

(21) 申請案號：098117016

(22) 申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 22 日

(51) Int. Cl. : *A61K47/48 (2006.01)*

A61K31/7125 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2008/05/23 美國 61/055,950

2008/05/23 美國 61/055,869

2008/10/19 美國 61/106,578

2008/10/19 美國 61/106,576

(71) 申請人：安龍製藥公司 (美國) ENZON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

美國

(72) 發明人：趙洪 ZHAO, HONG (US) ; 瑞迪 普沙納 REDDY, PRASANNA (US)

(74) 代理人：桂齊恆；閻啟泰

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：13 共 112 頁

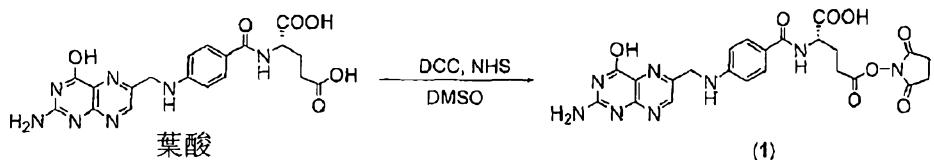
(54) 名稱

用於寡核苷酸傳遞的包含細胞內可釋放的雙硫連結子之聚合系統

POLYMERIC SYSTEMS CONTAINING INTRACELLULAR RELEASABLE DISULFIDE LINKER
FOR THE DELIVERY OF OLIGONUCLEOTIDES

(57) 摘要

本發明提供用於寡核苷酸傳遞的包括細胞內可釋放的雙硫連結子之聚合前藥。亦提供製備該等化合物之方法以及使用該等化合物將核酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之方法。



(21) 申請案號：098117016

(22) 申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 22 日

(51) Int. Cl. : *A61K47/48 (2006.01)*

A61K31/7125 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2008/05/23 美國 61/055,950

2008/05/23 美國 61/055,869

2008/10/19 美國 61/106,578

2008/10/19 美國 61/106,576

(71) 申請人：安龍製藥公司 (美國) ENZON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

美國

(72) 發明人：趙洪 ZHAO, HONG (US) ; 瑞迪 普沙納 REDDY, PRASANNA (US)

(74) 代理人：桂齊恆；閻啟泰

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：13 共 112 頁

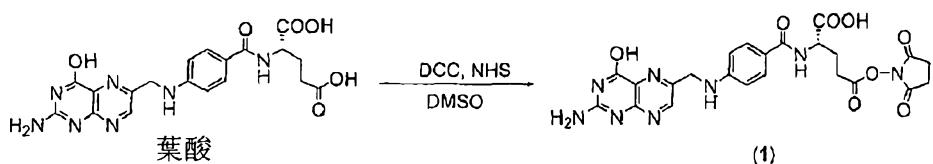
(54) 名稱

用於寡核苷酸傳遞的包含細胞內可釋放的雙硫連結子之聚合系統

POLYMERIC SYSTEMS CONTAINING INTRACELLULAR RELEASABLE DISULFIDE LINKER
FOR THE DELIVERY OF OLIGONUCLEOTIDES

(57) 摘要

本發明提供用於寡核苷酸傳遞的包括細胞內可釋放的雙硫連結子之聚合前藥。亦提供製備該等化合物之方法以及使用該等化合物將核酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之方法。



六、發明說明：

交互參照相關申請案

本申請案主張 2008 年 5 月 23 日申請之美國臨時專利申請案第 61/055,950 號、2008 年 5 月 23 日申請之美國臨時專利申請案第 61/055,869 號、2008 年 10 月 19 日申請之美國臨時專利申請案第 61/106,578 號及 2008 年 10 月 19 日申請之美國臨時專利申請案第 61/106,579 號之優先權的利益，該等參照案中之每一者之內容係以引用的方式併入本文中。

發明背景

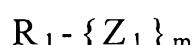
因為治療性基因可選擇性地調節與疾病相關之基因表現且將使用其他治療方法可能招致之副作用降至最低程度，所以基於基因之療法為治療疾病之有效工具。

已提出基於新一代 RNA 拮抗劑鎖核酸 (LNA) 反義寡核苷酸的療法。每一 LNA 單體在核糖之 2'- 氧與 4'- 碳之間含有亞甲基橋。此將 LNA 殘基固定於有利之類 RNA 構形中且使得 LNA 寡核苷酸與其他業內已知之寡核苷酸相比能夠具有較高親和力、特異性及對降解之抗性。已展示 LNA 寡核苷酸在試管內抑制目標基因表現（以亞奈莫耳含量）。雖然 LNA 寡核苷酸與其他業內已知之核酸相比具有改良之治療活性，但是仍需要進一步改良 LNA 寡核苷酸之藥物動力學概況及自循環之快速清除及活體內有限活性。對提供用於傳遞 LNA 寡核苷酸以及其他業內已知之核酸分子之經改良之系統及方法繼續存在需要。本發明著手解決此需要。

發明摘要

為了克服上述問題且改良傳遞寡核苷酸之技術，本發明提供含有細胞內可釋放的連結子之新穎聚合傳遞系統。

在本發明之一態樣中，提供將寡核苷酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之方法。該等方法包括向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予式（I）化合物：

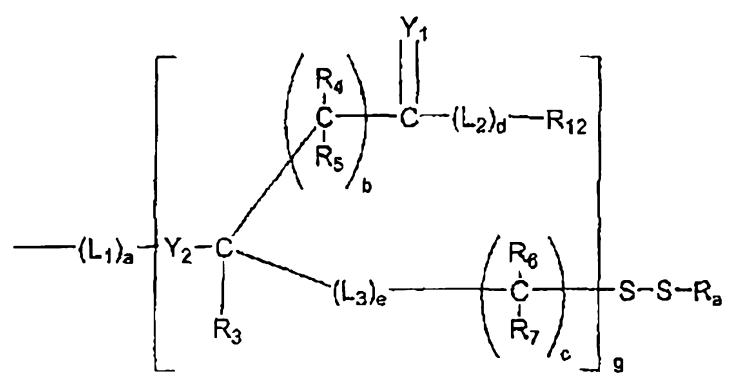


或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_1 相同或不同且係選自：



$-(L_4)_{a1}-R_b$ ；及

$-(L_4)_{a2}-R_c$ ，

Y_1 在每次出現時獨立地為 S 或 O ；

Y_2 在每次出現時獨立地為 NR_{13} ；

R_a 在每次出現時為相同或不同寡核苷酸；

L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

R_{13} 在每次出現時獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{3-8} 環烷基；

R_{12} 在每次出現時獨立地選自：氫、羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (e) 獨立地為 0 或 1；

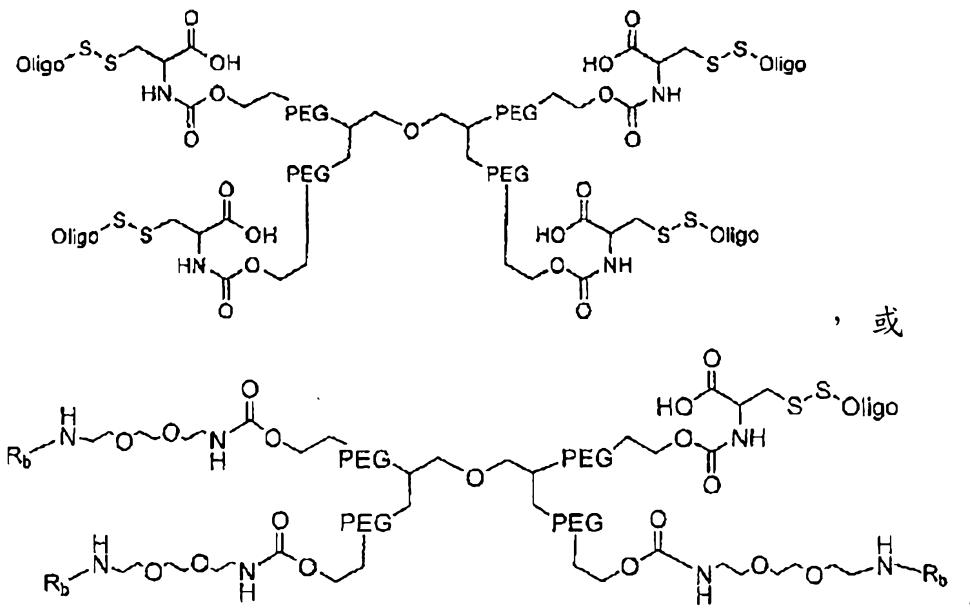
各 (g) 獨立地為 0 或 1；且

(m) 為約 2 至約 32 之正整數，

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0，且進一步限制條件為一或多個 Z_1 含有寡核苷酸。

在另一態樣中，本發明提供抑制具有前列腺或子宮頸癌細胞之哺乳動物之基因表現之方法。

在一具體實例中，本文中所描述之方法中所用之式 (I) 化合物為：

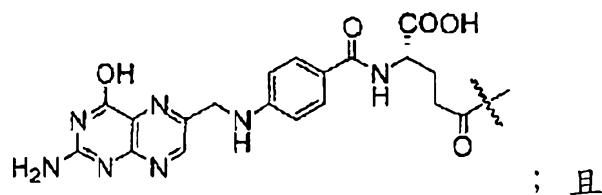


或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

PEG 為聚乙二醇且該化合物之聚合部分具有約 5,000 至約 25,000 道爾頓 (dalton) 或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平均分子量；

R_b 為



；且

Oligo 為約 8 至 30 個核苷酸之寡核苷酸。

在本發明之另一態樣中，提供抑制哺乳動物之基因表現以治療各種疾病（亦即前列腺或子宮頸癌）之方法。

本發明亦提供製備本文中描述之化合物之方法。

本文中描述之聚合傳輸系統之一優勢為可釋放的 PEG-連結子技術提供活體內投予包括 LNA 之治療性寡核苷酸之方法。此選擇性傳遞技術使得可增強 LNA 之治療功效且降低毒性。

另一優勢為本文中描述之可釋放的傳遞系統允許調節寡核苷酸之藥物動力學性質。經由 EPR 效應及靶向基團（諸如葉酸）可選擇性地靶向治療性寡核苷酸自聚合接合物釋放之部位。可使與本文中描述之聚合物連接之寡核苷酸（諸如 LNA）在目標區域（諸如癌細胞）釋放，由此使得熟習此項技術者可在目標區域達成治療性寡核苷酸之所需生物可用性。另外，可修飾寡核苷酸之釋放部位，亦即在細胞之不同隔室中釋放寡核苷酸。因此，本文中描述之聚合傳遞系統允許足夠量之治療性寡核苷酸（包括 LNA）在所需目標區域（例如細胞質、微胞飲小體及內體）處選擇性地得以利用。空間修飾可有利於治療疾病。本文中描述之方法提供傳遞寡核苷酸及改良寡核苷酸（例如 LNA 寡核苷酸、siRNA）活體內功效之方法。

本發明之另一優勢為本文中描述之接合物允許癌細胞中在不存在轉染劑的情況下發生細胞吸收及特定 mRNA 下調。此為優於先前技術之顯著優勢且由此顯著地簡化治療方案，亦即寡核苷酸藥物之活體內投藥。此技術可應用於治療性寡核苷酸之活體內投藥。

聚合化合物在緩衝條件下為穩定的且寡核苷酸或其他治療劑不過早地自身體排出。

其他優勢將由以下描述及圖式而顯而易見。

出於本發明之目的，術語“殘基”應理解為意謂其所指之化合物之部分，亦即PEG、寡核苷酸等，其在經歷與另一化合物之取代反應後仍留存。

出於本發明之目的，術語“聚合殘基”或“PEG殘基”各自應理解為意謂聚合物或PEG之部分，其在經歷與其他化合物、部分等之反應後仍留存。

出於本發明之目的，如本文中所用之術語“烷基”係指飽和脂族烴，包括直鏈、支鏈及環狀烷基。術語“烷基”亦包括烷基-硫基-烷基、烷氧基烷基、環烷基烷基、雜環烷基、C₁₋₆烴基。較佳地，烷基具有1至12個碳。更佳地，其為約1至7個碳之低碳烷基，仍更佳地為約1至4個碳之低碳烷基。烷基可經取代或未經取代。當經取代時，經取代之基團較佳包括齒基、氧基、疊氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫基、烷基-硫基-烷基、烷氧基烷基、烷基胺基、三齒甲基、羥基、疏基、羥基、氰基、烷基矽烷基、環烷基、環烷基烷基、雜環烷基、雜芳基、烯基、炔基、C₁₋₆烴基、芳基及胺基。

出於本發明之目的，如本文中所用之術語“經取代”係指添加來自以下群之部分中之一者，或以來自以下群之部分中之一者置換官能基或化合物中所含之一或多個原子：齒基、氧基、疊氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫基、烷基-硫基-烷基、烷氧基烷基、烷基胺基、三齒甲基、羥基、疏基、羥基、氰基、烷基矽烷基、環烷基、

環烷基烷基、雜環烷基、雜芳基、烯基、炔基、C₁₋₆ 細基、芳基及胺基。

如本文中所用之術語“烯基”係指含有至少一個碳-碳雙鍵之基團，包括直鏈、支鏈及環狀基團。較佳地，烯基具有約 2 至 12 個碳。更佳地，其為約 2 至 7 個碳之低碳烯基，仍更佳地為約 2 至 4 個碳之低碳烯基。烯基可經取代或未經取代。當經取代時，經取代之基團較佳包括鹵基、氧基、疊氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫基、烷基-硫基-烷基、烷氧基烷基、烷基胺基、三鹵甲基、羥基、疏基、羥基、氰基、烷基矽烷基、環烷基、環烷基烷基、雜環烷基、雜芳基、烯基、炔基、C₁₋₆ 細基、芳基及胺基。

如本文中所用之術語“炔基”係指含有至少一個碳-碳參鍵之基團，包括直鏈、支鏈及環狀基團。較佳地，炔基具有約 2 至 12 個碳。更佳地，其為約 2 至 7 個碳之低碳炔基，仍更佳地為約 2 至 4 個碳之低碳炔基。炔基可經取代或未經取代。當經取代時，經取代之基團較佳包括鹵基、氧基、疊氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫基、烷基-硫基-烷基、烷氧基烷基、烷基胺基、三鹵甲基、羥基、疏基、羥基、氰基、烷基矽烷基、環烷基、環烷基烷基、雜環烷基、雜芳基、烯基、炔基、C₁₋₆ 細基、芳基及胺基。

“炔基”之實例包括炔丙基、丙炔基及 3-己炔基。

如本文中所用之術語“芳基”係指含有至少一個芳族環之芳族細環系統。芳族環可視情況耦合或以其他方式連接至其他芳族細環或非芳族細環。芳基的實例包括（例如）

苯基、萘基、1,2,3,4-四氫萘及聯苯。芳基之較佳實例包括苯基及萘基。

如本文中所用之術語“環烷基”係指C₃₋₈環烴。環烷基的實例包括環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基及環辛基。

如本文中所用之術語“環烯基”係指含有至少一個碳-碳雙鍵之C₃₋₈環烴。環烯基之實例包括環戊烯基、環戊二烯基、環己烯基、1,3-環己二烯基、環庚烯基、環庚三烯基及環辛烯基。

如本文中所用之術語“環烷基烷基”係指經C₃₋₈環烷基取代之烷基。環烷基烷基之實例包括環丙基甲基及環戊基乙基。

如本文中所用之術語“烷氧基”係指經由氧橋與母體分子部分連接之具有指定數目碳原子之烷基。烷氧基之實例包括（例如）甲氧基、乙氧基、丙氧基及異丙氧基。

如本文中所用之“烷基芳基”係指經烷基取代之芳基。

如本文中所用之“芳烷基”係指經芳基取代之烷基。

如本文中所用之術語“烷氧基烷基”係指經烷氧基取代之烷基。

如本文中所用之術語“烷基-硫基-烷基”係指烷基-S-烷基硫醚，例如甲基硫基甲基或甲基硫基乙基。

如本文中所用之術語“胺基”係指如在此項技術中已知藉由以有機基團置換一或多個氫基而自氮衍生之含氮基

團。舉例而言，術語“醯基胺基”及“烷基胺基”係指分別具有醯基及烷基取代基之特定N-取代之有機基團。

如本文中所用之術語“烷基羧基”係指經烷基取代之羧基。

如本文中所用之術語“鹵素”或“鹵基”係指氯、氟、溴及碘。

如本文中所用之術語“雜環烷基”係指含有至少一個選自氮、氧及硫之雜原子之非芳族環系統。雜環烷基環可視情況稠合或以其他方式連接至其他雜環烷基環及/或非芳族煙環。較佳雜環烷基具有3至7個成員。雜環烷基之實例包括（例如）哌啶、嗎啉、哌啶、四氫呋喃、吡咯啶及吡唑。較佳雜環烷基包括哌啶基、哌啶基、嗎啉基及吡咯啶基。

如本文中所用之術語“雜芳基”係指含有至少一個選自氮、氧及硫之雜原子之芳族環系統。雜芳基環可視情況稠合或以其他方式連接至一或多個雜芳基環、芳族或非芳族煙環或雜環烷基環。雜芳基的實例包括（例如）吡啶、呋喃、噻吩、5,6,7,8-四氫異喹啉及嘧啶。雜芳基之較佳實例包括噻吩基、苯并噻吩基、吡啶基、喹啉基、吡啶基、嘧啶基、咪唑基、苯并咪唑基、呋喃基、苯并呋喃基、噻唑基、苯并噻唑基、異噁唑基、噁二唑基、異噻唑基、苯并異噁唑基、三唑基、四唑基、吡咯基、吲哚基、吡唑基及苯并吡唑基。

如本文中所用之術語“雜原子”係指氮、氧及硫。

在一些具體實例中，經取代烷基包括羧基烷基、胺基烷基、二烷基胺基、羥基烷基及疏基烷基；經取代烯基包括羧基烯基、胺基烯基、二烯基胺基、羥基烯基及疏基烯基；經取代炔基包括羧基炔基、胺基炔基、二炔基胺基、羥基炔基及疏基炔基；經取代環烷基包括諸如 4-氯環己基之部分；芳基包括諸如萘基之部分；經取代芳基包括諸如 3-溴苯基之部分；芳烷基包括諸如甲苯基之部分；雜烷基包括諸如乙基噻吩之部分；經取代雜烷基包括諸如 3-甲氧基-噻吩之部分；烷氧基包括諸如甲氧基之部分；且苯氧基包括諸如 3-硝基苯氧基之部分。鹵基應理解為包括氟、氯、碘及溴。

出於本發明之目的，“正整數”應理解為包括等於或大於 1 之整數且如一般技術者所瞭解，在普通技術者判定範圍內，亦即在一些具體實例中較佳為 1 至約 10，更佳為 1 或 2。

出於本發明之目的，術語“核酸”或“核苷酸”應用於脫氧核糖核酸（“DNA”）及核糖核酸（“RNA”）（除非另有說明，否則為單股或雙股）及其任何化學修飾形式。

出於本發明之目的，術語“連結”應理解為包括一基團與另一基團之共價（較佳）或非共價連接，亦即作為化學反應之結果。

出於本發明之目的，術語“有效量”及“足夠量”意謂達成所需效應或治療效應之量，該效應如一般技術者所瞭解。

出於本發明之目的，術語“治療性寡核苷酸”係指用作醫藥或診斷劑之寡核苷酸。

出於本發明之目的，“基因表現之調節”應理解為廣泛地包括在不考慮投藥途徑的情況下，與在不存在本文中描述之化合物之治療的情況下所觀察到之基因表現相比，較佳與癌症及發炎相關之任何類型之基因之下調或上調。

出於本發明之目的，目標基因之“基因表現之抑制”應理解為意謂當與在不存在本文中描述之化合物之治療的情況下所觀察到之 mRNA 表現或蛋白質轉譯相比，mRNA 表現或蛋白質轉譯降低或減弱。適合檢定包括（例如）使用熟習此項技術者已知之技術檢驗蛋白質或 mRNA 含量，諸如點印跡法、北方印跡法（northern blots）、原位雜交、ELISA、免疫沈澱、酶功能以及熟習此項技術者已知之表型檢定。經治療之病狀可由（例如）細胞、較佳癌細胞或組織中之 mRNA 含量降低證實。

廣泛而言，當獲得所需反應時，視為出現成功抑制或治療。舉例而言，成功抑制或治療可由獲得（例如）與腫瘤生長抑制相關之基因之 10% 或更高（亦即 20%、30%、40%）下調來定義。或者，成功治療可由當與在不存在本文中描述之化合物之治療的情況下所觀察到之彼含量相比時，獲得癌細胞或組織中致癌基因 mRNA 含量（包括熟習此項技術者預期之其他臨床標誌物）至少 20% 或較佳 30%、更佳 40% 或更高（亦即 50% 或 80%）降低來定義。

另外，在描述中為方便起見使用單數術語決不意欲僅限於此。因此舉例而言，提及包含一酶之組合物係指彼酶之一或多個分子。亦應瞭解本發明不侷限於本文中揭示之特定組態、方法步驟及物質，此係因為該等組態、方法步驟及物質可在某種程度上變化。

亦應瞭解，因為本發明之範疇係由隨附申請專利範圍及其等效物限制，所以本文中使用之術語僅用於描述特定具體實例之目的且不欲具有限制性。

【圖式簡單說明】

圖 1 示意地說明實施例 7 中描述之化合物 1 之合成。

圖 2 示意地說明實施例 8-13 中描述之化合物 10 之合成。

圖 3 示意地說明實施例 14-18 中描述之化合物 18 之合成。

圖 4 示意地說明實施例 19-23 中描述之化合物 25 之合成。

圖 5 示意地說明實施例 25-27 中描述之化合物 30 之合成。

圖 6 示意地說明實施例 28-29 中描述之化合物 35 之合成。

圖 7 展示實施例 32 中描述之 PEG-LNA 接合物之細胞吸收。

圖 8 展示實施例 32 中描述之 PEG-LNA 接合物之受體特異性細胞吸收。

圖 9 展示實施例 33 中描述之 PEG-LNA 接合物之試管內功效。

圖 10 展示實施例 34 中描述之葉酸-PEG-LNA 接合物之活體內功效及生物分布。

圖 11 展示實施例 35 中描述之 PEG-LNA 接合物之生物分布。

圖 12 展示實施例 36 中描述之 PEG-LNA 接合物之活體內功效。

圖 13 展示實施例 37 中描述之 PEG-LNA 接合物之活體內功效。

為便於描述且不加限制，多臂 PEG（例如四臂 PEG）在圖中描述為“PEG”。

發明之詳細述敘

A. 概述

在本發明之一態樣中，提供將寡核苷酸傳遞至有需要之哺乳動物之腫瘤細胞之方法。該方法包括向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予式（I）化合物：

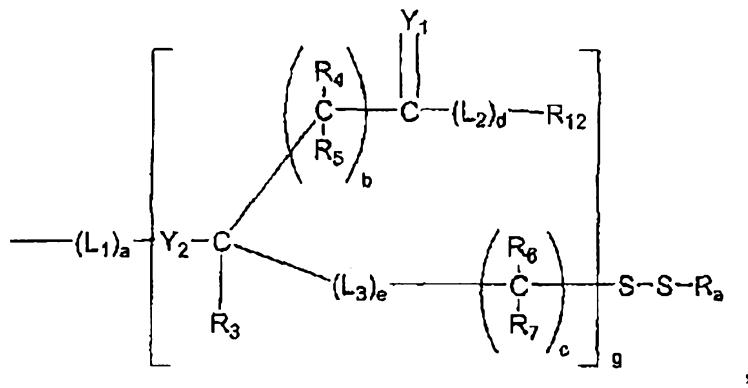
$R_1-\{Z_1\}_m$

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_1 相同或不同且係選自：



$-(L_4)_{a1}-R_b$ ；及

$-(L_4)_{a2}-R_c$ ，

Y_1 在每次出現時獨立地為 S 或 O ，較佳為 O ；

Y_2 在每次出現時獨立地為 NR_{13} ，較佳為 NH ；

R_a 在每次出現時為相同或不同寡核苷酸；

L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炫基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

R_{13} 在每次出現時獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} �炫基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{3-8} 環烷基；

R_{12} 在每次出現時獨立地選自：氫、羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} �炫基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 0；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 1；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 0；
 各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 1；
 各 (e) 獨立地為 0 或 1，且較佳為 0；
 各 (g) 獨立地為 0 或 1，且較佳為 1；且
 (m) 為約 2 至約 32 之正整數（例如 2、4、6、8、16、
 32），

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0 且限制條件為一或多個 Z_1 含有寡核苷酸。

在另一態樣中，提供式 (I) 化合物：

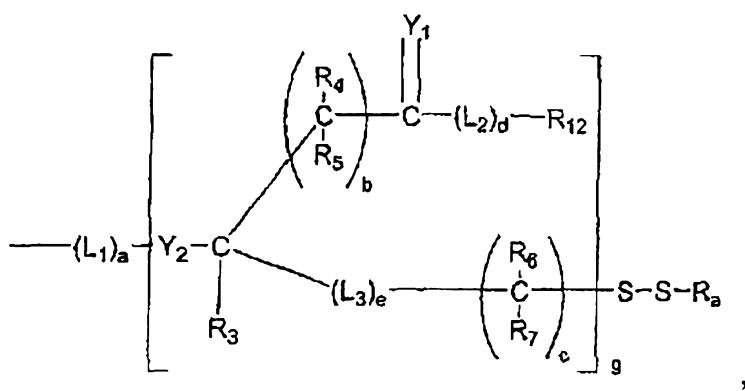
$R_1 - \{Z_1\}_m$

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_1 相同或不同且係選自：



$-(L_4)_{a1}-R_b$ ；及

$-(L_4)_{a2}-R_c$ ，

Y_1 在每次出現時獨立地為 S 或 O，較佳為 O；

Y_2 在每次出現時獨立地為 NR_{13} ，較佳為 NH ；

R_a 在每次出現時為相同或不同寡核苷酸；

L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

R_{13} 在每次出現時獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{3-8} 環烷基；

R_{12} 在每次出現時獨立地選自：氫、羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 0；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 1；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 0；

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 1；

各 (e) 獨立地為 0 或 1，且較佳為 0；

各 (g) 獨立地為 0 或 1，且較佳為 1；且

(m) 為約 2 至約 32 之正整數（例如 2、4、6、8、16、32），

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0，一或多個 Z_1 含有寡核苷酸，且一或多個 Z_1 含有葉酸。

在一具體實例中，一個 Z_1 含有寡核苷酸且其餘 Z_1 含有

葉酸。

出於本發明之目的，(m)係指聚合物臂之數目。每一聚合物臂包括線性聚合物，諸如聚乙二醇。較佳地，(m)等於約2至約32。舉例而言，當R₁具有32個線性聚合物臂時，(m)為32。當(m)為2時，在本文中描述之聚合化合物中使用雙PEG。因此，聚合化合物可較佳包括至多32個聚合物臂，亦即4、8、16或32個。在一具體實例中，聚合化合物可包括四至八個聚合物臂，其中(m)可為4至8(例如4、6或8)。較佳地，聚合部分包括四個聚合物臂，其中(m)為4。

出於本發明之目的，當(a)等於或大於2時，L₁相同或不同。

出於本發明之目的，當(d)等於或大於2時，L₂相同或不同。

出於本發明之目的，當(a1)或(a2)等於或大於2時，L₄相同或不同。

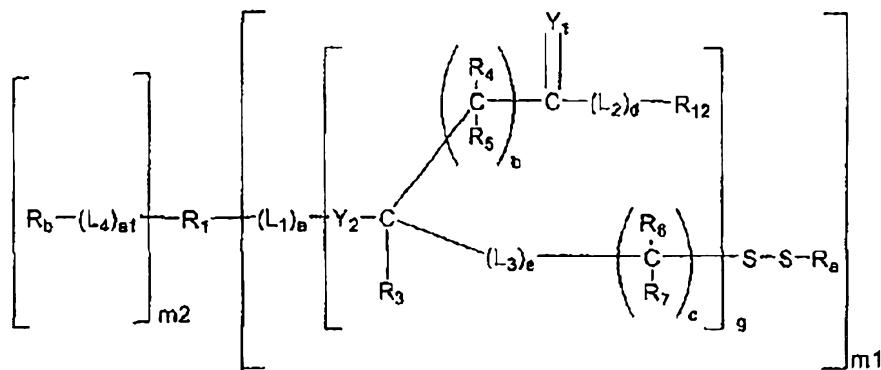
出於本發明之目的，當(b)等於或大於2時，C(R₄)(R₅)相同或不同。

出於本發明之目的，當(c)等於或大於2時，C(R₆)(R₇)相同或不同。

在一具體實例中，腫瘤細胞為前列腺或子宮頸癌細胞。

在另一態樣中，本發明提供抑制哺乳動物細胞或組織之基因表現之方法。該方法包括向有需要之哺乳動物投予有效量之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

在一具體實例中，本文中描述之方法係使用式 (I') 化合物來執行：



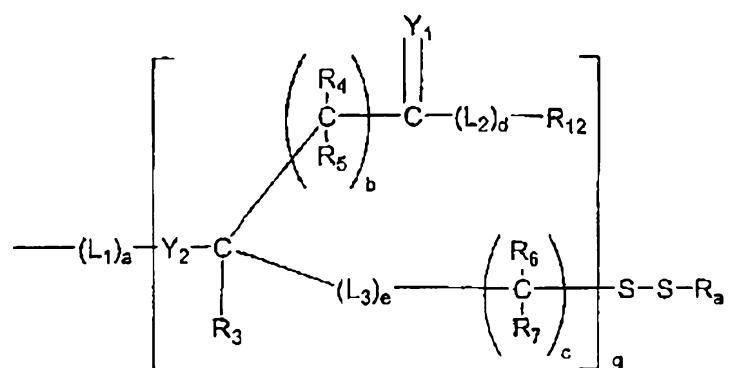
其中

(m1) 為約 1 至約 8 之正整數 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8)；

(m2) 為 0 或約 1 至約 7 之正整數 (例如 0、1、2、3、4、5、6、7)；且

(m1) 與 (m2) 之和為約 2 至約 8 之整數 (例如 2、4、6、8)。

在一特定具體實例中，所有 (Z₁) 含有寡核苷酸。在此態樣中，(m2) 為 0 且 (m1) 為 4 或 8。或者，所有 (Z₁) 相同或不同



在另一特定具體實例中，一或多個 Z_1 含有葉酸。或者，一或多個 Z_1 為 $-(L_4)_{a1}-R_b$ 。在此態樣中，當 (m) 大於 2 時，一個 Z_1 包括寡核苷酸且其餘 Z_1 中之每一者包括葉酸。

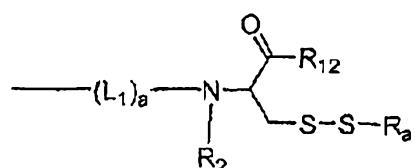
在另一具體實例中，本文中描述之化合物包括可選診斷劑。

在另一具體實例中，各 R_{12} 為選自 H 、 NH_2 、 OH 、 CO_2H 、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基之相同或不同基團，且較佳為 OH 。

在另一具體實例中， R_{3-7} 各自為選自氫、甲基、乙基及異丙基之相同或不同基團。較佳地， R_{3-7} 全部為氫。

在一較佳具體實例中，(b)、(d) 及 (e) 為 0 且 (c) 為 1。

在一較佳具體實例中，本文中描述之方法中所用之式 (I) 化合物包括具有下式之 Z_1 ：



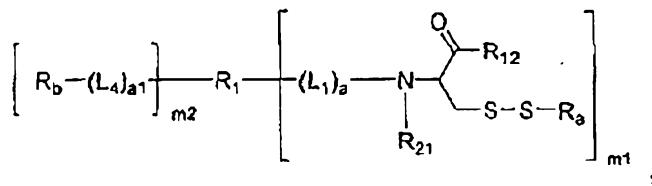
其中，

(a) 為 0 或 1；

(m) 為 1、2、4、8、16 或 32；

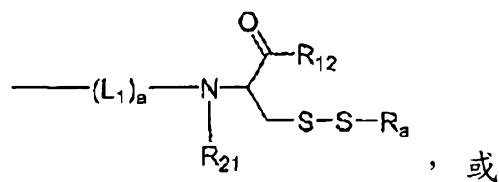
R_{12} 在每次出現時獨立地選自：羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{1-6} 烷氧基；且所有其他變數與以上定義相同。

或者，本文中描述之化合物具有下式：

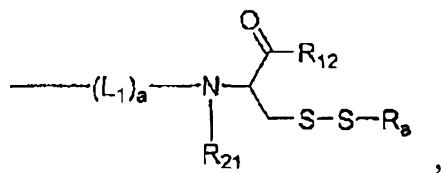


其中 (a) 為 0 或 1。

在此態樣中，(m_2) 為 0 且所有 Z_1 為



(m_1) 為 1，或一個 Z_1 為

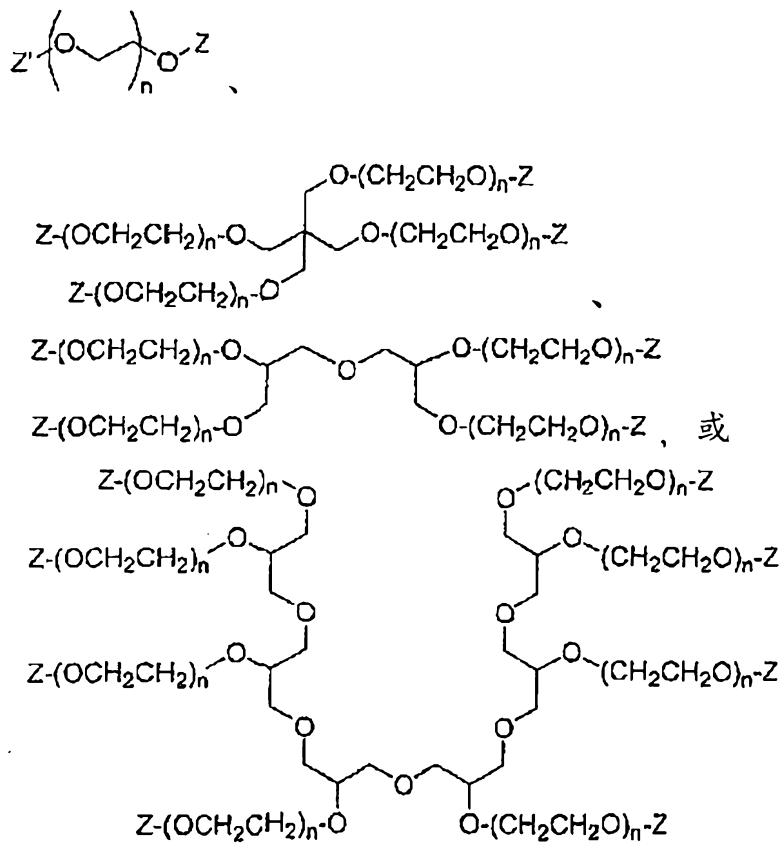


其中其餘 Z_1 中之每一者包括葉酸。

在另一具體實例中，一個 Z_1 包括診斷劑。

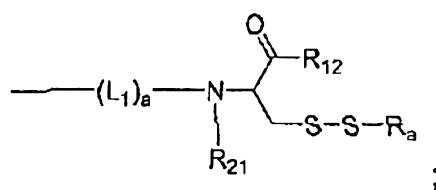
在另一態樣中， R_1 包括聚伸烷基氧化物。較佳地， R_1 具有約 5,000 至約 25,000 道爾頓或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平均分子量。

在本發明之一較佳態樣中，本文中描述之方法以具有下式之化合物進行：



其中

各 Z 獨立地為



$-(L_4)_{a1} - R_b$; 或

$$- (L_4)_{a2} - R_c \ ,$$

其中

(a) 為 0 或 1 。

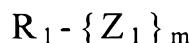
R_{12} 在每次出現時獨立地選自：羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(n) 為正整數且該化合物之聚合部分具有約 5,000 至約 25,000 道爾頓或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平均分子量；且

所有其他變數與以上定義相同。

在此態樣中，所有 Z 基團包括寡核苷酸。或者，一個 Z 包括寡核苷酸且其餘一或多個 Z 基團（例如 1、2、3、4、5、6 或 7 個 Z 基團）包括靶向劑，諸如葉酸。在另一具體實例中，一個 Z 包括寡核苷酸，另一 Z 包括診斷劑，且其餘一或多個（例如 2、3、4、5、6 個）Z 包括葉酸。

在本發明之另一態樣中，提供式 (Ia) 化合物：

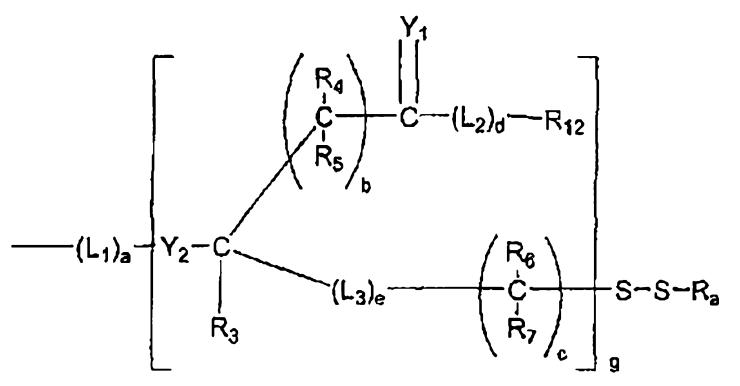


或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_1 相同或不同且係選自：



$-(L_4)_{a1}-R_b$ ；及

$-(L_4)_{a2}-R_c$ ，

Y_1 在每次出現時獨立地為 S 或 O；

Y_2 在每次出現時獨立地為 NR_{13} ；

R_a 在每次出現時為相同或不同寡核苷酸；

L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

R_{13} 在每次出現時獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{3-8} 環烷基；

R_{12} 在每次出現時獨立地選自：氫、羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (e) 獨立地為 0 或 1；

各 (g) 獨立地為 0 或 1；且

(m) 為約 2 至約 32 之正整數，

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0，一或多個 Z_1 含有寡核苷酸，且一或多個 Z_1 含有葉酸。

在某些具體實例中，變數與在式 (I) 中定義相同。

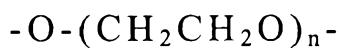
B. 實質上無抗原性之水溶性聚合物

本文中描述之化合物中所用之聚合物較佳為水溶性聚合物且實質上無抗原性，諸如聚伸烷基氧化物 (PAO)。

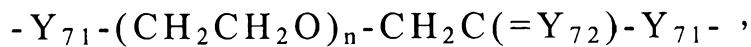
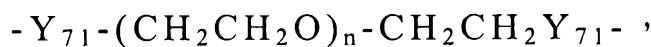
在本發明之一態樣中，本文中描述之化合物包括線性、末端分枝或多臂聚伸烷基氧化物。在本發明之某些具體實例中，聚伸烷基氧化物包括聚乙二醇及聚丙二醇。

聚伸烷基氧化物具有約 2,000 至約 100,000 道爾頓、較佳約 5,000 至約 60,000 道爾頓之總數量平均分子量。聚伸烷基氧化物可更佳為約 5,000 至約 25,000 或約 20,000 至約 45,000 道爾頓。在一些特定具體實例中，本文中描述之化合物包括具有約 30,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平均分子量之聚伸烷基氧化物。在一特定具體實例中，聚合部分具有約 40,000 道爾頓之總數量平均分子量。

聚伸烷基氧化物包括聚乙二醇及聚丙二醇。更佳地，聚伸烷基氧化物包括聚乙二醇 (PEG)。PEG 通常由以下結構代表：



其中 (n) 代表聚合物之聚合度，且取決於聚合物之分子量。或者，本文中描述之化合物之聚乙二醇 (PEG) 殘基部分可選自：



$-Y_{71}-C(=Y_{72})-(CH_2)_{a71}-Y_{73}-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y_{73}-(CH_2)_a71-C(=Y_{72})-Y_{71}-$ ，及

$-Y_{71}-(CR_{71}R_{72})_{a72}-Y_{73}-(CH_2)_{b71}-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_{b71}$
 $-Y_{73}-(CR_{71}R_{72})_{a72}-Y_{71}-$ ，

其中：

Y_{71} 及 Y_{73} 獨立地為 O 、 S 、 SO 、 SO_2 、 NR_{73} 或一鍵；

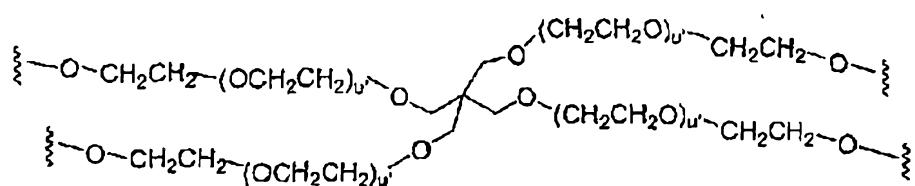
Y_{72} 為 O 、 S 或 NR_{74} ，較佳為 O ；

R_{71} 、 R_{72} 、 R_{73} 及 R_{74} 獨立地選自可用於 R_3 之相同部分；

($a71$)、($a72$) 及 ($b71$) 獨立地為 0 或正整數（例如 0、1、2、3），且較佳為 1；且

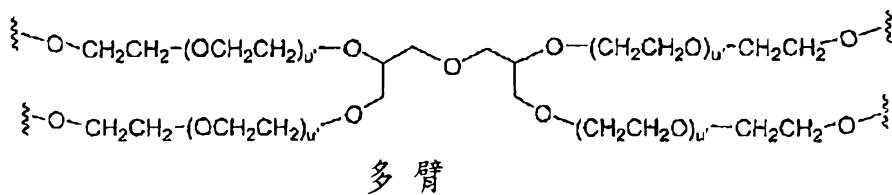
(n) 為約 10 至約 2300 之整數。

在一較佳態樣中，本文中描述之化合物中適用之聚合物包括多臂 PEG-OH 或“星形-PEG”產物，諸如 NOF Corp. 藥物傳遞系統目錄（第 8 版，2006 年 4 月）中描述者，該目錄之揭示內容以引用的方式併入本文中。可使用美國專利第 5,122,614 號或第 5,808,096 號中描述之活化技術將聚合物轉化為經合適地活化之形式。具體言之，該 PEG 可具有下式：



星形

或

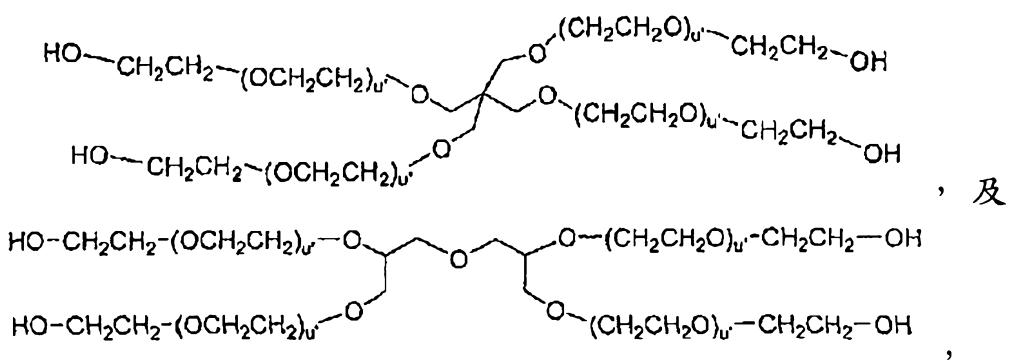


其中：

(u') 為約 4 至約 455 之整數。

在一較佳具體實例中，聚合物之聚合度 (u') 為約 28 至約 341 以提供具有約 5,000 Da 至約 60,000 Da 之總數量平均分子量之聚合物，且較佳為約 114 至約 239 以提供具有約 20,000 Da 至約 42,000 Da 之總數量平均分子量之聚合物。 (u') 代表聚合物鏈中重複單元之數目且取決於聚合物之分子量。在本發明之一特定具體實例中， (u') 為約 227 以提供具有約 40,000 Da 之總數量平均分子量之聚合部分。

在一些較佳具體實例中，所有 4 個 PEG 臂轉化為適合活化基團，以有助於連接至寡核苷酸或葉酸。轉化前之該等化合物包括：



本文中包括之聚合物較佳在室溫下可溶於水。該等聚合物之非限制性清單包括聚伸烷基氧化物均聚物，諸如聚乙二醇（PEG）或聚丙二醇，聚氧乙烯化多元醇，其共聚物

及其嵌段共聚物，限制條件為保持嵌段共聚物之水溶性。

出於本發明之目的，“實質上或實際上無抗原性”意謂在此項技術中所有物質應理解為在哺乳動物中無毒且不引起明顯免疫反應。

在一些態樣中，具有末端羧酸基團之聚合物可用於本文中描述之聚合傳遞系統中。製備高純度之具有末端羧酸之聚合物之方法描述於美國專利申請公開案第2007/0173615號中，其內容以引用的方式併入本文中。方法包括首先製備聚伸烷基氧化物之第三烷基酯，接著轉化為其羧酸衍生物。該方法之製備PAO羧酸之第一步驟包括形成中間物，諸如聚伸烷基氧化物羧酸之第三丁基酯。此中間物藉由在鹼（諸如第三丁醇鉀）存在下使PAO與齒乙酸第三丁酯反應來形成。形成第三丁基酯中間物後，可易於以超過92%、較佳超過97%、更佳超過99%之純度且最佳超過99.5%之純度提供聚伸烷基氧化物之羧酸衍生物。

在替代態樣中，具有末端胺基之聚合物可用於製備本文中描述之化合物。製備高純度之含有末端胺之聚合物之方法描述於美國專利申請公開案第2008/0249260號及第2007/0078219號中，其每一者之內容以引用的方式併入本文中。舉例而言，使具有疊氮基之聚合物與基於膦之還原劑（諸如三苯膦）或鹼金屬氫硼化物還原劑（諸如 NaBH_4 ）反應。或者，使包括離去基之聚合物與受保護之胺鹽（諸如亞胺二碳酸甲酯第三丁酯之鉀鹽（ KNMeBoc ）或亞胺二碳酸二第三丁酯之鉀鹽（ KNBoc_2 ））反應，接著將受保護

之胺基去保護。藉由此等方法形成之含有末端胺之聚合物之純度大於約 95% 且較佳大於 99%。

C. 雙官能連結子

雙官能連結子包括胺基酸、胺基酸衍生物及肽。胺基酸可為天然存在及非天然存在胺基酸中者。

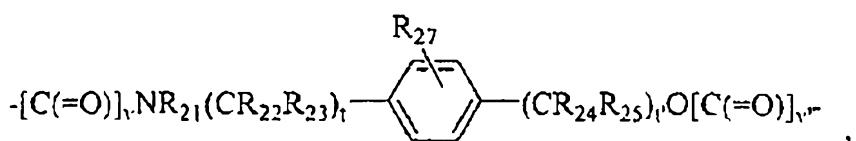
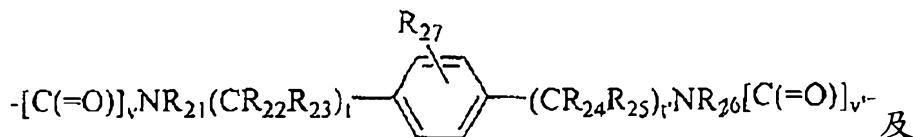
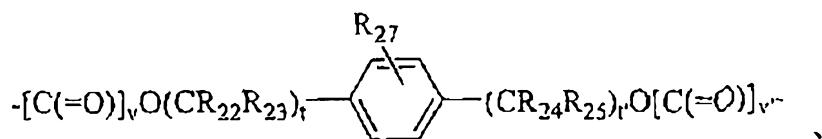
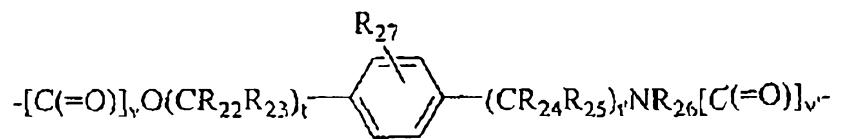
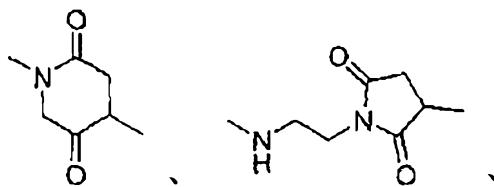
亦預期疏水性或非疏水性的天然存在胺基酸之衍生物及類似物以及各種業內已知之非天然存在胺基酸 (D 或 L) 在本發明之範疇內。非天然存在胺基酸之適合非限制性清單包括 2-胺基己二酸、3-胺基己二酸、 β -丙胺酸、 β -胺基丙酸、2-胺基丁酸、4-胺基丁酸、哌啶酸、6-胺基己酸、2-胺基庚酸、2-胺基異丁酸、3-胺基異丁酸、2-胺基庚二酸、2,4-胺基丁酸、鎖鏈素 (desmosine)、2,2-二胺基庚二酸、2,3-二胺基丙酸、N-乙基甘胺酸、N-乙基天冬醯胺、3-羥基脯胺酸、4-羥基脯胺酸、異鎖鏈素 (isodesmosine)、別異白胺酸、N-甲基甘胺酸、肌胺酸、N-甲基-異白胺酸、6-N-甲基離胺酸、N-甲基纈胺酸、正纈胺酸、正白胺酸及鳥胺酸。一些胺基酸殘基係選自甘胺酸、丙胺酸、甲硫胺酸或肌胺酸，且更佳為甘胺酸。

在本發明之一替代態樣中， L_{1-4} 為選自以下各基團之相同或不同基團：

- [C(=O)]_v(CR₂₂R₂₃)_t[C(=O)]_{v'} - 、
- [C(=O)]_v(CR₂₂R₂₃)_t-O[C(=O)]_{v'} - 、
- [C(=O)]_v(CR₂₂R₂₃)_t-NR₂₆[C(-O)]_{v'} - 、
- [C(=O)]_vO(CR₂₂R₂₃)_t[C(O)]_{v'} - 、

-[C(=O)]_vO(CR₂₂R₂₃)_tO[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vO(CR₂₂R₂₃)_tNR₂₆[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃)_t[C(-O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃)_tO[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃)_tNR₂₆[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_v(CR₂₂R₂₃)_tO-(CR₂₈R₂₉)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_v(CR₂₂R₂₃)_tNR₂₆-(CR₂₈R₂₉)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_v(CR₂₂R₂₃)_tS-(CR₂₈R₂₉)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vO(CR₂₂R₂₃)_tO-(CR₂₈R₂₉)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vO(CR₂₂R₂₃)_tNR₂₆-(CR₂₈R₂₉)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vO(CR₂₂R₂₃)_tS-(CR₂₈R₂₉)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃)_tO-(CR₂₈R₂₉)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃)_tNR₂₆-(CR₂₈R₂₉)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃)_tS-(CR₂₈R₂₉)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_v(CR₂₂R₂₃CR₂₈R₂₉O)_tNR₂₆[C(=O)]_{v'} - 、
[C(-O)]_v(CR₂₂R₂₃CR₂₈R₂₉O)_t[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vO(CR₂₂R₂₃CR₂₈R₂₉O)_tNR₂₆[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vO(CR₂₂R₂₃CR₂₈R₂₉O)_t[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃CR₂₈R₂₉O)_tNR₂₆[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃CR₂₈R₂₉O)_t[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_v(CR₂₂R₂₃CR₂₈R₂₉O)_t(CR₂₄R₂₅)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vO(CR₂₂R₂₃CR₂₈R₂₉O)_t(CR₂₄R₂₅)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃CR₂₈R₂₉O)_t(CR₂₄R₂₅)_t-[C(=O)]_{v'} - 、
-[C(=O)]_v(CR₂₂R₂₃CR₂₈R₂₉O)_t(CR₂₄R₂₅)_t-O[C(=O)]_{v'} - 、

$-\text{[C(=O)]}_v(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_t(\text{CR}_{24}\text{R}_{25}\text{CR}_{28}\text{R}_{29}\text{O})_t-\text{[C(=O)]}_v-$ 、
 $-\text{[C(=O)]}_v(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_t(\text{CR}_{24}\text{R}_{25}\text{CR}_{28}\text{R}_{29}\text{O})_t-\text{NR}_{26}[\text{C(=O)]}_v-$ 、
 $-\text{[C(=O)]}_v\text{O}(\text{CR}_{22}\text{R}_{23}\text{CR}_{28}\text{R}_{29}\text{O})_t(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_t-\text{O}[\text{C(=O)]}_v-$ 、
 $-\text{[C(=O)]}_v\text{O}(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_t(\text{CR}_{24}\text{R}_{25}\text{CR}_{28}\text{R}_{29}\text{O})_t-\text{[C(=O)]}_v-$ 、
 $-\text{[C(=O)]}_v\text{O}(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_t(\text{CR}_{24}\text{CR}_{25}\text{CR}_{28}\text{R}_{29}\text{O})_t-\text{NR}_{26}[\text{C(=O)]}_v-$ 、
 $-\text{[C(=O)]}_v\text{NR}_{21}(\text{CR}_{22}\text{R}_{23}\text{CR}_{28}\text{R}_{29}\text{O})_t(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_t-\text{O}[\text{C(=O)]}_v-$ 、
 $-\text{[C(=O)]}_v\text{NR}_{21}(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_t(\text{CR}_{24}\text{R}_{25}\text{CR}_{28}\text{R}_{29}\text{O})_t-\text{NR}_{26}[\text{C(=O)]}_v-$ 、



其中：

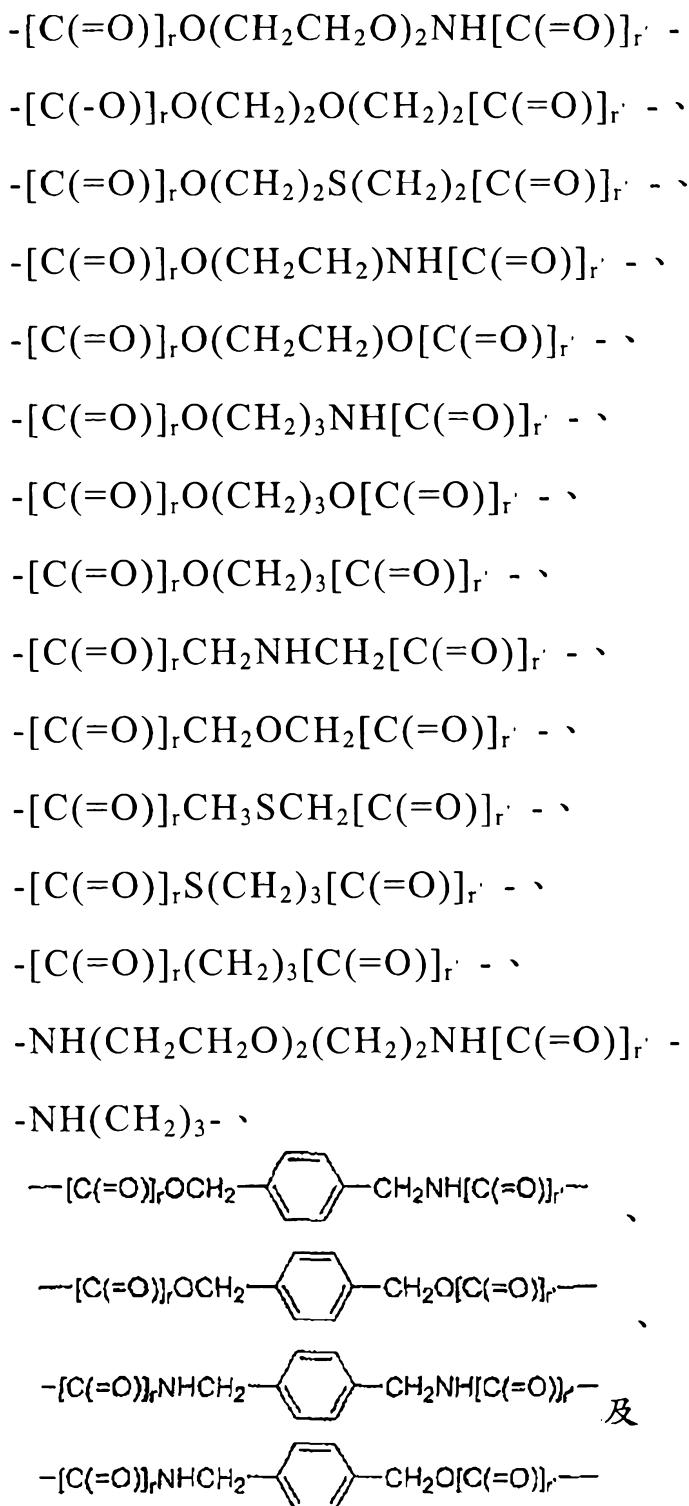
R_{21-29} 為選自以下各基團之相同或不同基團：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-12} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基、 C_{1-6} 經取代烷基、 C_{3-8} 經取代環烷基、芳基、經取代芳基、芳烷基、 C_{1-6} 雜烷基、經取代 C_{1-6} 雜烷基、 C_{1-6} 烷氧基、苯氧基及 C_{1-6} 雜烷氧基；
 v 及 t 為 1 至 6 之整數。

(t) 及 (t') 獨立地為 0 或正整數，較佳為 0 或約 1 至約 12 之整數，更佳為約 1 至約 8 之整數，且最佳為 1 或 2；且

(v) 及 (v') 獨立地為 0 或 1。

在一些較佳具體實例中，式 (I) 及式 (Ia) 之 L_{1-4} (更佳地，式 (Ia) 之 L_4) 包括選自以下各基團之相同或不同基團：

- [C(=O)]_rNH(CH₂)₂CH=N-NHC(=O)-(CH₂)₂-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂)₂(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂NH[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂CH₂)(CH₂CH₂O)₂NH[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂CH₂)₂NH(CH₂CH₂)_s[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂CH₂)₂S(CH₂CH₂)_s[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂CH₂)(CH₂CH₂O)[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂CH₂)₂O(CH₂CH₂)_s[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂CH₂O)(CH₂)NH[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂CH₂O)₂(CH₂)[C(=O)]_{r'}-
- [C(=O)]_rNH(CH₂CH₂O)_s(CH₂)_s[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNHCH₂CH₂NH[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂CH₂)₂O[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂CH₂O)[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂CH₂O)₂[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rNH(CH₂)₃[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rO(CH₂CH₂O)₂(CH₂)[C(=O)]_{r'}-、
- [C(=O)]_rO(CH₂)₂NH(CH₂)₂[C(=O)]_{r'}-、



其中 (r) 及 (r') 獨立地為 0 或 1；且 (s) 及 (s') 獨立地為 1、2 或 3。(r) 及 (r') 不同時為 0。

出於本發明之目的，當雙官能連結子之值為等於或大於 2 之正整數時，可使用相同或不同雙官能連結子。在含

有兩個或兩個以上雙官能連結子之一具體實例中，其中 (a)、(a1) 及 (a2) 等於或大於 2，雙官能連結子可相同或不同。

D. 診斷劑

本發明之另一態樣提供視情況經製備具有診斷標籤與本文中描述之聚合傳遞系統連結之化合物，其中該標籤經選擇用於診斷或成像目的。

本文中描述之化合物可經標記，諸如經生物素標記之化合物、螢光化合物（例如 FAM）、經放射性標記之化合物。適合標籤係藉由使任何適合部分（例如胺基酸殘基）與以下各者連結來製備：任何業內標準發射同位素、不透射線之標記物、磁共振標記物或適合於磁共振成像之其他非放射性同位素標記物、螢光型標記物、展現可見顏色且/或能夠在紫外線、紅外線或電化學刺激下發螢光以允許在手術程序期間使腫瘤組織成像之標記物等等。視情況，將診斷標籤併入且/或連結於接合治療性部分，從而允許監控治療性生物活性物質在動物或人類患者體內之分布。

經標記化合物易於藉由業內已知之方法以任何適合標記物（包括（例如）放射性同位素標記物）來製備。僅舉例而言，其包括 ^{131}I 碘、 ^{125}I 碘、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 錫及/或 ^{111}In 鋼，用以製備供活體內選擇性吸收至腫瘤細胞中之放射免疫閃爍造影劑。舉例而言，存在將肽連結至 Tc-99m 之許多業內已知之方法，包括（僅舉例而言）美國專利第 5,328,679 號、第 5,888,474 號、第 5,997,844 號及第 5,997,845 號所展示之彼

等方法，該等專利係以引用的方式併入本文中。

E. 寡核苷酸

本文中描述之化合物可用於將核酸（寡核苷酸）傳遞至細胞或組織中。

為了更充分瞭解本發明之範疇，定義以下術語。熟習此項技術者應瞭解術語“核酸”或“核苷酸”應用於脫氧核糖核酸（“DNA”）、核糖核酸（“RNA”）（除非另有說明，否則為單股或雙股）及其任何化學修飾形式。“寡核苷酸”通常為（例如）大小在約 2 至約 200 個核苷酸範圍內，或更佳長度為約 8 至約 30 個核苷酸之相對短的聚核苷酸。除非另有說明，否則本發明之寡核苷酸通常為合成核酸且為單股。在本文中，術語“聚核苷酸”及“聚核酸”亦可同義使用。

寡核苷酸（類似物）不限於單一種類之寡核苷酸，而實際上經設計可用於多種此類部分，應瞭解連結子可連接於 3' 或 5' 末端中之一或多者，通常核苷酸之 PO_4 或 SO_4 基團。所涵蓋之核酸分子可包括硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯修飾、糖修飾、核酸鹼基修飾及/或磷酸酯骨架修飾。寡核苷酸可含有天然磷酸二酯骨架或硫代磷酸酯骨架或任何其他經修飾骨架類似物，諸如 LNA（鎖核酸）、PNA（具有肽骨架之核酸）、CpG 寡聚物及其類似物，諸如在以下參照案中所揭示者：Tides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, 2002 年 5 月 6-8 日, Las Vegas, NV 及 Oligonucleotide & Peptide Technologies, 2003 年 11 月 18

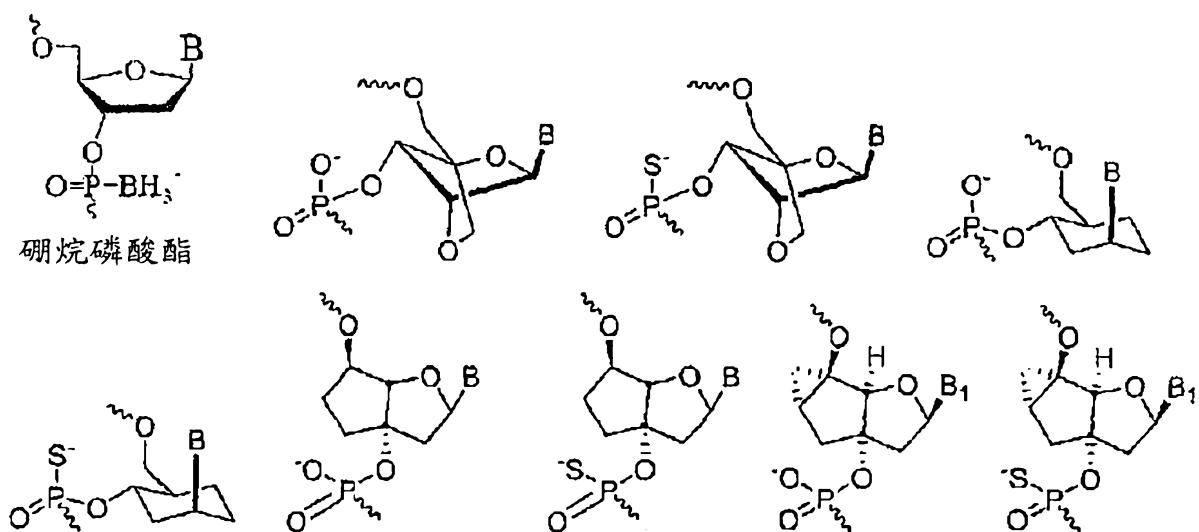
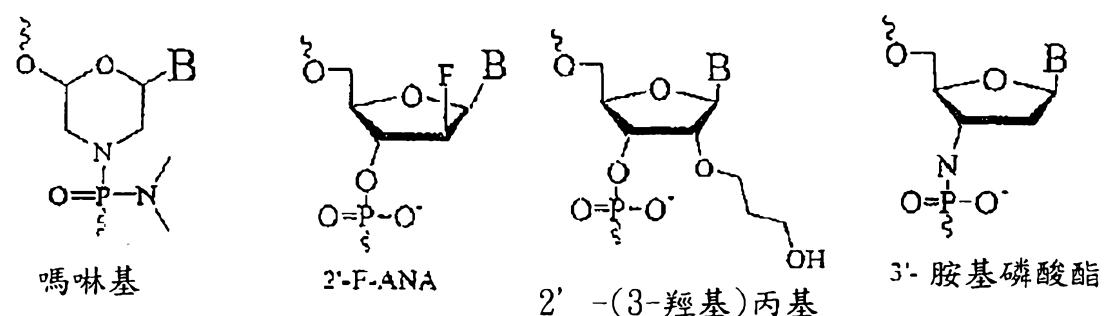
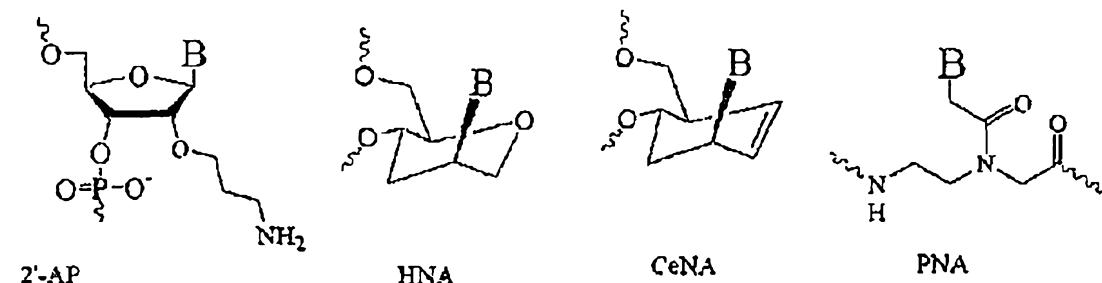
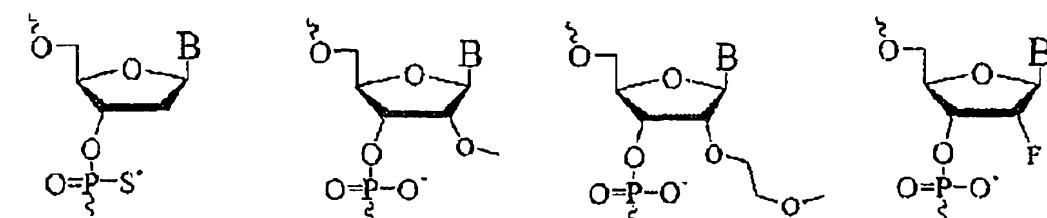
日及 19 日，Hamburg, Germany，該等參照案之內容係以引用的方式併入本文中。

本發明所涵蓋之寡核苷酸之修飾包括（例如）以允許寡核苷酸與所需聚合物共價鍵聯之官能基或部分添加至或取代所選核苷酸，及/或添加或取代將額外電荷、極化性、氫鍵、靜電相互作用及官能度併入寡核苷酸之官能部分。該等修飾包括（但不限於）2'-位糖修飾、5-位嘧啶修飾、8-位嘌呤修飾、對環外胺之修飾、4-硫代尿苷之取代、5-溴尿嘧啶或 5-碘尿嘧啶之取代、骨架修飾、甲基化、鹼基配對組合（諸如異鹼基異胞苷及異胍）及類似組合。涵蓋於本發明範疇內之寡核苷酸亦可包括 3' 及/或 5' 帽結構。

出於本發明之目的，“帽結構”應理解為意謂已併入寡核苷酸之任一末端之化學修飾。帽可存在於 5'-末端（5'-帽）或 3'-末端（3'-帽）或可存在於兩個末端上。5'-帽之非限制性實例包括倒轉無鹼基殘基（部分）、4',5'-亞甲基核苷酸；1-(β -D-赤呋喃糖基)核苷酸、4'-硫基核苷酸、碳環核苷酸；1,5-無水己糖醇核苷酸；L-核苷酸； α -核苷酸；經修飾鹼基核苷酸；二硫代磷酸酯鍵；蘇-戊呋喃糖基核苷酸；無環 3',4'-閉聯核苷酸；無環 3,4-二羥基丁基核苷酸；無環 3,5-二羥基戊基核苷酸；3'-3-倒轉核苷酸部分；3'-3'-倒轉無鹼基部分；3'-2'-倒轉核苷酸部分；3'-2'-倒轉無鹼基部分；1,4-丁二醇磷酸酯；3'-氨基磷酸酯；己基磷酸酯；氨基己基磷酸酯；3'-磷酸酯；3'-硫代磷酸酯；二硫代磷酸酯；或橋接或非橋接甲基磷酸酯部分。細節描述於 WO 97/26270

中，其以引用的方式併入本文中。3'-帽可包括（例如）4',5'-亞甲基核苷酸；1-(β -D-赤呋喃醣基)核苷酸；4'-硫基核苷酸、碳環核苷酸；5'-氨基-烷基磷酸酯；1,3-二氨基-2-丙基磷酸酯，3-氨基丙基磷酸酯；6-氨基己基磷酸酯；1,2-氨基十二烷基磷酸酯；羥基丙基磷酸酯；1,5-無水己糖醇核苷酸；L-核苷酸； α -核苷酸；經修飾鹼基核苷酸；二硫代磷酸酯；蘇-戊呋喃醣基核苷酸；無環3',4'-閉聯核苷酸；3,4-二羥基丁基核苷酸；3,5-二羥基戊基核苷酸，5'-5'-倒轉核苷酸部分；5'-5'-倒轉無鹼基部分；5'-氨基磷酸酯；5'-硫代磷酸酯；1,4-丁二醇磷酸酯；5'-氨基；橋接及/或非橋接5'-氨基磷酸酯，硫代磷酸酯及/或二硫代磷酸酯，橋接或非橋接甲基磷酸酯及5'-巯基部分。亦參見Beaucage及Iyer, 1993, *Tetrahedron* 49, 1925，其內容以引用的方式併入本文中。

核苷類似物之非限制性清單具有以下結構：



參見以下參照案中描述之核苷類似物之更多實例：

Freier 及 Altmann; *Nucl Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443 及

Uhlmann; *Curr. Opinion in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213，其每一者之內容以引用的方式併入本文中。

如本文中所用之術語“反義”係指與編碼基因產物或編碼控制序列之特定DNA或RNA序列互補之核苷酸序列。術語“反義股”關於與“有義”股互補之核酸股而使用。在細胞代謝之正常操作中，DNA分子之有義股為編碼多肽及/或其他基因產物之股。有義股充當合成信使RNA（“mRNA”）轉錄物（反義股）之模板，該轉錄物轉而指導任何所編碼基因產物之合成。反義核酸分子可藉由任何業內已知之方法製備，包括藉由使所關注之基因以顛倒方向接合至允許合成互補股之病毒啟動子來合成。引入細胞中後，此轉錄股與細胞產生之天然序列組合形成雙股體。此等雙股體隨後阻斷進一步轉錄或轉譯。以此方式，可產生突變表型。業內亦已知標號“負”或（-）係指反義股，且業內亦已知“正”或（+）係指有義股。

出於本發明之目的，“互補”應理解為意謂核酸序列與另一核酸序列形成氫鍵。互補性百分比指示核酸分子中可與第二核酸序列形成氫鍵（亦即華特生-克里克（Watson-Crick）鹼基配對）之連續殘基之百分比，亦即相對於10中有5、6、7、8、9、10個視為50%、60%、70%、80%、90%及100%互補。“完全互補”意謂核酸序列之所有連續殘基與第二核酸序列中相同數目之連續殘基形成氫鍵。

在一具體實例中，接合之選擇為寡核苷酸（或“聚核

苷酸”），且在接合之後，目標稱為寡核苷酸之殘基。寡核苷酸可選自具有磷酸二酯骨架或硫代磷酸酯骨架之任何已知寡核苷酸及寡脫氧核苷酸。

適用於本文中描述之化合物之寡核苷酸或寡核苷酸衍生物可包括約 8 至約 1000 種核酸，且較佳為相對短的聚核苷酸，例如大小較佳在約 8 至約 30 個核苷酸長度之範圍內（例如約 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 個）。

在本文中描述之方法中所用之適用核酸之一態樣中，具有天然磷酸二酯骨架或硫代磷酸酯骨架或任何其他經修飾骨架類似物之寡核苷酸及寡脫氧核苷酸包括：

LNA（鎖核酸）；

PNA（具有肽骨架之核酸）；

短干擾 RNA（siRNA）；

微 RNA（miRNA）；

具有肽骨架之核酸（PNA）；

二胺基磷酸酯嗎啉基寡核苷酸（PMO）；

三環-DNA；

誘餌 ODN（雙股寡核苷酸）；

催化 RNA 序列（RNAi）；

核糖酶；

適體；

斯皮格體（spiegelmer）（L-構形寡核苷酸）；

CpG 寡聚物及其類似物，諸如在以下參照案中揭示者：

Tides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, 2002 年 5 月 6-8 日, Las Vegas, NV 及 Oligonucleotide & Peptide Technologies, 2003 年 11 月 18 日及 19 日, Hamburg, Germany, 其內容以引用的方式併入本文中。

在本文中描述之方法中所用之核酸之另一態樣中，寡核苷酸可包括任何適合的業內已知之核苷酸類似物及衍生物，包括由如下表 1 列出者：

表 1. 代表性核苷酸類似物及衍生物

4-乙醯基胞苷	5-甲氨基氨基甲基-2-硫代尿苷
5-(羧基羥基甲基)尿苷	β , D-甘露糖基 Q 核苷
2'-O-甲基胞苷	5-甲氨基羧基甲基-2-硫代尿苷
5-甲氨基羧基甲基尿苷	5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷
5-甲氨基尿苷	5-羧基甲基氨基甲基尿苷
二氫尿苷	2-甲基硫基-N6-異戊烯基腺苷
2'-O-甲基假尿苷	N-[(9- β -D-呋喃核糖基-2-甲基硫嘌呤-6-基)胺甲醯基]蘇胺酸
D-半乳糖基 Q 核苷	N-[(9- β -D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)N-甲基胺甲醯基]蘇胺酸
2'-O-甲基鳥苷	尿苷-5-氨基乙酸-甲酯
2'-鹼基-腺苷	2'-鹼基-胞苷
2'-鹼基-鳥苷	2'-鹼基-胸腺嘧啶
2'-鹼基-尿苷	2'-鹼基-甲基胞苷
2'-胺基-腺苷	2'-胺基-胞苷
2'-胺基-鳥苷	2'-胺基-胸腺嘧啶
2'-胺基-尿苷	2'-胺基-甲基胞苷
肌苷	尿苷-5-氨基乙酸
N6-異戊烯基腺苷	osyw
1-甲基腺苷	假尿苷
1-甲基假尿苷	Q 核苷
1-甲基鳥苷	2-硫代胞苷
1-甲基肌苷	5-甲基-2-硫代尿苷
2,2-二甲基鳥苷	2-硫代尿苷
2-甲基腺苷	4-硫代尿苷
2-甲基鳥苷	5-甲基尿苷
3-甲基胞苷	N-[(9- β -D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)-胺甲醯基]蘇胺酸
5-甲基胞苷	2'-O-甲基-5-甲基尿苷
N6-甲基腺苷	2'-O-甲基尿苷
7-甲基鳥苷	yw
5-甲基氨基甲基尿苷	3-(3-胺基-3-羧基-丙基)尿苷
鎖腺苷	鎖胞苷
鎖鳥苷	鎖胸腺嘧啶
鎖尿苷	鎖甲基胞苷

較佳地，寡核苷酸包括於所靶向之腫瘤細胞中或參與下調與腫瘤細胞對於抗癌治療劑之抗性有關聯之蛋白質。舉例而言，任何業內已知之用於由反義寡核苷酸下調以便治療癌症之細胞蛋白質（諸如 BCL-2）可用於本發明。參見 2004 年 4 月 9 日申請之美國專利申請案第 10/822,205 號，其內容以引用的方式併入本文中。治療性寡核苷酸之非限制性清單包括反義 HIF-1 α 寡核苷酸、反義 ErbB3 寡核苷酸、反義存活素（survivin）寡核苷酸及 β -索煙素（ β -catenine）寡核苷酸。

較佳地，適用於本文中描述之方法之寡核苷酸包括硫代磷酸酯骨架及 LNA。

在一具體實例中，適用於本文中描述之方法之寡核苷酸包括反義 bcl-2 寡核苷酸、反義 HIF-1 α 寡核苷酸、反義存活素寡核苷酸及反義 Erb β 3 寡核苷酸。

在一較佳具體實例中，寡核苷酸可為（例如）具有與根納三思（GenaSense）（a/k/a 奧利默森鈉（oblimersen sodium），由 Genta Inc., Berkeley Heights, NJ 製造）相同或實質上類似之核苷酸序列之寡核苷酸。根納三思為與人類 bcl-2 mRNA（人類 bcl-2 mRNA 為業內已知的，且（例如）在美國專利第 6,414,134 號中描述為 SEQ ID NO : 19，該專利案以引用的方式併入本文中）之啟動序列之前六個密碼子互補之 18 聚體硫代磷酸酯反義寡核苷酸 TCTCCAGCGTGCAGCCAT (SEQ ID NO : 4)。美國食品及藥物管理局（U.S. Food and Drug Administration, FDA）在

2000 年 8 月給予根納三思孤兒藥物地位。較佳具體實例包括：

所涵蓋之較佳具體實例包括：

(i) 反義存活素 LNA 寡核苷酸 (SEQ ID NO: 1)

$^mC_s-T_s-^mC_s-A_s-a_s-t_s-c_s-c_s-a_s-t_s-g_s-g_s-^mC_s-A_s-G_s-c$;

其中大寫字母代表 LNA，“s”代表硫代磷酸酯骨架；

(ii) 反義 Bcl2 siRNA :

有義 5'-gcaugcggccucuguuugadTdT-3' (SEQ ID NO: 2)

反義 3'-dTdTcguaacgcccggagacaaacu-5' (SEQ ID NO: 3)

其中 dT 代表 DNA；

(iii) 根納三思 (硫代磷酸酯反義寡核苷酸) : (SEQ ID NO: 4)

$t_s-c_s-t_s-c_s-c_s-c_s-a_s-g_s-c_s-g_s-t_s-g_s-c_s-g_s-c_s-c_s-a_s-t$

其中小寫字母代表 DNA 且 “s” 代表硫代磷酸酯骨架；

(iv) 反義 HIF1 α LNA 寡核苷酸 (SEQ ID NO: 5)

5'-T_sG_sG_sc_sa_sa_sg_sc_sa_st_sc_sc_sT_sG_sT_sa-3'

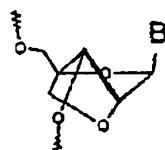
其中大寫字母代表 LNA 且 “s” 代表硫代磷酸酯骨架。

(v) 反義 ErbB3 LNA 寡核苷酸 (SEQ ID NO: 6)

5'-T_sA_sG_sc_sc_st_sg_st_sc_sa_sc_st_st_sC_sT_sC_s-3'

其中大寫字母代表 LNA 且 “s” 代表硫代磷酸酯骨架。

LNA 包括如下所示之 2'-O,4'-C 亞甲基雙環核苷酸：



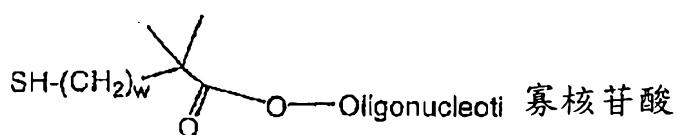
LNA 單體

β -D 構形

參見美國專利申請公開案第 2006/0154888 號及第 2005/0014712 號中所揭示之存活素 LNA 之詳細描述，該等參照案之每一者之內容係以引用的方式併入本文中。參見美國專利申請公開案第 2004/0096848 號及第 2006/0252721 號中所揭示之 HIF-1 α LNA 之詳細描述，該等參照案之每一者之內容全部係以引用的方式併入本文中。亦參見 WO2008/113832，其內容全部以引用的方式併入本文中。

在一特定具體實例中，寡核苷酸包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO 2 及 3、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 及 SEQ ID NO: 6。

在與本文中描述之聚合系統接合之前的寡核苷酸在寡核苷酸之 5' 或 3' 末端包括 $(CH_2)_w$ -硫氫基連結子（硫基寡核苷酸），其中此態樣中之 (w) 為約 1 至約 10 之正整數 (1、2、3、4、5、6、7、8、9、10，且較佳為 4、5、6 或 7)。硫基寡核苷酸具有結構 SH- $(CH_2)_w$ 寡核苷酸。本文中描述之化合物可包括經含有位阻酯之 $(CH_2)_w$ 硫氫基連結子修飾之寡核苷酸。在連接之前，寡核苷酸具有以下結構：



其中 (w) 為約 1 至約 10 之正整數，(例如 3、4、5、

6) 。

參見 WO 2008/034119，其內容以引用的方式併入本文中。聚合化合物可釋放不具有硫醇尾之寡核苷酸。

在一特定具體實例中，siRNA 之有義股之 5' 末端經修飾。舉例而言，聚合接合物中所用之 siRNA 經 5'-C₆-SH 修飾。本發明之一特定具體實例採用具有以下序列之 Bcl2-siRNA：

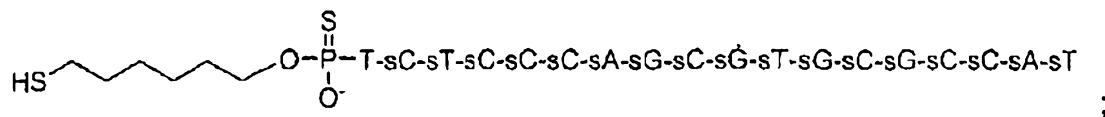
有義 5'-SH-C₆-GCAUGCGGCCUCUGUUUGAdTdT-3'

反義 3'-dTdT CGUACGCCGGAGACAAACU-5'。

經修飾之寡核苷酸之實例包括：

(i) 經 C₆-SH 尾修飾之根納三思：

5'-HS-C₆-s_t_sc_st_sc_sc_sa_sg_sc_sg_st_sg_sc_sg_sc_sc_sa_st-3'



(ii) 經 C₆-SH 尾修飾之反義 HIF1 α LNA：

5'-HS-C₆-s_T_sG_sG_sc_sa_sg_sc_sa_st_sc_sc_sT_sG_sT_sa-3' ;

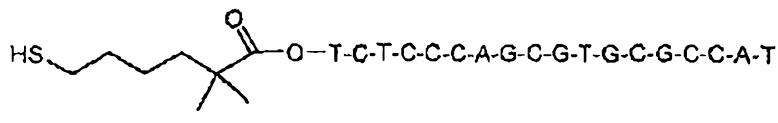
(iii) 經 C₆-SH 尾修飾之反義存活素 LNA

5'-HS-C₆-s^mC_sT_s^mC_sA_sa_st_sc_sc_sa_st_sg_sg_s^mC_sA_sG_sc-3' ;

(iv) 經 C₆-SH 尾修飾之反義 ErbB3 LNA：

5'-HS-C₆-T_sA_sG_sc_st_sg_st_sc_sa_sc_st_sC_sT_sC_s-3' :

(v) 經位阻酯尾修飾之根納三思

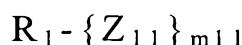


F. 聚合傳遞系統之合成

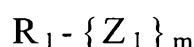
通常，製備本文中描述之化合物之方法包括使經活化聚合物與經 SH 基團修飾之寡核苷酸反應。適用於本文中描述之方法之經活化聚合物包括在遠端含有吡啶基雙硫基之聚合物。該等方法提供聚合接合物，其中生物活性部分經由 -S-S- 鍵與聚合物鍵結。

在本發明之一態樣中，製備本文中描述之聚合化合物之方法包括：

使式 (III) 聚合化合物：



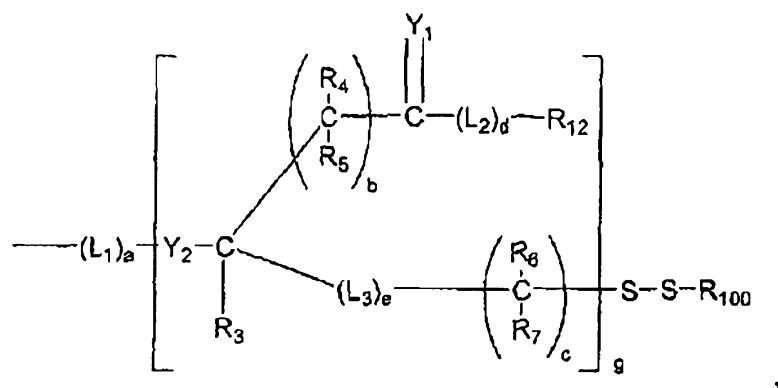
與經含有硫氨基之部分修飾之寡核苷酸在足以形成式 (I) 化合物的條件下反應：



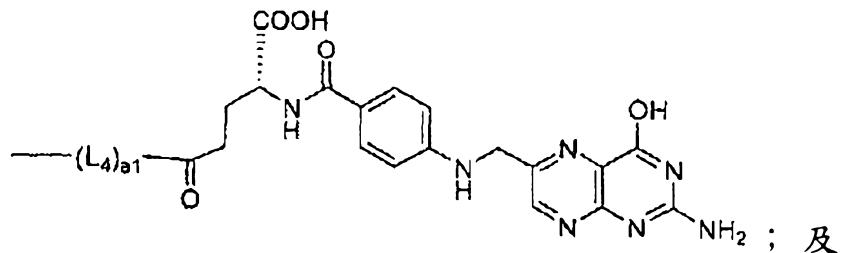
其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_{11} 相同或不同且係選自：



$-(L_4)_{a1}-R_b$, 諸如

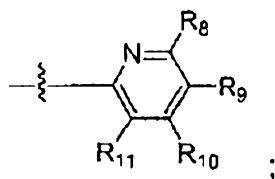


$-(L_4)_{a2}-R_c$,

Y_1 在每次出現時獨立地為 S 或 O，較佳為 O；

Y_2 在每次出現時獨立地為 NR_{13} ，較佳為 NH；

R_{100} 在每次出現時相同或不同且係選自：H、離去基、活化基團，及



L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

R_{8-11} 各自為吸電子基團，諸如經取代之醯胺基、醯基、疊氮基、羧基、烷基氨基羧基、氰基及硝基，且較佳 R_8 為硝基，且 R_9 、 R_{10} 及 R_{11} 為氫；

R_{13} 在每次出現時係獨立地選自由以下各基團組成之群：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{3-8} 環烷基；

R_{12} 在每次出現時係獨立地選自由以下各基團組成之群：氫、羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 0；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 1；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 0；

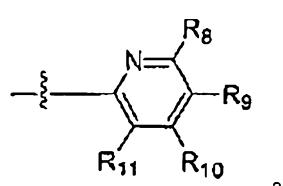
各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 1；

各 (e) 獨立地為 0 或 1，且較佳為 0；

各 (g) 獨立地為 0 或 1，且較佳為 1；且

(m11) 為約 2 至約 32 之正整數（例如 2、4、6、8、16、32），

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0 且限制條件為一或多個 Z_{11} 含有

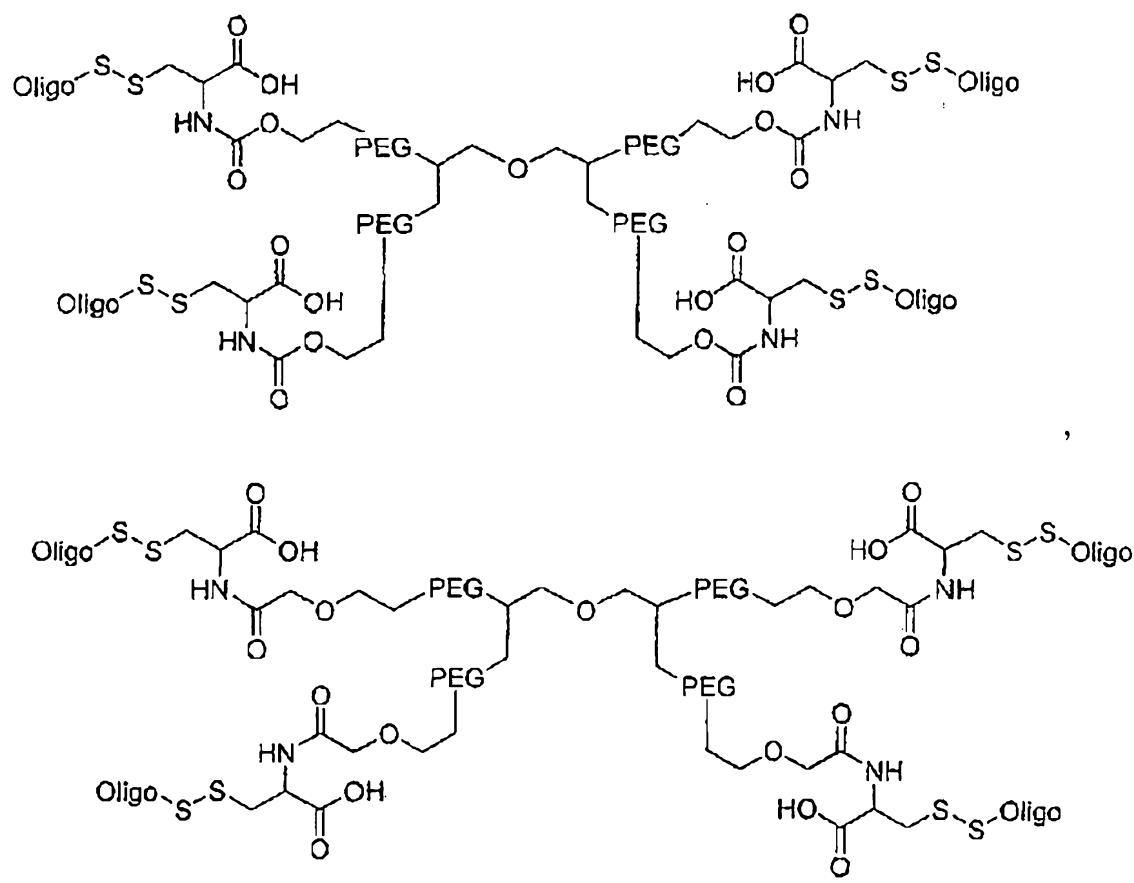


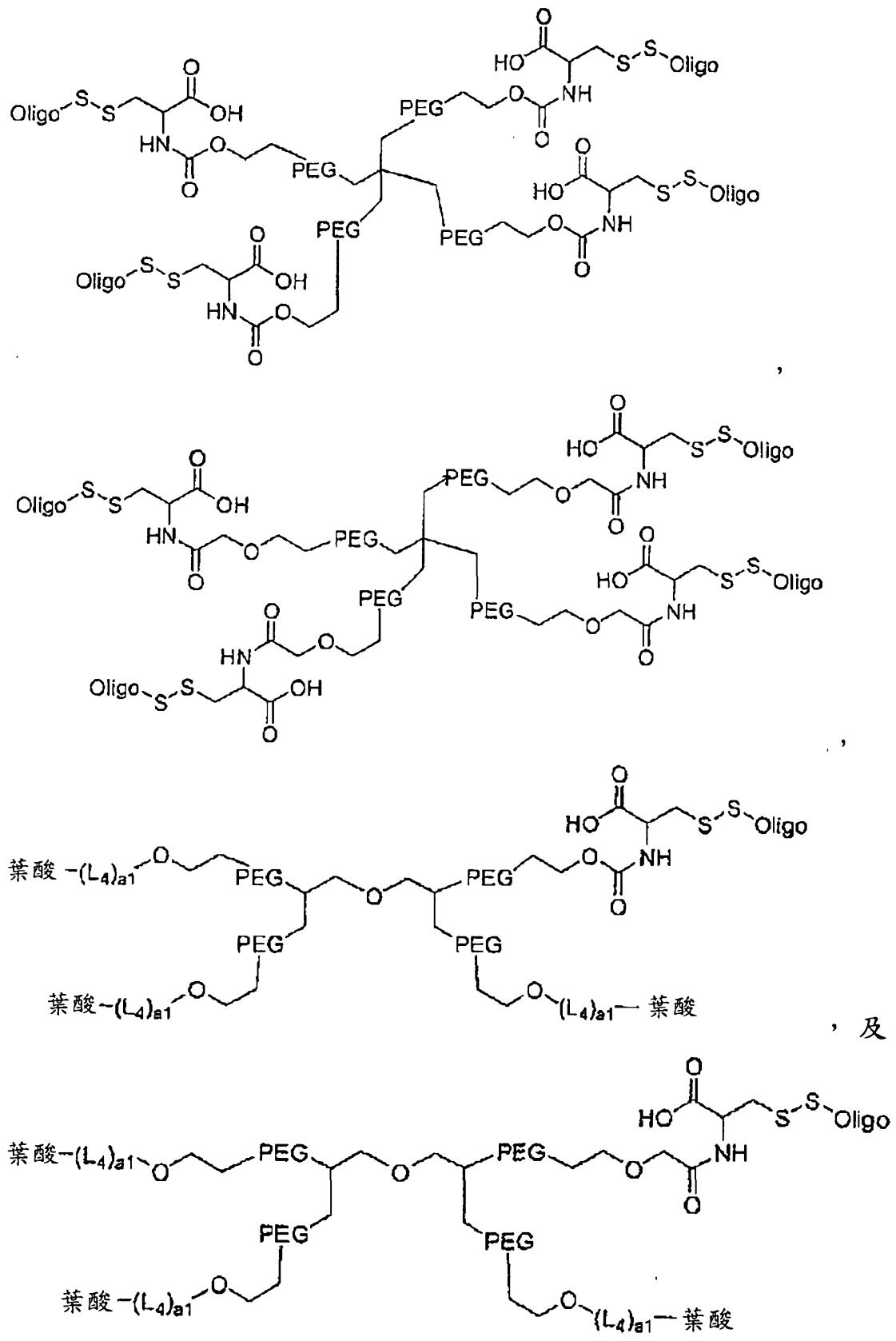
較佳地，反應在惰性溶劑（諸如二氯甲烷、氯仿、DMF 或其混合物）中執行。反應可較佳在鹼（諸如二甲胺基吡啶（DMAP）、二異丙基乙胺、吡啶、三乙胺等）存在下進

行以中和所產生之任何酸。反應可在約 0°C 至約 22°C (室溫) 之溫度下執行。參見 WO/2009/025669 中之詳細描述，其內容以引用的方式併入本文中。

G. 式 (I) 化合物

由本文中描述之方法製備之某些特定具體實例具有以下結構：





其中：

Oligo 為寡核昔酸，較佳為經 C_3, C_6 烷基 (C_6 烷基) 修

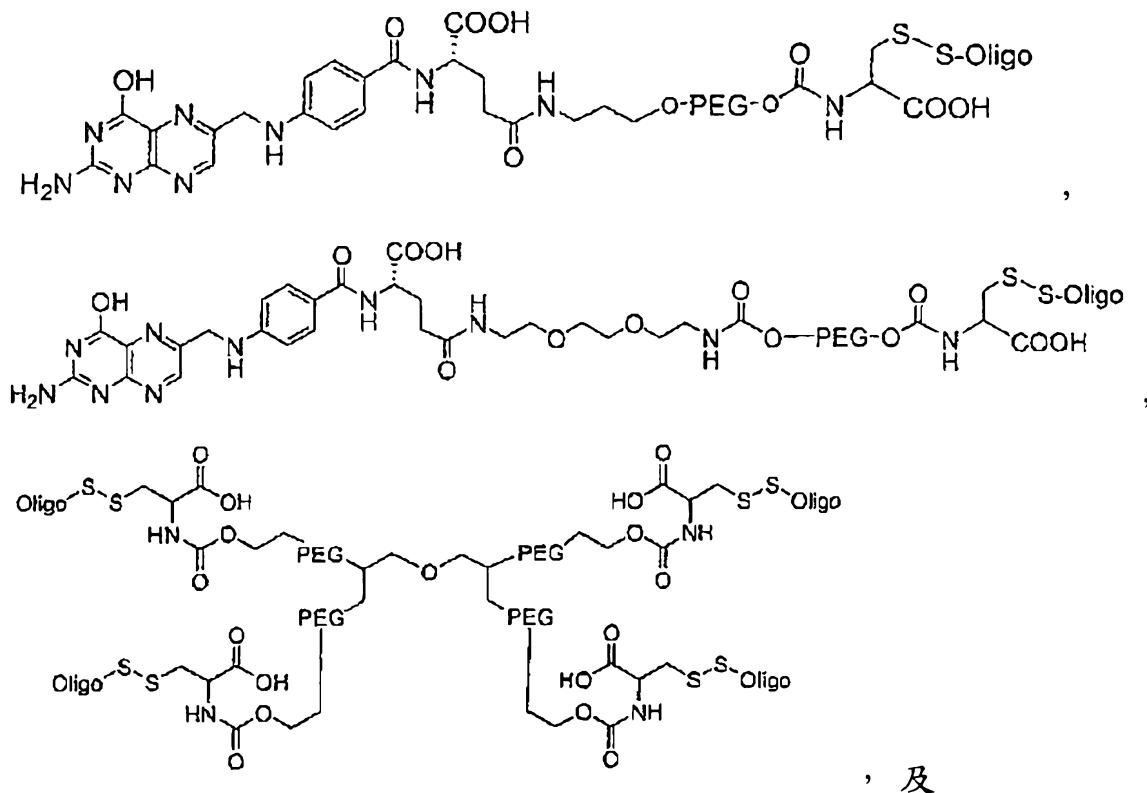
飾之寡核苷酸；

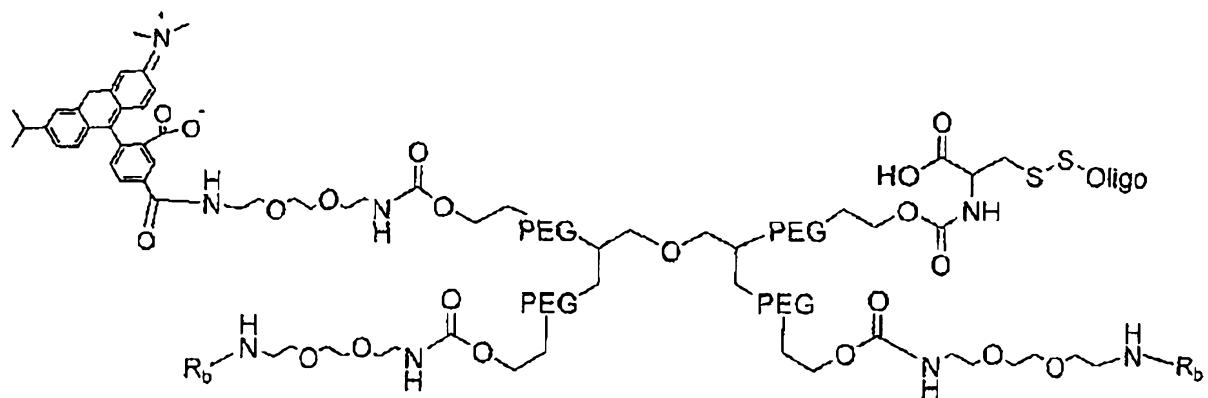
PEG 為聚乙二醇且該化合物之聚合部分具有約 5,000 至約 25,000 道爾頓或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平均分子量；

(a1) 為 1；

L_4 為 $-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}[\text{C}(=\text{O})]_{r'}$ 或 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ，其中 (r') 為 0 或 1；且所有其他變數與以上定義相同。

舉例而言，由本文中描述之方法製備之化合物包括

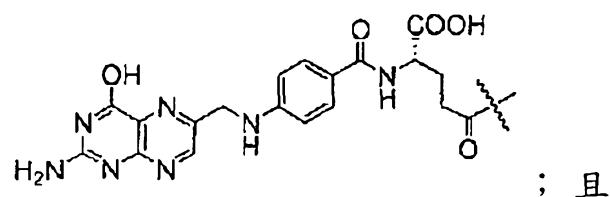




其中

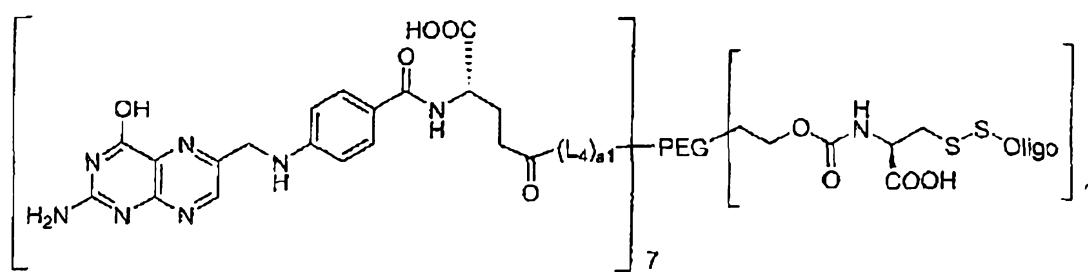
Oligo 為寡核苷酸；

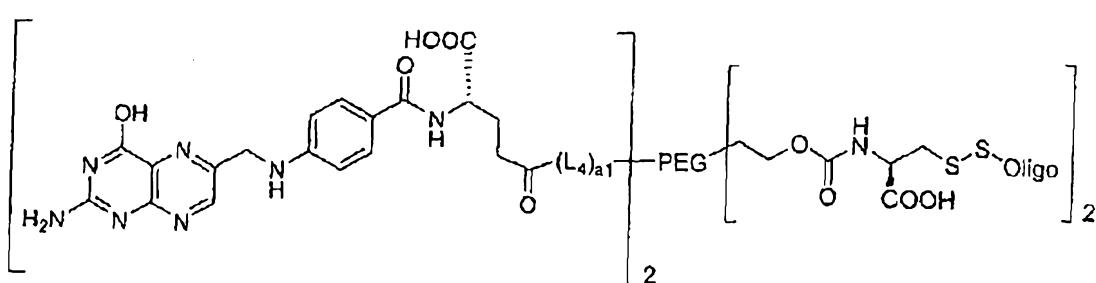
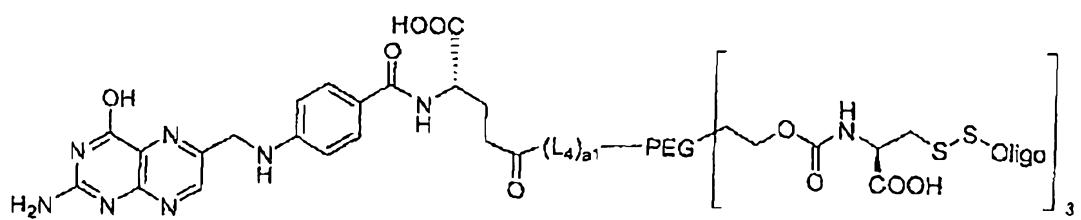
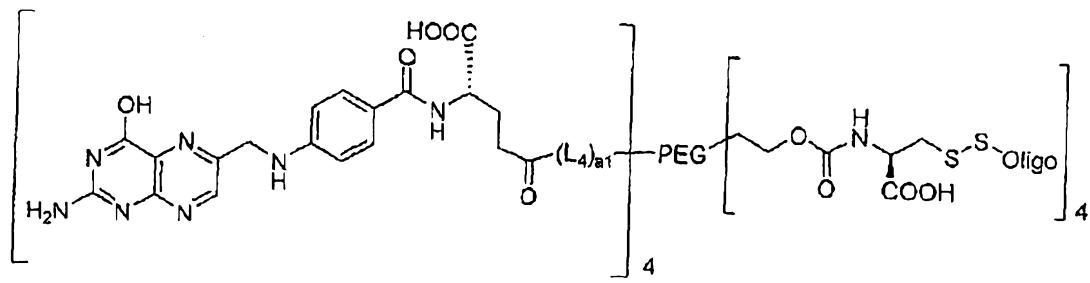
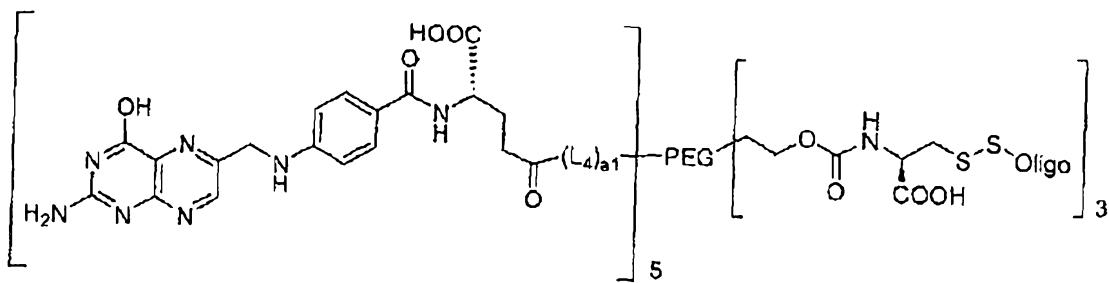
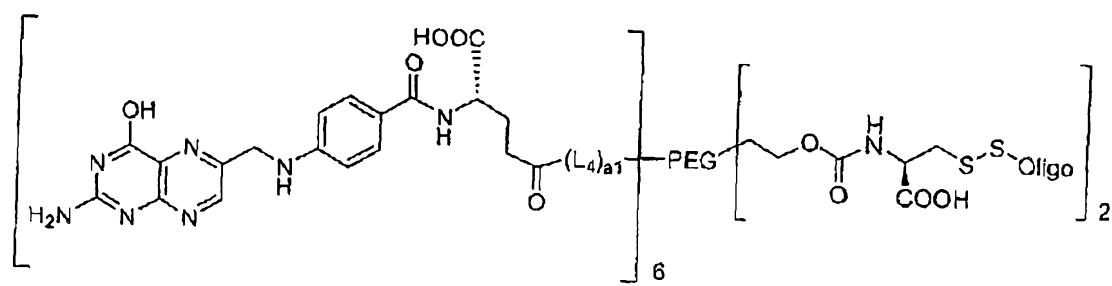
R_b 為



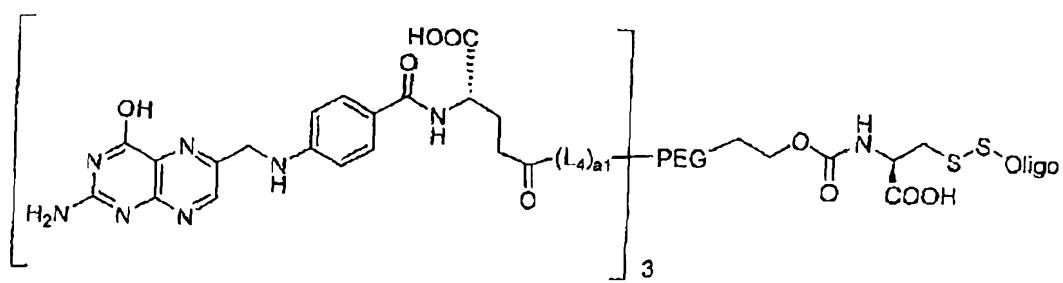
PEG 為聚乙二醇且該化合物之聚合部分具有約 5,000 至約 25,000 道爾頓或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平均分子量。

在另一具體實例中，由本文中描述之方法製備之化合物包括：





及



其中

Oligo 為寡核苷酸，較佳為經 C₃-C₆ 烷基（例如 C₆ 烷基）修飾之寡核苷酸；且

PEG 為聚乙二醇且該化合物之聚合部分具有約 5,000 至約 25,000 道爾頓或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平均分子量。為便於描述且不加限制，多臂 PEG 以“PEG”形式展示。八臂 PEG 之一臂、至多七臂（或四臂 PEG 之至多三臂）可與葉酸接合。

較佳地，化合物包括治療性寡核苷酸，諸如反義 ErbB3 寡核苷酸及反義存活素寡核苷酸。舉例而言，化合物包括如下經 C₆ 尾修飾之反義 LNA：

-5'-(CH₂)₆-TsAsGsCsCsTsGsTsCsAsCsTsTsCsTsCs-3' 或

-5'-(CH₂)₆-GsCsTsGsCsCsAsTsGsGsAsTsTsGsAsG-3'，

其中“s”代表硫代磷酸酯鍵且 5' 及 3' 末端中之前三個核苷酸為 LNA。

較佳地，聚合部分之平均分子量為約 40,000 道爾頓。

H. 治療方法

本發明之一態樣提供將寡核苷酸引入或傳遞至哺乳動物細胞中之方法。本發明之方法包括使細胞與本文中描述之式（I）化合物接觸。

本發明適用於將寡核苷酸引入具有腫瘤細胞之哺乳動物中。本文中描述之化合物可投予哺乳動物，較佳人類。

根據本發明，本發明較佳提供抑制或下調（或調節）哺乳動物細胞或組織中之基因表現的方法。基因表現之下

調或抑制可在活體內及/或試管內達成。該等方法包括使人類細胞或組織與本文中描述之式(I)化合物接觸。一旦發生接觸，則當在活體內或試管內量測時，當與在不存在本文中描述之化合物之治療的情況下所觀察到之 mRNA 或蛋白質含量相比時，若實現至少約 10%、較佳至少約 20%或 20%以上 mRNA 或蛋白質含量降低，則應認為發生對基因表現（諸如 mRNA 或蛋白質含量）之成功抑制或下調。

出於本發明之目的，“抑制”或“下調”應理解為意謂目標基因之表現，或編碼一或多個蛋白質次單元之 RNA 或等效 RNA 之含量，或一或多個蛋白質次單元（諸如 ErbB3）之活性降低至在不存在本文中描述之接合物之治療的情況下所觀察到者以下。

較佳地，在前列腺或子宮頸癌細胞或組織（例如前列腺或子宮頸癌細胞）中目標基因之基因表現受到抑制。

在另一具體實例中，癌細胞或組織可來自以下中之一或更多者：實體腫瘤、淋巴瘤、小細胞肺癌、急性淋巴細胞性白血病（ALL）、胰腺癌、神經膠母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、乳癌、結腸直腸癌、卵巢癌及腦腫瘤等。

在一特定具體實例中，本文中描述之方法之化合物包括（例如）反義 bcl-2 寡核苷酸、反義 HIF-1 α 寡核苷酸、反義存活素寡核苷酸及反義 Erb β 3 寡核苷酸。

較佳地，投藥步驟係經由哺乳動物之血流。

本發明之另一態樣提供治療哺乳動物之各種醫學病狀的方法。該等方法包括向需要該治療之哺乳動物投予有效

量之含有式(I)化合物之醫藥組合物。聚合接合化合物尤其適用於治療包括(但不限於)癌症、發炎性疾病及自體免疫疾病之疾病。

在此態樣中，適用目標基因包括(但不限於)致瘤基因、促血管生成路徑基因、促細胞增生路徑基因、病毒傳染媒介物基因及促發炎路徑基因。

在另一態樣中，亦提供治療患有惡性腫瘤或癌症之患者之方法，其包含向有需要之患者投予有效量之含有式(I)化合物之醫藥組合物。在替代態樣中，所治療之癌症可為以下中之一或多者：實體腫瘤、淋巴瘤、小細胞肺癌、急性淋巴細胞性白血病(ALL)、胰腺癌、神經膠母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、結腸直腸癌等。組合物適用於藉由下調目標基因之基因表現來在哺乳動物中治療贅生性疾病、降低腫瘤負荷、預防贅瘤轉移及預防腫瘤/贅生性生長之復發。

在非接合狀態下具有治療作用之任何寡核苷酸等可以如本文中描述而製得之其接合形式來使用。

在一特定具體實例中，本文中描述之方法包括向哺乳動物細胞投予聚核苷酸(寡核苷酸)，較佳反義寡核苷酸。該等方法包括視聚核苷酸對於所治療之病狀之功效而定，向該等病狀傳遞有效量之如本文中描述製備之接合物。

舉例而言，若非接合寡核苷酸(例如反義ErbB3寡核苷酸、反義存活素寡核苷酸)具有針對某些癌症或贅生性細胞之功效，則該方法包括向對原生寡核苷酸具有感受性之細胞傳遞含有該等寡核苷酸之聚合接合物。傳遞可在活

體內作為適合醫藥組合物之一部分進行或在活體外環境中直接傳遞至細胞。在一特定治療中，可使用包括寡核苷酸 (SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 及 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6) 之聚合接合物。

在另一態樣中，本發明提供活體內或試管內抑制癌細胞之生長或增殖之方法。該等方法包括使癌細胞與本文中描述之化合物接觸。或者，本發明提供藉由向有需要之哺乳動物投予本文中描述之化合物來調節癌細胞之細胞凋亡的方法。

在另一態樣中，亦提供活體內或試管內增加癌細胞或組織對化療劑之敏感性之方法。在一特定態樣中，該等方法包括將本文中描述之寡核苷酸 (反義 LNA) 接合物引入癌細胞以降低癌細胞或組織中之存活素表現，其中反義寡核苷酸與自存活素基因表現之 mRNA 結合且降低存活素基因表現。

在另一態樣中，提供活體內或試管內殺死腫瘤細胞之方法。該等方法包括將本文中描述之化合物引入腫瘤細胞以降低基因表現 (諸如 ErbB3) 及使腫瘤細胞與足以殺死一部分腫瘤細胞之量的至少一種化療劑接觸。因此，所殺死之腫瘤細胞之部分可大於在不存在本文中描述之化合物的情況下由相同量之該化療劑殺死之部分。

在本發明之另一態樣中，化療劑可與採用本文中描述之化合物之方法同時或依序組合使用。本文中描述之化合物可與化療劑同時、在投予化療劑之前或之後投予。因此，

本文中描述之化合物可在化療劑治療期間或之後投予。

I. 醫藥組合物/調配物

包括本文中描述之化合物之醫藥組合物可結合一或多種生理上可接受之載劑（包含賦形劑及助劑）來調配，該等載劑有助於將活性化合物加工為可在醫藥學上使用之製劑。適當調配物視所選投藥途徑而定，亦即是否治療局部或系統性治療。在本發明之許多態樣中，非經腸路徑較佳。

投予含有本文中描述之式（I）化合物之醫藥組合物可經口、經肺、表面（包括表皮、經皮、經眼）及至黏膜（包括陰道及直腸傳遞）或非經腸（包括靜脈內、動脈內、皮下、腹膜內或肌肉內注射或輸液）。在一具體實例中，含有治療性寡核昔酸之化合物係 IV、IP 或以快速注射方式投予。

對於注射（包括（但不限於）靜脈內、肌肉內及皮下注射）而言，本文中描述之化合物可調配於水溶液中、較佳於生理上相容之緩衝液（諸如生理鹽水緩衝液）或極性溶劑（包括（但不限於）吡咯啶酮或二甲亞砜）中。

化合物亦可經調配用於非經腸投藥（例如藉由快速注射或連續輸液）。用於注射之調配物可以單位劑型形式提供（例如於安瓶或多劑量容器中）。適用組合物包括（但不限於）油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液，且可含有佐劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。用於非經腸投藥之醫藥組合物包括活性化合物之水溶性形式（諸如（但不限於）鹽（較佳））之水溶液。另外，活性化合物之懸

浮液可在親脂性媒劑中製備。適合親脂性媒劑包括脂肪油（諸如芝麻油）、合成脂肪酸酯（諸如油酸乙酯及甘油三酯）或物質（諸如脂質體）。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液之黏度之物質，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇或聚葡萄糖。視情況，懸浮液亦可含有適合穩定劑及/或增加化合物溶解性以允許製備高濃度溶液之藥劑。或者，活性成份可呈用於在使用之前與合適媒劑（例如無菌無熱原質水）組合的散劑形式。

對於經口投藥而言，化合物可藉由將活性化合物與在此項技術中熟知之醫藥學上可接受之載劑組合來調配。該等載劑使得本發明化合物能夠調配為用於在患者之飲用水中稀釋之錠劑、丸劑、口含劑、糖衣藥丸、膠囊、液體、凝膠、糖漿、糊劑、漿液、溶液、懸浮液、濃溶液及懸浮液、用於在患者之飲食中稀釋之預混物及其類似物以便由患者經口攝入。可藉由使用固體賦形劑，視情況研磨所得混合物且必要時在添加其他合適助劑後加工顆粒之混合物以獲得錠劑或糖衣藥丸核心來製備經口使用的醫藥製劑。適用賦形劑（尤其）為填充劑，諸如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇；纖維素製劑，例如玉米澱粉、小麥澱粉、稻米澱粉及馬鈴薯澱粉；及其他物質，諸如明膠、黃蓍樹膠、甲基纖維素、羟丙基甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉及/或聚乙烯吡咯啶酮（PVP）。必要時，可添加崩解劑，諸如交聯聚乙烯吡咯啶酮、瓊脂或褐藻酸。亦可使用鹽，諸如海藻酸鈉。

對於吸入投藥而言，本發明化合物可便利地使用加壓包裝或霧化器及適合推進劑以氣溶膠噴霧形式傳遞。

化合物亦可使用（例如）習知栓劑基質（諸如可可脂或其他甘油酯）調配為直腸組合物（諸如栓劑或保留灌腸劑）。

除先前描述之調配物外，化合物亦可調配為儲存物製劑。該等長效調配物可藉由植入（例如皮下或肌肉內）或藉由肌肉內注射投予。本發明化合物可用適合聚合或疏水性物質（例如以具有藥理學上可接受之油之乳液形式）、用離子交換樹脂，或以微溶性衍生物（諸如（但不限於）微溶性鹽）形式調配用於此投藥途徑。

亦可使用其他傳遞系統，諸如脂質體及乳液。

另外，接合物可使用持續釋放系統傳遞，諸如含有治療劑之固體疏水性聚合物之半滲透性基質。各種持續釋放物質已經確立且為熟習此項技術者所熟知。

J. 劑量

治療有效量之確定完全在熟習此項技術者之能力範圍內，尤其根據本文中之揭示內容。

對於本發明之方法中所用之任何接合物，治療有效量可最初由試管內檢定來估算。隨後，劑量可經調配用於動物模型中以獲得包括有效劑量之循環濃度範圍。該等資訊可隨後用以更準確確定適用於患者之劑量。

所投予之組合物（例如用作前藥）之量將取決於其中所包括之母體分子（亦即非接合寡核苷酸之功效）。通常，

治療方法中所用之前藥之量為在哺乳動物中有效達成所需治療結果之量。自然地，各種前藥化合物之劑量在某種程度上視母體化合物（寡核苷酸，諸如 LNA）、活體內水解速率、聚合物分子量等而變化。另外，劑量當然可視劑型及投藥途徑而變化。然而，本文中描述之寡核苷酸接合物通常可以約 1 毫克/公斤/週至約 1 公克/公斤/週、較佳約 1 至約 500 毫克/公斤/週且更佳 1 至約 100 毫克/公斤/週（亦即約 2 至約 60 毫克/公斤/週）範圍內之量投予。以上闡明之範圍為說明性的且熟習此項技術者將基於臨床經驗及治療適應症確定所選前藥之最優給藥。另外，確切調配物、投藥途徑及劑量可由個別醫師鑑於患者之病狀來選擇。另外，本文中描述之化合物之毒性及治療功效可在細胞培養物或實驗動物中使用在此項技術中熟知之方法藉由標準醫藥程序來測定。

或者，每天每公斤體重約 0.1 mg 至約 140 mg 之劑量含量適用於治療以上指示之病狀（每名受檢者每天約 0.5 mg 至約 7 g）。可與載劑物質組合以製造單一劑型之活性成份之量視所治療之宿主及特定投藥模式而變化。單位劑型通常含有約 1 mg 至約 500 mg 之間之活性成份。

在一具體實例中，本發明之治療包括向哺乳動物投予約 2 至約 50 毫克/公斤/劑量（諸如約 5 至約 30 毫克/公斤/劑量）之量的本文中描述之寡核苷酸接合物。

或者，本文中描述之寡核苷酸接合物之傳遞包括在活體內或試管內使約 0.1 至約 1000 nM、較佳約 10 至約 1000

nM 之濃度的寡核苷酸與腫瘤細胞或組織接觸。

組合物可每天投予一次或劃分成多次劑量，其可作為多週治療方案之一部分給予。如一般技術者所瞭解，精確劑量將視病狀之階段及嚴重程度、腫瘤對於聚合物-前藥組合物之感受性及所治療患者之個別特徵而定。

在投予聚合接合物之本發明之所有態樣中，所提及之劑量係以寡核苷酸分子之量而非所投予聚合接合物之量計。預期將給予治療歷時一或多天直至獲得所需臨床結果。投予本發明化合物之確切量、頻率及時段當然視患者之性別、年齡及醫學病狀以及如主治臨床醫師所判定之疾病嚴重程度而變化。

其他態樣包括將本文中描述之本發明化合物與其他抗癌療法組合以達成協同作用或加成益處。

實施例

以下實施例用來提供對本發明之進一步瞭解但不欲以任何方式限制本發明之有效範疇。實施例中引用之粗體數字對應於圖 1-6 中所展示者。

實施例 1. 一般實驗。

所有合成反應在乾燥氮或氬之氣氛下進行。商業試劑在未經進一步純化的情況下使用。所有 PEG 化合物在使用之前在真空中或藉由自甲苯共沸蒸餾來乾燥。除非另有說明，否則使用 Varian Mercury 300 NMR 光譜儀及氘化氯仿作為溶劑，在 300 MHz 下獲得 ^1H NMR 光譜，且在 75.46 MHz 下獲得 ^{13}C NMR 光譜。化學遷移(δ)係以自四甲矽烷(TMS)

低磁場之百萬分率 (ppm) 來報導。

在整個實施例中使用縮寫，諸如 DCM (二氯甲烷)、DIEA (N,N-二異丙基乙胺)、LNA (鎖核酸)、MEM (經改良伊格爾氏培養基 (Modified Eagle's Medium))、TEAA (乙酸四乙銨)、TFA (三氟乙酸) 及 RT-qPCR (反轉錄-定量聚合酶鏈反應)。

實施例 2. 一般 HPLC 方法。

反應混合物及中間物及最終產物之純度係藉由 Beckman Coulter System Gold® HPLC 儀器來監測。其採用使用流動速率為 1 毫升/分鐘的於 0.05% TFA 中之 10-90% 乙腈梯度或流動速率為 1 毫升/分鐘的於 50 mM TEAA 緩衝液中之 25-35% 乙腈梯度的具有 168 二極體陣列 UV 偵測器之 ZORBAX® 300SB C8 逆相管柱 (150×4.6 mm) 或 Phenomenex Jupiter® 300A C18 逆相管柱 (150×4.6 mm)。陰離子交換層析係在來自 GE healthcare 之 AKTA 探測器 100A (Amersham Biosciences) 上、使用封裝於來自 Waters 之 AP-Empty 玻璃管柱中之來自 Applied Biosystems 之 Poros 50HQ 強陰離子交換樹脂來進行。藉由使用來自 Amersham Biosciences 之 HiPrep 26/10 脫鹽管柱達成脫鹽。

實施例 3. 一般 mRNA 下調程序。

將細胞維持於完全培養基 (F-12K 或 DMEM，補充有 10% FBS) 中。在 37°C 下培育每一孔中含有 2.5×10^3 個細胞之 12 孔板隔夜。將細胞以 Opti-MEM® 洗滌一次且每一孔添加 400 μ L Opti-MEM®。隨後向每一孔中添加含有寡核苷

酸之聚合接合物之溶液。培育細胞 4 小時，接著每孔添加 600 μ L 培養基，且培育 24 小時。處理 24 小時之後，藉由 RT-qPCR 量化目標基因（諸如人類存活素）及管家基因（諸如 GAPDH）之細胞內 mRNA 含量。比較相對於 GAPDH 之表現含量正規化之 mRNA 之表現含量。

實施例 4.一般 RNA 製備程序。

對於試管內 mRNA 下調研究而言，使用 RNAqueous 套組[®] (Ambion) 、遵循製造商之說明來製備總 RNA。RNA 濃度係使用 Nanodrop 藉由 OD₂₆₀ 來測定。

實施例 5.一般 RT-qPCR 程序。

所有試劑來自 Applied Biosystems：高容量 cDNA 反轉錄套組[®] (4368813) 、20 \times PCR 母體混合物 (4304437) 及用於人類 GAPDH 及存活素之 TaqMan[®] 基因表現檢定套組。對於最終體積為 50 μ L 之 cDNA 合成使用 2.0 μ g 總 RNA。反應在 PCR 溫度循環器中、在 25°C 下進行 10 分鐘，在 37°C 下進行 120 分鐘，在 85°C 下進行 5 秒且隨後在 4°C 下儲存。即時 PCR 以 50°C -2 分鐘、95°C -10 分鐘及 95°C -15 秒 / 60°C -1 分鐘層進行 40 個循環。對於每一 qPCR 反應，在 30 μ L 之最終體積中使用 1 μ L cDNA。

實施例 6.寡核苷酸 PEG 化之一般程序

將經活化 PEG (0.35 mmol，約 10-30 eq) 及寡核苷酸 (0.03 mmol，約 1 eq) 於 PBS 緩衝液 (約 5 mL / 100 mg PEG, pH 7.4) 中之溶液在室溫下攪拌且藉由 HPLC 監測反應進程。將反應稀釋於 Milli-Q 水 (25 mL) 中且使用 HQ/10 Poros

強陰離子交換管柱加以純化（例如在裝載之前以 100 mM TEAA 平衡之 Source 15RPC 管柱，30 mm×60 mm，床體積為約 6 mL）。將溶離份使用 1M NaCl、水及 50% CH₃CN 溶離。彙集含有純產物之溶離份且凍乾以產生純 PEG-Oligo。使用 MALDI 來證實產物之分子量。

實施例 7. 製備化合物 1（葉酸 NHS）。

在 DCC 存在下，使葉酸與 NHS 偶合以提供 NHS 酯（化合物 1）。

實施例 8. 製備化合物 3。

在 EDC 存在下，使異質雙功能胺基酸 PEG（化合物 2）與 NHS 偶合以提供 NHS 酯（化合物 3）。

實施例 9. 製備化合物 5

將 4N HCl 於二噁烷（70 mL）中之溶液添加至 BocCys(Npys)-OH（化合物 4，5 g，13.32 mmol）中。在室溫下攪拌懸浮液 3 小時，且隨後傾入 700 mL 乙醚中。在不施加真空的情況下，經由循行燒結漏斗過濾固體直至結束。將濾餅以乙醚洗滌（3×50 mL）且隨後在真空下、在室溫下乾燥隔夜。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.93 (1H, dd, J = 1.5, 4.7 Hz), 8.66 (1H, dd, J = 1.5, 8.20 Hz), 7.59 (1H, dd, J = 4.7, 8.2 Hz), 4.24 (1H, dd, J = 4.1, 9.4 Hz), 3.58 (1H, dd, J = 4.1, 14.9 Hz), 3.36 (1H, dd, J = 9.4, 15.2 Hz). ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 169.40, 156.27, 154.64, 144.13, 135.246, 123.10, 52.77, 39.27。

實施例 10. 製備化合物 6。

將化合物 3 (0.35 mmol) 添加至化合物 5 (相對於待經取代之每一 NHS, 2 當量) 於 DMF/DCM (25 mL/45 mL) 中之溶液中，接著添加 DIEA (相對於每一化合物 5, 3 當量)。於室溫下攪拌懸浮液 5 小時。將反應混合物在真空下蒸發且隨後在 0°C 下以 DCM/Et₂O 沈澱。過濾固體且隨後溶解於 80 mL DCM 中。添加 20mL 0.1N HCl 之後，攪拌混合物 5 分鐘，隨後轉移至分液漏斗且將有機層分離且再次以 0.1N HCl (20 mL) 及食鹽水 (20 mL) 洗滌。將有機層經 MgSO₄ 乾燥，過濾且在真空下蒸發。在 0°C 下，以 DCM/Et₂O 使殘餘物沈澱。過濾固體且在 30°C 下、在真空烘箱中乾燥至少 2 小時以得到化合物 14。

實施例 11. 製備化合物 7。

在 0°C 下，向化合物 6 於 DCM (10 mL/g 化合物 6) 中之溶液中添加 16 mL TFA (2.5 mL/g 化合物 6)。在 0°C 至室溫下攪拌反應混合物 1 小時。完成反應之後，在真空中移除溶劑且在 0°C 下，使殘餘物自 20 mL/300 mL/g 化合物 6 之 DCM/Et₂O 中沈澱。過濾固體且乾燥以得到化合物 7。

實施例 12. 製備化合物 8。

將化合物 1 於 DMSO 中之溶液添加至化合物 7 於 DCM 中之溶液中。攪拌反應混合物且粗產物沈澱於 DCM/乙醚中。過濾固體且在真空中乾燥以得到化合物 8。

實施例 13. 製備化合物 10。

在實施例 6 中描述之條件下，使化合物 8 與寡核苷酸 (化合物 9, HS-5'-(CH₂)₆-寡核苷酸) 反應以得到化合物 10。

實施例 14. 製備化合物 12。

將化合物 11 (雙 SC-PEG, 0.35 mmol) 添加至化合物 5 (相對於待經取代之每一 NHS, 2 當量) 於 DMF/DCM (25 mL/45 mL) 中之溶液中，接著添加 DIEA (相對於每一化合物 5, 3 當量)。於室溫下攪拌懸浮液 5 小時。在真空下蒸發反應混合物且隨後在 0°C 下以 DCM/Et₂O 沈澱。過濾固體且隨後溶解於 80 mL DCM 中。添加 20 mL 0.1N HCl 之後，攪拌混合物 5 分鐘，隨後轉移至分液漏斗且將有機層分離且再次以 0.1N HCl (20 mL) 及食鹽水 (20 mL) 洗滌。將有機層經 MgSO₄ 乾燥，過濾且在真空下蒸發。在 0°C 下，以 DCM/Et₂O 使殘餘物沈澱。過濾固體且在 30°C 下、在真空烘箱中乾燥至少 2 小時以得到化合物 12。

實施例 15. 製備化合物 14。

在 DCM 中在作為鹼之 DIEA 存在下，使化合物 13 與化合物 12 反應以得到化合物 14。

實施例 16. 製備化合物 15。

將化合物 14 以於 DCM 中之 TFA 處理以得到化合物 15。

實施例 17. 製備化合物 16。

將化合物 1 於 DMSO 中之溶液添加至化合物 15 於 DCM 中之溶液中。攪拌反應混合物且粗產物沈澱於 DCM/乙醚中。過濾固體且在真空中乾燥以得到化合物 16。

實施例 18. 製備化合物 18。

在實施例 6 中描述之條件下，使化合物 16 與寡核苷酸 (化合物 17, HS-5'-(CH₂)₆-寡核苷酸) 反應以得到化合物

18。

實施例 19. 製備化合物 20 ((SC)₃-PEG-Cys-SS-NPyS) 。

將化合物 19 (4 臂 SC-^{20K}PEG, 0.35 mmol) 添加至化合物 5 (相對於待經取代之每一 NHS, 2 當量) 於 DMF/DCM (25 mL/45 mL) 中之溶液中，接著添加 DIEA (相對於每一化合物 5, 3 當量)。於室溫下攪拌懸浮液 5 小時。在真空中蒸發反應混合物且隨後在 0°C 下以 DCM/Et₂O 沈澱。過濾固體且隨後溶解於 80 mL DCM 中。添加 20 mL 0.1N HCl 之後，攪拌混合物 5 分鐘，隨後轉移至分液漏斗且將有機層分離且再次以 0.1N HCl (20 mL) 及食鹽水 (20 mL) 洗滌。將有機層經 MgSO₄ 乾燥，過濾且在真空中蒸發。在 0 °C 下，以 DCM/Et₂O 使殘餘物沈澱。過濾固體且在 30°C 下、在真空烘箱中乾燥至少 2 小時以得到化合物 20。

實施例 20. 製備化合物 21 ((BocNH 延伸)₃-PEG-Cys-SS-NPyS) 。

在 DCM 中在作為鹼之 DIEA 存在下，使化合物 20 與化合物 13 反應以得到化合物 21。

實施例 21. 製備化合物 22 ((NH 延伸)₃-PEG-Cys-SS-NPyS) 。

將化合物 21 以於 DCM 中之 TFA 處理以得到化合物 22。

實施例 22. 製備化合物 23 ((葉酸-NH 延伸)₃-PEG-Cys-SS-NPyS) 。

將化合物 1 於 DMSO 中之溶液添加至化合物 22 於 DCM 中之溶液中。攪拌反應混合物且粗產物沈澱於 DCM/乙醚

中。過濾固體且在真空中乾燥以得到化合物 23。

**實 施 例 23. 製 備 化 合 物 25 ((葉 酸 -NH 延
伸)₃-^{20K}PEG-Cys-SS-C₆-Oligo) 。**

將(葉酸)₃-^{20K}PEG-NPyS(化合物 23, 120 mg, 5.50 μ mol)溶解於 pH 6.5 磷酸鹽緩衝液(3-4 mL)中，以箔覆蓋且以氮氣淨化 10 分鐘。向此溶液中添加寡核苷酸(化合物 24，例如反義 ErbB3 LNA 寡核苷酸，6.0 mg, 1.10 μ mol)且在環境溫度下攪拌所得橙黃色混合物約 2 小時，在此時間期間溶液顏色變為深黃色。此時後，使用 0.45 μ m 注射過濾器過濾溶液且使其裝載於以 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)(緩衝液 A)預平衡之 Poros HQ 強陰離子交換管柱(10 cm \times 1.0 cm，床體積為約 8 mL)上。將管柱以 3-4 管柱體積之緩衝液 A 洗滌以移除過量 PEG 連結子。藉由於 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)(緩衝液 B)中之 1M NaCl 之緩慢遞增梯度溶離產物。合併經分離溶離份且經由逆相層析(Source RPC)使其脫鹽且凍乾所得溶液以產生呈蓬鬆黃色固體狀之所需 PEG-LNA 化合物(4.62 mg, 以 Oligo 計, 77.0%)。

**實 施 例 24. 製 備 化 合 物 26 ((葉 酸 -NH 延
伸)₃-^{40K}PEG-Cys-SS-C₆-Oligo-FAM) 。**

將(葉酸)₃-^{40K}PEG-NPyS(0.35 g, 8.33 μ mol)溶解於 pH 6.5 磷酸鹽緩衝液(5 mL)中，以箔覆蓋且以氮氣淨化 10 分鐘。向此溶液中添加經 FAM 修飾之寡核苷酸(經 FAM 修飾之化合物 24, 10.0 mg, 1.67 μ mol)且在環境溫度下

攪拌所得橙黃色混合物約 3 小時，在此時間期間溶液顏色變為深黃色。此時間後，使用 $0.45 \mu\text{m}$ 注射過濾器過濾溶液且使其裝載於以 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) (緩衝液 A) 預平衡之 Poros HQ 強陰離子交換管柱 (10 cm \times 1.0 cm，床體積為約 8 mL) 上。將管柱以 3-4 管柱體積之緩衝液 A 洗滌以移除過量 PEG 連結子。藉由於 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) (緩衝液 B) 中之 1M NaCl 之緩慢遞增梯度溶離產物。合併經分離溶離份且經由逆相層析 (Source RPC) 使其脫鹽且凍乾所得溶液以產生呈蓬鬆黃色固體狀之所需 PEG-LNA 化合物 (3.33 mg，以 Oligo 計，33.3 %)。

實施例 25. 製備化合物 28。

使化合物 22 與化合物 TAMRA-C(=O)-OSu (化合物 27) 反應以得到化合物 28。

實施例 26. 製備化合物 29。

將化合物 1 於 DMSO 中之溶液添加至化合物 29 於 DCM 中之溶液中。攪拌反應混合物且粗產物沈澱於 DCM/乙醚中。過濾固體且在真空中乾燥以得到化合物 29。

實施例 27. 製備化合物 31 (葉酸)₂-TAMRA-^{20K}PEG-Cys-SS-C₆-Oligo。

在實施例 6 中描述之條件下，使化合物 29 與寡核苷酸 (化合物 30) 反應以得到化合物 31。

實施例 28. 製備化合物 33。

將化合物 32 (4 臂 SC-^{20K}PEG，0.35 mmol) 添加至化合物 5 (相對於待經取代之每一 NHS，2 當量) 於 DMF/DCM

(25 mL/45 mL) 中之溶液，接著添加 DIEA (相對於每一化合物 5, 3 當量)。於室溫下攪拌懸浮液 5 小時。在真空下蒸發反應混合物且隨後在 0°C 下以 DCM/Et₂O 沈澱。過濾固體且隨後溶解於 80 mL DCM 中。添加 20 mL 0.1N HCl 之後，攪拌混合物 5 分鐘，隨後轉移至分液漏斗且將有機層分離且再次以 0.1N HCl (20 mL) 及食鹽水 (20 mL) 洗滌。將有機層經 MgSO₄ 乾燥，過濾且在真空下蒸發。在 0 °C 下，以 DCM/Et₂O 使殘餘物沈澱。過濾固體且在 30 °C 下、在真空烘箱中乾燥至少 2 小時。¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 170.90, 156.66, 155.68, 153.86, 142.41, 133.85, 121.24, 72.96-69.30, 64.08, 53.01, 41.82。

實施例 29. 製備化合物 35。

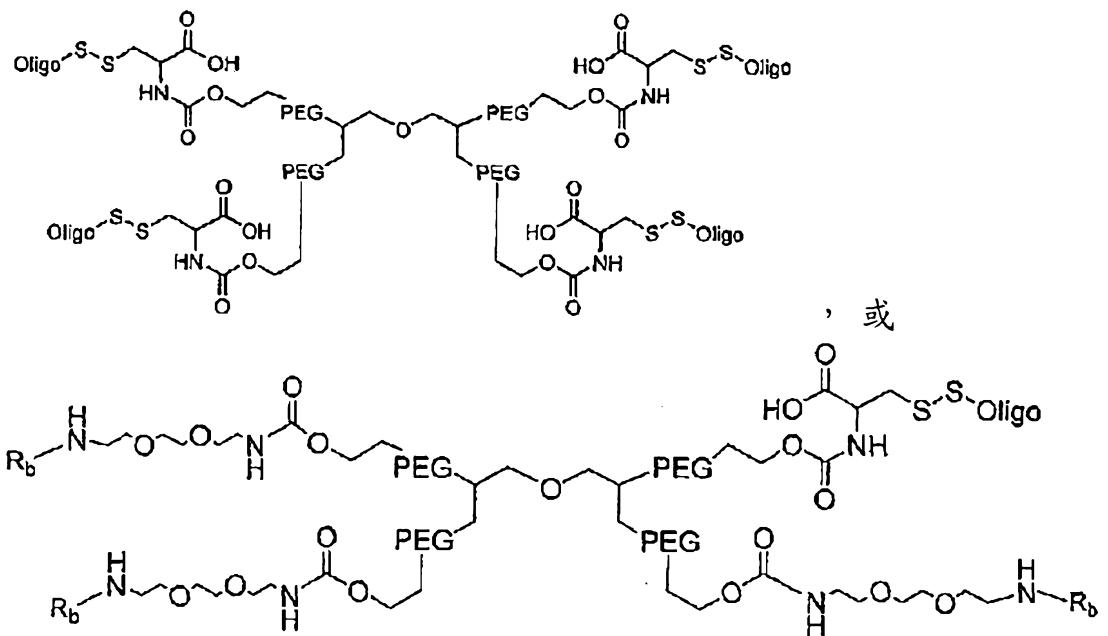
使用不同尺寸的經活化 PEG 聚合物來製備 PEG-LNA 接合物。通常，使用實施例 6 中描述之條件使化合物 33 與寡核苷酸 (化合物 34) 反應。每一化合物之描述提供於圖 6 中。將寡核苷酸 (化合物 34, 400 mg, 0.074 mmol) 添加至化合物 33 (505 mg, 0.012 mmol) 於 25 mL pH 6.5、100 mM 磷酸鈉中之溶液中。在氮氣下、於室溫下攪拌反應 5 小時。以 Source 15RPC 管柱純化反應混合物。以 100 mM TEAA 平衡管柱。隨後裝載反應混合物。以 1M NaCl、水及 50% CH₃CN 溶離管柱。收集化合物 35 且凍乾。產量 150 mg。MALDI 證實 62,590 之分子量。

實施例 30.式 (I) 化合物

實施例 31-36 證明使用可釋放地連結之具有下式之

PEG 分子改良寡核苷酸之腫瘤傳遞以及改良目標腫瘤 mRNA 之反義敲除。

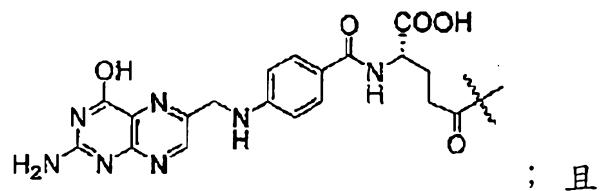
置換頁



其中

PEG 為聚乙二醇；

R_b 為



Oligo 統一地為 5'-(CH₂)₆-抗-存活素 LNA(SEQ ID NO: 1, 稱為 “LNA1”) 或 5'-(CH₂)₆-抗-erbB3 LNA(SEQ ID NO: 6, 稱為 “LNA2”) , 且

含有 PEG 之化合物之聚合部分之總分子量為約 40,000 道爾頓、20,000 道爾頓、10,000 道爾頓或 5,000 道爾頓。

舉例而言，化合物包括葉酸-^{40K}PEG-Cys-SS-LNA2 (化合物 101)、葉酸-^{5K}PEG-Cys-SS-LNA2 (化合物 102)、^{40K}PEG-Cys-SS-LNA1 (化合物 103)、^{10K}PEG-Cys-SS-LNA1 (化合物 4) 及 ^{40K}PEG-Cys-SS-LNA2 (化合物 105)。

實施例 31. 試管內穩定性

本文中描述之 PEG-Cys-SS-LNA 及葉酸-PEG-Cys-SS-LNA 接合物在緩衝液中展示良好穩定性。

置換頁

實施例 32. 葉酸-PEG-Cys-SS-LNA 接合物之試管內細胞吸收

葉酸-PEG-Cys-SS-LNA 接合物之細胞吸收及與葉酸受體結合之特異性係在 KB 人類宮頸癌細胞株中評價。在 37 °C 下塗鋪 KB 細胞隔夜。在 37 °C 下，在存在或不存在 1 μM 游離葉酸之情況下，將細胞與 100 nM 葉酸-PEG-Cys-SS-LNA2-FAM 接合物 (經 FAM 標記之化合物 101 及 102) 一起培育 24 小時。PEG-Cys-SS-LNA2-FAM 接合物之量係以 LNA2 之量、而非聚合接合物之量計。洗滌細胞且在螢光顯微鏡及共焦顯微鏡下觀察樣本。葉酸-PEG-Cys-SS-LNA 接合物之細胞吸收之結果展示於圖 7 中。

在 37 °C 下、在存在或不存在 100 nM 游離葉酸之情況下，亦使 KB 細胞暴露於葉酸-^{5K}PEG-Cys-SS-LNA2-FAM (經 FAM 標記之化合物 102) 4 小時。洗滌細胞且藉由 FACS 分

析其結合特異性。結果展示於圖 8 中。

螢光及共焦顯微鏡研究均展示葉酸改良 LNA 寡核苷酸之細胞吸收。葉酸-PEG 接合物之細胞內傳遞可與經脂質體轉染試劑 (lipofectamine) 轉染之彼細胞內傳遞相比。葉酸增強寡核苷酸之細胞內吸收。

螢光顯微鏡影像 (圖 7(a)) 及 FACS 分析 (圖 8) 展示葉酸-PEG 接合物與葉酸受體之結合及隨後至 KB 細胞中之內化作用在游離葉酸之存在下被阻斷。在 KB 細胞中，葉酸-PEG 接合物與葉酸受體之結合為特異性的。

實施例 33. 腫瘤細胞中 PEG-Cys-SS-LNA 接合物之試管內功效

藉由使用 qRT-PCR 來執行 PEG-Cys-SS-LNA 接合物及裸 LNA 寡核苷酸之試管內功效。將 15PC3 人類前列腺癌細胞以 0.1 nM 至 1,000 nM 之每一測試化合物、裸 LNA2 或 ⁴⁰K⁺PEG-Cys-SS-LNA2 (化合物 105) 處理。所投予 ⁴⁰K⁺PEG-Cys-SS-LNA2 之量係以 LNA2 之量、而非所投予聚接合物之量計。收集細胞且藉由使用 qRT-PCR 分析其 ErbB3 mRNA 下調。將 qRT-PCR 之結果與在存在或不存在脂質體轉染試劑之情況下未經處理的 15PC3 細胞相比較。結果展示於圖 9 中。結果展示 PEG-Cys-SS-LNA2 接合物下調目標基因 ErbB3 mRNA 之表現且功效可與裸 LNA2 相比。在 15PC3 細胞中，PEG-Cys-SS-LNA2 接合物之 ErbB3 mRNA 表現之敲除與相等裸 LNA2 一樣有效 (IC_{50} 分別等於 5 nM 及 8.5 nM)。與 LNA 寡核苷酸連接之 PEG 不干擾 LNA

寡核苷酸之效能。

實施例 34. 葉酸-PEG-Cys-SS-LNA 接合物在 KB 異種移植小鼠模型中之活體內功效

葉酸-PEG-LNA 接合物之功效係在 KB 人類子宮頸癌異種移植小鼠中評價。將帶有 KB 腫瘤（表皮樣瘤，人類宮頸癌細胞株）之無胸腺裸 Balb/c 小鼠於 q3dx4 以 35 mg/kg 劑量之裸 LNA2 或葉酸-^{40K}PEG-Cys-SS-LNA2、^{40K}PEG-LNA2、葉酸-^{5K}PEG-LNA2 或^{5K}PEG-LNA2 接合物處理 32 天。所投予 PEG 接合物之量係以 LNA2 之量、而非所投予聚合接合物之量計。分離腫瘤及肝臟樣本且藉由使用 qRT-PCR 分析其 ErbB3 mRNA 下調。

結果如圖 10 (A) 及 (B) 中所示。與裸 LNA2 相比，葉酸-PEG 接合物顯著抑制腫瘤組織中 ErbB3 mRNA 之表現。另外，與 5K 葉酸-PEG-LNA 接合物相比，40K 葉酸-PEG-LNA 接合物下調目標 mRNA。結果展示與裸 LNA 寡核苷酸相比，PEG 化增加 LNA 寡核苷酸在腫瘤中之積累且葉酸-PEG 接合物增強 mRNA 下調。

實施例 35. PEG-Cys-SS-LNA 在腫瘤及血漿中之生物分布

PEG-Cys-SS-LNA 接合物在血漿中之循環及在腫瘤中之滯留係在 A549 人類長腺癌異種移植小鼠中評價。

將 A549 (人類肺腺癌上皮細胞株) 細胞皮下植入無胸腺裸小鼠中。當腫瘤達到 75 mm³ 之平均體積時，將小鼠隨機分組且以 10 mg/kg 之單次劑量之裸 LNA1、

40K PEG-Cys-SSLNA1 (化合物 103, 10 mg/kg 等效劑量之 LNA 1) 或 10K PEG-Cys-SS-LNA1 (化合物 104, 10 mg/kg 等效劑量之 LNA 1) 靜脈內注射。在處理後 2 小時及 4 小時時點收集血漿樣本。在處理後不同時點 (2、4、12、24、48 及 72 小時) 自處死動物收集腫瘤組織。腫瘤或血漿樣本中之等效 LNA1 寡核苷酸之濃度藉由 ELISA 雜交檢定來量測。結果展示於圖 11 (A) 及 (B) 中。

結果展示與裸 LNA 寡核苷酸相比, 40K PEG-Cys-SS-LNA 接合物於血漿中具有顯著較高之循環且於腫瘤中具有顯著較高之積累。與裸 LNA 寡核苷酸相比, 以 PEG-Cys-SS-LNA 接合物處理之小鼠在處理後 2 小時及 4 小時在血漿中大於 50 倍之循環 LNA 寡核苷酸濃度。與裸 LNA 寡核苷酸相比, PEG-Cys-SS-LNA 接合物具有較高血漿濃度及較長循環時間。與裸 LNA 寡核苷酸相比, 以 PEG 接合物處理之小鼠在第 24 小時在腫瘤中具有高 3 倍之 LNA 寡核苷酸積累。結果亦指示與 10K PEG 接合物相比, 40K PEG 接合物在第 12 小時具有大於 3.5 倍之腫瘤積累且直至第 72 小時積累保持 ≥ 1.5 倍。結果指示較高分子量 PEG (40KDa) 接合物具有比較低 MW PEG (10KDa) PEG 接合物高的腫瘤積累。

實施例 36. PEG-Cys-SS-LNA 接合物在 KB 異種移植小鼠模型中之活體內功效

PEG-LNA 接合物之功效係在 KB 人類子宮頸癌異種移植小鼠中評價。將 KB 細胞 (表皮樣瘤, 人類宮頸癌細胞株) 皮下植入裸小鼠中。當腫瘤達到 75 mm^3 之平均體積時, 將

小鼠隨機分組且於 q3dx4 以 10 mg/kg 之單次劑量之裸 LNA2 或 ^{40K}PEG-Cys-SS LNA2 (化合物 105, 10 mg/kg 等效劑量之 LNA2) 靜脈內注射。最後劑量之後 24 小時收集腫瘤及肝臟樣本。藉由使用 qRT-PCR 量測樣本中之 ErbB3 mRNA 下調。結果展示於圖 12 中。

結果展示與裸 LNA 寡核苷酸相比，PEG-Cys-SS-LNA 接合物顯著抑制腫瘤中 ErbB3 mRNA 之表現。以 PEG 接合物處理之小鼠相比於以裸 LNA 處理之小鼠對 ErbB3 mRNA 表現之抑制高 2 倍。另外，與裸 LNA 寡核苷酸之 88% 相比，PEG 接合物抑制肝臟中 92% 之 ErbB3 mRNA 表現。

實施例 37. PEG-Cys-SS-LNA 接合物在 15PC3 異種移植小鼠模型中之活體內功效

PEG-LNA 接合物之功效係在 15PC3 人類前列腺癌異種移植小鼠中評價。將 15PC3 細胞 (人類前列腺癌細胞株) 皮下植入裸小鼠中。當腫瘤達到 75 mm³ 之平均體積時，將小鼠隨機分組且於 q3dx4 以 10 mg/kg 之單次劑量之裸 LNA2 或 ^{40K}PEG-Cys-SS LNA2 (化合物 105, 10 mg/kg 等效劑量之 LNA2) 靜脈內注射。最後劑量之後 24 小時收集腫瘤及肝臟樣本。藉由使用 qRT-PCR 量測樣本中之 ErbB3 mRNA 下調。結果展示於圖 13 中。

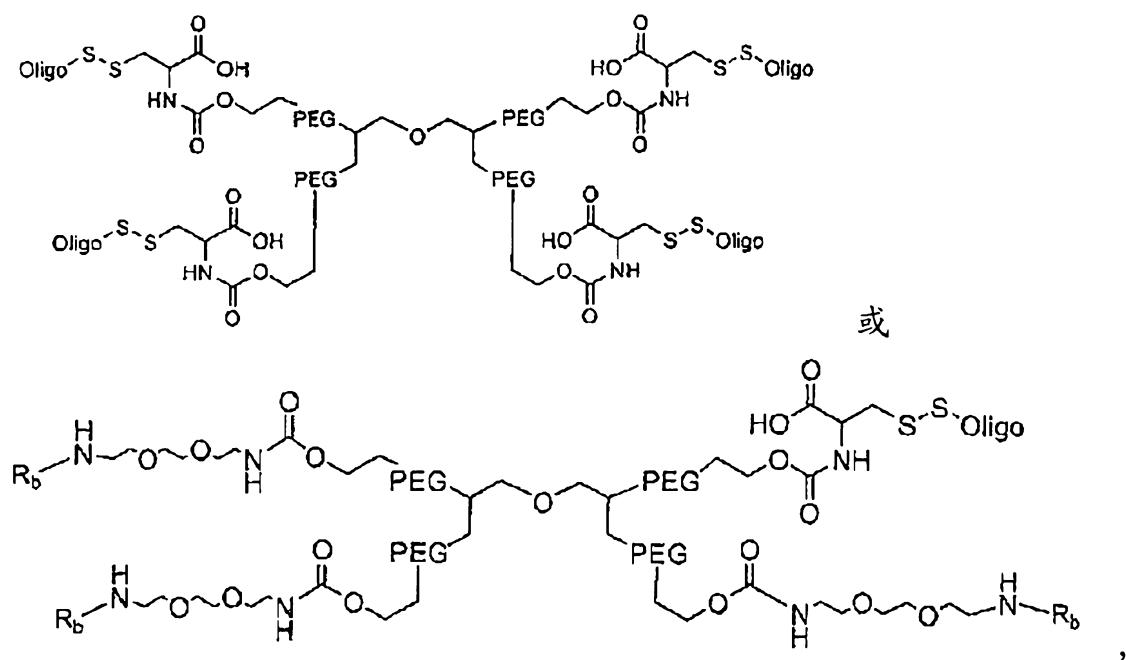
結果展示與裸 LNA 寡核苷酸相比，PEG-Cys-SS-LNA 接合物顯著抑制腫瘤中 ErbB3 mRNA 之表現。以 PEG 接合物處理之小鼠相比於以裸 LNA 處理之小鼠對 ErbB3 mRNA 表現之抑制高 2 倍。另外，與裸 LNA 寡核苷酸之 73% 相比，

PEG 接合物抑制肝臟中 83% 之 ErbB3 mRNA 表現。

鑑於上述內容，本發明有利地提供採用 PEG 接合物來將寡核苷酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之經改良方法，其與相應裸反義構築體相比，在活體內極大地增加循環時間、增強腫瘤中寡核苷酸之積累，同時亦實現腫瘤中致癌基因 mRNA 表現之下調增強。

本發明之一具體實例提供將寡核苷酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之經改良方法，其包括以下步驟：

(a) 提供具有下式之化合物：

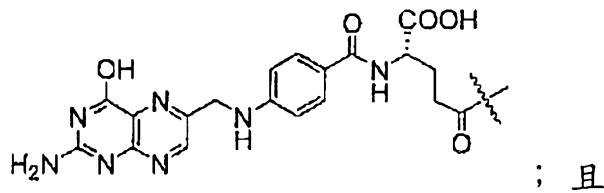


或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

PEG 為聚乙二醇；

R_b 為

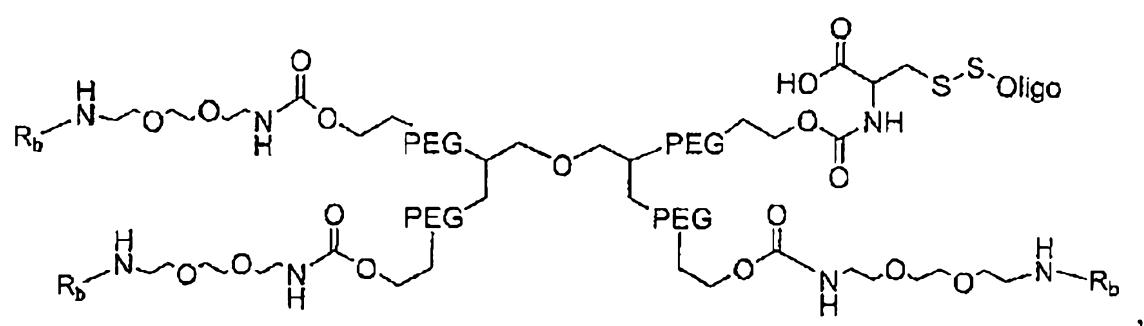
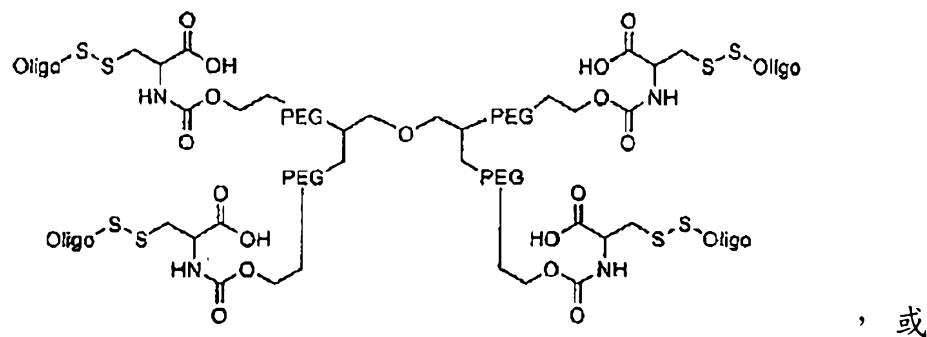


Oligo 為約 8 至 30 個核昔酸之寡核昔酸，
其中化合物之聚合部分具有約 40,000 道爾頓之總數量
平均分子量；及

(b) 向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予該化合物或其醫
藥學上可接受之鹽。

本發明之相關具體實例提供活體內抑制哺乳動物之腫
瘤基因表現之經改良方法，其包括以下步驟：

(a) 提供具有下式之化合物：

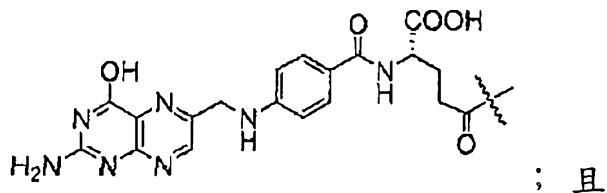


或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

PEG 為聚乙二醇；

R_b 為



Oligo 為約 8 至 30 個核苷酸之寡核苷酸，
其中化合物之聚合部分具有約 40,000 道爾頓之總數量
平均分子量；及

(b) 向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予該化合物或其
鹽，

其中該投藥降低腫瘤細胞對預選基因之表現。

對預選基因表現之抑制可為 mRNA 分子之反義靶向之
結果，由此降低或消除 mRNA 轉譯為多肽。在以上方法具
體實例中，投藥可經哺乳動物之血流實現，例如藉由靜脈
內 (i.v.) 注射。寡核苷酸可包含 LNA。寡核苷酸包括 -5'
-(CH₂)₆- 反義 - 存活素 LNA 寡核苷酸或 -5' - (CH₂)₆- 反義
- ErbB3 LNA 寡核苷酸。

【主要元件符號說明】

無

201004648

序列表

<110> 趙洪
瑞迪,普沙納

<120> 用於寡核苷酸傳遞的包含細胞內可釋放的雙硫連結子之聚合系統

<130> 213.1319-PCT

<140>

<141>

<150> 61/106,578
<151> 2008-10-19

<150> 61/106,579
<151> 2008-10-19

<150> 61/055,950
<151> 2008-05-23

<150> 61/055,869
<151> 2008-05-23

<160> 6

<170> PatentIn 3.3 版

<210> 1
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 混雜_特徵
<222> (1) (16)
<223> 硫代骨架

<220>

<221> 經修飾的鹼基
<222> (1)
<223> 甲基化胞嘧啶

<220>

<221> 混雜_特徵
<222> (1)
<223> LNA

<220>

<221> 混雜_特徵
<222> (2)
<223> LNA

<220>

<221> 經修飾的鹼基
<222> (3)
<223> 甲基化胞嘧啶

201004648

<220>
<221> 混雜_特徵
<222> (3)
<223> LNA

<220>
<221> 混雜_特徵
<222> (4)
<223> LNA

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (13)
<223> 甲基化胞嘧啶

<220>
<221> 混雜_特徵
<222> (13)
<223> LNA

<220>
<221> 混雜_特徵
<222> (14)
<223> LNA

<220>
<221> 混雜_特徵
<222> (15)
<223> LNA

<400> 1
ctcaatccat ggcagc

16

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 組合DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 混雜_特徵
<222> (1) (19)
<223> RNA

<400> 2
gcaugcggcc ucuguuugat t

21

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

2

201004648

<223> 組合DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 混雜_特徵

<222> (3) (21)

<223> RNA

<400> 3

ucaaacagag gccgcaugct t

21

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 混雜_特徵

<222> (1)..(18)

<223> 硫代骨架

<400> 4

tctcccaagcg tgcgccat

18

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 混雜_特徵

<222> (1) (16)

<223> 硫代骨架

<220>

<221> 混雜_特徵

<222> (1) (3)

<223> LNA

<220>

<221> 混雜_特徵

<222> (13) (15)

<223> LNA

<400> 5

tggcaagcat cctgtat

16

<210> 6

201004648

<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 混雜_特徵
<222> (1) (16)
<223> 硫代骨架

<220>
<221> 混雜_特徵
<222> (1) (3)
<223> LNA

<220>
<221> 混雜_特徵
<222> (14) (16)
<223> LNA

<400> 6
tagcctgtca cttctc

16

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 98117016

A61K 47/48

※ 申請日： 08. 11. 20

※IPC 分類： A61K 31/715 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 35/00 (2006.01)

用於寡核苷酸傳遞的包含細胞內可釋放的雙硫連結子
之聚合系統POLYMERIC SYSTEMS CONTAINING INTRACELLULAR
RELEASABLE DISULFIDE LINKER FOR THE DELIVERY
OF OLIGONUCLEOTIDES

二、中文發明摘要：

本發明提供用於寡核苷酸傳遞的包括細胞內可釋放的雙硫連結子之聚合前藥。亦提供製備該等化合物之方法以及使用該等化合物將核酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之方法。

三、英文發明摘要：

The present invention provides polymeric prodrugs including an intracellular releasable disulfide linker for the delivery of oligonucleotides. Methods of making the compounds as well as methods of delivering nucleic acids to tumor cells in a mammal using the same are also provided.

七、申請專利範圍：

1. 一種將寡核苷酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之改良方法，其包含向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予式(I)化合物：

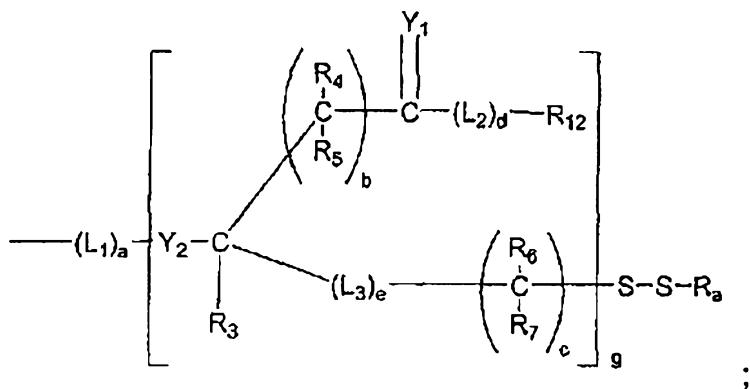
$R_1 - \{Z_1\}_m$ ，

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_1 相同或不同且選自由以下各基團組成之群：



$-(L_4)_{a1}-R_b$ ；及

$-(L_4)_{a2}-R_c$ ，

Y_1 在每次出現時獨立地為 S 或 O；

Y_2 在每次出現時獨立地為 NR_{13} ；

R_a 在每次出現時為相同或不同寡核苷酸；

L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自由以下各基團組成之群：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及

C₁₋₆ 烷 氧 基 ；

R_{13} 在每次出現時獨立地選自由以下各基團組成之群：
 氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{3-8} 環烷基；

R_{12} 在每次出現時獨立地選自由以下各基團組成之群：
 氢、羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-19} 支鏈烷基、
 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0 、 1 、 2 或 3 ；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3；

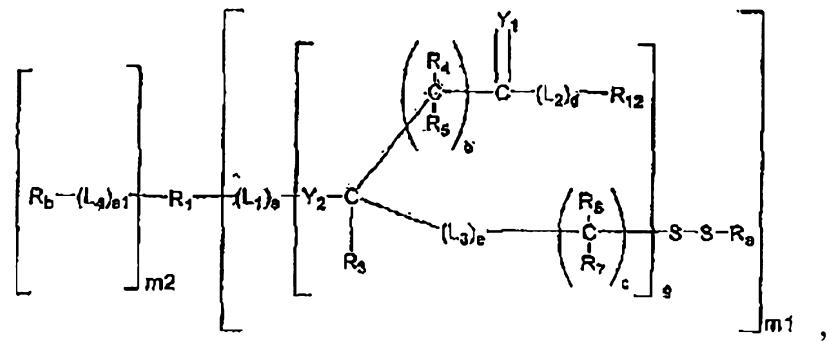
各 (e) 獨立地為 0 或 1；

各 (g) 獨立地為 0 或 1；且

(m) 為約2至約32之正整數，

限制條件為 (a) 及 (g) 同時為 0，且進一步限制條件為一或多個 Z_1 含有寡核苷酸。

2.如申請專利範圍第1項之方法，其中該式(I)化合物具有式(I')：



其中

(m1) 為約 1 至約 8 之正整數；

(m2) 為 0 或約 1 至約 7 之正整數；且

(m1) 與 (m2) 之和為約 2 至約 8 之整數。

3.如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中所有 Z_1 含有寡核昔酸。

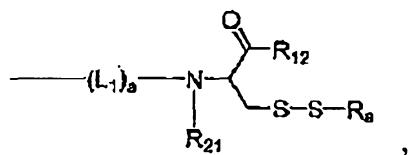
4.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中一或多個 Z_1 含有葉酸。

5.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 R_{12} 為 OH 。

6.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 R_{3-7} 全部為氫。

7.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 (b)、(d) 及 (e) 為 0，且 (c) 為 1。

8.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 Z_1 具有下式：



其中，

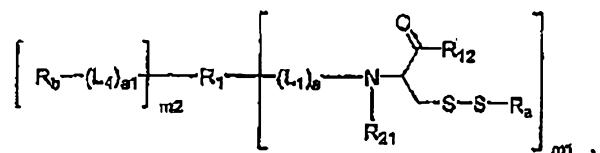
(a) 為 0 或 1；

(m) 為 2 至 8 之整數；且為 (2、4、8、16 或 32)；

R_{12} 在每次出現時係獨立地選自由以下各基團組成之群：羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{1-6} 烷基；且

所有其他變數與如申請專利範圍第 1 項中所定義相同。

9.如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該式 (I) 化合物具有下式



其中 (a) 為 0 或 1。

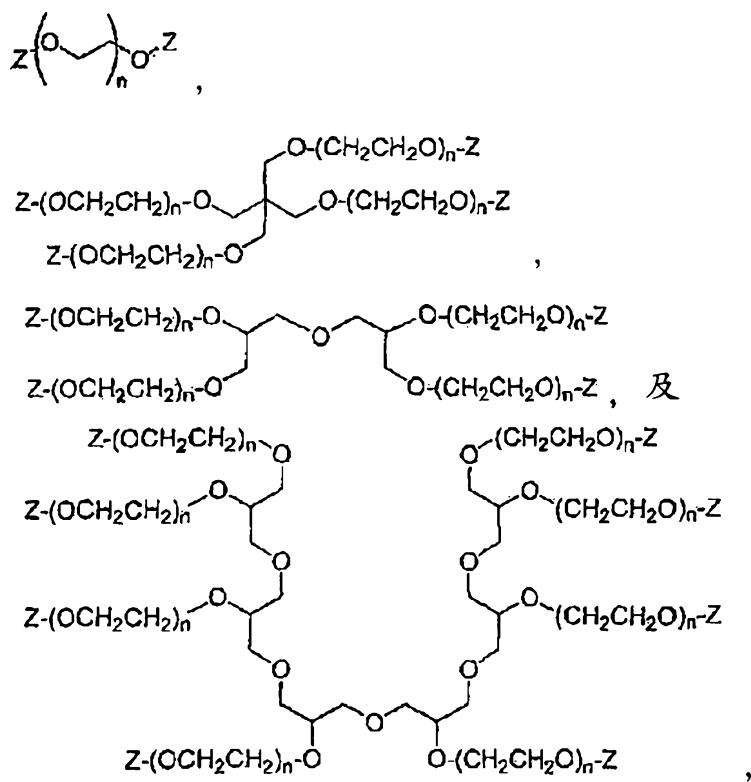
10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中 (m2) 為 0。

11. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 (m1) 為 1。

12. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 R_1 包含聚伸烷基氧化物。

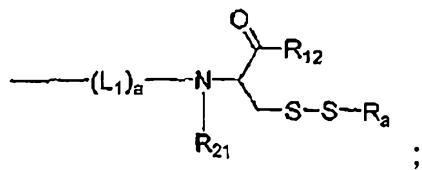
13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中 R_1 具有約 5,000 至約 25,000 道爾頓 (dalton) 或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平均分子量。

14. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該化合物係選自由以下各物組成之群：



其中

各 Z 獨立地為



$-(L_4)_{a1} - R_b$; 或

$$- (L_4)_{a2} - R_c \ ,$$

其中

(a) 為 0 或 1 ,

R_{12} 在每次出現時係獨立地選自由以下各基團組成之群：羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炫基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(n) 為正整數且該化合物之聚合部分具有約 5,000 至
約 25,000 道爾頓或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平
均分子量；且

所有其他變數與如申請專利範圍第1項中所定義相同。

15.如申請專利範圍第1項之方法，其中該寡核苷酸為單股或雙股寡核苷酸。

16.如申請專利範圍第15項之方法，其中該寡核苷酸為反義寡核苷酸。

17.如申請專利範圍第15項之方法，其中該寡核苷酸係選自由以下各物組成之群：脫氧核苷酸、核糖核苷酸、鎖核酸（LNA）、短干擾RNA（siRNA）、微RNA（miRNA）、適體（aptamer）、肽核酸（PNA）、二胺基磷酸酯嗎啉基寡核苷酸（PMO）、三環-DNA、雙股寡核苷酸（誘餌ODN）、催化RNA（RNAi）、適體、斯皮格體（spiegelmer）、CpG寡聚物及其組合。

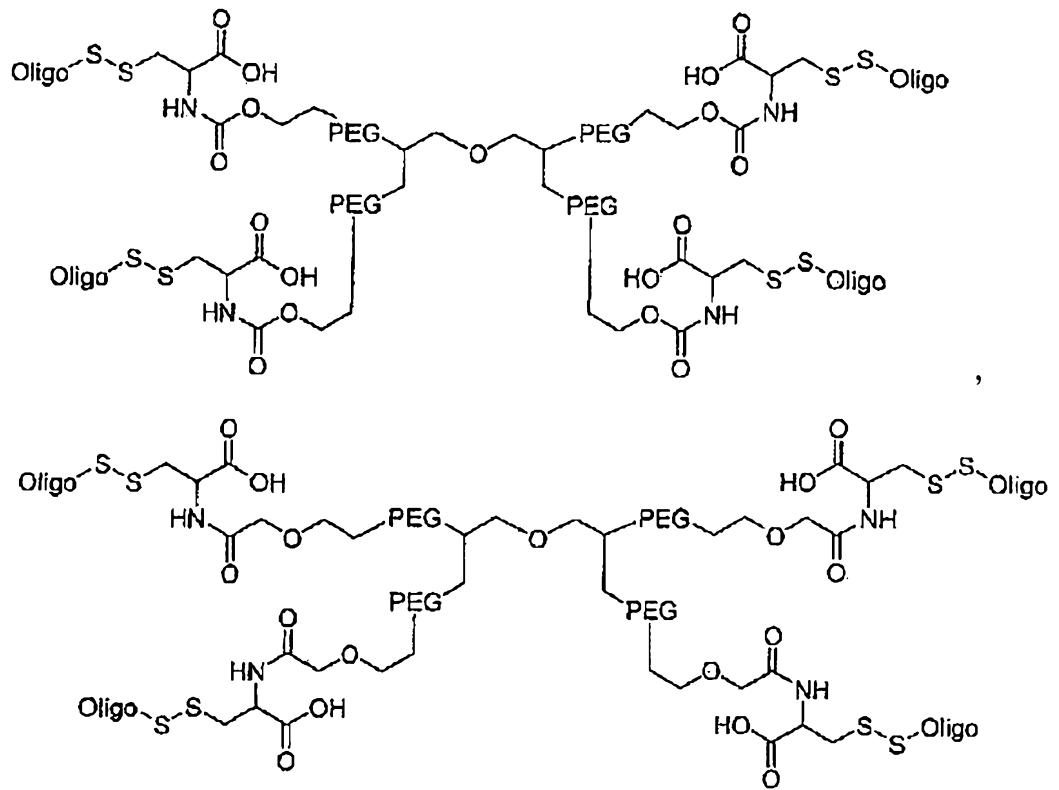
18.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該寡核苷酸具有 LNA 及硫代磷酸酯鍵。

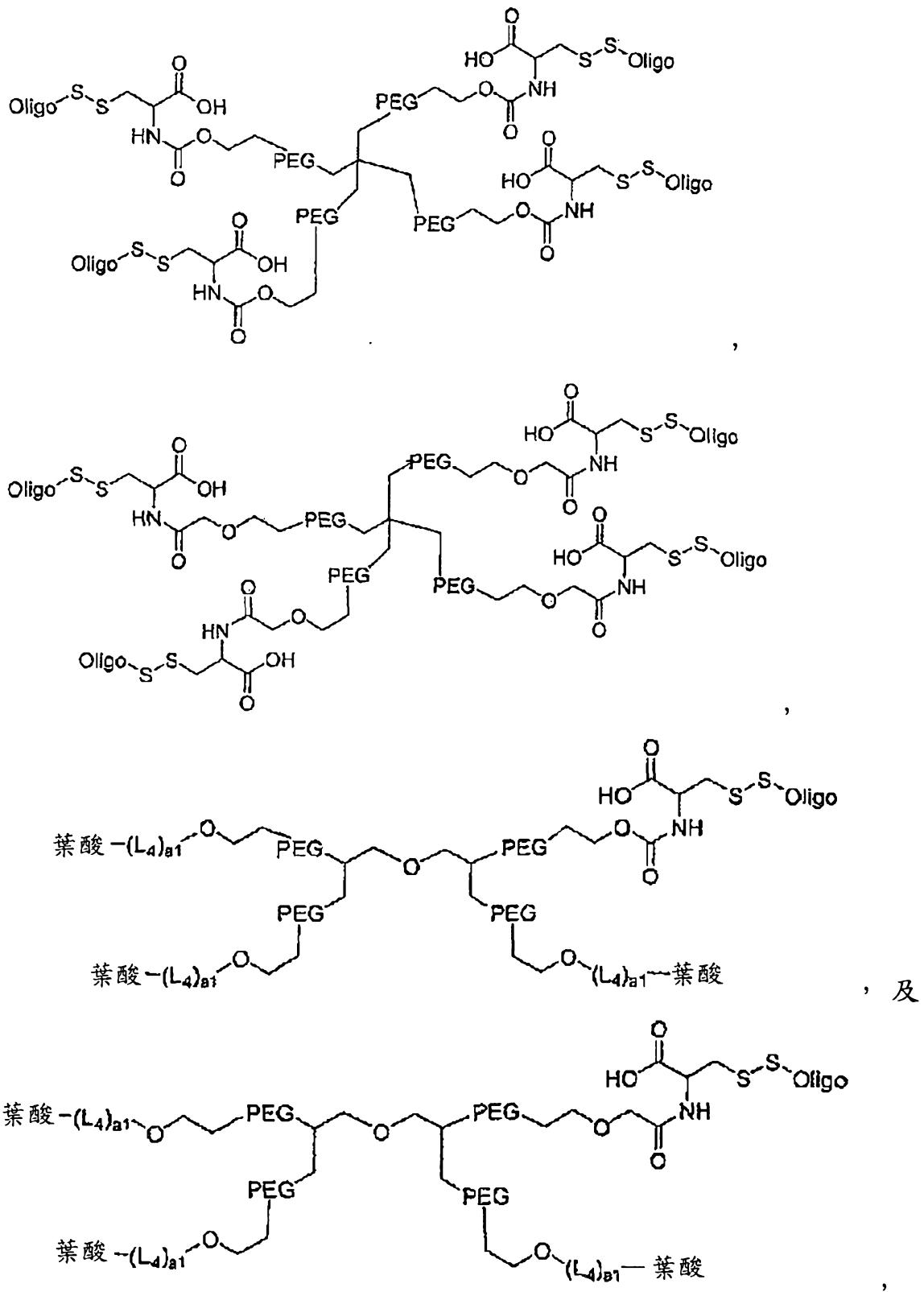
19.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該寡核苷酸具有約 8 至約 30 個核苷酸。

20.如申請專利範圍第 19 項之方法，其中該寡核苷酸係選自由以下各物組成之群：反義 bcl-2 寡核苷酸、反義 HIF-1 α 寡核苷酸、反義存活素 (survivin) 寡核苷酸及反義 Erb β 3 寡核苷酸。

21.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該寡核苷酸包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO 2 及 3、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 5 及 SEQ ID NO: 6。

22.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該式 (I) 化合物係選自由以下各物組成之群：





其中：

Oligo 為寡核苷酸；

PEG 為聚乙二醇且該化合物之聚合部分具有約 5,000

至約 25,000 道爾頓或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量
平均分子量；

(a 1) 為 1 ; 且

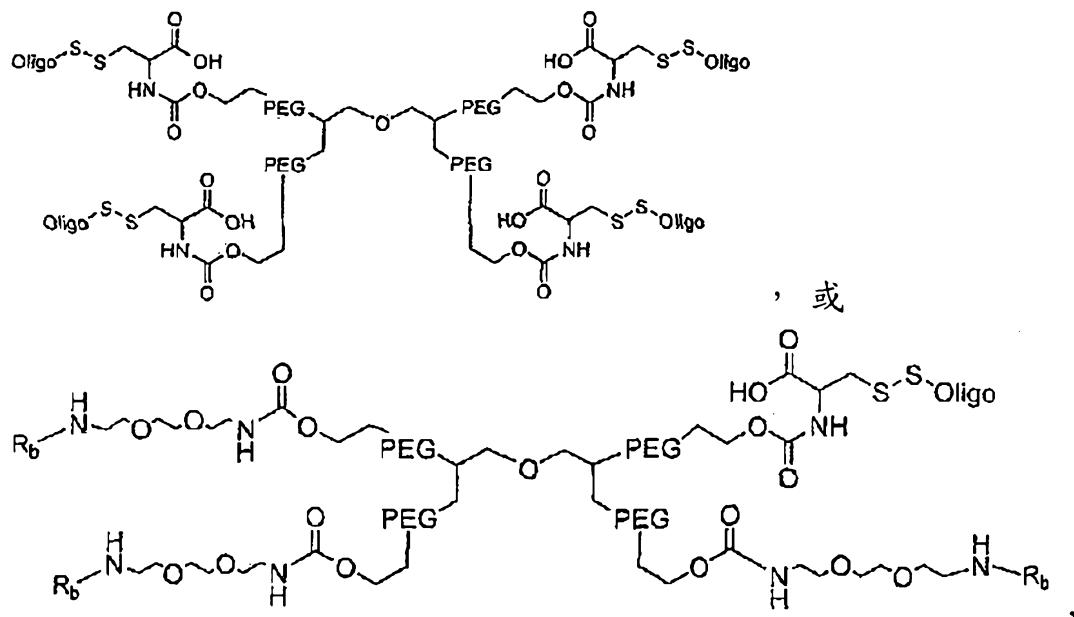
L_4 為 $-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}[\text{C}(=\text{O})]_{r'} -$ 或
 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ，其中 (r') 為 0 或 1。

23.如申請專利範圍第1項之方法，其中該等腫瘤細胞為前列腺或子宮頸癌細胞。

24.如申請專利範圍第1項之方法，其中該投藥步驟包含經由該哺乳動物之血流投藥。

25. 一種將寡核苷酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之經改良方法，其包含：

(a) 提供具有下式之化合物：

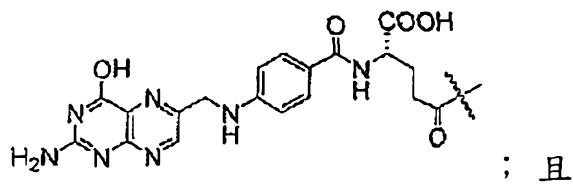


或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

PEG 為聚乙二醇；

R_h 為



；且

Oligo 為約 8 至 30 個核苷酸之寡核苷酸，

其中該化合物之聚合部分具有約 40,000 道爾頓之總數量平均分子量；及

(b) 向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

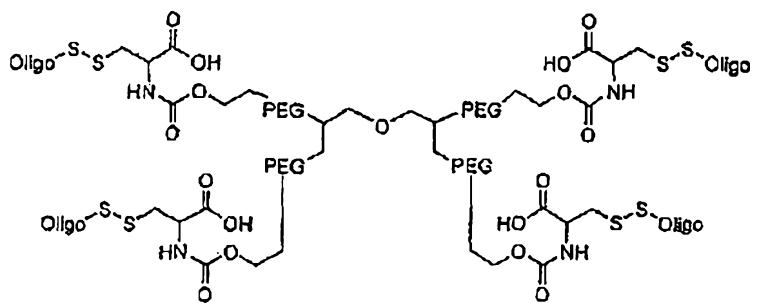
26.如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該寡核苷酸包含 LNA。

27.如申請專利範圍第 25 項之方法，其中 Oligo 為
 $-5'-(CH_2)_6-TsAsGsCsCsTsGsTsCsAsCsTsTsCsTsCs-3'$ 或
 $-5'-(CH_2)_6-GsCsTsGsCsCsAsTsGsGsAsTsTsGsAsG-3'$ ，其中
5'及 3'末端中之前三個核苷酸為 LNA 且“s”代表硫代磷酸酯鍵。

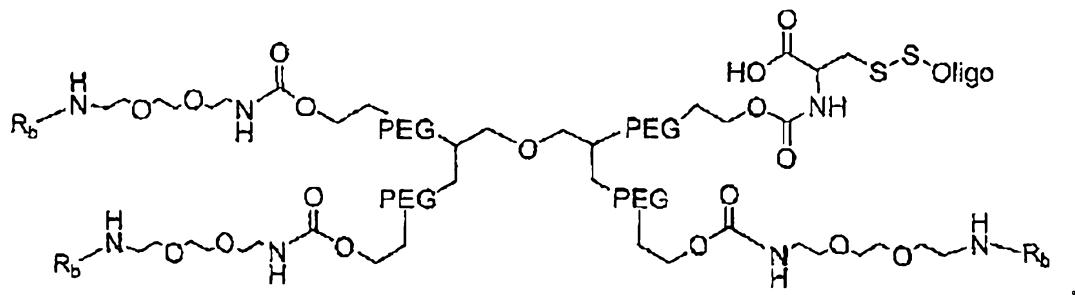
28.如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該等腫瘤細胞為前列腺或子宮頸癌細胞。

29.一種將寡核苷酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之經改良方法，其包含：

(a) 提供具有下式之化合物：



，或

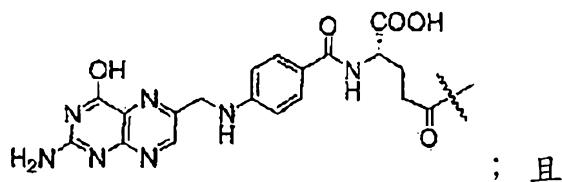


或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

PEG 為聚乙二醇；

R_b 為



；且

Oligo 為約 8 至 30 個核苷酸之寡核苷酸，

其中該化合物之聚合部分具有約 40,000 道爾頓之總數量平均分子量；及

(b) 向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予該化合物或其鹽，其中該投藥降低該等腫瘤細胞對預選基因之表現。

30. 一種將寡核苷酸引入細胞中之方法，其包含：

使細胞與式 (I) 化合物接觸。

31. 一種抑制癌細胞之生長或增殖之方法，其包含：

使癌細胞與式 (I) 化合物接觸。

32. 一種式 (Ia) 化合物：

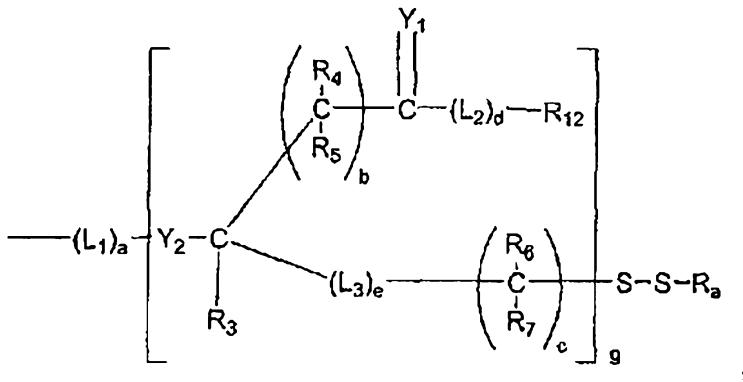
$R_1-\{Z_1\}_m$ ，

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_1 相同或不同且係選自：



$-(L_4)_{a1}-R_b$ ；及

$-(L_4)_{a2}-R_c$ ；

Y_1 在每次出現時獨立地為 S 或 O；

Y_2 在每次出現時獨立地為 NR_{13} ；

R_a 在每次出現時為相同或不同寡核昔酸；

L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

R_{13} 在每次出現時係獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{3-8} 環烷基；

R_{12} 在每次出現時係獨立地選自由以下各基團組成之群：氫、羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (e) 獨立地為 0 或 1；

各 (g) 獨立地為 0 或 1；且

(m) 為約 2 至約 32 之正整數，

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0，且進一步限制條件為一或多個 Z_1 含有寡核苷酸，且進一步限制條件為一或多個 Z_1 含有葉酸。

八、圖式：

(如次頁)

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (e) 獨立地為 0 或 1；

各 (g) 獨立地為 0 或 1；且

(m) 為約 2 至約 32 之正整數，

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0，且進一步限制條件為一或多個 Z_1 含有寡核苷酸，且進一步限制條件為一或多個 Z_1 含有葉酸。

八、圖式：

(如次頁)

201004648

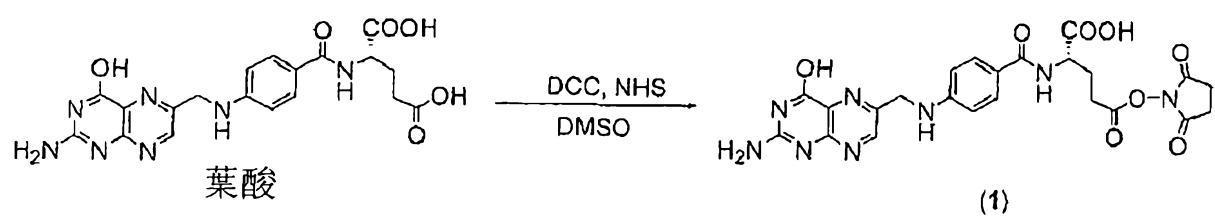


圖 1

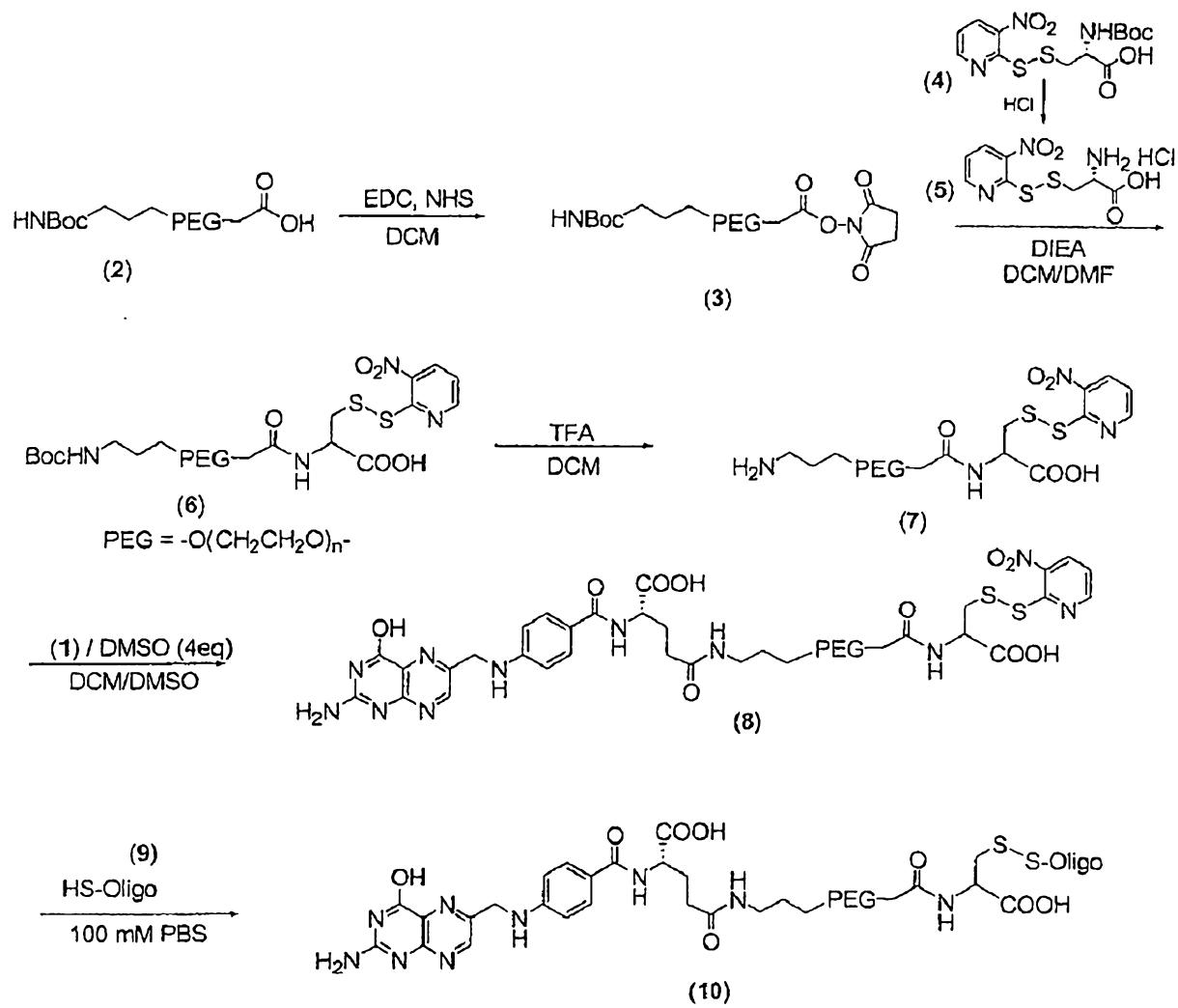
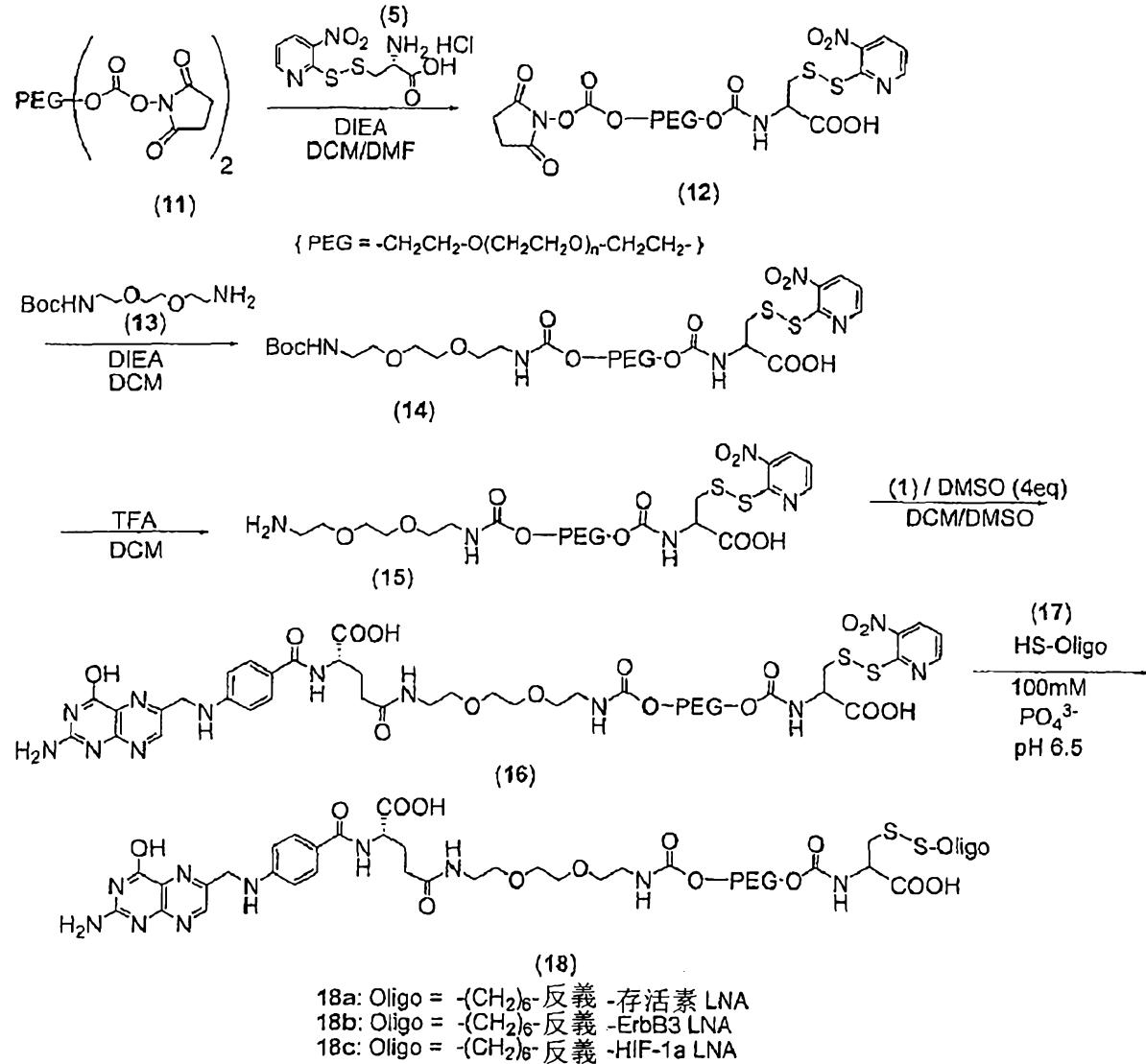


圖2



3

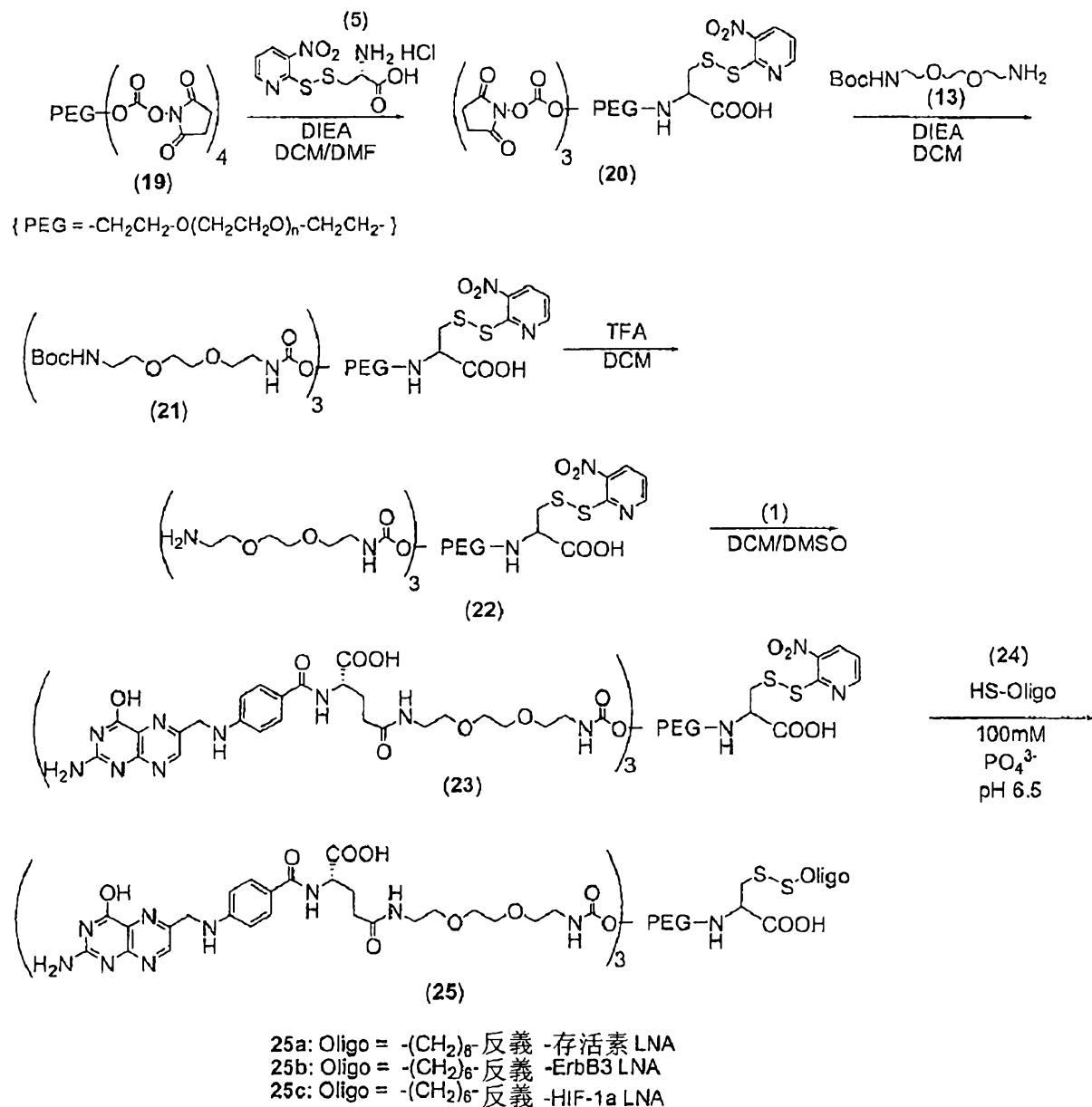


圖4

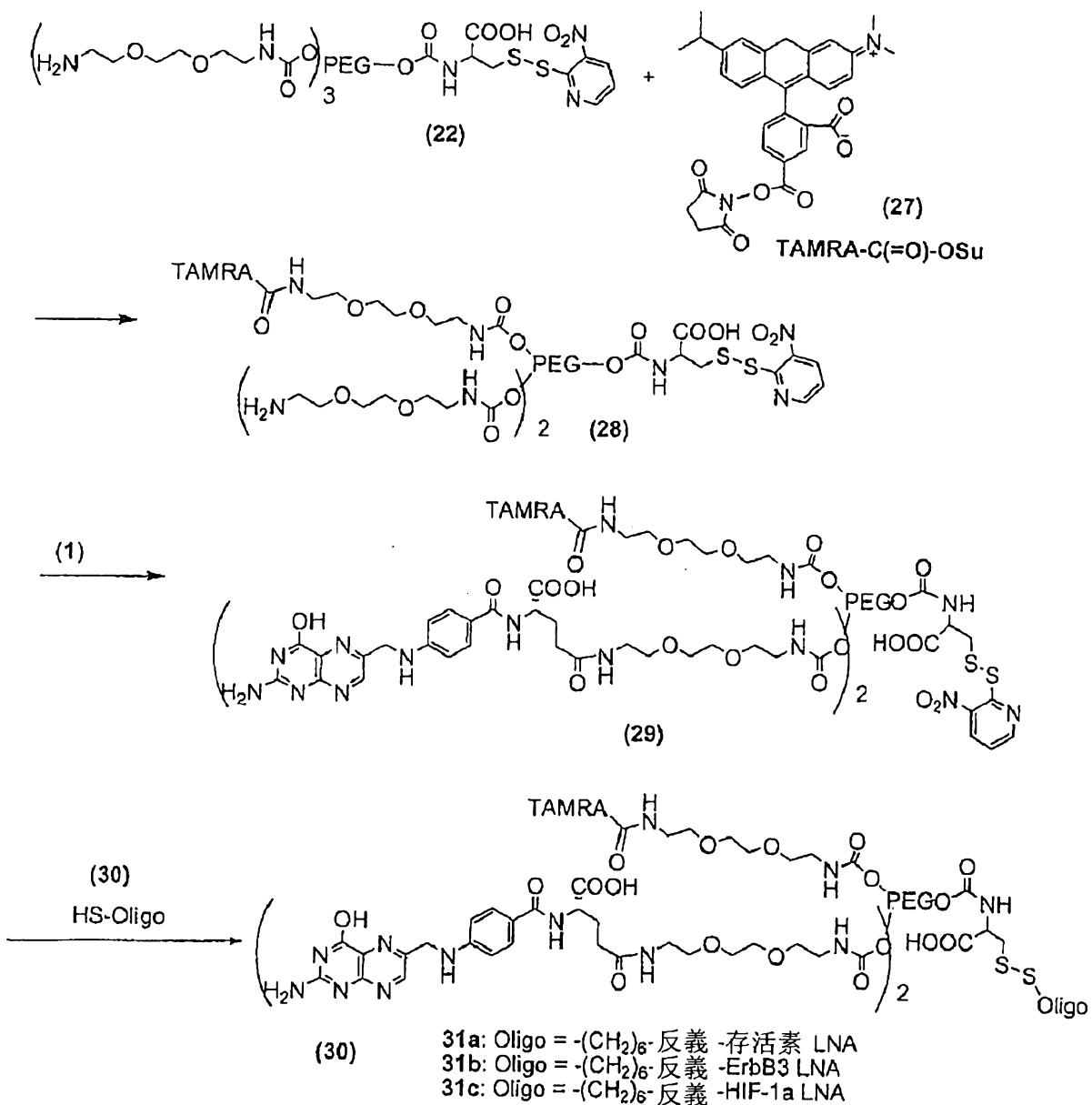
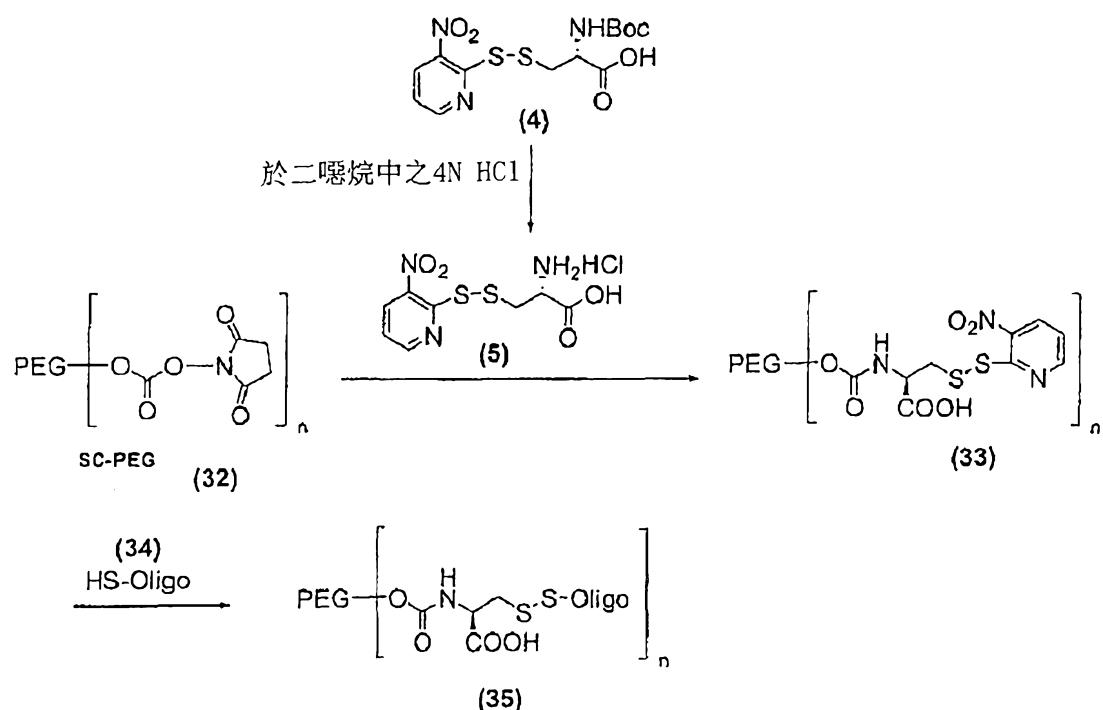


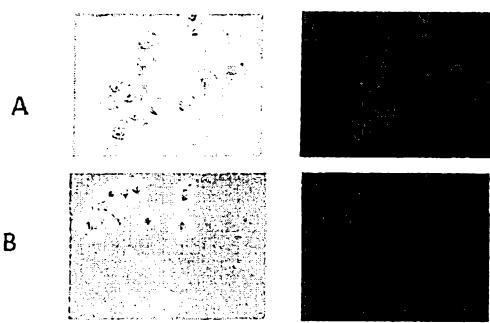
圖5



- $35a_1$: $n = 4$, Oligo = $-(\text{CH}_2)_6-$ 反義 -存活素 LNA
 $35a_2$: $n = 8$, Oligo = $-(\text{CH}_2)_6-$ 反義 -存活素 LNA
 $35b_1$: $n = 4$, Oligo = $-(\text{CH}_2)_6-$ 反義 -ErbB3 LNA
 $35b_2$: $n = 8$, Oligo = $-(\text{CH}_2)_6-$ 反義 -ErbB3 LNA
 $35c_1$: $n = 4$, Oligo = $-(\text{CH}_2)_6-$ 反義 -HIF-1a LNA
 $35c_2$: $n = 8$, Oligo = $-(\text{CH}_2)_6-$ 反義 -HIF-1a LNA

圖 6

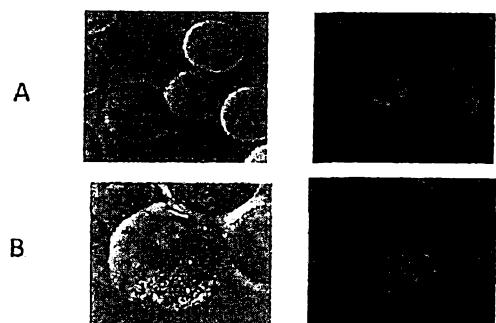
螢光顯微術研究



(a) 螢光顯微術：KB細胞中之100nM
葉酸-PEG-Cys-SS-LNA2-FAM

- A. 未經冷葉酸阻斷
- B. 經1 μ M冷葉酸阻斷

共焦顯微術研究



(b) 共焦顯微術：KB細胞中之100nM
葉酸-PEG-Cys-SS-LNA2-FAM

- A. 5K PEG 接合物
- B. 40K PEG 接合物

圖7

201004648

葉酸受體特異性結合之FACS分析

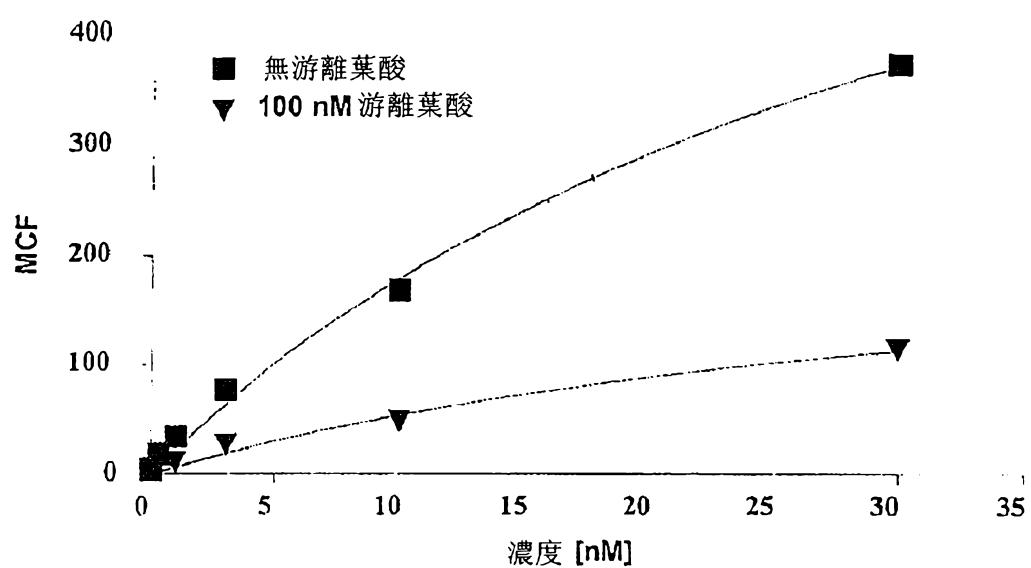
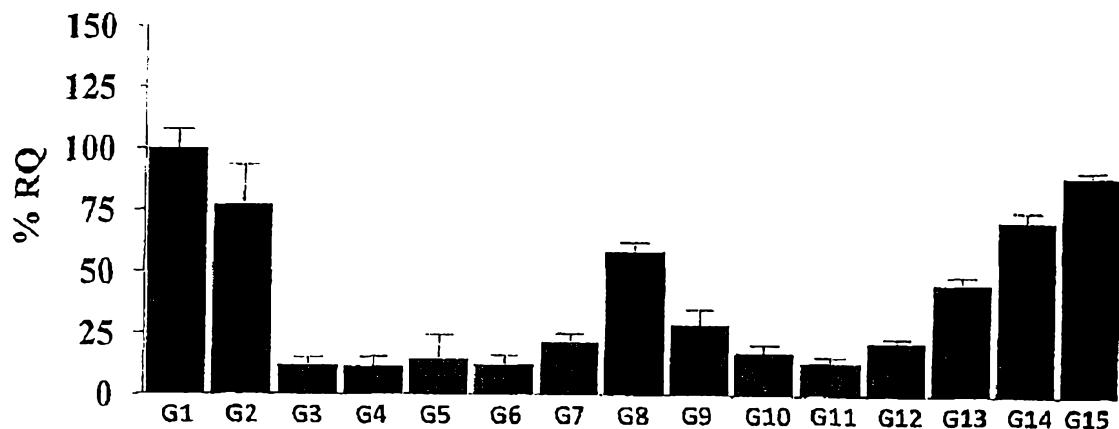


圖8



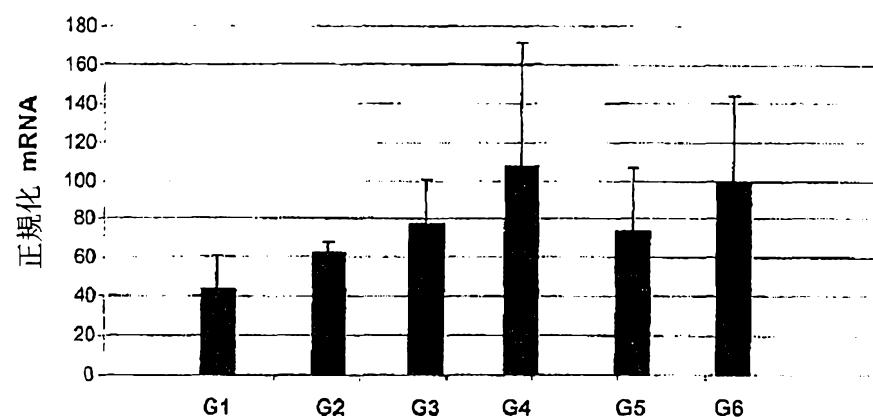
G1:Mock-脂質體轉染試劑(Lipofectamine)
 G2:Mock+脂質體轉染試劑
 G3:1000nM 裸 LNA2+脂質體轉染試劑
 G4:333nM 裸 LNA2+脂質體轉染試劑
 G5:100nM 裸 LNA2+脂質體轉染試劑
 G6:33nM 裸 LNA2+脂質體轉染試劑
 G7:10nM 裸 LNA2+脂質體轉染試劑
 G8:3nM 裸 LNA2+脂質體轉染試劑

G9:1000nM PEG-Cys-SS-LNA2+脂質體轉染試劑
 G10:333nM PEG-Cys-SS-LNA2+脂質體轉染試劑
 G11:100nM PEG-Cys-SS-LNA2+脂質體轉染試劑
 G12:33nM PEG-Cys-SS-LNA2+脂質體轉染試劑
 G13:10nM PEG-Cys-SS-LNA2+脂質體轉染試劑
 G14:3nM PEG-Cys-SS-LNA2+脂質體轉染試劑
 G15:1nM PEG-Cys-SS-LNA2+脂質體轉染試劑

圖 9

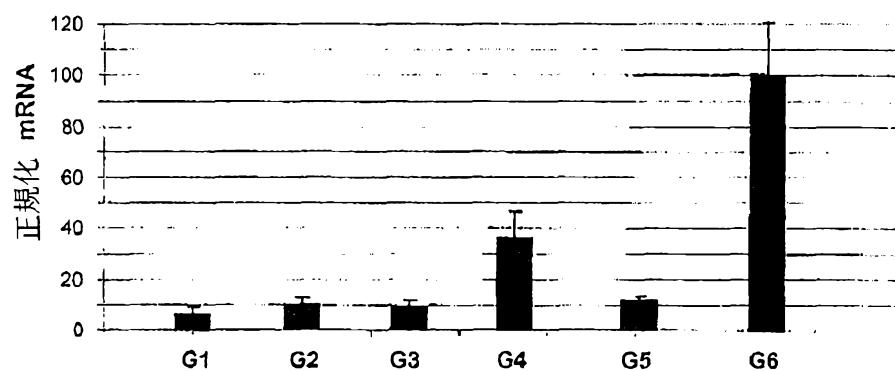
(A)

KB腫瘤中之ErbB3 mRNA下調



(B)

肝臟中之ErbB3 mRNA下調



G1 = 葉酸-^{40K}PEG-Cys-SS-LNA2

G2 = ^{40K}PEG-LNA2

G3 = 葉酸-^{5K}PEG-Cys-SS-LNA2

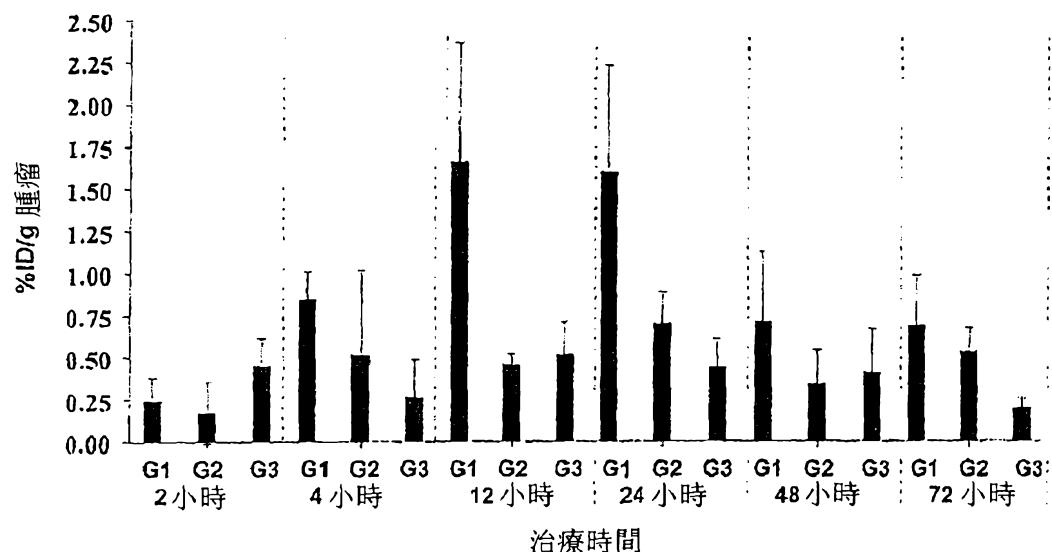
G4 = ^{5K}PEG-LNA2

G5 = LNA2

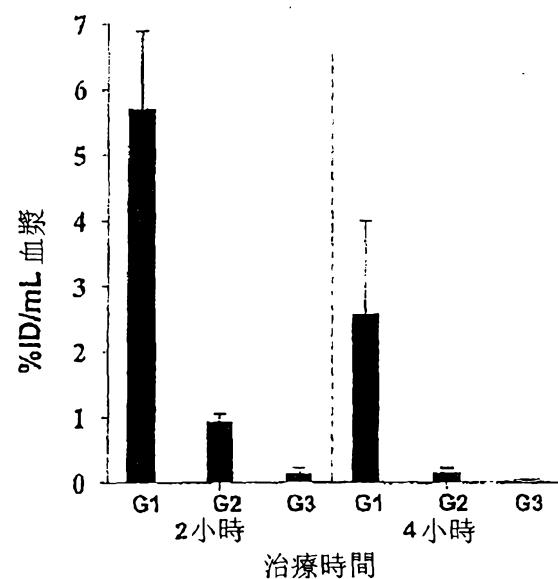
G6 = 食鹽水

圖 10

(A) % ID/g 肿瘤

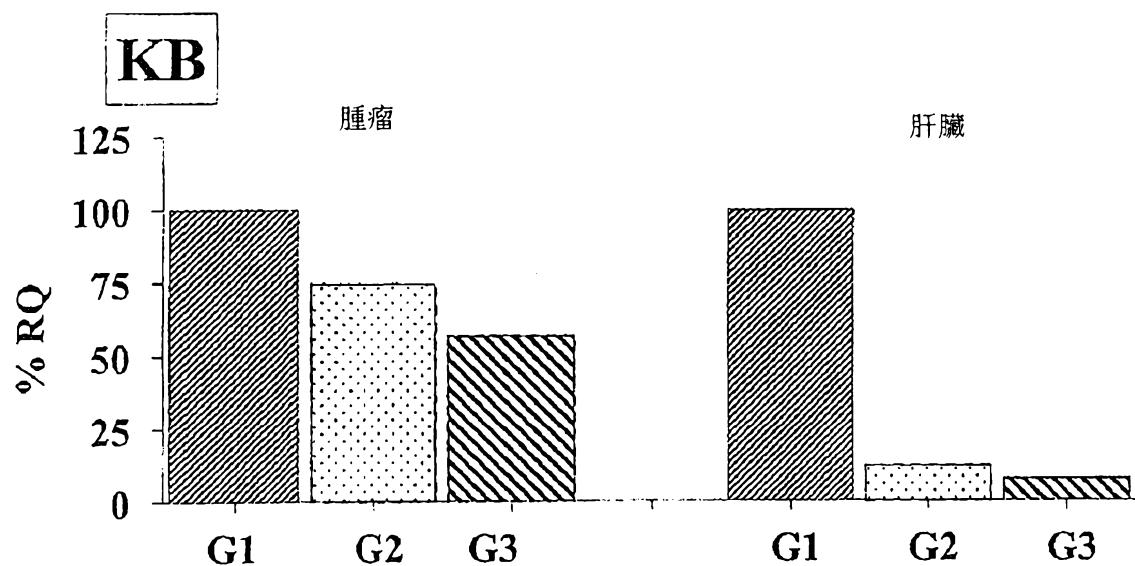


(B) % ID/mL 血漿



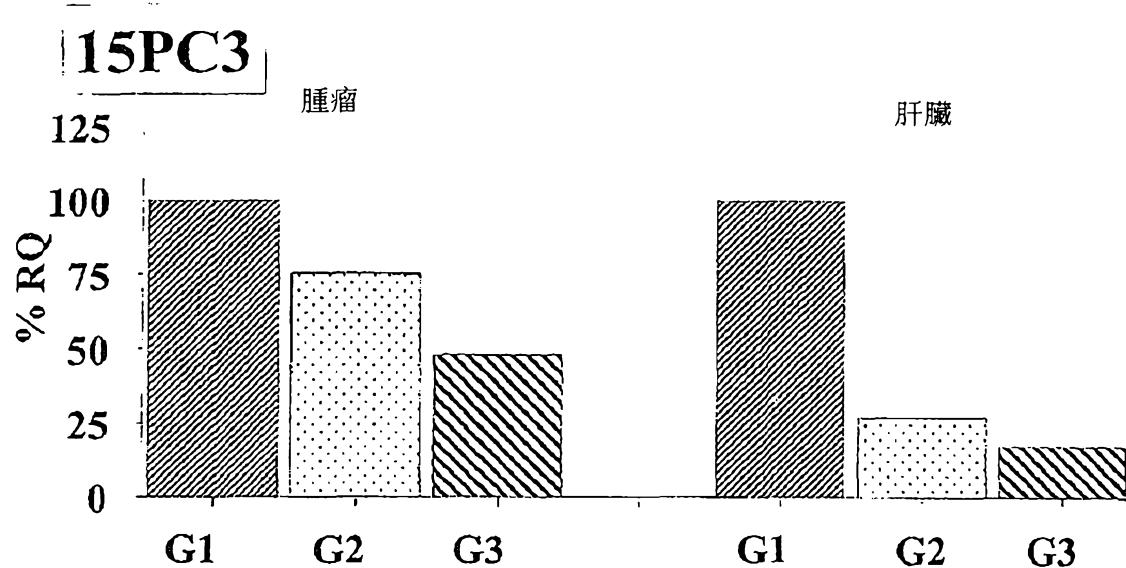
G1: 40K PEG-Cys-SS-LNA1 G2: 10K PEG-Cys-SS-LNA1 G3: 裸 LNA1

圖 11



G1: 未經治療
G2: PEG-Cys-SS-LNA2
G3: 裸 LNA2

圖 12



G1: 未經治療
G2: PEG-Cys-SS-LNA2
G3: 裸 LNA2

圖 13

201004648

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 1 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

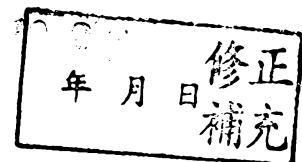
無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

201004648

98117016



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是關於寡核苷酸傳遞的包括細胞內可釋放的雙硫連結子之聚合前藥、製備該等化合物之方法以及使用該等化合物將核酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之方法。

交互參照相關申請案

本申請案主張 2008 年 5 月 23 日申請之美國臨時專利申請案第 61/055,950 號、2008 年 5 月 23 日申請之美國臨時專利申請案第 61/055,869 號、2008 年 10 月 19 日申請之美國臨時專利申請案第 61/106,578 號及 2008 年 10 月 19 日申請之美國臨時專利申請案第 61/106,579 號之優先權的利益，該等參照案中之每一者之內容係以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

因為治療性基因可選擇性地調節與疾病相關之基因表現且將使用其他治療方法可能招致之副作用降至最低程度，所以基於基因之療法為治療疾病之有效工具。

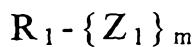
已提出基於新一代 RNA 拮抗劑鎖核酸 (LNA) 反義寡核苷酸的療法。每一 LNA 單體在核糖之 2'- 氧與 4'- 碳之間含有亞甲基橋。此將 LNA 殘基固定於有利之類 RNA 構形中且使得 LNA 寡核苷酸與其他業內已知之寡核苷酸相比能夠具有較高親和力、特異性及對降解之抗性。已展示 LNA 寡核苷酸在試管內抑制目標基因表現（以亞奈莫耳含量）。雖然 LNA 寡核苷酸與其他業內已知之核酸相比具有改良之

治療活性，但是仍需要進一步改良 LNA 寡核苷酸之藥物動力學概況及自循環之快速清除及活體內有限活性。對提供用於傳遞 LNA 寡核苷酸以及其他業內已知之核酸分子之經改良之系統及方法繼續存在需要。本發明著手解決此需要。

【發明內容】

為了克服上述問題且改良傳遞寡核苷酸之技術，本發明提供含有細胞內可釋放的連結子之新穎聚合傳遞系統。

在本發明之一態樣中，提供將寡核苷酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之方法。該等方法包括向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予式 (I) 化合物：

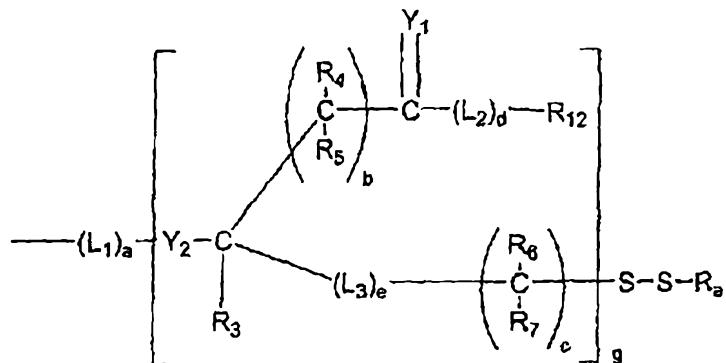


或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_1 相同或不同且係選自：



$-(L_4)_{a1}-R_b$ ；及

$-(L_4)_{a2}-R_c$ ，

Y_1 在每次出現時獨立地為 S 或 O；

Y_2 在每次出現時獨立地為 NR₁₃；

R_a 在每次出現時為相同或不同寡核昔酸；

L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

R_{13} 在每次出現時獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{3-8} 環烷基；

R_{12} 在每次出現時獨立地選自：氫、羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (e) 獨立地為 0 或 1；

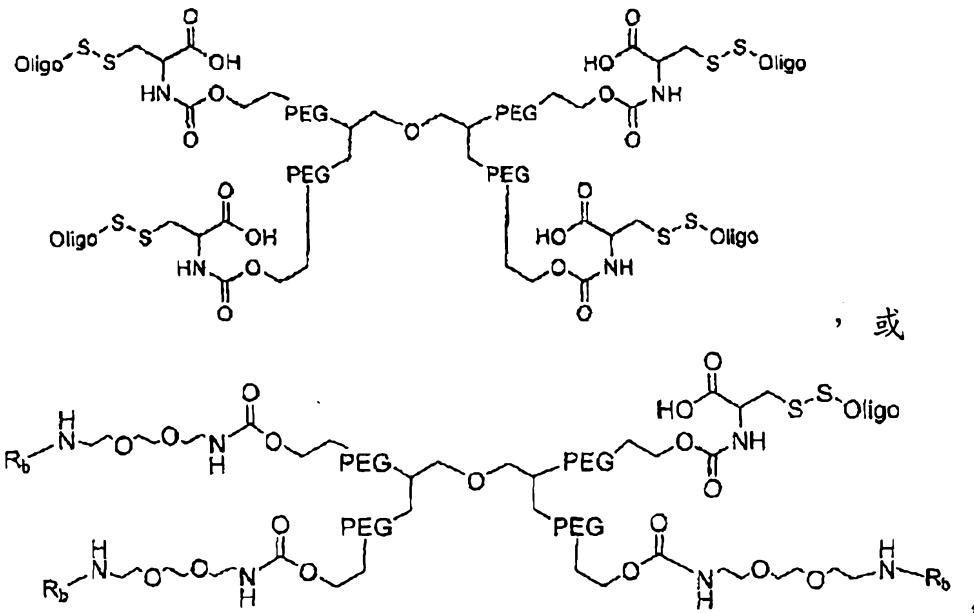
各 (g) 獨立地為 0 或 1；且

(m) 為約 2 至約 32 之正整數，

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0，且進一步限制條件為一或多個 Z_1 含有寡核昔酸。

在另一態樣中，本發明提供抑制具有前列腺或子宮頸癌細胞之哺乳動物之基因表現之方法。

在一具體實例中，本文中所描述之方法中所用之式 (I) 化合物為：

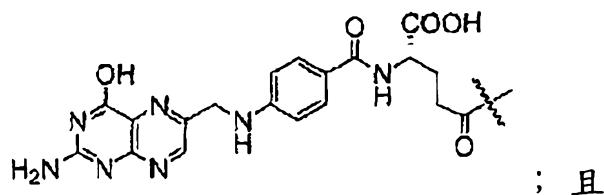


或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

PEG 為聚乙二醇且該化合物之聚合部分具有約 5,000 至約 25,000 道爾頓 (dalton) 或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平均分子量；

R_b 為



Oligo 為約 8 至 30 個核苷酸之寡核苷酸。

在本發明之另一態樣中，提供抑制哺乳動物之基因表現以治療各種疾病（亦即前列腺或子宮頸癌）之方法。

本發明亦提供製備本文中描述之化合物之方法。

出於本發明之目的，術語“治療性寡核苷酸”係指用作醫藥或診斷劑之寡核苷酸。

出於本發明之目的，“基因表現之調節”應理解為廣泛地包括在不考慮投藥途徑的情況下，與在不存在本文中描述之化合物之治療的情況下所觀察到之基因表現相比，較佳與癌症及發炎相關之任何類型之基因之下調或上調。

出於本發明之目的，目標基因之“基因表現之抑制”應理解為意謂當與在不存在本文中描述之化合物之治療的情況下所觀察到之 mRNA 表現或蛋白質轉譯相比，mRNA 表現或蛋白質轉譯降低或減弱。適合檢定包括（例如）使用熟習此項技術者已知之技術檢驗蛋白質或 mRNA 含量，諸如點印跡法、北方印跡法（northern blots）、原位雜交、ELISA、免疫沈澱、酶功能以及熟習此項技術者已知之表型檢定。經治療之病狀可由（例如）細胞、較佳癌細胞或組織中之 mRNA 含量降低證實。

廣泛而言，當獲得所需反應時，視為出現成功抑制或治療。舉例而言，成功抑制或治療可由獲得（例如）與腫瘤生長抑制相關之基因之 10% 或更高（亦即 20%、30%、40%）下調來定義。或者，成功治療可由當與在不存在本文中描述之化合物之治療的情況下所觀察到之彼含量相比時，獲得癌細胞或組織中致癌基因 mRNA 含量（包括熟習此項技術者預期之其他臨床標誌物）至少 20% 或較佳 30%、更佳 40% 或更高（亦即 50% 或 80%）降低來定義。

另外，在描述中為方便起見使用單數術語決不意欲僅限於此。因此舉例而言，提及包含一酶之組合物係指彼酶之一或多個分子。亦應瞭解本發明不侷限於本文中揭示之特定組態、方法步驟及物質，此係因為該等組態、方法步驟及物質可在某種程度上變化。

亦應瞭解，因為本發明之範疇係由隨附申請專利範圍及其等效物限制，所以本文中使用之術語僅用於描述特定具體實例之目的且不欲具有限制性。

【實施方式】

A. 概述

在本發明之一態樣中，提供將寡核昔酸傳遞至有需要之哺乳動物之腫瘤細胞之方法。該方法包括向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予式(I)化合物：

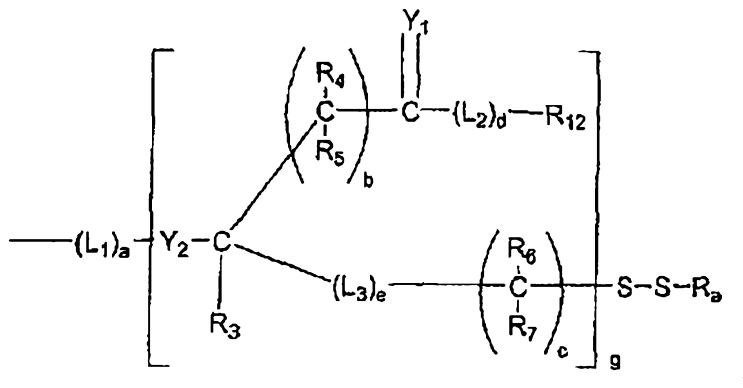
$R_1-\{Z_1\}_m$

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_1 相同或不同且係選自：



$-(L_4)_{a1}-R_b$ ；及

$-(L_4)_{a2}-R_c$ ，

Y_1 在每次出現時獨立地為 S 或 O，較佳為 O；

Y_2 在每次出現時獨立地為 NR_{13} ，較佳為 NH；

R_a 在每次出現時為相同或不同寡核苷酸；

L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6}

炔基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

R_{13} 在每次出現時獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{3-8} 環烷基；

R_{12} 在每次出現時獨立地選自：氫、羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 0；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 1；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 0；

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 1；

各 (e) 獨立地為 0 或 1，且較佳為 0；

各 (g) 獨立地為 0 或 1，且較佳為 1；且

(m) 為約 2 至約 32 之正整數（例如 2、4、6、8、16、32），

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0 且限制條件為一或多個 Z_1 含有寡核苷酸。

在另一態樣中，提供式 (I) 化合物：

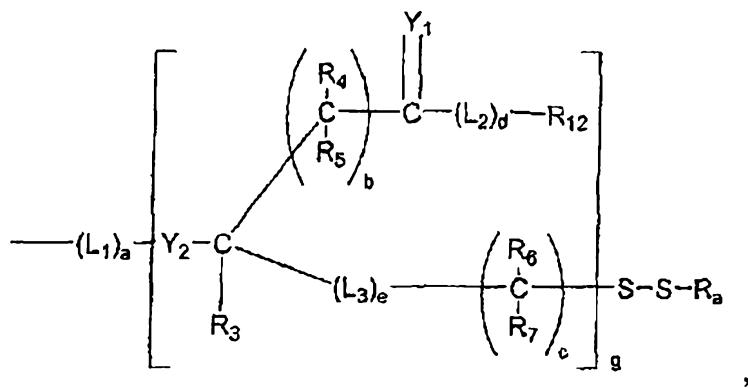
$R_1 - \{Z_1\}_m$

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_1 相同或不同且係選自：



$-(L_4)_{a1}-R_b$ ；及

$-(L_4)_{a2}-R_c$ ，

Y_1 在每次出現時獨立地為 S 或 O，較佳為 O；

Y_2 在每次出現時獨立地為 NR_{13} ，較佳為 NH ；

R_a 在每次出現時為相同或不同寡核苷酸；

L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烂基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

R_{13} 在每次出現時獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烂基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{3-8} 環烷基；

R_{12} 在每次出現時獨立地選自：氫、羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烂基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 0；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 1；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 0；

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3，且較佳為 1；

各 (e) 獨立地為 0 或 1，且較佳為 0；

各 (g) 獨立地為 0 或 1，且較佳為 1；且

(m) 為約 2 至約 32 之正整數（例如 2、4、6、8、16、32），

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0，一或多個 Z_1 含有寡核苷酸，且一或多個 Z_1 含有葉酸。

在一具體實例中，一個 Z_1 含有寡核苷酸且其餘 Z_1 含有

攪拌所得橙黃色混合物約 3 小時，在此時間期間溶液顏色變為深黃色。此時間後，使用 $0.45 \mu\text{m}$ 注射過濾器過濾溶液且使其裝載於以 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) (緩衝液 A) 預平衡之 Poros HQ 強陰離子交換管柱 (10 cm \times 1.0 cm，床體積為約 8 mL) 上。將管柱以 3-4 管柱體積之緩衝液 A 洗滌以移除過量 PEG 連結子。藉由於 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) (緩衝液 B) 中之 1M NaCl 之緩慢遞增梯度溶離產物。合併經分離溶離份且經由逆相層析 (Source RPC) 使其脫鹽且凍乾所得溶液以產生呈蓬鬆黃色固體狀之所需 PEG-LNA 化合物 (3.33 mg，以 Oligo 計，33.3 %)。

實施例 25. 製備化合物 28。

使化合物 22 與化合物 TAMRA-C(=O)-OSu (化合物 27) 反應以得到化合物 28。

實施例 26. 製備化合物 29。

將化合物 1 於 DMSO 中之溶液添加至化合物 29 於 DCM 中之溶液中。攪拌反應混合物且粗產物沈澱於 DCM/乙醚中。過濾固體且在真空中乾燥以得到化合物 29。

實施例 27. 製備化合物 31 (葉酸)₂-TAMRA-^{20K}PEG-Cys-SS-C₆-Oligo。

在實施例 6 中描述之條件下，使化合物 29 與寡核苷酸 (化合物 30) 反應以得到化合物 31。

實施例 28. 製備化合物 33。

將化合物 32 (4 臂 SC-^{20K}PEG，0.35 mmol) 添加至化合物 5 (相對於待經取代之每一 NHS，2 當量) 於 DMF/DCM

(25 mL/45 mL) 中之溶液，接著添加 DIEA (相對於每一化合物 5, 3 當量)。於室溫下攪拌懸浮液 5 小時。在真空下蒸發反應混合物且隨後在 0°C 下以 DCM/Et₂O 沈澱。過濾固體且隨後溶解於 80 mL DCM 中。添加 20 mL 0.1N HCl 之後，攪拌混合物 5 分鐘，隨後轉移至分液漏斗且將有機層分離且再次以 0.1N HCl (20 mL) 及食鹽水 (20 mL) 洗滌。將有機層經 MgSO₄ 乾燥，過濾且在真空下蒸發。在 0 °C 下，以 DCM/Et₂O 使殘餘物沈澱。過濾固體且在 30°C 下、在真空烘箱中乾燥至少 2 小時。¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 170.90, 156.66, 155.68, 153.86, 142.41, 133.85, 121.24, 72.96-69.30, 64.08, 53.01, 41.82。

實施例 29. 製備化合物 35。

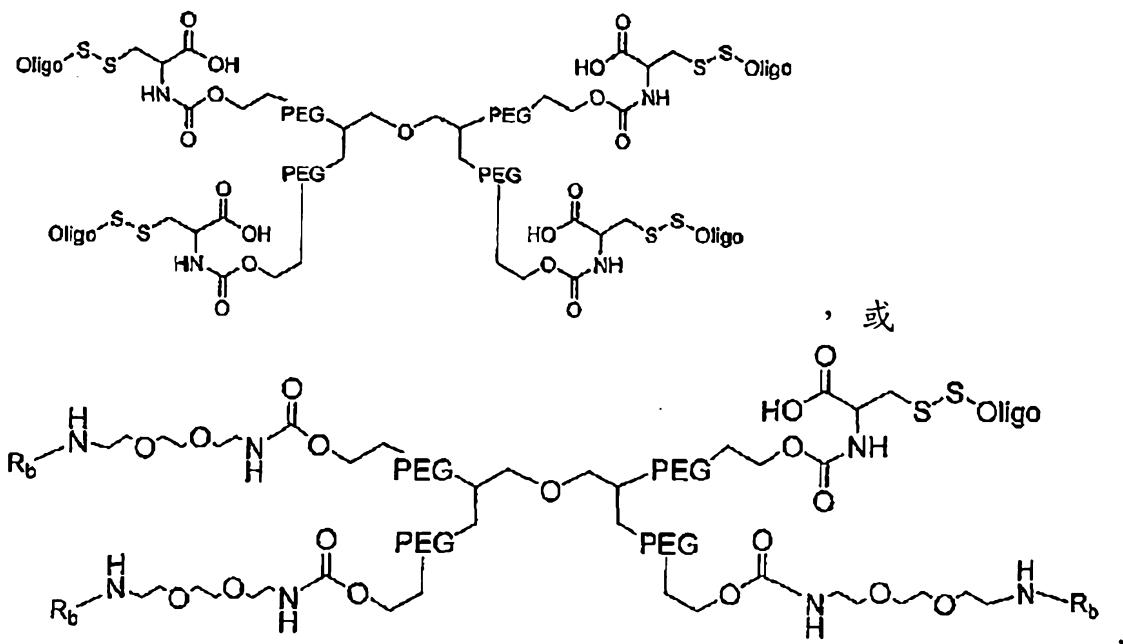
使用不同尺寸的經活化 PEG 聚合物來製備 PEG-LNA 接合物。通常，使用實施例 6 中描述之條件使化合物 33 與寡核苷酸 (化合物 34) 反應。每一化合物之描述提供於圖 6 中。將寡核苷酸 (化合物 34, 400 mg, 0.074 mmol) 添加至化合物 33 (505 mg, 0.012 mmol) 於 25 mL pH 6.5、100 mM 磷酸鈉中之溶液中。在氮氣下、於室溫下攪拌反應 5 小時。以 Source 15RPC 管柱純化反應混合物。以 100 mM TEAA 平衡管柱。隨後裝載反應混合物。以 1M NaCl、水及 50% CH₃CN 溶離管柱。收集化合物 35 且凍乾。產量 150mg。MALDI 證實 62,590 之分子量。

實施例 30. 式 (I) 化合物

實施例 31-37 證明使用可釋放地連結之具有下式之

PEG 分子改良寡核苷酸之腫瘤傳遞以及改良目標腫瘤 mRNA 之反義敲除。

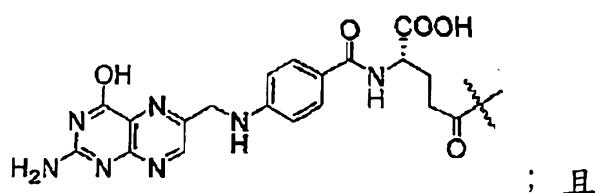
置換頁



其中

PEG 為聚乙二醇；

R_b 為



Oligo 統一地為 $5'-(CH_2)_6$ -抗-存活素 LNA (SEQ ID NO: 1，稱為“LNA1”)或 $5'-(CH_2)_6$ -抗-erbB3 LNA (SEQ ID NO: 6，稱為“LNA2”)，且

含有 PEG 之化合物之聚合部分之總分子量為約 40,000 道爾頓、20,000 道爾頓、10,000 道爾頓或 5,000 道爾頓。

舉例而言，化合物包括葉酸-^{40K}PEG-Cys-SS-LNA2 (化合物 101)、葉酸-^{5K}PEG-Cys-SS-LNA2 (化合物 10)、^{40K}PEG-Cys-SS-LNA1 (化合物 103)、^{10K}PEG-Cys-SS-LNA1 (化合物 104) 及 ^{40K}PEG-Cys-SS-LNA2 (化合物 105)。

實施例 31. 試管內穩定性

本文中描述之 PEG-Cys-SS-LNA 及葉酸-PEG-Cys-SS-LNA 接合物在緩衝液中展示良好穩定性。

置換頁

實施例 32. 葉酸-PEG-Cys-SS-LNA 接合物之試管內細胞吸收

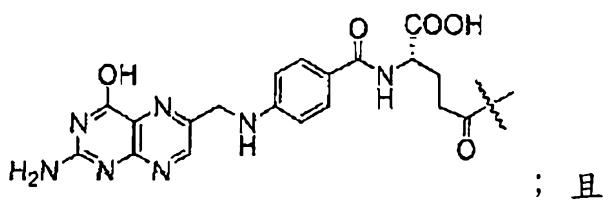
葉酸-PEG-Cys-SS-LNA 接合物之細胞吸收及與葉酸受體結合之特異性係在 KB 人類宮頸癌細胞株中評價。在 37 °C 下塗鋪 KB 細胞隔夜。在 37 °C 下，在存在或不存在 1 μM 游離葉酸之情況下，將細胞與 100 nM 葉酸-PEG-Cys-SS-LNA2-FAM 接合物 (經 FAM 標記之化合物 101 及 10) 一起培育 24 小時。PEG-Cys-SS-LNA2-FAM 接合物之量係以 LNA2 之量、而非聚合接合物之量計。洗滌細胞且在螢光顯微鏡及共焦顯微鏡下觀察樣本。葉酸-PEG-Cys-SS-LNA 接合物之細胞吸收之結果展示於圖 7 中。

在 37 °C 下、在存在或不存在 100 nM 游離葉酸之情況下，亦使 KB 細胞暴露於葉酸-^{5K}PEG-Cys-SS-LNA2-FAM (經 FAM 標記之化合物 10) 4 小時。洗滌細胞且藉由 FACS 分

其中

PEG 為聚乙二醇；

R_b 為



Oligo 為約 8 至 30 個核苷酸之寡核苷酸，

其中化合物之聚合部分具有約 40,000 道爾頓之總數量
平均分子量；及

(b) 向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予該化合物或其
鹽，

其中該投藥降低腫瘤細胞對預選基因之表現。

對預選基因表現之抑制可為 mRNA 分子之反義靶向之
結果，由此降低或消除 mRNA 轉譯為多肽。在以上方法具
體實例中，投藥可經哺乳動物之血流實現，例如藉由靜脈
內 (i.v.) 注射。寡核苷酸可包含 LNA。寡核苷酸包括 -5'
- $(CH_2)_6$ - 反義 - 存活素 LNA 寡核苷酸或 -5' - $(CH_2)_6$ - 反義
-ErbB3 LNA 寡核苷酸。

【圖式簡單說明】

圖 1 示意地說明實施例 7 中描述之化合物 1 之合成。

圖 2 示意地說明實施例 8-13 中描述之化合物 10 之合
成。

圖 3 示意地說明實施例 14-18 中描述之化合物 18 之合

成。

圖 4 示意地說明實施例 19-23 中描述之化合物 25 之合成。

圖 5 示意地說明實施例 25-27 中描述之化合物 30 之合成。

圖 6 示意地說明實施例 28-29 中描述之化合物 35 之合成。

圖 7 展示實施例 32 中描述之 PEG-LNA 接合物之細胞吸收。

圖 8 展示實施例 32 中描述之 PEG-LNA 接合物之受體特異性細胞吸收。

圖 9 展示實施例 33 中描述之 PEG-LNA 接合物之試管內功效。

圖 10 展示實施例 34 中描述之葉酸-PEG-LNA 接合物之活體內功效及生物分布。

圖 11 展示實施例 35 中描述之 PEG-LNA 接合物之生物分布。

圖 12 展示實施例 36 中描述之 PEG-LNA 接合物之活體內功效。

圖 13 展示實施例 37 中描述之 PEG-LNA 接合物之活體內功效。

為便於描述且不加限制，多臂 PEG（例如四臂 PEG）在圖中描述為“PEG”。

201004648

【主要元件符號說明】

無

七、申請專利範圍：

1. 一種將寡核苷酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之改良方法，其包含向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予式(I)化合物：

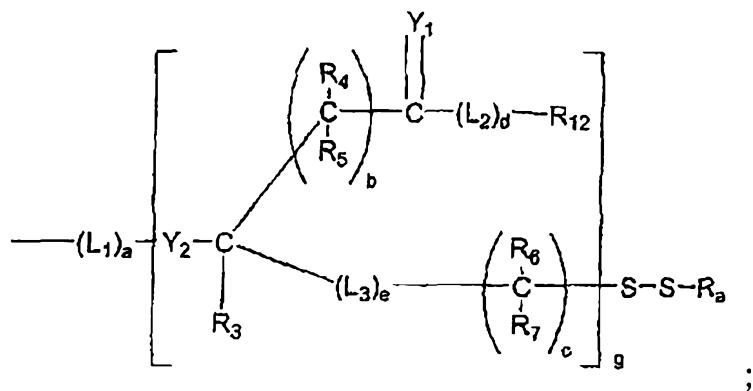
$R_1 - \{Z_1\}_m$ ，

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_1 相同或不同且選自由以下各基團組成之群：



$-(L_4)_{a1}-R_b$ ；及

$-(L_4)_{a2}-R_c$ ，

Y_1 在每次出現時獨立地為S或O；

Y_2 在每次出現時獨立地為NR₁₃；

R_a 在每次出現時為相同或不同寡核苷酸；

L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自由以下各基團組成之群：氫、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₉支鏈烷基、C₃₋₈環烷基及

C₁₋₆ 烷 氧 基 ；

R₁₃ 在每次出現時獨立地選自由以下各基團組成之群：
氫、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、C₃₋₁₉ 支鏈烷基及 C₃₋₈ 環烷基；

R₁₂ 在每次出現時獨立地選自由以下各基團組成之群：
氫、羥基、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、C₃₋₁₉ 支鏈烷基、
C₃₋₈ 環烷基及 C₁₋₆ 烷 氧 基 ；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3；

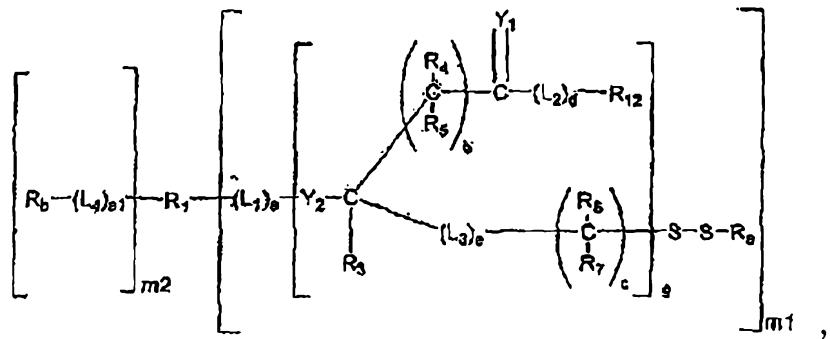
各 (e) 獨立地為 0 或 1；

各 (g) 獨立地為 0 或 1；且

(m) 為約 2 至約 32 之正整數，

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0，且進一步限制條件為一或多個 Z₁ 含有寡核苷酸。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該式 (I) 化合物具有式 (I') ：



其 中

(m1) 為約 1 至約 8 之正整數；

(m2) 為 0 或約 1 至約 7 之正整數；且

(m1) 與 (m2) 之和為約 2 至約 8 之整數。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中所有 Z_1 含有寡核苷酸。

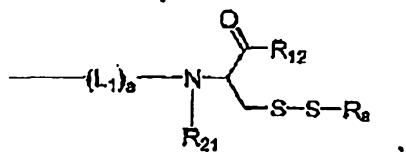
4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中一或多個 Z_1 含有葉酸。

5. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 R_{12} 為 OH 。

6. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 R_{3-7} 全部為氫。

7. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 (b)、(d) 及 (e) 為 0，且 (c) 為 1。

8. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 Z_1 具有下式：



其中，

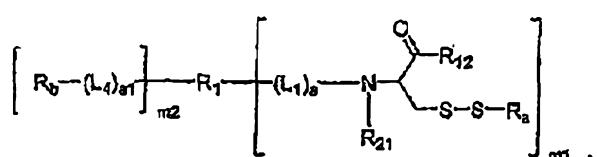
(a) 為 0 或 1；

(m) 為 2 至 8 之整數；且為 (2、4、8、16 或 32)；

R_{12} 在每次出現時係獨立地選自由以下各基團組成之群：羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{1-6} 烷氧基；且

所有其他變數與如申請專利範圍第 1 項中所定義相同。

9. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該式 (I) 化合物具有下式



其中 (a) 為 0 或 1。

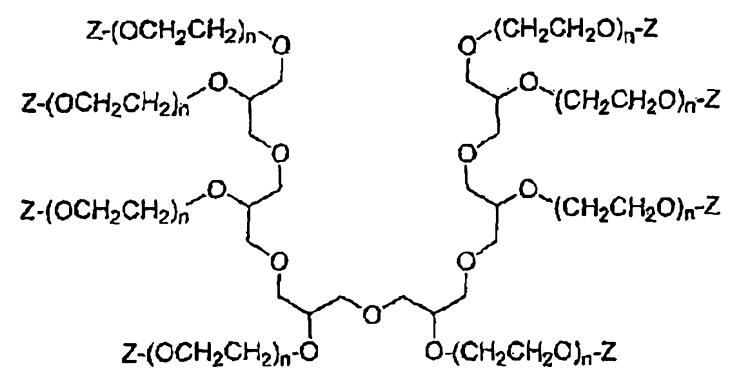
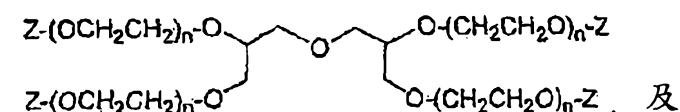
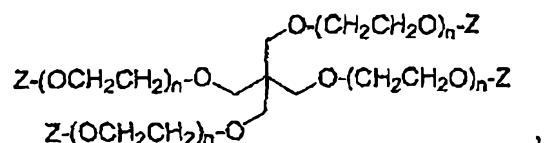
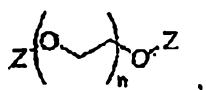
10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中 (m2) 為 0。

11. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 (m1) 為 1。

12. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 R_1 包含聚伸烷基氧化物。

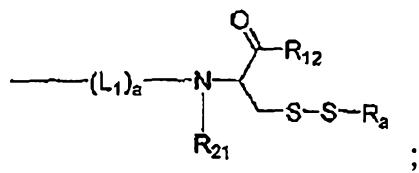
13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中 R_1 具有約 5,000 至約 25,000 道爾頓 (dalton) 或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平均分子量。

14. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該化合物係選自由以下各物組成之群：



其中

各 Z 獨立地為



-(L₄)_{a1}-R_b；或

-(L₄)_{a2}-R_c，

其中

(a) 為 0 或 1，

R₁₂ 在每次出現時係獨立地選自由以下各基團組成之群：羥基、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₉支鏈烷基及 C₁₋₆烷氧基；

(n) 為正整數且該化合物之聚合部分具有約 5,000 至約 25,000 道爾頓或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量平均分子量；且

所有其他變數與如申請專利範圍第 1 項中所定義相同。

15.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該寡核苷酸為單股或雙股寡核苷酸。

16.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該寡核苷酸為反義寡核苷酸。

17.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該寡核苷酸係選自由以下各物組成之群：脫氧核苷酸、核糖核苷酸、鎖核酸 (LNA)、短干擾 RNA (siRNA)、微 RNA (miRNA)、適體 (aptamer)、肽核酸 (PNA)、二胺基磷酸酯嗎啉基寡核苷酸 (PMO)、三環-DNA、雙股寡核苷酸 (誘餌 ODN)、催化 RNA (RNAi)、適體、斯皮格體 (spiegelmer)、CpG 寡聚物及其組合。

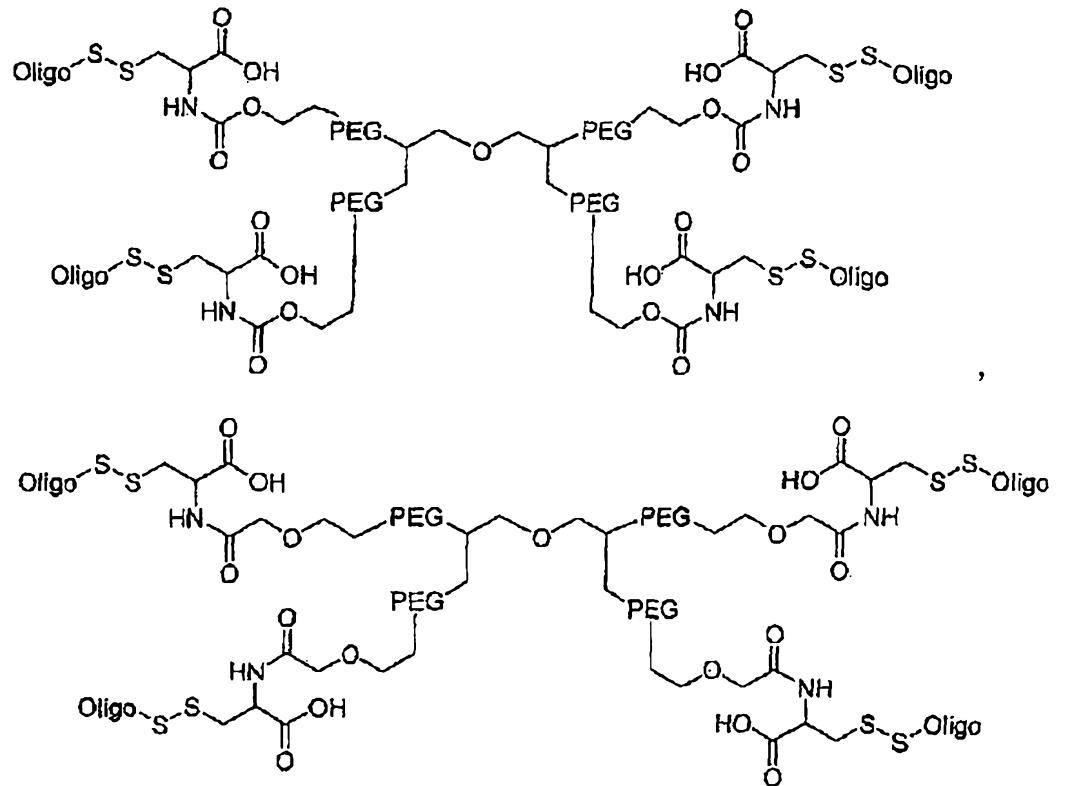
18.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該寡核苷酸具有 LNA 及硫代磷酸酯鍵。

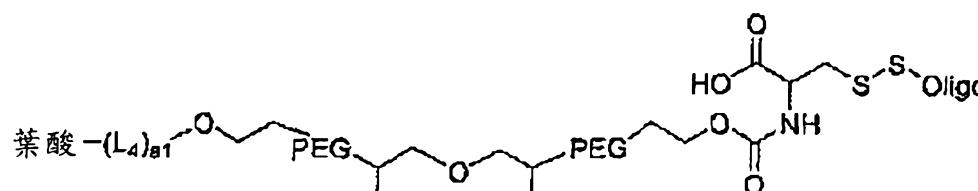
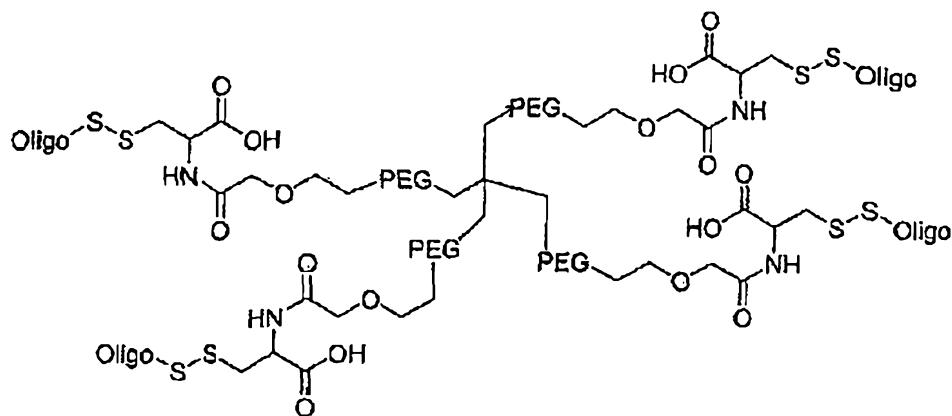
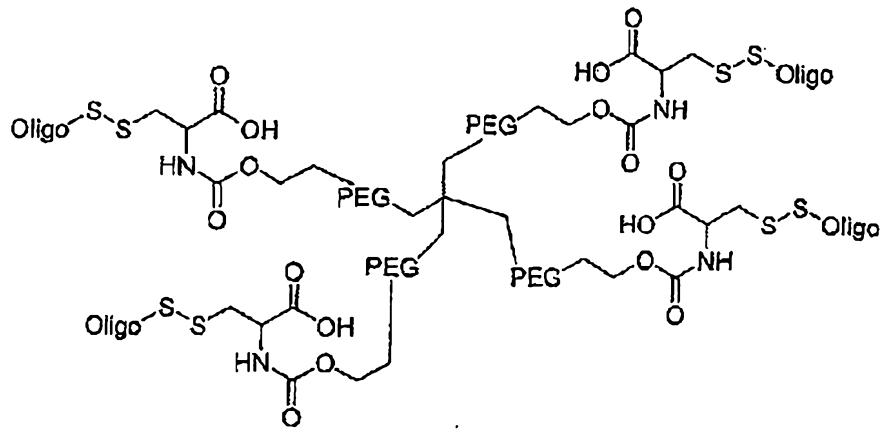
19.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該寡核苷酸具有約 8 至約 30 個核苷酸。

20.如申請專利範圍第 19 項之方法，其中該寡核苷酸係選自由以下各物組成之群：反義 bcl-2 寡核苷酸、反義 HIF-1 α 寡核苷酸、反義存活素 (survivin) 寡核苷酸及反義 Erb β 3 寡核苷酸。

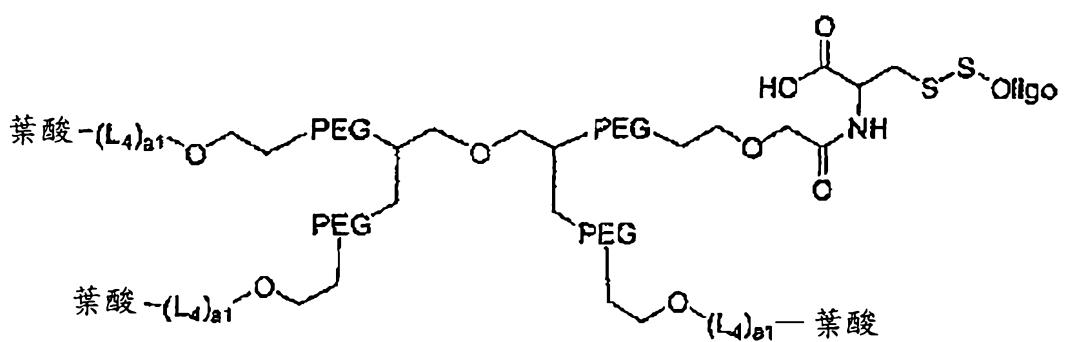
21.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該寡核苷酸包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO 2 及 3、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 5 及 SEQ ID NO: 6。

22.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該式 (I) 化合物係選自由以下各物組成之群：





，及



其中：

Oligo 為寡核苷酸；

PEG 為聚乙二醇且該化合物之聚合部分具有約 5,000

至約 25,000 道爾頓或約 20,000 至約 45,000 道爾頓之總數量
平均分子量；

(a1) 為 1；且

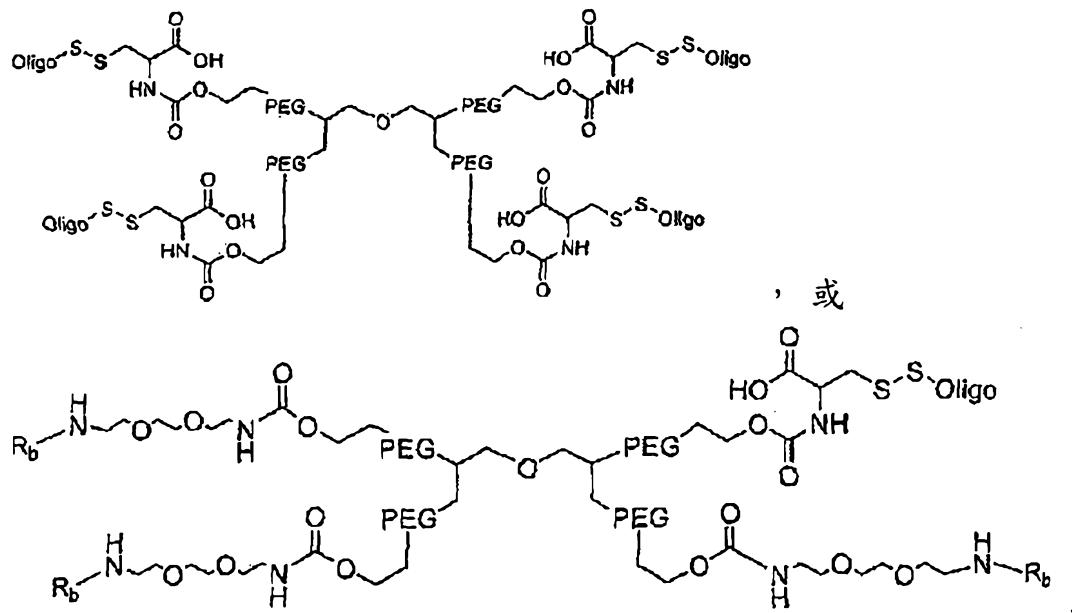
L_4 為 $-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}[\text{C}(=\text{O})]_{r'}-\text{O}-$ 或
 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ，其中 (r') 為 0 或 1。

23.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該等腫瘤細胞
為前列腺或子宮頸癌細胞。

24.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該投藥步驟包
含經由該哺乳動物之血流投藥。

25.一種將寡核苷酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之經改
良方法，其包含：

(a) 提供具有下式之化合物：

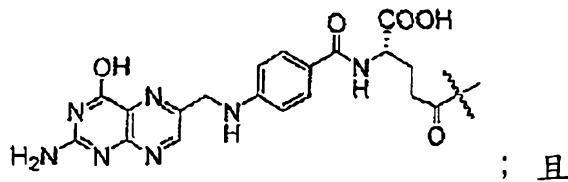


或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

PEG 為聚乙二醇；

R_b 為



；且

Oligo 為約 8 至 30 個核苷酸之寡核苷酸，

其中該化合物之聚合部分具有約 40,000 道爾頓之總數量平均分子量；及

(b) 向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

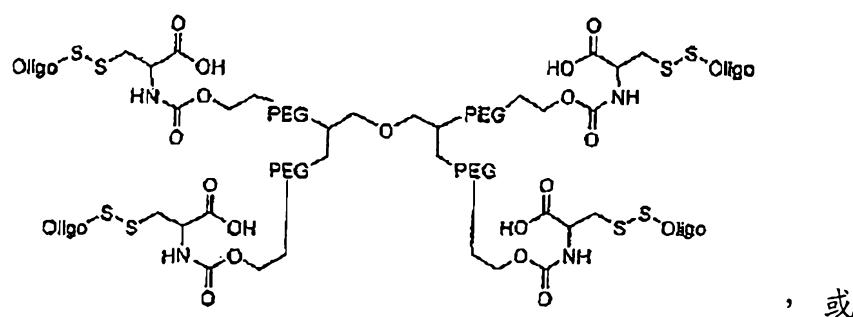
26. 如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該寡核苷酸包含 LNA。

27. 如申請專利範圍第 25 項之方法，其中 Oligo 為
 $-5'-(CH_2)_6-TsAsGsCsCsTsGsTsCsAsCsTsTsCsTsCs-3'$ 或
 $-5'-(CH_2)_6-GsCsTsGsCsCsAsTsGsGsAsTsTsGsAsG-3'$ ，其中
5'及 3'末端中之前三個核苷酸為 LNA 且“s”代表硫代磷酸酯鍵。

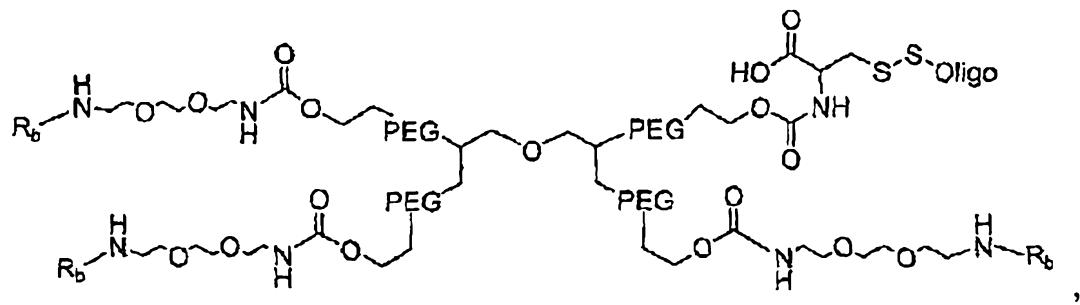
28. 如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該等腫瘤細胞為前列腺或子宮頸癌細胞。

29. 一種將寡核苷酸傳遞至哺乳動物之腫瘤細胞之經改良方法，其包含：

(a) 提供具有下式之化合物：



，或

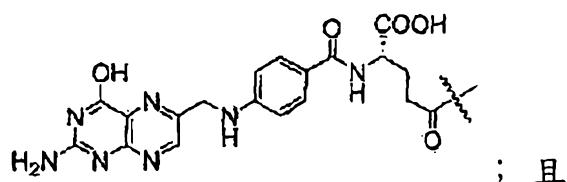


或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

PEG 為聚乙二醇；

R_b 為



；且

Oligo 為約 8 至 30 個核苷酸之寡核苷酸，

其中該化合物之聚合部分具有約 40,000 道爾頓之總數量平均分子量；及

(b) 向具有腫瘤細胞之哺乳動物投予該化合物或其鹽，其中該投藥降低該等腫瘤細胞對預選基因之表現。

30. 一種將寡核苷酸引入細胞中之方法，其包含：

使細胞與式 (I) 化合物接觸。

31. 一種抑制癌細胞之生長或增殖之方法，其包含：
使癌細胞與式 (I) 化合物接觸。

32. 一種式 (Ia) 化合物：

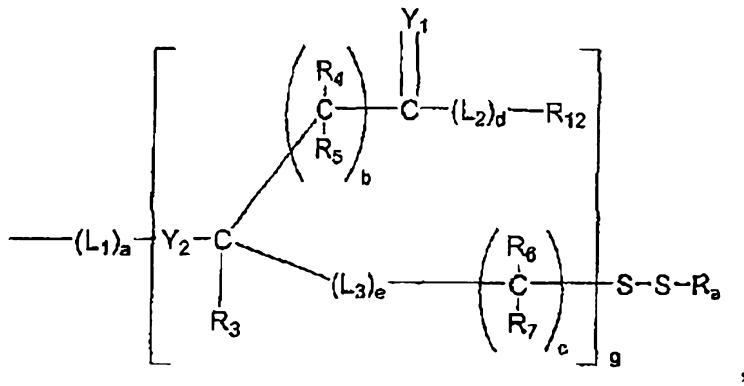
$R_1-\{Z_1\}_m$ ，

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中

R_1 為實質上無抗原性之水溶性聚合物；

各 Z_1 相同或不同且係選自：



$-(L_4)_{a1}-R_b$ ；及

$-(L_4)_{a2}-R_c$ ；

Y_1 在每次出現時獨立地為 S 或 O；

Y_2 在每次出現時獨立地為 NR_{13} ；

R_a 在每次出現時為相同或不同寡核苷酸；

L_{1-4} 各自在每次出現時為相同或不同雙官能連結子；

R_b 在每次出現時為葉酸；

R_c 在每次出現時為相同或不同診斷劑；

R_{3-7} 各自獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

R_{13} 在每次出現時係獨立地選自：氫、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基及 C_{3-8} 環烷基；

R_{12} 在每次出現時係獨立地選自由以下各基團組成之群：氫、羥基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 烷基、 C_{3-19} 支鏈烷基、 C_{3-8} 環烷基及 C_{1-6} 烷氧基；

(a) 及 (d) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

(a1) 及 (a2) 各自獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (b) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (e) 獨立地為 0 或 1；

各 (g) 獨立地為 0 或 1；且

(m) 為約 2 至約 32 之正整數，

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0，且進一步限制條件為一或多個 Z_1 含有寡核苷酸，且進一步限制條件為一或多個 Z_1 含有葉酸。

八、圖式：

(如次頁)

各 (c) 獨立地為 0、1、2 或 3；

各 (e) 獨立地為 0 或 1；

各 (g) 獨立地為 0 或 1；且

(m) 為約 2 至約 32 之正整數，

限制條件為 (a) 及 (g) 不同時為 0，且進一步限制條件為一或多個 Z_1 含有寡核苷酸，且進一步限制條件為一或多個 Z_1 含有葉酸。

八、圖式：

(如次頁)