



(21)申請案號：106121834 (22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 29 日

(51)Int. Cl. : C07F9/6533 (2006.01) C12N15/113 (2010.01)
A61K31/7088(2006.01) A61P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/06/30 美國 62/356,923
2016/06/30 美國 62/357,072

(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：法蘭克 迪亞娜 伊莉莎白 FRANK, DIANE ELIZABETH (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：10 項 圖式數：3 共 120 頁

(54)名稱

用於肌肉萎縮症之外顯子跳躍寡聚物

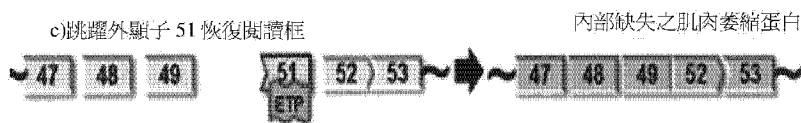
EXON SKIPPING OLIGOMERS FOR MUSCULAR DYSTROPHY

(57)摘要

本發明闡述與人類肌肉萎縮蛋白基因中之選定靶標位點互補以誘導外顯子 45 跳躍之反義寡聚物。

Antisense oligomers complementary to a selected target site in the human dystrophin gene to induce exon 45 skipping are described.

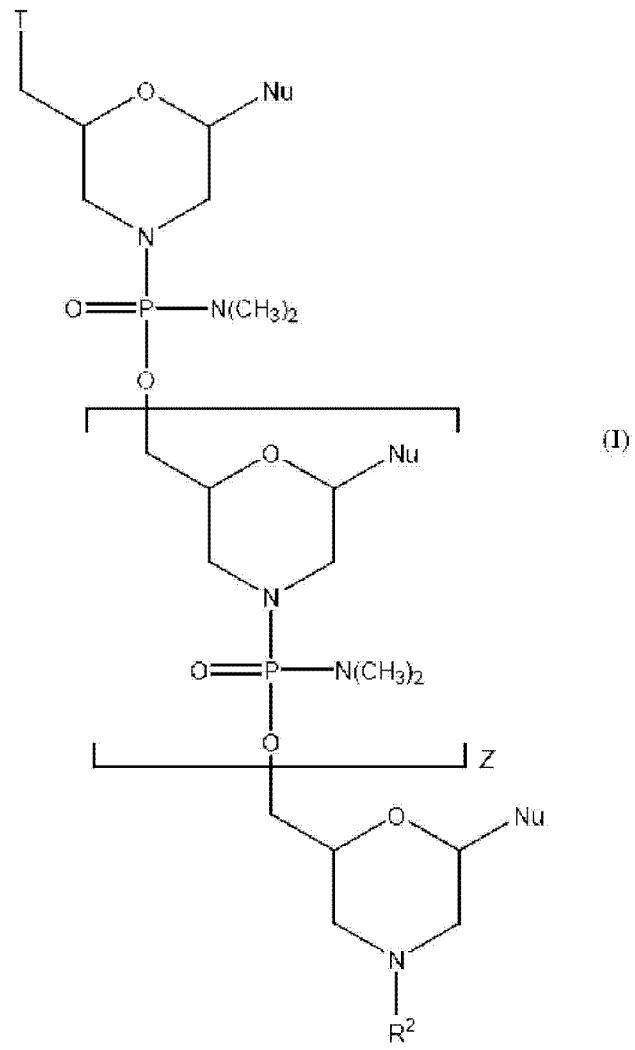
指定代表圖：



來源：自 Kole 2012 改編。

【圖 3】

特徵化學式：





201811807

申請日：

IPC 分類：

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於肌肉萎縮症之外顯子跳躍寡聚物

【英文發明名稱】

EXON SKIPPING OLIGOMERS FOR MUSCULAR DYSTROPHY

【中文】

本發明闡述與人類肌肉萎縮蛋白基因中之選定靶標位點互補以誘導外顯子45跳躍之反義寡聚物。

【英文】

Antisense oligomers complementary to a selected target site in the human dystrophin gene to induce exon 45 skipping are described.

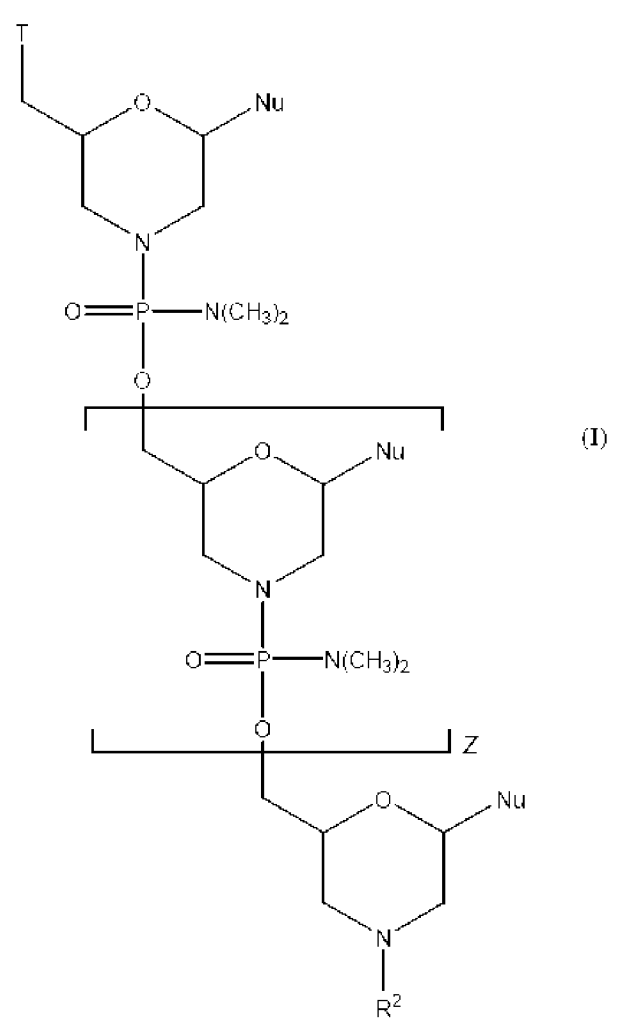
【指定代表圖】

圖3

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於肌肉萎縮症之外顯子跳躍寡聚物

【英文發明名稱】

EXON SKIPPING OLIGOMERS FOR MUSCULAR DYSTROPHY

【技術領域】

本揭示內容係關於適於在人類肌肉萎縮蛋白基因中外顯子45跳躍之新穎反義寡聚物及其醫藥組合物。本揭示內容亦提供使用該等新穎反義寡聚物誘導外顯子45跳躍之方法、在具有適於外顯子45跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變之個體中產生肌肉萎縮蛋白之方法及治療具有適於外顯子45跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變之個體之方法。

【先前技術】

業內正在開發使用一系列化學物質在各種不同層面(轉錄、剪接、穩定性、轉譯)影響基因表現之反義技術。大部分該研究集中在使用反義化合物來糾正或補償大範圍適應症中之異常或疾病相關基因。反義分子能夠特異性地抑制基因表現，且因此，關於寡聚物作為基因表現之調節劑之許多研究工作集中在抑制靶向基因之表現或順式作用元件之功能。反義寡聚物通常針對為有義鏈(例如，mRNA)或在一些病毒RNA靶標之情形下為負鏈之RNA。為達成特定基因下調之期望效應，寡聚物通常促進靶向mRNA之衰減、阻斷mRNA之轉譯或阻斷順式作用RNA元件之功能，藉此有效防止靶標蛋白質之重新合成或病毒RNA之複製。

然而，倘若目標為上調天然蛋白質之產生或補償誘導轉譯過早終止之突變，則此等技術無用。在該等情形下，缺陷型基因轉錄物不會經歷靶

向降解或空間抑制，因此反義寡聚物化學不會促進靶標 mRNA 分解 (decay) 或阻斷轉譯。

在各種遺傳疾病中，突變對基因最終表現之效應可藉助剪接過程中靶向外顯子跳躍過程來調節。剪接過程由複雜多組分機制引導，其使前體 mRNA (pre-mRNA) 中之毗鄰外顯子-內含子結點緊密靠近並在內含子之末端進行磷酸二酯鍵之裂解，該等磷酸二酯鍵隨後在待剪接在一起之外顯子之間重新形成。此複雜且高度精確之過程係由前體 mRNA 中相對較短之半保守 RNA 片段之序列基序介導，參與之後剪接反應之各種核剪接因子結合至該等序列基序。藉由改變剪接機制讀取或識別參與前體 mRNA 處理之基序之方式，可產生差異剪接之 mRNA 分子。現已認識到，儘管所涉及之機制尚未鑑別，但在正常基因表現期間，大多數人類基因經選擇性剪接。Bennett 等人 (美國專利第 6,210,892 號) 闡述使用不誘導 RNase H 介導之靶標 RNA 裂解之反義寡聚物類似物的野生型細胞 mRNA 處理之反義調節。此可用於產生缺少特異性外顯子之選擇性剪接 mRNA (例如，如 Sazani, Kole 等人，2007 所闡述用於產生缺少編碼跨膜結構域之外顯子之可溶性 TNF 超家族受體)。

在其中正常功能性蛋白質由於其中之突變而過早終止之情形下，藉助反義技術恢復一些功能性蛋白質產生之手段已顯示可藉助剪接過程期間之干預來實現，且若與致病突變相關之外顯子可特異性地自一些基因缺失，則有時可產生縮短之蛋白質產物，其具有天然蛋白質之相似生物學性質或具有足夠生物學活性以改善由與外顯子相關之突變所致之疾病(例如，參見 Sierakowska, Sambade 等人，1996；Wilton, Lloyd 等人，1999；van Deutekom, Bremmer-Bout 等人，2001；Lu, Mann 等人，

2003；Aartsma-Rus，Janson 等人，2004)。Kole 等人（美國專利第 5,627,274 號；第 5,916,808 號；第 5,976,879 號；及第 5,665,593 號）揭示使用不促進靶向前體 mRNA 之衰減之經修飾反義寡聚物類似物來對抗異常剪接之方法。Bennett 等人（美國專利第 6,210,892 號）闡述亦使用不誘導 RNase H 介導之靶標 RNA 裂解之反義寡聚物類似物的野生型細胞 mRNA 處理之反義調節。

靶向外顯子跳躍之過程可在其中存在許多外顯子及內含子、其中外顯子之遺傳構成中存在冗餘或其中蛋白質能夠在無一或多個特定外顯子之情形下起作用之長基因中尤其有用。重新引導用於治療與各種基因中之突變所致之截斷相關之遺傳疾病之基因處理之努力集中在使用反義寡聚物，該等反義寡聚物：(1) 與剪接過程中所涉及之元件完全或部分重疊；或(2) 在足夠靠近元件之位置處結合至前體 mRNA，以破壞通常調介在該元件處發生之特異性剪接反應之剪接因子之結合及功能。

杜興氏肌肉萎縮症(Duchenne muscular dystrophy，DMD)係由蛋白質肌肉萎縮蛋白之表現缺陷而引起。編碼該蛋白質之基因含有 79 個外顯子，展開覆蓋 DNA 之超過 2 百萬個核苷酸。改變外顯子之閱讀框，或引入終止密碼子，或特徵在於移除全部框外外顯子或一或多個外顯子之重複之任何外顯子突變均有可能破壞功能性肌肉萎縮蛋白之產生，從而導致 DMD。

已發現出現肌肉萎縮症之較不嚴重形式即貝克氏肌肉萎縮症(Becker muscular dystrophy，BMD)，其中突變(通常一或多個外顯子之缺失)在整個肌肉萎縮蛋白轉錄物中產生正確閱讀框，使得 mRNA 轉譯為蛋白質不過早終止。若在突變之肌肉萎縮蛋白前體 mRNA 之處理中上游及下游外顯子

之連接維持基因之正確閱讀框，則結果為mRNA編碼具有短內部缺失之保留一些活性之蛋白質，從而產生貝克氏表型。

多年來，已知曉不改變肌肉萎縮蛋白之閱讀框之一或多個外顯子缺失將導致BMD表型，而引起框移之外顯子缺失將導致DMD (Monaco, Bertelson等人, 1988)。一般而言，包括點突變及改變閱讀框且因此中斷適當蛋白質轉譯之外顯子缺失之肌肉萎縮蛋白突變導致DMD。亦應注意，一些BMD及DMD患者具有覆蓋多個外顯子之外顯子缺失。

已報導利用反義寡核糖核苷酸在活體外及活體內二者調節突變體肌肉萎縮蛋白前體 mRNA 剪接(例如，參見 Matsuo, Masumura 等人, 1991; Takeshima, Nishio 等人 1995; Pramono, Takeshima 等人, 1996; Dunckley, Eperon 等人, 1997; Dunckley, Manoharan 等人, 1998; Wilton, Lloyd 等人 1999; Mann, Honeyman 等人 2002; Errington, Mann 等人, 2003)。

已專門設計反義寡聚物以靶向前體 mRNA 之特定區域(通常外顯子)以誘導DMD基因突變之跳躍，藉此在框內恢復該等框外突變以使得能夠產生內部縮短但具功能之肌肉萎縮蛋白。已知此等反義寡聚物完全靶向於外顯子內(所謂的外顯子內部序列)或在自外顯子穿越進入內含子之一部分中之剪接供體或剪接受體結點處。

針對DMD之此等反義寡聚物之發現及研發一直為先前研究之領域。該等研發包括來自以下之彼等：(1) University of Western Australia及 Sarepta Therapeutics (本申請案之受讓人)：WO 2006/000057；WO 2010/048586；WO 2011/057350；WO 2014/100714；WO 2014/153240；WO 2014/153220；(2) Academisch Ziekenhuis

Leiden/Prosensa Technologies (現 BioMarin Pharmaceutical) : WO 02/24906 ; WO 2004/083432 ; WO 2004/083446 ; WO 2006/112705 ; WO 2007/133105 ; WO 2009/139630 ; WO 2009/054725 ; WO 2010/050801 ; WO 2010/050802 ; WO 2010/123369 ; WO 2013/112053 ; WO 2014/007620 ; (3) Carolinas Medical Center : WO 2012/109296 ; (4) Royal Holloway : 主張美國專利第61/096,073號及第61/164,978號之權益且包括其之專利及申請案 ; (4) JCR Pharmaceuticals and Matsuo : US 6,653,466 ; 主張JP 2000-125448之權益且包括其之專利及申請案 , 例如US 6,653,467 ; 主張JP 2000-256547之權益且包括其之專利及申請案 , 例如US 6,727,355 ; WO 2004/048570 ; (5) Nippon Shinyaku : WO 2012/029986 ; WO 2013/100190 ; WO 2015/137409 ; WO 2015/194520 ; 及(6) Association Institut de Myologie/Universite Pierre et Marie Curie/Universität Bern/Centre national de la Recherche Scientifique/Synthena AG : WO 2010/115993 ; WO 2013/053928 。

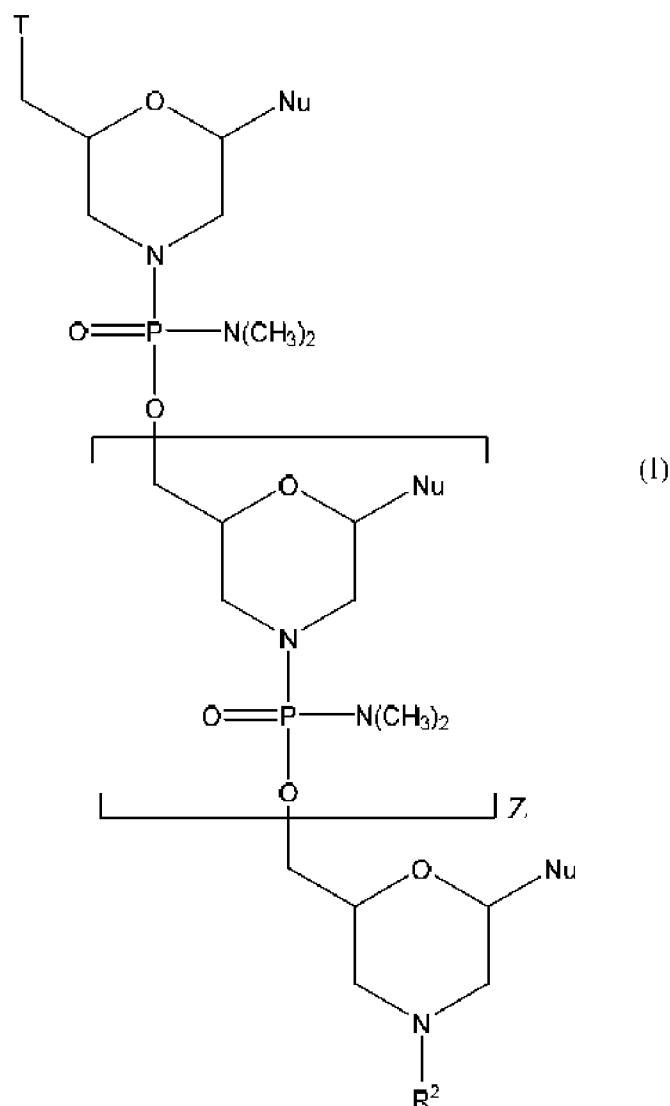
儘管已取得該等成功，但業內仍需要靶向外顯子45之改良反義寡聚物及相應醫藥組合物，其可潛在地用於產生肌肉萎縮蛋白及治療DMD之治療方法。

【發明內容】

在一態樣中，本揭示內容提供長度為22-30個亞單元之反義寡聚物，其能夠結合選定靶標以誘導人類肌肉萎縮蛋白基因中之外顯子跳躍，其中該反義寡聚物包含與選自由H45A(-06+20)、H45A(-03+19)、H45A(-09+16)、H45A(-09+19)及H45A(-12+16)組成之群之外顯子45靶標區域互補之鹼基序列，其中該寡聚物之鹼基鏈接至嗎啉基環結構，且其中該等

嗎啉基環結構由將一個環結構之嗎啉基氮連接至毗鄰環結構之5'環外碳之含磷亞單元間鏈接體連接。在一個實施例中，反義寡聚物包含指定為SEQ ID NO: 1-5之鹼基序列。在另一實施例中，反義寡聚物之長度為約22至28個亞單元或長度為約22至24個亞單元。

在另一態樣中，本揭示內容提供式(I)之反義寡聚物：

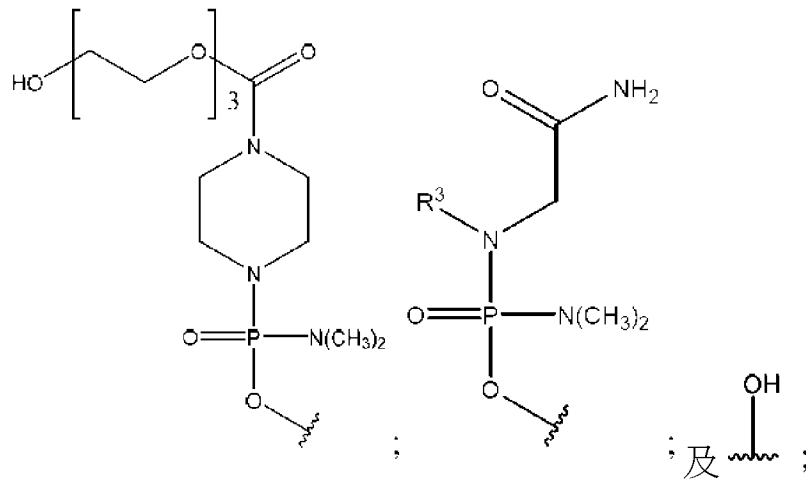


或其醫藥上可接受之鹽，其中：

每一Nu係核鹼基，其一起形成靶向序列；

Z係20至26之整數；

T係選自以下之部分：



其中R³係C₁-C₆烷基；且

R²係選自H、乙醯基、三苯甲基及4-甲氧基三苯甲基，

其中該靶向序列與選自由以下組成之群之外顯子45靶標區域互補：

H45A(-06+20)、H45A(-03+19)、H45A(-09+16)、H45A(-09+19)及H45A(-12+16)。

在包括(例如)式(I)之反義寡聚物之實施例之一些實施例中，靶向外顯子45之例示性反義寡聚物包括具有以下鑑別之靶向序列之彼等：

a)H45A(-06+20) SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3')其中Z係24；

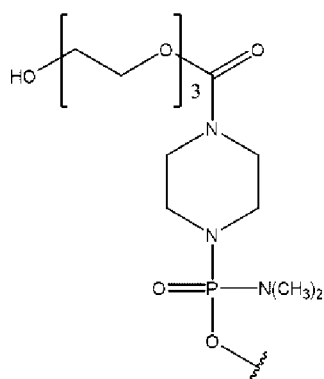
b)H45A(-03+19) SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3')其中Z係20；

c)H45A(-09+16) SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')其中Z係23；

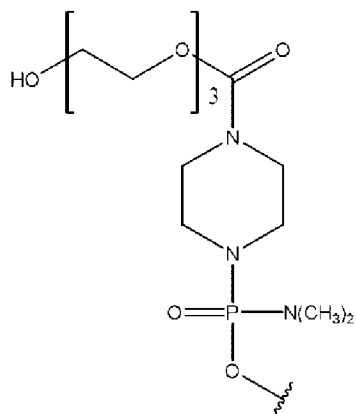
d)H45A(-09+19) SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')其中Z係26；及

e)H45A(-12+16) SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3')其中Z係26。

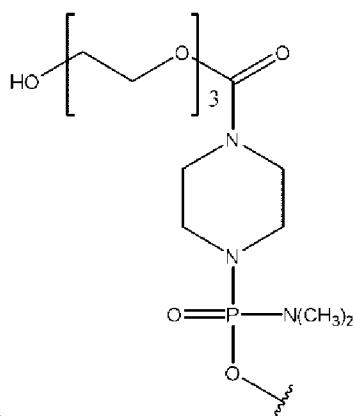
在某些實施例中，尿嘧啶鹼基可取代胸腺嘧啶鹼基。



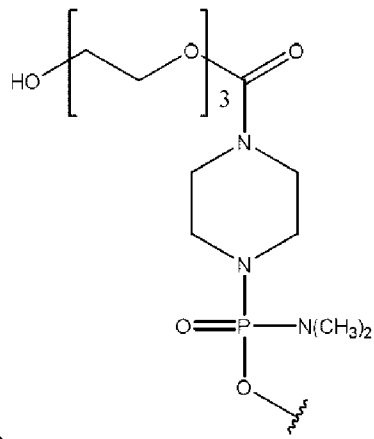
在某些實施例中，T係H。在一些實施例中，R²係H。在一些實施例中，Z係24。在一些實施例中，Z係20。在一些實施例中，Z係23。在一些實施例中，Z係26。



在其他實施例中，T係H，且R²係H，且Z係24。在

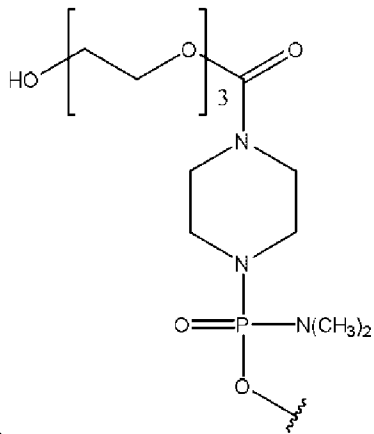


一些實施例中，T係H，且R²係H，且Z係20。在其他實施



例中，T係

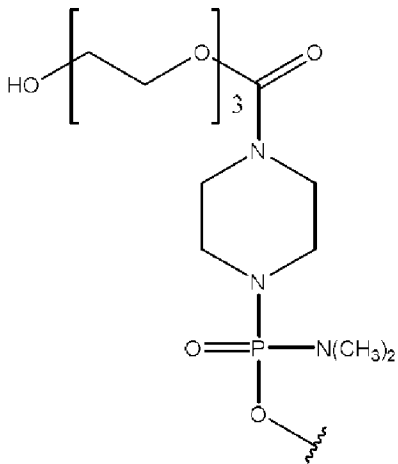
，R²係H，且Z係23。在一些實施例中，T



係

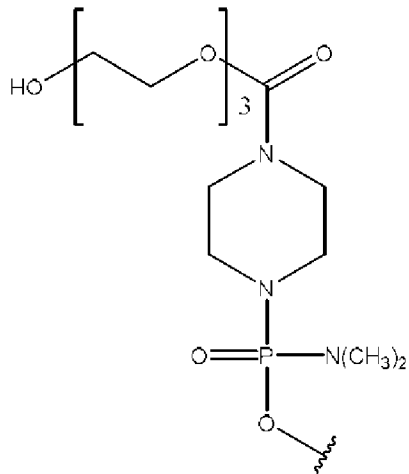
，R²係H，且Z係26。

在包括(例如)式(I)之反義寡聚物之實施例之一些實施例中，T係

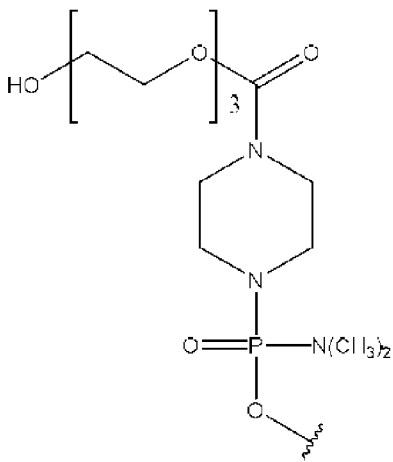


，靶向序列係 SEQ ID NO: 1 (5'-

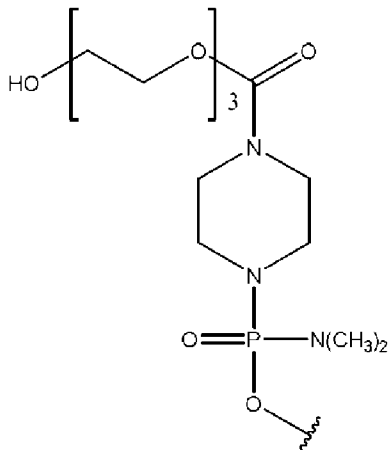
CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3')且Z係24。在其他實施例



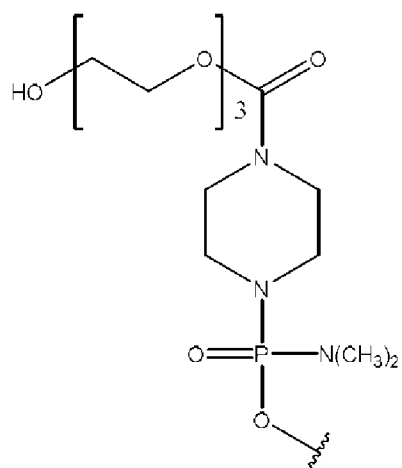
中，T係 $\text{N(CH}_3\text{)}_2$ ，靶向序列係 SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3')且Z係20。在其他實施例中，T係



，靶向序列係 SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')且Z係23。在一些實施例中，

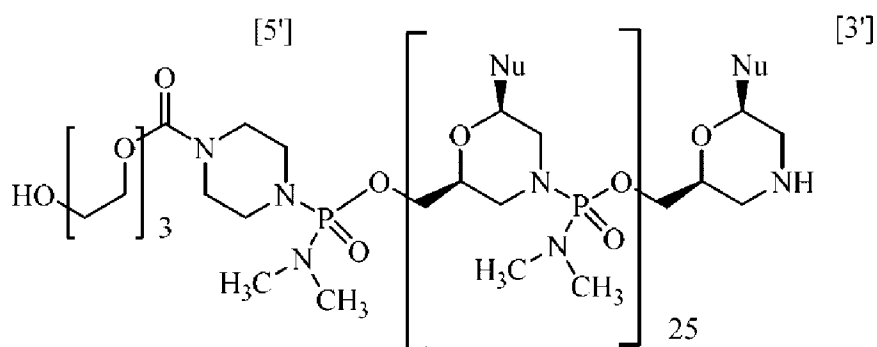


T係 $\text{N(CH}_3\text{)}_2$ ，靶向序列係 SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')且Z係26。在其他實施例



中，T係 C ，靶向序列係 SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3')且Z係26。

在另一態樣中，本揭示內容提供反義寡聚物或其醫藥上可接受之鹽，其係選自由以下組成之群：

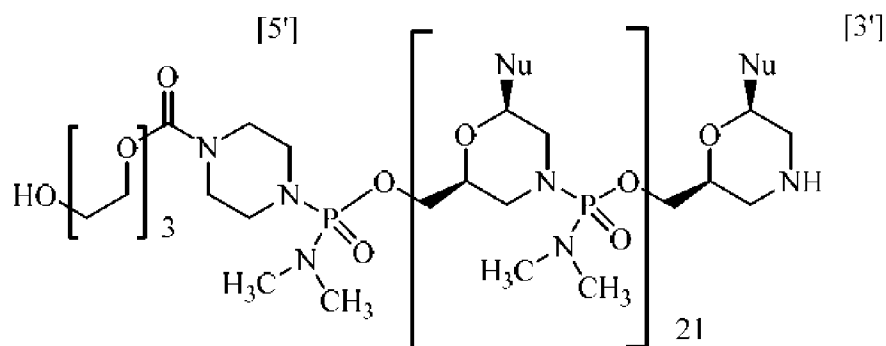


化合物1

其中每一Nu自1至26且5'至3'係以下(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	位置 編號5' 至3'	Nu
1	C	6	G	11	C	16	A	21	C	26	A
2	C	7	C	12	C	17	G	22	T		
3	A	8	C	13	T	18	T	23	G		
4	A	9	A	14	G	19	T	24	T		
5	T	10	T	15	G	20	C	25	A		

及

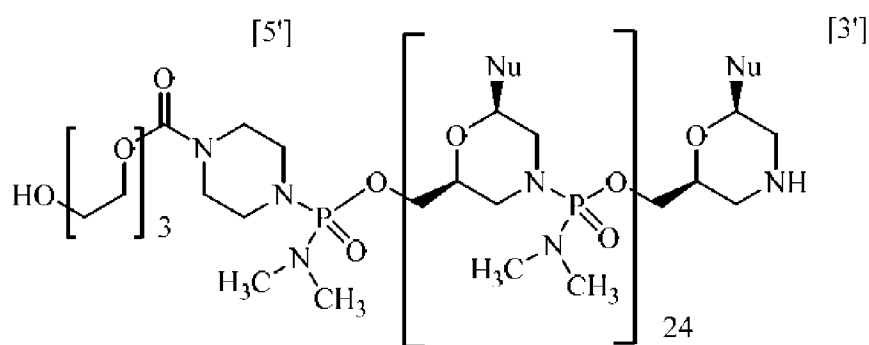


化合物2

其中每一Nu自1至22且5'至3'係以下(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	C	6	C	11	C	16	G	21	T
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G
3	A	8	A	13	G	18	T		
4	T	9	T	14	G	19	C		
5	G	10	C	15	A	20	C		

及



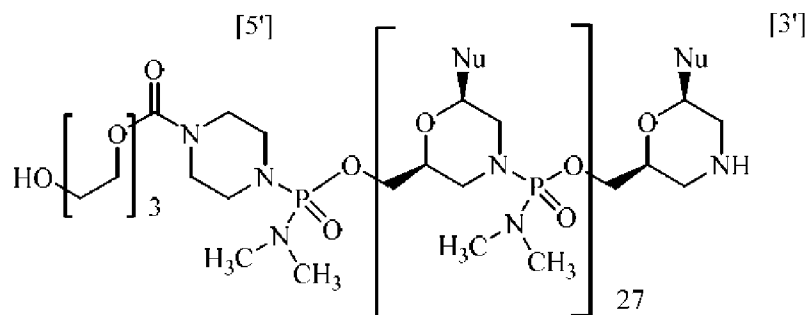
化合物3

其中每一Nu自1至25且5'至3'係以下(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	T	6	T	11	G	16	C	21	A

2	G	7	C	12	A	17	C	22	A
3	C	8	C	13	G	18	T	23	G
4	C	9	T	14	T	19	G	24	A
5	A	10	G	15	T	20	T	25	T

及

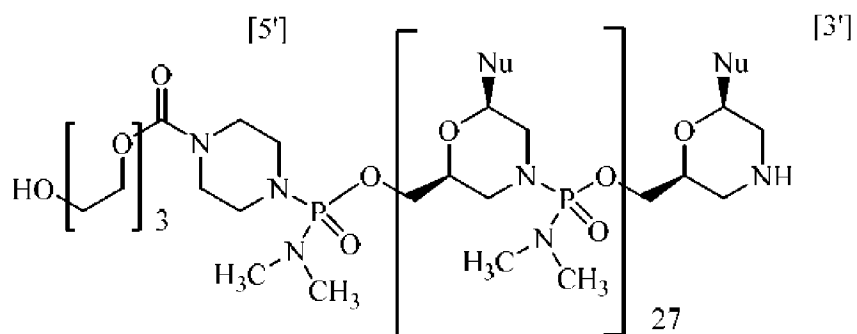


化合物4

其中每一Nu自1至28且5'至3'係以下(SEQ ID NO: 4)：

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	位置 編號5' 至3'	Nu
1	C	6	C	11	C	16	G	21	T	26	G
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G	27	A
3	A	8	A	13	G	18	T	23	T	28	T
4	T	9	T	14	G	19	C	24	A		
5	G	10	C	15	A	20	C	25	A		

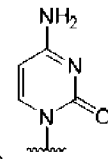
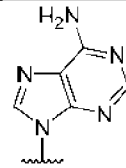
及



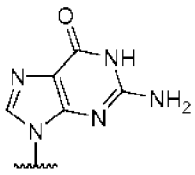
化合物5

其中每一Nu自1至28且5'至3'係以下(SEQ ID NO: 5)：

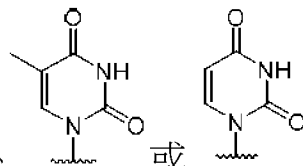
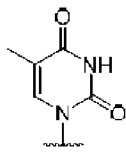
位置 編號5' 至3'	Nu	位置 編號5' 至3'	Nu	位置 編號5' 至3'	Nu	位置 編號5' 至3'	Nu	位置 編號5' 至3'	Nu	位置 編號5' 至3'	Nu
1	T	6	T	11	G	16	C	21	A	26	A
2	G	7	C	12	A	17	C	22	A	27	C
3	C	8	C	13	G	18	T	23	G	28	C
4	C	9	T	14	T	19	G	24	A		
5	A	10	G	15	T	20	T	25	T		



其中對於化合物1至5之每一者，A係



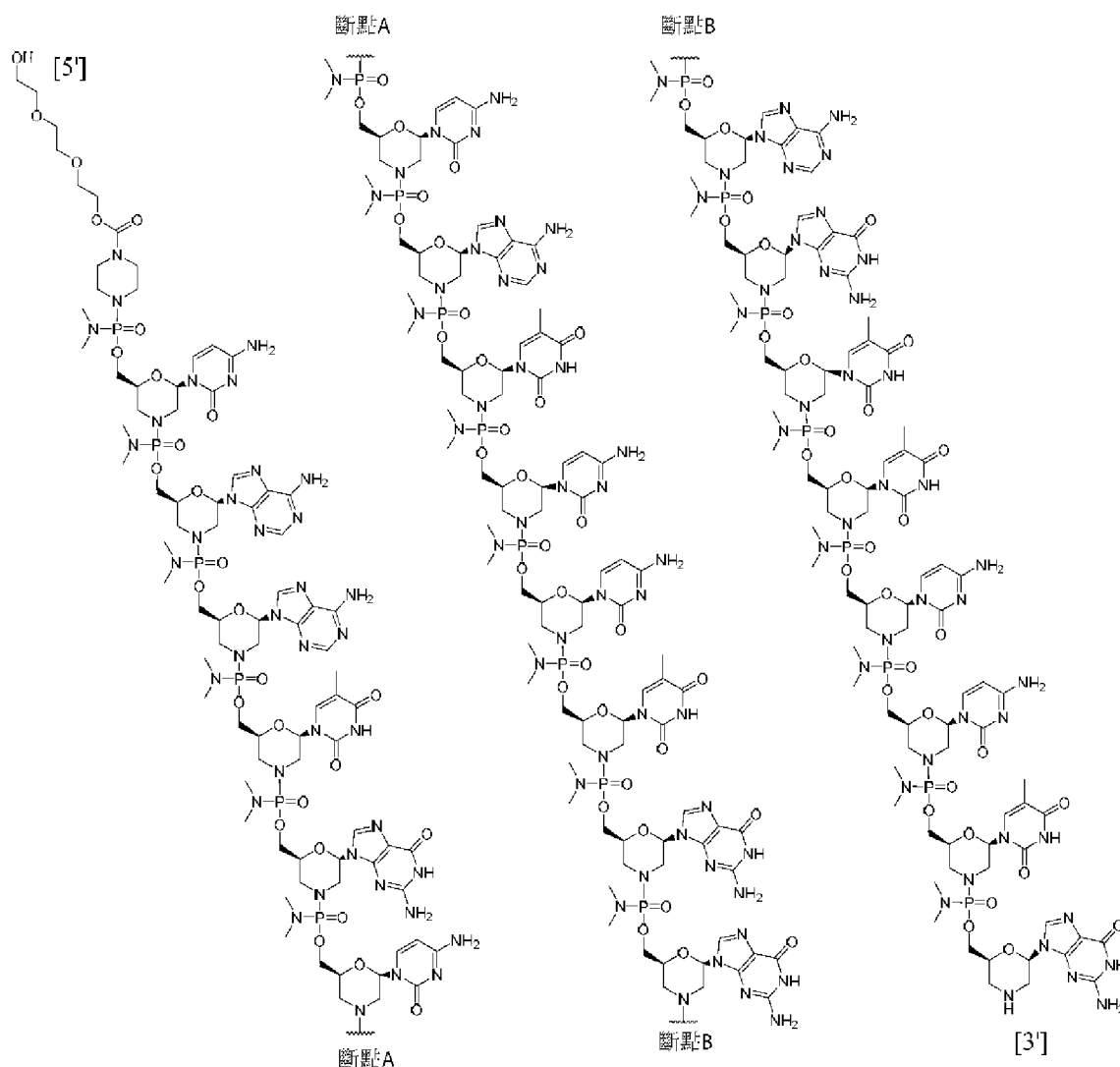
，且T係



在一些實施例中，T係

在一個實施例中，本揭示內容提供以下結構之反義寡聚物SRP-4045

(卡西莫森(casimersen))：



為清晰起見，包括(例如)上文卡西莫森結構之本揭示內容之結構自5'至3'係連續的，且為便於以緊湊形式繪示整個結構，已將標記為「斷點A」及「斷點B」之各種圖解說明斷點包括在內。如熟習此項技術者將理解，例如，「斷點A」之每一指示顯示在該等點繼續結構之圖解說明。熟習此項技術者理解，對於上文結構中之「斷點B」之每一情況亦係如此。然而，圖解說明斷點不會意欲指示且熟習此項技術者亦不會將其理解為意指上文結構之實際中止。

在另一實施例中，本揭示內容係關於長度為22至30個亞單元之反義寡聚物，其包括至少10、11、12、15、17、20、22、25、26、28或30個與肌肉萎縮蛋白基因之外顯子45靶標區域互補之連續鹼基，該外顯子45

靶標區域指定為選自由以下組成之群之退火位點：H45A(-06+20)、H45A(-03+19)、H45A(-09+16)、H45A(-09+19)及H45A(-12+16)，其中該反義寡聚物與誘導外顯子45跳躍之退火位點互補。

在另一態樣中，本揭示內容係關於長度為22至30個亞單元之反義寡聚物，其包括至少10、11、12、15、17、20、22、25、26、28或30個選自由SEQ ID NO: 1-5組成之群之序列之連續鹼基，其中該反義寡聚物與肌肉萎縮蛋白基因之外顯子45靶標區域互補且誘導外顯子45跳躍。在一個實施例中，SEQ ID NO: 1-5中之胸腺嘧啶鹼基視情況係尿嘧啶。

本揭示內容包括靶向外顯子45之例示性反義寡聚物，例如具有以下鑑別之靶向序列之彼等。

a)H45A(-06+20) SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3')；

b)H45A(-03+19) SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3')；

c)H45A(-09+16) SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')；

d)H45A(-09+19) SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')；

e)H45A(-12+16) SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3')。

在一個實施例中，反義寡聚物與退火位點H45A(-06+20)互補，例如SEQ ID NO: 1。在另一實施例中，反義寡聚物與退火位點H45A(-03+19)互補，例如SEQ ID NO: 2。在另一實施例中，反義寡聚物與退火位點

H45A(-09+16)互補，例如SEQ ID NO: 3。在另一實施例中，反義寡聚物與退火位點H45A(-09+19)互補，例如SEQ ID NO: 4。在另一實施例中，反義寡聚物與退火位點H45A(-12+16)互補，例如SEQ ID NO: 5。

在另一態樣中，本揭示內容提供醫藥組合物，其包括上文所闡述之反義寡聚物及醫藥上可接受之載劑。在一些實施例中，本揭示內容提供醫藥組合物，其包括上文所闡述之反義寡聚物及包括磷酸鹽緩衝劑之鹽水溶液。

在另一態樣中，本揭示內容提供治療患有遺傳疾病之患者之方法，其中在編碼特定蛋白質之基因中存在突變且該突變之效應可藉由外顯子跳躍消除，該方法包含以下步驟：(a) 根據本文中所闡述之方法選擇反義分子；及(b) 將該分子投與需要此治療之患者。本揭示內容亦涉及本揭示內容之經純化及反義寡聚物之用途，其用於製造用於治療遺傳疾病之藥劑。

在另一態樣中，本揭示內容提供治療特徵在於肌肉萎縮症(例如杜興氏肌肉萎縮症(DMD)或貝克氏肌肉萎縮症)之病狀之方法，該方法包括向患者投與有效量之經適當設計之本揭示內容之反義寡聚物，其與該患者之特定遺傳損傷有關。此外，本揭示內容提供預防性治療患者以預防或最小化肌肉萎縮症(例如杜興氏肌肉萎縮症或貝克氏肌肉萎縮症)之方法，其係藉由向該患者投與有效量之反義寡聚物或包含該等生物分子之一或多者之醫藥組合物來實施。

在一些實施例中，本揭示內容提供治療有需要之個體之杜興氏肌肉萎縮症(DMD)之方法，其中該個體具有適於外顯子45跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變，該方法包含向該個體投與本揭示內容之反義寡聚物。

在另一態樣中，本揭示內容提供在具有適於外顯子45跳躍之肌肉萎

縮蛋白基因突變之個體中產生肌肉萎縮蛋白之方法，該方法包含向該個體投與本揭示內容之反義寡聚物。

在另一態樣中，本揭示內容亦提供用於治療遺傳疾病之套組，該等套組至少包含包裝於適宜容器中之本揭示內容之反義寡聚物及其使用說明。

在結合各圖閱讀本揭示內容之以下詳細闡述時，將更全面地理解該等及其他目標及特徵。

【圖式簡單說明】

圖1繪示正常肌肉萎縮蛋白前體mRNA之一部分。

圖2繪示異常肌肉萎縮蛋白前體mRNA之一部分(DMD之實例)。

圖3繪示依替利森(eteplirsen)，其經設計以跳躍外顯子51，恢復前體mRNA之「框內」閱讀。

【實施方式】

相關申請案

本專利申請案主張於2016年6月30日提出申請之美國臨時專利申請案第62/356,923號及於2016年6月30日提出申請之美國臨時專利申請案第62/357,072號之權益。以上所提及之臨時專利申請案之全部內容均係以引用的方式併入本文中。

本揭示內容之實施例概言之係關於經改良之反義化合物及其使用方法，其經特定設計以誘導人類肌肉萎縮蛋白基因中之外顯子跳躍。肌肉萎縮蛋白在肌肉功能中起至關重要之作用，且各種肌肉有關疾病之特徵在於此基因之突變形式。因此，在某些實施例中，本文中所闡述之經改良反義化合物誘導人類肌肉萎縮蛋白基因之突變形式中之外顯子跳躍，例如杜興

氏肌肉萎縮症(DMD)及貝克氏肌肉萎縮症(BMD)中發現之突變肌肉萎縮蛋白基因。

由於由突變引起之異常mRNA剪接事件，該等突變之人類肌肉萎縮蛋白基因表現缺陷肌肉萎縮蛋白或表現完全不可量測之肌肉萎縮蛋白(一種導致各種形式之肌肉萎縮症之病狀)。為治療此病狀，本揭示內容之反義化合物與突變人類肌肉萎縮蛋白基因之預處理RNA之選定區域雜交，誘導外顯子跳躍及該原本異常剪接肌肉萎縮蛋白mRNA之差異剪接，且藉此使肌肉細胞產生編碼功能性肌肉萎縮蛋白之mRNA轉錄物。在某些實施例中，所得肌肉萎縮蛋白不一定係肌肉萎縮蛋白之「野生型」形式，而係截短但具功能性或具半功能性之肌肉萎縮蛋白形式。

藉由增加肌肉細胞中功能性肌肉萎縮蛋白之含量，該等及相關實施例可用於預防及治療肌肉萎縮症、尤其諸如DMD及BMD之肌肉萎縮症之彼等形式，其係以由異常mRNA剪接所致之缺陷肌肉萎縮蛋白之表現為特徵。本文中所闡述之特異性寡聚物進一步提供優於其他使用中之寡聚物之經改良肌肉萎縮蛋白-外顯子-特異性靶向，且藉此提供優於治療相關形式之肌肉萎縮症之替代方法之顯著且實際優點。

因此，本揭示內容係關於長度為22至30個亞單元之反義寡聚物，其能夠結合選定靶標以誘導人類肌肉萎縮蛋白基因中之外顯子跳躍，其中該反義寡聚物包含與選自由H45A(-06+20)、H45A(-03+19)、H45A(-09+16)、H45A(-09+19)及H45A(-12+16)組成之群之外顯子45靶標區域互補之鹼基序列，其中該寡聚物之鹼基鏈接至嗎啉基環結構，且其中該等嗎啉基環結構由將一個環結構之嗎啉基氮連接至毗鄰環結構之5'環外碳之含磷亞單元間鏈接體連接。在一個實施例中，反義寡聚物包含指定為SEQ

ID NO: 1-5之鹼基序列。

本揭示內容亦係關於長度為22至30個亞單元且包括至少10、12、15、17、20或更多個與肌肉萎縮蛋白基因之外顯子45靶標區域互補之連續鹼基之反義寡聚物，該外顯子45靶標區域指定為選自由以下組成之群之退火位點：H45A(-06+20)、H45A(-03+19)、H45A(-09+16)、H45A(-09+19)及H45A(-12+16)。

本揭示內容之其他反義寡聚物之長度為22至30個亞單元且包括至少10、12、15、17、20或更多個SEQ ID NO: 1-5之連續鹼基。在一些實施例中，SEQ ID NO: 1-5中之胸腺嘧啶鹼基視情況係尿嘧啶。

本揭示內容之例示性反義寡聚物闡述於下文中：

a) H45A(-06+20) SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3')；

b) H45A(-03+19) SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3')；

c) H45A(-09+16) SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')；

d) H45A(-09+19) SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')；

e) H45A(-12+16) SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3')。

除非另有定義，否則本文中所使用之所有技術及科學術語皆具有熟習本揭示內容所屬領域技術者一般理解之相同意義。儘管在本揭示內容之實踐或測試中可使用與本文中所闡述之任何方法及材料類似或等效之彼

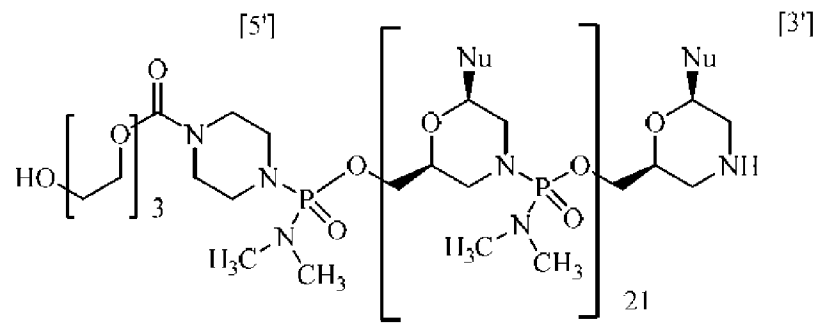
等，但本文闡述較佳方法及材料。出於本揭示內容之目的，下文定義以下術語。

I. 定義

「約」意指數量、程度、值、數字、頻率、百分比、尺寸、大小、量、重量或長度相對於參照數量、程度、值、數字、頻率、百分比、尺寸、大小、量、重量或長度變化至多30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。

如本文中關於個體或患者所使用之「適於外顯子45跳躍」意欲包括在肌肉萎縮蛋白基因中具有一或多個突變之個體及患者，此在無肌肉萎縮蛋白基因之外顯子45跳躍之情形下引起閱讀框位於框外，藉此破壞前體mRNA之轉譯，導致個體或患者不能產生肌肉萎縮蛋白。肌肉萎縮蛋白基因之以下外顯子中突變之非限制性實例適於外顯子45跳躍，該等突變之非限制性實例包括(例如)以下之缺失：外顯子7-44、外顯子12-44、外顯子18-44、外顯子44、外顯子46、外顯子46-47、外顯子46-48、外顯子46-49、外顯子46-51、外顯子46-53、外顯子46-55、外顯子46-57、外顯子46-59、外顯子46-60、外顯子46-67、外顯子46-69、外顯子46-75或外顯子46-78。確定患者是否具有適於外顯子跳躍之肌肉萎縮蛋白基因中之突變係為熟習此項技術者所熟知(例如，參見Aartsma-Rus等人 (2009) *Hum Mutat.* 30:293-299，Gurvich等人，*Hum Mutat.* 2009; 30(4) 633-640，及Fletcher等人 (2010) *Molecular Therapy* 18(6) 1218-1223.)。

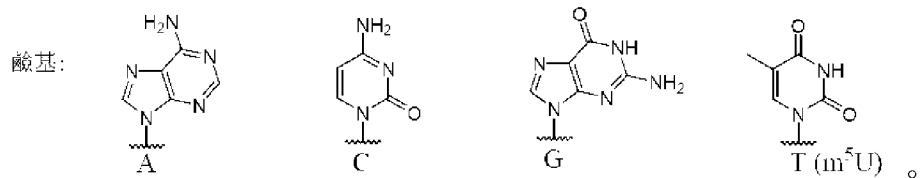
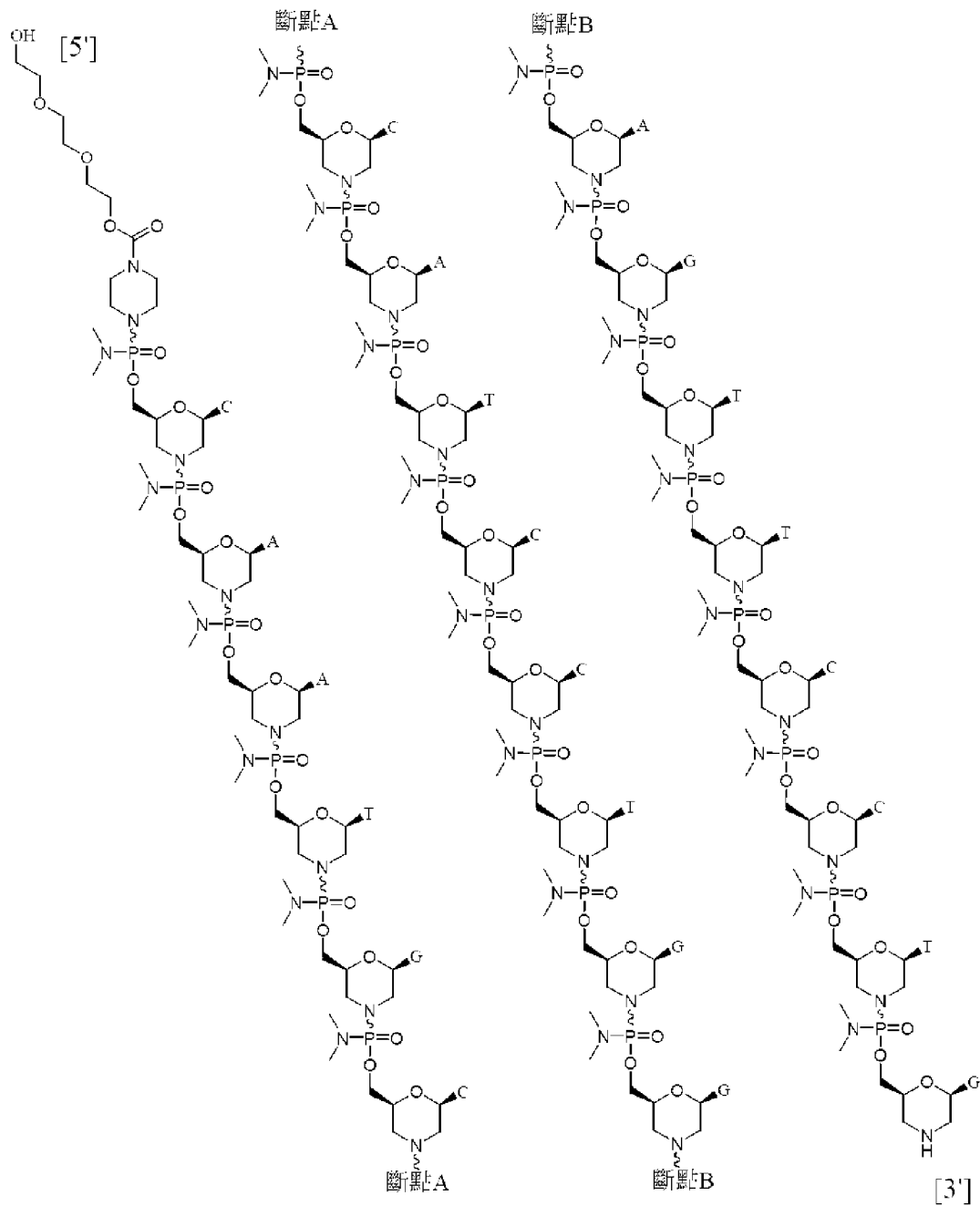
術語「反義寡聚物」及「寡聚物」可互換使用且係指由亞單元間鏈接體連結之環狀亞單元之序列，其中每一環狀亞單元係由以下組成：(i) 核糖或其衍生物；及(ii) 與其結合之鹼基配對部分，使得鹼基配對部分之



其中每一Nu自1至22且5'至3'係以下(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	C	6	C	11	C	16	G	21	T
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G
3	A	8	A	13	G	18	T		
4	T	9	T	14	G	19	C		
5	G	10	C	15	A	20	C		

及(序列揭示為SEQ ID NO: 2)



術語「互補」及「互補性」係指兩個或更多個藉由沃森-克裡克鹼基配對規律彼此相關之多核苷酸(即，核苷酸序列)。舉例而言，序列「T-G-A (5'→3')」與序列「A-C-T (3'→5')」互補。互補性可係「部分」的，其中根據鹼基配對規律既定靶向多核苷酸之少於所有核酸鹼基與靶標多核

苷酸匹配。或者，既定靶向多核苷酸與靶標多核苷酸之間可存在「完全」或「完美」(100%)互補性以使實例繼續。核酸鏈之間互補性之程度對核酸鏈之間之雜交效率及強度具有顯著效應。

「有效量」或「治療有效量」係指投與哺乳動物個體之治療化合物(例如反義寡聚物)作為單一劑量或作為一系列劑量之一部分有效產生期望治療效應之量。對於反義寡聚物而言，此效應通常藉由抑制選定靶標序列之轉譯或天然剪接處理來產生。

對於反義寡聚物而言，此效應通常藉由抑制選定靶標序列之轉譯或天然剪接處理或產生臨床上有意義量之肌肉萎縮蛋白(統計顯著性)來產生。在一些實施例中，有效量係至少20 mg/kg之包括反義寡聚物之組合物達一定時期以治療個體。在一些實施例中，有效量係至少20 mg/kg之包括反義寡聚物之組合物以使個體之肌肉萎縮蛋白陽性纖維之數量增加至正常之至少20%。在某些實施例中，有效量係至少20 mg/kg之包括反義寡聚物之組合物以相對於健康同等者將患者之步行距離(例如在6 MWT中)穩定、維持在20%差距或自其改良。在各個實施例中，有效量係至少20 mg/kg至約30 mg/kg、約25 mg/kg至約30 mg/kg或約30 mg/kg至約50 mg/kg。在一些實施例中，有效量係約30 mg/kg或約50 mg/kg。在另一態樣中，有效量係至少20 mg/kg、約25 mg/kg、約30mg/kg或約30 mg/kg至約50 mg/kg達至少24週、至少36週或至少48週，至藉此將個體之肌肉萎縮蛋白陽性纖維之數量增加至正常之至少20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%，及相對於健康之同等者將患者之步行距離(例如在6 MWT中)穩定、維持在20%差距或自其改良。在一些實施例中，治療將患者之肌肉萎縮蛋白陽性纖維之數量增加至正常之20-

60%或30-50%。

「增強(enhance或enhancing)」或「增加(increase或increasing)」或「刺激(stimulate或stimulating)」通常係指與無反義化合物或對照化合物所引起之反應相比，一或多種反義化合物或醫藥組合物在細胞或個體中產生或引起更大之生理學反應(即，下游效應)之能力。可量測之生理學反應可包括肌肉組織中肌肉萎縮蛋白之功能性形式之表現增加或肌肉萎縮蛋白相關生物學活性之增加以及自業內之瞭解及本文之闡述顯而易見之其他反應。亦可量測增加之肌肉功能，包括肌肉功能增加或改良約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。亦可量測表現功能性肌肉萎縮蛋白之肌肉纖維之百分比，包括在約1%、2%、%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%之肌肉纖維中肌肉萎縮蛋白表現增加。舉例而言，已顯示，若25-30%之纖維表現肌肉萎縮蛋白，則可產生大約40%之肌肉功能改良(例如，參見DelloRusso等人，Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002)。「增加」或「增強」量通常係「統計學顯著」量，且可包括為由無反義化合物(不存在藥劑)或對照化合物所產生之量之1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50或更多倍(例如，500倍、1000倍)(包括之間且大於1之所有整數及小數點，例如，1.5、1.6、1.7、1.8等)之增加。

如本文中所使用，術語「功能」及「功能性」及諸如此類係指生物

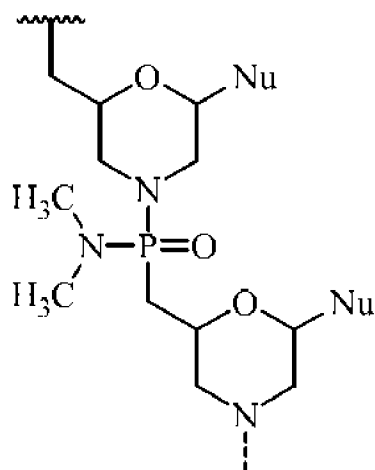
學、酶促或治療功能。

「功能性」肌肉萎縮蛋白一般係指通常與患有DMD或BMD之某些個體中存在之肌肉萎縮蛋白之改變或「缺陷」形式相比，具有足夠生物學活性以減少肌肉組織之進行性降解(此原本係肌肉萎縮症之特徵)之肌肉萎縮蛋白。在某些實施例中，功能性肌肉萎縮蛋白可具有約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100% (包括之間之所有整數)之野生型肌肉萎縮蛋白之活體外或活體內生物學活性，如根據業內常規技術所量測。作為一個實例，活體外肌肉培養物中之肌肉萎縮蛋白相關活性可根據以下來量測：肌管大小、肌原纖維結構有序性(或結構失序)、可收縮活性及乙醯膽鹼受體之自發聚集(例如，參見Brown等人，*Journal of Cell Science*. 112:209-216, 1999)。動物模型亦係研究疾病之發病機制之有價值之資源，且提供測試肌肉萎縮蛋白相關活性之手段。對於DMD研究，最廣泛使用之兩種動物模型係mdx小鼠及金毛獵犬肌肉萎縮症(GRMD)狗，該兩者均為肌肉萎縮蛋白陰性(例如，參見Collins & Morgan, *Int J Exp Pathol* 84: 165-172, 2003)。可使用該等及其他動物模型來量測各種肌肉萎縮蛋白之功能活性。包括肌肉萎縮蛋白之截短形式，例如藉由本揭示內容之某些外顯子-跳躍反義化合物所產生之彼等形式。

術語「錯配(mismatch或mismatches)」係指根據鹼基配對規律多核苷酸序列中不與靶標多核苷酸匹配之一或多個核苷酸(無論連續或單獨的)。雖然通常期望完美互補性，但一些實施例可包括一或多個但較佳6、5、4、3、2或1個關於靶標RNA之錯配。包括寡聚物內任何位置處之變異。在某些實施例中，本揭示內容之反義寡聚物包括序列中在內部中靠近末端變異之序列中之變異，且若存在，則通常在5'及/或3'末端之約6、

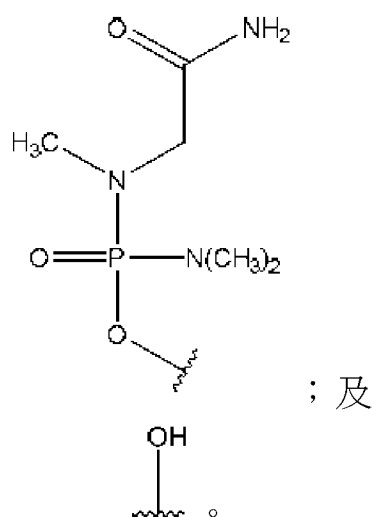
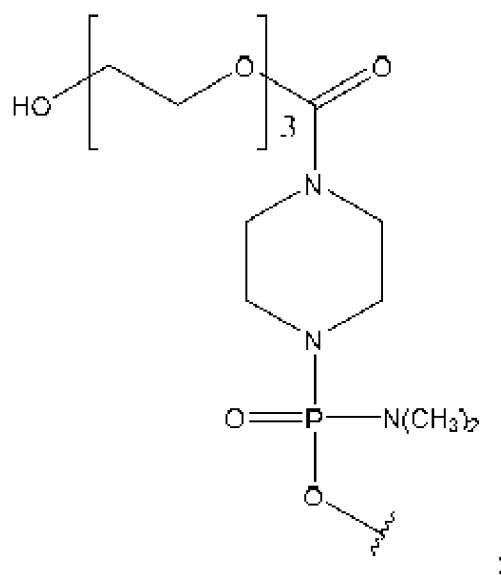
5、4、3、2或1個核苷酸內。

術語「嗎啉基」、「嗎啉基寡聚物」或「PMO」係指以下一般結構之磷醯二胺嗎啉基寡聚物：

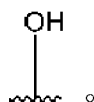


且如 Summerton, J. 等人，*Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997)之圖2中所描述。如本文中所闡述之嗎啉基意欲覆蓋前述一般結構之所有立體異構物及構型。嗎啉基寡聚物之合成、結構及結合特性詳述於美國專利第5,698,685號、第5,217,866號、第5,142,047號、第5,034,506號、第5,166,315號、第5,521,063號、第5,506,337號、第8,076,476號及第8,299,206號中，所有該等均係以引用的方式併入本文中。

在某些實施例中，嗎啉基在寡聚物之5'或3'端與「尾」部分偶聯以增加其穩定性及/或溶解性。例示性尾包括：



；及



片語「醫藥上可接受」意指物質或組合物在化學上及/或毒理學上與包含調配物之其他成分及/或以其治療之個體必須相容。

如本文中所使用之片語「醫藥上可接受之載劑」意指任何類型之無毒、惰性固體、半固體或液體填充劑、稀釋劑、囊封材料或調配物助劑。可用作醫藥上可接受之載劑之材料之一些實例係糖，例如乳糖、葡萄糖及蔗糖；澱粉，例如玉米澱粉及馬鈴薯澱粉；纖維素及其衍生物，例如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素及乙酸纖維素；粉末狀黃耆膠；麥芽；明膠；滑石；賦形劑，例如可可脂及栓劑蠟；油，例如花生油、棉籽油、紅花油、芝麻油、橄欖油、玉米油及豆油；二醇，例如丙二醇；酯，例如油酸乙酯

及月桂酸乙酯；瓊脂；緩衝劑，例如氫氧化鎂及氫氧化鋁；海藻酸；不含熱原之水；等滲鹽水；林格氏溶液(Ringer's solution)；乙醇及磷酸鹽緩衝溶液，以及其他無毒相容性潤滑劑(例如月桂基硫酸鈉及硬脂酸鎂)，且根據調配者之判斷，著色劑、釋放劑、塗覆劑、甜味劑、矯味劑及芳香劑、防腐劑及抗氧化劑亦可存在於組合物中。

術語「恢復」肌肉萎縮蛋白合成或產生通常係指在用如本文中所闡述之反義寡聚物治療後，在患有肌肉萎縮症之患者中產生肌肉萎縮蛋白(包括肌肉萎縮蛋白之截短形式)。在一些實施例中，治療使得患者中新的肌肉萎縮蛋白產生增加1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100% (包括之間之所有整數)。在一些實施例中，治療將個體中肌肉萎縮蛋白陽性纖維之數量增加至正常之至少20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或約95%至100%。在其他實施例中，治療將個體中肌肉萎縮蛋白陽性纖維之數量增加至正常之約20%至約60%或約30%至約50%。治療後患者之肌肉萎縮蛋白陽性纖維之百分比可藉由肌肉生檢使用已知技術來測定。舉例而言，可自適宜肌肉取出肌肉生檢，例如患者之肱二頭肌。

陽性肌肉萎縮蛋白纖維之百分比之分析可在治療前及/或治療後或在整個治療過程之時間點實施。在一些實施例中，治療後生檢取自來自治療前生檢之對側肌肉。治療前及治療後肌肉萎縮蛋白表現研究可使用針對肌肉萎縮蛋白之任何適宜分析來實施。在一些實施例中，使用為肌肉萎縮蛋白標記物之抗體(例如單株或多株抗體)在來自肌肉生檢之組織切片上實施免疫組織化學檢測。舉例而言，可使用MANDYS106抗體，其係肌肉萎縮蛋白之高度敏感性標記物。可使用任何適宜二級抗體。

在一些實施例中，肌肉萎縮蛋白陽性纖維百分比係藉由使陽性纖維之數量除以所計數之總纖維來計算。正常肌肉樣品具有100%之肌肉萎縮蛋白陽性纖維。因此，肌肉萎縮蛋白陽性纖維百分比可表示為正常百分比。為控制治療前肌肉以及突變回復纖維中痕量含量之肌肉萎縮蛋白之百分比，可在計數治療後肌肉中肌肉萎縮蛋白陽性纖維時使用來自每一患者之治療前肌肉之切片設置基線。此可用作在該患者之治療後肌肉之切片中計數肌肉萎縮蛋白陽性纖維之臨限值。在其他實施例中，使用Bioquant影像分析軟體(Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN)，亦可使用經抗體染色之組織切片來進行肌肉萎縮蛋白定量。總肌肉萎縮蛋白螢光信號強度可報告為正常百分比。另外，利用單株或多株抗肌肉萎縮蛋白抗體之西方墨點(Western blot)分析可用來測定肌肉萎縮蛋白陽性纖維之百分比。舉例而言，可使用來自Novacastra之抗肌肉萎縮蛋白抗體NCL-Dys1。肌肉萎縮蛋白陽性纖維之百分比亦可藉由測定肌聚醣複合物(β , γ)及/或神經元NOS之組分之表現來分析。

在一些實施例中，利用本揭示內容之反義寡聚物之治療減緩或減少患有DMD之患者在不進行治療之情形下將預期之進行性呼吸肌功能障礙及/或衰竭。在一些實施例中，利用本揭示內容之反義寡聚物之治療可減少或消除在不進行治療之情形下將預期之對於通氣輔助之需要。在一些實施例中，用於跟蹤疾病過程之呼吸功能之量測以及潛在治療性干預之評估包括最大吸氣壓(MIP)、最大呼氣壓(MEP)及用力肺活量(FVC)。MIP及MEP分別量測人在吸氣及呼氣期間可產生之壓力值，且係呼吸肌力之敏感量度。MIP係隔膜肌無力之量度。

在一些實施例中，MEP可在其他肺功能測試(包括MIP及FVC)變化之

前下降。在某些實施例中，MEP可係呼吸功能障礙之早期指標。在某些實施例中，FVC可用於量測在最大吸氣後強制呼氣期間所排出空氣之總體積。在患有DMD之患者中，FVC伴隨身體生長而增加直至十幾歲為止。然而，隨著生長減緩或因疾病進展而受阻及肌肉無力進展，肺活量進入下降階段，且在10至12歲以後以每年約8%至8.5%之平均速率下降。在某些實施例中，所預測之MIP百分比(針對重量調整之MIP)、所預測之MEP百分比(針對年齡調整之MEP)及所預測之FVC百分比(針對年齡及高度調整之FVC)係支持性分析。

如本文中所使用之「個體」包括可利用本揭示內容之反義化合物治療之展現症狀或處於展現症狀風險中之任何動物，例如患有或處於患有DMD或BMD或與該等病狀相關之任何症狀(例如，肌肉纖維損失)之風險中之個體。適宜個體(患者)包括實驗室動物(例如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、農場動物及家畜或寵物(例如貓或狗)。包括非人類靈長類動物及較佳人類患者。亦包括在具有適於外顯子45跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變之個體中產生肌肉萎縮蛋白之方法。

「治療」個體(例如哺乳動物，例如人類)或細胞係用於試圖改變個體或細胞之天然過程之任一類干預。治療包括(但不限於)投與寡聚物或其醫藥組合物，且可以預防性方式實施，或在病理性事件開始後或與病原體接觸後實施。治療包括對與肌肉萎縮蛋白相關之疾病或病狀之症狀或病理學(如在某些形式之肌肉萎縮症中)之任何期望效應，且可包括(例如)所治療疾病或病狀之一或多個可量測標記物之微小變化或改良。亦包括「預防性」治療，其可係關於降低所治療疾病或病狀之進展速率，延遲該疾病或病狀之發作，或降低其發作之嚴重度。「治療」或「預防」並不一定指示

完全根除、治癒或預防疾病或病狀或其相關症狀。

在一些實施例中，利用本揭示內容之反義寡聚物之治療增加新的肌肉萎縮蛋白產生、延遲疾病進展、減緩或減少行走能力之損失、減少肌肉發炎、減少肌肉損傷、改良肌肉功能、減少肺功能損失及/或增強肌肉再生，預期在不進行治療之情形下將出現上述不利情形。在一些實施例中，治療維持、延遲或減緩疾病進展。在一些實施例中，治療維持行走能力或減少行走能力之損失。在一些實施例中，治療維持肺功能或減少肺功能損失。在一些實施例中，治療維持或增加患者之穩定步行距離，如藉由(例如) 6分鐘步行測試(6 Minute Walk Test, 6MWT)所量測。在一些實施例中，治療維持或減少步行/奔跑10米之時間(即，10米步行/奔跑測試)。在一些實施例中，治療維持或減少自仰臥站立之時間(即，站起時間(time to stand)測試)。在一些實施例中，治療維持或減少攀爬四級標準樓梯之時間(即，四級樓梯攀爬測試)。在一些實施例中，治療維持或減少患者之肌肉發炎，如藉由(例如) MRI (例如，腿部肌肉之MRI)所量測。在一些實施例中，MRI量測T2及/或脂肪分數以鑑別肌肉變性。MRI可鑑別由發炎、水腫、肌肉損傷及脂肪浸潤所致之肌肉結構及組成之變化。

在一些實施例中，利用本揭示內容之反義寡聚物之治療增加新的肌肉萎縮蛋白產生且減緩或減少在不進行治療之情形下將預期之行走能力損失。舉例而言，治療可穩定化、維持、改良或增加個體之步行能力(例如，使行走能力穩定化)。在一些實施例中，治療維持或增加患者之穩定步行距離，如藉由(例如) McDonald等人(Muscle Nerve, 2010 ; 42:966-74，其係以引用的方式併入本文中)所闡述之6分鐘步行測試(6MWT)所量測。6分鐘步行距離(6MWD)之變化可表示為絕對值、百分比變化或預測

值%之變化。在一些實施例中，相對於健康之同等者，治療將個體在6MWT中之穩定步行距離維持在20%差距或自其改良。在6MWT中，相對於健康同等者之典型表現，DMD患者之表現可藉由計算預測值%來確定。舉例而言，所預測之6MWD%可使用以下針對男性之方程式來計算： $196.72 + (39.81 \times \text{年齡}) - (1.36 \times \text{年齡}^2) + (132.28 \times \text{高度(米)})$ 。對於女性，所預測之6MWD%可使用以下方程式來計算： $188.61 + (51.50 \times \text{年齡}) - (1.86 \times \text{年齡}^2) + (86.10 \times \text{高度(米)})$ (Henricson等人，PLoS Curr., 2012, 第2版，其係以引用的方式併入本文中)。在一些實施例中，利用反義寡聚物之治療將患者之穩定步行距離自基線增加至大於3、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30或50米(包括之間之所有整數)。

患有DMD之患者之肌肉功能損失可在正常的童年生長及發育之背景下發生。實際上，儘管存在進行性肌肉損傷，但患有DMD之年齡較小兒童在約1年之過程中可顯示6MWT期間之步行距離增加。在一些實施例中，將來自患有DMD之患者之6MWD與典型發育之對照個體及來自年齡及性別匹配個體之現有規範性數據進行比較。在一些實施例中，可使用擬合至規範性數據之基於年齡及高度之方程式計及正常生長及發育。此一方程式可用於將6MWD轉化為患有DMD之個體之預測值百分比(預測值%)。在某些實施例中，所預測之6MWD數據%之分析代表計及正常生長及發育之方法，且可顯示早齡期(例如，小於或等於7歲)功能之增益代表患有DMD之患者之能力的穩定而非改良(Henricson等人，PLoS Curr., 2012, 第2版，其係以引用的方式併入本文中)。

提出並公開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 4, 644-654)。在測試若干個略微不同之反義分子

(所有均針對相同靶標區域)時，此命名法變得尤其有意義，如下所示：

$H\#A/D(x:y)$ 。

第一個字母表示物種(例如H：人類，M：鼠類，C：犬類)。「#」表示靶標肌肉萎縮蛋白外顯子編號。「A/D」分別指示外顯子開始及結束處受體或供體之剪接位點。(x y)代表退火坐標，其中「-」或「+」分別指示內含子或外顯子序列。舉例而言，A(-6+18)將指示靶標外顯子之前內含子之最後6個鹼基及靶標外顯子之前18個鹼基。最靠近之剪接位點將係受體，因此該等坐標之前將具有「A」。描述供體剪接位點處之退火坐標可係D(+2-18)，其中最後2個外顯子鹼基及前18個內含子鹼基對應於反義分子之退火位點。整個外顯子退火坐標將由A(+65+85)代表，換言之自該外顯子開始在第65個與第85個核苷酸之間之位點。

II. 反義寡聚物

A. 經設計以誘導外顯子45跳躍之反義寡聚物

在某些實施例中，本揭示內容之反義寡聚物與肌肉萎縮蛋白基因之外顯子45靶標區域互補且誘導外顯子45跳躍。具體而言，本揭示內容係關於長度為22至30個亞單元之反義寡聚物，其包括至少10、12、15、17、20、25或更多個與肌肉萎縮蛋白基因之外顯子45靶標區域互補之連續核苷酸，該肌肉萎縮蛋白基因之外顯子45靶標區域指定為選自以下之退火位點：H45A(-06+20)、H45A(-03+19)、H45A(-09+16)、H45A(-09+19)及H45A(-12+16)。反義寡聚物與退火位點互補，誘導外顯子45跳躍。

本揭示內容之反義寡聚物靶向肌肉萎縮蛋白前體mRNA且誘導外顯子45之跳躍，因此其自成熟剪接之mRNA轉錄物排除或跳躍。藉由跳躍外

顯子45，破壞之閱讀框恢復為框內突變。雖然DMD包含各種遺傳亞型，但本揭示內容之反義寡聚物經特異性設計以跳躍肌肉萎縮蛋白前體mRNA之外顯子45。適於跳躍外顯子45之DMD突變包括與外顯子45鄰接之外顯子之缺失(即包括外顯子44或外顯子46之缺失)，且包含DMD患者之亞群(8%)。

誘導外顯子45跳躍之PMO之序列經設計與肌肉萎縮蛋白前體mRNA之外顯子45內之特定靶標序列互補。PMO中之每一嗎啉基環鏈接至核鹼基，包括(例如) DNA中發現之核鹼基(腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤及胸腺嘧啶)。

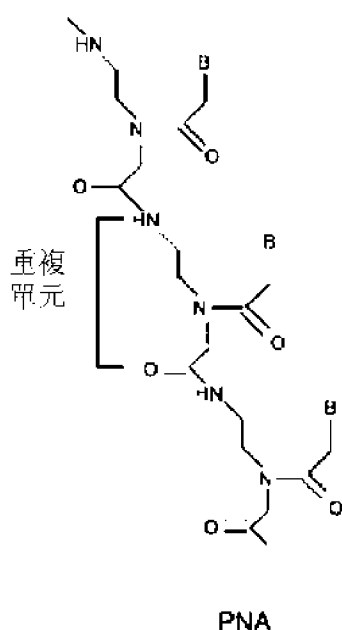
B. 寡聚物化學特徵

本揭示內容之反義寡聚物可採用各種反義化學物質。寡聚物化學物質之實例包括(但不限於)嗎啉基寡聚物、硫代磷酸酯修飾之寡聚物、2'-O-甲基修飾之寡聚物、肽核酸(PNA)、鎖定核酸(LNA)、硫代磷酸酯寡聚物、2'-O-MOE修飾之寡聚物、2'-氟修飾之寡聚物、2'-O,4'-C-伸乙基橋接核酸(ENA)、三環-DNA、三環-DNA硫代磷酸酯核苷酸、2'-O-[2-(N-甲基胺甲醯基)乙基]修飾之寡聚物，包括前述任一者之組合。硫代磷酸酯及2'-O-Me修飾之化學物質可組合以產生2'-O-Me-硫代磷酸酯骨架。例如，參見PCT公開案第WO/2013/112053號及第WO/2009/008725號，其係以全文引用的方式併入本文中。本揭示內容之寡聚物化學物質之例示性實施例進一步闡述於下文中。

1. 肽核酸(PNA)

肽核酸(PNA)係DNA類似物，其中骨架在結構上與去氧核糖骨架同形，其係由附接有嘧啶或嘌呤鹼基之N-(2-胺基乙基)甘胺酸單元組成。含

有天然嘧啶及嘌呤鹼基之PNA按照沃森-克裡克鹼基配對規律與互補寡聚物雜交，且在鹼基對識別方面模擬DNA (Egholm, Buchardt等人，1993)。PNA骨架係由肽鍵而非磷酸二酯鍵形成，從而使其非常適於反義應用(參見下文結構)。該骨架不帶電，從而產生展現大於正常熱穩定性之PNA/DNA或PNA/RNA雙鏈體。核酸酶或蛋白酶不識別PNA。PNA之非限制性實例繪示於下文中：



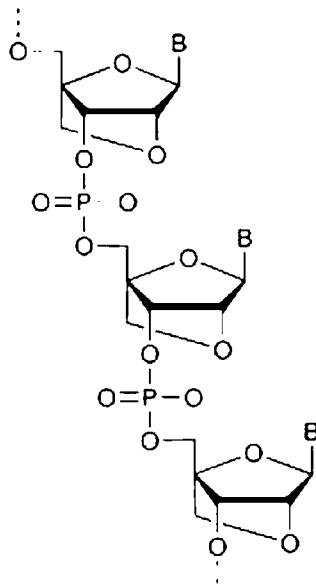
儘管關於天然結構發生了根本性結構變化，但PNA能夠以螺旋形式與DNA或RNA序列特異性結合。PNA之特性包括與互補DNA或RNA之高結合親和性、由單鹼基錯配所致之失穩效應、對核酸酶及蛋白酶之抗性、與DNA或RNA之雜交與鹽濃度無關及與同型嘌呤DNA形成三鏈體。PANAGENE™已研發出其專利性Bts PNA單體(Bts；苯并噻唑-2-磺醯基)及專有性寡聚化製程。使用Bts PNA單體之PNA寡聚化係由去保護、偶合及封端之重複性循環構成。PNA可使用業內已知之任何技術以合成方式來產生。例如，參見美國專利第6,969,766號、第7,211,668號、第7,022,851號、第7,125,994號、第7,145,006號及第7,179,896號。對於PNA之製備亦

參見美國專利第5,539,082號；第5,714,331號；及第5,719,262號。PNA化合物之其他教示可參見Nielsen等人，*Science*, 254:1497-1500, 1991。前述每一者均係以全文引用的方式併入。

2. 鎖定核酸(LNA)

反義寡聚物化合物亦可含有「鎖定核酸」亞單元(LNA)。「LNA」係一類稱為橋接核酸(BNA)之修飾之成員。BNA之特徵在於鎖定C3'-內(北方)糖褶中核糖環之構象之共價鏈接體。對於LNA而言，橋由2'-O與4'-C位置之間之亞甲基構成。LNA增強骨架預組織及鹼基堆積以增加雜交及熱穩定性。

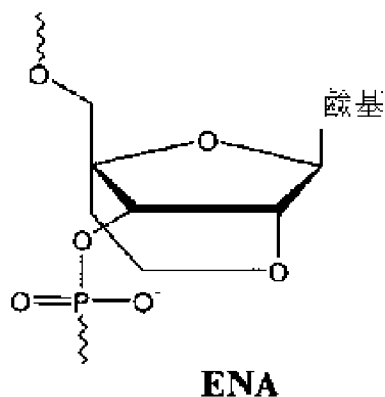
LNA之結構可參見(例如) Wengel等人，*Chemical Communications* (1998) 455；*Tetrahedron* (1998) 54:3607，及 *Accounts of Chem. Research* (1999) 32:301)；Obika等人，*Tetrahedron Letters* (1997) 38:8735；(1998) 39:5401，及 *Bioorganic Medicinal Chemistry* (2008) 16:9230，該等均係以全文引用的方式併入本文中。LNA之非限制性實例繪示於下文中：



LNA

本揭示內容之化合物可併入一或多種LNA；在一些情形下，化合物可完全由LNA構成。合成個別LNA核苷亞單元及其併入至寡聚物中之方法闡述於(例如)美國專利第7,572,582號、第7,569,575號、第7,084,125號、第7,060,809號、第7,053,207號、第7,034,133號、第6,794,499號及第6,670,461號中，該等專利之每一者均係以全文引用的方式併入。典型亞單元間連接體包括磷酸二酯及硫代磷酸酯部分；或者，可採用不含磷之連接體。其他實施例包括含LNA之化合物，其中每一LNA亞單元係由DNA亞單元來分隔。某些化合物係由交替之LNA及DNA亞單元構成，其中亞單元間連接體係硫代磷酸酯。

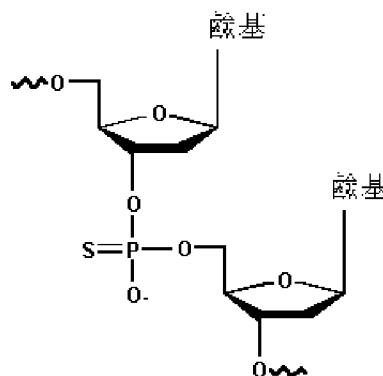
2'0,4'C-伸乙基橋接核酸(ENA)係BNA類別之另一成員。非限制性實例繪示於下文中：



ENA寡聚物及其製備闡述於Obika等人，Tetrahedron Lett 38 (50): 8735中，其係以全文引用的方式併入本文中。本揭示內容之化合物可併入一或多種ENA亞單元。

3. 硫代磷酸酯

「硫代磷酸酯」(或S-寡聚物)係其中一個非橋接氧由硫代替之正常DNA之變體。硫代磷酸酯之非限制性實例繪示於下文中：



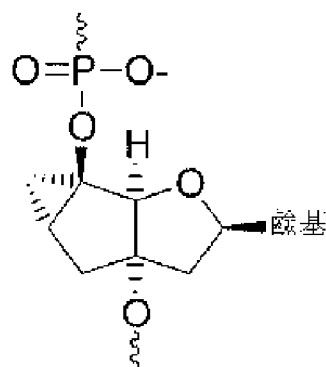
核苷間鍵之硫化減少內核酸酶及外核酸酶(包括5'至3'及3'至5' DNA POL 1外核酸酶、核酸酶S1及P1、RNase、血清核酸酶及蛇毒磷酸二酯酶)之作用。硫代磷酸酯係藉由以下兩種主要途徑製得：藉由於二硫化碳中之元素硫之溶液對氫磷酸酯之作用，或藉由利用二硫化四乙基秋蘭姆(tetraethylthiuram disulfide, TETD)或3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮1,1-二氧化物(BDTD)使亞磷酸三酯硫化之方法(例如，參見Iyer等人，J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990，其係以全文引用的方式併入本文中)。後一

方法避免了元素硫在大部分有機溶劑中之不溶性及二硫化碳之毒性之問題。TETD及BDTD方法亦產生更高純度之硫代磷酸酯。

4. 三環-DNA及三環-硫代磷酸酯核苷酸

三環-DNA (tc-DNA)係一類受約束DNA類似物，其中每一核苷酸係藉由引入環丙烷環來修飾以限制骨架之構象撓性並優化扭轉角 γ 之骨架幾何結構。含有腺嘌呤及胸腺嘧啶之同型鹼基tc-DNA與互補RNA形成格外穩定之A-T鹼基對。三環-DNA及其合成闡述於國際專利申請公開案第WO 2010/115993號中，該公開案係以全文引用的方式併入本文中。本揭示內容之化合物可併入一或多個三環-DNA核苷酸；在一些情形下，化合物可完全由三環-DNA核苷酸構成。

三環-硫代磷酸酯核苷酸係具有硫代磷酸酯亞單元間鏈接體之三環-DNA核苷酸。三環-硫代磷酸酯核苷酸及其合成闡述於國際專利申請公開案第WO 2013/053928號中，該公開案係以全文引用的方式併入本文中。本揭示內容之化合物可併入一或多個三環-DNA核苷酸；在一些情形下，化合物可完全由三環-DNA核苷酸構成。三環-DNA/三環-硫代磷酸酯核苷酸之非限制性實例繪示於下文中：

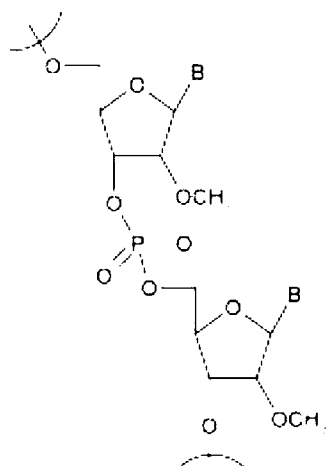


三環-DNA

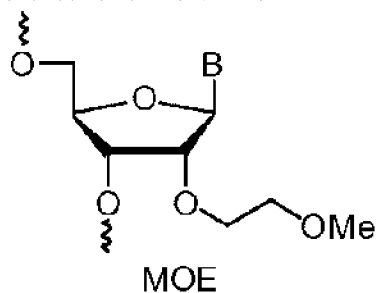
5. 2'-O-甲基、2'-O-MOE及2'-F寡聚物

「2'-O-Me寡聚物」分子在核糖分子之2'-OH殘基處攜帶甲基。2'-

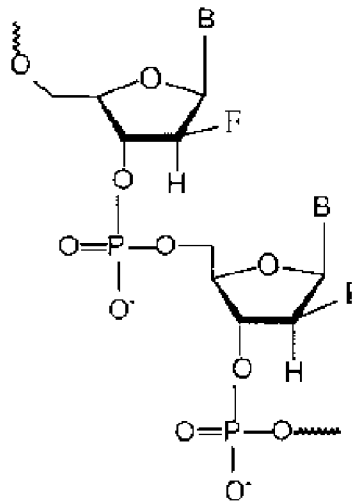
O-Me-RNA顯示與DNA相同(或相似)之行為，但受保護免於核酸酶降解。2'-O-Me-RNA亦可與硫代磷酸酯寡聚物(PTO)組合用於進一步穩定化。2'-O-Me寡聚物(磷酸二酯或硫代磷酸酯)可根據業內常規技術來合成(例如，參見Yoo等人，*Nucleic Acids Res.* 32:2008-16, 2004，該文獻係以全文引用的方式併入本文中)。2'-O-Me寡聚物之非限制性實例繪示於下文中：



2'-O-甲氧基乙基寡聚物(2'-O MOE) (如2'-O-Me寡聚物)在核糖分子之2'-OH殘基處攜帶甲氧基乙基且論述於Martin等人，*Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504, 1995中，該文獻係以全文引用的方式併入本文中。2'-O-MOE核苷酸之非限制性實例繪示於下文中：

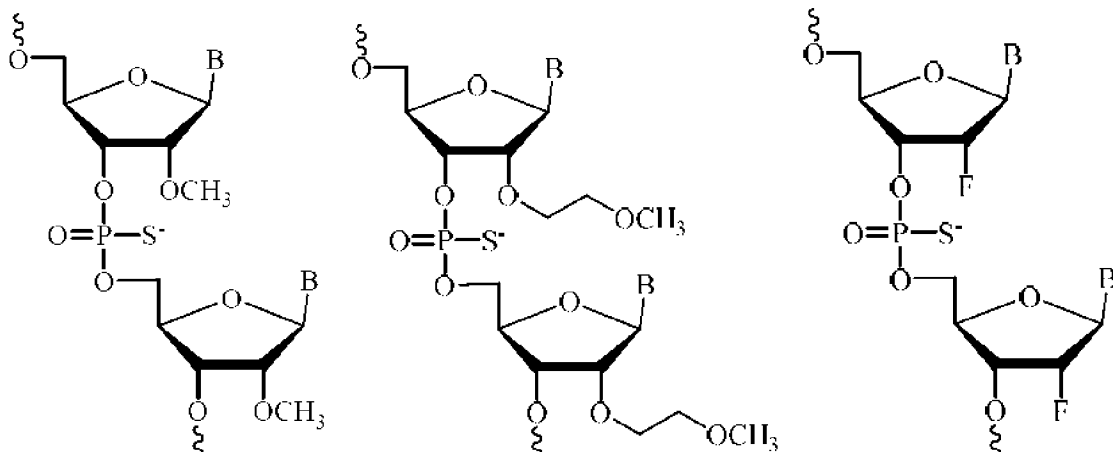


與先前烷基化之2'-OH核糖衍生物對比，2'-氟寡聚物在2'位置處具有氟基代替2'-OH。2'-F寡聚物之非限制性實例繪示於下文中：



2'-氟寡聚物進一步闡述於WO 2004/043977中，其係以全文引用的方式併入本文中。

2'-O-甲基、2'-O-MOE及2'-F寡聚物亦可包含一或多個硫代磷酸酯(PS)鏈接體，如下所繪示：

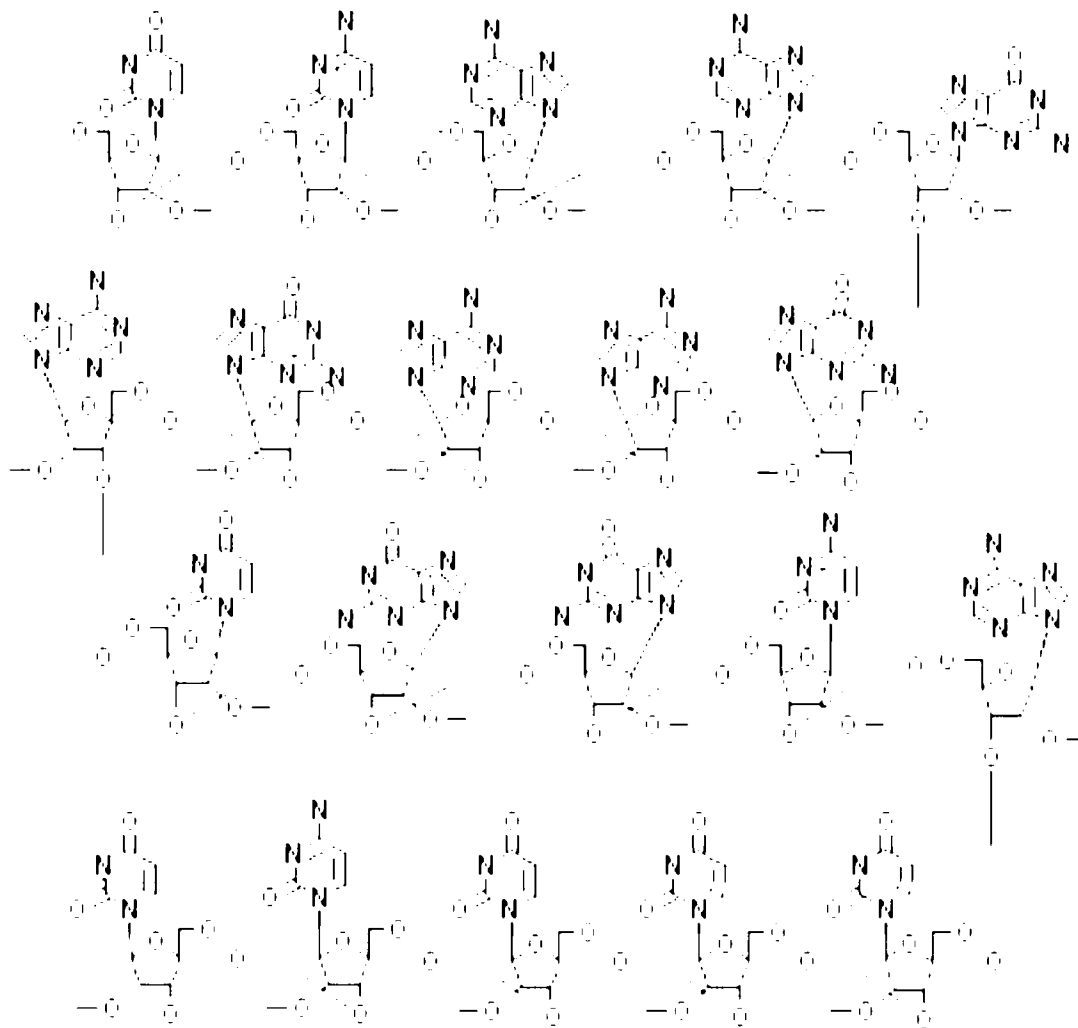


2'-O-甲基PS

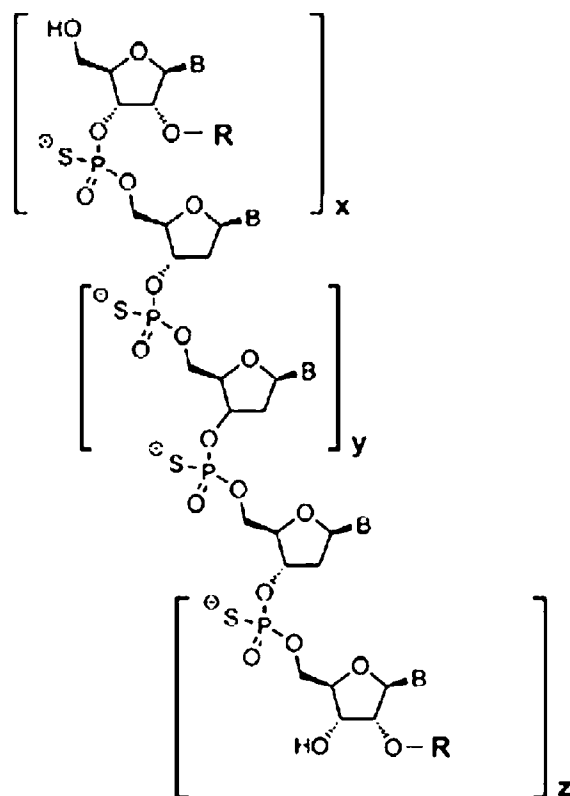
2'-O-MOE PS

2'-F PS

另外，2'-O-甲基、2'-O-MOE及2'-F寡聚物可在整個寡聚物中包含PS亞單元間鏈接體，例如如下文所繪示之2'-O-甲基PS寡聚物迪斯派森(drisapersen)：



或者，包含2'-O-甲基、2'-O-MOE及/或2'-F寡聚物之寡聚物可在如下所繪示之寡聚物末端包含PS鏈接體：



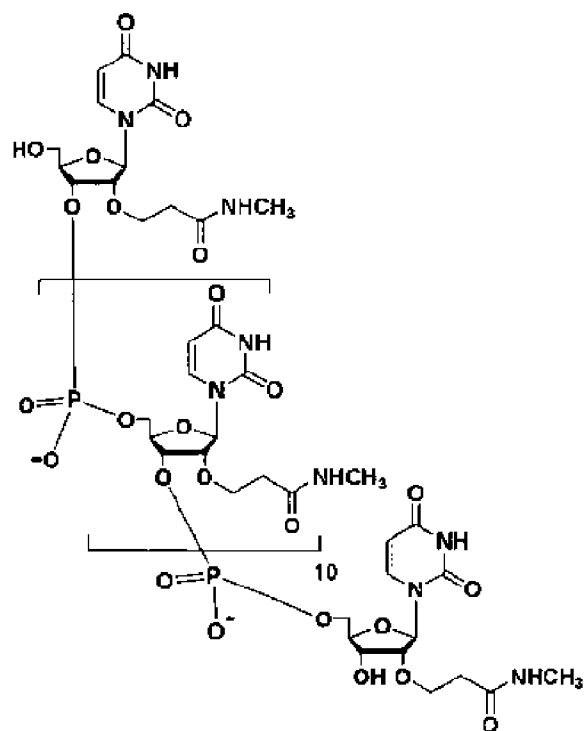
$R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, 甲氧基乙基(MOE)

其中, x、y、z 分別表示含於指定之 5'-翼、中央缺口及 3'-翼區域之每一者內之核苷酸之數量

本揭示內容之反義寡聚物可併入一或多個 2'-O-甲基、2'-O-MOE 及 2'-F 亞單元且可利用本文所闡述之任一亞單元間鏈接體。在一些情況中，本揭示內容之化合物可完全由 2'-O-甲基、2'-O-MOE 或 2'-F 亞單元構成。本揭示內容之化合物之一個實施例係完全由 2'-O-甲基亞單元構成。

6. 2'-O-[2-(N-甲基胺甲醯基)乙基]寡聚物(MCE)

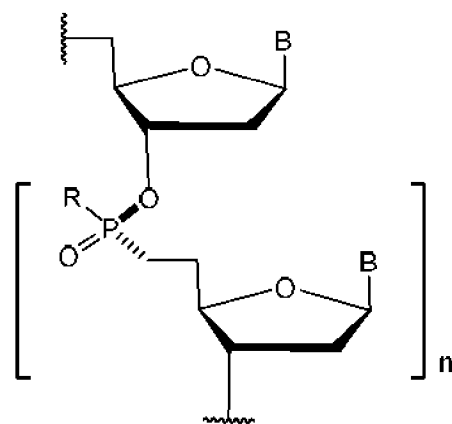
MCE 係可用於本揭示內容之化合物中之 2'-O 修飾之核糖核苷之另一實例。此處，2'-OH 衍生為 2-(N-甲基胺甲醯基)乙基部分以增加核酸酶抗性。MCE 寡聚物之非限制性實例繪示於下文中：



MCE及其合成闡述於Yamada等人，*J. Org. Chem.*, 76(9):3042-53中，該文獻係以全文引用的方式併入本文中。本揭示內容之化合物可併入一或多個MCE亞單元。

7. 立體特異性寡聚物

立體特異性寡聚物係每一含磷鏈接體之立體化學由使得產生實質上純之單一寡聚物之合成方法固定之彼等。立體特異性寡聚物之非限制性實例繪示於下文中：

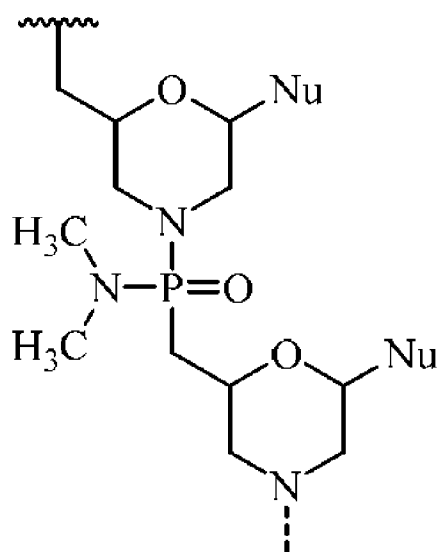


在以上實例中，寡聚物之每一磷具有相同的立體化學。其他實例包括上文所闡述之寡聚物。舉例而言，LNA、ENA、三環-DNA、MCE、2'

O-甲基、2' O-MOE、2'-F及基於嗎啉基之寡聚物可利用立體特異性含磷核苷間鏈接體來製備，該等核苷間鏈接體例如硫代磷酸酯、磷酸二酯、磷醯胺、磷醯二胺或其他含磷核苷間鏈接體。立體特異性寡聚物、製備方法、手性控制合成、手性設計及用於製備此等寡聚物之手性助劑詳述於(例如) WO2015107425、WO2015108048、WO2015108046、WO2015108047、WO2012039448、WO2010064146、WO2011034072、WO2014010250、WO2014012081、WO20130127858及WO2011005761中，該等之每一者均係以全文引用的方式併入本文中。

8. 嗎啉基寡聚物

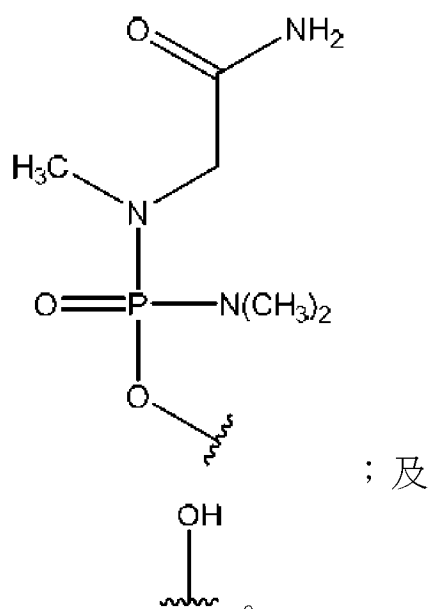
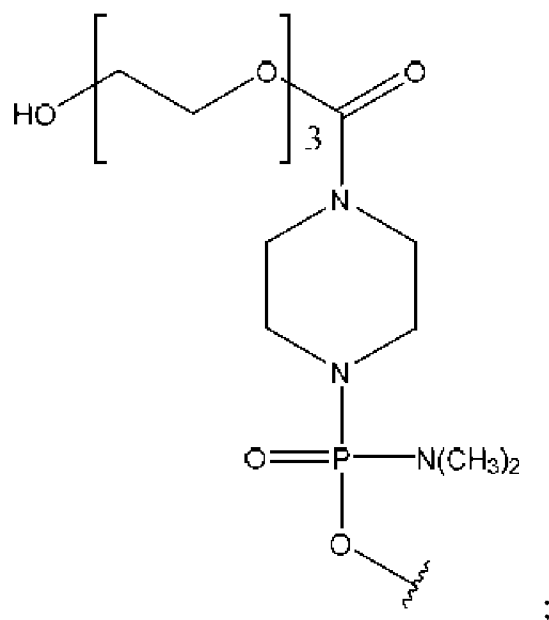
本揭示內容之例示性實施例係關於以下一般結構之磷醯二胺嗎啉基寡聚物：



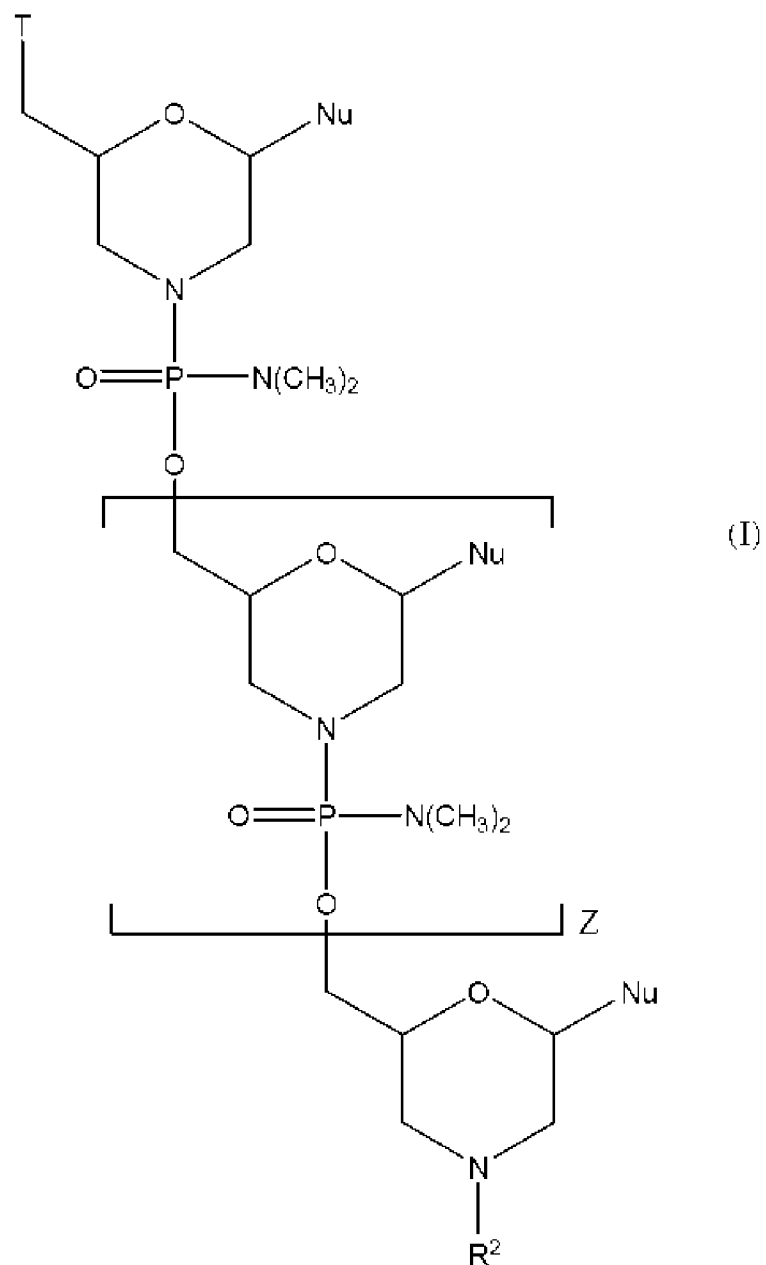
且如Summerton, J.等人，*Antisense & Nucleic Drug Development*, 7: 187-195 (1997)之圖2中所述。如本文中所闡述之嗎啉基意欲覆蓋前述一般結構之所有立體異構物及構型。嗎啉基寡聚物之合成、結構及結合特性詳述於美國專利第5,698,685號、第5,217,866號、第5,142,047號、第5,034,506號、第5,166,315號、第5,521,063號、第5,506,337號、第

8,076,476號及第8,299,206號中，所有該等均係以引用的方式併入本文中。

在某些實施例中，嗎啉基在寡聚物之5'或3'端與「尾」部分偶聯以增加其穩定性及/或溶解性。例示性尾包括：



在各個實施例中，本揭示內容之反義寡聚物可為式(I)：

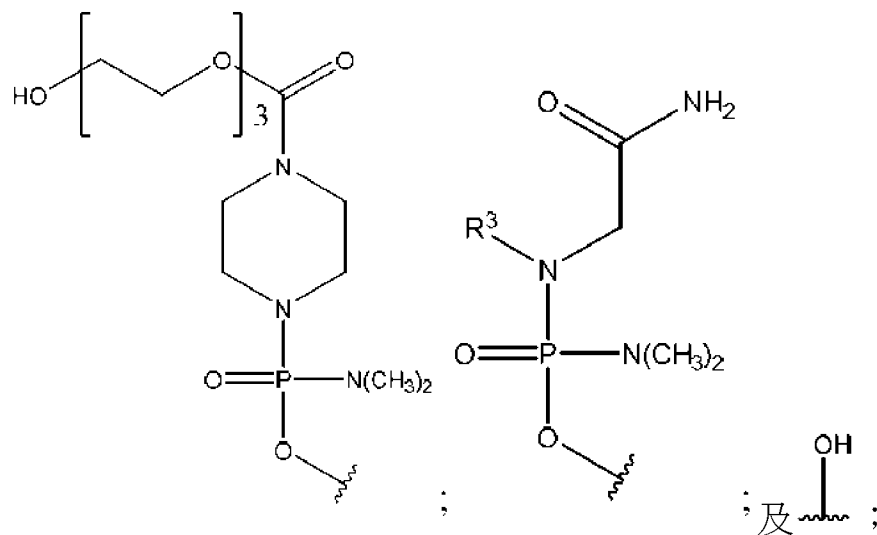


或其醫藥上可接受之鹽，其中：

每一Nu係核鹼基，其一起形成靶向序列；

Z係20至26之整數；

T係選自以下之部分：



其中R³係C₁-C₆烷基；且

R²係選自H、乙醯基、三苯甲基及4-甲氧基三苯甲基，

其中靶向序列與選自由H45A(-06+20)、H45A(-03+19)、H45A(-09+16)、H45A(-09+19)及H45A(-12+16)組成之群之外顯子45靶標區域互補。

在一些實施例中，靶向序列係選自：

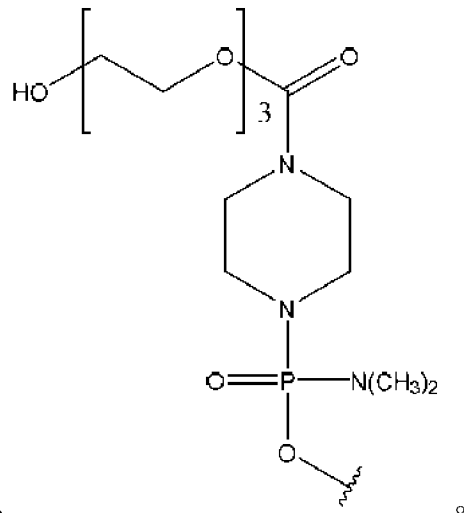
a) SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3')，其中Z係24；

b) SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3')，其中Z係20；

c) SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')，其中Z係23；

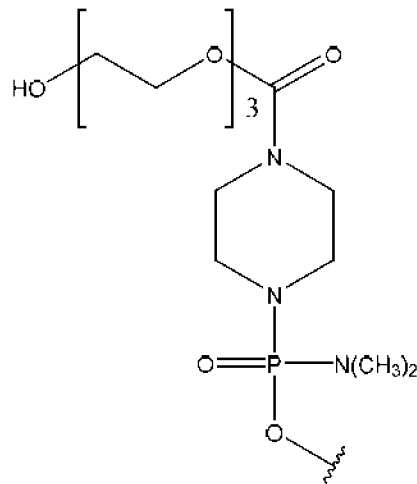
d) SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')，其中Z係26；且

e) SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3')，其中Z係26。



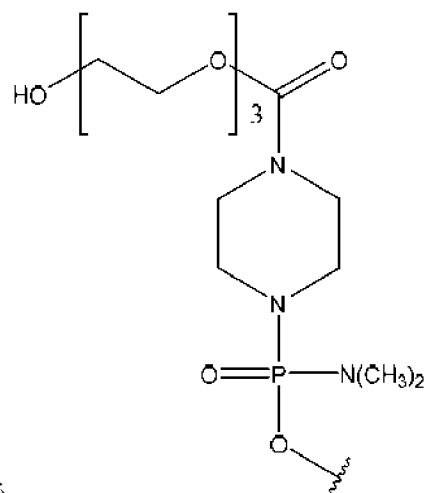
在各個實施例中，T係

在一些實施例中，R²係H。在某些實施例中，Z係24。在一些實施例中，Z係20。在一些實施例中，Z係23。在一些實施例中，Z係26。



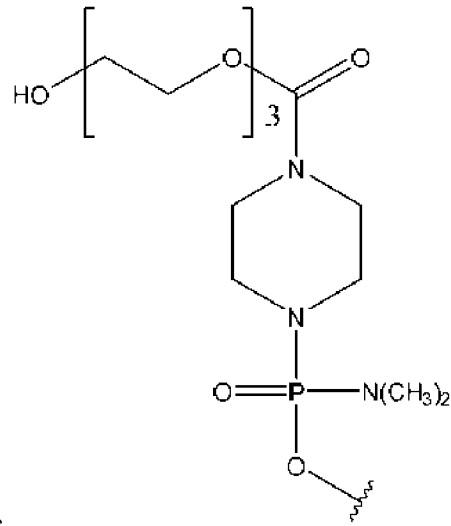
在一些實施例中，T係

，R²係H，且Z係24。



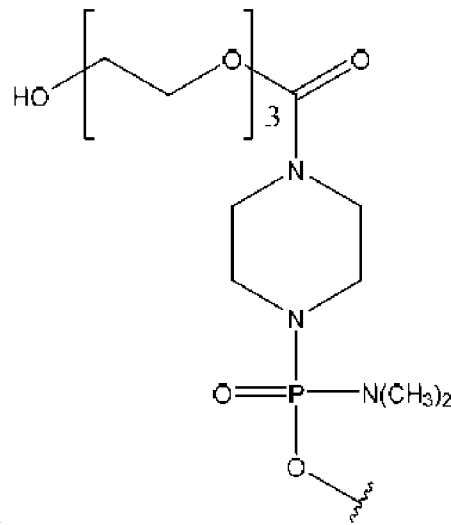
在一些實施例中，T係

，R²係H，且Z係20。在一



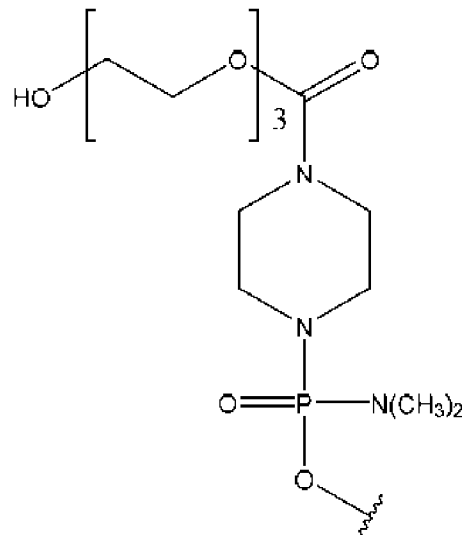
些實施例中，T係

，R²係H，且Z係23。在一些



實施例中，T係

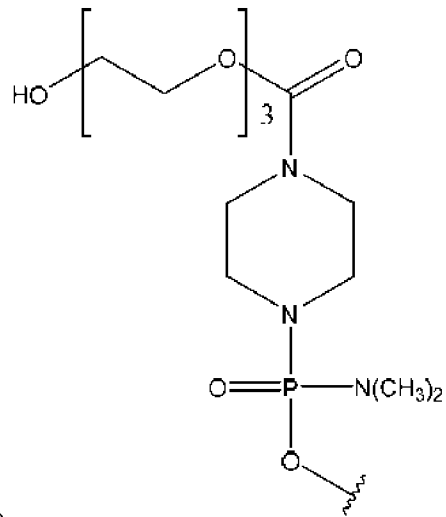
，R²係H，且Z係26。



在一些實施例中，T係

，靶向序列係SEQ

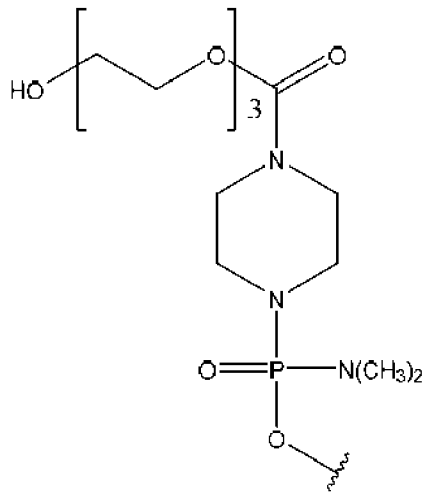
ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3')且Z係24。在



一些實施例中，T係

，靶向序列係SEQ ID NO: 2

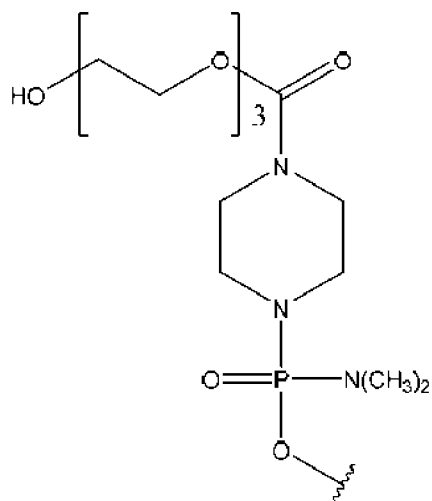
(5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3')且Z係20。在一些實施例中，T



係

，靶向序列係SEQ ID NO: 3 (5'-

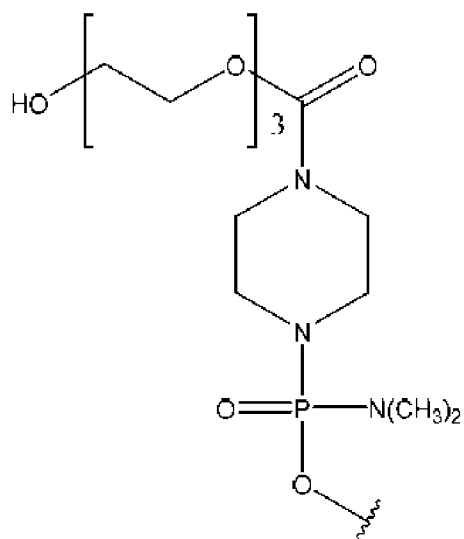
TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')且Z係23。在一些實施例中，



T係

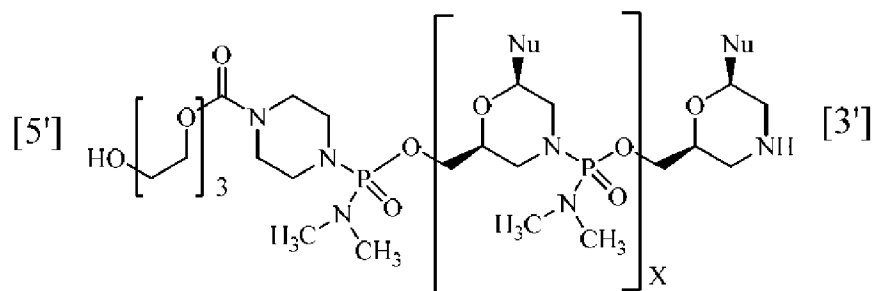
，靶向序列係SEQ ID NO: 4 (5'-

CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')且Z係26。在一些實施例



中，T係 A 、 C 、 G 、 T 、 U 、 C 、 G 、 A 、 T 、 C 、 C 、 T 、 G 、 G 、 A 、 G 、 T 、 T 、 C 、 T 、 G 、 T 、 A 、 A 、 G 、 A 、 T 、 A 、 C 、 C -3')且Z係26。

在一些實施例中，本揭示內容之反義寡聚物為式(II)：



(II)

或其醫藥上可接受之鹽，其中：

每一Nu係核鹼基，其一起形成靶向序列；且

X係21至29之整數，

其中靶向序列係選自：

a) SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3')，其中X係25；

b) SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3')，其中X係21；

c) SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAAGAT-3')，

其中X係24；

d)SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')，其中X係27；及

e)SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3')，其中X係27。

在包括(例如)式(II)之反義寡聚物之實施例之一些實施例中，靶向序列係SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3)且X係25。在包括(例如)式(II)之反義寡聚物之實施例之一些實施例中，靶向序列係SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3)且X係21。在包括(例如)式(II)之反義寡聚物之實施例之一些實施例中，靶向序列係SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3)且X係24。在包括(例如)式(II)之反義寡聚物之實施例之一些實施例中，靶向序列係SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3)且X係27。在包括(例如)式(II)之反義寡聚物之實施例之一些實施例中，靶向序列係SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3)且X係27。

在本揭示內容之實施例中，反義寡聚物係卡西莫森。

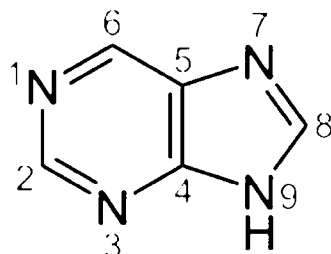
9. 核鹼基修飾及取代

在某些實施例中，本揭示內容之反義寡聚物係由RNA核鹼基及DNA核鹼基(業內通常簡稱為「鹼基」)構成。RNA鹼基通常稱為腺嘌呤(A)、尿嘧啶(U)、胞嘧啶(C)及鳥嘌呤(G)。DNA鹼基通常稱為腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及鳥嘌呤(G)。

在某些實施例中，寡聚物中之一或多個RNA鹼基或DNA鹼基可經除

RNA 鹼基或DNA 鹼基以外之鹼基修飾或取代。含有經修飾或取代之鹼基之寡聚物包括其中一或多個核酸中最常見之嘌呤或嘧啶鹼基經不太常見或非天然鹼基替代之寡聚物。

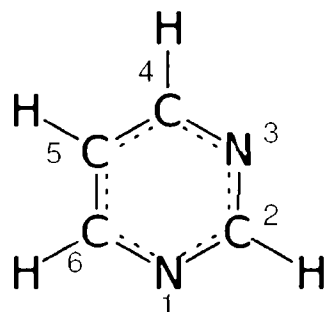
嘌呤鹼基包含稠合至咪唑環之嘧啶環，如以下通式所述：



嘌呤

腺嘌呤及鳥嘌呤係核酸中最常見之兩種嘌呤核鹼基。該等嘌呤核鹼基可經其他天然嘌呤取代，包括(但不限於) N⁶-甲基腺嘌呤、N²-甲基鳥嘌呤、次黃嘌呤及7-甲基鳥嘌呤。

嘧啶鹼基包含6員嘧啶環，如以下通式所述：



嘧啶

胞嘧啶、尿嘧啶及胸腺嘧啶係核酸中最常見之嘧啶鹼基。該等嘧啶鹼基可經其他天然嘧啶取代，包括(但不限於) 5-甲基胞嘧啶、5-羥基甲基胞嘧啶、假尿嘧啶及4-硫尿嘧啶。在一個實施例中，本文中所闡述之寡聚物含有胸腺嘧啶鹼基代替尿嘧啶。

其他經修飾或取代之鹼基包括(但不限於) 2,6-二胺基嘌呤、乳清酸、2-胍丁胺基胞苷(agmatidine)、賴西丁(lysidine)、2-硫嘧啶(例如2-硫尿嘧

啶、2-硫胸腺嘧啶)、G形夾及其衍生物、5-取代嘧啶(例如5-鹵代尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-胺基甲基尿嘧啶、5-羥基甲基尿嘧啶、5-胺基甲基胞嘧啶、5-羥基甲基胞嘧啶、Super T)、7-去氫鳥嘌呤、7-去氫腺嘌呤、7-氮雜-2,6-二胺基嘌呤、8-氮雜-7-去氫鳥嘌呤、8-氮雜-7-去氫腺嘌呤、8-氮雜-7-去氫-2,6-二胺基嘌呤、Super G、Super A及N⁴-乙基胞嘧啶或其衍生物；N²-環戊基鳥嘌呤(cPent-G)、N²-環戊基-2-胺基嘌呤(cPent-AP)及N²-丙基-2-胺基嘌呤(Pr-AP)、假尿嘧啶或其衍生物；及簡並鹼基或通用鹼基，如2,6-二氟甲苯，或缺少鹼基，如無鹼基位點(例如1-去氧核糖、1,2-二去氧核糖、1-去氧-2-O-甲基核糖；或其中環氧已經氮替代之吡咯啉衍生物(氮雜核糖))。Super A、Super G及Super T之衍生物之實例可參見美國專利6,683, 173 (Epoch Biosciences)，該專利係以全文引用的方式併入本文中。已顯示，cPent-G、cPent-AP及Pr-AP在併入siRNA中時降低免疫刺激效應(Peacock H.等人，J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200)。假尿嘧啶係尿嘧啶之天然異構化形式，其具有C-醣苷而非如尿苷中之常規N-醣苷。與含有尿苷之mPvNA相比，含有假尿苷之合成mRNA可具有經改良之安全性概況(WO 2009127230，其係以全文引用的方式併入本文中)。

某些經修飾或取代之核鹼基尤其可用於增加本揭示內容之反義寡聚物之結合親和性。該等核鹼基包括5-取代嘧啶、6-氮雜嘧啶及N-2、N-6及O-6取代嘌呤，包括2-胺基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶及5-丙炔基胞嘧啶。已顯示，5-甲基胞嘧啶取代使核酸雙鏈體穩定性增加0.6-1.2°C且係目前較佳之鹼基取代，在與2'-O-甲氧基乙基糖修飾組合時甚至更尤其如此。

10. 氫之同位素

在本發明之化合物中，原子之任何天然同位素可以其天然豐度存在或可在一或多個位置富合同位素。舉例而言，在本發明內，鑑別為在一個位置具有氫原子之化合物可在該位置具有 1H - (氕)、 2H - (氘或D)及 3H - (氚或T)，或在一個位置之碳原子可係 12C -、 13C -或 14C -碳。

在一或多個位置富含一或多種同位素可由於具有同位素之化合物的質量變化而有助於組合物之活性及/或有助於因不穩定同位素引起之組合物之放射性，此將使得組合物或代謝物之存在更易於檢測。

最豐富之氫同位素係 1H 且天然豐度為大於99.98%。氕天然地佔6,000個氫中之約1個或0.015%豐度。在本發明之一些化合物中，一個位置處之氕之量可自氕之天然豐度富集多達6,000倍，此將意味著該位置處之約100%之氫原子係氕。在本發明之一些實施例中，組合物中氕之富集可為1,000倍、2,000倍、3,000倍(約50%氕)或更大。或者，氕之富集可導致組合物在一或多個位置處具有大於約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。

11. 寡聚物之醫藥上可接受之鹽

本文中所闡述寡聚物之某些實施例可含有鹼性官能基(例如胺基或烷基胺基)，且因此能夠與醫藥上可接受之酸形成醫藥上可接受之鹽。就此而言，術語「醫藥上可接受之鹽」係指本揭示內容之化合物之相對無毒、無機及有機酸加成鹽。該等鹽可在投與媒劑或劑型製造製程中原位製備，或可藉由使本揭示內容之純化化合物以其游離鹼形式與適宜有機或無機酸單獨反應，並在隨後純化期間分離由此形成之鹽來製備。代表性鹽包括氫溴酸鹽、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、月桂酸鹽、苯甲酸鹽、乳酸鹽、磷酸鹽、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、萘酸鹽(naphylate)、甲磺酸鹽、葡庚糖酸鹽、乳糖醛酸鹽及月桂基磺酸鹽及諸如此類。(例如，參見Berge等人(1977)「Pharmaceutical Salts」, J. Pharm. Sci. 66:1-19)。

標的寡聚物之醫藥上可接受之鹽包括化合物之(例如)來自無毒有機或無機酸之習用無毒鹽或四級銨鹽。舉例而言，此等習用無毒鹽包括衍生自無機酸之彼等，例如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、胺基磺酸鹽、磷酸鹽、硝酸鹽及諸如此類；及自有機酸製備之鹽，例如乙酸鹽、丙酸鹽、琥珀酸鹽、乙醇酸鹽、硬脂酸鹽、乳酸鹽、蘋果酸鹽、酒石酸鹽、檸檬酸鹽、抗壞血酸鹽、棕櫚酸鹽、馬來酸鹽、羥基馬來酸鹽、苯乙酸鹽、麩胺酸鹽、苯甲酸鹽、柳酸鹽、對胺基苯磺酸鹽、2-乙醯氧基苯甲酸鹽、延胡索酸鹽、甲苯磺酸鹽、甲磺酸鹽、乙二磺酸鹽、草酸鹽、2-羥乙磺酸鹽及諸如此類。

在某些實施例中，本揭示內容之寡聚物可含有一或多個酸性官能基，且因此能夠與醫藥上可接受之鹼形成醫藥上可接受之鹽。在該等情況下術語「醫藥上可接受之鹽」係指本揭示內容之化合物之相對無毒、無機及有機鹼加成鹽。同樣，該等鹽可在投與媒劑或劑型製造製程中原位製備，或藉由使純化化合物以其游離酸形式與適宜鹼(例如，醫藥上可接受之金屬陽離子之氫氧化物、碳酸鹽或碳酸氫鹽)、與氨、或與醫藥上可接受之有機一級、二級或三級胺單獨反應來製備。代表性鹼金屬或鹼土金屬鹽包括鋰鹽、鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽、鎂鹽及鋁鹽及諸如此類。可用於形成鹼加成鹽之代表性有機胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、

六氫吡嗪及諸如此類。(例如，參見Berge等人，上文文獻)。

III. 調配物及投與模式

在某些實施例中，本揭示內容提供適於如本文中所闡述之反義寡聚物之治療性遞送之調配物或醫藥組合物。因此，在某些實施例中，本揭示內容提供醫藥上可接受之組合物，其包含與一或多種醫藥上可接受之載劑(添加劑)及/或稀釋劑一起調配之治療有效量之一或多種本文中所闡述之寡聚物。雖然本揭示內容之寡聚物可單獨投與，但較佳以醫藥調配物(組合物)投與該化合物。

遞送核酸分子之方法闡述於(例如) Akhtar等人，1992, Trends Cell Bio., 2:139；及 Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics，編輯Akhtar；Sullivan等人，PCT WO 94/02595中。該等及其他方案可用於遞送實際上任何核酸分子，包括本揭示內容之寡聚物。

如下文所詳述，本揭示內容之醫藥組合物可經專門調配用於以固體或液體形式投與，包括適於以下之彼等：(1) 經口投與，例如獸用頓服藥(水性或非水性溶液或懸浮液)、錠劑(例如靶向頰、舌下及全身吸收之彼等)、大丸劑、粉劑、顆粒劑、用於施加至舌之糊劑；(2) 非經腸投與，例如藉由皮下、肌內、靜脈內或硬膜外注射(例如)無菌溶液或懸浮液或持續釋放調配物；(3) 局部施加，例如作為乳膏、軟膏劑或受控釋放貼劑或噴霧劑施加至皮膚；(4) 陰道內或直腸內，例如作為陰道栓劑、乳膏或泡沫；(5) 舌下；(6) 經眼；(7) 經皮；或(8) 經鼻。

可用作醫藥上可接受之載劑之材料之一些實例包括(但不限於)：(1) 糖，例如乳糖、葡萄糖及蔗糖；(2) 澱粉，例如玉米澱粉及馬鈴薯澱粉；(3) 纖維素及其衍生物，例如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素及乙酸纖維

素；(4) 粉末狀黃耆膠；(5) 麥芽；(6) 明膠；(7) 滑石；(8) 賦形劑，例如可可脂及栓劑蠟；(9) 油，例如花生油、棉籽油、紅花油、芝麻油、橄欖油、玉米油及豆油；(10) 二醇，例如丙二醇；(11) 多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇及聚乙二醇；(12) 酯，例如油酸乙酯及月桂酸乙酯；(13) 瓊脂；(14) 緩衝劑，例如氫氧化鎂及氫氧化鋁；(15) 海藻酸；(16) 不含熱原之水；(17) 等滲鹽水；(18) 林格氏溶液；(19) 乙醇；(20) pH緩衝溶液；(21) 聚酯、聚碳酸酯及/或聚酸酐；及(22) 醫藥調配物中所採用之其他無毒可相容物質。

適於與本揭示內容之反義寡聚物一起調配之藥劑之其他非限制性實例包括：PEG偶聯核酸、磷脂偶聯核酸、含有親脂性部分之核酸、硫代磷酸酯、P-糖蛋白抑制劑(例如Pluronic P85)，其可促使藥物進入各種組織中；生物可降解聚合物，例如聚(DL-交酯-共乙交酯)微球體，其用於在植入後持續釋放遞送(Emerich, D F等人，1999, *Cell Transplant*, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.；及載荷奈米顆粒，例如由聚氰基丙烯酸丁基酯製得之彼等，其可遞送藥物穿過血腦障壁且可改變神經元攝取機制(*Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 23, 941-949, 1999)。

本揭示內容之特徵亦在於組合物之用途，該組合物包含經表面修飾之含有聚(乙二醇)脂質之脂質體(經PEG修飾，具支鏈及無支鏈或其組合，或長循環脂質體或隱形脂質體)。本揭示內容之寡聚物亦可包含具有各種分子量之共價附接之PEG分子。該等調配物提供增加藥物在靶標組織中之累積之方法。此類藥物載劑抵抗單核吞噬細胞系統(MPS或RES)之調理作用及清除，藉此容許更長血液循環時間且增強囊封藥物之組織暴露(Lasic等人，*Chem. Rev.* 1995, 95, 2601-2627；Ishiwata等人，*Chem. Pharm.*

Bull. 1995, 43, 1005-1011)。已顯示，此等脂質體在腫瘤中選擇性累積，此可能係由於在新生成血管之靶標組織中外滲及捕獲所致(Lasic等人，Science 1995, 267, 1275-1276；Oku等人，1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90)。尤其與已知在MPS組織中累積之習用陽離子脂質體相比，長循環脂質體增強DNA及RNA之藥物動力學及藥效學(Liu等人，J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870；Choi等人，國際PCT公開案第WO 96/10391號；Ansell等人，國際PCT公開案第WO 96/10390號；Holland等人，國際PCT公開案第WO 96/10392號)。與陽離子脂質體相比，長循環脂質體基於其避免在諸如肝及脾之代謝攻擊性MPS組織中累積之能力亦可在更大程度上保護藥物免於核酸酶降解。

在另一實施例中，本揭示內容包括經製備用於遞送之寡聚物醫藥組合物，如美國專利第6,692,911號、第7,163,695號及第7,070,807號中所闡述。就此而言，在一個實施例中，本揭示內容在包含離胺酸與組胺酸(HK)之共聚物之組合物中提供本揭示內容之寡聚物(如美國專利第7,163,695號、第7,070,807號及第6,692,911號中所闡述)，該寡聚物係單獨存在或與PEG(例如，具支鏈或無支鏈PEG或二者之混合物)組合、與PEG及靶向部分或前述任一者與交聯劑之組合之組合。在某些實施例中，本揭示內容在包含經葡萄糖酸修飾之多組胺酸或葡萄糖基化(glucosylated)多組胺酸/轉鐵蛋白-多離胺酸之醫藥組合物中提供反義寡聚物。熟習此項技術者亦將認識到，具有與His及Lys類似性質之胺基酸可在組合物內經取代。

潤濕劑、乳化劑及潤滑劑(例如月桂基硫酸鈉及硬脂酸鎂)以及著色劑、釋放劑、塗覆劑、甜味劑、矯味劑及芳香劑、防腐劑及抗氧化劑亦可

存在於組合物中。

醫藥上可接受之抗氧化劑之實例包括：(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、偏亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉及諸如此類；(2) 油溶性抗氧化劑，例如棕櫚酸抗壞血酸基酯、丁基化羥基苯甲醚(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 α -生育酚及諸如此類；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、磷酸及諸如此類。

本揭示內容之調配物包括適於經口、經鼻、局部(包括經頰及舌下)、經直腸、經陰道及/或非經腸投與之彼等。該等調配物可方便地以單位劑型呈現，且可藉由製藥領域中熟知之任何方法來製備。可與載劑材料組合以產生單一劑型之活性成分之量可端視所治療主體、具體投與模式而變化。可與載劑材料組合以產生單一劑型之活性成分之量通常將為產生治療效應之化合物之量。通常，在100%中，此活性成分之量將在約0.1%至約99%、較佳地約5%至約70%、最佳約10%至約30%範圍內。

在某些實施例中，本揭示內容之調配物包含選自以下之賦形劑：環糊精、纖維素、脂質體、膠束形成劑(例如，膽汁酸)及聚合載劑(例如，聚酯及聚酸酐)；及本揭示內容之寡聚物。在某些實施例中，上文所提及之調配物使得本揭示內容之寡聚物具有經口生物可利用性。

製備該等調配物或醫藥組合物之方法包括使本揭示內容之寡聚物與載劑及視情況一或多種輔助成分締合之步驟。一般而言，調配物係藉由以下來製備：使本揭示內容之化合物與液體載劑或精細固體載劑或二者均勻且充分地締合，且然後(若需要)使產物成形。

適於經口投與之本揭示內容之調配物可呈以下形式：膠囊、扁囊

劑、丸劑、錠劑、菱形錠劑(使用矯味基質，通常為蔗糖及阿拉伯膠或黃耆膠)、粉劑、顆粒劑；或作為於水性或非水性液體中之溶液或懸浮液；或作為水包油型或油包水型液體乳液；或作為醃劑或糖漿；或作為軟錠劑(使用惰性基質，例如明膠及甘油，或蔗糖及阿拉伯膠)及/或作為漱口劑及諸如此類，每一者含有預定量之本揭示內容之化合物作為活性成分。本揭示內容之寡聚物亦可作為大丸劑、藥糖劑或糊劑投與。

在用於經口投與之本揭示內容之固體劑型(膠囊、錠劑、丸劑、糖衣錠、粉劑、顆粒劑、片劑及諸如此類)中，活性成分可與一或多種醫藥上可接受之載劑(例如檸檬酸鈉或磷酸二鈣)及/或以下中之任一者混合：(1) 填充劑或增量劑，例如澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇及/或矽酸；(2) 黏合劑，例如羧甲基纖維素、海藻酸鹽、明膠、聚乙烯吡咯啉酮、蔗糖及/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、某些矽酸鹽及碳酸鈉；(5) 溶液阻滯劑，例如石蠟；(6) 吸收促進劑，例如四級銨化合物及表面活性劑(例如泊洛沙姆(poloxamer)及月桂基硫酸鈉)；(7) 潤濕劑，例如鯨蠟醇、單硬脂酸甘油酯及非離子型表面活性劑；(8) 吸收劑，例如高嶺土(kaolin)及膨潤土；(9) 潤滑劑，例如滑石、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；及(11) 受控釋放劑，例如交聚維酮或乙基纖維素。在膠囊、錠劑及丸劑之情形下，醫藥組合物亦可包含緩衝劑。在使用此等賦形劑(例如乳糖(lactose)或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇及諸如此類)之軟殼及硬殼明膠膠囊中，亦可採用相似類型之固體醫藥組合物作為填充劑。

錠劑可藉由壓製或模製來製得，其視情況具有一或多種輔助成分。

壓製錠劑可使用黏合劑(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羧甲基纖維素鈉)、表面活性劑或分散劑來製備。模製錠劑可藉由在適宜機器中模製經惰性液體稀釋劑潤濕之粉末狀化合物之混合物來製得。

本揭示內容之醫藥組合物之錠劑及其他固體劑型(例如糖衣錠、膠囊、丸劑及顆粒劑)可視情況經刻痕或利用諸如腸溶性包衣及醫藥調配技術中熟知之其他包衣之包衣及外殼來製備。其亦可使用(例如)不同比例之羥丙基甲基纖維素(以提供期望之釋放特徵)、其他聚合物基質、脂質體及/或微球體來調配，以提供其中活性成分之緩慢或受控釋放。其可經調配用於快速釋放，例如冷凍乾燥。其可藉由(例如)藉助細菌截留過濾器過濾或藉由併入呈無菌固體醫藥組合物形式之滅菌劑進行滅菌，該等滅菌劑可在臨用前立刻溶解於無菌水或一些其他無菌可注射介質中。該等醫藥組合物亦可視情況含有乳濁劑且亦可為視情況以延遲方式僅(或優先)在胃腸道之某一部分中釋放活性成分之組合物。可使用之包埋組合物之實例包括聚合物物質及蠟。若適當，則活性成分亦可呈具有一或多種上述賦形劑之微囊封形式。

用於經口投與本揭示內容之化合物之液體劑型包括醫藥上可接受之乳液、微乳液、溶液、懸浮液、糖漿及酞劑。除活性成分以外，該等液體劑型可含有業內常用之惰性稀釋劑，例如水或其他溶劑、增溶劑及乳化劑，例如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特定而言，棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油)、甘油、四氫呋喃醇、聚乙二醇及去水山梨醇之脂肪酸酯及其混合物。

除惰性稀釋劑以外，經口醫藥組合物亦可包括佐劑，例如潤濕劑、乳化劑及懸浮劑、甜味劑、矯味劑、著色劑、芳香劑及防腐劑。

除活性化合物以外，懸浮液亦可含有懸浮劑，例如乙氧基化異硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇及去水山梨醇酯、微晶纖維素、偏氫氧化鋁、膨潤土、瓊脂及黃蓍膠以及其混合物。

用於直腸或陰道投與之調配物可呈現為栓劑，其可藉由使一或多種本揭示內容之化合物與一或多種適宜非刺激性賦形劑或載劑混合來製備，該等適宜非刺激性賦形劑或載劑包含(例如)可可脂、聚乙二醇、栓劑蠟或柳酸鹽，且其在室溫下係固體但在體溫下係液體，且因此將在直腸或陰道腔中融化並釋放活性化合物。

用於局部或經皮投與如本文中提供之寡聚物之調配物或劑型包括粉劑、噴霧劑、軟膏劑、糊劑、乳膏、洗劑、凝膠、溶液、貼劑及吸入劑。活性寡聚物可在無菌條件下與醫藥上可接受之載劑及與可能需要之任何防腐劑、緩衝劑或推進劑混合。除本揭示內容之活性化合物以外，軟膏劑、糊劑、乳膏及凝膠可含有賦形劑，例如動物及植物脂肪、油、蠟、石蠟、澱粉、黃蓍膠、纖維素衍生物、聚乙二醇、聚矽氧、膨潤土、矽酸、滑石及氧化鋅或其混合物。

除本揭示內容之寡聚物以外，粉劑及噴霧劑可含有賦形劑，例如乳糖、滑石、矽酸、氫氧化鋁、矽酸鈣及聚醯胺粉劑或該等物質之混合物。噴霧劑可額外含有常用推進劑，例如氯氟烴類及未經取代之揮發性烴類，例如丁烷及丙烷。

經皮貼劑具有提供本揭示內容之寡聚物至身體之受控遞送之額外優點。此等劑型可藉由將寡聚物溶解於或分散於適宜介質中來製得。亦可使

用吸收增強劑來增加藥劑穿過皮膚之通量。在業內已知之方法中，此通量之速率尤其可藉由提供速率控制膜或使藥劑分散於聚合物基質或凝膠中來控制。

適於非經腸投與之醫藥組合物可包含一或多種本揭示內容之寡聚物以及一或多種醫藥上可接受之無菌等滲之水性或非水性溶液、分散液、懸浮液或乳液、或無菌粉劑，該等無菌粉劑可在即將使用前重構為無菌可注射溶液或分散液，該等醫藥組合物可含有糖、醇、抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑、可使調配物與預期接受者之血液等滲之溶質或懸浮劑或增稠劑。可用於本揭示內容之醫藥組合物之適宜水性及非水性載劑之實例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇及諸如此類)及其適宜混合物、植物油(例如橄欖油)及可注射有機酯(例如油酸乙酯)。適當流動性可藉由(例如)使用包衣材料(例如，卵磷脂)、藉由維持所需粒徑(在分散液情形下)及藉由使用表面活性劑來維持。

該等醫藥組合物亦可含有佐劑，例如防腐劑、潤濕劑、乳化劑及分散劑。可藉由納入各種抗細菌及抗真菌劑(例如，對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸及諸如此類)來確保防止標的寡聚物受到微生物影響。亦可期望組合物中包括等滲劑，例如糖、氯化鈉及諸如此類。另外，可藉由納入延遲吸收之藥劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)使可注射醫藥形式之吸收延長。

在一些情形下，為延長藥物之效應，期望減緩來自皮下或肌內注射之藥物之吸收。在業內已知之方法中，此尤其可藉由使用具有較差水溶性之結晶或非晶形材料之液體懸浮液來實現。因此，藥物之吸收速率取決於其溶解速率，而溶解速率進而可取決於晶體大小及結晶形式。或者，藉由

將藥物溶解或懸浮於油性媒劑中來實現非經腸投與藥物形式之延遲吸收。

可注射之儲積物形式可藉由在生物可降解聚合物(例如，聚交酯-聚乙交酯)中形成標的寡聚物之微膠囊基質來製得。端視寡聚物對聚合物之比率及所採用特定聚合物之性質，可控制寡聚物之釋放速率。其他生物可降解聚合物之實例包括聚(原酸酯)及聚(酸酐)。儲積物可注射調配物亦可藉由將藥物裝入與身體組織相容之脂質體或微乳液中來製備。

在本揭示內容之寡聚物係作為醫藥投與人類及動物時，其可以原樣或作為含有(例如) 0.1%至99% (更佳10%至30%)之活性成分與醫藥上可接受之載劑之組合的醫藥組合物給予。

如上所述，本揭示內容之調配物或製劑可經口、非經腸、局部或經直腸給予。其通常係以適於每一投與途徑之形式來給予。舉例而言，其係以錠劑或膠囊形式藉由注射、吸入來投與；以眼用洗劑、軟膏劑、栓劑等形式藉由注射、輸注或吸入來投與；藉由洗劑或軟膏劑局部投與；及藉由栓劑經直腸投與。

如本文中所使用之片語「非經腸投與」及「以非經腸方式投與」意指除經腸及局部投與以外之投與模式，通常藉由注射來投與且包括(不限於)靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、真皮內、腹膜內、經氣管、皮下、角質層下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內及胸骨內注射及輸注。

如本文中所使用之片語「全身性投與」、「以全身方式投與」、「外周性投與」及「以外周方式投與」意指以除直接進入中樞神經系統以外之方式投與化合物、藥物或其他材料，使得其進入患者全身且由此經受代謝及其他類似過程，例如皮下投與。

不管選擇何種投與途徑，本揭示內容之寡聚物(其可以適宜水合形式使用)及/或本揭示內容之醫藥組合物可藉由熟習此項技術者已知之習用方法調配為醫藥上可接受之劑型。本揭示內容之醫藥組合物中活性成分之實際劑量值可有所變化，以便獲得對於特定患者、組合物及投與模式有效達成期望治療反應而對患者不具不可接受之毒性之量的活性成分。

所選擇劑量值將取決於各種因素，包括本揭示內容所採用之特定寡聚物或其酯、鹽或醯胺之活性、投與途徑、投與時間、所採用特定寡聚物之排泄或代謝速率、吸收速率及程度、治療之持續時間、與所採用特定寡聚物組合使用之其他藥物、化合物及/或材料、所治療患者之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前病史以及醫學領域中所熟知之類似因素。

熟習此項技術之醫師或獸醫可容易地確定並開具所需醫藥組合物之有效量。舉例而言，為達成期望治療效應，醫師或獸醫開始可以低於所需值之劑量投與醫藥組合物中所採用之本揭示內容之化合物，並逐漸增加該劑量直至達成期望效應為止。一般而言，本揭示內容之化合物之適宜日劑量將為可有效產生治療效應之最低劑量之化合物之量。此一有效劑量將通常將取決於上文所述之因素。通常，本揭示內容之化合物在用於所指示效應時用於患者之經口、靜脈內、腦室內及皮下劑量可在約0.0001 mg/公斤體重/天至約100 mg/公斤體重/天範圍內。

在一些實施例中，本揭示內容之寡聚物通常係以約20-100 mg/kg之劑量投與。在一些情形下，可能需要大於100 mg/kg之劑量。在一些實施例中，用於i.v.投與之劑量係約0.5 mg/kg至100 mg/kg。在一些實施例中，寡聚物係以以下劑量投與：約20 mg/kg、21 mg/kg、25 mg/kg、26

mg/kg、27 mg/kg、28 mg/kg、29 mg/kg、30 mg/kg、31 mg/kg、32 mg/kg、33 mg/kg、34 mg/kg、35 mg/kg、36 mg/kg、37 mg/kg、38 mg/kg、39mg/kg、40mg/kg、41mg/kg、42mg/kg、43mg/kg、44mg/kg、45mg/kg、46mg/kg、47mg/kg、48mg/kg、49mg/kg、50mg/kg、51mg/kg、52mg/kg、53mg/kg、54mg/kg、55mg/kg、56mg/kg、57mg/kg、58mg/kg、59mg/kg、60mg/kg、65mg/kg、70mg/kg、75mg/kg、80mg/kg、85mg/kg、90mg/kg、95mg/kg、100mg/kg，包括之間之所有整數。在一些實施例中，寡聚物係以30 mg/kg投與。在一些實施例中，寡聚物係以50 mg/kg投與。

若期望，活性化合物之有效日劑量可以2、3、4、5、6或更多個亞劑量來投與，該等亞劑量係以適當間隔在全天內視情況以單位劑型分開投與。在某些情況下，投藥為每天投與一次。在某些實施例中，投藥為視需要每2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個月投與一或多次，以維持功能性肌肉萎縮蛋白之期望表現。

核酸分子可藉由熟習此項技術者已知之各種方法來投與細胞，包括(但不限於)囊封於脂質體中，離子電滲法，或併入至其他媒劑(例如水凝膠、環糊精、生物可降解奈米膠囊及生物黏附性微球體)中，如本文中所闡述及業內已知。在某些實施例中，可利用微乳化技術來改良親脂性(水不溶性)醫藥劑之生物利用度。實例包括替美春(Trimetrine)(Dordunoo, S. K. 等人，Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991及REV 5901 (Sheen, P. C.等人，J Pharm Sci 80(7), 712-714,

1991)。微乳化之益處尤其在於藉由優先將吸收引導至淋巴系統而非循環系統，藉此繞過肝並防止化合物在肝膽管循環中受到破壞而提供增強之生物利用度。

在本揭示內容之一個態樣中，調配物含有自如本文中所提供之寡聚物及至少一種兩親性載劑形成之膠束，其中該等膠束之平均直徑小於約100 nm。更佳實施例提供平均直徑小於約50 nm之膠束，且甚至更佳之實施例提供平均直徑小於約30 nm或甚至小於約20 nm之膠束。

儘管涵蓋所有適宜兩親性載劑，但本發明之較佳載劑通常係具有普遍認為安全(Generally-Recognized-as-Safe, GRAS)狀態且既可溶解本揭示內容之化合物且在後期階段中當溶液與複合水相(例如在人類胃腸道中發現者)接觸時使本揭示內容之化合物微乳化之彼等。通常，滿足該等要求之兩親性成分之HLB (親水-親脂平衡)值為2-20，且其結構含有在C-6至C-20範圍內之直鏈脂肪族基團。實例係聚乙二醇化(polyethylene-glycolized)之脂肪酸甘油酯及聚乙二醇。

兩親性載劑之實例包括飽和及單不飽和聚乙二醇化之脂肪酸甘油酯，例如自各種完全氫化或部分氫化之各種植物油所獲得之彼等。此等油可有利地係由相應脂肪酸之三-、二-及單脂肪酸甘油酯及二-及單聚乙二醇酯組成，且尤佳脂肪酸組成包括4-10%癸酸、3-9%癩酸、40-50%月桂酸、14-24%肉豆蔻酸、4-14%棕櫚酸及5-15%硬脂酸。另一類可用之兩親性載劑包括部分酯化之去水山梨醇及/或山梨醇以及飽和或單不飽和脂肪酸(SPAN系列)或相應乙氧基化類似物(TWEEN系列)。

市售兩親性載劑可尤其有用，包括 Gelucire 系列、Labrafil、Labrasol或Lauroglycol (全部均由Gattefosse Corporation, Saint Priest,

France製造及分銷)、PEG-單油酸酯、PEG-二油酸酯、PEG-單月桂酸酯及二月桂酸酯、卵磷脂、聚山梨醇酯80等(由USA及世界範圍內之眾多公司生產及分銷)。

在某些實施例中，可藉由使用脂質體、奈米膠囊、微粒、微球體、脂質顆粒、囊泡及諸如此類來實施遞送用於將本揭示內容之醫藥組合物引入至適宜宿主細胞中。具體而言，本揭示內容之醫藥組合物可經調配用於以囊封於脂質顆粒、脂質體、囊泡、奈米球體、奈米顆粒或諸如此類中之形式來遞送。此等遞送媒劑之調配及使用可使用已知且習用之技術來實施。

適用於本揭示內容之親水性聚合物係易溶於水、可共價附接至囊泡形成脂質且在活體內可耐受而無毒性效應(即具有生物相容性)之彼等。適宜聚合物包括聚乙二醇(PEG)、聚乳酸(亦稱為聚交酯)、聚乙醇酸(亦稱為聚乙交酯)、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物及聚乙烯醇。在某些實施例中，聚合物之分子量為約100或120道耳頓(dalton)直至約5,000或10,000道耳頓，或約300道耳頓至約5,000道耳頓。在其他實施例中，聚合物係分子量為約100至約5,000道耳頓或分子量為約300至約5,000道耳頓之聚乙二醇。在某些實施例中，聚合物係750道耳頓之聚乙二醇(PEG(750))。聚合物亦可藉由其中之單體之數量來定義；本揭示內容之較佳實施例利用至少約三個單體之聚合物，此等PEG聚合物係由三個單體組成(大約150道耳頓)。

可適用於本揭示內容之其他親水性聚合物包括聚乙基吡咯啉酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羥丙基甲基丙烯醯胺、聚甲基丙烯醯胺、聚二甲基丙烯醯胺及纖維素衍生物(例如羥甲基纖維素或羥乙基纖維素)。

在某些實施例中，本揭示內容之調配物包含選自由以下組成之群之生物相容性聚合物：聚醯胺、聚碳酸酯、聚伸烷基、丙烯酸酯及甲基丙烯酸酯之聚合物、聚乙烯基聚合物、聚乙交酯、聚矽氧烷、聚胺基甲酸酯及其共聚物、纖維素、聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、乳酸及乙醇酸之聚合物、聚酸酐、聚(原)酸酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(交酯-共-己內酯)、多醣、蛋白質、聚透明質酸、聚氰基丙烯酸酯以及其摻合物、混合物或共聚物。

環糊精係由6、7或8個葡萄糖單元組成之環狀寡醣，分別由希臘字母 α 、 β 或 γ 來命名。葡萄糖單元係藉由 α -1,4-糖苷鍵來鏈接。由於糖單元之椅型構象，所有二級羥基(C-2、C-3處)均位於環之一側，而C-6處之所有二級羥基位於另一側。因此，外表面係親水性，從而使得環糊精具有水溶性。相比之下，環糊精之腔為疏水性，此乃因其內襯有C-3及C-5原子之氫及醚樣氧。該等基質容許與各種相對疏水化合物複合，包括(例如)類固醇化合物，例如 17α -雌二醇(例如，參見van Uden等人，*Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38:1-3-113 (1994))。該複合係藉由凡得瓦相互作用(Van der Waals interaction)及氫鍵形成來進行。關於環糊精之化學之一般性綜述參見Wenz，*Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:803-822 (1994)。

環糊精衍生物之物理-化學性質主要取決於取代之種類及程度。舉例而言，其在水中之溶解度在不溶(例如三乙醯基- β -環糊精)至147%可溶(w/v) (G-2- β -環糊精)範圍內。另外，其可溶於多種有機溶劑中。環糊精之性質使得能夠藉由增加或減小其溶解度來控制各種調配物組分之溶解度。

已闡述多種環糊精及其製備方法。舉例而言，Parmeter (I)等人(美國

專利第3,453,259號)及Gramera等人(美國專利第3,459,731號)闡述電中性環糊精。其他衍生物包括具有陽離子性質之環糊精[Parmeter (II)，美國專利第3,453,257號]、不溶性交聯環糊精(Solms，美國專利第3,420,788號)及具有陰離子性質之環糊精[Parmeter (III)，美國專利第3,426,011號]。在具有陰離子性質之環糊精衍生物中，羧酸、亞磷酸、三價磷酸、磷酸、磷酸、硫代磷酸、硫代亞磺酸及磺酸已附接至親代環糊精上[參見Parmeter (III)，上文文獻]。此外，Stella等人(美國專利第5,134,127號)已闡述磺基烷基醚環糊精衍生物。

脂質體係由至少一個包封水性內部區室之脂質雙層膜組成。脂質體之特徵可在於膜類型及大小。小單層囊泡(SUV)具有單一膜且直徑通常在介於0.02 μm 與0.05 μm 之間之範圍內；大單層囊泡(LUVS)通常大於0.05 μm 。寡層大囊泡及多層囊泡具有通常為同心之多個膜層且通常大於0.1 μm 。具有若干個非同心膜(即若干個含於較大囊泡內之較小囊泡)之脂質體稱為多泡性囊泡。

本揭示內容之一個態樣係關於包含含有本揭示內容之寡聚物之脂質體之調配物，其中該脂質體膜經調配以提供攜帶能力增加之脂質體。或者或另外，本揭示內容之化合物可含於脂質體之脂質體雙層內或吸附至其上。本揭示內容之寡聚物可與脂質表面活性劑聚集在一起且載於脂質體內部空間內；在該等情形下，脂質體膜經調配以抵抗活性劑-表面活性劑聚集體之破裂效應。

根據本揭示內容之一個實施例，脂質體之脂質雙層含有經聚乙二醇(PEG)衍生之脂質，使得PEG鏈自脂質雙層之內表面延伸至脂質體囊封之內部空間中，且自脂質雙層之外部延伸至周圍環境中。

含於本揭示內容之脂質體內之活性劑呈溶解形式。表面活性劑與活性劑之聚集體(例如含有所關注活性劑之乳液或膠束)可裝入本揭示內容之脂質體之內部空間中。表面活性劑用於分散並溶解活性劑，且可選自任何適宜脂肪族、脂環族或芳香族表面活性劑，其包括(但不限於)具有不同鏈長度(例如，約C14至約C20)之生物相容性溶血磷脂醯膽鹼(LPG)。聚合物衍生脂質(例如PEG-脂質)亦可用於膠束形成，此乃因其將用於抑制膠束/膜融合，且向表面活性劑分子添加聚合物減小表面活性劑之CMC並有助於膠束形成。較佳者係CMO在微莫耳範圍內之表面活性劑；CMC較高之表面活性劑可用於製備裝入本揭示內容之脂質體內之膠束。

本揭示內容之脂質體可藉由業內已知之各種技術中之任一者來製備。例如，參見美國專利第4,235,871號；已公開之PCT申請案WO 96/14057；New RRC, *Liposomes: A practical approach*, IRL Press, Oxford (1990)，第33-104頁；Lasic DD, *Liposomes from physics to applications*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993。舉例而言，本揭示內容之脂質體可藉由使經親水性聚合物衍生之脂質以對應於經衍生脂質在脂質體中之期望最終莫耳百分比之脂質濃度擴散至預形成之脂質體中(例如藉由使預形成之脂質體暴露於由脂質接枝聚合物構成之膠束)來製備。含有親水性聚合物之脂質體亦可藉由均質化、脂質-域水合(field hydration)或擠出技術來形成，如業內所已知。

在另一例示性調配程序中，首先藉由音波處理使活性劑分散於溶血磷脂醯膽鹼或易於溶解疏水性分子之其他低CMC表面活性劑(包括聚合物接枝脂質)中。然後使用所得之活性劑之膠束懸浮液再水合含有適宜莫耳百分比之聚合物接枝脂質或膽固醇之乾燥脂質樣品。然後使用如業內已知

之擠出技術使脂質及活性劑懸浮液形成脂質體，並藉由標準管柱分離來使所得脂質體與未囊封之溶液分離。

在本揭示內容之一個態樣中，製備脂質體以在選定大小範圍內具有實質上均勻之大小。一個有效大小分級方法涉及擠壓脂質體之水性懸浮液穿過一系列具有所選均一孔徑之聚碳酸酯膜；膜之孔徑將與藉由擠壓穿過該膜產生之脂質體之最大大小大致對應。例如，參見美國專利第4,737,323號(1988年4月12日)。在某些實施例中，可利用諸如DharmaFECT®及Lipofectamine®之試劑將多核苷酸或蛋白質引入至細胞中。

本揭示內容之調配物之釋放特性取決於囊封材料、經囊封藥物之濃度及釋放調節劑之存在。舉例而言，可使用(例如)僅在低pH下(如在胃中)或較高pH下(如在腸中)釋放之pH敏感性包衣來操控釋放，以使其具有pH依賴性。可使用腸溶性包衣以防止在通過胃之前發生釋放。可使用多重包衣或囊封於不同材料中之氰胺混合物來獲得在胃中之最初釋放，隨後在腸中進行後續釋放。亦可藉由納入鹽或成孔劑(其可藉由自膠囊擴散來增加水攝取或藥物釋放)來操控釋放。亦可使用調節藥物之溶解度之賦形劑來控制釋放速率。亦可併入增強基質降解或自基質釋放之藥劑。其可添加至藥物，端視化合物而定，作為單獨相(即作為微粒)添加或可共溶於聚合物相中。在大多數情形下，該藥劑之量應在介於0.1%與30%之間(w/w聚合物)。降解增強劑之類型包括無機鹽(例如硫酸銨及氯化銨)、有機酸(例如檸檬酸、苯甲酸及抗壞血酸)、無機鹼(例如碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸鈣、碳酸鋅及氫氧化鋅)及有機鹼(例如硫酸魚精蛋白、精胺、膽鹼、乙醇胺、二乙醇胺及三乙醇胺)及表面活性劑(例如Tween®及Pluronic®)。將微結構

添加至基質(即，水溶性化合物，例如無機鹽及糖)之成孔劑係作為微粒添加。其範圍通常在介於1%與30%之間(w/w聚合物)。

亦可藉由改變顆粒在腸中之停留時間來操控攝取。此可藉由(例如)用黏膜黏附性聚合物包覆顆粒或選擇該聚合物作為囊封材料來達成。實例包括具有游離羧基之大多數聚合物，例如幾丁聚醣、纖維素及尤其聚丙烯酸酯(如本文中所使用，聚丙烯酸酯係指包括丙烯酸酯基團及經修飾之丙烯酸酯基團(例如氰基丙烯酸酯及甲基丙烯酸酯)之聚合物)。

寡聚物可經調配以含於外科或醫療裝置或植入物內或適於藉由外科或醫療裝置或植入物來釋放。在某些態樣中，植入物可經包覆或以其他方式經寡聚物處理。舉例而言，可使用水凝膠或其他聚合物(例如生物相容性及/或生物可降解聚合物)來包覆具有本揭示內容之醫藥組合物之植入物(即，可藉由使用水凝膠或其他聚合物來使該組合物適於與醫療裝置一起使用)。用於包覆具有藥劑之醫療裝置之聚合物及共聚物為業內所熟知。植入物之實例包括(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、可植入心律轉變除顫器、IV針、用於正骨及骨形成之裝置(例如插針、螺絲、板及其他裝置)及用於傷口癒合之人工組織基質。

除本文中所提供之方法以外，根據本揭示內容使用之寡聚物可經調配用於根據其他醫藥類推以用於人類或獸醫醫學之任何便捷方式投與。反義寡聚物及其相應調配物可單獨投與或與肌肉萎縮症之治療中之其他治療策略組合投與，該等其他治療策略例如肌原細胞移植、幹細胞療法、投與胺基醣苷抗生素、蛋白酶體抑制劑及上調療法(例如，上調肌肉營養相關蛋白(utrophin)，即肌肉萎縮蛋白之常染色體旁系同源物)。

在一些實施例中，額外治療可在本揭示內容之寡聚物之投與之前、與其同時或之後投與。舉例而言，寡聚物可與類固醇及/或抗生素組合投與。在某些實施例中，將寡聚物投與進行背景類固醇療法之患者(例如，間歇或慢性/連續背景類固醇療法)。舉例而言，在一些實施例中，在投與反義寡聚物之前患者已經皮質類固醇治療且繼續接受類固醇療法。在一些實施例中，類固醇係醣皮質激素或普賴松(prednisone)。

所闡述之投與途徑僅意欲作為指導，此乃因熟習此項技術者將能夠容易地確定最佳投與途徑及用於任何特定動物及病狀之任何劑量。已在活體外及活體內均嘗試將功能性新遺傳材料引入至細胞中之多種方法(Friedmann (1989) *Science*, 244:1275-1280)。該等方法包括將欲表現之基因整合至經修飾之反轉錄病毒中(Friedmann (1989)，上文文獻；Rosenberg (1991) *Cancer Research* 51(18)，增刊：5074S-5079S)；整合至非反轉錄病毒載體中(例如，腺相關病毒載體)(Rosenfeld等人(1992) *Cell*, 68:143-155；Rosenfeld等人(1991) *Science*, 252:431-434)；或經由脂質體遞送鏈接至異源啟動子-增強子元件之轉基因(Friedmann (1989)，上文文獻；Brigham等人(1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298:278-281；Nabel等人(1990) *Science*, 249:1285-1288；Hazinski等人(1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*, 4:206-209；及Wang及Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7851-7855)；偶合至配體特異性之基於陽離子之轉運系統(Wu及Wu (1988) *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624)或使用裸DNA、表現載體(Nabel等人(1990)，上文文獻)；Wolff等人(1990) *Science*, 247:1465-1468)。將轉基因直接注射至組織中僅產生局部性表現(Rosenfeld (1992)，上文文獻)；Rosenfeld等人(1991)，上文文獻；

Brigham等人(1989)，上文文獻；Nabel (1990)，上文文獻；及Hazinski等人(1991)，上文文獻)。Brigham等人小組(Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281及Clinical Research (1991) 39 (摘要))已報導在靜脈內或氣管內投與DNA脂質體複合物之後僅在小鼠之肺中出現活體內轉染。人類基因療法程序之綜述文章之實例係：Anderson, Science (1992) 256:808-813。

IV. 使用方法

使用外顯子跳躍恢復肌肉萎縮蛋白閱讀框

由框內突變所引起之稱為**BMD**之肌肉萎縮蛋白病之較溫和形式提示對由肌肉萎縮蛋白基因中之框外突變所引起之**DMD**治療之潛在治療方法。將框外突變轉變為框內突變之能力將假想地保留mRNA閱讀框並產生內部縮短但具功能性之肌肉萎縮蛋白。本揭示內容之反義寡聚物經設計以實現此目的。

PMO與靶向前體mRNA序列之雜交干擾前體mRNA剪接複合物之形成並自成熟mRNA刪除外顯子45。本揭示內容之反義寡聚物之結構及構象容許與互補序列之序列特異性鹼基配對。藉由類似機制，例如，依替利森(其係經設計以跳躍肌肉萎縮蛋白前體mRNA之外顯子51之**PMO**)容許與含於肌肉萎縮蛋白前體mRNA之外顯子51中之互補序列之序列特異性鹼基配對。

含有全部79個外顯子之正常肌肉萎縮蛋白mRNA將產生正常肌肉萎縮蛋白。圖1中之圖形繪示自外顯子47至外顯子53之肌肉萎縮蛋白前體mRNA及成熟mRNA之一小部分。每一外顯子之形狀繪示密碼子如何在外顯子之間分離；值得注意的是，一個密碼子係由三個核苷酸組成。矩形形

狀之外顯子以完整密碼子開始及結束。箭頭形狀之外顯子以完整密碼子開始，但以分離密碼子結束，僅含有密碼子之1號核苷酸。此密碼子之2號及3號核苷酸含於將以V形開始之隨後外顯子中。

缺少來自肌肉萎縮蛋白基因之整個外顯子之肌肉萎縮蛋白mRNA通常導致DMD。圖2中之圖形圖解說明已知導致DMD之一類遺傳突變(缺失外顯子50)。由於外顯子49以完整密碼子結束且外顯子51以密碼子之第二個核苷酸開始，因此外顯子49之後之閱讀框出現移框，產生框外mRNA閱讀框並自突變之下游併入不正確之胺基酸。功能性C-末端肌肉萎縮蛋白聚醣結合結構域之隨後不存在導致產生不穩定之肌肉萎縮蛋白。

依替利森跳躍外顯子51以恢復mRNA閱讀框。由於外顯子49以完整密碼子結束且外顯子52以密碼子之第一個核苷酸開始，外顯子51之缺失恢復閱讀框，導致產生具有完整肌肉萎縮蛋白聚醣結合位點之內部縮短之肌肉萎縮蛋白，類似於「框內」BMD突變(圖3)。

非臨床研究支持使用外顯子跳躍以恢復肌肉萎縮蛋白mRNA開放閱讀框來改善DMD表型之可行性。在DMD之肌肉萎縮動物模型中之許多研究已顯示，藉由外顯子跳躍來恢復肌肉萎縮蛋白產生肌肉力量及功能之可靠改良(Sharp 2011；Yokota 2009；Wu 2008；Wu 2011；Barton-Davis 1999；Goyenvalle 2004；Gregorevic 2006；Yue 2006；Welch 2007；Kawano 2008；Reay 2008；van Putten 2012)。此之令人信服之實例來自其中將外顯子跳躍(使用PMO)療法之後之肌肉萎縮蛋白含量與同一組織中之肌肉功能進行比較之研究。在肌肉萎縮mdx小鼠中，經小鼠特異性PMO治療之脛骨前部(TA)肌肉在應力誘發收縮後維持其最大受力能力之約75%，而未經治療之對側TA肌肉僅維持其最大受力能力之約25% (p

<0.05) (Sharp 2011)。在另一研究中，3隻肌肉萎縮CXMD狗在2-5月齡時使用對其遺傳突變具特異性之PMO每週一次持續5至7週或每隔一週持續22週接受外顯子-跳躍療法。在外顯子-跳躍療法之後，所有3隻狗均在骨骼肌中展示肌肉萎縮蛋白之廣泛全身性表現，以及相對於基線維持或經改良之行走能力(15 m跑步測試)。相比之下，未經治療之年齡匹配的CXMD狗在研究過程中顯示出行走能力明顯減少(Yokota 2009)。

在表現整個人類DMD轉錄物之mdx小鼠及人類化DMD (hDMD)小鼠模型中，PMO在等莫耳濃度下顯示具有高於硫代磷酸酯之外顯子跳躍活性(Heemskirk 2009)。使用反轉錄聚合酶鏈式反應(RT-PCR)及西方墨點(WB)在正常人類骨骼肌細胞或來自具有適於外顯子51跳躍之不同突變之DMD患者之肌肉細胞中之活體外實驗鑑別依替利森(PMO)為外顯子51跳躍之強效誘導物。在hDMD小鼠模型中，依替利森誘導之外顯子51跳躍已在活體內證實(Arechavala-Gomez 2007)。

用於分析與人類肌肉萎縮蛋白前體mRNA之外顯子45之靶標區域互補並誘導外顯子45跳躍之反義寡聚物之效應之臨床結果包括肌肉萎縮蛋白陽性纖維百分比(PDPF)、6分鐘步行測試(6MWT)、行走能力損失(LOA)、北極星行走能力評價(North Star Ambulatory Assessment (NSAA))、肺功能測試(PFT)、無外部支持起身能力(自仰臥位)、肌肉萎縮蛋白重新產生及其他功能量度。

在一些實施例中，本揭示內容提供在具有適於外顯子45跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變之個體中產生肌肉萎縮蛋白之方法，該方法包含向該個體投與如本文中所闡述之反義寡聚物或其醫藥上可接受之鹽。在某些實施例中，本揭示內容提供在具有適於外顯子45跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變

之患有杜興氏肌肉萎縮症(DMD)之個體中恢復mRNA閱讀框以誘導肌肉萎縮蛋白產生之方法。蛋白質產生可藉由反轉錄聚合酶鏈式反應(RT-PCR)、西方墨點分析或免疫組織化學(IHC)來量測。

在一些實施例中，本揭示內容提供治療有需要之個體之DMD之方法，其中該個體具有適於外顯子45跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變，該方法包含向該個體投與如本文中所闡述之反義寡聚物或其醫藥上可接受之鹽。在各個實施例中，個體之治療係藉由疾病進展之延遲來量測。在一些實施例中，個體之治療係藉由個體行走能力之維持或個體之行走能力損失之減少來量測。在一些實施例中，使用6分鐘步行測試(6MWT)量測行走能力。在某些實施例中，使用北極星行走能力評價(NSAA)來量測行走能力。

在各個實施例中，本揭示內容提供維持患有DMD之個體之肺功能或減少肺功能損失之方法，其中該個體具有適於外顯子45跳躍之DMD基因突變，該方法包含向該個體投與如本文中所闡述之反義寡聚物或其醫藥上可接受之鹽。在一些實施例中，肺功能量測為最大呼氣壓(MEP)。在某些實施例中，肺功能量測為最大吸氣壓(MIP)。在一些實施例中，肺功能量測為用力肺活量(FVC)。

研究4045-301 (本質)：

研究4045-301係DMD患者中SRP-4045 (卡西莫森)及SRP-4053 (格魯帝森(golodirsen))之研究。此研究係評估SRP-4045及SRP-4053之效能及安全性之雙盲、安慰劑對照、多中心之48週研究。將具有可藉由跳躍外顯子45或53校正之框外缺失之合格患者隨機化，以分別接受每週一次30 mg/kg SRP-4045或30 mg/kg SRP-4053 (合併活性組，66名患者)或安慰

劑(33名患者)之靜脈內(IV)輸注達48週。臨床效能將在定期研究就診時評價，包括功能測試(例如6分鐘步行測試)。所有患者將在基線時進行肌肉生檢且在研究過程中進行第二次肌肉生檢。安全性將藉助收集整個研究期間之不良事件(AE)、實驗室測試、心電圖(ECG)、超音波心電圖(ECHO)、生命體徵及體格檢查來評價。將在整個研究期間定期取出血液樣品以評價兩種藥物之藥物動力學。主要結果量度包括自基線之6分鐘步行測試(6MWT)變化[時段：基線至第48週]，且次要結果量度包括肌肉萎縮蛋白陽性纖維之百分比[時段：基線至第24週及第48週]及自基線之所預測之最大吸氣壓(MIP)%、所預測之最大呼氣壓(MEP)%變化[時段：基線至第48週]。本研究之其他細節參見 www.clinicaltrials.org (NCT02500381)。

V. 套組

本揭示內容亦提供用於治療患有遺傳疾病之患者之套組，該套組至少包含包裝於適宜容器中之反義分子(例如，SEQ ID NO: 1-5中所示之反義寡聚物)以及其使用說明。套組亦可含有外圍試劑，例如緩衝劑、穩定劑等。熟習此項技術者應瞭解，以上方法之應用對於鑑別適用於治療許多其他疾病之反義分子具有廣泛應用。

實例

儘管已出於清晰理解之目的藉助說明及實例相當詳細地闡述前述揭示內容，但熟習此項技術者鑒於本揭示內容之教示可容易地明瞭，可在不背離隨附申請專利範圍之精神或範圍之情形下對本揭示內容進行某些改變及修改。提供以下實例以僅用於說明而非予以限制。熟習此項技術者將容易地識別各種非關鍵參數，可對該等參數進行改變或修改以獲得基本上相

似之結果。

材料及方法

細胞及組織培養物處理條件

於組織培養物處理之T75燒瓶(Nunc)中以 1.5×10^6 個細胞/燒瓶將人類橫紋肌肉瘤細胞(ATCC, CCL-136; RD細胞)接種於24 mL具有L-麩醯胺酸(HyClone)、10%胎牛血清及1%青黴素-鏈黴素抗生素溶液(CelGro)之溫熱DMEM中; 24小時後, 吸出培養基, 將細胞於溫熱PBS中洗滌一次, 並添加新鮮培養基。使細胞於37°C培育器中在5.0% CO₂下生長至80%鋪滿並使用胰蛋白酶收穫。將凍乾之磷醯二胺嗎啉基寡聚物(PMO)以大約0.5至2.0 mM重新懸浮於不含核酸酶之水中; 為驗證莫耳濃度, 使用NanoDrop 2000分光光度計(Thermo Scientific)量測PMO溶液。根據製造商之說明書及SG套組(Lonza)使用核轉染將PMO遞送至RD細胞。根據指示(例如, 2.5、5、10、12.5、20及25微莫耳)以各種濃度測試PMO。將細胞在核轉染後以大約 $2 - 3 \times 10^5$ 個細胞/孔於12或24孔板培育24小時(n=2或3), 且然後經受如下文所述之RNA提取。

RNA提取及PCR擴增

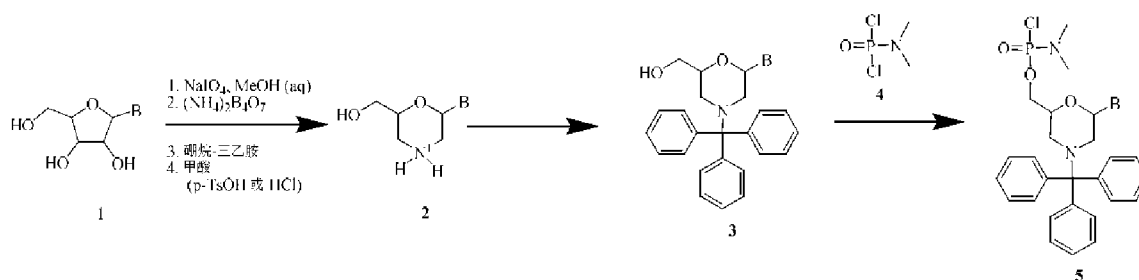
使用來自GE Healthcare之RNAspin 96孔RNA分離套組自PMO處理之細胞(RD細胞或原代人類肌原細胞)提取RNA且使用標準技術及以下引子對進行巢式RT-PCR。外引子: 正向5'-CAATGCTCCTGACCTCTGTGC-3' (SEQ ID NO: 6), 反向5'-GCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGG -3'(SEQ ID NO: 7); 內引子: 正向5'-GTCTACAACAAAGCTCAGGTCG-3'(SEQ ID NO: 8), 反向5'-GCAATGTTATCTGCTTCCTCCAACC-3'(SEQ ID NO: 9)。外顯子跳躍

係藉由Cy5-標記之丙稀醯胺凝膠電泳之密度測定法來量測。外顯子跳躍之百分比(即，相對於全長PCR產物外顯子-跳躍產物之條帶強度)係藉由在針對每一條帶中預期之長度及GC含量校正原始信號強度後量化跳躍及未跳躍條帶之強度來計算。預期PCR產物示於下表中：

	bp	GC%
未跳躍	571	40.8
跳躍	395	38.5

外顯子跳躍活性係計算為跳躍及未跳躍預期產物之總強度之百分比。

嗎啉基亞單元、PMO及具有經修飾之亞單元間鏈接體之PMO之製備



反應圖1：PMO亞單元之一般合成途徑

參考反應圖1，其中B代表鹼基配對部分，嗎啉基亞單元可自如所示之相應核糖核苷(1)製備。可視情況藉由與適宜保護基團前體(例如三苯甲基氯)之反應來保護嗎啉基亞單元(2)。3'保護基團通常在固態寡聚物合成期間去除，如下文中更詳細地闡述。可適當地保護鹼基配對部分用於固相寡聚物合成。適宜保護基團包含苯甲醯基(用於腺嘌呤及胞嘧啶)、苯基乙醯基(用於鳥嘌呤)及新戊醯基氧基甲基(用於次黃嘌呤(I))。可將新戊醯基氧基甲基引入次黃嘌呤雜環鹼基之N1位置處。儘管可採用未保護之次黃嘌呤亞單元，但在鹼基受保護時活化反應中之產率極佳。其他適宜保護基團包括美國專利第8,076,476號中所揭示之彼等，該專利係以全文引用的

方式併入本文中。

3與經活化磷化合物**4**之反應產生具有期望鏈接體部分**5**之嗎啉基亞單元。

可使用熟習此項技術者已知之任何數量之方法來製備結構**4**之化合物。然後，如上文所概述進行與嗎啉基部分之偶合。

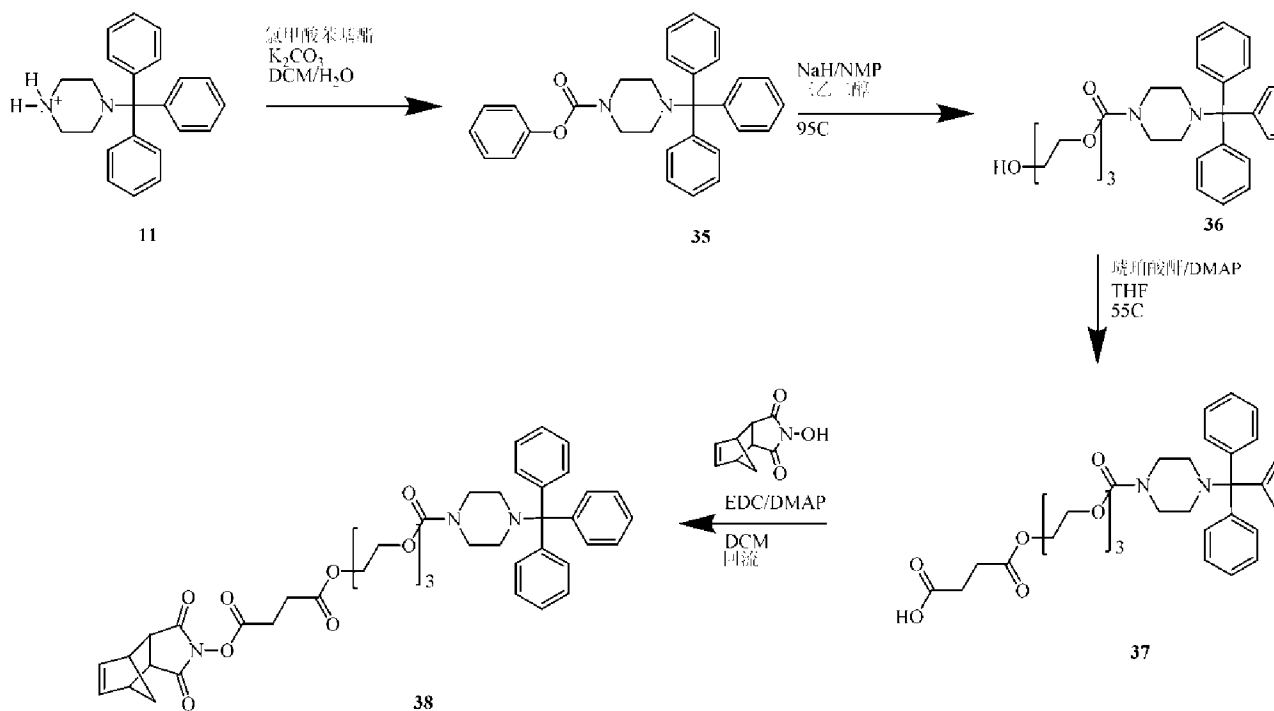
結構**5**之化合物可用於固相寡聚物合成中，用於製備包含亞單元間鏈接體之寡聚物。此等方法為業內所熟知。簡言之，結構**5**之化合物可在**5'**端經修飾以含有連接至固體載體之連接體。一旦受載，去除**5**之保護基團(例如，**3'**端處之三苯甲基)，且使游離胺與結構**5**之第二化合物之經活化磷部分反應。重複此序列直至獲得期望長度之寡聚物為止。末端**3'**端中之保護基團端可去除或保留(若期望**3'**修飾)。可使用任何數量之方法自固體載體去除寡聚物，例如用鹼處理以裂解至固體載體之鏈接體。

嗎啉基寡聚物之通常製備及本揭示內容之特定嗎啉基寡聚物更詳細地闡述於實例中。

實例1

嗎啉基寡聚物之製備

本揭示內容之化合物之製備係使用以下方案根據反應圖2來實施：



反應圖2：經活化尾酸之製備

三苯甲基六氫吡嗪胺基甲酸苯基酯35之製備：向化合物11於二氯甲烷(6 mL/g 11)中之冷卻懸浮液添加碳酸鉀(3.2 eq)於水(4 mL/g碳酸鉀)中之溶液。向此兩相混合物緩慢添加氯甲酸苯基酯(1.03 eq)於二氯甲烷(2 g/g氯甲酸苯基酯)中之溶液。使反應混合物升溫至20°C。在反應完成後(1-2小時)，分離各層。用水洗滌有機層，並經無水碳酸鉀乾燥。產物35係藉由自乙腈結晶來分離。

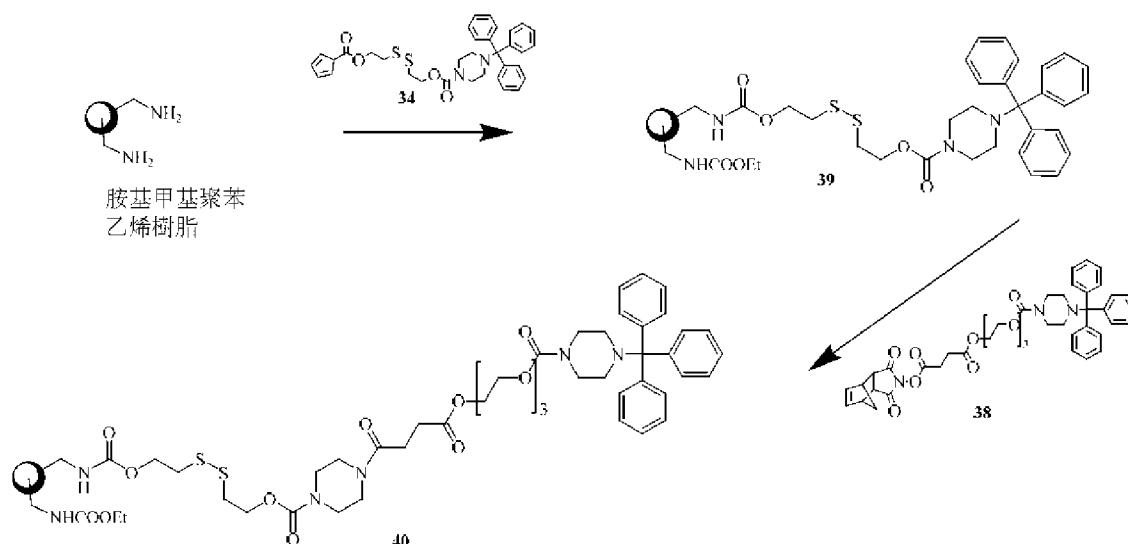
胺基甲酸酯醇36之製備：將氫化鈉(1.2 eq)懸浮於1-甲基-2-吡咯啉酮(32 mL/g氫化鈉)中。向此懸浮液添加三乙二醇(10.0 eq)及化合物35 (1.0 eq)。將所得漿液加熱至95°C。在反應完成後(1-2小時)，使混合物冷卻至20°C。向此混合物添加30%二氯甲烷/甲基第三丁基醚(v:v)及水。用NaOH水溶液、琥珀酸水溶液及飽和氯化鈉水溶液相繼洗滌含有產物之有機層。產物36係藉由自二氯甲烷/甲基第三丁基醚/庚烷結晶來分離。

尾酸37之製備：向化合物36於四氫呋喃(7 mL/g 36)中之溶液添加琥

珀酸酐(2.0 eq)及DMAP (0.5 eq)。將混合物加熱至50°C。在反應完成後(5小時)，使混合物冷卻至20°C並利用NaHCO₃水溶液調整至pH 8.5。添加甲基第三丁基醚，並將產物萃取至水層中。添加二氯甲烷，並利用檸檬酸水溶液將混合物調整至pH 3。利用pH=3之檸檬酸鹽緩衝劑及飽和氯化鈉水溶液之混合物洗滌含有產物之有機層。37之此二氯甲烷溶液不經分離即用於化合物38之製備中。

38之製備：向化合物37之溶液添加N-羥基-5-降冰片烯-2,3-二甲酸醯亞胺(HONB) (1.02 eq)、4-二甲基胺基吡啶(DMAP) (0.34 eq)且然後1-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC) (1.1 eq)。將混合物加熱至55°C。在反應完成後(4-5小時)，使混合物冷卻至20°C並用1:1 0.2 M 檸檬酸/鹽水及鹽水相繼洗滌。二氯甲烷溶液經歷溶劑交換為丙酮且然後為N,N-二甲基甲醯胺，且產物係藉由自丙酮/N,N-二甲基甲醯胺沈澱至飽和氯化鈉水溶液中來分離。將粗製產物於水中重新製漿若干次來去除殘餘N,N-二甲基甲醯胺及鹽。

將經活化之「尾」引入至載錨樹脂上係藉由用於將亞單元在固相合成期間併入之程序於二甲基咪唑啉酮(DMI)中實施。



反應圖3：用於嗎啉基寡聚物之合成之固體載體之製備

此程序係在具有粗孔隙率(40-60 μm)玻璃料、頂置式攪拌器及3通特氟龍 (Teflon) 活塞以使 N2 鼓泡穿過玻料之矽烷化夾套式肽容器 (ChemGlass, NJ, USA)或真空萃取中實施。

以下程序中之樹脂處理/洗滌步驟係由兩個基本操作組成：樹脂流化或攪拌器床反應器及溶劑/溶液萃取。對於樹脂流化，將活塞定位以容許 N2 穿過玻料向上流動，並將指定樹脂處理/洗滌液添加至反應器且使其滲透並完全潤濕樹脂。然後開始混合並將樹脂漿液混合達指定時間。對於溶劑/溶液萃取，停止混合及 N2 流並啟動真空幫浦且然後將活塞定位以便將樹脂處理/洗滌液排空至廢料。除非另有註明，否則所有樹脂處理/洗滌液體積均為 15 mL/g 樹脂。

向於矽烷化夾套肽容器中之胺基甲基聚苯乙烯樹脂(100-200目；基於氮取代約 1.0 mmol/g 負載；75 g, 1 eq, Polymer Labs, UK, 部件號 1464-X799)添加 1-甲基-2-吡咯啉酮(NMP；20 ml/g 樹脂)，並使樹脂在混合下溶脹 1-2 小時。在將溶脹溶劑排空後，用二氯甲烷(2 \times 1-2 min)、於 25% 異丙醇/二氯甲烷中之 5% 二異丙基乙胺(2 \times 3-4 min)及二氯甲烷(2 \times 1-2 min)洗滌樹脂。在將最終洗滌液排空之後，用二硫化物錨 34 於 1-甲基

-2-吡咯啉酮(0.17 M ; 15 mL/g樹脂，約2.5 eq)中之溶液處理樹脂，並將樹脂/試劑混合物在45°C下加熱60小時。反應完成後，中斷加熱且將錙溶液排空，並用1-甲基-2-吡咯啉酮(4 × 3-4 min)及二氯甲烷(6 × 1-2 min)洗滌樹脂。將樹脂用10% (v/v)二碳酸二乙基酯於二氯甲烷(16 mL/g ; 2 × 5-6 min)中之溶液處理且然後用二氯甲烷(6 × 1-2 min)洗滌。將樹脂39在N₂流下乾燥1-3小時且然後在真空下乾燥至恒重(± 2%)。產率：原始樹脂重量之110-150%。

胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂之負載之測定：樹脂之負載(潛在可獲得之反應性位點之數量)係藉由對每克樹脂三苯基甲基(三苯甲基)之數量之光譜分析來測定。

將已知重量之乾燥樹脂(25 ± 3 mg)轉移至矽烷化之25 ml容量瓶中，並添加約5 mL之於二氯甲烷中之2% (v/v)三氟乙酸。藉由溫和渦旋將內容物混合且然後使其靜置30 min。用額外之於二氯甲烷中之2% (v/v)三氟乙酸使體積達到25 mL並將內容物充分混合。使用正排量式吸量管將含有三苯甲基之溶液之等分試樣(500 μL)轉移至10 mL容量瓶中，並用甲磺酸使體積達到10 mL。

最終溶液中三苯甲基陽離子之含量係藉由在431.7 nm下之UV吸光度來量測，且樹脂負載係使用適當體積、稀釋度、消光係數(ϵ : 41 $\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及樹脂重量以每克樹脂之三苯甲基($\mu\text{mol/g}$)來計算。以一式三份實施分析並計算平均負載。

此實例中之樹脂裝載程序將提供負載為大約500 $\mu\text{mol/g}$ 之樹脂。若二硫化物錙併入步驟在室溫下實施24小時，則獲得300-400 $\mu\text{mol/g}$ 之負載。

尾裝載：使用與胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂之製備相同之設置及體積，可將尾引入至固體載體中。在酸性條件下首先使載錨樹脂去保護，並將所得材料在偶合前中和。對於偶合步驟，使用38 (0.2 M)於含有4-乙基嗎啉(NEM, 0.4 M)之DMI中之溶液代替二硫化物錨溶液。在45°C下2小時之後，將樹脂39用於25%異丙醇/二氯甲烷中之5%二異丙基乙胺洗滌兩次並用DCM洗滌一次。向該樹脂添加苯甲酸酐(0.4 M)及NEM (0.4 M)之溶液。25 min之後，使反應器夾套冷卻至室溫，並將樹脂用於25%異丙醇/二氯甲烷中之5%二異丙基乙胺洗滌兩次並用DCM洗滌八次。將樹脂40過濾並在高真空下乾燥。樹脂40之負載係定義為用於尾裝載中之原始胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂39之負載。

固相合成：嗎啉基寡聚物係在Gilson AMS-422自動化肽合成儀上在2 mL Gilson聚丙烯反應管柱(部件號3980270)中製備。當將管柱置於合成儀上時，將具有用於水流動之通道之鋁塊置於該等管柱周圍。AMS-422將交替添加試劑/洗滌溶液，保持指定時間，並使用真空排空管柱。

對於長度為至多約25個亞單元之寡聚物而言，負載接近500 $\mu\text{mol/g}$ 樹脂之胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂較佳。對於較大之寡聚物而言，負載為300-400 $\mu\text{mol/g}$ 樹脂之胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂較佳。若期望具有5'-尾之分子，則使用相同裝載指南選擇已裝載尾之樹脂。

製備以下試劑溶液：

- 去三苯甲基化溶液：於4:1二氯甲烷/乙腈中之10%氰基乙酸(w/v)；
- 中和溶液：於3:1二氯甲烷/異丙醇中之5%二異丙基乙胺；
- 偶合溶液：於1,3-二甲基咪唑啉酮中之期望鹼基及鏈接體類型之

0.18 M (或對於生長長於20個亞單元之寡聚物為0.24 M)經活化之嗎啉基亞單元及0.4 M N乙基嗎啉。

二氯甲烷(DCM)用作過渡洗滌劑以分離不同試劑溶液洗滌液。

在合成儀上，使塊設定為42°C，向含有30 mg胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂(或尾樹脂)之每一管柱添加2 mL之1-甲基-2-吡咯啉酮並使其在室溫下放置30 min。在用2 mL二氯甲烷洗滌2次之後，採用以下合成循環：

步驟	體積	遞送	保持時間
去三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
去三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
去三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
去三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
去三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
去三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15秒
去三苯甲基化	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 μ L 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

將個別寡聚物之順序程式化至合成儀中，使得每一管柱以適當順序接受適當偶合溶液(A、C、G、T、I)。當管柱中之寡聚物完成其最終亞單元之併入時，將管柱自塊去除，並使用包含含有0.89 M 4-乙基嗎啉之4-甲氧基三苯基甲基氯(0.32 M於DMI中)之偶合溶液手動實施最終循環。

自樹脂裂解並去除鹼基及骨架保護基團：在甲氧基三苯甲基化之後，將樹脂用2 mL 1-甲基-2-吡咯啉酮洗滌8次。添加1 mL由於1-甲基-2-吡咯啉酮中之0.1 M 1,4-二硫蘇糖醇(DTT)及0.73 M三乙胺組成之裂解溶液，且將管柱加蓋，並使其在室溫下放置30 min。之後，將溶液排至12 mL Wheaton小瓶中。將極大收縮之樹脂用300 μ L裂解溶液洗滌兩次。向該溶液添加4.0 mL濃氨水(在-20°C下儲存)，將小瓶蓋緊(用特氟龍襯裡之螺帽)，並將混合物渦旋以使溶液混合。將小瓶置於45°C烘箱中16-24小時，以實現鹼基及骨架保護基團之裂解。

粗製產物純化：將裝入小瓶中之氨解溶液自烘箱移除並使其冷卻至室溫。將溶液用20 mL之0.28%氨水稀釋並通過含有Macroprep HQ 樹脂(BioRad)之2.5 \times 10 cm管柱。使用鹽梯度(A：0.28%氨B：於0.28%氨中之1 M氯化鈉；0-100% B，60 min內)以溶析含有甲氧基三苯甲基之峰。將

合併之級分合併並端視期望產物進行進一步處理。

嗎啉基寡聚物之去甲氧基三苯甲基化：將來自Macroprep純化之合併級分用1 M H₃PO₄處理以將pH降低至2.5。初始混合後，將樣品在室溫下放置4 min，此時用2.8%氨/水將其中和至pH 10-11。藉由固相萃取(SPE)將產物純化。

SPE管柱裝填及預處理：將Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3 mL)裝填至20 mL燒結管柱(BioRad Econo-Pac層析管柱(732-1011))中，並將樹脂用3 mL之以下各項沖洗：0.28% NH₄OH/80%乙腈；0.5M NaOH/20%乙醇；水；50 mM H₃PO₄/80%乙腈；水；0.5 NaOH/20%乙醇；水；0.28% NH₄OH。

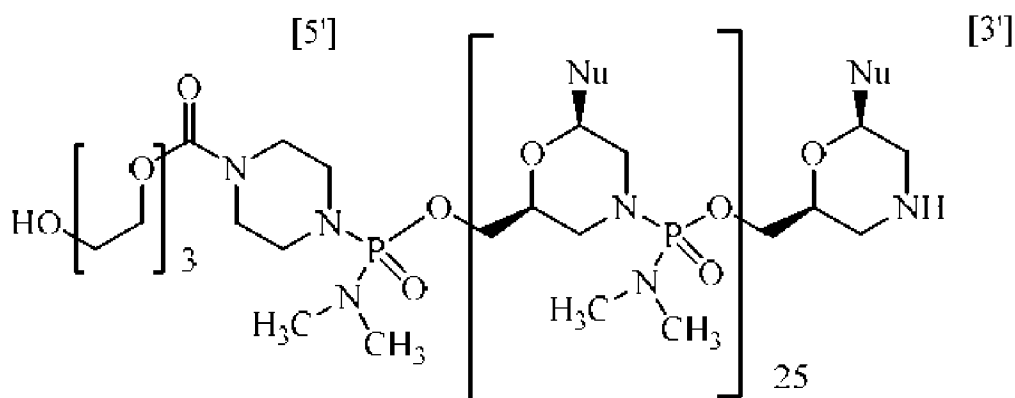
SPE純化：將來自去甲氧基三苯甲基化之溶液裝載至管柱上並用3-6 mL 0.28%氨水將樹脂沖洗三次。將Wheaton小瓶(12 mL)置於管柱下，並藉由用於0.28%氨水中之2 mL 45%乙腈洗滌兩次來溶析產物。

產物分離：使溶液於乾冰中冷凍並將小瓶置於冷凍乾燥器中以產生蓬鬆之白色粉末。將樣品溶解於水中，使用注射器藉助0.22微米過濾器(Pall Life Sciences, Acrodisc 25 mm注射器式過濾器，具有0.2微米 HT Tuffryn膜)過濾，並在UV分光光度計上量測光密度(OD)以測定所存在之寡聚物之OD單元，以及分配樣品進行分析。然後將溶液回置於Wheaton小瓶中進行凍乾。

藉由MALDI分析嗎啉基寡聚物：使用MALDI-TOF質譜測定純化中級分之組成以及提供寡聚物之身份(分子量)之證據。樣品在用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)作為基質之溶液稀釋之後運行。

實例2

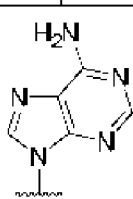
使用實例1中所闡述之方案，合成以下PMO並用於實例中。



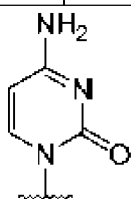
化合物1

其中每一Nu自1至26且5'至3'為以下(SEQ ID NO: 1)：

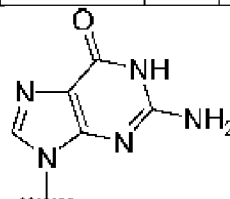
位置編號5'至3'	Nu	位置編號5'至3'	Nu	位置編號5'至3'	Nu	位置編號5'至3'	Nu	位置編號5'至3'	Nu	位置編號5'至3'	Nu
1	C	6	G	11	C	16	A	21	C	26	A
2	C	7	C	12	C	17	G	22	T		
3	A	8	C	13	T	18	T	23	G		
4	A	9	A	14	G	19	T	24	T		
5	T	10	T	15	G	20	C	25	A		



其中 A 係

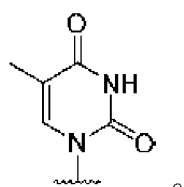


， C 係



， G 係

， 且 T 係



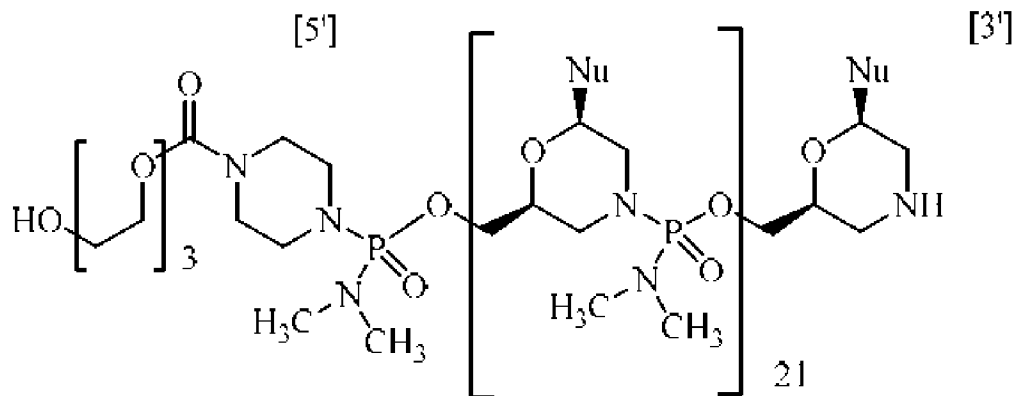
HPLC：78.60%；條件：Dionex DNAPac (DNX97號) 梯度：在0 min時75%A + 20%B + 5%C；在20 min時50%A；在21 min時25%A +

75%C；流動相A：10 mM NaOH/20 mM NaCl；C：10 mM NaOH/0.5 M NaCl。管柱溫度：45C；流速1.0 mL/min。

MALDI質譜確認質量：8908.2

實例3

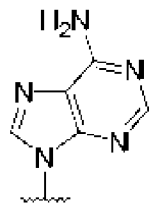
使用實例1中所闡述之方案，合成以下PMO並用於實例中。



化合物2

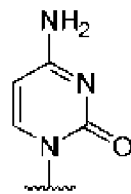
其中每一Nu自1至22且5'至3'係以下(SEQ ID NO: 2)：

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	C	6	C	11	C	16	G	21	T
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G
3	A	8	A	13	G	18	T		
4	T	9	T	14	G	19	C		
5	G	10	C	15	A	20	C		

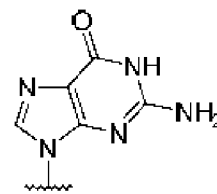


其中 A 係

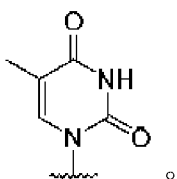
， C 係



， G 係



， 且 T 係

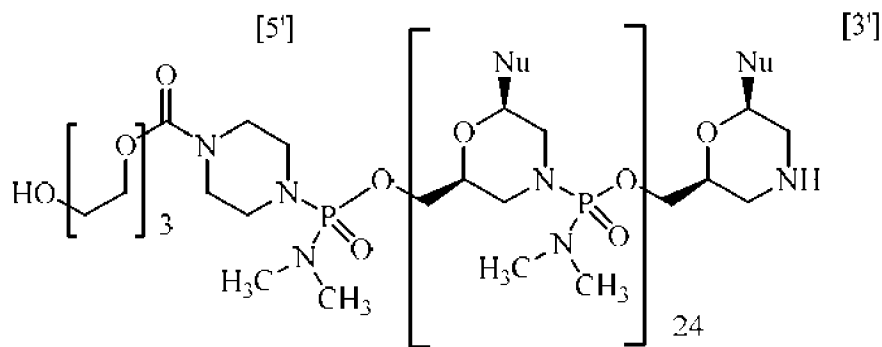


HPLC : 71.85% ; 條件 : Dionex DNAPac (DNX97號) 梯度 : 在 0 min時 75%A + 20%B + 5%C ; 在 20 min時 50%A ; 在 21 min時 25%A + 75%C ; 流動相 A : 10 mM NaOH/20 mM NaCl ; C : 10 mM NaOH/0.5 M NaCl 。 管柱溫度 : 45C ; 流速 1.0 mL/min 。

MALDI質譜確認質量 : 7588.39

實例4

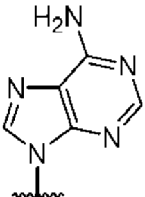
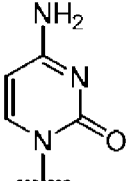
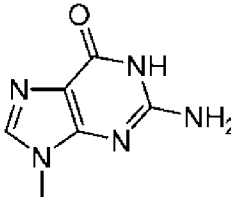
使用實例1中所闡述之方案，合成以下PMO並用於實例中。

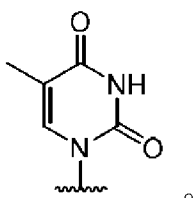


化合物3

其中每一Nu自1至25且5'至3'係以下(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	T	6	T	11	G	16	C	21	A
2	G	7	C	12	A	17	C	22	A
3	C	8	C	13	G	18	T	23	G
4	C	9	T	14	T	19	G	24	A
5	A	10	G	15	T	20	T	25	T

其中 A 係  , C 係  , G 係  , 且 T 係

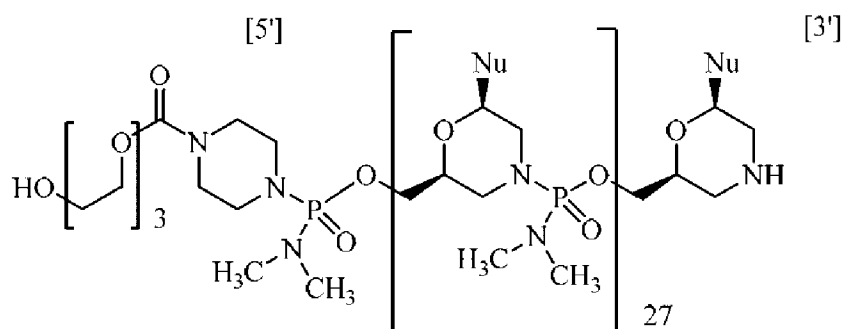


HPLC : 78.00% ; 條件 : Dionex DNAPac (DNX97號) 梯度 : 在0 min時75%A + 20%B + 5%C ; 在20 min時50%A ; 在21 min時25%A + 75%C ; 流動相A : 10 mM NaOH/20 mM NaCl ; C : 10 mM NaOH/0.5 M NaCL。管柱溫度 : 45C ; 流速1.0 mL/min。

MALDI質譜確認質量 : 8623.84

實例5

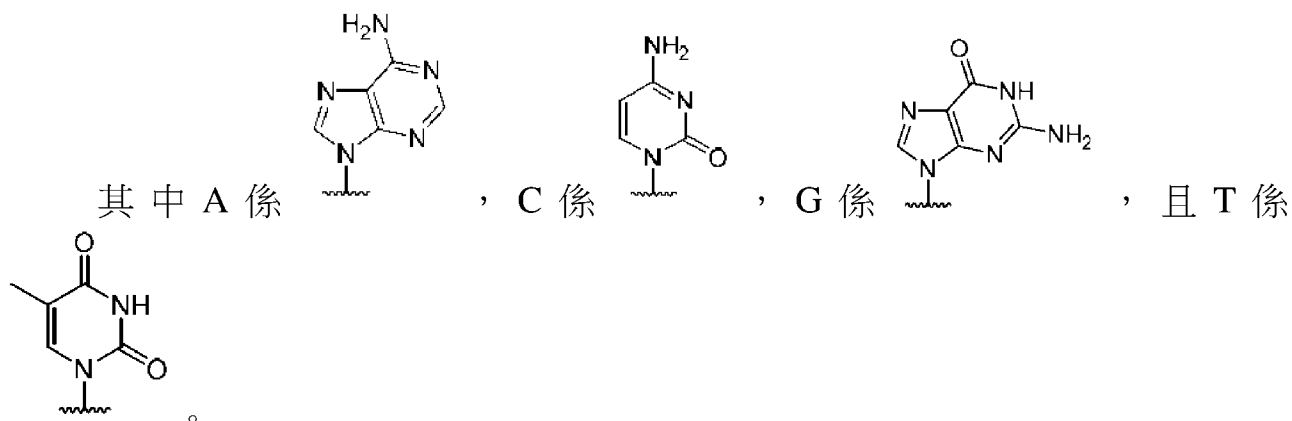
使用實例1中所闡述之方案，合成以下PMO並用於實例中。



化合物4

其中每一Nu自1至28且5'至3'係以下(SEQ ID NO: 4) :

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	位置編號5'至3'	Nu
1	C	6	C	11	C	16	G	21	T	26	G
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G	27	A
3	A	8	A	13	G	18	T	23	T	28	T
4	T	9	T	14	G	19	C	24	A		
5	G	10	C	15	A	20	C	25	A		

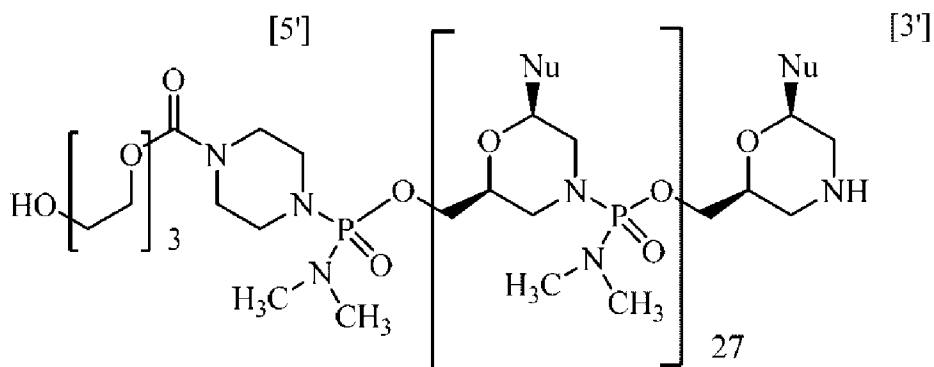


HPLC：71.84%；條件：Dionex DNAPac (DNX97 號) 梯度：在 0 min 時 75%A + 20%B + 5%C；在 20 min 時 50%A；在 21 min 時 25%A + 75%C；流動相 A：10 mM NaOH/20 mM NaCl；C：10 mM NaOH/0.5 M NaCl。管柱溫度：45C；流速 1.0 mL/min。

MALDI 質譜確認質量：9616.50

實例 6

使用實例 1 中所闡述之方案，合成以下 PMO 並用於實例中。

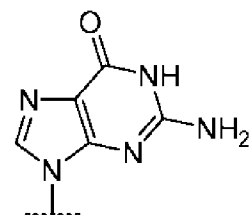
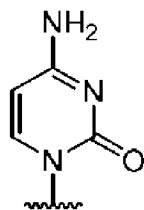
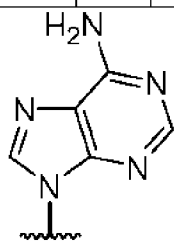


化合物 5

其中每一 Nu 自 1 至 28 且 5' 至 3' 係以下 (SEQ ID NO: 5)：

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	位置編號 5' 至 3'	Nu
1	T	6	T	11	G	16	C	21	A	26	A
2	G	7	C	12	A	17	C	22	A	27	C

3	C	8	C	13	G	18	T	23	G	28	C
4	C	9	T	14	T	19	G	24	A		
5	A	10	G	15	T	20	T	25	T		

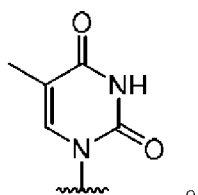


其中 A 係

， C 係

， G 係

， 且 T 係

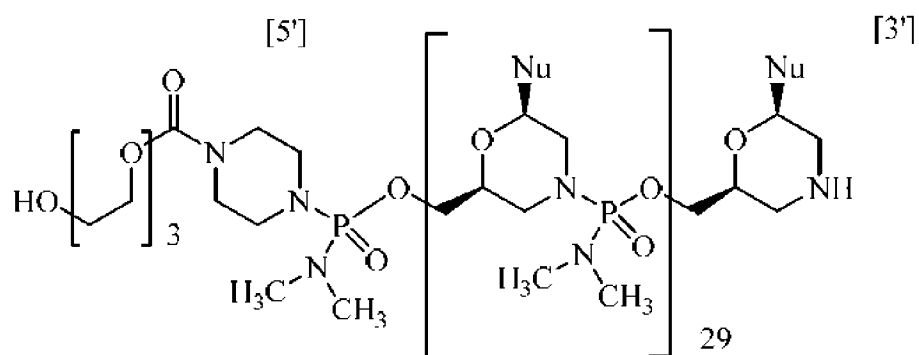


HPLC : 75.15% ; 條件 : Dionex DNAPac (DNX97 號) 梯度 : 在 0 min 時 75%A + 20%B + 5%C ; 在 20 min 時 50%A ; 在 21 min 時 25%A + 75%C ; 流動相 A : 10 mM NaOH/20 mM NaCl ; C : 10 mM NaOH/0.5 M NaCl 。 管柱溫度 : 45C ; 流速 1.0 mL/min 。

MALDI 質譜確認質量 : 9593.64

實例 7

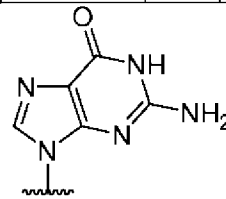
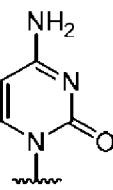
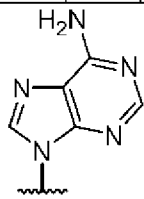
使用實例 1 中所闡述之方案，合成以下 PMO 並用於實例中。



化合物 6

其中每一 Nu 自 1 至 30 且 5' 至 3' 係以下 (SEQ ID NO: 10) :

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	位置編號5'至3'	Nu
1	A	6	C	11	T	16	T	21	G	26	A
2	A	7	A	12	G	17	T	22	T	27	T
3	T	8	T	13	G	18	C	23	A	28	A
4	G	9	C	14	A	19	C	24	A	29	C
5	C	10	C	15	G	20	T	25	G	30	C

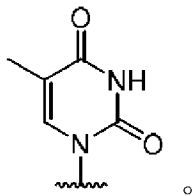


其中 A 係

， C 係

， G 係

， 且 T 係



HPLC : 75.15% ; 條件 : Dionex DNAPac (DNX97號) 梯度 : 在 0 min時 75%A + 20%B + 5%C ; 在 20 min時 50%A ; 在 21 min時 25%A + 75%C ; 流動相 A : 10 mM NaOH/20 mM NaCl ; C : 10 mM NaOH/0.5 M NaCl 。 管柱溫度 : 45C ; 流速 1.0 mL/min 。

MALDI質譜確認質量 : 10271.39

實例8

外顯子45跳躍

製備實例2-6中所闡述之靶向如下表中所述之人類肌肉萎縮蛋白外顯子45之一系列反義寡聚物並評價誘導外顯子45跳躍之能力。

化合物名稱	外顯子45 靶標區域	鹼基序列	SEQ ID NO
化合物1	H45A(-06+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTC CTGTAA	1

化合物2	H45A(-03+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCC TG	2
化合物3	H45A(-09+16)	TGCCATCCTGGAGTTCCTGT AAGAT	3
化合物4	H45A(-09+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCC TGTAAGAT	4
化合物5	H45A(-12+16)	TGCCATCCTGGAGTTCCTGT AAGATACC	5
化合物6	hE45CMC (-12+18)	AATGCCATCCTGGAGTTCCT GTAAGATACC	10

具體而言，使用人類橫紋肌肉瘤細胞來測定化合物1-5在不同濃度(即，12.5 μm 、2.5 μm 、0.5 μm 及0.25 μm)下誘導外顯子45跳躍之能力。核轉染後24小時，採集RNA並經受巢式RT-PCR。使用Cy5標記之丙烯醯胺凝膠電泳分析樣品並計算外顯子跳躍百分比。結果呈現於下表中：

反義寡聚物	外顯子跳躍百分比	
	12.5 μm 劑量	2.5 μm 劑量
化合物2	80	31
化合物1	74	26
化合物4	71	18
化合物3	68	17
化合物5	63	18
化合物6	44	19

結果指示在所有測試之PMO中在外顯子45跳躍程度方面具有劑量反應。令人驚訝地，相對於所測試之其他PMO，化合物2在12.5 μm 及2.5 μm 濃度時誘導最高百分比之外顯子45跳躍。具體而言，在12.5 μm 濃度下，化合物2誘導之外顯子45跳躍較化合物6多82%。

本說明書中所引用之所有出版物及專利申請案均係以引用的方式併入本文中，其併入程度如同明確地且個別地指示將每一個別出版物或專利申請案以引用的方式併入一般。

參考文獻

Aartsma-Rus, A., A. A. Janson 等人，(2004). 「Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense.」 **Am J Hum Genet** **74**(1): 83-92。

Cirak, S., V. Arechavala-Gomez 等人，(2011). 「Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study.」 **Lancet** **378**(9791): 595-605。

Dunckley, M. G., I. C. Eperon 等人，(1997). 「Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides.」 **Nucleosides & Nucleotides** **16**(7-9): 1665-1668。

Dunckley, M. G., M. Manoharan 等人，(1998). 「Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides.」 **Hum Mol Genet** **7**(7): 1083-90。

Errington, S. J., C. J. Mann 等人，(2003). 「Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene.」 **J Gene Med** **5**(6): 518-27。

Goemans, N. M., M. Tulinius 等人，(2011). 「Systemic Administration of PRO051 in Duchenne's Muscular Dystrophy.」 **N Engl**

J Med ◦

Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton 等人，(2008). 「 Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice. 」 **Mol Ther** ◦

Kinali, M., V. Arechavala-Gomez 等人，(2009). 「 Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. 」 **Lancet Neurol** **8**(10): 918-28 ◦

Lu, Q. L., C. J. Mann 等人，(2003). 「 Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. 」 **Nat Med** **9**(8): 1009-14 ◦

Mann, C. J., K. Honeyman 等人，(2002). 「 Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. 」 **J Gene Med** **4**(6): 644-54 ◦

Marshall, N. B., S. K. Oda 等人，(2007). 「 Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing. 」 **Journal of Immunological Methods** **325**(1-2): 114-126 ◦

Matsuo, M., T. Masumura 等人，(1991). 「 Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe. 」 **J Clin Invest** **87**(6): 2127-31 ◦

Monaco, A. P., C. J. Bertelson等人，(1988). 「An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus.」 **Genomics** 2(1): 90-5。

Pramono, Z. A., Y. Takeshima等人，(1996). 「Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence.」 **Biochem Biophys Res Commun** 226(2): 445-9。

Sazani, P., R. Kole等人，(2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. **PCT WO2007058894**, University of North Carolina。

Sierakowska, H., M. J. Sambade等人，(1996). 「Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides.」 **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(23): 12840-4。

Summerton, J. and D. Weller (1997). 「Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties.」 **Antisense Nucleic Acid Drug Dev** 7(3): 187-95。

Takeshima, Y., H. Nishio等人，(1995). 「Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe.」 **J Clin Invest** 95(2): 515-20。

van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout等人，(2001). 「Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient

derived muscle cells.」 **Hum Mol Genet** **10**(15): 1547-54。

van Deutekom, J. C., A. A. Janson等人，(2007). 「Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051.」 **N Engl J Med** **357**(26): 2677-86。

Wilton, S. D., A. M. Fall 等人，(2007). 「Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript.」 **Mol Ther** **15**(7): 1288-96。

Wilton, S. D., F. Lloyd 等人，(1999). 「Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides.」 **Neuromuscul Disord** **9**(5): 330-8。

Wu, B., H. M. Moulton 等人，(2008). 「Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer.」 **Proc Natl Acad Sci U S A** **105**(39): 14814-9。

Yin, H., H. M. Moulton 等人，(2008). 「Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function.」 **Hum Mol Genet** **17**(24): 3909-18。

序列表

描述	序列	SEQ ID NO
H45A(-06+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	1
H45A(-03+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	2
H45A(-09+16)	TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	3
H45A(-09+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	4
H45A(-12+16)	TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC	5

外正向引子	CAATGCTCCTGACCTCTGTGC	6
外反向引子	GCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGG	7
內正向引子	GTCTACAACAAAGCTCAGGTCG	8
內反向引子	GCAATGTTATCTGCTTCCTCCAACC	9
hE45CMC (-12+18)	AATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC	10

【序列表】

<110> 美商薩羅塔治療公司

<120> 用於肌肉萎縮症之外顯子跳躍寡聚物

<130> AVN-025TW

<140>

<141>

<150> 62/356,923

<151> 2016-06-30

<150> 62/357,072

<151> 2016-06-30

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 1

ccaatgccat cctggagttc ctgtaa

26

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 2

caatgccatc ctggagttcc tg

22

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 3 tgccatcctg gagttcctgt aagat	25
<210> 4 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 4 caatgccatc ctggagttcc tgtaagat	28
<210> 5 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 5 tgccatcctg gagttcctgt aagatacc	28
<210> 6 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成引子	
<400> 6 caatgctcct gacctctgtg c	21
<210> 7 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成引子	
<400> 7 gctcttttcc aggttcaagt gg	22

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 8
 gtctacaaca aagctcaggt cg 22

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

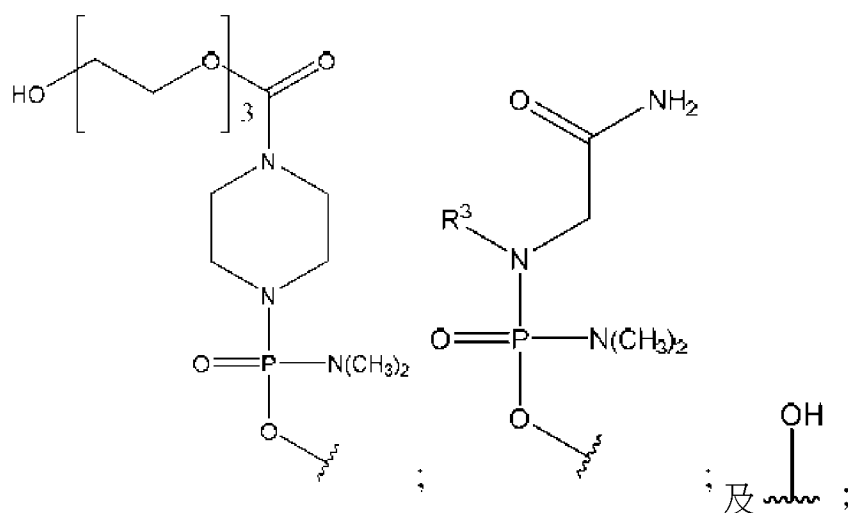
<220>
 <223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 9
 gcaatgttat ctgcttcctc caacc 25

<210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 10
 aatgccatcc tggagttcct gtaagatacc 30



其中R³係C₁-C₆烷基；且

R²係選自H、乙醯基、三苯甲基及4-甲氧基三苯甲基，

其中該靶向序列與選自由H45A(-06+20)、H45A(-03+19)、H45A(-09+16)、H45A(-09+19)及H45A(-12+16)組成之群之外顯子45靶標區域互補。

【第2項】

如請求項1之反義寡聚物，其中該靶向序列係選自：

a) SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3')，其中Z係24；

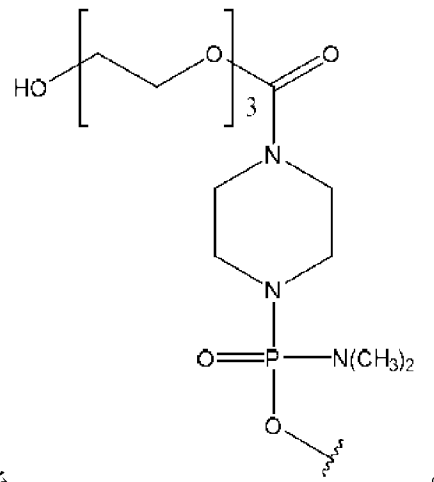
b) SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3')，其中Z係20；

c) SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')，其中Z係23；

d) SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')，其中Z係26；及

e) SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3')，其中Z係26。

【第3項】



如請求項1之反義寡聚物，其中T係

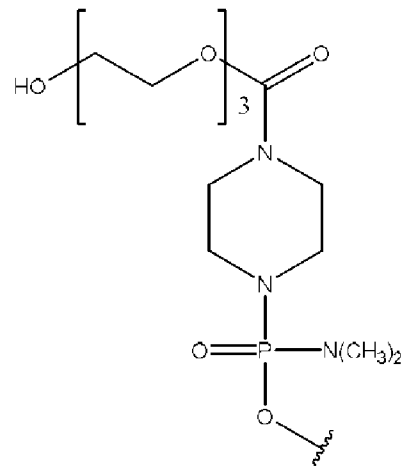
【第4項】

如請求項1之反義寡聚物，其中 R^2 係H。

【第5項】

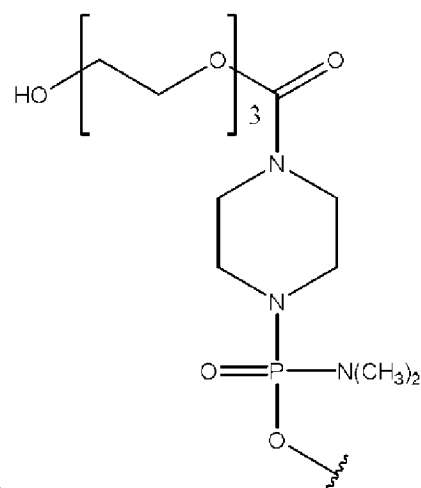
如請求項1之反義寡聚物，其中Z係20。

【第6項】



如請求項1之反義寡聚物，其中T係
H，且Z係20。 ， R^2 係

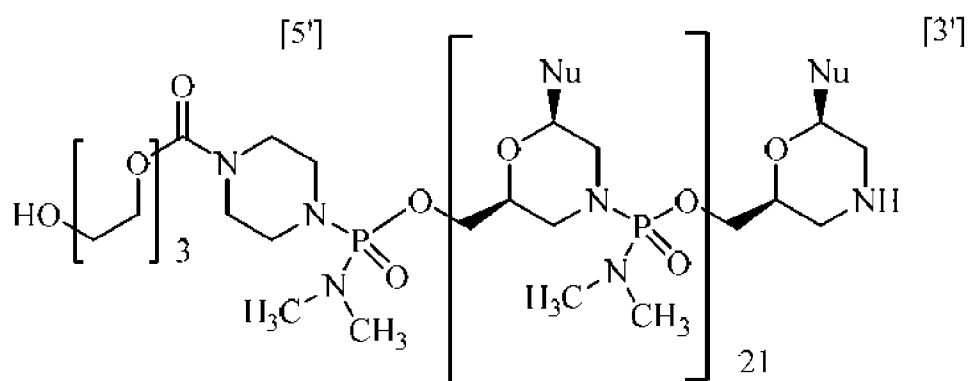
【第7項】



如請求項1之反義寡聚物，其中T係 ，該靶向序列係 SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3') 且 Z 係 20。

【第8項】

如請求項1之反義寡聚物，其具有以下結構：



化合物2

其中每一Nu自1至22且5'至3'係以下 (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	C	6	C	11	C	16	G	21	T
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G
3	A	8	A	13	G	18	T		
4	T	9	T	14	G	19	C		
5	G	10	C	15	A	20	C		

【第9項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1之反義寡聚物及醫藥上可接受之載劑。

【第10項】

一種如請求項1之反義寡聚物之用途，其用於製造用於在有需要之個體中治療杜興氏肌肉萎縮症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)或產生肌肉萎縮蛋白之藥劑，其中該個體具有適於外顯子45跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變。

【發明圖式】



【圖 1】



【圖 2】



來源：自 Kole 2012 改編。

【圖 3】