202019442

(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 202019442 A

(43)公開日： 中華民國 109 (2020) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：108126853　(22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 07 月 29 日

(51)Int. Cl.：　*A61K31/712 (2006.01)*　*A61K31/713 (2006.01)*

A61K47/64 (2017.01)　*C12N15/113 (2010.01)*

(30)優先權：2018/07/30　美國　62/711,894

(71)申請人：美商薩羅塔治療公司 (美國) SAREPTA THERAPEUTICS, INC.　(US)
美國
美國麻省理工學院 (美國) MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY　(US)
美國

(72)發明人：沃夫　賈斯汀　M WOLFE, JUSTIN M. (US)；菲德森　科林　M FADZEN, COLIN M. (US)；潘特盧特　布萊德利　L PENTELUTE, BRADLEY L. (US)；韓森　甘納　J HANSON, GUNNAR J. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：49 項　圖式數：7　共 86 頁

(54)名稱

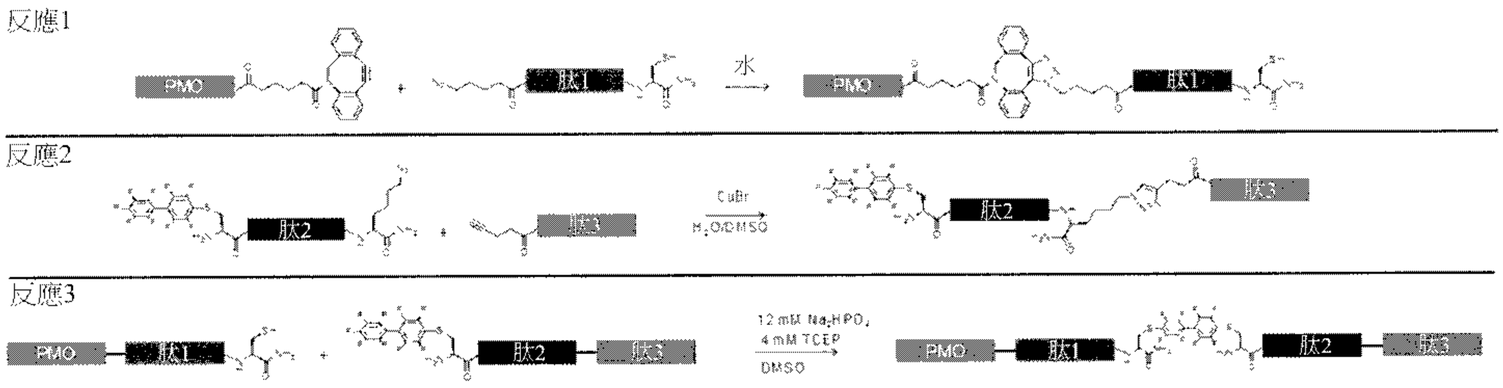
用於反義遞送之三聚合肽

(57)摘要

本發明提供寡核苷酸、三聚合肽及肽-寡核苷酸-結合物。本發明亦提供治療有需要個體之肌肉疾病的方法，其包含向個體投與本文所描述之寡核苷酸、三聚合肽及肽-寡核苷酸-結合物。

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

指定代表圖：

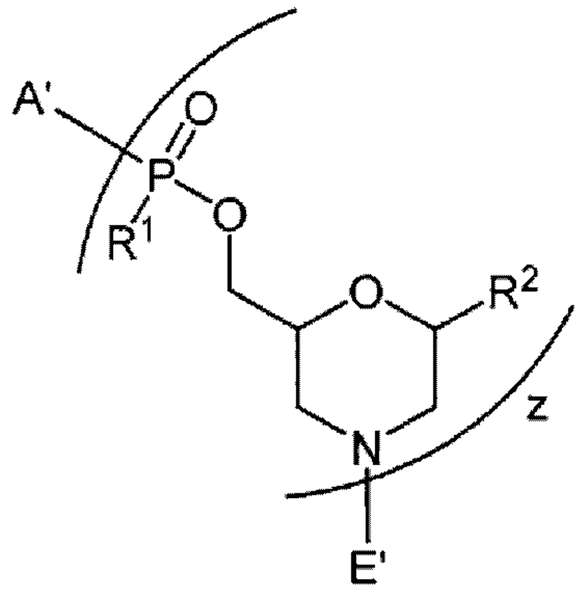


【圖2】

符號簡單說明：

無

特徵化學式：



(I)

202019442

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於反義遞送之三聚合肽

【英文發明名稱】

TRIMERIC PEPTIDES FOR ANTISENSE DELIVERY

【中文】

本發明提供寡核苷酸、三聚合肽及肽-寡核苷酸-結合物。本發明亦提供治療有需要個體之肌肉疾病的方法，其包含向個體投與本文所描述之寡核苷酸、三聚合肽及肽-寡核苷酸-結合物。

【英文】

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

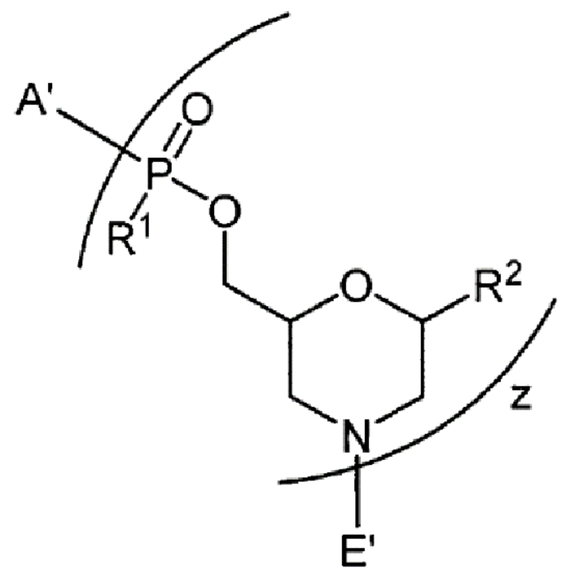
【指定代表圖】

圖2

【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】

用於反義遞送之三聚合肽

【英文發明名稱】

TRIMERIC PEPTIDES FOR ANTISENSE DELIVERY

【技術領域】

【先前技術】

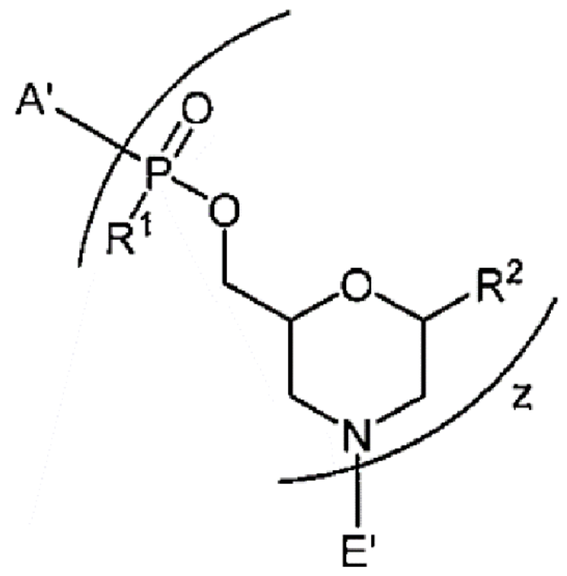
【0001】 反義技術提供用於調變一或多種特定基因產物(包括替代剪接產物)之表現之方式，且該方式唯一地適用於許多治療性、診斷性及研究應用。反義技術背後之原理為：與目標核酸雜交之反義化合物(例如寡核苷酸)經由許多反義機制中之任一者調變諸如轉錄、剪接或翻譯之基因表現活性。反義化合物之序列特異性使得其作為用於目標驗證及基因功能化的工具以及選擇性地調變與疾病有關之基因表現的療法有吸引力。

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

【發明內容】

【0003】 本文提供三聚合肽-寡核苷酸-結合物，其包含共價鍵結至三聚合肽之寡核苷酸。本文亦提供治療有需要個體之疾病的方法，其包含向個體投與本文中所描述之三聚合肽-寡核苷酸-結合物。本文亦提供用於製備本文所描述之三聚合肽-寡核苷酸-結合物之方法。

【0004】 因此，在一個態樣中，本文提供式I之三聚合肽-寡核苷酸結合物：

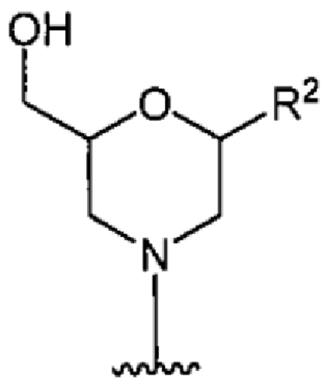


(I)

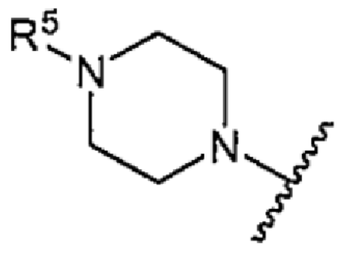
或其醫藥學上可接受之鹽。

其中：

A'選自-N(H)$CH_2C(O)NH_2$、-N(C_{1-6}烷基)$CH_2C(O)NH_2$、



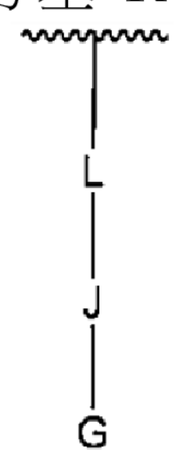
及



，其中

R^5為-C(O)(O-烷基)$_x$-OH，其中x為3至10，且各烷基在每次出現時獨立地為C_{2-6}烷基，

或R^5選自-C(O)C_{1-6}烷基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、-(C_{1-6}烷基)-R^6、-(C_{1-6}雜烷基)-R^6、芳基-R^6、雜芳基-R^6、-C(O)O-(C_{1-6}烷基)-R^6、-C(O)O-芳基-R^6、-C(O)O-雜芳基-R^6及



；

其中R^6選自OH、SH及NH_2，或R^6為O、S或NH，其每一者共價連接至固體支撐物；

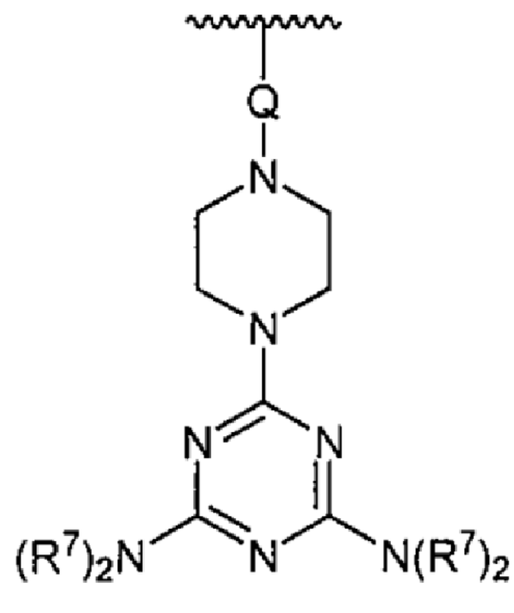
各R^1獨立地選自OH及-N(R^3)(R^4)，其中各R^3及R^4在每次出現時獨立

地為-C_{1-6}烷基；

各R^2在每次出現時獨立地選自H、核鹼基及經化學保護基官能化之核鹼基，其中該核鹼基在每次出現時獨立地包含選自吡啶、嘧啶、三氮雜環己烷、嘌呤及去氮嘌呤之C_{3-6}雜環；

z為8至40；及

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



及



；

其中

Q為-C(O)$(CH_2)_6$C(O)-或-C(O)$(CH_2)_2S_2(CH_2)_2$C(O)-；

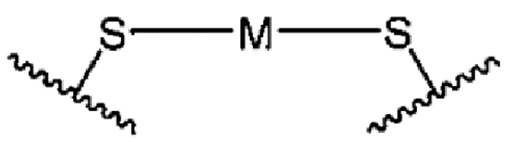
R^7為-$(CH_2)_2$OC(O)N$(R^8)_2$，其中R^8為-$(CH_2)_6$NHC(=NH)NH_2；

L為-C(O)$(CH_2)_{1-6}$-C_{7-15}-雜芳族基-$(CH_2)_{1-6}$C(O)-，其中L藉由醯胺鍵共價連接至J之胺基末端；

J為-P^1-L^1-P^2-L^2-P^3-；

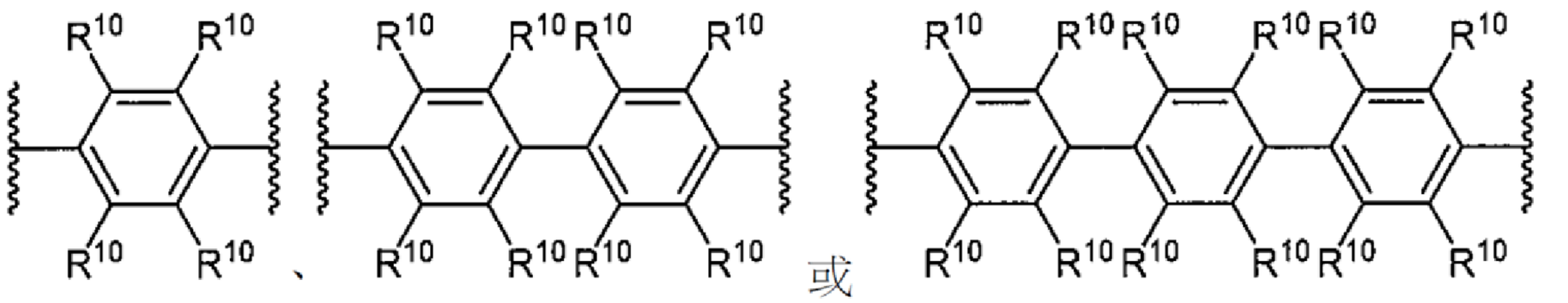
P^1、P^2及P^3各自獨立地為細胞穿透肽，其中P^1及P^2各自包含至少一個末端或內部半胱胺酸殘基，且P^2包含至少一個末端或內部離胺酸殘基；

L^1為



，

M為



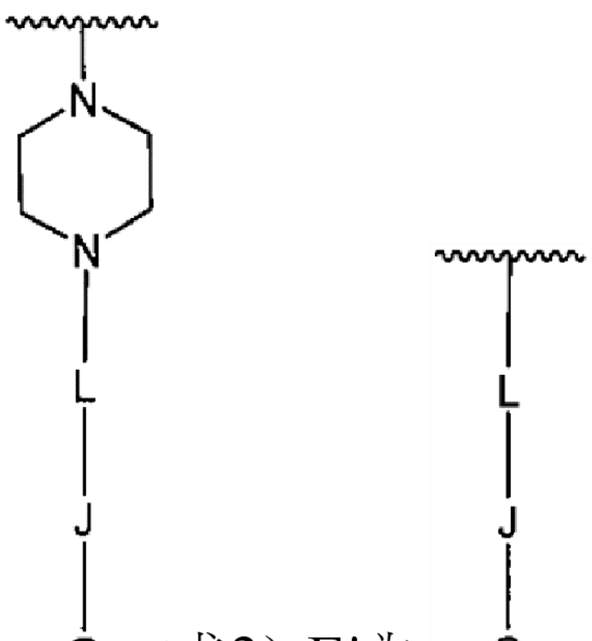
且R^{10}在每次出現時獨立地為H或鹵素，

其中L^1共價連接至P^1及P^2之末端或內部半胱胺酸之側鏈；

L^2為-$(CH_2)_{1-6}$-C_{1-6}-雜芳族基-$(CH_2)_{1-6}$C(O)-，其中L^2共價連接至P^2上之末端或內部離胺酸之側鏈且藉由醯胺鍵共價連接至P^3之胺基末端；

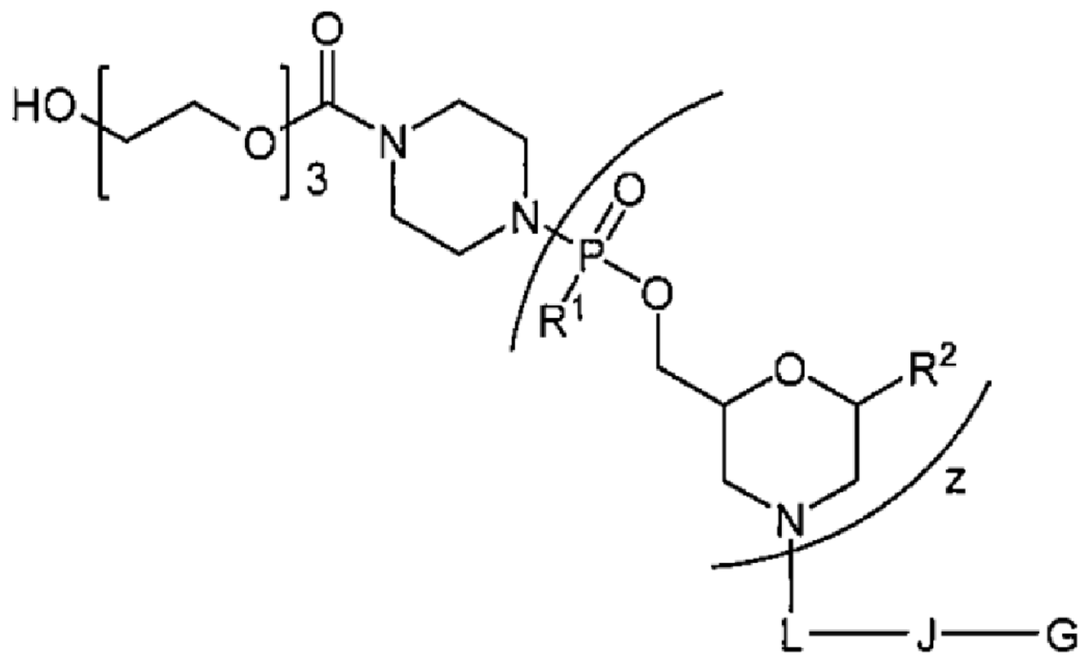
G選自H、-C(O)C_{1-6}烷基、苯甲醯基及硬脂醯基，其中G共價連接至J之羧基末端；及

其中以下條件中之至少一者為真實的：



1) A'為 或2) E'為 。

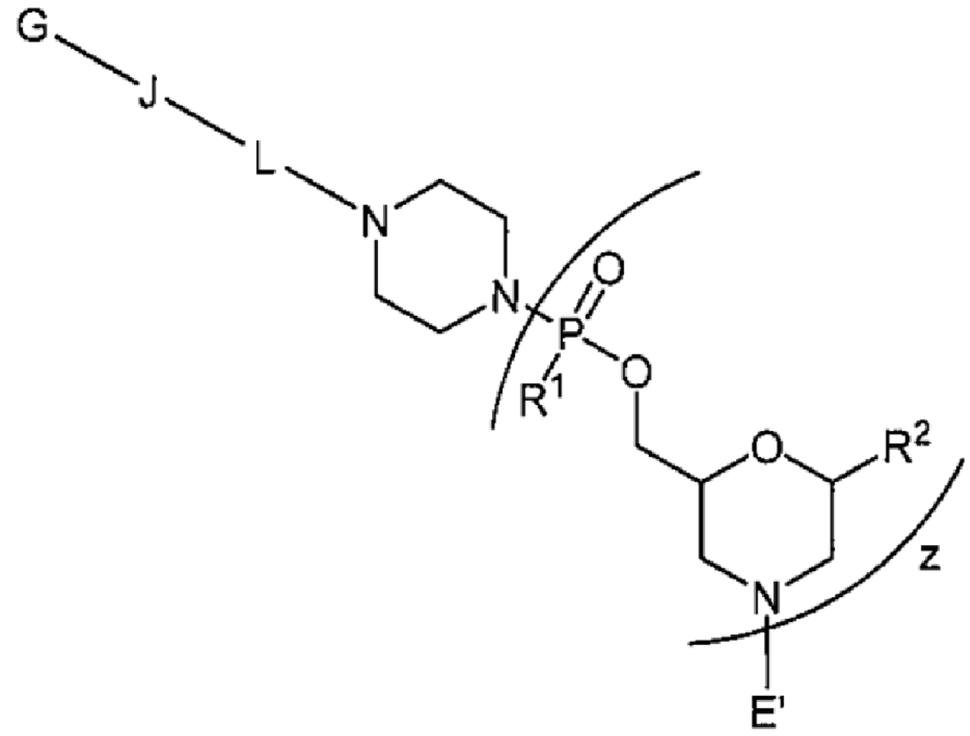
【0005】 在一個實施例中，式I之嵌合肽-寡核苷酸-結合物為式Ia之嵌合肽-寡核苷酸-結合物：



(Ia)

或其醫藥學上可接受之鹽。

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

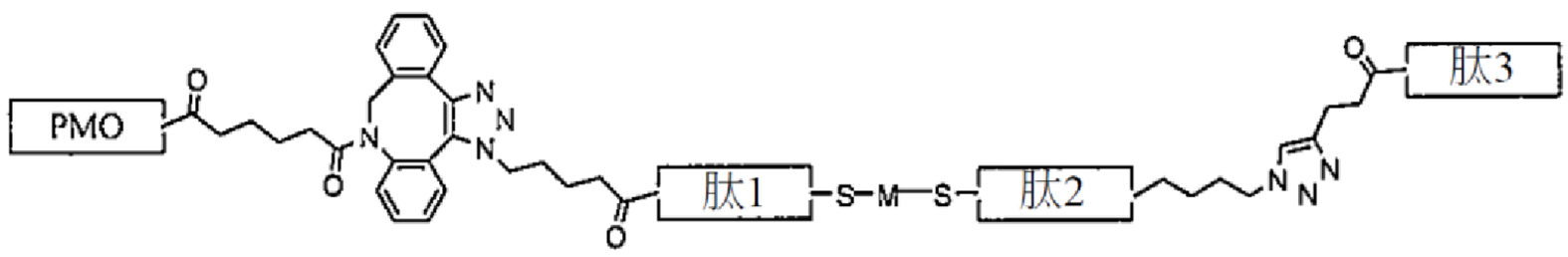


(Ib)

或其醫藥學上可接受之鹽。

【0007】 在再一態樣中，本文提供一種治療神經肌肉疾病之方法，其包含向該個體投與本發明之三聚合肽-寡核苷酸-結合物。

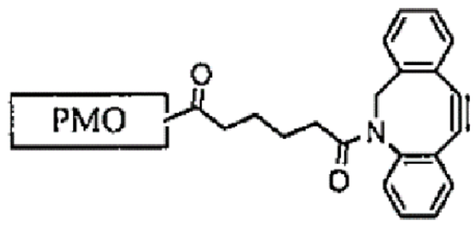
【0008】 在再一態樣中，本發明提供一種用於製備式(II)之三聚合肽-寡核苷酸結合物的方法：



(II)

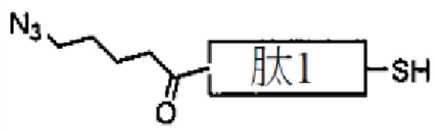
其包含：

(a) 使式(III)之化合物



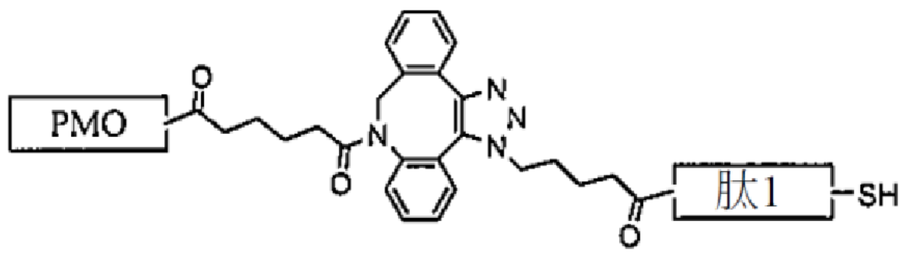
(III)

與式(IV)之化合物



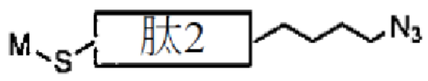
(IV)

在酸存在下接觸，形成式(V)之化合物，



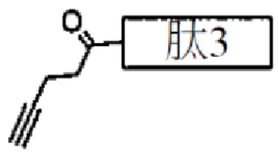
(V)

(b) 使式(VI)之化合物



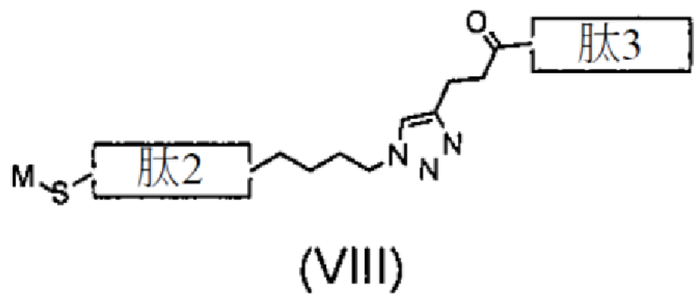
(VI)

與式(VII)之化合物



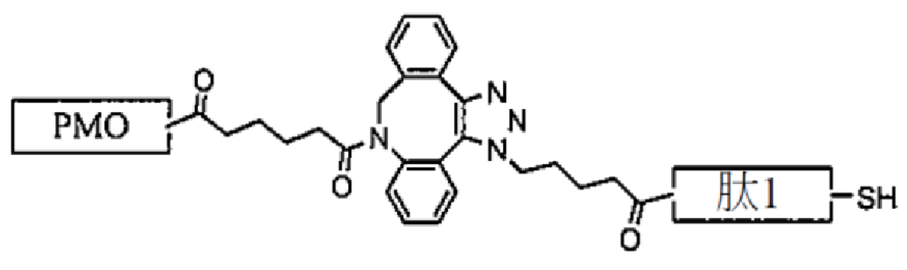
(VII)

在銅催化劑存在下接觸，形成式(VIII)之化合物，



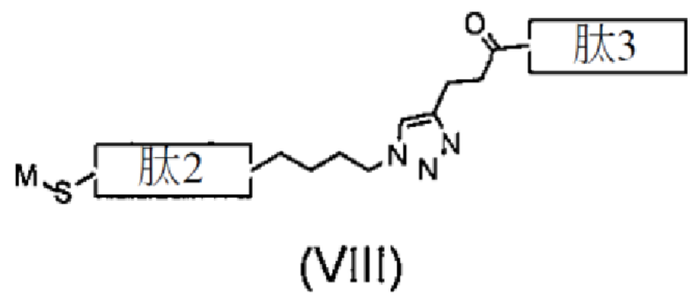
(VIII)

(c) 使式(V)之化合物



(V)

與式(VIII)之化合物



(VIII)

在偶合試劑存在下接觸，形成式(II)之化合物。

【圖式簡單說明】

【0009】 **圖1**展示四組分模組化庫之開發及實施。使用生物結合，肽之每一組合可組合成一個構築體且個別地測試。

【0010】 **圖2**展示用於合成模組化構築體之合成流程。

【0011】 **圖3**展示概念驗證實驗之特定肽序列及名稱。

【0012】 **圖4 A)**展示揭示用各模組化構築體處理之HeLa-654細胞之平均細胞螢光的熱度圖(n=3個重複孔)。**B)**展示揭示在用各模組化構築體處理之後HeLa-654細胞之總細胞計數的熱度圖。各實驗之上限為5000個細胞。低細胞計數表明細胞毒性。**C)**展示揭示細胞計數乘以平均螢光(F×C)之熱度圖，細胞計數乘以平均螢光(F×C)提供採集模組化構築體之兩個最重要參數之單一度量。

【0013】 **圖5**展示揭示在HeLa-654分析中測試之600種構築體之F×C的熱度圖(n=1個重複孔)。最有效的化合物為PMO-DPV6-SV40-W/R，該肽組合在測試之前未被預測為尤其顯著的。標記有「X」之方框為其中閘控細胞計數為零之構築體。

【0014】 **圖6**展示揭示在HeLa-654分析中測試之600種構築體之平均螢光強度的熱度圖(n=1個重複孔)。標記有「X」之方框為其中閘控細胞計數為零之構築體。

【0015】 **圖7**展示揭示在用600種構築體處理之後的總細胞計數的熱度圖(n=1個重複孔)。閘控細胞之數目之上限為5000。

【實施方式】

【0016】

相關申請之交叉引用

本申請案主張2018年7月30日申請之美國臨時申請案第62/711,894號

之優先權，其以全文引用的方式併入本文中。

【0017】 二胺基磷酸酯N-嗎啉基寡核苷酸(PMO)為用於基因疾病之有吸引力的治療性分子。PMO經設計以藉由Watson-Crick鹼基配對識別目標且針對其互補核苷酸序列展現高水準之特異性。根據所靶向序列之類型，PMO可介導多種效應，該等效應包括：阻斷蛋白質翻譯或修改基因剪接。伊特普森(Eteplirsen)，一種經FDA批准用以治療杜興氏肌肉失養症(Duchenne muscular dystrophy)之PMO，使針對肌縮蛋白編碼之前體mRNA中之含突變的外顯子自最終蛋白轉錄物中排除，從而使蛋白質功能性復原。

【0018】 就結構而言，PMO為中性寡核苷酸類似物，該中性寡核苷酸類似物中核糖基環已經N-嗎啉基環置換，且帶負電荷磷酸二酯主鏈已經不帶電荷二胺基磷酸酯置換。所變更之主鏈構防止在兩種血清中之降解及藉由胞內核酸酶之降解。然而，PMO之相對較大尺寸及中性電荷可導致低效遞送至細胞溶質及胞核。

【0019】 細胞穿透肽(CPP)為用以改進PMO向胞核之遞送之有前景的策略。CPP為5至40個胺基酸之相對短序列，其理想地接近細胞溶質且可促進負荷之細胞內遞送。CPP可基於其物理化學特性分成不同群組。一種常見CPP類別由諸如R_{12}之重複的基於精胺酸之肽及Bpep (RXRRβRRXRRβR，其中X為胺基己酸且β為β-丙胺酸)組成。此等寡精胺酸肽通常為無規螺旋(coil)。當與PMO結合時，寡精胺酸肽已為促進PMO遞送之最有效的一些肽。諸如穿膜肽、pVEC及蜂毒素之其他CPP在本質上更為兩性的。在此等序列確實含有陽離子殘基時，帶電荷及疏水性殘基之規定間距可促使兩性螺旋形成。然而，兩性CPP尚未顯示出可顯著改良

PMO功效。

【0020】 針對CPP或CPP-PMO結合物不存在通用細胞進入機制。機制通常與治療濃度及所附負荷之類型高度相關。在超過特定閾值濃度(大體上較低微莫耳濃度)的情況下，可觀測到能量獨立細胞溶質攝取(energy-independent cytosolic uptake)比內飲作用及細胞表面再循環之時間刻度更快。較快攝取速率提供與針對小分子觀測到的內容類似之直接位移機制的證據。然而，在較低生理上相關濃度下，攝取主要為內吞的。即使在內吞作用之類別內，CPP及CPP-PMO結合物可使用一或多種內吞機制進入細胞。此等內吞機制包括微胞飲、網格蛋白介導之內吞作用、胞膜窖介導之內吞作用及網格蛋白/胞膜窖無關性內吞作用。CPP-PMO結合物在低濃度下主要經內吞，且PMO遞送不佳之CPP很可能會捕獲於核內體中或自核區室中排除。

【0021】 本文提供用於改進PMO遞送之三聚合肽-PMO結合物。此等三聚合肽-PMO結合物包含彼此共價連接且與PMO結合之三個或更多個CPP。在本文中描述寡核苷酸之細胞攝取升高，尤其在與非結合PMO及單一CPP-PMO結合物相比時。

【0022】

定義

下文列舉用於描述本發明之各種術語之定義。除非在特定情況下單獨地或作為較大群組的一部分以其他方式加以限制，否則此等定義適用於整個說明書及申請專利範圍中所用的術語。

【0023】 術語「約」應為一般熟習此項技術者理解，且將在其使用之上下文中在一定程度上變化。如本文中所使用，當提及可量測值，諸如

量、持續時間及其類似物時，術語「約」意謂涵蓋自指定值±20%或±10%(包括±5%、±1%及±0.1%)之變化，因此此類變化適於執行所揭示之方法。

【0024】 術語「烷基」係指在某些實施例中分別地含有一個至六個碳原子或一個至八個碳原子之飽和烴部分、直鏈烴部分或分支鏈烴部分。C_{1-6}烷基部分之實例包括(但不限於)甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、第三丁基、新戊基、正己基部分；且C_{1-8}烷基部分之實例包括(但不限於)甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、第三丁基、新戊基、正己基、庚基及辛基部分。

【0025】 烷基取代基中之碳原子數目可由字首「C_{x-y}」指示，其中x為取代基中碳原子之最小數目且y為最大數目。同樣，C_x鏈意謂含有x個碳原子之烷基鏈。

【0026】 除非另外說明，否則術語「雜烷基」本身或與另一術語組合意謂由所陳述數目之碳原子及一個或兩個選自由O、N及S組成之群之雜原子組成的穩定直鏈或分支鏈烷基，且其中氮及硫原子可視情況經氧化且氮雜原子可視情況經四級銨化。雜原子可位於雜烷基之任何位置處，包括在雜烷基之其餘部分及與其所連接之片段之間，以及連接至雜烷基中之最遠端碳原子。實例包括：$-O-CH_2-CH_2-CH_3$、$-CH_2-CH_2-CH_2-OH$、$-CH_2-CH_2-NH-CH_3$、$-CH_2-S-CH_2-CH_3$及$-CH_2-CH_2-S(=O)-CH_3$。至多兩個雜原子可為連續的，諸如$-CH_2-NH-OCH_3$或$-CH_2-CH_2-S-S-CH_3$。

【0027】 除非另外陳述，否則單獨或與其他術語組合使用之術語「芳基」意謂含有一或多個環(通常一個、兩個或三個環)之碳環芳族系統，其中此類環可以側接方式連接在一起(諸如聯苯)或可經稠合(諸如

萘)。芳基之實例包括苯基、蒽基及萘基。在各種實施例中，芳基之實例可包括苯基(例如C_6芳基)及聯苯基(例如C_{12}芳基)。在一些實施例中，芳基具有六至十六個碳原子。在一些實施例中，芳基具有六個至十二個碳原子(例如C_{6-12}芳基)。在一些實施例中，芳基具有六個碳原子(例如C_6芳基)。

【0028】如本文所使用，術語「雜芳基」或「雜芳族基heteroaromatic)係指具有芳族特徵之雜環。雜芳基取代基可由碳原子之數目定義，例如C_{1-9}雜芳基指示含於雜芳基中之碳原子數目而不包括雜原子之數目。舉例而言，C_{1-9}雜芳基將包括額外一至四個雜原子。多環雜芳基可包括一或多個部分飽和之環。雜芳基之非限制性實例包括：吡啶基、吡嗪基、嘧啶基(包括例如2-嘧啶基及4-嘧啶基)、噠嗪基、噻吩基、呋喃基、吡咯基(包括例如2-吡咯基)、咪唑基、噻唑基、噁唑基、吡唑基(包括例如3-吡唑基及5-吡唑基)、異噻唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,3,4-三唑基、四唑基、1,2,3-噻二唑基、1,2,3-噁二唑基、1,3,4-噻二唑基及1,3,4-噁二唑基。

【0029】多環雜環及雜芳基之非限制性實例包括吲哚基(包括例如3-吲哚基、4-吲哚基、5-吲哚基、6-吲哚基及7-吲哚基)、二氫吲哚基、喹啉基、四氫喹啉基、異喹啉基(包括例如1-異喹啉基及5-異喹啉基)、1,2,3,4-四氫異喹啉基、啐啉基、喹喏啉基(包括例如2-喹喏啉基及5-喹喏啉基)、喹唑啉基、酞嗪基、1,8-萘啶基、1,4-苯并二噁烷基、香豆素(coumarin)、二氫香豆素、1,5-萘啶基、苯并呋喃基(包括例如3-苯并呋喃基、4-苯并呋喃基、5-苯并呋喃基、6-苯并呋喃基及7-苯并呋喃基)、2,3-二氫苯并呋喃基、1,2-苯并異噁唑基、苯并噻吩基(包括例如3-苯并噻吩基、4-苯并噻吩基、5-苯并噻吩基、6-苯并噻吩基及7-苯并噻吩基)、苯并

噁唑基、苯并噻唑基(包括例如2-苯并噻唑基及5-苯并噻唑基)、嘌呤基、苯并咪唑基(包括例如2-苯并咪唑基)、苯并三唑基、硫代黃嘌呤基、咔唑基、咔啉基、吖啶基、吡咯聯啶基及喹嗪基。

【0030】如本文所用，縮寫DBCO係指8,9-二氫-3H-二苯并[b,f][1,2,3]三唑并[4,5-d]吖啉。

【0031】術語「保護基」或「化學保護基」係指阻隔化合物之一些或所有反應性部分且防止此類部分參與化學反應直至移除保護基為止之化學部分，例如T.W. Greene，P.G.M. Wuts，Protective Groups in Organic Synthesis，第3版. John Wiley & Sons (1999)中所列舉且描述之彼等部分。在採用不同保護基之情況下，各(不同)保護基藉由不同方式為可移除的可為有利的。在完全不同反應條件下裂解之保護基允許此類保護基之差異性移除。舉例而言，保護基可藉由酸、鹼及氫解移除。諸如三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、縮醛及第三丁基二甲基矽烷基之基團為酸不穩定的且可用於在存在經Cbz基團(其可藉由氫解來移除)及Fmoc基團(其為鹼不穩定的)保護之胺基的情況下保護羧基及羥基反應性部分。羧酸部分可用諸如(但不限於)甲基或乙基之鹼不穩定基團來阻隔，且羥基反應性部分可在存在用酸不穩定基團(諸如胺基甲酸第三丁酯)或用酸及鹼均穩定但可水解移除之胺基甲酸酯阻隔之胺的情況下用諸如乙醯基之鹼不穩定基團來阻隔。

【0032】羧酸反應性部分及羥基反應性部分亦可用諸如苯甲基之可水解移除保護基阻隔，而胺基可用諸如Fmoc之鹼不穩定基團阻隔。用於合成式(I)之化合物之尤其適用之胺保護基為三氟乙醯胺。羧酸反應性部分可用諸如2,4-二甲氧基苄基之可氧化移除保護基阻隔，而共存胺基可用

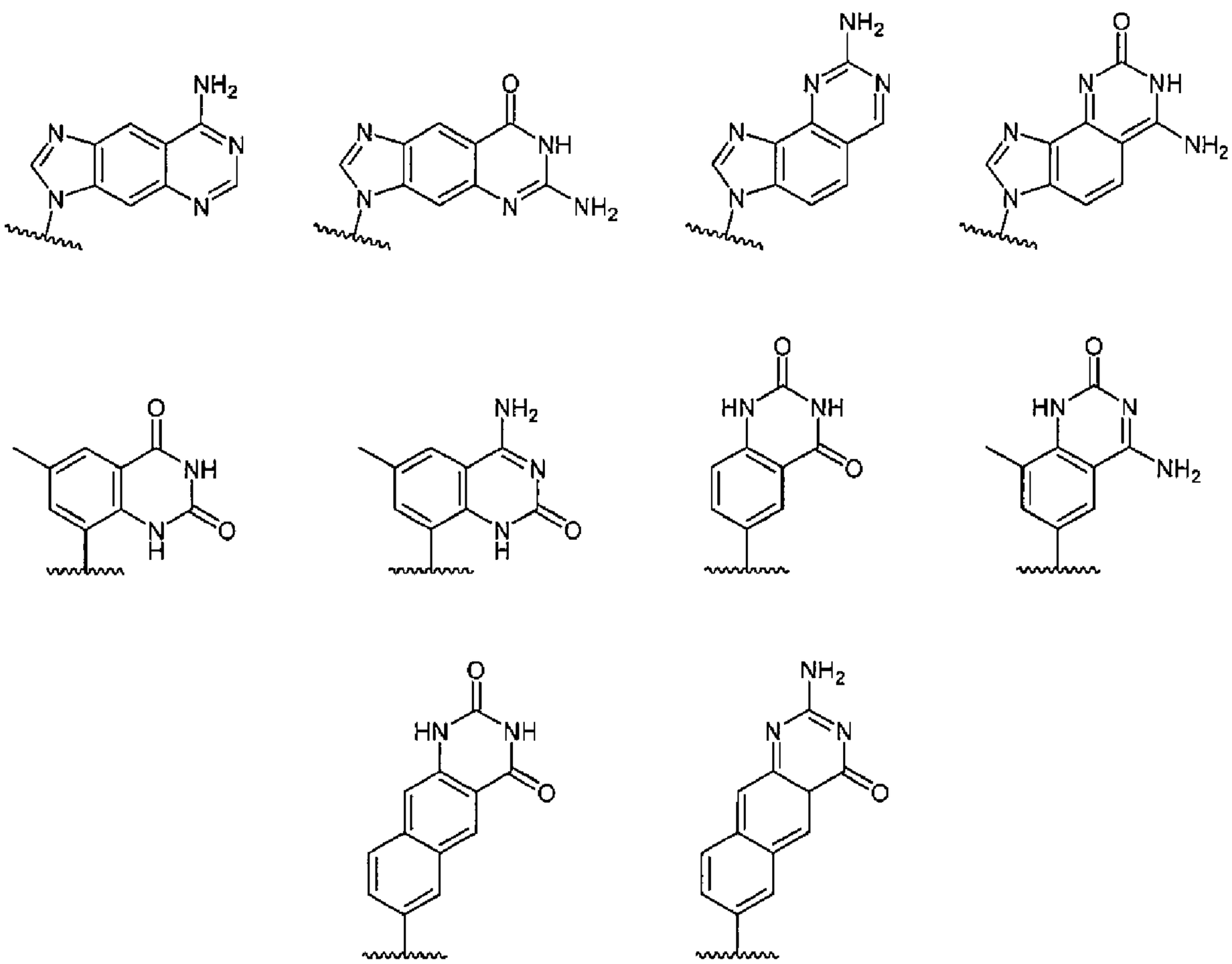
氟不穩定胺基甲酸矽烷酯阻隔。

【0033】 烯丙基阻隔基在存在酸保護基及鹼保護基之情況下適用，由於前者穩定且隨後可藉由金屬或π-酸(pi-acid)催化劑移除。舉例而言，烯丙基阻隔之羧酸可在酸不穩定之胺基甲酸第三丁酯或鹼不穩定之乙酸酯胺保護基存在下用鈀(0)催化之反應脫除保護基。保護基之又一形式為可連接化合物或中間物之樹脂。只要殘基連接至樹脂，則阻隔官能基且無法反應。一旦自樹脂釋放，官能基可用於反應。

【0034】 術語「核鹼基」、「鹼基配對部分(base pairing moiety)」、「核鹼基配對部分(nucleobase-pairing moiety)」或「鹼」係指核苷、核苷酸及/或N-嗎啉基次單元之雜環部分。核鹼基可為天然存在核鹼基或可為經修飾之核鹼基或此等天然存在核鹼基之類似物，例如核鹼基之一或多個氮原子可在每次出現時獨立地經碳置換。例示性類似物包括：次黃嘌呤(核苷肌苷之鹼基組分)；2,6-二胺基嘌呤；5-甲基胞嘧啶；經C5-丙炔基修飾之嘧啶；10-(9-(胺基乙氧基)啡噁嗪基)(G形夾)及其類似物。

【0035】 鹼基配對部分之另外實例包括(但不限於)：尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤及使其各別胺基由醯基保護基保護之次黃嘌呤、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、諸如假異胞嘧啶及假尿嘧啶之嘧啶類似物及諸如8-經取代嘌呤、黃嘌呤或次黃嘌呤(後兩者為天然降解產物)之其他經修飾之核鹼基。亦涵蓋揭示於Chiu及Rana，RNA，2003，9，1034-1048，Limbach等人，Nucleic Acids Research，1994，22，2183-2196以及Revankar及Rao，Comprehensive Natural Products Chemistry，第7卷，313中之經修飾之核鹼基，其內容以引用之方式併入本文中。

【0036】 鹼基配對部分之其他實例包括(但不限於)其中已添加一或多個苯環之尺寸經擴增之核鹼基。涵蓋描述於Glen Research catalog(www.glenresearch.com)；Krueger AT等人，Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150; Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A.等人，Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg, F. E. 等人, Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733; Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627 (其內容以引用之方式併入本文中)中之核鹼基替代物適用於合成本文所描述之寡聚物。尺寸經擴增之核鹼基之實例展示如下：



【0037】 術語「寡核苷酸」或「寡聚物」係指包含複數個經連接之核苷、核苷酸或核苷及核苷酸兩者之組合的化合物。在本文所提供之具體

實施例中，寡核苷酸為N-嗎啉基寡核苷酸。

【0038】 片語「N-嗎啉基寡核苷酸」或「PMO」係指藉由胺基磷酸酯鍵或二胺基磷酸酯鍵使N-嗎啉基次單元連接在一起、將一個次單元之N-嗎啉基氮接合至鄰近次單元之5'-環外碳的經修飾之寡核苷酸。各N-嗎啉基次單元包含藉由核鹼基特異性氫鍵結有效地與目標中之核鹼基連接之核鹼基配對部分。

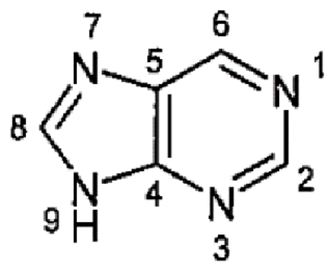
【0039】 術語「反義寡聚物」、「反義化合物」及「反義寡核苷酸」可交換使用，且係指一種各自帶有鹼基配對部分之次單元的序列，次單元藉由次單元之間鍵連接，次單元之間鍵可以讓鹼基配對部分與核酸(通常為RNA)中之目標序列藉由Watson-Crick鹼基配對雜交，以在目標序列內形成核酸:寡聚物異雙螺旋。寡聚物可具有與目標序列準確(完美的) 序列互補或幾乎(充分) 序列互補；靠近寡聚物末端之序列變化一般比內部中之變化更佳。

【0040】 此類反義寡聚物可經設計以阻斷或抑制mRNA之翻譯或抑制/更改天然或異常前體mRNA剪接過程，且可稱為「針對於」或「靶向於」與其雜交之目標序列。目標序列通常為一個包括mRNA之AUG起始密碼子、翻譯抑制寡聚物、或經預處理之mRNA的剪接位點、剪接抑制寡聚物(SSO)的區域。剪接位點之目標序列可包括mRNA序列，在經預處理之mRNA中正常剪接受體接合點下游具有其5'端1至約25個鹼基對。在各種實施例中，目標序列可為經預處理之mRNA之任何區域，該mRNA包括剪接位點或完全含於外顯子編碼序列內或跨越剪接接受體位點或供體位點。當寡聚物以上文所描述之方式靶向目標核酸時，更一般化地稱為「靶向於」生物相關目標，諸如蛋白、病毒或細菌。

【0041】 當反義寡核苷酸及目標RNA中之足夠數目之對應位置由可彼此經氫鍵結之核苷酸佔據時，各分子彼此互補，使得穩定結合及特異性結合在寡核苷酸與目標之間發生。因此，「可特異性雜交」及「互補」為用於指示充分程度之互補或精確配對，使得穩定結合及特異性結合在寡核苷酸與目標之間發生的術語。在此項技術中應理解，寡核苷酸之序列不需要與其待要可特異性雜交之目標序列100%互補。當寡核苷酸與目標分子之結合干擾目標RNA之正常功能，且存在充分程度之互補以避免反義寡核苷酸與非目標序列在需要特異性結合之條件下(亦即，在活體內檢定或治療性處理之情況下在生理學條件下，及在活體外檢定之情況下，在執行檢定之條件下)非特異性結合時，寡核苷酸可特異性雜交。

【0042】 寡核苷酸亦可包括核鹼基(此項技術中通常簡稱為「鹼基」)修飾或取代。含有經修飾之或經取代之鹼基之寡核苷酸包括一或多種最常發現於核酸中之嘌呤鹼基或嘧啶鹼基用較不常見或非天然鹼基替換的寡核苷酸。在一些實施例中，核鹼基在嘌呤鹼基之N9原子處或在嘧啶鹼基之N1原子處共價連接至核苷酸或核苷之嗎啉環。

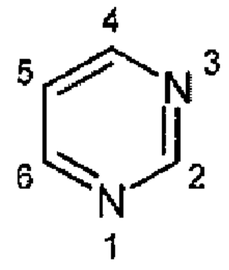
【0043】 嘌呤鹼基包含稠合至咪唑環之嘧啶環，如藉由以下通式所描述：



嘌呤

【0044】 腺嘌呤及鳥嘌呤為最常見於核酸中之兩種嘌呤核鹼基。此等可經其他天然存在之嘌呤(包括但不限於N6-甲基腺嘌呤、N2-甲基鳥嘌呤、次黃嘌呤及7-甲基鳥嘌呤)取代。

【0045】 嘧啶鹼基包含六員嘧啶環，如藉由以下通式所描述：



嘧啶

【0046】 胞嘧啶、尿嘧啶及胸腺嘧啶為最常見於核酸中之嘧啶鹼基。此等嘧啶鹼基可經其他天然存在之嘧啶(包括但不限於5-甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶、假尿嘧啶及4-硫尿嘧啶)取代。在一個實施例中，本文所描述之寡核苷酸含有胸腺嘧啶鹼基代替尿嘧啶。

【0047】 其他經修飾或經取代之鹼基包括(但不限於) 2,6-二胺基嘌呤、乳清酸、阿格瑪特啶(agmatidine)、立西啶(lysidine)、2-硫代嘧啶(例如2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶)、G形夾及其衍生物、5-經取代嘧啶(例如5-鹵代尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-胺基甲基尿嘧啶、5-羥甲基尿嘧啶、5-胺基甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶、Super T)、7-去氮鳥嘌呤、7-去氮腺嘌呤、7-氮雜-2,6-二胺基嘌呤、8-氮雜-7-去氮鳥嘌呤、8-氮雜-7-去氮腺嘌呤、8-氮雜-7-去氮-2,6-二胺基嘌呤、Super G、Super A，及N4-乙基胞嘧啶或其衍生物；N2-環戊基鳥嘌呤(cPent-G)、N2-環戊基-2-胺基嘌呤(cPent-AP)及N2-丙基-2-胺基嘌呤(Pr-AP)、假尿嘧啶或其衍生物；以及退化或通用鹼基，如2,6-二氟甲苯或不存在鹼，如無鹼基位點(例如1-去氧核苷、1,2-二去氧核糖、1-去氧-2-O-甲基核糖；或環氧已經用氮置換之吡咯啶衍生物(氮雜核糖))。假尿嘧啶為尿嘧啶之天然存在之異構化型式，其在尿苷中具有C-糖苷而非常規N-糖苷。

【0048】 某些經修飾或經取代之核鹼基特別適用於提高本發明之反義寡核苷酸之結合親和性。此等核鹼基包括5-經取代之嘧啶、6-氮雜嘧啶

及N-2、N-6及0-6經取代之嘌呤，其包括2-胺基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶及5-丙炔基胞嘧啶。在各種實施例中，核鹼基可包括5-甲基胞嘧啶取代，已展示該等取代將核酸雙螺旋穩定性提高0.6℃至1.2℃。

【0049】在一些實施例中，經修飾或經取代之核鹼基適用於促進反義寡核苷酸之純化。舉例而言，在某些實施例中，反義寡核苷酸可含有三個或更多個(例如3個、4個、5個、6個或更多個)連續鳥嘌呤鹼基。在某些反義寡核苷酸中，一串三個或更多個連續鳥嘌呤鹼基可引起寡核苷酸之凝聚，使純化複雜化。在此類反義寡核苷酸中，連續鳥嘌呤中之一或多者可經次黃嘌呤取代。次黃嘌呤取代一串三個或更多個連續鳥嘌呤鹼基中之一或多個鳥嘌呤可減少反義寡核苷酸之凝聚，由此促進純化。

【0050】合成本文所提供之寡核苷酸且該等寡核苷酸不包括生物學來源之反義組合物。本發明之分子亦可與其他分子、分子結構或化合物之混合物(例如脂質體、受體靶向分子、經口調配物、直腸調配物、局部調配物或其他調配物)混合、囊封、結合或以其他方式締合，用於輔助攝取、分佈或吸收或其組合。

【0051】術語「互補(complementary)」及「互補性(complementarity)」係指由鹼基配對法則相關之寡核苷酸(亦即核苷酸序列)。舉例而言，序列「T-G-A(5'-3')」與序列「T-C-A(5'-3')」互補。互補可為「部分的」，其中僅一些核酸之鹼基根據鹼基配對法則匹配。或者，在核酸之間可存在「完全」、「總體」或「完美」(100%)的互補性。核酸股之間的互補程度對核酸股之間的雜交效率及強度具有顯著影響。儘管通常需要完美的互補，然一些實施例可包括一或多個但較佳地6、5、4、3、2或1個對於目標RNA之錯配。此類雜交可在反義寡聚物與目標序

列「幾乎」或「實質上」互補以及準確互補之情況下發生。在一些實施例中，寡聚物可與目標序列以約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%互補性來雜交。包括在寡聚物內之任何位置處之變化。在某些實施例中，靠近寡聚物之末端之序列中之變化一般比在內部中之變化更佳，且若存在，則變化通常在5'-末端、3'-末端或兩個末端之約6、5、4、3、2或1個核苷酸內。

【0052】 術語「肽」係指包含複數個經連接胺基酸之化合物。可認為本文所提供之肽為細胞穿透肽。

【0053】 術語「細胞穿透肽」及「CPP」可互換地使用，且係指陽離子型細胞穿透肽，亦稱為轉運肽、載體肽或肽轉導域。本文中所提供之肽具有在給定細胞培養群體之100%細胞內誘導細胞穿透性之能力，且在全身性投與後允許活體內多個組織內的大分子位移。在各種實施例中，本發明之CPP實施例可包括如下文進一步描述之富含精胺酸之肽。

【0054】 如本文中所使用，術語「嵌合肽」係指一種多肽，該多肽包含為第一肽或其片段之第一部分，其與為不同肽或其片段之第二部分融合。嵌合肽可包含2個或更多個共價連接之肽。肽可經由胺基酸側鏈、N-末端、C-末端或其任何組合共價連接。在某些實施例中，肽經由一個肽之N-末端共價連接至另一個肽之C-末端。在某些實施例中，共價連接子為醯胺鍵。

【0055】 如本文中所使用，術語「三聚合肽」係指一種多肽，該多肽包含為第一肽或其片段之第一部分，其與為不同肽或其片段之第二部分融合，與為不同肽或其片段之第三部分融合。三聚合肽可包含3個或更多個共價連接之肽。肽可經由胺基酸側鏈、N-末端、C-末端或其任何組合

共價連接。在某些實施例中，肽經由一個肽之N-末端共價連接至另一個肽之C-末端。在某些實施例中，共價連接子為醯胺鍵。

【0056】 如本文中所使用，術語「兩性肽」係指具有基本上帶電荷胺基酸及基本上不帶電荷胺基酸之分隔區域的肽。此等區域分別被稱為親水性肽基片段及疏水性肽基片段。

【0057】 如本文中所使用，術語「寡精胺酸肽」係指一種肽，其中該肽全由精胺酸或主要由精胺酸胺基酸殘基構成。在某些實施例中，肽完全由精胺酸胺基酸殘基構成。在某些實施例中，肽由與諸如但不限於胺基己酸或β-丙胺酸的胺基酸連接子間雜之50%至99%精胺酸胺基酸殘基構成。在某些實施例中，肽由與諸如但不限於胺基己酸或β-丙胺酸的胺基酸連接子間雜之75%精胺酸胺基酸殘基構成。

【0058】 如本文所使用，術語「核靶向肽」係指一種肽，其中肽含有核定位序列，該序列可以讓蛋白質藉由核運輸輸入至細胞核中。在某一實施例中，此序列係由暴露於蛋白質表面上之一或多個帶正電胺基酸組成。

【0059】 如本文所用，術語「核內體分裂肽」係指一種肽，其中該肽可幫助將藥劑釋放至細胞之細胞質中。在某一實施例中，此序列由一或多個帶正電胺基酸組成。

【0060】 術語「治療」係指施加用於改善疾病之一或多個特異性程序。在某些實施例中，特異性程序為投與一或多種醫藥劑。個體(例如哺乳動物，諸如人類)或細胞之「治療」為用於試圖更改個體或細胞之天然病程之任何類型的干預。治療包括(但不限於)投與醫藥組合物，且可防治進行或在開始出現病理性事件或接觸病原體之後進行。治療包括對疾病或

病況之症狀或病變之任何所需效果，且可包括例如被治療之疾病或病況之一或多個可量測標記之極小改變或改善。亦包括「預防性」治療，其可針對降低被治療疾病或病況之發展速率，延緩疾病或病況之發作或降低其發作之嚴重性。

【0061】 「有效量」或「治療有效量」係指作為單次劑量或作為一系列劑量之部分投與哺乳動物個體的治療性化合物(諸如反義寡聚物)之量，該量可有效地產生所需治療性效果。

【0062】 術語「改善」意謂減輕至少一個病況或疾病指標之嚴重性。在某些實施例中，改善包括延遲或遲緩一或多個病況或疾病指標之進程。可藉由熟習此項技術者已知之主觀或客觀度量來測定指標之嚴重程度。

【0063】 如本文所使用，「醫藥學上可接受之鹽」係指所揭示寡核苷酸之衍生物，其中母體寡核苷酸藉由將現有酸或鹼部分轉換為其鹽形式而經修飾。適合之鹽之清單可見於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, 第1418頁 及 Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977)，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。

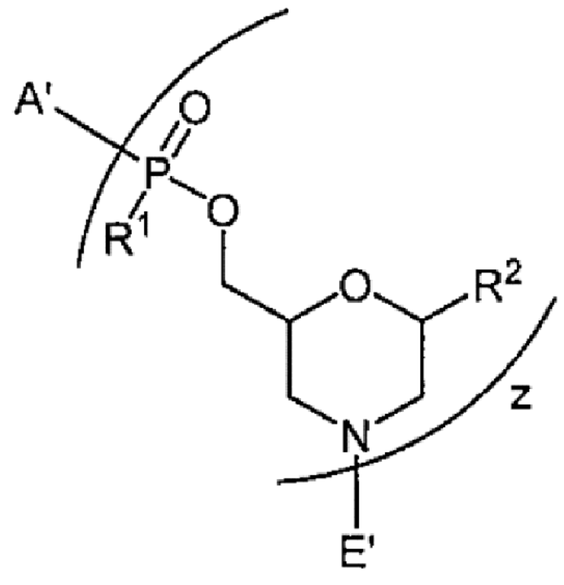
【0064】

三聚合肽-寡核苷酸-結合物

本文提供以化學方式連接至三聚合細胞穿透肽之寡核苷酸。三聚合細胞穿透肽增強寡核苷酸之活性、細胞分佈或細胞攝取。特定言之，三聚合細胞穿透肽包含兩性肽、核靶向肽、核內體分裂肽、嵌合肽、環狀肽、雙環肽、寡精胺酸肽或其任何組合。

【0065】 寡核苷酸可另外以化學方式連接至一或多個雜烷基部分(例如聚乙二醇)，該等雜烷基部分進一步增強寡核苷酸之活性、細胞分佈或細胞攝取。在一個例示性實施例中，三聚合細胞穿透肽在其N-末端或C-末端殘基處共價偶合至寡核苷酸之任一端或兩端。

【0066】 因此，在一個態樣中，本文提供式I之三聚合肽-寡核苷酸結合物：

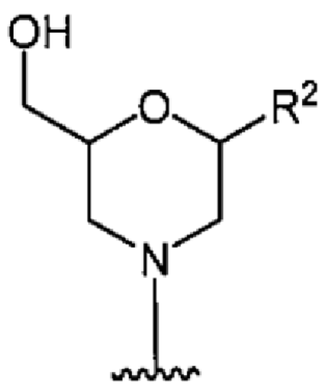


(I)

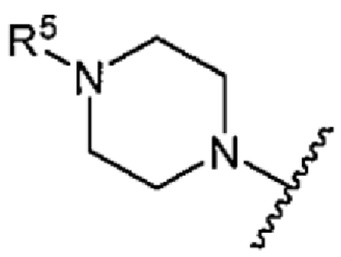
或其醫藥學上可接受之鹽，

其中：

A'選自-N(H)$CH_2C(O)NH_2$、-N(C_{1-6}烷基)$CH_2C(O)NH_2$、



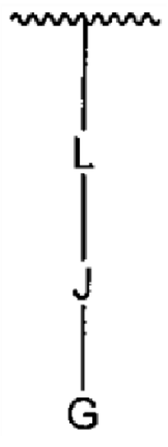
及



，其中

R^5為-C(O)(O-烷基)$_x$-OH，其中x為3至10，且各烷基在每次出現時獨立地為C_{2-6}烷基，

或R^5選自-C(O)C_{1-6}烷基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、-(C_{1-6}烷基)-R^6、-(C_{1-6}雜烷基)-R^6、芳基-R^6、雜芳基-R^6、-C(O)O-(C_{1-6}烷基)-R^6、-C(O)O-芳基-R^6、-C(O)O-雜芳基-R^6及



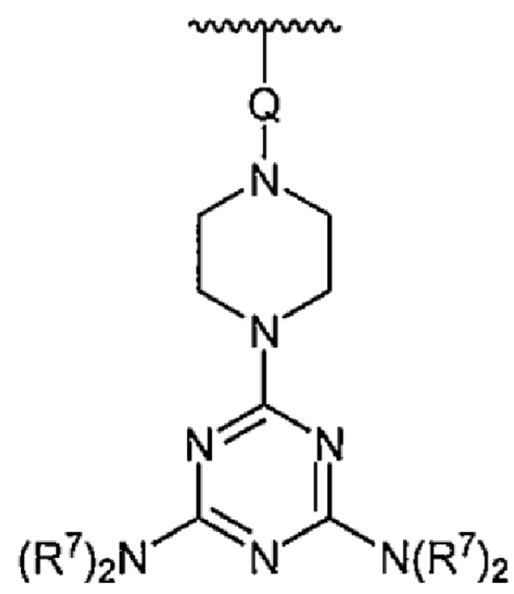
其中R^6選自OH、SH及NH_2，或R^6為O、S或NH，其每一者共價連接至固體支撐物；

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

各R^2在每次出現時獨立地選自H、核鹼基及經化學保護基官能化之核鹼基，其中該核鹼基在每次出現時獨立地包含選自吡啶、嘧啶、三氮雜環己烷(triazinane)、嘌呤及去氮嘌呤之C_{3-6}雜環；

z為8至40；及

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


及


其中

Q為-C(O)$(CH_2)_6$C(O)-或-C(O)$(CH_2)_2S_2(CH_2)_2$C(O)-；

R^7為-$(CH_2)_2$OC(O)N(R^8)$_2$，其中R^8為-$(CH_2)_6$NHC(=NH)NH_2；

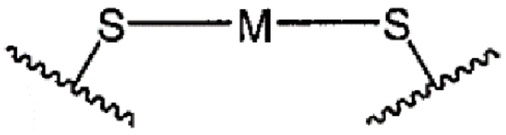
P^1、P^2及P^3各自獨立地為細胞穿透肽，其中P^1及P^2各自包含至少一

個半胱胺酸胺基酸殘基，且P^2包含至少一個離胺酸；

J為-P^1-L^1-P^2-L^2-P^3-；

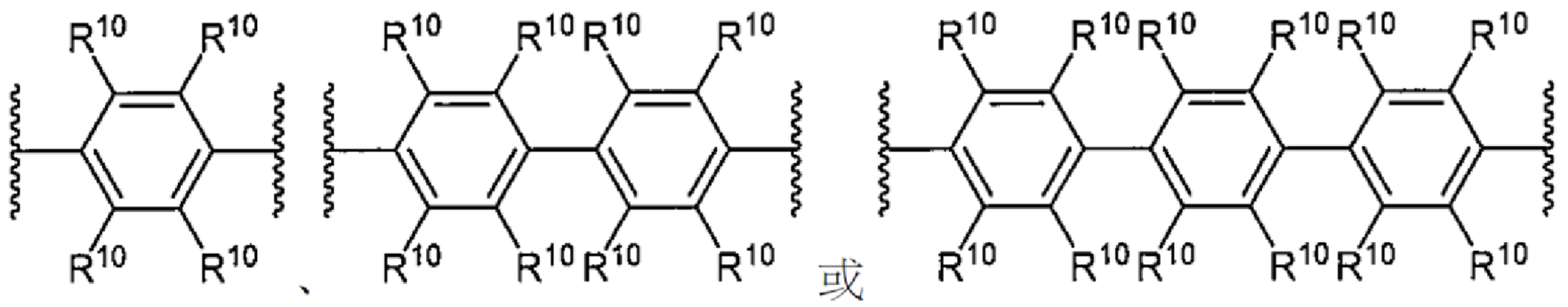
P^1、P^2及P^3各自獨立地為細胞穿透肽，其中P^1及P^2各自包含至少一個末端或內部半胱胺酸殘基，且P^2包含至少一個末端或內部離胺酸殘基；

L^1為



，

M為



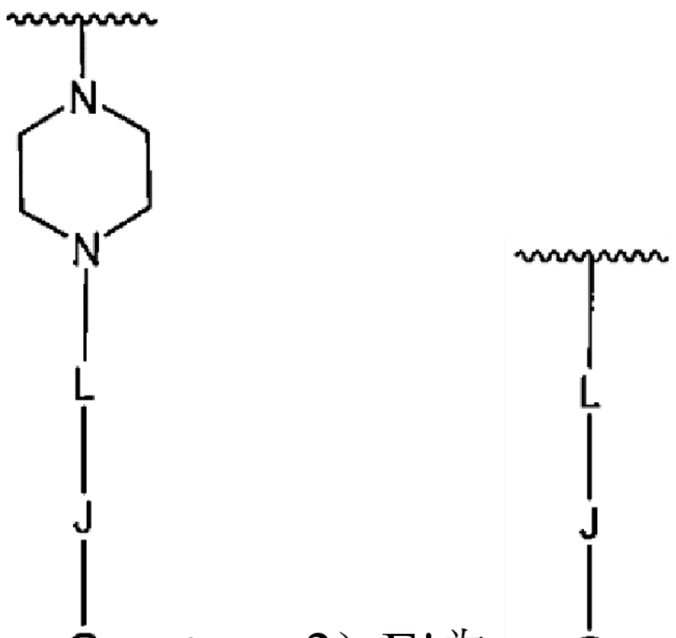
且R^{10}在每次出現時獨立地為H或鹵素，

其中L^1共價連接至P^1及P^2之末端或內部半胱胺酸之側鏈；

L^2為-$(CH_2)_{1-6}$-C_{1-6}-雜芳族基-$(CH_2)_{1-6}$C(O)-，其中L^2共價連接至P^2上之末端或內部離胺酸之側鏈且藉由醯胺鍵共價連接至P^3之胺基末端；

G選自H、-C(O)C_{1-6}烷基、苯甲醯基及硬脂醯基，其中G共價連接至J之羧基末端；及

其中以下條件中之至少一者為真實的：



1) A'為 ；or 2) E'為 。

【0067】 在一實施例中，當P^1及P^2各自包含至少一個半胱胺酸胺基酸殘基時，其中半胱胺酸胺基酸殘基置換初始胺基酸殘基中之一者。

【0068】 在另一實施例中，當P^1及P^2各自包含至少一個半胱胺酸胺基酸殘基時，其中半胱胺酸胺基酸殘基為初始胺基酸殘基之額外殘基。

【0069】 在一實施例中，P^2包含至少一個離胺酸胺基酸殘基，其中離胺酸胺基酸殘基置換初始胺基酸殘基中之一者。

【0070】 在另一實施例中，P^2包含至少一個離胺酸胺基酸殘基，其中離胺酸胺基酸殘基為初始胺基酸殘基之額外殘基。

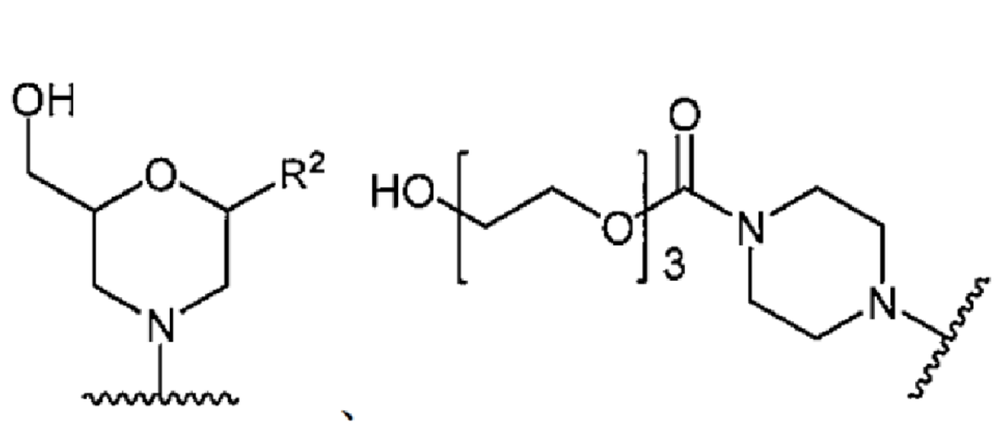
【0071】 在一實施例中，z為8至30。在另一實施例中，z為10至30。在另一實施例中，z為15至25。在另一實施例中，z為20至25。在一實施例中，z為8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30。

【0072】 在又一實施例中，E'選自H、-C_{1-6}烷基、-C(O)C_{1-6}烷基、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、三甲氧基三苯甲基及

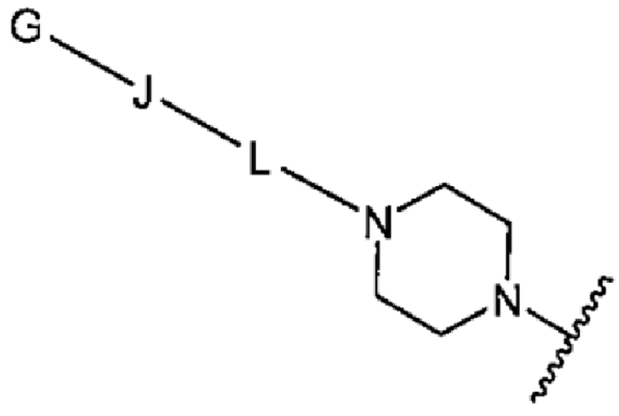


。

【0073】 在另一實施例中，A'選自-N(C_{1-6}烷基)$CH_2C(O)NH_2$、



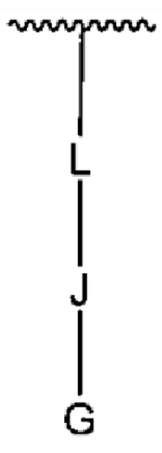
、



及

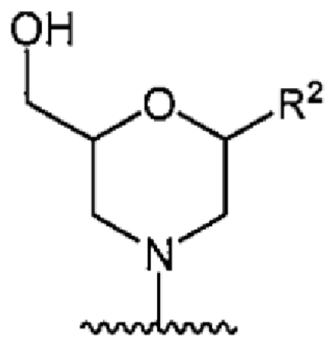
。

【0074】 在再一實施例中，E'選自H、-C(O)CH_3、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基及

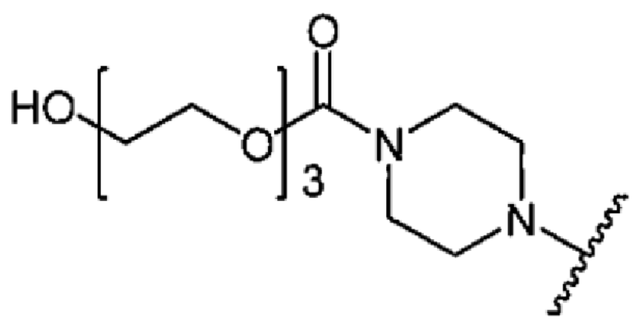


。

【0075】 在又一實施例中，A'選自-N(C_{1-6}烷基)$CH_2C(O)NH_2$、



及



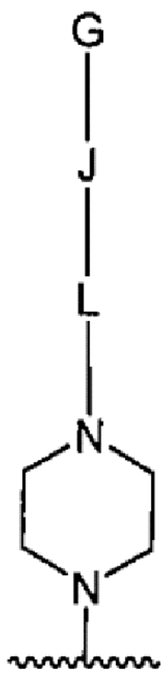
；且

E'為



。

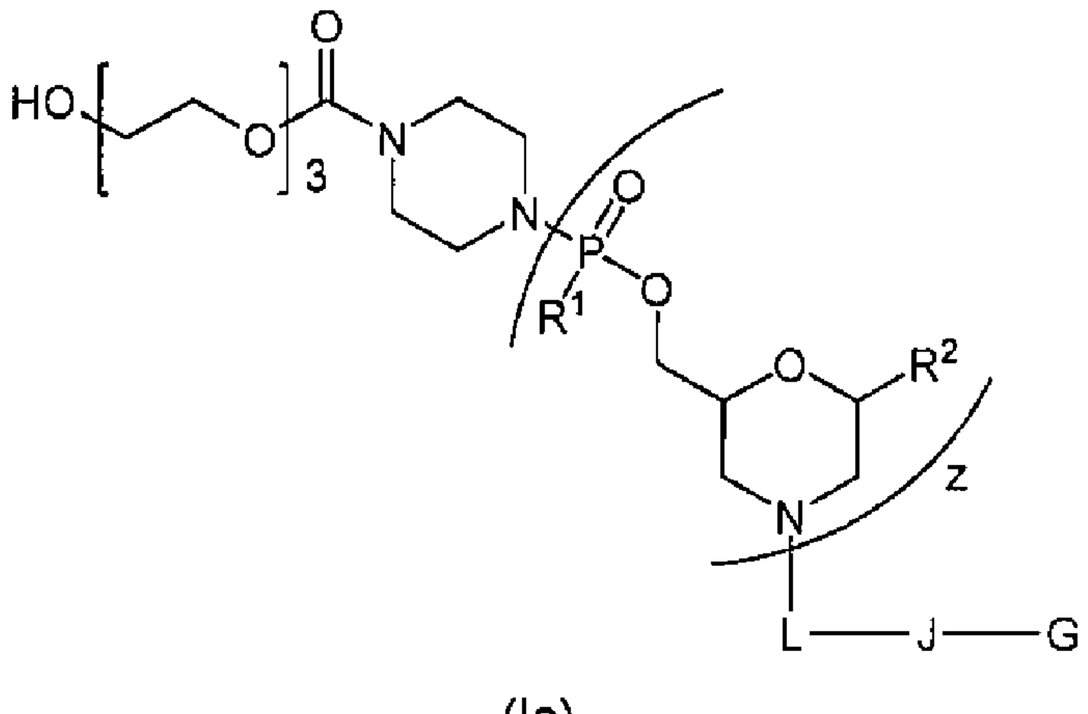
【0076】 在另一實施例中，A'為



，且

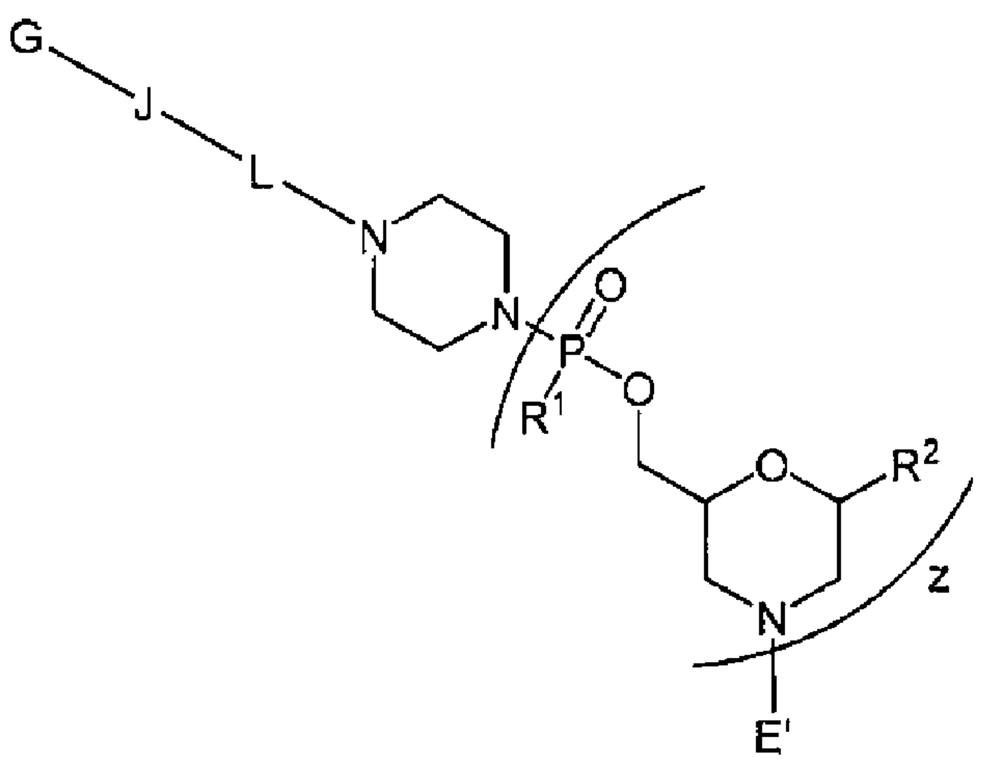
E'選自H、-C(O)CH_3、三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基、苯甲醯基及硬脂醯基。

【0077】 在一實施例中，式I之三聚合肽-寡核苷酸結合物為式Ia之嵌合肽-寡核苷酸結合物：



(Ia)

【0078】在一實施例中，式I之嵌合肽-寡核苷酸結合物為式Ib之嵌合肽-寡核苷酸結合物：



(Ib)

其中E'選自H、C_{1-6}烷基、-C(O)CH_3、苯甲醯基及硬脂醯基。

【0079】在一實施例中，細胞穿透肽中之每一者獨立地為兩性肽、核靶向肽、核內體分裂肽、嵌合肽、環狀肽、雙環肽或寡精胺酸肽。

【0080】在另一實施例中，P^1為兩性肽。

【0081】在又一實施例中，P^2為核靶向肽。

【0082】在再一實施例中，兩性肽包含疏水性肽基片段及親水性肽基片段，其中疏水性肽基片段包含2至10個獨立地選自甘胺酸、異白胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之胺基酸的序

列，且其中親水性肽基片段包含2至20個獨立地選自帶電荷胺基酸、不帶電但極性胺基酸或疏水性胺基酸之胺基酸的序列，其中親水性肽基片段包含至少一個非疏水性胺基酸。

【0083】 在一實施例中，親水性肽基片段包含2至20個獨立地選自精胺酸、離胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、纈胺酸、脯胺酸或甘胺酸之胺基酸的序列，其中親水性肽基片段包含至少一個非疏水性胺基酸。

【0084】 在另一實施例中，P^1為穿膜肽、pVEC、TP10或DPV6。

【0085】 在又一實施例中，P2為KRVK、SV40或AAV-PHP.eB。

【0086】 在另一實施例中，P^3為DPV6、PPC3、PPC5、R12、R12全循環、R12 N-循環、R12 C-循環、R12苯甲基二循環、R12雙循環、Bpep、Bpep全循環、Bpep C-循環、穿膜肽(nle)、波紋因子(Engrailed) N-循環、波紋因子C-循環、波紋因子全循環、pVEC、pVEC-Bpep、AIP6全循環、蜂毒素-Bpep、Bh3螺旋、Bac7、蟾蜍素2、蜂毒素、SynB1、S413-PVrev、核糖體毒素2 L3、PreS2-TLM、MAP、W/R、MAP12、SAP、SVM1、SVM3、SVM4、YTA4、439a、HoxA13絲胺酸2、Bip、PPR3、PPR4、AIP6、DPV15b、TAT、穿膜肽、R9、HoxA13絲胺酸1、KRVK TP10、TP10 KRVK或SV40 TP10。

【0087】 在一實施例中，P^1為DPV6。

【0088】 在另一實施例中，P^3為DPV6、Bpep、pVEC-Bpep、蟾蜍素2、SynB1、W/R或AIP6。

【0089】 在又一實施例中，P^1為DPV6，P^2為SV40，且P^3為

DPV6、Bpep、pVEC-Bpep、蟾蜍素2、SynB1、W/R或AIP6。

【0090】在另一實施例中，P^1為DPV6，P^2為SV40，且P^3為pVEC-Bpep。

【0091】在一實施例中，P^1為DPV6，P^2為SV40，且P^3為W/R。

【0092】在另一實施例中，P^1為DPV6，P^2為SV40，且P^3為SynB1。

【0093】在式I、Ia及Ib之一實施例中，各R^1為$N(CH_3)_2$。

【0094】在式I、Ia及Ib之又一實施例中，各R^2為核鹼基，其中核鹼基在每次出現時獨立地包含選自吡啶、嘧啶、三氮雜環己烷、嘌呤及去氮嘌呤之C_{4-6}雜環。

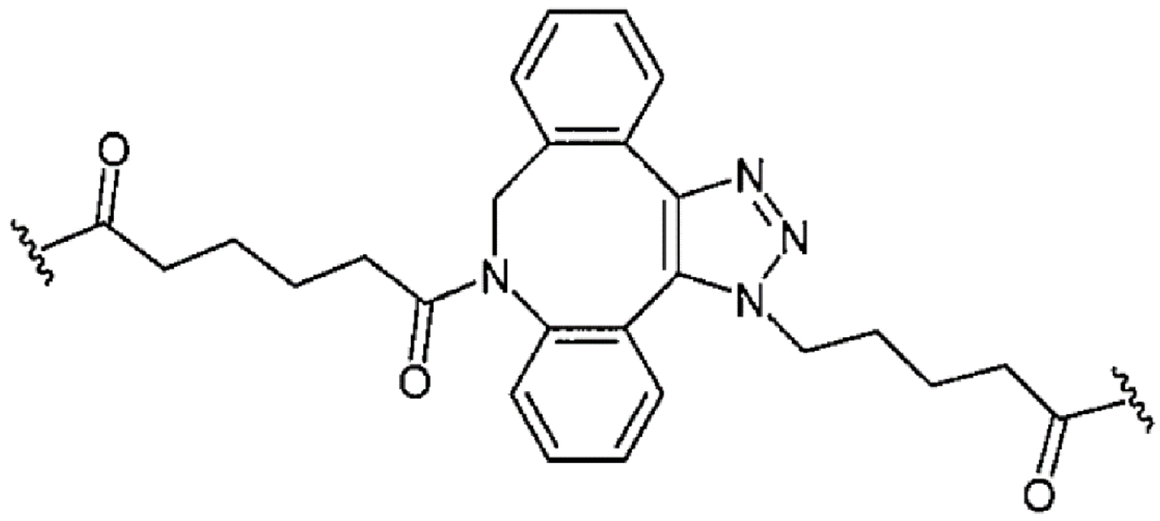
【0095】在式I、Ia及Ib之另一實施例中，各R^2為核鹼基，其中核鹼基在每次出現時獨立地包含選自嘧啶、嘌呤及去氮嘌呤之C_{4-6}雜環。

【0096】在式I、Ia及Ib之再一實施例中，各R^2為核鹼基，該核鹼基在每次出現時獨立地選自：腺嘌呤、2,6-二胺基嘌呤、7-去氮腺嘌呤、鳥嘌呤、7-去氮鳥嘌呤、次黃嘌呤、胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶及次黃嘌呤。

【0097】在式I、Ia及Ib之又一實施例中，各R^2為核鹼基，該核鹼基在每次出現時獨立地選自：腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶及次黃嘌呤。

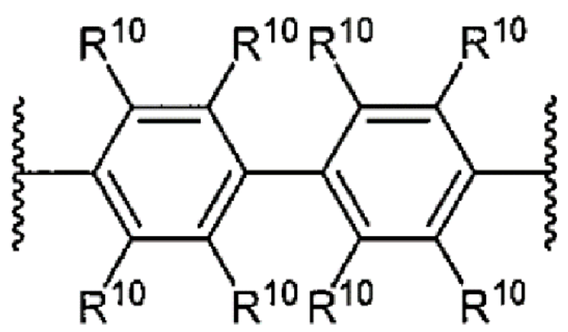
【0098】在式I、Ia及Ib之另一實施例中，L為$-C(O)(CH_2)_{1-6}$-DBCO-$(CH_2)_{1-6}C(O)$-。

【0099】在式I、Ia及Ib之另一實施例中，L為



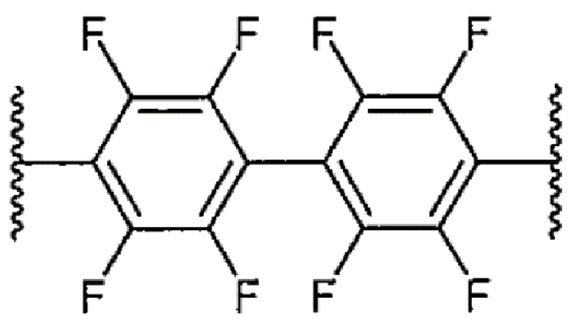
。

【0100】 在式I、Ia及Ib之另一實施例中，M為



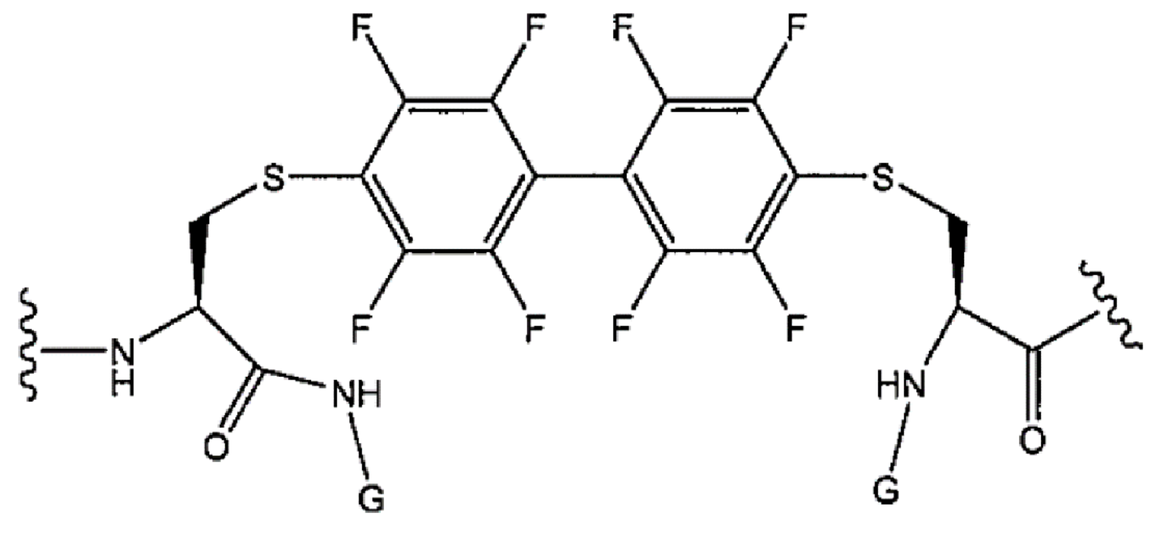
。

【0101】 在式I、Ia及Ib之又一實施例中，M為



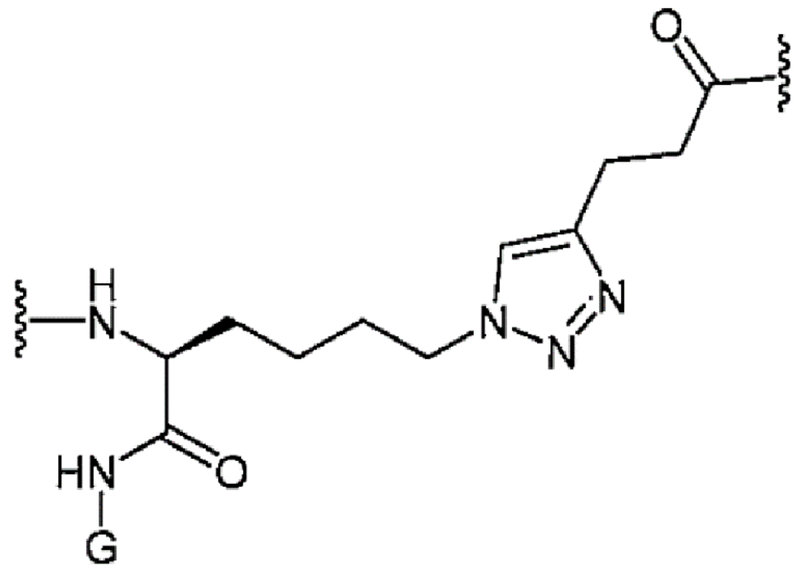
。

【0102】 在式I、Ia及Ib之另一實施例中，L^1共價連接至P^1及P^2上之末端半胱胺酸之側鏈，形成以下結構：



。

【0103】 在式I、Ia及Ib之另一實施例中，L^2共價連接至P^2上之末端離胺酸之側鏈且藉由醯胺鍵共價連接至P^3之胺基末端，形成以下結構：



。

【0104】 在式I、Ia及Ib之另一實施例中，G選自H、$C(O)CH_3$、苯甲醯基及硬脂醯基。

【0105】 在式I、Ia及Ib之再一實施例中，G為H或$-C(O)CH_3$。

【0106】 在式I、Ia及Ib之又一實施例中，G為H。

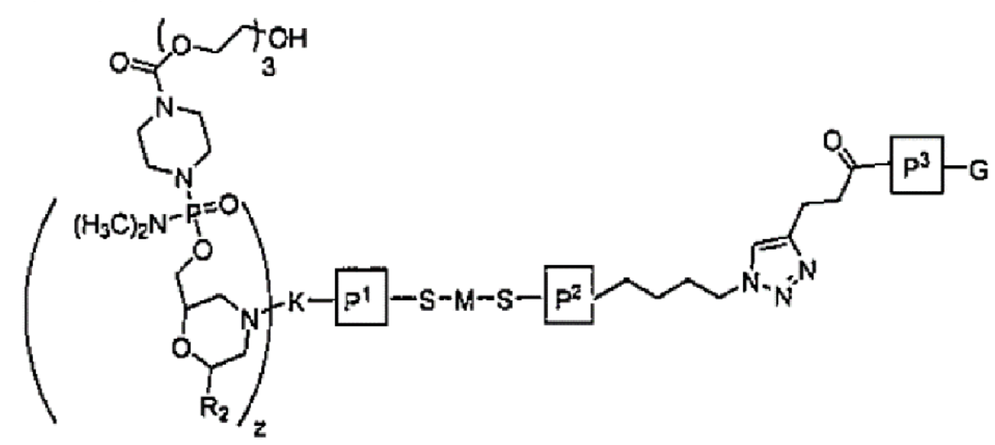
【0107】 在式I、Ia及Ib之又一實施例中，G為$-C(O)CH_3$。

【0108】 在式I、Ia及Ib之又一實施例中，相較於非結合寡核苷酸，三聚合寡核苷酸-肽結合物在攝取方面顯示至少20倍之改良。

【0109】 在一實施例中，相較於非三聚合寡核苷酸-肽結合物，三聚合寡核苷酸-肽結合物在攝取方面顯示至少三倍之改良。

【0110】 在另一實施例中，相較於對應非三聚合穿膜肽-肽結合物，三聚合寡核苷酸-肽結合物在攝取方面顯示改良。

【0111】 本發明之代表性肽-寡核苷酸-結合物包括尤其以下結構之三聚合肽-寡核苷酸-結合物：



(IV)

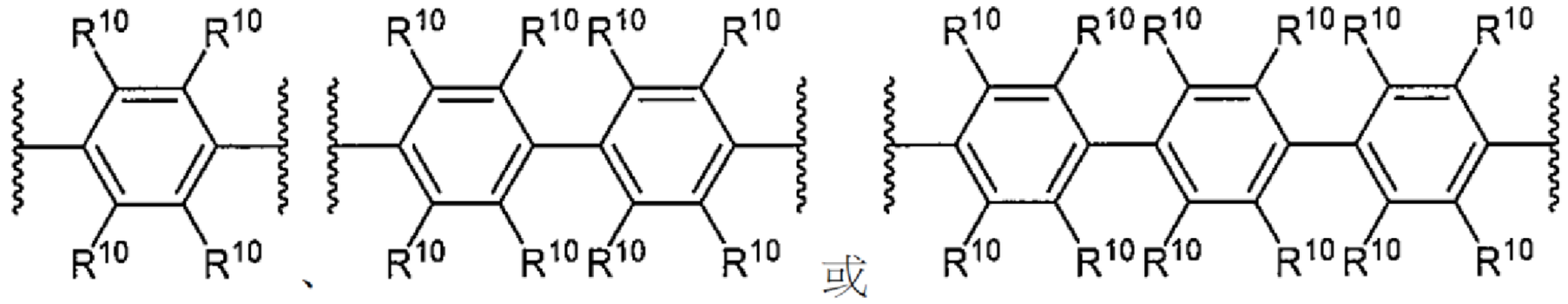
或其醫藥學上可接受之鹽，其中

G為H或$-C(O)CH_3$；

R^2為核鹼基，該核鹼基在每次出現時獨立地選自：腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶及次黃嘌呤；

K為-C(O)$(CH_2)_{1-6}$-C_{7-15}-雜芳族基-$(CH_2)_{1-6}$C(O)-；

M為

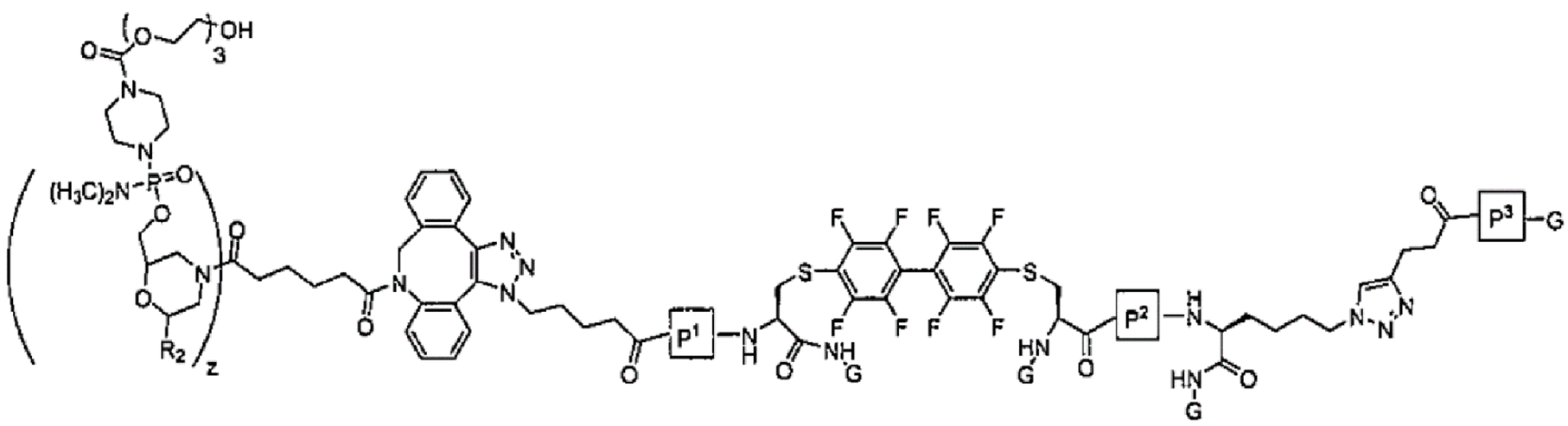


且R^{10}在每次出現時獨立地為H或鹵素，其中L^1共價連接至P^1及P^2上之末端或內部半胱胺酸之側鏈；

z為8至40；及

P^1、P^2及P^3各自獨立地為細胞穿透肽，其中P^1及P^2各自包含至少一個半胱胺酸胺基酸殘基，且其中細胞穿透肽中之每一者獨立地為兩性肽、核靶向肽、核內體分裂肽、嵌合肽、環狀肽、雙環肽或寡精胺酸肽。

【0112】 在一個實施例中，式(IV)之結構為式(IVa)：



(IVa)

。

【0113】 在本發明之三聚合肽-寡核苷酸-結合物之一個實施例中，G為H。

【0114】 在本發明之三聚合肽-寡核苷酸-結合物之另一實施例中，G為-C(O)CH_3。

【0115】 在一些實施例中，本文中所描述之三聚合肽-寡核苷酸-結合物為未溶劑化的。在其他實施例中，三聚合肽-寡核苷酸-結合物中之一或多種呈溶劑化形式。如此項技術中已知，溶劑合物可為醫藥學上可接受之溶劑中之任一者，諸如水、乙醇及其類似物。

【0116】 儘管式I、Ia、Ib、II、IIa及IV之三聚合肽-寡核苷酸-結合物以其中性形式描繪，但在一些實施例中，此等肽-寡核苷酸-結合物以醫藥學上可接受之鹽形式使用。

【0117】

寡核苷酸

基於N-嗎啉基之次單元之重要特性包括：1)藉由穩定不帶電荷或帶正電荷之主鏈鍵以寡聚形式連接之能力；2)支撐核苷酸鹼基(例如腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、胸苷、尿嘧啶、5-甲基-胞嘧啶及次黃嘌呤)以使得所形成之聚合物可與互補鹼基目標核酸(包括目標RNA，在相對較短之寡核苷酸(例如10-15個鹼基)中T_M值高於約45℃)雜交之能力；3)寡核苷酸主動地或被動地轉運至哺乳動物細胞中之能力；及4)寡核苷酸及寡核苷酸:RNA異雙螺旋分別抵抗RNAse及RNase H降解之能力。

【0118】 形成於寡聚物與目標序列之間的雙螺旋之穩定性取決於結合T_M與雙螺旋對細胞酶促裂解之易感性。寡聚物關於互補序列RNA之T_M可藉由習知方法來量測，該等方法諸如由Hames等人，Nucleic Acid Hybridization，IRL Press，1985,第107-108頁所描述或如Miyada C. G. 及Wallace R. B.，1987，Oligomer Hybridization Techniques，Methods Enzymol.第154卷，第94-107頁中所描述之彼等。在某些實施例中，反義寡聚物關於互補序列RNA可具有高於體溫且在一些實施例中高於約45℃

或50℃之結合T_M。亦包括在60℃至80℃或更高範圍內之T_M。根據公認原理：寡聚物之T_M (關於基於互補之RNA雜交體)可藉由提高雙螺旋中之C:G配對鹼基之比率或藉由增加異雙螺旋之(鹼基對)長度或兩者來提高。同時，出於最佳化細胞攝取之目的，限制寡聚物之尺寸可為有利的。出於此原因，本發明之化合物包括在25個鹼基或更小之長度下展示高T_M (45-50℃或更高)之化合物。

【0119】寡核苷酸之長度可變化，只要其能夠選擇性地結合至在前體mRNA分子內之所欲位置。此類序列之長度可根據本文所描述之選擇程序來測定。大體而言，寡核苷酸長度應為約8個核苷酸，至多約50個核苷酸。舉例而言，寡核苷酸之長度(z)可為8至38、8至25、15至25、17至21或約18。然而應瞭解，可在本文所描述之方法中使用在此範圍內之任何長度之核苷酸。

【0120】在一些實施例中，反義寡核苷酸含有鹼基修飾或取代。舉例而言，可選擇某些核鹼基以提高本文所描述之反義寡核苷酸之結合親和性。此等核鹼基包括5-經取代之嘧啶、6-氮雜嘧啶及N-2、N-6及0-6經取代之嘌呤，其包括2-胺基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶及2,6-二胺基嘌呤。已展示5-甲基胞嘧啶取代將核酸雙螺旋穩定性提高0.6至1.2℃，且可併入至本文中所描述之反義寡核苷酸中。在一實施例中，寡核苷酸之至少一個嘧啶鹼基包含5-經取代嘧啶鹼基，其中嘧啶鹼基選自由以下所組成之群：胞嘧啶、胸腺嘧啶及尿嘧啶。在一實施例中，5-經取代嘧啶鹼基為5-甲基胞嘧啶。在另一實施例中，寡核苷酸之至少一個嘌呤鹼基包含N-2、N-6經取代之嘌呤鹼基。在一實施例中，N-2、N-6經取代之嘌呤鹼基為2,6-二胺基嘌呤。

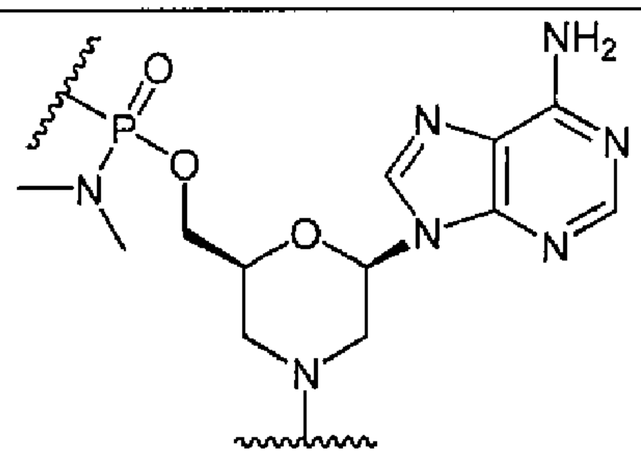
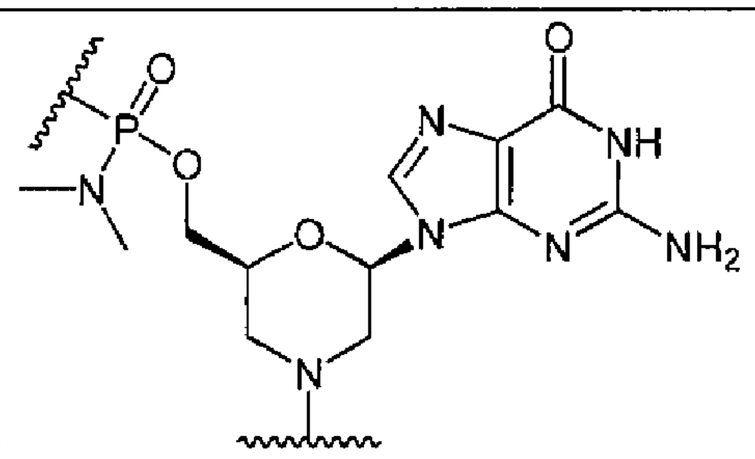
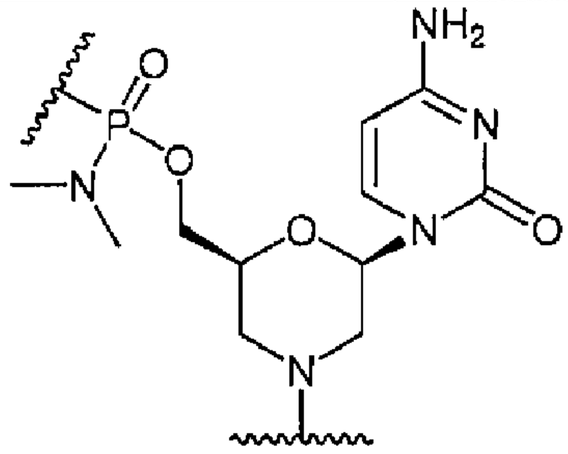
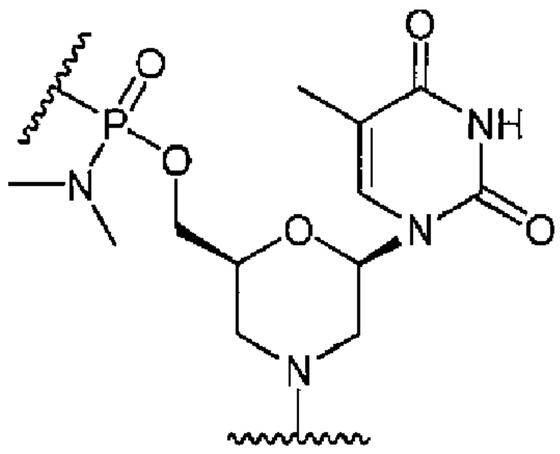
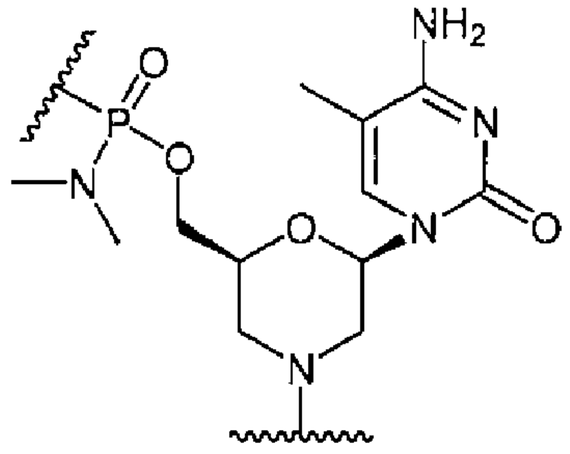
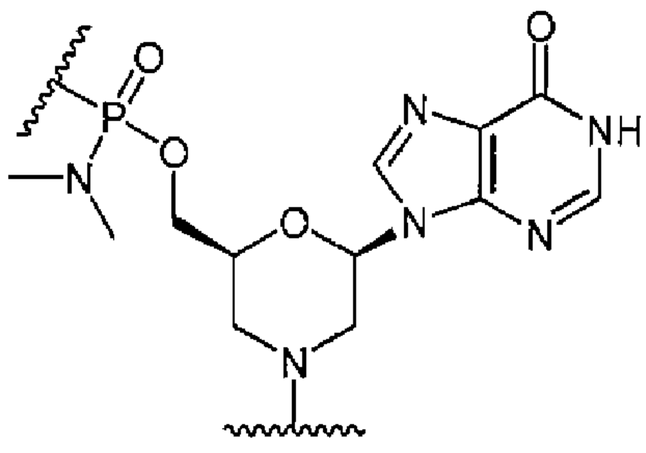
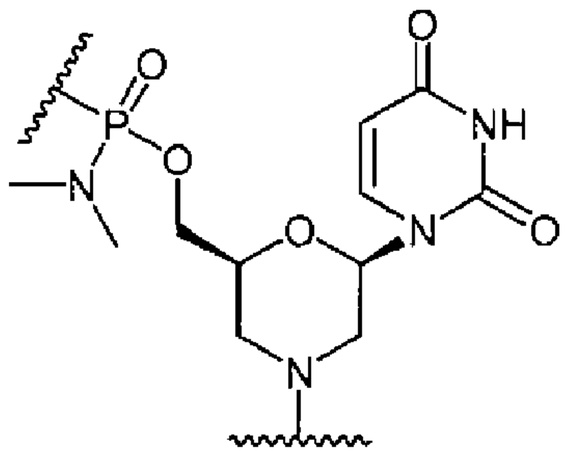
【0121】 基於N-嗎啉基之寡聚物(包括反義寡聚物)詳述於例如美國專利第5,698,685號、第5,217,866號、第5,142,047號、第5,034,506號、第5,166,315號、第5,185,444號、第5,521,063號、第5,506,337號及申請中之美國專利申請案第12/271,036號、第12/271,040號及PCT公開案第WO/2009/064471號 及 第WO/2012/043730號 以 及Summerton等 人 ，1997，Antisense and Nucleic Acid Drug Development，7，187-195中，該等文獻以全文引用之方式併入本文中。

【0122】 在式I、Ia及Ib之一實施例中，R^2在每次出現時獨立地為腺嘌呤、2,6-二胺基嘌呤、鳥嘌呤、次黃嘌呤、胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶及次黃嘌呤；及

各R^1為$-N(CH_3)_2$。

【0123】 表1提供如本文所描述之核苷酸部分之各種實施例。

表1：核苷酸部分之各種實施例。

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

【0124】在一特定實施例中，寡核苷酸之序列表為GCTATTACCTTAACCCAG (SEQ ID. 56)。

【0125】在一些實施例中，本文所描述之寡核苷酸為未溶劑化的。在其他實施例中，寡核苷酸中之一或多者呈溶劑化形式。如此項技術中已知，溶劑合物可為醫藥學上可接受之溶劑中之任一者，諸如水、乙醇及其類似物。

【0126】儘管式I、Ia及Ib之寡核苷酸以其中性形式描繪，但在一些

實施例中，此等寡核苷酸以醫藥學上可接受之鹽形式使用。

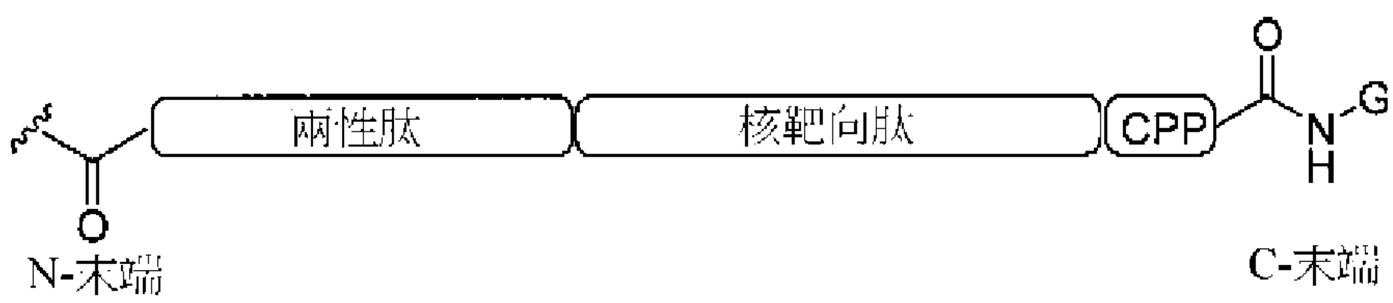
【0127】

三聚合肽

本文所提供之寡核苷酸包括與三聚合肽結合之寡核苷酸部分。特定言之，三聚合肽包含三個共價連接之細胞穿透肽，且其中三個細胞穿透肽獨立地為兩性肽、核靶向肽、核內體分裂肽、嵌合肽、環狀肽、雙環肽或寡聚精胺酸肽。

【0128】 在一些實施例中，三個細胞穿透肽包含一個兩性肽、一個核靶向肽及一個額外的細胞穿透肽，其中該兩性肽為三聚合肽之N-末端，核靶向肽為中間肽，且額外的細胞穿透肽為三聚合肽之C-末端。

【0129】 以下展示此類三聚合肽之圖示：



其中N-末端共價連接至寡核苷酸。

【0130】 在一些實施例中，三聚合肽可有效促進化合物轉運至細胞中。轉運部分在一些實施例中連接至寡聚物之末端。肽具有在給出細胞培養群體之30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100% (包括其間之所有整數)細胞內誘導細胞穿透的能力，且允許在全身投與後在活體內之多個組織內的大分子移位。

【0131】 相對於在無經連接之轉運部分存在下之寡聚物之攝取，已展示如上文所描述之轉運部分極大地增強經連接之寡聚物之細胞進入。相對於非結合化合物，攝取可增強至少三倍，且在一些實施例中增強50倍。在一些實施例中，相對於非三聚合寡核苷酸-肽結合物，攝取可增強，且

在一些實施例中增強三倍。

【0132】 三聚合肽之使用特別適用於實踐本發明。已展示某些三聚合肽轉運體對將反義化合物遞送至包括肌細胞之原代細胞中為高度有效的。此外，本文中所描述之三聚合肽轉運體在與反義PMO結合時，顯示提高的改變數個基因轉錄物之剪接的能力。

【0133】 因此，在一個態樣中，本文提供一種三聚合肽，其為三個共價連接之細胞穿透肽或其醫藥學上可接受之鹽。

【0134】 特定言之，各三聚合肽為三個共價連接之細胞穿透肽，其中細胞穿透肽獨立地為兩性肽、核靶向肽、核內體分裂肽、嵌合肽、環狀肽、雙環肽或寡聚精胺酸肽。

【0135】 在另一實施例中，各三聚合肽為三個共價連接之細胞穿透肽，其中細胞穿透肽中之一者為兩性肽，細胞穿透肽中之一者為核靶向肽，且肽中之一者為額外的細胞穿透肽。

【0136】 在再一實施例中，各三聚合肽為三個共價連接之細胞穿透肽，其中三個細胞穿透肽包含一個兩性肽、一個核靶向肽及一個額外的細胞穿透肽，且其中兩性肽為三聚合肽之N-末端，核靶向肽為中間肽，且額外的細胞穿透肽為三聚合肽之C-末端。

【0137】 在再一實施例中，兩性肽包含疏水性肽基片段及親水性肽基片段，其中疏水性肽基片段包含2至10個獨立地選自甘胺酸、異白胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之胺基酸的序列，且其中親水性肽基片段包含2至20個獨立地選自帶電荷胺基酸、不帶電但極性胺基酸或疏水性胺基酸之胺基酸的序列，其中親水性肽基片段包含至少一個非疏水性胺基酸。

【0138】在一實施例中，親水性肽基片段包含2至20個獨立地選自精胺酸、離胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、纈胺酸、脯胺酸或甘胺酸之胺基酸的序列，其中親水性肽基片段包含至少一個非疏水性胺基酸。

【0139】在另一實施例中，P^1為穿膜肽、pVEC、TP10或DPV6。

【0140】在又一實施例中，P^2為KRVK、SV40或AAV-PHP.eB。

【0141】在另一實施例中，P^3為DPV6、PPC3、PPC5、R12、R12全循環、R12 N-循環、R12 C-循環、R12苯甲基二循環、R12雙循環、Bpep、Bpep全循環、Bpep C-循環、穿膜肽(nle)、波紋因子N-循環、波紋因子C-循環、波紋因子全循環、pVEC、pVEC-Bpep、AIP6全循環、蜂毒素-Bpep、Bh3螺旋、Bac7、蟾蜍素2、蜂毒素、SynB1、S413-PVrev、核糖體毒素2 L3、PreS2-TLM、MAP、W/R、MAP12、SAP、SVM1、SVM3、SVM4、YTA4、439a、HoxA13絲胺酸2、Bip、PPR3、PPR4、AIP6、DPV15b、TAT、穿膜肽、R9、HoxA13絲胺酸1、KRVK TP10、TP10 KRVK或SV40 TP10。

【0142】在一實施例中，P^1為DPV6。

【0143】在另一實施例中，P^3為DPV6、Bpep、pVEC-Bpep、蟾蜍素2、SynB1、W/R或AIP6。

【0144】在又一實施例中，P^1為DPV6，P^2為SV40，且P^3為DPV6、Bpep、pVEC-Bpep、蟾蜍素2、SynB1、W/R或AIP6。

【0145】在另一實施例中，P^1為DPV6，P^2為SV40，且P^3為pVEC-Bpep。

【0146】 在一實施例中，P^1為DPV6，P^2為SV40，且P^3為W/R。

【0147】 在另一實施例中，P^1為DPV6，P^2為SV40，且P^3為SynB1。

【0148】 表2中提供變數P^1、P^2及P^3之各種實施例：

【0149】 **表2**：CPP之各種實施例。

肽名稱	**序列**	**SEQ ID NO.**
DPV6	GRPRESGKKRKRKRLKP	1
PPC3	KKYRGRKRHPR	2
PPC5	GRKAARAPGRRKQ	3
R12	RRRRRRRRRRRR	4
R12全循環	**C**RRRRRRRRRRRR**C**	5
R12 N-循環	**C**RRRRRR**C**RRRRRR	6
R12 C-循環	RRRRRR**C**RRRRRR**C**	7
R12苯甲基二循環	*C*RRRRRR*C*RRRRRR*C*	8
R12雙循環	**C**RRRRRR**CC**RRRRRR**C**	9
Bpep	RXRRBRRXRRBR	10
Bpep全循環	**C**RXRRBRRXRRBR**C**	11
Bpep C-循環	RXRRBR**C**RXRRBR**C**	12
穿膜肽(nle)	RQIKIWFQNRRMKWKK	13
波紋因子N-循環	**C**QIKIWF**C**NKRAKIKK	14
波紋因子C-循環	SQIKIWFQ**C**KRAKIK**C**	15
波紋因子全循環	**C**SQIKIWFQNKRAKIKK**C**	16
pVEC	LLIILRRRIRKQAHAHSK	17
pVEC-Bpep	LLIILRRRIRKQAHAHSKRXRRBRRXRRBR	18
AIP6全循環	Z**C**RLRWR**C**	19
蜂毒素-Bpep	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQRXRRBRRXRRBR	20
Bh3螺旋	IWIAQELRRIGDEFNAYYARR	21
Bac7	RRIRPRPPRLPRPRPRPLPFPRPG	22
蟾蜍素2	TRSSRAGLQWPVGRVHRLLRK	23
蜂毒素	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	24
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	25
S413-PVrev	ALWKTLLKKVLKAPKKKRKV	26
核糖體毒素2 L3	KLIKGRTPIKFGKADCDRPPKHSQNGMGK	27
PreS2-TLM	PLSSIFSRIGDP	28
MAP	KLALKALKALKAALKLA	29
W/R	RRWWRRWRR	30
MAP12	LKTLTETLKELTKTLTEL	31
SAP	VRLPPPVRLPPPVRLPPP	32
SVM1	FKIYDKKVRTRVVKH	33
SVM3	KGTYKKKLMRIPLKGT	34

SVM4	LYKKGPAKKGRPPLRGWFH	35
YTA4	IAWVKAFIRKLRKGPLG	36
439a	GSPWGLQHHPPRT	37
HoxA13絲胺酸2	RQVTIWSQNRRVKSKK	38
Bip	VSALK	39
PPR3	PPRPPRPPR	40
PPR4	PPRPPRPPRPPR	41
AIP6	RLRWR	42
DPV15b	GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR	43
TAT	RKKRRQRRR	44
穿膜肽	RQIKIWFQNRRMKWKK	45
R9	RRRRRRRRR	46
HoxA13絲胺酸1	RSVTIWFQSRRVKEKK	47
KRVK TP10	KRVKAGYLLGKINLKALAALAKKIL	48
TP10 KRVK	AGYLLGKINLKALAALAKKILKRVK	49
KRVK	KRVK	50
SV40 TP10	PKKKRKVAGYLLGKINLKALAALAKKIL	51
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	52
SV40	PKKKRKV	53
AAV-PHP.eB	SDGTLAVPFKA	54
PPC3	KKYRGRKRHPR	55

【0150】粗體半胱胺酸係與十氟聯苯連接。斜體半胱胺酸係與1,3,5-三溴甲苯連接。

【0151】在一些實施例中，本文所描述之三聚合肽係未溶劑化的。在其他實施例中，嵌合肽中之一或多者呈溶劑化形式。如此項技術中已知，溶劑合物可為醫藥學上可接受之溶劑中之任一者，諸如水、乙醇及其類似物。

【0152】雖然三聚合肽係以其中性形式呈現，但在一些實施例中，此等寡核苷酸係以醫藥學上可接受之鹽的形式使用。

【0153】

方法

本文提供治療有需要個體之神經肌肉疾病、肌肉疾病、病毒感染或細菌感染之方法，其包含向個體投與式I、Ia或Ib之肽-寡核苷酸-結合物。

【0154】因此，在一個態樣中，本文提供治療有需要個體之肌肉疾

病、病毒感染、神經肌肉疾病或細菌感染之方法，其包含向個體投與本發明之嵌合肽-寡核苷酸-結合物。

【0155】 在一實施例中，肌肉疾病為杜興氏肌肉失養症。

【0156】 在另一實施例中，病毒感染由選自由以下組成之群的病毒引起：馬堡病毒(marburg virus)、埃博拉病毒(ebola virus)、流感病毒及登革熱病毒(dengue virus)。

【0157】 在又一實施例中，細菌性感染係由結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)引起。

【0158】 在本文中所認為之個體通常為人類。然而，個體可為需要治療之任何哺乳動物。因此，本文所描述之方法可應用於人類及獸醫應用兩者。

【0159】

投與/給藥

治療性組合物之調配物及其隨後投與(給藥)係在熟習此項技術者之技能範圍內。給藥視待治療之疾病病況之嚴重程度及反應而定，其中治療之過程持續數天至數月或直到達成疾病病況充分減輕。最佳給藥時程可從患者體內之藥物堆積之量測值來計算。

【0160】 一般此項技術者可容易地判定最佳劑量、給藥方法及重複率。最佳劑量可視個體寡聚物之相對效能而變化，且可大體上基於被認為在活體外及活體內動物模型中有效之EC_{50}來評估。大體而言，劑量為0.01 μg/kg體重至100 g/kg體重，且可以每天一次或更多次，每週一次或更多次、每月一次或更多次或每年一次或更多次或甚至每2年至20年一次給予。基於所量測到的藥物在體液或組織中之駐留時間及濃度，一般熟習此

項技術者可容易地評估給藥之重複率。在成功治療之後，可能需要使患者進行維持療法以防止疾病病況復發，其中以維持劑量(介於0.01 μg/kg體重至100 g/kg體重之範圍內，每天一次或更多次至每20年一次)投與寡聚物。

【0161】 在一些實施例中，單獨投與式I、Ia或Ib之三聚合結合物。

【0162】 在一些實施例中，式I、Ia或Ib之三聚合結合物以治療有效量或劑量投與。「治療有效量」為式I、Ia或Ib之三聚合結合物之量，當其本身向患者投與時可有效治療肌肉疾病、病毒感染或細菌感染。在給定的情況下證明為特定個體之「治療有效量」之量，可能對於類似地治療所考慮之疾病或病況之100%患者並非有效，儘管此類劑量被熟練的從業者認為「治療有效量」。對應於治療有效量之寡核苷酸之量很大程度上視疾病之類型、疾病之階段、被治療患者之年齡及其他事實而定。

【0163】 在不同實施例中，視式I、Ia或Ib之三聚合結合物及所用有效量而定，寡核苷酸可調節與肌肉疾病、病毒感染或細菌感染有關之基因之表現。

【0164】 雖然式I、Ia或Ib之三聚合結合物之量應使得有效治療肌肉疾病、病毒感染或細菌感染，但該等量對於患者較佳為非過度有毒的(亦即，該等量較佳在如醫學準則確定之毒性限制內)。在一些實施例中，為預防毒性過量或更有效地治療肌肉疾病、病毒感染或細菌感染，或其中之兩者，提供對總投與劑量之限制。通常，本文中考慮之量為每天的；然而，本文中亦考慮半天及兩天或三天之循環。

【0165】 不同給藥方案可用於治療肌肉疾病、病毒感染或細菌感染。在一些實施例中，一日一次、兩次、三次或四次投與日劑量(諸如上

文所描述之例示性劑量中之任一者)持續三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天或十天。根據所治療之疾病之階段及嚴重程度，可伴隨較高劑量而採用較短治療時間(例如至多五天)，或可伴隨較低劑量而採用較長治療時間(例如十天或更多天或數週或一個月或更長時間)。在一些實施例中，每隔一天投與一次或兩次日劑量。

【0166】 呈純形式或呈適當之醫藥組合物之式I、Ia或Ib之三聚合結合物或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物形式可經由此項技術中已知之可接受的投與模式或藥劑中之任一者投與。寡核苷酸例如可經口、經鼻、非經腸(靜脈內、肌肉內或皮下)、局部、經皮、陰道內、膀胱內、腦池內(intracistemally)或經直腸投與。劑型可為例如固體、半固體、凍乾散劑或液體劑型，諸如錠劑、丸劑、軟彈性膠囊或硬明膠膠囊、散劑、溶液、懸浮液、栓劑、噴霧劑或其類似物，例如呈適合於僅投與精確劑量之單位劑型。特定投與途徑為經口，特定言之為一種可根據待治療之疾病之嚴重程度調整方便的日給藥方案之途徑。

【0167】 助劑及佐劑可包括例如保藏劑、潤濕劑、懸浮劑、甜味劑、調味劑、芳香劑、乳化劑及分散劑。大體上藉由各種抗細菌藥劑或抗真菌藥劑(諸如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及其類似物)來防止微生物之作用。亦可包括等張劑，諸如糖、氯化鈉及其類似物。可藉由使用延緩吸收之藥劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)來實現可注射醫藥形式之延長吸收。助劑亦可包括潤濕劑、乳化劑、pH緩衝劑及抗氧化劑，諸如檸檬酸、脫水山梨糖醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、丁基化羥基甲苯及其類似物。

【0168】 可使用包衣及殼層(諸如腸溶衣及此項技術中熟知的其他

者)來製備固體劑型。該等固體劑型可含有遮光劑(opacifying agent)且可具有如此組合物使得其以延緩方式將一或多種活性寡核苷酸釋放在腸道之某一部分中。可使用之包埋組合物之實例為聚合物質及蠟。適當時，活性寡核苷酸亦可與上文所提及之賦形劑中之一或多者一起處於微囊封形式。

【0169】 用於經口投與之液體劑型包括醫藥學上可接受之乳液、溶液、懸浮液、糖漿及酏劑。藉由將本文所描述之結合物或其醫藥學上可接受之鹽及視情況選用之醫藥學佐劑在載劑(諸如水、鹽水、水性右旋糖、甘油、乙醇及其類似物)、增溶劑及乳化劑(例如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺)、油(特定言之，棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇及脫水山梨糖醇之脂肪酸酯)或此等物質之混合物及其類似物中溶解、分散等，從而形成溶液或懸浮液來製備此類劑型。

【0170】 一般而言，根據預期之投與模式，醫藥學上可接受之組合物將含有約1重量%至約99重量%之本文中所描述之寡核苷酸，或其醫藥學上可接受之鹽，及99重量%至1重量%之醫藥學上可接受之賦形劑。在一個實例中，組合物將為在約5重量%及約75重量%之間的本文中所描述之寡核苷酸，或其醫藥學上可接受之鹽，其餘為適合之醫藥賦形劑。

【0171】 製備此類劑型之實際方法為熟習此項技術者已知或將顯而易見的。參照(例如)Remington's Pharmaceutical Sciences第18版(Mack Publishing Company，Easton，Pa.，1990)。

【0172】

套組

在其他實施例中，提供套組。根據本發明之套組包括一或多個包含寡核苷酸、肽、肽-寡核苷酸-結合物或本發明之組合物的封裝。在一些實施例中，套組包含根據式I、Ia或Ib之肽-寡核苷酸-結合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0173】 片語「封裝」意謂含有本文中提出之寡核苷酸或組合物之任何容器。在一些實施例中，封裝可為盒或包裹。用於封裝醫藥產品之封裝材料為熟習此項技術者所熟知。醫藥封裝材料之實例包括(但不限於)瓶子、管、吸入器、泵、袋、小瓶、匣、注射器、瓶子及適用於所選調配物及所欲投與及治療模式之任何封裝材料。

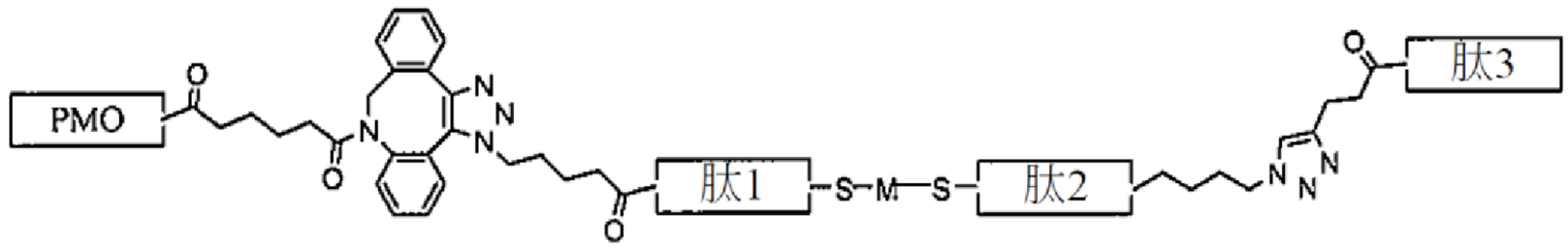
【0174】 套組亦可含有並不含於封裝內但附著至封裝之外部之物件，例如吸液管。

【0175】 套組可另外含有用於向患者投與本發明之寡核苷酸或組合物之說明書。套組亦可包含由諸如 United States Food and Drug Administration之管制機構批准的本文中寡核苷酸之使用說明書。套組亦可含有寡核苷酸之標籤或產品插頁。封裝或任何產品插頁或兩者可自身由管制機構批准。套組可包括封裝中之呈固相或呈液相(諸如所提供之緩衝液)之寡核苷酸。套組亦可包括用於製備用以實施該等方法之溶液的緩衝液及用於將液體自一個容器轉移至另一個容器的吸液管。

【0176】

製備三聚合肽-寡核苷酸-結合物之方法

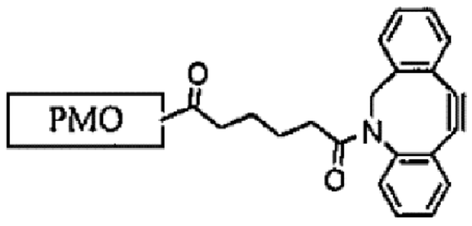
在另一態樣中，本文中提供一種用於製備本申請案中所描述之三聚合肽-寡核苷酸-結合物的方法。特定言之，本文提供一種用於製備式(II)之三聚合肽-寡核苷酸結合物的方法：



(II)

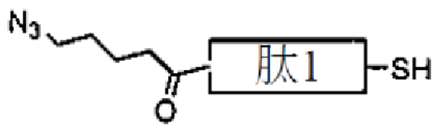
其包含：

(a) 使式(III)之化合物



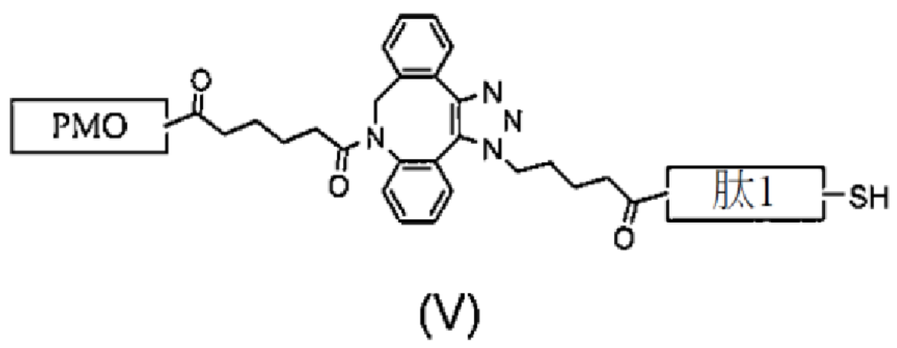
(III)

與式(IV)之化合物



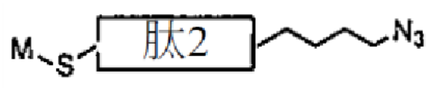
(IV)

在酸存在下接觸，形成式(V)之化合物，



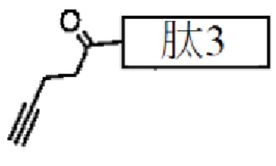
(V)

(b) 使式(VI)之化合物



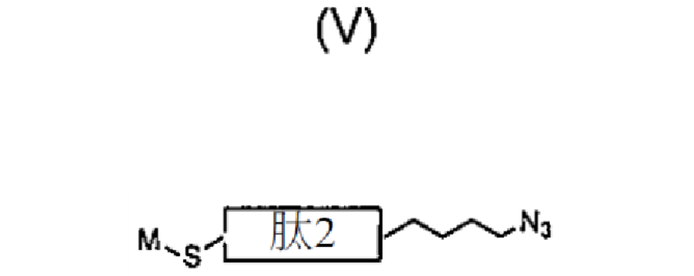
(VI)

與式(VII)之化合物



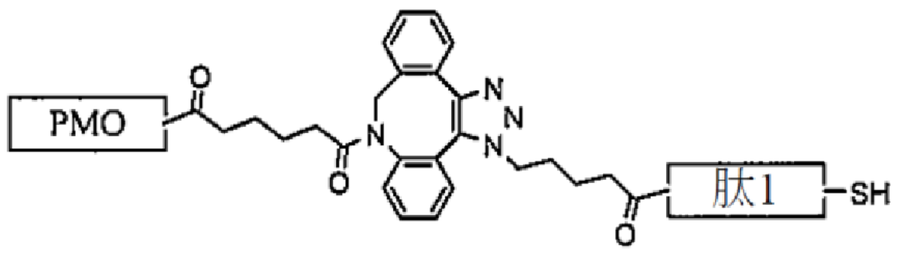
(VII)

在銅催化劑存在下接觸，形成式(VIII)之化合物，



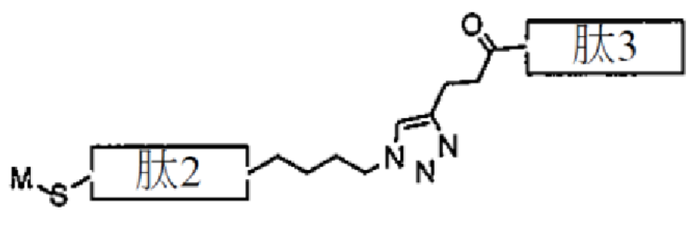
(VIII)

(c) 使式(V)之化合物



(V)

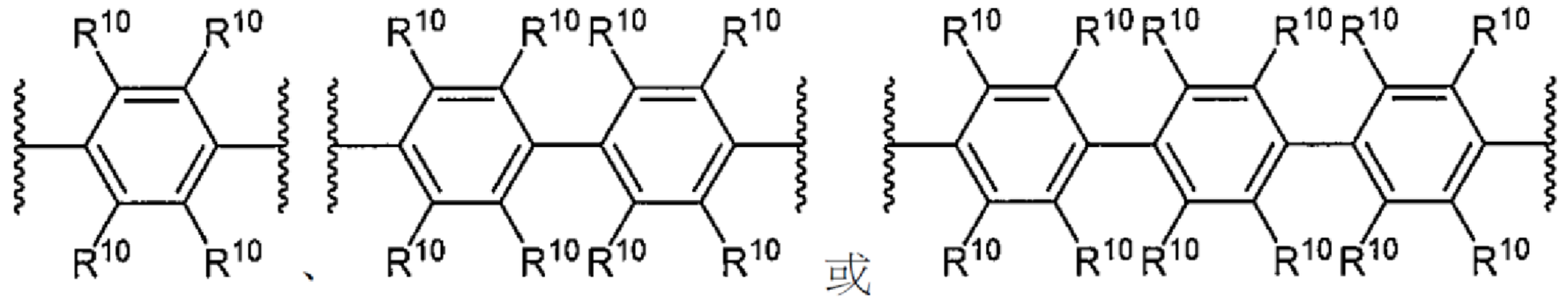
與式(VIII)之化合物



(VIII)

在偶合試劑存在下接觸，形成式(II)之化合物；

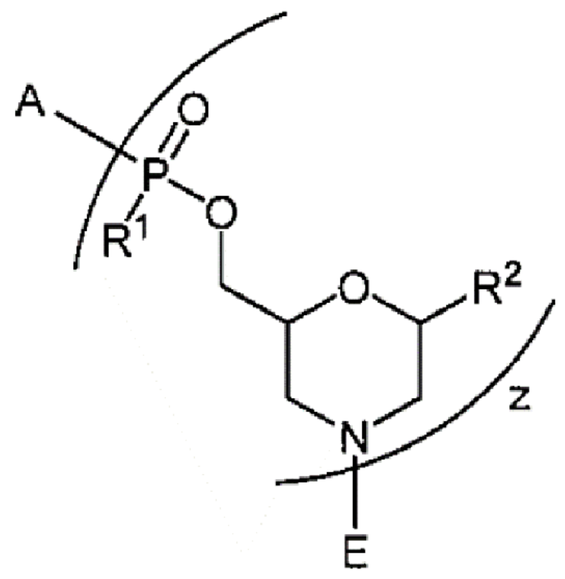
其中M為



，

且R^{10}在每次出現時獨立地為H或鹵素，其中M共價連接至在P^1及P^2上之末端或內部半胱胺酸之側鏈；

其中PMO為式IX之寡核苷酸：

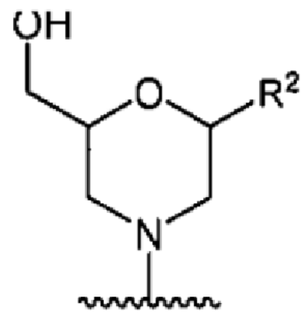
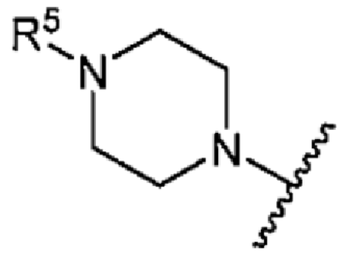


(IX)

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

A選自由以下組成之群：OH、$-NHCH_2C(O)NH_2$、$-N(C_{1-6}$烷基$)CH_2C(O)NH_2$、


及

；

R^5為-C(O)(O-烷基)$_x$OH，其中x為3-10且各烷基在每次出現時獨立地為-C_{2-6}烷基，或R^5選自由以下組成之群：-C(O)C_{1-6}烷基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、-C_{1-6}烷基-R^6、-C_{1-6}雜烷基-R^6、-芳基-R^6、-雜芳基-R^6、-C(O)O-C_{1-6}烷基-R^6、-C(O)O-芳基-R^6及-C(O)O-雜芳基-R^6，或R^5為三聚合肽之連接點；

R^6選自由以下組成之群：OH、SH及NH_2，或R^6為共價連接至固體支撐物之O、S或NH；

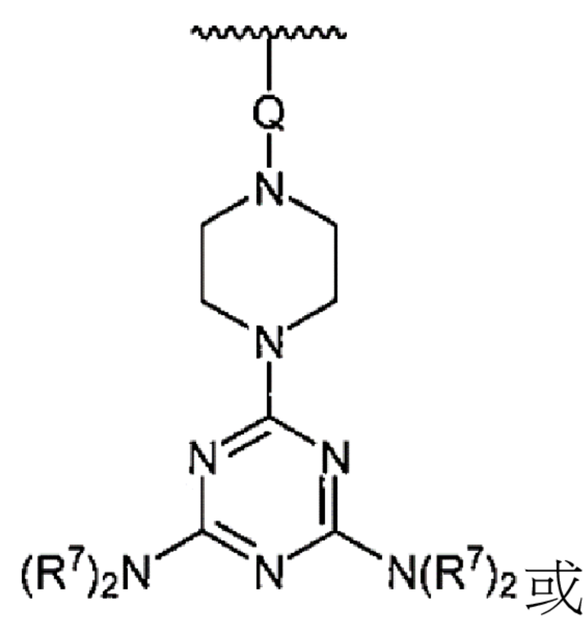
各R^1獨立地為OH或-NR^3R^4；

各R^3及R^4在每次出現時獨立地為-C_{1-6}烷基；

各R^2獨立地選自由以下組成之群：H、核鹼基及用化學保護基官能化之核鹼基，其中核鹼基在每次出現時獨立地包含選自由吡啶、嘧啶、三氮雜環己烷、嘌呤及去氮嘌呤組成之群的C_{3-6}雜環；

z為8至40；

E選自由以下組成之群：H、-C_{1-6}烷基、-C(O)C_{1-6}烷基、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、三甲氧基三苯甲基及


或

E為三聚合肽之連接點；

Q為-C(O)$(CH_2)_6$C(O)-或-C(O)$(CH_2)_2S_2(CH_2)_2$C(O)-；

R^7為-$(CH_2)_2$OC(O)N$(R^8)_2$；及

R^8為-$(CH_2)_6$NHC(=NH)NH_2。

【0177】 在一實施例中，步驟(a)之酸為三氟乙酸。

【0178】 在另一實施例中，步驟(b)之銅催化劑為溴化銅(I)。

【0179】 在又一實施例中，步驟(c)之偶合試劑為參(2-羧乙基)膦鹽酸鹽(TCEP)。

【0180】 在又一實施例中，步驟(a)之溶劑為水，步驟(b)之溶劑為水/DMSO，且步驟(c)之溶劑為水/DMSO。

【0181】 在另一實施例中，步驟(a)及(b)之產物對步驟(c)之反應條件為惰性的。

【0182】 在另一實施例中，步驟(a)及(b)之產物可不經任何純化即用於步驟(c)中。

【0183】

實例

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

【0184】 聚焦於含有四個模組之構築體上：一個用於寡核苷酸且三個用於不同肽序列。據設想，模組將必需含有多種功能肽，諸如核靶向肽或核內體分裂肽。為了合成構築體，選擇收斂法，其中模組1連接至模組2且模組3分開地連接至模組4。隨後，兩種二聚體可結合以提供四模組構築體(圖2)。

【0185】 生物結合反應之選擇為關鍵的，因為需要將各反應最佳化以耐受某些官能基、與常用溶劑及條件相容且適用於肽受質。在肽結合之情形下探究若干反應且遇到對某些反應之各種限制。

【0186】 **表3.**用於普通生物結合反應之官能基及對其使用之潛在限制的列表。

官能基	**結合限制**
硫醇	-可能需要還原劑以防止二硫化物形成 -可能與DBCO反應
順丁烯二醯亞胺	-與疊氮化物反應 -鍵為可逆的
烷基鹵化物	-減慢與硫醇反應之速率
全氟芳烴	-高於pH10之不穩定鍵聯 -疏水性
四嗪	-在硫醇或TIPS存在下迅速減少 -與DBCO反應
降冰片烯	-在肽裂解期間與硫醇反應 -與疊氮化物反應
DBCO	-與四嗪反應，可能與硫醇反應 -在三氟乙酸存在下水解之連接子
醛	-本質上可逆
炔烴	-與鈀反應(例如在alloc移除期間)
疊氮化物	-藉由TCEP減少

【0187】 舉例而言，發現四嗪可併入樹脂上之肽中，但在肽裂解及側鏈脫除保護基期間還原。類似地，存在於可商購之DBCO試劑上之三級醯胺在三氟乙酸中裂解，需要將DBCO併入至樹脂外受質中。另外，當存在於同一肽上時，順丁烯二醯亞胺及疊氮化物將發生反應。

【0188】 在研究若干潛在反應之後，最終合成流程將兩個疊氮化物-炔烴環加成與一個S_NAr反應組合(圖2)。在反應1中，PMO-DBCO將與疊氮基肽偶合以連接模組1及2。疊氮基肽亦將含有游離硫醇，其在中性條件下將不與DBCO反應。分開地，對於反應2，銅催化之疊氮化物-炔烴環加成將連接模組3及4。模組3將含有連接至十氟聯苯之N-末端半胱胺酸殘基及C-末端疊氮基離胺酸。全氟芳烴使得反應3能夠發生且亦用以防止游離硫醇干擾疊氮化物/炔烴環加成。模組4僅含有炔烴，其對大多數反應穩定，諸如肽巨環化。最後，在反應3中，可經由硫醇-全氟芳烴S_NAr反應使模組1-2及3-4結合。因為疊氮化物已與炔烴反應，所以TCEP可用於防止二硫化物形成而不用擔心無意之疊氮化物還原。

【0189】 所選擇合成方案對於組合庫之合成具有眾多益處。首先，在產生穩定、不可逆鍵之前，所有反應均已用於生物分析中。其次，反應不產生副產物且在理論上為定量的，其降低對於純化之需求。第三，所有試劑均為相對良性的且不應影響細胞培養實驗。儘管將存在銅，但發現出於此篩選之目的，低微莫耳濃度之銅不影響細胞存活率。最後，反應均可以極小規模(例如小於5 μL之體積)來進行。值得注意的是，高產率及小體積之組合表明反應可在高濃度下進行且反應可以立即稀釋至培養基中用於細胞培養物處理，而無需單獨地純化各反應。

【0190】 在優化個別反應條件之後，合成一組36種概念驗證構築體。對於寡核苷酸，使用模組1，PMO IVS2-654 (SEQ. ID. 56)，其在成功遞送至經修飾之HeLa細胞株中之胞核之後誘發eGFP螢光。模組2包括一組四個不同CPP：穿膜肽、pVEC、TP10及DPV6。模組3包括KRVK及SV40核定位序列(NLS)及肽PHP.eB，一種最近報導用於改良將至大腦中

之病毒遞送的序列。模組4包括三個CPP：Bpep、DPV6及PPC3 (圖3)。

【0191】 合成以使用疊氮化物-變形-炔烴環加成的模組1及2之結合開始。在水中，將5 mM PMO-DBCO與5 mM疊氮化物-模組2肽-半胱胺酸一起培育。在一小時之後，將反應物於液氮中急驟冷凍且藉由凍乾法移除溶劑。對於各反應，LC-MS分析展示幾乎完全轉化成產物且指示反應在不需要純化之情況下乾淨地進行。

【0192】 使用銅催化之疊氮化物-炔烴環加成結合模組3及4。將十氟聯苯-模組3肽-疊氮化物及炔烴-模組4肽溶解於水中以製備各模組之10 mM儲備溶液。分開地，在惰性氛圍下將溴化銅(I)溶解於DMSO中。組合肽(各自最終濃度為3.3 mM)且藉由添加溴化銅溶液(最終濃度6.7 mM)起始反應。2小時後，藉由添加100 mM磷酸氫二鈉水溶液淬滅反應物。在反應3之製備中，在真空下移除溶劑。

【0193】 最後，組合模組1-2及3-4。將模組1-2 (最終濃度0.63 mM)與模組3-4 (最終濃度1.25 mM，2當量)混合於含有5 mM TCEP之DMSO中。由於模組1為用於細胞分析之活性組分，因此其用作限量試劑。在2小時之後，反應物經急驟冷凍且儲存在-80℃下直至稀釋及細胞處理。個別地測試反應組分表明銅之存在干擾反應，且儘管進行大量最佳化嘗試，但反應轉化率從未超過約70%。

【0194】 在合成36個構築體之情況下，測試使用經修飾之HeLa細胞分析法調節PMO活性之能力。HeLa-654細胞經穩定轉染以表現非螢光eGFP蛋白。eGFP基因間雜有來自人類β-血球蛋白基因之突變內含子(IVS2-654)。插入改變前體mRNA剪接以使得片段保留在成熟mRNA中，從而產生非螢光蛋白。具有β-血球蛋白插入之PMO IVS2-654鹼基對修飾

mRNA剪接，且從而產生螢光eGFP之表現。

【0195】 為了處理，將粗反應混合物在培養基中稀釋至5 μM。基於在反應中混合之模組1-2結合物之原始濃度計算模組化構築體之濃度。使用含有10%胎牛血清(FBS)之培養基，用各構築體處理細胞22小時，其後藉由流動式細胞測量術量測細胞螢光。

【0196】 不同模組導致細胞螢光水準之若干可辨趨勢(圖4)。當模組2為DPV6時，不管哪些肽置放於模組3及4中，總構築體不斷地產生高螢光。然而，當pVEC或TP10任一者置放於模組2中時，觀測到微小細胞螢光。在流動式細胞測量術期間，吾人將閘控細胞計數用作控制化合物之毒性的間接讀出。高度毒性化合物使得總細胞計數降低，且根據碘化丙錠染色閘控出非活細胞。在此實驗中，觀測到當模組3肽為核定位序列KRVK時，持續地觀測到較低之細胞計數。由於較佳化合物為高度活性及無毒性的，因此將細胞螢光及細胞計數讀數乘在一起以獲得總化合物功效之量度(F×C)。

【0197】 鑒於概念驗證實驗之成功，合成600個結合物之庫用於在HeLa-654細胞中測試。選擇將模組4中之肽數目自3增加至50。為了增加庫中肽類型之多樣性且突出併入經修飾之肽及異常官能基之可行性，包括嵌合肽、環狀肽及雙環肽之混合物。環肽包括R12、Bpep及波紋因子變異體，其中連接兩個半胱胺酸殘基形成穩定肽巨環，其與模組化反應相容。雙環變異體包括雙重巨環R12及另一R12序列，其中三個側鏈與1,3,5-三溴甲苯連接。其他肽包括若干先前報導之CPP、計算預測為有效PMO載體(PPC)之肽，及具有隨附NLS序列之肽(參見表2)。

【0198】 使用額外化合物，如先前所描述進行反應1及反應2，但反

應2現在涉及150種相異產物。對於反應3，為處理大量化合物，使用先前所描述之條件在384孔盤中在兩天內進行合成。在合成之後，在PBS中將化合物稀釋至100 μM且隨後在含有10% FBS之培養基中將化合物稀釋至5 μM。再次，用構築體處理HeLa-654細胞22小時且藉由流動式細胞測量術分析細胞螢光(圖5)。

【0199】不同之肽組合突出了肽功效之某些傾向。首先，如概念驗證實驗中所見，作為模組2之DPV6產生最高F×C。對於模組4，pVEC-Bpep嵌合體不斷地產生高效能。當模組4位置含有肽，諸如蜂毒素或蜂毒素-Bpep時，某些結合物具有高毒性。如所預測，高度陽離子肽，諸如R12或Bpep變異體具有相對較高活性且叢集在熱圖之頂部。最後，個別模組之作用為關鍵的-如針對模組2肽所示，即使模組3及4中之某些肽可上調或下調螢光，pVEC或TP10之存在顯著減少螢光且促成主要作用。

【0200】 PMO-DPV6-SV40-W/R之總F×C最高。閘控細胞計數達到5000個細胞之最大值且平均螢光強度為非結合之PMO的約20倍。因為當單獨與PMO結合時，W/R不為特別有效之肽(其活性約為PMO本身3倍)，所以此結果對組合多個肽為有益的概念提供進一步支持。一個引起興趣的趨勢展示，除了肽蟾蜍素2及synB1以外，在前三個模組含有PMO-DPV6-SV40時，W/R表現格外良好。當模組3含有肽KRVK或PHP.eB時，此等三種肽不太有效。在不受特定理論束縛的情況下，此可能起源於由SV40提供之較大淨電荷，大量構築體(例如PMO-DPV6-SV40-R12)具有較高淨正電荷但具有較低活性。

【0201】

實例1：肽製備及純化之通用方法

快速流動肽合成

使用自動化流動肽合成器以0.1-mmol規模合成肽。將200 mg部分之ChemMatrix Rink Amide HYR樹脂裝載至維持在90℃之反應器中。所有試劑在引入至反應器中之前用HPLC泵以80 mL/min流動通過維持於90℃之不鏽鋼環。對於各偶合，將於DMF中含有0.2 M胺基酸及0.17 M HATU之10 mL溶液與200 μL二異丙基乙胺混合且遞送至反應器中。使用10.4 mL之20% (v/v)哌啶實現Fmoc移除。在各步驟間，使用DMF (15 mL)洗滌反應器。特別偶合條件用於精胺酸，其中流速降低至40 mL/min且10 mL於DMF中含有0.2 M Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH及0.17 M PyAOP之溶液與200 μL二異丙基乙胺混合且遞送至反應器。為偶合非天然胺基酸或給肽加帽(例如用4-戊炔酸)，在室溫下將樹脂與4-戊炔酸(1 mmol)(溶解於含有500 μL二異丙基乙胺的2.5 mL 0.4 M HATU於DMF中)一起培育30分鐘。完成合成之後，用DCM洗滌樹脂3次且在真空下乾燥。

【0202】

肽裂解及脫除保護基

各肽在60℃下藉由用5 mL 94%三氟乙酸(TFA)、2.5% 1,2-乙二硫醇(EDT)、2.5%水及1%三異丙基矽烷(TIPS) (v/v)處理7分鐘進行同步的全域側鏈脫除保護基且自樹脂裂解。對於富含精胺酸之序列，在室溫下用由82.5% TFA、5%苯酚、5%苯硫基甲烷、5%水及2.5% EDT (v/v)組成之裂解混合液處理樹脂14小時。藉由使N2鼓泡通過混合物來蒸發TFA。接著添加約40 mL冷乙醚(在-80℃下冷卻)以沈澱且洗滌肽。經由在4,000 rpm下離心三分鐘使粗產物粒化且傾析乙醚。再重複乙醚沈澱及離心兩次。第三次洗滌之後，將集結粒再溶解於50%水及50%含有0.1% TFA之乙腈

中，經由燒結注射器過濾以移除樹脂且凍乾。

【0203】

肽純化

將肽再溶解於水及含有0.1% TFA之乙腈中，經由0.22 μm耐綸過濾器過濾且藉由質量導向半製備型逆相HPLC純化。溶劑A為具有0.1% TFA添加劑之水，且溶劑B為具有0.1% TFA添加劑之乙腈。使用以0.5%/min之速率改變之線性梯度。大多數肽在Agilent Zorbax SB C3管柱：9.4×250 mm，5 μm上純化。極其親水性肽，諸如富含精胺酸之序列，在Agilent Zorbax SB C18管柱：9.4×250 mm，5 μm上純化。使用關於來自儀器之各溶離份的質量資料，僅合並且凍乾純溶離份。溶離份池之純度藉由LC-MS確認。

【0204】 使用實例1之方案，合成表2之肽。

【0205】

實例2：PMO-DBCO合成

將PMO IVS-654 (50 mg，8 μmol)溶解於150 μL DMSO中。向溶液中添加含有2當量之二苯并環辛炔酸(5.3 mg，16 μmol)的溶液，該溶液用HBTU (37.5 μL之0.4 M HBTU於DMF中，15 μmol)及DIEA (2.8 μL，16 μmol)於40 μL DMF中活化(最終反應體積=0.23 mL)。反應在用1 mL水及2 mL氫氧化銨淬滅之前進行25 min。氫氧化銨將水解在反應過程期間形成之任何酯。在1小時之後，溶液經稀釋至40 mL且使用逆相HPLC (Agilent Zorbax SB C3管柱：21.2×100 mm，5 μm)及自2%至60% B (溶劑A：水；溶劑B：乙腈)之線性梯度在58分鐘(1% B/min)內純化。使用來自儀器之關於各溶離份的質量資料，僅合並且凍乾純溶離份。溶離份池之

純度藉由LC-MS確認。

【0206】

實例3：庫合成條件

反應1

將PMO-DBCO以10 mM濃度溶解於水中(以重力方式測定)。將模組2肽以10 mM濃度(以重力方式測定；計算分子量以包括0.5三氟乙酸鹽反離子/離胺酸、精胺酸及組胺酸殘基)溶解於含有0.1%三氟乙酸之水中。在微型離心管中，將50 μL PMO-DBCO溶液與50 μL模組2肽混合。混合溶液且使反應進行一小時。隨後，藉由LC-MS分析產物且藉由凍乾移除溶劑。最後，將產物再懸浮於100 μL DMSO中以提供5 mM溶液且儲存於-20℃下。

【0207】

反應2

藉由將模組3肽及模組4肽以10 mM濃度(以重力方式測定)溶解於水中來製備儲備溶液。對於各反應，在PCR管中使4 μL模組3肽與4 μL模組4肽混合。分開地，藉由在N_2下將1 mL經脫氣DMSO與2.8 mg溴化銅(I)混合以得到20 mM溶液來製備溴化銅溶液。在環境條件下，將4 μL CuBr溶液添加至模組肽3及4之混合物中。將反應物加帽且使反應進行2小時；在反應設置期間存在之少量O_2實質上並不妨礙反應進展。在2小時之後，添加2 μL 100 mM之Na_2HPO_4溶液。隨後音波處理PCR管，渦旋且離心。為移除溶劑，使用設定在35℃下之Savant SPD121P Speed-Vac在真空下離心PCR管2小時。最後，將產物再懸浮於16 μL DMSO中以提供5 mM溶液且儲存於-80℃下。藉由LC-MS分析產物。

【0208】

反應3

最終模組化構築體係經由模組1-2與模組3-4之組合合成。首先，將1.6 μL反應物2添加至384孔盤中。分開地使30 μL反應物1與15 μL TCEP溶液(100 mM TCEP·HCl於50/50含有400 mM NaOH之水/DMSO中)及75 μL DMSO混合。隨後，將1.6 μL反應物1溶液添加至384孔盤中之反應物2中。各個反應最終含有0.4 μL反應物1 (以5 mM於DMSO中)、1.6 μL反應物2 (以5 mM於DMSO中)、0.2 μL TCEP溶液(以100 mM於水/DMSO中)及1 μL DMSO。使用過量反應物2迫使反應完成；銅之存在阻礙此結合之效率。使用反應物1作為限制試劑以避免過量PMO，其為細胞培養分析之活性組分。使反應進行2小時，且隨後將盤儲存在-80℃下。藉由LC-MS分析反應物。

【0209】

實例4：HeLa-654 eGFP分析

在37℃及5% CO_2下將HeLa 654細胞保持在補充有10% (v/v)胎牛血清(FBS)及1% (v/v)青黴素-鏈黴素之MEM中。在治療前十八小時，在96孔盤中以5,000個細胞/孔之密度在補充有10% FBS及1%青黴素-鏈黴素之MEM中塗細胞。實驗當天，藉由將16.8 μL PBS添加至3.2 μL反應混合物中將於DMSO中含有粗反應混合物之384孔盤稀釋至100 μM。隨後，將各構築體在補充有10% FBS及1%青黴素-鏈黴素之MEM中稀釋至5μM。將細胞與濃度為5 μM之各結合物一起在37℃及5% CO_2下培育22小時。接著，抽吸處理培養基，將細胞與胰蛋白酶-EDTA 0.25%在37℃及5% CO_2下一起培育15 min，用PBS洗滌1次，且再懸浮於具有2% FBS及2 μg/mL

碘化丙錠之PBS中。在BD LSRII流動式細胞儀上進行流動式細胞測量術分析。將閘應用於資料，以確保排除對碘化丙錠為高度陽性或具有充分不同於主要細胞群體之正向散射/側散射讀數的細胞。各樣品之上限為5,000個閘控事件。

【0210】 使用Graphpad Prism 7進行分析。對於各樣品，量測平均螢光強度及閘控細胞之數目(圖6及圖7)且計算強度乘以細胞數目(圖5)。

【0211】

以引用方式之併入

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

【0212】

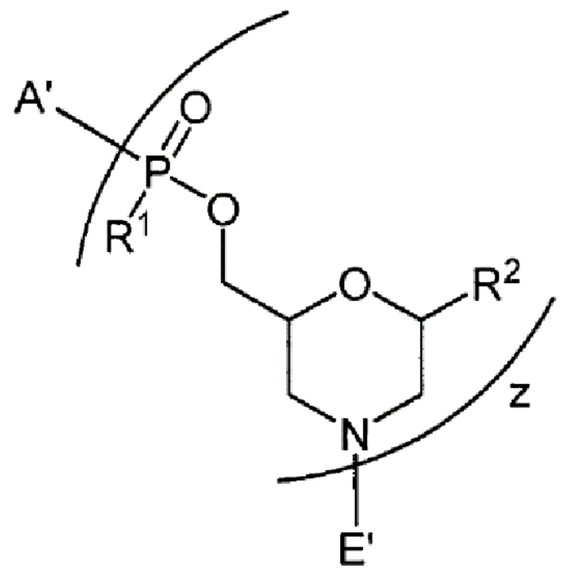
等效物

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

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種式I之三聚合肽-寡核苷酸結合物：

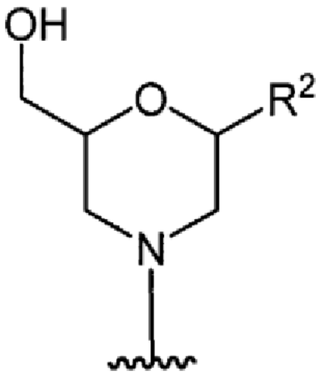


(I)

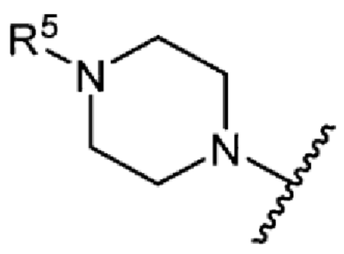
或其醫藥學上可接受之鹽，

其中：

A'選自-N(H)$CH_2C(O)NH_2$、-N(C_{1-6}烷基)$CH_2C(O)NH_2$、



及



，其中

R^5為-C(O)(O-烷基)$_x$-OH，其中x為3至10，且各烷基在每次出現時獨立地為C_{2-6}烷基，

或R^5選自-C(O)C_{1-6}烷基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、-(C_{1-6}烷基)-R^6、-(C_{1-6}雜烷基)-R^6、芳基-R^6、雜芳基-R^6、-C(O)O-(C_{1-6}烷基)-R^6、-C(O)O-芳基-R^6、-C(O)O-雜芳基-R^6及



；

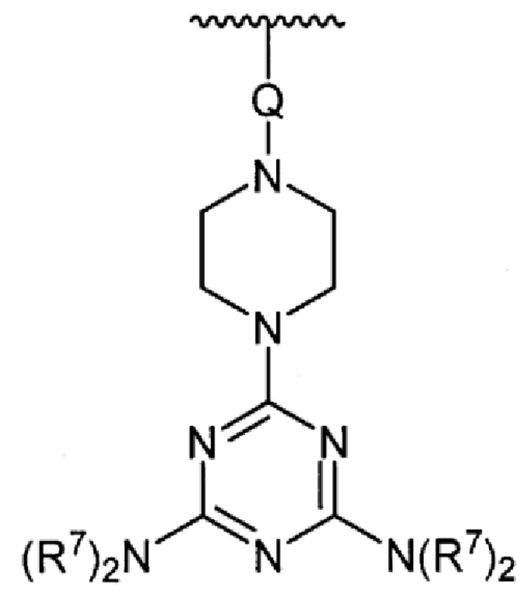
其中R^6選自OH、SH及NH_2，或R^6為O、S或NH，其每一者共價連接至固體支撐物；

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

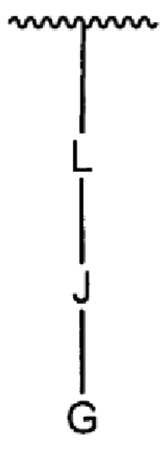
各R^2在每次出現時獨立地選自H、核鹼基及經化學保護基官能化之核鹼基，其中該核鹼基在每次出現時獨立地包含選自吡啶、嘧啶、三氮雜環己烷、嘌呤及去氮嘌呤之C_{3-6}雜環；

z為8至40；及

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



及



；

其中

Q為-C(O)$(CH_2)_6$C(O)-或-C(O)$(CH_2)_2S_2(CH_2)_2$C(O)-；

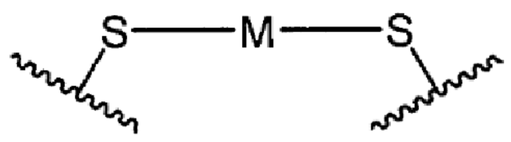
R^7為-$(CH_2)_2$OC(O)N(R^8)$_2$，其中R^8為-$(CH_2)_6$NHC(=NH)NH_2；

L為-C(O)$(CH_2)_{1-6}$-C_{7-15}-雜芳族基-$(CH_2)_{1-6}$C(O)-，其中L藉由醯胺鍵共價連接至J之胺基末端；

J為-P^1-L^1-P^2-L^2-P^3-；

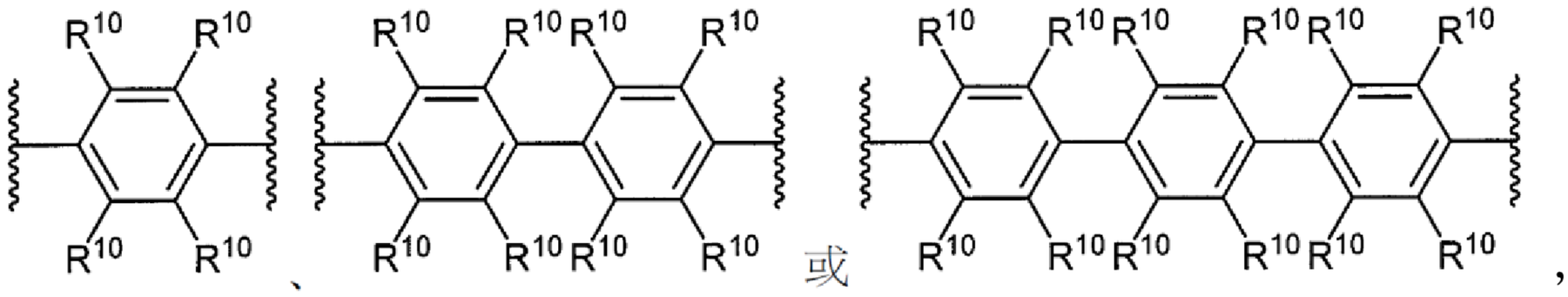
P^1、P^2及P^3各自獨立地為細胞穿透肽，其中P^1及P^2各自包含至少一個末端或內部半胱胺酸殘基，且P^2包含至少一個末端或內部離胺酸殘基；

L^1為



，

M為



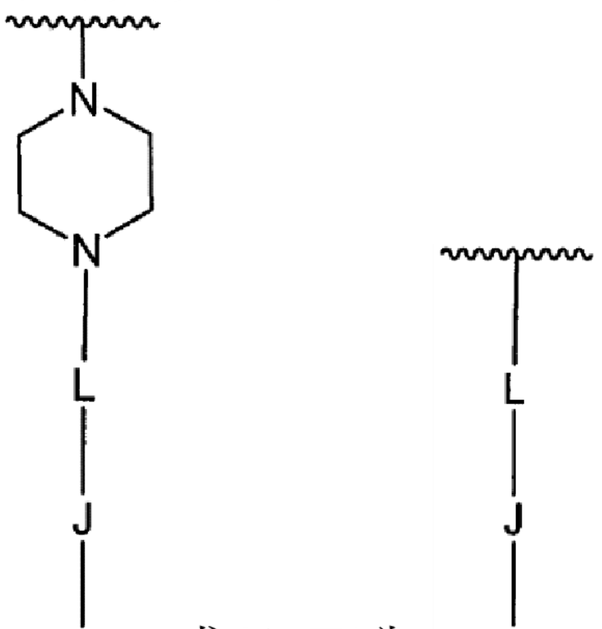
且R^{10}在每次出現時獨立地為H或鹵素，

其中L^1共價連接至P^1及P^2之末端或內部半胱胺酸之側鏈；

L^2為-$(CH_2)_{1-6}$-C_{1-6}-雜芳族基-$(CH_2)_{1-6}C(O)$-，其中L^2共價連接至P^2上之末端或內部離胺酸之側鏈且藉由醯胺鍵共價連接至P^3之胺基末端；

G選自H、-$C(O)C_{1-6}$烷基、苯甲醯基及硬脂醯基，其中G共價連接至J之羧基末端；及

其中以下條件中之至少一者為真實的：



1) A'為 或2) E'為 。

【第2項】

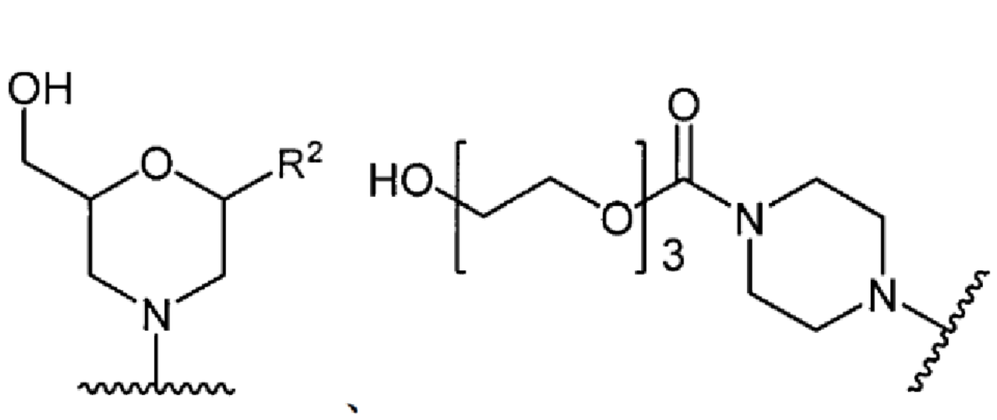
如請求項1之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中E'選自H、-C_{1-6}烷基、-$C(O)C_{1-6}$烷基、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、三甲氧基三苯甲基及

。

【第3項】

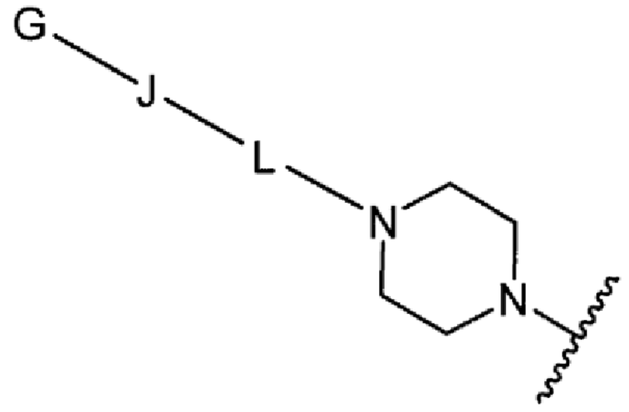
如請求項1之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中

A'選自-N(C_{1-6}烷基)$CH_2C(O)NH_2$、



、

及



。

【第4項】

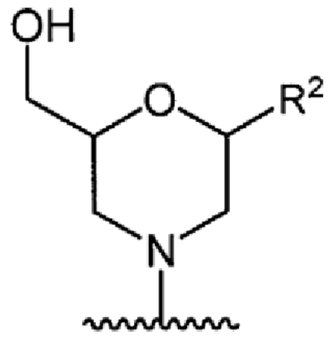
如請求項1之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中E'選自H、-$C(O)CH_3$、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基及



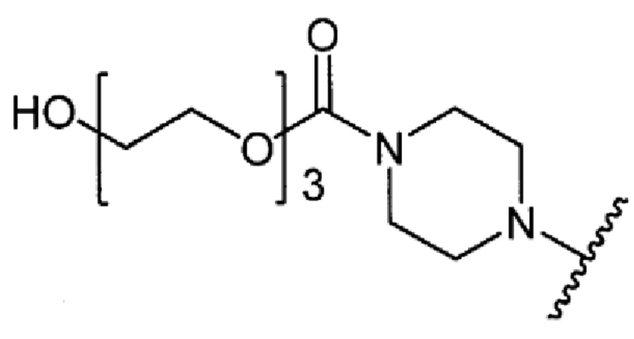
。

【第5項】

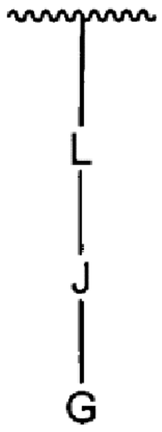
如請求項1之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中A'選自-N(C_{1-6}烷基)$CH_2C(O)NH_2$、



及



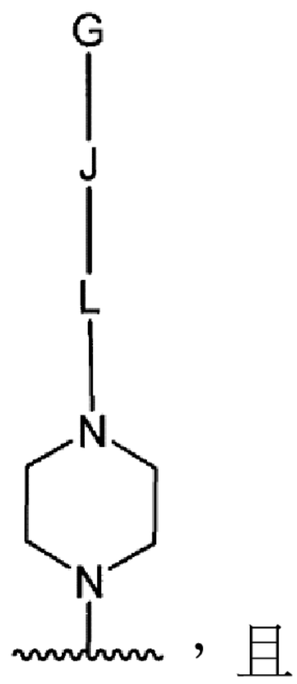
；且



E'為　　。

【第6項】

如請求項1之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中A'為

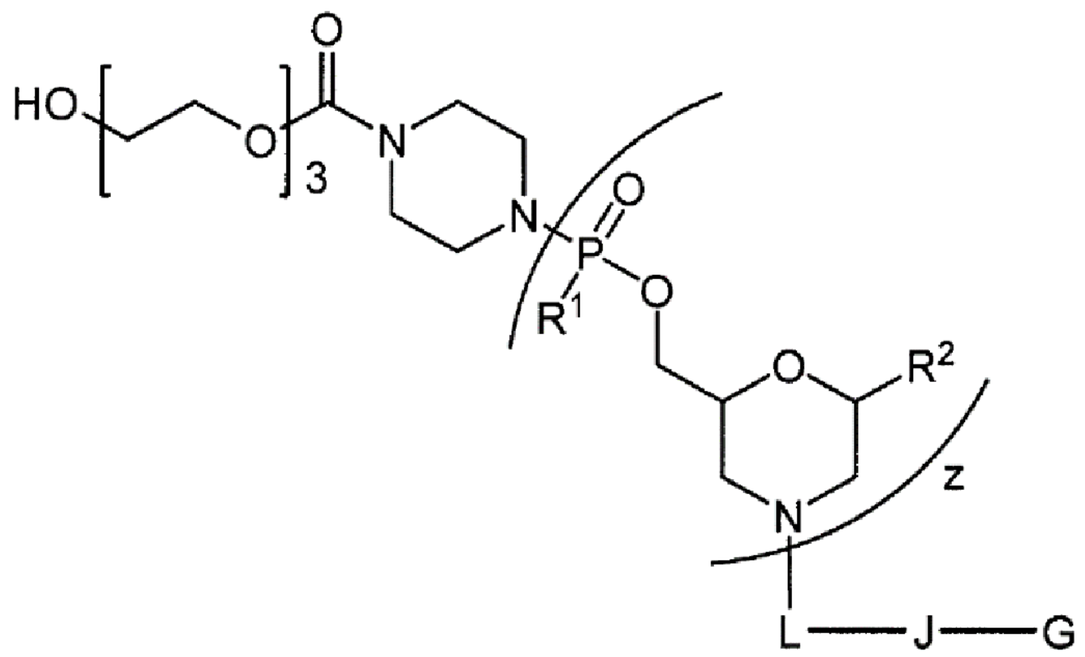


，且

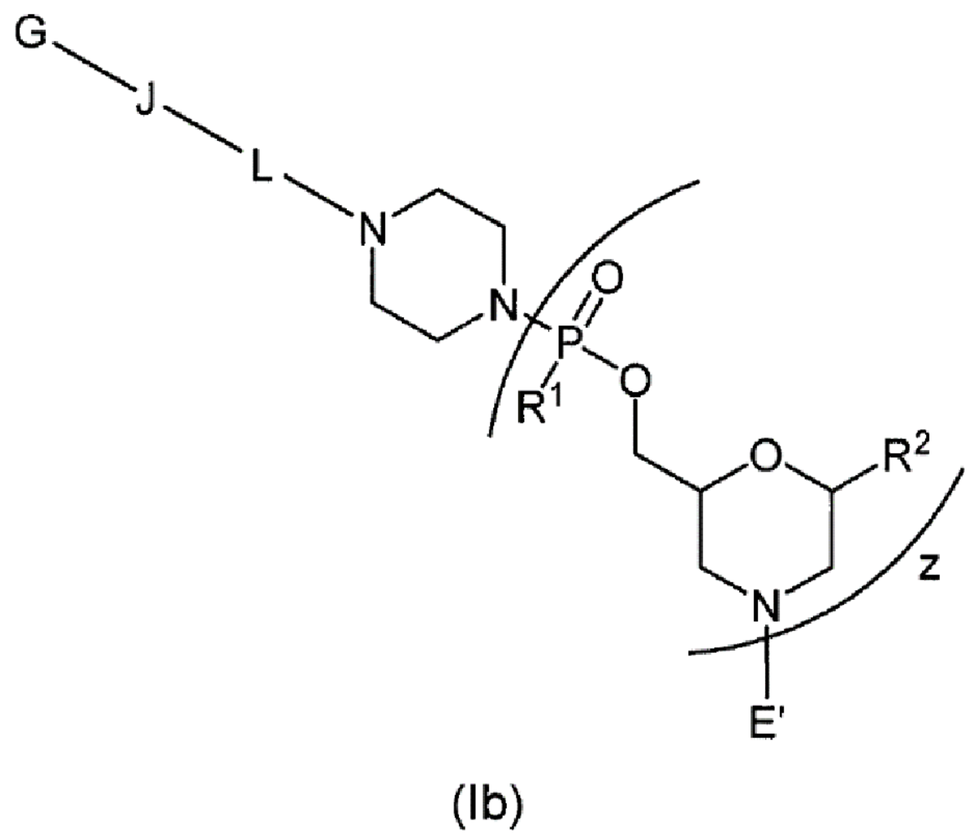
E'選自H、-C(O)CH_3、三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基、苯甲醯基及硬脂醯基。

【第7項】

如請求項1之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中式I之肽-寡核苷酸結合物為選自以下之肽-寡核苷酸結合物：



(Ia)　　；及



(Ib)

其中E'選自H、C_{1-6}烷基、-C(O)CH_3、苯甲醯基及硬脂醯基。

【第8項】

如請求項1或7之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該肽-寡核苷酸結合物具有式(Ia)。

【第9項】

如請求項1或7之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該肽-寡核苷酸結合物具有式(Ib)。

【第10項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該等細胞穿透肽中之每一者獨立地為兩性肽、核靶向肽、核內體分裂肽、嵌合肽、環狀肽、雙環肽或寡精胺酸肽。

【第11項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中P^1為兩性肽。

【第12項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中P^2為核靶向肽。

【第13項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該兩性肽包含疏水性肽基片段及親水性肽基片段，其中該疏水性肽基片段包含2至10個獨立地選自甘胺酸、異白胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之胺基酸的序列，且其中該親水性肽基片段包含2至20個獨立地選自帶電荷胺基酸、不帶電荷但極性胺基酸或疏水性胺基酸之胺基酸的序列，其中該親水性肽基片段包含至少一個非疏水性的胺基酸。

【第14項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該親水性肽基片段包含2至20個獨立地選自精胺酸、離胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、纈胺酸、脯胺酸或甘胺酸之胺基酸的序列，其中該親水性肽基片段包含至少一個非疏水性胺基酸。

【第15項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中P^1為穿膜肽(SEQ. ID. No. 45)、pVEC (SEQ. ID. No. 17)、TP10 (SEQ. ID. No. 52)或DPV6 (SEQ. ID. No. 1)。

【第16項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中P^2為KRVK (SEQ. ID. No. 50)、SV40 (SEQ. ID. No. 53)或AAV-PHP.eB (SEQ. ID. No. 54)。

【第17項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中P^3為DPV6 (SEQ. ID. No. 1)、PPC3 (SEQ. ID. No. 2)、PPC5 (SEQ. ID. No. 3)、R12 (SEQ. ID. No. 4)、R12全循環(SEQ. ID. No. 5)、R12 N-循環(SEQ. ID. No. 6)、R12 C-循環(SEQ. ID. No. 7)、R12苯甲基二循環(SEQ. ID. No. 8)、R12雙循環(SEQ. ID. No. 9)、Bpep (SEQ. ID. No. 10)、Bpep全循環(SEQ. ID. No. 11)、Bpep C-循環(SEQ. ID. No. 12)、 穿膜肽(nle) (SEQ. ID. No. 13)、波紋因子(Engrailed) N-循環(SEQ. ID. No. 14)、波紋因子C-循環(SEQ. ID. No. 15)、波紋因子全循環(SEQ. ID. No. 16)、pVEC (SEQ. ID. No. 17)、pVEC-Bpep (SEQ. ID. No. 18)、AIP6全循環(SEQ. ID. No. 19)、蜂毒素-Bpep (SEQ. ID. No. 20)、Bh3螺旋(SEQ. ID. No. 21)、Bac7 (SEQ. ID. No. 22)、蟾蜍素2 (SEQ. ID. No. 23)、蜂毒素(SEQ. ID. No. 24)、SynB1 (SEQ. ID. No. 25)、S413-PVrev (SEQ. ID. No. 26)、核糖體毒素2 L3 (SEQ. ID. No. 27)、PreS2-TLM (SEQ. ID. No. 28)、MAP (SEQ. ID. No. 29)、 W/R (SEQ. ID. No. 30)、MAP12 (SEQ. ID. No. 31)、SAP (SEQ. ID. No. 32)、SVM1 (SEQ. ID. No. 33)、SVM3 (SEQ. ID. No. 34)、SVM4 (SEQ. ID. No. 35)、YTA4 (SEQ. ID. No. 36)、439a (SEQ. ID. No. 37)、HoxA13絲胺酸2 (SEQ. ID. No. 38)、Bip (SEQ. ID. No. 39)、PPR3 (SEQ. ID. No. 40)、PPR4 (SEQ. ID. No. 41)、AIP6 (SEQ. ID. No. 42)、 DPV15b (SEQ. ID. No. 43)、TAT (SEQ. ID. No. 44)、穿膜肽 (SEQ. ID. No. 45)、R9 (SEQ. ID. No. 46)、HoxA13絲胺酸1 (SEQ. ID. No. 47)、KRVK TP10 (SEQ. ID. No. 48)、TP10 KRVK (SEQ. ID. No. 49)或SV40 TP10 (SEQ. ID. No. 51)。

【第18項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中P^1為DPV6 (SEQ. ID. No. 1)。

【第19項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中P^3為DPV6 (SEQ. ID. No. 1)、Bpep (SEQ. ID. No. 10)、pVEC-Bpep (SEQ. ID. No. 18)、蟾蜍素2 (SEQ. ID. No. 23)、SynB1 (SEQ. ID. No. 25)、W/R (SEQ. ID. No. 30)或AIP6 (SEQ. ID. No. 46)。

【第20項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中P^1為DPV6 (SEQ. ID. No. 1)、P^2為SV40 (SEQ. ID. No. 53)且P^3為DPV6 (SEQ. ID. No. 1)、Bpep (SEQ. ID. No. 10)、pVEC-Bpep (SEQ. ID. No. 18)、蟾蜍素2 (SEQ. ID. No. 23)、SynB1 (SEQ. ID. No. 25)、W/R (SEQ. ID. No. 30)或AIP6 (SEQ. ID. No. 46)。

【第21項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中P^1為DPV6 (SEQ. ID. No. 1)、P^2為SV40 (SEQ. ID. No. 53)且P^3為pVEC-Bpep (SEQ. ID. No. 18)。

【第22項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中P^1為DPV6 (SEQ. ID. No. 1)、P^2為SV40 (SEQ. ID. No. 30)且P^3為W/R (SEQ. ID. No. 30)。

【第23項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中P^1為DPV6 (SEQ. ID. No. 1)、P^2為SV40 (SEQ. ID. No. 30)且P^3為SynB1 (SEQ. ID. No. 25)。

【第24項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中各R^1為$N(CH_3)_2$。

【第25項】

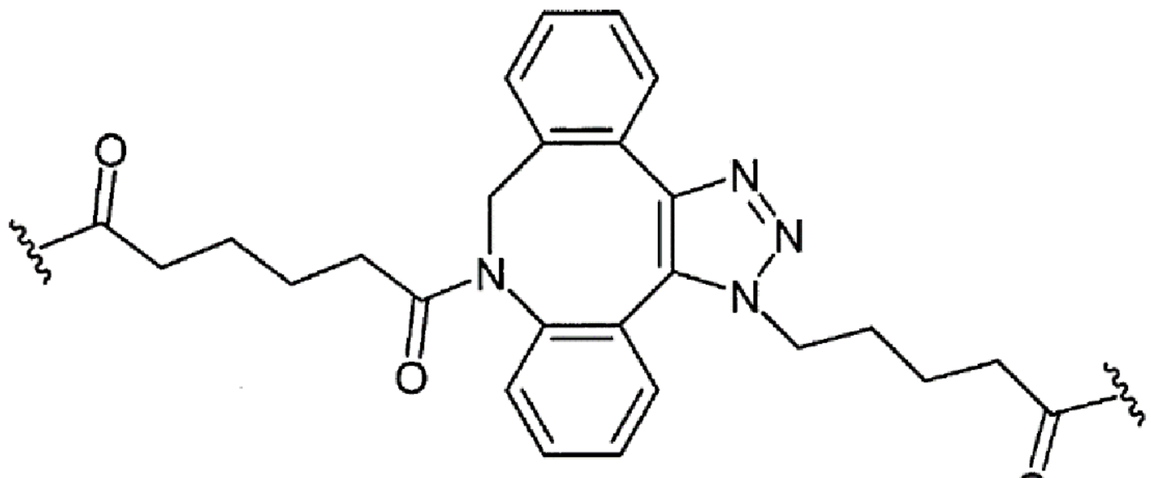
如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中各R^2為核鹼基，其在每次出現時獨立地選自：腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶及次黃嘌呤。

【第26項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中L為$-C(O)(CH_2)_{1-6}$-DBCO-$(CH_2)_{1-6}C(O)-$。

【第27項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中L為

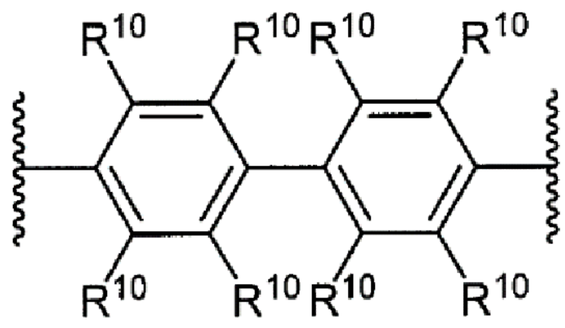


。

【第28項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中

M為

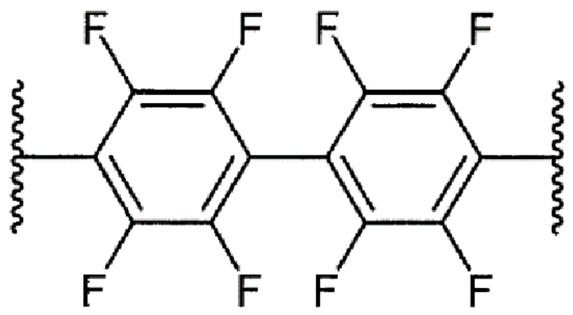


。

【第29項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中

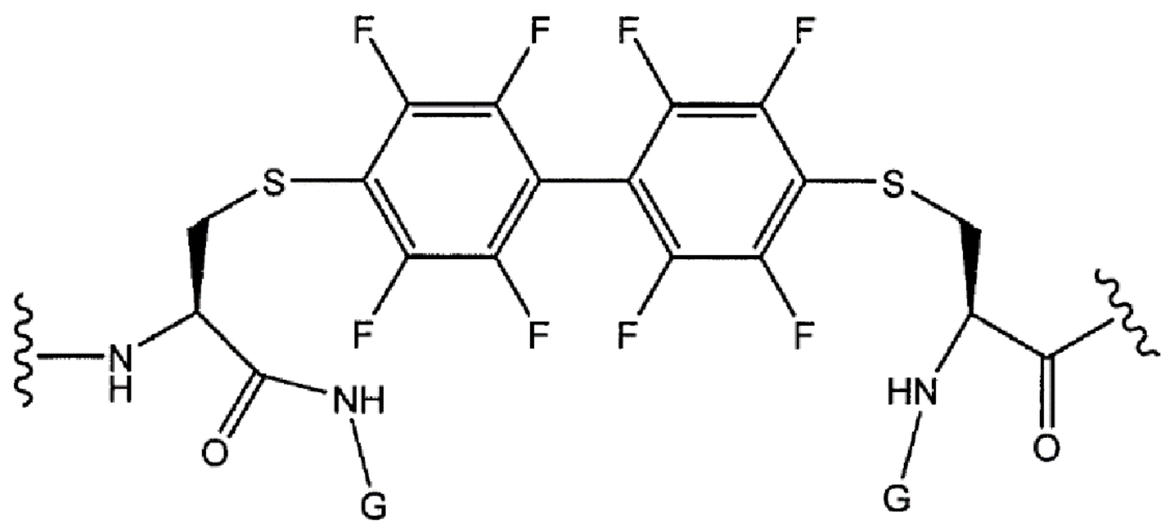
M為



。

【第30項】

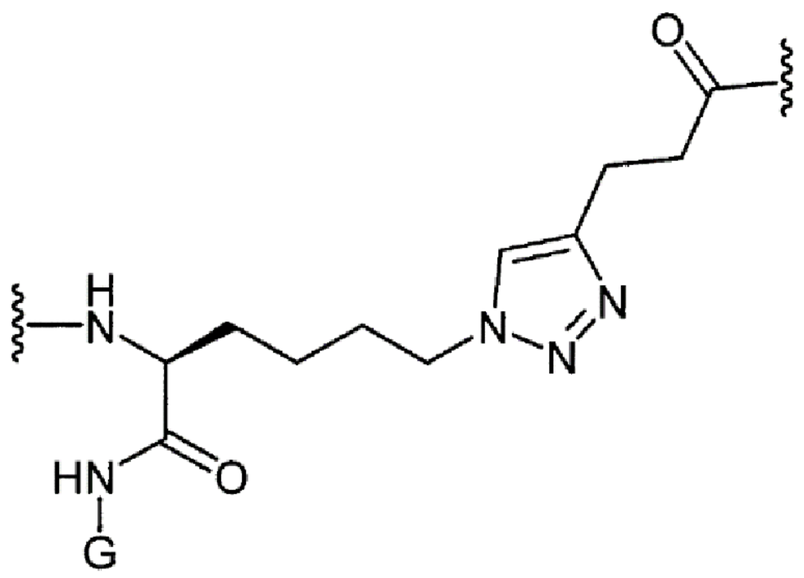
如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中L^1共價連接至P^1及P^2上之末端半胱胺酸之側鏈，形成以下結構：



。

【第31項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中L^2共價連接至P^2上之末端離胺酸之側鏈且藉由醯胺鍵共價連接至P^3之胺基末端，形成以下結構：



。

【第32項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中G選自H、$C(O)CH_3$、苯甲醯基及硬脂醯基。

【第33項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中G為H或$-C(O)CH_3$。

【第34項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中G為H。

【第35項】

如請求項1至7中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中G為$-C(O)CH_3$。

【第36項】

如請求項1之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中與非結合寡核苷酸相比，該三聚合寡核苷酸-肽結合物顯示在攝取改良至少20倍。

【第37項】

如請求項1之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中與非三聚合寡核苷酸-肽結合物相比，該三聚合寡核苷酸-肽結合物顯

示在攝取改良至少三倍。

【第38項】

如請求項1之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中與對應非三聚合穿膜肽-肽結合物相比，該三聚合寡核苷酸-肽結合物顯示在攝取有改良。

【第39項】

一種組合物，其包含如請求項1至38中任一項之三聚合肽-寡核苷酸結合物或其醫藥學上可接受之鹽及至少一醫藥學上可接受之載劑。

【第40項】

一種如請求項39之組合物之用途，其用於製造用以治療有需要個體之疾病的藥劑。

【第41項】

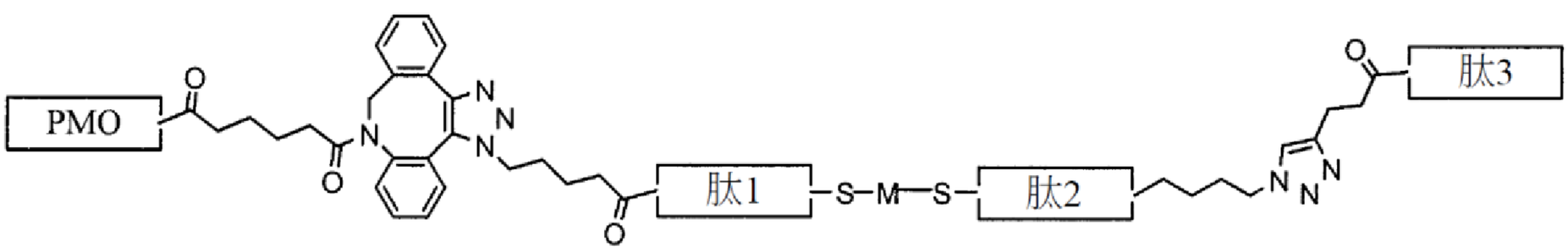
如請求項40之用途，其中該疾病為神經肌肉疾病。

【第42項】

如請求項41之用途，其中該神經肌肉疾病係杜興氏肌肉失養症(Duchenne muscular dystrophy)。

【第43項】

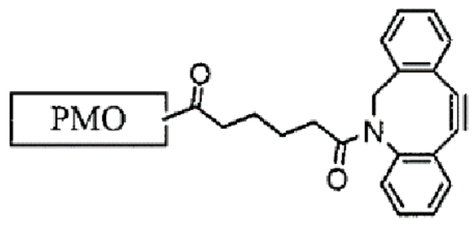
一種用於製備式(II)之三聚合肽-寡核苷酸結合物之方法：



(II)

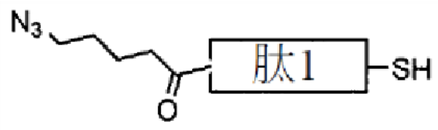
其包含：

(a) 使式(III)之化合物



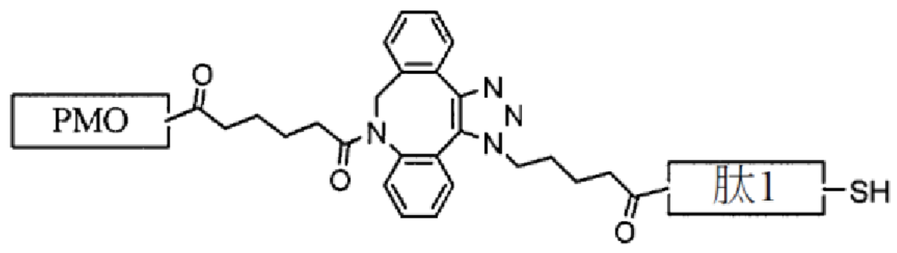
(III)

與式(IV)之化合物



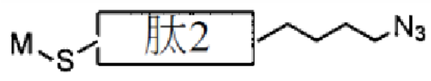
(IV)

在酸存在下接觸，形成式(V)之化合物，



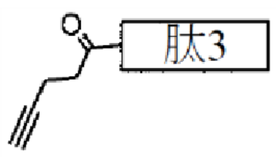
(V)

(b) 使式(VI)之化合物



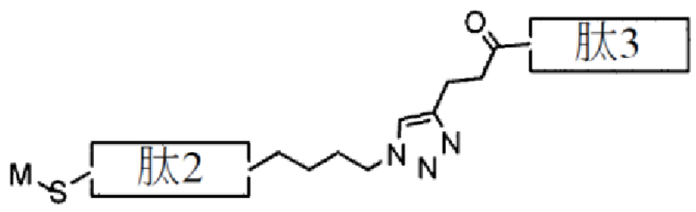
(VI)

與式(VII)之化合物



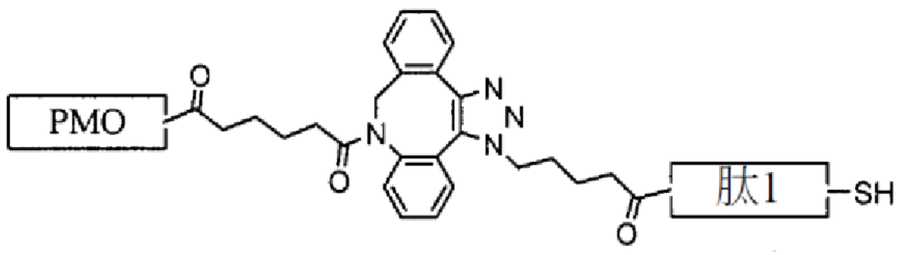
(VII)

在銅催化劑存在下接觸，形成式(VIII)之化合物，



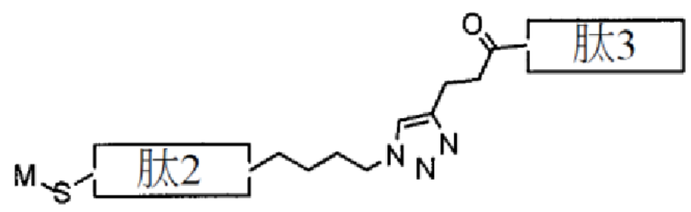
(VIII)

(c) 使式(V)之化合物



(V)

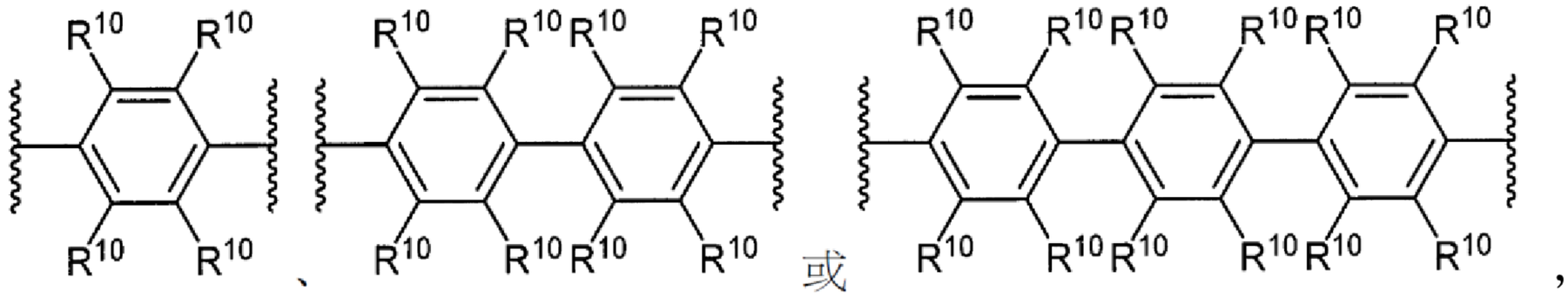
與式(VIII)之化合物



(VIII)

在偶合試劑存在下接觸，形成式(II)之化合物；

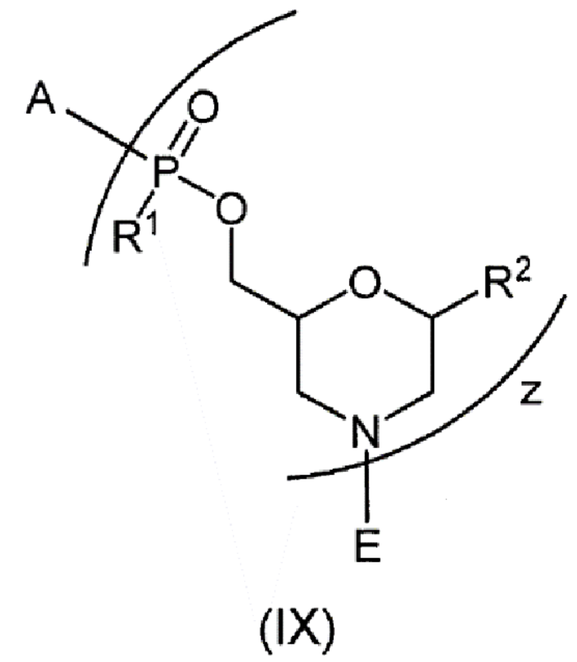
其中M為



，

且R^{10}在每次出現時獨立地為H或鹵素，其中M共價連接至在P^1及P^2上之末端或內部半胱胺酸之側鏈；

其中該PMO為式IX之寡核苷酸：

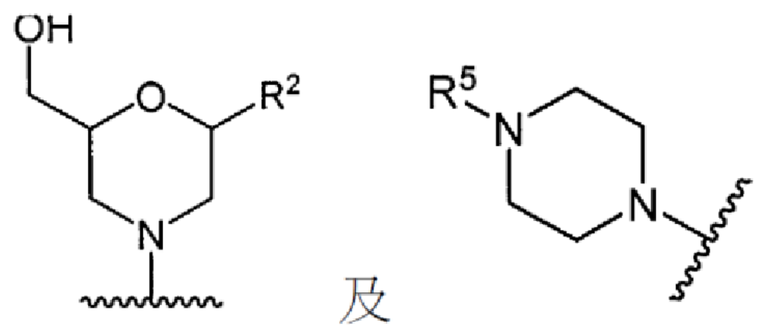


(IX)

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

A選自由以下組成之群：OH、$-NHCH_2C(O)NH_2$、$-N(C_{1-6}$烷基$)CH_2C(O)NH_2$、



；

R^5為$-C(O)(O-$烷基$)_xOH$，其中x為3至10且各烷基在每次出現時獨

立地為-C_{2-6}烷基，或R^5選自由以下組成之群：-C(O)C_{1-6}烷基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、-C_{1-6}烷基-R^6、-C_{1-6}雜烷基-R^6、-芳基-R^6、-雜芳基-R^6、-C(O)O-C_{1-6}烷基-R^6、-C(O)O-芳基-R^6及-C(O)O-雜芳基-R^6，或R^5為該三聚合肽之連接點；

R^6選自由以下組成之群：OH、SH及NH_2，或R^6為共價連接至固體支撐物之O、S或NH；

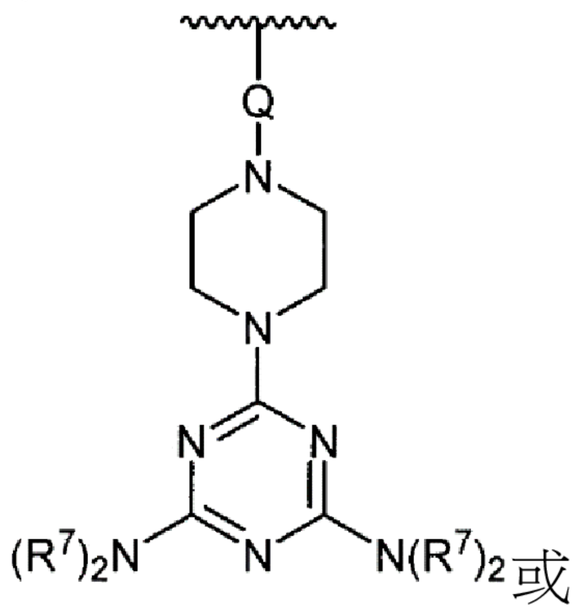
各R^1獨立地為OH或-NR^3R^4；

各R^3及R^4在每次出現時獨立地為-C_{1-6}烷基；

各R^2獨立地選自由以下組成之群：H、核鹼基及用化學保護基官能化之核鹼基，其中該核鹼基在每次出現時獨立地包含選自由吡啶、嘧啶、三氮雜環己烷、嘌呤及去氮嘌呤組成之群的C_{3-6}雜環；

z為8至40；

E選自由以下組成之群：H、-C_{1-6}烷基、-C(O)C_{1-6}烷基、苯甲醯基、硬脂醯基、三苯甲基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、三甲氧基三苯甲基及



或

E為該三聚合肽之連接點；

Q為-C(O)$(CH_2)_6$C(O)-或-C(O)$(CH_2)_2S_2(CH_2)_2$C(O)-；

R^7為-$(CH_2)_2$OC(O)N$(R^8)_2$；及

R^8為-$(CH_2)_6$NHC(=NH)NH_2。

【第44項】

如請求項43之方法，其中步驟(a)之酸為三氟乙酸。

【第45項】

如請求項43之方法，其中步驟(b)之銅催化劑為溴化銅(I)。

【第46項】

如請求項43之方法，其中步驟(c)之偶合試劑為三(2-羧乙基)膦鹽酸鹽(TCEP)。

【第47項】

如請求項43至46中任一項之方法，其中用於步驟(a)之溶劑為水，用於步驟(b)之溶劑為水/DMSO，且用於步驟(c)之溶劑為水/DMSO。

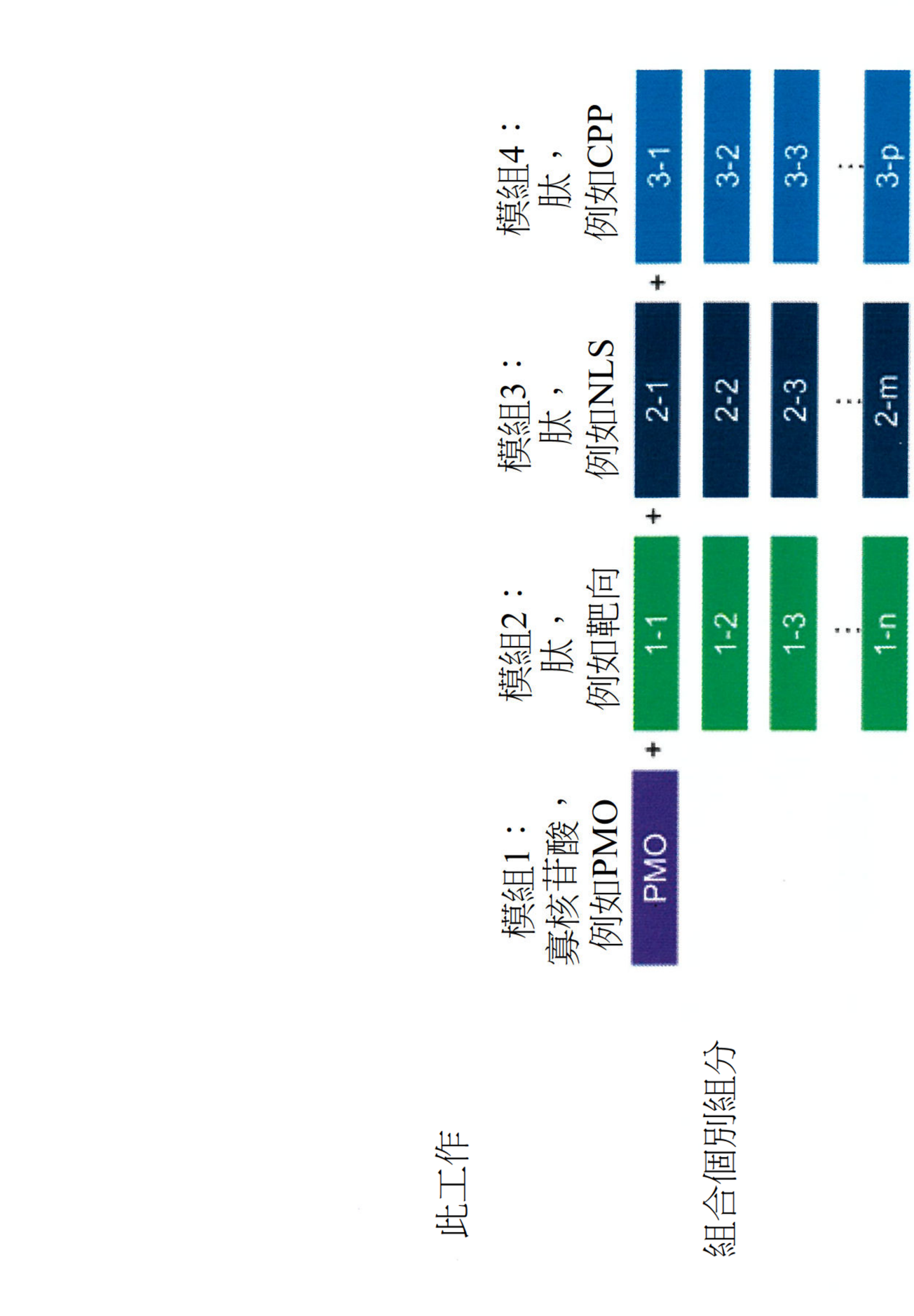
【第48項】

如請求項43至46中任一項之方法，其中步驟(a)及(b)之產物對步驟(c)之反應條件為惰性的。

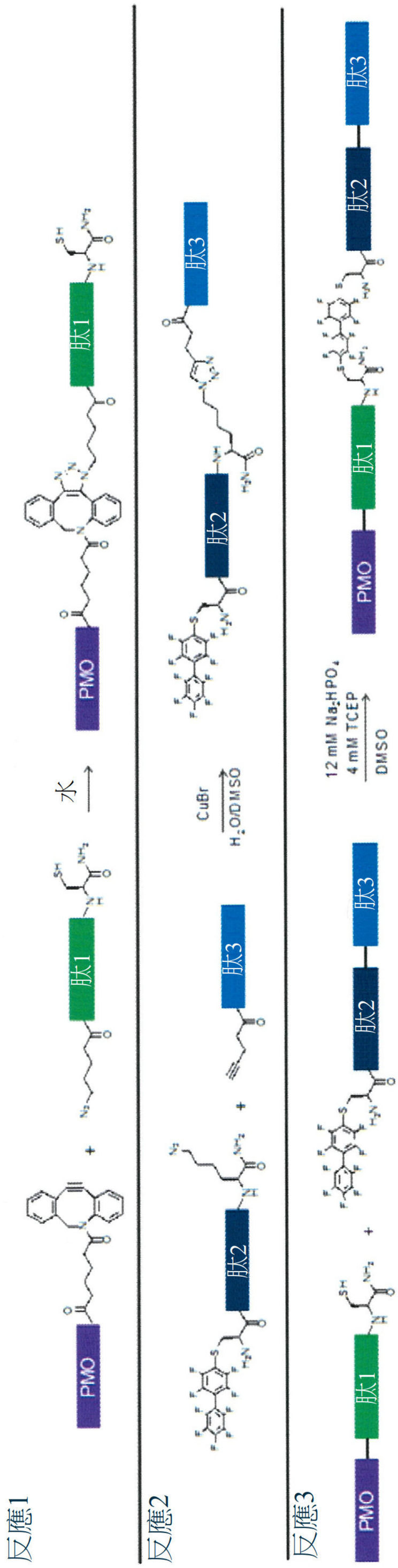
【第49項】

如請求項43至46中任一項之方法，其中步驟(a)及(b)之產物可不經任何純化用於步驟(c)中。

【發明圖式】


模組2：
肽，
例如靶向
模組3：
肽，
例如NLS
模組4：
肽，
例如CPP
1-1
1-2
1-3
1-n
2-1
2-2
2-3
2-m
3-1
3-2
3-3
3-p
+
...
生物結合
模組1：
寡核苷酸，
例如PMO
PMO
1-1
2-3
3-1
此工作
組合個別組分
實例PMO-肽結合物
分別合成數百個構築體且測試其活性

【圖1】


肽1
肽3
肽2
肽3
PMO
水
CuBr
H2O/DMSO
12 mM Na2HPO4
4 mM TCEP
DMSO
肽3
肽2
肽1
PMO
肽1
肽3
肽2
PMO
反應1
反應2
反應3

【圖2】

模組1

PMO	序列
IVS2-654	GCTATTACCTTAACCCAG

模組2

肽1	序列
穿膜肽	RQIKIWFQNRRMKWKK
pVEC	LLIILRRRIRKQAHAHSK
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL
DPV6	GRPRESGKKRKRKRLKP

模組3

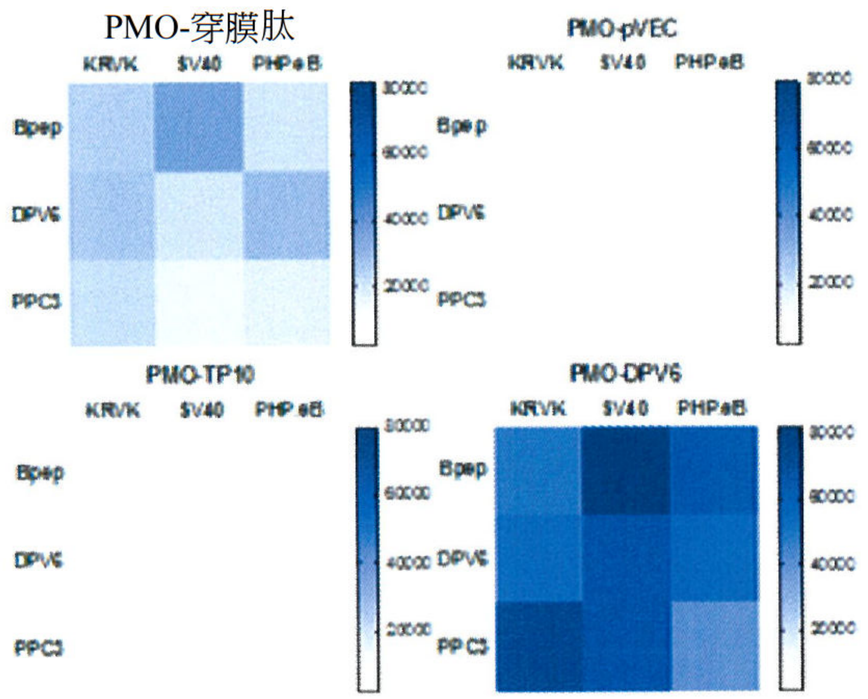
肽2	序列
KRVK (NLS)	KRVK
SV40 (NLS)	PKKKRKV
AAV-PHP.eB	SDGTLAVPFKA

模組4

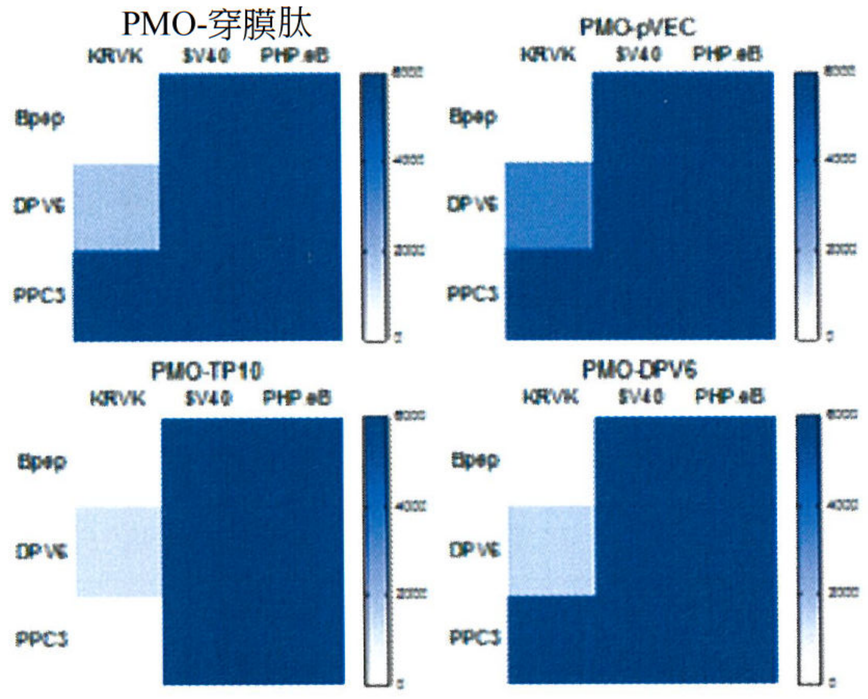
肽3	序列
Bpep	RXRRBRRXRRBR
DPV6	GRPRESGKKRKRKRLKP
PPC3	KKYRGRKRHPR

【圖3】

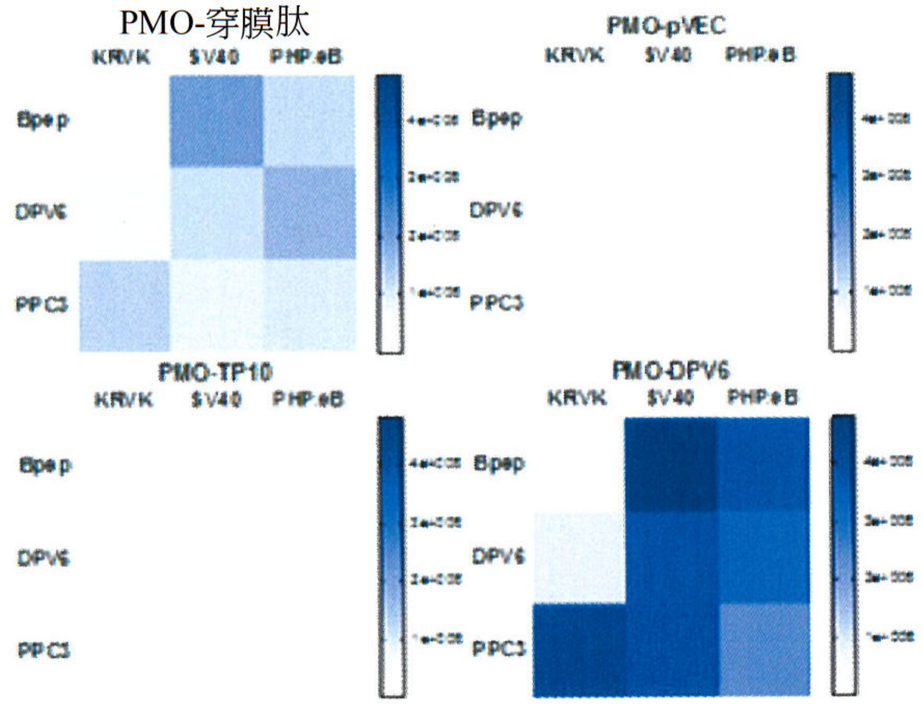
A)FITC平均螢光



B)細胞計數



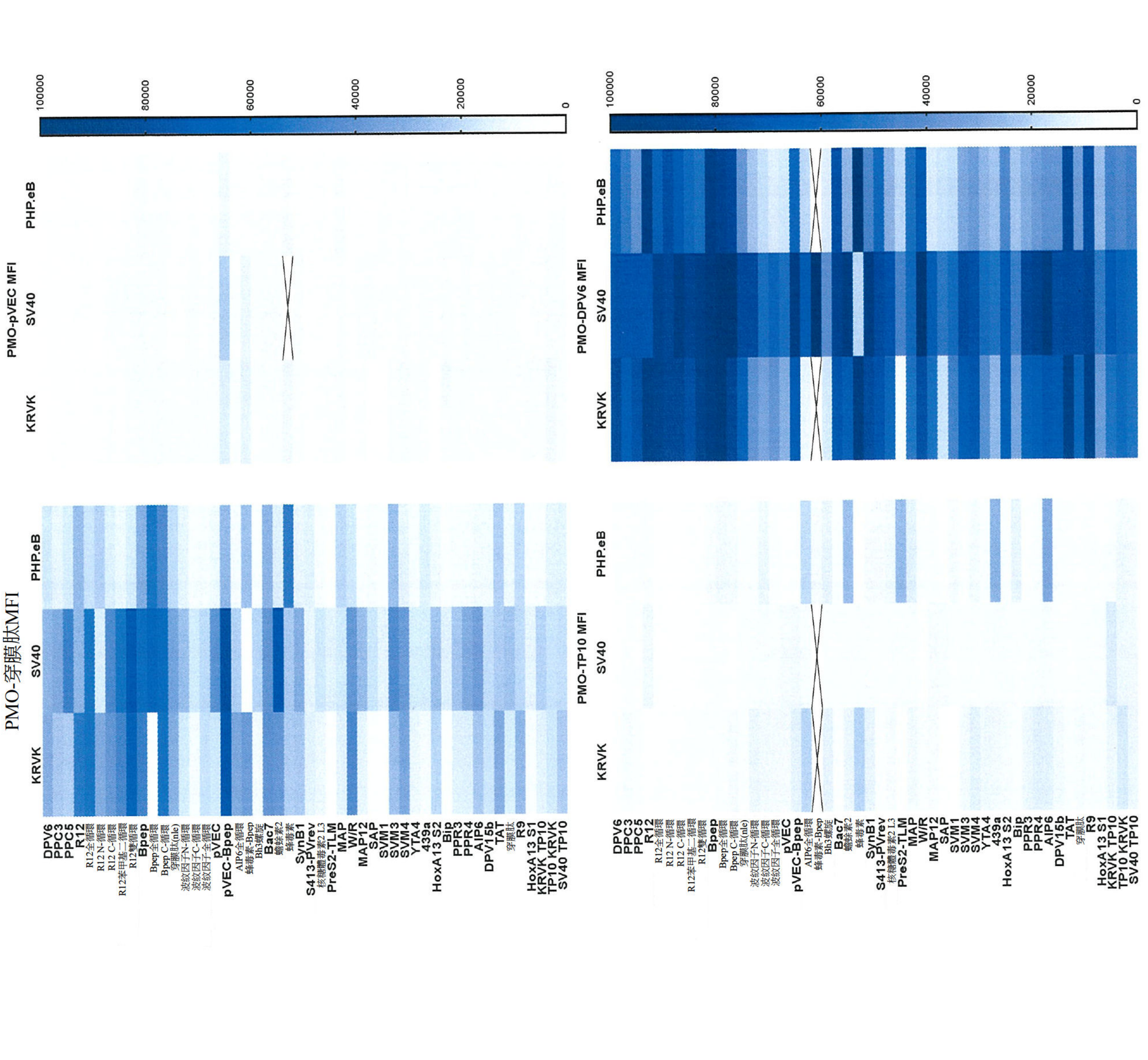
C)FITC平均值×細胞計數



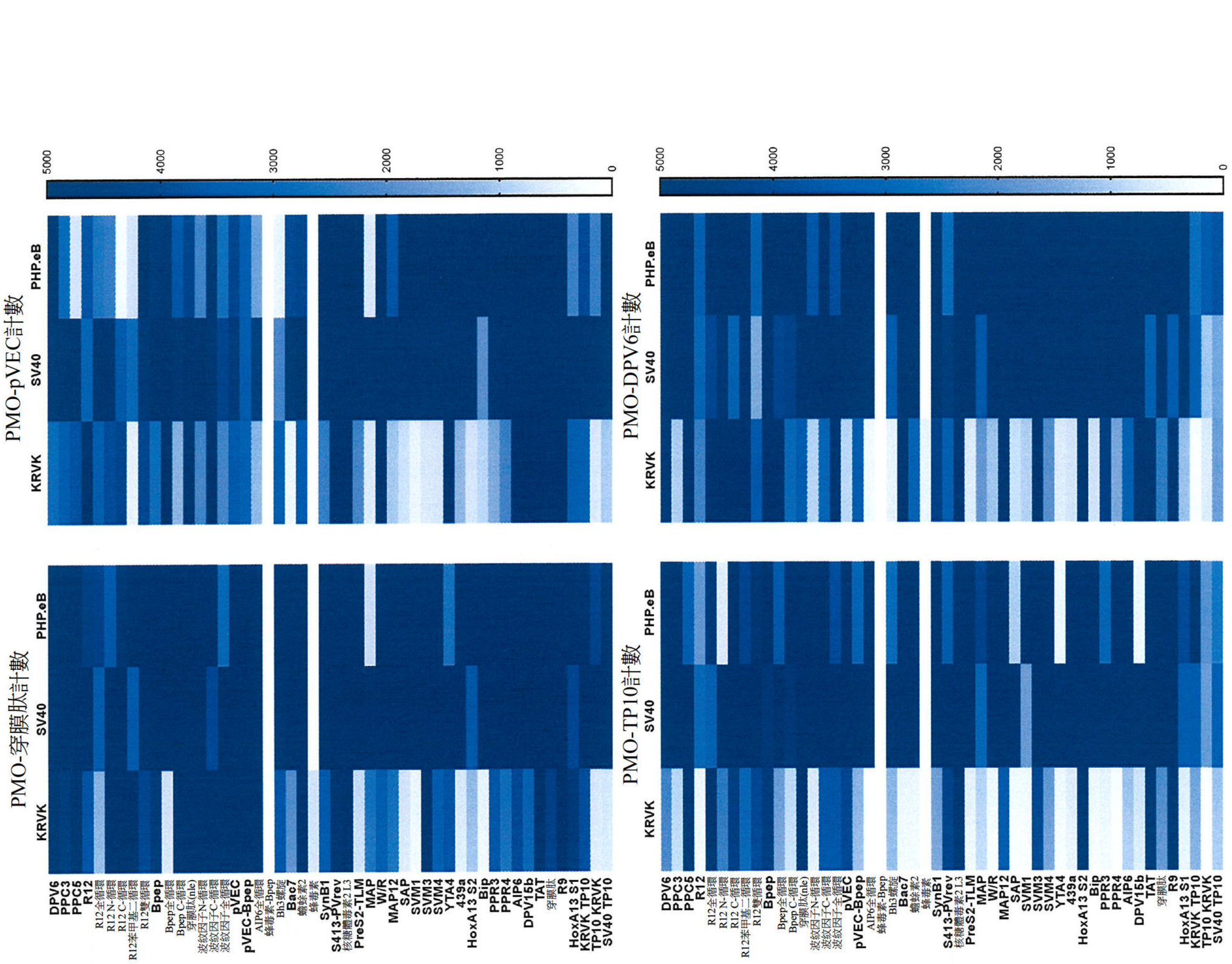
【圖4】

【圖5】

C223000DA.pdf
108126853 表單編號 A0202


PMO-穿膜肽MFI
KRVK
SV40
PHP.eB
DPV6
PPC3
PPC5
R12
R12全循環
R12 N-循環
R12 C-循環
R12苯甲基二循環
R12雙循環
Bpep
Bpep全循環
Bpep C-循環
穿膜肽(nle)
波紋因子N-循環
波紋因子C-循環
波紋因子全循環
pVEC
pVEC-Bpep
AIP6全循環
蜂毒素-Bpep
Bh3螺旋
Bac7
蠕蛛素2
蜂毒素
SynB1
S413-PVrev
核糖體毒素2 L3
PreS2-TLM
MAP
W/R
MAP12
SAP
SVM1
SVM3
SVM4
YTA4
439a
HoxA13 S2
Bip
PPR3
PPR4
AIP6
DPV15b
TAT
穿膜肽
R9
HoxA13 S1
KRVK TP10
TP10 KRVK
SV40 TP10
PMO-TP10 MFI
KRVK
SV40
PHP.eB
100000
80000
60000
40000
20000
0
PMO-pVEC MFI
KRVK
SV40
PHP.eB
PMO-DPV6 MFI
KRVK
SV40
PHP.eB

【圖6】


PMO-pVEC計數
KRVK
SV40
PHP.eB
5000
4000
3000
2000
1000
0
PMO-DPV6計數
KRVK
SV40
PHP.eB
5000
4000
3000
2000
1000
0
PMO-穿膜肽計數
KRVK
SV40
PHP.eB
DPV6
PPC3
PPC5
R12
R12全循環
R12 N-循環
R12 C-循環
R12苯甲基二循環
R12雙循環
Bpep
Bpep全循環
Bpep C-循環
穿膜肽(nle)
波紋因子N-循環
波紋因子C-循環
波紋因子全循環
pVEC
pVEC-Bpep
AIP6全循環
蜂毒素-Bpep
Bh3螺旋
Bac7
蜱蛛素2
蜂毒素
SynB1
S413-PVrev
核糖體毒素2L3
PreS2-TLM
MAP
W/R
MAP12
SAP
SVM1
SVM3
SVM4
YTA4
439a
HoxA13 S2
Bip
PPR3
PPR4
AIP6
DPV15b
TAT
穿膜肽
R9
HoxA13 S1
KRVK TP10
TP10 KRVK
SV40 TP10
PMO-TP10計數
KRVK
SV40
PHP.eB
DPV6
PPC3
PPC5
R12
R12全循環
R12 N-循環
R12 C-循環
R12苯甲基二循環
R12雙循環
Bpep
Bpep全循環
Bpep C-循環
穿膜肽(nle)
波紋因子N-循環
波紋因子C-循環
波紋因子全循環
pVEC
pVEC-Bpep
AIP6全循環
蜂毒素-Bpep
Bh3螺旋
Bac7
蜱蛛素2
蜂毒素
SynB1
S413-PVrev
核糖體毒素2L3
PreS2-TLM
MAP
W/R
MAP12
SAP
SVM1
SVM3
SVM4
YTA4
439a
HoxA13 S2
Bip
PPR3
PPR4
AIP6
DPV15b
TAT
穿膜肽
R9
HoxA13 S1
KRVK TP10
TP10 KRVK
SV40 TP10

【圖7】