

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

美 國 (地 區) 申 請 專 利 ， 申 請 日 期 ： 案 號 ： ， 有 無 主 張 優 先 權
 1995, 11, 22 60/007, 480

有 關 微 生 物 已 寄 存 於 ： ， 寄 存 日 期 ： ， 寄 存 號 碼 ：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

此申請案係依據在1995年11月22日提申的U.S.暫時申請案第60/007,480號。導致本發明之發展的研究係由一來自國家健康研究中心的獎助金所支持。政府在本發明中具有某些權利。

發明背景

1. 發明領域

本發明係關於一種用以將抗-生物降解之均質寡核苷酸綴合物引入細胞內的傳輸系統。

2. 背景資料

用於藥物設計的反訊息(反編碼)或反基因策略係依據對蛋白質合成的序列-專一性抑制,該抑制作用係分別地肇因於由合成之寡去氧核苷酸(oligo dN)及其類似物(1)所造成的與標的mRNA或體DNA的結合或遮蔽。在此策略中暗示著oligo-dNs穿越細胞膜的能力,並藉此到達含有其所欲標的之細胞隔室,且以足夠量進行之俾便與該等標的的相結合。在許多供利用作為反訊息的oligo-dN類似物中,非-離子性寡核苷酸甲基磷酸酯(oligo-MPs)已被廣泛地研究(2)。oligo-MPs係完全地抵抗核酸酶降解(3)且為具有對抗單純疱疹病毒第1型(4)、水疱性口炎病毒(5)及人類免疫不全病毒(6)的指示性活體外活性的有效之反訊息試劑,並可抑制ras p21的表現(7)。然而,對展示反訊息活性的oligo-MPs而言,其需存在於胞內介質中而呈達至100 μ M的濃度(4-7)。達到及維持此等用於治療目的之濃度存有數個困難,其包括花費、由於oligo-MP的非-專一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(2)

性結合所造成的潛在性副效應以及免疫原性 (immunogenicity)。此等困難可以兩種方法來避免：

- 1) 藉由專一性傳輸至一標的細胞株，而達到一局部高濃度的 oligo-MP。
- 2) 藉由促進該 oligo-MP 之傳輸通過該標的細胞株的細胞膜。

兩個策略皆有助於大大地降低產生一反訊息效應所需的 oligo-MP 之濃度。

外源 DNA 之傳輸至胞內介質係藉由將其之吸收與受體-調控之胞嚥作用相偶合而大大地促進。由 Wu and Wu (8) 的前驅研究顯示與連接至去唾液 α -酸醣蛋白 (asialoorosomucoid) 之聚-L-離胺酸靜電地相複合的外來基因 (8a-c) 或 oligo-dNs (8d) 係經由與去唾液酸醣蛋白受體的直接反應而被有效且專一地吸收入人類肝癌 (Hep G2) 細胞中。因為此起始研究，DNA 之受體-調控傳輸的其他例子已顯現包括有四-觸鬚狀半乳糖新醣胜肽·聚-L-離胺酸綴合物 (9)、三半乳糖化之二吡啶綴合物 (10)、葉酸綴合物 (11)、抗體綴合物 (12)、輸鐵蛋白綴合物 (13) 以及經由一雙硫鍵 (14) 而與一反訊息 oligo-dNs 相連接的經 6-磷酸甘露糖化之蛋白質 (14)。最近，將三-觸鬚狀 N-乙醯半乳糖胺新醣蛋白 [YEE(ah-GalNAc)₃] (15) 與人類血清蛋白相綴合，而該血清蛋白再與聚-L-離胺酸相連接，該綴合物顯示可有效地將 DNA 傳輸進入 Hep G2 細胞內 (16)。縱然經過改良，此等傳輸方法仍具有數個缺點：(1) 藉由起始材料 (例

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(3)

如最常為聚-L-離胺酸或牛血清蛋白)的結構異質性之優點以及所使用的策略,由此等材料所衍生的醣綴合物係為功能上等效但結構上異質的,因此,其等之物理及生物性質將很難完全界定;(2)多陽離子化合物(例如聚-L-離胺酸及陽離子性脂肪)在用於活體外及可預測地活體內傳輸DNA及oligo-dNs的濃度下係具有毒性的;(3)在各個例子中,需實驗地測定oligo-dN或DNA相對於陽離子綴合物的比例。

數個係為綴合物之異質混合物的合成產物已被敘述可用於oligo dN的傳輸上。例如, Bonfils et al.敘述了在經6-磷酸甘露糖化之蛋白質及寡核苷之間綴合物的形成,因為該蛋白質的修飾及雙硫鍵的形成並非在區位化學上被控制,所以該綴合物之形成產生了一種由在功能上相關但在結構上不同的分子所構成之混合物。

數個研究已敘述了含有可生物降解之磷酸二酯之核苷酸間鍵結的寡去氧核苷酸或DNA的胞內傳輸。因此,他們可能具有相對較短的胞內半衰期(half lives),且其效力亦隨後降低。例如,一完全之磷酸二酯16-單元[d(T)₁₆]在細胞內僅2小時後即被廣泛地降解。此項利用oligo-dNs及DNA的優點在反訊息之社群中已被充分地認識。本發明係利用於此所述之傳輸策略來獲致在生物學上穩定之oligo-MPs、其他寡去氧核苷酸(參見第1表)及其他生物性穩定之前-藥劑的傳輸。因此,一在反訊息試劑之濃度上的進一步降低可隨著其生物穩定性而被實現。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(4)

Merwin et al.敘述了利用新醣胜肽 YEE(ah-GalNAc)₃ 之綴合物的合成。他們的傳輸系統係為異質的且含有聚-L-離胺酸，該聚-L-離胺酸係用以將DNA靜電地與該綴合物相結合。此傳輸策略的缺點為：其結構異質性；肇因於其多陽離子電荷的潛在毒性；以及因為需要實驗地測定用於最佳傳輸之陽離子載劑相對於oligo-dN或DNA的比例而造成之在配製上的困難性。本發明之傳輸策略排除了所有的此等困難，因為其業經化學鑑定且在結構上係為同質，且係意欲傳輸生物學上安定的反訊息試劑及其他生物性穩定的前-藥劑。

因此，用於將oligo dN及oligo dN類似物傳輸至其胞內標的之得自於此的綴合物，係受困於為異質及／或快速降解的，且造成大多數有藥效的化合物可能會呈一稀釋狀態而與無效及／或有害之異質化合物一同被傳輸至該標的。

發明簡介

本發明之一目的係提供含有非-可生物降解之甲基磷酸酯的核苷酸間鍵結的同質寡去氧核苷甲基磷酸酯綴合物。此獲致了生物性質上安定之非-離子性寡去氧核苷的傳輸進入細胞中。

本發明之進一步目的係提供一種用以合成寡去氧核苷異質體(chimeras)之綴合物的方法，該異質體含有所有的2'-O-甲基核糖核苷以及由交互相間之甲基磷酸酯及磷酸二酯或其他具生物穩定性之寡聚體所構成的核苷酸間鍵結

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(5)

。此等具生物穩定性之寡聚體包括但不受限於含有下列組份的寡去氧核苷酸類似物：所有的2'-去氧核糖核苷及由交互相間之硫代磷酸酯與甲基磷酸酯所構成的核苷酸間鍵結；所有的2'-去氧核糖核苷及硫代磷酸酯之核苷酸間鍵結；所有的2'-0-甲基核糖及硫代磷酸酯之核苷酸間鍵結。

本發明之進一步目的係提供在生物上非-可降解（或為抗-水解酶）之綴合物，該綴合物係包含可有效地穿越細胞膜並到達細胞質的oligo dN及／或oligo dN之類似物。使用於此之名詞“有效地”係意指，例如若綴合物存在於胞內介質中，則在37°下經24小時之培育期間後，胞內濃度將至少約為胞外濃度之3倍，且較佳為約10倍。

本發明之進一步目的係提供一種在結構上經界定且在化學上均一的“傳輸聚集體”，其由用於一種具組織／細胞型專一性、由配位子所引導且由受體所調控藥劑胞噬傳輸所構成，該藥劑在該標的細胞／組織中係不為可生物降解的。在配位子及前-藥劑之間的鍵結係為共價的，且經由一可與該配位子及該前-藥劑形成共價鍵的交聯劑來形成。可利用可與存在於該配位子及該前-藥劑上之各種官能基進行反應的廣泛種類之交聯劑，因此，許多在化學上獨特的鍵結可被構建。例如，配位子Yee(ah-GalNAc)₃（參見第1圖第1式）在其胺基端含有一自由胺基基團。該胺基基團將與異質二官能基交聯劑SMCC（第4表第3欄）區位專一地進行反應，俾以生成一藍胺鍵。若前藥劑被

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

五、發明說明(6)

化學地修飾而含有一游離巰基團(如參見第2表第9-14欄),則其將化學地與SMCC相組合而生成一硫醚鍵結。在此例中,在配位子及前-藥劑之間所生成的鍵結可被概述為醯胺/硫醚鍵。明顯地,在所有可能之組合中,數百個結構可藉由與配位子、交聯劑及前-藥劑相組合來配製

(敘述於第1-4表及第1圖中)。因此,其他之鍵結包括但不限於醯胺/醯胺鍵、硫醚/醯胺鍵、雙硫/醯胺鍵、醯胺/硫醚鍵及醯胺/雙硫鍵。該等鍵結亦可被進一步分類為生物性穩定的(硫醚及胺鍵)、少許生物性穩定的(醯胺鍵)以及生物性易分解的(雙硫鍵)。因此,該傳輸系統可被結構地修飾俾以作用在胞外及胞內介質的各種化學環境下。用於此傳輸系統之配位子包括但不限於展示在第1圖中者。用於此處之名詞“接觸基團”係指涉此等配位子。該等配位子係由一合成、經化學鑑定且在結構上同質的寡胜肽骨架,該寡胜肽骨架係由包括但不限於葡萄糖、N-乙醯基葡萄糖胺、半乳糖、N-乙醯基半乳糖胺、甘露糖及岩藻糖的數個糖類殘基中之任一者所醴化。用於此處的名詞“新醴胜肽”係指涉此等以及相似結構。另外,此等寡胜肽提供了骨架俾以與葉酸構建多價配位子。

用於此處之名詞“前-藥劑”係意指在特定化學鍵結之水解作用或生物還原時,被由綴合物中釋出而變得具有活性或變得較被包含為該綴合物中之一部分時更具活性的化合物。

用於此處之名詞“化學均一的”係意指至少95%且最

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(7)

佳為99%之該傳輸系統聚集體在組成物及在連結性上係為一單一品系。化學均一性係藉由聚丙烯醯胺凝膠電泳、反-相高壓液相層析、核磁共振、質譜法及化學分析來鑑定。該片語“經化學鑑定且結構上同質的”係與“化學均一的”可置換地使用。

用於此處之名詞“具基因專一性的”係意指該前-藥劑為一個具有一與一發現在被該綴合物所標的組織或細胞型中的基因之一部分或mRNA分子之一部分互補之序列的寡核苷酸（特別是一寡去氧核苷酸甲基磷酸酯或其類似物）。在一具基因專一性之前-藥劑及標的mRNA之間的一序列-專一性雙螺旋(duplex)之生成，將導致該mRNA之表現的抑制。

圖式簡述

第1圖 化學均一之綴合物的接觸基團。該n值係介於0至10間且包含0及10。

第2圖 新醣胜肽 $YEE(ah-GalNAc)_3$ (5)、oligo-MP $U^m pT_7$ (6)及經5'-乙二胺覆蓋之 $U^m pT_7$ (11)的結構。

第3圖 $[YEE(ah-GalNAc)_3]-SMCC-AET-pU^m pT_7$ (10)之合成的反應計劃。

第4圖 在綴合物10之合成中之中間產物的PAGE分析(15%聚丙烯醯胺、4 V/cm, 2小時)。第1道，經[5'- ^{32}P]-標記之化合物6(譜帶A)。第2道，[5'- ^{32}P]-胺複合物(譜帶B)及對應之胸腺嘧啶核苷-EDAC複合物(譜帶C)。第3道，[5'- ^{32}P]-硫醇5(譜帶D)及對應之胸腺嘧啶核苷-EDAC複合物(譜帶E)。第4道，

五、發明說明(8)

[5'-³²P]-綴合物 10 (譜帶 F) 及對應之胸腺嘧啶核苷-EDAC 複合物 (譜帶 G)。

第 5 圖 由 Hep G2 細胞所吸收之 1 μ M 綴合物 10 以及 oligo-MP 11 的時間流程，僅有該綴合物 10 (空心圓) 及存有游離 5 之 100 種類似物 (實心圓)，以及僅有 oligo-MP 11 (空心三角形) 及存有游離 5 之 10 種類似物 (實心三角形)。細胞被培育在 37° 下歷時 0、1 及 2 小時，且樣品係如在實驗部分中所述之方法來收集。各個數據點係代表三次測試之平均值 (± 1 標準偏差)。

第 6 圖 綴合物 10 被 Hep G2 細胞所吸收的時間流程。細胞被培育在 37° 下且樣品係如在實驗部分中所述之方法來收集。各個數據點係代表三次實驗之平均值 (± 1 標準偏差)。

第 7 圖 Hep G2、HL-60 及 HT 1080 細胞之綴合物 10 的組織專一性吸收。將細胞加以收集並測定在 3 及 24 小時時各細胞株的 [³²P] 的含量。完成重覆三次之實驗，且該數據係以平均值 ± 1 標準偏差來表示。

第 8 圖 綴合物 10 及藉由 N-乙酰基葡萄糖胺酶來移除端部 GalNAc 殘基而生成之綴合物 12 的組織分佈。圖 A：百分起始劑量 / 公克組織對注射綴合物 10 後之時間。圖 B：百分起始劑量 / 公克組織對注射綴合物 12 後之時間。

第 9 圖 追蹤子 3'-綴合物的結構。

第 10 圖 利用 5'-硫醇改質劑之自動化合成的反應計劃。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(9)

第11圖 1c之合成的反應計劃。

第12A圖 綴合物10的結構。該綴合物係被合成而具有位在該oligo-MP部分之5'-OH上的放射性磷酸根。該箭頭係標示該 ^{32}P 標記的位置。

第12B圖 以縮寫來表示的綴合物10之結構。結構12及3-6係為由PAGE分析所鑑定出之代謝物的推測結構。結構12及3-6係藉由分別以N-乙醯基葡萄糖胺酶、胰蛋白凝乳酶或0.1 HCl來處理所獲得。

第13圖 Hep G2細胞中之綴合物10之代謝物的放射線圖譜分析。第1道，化合物1；第2道，以N-乙醯基葡萄糖胺酶所處理之化合物1；第3道，以胰蛋白凝乳酶所處理之化合物1；第4至8道，以化合物分別培育2、4、8、16及24小時後的Hep G2細胞萃出物。

第14圖 肝細胞中之綴合物10之代謝物的放射線圖譜分析。第1道，化合物1；第2道，以N-乙醯基葡萄糖胺酶所處理之化合物1；第3道，以胰蛋白凝乳酶所處理之化合物1；第4道，以0.1 HCl處理；第5至9道，注射後2小時、1小時及15分鐘時的肝均質液萃出物。請注意第5與6道以及第7與8道係為複製。

第15圖 老鼠尿液中之綴合物10之代謝物的放射線圖譜分析。第1道，化合物1；第2道，以N-乙醯基葡萄糖胺酶所處理之化合物1；第3道，以胰蛋白凝乳酶所處理之化合物1；第4道，以0.1 HCl處理；第5至8道，注射後2小時、1小時及15分鐘時的尿液萃出物。請注意第5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

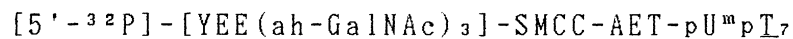
五、發明說明 (10)

與 6 道係為複製。

發明詳述

縮寫

為了方便起見，而使用下列縮寫：AET，2-胺基巯基乙醇（胺基乙硫醇）；ATP，腺嘌呤核苷三磷酸；BAP，細菌鹼磷酸酯酶；CPG，經控制之多孔玻璃載體；DIPEA，二異丙基乙胺；D-MEM，Dulbecco之經改質的Eagle培養基；DMSO，二甲基亞砷；D-PBS，Dulbecco之經磷酸緩衝的生理食鹽水；DTT，二硫蘇糖醇；EDAC，1-乙基-3-[3(二甲胺基)丙基]碳化二亞胺；EDTA，乙二胺四乙酸；FCS，小牛血清；GalNAc，N-乙醯基半乳糖胺；MEM，具有Earle鹽之最低必須培養基；SMCC，N-羥基琥珀醯亞胺基4(N-甲基馬來醯亞胺基)環己基-1 羧酸酯；Tris，三(羥甲基)胺。



(10)之合成。材料：甲基胺基磷酸酯合成子(synthon)係通常由JBL Scientific, Inc.所提供，且係為可商業地獲得。其等可經由依據熟習此技藝人士所建立之流程而獲得的核苷來輕易地合成之。所有用於U^mpT₇之自動化合成的其他試劑係購自於Glen Research, Inc.。HiTrap Q 陰離子交換管柱係購自於Pharmacia LKB Biotechnology。反相高解析度液相層析係利用購自於Rainin Instrument Co., Inc.之Microsorb C-18管柱來進行。氫氯化脒胺、1-乙基-3-[3-(二甲胺基)丙基]碳化二亞胺(EDAC)、1-甲基咪唑及二甲基亞砷(DMSO)、二硫蘇糖醇(DTT)以及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (11)

Ellmen氏試劑係購自於Aldrich，且無進一步之純化。二異丙基乙胺(DIPEA)係購自於Aldrich，且在使用前由氫化鈣再蒸餾。N-羥琥珀醯亞胺基-4-(N-甲基馬來醯亞胺基)環己基羧酸酯(SMCC)係購自於Pierce。Waters SepPak C-18管柱係購自於Millipore Corp.。YEE(ah-GalNAc)₃係依據Lee et al. (15a)來合成，且呈一水溶液而貯存在4°C下。腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)及[γ -³²P]-ATP係分別購自於P-L Biochemicals, Inc.及Amersham。聚丙烯醯胺凝膠電泳係利用含有15%之聚丙烯醯胺、0.089 M Tris、0.089M之硼酸、0.2 mM EDTA (1X TBE)及7 M之尿素的20公分 X 20公分 X 0.75公釐凝膠來進行。將樣品溶於含有90%之甲醯胺、10% 1X TBE、0.2%之溴酚藍及0.2%之二甲苯藍的裝填緩衝液中。

實例 1

U^mpT₇之合成(6)。

此寡去氧核苷甲基磷酸酯係依據經建立之方法(17)而利用5'-0-(二甲氧三苯甲基)-3'-0-甲基-N,N-二異丙基胺基磷酸酯胸嘧啶而被合成在一經控制之多孔玻璃載體(CPG)上並去保護。被編入該寡聚體之5'端的最終合成子為5'-0-(二甲氧三苯甲基)-2'-0-甲基-3'[(2-氰乙基)-N,N-二異丙基]胺基磷酸酯尿嘧啶。該最終偶合步驟在5'端部核苷及其鄰接核苷之間置入一磷酸二酯鍵結，該鍵結容許了利用嗜菌體T4聚核苷酸激酶來磷酸化5'端之羥基，並因2'-0-甲基基團之存在而確保了該磷酸酯鍵的合理安

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (12)

定性。該粗製之 8-聚體係藉由 HiTrap Q 陰離子交換層析 (以含有 <25% 乙腈之緩衝液載入；以 0.1 M 之磷酸鈉 (pH 5.8) 來洗脫)，以及利用一線性梯度 (溶劑 A：50 mM 之磷酸鈉 (pH 5.8) 及 2% 之乙腈；溶劑 B：50 mM 之磷酸鈉 (pH 5.8) 及 50% 之乙腈；梯度：在 30 分鐘內 B 由 0 至 60%) 所進行之製備式反相層析 (Microsorb C-18) 來純化。由此所純化之該寡聚體係由分析式 HPLC 測得約 97% 純度，而僅被少量之 n-1 物種所污染。

實例 2

[5'-³²P]-5'-O-[(N-2-硫乙基)胺基磷酸酯]-U_mpT₇ (9)。

將該經純化之寡聚體 (168 nmole)、ATP (160 nmole)、H₂O (75 μl)、10X PNK 緩衝液 (5 mM DTT、50 mM Tris-HCl、5 mM MgCl₂、pH 7.6；10 μl)、[γ-³²P]-ATP (3000 Ci/mmol、100 μCi、10 μl) 以及 PNK (在 5 μl 內具有 150 U) 加以組合，且在 37°C 下培育 16 小時並烘乾。將殘餘物再溶解於 0.2 M 之 1-甲基咪唑 (pH 7.2，100 μl) 以及含有 0.3 MEDAC 之 1.0 M 氫氯化脘胺中 (100 μl)，並在 50°C 下加熱 2 小時 (18)。多餘之試劑係藉由 SepPak 來移除 (以 50 mM 磷酸鈉 (pH 5.8) 及 5% 乙腈載入；以 5% 溶於水中之乙腈來洗滌；以 50% 溶於水中之乙腈來洗脫)。將溶劑在真空下蒸發，且將粗製之脘胺複合物再溶解於含有 50 mM DTT 之 10 mM 磷酸中，並加熱至 37°C 歷時 1 小時。緩衝液中之鹽類及多餘之還原劑係如前述般由反應混合物中移

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (13)

除，並將該粗製產物在真空下乾燥。來自於化合物 6 且以 57% 之產率所生成的化合物 9 係供用於下一步驟而不需進一步之純化。

實例 3

將新醣胜肽 5 (336 nmol) 溶解於無水 DMSO 中 (40 μ l)，並以 DIPEA (336 nmol) 及 SMCC (336 nmol) 加以處理。令該反應在室溫下進行 4 小時，並隨後加入剛製備之硫醇 9。將反應混合物加以脫氣，並令其在室溫及真空狀態下緩慢地濃縮。將粗製之 10 溶解於甲醯胺裝填緩衝液中 (100 μ l)，且以 PAGE 來純化，並藉由壓碎及浸潤法 (crush and soak method) 來回收 (50% 在水中之乙睛)。精純之 10 的總產率為 25%。以 0.1 N HCl 加以處理 (37°C, 1 小時) 而造成 P-N 鍵之水解，10 生成了 - 磷酸化之 6；然而，6 與 DTT (50 mM、pH 8、37°C、1 小時)、3-馬來醯亞胺丙酸 (50 mM、pH 8、37°C、1 小時)、Ellman 氏試劑 (50 mM、pH 8、37°C、1 小時) 以及 BAP (70 U、65°C、1 小時) 不產生反應。利用 0.1 N HCl 及 BAP 來連續處理 10，而造成如預期般 [³²P] 之標記的完全喪失。以一相同方式所製備之 10 之未標記樣品的劑量分析，顯示每莫耳之綴合物中含有 3 莫耳之 N-乙醯半乳糖胺，而相符合於預期之構造。

($U^{mp}I_7$ 之莫耳體積吸收性係藉由包含在該結構中每一核苷之莫耳體積吸收性的總和而計算出為 59,750 L/mol-cm。此值與包含於該綴合物中之 GalNAc 殘基的莫耳數極為相符。) 氣助式電射出質譜法 (pneumatically assisted

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (14)

electrospray mass spectrometry) 在 M/Z 4080 處 (經計算出之質量為 4080.7) 產生一母離子 (陰離子型式)。

細胞之吸收實驗

材料：補充以 L-麩胺酸之具有 Earle 氏鹽的最低必須培養基 (MEM)、Dulbecco 之改質 Eagle 培養基 (D-MEM)、補充以 L-麩胺酸之 RPMI 培養基 1640 (RPMI)、Dulbecco 之磷酸緩衝生理食鹽水 (D-PBS)、小牛血清 (FCS)、丙酮酸鈉 (100 mM)、非-必須性胺基酸 (10 mM)、碳酸氫鈉水溶液 (7.5%) 以及胰蛋白酶 (0.25%；製備於具有 1.0 mM EDTA 之 HBSS 中) 係購自於 GIBCO BRL。人類肝細胞癌 (Hep G2)、人類纖維肉瘤 (HT 1080) 以及人類前骨髓白血病 (HL-60) 細胞係購自於 ATCC，且被維持在經補充以 10% FCS、1 mM 丙酮酸鈉及 0.1 mM 非-必須性胺基酸的 1X MEM 中 (Hep G2)，或經補充以 10% FCS 的 1X D-MEM 中 (HT-1080)，或經補充以 10% FCS 的 1X RPMI 中 (HL-60)。矽油係由 General Electric 所提供 (產品編號 SF 1250)。利用一 Coulter 細胞計數器來計算細胞。

實例 4

利用 Hep G2 或 HT 1080 的吸收實驗。

將細胞繼代至 2 公分之井中，並令其在適當之培養基中生長至一約 10^5 細胞/井的密度。將該等維持培養基吸出，並將該等細胞在 37°C 下以含有 2% FCS 及 1 μ M 經 [5'- 32 P] 標記之 10 的 0.5 ml 培養基中。經一指定的時間後，將該培養基之一 5 μ l 分量保存以用作閃爍計數，並將殘餘者

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (15)

吸出。以D-PBS (2X 0.5 ml)洗滌該等細胞、並以0.25%之胰蛋白酶加以處理(37°C下2分鐘)並將其懸浮於含有10% FCS之新鮮生長培養基中。將該懸浮細胞層覆在1.7 ml之錐形離心管內之矽油(0.5 ml)上，並以14,000 rpm (12,000 g)之速率藉由離心30秒加以沈澱。將上清液小心傾出，並將細胞沈澱物以一100 μ l含有0.5%之NP 40、100 mM之氯化鈉、14 mM Tris-HCl及30%之乙腈的溶液來分解。放射性強度以及依其推知之在該溶胞液中之¹⁰的量係藉由閃爍計數法來測定。

實例 5

利用HL-60細胞的吸收實驗。

在室溫下，利用 7.5×10^6 之HL-60細胞來前-處理被補充以2% FCS及 1μ M之 $[\gamma - ^{32}P]$ -¹⁰的RPMI培養基歷時5分鐘。將細胞藉由離心(5分鐘)加以移除。將該培養基(31 ml)傾出並加入 7.5×10^6 之新鮮HL-60細胞。最後將該等細胞加以懸浮並將細胞懸浮液分成6個0.4 ml之部分。棄置殘餘物。將該細胞培育歷時一限定之時間，隨後藉由離心來收集(5分鐘)並懸浮在0.5 ml之D-PBS內，且將其層覆在1.7 ml之錐形離心管內的矽油上。將該等細胞以離心來沈澱(12,000 g、30秒)、經溶胞並將在該細胞中之經 $[^{32}P]$ -標記之物質的量藉由閃爍計數法來測定。

實例 6

用以合成其他綴合物的方法。

本發明之方法可被用以合成廣泛種類的有用綴合物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

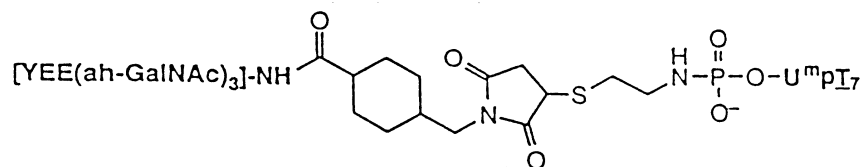
訂

線

五、發明說明 (16)

14個寡核苷類似物之例子係展示於第1表。第2表列舉了14個3'-及5'-磷酸酯修飾物的例子，該等修飾物提供了一用於進一步反應之一級胺或硫醇。第3表展示含有一N端胺基基團之新醣胜肽，以及用以修飾該胺基俾以提供一硫醇的方法。最後，第4表列舉了數種異質二官能性交聯劑及一種對組織蛋白酶D (cathepsin D)敏感的寡胜肽，其等可被用以將前-藥劑與配位子相連結。明顯地之，許多可得之其他試劑亦可適用於本發明。

一般而言，有二種反應流程能用以將寡聚體及新醣胜肽共價地相連結。第一種係利用一異質二官能性交聯劑進行一寡聚體及該新醣胜肽的偶合反應，此反應可被歸類為一種三成份反應。此流程提供了該偶合反應之完全區域性化學控制，並生成了經結構鑑定且同質的綴合物。例如，若利用一硫醇連接子（第2表之展示者1）而後-合成地修飾一展示於第1表的此型寡聚體（展示者1）之5'-端，並利用 SMCC（第4表之展示者3）而與 YEE(ah-GalNAc)₃（第3表之展示者1）相綴合，則可得一種具有一與下列相同之鍵結的綴合物：



任擇地，可將新醣胜肽修飾成為第3表之展示者2至5。硫醇的活化可利用諸如2,2'-二雙硫吡啶來達成。經

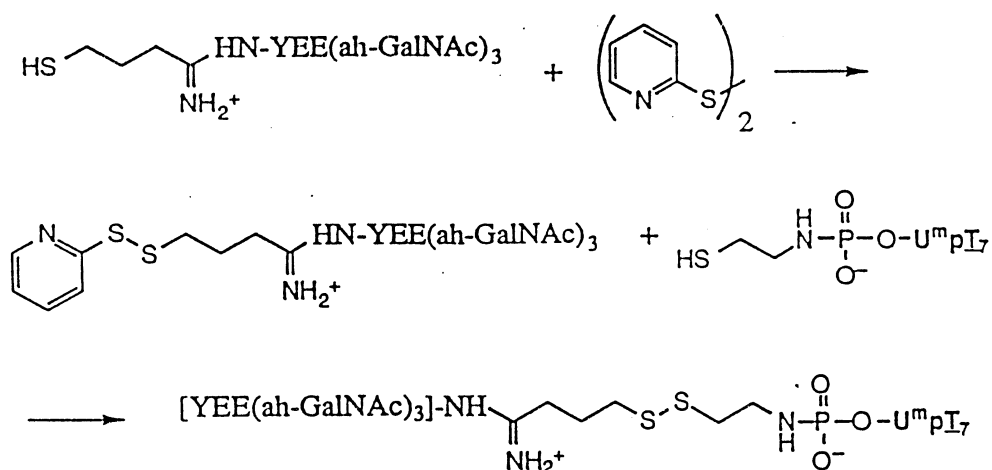
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(17)

活化之硫醇與經3'或5'硫醇修飾的寡聚體(第1表之展示者9-14)中之任一者所進行的反應,將提供一如下之介於該寡聚體及該新醣胜肽間的雙硫鍵結:



第二種流程提供一種接近在硫原子周圍具有各種立體障礙而無法利用商業上可得之交聯劑來接近(參照第4表之展示者4-6)的雙硫鍵之方法。在觀念上,該反應流程可被歸類為一種二成份反應,其中將一“半綴合物”加以修飾,且隨後被活化俾以與另一“半綴合物”進行反應。

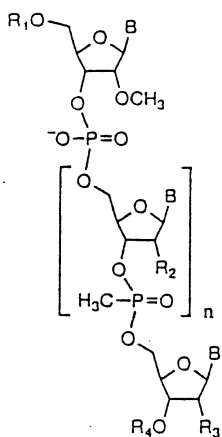
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明(18)

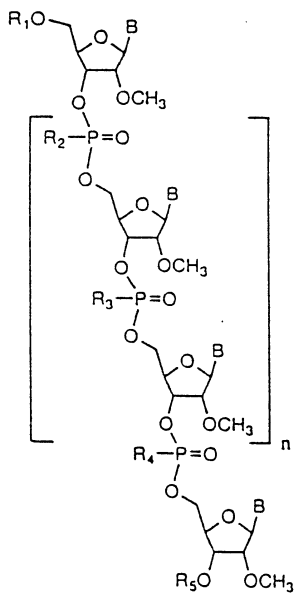
第 1 表 寡核苷酸甲基磷酸酯之類似物



表示者	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	5'-綴合物	H	H	H
2	H	H	H	3'-綴合物
3	5'-綴合物	-OCH ₃	-OCH ₃	H
4	H	-OCH ₃	-OCH ₃	3'-綴合物

B = A, C, G, or T

8 ≤ n ≤ 50



表示者	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
5	5'-綴合物	O ⁻	CH ₃	O ⁻	H
6	H	O ⁻	CH ₃	O ⁻	3'-綴合物
7	5'-綴合物	CH ₃	O ⁻	CH ₃	H
8	H	CH ₃	O ⁻	CH ₃	3'-綴合物
9	5'-綴合物	S ⁻	CH ₃	S ⁻	H
10	H	S ⁻	CH ₃	S ⁻	3'-綴合物
11	5'-綴合物	CH ₃	S ⁻	CH ₃	H
12	H	CH ₃	S ⁻	CH ₃	3'-綴合物
13	5'-綴合物	S ⁻	S ⁻	S ⁻	H
14	H	S ⁻	S ⁻	S ⁻	3'-綴合物

B = A, C, G, or T

8 ≤ n ≤ 50

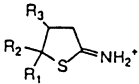
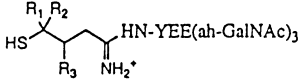

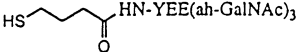
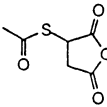
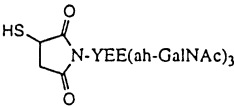
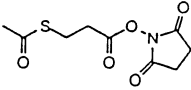
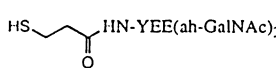
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(20)

第3表 對YEE(ah-GalNAc)₃之官能基修飾的例子^a

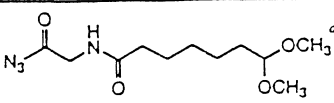
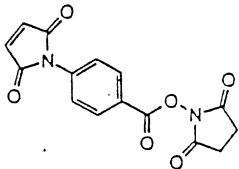
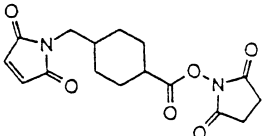
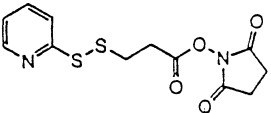
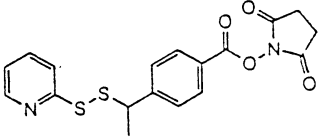
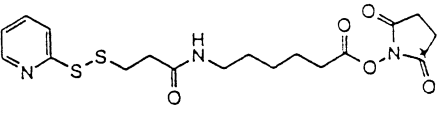
展示者	改質劑	配位子	反應基團	反應性
1	無	H ₂ N-YEE(ah-GalNAc) ₃	胺基	活性酯、異硫氰酸酯、 氰酸酯、胺
2 ^b			硫醇	1-鹵化物、馬來達亞胺、 經活化之雙硫化物
3			硫醇	
4			硫醇	
5			硫醇	

^a此等試劑可被用以修飾第1圖所展示之配位子中之任一者。

^b參見Goff, D.A.及Carroll, S.F. (1990)經取代之2-亞胺蒂奧倫：用以製備具有增加之安定性的雙硫交聯綴合物之試劑。 Bioconjugate Chem. 1:381-386。

五、發明說明(21)

第4表 經活化之oligo-MP、經活化之配位子及交聯劑之可能組合的例子

表示符	反應基團		交聯劑	連結
	Oligo-MP	配位子		
1	-NH ₂	-NH ₂		雙胺/雙硫
2	-SH	-NH ₂		雙胺/雙硫
3	-SH	-NH ₂		雙胺/雙硫
4	-SH	-NH ₂		雙胺/雙硫
5	-SH	-NH ₂		雙胺/雙硫
6	-SH	-NH ₂		雙胺/雙硫
7	-NH ₂	-SH	見表示符2-6	雙胺/雙胺或雙胺/雙硫
8	-NH ₂	-NH ₂	α -胺基酸-K16-F40C1PILFRL ^a (對組織蛋白過敏之連接子)	雙胺/雙胺
9	-SH	-SH	請以2,2'-雙硫二吡啶或與其相當之試劑來活化	雙硫

^a展示之試劑係為商業上不可得。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (22)

討論

[YEE(ah-GalNAc)₃]-SMCC-AET-pU^mpT₇之合成 (10)。

YEE(ah-GalNAc)₃ (5) (15a)及pU^mpT₇ (6) (17)之合成及純化係依據已建立之流程來進行。為了在5及6間形成一共價鍵結，而利用Orgel之方法(18)將6之5'端加以修飾。此將一雙硫鍵引入該oligo-MP中，該oligo-MP接著可被DTT所還原而得一5'-硫醇。利用可與5之N-端胺基相結合的異質雙官能性交聯劑SMCC，將新醣胜肽5修飾成一互補態。由SMCC所引入之馬來醯亞胺基團及該經修飾之oligo-MP之5'-硫醇間的偶合反應獲致了一介於該oligo-MP及新醣胜肽間之具有代謝安定性的硫醚鍵(第2圖)。為了起始該合成反應，利用T4聚核苷酸激酶及0.95對等量之ATP而將6予以磷酸化。以此種方式所進行之該端部-標記反應確保了約90%之ATP被消耗，而容許了用以放射性標記該綴合物之[³²P]-ATP的有效利用。5'-磷酸之修飾係以二步驟來達成。在50°C及存有0.15 M EDAC下，令經端部-標記之oligo-MP與在一含有1-甲基咪唑(pH7.2)之0.5 M氫氯化脒胺共同培育，俾以獲得5'脒胺胺基磷酸酯(65%產率)。在反應期間，生成了達35%之經胸嘧啶修飾的oligo-MP，且即使嘗試去改變反應條件(例如降低溫度及降低EDAC之濃度)亦不能排除其之生成。此副產物猜測係由EDAC與胸嘧啶之N-3間形成一胸嘧啶-EDAC複合物的反應所生成(19)。在pH 8下以50 mM之DTT來還原雙硫鍵是可定量的。雖然在此例中，一硫醇係後-合成地引入

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (23)

該 oligo-MP，部分係為利用酵素將 ^{32}P 引入至 5' 端，但該綴合物之構建可藉由在利用諸如可商業地得自於 Glen Research 之 6-(三苯甲硫基)己基胺基磷酸酯 (19) 的 oligo-MP 之固相合成期間，引入一硫醇連接子而輕易地進行。

在一分開的實驗中，將 5 與各一對等量之 SMCC (7) 及 DIPEA 在無水 DMSO 內組合，並在室溫下培育。因為存在於 5、7 及 9 上的反應基團係區位專一地進行結合，故此反應混合物與硫醇 9 的組合可在 SMCC 不被 5 完全耗盡的情形下進行。在此流程之後，當使用二對等量之新醣胜肽 5 時，9 被完全地轉換成 10。依 oligo 6 之量計，綴合物 10 之總產率為 24% (三次合成之平均值)。

細胞吸收實驗。在單獨或存有 100 對等量之游離新醣胜肽 5 的情形下，測試綴合物 10 與 Hep G2 細胞的細胞附着性，俾以顯示被該等細胞吸收係為 10 之新醣胜肽部分與肝細胞之碳水化合物受體相結合的結果。在相同之條件下，亦令一以乙二胺來修飾其 5'-端的 oligo-MP 與 Hep G2 細胞共同培育，以作為一對照組。以乙二胺所進行之其 5'-磷酸的修飾係藉由將 5'-磷酸化之 2 與在一含有 0.1 M 咪唑之 (pH 7) 緩衝液中的 0.1 M EDAC 在 37°C 下共同培育 2 小時，並接著藉由與一經氫氯酸乙二胺緩衝至 pH 7.0 之水溶液隔夜培育來達成 (Miller, P.S.; Levis, J.T., 未發表之結果)。此修飾避免了被細胞磷酸酯酶之作用而移除 5'-磷酸基。

在各個例子中，該經修飾之 oligo-MP 係以 $1 \mu\text{m}$ 之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (24)

濃度而存在於含有2%小牛血清(FCS)的培養基中，且該培養係於37°下進行。當將該綴合物單獨培育時會迅速地附著於該等細胞上，於2小時後，該綴合物即呈一線性形式而載入該細胞中至7.8 pmol/10⁶個細胞的程度(第5圖)。相反地，當一100-倍過量之游離5與1μM之綴合物共同存在時，10之附著僅為0.42 pmol/10⁶個細胞，此值與對照組oligo-MP 11(0.49 pmol/10⁶個細胞)所得者大致相同。在存有10-倍過量之5下，令Hep G2細胞與11共同培育以作為另一個對照組，俾以評定下列可能性：雖然在5及11之間並不存有共價鍵結，但5可導致11被Hep G2細胞所吸收。在2小時之培育後，附著於細胞上之11量僅為0.60 pmol/10⁶個細胞，而顯著地小於在綴合物10上所呈現的結果。此外，亦檢測更長時間之10被Hep G2細胞的吸收情形(1μM綴合物，37°C下)，並發現其呈線性至約24小時而達到一26.6 pmol/10⁶個細胞之數值(第6圖)。這些實驗的結果指出：(1)綴合物10係藉由專一地與去唾液酸醣蛋白之受體相結合而附著至Hep G2細胞上；(2)一介於oligo-Mp及新醣胜肽間的共價鍵結對於該oligo-MP與Hep G2細胞之結合的顯著增進是必須的；以及(3)在此研究所使用的條件下，Hep G2細胞對10的吸收作用在達到24小時時並未呈現飽合。

亦檢測該等化合物的細胞-種類專一性。已知去唾液酸醣蛋白受體係存在於肝細胞的表面上，且扮演一用以選擇性地標的用於傳輸各種治療性試劑之組織的裝置(21)。

五、發明說明 (25)

組織專一性係藉由在 37°C 下，將三種人類細胞株（即 Hep G2、HL-60 及 HT 1080 培育在含有 1 μ M 之綴合物 10 及 2% FCS 的培養基中歷時 3 及 24 小時來檢測。而唯一展現對 10 之顯著吸收的細胞株為 Hep G2。經培育 3 及 24 小時後，分別有 8.5 及 26.7 pmol / 10⁶ 個細胞與該細胞相結合（第 7 圖）。相對地，經 24 小時後，僅分別有 0.10 及 0.53 pmol / 10⁶ 個細胞與 HL-60 細胞及 HT 1080 細胞相結合。此結果與先前之發現相符合，該等發現顯示綴合物 YEE(ah-GalNAc)₃-HSA-聚-L-離胺酸係主要將 DNA 傳輸至老鼠的肝臟內 (16)。

一新穎之 oligo-MP 新醣胜肽綴合物 [YEE(ah-GalNAc)₃]-SMCC-AET-pU^mpT₇ (10) 的細胞附著性及細胞-種類專一性，係利用三種細胞株來檢測。Hep G2 細胞對 10 之細胞附著性係顯著地具有效率，並呈線性至 24 小時而達到 26 pmol / 10⁶ 個細胞的最佳程度。若利用 10⁶ 個細胞來代表 1 μ l 體積的近似值，則此綴合物之胞內濃度可高達 26 μ M。此外，僅有少量之綴合物與 HL-60 或 HT 1080 細胞相結合，此顯示新醣胜肽 5 可以一高度選擇性之方式將 oligo-MP 6 傳輸至肝細胞。

全動物體之生物分佈及藥理動力學

[YEE(ah-GalNAc)₃]-SMCC-AET-[³²P]-pU^mpT₇ (10) 及 [YEE(ah)₃]-SMCC-AET-[³²P]-pU^mpT₇ (12) 之合成。

簡言之，母本寡核苷甲基磷酸酯 (oligo-MP) U^mpT₇ 係以 [γ -³²P]-ATP 及 ATP 來標記 5'-端，俾以獲得具有一 300 μ Ci / 14 nmol 之比活性 (specific activity) 的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (26)

$p^*U^m pT_7$ (*代表放射性核素之位置)。該5'磷酸酯係於1-甲基咪唑及水溶性碳化二亞胺之存在下，利用脘胺來進行修飾。所得之雙硫鍵係利用過量之二硫蘇糖醇來還原，並利用異質二官能性交聯劑SMCC而綴合至配位子 YEE(ah-GalNAc)₃上。綴合物(1)係藉由聚丙烯醯胺凝膠電泳來純化，再由該凝膠內萃出並利用一SepPak管柱來去鹽。將該精純之綴合物加以酵素地及化學地定性。一部分之綴合物以N-乙醯葡萄糖胺酶來處理，俾以完全地移除GalNAc殘基(12)。以PAGE分析來判定，10及12二者皆為>99%純度。將含有該等綴合物之溶液置入無菌試管內，並在無菌條件下冷凍乾燥以準備全動物體之生物分佈及藥理動力學實驗。

全動物體之生物分佈及藥理動力學

將綴合物10及12再溶解於無菌水中。各隻老鼠皆藉由尾部靜脈注射而接受 $0.11 \mu Ci$ (7 pmol)之綴合物10及 $0.036 \mu Ci$ (1.2 pmol)之12。在注射後15、30、60、120及1440分鐘時，收集所生成之血液、膀胱/尿液及組織樣品(肝、脾、腎及肌肉)。每一時間使用三隻老鼠而總共使用30隻老鼠。在取樣時，老鼠係藉由頸椎脫臼而致死。將整個溼組織在一閃爍計數瓶中稱重，並在 $50^\circ C$ 下以NCS溶解劑加以消化。將該樣品予以脫色、再溶於閃爍計數調理劑中，且藉由閃爍計數法來測定放射性含量。將初步之數據轉換成百分起始劑量/克組織，除了得自於膀胱者，因不易獲得完整之組織而以百分劑量/組織樣品來表示

(參見第8圖)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

後

五、發明說明 (27)

在15分鐘之時間點上，37%起始劑量／克組織的綴合物10係與肝臟相結合，而較低量，亦即分別為11%及2.4%係與膀胱／尿液及腎臟相結合。當考慮到肝臟係平均具有1.4 g之質量時，則在注射15分鐘後約有52%之起始劑量係與肝臟相結合。其他經測試之組織則在15分鐘後含有<1.2%之起始劑量。與肝臟相結合之放射性含量在較長之時間穩定地降低，而最後在24小時後達到一2.3%的程度。相對地，在膀胱及尿液中的綴合物含量於15及30分鐘之間增加，隨後降低至相似的程度。

缺少三個GalNAc殘基的綴合物12會迅速地與膀胱／尿液相結合，並與腎臟相結合至一較低之程度，且不對肝臟展示專一性。例如，在30分鐘時，對膀胱／尿液、腎臟及肝臟的起始劑量／克組織之百分率係分別為40%、5.0%及1.1%。

由這些數據明顯可見：(1)綴合物10係專一地與肝臟相結合；(2)綴合物10之結合係完全依配位子上GalNAc之存在而定；(3)綴合物10，或更像其代謝物，係在24小時內自肝臟內清除，並經腎臟排出鼠體，所以到達膀胱／尿液中。再者，因為發現於血液中之低量放射性相對於與肝臟相結合之大量放射性，吾人可下結論：綴合物10係被傳輸至肝細胞內，而非僅與肝臟相結合於組織間隙內。

用於化合物1b及1c的合成過程

本發明之化合物的其他例子係展示於第5表中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

後

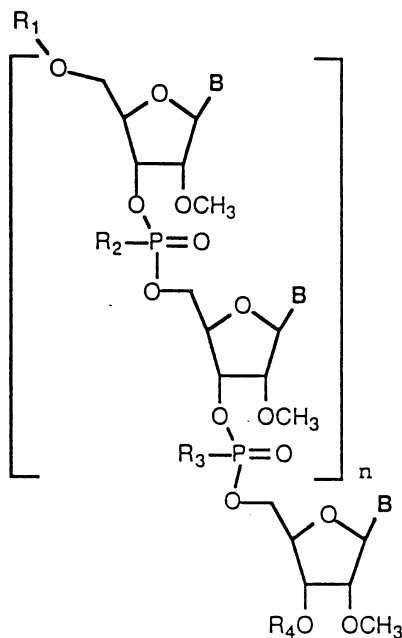
五、發明說明 (28)

第 5 表 交互以甲基磷酸酯類似物的寡核苷酸

序列

- 1 (n=7) ApGpUpCpApGpUpCpApGpUpCpApGpU
- 2 (n=7) GpUpUpCpUpCpApUpGpUpUpCpApG
- 3 (n=10) UpUpUpApUpApApGpGpGpUpCpGpApUpGpUpCpCpApU

其中 p: 磷酸二酯鍵結
 p: 甲基磷酸酯鍵結
 ps: 硫代磷酸酯鍵結



寡核苷酸	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	H	O ⁻	CH ₃	3'-綴合物
b	C6-硫醇-ps	O ⁻	CH ₃	3'-綴合物
c	5'-綴合物	O ⁻	CH ₃	3'-綴合物
d	配位子-SMCC-AET	O ⁻	CH ₃	H
e	EDA	O ⁻	CH ₃	H

其中，配位子：YEE(ah-GalNAc)₃
 5'-綴合物：YEE(ah-GalNAc)₃-SMCC-S(CH₂)₆-ps
 鍵結 (第 3 圖)。
 3'-綴合物：追蹤子單元 (第 9 圖)。
 EDA：乙二胺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (29)

利用下述合成方法，序列1-3可與在第5表底部以寡核苷酸a-e來表示之取代基相連結，俾以生成本發明之化合物的其他例子。例如，1b係由序列1與依據本發明之C6-硫醇- ps 、 O^- 、 CH_3 及3'-綴合物的取代基所構成（其結構展示於第9圖）。由1b（化合物13）及1c（化合物14）所表示之結構的化合物係如詳述於實例8及9般依據展示於第3圖中之流程來合成。明顯地，利用在起始材料中適當取代以及合成方法的變化，可將其他之組合類似地合成。

實例7

SMCC-YEE(ah-GalNAc)₃ (8)之合成（任擇之方法）。

將約1.2 μ mole之YEE(ah-GalNAc)₃在一玻璃反應瓶中加入以乾燥。將無水DMSO (2580 μ l)及無水DIPEA (3 μ l)加入此溶液中，接著以150 μ l在無水DMSO中之含有經真空乾燥的SMCC (6 mg)之溶液加以處理。將該混合物施以輕微振盪，並置於室溫下2小時。由反-相HPLC所進行之分析指出起始之YEE(ah-GalNAc)₃ (洗脫時間：7.3分鐘)完全轉換為所欲之產物SMCC-YEE(ah-GalNAc)₃ (洗脫時間：9.8分鐘)。隨後將該反應混合物以含有2% CH_3CN 之50 mM磷酸鈉(pH 5.8)稀釋至10 ml，並添加至Sep-Pak管柱內。以10 ml之含有2% CH_3CN 的50 mM磷酸鈉(pH 5.8)洗滌該管柱，並以10 ml之25% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 來洗脫產物。該產物於經降低之壓力下在一Speed-vac真空乾燥機內加以濃縮，並在一半-製備式反-相C18管柱內進一步純化。將含有精純之SMCC-YEE(ah-GalNAc)₃的分離部分傾入一Sep-Pak中並予

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (30)

以去鹽。產物之最終產率為 $1.89^{\circ}\text{D}_{276}$ 或 $1.35\mu\text{mole}$ 。

實例 8

經硫醇修飾之寡核苷酸的製備 (如第 5 表中之化合物 1b)。

含有具交互之磷酸二酯及甲基磷酸酯核苷酸間鍵結的 2'-O-甲基核糖的新型寡聚體 [即一隨機序列 (第 5 表序列 1)、抗-HBV (第 5 表序列 2) 及核 (第 5 表序列 3)] 被用於此研究中。經由一磷酸胺基酯合成子, 將一可被還原而產生一用於與新醣肽相綴合之硫醇基團的 5'-雙硫連接子予以引入。最後, 呈一 3'-綴合物型式的寡核苷酸追蹤子單元亦被用於此研究中, 以使可磷酸化之 3'-端可被用來引入放射性 ^{32}P 標記。利用來自於商業來源之對應胺基磷酸酯及甲基胺基磷酸酯 (Glen Research), 在一固-相 DNA 合成儀內合成此等經修飾之寡聚體。該追蹤子係利用 dT-5'-Lcaa-CPG 作為固相而合成, 且 dT-5'-CE 胺基磷酸酯、5'-DMT-5-[N(三氟乙醯基)己基-3-丙烯醯亞胺]-2'-去氧尿核苷、3'-[(2-氰乙基)-(N,N'-二異丙基)]胺基磷酸酯係可商業地得自於 Glen Research。該 5'-雙硫連接子係藉由與一 C6-雙硫氰乙基-胺基磷酸酯合成子 (Glen Research) 在該固-相合成之最終偶合步驟中相偶合而被引入。當需要時, 可依據標準之習知方法, 以低溼氧化劑來取代 Beaucage 試劑 (Glen Research), 俾以引發亞磷酸的硫化作用而獲致硫代磷酸酯。在 Genta 之一-壺法 (one-pot method) 下將該等寡聚體去保護, 並藉由三苯甲基黏附法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (31)

(trityl-on)來純化。最終之純化係利用一製備式反-相 C18管柱來進行。

雙硫部分之還原成為硫醇係藉由以 DTT 來處理含有 5'-雙硫之寡聚體而引發。因此，將一 2.5 OD₂₆₀ (~16 nmole) 之雙硫寡聚體溶於 400 μl 新鮮製備且經脫氣之在 10 mM 磷酸鈉中 (pH 8) 的 50 mM DTT 內。將該混合物在 37°C 下培育 2 小時。定量之還原作用係以反-相 HPLC 分析來確認，其顯示硫醇寡聚體較母本雙硫寡聚體更快洗脫出來。隨後將該硫醇寡聚體在一 Sephadex G-25 管柱內 (10 X 300 mm) 純化俾以移除 DTT 及鹽類。管柱裝填及樣品洗脫係由經脫氣之 20% 乙醇-水來進行。將含有純硫醇寡聚體之 G-25 分離部分立即使用於下一步驟中，俾以最小化非所欲之氧化作用。

實例 9

含有 SMCC-YEE(ah-GalNAc)₃ 之寡核苷酸的合成 (化合物 14, 即第 5 表中所示之 1c)。

將含有 1.8 OD₂₆₀ (12 nmole) 之純硫醇寡聚體 (1b) 的 G-25 分離部分在收集後立即與 SMCC-YEE(ah-GalNAc)₃ (50 nmole) 相混合。將該混合物在一真空乾燥機內濃縮至乾燥。將殘餘物溶於 100 μl 含有 0.1 M 磷酸鈉 (pH 7) 之經脫氣的 50% CH₃CN 中。將該溶液藉由在一真空乾燥機內真空處理約 5 分鐘來進一步脫氣。隨後將該溶液蓋緊於瓶中，並在室溫下培育至隔天以完成綴合作用。為測定綴合物之產率，以 [γ -³²P]-ATP 及 PNK 來磷酸化該反應之 0.5 μl 部分，並以 20% 變性 PAGE 分析之。該結果指出了該硫醇寡聚體

五、發明說明 (32)

與新醣胜肽的定量綴合。該綴合物係藉由其經凝乳胰蛋白酶消化後之顯著凝膠泳動性偏移以及其經DTT處理後之不偏移來確認。最後，將該綴合物藉由一Sephadex G-25管柱來分離，再利用20%乙醇予以洗脫，並接著用於進一步之研究中。

實例 10

Hep G2 2.2.15的細胞吸收實驗

經人類B型肝炎病毒DNA (22)安定地轉染的Hep G2 2.2.15 (一種人類肝細胞腫瘤細胞株) 係由G.Y. Wu博士所給予。其他適合之細胞株係為熟習此技藝人士所習知，例如PLC/PRF/5 (Alexander細胞，一種可分泌B型肝炎病毒表面抗原的人類肝腫瘤) 已被描述(22)，並可得自於美國菌種收集中心。

將Hep G2 2.2.15細胞維持於經補充以10%小牛血清之1X Dulbecco的改質Eagles培養基內。所有其他所用之材料係與以上細胞吸收段落所述者相同。

將Hep G2 2.2.15細胞接種在2 cm²之井中，並令其在含有10% FCS之1X DMEM內生長至 10^5 個細胞/井的密度。將該維持培養基吸出，將該等細胞在37°C下培育在含有2% FCS及1 μ M [5'-³²P]-1c、1d或1e之0.5 ml DMEM中。所有其他之方法係與在實例4中所示者相同。

為了測量1c之釋出作用，將Hep G2 2.2.15細胞加以接種，並與1 μ M經綴合寡聚體如前述般共同培育24小時。接著將含有寡聚體之培養基吸出，再將該等細胞洗滌二次

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

後

五、發明說明(33)

並隨後培育於0.5 ml之維持培養基內。如在該暫時申請案之細胞吸收段落所述者，在指定的時間將該等細胞加以收集並溶胞。釋出作用係藉由檢測放射性含量並藉由推測在該溶胞液內之綴合寡聚體的濃度來測定。

討論

將上述之細胞吸收實驗加以延伸俾以檢測1d與Hep G2 2.2.15細胞的細胞附著情形。如在oligo-Mp之例子中般，藉由以乙二胺修飾1之經 ^{32}P 標記的5'端而生成1e來製備一對照組。

此實驗之結果非常相似於應用經修飾之oligo-MP所展示者。經綴合之交互以2'OMe的寡聚體(1d)呈一線性形式而被Hep G2 2.2.15細胞吸收，並於24小時後至 $7.7 \text{ pmole} / 10^6$ 個細胞的程度(第6表)。該吸收在三小時增加至 $14.2 \text{ pmole} / 10^6$ 個細胞，並於24小時培育後達到 $28.5 \text{ pmole} / 10^6$ 個細胞的高峰。相對地，經EDA修飾之寡聚體(1e)與Hep G2 2.2.15細胞結合而在2小時後至 $0.275 \text{ pmole} / 10^6$ 個細胞、在三小時後至 $0.978 \text{ pmole} / 10^6$ 個細胞且在24小時培育後至 $0.385 \text{ pmole} / 10^6$ 個細胞的程度(第6表)。

藉由將一受硫代磷酸酯所保護之經 ^{32}P 標記的追蹤子置於1d之3'端來進行1d之進一步修飾俾以生成1c。此綴合寡聚體之吸收與由1d所示者非常相似。細胞結合係呈一線性而在12小時後達 $18.6 \text{ pmole} / 10^6$ 個細胞，並在24小時培育後達到一 $28.97 \text{ pmole} / 10^6$ 個細胞之峰值(第7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(34)

表)。

隨後，亦估測與細胞相結合之1c的排出速率。經綴合之交互以2'OMe的寡聚體在Hep G2 2.2.15細胞中之濃度在移除該處理24小時後呈一穩定降低而至一12.45 pmole/ 10^6 個細胞的數值(第8表)。

以上實驗顯示新醣胜肽5可以一高效率之形式，而將一由所有的2'-O-甲基核糖以及交互以甲基磷酸酯及磷酸二酯的核苷酸間鍵結所構成之生物性質穩定的寡聚體傳輸至肝細胞。此外，將一經硫代磷酸酯保護之追蹤子置於綴合寡聚體(1c)之3'端，在細胞吸收性上並不具有顯著影響。尤其是，此等研究亦顯示經噬入之寡聚體會排出細胞外，而在處理終止後24小時達到一為58%之最高吸收值。

第6表-由培養中之Hep G2 2.2.15細胞所吸收的經綴合之YEE(ah-GalNAc)₃-SMCC-2'-O-Me^{5'}AGpUCpAGpUCpAGpUCpAGpU^{3'}(1d)及EDA-2'-O-Me^{5'}AGpUCpAGpUCpAGpUCpAGpU^{3'}(1e)(pmoles/ 10^6 個細胞)

寡聚體	1小時	2小時	3小時	24小時
1d	3.63	7.71	14.16	28.52
1e	0.277	0.305	0.400	0.450

第7表-由培養中之Hep G2 2.2.15細胞所吸收的經綴合之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明(35)

YEE(ah-GalNAc)₃-SMCC-S(CH₂)₆-ps-2'O-Me-5'AGpUCpAGp

UCpAGpUCpAGpU^{3'}-U^mdT*^{3'}-^{3'}(dT-T)-³²P-EDA (1c)

(pmoles/10⁶個細胞)

寡聚體	4小時	8小時	12小時	16小時	24小時
1c	9.44	18.60	22.05	24.92	28.97

第8表-由培養中之Hep G2 2.2.15細胞所釋出的經綴合之

YEE(ah-GalNAc)₃-SMCC-S(CH₂)₆-ps-2'O-Me-5'AGpUCpAGp

UCpAGpUCpAGpU^{3'}-U^mdT*^{3'}-^{3'}(dT-T)-³²P-EDA (1c)

(pmoles/10⁶個細胞)

寡聚體	4小時	8小時	12小時	16小時	24小時
1c	25.88	23.96	20.23	16.04	12.45

實例 11

進行全動物體實驗俾以測試本發明之傳輸載體(亦即含有去唾液酸醣蛋白配位子以及經³²P標記之YEE(ah-GalNAc)₃者)的能力、俾以將合成oligo-MPs專一地傳輸至老鼠肝臟,並檢測在經分離之Hep G2細胞中以及於活體之老鼠肝臟及尿液中,此綴合物之代謝途徑。

為了比較,而合成一缺乏三個端部GalNAc殘基的綴合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (36)

物。此無糖綴合物係作為一用於研究在鼠體內配位子之 (GalNAc)-專一性吸收的對照組。

材料與方法

實例 12

組織分佈及清除之時間流程

重量為 22 至 35 克之雄性 CD-1 鼠 (Charles River) 經由尾部靜脈之單一注射，而接受了包含於 0.2 ml 之生理食鹽水中的 7 至 30 picomoles 之 $[^{32}\text{P}]\text{-[YEE(ah-GalNAc)}_3\text{-SMCC-AET-pU}^{\text{mp}}\text{T}_7$ (10) 或 7 pmoles 之 $[^{32}\text{P}]\text{-[YEE(ah)}_3\text{-SMCC-AET-pU}^{\text{mp}}\text{T}_7$ (12)。藉由頸椎脫臼而令老鼠在 15、30 及 60 分鐘以及 2、4、6 及 24 小時時犧牲。收集血液、肝臟、腎臟、脾臟、肌肉、上及下胃腸道以及糞便並加以稱重。將來自這些器官及組織的代表性樣品加以稱重並置入玻璃瓶內。為了收集尿液 (注射後 2 小時)，在短暫之乙醚麻醉下將老鼠之外尿道縫合，且在犧牲後將膀胱摘下並置入玻璃瓶內。將 Solvables[®] (NEN; 1 ml) 添加至各樣品中。接著該等樣品置於一滑動加熱器上而消化隔夜，並於隔天早晨移出以冷卻之。將該經消化之樣品以 3 至 7 滴之 H_2O_2 (30% w/v) 加以脫色，並加入 10 ml 之 Formula 989 (NEN) 閃爍調理劑。放射性含量係藉由閃爍計數法來測定 (Packard 1900 TR; <3% 誤差)。將注射劑量之分量與樣品一同計數算出百分劑量 / 器官或克組織。

實驗 13

分離自 Hep G2 細胞之代謝物的分析。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (37)

將細胞 (約 10^5) 培育在含有 $1 \mu\text{M}$ 經 [^{32}P] 標記之 1 的培養基內歷時 2、4、8、16 及 24 小時，再以 PBS 加以洗滌 (2X)，經砂油沈澱後予以溶胞 (0.5% NP-40、100 mM 氯化鈉、14 mM Tris-HCl pH 7.5、30% ACN)。以 50% 之水溶性乙腈 (v/v) 萃取該溶胞液二次。將該萃取液冷凍乾燥，再溶解於甲醯胺裝填緩衝液中並藉由 PAGE 分析之 (15%、2 V/cm、30 分鐘)。

實例 14

綴合物代謝之分析。

重量介於 22 至 35 克之間的雄性 CD-1 鼠經由尾部靜脈而接受 40 pmole 之 [^{32}P]-[YEE(ah-GalNAc)₃]-SMCC-AET-pU^mpT₇(10) 的單一注射。動物在 15、60 及 120 分鐘後被犧牲。肝臟及膀胱被收集如前，再置入塑膠瓶中並立即冷凍 (80°C)。令肝臟樣品融化至 0°C 並稱重 (平均質量 0.25 克)。將該組織在 4 倍體積之乙腈 / 水 (1:1) 內加以均質化 (Polytron PCU-2-110 組織均質機)。組織碎片係藉由離心來移除 (10,000 g、20 分鐘、Sorval 型號 RC-5B 冷凍高速離心機)。將上清液移除並重覆萃取過程。藉由與經脫色之均質液及上清液比較而估計出來自肝臟樣品之放射性的典型回收為 90%。將該上清液之一部分濾過一 Centricon 過濾器 (30,000 MWC; 20 分鐘、0°C、10,000 g; Herml Z 360 K 冷凍微離心機) 並予以冷凍乾燥。將殘餘物再溶解於 10 ml 之甲醯胺裝填緩衝液中 (90% 甲醯胺、10% 1X TBE

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

頁

五、發明說明 (38)

、0.2%溴酚藍及0.2%二甲苯藍)，以準備由聚丙烯醯胺凝膠電泳來分析 (PAGE; 15%、20 X 20 X 0.75 cm、2 V/cm、45分鐘)。尿液係由已融化至0°C之膀胱中收集而得，並在0°C下利用乙醇(1:2 v/v)去保護歷時30分鐘。沈澱之蛋白質係藉由離心而移除(16,000 g、20分鐘、0°C)。藉由比較上清液及蛋白質沈澱之分量而估計出放射性回收率為90%。將該上清液予以冷凍乾燥，再溶於甲醯胺裝填緩衝液中並藉由PAGE分析之(15%、20 X 20 X 0.75 cm、2 V/cm、45分鐘)。基準樣品係藉由將全-長度之綴合物(10)在個別之反應中與N-乙醯葡萄糖胺酶(在50 mM檸檬酸鈉內，pH 5.0)、胰蛋白酶(在含有200 mM KCl之10 mM Tris-HCl內，pH 8.0)以及0.1 N HCl來產生，各反應係在37°C下歷時30分鐘。

實例 15

肝臟之吸收及清除的組織分佈及動力學。

為了檢測綴合物10的在活體組織及器官中之分佈，而以前述方法，將老鼠經由尾部靜脈注射以經放射性標記之綴合物，並藉由閃爍計數法來測定附著於各器官之放射性含量。第9表顯示該綴合物與肝臟結合至最佳程度，而在注射15分鐘後達到一69.9%之注射劑量值。在其他組織中，注射後15分鐘時所測得之總放射性順序為(以增加順序排列)：肌肉 > 腎臟 > 血液 > 脾臟。尿液中放射性之峰值為28%之注射劑量，並在注射30分鐘後達到。附著於腎臟及血液的放射性含量隨時間而降低。值得注意的是，縱然

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (39)

可預期生成在肝臟中之綴合物代謝物會經由膽汁之排出而堆積於胃腸道中，但極少放射性附著於膽囊、上及下部胃腸道以及糞便中（第9表）。

第11表顯示缺乏三個端部GalNAc殘基之綴合物12係依如下順序而分佈：肌肉 > 血液 > 腎臟 > 肝臟 > 脾臟。經24小時研究後，肌肉及肝臟之放射性含量顯現保持恆定，而附著於血液及腎臟者則降低。尿液中放射性之峰值為在注射後30分鐘時之39.9%。以綴合物10進行一相同實驗以作為一對照組（第11表）。組織分佈之順序為（以放射性之增加順序排列）：肝臟 > 肌肉 > 腎臟 > 血液 > 脾臟。在注射後30分鐘時，尿液中含有17%之注射劑量。

實例 16

綴合物10之代謝物的聚丙烯醯胺凝膠電泳。

第13圖展示了與Hep G2細胞培育2至24小時後之綴合物10之代謝的PAGE分析結果。依據相對於對照組反應之電泳泳動性而鑑定出三類代謝物（在第13圖中被標示為I至III）。第I類顯示由四個化學上相異的品系所構成，其中1及2在所有的時間點上佔有優勢。1及2之分佈在較早之時間點時為約1:1，而在較長培育時間轉為2佔優勢。此例中之第三代謝物（第12b圖中之3）亦可見於各時間點上，該代謝物與一藉由凝乳胰蛋白酶來消化1所生成的物質共-移動(co-migrate)。此品系之相對量大致維持恆定，直到最終時間點（24小時）。第四品系（未經鑑定）可見於除了最後一時間點外之所有時間點上，其具有較3

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

五、發明說明(40)

略低的泳動性。所有的第 I 類代謝物之含量似乎在近於最終時間點處逐漸降低。第 II 類代謝物係由具有遠高於第 I 類品系之電泳泳動性的經放射性標記之品系。至少可見五條譜帶，然而並非所有的都存在於各時間點上。例如，位於最高及最低泳動位置的譜帶呈現增加直到 16 小時之時間點，接著在 24 小時處下降。優勢品系可見相同行為。此譜帶的最高強度發生在 8 小時處，隨後逐漸降低至 24 小時處。如同可見於第 I 類代謝物者，所有的第 II 類代謝物之量在近於 24 小時時間點處呈現降低。第 III 類代謝物在凝膠基質內不甚泳動，且大部分留置在聚丙烯醯胺凝膠之井內。此譜帶之強度係隨時間而增加，並在 24 小時處達到一最高值。

以一類似方式在完整鼠肝中進行 10 之代謝途徑的分析。第 14 圖展示得自於經注射以 [^{32}P]-標記之綴合物 10 之鼠肝樣品的肝臟均質萃取液之 PAGE 分析結果。

在注射後 5 分鐘之後，仍存有一顯著量之完整綴合物 10 (參照第 13 圖之第 I 類代謝物)。該凝膠之解析度並不足以辨別該二種品系。在此樣品中，經放射性標記之品系的殘餘物較 1 及 2 顯著地泳動得快，且不與任一對照組共移動。此等代謝物顯現具有一較寬之泳動範圍，且最低者顯著地較以 Hep G2 細胞所鑑定之第 II 類代謝物 (第 II' 類) 不易泳動。在其後的時間點處，幾乎所有完整的 10 及 12 已消失，其中第 II' 類代謝物之含量呈現增加。第 15 圖展示在靜脈投予經放射性標記之綴合物 10 後，老鼠尿液中所

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (41)

測得代謝物形式。第 I 類代謝物為唯一被測得之放射性標記品系。該綴合物呈現大部分完整而具有微少但顯著含量的轉變成二種品系之物質，該二種品系並不與任一對照組共-移動。各該品系之相對含量在實驗過程間係呈現維持恆定。在老鼠尿液中未見第 II、II' 或 III 類代謝物。

討論

在此所述之證據顯示經化學鑑定且為均質並經 [^{32}P]-標記之綴合物 10 可以一配位子-及細胞-專一性之方式通過 Hep G2 細胞的細胞膜。此等檢測之合理延伸為測定活體內 1 的組織分佈，並比較活體內及活體外 10 的代謝途徑，以及將該等數據與利用缺乏三個端部 GalNAc 殘基之綴合物所得者相比較。

該活體內組織分佈數據確認了利用培養之人類細胞所得之結果。該寡去氧核苷甲基磷酸酯對肝臟的高度選擇性標的 (前述之 $70 \pm 10\%$) 係經由該寡聚體與去唾液酸糖蛋白受體 (ASGP) 之配位子 YEE(ah-GalNAc)₃ 的共價連結而有效地達成。的確，依據全組織之測量，綴合物在肝臟中的濃度係 25-倍高於在血液中所見者，且約 10-倍高於在肌肉中所見者 (第 9 表)。此等結果較之於被 Lu et al. 所報導之類似實驗的結果為較佳且就某種角度而言為更優異，其中 Lu et al. 報導：一經 [^{32}P]-標記之反訊息 oligo-dN 與一去唾液酸糖蛋白-聚-L-離胺酸綴合物複合，而使其對肝臟之傳輸較其他組織為增加 (Lu et al., 1994) 然而，如該作者所提醒者，該複合物對肝臟之喜好是勉強的，因為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (42)

脾臟、肺臟及腎臟亦堆積此經放射性標記之 oligo-dN (例如在注射後5分鐘時，各組織之分佈分別為約6、4、2及2%之注射劑量/克；Lu et al., 1994)。進一步感興趣的是，將本案結果與Eichler et al. (1992)所報導者相比較，Eichler et al.係報導：在鼠體內以單獨或共價地與另外之三-觸鬚狀ASGP配位子N-[三(β-D-半乳吡喃糖基)甲基]-N^a-(乙醯基)甘胺酸醯胺(即三-乳糖酸(galacetate))相連結的脂肪降低劑(祥徽素)來測定生物性分佈及肝臟吸收之速率。該作者報導該游離藥劑及該綴合物的肝臟吸收係大約相等，此使他們作以下結論：該三-觸鬚狀ASGP配位子不能促進老鼠肝臟對該藥劑之吸收。此結果係與本案之發現相反，其為老鼠肝細胞係藉由配位子YEE(ah-GalNAc)₃之連結而大大地促進。

將老鼠注射以綴合物12以作為一對照組，該綴合物係缺乏三個端部GalNAc殘基，且因此而無法被ASGP受體所認識。如預期般，在肝臟中測出極少之放射性，且一遠遠較高量之放射性附著於其他組織上(第11表)。此結果延伸了本案先前之發現：經放射性標記之oligo-MP之標的至肝細胞為其與配位子共價連結的結果。

無糖配位子-寡聚體綴合物係非常相似於被個別報導之其他結果。將一由除了最後一個5'端磷酸二酯鍵外之所有甲基磷酸酯主鏈所構成的經氫標記之12聚體(d-T_p*TCCTCCTGCGG)以一單一劑量經靜脈注入鼠體內。在投藥後2、5、10、30、60及120分鐘時收集器官。該數據顯示放射性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(43)

不被分配於肝臟、肌肉或脾臟內，且由血漿內快速地消失而進入腎臟及尿液內。HPLC研究顯示該完整的12聚體經端部核苷酸之酵素切割而被代謝為11聚體，且此二者在靜脈注射後被快速地移入尿液中。因此，在此所報導的結果與先前所得者極為符合，此顯示在引導寡聚體綴合物之吸收上GalNAc端部的重要性。

為了解綴合物之活體外及活體內代謝途徑，我們利用PAGE分析檢測了得自於生長在培養基內之Hep G2細胞以及老鼠肝臟及尿液的萃取液。我們發現在Hep G2細胞及鼠肝內可生成三種代謝物(第I至III類)，而僅有第I類代謝物可由老鼠尿液中分離出來。第I類代謝物顯示係因配位子之降解而生成。利用二個酵素反應於一模擬此等品系之生成的嘗試中：N-乙醯葡萄糖胺酶及凝乳胰蛋白酶。前項處理會生成2，其因喪失三個端部GalNAc殘基所造成之輕微質量減低而較1泳動得稍快。因大部分配位子之喪失以及在總價上由-1減至-2，後項處理獲致一大致增加之泳動性(第12圖)。此二個模擬反應生成了具有仍與經放射性標記之完整oligo-MP共價鍵結之經修飾配位子的化合物。因此，可合理地總結：並泳動至該凝膠之相同區域的其他品系係由配位子之降解所造成，且不由位於1之其他易分解位置的鍵結切割。例如，一單一胺己基側鏈醯胺鍵之水解將造成具有介於2及3間之質量的5，並造成一在負價上由-1至-2的增加。在此例中，一具有介於2及3之泳動性的品系可由PAGE分析所預期。第II類代謝物顯著地較被鑑

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

像

五、發明說明(44)

定為第 I 類者泳動得快。我們推測其係因位在該 oligo-MP 之 5' 端的磷酸二酯鍵之未預期水解所造成。依據一利用蛇毒磷酸二酯酶來進行且未見切割現象之模擬反應，而預期此一位置將對於由核苷內切酶活性所造成之切割是安定的 (Sproat et al., 1989)。在此位置之切割將由 1 之殘餘物中釋出該 oligo-MP 之端部七個核苷酸，且更重要的是會生成一含有經標記之磷酸根的單一核苷酸 (第 12b 圖之 6) 的相對低分子量品系。該配位子之進一步降解將生成被鑑定為第 II 類代謝物的多種品系。僅在 Hep G2 細胞中發現的第 III 類代謝物顯示為含有放射性磷的高分子量品系而在凝膠內泳動一短距離。由 1 中釋出之放射性磷酸酯及其隨後編入高分子量細胞結構中 (核苷或蛋白質) 將會計入此譜帶中。已載述當胞內體 (endosome) 隔室成熟時會酸化，而在其與溶素體 (lysosome) 相融合前達到低至 5.5 的 pH 值 (Schwartz et al., 1985)。再者，在酸性狀態下，將 oligo-MP 繫於配位子上的胺基磷酸酯傾向水解而獲致 4 (第 12b 圖)。為測試因胞內體隔室之酸化而造成 P-N 鍵水解的可能性，將 1 在 37°C 下培育於 50 mM 之檸檬酸鈉中 (pH 5.5 及 6.0)。我們發現 1 在 pH 6 時是安定的，但在 pH 5.5 時於 24 小時後大致被水解成為 4 (>50%)，且以 PAGE 分析測出該水解專一地發生在胺基磷酸酯之 P-N 鍵處 (未展示本數據)。因此，可合理地總結：放射性磷酸根的編入細胞構造內係因為含有 1 之胞內體隔室的酸化而造成 P-N 鍵之水解，且因磷酸酯酶之作用而將端部磷酸根釋入細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (45)

胞周遭環境中所造成。在由 Hep G2 細胞所得之萃取液中所見的代謝物圖譜包括各類代謝物。在較早之時間點上，大部分之放射性包含於第 I 類品系中，主要為 1 及 2。在其後之時間點上，代謝物之分佈由第 I 類轉移至第 II 及 III 類，其中在最後時間點處所作之取樣中，大部分之放射性磷係位於第 III 類代謝物上，此指出該 P-N 鍵之實質水解已隨實驗之過程而發生。明顯地，一旦進入 Hep G2 細胞中，1 即顯著地被代謝，此顯示藉由本方法之反訊息 oligo-MP 或其他試劑的胞內傳輸是可實行的。

因為僅有位於 N-P 鍵處之磷被 ^{32}P 所標記，故不可能測量寡核苷酸類似物之代謝途徑。因為寡核苷酸之廣泛代謝會不利地影響其專一地與胞內互補核酸序列進行反應的能力，故需進行利用被標記於其他位置之寡核苷酸序列來進行進一步之研究。

得自於老鼠肝臟及尿液之萃取液的 PAGE 分析結果顯示在鼠肝中代謝物之生成在二方面上與利用 Hep G2 細胞所得者不同。首先，在鼠肝中，1 之消化生成了第 II' 類代謝物顯著地較快，並在僅 1 小時後可在此等品系中發現大部分放射性。第二，在肝臟中，第 II' 類代謝物之泳動性及種類不同於在經培養之細胞中的第 II 類代謝物，此顯示 1 在鼠肝及 Hep G2 細胞中所遭受之酵素作用是不同的。在 2 小時之時間過程中，極少或無第 III 類代謝物被生成，此一結果與由 Hep G2 細胞所得之結果相符合，相對於在鼠肝中 1 之廣泛降解，在尿液中之代謝物種類較不複雜且顯示僅

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(46)

由第 I 類代謝物所構成。在肝臟及尿液中所見之代謝物的不同種類顯示該綴合物被傳輸至肝細胞內，而不僅位於該器官之組織間隙。

結論

一經化學鑑定且在結構上均質的新醣胜肽-寡去氧核苷甲基磷酸酯綴合物(10)的活體外分佈及代謝顯示此綴合物之傳輸是高效率的，且在注射後15分鐘時於肝臟中達到約70%之注射劑量。加上配位子之快速且廣泛之降解，此等結果指出此一用於傳輸反訊息試劑(甲基磷酸酯或其他類似物)及其他藥學上之試劑的方法將會非常有用。再者，此等結果顯示了利用配位子之組織專一性及反訊息部分之核酸專一性的診斷假設過程之潛力，此提供了利用在此之前不明瞭的專一性來確保細胞功能的區域不正常性之方法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

泉

五、發明說明 (47)

第9表 以一30 pmol之劑量靜脈注射入鼠體內的 $[^{32}\text{P}]$ -
 $[\text{YEE}(\text{ah-GalNAc})_3]\text{-SMCC-SET-pU}^{\text{mp}}\text{I}_7$ 之動力學

器官	百分注射劑量／器官 注射後時間 (分鐘)									
	15	30	60	120	240	360	1440			
血液 ^a	2.79±0.18	2.25±0.48	1.42±0.38	0.90±0.26	1.09±0.16	1.23±0.30	0.61±0.11			
肝臟 ^a	69.9±9.9	41.8±9.3	25.2±2.4	14.2±2.2	10.6±4.2	8.5±0.6	3.2±1.4			
脾臟 ^a	0.08±0.04	0.08±0.03	0.2±0.01	0.17±0.04	0.24±0.02	0.16±0.08	0.25±0.04			
腎臟 ^a	3.00±1.26	2.12±0.27	1.58±0.15	1.26±0.19	1.25±0.21	1.80±0.70	0.92±0.19			
肌肉 ^a	7.83±1.49	8.42±1.51	8.46±2.32	8.76±0.92	13.0±3.9	17.2±4.6	13.9±1.3			
上部G. I.	3.63±1.85	2.72±9.41	6.28±1.74	3.73±2.80	3.19±0.78	3.82±0.87	2.01±0.28			
下部G. I.	0.24±0.05	0.33±0.20	0.38±0.14	0.34±0.05	0.63±0.26	0.50±0.22	0.48±0.09			
膽囊	0.27±0.23	0.62±0.14	0.7 ^b	0.4 ^c	0.31 ^c	0.17 ^c	NA			
糞便 ^b	0.01±0.01	0.05±0.05	0.05±0.03	0.27±0.26	1.40±1.11	0.47±0.23	0.55±0.41			

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(48)

^a 這些數值係被報導為在三隻動物中之平均百分注射劑量／器官±1標準偏差。約有0.5微居里(30 pmol)之綴合物經靜脈注入各鼠體內。各器官之質量係分別測定，且被用以由綴合物之百分率來測定百分注射劑量／器官。各器官或組織之質量的典型為：血液=0.07X驅體質量；肝臟=1.6±0.21 g；脾臟=0.17±0.05 g；腎臟=0.6±0.1 g；肌肉=0.4X驅體質量。平均驅體質量為32.4±2.0 g(標準偏差；n=21)。尿液中之放射性峰值為在60分鐘時之27.7±20.2%的注射劑量。此一大的標準偏差反映了在各動物體間之尿液產生及收集完全性上的多變性。

^b 本數值係得自於一單一測量。

^c 本數值係為二次個別測量之平均值。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

象

五、發明說明 (49)

第10表 在靜脈注射 [YEE(ah-GalNAc)₃]-SMCC-SET-pU^mpT₇
後堆積於各器官之百分注射劑量

百分注射劑量 / 器官 注射後時間 (分鐘)					
器官	15	30	60	120	1440
血液 ^a	1.71 ± 0.32	1.55 ± 0.23	0.87 ± 0.12	1.00 ± 0.37	0.44 ± 0.13
肝臟 ^a	42.4 ± 8.0	28.9 ± 0.97	21.7 ± 3.0	18.6 ± 6.5	2.89 ± 0.45
脾臟 ^a	0.04 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.23 ± 0.04	0.30 ± 0.11
腎臟 ^a	0.93 ± 0.35	1.17 ± 0.11	1.18 ± 0.06	1.15 ± 0.13	0.68 ± 0.13
肌肉 ^a	9.95 ± 1.04	8.37 ± 1.26	8.85 ± 1.30	8.62 ± 0.97	8.63 ± 1.16

^a 這些數值係被報導為在三隻動物中之平均百分注射劑量 / 器官 ± 1 標準偏差。約有 0.1 微居里 (7 pmol) 之綴合物經靜脈注入各鼠體內。下列數值被用以由百分劑量 / 克組織來測定百分劑量 / 器官；血液之質量 = 0.07X 軀體質量；肝臟之質量 = 1.14 g；脾臟之質量 = 0.124 g；腎臟之質量 = 0.4 g；肌肉 = 0.4X 軀體質量。平均軀體質量為 23.7 ± 1.2g (標準偏差；n=15)。尿液中之放射性峰值為在 30 分鐘時之 17.1 ± 10.2% 的注射劑量。此一大的標準偏差反映了在各動物體間之尿液產生及收集完全性上的多變性。

五、發明說明(50)

第11表 在靜脈注射後， $[^3\text{P}]-[\text{YEE}(\text{ah-GalNAc})_3]-\text{SMCC}-\text{SET-pU}^{\text{m}}\text{pT}_7$ 之動力學

百分注射劑量 / 器官 注射後時間 (分鐘)					
器官	15	30	60	120	1440
血液 ^a	4.82 ± 0.27	2.35 ± 0.33	0.91 ± 0.43	ND	ND
肝臟 ^a	1.06 ± 0.21	1.14 ± 0.32	1.65 ± 0.91	1.38 ± 0.83	ND
脾臟 ^a	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.07	0.08 ± 0.08	ND
腎臟 ^a	2.46 ± 0.42	1.82 ± 0.03	0.88 ± 0.27	0.73 ± 0.30	ND
肌肉 ^a	12.9 ± 2.1	13.8 ± 2.4	25.8 ± 18.6	25.3 ^b	ND

^a 這些數值係被報導為在三隻動物中之平均百分注射劑量 / 器官 ± 1 標準偏差。約有 0.1 微居里 (7 pmol) 之綴合物經靜脈注入各鼠體內。下列數值被用以由百分劑量 / 克組織來測定百分劑量 / 器官；血液之質量 = 0.07X 驅體質量；肝臟之質量 = 1.14 g；脾臟之質量 = 0.124 g；腎臟之質量 = 0.4 g；肌肉 = 0.4X 驅體質量。平均驅體質量為 23.7 ± 1.2g (標準偏差；n=15)。尿液中之放射性峰值為在 30 分鐘時之 36.9 ± 13.5% 的注射劑量。此一大的標準偏差反映了在各動物體間之尿液產生及收集完全性上的多變性。

^b 本數值係為二次個別測量之平均值。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (51)

應明瞭許多有用之化合物可利用在此所述之方法，特別是利用詳載於第1至4表中之試劑及化合物來合成。目前之實例並非意欲限制本發明而僅為例示。明顯地，各種變化可被達成而仍被包含於本發明之範圍內。

1. Mirabelli, C K.; Crooke, S.T. (1993) Antisense oligonucleosides in the context of modern molecular drug discovery and development, in Antisense research and applications (Crooke, S.T., and LeBleu, B. Ed.) CRC Press, Boca Raton, pp. 7-35.
2. Ts'ou, P.O.P.; Aurelian, L.; Chang, E.; Miller, P.S. (1992) Nonionic oligodeoxynucleotide analogs (Matagen™) as anticodic agents in duplex and triplex formation. Ann. NY Acad. Sci. 600, 159-177.
3. Miller, P.S.; McParland, K.B.; Javaraman, K.; Ts'ou, P.O.P. (1981) Biochemical and biological effects of nonionic nucleic acid methylphosphonates. Biochemistry 20, 1874-1880.
4. (a) Smith, C.C.; Aurelian, L.; Reddy, M.P.; Miller, P.S.; Ts'ou, P.O.P. (1986) Antiviral effect of an oligo(nucleoside methylphosphonate) complementary to the splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early pre-mRNAs 4 and 5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2787-2791. (b) Kulka, M.; Smith, C.C.; Aurelian, L.; Fischelevich, R.; Meade, K.; Miller, P.; Ts'ou, P.O.P. (1989) Site specificity of the inhibitory effects of oligo(nucleoside methylphosphonate)s complementary to the acceptor splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate

五、發明說明 (52)

early mRNA 4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry 86, 6868-6872. (c) Kulka, M.; Wachsmann, M.; Miura, S.; Fischelevich, R.; Miller, P.S.; Ts'o, P.O.P.; Aurelian, L. (1993) Antiviral effect of oligo(nucleoside methylphosphonates) complementary to the herpes simplex virus type 1 immediate early mRNAs 4 and 5. Antiviral Res. 20, 115- 120. (d) Kulka, M.; Smith, C.C.; Levis, J.; Fischelevich, R.; Hunter, J.C.R.; Cushman, C.D.; Miller, P.S.; Ts'o, P.O.P.; Aurelian, L. (1994) Synergistic antiviral activities of oligonucleoside methylphosphonates complementary to herpes simplex virus type 1 immediate-early mRNAs 4, 5, and 1. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 38, 675-680.

5. Agris; C H.; Blake, K.R.; Miller, P.S.; Reddy, M.P.; Ts'o, P.O.P. (1986) Inhibition of vesicular stomatitis virus protein synthesis and infection by sequence-specific oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates. Biochemistry 25, 6268-6275.I

6. (a) Sarin, P.S.; Agrawal, S.; Civeira, M.P.; Goodchild, J.; Ikeuchi, T.; Zamecnik (1988) Inhibition of acquired immunodeficiency syndrome virus by oligodeoxynucleoside methylphosphonates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7448-7451. (b) Zaia, J.A.; Rossi, J.J.; Murakawa, G.J.; Spallone, P.A.; Stephens, D.A.; Kaplan, B.E.; Eritja, R.; Wallace, R.B.; Cantin, E.M. (1988) Inhibition of human immunodeficiency virus by using an oligonucleoside methylphosphonate targeted to the tat-3 gene. J. Virology 62, 3914-3917. (c) Laurence, J.; Sikder, S.K.; Kulkosky, J.; Miller, P.; Ts'o P.O.P. (1991) Induction of chronic human immunodeficiency virus infection is blocked by a methylphosphonate oligodeoxynucleoside targeted to a U3 enhancer element. J. Virology 65, 213-219.

7. (a) Brown, D.; Zhipeng, Y.; Miller, P.; Blake, K.; Wei, C.; Kung, H.-F.; Black, R.J.; Ts'o, P.O.P., Chang, E.H. (1989) Modulation fo ras expression by anti-sense, non-ionic

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明 (53)

deoxyoligonucleotide analogs. *Oncogene Research* 4, 243-252. (b) Yu, Z.; Chen, D.; Black, R.J.; Blake, K.; Ts'o, P.O.P.; Miller, P.; Chang, E.H. (1989) Sequence specific inhibition of *in vitro* translation of mutated or normal ras p21. *J. Experimental Pathology* 4, 97-107. (c) Chang, C.H.; Miller, P.S.; Cushman, C.; Devadas, K.; Pirolo, K.F.; Ts'o, P.O.P.; Yu, Z.P. (1991) Antisense inhibition of ras p21 expression that is sensitive to a point mutation. *Biochemistry* 30, 8283-8286.

8. (a) Wu, G.Y.; Wu, C.H. (1987) Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432. (b) Wu, G.Y.; Wu, C.H. (1988) Receptor-mediated gene delivery and expression *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 263, 14621-14624. (c) Wu, G.Y.; Wu, C.H. (1988) Evidence for targeted gene delivery to Hep G2 hepatoma cells *in vitro*. *Biochemistry* 27, 887-892. (d) Wu, G.Y.; Wu, C.H. (1992) Specific inhibition of hepatitis B viral gene expression *in vitro* by targeted antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 267, 146-12439.

9. Plank, C.; Zatloukal, K.; Cotten, M.; Mechtler, K.; Wagner, E. (1992) Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconjugate Chem.* 3, 533-539.

10. Haensler, J.; Szoka, F.C., Jr. (1993) Synthesis and characterization of a trigalactosylated bisacridine compound to target DNA to hepatocytes. *Bioconjugate Chem.* 4, 85-93.

11. (a) Kamen, B.A.; Wang, M.-T.; Streckfuss, A.J.; Peryea, X.; Anderson, R.G.W. (1988) Delivery of folates to the cytoplasm of MA104 cells is mediated by a surface membrane receptor that recycles. *J. Biol. Chem.* 263, 13602-13609. (b) Leamon, C.P.; Low, P.S. (1991) Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5572-5576. (c) Citro, G.; Szczylik, C.;

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (54)

Ginobbi, P.; Zupi, G.; Calabretta, B. (1994) Inhibition of leukemia cell proliferation by folic acid-polylysine-mediated introduction of c-myc antisense oligodeoxynucleotides into HL-60 cells. Br.J.Cancer 69, 463467.

12. Trubetskoy, V.; Torchilin, V.P.; Kennel, S.J.; Huang, L. (1992) Use of N-Terminal modified poly(L-lysine)-antibody conjugate as a carrier for targeted gene delivery in mouse lung endothelial cells. Bioconjugate Chem. 3, 323-327.

13. (a) Wagner, E.; Zenke, M.; Cotten, M.; Beug, H.; Birnstiel, M.L. (1990) Transferrin-polycation conjugates as carrier for DNA uptake into cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 34103414. (b) Wagner, E.; Plank, C.; Zatloukal, K.; Cotten, M.; Birnstiel, M.L. (1992) Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: Toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. Biochemistry 89, 7934-7938.

14. Bonfils, E.; Dupierreux, C.; Midoux, P.; Thuong, N.T.; Monsigny, M.; Roche, A.C. (1992) Drug targeting: synthesis and endocytosis of oligonucleotide-neoglycoprotein conjugates. Nucleic Acids Res. 20, 46214629.

15. (a) Lee, R. T.; Lee, Y. C. (1987) Preparation of cluster glycosides and N-acetylgalactosamine that have sub-nanomolar binding constants toward mammalian hepatic Gal/GalNAc-specific receptors. Glycoconjugate J. 4, 317-328. (b) Oshumi, Y.; Ichikawa, Y.; Lee, Y. C. (1990) Neoglycoproteins: Recent Progress and Future Outlook. Cell Technology 9, 229-238.

16. Merwin, J.R.; Noell, G.S.; Thomas, W.C.; Chion, H.C.; De Rome, M.E.; McKee, T.D.; Spitalny, G.L.; Findeis, M.A. (1994) Targeted delivery of DNA using YEE(ah-GalNAc)₃, a synthetic

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (55)

glycopeptide for the asialoglycoprotein receptor. *Bioconjugate Chem.* 5, 612-620.

17. (a) Miller, P.S.; Cushman, C.D.; Levis, J.T. (1991) Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates, in *Oligonucleotides and analogues. A practical approach* (Eckstein, E., Ed.) IRL Press, Oxford, pp. 137-154. (b) Hogrefe, R. I.; Reynolds, M.A.; Vaghefi, M.M.; Yang, K.M.; Riley, K.M.; Klem, R.E.; Arnold, L.T., Jr. (1993) An improved method for the synthesis and deprotection of methylphosphonate oligodeoxynucleosides, in *Methods on Molecular Biology, vol 20: Protocols for Oligonucleotides and Analogs* (Aragawal, S., Ed.) Humana Press, Inc. Totown, pp. 143-164.

18. (a) Chu, B.C.F.; Wahl, G.M.; Orgel, L.E. (1983) Derivatization of unprotected polynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 11, 6513-6529. (b) Chu, B.C.F.; Orgel, L.E. (1988) Ligation of oligonucleotides to nucleic acids or proteins via disulfide bonds. *Nucleic Acids Res.* 16, 3671-3691.

19. Gilham, P.T. (1962) *Title. J. Am. Chem. Soc.* 84, 687-688.

20. Ede, N.J.; Treagear, G.W.; Haralambridis, J. (1994) Routine Preparation of Thiol Oligonucleotides: Application to the Synthesis of Oligonucleotide-Peptide Hybrids. *Bioconjugate Chem.* 5, 373-378.

21. Wu, G.Y.; Wu, C.H., eds. (1991) *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, Marcel Dekker, Inc., New York.

22. Sells, M.A.; Chen, M.L.; and Acs, G. (1987), Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 1005-1009.

23. Jacinta, Skelly, et al. (1979) *Nature* 282:617-618.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 用以增進生物分子的細胞吸收之傳輸系統)

本案係揭示用於將生物性質安定且非離子性之寡核苷類似物的組織專一性傳輸至細胞內之寡去氧核苷甲基磷酸酯新醣胜肽綴合物及相關的化合物。

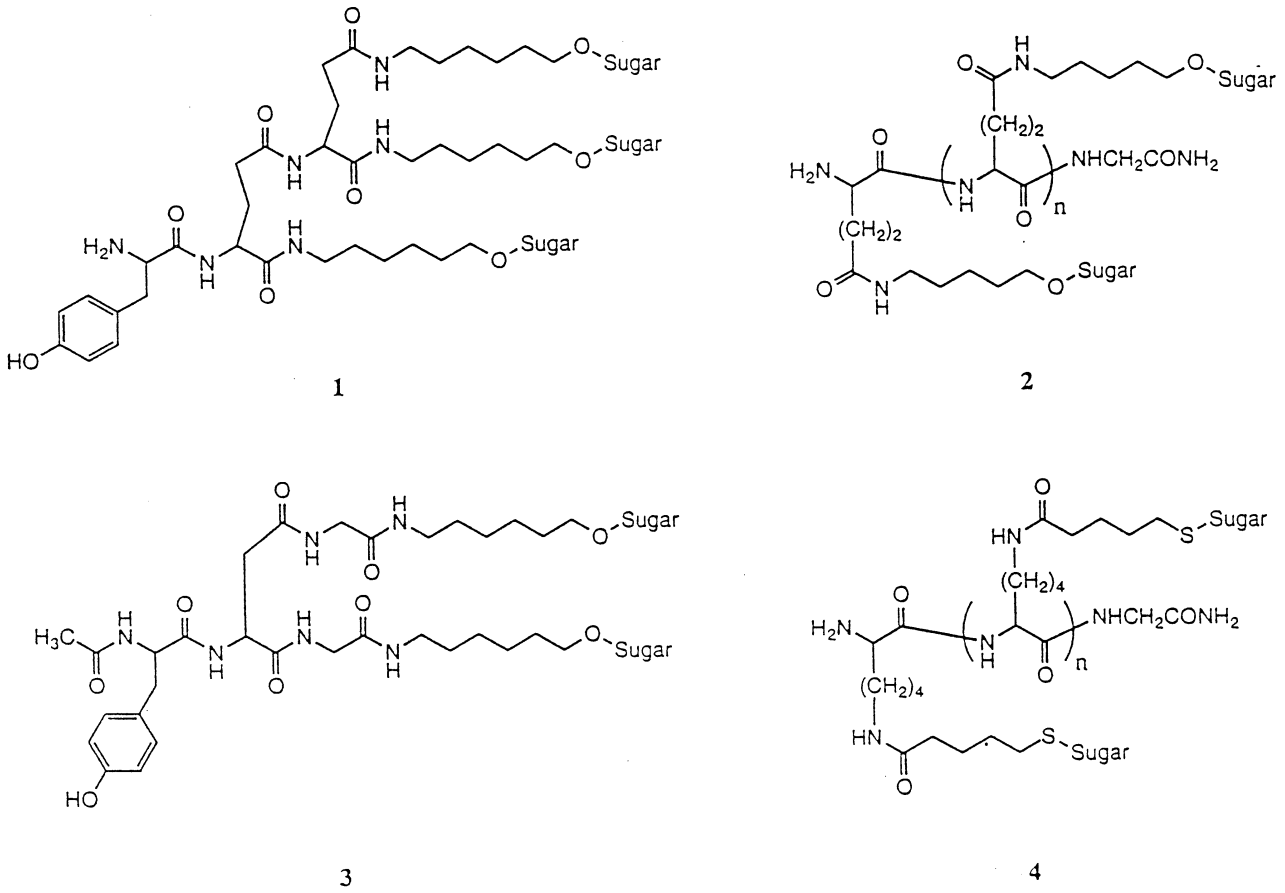
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

英文發明摘要 (發明之名稱： Delivery system to enhance cellular uptake of biomolecules)

Oligodeoxynucleoside methylphosphonate neoglycopeptide conjugates and related compounds for tissue specific delivery of biologically stable, non-ionic oligodeoxynucleoside analogs into cells.

第 1 圖

所請配位子之描述

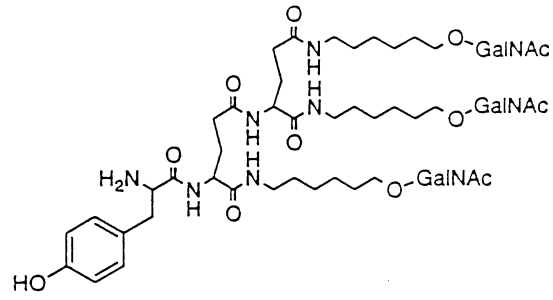


^a糖可為但不限於下列任一糖類：葡萄糖，N-乙醯葡萄糖胺、半乳糖、乙醯半乳糖胺、甘露糖及岩藻糖

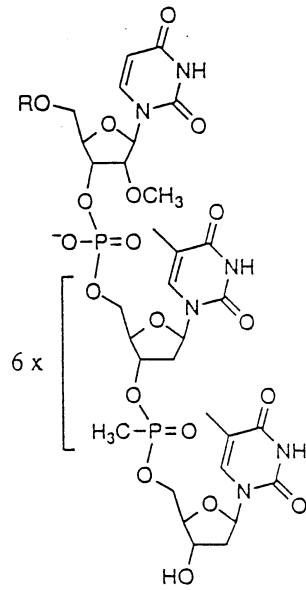
^b葉酸可被用以取代該糖類殘基

第 2 圖

用以生成綴合物 10 之配位子及寡核苷酸甲基磷酸酯

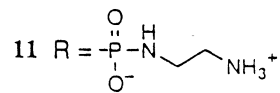


5



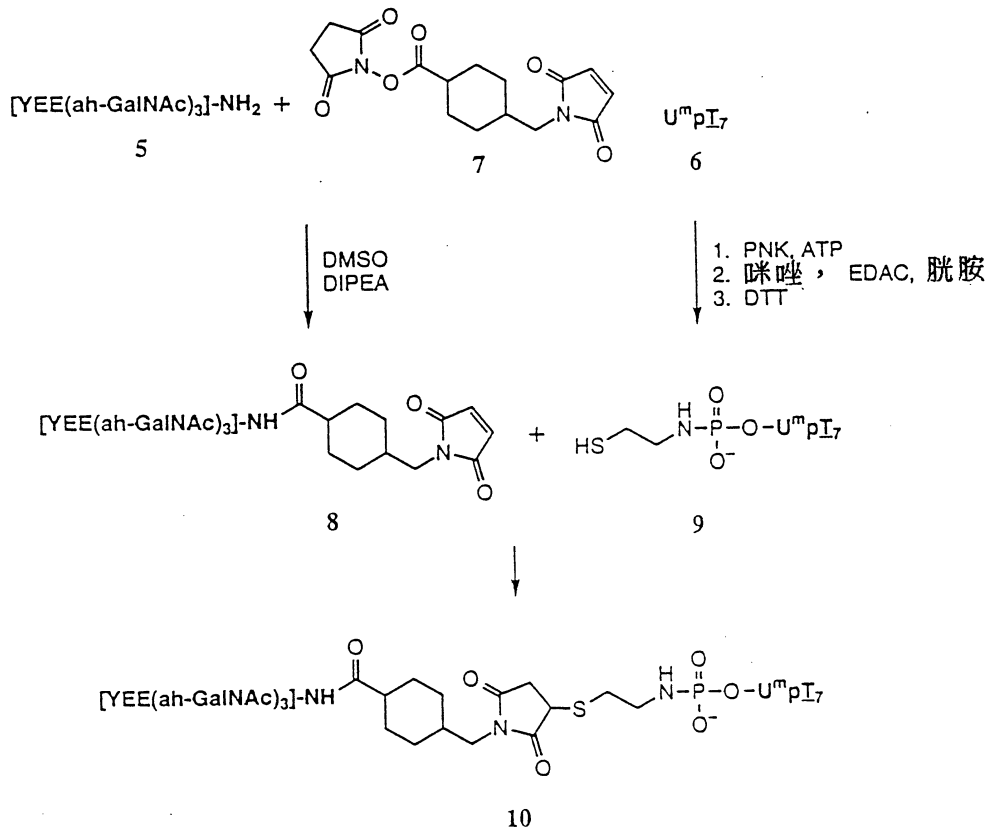
6 x

6 R = H

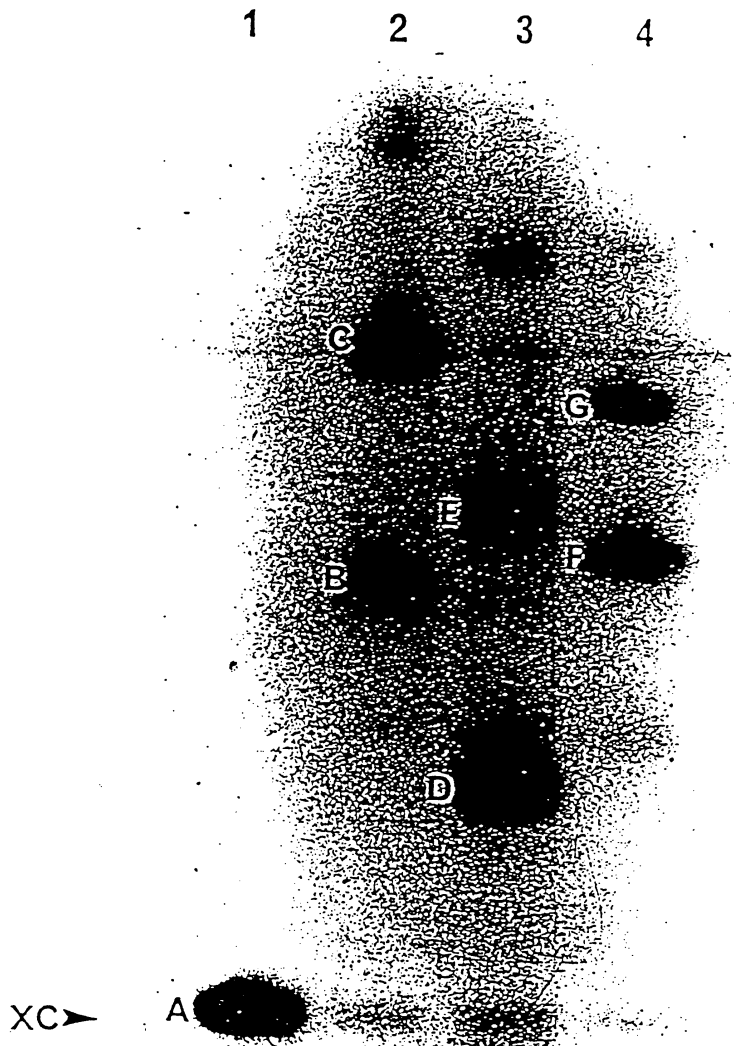


第 3 圖

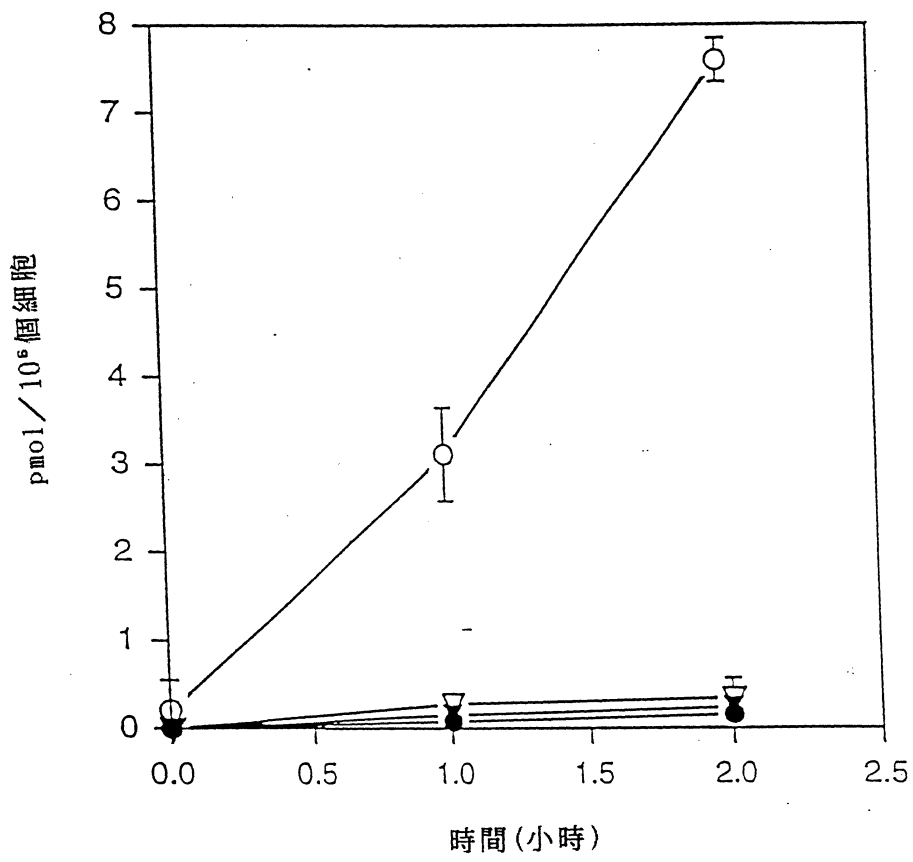
10之合成反應流程



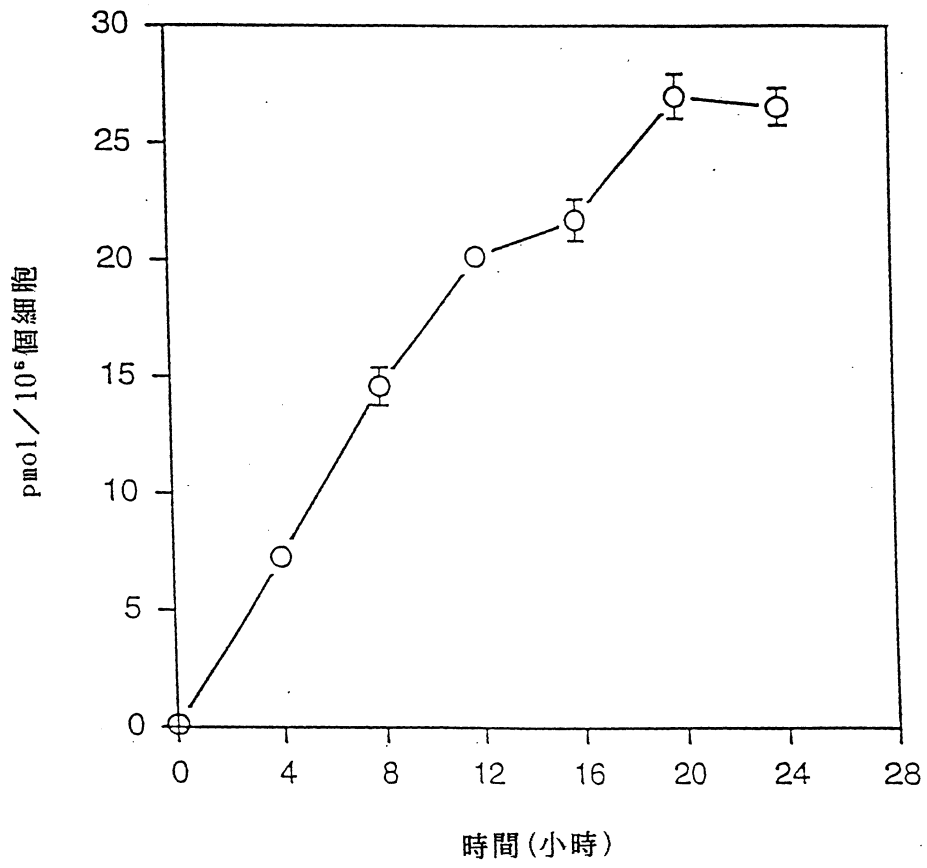
第 4 圖



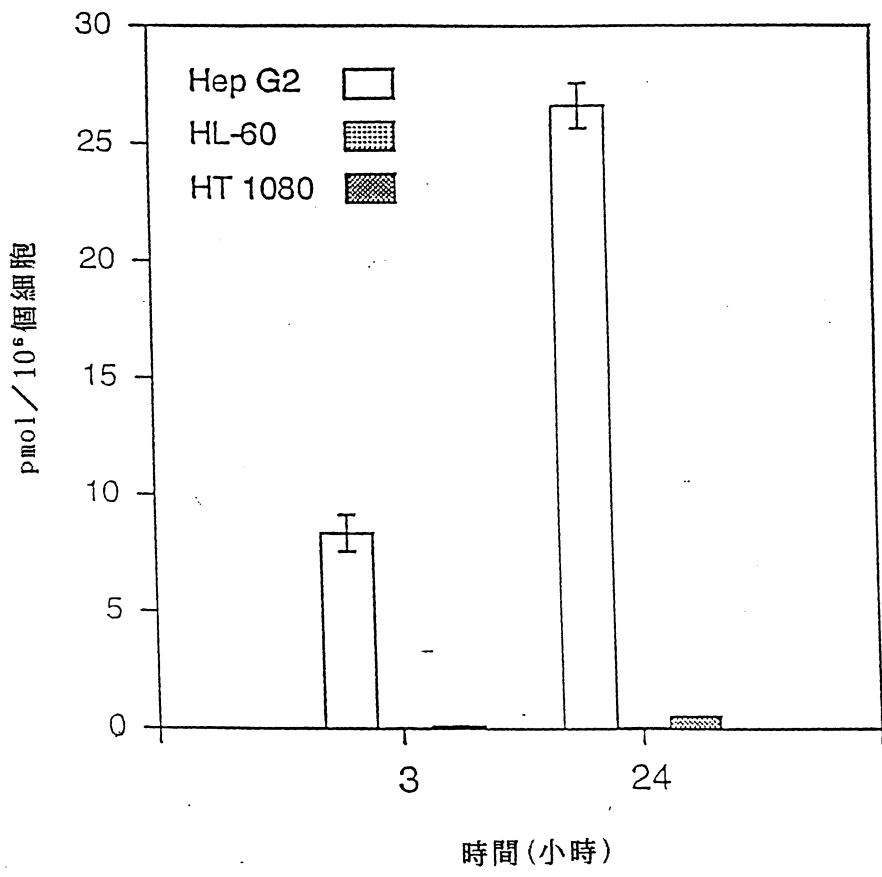
第 5 圖



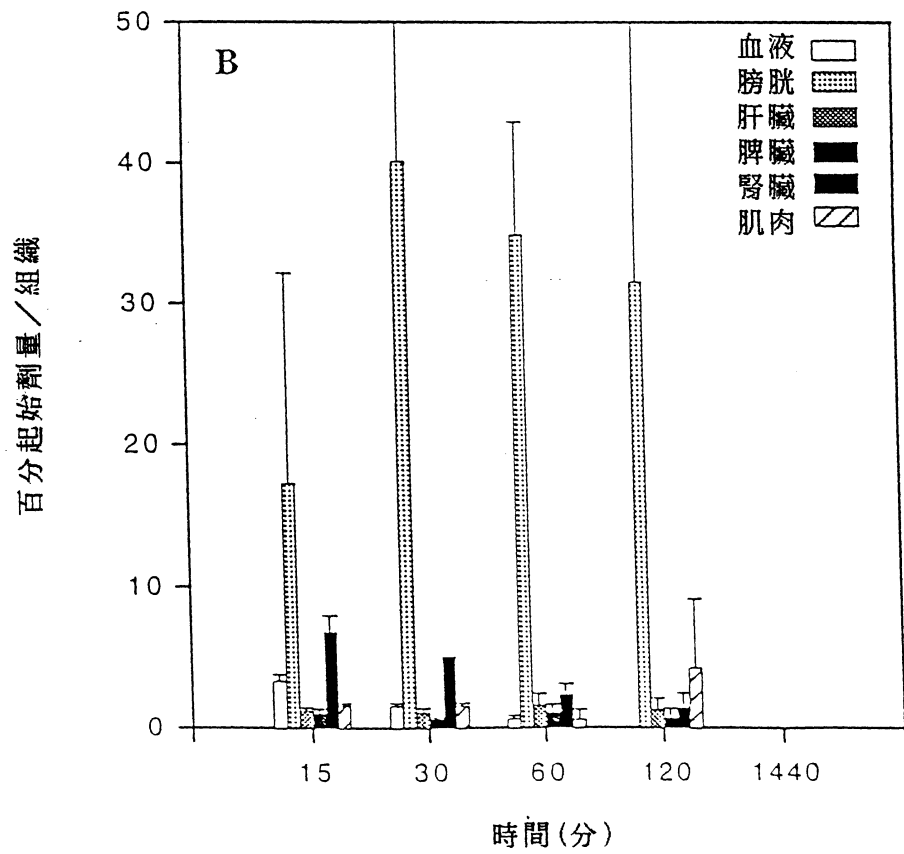
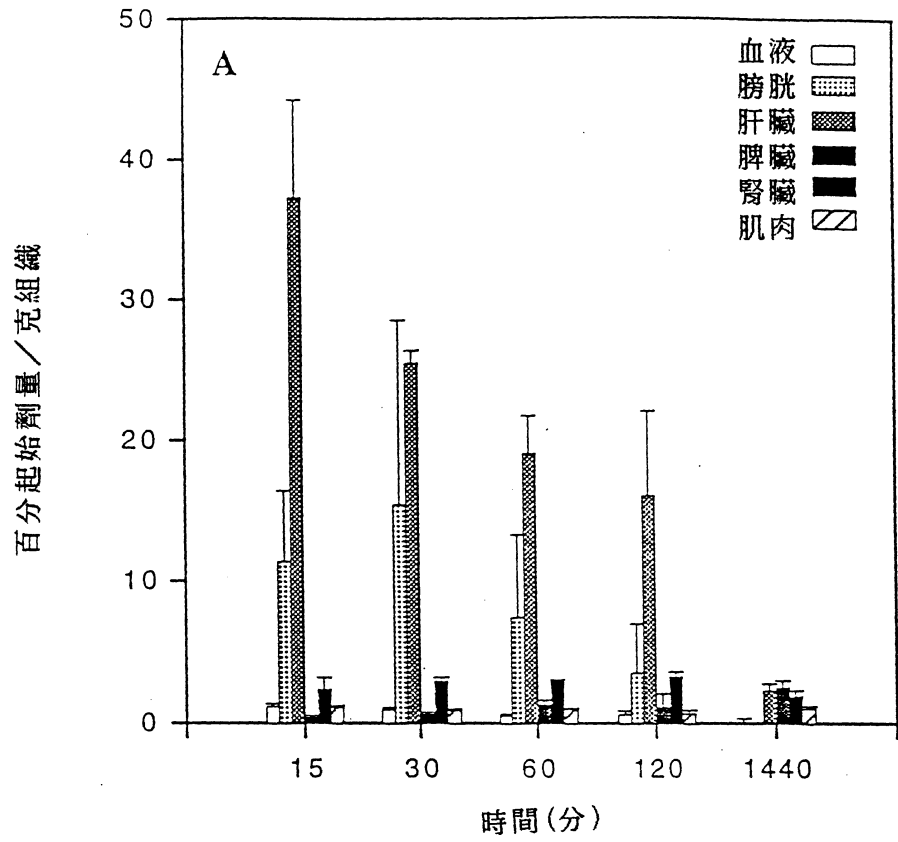
第 6 圖

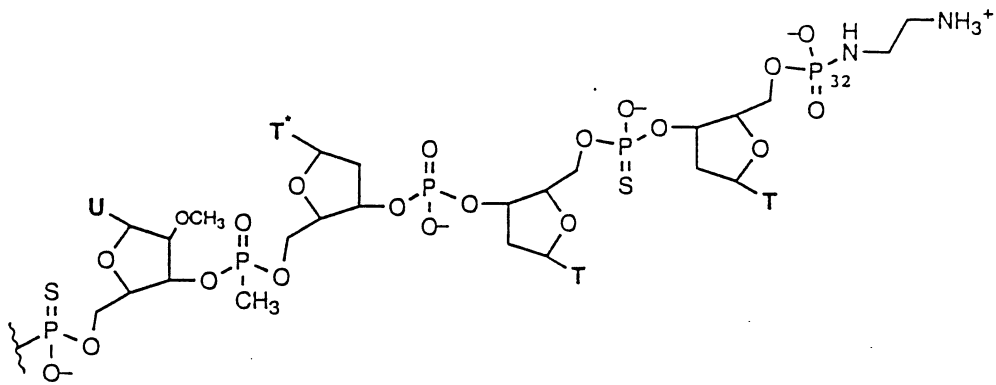


第 7 圖

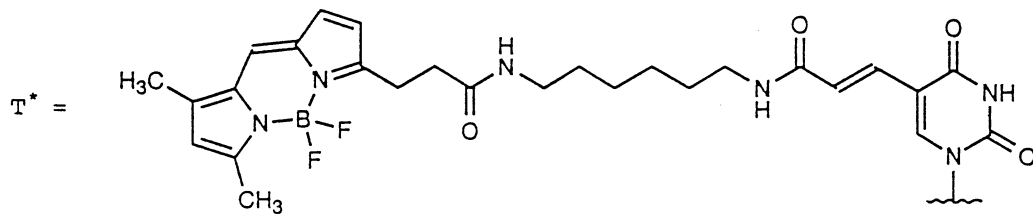


第 8 圖





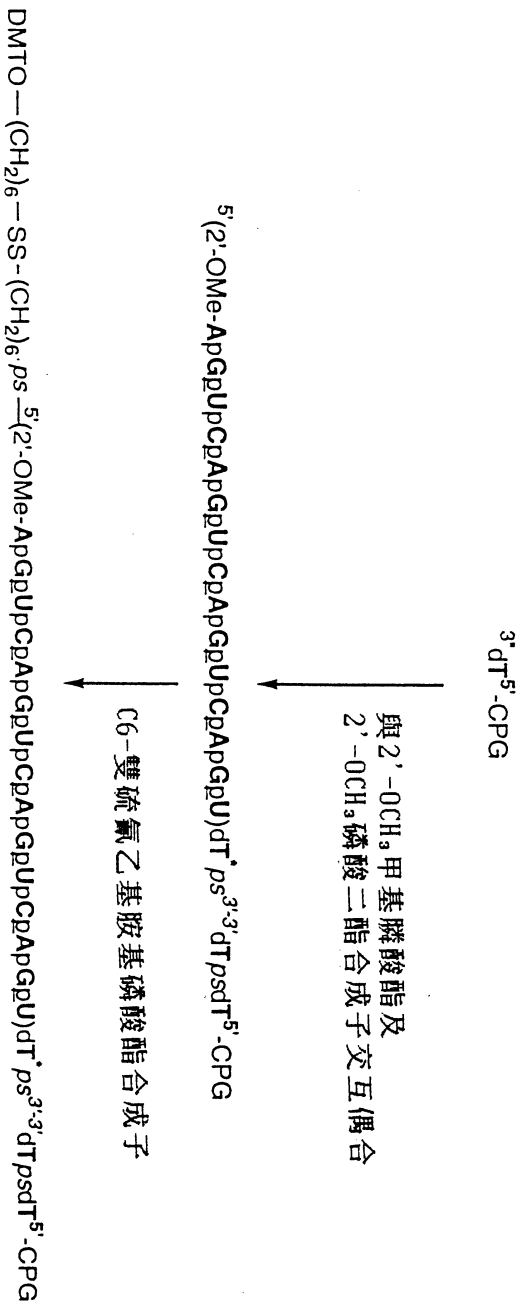
追踪子(3'-綴合物)之結構



第 9 圖

第 10 圖

以 5'-硫醇改質 DNA 所進行之自動化合成的反應流程



第 11 圖 1c 之合成的反應流程



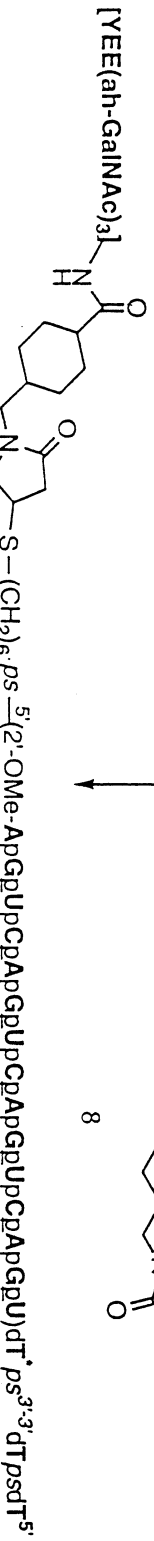
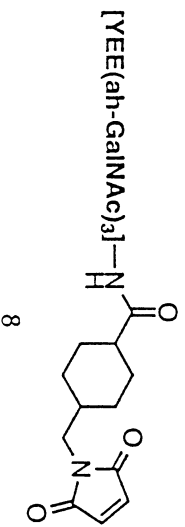
1. Genta 之單一容器之保護作用
2. 三苯甲基之



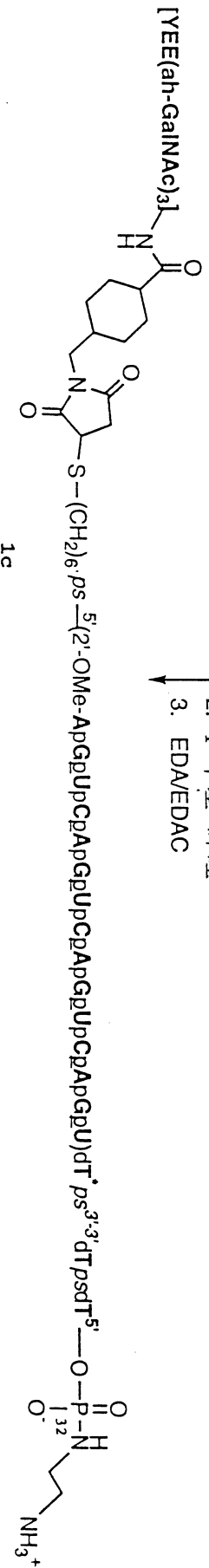
- 50 mM DTT
- 10mM 之磷酸鈉 (pH8)



1b



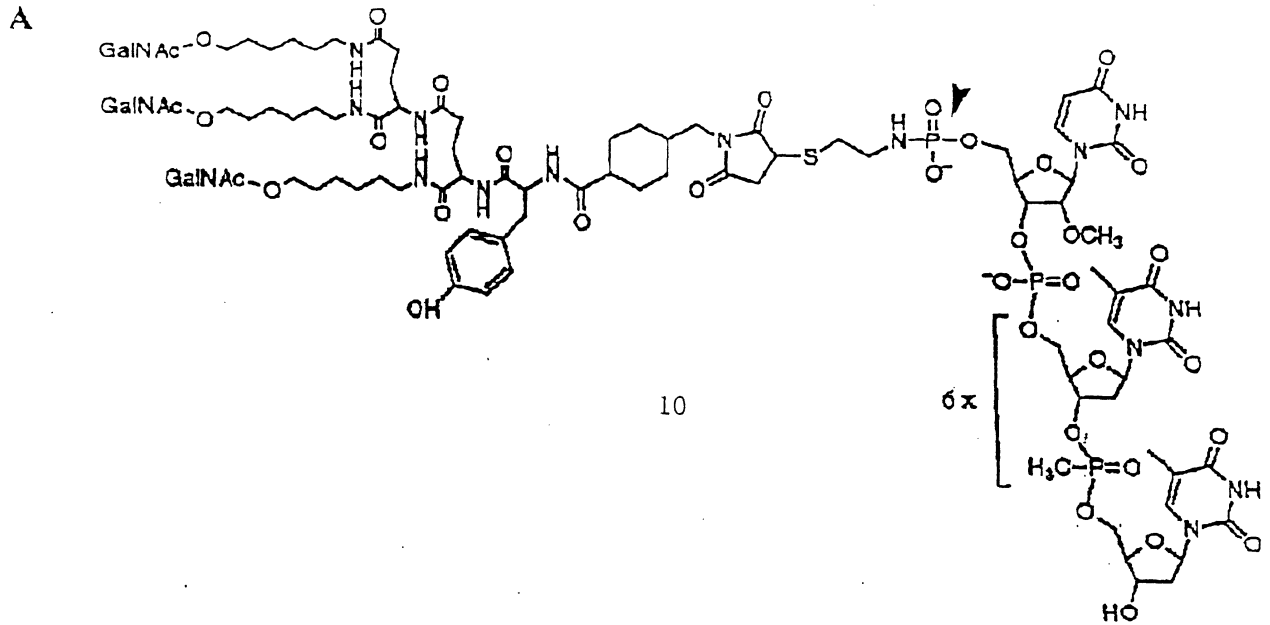
1. {γ-³²P}-ATP, PNK
2. 1-甲基-咪唑
3. EDA/EDAC



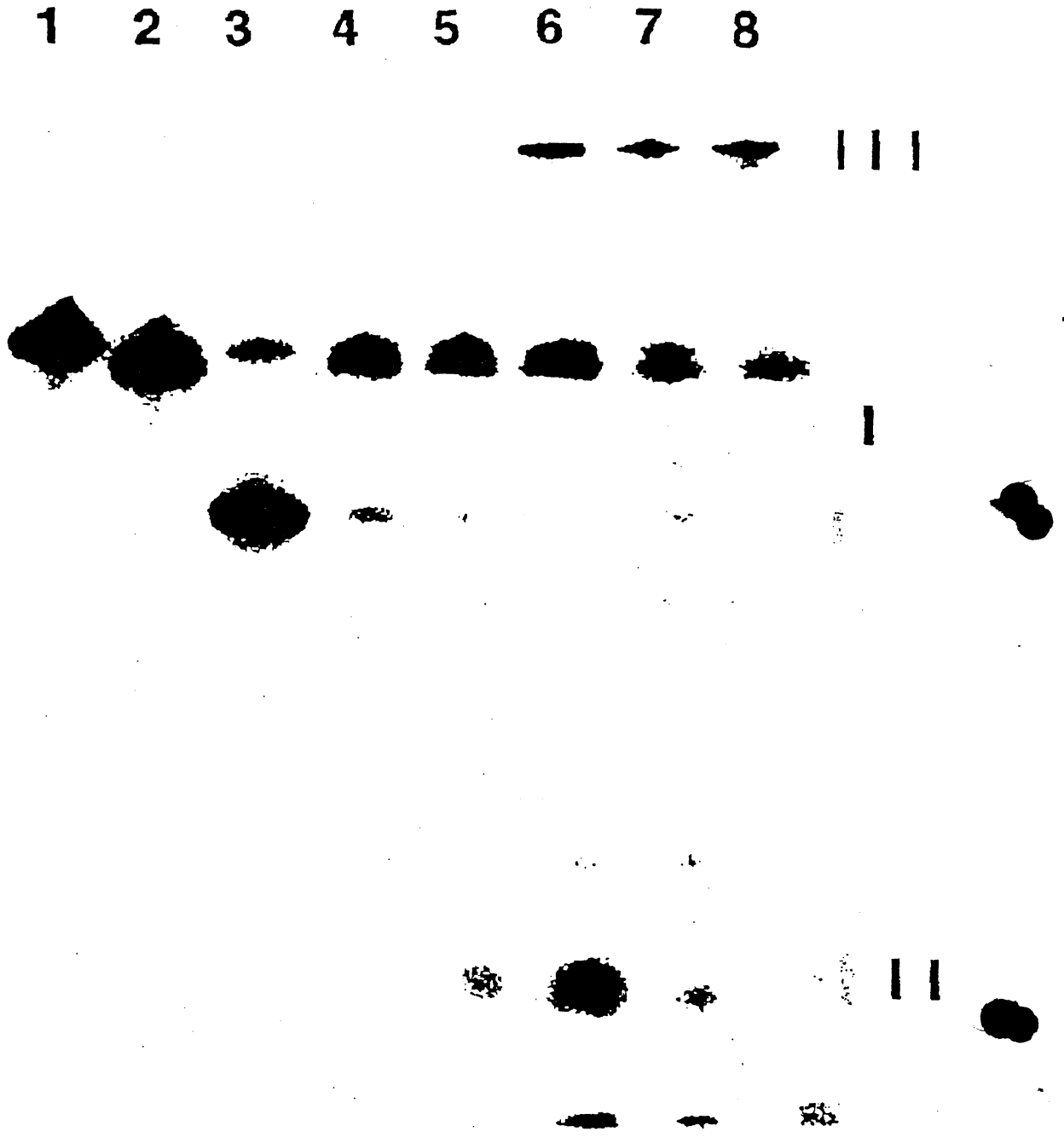
其中 p : 磷酸二酯鍵結

p : 甲基膦酸酯鍵結

ps : 硫代磷酸酯鍵結

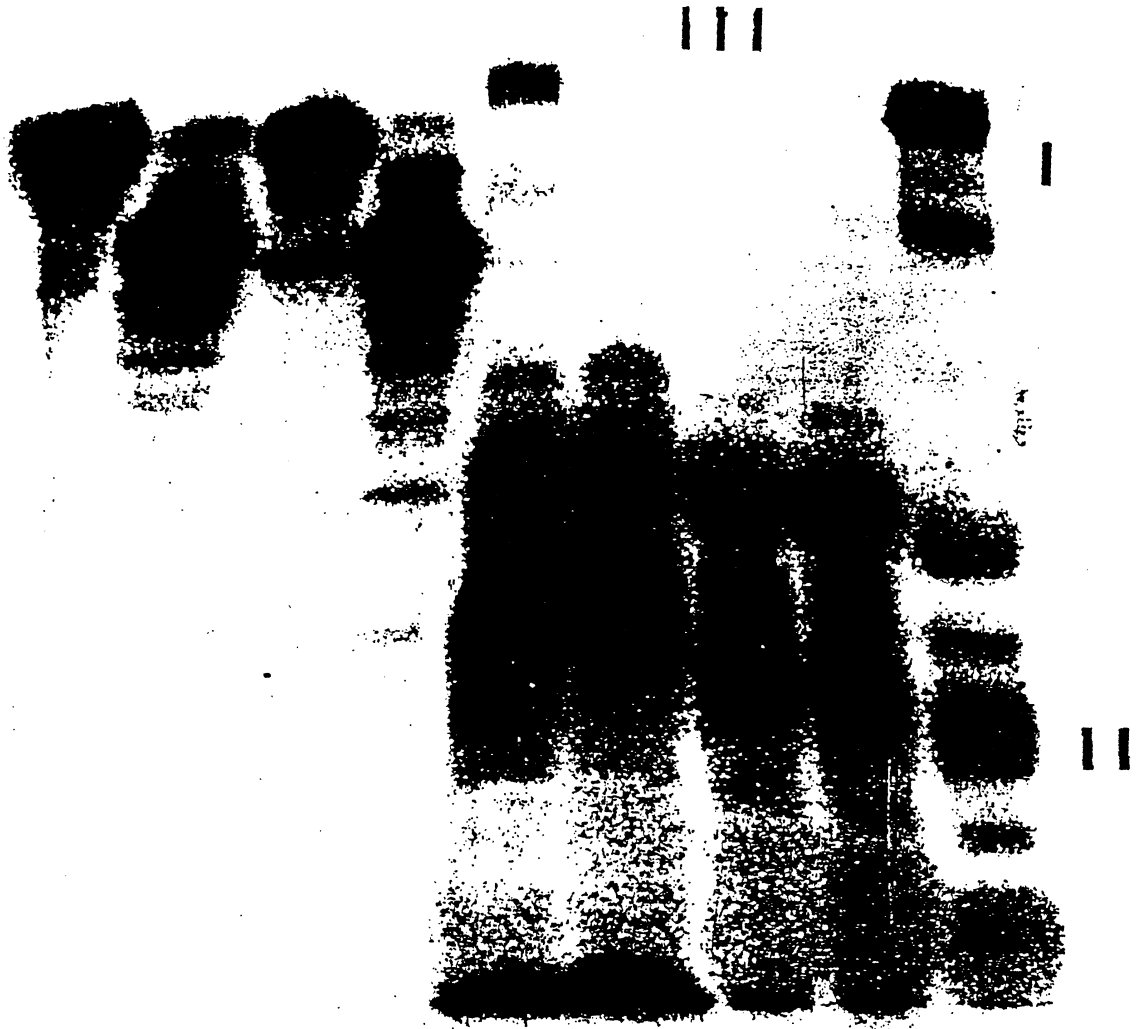


- B
- 10: [YEE(ah-GalNAc)₃]-SMCC-AET-pU^mpI₇
- 12: [YEE(ah)₃]-SMCC-AET-pU^mpI₇
- 3: [Y]-SMCC-AET-pU^mpI₇
- 4: pU^mpI₇
- 5: [YEE(ah-GalNAc)₂]-SMCC-AET-pU^mpI₇
- 6: [YEE(ah-GalNAc)₃]-SMCC-AET-pU^m



第 13 圖

1 2 3 4 5 6 7 8 9



第 14 圖

1 2 3 4 5 6 7 8



第 15 圖

公告本

修正
91年12月11日
補文

申請日期	85. 11. 22
案 號	85114401
類 別	AGIK 4 ⁷ /48

A4
C4

520293

(以上各欄由本局填註)

第85114401號案 **發明** 專利說明書修正日期: 91年12月

一、發明名稱	中 文	用以增進生物分子的細胞吸收之傳輸系統
	英 文	Delivery system to enhance cellular uptake of biomolecules
二、發明人	姓 名	(1) 曹安邦 (2) 瓊 J. 韓 格蘭 (3) 李 C. 源
	國 籍	(1)(3) 中華民國 (2) 美國
	住、居所	(1) 美國馬里蘭州巴爾的摩市北查爾斯街3400號 (2) 美國賓州模理斯威禮市路易士路234號 (3) 美國馬里蘭州巴爾的摩市北查爾斯街3400號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美國·約翰霍普金斯大學
	國 籍	美 國
	住、居所 (事務所)	美國馬里蘭州巴爾的摩市北查爾斯街3400號
	代 表 人 姓 名	狄奧多瑞 O. 包溪樂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝 訂 線

六、申請專利範圍

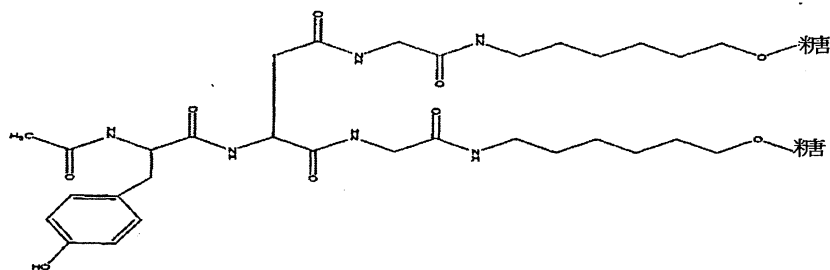
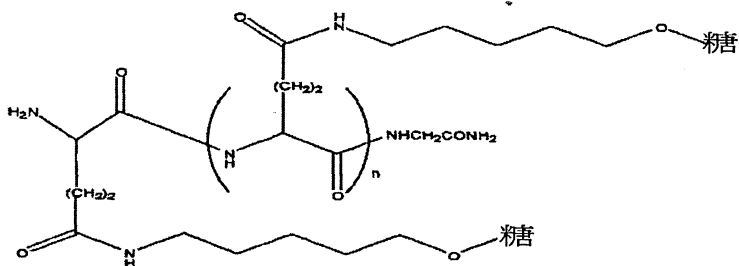
第85114401號專利再審查案申請專利範圍修正本

修正日期：91年12月

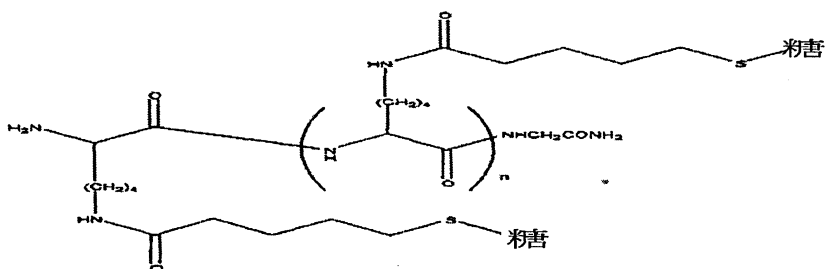
1. 一種傳輸系統，其包含一如下式之均質綴合物：

A-L-P

其中A係代表一個能專一性地結合至一肝受器的醣類配位子，藉此來促進該綴合物進入具有該受器之細胞，其中A係選自於由下列者所組成之群組中：



及



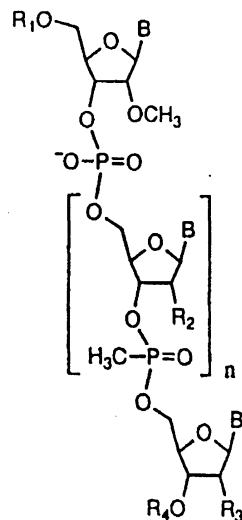
六、申請專利範圍

L 係代表一雙官能性連接子，該連接子係以區位專一之方式與 A 及 P 成化學上相結合；

P 係代表一生物性質安定之寡核苷酸或寡核苷酸衍生物，其中 P 係在特定之生化鍵結的水解或還原之後由該綴合物中釋出，並含有由該綴合物中釋出後能對抗酵素水解或生物降解的核苷酸間連結；

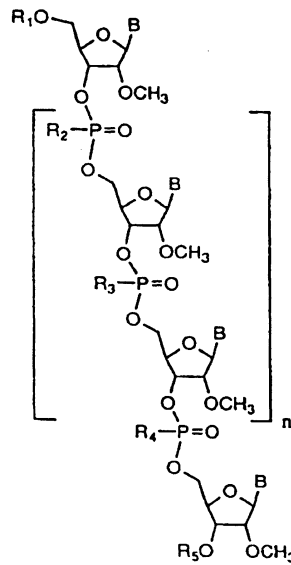
其中，A、L 及 P 係共價地鍵結著。

2. 如申請專利範圍第 1 項之傳輸系統，其中 P 係擇自於由去氧核糖、核糖與 2'-O-甲基核糖所構成之群組中。
3. 如申請專利範圍第 2 項之傳輸系統，其中 P 為一具有核苷酸間連結的寡核苷酸，該等核苷酸間連結係擇自於由磷酸二酯、硫代磷酸二酯與甲基磷酸酯所構成之群組中。
4. 如申請專利範圍第 3 項之傳輸系統，其中該寡核苷酸含有交替之二酯與甲基磷酸酯的核苷酸間連結。
5. 如申請專利範圍第 1 項之傳輸系統，其中 P 為



六、申請專利範圍

其中B係代表腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)；n係介於8至50(含)； R_1 為H或一個5'綴合物連結； R_2 與 R_3 係相同地為H或 OCH_3 ，以及 R_4 為H或一個3'綴合物連結，但 R_1 與 R_4 其中一者為綴合物連結，而另一者為H；或者



其中B係代表腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)；n係介於8至50(含)； R_1 為H或一個5'綴合物連結； R_5 為H或一個3'綴合物連結， R_2 係擇自於由 O^- 、 CH_3 或 S^- ，其中

當 R_2 為 O^- 時， R_3 為 CH_3 且 R_4 為 O^- ；

當 R_2 為 CH_3 時， R_4 為 CH_3 且 R_4 可為 O^- 或 S^- ；

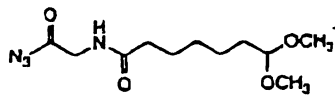
當 R_2 為 S^- 時， R_4 為 S^- 且 R_3 可為 S^- 或 CH_3 ；

但 R_1 與 R_5 其中一者為綴合物連結，而另一者為H。

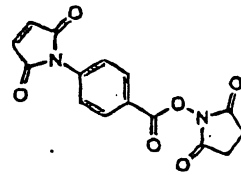
6. 如申請專利範圍第1項之傳輸系統，其中該連接子具有相異雙官能性。

六、申請專利範圍

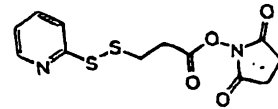
7. 如申請專利範圍第1項之傳輸系統，其中該連接子為一個由一交聯劑與 α -檸康基-K(ϵ -FMOC)PILFFRL所構成之產物，該交聯劑係擇自於由下列所構成之群組中：



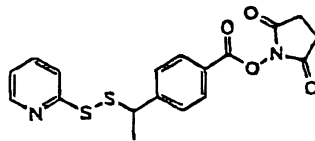
)



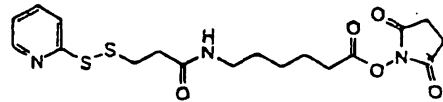
)



)



)



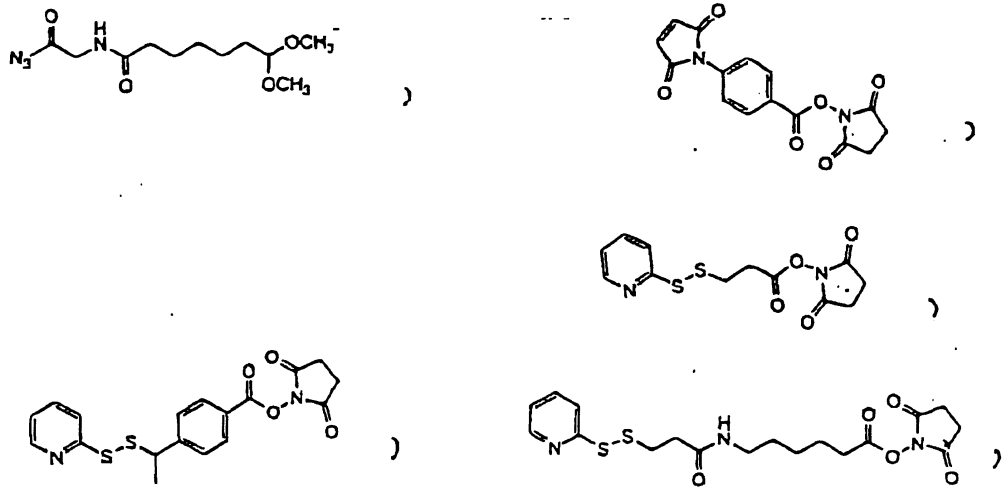
)

8. 一種傳輸系統，其包含式 A-L-P 之一均質綴合物，其中
- A 係代表一肝配位子；
- L 係代表一雙官能性連接子，其選自於由下列者所組成之群組：

訂

線

六、申請專利範圍



及 α -檸康基-K(ϵ -FMOC)PILFFRL,

其中L係以區位專一之方式與A及P成共價連結；以及

P係代表一生物性質安定之寡核苷酸或寡核苷酸衍生物，其中P含有由該綴合物中釋出後能對抗酵素水解或生物降解的核苷酸間連結。

9. 一種用於肝細胞之基因專一性傳輸的傳輸系統，該傳輸系統包含一經純化之綴合物，該綴合物含有一寡聚體及一新醣胜肽，其中該寡聚體為包含10至52個單元之寡去氧核苷甲基磷酸酯或其類似物，以及其中該寡聚體與該新醣胜肽被一雙官能性連接子所共價連結。