



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I794197 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：106144429

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 18 日

(51)Int. Cl. : A61K48/00 (2006.01)

A61K31/675 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/12/19 美國

62/436,223

2017/01/06 美國

62/443,484

2017/03/30 美國

62/479,178

2017/09/22 美國

62/562,146

(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：帕西尼 馬可 APASSINI, MARCO A. (US)；韓森 甘納 JHANSON, GUNNAR

J. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2014/153240A2

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：20 共 165 頁

(54)名稱

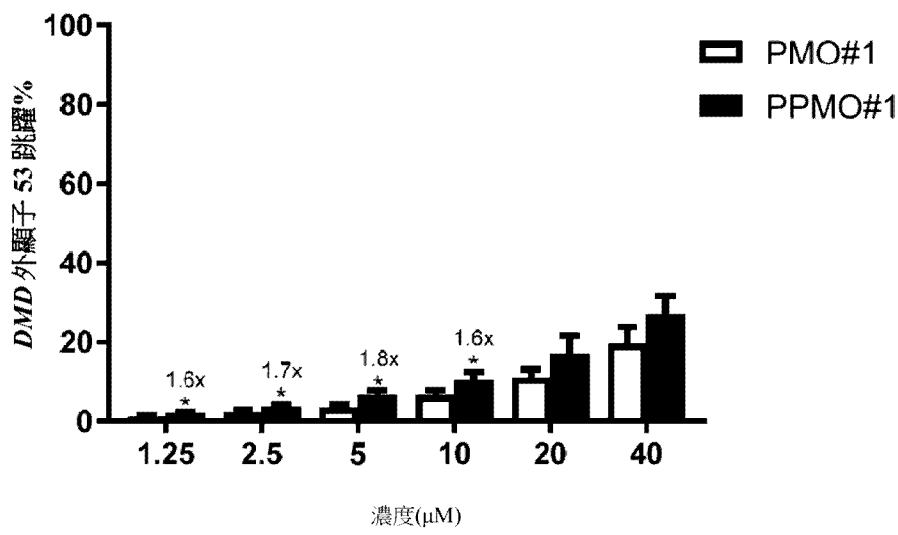
用於肌肉萎縮症之外顯子跳躍寡聚物結合物

(57)摘要

本文闡述用於誘導外顯子 53 跳躍之與人類肌肉萎縮蛋白基因中之所選靶位點互補之反義寡聚物結合物。

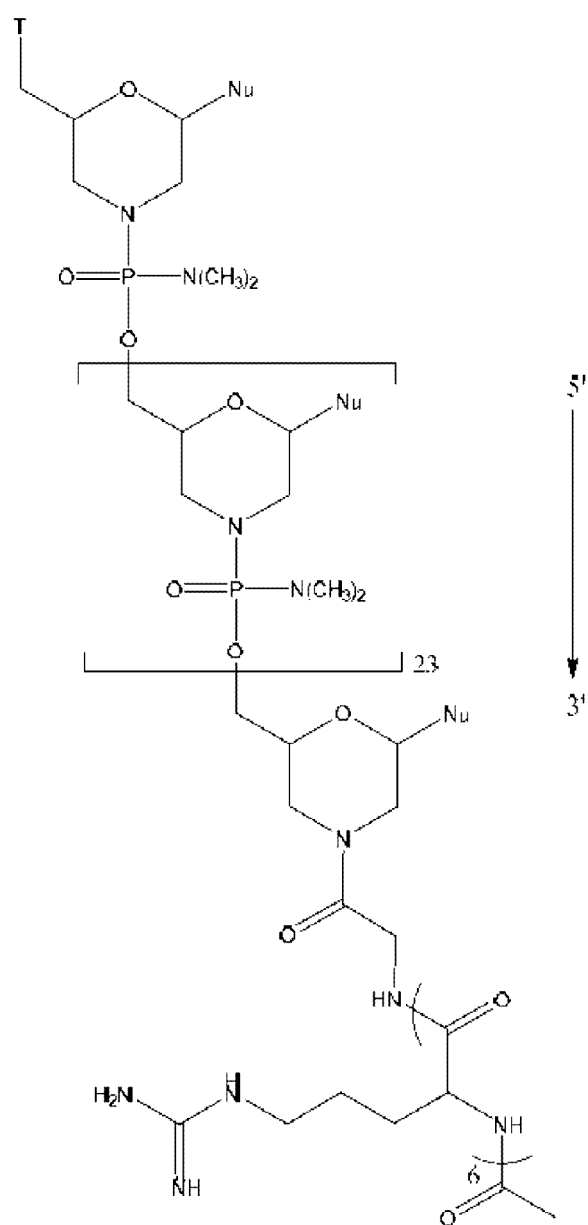
Antisense oligomer conjugates complementary to a selected target site in the human dystrophin gene to induce exon 53 skipping are described.

指定代表圖：



【圖 4】

特徵化學式：



(I)



I794197

【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結合物

【英文發明名稱】

EXON SKIPPING OLIGOMER CONJUGATES FOR MUSCULAR
DYSTROPHY

【中文】

本文闡述用於誘導外顯子53跳躍之與人類肌肉萎縮蛋白基因中之所
選靶位點互補之反義寡聚物結合物。

【英文】

Antisense oligomer conjugates complementary to a selected target
site in the human dystrophin gene to induce exon 53 skipping are
described.

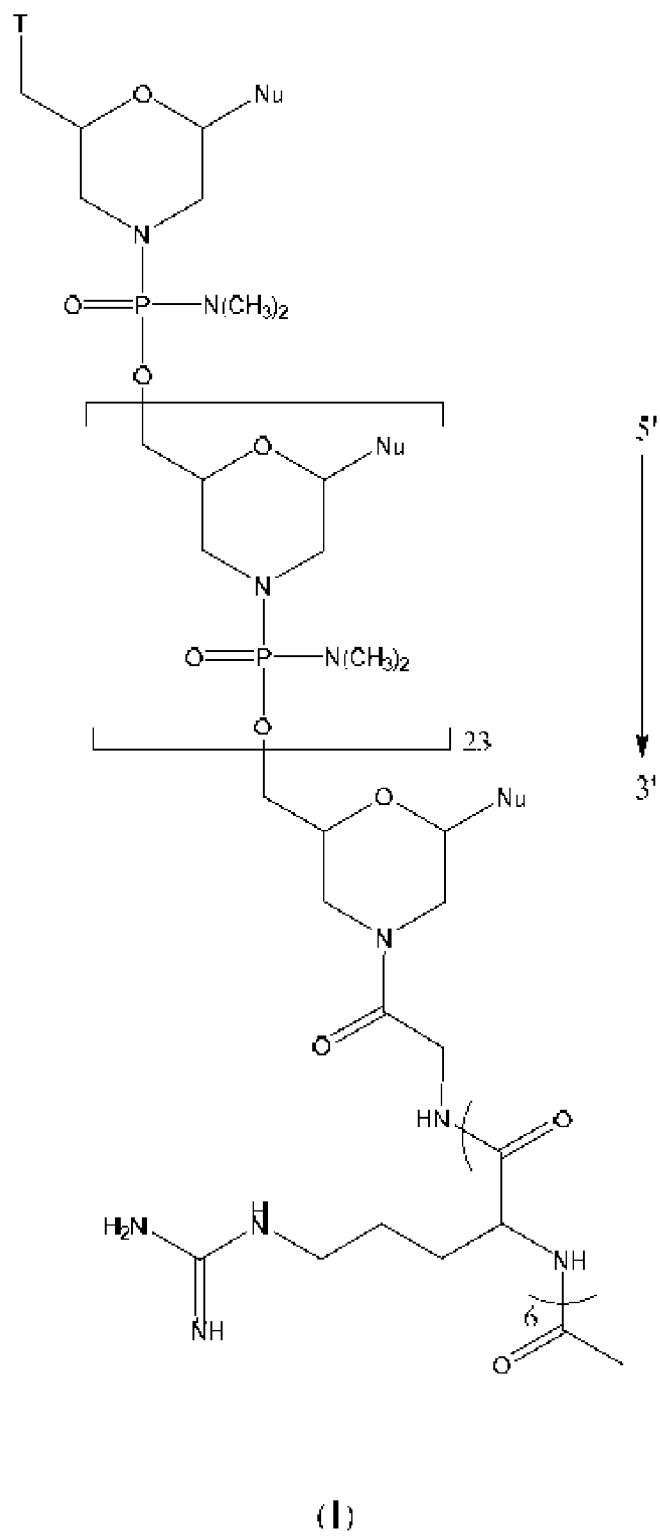
【指定代表圖】

圖4

【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結合物

【英文發明名稱】

EXON SKIPPING OLIGOMER CONJUGATES FOR MUSCULAR
DYSTROPHY

【技術領域】

本發明係關於適於人類肌肉萎縮蛋白基因之外顯子53跳躍之新穎反義寡聚物結合物及其醫藥組合物。本發明亦提供使用新穎反義寡聚物結合物誘導外顯子53跳躍之方法、在具有適於外顯子53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53跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變之個體之方法。

【先前技術】

反義技術正在使用一系列在多個不同層級(轉錄、剪接、穩定性、轉譯)上影響基因表現之化學進行研發。大量該研究已集中在使用反義化合物來校正或補償眾多適應症中之異常或疾病相關基因。反義分子能夠特异性抑制基因表現，且為此許多致力於使用寡聚物作為基因表現調節劑之研究已集中在抑制經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RNA，即有義鏈(例如mRNA)或負鏈(在一些病毒RNA靶之情形下)。為達成特定基因下調之期望效應，寡聚物通常促進經靶向mRNA之衰變、阻斷mRNA之轉譯或阻斷順式作用RNA元件之功能，藉此有效地阻止靶蛋白之重新合成或病毒RNA之複製。

然而，該等技術無法用於目標係上調天然蛋白質之產生或補償引起

轉譯過早終止之突變(例如無義或框移突變)時。在該等情形下，缺陷性基因轉錄本不應經受經靶向降解或空間抑制，因此反義寡聚物化學不應促進靶mRNA衰變或阻斷轉譯。

在多種遺傳病中，可經由剪接過程期間之經靶向外顯子跳躍方法來調節突變對最終基因表現之效應。剪接過程係由複雜的多組分機構引導，該機構使前mRNA中之相鄰外顯子-內含子接合處緊密靠近且在內含子末端實施磷酸二酯鍵之裂解及其隨後在欲剪接在一起之外顯子之間的再形成。此複雜且高度精密之過程係由前mRNA中為相對較短之半保守RNA區段之序列基序調介，該等區段與隨後參與剪接反應之多種核剪接因子結合。藉由改變剪接機構讀取或識別參與前mRNA加工之基序之方式，可產生差異剪接之mRNA分子。現已意識到，大多數人類基因在正常基因表現期間選擇式剪接，但尚未鑑別出所涉及機制。Bennett等人(美國專利第6,210,892號)闡述使用不會引起RNase H介導之靶RNA裂解之反義寡聚物類似物的野生型細胞mRNA加工之反義調節。此發現在能夠產生缺少特異性外顯子之選擇式剪接mRNA中的效用(例如，參見如Sazani, Kole等人，2007關於缺少編碼跨膜結構域之外顯子之可溶性TNF超家族受體之產生所述)。

在正常功能蛋白因其中之突變過早終止之情形下，已顯示在剪接過程期間經由介入使經由反義技術恢復一定功能蛋白產生之方法成為可能，且若可自一些基因特異性缺失與致病性突變相關之外顯子，則有時可產生縮短的蛋白產物，其具有天然蛋白質之相似生物性質或具有足夠生物活性以改善由與外顯子相關之突變引起之疾病(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)揭示使用不會促進經靶向前mRNA衰變之經修飾反義寡聚物類似物抵抗異常剪接之方法。Bennett等人(美國專利第6,210,892號)闡述亦使用不會引起RNase H介導之靶RNA裂解之反義寡聚物類似物的野生型細胞mRNA加工之反義調節。

經靶向外顯子跳躍之方法可能尤其可用於存在許多外顯子及內含子、外顯子之遺傳組成具有冗餘性或蛋白質能夠在沒有一或多個特定外顯子下發揮功能之長基因中。致力於重定向基因加工來治療與由多個基因突變引起之截短相關之遺傳病已集中在使用以下反義寡聚物：(1) 與參與剪接過程之元件完全或部分重疊；或(2) 結合至前mRNA之足夠靠近該元件之位置以破壞結合及通常將調介在該元件處發生之特定剪接反應之剪接因子的功能。

杜興氏肌肉萎縮症(duchenne muscular dystrophy, DMD)係由肌肉萎縮蛋白之表現缺陷引起。編碼該蛋白之基因含有79個外顯子，其散佈在DNA之2百萬個以上之核苷酸內。改變外顯子之讀碼框或引入終止密碼子或特徵在於將整個外顯子或多個外顯子或一或多個外顯子之副本移出框外的任何外顯子突變可破壞功能性肌肉萎縮蛋白之產生，從而引起DMD。

已發現肌肉萎縮症之較不嚴重形式貝克氏肌肉萎縮症(Becker muscular dystrophy, BMD)出現在突變(通常一或多個外顯子之缺失)沿整個肌肉萎縮蛋白轉錄本產生正確讀碼框、使得mRNA轉譯成蛋白質過早終止時。若在加工突變的肌肉萎縮蛋白前mRNA中上游及下游外顯子之連結維持基因之正確讀碼框，則結果為編碼具有短內部缺失之蛋白質之mRNA

保留一定活性，從而產生貝克氏表型。

多年來已顯示，不會改變肌肉萎縮蛋白讀碼框之一或多個外顯子缺失會引起BMD表型，而引起框移之外顯子缺失將引起DMD (Monaco, Bertelson等人，1988)。一般而言，改變讀碼框且因此中斷適當蛋白質轉譯之肌肉萎縮蛋白突變(包括點突變及外顯子缺失)引起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。

已報導在活體外及活體內用反義寡核糖核苷酸調節突變體肌肉萎縮蛋白前 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)。

反義寡聚物已經特殊設計以靶向前 mRNA 之特定區域(通常外顯子)以誘導DMD基因突變之跳躍，藉此使該等框外突變恢復為框內以使得能夠產生內部縮短但仍具功能之肌肉萎縮蛋白。已顯示該等反義寡聚物完全靶向外顯子內(因此稱為外顯子內部序列)或自外顯子交叉至內含子一部分中之剪接供體或剪接受體接合處。

用於DMD之該等反義寡聚物之發現及研發已成為先前研究之領域。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 (現為 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 ; 例如 US 8,084,601 及 US 2017-0204413 ; (4) JCR Pharmaceuticals 及 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 。

用於 DMD 之結合至細胞穿透肽之反義寡聚物之發現及研發亦已成為一個研究領域(參見 PCT 公開案第 WO 2010/048586 號 ; Wu, B. 等人 , *The American Journal of Pathology*, 第 181 卷(2): 392-400, 2012 ; Wu, R. 等人 , *Nucleic Acids Research*, 第 35 卷(15): 5182-5191, 2007 ; Mulders, S. 等人 , *19th International Congress of the World Muscle Society*, Poster Presentation Berlin, 2014 年 10 月 ; Bestas, B. 等人 , *The Journal of Clinical Investigation*, doi: 10.1172/JCI76175, 2014 ; Jearawiriyapaisarn, N. 等人 , *Molecular Therapy*, 第 16 卷(9): 1624-1629, 2008 ; Jearawiriyapaisarn, N. 等人 , *Cardiovascular Research*, 第 85 卷:

444-453, 2010 ; Moulton, H.M.等人 , *Biochemical Society Transactions*, 第35卷(4): 826-828, 2007 ; Yin, H.等人 , *Molecular Therapy*, 第19卷(7): 1295-1303, 2011 ; Abes, R.等人 , *J. Pept. Sci.*, 第14卷: 455-460, 2008 ; Lebleu, B.等人 , *Advanced Drug Delivery Reviews*, 第60卷: 517-529, 2008 ; McClorey, G. 等人 , *Gene Therapy*, 第13卷: 1373-1381, 2006 ; Alter, J.等人 , *Nature Medicine*, 第12卷(2): 175-177, 2006 ; 及 Youngblood, D.等人 , *American Chemical Society, Bioconjugate Chem.*, 2007, 18 (1), 第50-60頁)。

細胞穿透肽(CPP)係一種例如富含精胺酸之肽運輸部分，其可有效地增強例如結合至CPP之反義寡聚物穿透至細胞中。

儘管有該等努力，業內仍需要靶向外顯子53之經改良反義寡聚物及可用於產生肌肉萎縮蛋白及治療DMD之治療方法之相應醫藥組合物。

【發明內容】

本文所提供之反義寡聚物結合物包括結合至CPP之反義寡聚物部分。在一態樣中，本發明提供反義寡聚物結合物，其包含：

長度為25個亞單位之反義寡聚物，其能夠結合所選靶以誘導人類肌肉萎縮蛋白基因之外顯子跳躍，其中反義寡聚物包含與肌肉萎縮蛋白前mRNA之外顯子53靶區域(稱為黏合位點)互補之鹼基之序列；及

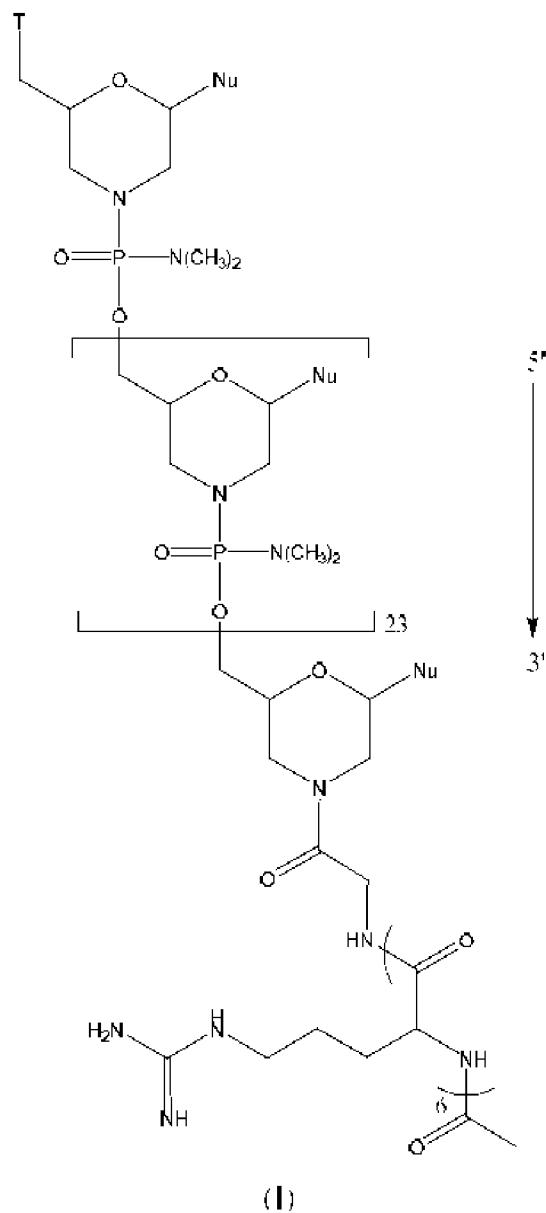
細胞穿透肽(CPP)，其藉由連接體部分結合至反義寡聚物。

在一些實施例中，黏合位點係H53A(+36+60)。

在一些實施例中，反義寡聚物之鹼基連接至嗎啉基環結構，其中嗎啉基環結構係藉由連結一個環結構之嗎啉基氮與相鄰環結構之5'環外碳之含磷亞單位間鍵聯來連結。在某些實施例中，細胞穿透肽為六精胺酸單元

(「R₆」)且連接體部分係甘胺酸。在一些實施例中，反義寡聚物包含稱為 SEQ ID NO: 1 之鹼基之序列。

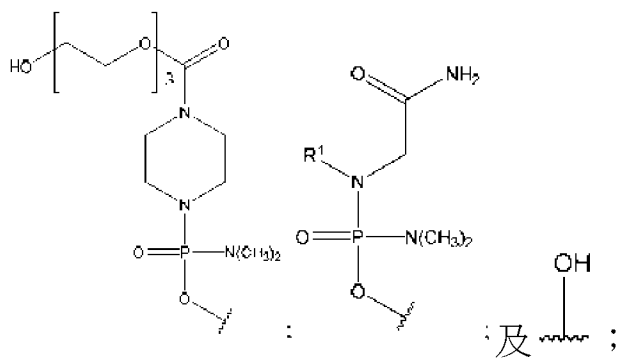
在多個態樣中，本發明提供反義寡聚物結合物，其可具有式(I)：



或其醫藥上可接受之鹽，其中：

每一Nu係一起形成靶向序列之核鹼基；且

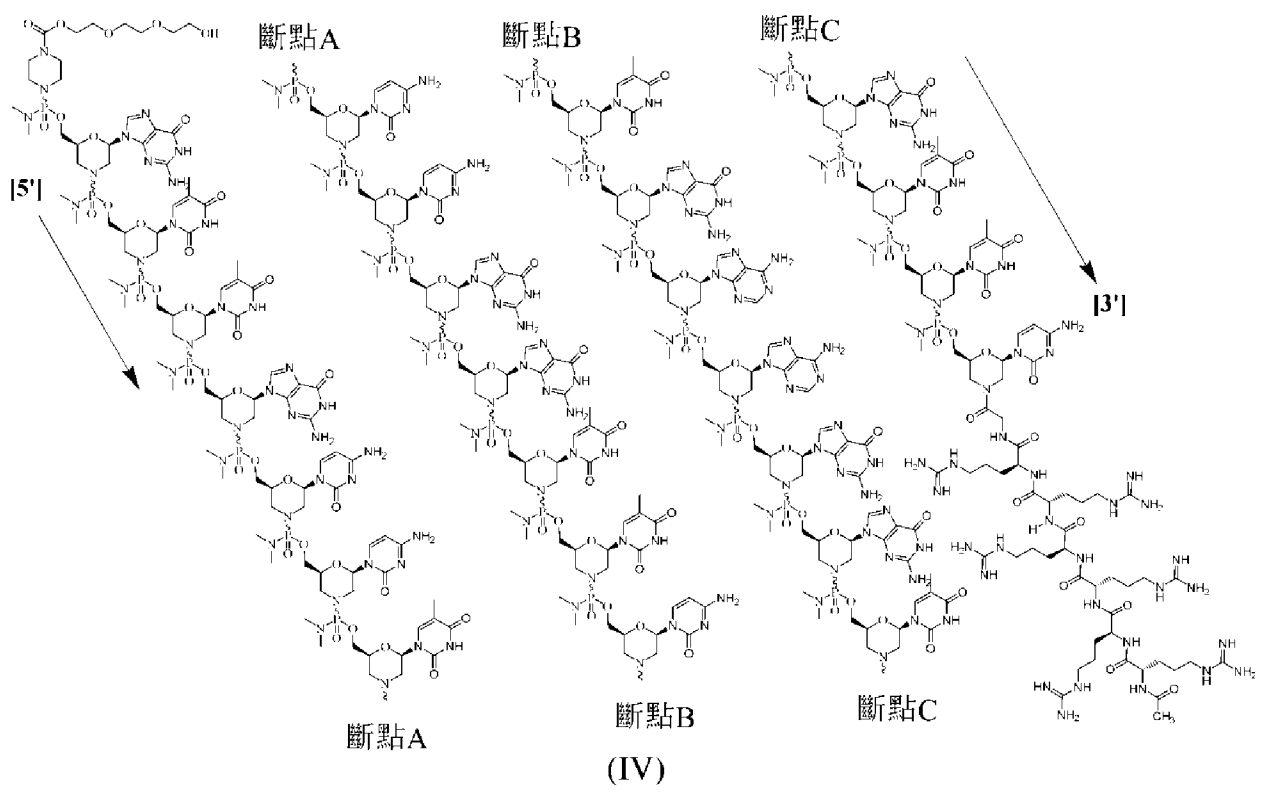
T係選自以下之部分：



R¹係C₁-C₆烷基；

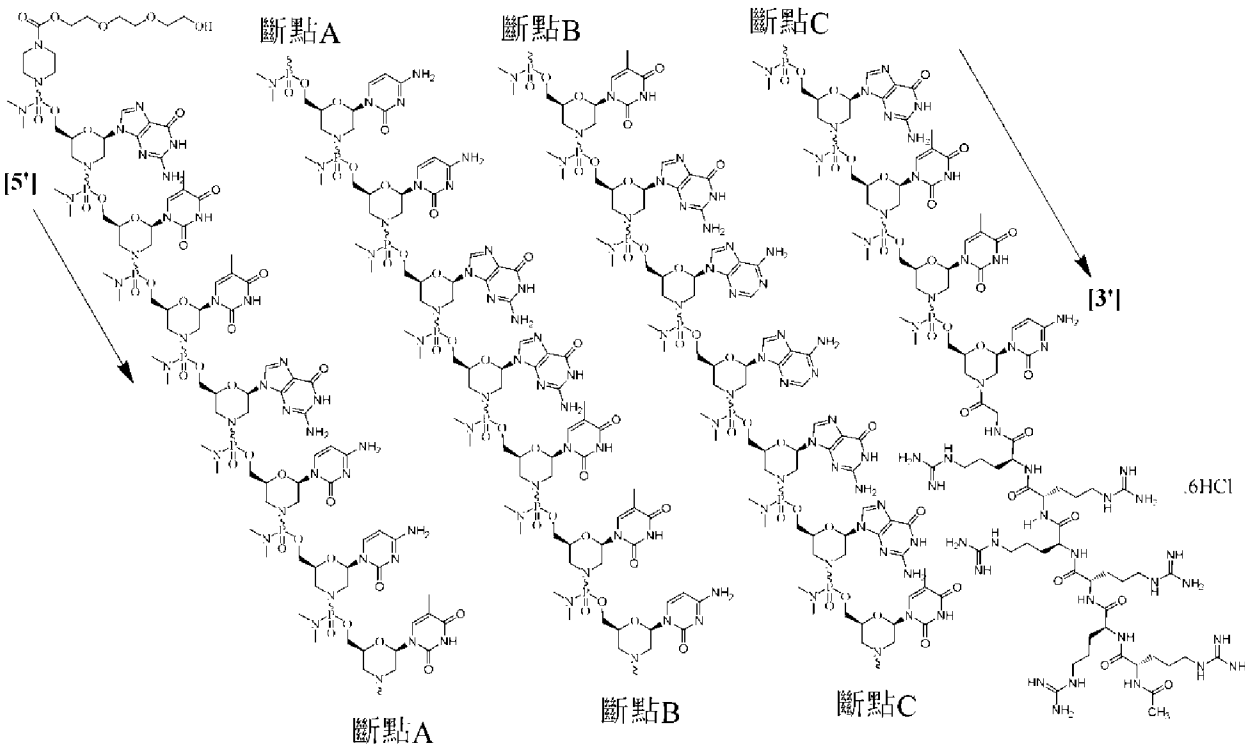
其中靶向序列與肌肉萎縮蛋白前mRNA中之外顯子53黏合位點(稱為H53A(+36+60))互補。

在另一態樣中，本發明提供式(IV)之反義寡聚物結合物：



或其醫藥上可接受之鹽。

在另一態樣中，本發明提供式(IVA)之反義寡聚物結合物：



(IVA)。

在另一態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包括本發明之反義寡聚物結合物及醫藥上可接受之載劑。在一些實施例中，醫藥上可接受之載劑係包括磷酸鹽緩衝液之鹽水溶液。

在另一態樣中，本發明提供為有需要之個體治療杜興氏肌肉萎縮症(DMD)之方法，其中該個體具有適於外顯子53跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變，該方法包含向個體投與本發明之反義寡聚物結合物。本發明亦係關於本發明之反義寡聚物結合物之用途，其用於製造用來為有需要之個體治療杜興氏肌肉萎縮症(DMD)的藥劑，其中該個體具有適於外顯子53跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變。

在另一態樣中，本發明提供恢復mRNA讀碼框以誘導具有適於外顯子53跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變之個體產生肌肉萎縮蛋白之方法，該方法包含向個體投與本發明之反義寡聚物結合物。在另一態樣中，本發明提供在具有適於外顯子53跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變之個體的mRNA加工

期間自肌肉萎縮蛋白前mRNA排除外顯子53之方法，該方法包含向個體投與本發明之反義寡聚物結合物。在另一態樣中，本發明提供結合具有適於外顯子53跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變之個體的肌肉萎縮蛋白前mRNA中之外顯子53之方法，該方法包含向個體投與本發明之反義寡聚物結合物。

在另一態樣中，本發明提供本文本發明之反義寡聚物結合物，其用於療法中。在某些實施例中，本發明提供本發明之反義寡聚物結合物，其用於治療杜興氏肌肉萎縮症。在某些實施例中，本發明提供本發明之反義寡聚物結合物，其用於治療用於療法中之藥劑。在某些實施例中，本發明提供本發明之反義寡聚物結合物，其用於製造用來治療杜興氏肌肉萎縮症之藥劑。

在另一態樣中，本發明亦提供用於為有需要之個體治療杜興氏肌肉萎縮症(DMD)之套組，其中該個體具有適於外顯子53跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變，該等套組包含至少封裝於適宜容器中之本發明之反義寡聚物結合物及其使用說明書。

當結合各圖閱讀本發明之以下詳細說明時，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mRNA及成熟mRNA之部分。

圖2繪示異常肌肉萎縮蛋白前mRNA (DMD之實例)及所得無功能不穩定肌肉萎縮蛋白之部分。

圖3繪示依替利森(etepirsen)經設計以使外顯子51跳躍，恢復前mRNA之「框內」閱讀。

圖4提供在健康人類肌母細胞中藉由不同濃度之PMO#1及PPMO#1處

理後96小時外顯子53跳躍之百分比的條形圖，如藉由RT-PCR所量測。誤差槓代表平均值 $\pm$ SD。

圖5A-5D提供量測用PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)治療不同時間點[7天(5A)、30天(5B)、60天(5C)及90天(5D)]之mdx小鼠之四頭肌中之肌肉萎縮蛋白的西方墨點(Western Blot)分析之代表性影像。

圖6A提供線圖，其繪示在mdx小鼠之四頭肌中在注射後90天內由PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)誘導之野生型肌肉萎縮蛋白之百分比，如藉由西方墨點分析所測定。

圖6B提供線圖，其繪示在mdx小鼠之四頭肌中在注射後90天內由PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)誘導之外顯子23跳躍之百分比，如藉由RT-PCR所測定。

圖7A-7D提供量測用PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)治療不同時間點[7天(7A)、30天(7B)、60天(7C)及90天(7D)]之mdx小鼠之橫膈膜中之肌肉萎縮蛋白的西方墨點分析之代表性影像。

圖8A提供線圖，其繪示在mdx小鼠之橫膈膜中在注射後90天內由PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)誘導之野生型肌肉萎縮蛋白之百分比，如藉由西方墨點分析所測定。

圖8B提供線圖，其繪示在mdx小鼠之橫膈膜中在注射後90天內由PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)誘導之外顯子23跳躍之百分比，如藉由RT-PCR所測定。

圖9A-9D提供量測用PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)治療不同時間點[7天(9A)、30天(9B)、60天(9C)及90天(9D)]之mdx小鼠之心臟中之肌肉萎縮蛋白的西方墨點分析之代表性影像。

圖 10A 提供線圖，其繪示在mdx小鼠之心臟中在注射後90天內由PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)誘導之野生型肌肉萎縮蛋白之百分比，如藉由西方墨點分析所測定。

圖 10B 提供線圖，其繪示在mdx小鼠之心臟中在注射後90天內由PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)誘導之外顯子23跳躍之百分比，如藉由RT-PCR所測定。

圖 11 提供免疫組織化學分析，其顯示在mdx小鼠左四頭肌中由PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)誘導之肌肉萎縮蛋白。

圖 12A-B 提供量測用下列不同劑量之PMO (PMO4225) 或 PPMO (PPMO4225)治療之mdx小鼠之心臟中之肌肉萎縮蛋白的西方墨點分析之代表性影像：40 mg/kg、80 mg/kg及120 mg/kg。

圖 13 提供條形圖，其繪示在以下列不同劑量注射後30天在mdx小鼠之心臟中由PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)誘導之野生型肌肉萎縮蛋白之百分比，如藉由西方墨點分析所測定：40 mg/kg、80 mg/kg及120 mg/kg。

圖 14A-B 提供量測用下列不同劑量之PMO (PMO4225) 或 PPMO (PPMO4225)治療之mdx小鼠之橫膈膜中之肌肉萎縮蛋白的西方墨點分析之代表性影像：40 mg/kg、80 mg/kg及120 mg/kg。

圖 15 提供條形圖，其繪示在以下列不同劑量注射後30天在mdx小鼠之橫膈膜中由PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)誘導之野生型肌肉萎縮蛋白之百分比，如藉由西方墨點分析所測定：40 mg/kg、80 mg/kg及120 mg/kg。

圖 16A-B 提供量測用下列不同劑量之PMO (PMO4225) 或 PPMO

(PPMO4225)治療之mdx小鼠之四頭肌中之肌肉萎縮蛋白的西方墨點分析之代表性影像：40 mg/kg、80 mg/kg及120 mg/kg。

圖17提供條形圖，其繪示在以下列不同劑量注射後30天在mdx小鼠之四頭肌中由PMO (PMO4225)或PPMO (PPMO4225)誘導之野生型肌肉萎縮蛋白之百分比，如藉由西方墨點分析所測定：40 mg/kg、80 mg/kg及120 mg/kg。

圖18顯示藉由PMO合成方法B實施之偶合循環。

圖19提供免疫組織化學分析，其顯示與mdx小鼠及野生型小鼠中之鹽水相比，在mdx小鼠橫膈膜及心臟中由PPMO (PPMO4225)誘導之肌肉萎縮蛋白及層黏蛋白。

圖20提供在健康人類肌管中藉由不同濃度之PMO#1及PPMO#1處理後96小時外顯子53跳躍之百分比的條形圖，如藉由RT-PCR所量測。誤差槓代表平均值 $\pm$ SD。

【實施方式】

相關資訊

本專利申請案主張於2016年12月19日提出申請之美國臨時專利申請案第62/436,223號、於2017年1月6日提出申請之美國臨時專利申請案第62/443,484號、於2017年3月30日提出申請之美國臨時專利申請案第62/479,178號及於2017年9月22日提出申請之美國臨時專利申請案第62/562,146號的權益。上文所提及臨時專利申請案之全部內容皆以引用方式併入本文中。

本發明之實施例概言之係關於經特殊設計以誘導人類肌肉萎縮蛋白基因之外顯子跳躍之經改良反義寡聚物結合物及其使用方法。肌肉萎縮蛋

白在肌肉功能中起重要作用，且多種肌肉相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，本文所述之經改良反義寡聚物結合物誘導人類肌肉萎縮蛋白基因之突變形式(例如在杜興氏肌肉萎縮症(DMD)及貝克氏肌肉萎縮症(BMD)中發現之突變的肌肉萎縮蛋白基因)之外顯子跳躍。

由於突變引起之異常mRNA剪接事件，該等突變的人類肌肉萎縮蛋白基因表現缺陷性肌肉萎縮蛋白或根本不表現可量測之肌肉萎縮蛋白，其係導致各種形式之肌肉萎縮症之條件。為補救此條件，本發明之反義寡聚物結合物與突變的人類肌肉萎縮蛋白基因之預處理mRNA之所選區域雜交，誘導該原本異常剪接之肌肉萎縮蛋白mRNA中之外顯子跳躍及差異剪接，且由此容許肌肉細胞產生編碼功能性肌肉萎縮蛋白之mRNA轉錄本。在某些實施例中，所得肌肉萎縮蛋白不必為肌肉萎縮蛋白之「野生型」形式，而是肌肉萎縮蛋白之截短但仍具功能之形式。

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特徵在於因異常mRNA剪接而表現缺陷性肌肉萎縮蛋白之肌肉萎縮症，尤其彼等形式之肌肉萎縮症，例如DMD及BMD。本文所述之具體反義寡聚物結合物進一步提供與其他寡聚物相比經改良之肌肉萎縮蛋白-外顯子特異性靶向，且由此提供與治療相關形式之肌肉萎縮症之替代方法相比顯著且實際之優點。

因此，本發明係關於反義寡聚物結合物，其包含：

長度為25個亞單位之反義寡聚物，其能夠結合所選靶以誘導人類肌肉萎縮蛋白基因之外顯子跳躍，其中反義寡聚物包含與肌肉萎縮蛋白前mRNA之外顯子53靶區域(稱為黏合位點)互補之鹼基之序列；及

細胞穿透肽(CPP)，其藉由連接體部分結合至反義寡聚物。

在一些實施例中，黏合位點係H53A(+36+60)。

在一些實施例中，反義寡聚物之鹼基連接至嗎啉基環結構，其中嗎啉基環結構係藉由連結一個環結構之嗎啉基氮與相鄰環結構之5'環外碳之含磷亞單位間鍵聯來連結。在某些實施例中，細胞穿透肽係R₆且連接體部分係甘胺酸。在一些實施例中，反義寡聚物包含稱為SEQ ID NO: 1之鹼基之序列，其中每一胸腺嘧啶鹼基(T)視情況為尿嘧啶鹼基(U)。

除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語皆具有與熟習本發明所屬技術領域者通常所理解相同之含義。儘管類似或等效於本文所述方法及材料之任何方法及材料皆可用於本發明之實踐或測試中，但闡述較佳方法及材料。出於本發明之目的，在下文中定義下列術語。

I. 定義

「約」意指改變參考數量、含量、值、數目、頻率、百分比、尺寸、大小、量、重量或長度之多達30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%之數量、含量、值、數目、頻率、百分比、尺寸、大小、量、重量或長度。

除非另外規定，否則如本文所用之術語「烷基」係指飽和直鏈或具支鏈烴。在某些實施例中，烷基係一級、二級或三級烴。在某些實施例中，烷基包括1至10個碳原子，即C₁至C₁₀烷基。在某些實施例中，烷基包括1至6個碳原子，即C₁至C₆烷基。在某些實施例中，烷基選自由以下組成之群：甲基、CF₃、CCl₃、CFC1₂、CF₂Cl、乙基、CH₂CF₃、CF₂CF₃、丙基、異丙基、丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、異戊基、新戊基、己基、異己基、3-甲基戊基、2,2-二甲基丁基及2,3-二甲基丁基。

該術語包括經取代及未經取代之烷基，包括鹵化烷基。在某些實施例中，烷基係氟化烷基。可取代烷基之部分之非限制性實例選自由以下組成之群：鹵素(氟、氯、溴或碘)、羥基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、烷氧基、芳基氧基、硝基、氰基、磺酸、硫酸酯、膦酸、磷酸酯或膦酸酯，視需要未經保護或經保護，如熟習此項技術者已知，例如如Greene等人，*Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 第二版, 1991中所教示，其以引用方式併入本文中。

如本文對於個體或患者所用之「適於外顯子53跳躍」意欲包括具有肌肉萎縮蛋白基因之一或多個突變之個體及患者，該肌肉萎縮蛋白基因在缺少肌肉萎縮蛋白前mRNA之外顯子53跳躍時使得讀碼框在框外，藉此破壞前mRNA之轉譯，從而導致個體或患者無法產生功能性或半功能性肌肉萎縮蛋白。適於外顯子53跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變之實例包括例如外顯子外顯子42至52、外顯子45至52、外顯子47至52、外顯子48至52、外顯子49至52、外顯子50至52或外顯子52之缺失。確定患者是否具有適於外顯子跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變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。)。

如本文所用之術語「寡聚物」係指藉由亞單位間鍵聯連接之亞單位之序列。在某些情況下，術語「寡聚物」用於指「反義寡聚物」。對於「反義寡聚物」，每一亞單位係由以下各項組成：(i) 核糖糖或其衍生物；及(ii) 與其結合之核鹼基，使得鹼基配對部分之順序藉由華特生-克裡克(Watson-Crick)鹼基配對形成與核酸(通常RNA)中之靶序列互補之鹼基序

列，以在靶序列內形成核酸:寡聚物異源雙鏈體，條件係亞單位、亞單位間鍵聯或二者皆不為天然的。在某些實施例中，反義寡聚物係PMO。在其他實施例中，反義寡聚物係硫代磷酸2'-O-甲酯。在其他實施例中，本發明之反義寡聚物係肽核酸(PNA)、鎖核酸(LNA)或橋接核酸(BNA)，例如2'-O,4'-C-伸乙基-橋接核酸(ENA)。其他實例性實施例闡述於本文中。

術語「互補」及「互補性」係指兩種或更多種藉由華特生-克裡克鹼基配對規則彼此相關之寡聚物(即各自包含核鹼基序列)。舉例而言，核鹼基序列「T-G-A (5'→3')」與核鹼基序列「A-C-T (3'→5')」互補。互補性可為「部分的」，其中根據鹼基配對規則，給定核鹼基序列之並非所有核鹼基皆與另一核鹼基序列匹配。舉例而言，在一些實施例中，給定核鹼基序列與另一核鹼基序列之間之互補性可為約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。或者，在給定核鹼基序列與另一核鹼基序列之間可存在「完全」或「完美」(100%)互補性以繼續該實例。核鹼基序列之間之互補程度對效率及序列之間之雜交強度具有重要效應。

術語「有效量」及「治療有效量」在本文中可互換使用且係指以單一劑量或作為一系列劑量之一部分投與哺乳動物個體之治療性化合物(例如反義寡聚物)之量，其可有效地產生期望治療效應。對於反義寡聚物，此效應通常係藉由抑制所選靶序列之轉譯或天然剪接加工或產生在臨床上有意義之量之肌肉萎縮蛋白(統計學顯著性)來實現。

在一些實施例中，有效量為至少10 mg/kg或至少20 mg/kg之包括反義寡聚物之組合物達一段時間以治療個體。在一些實施例中，有效量為至少20 mg/kg之包括反義寡聚物之組合物以使個體中肌肉萎縮蛋白陽性纖維之數目增加至正常值之至少20%。在某些實施例中，有效量為10 mg/kg或

至少20 mg/kg之包括反義寡聚物之組合物以穩定、維持或改良例如在6 MWT中患者相對於健康人之步行距離之20%欠缺。在各個實施例中，有效量為至少10 mg/kg至約30 mg/kg、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，有效量為約10 mg/kg、約20 mg/kg、約30 mg/kg或約50 mg/kg。在另一態樣中，有效量為至少約10 mg/kg、約20 mg/kg、約25 mg/kg、約30 mg/kg或約30 mg/kg至約50 mg/kg，持續至少24週、至少36週或至少48週，以藉此使個體中肌肉萎縮蛋白陽性纖維之數目增加至正常值之至少20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%，且穩定或改良例如在6 MWT中患者相對於健康人之步行距離之20%欠缺。在一些實施例中，治療使肌肉萎縮蛋白陽性纖維之數目增加至患者正常值之20%-60%或30%-50%。

「增強(enhance或enhancing)」或「增加(increase或increasing)」或「刺激(stimulate或stimulating)」通常係指與由無反義寡聚物結合物引起或由對照化合物引起之反應相比，一或多種反義寡聚物結合物或醫藥組合物在細胞或個體中產生或引起較大生理反應(即下游效應)之能力。除根據業內理解及本文說明顯而易見之反應外，較大生理反應可包括增加的肌肉萎縮蛋白之功能形式之表現或肌肉組織中增加的肌肉萎縮蛋白相關生物活性。亦可量測到增加的肌肉功能，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%、5%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%之肌肉纖維中增加的肌肉萎縮蛋白表現。例如，已顯示約40%之肌肉功能改良可發生在25%-30%之纖維表現肌肉萎縮蛋白時(例如，參見DelloRusso等人，Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002)。「增加的」或「增強的」量通常係「統計學上顯著」之量，且可包括比由無反義寡聚物結合物(藥劑不存在)或對照化合物產生之量增加1.1倍、1.2倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍或以上(例如500倍、1000倍，包括其間及1以上之所有整數及小數點)，例如1.5、1.6、1.7、1.8等)。

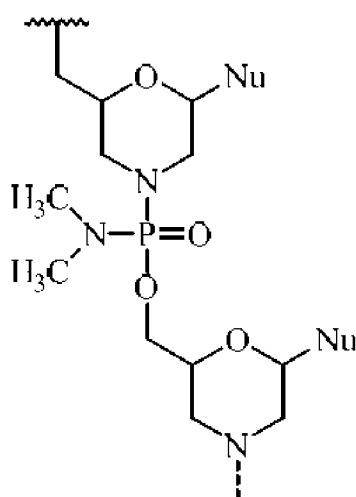
如本文所用之術語「功能」及「功能性」及諸如此類係指生物、酶促或治療功能。

「功能性」肌肉萎縮蛋白通常係指，通常與存在於某些DMD或BMD個體中之改變的或「缺陷性」肌肉萎縮蛋白形式相比，具有足夠生物活性以減少原本為肌肉萎縮症所特有之肌肉組織之進行性降解的肌肉萎縮蛋白。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% (包括其間之所有整數)之野生型肌肉萎縮蛋白之活體外或活體內生物活性，如根據業內之常規技術所量測。作為一個實例，可根據肌管大小、肌原纖維組織(或解組)、收縮活性及乙醯基膽鹼受體之自發分群來量測活體外肌肉培養物中之肌肉萎縮蛋白相關活性(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頗具價值之資源，且提供測試肌肉萎縮蛋白相關活性之方法。最廣泛用於DMD研究之動物模型

中之兩者係mdx小鼠及肌肉萎縮症金毛獵犬(GRMD)，其二者呈肌肉萎縮蛋白陰性(例如，參見Collins及Morgan, *Int J Exp Pathol* 84: 165-172, 2003)。該等及其他動物模型可用於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，例如在投與本發明之某些外顯子跳躍反義寡聚物結合物後產生之彼等形式。

術語「失配(mismatch或mismatches)」係指根據鹼基配對規則寡聚物核鹼基序列中之一或多個核鹼基(無論連續抑或分開)不與靶前mRNA匹配。儘管通常期望完美互補性，但一些實施例可包括相對於靶前mRNA之一或多個但較佳6個、5個、4個、3個、2個或1個失配。包括寡聚物內任一位置之變化。在某些實施例中，本發明之反義寡聚物結合物包括靠近內部之末端變化之核鹼基序列之變化，且若存在通常在5'及/或3'末端之約6個、5個、4個、3個、2個或1個亞單位內。

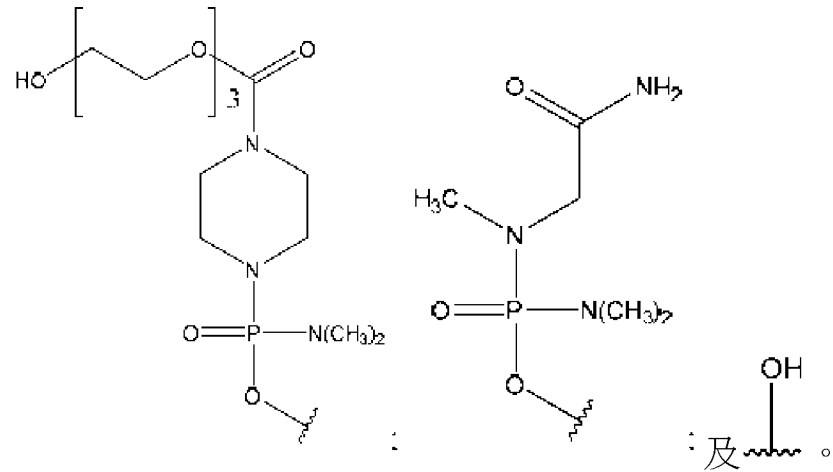
術語「嗎啉基」、「嗎啉基寡聚物」及「PMO」係指以下一般結構之磷二醯胺嗎啉基寡聚物：



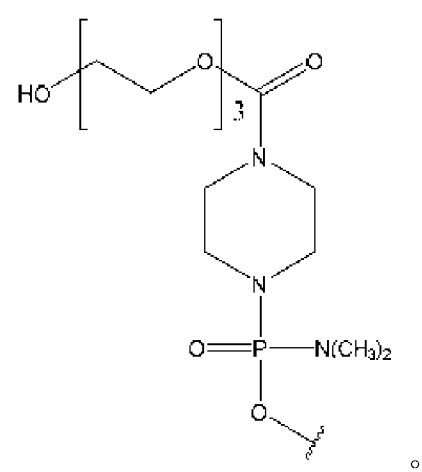
且如 Summerton, J. 等人，*Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997)之圖2中所述。如本文所述之嗎啉基包括前述一般結構之所有立體異構物及互變異構物。嗎啉基寡聚物之合成、結

構及結合特徵詳述於美國專利第 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；其皆以引用方式併入本文中。

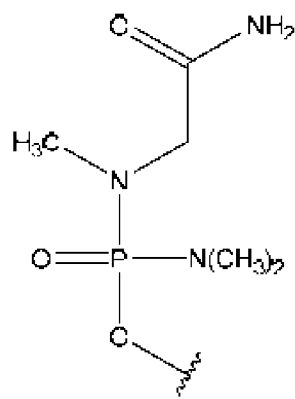
在某些實施例中，嗎啉基在寡聚物之 5' 或 3' 末端與「尾」部分結合以增加其穩定性及/或溶解度。實例性尾包括：



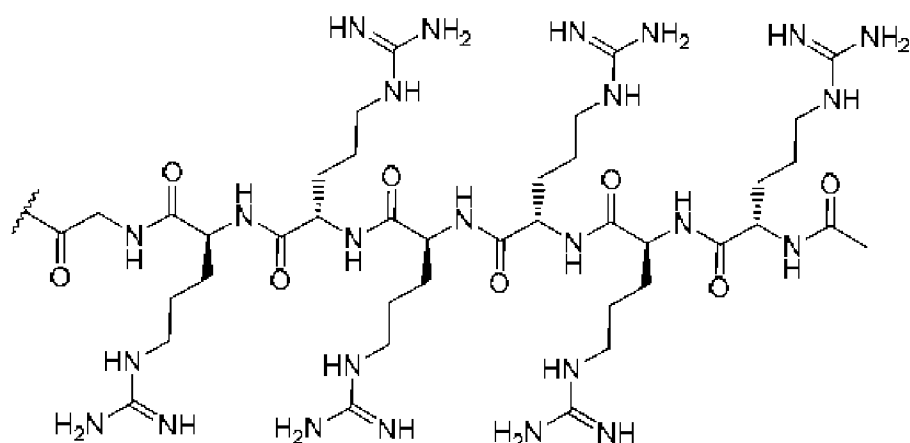
在上述實例性尾部分中，「TEG」或「EG3」係指以下尾部分：



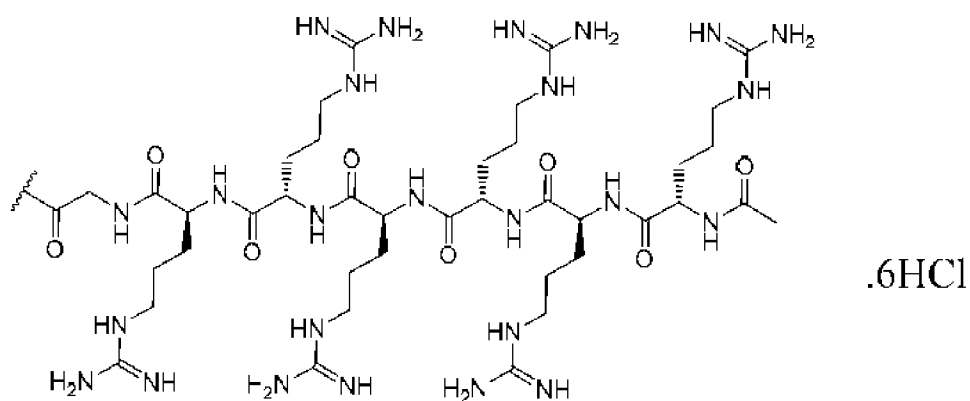
在上述實例性尾部分中，「GT」係指以下尾部分：



如本文所用之術語「-G-R₆」及「-G-R₆-Ac」可互換使用且係指結合至本發明之反義寡聚物之肽部分。在各個實施例中，「G」表示藉由醯胺鍵結合至「R₆」之甘胺酸殘基，且每一「R」表示藉由醯胺鍵結合在一起之精胺酸殘基，使得「R₆」意指藉由醯胺鍵結合在一起之六(6)個精胺酸殘基。精胺酸殘基可具有任一立體組態，例如精胺酸殘基可為L-精胺酸殘基、D-精胺酸殘基或D-精胺酸殘基及L-精胺酸殘基之混合物。在某些實施例中，「-G-R₆」或「-G-R₆-Ac」結合至本發明之PMO反義寡聚物之3'最大嗎啉基亞單位之嗎啉環氮。在一些實施例中，「-G-R₆」或「-G-R₆-Ac」結合至本發明之反義寡聚物之3'末端且具有下式：



或

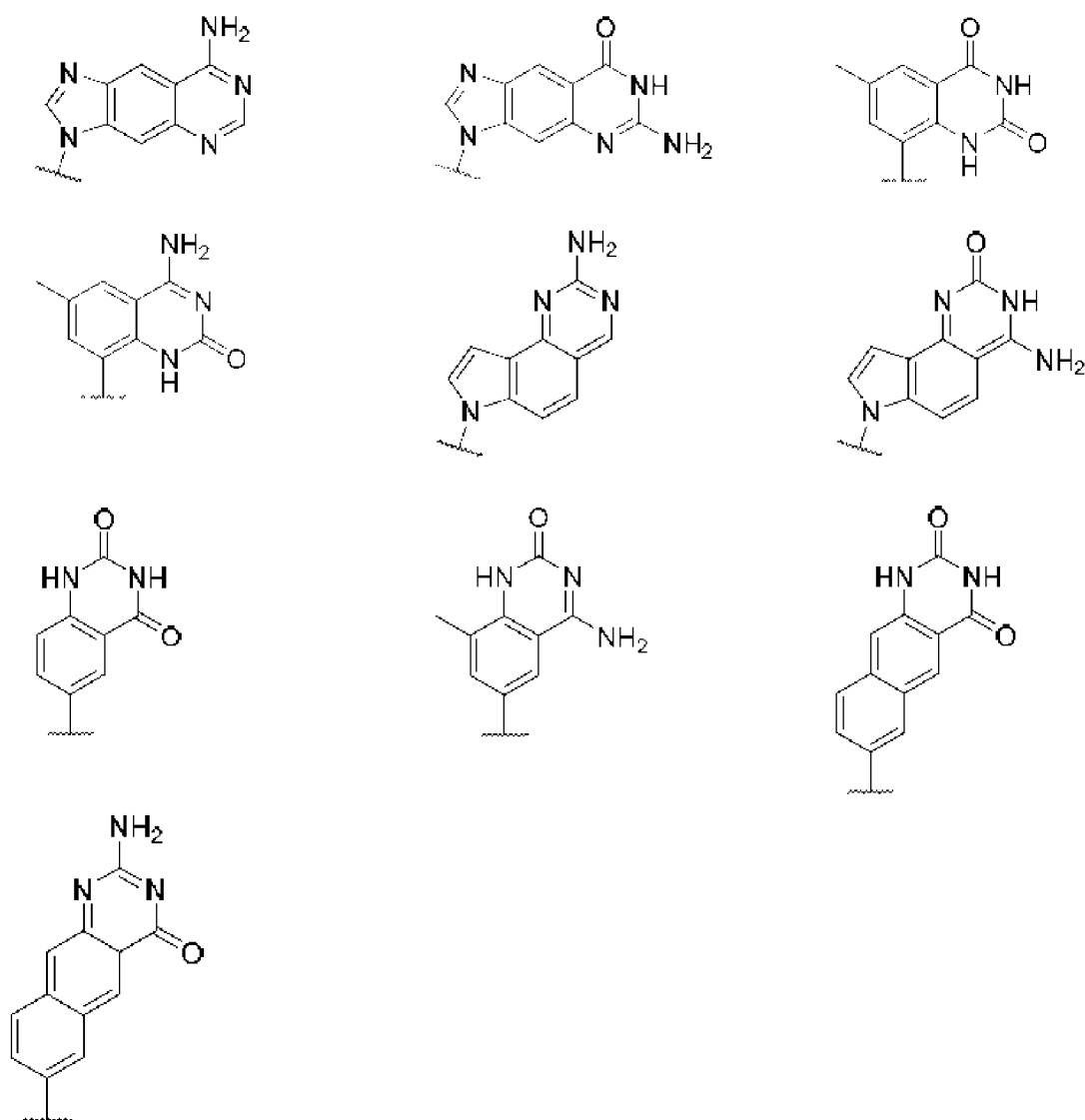


術語「核鹼基」(Nu)、「鹼基配對部分」或「鹼基」可互換使用以係指在天然(naturally occurring)或「天然(native)」DNA或RNA中發現之嘌呤或嘧啶鹼基(例如尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶及鳥嘌呤)以及該等天然嘌呤及嘧啶之類似物。該等類似物可賦予寡聚物經改良性質，例如結合親和力。實例性類似物包括次黃嘌呤(肌苷之基本組分)；2,6-二氨基嘌呤；5-甲基胞嘧啶；C5-丙炔基修飾之嘧啶；10-(9-(胺基乙氧基)吩噁嗪基)(G-鉗)及諸如此類。

鹼基配對部分之其他實例包括(但不限於)其各別胺基經鹼基保護基團保護之尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤及次黃嘌呤(肌苷)、2-氟尿嘧啶、2-氟胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、氮雜胞嘧啶、嘧啶類似物(例如假異胞嘧啶及假尿嘧啶)及其他經修飾核鹼基(例如8-取代嘌呤、黃嘌呤或次黃嘌呤，後兩者為天然降解產物)。亦涵蓋以下文獻中所揭示之經修飾核鹼基：Chiu及Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048；Limbach等人, Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196；及 Revankar 及 Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, 第7卷, 313；該等文獻之內容皆以引用方式併入本文中。

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大小擴大之核鹼基。涵蓋可用於本文所述反義寡聚物結合物中之以下文獻

中所述之核酸鹼基替代：Glen Research目錄(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；及Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-
 627；該等文獻之內容皆以引用方式併入本文中。大小擴大之核鹼基之實
 例包括下文所顯示之彼等以及其互變異組態式。



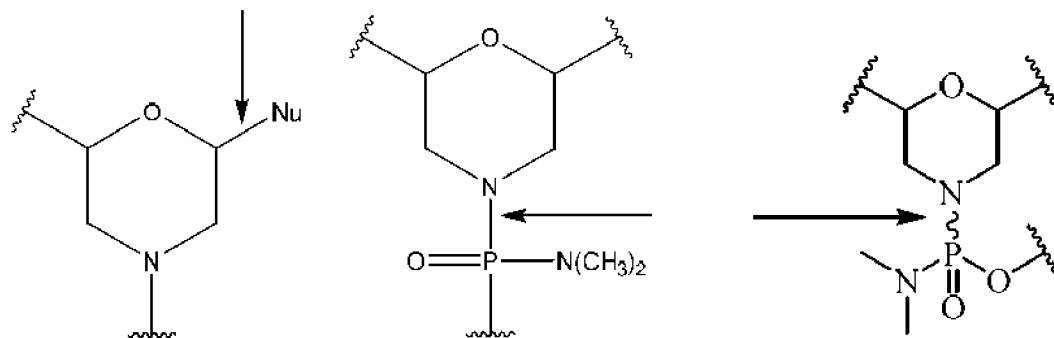
如本文所用之片語「非經腸投與 (parenteral administration 及 administered parenterally)」意指除經腸及局部投與外通常藉由注射之投

與模式，且包括(但不限於)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、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內及胸骨內注射及輸注。

為清晰起見，本發明之結構(包括例如式(IV))自5'至3'係連續的且為便於以緊湊形式繪示整個結構，已納入多個說明性斷點，標記為「斷點A」、「斷點B」及「斷點C」。如熟習此項技術者應理解，例如，「斷點A」之每一指示顯示該結構之圖解說明在該等點係連續的。熟習此項技術者應理解，對於上述結構中之「斷點B」及「斷點C」之每一情況亦如此。然而，說明性斷點皆不欲指示且熟習此項技術者亦不應將其理解為意指上述結構之實際中斷。

如本文所用，用於結構式內之一組括弧指示括弧之間之結構特徵係重複的。在一些實施例中，所用括弧可為「[」及「]」，且在某些實施例中，用於指示重複結構特徵之括弧可為「(」及「)」」。在一些實施例中，括弧之間之結構特徵之重複迭代數係括弧外所指示之數字，例如2、3、4、5、6、7等。在各個實施例中，括弧之間之結構特徵之重複迭代數係由括弧外所指示之變量(例如「Z」)指示。

如本文所用，對結構式內之手性碳或磷原子繪示之直鍵或彎曲鍵指示，手性碳或磷之立體化學並未定義且意欲包括手性中心之所有形式。該等說明之實例繪示於下文中。



第 25 頁(發明說明書)

片語「醫藥上可接受」意指物質或組合物必須在化學上及/或毒理學上與包含調配物之其他成分及/或用其治療之哺乳動物相容。

如本文所用之片語「醫藥上可接受之載劑」意指無毒惰性固體、半固體或液體填充劑、稀釋劑、囊封材料或任一類型之調配物助劑。根據調配者之判斷，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；粉末狀黃蓍膠；麥芽；明膠；滑石；賦形劑，例如可可油及栓劑蠟；油，例如花生油、棉籽油、紅花油、芝麻油、橄欖油、玉米油及大豆油；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；無熱源水；等滲鹽水；林格氏溶液(Ringer's solution)；乙醇；磷酸鹽緩衝溶液；無毒相容性潤滑劑，例如月桂基硫酸鈉及硬脂酸鎂；著色劑；釋放劑；包衣劑；甜味劑；矯味劑；芳香劑；防腐劑；及抗氧化劑。

關於肌肉萎縮蛋白合成或產生之術語「恢復」通常係指在用本文所述之反義寡聚物結合物治療後在肌肉萎縮症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，治療可使患者中之新穎肌肉萎縮蛋白產生增加1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%（包括其間之所有整數）。在一些實施例中，治療使肌肉萎縮蛋白陽性纖維之數目增加個體正常值之至少約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，治療使肌肉萎縮蛋白陽性纖維之數目增加至個體正常值之約20%至約60%或約30%至約50%。治療後患者中肌肉萎縮蛋

白陽性纖維之百分數可藉由肌肉生檢使用已知技術來測定。舉例而言，肌肉生檢可取自患者之適宜肌肉，例如肱二頭肌。

可在治療前及/或治療後或整個療程之時間點實施陽性肌肉萎縮蛋白纖維之百分比之分析。在一些實施例中，治療後生檢係取自治療前生檢對側之肌肉。可使用肌肉萎縮蛋白之任一適宜分析來實施治療前及治療後肌肉萎縮蛋白表現分析。在一些實施例中，使用為肌肉萎縮蛋白之標記物之抗體(例如單株或多株抗體)對肌肉生檢之組織切片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之標記物。可使用任一適宜二級抗體。

在一些實施例中，藉由用陽性纖維之數目除以所計數總纖維來計算肌肉萎縮蛋白陽性纖維%。正常肌肉樣本具有**100%**肌肉萎縮蛋白陽性纖維。因此，肌肉萎縮蛋白陽性纖維%可表示為正常值之百分比。為控制治療前肌肉中痕量肌肉萎縮蛋白以及相關纖維之存在，可在計數治療後肌肉中之肌肉萎縮蛋白陽性纖維時，使用患者之治療前肌肉之切片設定基線。此可用作計數該患者之治療後肌肉之切片中之肌肉萎縮蛋白陽性纖維的臨限值。在其他實施例中，亦可使用**Bioquant**影像分析軟體(**Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN**)將經抗體染色之組織切片用於肌肉萎縮蛋白量化。總肌肉萎縮蛋白螢光信號強度可報告為正常值之百分比。另外，可使用單株或多株抗肌肉萎縮蛋白抗體之西方墨點分析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**Leica Biosystems**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糖複合物(β,γ)之組分及/或神經元**NOS**之表現來分析。

在一些實施例中，用本發明之反義寡聚物結合物治療會減緩或減輕DMD患者之在不治療的情況下預期將出現之進行性呼吸肌功能障礙及/或衰竭。在一些實施例中，用本發明之反義寡聚物結合物治療可減少或消除對在不治療的情況下預期將出現之換氣輔助裝置之需要。在一些實施例中，用於追蹤病程之呼吸功能之量測以及潛在治療介入之評估包括最大吸氣壓(MIP)、最大呼氣壓(MEP)及用力肺活量(FVC)。量測個人壓力值之MIP及MEP分別可在吸氣及呼氣期間產生，且係呼吸肌強度之敏感性量度。MIP係橫膈膜肌無力之量度。

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可為呼吸功能障礙之早期指示劑。在某些實施例中，FVC可用於量測在最大吸氣後之用力呼氣期間排出之總空氣體積。在DMD患者中，FVC與身體生長同時增加直至十幾歲。然而，隨著生長減緩或被疾病演進阻礙及肌無力演進，肺活量進入下行期且在10歲至12歲後以每年約8%至8.5%之平均速率下降。在某些實施例中，經預測MIP% (針對體重調整之MIP)、經預測MEP% (針對年齡調整之MEP)及經預測FVC% (針對年齡及身高調整之FVC)係支持性分析。

如本文所用之術語「個體」及「患者」包括展現可用本發明之反義寡聚物結合物治療之症狀或處於展現該症狀風險之任何動物，例如具有或處於患DMD或BMD或與該等病況相關之任一症狀(例如肌肉纖維喪失)之風險的個體(或患者)。適宜個體(或患者)包括實驗室動物(例如小鼠、大鼠、兔或天竺鼠)、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地人類患者(或個體)。亦包括在具有適於外顯子51跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變之個體(或患者)中產生肌肉萎縮蛋白之方法。

如本文所用之片語「全身投與」、「以全身方式投與」、「外周投與」及「以外周方式投與」意指以除直接進入中樞神經系統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進行代謝及其他類似過程，例如皮下投與。

片語「靶向序列」係指與靶前mRNA中之核苷酸序列互補之寡聚物核鹼基序列。在本發明之一些實施例中，靶前mRNA中之核苷酸序列係肌肉萎縮蛋白前mRNA中之外顯子53黏合位點，稱為H53A(+36+60)。

個體(例如哺乳動物，例如人類)或細胞之「治療」係任一類型之用於嘗試改變個體或細胞之天然進程之介入。治療包括(但不限於)投與寡聚物或其醫藥組合物，且可以預防性方式或在開始病理性事件或與病原性因子接觸後實施。治療包括針對與肌肉萎縮蛋白相關之疾病或病況之症狀或病理的任何期望效應，如在某些形式之肌肉萎縮症中，且可包括例如所治療疾病或病況之一或多種可量測標記物之微小改變或改良。亦包括「預防性」治療，其可針對減小所治療疾病或病況之演進速率、延遲該疾病或病況之發作或減輕其發作之嚴重程度。「治療」或「預防」不必指示完全根除、治癒或防止疾病或病況或其相關症狀。

在一些實施例中，用本發明之反義寡聚物結合物治療增加新的肌肉萎縮蛋白產生，延遲疾病演進，減緩或減少移動性喪失，減輕肌肉發炎，減輕肌肉損傷，改良肌肉功能，減少肺功能喪失及/或增強肌肉再生，在不治療的情況下預期將出現上述各症狀。在一些實施例中，治療維持、延遲或減緩疾病演進。在一些實施例中，治療維持移動性或減少移動性喪失。在一些實施例中，治療維持肺功能或減少肺功能喪失。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

(6MWT)所量測。在一些實施例中，治療維持或縮短10米步行/跑步之時間(即10米步行/跑步測試)。在一些實施例中，治療維持或縮短仰臥站立之時間(即仰臥時間測試)。在一些實施例中，治療維持或縮短爬四級標準樓梯之時間(即四樓爬行測試)。在一些實施例中，治療維持或減輕患者之肌肉發炎，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可鑑別出由發炎、水腫、肌肉損傷及脂肪浸潤引起之肌肉結構及組成之變化。

在一些實施例中，用本發明之反義寡聚物結合物治療增加新穎肌肉萎縮蛋白產生且減緩或減少在不治療的情況下預期將出現之移動性喪失。舉例而言，治療可穩定、維持、改良或增加個體之步行能力(例如穩定移動)。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，其以引用方式併入本文中)所述之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、百分比變化或經預測%值之變化。在一些實施例中，治療維持或改良在6MWT中個體相對於健康人之穩定步行距離之20%欠缺。相對於健康人之典型行為，在6MWT中DMD患者之行為可藉由計算經預測%值來確定。舉例而言，男性之經預測% 6MWD可使用以下等式來計算： $196.72 + (39.81 \times \text{年齡}) - (1.36 \times \text{年齡}^2) + (132.28 \times \text{身高(米)})$ 。對於女性，經預測% 6MWD可使用以下等式來計算： $188.61 + (51.50 \times \text{年齡}) - (1.86 \times \text{年齡}^2) + (86.10 \times \text{身高(米)})$ (Henricson等人，PLoS Curr., 2012, 第2版，其以引用方式併入本文中)。在一些實施例中，用反義寡聚物治療使患者自基線之穩定步行距離增加至3米、5米、6米、7米、8米、9米、10米、15米、20米、25米、30米或50米以上(包括其間之所有整

數)。

DMD患者之肌肉功能之喪失可逆正常兒童期生長及發育之背景而發生。實際上，患有DMD之幼兒可顯示在約1年之病程內在6MWT期間步行之距離增加，儘管進行性肌力不足。在一些實施例中，比較DMD患者之6MWD與正常發育之對照個體以及年齡及性別匹配之個體之現有標準數據。在一些實施例中，正常生長及發育可使用擬合至標準數據之基於年齡及身高之等式來計算。此一等式可用於將6MWD轉化成DMD個體之經預測百分數(經預測%)值。在某些實施例中，經預測% 6MWD數據之分析代表一種計算正常生長及發育之方法，且可顯示年幼(例如小於或等於7歲)時功能之增加表示穩定而非改良DMD患者之能力(Henricson等人，PLoS Curr., 2012, 第2版，其以引用方式併入本文中)。

提出且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)。此命名在測試若干皆針對相同靶區域但稍有不同之反義分子時變得尤其相關，如下文所顯示：

$H\#A/D(x:y)$ 。

第一個字母表示物種(例如H：人類，M：鼠類，C：犬)。「#」表示靶肌肉萎縮蛋白外顯子編號。「A/D」分別指示外顯子之開頭及末端之受體或供體剪接位點。(x y)表示黏合坐標，其中「-」或「+」分別指示內含子或外顯子序列。舉例而言，A(-6+18)將指示在靶外顯子之前的內含子之最末6個鹼基及靶外顯子之前18個鹼基。最近剪接位點將為該受體，因此該等坐標之前將具有「A」。闡述供體剪接位點之黏合坐標可為D(+2-18)，其中最末2個外顯子鹼基及前18個內含子鹼基對應於反義分子之黏合位點。整個外顯子黏合坐標將由A(+65+85)表示，其係自該外顯子起始第

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53跳躍之反義寡聚物結合物

在某些實施例中，本發明之反義寡聚物結合物與肌肉萎縮蛋白基因之外顯子53靶區域互補且誘導外顯子53跳躍。具體而言，本發明係關於反義寡聚物結合物，其與肌肉萎縮蛋白前mRNA之外顯子53靶區域(稱為黏合位點)互補。在一些實施例中，黏合位點係H53A(+36+60)。

本發明之反義寡聚物結合物靶向肌肉萎縮蛋白前mRNA且誘導外顯子53之跳躍，因此其自經剪接成熟mRNA轉錄本排除或跳躍。藉由使外顯子53跳躍，將破壞的讀碼框恢復至框內突變。儘管DMD包含多種遺傳亞型，但本發明之反義寡聚物結合物經特殊設計以使肌肉萎縮蛋白前mRNA之外顯子53跳躍。適於使外顯子53跳躍之DMD突變包含DMD患者之亞群(8%)。

誘導外顯子53跳躍之反義寡聚物結合物之核鹼基序列經設計以與肌肉萎縮蛋白前mRNA之外顯子53內之特異性靶序列互補。在一些實施例中，反義寡聚物結合物之反義寡聚物係PMO，其中PMO之每一嗎啉基環連接至核鹼基，包括例如在DNA中發現之核鹼基(腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤及胸腺嘧啶)。

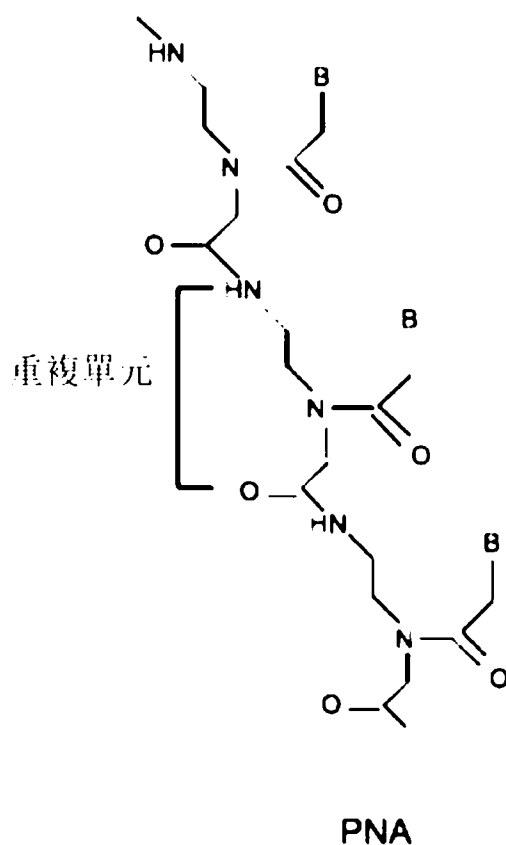
B. 寡聚物化學特徵

本發明之反義寡聚物結合物可採用多種反義寡聚物化學。寡聚物化學之實例包括(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硫代磷酸酯亞單位、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修飾化學品可組合產生2'O-Me-硫代磷酸酯主鏈。例如，參見PCT公開案第WO/2013/112053號及第WO/2009/008725號，其全文係以引用方式併入本文中。本發明寡聚物化學之實例性實施例進一步闡述於下文中。

1. 肽核酸(PNA)

肽核酸(PNA)係DNA之類似物，其中主鏈之結構與去氧核糖主鏈同形，由嘧啶或嘌呤鹼基所附接之N-(2-胺基乙基)甘胺酸單元組成組成。含有天然嘧啶及嘌呤鹼基之PNA遵從華特生-克裡克鹼基配對規則與互補寡聚物雜交，且模擬DNA之鹼基對識別(Egholm, Buchardt等人，1993)。PNA之主鏈係藉由肽鍵而非磷酸二酯鍵形成，此使其充分適於反義應用(參見下文結構)。主鏈係不帶電荷的，從而產生展現大於正常熱穩定性之PNA/DNA或PNA/RNA雙鏈體。PNA並不由核酸酶或蛋白酶識別。PNA之非限制性實例繪示於下文中。

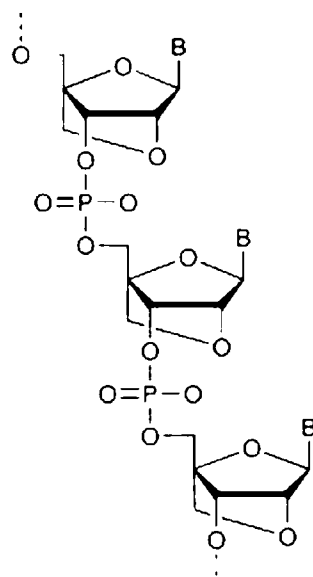


儘管天然結構存在根本結構變化，但PNA能夠以螺旋形式序列特異性結合至DNA或RNA。PNA之特徵包括與互補DNA或RNA之高結合親和力、由單鹼基失配引起之去穩定效應、核酸酶及蛋白酶抗性、獨立於鹽濃度與DNA或RNA雜交及與同嘌呤DNA形成三鏈體。PANAGENE™已研發出其專有Bts PNA單體(Bts：苯并噻唑-2-磺醯基)及專有寡聚化製程。使用Bts PNA單體之PNA寡聚化係由去保護、偶合及加帽之重複循環構成。PNA可使用業內已知之任一技術以合成方式產生。例如，參見美國專利第6,969,766號；第7,211,668號；第7,022,851號；第7,125,994號；第7,145,006號；及第7,179,896號。關於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。前述每一者之全文皆以引用方式併入本文中。

2. 鎖核酸(LNA)

反義寡聚物結合物亦可含有「鎖核酸」亞單位(LNA)。「LNA」係稱為橋接核酸(BNA)之一類修飾之成員。BNA之特徵在於將核糖環之組態鎖定於C3'-內式(北方(northern))糖褶中之共價鍵聯。對於LNA，橋係由2'-O與4'-C位置之間之亞甲基構成。LNA增強主鏈預組織及鹼基堆疊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；Koshkin等人，Tetrahedron (1998) 54:3607；Jesper Wengel, Accounts of Chem. Research (1999) 32:301；Obika等人，Tetrahedron Letters (1997) 38:8735；Obika等人，Tetrahedron Letters (1998) 39:5401；及Obika等人，Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230，其全文皆以引用方式併入本文中。LNA之非限制性實例繪示於下文中。

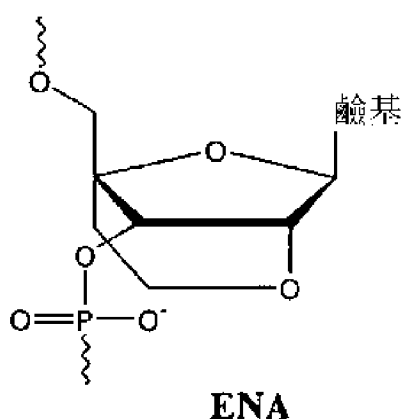


LNA

本發明之反義寡聚物結合物可納入一或多個LNA；在一些情形下，反義寡聚物結合物可完全由LNA構成。用於合成個別LNA核苷亞單位及將其納入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；其各自之全文皆以引用方式併入本文中。典型亞單位間連接體包括磷酸二酯及硫代磷酸酯部分；或者，可採用非含磷連接體。其他實施例包括含 LNA 之反義寡聚物結合物，其中每一 LNA 亞單位由 DNA 亞單位分開。某些反義寡聚物結合物係由交替 LNA 及 DNA 亞單位構成，其中亞單位間連接體為硫代磷酸酯。

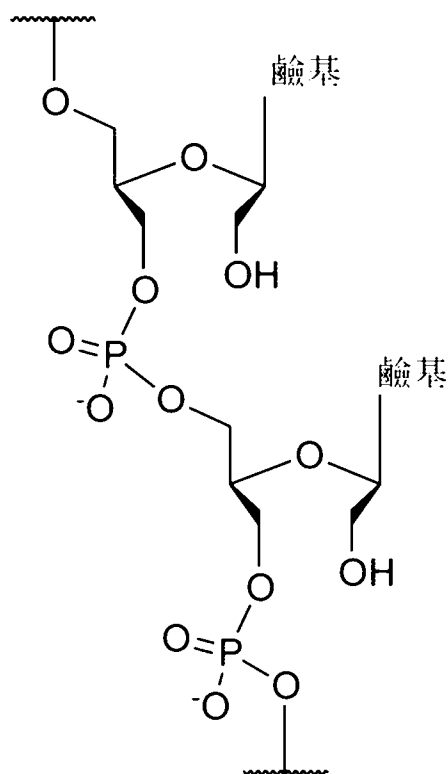
2'O,4'C-伸乙基橋接核酸(ENA)係 BNA 類之另一成員。非限制性實例繪示於下文中。



ENA 寡聚物及其製備闡述於 Obika 等人，*Tetrahedron Lett* (1997) 38 (50): 8735 中，該文獻之全文皆以引用方式併入本文中。本發明之反義寡聚物結合物可納入一或多個 ENA 亞單位。

3. 解鎖核酸(UNA)

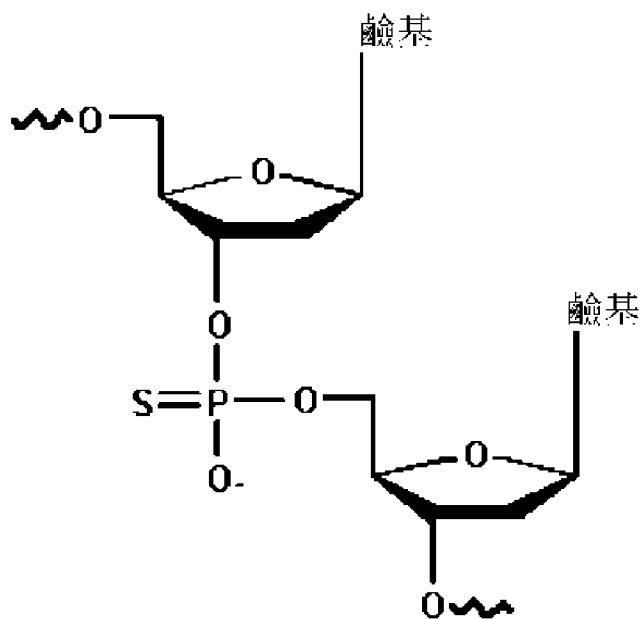
反義寡聚物結合物亦可含有解鎖核酸(UNA)亞單位。UNA 及 UNA 寡聚物係 RNA 之類似物，其中亞單位之 C2'-C3' 鍵已裂解。而 LNA 係組態受限的(相對於 DNA 及 RNA)，UNA 係極具撓性的。UNA 揭示於例如 WO 2016/070166 中。UNA 之非限制性實例繪示於下文中。



典型亞單位間連接體包括磷酸二酯及硫代磷酸酯部分；或者，可採用非含磷連接體。

4. 硫代磷酸酯

「硫代磷酸酯」(或S-寡核苷酸)係正常DNA之變體，其中非橋接氧經硫替代。硫代磷酸酯之非限制性實例繪示於下文中。

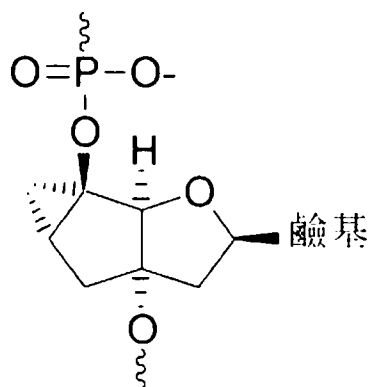


核苷酸間鍵之硫化降低內及外核酸酶之作用，該等核酸酶包括5'至3'及3'至5' DNA POL 1外核酸酶、核酸酶S1及P1、RNase、血清核酸酶及蛇毒磷酸二酯酶。硫代磷酸酯係藉由兩條主要途徑製得：藉由元素硫於二硫化碳中之溶液對氫磷酸酯之作用，或藉由用二硫化四乙基秋蘭姆(tetraethylthiuram disulfide, TETD)或3H-1, 2-苯并二硫雜環戊烯-3-酮1, 1-二氧化物(BDTD)硫化亞磷酸三酯之方法(例如，參見Iyer等人，J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990，其全文皆以引用方式併入本文中)。後一方法避免了元素硫在大多數有機溶劑中不溶解及二硫化碳毒性之問題。TETD及BDTD方法亦產生較高純度之硫代磷酸酯。

5. 三環-DNA及三環-硫代磷酸酯亞單位

三環-DNA (tc-DNA)係一類受限DNA類似物，其中每一核苷酸藉由引入環丙烷環經修飾以限制主鏈之組態撓性且最佳化扭轉角 γ 之主鏈幾何學。含同鹼性腺嘌呤及胸腺嘧啶之tc-DNA與互補RNA形成異常穩定之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，其全文皆以引用方式併入本文中。本發明之反義寡聚物結合物可納入一或多個三環-DNA亞單位；在一些情形下，反義寡聚物結合物可完全由三環-DNA亞單位構成。

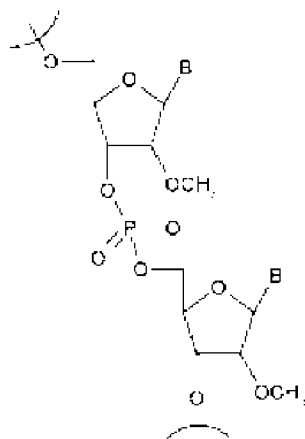
三環-硫代磷酸酯亞單位係具有硫代磷酸酯亞單位間鍵聯之三環-DNA亞單位。三環-硫代磷酸酯亞單位及其合成闡述於國際專利申請公開案第WO 2013/053928號中，其全文皆以引用方式併入本文中。本發明之反義寡聚物結合物可納入一或多個三環-DNA亞單位；在一些情形下，反義寡聚物結合物可完全由三環-DNA亞單位構成。三環-DNA/三環-硫代磷酸酯亞單位之非限制性實例繪示於下文中。



三環-DNA

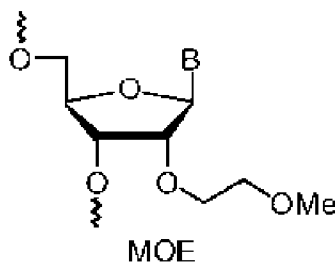
6. 2'-O-甲基、2'-O-MOE及2'-F寡聚物

「2'-O-Me寡聚物」分子在核糖分子之2'-OH殘基處攜載甲基。2'-O-Me-RNA顯示與DNA相同(或相似)之行為，但經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)組合以進一步穩定。2'-O-Me寡聚物(磷酸二酯或硫代磷酸酯)可根據業內之常規技術合成(例如，參見Yoo等人，*Nucleic Acids Res.* 32:2008-16, 2004，其全文皆以引用方式併入本文中)。2'-O-Me寡聚物之非限制性實例繪示於下文中。

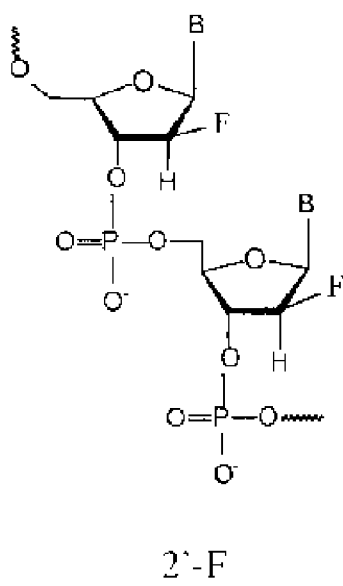


2'-O-Me

2'-O-甲氧基乙基寡聚物(2'-O MOE)在核糖分子之2'-OH殘基處攜載甲氧基乙基且論述於Martin等人，*Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504, 1995中，其全文皆以引用方式併入本文中。2'-O MOE亞單位之非限制性實例繪示於下文中。

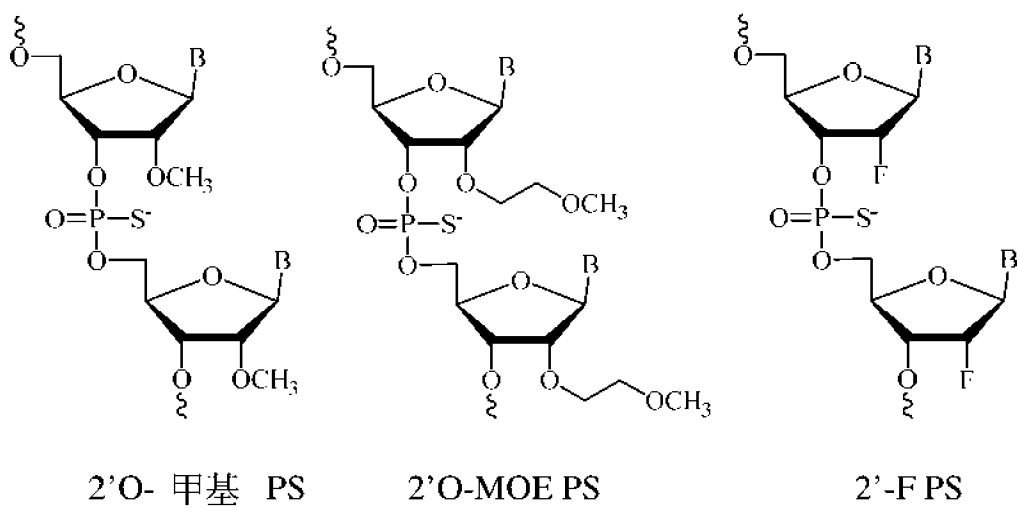


2'-氟(2'-F)寡聚物在2'位具有氟基替代2'OH。2'-F寡聚物之非限制性實例繪示於下文中。

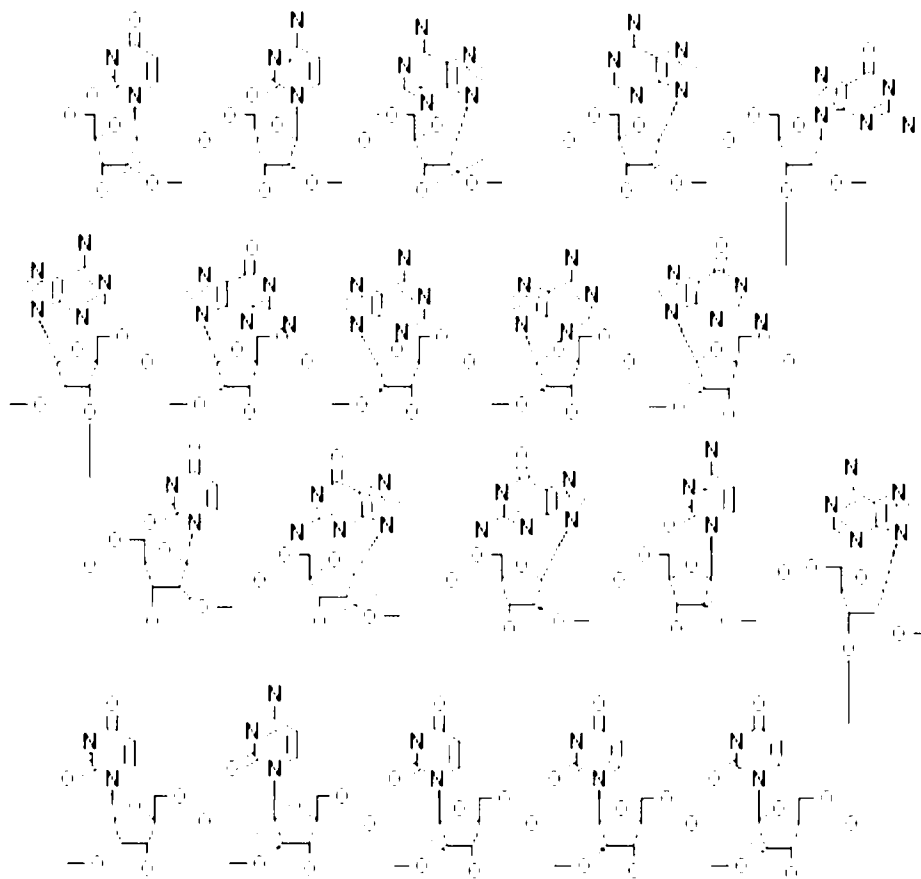


2'-氟寡聚物進一步闡述於WO 2004/043977中，其全文皆以引用方式併入本文中。

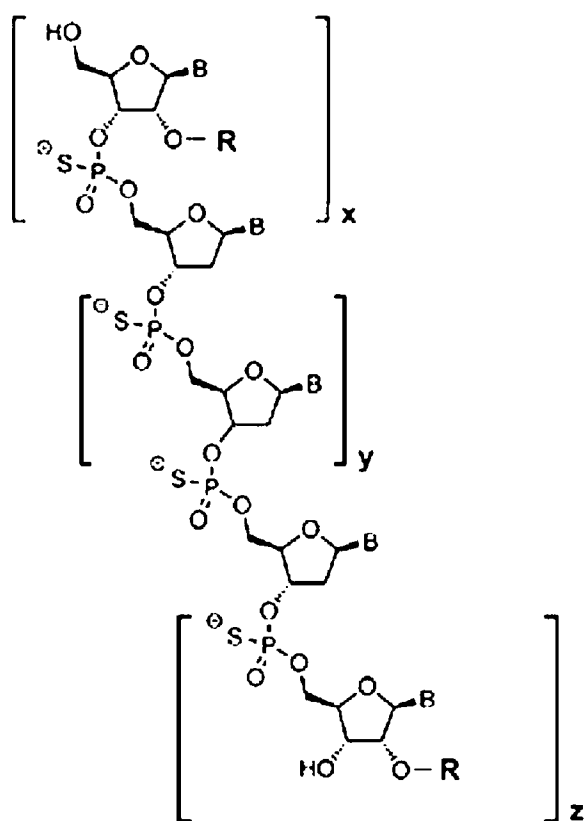
2'-O-甲基、2' O-MOE及2'-F寡聚物亦可包含一或多個硫代磷酸酯(PS)鍵聯，如下文所繪示。



另外，2'-O-甲基、2'-O-MOE及2'-F寡聚物可在整個寡聚物中、例如如下文所繪示之2'-O-甲基PS寡聚物屈沙培森(drisapersen)中包含PS亞單位間鍵聯。



或者，2'-O-甲基、2'-O-MOE及/或2'-F寡聚物可在寡聚物之末端包含PS鍵聯，如下文所繪示。



其中：

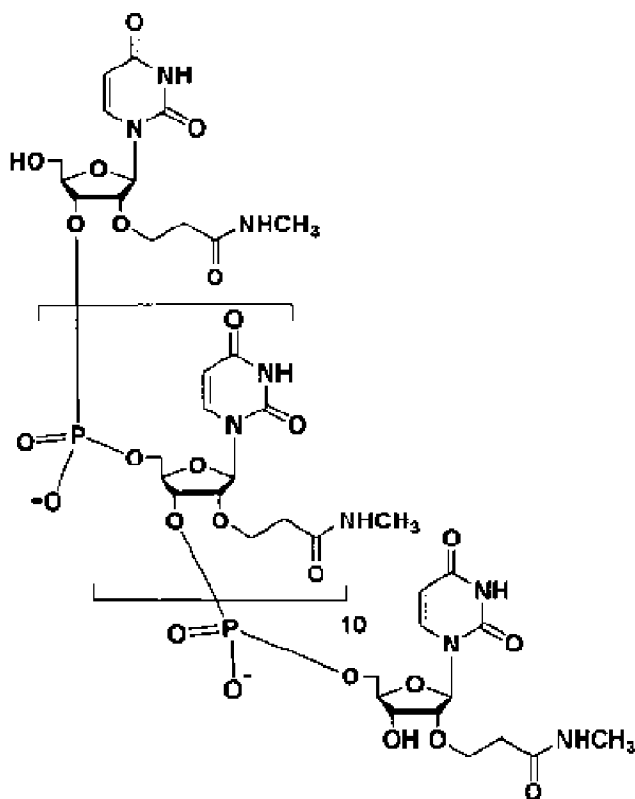
R係 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ (甲氧基乙基或MOE)；且

x、y及z分別表示含於所指定5'-翼區、中心間隙區及3'-翼區中每一者內之核苷酸數。

本發明之反義寡聚物結合物可納入一或多個2' O-甲基、2' O-MOE及2'-F亞單位且可利用本文所述之任一亞單位間鍵聯。在一些情況下，本發明之反義寡聚物結合物可完全由2' O-甲基、2' O-MOE或2'-F亞單位構成。本發明反義寡聚物結合物之一個實施例完全由2' O-甲基亞單位構成。

7. 2'-O-[2-(N-甲基胺甲醯基)乙基]寡聚物(MCE)

MCE係可用於本發明反義寡聚物結合物之2' O修飾之核糖核苷之另一實例。在此處，2' OH衍生化成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。

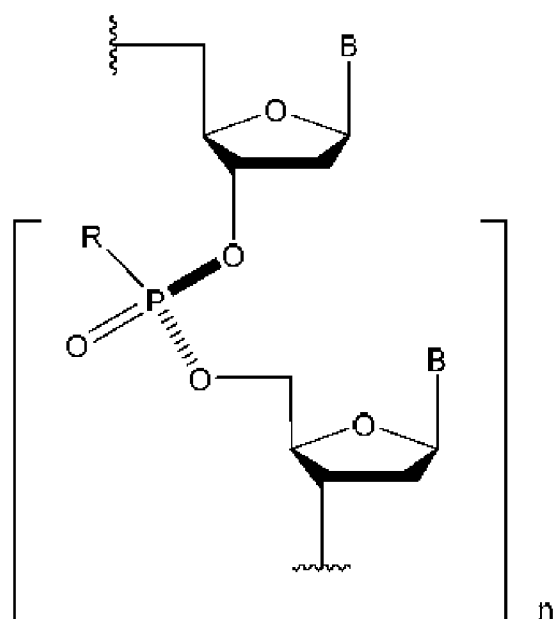


MCE

MCE 及其合成闡述於 Yamada 等人，*J. Org. Chem.* (2011) 76(9):3042-53 中，其全文皆以引用方式併入本文中。本發明之反義寡聚物結合物可納入一或多個 MCE 亞單位。

8. 立體特異性寡聚物

立體特異性寡聚物係其中每一含磷鍵聯之立體化學係藉由合成方法固定、使得產生實質上立體純之寡聚物的彼等。立體特異性寡聚物之非限制性實例繪示於下文中。



在上述實例中，寡聚物之每一磷具有相同的立體組態。其他實例包括上文所述之寡聚物。舉例而言，基於LNA、ENA、三環-DNA、MCE、2' O-甲基、2' O-MOE、2'-F及嗎啉基之寡聚物可用立體特異性含磷核苷間鍵聯(例如硫代磷酸酯、磷酸二酯、胺基磷酸酯、磷二醯胺或其他含磷核苷間鍵聯)製備。立體特異性寡聚物、用於製備該等寡聚物之製備方法、手性控制合成、手性設計及手性助劑詳述於例如WO2017192664、WO2017192679、WO2017062862、WO2017015575、WO2017015555、WO2015107425、WO2015108048、WO2015108046、WO2015108047、WO2012039448、WO2010064146、WO2011034072、WO2014010250、WO2014012081、WO20130127858及WO2011005761中，其各自之全文皆以引用方式併入本文中。

立體特異性寡聚物可具有呈 R_P 或 S_P 組態之含磷核苷間鍵聯。其中鍵聯之立體組態受控之手性含磷鍵聯稱為「立體純」，而其中鍵聯之立體組態不受控之手性含磷鍵聯稱為「立體無規」。在某些實施例中，本發明之寡聚物包含複數個立體純及立體無規鍵聯，使得所得寡聚物在寡聚物之預

定位置具有立體純亞單位。立體純亞單位之位置之實例提供於國際專利申請公開案第WO 2017/062862 A2號中之圖7A及7B中。在實施例中，寡聚物中之所有手性含磷鍵聯為立體無規。在實施例中，寡聚物中之所有手性含磷鍵聯為立體純。

在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物中之所有 n 個手性含磷鍵聯為立體無規。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物中之所有 n 個手性含磷鍵聯為立體純。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物中 n 個含磷鍵聯之至少10% (至最接近整數)為立體純。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物中 n 個含磷鍵聯之至少20% (至最接近整數)為立體純。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物中 n 個含磷鍵聯之至少30% (至最接近整數)為立體純。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物中 n 個含磷鍵聯之至少40% (至最接近整數)為立體純。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物中 n 個含磷鍵聯之至少50% (至最接近整數)為立體純。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物中 n 個含磷鍵聯之至少60% (至最接近整數)為立體純。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物中 n 個含磷鍵聯之至少70% (至最接近整數)為立體純。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物中 n 個含磷鍵聯之至少80% (至最接近整數)為立體純。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，

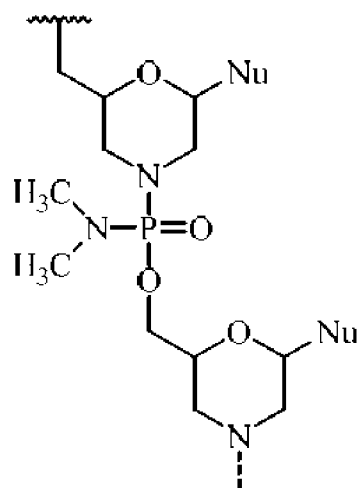
寡聚物中 n 個含磷鍵聯之至少90% (至最接近整數)為立體純。

在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少2個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少3個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少4個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少5個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少6個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少7個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少8個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少9個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少10個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少11個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少12個具有相同立體定向(即 S_P

或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少13個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少14個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少15個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少16個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少17個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少18個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少19個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。在具有 n 個手性含磷鍵聯(其中 n 係1或更大之整數)之寡聚物之實施例中，寡聚物含有至少20個具有相同立體定向(即 S_P 或 R_P)之鄰接立體純含磷鍵聯。

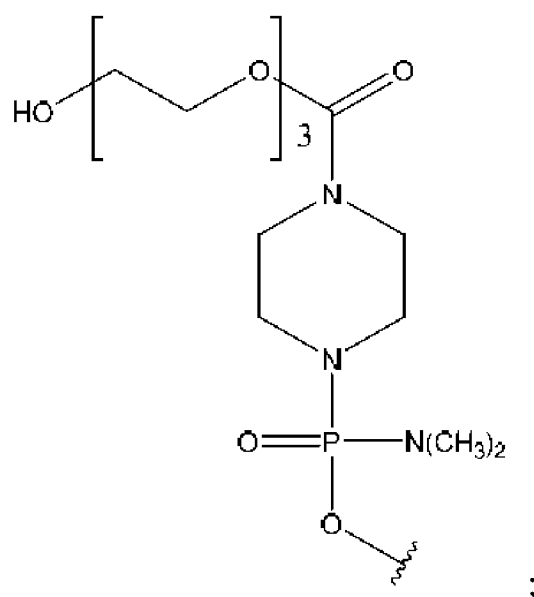
9. 嗎啉基寡聚物

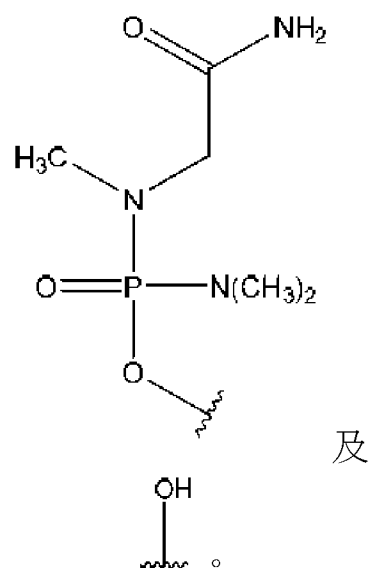
本發明之實例性實施例係關於以下一般結構之磷二醯胺嗎啉基寡聚物：



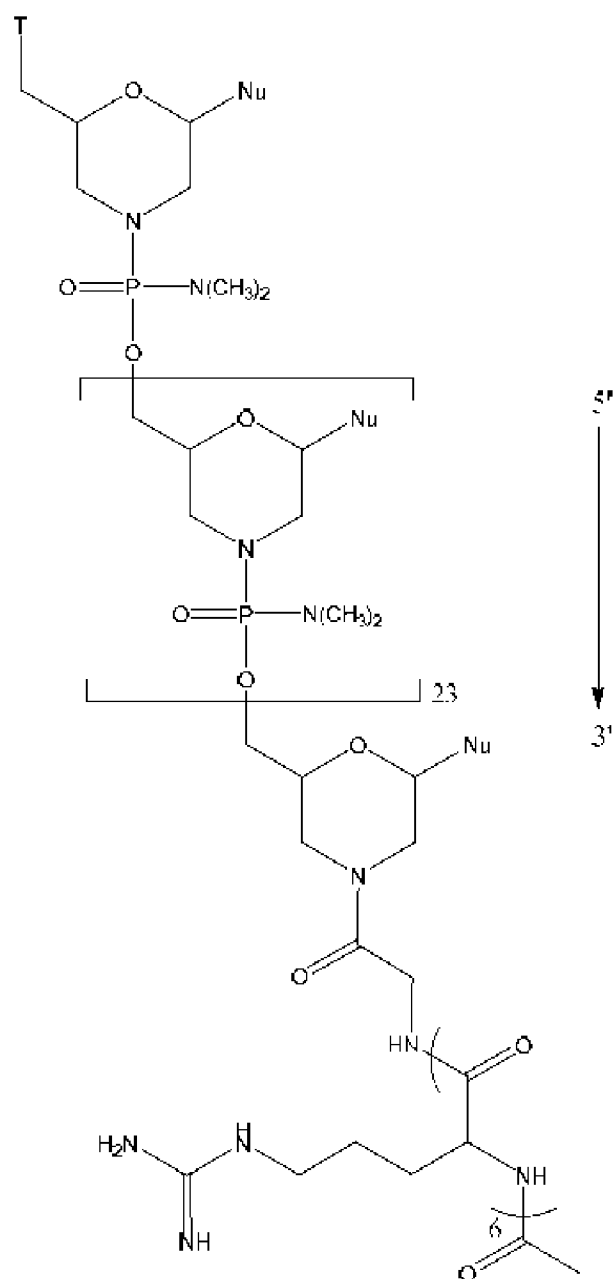
且如 Summerton, J. 等人，*Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997)之圖2中所述。如本文所述之嗎啉基意欲涵蓋前述一般結構之所有立體異構物及互變異構物。嗎啉基寡聚物之合成、結構及結合特徵詳述於美國專利第5,698,685號；第5,217,866號；第5,142,047號；第5,034,506號；第5,166,315號；第5,521,063號；第5,506,337號；第8,076,476號；及第8,299,206號中，其皆以引用方式併入本文中。

在某些實施例中，嗎啉基在寡聚物之5'或3'末端與「尾」部分結合以增加其穩定性及/或溶解度。實例性尾包括：





在各個實施例中，本發明之反義寡聚物結合物具有式(I)：

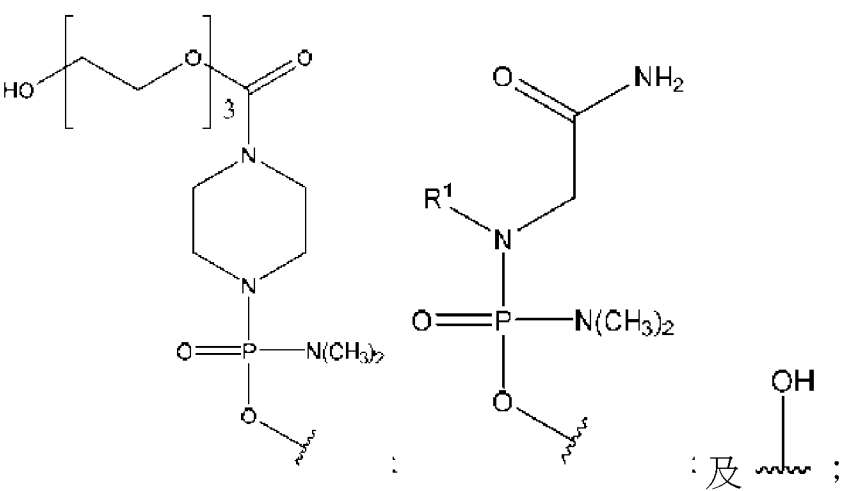


(I)

或其醫藥上可接受之鹽，其中：

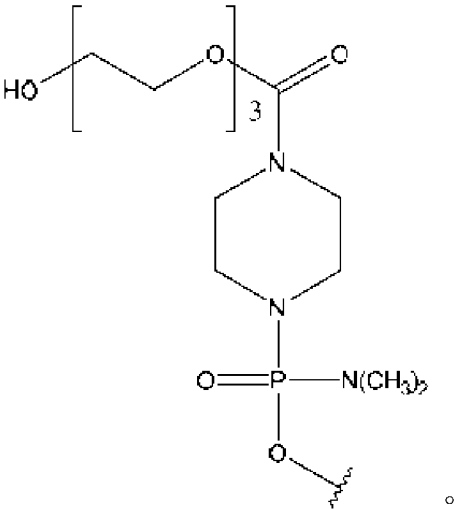
每一Nu係一起形成靶向序列之核鹼基；

T係選自以下之部分：



R¹係C₁-C₆烷基；

其中靶向序列與肌肉萎縮蛋白前mRNA中之外顯子53黏合位點(稱為H53A(+36+60))互補。



在各個實施例中，T係

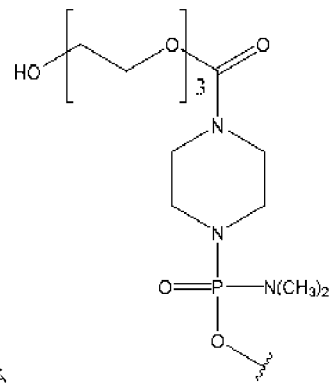
在各個實施例中，R¹係甲基、CF₃、CCl₃、CFC1₂、CF₂Cl、乙基、CH₂CF₃、CF₂CF₃、丙基、異丙基、丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、異戊基、新戊基、己基、異己基、3-甲基戊基、2,2-二甲基丁基或2,3-二甲基丁基。

在一些實施例中，式(I)之反義寡聚物結合物係其HCl (鹽酸)鹽。在某些實施例中，HCl鹽係.6HCl鹽。

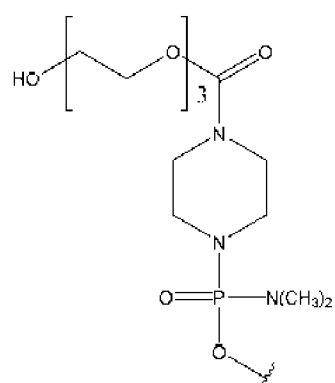
在一些實施例中，每一Nu獨立地選自胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、胸腺

嘧啶(T)、腺嘌呤(A)、5-甲基胞嘧啶(5mC)、尿嘧啶(U)及次黃嘌呤(I)。

在一些實施例中，靶向序列係 SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3')，其中每一胸腺嘧啶(T)視情況為尿嘧啶(U)。

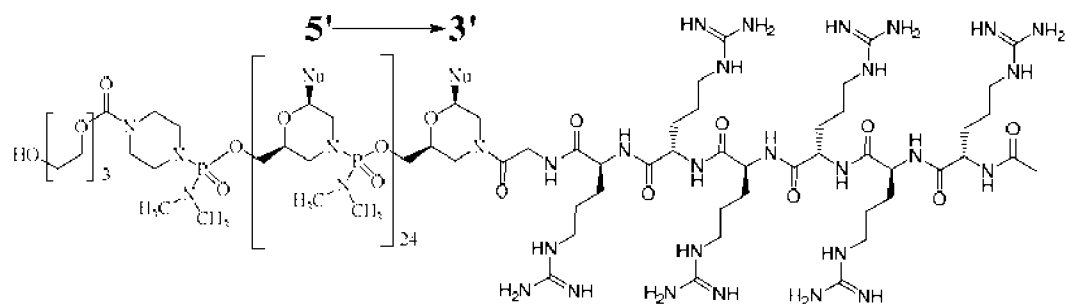


在各個實施例中，T係，且靶向序列係 SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3')，其中每一胸腺嘧啶(T)視情況為尿嘧啶(U)。



在各個實施例中，T係，且靶向序列係 SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3')。

在一些實施例(包括例如式(I)之一些實施例)中，本發明之反義寡聚物結合物具有式(II)：



(II)

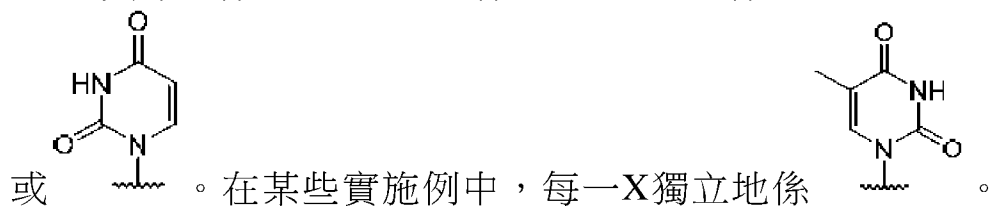
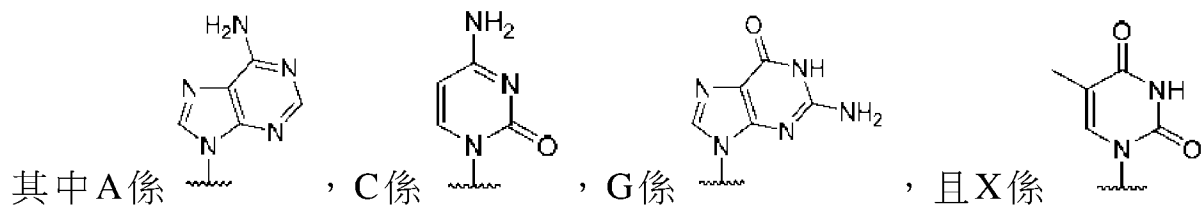
或其醫藥上可接受之鹽，其中：

每一Nu係一起形成靶向序列之核鹼基，該靶向序列與肌肉萎縮蛋白前mRNA中之外顯子53黏合位點(稱為H53A(+36+60))互補。

在一些實施例中，每一Nu獨立地選自胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、腺嘌呤(A)、5-甲基胞嘧啶(5mC)、尿嘧啶(U)及次黃嘌呤(I)。

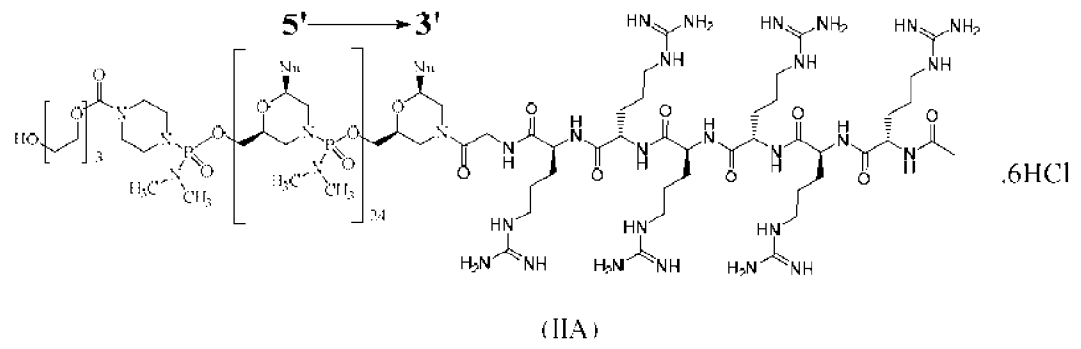
在各個實施例中，每一Nu自1至25及5'至3'係(SEQ ID NO: 1)：

位置 編號 5' 至 3'	Nu	位置 編號 5' 至 3'	Nu	位置 編號 5' 至 3'	Nu	位置 編號 5' 至 3'	Nu	位置 編號 5' 至 3'	Nu
1	G	6	C	11	G	16	G	21	X
2	X	7	X	12	X	17	A	22	G
3	X	8	C	13	X	18	A	23	X
4	G	9	C	14	C	19	G	24	X
5	C	10	G	15	X	20	G	25	C



在一些實施例中，式(II)之反義寡聚物結合物係其HCl (鹽酸)鹽。在某些實施例中，HCl鹽係.6HCl鹽。

在一些實施例(包括例如式(II)之一些實施例)中，本發明之反義寡聚物結合物具有式(IIA)：

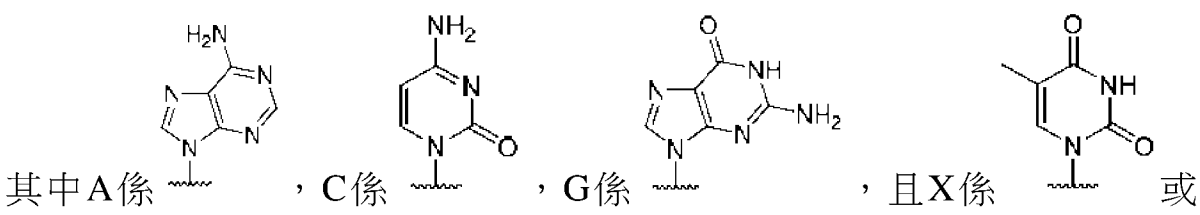


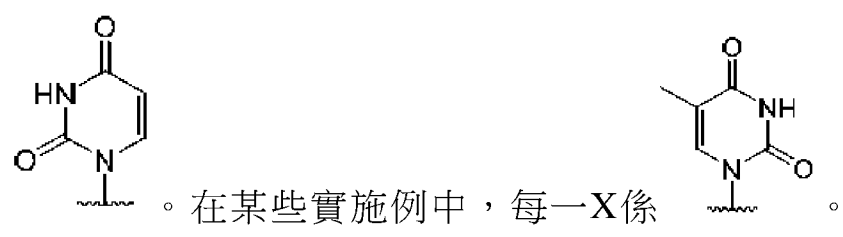
其中每一Nu係一起形成靶向序列之核鹼基，該靶向序列與肌肉萎縮蛋白前mRNA中之外顯子53黏合位點(稱為H53A(+36+60))互補。

在一些實施例中，每一Nu獨立地選自胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、腺嘌呤(A)、5-甲基胞嘧啶(5mC)、尿嘧啶(U)及次黃嘌呤(I)。

在各個實施例中，每一Nu自1至25及5'至3'係(SEQ ID NO: 1)：

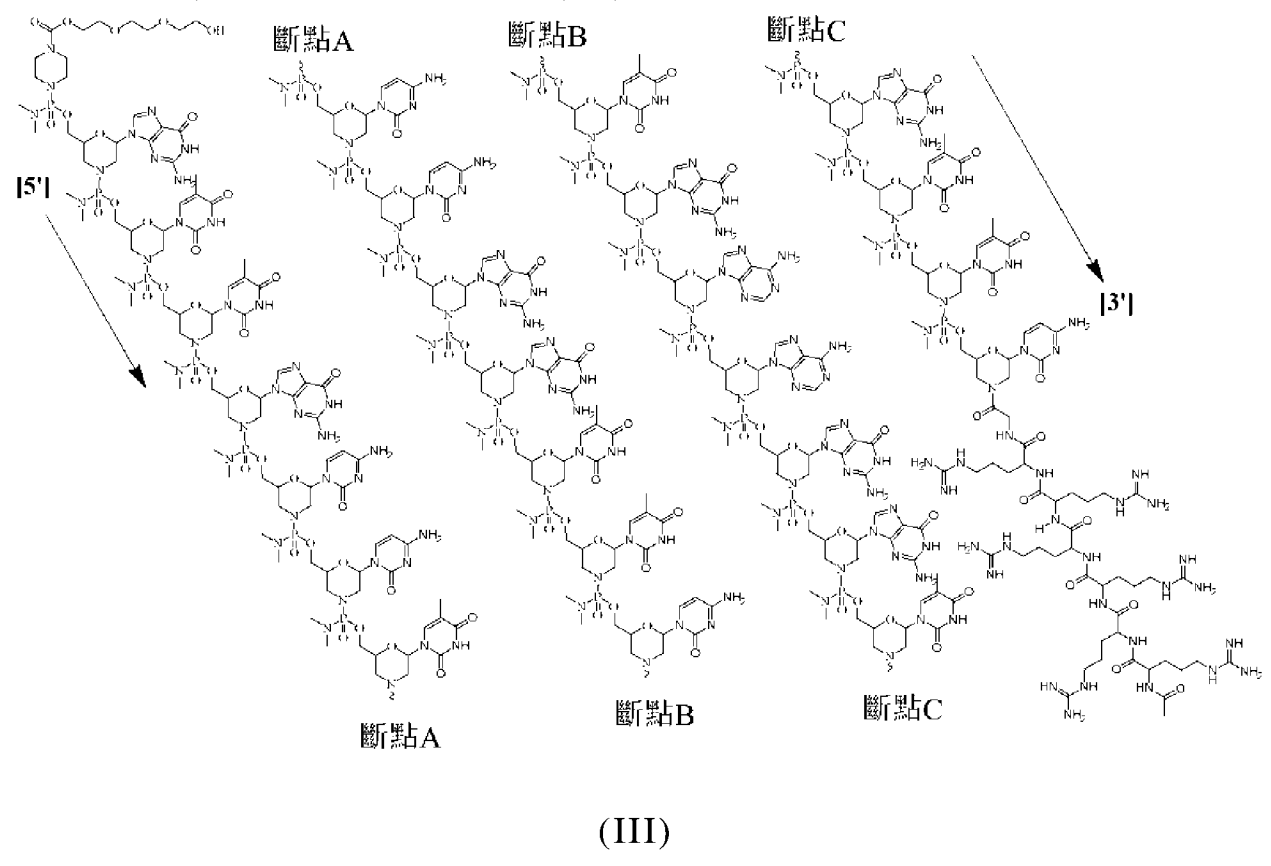
位置 編號5'至 3'	Nu	位置 編號5'至 3'	Nu	位置 編號5'至 3'	Nu	位置 編號5'至 3'	Nu	位置 編號5'至 3'	Nu
1	G	6	C	11	G	16	G	21	X
2	X	7	X	12	X	17	A	22	G
3	X	8	C	13	X	18	A	23	X
4	G	9	C	14	C	19	G	24	X
5	C	10	G	15	X	20	G	25	C





在一些實施例(包括例如式(II)及式(IIA)之反義寡聚物結合物之實施例)中，靶向序列係 SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3')，其中每一胸腺嘧啶(T)視情況為尿嘧啶(U)。在各個實施例(包括例如式(II)及式(IIA)之反義寡聚物結合物之實施例)中，靶向序列係 SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3')。

在一些實施例(包括例如式(I)之反義寡聚物結合物之實施例)中，本發明之反義寡聚物結合物具有式(III)：

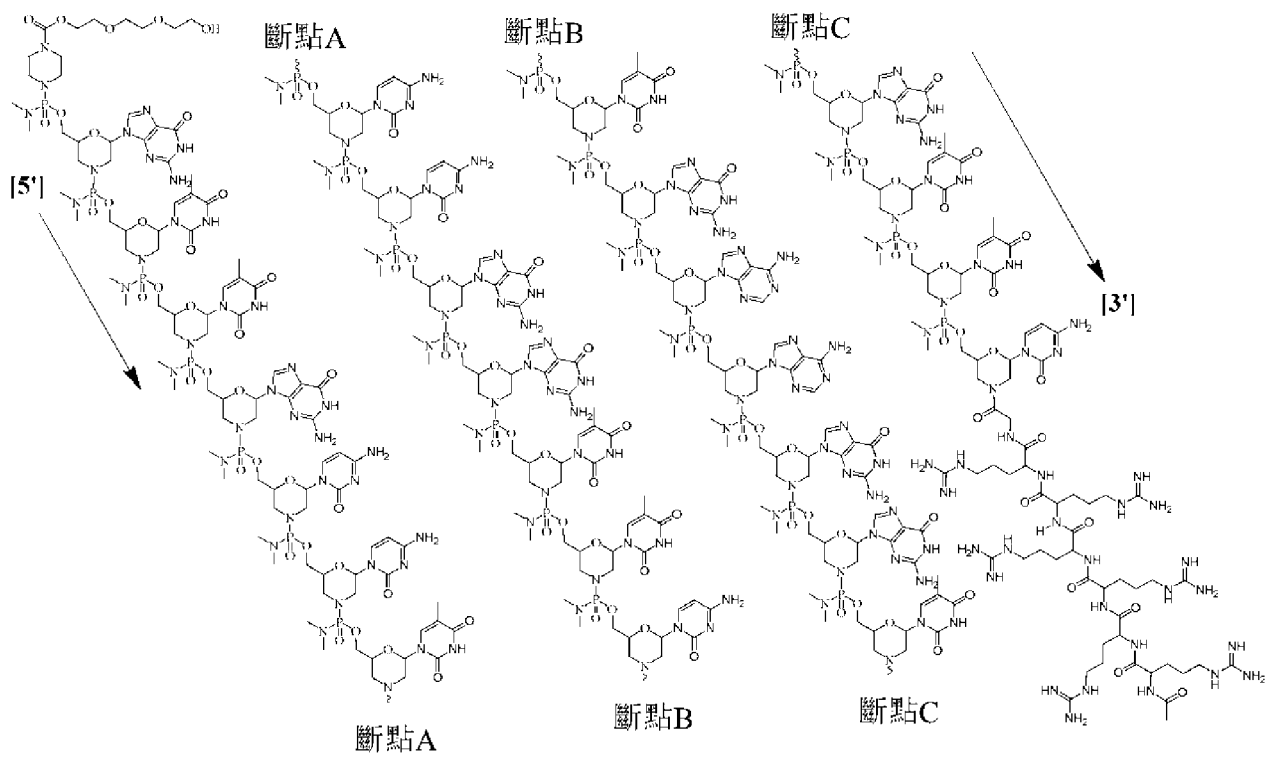


或其醫藥上可接受之鹽。

在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係其HCl (鹽酸)鹽。在

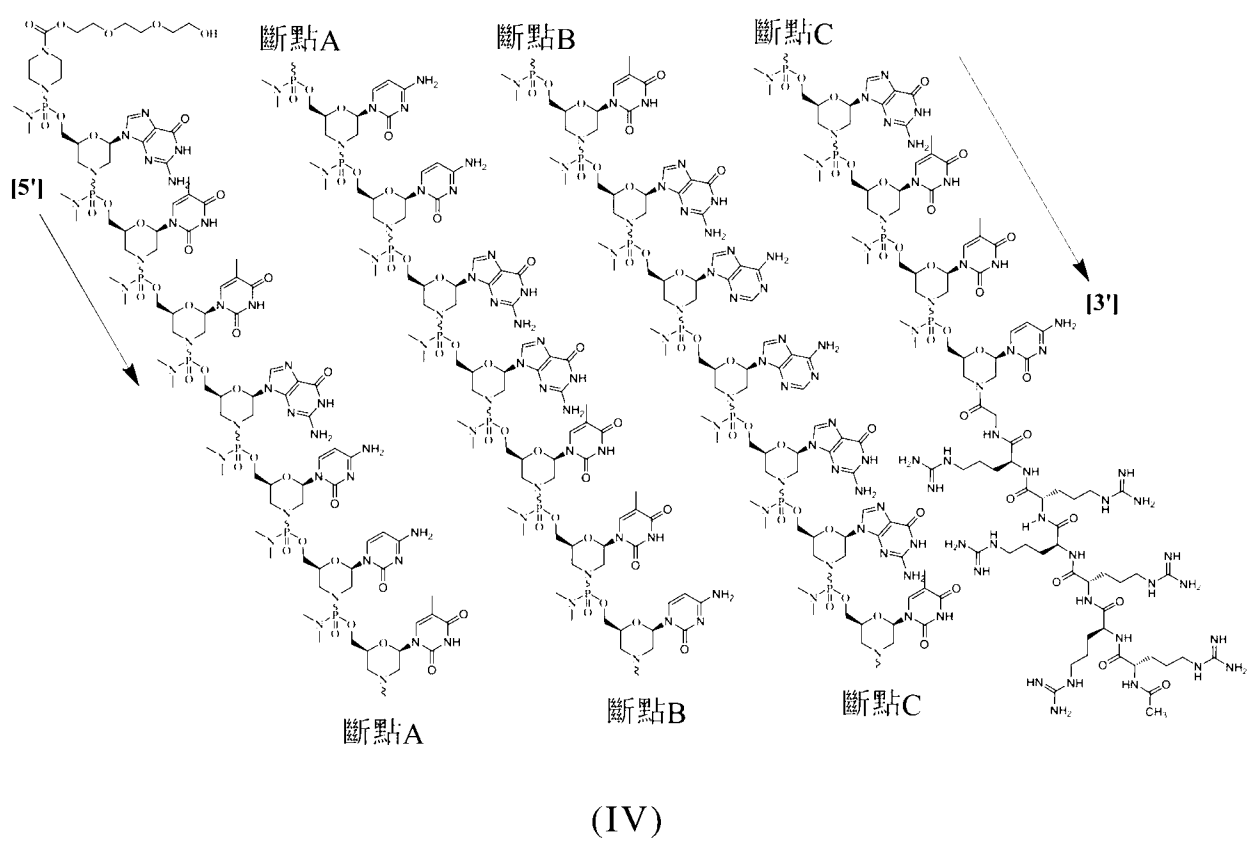
某些實施例中，HCl鹽係.6HCl鹽。

在一些實施例(包括例如式(III)之反義寡聚物結合物之實施例)中，本發明之反義寡聚物結合物具有式(IIIA)：



(IIIA)。

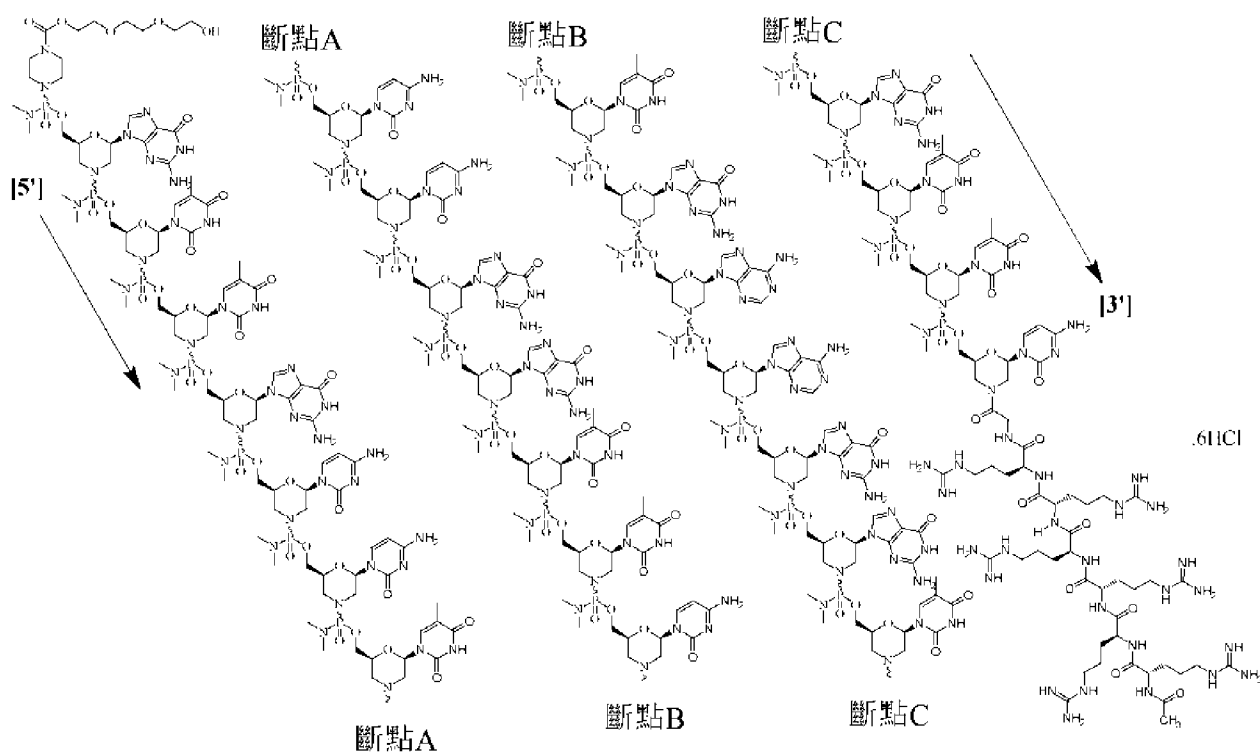
在本發明之一些實施例(包括式(I)之反義寡聚物結合物之一些實施例及式(III)之反義寡聚物結合物之實施例)中，反義寡聚物結合物具有式(IV)：



或其醫藥上可接受之鹽。

在一些實施例中，式(IV)之反義寡聚物結合物係其HCl (鹽酸)鹽。在某些實施例中，HCl鹽係.6HCl鹽。

在一些實施例(包括例如式(IV)之反義寡聚物結合物之實施例)中，本發明之反義寡聚物結合物具有式(IVA)：



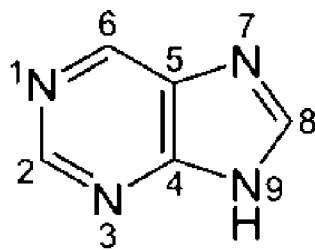
(IVA) $\circ$

10. 核鹼基修飾及取代

在某些實施例中，本發明之反義寡聚物結合物係由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)。在各個實施例中，本發明之反義寡聚物結合物係由胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、腺嘌呤(A)、5-甲基胞嘧啶(5mC)、尿嘧啶(U)及次黃嘌呤(I)構成。

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鹼基外之鹼基修飾或經取代。含有經修飾或經取代鹼基之寡聚物包括其中一或多個最常在核酸中發現之嘌呤或嘧啶鹼基經較不常見或非天然鹼基替代之寡聚物。

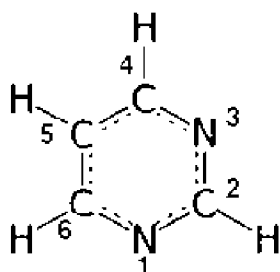
嘌呤鹼基包含稠合至咪唑環之嘧啶環，如藉由以下通式所述。



嘌呤

腺嘌呤及鳥嘌呤係兩個最常在核酸中發現之嘌呤核鹼基。其他天然嘌呤包括(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。

嘧啶鹼基包含如藉由以下通式所述之6員嘧啶環。



嘧啶

胞嘧啶、尿嘧啶及胸腺嘧啶係最常在核酸中發現之嘧啶鹼基。其他天然嘧啶包括(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，本文所述之寡聚物含有胸腺嘧啶鹼基替代尿嘧啶。

其他適宜鹼基包括(但不限於)：2,6-二胺基嘌呤、乳清酸、2-胍丁胺基胞苷、立西啉(lysidine)、2-硫嘧啶(例如2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶)、G-鈷及其衍生物、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-2,6-二氨基嘌呤、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-氨基嘌呤(cPent-AP)及N²-丙基-2-氨基嘌呤(Pr-AP)、假尿嘧啶或其衍生物；及變性或萬能鹼基(如2,6-二氟甲苯)或無鹼基(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；或其中環氧基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)，其全文皆以引用方式併入本文中。顯示cPent-G、cPent-AP及Pr-AP在納入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具有C-糖苷而非規則N-糖苷(如在尿苷中)之天然異構化形式。含假尿苷之合成mRNA與含尿苷之mPvNA相比可具有經改良之安全性概況(WO 2009127230，其全文皆以引用方式併入本文中)。

某些核鹼基尤其可用於增加本發明反義寡聚物結合物之結合親和力。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-氨基丙基腺嘌呤、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°C-1.2°C且係目前較佳之鹼基取代，甚至更尤其在與2'-O-甲氧基乙基糖修飾組合時。其他實例性經修飾核鹼基包括其中核鹼基之至少一個氫原子經氟替代之彼等。

11. 反義寡聚物結合物之醫藥上可接受之鹽

本文所述反義寡聚物結合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。在此方面中，術語「醫藥上可接受之鹽」係指本發明反義寡聚物結合物之相對無毒之無機及有機酸加成鹽。該等鹽可於投與媒劑或劑型製造製

程中或藉由各別地使本發明之經純化反義寡聚物結合物以其游離鹼形式與適宜有機或無機酸反應及在後續純化期間分離由此形成之鹽原位製備。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、甲苯磺酸鹽、檸檬酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、萘酸鹽、甲磺酸鹽、葡庚糖酸鹽、乳糖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)。

標的反義寡聚物結合物之醫藥上可接受之鹽包括反義寡聚物結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，該等習用無毒鹽包括源自諸如以下等無機酸之彼等：鹽酸、氫溴酸、硫酸、胺基磺酸、磷酸、硝酸及諸如此類；及自諸如以下等有機酸製備之彼等：乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、蘋果酸、酒石酸、檸檬酸、抗壞血酸、巴莫酸、馬來酸、羥基馬來酸、苯乙酸、麩胺酸、苯甲酸、柳酸、磺胺酸、2-乙醯氧基苯甲酸、富馬酸、甲苯磺酸、甲烷磺酸、乙烷二磺酸、草酸、羥乙磺酸及諸如此類。

在某些實施例中，本發明之反義寡聚物結合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。術語「醫藥上可接受之鹽」在該等情況下係指本發明反義寡聚物結合物之相對無毒之無機及有機鹼加成鹽。該等鹽同樣可於投與媒劑或劑型製造製程中或藉由各別地使經純化反義寡聚物結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、二級或三級胺反應原位製備。代表性鹼金屬或

鹼土金屬鹽包括鋰鹽、鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽、鎂鹽及銨鹽及諸如此類。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，本發明提供適於治療性遞送反義寡聚物結合物之調配物或醫藥組合物，如本文所述。因此，在某些實施例中，本發明提供醫藥上可接受之組合物，其包含治療有效量之一或多種本文所述之反義寡聚物結合物，與一或多種醫藥上可接受之載劑(添加劑)及/或稀釋劑調配在一起。儘管本發明之反義寡聚物結合物可單獨投與，但反義寡聚物結合物較佳以醫藥調配物(組合物)形式投與。在實施例中，調配物之反義寡聚物結合物具有式(III)。

可適用於本發明反義寡聚物結合物之用於遞送核酸分子之方法闡述於例如以下文獻中：Akhtar等人，1992, Trends Cell Bio., 2:139；Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, Akhtar編輯, 1995, CRC Press；及Sullivan等人，PCT WO 94/02595。該等及其他方案可用於遞送幾乎任何核酸分子，包括本發明之反義寡聚物結合物。

本發明之醫藥組合物可經特殊調配用於以固體或液體形式投與，包括適於以下各項之彼等：(1) 經口投與，例如施用至舌之灌藥(水性或非水性溶液或懸浮液)、錠劑(經靶向用於經頰、舌下或全身性吸收)、濃注、粉末、顆粒、糊劑；(2) 非經腸投與，以例如無菌溶液或懸浮液或持續釋放調配物形式例如藉由皮下、肌肉、靜脈內或硬膜外注射；(3) 局部施用，例如以施用至皮膚之乳霜、軟膏或受控釋放貼片或噴霧劑形式；(4) 陰道內或直腸內，例如以子宮托、乳霜或泡沫形式；(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的一些實例包括(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、玉米油及大豆油；(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) 無熱源水；(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) 用於醫藥調配物中之其他無毒相容性物質。

適於與本發明之反義寡聚物結合物一起調配之藥劑之其他非限制性實例包括：PEG結合核酸；磷脂結合核酸；含有親脂性部分之核酸；硫代磷酸酯；P-醣蛋白抑制劑(例如Pluronic P85)，其可增強藥物進入多個組織中；生物可降解聚合物，例如聚(D,L-乳酸交酯-共乙交酯)微球體用於植入後持續釋放遞送(Emerich, D F等人，1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.；及負載奈米粒子，例如由聚氰基丙烯酸丁基酯製得之彼等，其可將藥物遞送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)。

本發明之特徵亦在於組合物之用途，該組合物包含含有聚(乙二醇) (「PEG」)脂質之表面經修飾脂質體(PEG修飾、具支鏈及不具支鏈或其組

合，或長循環脂質體或隱形脂質體)。本發明之寡聚物結合物亦可包含各個分子量之共價附接之PEG分子。該等調配物提供增加靶組織中之藥物累積之方法。此類藥物載劑抵抗調理作用及單核巨噬細胞系統(MPS或RES)之消除，藉此實現經囊封藥物之較長血液循環時間及增強的組織暴露(Lasic等人，Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627；Ishiwata等人，Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011)。已顯示該等脂質體推測因新生血管化靶組織中之外滲及捕獲而在腫瘤中選擇性累積(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之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, 270, 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，基於其避免代謝攻擊性MPS組織(例如肝及脾)中之累積之能力，長循環脂質體亦可能保護藥物免於較大程度之核酸酶降解。

在另一實施例中，本發明包括如美國專利第6,692,911號、第7,163,695號及第7,070,807號中所述製備用於遞送之反義寡聚物結合物醫藥組合物。就此而言，在一個實施例中，本發明提供包含離胺酸及組胺酸之共聚物(HK)之組合物中之本發明反義寡聚物結合物(如美國專利第7,163,695號、第7,070,807號及第6,692,911號中所述)單獨或與PEG (例如具支鏈或不具支鏈之PEG或二者之混合物)之組合、與PEG及靶向部分之組合或前述任一者與交聯劑之組合。在某些實施例中，本發明提供包含葡萄糖酸修飾之聚組胺酸或葡萄糖化聚組胺酸/運鐵蛋白-聚離胺酸之醫藥組

合物中之反義寡聚物結合物。熟習此項技術者亦將意識到，具有類似於His及Lys之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)、著色劑、釋放劑、包衣劑、甜味劑、矯味劑、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、氫氯酸半胱胺酸、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。

本發明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。調配物可便捷地以單位劑型呈現，且可藉由製藥領域熟知之任何方法來製備。可與載劑材料組合產生單一劑型之活性成分之量將端視所治療之個體及具體投與模式而變化。可與載劑材料組合產生單一劑型之活性成分之量通常將為產生治療效應之活性成分之量。通常，此量將介於約0.1%至約99%之活性成分、較佳約5%至約70%、最佳約10%至約30%範圍內。

在某些實施例中，本發明之調配物包含選自以下之賦形劑：環糊精、纖維素、脂質體、微團形成劑(例如膽汁酸)及聚合載劑(例如聚酯及聚酸酐)；及本發明之反義寡聚物結合物。在實施例中，調配物之反義寡聚物結合物具有式(III)。在某些實施例中，上文所提及之調配物使得本發明之反義寡聚物結合物為經口可利用的。

製備該等調配物或醫藥組合物之方法包括使本發明之反義寡聚物結合物與載劑及視情況一或多種輔助成分混合之步驟。一般而言，該等調配物係藉由以下方式來製備：使本發明之反義寡聚物結合物與液體載劑或微細固體載劑或二者均勻且充分地混合，且隨後(若需要)使產物成型。

適於經口投與之本發明調配物可呈下列形式：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蓍膠)、粉末、顆粒；或呈水性或非水性液體中之溶液或懸浮液形式；或呈水包油型或油包水型液體乳液形式；或呈酏劑或糖漿形式；或呈軟錠劑(使用惰性基質，例如明膠及甘油、或蔗糖及阿拉伯膠)及/或呈漱口劑及諸如此類，其各自含有預定量之本發明反義寡聚物結合物作為活性成分。本發明之反義寡聚物結合物亦可以濃注、糖劑或糊劑形式投與。

在用於經口投與之本發明固體劑型(膠囊、錠劑、丸劑、糖衣錠、粉末、顆粒、口含錠及諸如此類)中，可將活性成分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) 緩溶劑，例如石蠟；(6) 吸收加速劑(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、甘油單硬脂酸酯及非離子型表面活性劑；(8) 吸收劑，例如高嶺土及膨潤土；(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；及(10) 著色劑；及(11) 控制釋

放劑，例如交聯聚維酮(crospovidone)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液。在使用諸如乳糖(lactose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇及諸如此類等賦形劑之軟殼及硬殼明膠膠囊中，亦可使用相似類型之固體醫藥組合物作為填充劑。

可藉由壓縮或模製來製備錠劑，其視情況含有一或多種輔助成分。壓縮錠劑可使用黏合劑(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(例如甘醇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備。

本發明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)可視情況經刻痕或使用諸如腸溶包衣及醫藥調配技術中所熟知之其他包衣等包衣及外殼來製備。亦可使用例如提供期望釋放性質之不同比例之羥丙基甲基纖維素、其他聚合物基質、脂質體及/或微球體對其進行調配以在其中提供活性成分之緩慢或控制釋放。其可經調配用於快速釋放，例如冷凍乾燥。其可藉由例如經由細菌截留過濾器過濾或藉由納入滅菌劑來滅菌，該等滅菌劑呈無菌固體醫藥組合物形式，可在即將使用前將其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遮光劑且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的組合物。可用包埋組合物之實例包括聚合物質及蠟。若適宜，活性成分亦可呈含有一或多種上述賦形劑之微囊封形式。

用於經口投與本發明反義寡聚物結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、糖漿及酏劑。除活性成分外，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、苯甲酸苜基酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(具體而言，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。

除惰性稀釋劑外，口服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。

除活性化合物外，懸浮液可含有懸浮劑，例如乙氧基化異硬脂醇、聚環氧乙烷山梨醇及去水山梨醇酯、微晶纖維素、偏氫氧化鋁、膨潤土、瓊脂及黃耆膠及其混合物。

用於直腸或陰道投與之調配物可作為栓劑呈現，該栓劑可藉由將一或多種本發明化合物與一或多種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)混合來製備，且該栓劑在室溫下為固體，但在體溫下為液體，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所提供寡聚物之調配物或劑型包括粉劑、噴霧劑、軟膏、糊劑、乳霜、洗劑、凝膠、溶液、貼片及吸入劑。可在無菌條件下將活性寡聚物結合物與醫藥上可接受之載劑及與任何可需要之防腐劑、緩衝劑或推進劑混合。除本發明之活性化合物外，軟膏、糊劑、乳霜及凝膠可含有賦形劑，例如動物及植物脂肪、油、蠟、石蠟、澱粉、黃耆膠、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。

除本發明之反義寡聚物結合物外，粉劑及噴霧劑可含有賦形劑，例如乳糖、滑石、矽酸、氫氧化鋁、矽酸鈣及聚醯胺粉末或該等物質之混合

物。噴霧劑可另外含有慣用推進劑，例如氯氟烴類及未經取代之揮發性烴類，例如丁烷及丙烷。

經皮貼片具有以控制方式遞送本發明之反義寡聚物結合物給身體之額外優點。該等劑型可藉由將寡聚物溶解或分散於適當介質中來製得。亦可使用吸收增強劑來增加該藥劑穿過皮膚之通量。除業內已知之方法外，該通量之速率可藉由提供控速膜或使藥劑分散於聚合物基質或凝膠中來控制。

適用於非經腸投與之醫藥組合物可包含一或多種本發明寡聚物結合物與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、或無菌粉末之組合，該等無菌粉末可在即將使用前重構成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、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。可用於本發明醫藥組合物中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)。舉例而言，藉由使用諸如卵磷脂等包衣材料、維持所需粒徑(以分散液為例)及使用表面活性劑可維持適當流動性。在實施例中，醫藥組合物之反義寡聚物結合物具有式(III)。

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)來確保防止微生物對標的寡聚物結合物之作用。該等組合物中亦可能需要包括等滲劑，例如糖、氯化鈉及諸如此類。另外，可藉由納入吸收延遲劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)來達成注射型醫藥

之長效吸收。

在一些情形下，為延長藥物之效應，期望減緩來自皮下或肌肉注射之藥物之吸收。除業內已知之方法外，此可藉由使用具有較差水溶解度之結晶或非晶形材料之液體懸浮液來實現。藥物吸收之速率則取決於其溶解速率，該溶解速率進而可取決於晶體大小及結晶型。或者，藉由將非經腸投與之藥物形式溶解或懸浮於油媒劑中來實現該藥物之延遲吸收。

可注射儲積形式可藉由在生物可降解聚合物(例如聚乳酸交酯-聚乙醇酸交酯)中形成標的寡聚物結合物之微囊封基質來製備。端視寡聚物對聚合物之比率及所用具體聚合物之性質，可控制寡聚物釋放之速率。其他生物可降解聚合物之實例包括聚(原酸酯)及聚(酐)。儲積可注射調配物亦可藉由將藥物包裹入與身體組織相容之脂質體或微乳液中來製備。

當本發明之反義寡聚物結合物係作為醫藥投與人類及動物時，其可以原樣或以含有例如0.1%至99% (更佳10%至30%)反義寡聚物結合物與醫藥上可接受之載劑之組合的醫藥組合物形式給予。

本發明之調配物或製劑可經口、非經腸、經局部或經直腸給予。其通常係以適於每一投與途徑之形式給予。舉例而言，其係以錠劑或膠囊形式、藉由注射、吸入、眼用洗劑、軟膏、栓劑或輸注；局部藉由洗劑或軟膏；或經直腸地藉由栓劑來投與。

無論所選投與途徑如何，可以適宜水合形式使用之本發明反義寡聚物結合物及/或本發明醫藥組合物可藉由熟習此項技術者已知之習用方法調配成醫藥上可接受之劑型。可改變本發明醫藥組合物中活性成分之實際劑量值以獲得可有效地達成特定患者之期望治療反應之活性分量、組合物及投與模式，而對患者無不可接受之毒性。

所選劑量值將端視多種因素而定，包括所用本發明具體反義寡聚物結合物或其酯、鹽或醯胺之活性、投與途徑、投與時間、所用具體寡聚物之排泄或代謝速率、吸收之速率及程度、治療之持續時間、與所用具體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、病況、一般健康狀況及先前醫療史及醫療技術中所熟知之類似因素。

具有一般技術之醫師或獸醫可容易地確定並開列(prescribe)所需醫藥組合物之有效量。舉例而言，醫師或獸醫可以低於達成期望治療效應所需之量開始投用醫藥組合物中所用之本發明反義寡聚物結合物，並逐漸增加劑量直至達成期望效應。一般而言，本發明反義寡聚物結合物之適宜日劑量將為可有效地產生治療效應之最低劑量之反義寡聚物結合物之量。此一有效劑量通常將端視本文所述之因素而定。通常，在用於所指示效應時，本發明反義寡聚物結合物用於患者之經口、靜脈內、腦室內及皮下劑量將介於約0.0001 mg至約100 mg/公斤體重/天範圍內。

在一些實施例中，本發明之反義寡聚物結合物係以通常約10-160 mg/kg 或20-160 mg/kg之劑量投與。在一些情形下，可需要大於160 mg/kg之劑量。在一些實施例中，用於i.v.投與之劑量為約0.5 mg至160 mg/kg。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以下列劑量投與：約0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以下列劑量投與：約10 mg/kg、11 mg/kg、12 mg/kg、15 mg/kg、18 mg/kg、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、39 mg/kg、40 mg/kg、41 mg/kg、42 mg/kg、43 mg/kg、44 mg/kg、45 mg/kg、46 mg/kg、47 mg/kg、48 mg/kg、49 mg/kg、50 mg/kg、51 mg/kg、52 mg/kg、53 mg/kg、54 mg/kg、55 mg/kg、56 mg/kg、57 mg/kg、58 mg/kg、59 mg/kg、60 mg/kg、65 mg/kg、70 mg/kg、75 mg/kg、80 mg/kg、85 mg/kg、90 mg/kg、95 mg/kg、100 mg/kg、105 mg/kg、110 mg/kg、115 mg/kg、120 mg/kg、125 mg/kg、130 mg/kg、135 mg/kg、140 mg/kg、145 mg/kg、150 mg/kg、155 mg/kg、160 mg/kg，包括其間之所有整數。在一些實施例中，寡聚物係以10 mg/kg投與。在一些實施例中，寡聚物係以20 mg/kg投與。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40 mg/kg投與。在一些實施例中，寡聚物係以60 mg/kg投與。在一些實施例中，寡聚物係以80 mg/kg投與。在一些實施例中，寡聚物係以160 mg/kg投與。在一些實施例中，寡聚物係以50 mg/kg投與。

在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係以通常約10-160 mg/kg或20-160 mg/kg之劑量投與。在一些實施例中，用於i.v.投與之式(III)反義寡聚物結合物之劑量為約0.5 mg至160 mg/kg。在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係以下列劑量投與：約0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg。在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係以下列劑量投與：約10 mg/kg、11 mg/kg、12 mg/kg、15 mg/kg、18 mg/kg、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、39 mg/kg、40 mg/kg、41 mg/kg、42 mg/kg、43 mg/kg、44 mg/kg、45 mg/kg、46 mg/kg、47 mg/kg、48 mg/kg、49 mg/kg、50 mg/kg、51 mg/kg、52 mg/kg、53 mg/kg、54 mg/kg、55 mg/kg、56 mg/kg、57 mg/kg、58 mg/kg、59 mg/kg、60 mg/kg、65 mg/kg、70 mg/kg、75 mg/kg、80 mg/kg、85 mg/kg、90 mg/kg、95 mg/kg、100 mg/kg、105 mg/kg、110 mg/kg、115 mg/kg、120 mg/kg、125 mg/kg、130 mg/kg、135 mg/kg、140 mg/kg、145 mg/kg、150 mg/kg、155 mg/kg、160 mg/kg，包括其間之所有整數。在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係以10 mg/kg投與。在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係以20 mg/kg投與。在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係以30 mg/kg投與。在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係以40 mg/kg投與。在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係以60 mg/kg投與。在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係以80 mg/kg投與。在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係以160 mg/kg投與。在一些實施例中，式(III)之反義寡聚物結合物係以50 mg/kg投與。

若需要，活性化合物之有效日劑量可以2個、3個、4個、5個、6個或更多個子劑量來投與，該等子劑量係以適宜間隔在全天內、視情況以單位劑型分開投與。在某些情況下，投藥係每天一個投與。在某些實施例中，投藥係視需要每2天、每3天、每4天、每5天、每6天、每7天、每8天、每9天、每10天、每11天、每12天、每13天、每14天或每1週、每2週、每3週、每4週、每5週、每6週、每7週、每8週、每9週、每10週、每11週、每12週或每1個月、每2個月、每3個月、每4個月、每5個月、每6個月、

每7個月、每8個月、每9個月、每10個月、每11個月、每12個月一或多個投與，以維持功能性肌肉萎縮蛋白之期望表現。在某些實施例中，投藥係每兩週一次一或多個投與。在一些實施例中，投藥係每兩週一次一個投與。在各個實施例中，投藥係每月一或多個投與。在某些實施例中，投藥係每月一個投與。

在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以10 mg/kg每週一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以20 mg/kg每週一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以30 mg/kg每週一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以40 mg/kg每週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以60 mg/kg每週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以80 mg/kg每週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以100 mg/kg每週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以160 mg/kg每週一次投與。如本文所用之每週一次應理解為具有業內公認之每週含義。

在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以10 mg/kg每兩週一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以20 mg/kg每兩週一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以30 mg/kg每兩週一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以40 mg/kg每兩週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以60 mg/kg每兩週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以80 mg/kg每兩週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以100 mg/kg每兩週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以160 mg/kg每兩週一次投與。如本文所用之每兩週一次應理解為具有業內公認之每兩週含義。

在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以10 mg/kg每三週一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以20 mg/kg每三週一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以30 mg/kg每三週一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以40 mg/kg每三週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以60 mg/kg每三週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以80 mg/kg每三週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以100 mg/kg每三週一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以160 mg/kg每三週一次投與。如本文所用之每三週一次(every third week)應理解為具有業內公認之每三週一次(once every three weeks)之含義。

在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以10 mg/kg每月一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以20 mg/kg每月一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以30 mg/kg每月一次投與。在各個實施例中，反義寡聚物結合物係以40 mg/kg每月一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以60 mg/kg每月一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以80 mg/kg每月一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以100 mg/kg每月一次投與。在一些實施例中，反義寡聚物結合物係以160 mg/kg每月一次投與。如本文所用之每月一次應理解為具有業內公認之每月含義。

如業內應理解，每週一次、每兩週一次、每三週一次或每月一次投與可呈如本文所論述之一或多個投與或子劑量。

本文所述之核酸分子及反義寡聚物結合物可藉由多種熟習此項技術者已知之方法投與細胞，包括(但不限於)囊封於脂質體中、藉由離子電滲

或藉由納入其他媒劑(例如水凝膠、環糊精、生物可降解奈米膠囊及生物黏著微球體)中，如本文所述及業內已知。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 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)。在眾多益處中，微乳化藉由優先引導吸收至淋巴系統而非循環系統、藉此繞過肝且防止化合物在肝膽循環中破壞來提供增強的生物利用度。

在本發明之一個態樣中，調配物含有由如本文所提供之寡聚物及至少一種兩親性載劑形成之微團，其中該等微團具有小於約100 nm之平均直徑。更佳實施例提供具有小於約50 nm之平均直徑之微團，且甚至更佳實施例提供具有小於約30 nm或甚至小於約20 nm之平均直徑之微團。

儘管涵蓋所有適宜兩親性載劑，但目前較佳之載劑通常係具有通常認為安全(Generally-Recognized-as-Safe，GRAS)之狀況且可在溶液與複雜水相(例如在人類胃腸道中發現者)接觸時使本發明之反義寡聚物結合物增溶並在隨後階段將其微乳化的彼等。通常，滿足該等要求之兩親性成分具有2-20之HLB (親水性對親脂性平衡)值，且其結構含有介於C-6至C-20範圍內之直鏈脂肪族基團。實例係聚乙二醇化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脂肪酸甘油酯，例如自完全或部分氫化之各種植物油獲得之彼等。該等油可有利地由三脂肪酸甘油酯、二脂肪酸甘油酯及單脂肪酸甘油酯以及相應脂肪酸之二聚(乙二醇)酯及單聚(乙二醇)酯組成，其中尤佳脂肪酸組合物包括癸酸4%-10%、癸酸3%-9%、月桂酸40%-50%、肉豆蔻酸14%-24%、棕櫚酸4%-

14%及硬脂酸5%-15%。另一有用類別之兩親性載劑包括含有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)之部分酯化去水山梨醇及/或山梨醇。

市售兩親性載劑可尤其有用，包括 Gelucire 系列、Labrafil、Labrasol 或 Lauroglycol（其皆由 Gattefosse Corporation, Saint Priest, France 製造及分配）、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(由美國及世界範圍內之多家公司製造及分配)。

在某些實施例中，遞送可藉由使用脂質體、奈米膠囊、微粒、微球體、脂質粒子、囊泡及諸如此類來進行，以將本發明之醫藥組合物引入適宜宿主細胞中。具體而言，本發明之醫藥組合物可經調配以囊封於脂質粒子、脂質體、囊泡、奈米球、奈米粒子或諸如此類中來遞送。調配物及該等遞送媒劑之使用可使用已知及習用技術來實施。

適用於本發明中之親水聚合物係容易地具有水可溶性、可共價附接至囊泡形成脂質且在活體內耐受而無毒性效應(即為生物相容的)之彼等。適宜聚合物包括聚(乙二醇) (PEG)、聚乳酸(亦稱為聚乳酸交酯)、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，聚合物具有約100道爾頓或120道爾頓至約5,000道爾頓或10,000道爾頓或約300道爾頓至約5,000道爾頓之重量平均分子量。在其他實施例中，聚合物係重量平均分子量為約100道爾頓至約5,000道爾頓或重量平均分子量為約300道爾頓至約5,000道爾頓之聚(乙二醇)。在某些實施例中，聚合物係重量平均分子量為約750道爾頓之聚(乙二醇)，例如PEG(750)。聚合物亦可藉由其中之單體數來定義；本發明之較佳實施例利用至少約3

種單體之聚合物，該等PEG聚合物係由三種分子量為約132道爾頓之單體組成。

可適用於本發明中之其他親水聚合物包括聚乙烷基吡咯啉酮、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衍生化纖維素(例如羥甲基纖維素或羥乙基纖維素)。

在某些實施例中，本發明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、聚烯烴、丙烯酸及甲基丙烯酸酯之聚合物、聚乙烷基聚合物、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(乳酸交酯-共-己內酯)、多醣、蛋白質、聚玻尿酸、聚氰基丙烯酸酯及其摻合物、混合物或共聚物。

環糊精係環狀寡醣，其係由6個、7個或8個葡萄糖單元組成，分別由希臘字母 α 、 β 或 γ 表示。葡萄糖單元藉由 α -1,4-葡萄糖苷鍵連接。由於糖單元之椅型組態，所有二級羥基(在C-2、C-3處)位於環之一側上，而C-6處之所有一級羥基位於另一側上。因此，外部面係親水的，此使得環糊精具有水溶性。相反，環糊精之腔係疏水的，此乃因其內襯有原子C-3及C-5之氫及醚樣氧。該等基質容許與多種相對疏水之化合物(包括例如類固醇化合物，例如17 α -雌二醇)錯合(例如，參見van Uden等人，Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994))。錯合係藉由凡得瓦相互作用(Van der Waals interaction)及藉由氫鍵形成來進行。關於環糊精化學之一般綜述參見Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994)。

環糊精衍生物之物理化學性質強烈地取決於取代之類別及程度。舉例而言，其於水中之溶解度介於不溶(例如三乙醯基- β -環糊精)至147%可

溶性(w/v) (G-2- β -環糊精)範圍內。另外，其可溶於許多有機溶劑中。環糊精之性質使得可藉由增加或減小其溶解度來控制多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、磷酸、三價膦酸、膦酸、磷酸、硫代膦酸、硫代亞磺酸及磺酸已附加至母體環糊精[參見Parmeter (III)，上文文獻]。此外，磺烷基醚環糊精衍生物已闡述於Stella等人(美國專利第5,134,127號)。

脂質體係由至少一個包封水性內部隔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介於0.02 μm 與0.05 μm 之間；大單層囊泡(LUV)通常大於0.05 μm 。寡層大囊泡及多層囊泡具有多個通常同心之膜層且通常大於0.1 μm 。具有若干非同心膜、即若干較小囊泡含於較大囊泡內之脂質體稱為多囊囊泡。

本發明之一個態樣係關於包含含有本發明之反義寡聚物結合物之脂質體之調配物，其中脂質體膜經調配以提供具有增加的攜載能力之脂質體。或者或另外，本發明之反義寡聚物結合物可含於脂質體之脂質體雙層內或吸附於其上。本發明之反義寡聚物結合物可使用脂質表面活性劑聚集且攜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-表面活性劑聚集物之破壞效應。

根據本發明之一個實施例，脂質體之脂質雙層含有經聚(乙二醇)(PEG)衍生化之脂質，使得PEG鏈自脂質雙層之內表面延伸至由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。

含於本發明脂質體內之活性劑呈增溶形式。表面活性劑及活性劑之聚集物(例如含有所關注活性劑之乳液或微團)可包裹於本發明脂質體之內部空間內。表面活性劑用於分散及增溶活性劑，且可選自任何適宜脂肪族、環脂肪族或芳香族表面活性劑，包括(但不限於)不同鏈長度(例如約C14至約C20)之生物相容性溶血磷脂酰膽鹼(LPG)。聚合物衍生化脂質(例如PEG脂質)亦可用於微團形成，此乃因其將用於抑制微團/膜融合及將聚合物添加至表面活性劑分子會減小表面活性劑之CMC且有助於微團形成。較佳者係具有微莫耳濃度範圍內之CMO之表面活性劑；可使用較高CMC表面活性劑來製備包裹於本發明脂質體內之微團。

本發明之脂質體可藉由多種業內已知技術中之任一者製備。例如，參見美國專利第4,235,871號；PCT公開申請案WO 96/14057；New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), 第33-104頁；及 Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993。舉例而言，本發明之脂質體可藉由使經親水聚合物衍生化之脂質擴散於預形成之脂質體中、例如在對應於在脂質體中合意之衍生化脂質之最終莫耳%之脂質濃度下藉由使預形成之脂質體暴露於由脂質接枝聚合物構成之微團製備。含有親水聚合物之脂質體亦可藉由均質化、脂質場水合或擠出技術形成，如為業內已知。

在另一實例性調配程序中，首先藉由超音波處理使活性劑分散於易於溶解疏水性分子之溶血磷脂酰膽鹼或其他低CMC表面活性劑(包括聚合

物接枝脂質)中。然後使用活性劑之所得微團懸浮液再水合含有適宜莫耳%之聚合物接枝脂質或膽固醇之乾燥脂質樣本。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，且藉由標準管柱分離來分離所得脂質體與未囊封溶液。

在本發明之一個態樣中，脂質體經製備以具有所選大小範圍內之實質上均一之大小。一種有效分篩方法涉及將脂質體之水性懸浮液擠出通過一系列具有所選均勻孔徑之聚碳酸酯膜；膜之孔徑將大致對應於藉由擠出通過該膜製造之脂質體之最大大小。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，可使用諸如 DharmaFECT® 及 Lipofectamine®等試劑將多核苷酸或蛋白質引入細胞中。

本發明調配物之釋放特徵端視囊封材料、囊封藥物之濃度及釋放改質劑之存在而定。舉例而言，釋放可例如使用僅在低pH下(如在胃中)或在較高pH下(如在腸中)釋放之pH敏感包衣操縱以具有pH依賴性。可使用腸溶包衣以防止釋放發生直至通過胃後為止。可使用囊封於不同材料中之氰胺之多種包衣或混合物以獲得胃中之初始釋放，隨後在腸中釋放。釋放亦可藉由納入可增加水攝取或藉由自膠囊擴散增加藥物釋放之鹽或孔形成劑來操縱。亦可使用改良藥物溶解度之賦形劑來控制釋放速率。亦可納入增強基質之降解或自基質釋放之藥劑。其可添加至藥物，作為單獨相(即作為微粒)添加，或可共溶解於聚合物相中，此端視化合物而定。在大多數情形下，該量應介於0.1%與30% (w/w聚合物)之間。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)之孔形成劑係以微粒形式添加。範圍通常介於1%與30% (w/w聚合物)之間。

攝取亦可藉由改變粒子在腸中之滯留時間來操縱。此可例如藉由用黏膜黏著聚合物包覆粒子或選擇其作為囊封材料來達成。實例包括大多數含有游離羧基之聚合物，例如幾丁聚醣、纖維素及尤其聚丙烯酸酯(如本文所用之聚丙烯酸酯係指包括丙烯酸酯基團及經修飾丙烯酸酯基團之聚合物，例如氰基丙烯酸酯及甲基丙烯酸酯)。

反義寡聚物結合物可經調配以含於手術或醫療裝置或植入物內或適於藉由手術或醫療裝置或植入物釋放。在某些態樣中，植入物可經反義寡聚物結合物包覆或以其他方式處理。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)與本發明之醫藥組合物一起包覆植入物(即，該組合物可藉由使用水凝膠或其他聚合物適於與醫療裝置一起使用)。用於與藥劑一起包覆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、藥物溶析支架、縫線、假體、血管導管、透析導管、血管移植物、人工心臟瓣膜、心律調節器、可植入心臟複律去顫器、IV針、骨傷及形成裝置(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。

除本文所提供之方法外，根據本發明使用之反義寡聚物結合物可藉由與其他醫藥類似之方式調配以任一便捷方式投與用於人類或獸醫藥劑中。反義寡聚物結合物及其相應調配物可單獨投與或與治療肌肉萎縮症之其他治療策略組合投與，該等其他治療策略係例如肌母細胞移植、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(例如上調抗肌

萎縮蛋白相關蛋白(utrophin)、肌肉萎縮蛋白之體染色體旁系同源物)。

在一些實施例中，其他治療劑可在投與本發明之反義寡聚物結合物之前、與其同時或在其之後投與。舉例而言，反義寡聚物結合物可與類固醇及/或抗生素組合投與。在某些實施例中，將反義寡聚物結合物投與正在進行背景類固醇療法(例如間歇性或慢性/持續性背景類固醇療法)之患者。舉例而言，在一些實施例中，患者在投與反義寡聚物之前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，類固醇係糖皮質激素或普賴松(prednisone)。

所述投與途徑預期僅作為指導，此乃因熟習此項技術者將能夠容易地確定用於任一具體動物及病況之最佳投與途徑及任一劑量。已嘗試多種在活體外及活體內將功能性新遺傳材料引入細胞中之方法(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(例如腺相關病毒載體)中(Rosenfeld等人(1992) *Cell*, 68:143-155；Rosenfeld等人(1991) *Science*, 252:431-434)；或經由脂質體遞送連接至異源啟動子-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)；偶合至基於陽離子之配體特異性運輸系統(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脂質體複合物後僅小鼠肺之活體內轉染。人類基因療法程序之綜述論文之實例係Anderson, Science (1992) 256:808-813。

在另一實施例中，本發明之醫藥組合物可另外包含碳水化合物，如Han等人，Nat. Comms. 7, 10981 (2016)中所提供，其全文皆以引用方式併入本文中。在一些實施例中，本發明之醫藥組合物可包含5%之己糖碳水化合物。舉例而言，本發明之醫藥組合物可包含5%葡萄糖、5%果糖或5%甘露糖。在某些實施例中，本發明之醫藥組合物可包含2.5%葡萄糖及2.5%果糖。在一些實施例中，本發明之醫藥組合物可包含選自以下之碳水化合物：以5體積%之量存在之阿拉伯糖、以5體積%之量存在之葡萄糖、以5體積%之量存在之山梨醇、以5體積%之量存在之半乳糖、以5體積%之量存在之果糖、以5體積%之量存在之木糖醇、以5體積%之量存在之甘露糖、各自以2.5體積%之量存在之葡萄糖及果糖之組合及以5.7體積%之量存在之葡萄糖、以2.86體積%之量存在之果糖及以1.4體積%之量存在之木糖醇的組合。

IV. 使用方法

使用外顯子跳躍恢復肌肉萎縮蛋白讀碼框

用於治療由肌肉萎縮蛋白基因之框外突變引起之DMD之潛在治療方法係由框內突變引起之肌肉萎縮蛋白病變之輕度形式(稱為BMD)來表明。

將框外突變轉化成框內突變之能力將假設保留mRNA讀碼框且產生內部縮短但仍具功能性之肌肉萎縮蛋白。本發明之反義寡聚物結合物經設計以實現此目的。

PMO與經靶向前mRNA序列雜交干擾前mRNA剪接複合物之形成且使成熟mRNA缺失外顯子53。本發明反義寡聚物結合物之結構及組態容許與互補序列之序列特異性鹼基配對。藉由類似機制，依替利森(例如其係經設計以使肌肉萎縮蛋白前mRNA之外顯子51跳躍之PMO)容許與含於肌肉萎縮蛋白前mRNA之外顯子51中之互補序列之序列特異性鹼基配對。

含有所有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中之圖表繪示肌肉萎縮蛋白前mRNA及成熟mRNA之自外顯子47至外顯子53之小部分。每一外顯子之形狀繪示密碼子在外顯子之間剪接之方式；應注意，一個密碼子係由三個核苷酸組成。矩形外顯子起始且終止於完整密碼子。箭頭狀外顯子起始於完整密碼子但終止於僅含密碼子之1號核苷酸之剪接密碼子。此密碼子之2號及3號核苷酸含於將起始於人字形之後續外顯子中。

肌肉萎縮蛋白mRNA丟失肌肉萎縮蛋白基因之整個外顯子通常導致DMD。圖2中之圖表圖解說明一種類型之已知導致DMD之遺傳突變(外顯子50缺失)。由於外顯子49終止於完整密碼子中且外顯子51起始於密碼子之第二個核苷酸，故外顯子49後之讀碼框發生移位，從而產生框外mRNA讀碼框並納入突變下游不正確的胺基酸。隨後缺少功能性C末端肌萎縮蛋白聚醣結合結構域可產生不穩定肌肉萎縮蛋白。

依替利森使外顯子51跳躍以恢復mRNA讀碼框。由於外顯子49終止於完整密碼子且外顯子52起始於密碼子之第一個核苷酸，故外顯子51之

缺失即恢復讀碼框，從而產生含有完整肌萎縮蛋白聚醣結合位點之內部縮短的肌肉萎縮蛋白，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 開放讀碼框來改善DMD表型之可行性。DMD之肌肉萎縮動物模型中之多項研究已顯示，藉由外顯子跳躍恢復肌肉萎縮蛋白可以可靠地改善肌肉強度及功能(Sharp 2011；Yokota 2009；Wu 2008；Wu 2011；Barton-Davis 1999；Goyenvallé 2004；Gregorevic 2006；Yue 2006；Welch 2007；Kawano 2008；Reay 2008；van Putten 2012)。此之極有說服力之實例來自在外顯子跳躍(使用PMO)療法後比較同一組織中之肌肉萎縮蛋白含量與肌肉功能之研究。在肌肉萎縮mdx小鼠中，經小鼠特異性PMO治療之脛骨前肌(TA)在應激誘導之收縮後維持其最大力量能力的約75%，而未經治療之對側TA肌肉僅維持其最大力量能力的約25%($p < 0.05$) (Sharp 2011)。在另一研究中，使3隻2-5月齡之肌肉萎縮CXMD狗每週一次持續5至7週或每隔一週持續22週接受使用特異性針對其遺傳突變之PMO之外顯子跳躍療法。在外顯子跳躍療法後，所有3隻狗展示肌肉萎縮蛋白在骨骼肌中之廣泛的全身表現以及相對於基線維持或改善的移動性(15 m跑步測試)。相比之下，未經治療之年齡匹配之CXMD狗在整個研究進程中顯示顯著減少之移動性(Yokota 2009)。

在mdx小鼠及表現整個人類DMD轉錄本之人類化DMD (hDMD)小鼠模型二者中顯示，PMO在等莫耳濃度下具有大於硫代磷酸酯之外顯子跳躍活性(Heemskirk 2009)。在正常人類骨骼肌細胞或具有適於外顯子51跳躍之不同突變之DMD患者之肌肉細胞中，使用反轉錄聚合酶鏈式反應(RT-PCR)及西方墨點(WB)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。已在hDMD小鼠模型中，在活體內證實依替利森誘導之外顯子51跳躍(Arechavala-Gomez 2007)。

用於分析與人類肌肉萎縮蛋白前mRNA之外顯子53之靶區域互補且誘導外顯子53跳躍之反義寡聚物結合物之效應的臨床結果包括肌肉萎縮蛋白陽性纖維% (PDPF)、6分鐘步行測試(6MWT)、移動性喪失(LOA)、北極星移動評估(NSAA)、肺功能測試(PFT)、在無外部支持下站起之能力(自仰臥位置)、重新產生肌肉萎縮蛋白及其他功能性量度。

在一些實施例中，本發明提供在具有適於外顯子53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，該方法包含向個體投與反義寡聚物結合物或其醫藥上可接受之鹽，如本文所述。在某些實施例中，本發明提供恢復mRNA讀碼框以誘導具有適於外顯子53跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變之杜興氏肌肉萎縮症(DMD)個體中產生肌肉萎縮蛋白的方法。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)量測蛋白質之產生。

在一些實施例中，本發明提供為有需要之個體治療DMD之方法，其中個體具有適於外顯子53跳躍之肌肉萎縮蛋白基因突變，該方法包含向個體投與反義寡聚物結合物或其醫藥上可接受之鹽，如本文所述。在各個實施例中，個體之治療係藉由量測疾病演進之延緩。在一些實施例中，個體之治療係藉由量測個體移動性之維持或個體移動性之喪失程度減輕。在一些實施例中，係採用6分鐘步行測試(6MWT)量測移動性。在某些實施例中，係採用北極星移動評估(NSAA)量測移動性。

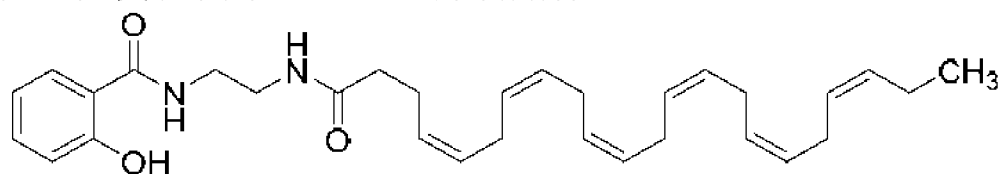
在各個實施例中，本發明提供維持DMD個體之肺功能或減少其肺功能喪失之方法，其中個體具有適於外顯子53跳躍之DMD基因突變，該方

法包含向個體投與反義寡聚物結合物或其醫藥上可接受之鹽，如本文所述。在一些實施例中，肺功能係以最大呼氣壓(MEP)量測。在某些實施例中，肺功能係以最大吸氣壓(MIP)量測。在一些實施例中，肺功能係以用力肺活量(FVC)量測。

在另一實施例中，本發明之醫藥組合物在本發明方法中可與碳水化合物共投與，於同一調配物中或係單獨調配物，如 Han 等人，Nat. Comms. 7, 10981 (2016)中所提供，其全文皆以引用方式併入本文中。在一些實施例中，本發明之醫藥組合物可與5%之己糖碳水化合物共投與。舉例而言，本發明之醫藥組合物可與5%葡萄糖、5%果糖或5%甘露糖共投與。在某些實施例中，本發明之醫藥組合物可與2.5%葡萄糖及2.5%果糖共投與。在一些實施例中，本發明之醫藥組合物可與選自以下之碳水化合物共投與：以5體積%之量存在之阿拉伯糖、以5體積%之量存在之葡萄糖、以5體積%之量存在之山梨醇、以5體積%之量存在之半乳糖、以5體積%之量存在之果糖、以5體積%之量存在之木糖醇、以5體積%之量存在之甘露糖、各自以2.5體積%之量存在之葡萄糖及果糖之組合以及以5.7體積%之量存在之葡萄糖、以2.86體積%之量存在之果糖及以1.4體積%之量存在之木糖醇的組合。

在各個實施例中，本發明之反義寡聚物結合物係與治療有效量之非類固醇抗發炎化合物共投與。在一些實施例中，非類固醇抗發炎化合物係 NF- κ B 抑制劑。舉例而言，在一些實施例中，NF- κ B 抑制劑可為 CAT-1004 或其醫藥上可接受之鹽。在各個實施例中，NF- κ B 抑制劑可為柳酸鹽及 DHA 之結合物。在一些實施例中，NF- κ B 抑制劑係 CAT-1041 或其醫藥上可接受之鹽。在某些實施例中，NF- κ B 抑制劑係柳酸鹽及 EPA 之結合

物。在各個實施例中，NF-kB抑制劑係



或其醫藥

上可接受之鹽。

在一些實施例中，非類固醇抗發炎化合物係TGF- β 抑制劑。舉例而言，在某些實施例中，TGF- β 抑制劑係HT-100。

在某些實施例中，闡述如本文所述之反義寡聚物結合物，其用於療法中。在某些實施例中，闡述如本文所述之反義寡聚物結合物，其用於治療杜興氏肌肉萎縮症。在某些實施例中，闡述如本文所述之反義寡聚物結合物，其用於製造用於療法中之藥劑。在某些實施例中，闡述如本文所述之反義寡聚物結合物，其用於製造用來治療杜興氏肌肉萎縮症之藥劑。

V. 套組

本發明亦提供用於治療遺傳病患者之套組，該套組包含至少反義分子(例如包含SEQ ID NO: 1中所示之反義寡聚物之反義寡聚物結合物)，與其使用說明書一起封裝於適宜容器中。套組亦可含有輔助試劑，例如緩衝劑、穩定劑等。熟習此項技術者應瞭解，上述方法之應用具有鑑別適用於治療許多其他疾病之反義分子之廣泛應用。在實施例中，套組包含式(III)之反義寡聚物結合物。

實例

儘管已藉助說明及實例一定詳細地闡述前述揭示內容用於清楚理解之目的，但熟習此項技術者根據本發明之教示將容易明瞭，可在不背離隨附申請專利範圍之精神或範圍下作出某些改變或修改。僅以說明方式而非以限制方式提供以下實例。熟習此項技術者應容易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

使用分化的人類肌細胞(ZenBio, Inc.)來量測外顯子跳躍。具體而言，使肌母細胞(ZenBio, Inc., SKB-F)在37°C及5% CO₂下在生長培養基(SK-B-M; ZenBio, Inc.)中生長至80%-90%鋪滿。藉由將生長培養基更換為分化培養基(SK-M-D; ZenBio, Inc.)起始分化。為分析外顯子53跳躍，將 1×10^4 個分化細胞平鋪於24孔板中且將1 mL含有不同濃度之PMO或PPMO之分化培養基(SK-M-D; ZenBio, Inc.)添加至每一孔中並培育96小時。

西方墨點分析

對於西方墨點分析，用均質化緩衝液(4% SDS、4 M尿素、125 mM tris-HCl (pH 6.8))以直徑約5 mm之9至18 × 20 μm組織切片於133 μL緩衝液中之比例均質化組織。收集相應溶解物且根據製造商之說明書(BioRad目錄500-0122)使用RC DC蛋白質分析套組進行蛋白質定量。使用均質化緩衝液以1:10稀釋組織提取物樣本，以降至BSA標準曲線之範圍內。使用25 μl蛋白質溶解物、7 μl NuPAGE LDS樣本緩衝液(Life Technologies目錄NP0008, Carlsbad, California, USA)及3 μl NuPAGE還原劑(10×) (Life Technologies目錄NP0004)製備樣本，使得35 μl樣本將含有期望量之蛋白質。在95°C下將蛋白質樣本加熱5分鐘後，將樣本離心，取上清液依每泳道最多50 μg總蛋白質之載量加載至NuPAGE Novex 10孔1 mm微型3%-8%聚丙烯醯胺tris-乙酸鹽凝膠(Life Technologies目錄EA0375)上。使凝膠在150伏特下在室溫下運行，直至染料前沿已運行出凝膠。在室溫及30

伏特下經75分鐘使用NuPAGE轉移緩衝液(Life Technologies NP006-1)、10%甲醇及0.1% NuPAGE抗氧化劑(Life Technologies NP0005)將所得蛋白質凝膠轉移至PVDF膜(Life Technologies目錄LC2007)。

蛋白質轉移後，將PVDF膜浸沒於TTBS緩衝液(1× TBS (Amresco目錄J640-4L)、0.1% (v/v) tween-20)中。將膜轉移至封阻緩衝液(5% (w/v) 乾燥脫脂奶粉(Lab Scientific目錄M0841)於TTBS中)且在4℃下在溫和搖動下浸漬過夜。封阻後，將膜在室溫下在使用封阻緩衝液以1:20稀釋之DYS1 (Leica目錄NCL-DYS1)中培育60分鐘，或在室溫下在用封阻緩衝液以1:100,000稀釋之抗 α -輔肌動蛋白抗體(Sigma-Aldrich目錄NA931V)中培育20分鐘，然後洗滌6次(每次用TTBS洗滌5分鐘)。使用封阻緩衝液以1:40,000稀釋已結合辣根過氧化物酶(GE Healthcare目錄NA931V)之抗小鼠IgG，且添加至膜並保持45分鐘(DYS1)或15分鐘(α -輔肌動蛋白)，然後再洗滌6次。使用ECL Prime西方檢測套組(GE Healthcare目錄RPN2232)，使膜暴露於凝膠且相應地顯影。使用ImageQuant TL Plus軟體(8.1版)掃描且分析顯影膜並使用Graphpad軟體進行線性迴歸分析。

每一西方墨點凝膠包括使用自正常組織(小鼠四頭肌、橫膈膜或心臟)提取之稀釋至例如64%、16%、4%、1%及0.25% (例如，參見圖5A及5B)且摻入DMD組織(例如mdx小鼠四頭肌、橫膈膜或心臟，或NHP四頭肌、橫膈膜或平滑肌(胃腸))提取物中之總蛋白質製備之4點或5點肌肉萎縮蛋白標準曲線。如上文所述處理標準曲線樣本。藉由比較肌肉萎縮蛋白條帶強度與凝膠標準曲線確定肌肉萎縮蛋白含量，以野生型肌肉萎縮蛋白含量之% (WT%)表示。

RT-PCR分析

對於RT-PCR分析，使用Illustra GE spin套組根據製造商之方案自細胞分離RNA。使用NanoDrop測定RNA之濃度及純度。藉由RT-PCR使用結合外顯子51/52接合處及54之正向引子SEQ ID NO: 5 (5'-CATCAAGCAGAAGGCAACAA-3'')及結合外顯子51/52接合處及54之反向引子SEQ ID NO: 6 (5'-GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3')量測外顯子53跳躍。跳躍的外顯子53產生201 bp擴增子且未跳躍的外顯子53產生413 bp擴增子。

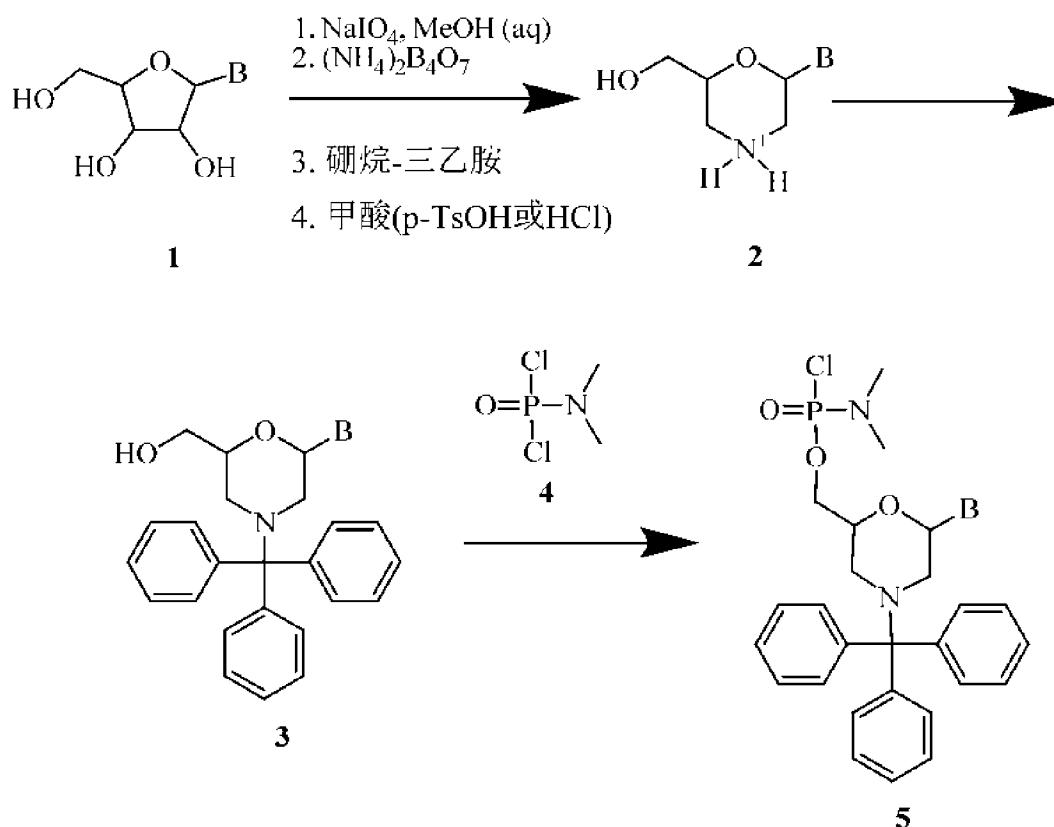
藉由RT-PCR使用正向引子-SEQ ID NO: 7 (5'-CACATCTTTGATGGTGTGAGG-3')及反向引子SEQ ID NO: 8 (5'-CAACTTCAGCCATCCATTTCTG-3')量測小鼠外顯子23跳躍。

在使RNA經受RT-PCR後，使用利用凝膠毛細管電泳之測徑器分析樣本。使用以下等式計算外顯子跳躍%： $(\text{跳躍條帶之曲線下面積})/(\text{跳躍及未跳躍條帶之曲線下面積之和}) \times 100$ 。

免疫組織化學：肌肉萎縮蛋白染色：

使用小鼠四頭肌之10微米冷凍組織切片藉由10%山羊血清+ PBS中之1% BSA中之肌肉萎縮蛋白一級抗體(以1:250稀釋，兔，Abcam，目錄號ab15277)及10%山羊血清+ 1% BSA中之二級抗體Alexa-Fluoro 488山羊抗兔(以1:1000稀釋)來檢測肌肉萎縮蛋白。

嗎啉基亞單位之製備



方案1：PMO亞單位之一般合成途徑

參考方案1，其中B表示鹼基配對部分，可自相應核糖核苷(1)製備嗎啉基亞單位，如所顯示。可藉由與適宜保護基團前體(例如三苯甲基氯)反應視情況保護嗎啉基亞單位(2)。3'保護基團通常在固態寡聚物合成期間移除，如下文更詳細闡述。可適當保護鹼基配對部分用於固相寡聚物合成。適宜保護基團包括腺嘌呤及胞嘧啶之苯甲醯基、鳥嘌呤之苯基乙醯基及次黃嘌呤(I)之特戊醯基氧基甲基。特戊醯基氧基甲基可引入次黃嘌呤雜環鹼基之N1位置上。儘管可採用未經保護之次黃嘌呤亞單位，但活化反應之產率在該鹼基被保護時甚為優異。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，該專利之全文皆以引用方式併入本文中。

使3與活化磷化合物4反應產生具有期望鍵聯部分之嗎啉基亞單位5。

結構4之化合物可使用熟習此項技術者已知之任一數量之方法製備。

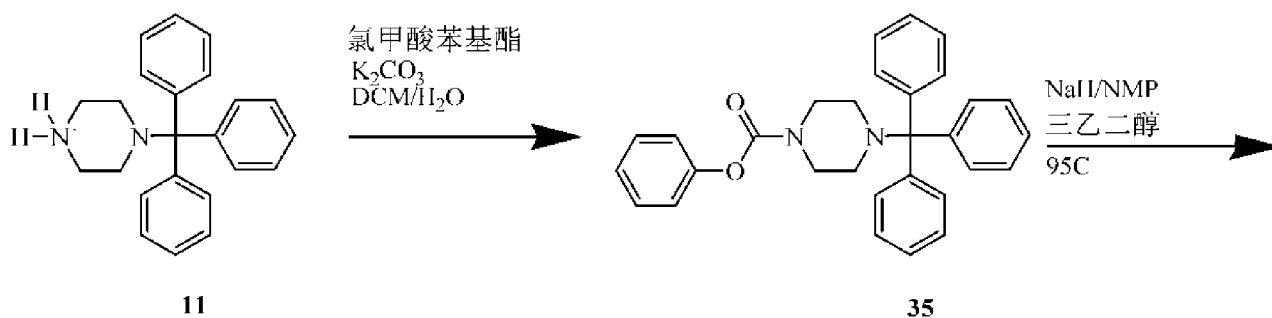
然後進行與嗎啉基部分之偶合，如上文所概述。

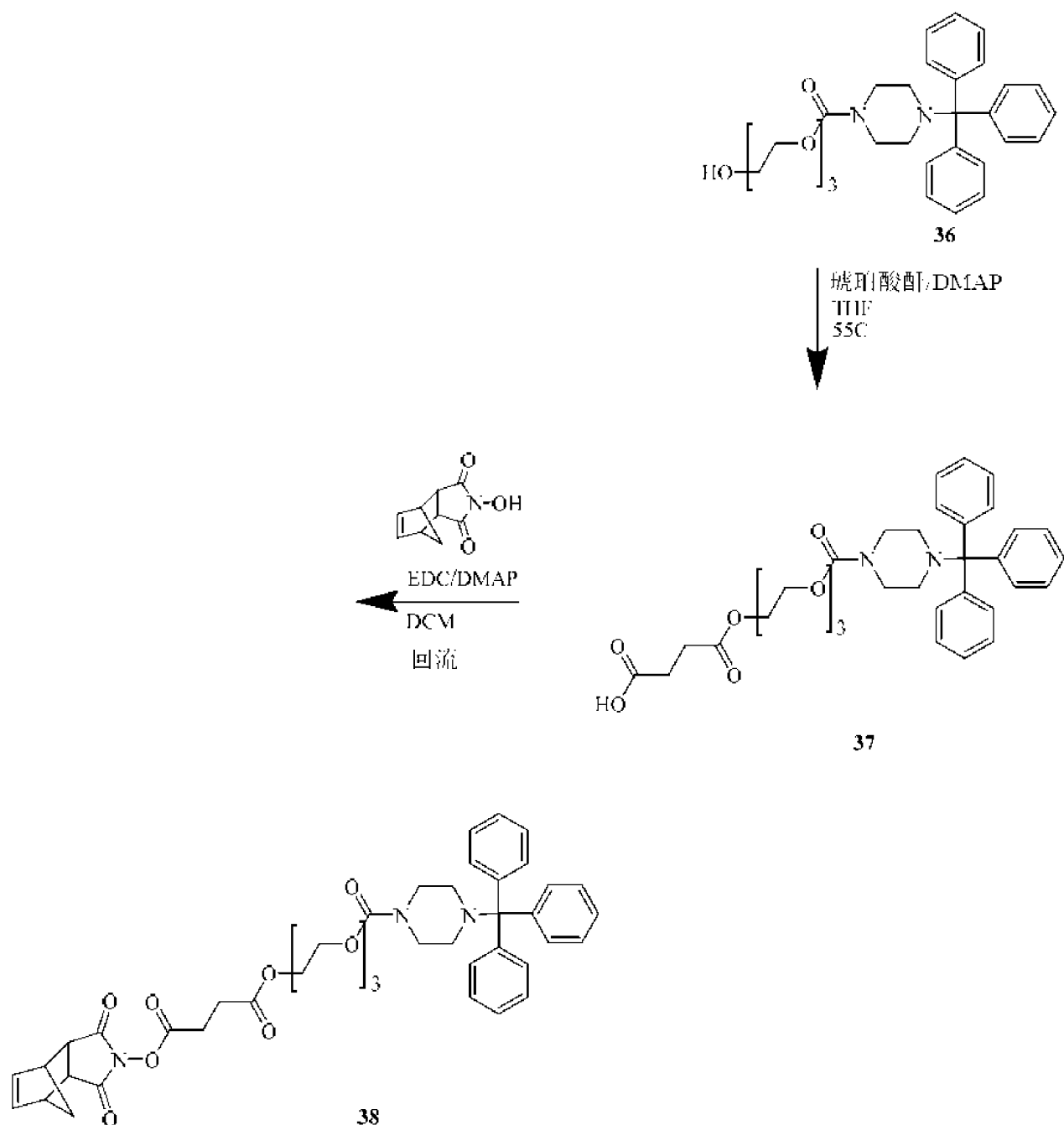
結構**5**之化合物可於固相寡聚物合成中用來製備包含亞單位間鍵聯之寡聚物。該等方法為業內所熟知。簡言之，結構**5**之化合物可在5'末端經修飾以含有與固體支撐物之連接體。支撐後，立即移除**5**之保護基團(例如3'末端之三苯甲基))且使游離胺與第二結構**5**化合物之活化磷部分反應。重複此序列直至獲得期望長度之寡聚物。若期望3'修飾，則可移除或保留末端3'端之保護基團。寡聚物可使用任一數量之方法自固體支撐物移除，或用鹼實例性處理以裂解與固體支撐物之鍵聯。

本發明之一般及特定嗎啉基寡聚物中之嗎啉基寡聚物之製備更詳細闡述於實例中。

嗎啉基寡聚物之製備

根據方案2使用以下方案實施本發明化合物之製備：





方案2：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**)中之冷卻懸浮液中添加碳酸鉀(3.2當量)於水(4 mL/g碳酸鉀)中之溶液。向此兩相混合物中緩慢添加氯甲酸苯基酯(1.03當量)於二氯甲烷(2 g/g氯甲酸苯基酯)中之溶液。將反應混合物升溫至20℃。在反應完成(1-2 hr)後，分離各層。用水洗滌有機層，並經無水碳酸鉀乾燥。藉由

自乙腈結晶分離產物**35**。

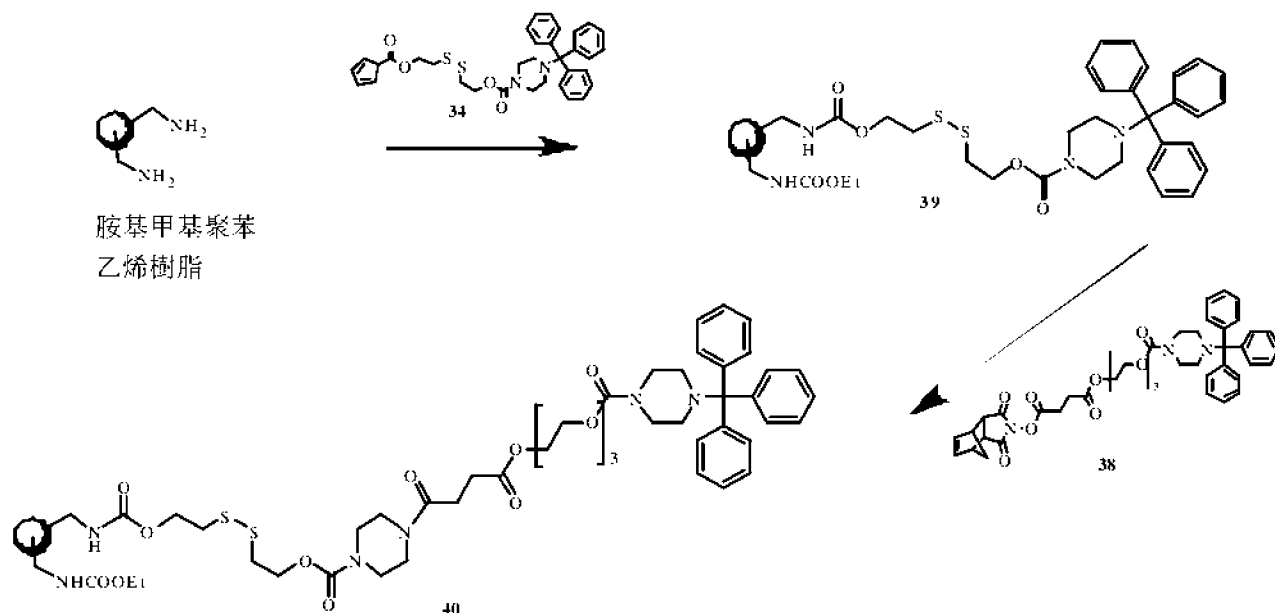
胺基甲酸酯醇**36**之製備：將氫化鈉(1.2當量)懸浮於1-甲基-2-吡咯啉酮(32 mL/g氫化鈉)中。向此懸浮液中添加三乙二醇(10.0當量)及化合物**35** (1.0當量)。將所得漿液加熱至95°C。在反應完成(1-2 hr)後，將混合物冷卻至20°C。向此混合物中添加30%二氯甲烷/甲基第三丁基醚(v:v)及水。相繼用NaOH水溶液、琥珀酸水溶液及飽和氯化鈉水溶液洗滌含產物之有機層。藉由自二氯甲烷/甲基第三丁基醚/庚烷結晶分離產物**36**。

尾酸**37**之製備：向化合物**36**於四氫呋喃(7 mL/g **36**)中之溶液中添加琥珀酸酐(2.0當量)及DMAP (0.5當量)。將混合物加熱至50°C。在反應完成(5 hr)後，將混合物冷卻至20°C且用NaHCO₃水溶液調節至pH 8.5。添加甲基第三丁基醚，且將產物萃取至水層中。添加二氯甲烷，且用檸檬酸水溶液將混合物調節至pH 3。用pH=3檸檬酸鹽緩衝液及飽和氯化鈉水溶液之混合物洗滌含產物之有機層。**37**之此二氯甲烷溶液未經分離即用於化合物**38**之製備中。

38之製備：向化合物**37**之溶液中添加N-羥基-5-降莖烯-2,3-二甲酸亞胺(HONB) (1.02當量)、4-二甲基胺基吡啶(DMAP) (0.34當量)及然後1-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(EDC) (1.1當量)。將混合物加熱至55°C。在反應完成(4-5 hr)後，將混合物冷卻至20°C且相繼用1:1 0.2 M檸檬酸/鹽水及鹽水洗滌。使二氯甲烷溶液經歷溶劑交換至丙酮且然後交換至N,N-二甲基甲醯胺，並藉由自丙酮/N,N-二甲基甲醯胺沈澱至飽和氯化鈉水溶液中分離產物。將粗產物於水中再製成漿液若干次以移除殘餘N,N-二甲基甲醯胺及鹽。

PMO合成方法A：使用二硫化物錨

在二甲基咪唑啉酮(DMI)中藉由用於在固相合成期間納入亞單位之程序將活化「尾」引入錨負載樹脂中。



方案3：用於合成嗎啉基寡聚物之固體支撐物之製備

此程序係在具有粗孔隙(40-60 μm)玻璃釉料、頂置式攪拌器及3向鐵氟龍活塞之矽化夾套肽容器(ChemGlass, NJ, USA)中實施以容許 N_2 向上鼓泡通過釉料或真空萃取。

以下程序中之樹脂處理/洗滌步驟係由兩個基本操作組成：樹脂流化或攪拌床反應器及溶劑/溶液萃取。對於樹脂流化，使活塞定位以容許 N_2 向上流過釉料且將指定樹脂處理/洗滌添加至反應器中並容許滲透且完全潤濕樹脂。然後開始混合且將樹脂漿液混合指定時間。對於溶劑/溶液萃取，終止混合及 N_2 流並開啟真空幫浦且然後使活塞定位以容許將樹脂處理/洗滌抽空至廢棄物。除非另外註明，否則所有樹脂處理/洗滌體積為15 mL/g樹脂。

向矽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載量；75 g, 1當量，Polymer Labs, UK，部件編號

1464-X799)中添加1-甲基-2-吡咯啉酮(NMP; 20 ml/g樹脂)且藉由混合1-2 hr使樹脂膨脹。在抽空膨脹溶劑後，用二氯甲烷($2 \times 1-2$ min)、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。在抽空最後洗滌液後，用二硫化物錨**34**於1-甲基-2-吡咯啉酮中之溶液(0.17 M; 15 mL/g樹脂，約2.5當量)處理樹脂且將樹脂/試劑混合物在45°C下加熱60 hr。反應完成時，停止加熱且抽空錨溶液並用1-甲基-2-吡咯啉酮($4 \times 3-4$ min)及二氯甲烷($6 \times 1-2$ min)洗滌樹脂。用10% (v/v)二碳酸二乙酯於二氯甲烷中之溶液(16 mL/g; $2 \times 5-6$ min)處理樹脂且然後用二氯甲烷($6 \times 1-2$ min)洗滌。在N₂流下將樹脂**39**乾燥1-3 hr且然後在真空下乾燥至恆定重量($\pm 2\%$)。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(潛在有效反應性位點數)係藉由三苯基甲基(三苯甲基)數/克樹脂之光譜測定分析來測定。

將已知重量之乾燥樹脂(25 ± 3 mg)轉移至25 ml矽化容量瓶且添加約5 mL之於二氯甲烷中之2% (v/v)三氟乙酸。藉由溫和渦漩混合內容物且然後靜置30 min。用額外於二氯甲烷中之2% (v/v)三氟乙酸使體積達到25 mL且充分混合內容物。使用正壓式移液管，將含三苯甲基之溶液之等份(500 μ L)轉移至10 mL容量瓶且用甲磺酸使體積達到10 mL。

藉由431.7 nm下之UV吸光度量測最終溶液中之三苯甲基陽離子含量且使用適當體積、稀釋度、消光係數(ϵ : 41 μ mol-1cm⁻¹)及樹脂重量計算樹脂負載，以三苯甲基/克樹脂(μ mol/g)表示。以一式三份實施分析且計算平均負載。

此實例中之樹脂負載程序將提供負載為約500 μ mol/g之樹脂。若在

室溫下實施24 hr二硫化物錨納入步驟則獲得300-400 $\mu\text{mol/g}$ 之負載。

尾負載：使用與製備胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂相同之設定及體積，可將尾引入固體支撐物中。首先在酸性條件下對錨負載樹脂去保護且在偶合之前中和所得材料。對於偶合步驟，使用**38** (0.2 M)於含有4-乙基嗎啉之DMI (NEM, 0.4 M)中之溶液替代二硫化物錨溶液。在45°C下保持2 hr後，將樹脂**39**用25%異丙醇/二氯甲烷中之5%二異丙基乙胺洗滌兩次且用DCM洗滌一次。向樹脂中添加苯甲酸酐(0.4 M)及NEM (0.4 M)之溶液。25 min後，將反應器夾套冷卻至室溫，且將樹脂用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**過濾且在高真空下乾燥。樹脂**40**之負載定義為用於尾負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：在Gilson AMS-422自動化肽合成器上之2 mL Gilson聚丙烯反應管柱(部件編號3980270)中製備嗎啉基寡聚物。將具有水流動通道之鋁塊在管柱位於合成器上時置於管柱周圍。或者，AMS-422將添加試劑/洗滌溶液，保持指定時間且使用真空抽空管柱。

對於長度在高達約25亞單位範圍內之寡聚物，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。對於更大寡聚物，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，則利用相同負載指導方針選擇已負載有尾之樹脂。

製備以下試劑溶液：

去三苯甲基化溶液：10%氰乙酸(w/v)於4:1二氯甲烷/乙腈中；

中和溶液：5%二異丙基乙胺於3:1二氯甲烷/異丙醇中；及

偶合溶液：0.18 M (或對於已生長長於20個亞單位之寡聚物使用0.24

M)期望鹼基及鍵聯類型之活化嗎啉基亞單位及0.4 M N乙基嗎啉於1,3-二甲基咪唑啉酮中。

使用二氯甲烷(DCM)作為分離不同試劑溶液洗滌液之傳統洗滌液。

在合成器上，使用設定為42°C之鋁塊，向含有30 mg胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂(或尾樹脂)之每一管柱中添加2 mL 1-甲基-2-吡咯啉酮且容許在室溫下靜置30 min。用2 × 2 mL二氯甲烷洗滌後，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	350-500uL	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

將個別寡聚物之序列程式化至合成器中，以使得每一管柱以適當序列接收適當偶合溶液(A、C、G、T、I)。當管柱中之寡聚物已完成納入其最後亞單位時，自鋁塊移除管柱且用含有0.89 M 4-乙基嗎啉之包含4-甲氧基三苯基甲基氯之偶合溶液(0.32 M於DMI中)人工實施最後循環。

自樹脂裂解及移除鹼基及主鏈保護基團：在甲氧基三苯甲基化後，用2 mL 1-甲基-2-吡咯啉酮將樹脂洗滌8次。添加1 mL由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，蓋住管柱，且使其在室溫下靜置30 min。此後將溶液排至12 mL惠頓瓶(Wheaton vial)中。用300 μ L裂解溶液將極度皺縮之樹脂洗滌兩次。向溶液中添加4.0 mL濃氨水(儲存在-20°C下)，緊緊蓋住瓶口(用鐵氟龍內襯之螺旋蓋)，且將混合物渦旋以混合溶液。將瓶置於45°C烘箱中達16-24 hr以實現鹼基及主鏈保護基團之裂解。

粗產物純化：自烘箱移除成瓶胺解溶液且將其冷卻至室溫。用20 mL 0.28%氨水稀釋溶液且使其通過含有Macroprep HQ樹脂(BioRad)之2.5 $\times$ 10 cm管柱。使用鹽梯度(A：0.28%氨及B：1 M氯化鈉於0.28%氨中；0-100% B，60 min)溶析含有甲氧基三苯甲基之峰。彙集合併之部分且端視期望產物進一步處理。

嗎啉基寡聚物之去甲氧基三苯甲基化：用1 M H₃PO₄處理自Macroprep純化彙集之部分以使pH降低至2.5。初始混合後，使樣本在室溫下靜置4 min，此時用2.8%氨/水將其中和至pH 10-11。藉由固相萃取(SPE)純化產物。

SPE管柱封裝及條件化：將Amberchrome CG-300M (Rohm及Haas; Philadelphia, PA) (3 mL)封裝至20 mL燒結管柱(BioRad Econo-Pac層析

管柱(732-1011))中且用3 mL以下各項沖洗樹脂：0.28% NH_4OH / 80% 乙腈；0.5 M NaOH / 20% 乙醇；水；50 mM H_3PO_4 / 80% 乙腈；水；0.5 NaOH / 20% 乙醇；水；0.28% NH_4OH 。

SPE純化：將來自去甲氧基三苯甲基化之溶液加載至管柱上且用3-6 mL 0.28% 氨水將樹脂沖洗三次。將惠頓瓶(12 mL)置於管柱下且藉由用2 mL於0.28% 氨水中之45% 乙腈洗滌兩次溶析產物。

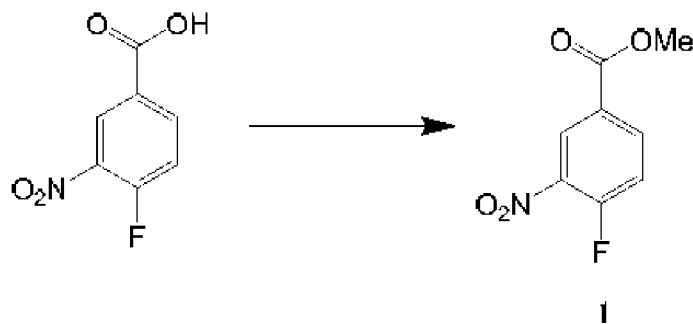
產物分離：將溶液冷凍於乾冰上且將瓶置於冷凍乾燥機中以產生鬆散白色粉末。將樣本溶解於水中，使用針筒經由0.22微米過濾器(Pall Life Sciences, Acrodisc 25 mm針筒過濾器，具有0.2微米HT Tuffryn膜)過濾，且在UV分光光度計上量測光學密度(OD)以確定所存在寡聚物之OD單位，並分配樣本以供分析。然後將溶液放回惠頓瓶中以凍乾。

藉由MALDI分析嗎啉基寡聚物：使用MALDI-TOF質譜來測定純化物中各部分之組成以及提供寡聚物之屬性(分子量)之證據。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)之溶液作為基質稀釋後運行樣本。

PMO合成方法B：使用NCP2錨

NCP2錨合成：

1. 4-氟-3-硝基苯甲酸甲酯(1)之製備

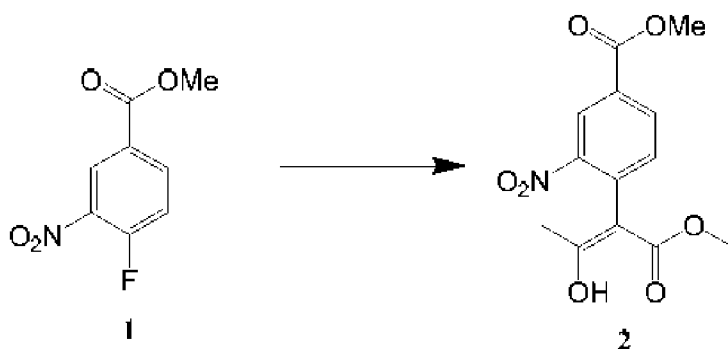


向100 L燒瓶中裝填12.7 kg 4-氟-3-硝基苯甲酸，添加40 kg 甲醇及

2.82 kg 濃硫酸。將混合物於回流(65°C)下攪拌36小時。將反應混合物冷卻至0°C。在38°C下形成晶體。將混合物在0°C下保持4 hr，然後在氮下過濾。洗滌100 L燒瓶且用10 kg已冷卻至0°C之甲醇洗滌濾餅。在漏斗上將固體濾餅乾燥1小時，轉移至托盤，且在真空烘箱中在室溫下乾燥至13.695 kg 4-氟-3-硝基苯甲酸甲酯之恆定重量(100%產率；HPLC 99%)。

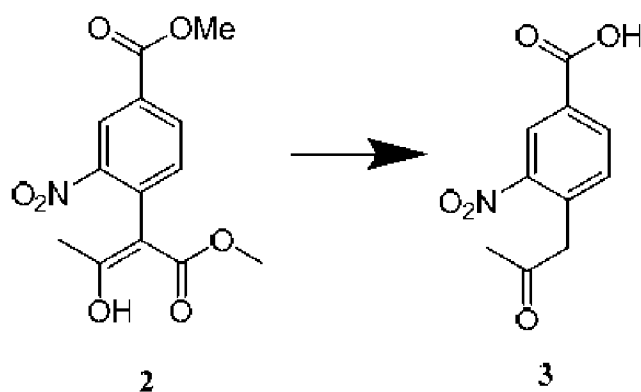
2. 3-硝基-4-(2-側氧基丙基)苯甲酸之製備

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



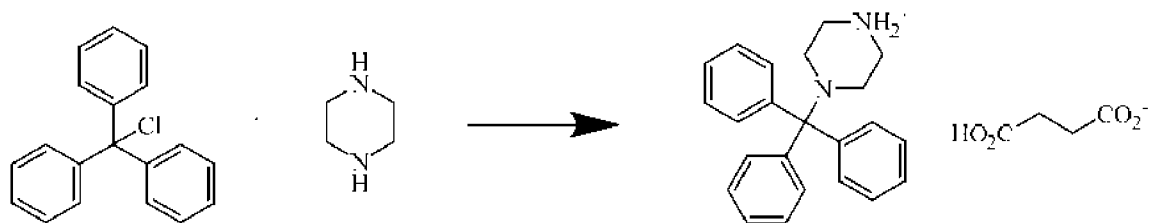
向100 L燒瓶中裝填3.98 kg來自先前步驟之4-氟-3-硝基苯甲酸甲酯(1)、9.8 kg DMF、2.81 kg 乙醯乙酸甲酯。將混合物攪拌且冷卻至0°C。經約4小時向此添加3.66 kg DBU，同時將溫度維持在5°C或以下。將混合物再攪拌1小時。向反應燒瓶中添加8.15 kg 檸檬酸於37.5 kg 純化水中之溶液，同時將反應溫度維持在15°C或以下。添加後，將反應混合物再攪拌30分鐘，然後在氮下過濾。使濕濾餅與14.8 kg 純化水一起返回至100 L燒瓶。將漿液攪拌10分鐘，然後過濾。使濕濾餅再返回至100 L燒瓶，用14.8 kg 純化水經10分鐘製成漿液，且過濾至粗(Z)-4-(3-羥基-1-甲氧基-1-側氧基丁-2-烯-2-基)-3-硝基苯甲酸甲酯。

B. 3-硝基-4-(2-側氧基丙基)苯甲酸



在氮下將粗(Z)-4-(3-羥基-1-甲氧基-1-側氧基丁-2-烯-2-基)-3-硝基苯甲酸甲酯裝填至100 L反應燒瓶。向此添加14.2 kg 1,4-二噁烷並攪拌。經2小時向混合物中添加16.655 kg濃HCl及13.33 kg純化水(6 M HCl)之溶液，同時將反應混合物之溫度維持在15℃以下。當完成添加時，在回流(80℃)下將反應混合物加熱24小時，冷卻至室溫，且在氮下過濾。用14.8 kg純化水研磨固體濾餅，過濾，用14.8 kg純化水再研磨，且過濾。使用39.9 kg DCM使固體返回至100 L燒瓶且在攪拌下回流1小時。添加1.5 kg純化水以溶解剩餘固體。將底部有機層分流至預熱72 L燒瓶，然後返回至清潔的乾燥100 L燒瓶。將溶液冷卻至0℃，保持1小時，然後過濾。各自用9.8 kg DCM及5 kg庚烷之溶液將固體濾餅洗滌兩次，然後在漏斗上乾燥。將固體轉移至托盤且乾燥至1.855 kg 3-硝基-4-(2-側氧基丙基)苯甲酸之恆定重量。化合物1之總產率42%。HPLC 99.45%。

3. N-三苯甲基六氫吡嗪琥珀酸酯(NTP)之製備



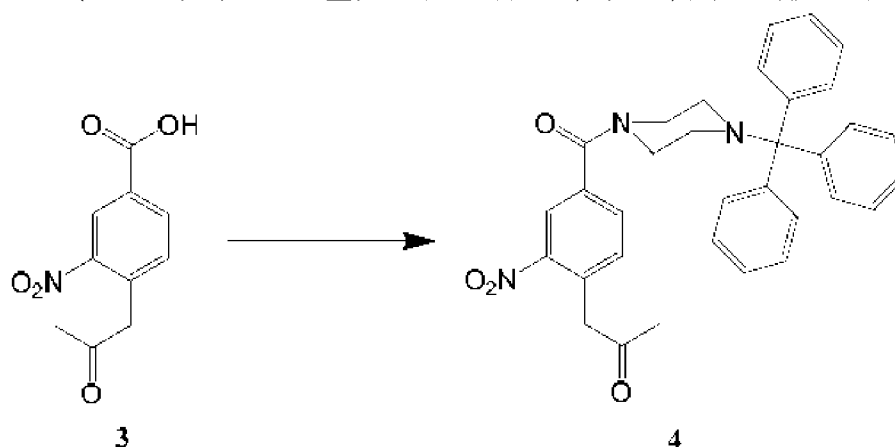
在氮下向72 L夾套燒瓶中裝填1.805 kg三苯基甲基氯及8.3 kg甲苯(THF溶液)。攪拌混合物直至固體溶解。在氮下向100 L夾套反應燒瓶中

添加5.61 kg六氫吡嗪、19.9 kg甲苯及3.72 kg甲醇。將混合物攪拌且冷卻至0℃。經4小時向此逐份緩慢添加TPC溶液，同時將反應溫度維持在10℃或以下。在10℃下將混合物攪拌1.5小時，然後升溫至14℃。將32.6 kg純化水裝填至72 L燒瓶，然後轉移至100 L燒瓶，同時將內部批料溫度維持在20℃ +/- 5℃下。使各層分流且分離並儲存底部水層。各自用32 kg純化水將有機層萃取三次，且分離水層並與所儲存水溶液合併。

將剩餘有機層冷卻至18℃且將847 g琥珀酸於10.87 kg純化水中之溶液逐份緩慢添加至有機層中。在20℃ +/- 5℃下將混合物攪拌1.75小時。將混合物過濾，且用2 kg TBME及2 kg丙酮洗滌固體，然後在漏斗上乾燥。各自用5.7 kg丙酮將濾餅研磨兩次且過濾並在研磨之間用1 kg丙酮洗滌。在漏斗上乾燥固體，然後轉移至托盤且在真空烘箱中在室溫下乾燥至2.32 kg NTP之恆定重量。產率80%。

4. (4-(2-羥基丙基)-3-硝基苯基)(4-三苯甲基六氫吡嗪-1-基)甲酮之製備

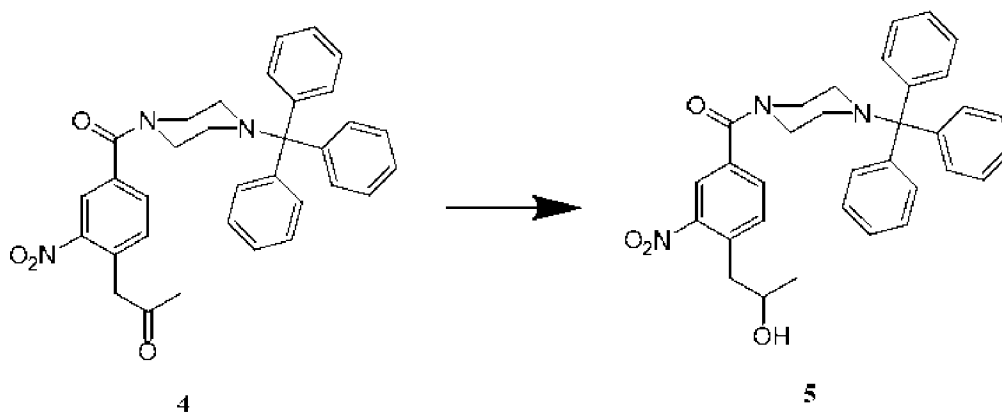
A. 1-(2-硝基-4(4-三苯甲基六氫吡嗪-1-羰基)苯基)丙-2-酮之製備



在氮下向100 L夾套燒瓶中裝填2 kg 3-硝基-4-(2-側氧基丙基)苯甲酸(3)、18.3 kg DCM及1.845 kg N-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(EDC.HCl)。攪拌溶液直至形成均質混合物。在室溫下經30分鐘添加3.048 kg NTP且攪拌8小時。將5.44 kg純化水添加至反應混合物中且攪拌

30分鐘。分離各層且排出並儲存含有產物之底部有機層。用5.65 kg DCM將水層萃取兩次。用1.08 kg氯化鈉於4.08 kg純化水中之溶液洗滌合併之有機層。經1.068 kg硫酸鈉乾燥有機層且過濾。用1.3 kg DCM洗滌硫酸鈉。用252 g矽膠將合併之有機層製成漿液且經由含有252 g矽膠床之過濾漏斗過濾。用2 kg DCM洗滌矽膠床。在rotovap上蒸發合併之有機層。將4.8 kg THF添加至殘餘物中且然後在rotovap上蒸發直至達到2.5體積之於THF中之粗1-(2-硝基-4(4-三苯甲基六氫吡嗪-1-羰基)苯基)丙-2-酮。

B. (4-(2-羥基丙基)-3-硝基苯基)(4-三苯甲基六氫吡嗪-1-基)甲酮(5)之製備



在氮下向100 L夾套燒瓶中裝填3600 g來自先前步驟之4及9800 g THF。將攪拌溶液冷卻至 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 。用11525 g乙醇稀釋溶液且在 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 下經約2小時添加194 g硼氫化鈉。在 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 下將反應混合物再攪拌2小時。藉由緩慢添加約1.1 kg氯化銨於約3 kg水中之溶液淬滅反應以維持 $\leq 10^{\circ}\text{C}$ 之溫度。將反應混合物再攪拌30分鐘，過濾以移除無機物，並再裝填至100 L夾套燒瓶且用23 kg DCM萃取。分離有機層且各自用4.7 kg DCM將水溶液萃取兩次。用約800 g氯化鈉於約3 kg水中之溶液洗滌合併之有機層，然後經2.7 kg硫酸鈉乾燥。過濾懸浮液並用2 kg DCM洗滌濾餅。將合併之濾液濃縮至2.0體積，用約360 g乙酸乙酯稀釋，並蒸發。在氮下將粗產

在真空下乾燥至6.16 kg **NCP2錨**(114%產率)。

NCP2錨負載樹脂合成

向具有鐵氟龍活塞之75 L固相合成反應器裝填約52 L NMP及2300 g 胺基甲基聚苯乙烯樹脂。攪拌NMP中之樹脂以膨脹約2小時，然後排出。將樹脂洗滌兩次，每次洗滌用約4 L DCM，然後洗滌兩次，每次洗滌用39 L中和溶液，然後洗滌兩次，每次洗滌用39 L DCM。將NCP2錨溶液緩慢添加至攪拌樹脂溶液中，在室溫下攪拌24小時，並排出。將樹脂洗滌四次，每次洗滌用39 L NMP，且洗滌六次，每次洗滌用39 L DCM。用½ DEDC加帽溶液將樹脂處理且攪拌30分鐘，排出，並用第2 ½ DEDC加帽溶液處理且攪拌30分鐘並排出。將樹脂洗滌六次，每次洗滌用39 L DCM，然後在烘箱中乾燥至3573.71 g錨負載樹脂之恆定重量。

使用NCP2錨製備嗎啉基寡聚物

古路地森(Golodirsen，PMO#1)粗原料藥之50 L固相合成

1. 材料

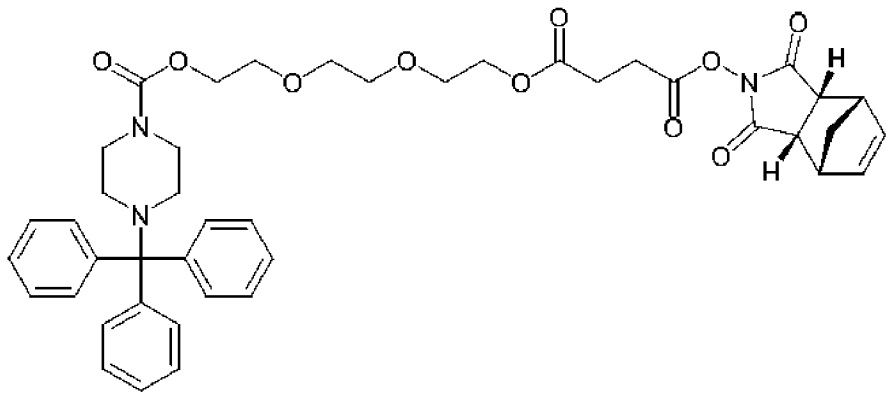
表2：起始材料

材料名稱	化學名稱	CAS編號	化學式	分子量
活化A亞單位	磷醯胺基氯酸, <i>N,N</i> -二甲基-,[6-[6-(苯甲醯基胺基)-9H-嘌呤-9-基]-4-(三苯基甲基)-2-嗎啉基]甲酯	1155373-30-0	C ₃₈ H ₃₇ ClN ₇ O ₄ P	722.2
活化C亞單位	磷醯胺基氯酸, <i>N,N</i> -二甲基-,[6-[4-(苯甲醯基胺基)-2-側氧基-1(2H)-嘓啶基]-4-(三苯基甲基)-2-嗎啉基]甲酯	1155373-31-1	C ₃₇ H ₃₇ ClN ₅ O ₅ P	698.2

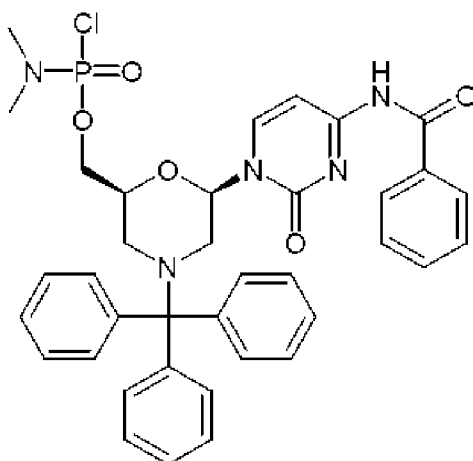
活化 DPG 亞單 位	丙酸, 2,2-二甲基-,4-[[[9-[6-[[[氯(二 甲基胺基)氧磷基]氧基]甲基]-4-(三 苯基甲基)-2-嗎啉基]-2-[(2-苯基乙 醯基)胺基]-9H-嘌呤-6-基]氧基]甲 基]苯基酯	1155309-89-9	C ₅₁ H ₅₃ ClN ₇ O ₇ P	942.2
活化 T 亞 單位	磷醯胺基氯酸, <i>N,N</i> -二甲基-,[6- (3,4-二氫-5-甲基-2,4-二側氧基- 1(2H)-嘓啶基)]-4-(三苯基甲基)-2- 嗎啉基]甲酯	1155373-34-4	C ₃₁ H ₃₄ ClN ₄ O ₅ P	609.1
活化 EG3 尾	丁二酸, 1-[3aR,4S,7R,7aS)- 1,3,3a,4,7,7a-六氫-1,3-二側氧基- 4,7-亞甲基-2H-異吲哚-2-基]4-[2- [2-[2-[[[4-(三苯基甲基)-1-六氫吡 嚟基]羰基]氧基]乙氧基]乙氧基]乙 基]酯	1380600-06-5	C ₄₃ H ₄₇ N ₃ O ₁₀	765.9

起始材料之化學結構：

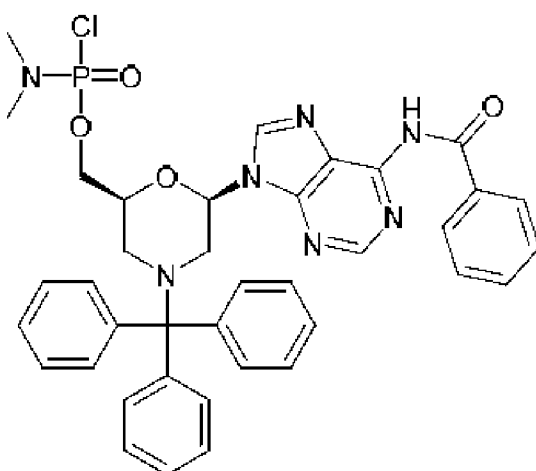
A. 活化EG3尾



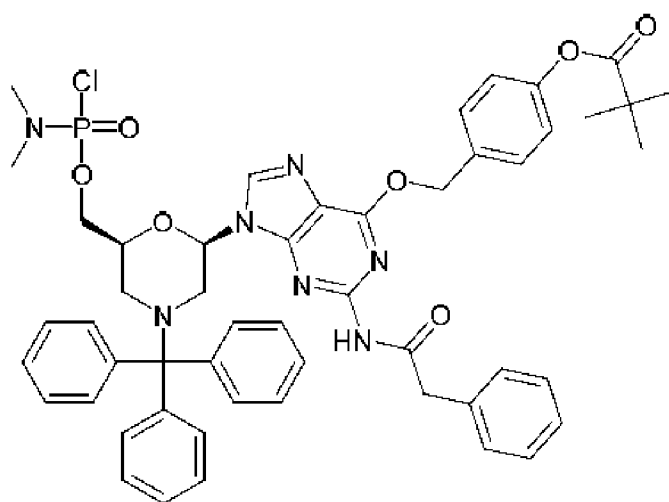
B. 活化C亞單位(關於製備參見美國專利第8,067,571號)



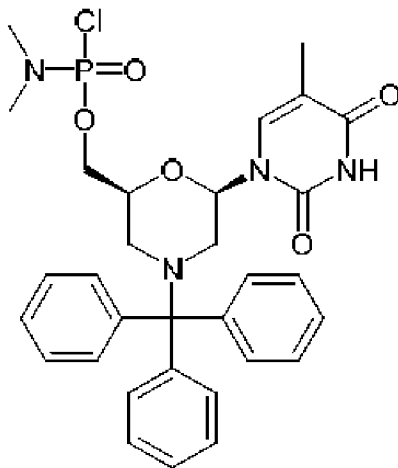
C. 活化A亞單位(關於製備參見美國專利第8,067,571號)



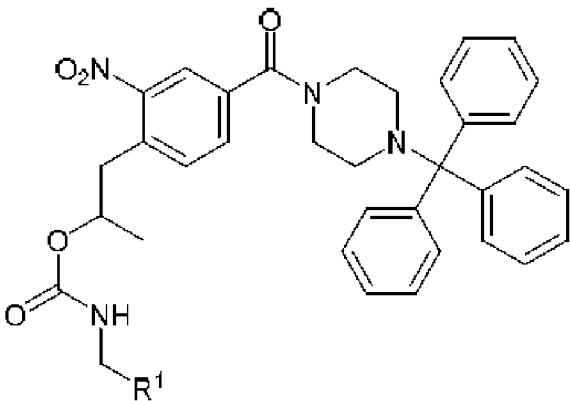
D. 活化DPG亞單位(關於製備參見WO 2009/064471)



E. 活化T亞單位(關於製備參見WO 2013/082551)



F. 錨負載樹脂



其中R¹係支撐介質。

表3：用於古路地森粗原料藥之固相寡聚物合成之溶液之說明

溶液名稱	溶液組成
NCP2錨溶液	37.5 L NMP及1292 g NCP2錨
DEDC 加帽 溶液	4.16 L二碳酸二乙酯(DEDC)、3.64 L NEM及33.8 L DCM
CYTFA溶液	2.02 kg 4-氰基吡啶、158 L DCM、1.42 L TFA、39 L TFE及2 L 純化水
中和溶液	35.3 L IPA、7.5 L DIPEA及106.5 L DCM
裂解溶液	1,530.04 g DTT、6.96 L NMP及2.98 L DBU

2. 古路地森粗原料藥之合成

A. 樹脂膨脹

將750 g錨負載樹脂及10.5 L NMP裝填至50 L矽化反應器且攪拌3小

時。排出NMP且將錨負載樹脂各自用5.5 L DCM洗滌兩次且各自用5.5 L 30% TFE/DCM洗滌兩次。

B. 循環0：EG3尾偶合

各自用5.5 L 30% TFE/DCM將錨負載樹脂洗滌三次且排出，用5.5 L CYTFA溶液洗滌15分鐘且排出，且再用5.5 L CYTFA溶液洗滌15分鐘但不排出，向其裝填122 mL 1:1 NEM/DCM並將懸浮液攪拌2分鐘且排出。將樹脂用5.5 L中和溶液洗滌5分鐘共兩次達且排出，然後各自用5.5 L DCM洗滌兩次且排出。將706.2 g活化EG3尾(MW 765.85)及234 mL NEM於3 L DMI中之溶液裝填至樹脂且在室溫下攪拌3小時並排出。各自用5.5 L中和溶液將樹脂洗滌兩次，每次洗滌5分鐘，且用5.5 L DCM洗滌一次並排出。裝填374.8 g苯甲酸酐及195 mL NEM於2680 mL NMP中之溶液且攪拌15分鐘並排出。將樹脂與5.5 L中和溶液一起攪拌5分鐘，然後用5.5 L DCM洗滌一次並各自用5.5 L 30% TFE/DCM洗滌兩次。將樹脂懸浮於5.5 L 30% TFE/DCM中且保持14小時。

C. 亞單位偶合循環1-30

i. 偶合前處理

在每一偶合循環之前如圖18中所述，將樹脂：1) 用30% TFE/DCM洗滌；2) a) 用CYTFA溶液處理15分鐘且排出，及b) 用CYTFA溶液處理15分鐘，向其添加1:1 NEM/DCM，攪拌，且排出；3) 與中和溶液一起攪拌三次；及4) 用DCM洗滌兩次。參見圖18。

ii. 偶合後處理

在排出每一亞單位溶液後如圖18中所述，將樹脂：1) 用DCM洗滌；及2) 用30% TFE/DCM洗滌兩次。若將樹脂在下一偶合循環之前保持一定

時間段，則不排出TFE/DCM洗滌液且使樹脂保留在該TFE/DCM洗滌溶液中。參見圖18。

iii. 活化亞單位偶合循環

偶合循環係如圖18中所述實施。

iv. 最終IPA洗滌

在實施最終偶合步驟後，如圖18中所述，各自用19.5 L IPA將樹脂洗滌8次，且在室溫下在真空下乾燥約63.5小時至4857.9 g之乾重。

C. 裂解

將上述樹脂結合之古路地森粗原料藥分成兩批，如下處理每一批。將1619.3 g批次之樹脂：1) 與10L NMP一起攪拌2hr，然後排出NMP；2) 各自用10 L 30% TFE/DCM洗滌三次；3) 用10 L CYTFA溶液處理15分鐘；及4) 用10 L CYTFA溶液處理15分鐘，然後向其添加130 ml 1:1 NEM/DCM且攪拌2分鐘並排出。各自用10 L中和溶液將樹脂處理三次，用10 L DCM洗滌六次，且各自用10 L NMP洗滌八次。用1530.4 g DTT及2980 DBU於6.96 L NMP中之裂解溶液將樹脂處理2小時以分開依替利森粗原料藥與樹脂。將裂解溶液排出且保留在單獨容器中。用4.97 L與裂解溶液合併之NMP洗滌反應器及樹脂。

D. 去保護

將合併之裂解溶液及NMP洗滌液轉移至壓力容器，向其添加39.8 L已在冰箱中冷卻至-10℃至-25℃溫度之 NH_4OH ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。將壓力容器密封且加熱至45℃並保持16 hr，然後冷卻至25℃。用純化水以3:1稀釋此含有古路地森粗原料藥之去保護溶液且用2 M磷酸將pH調節至3.0，然後用 NH_4OH 調節至pH 8.03。HPLC：C18 77.552%及SCX-10 73.768%。

古路地森(PMO#1)粗原料藥之純化

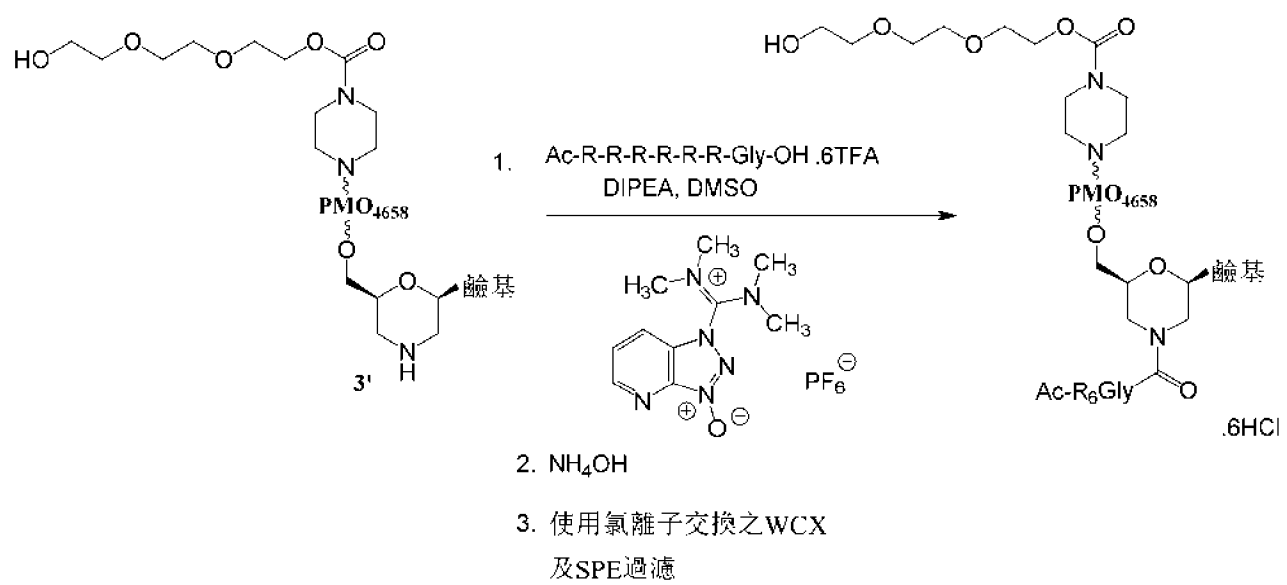
將來自上文部分D之含有古路地森粗原料藥之去保護溶液加載至ToyoPearl Super-Q 650S陰離子交換樹脂管柱(Tosoh Bioscience)上且用0-35% B之梯度經17管柱體積(緩衝液A：10 mM氫氧化鈉；緩衝液B：1 M氯化鈉於10 mM氫氧化鈉中)溶析並使可接受純度之部分(C18及SCX HPLC)彙集至經純化藥品溶液。HPLC：93.571% (C18) 88.270% (SCX)。

將經純化原料藥溶液脫鹽且凍乾至1450.72 g經純化古路地森原料藥。產率54.56%；HPLC：93.531% (C18) 88.354% (SCX)。

表5. 縮寫字

縮寫字	名稱
DBU	1,8-二氮雜二環十一-7-烯
DCM	二氯甲烷
DIPEA	N,N-二異丙基乙胺
DMI	1,3-二甲基-2-咪唑啉酮
DTT	二硫蘇糖醇
IPA	異丙醇
MW	分子量
NEM	N-乙基嗎啉
NMP	N-甲基-2-吡咯啉酮
RT	室溫
TFA	2,2,2-三氟乙酸
TFE	2,2,2-三氟乙醇

CPP結合



分析程序：使用芥子酸(SA)基質在Bruker Autoflex™ Speed上記錄基質輔助雷射脫附離子化時間飛行質譜(MALDI-TOF-MS)。在配備有3000二極體陣列檢測器及ProPac™ SCX-20管柱(250 × 4 mm)之Thermo Dionex UltiMate 3000系統上使用1.0 mL/min之流速(pH = 2；30℃管柱溫度)實施SCX-HPLC。移動相為**A** (25%乙腈於含有24 mM H₃PO₄之水中)及**B** (25%乙腈於含有1 M KCl及24 mM H₃PO₄之水中)。採用以下梯度溶析：0 min, 35% **B**；2 min, 35% **B**；22 min, 80% **B**；25 min, 80% **B**；25.1 min, 35% **B**；30 min, 35% **B**。

向PMO#1 (1.82 g, 0.177 mmol，藉由凍乾兩天新鮮乾燥)、Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH 六(三氟乙酸酯) (614.7 mg, 0.354 mmol)及1-[雙(二甲基氨基)亞甲基]-1*H*-1,2,3-三唑并[4,5-*b*]吡啶鎢3-氧化物六氟磷酸鹽(HATU, 134.4 mg, 0.354 mmol)之混合物中添加二甲亞砜(DMSO, 20 mL)。在室溫下將混合物攪拌3分鐘，然後添加*N,N*-二異丙基乙胺(DIPEA, 68.5 mg, 0.530 mmol)。5分鐘後，渾濁混合物變成澄清溶液。藉由SCX-HPLC監測反應。2小時後，添加20 mL 10%氫氧化銨溶液(2.8% NH₃)。在室溫下將混合物再攪拌2小時。藉由添加400 mL

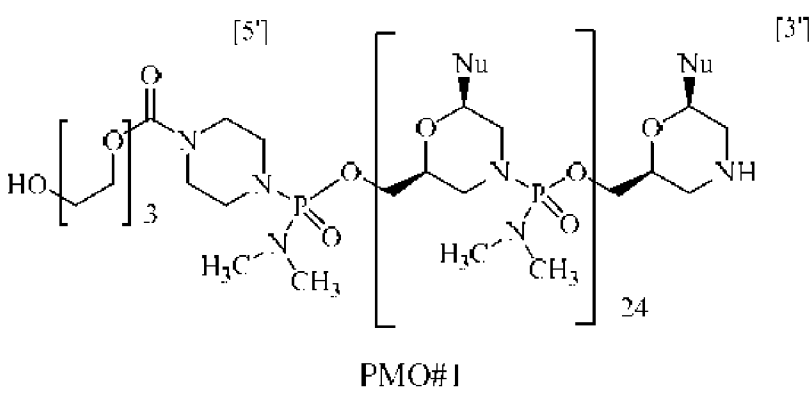
水終止反應。將三氟乙醇(2.0 mL)添加至溶液中。

將溶液分成兩部分且藉由WCX管柱(10 g樹脂/管柱)純化每一部分。首先用水中之20%乙腈(v/v)洗滌每一WCX管柱以移除PMO#1起始材料。當MALDI-TOF質譜分析顯示不存在PMO#1信號時停止洗滌(225 mL/管柱)。然後用水(100 mL/管柱)洗滌每一管柱。藉由2.0 M胍HCl (140 mL/管柱)溶析期望產物PPMO#1。將PPMO#1之經純化溶液彙集在一起且然後分成兩部分並藉由SPE管柱(10 g樹脂/管柱)對每一部分脫鹽。

首先用 1.0 M NaCl 水溶液(100 mL/管柱)洗滌SPE管柱以產生PPMO#1之六鹽酸鹽。然後用水(200 mL/管柱)洗滌每一SPE管柱。藉由水中之50%乙腈(v/v, 150 mL/管柱)溶析最終脫鹽的PPMO#1。藉由在減壓下抽空移除乙腈。將所得水溶液凍乾以獲得期望結合物PPMO#1六鹽酸鹽(1.93 g, 94.5%產率)。

實例1：PMO#1

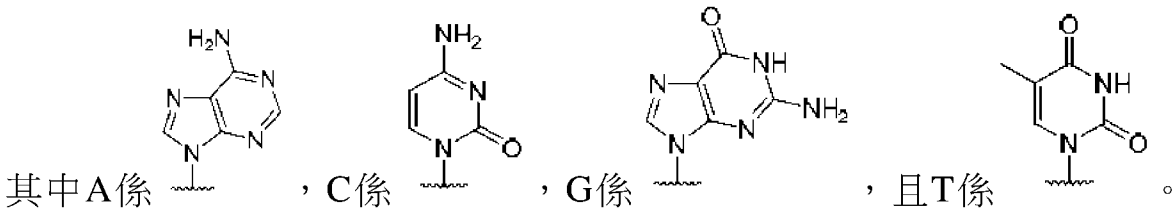
使用上文所述之PMO合成方法B方案，合成PMO#1：



其中每一Nu自1至25及5'至3'係：

位置 編號5'至 3'	Nu	位置 編號5'至 3'	Nu	位置 編號5'至 3'	Nu	位置 編號5'至 3'	Nu	位置 編號5'至 3'	Nu
1	G	6	C	11	G	16	G	21	T

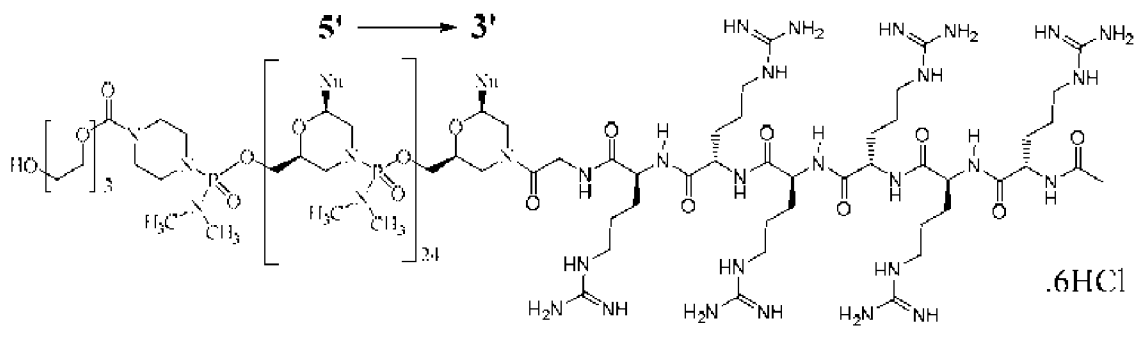
2	T	7	T	12	T	17	A	22	G
3	T	8	C	13	T	18	A	23	T
4	G	9	C	14	C	19	G	24	T
5	C	10	G	15	T	20	G	25	C



HPLC：71.85%；條件：Dionex DNAPac (DNX#97)；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；移動相A：10mM NaOH/20mM NaCl；C：10mM NaOH/0.5 M NaCL。管柱溫度：45℃；流速1.0 mL/min。

實例2：PPMO#1

使用上文所述之方案，自PMO#1合成PPMO#1：

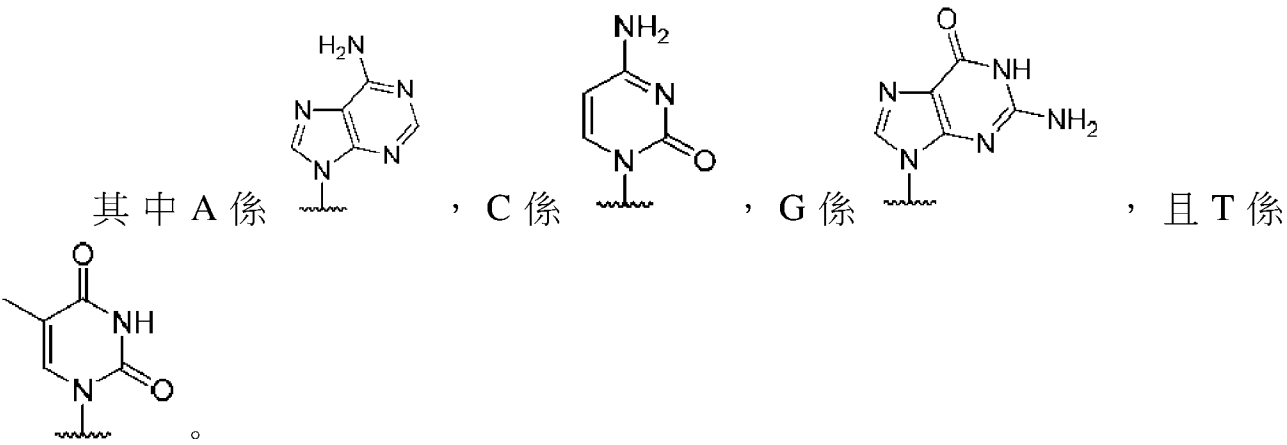


PPMO#1

其中每一Nu自1至25及5'至3'係：

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

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



實例3：活體外外顯子53跳躍(肌母細胞)

評價在健康人類肌母細胞中如下表中所述靶向人類肌肉萎縮蛋白(DMD)外顯子53之兩種化合物PMO#1及PPMO#1 (二者含有相同序列)之DMD外顯子53跳躍。

用於人類DMD外顯子53之PMO#1及PPMO#1之序列.

名稱	靶向序列(TS)	TS SEQ ID NO.	5'	3'
PMO#1	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1	EG3	H
PPMO#1	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1	EG3	-G-R ₆

具體而言，將健康人類肌母細胞(5-6代，SKB-F-SL，購自Zen-Bio, Inc.)在用不同濃度(即40 μm、20 μm、10 μm、5 μm、2.5 μm及1.25 μm)之PMO#1或PPMO#1處理達到約40%鋪滿時平鋪於SKM-M培養基(Zen-Bio, Inc.)中。培育96小時後，用PBS洗滌肌母細胞且藉由Illustra GE RNAspin 96套組(目錄號25-055-75, GE Healthcare Bio-Sciences)中之RA1溶解緩衝液溶解。根據製造商之建議分離總RNA，只是使用40μL無RNase水來溶析RNA。

為測定藉由兩種化合物之外顯子53跳躍，實施兩步終點RT-PCR。具

體而言，首先藉由SuperScript IV第一鏈合成套組(目錄號18091200, Invitrogen)使用無規六聚體根據製造商之說明書將11微升總RNA反轉錄成cDNA。藉由將9μL cDNA添加至Platinum Taq DNA聚合酶PCR Supermix高保真度(目錄號12532024, Invitrogen)中使用靶向人類DMD外顯子51/52接合處及54之引子(正向引子(SEQ ID NO: 5)：CATCAAGCAGAAGGCAACAA；反向引子(SEQ ID NO: 6)：GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA)實施PCR。使用BioRad CFX96即時溫度循環器使用表2中所顯示之程式實施PCR擴增。使用DNA高靈敏度試劑套組(CLS760672, Perkin Elmer)藉由將32μL PCR產物加載至LabChip GX系統中來評價跳躍或非跳躍PCR產物之表現。DMD外顯子53跳躍之百分比計算為外顯子53跳躍條帶(201 bp)之莫耳濃度(nmol/l)與跳躍(201 bp)及未跳躍(413 bp)條帶之總莫耳濃度相比之百分比。

使用雙尾未配對司徒頓t-測試(Student’s t-test，同方差)來評價在每一劑量下2組之平均值是否在統計學上彼此不同。P值< 0.05視為在統計學上顯著。

用於擴增具或不具外顯子53跳躍之DMD擴增子之溫度循環器程式.

步驟	溫度	時間
1. 變性	94°C	2 min
2. 變性	94°C	30 sec
3. 黏合	61.2°C	30 sec
4. 延伸	68°C	1 min
5. 重複步驟2-4	34個循環	
6. 最後延伸	68°C	5 min
7. 儲存	4°C	∞

結果呈現於下表及圖4中。在圖4中，誤差槓呈現平均值± SD，槓上

方之「[數字] x」表示藉由在每一濃度下PPMO#1與PMO#1相比之相對倍數變化，以外顯子跳躍之百分比表示，且「*」指示PMO#1與PPMO#1之間之顯著差異，其中p值< 0.05。

人類肌母細胞中藉由PMO#1及PPMO#1之DMD外顯子53跳躍之百分比.

化合物/ 劑 量 (µm)	外顯子跳躍% (平均值± SD)					
	1.25	2.5	5	10	20	40
PMO#1	1.27±0.24	2.19±0.44	3.58±0.91	6.56±1.32	11.06±2.08	19.57±4.23
PPMO#1	2.03±0.48	3.73±0.70	6.57±1.47	10.27±2.78	17.08±4.61	26.90±4.78

上表及圖4中之數據令人驚訝地顯示，當用PPMO#1處理細胞時與PMO#1相比在所有濃度下，在肌母細胞中產生顯著較高之外顯子53跳躍，其程度出人意料。此顯著改良可能在活體內比較測試中得到進一步證實，該活體內比較測試係例如實例5之非人類靈長類動物(NHP)研究，其中用PPMO#1或PMO#1治療NHP且量測多個相關肌肉組織中之外顯子53跳躍(關於細節參見實例5)。此外，由於在此研究之時間標度上PPMO#1在此實例中所用之SKM-M培養基中分解(數據未顯示)，故NHP研究可展示比此實例中所展示甚至更大之改良。

實例4：MDX小鼠研究

mdx小鼠係含有肌肉萎縮蛋白基因之外顯子23突變之杜興氏肌肉萎縮症(DMD)之公認且經充分表徵之動物模型。已知M23D反義序列(SEQ ID NO: 2)誘導功能性肌肉萎縮蛋白表現之外顯子23跳躍及恢復。將下表40 mg/kg劑量之PPMO4225或PMO4225或鹽水單次注射至6-7週齡MDX小鼠之尾靜脈中。

名稱	靶向序列(TS)	TS SEQ ID NO.	5'	3'
PMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	H
PPMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	-G-R ₆

PMO4225及PPMO4225各自係藉由上文所述之PMO方法A及CPP結合方法製備。

在單次劑量注射後7天、30天、60天及90天殺死經治療小鼠(n=6隻/組)。處理橫膈膜、心臟及右四頭肌用於西方墨點分析以量測肌肉萎縮蛋白之產生及用於RT-PCR分析以量測外顯子跳躍之百分比，且處理左四頭肌用於免疫組織化學及H/E染色，如上文所述。

藉由西方墨點量化肌肉萎縮蛋白恢復，且藉由RT-PCR量測外顯子23跳躍之百分比，各自如上文所述。

RT-PCR及西方墨點結果顯示於圖5A-10B及下表中。令人驚訝的是，PPMO4225誘導與PMO4225相比顯著較高且持續的肌肉萎縮蛋白恢復及外顯子23跳躍程度，且最高程度出現在注射後30天。甚至更令人驚訝的是，PPMO4225增加心臟中之肌肉萎縮蛋白含量而PMO4225不會；使用PMO4225在心臟中在所有時間點未觀察到肌肉萎縮蛋白及外顯子跳躍。

	藉由西方墨點將肌肉萎縮蛋白量化為野生型蛋白之百分比(WT%)								
	化合物	PMO4225				PPMO4225			
	天	7	30	60	90	7	30	60	90
組織									
四頭肌		1.1	2.3	1.6	0.7	20.7	28.1	20.8	8.2
橫膈膜		1.4	1.9	1.3	0.6	14.5	15.2	9.8	2.3
心臟		0	0	0	0	2.0	1.0	0.9	0.1

	如藉由RT-PCR所量測之外顯子跳躍%								
	化合物	PMO4225				PPMO4225			
	天	7	30	60	90	7	30	60	90
組織									
四頭肌		21.2	5.5	7.9	2.8	61.5	42.02	28.8	6.9
橫膈膜		29.9	2.6	0.5	0	51.6	36.76	3.05	0
心臟		0	0	0	0	13.15	2.64	0	0

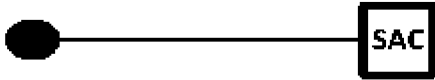
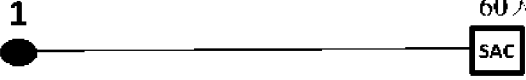
免疫組織化學結果顯示於圖11中。在此處，PPMO4225恢復整個四頭肌之肌肉萎縮蛋白，而4225產生「斑塊樣」表現模式。使用PPMO4225治療之肌肉萎縮蛋白之不均勻分佈指示可達成骨骼肌之廣泛靶向。PPMO4225具有與PMO4225相比顯著改良之活體內遞送。

實例5：NHP中之外顯子53跳躍

為進一步證實PPMO反義寡聚物之外顯子跳躍之效能，使用非人類靈長類動物。具體而言，根據下表中之投藥時間表向具有完整肌肉組織之食蟹猴靜脈內注射PPMO#1、PMO#1（來自實例3）或鹽水：

食蟹猴投藥時間表

組	化合物	劑量 (mg/kg)	每組數 目	遞送策略
1	PPMO#1	20	3	1234週 SAC 每週一次投藥，4個總劑量 在末次劑量後48小時(在第22天)殺死動物
2	PPMO#1	40	3	
3	PPMO#1	80	3	
4	PPMO#1	160	3	
5	PMO#1	40	3	

6	鹽水	0	2	
7	PPMO#1	40	2	130天  在第1天給予單次劑量且恢復4週
8	PPMO#1	40	2	160天  在第1天給予單次劑量且恢復8週

在整個研究中觀察動物，包括臨床觀察(例如評估皮膚及毛皮、呼吸效應)及體重量測。至少在測試開始之前以及第一劑量及末次劑量後24小時(若適用)獲取血液及尿液樣本。

在每一排定的驗屍或安樂死臨死時，收集橫膈膜、十二指腸、食管及主動脈之平滑肌、四頭肌、三角肌、二頭肌及心臟之切片且快速冷凍。使用RT-PCR測定外顯子51跳躍%，如上文所述。

實例6：MDX小鼠劑量反應研究

將上文所述之PPMO4225或PMO4225以40 mg/kg、80 mg/kg或120 mg/kg之劑量單次注射至6-7週齡MDX小鼠之尾靜脈中(n=6隻/組)。

在注射後30天殺死經治療小鼠。處理橫膈膜、四頭肌及心臟用於西方墨點分析以基於具有以下修改之上述西方墨點方案(用於例如實例4中)量測肌肉萎縮蛋白之產生：

參數	實例4之西方墨點方案	西方墨點方案修改
蛋白量化	RC DC蛋白分析套組	BCA方法
封阻步驟	在4°C下過夜	在室溫下1小時
一級抗體培育	在室溫下1小時	在4°C下過夜
一級抗體濃度	1:20	1:500

肌肉萎縮蛋白恢復(以野生型%表示)呈現於下表及圖12-15中。

	藉由西方墨點將肌肉萎縮蛋白量化為野生型蛋白之百分比(WT%)						
	化合物	PMO4225			PPMO4225		
	劑量(mg/kg)	40	80	120	40	80	120
組織							
橫膈膜		0.80	0.97	1.83	8.02	26.03	42.77
心臟		0.13	0.24	0.34	0.61	6.34	19.48
四頭肌		3.5	2.6	3.0	43	90	144

令人驚訝的是，數據顯示單次劑量之PPMO4225以劑量依賴性方式使mdx小鼠中之肌肉萎縮蛋白含量增加至顯著且實質上大於PMO4225之程度。

實例7：MDX小鼠橫膈膜及心臟之IHC研究

將劑量為80 mg/kg之PPMO4225或鹽水單次注射至6-7週齡MDX小鼠之尾靜脈中，且向6-7週齡之野生型小鼠單次注射鹽水。在單次劑量注射後30天時殺死經治療之mdx小鼠、鹽水mdx小鼠及野生型小鼠(n=4隻/組)。免疫組織化學結果顯示於圖19中。在此處，結果顯示組織中肌肉萎縮蛋白之不均勻增加與經PPMO4225治療之mdx小鼠之DMD之發病率及死亡率相關。

實例8：活體外外顯子53跳躍(肌管)

評價在健康人類肌管中如下表中所述靶向人類肌肉萎縮蛋白(DMD)外顯子53之兩種化合物PMO#1及PPMO#1 (二者含有相同序列)之DMD外顯子53跳躍。

用於人類DMD外顯子53之PMO#1及PPMO#1之序列.

名稱	化合物序列	靶向序列ID NO.	5'	3'
PMO#1	GTT GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT C	H53(+36+60)	EG3	H
PPMO#1	GTT GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT C	H53(+36+60 R6G)	EG3	GR6Ac

具體而言，在SKM-M培養基中將健康人類肌母細胞(5-6代，SKB-F-SL，購自Zen-Bio, Inc.)培養至達到80%-90%鋪滿，然後藉由在低血清培養基(SKM-D, Zen-Bio, Inc.)中培育起始分化。在分化後5天，將成熟肌管與不同濃度(即40 μm、20 μm、10 μm、5 μm、2.5 μm及1.25 μm)之上述化合物一起培育。培育96小時後，用PBS洗滌肌管且藉由RNeasy Micro套組(目錄號74004, Qiagen)之RLT溶解緩衝液溶解。根據製造商之建議分離總RNA，只是使用20μL無RNase水來溶析RNA。

為測定藉由兩種化合物之外顯子53跳躍，實施兩步終點RT-PCR。具體而言，首先藉由SuperScript IV第一鏈合成套組(目錄號18091200, Invitrogen)使用無規六聚體根據製造商之說明書將7微升總RNA反轉錄成cDNA。藉由將5μL cDNA添加至Platinum Taq DNA聚合酶PCR Supermix高保真度(目錄號12532024, Invitrogen)中使用靶向人類DMD外顯子51/52接合處及54之引子(正向引子：CAT CAA GCA GAA GGC AAC AA；反向引子：GAA GTT TCA GGG CCA AGT CA)實施PCR。使用BioRad CFX96即時溫度循環器使用表2中所顯示之程式實施PCR擴增。使用DNA高靈敏度試劑套組(CLS760672, Perkin Elmer)藉由將32μL PCR產物加載至LabChip GX系統中來評價跳躍或非跳躍PCR產物之表現。DMD外顯子53跳躍之百分比計算為外顯子53跳躍條帶(201 bp)之莫耳濃

度(nmol/l)與跳躍(201 bp)及未跳躍(413 bp)條帶之總莫耳濃度相比之百分比。

使用雙尾未配對司徒頓t-測試(同方差)來評價在每一劑量下2組之平均值是否在統計學上彼此不同。P值< 0.05視為在統計學上顯著。

用於擴增具或不具外顯子53跳躍之DMD擴增子之溫度循環器程式.

步驟	溫度	時間
8. 變性	94°C	2 min
9. 變性	94°C	30 sec
10. 黏合	61.2°C	30 sec
11. 延伸	68°C	1 min
12. 重複步驟2-4	34個循環	
13. 最後延伸	68°C	5 min
14. 儲存	4°C	∞

結果呈現於下表及圖20中。在圖20中，誤差槓呈現平均值± SD，「[數字] x」表示相對倍數變化，以藉由在每一濃度下PPMO#1與PMO#1相比之外顯子跳躍之百分比表示，且「*」、「**」分別指示PMO#1與PPMO#1之間之顯著差異，其中p值< 0.05或0.005。

人類肌管中藉由PMO#1及PPMO#1之DMD外顯子53跳躍之百分比.

化合物/ 劑量(µm)	外顯子跳躍% (平均值± SD)					
	1.25	2.5	5	10	20	40
PMO#1	1.45±0.39	2.63±0.50	3.33±0.47	4.78±0.88	8.40±0.53	12.98±1.21
PPMO#1	3.10±1.67	2.45±0.52	4.73±1.01	7.08±0.48	9.45±1.03	12.08±1.30

上表及圖20中之數據令人驚訝地顯示，當用PPMO#1處理細胞時與PMO#1相比至少在5 µm及10 µm濃度下，在肌管中產生顯著較高之外顯子53跳躍，其程度出人意料。此顯著改良可能在活體內比較測試中得到進一步證實，該活體內比較測試係例如實例5之非人類靈長類動物(NHP)研

究，其中用PPMO#1或PMO#1治療NHP且量測多個相關肌肉組織中之外顯子53跳躍(關於細節參見實例5)。此外，由於在此研究之時間標度上PPMO#1在此實例中所用之SKM-M培養基中分解(數據未顯示)，故NHP研究可展示比此實例中所展示甚至更大之改良。

本說明書中所引用之所有出版物及專利申請案皆以引用方式併入本文中，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。

Abes, R. 等人(2008). 「Arginine-rich cell penetrating peptides: design, structure-activity, and applications to alter pre-mRNA splicing by steric-block oligonucleotides」. **J Pept. Sci.** **14**: 455-460。

Alter, J. 等人(2006). 「Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology」. **Nat. Med.** **12**(2): 175-177。

Bestas, B. 等人(2014). 「Splice-correcting ligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model」. **J. Clin. Invest**。

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**。

Jearawiriyapaisarn, N. 等人(2010). 「Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-conjugated morpholino oligomers」. **Cardiovascular Research** **85**: 444-453。

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。

Leblue, B. 等人(2008). 「Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides」. **Adv. Drug Deliv. Rev.** **60**: 517-529。

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。

McClory, G. 等人(2006). 「Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restored dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD」. **Gene Therapy** **13**: 1373-1381。

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。

Moulton, H.M., (2007). 「Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication *in vivo*」. **Biochem. Society Trans** 35(4): 826-828。

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. 及 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。

Wu, B.等人(2012). 「Long-term rescue of dystrophin expression and improvement in muscle pathology and function in dystrophic mdx mice by peptide-conjugated morpholino」. **The Am. J. Pathol.** **181**(2): 392-400。

Wu, P.等人(2007) 「Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity」. **Nucleic Acids Research**

35(15): 5182-5191 。

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 。

Yin, H. 等 人 (2011). 「 Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin exon skipping in heart and phenotypic correction in mdx mice 」 . **Mol. Ther** **19**(7): 1295-1303 。

Youngblood, D.等人(2006). 「 Stability of cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells 」 . **Am. Chem. Soc** 。

序列表

說明	序列5’至3’或N末端至C末端	SEQ ID NO
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1
mdx4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2
R ₆	RRRRRR	3
R ₆ -G	RRRRRRG	4
人類外顯子51/52接合處及54結合正向引子	CATCAAGCAGAAGGCAACAA	5
人類外顯子51/52接合處及54結合正向引子	GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA	6
小鼠外顯子23結合正向引子	CACATCTTTGATGGTGTGAGG	7
小鼠外顯子23結合反向引子	CAACTTCAGCCATCCATTCTG	8

【序列表】

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

<120> 用於肌肉萎縮症之外顯子跳躍寡聚物結合物

<130> AVN-028TW

<140> TW 106144429

<141> 2017-12-18

<150> US 62/436,223

<151> 2016-12-19

<150> US 62/443,484

<151> 2017-01-06

<150> US 62/479,178

<151> 2017-03-30

<150> US 62/562,146

<151> 2017-09-22

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成：H53A(+36+60)

<400> 1

gttgccctccg gttctgaagg tgttc 25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成：mdx4225

<400> 2

ggccaaacct cggttacct gaaat 25

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：R6

<400> 3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：R6-G

<400> 4

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly
1 5

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：人類外顯子51/52接合處及54結合正向引子

<400> 5
catcaagcag aaggcaacaa 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：人類外顯子51/52接合處及54結合正向引子

<400> 6
gaagtttcag ggccaagtca

20

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：小鼠外顯子23結合正向引子

<400> 7
cacatctttg atggtgtgag g

21

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：小鼠外顯子23結合反向引子

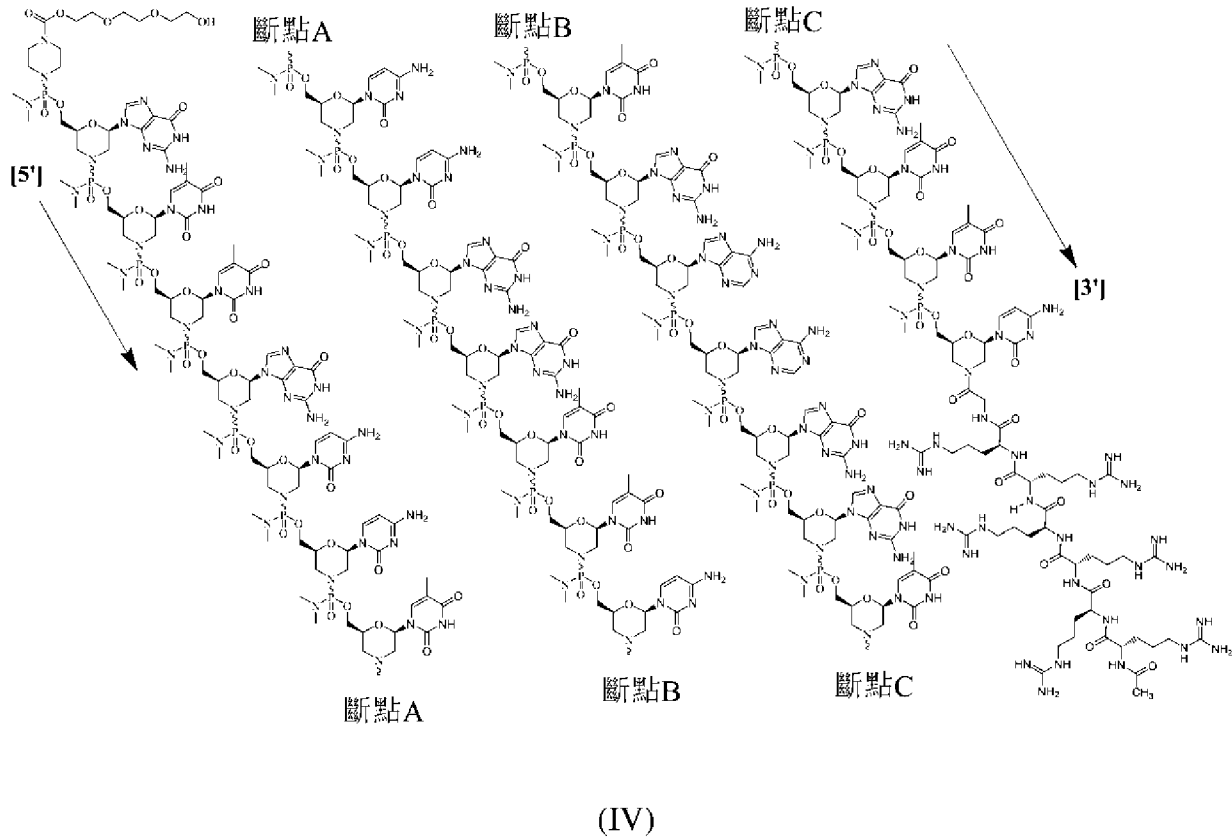
<400> 8
caacttcagc catccatttc tg

22

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種式(IV)之反義寡聚物結合物或其醫藥上可接受之鹽，

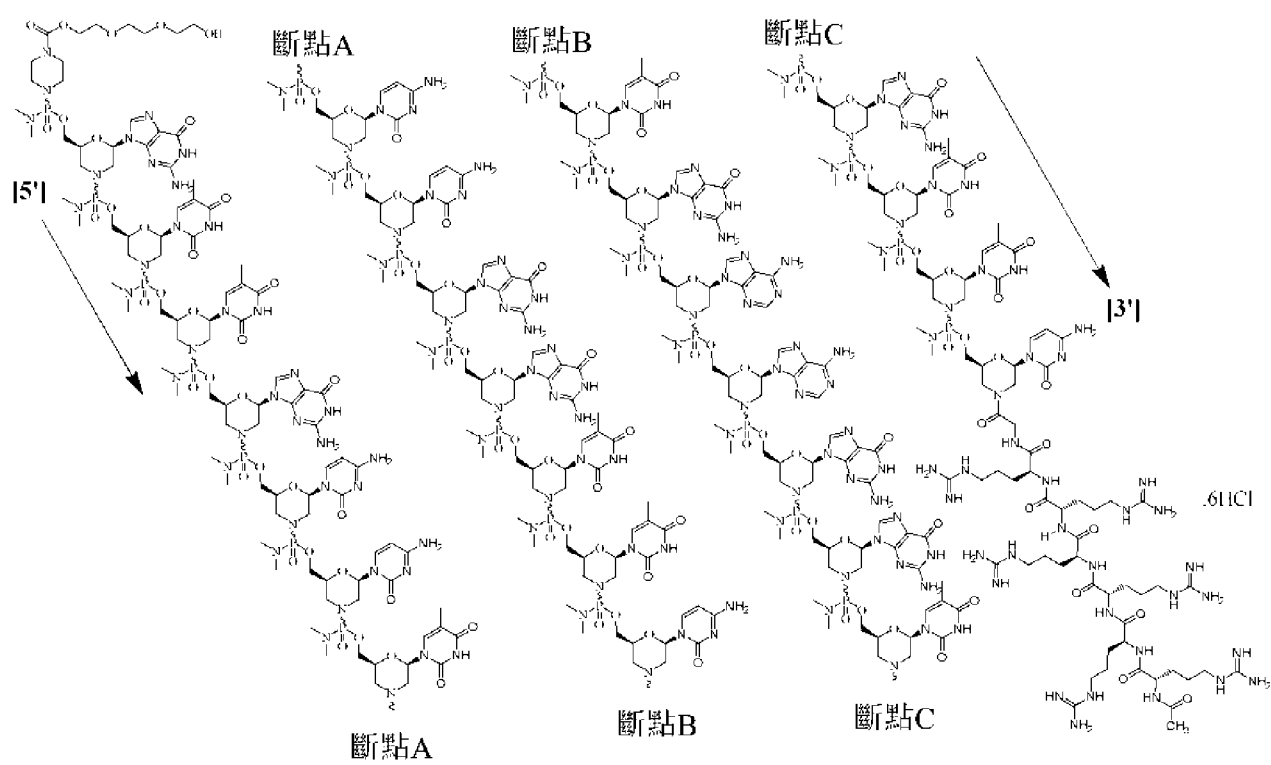


【第2項】

如請求項1之反義寡聚物結合物或其醫藥上可接受之鹽，其為醫藥上可接受之鹽的形式。

【第3項】

如請求項1之反義寡聚物結合物或其醫藥上可接受之鹽，其中該反義寡聚物具有式(IVA)：



(IVA)。

【第4項】

如請求項1之反義寡聚物結合物或其醫藥上可接受之鹽，其進一步包含醫藥上可接受之載劑。

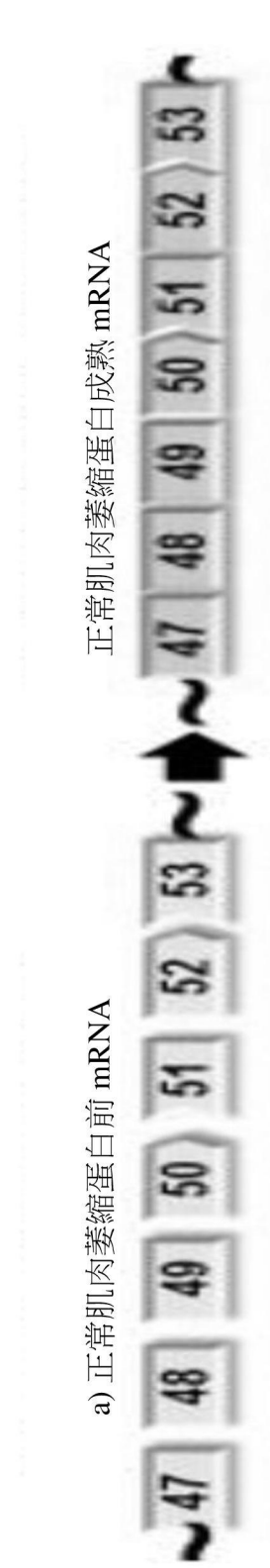
【第5項】

如請求項2之反義寡聚物結合物或其醫藥上可接受之鹽，其進一步包含醫藥上可接受之載劑。

【第6項】

如請求項3之反義寡聚物結合物或其醫藥上可接受之鹽，其為式(IVA)之醫藥上可接受之鹽的形式，且進一步包含醫藥上可接受之載劑。

【發明圖式】



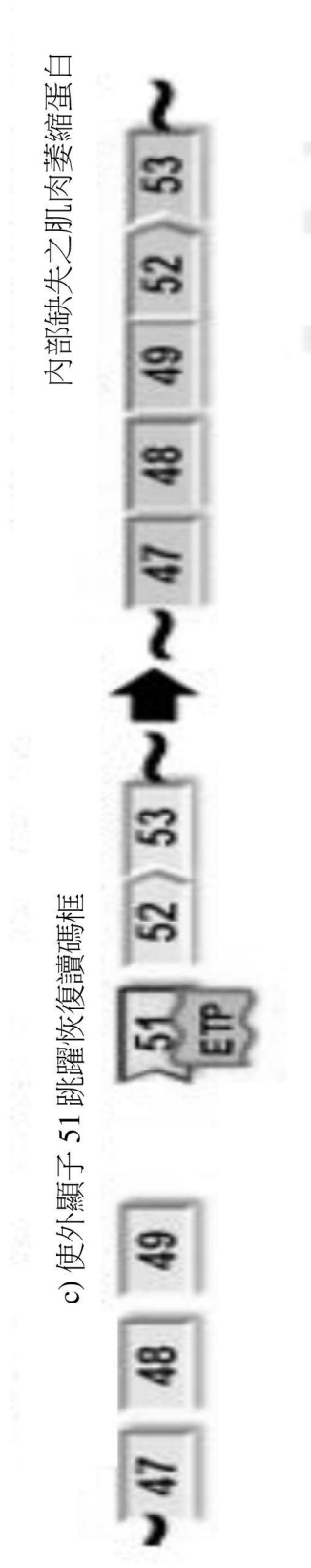
【圖 1】

非功能性不穩定肌肉萎縮蛋白

b) 外顯子 50 缺失破壞讀碼框

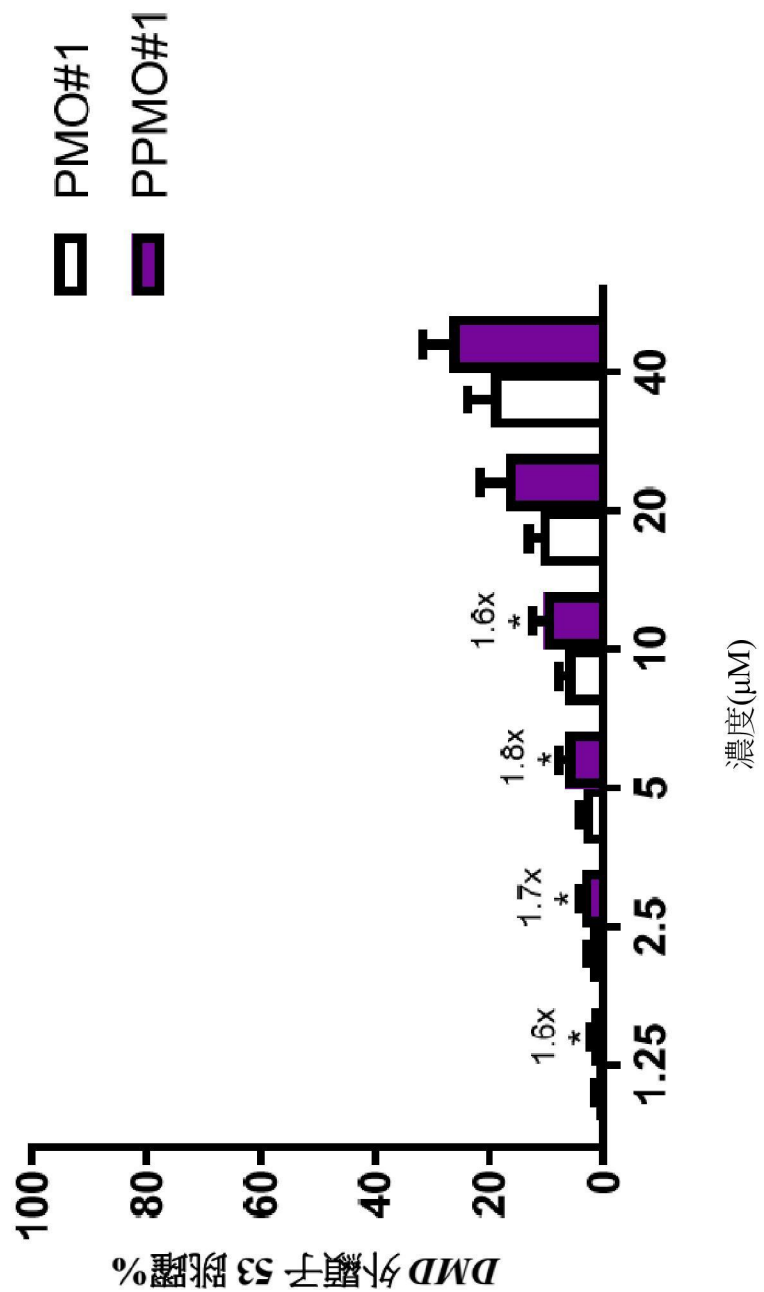


【圖 2】

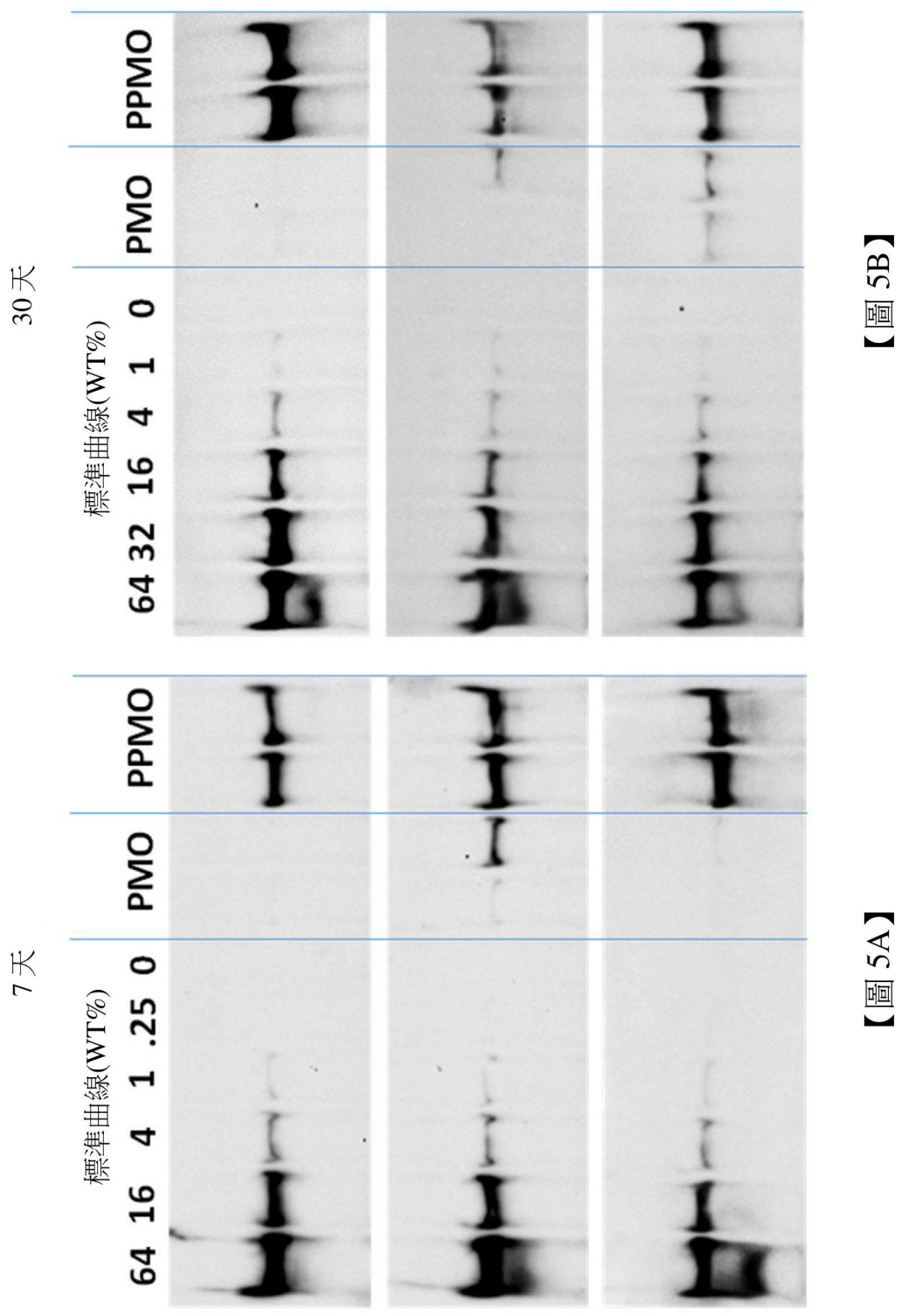


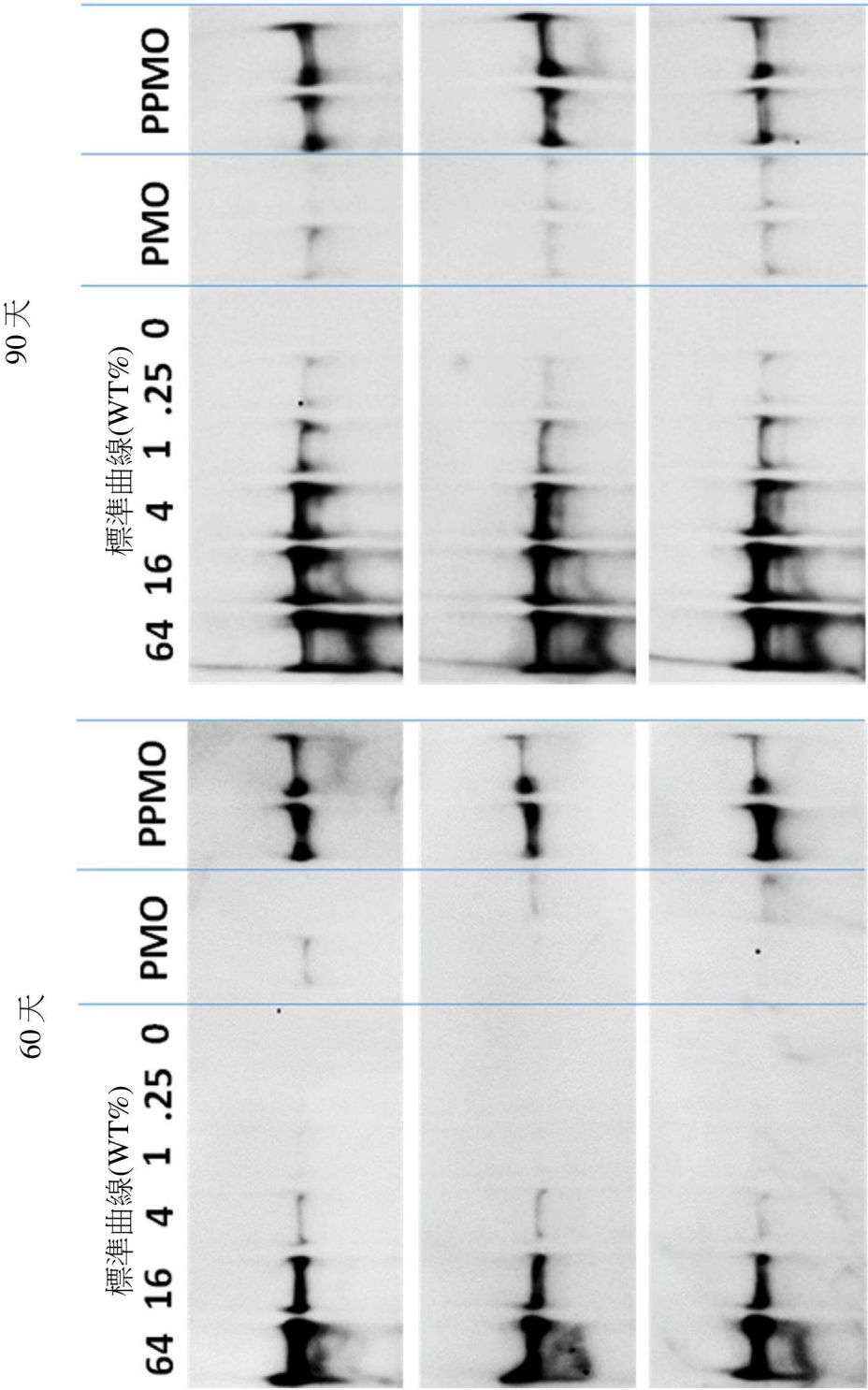
來源：根據 Kole 2012 改編.

【圖 3】



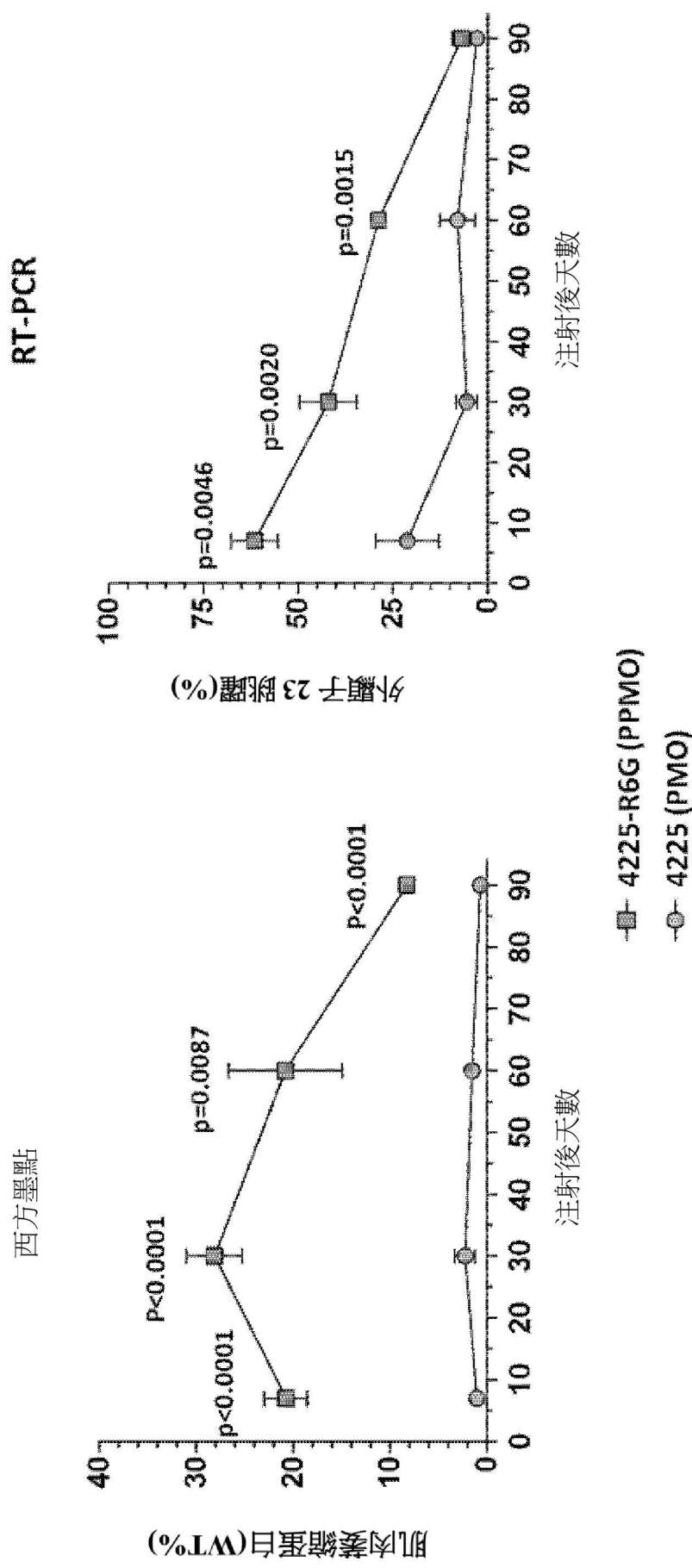
【圖 4】





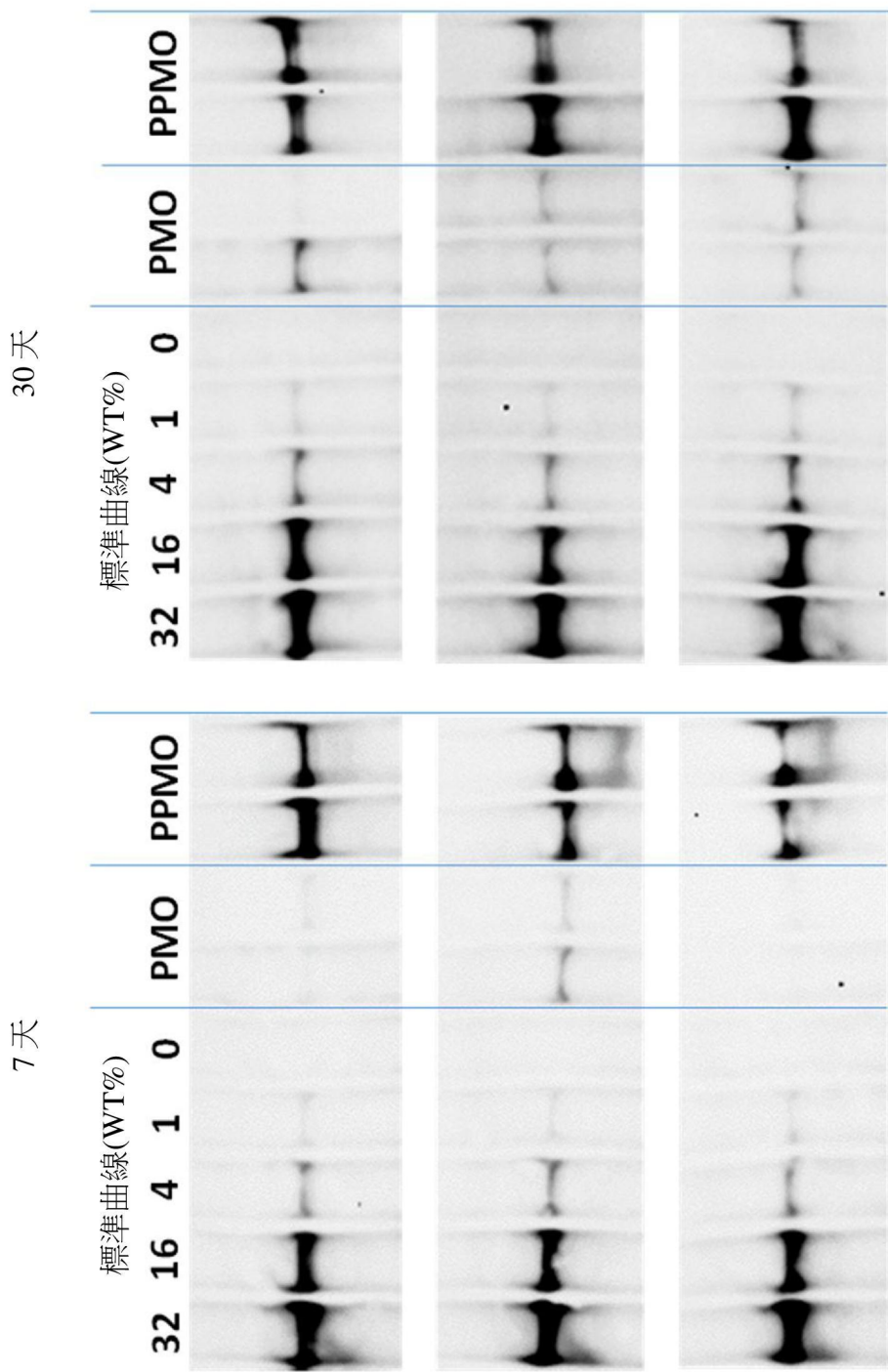
【圖 5D】

【圖 5C】



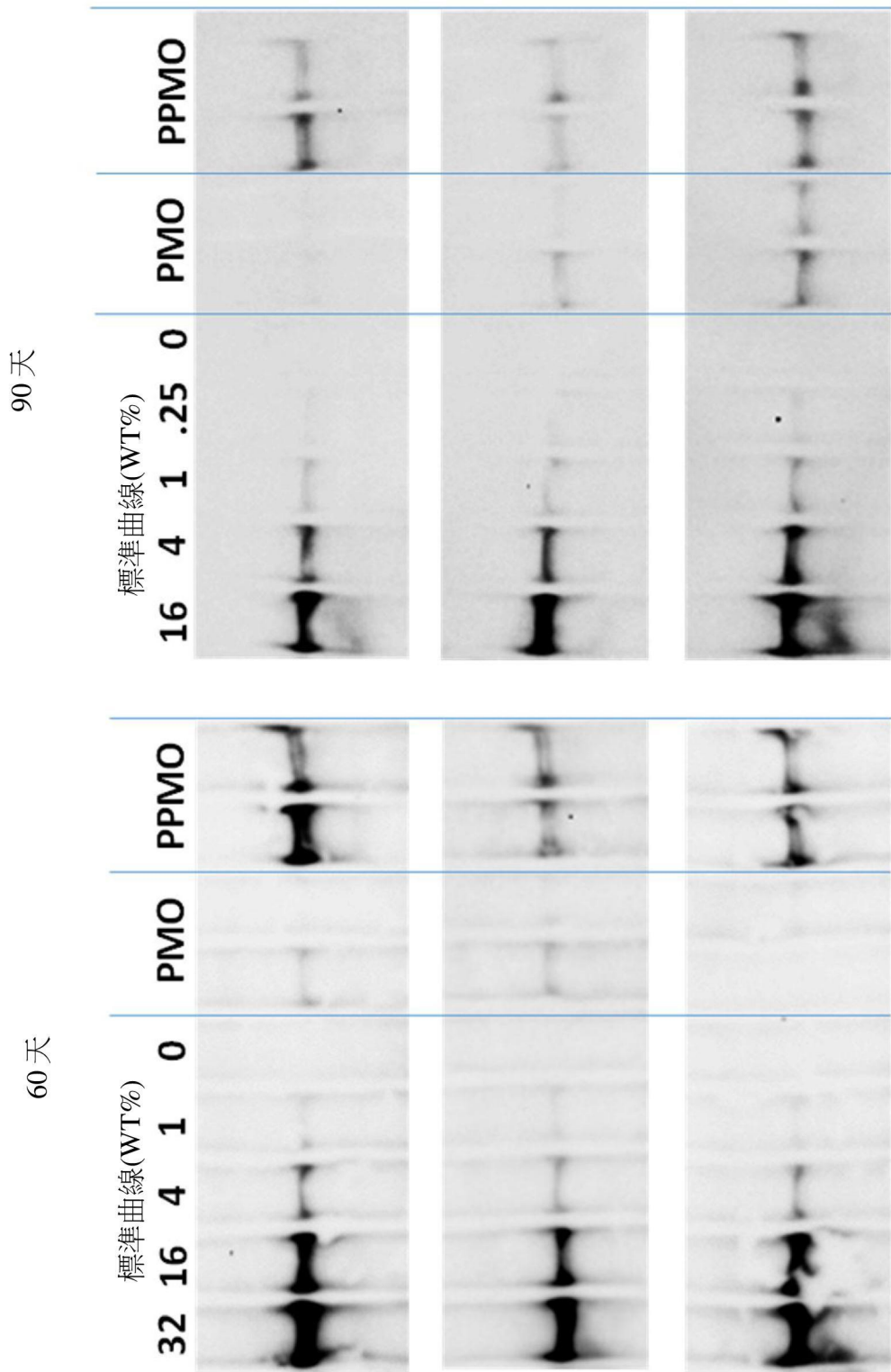
【圖 6A】

【圖 6B】



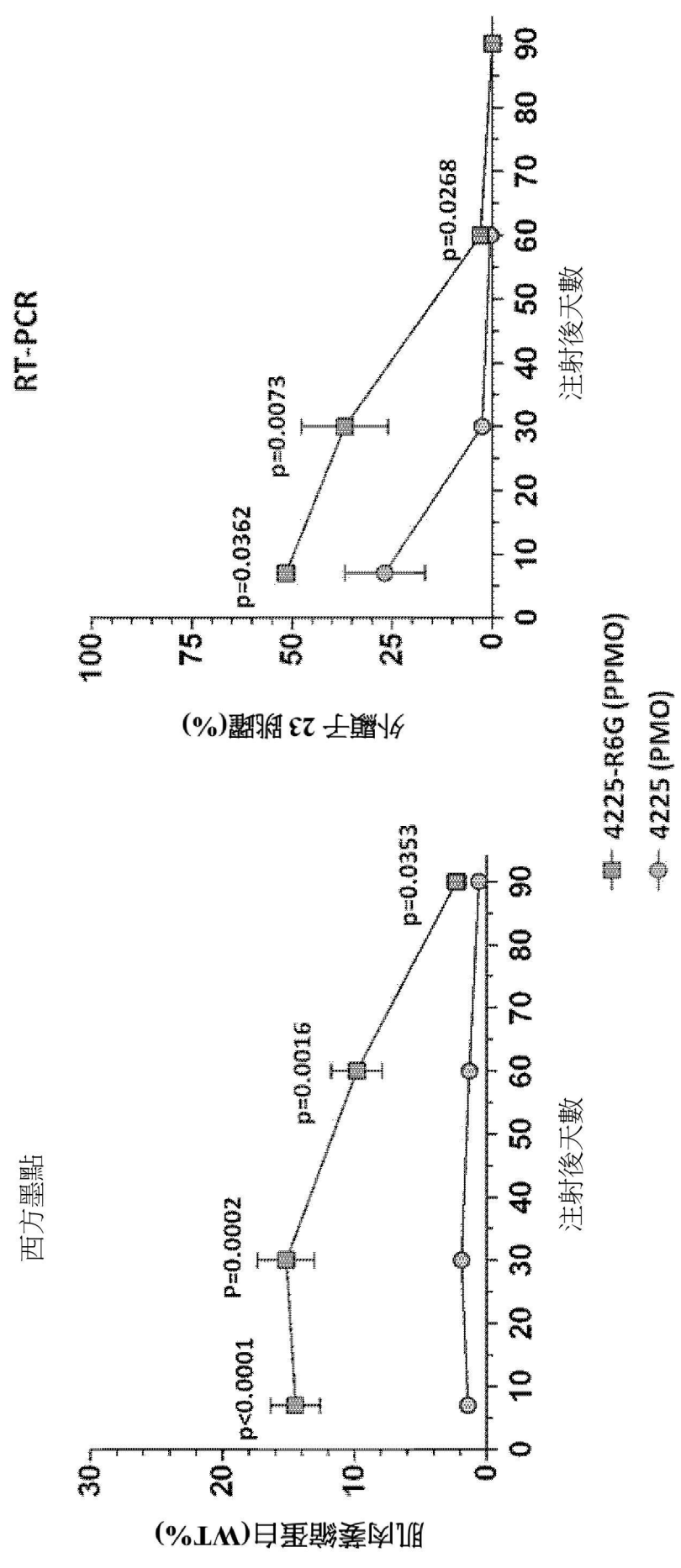
【圖 7A】

【圖 7B】



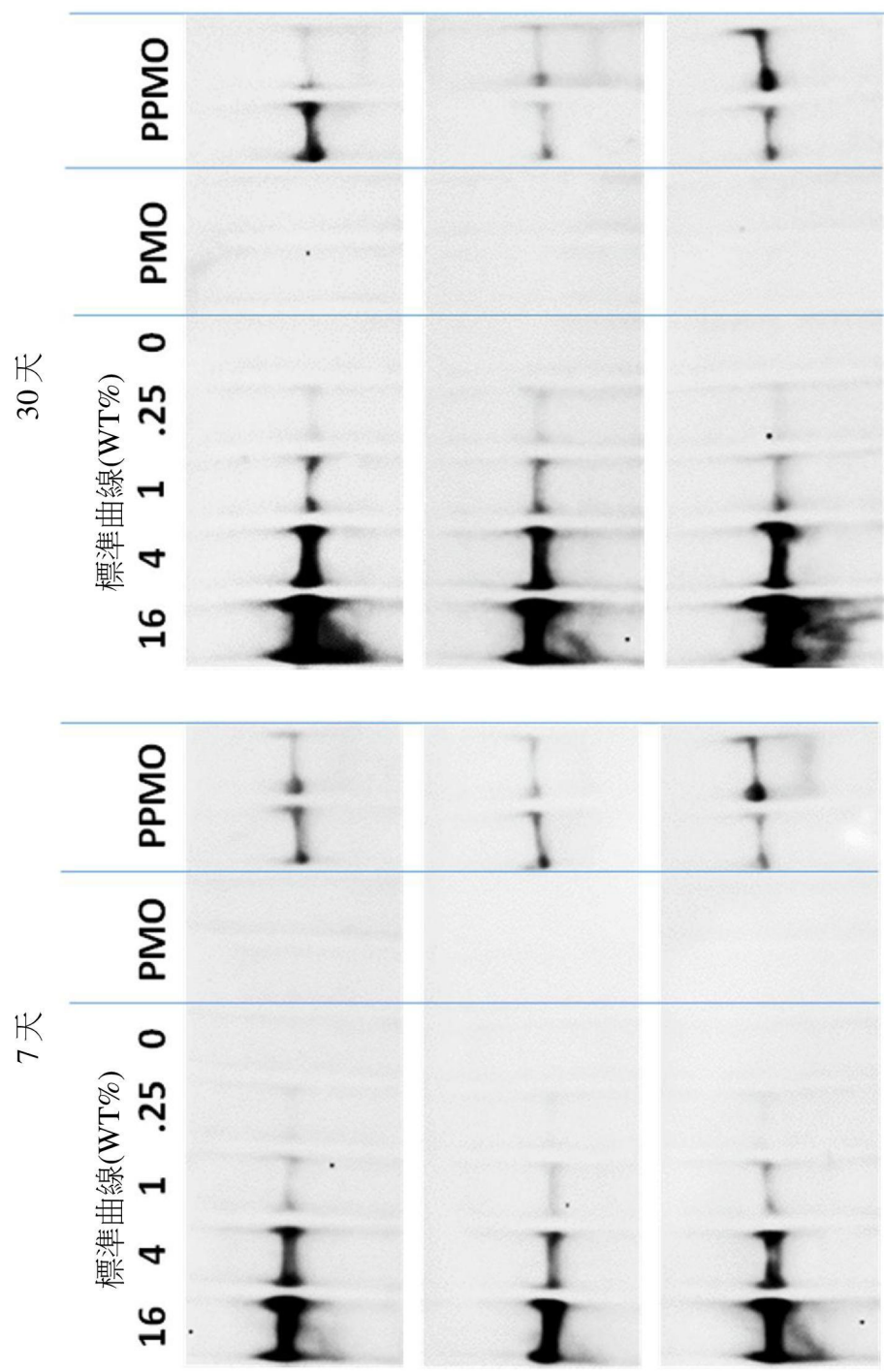
【圖 7D】

【圖 7C】



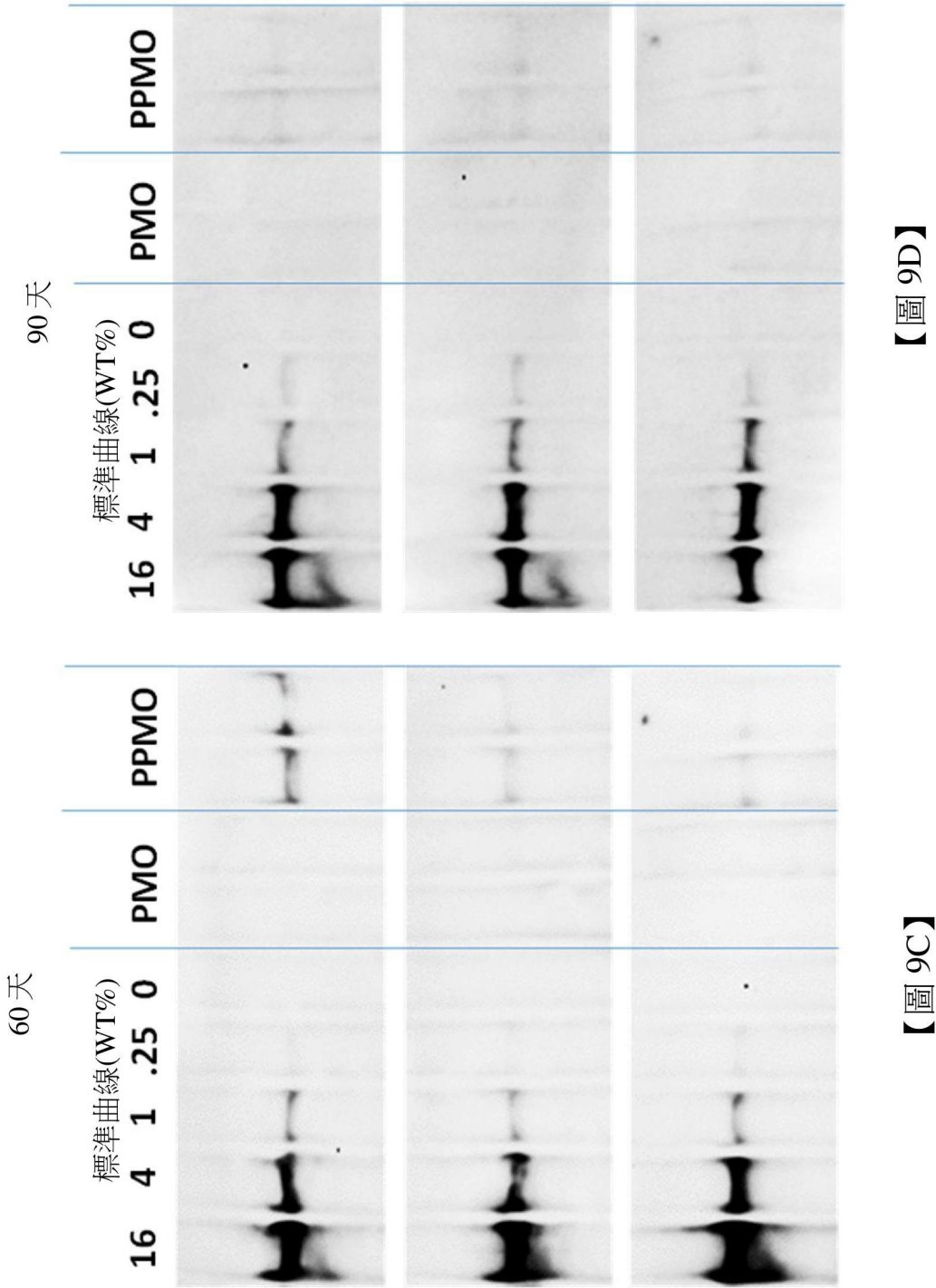
【圖 8B】

【圖 8A】

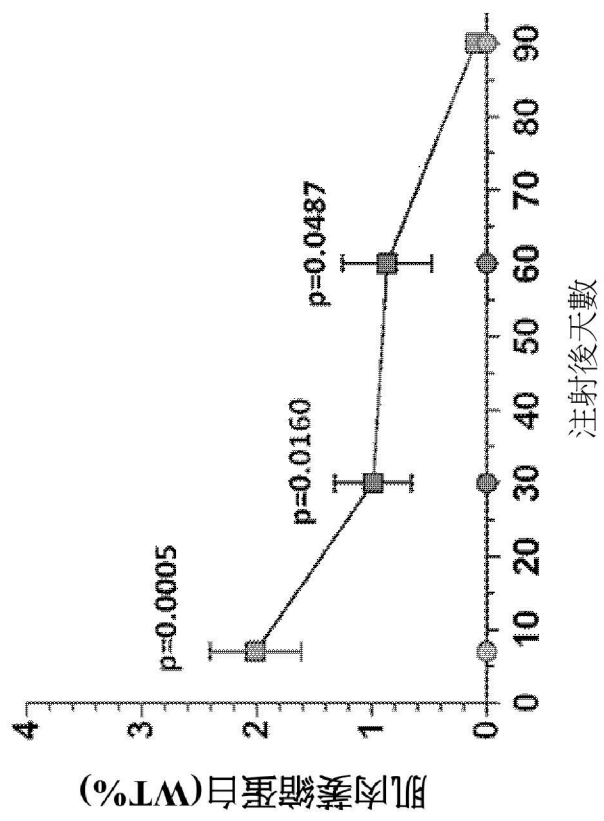


【圖 9B】

【圖 9A】

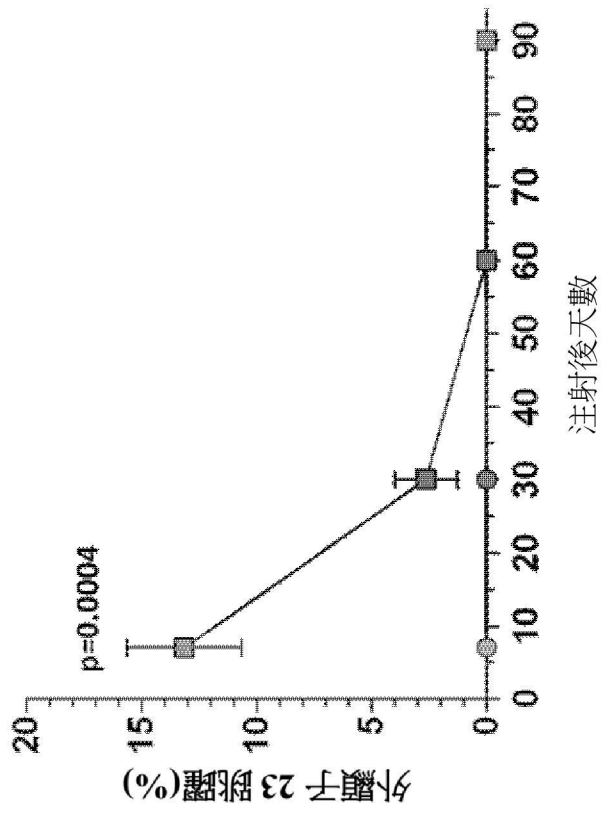


西方墨點

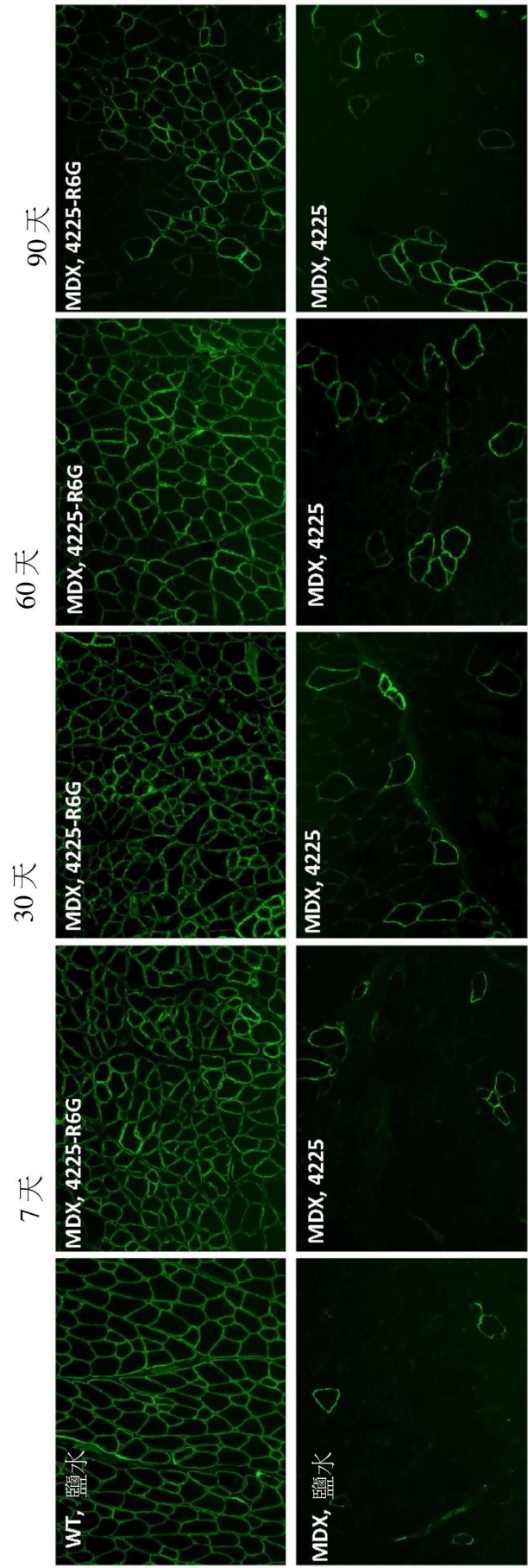


【圖 10A】

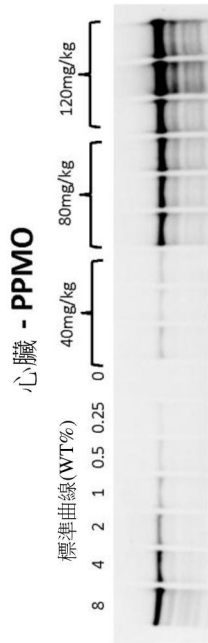
RT-PCR



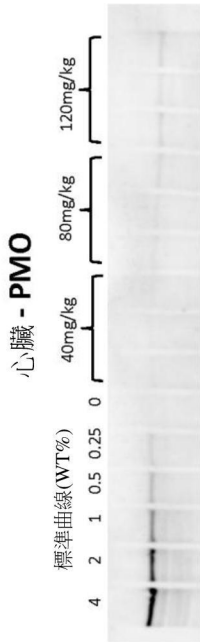
【圖 10B】



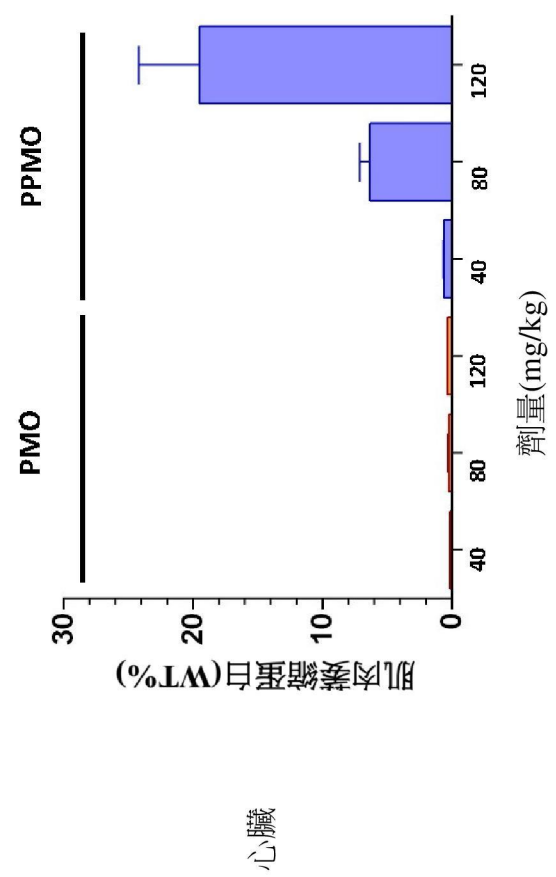
【圖 11】



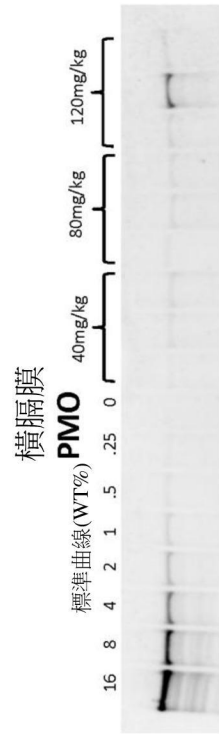
【圖 12B】



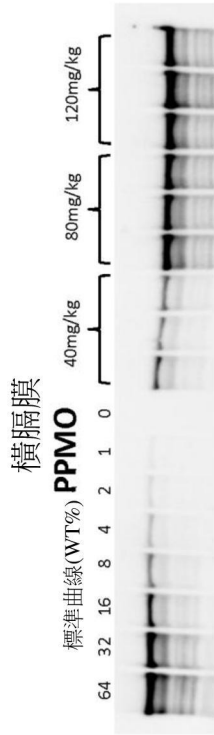
【圖 12A】



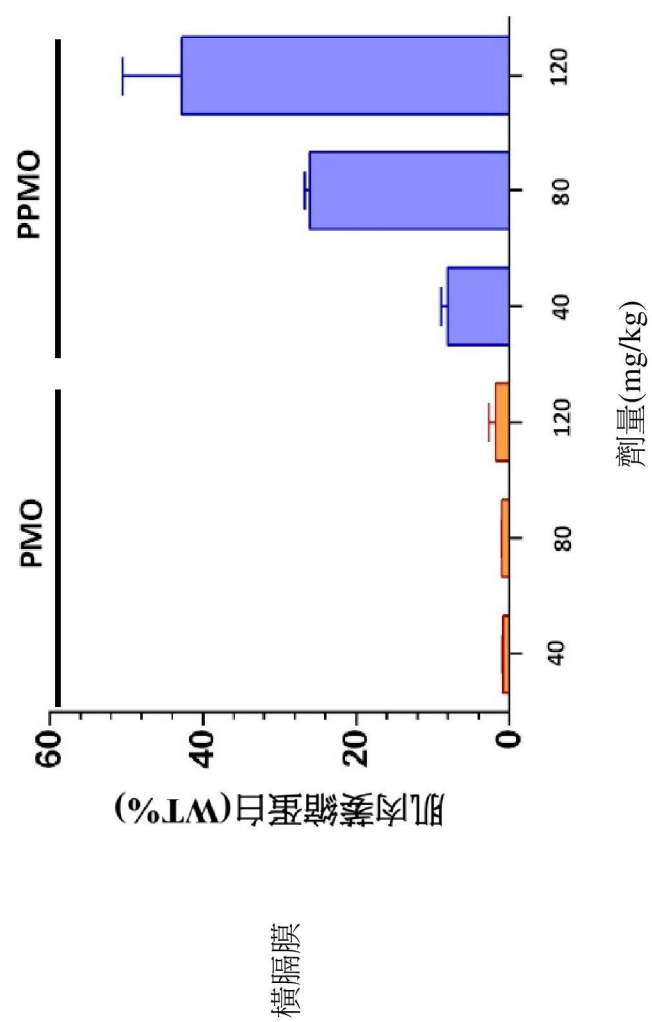
【圖 13】



【圖 14A】

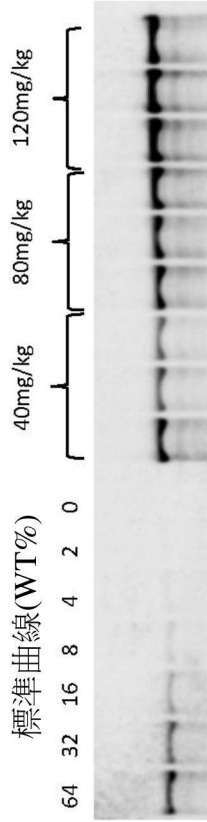


【圖 14B】



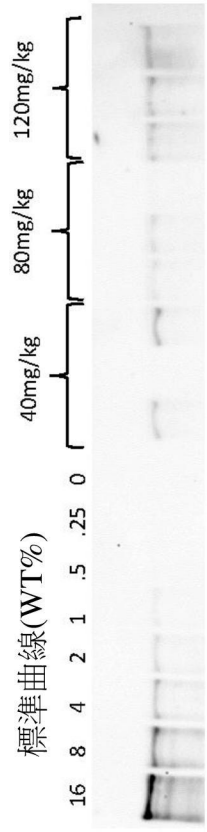
【圖 15】

四頭肌 - PPMO

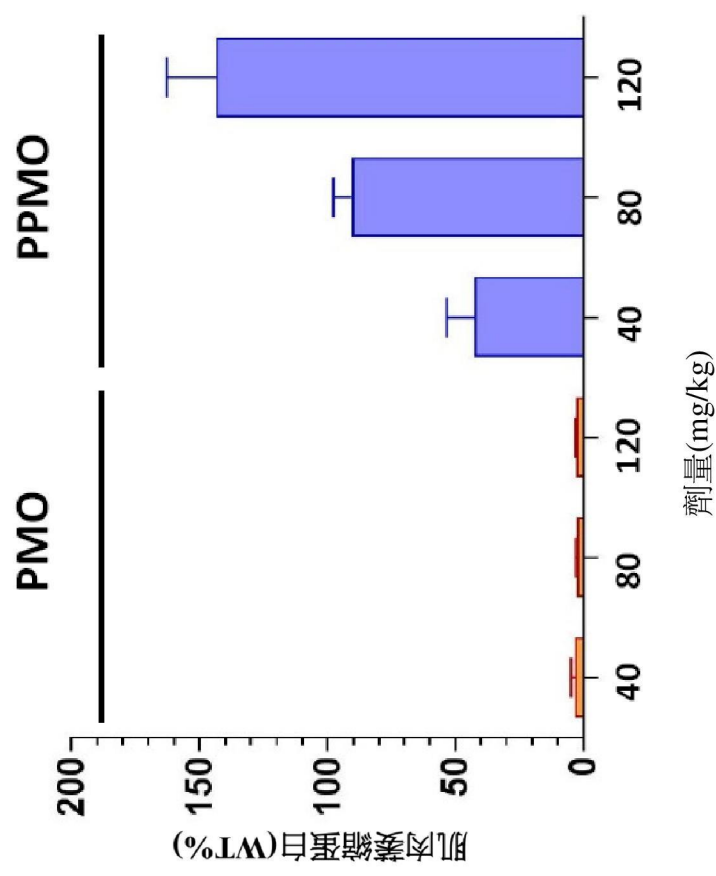


【圖 16A】

四頭肌 - PMO



【圖 16B】



【圖 17】

四頭肌

循環編號:亞單位 (SU)	偶合前處理				偶合循環		偶合後處理	
	1	2	3	4			1	2
	30% TFE/DCM 洗滌液	CYTFA 溶液 ¹	中和溶液	DCM 洗滌液	量 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 偶合時間 (Hrs.)	DCM 洗滌液	30% TFE/DCM 洗滌液
1:DPG	5.5L	a) 5.5L b) 5.5L, 122ml	3x5.5L	5.5L	536.7g; 195 ml NEM; 3.2L DMI	5	5.5L	2x5.5L
2:T	7.0L	a) 7L b) 7L, 158ml	3x7L	2x7L	468.2g 及 195ml NEM 3.2L DMI	4.25	7L	2x7L
3:T	8L	a) 8L b) 8L, 182ml	3x8L	2x8L	536.7g; 195ml NEM; 3.4L DMI	4.25	8L	2x8L
4:DPG	9L	a) 9L b) 9L, 206ml	3x9L	2x9L	536.7g; 195ml NEM; 3.6L DMI	4.25	9L	2x9L
5:C	9.5L	a) 9.5L b) 9.5L, 220ml	3x9.5L	2x9.5L	555.2g; 195ml NEM; 3.4L DMI	4.25	9.5L	2x9.5L
6:C	10L	a) 10L b) 10L, 232ml	3x10L	2x10L	555.2g; 195ml NEM; 3.45L DMI	4.25	10L	2x10L
7:T	11L	a) 11L b) 11L, 256ml	3x11L	2x11L	536.7g; 195ml NEM;	4.25	11L	2x11L

¹ ml 指示 1:1 NEM/DCM 之量

【圖 18】

循環編號: 亞單位 (SU)	偶合前處理				偶合循環		偶合後處理	
	1	2	3	4			1	2
	30% TFE/DCM 洗滌液	CYTFA 溶液 ¹	中和溶液	DCM 洗滌液	量 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 偶合 時間 (Hrs.)	DCM 洗滌液	30% TFE/DCM 洗滌液
					3.57L DMI			
8:C	11L	a) 11L b) 11L, 256ml	3x11L	2x11L	555.2g; 195ml NEM; 3.64L DMI	4.25	11L	2x11L
9:C	11.5L	a) 11.5L b) 11.5L 268ml	3x11.5L	2x 11.5L	468.2g; 195ml NEM; 3.72L DMI	4.25	11.5L	2x11.5L
10:DPG	12L	a) 12L b) 12L, 280ml	3x12L	2x12L	536.7g; 195ml NEM; 3.96L DMI	4.25	12L	2x12L
11:DPG	13.5L	a) 13.5L b) 13.5L, 204ml	3x13.5L	2x 13.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	13.5L	2x13.5L
12:T	13.5L	a) 13.5L b) 13.5L, 204ml	3x13.5L	2x 13.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	13.5L	2x13.5L
13:T	14L	a) 14L b) 14L, 216ml	3x14L	2x14L	941.9g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	14L	2x14L
14:C	14.5L	a) 14.5L b) 14.5L, 228ml	3x14.5L	2x 14.5L	941.9g; 253ml NEM; 4.1L DMI	4.25	14.5L	2x14.5L

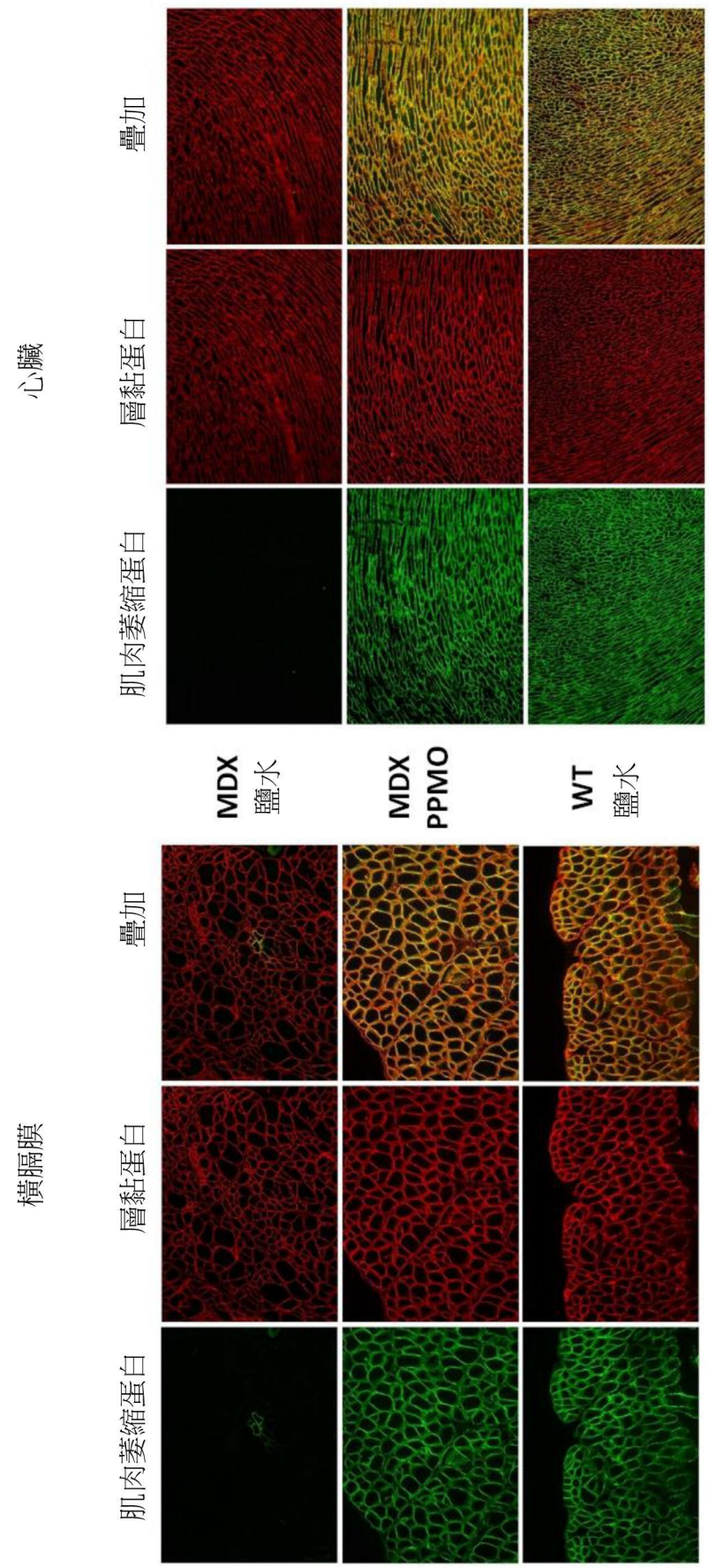
【圖 18】(續)

循環編號:亞單位 (SU)	偶合前處理				偶合循環		偶合後處理	
	1	2	3	4			1	2
	30% TFE/DCM 洗滌液	CYTFA 溶液 ¹	中和溶液	DCM 洗滌液	量 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 偶合時間 (Hrs.)	DCM 洗滌液	30% TFE/DCM 洗滌液
15:T	15.5L	a) 15.5L b) 15.5L, 254ml	3x15.5L	2x 15.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.26L DMI	4.25	15.5L	2x15.5L
16:DPG	15.5L	a) 15.5L b) 15.5L, 254ml	3x15.5L	2x 15.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.26L DMI	4.25	15.5L	2x15.5L
17:A	16L	a) 16L b) 16L, 366ml	3x16L	2x16L	941.9g; 253ml NEM; 4.4L DMI	4.75	16L	2x16L
18:A	16.5L	a) 16.5L b) 16.5L, 378ml	3x16.5L	2x 16.5L	721.7g; 253ml NEM; 4.4L DMI	4.25	16.5L	2x16.5L
19: DPG	16.5L	a) 16.5L b) 16.5L, 378ml	3x16.5L	2x 16.5L	608.7g; 253ml NEM; 4.57L DMI	4.25	16.5L	2x16.5L
20:DPG	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	941.9g; 253ml NEM; 4.57L DMI	4.75	17L	2x17L
21:T	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	1159.2g; 311ml NEM; 4.72L DMI	4.25	17L	2x17L
22: DPG	17.5L	a) 17.5L b) 17.5L, 402ml	3x17.5L	2x 17.5L	858.7g; 311ml NEM;	4.75	17.5L	2x17.5L

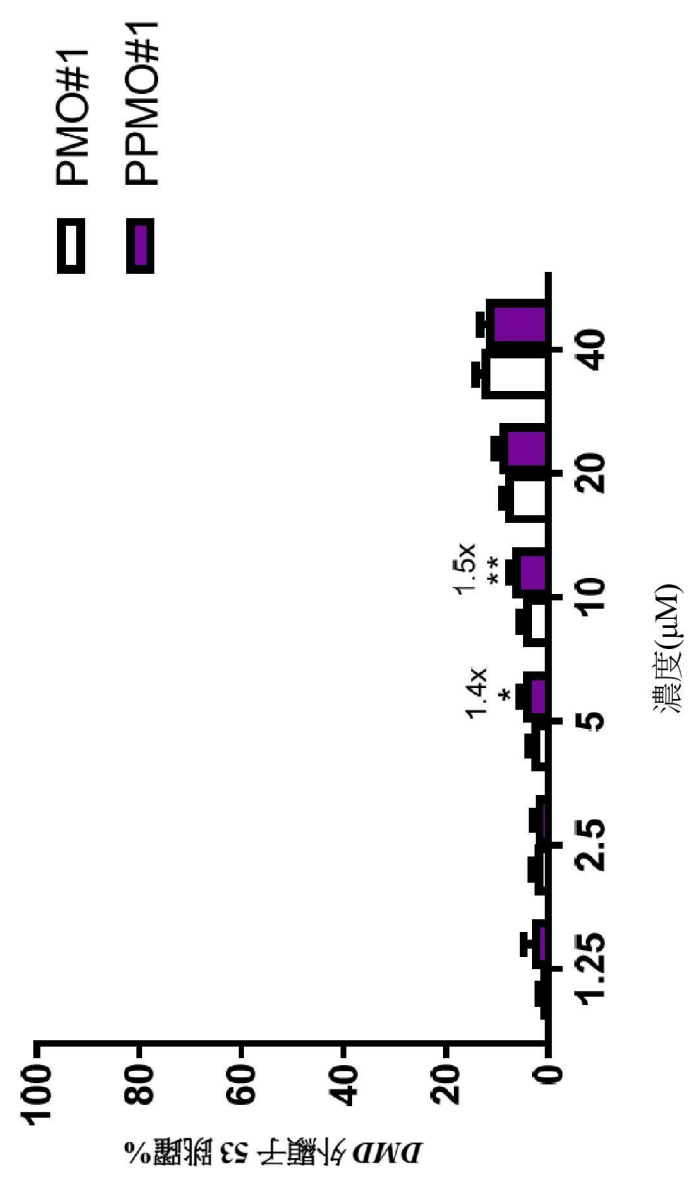
【圖 18】(續)

循環編號:亞單位 (SU)	偶合前處理				偶合循環		偶合後處理	
	1	2	3	4			1	2
	30% TFE/DCM 洗滌液	CYTFA 溶液 ¹	中和溶液	DCM 洗滌液	量 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 偶合時間 (Hrs.)	DCM 洗滌液	30% TFE/DCM 洗滌液
					4.72L DMI			
23:T	17.5L	a) 17.5L b) 17.5L, 402ml	3x17.5L	2x 17.5L	888.3g; 311ml NEM; 4.88L DMI	4.25	17.5L	2x17.5L
24:T	18L	a) 18L b) 18L, 414ml	3x18L	2x18L	749.1g; 311ml NEM; 4.95L DMI	4.25	18L	2x18L
25:C	18L	a) 18L b) 18L, 414ml	3x18L	2x18L	749.1g; 311ml NEM; 5.1L DMI	4.25	18L	2x18L

【圖 18】(續)



【圖 19】



【圖 20】