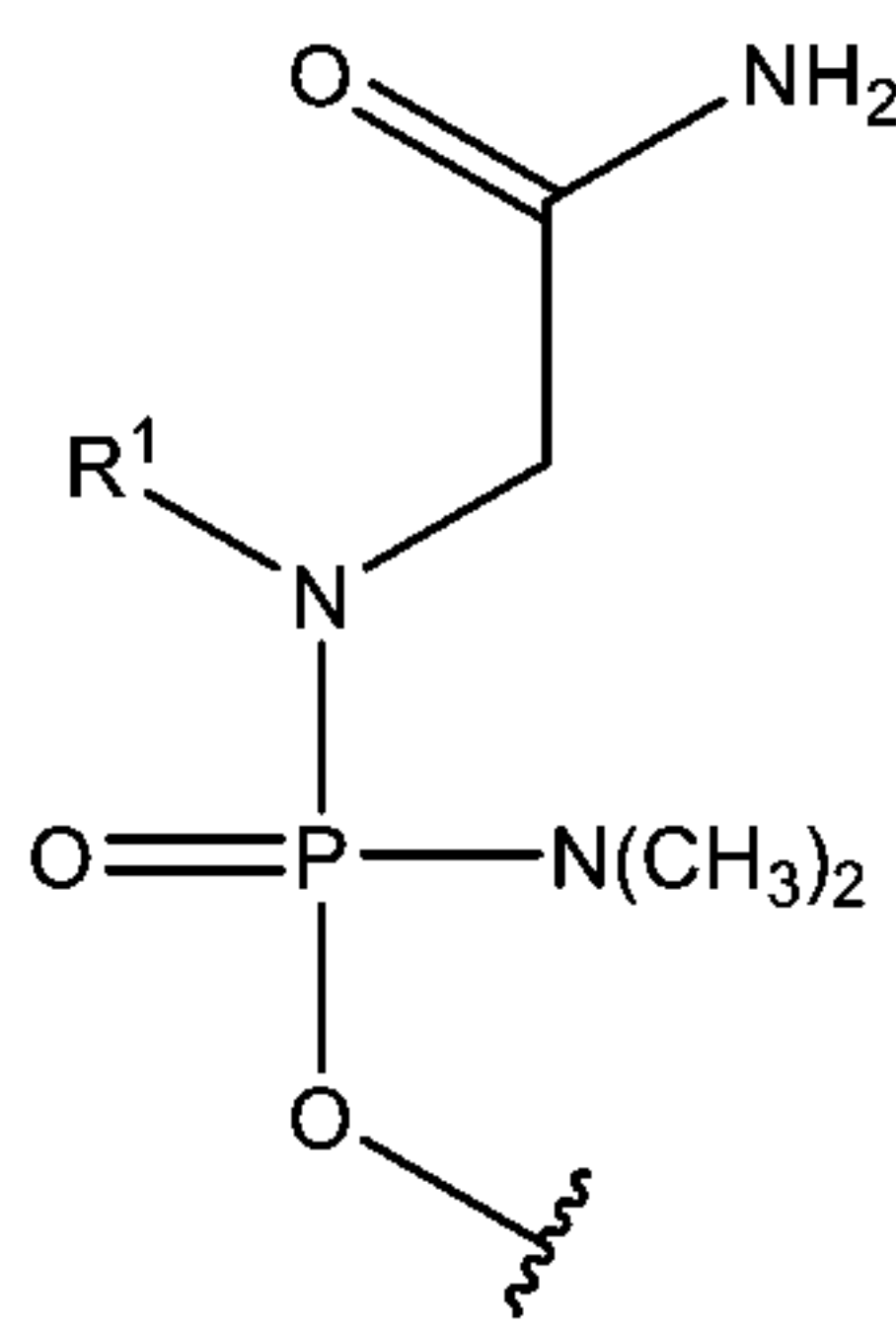


(I)

或其藥學上可接受的鹽，其中：

每個Nu係一起形成靶向序列(targeting sequence)的核鹼基；

T係選自以下的部分：



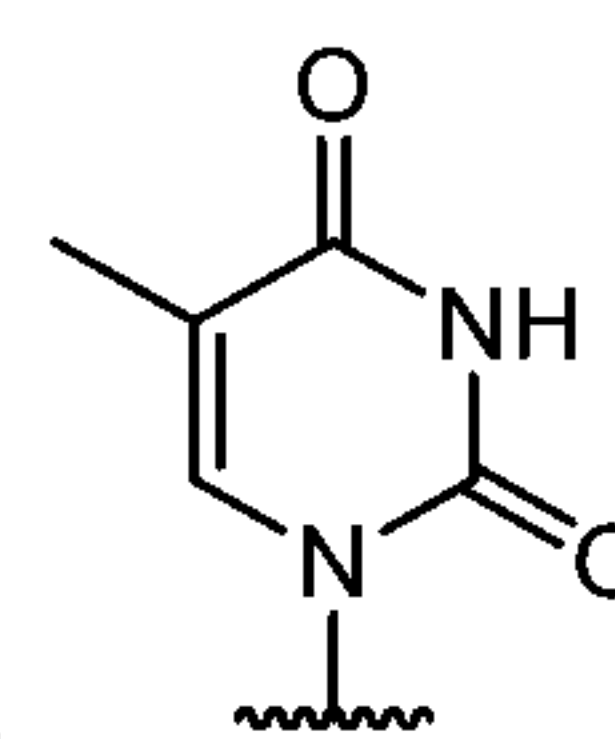
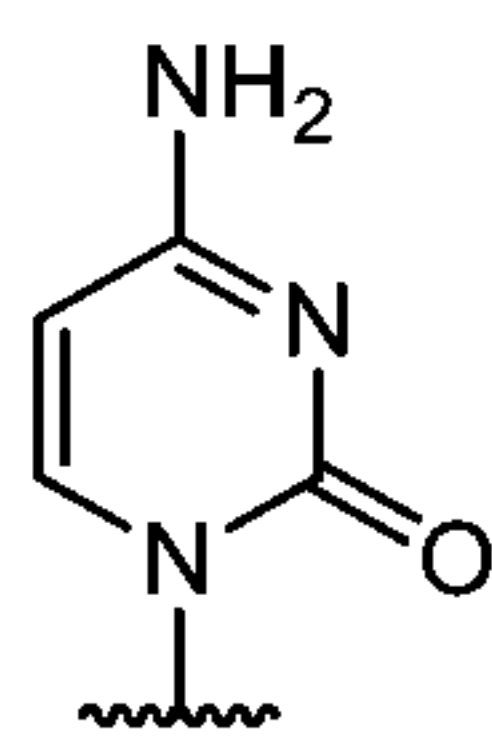
；和  ；並且T部分的遠端-OH或-

NH₂視需要連接至細胞穿透肽。

【0034】 R^{100} 係氫或細胞穿透肽；

從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：

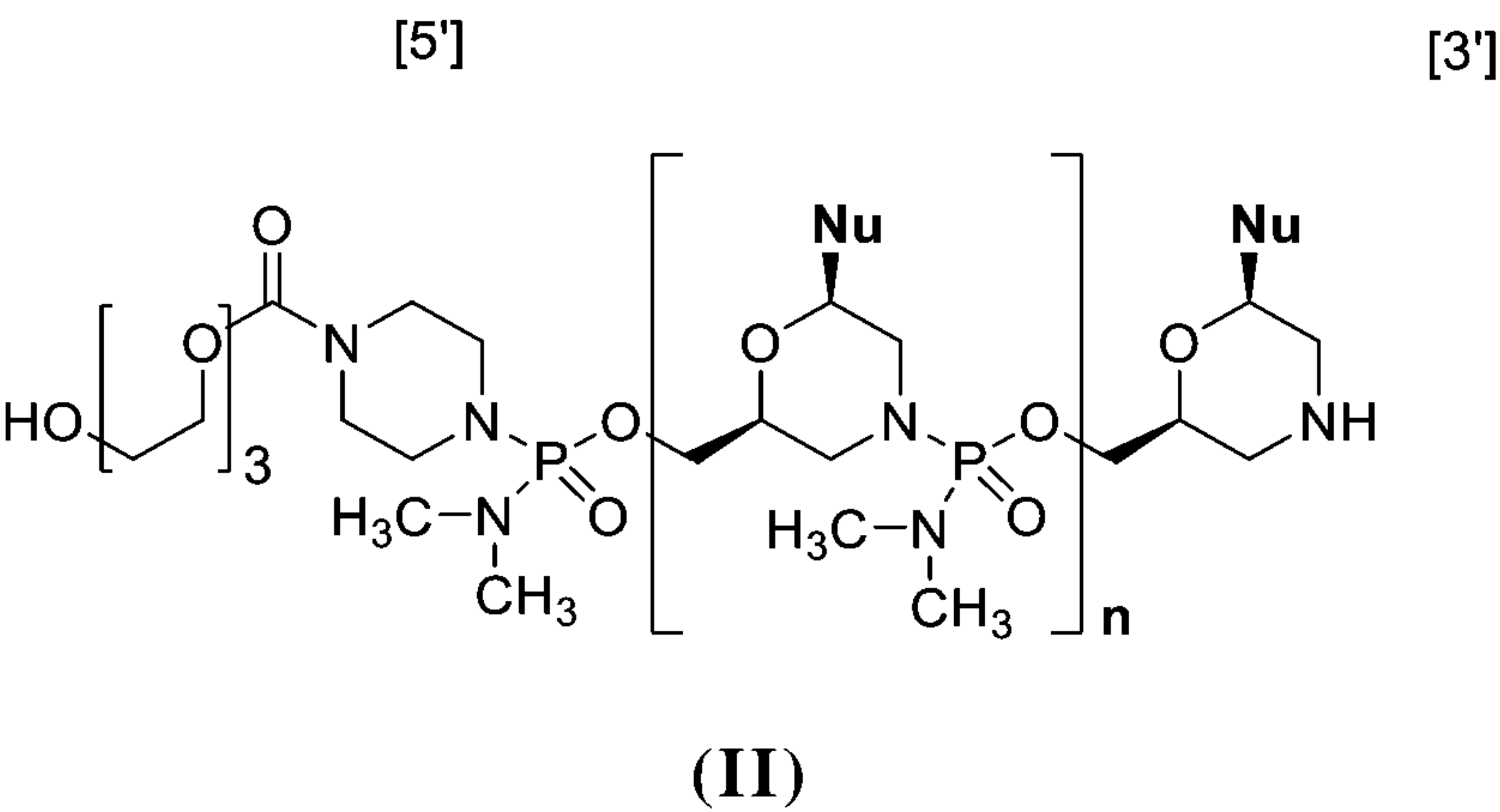
退火位點	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO :
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



其中A係 ，C係 ，G係 ，並且T係 。

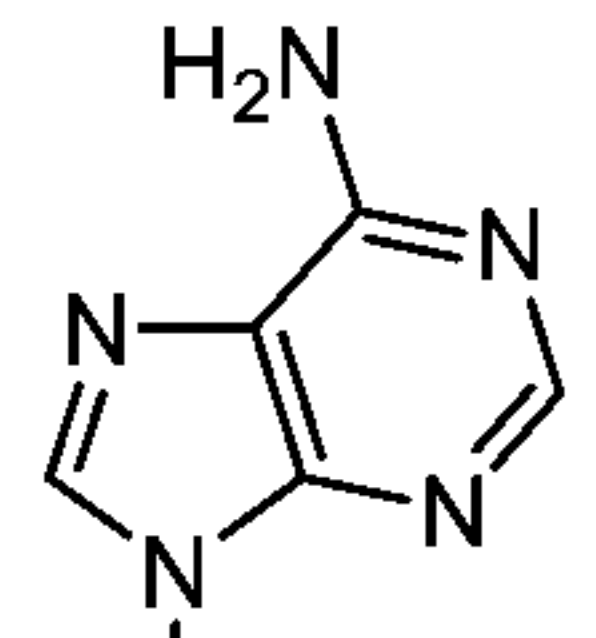
【0035】 在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、或SEQ ID NO: 9。在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於SEQ ID NO. 3。

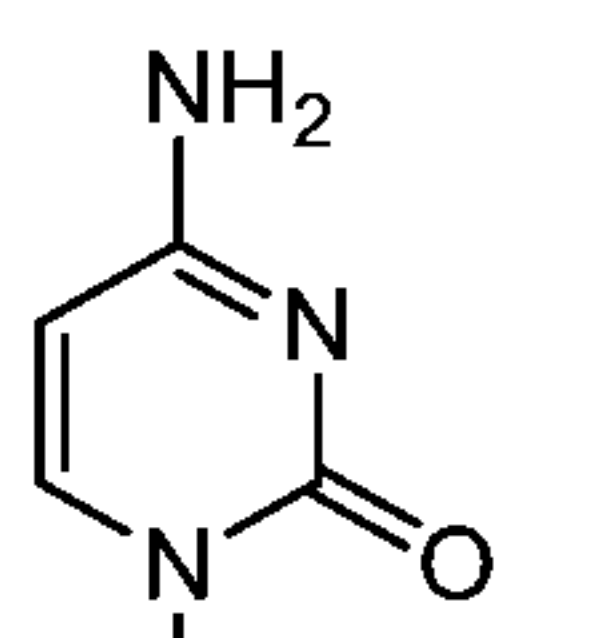
【0036】在另一方面，本揭露提供了具有式 (II) 之反義寡聚體：

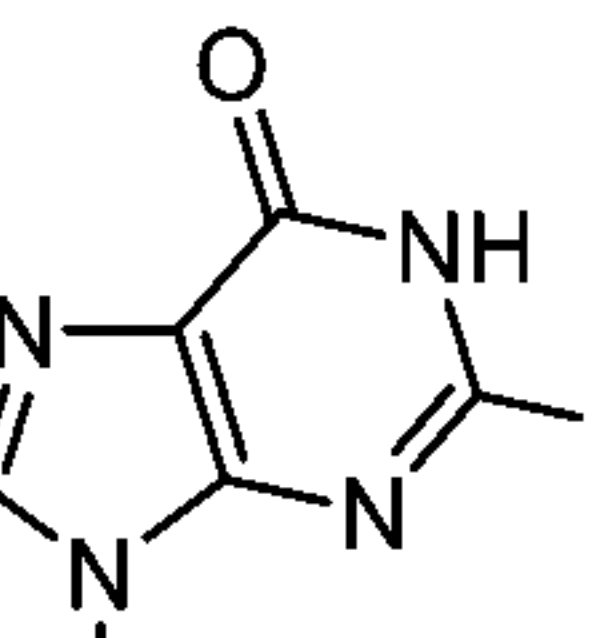


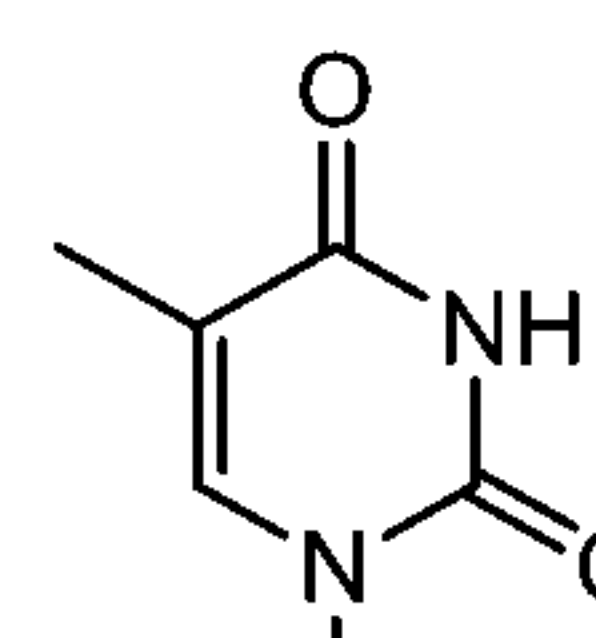
或其藥學上可接受的鹽，其中從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5’至3’]	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9


其中A係


，C係

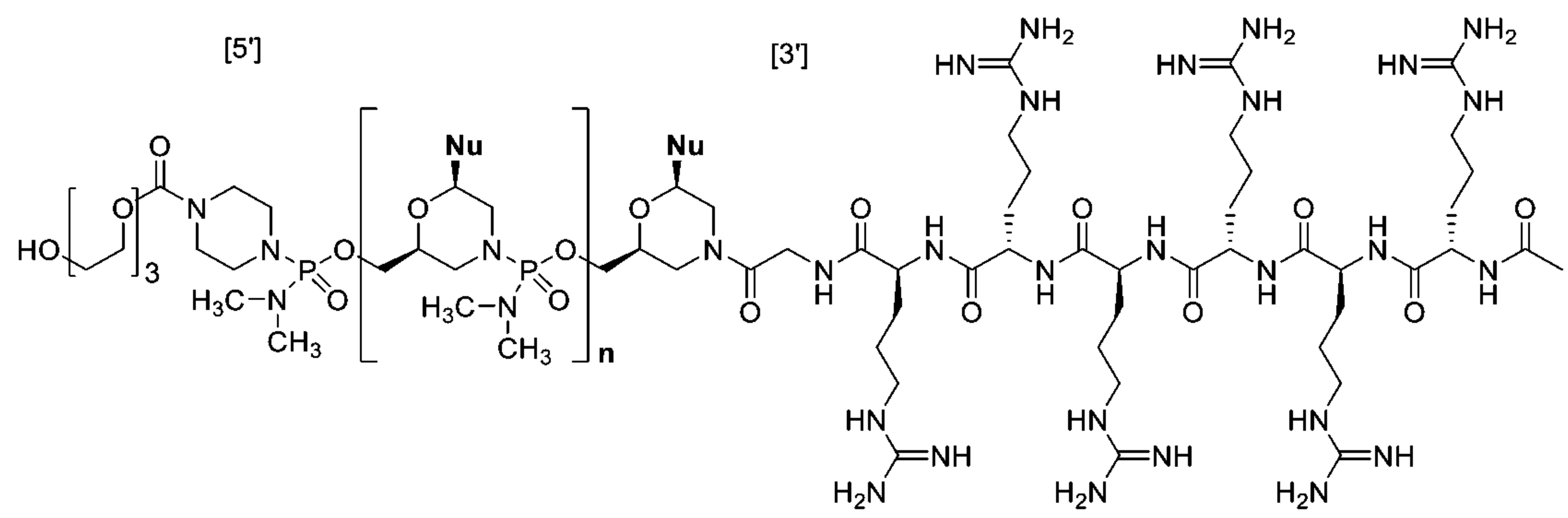

，G係


，並且T係

。在
一些實施方式中，式 (II) 之遠端-OH連接至細胞穿透肽。

【0037】 在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、或SEQ ID NO: 9。在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於SEQ ID NO. 3。

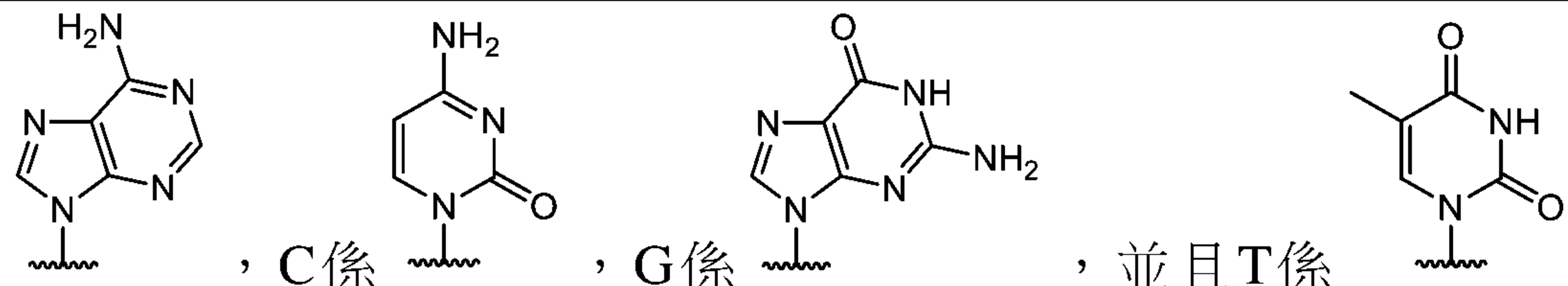
【0038】 在另一方面，本揭露提供了具有式 (III) 之反義寡聚體：

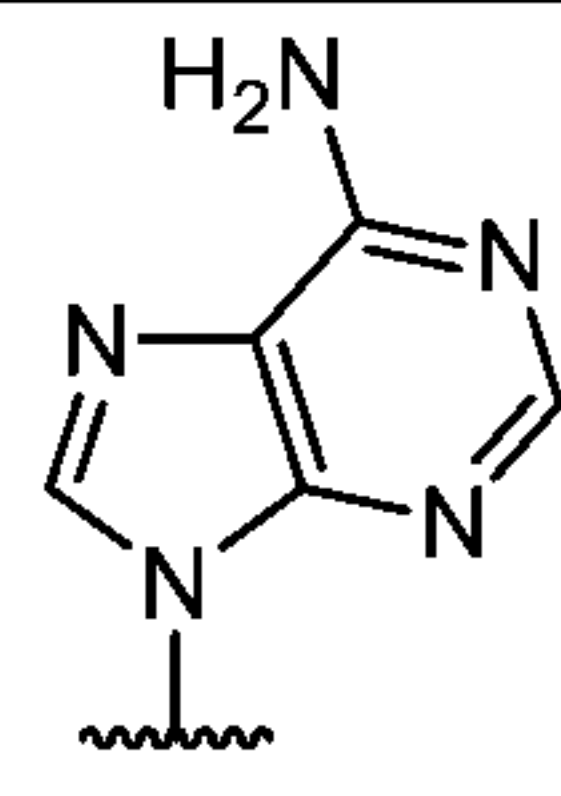
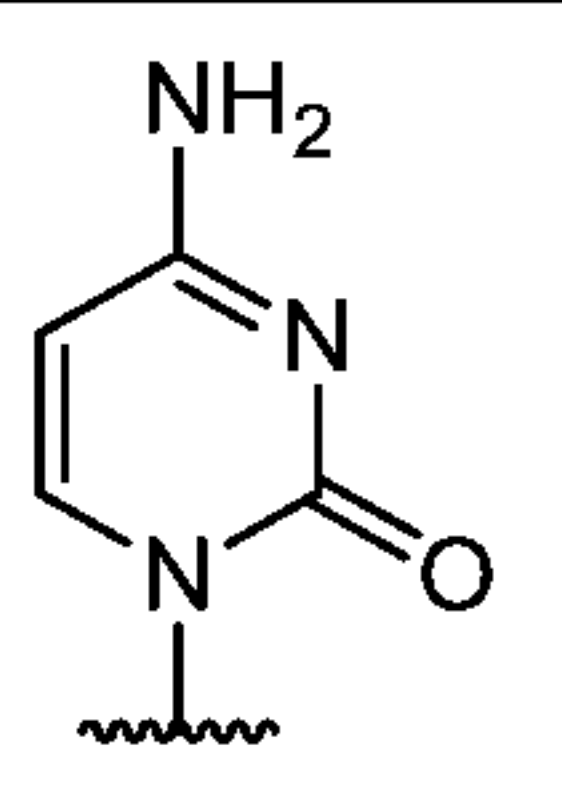
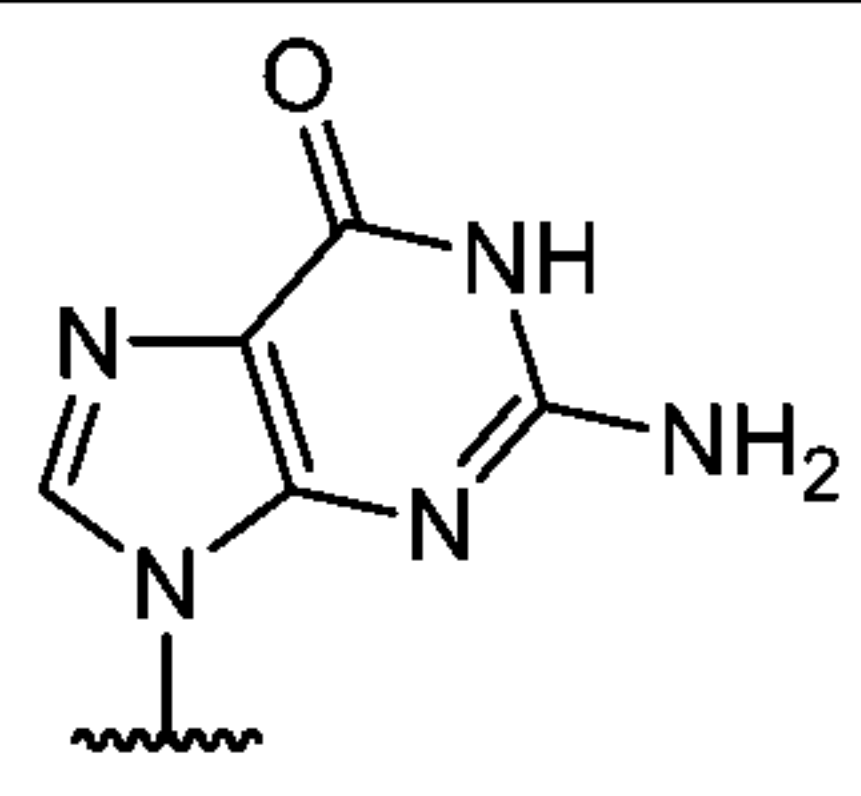
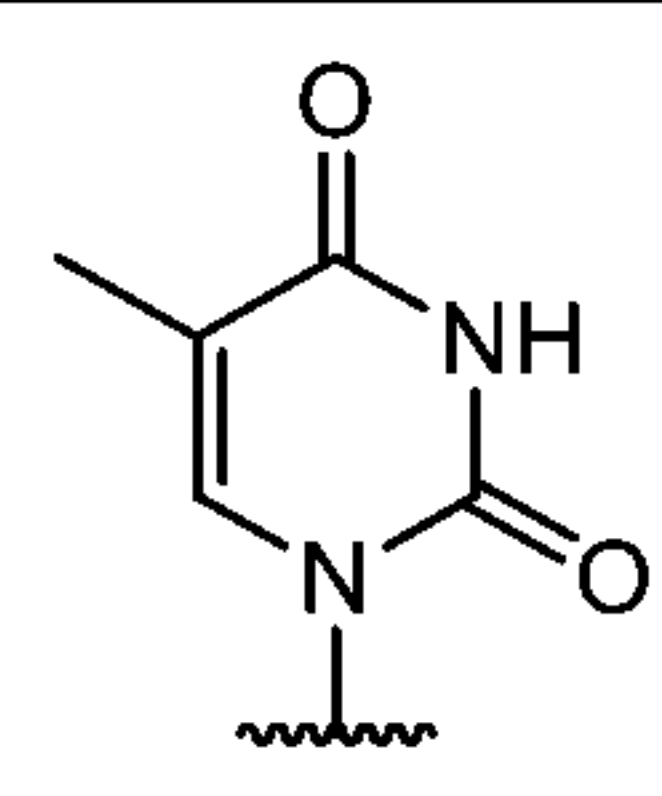


(III)

或其藥學上可接受的鹽，其中從1至n和從5’至3’，每個**Nu**對應於以下之一中的核鹼基：

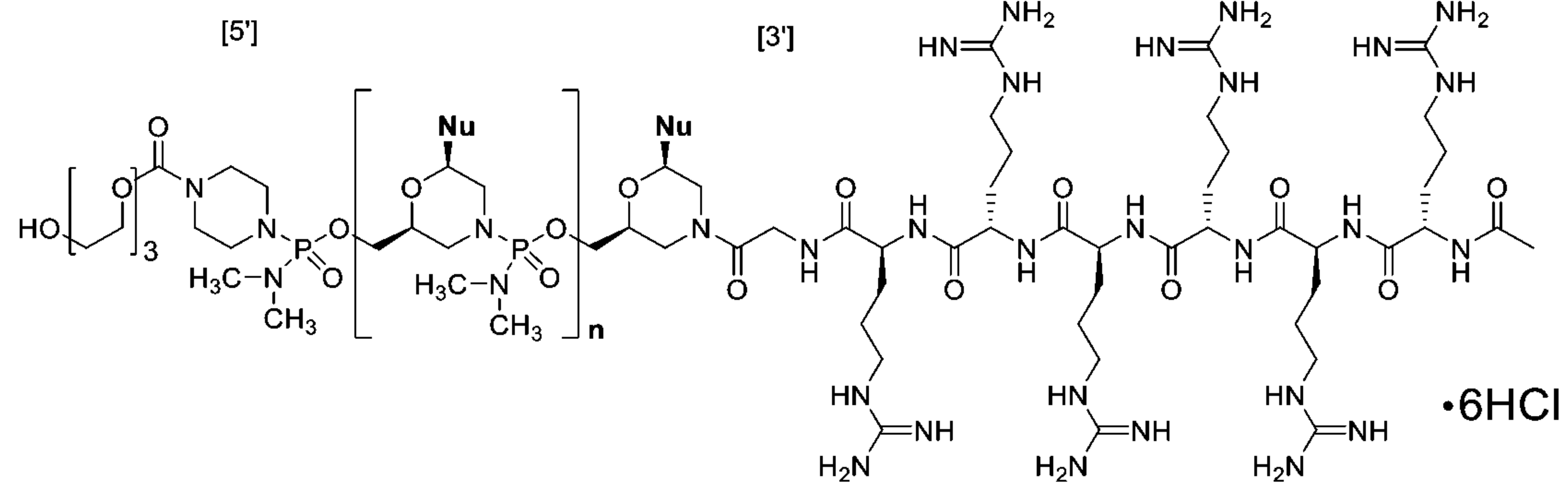
退火位點	靶向序列[5’至3’]	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



其中A係，C係，G係，並且T係。在一些實施方式中，式 (III) 之遠端-OH連接至細胞穿透肽。

【0039】 在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個**Nu**對應於SEQ ID NO. 3。

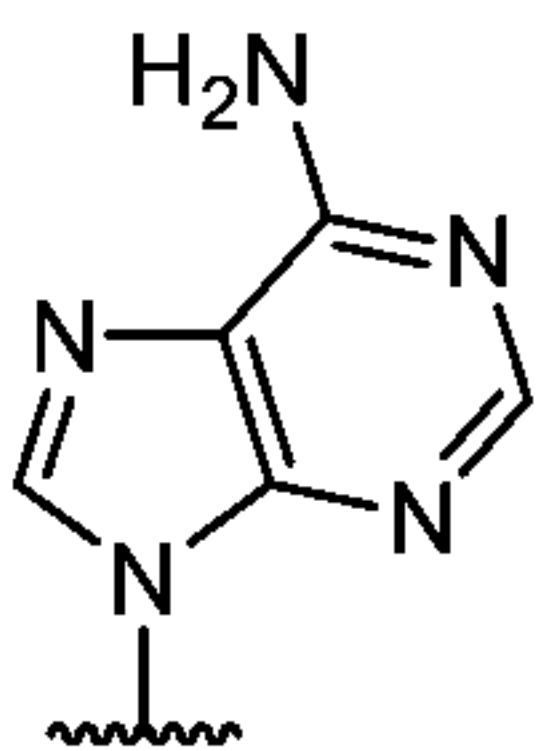
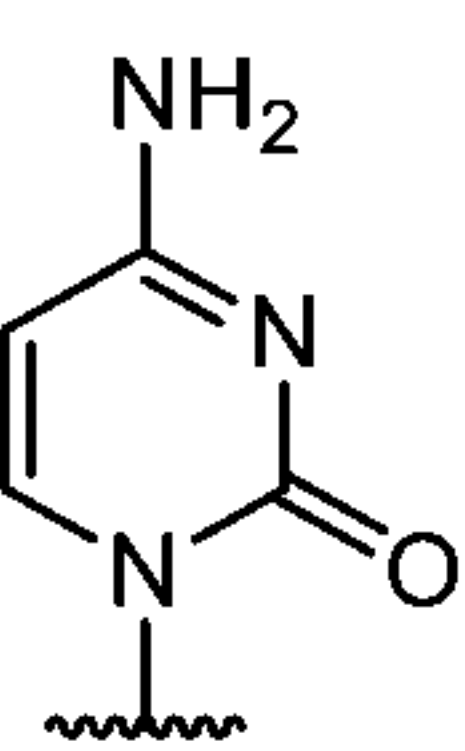
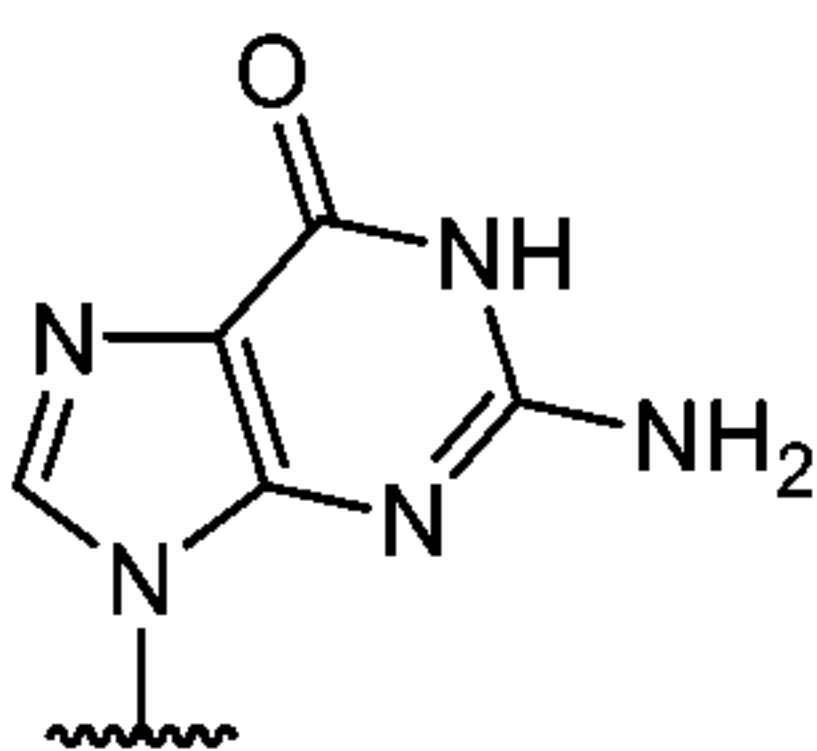
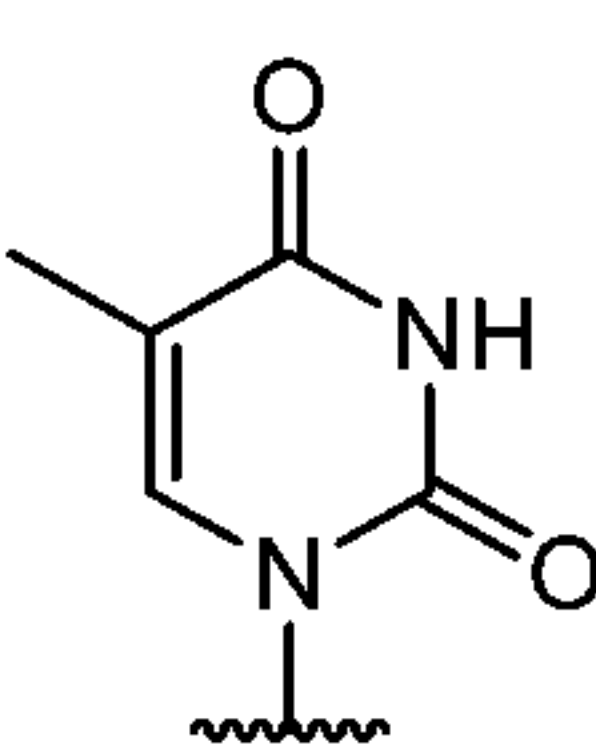
【0040】 在另一方面，本揭露提供了具有式 (IV) 之反義寡聚體：



(IV)

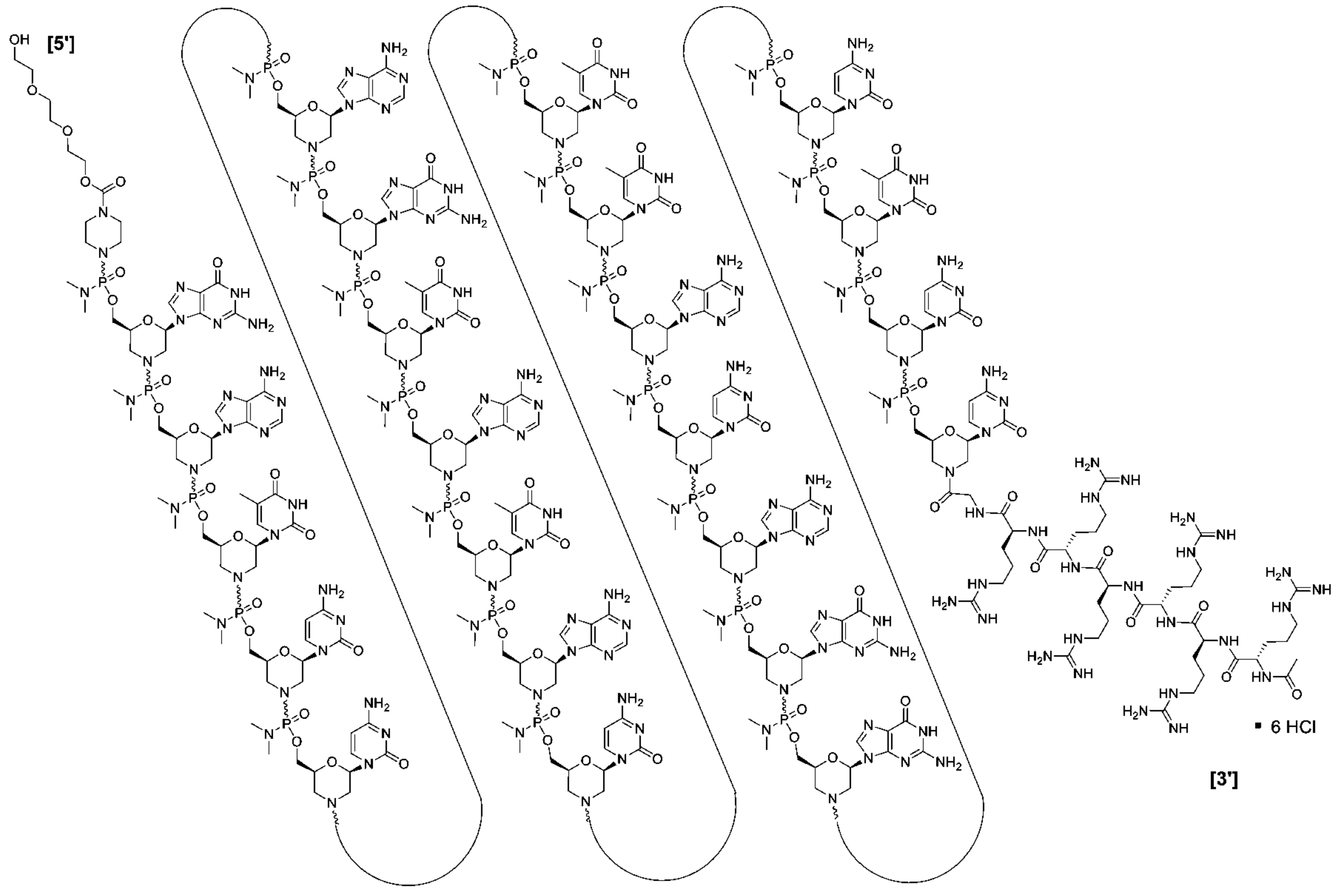
其中從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5’至3’]	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

其中A係，C係，G係，並且T係。

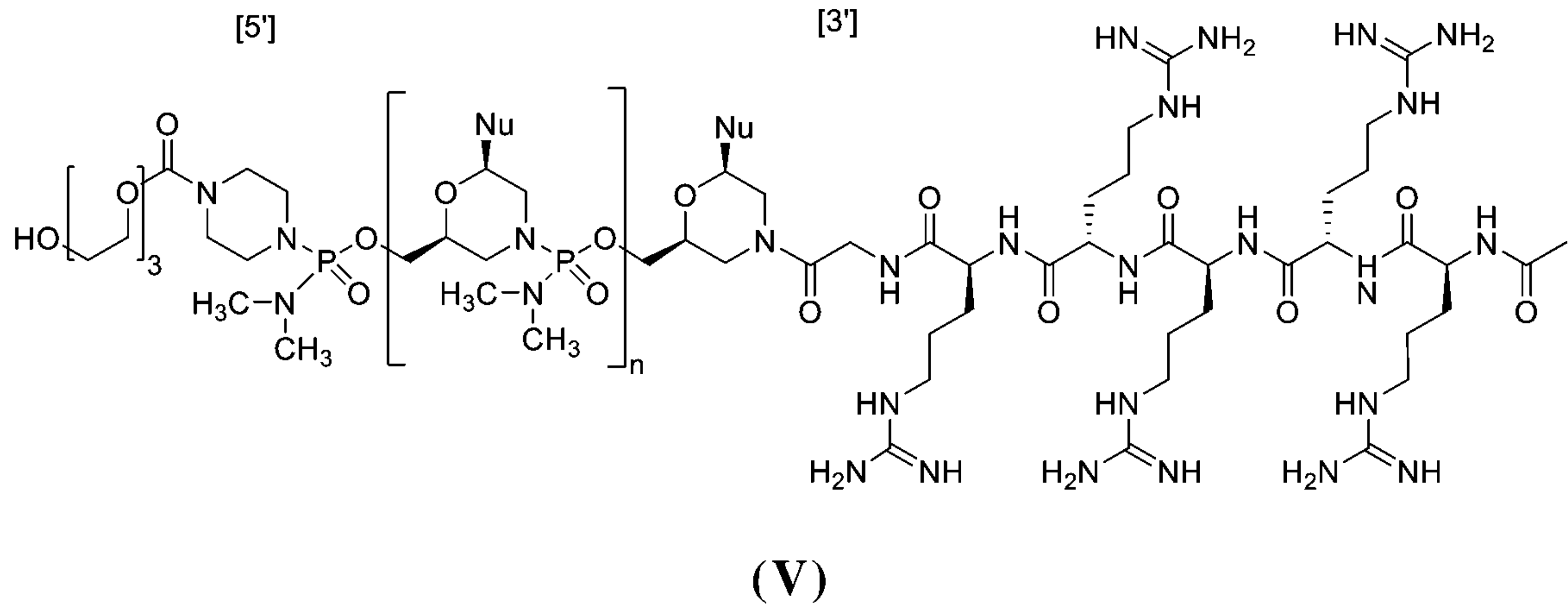
【0041】 在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於SEQ ID NO. 3。

【0042】 在針對式 (IV) 之一些實施方式中，該反義寡聚體係根據式 (IVa)



(IVa)

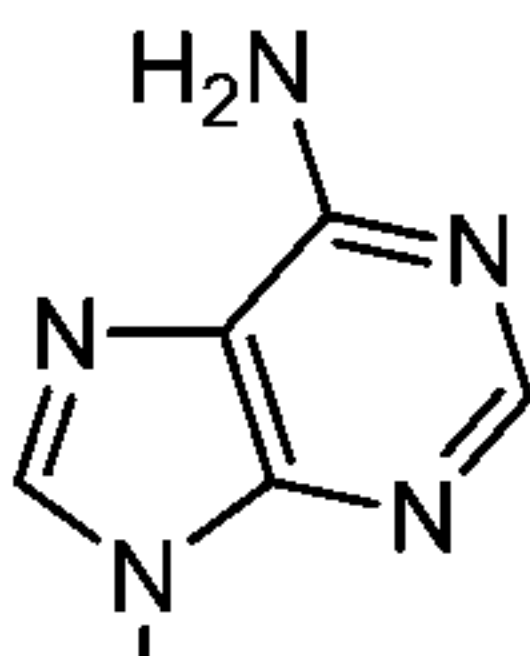
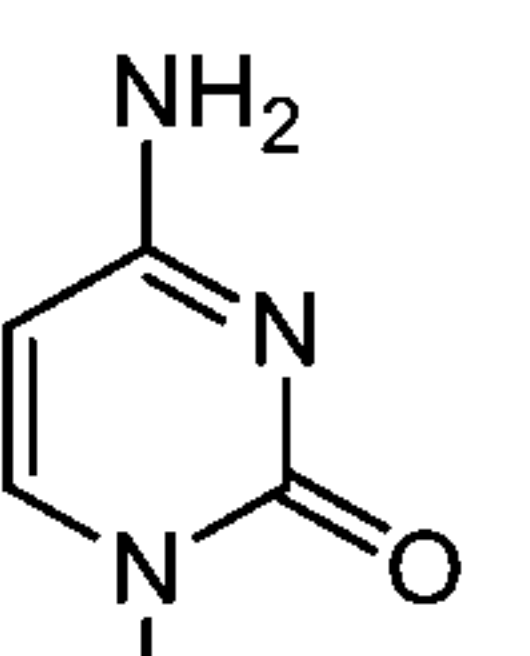
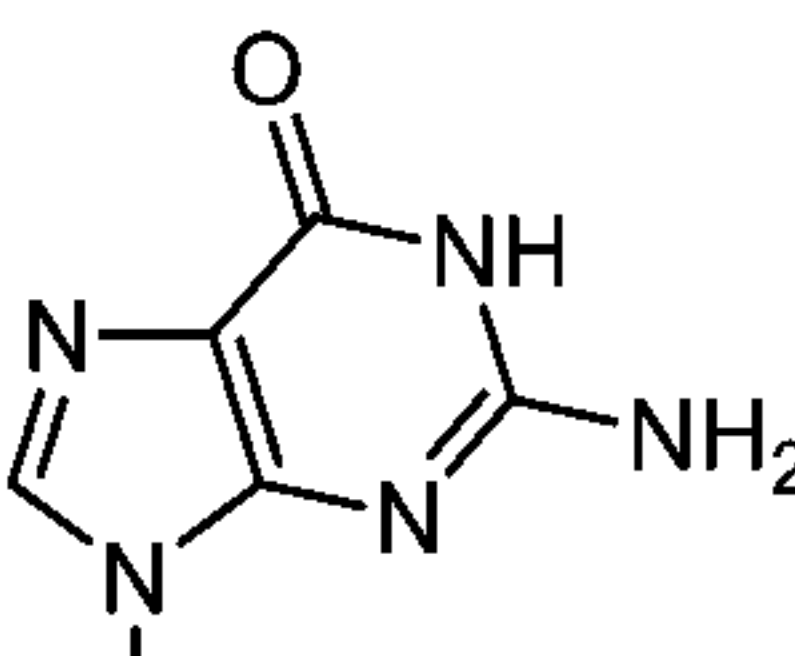
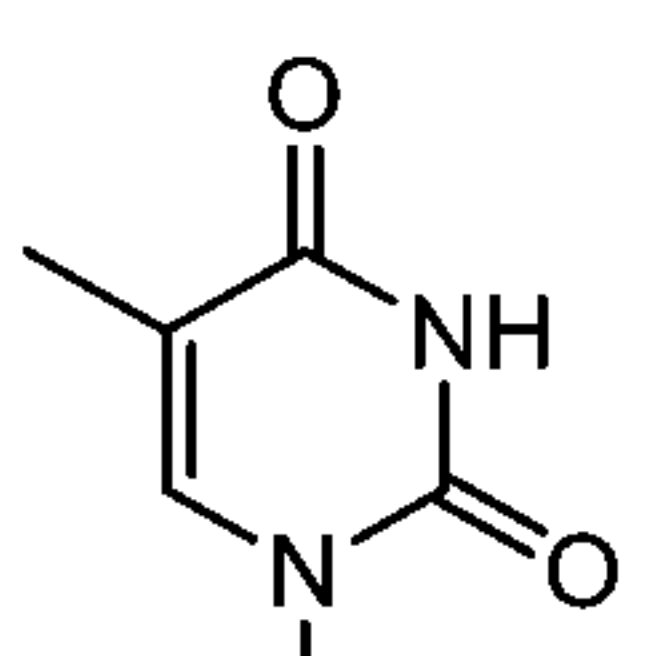
【0043】 在另一方面，本揭露提供了具有式 (V) 之反義寡聚體：



(V)

其中從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5’至3’]	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

其中A係，C係，G係，並且T係。在

一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於SEQ ID NO. 3。

【0044】 在另一方面，本揭露提供了一種在有需要的受試者中治療杜興氏肌肉失養症(DMD)之方法，其中該受試者具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變，該方法包括向該受試者施用本揭露的反義寡聚體。本揭露還解決了本揭露的反義寡聚體用於製造在有需要的受試者中治療杜興氏肌肉失養症(DMD)的藥物的用途，其中該受試者具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變。

【0045】 在另一方面，本揭露提供了一種恢復mRNA閱讀框以誘導受試者中肌養蛋白產生之方法，該受試者具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變，該方法包括向該受試者施用本揭露的反義寡聚體。在另一方面，本揭露提供了一種在受試者的mRNA加工期間從肌養蛋白先質mRNA中排除外顯子50之方法，該受試者具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變，該方法包括向該受試者施用本揭露的反義寡聚體。在另一方面，本揭露提供了一種在受試者中結合肌養蛋白先質mRNA的外顯子50、內含子49、和/或內含子50之方法，該受試者具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變，該方法包括向該受試者施用本揭露的反義寡聚體。

【0046】 在另一方面，本揭露提供了用於在療法中使用的本揭露的反義寡聚體。在某些實施方式中，本揭露提供了用於治療杜興氏肌肉失養症的本揭露的反義寡聚體。在某些實施方式中，本揭露提供了用於製造用於在療法中使用的藥物的本揭露的反義寡聚體。在某些實施方式中，本揭露提供了用於製造用於治療杜興氏肌肉失養症的藥物的本揭露的反義寡聚體。

【0047】 在另一方面，本揭露還提供了用於在有需要的受試者中治療杜興氏肌肉失養症(DMD)的套組(kit)，其中該受試者具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變，其中套組(包裝在合適的容器中)包含至少一個本揭露的反義寡聚體及其使用說明書。

【實施方式】

相關申請的交叉引用

【0048】 本申請要求了2018年12月13日提交的美國臨時申請案號62/779,028的優先權。以上提及的申請的全部教導藉由引用以其整體併

入。

關於經由EFS-WEB以電子方式提交的序列表

【0049】 將與本申請一起以電子方式提交的序列表的內容(名稱：8171_50_WO00_SL.txt；大小：10,080位元組；創建日期：2019年11月6日)藉由引用以其整體併入本文。

【0050】 本揭露的實施方式總體上涉及改善的反義寡聚體及其使用方法，該等改善的反義寡聚體被專門設計成誘導人肌養蛋白基因中的外顯子跳躍。肌養蛋白在肌肉功能中起著至關重要的作用，並且多種與肌肉相關的疾病的特徵係這種基因的突變形式。因此，在某些實施方式中，本文所述的改善的反義寡聚體誘導人肌養蛋白基因的突變形式中的外顯子跳躍，例如在杜興氏肌肉失養症(DMD)和貝克肌營養不良(BMD)中發現的經突變的肌養蛋白基因。

【0051】 由於突變引起的異常mRNA剪接事件，該等經突變的人肌養蛋白基因要麼表現缺陷性肌養蛋白，要麼根本不表現可測量的肌養蛋白，這種情況導致多種形式的肌營養不良。為了補救這種情況，本揭露的反義寡聚體與經突變的人肌養蛋白基因的預處理的mRNA的選定區域雜交，誘導外顯子跳躍和差別剪接，否則會異常剪接肌養蛋白mRNA，從而允許肌肉細胞產生編碼功能性肌養蛋白的mRNA轉錄物。在某些實施方式中，所得的肌養蛋白不一定是肌養蛋白的「野生型」形式，而是肌養蛋白的截短的但具有功能性的形式。

【0052】 藉由增加肌肉細胞中功能性肌養蛋白的水平，該等實施方式及相關實施方式可用於預防和治療肌營養不良，尤其是那些以由於異常mRNA剪接而導致缺陷性肌養蛋白的表現為特徵的肌營養不良形式(例如

DMD和BMD)。本文所述的具體反義寡聚體相對於其他寡聚體進一步提供了改善的肌養蛋白-外顯子特異性靶向，並且因此與治療相關形式的肌營養不良的替代方法相比，具有明顯的實用優勢。

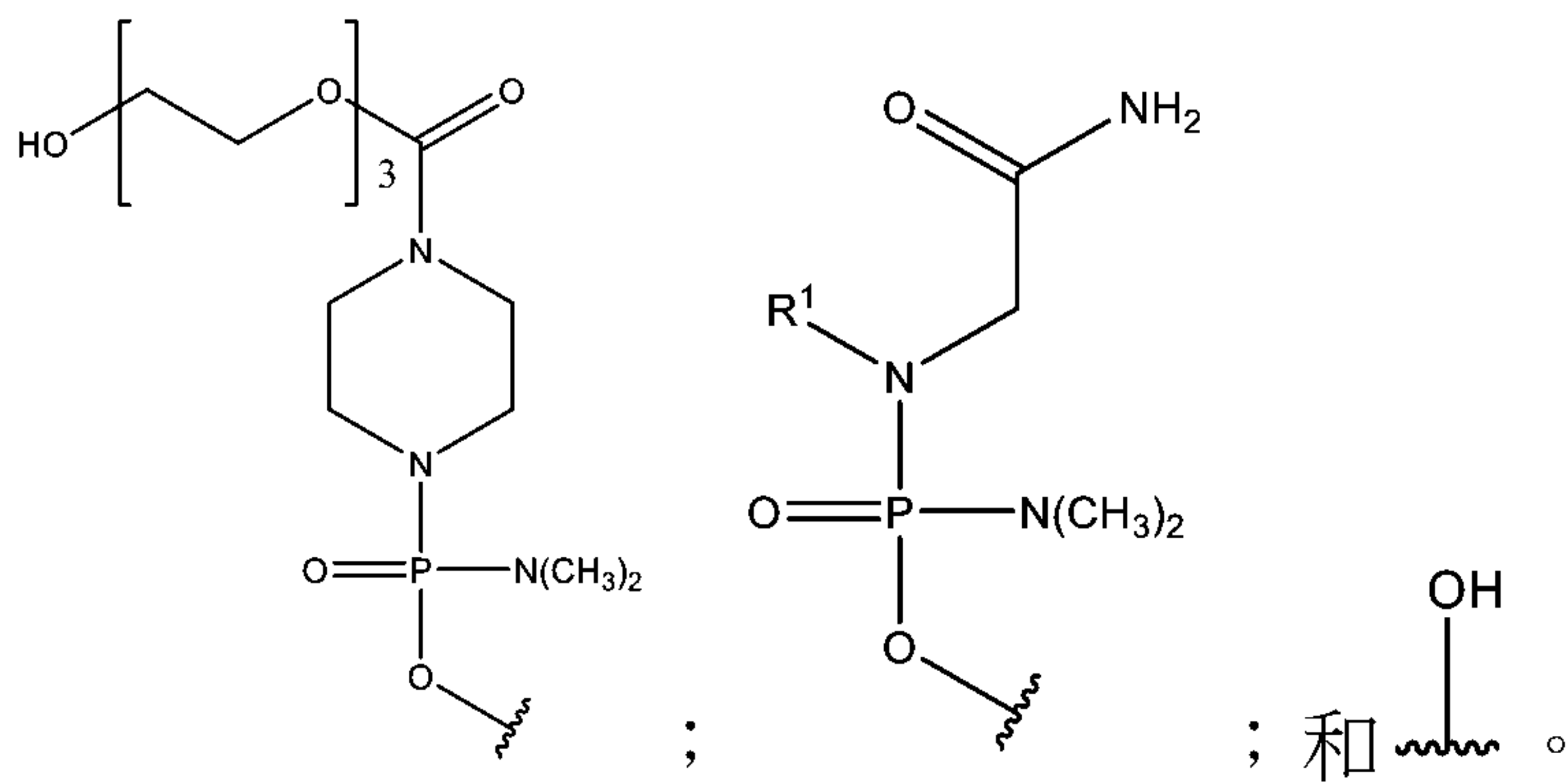
【0053】 因此，本揭露涉及反義寡聚體或其藥學上可接受的鹽，該等反義寡聚體或其藥學上可接受的鹽能夠結合選定的靶標以誘導人肌養蛋白基因中的外顯子跳躍，其中該等反義寡聚體包含與肌養蛋白先質mRNA的外顯子50靶標區域(稱為退火位點)互補的鹼基序列，其中該鹼基序列和退火位點選自：

退火位點	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

其中T係胸腺嘧啶或尿嘧啶。

【0054】 在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、或SEQ ID NO: 9。在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於SEQ ID NO: 3中的核鹼基。

【0055】 在一方面，該反義寡聚體含有附接至該反義寡聚體的5'端的T部分，其中該T部分選自：



【0056】 在某些實施方式中，該反義寡聚體軀合至一種或多種細胞穿透肽(本文中稱為「**CPP**」)。在某些實施方式中，一種或多種**CPP**附接至該反義寡聚體的末端。在某些實施方式中，至少一種**CPP**附接至該反義寡聚體的5'末端。在某些實施方式中，至少一種**CPP**附接至該反義寡聚體的3'末端。在某些實施方式中，第一**CPP**附接至該反義寡聚體的5'末端，並且第二**CPP**附接至該反義寡聚體的3'末端。

【0057】 在一些實施方式中，該**CPP**係富含精胺酸的肽。術語「富含精胺酸的」係指具有至少2個(以及較佳的是2、3、4、5、6、7或8個)精胺酸殘基的**CPP**，每個殘基視需要被一個或多個不帶電荷的疏水性殘基分開，並且視需要含有約6-14個胺基酸殘基。如以下所解釋的，**CPP**較佳的是在其羧基末端藉由連接子(也可以是一個或多個胺基酸)與反義寡核苷酸的3'和/或5'端連接，並且還較佳的是在其胺基末端被取代基R^a封端，其中R^a選自H、醯基、乙醯基、苯甲醯基、或硬脂醯基。在一些實施方式中，R^a係乙醯基。

【0058】 如下表中所示，本文使用的**CPP**的非限制性實例-包括-(RXR)₄-R^a(SEQ ID NO: 15)、R-(FFR)₃-R^a(SEQ ID NO: 16)、-B-X-(RXR)₄-R^a(SEQ ID NO: 17)、-B-X-R-(FFR)₃-R^a(SEQ ID NO: 18)、-GLY-R-(FFR)₃-R^a(SEQ ID NO: 19)、-GLY-R₅-R^a(SEQ ID NO: 20)、-R₅-R^a(SEQ ID NO: 21)、-GLY-R₆-R^a(SEQ ID NO: 11)和-R₆-R^a(SEQ ID

NO: 10)，其中R^a選自H、醯基、苯甲醯基和硬脂醯基，並且其中R係精胺酸，X係6-胺基己酸，B係β-丙胺酸，F係苯丙胺酸，並且GLY(或G)係甘胺酸。CPP「R₅(SEQ ID NO: 21)」意指經由醯胺鍵(而不是單個取代基，例如R⁵(SEQ ID NO: 21))連接在一起的五個(5)精胺酸殘基的肽。CPP「R₆(SEQ ID NO: 10)」意指經由醯胺鍵(而不是單個取代基，例如R⁶(SEQ ID NO: 10))連接在一起的六個(6)精胺酸殘基的肽。在一些實施方式中，R^a係乙醯基。

【0059】 [表1]中提供了示例性CPP(SEQ ID NO: 10、11、和15-21)。

表1：示例性細胞穿透肽		
名稱	序列	SEQ ID NO：
R ₆ G	RRRRRRG	11
R ₆	RRRRRR	10
(RXR) ₄	RXRRXRRXRRXR	15
(RFF) ₃ R	RFFRFFRFFR	16
(RXR) ₄ XB	RXRRXRRXRRXRXB	17
(RFF) ₃ RXB	RFFRFFRFFRXB	18
(RFF) ₃ RG	RFFRFFRFFRG	19
R ₅ G	RRRRRG	20
R ₅	RRRRR	21
R係精胺酸；X係6-胺基己酸；B係β-丙胺酸；F係苯丙胺酸；G係甘胺酸		

【0060】 CPP、其合成以及軛合至寡聚體的方法進一步描述於美國申請公開案號US 2012/0289457和國際專利申請公開案號WO 2004/097017、WO 2009/005793、和WO 2012/150960中，該等文獻的揭露內容藉由引用以其整體併入本文。

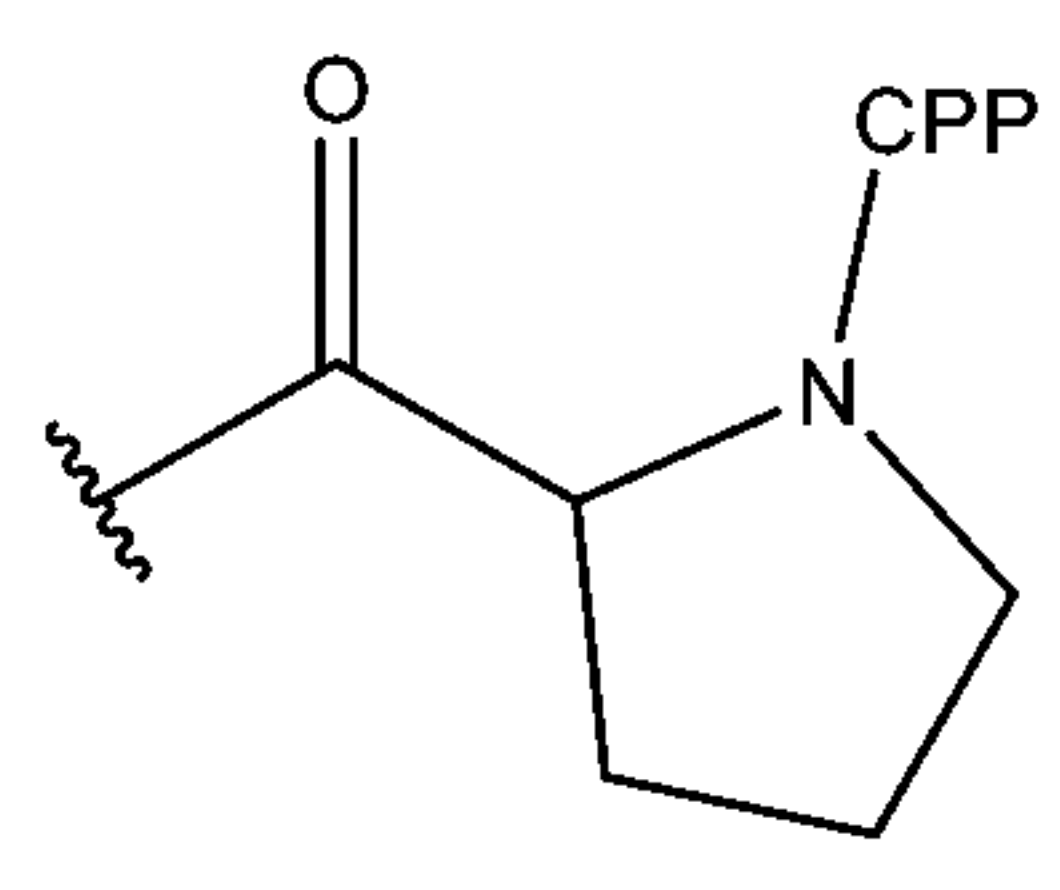
【0061】 在一些實施方式中，反義寡核苷酸包含取代基「Z」，其被定義為CPP和連接子的組合。該連接子將CPP在其羧基末端橋接至寡核苷酸的3'端和/或5'端。在多個實施方式中，反義寡核苷酸可僅包含一個

連接至寡聚體的3'端的CPP。在其他實施方式中，反義寡核苷酸可僅包含一個連接至寡聚體的5'端的CPP。

【0062】 Z內的連接子可包含例如1、2、3、4或5個胺基酸。

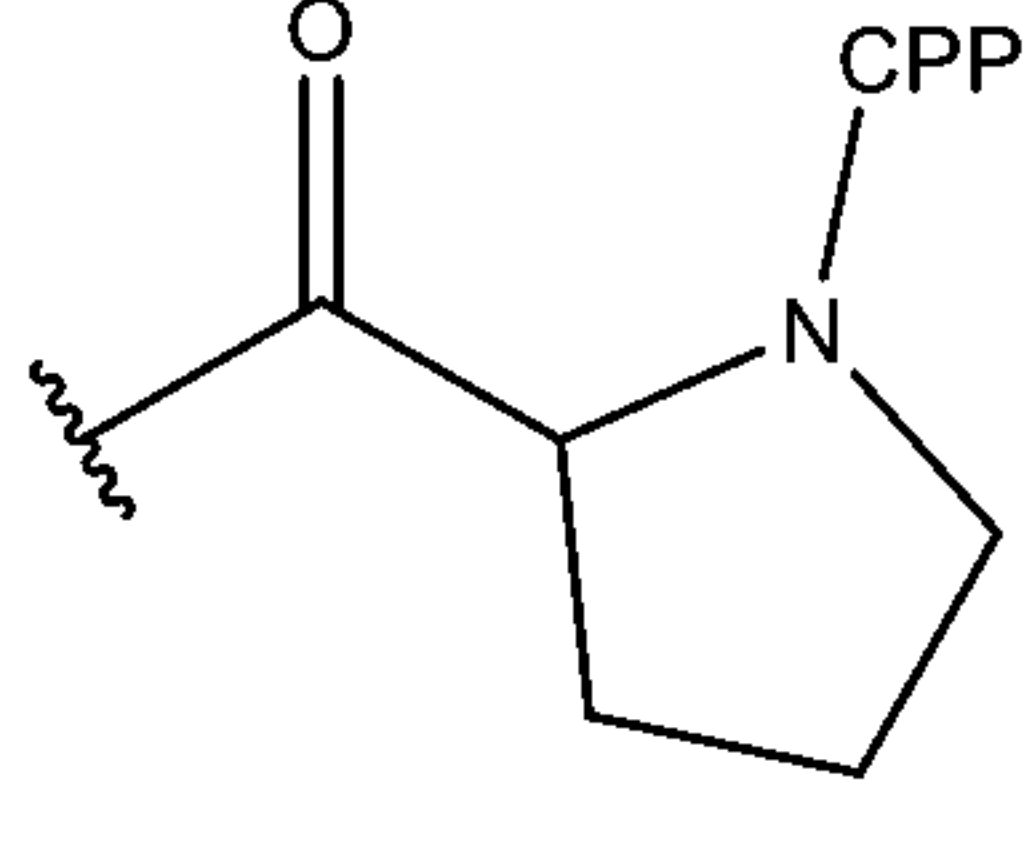
【0063】 在具體的實施方式中，Z選自：

- C(O)(CH₂)₅NH-CPP；
- C(O)(CH₂)₂NH-CPP；
- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP；
- C(O)CH₂NH-CPP，以及如下式：

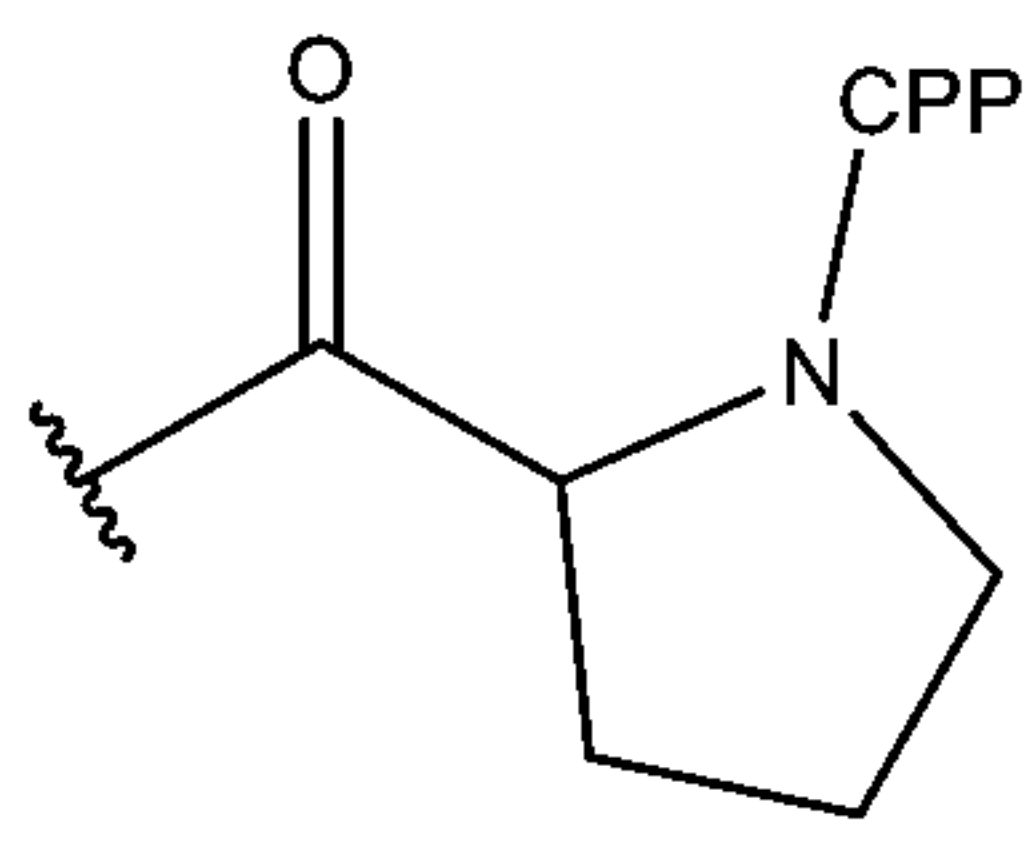


其中該CPP藉由在CPP羧基末端的醯胺鍵附接至連接子部分。

【0064】 在多個實施方式中，該CPP係本文所述和表1中所示的富含精胺酸的肽。在某些實施方式中，該富含精胺酸的CPP係-R₅-R^a(即五個精胺酸殘基；SEQ ID NO: 21)，其中R^a選自H、醯基、乙醯基、苯甲醯基、和硬脂醯基。在某些實施方式中，R^a係乙醯基。在多個實施方式中，該CPP選自SEQ ID NO: 15、16、或21，並且該連接子選自由以下各項組成之群組： -C(O)(CH₂)₅NH-、 -C(O)(CH₂)₂NH-、 -

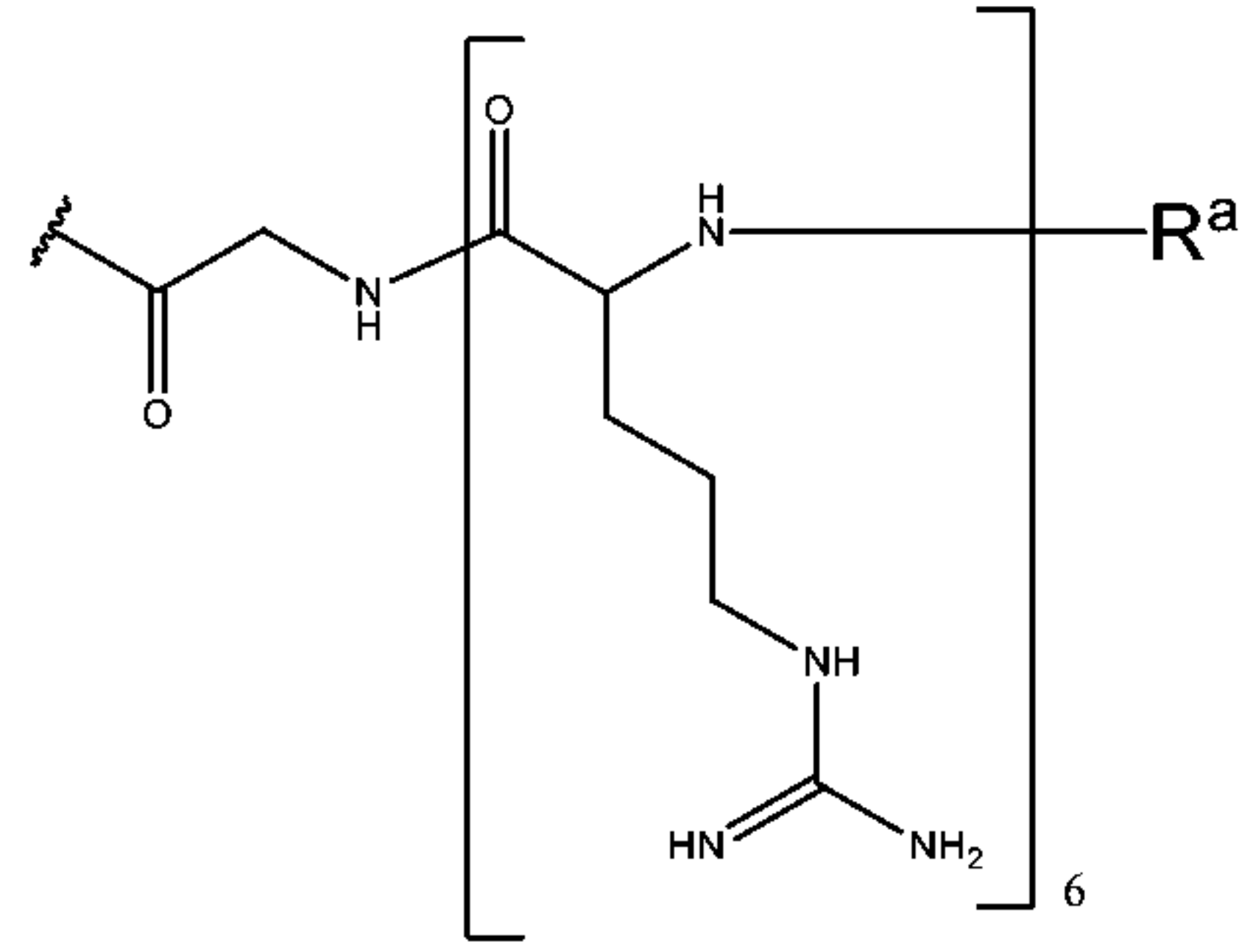
C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-、 -C(O)CH₂NH-、和 。在一些實施方式中，該連接子包含1、2、3、4或5個胺基酸。

【0065】 在一些實施方式中，該CPP係SEQ ID NO: 21並且該連接子係Gly。在一些實施方式中，該CPP係SEQ ID NO: 20。

【0066】 在某些實施方式中，該富含精胺酸的CPP係-R₆-R^a(即六個精胺酸殘基；SEQ ID NO: 10)，其中R^a選自H、鹼基、乙鹼基、苯甲鹼基、和硬脂鹼基。在某些實施方式中，R^a係乙鹼基。在多個實施方式中，該CPP選自SEQ ID NO: 10、15、或16，並且該連接子選自由以下各項組成之群組：
-C(O)(CH₂)₅NH-、-C(O)(CH₂)₂NH-、、C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-、-C(O)CH₂NH-、和。在一些實施方式中，該連接子包含1、2、3、4或5個胺基酸。

【0067】 在一些實施方式中，該CPP係SEQ ID NO: 10並且該連接子係Gly。在一些實施方式中，該CPP係SEQ ID NO: 11。

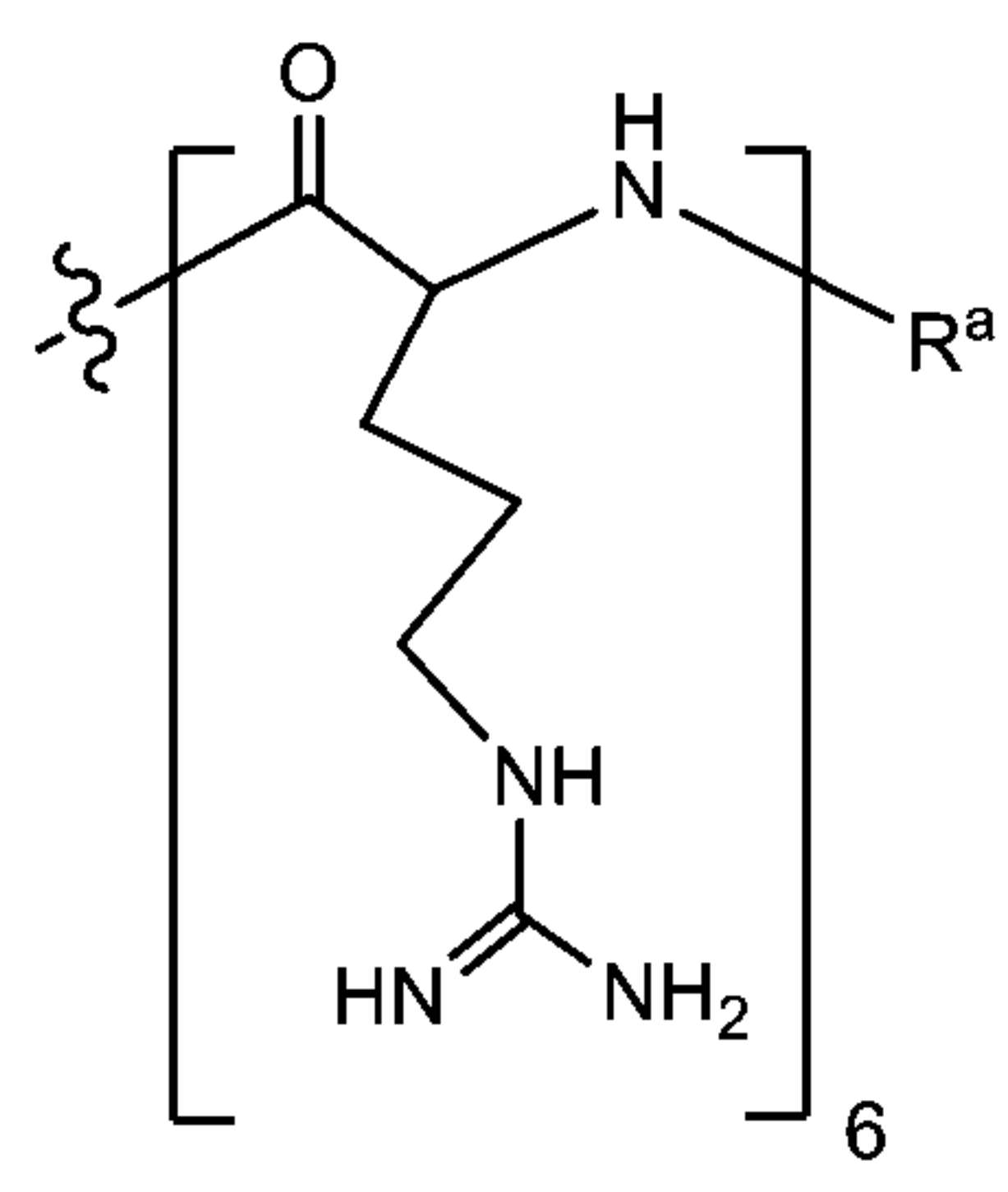
【0068】 在某些實施方式中，Z係在寡聚體的5'和/或3'端與本揭露的反義寡聚體共價鍵合的-C(O)CH₂NH-R₆-R^a(「R₆」被揭露為SEQ ID NO: 10)，其中R^a係H、鹼基、乙鹼基、苯甲鹼基、或硬脂鹼基，以封端R₆(SEQ ID NO: 10)的胺基末端。在某些實施方式中，R^a係乙鹼基。在該等非限制性實例中，該CPP係-R₆-R^a(SEQ ID NO: 10)並且該連接子係-C(O)CH₂NH-(即GLY)。Z = -C(O)CH₂NH-R₆-R^a(「R₆」被揭露為SEQ ID NO: 10)的這一具體實例還藉由以下結構例示：



其中R^a選自H、鹼基、乙鹼基、苯甲鹼基、和硬脂鹼基。

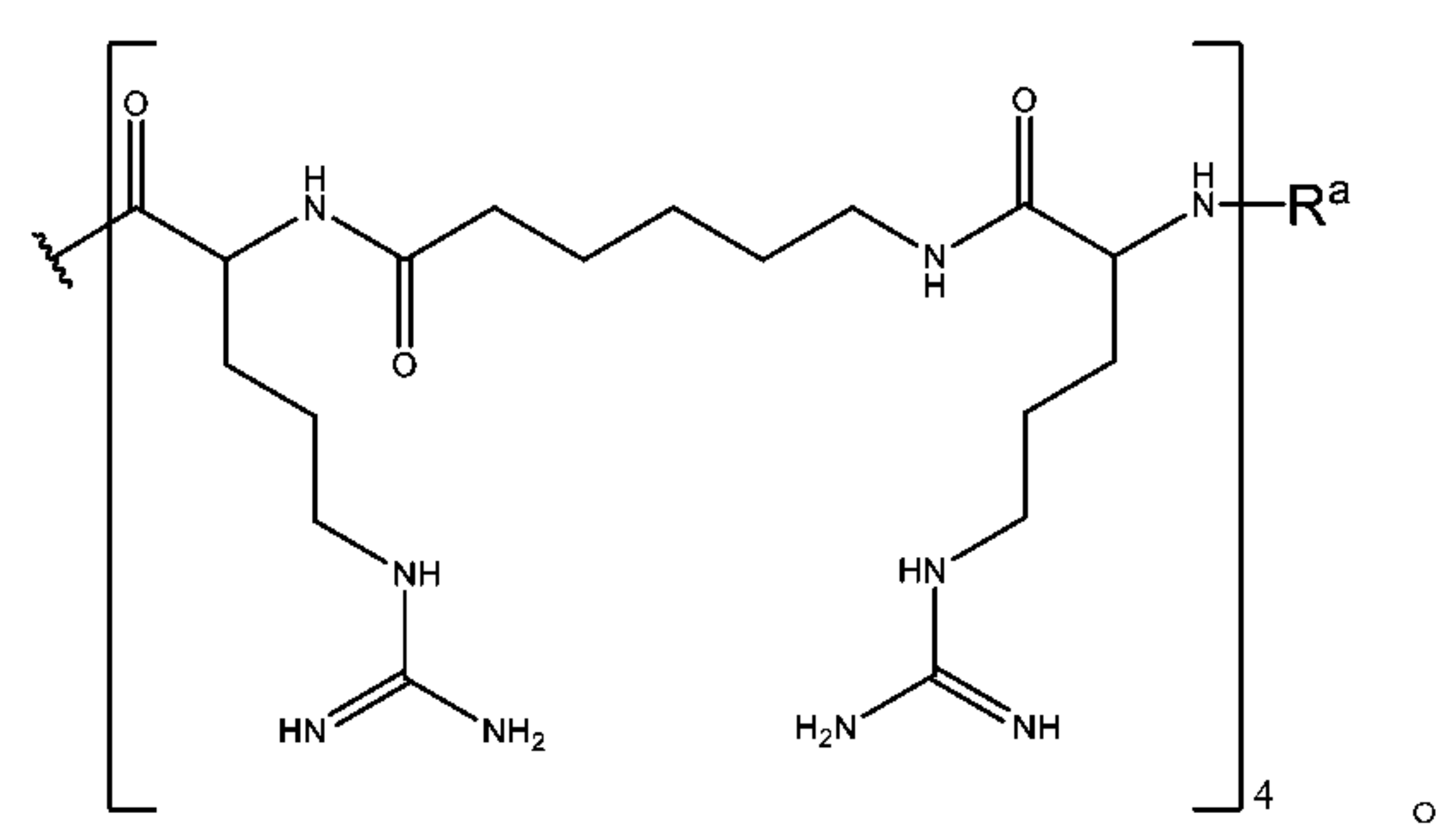
【0069】 在多個實施方式中，該CPP係-R₆-R^a(SEQ ID NO: 10)，也

例示為下式：

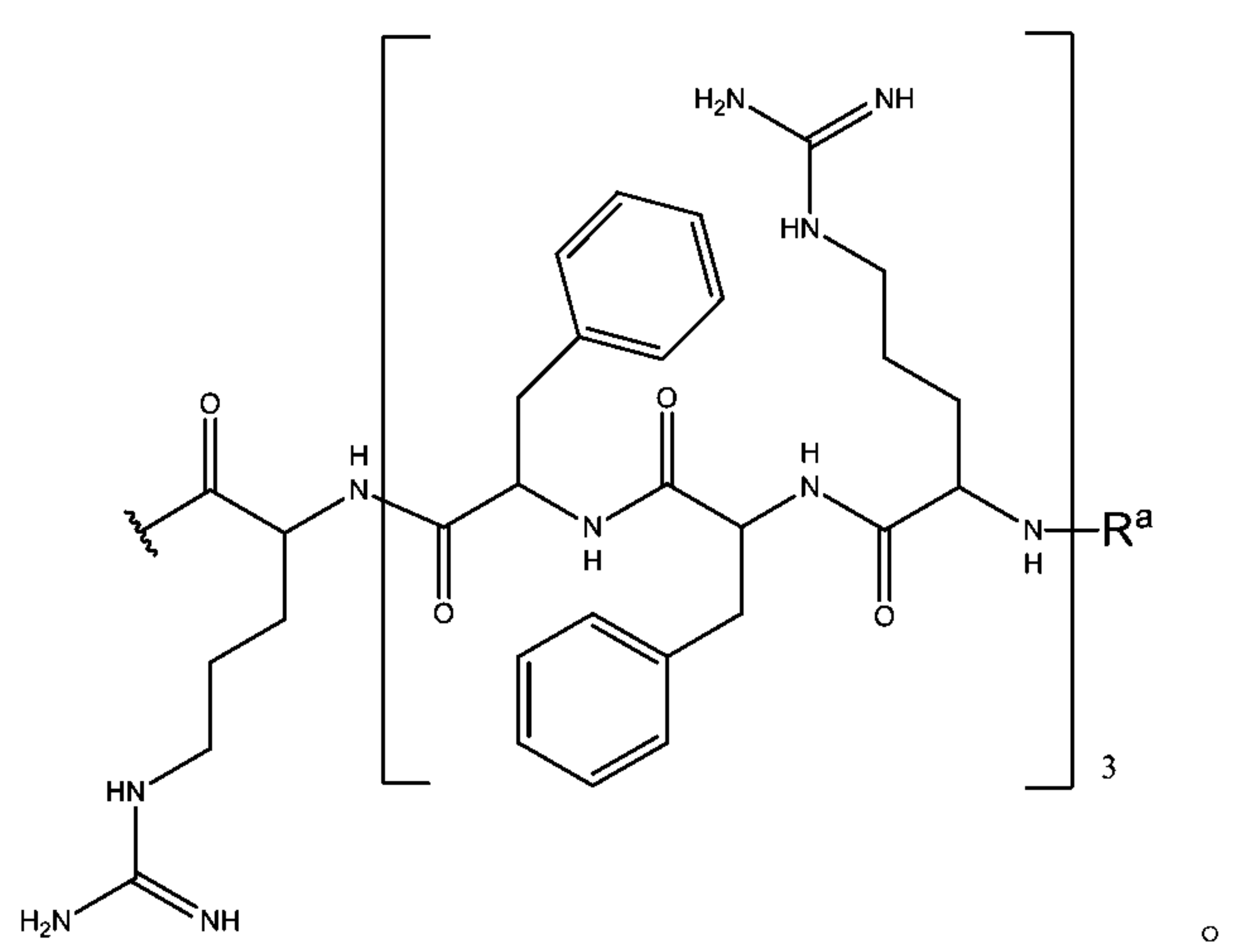


其中R^a選自H、醯基、乙醯基、苯甲醯基、和硬脂醯基。在某些實施方式中，該CPP係SEQ ID NO: 11。在一些實施方式中，R^a係乙醯基。

【0070】 在一些實施方式中，該CPP係-(RXR)₄-R^a(SEQ ID NO: 15)，也例示為下式：

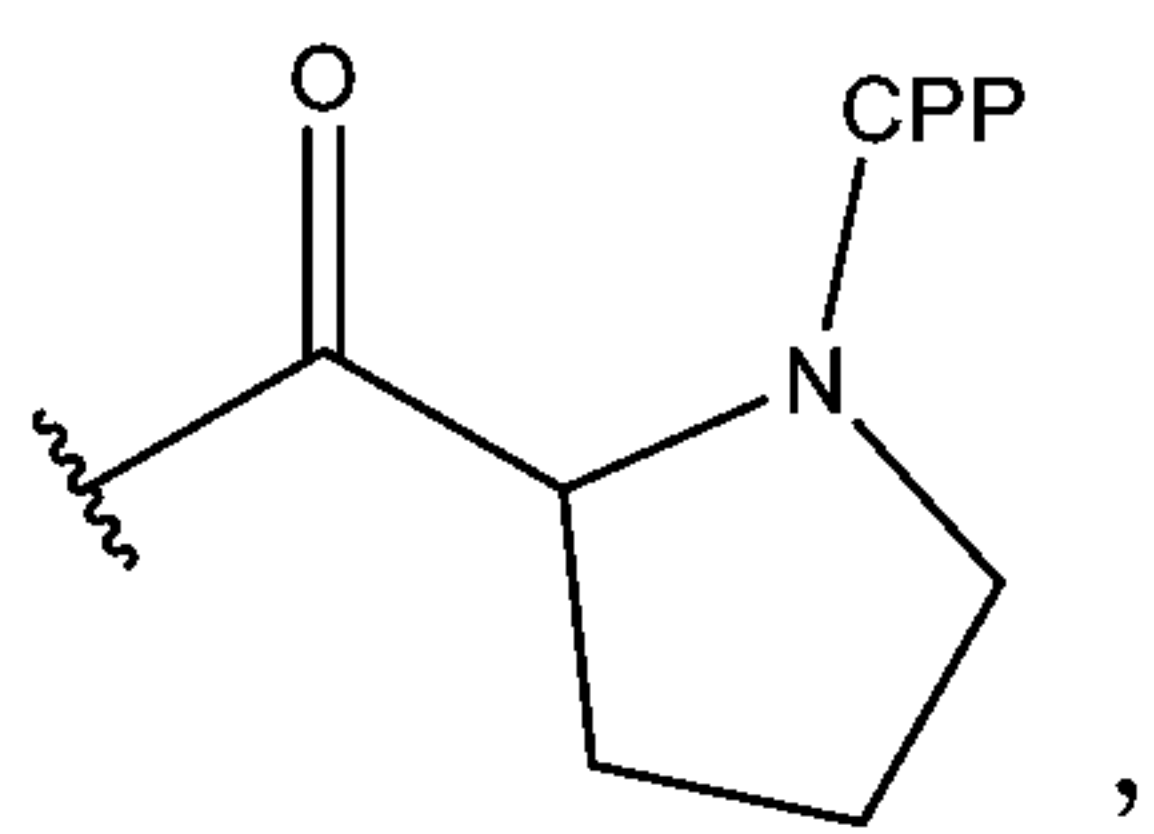


【0071】 在多個實施方式中，該CPP係-R-(FFR)₃-R^a(SEQ ID NO: 16)，也例示為下式：

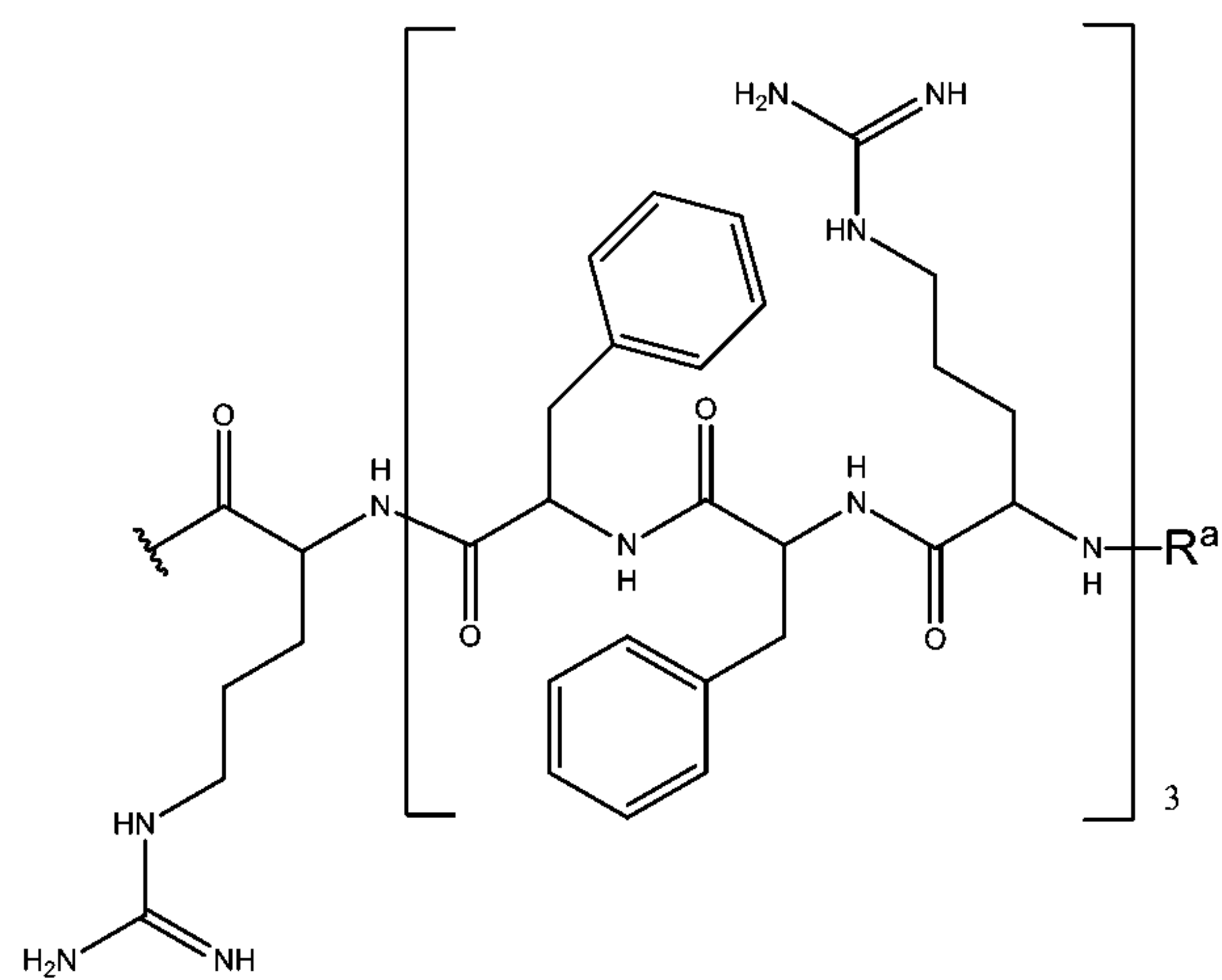


【0072】 在多個實施方式中，Z選自：
-C(O)(CH₂)₅NH-CPP；

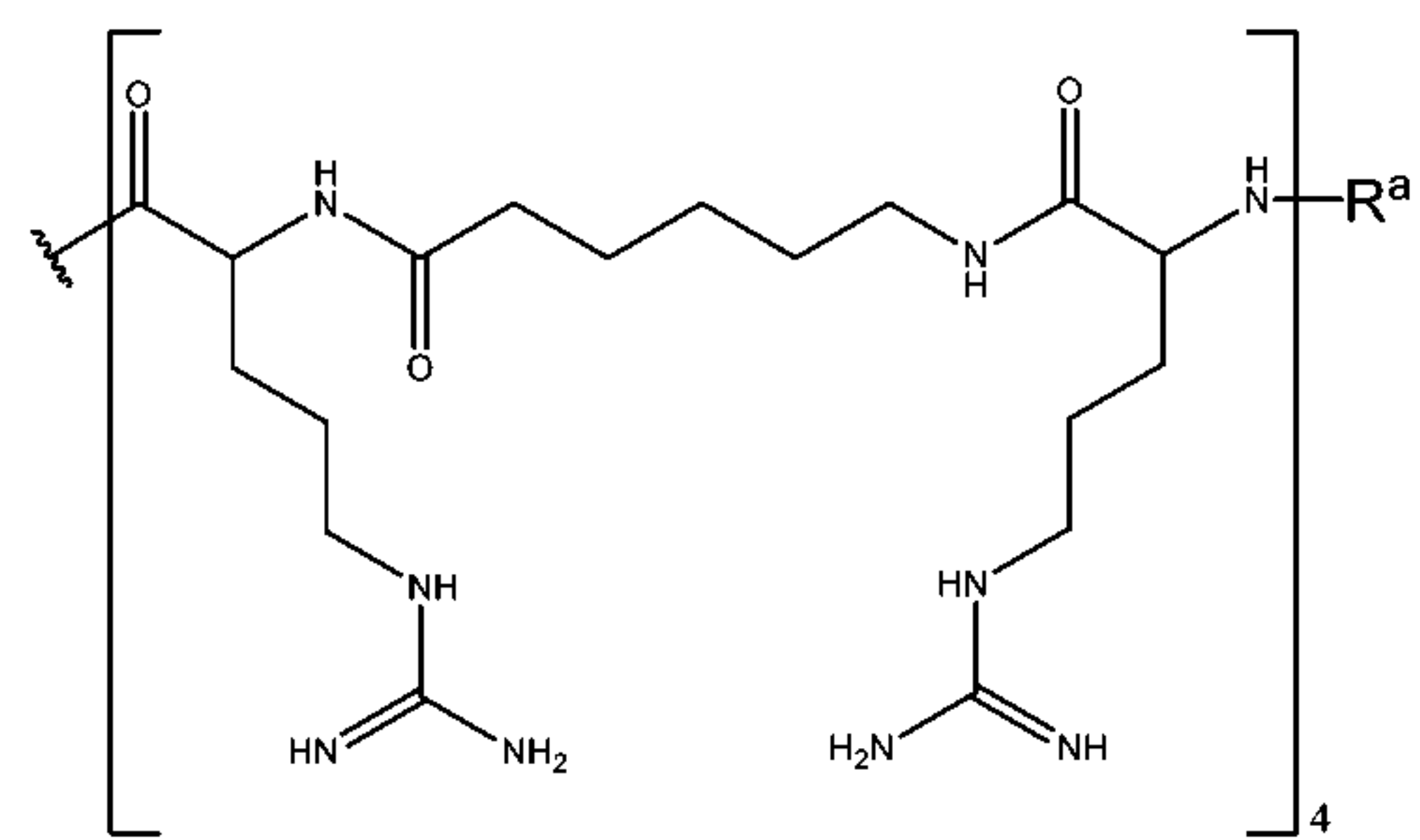
- C(O)(CH₂)₂NH-CPP；
- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP；
- C(O)CH₂NH-CPP；以及如下式：



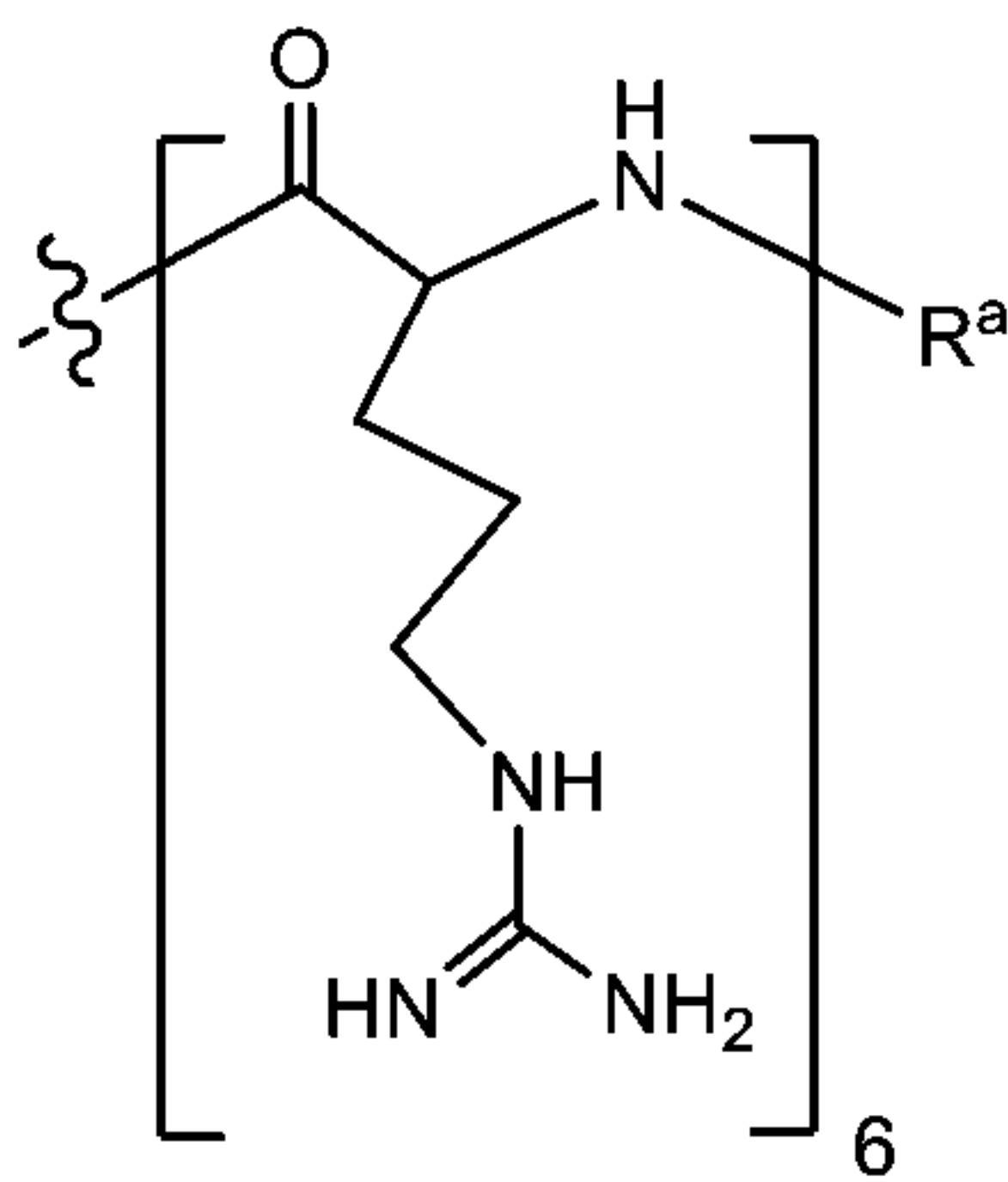
其中該CPP藉由在CPP羧基末端的醯胺鍵附接至連接子部分，並且其中該CPP選自：



、(-R-(FFR)₃-R^a)(SEQ ID NO: 16)、



、(-(RXR)₄-R^a)(SEQ ID NO: 15)、



、或(-R₆-R^a)(SEQ ID NO: 10)。在一些實施方式中，R^a

係乙醯基。

【0073】 在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於SEQ ID NO. 3。

【0074】 在一些方面，經修飾的反義寡聚體的核鹼基連接至咪啉代環結構，其中該等咪啉代環結構藉由含磷的亞基間鍵連接，該等亞基間鍵將一個環結構的咪啉代氮與相鄰環結構的5'環外碳相連。在這個方面，SEQ ID NO: 1-9的每個中的T較佳的是胸腺嘧啶。

【0075】 在一些方面，該反義寡聚體的核鹼基連接至肽核酸(PNA)，其中磷酸-糖多核苷酸骨架被連接有核鹼基的柔性假肽聚合物代替。

【0076】 在一些方面，該反義寡聚體的核鹼基的至少一個連接至鎖核酸(LNA)，其中該鎖核酸結構係經過化學修飾的核苷酸類似物，其中核糖部分具有連接2'氧和4'碳的額外橋。在這個方面，連接至SEQ ID NO: 1-9的每個中的LNA的每個核鹼基包含5-甲基基團。

【0077】 在一些方面，該反義寡聚體的核鹼基的至少一個連接至橋接核酸(BNA)，其中藉由向呋喃糖骨架中引入另外的橋接結構來限制或鎖定糖構象。在一些方面，該反義寡聚體的核鹼基的至少一個連接至2'-O,4'-C-乙烯-橋接核酸(ENA)。在這類方面，連接至SEQ ID NO: 1-9的每個中的BNA或ENA的每個核鹼基包含5-甲基基團。

【0078】 在一些方面，當骨架的化學性質允許時，SEQ ID NO: 1-9中的每個胸腺嘧啶係尿嘧啶。

【0079】 除非另外定義，本文中所用的全部技術術語和科學術語具有與本揭露所屬領域的普通技術人員通常所理解的相同意義。儘管與本文所述的那些類似或等效的任何方法和材料都可以用於實施或測試本揭露，

但描述了較佳的方法和材料。對於本揭露的目的，在下文定義了以下術語。

I. 定義

【0080】除非另有說明，否則如本文所用，術語「烷基」係指飽和的直鏈或支鏈烴。在某些實施方式中，該烷基基團係一級烴、二級烴或三級烴。在某些實施方式中，該烷基基團包括一至十個碳原子，即C₁至C₁₀烷基。在某些實施方式中，該烷基基團包括一至六個碳原子，即C₁至C₆烷基。該術語包括經取代的和未經取代的烷基基團，包括鹵代烷基基團。在某些實施方式中，該烷基基團係氟化烷基基團。該烷基基團可被取代的部分的非限制性實例選自由以下各項組成之群組：鹵素(氟、氯、溴或碘)，經基，胺基，烷基胺基，芳基胺基，烷氧基，芳氧基，硝基，氰基，磺酸，硫酸鹽，膦酸，磷酸鹽，或膦酸鹽，可以是未保護的或視需要保護的，它們係熟悉該項技術者已知的，例如Greene等人, *Protective Groups in Organic Synthesis* [有機合成中的保護基團], 約翰威利父子公司(John Wiley and Sons), 第二版, 1991的教導，藉由引用特此併入。在某些實施方式中，該烷基基團選自由以下各項組成之群組：甲基、CF₃、CCl₃、CFCI₂、CF₂Cl、乙基、CH₂CF₃、CF₂CF₃、丙基、異丙基、丁基、異丁基、二級丁基、三級丁基、戊基、異戊基、新戊基、己基、異己基、3-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、和2,3-二甲基丁基。

【0081】如本文所用，關於受試者或患者的「適於外顯子50跳躍」旨在包括在肌養蛋白基因中具有一個或多個突變的受試者和患者，由於缺少肌養蛋白先質mRNA的外顯子50的跳躍，這使得閱讀框成為異讀框，從而破壞先質mRNA的翻譯，導致該受試者或患者無法產生功能性或半功能

性肌養蛋白。確定患者是否具有適於外顯子跳躍的在肌養蛋白基因中的突變在熟悉該項技術者的能力範圍內(參見，例如Aartsma-Rus等人 (2009) Hum Mutat.[人類突變] 30: 293-299；Gurvich等人, Hum Mutat.[人類突變] 2009; 30(4) 633-640；以及Fletcher等人 (2010) Molecular Therapy [分子療法] 18(6) 1218-1223)。

【0082】如本文所用，術語「寡聚體」係指藉由亞基間鍵連接的亞基序列。在某些情況下，術語「寡聚體」用於指「反義寡聚體」。對於「反義寡聚體」，每個亞基由以下組成：(i) 核糖或其衍生物；和 (ii) 與其結合的核鹼基，以使得鹼基配對部分的順序藉由沃森-克裡克(Watson-Crick)鹼基配對形成與核酸(通常是RNA)中的靶序列互補的鹼基序列，從而在靶序列內形成核酸:寡聚體異源雙鏈體，條件係亞基、亞基間鍵或兩者不是天然存在的。在某些實施方式中，該反義寡聚體係磷酸二胺咪啉代寡聚體(PMO)。在其他實施方式中，該反義寡聚體係2'-O-甲基硫代磷酸酯。在其他實施方式中，本揭露的反義寡聚體係肽核酸(PNA)、鎖核酸(LNA)、或橋接核酸(BNA)例如2'-O,4'-C-乙烯-橋接核酸(ENA)。本文描述了另外的示例性實施方式。

【0083】術語「互補的」和「互補性」係指藉由沃森-克裡克鹼基配對規則彼此相關的兩個或更多個寡聚體(即，各自包含核鹼基序列)。例如，核鹼基序列「T-G-A (5'→3')」與核鹼基序列「A-C-T (3'→5')」互補。互補性可以是「部分的」，其中根據鹼基配對規則，少於給定核鹼基序列的所有核鹼基與另一核鹼基序列匹配。例如，在一些實施方式中，給定核鹼基序列與另一核鹼基序列之間的互補性可以是約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、或約95%。或者，在給定核鹼基序列與另一核鹼

基序列之間可能存在「完全的」或「完美的」(100%)互補性，以繼續該實例。核鹼基序列之間的互補性程度對於序列之間雜交的效率 and 強度具有顯著影響。

【0084】術語「有效量」和「治療有效量」在本文中互換地使用，並且是指以單劑量或作為一系列劑量的一部分向哺乳動物受試者施用的治療化合物(例如反義寡聚體)的量，這種量可有效產生期望的治療效果。對於反義寡聚體，通常藉由抑制選定的靶序列的翻譯或天然剪接加工，或者藉由產生臨床上有意義量的肌養蛋白(統計學意義)來產生這種作用。

【0085】在一些實施方式中，在一段時間內，有效量係約1 mg/kg至約200 mg/kg的包含反義寡聚體的組成物，以治療受試者。在一些實施方式中，有效量係約1 mg/kg至約200 mg/kg的包含反義寡聚體的組成物，以增加受試者中肌養蛋白陽性纖維的數目。在某些實施方式中，有效量係從約1 mg/kg至約200 mg/kg的包含反義寡聚體的組成物，以穩定、維持或改善患者(相對於健康同齡人)的行走距離，例如在6分鐘行走測試(6MWT)中。

【0086】「增強(enhance或enhancing)」或者「增加(increase或increasing)」或者「刺激(stimulate或stimulating)」總體上係指與不由反義寡聚體或對照化合物引起的反應相比，一種或多種前述任一項所述的反義寡聚體或藥物組成物在細胞或受試者中產生或引起更大的生理反應(即下游效應)的能力。在根據本領域的理解和本文的描述顯而易見的其他反應中，更大的生理反應可包括肌養蛋白的功能形式的表現增加，或者肌組織中肌養蛋白相關的生物學活性增加。

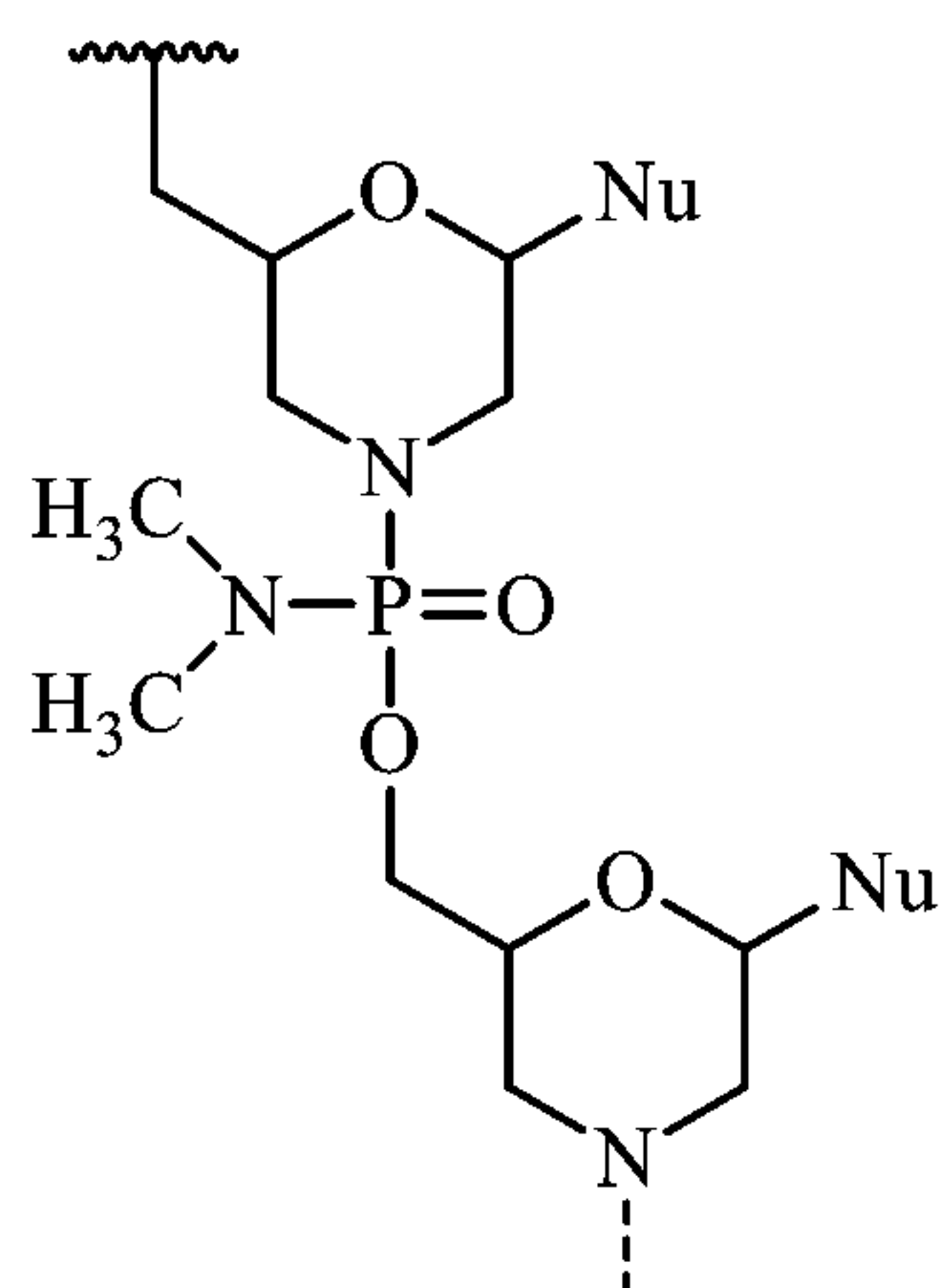
【0087】如本文所用，術語「功能」和「功能性」等等係指生物學

的、酶的或治療的功能。

【0088】「功能性」肌養蛋白總體上係指通常與某些患有DMD或BMD的受試者中存在的肌養蛋白的改變的或「缺陷性」形式相比，具有足夠的生物學活性以減少肌組織的進行性降解(其係肌營養不良的另外的特徵)的肌養蛋白。作為一個實例，在體外肌肉培養物中的肌養蛋白相關活性可以根據肌管大小、肌原纖維的組織(或組織紊亂)、收縮活性、和乙酰膽鹼受體的自發聚集來測定(參見，例如Brown等人, *Journal of Cell Science* [細胞科學雜誌] 112: 209-216, 1999)。動物模型也是研究疾病發病機理的寶貴資源，並提供了測試肌養蛋白相關活性的手段。用於DMD研究的兩種最廣泛使用的動物模型係mdx小鼠和金毛獵犬肌營養不良(GRMD)狗，它們都是肌養蛋白陰性的(參見，例如Collins和Morgan, *Int J Exp Pathol* [國際實驗病理學雜誌] 84: 165-172, 2003)。該等和其他動物模型可用於測量多種肌養蛋白的功能活性。包括肌養蛋白的截短形式，例如在施用本揭露的某些外顯子跳躍反義寡聚體後產生的那些形式。

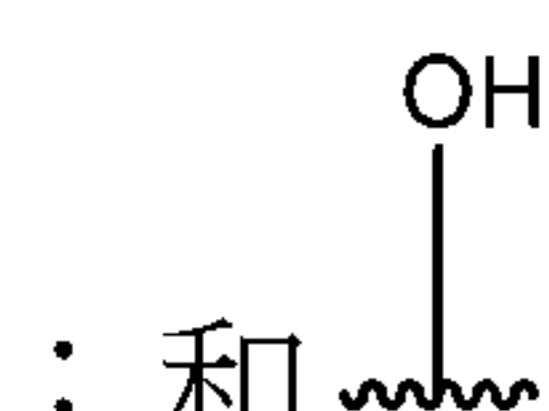
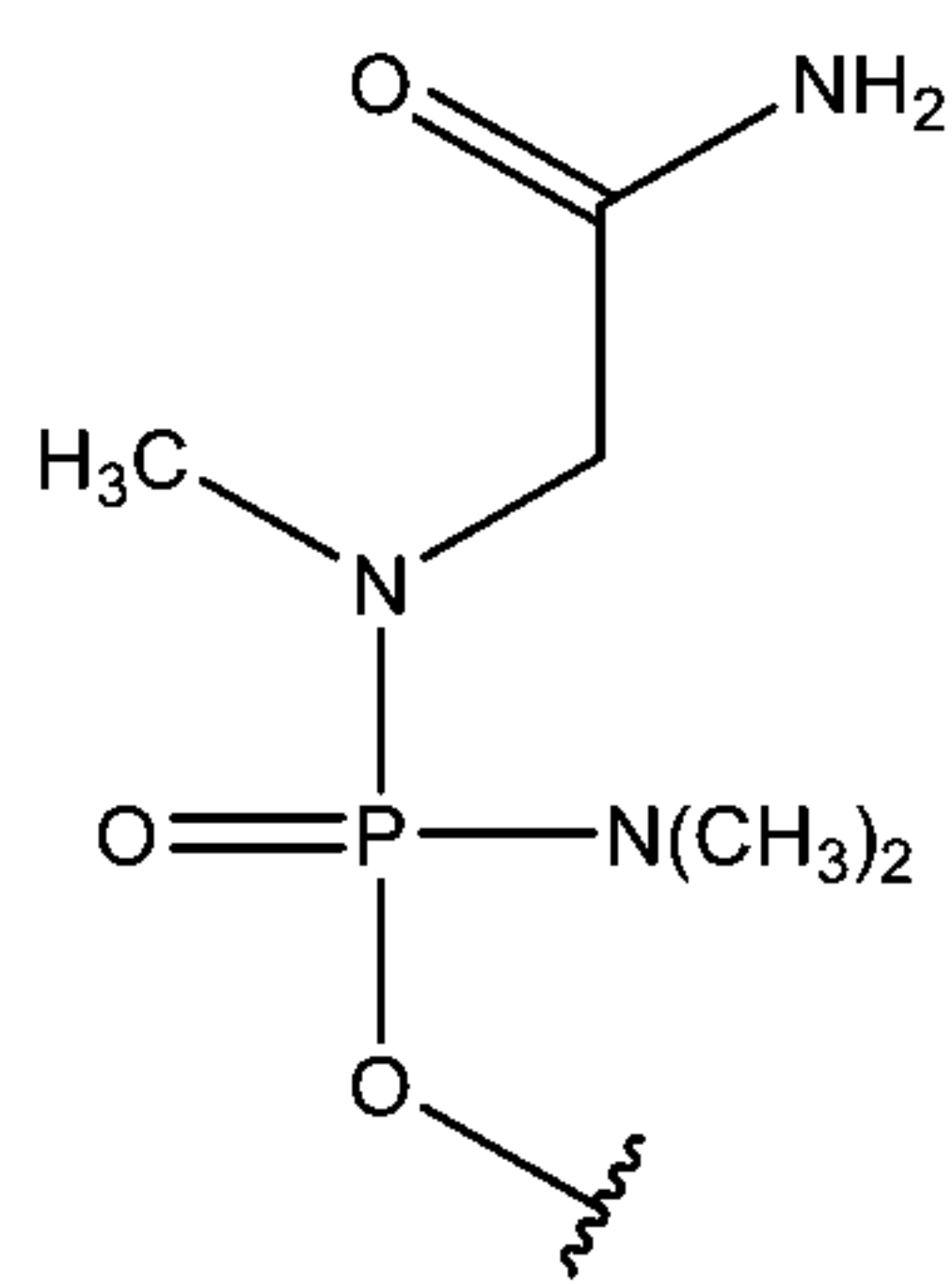
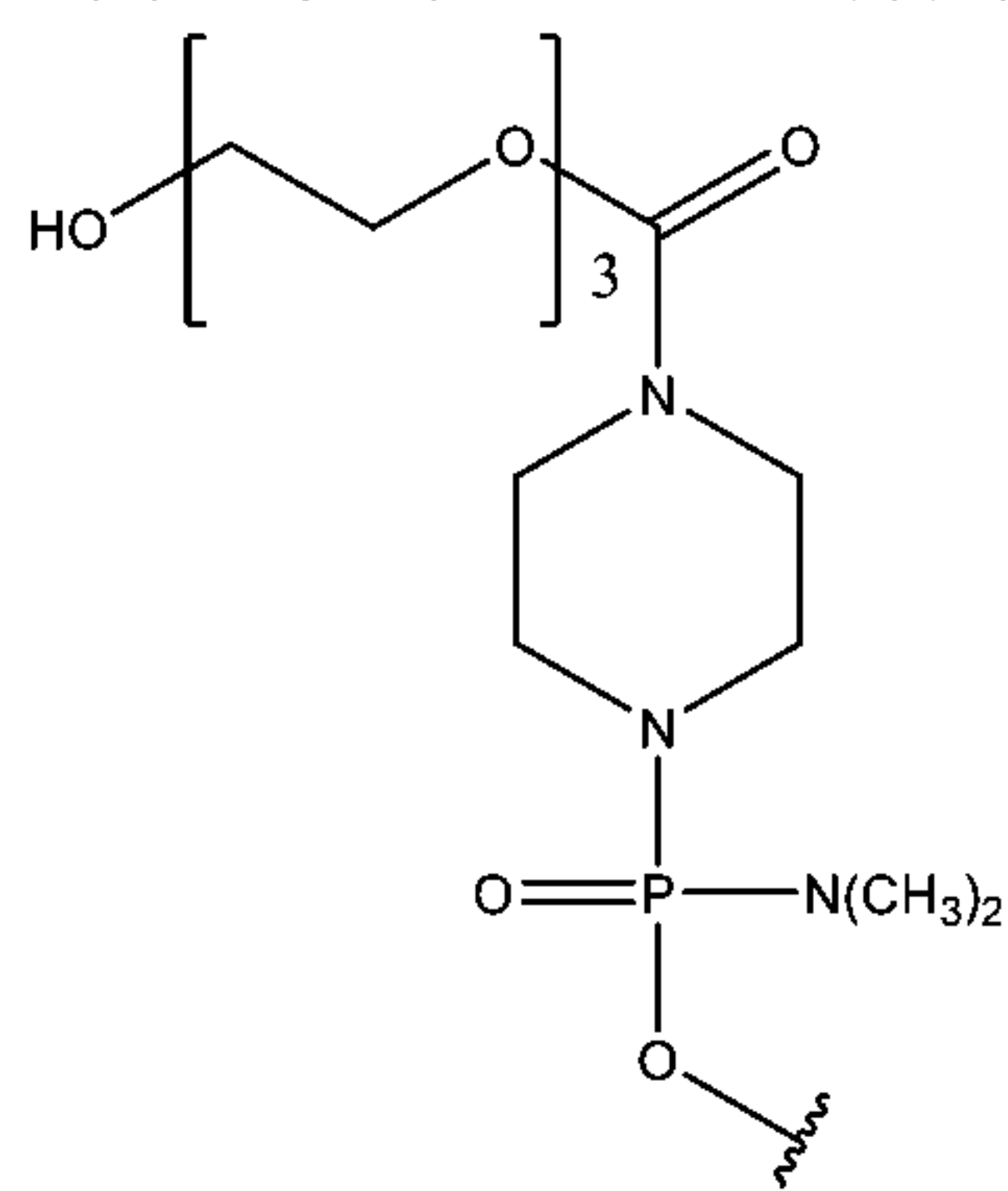
【0089】術語「錯配(mismatch或mismatches)」係指根據鹼基配對規則，與靶標先質mRNA不匹配的寡聚體核鹼基序列中的一個或多個核鹼基(無論是連續的還是分開的)。儘管經常需要完美的互補性，但是一些實施方式可以包括相對於靶標先質mRNA的一個或多個但較佳的是6、5、4、3、2或1個錯配。包括寡聚體內任何位置處的變化。在某些實施方式中，本揭露的反義寡聚體包括在末端附近的核鹼基序列的變化，內部的變化，以及如果存在則通常在5'和/或3'末端的約6、5、4、3、2或1個亞基內的變化。在某些實施方式中，可以去除一個、兩個或三個核鹼基，並且仍提供中靶結合。

【0090】術語「咪啉代」、「咪啉代寡聚體」和「PMO」係指具有以下通式結構的磷酸二胺咪啉代寡聚體：



並且如在 Summerton, J. 等人, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* [反義和核酸藥物開發], 7: 187-195 (1997)的圖2中所描述的。如本文所述的咪啉代包括前述通式結構的所有立體異構物和互變異構物。咪啉代寡聚體的合成、結構和結合特性詳細描述於美國專利案號：5,698,685；5,217,866；5,142,047；5,034,506；5,166,315；5,521,063；5,506,337；8,076,476；和8,299,206中；所有的該等文獻藉由引用併入本文。

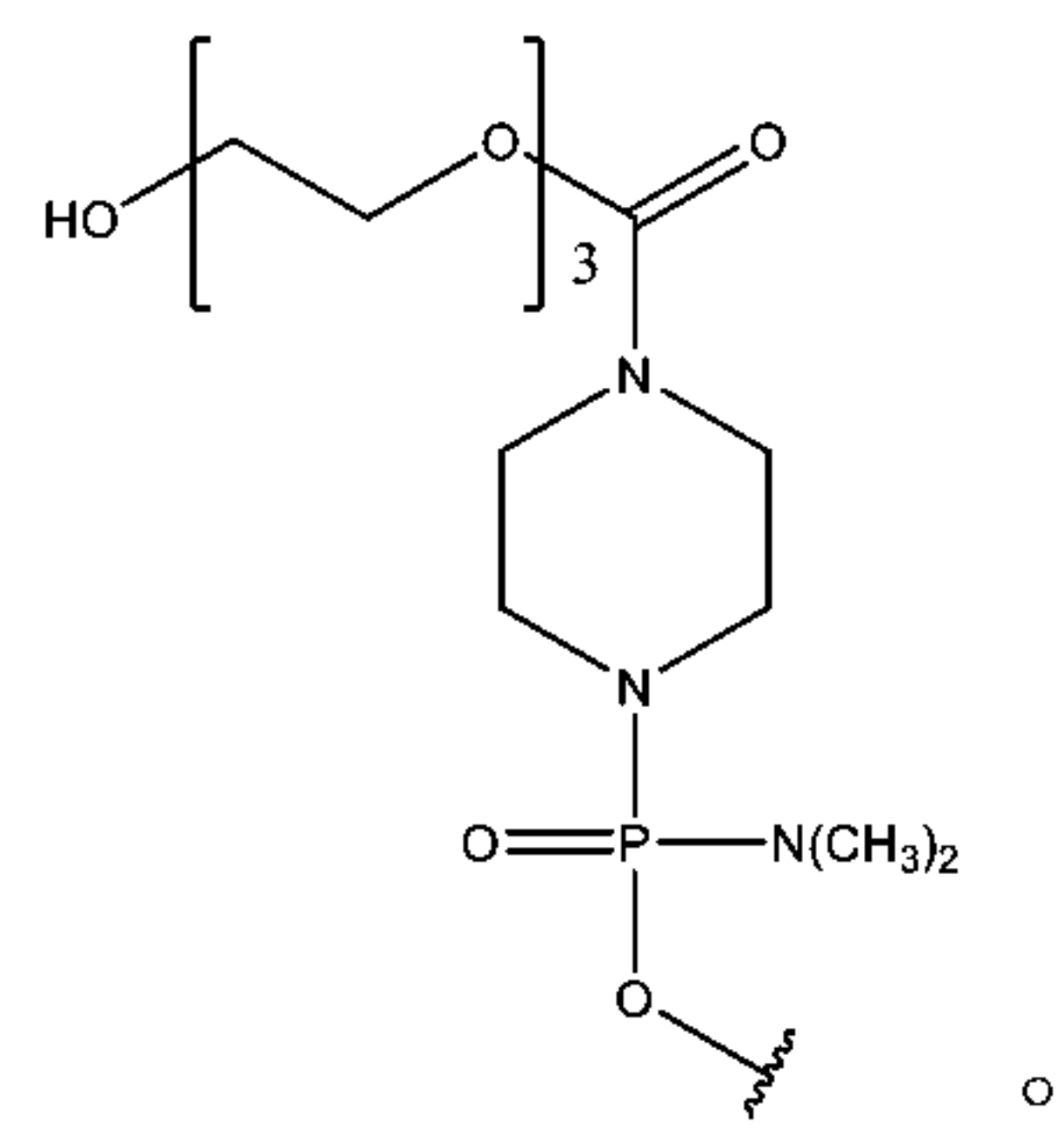
【0091】在某些實施方式中，咪啉代在寡聚體的5'或3'端與「尾」部分軛合，以增加其穩定性和/或溶解性。示例性尾包括：



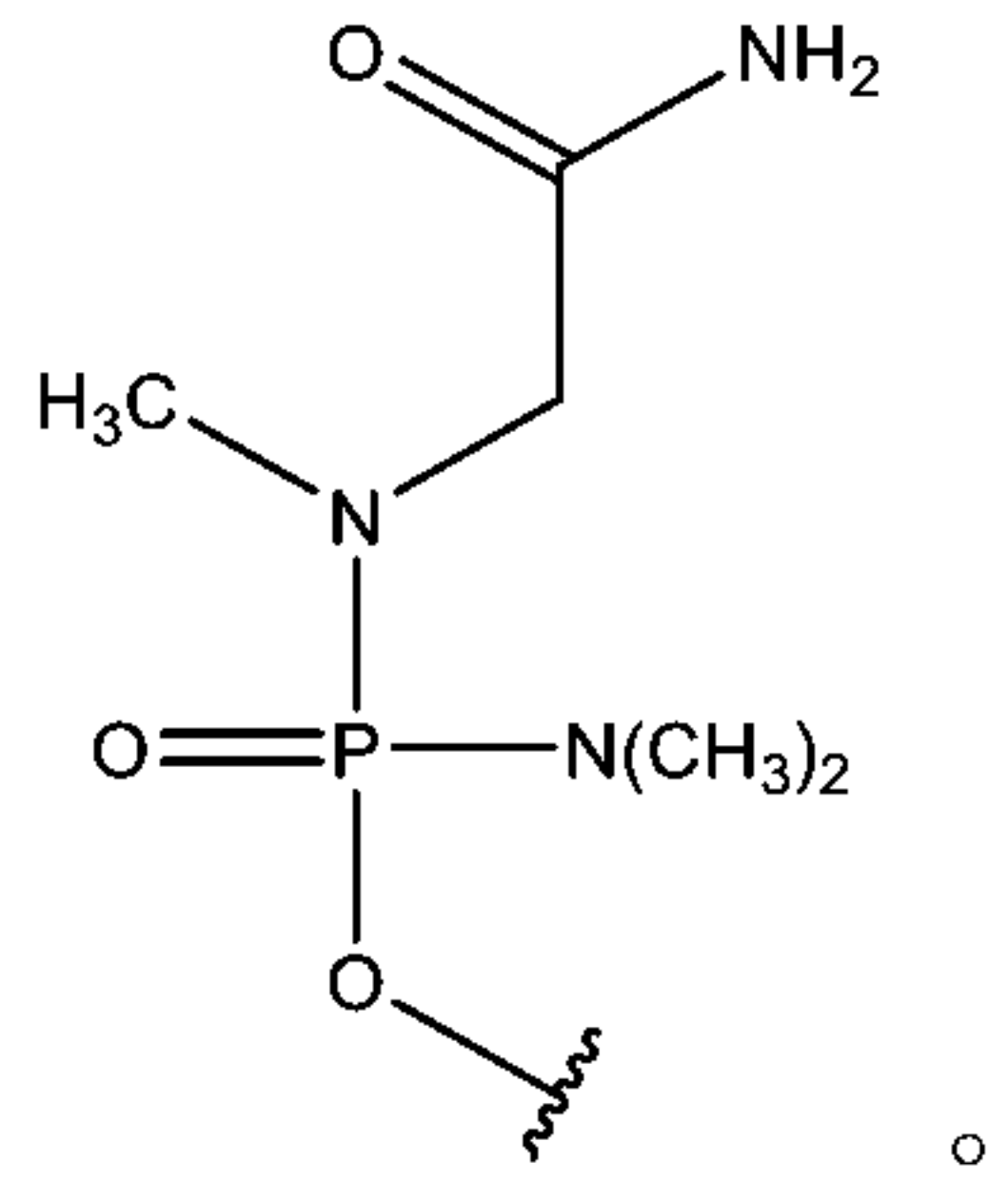
；和 。T部分的遠端-OH或-NH₂視需要連接至細胞穿透肽。

【0092】在以上示例性尾部分中，「TEG」或「EG3」係指以下尾

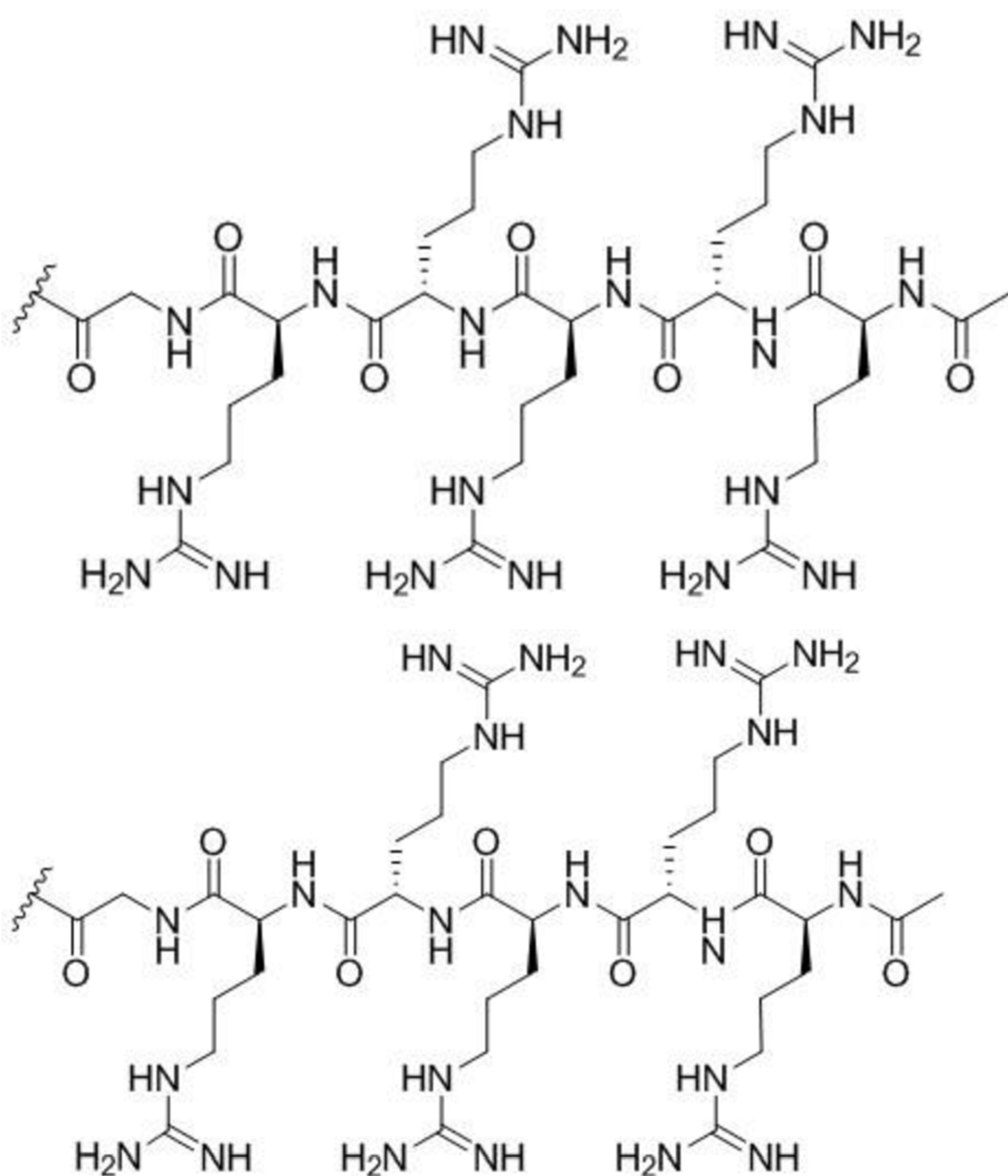
部分：



【0093】 在以上示例性尾部分中，「GT」係指以下尾部分：



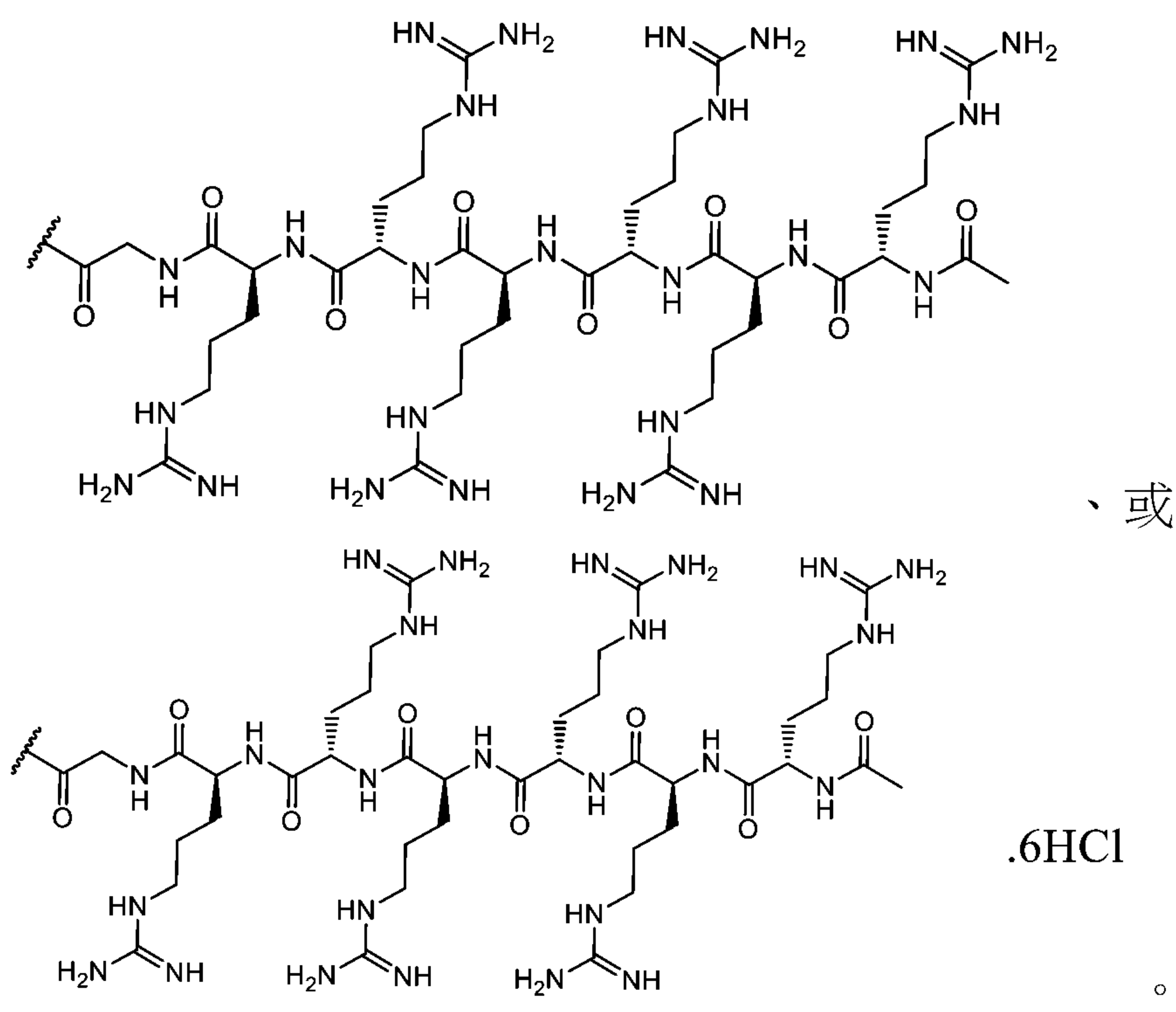
【0094】 如本文所用，術語「-G-R₅(SEQ ID NO: 20)」和「-G-R₅-Ac(SEQ ID NO: 20)」可互換地使用，並且是指軛合至本揭露的反義寡聚體的肽部分。在多個實施方式中，「G」表示藉由醯胺鍵軛合至「R₅(SEQ ID NO: 21)」的甘胺酸殘基，並且每個「R」表示藉由醯胺鍵軛合在一起的精胺酸殘基，使得「R₅(SEQ ID NO: 21)」表示藉由醯胺鍵軛合在一起的五個(5)精胺酸殘基。精胺酸殘基可以具有任何立體組態，例如，精胺酸殘基可以是L-精胺酸殘基、D-精胺酸殘基、或D-和L-精胺酸殘基的混合物。在某些實施方式中，「-G-R₅(SEQ ID NO: 20)」或「-G-R₅-Ac(SEQ ID NO: 20)」連接至「尾」部分的遠端-OH或NH₂。在某些實施方式中，「-G-R₅(SEQ ID NO: 20)」或「-G-R₅-Ac(SEQ ID NO: 20)」軛合至本揭露的PMO反義寡聚體的3'最味啉代亞基的味啉環氮。在一些實施方式中，「-G-R₅(SEQ ID NO: 20)」或「-G-R₅-Ac(SEQ ID NO: 20)」軛合至本揭露的反義寡聚體的3'端，並且具有下式：



，或其藥學上可接受的鹽，或

• 5HCl

【0095】 如本文所用，術語「-G-R₆(SEQ ID NO: 11)」和「-G-R₆-Ac(SEQ ID NO: 11)」以及「R₆G(SEQ ID NO: 11)」可互換地使用，並且是指軛合至本揭露的反義寡聚體的肽部分。在多個實施方式中，「G」表示藉由醯胺鍵軛合至「R₆(SEQ ID NO: 10)」的甘胺酸殘基，並且每個「R」表示藉由醯胺鍵軛合在一起的精胺酸殘基，使得「R₆(SEQ ID NO: 10)」表示藉由醯胺鍵軛合在一起的六個(6)精胺酸殘基。精胺酸殘基可以具有任何立體組態，例如，精胺酸殘基可以是L-精胺酸殘基、D-精胺酸殘基、或D-和L-精胺酸殘基的混合物。在某些實施方式中，「-G-R₆(SEQ ID NO: 11)」或「-G-R₆-Ac(SEQ ID NO: 11)」連接至「尾」部分的遠端-OH或-NH₂。在某些實施方式中，「-G-R₆(SEQ ID NO: 11)」或「-G-R₆-Ac(SEQ ID NO: 11)」軛合至本揭露的PMO反義寡聚體的3'最味啉代亞基的味啉環氮。在一些實施方式中，「-G-R₆(SEQ ID NO: 11)」或「-G-R₆-Ac(SEQ ID NO: 11)」軛合至本揭露的反義寡聚體的3'端，並且具有下式：

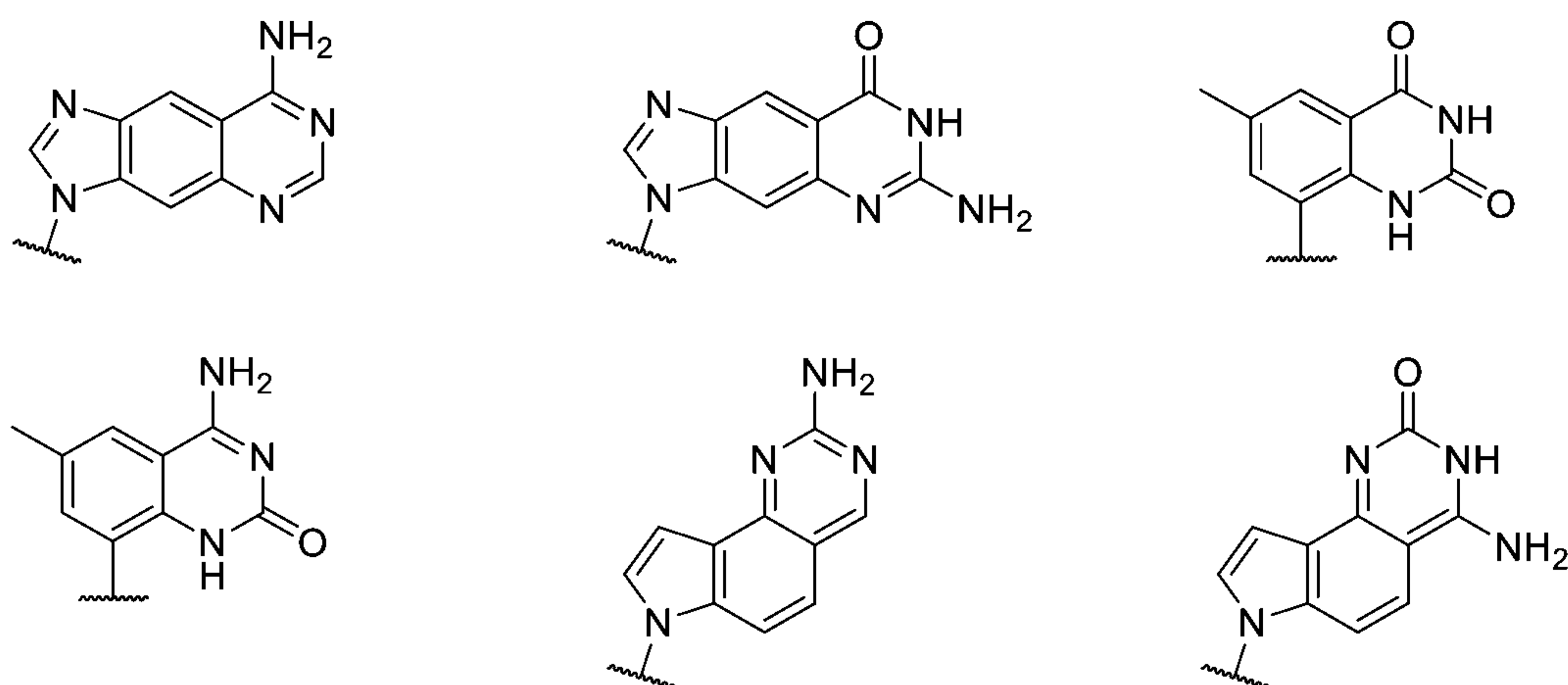


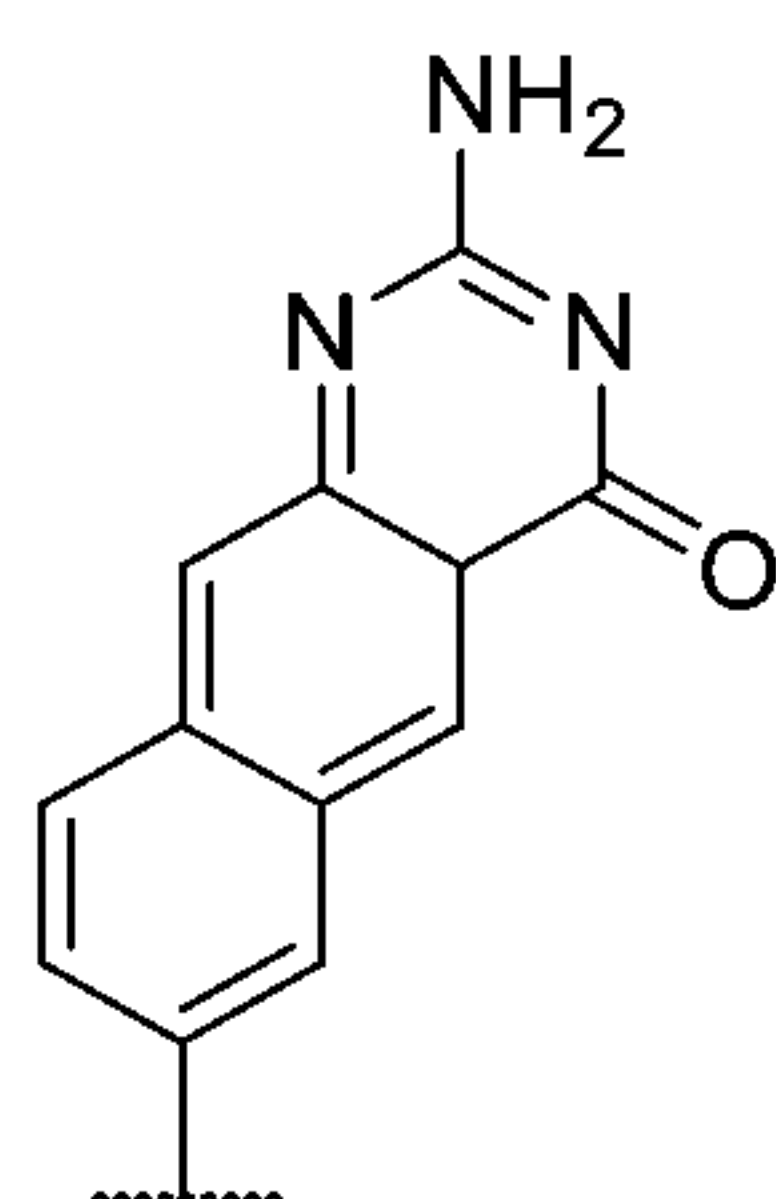
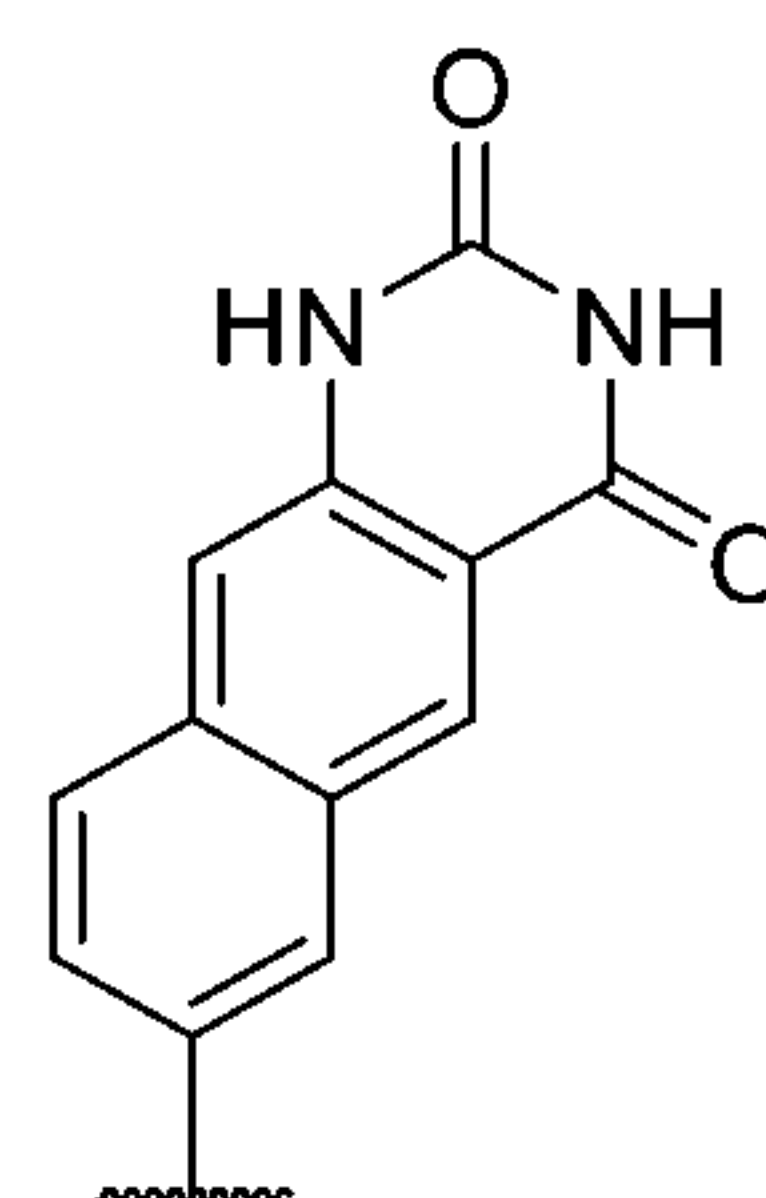
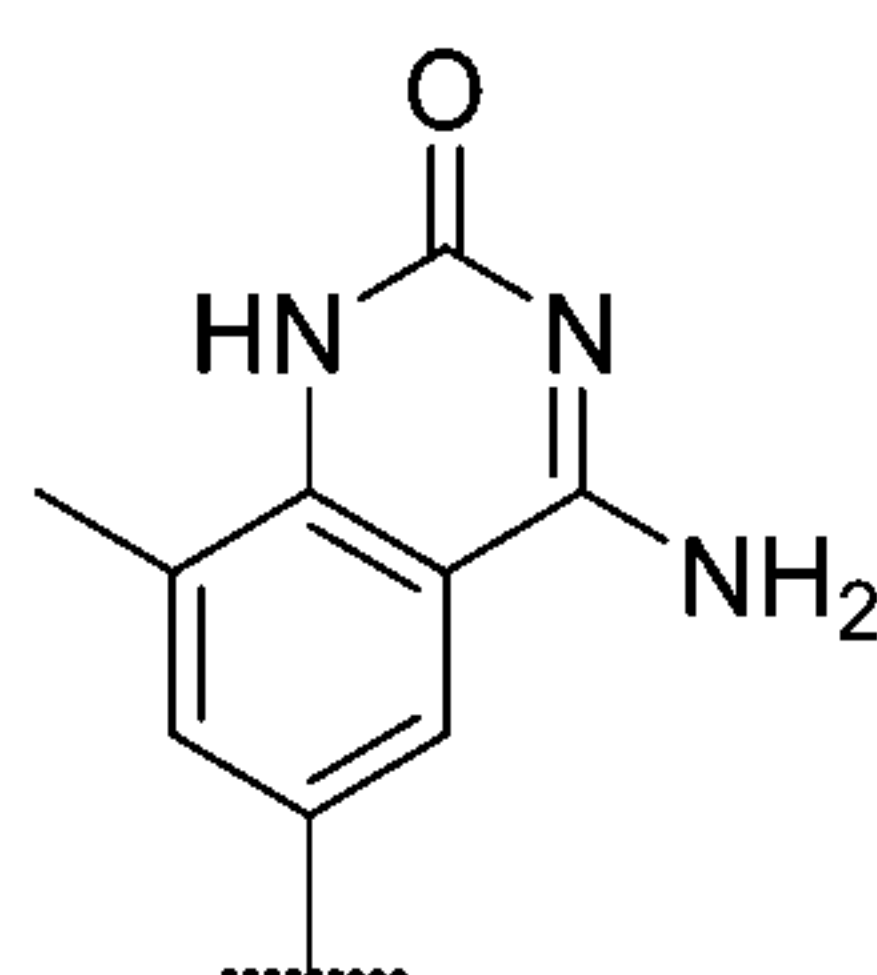
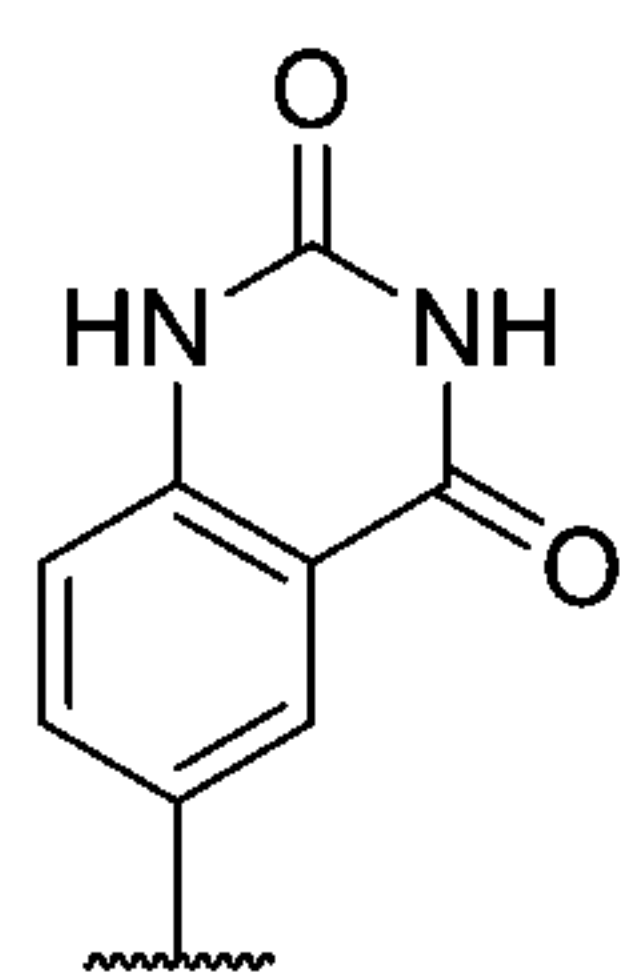
【0096】術語「核鹼基」(Nu)、「鹼基配對部分」或「鹼基」可互換地使用，係指在天然存在的或者「天然」DNA或RNA中發現的嘌呤或嘧啶鹼基(例如尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶和鳥嘌呤)，以及該等天然存在的嘌呤和嘧啶的類似物。該等類似物可以賦予該寡聚體改善的性質，例如結合親和力。示例性類似物包括次黃嘌呤(肌苷的基本組分)；2,6-二胺基嘌呤；5-甲基胞嘧啶；C5-丙炔基修飾的嘧啶；10-(9-(胺基乙氧基)吩啶基)(G-夾(G-clamp))等等。

【0097】鹼基配對部分的其他實例包括但不限於：尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、和次黃嘌呤(肌苷)，其各自的胺基基團被如下鹼基保護基團保護：2-氟尿嘧啶，2-氟胞嘧啶，5-溴尿嘧啶，5-碘尿嘧啶，2,6-二胺基嘌呤，氮雜胞嘧啶，嘧啶類似物(例如假異胞嘧啶和假尿嘧啶)，以及其他修飾的核鹼基(例如8取代的嘌呤、黃嘌呤、或次黃嘌呤)(後兩個係天然降解產物)。還預期揭露於以下的修飾的核鹼基：Chiu和Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048；Limbach等人，Nucleic Acids

Research [核酸研究], 1994, 22, 2183-2196 ; 以及 Revankar 和 Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry [綜合天然產物化學], 第7卷, 313, 該等文獻的內容藉由引用併入本文。

【0098】 鹼基配對部分的其他實例包括但不限於其中已添加一個或多個苯環的擴大尺寸的核鹼基。預期核酸鹼基替代物可用於本文所述的反義寡聚體，該等核酸鹼基替代物揭露於：Glen Research catalog [葛蘭研究目錄](www.glenresearch.com)；Krueger AT等人, Acc. Chem. Res.[化學研究述評], 2007, 40, 141-150；Kool, ET, Acc. Chem. Res.[化學研究述評], 2002, 35, 936-943；Benner S.A.等人, Nat. Rev. Genet.[遺傳學自然評論], 2005, 6, 553-543；Romesberg, F.E.等人, Curr. Opin. Chem. Biol.[化學生物當前觀點], 2003, 7, 723-733；以及Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol.[化學生物當前觀點], 2006, 10, 622-627，該等文獻的內容藉由引用併入本文。擴大尺寸的核鹼基的實例包括以下所示的那些及其互變異構形式。

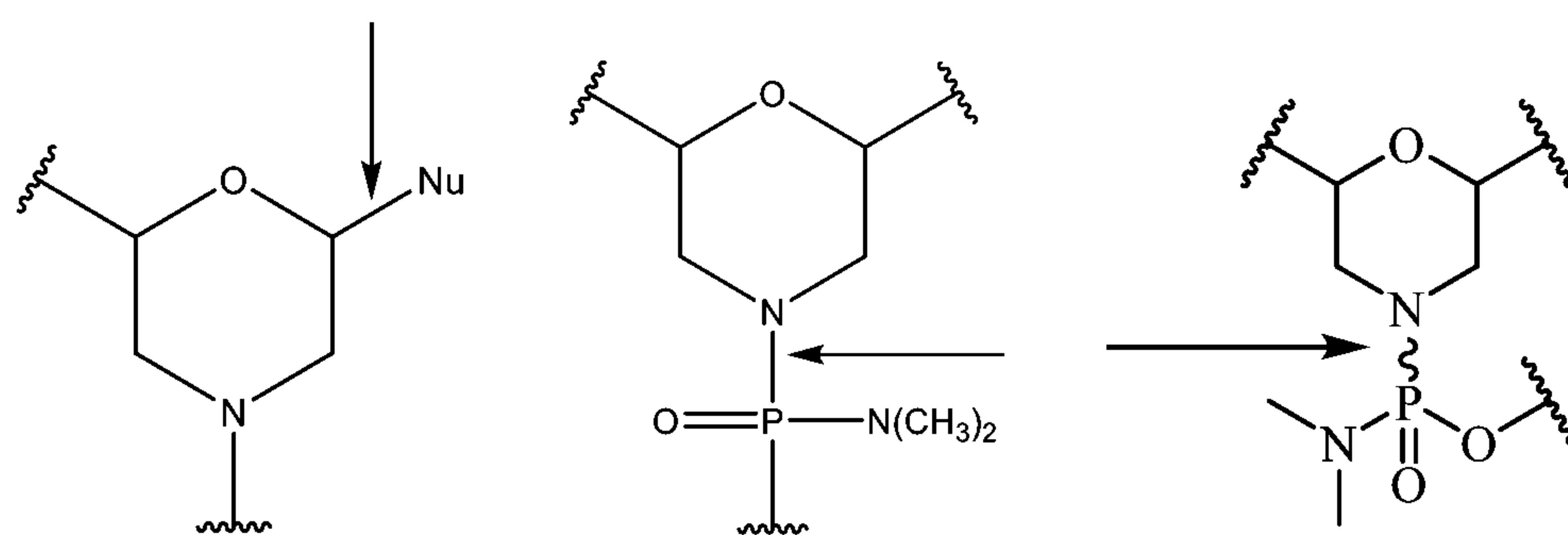




【0099】如本文所用，短語「腸胃外施用(parenteral administration 和administered parenterally)」意指除了腸內以及局部施用之外的施用方式，通常是藉由注射，並且包括但並不局限於，靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、囊內、眼眶內、心內、真皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊髓內以及胸骨內注射以及輸注。

【0100】如本文所用，在結構式中使用的一組括弧指示括弧之間的結構特徵係重複的。在一些實施方式中，使用的括弧可以是「[」和「]」，並且在某些實施方式中，用於指示重複結構特徵的括弧可以是「(」和「)」」。在一些實施方式中，括弧之間的結構特徵的重複迭代次數係括弧外指示的次數，例如2、3、4、5、6、7次等等。在多個實施方式中，括弧之間的結構特徵的重複迭代次數由括弧外指示的變數(例如「Z」)所指示。

【0101】如本文所用，在結構式內繪製到手性碳或磷原子的直鍵或彎曲鍵指示該手性碳或磷的立體化學係不確定的，並且旨在包括所有形式的手性中心和/或其混合物。此類圖示的示例如下所述。



【0102】 短語「藥學上可接受的」意指物質或組成物必需係在化學上和/或毒理學上與包含配製物的其他成分和/或用其治療的受試者相容的。

【0103】 如本文所用，短語「藥學上可接受的載體」意指非-毒性的、惰性固體、半固體或液體填充劑、稀釋劑、封裝材料、或任何類型的配製物輔料。可以充當藥學上可接受的載體的材料的一些實例係：糖類，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；澱粉，例如玉米澱粉和馬鈴薯澱粉；纖維素及其衍生物，例如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素、和乙酸纖維素；粉狀西黃蓍膠；麥芽；明膠；滑石粉；賦形劑，例如可可脂和栓劑蠟；油類，例如花生油、棉籽油、紅花油、芝麻油、橄欖油、玉米油和大豆油；二醇類，例如丙二醇；酯類，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；瓊脂；緩衝劑，例如氫氧化鎂和氫氧化鋁；海藻酸；無熱原水；等滲鹽水；林格氏溶液；乙醇；磷酸鹽緩衝溶液；無毒相容的潤滑劑，例如月桂基硫酸鈉和硬脂酸鎂；著色劑；釋放劑；包衣劑；甜味劑；調味劑；芳香劑；防腐劑；和抗氧化劑；這需要根據配方設計師的判斷。

【0104】 關於肌養蛋白合成或產生的術語「恢復」總體上係指患有肌營養不良的患者在用本文所述的反義寡聚體治療後產生肌養蛋白，包括截短形式的肌養蛋白。可以使用已知技術藉由肌肉活檢來確定治療後患者中肌養蛋白陽性纖維的百分比。例如，肌肉活檢可取自合適的肌肉，例如

患者的肱二頭肌。

【0105】 肌養蛋白陽性纖維百分比的分析可以在治療前和/或治療後、或者在整個治療過程中的某些時間點進行。在一些實施方式中，治療後活檢取自治療前活檢的對側肌肉。可以使用針對肌養蛋白的任何合適的測定來進行治療前後肌養蛋白表現分析。在一些實施方式中，使用肌養蛋白的標誌物抗體(例如單株或多株抗體)對來自肌肉活檢的組織切片進行免疫組織化學檢測。例如，可以使用MANDYS106抗體，該抗體係肌養蛋白的高度敏感性標誌物。可以使用任何合適的第二抗體。

【0106】 在一些實施方式中，肌養蛋白陽性纖維的百分比係藉由將陽性纖維的數目除以計數的總纖維來計算的。正常肌肉樣本具有100%肌養蛋白陽性纖維。因此，肌養蛋白陽性纖維的百分比可以表示為正常百分比。為了控制治療前肌肉中痕量水平的肌養蛋白以及回復突變纖維的存在，在對治療後肌肉中的肌養蛋白陽性纖維計數時，可以使用來自患者的治療前肌肉的切片設置基線。這可以用作計數該患者治療後肌肉切片中的肌養蛋白陽性纖維的閾值。在其他實施方式中，使用Bioquant圖像分析軟體(Bioquant圖像分析公司(Bioquant Image Analysis Corporation)，納什維爾(Nashville)，田納西州(TN))，抗體染色的組織切片也可用於肌養蛋白定量。總肌養蛋白螢光信號強度可以報告為正常百分比。此外，單株或多株抗肌養蛋白抗體的西方墨點法分析可用於確定肌養蛋白陽性纖維的百分比。例如，可以使用來自徠卡生物系統公司(Leica Biosystems)的抗肌養蛋白抗體NCL-Dys1。肌養蛋白陽性纖維的百分比也可以藉由確定肌聚糖複合物(β , γ)和/或神經元NOS的組分表現來分析。

【0107】 在一些實施方式中，用本揭露的反義寡聚體進行的治療減

慢或減少了DMD患者的進行性呼吸肌功能障礙和/或衰竭，這係不進行治療所期望的。在一些實施方式中，用本揭露的反義寡聚體進行的治療可減少或消除對通氣輔助的需求，這係不進行治療所期望的。在一些實施方式中，用於跟蹤疾病進程的呼吸功能測量以及潛在治療干預的評估包括最大吸氣壓力(MIP)、最大呼氣壓力(MEP)和用力肺活量(FVC)。MIP和MEP分別測量一個人在吸氣和呼氣過程中可產生的壓力水平，並且是呼吸肌強度的敏感量度。MIP係膈肌無力的量度。

【0108】 在一些實施方式中，MEP可能會在其他肺功能檢查(包括MIP和FVC)發生變化之前下降。在某些實施方式中，MEP可以是呼吸功能障礙的早期指標。在某些實施方式中，FVC可用於測量最大吸氣後用力呼氣期間排出的空氣的總體積。在DMD患者中，FVC伴隨著身體發育而增加，直到青少年早期。然而，當發育減慢或因疾病進展而受阻，以及肌無力進展時，肺活量進入下降期，並且在10至12歲後以每年約8至8.5百分比的平均速率下降。在某些實施方式中，支持性分析有預測的MIP百分比(針對體重調整MIP)、預測的MEP百分比(針對年齡調整MEP)、和預測的FVC百分比(針對年齡和身高調整FVC)。

【0109】 如本文所用，術語「受試者」和「患者」包括任何表現出症狀或有表現出症狀的風險的動物，例如患有DMD或BMD或者有患上DMD或BMD的風險，或者具有與該等病症相關的任何症狀(例如肌纖維損失)或處於與該等病症相關的任何症狀(例如肌纖維損失)的風險的受試者(或患者)，可以用本揭露的反義寡聚體對其進行治療。合適的受試者(或患者)包括實驗動物(例如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)，農場動物，以及家畜或寵物(例如貓或狗)。包括非人靈長類動物，較佳的是人患者(或受試

者)。還包括在具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變的受試者(或患者)中產生肌養蛋白的方法。

【0110】如本文所用，短語「全身施用(systemic administration和administered systemically)」、「外周施用(peripheral administration和administered peripherally)」意指除了直接用於中樞神經系統以外的方式施用化合物、藥物或其他材料，從而使得其進入患者的系統中並因此進行代謝和其他相似過程，例如皮下施用。

【0111】短語「靶向序列」或「鹼基序列」係指與靶標先質mRNA中的核苷酸序列互補的寡聚體的核鹼基序列。在本揭露的一些實施方式中，靶標先質mRNA中的核苷酸序列係肌養蛋白先質mRNA中的外顯子50、內含子49、和/或內含子50退火位點，稱為H50D(+04-18)、H50D(+07-18)、H50D(+07-16)、H50D(+07-17)、H50A(-19+07)、H50D(+07-15)、H50A(-02+23)、H50D(+06-18)、或H50D(+07-20)。在一個實施方式中，本文所述的反義寡聚體靶向的退火位點係H50D(+07-16)。

【0112】受試者(例如，哺乳動物例如人)或細胞的「治療」係試圖改變受試者或細胞的自然進程的任何類型的干預。治療包括但不限於寡聚體或其藥物組成物的施用，並且可以預防性地進行或者在病理事件開始或與致病因子接觸之後進行。治療包括對與肌養蛋白相關的疾病或病症的症狀或病理(如呈某些形式的肌營養不良)的任何期望的效果，並且可包括例如所治療疾病或病症的一種或多種可測量標誌物的最小變化或改善。還包括「預防性」治療，其可以旨在降低所治療疾病或病症的進展速度，延遲該疾病或病症的發作，或降低其發作的嚴重性。「治療」或「預防」不一

定指示完全根除、治癒或防止該疾病或病症或其相關症狀。

【0113】 在一些實施方式中，用本揭露的反義寡聚體進行的治療增加新型肌養蛋白的產生，延緩疾病進展，減慢或減少步行的損失，減輕肌肉炎症，減少肌肉損害，改善肌肉功能，減少肺功能的損失，和/或增強肌肉再生，這係不進行治療所期望的。在一些實施方式中，治療維持、延緩或減慢疾病進展。在一些實施方式中，治療維持步行或減少步行的損失。在一些實施方式中，治療維持肺功能或減少肺功能的損失。在一些實施方式中，如藉由例如6分鐘行走測試(6MWT)所測量的，治療維持或增加患者的穩定行走距離。在一些實施方式中，治療維持或減少行走/跑步10米的時間(即10米行走/跑步測試)。在一些實施方式中，治療維持或減少仰臥站立的時間(即站立測試的時間)。在一些實施方式中，治療維持或減少爬四個標準樓梯的時間(即四級爬樓梯測試)。在一些實施方式中，如藉由例如MRI(例如，腿部肌肉的MRI)所測量的，治療維持或減少患者的肌肉炎症。在一些實施方式中，MRI測量T2和/或脂肪分數以識別肌肉退化。MRI可以識別由炎症、水腫、肌肉損害、和脂肪浸潤引起的肌肉結構和成分的變化。

【0114】 在一些實施方式中，用本揭露的反義寡聚體進行的治療增加新型肌養蛋白的產生，並且減慢或減少步行的損失，這係不進行治療所期望的。例如，治療可穩定、維持、改善或增加受試者的行走能力(例如，步行的穩定)。在一些實施方式中，如藉由例如6分鐘行走測試(6MWT)所測量的，治療維持或增加患者的穩定行走距離，這藉由McDonald等人(Muscle Nerve [肌肉神經], 2010; 42:966-74，藉由引用併入本文)描述。6分鐘行走距離(6MWD)的變化可以表示為絕對值、百分比

變化或%預測值中的變化。可以藉由計算%預測值來確定6MWT中DMD患者的表現(相對於健康同齡人的典型表現)。例如，對於男性，%預測的6MWD可以使用以下等式計算： $196.72 + (39.81 \times \text{年齡}) - (1.36 \times \text{年齡}^2) + (132.28 \times \text{以米為單位的高度})$ 。對於女性，%預測的6MWD可以使用以下等式計算： $188.61 + (51.50 \times \text{年齡}) - (1.86 \times \text{年齡}^2) + (86.10 \times \text{以米為單位的高度})$ (Henricson等人, PLoS Curr.[公共科學圖書館潮流], 2012, 第2版, 藉由引用併入本文)。

【0115】 DMD患者的肌肉功能損失可能發生在兒童時期正常生長和發育的背景下。事實上，儘管存在進行性肌肉損傷，但是在約1年的時間內，患有DMD的年齡較小的兒童在6MWT期間的行走距離可能會增加。在一些實施方式中，將來自DMD患者的6MWD與典型發育的對照受試者以及與來自年齡和性別相匹配的受試者的現有標準數據進行比較。在一些實施方式中，可以使用擬合於標準數據的基於年齡和身高的等式來計算正常生長和發育。這樣的等式可用於將6MWD轉換為DMD受試者的百分比預測(%預測的)值。在某些實施方式中，對%預測的6MWD數據的分析表示一種計算正常生長和發育之方法，並且可表明，早期(例如，小於或等於7歲)的功能增強表示DMD患者的能力穩定而非提高(Henricson等人, PLoS Curr.[公共科學圖書館潮流], 2012, 第2版, 藉由引用併入本文)。

【0116】 提出並公開一種反義分子命名系統，以區分不同的反義分子(參見Mann等人, (2002) J Gen Med [基因醫學雜誌] 4, 644-654)。測試若干個略有不同的反義分子時，這種命名法變得尤其相關，該等反義分子全部針對相同的靶標區域，如下所示：

H#A/D(x:y)。

【0117】 第一個字母表示物種(例如，H：人，M：小鼠，C：犬)。

「#」表示靶標肌養蛋白外顯子數。「A/D」分別指示在外顯子的開始和結束處的受體或供體剪接位點。(x y)表示退火座標，其中「-」或「+」分別指示內含子或外顯子序列。例如，A(-6+18)將指示在靶標外顯子之前的內含子的後6個鹼基和靶標外顯子的前18個鹼基。最接近的剪接位點係受體，因此該等座標前面將帶有「A」。描述在供體剪接位點處的退火座標可以是D(+2-18)，其中後2個外顯子鹼基和前18個內含子鹼基對應於該反義分子的退火位點。完整的外顯子退火座標將由A(+65+85)表示，即從該外顯子開始的第65和第85個核苷酸之間的位點。

II. 反義寡聚體

A. 設計成誘導外顯子50跳躍的反義寡聚體

【0118】 在某些實施方式中，本揭露的反義寡聚體與肌養蛋白基因的外顯子50、內含子49、和/或內含子50靶標區域互補，並且誘導外顯子50跳躍。具體地，本揭露涉及與肌養蛋白先質mRNA的外顯子50、內含子49、和/或內含子50靶標區域(稱為退火位點)互補的反義寡聚體。在一些實施方式中，該退火位點選自H50D(+04-18)、H50D(+07-18)、H50D(+07-16)、H50D(+07-17)、H50A(-19+07)、H50D(+07-15)、H50A(-02+23)、H50D(+06-18)、或H50D(+07-20)。在一些實施方式中，該退火位點係H50D(+07-16)。

【0119】 本揭露的反義寡聚體靶向肌養蛋白先質mRNA並誘導外顯子50的跳躍，因此其從成熟的剪接的mRNA轉錄物被排除或跳躍。藉由跳過外顯子50，被破壞的閱讀框被恢復為整碼突變。儘管DMD由多種遺傳亞型組成，但是本揭露的反義寡聚體被專門設計成跳過肌養蛋白先質

mRNA的外顯子50。適於跳過外顯子50的DMD突變包含DMD患者亞組(4%)。

【0120】誘導外顯子50跳躍的反義寡聚體的核鹼基序列被設計成與肌養蛋白先質mRNA的外顯子50、內含子49、和/或內含子50中的特定靶序列互補。在一些實施方式中，反義寡聚體係PMO，其中PMO的每個味啉代環連接至核鹼基，該核鹼基包括例如DNA中發現的核鹼基(腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、和胸腺嘧啶)。

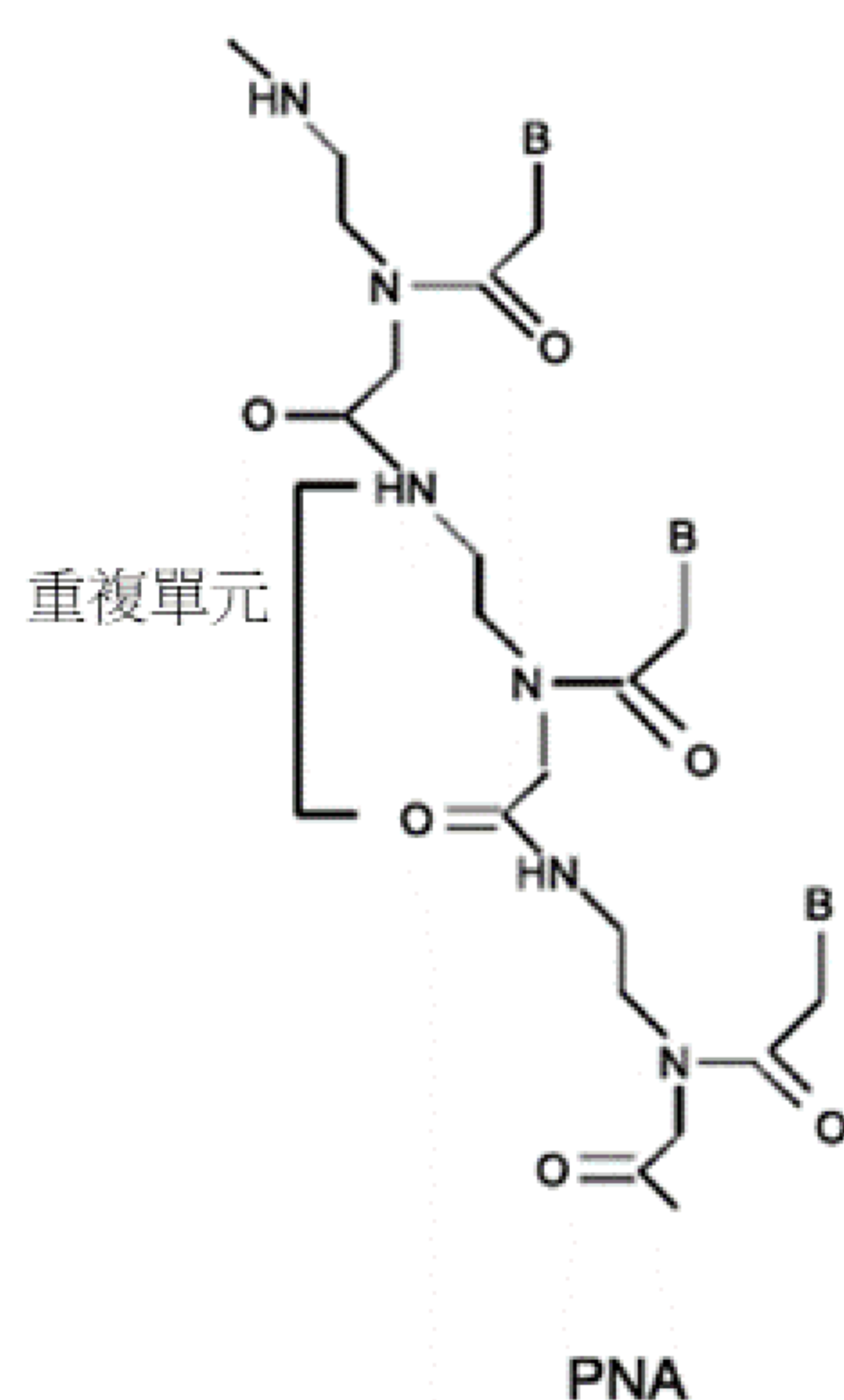
B. 寡聚體化學特徵

【0121】本揭露的反義寡聚體可以採用多種反義寡聚體化學物質。寡聚體化學物質的實例包括但不限於：味啉代寡聚體、硫代磷酸酯修飾的寡聚體、2'-O-甲基修飾的寡聚體、肽核酸(PNA)、鎖核酸(LNA)、硫代磷酸酯寡聚體、2'-O-MOE修飾的寡聚體、2'-氟-修飾的寡聚體、2'-O,4'-C-乙烯-橋接核酸(ENA)、三環DNA、三環DNA硫代磷酸酯亞基、2'-O-[2-(N-甲基胺基甲醯基)乙基]修飾的寡聚體，包括前述任一項的組合。硫代磷酸酯和2'-O-Me修飾的化學物質可以組合以產生2'-O-Me-硫代磷酸酯骨架。參見，例如PCT公開案號WO/2013/112053和WO/2009/008725，該等文獻藉由引用以其整體特此併入。如藉由所用化學物質允許的，SEQ ID NO: 1-9的任一個中的每個T可以是尿嘧啶。如藉由所用化學物質允許的，SEQ ID NO: 1-9的任一個中的相關核鹼基可包含5-甲基基團。下面進一步描述本揭露的寡聚體化學物質的示例性實施方式。

1. 肽核酸(PNA)

【0122】肽核酸(PNA)係DNA的類似物，其中該骨架與去氧核糖骨架在結構上同形，由附接有嘧啶或嘌呤鹼基的N-(2-胺基乙基)甘胺酸單元

組成。含有天然嘧啶和嘌呤鹼基的PNA遵循沃森-克裡克鹼基配對規則與互補寡聚體雜交，並且在鹼基對識別方面模擬DNA。PNA的骨架係藉由肽鍵而非磷酸二酯鍵形成的，使得它們非常適合於反義應用(參見以下結構)。該骨架不帶電荷，導致PNA/DNA或PNA/RNA雙鏈體顯示出比正常的熱穩定性更高的熱穩定性。PNA不被核酸酶或蛋白酶識別。PNA的非限制性實例如下所述。



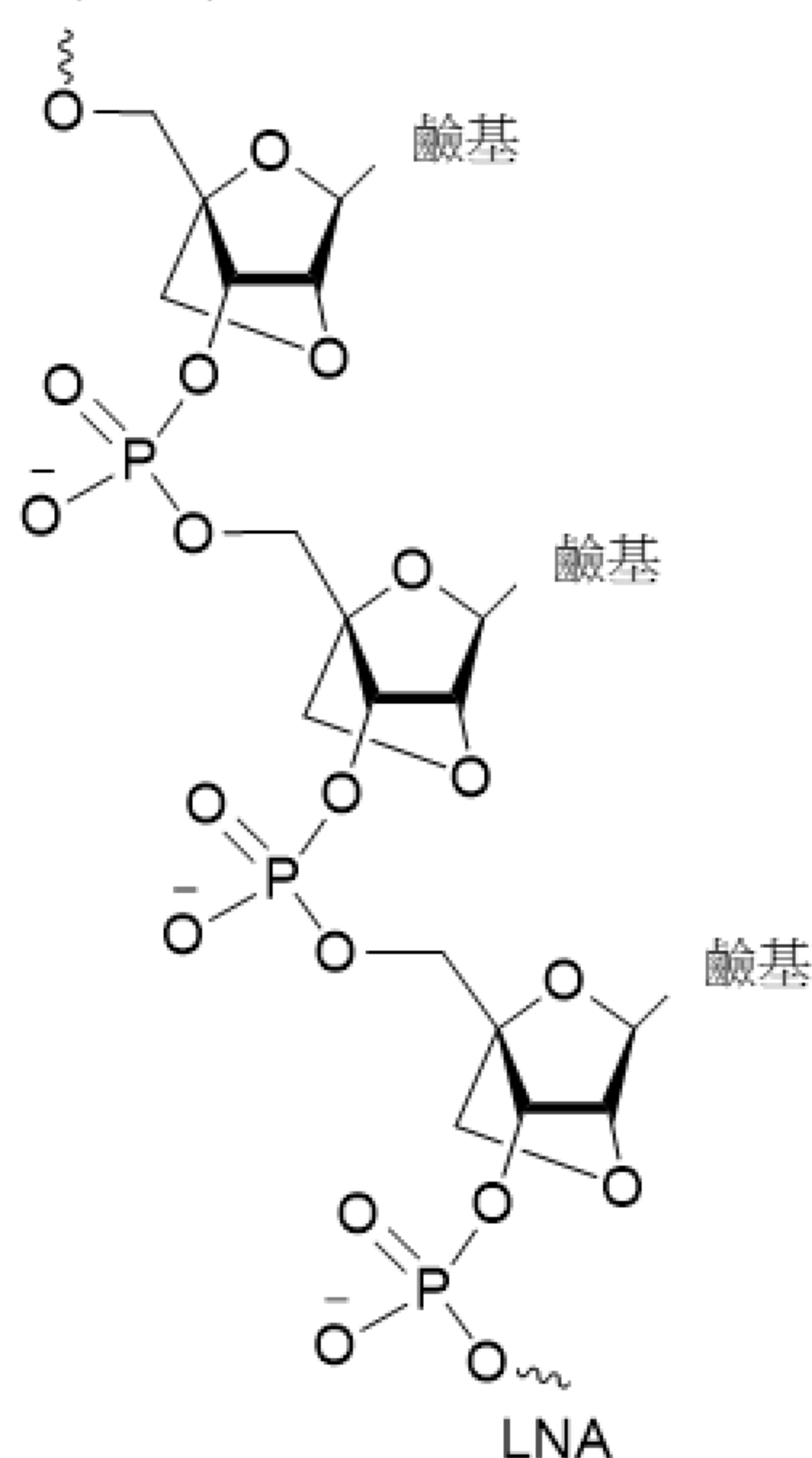
【0123】 儘管天然結構發生了根本的結構變化，但PNA能夠以螺旋形式序列特異性結合至DNA或RNA。PNA的特徵包括對互補DNA或RNA的高結合親和力、由單鹼基錯配引起的去穩定化作用、對核酸酶和蛋白酶的抗性、與DNA或RNA的雜交(不依賴鹽濃度)、以及與同型嘌呤DNA的三鏈形成。PANAGENE™已開發出其專有的Bts PNA單體(Bts；苯并噻唑-2-磺醯基基團)和專有的寡聚方法。使用Bts PNA單體進行的PNA寡聚係由脫保護、偶合和封端的重複循環組成。可以使用本領域已知的任何技術來合成地產生PNA。參見，例如美國專利案號：6,969,766；7,211,668；7,022,851；7,125,994；7,145,006；和7,179,896。還參見美國專利案號：5,539,082；5,714,331；和5,719,262，用於製備PNA。PNA化合物的另外的教導可以發現於Nielsen等人，*Science* [科學], 254:

1497-1500, 1991中。前述文獻各自藉由引用以其整體併入。

2. 鎖核酸(LNA)

【0124】 反義寡聚體也可含有「鎖核酸」(LNA)亞基。「LNA」係稱為橋接核酸(BNA)的一類修飾的成員。BNA的特徵在於將核糖環的構象鎖定在C3'-內(北)糖皺褶中的共價鍵。對於LNA，該橋由2'-O和4'-C位置之間的亞甲基組成。LNA增強骨架預組織化和鹼基堆積，以提高雜交和熱穩定性。

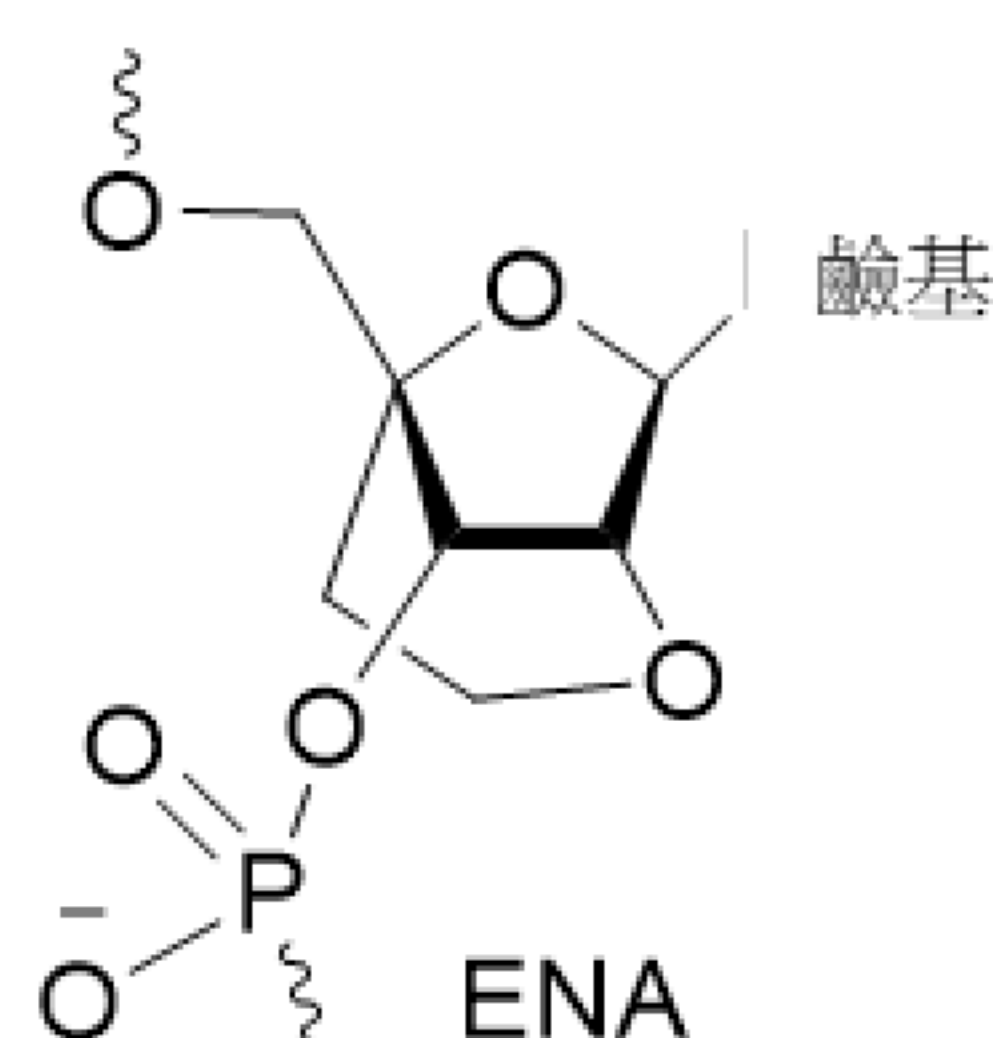
【0125】 LNA的結構可以發現於，例如，Wengel等人，*Chemical Communications* [化學通訊] (1998) 455；Koshkin等人，*Tetrahedron* [四面體] (1998) 54:3607；Jesper Wengel, *Accounts of Chem. Research* [化學研究報告] (1999) 32:301；Obika等人，*Tetrahedron Letters* [四面體通訊] (1997) 38:8735；Obika等人，*Tetrahedron Letters* [四面體通訊] (1998) 39:5401；以及Obika等人，*Bioorganic Medicinal Chemistry* [生物有機與藥物化學] (2008) 16:9230中，該等文獻藉由引用以其整體特此併入。LNA的非限制性實例如下所述。



【0126】 本揭露的反義寡聚體可摻入一個或多個LNA；在一些情況

下，該等反義寡聚體可以完全由LNA組成。單個LNA核苷亞基的合成方法及其摻入寡聚體的方法描述於，例如美國專利案號：7,572,582；7,569,575；7,084,125；7,060,809；7,053,207；7,034,133；6,794,499；和6,670,461中；該等文獻各自藉由引用以其整體併入。典型的亞基間連接子包括磷酸二酯和硫代磷酸酯部分；可替代地，可以採用不含磷的連接子。另外的實施方式包括含LNA的反義寡聚體，其中每個LNA亞基被DNA亞基分開。某些反義寡聚體由交替的LNA和DNA亞基組成，其中亞基間連接子係硫代磷酸酯。

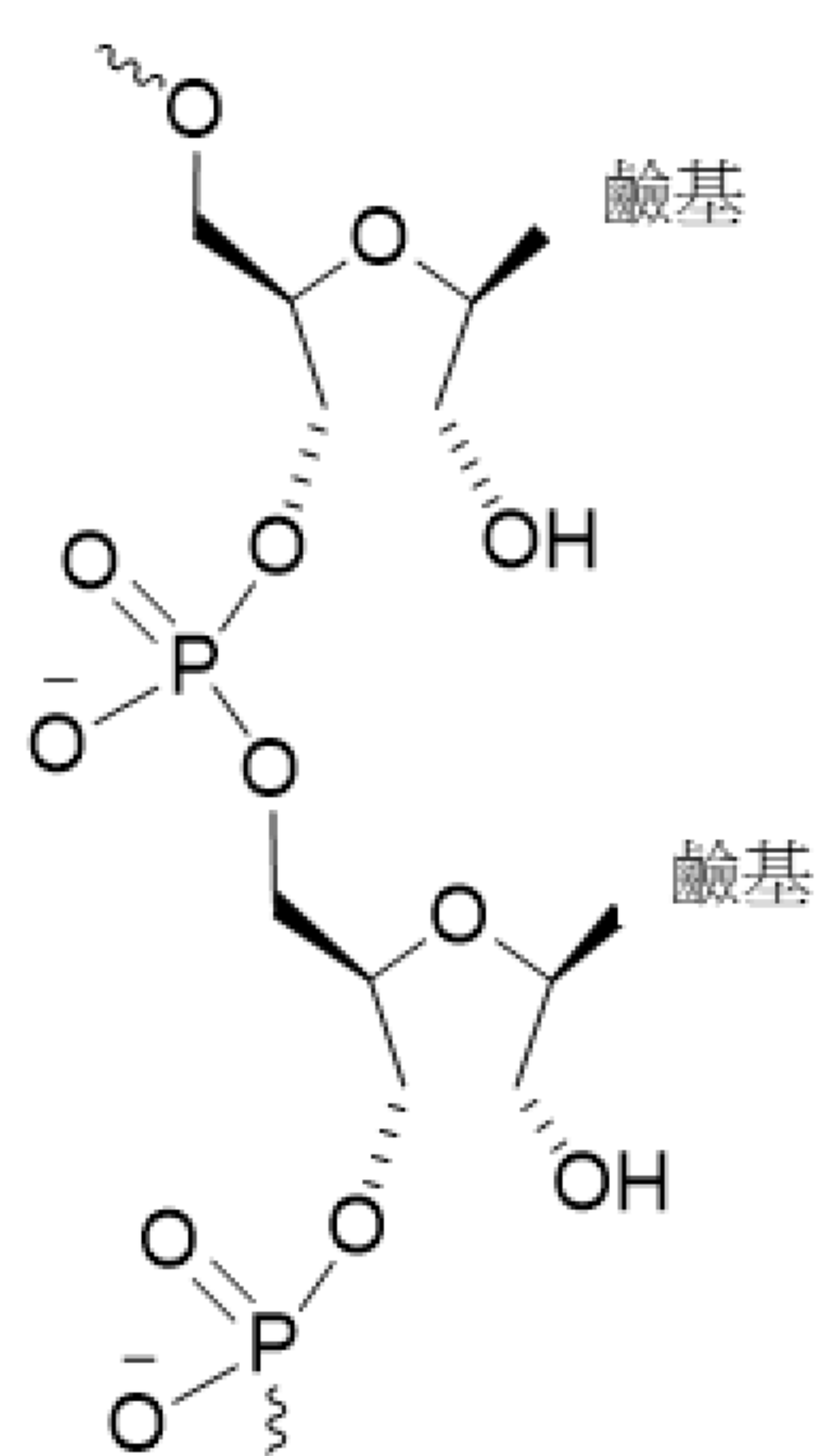
【0127】 2'O,4'C-乙烯-橋接核酸(ENA)係BNA類別的另一成員。非限制性實例如下所述。



【0128】 ENA寡聚體及其製備描述於Obika等人, *Tetrahedron Lett* [四面體通訊](1997) 38 (50): 8735中，該文獻藉由引用以其整體特此併入。本揭露的反義寡聚體可摻入一個或多個ENA亞基。

3. 解鎖核酸(UNA)

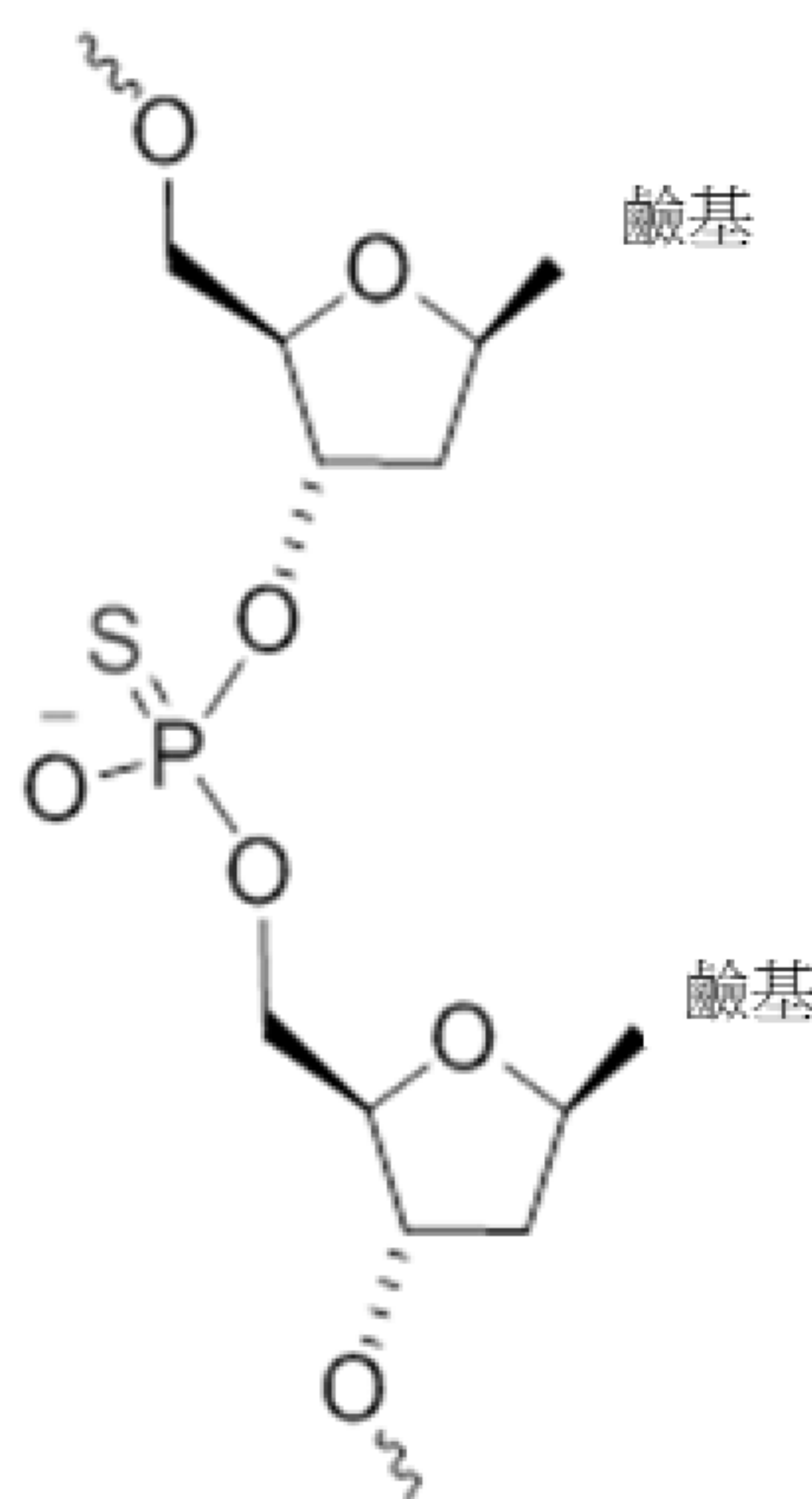
【0129】 反義寡聚體也可含有解鎖核酸(UNA)亞基。UNA和UNA寡聚體係RNA的類似物，其中該亞基的C2'-C3'鍵已被切割。LNA受構象限制(相對於DNA和RNA)，而UNA非常柔性。UNA揭露於例如WO 2016/070166中。UNA的非限制性實例如下所述。



【0130】 典型的亞基間連接子包括磷酸二酯和硫代磷酸酯部分；可替代地，可以採用不含磷的連接子。

4. 硫代磷酸酯

【0131】 「硫代磷酸酯」(或S-寡聚物)係正常DNA的變體，其中一個非橋接氧被硫代替。硫代磷酸酯的非限制性實例如下所述。



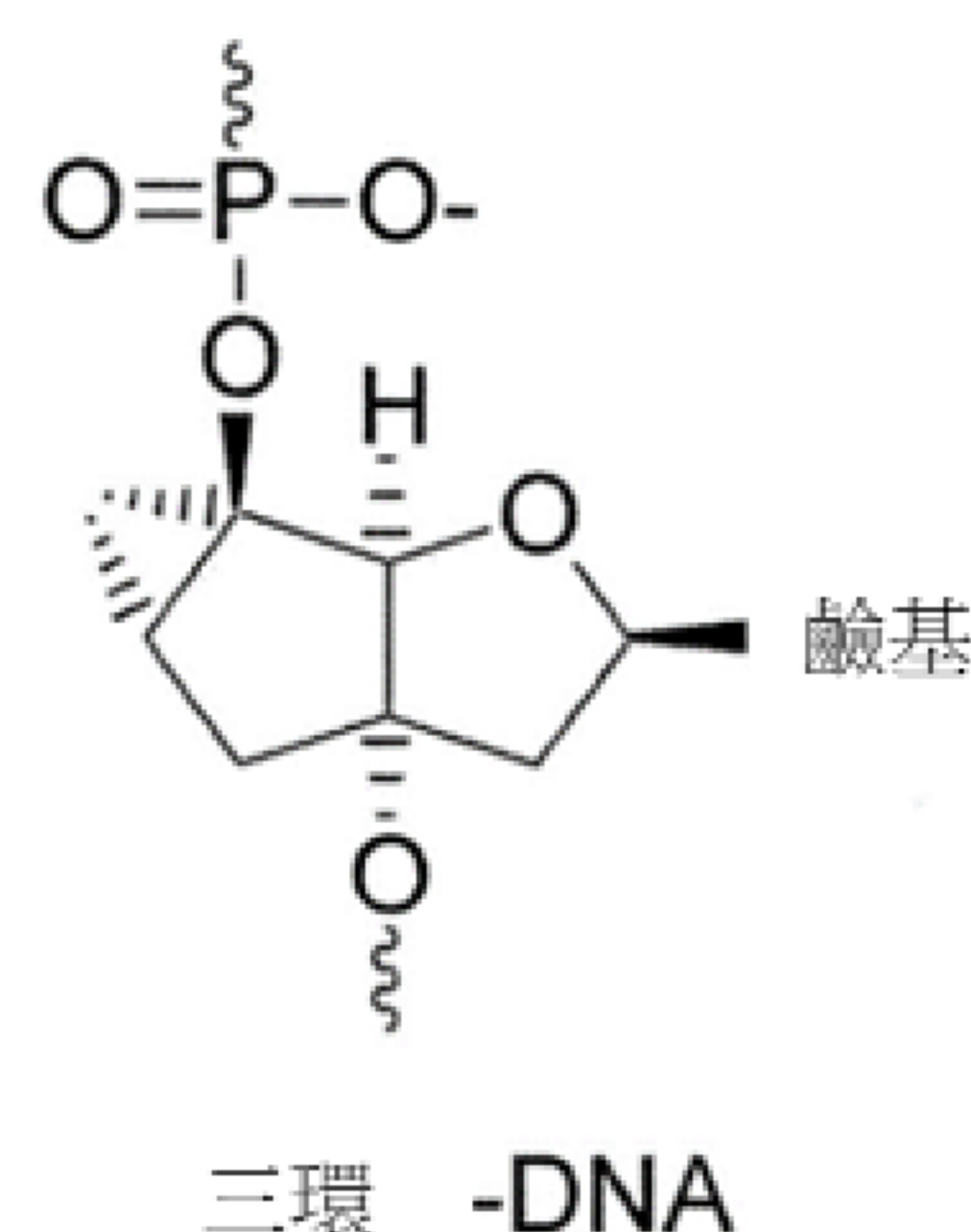
【0132】 核苷酸間鍵的硫化降低了包括5'到3'和3'到5' DNA POL 1 外切核酸酶、核酸酶S1和P1、RNA酶、血清核酸酶、以及蛇毒磷酸二酯酶在內的內切核酸酶和外切核酸酶的作用。硫代磷酸酯係藉由兩種主要途徑製備的：藉由元素硫在二硫化碳中的溶液作用於磷酸氫鹽上，或者藉由用四乙基秋蘭姆二硫化物(TETD)或3H-1, 2-苯并二硫醇-3-酮1, 1-二氧化物(BDTD)硫化亞磷酸三酯的方法(參見，例如Iyer等人, *J. Org. Chem.*[有機化學雜誌] 55, 4693-4699, 1990，該文獻藉由引用以其整體特此併入)。

後一方法避免了元素硫在大多數有機溶劑中的不溶性和二硫化碳的毒性問題。TETD和BDTD方法還可產生更高純度的硫代磷酸酯。

5. 三環DNA和三環硫代磷酸酯亞基

【0133】 三環DNA(tc-DNA)係一類受約束的DNA類似物，其中藉由引入環丙烷環來修飾每個核苷酸，以限制骨架的構象柔性並優化扭轉角 γ 的骨架幾何形狀。含同鹼基的腺嘌呤和胸腺嘧啶的tc-DNA與互補RNA形成極其穩定的A-T鹼基對。三環DNA及其合成描述於國際專利申請公開案號WO 2010/115993中，該文獻藉由引用以其整體特此併入。本揭露的反義寡聚體可摻入一個或多個三環DNA亞基；在一些情況下，該等反義寡聚體可以完全由三環DNA亞基組成。

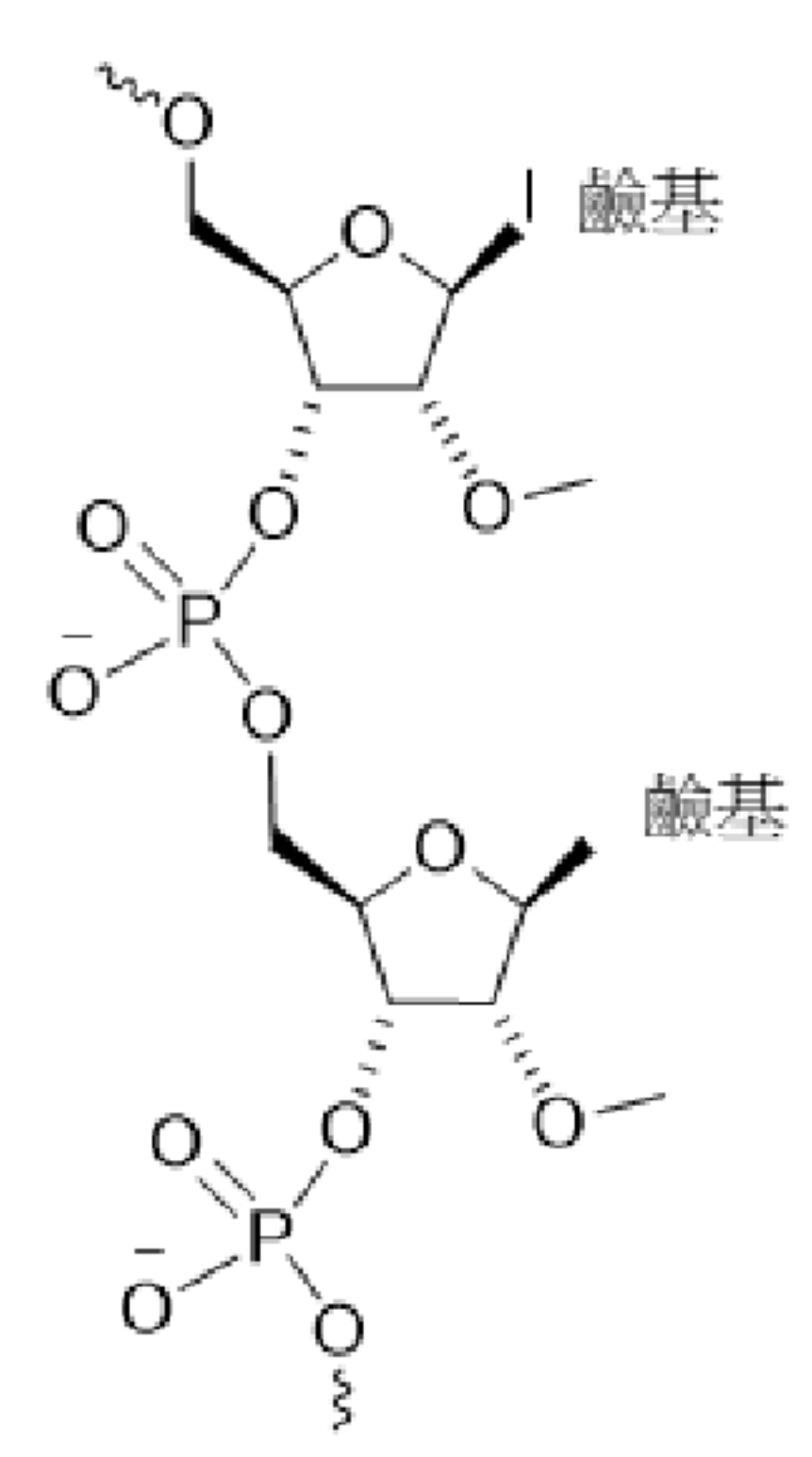
【0134】 三環硫代磷酸酯亞基係具有硫代磷酸酯亞基間鍵的三環DNA亞基。三環硫代磷酸酯亞基及其合成描述於國際專利申請公開案號WO 2013/053928中，該文獻藉由引用以其整體特此併入。本揭露的反義寡聚體可摻入一個或多個三環DNA亞基；在一些情況下，該等反義寡聚體可以完全由三環DNA亞基組成。三環DNA/三環硫代磷酸酯亞基的非限制性實例如下所述。



6. 2'-O-甲基、2'-O-MOE和2'-F寡聚體

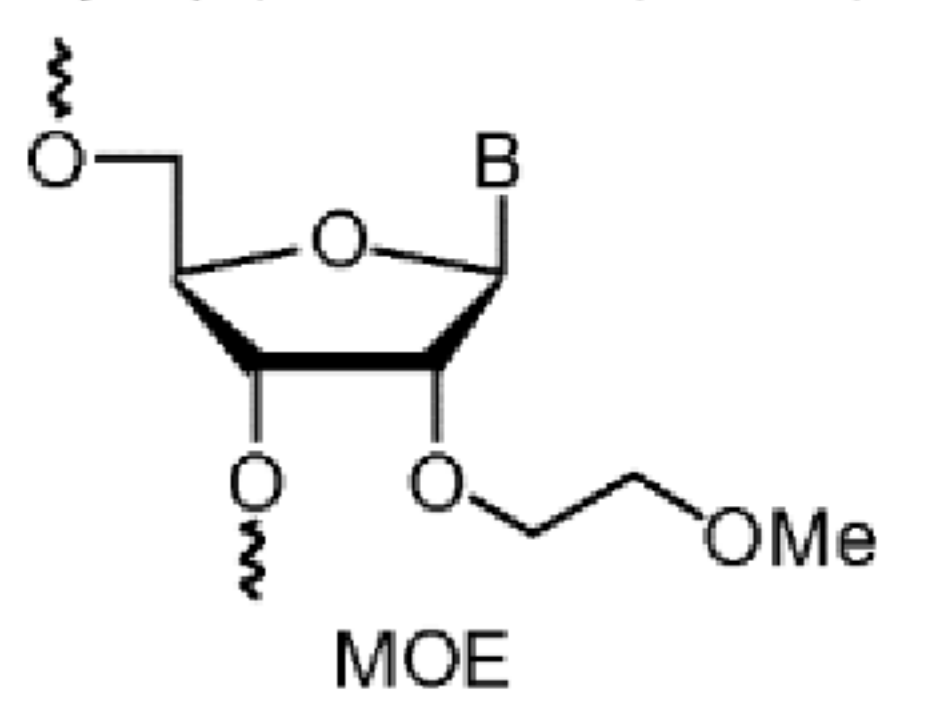
【0135】 「2'-O-Me寡聚體」分子在核糖分子的2'-OH殘基處攜帶甲基基團。2'-O-Me-RNA表現出與DNA相同(或類似)的行為，但受到了核

酸酶降解的保護。2'-O-Me-RNA也可以與硫代磷酸酯寡聚體(PTO)組合用於進一步穩定。2'-O-Me寡聚體(磷酸二酯或硫代磷酸酯)可以根據本領域的常規技術來合成(參見，例如Yoo等人, *Nucleic Acids Res.*[核酸研究] 32:2008-16, 2004，該文獻藉由引用以其整體特此併入)。2'-O-Me寡聚體的非限制性實例如下所述。

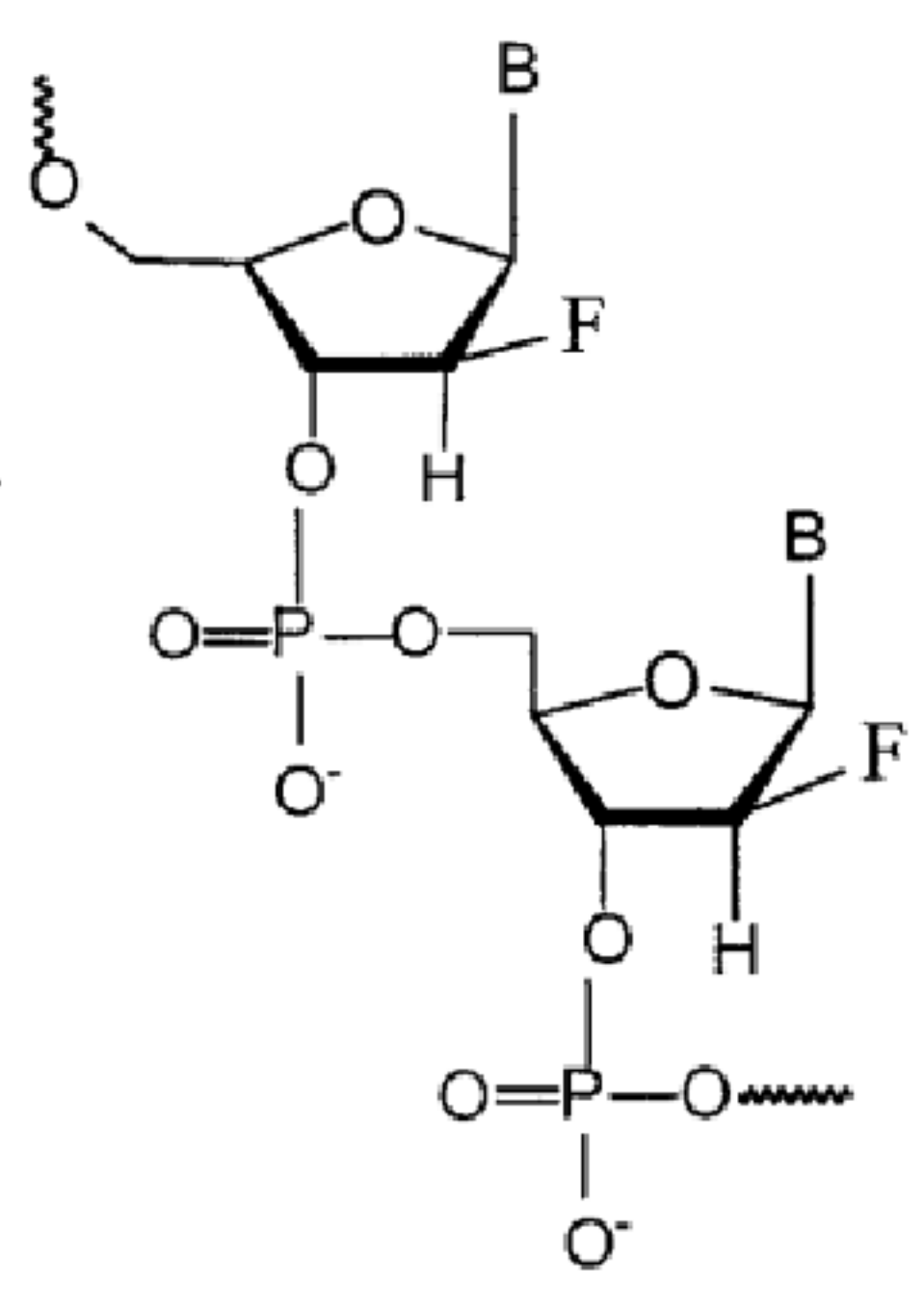


2'-O-Me

【0136】 2'-O-甲氧基乙基寡聚體(2'-O-MOE)在核糖分子的2'-OH殘基處攜帶甲氧基乙基基團，並且在Martin等人, *Helv. Chim. Acta* [瑞士化學學報], 78, 486-504, 1995中討論，該文獻藉由引用以其整體特此併入。2'-O-MOE亞基的非限制性實例如下所述。



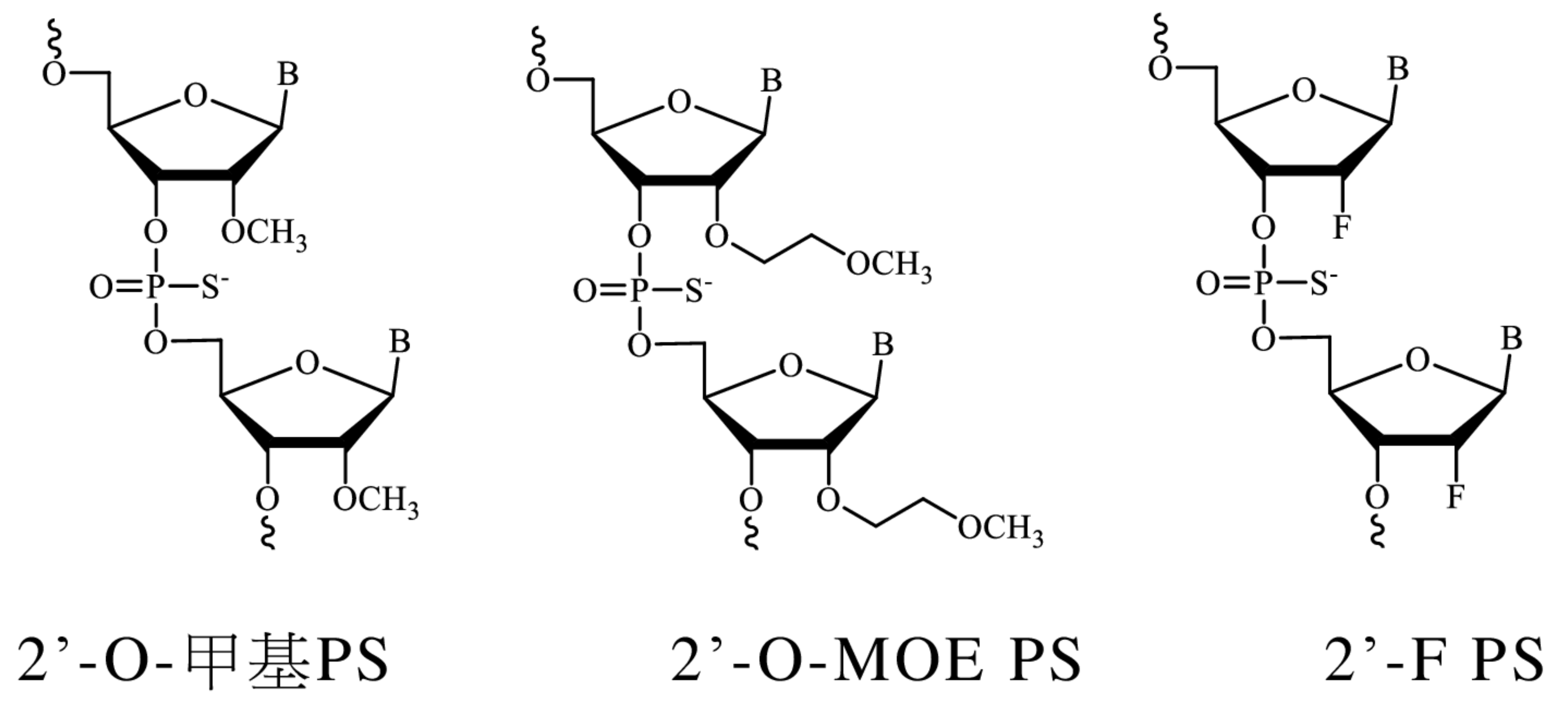
【0137】 2'-氟(2'-F)寡聚體在2'位置處具有代替2'-OH的氟基團。2'-F寡聚體的非限制性實例如下所述。



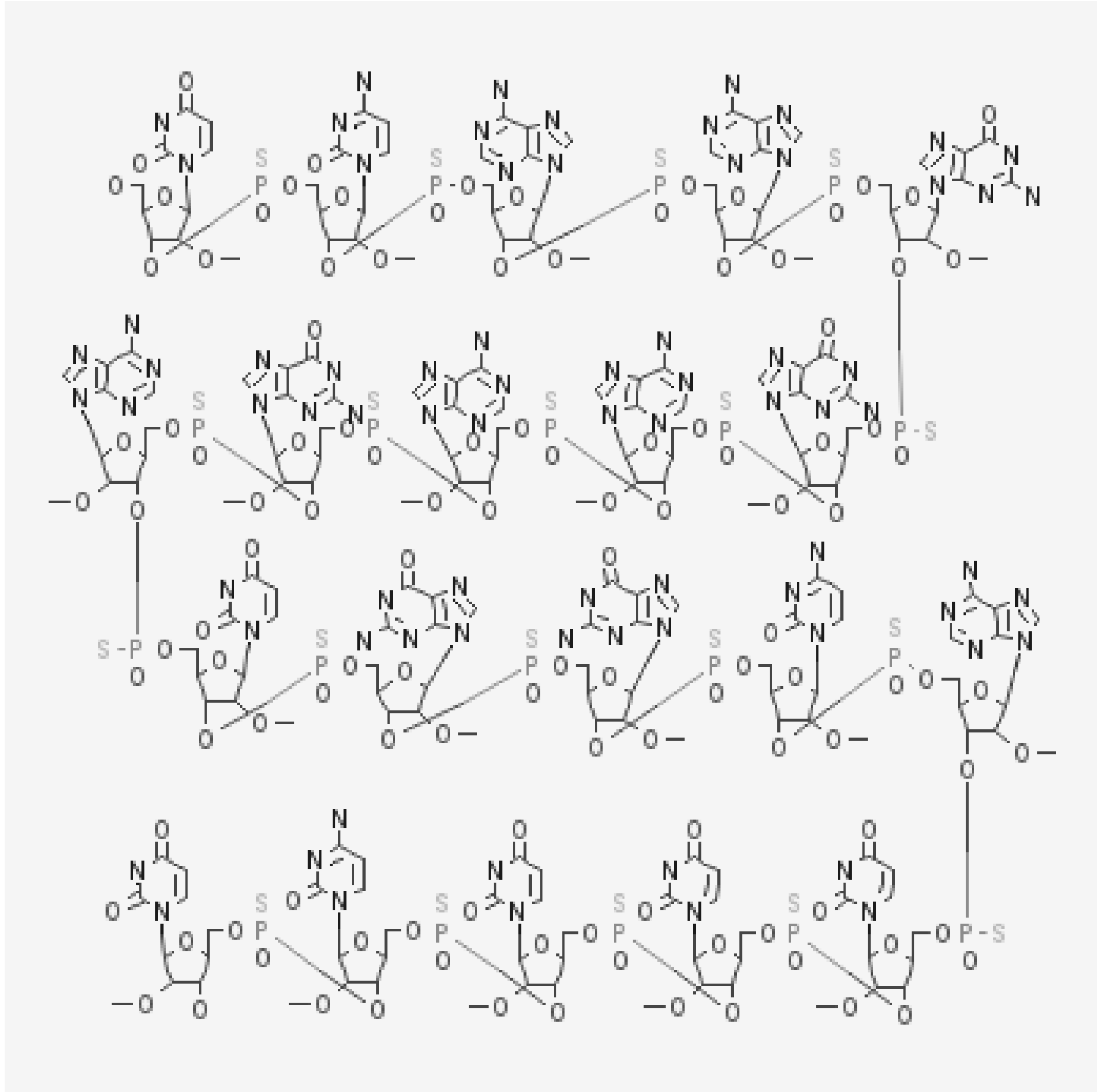
2'-F

【0138】 2'-氟寡聚體進一步描述於WO 2004/043977中，該文獻藉由引用以其整體特此併入。

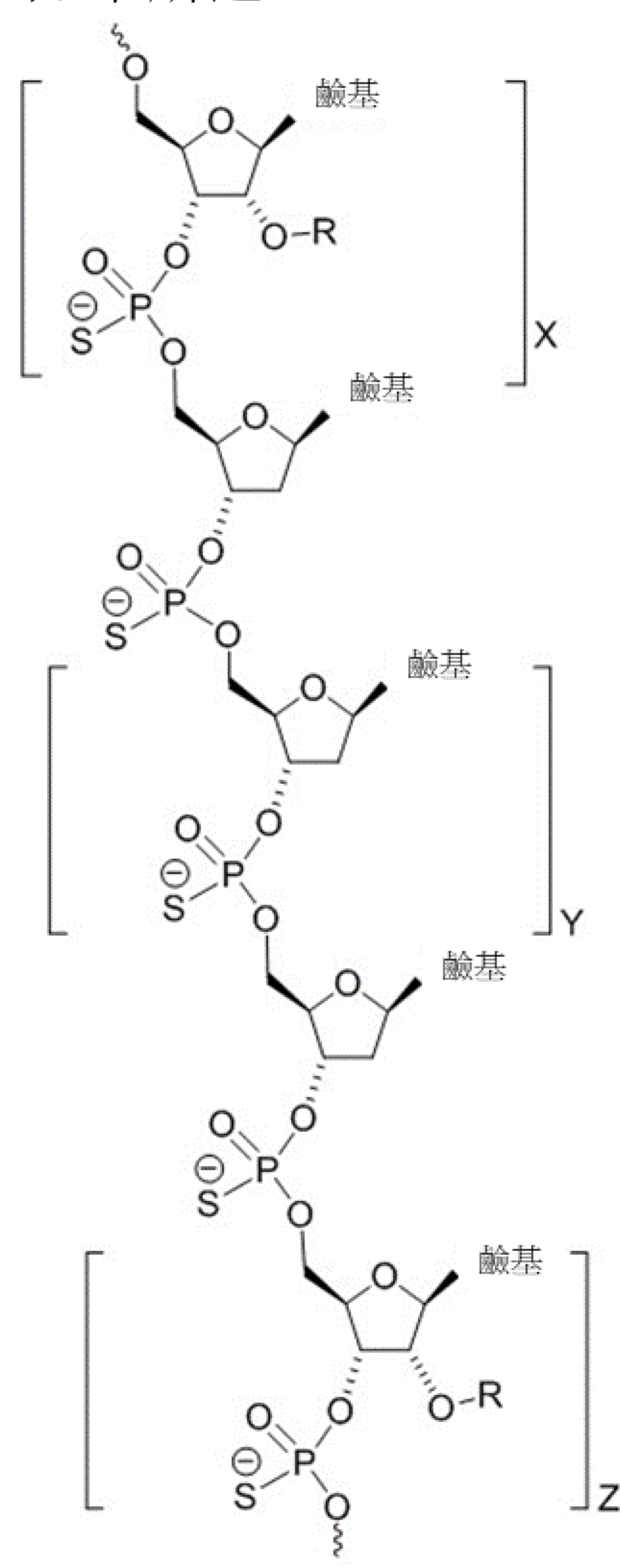
【0139】 2'-O-甲基、2'-O-MOE和2'-F寡聚體也可包含一個或多個如下所述的硫代磷酸酯(PS)鍵。



【0140】 此外，2'-O-甲基、2'-O-MOE和2'-F寡聚體可在整個寡聚體中包含PS亞基間鍵，例如，如在以下描述的2'-O-甲基PS寡聚體曲薩珀森(drisapersen)中。



【0141】 可替代地，2'-O-甲基、2'-O-MOE、和/或2'-F寡聚體可在寡聚體的端處包含PS鍵，如下所述。



其中：

R係CH₂CH₂OCH₃(甲氧基乙基或MOE)；並且

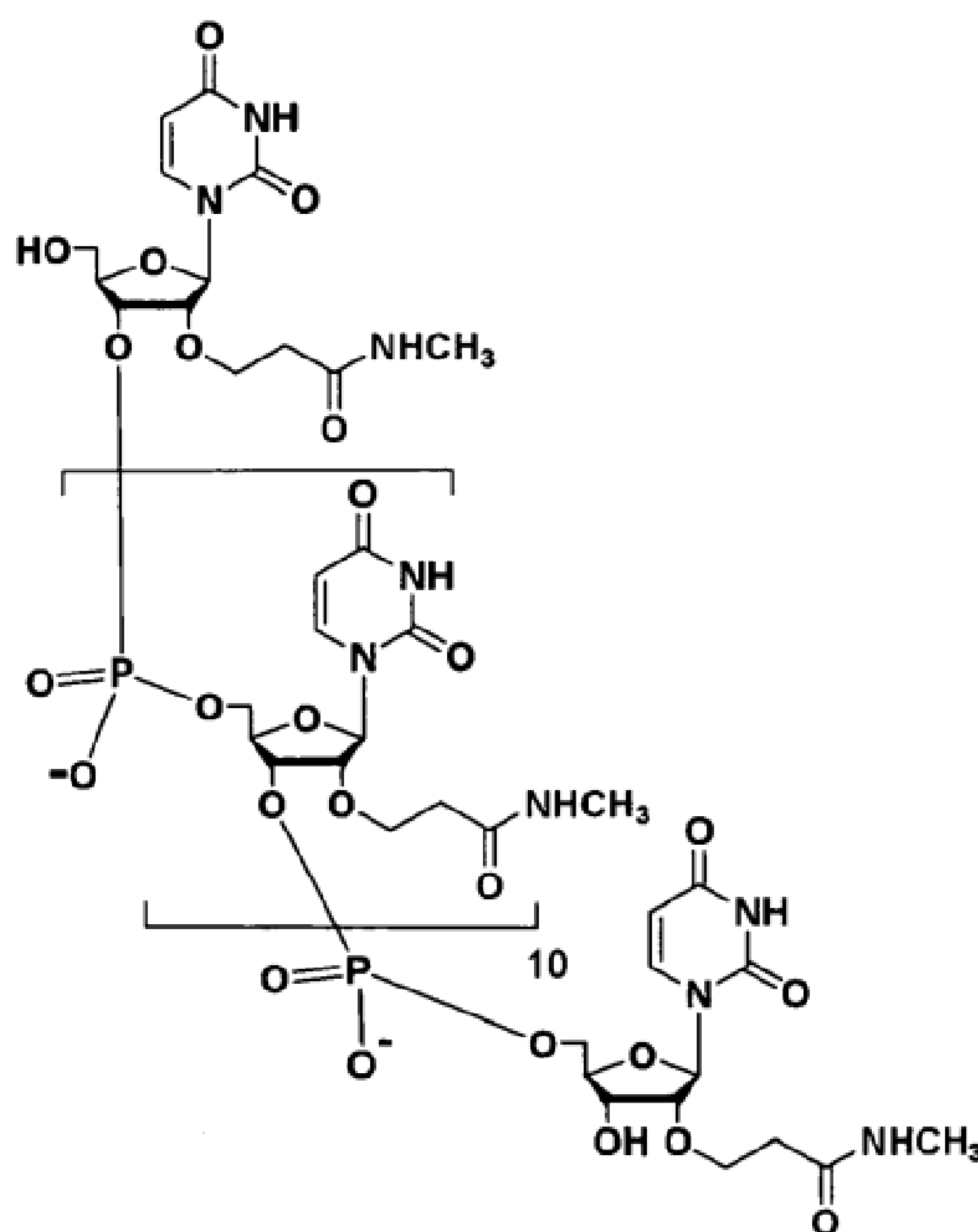
X、Y和Z分別表示每個指定的5'-翼、中央缺口和3'-翼區域中含有的核苷酸的數目。

【0142】 本揭露的反義寡聚體可摻入一個或多個2'-O-甲基、2'-O-MOE和2'-F亞基，並且可利用本文所述的亞基間鍵的任一個。在一些情況下，本揭露的反義寡聚體可以完全由2'-O-甲基、2'-O-MOE、或2'-F亞基組成。本揭露的反義寡聚體的一個實施方式完全由2'-O-甲基亞基組

成。

7. 2'-O-[2-(N-甲基胺基甲醯基)乙基]寡聚體(MCE)

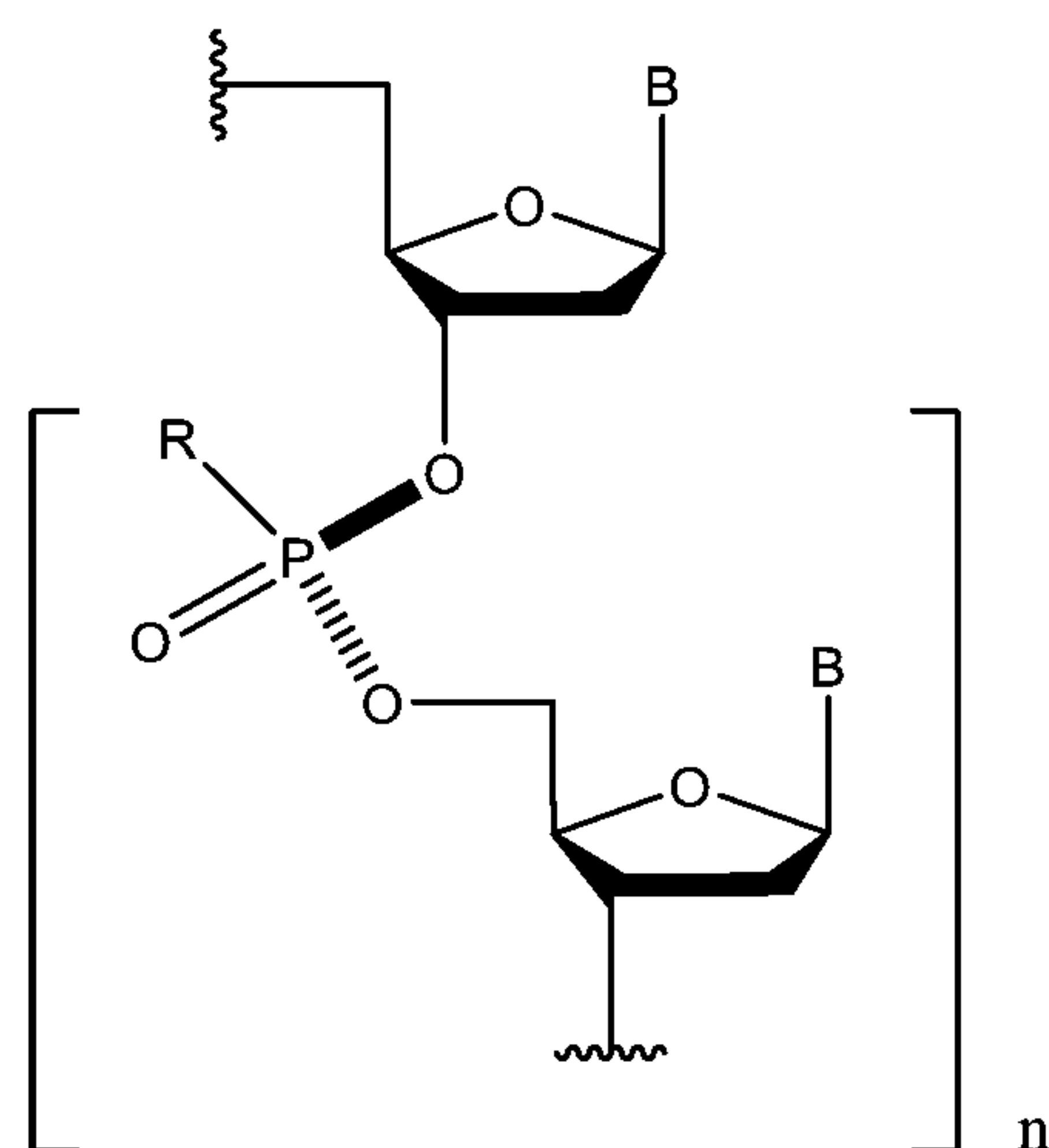
【0143】 MCE係可用於本揭露的反義寡聚體的2'-O修飾的核糖核苷的另一個實例。在本文，2'-OH被衍生化為2-(N-甲基胺基甲醯基)乙基部分以增加核酸酶抗性。MCE寡聚體的非限制性實例如下所述。



【0144】 MCE及其合成描述於Yamada等人, *J. Org. Chem.*[有機化學雜誌] (2011) 76(9):3042-53，該文獻藉由引用以其整體特此併入。本揭露的反義寡聚體可摻入一個或多個MCE亞基。

8. 立體特異性寡聚體

【0145】 立體特異性寡聚體係其中藉由合成方法固定每個含磷鍵的立體化學從而產生基本上立體純的寡聚體的那些。立體特異性寡聚體的非限制性實例如下所述。



【0146】在以上實例中，寡聚體的每個磷具有相同的立體組態。另外的實例包括本文所述的寡聚體。例如，LNA、ENA、三環DNA、MCE、2'-O-甲基、2'-O-MOE、2'-F、和基於咪啉代的寡聚體可以用立體特異性的含磷核苷間鍵(例如像，硫代磷酸酯、磷酸二酯、磷醯胺、磷酸二胺)或其他含磷核苷間鍵來製備。立體特異性寡聚體、製備方法、手性受控合成、手性設計、以及用於製備此類寡聚體的手性助劑詳細描述於，例如WO 2017192664、WO 2017192679、WO 2017062862、WO 2017015575、WO 2017015555、WO 2015107425、WO 2015108048、WO 2015108046、WO 2015108047、WO 2012039448、WO 2010064146、WO 2011034072、WO 2014010250、WO 2014012081、WO 20130127858、和WO 2011005761中，該等文獻各自藉由引用以其整體特此併入。

【0147】 立體特異性寡聚體在 R_P 或 S_P 組態中可具有含磷核苷間鍵。其中鍵的立體組態被控制的手性含磷鍵稱為「立體純的」，而其中鍵的立體組態不受控制的手性含磷鍵稱為「立體無規的」。在某些實施方式中，本揭露的寡聚體包含多個立體純的和立體無規的鍵，使得所得的寡聚體在該寡聚體的預先指定的位置處具有立體純的亞基。在圖7A和7B中的國際

專利申請公開案號WO 2017/062862 A2中提供了立體純的亞基的位置的實例。在一個實施方式中，寡聚體中所有的手性含磷鍵都是立體無規的。在一個實施方式中，寡聚體中所有的手性含磷鍵都是立體純的。

【0148】 在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，寡聚體中所有 n 個手性含磷鍵係立體無規的。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，寡聚體中所有 n 個手性含磷鍵係立體純的。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，寡聚體中 n 個含磷鍵的至少10%(至最接近的整數)係立體純的。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，寡聚體中 n 個含磷鍵的至少20%(至最接近的整數)係立體純的。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，寡聚體中 n 個含磷鍵的至少30%(至最接近的整數)係立體純的。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，寡聚體中 n 個含磷鍵的至少40%(至最接近的整數)係立體純的。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，寡聚體中 n 個含磷鍵的至少50%(至最接近的整數)係立體純的。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，寡聚體中 n 個含磷鍵的至少60%(至最接近的整數)係立體純的。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，寡聚體中 n 個含磷鍵的至少70%(至最接近的整數)係立體純的。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，寡聚體中 n 個含磷鍵的至少80%(至最接近的整數)係立體純的。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，寡聚體中 n 個含磷鍵的至少90%(至最接近的整數)係立體純的。

數)係立體純的。

【0149】 在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少2個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少3個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少4個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少5個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少6個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少7個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少8個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少9個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少10個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少11個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)

的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少12個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少13個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少14個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少15個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少16個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少17個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少18個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少19個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少20個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵。

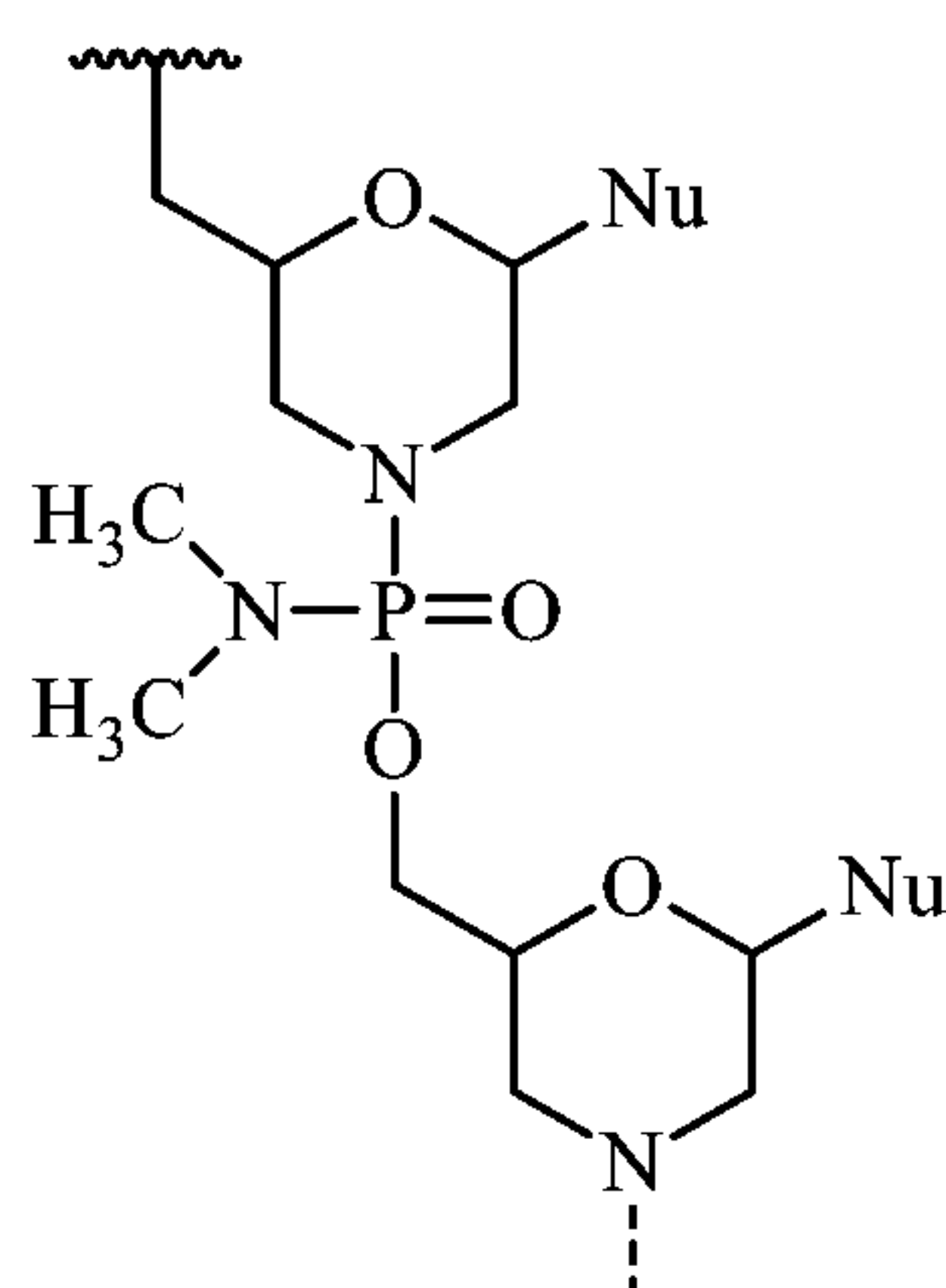
【0150】 在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體含有至少2個具有相同立體取向(即， S_P 或 R_P)的連續的立體純的含磷鍵，以及至少2個具有其他立體取向的連續的立體純的含磷鍵。例如，該寡聚體可含有至少2個具有 S_P 取向的連續的立體純的含磷鍵。

磷鍵和至少2個具有 R_P 取向的連續的立體純的含磷鍵。

【0151】 在具有 n 個手性含磷鍵(其中 n 係1或更大的整數)的寡聚體的實施方式中，該寡聚體以交替形式含有至少2個具有相同立體取向的連續的立體純的含磷鍵。例如，該寡聚體可以依次含有以下：2個或更多個 R_P 、2個或更多個 S_P 、以及2個或更多個 R_P 等。

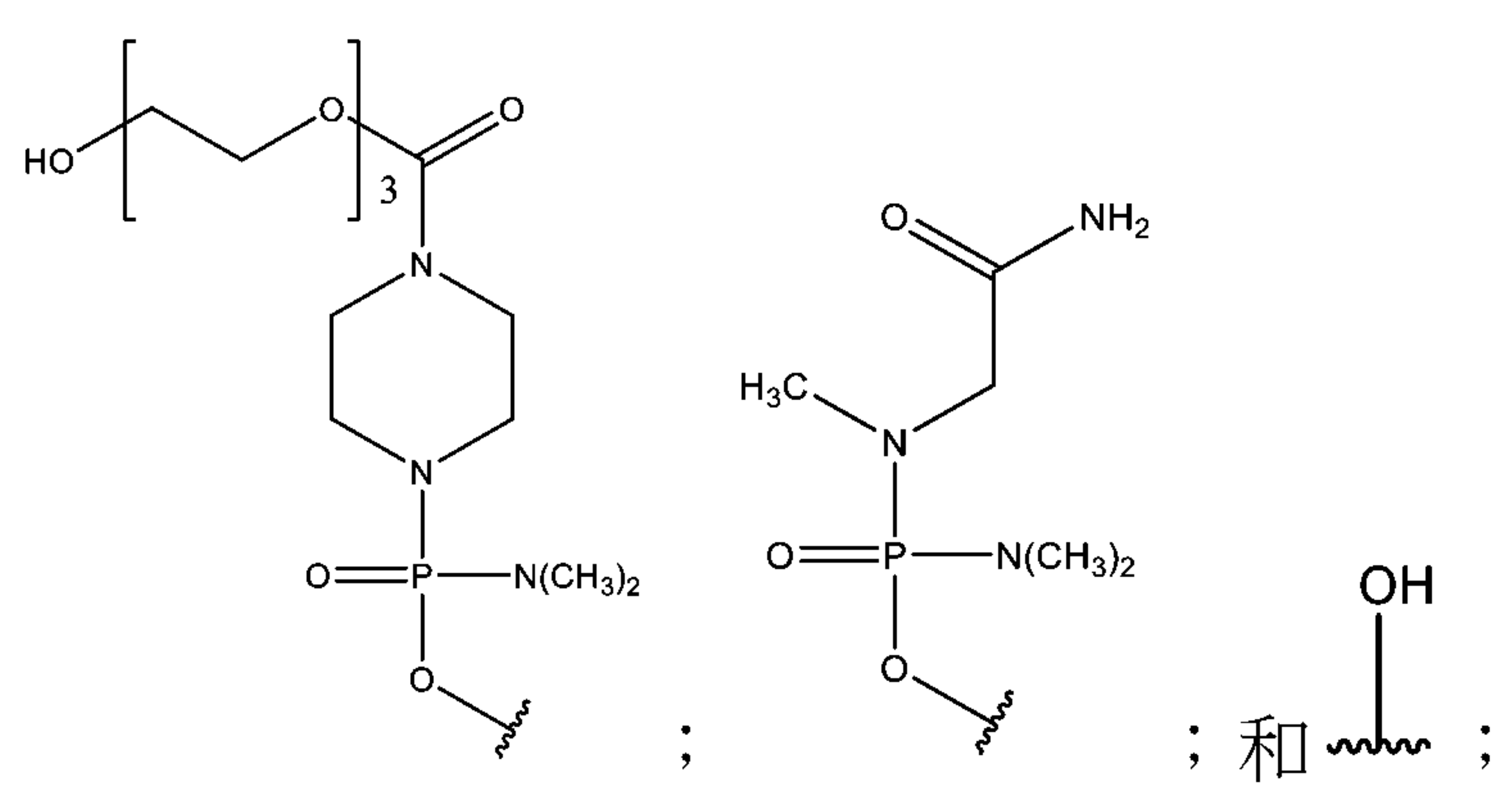
9. 咪啉代寡聚體

【0152】 本揭露的示例性實施方式涉及具有以下通式結構的磷酸二胺咪啉代寡聚體：



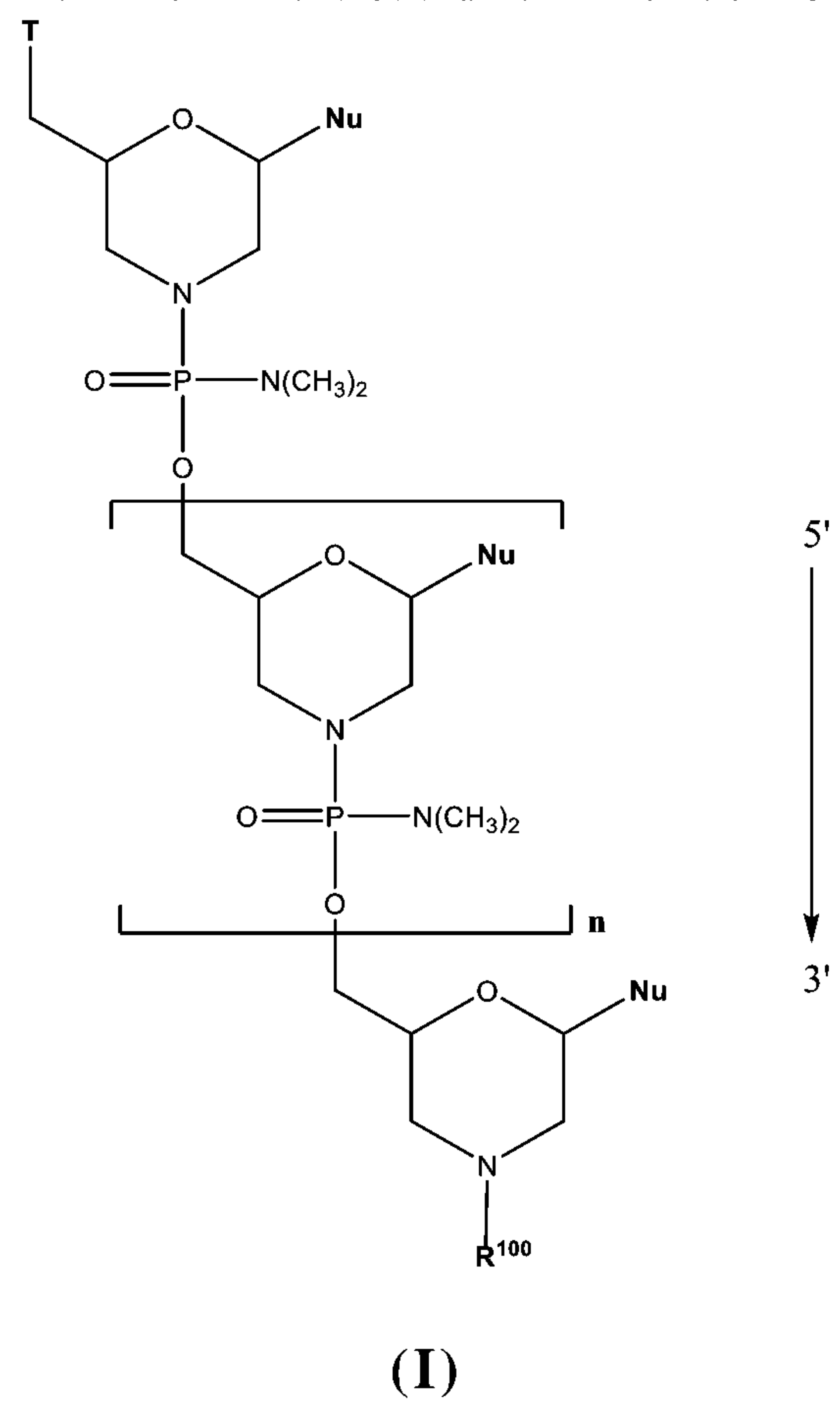
並且如在 Summerton, J. 等人, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* [反義和核酸藥物開發], 7: 187-195 (1997)的圖2中所描述的。如本文所述的咪啉代旨在涵蓋前述通式結構的所有立體異構物和互變異構物。咪啉代寡聚體的合成、結構和結合特性詳細描述於美國專利案號：5,698,685；5,217,866；5,142,047；5,034,506；5,166,315；5,521,063；5,506,337；8,076,476；和8,299,206中，所有的該等文獻藉由引用併入本文。

【0153】 在某些實施方式中，咪啉代在寡聚體的5'或3'端與「尾」部分軛合，以增加其穩定性和/或溶解性。示例性尾包括：



並且「尾」部分的遠端-OH或-NH₂視需要連接至細胞穿透肽。

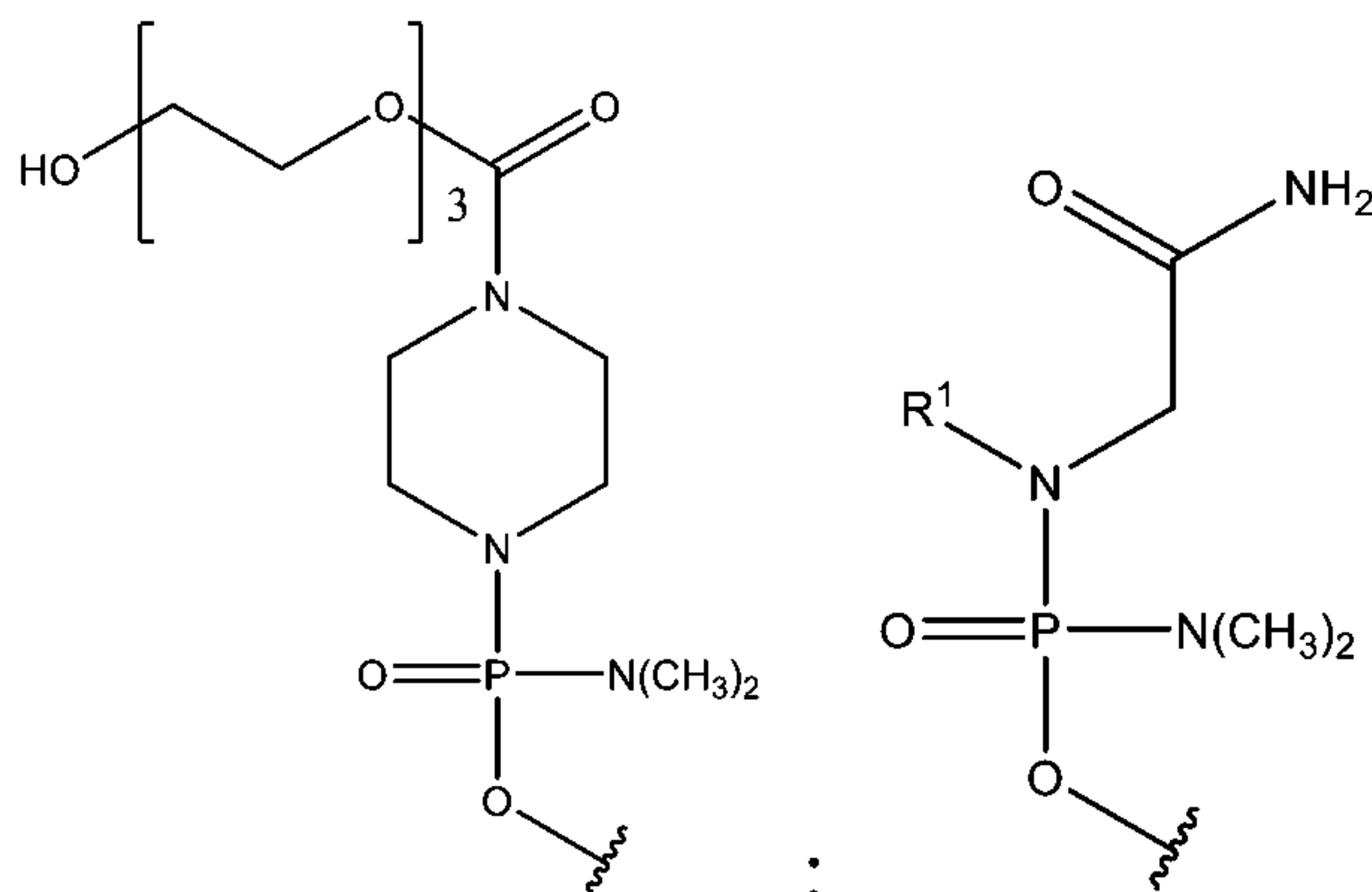
【0154】 在多個方面中，本揭露提供了根據式 (I) 之反義寡聚體：



或其藥學上可接受的鹽，其中：

每個Nu係一起形成靶向序列的核鹼基；

T係選自以下的部分：



；和 ；並且T部分的遠端-OH或-NH₂視需要連接至細胞穿透肽；

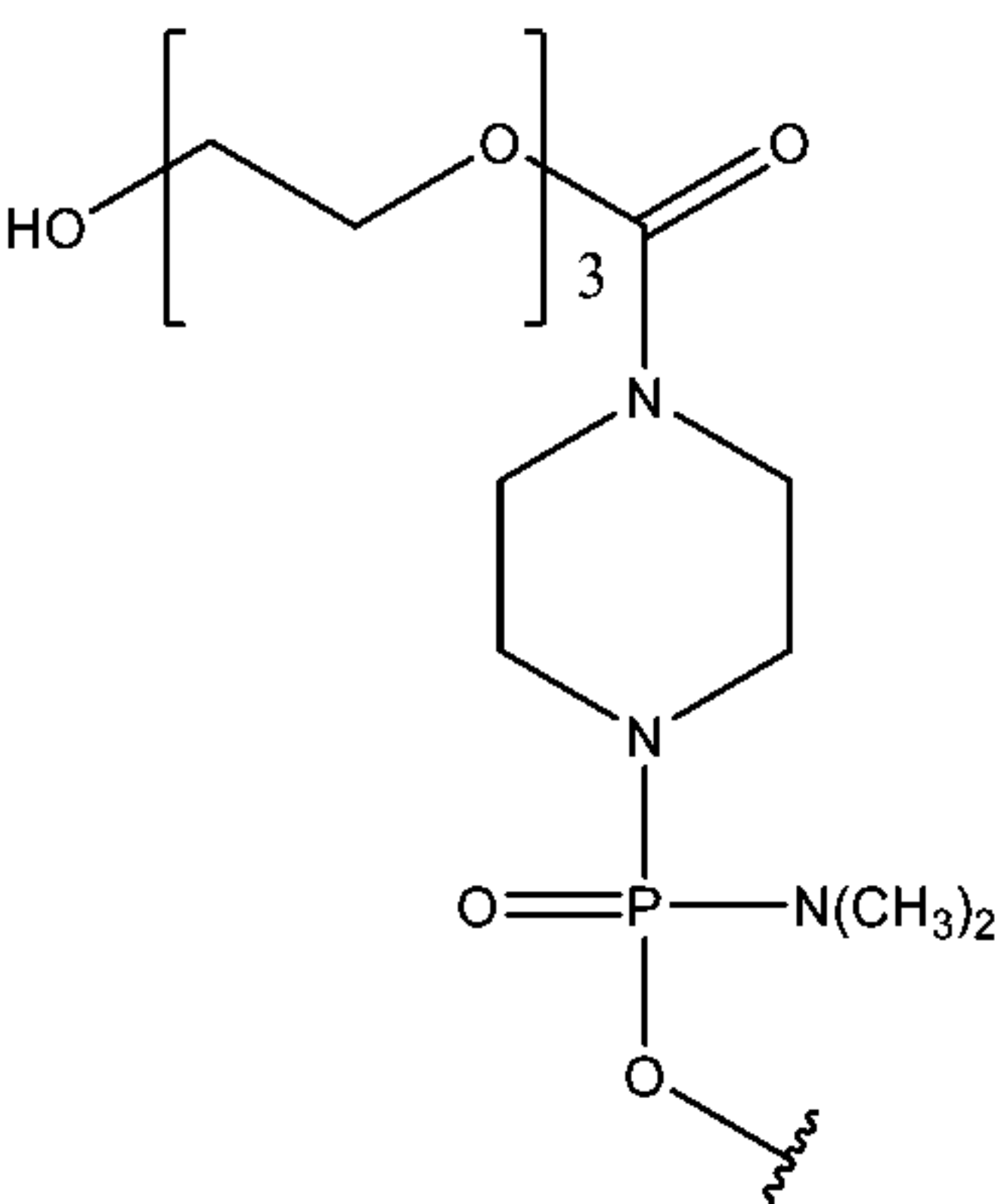
R¹⁰⁰係氫或細胞穿透肽；

從1至n和從5’至3’，每個**Nu**對應於以下之一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5’至3’]	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

其中A係 ，C係 ，G係 ，並且T係 。

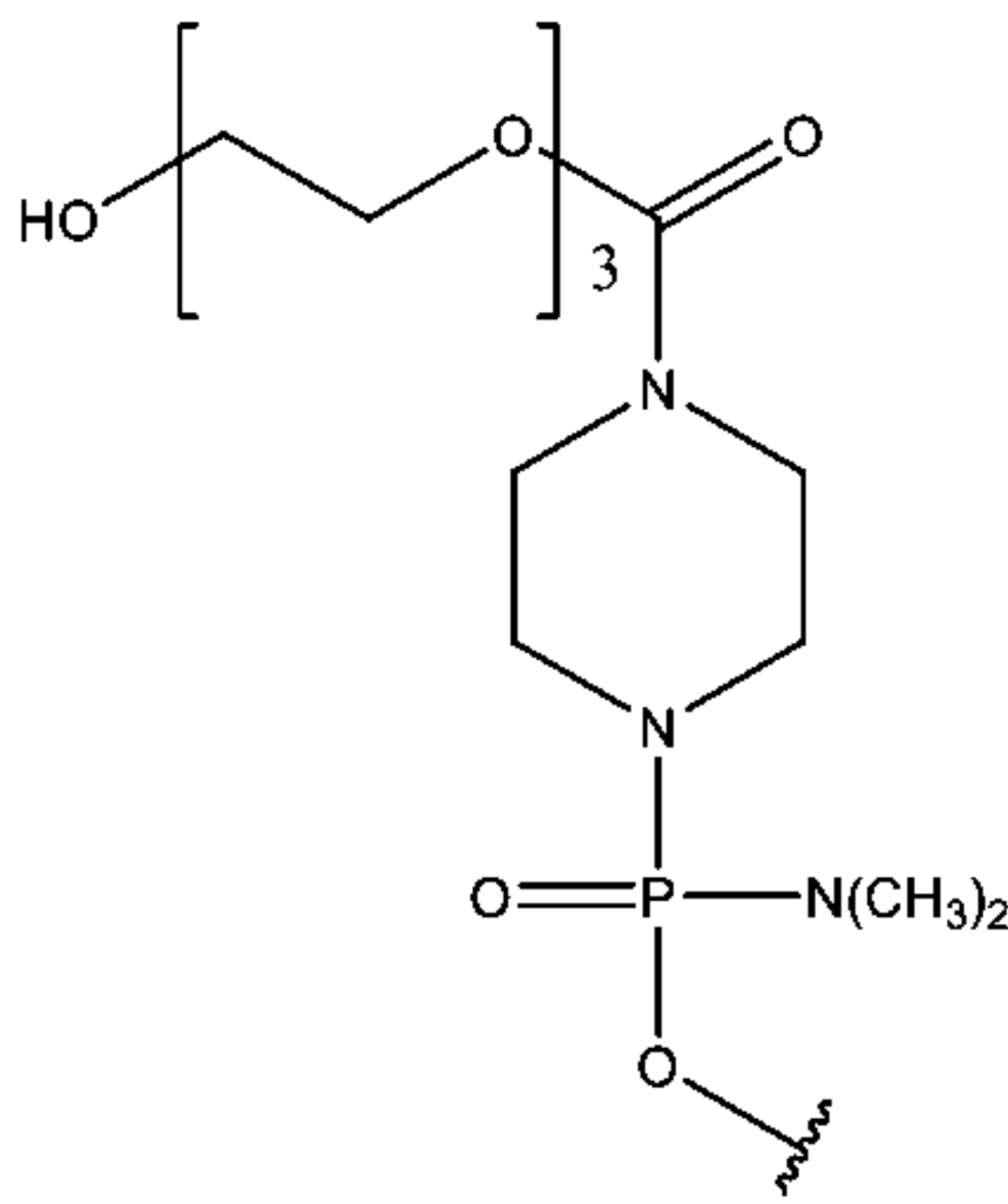
【0155】 在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個**Nu**對應於以下之一：SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、或SEQ ID NO.9。在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個**Nu**對應於SEQ ID NO. 3。



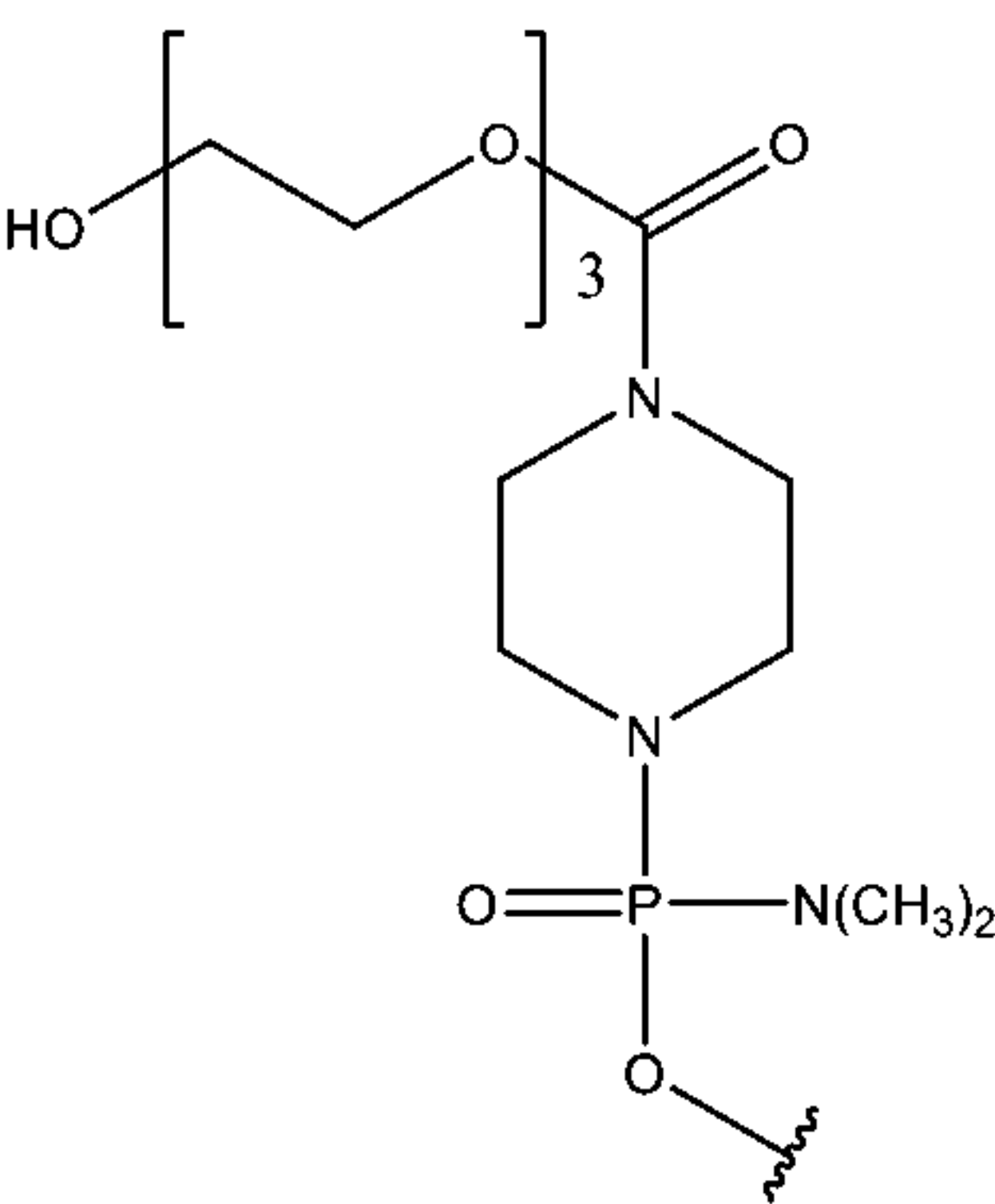
【0156】 在多個實施方式中，T係遠端-OH視需要連接至細胞穿透肽。；並且T部分的

【0157】 在多個實施方式中，R¹⁰⁰係氫。在多個其他實施方式中，R¹⁰⁰係細胞穿透肽。在多個實施方式中，R¹⁰⁰係-R⁵(SEQ ID NO: 21)。在多個其他實施方式中，R¹⁰⁰係-G-R⁵(SEQ ID NO: 20)。在多個實施方式中，R¹⁰⁰係-R⁶(SEQ ID NO: 10)。在多個其他實施方式中，R¹⁰⁰係-G-R⁶(SEQ ID NO: 11)。

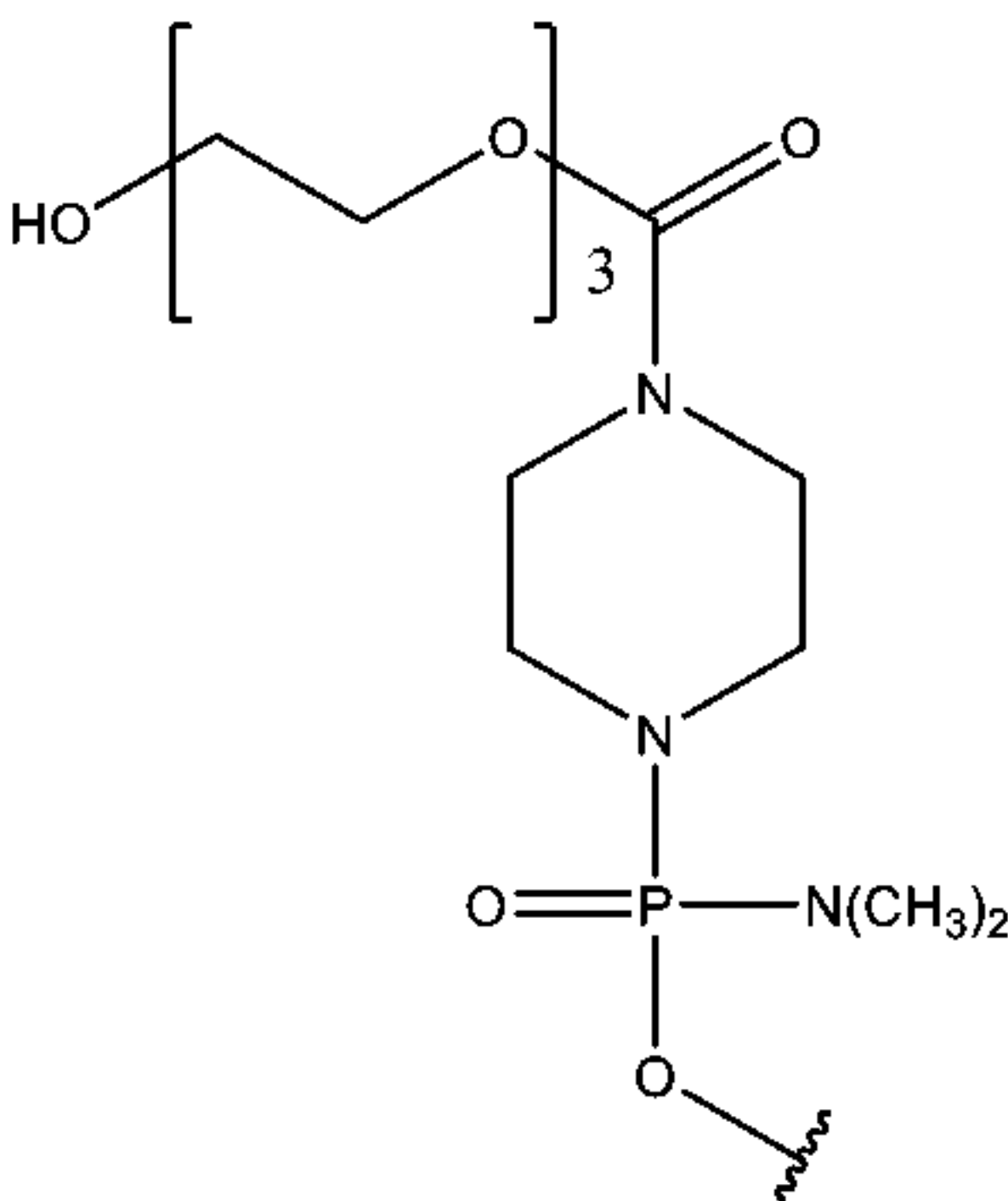
【0158】 在一些實施方式中，具有式 (I) 之反義寡聚體呈游離鹼形式。在一些實施方式中，具有式 (I) 之反義寡聚體係其藥學上可接受的鹽。在一些實施方式中，具有式 (I) 之反義寡聚體係其HCl(鹽酸)鹽。在某些實施方式中，該HCl鹽係1HCl、2HCl、3HCl、4HCl、5HCl、或6HCl鹽。在某些實施方式中，該HCl鹽係6HCl鹽。



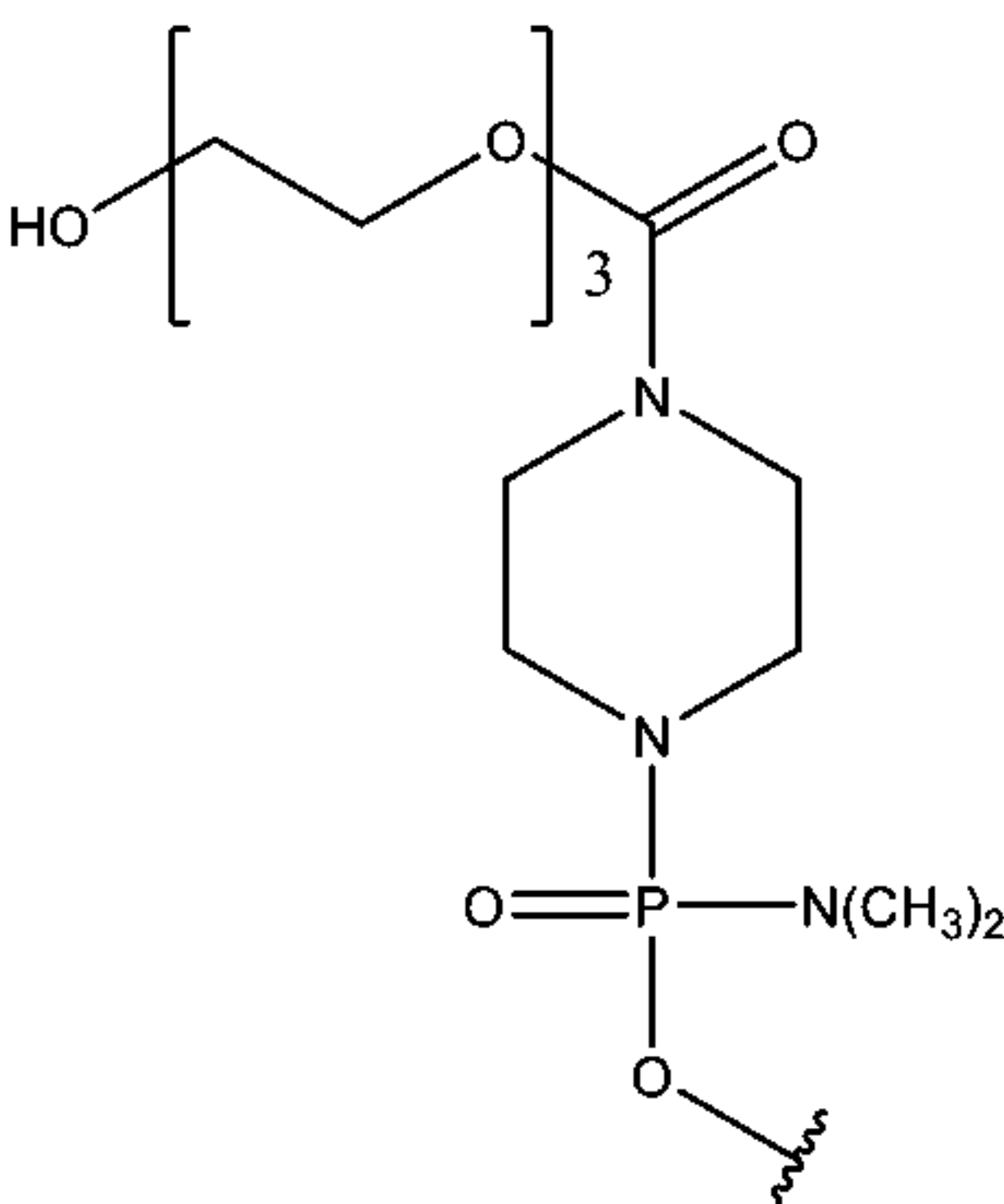
【0159】 在多個實施方式中，T係遠端-OH視需要連接至細胞穿透肽，並且R¹⁰⁰係細胞穿透肽。；並且T部分的遠



【0160】 在多個實施方式中，**T**係 並且**R¹⁰⁰**係細胞 穿透肽。

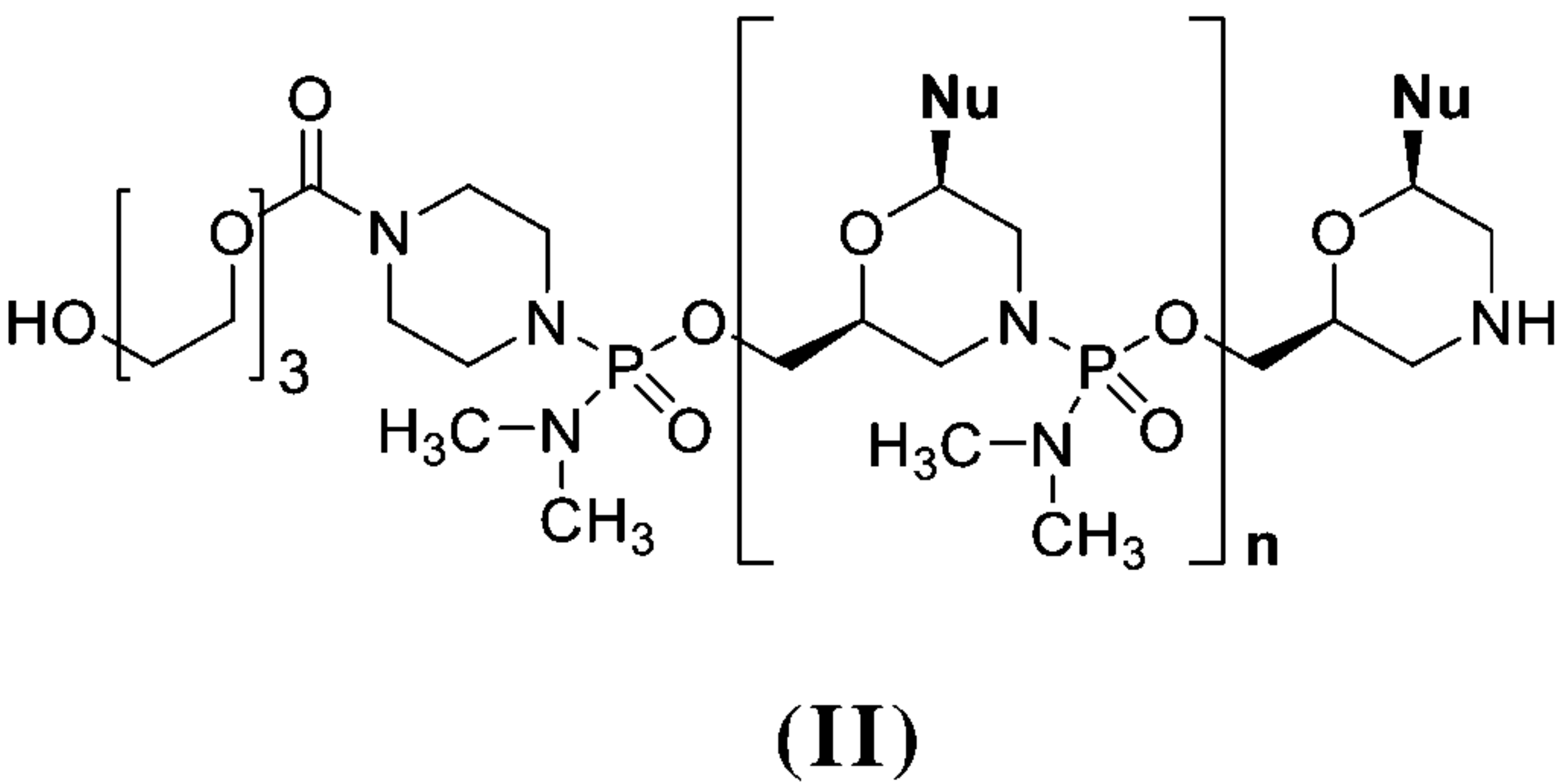


【0161】 在多個實施方式中，**T**係 並且**R¹⁰⁰**係-G-
R⁵(SEQ ID NO: 20)。



【0162】 在多個實施方式中，**T**係 並且**R¹⁰⁰**係-G-
R⁶(SEQ ID NO: 11)。

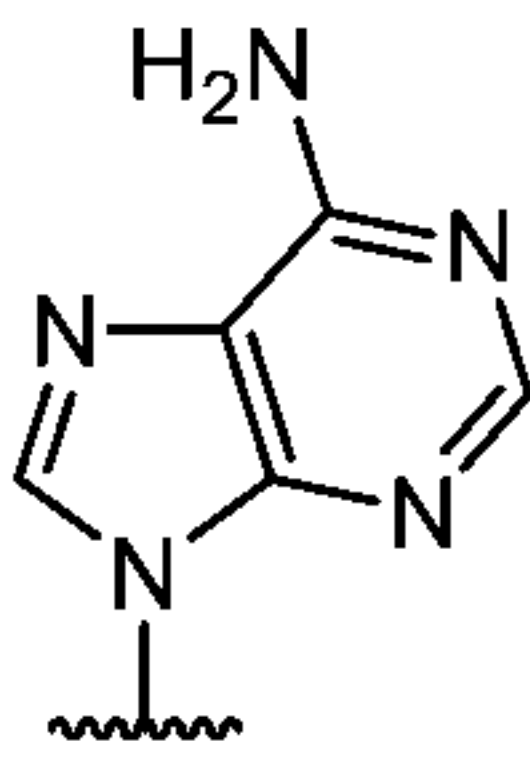
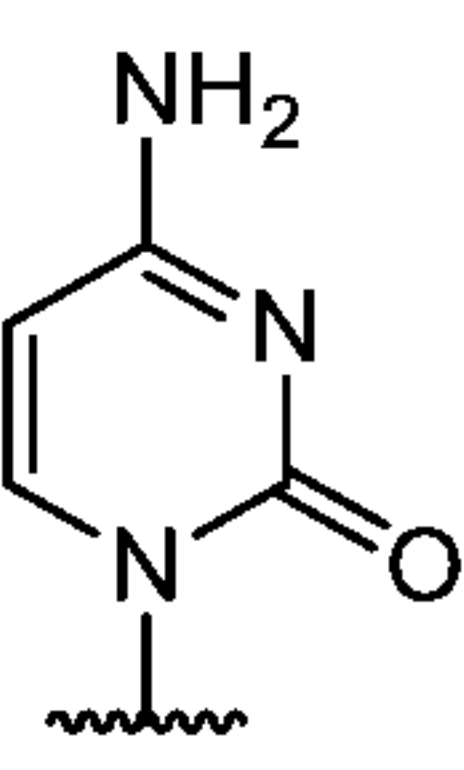
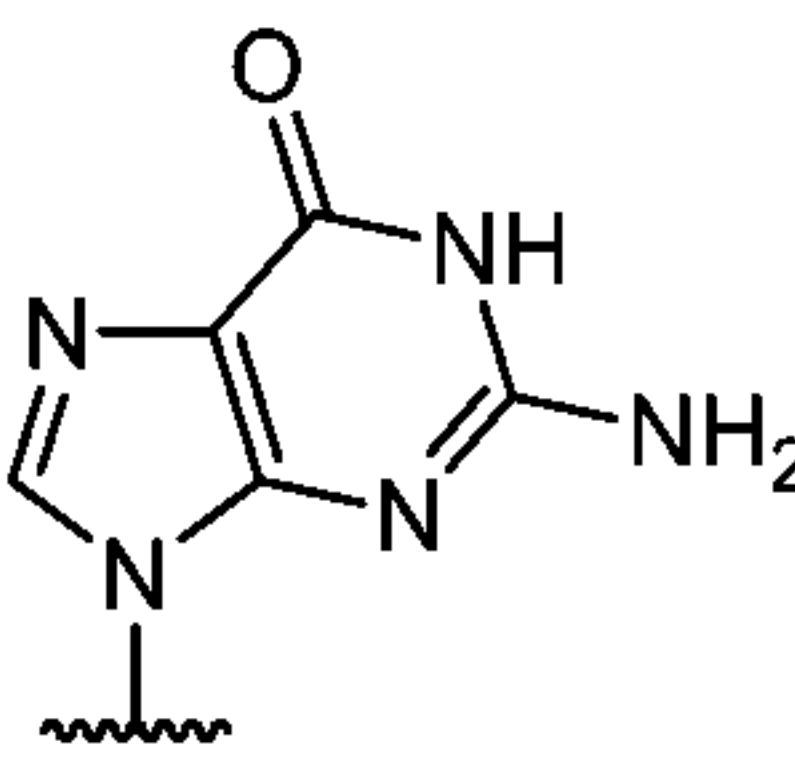
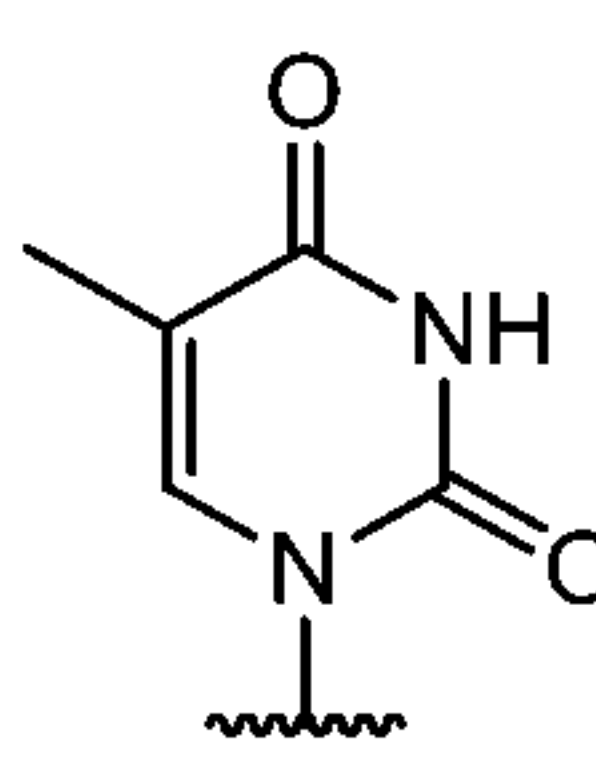
【0163】 在一些實施方式中，本揭露的反義寡聚體係根據式 (II)：



或其藥學上可接受的鹽，其中從1至n和從5'至3'，每個**Nu**對應於以下之

一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

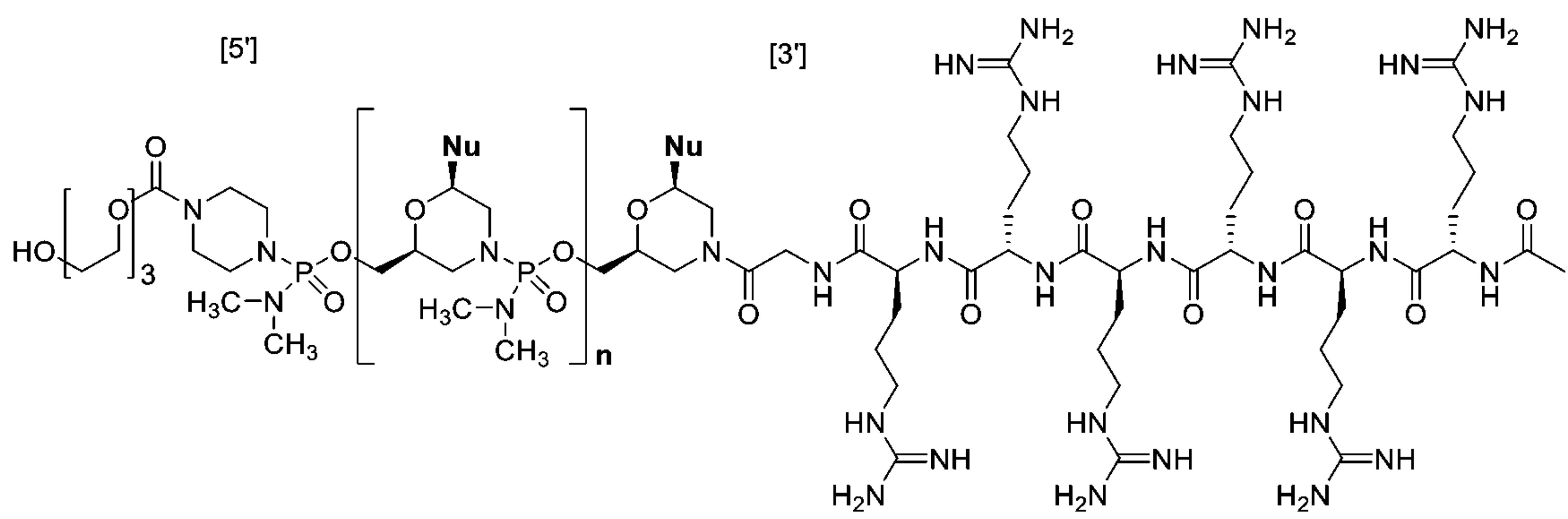
其中A係，C係，G係，並且T係。在

一些實施方式中，式 (II) 之遠端-OH連接至細胞穿透肽。

【0164】 在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於以下之一：SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、或SEQ ID NO.9。在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於SEQ ID NO. 3。

【0165】 在一些實施方式中，具有式 (II) 之反義寡聚體呈游離鹼形式。在一些實施方式中，具有式 (II) 之反義寡聚體係其藥學上可接受的鹽形式。在一些實施方式中，具有式 (II) 之反義寡聚體係其HCl(鹽酸)鹽。在某些實施方式中，該HCl鹽係1HCl、2HCl、3HCl、4HCl、5HCl、或6HCl鹽。在某些實施方式中，該HCl鹽係6HCl鹽。

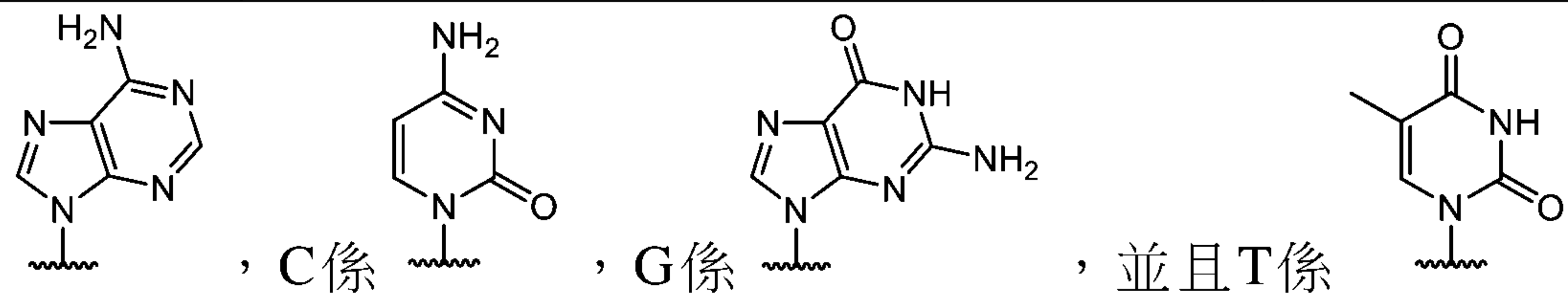
【0166】 在一些實施方式中，本揭露的反義寡聚體係根據式 (III)：

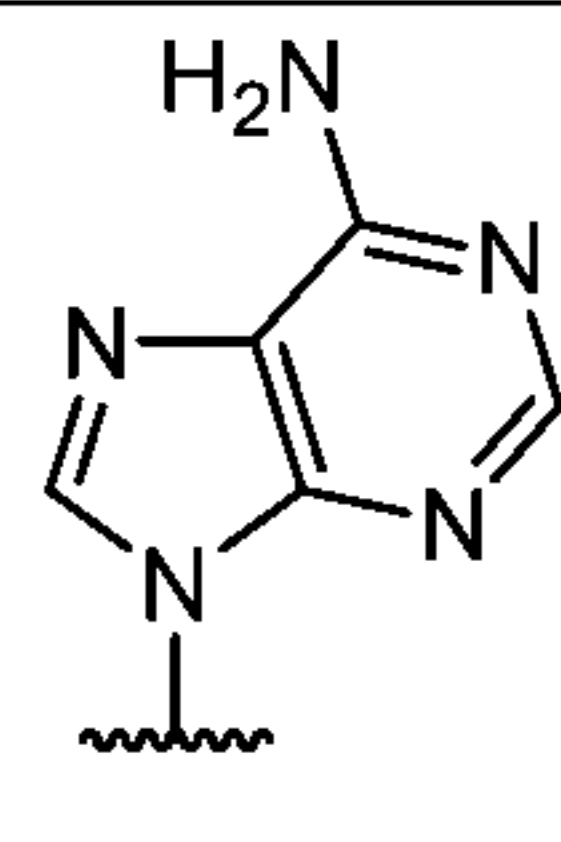
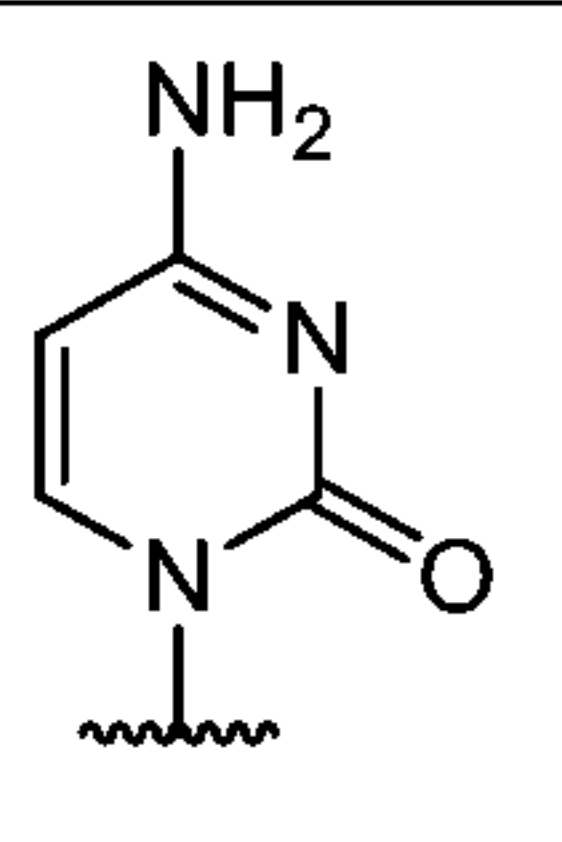
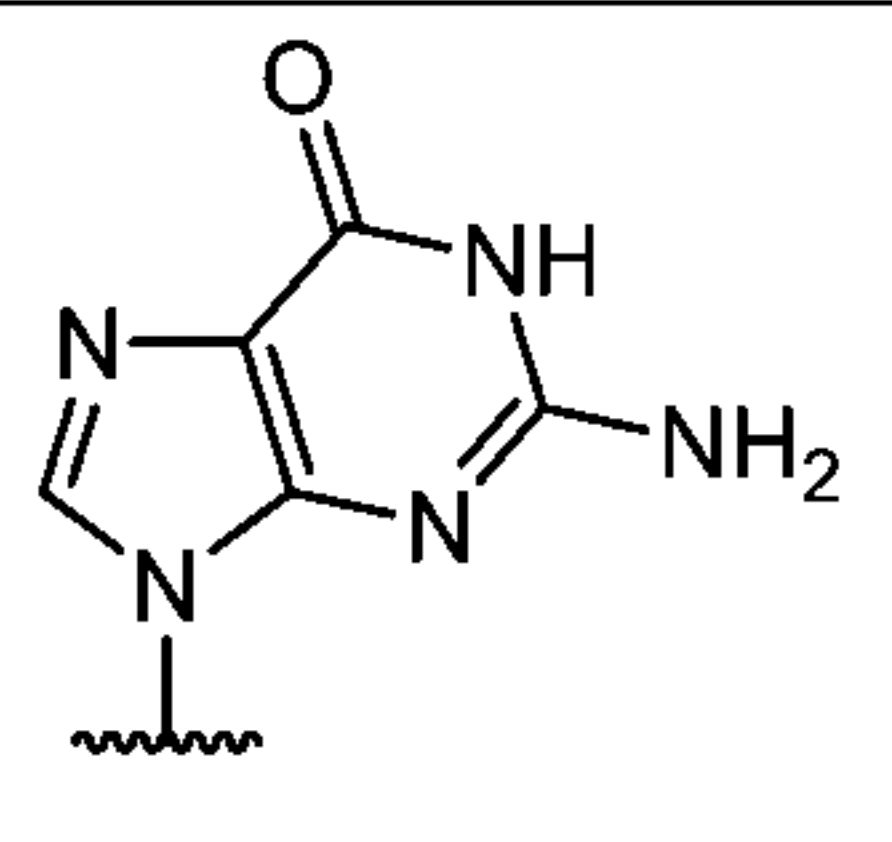
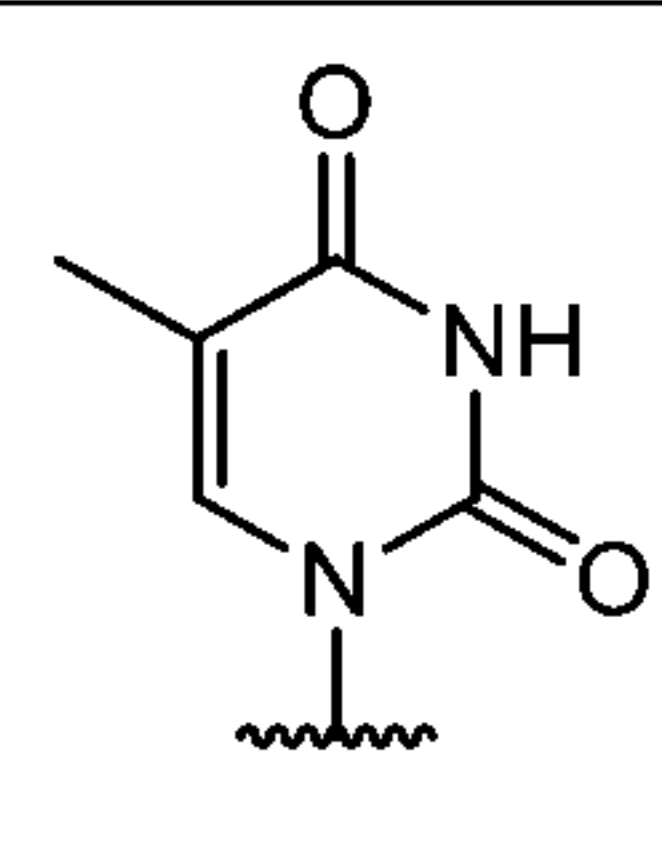


(III)

或其藥學上可接受的鹽，其中從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5’至3’]	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



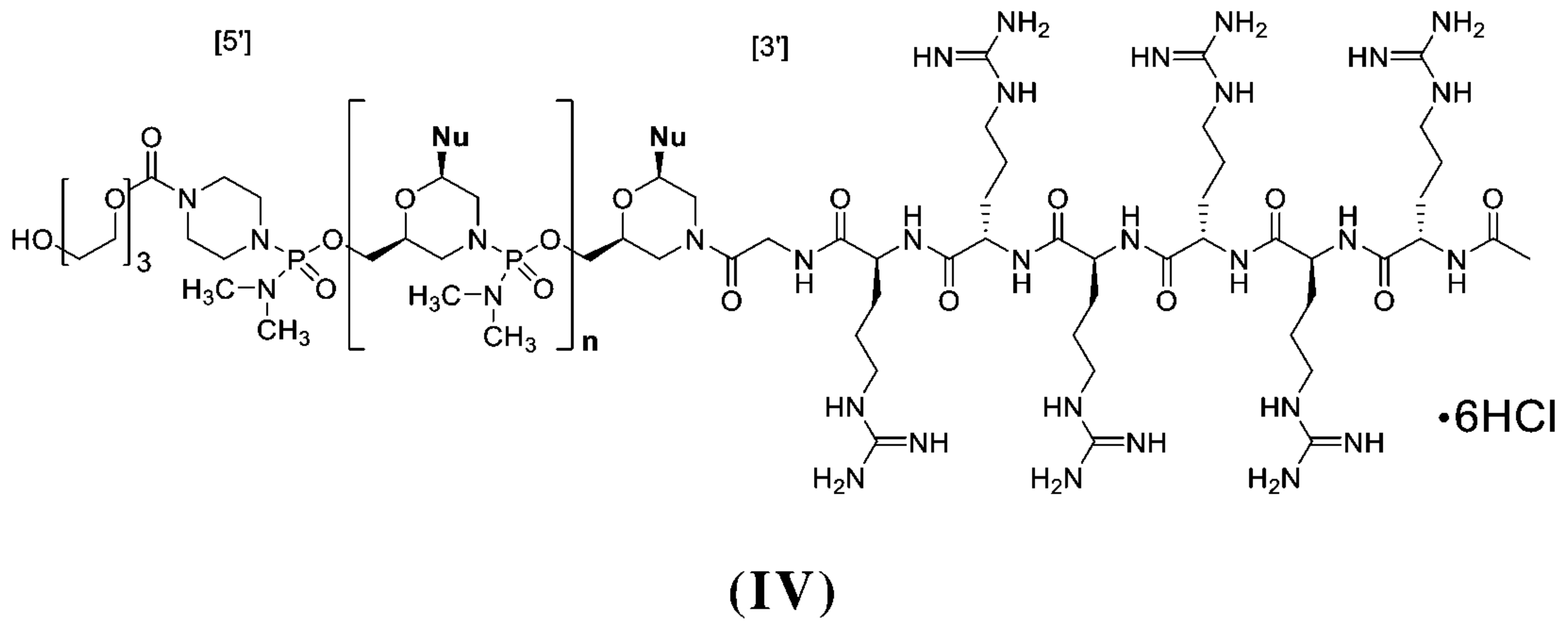
其中A係，C係，G係，並且T係。在一些實施方式中，式 (III) 之遠端-OH連接至細胞穿透肽。

【0167】 在一些實施方式中，式 (III) 之遠端-OH視需要連接至細胞穿透肽。

【0168】 在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一：SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、或SEQ ID NO.9。在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於SEQ ID NO. 3。

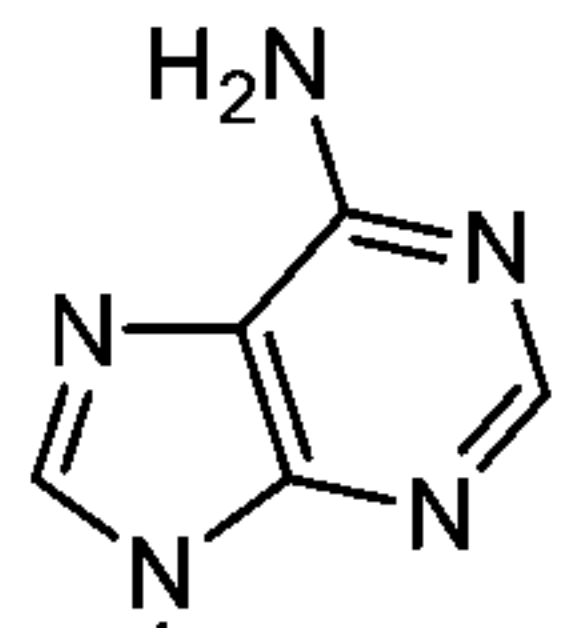
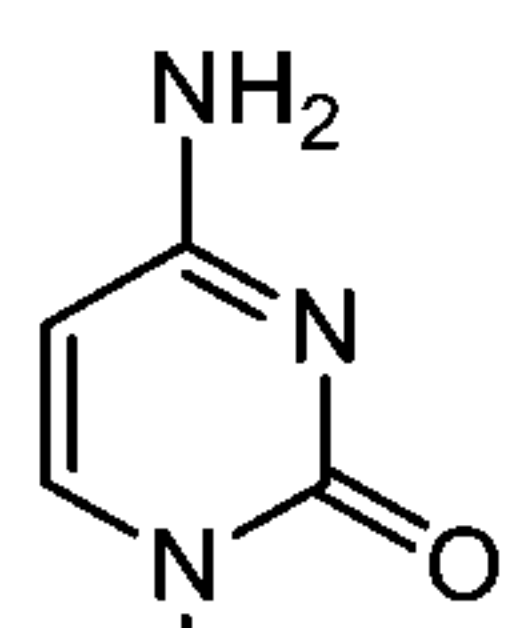
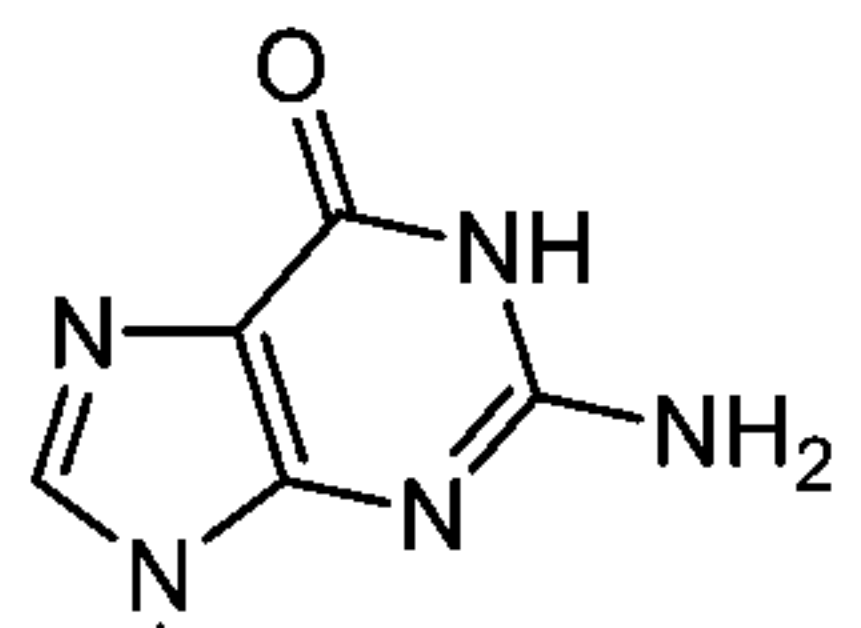
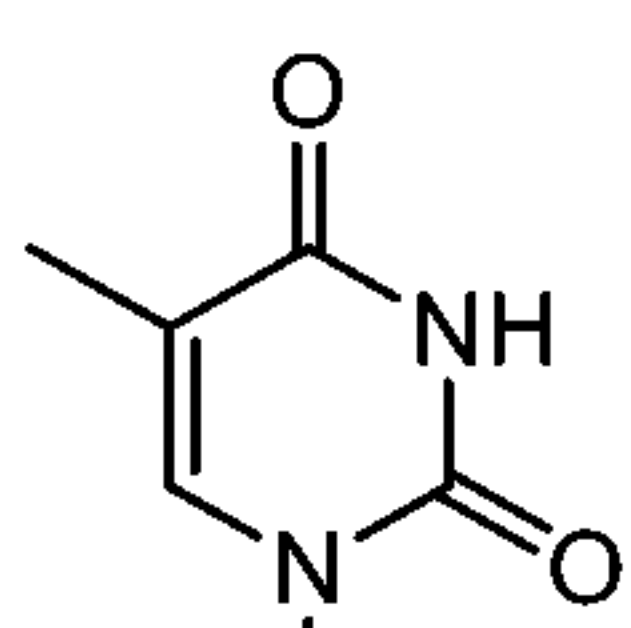
【0169】 在一些實施方式中，具有式 (III) 之反義寡聚體呈游離鹼形式。在一些實施方式中，具有式 (III) 之反義寡聚體係其藥學上可接受的鹽。在一些實施方式中，具有式 (III) 之反義寡聚體係其HCl(鹽酸)鹽。在某些實施方式中，該HCl鹽係6HCl鹽。

【0170】 在一些實施方式中，本揭露的反義寡聚體係根據式 (IV)：



其中從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5’至3’]	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

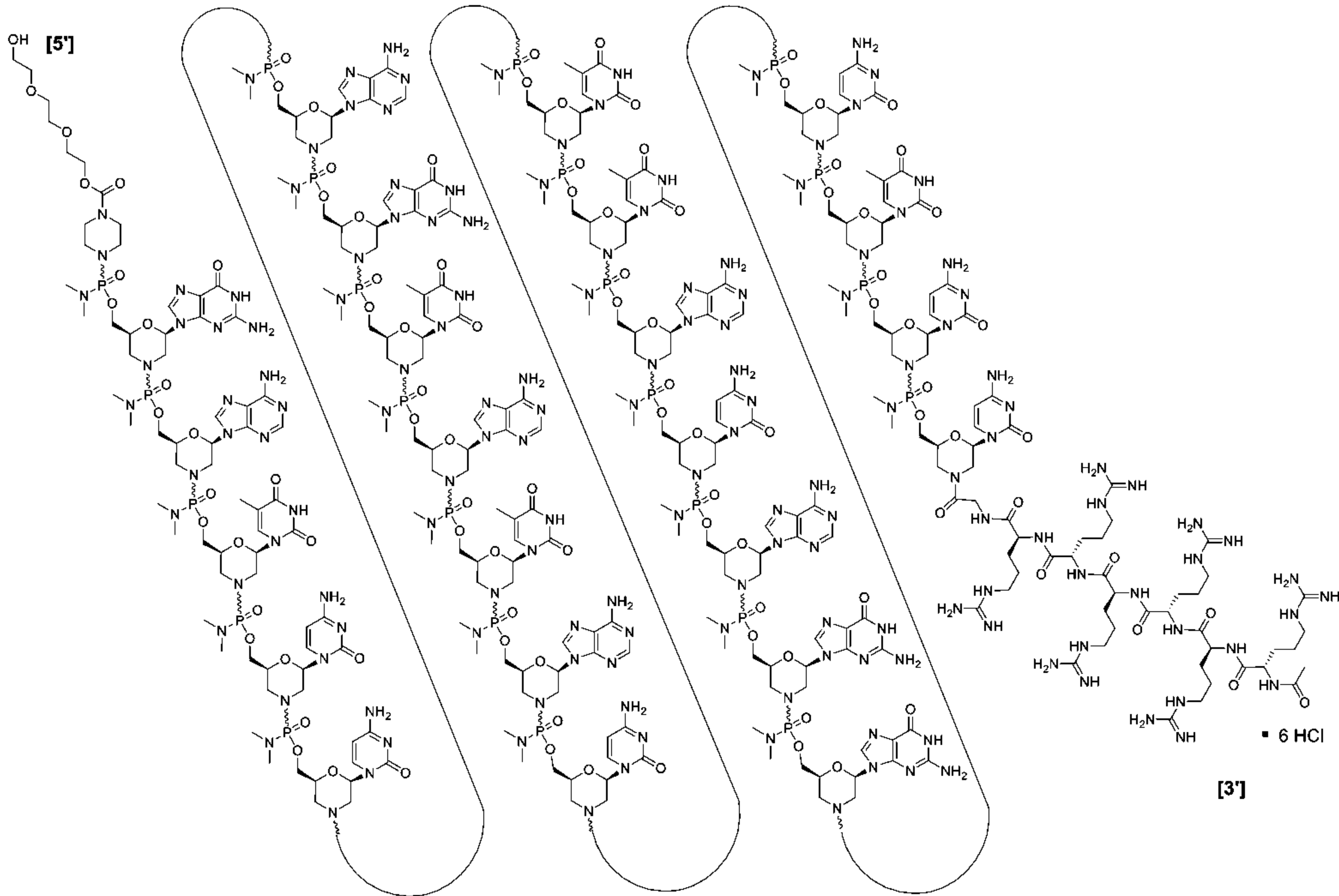
其中A係，C係，G係，並且T係。

【0171】 在一些實施方式中，式 (IV) 之遠端-OH視需要連接至細胞穿透肽。

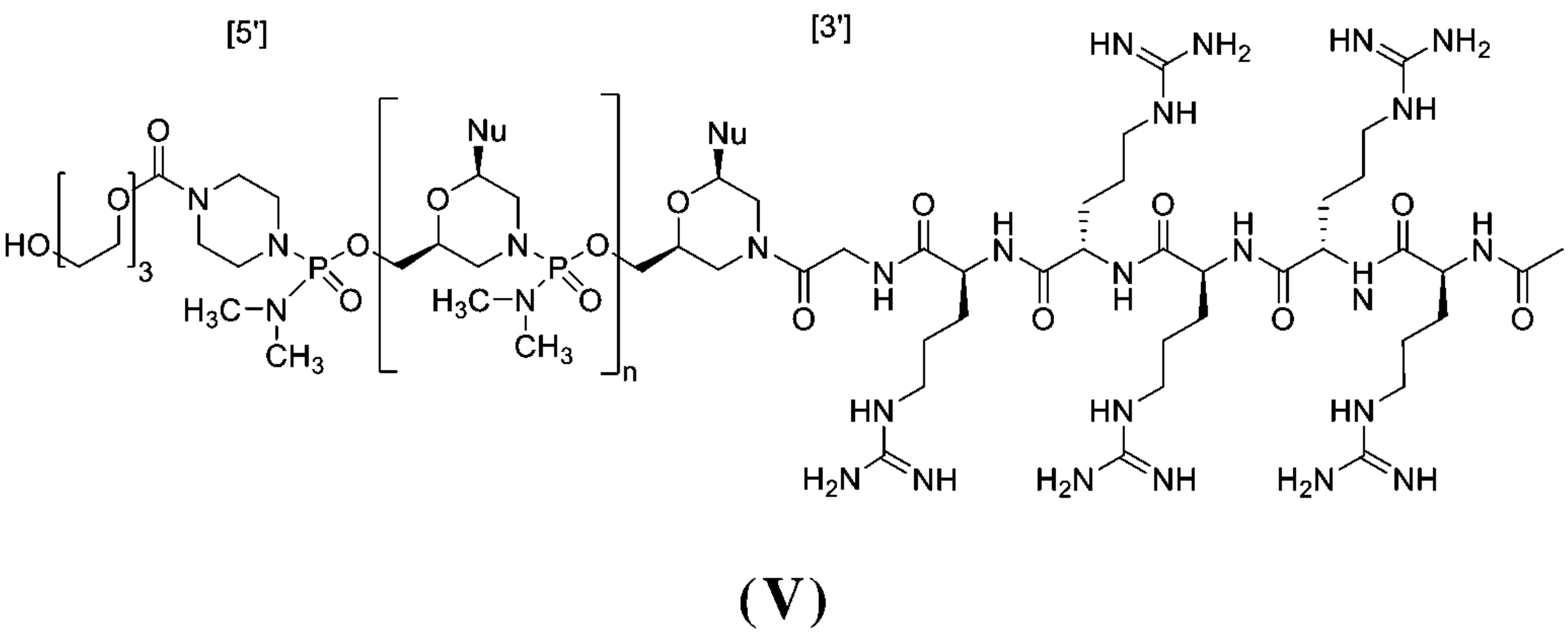
【0172】 在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一：SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、或SEQ

ID NO.9。在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於SEQ ID NO. 3。

【0173】 在一些實施方式中，包括例如式 (IV) 之一些實施方式，該反義寡聚體係根據式 (IVa)：



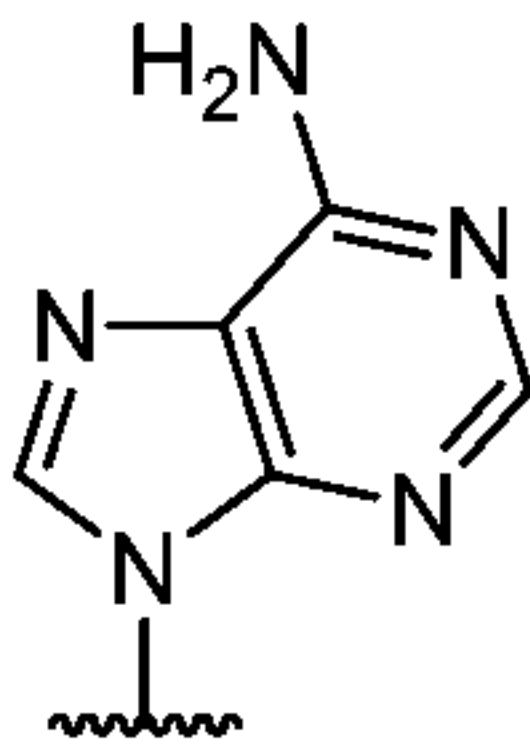
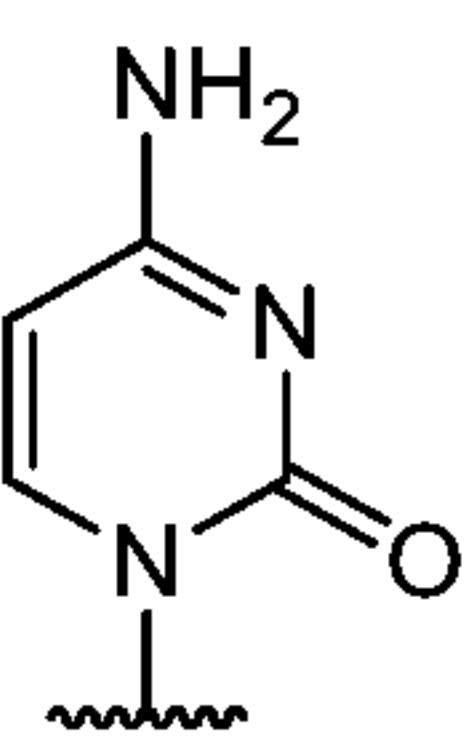
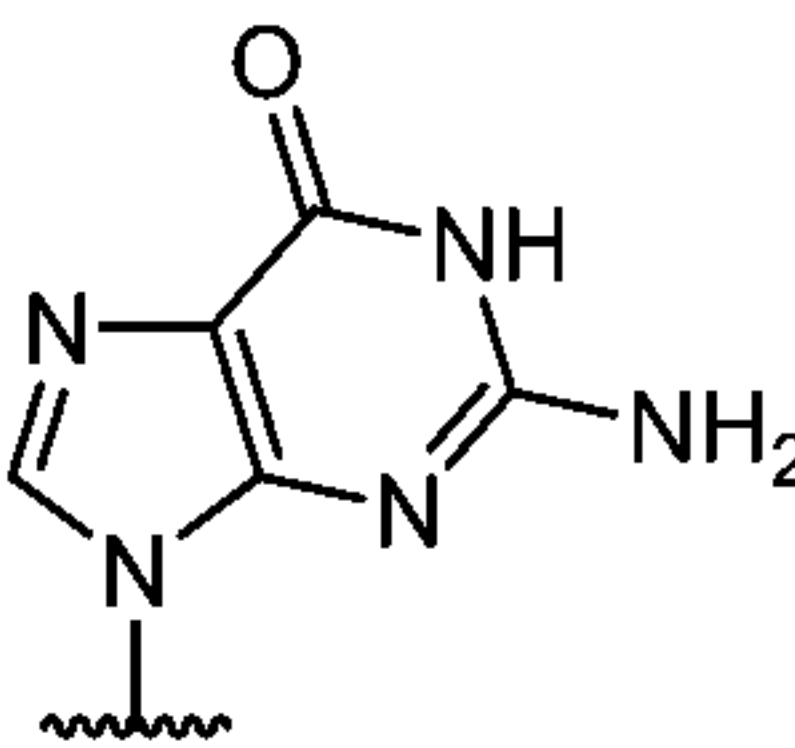
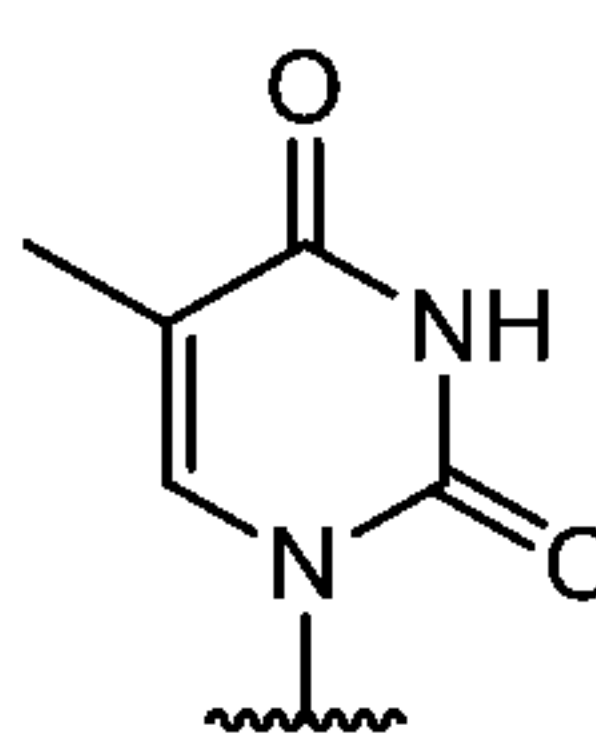
【0174】 在一些實施方式中，本揭露的反義寡聚體係根據式 (V)：



或其藥學上可接受的鹽，其中從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5’至3’]	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5

H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

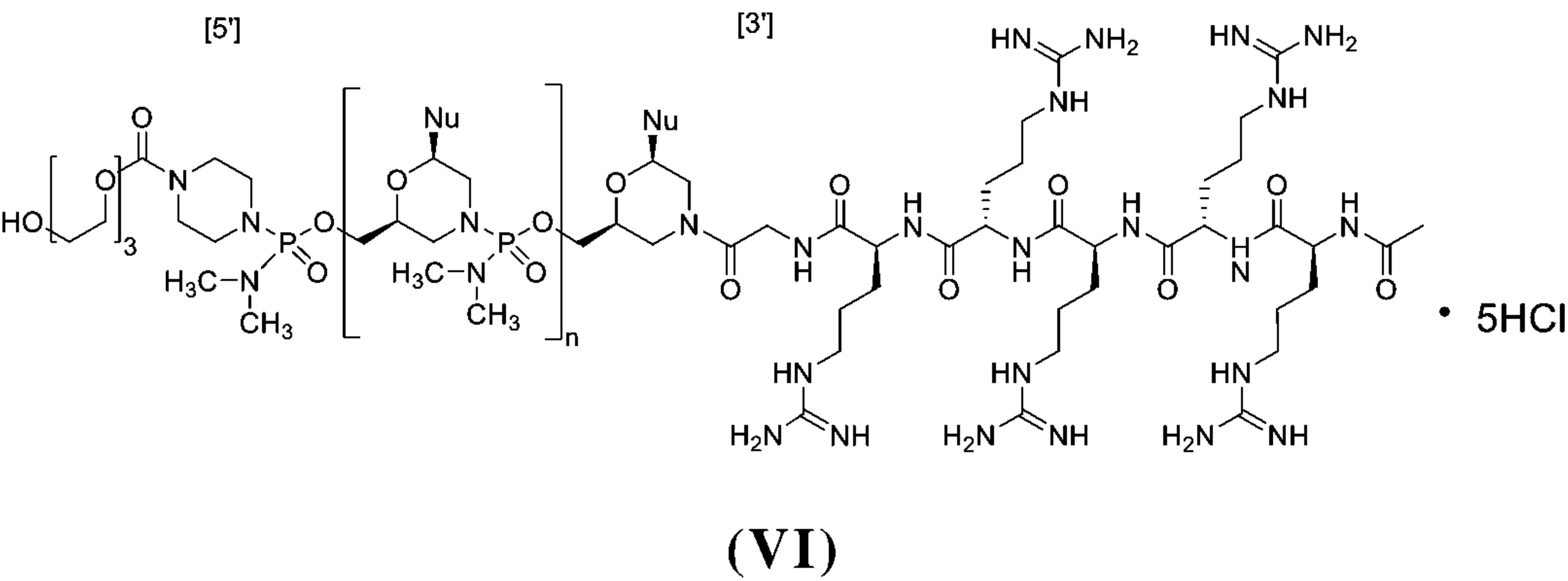
其中A係，C係，G係，並且T係。在一些實施方式中，式 (IV) 之遠端-OH連接至細胞穿透肽。

【0175】 在一些實施方式中，式 (V) 之遠端-OH視需要連接至細胞穿透肽。

【0176】 在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一：SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、或SEQ ID NO.9。在一些實施方式中，從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於SEQ ID NO. 3。

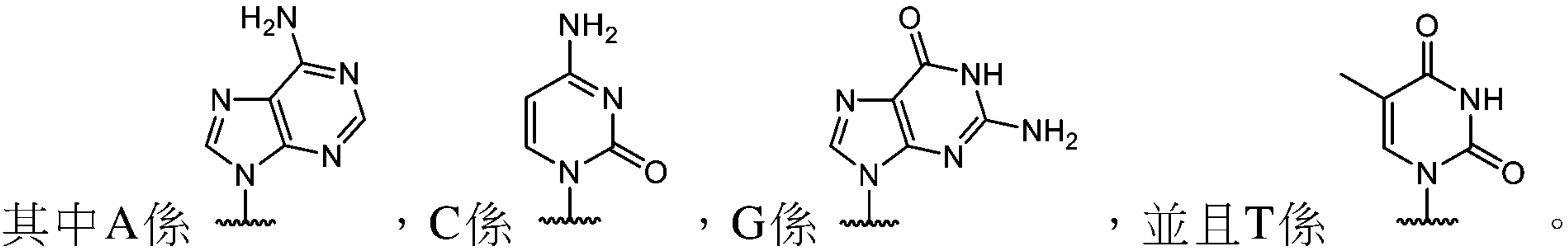
【0177】 在一些實施方式中，具有式 (V) 之反義寡聚體呈游離鹼形式。在一些實施方式中，具有式 (V) 之反義寡聚體係其藥學上可接受的鹽。在一些實施方式中，具有式 (V) 之反義寡聚體係其HCl(鹽酸)鹽。在某些實施方式中，該HCl鹽係5HCl鹽。

【0178】 在一些實施方式中，本揭露的反義寡聚體係根據式 (VI)：



其中從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO :
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



【0179】 在一些實施方式中，式 (VI) 之遠端-OH視需要連接至細胞穿透肽。

【0180】 在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於以下之一：SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、或SEQ ID NO. 9。在一些實施方式中，從1至n和從5'至3'，每個Nu對應於SEQ ID NO. 3。

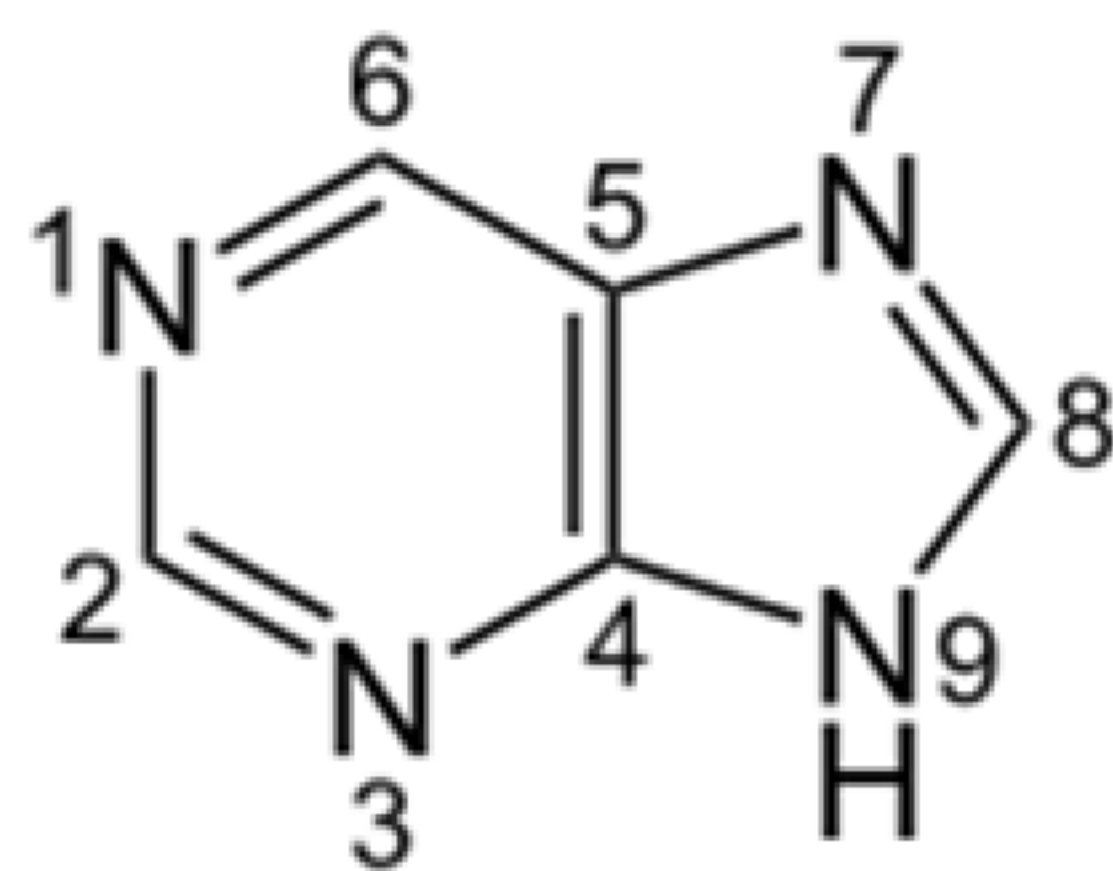
10. 核鹼基修飾和取代

【0181】 在某些實施方式中，本揭露的反義寡聚體由RNA核鹼基和DNA核鹼基(在本領域中通常簡稱為「鹼基」)組成。RNA鹼基通常稱為腺嘌呤(A)、尿嘧啶(U)、胞嘧啶(C)、和鳥嘌呤(G)。DNA鹼基通常稱為腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、和鳥嘌呤(G)。在多個實施方式中，本揭露的反義寡聚體由胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、腺嘌呤(A)、5-甲基胞嘧啶(5mC)、尿嘧啶(U)、和次黃嘌呤(I)組成。

【0182】 在某些實施方式中，寡聚體中的一個或多個RNA鹼基或DNA鹼基可以被除了RNA鹼基或DNA鹼基以外的鹼基修飾或取代。含有

經修飾的或經取代的鹼基的寡聚體包括其中核酸中最常見的一種或多種嘌呤或嘧啶鹼基被較少見的或非天然的鹼基代替的寡聚體。

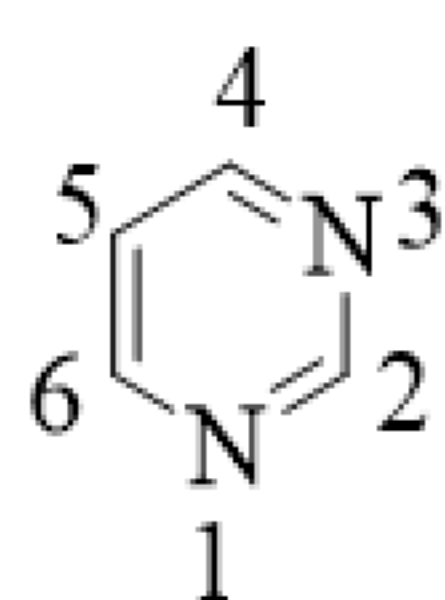
【0183】 嘌呤鹼基包含與咪唑環稠合的嘧啶環，如以下通式所述。



嘌呤

【0184】 腺嘌呤和鳥嘌呤係核酸中最常見的兩個嘌呤核鹼基。其他天然存在的嘌呤包括但不限於： N^6 -甲基腺嘌呤、 N^2 -甲基鳥嘌呤、次黃嘌呤、和7-甲基鳥嘌呤。

【0185】 嘧啶鹼基包含如以下通式所述的六員嘧啶環。



嘧啶核心

【0186】 胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶係核酸中最常見的嘧啶鹼基。其他天然存在的嘧啶包括但不限於：5-甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶、假尿嘧啶、和4-硫尿嘧啶。在一個實施方式中，本文所述的寡聚體含有代替尿嘧啶的胸腺嘧啶鹼基。

【0187】 其他合適的鹼基包括但不限於：2,6-二胺基嘌呤，乳清酸，胍丁胺，離胺酸，2-硫代嘧啶(例如，2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶)，G-夾及其衍生物，5-取代的嘧啶(例如，5-鹵尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-胺基甲基尿嘧啶、5-羥甲基尿嘧啶、5-胺基甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶、超胸腺嘧啶(Super T))，7-脫氫鳥嘌呤，7-脫氫腺嘌呤，7-氮雜-2,6-二胺基嘌呤，8-氮雜-7-脫氫鳥嘌呤，8-氮雜-7-脫氫腺

嘌呤，8-氮雜-7-脫氮-2,6-二胺基嘌呤，超鳥嘌呤(Super G)，超腺嘌呤(Super A)，和N⁴-乙基胞嘧啶，或其衍生物；N²-環戊基鳥嘌呤(cPent-G)，N²-環戊基-2-胺基嘌呤(cPent-AP)，和N²-丙基-2-胺基嘌呤(Pr-AP)，假尿嘧啶，或其衍生物；以及簡並或通用鹼基，像2,6-二氟甲苯，或不存在的鹼基，像脫鹼基位點(例如，1-去氧核糖、1,2-二去氧核糖、1-去氧-2-O-甲基核糖；或者吡咯啉衍生物，其中環氧已被氮(氮雜核糖)代替)。可以在美國專利6,683,173(時代生物科學公司(Epoch Biosciences))中找到超級A、超級G和超級T的衍生物的實例，該文獻藉由引用全部併入本文。顯示將cPent-G、cPent-AP和Pr-AP摻入siRNA後可降低其免疫刺激作用(Peacock H.等人 *J. Am. Chem. Soc.*[美國化學會誌] 2011, 133, 9200)。假尿嘧啶係尿嘧啶的天然存在的異構化形式，具有C糖苷而非尿苷中的常規N糖苷。與含尿苷的mPvNA相比，含假尿苷的合成mRNA可能具有改善的安全性(WO 2009127230，藉由引用以其整體併入本文)。

【0188】 某些核鹼基對於增加本揭露的反義寡聚體的結合親和力係特別有用的。該等核鹼基包括5-取代的嘧啶、6-氮雜嘧啶、以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤，包括2-胺基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。已顯示5-甲基胞嘧啶取代將核酸雙鏈體穩定性提高0.6°C-1.2°C，並且是目前較佳的鹼基取代，甚至當與2'-O-甲氧基乙基糖修飾組合時，尤其如此。另外的示例性修飾的核鹼基包括其中核鹼基的至少一個氫原子被氟代替的那些。

11. 反義寡聚體的藥學上可接受的鹽

【0189】 本文所述的反義寡聚體的某些實施方式可含有鹼性官能基，例如胺基或烷基胺基，並且因此能夠與藥學上可接受的酸形成藥學上

可接受的鹽。就此而言，術語「藥學上可接受的鹽」係指本揭露的反義寡聚體的相對無毒的無機和有機酸加成鹽。該等鹽可以在原位在施用運載體中或劑型製造過程中製備，或者藉由使本揭露純化的處於其游離鹼形式的反義寡聚體與合適的有機酸或無機酸單獨反應，並且將由此在隨後純化期間形成的鹽分離來製備。代表性的鹽包括氫溴酸鹽、鹽酸鹽、硫酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、硝酸鹽、乙酸鹽、戊酸鹽、油酸鹽、棕櫚酸鹽、硬脂酸鹽、月矽酸鹽、苯甲酸鹽、乳酸鹽、甲苯磺酸鹽、檸檬酸鹽、馬來酸鹽、延胡索酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、萘甲酸鹽(naphthylate)、甲磺酸鹽、葡庚糖酸鹽、乳糖醛酸鹽、以及月桂基磺酸鹽等等。(參見，例如Berge等人, (1977) 「Pharmaceutical Salts [藥物鹽]」 *J. Pharm. Sci.* [藥物科學雜誌] 66: 1-19)。

【0190】 主題反義寡聚體的藥學上可接受的鹽包括該等反義寡聚體的常規的無毒鹽或季銨鹽，例如，來自無毒的有機酸或無機酸。例如，此類常規的無毒鹽包括衍生自以下無機酸的那些，例如，鹽酸、氫溴酸、硫酸、胺基磺酸、磷酸、硝酸等等；和從以下有機酸製備的鹽，例如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、蘋果酸、酒石酸、檸檬酸、抗壞血酸、軟脂酸、順丁烯二酸、羥基馬來酸、苯乙酸、麩胺酸、苯甲酸、水楊酸、磺胺酸、2-乙基苯甲酸、反丁烯二酸、甲基苯磺酸、甲基磺酸、乙烷二磺酸、草酸、異硫羧酸(isothionic)等等。

【0191】 在某些實施方式中，本揭露的反義寡聚體可含有一個或多個酸性官能基，並且因此能夠與藥學上可接受的鹼形成藥學上可接受的鹽。在該等情況中，術語「藥學上可接受的鹽」係指本揭露的反義寡聚體的相對無毒的無機和有機鹼加成鹽。該等鹽同樣可以在原位在施用運載體

中或劑型製造過程中製備，或者藉由使純化的處於其游離酸形式的反義寡聚體與合適的鹼(例如，藥學上可接受的金屬陽離子的氫氧化物、碳酸鹽、或碳酸氫鹽)，與氨，或者與藥學上可接受的有機一級胺、二級胺或三級胺單獨反應來製備。代表性的鹼鹽或鹼土鹽包括鋰、鈉、鉀、鈣、鎂、以及鋁鹽等等。可用於形成鹼加成鹽的代表性的有機胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌啶等等。(參見，例如Berge等人，同上)。

III. 配製物和施用方式

【0192】 在某些實施方式中，如本文所述，本揭露提供了適合於治療性遞送反義寡聚體的配製物或藥物組成物。因此，在某些實施方式中，本揭露提供了藥學上可接受的組成物，該等藥學上可接受的組成物包含治療有效量的一種或多種本文所述的反義寡聚體，與一種或多種藥學上可接受的載體(添加劑)和/或稀釋劑一起配製。儘管本揭露的反義寡聚體可單獨施用，但較佳的是，該反義寡聚體以藥物配製物(組成物)施用。在一個實施方式中，該配製物的反義寡聚體係根據式 (III) 或其藥學上可接受的鹽。

【0193】 可適用於本揭露的反義寡聚體的用於遞送核酸分子的方法描述於例如：Akhtar等人，1992, *Trends Cell Bio.*[細胞生物學趨勢], 2:139；Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics [用於反義寡核苷酸治療劑的遞送策略]，編輯Akhtar，1995，CRC出版社；和Sullivan等人，PCT WO 94/02595中。該等方案和其他方案可用於遞送幾乎任何核酸分子，包括本揭露的反義寡聚體。

【0194】 本揭露的藥物組成物可以被專門地配製用於以固體或液體

形式施用，包括適於以下的那些：(1) 口服施用，例如灌藥(水性或非水性溶液或懸浮液)，片劑(靶向用於經頰、經舌下以及全身性吸收)，大丸劑，散劑，顆粒劑，用於應用到舌的糊劑；(2) 腸胃外施用，例如藉由皮下、肌肉內、靜脈內或硬膜外注射，如例如無菌溶液或懸浮液、或持續釋放配製物；(3) 局部應用，例如作為應用至皮膚的乳膏劑、軟膏劑或控釋貼劑或噴霧劑；(4) 陰道內或直腸內，例如作為子宮托、乳膏或泡沫；(5) 舌下；(6) 經眼；(7) 經皮；或(8) 經鼻。

【0195】可充當藥學上可接受的載體的材料的一些實例包括但不限於：(1) 糖類，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 澱粉，例如玉米澱粉和馬鈴薯澱粉；(3) 纖維素及其衍生物，例如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素、和乙酸纖維素；(4) 粉狀西黃蓍膠；(5) 麥芽；(6) 明膠；(7) 滑石粉；(8) 賦形劑，例如可可脂和栓劑蠟；(9) 油類，例如花生油、棉籽油、紅花油、芝麻油、橄欖油、玉米油和大豆油；(10) 二醇類，例如丙二醇；(11) 多元醇類，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯類，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 瓊脂；(14) 緩衝劑，例如氫氧化鎂和氫氧化鋁；(15) 海藻酸；(16) 無熱原水；(17) 等滲鹽水；(18) 林格氏溶液；(19) 乙醇；(20) pH緩衝溶液；(21) 聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐；以及(22) 藥物配製物中所用的其他無毒相容物質。

【0196】適合於與本揭露的反義寡聚體一起配製的試劑的另外的非限制性實例包括：PEG軛合的核酸；磷脂軛合的核酸；含有親脂性部分的核酸；硫代磷酸酯；P-糖蛋白抑制劑(例如Pluronic P85)，其可增強藥物進入各種組織的能力；可生物降解的聚合物，例如聚(D,L-丙交酯-共乙交酯)微球，其可在植入後用於持續釋放遞送(Emerich, D F等人, 1999, Cell

Transplant [細胞移植], 8, 47-58)阿爾卡姆斯公司(Alkermes, Inc.)劍橋，麻塞諸塞州；以及負載的奈米顆粒，例如由聚氰基丙烯酸丁酯製成的那些，其可以通過血腦障壁遞送藥物並且可改變神經元攝取機制(*Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* [神經心理藥理學與生物精神病學進展], 23, 941-949, 1999)。

【0197】 本揭露的特徵還在於包含含有聚(乙二醇)(「PEG」)脂質的表面改性的脂質體(PEG改性的，支鏈和直鏈或其組合的，或者長循環脂質體或隱形脂質體)的組成物的用途。本揭露的寡聚體軀合物還可包含各種分子量的共價附接的PEG分子。該等配製物提供了用於增加藥物在靶標組織中積聚的方法。這類藥物載體藉由單核巨噬細胞系統(MPS或RES)抵抗調理作用和消除作用，從而使得更長的血液循環時間和對於被封裝藥物來說增加的組織暴露(Lasic等人, *Chem. Rev.*[化學評論] 1995, 95, 2601-2627；Ishiwata等人, *Chem. Pharm. Bull.*[化學與藥學通報] 1995, 43, 1005-1011)。已經顯示此類脂質體選擇性地在腫瘤中積聚，可能是藉由外滲並在新血管形成的靶標組織中捕獲形成的(Lasic等人, *Science* [科學] 1995, 267, 1275-1276；Oku等人, 1995, *Biochim. Biophys. Acta* [生物化學與生物物理學報], 1238, 86-90)。長循環脂質體增強DNA和RNA的藥物動力學 和藥效動力學，特別是與已知在MPS組織中積聚的常規陽離子脂質體相比(Liu等人, *J. Biol. Chem.*[生物化學雜誌] 1995, 42, 24864-24870；Choi等人, 國際PCT公開案號WO 96/10391；Ansell等人, 國際PCT公開案號WO 96/10390；Holland等人, 國際PCT公開案號WO 96/10392)。基於長循環脂質體避免在代謝侵襲性MPS組織(例如，肝臟和脾臟)中積聚的能力，與陽離子脂質體相比，長循環脂質體還可能在更大

程度上保護藥物免受核酸酶降解。

【0198】 在另一個實施方式中，本揭露包括所製備的用於遞送的反義寡聚體藥物組成物，如在美國專利案號 6,692,911、7,163,695 和 7,070,807 中所述。就此而言，在一個實施方式中，本揭露提供了在組成物中的本揭露的反義寡聚體，該組成物包含單獨或與 PEG(例如，支鏈或直鏈 PEG 或兩者的混合物)組合的，與 PEG 和靶向部分組合的，或者前述任一項與交聯劑組合的離胺酸和組胺酸(HK)的共聚物(如描述於美國專利案號 7,163,695、7,070,807 和 6,692,911 中)。在某些實施方式中，本揭露提供了在藥物組成物中的反義寡聚體，該等藥物組成物包含葡萄糖酸修飾的聚組胺酸或葡萄糖基化的聚組胺酸/轉鐵蛋白-聚離胺酸。熟悉該項技術者還將認識到，具有類似於 His 和 Lys 特性的胺基酸可以在該組成物中被取代。

【0199】 在組成物中也可以存在潤濕劑、乳化劑和潤滑劑(例如月桂基硫酸鈉和硬脂酸鎂)、著色劑、釋放劑、包被劑、甜味劑、調味劑、芳香劑、防腐劑和抗氧化劑。

【0200】 藥學上可接受的抗氧化劑的實例包括：(1) 水溶性抗氧化劑，例如抗壞血酸、半胱胺酸鹽酸鹽、硫酸氫鈉、焦亞硫酸鈉、亞硫酸鈉等等；(2) 油溶性抗氧化劑，例如抗壞血酸棕櫚酸酯、丁基羥基茴香醚(BHA)、丁基羥基甲苯(BHT)、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 α -生育酚等等；以及 (3) 金屬螯合劑，例如檸檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等等。

【0201】 本揭露的配製物包括適於口服、經鼻、局部(包括經頰和經舌下)、直腸、陰道和/或腸胃外施用的那些。該等配製物可以方便地以單位劑量形式存在並且可以藉由藥學領域眾所周知的任何方法製備。可與載

體材料組合以產生單個劑量形式的活性成分的量將取決於待治療的受試者和具體的施用方式。可與載體材料組合以產生單個劑量形式的活性成分的量將通常是產生治療效果的活性成分的量。通常，這個量的範圍將是從約0.1%至約99%的活性成分，較佳的是從約5%至約70%，最較佳的是從約10%至約30%。

【0202】 在某些實施方式中，本揭露的配製物包含選自以下的賦形劑：環糊精、纖維素、脂質體、膠束形成劑(例如膽汁酸)、和聚合載體(例如聚酯和聚酸酐)；以及本揭露的反義寡聚體。在一個實施方式中，該配製物的反義寡聚體係根據式 (IV)。在一個實施方式中，該配製物的反義寡聚體係根據式 (IVa)。在某些實施方式中，上述配製物使得本揭露的反義寡聚體變得經口生物可用。

【0203】 製備該等配製物或藥物組成物的方法包括使本揭露的反義寡聚體與載體和視需要的一種或多種輔助成分結合的步驟。通常，該配製物係藉由使本揭露的反義寡聚體與液體載體或細碎的固體載體或二者均勻地且緊密地結合，然後(如果需要的話)將該產物成型而製備。

【0204】 適於口服施用的本揭露的配製物可以呈膠囊劑、扁囊劑、丸劑、片劑、錠劑(使用矯味基質，通常是蔗糖和阿拉伯膠或西黃蓍膠)、散劑、顆粒劑的形式；或者作為水性或非水性液體中的溶液或懸浮液；或者作為水包油型或油包水型液體乳劑；或者作為酏劑或糖漿劑；或者作為軟錠劑(使用惰性基質，例如明膠和甘油、或蔗糖和阿拉伯膠)和/或作為漱口劑等等，各劑型含有預定量的本揭露的反義寡聚體作為活性成分。本揭露的反義寡聚體也可作為大丸劑、藥糖劑或糊劑施用。

【0205】 在用於口服施用的本揭露的固體劑型(膠囊劑、片劑、丸

劑、糖衣丸、散劑、顆粒劑、糖錠等等)中，將活性成分與一種或多種藥學上可接受的載體(例如檸檬酸鈉或磷酸二鈣)和/或任何下列物質混合：

(1) 填充劑或擴充劑(**extender**)，例如澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、和/或矽酸；(2) 黏合劑，例如像羧甲基纖維素、海藻酸鹽、明膠、聚乙烯吡咯啉酮、蔗糖、和/或阿拉伯膠；(3) 保濕劑，例如甘油；(4) 崩解劑，例如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、海藻酸、某些矽酸鹽、和碳酸鈉；(5) 溶液阻滯劑(**solution retarding agent**)，例如石蠟；(6) 吸收加速劑，例如季銨化合物，以及表面活性劑，例如泊洛沙姆和月桂基硫酸鈉；(7) 潤濕劑，例如像鯨蠟醇、單硬脂酸甘油酯、和非離子表面活性劑；(8) 吸附劑，例如高嶺土和膨潤土；(9) 潤滑劑，例如滑石粉、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉、硬脂酸鋅、硬脂酸鈉、硬脂酸、及其混合物；(10) 著色劑；以及 (11) 受控釋放劑，例如交聚維酮或乙基纖維素。在膠囊劑、片劑和丸劑的情況下，該等藥物組成物還可包含緩衝劑。類似類型的固體藥物組成物也可以用作處於軟殼和硬殼明膠膠囊中的填充劑，使用如乳糖或奶糖(**milk sugar**)以及高分子量聚乙二醇等的此類賦形劑。

【0206】 片劑可以是藉由視需要與一種或多種輔助成分壓縮或模製來製備的。可藉由使用黏合劑(例如，明膠或羥丙基甲基纖維素)、潤滑劑、惰性稀釋劑、防腐劑、崩解劑(例如，羥基乙酸澱粉鈉或交聯的羧甲基纖維素鈉)、表面活性劑或分散劑來製備壓縮的片劑。可藉由在合適的機器中模製用惰性液體稀釋劑潤濕的粉狀化合物的混合物來製備模製的片劑。

【0207】 本揭露的藥物組成物的片劑和其他固體劑型(例如糖衣丸、

膠囊劑、丸劑、和顆粒劑)可視需要用包衣和外殼進行刻痕(scored)或製備，該等包衣和外殼為例如腸包衣和藥物配製物領域中眾所周知的其他包衣。也可使用例如不同比例的羥丙基甲基纖維素以提供所需的釋放譜、其他聚合物基質，脂質體和/或微球來配製它們從而提供其中活性成分的緩釋或受控釋放。它們可以被配製用於快速釋放，例如，冷凍乾燥。可將它們例如通過用截留細菌的濾器過濾或藉由在使用前即刻摻入可溶解於無菌水或一些其他可注射無菌介質中的無菌固體藥物組成物形式的滅菌劑來進行滅菌。視需要，該等藥物組成物也可含有遮光劑並且可以是僅或者優先在胃腸道的某個部分，視需要以延遲的方式釋放一種或多種活性成分的組成物。可以使用的包埋組成物的實例包括聚合物質和蠟。活性成分也可以是微囊化的形式，如果適當的話，含有一種或多種上文所述的賦形劑。

【0208】 用於口服施用的本揭露的反義寡聚體的液體劑型包括藥學上可接受的乳劑、微乳劑、溶液、懸浮液、糖漿劑、和酏劑。除了該活性成分之外，該等液體劑型可含有在本領域中常用的惰性稀釋劑，例如像，水或其他溶劑、增溶劑和乳化劑，例如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油類(具體地，棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氫呋喃醇、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯類，及其混合物。

【0209】 除了惰性稀釋劑之外，該口服藥物組成物還可以包含輔助劑，例如潤濕劑、乳化劑和懸浮劑、甜味劑、調味劑、著色劑、芳香劑、和防腐劑。

【0210】 除了活性化合物之外，懸浮液還可含有懸浮劑，例如乙氧基化異硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨聚糖酯、微晶纖維素、偏氫氧化

鋁、膨潤土、瓊脂和西黃蓍膠，及其混合物。

【0211】 用於直腸或陰道施用的配製物可作為栓劑呈遞，該等配製物可藉由將一種或多種本揭露的化合物與一種或多種合適的無刺激性賦形劑或載體相混合而製備，該等賦形劑或載體包含例如可可脂、聚乙二醇、栓劑蠟或水楊酸鹽，並且該等配製物在室溫下是固體的但在體溫下是液體的，因此其將在直腸或陰道腔中融化並釋放活性化合物。

【0212】 用於如本文提供的寡聚體的局部或經皮施用的配製物或劑型包括散劑、噴霧劑、軟膏劑、糊劑、乳膏劑、洗劑、凝膠劑、溶液、貼劑和吸入劑。活性寡聚體軛合物可以在無菌條件下與藥學上可接受的載體混合，並且與任何可能需要的防腐劑、緩衝劑或推進劑混合。除了本揭露的活性化合物之外，軟膏劑、糊劑、乳膏劑和凝膠劑還可含有賦形劑，例如動物和植物脂肪、油類、蠟、石蠟、澱粉、西黃蓍膠、纖維素衍生物、聚乙二醇類、矽氧烷類、膨潤土、矽酸、滑石粉和氧化鋅、或其混合物。

【0213】 除了本揭露的反義寡聚體之外，散劑和噴霧劑還可含有賦形劑，例如乳糖、滑石粉、矽酸、氫氧化鋁、矽酸鈣和聚醯胺粉、或該等物質的混合物。噴霧劑還可含有常規的拋射劑，例如氯氟烴類和未經取代的揮發性烴類，例如丁烷和丙烷。

【0214】 經皮貼劑具有下列附加的優勢：向身體提供本揭露的反義寡聚體的受控遞送。此類劑型可以藉由將寡聚體溶解或分散於適宜的介質中製備。吸收增強劑還可以用於增加藥劑的透皮量。除了本領域已知的其他方法之外，還可以藉由提供速率控制膜或將藥劑分散在聚合物基質或凝膠中來控制這種流量的速率。

【0215】 適合於腸胃外施用的藥物組成物可包含與以下物質組合的

一種或多種本揭露的寡聚體軛合物：一種或多種藥學上可接受的無菌等滲水性或非水性溶液、分散液、懸浮液或乳劑，或者在使用之前可以重構進入無菌可注射的溶液或分散液中的無菌散劑，它們可以包含糖類、醇類、抗氧化劑、緩衝液、抑菌劑、溶質(使該配製物與預期接收者的血液等滲)、或懸浮劑或增稠劑。本揭露的藥物組成物中可採用的適宜水性和非水性載體的實例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等等)及其適合的混合物，植物油，例如橄欖油，和可注射的有機酯，例如油酸乙酯。例如可以藉由使用包衣材料，例如卵磷脂，在分散液的情況下藉由維持所需要的粒度，以及藉由使用表面活性劑，來維持適當的流動性。在一個實施方式中，該藥物組成物的反義寡聚體係根據式 (IV)。在一個實施方式中，該藥物組成物的反義寡聚體係根據式 (IVa)。

【0216】 該等藥物組成物還可以含有輔助劑，例如防腐劑、潤濕劑、乳化劑、和分散劑。在主題寡聚體軛合物上的微生物作用的預防可以藉由包含不同抗細菌劑和抗真菌劑(例如，對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等等)來保證。還希望在組成物中包括等滲劑，例如糖、氯化鈉等等。此外，藉由包括延遲吸收的試劑，例如單硬脂酸鋁和明膠可以引起可注射藥物形式的延長吸收。

【0217】 在一些情況下，為了延長藥物的效果，希望減緩來自皮下或肌肉注射的藥物的吸收。除了本領域已知的其他方法之外，還可以藉由使用水溶性差的結晶或無定形材料的液體懸浮液實現。於係藥物的吸收速率取決於其溶解速率，反過來，溶解速率又可以取決於晶體尺寸和結晶形式。可替代地，延緩腸胃外施用的藥物形式的吸收藉由將藥物溶於或懸浮於油性載體中而實現。

【0218】藉由在可生物降解的聚合物(例如聚交酯-聚乙交酯)中形成主鏈寡聚體軀合物的微囊基質，可以製備可注射的儲庫形式。取決於寡聚體與聚合物的比率以及所採用的具體聚合物的性質，可以控制寡聚體釋放的速率。其他可生物降解的聚合物的實例包括聚鄰醚以及聚酸酐。可注射的儲庫配製物也可以藉由將藥物包埋到可與機體組織相容的脂質體或微乳劑中來製備。

【0219】當本揭露的反義寡聚體作為藥物施用至人和動物時，它們可以以其自身投與或以含有例如0.1%至99%(更較佳的是10%至30%)反義寡聚體與藥學上可接受的載體組合的藥物組成物而投與。

【0220】本揭露的配製物或製劑可以被口服、腸胃外、局部或直腸投與。通常，它們係以適用於各施用途徑的形式被投與。例如，它們以片劑或膠囊劑的形式被施用，藉由注射劑、吸入劑、眼用洗劑、軟膏劑、栓劑、或輸注被施用；藉由洗劑或軟膏劑被局部施用；或者藉由栓劑被直腸施用。

【0221】無論所選擇的施用途徑如何，藉由熟悉該項技術者已知的常規方法可以將本揭露的反義寡聚體(其可以以合適的水合形式使用)和/或本揭露的藥物組成物配製為藥學上可接受的劑型。可以改變本揭露的藥物組成物中活性成分的實際劑量水平，從而獲得在不對患者有不可接受的毒性情況下有效地實現針對具體患者、組成物、施用方式的期望治療反應的活性成分的量。

【0222】所選擇的劑量水平將取決於多種因素，包括所用的本揭露的具體反義寡聚體或其酯、鹽或醯胺的活性，施用途徑，施用時間，所用的具體寡聚體的排泄或代謝速率，吸收的速率和程度，治療的持續時間，

與所用的具體寡聚體組合使用的其他藥物、化合物和/或材料，所治療的患者的年齡、性別、體重、情況、一般健康狀況和既往醫學史，以及醫學領域中眾所周知的類似因素。

【0223】 具有本領域普通技術的醫師或獸醫可容易地確定並開處方有效量的所需藥物組成物。例如，醫師或獸醫可以在低於達到期望治療效果所需的水平下開始藥物組成物中所使用的本揭露的反義寡聚體的給藥，並且逐漸增加劑量，直至實現期望的效果。通常，本揭露的反義寡聚體的合適日劑量將是有效產生治療效果的最低劑量的反義寡聚體的量。這種有效劑量通常將取決於本文所述的因素。通常，當用於指示作用時，用於患者的本揭露反義寡聚體的口服、靜脈內、腦室內和皮下劑量範圍將從每日每kg體重約0.0001至約100 mg。

【0224】 在一些實施方式中，本揭露的反義寡聚體通常以從約1至約200 mg/kg的劑量施用。在一些實施方式中，用於靜脈內施用的劑量為從約0.5 mg至約200 mg/kg。

【0225】 在一些實施方式中，具有式 (I) 之反義寡聚體通常以從約1至約200 mg/kg的劑量施用。在一些實施方式中，用於靜脈內施用的具有式 (I) 之反義寡聚體的劑量為從約0.5 mg至約200 mg/kg。在一些實施方式中，具有式 (II) 之反義寡聚體通常以從約1至約200 mg/kg的劑量施用。在一些實施方式中，用於靜脈內施用的具有式 (II) 之反義寡聚體的劑量為從約0.5 mg至約200 mg/kg。在一些實施方式中，具有式 (III) 之反義寡聚體通常以從約1至約200 mg/kg的劑量施用。在一些實施方式中，用於靜脈內施用的具有式 (III) 之反義寡聚體的劑量為從約0.5 mg至約200 mg/kg。在一些實施方式中，具有式 (IV) 之反義寡聚體通常以從約1至約

200 mg/kg的劑量施用。在一些實施方式中，用於靜脈內施用的具有式 (IV) 之反義寡聚體的劑量為從約0.5 mg至約200 mg/kg。在一些實施方式中，具有式 (IVa) 之反義寡聚體通常以從約1至約200 mg/kg的劑量施用。在一些實施方式中，用於靜脈內施用的具有式 (IVa) 之反義寡聚體的劑量為從約0.5 mg至約200 mg/kg。在一些實施方式中，具有式 (V) 之反義寡聚體通常以從約1至約200 mg/kg的劑量施用。在一些實施方式中，用於靜脈內施用的具有式 (V) 之反義寡聚體的劑量為從約0.5 mg至約200 mg/kg。在一些實施方式中，具有式 (VI) 之反義寡聚體通常以從約1至約200 mg/kg的劑量施用。在一些實施方式中，用於靜脈內施用的具有式 (VI) 之反義寡聚體的劑量為從約0.5 mg至約200 mg/kg。

【0226】 如本領域理解的那樣，每週、每兩周、每三周或每月施用可以是如本文所討論的一種或多種施用或者亞劑量。

【0227】 本文所述的核酸分子和反義寡聚體可以藉由熟悉該項技術者已知的多種方法施用於細胞，包括但不限於，藉由離子電滲療法或藉由摻入其他載體(例如水凝膠、環糊精、可生物降解的奈米膠囊、和生物黏附性微球)封裝在脂質體中，如本文所述和本領域已知的。在某些實施方式中，微乳化技術可用於改善親脂性(水不溶性)藥物製劑的生體可用率。實例包括 Trimetrine(Dordunoo, S. K. 等人, *Drug Development and Industrial Pharmacy* [藥物開發與工業藥學], 17(12), 1685-1713, 1991)和 REV 5901(Sheen, P. C.等人, *J Pharm Sci* [藥物科學雜誌] 80(7), 712-714, 1991)。除其他益處之外，微乳化還可藉由優先將吸收指向淋巴系統而非循環系統，由此繞過肝臟並防止化合物在肝膽循環中的破壞來提供提高的生體可用率。

【0228】 在本揭露的一方面，該配製物含有由如本文提供的寡聚體和至少一種兩親性載體形成的膠束，其中該等膠束具有小於約100 nm的平均直徑。更較佳的實施方式提供平均直徑小於約50 nm的膠束，並且甚至更較佳的實施方式提供平均直徑小於約30 nm或甚至小於約20 nm的膠束。

【0229】 儘管考慮了所有合適的兩親性載體，但是目前較佳的載體通常是具有一般公認安全(GRAS)狀態的那些，並且是既可以溶解本揭露的反義寡聚體又可以在溶液與複合水相(例如，在人胃腸道中發現的水相)接觸的後期階段將其微乳化的那些。通常，滿足該等要求的兩親性成分的HLB(親水性至親脂性平衡)值為2-20，並且其結構含有C-6至C-20範圍內的直鏈脂族基團。實例係聚乙二醇化的脂肪甘油酯和聚乙二醇。

【0230】 兩親性載體的實例包括飽和的和單不飽和的聚乙二醇化的脂肪酸甘油酯，例如從完全或部分氫化的各種植物油中獲得的那些。此類油可以有利地由三脂肪酸甘油酯、二脂肪酸甘油酯和單脂肪酸甘油酯，以及相應脂肪酸的二聚(乙二醇)酯和單聚(乙二醇)酯組成，其中特別較佳的脂肪酸組成物包括癸酸4%-10%、癩酸3%-9%、月桂酸40%-50%、肉豆蔻酸14%-24%、棕櫚酸4%-14%、和硬脂酸5%-15%。另一類有用的兩親性載體包括具有飽和的或單不飽和的脂肪酸(SPAN系列)或者相應的乙氧基化類似物(TWEEN系列)的部分酯化的山梨聚糖和/或山梨醇。

【0231】 可商購的兩親性載體可以是特別有用的，包括Gelucire系列、Labrafil、Labrasol、或Lauroglycol(均由法國聖普裡埃斯特的嘉法獅公司(Gattefosse Corporation)製造和分銷)、PEG-單油酸酯、PEG-二油酸酯、PEG-單月桂酸酯和二月桂酸酯、卵磷脂、聚山梨酸酯80等(由美國和

全球的許多公司生產和分銷)。

【0232】 在某些實施方式中，為了將本揭露的藥物組成物引入合適的宿主細胞中，遞送可以藉由使用脂質體、奈米膠囊、微粒、微球、脂質顆粒、囊泡等等發生。具體地，可以配製本揭露的藥物組成物以用於遞送，該等藥物組成物被封裝在脂質顆粒、脂質體、囊泡、奈米球、奈米顆粒等等中。可以使用已知的和常規的技術進行此類遞送載體的配製和使用。

【0233】 適用於本揭露的親水性聚合物係易溶於水，可以共價附接至形成囊泡的脂質，並且在體內被耐受而沒有毒性作用(即，係生物相容的)的那些。合適的聚合物包括聚(乙二醇)(PEG)、聚乳酸(也稱為聚交酯)、聚乙醇酸(也稱為聚乙交酯)、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物、和聚乙醇醇。在某些實施方式中，聚合物的重均分子量為從約100或120道耳頓多至約5,000或10,000道耳頓、或者從約300道耳頓至約5,000道耳頓。在其他實施方式中，該聚合物係重均分子量為從約100至約5,000道耳頓、或者重均分子量為從約300至約5,000道耳頓的聚(乙二醇)。在某些實施方式中，該聚合物係重均分子量為約750道耳頓的聚(乙二醇)，例如PEG(750)。聚合物也可以由其中的單體的數目來定義；本揭露的一個較佳的實施方式利用至少約三種單體的聚合物，由三種單體組成的這種PEG聚合物具有大約132道耳頓的分子量。

【0234】 可能適用於本揭露的其他親水性聚合物包括聚乙烯吡咯啉酮、聚甲基哢唑啉、聚乙基哢唑啉、聚羥丙基甲基丙烯醯胺、聚甲基丙烯醯胺、聚二甲基丙烯醯胺、和衍生化的纖維素，例如羥甲基纖維素或羥乙基纖維素。

【0235】在某些實施方式中，本揭露的配製物包含選自由以下各項組成之群組的生物相容性聚合物：聚醯胺、聚碳酸酯、聚仲烷基、丙烯酸和甲基丙烯酸酯的聚合物、聚乙烯聚合物、聚乙交酯、聚矽氧烷、聚胺酯及其共聚物、纖維素、聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酸酐、聚(原)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(丙交酯-共己內酯)、多糖、蛋白質、聚透明質酸、聚氰基丙烯酸酯及其共混物、混合物或共聚物。

【0236】環糊精係環狀寡糖，由6、7或8個葡萄糖單元組成，分別由希臘字母 α 、 β 或 γ 表示。葡萄糖單元藉由 α -1,4-糖苷鍵連接。由於糖單元的椅型構象，所有二級羥基基團(在C-2、C-3處)均位於環的一側，而所有一級羥基基團在C-6處均位於另一側。因此，外表面係親水性的，使環糊精可溶於水。相反，環糊精的腔係疏水性的，因為它們被原子C-3和C-5的氫以及類醚氧所襯。該等基質允許與多種相對疏水的化合物複合，包括例如類固醇化合物，例如17 α -雌二醇(參見，例如van Uden等人 *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*[植物細胞、組織和器官培養] 38:1-3-113 (1994))。該複合藉由凡得瓦相互作用(Van der Waals interaction)並藉由氫鍵形成而發生。關於環糊精的化學過程的一般綜述，參見Wenz, Agnew. *Chem. Int. Ed. Engl.*[德國應用化學英文國際版], 33:803-822 (1994)。

【0237】環糊精衍生物的物理化學性質在很大程度上取決於取代的種類和程度。例如，它們在水中的溶解性範圍從不溶的(例如，三乙醯基- β -環糊精)至147%可溶的(w/v)(G-2- β -環糊精)。此外，它們可溶於許多有機溶劑。環糊精的性質使得能夠藉由增加或減少其溶解度來控制各種配製物組分的溶解性。

【0238】許多環糊精及其製備方法已進行了描述。例如，Parmeter (I)等人(美國專利案號3,453,259)和Gramera等人(美國專利案號3,459,731)描述了電中性環糊精。其他衍生物包括具有陽離子性質的環糊精[Parmeter (II)，美國專利案號3,453,257]、不溶性交聯的環糊精(Solms，美國專利案號3,420,788)、以及具有陰離子性質的環糊精[Parmeter (III)，美國專利案號3,426,011]。在具有陰離子性質的環糊精衍生物中，羧酸、亞磷酸、次膦酸、膦酸、磷酸、硫代膦酸、硫代亞磺酸和磺酸已被附加到母體環糊精上[參見，Parmeter (III)，美國專利案號3,453,257]。此外，磺烷基醚環糊精衍生物已經由Stella等人描述(美國專利案號5,134,127)。

【0239】脂質體由至少一個脂質雙層膜組成，該脂質雙層膜封閉內部水性區室。脂質體可以藉由膜類型和大小來表徵。小單層囊泡(SUV)具有單個膜且直徑範圍通常在0.02和0.05 μm 之間；大單層囊泡(LUVS)通常大於0.05 μm 。寡層大囊泡和多層囊泡具有多個通常同心的膜層，並且通常大於0.1 μm 。具有若干個非同心膜的脂質體，即包含在更大囊泡中的若干個更小囊泡，被稱為多囊泡的囊泡。

【0240】本揭露的一方面涉及包含脂質體的配製物，該等脂質體含有本揭露的反義寡聚體，其中脂質體膜被配製為提供具有增加的攜帶量的脂質體。可替代地或此外，本揭露的反義寡聚體可包含在脂質體的脂質體雙層中或吸附在脂質體的脂質體雙層上。本揭露的反義寡聚體可與脂質表面活性劑聚集並被攜帶在脂質體的內部空間中；在該等情況下，配製脂質體膜以抵抗活性劑-表面活性劑聚集體的破壞作用。

【0241】根據本揭露的一個實施方式，脂質體的脂質雙層含有被聚

(乙二醇)(PEG)衍生化的脂質，使得PEG鏈從該脂質雙層的內表面延伸到由脂質體封裝的內部空間，並從該脂質雙層的外部延伸到周圍環境。

【0242】 本揭露的脂質體中包含的活性劑呈溶解形式。根據本揭露，表面活性劑和活性劑的聚集體(例如含有感興趣的活性劑的乳劑或膠束)可被包埋在脂質體的內部空間內。表面活性劑起到分散和溶解活性劑的作用，並且可以選自任何合適的脂族、脂環族、或芳族表面活性劑，包括但不限於具有不同鏈長(例如，從約C14至約C20)的生物相容性溶血磷脂醯膽鹼(LPG)。聚合物衍生化的脂質(例如PEG脂質)也可用於膠束形成，因為它們將起到抑制膠束/膜融合的作用，並且因為將聚合物添加到表面活性劑分子中降低表面活性劑的CMC並有助於膠束形成。較佳的是具有在微莫耳範圍的CMO的表面活性劑；更高的CMC表面活性劑可用於製備包埋在本揭露的脂質體內的膠束。

【0243】 可以藉由本領域已知的多種技術中的任一種來製備根據本揭露的脂質體。參見，例如美國專利案號4,235,871；公開的PCT申請WO 96/14057；New RRC, *Liposomes: A practical approach* [新型RRC脂質體：一種實用方法], IRL新聞出版社(IRL Press), 牛津 (1990), 第33-104頁；以及Lasic DD, *Liposomes from physics to applications* [從物理學到應用的脂質體], 愛思唯爾科學出版社(Elsevier Science Publishers BV), 阿姆斯特丹, 1993。例如，本揭露的脂質體可以藉由如下製備：以與脂質體中所需的衍生化脂質的最終莫耳百分比相對應的脂質濃度，將被親水性聚合物衍生化的脂質擴散到預先形成的脂質體中，例如藉由將預先形成的脂質體暴露於由脂質接枝的聚合物組成的膠束中。含有親水性聚合物的脂質體也可以藉由均質化、脂質場水合、或擠出技術形成，如本領域已知

的。

【0244】 在另一示例性的配製過程中，首先藉由超音波處理將活性劑分散在容易溶解疏水性分子的溶血磷脂醯膽鹼或其他低CMC表面活性劑(包括聚合物接枝的脂質)中。然後將所得的活性劑的膠束懸浮液用於再水化乾燥的脂質樣品，該乾燥的脂質樣品含有合適莫耳百分比的聚合物接枝的脂質或膽固醇。然後使用如本領域已知的擠出技術將脂質和活性劑懸浮液形成脂質體，並且藉由標準柱分離從未封裝的溶液中分離出所得的脂質體。

【0245】 在本揭露的一方面，脂質體被製備成在選定的尺寸範圍內具有基本均勻的尺寸。一種有效的分級方法涉及將脂質體的水性懸浮液通過一系列具有選定的均勻孔徑的聚碳酸酯膜擠出；膜的孔徑將大致對應於通過該膜擠出產生的最大脂質體尺寸。參見，例如美國專利案號4,737,323(1988年4月12日)。在某些實施方式中，可以使用DharmaFECT®和Lipofectamine®等試劑將多核苷酸或蛋白質引入細胞。

【0246】 本揭露的配製物的釋放特性取決於封裝材料、封裝藥物的濃度、和釋放調節劑的存在。例如，可以使用例如僅在低pH(如在胃中)或更高pH(如在腸中)釋放的pH敏感性包衣將釋放操縱為pH依賴性的。腸包衣可用於防止釋放產生，直到通過胃之後。封裝在不同材料中的氰胺的多種包衣或混合物可用於獲得在胃中的初始釋放，隨後獲得在腸道中的後期釋放。釋放也可以藉由包括鹽或成孔劑來操縱，該等鹽或成孔劑可以增加水攝取或藉由從膠囊中擴散而釋放藥物。改變藥物溶解性的賦形劑也可用於控制釋放速率。也可以摻入增強基質降解或從基質釋放的試劑。它們可以被添加到藥物中，作為分開相(即作為顆粒)添加，或取決於化合物可以

共溶解在聚合物相中。在大多數情況下，該量應在0.1%至30%(w/w聚合物)之間。降解增強劑的類型包括無機鹽(例如硫酸銨和氯化銨)，有機酸(例如檸檬酸、苯甲酸和抗壞血酸)，無機鹼(例如碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸鈣、碳酸鋅和氫氧化鋅)，和有機鹼(例如魚精蛋白硫酸鹽、精胺、膽鹼、乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺)，以及表面活性劑(例如 Tween® 和 Pluronic®)。將添加微結構至基質的成孔劑(即水溶性化合物，例如無機鹽和糖)作為顆粒添加。該範圍通常在1%至30%(w/w聚合物)之間。

【0247】也可以藉由改變顆粒在腸道中的停留時間來操縱攝取。這可以例如藉由用黏膜黏附性聚合物包衣顆粒或選擇黏膜黏附性聚合物作為封裝材料來實現。實例包括大多數具有游離羧基基團的聚合物，例如殼聚糖、纖維素，並且尤其是聚丙烯酸酯(如本文所用，聚丙烯酸酯係指包括丙烯酸酯基團和改性丙烯酸酯基團的聚合物，例如氰基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯)。

【0248】可以將反義寡聚體配製成包含在手術設備或醫療裝置或植入物中或者適於由手術設備或醫療裝置或植入物釋放。在某些方面，可以用反義寡聚體包衣或以其他方式處理植入物。例如，水凝膠或其他聚合物(例如，生物相容性聚合物和/或可生物降解的聚合物)可以用於用本揭露的藥物組成物包衣植入物(即藉由使用水凝膠或其他聚合物，該組成物可適用於醫療裝置)。用於用試劑包衣醫療裝置的聚合物和共聚物係本領域眾所周知的。植入物的實例包括但不限於：支架、藥物洗脫支架、縫合線、假體、血管導管、透析導管、血管移植物、人工心臟瓣膜、心臟起搏器、可植入的心臟復律除顫器、IV針、用於骨固定和形成的裝置(例如銷、螺釘、板和其他裝置)，以及用於傷口癒合的人造組織基質。

【0249】除了本文提供的方法之外，還可以藉由與其他藥物類似的方式，將根據本揭露使用的反義寡聚體配製成用於以任何方便的方式施用，以用於人體醫學或獸醫。在肌營養不良的治療中，反義寡聚體及其相應的配製物可以單獨施用或與其他治療策略組合施用，例如成肌細胞移植，幹細胞療法，胺基糖苷類抗生素、蛋白酶體抑制劑的施用，以及上調療法(例如，肌養蛋白的常染色體旁系同源物-抗肌養蛋白相關蛋白的上調)。

【0250】在一些實施方式中，另外的治療劑可以在本揭露的反義寡聚體的施用之前、同時或之後施用。例如，反義寡聚體可以與類固醇和/或抗生素組合施用。在某些實施方式中，將反義寡聚體施用至有背景類固醇理論(例如，間歇性或慢性/連續背景類固醇療法)的患者。例如，在一些實施方式中，在施用反義寡聚體之前，該患者已接受皮質類固醇治療，並繼續接受類固醇療法。在一些實施方式中，該類固醇係糖皮質激素或潑尼松。

【0251】所述施用途徑僅旨在作為引導，因為熟悉該項技術者能夠容易地確定用於任何具體動物和病狀的最佳施用途徑和任何劑量。已嘗試了多種在體外和體內將功能性新遺傳物質引入細胞的方法(Friedmann (1989) *Science* [科學], 244: 1275-1280)。該等方法包括將待表現的基因整合到經修飾的逆轉錄病毒中(Friedmann (1989) 同上；Rosenberg (1991) *Cancer Research* [癌症研究] 51(18), 增刊：5074S-5079S)；整合到非逆轉錄病毒載體中(例如，腺相關病毒載體)(Rosenfeld, 等人, (1992) *Cell* [細胞], 68: 143-155；Rosenfeld 等人, (1991) *Science* [科學], 252: 431-434)；或者藉由脂質體遞送連接至異源啟動子-增強子元件的轉基因

(Friedmann (1989), 同上；Brigham等人,(1989) *Am. J. Med. Sci.*[美國醫學科學雜誌], 298: 278-281；Nabel等人,(1990) *Science* [科學], 249: 1285-1288；Hazinski等人,(1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*[美國呼吸細胞和分子生物學雜誌], 4:206-209；以及Wang和Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* [美國國家科學院院刊], 84:7851-7855)；偶合至配位基特異性的、基於陽離子的轉運系統(Wu和Wu (1988) *J. Biol. Chem.*[生物化學雜誌], 263: 14621-14624)，或者使用裸DNA、表現載體(Nabel等人,(1990), 同上；Wolff等人,(1990) *Science* [科學], 247: 1465-1468)。直接將轉基因注入組織中僅產生局部表現(Rosenfeld (1992) 同上；Rosenfeld等人,(1991) 同上；Brigham等人,(1989) 同上；Nabel (1990) 同上；和Hazinski等人,(1991) 同上)。Brigham等人小組(*Am. J. Med. Sci* [美國醫學科學雜誌] (1989) 298: 278-281和*Clinical Research* [臨床研究] (1991) 39(摘要))已經報導了在靜脈內或氣管內施用DNA脂質體複合物後僅對小鼠的肺進行體內轉染。人類基因療法程序的綜述文章的一個實例係：Anderson, *Science* [科學] (1992) 256: 808-813。

【0252】在另一個實施方式中，本揭露的藥物組成物可另外包含碳水化合物，如Han等人, *Nat. Comms.*[自然通訊] 7, 10981 (2016)提供的，該文獻的全文藉由引用併入本文。在一些實施方式中，本揭露的藥物組成物可包含5%的己糖碳水化合物。例如，本揭露的藥物組成物可包含5%葡萄糖、5%果糖、或5%甘露糖。在某些實施方式中，本揭露的藥物組成物可包含2.5%葡萄糖和2.5%果糖。在一些實施方式中，本揭露的藥物組成物可包含選自以下的碳水化合物：按體積計以5%的量存在的阿拉伯糖，按體積計以5%的量存在的葡萄糖，按體積計以5%的量存在的山梨醇，按

體積計以5%的量存在的半乳糖，按體積計以5%的量存在的果糖，按體積計以5%的量存在的木糖醇，按體積計以5%的量存在的甘露糖，按體積計各自以2.5%的量存在的葡萄糖和果糖的組合，和按體積計以5.7%的量存在的葡萄糖的組合，按體積計以2.86%的量存在的果糖，以及按體積計以1.4%的量存在的木糖醇。

IV. 使用方法

使用外顯子跳躍恢復肌養蛋白閱讀框

【0253】 輕度形式的肌養蛋白病(稱為**BMD**，由整碼突變引起)建議了一種治療**DMD**(由肌養蛋白基因中的異讀框突變引起)的潛在治療方法。假設將異讀框突變轉換為整碼突變的能力可以保留mRNA閱讀框並產生內部縮短但仍具功能性的肌養蛋白。設計本揭露的反義寡聚體以實現此目的。

【0254】 具有式 (I)、式 (II)、式 (III)、式 (IV)、式 (IVa)、式 (V)、式 (VI) 之反義寡聚體與靶向的先質mRNA序列的雜交干擾先質mRNA剪接複合物的形成，並且從成熟的mRNA中缺失外顯子50。本揭露的反義寡聚體的結構和構象允許與互補序列的序列特異性鹼基配對。

【0255】 含有所有79個外顯子的正常肌養蛋白mRNA將產生正常肌養蛋白。每個外顯子的形狀描述了外顯子之間密碼子的分裂方式；值得注意的是，一個密碼子由三個核苷酸組成。矩形外顯子以完整密碼子開始和結束。箭頭形外顯子以完整密碼子開始，但以分裂密碼子結束，僅含有密碼子的核苷酸#1。該密碼子的核苷酸#2和#3包含在隨後的外顯子中，該外顯子將以人字形開始。

【0256】 用於分析與人肌養蛋白先質mRNA的外顯子50、內含子49

和/或內含子50的靶標區域互補並誘導外顯子50跳躍的反義寡聚體的效果的臨床結果包括肌養蛋白陽性纖維百分比(PDPF)、六分鐘行走測試(6MWT)、步行的損失(LOA)、北極星步行評估(NSAA)、肺功能測試(PFT)、在沒有外部支持的情況下(從仰臥位)起立的能力、重新的肌養蛋白產生、以及其他功能性量度。

【0257】 在一些實施方式中，本揭露提供了在具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變的受試者中產生肌養蛋白之方法，該方法包括向該受試者施用如本文所述的反義寡聚體或其藥學上可接受的鹽。在某些實施方式中，本揭露提供了恢復mRNA閱讀框以誘導患有杜興氏肌肉失養症(DMD)的受試者中肌養蛋白產生之方法，該受試者具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變。可以藉由逆轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)、西方墨點法分析、或免疫組織化學(IHC)來測量蛋白質產生。

【0258】 在一些實施方式中，本揭露提供了在有需要的受試者中治療DMD之方法，其中該受試者具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變，該方法包括向該受試者施用如本文所述的反義寡聚體或其藥學上可接受的鹽。在多個實施方式中，藉由疾病進展的延遲來測量受試者的治療。在一些實施方式中，藉由維持受試者的步行或減少受試者的步行的損失來測量受試者的治療。在一些實施方式中，使用6分鐘行走測試(6MWT)來測量步行。在某些實施方式中，使用北極星步行評估(NSAA)來測量步行。

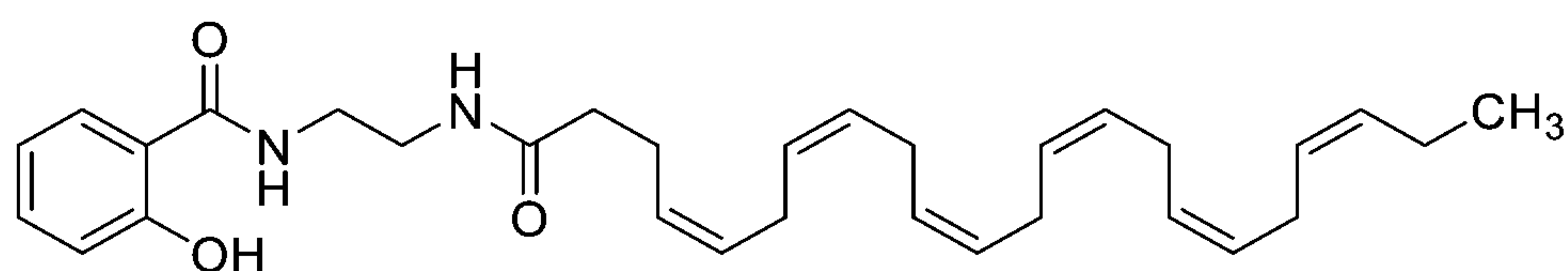
【0259】 在多個實施方式中，本揭露提供了在患有DMD的受試者中維持肺功能或減少肺功能的損失之方法，其中該受試者具有適於外顯子50跳躍的DMD基因突變，該方法包括向該受試者施用如本文所述的反義寡

聚體或其藥學上可接受的鹽。在一些實施方式中，肺功能被測量為最大呼氣壓力(MEP)。在某些實施方式中，肺功能被測量為最大吸氣壓力(MIP)。在一些實施方式中，肺功能被測量為用力肺活量(FVC)。

【0260】在另一個實施方式中，可以在本揭露的方法中將本揭露的藥物組成物與碳水化合物以相同配製物或單獨配製物的形式共同施用，如Han等人, *Nat. Comms.*[自然通訊] 7, 10981 (2016)提供的，該文獻的全文藉由引用併入本文。在一些實施方式中，本揭露的藥物組成物可以與5%的己糖碳水化合物共同施用。例如，本揭露的藥物組成物可以與5%葡萄糖、5%果糖、或5%甘露糖共同施用。在某些實施方式中，本揭露的藥物組成物可以與2.5%葡萄糖和2.5%果糖共同施用。在一些實施方式中，本揭露的藥物組成物可以與選自以下的碳水化合物共同施用：按體積計以5%的量存在的阿拉伯糖，按體積計以5%的量存在的葡萄糖，按體積計以5%的量存在的山梨醇，按體積計以5%的量存在的半乳糖，按體積計以5%的量存在的果糖，按體積計以5%的量存在的木糖醇，按體積計以5%的量存在的甘露糖，按體積計各自以2.5%的量存在的葡萄糖和果糖的組合，和按體積計以5.7%的量存在的葡萄糖的組合，按體積計以2.86%的量存在的果糖，以及按體積計以1.4%的量存在的木糖醇。

【0261】在多個實施方式中，本揭露的反義寡聚體可以與治療有效量的非甾體類抗炎化合物共同施用。在一些實施方式中，該非甾體類抗炎化合物係NF- κ B抑制劑。例如，在一些實施方式中，該NF- κ B抑制劑可以是CAT-1004或其藥學上可接受的鹽。在多個實施方式中，該NF- κ B抑制劑可以是水楊酸鹽和DHA的軛合物。在一些實施方式中，該NF- κ B抑制劑係CAT-1041或其藥學上可接受的鹽。在某些實施方式中，該NF- κ B抑

制劑係水楊酸鹽和EPA的軛合物。在多個實施方式中，該NF-kB抑制劑係



、或其藥學上可接

受的鹽。

【0262】 在一些實施方式中，非甾體類抗炎化合物係TGF-b抑制劑。例如，在某些實施方式中，該TGF-b抑制劑係HT-100。

【0263】 在某些實施方式中，描述了如本文所述的反義寡聚體，該反義寡聚體用於在療法中使用。在某些實施方式中，描述了如本文所述的反義寡聚體，該反義寡聚體用於治療杜興氏肌肉失養症。在某些實施方式中，描述了如本文所述的反義寡聚體，該反義寡聚體用於製造用於在療法中使用的藥物。在某些實施方式中，描述了如本文所述的反義寡聚體，該反義寡聚體用於製造用於治療杜興氏肌肉失養症的藥物。

V.套組

【0264】 本揭露還提供了用於治療患有遺傳疾病的患者的套組，其中套組(包裝在合適的容器中)包含至少一個反義分子(例如，包含SEQ ID NO. 1-9中任一個所示的鹼基序列的反義寡聚體)及其使用說明書。套組還可以包含週邊試劑例如緩衝劑、穩定劑等。熟悉該項技術者應該理解，上述方法的應用在鑒定適用於治療許多其他疾病的反義分子方面具有廣泛的應用。在一個實施方式中，該套組包含根據式 (I)-(VI) 之任一個的反義寡聚體。

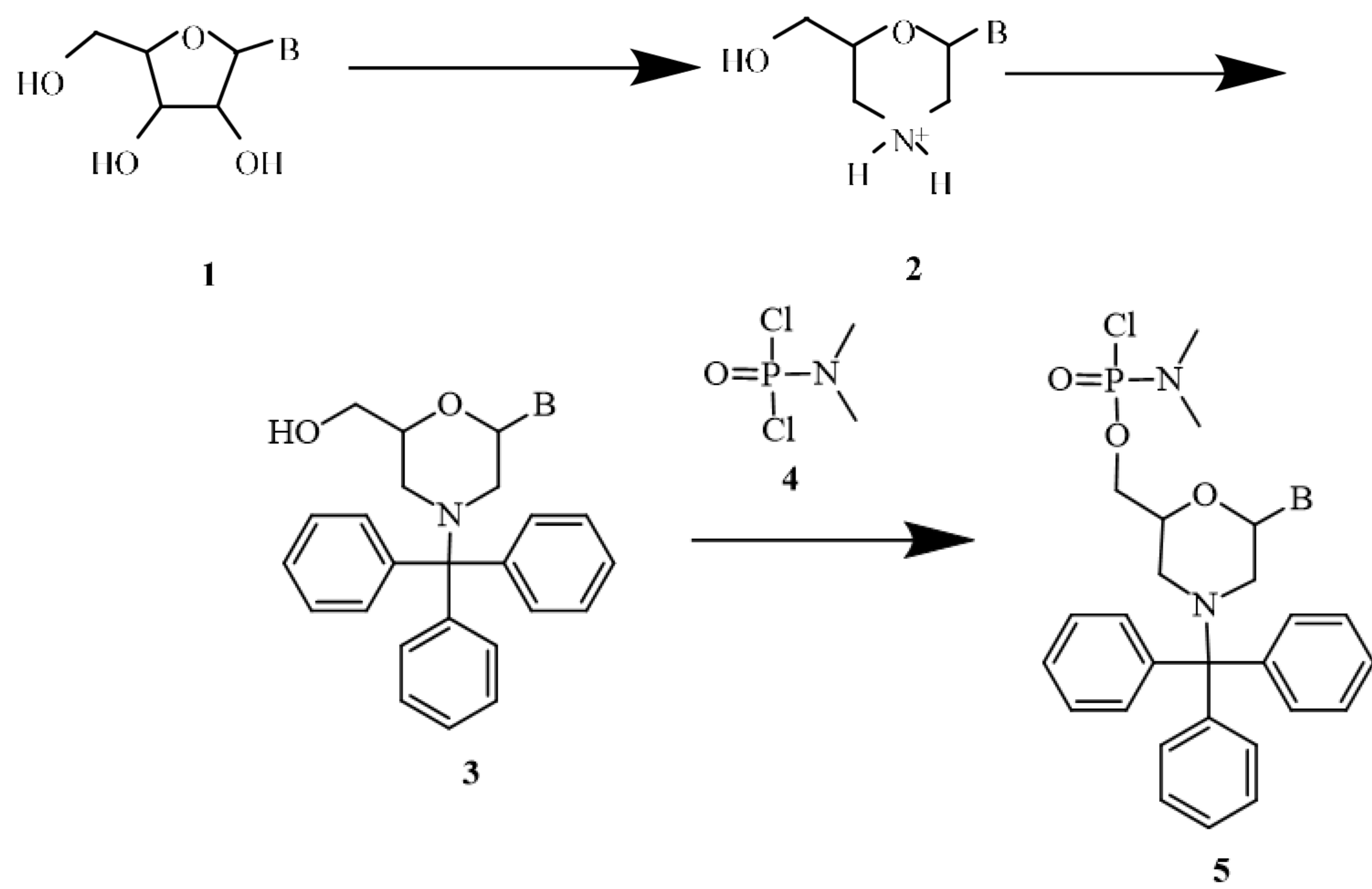
實例

【0265】 儘管已經藉由說明和以清楚理解為目的的實例對上述揭露進行了詳細描述，在本揭露的教導下，對熟悉該項技術者應該顯而易見的

是可以對本揭露做出某些改變和修改而不背離所附申請專利範圍的精神或範圍。以下實例係僅藉由說明的方式但不是藉由限制的方式來提供的。熟悉該項技術者很容易認識到許多非標準的參數加以改變或修飾後也能產生基本相似的結果。

材料和方法

咪啉代亞基的製備



方案1：PMO亞基的一般合成途徑

【0266】 參考方案1，其中B表示鹼基配對部分，咪啉代亞基可以從所示的相應核糖核苷(1)來製備。可以藉由與合適的保護基團先質(例如三苯甲基氯)反應來視需要保護咪啉代亞基(2)。通常在固態寡聚體合成期間去除3'保護基團，如下文更詳細描述的。該鹼基配對部分可以被適當地保護用於固相寡聚體合成。合適的保護基團包括用於腺嘌呤和胞嘧啶的苯甲醯基，用於鳥嘌呤的苯基乙醯基，以及用於次黃嘌呤(肌苷)的新戊醯氧基甲基。可以將新戊醯氧基甲基基團引入次黃嘌呤雜環鹼基的N1位。儘管可以使用未保護的次黃嘌呤亞基，但是當鹼基受到保護時，活化反應的產

率要高得多。其他合適的保護基團包括揭露於美國專利案號8,076,476的那些，該文獻藉由引用以其整體特此併入。

【0267】 3與激活的磷化合物4的反應產生具有所需連接部分5的咪啉代亞基。

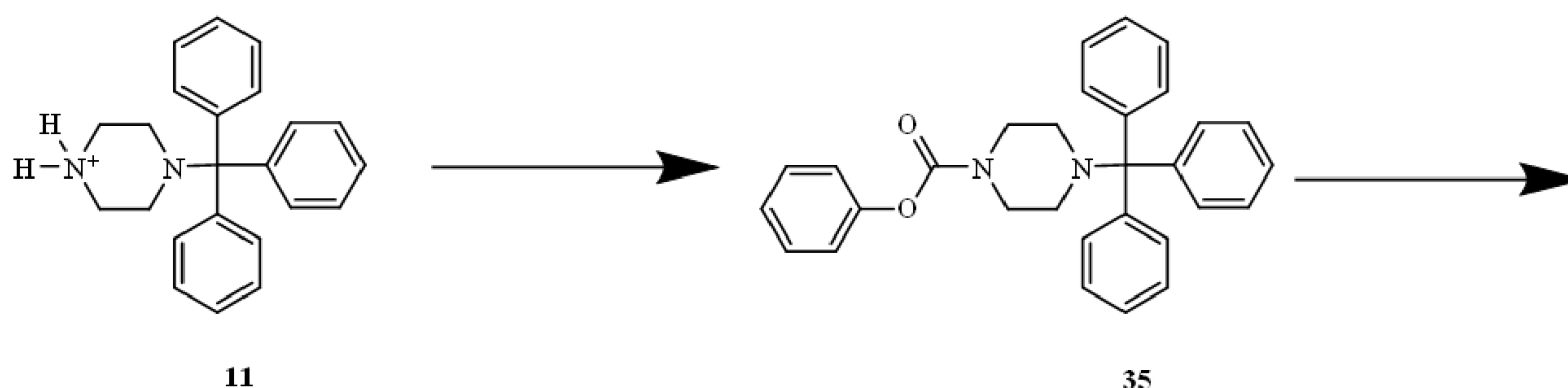
【0268】 可以使用熟悉該項技術者已知的任何數目的方法來製備具有結構4的化合物。然後如上所述進行與咪啉代部分偶合。

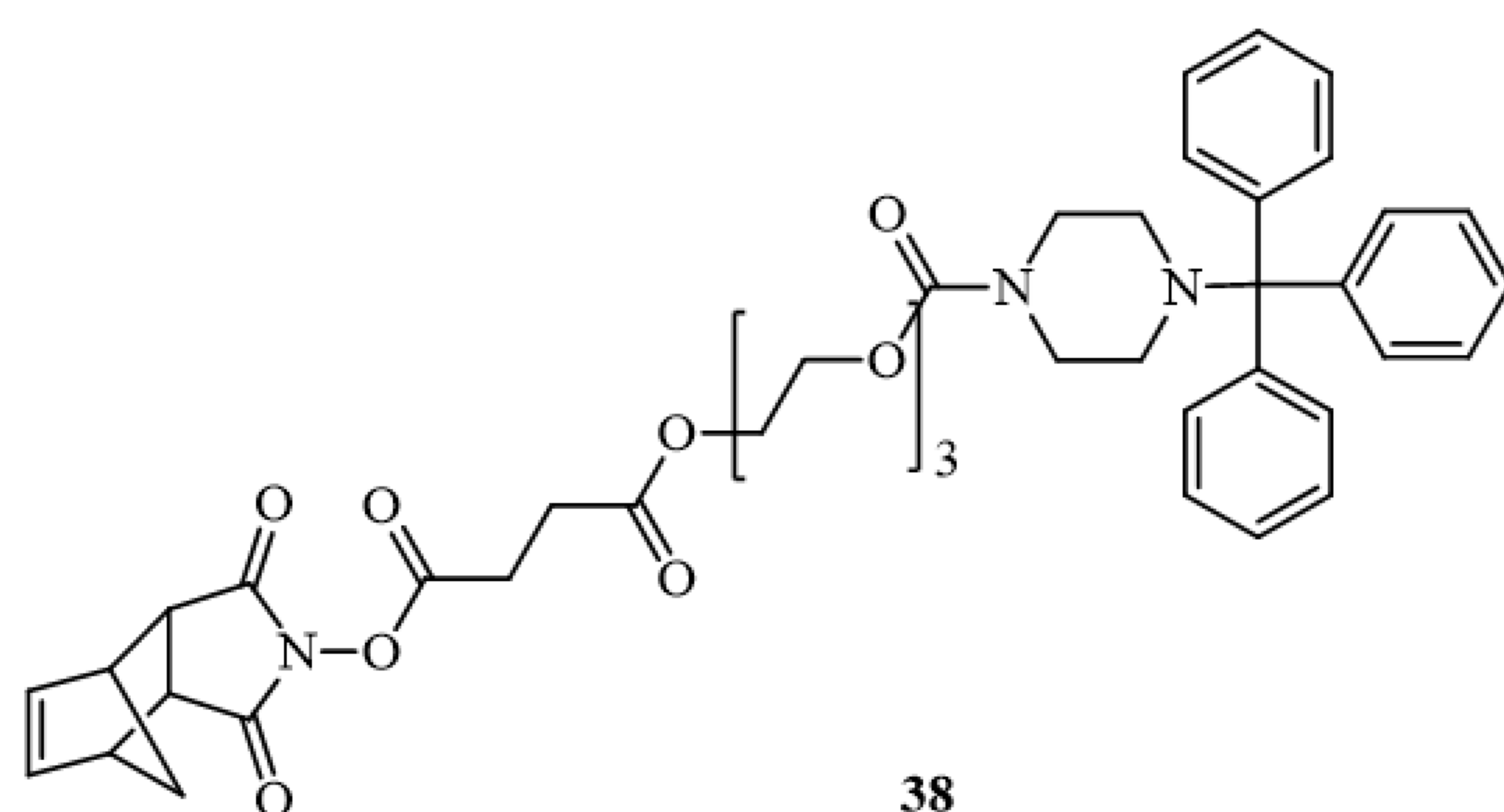
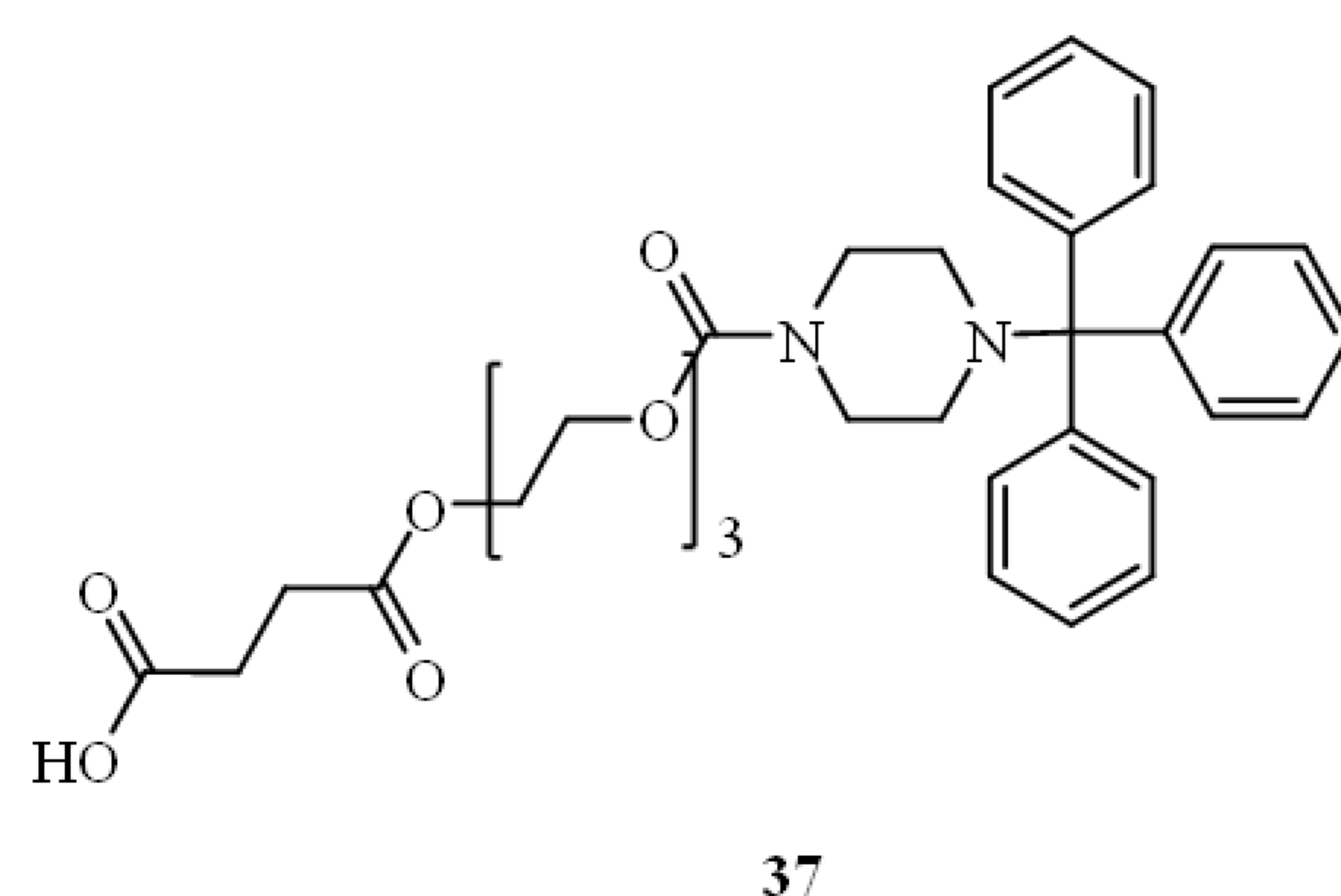
【0269】 具有結構5的化合物可用於固相寡聚體合成中，以製備包含亞基間鍵的寡聚體。此類方法係本領域中眾所周知的。簡而言之，可以在5'端處修飾具有結構5的化合物以包含至固體支持物的連接子。一旦被支持，在3'端處的5的保護基團(例如三苯甲基)被去除，並且游離胺與具有結構5的第二化合物的激活的磷部分反應。重複該序列，直至獲得所需的序列寡聚物。如果需要3'修飾，則可以去除或保留在末端3'端的保護基團。可以使用任何數目的方法將寡聚物從固體支持物中去除，或實例用鹼進行處理以切割與固體支持物的連接。

【0270】 實例中更詳細地描述了本揭露的咪啉代寡聚體的總體製備和具體的咪啉代寡聚體。

咪啉代寡聚體的製備

【0271】 可以根據方案2使用以下方案進行本揭露的化合物的製備：





【0272】 三苯甲基哌啶苯基胺基甲酸酯**35**的製備：向化合物**11**在二氯甲烷(6 mL/g **11**)中的冷卻懸浮液中添加碳酸鉀(3.2當量)在水(4 mL/g碳酸鉀)中的溶液。向該兩相混合物中緩慢添加氯甲酸苯酯(1.03當量)在二氯甲烷(2 g/g氯甲酸苯酯)中的溶液。將該反應混合物溫熱至20°C。反應完成後(1-2小時)，分離各層。將有機層用水洗滌，並且經無水碳酸鉀乾燥。藉由從乙腈結晶分離出產物**35**。

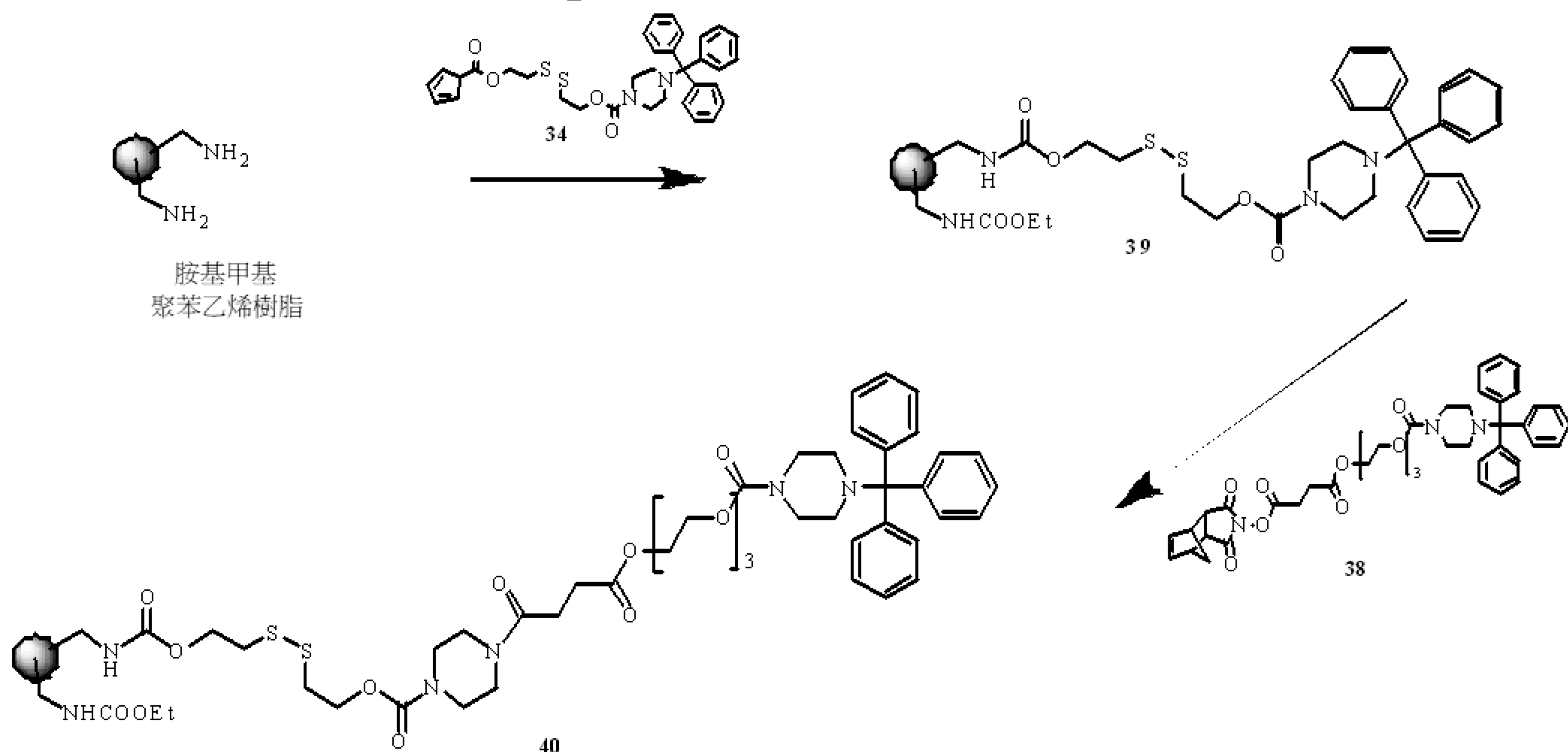
【0273】 胺基甲酸酯醇**36**的製備：將氫化鈉(1.2當量)懸浮在1-甲基-2-吡咯啉酮(32 mL/g氫化鈉)中。可以將三甘醇(10.0當量)和化合物**35**(1.0當量)添加至該懸浮液中。將所得漿料加熱至95°C。反應完成後(1-2小時)，將該混合物冷卻至20°C。向該混合物中添加30%二氯甲烷/甲基三級丁基醚(v:v)和水。依次用水性NaOH、水性琥珀酸、和飽和的水性氯化鈉洗滌含有產物的有機層。藉由從二氯甲烷/甲基三級丁基醚/庚烷結晶分離出產物**36**。

【0274】 尾酸**37**的製備：向化合物**36**在四氫呋喃(7 mL/g **36**)中的溶液中添加琥珀酸酐(2.0當量)和DMAP(0.5當量)。將該混合物加熱至50°C。反應完成後(5小時)，將該混合物冷卻至20°C，並用水性NaHCO₃將其調節至pH 8.5。添加甲基三級丁基醚，並將該產物萃取到水層中。添加二氯甲烷，並用水性檸檬酸將水層混合物調節至pH 3。用pH = 3的檸檬酸鹽緩衝劑和飽和的水性氯化鈉的混合物洗滌含有產物的有機層。**37**的此二氯甲烷溶液無需分離即可用於化合物**38**的製備。

【0275】 **38**的製備：將N-羥基-5-降冰片烯-2,3-二羧酸醯亞胺(HONB)(1.02當量)、4-二甲基胺基吡啶(DMAP)(0.34當量)、然後1-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(EDC)(1.1當量)添加至化合物**37**的溶液中。將該混合物加熱至55°C。反應完成後(4-5小時)，將該混合物冷卻至20°C，並依次用1:1 0.2 M檸檬酸/鹽水和鹽水洗滌。該二氯甲烷溶液經歷溶劑交換成丙酮，然後交換成N,N-二甲基甲醯胺，並且藉由從丙酮/N,N-二甲基甲醯胺沈澱到飽和的水性氯化鈉中來分離產物。將粗產物在水中重新製漿若干次，以去除殘留的N,N-二甲基甲醯胺和鹽。

PMO合成方法A：二硫化物錨的用途

【0276】藉由在固相合成期間用於摻入亞基的程序，在二甲基咪唑啉酮(DMI)中將激活的「尾」引入錨負載的樹脂中。



方案3：用於合成咪啉代寡聚體的固體支持物的製備

【0277】該程序可以在帶有粗孔(40-60 μm)玻璃料、頂置式攪拌器、和3通特氟龍(Teflon)旋塞的矽烷化、帶夾套的肽容器(美國新澤西州ChemGlass公司)中進行，以允許 N_2 向上冒泡通過玻璃料或真空萃取。

【0278】以下程序中的樹脂處理/洗滌步驟由兩個基本操作組成：樹脂流化或攪拌床反應器以及溶劑/溶液萃取。為了進行樹脂流化，將旋塞置於允許 N_2 向上流動通過玻璃料的位置，並且將指定的樹脂處理劑/洗滌液添加至反應器中，並允許其滲透且完全潤濕該樹脂。然後開始混合並將樹脂漿料混合指定的時間。為了進行溶劑/溶液萃取，停止混合和 N_2 流動，並啟動真空泵，然後將旋塞置於允許抽空樹脂處理劑/洗滌液至廢液的位置。除非另有說明，否則所有樹脂處理劑/洗滌液體積均為15 mL/g的樹脂。

【0279】將1-甲基-2-吡咯啉酮(NMP；20 mL/g樹脂)添加至在矽烷

化、帶夾套的肽容器中的胺基甲基聚苯乙烯樹脂(100-200目；基於氮取代的約1.0 mmol/g負載；75 g，1當量，英國聚合物實驗室(Polymer Labs, UK)，部件號1464-X799)中，並且允許樹脂溶脹，伴隨混合1-2小時。抽空溶脹溶劑後，用二氯甲烷(2 x 1-2分鐘)、在25%異丙醇/二氯甲烷中的5%二異丙基乙胺(2 x 3-4分鐘)、和二氯甲烷(2 x 1-2分鐘)洗滌樹脂。抽空最終洗滌液後，用二硫化物錨**34**在1-甲基-2-吡咯啉酮(0.17 M；15 mL/g樹脂，約2.5當量)中的溶液處理樹脂，並將樹脂/試劑混合物在45°C下加熱60小時。反應完成後，停止加熱並抽空錨溶液，並且用1-甲基-2-吡咯啉酮(4 x 3-4分鐘)和二氯甲烷(6 x 1-2分鐘)洗滌樹脂。用10%(v/v)碳酸二乙酯(DEDC)在二氯甲烷(16 mL/g；2 x 5-6分鐘)中的溶液處理樹脂，然後用二氯甲烷(6 x 1-2分鐘)洗滌。將樹脂**39**在N₂流下乾燥1-3小時，然後在真空下乾燥至恒重($\pm 2\%$)。

【0280】 胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂的負載量的確定：藉由分光光度法測定每克樹脂中三苯基甲基(三苯甲基)基團的數目來確定樹脂的負載量(潛在可用的反應位點的數目)。

【0281】 將已知重量的乾燥樹脂(25 ± 3 mg)轉移至矽烷化的25 mL容量燒瓶中，並添加在二氯甲烷中約5 mL的2%(v/v)三氟乙酸。藉由輕輕旋轉將內容物混合，然後允許其靜置30分鐘。用在二氯甲烷中的另外的2%(v/v)三氟乙酸將體積升至25 mL，並將內容物充分混合。使用容積移液管，將等分試樣的含三苯甲基溶液(500 μ L)轉移至10 mL容量燒瓶中，並用甲磺酸將體積升至10 mL。

【0282】 最終溶液中的三苯甲基陽離子含量藉由在431.7 nm處的UV吸光度測量，並且使用適當的體積、稀釋度、消光係數(ϵ : 41 μ mol⁻¹cm⁻¹)。

1)和樹脂重量，以每克樹脂的三苯甲基基團計算樹脂負載量($\mu\text{mol/g}$)。一式三份進行該測定，並計算平均負載量。

【0283】該實例中的樹脂負載程序將為樹脂提供大約500 $\mu\text{mol/g}$ 的負載量。如果二硫化物錨摻入步驟在室溫下進行24小時，則會獲得300-400以 $\mu\text{mol/g}$ 計的負載量。

【0284】尾負載：使用與製備胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂相同的設置和體積，可以將尾引入到固體支持物上。首先將錨負載的樹脂在酸性條件下脫保護，並在偶合前中和所得材料。對於偶合步驟，將**38**(0.2 M)在含有4-乙基咪啉(NEM, 0.4 M)的DMI中的溶液(而不是1-甲基-2-吡咯啉酮)用於二硫化物錨溶液。在45°C下2小時後，將樹脂**39**用在25%異丙醇/二氯甲烷中的5%二異丙基乙胺洗滌兩次，並用DCM洗滌一次。將苯甲酸酐(0.4 M)和NEM(0.4 M)的溶液添加至樹脂中。25分鐘後，將反應器夾套冷卻至室溫，並用在25%異丙醇/二氯甲烷中的5%二異丙基乙胺洗滌樹脂兩次，並用DCM洗滌八次。將樹脂**40**過濾，並在高真空下乾燥。樹脂**40**的負載量被定義為在尾負載中使用的原始胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂**39**的負載量。

【0285】固相合成：咪啉代寡聚體係在4 mL BioComma聚丙烯反應柱(部件號CT003-BC)中，在定制的BioAutomation 128AVB(德克薩斯州普萊諾)上製備的。當柱位於合成器上時，將帶有水流通道的鋁塊放置在柱周圍。可替代地，AVB128添加試劑/洗滌溶液，保持指定的時間，並使用真空抽空柱。

【0286】對於長度範圍多至約25個亞基的寡聚體，較佳的是負載量接近500 $\mu\text{mol/g}$ 樹脂的胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂。對於更大的寡

聚體，較佳的是負載量為300-400 μmol/g樹脂的胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂。如果需要具有5’尾的分子，則應按照相同的負載準則選擇已負載尾的樹脂。

【0287】 製備以下試劑溶液：

脫三苯甲基化溶液：在4：1二氯甲烷/三氟乙醇溶液中的1% 4氰基吡啶和三氟乙酸(w/w)；

中和溶液：在5：1二氯甲烷/異丙醇溶液中的3%二異丙基乙胺；以及

偶合溶液：在1,3-二甲基咪唑啉酮(DMI)溶液中，具有0.4 M N-乙基咪啉的0.18 M(或對於生長超過20個亞基的寡聚體為0.24 M)激活的咪啉代亞基(其具有所需鹼基和連接類型)。

【0288】 將二氯甲烷(DCM)用作分離不同的試劑溶液洗滌液的過渡洗滌液。

【0289】 在合成器上，其中將塊設置為42°C，向每個含有30 mg胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂(或尾樹脂)的柱中添加2 mL的1-甲基-2-吡咯啉酮，並允許其在室溫下放置30分鐘。用2 mL的二氯甲烷洗滌2次後，可以採用以下合成循環：

步驟	體積	遞送	保持時間
脫三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
脫三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
脫三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
脫三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
脫三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
脫三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒

脫三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
DCM	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
DCM	1.5 mL	歧管	30秒
偶合	350-500 uL	注射器	40分鐘
DCM	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
DCM	1.5 mL	歧管	30秒
DCM	1.5 mL	歧管	30秒
DCM	1.5 mL	歧管	30秒

【0290】 將各個寡聚體的序列程序設計到合成器中，以便每個柱都能在適當的序列中接收適當的偶合溶液(A、C、G、T或I)。當柱中的寡聚體已完成其最終亞基的摻入後，將該柱從塊中去除，並使用含有4-甲氧基三苯基甲基氯(在DMI中為0.32 M)和0.89 M 4-乙基咪啉的偶合溶液手動進行最終循環。

【0291】 從樹脂切割並去除鹼基和骨架保護基團：甲氧基三苯甲基化後，將樹脂用2 mL的1-甲基-2-吡咯啉酮洗滌8次。添加1 mL由在1-甲

基-2-吡咯啉酮中的0.1 M 1,4-二硫蘇糖醇(DTT)和0.73 M三乙胺組成的切割溶液，將柱加蓋，並允許其在室溫下放置30分鐘。之後，將該溶液排入12 mL惠頓瓶(Wheaton vial)中。將收縮嚴重的樹脂用300 μ L的切割溶液洗滌兩次。向該溶液中添加4.0 mL濃氨水(儲存在-20°C)，將小瓶蓋緊(用特氟龍襯裡的螺旋蓋擰緊)，並將混合物旋流以混合溶液。將小瓶置於45°C的烘箱中持續16-24小時以實施對鹼基和骨架保護基團的切割。

【0292】粗產物純化：將裝入小瓶的氨解溶液從烘箱中去除並允許其冷卻至室溫。將該溶液用20 mL的0.28%氨水稀釋，並使其通過含有Macroprep HQ樹脂的2.5x10 cm柱(伯樂公司(BioRad))。鹽梯度(A：0.28%氨，B：0.28%氨中的1M氯化鈉；60分鐘內0-100% B)用於洗脫甲氧基三苯甲基保護的寡聚體。將合併的級分集合，並根據所需產物進一步處理。

【0293】咪啉代寡聚體的脫甲氧基三苯甲基化：將Macroprep純化得到的集合的級分用1 M H_3PO_4 處理，以將pH降至2.5。初始混合後，將樣品在室溫下放置4分鐘，在此時用2.8%氨/水將其中和至pH 10-11。將產物藉由固相萃取(SPE)純化。

【0294】SPE柱填充和調節：將Amberchrome CG-300M(密西根州米德蘭鎮陶氏化學公司(Dow Chemicals)(Rohm和Haas)(3 mL)裝入20 mL玻璃柱(伯樂公司Econo-Pac層析柱(732-1011))中，並用3 mL的以下溶液沖洗樹脂：0.28% NH_4OH /80%乙腈；0.5 M NaOH /20%乙醇；水；50 mM H_3PO_4 /80%乙腈；水；0.5 NaOH /20%乙醇；水；0.28% NH_4OH 。

【0295】SPE純化：將來自脫甲氧基三苯甲基化的溶液載入到柱上，並用8 mL 0.28%氨水將樹脂沖洗三次。可以在柱下放置惠頓瓶(12 mL)，

並且可以藉由在0.28%氨水中的2 mL 45%乙腈洗滌兩次來洗脫產物。

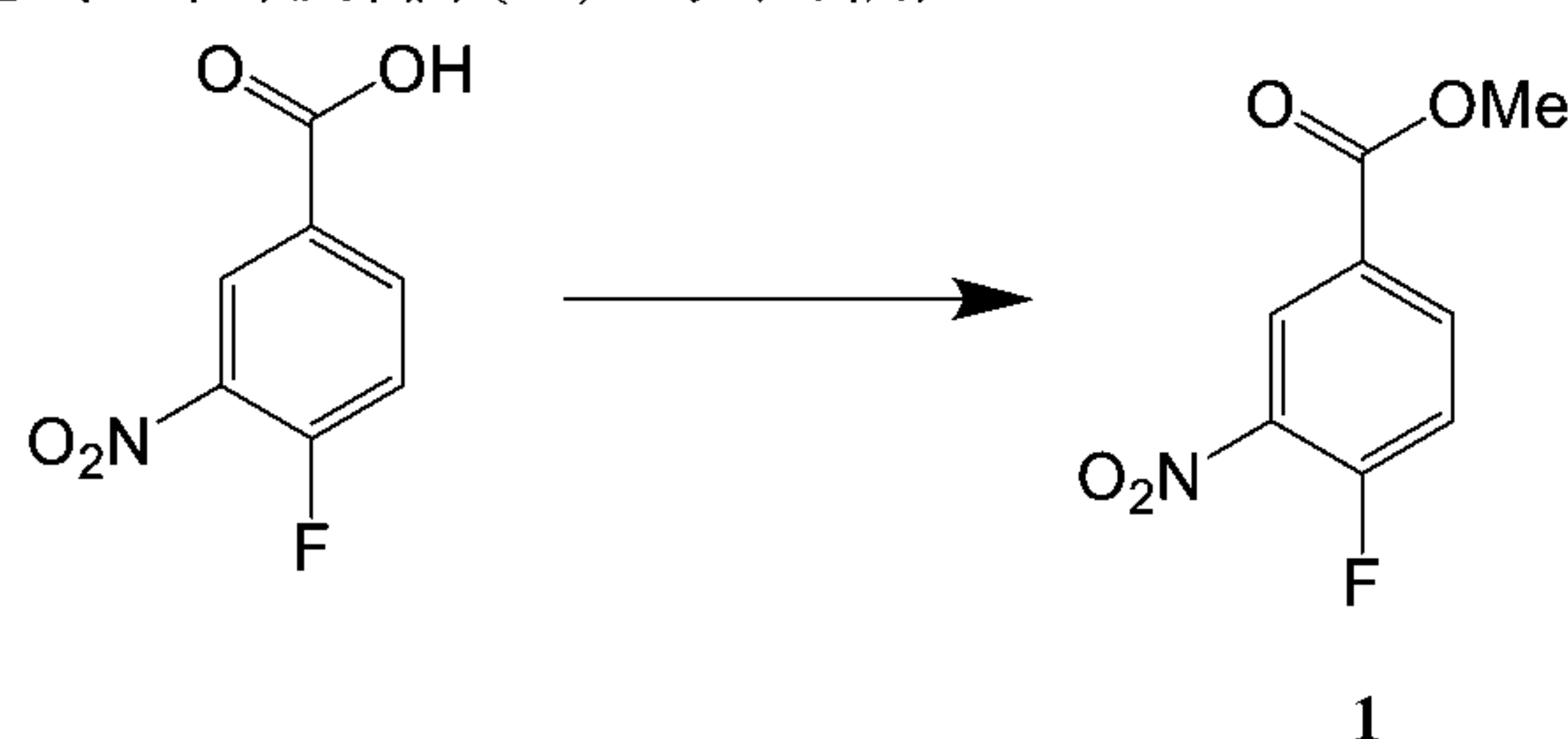
【0296】產物分離：將該溶液在乾冰中冷凍，並將小瓶放置在冷凍乾燥器上持續至少兩天，以產生蓬鬆的白色粉末。然後將樣品溶解在水中，使用注射器通過0.22微米過濾器(頗爾生命科學公司(Pall Life Sciences)，Acrodisc 25 mm注射器過濾器，帶有0.2微米HT Tuffryn膜)過濾，並且在UV分光光度計上測量光密度(OD)，以確定存在的寡聚體的OD單位，並分配樣品進行分析。然後將該溶液放回惠頓瓶中進行凍乾。

【0297】藉由MALDI分析咪啉代寡聚體：MALDI-TOF質譜法可用於確定純化中級分的組成，以及為寡聚體的身份(分子量)提供證據。用3,5-二甲氧基-4-羥基肉桂酸(芥子酸)、3,4,5-三羥基苯乙酮(THAP)、或 α -氰基-4-羥基肉桂酸(HCCA)的溶液作為基質稀釋後，即可運行樣品。

【0298】PMO合成方法B：硝基羧苯基丙基(NCP2)錨的用途

NCP2錨合成：

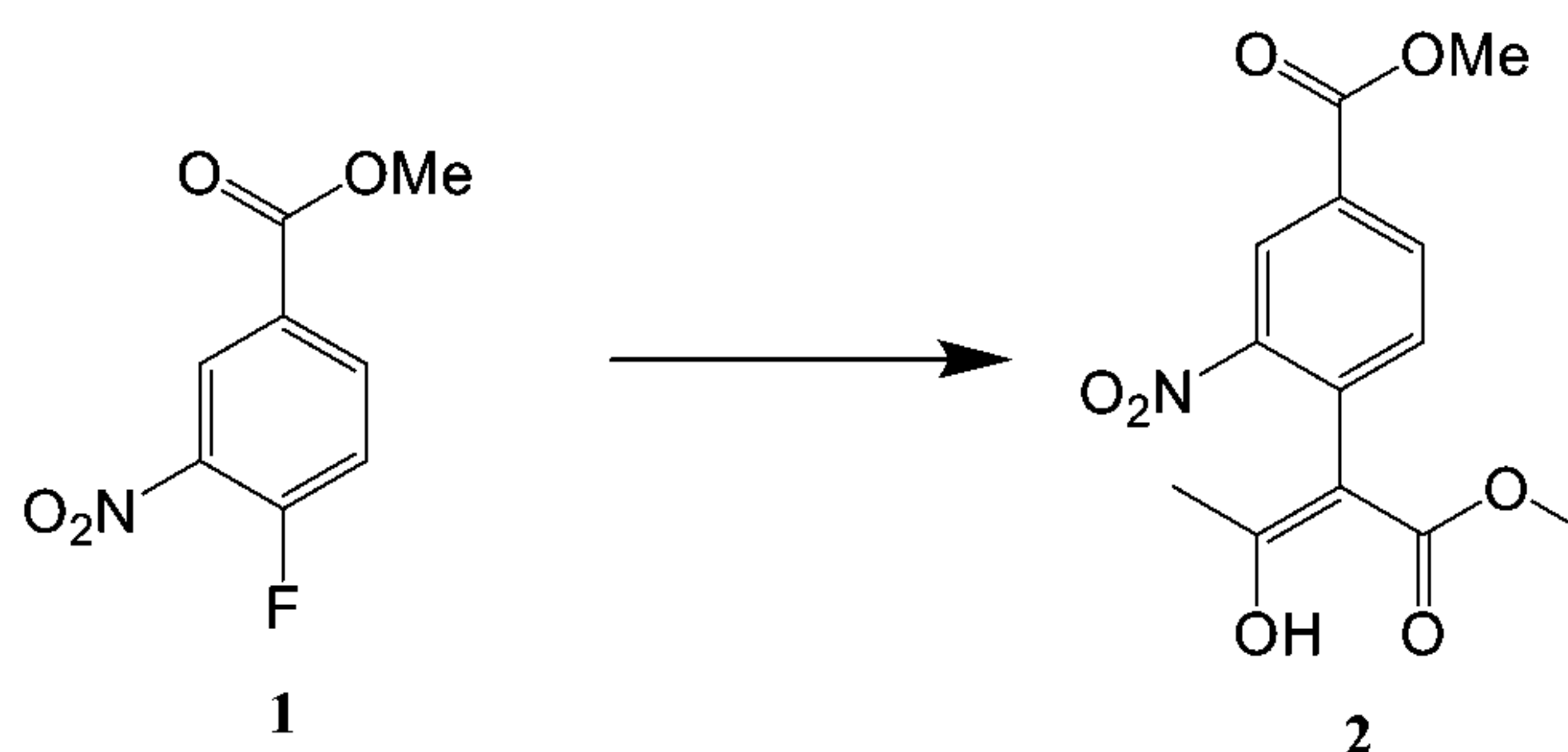
1. 甲基 4-氟-3-硝基苯甲酸酯(1)的製備



【0299】可以將12.7 kg的4-氟-3-硝基苯甲酸、40 kg的甲醇、和2.82 kg的濃硫酸添加至100 L燒瓶中。將該混合物在回流(65°C)下攪拌36小時。將該反應混合物冷卻至0°C。在約38°C下可形成晶體。將該混合物在0°C下保持4小時，然後在氮氣下過濾。洗滌該100 L燒瓶，並用已冷卻至0°C的10 kg甲醇洗滌該濾餅。將該固體濾餅在漏斗上乾燥1小時，轉移至託盤，並在真空烘箱中於室溫下乾燥至恒重。

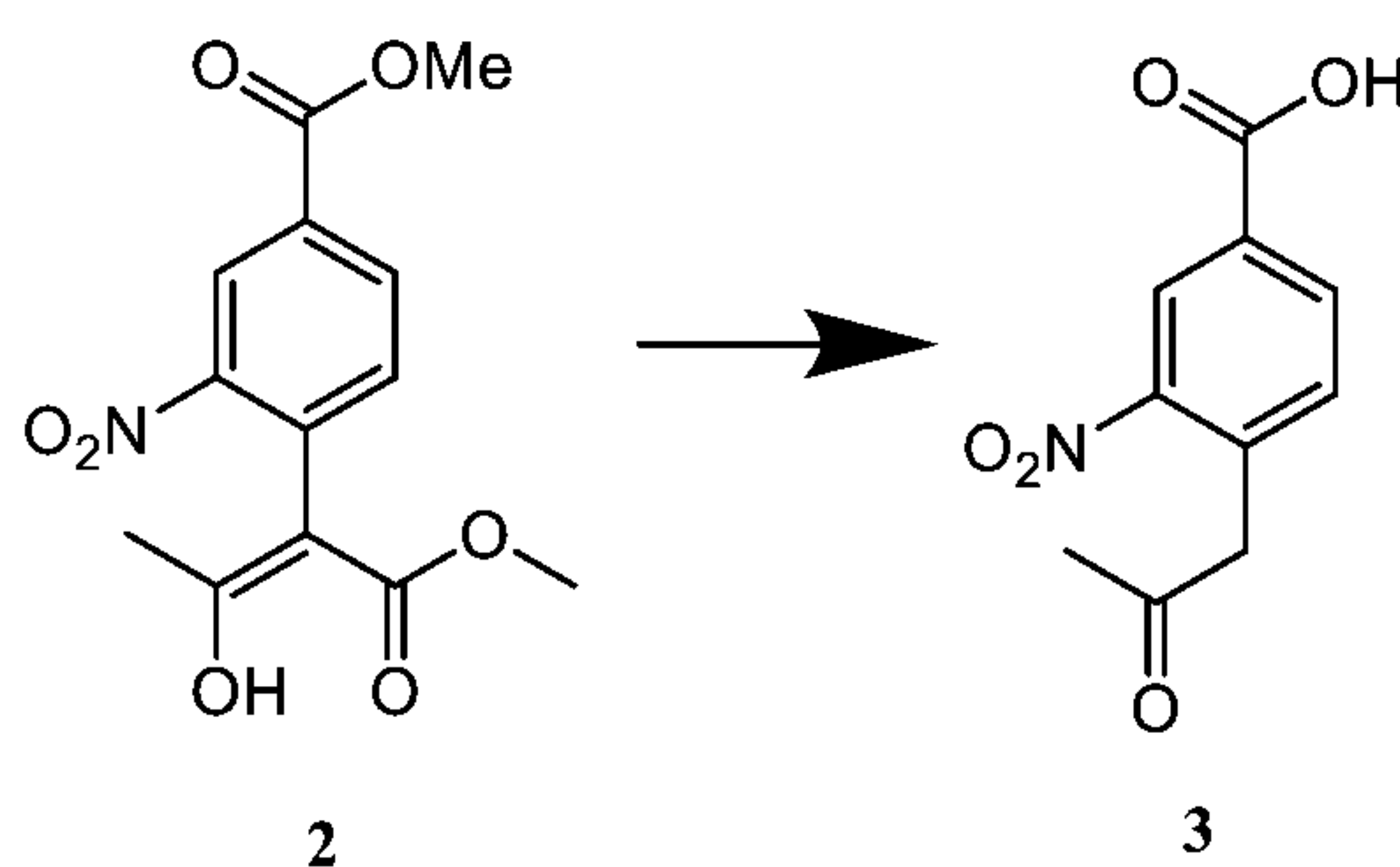
2. 3-硝基-4-(2-側氧基丙基)苯甲酸的製備

A. (Z)-甲基 4-(3-羥基-1-甲氧基-1-側氧基丁-2-烯-2-基)-3-硝基苯甲酸酯(2)



【0300】 可以將來自前一步驟的3.98 kg 甲基 4-氟-3-硝基苯甲酸酯(1)、9.8 kg DMF、和2.81 kg 乙醯乙酸甲酯添加至100 L 燒瓶中。將該混合物攪拌並冷卻至0°C。在約4小時內添加3.66 kg的DBU，同時將溫度維持在5°C或以下。將該混合物再攪拌1小時。添加8.15 kg 檸檬酸在37.5 kg 純淨水中的溶液，同時將反應溫度維持在15°C或以下。添加後，將該反應混合物再攪拌30分鐘，然後在氮氣下過濾。將濕濾餅與14.8 kg的純淨水一起返回到100 L 燒瓶中。將漿料攪拌10分鐘，然後過濾。再次將濕餅返回到100 L 燒瓶中，用14.8 kg的純淨水製漿10分鐘，並過濾成粗(Z)-甲基 4-(3-羥基-1-甲氧基-1-側氧基丁-2-烯-2-基)-3-硝基苯甲酸酯。

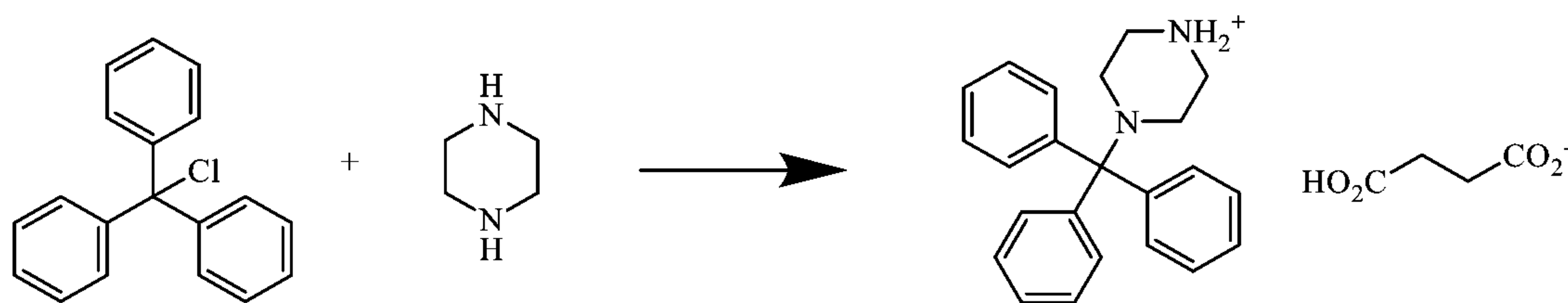
B. 3-硝基-4-(2-側氧基丙基)苯甲酸



【0301】 可以在氮氣下將該粗(Z)-甲基 4-(3-羥基-1-甲氧基-1-側氧基丁-2-烯-2-基)-3-硝基苯甲酸酯裝入100 L 反應燒瓶中。添加14.2 kg的

1,4-二噁唑，然後攪拌。在2小時內添加16.655 kg濃HCl和13.33 kg純淨水(6M HCl)的溶液，同時將該反應混合物的溫度維持在15°C以下。添加完成後，將該反應混合物在回流(80°C)下加熱24小時，冷卻至室溫，並在氮氣下過濾。將該固體濾餅用14.8 kg的純淨水研磨，過濾，再次用14.8 kg的純淨水研磨，並過濾。將該固體與39.9 kg的DCM一起返回到100 L燒瓶中，並在攪拌下回流1小時。添加1.5 kg的純淨水以溶解剩餘的固體。將底部有機層分至預溫熱的72 L燒瓶中，然後返回至潔淨乾燥的100 L燒瓶中。將該溶液冷卻至0°C，保持1小時，然後過濾。將該固體濾餅每次用9.8 kg DCM和5 kg庚烷的溶液洗滌兩次，然後在漏斗上乾燥。將該固體轉移至託盤並乾燥至1.855 kg恒重的3-硝基-4-(2-側氧基丙基)苯甲酸。

3. N-三苯甲基哌啶琥珀酸酯(NTP)的製備

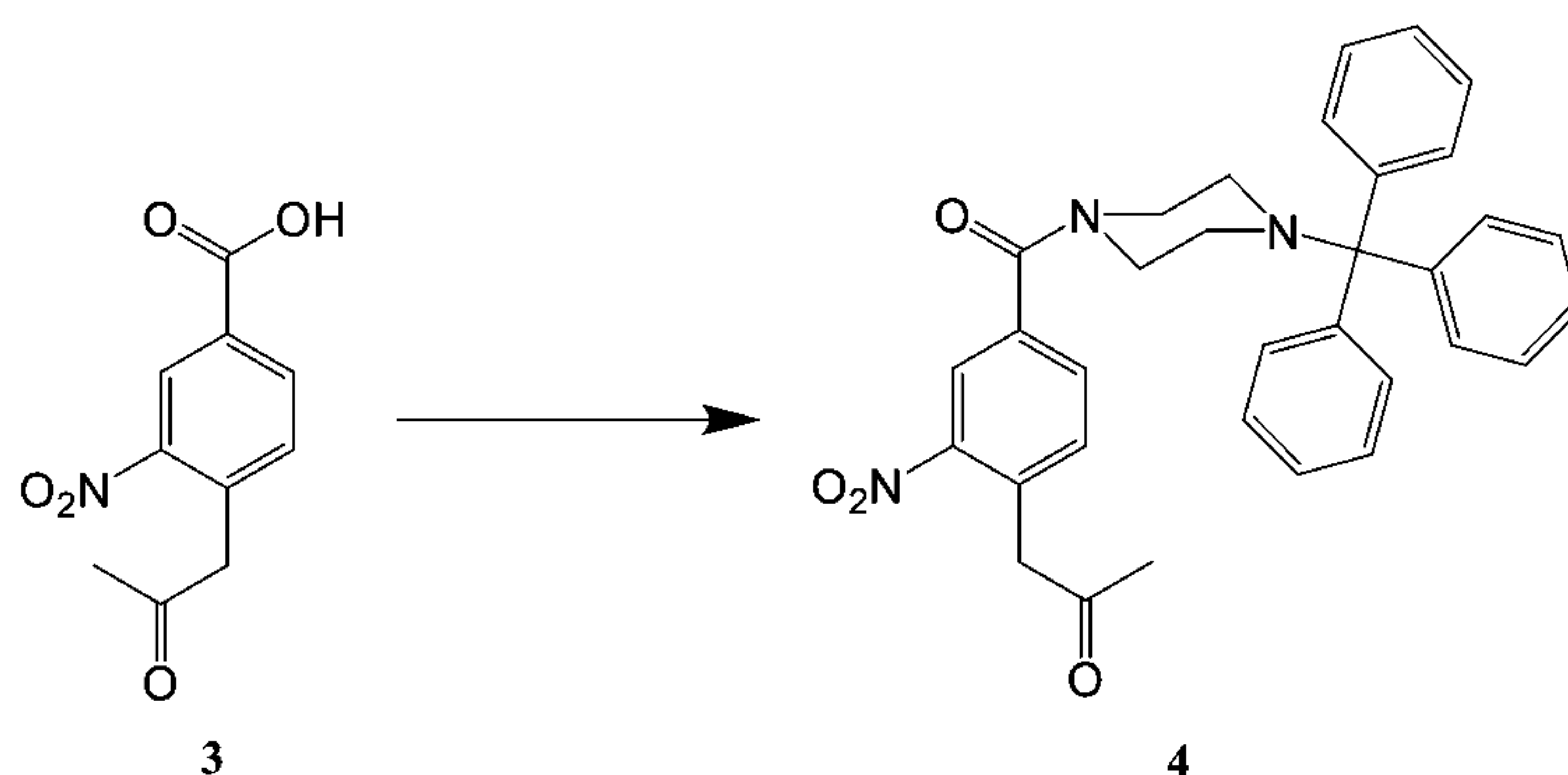


【0302】可以在氮氣下將1.805 kg三苯基甲基氯和8.3 kg的甲苯(TPC溶液)裝入72 L帶夾套的燒瓶中。攪拌該混合物，直至固體溶解。在氮氣下，將5.61 kg哌啶、19.9 kg甲苯、和3.72 kg甲醇添加至100 L帶夾套的反應燒瓶中。將該混合物攪拌並冷卻至0°C。在4小時內分批緩慢添加TPC溶液，同時將反應溫度維持在10°C或以下。將該混合物在10°C下攪拌1.5小時，然後允許其溫熱至14°C。可以將32.6 kg的純淨水裝入72 L燒瓶中，然後轉移至100 L燒瓶中，同時將內部批料溫度維持在20°C ± 5°C。允許各層分開，並且將底部水層分離並儲存。將該有機層每次用32 kg的純淨水萃取三次，並且將水層分離並與儲存的水性溶液合併。

【0303】 將剩餘的有機層冷卻至18°C，並將847 g琥珀酸在10.87 kg純淨水中的溶液分批緩慢添加至該有機層中。將該混合物在20°C ± 5°C下攪拌1.75小時。將該混合物過濾，並且將固體用2 kg TBME和2 kg的丙酮洗滌，然後在漏斗上乾燥。將該濾餅每次用5.7 kg的丙酮研磨兩次，並在研磨之間用1 kg的丙酮過濾並洗滌。將該固體在漏斗上乾燥，然後轉移至託盤，並在真空烘箱中於室溫下乾燥至恒重。

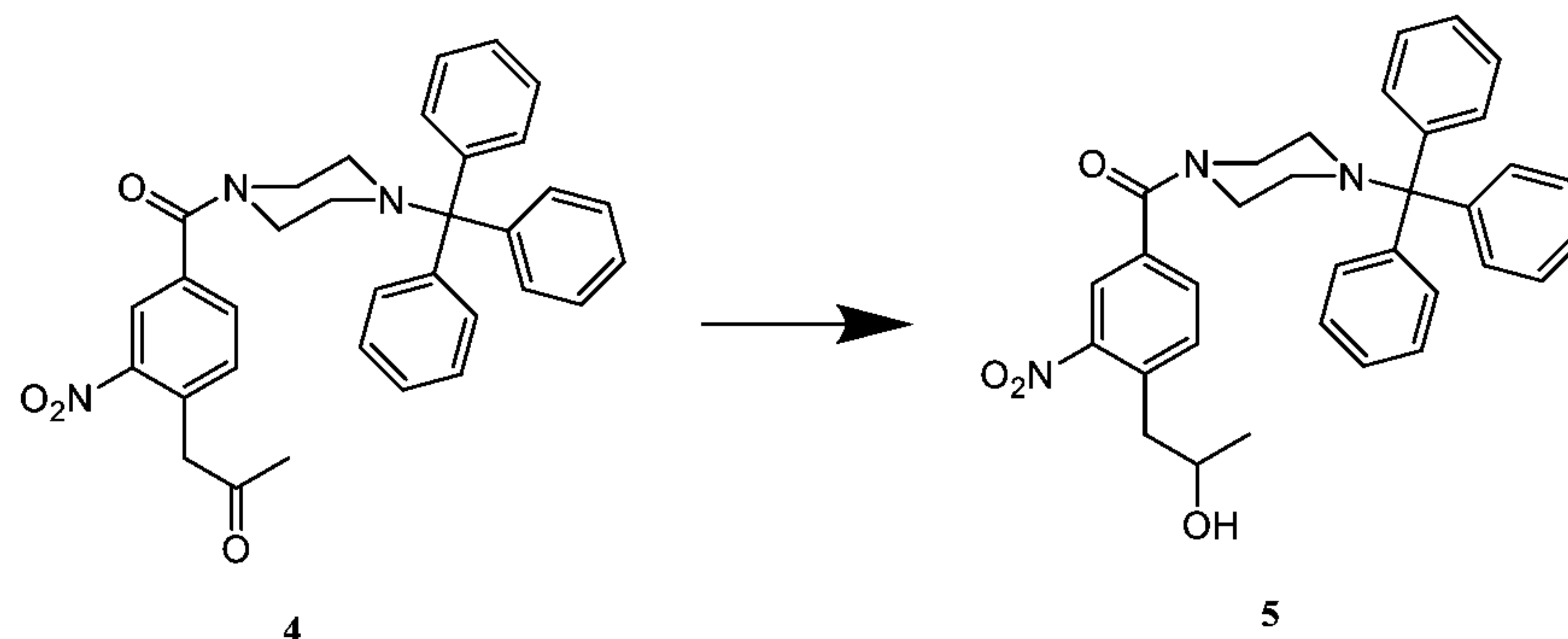
4. (4-(2-羥丙基)-3-硝基苯基)(4-三苯甲基哌啶-1-基)甲酮的製備

A.1-(2-硝基-4(4-三苯甲基哌啶-1-羰基)苯基)丙-2-酮的製備



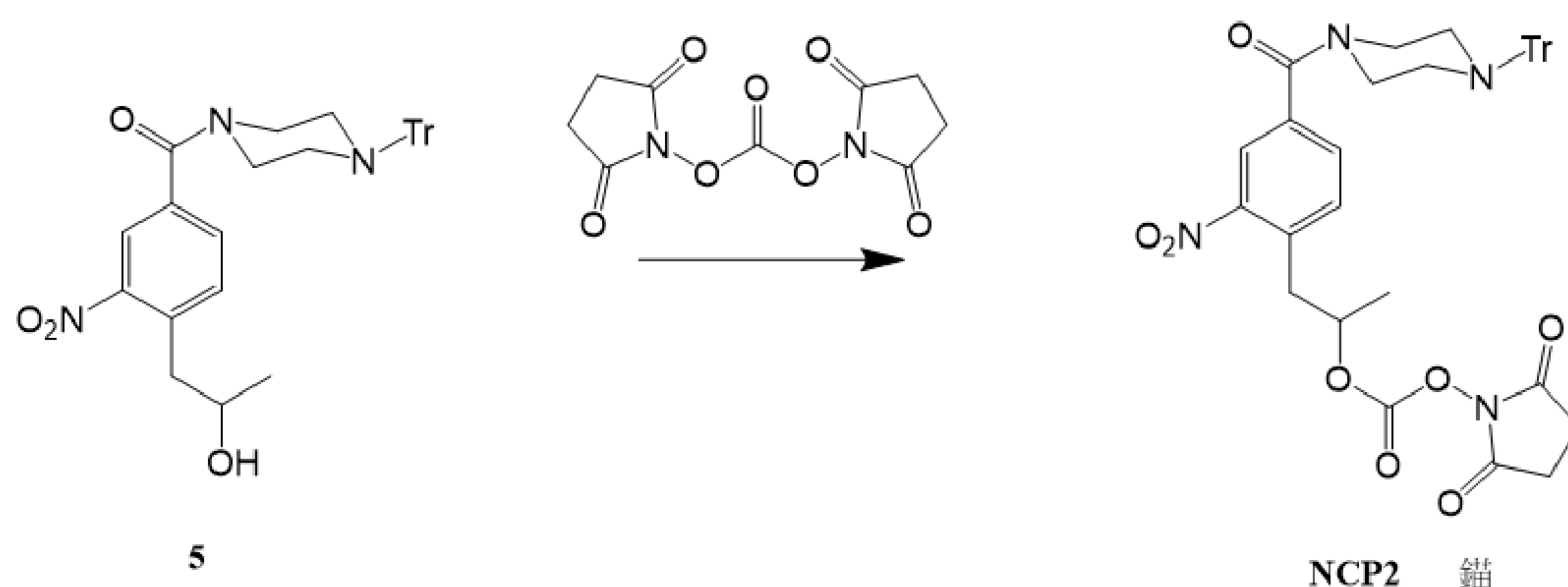
達到在THF中2.5體積的粗1-(2-硝基-4-(4-三苯甲基哌啶-1-羰基)苯基)丙-2-酮。

B.(4-(2-羥丙基)-3-硝基苯基)(4-三苯甲基哌啶-1-基)甲酮(**5**)的製備



【0305】可以在氮氣下將來自前一步驟的3600 g的**4**和9800 g THF裝入100 L帶夾套的燒瓶中。將該攪拌溶液冷卻至 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 。將該溶液用11525 g乙醇稀釋，並在 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 下於約2小時內添加194 g的硼氫化鈉。將該反應混合物在 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 下再攪拌2小時。藉由緩慢添加，用1.1 kg氯化銨在3 kg水中的溶液淬滅該反應，以維持溫度在 $\leq 10^{\circ}\text{C}$ 。將該反應混合物再攪拌30分鐘，過濾以去除無機物，再裝入100 L帶夾套的燒瓶中，並用23 kg的DCM萃取。將該有機層分離，並且將該水層每次用4.7 kg的DCM再萃取兩次。將合併的有機層用800 g氯化鈉在3 kg水中的溶液洗滌，然後經2.7 kg的硫酸鈉乾燥。將該懸浮液過濾，並將該濾餅用2 kg的DCM洗滌。將合併的濾液濃縮至2.0體積，用360 g的乙酸乙酯稀釋，並蒸發。在氮氣下，將粗產物載入到用DCM填充的4 kg矽膠的矽膠柱上，並且用在7.2 kg DCM中的2.3 kg乙酸乙酯洗脫。將合併的級分蒸發，並將殘餘物吸收在11.7 kg的甲苯中。將該甲苯溶液過濾，並將該濾餅每次用2 kg的甲苯洗滌兩次。將該濾餅乾燥至恒重。

5. 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基(1-(2-硝基-4-(4-三苯基甲基哌啶-1-羰基)苯基)丙-2-基)碳酸酯(**NCP2錨**)的製備



【0306】可以在氮氣下將4.3 kg的化合物**5**(藉由¹H NMR基於殘餘甲苯調整的重量；之後的所有試劑均按比例標度)和12.7 kg吡啶裝入100 L帶夾套的燒瓶中。向其中添加3.160 kg的DSC(藉由¹H NMR測定為78.91重量%)，同時將內部溫度維持在 $\leq 35^{\circ}\text{C}$ 。將該反應混合物在環境室溫下老化約22小時，然後過濾。將該濾餅用200 g的吡啶洗滌。在兩個批次中，每批包含 $\frac{1}{2}$ 的濾液體積，可以將濾液洗滌液緩慢裝入含有11 kg檸檬酸和50 kg水的100 L帶夾套的燒瓶中，並且攪拌30分鐘以允許固體沈澱。將該固體用過濾漏斗收集，每次洗滌用4.3 kg的水洗滌兩次，並在真空下在過濾漏斗上乾燥。

【0307】可以將合併的固體裝入100 L帶夾套的燒瓶中，並溶解在28 kg的DCM中，並用900 g碳酸鉀在4.3 kg水中的溶液洗滌。1小時後，允許各層分離並去除水層。將該有機層用10 kg的水洗滌，分離，並經3.5 kg的硫酸鈉乾燥。將DCM過濾，蒸發並在真空下乾燥至6.16 kg的NCP2錨。

NCP2錨負載的樹脂合成

【0308】可以將約52 L的NMP和2300 g的胺基甲基聚苯乙烯樹脂裝入帶有特氟龍旋塞的75 L固相合成反應器中。將樹脂在NMP中攪拌至溶脹約2小時，然後排乾。將該樹脂每次洗滌用4 L DCM洗滌兩次，然後每

次洗滌用39 L的中和溶液洗滌兩次，然後每次洗滌用39 L的DCM洗滌兩次。將NCP2錨溶液緩慢添加至攪拌的樹脂溶液中，在室溫下攪拌24小時，並排乾。將該樹脂每次洗滌用39 L的NMP洗滌四次，並且每次洗滌用39 L的DCM洗滌六次。將該樹脂與½碳酸二乙酯(DEDIC)封端溶液一起處理並攪拌30分鐘，排乾，然後將其與DEDIC封端溶液的另一半一起處理並攪拌30分鐘，並排乾。將該樹脂每次洗滌用39 L的DCM洗滌六次，然後在烘箱中乾燥至恒重為3573.71 g錨負載的樹脂。

使用NCP2錨製備咪啉代寡聚體

50 L PMO粗藥物物質的固相合成

1. 材料

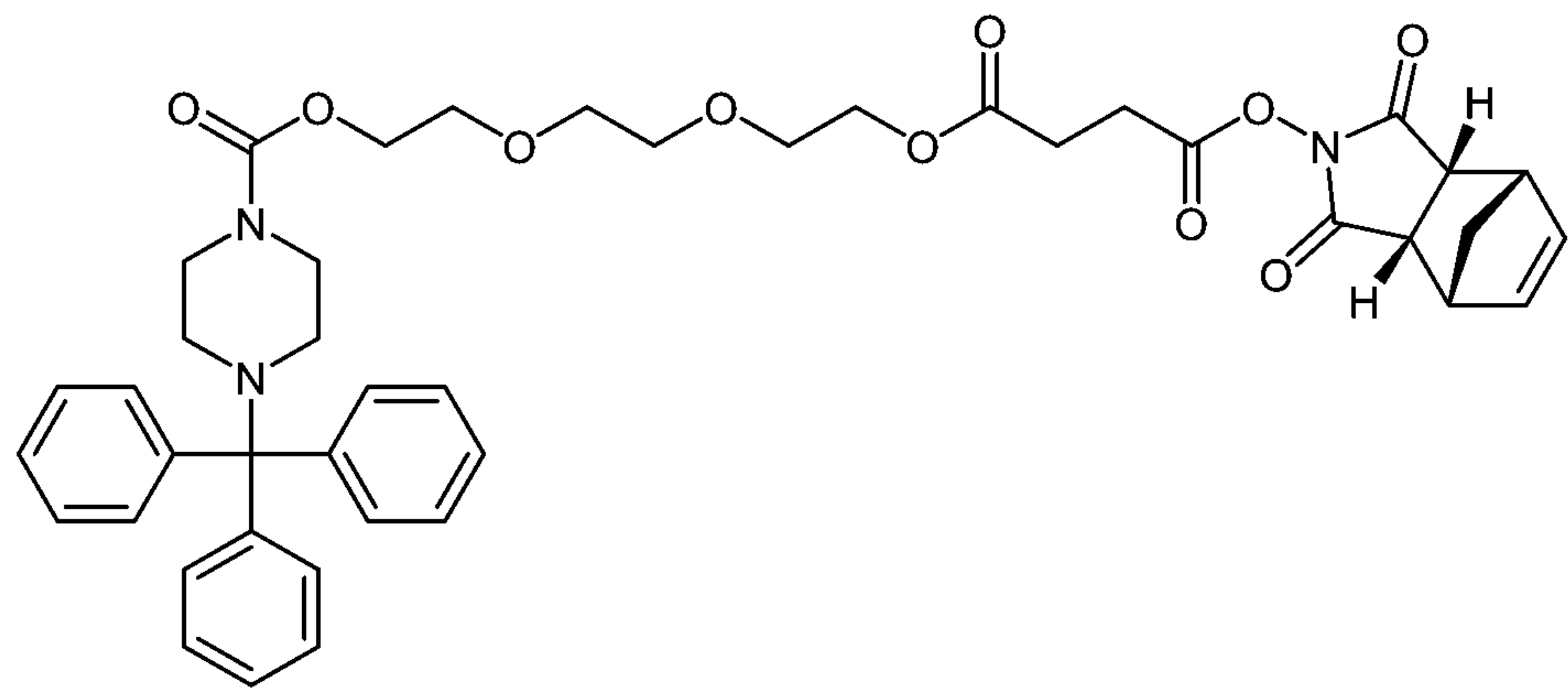
[表2]：起始材料

材 料 名 稱	化學名稱	CAS號	化學式	分子量
激 活 的 A亞基	磷醯胺氯酸, <i>N,N</i> -二甲基-,[6-[6-(苯甲醯基胺基)-9H-嘌呤-9-基]-4-(三苯基甲基)-2-咪啉基]甲基酯	1155373-30-0	C ₃₈ H ₃₇ ClN ₇ O ₄ P	722.2
激 活 的 C亞基	磷醯胺氯酸, <i>N,N</i> -二甲基-,[6-[4-(苯甲醯基胺基)-2-側氧基-1(2H)-嘓啖基]-4-(三苯基甲基)-2-咪啉基]甲基酯	1155373-31-1	C ₃₇ H ₃₇ ClN ₅ O ₅ P	698.2
激 活 的 DPG 亞基	丙酸, 2,2-二甲基-,4-[[[9-[6-[[[氯(二甲基胺基)氧磷基]氧基]甲基]-4-(三苯基甲基)-2-咪啉基]-2-[(2-苯基乙醯基)胺基]-9H-嘌呤-6-基]氧基]甲基]苯基酯	1155309-89-9	C ₅₁ H ₅₃ ClN ₇ O ₇ P	942.2
激 活 的 T亞基	磷醯胺氯酸, <i>N,N</i> -二甲基-,[6-(3,4- 二 氫 -5- 甲 基 -	1155373-34-4	C ₃₁ H ₃₄ ClN ₄ O ₅ P	609.1

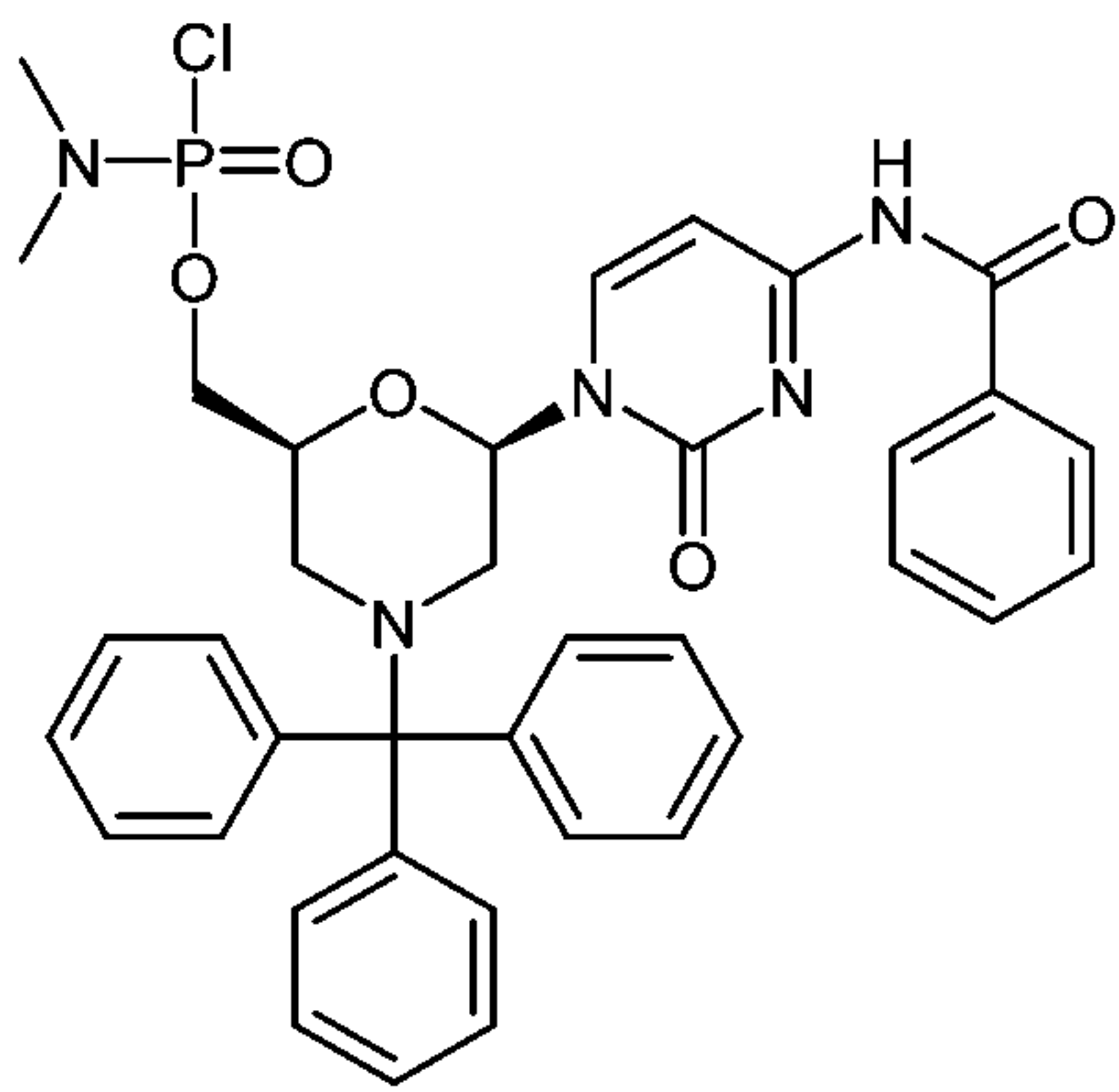
	2,4- 二側氧基-1(2H)- 嘧啶基)]-4-(三苯基甲基)-2-咪啉基]甲基酯			
激 活 的 EG3尾	丁 二 酸 ， 1-[3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-六氫-1,3-二側氧基-4,7- 甲醇-2H- 異 呔 啉 -2- 基] 4-[2-[2-[2-[[[4-(三苯基甲基)-1- 哌 咩 基]羰基]氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]酯	1380600-06-5	C ₄₃ H ₄₇ N ₃ O ₁₀	765.9

【0309】 起始材料的化學結構：

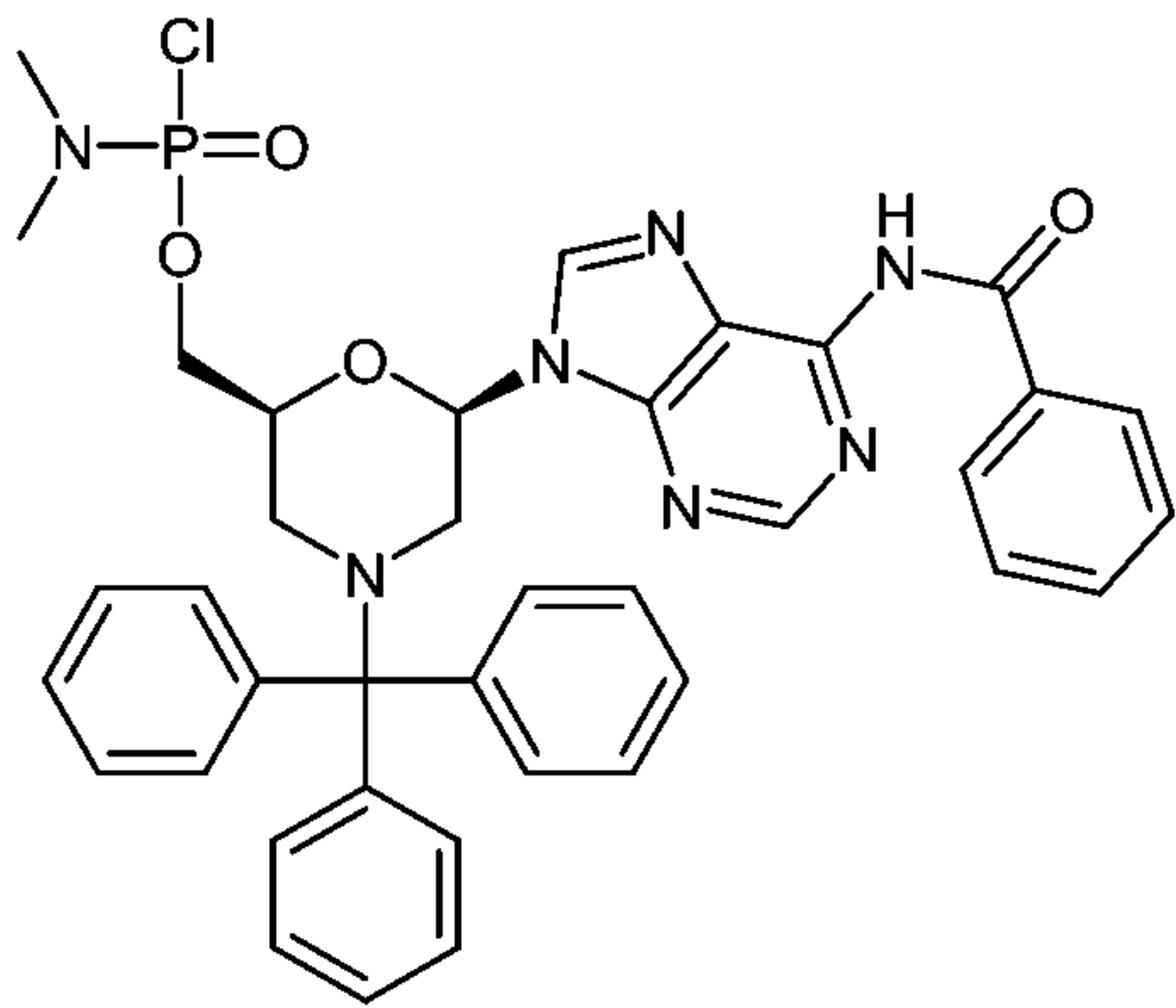
A.激活的EG3尾



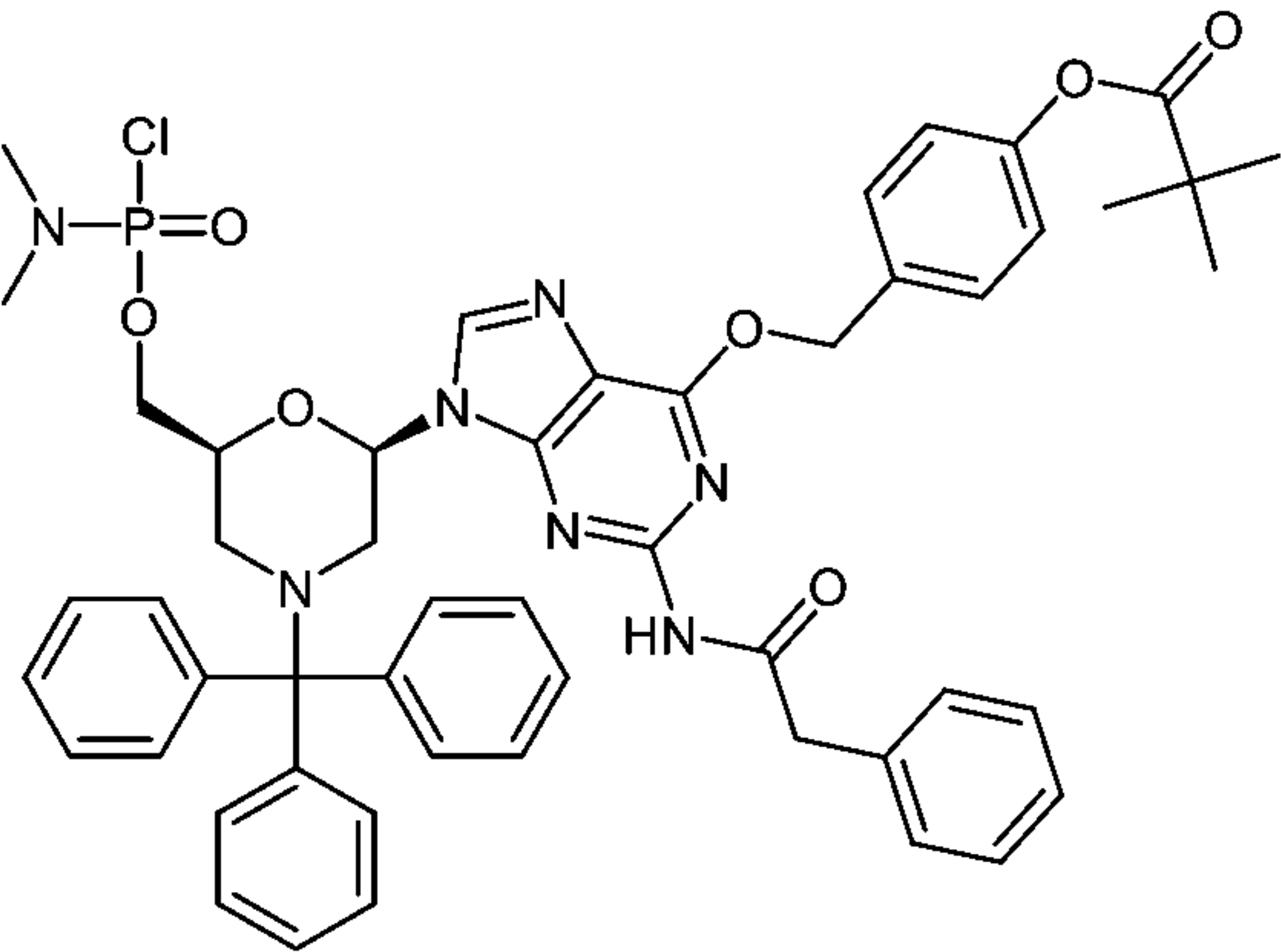
B.激活的C亞基(有關製備，參見美國專利案號8,067,571)



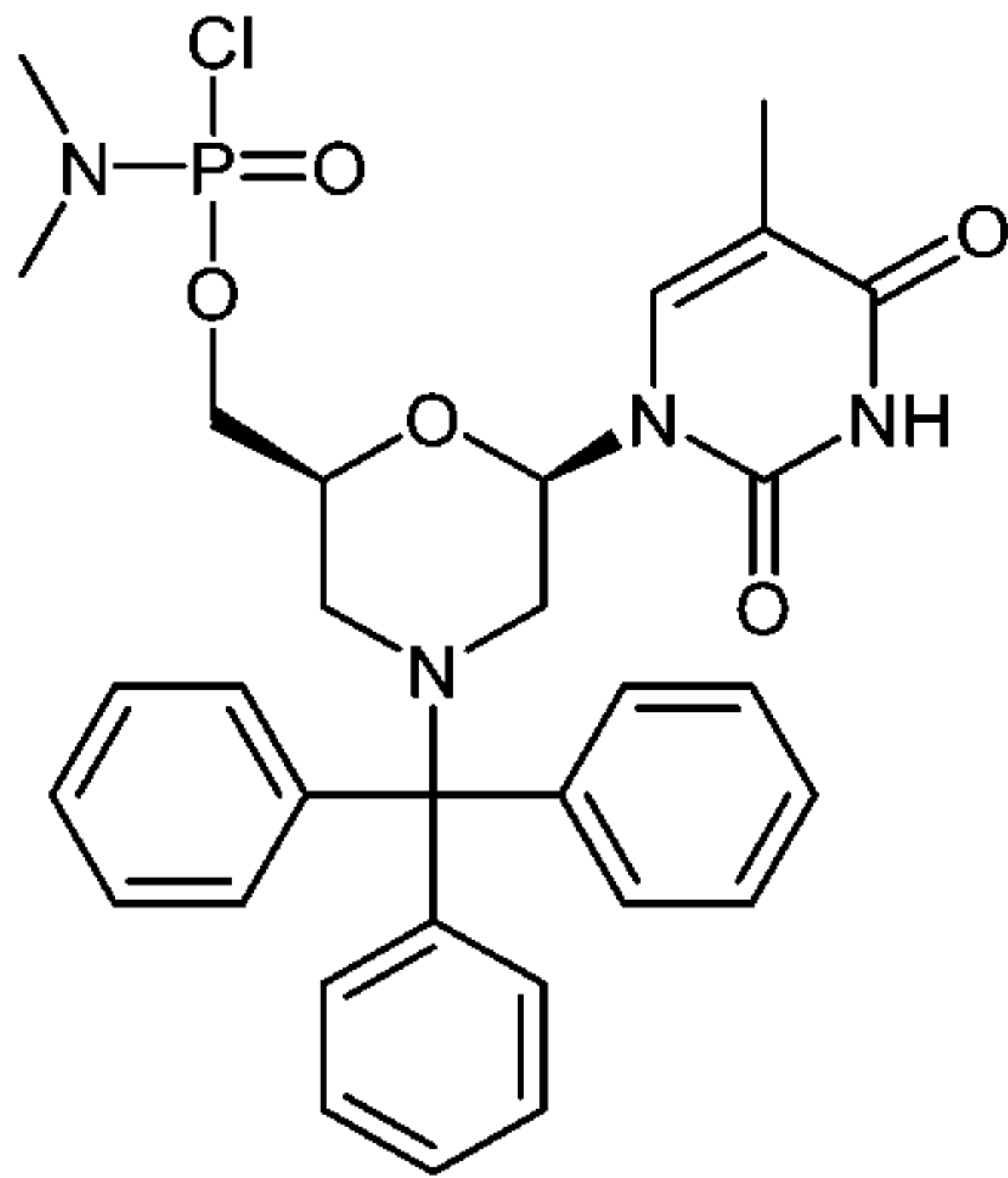
C.激活的A亞基(有關製備，參見美國專利案號8,067,571)



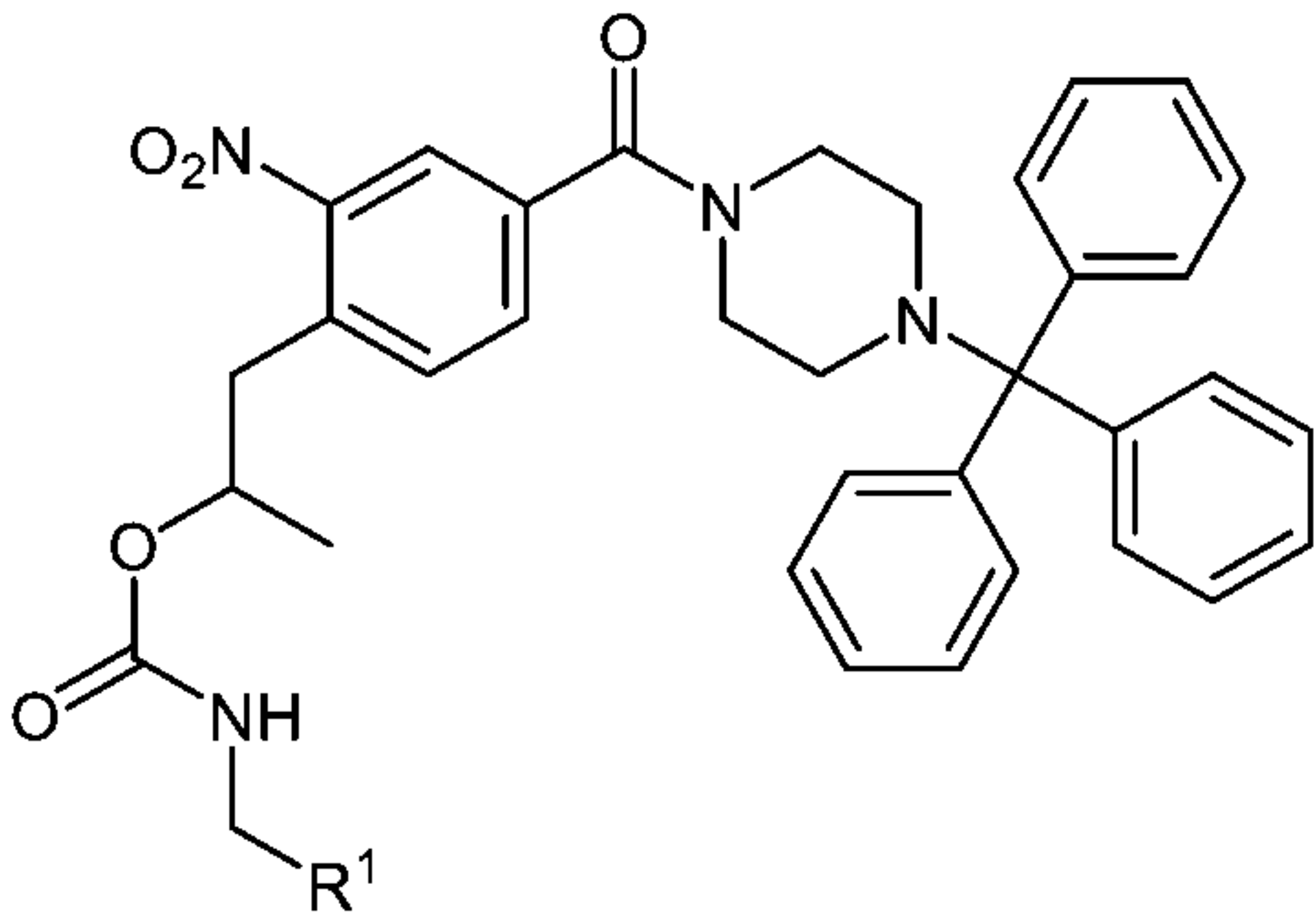
D.激活的DPG亞基(有關製備，參見WO 2009/064471)



E.激活的T亞基(有關製備，參見WO 2013/082551)



F.錨負載的樹脂



其中R¹係支持介質。

[表3]：用於PMO粗藥物物質的固相寡聚體合成的溶液的描述

溶液名稱	溶液組成
NCP2錨溶液	37.5 L NMP和1292 g NCP2錨
DEDC封端溶液	4.16 L碳酸二乙酯(DEDC)，3.64 L NEM，和33.8 L DCM
CYTFA溶液	2.02 kg 4-氰基吡啶，158 L DCM，1.42 L TFA，39 L TFE，和2 L純淨水
中和溶液	35.3 L IPA，7.5 L DIPEA，和106.5 L DCM
切割溶液	1,530.04 g DTT，6.96 L NMP，和2.98 L DBU

2. PMO粗藥物物質的合成

A. 樹脂溶脹

【0310】 可以將等分試樣的750 g錨負載的樹脂和10.5 L NMP裝入50 L矽烷化的反應器中並攪拌3小時。排乾NMP，並且將該錨負載的樹脂每次用5.5 L的DCM洗滌兩次，且每次用5.5 L的30% TFE/DCM洗滌兩次。

B. 循環0：EG3尾偶合

【0311】 將該錨負載的樹脂每次用5.5 L的30% TFE/DCM洗滌三次並排乾，用5.5 L的CYTFA溶液洗滌15分鐘並排乾，並且再次用5.5 L的CYTFA溶液洗滌15分鐘但不排乾，可以將122 mL的1:1 NEM/DCM裝入其中，並且將懸浮液攪拌2分鐘並排乾。將該樹脂用5.5 L的中和溶液洗滌兩次，持續5分鐘，並排乾，然後每次用5.5 L的DCM洗滌兩次並排乾。可以將706.2 g激活的EG3尾和234 mL NEM在3 L DMI中的溶液裝入樹脂中，並且在RT下攪拌3小時並排乾。將該樹脂每次用5.5 L的中和溶液洗滌兩次，每次洗滌持續5分鐘，然後用5.5 L的DCM洗滌一次並排乾。可以將374.8 g 苯甲酸酐和195 mL NEM在2680 mL NMP中的溶液裝入，並且攪拌15分鐘並排乾。將該樹脂與5.5 L的中和溶液一起攪拌5分鐘，然後用5.5 L的DCM洗滌一次，並且每次用5.5 L的30% TFE/DCM洗滌兩次。將該樹脂懸浮在5.5 L的30% TFE/DCM中並保持14小時。

C.亞基偶合循環1-n

[表4]-通用鹼基亞基偶合

循環 編號： 亞基 (SU)	前偶合處理				偶合循環		後偶合處理	
	1	2	3	4			1	2
	30% TFE/ DCM 洗滌液	CYTFA 溶液 ¹	中和 溶液	DCM 洗滌 液	數量 SU(g) NEM(L) DMI(L)	RT偶合 時間 (小時)	DCM 洗滌 液	30% TFE/ DCM 洗滌液
1:C	5.5 L	a) 5.5 L b) 5.5 L，122 mL	3x5.5 L	5.5 L	536.7 g； 195 mL NEM； 3.2L DMI	5	5.5 L	2x5.5 L

¹ mL指示1:1 NEM/DCM的量

i. 前偶合處理

【0312】 在每個偶合循環之前，該樹脂：1) 用30% TFE/DCM洗滌；2) a) 用CYTFA溶液處理15分鐘並排乾，和 b) 用CYTFA溶液處理15分鐘，向其中添加1:1 NEM/DCM，攪拌並排乾；3) 用中和溶液攪拌三次；和 4) 用DCM洗滌兩次。

ii.後偶合處理

【0313】 排乾每個亞基溶液後，該樹脂：1) 用DCM洗滌；和 2) 用30% TFE/DCM洗滌兩次。如果該樹脂在下一個偶合循環之前保持一段時間，則第二TFE/DCM洗滌不被排乾並且該樹脂被保留在所述TFE/DCM洗滌液中。

iii.激活的亞基偶合循環

【0314】 如表2中針對每個含鹼基的亞基的初始C(胞嘧啶)單體偶合的一般描述那樣進行每個偶合循環。

iv. 最終IPA洗滌

【0315】 在進行最終的偶合步驟之後，將該樹脂每次用19.5 L的IPA

洗滌8次，並在室溫下在真空下乾燥約63.5小時至乾燥後的重量為5,579.8 g。

C. 切割

【0316】將上述樹脂結合的PMO粗藥物物質分為兩批，每批按以下方式處理。將2,789.9 g批次的樹脂：1) 與10 L的NMP一起攪拌2小時，然後將NMP排乾；2) 每次用10 L的30% TFE/DCM洗滌三次；3) 用10 L CYTFA溶液處理15分鐘；和 4) 用10 L的CYTFA溶液處理15分鐘，然後向其中添加130 mL 1:1 NEM/DCM，攪拌2分鐘並排乾。將該樹脂每次用10 L的中和溶液處理三次，用10 L的DCM洗滌六次，並且每次用10 L的NMP洗滌八次。用1530.4 g DTT和2980 DBU在6.96 L NMP中的切割溶液處理樹脂2小時，以從樹脂中分離出PMO粗藥物物質。將該切割溶液排乾並保留在單獨的容器中。用4.97 L的NMP(其與該切割溶液合併)洗滌反應器和樹脂。

D. 脫保護

【0317】將合併的切割溶液和NMP洗滌液轉移至壓力容器中，向其中添加 39.8 L 在製冷機中預冷至 -10°C 至 -25°C 溫度的 $\text{NH}_4\text{OH}(\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O})$ 。將該壓力容器密封並加熱至 45°C 持續16小時，然後允許其冷卻至 25°C 。將該含PMO粗藥物物質的脫保護溶液用純淨水稀釋3:1，並用2 M磷酸將pH調節至3.0，然後用 NH_4OH 將pH調節至8.03。

E. PMO粗藥物物質的純化

【0318】將來自上述D部分的、含PMO粗藥物物質的脫保護溶液載入到ToyoPearl Super-Q 650S陰離子交換樹脂柱(東曹生物科技公司(Tosoh Bioscience))上，並經17個柱體積以0-35% B的梯度洗脫(緩衝劑

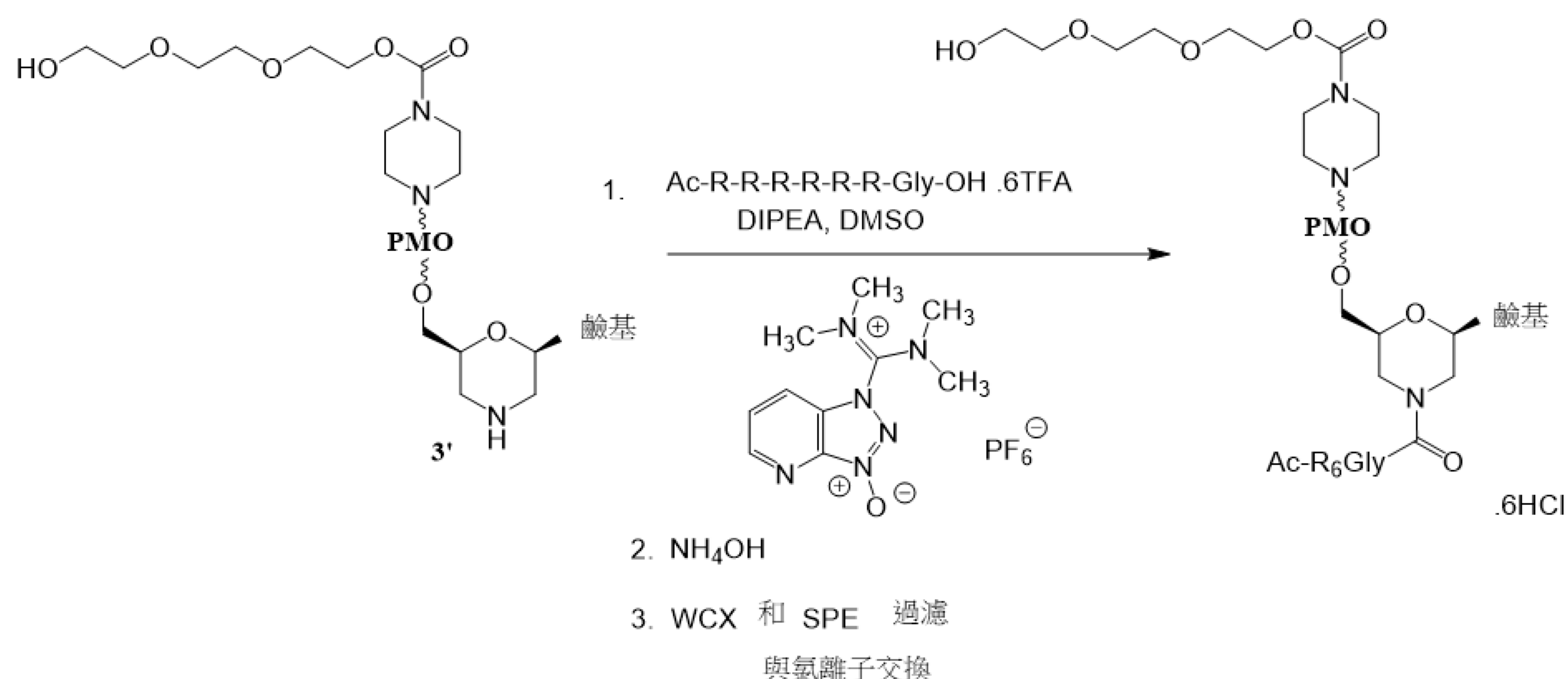
A：10 mM氫氧化鈉；緩衝劑B：在10 mM氫氧化鈉中的1 M氯化鈉)，並且將可接受純度的級分(C18和SCX HPLC)集合到純化的藥物產物溶液中。

【0319】 將純化的藥物物質溶液脫鹽並凍乾成純化的PMO藥物物質。

[表5].首字母縮略詞

首字母縮略詞	名稱
CYTFA	4-氰基吡啶三氟乙酸
CPP	細胞穿透肽
DBU	1,8-二氮雜雙環十一碳-7-烯
DCM	二氯甲烷
DEDC	碳酸二乙酯
DIPEA	N,N-二異丙基乙胺
DMI	1,3-二甲基-2-咪唑啉酮
DMSO	二甲基亞砷
DTT	DL-二硫蘇糖醇
HPLC	高效液相層析法
IPA	異丙醇
MW	分子量
NEM	N-乙基咪啉
NMP	N-甲基-2-吡咯啉酮
SAX	強陰離子交換
SCX	強陽離子交換
SPE	固相萃取
RT	室溫
TFA	2,2,2-三氟乙酸
TFE	2,2,2-三氟乙醇

CPP軀合(「R6Gly」被揭露為SEQ ID NO: 11)



【0320】分析程序：可以使用芥子酸 (SA) 基質在 Bruker Autoflex™ Speed 上記錄基質輔助的 LASER 解吸電離飛行時間質譜 (MALDI-TOF-MS)。可以使用 1.0 mL/min 的流速，在配備有 3000 二極體陣列檢測器和 ProPac™ SCX-20 柱 (250 x 4 mm) (pH = 2；30°C 柱溫) 的 Thermo Dionex UltiMate 3000 系統上進行 SCX-HPLC。流動相可以是 A (含 24 mM H₃PO₄ 的水中的 25% 乙腈) 和 B (含 1 M KCl 和 24 mM H₃PO₄ 的水中的 25% 乙腈)。可以採用以下梯度洗脫：0 min，35% B；2 min，35% B；22 min，80% B；25 min，80% B；25.1 min，35% B；30 min，35% B。

【0321】將 Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH (SEQ ID NO: 11) 三氟乙酸己酯 (614.7 mg，0.354 mmol) 和 1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1*H*-1,2,3-三唑并[4,5-*b*]吡啶鎘 3-氧化物六氟磷酸鹽 (HATU，134.4 mg，0.354 mmol) 以及二甲基亞砷 (DMSO，20 mL) 添加至 PMO 的混合物中 (藉由凍乾新鮮乾燥兩天)。將該混合物在室溫下攪拌 3 分鐘，然後添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (DIPEA，68.5 mg，0.530 mmol)。5 分鐘後，渾濁的混合物變成澄清溶液。可以藉由 SCX-HPLC 監測該反應。2 小時後，添加 20 mL 的 10% 氫氧化銨溶液 (2.8% NH₃*H₂O)。將該混合物在室溫下再攪

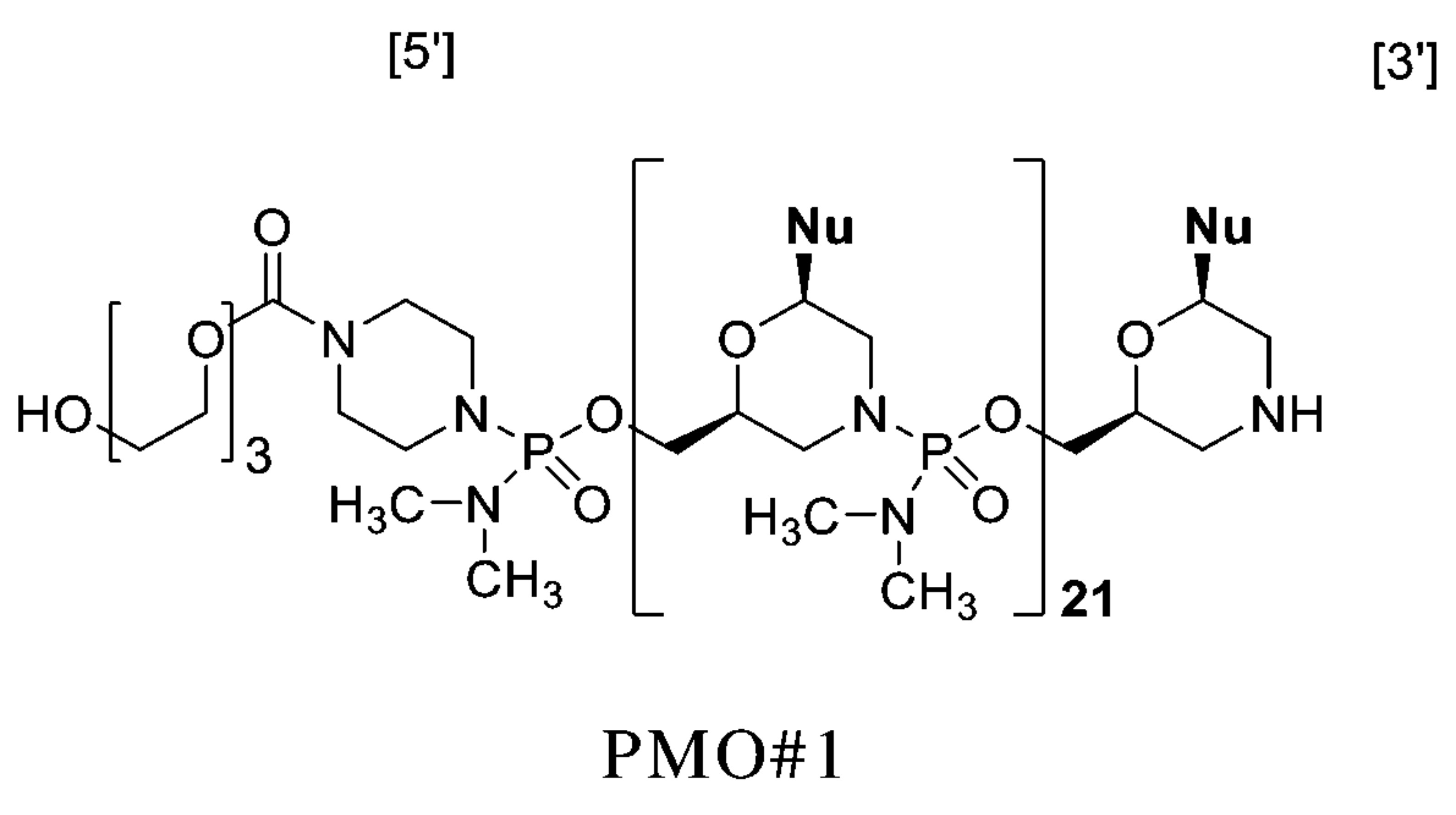
拌2小時。藉由添加400 mL水來終止該反應。將三氟乙醇(2.0 mL)添加至該溶液中。

【0322】 將該溶液分為兩部分，並且每部分都可以藉由WCX柱(每柱10 g樹脂)進行純化。首先，用水(v/v)中的20%乙腈洗滌每個WCX柱，以去除PMO起始材料。當MALDI-TOF質譜分析顯示不存在PMO信號時，可以停止洗滌(每個柱225 mL)。然後用水(每柱100 mL)洗滌每個柱。可以使用2.0 M鹽酸胍(每個柱140 mL)洗脫所需產物。將純化的溶液集合在一起，然後分成兩部分，每份均由SPE柱(每個柱10 g樹脂)脫鹽。

【0323】 首先，可以用1.0 M水性NaCl溶液(每個柱100 mL)洗滌SPE柱，以生成六鹽酸鹽形式。然後用水(每個柱200 mL)洗滌每個SPE柱。可以使用在水(v/v，每個柱150 mL)中的50%乙腈洗脫最終的脫鹽產物。可以藉由在減壓下抽空去除乙腈。可以將所得的水溶液凍乾，以獲得作為六鹽酸鹽的所需產物。

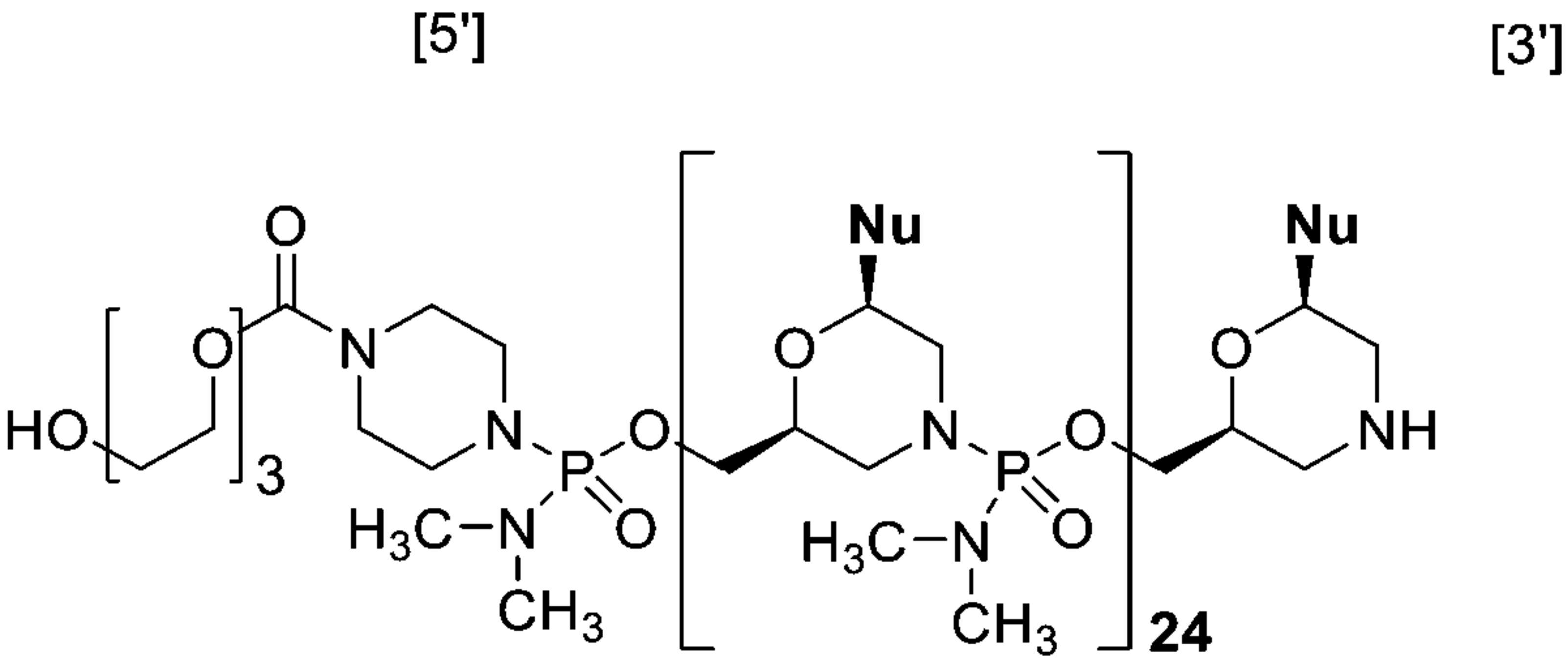
實例1：PMO

【0324】 使用上述PMO合成方法，可以如下合成PMO#1、PMO#2和PMO#3：



其中從1至22和從5'至3'，每個Nu係H50D(+04-18)(SEQ ID NO: 1)：

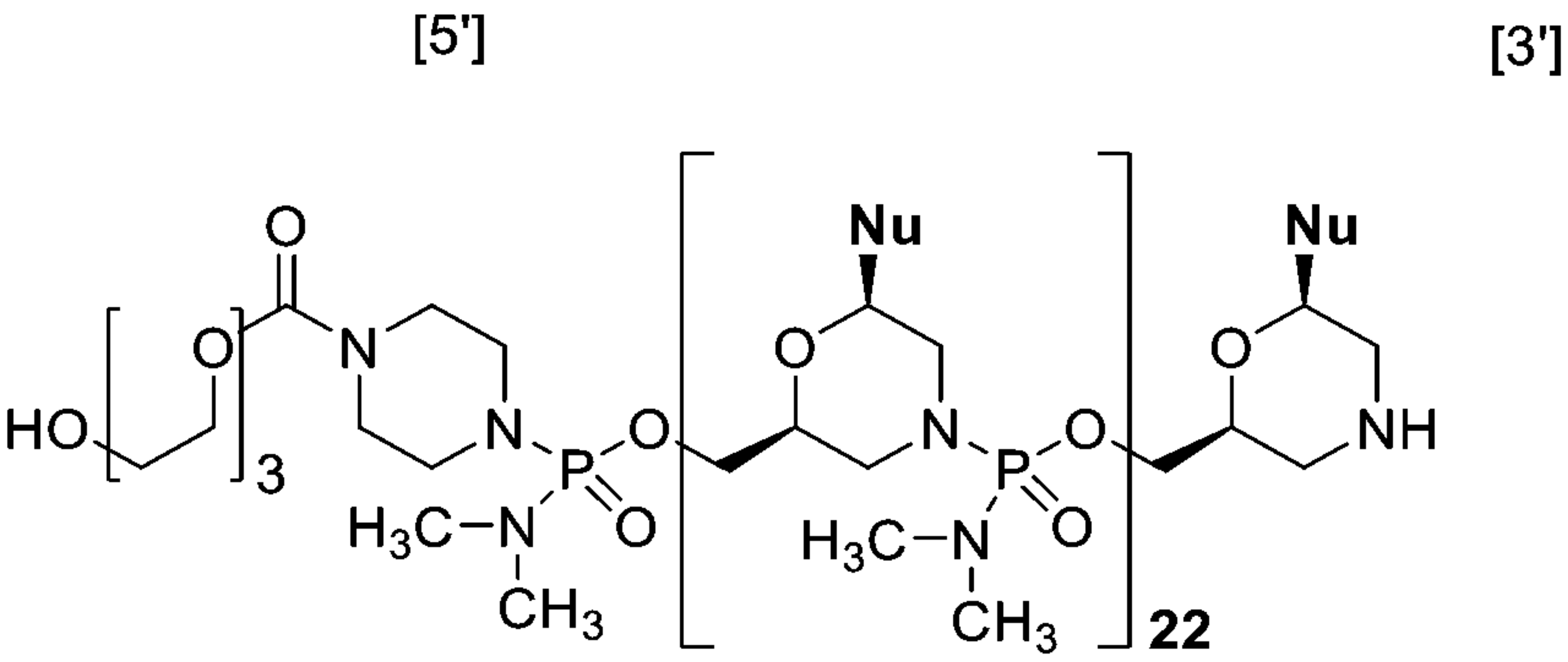
位置編號，5'至3'	Nu	位置編號，5'至3'	Nu	位置編號，5'至3'	Nu	位置編號，5'至3'	Nu	位置編號，5'至3'	Nu
1	G	6	C	11	A	16	T	21	G
2	G	7	C	12	T	17	A	22	C
3	G	8	A	13	A	18	C		
4	A	9	G	14	C	19	A		
5	T	10	T	15	T	20	G		



PMO#2

其中從1至25和從5’至3’， 每個Nu係H50D(+07-18)(SEQ ID NO: 2)：

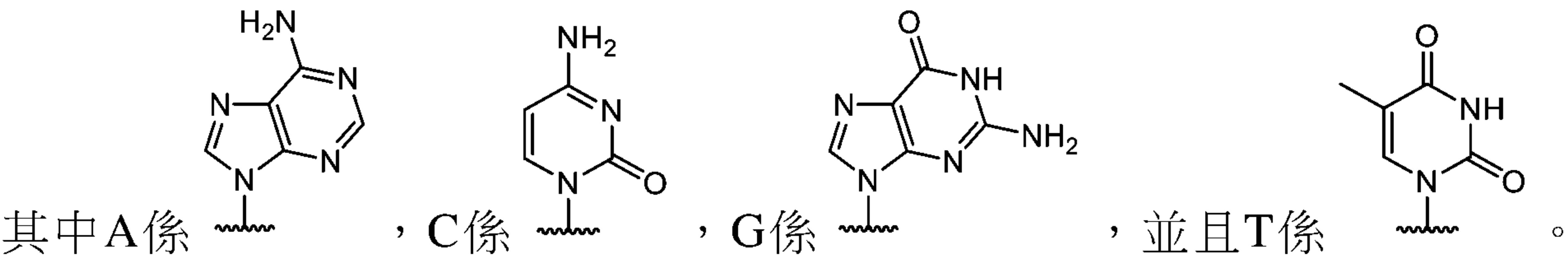
位置編號，5'至3'	Nu	位置編號，5'至3'	Nu	位置編號，5'至3'	Nu	位置編號，5'至3'	Nu	位置編號，5'至3'	Nu
1	G	6	C	11	A	16	T	21	G
2	G	7	C	12	T	17	A	22	C
3	G	8	A	13	A	18	C	23	T
4	A	9	G	14	C	19	A	24	C
5	T	10	T	15	T	20	G	25	C



PMO#3

其中從1至23和從5’至3’， 每個Nu係H50D(+07-16)(SEQ ID NO: 3)：

位置 編號， 5’至3’	Nu	位置 編號， 5’至3’	Nu	位置 編號， 5’至3’	Nu	位置 編號， 5’至3’	Nu	位置 編號， 5’至3’	Nu
1	G	6	A	11	A	16	C	21	T
2	A	7	G	12	C	17	A	22	C
3	T	8	T	13	T	18	G	23	C
4	C	9	A	14	T	19	G		
5	C	10	T	15	A	20	C		



【0325】 PMO#1(SEQ ID NO: 1)產出具有溶解性特徵(該等特徵太局限，無法用於藥物產物配製物)的產物，而PMO#2(SEQ ID NO: 2)產出不能以足夠的產率和純度製造的產物。

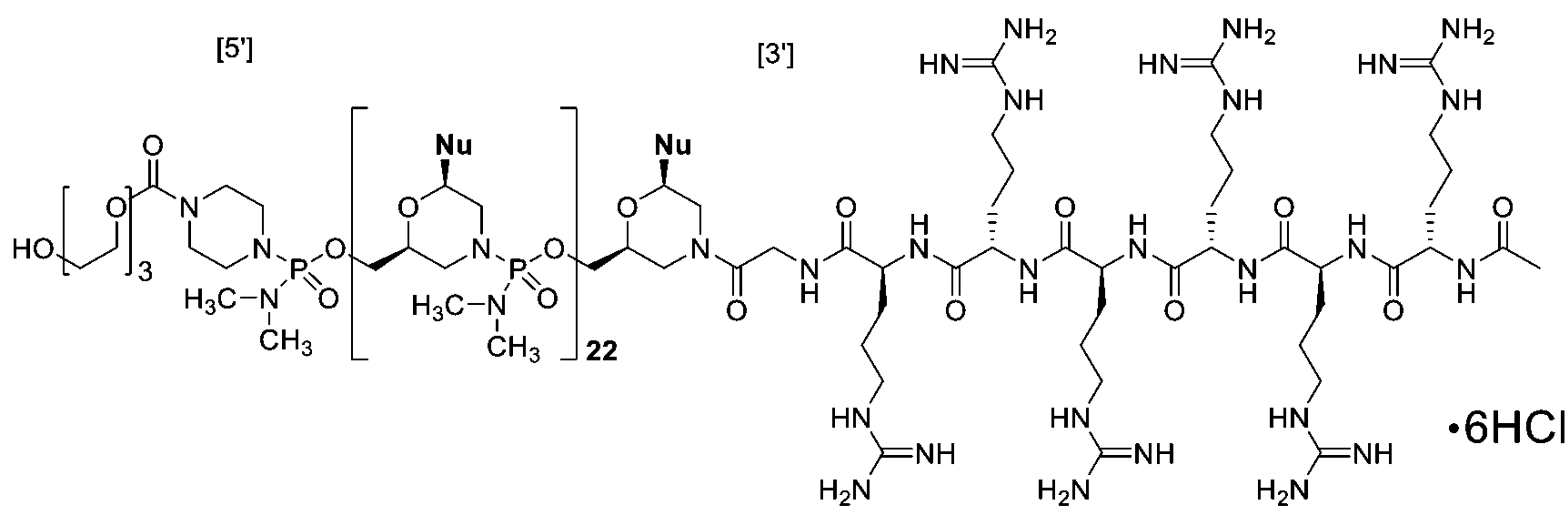
【0326】 與PMO#1和PMO#2的合成相反，PMO#3(與PMO#2的5’端僅相差2個鹼基)的合成沒有提供溶解性或純化問題，從而允許隨後由PMO#3合成PPMO#3(以下實例2)。

靶向序列(5’-3’)	SEQ ID NO：	PMO製造問題：
GGGATCCAGTATACTTACAGGC	1	溶解性：儲存後粗PMO沈澱出來，顯示出有限的溶解性和溶液穩定性，使得隨後的PPMO合成不可行，並充當藥物產物候選物。
GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	2	純化：無法將粗PMO純化到隨後的PPMO合成所需的適當純度水平，並充當藥物產物候選物。
GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	無(純度91%；溶於水)

【0327】 使用類似的過程來合成PMO#4、PMO#5、PMO#6、PMO#7、PMO#8和PMO#9。

實例2：PPMO#3

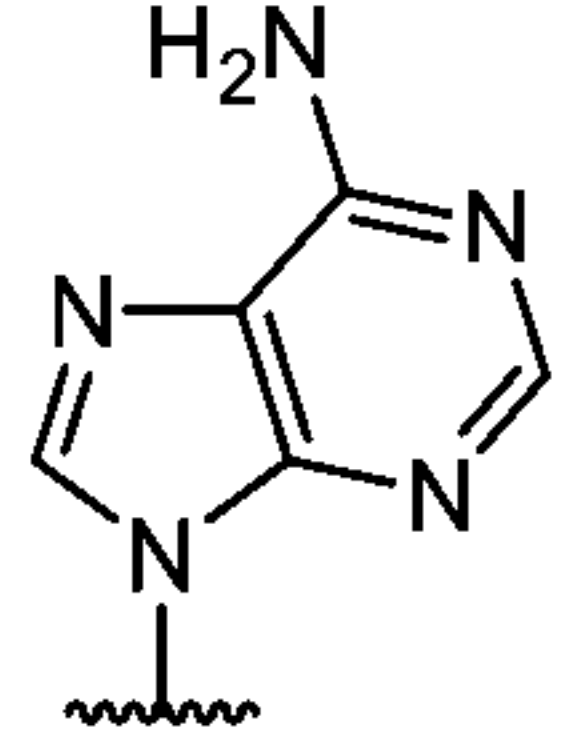
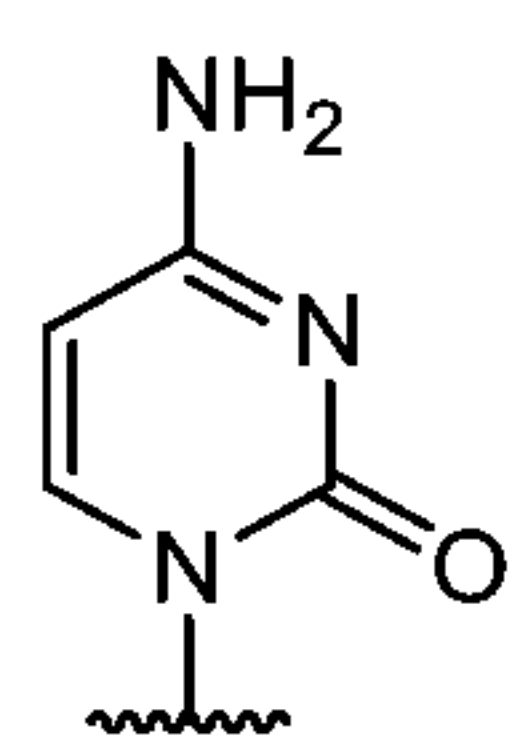
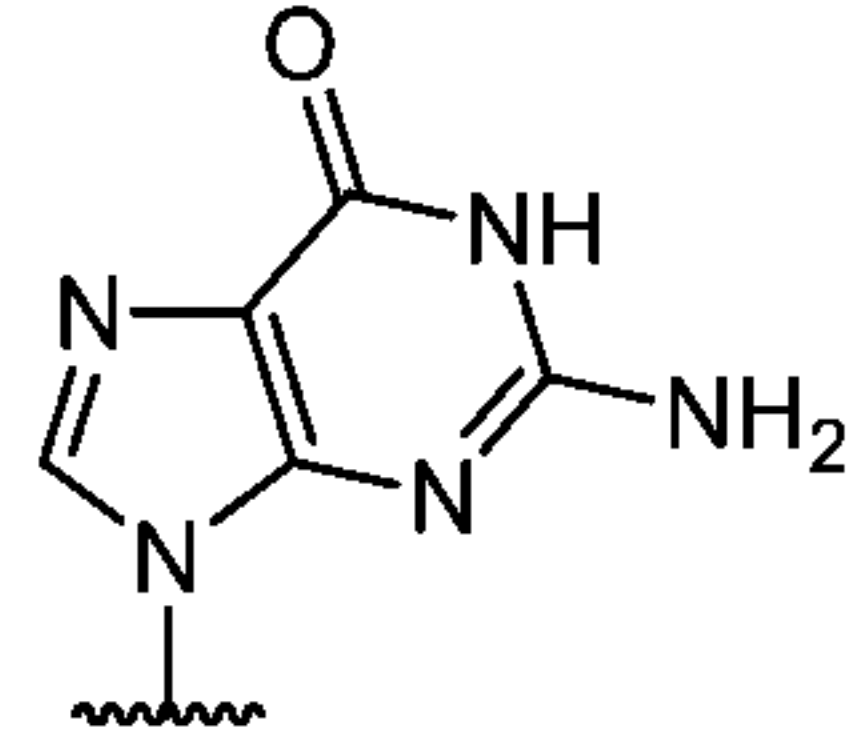
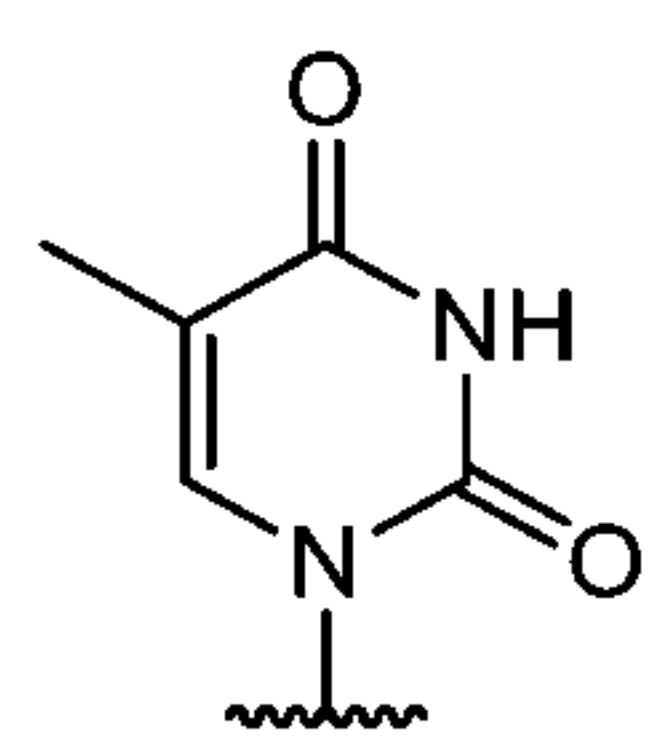
【0328】 使用上述方案，由PMO#3(SEQ ID NO: 3)合成PPMO#3：



PPMO#3

其中從1至23和從5’至3’，每個Nu係SEQ ID NO: 3：

位置 編號， 5’至3’	Nu	位置 編號， 5’至3’	Nu	位置 編號， 5’至3’	Nu	位置 編號， 5’至3’	Nu	位置 編號， 5’至3’	Nu
1	G	6	A	11	A	16	C	21	T
2	A	7	G	12	C	17	A	22	C
3	T	8	T	13	T	18	G	23	C
4	C	9	A	14	T	19	G		
5	C	10	T	15	A	20	C		

其中A係，C係，G係，並且T係。

實例3：體外外顯子50跳躍

【0329】 針對健康人肌管中*DMD*外顯子50跳躍，對如下表所述的靶向人肌養蛋白(*DMD*)外顯子50的兩種化合物PMO#3和PPMO#3(均含有相同序列)進行了評估。

PMO#3和PPMO#3的序列：

名稱	靶向序列(TS)	SEQ ID NO.	5’	3’
PMO#3	GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	EG3	H
PPMO#3	GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	EG3	-G-R ₆ (SEQ ID NO: 11)

【0330】 特別地，開始分化之前，藉由在低血清培養基(SKM-D，Zen-Bio公司)中孵育，將健康的人成肌細胞(第5-6代，購自Zen-Bio公司的SKB-F-SL)在SKM-M培養基中培養以達到80%-90%匯合。分化後五

天，將成熟的肌管與上述化合物以不同濃度(即40 μm、20 μm、10 μm、5 μm、2.5 μm、和1.25 μm)一起孵育。孵育96小時後，將肌管用PBS洗滌，並在補充有1% β-巯基乙醇的RNeasy微套組(目錄號74004，凱傑公司(Qiagen))中藉由RLT緩衝劑裂解。除了使用20 μL不含RNA酶的水洗脫RNA外，按照製造商的建議分離總RNA。

【0331】 為了確定兩種化合物的*DMD*外顯子50跳躍，進行了一步終點RT-PCR。cDNA合成和PCR擴增係藉由使用100 ng的總RNA、基因特異性引物和具有Platinum *Taq* DNA聚合酶(目錄號12574-026，英傑公司(Invitrogen))的SuperScript III一步RT-PCR系統進行的。基因特異性引物被設計用於靶向人*DMD*外顯子49和52(正向引物：CCA GCC ACT CAG CCA GTG AAG(SEQ ID NO: 12)；反向引物：CGA TCC GTA ATG ATT GTT CTA GCC(SEQ ID NO: 13))。cDNA合成和PCR擴增藉由伯樂公司CFX96即時熱循環儀使用表6中所示的程序進行。按照製造商的說明，藉由將22 μL PCR產物載入到由DNA 1K試劑(目錄號760517和CLS760673，珀金埃爾默公司)製備的LabChip GX系統的DNA Extended Range LabChip中，評估跳躍的和未跳躍的PCR產物的表現。將*DMD*外顯子50跳躍的百分比計算為外顯子50跳躍帶的莫耳濃度(nmol/l)與跳躍帶和未跳躍帶的總莫耳濃度的百分比。

【0332】 使用雙尾非配對學生t檢驗(同方差)來評估2組在各劑量下的平均值是否彼此具有統計學差異。*P*值 < 0.05被認為係統計上顯著的。

[表6]. 熱循環儀程序，用於擴增*DMD*擴增子(有或沒有外顯子50跳躍)。

步驟	溫度	時間
1. 逆轉錄	55°C	30 min
2. 逆轉錄酶失活	94°C	2 min
3. 變性	94°C	45 sec

4. 退火	59°C	45 sec
5. 延伸	68°C	1 min
6. 重複步驟3-4	45個循環	
7. 最終延伸	68°C	10 min
8. 儲存	4°C	∞

【0333】 結果呈現在下表中(作為PPMO#3與PMO#的跳躍比)，所述結果顯示如與PMO#3相比，PPMO#3顯著增加*DMD*外顯子50跳躍。

[表7]. PMO#3和PPMO#3引起的人肌管中*DMD*外顯子50跳躍的百分比。

化合物/劑量(μm)	相對外顯子跳躍					
	1.25	2.5	5	10	20	40
PMO#3	1	1	1	1	1	1
PPMO#3	2.6	3.2	3.0	2.4	2.1	1.9

【0334】 上述表7中的數據顯示所有濃度下，如與PMO#3相比，當用PPMO#3處理細胞時肌管中更高的外顯子50跳躍的結果。這種改善可以在體內比較試驗中得到進一步證明，例如實例4的非人靈長類動物(NHP)研究，其中用PPMO#3或PMO#3處理NHP，並在各種相關的肌組織中測量外顯子50跳躍(詳見實例4)。

實例4：NHP中的外顯子50跳躍

【0335】 為了進一步證明PPMO反義寡聚體的外顯子跳躍的功效，使用非人靈長類動物。特別地，將具有完整肌組織的食蟹猴靜脈內注射PPMO#3(實例2)、PMO#3(實例1)、或鹽水。

【0336】 在整個研究過程中觀察動物，包括臨床觀察(例如，對皮膚和毛皮、呼吸作用的評估)和體重測量。至少在測試開始之前以及在第一劑量和最後劑量(如果適用)之後的24小時採集血液和尿液樣本。

【0337】 在每次計畫的屍檢或臨終安樂死時，收集橫膈膜、十二指腸平滑肌、食道和主動脈、四頭肌、三角肌、二頭肌以及心臟的切片並速凍。使用如上所述的RT-PCR確定外顯子50跳躍的百分比。

實例5：體外用PMO發生的外顯子50跳躍

【0338】 製備了一系列PMO(SEQ ID NO 1-7；PMO#1-#7)，並測試了外顯子50跳躍的效率。簡而言之，使用標準技術培養人原代成肌細胞。將凍乾的PMO重新懸浮在無核酸酶的水中；以驗證莫耳濃度，並使用NanoDrop 2000分光光度計(賽默科技公司(Thermo Scientific))測量PMO溶液。根據製造商的說明和P3套組(龍沙公司(Lonza))，使用核穿孔將一定劑量範圍的PMO(例如0.625、1.25、2.5、5、10和20 μM)遞送至成肌細胞，並允許在提取RNA之前，在37°C下5% CO2孵育箱中孵育過夜。使用來自GE醫療集團(GE Healthcare)的RNAspin 96孔RNA分離套組從PMO處理的細胞中提取RNA，並使用標準技術對其進行RT-PCR，其中該等引物擴增人DMD外顯子49-52。使用Caliper LabChip生物分析儀測量跳躍，並藉由以下公式計算外顯子跳躍百分比(即外顯子跳躍的產物相對於全長PCR產物的帶強度)：[外顯子50跳躍的產物/(外顯子50跳躍的產物和外顯子50未跳躍的產物的總和)*100]，並且基於每種濃度下引起的跳躍百分比計算EC50值。如表8所示，設計為靶向外顯子50的剪接受體或剪接供體區域的本揭露的PMO寡聚體提供了外顯子50的跳躍，其中PMO#1、PMO#2和PMO#3提供了最高水平的外顯子50跳躍活性(EC₅₀ < 1.0 μM)。

[表8].

SEQ ID NO：	化合物	活性(EC ₅₀ ⁽¹⁾)
1	PMO#1 (+04-18)	*****
2	PMO#2 (+07-18)	*****
3	PMO#3 (+07-16)	*****
4	PMO#4 (+07-17)	**
5	PMO#5 (-19+07)	**
6	PMO#6 (+07-15)	*
7	PMO#7 (-02+23)	*

(1) **** = EC₅₀ < 1.0 μM ； ** = EC₅₀ 1.0至3.0 μM ； * = EC₅₀ 3.0 μM或更大。

【0339】 要理解的是，前面的詳述說明和隨後的實例僅用於說明，不應被視為對本發明範圍的限制，本發明範圍僅由所附申請專利範圍及其等同方案限定。

【0340】 所揭露的實施方式的各種改變和修改對熟悉該項技術者將會係顯而易見的。在不脫離本發明實質或其範圍下可以進行這樣的改變和修改，包括但不限於與本發明的化學結構、取代基、衍生物、中間體、合成、組成物、配製物或使用方法相關的那些。

序列表*

描述	PMO 識別符	PPMO 識別符	序列(5'至3'或N末端至C末端)	SEQ ID NO
H50D (+04-18)	PMO#1	PPMO# 1	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	1
H50D (+07-18)	PMO#2	PPMO# 2	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	2
H50D (+07-16)	PMO#3	PPMO# 3	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	3
H50D (+07-17)	PMO#4	PPMO# 4	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	4
H50A (-19+07)	PMO#5	PPMO# 5	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	5
H50D (+07-15)	PMO#6	PPMO# 6	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	6
H50A (-02+23)	PMO#7	PPMO# 7	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	7
H50D (+06-18)	PMO#8	PPMO# 8	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	8
H50D (+07-20)	PMO#9	PPMO# 9	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	9
R ₆			RRRRRR	10
R ₆ G			RRRRRRG	11
人外顯子 49 結 合 正向引物			CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG	12

人外顯子 52結合反 向引物			CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC	13
PMO-G	PMO-G	PPMO-G	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	14
(RXR) ₄			RXRRXRRXRRXR	15
(RFF) ₃ R			RFFRFFRFFR	16
(RXR) ₄ XB			RXRRXRRXRRXRXB	17
(RFF) ₃ RXB			RFFRFFRFFRXB	18
(RFF) ₃ RG			RFFRFFRFFRG	19
R ₅ G			RRRRRG	20
R ₅			RRRRR	21
內含子49 - 外顯子 50 - 內含 子50	atcttcaaagtgttaatcgaataagtaatgtgtatgcttttctgttaaagAGGAAGTTAGAAGATCTGAGC TCTGAGTGGAAGGCGGTAAACCGTTTACTTCAAGAGCTGAGGGCAAA GCAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTATTGGAGCCTg taagtatactggatccattctctttggtctagctatttgttcaaaag			22

【0341】 *取決於用於連接核鹼基的化學物質，T可以是胸腺嘧啶或尿嘧啶。

【序列表】

<110> 美商薩羅塔治療公司（SAREPTA THERAPEUTICS，INC.）

<120> 用於肌營養不良之外顯子跳躍寡聚體軛合物

<130> 8171.50.W000

<140>

<141>

<150> 62/779,028

<151> 2018-12-13

<160> 22

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<220>

<223> 組合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (5)..(5)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (10)..(10)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (12)..(12)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (15)..(16)

<223> t或u

<400> 1 ggganccagn anacnnacag gc	22
<210> 2 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸	
<220> <223> 組合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (5)..(5) <223> t或u	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (10)..(10) <223> t或u	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (12)..(12) <223> t或u	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (15)..(16) <223> t或u	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (23)..(23) <223> t或u	
<400> 2 ggganccagn anacnnacag gcnc	25
<210> 3 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<220>
<223> 組合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (3)..(3)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (8)..(8)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (10)..(10)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (13)..(14)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (21)..(21)
<223> t或u

<400> 3
ganccagnan acnnacaggc ncc

23

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<220>
<223> 組合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 經修飾的鹼基
<222> (4)..(4)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (9)..(9)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (11)..(11)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (14)..(15)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (22)..(22)
<223> t或u

<400> 4
gganccagna nacnnacagg cncc

24

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<220>
<223> 組合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (3)..(4)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (7)..(7)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (9)..(11)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (24)..(24)
<223> t或u

<400> 5
acnncncnn naacagaaaa gcanac

26

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<220>
<223> 組合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (2)..(2)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (7)..(7)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (9)..(9)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (12)..(13)
<223> t或u

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (20)..(20)
<223> t或u

<400> 6 anccagnana cnnacaggen cc	22
<210> 7 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸	
<220> <223> 組合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (5)..(5) <223> t或u	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (10)..(10) <223> t或u	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (12)..(13) <223> t或u	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (15)..(15) <223> t或u	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (19)..(20) <223> t或u	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (23)..(23) <223> t或u	
<220> <221> 經修飾的鹼基 <222> (25)..(25)	

<223> t或u

<400> 7

gagcncagan cnnchnaacnn ccncn

25

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<220>

<223> 組合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (5)..(5)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (10)..(10)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (12)..(12)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (15)..(16)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (23)..(23)

<223> t或u

<400> 8

ggganccagn anacnnacag gcnc

24

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<220>

<223> 組合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (2)..(2)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (7)..(7)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (12)..(12)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (14)..(14)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (17)..(18)

<223> t或u

<220>

<221> 經修飾的鹼基

<222> (25)..(25)

<223> t或u

<400> 9

angggancca gnanaacnnac aggcnc

27

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 10 Arg Arg Arg Arg Arg Arg 1 5		
<210> 11 <211> 7 <212> PRT <213> 人工序列		
<220> <223> 人工序列的描述：合成肽		
<400> 11 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly 1 5		
<210> 12 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列		
<220> <223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸		
<400> 12 ccagccactc agccagtga g		21
<210> 13 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列		
<220> <223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸		
<400> 13 cgatccgtaa tgattgttct agcc		24
<210> 14 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列		
<220> <223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸		

<400> 14
gttgcctccg gttctgaagg tgttc

25

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (2)..(2)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (5)..(5)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (8)..(8)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (11)..(11)
<223> 6-胺基己酸

<400> 15
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 16
Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg
1 5 10

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (2)..(2)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (5)..(5)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (8)..(8)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (11)..(11)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (13)..(13)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (14)..(14)
<223> β -丙胺酸

<400> 17
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Ala
1 5 10

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (11)..(11)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (12)..(12)
<223> β -丙胺酸

<400> 18
Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Xaa Ala
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 19
Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Gly
1 5 10

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 20
Arg Arg Arg Arg Arg Gly
1 5

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 21
Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 22
<211> 209
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 22
atcttcaaag tgttaatcga ataagtaatg tgtatgcttt tctgttaaag aggaagttag 60

aagatctgag ctctgagtgg aaggcggtaa accgtttact tcaagagctg agggcaaagc 120

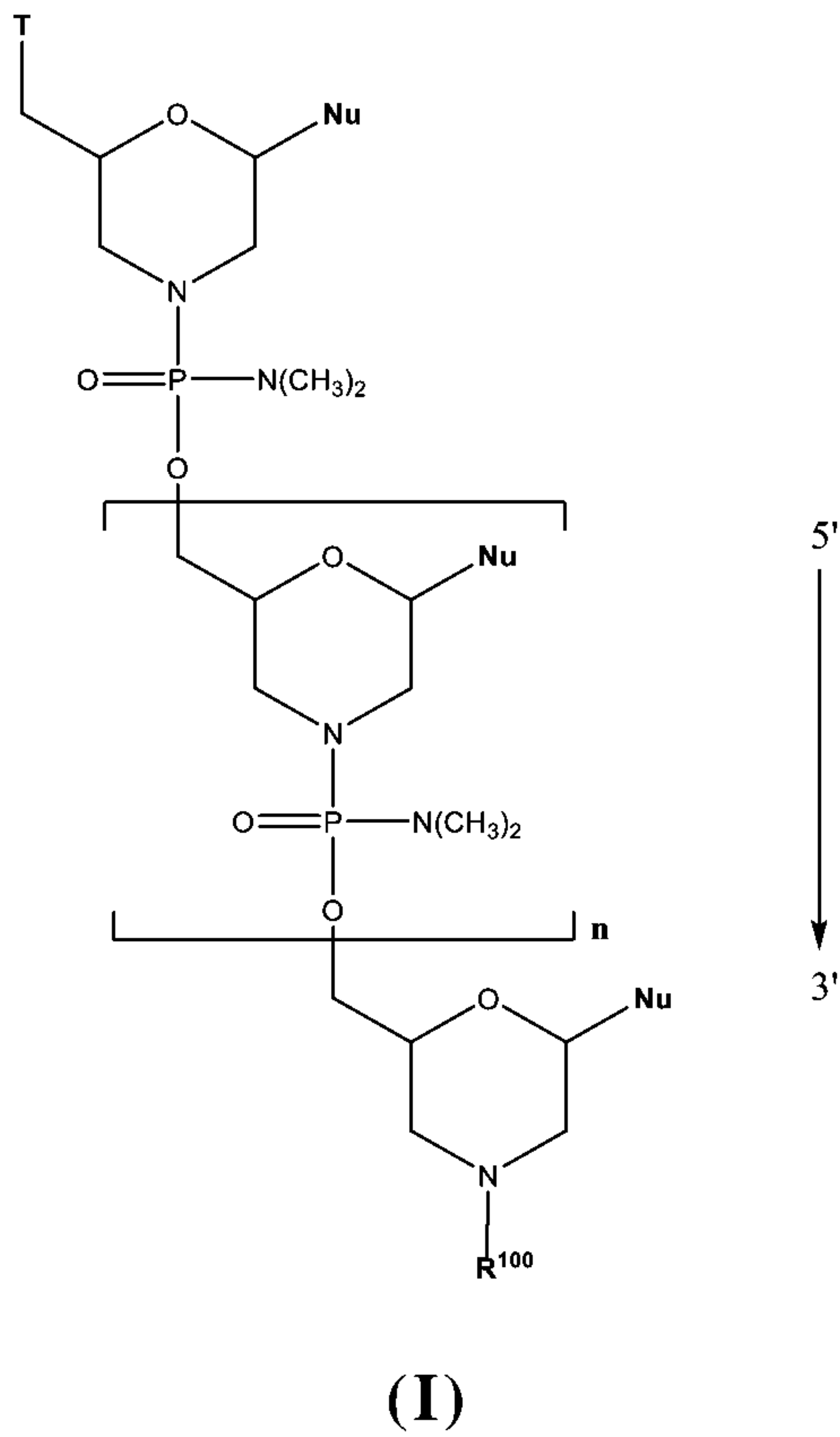
agcctgacct agctcctgga ctgaccacta ttggagcctg taagtatact ggatcccatt 180

ctcttttggt ctagctattt gttcaaaag 209

【發明申請專利範圍】

【第1項】

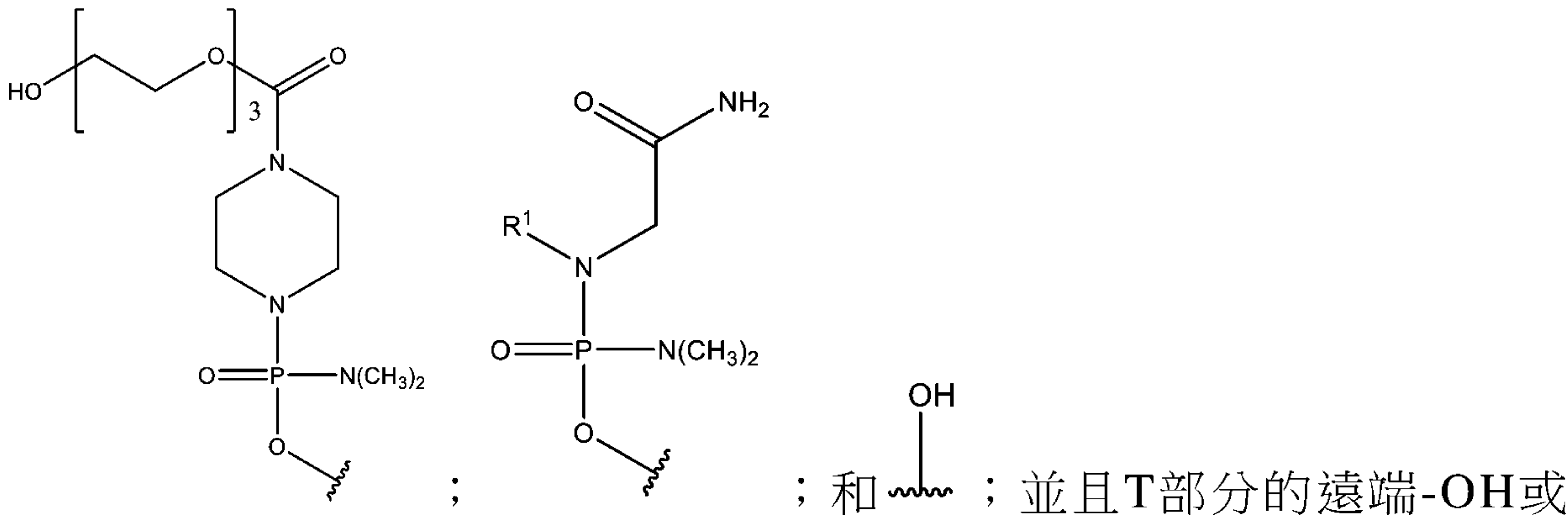
一種根據式 (I) 之反義寡聚體：



或其藥學上可接受的鹽，其中：

每個**Nu**係一起形成靶向序列的核鹼基；

T係選自以下的部分：

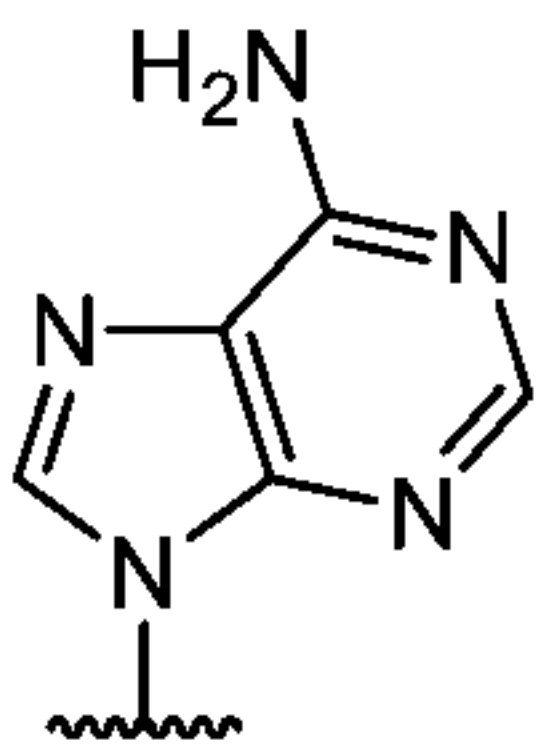
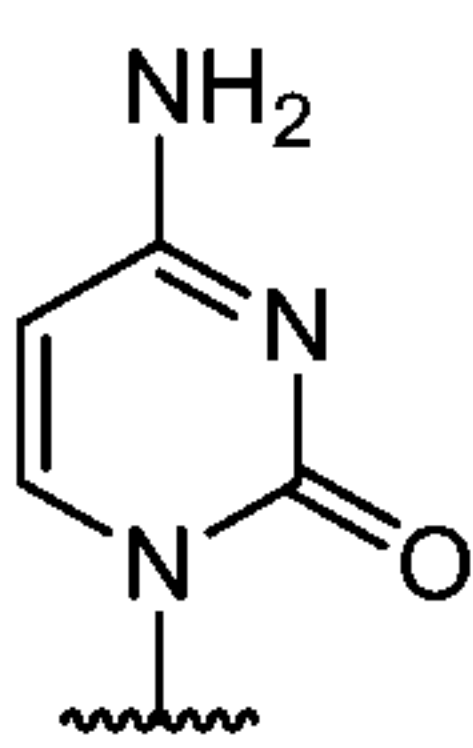
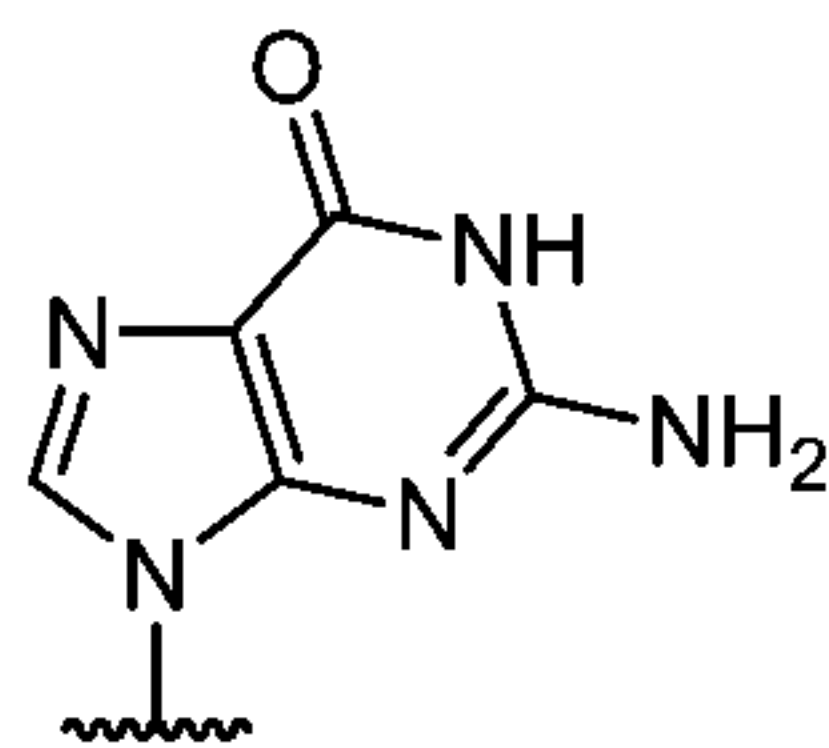
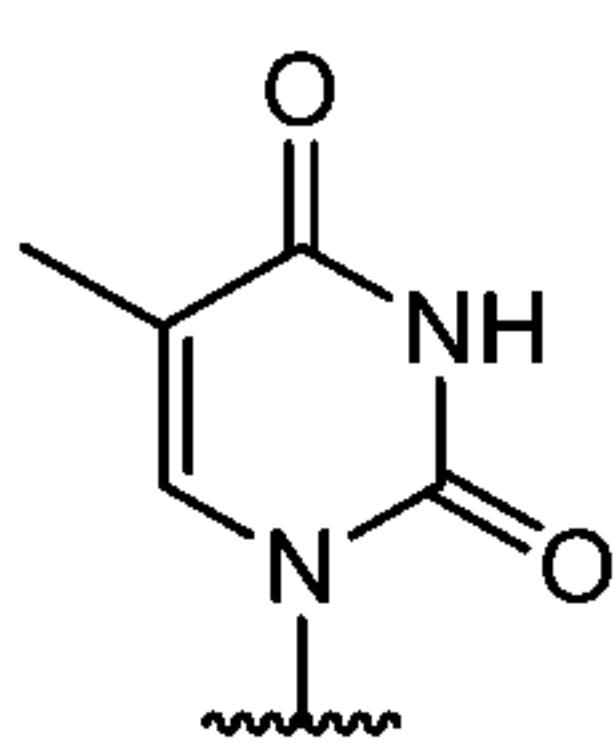


-NH₂視需要連接至細胞穿透肽；

R¹⁰⁰係氫或細胞穿透肽；

從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5’至3’]	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

其中A係，C係，G係，並且T係。

【第2項】

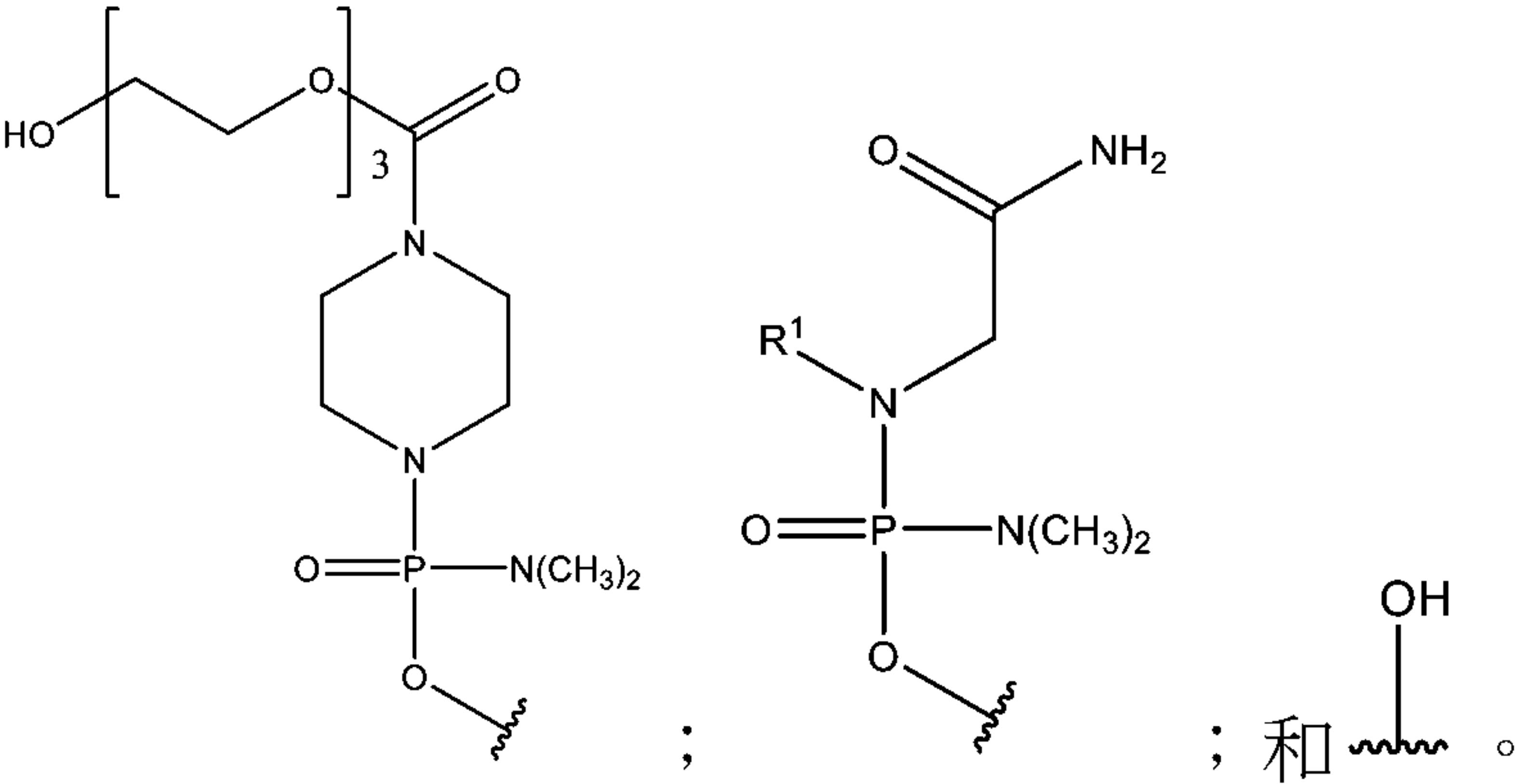
如請求項1之反義寡聚體，其中從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於SEQ ID NO: 3。

【第3項】

如請求項1或2之反義寡聚體，其中該反義寡聚體含有一種細胞穿透肽。

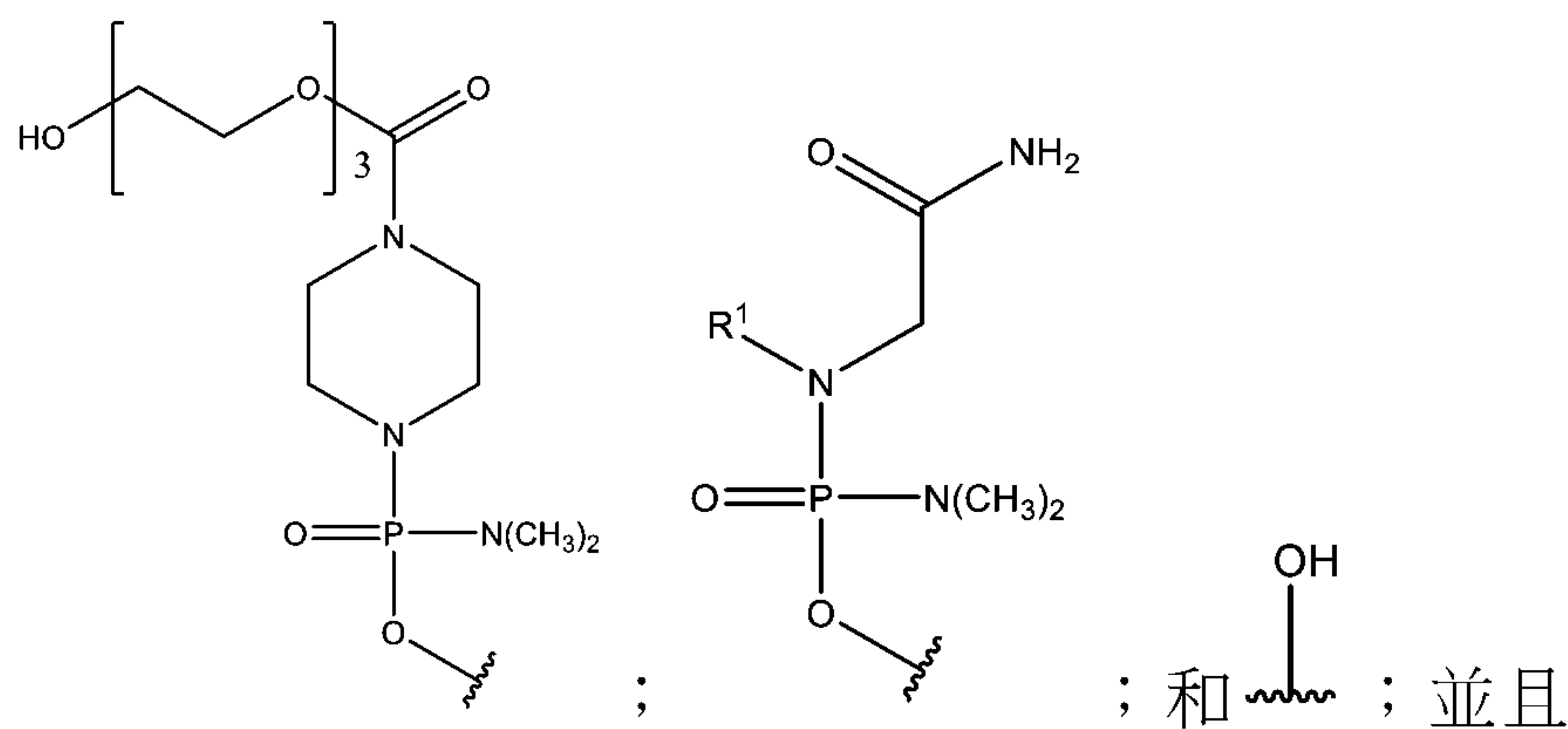
【第4項】

如請求項1至3中任一項之反義寡聚體，其中T係選自以下的部分：



【第5項】

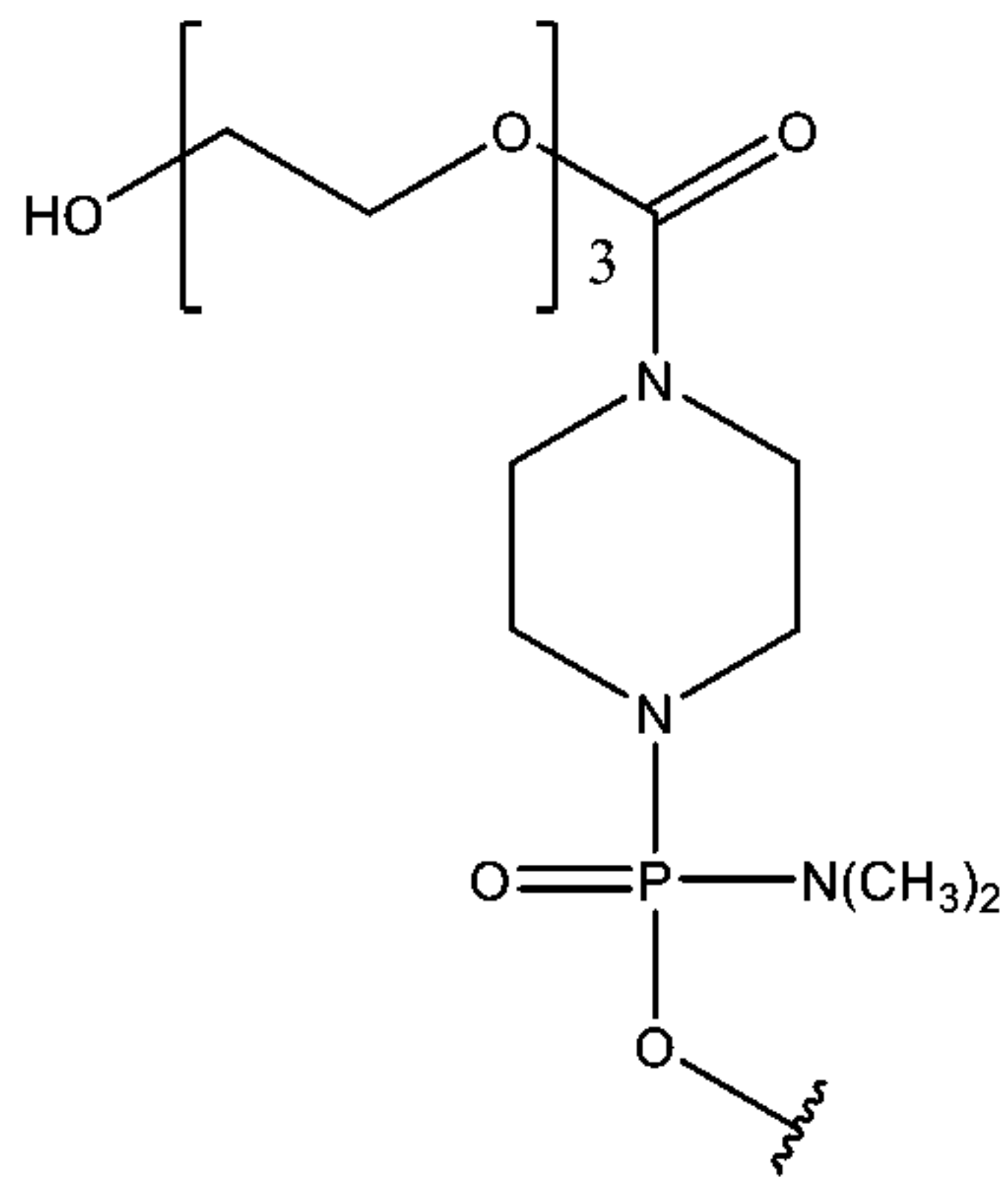
如請求項1至4中任一項之反義寡聚體，其中T係選自以下的部分：



R¹⁰⁰係細胞穿透肽。

【第6項】

如請求項5之反義寡聚體，其中：



T係；  並且

R¹⁰⁰係細胞穿透肽。

【第7項】

如請求項1至6中任一項之反義寡聚體，其中該細胞穿透肽係富含精胺酸的肽。

【第8項】

如請求項7之反義寡聚體，其中該富含精胺酸的肽選自由以下各項組成之群組：-(RXR)₄-R^a(SEQ ID NO: 15)、R-(FFR)₃-R^a(SEQ ID NO: 16)、-B-X-(RXR)₄-R^a(SEQ ID NO: 17)、-B-X-R-(FFR)₃-R^a(SEQ ID NO: 18)、-GLY-R-(FFR)₃-R^a(SEQ ID NO: 19)、-GLY-R₅-R^a(SEQ ID NO: 20)、-R₅-R^a(SEQ ID NO: 21)、-GLY-R₆-R^a(SEQ ID NO: 11)和-R₆-

R^a(SEQ ID NO: 10)，其中R^a選自H、醯基、苯甲醯基和硬脂醯基，並且其中R係精胺酸，X係6-胺基己酸，B係β-丙胺酸，F係苯丙胺酸，並且GLY(或G)係甘胺酸。

【第9項】

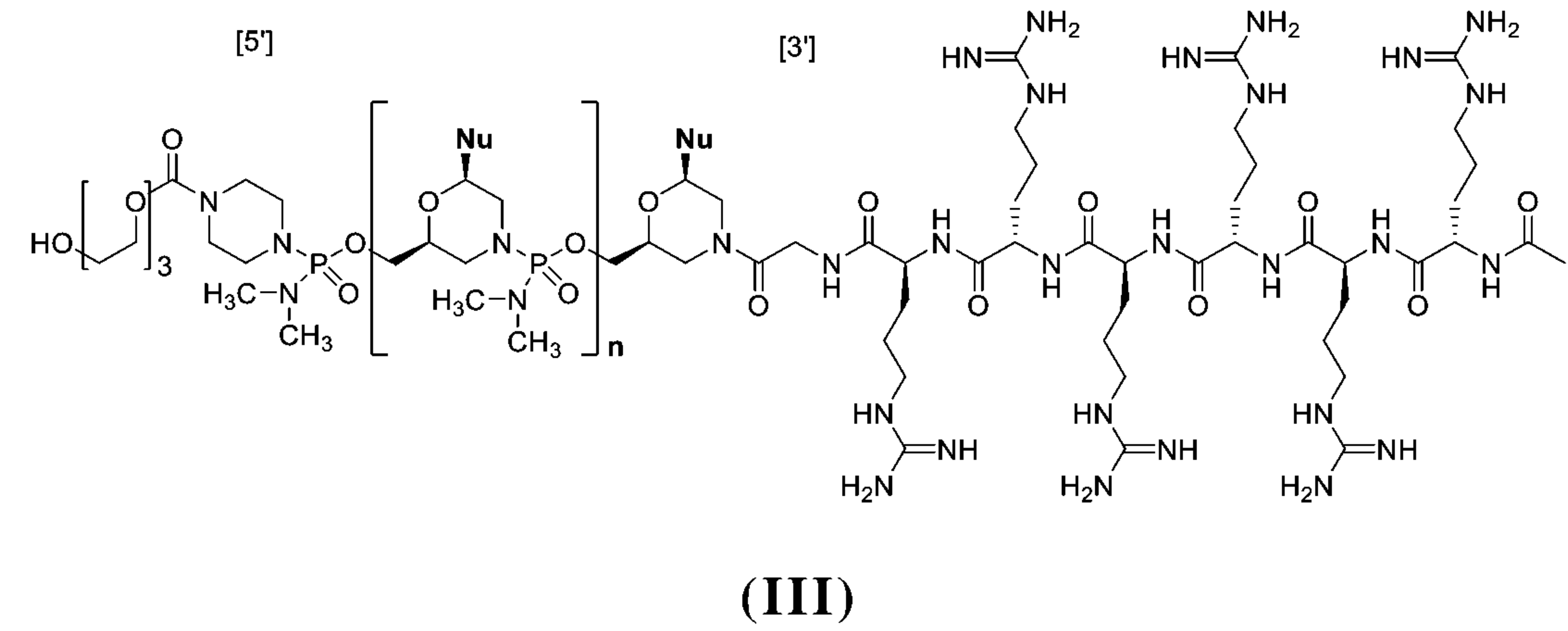
如請求項1至8中任一項之反義寡聚體，其中該反義寡聚體呈游離鹼形式。

【第10項】

如請求項1至8中任一項之反義寡聚體，其中該反義寡聚體係其藥學上可接受的鹽。

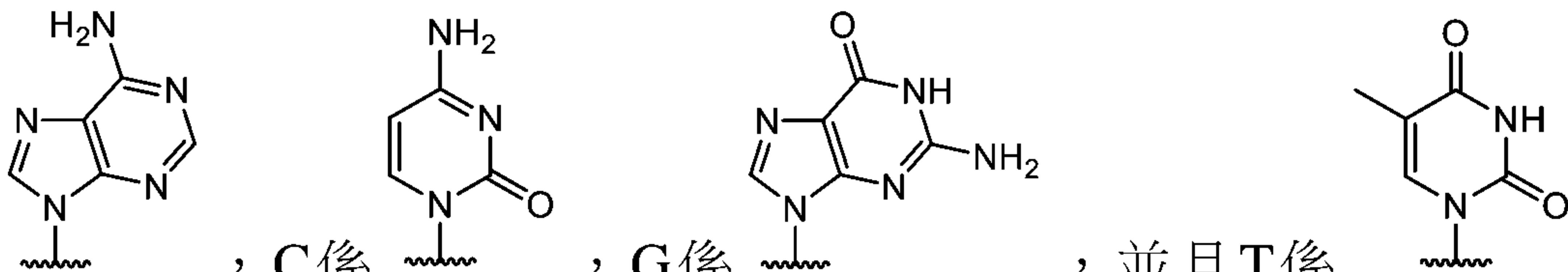
【第11項】

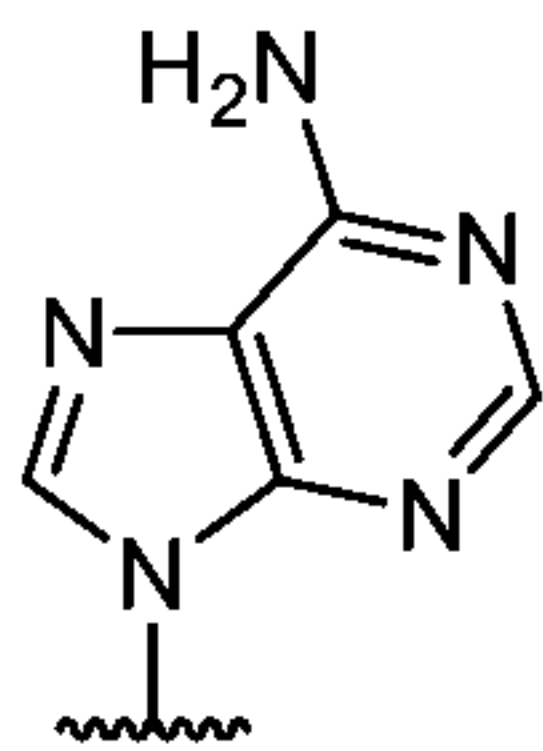
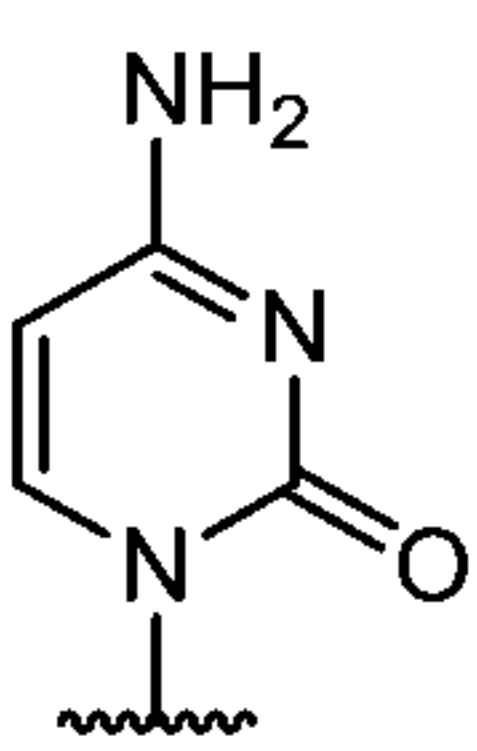
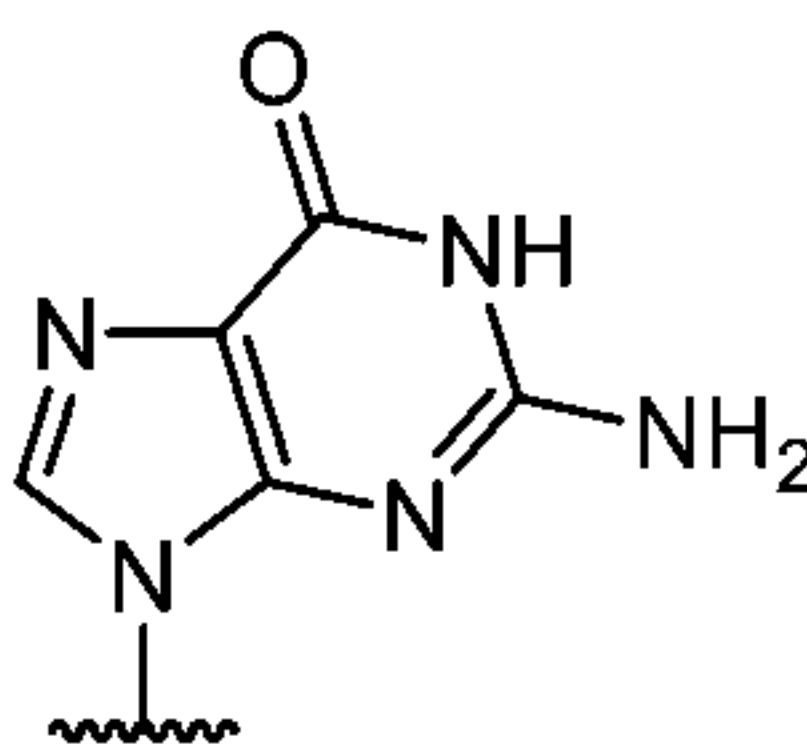
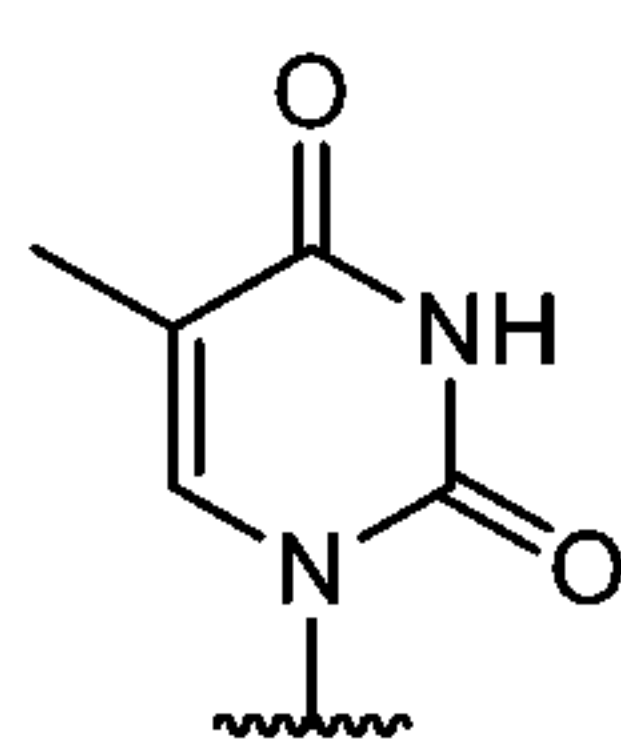
一種根據式 (III) 之反義寡聚體：



或其藥學上可接受的鹽，其中從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5’至3’]	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



其中A係，C係，G係，並且T係，並且式 (III) 之遠端-OH視需要連接至細胞穿透肽。

【第12項】

如請求項11之反義寡聚體，其中從1至n和從5’至3’，式 (III) 之每個Nu對應於SEQ ID NO: 3。

【第13項】

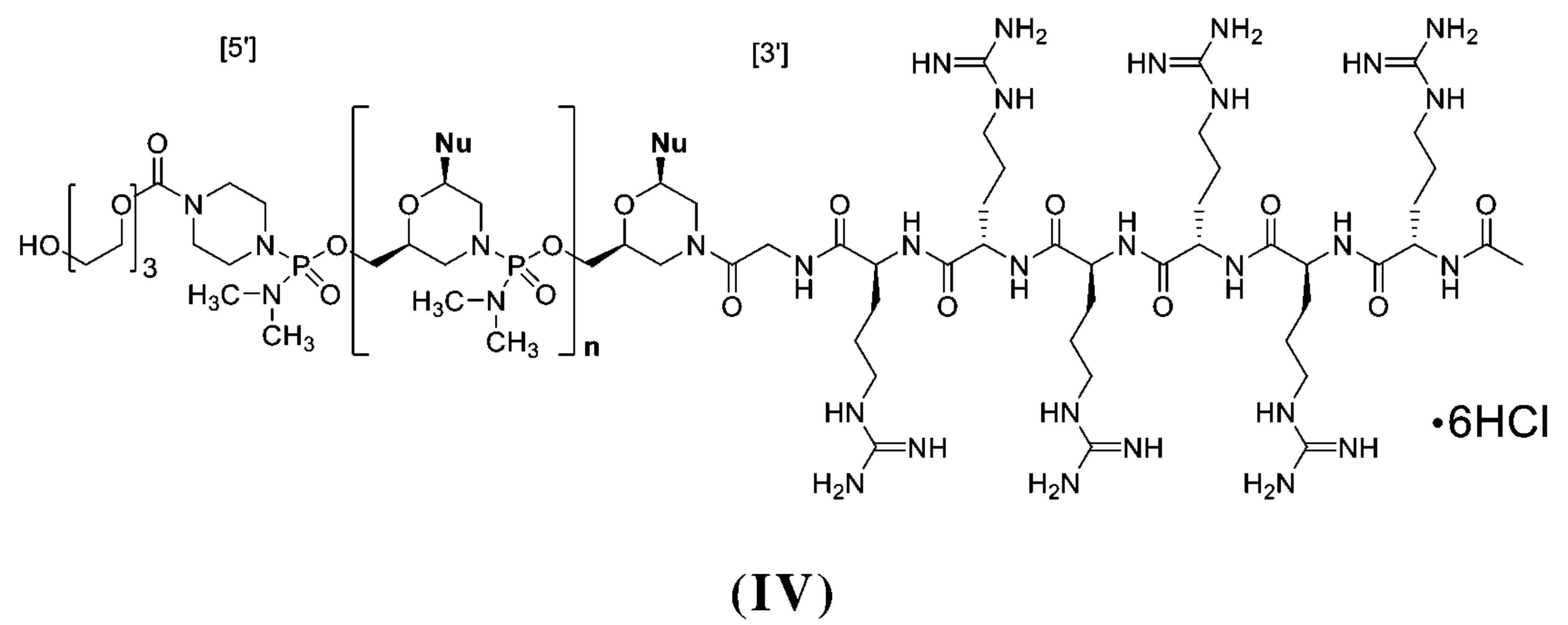
如請求項11至12中任一項之反義寡聚體，其中該反義寡聚體呈游離鹼形式。

【第14項】

如請求項11至12中任一項之反義寡聚體，其中該反義寡聚體係其藥學上可接受的鹽。

【第15項】

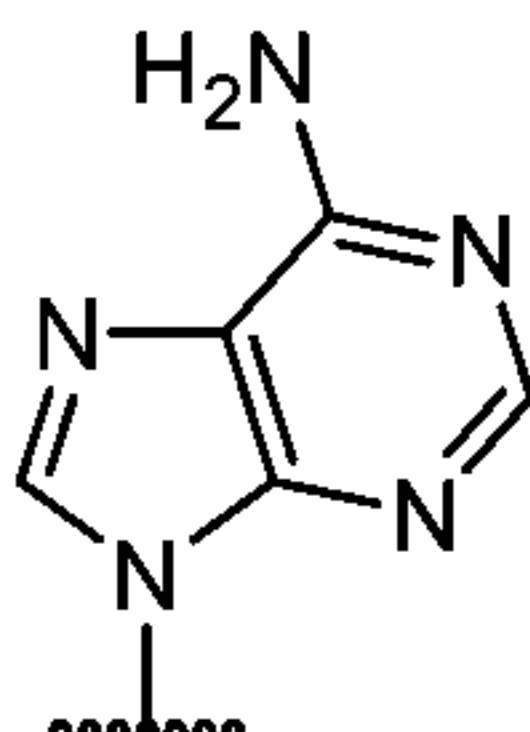
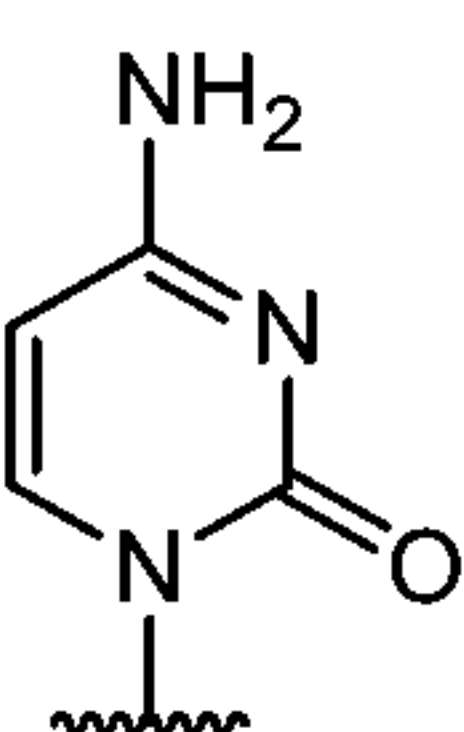
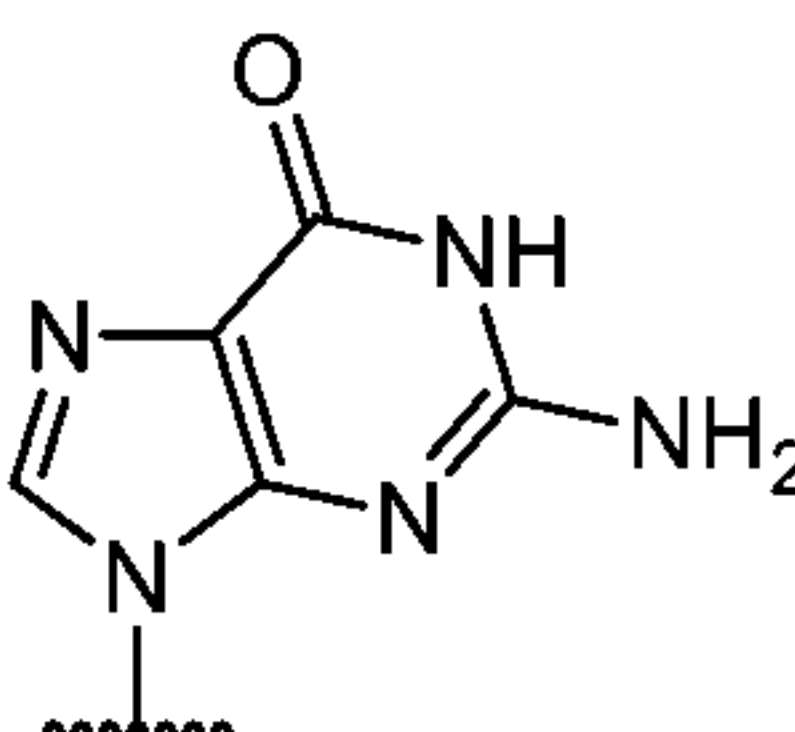
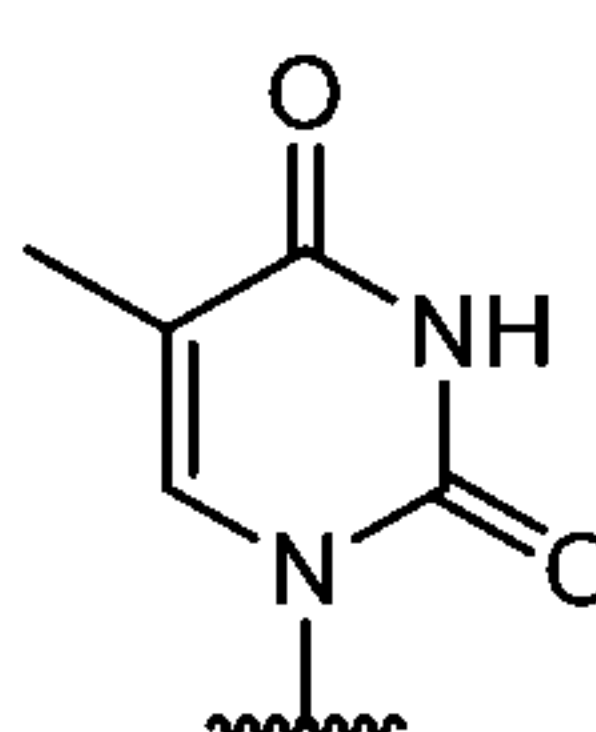
一種根據式 (IV) 之反義寡聚體：



其中從1至n和從5’至3’，每個Nu對應於以下之一中的核鹼基：

退火位點	靶向序列[5’至3’]	SEQ ID NO：
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4

H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

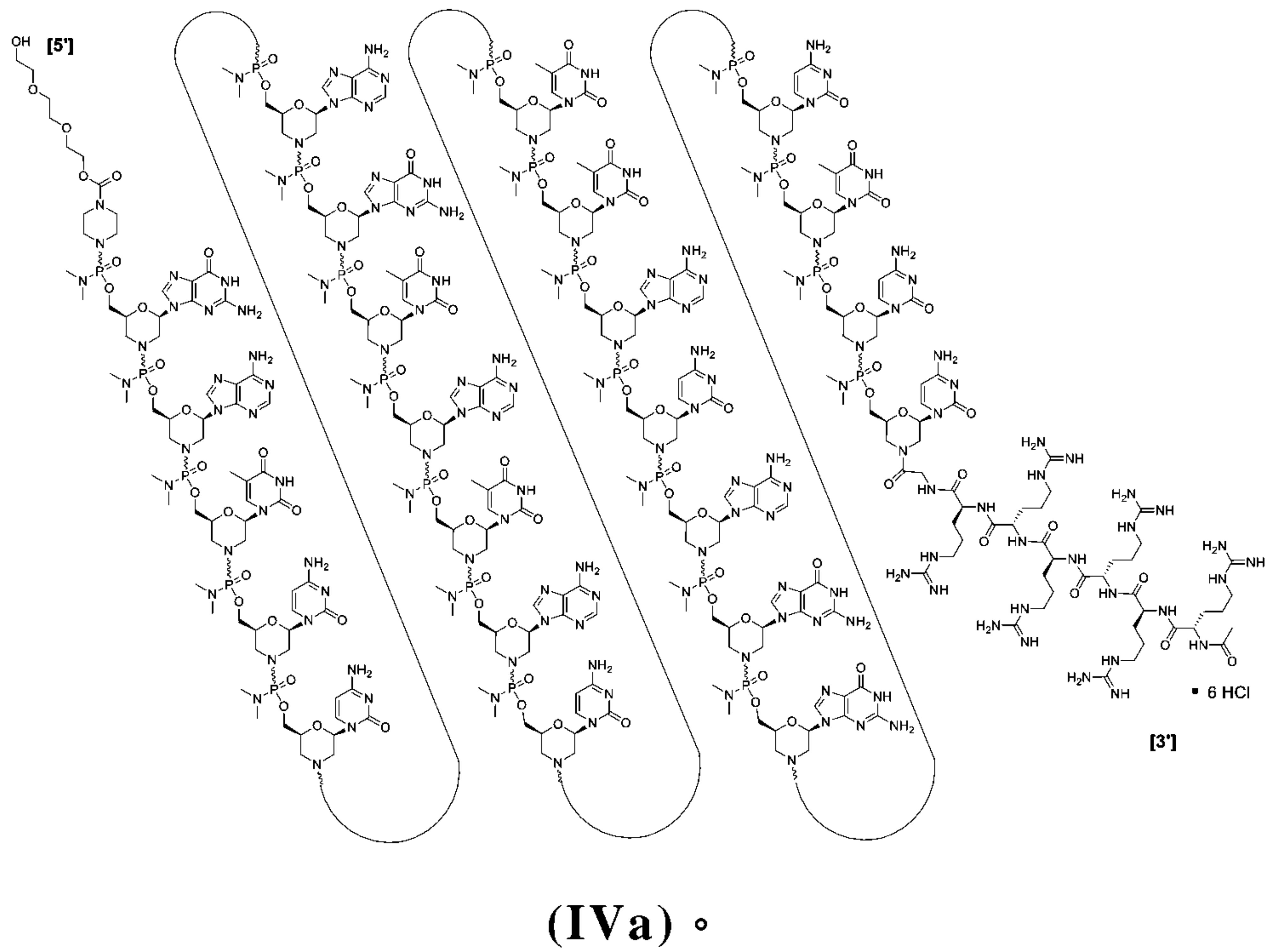
其中A係，C係，G係，並且T係，並且式 (IV) 之遠端-OH視需要連接至細胞穿透肽。

【第16項】

如請求項15之反義寡聚體，其中從1至n和從5’至3’，式 (IV) 之每個Nu對應於SEQ ID NO: 3。

【第17項】

如請求項15之反義寡聚體，其中該反義寡聚體係根據式 (IVa) 之結構



【第18項】

一種藥物組成物，該藥物組成物包含如請求項1至17中任一項之反義

寡聚體或其藥學上可接受的鹽、和藥學上可接受的載體。

【第19項】

一種在有需要的受試者中治療杜興氏肌肉失養症(DMD)之方法，該方法包括向該受試者施用治療有效量的如請求項1至17中任一項之反義寡聚體或如請求項18之藥物組成物。

【第20項】

如請求項19之方法，其中該受試者具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變。

【第21項】

一種恢復mRNA閱讀框以誘導受試者中肌養蛋白產生之方法，該方法包括向該受試者施用治療有效量的如請求項1至17中任一項之反義寡聚體或如請求項18之藥物組成物。

【第22項】

如請求項21之方法，其中該受試者具有適於外顯子50跳躍的肌養蛋白基因突變。