202434265

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202434265 A

(43)公開日： 中華民國 113 (2024) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：113116199 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 07 月 10 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/713 (2006.01)* *C12N15/113 (2010.01)*
A61K48/00 (2006.01) *A61P7/04 (2006.01)*

(30)優先權：2017/07/10 美國 62/530,518
2017/12/15 美國 62/599,223
2018/01/05 美國 62/614,111
2018/05/18 美國 62/673,424

(71)申請人：美商健贊公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)
美國

(72)發明人：阿肯 艾金 AKINC, AKIN (US)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：56 項 圖式數：29 共 275 頁

(54)名稱

於患有血友病之個體中治療出血事件之方法及組成物

(57)摘要

本發明係有關一種靶向 Serpinc1 基因之 iRNA(例如，雙股核糖核酸(dsRNA))組成物、及使用此等 iRNA(例如，dsRNA)組成物為患有血友病(例如，帶或不帶抑制劑)之個體治療出血事件之方法。

The invention relates to iRNA, e.g., double stranded ribonucleic acid (dsRNA), compositions targeting the Serpinc1 gene, and methods of using such iRNA, e.g., dsRNA, compositions to treat a bleeding event in a subject having a hemophilia (e.g., with or without inhibitors).

202434265

發明摘要

【發明名稱】（中文/英文）

於患有血友病之個體中治療出血事件之方法及組成物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING A BLEEDING EVENT IN A SUBJECT HAVING HEMOPHILIA

【中文】

本發明係有關一種靶向 Serpinc1 基因之 iRNA(例如，雙股核糖核酸(dsRNA))組成物、及使用此等 iRNA(例如，dsRNA)組成物為患有血友病(例如，帶或不帶抑制劑)之個體治療出血事件之方法。

【英文】

The invention relates to iRNA, *e.g.*, double stranded ribonucleic acid (dsRNA), compositions targeting the Serpinc1 gene, and methods of using such iRNA, *e.g.*, dsRNA, compositions to treat a bleeding event in a subject having a hemophilia (*e.g.*, with or without inhibitors).

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

本案圖式不足以代表本案之特徵，故本案無指定代表圖。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】（中文/英文）

於患有血友病之個體中治療出血事件之方法及組成物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING A BLEEDING EVENT IN A SUBJECT HAVING HEMOPHILIA

【技術領域】

相關申請案

【0001】 本申請案主張美國臨時專利申請案案號：62/530,518(申請日：2017年7月10日)、美國臨時專利申請案案號：62/599,223(申請日：2017年12月15日)、美國臨時專利申請案案號：62/614,111(申請日：2018年1月5日)、與美國臨時專利申請案案號：62/673,424(申請日：2018年5月18日)之優先權利。上述各專利申請案之完整內容已以引用方式併入本文中。

【0002】 本申請案亦有關國際申請案案號：PCT/US2016/065245(申請日：2016年12月7日)、美國臨時專利申請案案號：62/264,013(申請日：2015年12月7日)、美國臨時專利申請案案號：62/315,228(申請日：2016年3月30日)、美國臨時專利申請案案號：62/366,304(申請日：2016年7月25日)、與美國臨時專利申請案案號：62/429,241(申請日：

2016年12月2日)。上述各專利申請案之完整內容已以引用方式併入本文中。

【0003】 此外，本申請案係有關美國臨時專利申請案案號：61/992,057(申請日：2014年5月12日)、美國臨時專利申請案案號：62/089,018(申請日：2014年12月8日)、美國臨時專利申請案案號：62/102,281(申請日：2015年1月12日)、與國際申請案案號：PCT/US2015/030337(申請日：2015年5月12日)。上述各專利申請案之完整內容已以引用方式併入本文中。

【0004】 本申請案亦有關美國臨時專利申請案案號：61/638,952(申請日：2012年4月26日)、美國臨時專利申請案案號：61/669,249(申請日：2012年7月9日)、美國臨時專利申請案案號：61/734,573(申請日：2012年12月7日)、美國專利申請案案號：13/837,129(申請日：2013年3月15日)(目前為美國專利案案號：9,127,274)、美國專利申請案案號：14/806,084(申請日：2015年7月22日) (目前為美國專利案案號：9,376,680)、美國專利申請案案號：15/070,358(申請日：2016年3月15日)、與國際申請案案號：PCT/US2013/038218(申請日：2013年4月25日)。本申請案亦有關國際申請案案號：PCT/US2012/065601(申請日：2012年11月16日)。上述各專利申請案之完整內容已以引用方式併入本

文中。

【0005】 序列表

本申請案包含之序列表已呈 ASCII 格式電子檔交付，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。該於 2018 年 7 月 2 日製作之 ASCII 複本名稱為 117811-02720_SL.TXT，檔案大小為 21,147 位元組。

【先前技術】

【0006】 Serpinc1 為絲胺酸蛋白酶抑制劑(serpin)超級家族之成員。Serpinc1 為一種血漿蛋白酶抑制劑，其抑制凝血酶及凝血系統之其他活化絲胺酸蛋白酶，如因子 X、IX、XI、XII 及 VII，因此調節血液凝結級聯反應。Serpinc1 之抗凝血活性會因肝素及其他會催化凝血酶：抗凝血酶(TAT)複合物形成之相關醣胺聚醣之存在而加強。

【0007】 出血疾患不論先天或後天，均係血液凝結不當之病症。例如，血友病即為一種先天性遺傳出血疾患，其破壞身體調控血液凝結或凝血之能力。血友病 A 為涉及缺乏功能性凝結因子 VIII 之隱性 X 性聯遺傳疾患，且佔血友病病例之 80%。血友病 B 為涉及缺乏功能性凝結因子 IX 之隱性 X 性聯遺傳疾患。其佔約 20%血友病病例。血友病 C 為涉及缺乏功能性凝結因子 XI 之體染色體遺傳疾患。血友病 C 並非完全隱性，因為異型合子的個體亦顯示增加出血。

【0008】 雖然目前仍無法治癒血友病，但可以藉由

定期輸注所缺乏之凝結因子(例如，血友病 A 之因子 VIII)來控制。然而，有些血友病患者會對所接受之置換因子發展出抗體(抑制劑)，因此對置換凝血因子產生頑抗性。因此，無法適當調控此等個體之出血。

【0009】 針對例如因子 VIII 及其他凝血因子發展出的高效價抑制劑為血友病療法中最嚴重之併發症，且讓出血之治療極具挑戰性。目前，阻止此等個體出血之唯一策略為使用「繞徑劑」，如第八因子抑制劑繞徑活性(FEIBA)及活化重組因子 VII (rFVIIa)、血漿分離術、連續因子置換、及免疫耐受療法，其均無法完全有效。因此，此技術領域中需要為患有出血疾患(如：血友病)之個體提供替代療法。

【發明內容】

【0010】 本發明至少部份基於驚人地發現，對患有不帶抑制劑之血友病個體投與醫療有效量之 iRNA 組成物，其導致 RNA 誘發靜默複合物(RISC)介導的 Serpinc1 基因之 RNA 轉錄本的裂解，即可利用低於例如世界血友病聯盟(World Federation of Hemophilia)(參見例如，Srivastava 等人之「Guidelines for the Management of Hemophilia」, *Hemophilia* (2012 年 7 月 6 日電子書)；DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x)及/或食品藥物管理局(Food and Drug Administration)建議有效量之醫療有效量置換因子(如

因子 VIII 或因子 XI)治療出血事件；而在帶抑制劑之患有血友病個體中，投與醫療有效量之 iRNA 組成物，其導致 RNA 誘發靜默複合物(RISC)介導的 Serpinc1 基因之 RNA 轉錄本裂解，即可利用低於例如世界血友病聯盟(參見例如，Srivastava 等人之「Guidelines for the Management of Hemophilia」, *Hemophilia* (2012 年 7 月 6 日電子書)；DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x)及/或食品藥物管理局建議有效量之醫療有效量繞徑劑(如：經活化之凝血酶原複合物濃聚物(aPCC)或重組體因子 VIIa(rFVIIa))治療出血事件。

【0011】 因此在一項態樣中，本發明提供一種為患有出血疾患(如不帶抑制劑之血友病)個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與固定劑量約 30 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其中該雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3’(SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3’-末端之配體；及對該個體投與醫療有效量之置換因子，其中該置換

因子有效量低於該置換因子之建議有效量，藉以為患有不帶抑制劑之血友病的個體治療出血事件。

【0012】 另一態樣中，本發明提供一種為患有出血疾患(如帶抑制劑之血友病)個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與固定劑量約 30 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其中該雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體；及對該個體投與醫療有效量之繞徑劑，其中該繞徑劑有效量低於該繞徑劑之建議有效量，藉以為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

【0013】 本發明一項態樣提供一種為患有出血疾患(如不帶抑制劑之血友病)的個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與固定劑量約 40 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其中該雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5' -UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ

ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體；及對該個體投與醫療有效量之置換因子，其中該置換因子有效量低於該置換因子之建議有效量，藉以為患有不帶抑制劑之血友病的個體治療出血事件。

【0014】 另一態樣中，本發明提供一種為患有出血疾患(如帶抑制劑之血友病)的個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與固定劑量約 40 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其中該雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO：15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體；及對該個體投與醫療有效量之繞徑劑，其中該繞徑劑有效量低於該繞徑劑之建議有效量，藉以為患有帶抑制劑之血友病的個體治療出血事件。

【0015】 雙股 RNAi 劑可以 2 劑或更多劑投與個體。

【0016】 有些實施例中，雙股 RNAi 劑係一個月一次、每五週一次、每六週一次、每七週一次、每 2 個月

一次、每季一次、或依需要投與個體。

【0017】 一項實施例中，雙股 RNAi 劑係一個月一次投與個體。另一項實施例中，雙股 RNAi 劑係每六週一次投與個體。一項實施例中，雙股 RNAi 劑係每 2 個月一次投與個體。再另一項實施例中，雙股 RNAi 劑係每季一次投與個體。

【0018】 雙股 RNAi 劑可呈固定劑量投與個體，例如，在約 25 mg 至約 100 mg 之間，例如，約 25 mg 至約 95 mg 之間、約 25 mg 至約 90 mg 之間、約 25 mg 至約 85 mg 之間、約 25 mg 至約 80 mg 之間、約 25 mg 至約 75 mg 之間、約 25 mg 至約 70 mg 之間、約 25 mg 至約 65 mg 之間、約 25 mg 至約 60 mg 之間、約 25 mg 至約 50 mg 之間、約 50 mg 至約 100 mg 之間、約 50 mg 至約 95 mg 之間、約 50 mg 至約 90 mg 之間、約 50 mg 至約 85 mg 之間、約 50 mg 至約 80 mg 之間、約 30 mg 至約 100 mg 之間、約 30 mg 至約 90 mg 之間、約 30 mg 至約 80 mg 之間、約 40 mg 至約 100 mg 之間、約 40 mg 至約 90 mg 之間、約 40 mg 至約 80 mg 之間、約 60 mg 至約 100 mg 之間、約 60 mg 至約 90 mg 之間、約 25 mg 至約 55 mg 之間、約 25 mg 至約 65 mg 之間、約 30 mg 至約 95 mg 之間、約 30 mg 至約 85 mg 之間、約 30 mg 至約 75 mg 之間、約 30 mg 至約 65 mg 之間、約 30 mg 至約 55 mg 之間、約 40 mg 至約 95 mg 之間、

約40 mg至約85 mg之間、約40 mg至約75 mg之間、約40 mg至約65 mg之間、約40 mg至約55 mg、或約45 mg至約95 mg之間。

【0019】有些實施例中，雙股RNAi劑可投與固定劑量約25 mg、約30 mg、約35 mg、約40 mg、約45 mg、約50 mg、約55 mg、約60 mg、約65 mg、約70 mg、約75 mg、約80 mg、約85 mg、約90 mg、約95 mg、或約100 mg。

【0020】有些實施例中，雙股RNAi劑係投與個體固定劑量約25 mg；或固定劑量約50 mg；或固定劑量約80 mg；或固定劑量約100 mg。

【0021】一項實施例中，雙股RNAi劑係經皮下投與個體。

【0022】一項實施例中，該個體為人類。

【0023】血友病可為血友病A、血友病B、或血友病C。

【0024】一項實施例中，正義股之所有核苷酸與反義股之所有核苷酸為經修飾之核苷酸。

【0025】一項實施例中，該經修飾之核苷酸係分別獨立選自下列各物組成之群中：2'-去氧-2'-氟修飾之核苷酸、2'-去氧-修飾之核苷酸、鎖核苷酸、無鹼基核苷酸、2'-胺基-修飾之核苷酸、2'-烷基-修飾之核苷酸、N-嗎啉基核苷酸、胺基磷酸酯、及包含非天然鹼基之核苷酸。

【0026】 互補區可為至少 17 個核苷酸之長度或 19 個核苷酸之長度。

【0027】 一項實施例中，互補區長度為 19 至 21 個核苷酸之間。另一項實施例中，互補區長度為 21 至 23 個核苷酸之間。

【0028】 一項實施例中，各股長度不超過 30 個核苷酸。

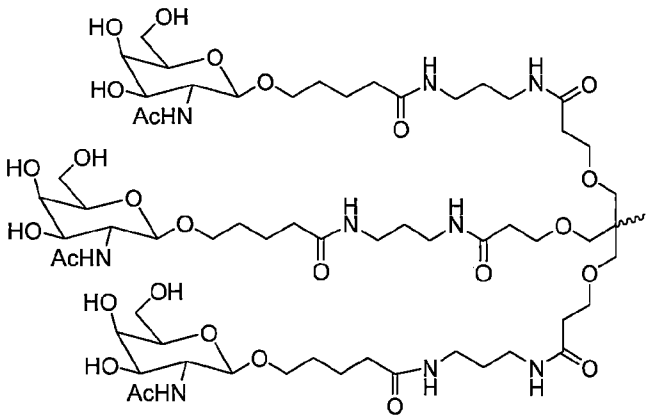
【0029】 雙股 RNAi 劑之至少一股可包含至少 1 個核苷酸之 3’突出或至少 2 個核苷酸之 3’突出，例如，2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、或 15 個核苷酸。其他實施例中，RNAi 劑之至少一股包含至少 1 個核苷酸之 5’突出。某些實施例中，至少一股包含至少 2 個核苷酸之 5’突出，例如，2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、或 15 個核苷酸。再其他實施例中，RNAi 劑之一股之 3’與 5’兩端均包含至少 1 個核苷酸之突出。

【0030】 某些實施例中，配體為 N-乙醯基半乳糖胺(GalNAc)。配體可為一或多個 GalNAc 透過單價、二價、或三價分支連接基附接至 RNAi 劑。該配體可接合雙股 RNAi 劑正義股之 3’端、雙股 RNAi 劑正義股之 5’端、雙股 RNAi 劑反義股之 3’端、雙股 RNAi 劑反義股之 5’端。

【0031】 有些實施例中，本發明雙股 RNAi 劑包含複數個，例如，2、3、4、5、或 6 個 GalNAc，每一個

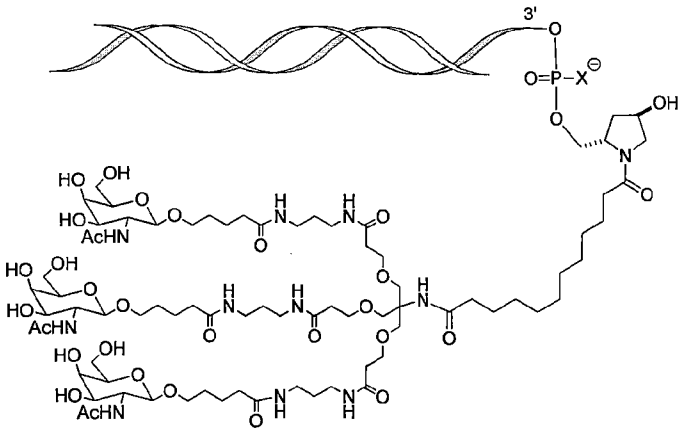
分別獨立透過複數個單價連接基附接至雙股 RNAi 劑之複數個核苷酸。

【0032】 某些實施例中，該配體為



。

【0033】 一項實施例中，RNAi 劑係如下方案所示接合至配體：



及其中 X 為 O 或 S。

【0034】 一項實施例中，X 為 O。

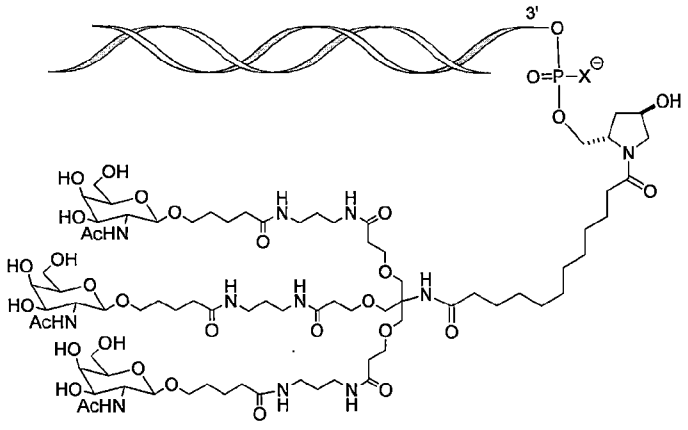
【0035】 一項實施例中，互補區係由核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO： 15)組成。

【0036】 一項實施例中，雙股 RNAi 劑包含正義股，其包含核苷酸序列 5'-

GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3'(SEQ ID NO: 16)；及反義股，其包含核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO: 15)。

【0037】一項實施例中，正義股包含 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO：13)，及反義股包含 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO：14)，其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、或 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鍵聯。

【0038】一項實施例中，正義股包含 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO：13)，及反義股包含 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO：14)，其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、或 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鍵聯；且其中正義股係如下方案所示接合至配體：



，其中 X 為 O 或 S。

【0039】 一項實施例中，該劑係呈醫藥組成物投藥。一項實施例中，該 RNAi 劑係含在未緩衝之溶液(如：生理食鹽水或水)中投藥。

【0040】 另一項實施例中，siRNA 係使用緩衝溶液投藥，如包含乙酸鹽、檸檬酸鹽、醇溶穀蛋白、碳酸鹽、或磷酸鹽或其任何組合之緩衝溶液。一項實施例中，該緩衝溶液為磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液(PBS)。

【0041】 一項實施例中，對該個體投與 dsRNA 劑降低 Serpinc1 活性約 75%或更高。

【0042】 一項實施例中，該置換因子為因子 VIII。投與個體之因子 VIII 之醫療有效量可低於約 200 IU/kg、或低於約 190 IU/kg、或低於約 180 IU/kg、或低於約 170 IU/kg、或低於約 160 IU/kg、或低於約 150 IU/kg、或低於約 140 IU/kg、或低於約 130 IU/kg、或低於約 120 IU/kg、或低於約 110 IU/kg、或低於約 100 IU/kg、或低於約 90 IU/kg、或低於約 80 IU/kg、或低於約 70 IU/kg、或低於約

60 IU/kg、或低於約 50 IU/kg、或低於約 40 IU/kg、或低於約 30 IU/kg、或低於約 20 IU/kg、或低於約 10 IU/kg。一項實施例中，投與個體之因子 VIII 之醫療有效量比因子 VIII 之建議有效量降低約 1.5 倍至約 5 倍，例如，劑量為約 5 IU/kg 至約 20 IU/kg、或約 10 IU/kg 至約 20 IU/kg，例如，約 5、10、15、或 20 IU/kg。一項實施例中，出血事件係中度出血事件。另一項實施例中，出血事件係重度出血事件。

【0043】 另一項實施例中，置換因子為因子 IX。因子 IX 之醫療有效量可低於約 200 IU/kg、或低於約 190 IU/kg、或低於約 180 IU/kg、或低於約 170 IU/kg、或低於約 160 IU/kg、或低於約 150 IU/kg、或低於約 140 IU/kg、或低於約 130 IU/kg、或低於約 120 IU/kg、或低於約 110 IU/kg、或低於約 100 IU/kg、或低於約 90 IU/kg、或低於約 80 IU/kg、或低於約 70 IU/kg、或低於約 60 IU/kg、或低於約 50 IU/kg、或低於約 40 IU/kg、或低於約 30 IU/kg、或低於約 20 IU/kg、或低於約 10 IU/kg。一項實施例中，投與個體之因子 IX 之醫療有效量比因子 IX 之建議有效量降低約 2 倍至約 6 倍，例如，劑量約 10 IU/kg 至約 30 IU/kg、或約 20 至約 30 IU/kg，例如，約 10、15、20、25、或約 30 IU/kg。一項實施例中，出血事件係中度出血事件。另一項實施例中，出血事件係重

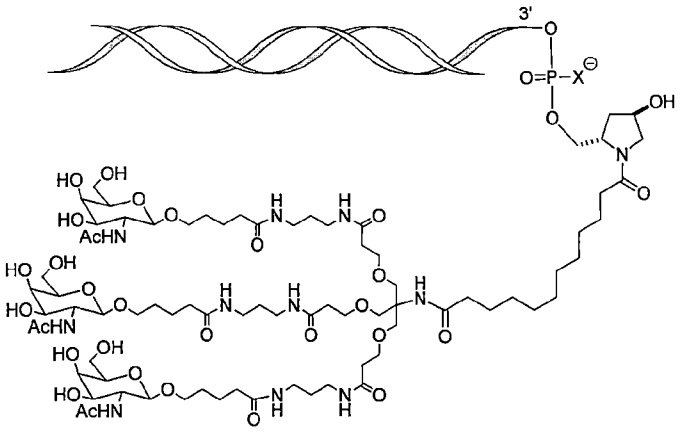
度出血事件。

【0044】 一項實施例中，繞徑劑為經活化之凝血酶原複合物濃聚物(aPCC)。aPCC之醫療有效量可低於約100 U/kg、或低於約90 U/kg、或低於約80 U/kg、或低於約70 U/kg、或低於約60 U/kg、或低於約50 U/kg、或低於約40 U/kg、或低於約30 U/kg、或低於約20 U/kg、或低於約10 U/kg。一項實施例中，投與個體之aPCC之醫療有效量比aPCC之建議有效量降低約2倍至約3倍，例如，劑量約30至約50 U/kg。一項實施例中，出血事件係中度出血事件。另一項實施例中，出血事件係重度出血事件。

【0045】 另一項實施例中，繞徑劑為重組因子VIIa(rFVIIa)。繞徑劑之醫療有效量可低於約120 μg/kg、或低於約110 μg/kg、或低於約100 μg/kg、或低於約90 μg/kg、或低於約80 μg/kg、或低於約70 μg/kg、或低於約60 μg/kg、或低於約50 μg/kg、或低於約40 μg/kg、或低於約30 μg/kg、或低於約20 μg/kg。一項實施例中，投與個體之rFVIIa之醫療有效量比rFVIIa之建議有效量降低約2倍，例如，劑量約45 μg/kg。一項實施例中，出血事件係中度出血事件。另一項實施例中，出血事件係重度出血事件。

【0046】 一項態樣中，本發明提供一種為患有血友病(例如，不帶抑制劑之血友病A、血友病B、或血友病C)的個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投

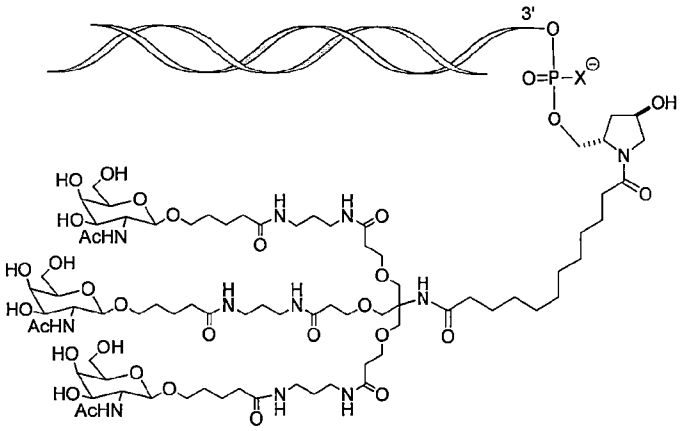
與(例如，經皮下投與)固定劑量約 80 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，其中正義股包含 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO：13)，及反義股包含 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO：14)，其中 a、c、g、與 u 為 2′-O-甲基(2′-OMe)A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、或 Uf 為 2′-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鍵聯；且其中正義股之 3'-端係如下方案所示接合至配體：



，其中 X 為 O 或 S；及對該個體投與醫療有效量之置換因子，其中置換因子有效量低於該置換因子之建議有效量，藉以為患有不帶抑制劑之血友病的個體治療出血事件。

【0047】 另一項態樣中，本發明提供一種為患有血友病(例如，帶抑制劑之血友病 A、血友病 B、或血友病 C)的個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與(例如，經皮下投與)固定劑量約 80 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其中雙股

RNAi 劑包含正義股與反義股，其中正義股包含 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO：13)與反義股包含 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO：14)，其中 a、c、g、與 u 為 2′-O-甲基(2′-OMe)A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、或 Uf 為 2′-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鍵聯；且其中正義股之 3'-端係如下方案所示接合至配體：



，其中 X 為 O 或 S；及對該個體投與醫療有效量之繞徑劑，其中該繞徑劑有效量低於該繞徑劑之建議有效量，藉以為患有帶抑制劑之血友病的個體治療出血事件。

【0048】 一項實施例中，固定劑量之 RNAi 劑係經皮下投與個體。

【0049】 一項實施例中，固定劑量之 RNAi 劑係一個月一次投與個體。

【0050】 血友病可為血友病 A、血友病 B、或血友病 C。

【圖式簡單說明】

【0051】 第 1A 圖為說明單一皮下 0.03 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 在一位健康人類個體中，對血漿凝血酶產生含量之效應圖式。

【0052】 第 1B 圖為說明單一皮下 0.03 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 在一位健康人類個體中，對血漿凝血酶產生含量之效應圖式。

【0053】 第 1C 圖為說明單一皮下 0.03 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 在一位健康人類個體中，對血漿凝血酶產生含量之效應圖式。

【0054】 第 1D 圖為說明單一皮下 0.03 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 在一位健康人類個體中，對血漿凝血酶產生含量之效應圖式。

【0055】 第 2A 圖為說明單一皮下 0.03 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 在一位健康人類個體中，對血漿 AT(Serpinc1)蛋白質含量之效應圖式。

【0056】 第 2B 圖為說明單一皮下 0.03 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 在一位健康人類個體中，對血漿 AT(Serpinc1)蛋白質含量之效應圖式。

【0057】 第 3 圖為說明在接受投與單一皮下 0.03 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 之健康個體中，AT(Serpinc1)減弱百分比與峰值凝血酶產生的增加百分比之間相關性圖式。

【0058】 第 4 圖為說明在患有血友病 A 或 B 之人類個體中，多重 0.015 mg/kg、0.045 mg/kg、或

0.075 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 對血漿 AT (Serpinc1)蛋白質含量之效應圖式。

【0059】 第 5A 圖為說明在患有血友病 A 或 B 之人類個體中，多重 0.225 mg/kg、0.450 mg/kg、0.900 mg/kg、1.800 mg/kg、或 80 mg 劑量之 AT3SC-001 對血漿 AT (Serpinc1)蛋白質含量之效應圖式。

【0060】 第 5B 圖為說明在人類個體中 AT3SC-001 對血漿 AT (Serpinc1)蛋白質含量之劑量依賴性效應之圖式。

【0061】 第 6A 圖為說明在患有血友病 A 或 B 之人類個體中，多重 0.015 mg/kg 或 0.045 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 對峰值凝血酶含量之效應圖式。

【0062】 第 6B 圖為說明在患有血友病 A 或 B 之人類個體中，多重 0.015 mg/kg 或 0.045 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 對凝血酶含量產生濃度相對於群組基線變化百分比之效應圖式。

【0063】 第 7 圖為說明在一位患有血友病 A 之個體(個體 101-009)中，多重 0.045 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 對血塊形成時間及凝結時間之效應圖式。

【0064】 第 8 圖為說明以每月同等劑量降低之平均最大 AT 下降之圖式。

【0065】 第 9 圖為說明多重劑量之 AT3SC-001 對 AT 下降四分位數時之凝血酶產生的效應之圖式。

【0066】 第 10A 圖為說明在接受投與 225

mcg/kg qM 之 AT3SC-001 之個體中，測定相對 AT 活性與利用因子 VIII 所達成峰值凝血酶產生百分比之相關性圖式。

【0067】 第 10B 圖為說明在接受投與 1800 mcg/kg qM 之 AT3SC-001 之個體中，測定相對 AT 活性與利用因子 VIII 所達成峰值凝血酶產生百分比之相關性圖式。

【0068】 第 10C 圖為說明在接受投與 80 mg qM 之 AT3SC-001 之個體中，測定相對 AT 活性與利用因子 VIII 所達成峰值凝血酶產生百分比之相關性圖式。

【0069】 第 11 圖為說明多重劑量之 AT3SC-001 對 AT 下降四分位數時之出血事件之效應之圖式。

【0070】 第 12 圖為出示參與 AT3SC-001 之第 I 期臨床試驗 C 部份之個體之出血事件數據列表。

【0071】 第 13A 圖為出示在 AT3SC-001 之第 I 期臨床試驗 C 部份中，所有劑量組在實驗開始之前、實驗開始時、及實驗觀察期間之中值年出血率(ABR)之圖式。

【0072】 第 13B 圖為出示在 AT3SC-001 之第 I 期臨床試驗 C 部份中，每個月 80 mg (80 mg qM x3) 組在實驗開始之前、實驗開始時、及實驗觀察期間之中值年出血率(ABR)之圖式。

【0073】 第 14A 圖為說明在接受投與每個月固定 50 mg 劑量之 AT3SC-001 之帶抑制劑個體中，測定相

對 AT 活性與因子 VIII 所達到峰值凝血酶產生百分比之相關性之圖式。

【0074】 第 14B 圖為說明在接受投與每個月固定 50 mg 劑量之 AT3SC-001 之帶抑制劑個體中，測定相對 AT 活性與因子 VIII 所達到峰值凝血酶產生百分比之相關性之圖示。

【0075】 第 14C 圖為說明在接受投與每個月固定 50 mg 劑量之 AT3SC-001 之帶抑制劑個體中，測定相對 AT 活性與因子 VIII 所達到峰值凝血酶產生百分比之相關性之圖示。

【0076】 第 14D 圖為說明在接受投與每個月固定 50 mg 劑量之 AT3SC-001 之帶抑制劑個體中，測定相對 AT 活性與因子 VIII 所達到峰值凝血酶產生百分比之相關性圖式。

【0077】 第 14E 圖為說明在接受投與每個月固定 50 mg 劑量之 AT3SC-001 之帶抑制劑個體中，測定相對 AT 活性與因子 VIII 所達到峰值凝血酶產生百分比之相關性圖式。

【0078】 第 14F 圖為說明在接受投與每個月固定 50 mg 劑量之 AT3SC-001 之帶抑制劑個體中，測定相對 AT 活性與因子 VIII 所達到峰值凝血酶產生百分比之相關性圖式。

【0079】 第 15 圖為說明在患有帶抑制劑之血友病 A 或 B 人類個體中，多重 50 mg 或 80 mg 劑量之

AT3SC-001 對相對於基線之平均 AT(Serpinc1)活性之效應圖式。

【0080】 第 16 圖為說明患有血友病 A 之個體中，多重 50 mg 劑量之 AT3SC-001 之 AT 下降效應與增加的凝血酶產生之相關性圖式。

【0081】 第 17A 圖為出示參與 AT3SC-001 之第 I 期臨床試驗 D 部份之個體之出血事件數據列表。

【0082】 第 17B 圖為出示 AT3SC-001 之第 I 期臨床試驗 D 部份中，所有個體在實驗開始之前、實驗開始時、及實驗觀察期間之中值年出血率(ABR)圖式。

【0083】 第 18 圖為說明 AT3SC-001 之第 II 期開放性延伸(OLE)試驗中，在患有不帶抑制劑之血友病人類個體中，多重 80 mg 劑量之 AT3SC-001 對相對於基線之平均 AT(Serpinc1)活性之效應圖式。

【0084】 第 19A 圖為說明 AT3SC-001 之第 II 期開放性延伸(OLE)試驗中，在患有帶或不帶抑制劑之血友病 A 或 B 人類個體中，多重 50 mg 或 80 mg 劑量之 AT3SC-001 對相對於基線之平均 AT (Serpinc1)活性之效應圖式。

【0085】 第 19B 圖為說明 AT3SC-001 之第 II 期開放性延伸(OLE)試驗中，在患有帶或不帶抑制劑之血友病 A 或 B 人類個體中，多重 50 mg 或 80 mg 劑量之 AT3SC-001 對峰值凝血酶產生之效應圖式。圖中陰影部份代表健康人類自願者(HV)在實例 1 說明之 AT3SC-

001之第I期試驗中接受投與AT3SC-001且AT減弱小於25%時，所觀察到之峰值凝血酶含量的範圍。通過HV範圍之虛線代表健康人類自願者(HV)在實例1說明之AT3SC-001之第I期試驗中接受投與AT3SC-001且AT減弱小於25%時觀察到之中值的峰值凝血酶含量。

【0086】 第20A圖為出示AT3SC-001之第II期OLE臨床試驗中，患有不帶抑制劑之血友病A或B個體在實驗開始之前、實驗開始時、及實驗觀察期間之中值年出血率(ABR)圖式。

【0087】 第20B圖為出示AT3SC-001之第II期OLE臨床試驗中，患有帶抑制劑之血友病A或B個體在實驗開始之前及實驗觀察期間之中值年出血率(ABR)圖式。

【0088】 第21圖為出示AT3SC-001之第II期OLE臨床試驗中，帶或不帶抑制劑之血友病A或B患者所經歷之出血事件特徵列表。

【0089】 第22圖為出示AT3SC-001之第II期OLE臨床試驗中，不帶抑制劑之血友病A或B患者所經歷出血事件之處理列表。

【0090】 第23圖為出示AT3SC-001之第II期OLE臨床試驗中，帶抑制劑之血友病A或B患者所經歷出血事件特徵之列表。

【0091】 第24A圖為出示不帶抑制劑之血友病A

個體中，每個月固定劑量 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 對處理出血時之因子 VIII 需要量之效應圖式。

【0092】 第 24B 圖為出示不帶抑制劑之血友病 B 個體中，每個月固定劑量 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 對處理出血時之因子 IX 需要量之效應圖式。

【0093】 第 24C 圖為出示帶抑制劑之血友病 A 或 B 個體中，每個月固定劑量 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 對處理出血時之 rFVIIa 需要量之效應圖式。

【0094】 第 24D 圖為出示帶抑制劑之血友病 A 或 B 個體中，每個月固定劑量 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 對處理出血時之 aPCC 需要量之效應圖式。

【0095】 第 25A 圖為說明有帶抑制劑之血友病 A 個體接受投與 AT3SC-001 之前(較下方的線)與之後(較上方的線)，之添加 aPCC 對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0096】 第 25B 圖為說明患有帶抑制劑之血友病 A 個體接受投與 AT3SC-001 之前(較下方的線)與之後(較上方的線)，之添加 rFVIIa 對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0097】 第 26A 圖為說明患有不帶抑制劑之血友病 A 個體接受投與 AT3SC-001 之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加 aPCC 對來自該個體的血漿樣本

中凝血酶產生之效應圖式。

【0098】 第26B圖為說明患有不帶抑制劑之血友病A個體接受投與AT3SC-001之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加rFVIIa對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0099】 第26C圖為說明患有不帶抑制劑之血友病A個體接受投與AT3SC-001之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加aPCC對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0100】 第26D圖為說明患有不帶抑制劑之血友病A個體接受投與AT3SC-001之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加rFVIIa對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0101】 第26E圖為說明患有不帶抑制劑之血友病A個體接受投與AT3SC-001之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加aPCC對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0102】 第26F圖為說明患有不帶抑制劑之血友病A個體接受投與AT3SC-001之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加rFVIIa對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0103】 第26G圖為說明患有不帶抑制劑之血友病A個體接受投與AT3SC-001之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加aPCC對來自該個體的血漿樣本

中凝血酶產生之效應圖式。

【0104】 第 26H 圖為說明患有不帶抑制劑之血友病 A 個體接受投與 AT3SC-001 之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加 rFVIIa 對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0105】 第 26I 圖為說明患有不帶抑制劑之血友病 A 個體接受投與 AT3SC-001 之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加 aPCC 對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0106】 第 26J 圖為說明患有不帶抑制劑之血友病 A 個體接受投與 AT3SC-001 之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加 rFVIIa 對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0107】 第 26K 圖為說明患有不帶抑制劑之血友病 A 個體接受投與 AT3SC-001 之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加 aPCC 對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0108】 第 26L 圖為說明患有不帶抑制劑之血友病 A 個體接受投與 AT3SC-001 之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加 rFVIIa 時對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0109】 第 26M 圖為說明患有不帶抑制劑之血友病 A 個體接受投與 AT3SC-001 之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加 aPCC 對來自該個體的血漿樣本

中凝血酶產生之效應圖式。

【0110】 第26N圖為說明患有不帶抑制劑之血友病A個體接受投與AT3SC-001之前(較下方的線)與之後(較上方的線)之添加rFVIIa對來自該個體的血漿樣本中凝血酶產生之效應圖式。

【0111】 第27A圖為說明在第I/II期開放性延伸(OLE)臨床樣本中，多重劑量之AT3SC-001對AT下降四分位數時之凝血酶產生之效應圖式。

【0112】 第27B圖為說明多重劑量之AT3SC-001對AT下降四分位數時之凝血酶產生之模擬效應圖式。

【0113】 第27C圖為說明模擬TG (第27B圖)與實測TG(第27A圖)之間強力相關性之散佈圖。

【0114】 第28A圖說明各種不同AT含量與0.1%因子FVIII(模擬嚴重血友病A)之電腦模擬凝血酶產生曲線。

【0115】 第28B圖為嚴重血友病A在各種不同因子VIII劑量(單劑)與AT含量之峰值凝血酶之熱製圖。

【0116】 第28C圖為嚴重血友病B在各種不同FIX劑量(單劑)與AT濃度下之峰值凝血酶之熱製圖。

【0117】 第29 A圖為說明在5、10、20與50 IU/kg之因子FVIII及AT在100%下，模擬之峰值凝血酶潛勢(nM)以時間為函數之圖式。

【0118】 第29B圖為說明在5、10、20 IU/kg之

因子 FVIII 及 AT 在基線之 20%下，模擬之峰值凝血酶潛勢(nM)以時間為函數之圖式。

【實施方式】

【0119】 本發明至少部份基於驚人地發現，患有不帶抑制劑之血友病(例如，血友病 A、血友病 B、或血友病 C)個體接受投與醫療有效量之 iRNA 組成物，其導致 RNA 誘發靜默複合物(RISC)介導 Serpinc1 基因之 RNA 轉錄本的裂解，即可利用醫療有效量之置換因子(如：因子 VIII 或因子 XI)治療出血事件，其劑量低於世界血友病聯盟(參見例如，Srivastava 等人之「Guidelines for the Management of Hemophilia」，*Hemophilia* (2012 年 7 月 6 日電子書)；DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x，其完整內容已以引用方式併入本文中)及/或食品藥物管理局之建議有效量(參見例如，艾非特(ADVATE)(抗血友病因子(重組體))產品插頁；11/2016；貝尼克(BeneFIX)(凝血因子 IX (重組體)產品插頁；11/2011；其完整內容已以引用方式併入本文中)。因此本發明提供一種為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與固定劑量約 30 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其中與核苷酸序列 5’-

UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3’(SEQ ID NO：15)之差異不超過3個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在3’-末端之配體；及對該個體投與醫療有效量之置換因子，其中置換因子之有效量低於置換因子之建議有效量，藉以為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

【0120】另一項態樣中，本發明提供一種為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與固定劑量約40 mg至約90 mg之抑制Serpinc1表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其中雙股RNAi劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼Serpinc1之mRNA互補之區，其包含至少15個連續核苷酸，其與核苷酸序列5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3’(SEQ ID NO：15)之差異不超過3個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在3’-末端之配體；及對該個體投與醫療有效量之置換因子，其中置換因子之有效量低於置換因子之建議有效量，藉以為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

【0121】本發明亦至少部份基於發現，患有帶抑制劑之血友病(例如，血友病A、血友病B、或血友病C)個體接受投與醫療有效量之iRNA組成物，其導致RNA誘

發靜默複合物(RISC)介導 Serpinc1 基因之 RNA 轉錄本的裂解，即可利用醫療有效量之繞徑劑(如：經活化之凝血酶原複合物濃聚物(aPCC)或重組因子 VIIa(rFVIIa))治療出血事件，其劑量低於世界血友病聯盟(參見例如，Srivastava 等人之「Guidelines for the Management of Hemophilia」，*Hemophilia* (2012 年 7 月 6 日電子書)；DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x)及/或食品藥物管理局之建議有效量(參見例如，NovoSeven RT，凝血因子 VIIA(重組)產品插頁；07/2014；FEIBA，抗抑制劑凝血複合物(Anti-Inhibitor Coagulation Complex)產品插頁；11/2013；其完整內容已分別以引用方式併入本文中)。

【0122】 因此，本發明另一態樣提供一種為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與固定劑量約 30 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3’(SEQ ID NO：15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3’-末端之配

體；及對該個體投與醫療有效量之繞徑劑，其中繞徑劑之有效量低於例如，由食品藥物管理局所核准繞徑劑之建議有效量，藉以為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

【0123】 本發明另一態樣提供一種為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與固定劑量約 40 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3’(SEQ ID NO：15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3’-末端之配體；及對該個體投與醫療有效量之繞徑劑，其中繞徑劑之有效量低於例如，由食品藥物管理局所核准繞徑劑之建議有效量，藉以為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

【0124】 本發明方法所使用之 iRNA 劑一般包括 RNA 股(反義股)，其具有一區長度約 30 個或更少核苷酸，例如，15 至 30、15 至 29、15 至 28、15 至 27、15 至 26、15 至 25、15 至 24、15 至 23、15 至 22、15 至 21、15 至 20、15 至 19、15 至 18、15 至 17、

18至30、18至29、18至28、18至27、18至26、18至25、18至24、18至23、18至22、18至21、18至20、19至30、19至29、19至28、19至27、19至26、19至25、19至24、19至23、19至22、19至21、19至20、20至30、20至29、20至28、20至27、20至26、20至25、20至24,20至23、20至22、20至21、21至30、21至29、21至28、21至27、21至26、21至25、21至24、21至23、或21至22個核苷酸長度，該區實質上與Serpinc1基因之mRNA轉錄本之至少一部份互補。

【0125】 其他實施例中，本發明雙股RNAi劑之一股或兩股之長度為多至66個核苷酸，例如，36至66、26至36、25至36、31至60、22至43、27至53個核苷酸長度，其中有一區至少19個連續核苷酸係實質上與Serpinc1基因之mRNA轉錄本之至少一部份互補。有些實施例中，正義股與反義股形成18至30個連續核苷酸之雙螺旋。

【0126】 有些實施例中，本發明方法所使用之iRNA劑包括RNA股(反義股)，其長度為多至66個核苷酸，例如，36至66、26至36、25至36、31至60、22至43、27至53個核苷酸長度，其中有一區至少19個連續核苷酸係實質上與Serpinc1基因之mRNA轉錄本之至少一部份互補。有些實施例中，此等具有更長長度反義股之iRNA劑可能包括20-60個核苷

酸長度之第二 RNA 股(正義股)，其中正義股與反義股形成 18 至 30 個連續核苷酸之雙螺旋。

【0127】 下列詳細說明揭示如何製造及使用供抑制 Serpinc1 基因表現之包含 iRNA 之組成物，及供治療患有可因抑制及/或降低此基因表現而受益之疾病與疾患之個體之組成物、用途及方法。

【0128】

I. 定義

為了更容易了解本發明，首先定義某些術語。此外應注意，不論何時出示之參數數值或數值範圍，其均指該等所出示數值之間之數值與範圍亦為本發明一部份。

【0129】 本文所採用冠詞「一種」與「一個」係指該文法上主詞為一個(種)或超過一個(種)(亦即至少一個(種))。例如，「一個元素」係指一個元素或超過一個元素，例如，複數個元素。

【0130】 本文所採用術語「包括」意指片語「包括(但不限於)」，並可與其交換使用。

【0131】 本文所採用術語「或」意指「與/或」，並可與其交換使用，除非文中另有說明。

【0132】 本文所採用「Serpinc1」意指於細胞中表現之特定多肽。Serpinc1 亦稱為絲胺酸肽酶抑制劑 C 型(抗凝血酶；AT)，成員 1；抗凝血酶 III；AT3；抗凝血酶；及肝素輔因子 1。人類 Serpinc1 mRNA 轉錄本之序列可參見例如，GenBank 登錄號 GI：

254588059 (NM_000488；SEQ ID NO：1)。普通獼猴 Serpinc1 mRNA 之序列可參見例如，GenBank 登錄號 GI：157167169 (NM_001104583；SEQ ID NO：2)。小鼠 Serpinc1 mRNA 之序列可參見例如，GenBank 登錄號 GI：237874216(NM_080844；SEQ ID NO：3)。大鼠 Serpinc1 mRNA 之序列可參見例如，GenBank 登錄號 GI：58865629 (NM_001012027；SEQ ID NO：4)。

【0133】 本文所採用術語「Serpinc1」亦指由 Serpinc1 基因之天然發生 DNA 序列變異(如：Serpinc1 基因中之單一核苷酸多形性)於細胞中表現之特定多肽。已經判別出 Serpinc1 基因內許多 SNP，且可參見例如，NCBI dbSNP(參見例如，www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)。Serpinc1 基因內之 SNP 之不設限實例可參見 NCBI dbSNP 登錄號 rs677；rs5877；rs5878；rs5879；rs941988；rs941989；rs1799876；rs19637711；rs2008946；及 rs2227586。

【0134】 本文所採用「個體」為動物，如哺乳動物，包括靈長類(如人類)、非人類靈長類(例如，猴子與黑猩猩)、非靈長類(如牛、豬、駱駝、大羊駝、馬、山羊、兔子、綿羊、倉鼠、天竺鼠、貓、狗、大鼠、小鼠、馬與鯨魚)、或鳥類(例如，鴨或鵝)。一項實施例中，該個體為人類，如接受治療或評估如本文所說明可因降低

Serpinc1 表現而受益之疾病、疾患或病症之人類；處於患有可因降低 Serpinc1 表現而受益之疾病、疾患或病症之風險之人類；患有可因降低 Serpinc1 表現而受益之疾病、疾患或病症之人類；與/或正接受治療可因降低 Serpinc1 表現而受益之疾病、疾患或病症之人類。

【0135】 本文所採用術語「治療」或「處理」係指下列有利或所需結果，包括(但不限於)，減輕或緩和一或多種症狀；降低出血程度；穩定(亦即不惡化)出血狀態；緩和或減緩出血，不論可檢測或不可檢測；或解除出血。「治療」亦可意指比沒有接受治療時之預期存活性延長其存活。本發明方法中，治療包括依需要處理及調控出血發作、手術前後期間之出血處理、及例行預防減少出血發作頻率。

【0136】 在個體或疾病標記物或症狀中之 Serpinc1 含量之相關內容中使用之術語「降低」意指此等含量在統計上顯著降低。其可降低例如，至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、或更多，且較佳係降至未患有此等疾患之個體之正常範圍內之可接受程度。

【0137】 本文所採用「防止」或「預防」當用在可因降低 Sertpinc1 基因表現而受益之疾病、疾患或其病

症時，意指可以降低個體將發展出與此等疾病、疾患、或病症有關之症狀(例如，如出血之症狀)之可能性。例如，當具有一個或多個出血之危險因子之個體未出現出血或所出現之出血嚴重性比具有相同危險因子但未接受如本文所說明治療法之個體減輕時，即係降低發展出出血之可能性。未發展出疾病、疾患或病症，或所發展出與此等疾病、疾患或病症有關之症狀減輕(例如，針對該疾病或疾患之臨床上可接受指標減輕至少約 10%)、或延遲出現後來的症狀(例如，延遲數天、數週、數個月或數年)時，即視為有效預防。

【0138】 本文所採用術語「出血疾患」為造成血液凝結不良及/或過度出血之疾病或疾患。出血疾患可為先天性疾患，如血友病或溫韋伯氏疾病(von Willebrand's disease)，或相關之後天性疾患，例如，瀰漫性血管內凝血、與懷孕相關之子癲症、維生素 K 缺乏、自體免疫疾患、發炎性腸部疾病、潰瘍性大腸炎、皮膚疾患(例如，乾藓、天皰瘡)、呼吸疾病(例如，氣喘、慢性阻塞性肺病)、過敏性藥物反應(例如，醫藥所造成，如阿斯匹林、肝素、及香豆素)、糖尿病、急性 B 型肝炎感染、急性 C 型肝炎感染、惡性或固體腫瘤(例如，前列腺、肺、大腸、胰臟、胃、膽管、頭與頸、子宮頸、乳房、黑色素瘤、腎臟、及/或血液性惡病質)。一項實施例中，該先天性出血疾患為血友病，例如，血友病 A、B、或 C。一項實施例中，患有先天性出血疾患(例

如，血友病)之個體已經對置換凝血療法發展出抑制劑，例如，同種異體抗體抑制劑，本文中稱為「帶抑制劑個體」。一項實施例中，該帶抑制劑個體患有血友病 A。另一項實施例中，該帶抑制劑個體患有血友病 B。又另一項實施例中，該帶抑制劑個體患有血友病 C。

【0139】 一項實施例中，出血疾患為罕見出血疾患(RBD)。RBD 可為後天型 RBD 或遺傳型 RBD。遺傳型 RBD 包括與缺乏凝血因子纖維蛋白原、FII、FV、組合 FV 與 FVIII、FVII、FX、FXI、FXIII、及先天性缺乏維生素 K 依賴型因子(VKCFD)相關之疾患。其等通常呈體染色體隱性病症遺傳，但有些病例(如 FXI 與纖維蛋白原不良血症)可能為體染色體顯性。在大多數族群中，因同型合子或雙重異型合子發生 RBD 之機率從 FVII 缺陷的 500,000 分之一至凝血酶原與 FXIII 缺陷的 2 至 3 百萬之一。族群之間會有相對頻率上的變異，血親或同族婚姻較普遍的族群中由於特定突變基因之頻率增加，頻率較高。

【0140】 RBD 實例包括無纖維蛋白原血症(纖維蛋白原；因子 I 缺陷)；低纖維蛋白原血症(纖維蛋白原；因子 I 缺陷)；纖維蛋白原不良血症(纖維蛋白原；因子 I 缺陷)；低纖維蛋白原不良血症(纖維蛋白原；因子 I 缺陷)；低凝血酶原血症(凝血酶原；因子 II 缺陷)；凝血酶原缺陷(凝血酶原；因子 II 缺陷)；血栓形成體質(凝血酶原；因子 II 缺陷)；先天性抗凝血酶 III 缺陷(凝血質；

因子 III；組織因子)；類血友病(促凝血球蛋白原；因子 V；易變因子)；奧倫氏症(Owren's disease)(促凝血球蛋白原；因子 V；易變因子)；活化蛋白質 C 抗性(促凝血球蛋白原；因子 V；易變因子)；亞歷山大症(Alexander's disease)(穩定因子前轉化素(proconvertin)；因子 VII)；先天性前轉化素/因子 VII 缺陷(穩定因子前轉化素；因子 VII)；史道特-鮑爾(Stuart-Prower)缺陷(史道特-鮑爾因子(Stuart-Prower factor)；因子 X)；先天性因子 XIIIa/b 缺陷(係纖維蛋白穩定因子；因子 XIII)；遺傳因子 XIII 缺陷(纖維蛋白穩定因子；因子 XIII)；及纖維蛋白穩定因子缺陷(纖維蛋白穩定因子；因子 XIII)。

【0141】 本文所採用「醫療有效量」意指所包括 RNAi 劑用量當投與患有出血疾患及出血中之個體時，足以治療疾病(例如，減輕、緩解或維持現有疾病或疾病之一或多種症狀)。「醫療有效量」可能隨 RNAi 劑、該製劑之投藥法、該疾病及其嚴重程度、及病史、年齡、體重、家庭病史、基因組態、可能進行之過去或併行之任何治療、及接受治療之個體之其他個人特徵而異。

【0142】 本文所採用「預防有效量」意指所包括 iRNA 劑用量當投與患有出血疾患但未在出血中之個體，例如，患有出血疾患且計畫接受手術之個體(手術前後期間治療)時，足以預防或緩解疾病或疾病之一或多種症狀。疾病之緩解包括減慢疾病過程或降低後來發展之疾病

之嚴重性。「預防有效量」可能隨 iRNA 劑、該製劑之投藥法、該疾病之嚴重程度、及病史、年齡、體重、家庭病史、基因組態、可能進行之過去或併行之任何治療、及接受治療之患者之其他個人特徵而異。

【0143】「醫療有效量」或「預防有效量」亦包括 RNAi 劑可以在適用於任何治療之合理效益/風險比值下產生某些所需局部或全身性效應時之量。本發明方法所採用 iRNA 可能投與足以產生適用於此等治療之合理效益/風險比值之量。

【0144】「置換因子之建議醫療有效量」與「繞徑劑之建議醫療有效量」係分別指置換因子或繞徑劑之劑量，其足以在出現出血之個體中產生凝血酶並解除出血及/或足以達到血漿因子峰值濃度，如世界血友病聯盟(參見例如，Srivastava 等人之「Guidelines for the Management of Hemophilia」, *Hemophilia* (2012 年 7 月 6 日電子書)；DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x；艾非特(ADVATE)(抗血友病因子(重組體))產品插頁；11/2016；及貝尼克(BeneFIX)(凝血因子 IX (重組體)產品插頁；11/2011 所提供。其等完整內容已分別以引用方式併入本文中。

【0145】例如，針對患有輕度出血之個體，置換因子或繞徑劑之建議劑量為足以使峰值血漿因子 VIII 濃度達到約 10-40 IU/dL 時之劑量；針對患有中度出血之個體之置換因子或繞徑劑之建議劑量為足以使峰值血漿因子

VIII 濃度達到約 30-60 IU/dL 時之劑量；針對患有重度出血之個體之置換因子或繞徑劑之建議劑量為足以使峰值血漿因子 VIII 濃度達到約 60-100 IU/dL 時之劑量；針對手術前後期間之個體之置換因子或繞徑劑之建議劑量為足以使峰值血漿因子 VIII 濃度達到約 30-60 IU/dL 時之劑量(參見例如，艾非特(ADVATE)(抗血友病因子(重組))產品插頁；11/2016 之表 1 與 2)。

【0146】 針對患有輕度出血之個體之置換因子或繞徑劑之建議劑量為足以使峰值血漿因子 IX 濃度達到約 10-30 IU/dL 時之劑量；針對患有中度出血之個體之置換因子或繞徑劑之建議劑量為足以使峰值血漿因子 IX 濃度達到約 25-50 IU/dL 時之劑量；針對患有重度出血之個體之置換因子或繞徑劑之建議劑量為足以使峰值血漿因子 IX 濃度達到約 50-100 IU/dL 時之劑量。

【0147】 本文所採用片語「醫藥上可接受」係指彼等在完整之醫學判斷下適合與人類個體及動物之組織接觸，且在合理之效益/風險比值下不會有過度毒性、刺激性、過敏反應或其他問題或併發症之化合物、材料、組成物與/或劑型。

【0148】 本文所採用片語「醫藥上可接受之載劑」係指醫藥上可接受之材料、組成物或媒劑，如液態或固態填料、稀釋劑、賦形劑、製造助劑(例如，潤滑劑、滑石、硬脂酸鎂、-鈣或-鋅、或硬脂酸)、或溶劑包埋材料，其涉及從一個器官或身體之一部份攜帶或轉運該主題

化合物至另一個器官或身體之一部份。各載劑必需在可與調配物中其他成份相容之意義上為「可接受」，且對接受治療之個體無害。可作為醫藥上可接受之載劑之有些材料實例包括：(1)糖類，如乳糖、葡萄糖與蔗糖；(2)澱粉，如玉米澱粉與馬鈴薯澱粉；(3)纖維素、與其衍生物，如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素與乙酸纖維素；(4)黃蓍膠粉末；(5)麥芽；(6)明膠；(7)潤滑劑，如硬脂酸鎂、月桂基硫酸鈉與滑石；(8)賦形劑，如可可奶油與栓劑用蠟；(9)油類，如花生油、玉米籽油、葵花油、芝麻油、橄欖油、玉米油與大豆油；(10)甘醇類，如丙二醇；(11)多元醇類，如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇、與聚乙二醇；(12)酯類，如油酸乙酯與月桂酸乙酯；(13)洋菜；(14)緩衝劑，如氫氧化鎂與氫氧化鋁；(15)藻酸；(16)無熱原水；(17)等滲生理食鹽水；(18)林格氏溶液(Ringer's solution)；(19)乙醇；(20) pH 緩衝液；(21)聚酯類、聚碳酸鹽與/或聚酸酐；(22)增積劑，如多肽類與胺基酸；(23)血清組份，如血清白蛋白、HDL 與 LDL；與(24)用於醫藥調配物中之其他無毒性相容物質。

【0149】 本文所採用「標靶序列」係指在 Serpinc1 基因轉錄期間所形成 mRNA 分子之核苷酸序列中之連續部份，包括作為主要轉錄產物之 RNA 處理產物之 mRNA。一項實施例中，該序列之標靶部份之長度應為至少足以作為受質之長度，可在或接近 Serpinc1

基因轉錄期間所形成 mRNA 分子之核苷酸序列之一部份之位置接受 iRNA 所主導之裂解。

【0150】 標靶序列長度可為約 9 至 36 個核苷酸，例如，約 15 至 30 個核苷酸長度。例如，標靶序列長度可為約 15 至 30 個核苷酸、15 至 29、15 至 28、15 至 27、15 至 26、15 至 25、15 至 24、15 至 23、15 至 22、15 至 21、15 至 20、15 至 19、15 至 18、15 至 17、18 至 30、18 至 29、18 至 28、18 至 27、18 至 26、18 至 25、18 至 24、18 至 23、18 至 22、18 至 21、18 至 20、19 至 30、19 至 29、19 至 28、19 至 27、19 至 26、19 至 25、19 至 24、19 至 23、19 至 22、19 至 21、19 至 20、20 至 30、20 至 29、20 至 28、20 至 27、20 至 26、20 至 25、20 至 24,20 至 23、20 至 22、20 至 21、21 至 30、21 至 29、21 至 28、21 至 27、21 至 26、21 至 25、21 至 24、21 至 23、或 21 至 22 個核苷酸。上述範圍與長度之間之範圍與長度亦包括為本發明之一部份。

【0151】 本文所採用術語「包含序列之股」係指包含核苷酸鏈之寡核苷酸，其係採用標準核苷酸命名法之序列說明。

【0152】 「G」、「C」、「A」、「T」與「U」一般分別代表核苷酸，其分別包含鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶與尿嘧啶作為鹼基。然而，咸了解，術語「核糖核苷酸」或「核苷酸」亦指經修飾之核苷酸，如下

文中進一步說明，或改用置換部份基團(參見例如，表1)。熟悉此相關技術者咸了解，鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤與尿嘧啶可在不會實質上改變該包含帶有此等置換部份基團之核苷酸之寡核苷酸鹼基配對性質下改用其他部份基團置換。例如(但不限於)，包含肌苷作為其鹼基之核苷酸可與包含腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之核苷酸形成鹼基對。因此，如本發明所說明特徵之 dsRNA 之核苷酸序列中，包含尿嘧啶、鳥嘌呤或腺嘌呤之核苷酸可被包含例如，肌苷之核苷酸置換。另一項實例中，寡核苷酸中之任何腺嘌呤與胞嘧啶均可分別被鳥嘌呤與尿嘧啶置換，與標靶 mRNA 形成 G-U 搖擺鹼基對。包含此等置換部份基團之序列適合如本發明所說明特徵之組成物與方法。

【0153】 本所採用術語「iRNA」、「RNAi 劑」、「iRNA 劑」、「RNA 干擾劑」可交換使用，其意指包含如本文術語所定義之 RNA 之製劑，其可藉由 RNA 誘發靜默複合物(RISC)途徑介導 RNA 轉錄本的靶向裂解。iRNA 透過稱為 RNA 干擾(RNAi)之過程主導依序列專一性裂解 mRNA。iRNA 調控(例如，抑制) Serpinc1 於細胞(例如，個體，如哺乳動物個體之細胞)中之表現。

【0154】 一項實施例中，本發明 RNAi 劑包括與標靶 RNA 序列(例如，Serpinc1 標靶 mRNA 序列)交互作用之單股 RNA，以主導標靶 RNA 的裂解。在不希望受到理論限制下，咸信進入細胞中之長雙股 RNA 被稱為

Dicer 之第 III 型內切核酸酶分解成 siRNA(Sharp 等人(2001)*Genes Dev*. 15:485)。Dicer 係一種類似核糖核酸酶-III 之酵素，可處理 dsRNA 形成 19 至 23 對鹼基之短干擾 RNA，其特徵在於兩個鹼基之 3'突出(Bernstein 等人(2001) *Nature* 409:363)。siRNA 隨後進入 RNA 誘發靜默複合物(RISC)中，其中一或多種解螺旋酶解開 siRNA 雙螺旋，讓互補反義股可以指揮辨識標靶(Nykanen 等人(2001) *Cell* 107:309)。當與適當標靶 mRNA 結合時，RISC 內之一或多種內切核酸酶會裂解標靶，引發靜默(Elbashir 等人(2001)*Genes Dev*. 15:188)。因此一項態樣中，本發明係有關一種在細胞內產生之單股 RNA(siRNA)，其促進形成 RISC 複合物，導致標靶基因(亦即 Serpinc1 基因)靜默。因此，本文所採用術語「siRNA」亦指上述 RNAi。

【0155】 另一項實施例中，RNAi 劑可為進入細胞或生物體中來抑制標靶 mRNA 之單股 siRNA。單股 RNAi 劑結合 RISC 內切核酸酶 Argonaute 2，然後其裂解標靶 mRNA。單股 siRNA 一般為 15 至 30 個核苷酸且經化學修飾。單股 siRNA 之設計與試驗說明於美國專利案案號 8,101,348 與 Lima 等人(2012) *Cell* 150：883-894，其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。本文所說明之任何反義核苷酸序列均可作為本文說明之單股 siRNA 使用或可採用 Lima 等人

(2012) *Cell* 150：883-894說明之方法進行化學修飾。

【0156】另一項實施例中，本發明組成物、用途與方法所使用之「iRNA」係雙股RNA，本文中稱為「’雙股RNAi劑」、「雙股RNA(dsRNA)分子」、「dsRNA劑」或「dsRNA」。術語「dsRNA」係指核糖核酸分子之複合物，其具有雙螺旋結構，包含兩個反向平行且實質上互補之核酸股，具有相對於標靶RNA(亦即Serpinc1基因)之「正義」與「反義」取向。有些本發明實施例中，雙股RNA(dsRNA)透過轉錄後基因-靜默機轉(本文稱為RNA干擾或RNAi)啟動標靶RNA(例如，mRNA)的降解。

【0157】通常，dsRNA分子之各股之大多數核苷酸為核糖核苷酸，但如同本文之詳細說明，各股或兩股亦可包括一個或多個非核糖核苷酸，例如，去氧核糖核苷酸與/或經修飾之核苷酸。此外，本說明書所採用「RNAi劑」可能包括經化學修飾之核糖核苷酸；RNAi劑可能在多個核苷酸包括實質修飾。

【0158】本文所採用術語「經修飾之核苷酸」意指分別獨立具有經修飾之糖部分基團、經修飾之核苷酸之間鍵聯、與/或經修飾之核鹼基之核苷酸。因此，術語「經修飾之核苷酸」包括在核苷酸之間鍵聯、糖部份基團或核鹼基的取代、加成、或排除例如，官能基或原子。適用於本發明製劑之修飾法包括本文所揭示或相關技藝已知之所

有修飾型態。針對本說明書與申請專利範圍的目的，「RNAi劑」包括用於siRNA型分子之任何此等修飾。

【0159】雙螺旋區之長度可為容許所需之標靶RNA透過RISC途徑進行專一性降解之任何長度，且可能在約9至36對鹼基之長度範圍內，例如，約15至30對鹼基之長度，例如，約9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、或36對鹼基之長度，如約15至30、15至29、15至28、15至27、15至26、15至25、15至24、15至23、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、15至17、18至30、18至29、18至28、18至27、18至26、18至25、18至24、18至23、18至22、18至21、18至20、19至30、19至29、19至28、19至27、19至26、19至25、19至24、19至23、19至22、19至21、19至20、20至30、20至29、20至28、20至27、20至26、20至25、20至24,20至23、20至22、20至21、21至30、21至29、21至28、21至27、21至26、21至25、21至24、21至23、或21至22對鹼基之長度。上述範圍與長度之間之範圍與長度亦包括為本發明之一部份。

【0160】形成雙螺旋結構之兩股可能為一個較大RNA分子之不同部份，或其可能為分開之RNA分子。若這兩股為一個較大分子之一部份，且因此在形成該雙螺

旋結構之其中一股之 3'-端與另一股之 5'-端之間利用未中斷之核苷酸鏈連接時，該連接之 RNA 鏈稱為「髮夾環」。髮夾環可包含至少一個未配對之核苷酸。有些實施例中，髮夾環可包含至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個、至少 5 個、至少 6 個、至少 7 個、至少 8 個、至少 9 個、至少 10 個、至少 20 個、至少 23 個或更多個未配對之核苷酸。

【0161】 若 dsRNA 之兩個實質上互補股包含在分開之 RNA 分子上時，彼等分子不一定需要但可以共價連接。若這兩股在形成該雙螺旋結構之其中一股之 3'-端與另一股之 5'-端之間利用除了未中斷之核苷酸鏈以外之其他連接方式共價連接時，該連接結構稱為「連接基」。RNA 股可能具有相同或不同數量之核苷酸。鹼基對之最高數量即為 dsRNA 中最短股之核苷酸數量減去雙螺旋中任何突出後之數量。除了雙螺旋結構外，RNAi 亦可包含一個或多個核苷酸突出。

【0162】 一項實施例中，本發明 RNAi 劑為 24 至 30 個核苷酸之 dsRNA，其與標靶 RNA 序列(例如，Serpinc1 標靶 mRNA 序列)交互作用，主導標靶 RNA 的裂解。在不希望受到理論之限制下，進入細胞中之長的雙股 RNA 被稱為 Dicer 之第 III 型內切核酸酶分解成 siRNA(Sharp 等人(2001)*Genes Dev.* 15：485)。Dicer 係類似核糖核酸酶-III 之酵素，其處理 dsRNA 形成 19 至 23 對鹼基之短干擾型 RNA，其特徵在於兩個

鹼基之 3'突出(Bernstein 等人(2001) *Nature* 409：363)。該等 siRNA 隨後再進入 RNA 誘發靜默複合物(RISC)中，其中一或多種解螺旋酶解開 siRNA 雙螺旋，讓該互補反義股可以指揮辨識標靶(Nykanen 等人(2001) *Cell* 107：309)。當與適當標靶 mRNA 結合時，RISC 內之一或多種內切核酸酶即裂解標靶而誘發靜默(Elbashir 等人(2001)*Genes Dev*. 15：188)。

【0163】 本文所採用術語「核苷酸突出」係指至少一個未配對之核苷酸從 iRNA 雙螺旋結構(例如，dsRNA)中突出。例如，當 dsRNA 中一股之 3'-端超出另一股 5'-端，或反之亦然時，即有一個核苷酸突出。dsRNA 可包含含有至少一個核苷酸之突出；或者，該突出可包含至少兩個核苷酸、至少三個核苷酸、至少四個核苷酸、至少五個或更多個核苷酸。核苷酸突出可包含或其組成可為核苷酸/核苷類似物，包括去氧核苷酸/核苷。該(等)突出可位於正義股、反義股或其任何組合。此外，突出之核苷酸(群)可出現在 dsRNA 之反義或正義股之 5'-端、3'-端或兩端。

【0164】 一項實施例中，dsRNA 之反義股可在 3'-端與/或 5'-端具有 1 至 10 個核苷酸(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸)之突出。一項實施例中，dsRNA 之正義股可在 3'-端與/或 5'-端具有 1 至 10 個核苷酸(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸)之突出。另一項實施例中，突出中一

個或多個核苷酸被核苷硫代磷酸酯置換。

【0165】 某些實施例中，正義股或反義股、或二者之突出可包括延長超過10個核苷酸之長度，例如，10至30個核苷酸、10至25個核苷酸、10至20個核苷酸或10至15個核苷酸長度。某些實施例中，延長之突出出現在雙螺旋之正義股。某些實施例中，延長之突出出現在雙螺旋正義股之3'端。某些實施例中，延長之突出出現在雙螺旋正義股之5'端。某些實施例中，延長之突出出現在雙螺旋之反義股。某些實施例中，延長之突出出現在雙螺旋反義股之3'端。某些實施例中，延長之突出出現在雙螺旋反義股之5'端。某些實施例中，延長突出中一個或多個核苷酸被核苷硫代磷酸酯置換。

【0166】 「鈍」或「鈍端」意指雙股RNAi劑之端沒有未配對之核苷酸，亦即沒有核苷酸突出。「鈍端」RNAi劑為其整個長度均為雙股之dsRNA，亦即該分子之任一端均沒有核苷酸突出。本發明RNAi劑包括在一端具有核苷酸突出之RNAi劑(亦即具有一個突出與一個鈍端之製劑)之RNAi劑或兩端均具有核苷酸突出之RNAi劑。

【0167】 術語「反義股」或「引導股」係指iRNA(例如，dsRNA)之該股包括一個與標靶序列(例如，Serpinc1 mRNA)實質上互補之區。本文所採用術語「互補區」係指反義股與序列(例如，標靶序列，例如，如本文定義之Serpinc1核苷酸序列)實質上互補之

區。若當互補區未與標靶序列完全互補時，可能在分子內部或末端區發生錯配。通常，最能忍受之錯配係在末端區內，例如，iRNA 之 5'-與/或 3'-末端之 5、4、3、或 2 個核苷酸內。

【0168】 本文所採用術語「正義股」或「過客股」係指該 iRNA 之股包括一個與如本文術語所定義反義股區實質上互補之區。

【0169】 本文所採用術語「裂解區」係指位在緊鄰裂解位點之區。裂解位點係在標靶發生裂解之位點。有些實施例中，裂解區包含三個鹼基在裂解位點之任一端且緊鄰裂解位點。有些實施例中，裂解區包含二個鹼基在裂解位點任一端且緊鄰裂解位點。有些實施例中，裂解位點明確位於與反義股之核苷酸 10 與 11 結合之位點，且裂解區包含核苷酸 11、12 與 13。

【0170】 除非另有說明，否則當本文採用術語「互補」說明第一核苷酸序列與第二核苷酸序列之關係時，係指包含該第一核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸在熟悉此相關技術者咸了解之某些條件下與包含第二核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸雜交並形成雙螺旋結構之能力。此等條件可為例如，嚴苛條件，其中嚴苛條件包括：400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA，50℃或 70℃為 12 至 16 小時，然後洗滌(參見例如，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook 等人(1989) Cold Spring Harbor

Laboratory Press))。可採用其他條件，如生物體內部可能遇到之生理上相關條件。熟悉此相關技術者均可依據最終雜交核苷酸之用途，決定一組最適合測試兩個序列之互補性之條件。

【0171】 iRNA(例如，本文說明之 dsRNA)內之互補序列包括包含第一核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸與包含第二核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸沿著其中一或兩個核苷酸序列之整個長度之鹼基配對。此等序列在本文中可稱為其彼此「完全互補」。然而，若第一序列相對於本文第二序列稱為「實質上互補」時，則該等兩個序列可能完全互補，或當具有多至 30 對鹼基之雙螺旋在雜交時，其可能形成一或多對，通常不會有超過 5、4、3 或 2 對錯配鹼基，反而在與其最終用途(例如，經由 RISC 途徑抑制基因表現)最相關之條件下仍保留雜交能力。然而，若兩個寡核苷酸之設計在於雜交時形成一個或多個單股突出時，則此等突出不應在決定互補性時視為錯配。例如，包含一個長度為 21 個核苷酸之寡核苷酸與另一個長度為 23 個核苷酸之寡核苷酸之 dsRNA 中，包含一個與該較短寡核苷酸完全互補之 21 個核苷酸序列之較長寡核苷酸在本發明所說明目的下，仍可稱為「完全互補」。

【0172】 本文所採用「互補」序列亦可包括非華生-克里克(Watson-Crick)鹼基對及/或由非天然與經修飾之核苷酸形成之鹼基對，或完全由其組成，只要符合上述雜交能力之要求即可。此等非華生-克里克(Watson-

Crick)鹼基對包括(但不限於)，G：U 搖擺或胡斯坦(Hoogstein)鹼基配對。

【0173】 本文中有關 dsRNA 之正義股與反義股之間或 iRNA 劑之反義股與標靶序列之間鹼基配對之內容所採用之術語「互補」、「完全互補」與「實質上互補」可由其用途之內容中了解。

【0174】 本文所採用與信使 RNA(mRNA)之「至少一部份實質上互補」之多核苷酸係指該多核苷酸與所需 mRNA (例如，編碼 Serpinc1 之 mRNA)之連續部份實質上互補。例如，若該序列係與編碼 Serpinc1 之 mRNA 之非中斷部份實質上互補時，則該多核苷酸係與至少一部份 Serpinc1 mRNA 互補。

【0175】 因此有些實施例中，本文所揭示反義股多核苷酸係與標靶 Serpinc1 序列完全互補。其他實施例中，本文所揭示反義股多核苷酸係與標靶 Serpinc1 序列實質上互補，且所包含之連續核苷酸序列與核苷酸序列 SEQ ID NO：1 之同等區之完整長度或 SEQ ID NO：1 之片段至少約 80%互補，如約 85%、約 86%、約 87%、約 88%、約 89%、約 90%、約% 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、或約 99% 互補。

【0176】 一項實施例中，本發明 RNAi 劑包括與反義多核苷酸實質上互補之正義股，該反義股再與標靶 Serpinc1 序列互補，且其中該正義股多核苷酸所包含之

連續核苷酸序列與核苷酸序列 SEQ ID NO：5 之同等區之完整長度或任一 SEQ ID NO：5 之片段至少約 80%互補，如約 85%、約 86%、約 87%、約 88%、約 89%、約 90%、約% 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、或約 99%互補。

【0177】 本發明一項態樣中，本發明方法與組成物所採用之製劑為經由反義抑制機轉來抑制標靶 mRNA 之單股反義 RNA 分子。單股反義 RNA 分子係與標靶 mRNA 內之序列互補。單股反義寡核苷酸可藉由與 mRNA 進行鹼基配對，依化學計量方式抑制轉譯，並以物理方式封阻轉譯機轉，參見 Dias,N.等人(2002) *Mol Cancer Ther* 1：347-355。單股反義 RNA 分子之長度可為約 15 至約 30 個核苷酸且具有與標靶序列互補之序列。例如，單股反義 RNA 分子可能包含選自本文所說明任一種反義序列且具有至少約 15、16、17、18、19、20、或更多個連續核苷酸之序列。

【0178】 本文所採用術語「抑制」可與「降低」、「靜默」、「下調」、「壓制」及其他類似術語交換使用，且包括任何程度之抑制作用。

【0179】 片語「抑制 Serpinc1 表現」包括抑制任何 Serpinc1 基因(如，例如，小鼠 Serpinc1 基因、大鼠 Serpinc1 基因、猴 Serpinc1 基因、或人類 Serpinc1 基因)及編碼 Serpinc1 蛋白質之 Serpinc1

基因之變異體或突變體之表現。

【0180】「抑制 Serpinc1 基因之表現」包括 Serpinc1 基因之任何抑制程度，例如，至少部份壓制 Serpinc1 基因之表現，如抑制至少約 5%、至少約 10%、至少約 15%、至少約 20%、至少約 25%、至少約 30%、至少約 35%、至少約 40%、至少約 45%、至少約 50%、 至少約 55%、 至少約 60%、至少約 65%、至少約 70%、至少約 75%、至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%、或至少約 99%。

【0181】 Serpinc1 基因之表現可依據與 Serpinc1 基因表現相關之任何變數來分析，例如，Serpinc1 mRNA 含量、Serpinc1 蛋白質含量、或例如，用於測定凝血酶形成潛力之凝血酶：抗凝血酶複合物含量、出血時間、凝血酶原時間(PT)、血小板計數、與/或活化之部分凝血質時間(aPTT)。可由其中一或多種變數與對照組含量比較其絕對或相對下降程度，來分析抑制性。對照組含量可能為相關技藝上採用之任何型態之對照組含量，例如，投藥前之基線值或由未處理或接受對照物(如，例如，僅使用緩衝劑之對照物或含無活性劑之對照物)處理之類似個體、細胞或樣本所測得之含量。

【0182】 一項實施例中，對 Serpinc1 基因表現之至少部份壓制性可由從其中 Serpinc1 基因已轉錄且已

接受處理以致抑制 Serpinc1 基因表現之第一細胞或細胞群中所單離或所檢測之 Serpinc1 mRNA 相對於實質上與該第一細胞或細胞群相同但未曾接受如此處理之第二細胞或細胞群(對照細胞)之降低程度來分析。採用下列公式來表示抑制程度：

【0183】

$$\frac{(\text{對照細胞之 mRNA})-(\text{處理細胞之 mRNA})}{(\text{對照細胞之 mRNA})} \times 100\%$$

【0184】 本文所採用片語「細胞與 RNAi 劑(如 dsRNA)接觸」，包括依任何可能方式接觸細胞。細胞與 RNAi 劑之接觸包括細胞於活體外與 iRNA 接觸或細胞於活體內與 iRNA 接觸。該接觸可能直接或間接進行。因此例如，可能由執行該方法之個體讓 RNAi 劑與細胞進行物理性接觸，或者，可能讓 RNAi 劑處於容許或導致其隨後得以接觸細胞之狀態下。

【0185】 細胞於活體外之接觸可能為例如，細胞與 RNAi 劑培養。細胞於活體內之接觸可能為例如，注射 RNAi 劑至該細胞所在之組織內或附近，或注射 RNAi 劑至另一個區域，例如，血流或皮下空間，因此該劑隨後即可到達希望接觸之細胞所在之組織位置。例如，RNAi 劑可能包含及/或可能偶聯配體，例如，GalNAc3，其主導 RNAi 劑至所需位點，例如，肝臟。亦可能組合活體外與活體內接觸方法。例如，細胞亦可於活體外與 RNAi 劑接觸，隨後再移植入個體內。

【0186】 一項實施例中，細胞與iRNA之接觸包括藉由促進或引發接收或吸收至細胞內，而「引進」或「傳遞iRNA至細胞內」。可透過無助力下之擴散或主動細胞過程，或透過輔劑或裝置，吸收或接收iRNA。可能於活體外與/或活體內引進iRNA至細胞內。例如，於活體內引進iRNA時，將其注射至組織位點或全身性投藥。亦可利用β-葡聚醣傳遞系統於活體內傳遞，如彼等說明於美國專利案案號5,032,401與5,607,677、與美國公開案案號2005/0281781中者，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。於活體外引至細胞中之方法包括相關技藝上已知方法，如電穿孔法與脂染法。其他方法說明於下文與/或係相關技藝上已知者。

【0187】

II. 本發明方法

本發明提供一種在患有血友病(例如，血友病A、血友病B、或血友病C)之個體中治療出血事件之醫療方法，其包括對該個體投與本發明iRNA劑或包含本發明iRNA劑之醫藥組成物，例如，其用量可使該個體之Serpinc1活性降低約75%或更多，及投與置換因子或繞徑劑，其醫療有效量低於置換因子或繞徑劑之建議醫療有效量，例如，世界血友病聯盟(參見例如，Srivastava等人之「Guidelines for the Management of Hemophilia」，*Hemophilia*(2012年7月6日電子書)；DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x，

其完整內容已以引用方式併入本文中)及/或食品藥物管理局之建議(參見例如，艾非特(ADVATE)(抗血友病因子(重組))產品插頁；11/2016；貝尼克(BeneFIX)(凝血因子 IX (重組體)產品插頁；11/2011)(例如，其量足以產生凝血酶及解除出血(形成血塊)。上述各文獻之完整內容已以引用方式併入本文。

【0188】 如下文實例中之說明，已驚人地發現患有帶或不帶抑制劑之血友病(例如，血友病 A、血友病 B、或血友病 C)個體接受投與抑制 Serpinc1 表現之 RNAi 劑，其用量可使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多，降低中值年出血率及自發性年出血率，並可處理出血(產生凝血酶及解除出血)，並接受醫療有效量之置換因子或繞徑劑，其用量低於置換因子或繞徑劑之建議有效量。

【0189】 適用於本發明方法之置換因子包括因子 VIII，例如，艾非特(Advate)、艾拉特(Eloctate)、赫滿特(Haemate)、希利特(Helixate)、英姆特(Immunate)、歐康特(Octanate)、立康貝(Recombinate)、與立法克(Refacto)，或因子 IX，例如，安美克(Aimafix)、貝尼克(Benefix)、英姆尼(Immunine)、與立法克(Refacto)。適用於本發明方法之繞徑劑包括經活化之凝血酶原複合物濃聚物(aPCC)，例如，FEIBA 與 Prothromplex，及重組因子 VIIa (rFVIIa)，例如，NovoSeven。

【0190】 本發明方法中，置換因子可為因子VIII，且投與個體之置換因子之醫療有效量為足以達到峰值血漿因子 VIII 含量約 10 至 100 IU/dL 時之劑量，例如，約 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、或約 100 IU/dL。

【0191】 例如，投與個體之因子 VIII 置換因子之醫療有效量可低於約 200 IU/kg、或低於約 190 IU/kg、或低於約 180 IU/kg、或低於約 170 IU/kg、或低於約 160 IU/kg、或低於約 150 IU/kg、或低於約 140 IU/kg、或低於約 130 IU/kg、或低於約 120 IU/kg、或低於約 110 IU/kg、或低於約 100 IU/kg、或低於約 90 IU/kg、或低於約 80 IU/kg、或低於約 70 IU/kg、或低於約 60 IU/kg、或低於約 50 IU/kg、或低於約 40 IU/kg、或低於約 30 IU/kg、或低於約 20 IU/kg、或低於約 10 IU/kg。一項實施例中，投與個體之因子 VIII 之醫療有效量比置換因子之建議有效量降低約 1.5 倍至約 5 倍，如劑量為約 5 至約 20 IU/kg 或約 10 至約 20 IU/kg，例如，5、10、15、或 20 IU/kg。一項實施例中，出血事件係中度出血事件。另一項實施例中，出血事件係重度出血事件。

【0192】 本發明方法中，置換因子可為因子 IX，且投與個體之置換因子之醫療有效量為足以達到峰值血漿因子 IX 含量約 10 至 100 IU/dL 時之劑量，例如，約

10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、或約 100 IU/dL。

【0193】 例如，因子 IX 置換因子之醫療有效量可低於約 200 IU/kg、或低於約 190 IU/kg、或低於約 180 IU/kg、或低於約 170 IU/kg、或低於約 160 IU/kg、或低於約 150 IU/kg、或低於約 140 IU/kg、或低於約 130 IU/kg、或低於約 120 IU/kg、或低於約 110 IU/kg、或低於約 100 IU/kg、或低於約 90 IU/kg、或低於約 80 IU/kg、或低於約 70 IU/kg、或低於約 60 IU/kg、或低於約 50 IU/kg、或低於約 40 IU/kg、或低於約 30 IU/kg、或低於約 20 IU/kg、或低於約 10 IU/kg。一項實施例中，投與個體之因子 IX 之醫療有效量比置換因子之建議有效量降低約 2 倍至約 6 倍，例如，劑量約 10 至約 30 IU/kg 或約 20 至約 30 IU/kg，如約 10、15、20、25、或 30 IU/kg。一項實施例中，出血事件係中度出血事件。另一項實施例中，出血事件為重度出血事件。

【0194】 本發明方法中，繞徑劑可為 aPCC，且投與個體之繞徑劑之醫療有效量為足以產生凝血酶及解除出血時之劑量。

【0195】 例如，繞徑劑 aPCC 之醫療有效量可低於約 100 U/kg、或低於約 90 U/kg、或低於約 80 U/kg、或低於約 70 U/kg、或低於約 60 U/kg、或低於約 50 U/kg、或低於約 40 U/kg、或低於約 30

U/kg、或低於約 20 U/kg、或低於約 10 U/kg。一項實施例中，投與個體之 aPCC 之醫療有效量比置換因子之建議有效量降低約 2 倍至約 3 倍，例如，劑量約 30 至約 50 U/kg，如約 30、35、40、45、或 50 U/kg。一項實施例中，出血事件係中度出血事件。另一項實施例中，出血事件係重度出血事件。

【0196】 本發明方法中，繞徑劑可為 rFVIIa，且投與個體之繞徑劑之醫療有效量為足以產生凝血酶及解除出血時之劑量。

【0197】 例如，繞徑劑 rFVIIa 之醫療有效量係低於約 120 μg/kg、或低於約 110 μg/kg、或低於約 100 μg/kg、或低於約 90 μg/kg、或低於約 80 μg/kg、或低於約 70 μg/kg、或低於約 60 μg/kg、或低於約 50 μg/kg、或低於約 40 μg/kg、或低於約 30 μg/kg、或低於約 20 μg/kg。一項實施例中，投與個體之 rFVIIa 之醫療有效量比置換因子之建議有效量降低約 2 倍，例如，劑量約 45 μg/kg。一項實施例中，出血事件係中度出血事件。另一項實施例中，出血事件為重度出血事件。

【0198】 有些實施例中，RNAi 劑係投與固定劑量約 25 mg 至約 100 mg 之間，例如，約 25 mg 至約 95 mg 之間、約 25 mg 至約 90 mg 之間、約 25 mg 至約 85 mg 之間、約 25 mg 至約 80 mg 之間、約 25 mg 至約 75 mg 之間、約 25 mg 至約 70 mg 之間、約 25 mg 至約 65 mg 之間、約 25 mg 至約 60 mg 之間、約

25 mg 至約 50 mg 之間、約 50 mg 至約 100 mg 之間、約 50 mg 至約 95 mg 之間、約 50 mg 至約 90 mg 之間、約 50 mg 至約 85 mg 之間、約 50 mg 至約 80 mg 之間、約 30 mg 至約 100 mg 之間、約 30 mg 至約 90 mg 之間、約 30 mg 至約 80 mg 之間、約 40 mg 至約 100 mg 之間、約 40 mg 至約 90 mg 之間、約 40 mg 至約 80 mg 之間、約 60 mg 至約 100 mg 之間、約 60 mg 至約 90 mg,之間、約 25 mg 至約 55 mg 之間、約 25 mg 至約 65 mg 之間、約 30 mg 至約 95 mg 之間、約 30 mg 至約 85 mg 之間、約 30 mg 至約 75 mg 之間、約 30 mg 至約 65 mg 之間、約 30 mg 至約 55 mg 之間、約 40 mg 至約 95 mg 之間、約 40 mg 至約 85 mg 之間、約 40 mg 至約 75 mg 之間、約 40 mg 至約 65 mg 之間、約 40 mg 至約 55 mg 之間、或約 45 mg 至約 95 mg 之間。

【0199】 有些實施例中，RNAi 劑係投與固定劑量約 25 mg、約 30 mg、約 35 mg、約 40 mg、約 45 mg、約 50 mg、約 55 mg、約 60 mg、約 65 mg、約 70 mg、約 75 mg、約 80 mg、約 85 mg、約 90 mg、約 95 mg、或約 100 mg。

【0200】 一項實施例中，投與個體之 RNAi 劑劑量可使 Serpinc1 活性降低約 75%或更多。

【0201】 因此，本發明一項態樣提供一種為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法。該方法包括

對該個體投與固定劑量約 30 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑(例如，可使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之劑量)，其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3’(SEQ ID NO： 15) 差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3’-末端之配體；及對該個體投與醫療有效量之置換因子，其中置換因子之有效量低於置換因子之建議有效量(例如，足以達到峰值血漿因子 VIII 含量約 10 至 100 IU/dL 時之劑量(例如，劑量低於約 200 IU/kg 之因子 VIII，例如，劑量約 5 至約 20 IU/kg 之因子 VIII)；或足以達到峰值血漿因子 IX 含量約 10 至 100 IU/dL 時之劑量(例如，劑量低於約 200 IU/kg 之因子 IX，例如，劑量約 10 至約 30 IU/kg 之因子 IX))，藉以為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

【0202】 另一項態樣中，本發明提供一種為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與固定劑量約 30 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑(例如，可使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量)，其中

雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體；及對該個體投與醫療有效量之繞徑劑，其中繞徑劑之有效量低於繞徑劑之建議有效量(例如，足以產生凝血酶及解除出血降低時之劑量，例如，劑量低於約 100 U/kg 之 aPCC (例如，劑量約 30 至 50 U/kg 之 PCC)；劑量低於約 120 μg/kg 之 rFVIIa (例如，劑量約 45 μg/kg 之 rFVIIa))，藉以為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

【0203】 本發明另一態樣提供一種為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與固定劑量約 40 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑(例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量)，其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之

實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體；及對該個體投與醫療有效量之置換因子，其中置換因子之有效量低於置換因子之建議有效量(例如，足以達到峰值血漿因子 VIII 含量約 10 至 100 IU/dL 之量(例如，劑量低於約 200 IU/kg 之因子 VIII，例如，劑量約 5 至約 20 IU/kg 之因子 VIII)；或足以達到峰值血漿因子 IX 含量約 10 至 100 IU/dl 時之量(例如，劑量低於約 200 IU/kg 之因子 IX，例如，劑量約 10 至約 30 IU/kg 之因子 IX))，藉以為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

【0204】 另一項態樣中，本發明提供一種為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法。該方法包括對該個體投與固定劑量約 40 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑(例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量)，其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體；及對該個體投與醫療有效量之繞徑劑，其中繞徑劑之

有效量低於繞徑劑之建議有效量(例如，足以產生凝血酶及解除出血時之量，例如，劑量低於約 100 U/kg 之 aPCC (例如，劑量約 30 至 50U/kg 之 aPCC)；劑量低於約 120 μg/kg 之 rFVIIa (例如，劑量約 45 μg/kg 之 rFVIIa))，藉以為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

【0205】 本發明一項態樣提供一種抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其適合投與個體固定劑量約 30 mg 至 90 mg (例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量)；及置換因子，其適合投與個體之劑量低於置換因子之建議有效量(例如，足以達到峰值血漿因子 VIII 含量約 10 至 100 IU/dL 時之量(例如，劑量低於約 200 IU/kg 之因子 VIII，例如，劑量約 5 至約 20 IU/kg 之因子 VIII)；或足以達到峰值血漿因子 IX 含量約 10 至 100 IU/dl 時之量(例如，劑量低於約 200 IU/kg 之因子 IX，例如，劑量約 10 至約 30 IU/kg 之因子 IX))，用於為患有不帶抑制劑之血友病(例如，血友病 A、血友病 B、或血友病 C)個體治療出血事件。該 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3’(SEQ ID NO：15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾

之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體。

【0206】 本發明另一態樣提供一種抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其適合投與個體固定劑量約 30 mg 至 90 mg (例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量)；及繞徑劑，其適合投與個體之劑量低於繞徑劑之建議有效量(例如，足以產生凝血酶及解除出血時之量，例如，劑量低於約 100 U/kg 之 aPCC (例如，劑量約 30 至 50 U/kg 之 aPCC)；劑量低於約 120 μg/kg 之 rFVIIa (例如，劑量約 45 μg/kg 之 rFVIIa))用於為患有帶抑制劑之血友病(例如，血友病 A、血友病 B、或血友病 C)個體治療出血事件。該 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3' (SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體。

【0207】 本發明一項態樣提供一種抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其適合投與個體固定劑量約 40 mg 至 90 mg(例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量)；及置換因子，其適合投與

個體之劑量低於置換因子之建議有效量(例如，足以達到峰值血漿因子 VIII 含量約 10 至 100 IU/dL 時之量(例如，劑量低於約 200 IU/kg 之因子 VIII，例如，劑量約 5 至約 20 IU/kg 之因子 VIII)；或足以達到峰值血漿因子 IX 含量約 10 至 100 IU/dl 時之量(例如，劑量低於約 200 IU/kg 之因子 IX，例如，劑量約 10 至約 30 IU/kg 之因子 IX))，用於為患有不帶抑制劑之血友病(例如，血友病 A、血友病 B、或血友病 C)個體治療出血事件。該 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO：15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體。

【0208】 本發明另一態樣提供一種抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其適合投與個體固定劑量約 40 mg 至 90 mg (例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量)；及繞徑劑，其適合投與個體之劑量低於繞徑劑之建議有效量(例如，足以產生凝血酶及解除出血時之量，例如，劑量低於約 100 U/kg 之 aPCC (例如，劑量約 30 至 50U/kg 之 aPCC)；劑量低於約 120 μg/kg 之 rFVIIa (例如，劑量約 45 μg/kg

之 rFVIIa))，用於為患有帶抑制劑之血友病(例如，血友病 A、血友病 B、或血友病 C)個體治療出血事件。RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO：15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體。

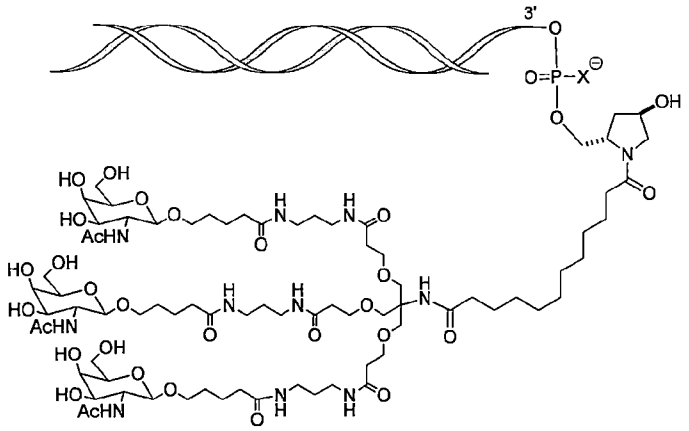
【0209】 一項實施例中，上述方法與用途中，互補區係由核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO：15)組成。

【0210】 一項實施例中，雙股 RNAi 劑包含正義股，其包含核苷酸序列 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3'(SEQ ID NO： 16)，與反義股，其包含核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO：15)。

【0211】 一項實施例中，正義股包含 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO：13)及反義股包含 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3'

(SEQ ID NO：14)，其中 a、c、g、與 u 為 2′-O-甲基(2′-OMe)A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、或 Uf 為 2′-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鍵聯。

【0212】 一項實施例中，正義股包含 5’-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3’ (SEQ ID NO：13)及反義股包含 5’-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3’ (SEQ ID NO：14)，其中 a、c、g、與 u 為 2′-O-甲基(2′-OMe)A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、或 Uf 為 2′-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鍵聯；且其中正義股係如下方案所示接合至配體：



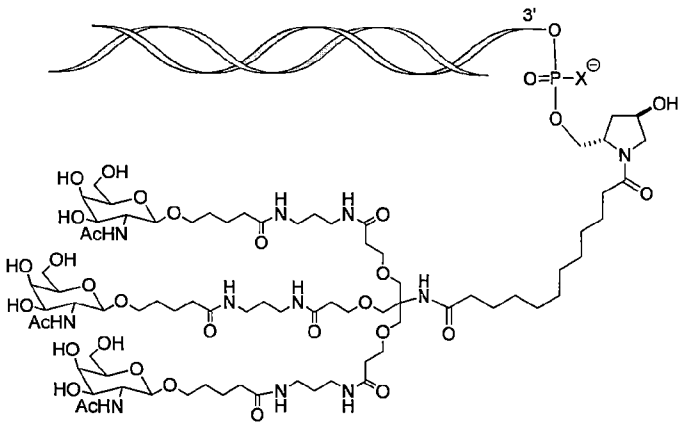
，其中 X 為 O 或 S。

【0213】 一項實施例中，該製劑係呈醫藥組成物投藥。一項實施例中，該 RNAi 劑係含在未緩衝之溶液(如生理食鹽水或水)中投藥。

【0214】 另一項實施例中，RNAi 劑係使用緩衝溶液(如包含乙酸鹽、檸檬酸鹽、醇溶穀蛋白、碳酸鹽、或磷酸鹽或其任何組合)之緩衝溶液投藥。一項實施例中，

該緩衝溶液為磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液(PBS)。

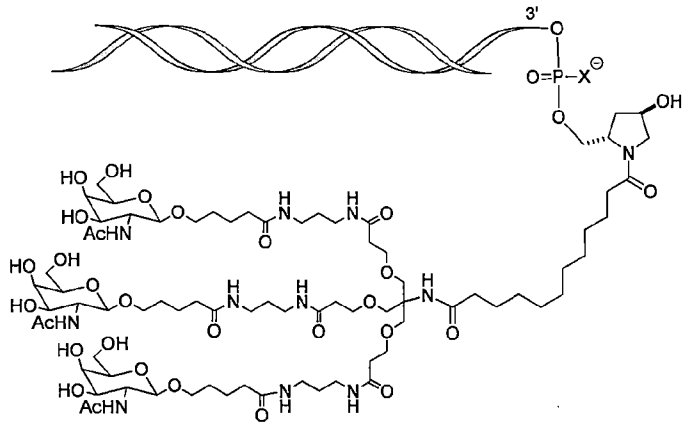
【0215】 本發明一項態樣提供一種抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其適合投與個體固定劑量約 80 mg (例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量)；及置換因子，其適合投與個體之劑量低於置換因子之建議有效量(例如，足以達到峰值血漿因子 VIII 含量約 10 至 100 IU/dL 時之量(例如，劑量低於約 200 IU/kg 之因子 VIII，例如，劑量約 5 至約 20 IU/kg 之因子 VIII)；或足以達到峰值血漿因子 IX 含量約 10 至 100 IU/dl 時之量(例如，劑量低於約 200 IU/kg 之因子 IX，例如，劑量約 10 至約 30 IU/kg 之因子 IX))，用於為患有不帶抑制劑之血友病(例如，血友病 A、血友病 B、或血友病 C)個體治療出血事件。該 RNAi 劑包含正義股與反義股，其中正義股包含 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO：13)及反義股包含 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO：14)，其中 a、c、g、與 u 為 2′-O-甲基(2′-OMe)A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、或 Uf 為 2′-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鍵聯；且其中正義股之 3'-端係如下方案所示接合至配體：



，其中 X 為 O 或 S。

【0216】 本發明另一態樣提供一種抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其適合投與個體固定劑量約 80 mg (例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量)；及繞徑劑，其適合投與個體之劑量低於繞徑劑之建議有效量(例如，足以產生凝血酶及解除出血時之量，例如，劑量低於約 100 U/kg 之 aPCC (例如，劑量約 30 至 50U/kg 之 aPCC)；劑量低於約 120 μg/kg 之 rFVIIa (例如，劑量約 45 μg/kg 之 rFVIIa))，用於為患有帶抑制劑之血友病(例如，血友病 A、血友病 B、或血友病 C)個體治療出血事件。該 RNAi 劑包含正義股與反義股，其中正義股包含 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO：13)，及反義股包含 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO：14)，其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、或 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鍵聯；且其

中正義股之 3'-端係如下方案所示接合至配體：



，其中 X 為 O 或 S。

【0217】 一項實施例中，該固定劑量之 RNAi 劑適合經皮下投藥。

【0218】 一項實施例中，該固定劑量之 RNAi 劑適合一個月一次投與該個體。

【0219】 本發明亦提供一種為患有可因降低 Serpinc1 表現而受益之疾患(例如，出血疾患，例如，血友病)之個體預防至少一種症狀之方法。該方法包括對該個體投與預防有效劑量，例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量(例如，固定劑量約 25 mg 至約 100 mg)之本發明 iRNA 劑，例如，dsRNA(例如，包含本發明 dsRNA 之醫藥組成物)，藉以為患有可因降低 Serpinc1 表現而受益之疾患之個體預防至少一種症狀。一項實施例中，該方法包括對該個體投與預防有效劑量，例如，固定劑量約 50 mg 之本發明 iRNA 劑，例如，dsRNA(例如，包含本發明 dsRNA 之醫藥組成物)，藉以為患有可因降低 Serpinc1 表現而受

益之疾患之個體預防至少一種症狀。另一項實施例中，該方法包括對該個體投與預防有效劑量(例如，固定劑量約80 mg)之本發明iRNA劑，例如，dsRNA(例如，包含本發明dsRNA之醫藥組成物)，藉以為患有可因降低Serpinc1表現而受益之疾患之個體預防至少一種症狀。

【0220】 另一項態樣中，本發明提供一種治療患有可因降低Serpinc1表現而受益之疾患(例如，出血疾患，例如，血友病)之個體之方法，其包括對該個體(例如，人類)投與醫療有效劑量(例如，使該個體之Serpinc1活性降低約75%或更多時之量，例如，固定劑量約25 mg至約100 mg)之靶向Serpinc1基因之iRNA劑或包含靶向Serpinc1基因之iRNA劑之醫藥組成物，藉以治療患有可因降低Serpinc1表現而受益之疾患之個體。一項實施例中，該方法包括對該個體投與醫療有效劑量(例如，固定劑量約50 mg)之本發明iRNA劑，例如，dsRNA(例如，包含本發明dsRNA之醫藥組成物)，藉以治療患有可因降低Serpinc1表現而受益之疾患之個體。另一項實施例中，該方法包括對該個體投與醫療有效劑量，例如，固定劑量約80 mg之本發明iRNA劑，例如，dsRNA(例如，包含本發明dsRNA之醫藥組成物)，藉以治療患有可因降低Serpinc1表現而受益之疾患之個體。

【0221】 另一項態樣中，本發明提供一種以預防有效劑量(例如，使該個體之Serpinc1活性降低約75%或

更多時之量，例如，固定劑量約 25 mg 至約 100 mg)之本發明 iRNA(例如，dsRNA)為患有可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之疾患(如出血疾患，例如，血友病)之個體預防至少一種症狀之用途。一項實施例中，本發明提供一種以預防有效劑量(例如，固定劑量約 50 mg)之本發明 iRNA(例如，dsRNA)為患有可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之疾患(如出血疾患，例如，血友病)之個體預防至少一種症狀之用途。另一項實施例中，本發明提供一種以預防有效劑量(例如，固定劑量約 80 mg)之本發明 iRNA(例如，dsRNA)為患有可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之疾患(如出血疾患，例如，血友病)之個體預防至少一種症狀之用途。

【0222】 另一態樣中，本發明提供一種以預防有效劑量(例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量，例如，固定劑量約 25 mg 至約 100 mg)之本發明 iRNA 劑於製造醫藥之用途，為患有可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之疾患(如出血疾患，例如，血友病)之個體預防至少一種症狀。一項實施例中，本發明提供一種以預防有效劑量(例如，固定劑量約 50 mg)之本發明 iRNA 劑於製造醫藥之用途，為患有可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之疾患(如出血疾患，例如，血友病)之個體預防至少一種症狀。另一項實施例中，本發明提供一種以預防有效劑量(例如，固定劑量約 80 mg)之本發明 iRNA 劑於製造醫藥之用途，為患有可

因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之疾患(如出血疾患，例如，血友病)之個體預防至少一種症狀。

【0223】 另一項態樣中，本發明提供一種以醫療有效劑量(例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量，例如，固定劑量約 25 mg 至約 100 mg)之本發明 iRNA 劑於治療個體(例如，可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之個體)之用途。一項實施例中，本發明提供一種以醫療有效劑量(例如，固定劑量約 50 mg)之本發明 iRNA 劑於治療個體(例如，可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之個體)之用途。另一項實施例中，本發明提供一種以醫療有效劑量(例如，固定劑量約 80 mg)之本發明 iRNA 劑，於治療個體(例如，可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之個體)之用途。

【0224】 又另一態樣中，本發明提供一種以本發明靶向 Serpinc1 基因之 iRNA 劑(例如，dsRNA)或包含醫療有效劑量(例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量，例如，固定劑量約 25 mg 至約 100 mg)之靶向 Serpinc1 基因之 iRNA 劑之醫藥組成物於製造醫藥之用途，供治療個體，例如，可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之個體，如患有出血疾患，例如，血友病之個體。一項實施例中，本發明提供一種以本發明靶向 Serpinc1 基因之 iRNA 劑(例如，dsRNA)或包含醫療有效劑量(例如，固定劑量約 50 mg)之靶向 Serpinc1 基因之 iRNA 劑之醫藥組成物於製造醫藥之用

途，供治療個體，例如，可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之個體，如患有出血疾患，例如，血友病之個體。另一項實施例中，本發明提供一種以本發明靶向 Serpinc1 基因之 iRNA 劑(例如，dsRNA)或包含醫療有效劑量(例如，固定劑量約 80 mg)之靶向 Serpinc1 基因之 iRNA 劑之醫藥組成物於製造醫藥之用途，供治療個體，例如，可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之個體，如患有出血疾患，例如，血友病之個體。

【0225】 本發明有些實施例中，例如，當雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3’(SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3’-末端之配體時，此等製劑係投與固定劑量約 25 mg 至約 100 mg，例如，固定劑量約 25 mg；或固定劑量約 50 mg；或固定劑量約 80 mg；或固定劑量約 100 mg。一項實施例中，該固定劑量為 50 mg。另一項實施例中，該固定劑量為 80 mg。

【0226】 因此，本發明一項態樣提供一種為患有可因降低 Serpinc1 表現而受益之疾患(例如，出血疾患，例如，血友病)之個體預防至少一種症狀之方法。該方法

包括對該個體投與預防有效劑量，例如，使該個體之Serpinc1活性降低約75%或更多時之量(例如，固定劑量約25 mg至約100 mg)之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，反義股包含與編碼Serpinc1之mRNA互補之區，其包含至少15個連續核苷酸，其與核苷酸序列5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3’(SEQ ID NO：15)之差異不超過3個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在3’-末端之配體(例如，包含該RNAi劑之醫藥組成物)，藉以為患有可因降低Serpinc1表現而受益之疾患之個體預防至少一種症狀。一項實施例中，該固定劑量為50 mg。另一項實施例中，該固定劑量為80 mg。

【0227】 另一項態樣中，本發明提供一種治療患有可因降低Serpinc1表現而受益之疾患(例如，出血疾患，例如，血友病)之個體之方法，其包括對該個體(例如，人類)投與醫療有效劑量(例如，使該個體之Serpinc1活性降低約75%或更多時之量，例如，固定劑量約25 mg至約100 mg)之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，反義股包含與編碼Serpinc1之mRNA互補之區，其包含至少15個連續核苷酸，其與核苷酸序列5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3’(SEQ

ID NO：15)之差異不超過 3 個核苷酸，且其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體；或投與包含靶向 Serpinc1 基因之 iRNA 劑之醫藥組成物，藉以治療患有可因降低 Serpinc1 表現而受益之疾患之個體。一項實施例中，該固定劑量為 50 mg。另一項實施例中，該固定劑量為 80 mg。

【0228】 另一項態樣中，本發明提供一種以預防有效劑量(例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量，例如，固定劑量約 25 mg 至約 100 mg)之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO：15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體，為患有可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之疾患(如出血疾患，例如，血友病)之個體預防至少一種症狀之用途。一項實施例中，該固定劑量為 50 mg。另一項實施例中，該固定劑量為 80 mg。

【0229】 另一態樣中，本發明提供一種以預防有效劑量(例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量，例如，固定劑量約 25 mg 至約 100 mg)之雙

股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3'(SEQ ID NO：15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體，於製造醫藥之用途，為患有可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之疾患(如出血疾患，例如，血友病)之個體預防至少一種症狀。一項實施例中，該固定劑量為 50 mg。另一項實施例中，該固定劑量為 80 mg。

【0230】 另一項態樣中，本發明提供一種以醫療有效劑量(例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量，例如，固定劑量約 25 mg 至約 100 mg)之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3'(SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體，於治療個體，例如，可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之個體之用途。一項實施例中，該固定劑量為 50 mg。另一項實施例中，該固定劑量為 80 mg。

【0231】 又另一態樣中，本發明提供一種以本發明靶向 Serpinc1 基因之 iRNA 劑(例如，dsRNA)或包含醫療有效劑量(例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量(例如，固定劑量約 25 mg 至約 100 mg)之雙股核糖核酸(RNAi)劑(其包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3’(SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3’-末端之配體)之醫藥組成物於製造醫藥之用途，供治療個體，例如，可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之個體，如患有出血疾患，例如，血友病之個體。一項實施例中，該固定劑量為 50 mg。另一項實施例中，該固定劑量為 80 mg。

【0232】 本發明之方法及用途包括投與本文所說明之組成物，藉以降低標靶 Serpinc1 基因之表現，如為期約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、

68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、或約 80 天。一項實施例中，標靶 Serpinc1 基因之表現可長期降低，例如，至少約 7 天或更久，例如，約一週、兩週、三週、約四週、約 5 週、或約 6 週、約 2 個月、約一季、或更久。

【0233】 可採用相關技藝上已知之任何方法分析基因表現之降低程度。例如，可採用熟悉此相關技術者已知之例如，北方墨點法、qRT-PCR 等例行方法之一，測定 Serpinc1 之 mRNA 表現量；採用熟悉此相關技術者已知之如西方墨點法、免疫技術等例行方法之一，測定 Serpinc1 之蛋白質含量；及/或測定 Serpinc1 之生物活性，如影響與細胞血液凝結機轉有關(或在活體內與血液凝結本身有關)之一或多種分子，來決定 Serpinc1 表現之降低程度。一項實施例中，使用例如，全血之 ROTEM®血栓彈性分析，測定凝血酶形成時間、血塊形成時間與/或凝血時間，以分析 Serpinc1 表現。

【0234】 根據本發明方法及用途投與 dsRNA 可能降低患有 Serpinc1-相關疾病之患者之此等疾病或疾患之嚴重性、癥兆、症狀與/或標記物。本文中「降低」意指在統計學上顯著降低此等含量。該降低量可為例如，至少約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或約 100%。

【0235】 治療或預防疾病之效力之評估法可為例

如，測定疾病惡化、疾病消退、症狀嚴重性、出血頻率、疼痛減輕、生活品質，需要維持治療效果時之醫藥劑量、適合該所治療疾病或預防目標之疾病標記物含量或任何其他可測量之參數值。熟悉此相關技術者均有能力藉由測定其中任一種參數或任何參數組合，來追蹤治療或預防之效力。例如，可能藉由例如，定期追蹤凝血酶：抗凝血酶含量，來評估出血疾患之治療效力。由後來之讀數與原始之讀數比較，即可指示醫師該治療是否有效。熟悉此相關技術者均有能力藉由測定其中任一種參數或任何參數組合，來追蹤治療或預防之效力。在投與靶向 Serpinc1 之 iRNA 或其醫藥組成物之相關內容中，「有效對抗」出血疾患係指依臨床上適當方式投藥時，可以讓至少統計上顯著比例之患者得到有利效應，如改善症狀、治癒、減輕疾病、延長壽命、改善生活品質、或熟悉治療出血疾患與相關病因之醫師通常認定為正向之其他效應。

【0236】 當一或多種疾病狀態之參數出現統計上顯著改善時，或原本預期之症狀不會再惡化或發展時，即證實該治療或預防效果。例如，疾病之可測定參數之有利變化為至少 10%，較佳為至少 20%、30%、40%、50%或更高，即表示為有效之治療。針對特定 iRNA 藥物或該藥物之調配物之效力亦可採用相關技藝上已知針對該疾病之實驗動物模式來判斷。當採用實驗動物模式時，當觀察到標記物或症狀在統計學上顯著下降時，即證實有治療效力。

【0237】 或者，可由熟悉此相關診斷技術者依據臨床上可接受之疾病嚴重性量表決定疾病嚴重性之降低程度，來測定其效力。採用適當量表測定之任何正向變化結果(例如，減輕疾病嚴重性)均代表使用本文所說明 iRNA 或 iRNA 調配物之適當治療。

【0238】 該 iRNA(或包含該 iRNA 之醫藥組成物)可投與該個體約一週一次、約一個月 2 次、約每 6 週一次、或約每 2 個月一次、或每季一次。

【0239】 該雙股 iRNA 劑可投與個體一劑或多劑。例如，雙股 iRNA 劑可投與個體每個月一劑約 0.200 mg/kg 至約 1.825 mg/kg。或者，雙股 iRNA 劑可投與個體固定劑量約 25 mg 至約 100 mg。

【0240】 一項實施例中，包含正義股與反義股之雙股 RNAi 劑，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5’ - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3’ (SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3’-末端之配體，係投與個體固定劑量約 25 至約 100 mg，例如，約 25 mg、50 mg、80 mg、或 100 mg。一項實施例中，該固定劑量為 50 mg。另一項實施例中，該固定劑量為 80 mg。

【0241】 該投藥可以重複，例如，定期重複，如每

個月為期一個月、兩個月、三個月、四個月、或更久。經過初期療程後，該治療法可以減少投藥頻率。例如，經過每個月投藥為期 3 個月後，可以每季重複投藥一次，為期一年或更久。

【0242】 因此有些實施例中，RNAi 劑之投藥療程包括頻繁投藥之「加載期」，然後為 RNAi 劑之投藥間隔時間較長之「維持期」。

【0243】 加載投藥時程與/或維持投藥時程可視需要重複一或多次。重複次數可隨所需達成效果(例如，壓制 Serpinc1 基因)、與/或達成醫療或預防效果(例如，增加血液凝結、縮短血塊形成時間，與/或縮短凝血時間)而定。

【0244】 投與 iRNA 可使例如，患者之細胞、組織、血液、尿液或其他區間中之 Serpinc1 含量降低至少約 5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、

85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或至少約99%或更多。

【0245】 該iRNA可採用靜脈內輸注投藥，歷時如，5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或約25分鐘期間。

【0246】 投與全劑量之iRNA之前，患者可先接受投與較小劑量，如，輸注5%，並監測不良效應，如過敏反應。另一項實例中，可監測患者之不期望之免疫刺激效應，如，細胞激素(例如，TNF-α或INF-α)含量增加。

【0247】 由於根據本發明組成物或由其製成之醫藥組成物對Serpinc1表現具有抑制效應，因此可提高生活品質。

【0248】 本發明iRNA可呈「裸」型投藥，或呈「游離iRNA」投藥。裸iRNA係在沒有醫藥組成物之存在下投藥。裸iRNA可含於合適緩衝溶液中。該緩衝溶液可能包含乙酸鹽、檸檬酸鹽、醇溶穀蛋白、碳酸鹽、或磷酸鹽、或其任何組合。一項實施例中，緩衝溶液為磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)。可以調整包含iRNA之緩衝溶液之pH與滲透壓，以便適合投與個體。

【0249】 或者，本發明iRNA可呈醫藥組成物投藥，如，dsRNA脂質體調配物。

【0250】 可因降低及/或抑制Serpinc1基因表現

而受益之個體為彼等患有出血疾患，例如，如本文所說明先天性出血疾患或後天性出血疾患之個體。一項實施例中，該患有先天性出血疾患之個體患有血友病，例如，血友病 A、B、或 C。一項實施例中，該患有先天性出血疾患(例如，血友病)之個體為帶抑制劑個體(對置換凝血因子變得頑抗之個體)。一項實施例中，該帶抑制劑個體患有血友病 A。另一項實施例中，該帶抑制劑個體患有血友病 B。又另一項實施例中，該帶抑制劑個體患有血友病 C。可因降低及/或抑制 Serpinc1 基因表現而受益之個體之治療法包括醫療性(例如，依需要，例如，該個體在出血中(自發性出血或因創傷所致之出血)且無法凝血)及預防性(例如，該個體未出血及/或計畫接受手術)處理。

【0251】 本發明進一步提供一種使用 iRNA 或其醫藥組成物之方法及用途，例如，用於治療可因降低及/或抑制 Serpinc1 表現而受益之個體，例如，患有出血疾患之個體，其係與其他醫藥及/或其他醫療方法組合，例如，與已知醫藥及/或已知醫療方法(如，例如，彼等目前用於治療此等疾患之方法)組合。

【0252】 例如，某些實施例中，靶向 Serpinc1 之 iRNA 係與例如，適用於治療本文所說明出血疾患之劑組合。例如，適用於治療可因降低 Serpinc1 表現而受益之個體(例如，患有出血疾患之個體)之其他醫療劑及醫療方法包括新鮮冷凍血漿(FFP)；重組 FVIIa；重組 FIX；FXI 濃縮劑；含病毒滅活之 vWF 之 FVIII 濃縮

劑；去敏化療法，其可包括大劑量之 FVIII 或 FIX，及類固醇或靜脈注射免疫球蛋白(IVIG)與環磷醯胺；血漿分離術組合免疫抑制及輸注 FVIII 或 FIX，採用或不採用抗纖維蛋白溶解療法；誘發免疫耐受性(ITI)，採用或不採用免疫抑制療法(例如，環磷醯胺、潑尼松(prednisone)、與/或抗-CD20)；去胺增壓素(desmopressin)乙酸鹽[DDAVP]；抗纖維蛋白溶酶劑，如胺基己酸及傳明酸(tranexamic acid)；活化凝血酶原複合物濃縮劑(PCC)；抗血友病劑；皮質類固醇；免疫抑制劑；及雌激素。

【0253】 iRNA 與外加醫療劑及/或治療法可同時投藥及/或在相同組合中投藥，例如，非經腸式，或該外加醫療劑可做為分開組成物之一部份投藥，或在分開時間投藥，及/或採用相關技藝上已知或本文說明之另一種方法投藥。

【0254】 一項實施例中，本發明提供一種治療患有出血疾患(例如，血友病)之個體之方法，其係對該個體經皮下投與化合物 AT3SC-001 (AD-57213 -正義股：5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO：13)與反義股：5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO：14)，其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、或 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鍵聯)固定劑

量約 25 mg 至約 100 mg，例如，固定劑量約 25 mg、約 50 mg、約 80 mg 或約 100 mg (例如，使該個體之 Serpinc1 活性降低約 75%或更多時之量)。一項實施例中，該固定劑量為 50 mg。另一項實施例中，該固定劑量為 80 mg。

【0255】

III. 用於本發明方法之 iRNA

本文說明之方法係使用改良之雙股 RNAi 劑，其抑制細胞中，如個體(例如，哺乳動物，如患有 Serpinc1-相關疾患(例如，出血疾患，例如，血友病)之人類)之細胞中之 Serpinc1 基因表現。

【0256】 因此，本發明提供一種雙股 RNAi 劑，其具有可於活體內抑制標靶基因(亦即 Serpinc1 基因)表現之化學修飾。本發明某些態樣中，本發明 iRNA 之實質上所有核苷酸均經修飾。本發明其他實施例中，本發明 iRNA 之所有核苷酸均經修飾。本發明之 iRNA 中「實質上所有核苷酸均經修飾」係大部份但不一定全部經修飾，且可包括不超過 5、4、3、2、或 1 個未修飾之核苷酸。

【0257】 RNAi 劑包含正義股與反義股。RNAi 劑之股長度可為 12 至 30 個核苷酸。例如，各股可為 14 至 30 個核苷酸長度、17 至 30 個核苷酸長度、19 至 30 個核苷酸長度、25 至 30 個核苷酸長度、27 至 30 個核苷酸長度、17 至 23 個核苷酸長度、17 至 21 個核苷酸

長度、17 至 19 個核苷酸長度、19 至 25 個核苷酸長度、19 至 23 個核苷酸長度、19 至 21 個核苷酸長度、21 至 25 個核苷酸長度、或 21 至 23 個核苷酸長度。

【0258】 正義股及反義股通常形成雙螺旋雙股 RNA(「dsRNA」)，本文中亦稱為「RNAi 劑」。RNAi 劑之雙螺旋區長度可為 12 至 30 對核苷酸。例如，雙螺旋區可為 14 至 30 對核苷酸長度、17 至 30 對核苷酸長度、27 至 30 對核苷酸長度、17 至 23 對核苷酸長度、17 至 21 對核苷酸長度、17 至 19 對核苷酸長度、19 至 25 對核苷酸長度、19 至 23 對核苷酸長度、19 至 21 對核苷酸長度、21 至 25 對核苷酸長度、或 21 至 23 對核苷酸長度。另一項實例中，雙螺旋區之長度係選自：15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、及 27 個核苷酸。

【0259】 一項實施例中，RNAi 劑可在其中一股或兩股之 3'-端、5'-端、或兩端包含一個或多個突出區與/或封端基團。該突出可為 1 至 6 個核苷酸長度，例如，2 至 6 個核苷酸長度、1 至 5 個核苷酸長度、2 至 5 個核苷酸長度、1 至 4 個核苷酸長度、2 至 4 個核苷酸長度、1 至 3 個核苷酸長度、2 至 3 個核苷酸長度、或 1 至 2 個核苷酸長度。該突出係由其中一股之長度超過另一股所造成，或由相同長度之兩股交錯造成。該突出可與標靶 mRNA 形成錯配或其可與所靶向之基因序列互補或可為另一個序列。可以連接第一與第二股，例如，利用外加鹼

基形成髮夾型，或利用其他非鹼基連接基。

【0260】 一項實施例中，RNAi 劑之突出區之核苷酸可彼此分別獨立為經修飾或未經修飾之核苷酸，包括(但不限於)，2'-糖修飾，如 2-F、2'-O 甲基、胸苷(T)、2`-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷(Teo)、2`-O-甲氧基乙基腺苷(Aeo)、2`-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷(m5Ceo)，及其任何組合。例如，TT 可為任一股之任一端之突出序列。突出可與標靶 mRNA 形成錯配，或其可與所靶向之基因序列互補或可為另一個序列。

【0261】 RNAi 劑之正義股、反義股或兩股之 5'-或 3'-突出可經過磷酸化。有些實施例中，突出區(群)包含兩個核苷酸，其在這兩個核苷酸之間具有硫代磷酸酯，其中這兩個核苷酸可相同或不同。一項實施例中，突出存在於正義股、反義股或兩股之 3'-端。一項實施例中，此 3'-突出存在於反義股。一項實施例中，此 3'-突出存在於正義股。

【0262】 RNAi 劑可能僅包含單一突出，其可強化 RNAi 之干擾活性，不會影響整體穩定性。例如，單股突出可能位於正義股之 3'末端，或者在反義股之 3'末端。RNAi 亦可能在反義股之 5'-端(或正義股之 3'-端)具有鈍端，或反之亦然。通常 RNAi 之反義股在 3'-端具有核苷酸突出，且 5'-端為鈍端。在不希望受到理論限制下，反義股 5'-端之不對稱鈍端與反義股 3'-端之突出有利該引導股進入 RISC 過程。

【0263】 任何如本發明所說明特徵之核酸均可採用相關技藝上習知之方法合成與/或修飾，如彼等說明於「Current protocols in nucleic acid chemistry」，Beaucage, S.L.等人(編輯)，John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA，其完整內容已以引用方式併入本文中。修飾法包括例如，末端修飾，例如，5'-端修飾(磷酸化、接合、反向連接體)或3'-端修飾(接合、DNA核苷酸、反向連接體等等)；鹼基修飾，例如使用穩定化鹼基、去穩定化鹼基或會與對象之擴張區之鹼基配對之鹼基置換、排除鹼基(無鹼基核苷酸)、或接合鹼基；糖修飾(例如，位於2'-位置或4'-位置)或置換糖；與/或主幹修飾，包括修飾或置換磷酸二酯連接體。適用於本文所說明實施例之iRNA化合物之明確實例包括(但不限於)，包含經修飾主幹或沒有天然核苷之間連接體之RNA。具有經修飾主幹之RNA特別包括彼等主幹中沒有磷原子者。針對本說明書之目的及相關技藝上有時候提及者，其核苷之間主幹中沒有磷原子之經修飾RNA亦可視為寡核苷。有些實施例中，經修飾之iRNA將在其核苷之間主幹中具有一個磷原子。

【0264】 經修飾之RNA主幹包括例如，硫代磷酸酯、對掌性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基磷酸三酯、甲基與其他烷基之膦酸酯(包括膦酸3'-伸烷基酯與對掌性膦酸酯)、次膦酸酯、胺基磷酸酯(包括3'-胺基胺基磷酸酯與胺基烷基胺基磷酸酯)、硫羰基胺基

磷酸酯、硫羰基烷基膦酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯、及具有正常 3'-5'連接體之硼代磷酸酯、其等之 2'-5'-連接類似物、及彼等具有反向極性者，其中相鄰之成對核苷單位係依 3'-5'連接 5'-3'或 2'-5'連接 5'-2'。亦包括各種不同鹽類、混合鹽類與游離酸型。

【0265】 教示上述含磷連接體製法之代表性美國專利案包括(但不限於)，美國專利案案號 3,687,808；4,469,863；4,476,301；5,023,243；5,177,195；5,188,897；5,264,423；5,276,019；5,278,302；5,286,717；5,321,131；5,399,676；5,405,939；5,453,496；5,455,233；5,466,677；5,476,925；5,519,126；5,536,821；5,541,316；5,550,111；5,563,253；5,571,799；5,587,361；5,625,050；6,028,188；6,124,445；6,160,109；6,169,170；6,172,209；6, 239,265；6,277,603；6,326,199；6,346,614；6,444,423；6,531,590；6,534,639；6,608,035；6,683,167；6,858,715；6,867,294；6,878,805；7,015,315；7,041,816；7,273,933；7,321,029；與 US Pat RE39464，其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0266】 其中不包括磷原子之經修飾 RNA 主幹所具有之主幹係由短鏈烷基或環烷基核苷之間連接體、混合雜原子、及烷基或環烷基核苷之間連接體、或一個或多個短鏈雜原子或雜環核苷之間連接體形成。此等包括彼等具

有 N-嗎啉基連接體(一部份從核苷之糖部份基團形成)；矽氧烷主幹；硫醚、亞碸與碸主幹；甲醯乙醯基(formacetyl)與硫甲醯乙醯基主幹；亞甲基甲醯乙醯基與硫甲醯乙醯基主幹；含烯烴主幹；胺磺酸根主幹；亞甲基亞胺基及亞甲基肼基主幹；磺酸根與磺醯胺主幹；醯胺主幹；及其他具有混合 N、O、S 與 CH_2 組份者。

【0267】 教示上述寡核苷製法之代表性美國專利案包括(但不限於)，美國專利案案號 5,034,506；5,166,315；5,185,444；5,214,134；5,216,141；5,235,033；5,64,562；5,264,564；5,405,938；5,434,257；5,466,677；5,470,967；5,489,677；5,541,307；5,561,225；5,596,086；5,602,240；5,608,046；5,610,289；5,618,704；5,623,070；5,663,312；5,633,360；5,677,437；與5,677,439，其揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0268】 其他實施例中，希望包括合適 RNA 擬似物用於 iRNA，其中核苷酸單位之糖與核苷之間連接體(亦即主幹)二者均被新穎基團置換。該等鹼基單位維持與適當核酸標靶化合物雜交。其中一種寡聚化合物為 RNA 擬似物，已顯示具有優異之雜交性質，稱為肽核酸(PNA)。PNA 化合物中，RNA 之糖主幹被包含醯胺之主幹(特定言之胺基乙基甘胺酸主幹)置換。核鹼基則保留並直接或間接結合主幹之醯胺部份之氮雜態氮原子。教示

PNA 化合物製法之代表性美國專利案包括(但不限於)，美國專利案案號 5,539,082；5,714,331；與 5,719,262，其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。適用於本發明 iRNA 之其他 PNA 化合物說明於例如，Nielsen 等人，*Science*, 1991, 254, 1497-1500。

【0269】 如本發明所說明特徵之某些實施例包括具有硫代磷酸根主幹之 RNA 與具有雜原子主幹之寡核苷，特定言之上述美國專利案案號 5,489,677 之--CH_2--NH--CH_2-、--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--[稱為亞甲基(甲基亞胺基)或 MMI 主幹]、--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--、--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--及--N(CH_3)--CH_2--CH_2--[其中天然磷酸二酯主幹係由--O--P--O--CH_2--代表]，及上述美國專利案案號 5,602,240 之醯胺主幹。有些實施例中，如本文所說明特徵之 RNA 具有上述美國專利案案號 5,034,506 之 N-嗎啉基主幹結構。

【0270】 經修飾之 RNA 亦可包含一個或多個經取代之糖部份基團。如本文所說明特徵之該等 iRNA(例如，dsRNA)包括在 2'-位置具有下列其中一項：OH；F；O-、S-、或 N-烷基；O-、S-、或 N-烯基；O-、S-或 N-炔基；或 O-烷基-O-烷基，其中該烷基、烯基與炔基可為經取代或未經取代之 C_1 至 C_{10} 烷基或 C_2 至 C_{10} 烯基與炔基。合適修飾實例包括 O[(CH_2)$_n$O]$_m$$CH_3$、

$O(CH_2)._nOCH_3$、$O(CH_2)_nNH_2$、$O(CH_2)_nCH_3$、$O(CH_2)_nONH_2$、及 $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3)]_2$，其中 n 與 m 為 1 至約 10。其他實施例中，dsRNA 在 2'-位置包括下列其中一項：C_1 至 C_{10} 低碳數烷基、經取代之低碳數烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或 O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、雜環烷基、雜環烷芳基、胺基烷基胺基、聚烷基胺基、經取代之矽烷基、RNA 裂解基團、報導子基團、嵌入劑、改善 iRNA 之藥物動力學性質之基團、或改善 iRNA 之藥效學性質之基團、及具有類似性質之其他取代基。有些實施例中，該修飾包括 2'-甲氧基乙氧基(2'-O--$CH_2CH_2OCH_3$，亦稱為 2'-O-(2-甲氧基乙基)或 2'-MOE)(Martin 等人，*Helv. Chim. Acta*, 1995, 78：486-504)，亦即烷氧-烷氧基。另一種修飾實例為 2'-二甲基胺基氧乙氧基，亦即 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基團(亦稱為 2'-DMAOE，其說明於下文實例中)與 2'-二甲基胺基乙氧基乙氧基(相關技藝上亦稱為 2'-O-二甲基胺基乙氧基乙基或 2'-DMAEOE)，亦即 2'-O--CH_2--O--CH_2--$N(CH_2)_2$。

【0271】 其他修飾包括 2'-甲氧基(2'-OCH_3)、2'-胺基丙氧基(2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)與 2'-氟(2'-F)。亦可在 iRNA 之 RNA 上其他位置進行類似修飾，特定言之在 3'末端核苷酸之糖之 3'位置或在 2'-5'連接

dsRNA 與 5'末端核苷酸之 5'位置。iRNA 亦可改具有糖擬似物(如環丁基部份基團)替代呋喃戊糖基糖。教示此等經修飾糖結構製法之代表性美國專利案包括(但不限於)，美國專利案案號 4,981,957；5,118,800；5,319,080；5,359,044；5,393,878；5,446,137；5,466,786；5,514,785；5,519,134；5,567,811；5,576,427；5,591,722；5,597,909；5,610,300；5,627,053；5,639,873；5,646,265；5,658,873；5,670,633；及 5,700,920，其中某些專利案已成為本申請案共同擁有。上述之完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0272】 iRNA 亦包括核鹼基(相關技藝上通常簡稱「鹼基」)修飾或取代。本文所採用「未經修飾」或「天然」核鹼基包括嘌呤鹼基腺嘌呤(A)與鳥嘌呤(G)，及嘧啶鹼基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)與尿嘧啶(U)。經修飾之核鹼基包括其他合成性與天然核鹼基，如去氧-胸腺嘧啶(dT)、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羥基甲基胞嘧啶、黃嘌呤、次黃嘌呤、2-胺基腺嘌呤、腺嘌呤與鳥嘌呤之 6-甲基與其他烷基衍生物、腺嘌呤與鳥嘌呤之 2-丙基與其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶與 2-硫胞嘧啶、5-鹵尿嘧啶與胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶與胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶與胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-鹵基、8-胺基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羥基及其他 8-經取代之腺嘌呤與鳥嘌呤、

5-鹵基(特定言之 5-溴)、5-三氟甲基及其他 5-經取代之尿嘧啶與胞嘧啶、7-甲基鳥嘌呤與 7-甲基腺嘌呤、8-氮雜鳥嘌呤與 8-氮雜腺嘌呤、7-去氮雜鳥嘌呤與 7-去氮雜腺嘌呤及 3-去氮雜鳥嘌呤與 3-去氮雜腺嘌呤。其他核鹼基包括彼等揭示於美國專利案案號 3,687,808、彼等揭示於 Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P.編輯，Wiley-VCH, 2008；彼等揭示於 The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, p.858-859, Kroschwitz, J. L.編輯 John Wiley & Sons, 1990；此等揭示於 Englisch 等人之 Angewandte Chemie，國際版，1991，30, 613，及彼等揭示於 Sanghvi, Y S.，dsRNA Research and Applications, p.289-302，第 15 章，Crooke, S. T.與 Lebleu, B.編輯，CRC Press, 1993。其中某些核鹼基特別適用於提高如本發明所說明特徵之寡聚化合物之結合親和性。此等包括 5-經取代之嘧啶、6-氮雜嘧啶與 N-2、N-6 與 O-6 經取代之嘌呤，包括 2-胺基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶與 5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已顯示可使核酸雙螺旋穩定性提高 0.6-1.2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T.與 Lebleu, B.編輯，dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)且成為鹼基取代實例，甚至更特別當與

2'-O-甲氧基乙基糖修飾組合時。

【0273】 教示上述某些經修飾之核鹼基及其他經修飾之核鹼基製法之代表性美國專利案包括(但不限於)，上述美國專利案案號 3,687,808, 4,845,205；5,130,30；5,134,066；5,175,273；5,367,066；5,432,272；5,457,187；5,459,255；5,484,908；5,502,177；5,525,711；5,552,540；5,587,469；5,594,121, 5,596,091；5,614,617；5,681,941；5,750,692；6,015,886；6,147,200；6,166,197；6,222,025；6,235,887；6,380,368；6,528,640；6,639,062；6,617,438；7,045,610；7,427,672；及 7,495,088，其等完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0274】 iRNA 之 RNA 亦可經修飾，以包括一個或多個雙環糖部份基團。「雙環糖」為經兩個原子之橋基修飾之呋喃糖基環。「雙環核苷」(「BNA」)為具有糖部份基團之核苷，該糖部份基團包含由糖環之兩個碳原子連接之橋基，藉以形成雙環系。某些實施例中，該橋基連接糖環之 4′-碳與 2′-碳。因此，有些實施例中，本發明製劑可包括 iRNA 之 RNA 亦可經修飾，以包括一個或多個鎖核酸(LNA)。鎖核酸為具有經修飾之核糖部份基團之核苷酸，其中該核糖部份基團額外包含連接 2'與 4'碳之橋基。換言之，LNA 為一種包含雙環糖部份基團(其包含 4′-CH2-O-2′-橋基)之核苷酸。此結構有效地「封

鎖」3'-內部結構構形內之核糖。添加鎖核酸至 siRNA 中時，已顯示可以提高 siRNA 在血清中之穩定性，並降低脫靶效應(Elmen, J.等人之(2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447；Mook, OR.等人(2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843；Grunweller, A.等人(2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193)。

【0275】 用於本發明多核苷酸之雙環核苷實例包括(但不限於)，在 4′與 2′核糖基環原子之間包含橋基之核苷。某些實施例中，本發明反義多核苷酸劑包括一個或多個包含一個 4′至 2′橋基之雙環核苷。此等 4′至 2′橋連雙環核苷實例包括(但不限於)，4′-(CH2)—O-2′(LNA)；4′-(CH2)—S-2′；4′-(CH2)2—O-2′(ENA)；4′-CH(CH3)—O-2′(亦稱為「限定構象乙基」或「cEt」)及 4′-CH(CH2OCH3)—O-2′(及其類似物；參見例如，美國專利案案號 7,399,845)；4′-C(CH3)(CH3)—O-2′(及其類似物；參見例如，美國專利案案號 8,278,283)；4′-CH2—N(OCH3)-2′(及其類似物；參見例如，美國專利案案號 8,278,425)；4′-CH2—O—N(CH3)-2′(參見例如，美國專利公開案案號 2004/0171570)；4′-CH2—N(R)—O-2′，其中 R 為 H、C1-C12 烷基、或保護基(參見例如，美國專利案案號 7,427,672)；4′-CH2—C(H)(CH3)-2′(參見例如，Chattopadhyaya 等人，*J. Org. Chem.*,

2009, 74, 118-134)；及 4'-CH2—C(=CH2)-2'(及其類似物；參見例如，美國專利案案號 8,278,426)。上述各文獻之完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0276】 其他教示鎖核酸核苷酸製法之代表性美國專利案及美國專利公告案包括(但不限於)下列，美國專利案案號 6,268,490；6,525,191；6,670,461；6,770,748；6,794,499；6,998,484；7,053,207；7,034,133；7,084,125；7,399,845；7,427,672；7,569,686；7,741,457；8,022,193；8,030,467；8,278,425；8,278,426；8,278,283；US 2008/0039618；及 US 2009/0012281，其等之完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0277】 上述任何雙環核苷可製成具有一或多種立體化學糖組態，包括例如，α-L-呋喃核糖及 β-D-呋喃核糖(參見 WO 99/14226)。

【0278】 iRNA 之 RNA 亦可經修飾，以包括一個或多個限定構象乙基核苷酸。本文所採用「限定構象乙基核苷酸」或「cEt」為一種包含雙環糖部份基團(其含有 4'-CH(CH3)-O-2'橋基)之鎖核酸。一項實施例中，該限定構象乙基核苷酸係呈 S 構形，本文稱為「S-cEt」。

【0279】 本發明 iRNA 亦可包括一個或多個「限制構形核苷酸」(「CRN」)。CRN 係核苷酸類似物，其具有連接核糖之 C2'與 C4'碳或核糖之 C3 與-C5' 碳之

連接基。CRN 鎖住核糖環成為穩定之構形，並提高其與 mRNA 之雜交親合性。該連接基之長度足以讓氧置於最適合穩定性與親和性之位置，因此較少核糖環折皺。

【0280】 教示上述某些 CRN 之製法之代表性公開文獻包括(但不限於)，美國專利公開案案號 2013/0190383；及 PCT 公開案 WO 2013/036868，其等之完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0281】 本發明 iRNA 之一個或多個核苷酸亦可包括經羥甲基取代之核苷酸。「經羥甲基取代之核苷酸」為無環 2'-3'-開環(seco)-核苷酸，亦稱為「非鎖核酸」(「UNA」)修飾。

【0282】 教示 UNA 製法之代表性美國公開案包括(但不限於)，美國專利案案號 8,314,227；及美國專利公開案案號 2013/0096289；2013/0011922；及 2011/0313020，其等之完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0283】 RNA 分子末端之可能穩定化修飾法包括：N-(乙醯基胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-NHAc)、N-(己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6)、N-(乙醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-去氧胸苷(醚)、N-(胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-胺基)、2-廿二碳烷醯基-尿苷-3"-磷酸酯、反轉鹼基 dT(idT)等等。此修飾法之揭示內容可參見 PCT 公開案案號 WO 2011/005861。

【0284】

A. 包含本發明基序之經修飾 iRNA

本發明某些態樣中，本發明雙股 RNAi 劑包括依例如，美國臨時申請案案號 61/561,710(申請日 2011 年 11 月 18 日)或 PCT/US2012/065691(申請日 2012 年 11 月 16 日)之揭示內容進行化學修飾之製劑，其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0285】 如本文，臨時申請案案號 61/561,710、及 PCT/US2012/065691 所示，藉由在 RNAi 劑之正義股與/或反義股(特定言之在裂解位點或接近裂解位點處)引進一個或多個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序，可得到優異結果。有些實施例中，RNAi 劑之正義股與反義股可能完全經修飾。引進此等基序會中斷正義與/或反義股上可能存在之修飾型態。RNAi 劑可視需要例如，在正義股接合 GalNAc 衍生物配體。所得 RNAi 劑即具有優異基因靜默活性。

【0286】 更明確言之，已驚人地發現，當雙股 RNAi 劑之正義股與反義股經過修飾而在 RNAi 劑之至少一股之裂解位點或接近裂解位點處具有一個或多個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序時，可優異地提高 RNAi 劑之基因靜默活性。

【0287】 一項實施例中，該 RNAi 劑為兩端均為鈍端之 19 個核苷酸長度，其中該正義股包含至少一個在 5'端起之位置 7、8、9 三個連續核苷酸上具有三個 2'-F

修飾之基序。反義股包含至少一個在 5’端起之位置 11、12、13 三個連續核苷酸具有三個 2’-O-甲基修飾之基序。

【0288】 另一項實施例中，該 RNAi 劑為兩端均為鈍端之 20 個核苷酸長度，其中該正義股包含至少一個在 5’端起之位置 8、9、10 三個連續核苷酸具有三個 2’-F 修飾之基序。反義股包含至少一個在 5’端起之位置 11、12、13 三個連續核苷酸具有三個 2’-O-甲基修飾之基序。

【0289】 再另一項實施例中，該 RNAi 劑為兩端均為鈍端之 21 個核苷酸長度，其中該正義股包含至少一個在 5’端起之位置 9、10、11 三個連續核苷酸具有三個 2’-F 修飾之基序。反義股包含至少一個在 5’端起之位置 11、12、13 三個連續核苷酸具有三個 2’-O-甲基修飾之基序。

【0290】 一項實施例中，該 RNAi 劑包含 21 個核苷酸之正義股與 23 個核苷酸之反義股，其中該正義股包含至少一個在 5’端起之位置 9、10、11 三個連續核苷酸具有三個 2’-F 修飾之基序；反義股包含至少一個在 5’端起之位置 11、12、13 三個連續核苷酸具有三個 2’-O-甲基修飾之基序，其中 RNAi 劑之一端為鈍端，而另一端包含具有 2 個核苷酸之突出。較佳係該 2 個核苷酸突出位在反義股之 3’-端。當該 2 個核苷酸突出位在反義股之 3’-端時，末端三個核苷酸之間可能有兩個硫代磷酸

酯之核苷酸之間連接體，其中該三個核苷酸中有兩個為突出核苷酸，第三個核苷酸為鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。一項實施例中，RNAi 劑在正義股 5'-端與反義股 5'-端之兩端之末端三個核苷酸之間另外具有兩個硫代磷酸酯之核苷酸之間連接體。一項實施例中，RNAi 劑之正義股與反義股中每一個核苷酸(包括作為基序之一部份之核苷酸)均為經修飾之核苷酸。一項實施例，各殘基係分別獨立經 2'-O-甲基或 3'-氟修飾，例如，在交替之基序上。RNAi 劑可視需要再包含配體(較佳為 $GalNAc_3$)。

【0291】 一項實施例中，該 RNAi 劑包含正義與反義股，其中 RNAi 劑包含長度為至少 25 個及至多 29 個核苷酸之第一股及長度為至多 30 個核苷酸之第二股，其具有至少一個自 5'末端起位置 11、12、13 連續三個核苷酸之三個 2'-O-甲基修飾之基序；其中第一股 3'端與第二股 5'端形成鈍端，且第二股之 3'端比第一股長 1 至 4 個核苷酸，其中雙螺旋區之長度為至少 25 個核苷酸，且第二股與標靶 mRNA 沿著第二股至少 19 個核苷酸長度充份互補，當 RNAi 劑引進哺乳動物細胞中時，可以降低標靶基因表現，且其中 dicer 裂解 RNAi 劑偏向於產生包含第二股 3'端之 siRNA，藉以降低標靶基因在哺乳動物中之表現。該 RNAi 劑可視需要再包含配體。

【0292】 一項實施例中，該 RNAi 劑之正義股劑包含至少一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序，其中一個基序出現在正義股之裂解位點處。

【0293】一項實施例中，該RNAi劑之反義股亦可包含至少一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序，其中一個基序出現在反義股之裂解位點或接近裂解位點處。

【0294】當RNAi劑具有長度為17至23個核苷酸之雙螺旋區時，反義股之裂解位點通常約在自5'-端起之10、11與12位置。因此，三個相同修飾之基序可能出現在反義股之9、10、11位置；10、11、12位置；11、12、13位置；12、13、14位置；或13、14、15位置，其係從反義股5'-端起之第一個核苷酸開始計數，或從反義股5'-端起之雙螺旋區內第一對核苷酸開始計數。反義股中之裂解位點亦可能隨RNAi從5'-端開始之雙螺旋區長度變化。

【0295】RNAi劑之正義股可能在該股之裂解位點包含至少一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序；且反義股可能在該股之裂解位點或接近裂解位點處具有至少一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序。當正義股與反義股形成dsRNA雙螺旋時，正義股與反義股之排比可讓正義股之三個核苷酸之一個基序與反義股三個核苷酸之一個基序具有至少一個核苷酸重疊，亦即正義股之基序之三個核苷酸之至少一者與反義股至少一個三之基序之三個核苷酸之至少一者形成鹼基對。或者，可能至少兩個核苷酸重疊，或可能所有三個核苷酸重疊。

【0296】一項實施例中，RNAi劑正義股可能包含

超過一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序。該第一基序可能出現在該股之裂解位點或接近裂解位點，且其他基序可能為側翼修飾。本文中術語「側翼修飾」係指出現在該股之另一部份之基序，其與出現在相同股之裂解位點或接近裂解位點之基序分開。該側翼修飾係與第一基序相鄰或分隔至少一個或更多個核苷酸。當彼等基序彼此緊鄰時，則該等基序之化學係彼此獨立，且當基序之間分隔一個或多個核苷酸時，則其化學可能相同或不同。可能出現兩個或更多個側翼修飾。例如，當存在兩個側翼修飾時，各側翼修飾可能出現於相對於在該裂解位點或接近裂解位點之第一基序之一端或在該前導基序之任一側。

【0297】 如同正義股，RNAi 劑之反義股可能包含超過一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序，其中至少一個基序出現在該股之裂解位點或接近裂解位點。此反義股亦可能包含一個或多個側翼修飾，其排比應類似可能出現在正義股上之側翼修飾。

【0298】 一項實施例中，RNAi 劑之正義股或反義股之側翼修飾通常不包括該股之 3'-端、5'-端或兩端之第一個或兩個末端核苷酸。

【0299】 另一項實施例中，RNAi 劑之正義股或反義股之側翼修飾通常不包括該股之 3'-端、5'-端或兩端之雙螺旋區內第一個或兩個配對之核苷酸。

【0300】 當 RNAi 劑之正義股與反義股各包含至少一個側翼修飾時，該側翼修飾可能落在雙螺旋區之相同

端，且具有一、二或三個核苷酸重疊。

【0301】當RNAi劑之正義股與反義股各包含至少兩個側翼修飾時，正義股與反義股之排列可使分別來自一股之兩個修飾落在雙螺旋區之一端，具有一、二或三個核苷酸重疊；分別來自一股之兩個修飾落在雙螺旋區之另一端，具有一、二或三個核苷酸重疊；一股之兩個修飾落在前導基序之每一側，且在雙螺旋區有一、二或三個核苷酸重疊。

【0302】一項實施例中，RNAi劑之正義股與反義股中每一個核苷酸(包括作為基序之一部份之核苷酸)可能經過修飾。各核苷酸可能經過相同或不同修飾法修飾，其可包括以下一或多種修改：一個或兩個非連接性磷酸態氧與/或一個或多個連接性磷酸態氧；修改核糖之組成，例如，核糖之2′羥基；以「去磷酸」連接基完全置換磷酸根部份基團；修飾或置換天然鹼基；及置換或修飾核糖-磷酸根主幹。

【0303】由於核酸為亞單位之聚合物，因此許多修飾會出現在核酸內之重複位置，例如，鹼基、或磷酸根部份基團、或磷酸根部份基團之非連接性O之修飾。有些例子中，將在核酸之所有個別位置進行修飾，但許多例子中並未進行修飾。例如，可能僅在3’或5’末端位置進行修飾，可能僅在一個末端區進行，例如，在一股之末端核苷酸或最後2、3、4、5或10個核苷酸之位置。可能在雙股區、單股區或二者進行修飾。可能僅在RNA之雙股

區或可能僅在RNA之單股區進行修飾。例如，在非連接性O位置之硫代磷酸根修飾可能僅在一個或兩個末端進行、可能僅在末端區進行，例如，在一股之末端核苷酸或最後2、3、4、5、或10個核苷酸位置，或可能在雙股與單股區，特定言之末端進行。5'端或末端可經磷酸化。

【0304】 為了例如，加強穩定性，可能在突出中包括特定鹼基，或在單股突出，例如，5'或3'突出或二者中包括經修飾之核苷酸或核苷酸替代物。例如，希望在突出中包括嘌呤核苷酸。有些實施例中，3'或5'突出中所有或有些鹼基可經修飾，例如，具有本文所說明之修飾。修飾法可包括例如，採用相關技藝上已知之修飾法在核糖之2'位置進行修飾，例如，改用去氧核糖核苷酸、2'-去氧-2'-氟(2'-F)或2'-O-甲基修飾替代核鹼基之核糖；及磷酸根之修飾，例如，硫代磷酸根修飾法。突出不一定與標靶序列同源。

【0305】 一項實施例中，正義股與反義股之各殘基分別獨立經LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-去氧、2'-羥基、或2'-氟修飾。該等股可包含超過一個修飾。一項實施例中，正義股與反義股之各殘基分別獨立經2'- O-甲基或2'-氟修飾。

【0306】 正義股與反義股通常出現至少兩種不同修飾。這兩種修飾可能為2'- O-甲基或2'-氟修飾，或其

他。

【0307】 一項實施例中，N_a 與/或 N_b 包含交替修飾型態。本文所採用術語「交替基序」係指具有一或多種修飾之基序，各修飾係在一股之交替核苷酸進行。該交替核苷酸可能係指每隔一個核苷酸有一種修飾或每隔三個核苷酸有一種修飾，或類似型態。例如，若 A、B 與 C 分別代表核苷酸之一種修飾時，則該交替基序可為

「ABABABABABAB...」、

「AABBAABBAABB...」、

「AABAABAABAAB...」、

「AAABAAABAAAB...」、

「AAABBBAAABBB...」或

「ABCABCABCABC...」等等。

【0308】 包含在交替基序中之修飾型態可能相同或不同。例如，若 A、B、C、D 分別代表核苷酸之一種修飾型態時，交替型態(亦即每隔一個核苷酸之修飾型態)可能相同，但各正義股或反義股之修飾型態可能分別選自交替基序中之數種修飾可能性，如「ABABAB...」、「ACACAC...」、「BDBDBD...」或「CDCDCD...」等等。

【0309】 一項實施例中，本發明 RNAi 劑包含在正義股之交替基序之修飾型態相對於反義股之交替基序之修飾型態出現位移。該位移可使正義股核苷酸之經修飾基團對應於反義股核苷酸之經不同修飾之基團，且反之亦然。

例如，當正義股與 dsRNA 雙螺旋中反義股配對時，雙螺旋區內之正義股之交替基序可能始於該股之 5’-3’之「ABABAB」，而反義股之交替基序可能始於該股之 5’- 3’之「BABABA」。另一項實例中，雙螺旋區內之正義股之交替基序可能始於該股之 5’-3’之「AABBAABB」，而反義股之交替基序可能始於該股之 5’-3’之「BBAABBAA」，因此正義股與反義股之間之修飾型態會出現完全或部份位移。

【0310】 一項實施例中，RNAi 劑包含在原始正義股之 2'-O-甲基修飾與 2’-F 修飾之交替基序型態相對於在原始反義股之 2'-O-甲基修飾與 2’-F 修飾之交替基序型態出現位移，亦即正義股之 2'-O-甲基修飾之核苷酸與反義股之 2'-F 修飾之核苷酸形成鹼基配對，且反之亦然。正義股之 1-位置可能始於 2'-F 修飾，及反義股之 1-位置可能始於 2'-O-甲基修飾。

【0311】 在正義股與/或反義股之引進一個或多個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序時，可中斷正義股與/或反義股之原始修飾型態。這種在正義與/或反義股中引進一個或多個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序而中斷正義與/或反義股之修飾型態時，驚人地加強針對標靶基因之基因靜默活性。

【0312】 一項實施例中，當在任一股中引進在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序時，鄰接該基序之核苷酸修飾為不同於該基序修飾之修飾。例如，包含該基序之

序列部份為「…N_aYYYN_b…」，其中「Y」代表在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序之修飾，及「N_a」與「N_b」代表鄰接該基序「YYY」之核苷酸之修飾，其不同於 Y 之修飾，且其中 N_a 與 N_b 可為相同或不同修飾。或者，當出現側翼修飾時，N_a 與/或 N_b 可能存在或不存在。

【0313】 RNAi 劑可能進一步包含至少一個硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸之間連接體。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸之間連接體修飾可能出現在正義股或反義股或兩股之股中任何位置之任何核苷酸。例如，核苷酸之間連接體修飾可能出現在正義股與/或反義股之每一個核苷酸；各核苷酸之間連接體修飾可能呈交替型態出現在正義股與/或反義股；或正義股或反義股可能包含呈交替型態之兩種核苷酸之間連接體之修飾。正義股核苷酸之間連接體之交替修飾型態可能與反義股相同或不同，正義股核苷酸之間連接體之交替修飾型態相對於反義股核苷酸之間連接體之交替修飾型態可能出現位移。

【0314】 一項實施例中，RNAi 在突出區包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸之間連接體修飾。例如，突出區可能包含兩個核苷酸，其在兩個核苷酸之間具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸之間連接體。亦可能進行核苷酸之間連接體修飾來連接突出核苷酸與雙螺旋區內末端配對之核苷酸。例如，至少 2、3、4 個或所有突出核苷酸可能利用硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸之間連接體

連接，且可視需要可能有額外硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸之間連接體連接該突出核苷酸與鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。例如，末端三個核苷酸之間可能有至少兩個硫代磷酸酯之核苷酸之間連接體，三個核苷酸中有兩個為突出核苷酸，第三個為鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。末端這三個核苷酸可在反義股 3'-端、正義股 3'-端、反義股 5'-端、與/或反義股 5'-端。

【0315】 一項實施例中，該 2 個核苷酸突出係在反義股 3'-端，且末端三個核苷酸之間有兩個硫代磷酸酯之核苷酸之間連接體，這三個核苷酸中有兩個為突出核苷酸，第三個核苷酸為鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。該 RNAi 劑可視需要再於正義股 5'-端與反義股 5'-端兩個末端，於末端三個核苷酸之間另包含兩個硫代磷酸酯之核苷酸之間連接體。

【0316】 一項實施例中，RNAi 劑在雙螺旋內包含與標靶錯配(群)，或其組合。「錯配」可為核苷酸之非典型鹼基配對或典型以外之配對。錯配可能發生於突出區或雙螺旋區。鹼基對可能依據其促進解離或熔解之傾向排序(例如，依據特定配對之結合或解離之自由能，最簡單之方法為檢視個別成對核苷酸，但亦可針對相鄰核苷酸或採用類似分析法)。以促進解離而言：A：U 優於 G：C；G：U 優於 G：C；及 I：C 優於 G：C (I=肌苷)。錯配，例如，非典型或典型以外之配對(如本文中其他說明)優於典型(A：T、A：U、G：C)配對；且包括通用鹼基

之配對優於典型配對。「通用鹼基」為有能力置換四種正常鹼基(G、C、A、與 U)中任一種且不會顯著破壞相鄰鹼基對交互作用之穩定性或破壞所修飾寡核苷酸之所期望功能性生化用途之鹼基。通用鹼基之不設限實例包括 2'-去氧肌苷(次黃嘌呤去氧核苷酸)或其衍生物、硝基唑類似物、及疏水性芳香系非氫鍵鍵結鹼基。

【0317】 一項實施例中，RNAi 劑包含雙螺旋區內反義股 5'-端起前 1、2、3、4、或 5 對鹼基中至少一對，其係分別獨立選自：A：U、G：U、I：C，及錯配對，例如，非典型或典型以外之配對或包括通用鹼基之配對，以促進雙螺旋反義股 5'-端之解離。

【0318】 一項實施例中，雙螺旋區中反義股 5'-端起 1-位置之核苷酸係選自下列各物所組成群中：A、dA、dU、U、與 dT。或者，雙螺旋區中反義股 5'-端起第 1、2 或 3 對鹼基中至少一對為 AU 鹼基對。例如，雙螺旋區中反義股 5'-端起第一對鹼基為 AU 鹼基對。

【0319】 另一項實施例中，正義股 3'-端之核苷酸為去氧-胸腺嘧啶(dT)。另一項實施例中，反義股 3'-端之核苷酸為去氧-胸腺嘧啶(dT)。一項實施例中，正義與/或反義股之 3'-端有一個去氧-胸腺嘧啶核苷酸短序列，例如，兩個 dT 核苷酸。

【0320】 一項實施例中，正義股序列可如式(I)代表：

$5'\ n_p\text{-}N_a\text{-}(X\ X\ X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\ Y\ Y\text{-}N_b\text{-}(Z\ Z\ Z)_j\text{-}$

N_a-n_q 3' (I)

【0321】 其中：

【0322】 i 與 j 分別獨立為 0 或 1；

【0323】 p 與 q 分別獨立為 0 至 6；

【0324】 各 N_a 分別獨立代表包含 0 至 25 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列，各序列包含至少 2 個經不同修飾之核苷酸；

【0325】 各 N_b 分別獨立代表包含 0 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；

【0326】 各 n_p 及 n_q 分別獨立代表突出核苷酸；

【0327】 其中 Nb 及 Y 不具有相同修飾；及

【0328】 XXX、YYY 及 ZZZ 分別獨立代表在三個連續核苷酸有三個相同修飾之一個基序。較佳係 YYY 為均經 2'-F 修飾之核苷酸。

【0329】 一項實施例中，該 N_a 與/或 N_b 包含交錯型態修飾。

【0330】 一項實施例中，該 YYY 基序出現在正義股之裂解位點或接近裂解位點。例如，當 RNAi 劑具有 17 至 23 個核苷酸長度之雙螺旋區時，該 YYY 基序可出現在正義股之裂解位點或接近裂解位點處(例如，可出現在位置 6、7、8，7、8、9，8、9、10，9、10、11，10、11、12，或 11、12、13)，其係從 5'-端之第一個核苷酸開始計數；或可視需要從雙螺旋區內 5'-端之第一對核苷酸開始計數。

【0331】 一項實施例中，i 為 1 及 j 為 0，或 i 為 0 及 j 為 1，或 i 與 j 二者均為 1。因此正義股由下式代表：

5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3' (Ib)；

5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q 3' (Ic)；或

5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3' (Id)。

【0332】 當正義股由式(Ib)代表時，N_b 代表包含 0 至 10、0 至 7、0 至 5、0 至 4、0 至 2 或 0 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 可分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15、或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0333】 當正義股由式(Ic)代表時，N_b 代表包含 0 至 10、0 至 7、0 至 10、0 至 7、0 至 5、0 至 4、0 至 2 或 0 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 可分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15、或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0334】 當正義股由式(Id)代表時，各 N_b 分別獨立代表包含 0 至 10、0 至 7、0 至 5、0 至 4、0 至 2 或 0 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。較佳為 N_b 為 0、1、2、3、4、5 或 6。各 N_a 可分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15 或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0335】 各 X、Y 與 Z 可彼此相同或不同。

【0336】 其他實施例中，i 為 0 及 j 為 0，且正義股可由下式代表：

5' n_p-N_a-YYY- N_a-n_q 3' (Ia)。

【0337】 當正義股由式(Ia)代表時，各 N_a 可分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15、或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0338】 一項實施例中，RNAi 之反義股序列可由式(II)代表：

5' $n_{q'}$-N_a'-$(Z'Z'Z')_k$-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-$(X'X'X')_l$-N'_a-n_p' 3' (II)

【0339】 其中：

【0340】 k 與 l 分別獨立為 0 或 1；

【0341】 p'與 q'分別獨立為 0 至 6；

【0342】 各 N_a'分別獨立代表包含 0 至 25 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列，各序列包含至少 2 個經不同修飾之核苷酸；

【0343】 各 N_b'分別獨立代表包含 0 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；

【0344】 各 n_p'及 n_q'分別獨立代表突出核苷酸；

【0345】 其中 N_b'及 Y'不具有相同修飾；

及

【0346】 X'X'X'、Y'Y'Y'及 Z'Z'Z'分別獨立代表在三個連續核苷酸有三個相同修飾之一個基序。

【0347】 一項實施例中，該 N_a'與/或 N_b'包含交替之修飾型態。

【0348】 Y'Y'Y'基序出現在反義股之裂解位點或

接近裂解位點。例如，當 RNAi 劑之雙螺旋區長度為 17 至 23 個核苷酸時，該 Y'Y'Y'基序可出現在反義股之位置 9、10、11；10、11、12；11、12、13；12、13、14；或 13、14、15，其係從 5'-端之第一個核苷酸開始計數；或可視需要從雙螺旋區內 5'-端之第一對核苷酸開始計數。較佳係該 Y'Y'Y'基序出現在位置 11、12、13。

【0349】 一項實施例中，Y'Y'Y'基序為均經 2'-OMe 修飾之核苷酸。

【0350】 一項實施例中，k 為 1 及 l 為 0，或 k 為 0 及 l 為 1，或 k 與 l 二者均為 1。

【0351】 因此反義股可由下式代表：

5' $n_{q'}$-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-$n_{p'}$ 3' (IIb)；

5' $n_{q'}$-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-$n_{p'}$ 3' (IIc)；或

5' $n_{q'}$-N_a'- Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-$n_{p'}$ 3' (IId)。

【0352】 當反義股由式(IIb)代表時，N_b'代表包含 0 至 10、0 至 7、0 至 10、0 至 7、0 至 5、0 至 4、0 至 2 或 0 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a'分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15、或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0353】 當反義股由式(IIc)代表時，N_b'代表包含 0 至 10、0 至 7、0 至 10、0 至 7、0 至 5、0 至 4、0 至 2 或 0 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a'分別

獨立代表包含 2 至 20、2 至 15 或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0354】 當反義股由式(IId)代表時，各 N_b'分別獨立代表包含 0 至 10、0 至 7、0 至 10、0 至 7、0 至 5、0 至 4、0 至 2 或 0 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a'分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15 或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。較佳為 N_b 為 0、1、2、3、4、5 或 6。

【0355】 其他實施例中，k 為 0 及 l 為 0，且該反義股可由下式代表：

5' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'- N_a'-n_q' 3' (Ia)。

【0356】 當反義股由式(IIa)代表時，各 N_a'分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15 或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0357】 各 X'、Y'與 Z'可彼此相同或不同。

【0358】 正義股與反義股之各核苷酸可能分別獨立經 LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-羥基、或 2'-氟修飾。例如，正義股與反義股之各核苷酸係分別獨立經 2'-O-甲基或 2'-氟修飾。特定言之，各 X、Y、Z、X'、Y'與 Z'可代表 2'-O-甲基修飾或 2'-氟修飾。

【0359】 一項實施例中，當 RNAi 劑之雙螺旋區為 21 聚體時，其正義股可能包含出現在該股 9、10 與 11 位置之 YYY 基序，其係從 5'-端第一個核苷酸開始計

數，或可視需要從雙螺旋區內 5'-端第一對核苷酸開始計數；及 Y 代表 2'-F 修飾。正義股可另外在雙螺旋區之相反末端包含 XXX 基序或 ZZZ 基序作為側翼修飾；及 XXX 與 ZZZ 各分別獨立代表 2'-OMe 修飾或 2'-F 修飾。

【0360】 一項實施例中，反義股可能包含出現在該股之位置 11、12、13 之 Y'Y'Y'基序，其係從 5'-端第一個核苷酸開始計數，或可視需要從雙螺旋區內 5'-端第一對核苷酸開始計數；及 Y'代表 2'-O-甲基修飾。該反義股可另外在雙螺旋區之相反末端包含 X'X'X'基序或 Z'Z'Z'基序作為側翼修飾；及 X'X'X'與 Z'Z'Z'各分別獨立代表 2'-OMe 修飾或 2'-F 修飾。

【0361】 由上式(Ia)、(Ib)、(Ic)與(Id)中任一式代表之正義股可分別與上式(IIa)、(IIb)、(IIc)與(IId)中任一式代表之反義股形成雙螺旋。

【0362】 因此，本發明方法所使用之 RNAi 劑可包含正義股與反義股，每一股具有 14 至 30 個核苷酸，該 RNAi 雙螺旋係如式(III)代表：

正義： 5' n_p -N_a-(X X X)$_i$ -N_b- Y Y Y -N_b -(Z Z Z)$_j$-N_a-n_q 3'

反義： 3' n_p'-N_a'-(X'X'X')$_k$-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')$_l$-N_a'-n_q' 5'

(III)

【0363】 其中：

【0364】 i、j、k、及 l 分別獨立為 0 或 1；

【0365】 p、p′、q、及 q′ 分別獨立為 0 至 6；

【0366】 各 N_a 及 N_a' 分別獨立代表包含 0 至 25 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列，各序列包含至少 2 個經不同修飾之核苷酸；

【0367】 各 N_b 及 N_b' 分別獨立代表包含 0 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；

【0368】 其中

【0369】 各 n_p'、n_p、n_q'、及 n_q，其分別可能存在或不存在，分別獨立代表一個突出核苷酸；及

【0370】 XXX、YYY、ZZZ、X′X′X′、Y′Y′Y′、及 Z′Z′Z′分別獨立代表在三個連續核苷酸有三個相同修飾之一個基序。

【0371】 一項實施例中，i 為 0 及 j 為 0；或 i 為 1 及 j 為 0；或 i 為 0 及 j 為 1；或 i 與 j 二者均為 0；或 i 與 j 二者均為 1。另一項實施例中，k 為 0 及 l 為 0；或 k 為 1 及 l 為 0；k 為 0 及 l 為 1；或 k 與 l 二者均為 0；或 k 與 l 二者均為 1。

【0372】 形成 RNAi 雙螺旋之正義股與反義股之組合實例包括下式：

5' n_p - N_a -Y Y Y -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-Y′Y′Y′ -$N_a'$$n_q'$ 5'

(IIIa)

5' n_p -N_a -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-$N_a'$$n_q'$ 5'

(IIIb)

5' n_p-N_a- X X X -N_b -Y Y Y - N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 5'

(IIIc)

5' n_p -N_a -X X X -N_b-Y Y Y -N_b- Z Z Z -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a-n_q' 5'

(IIId)

5' - N_a -Y Y Y -N_a- 3'

3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y' -N_a' 5'

(IIIe)

【0373】 當 RNAi 劑如式(IIIa)代表時，各 N_a 分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15、或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0374】 當 RNAi 劑如式(IIIb)代表時，各 N_b 分別獨立代表包含 1 至 10、1 至 7、1 至 5 或 1 至 4 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15 或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0375】 當 RNAi 劑如式(IIIc)代表時，各 N_b、N_b'分別獨立代表包含 0 至 10、0 至 7、0 至 10、0 至 7、0 至 5、0 至 4、0 至 2 或 0 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15 或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0376】 當 RNAi 劑如式(IIId)代表時，各 N_b、N_b'分別獨立代表包含 0 至 10、0 至 7、0 至 10、0 至 7、0 至 5、0 至 4、0 至 2 或 0 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a、N_a'分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15 或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a、N_a'、N_b 與 N_b'分別獨立包含交替之修飾型態。

【0377】 當 RNAi 劑如式(IIId)代表時，各 N_b、N_b'分別獨立代表包含 0 至 10、0 至 7、0 至 10、0 至 7、0 至 5、0 至 4、0 至 2 或 0 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a、N_a'分別獨立代表包含 2 至 20、2 至 15 或 2 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a、N_a'、N_b 與 N_b'分別獨立包含交替之修飾型態

【0378】 當 RNAi 劑如式(IIIe)代表時，各 N_a 及 N_a'分別獨立代表包含 0 至 25 個經修飾或未修飾或其組合之核苷酸之寡核苷酸序列，各序列包含至少 2 個經不同修飾之核苷酸。

【0379】 式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)、與(IIIe)中各 X、Y 及 Z 可彼此相同或不同。

【0380】 當 RNAi 劑如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)與(IIIe)代表時，至少一個 Y 核苷酸可與一個 Y'核苷酸形成鹼基對。或者，至少兩個 Y 核苷酸與對應 Y'核苷酸形鹼基對；或所有三個 Y 核苷酸均與對應 Y'核苷酸形成鹼基對。

【0381】 當 RNAi 劑如式(IIIb)或(IIId)代表時，

至少一個 Z 核苷酸可與一個 Z′核苷酸形成鹼基對。或者，至少兩個 Z 核苷酸可與對應 Z′核苷酸形成鹼基對；或所有三個 Z 核苷酸均與對應 Z′核苷酸形成鹼基對。

【0382】 當 RNAi 劑如式(IIIc)或(IIId)代表時，至少一個 X 核苷酸可與一個 X′核苷酸形成鹼基對。或者，至少兩個 X 核苷酸可與對應 X′核苷酸形成鹼基對；或所有三個 X 核苷酸均與對應 X′核苷酸形成鹼基對。

【0383】 一項實施例中，Y 核苷酸之修飾不同於 Y’核苷酸之修飾，Z 核苷酸之修飾不同於 Z’核苷酸之修飾，及/或 X 核苷酸之修飾不同於 X’核苷酸之修飾。

【0384】 一項實施例中，當 RNAi 劑如式(IIId)代表時，N_a 修飾為 2′-O-甲基或 2′-氟修飾。另一項實施例中，當 RNAi 劑如式(IIId)代表時，N_a 修飾為 2′-O-甲基或 2′-氟修飾，且 $n_p' > 0$，及至少一個 n_p'係利用硫代磷酸酯鍵聯連接相鄰核苷酸。另一項實施例中，當 RNAi 劑如式(IIId)代表時，該 N_a 修飾為 2′-O-甲基或 2′-氟修飾，$n_p' > 0$，及至少一個 n_p'係利用硫代磷酸酯鍵聯連接相鄰核苷酸，且正義股係接合一或多種利用單價、二價或三價之分支連接基附接之 GalNAc 衍生物。另一項實施例中，當 RNAi 劑如式(IIId)代表時，該 N_a 修飾為 2′-O-甲基或 2′-氟修飾，$n_p' > 0$，及至少一個 n_p'係利用硫代磷酸酯鍵聯連接相鄰核苷酸，正義股包含至少一個硫代磷酸酯鍵聯，且正義股係接合一或多種利用單價、二價或三價之分支連接基附接之 GalNAc 衍生

物。

【0385】一項實施例中，當RNAi劑如式(IIIa)代表時，N_a修飾為2′-O-甲基或2′-氟修飾，$n_p' > 0$，及至少一個n_p'係利用硫代磷酸酯鍵聯連接相鄰核苷酸，正義股包含至少一個硫代磷酸酯鍵聯，且正義股係接合一或多種利用單價、二價或三價之分支連接基附接之GalNAc衍生物。

【0386】一項實施例中，RNAi劑為包含至少兩個如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)與(IIIe)代表之雙螺旋之多聚體，其中該雙螺旋係利用連接基連接。該連接基可以裂解或不可以裂解。該多聚體可視需要進一步包含配體。各雙螺旋可靶向相同基因或兩個不同基因；或各雙螺旋可靶向相同基因於兩個不同標靶位點。

【0387】一項實施例中，RNAi劑為包含三個、四個、五個、六個或更多個如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)與(IIIe)代表之雙螺旋之多聚體，其中雙螺旋係利用連接基連接。該連接基可以裂解或不可以裂解。該多聚體可視需要進一步包含配體。各雙螺旋可靶向相同基因或兩個不同基因；或各雙螺旋可靶向相同基因於兩個不同標靶位點。

【0388】一項實施例中，兩個如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)與(IIIe)代表之RNAi劑係在5’端及其中一個或兩個3’端彼此連接，且可視需要接合配體。各製劑可靶向相同基因或兩個不同基

因；或各製劑可靶向相同基因於兩個不同標靶位點。

【0389】 各種不同文獻說明之多聚體 RNAi 劑均可用於本發明方法。此等文獻包括包括 WO2007/091269、美國專利案案號 7858769、WO2010/141511、WO2007/117686、WO2009/014887 與 WO2011/031520，其等完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0390】 包含一或多個碳水化合物部份基團與 RNAi 劑之接合物之 RNAi 劑可以優化一或多種 RNAi 劑之性質。許多例子中，由碳水化合物部份基團附接 RNAi 劑之經修飾亞單位。例如，dsRNA 劑之一個或多個核糖核苷酸亞單位之核糖可被另一個部份基團置換，例如，附接碳水化合物配體之非碳水化合物(較佳為環狀)載劑。依此方式置換亞單位中核糖之核糖核苷酸亞單位在本文中稱為核糖置換修飾亞單位(RRMS)。環狀載劑可能為碳環狀環系(亦即所有環原子均為碳原子)或雜環狀環系(亦即一個或多個環原子可能為雜原子，例如，氮、氧、硫)。該環狀載劑可能為單環狀環系，或可能包含兩個或更多個環，例如，稠合環。環狀載劑可能為完全飽和環系，或其可能包含一個或多個雙鍵。

【0391】 配體可能利用載劑附接多核苷酸。該載劑包括(i)至少一個「主幹附接點」，較佳為兩個「主幹附接點」，及(ii)至少一個「系鏈附接點」。本文所採用「主幹附接點」係指可用於且適於讓載劑進入主幹(例

如，核糖核酸之磷酸酯或經修飾磷酸酯(例如，含硫)主幹)中之官能基，例如，羥基，或通常為一個鍵結。有些實施例中，「系鏈附接點」(TAP)係指環狀載劑之組成環原子，例如，碳原子或雜原子(不同於提供主幹附接點之原子)，其連接所選定之部份基團。該部份基團可為例如，碳水化合物，例如，單糖、雙醣、參醣、肆醣、寡醣、與多醣。該選定之部份基團可視需要利用穿插之系鏈連接該環狀載劑。因此該環狀載劑經常包括適合引進或系鏈另一個化學部份基團(例如，配體)至組成環之官能基，例如，胺基，或通常提供一個鍵結。

【0392】 該RNAi劑可能利用載劑接合配體，其中該載劑可為環狀基團或無環基團；較佳為該環狀基團係選自：吡咯啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、哌啶基、哌吡基、[1,3]二氧雜環戊烷、噁唑啶基、異噁唑啶基、嗎啉基、噻唑啶基、異噻唑啶基、喹噁啉基、嗒吡酮基、四氫呋喃基、與萘滿；較佳係該無環基團係選自：絲胺醇主幹或二乙醇胺主幹。

【0393】 某些明確實施例中，用於本發明方法之RNAi劑為AT3SC-001 (AD-57213 - 正義股：5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO：13)與反義股：5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO：14)，其中a、c、g、與u為2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G、或U；Af、Cf、Gf、或Uf為

2′-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鍵聯。

【0394】 此等製劑可進一步包含配體。

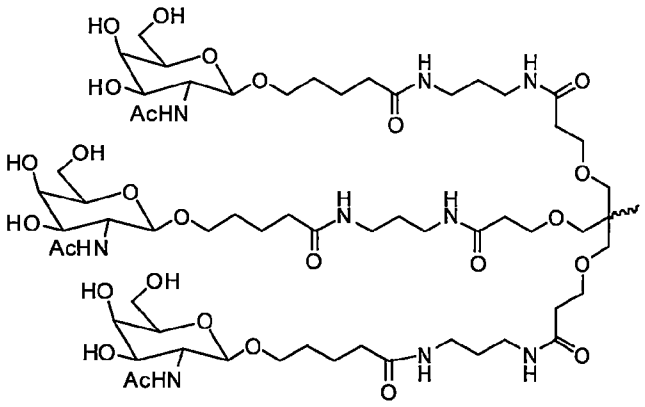
【0395】

配體

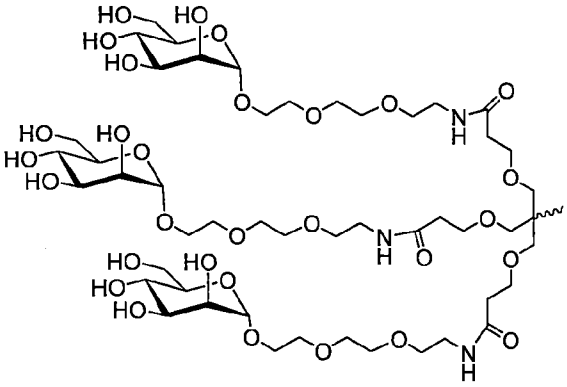
本發明雙股 RNA(dsRNA)劑可視需要接合一個或多個配體。該等配體可附接正義股、反義股或兩股之 3'-端、5'-端或兩端。例如，配體可接合正義股。較佳實施例中，配體係接合正義股之 3'-端。

【0396】 一項實施例中，該配體為碳水化合物接合物，如單醣。一項實施例中，該配體為 N-乙醯基半乳糖胺(GalNAc) GalNAc 或 GalNAc 衍生物。某些本發明實施例中，GalNAc 或 GalNAc 衍生物係利用單價連接基附接本發明 iRNA 劑。有些實施例中，GalNAc 或 GalNAc 衍生物係利用二價連接基附接本發明 iRNA 劑。本發明又其他實施例中，GalNAc 或 GalNAc 衍生物係利用三價連接基附接本發明 iRNA 劑。

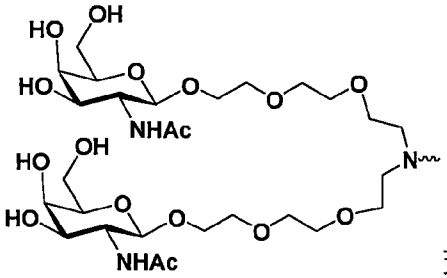
【0397】 一項實施例中，本發明組成物與方法所使用碳水化合物接合物係選自下列所組成群中：



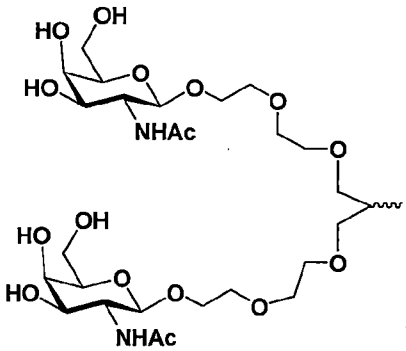
式 II，



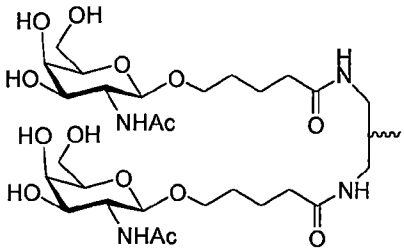
式 III，



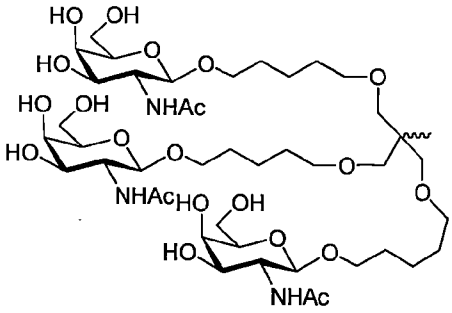
式 IV，



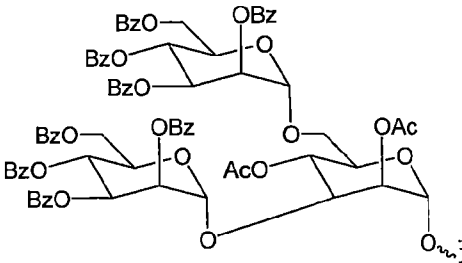
式 V，



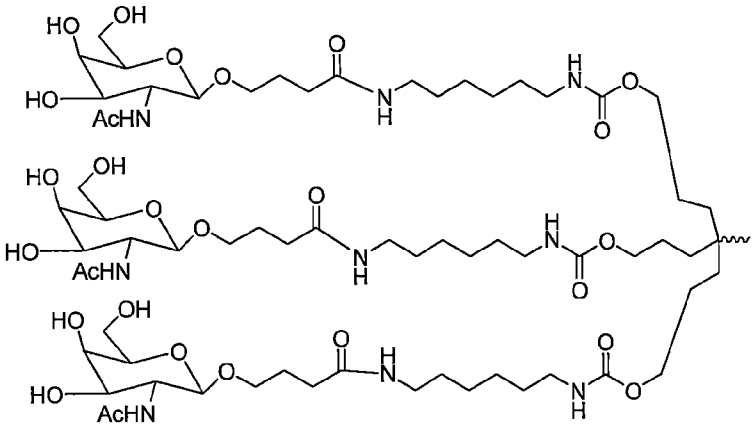
式 VI，



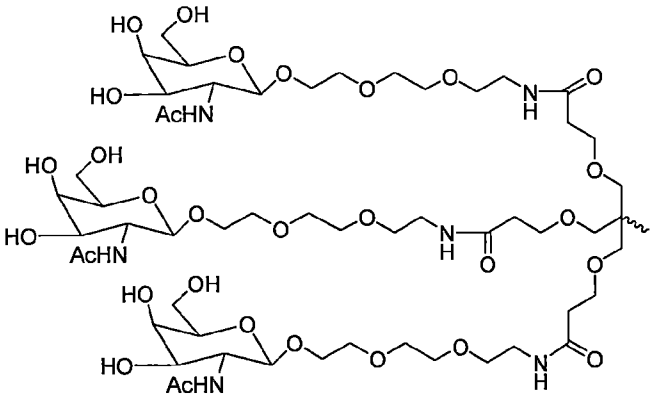
式 VII，



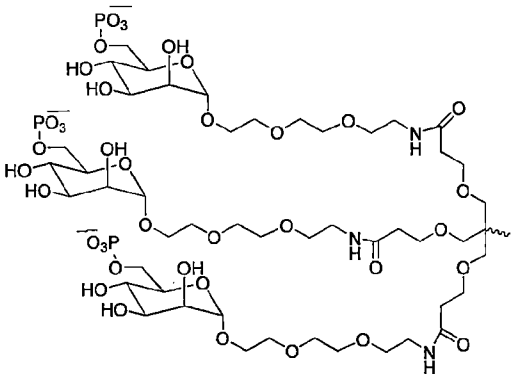
式 VIII，



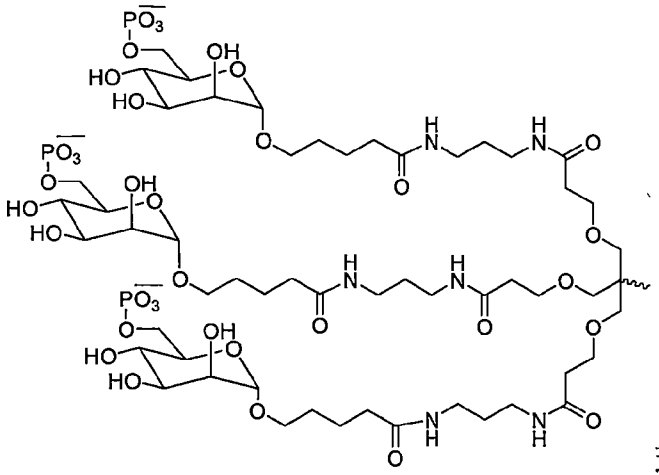
式 IX，



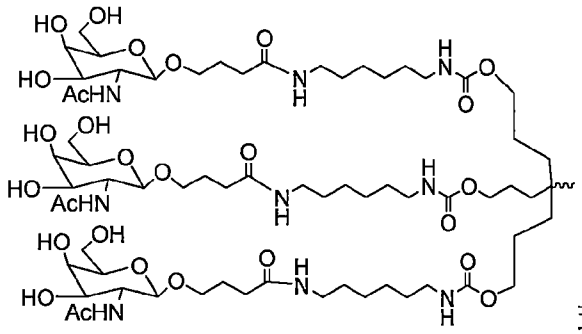
式 X，



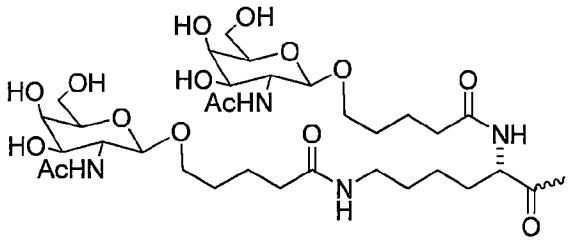
式 XI，



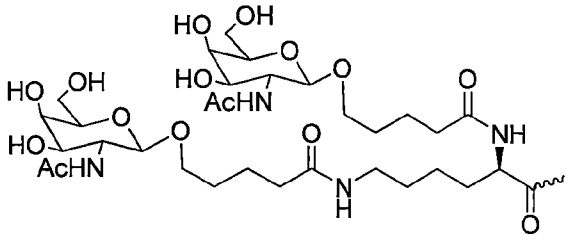
式 XII，



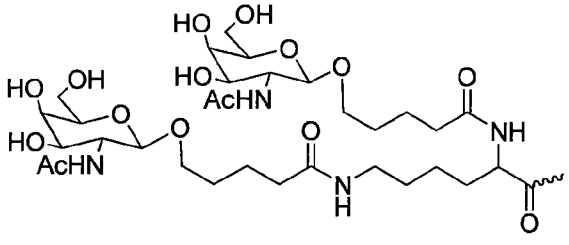
式 XIII，



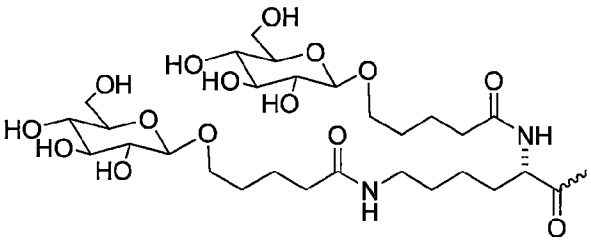
式 XIV，



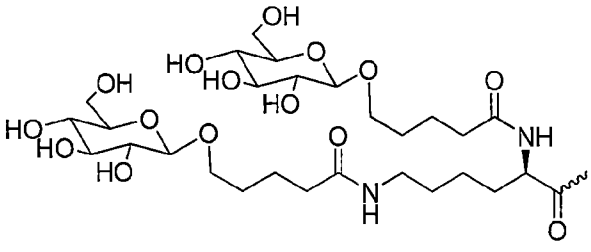
式 XV，



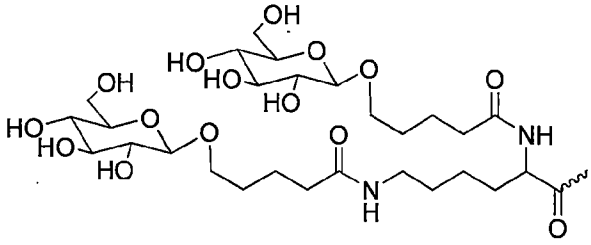
式 XVI，



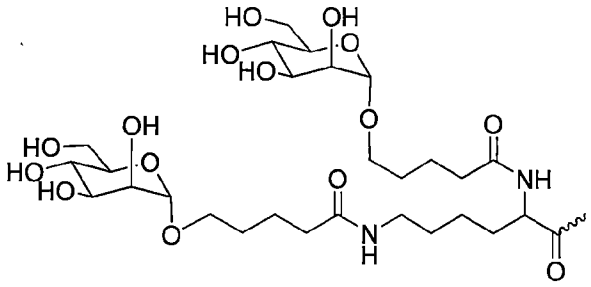
式 XVII，



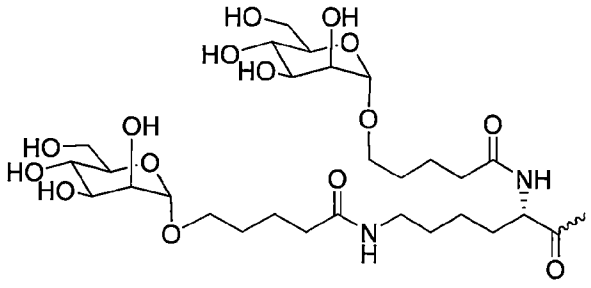
式 XVIII，



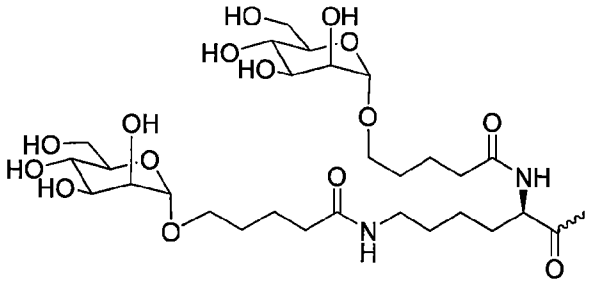
式 XIX，



式 XX，

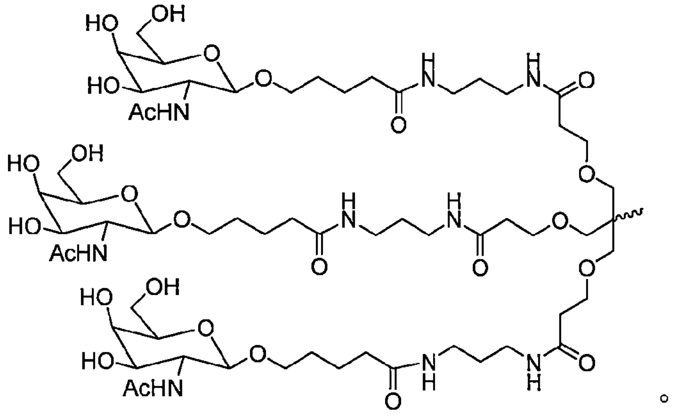


式 XXI，



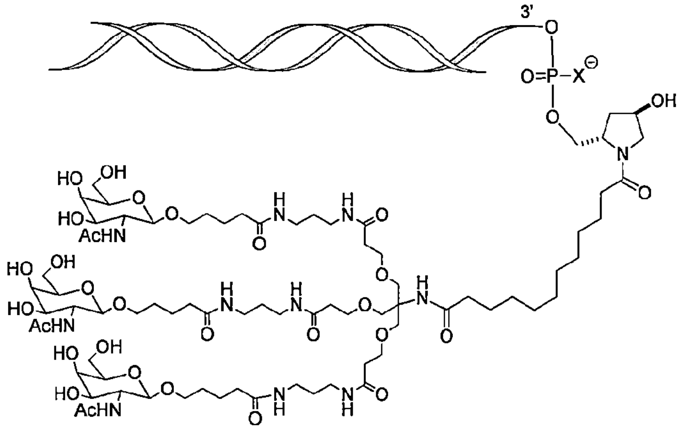
式 XXII。

【0398】 一項實施例中，該GalNAc或GalNAc衍生物為GalNAc$_3$：



。

【0399】 有些實施例中，該配體(例如，GalNAc配體)係附接該RNAi劑之3'端。一項實施例中，該RNAi劑係接合至配體，例如，如下方案所示接合至GalNAc配體。



【0400】 其中X為O或S。一項實施例中，X為O。

【0401】 本發明RNAi劑可與許多不同部份基團偶聯。較佳部份基團為直接偶聯或利用穿插之系鏈間接偶聯(較佳係共價偶聯)之配體。

【0402】 較佳實施例中，引進配體後會改變該分子

之分佈、靶向或壽命。較佳實施例中，例如，相較於沒有此等配體之物種，該等配體可加強對所選定標靶(例如，對分子、細胞或細胞型態、隔室、受體(例如，細胞或器官隔室)、組織、器官或身體區域)之親和力。對選定之標靶具有加強親和力之配體亦稱為靶向配體。

【0403】 有些配體具有核內體裂解性質。該核內體裂解性配體會促進核內體溶解及/或從核內體轉運本發明組成物或其組份至細胞之細胞質中。核內體裂解性配體可為顯示 pH-依賴性膜活性與基因融合性之聚陰離子性肽或肽擬似物。一項實施例中，核內體裂解性配體在核內體 pH 下呈現其活性構形。「活性」構形為其中核內體裂解性配體促進核內體溶解及/或從核內體轉運本發明組成物或其組份至細胞之細胞質中之構形。核內體裂解性配體實例包括 GALA 肽(Subbarao 等人之 *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972)、EALA 肽(Vogel 等人之 *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586)、與其衍生物(Turk 等人之 *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68)。一項實施例中，核內體裂解性組份可包含可以隨 pH 變化而改變價數或質子化之化學基團(例如，胺基酸)。核內體裂解性組份可為線性或分支。

【0404】 配體可改善所產生天然或經修飾寡核糖核苷酸、或包含本文所說明單體之任何組合與/或天然或經修飾核糖核苷酸之聚合分子之轉運、雜交、與專一性，且亦可改善核酸酶抗性。

【0405】 配體通常可包括醫療修飾劑，例如，加強吸收；診斷性化合物或報導子基團，例如，用於偵測分佈；交聯劑；及賦予核酸酶抗性之部份基團。其一般實例包括脂質、類固醇、維生素、糖類、蛋白質、肽類、多胺類、與肽擬似物。

【0406】 配體可包括天然物質，如蛋白質(例如，人類血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、或球蛋白)；碳水化合物(例如，葡聚糖、普藍多醣(pullulan)、幾丁質、幾丁聚醣、菊糖、環糊精、或玻尿酸)；或脂質。配體亦可為重組或合成性分子，如合成性聚合物，例如，合成性聚胺基酸、寡核苷酸(例如，適體)。聚胺基酸實例包括聚離胺酸(PLL)、聚L-天冬胺酸、聚L-麩胺酸等聚胺基酸；苯乙烯-馬來酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-馬來酸酐共聚物、N-(2-羥基丙基)甲基丙烯基醯胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚胺基甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-異丙基丙烯基醯胺聚合物、或聚磷腈。多元胺實例包括：聚乙烯亞胺、聚離胺酸(PLL)、精胺、精脒、多胺、偽肽-多胺、肽擬似性多胺、樹枝狀多胺、精胺酸、脒、魚精蛋白、陽離子性脂質、陽離子性紫質、多胺之四級鹽、或α螺旋肽。

【0407】 配體亦可包括靶向基團，例如，靶向細胞或組織之製劑，例如，凝集素、醣蛋白、脂質或蛋白質，例如，結合特定細胞型態(如腎臟細胞)之抗體。靶向基團

可為促甲狀腺激素、促黑激素、凝集素、醣蛋白、表面活性蛋白質 A、黏蛋白碳水化合物、多價乳糖、多價半乳糖、N-乙醯基-半乳糖胺、N-乙醯基-葡萄糖胺、多價甘露糖、多價岩藻糖、糖基化聚胺基酸、多價半乳糖、轉鐵蛋白、雙膦酸鹽、聚麩胺酸、聚天冬胺酸、脂質、膽固醇、類固醇、膽汁酸、葉酸鹽、維生素 B12、生物素、RGD 肽、RGD 肽擬似物或適體。

【0408】 其他配體實例包括染劑、螯合劑(例如，吖啶類)、交聯劑(例如，補骨脂內酯、絲裂黴素 C)、紫質(TPPC4、德卟啉(texaphyrin)、噻啉(Sapphyrin))、多環狀芳香烴(例如，吩吡、二氫吩吡)、人造內切核酸酶或螯合劑(例如，EDTA)、親脂性分子(例如，膽固醇、膽酸、金剛烷乙酸、1-芘丁酸、雙氫睾酮、1,3-雙-O(十六碳烷基)甘油、香葉草基氧己基、十六碳烷基甘油、龍腦、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七碳烷基、棕櫚酸、肉豆蔻酸、O3-(油基)石膽酸、O3-(油基)膽烯酸、二甲氧基三苯甲基、或吩吡)與肽接合物(例如，觸足肽(antennopedia)、Tat 肽)、烷化劑、磷酸鹽、胺基、氫硫基、PEG(例如，PEG-40K)、MPEG、$[MPEG]_2$、聚胺基、烷基、經取代之烷基、標記放射性之標記物、酵素、半抗原(例如，生物素)、轉運/吸收促進劑(例如，阿斯匹靈、維生素 E、葉酸)、合成性核糖核酸酶(例如，咪唑、雙咪唑、組織胺、咪唑簇集物、吖啶-咪唑接合物、Eu3+ 四氮雜大環複合物)、二硝

基苯基、HRP、或 AP。

【0409】 配體可為蛋白質(例如，醣蛋白)、或肽(例如，對輔配體具有專一親和性之分子)、或抗體(例如，結合特異化細胞型態(如：癌細胞、內皮細胞、或骨細胞)之抗體)。配體亦可包括激素與激素受體。其亦可包括非肽物質，如脂質、凝集素、碳水化合物、維生素、輔因子、多價乳糖、多價半乳糖、N-乙醯基-半乳糖胺、N-乙醯基-葡萄糖胺、多價甘露糖、或多價岩藻糖。配體可為例如，脂多醣、p38 MAP 激酶之活化劑、或 NF-κB 之活化劑。

【0410】 配體可為例如藥物之促進細胞吸收 iRNA 劑之物質，藉由例如，破壞細胞之細胞骨架，例如，破壞細胞之微小管、微絲、與/或中間絲。該藥物可為例如，紫杉醇(taxon)、長春新鹼(vincristine)、長春花鹼(vinblastine)、細胞鬆弛素(cytochalasin)、諾考達唑(nocodazole)、促進微絲聚合劑(japlakinolide)、微絲解聚劑(latrunculin A)、毒傘素(phalloidin)、紅海海綿抗菌素(swinholide A)、茚酮衍生物(indanocine)、或邁爾素(myoservin)。

【0411】 配體可藉由例如，活化發炎反應，提高細胞吸收寡核苷酸。具有此等效力之配體實例包括腫瘤壞死因子 α(TNFα)、間白素-1β、或 γ 干擾素。

【0412】 一項態樣中，配體為脂質或基於脂質之分子。此等脂質或基於脂質之分子較佳係與血清蛋白質，例

如，人類血清白蛋白(HSA)結合。HSA結合性配體可以讓接合物分佈在標靶組織，例如，身體之非腎臟標靶組織。例如，該標靶組織可為肝臟，包括肝之實質細胞。其他可結合HSA之分子亦可作為配體使用。例如，可使用納普生(naproxen)或阿斯匹靈。脂質或基於脂質配體可以(a)提高接合物對降解之抗性，(b)提高靶向或轉運至標靶細胞或細胞膜，及/或(c)可用於調整與血清蛋白質(例如，HSA)之結合性。

【0413】 基於脂質之配體可用於調節(例如，調控)接合物與標靶組織之結合性。例如，脂質或基於脂質之配體與HSA之結合性越強時，越不容易靶向腎臟，因此越不容易從身體清除。可使用與HSA之結合性較低之脂質或基於脂質配體，讓該接合物靶向腎臟。

【0414】 一項較佳實施例中，該基於脂質之配體結合HSA。較佳係其與HSA具有充份親和性，以使該接合物較佳分佈至非腎臟組織。然而，該親和性最好不會太強導致無法逆轉HSA-配體結合性。

【0415】 另一項較佳實施例中，該基於脂質配體與HSA之親和性弱或完全沒有親和性，因此該接合物將會優先分佈至腎臟。除了基於脂質之配體外，亦可改用或額外使用其他靶向腎臟細胞之部份基團。

【0416】 另一項態樣中，該配體為部份基團，例如，維生素，其可被標靶細胞(例如，增生細胞)吸收。其等特別適用於治療特徵在於不期望之細胞增生之疾患，例

如，惡性或非惡性型，例如，癌細胞。維生素實例包括維生素 A、E、與 K。其他維生素實例包括維生素 B 群，例如，葉酸、B12、核黃素、生物素、吡哆醛或其他維生素或可被癌細胞吸收之營養素。亦包括 HSA、低密度脂蛋白(LDL)與高密度脂蛋白(HDL)。

【0417】 另一項態樣中，該配體為細胞滲透劑，較佳為螺旋細胞滲透劑。該製劑較佳為兩親性。該製劑實例為肽，如 tat 或觸足肽。若該製劑為肽時，其可經修飾，包括肽基擬似物、反轉異構體、非肽或偽肽連接體，及使用 D-胺基酸。該螺旋劑較佳為 α-螺旋劑，其較佳具有親脂相與疏脂相。

【0418】 配體可為肽或肽擬似物。肽擬似物(本文亦稱為寡肽擬似物)為可以折疊成類似天然肽之限定三度空間結構之分子。該肽或肽擬似部份基團之長度可為約 5 至 50 個胺基酸，例如，長度約 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 個胺基酸。該肽或肽擬似物可為例如，細胞滲透肽、陽離子性肽、兩親性肽、或疏水性肽(例如，主要由 Tyr、Trp 或 Phe 組成)。肽部份基團可為樹枝狀肽、限定構象肽或交鏈肽。或者，肽部份基團可包括疏水性膜轉送序列(MTS)。含疏水性 MTS 之肽實例為具有胺基酸序列 AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO：9) 之 RFGF。包含疏水性 MTS 之 RFGF 類似物(例如，胺基酸序列 AALLPVLLAAP (SEQ ID NO：10))亦可作為靶向部份基團。該肽部份基團可為「傳

遞」肽，其可攜帶大型極性分子(包括肽、寡核苷酸與蛋白質)穿越細胞膜。已發現例如，衍生自 HIV Tat 蛋白質((GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO：11))與果蠅觸足肽(Drosophila antennapedia)蛋白質(RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO：12))之序列具有作為傳遞肽之功能。肽或肽擬似物可由 DNA 之隨機序列編碼，如從噬菌體展示庫或一珠一化合物(one-bead-one-compound(OBOC))組合庫(Lam 等人，*Nature*, 354：82-84, 1991)中判別之肽。藉由引進之單體單位與 dsRNA 劑進行系鏈之較佳肽或肽擬似物為靶向細胞之肽，如精胺酸-甘胺酸-天冬胺酸(RGD)-肽、或 RGD 擬似物。肽部份基團之長度範圍可為約 5 個胺基酸至約 40 個胺基酸。該肽部份基團具有之結構修飾可提高穩定性或主導構形性質。可採用下文說明之任何結構修飾。可採用 RGD 肽部份基團靶向腫瘤細胞，如內皮腫瘤細胞或乳癌腫瘤細胞(Zitzmann 等人之 *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002)。RGD 肽可促進 iRNA 劑靶向各種不同其他組織之腫瘤，包括肺、腎臟、脾、或肝臟(Aoki 等人之 *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001)。較佳係該 RGD 肽促進 iRNA 劑靶向腎臟。該 RGD 肽可為線性或環狀，且可經過修飾，例如，糖基化或甲基化，以促進靶向特定組織。例如，糖基化 RGD 肽可以傳送 iRNA 劑至表現 $\alpha_V\beta_3$ 之腫瘤細胞(Haubner 等人之 *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001)。可採

用靶向富集在增生細胞中之標記物之肽。例如，包含RGD之肽與肽擬似物可靶向癌細胞，特定言之具有整合素之細胞。因此可使用RGD肽、包含RGD之環狀肽、包括D-胺基酸之RGD肽，及合成性RGD擬似物。除了RGD外，尚可使用靶向整合素配體之其他部份基團。通常可使用此等配體來調控增生之細胞與血管新生作用。這種配體之較佳接合物係靶向PECAM-1、VEGF或其他癌基因，例如，本文說明之癌基因。

【0419】「細胞滲透性肽」可以通透細胞，例如，微生物細胞，如細菌或真菌細胞，或哺乳動物細胞，如人類細胞。可通透微生物細胞之肽可為例如，α-螺旋線性肽(例如，LL-37或Ceropin P1)、包含二硫鍵之肽(例如，α-防禦素(defensin)、β-防禦素或制菌肽(bactenecin))，或僅包含一個或兩個主要胺基酸之肽(例如，PR-39或吲哚抗生肽(indolicidin))。細胞滲透性肽亦可包括核定位訊號(NLS)。例如，細胞滲透性肽可為二部組合之兩親性肽，如MPG，其係衍生自HIV-1 gp41與SV40大型T抗原之NLS之稠合肽功能域(Simeoni等人之Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003)。

【0420】一項實施例中，靶向肽可為兩親性α-螺旋肽。兩親性α-螺旋肽實例包括(但不限於)，天蠶素(cecropins)、鳥蛛毒素(lycotoxins)、鰈魚肽(paradaxins)、蟾蜍抗菌肽(buforin)、CPF、鈴蟾抗

菌肽樣(bombinin-like)肽(BLP)、青環海蛇抗菌肽(cathelicidins)、地中海蠟實蠅抗菌肽(ceratotoxins)、柄海鞘(S. clava)肽、盲鰻腸抗微生物肽(HFIAP)、爪蟾抗菌肽(magainines)、東方蛙抗菌肽(brevinins)-2、樹蛙抗菌肽(dermaseptins)、蜂毒肽(melittins)、比目魚抗菌肽(pleurocidin)、H_2A肽、爪蟾(Xenopus)肽、抗菌肽(esculentinis)-1、與澳洲蛙活性肽(caerins)。有許多因子被視為較適合維持螺旋完整穩定性。例如，將利用最大螺旋穩定殘基數(例如，leu、ala、或 lys)，及利用最小螺旋失穩殘基數(例如，脯胺酸或環狀單體單位)。可考慮使用封端殘基(例如，Gly 為 N-封端殘基實例)與/或 C-末端醯胺化來提供額外 H-鍵，以穩定螺旋。帶相反電價且分隔 i ± 3 或 i ± 4-位置之殘基之間所形成之鹽橋基可提供穩定性。例如，陽離子性殘基(如離胺酸、精胺酸、高碳精胺酸、鳥胺酸或組胺酸)可與陰離子殘基(如麩胺酸或天冬胺酸)形成鹽橋基。

【0421】 肽與肽擬似物配體包括彼等具有天然肽或經修飾肽者，例如，D 或 L 肽；α、β 或 γ 肽；N-甲基肽；氮雜肽；有一個或多個醯胺連接體(亦即肽連接體)被一個或多個脲、硫脲、胺甲酸酯或磺醯脲連接體置換之肽；或環狀肽。

【0422】 靶向配體可為任何可以靶向特定受體之配體。其實例為葉酸鹽、GalNAc、半乳糖、甘露糖、甘露

糖-6P、糖聚集物，如 GalNAc 聚集物、甘露糖聚集物、半乳糖聚集物、或適體。聚集物為兩個或多個糖單位之組合。靶向配體亦包括整合素受體配體、趨化激素受體配體、轉鐵蛋白、生物素、血清素受體配體、PSMA、內皮肽、GCPII、體抑素、LDL 與 HDL 配體。配體亦可以核酸為基礎，例如，適體。適體可未經修飾或具有本文所揭示之任何修飾組合。

【0423】 核內體釋放劑包括咪唑類、聚咪唑或寡咪唑、PEI、肽、基因融合肽、聚羧酸酯、聚陽離子劑、遮蔽之寡或聚陽離子或陰離子、縮醛、聚縮醛、縮酮/聚縮酮、原酸酯、帶有遮蔽或未遮蔽陽離子或陰離子電價之聚合物、帶有遮蔽或未遮蔽陽離子或陰離子電價之樹枝狀聚合物。

【0424】 PK 調節劑代表藥動力學調節劑。PK 調節劑包括親脂物、膽汁酸、類固醇、磷脂類似物、肽、蛋白質結合劑、PEG、維生素等等。PK 調節劑實例包括(但不限於)，膽固醇、脂肪酸、膽酸、石膽酸、二烷基甘油酯、二醯基甘油酯、磷脂、鞘脂質、納普生(naproxen)、異布洛芬(ibuprofen)、維生素 E、生物素等等。包含許多硫代磷酸酯鍵聯之寡核苷酸亦已知與血清蛋白質結合，因此在主幹中包含多個硫代磷酸酯鍵聯之短寡核苷酸，例如，約 5 個鹼基、10 個鹼基、15 個鹼基或 20 個鹼基之寡核苷酸亦適合作為本發明之配體(例如，作為 PK 調節配體)。

【0425】 此外，會結合血清組份(例如，血清蛋白質)之適體亦適合作為本發明之 PK 調節配體。

【0426】 其他適合本發明之配體接合物說明於美國專利申請案 USSN：10/916,185，申請日 2004 年 8 月 10 日；USSN：10/946,873，申請日 2004 年 9 月 21 日；USSN：10/833,934，申請日 2007 年 8 月 3 日；USSN：11/115,989，申請日 2005 年 4 月 27 日及 USSN：11/944,227，申請日 2007 年 11 月 21 日，其揭示內容已基於所有目的以引用之方式完全併入本文中。

【0427】 當存在兩個或多個配體時，配體可均具有相同性質、均具有不同性質、或有些配體具有相同性質而其他則具有不同性質。例如，配體可具有靶向性質、具有核內體裂解活性或具有 PK 調節性質。較佳實施例中，所有配體均具有不同性質。

【0428】 配體可在不同位置偶聯寡核苷酸，例如，3'-端、5'-端、與/或內部位置。較佳實施例中，該配體係利用穿插之系鏈(例如，本文說明之載劑)附接寡核苷酸。當引進單體納入加長中之股中時，該配體或系鏈配體可能出現在單體上。有些實施例中，該配體可在「前體」單體已納入生長中之股中後，藉由偶聯「前體」單體而納入。例如，具有例如，胺基末端系鏈(亦即沒有結合配體)之單體，例如，TAP-$(CH_2)_nNH_2$ 即可進入生長中之寡核苷酸股中。隨後之操作中，亦即在前體單體納入股中後，具有親電子基(例如，五氟苯基酯或醛基)之配體隨即

可藉由配體之親電子基而與前體單體之系鏈之末端親核性基團偶聯，來附接前體單體。

【0429】 另一項實例中，可引進具有適合參與克里克(Click)化學反應之化學基團之單體，例如，以疊氮化物或炔為末端之系鏈/連接基。隨後操作中，亦即在前體單體納入股中後，具有互補化學基團(例如，炔或疊氮化物)之配體可藉由共同偶聯炔與疊氮化物來附接前體單體。

【0430】 針對雙股寡核苷酸，配體可附接一股或雙股。有些實施例中，雙股 iRNA 劑包含接合正義股之配體。其他實施例中，雙股 iRNA 劑包含接合反義股之配體。

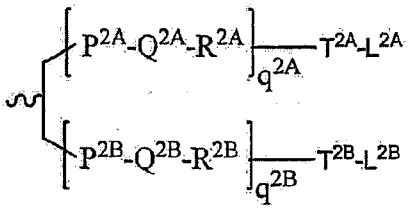
【0431】 有些實施例中，配體可接合核鹼基、糖部份基團、或核酸分子之核苷之間連接體。與嘌呤核鹼基或其衍生物之接合可能發生在任何位置，包括環內與環外原子。有些實施例中，嘌呤核鹼基之 2-、6-、7-或 8-位置係附接接合物部份基團。與嘧啶核鹼基或其衍生物之接合可能發生在任何位置。有些實施例中，嘧啶核鹼基之 2-、5-、與 6-位置可經接合物部份基團取代。與核苷之糖部份基團之接合可能發生在任何位置。可附接接合物部份基團之糖部份基團之碳原子實例包括 2’、3’、與 5’碳原子。1’-位置亦可附接接合物部份基團，如無鹼基殘基。核苷之間連接體亦可帶有接合物部份基團。針對含磷之連接體(例如，磷二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、

胺基磷酸酯等等)，接合物部份基團可以直接附接磷原子或已與磷原子鍵結之 O、N 或 S 原子。針對含胺或醯胺之核苷之間連接體(例如，PNA)，該接合物部份基團可附接胺或醯胺之氮原子或附接相鄰碳原子。

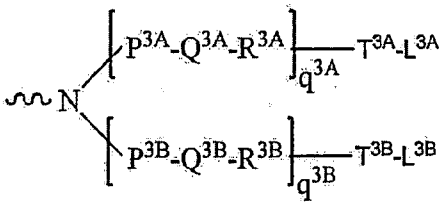
【0432】 RNA 干擾領域中任何合適之配體均可使用，但配體通常為碳水化合物，例如，單糖(如 GalNAc)、雙醣、參醣、肆醣、多醣。

【0433】 接合配體與核酸之連接基包括彼等如上述者。例如，該配體可為一或多種利用單價、二價或三價之分支連接基附接之 GalNAc (*N*-乙醯基葡糖胺)衍生物。

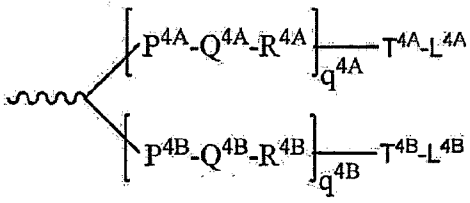
【0434】 一項實施例中，本發明 dsRNA 係接合二價與三價之分支連接基，包括式(IV) – (VII)中任一式所示之結構：



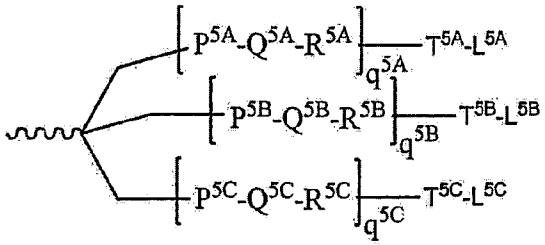
式 (IV)，



式 (V)，



式 (VI)，或



式 (VII)；

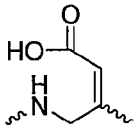
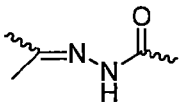
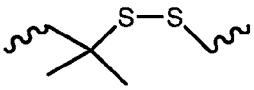
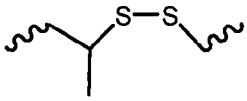
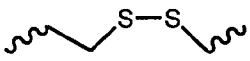
【0435】 其中：

【0436】 q^{2A}、q^{2B}、q^{3A}、q^{3B}、q^{4A}、q^{4B}、q^{5A}、q^{5B} 及 q^{5C} 每次出現時分別獨立代表 0 至 20，且

其中重複單位可相同或相異，

【0437】 P^{2A}、P^{2B}、P^{3A}、P^{3B}、P^{4A}、P^{4B}、P^{5A}、P^{5B}、P^{5C}、T^{2A}、T^{2B}、T^{3A}、T^{3B}、T^{4A}、T^{4B}、T^{4A}、T^{5B}、T^{5C} 每次出現時分別獨立為不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH_2、CH_2NH 或 CH_2O；

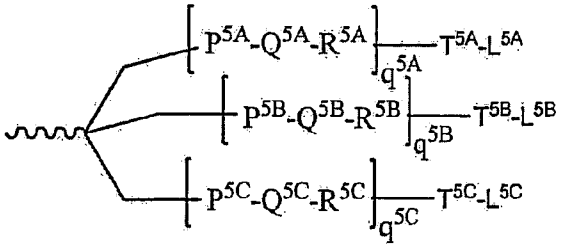
【0438】 Q^{2A}、Q^{2B}、Q^{3A}、Q^{3B}、Q^{4A}、Q^{4B}、Q^{5A}、Q^{5B}、Q^{5C} 每次出現時分別獨立為不存在、伸烷基、經取代之伸烷基(其中一個或多個亞甲基可藉由一個或多個 O、S、S(O)、SO_2、$N(R^N)$、C(R')=C(R'')、C≡C 或 C(O) 穿插或在末端；

【0439】 R^{2A}、R^{2B}、R^{3A}、R^{3B}、R^{4A}、R^{4B}、R^{5A}、R^{5B}、R^{5C} 每次出現時分別獨立為不存在、NH、O、S、CH_2、C(O)O、C(O)NH、$NHCH(R^a)C(O)$、$-C(O)-CH(R^a)-NH-$、CO、CH=N-O、  、  、  、  ，  或雜環基；

【0440】 L^{2A}、L^{2B}、L^{3A}、L^{3B}、L^{4A}、L^{4B}、L^{5A}、L^{5B} 及 L^{5C} 代表配體；亦即每次出現時分別獨立為單糖(如：GalNAc)、雙醣、參醣、肆醣、寡醣或多醣；及

【0441】 R^a 為 H 或胺基酸側鏈。

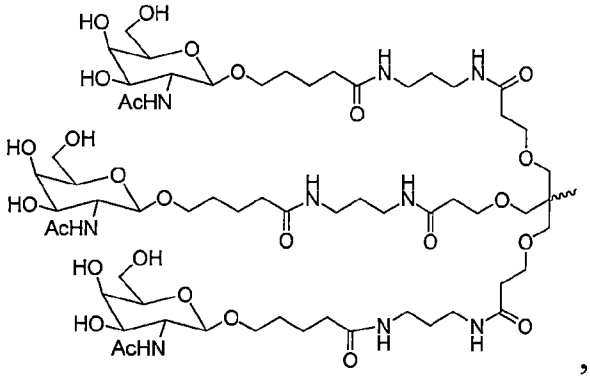
【0442】 三價接合 GalNAc 衍生物特別適用於 RNAi 劑，供抑制標靶基因之表現，如彼等如式(VII)者：



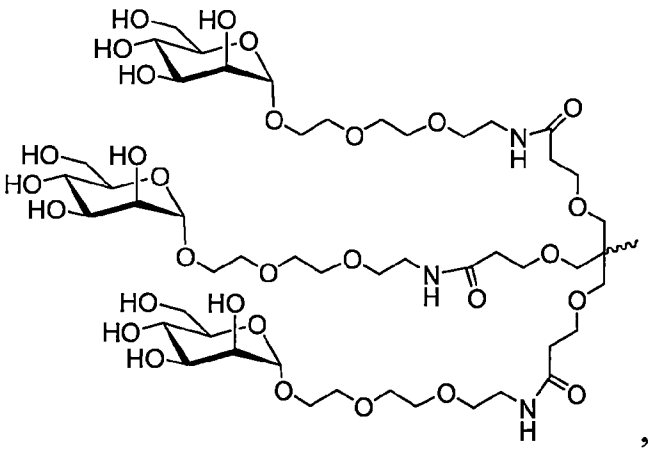
式 (VII)

【0443】 其中 L^{5A}、L^{5B} 及 L^{5C} 代表單糖，如 GalNAc 衍生物。

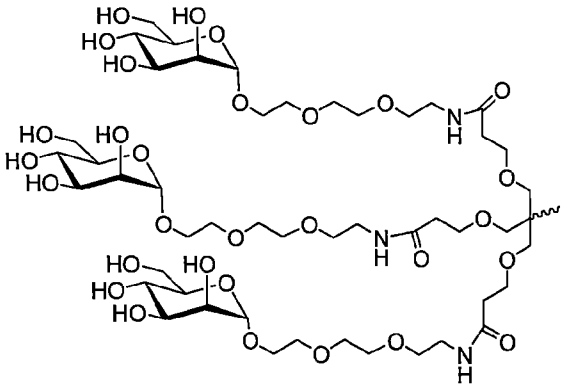
【0444】 接合 GalNAc 衍生物之合適二價與三價之分支連接基實例包括(但不限於)下列化合物：



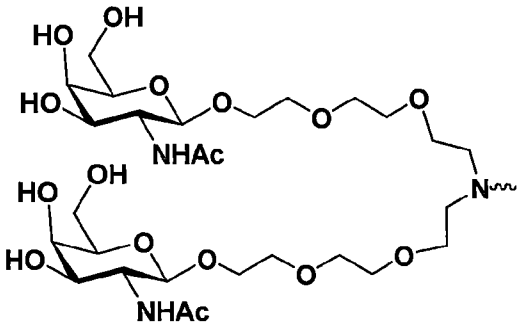
,



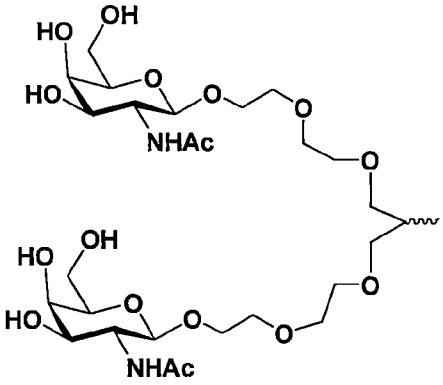
,



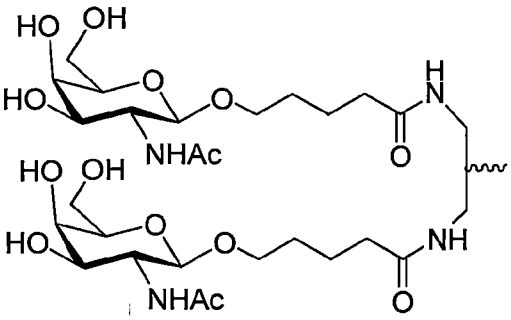
,



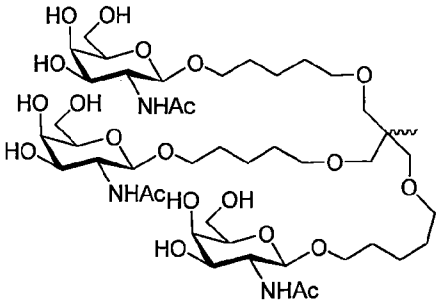
,

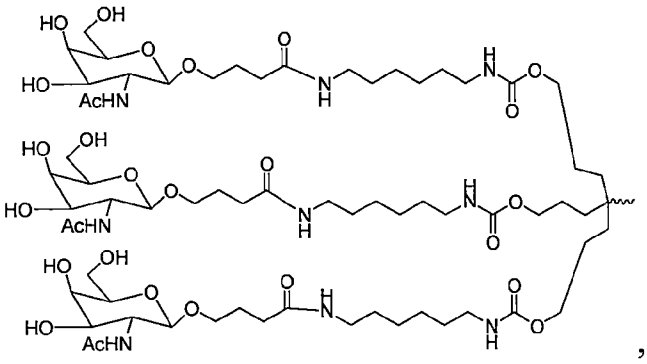


,

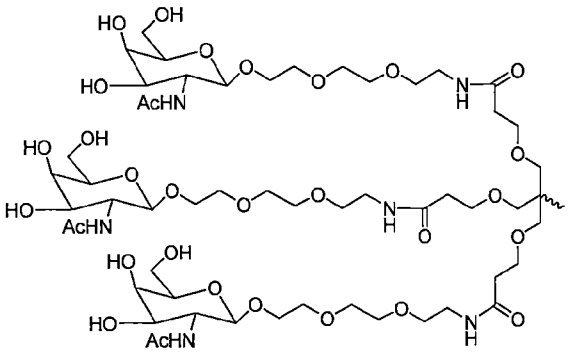


,

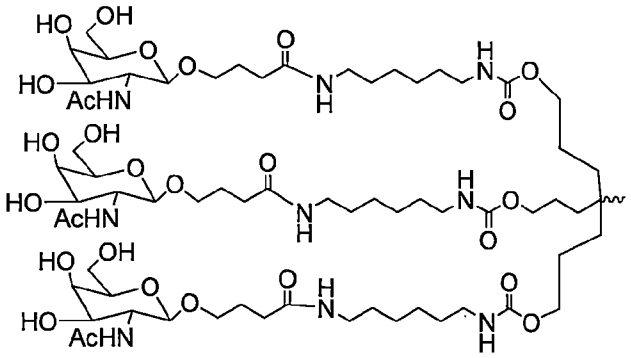




，



，或



。

【0445】教示 RNA 接合物製法之代表性美國專利案包括(但不限於)，美國專利案案號 4,828,979；4,948,882；5,218,105；5,525,465；5,541,313；5,545,730；5,552,538；5,578,717, 5,580,731；5,591,584；5,109,124；5,118,802；5,138,045；5,414,077；5,486,603；5,512,439；5,578,718；5,608,046；

4,587,044；4,605,735；4,667,025；4,762,779；4,789,737；4,824,941；4,835,263；4,876,335；4,904,582；4,958,013；5,082,830；5,112,963；5,214,136；5,082,830；5,112,963；5,214,136；5,245,022；5,254,469；5,258,506；5,262,536；5,272,250；5,292,873；5,317,098；5,371,241, 5,391,723；5,416,203, 5,451,463；5,510,475；5,512,667；5,514,785；5,565,552；5,567,810；5,574,142；5,585,481；5,587,371；5,595,726；5,597,696；5,599,923；5,599,928 與 5,688,941；6,294,664；6,320,017；6,576,752；6,783,931；6,900,297；7,037,646；8,106,022，上述各文獻之完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0446】 上述化合物不一定所有位置均經一致修飾，事實上可在單一化合物中或甚至在 iRNA 中之單一核苷引進超過一個上述修飾。本發明亦包括呈嵌合化合物之 iRNA 化合物。

【0447】 本發明內容中，「嵌合」iRNA 化合物或「嵌合體」為包含兩個或更多個化學上獨立區之 iRNA 化合物，較佳為 dsRNA，該各區分別由至少一個單體單位組成，亦即以 dsRNA 化合物為例，為由核苷酸組成。此等 iRNA 通常包含至少一個區，其中 RNA 係經修飾，以致提高 iRNA 對抗核酸酶降解之抗性，提高細胞吸收性，及/或提高對標靶核酸之結合親和性。iRNA 之額外一區可作為可

以裂解 RNA：DNA 或 RNA：RNA 雜交體之酵素之受質。例如，RNase H 為細胞內切核酸酶，其裂解 RNA：DNA 雙螺旋之 RNA 股。因此活化 RNase H 造成裂解 RNA 標靶，藉以大幅加強 iRNA 抑制基因表現之效力。結果，當採用嵌合性 dsRNA 時，經常可以採用較短之 iRNA 得到類似硫代磷酸酯去氧 dsRNA 與相同標靶區雜交後得到之結果。RNA 標靶之裂解作用照例可採用凝膠電泳分析法檢測，且若必要時，可聯合採用相關技藝上已知之核酸雜交技術。

【0448】 某些例子中，iRNA 之 RNA 可經過非配體基團修飾。許多種非配體分子已與 iRNA 接合，以加強 iRNA 之活性、細胞分佈性或細胞吸收性，且進行此等接合法之程序可從科學文獻中取得。此等非配體部份基團包括脂質部份基團，如膽固醇(Kubo, T.等人，*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1)：54-61；Letsinger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86：6553)、膽酸(Manoharan 等人，*Biorg. Med. Chem. Let.*, 1994, 4：1053)、硫醚，例如，己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan 等人，*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660：306；Manoharan 等人，*Biorg. Med. Chem. Let.*, 1993, 3：2765)、硫膽固醇(Oberhauser 等人，*Nucl. Acids Res.*, 1992, 20：533)、脂系鏈，例如，十二碳烷二醇或十一碳烷基(Saison-Behmoaras 等人，*EMBO J*, 1991, 10：1111；Kabanov 等人，*FEBS Lett.*, 1990, 259：327；Svinarchuk 等人，*Biochimie*, 1993, 75：49)、磷脂，

例如，二-十六碳烷-消旋性-甘油或 1,2-二-O-十六碳烷基-消旋性-甘油基-3-H-膦酸三乙基銨鹽(Manoharan 等人，*Tetrahedron Lett.*, 1995, 36：3651；Shea 等人，*Nucl. Acids Res.*, 1990, 18：3777)、多胺或聚乙二醇鏈(Manoharan 等人，*Nuclosides & Nuclotides*, 1995, 14：969)、或金剛烷乙酸(Manoharan 等人，*Tetrahedron Lett.*, 1995, 36：3651)、棕櫚基部份基團(Mishra 等人，*Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264：229)、或十八碳烷基胺或己基胺基-羰基氧-膽固醇部份基團(Crooke 等人，J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277：923)。教示此等 RNA 接合物製法之代表性美國專利案已如上述。典型接合法程序涉及在序列之一個或多個位置帶有胺基連接基之 RNA 之合成法。該胺基再與準備接合之分子採用適當偶聯或活化試劑反應。該接合反應可在 RNA 仍結合在固態擔體時進行或可在裂解 RNA 後，在溶液相中進行。採用 HPLC 法純化 RNA 接合物，通常產生純接合物。

【0449】 有些實施例中，本發明雙股 RNAi 劑為 AT3SC-001 (AD-57213)。

【0450】

VI. 本發明 iRNA 之傳遞法

可採用許多不同方式傳遞本發明 iRNA 至細胞中，例如，個體(如：人類個體，例如，有此需要之個體，如患有出血疾患之個體)之細胞。例如，可能藉由細胞與本發明 iRNA 於活體外或活體內接觸，進行傳遞。亦可直接投與包含

iRNA(例如，dsRNA)之組成物給個體，進行活體內傳遞法。或者，可能間接投與編碼並主導 iRNA 表現之一或多種載體，進行活體內傳遞。此等替代法更進一步於下文中說明。

【0451】 通常，本發明 iRNA 可採用任何傳遞核酸分子之方法(活體外或活體內)(參見例如，Akhtar S.與 Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 與 WO94/02595，其等完整內容已以引用方式併入本文中)。用於活體內傳遞時，要傳遞 iRNA 分子之考量因素包括例如，所傳遞分子之生物穩定性、預防所傳遞分子在標靶組織中之非特異性效應及累積。可藉由局部投藥法使 iRNA 之非特異性效應降至最低，例如，採用直接注射或植入組織中或局部投與製劑。局部投藥至治療位點時，可使該製劑達最大局部濃度，限制該製劑曝露在可能會受到製劑傷害且使製劑降解之全身組織，並可以降低 iRNA 分子之總投藥劑量。數項研究已顯示，當局部投與 iRNA 時，可成功減弱基因產物。例如，在彌猴(cynomolgus monkeys)玻璃體內注射(Tolentino, MJ.等人(2004) *Retina* 24：132-138)及在小鼠視網膜下注射(Reich, SJ.等人(2003) *Mol. Vis.* 9：210-216)，以經眼內傳遞 VEGF dsRNA 時，均顯示可在老年性黃斑部病變之實驗模式中預防新血管形成。此外，直接在小鼠腫瘤內注射 dsRNA 時，可縮小腫瘤體積(Pille, J.等人(2005) *Mol. Ther.*11：267-274)，並可延長帶腫瘤小鼠之壽命(Kim, WJ.等人(2006) *Mol. Ther.* 14：343-

350；Li, S.等人(2007) *Mol. Ther.* 15：515-523)。RNA 干擾法亦已顯示可藉由直接注射法成功局部傳遞至 CNS(Dorn, G., 等人(2004) *Nucleic Acids* 32：e49；Tan, PH.等人(2005)*Gene Ther.* 12：59-66；Makimura, H.等人(2002) *BMC Neurosci.* 3：18；Shishkina, GT.等人(2004) *Neuroscience* 129：521-528；Thakker, ER.等人(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101：17270-17275；Akaneya,Y.等人(2005) *J. Neurophysiol.* 93：594-602)及藉由鼻內投藥法投與肺部(Howard, KA.等人(2006) *Mol. Ther.* 14：476-484；Zhang, X.等人(2004) *J. Biol. Chem.* 279：10677-10684；Bitko, V.等人(2005) *Nat. Med.* 11：50-55)。全身投與 iRNA 以治療疾病時，RNA 可經修飾或改用藥物傳遞系統傳遞；這兩種方法均可預防 dsRNA 於活體內被內切-與外切-核酸酶快速降解。修飾 RNA 或醫藥載劑亦可讓 iRNA 組成物靶向標靶組織，並避免不期望之脫靶效應。iRNA 分子可採用化學法接合親脂性基團(如膽固醇)進行修飾，以加強細胞吸收並預防降解。例如，由主導對抗 ApoB 之 iRNA 與親脂性膽固醇部份基團之接合物全身注射至小鼠，結果減弱肝與空腸中之 apoB mRNA(Soutschek, J.等人(2004) *Nature* 432：173-178)。iRNA 與適體之接合物已在小鼠攝護腺癌模式中顯示可抑制腫瘤生長，並介導腫瘤消退(McNamara, JO.等人(2006) *Nat. Biotechnol.* 24：1005-1015)。另一項實施例，可使用藥物傳遞系統(如

奈米粒子、樹枝狀物、聚合物、脂質體或陽離子性傳遞系統)傳遞 iRNA。帶正電荷之陽離子性傳遞系統可促進 iRNA 分子(帶負電荷)之結合性，亦加強在帶負電荷之細胞膜之交互作用，讓細胞有效吸收 iRNA。陽離子性脂質、樹枝狀物、或聚合物可與 iRNA 結合，或誘發形成包埋 iRNA 之囊泡或微胞(參見例如，Kim SH.等人(2008) *Journal of Controlled Release* 129(2)：107-116)。形成囊泡或微胞可在全身投藥時進一步預防 iRNA 降解。製造及投與陽離子性- iRNA 複合物之方法係熟悉此相關技術者之能力範圍內(參見例如，Sorensen, DR.等人(2003) *J. Mol. Biol* 327：761-766；Verma, UN.等人(2003) Clin. *Cancer Res*. 9：1291-1300；Arnold, AS 等人(2007) *J. Hypertens*. 25：197-205，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中)。適用於全身性傳遞 iRNA 之藥物傳遞系統之有些非限制性實例包括 DOTAP(Sorensen, DR.等人(2003)，如上述文獻；Verma, UN.等人(2003)，如上述文獻)、寡染胺(Oligofectamine)、「固體核酸脂質粒子」(Zimmermann, TS.等人(2006) *Nature* 441：111-114)、心磷脂(cardiolipin)(Chien, PY.等人(2005) *Cancer Gene Ther*. 12：321-328；Pal, A.等人(2005) *Int J. Oncol*. 26：1087-1091)、聚乙烯亞胺(Bonnet ME.等人(2008) *Pharm. Res*. 8 月 16 日電子書(Epub ahead of print)；Aigner, A.(2006) *J. Biomed. Biotechnol*. 71659)、Arg-Gly-Asp(RGD)肽類(Liu,

S.(2006) *Mol. Pharm.* 3：472-487)、與聚醯胺基胺類(Tomalia, DA.等人(2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35：61-67；Yoo, H.等人(1999) *Pharm. Res.* 16：1799-1804)。有些實施例中，iRNA 與環糊精形成複合物，供全身性投藥。iRNA 與環糊精之投藥方法與醫藥組成物可參見美國專利案案號 7,427,605，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0452】

A.編碼本發明 iRNA 之載體

靶向 Serpinc1 基因之 iRNA 可由嵌入 DNA 或 RNA 載體中之轉錄單位表現(參見例如，Couture, A 等人 *TIG.(*1996), 12：5-10；Skillern, A.等人之國際 PCT 公開案案號 WO 00/22113、Conrad 之國際 PCT 公開案案號 WO 00/22114、與 Conrad 之美國專利案案號 6,054,299)。該表現可為過渡性(數小時至數週)或持續性(數週至數個月或更久)，依所採用之特定構築體與標靶組織或細胞型態而定。此等轉殖基因可呈線性構築體、環狀質體、或病毒載體引進，其可為整合或非整合載體。亦可構築該轉殖基因，使其得以呈染色體外質體遺傳(Gassmann 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA(*1995) 92：1292)。

【0453】 iRNA 之個別股或兩股可由表現載體之啟動子轉錄。當希望這兩個分開股可以表現產生例如，dsRNA 時，可以將兩個分開之表現載體共同引進(例如，轉染或感染)至標靶細胞中。或者，dsRNA 之各個別股可利用均位於

相同表現質體上之啟動子轉錄。一項實施例中，dsRNA 係呈利用連接基多核苷酸序列連接之反向重複序列多核苷酸表現，因此 dsRNA 具有莖與環結構。

【0454】 iRNA 表現載體通常為 DNA 質體或病毒載體。可採用可與真核生物細胞相容，較佳為彼等與脊椎動物細胞相容之表現載體來製造重組構築體，供表現本文所說明之 iRNA。真核生物細胞表現載體係相關技藝上習知，且可從許多商品來源取得。通常，所提供之此等載體包含合宜之限制酶切割位點，供嵌入所需之核酸節段。可經全身性傳遞 iRNA 表現載體，如經靜脈內或經肌內投藥、投藥至從患者取出之標靶細胞後再引進患者體內，或採用可以進入所需標靶細胞中之任何其他方式。

【0455】 iRNA 表現質體可與陽離子性脂質載劑(例如，寡染胺(Oligofectamine)或基於非陽離子性脂質之載劑(例如，Transit-TKO™)形成複合物轉染至標靶細胞。本發明範圍內亦包括持續一週或更久之多重脂質轉染法，供 iRNA 介導減弱靶向標靶 RNA 之不同區。可採用各種不同已知方法追蹤成功引進載體進入宿主細胞。例如，過渡轉染可以標記報導子為訊號，如螢光標記物，如綠色螢光蛋白質(GFP)。採用可讓轉染細胞對特定環境因子(例如，抗生素與藥物)具有抗性之標記物(如潮黴素 B(hygromycin B)抗性)來確認離體細胞之穩定轉染。

【0456】 本文所說明方法與組成物可利用之病毒載體系統包括(但不限於)，(a)腺病毒載體；(b)逆轉錄病毒載

體，包括(但不限於)，慢病毒(lentivirus)載體、莫洛尼氏白血病病毒(moloney murine leukemia virus)等等；(c)腺相關病毒載體；(d)單純皰疹病毒載體；(e) SV 40 載體；(f)多瘤病毒載體；(g)乳突病毒載體；(h)小核糖核酸病毒載體；(i)痘病毒載體，如正痘(orthopox)，例如，牛痘病毒載體或鳥痘，例如，金絲雀痘或禽痘；與(j)輔助病毒依賴性或無腸腺病毒。複製缺陷病毒亦有利。細胞基因組中不一定會引進不同載體。若需要時，該構築體可包括用於轉錄之病毒序列。或者，該構築體可引進可以進行附加體型複製之載體，例如，EPV 與 EBV 載體。用於 iRNA 之重組表現之構築體通常需要調節元素，例如，啟動子、加強子等等，以確保 iRNA 於標靶細胞中之表現。下文將進一步說明有關載體與構築體之其他態樣。

【0457】 有用於傳遞 iRNA 之載體包括足以在所需標靶細胞或組織中表現 iRNA 之調節元件(啟動子、加強子等等)。可選擇該等調節元件來提供組成性或調節/誘發性表現。

【0458】 可以例如，利用對某些生理調節劑(例如，循環葡萄糖含量或激素)敏感之誘發性調節序列準確調節 iRNA 之表現(Docherty 等人，1994, *FASEB J.* 8：20-24)。此等適用於細胞中或哺乳動物中調控 dsRNA 表現之誘發性表現系統包括例如，利用蛻皮激素、雌激素、黃體酮、四環素、二聚合之化學誘發劑、與異丙基-β-D1-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)之調節作用。熟悉此相關技術者將有能力依據

iRNA 轉殖基因之計畫用途選擇適當之調節/啟動子序列。

【0459】 可使用包含編碼 iRNA 之核酸序列之病毒載體。例如，可使用逆轉錄病毒載體(參見 Miller 等人，*Meth. Enzymol.* 217：581-599(1993))。此等逆轉錄病毒載體包含正確包裹病毒基因組並整合進入宿主細胞 DNA 時所必要之組份。選殖編碼 iRNA 之核酸序列進入一或多個載體中，促進傳遞核酸至患者中。有關逆轉錄病毒載體之更詳細說明可參見例如，Boesen 等人之 *Biotherapy* 6：291-302(1994)，其說明使用逆轉錄病毒載體傳遞 mdr1 基因至造血幹細胞，以便製造更能抵抗化療之幹細胞。其他說明逆轉錄病毒載體於基因療法中用途之參考文獻為：Clowes 等人，*J. Clin. Invest.* 93：644-651(1994)；Kiem 等人，*Blood* 83：1467-1473(1994)；Salmons 與 Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4：129-141(1993)；與 Grossman 與 Wilson, *Curr. Opin. In Genetics and Devel.* 3：110-114(1993)。計畫使用之慢病毒載體包括例如，美國專利案案號 6,143,520；5,665,557；與 5,981,276 所說明之基於 HIV 之載體，其揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0460】 亦計畫使用腺病毒來傳遞本發明 iRNA。腺病毒為特別值得注意之媒劑，例如，用於傳遞基因至呼吸上皮。腺病毒會自然感染呼吸上皮，在此造成輕度疾病。基於腺病毒之傳遞系統之其他標靶為肝臟、中樞神經系統、內皮細胞、與肌肉。腺病毒之優點在於可以感染非分裂細胞。

Kozarsky 與 Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3：499-503(1993)提出有關基於腺病毒之基因療法之概論。Bout 等人, *Human Gene Therapy* 5：3-10(1994)證實使用腺病毒載體轉移基因至恒河猴之呼吸上皮。腺病毒於基因療法中之其他用途實例可參見 Rosenfeld 等人，*Science* 252：431-434(1991)；Rosenfeld 等人，*Cell* 68：143-155(1992)；Mastrangeli 等人，*J. Clin. Invest.* 91：225-234(1993)；PCT 公開案 WO94/12649；與 Wang 等人之 *Gene Therapy* 2：775-783(1995)。適合表現如本文所說明特徵之 iRNA 之 AV 載體、構築重組 AV 載體之方法及傳遞載體至標靶細胞之方法說明於 Xia H 等人(2002), *Nat. Biotech.* 20：1006-1010。

【0461】 亦可使用腺相關病毒(AAV)載體來傳遞本發明 iRNA(Walsh 等人，Proc. Soc. Exp. Biol.Med. 204：289-300(1993)；美國專利案案號 5,436,146)。一項實施例中，可由具有例如，U6 或 H1 RNA 啟動子或巨細胞病毒(CMV)啟動子之重組 AAV 載體表現 iRNA，其係呈兩個分開之互補單股 RNA 分子。適合表現如本發明所說明特徵之 dsRNA 之 AAV 載體、構築重組 AV 載體之方法及傳遞載體至標靶細胞之方法說明於 Samulski R 等人(1987), *J. Virol.* 61：3096-3101；Fisher K J 等人(1996), *J. Virol*, 70：520-532；Samulski R 等人(1989), *J. Virol.* 63：3822-3826；美國專利案案號

5,252,479；美國專利案案號 5,139,941；國際專利申請案案號 WO 94/13788；與國際專利申請案案號 WO 93/24641，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0462】 另一種適合傳遞本發明 iRNA 之病毒載體為痘病毒，如牛痘病毒，例如，減毒牛痘，如經修飾之安卡拉(Ankara)病毒(MVA)或 NYVAC、鳥痘，如禽痘或金絲雀痘。

【0463】 病毒載體之向性可利用外套膜蛋白假性病毒載體或來自其他病毒之其他表面抗原進行修飾，或適當時改用不同病毒外鞘蛋白質取代。例如，慢病毒載體可利用來自水泡性病毒(VSV)、狂犬病、伊波拉(Ebola)、蒙古拉(Mokola)等等之表面蛋白質進行假型改造。AAV 載體可經過工程改造，讓載體表現不同外鞘蛋白質血清型，而靶向不同細胞；參見例如，Rabinowitz J E 等人(2002), *J Virol* 76：791-801，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0464】 載體之醫藥製劑中可包括含在可接受之稀釋劑中之載體，或可包括其中已包埋基因傳遞媒劑之緩釋基質。或者，若可從重組細胞(例如，逆轉錄病毒載體)完整產生完整基因傳遞載體時，醫藥製劑可包括產生基因傳遞系統之一或多種細胞。

【0465】

V. 本發明醫藥組成物

本發明亦提供一種包含本發明 iRNA 之醫藥組成物與調

配物。一項實施例中，本文提供包含本文說明之 iRNA 與醫藥上可接受之載劑之醫藥組成物。該包含 iRNA 之醫藥組成物適用於治療與 Serpinc1 基因表現或活性相關之疾病或疾患，例如，Serpinc1-相關疾病。此等醫藥組成物係依據傳遞模式調配。其中一項實例為一種調配成以非經腸式傳遞而全身性投藥之組成物，例如，經皮下(SC)或經靜脈內(IV)傳遞。另一項實例為調配成直接傳遞至腦實質之組成物，例如，採用如連續幫浦輸注至腦內。本發明醫藥組成物可投與足以抑制 Serpinc1 基因表現之劑量。

【0466】 本發明某些實施例中，例如，當該醫藥組成物包含之雙股 RNAi 劑包括一個或多個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序(包括一個在該製劑之裂解位點或接近裂解位點之此等基序)、6 個硫代磷酸酯鍵聯、及 GalNAc 配體時，此等組成物之投藥劑量為 0.200 至約 1.825 mg/kg、0.200 至約 1.800 mg/kg、約 0.200 至約 1.700 mg/kg、約 0.200 至約 1.600 mg/kg、約 0.200 至約 1.500 mg/kg、約 0.200 至約 1.400 mg/kg、約 0.200 至約 1.400 mg/kg、約 0.200 至約 1.200 mg/kg、約 0.200 至約 1.100 mg/kg、約 0.200 至約 1.000 mg/kg、約 0.200 至約 0.900 mg/kg、約 0.200 至約 0.800 mg/kg、約 0.200 至約 0.700 mg/kg、約 0.200 至約 0.600 mg/kg、約 0.200 至約 0.500 mg/kg、約 0.200 至約 0.400 mg/kg、約 0.225 至約 1.825 mg/kg、約 0.225 至約 1.800 mg/kg、約 0.225 至約 1.700 mg/kg、約 0.225

至約 1.600 mg/kg、約 0.225 至約 1.500 mg/kg、約 0.225 至約 1.400 mg/kg、約 0.225 至約 1.400 mg/kg、約 0.225 至約 1.200 mg/kg、約 0.225 至約 1.100 mg/kg、約 0.225 至約 1.000 mg/kg、約 0.225 至約 0.900 mg/kg、約 0.225 至約 0.800 mg/kg、約 0.225 至約 0.700 mg/kg、約 0.225 至約 0.600 mg/kg、約 0.225 至約 0.500 mg/kg、約 0.225 至約 0.400 mg/kg、約 0.250 至約 1.825 mg/kg、約 0.250 至約 1.800 mg/kg、約 0.250 至約 1.700 mg/kg、約 0.250 至約 1.600 mg/kg、約 0.250 至約 1.500 mg/kg、約 0.250 至約 1.400 mg/kg、約 0.250 至約 1.400 mg/kg、約 0.250 至約 1.200 mg/kg、約 0.250 至約 1.100 mg/kg、約 0.250 至約 1.000 mg/kg、約 0.250 至約 0.900 mg/kg、約 0.250 至約 0.800 mg/kg、約 0.250 至約 0.700 mg/kg、約 0.250 至約 0.600 mg/kg、約 0.250 至約 0.500 mg/kg、約 0.250 至約 0.400 mg/kg、約 0.425 至約 1.825 mg/kg、約 0.425 至約 1.800 mg/kg、約 0.425 至約 1.700 mg/kg、約 0.425 至約 1.600 mg/kg、約 0.425 至約 1.500 mg/kg、約 0.425 至約 1.400 mg/kg、約 0.425 至約 1.400 mg/kg、約 0.425 至約 1.200 mg/kg、約 0.425 至約 1.100 mg/kg、約 0.425 至約 1.000 mg/kg、約 0.425 至約 0.900 mg/kg、約 0.425 至約 0.800 mg/kg、約 0.425 至約 0.700 mg/kg、約 0.425 至約 0.600 mg/kg、約 0.425 至約 0.500 mg/kg、約 0.450

至約 1.825 mg/kg、約 0.450 至約 1.800 mg/kg、約 0.450 至約 1.700 mg/kg、約 0.450 至約 1.600 mg/kg、約 0.450 至約 1.500 mg/kg、約 0.450 至約 1.400 mg/kg、約 0.450 至約 1.400 mg/kg、約 0.450 至約 1.200 mg/kg、約 0.450 至約 1.100 mg/kg、約 0.450 至約 1.000 mg/kg、約 0.450 至約 0.900 mg/kg、約 0.450 至約 0.800 mg/kg、約 0.450 至約 0.700 mg/kg、約 0.450 至約 0.600 mg/kg、約 0.450 至約 0.500 mg/kg、約 0.475 至約 1.825 mg/kg、約 0.475 至約 1.800 mg/kg、約 0.475 至約 1.700 mg/kg、約 0.475 至約 1.600 mg/kg、約 0.475 至約 1.500 mg/kg、約 0.475 至約 1.400 mg/kg、約 0.475 至約 1.400 mg/kg、約 0.475 至約 1.200 mg/kg、約 0.475 至約 1.100 mg/kg、約 0.475 至約 1.000 mg/kg、約 0.475 至約 0.900 mg/kg、約 0.475 至約 0.800 mg/kg、約 0.475 至約 0.700 mg/kg、約 0.475 至約 0.600 mg/kg、約 0.475 至約 0.500 mg/kg、約 0.875 至約 1.825 mg/kg、約 0.875 至約 1.800 mg/kg、約 0.875 至約 1.700 mg/kg、約 0.875 至約 1.600 mg/kg、約 0.875 至約 1.500 mg/kg、約 0.875 至約 1.400 mg/kg、約 0.875 至約 1.400 mg/kg、約 0.875 至約 1.200 mg/kg、約 0.875 至約 1.100 mg/kg、約 0.875 至約 1.000 mg/kg、約 0.875 至約 0.900 mg/kg、約 0.900 至約 1.825 mg/kg、約 0.900 至約 1.800 mg/kg、約 0.900 至約 1.700 mg/kg、約 0.900

至約 1.600 mg/kg、約 0.900 至約 1.500 mg/kg、約 0.900 至約 1.400 mg/kg、約 0.900 至約 1.400 mg/kg、約 0.900 至約 1.200 mg/kg、約 0.900 至約 1.100 mg/kg、約 0.900 至約 1.000 mg/kg、約 0.925 至約 1.825 mg/kg、約 0.925 至約 1.800 mg/kg、約 0.925 至約 1.700 mg/kg、約 0.925 至約 1.600 mg/kg、約 0.925 至約 1.500 mg/kg、約 0.925 至約 1.400 mg/kg、約 0.925 至約 1.400 mg/kg、約 0.925 至約 1.200 mg/kg、約 0.925 至約 1.100 mg/kg、或約 0.925 至約 1.000 mg/kg。上示數值之間之數值與範圍亦包括為本發明之一部份，例如，該 RNAi 劑投與該個體之劑量可為約 0.015 mg/kg 至約 0.45 mg/kg。

【0467】 例如，該 RNAi 劑(例如，呈醫藥組成物之 RNAi 劑)之投藥劑量可為約 0.2 mg/kg、0.225 mg/kg、0.25 mg/kg、0.275 mg/kg、0.3 mg/kg、0.325 mg/kg、 0.35 mg/kg、0.375 mg/kg、0.4 mg/kg、0.425 mg/kg、0.45 mg/kg、0.475 mg/kg、約 0.5 mg/kg、0.525 mg/kg、0.55 mg/kg、0.575 mg/kg、約 0.6 mg/kg、0.625 mg/kg、0.65 mg/kg、0.675 mg/kg、約 0.7 mg/kg、0.725 mg/kg、0.75 mg/kg、0.775 mg/kg、約 0.8 mg/kg、0.925 mg/kg、0.95 mg/kg、0.975 mg/kg、約 1.0 mg/kg、1.025 mg/kg、1.05 mg/kg、1.075 mg/kg、約 1.1 mg/kg、1.125 mg/kg、1.15 mg/kg、1.175 mg/kg、約 1.2 mg/kg、

1.225 mg/kg、1.25 mg/kg、1.275 mg/kg、約 1.3 mg/kg、1.325 mg/kg、1.35 mg/kg、1.375 mg/kg、約 1.4 mg/kg、1.425 mg/kg、1.45 mg/kg、1.475 mg/kg、約 1.5 mg/kg、1.525 mg/kg、1.55 mg/kg、1.575 mg/kg、約 1.6 mg/kg、1.625 mg/kg、1.65 mg/kg、1.675 mg/kg、約 1.7 mg/kg、1.725 mg/kg、1.75 mg/kg、1.775 mg/kg、或約 1.8 mg/kg。上述數值之間之數值亦為本發明之一部份。

【0468】 本發明有些實施例中，例如，當雙股 RNAi 劑包含正義股及反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5’ - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3’ (SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3’-末端之配體時，此等含在醫藥組成物中之製劑之投藥劑量為約 0.200 至約 1.825 mg/kg、0.200 至約 1.800 mg/kg、約 0.200 至約 1.700 mg/kg、約 0.200 至約 1.600 mg/kg、約 0.200 至約 1.500 mg/kg、約 0.200 至約 1.400 mg/kg、約 0.200 至約 1.400 mg/kg、約 0.200 至約 1.200 mg/kg、約 0.200 至約 1.100 mg/kg、約 0.200 至約 1.000 mg/kg、約 0.200 至約 0.900 mg/kg、約 0.200 至約 0.800 mg/kg、約 0.200 至約 0.700 mg/kg、約 0.200 至約 0.600 mg/kg、約 0.200 至約 0.500 mg/kg、約 0.200

至約 0.400 mg/kg、約 0.225 至約 1.825 mg/kg、約 0.225 至約 1.800 mg/kg、約 0.225 至約 1.700 mg/kg、約 0.225 至約 1.600 mg/kg、約 0.225 至約 1.500 mg/kg、約 0.225 至約 1.400 mg/kg、約 0.225 至約 1.400 mg/kg、約 0.225 至約 1.200 mg/kg、約 0.225 至約 1.100 mg/kg、約 0.225 至約 1.000 mg/kg、約 0.225 至約 0.900 mg/kg、約 0.225 至約 0.800 mg/kg、約 0.225 至約 0.700 mg/kg、約 0.225 至約 0.600 mg/kg、約 0.225 至約 0.500 mg/kg、約 0.225 至約 0.400 mg/kg、約 0.250 至約 1.825 mg/kg、約 0.250 至約 1.800 mg/kg、約 0.250 至約 1.700 mg/kg、約 0.250 至約 1.600 mg/kg、約 0.250 至約 1.500 mg/kg、約 0.250 至約 1.400 mg/kg、約 0.250 至約 1.400 mg/kg、約 0.250 至約 1.200 mg/kg、約 0.250 至約 1.100 mg/kg、約 0.250 至約 1.000 mg/kg、約 0.250 至約 0.900 mg/kg、約 0.250 至約 0.800 mg/kg、約 0.250 至約 0.700 mg/kg、約 0.250 至約 0.600 mg/kg、約 0.250 至約 0.500 mg/kg、約 0.250 至約 0.400 mg/kg、約 0.425 至約 1.825 mg/kg、約 0.425 至約 1.800 mg/kg、約 0.425 至約 1.700 mg/kg、約 0.425 至約 1.600 mg/kg、約 0.425 至約 1.500 mg/kg、約 0.425 至約 1.400 mg/kg、約 0.425 至約 1.400 mg/kg、約 0.425 至約 1.200 mg/kg、約 0.425 至約 1.100 mg/kg、約 0.425 至約 1.000 mg/kg、約 0.425 至約 0.900 mg/kg、約 0.425

至約 0.800 mg/kg、約 0.425 至約 0.700 mg/kg、約 0.425 至約 0.600 mg/kg、約 0.425 至約 0.500 mg/kg、約 0.450 至約 1.825 mg/kg、約 0.450 至約 1.800 mg/kg、約 0.450 至約 1.700 mg/kg、約 0.450 至約 1.600 mg/kg、約 0.450 至約 1.500 mg/kg、約 0.450 至約 1.400 mg/kg、約 0.450 至約 1.400 mg/kg、約 0.450 至約 1.200 mg/kg、約 0.450 至約 1.100 mg/kg、約 0.450 至約 1.000 mg/kg、約 0.450 至約 0.900 mg/kg、約 0.450 至約 0.800 mg/kg、約 0.450 至約 0.700 mg/kg、約 0.450 至約 0.600 mg/kg、約 0.450 至約 0.500 mg/kg、約 0.475 至約 1.825 mg/kg、約 0.475 至約 1.800 mg/kg、約 0.475 至約 1.700 mg/kg、約 0.475 至約 1.600 mg/kg、約 0.475 至約 1.500 mg/kg、約 0.475 至約 1.400 mg/kg、約 0.475 至約 1.400 mg/kg、約 0.475 至約 1.200 mg/kg、約 0.475 至約 1.100 mg/kg、約 0.475 至約 1.000 mg/kg、約 0.475 至約 0.900 mg/kg、約 0.475 至約 0.800 mg/kg、約 0.475 至約 0.700 mg/kg、約 0.475 至約 0.600 mg/kg、約 0.475 至約 0.500 mg/kg、約 0.875 至約 1.825 mg/kg、約 0.875 至約 1.800 mg/kg、約 0.875 至約 1.700 mg/kg、約 0.875 至約 1.600 mg/kg、約 0.875 至約 1.500 mg/kg、約 0.875 至約 1.400 mg/kg、約 0.875 至約 1.400 mg/kg、約 0.875 至約 1.200 mg/kg、約 0.875 至約 1.100 mg/kg、約 0.875 至約 1.000 mg/kg、約 0.875

至約 0.900 mg/kg、約 0.900 至約 1.825 mg/kg、約 0.900 至約 1.800 mg/kg、約 0.900 至約 1.700 mg/kg、約 0.900 至約 1.600 mg/kg、約 0.900 至約 1.500 mg/kg、約 0.900 至約 1.400 mg/kg、約 0.900 至約 1.400 mg/kg、約 0.900 至約 1.200 mg/kg、約 0.900 至約 1.100 mg/kg、約 0.900 至約 1.000 mg/kg、約 0.925 至約 1.825 mg/kg、約 0.925 至約 1.800 mg/kg、約 0.925 至約 1.700 mg/kg、約 0.925 至約 1.600 mg/kg、約 0.925 至約 1.500 mg/kg、約 0.925 至約 1.400 mg/kg、約 0.925 至約 1.400 mg/kg、約 0.925 至約 1.200 mg/kg、約 0.925 至約 1.100 mg/kg、或約 0.925 至約 1.000 mg/kg。上述數值之間之數值亦為本發明之一部份，例如，RNAi 劑可投與個體之劑量為約 0.015 mg/kg 至約 0.45 mg/kg。

【0469】 例如，醫藥組成物中之 RNAi 劑，例如，RNAi 劑之投藥劑量可為約 0.2 mg/kg、0.225 mg/kg、0.25 mg/kg、0.275 mg/kg、0.3 mg/kg、0.325 mg/kg、 0.35 mg/kg、0.375 mg/kg、0.4 mg/kg、0.425 mg/kg、0.45 mg/kg、0.475 mg/kg、約 0.5 mg/kg、0.525 mg/kg、0.55 mg/kg、0.575 mg/kg、約 0.6 mg/kg、0.625 mg/kg、0.65 mg/kg、0.675 mg/kg、約 0.7 mg/kg、0.725 mg/kg、0.75 mg/kg、0.775 mg/kg、約 0.8 mg/kg、0.925 mg/kg、0.95 mg/kg、0.975 mg/kg、約 1.0 mg/kg、1.025 mg/kg、

1.05 mg/kg、1.075 mg/kg、約 1.1 mg/kg、1.125 mg/kg、1.15 mg/kg、1.175 mg/kg、約 1.2 mg/kg、1.225 mg/kg、1.25 mg/kg、1.275 mg/kg、約 1.3 mg/kg、1.325 mg/kg、1.35 mg/kg、1.375 mg/kg、約 1.4 mg/kg、1.425 mg/kg、1.45 mg/kg、1.475 mg/kg、約 1.5 mg/kg、1.525 mg/kg、1.55 mg/kg、1.575 mg/kg、約 1.6 mg/kg、1.625 mg/kg、1.65 mg/kg、1.675 mg/kg、約 1.7 mg/kg、1.725 mg/kg、1.75 mg/kg、1.775 mg/kg、或約 1.8 mg/kg。上述數值之間之數值亦為本發明之一部份。

【0470】 有些實施例中，包含 iRNA 劑之醫藥組成物係以固定劑量投與個體。「固定劑量」(例如，以 mg 計之劑量)意指用於所有個體之一劑 iRNA 劑劑量，不受任何特定個體相關因素影響，如體重。一項特定實施例中，本發明 iRNA 劑固定劑量係依據預定體重或年齡計。

【0471】 有些實施例中，包含 iRNA 劑之醫藥組成物係投與固定劑量約 25 mg 至約 100 mg 之間，例如，約 25 mg 至約 95 mg 之間、約 25 mg 至約 90 mg 之間、約 25 mg 至約 85 mg 之間、約 25 mg 至約 80 mg 之間、約 25 mg 至約 75 mg 之間、約 25 mg 至約 70 mg 之間、約 25 mg 至約 65 mg 之間、約 25 mg 至約 60 mg 之間、約 25 mg 至約 50 mg 之間、約 50 mg 至約 100 mg 之間、約 50 mg 至約 95 mg 之間、約 50 mg 至約 90 mg 之間、約 50 mg 至約 85 mg 之間、約 50 mg 至約 80 mg 之間、約 30

mg 至約 100 mg 之間、約 30 mg 至約 90 mg 之間、約 30 mg 至約 80 mg 之間、約 40 mg 至約 100 mg 之間、約 40 mg 至約 90 mg 之間、約 40 mg 至約 80 mg 之間、約 60 mg 至約 100 mg 之間、約 60 mg 至約 90 mg,之間、約 25 mg 至約 55 mg 之間、約 30 mg 至約 95 mg 之間、約 30 mg 至約 85 mg 之間、約 30 mg 至約 75 mg 之間、約 30 mg 至約 65 mg 之間、約 30 mg 至約 55 mg 之間、約 40 mg 至約 95 mg 之間、約 40 mg 至約 85 mg 之間、約 40 mg 至約 75 mg 之間、約 40 mg 至約 65 mg 之間、約 40 mg 至約 55 mg 之間、或約 45 mg 至約 95 mg 之間。

【0472】 有些實施例中，包含 iRNA 劑之醫藥組成物係投與固定劑量約 25 mg、約 30 mg、約 35 mg、約 40 mg、約 45 mg、約 50 mg、約 55 mg、約 60 mg、約 65 mg、約 70 mg、約 75 mg、約 80 mg、約 85 mg、約 90 mg、約 95 mg、或約 100 mg。

【0473】 包含 i RNA 劑之醫藥組成物可投與個體約一個月一次、約每五週一次、約每六週一次、約每 2 個月一次、或每季一次。

【0474】 包含 iRNA 劑之醫藥組成物可投與個體一劑或多劑。有些實施例中，包含雙股 iRNA 劑之醫藥組成物可投與個體每個月一次劑量約 0.200 mg/kg 至約 0.250 mg/kg、每個月一次劑量約 0.425 mg/kg 至約 0.475 mg/kg、每個月一次劑量約 0.875 mg/kg 至約 0.925 mg/kg、或每個月一次劑量約 1.775 mg/kg 至約 1.825

mg/kg。有些實施例中，包含雙股 iRNA 劑之醫藥組成物可投與個體固定劑量約 25 mg 至約 100 mg，例如，約 25 mg、約 50 mg、約 80 mg、或約 100 mg。

【0475】 該醫藥組成物可經靜脈輸注投與一段時間，如歷時 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、 20、及 21、22、23、24、或約 25 分鐘之時間。可以重複投藥，例如，定期重複，如每週、雙週(亦即每兩週)、每個月、每兩個月、每三個月、每四個月、或更久。經過初次療程後，該治療法可以減少投藥頻率。例如，經過每週或雙週投藥為期 3 個月後，可以每個月重複投藥一次，為期 6 個月或一年或更久。

【0476】 醫藥組成物可以一天投藥一次，或 iRNA 可在一天內依適當間隔投與兩個、三個或更多個小劑量，或甚至使用連續輸注或透過調控釋放之調配物傳遞。此時，各小劑量中之 iRNA 含量必需相對減少，以達到總日劑量。該劑量單位亦可組合以供持續傳遞數天，例如，採用常用之持續釋放調配物，其可歷時數天持續釋放 iRNA。持續釋放調配物係相關技藝上已知，且特別適用於在特定位點傳遞該製劑，如可與本發明製劑一起使用。此實施例中，該劑量單位包含對應之多重日劑量。

【0477】 其他實施例中，醫藥組成物之單一劑量可以為長效性，因此下一個劑量可在間隔不超過 1、2、3、4、5、6、7、或 8 週內投藥。本發明有些實施例中，本發明醫藥組成物之單一劑量係一個月投藥一次。

【0478】 熟悉此相關技術者咸了解，某些因素會影響有效治療個體時所需之劑量與投藥時間，包括(但不限於)，疾病或疾患之嚴重性、過去之治療、該個體之一般健康與/或年齡、及其他現有疾病。此外，以醫療有效量之組成物治療該個體時，可包括單次治療或連續治療。本發明所包括之個別 iRNA 可採用習知方法或使用本文說明之適當動物模式，依據活體內試驗估測其有效劑量及活體內半衰期。

【0479】 小鼠基因學上之進展已產生許多小鼠模式，供探討各種不同人類疾病，如可因降低 Serpinc1 表現而受益之出血疾患。此等模式可用於活體內測試 iRNA，並決定醫療有效劑量。合適小鼠模式係相關技藝上已知，且包括例如，血友病 A 小鼠模式及血友病 B 小鼠模式，例如，含有剔除凝結因子基因之小鼠，如彼等說明於 Bolliger 等人 (2010) *Thromb Haemost* 103:1233-1238；Bi L 等人 (1995) *Nat Genet* 10: 119–21；Lin 等人(1997) *Blood* 90: 3962–6；Kundu 等人(1998) *Blood* 92: 168–74；Wang 等人(1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11563–6；與 Jin 等人(2004) *Blood* 104:1733。

【0480】 本發明醫藥組成物可依許多方式投藥，端賴是否需要局部或全身性治療及需要治療之區域而定。投藥法可能為局部(例如，採用穿皮式貼布)、經肺部，例如，吸入或吹入粉劑或氣霧劑，包括利用噴霧器；經氣管內、經鼻內、經表皮與穿皮、經口或非經腸式。非經腸式投藥法包括經靜脈內、經動脈內、經皮下、經腹膜內或經肌內注射或輸

注；皮下，例如，經由植入裝置；或經顱內，例如，經腦實質內、鞘內或腦室內投藥。

【0481】 iRNA 可依靶向方式傳遞到特定組織，如肝臟(例如，肝臟之肝細胞)。

【0482】 供局部投藥之醫藥組成物與調配物可包括穿皮式貼布、油膏、洗液、乳霜、凝膠、滴劑、栓劑、噴液、液體與粉劑。可能必須或需要使用常用之醫藥載劑、水性、粉狀或油性基質、增稠劑等等。有塗層之保險套、手套等等亦適用。合適之局部調配物包括彼等由如本發明所說明特徵之 iRNA 與局部傳遞劑(如脂質、脂質體、脂肪酸、脂肪酸酯類、類固醇、螯合劑與界面活性劑)混合者。局部調配物詳細說明於美國專利案案號 6,747,014，其揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0483】

A. 其他調配物

i. 乳劑

本發明組成物可製造並調配成乳劑。乳劑為一種液體呈直徑通常超過 0.1μm 之液滴型態勻散在另一種液體中之典型不均相系統(參見例如，Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第 8 版), New York, NY；Idson 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊,

p. 199；Rosoff 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊, p. 245；Block 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.,第 2 冊, p. 335；Higuchi 等人述於 Remington's Parmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301)。乳劑液通常為雙相系統，其包含兩個彼此密切混合與分散之不可混溶之液相。通常，乳劑可為油包水(w/o)型或水包油(o/w)型。當水相呈小液滴均勻分佈且分散在大體積之油相中時，所得組成物稱為油包水性(w/o)乳劑。或者，當油相呈小液滴均勻分佈且分散在大體積之水相中時，所得組成物稱為水包油性(o/w)乳劑。乳劑中除了分散相外，可再包含其他組份，且活性藥物可呈溶液存在於水相、油相或本身另呈一相。需要時，乳劑中亦可包含醫藥賦形劑，如乳化劑、穩定劑、染劑、與抗氧化劑。醫藥乳劑亦可為由超過兩相組成之多相乳劑，如，例如，以油包水包油性(o/w/o)及水包油包水性(w/o/w)乳劑為例。此等複合調配物經常提供單純二元乳劑沒有之優點。其中 o/w 乳劑之個別油滴包埋小水滴之多相乳劑即構成 w/o/w 乳劑。同樣地，由油滴包埋在於油連續相中穩定化之水球中之系統即提供 o/w/o 乳劑。

【0484】 乳劑之特徵在於很低或沒有熱動力學穩定性。通常，乳劑之分散相或不連續相均勻分佈在外相或連續

相內，並利用乳化劑或調配物之黏度維持此型式。乳劑之任一相可以為半固體或固體，如乳劑型油膏基質與乳霜。其他穩定乳劑方式可以使用乳化劑，引進乳劑之任一相中。乳化劑可廣義分為四類：合成性界面活性劑、天然乳化劑、吸收基質、與均勻分散之固體(參見例如，Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第 8 版), New York, NY；Idson 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊, p. 199)。

【0485】 合成性界面活性劑亦已知為表面活性劑，已廣泛用於乳劑之調配物，且已於文獻中說明(參見例如，Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第 8 版), New York, NY；Rieger 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊, p. 285；Idson 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, 第 1 冊, p. 199)。界面活性劑通常為兩親性，其包含親水性與疏水性部份。界面活性劑之親水性對疏水性性質之比值稱為親水物/親脂物平衡值(HLB)，係

在製備調配物時用於分類及選擇界面活性劑之有利工具。界面活性劑可依據親水性基團性質分成不同類型：非離子性、陰離子性、陽離子性、與兩親性(參見例如，Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第 8 版), New York, NY；Rieger 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊, p. 285)。

【0486】 用於乳劑調配物之天然乳化劑包括羊毛脂、蜂蠟、磷脂、卵磷脂與阿拉伯膠。吸收性基質具有親水性性質，因此可吸水形成 w/o 乳劑，但仍保留其半固態堅實度，如無水羊毛脂與親水性石蠟。亦可使用細碎固體作為良好乳化劑，尤其與界面活性劑組合及用於黏性製劑中時。此等包括極性無機固體，如重金屬氫氧化物、非膨脹性黏土，如皂土、矽鎂土、鋰蒙脫石、高嶺土、蒙脫土、膠體矽酸鋁與膠體矽酸鎂鋁、色素、與非極性固體，如碳或三硬脂酸甘油酯。

【0487】 乳劑調配物中亦可包括許多種不同之非乳化材料，其可賦與乳劑性質。此等物質包括脂肪、油類、蠟類、脂肪酸、脂肪醇類、脂肪酯類、保濕劑、親水性膠體、防腐劑與抗氧化劑(Block 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.,第 1 冊, p.

335；Idson 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊, p. 199)。

【0488】 親水性膠體或水膠體包括天然膠質與合成性聚合物，如多醣類(例如，阿拉伯膠、洋菜、藻酸、鹿角菜膠、關華豆膠、卡拉膠與黃蓍膠)、纖維素衍生物(例如，羧甲基纖維素與羧丙基纖維素)、與合成性聚合物(例如，卡波姆(carbomers)、纖維素醚與羧乙烯基聚合物)。此等物質於水中分散或膨脹，形成膠體溶液，藉由在分散相之液滴周圍形成強力界面膜並提高外相之黏度，而穩定該乳劑。

【0489】 由於乳劑經常包含許多如碳水化合物、蛋白質、固醇類、與磷脂之成份，很容易支持微生物生長，因此此等調配物經常添加防腐劑。常包括於乳劑調配物中之防腐劑包括對羥基苯甲酸甲基酯、對羥基苯甲酸丙基酯、四級銨鹽類、氯化苄二甲烴銨、對羥基苯甲酸之酯類、與硼酸。亦經常添加抗氧化劑至乳劑調配物中，以防止破壞調配物。所使用之抗氧化劑可為游離基清除劑，如生育酚、沒食子酸烷基酯、丁基化羥基苯甲醚、丁基化羥基甲苯，或還原劑，如抗壞血酸與偏亞硫酸氫鈉，與抗氧化促效劑，如檸檬酸、酒石酸與卵磷脂。

【0490】 乳劑調配物經由皮膚、口、與非經腸式途徑之施用法與其製造方法已有文獻說明(參見例如，Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott

Williams & Wilkins (第 8 版), New York, NY；Idson 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊, p. 199)。用於經口傳遞之乳劑調配物因為容易調配，且從吸收效力與生體可用率觀點，已極廣泛使用(參見例如，Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第 8 版), New York, NY；Rosoff 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊, p. 245；Idson 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊, p. 199)。基於礦物油之緩瀉劑、油溶性維生素與高脂肪營養製劑為常用於呈 o/w 乳劑經口投藥之材料。

【0491】

ii. 微乳劑

本發明一項實施例中，iRNA 與核酸之組成物係調配成微乳劑。微乳劑之定義為由水、油與兩親物形成光學上各向同性且熱動力學穩定之單一液體溶液之系統(參見例如，Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第 8 版), New York,

NY；Rosoff 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊, p. 245)。典型微乳劑為先讓油分散在水性界面活性劑溶液中，然後添加足量之第四組份所形成之系統，通常添加中鏈長醇類，以形成透明系統。因此，微乳劑亦稱為兩種不混溶液體之動力學穩定之各向同性透明分散液，其係利用表面活性分子之界面膜穩定化(Leung 與 Shah 述於：Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate System, Rosoff, M, 編輯，1989, VCH Publishers, New York, p.185-215)。微乳劑通常係由 3 至 5 種組份組合製成，其包括油、水、界面活性劑、輔界面活性劑與電解質。該微乳劑為油包水(w/o)或水包油(o/w)型端賴所使用油及界面活性劑之性質及界面活性劑分子之極性頭端與烴尾端之結構與幾何堆疊而定(Schott 之 Remington's Parmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271)。

【0492】 利用相態圖之現象學方法已有深入研究，且已產生大量知識，讓熟悉此相關技術者了解如何調配微乳劑(參見例如，Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第 8 版), New York, NY；Rosoff 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊, p. 245；

Block 述於 Parmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 與 Banker (編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第 1 冊, p.335)。相較於一般乳劑，微乳劑之優點在於可在自發性形成之熱動力學穩定之液滴之調配物中溶解水不溶性藥物。

【0493】 製備微乳劑時所使用之界面活性劑包括(但不限於)，離子性界面活性劑、非離子性界面活性劑、Brij 96、聚氧乙烯油基醚類、聚甘油脂肪酸酯類、單月桂酸四甘油酯(ML310)、單油酸四甘油酯(MO310)、單油酸六甘油酯(PO310)、五油酸六甘油酯(PO500)、單癸酸十甘油酯(MCA750)、單油酸十甘油酯(MO750)、倍半油酸十甘油酯(SO750)、十油酸十甘油酯(DAO750)，其可單獨使用或與輔界面活性劑組合使用。輔界面活性劑通常為短鏈醇，如乙醇、1-丙醇、與 1-丁醇，其藉由滲透入界面活性劑膜，在界面活性劑分子之間產生空隙，因此造成無序膜，而提高界面流動性。然而不需要使用輔界面活性劑亦可製備微乳劑，且相關技藝上已知不含醇之可自行乳化之微乳劑系統。典型之水相為(但不限於)，水、藥物水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇、及乙二醇之衍生物。該油相可包括(但不限於)，下列材料，如 Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯類、中鏈(C8-C12)單酸-、二酸-、與三酸甘油酯、聚氧乙基化甘油基脂肪酸酯類、脂肪醇類、聚二醇化甘油酯類、飽和聚二醇化 C8-C10 甘油酯類、植物油與矽酮油類。

【0494】 從藥物溶解度與加強藥物吸收性之觀點而言，微乳劑特別值得注意。已提出基於脂質之微乳劑(包括 o/w 與 w/o)來加強藥物(包括肽)之口服生體可用率(參見例如，美國專利案案號 6,191,105；7,063,860；7,070,802；7,157,099；Constantinides 等人，*Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390；Ritschel 之 *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205)。微乳劑提供之優點為改善藥物溶解性、保護藥物免於酵素水解、可能基於界面活性劑誘發改變膜流動性與通透性而加強藥物吸收性、容易製備、比固態劑型容易經口投藥、改善臨床效力、及降低毒性(參見例如，美國專利案案號 6,191,105；7,063,860；7,070,802；7,157,099；Constantinides 等人，*Pharmaceutical Researchh*, 1994, 11, 1385；Ho 等人，*J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143)。當於環境溫度下將微乳劑組份組合在一起時，經常可自發性形成微乳劑。當調配對熱敏感之藥物、肽、或 iRNA 時，微乳劑特別有利。微乳劑亦可在化粧品與醫藥用途上有效地穿皮式傳遞活性組份。預期本發明微乳劑組成物與調配物將可促進從胃腸道提高 iRNA 與核酸之全身吸收性，並改善局部細胞吸收 iRNA 與核酸。

【0495】 本發明微乳劑亦可包含其他組份與添加劑，如山梨糖醇酐單硬脂酸酯(Grill 3)、聚乙二醇-8-辛酸/癸酸酯(Labrasol)與滲透加強劑，以改善調配物性質，及加強本發明 iRNA 與核酸之吸收性。本發明微乳劑所採用之滲透加

強劑可分為 1 至 5 大類-界面活性劑、脂肪酸類、膽汁鹽類、螯合劑與非螯合性非界面活性劑(Lee 等人 *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92)。各類此等物質已於上文中說明。

【0496】

iii. 微粒子

本發明 RNAi 劑可以納入粒子中，例如，微粒子中。微粒子可由噴霧乾燥法產生，但亦可採用其他方法，包括冷凍乾燥、蒸發、流化床、真空乾燥、或此等技術之組合。

【0497】

iv. 滲透加強劑

一項實施例中，本發明使用各種不同滲透加強劑，讓核酸(特定言之 iRNA)有效傳遞至動物皮膚。大多數藥物在溶液中係呈離子化與非離子化型。然而，通常僅有脂溶性或親脂性藥物容易通過細胞膜。已發現，若所要通過的膜經過滲透加強劑處理時，即使非親脂性藥物亦可穿過細胞膜。除了協助非親脂性藥物擴散通過細胞膜外，滲透加強劑亦可加強親脂性藥物之通透性。

【0498】 滲透加強劑可分成 1 至 5 大類，亦即界面活性劑、脂肪酸類、膽汁鹽類、螯合劑、與非螯合性非界面活性劑(參見例如，Malmsten, M.之 Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002；Lee 等人之 Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92)。上

述各類滲透加強劑將更詳細說明於下文中。

【0499】 界面活性劑(或「表面活性劑」)為一種在溶於水溶液中時可以降低溶液之表面張力或水溶液與另一種液體之間之界面張力之化學物質，結果將加強 iRNA 通過黏膜之吸收性。除了膽汁鹽類與脂肪酸外，此等滲透加強劑包括例如，月桂基硫酸鈉、聚氧乙烯-9-月桂基醚與聚氧乙烯-20-鯨蠟基醚(參見例如，Malmsten, M.之 Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002；Lee 等人之 Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92)；及全氟化學乳劑，如 FC-43(Takahashi 等人 *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252)。

【0500】 可作為滲透加強劑之各種不同脂肪酸與其衍生物包括例如，油酸、月桂酸、癸酸(正癸酸)、肉豆蔻酸、棕櫚酸、硬脂酸、亞油酸、亞麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油單油酸酯(1-單油基-消旋性-甘油)、甘油二月桂酸酯、辛酸、花生四烯酸、1-單癸酸甘油酯、1-十二碳烷基氮雜環庚烷-2-酮、醯基肉鹼、醯基膽鹼、其 C_{1-20} 烷基酯(例如，甲基酯、異丙基酯與第三丁基酯)、及其單酸-與二酸甘油酯(亦即油酸酯、月桂酸酯、癸酸酯、肉豆蔻酸酯、棕櫚酸酯、硬脂酸酯、亞油酸酯等等)(參見例如，Touitou, E.等人之 Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006；Lee 等人之 Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92；

Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33；El Hariri 等人之 *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654)。

【0501】 膽汁之生理性角色包括促進脂質與脂溶性維生素分散與吸收(參見例如，Malmsten, M.之 Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002；Brunton 述於: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics，第 9 版，第 38 章，Hardman 等人編輯, McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935)。各種不同天然膽汁鹽類與其合成性衍生物均可作為滲透加強劑。因此術語「膽汁鹽類」包括膽汁之任何天然組份及其任何合成性衍生物。合適膽汁鹽包括例如，膽酸(或其醫藥上可接受之鈉鹽、膽酸鈉)、去氫膽酸(去氫膽酸鈉)、去氧膽酸(去氧膽酸鈉)、葡膽酸(葡膽酸鈉)、甘膽酸(甘膽酸鈉)、去氧甘膽酸(去氧甘膽酸鈉)、牛磺膽酸(牛磺膽酸鈉)、牛磺去氧膽酸(牛磺去氧膽酸鈉)、鵝去氧膽酸(鵝去氧膽酸鈉)、熊去氧膽酸(UDCA)、牛磺-24,25-二氫-褐黴酸鈉(STDHF)、甘胺二氫褐黴酸鈉與聚氧乙烯-9-月桂基醚(POE)(參見例如，Malmsten, M.之 Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002；Lee 等人之 Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92；Swinyard 述於：Remington's Parmaceutical Sciences，第 18 版，第 39

章，Gennaro 編輯，Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, p.782-783；Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33；Yamamoto 等人之 *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25；Yamashita 等人之 *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583)。

【0502】 本發明所使用之螯合劑可定義為可讓溶液中金屬離子與其形成複合物而藉以排除之化合物，結果可以藉此加強 iRNA 通過黏膜之吸收性。螯合劑在本發明中作為滲透加強劑之相關用法中，其附加價值在於亦可作為 DNase 抑制劑，因為大多數已判斷特徵之 DNA 核酸酶均需要二價金屬離子，供進行催化作用，因此可被螯合劑抑制(Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339)。合適螯合劑包括(但不限於)，乙二胺四乙酸二鈉(EDTA)、檸檬酸、水楊酸鹽(例如，水楊酸鈉、5-甲氧基水楊酸鹽與高碳香蘭酸鹽)、膠原蛋白之 N-醯基衍生物、月桂基醚-9 與 β-二酮之 N-胺基醯基衍生物(烯胺類) (參見例如，Katdare, A.等人之 Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006；Lee 等人之 Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92；Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33；Buur 等人之 *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51)。

【0503】 本文所採用非螯合性非界面活性劑滲透加強化合物可定義為已證實沒有顯著螯合劑或界面活性劑活性，但仍可加強 iRNA 透過消化道黏膜吸收之化合物(參見例如，Muranishi 之 Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33)。此類滲透加強劑包括例如，不飽和環狀脲類、1-烷基-與 1-烯基氮雜環-烷酮類衍生物(Lee 等人之 Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92)；及非類固醇消炎劑，如雙氯芬酸鈉(diclofenac sodium)、吲哚美辛(indomethacin)與苯丁吡唑酮(phenylbutazone)(Yamashita 等人之 *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626)。

【0504】 亦可添加可在細胞層級上加強吸收 iRNA 之製劑至本發明醫藥與其他組成物中。亦已知例如，陽離子性脂質，如脂質體(lipofectin)(Junichi 等人，美國專利案案號 5,705,188)、陽離子性甘油衍生物、與聚陽離子性分子，如聚離胺酸(Lollo 等人，PCT 申請案 WO 97/30731)可加強細胞吸收 dsRNA。可自商品取得之轉染劑實例包括例如，Lipofectamine™ (Invitrogen；Carlsbad, CA)、Lipofectamine 2000™ (Invitrogen；Carlsbad, CA)、293fectin™ (Invitrogen；Carlsbad, CA)、Cellfectin™ (Invitrogen；Carlsbad, CA)、DMRIE-C™ (Invitrogen；Carlsbad, CA)、FreeStyle™ MAX (Invitrogen；Carlsbad, CA)、Lipofectamine™ 2000

CD (Invitrogen；Carlsbad, CA)、Lipofectamine™ (Invitrogen；Carlsbad, CA)、RNAiMAX (Invitrogen；Carlsbad, CA)、Oligofectamine™ (Invitrogen；Carlsbad, CA)、Optifect™ (Invitrogen；Carlsbad, CA)、X-tremeGENE Q2 轉染試劑(Roche；Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOTAP 脂質體轉染試劑(Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOSPER 脂質體轉染試劑 (Grenzacherstrasse, Switzerland)、或 Fugene (Grenzacherstrasse, Switzerland)、Transfectam®試劑(Promega；Madison, WI)、TransFast™轉染試劑 (Promega；Madison, WI)、Tfx™-20 試劑(Promega；Madison, WI)、Tfx™-50 試劑(Promega；Madison, WI)、DreamFect™ (OZ Biosciences；Marseille, France)、EcoTransfect (OZ Biosciences；Marseille, France)、TransPass[a] D1 轉染試劑(New England Biolabs；Ipswich, MA, USA)、LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen；San Diego, CA, USA)、PerFectin 轉染試劑(Genlantis；San Diego, CA, USA)、NeuroPORTER 轉染試劑(Genlantis；San Diego, CA, USA)、GenePORTER 轉染試劑(Genlantis；San Diego, CA, USA)、GenePORTER 2 轉染試劑(Genlantis；San Diego, CA, USA)、Cytofectin 轉染試劑(Genlantis；San Diego, CA, USA)、BaculoPORTER 轉染試劑

(Genlantis；San Diego, CA, USA)、TroganPORTER™轉染試劑(Genlantis；San Diego, CA, USA)、RiboFect (Bioline；Taunton, MA, USA)、PlasFect (Bioline；Taunton, MA, USA)、UniFECTOR (B-Bridge International；Mountain View, CA, USA)、SureFECTOR (B-Bridge International；Mountain View, CA, USA)、或HiFect™ (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA)等等。

【0505】 其他可用於加強所投與核酸之滲透性之製劑包括二醇類(如乙二醇與丙二醇)、吡咯類(如 2-吡咯)、氮酮類與萜烯類，如檸檬烯與薄荷酮。

【0506】

v. 載劑

某些本發明組成物亦可在調配物中納入載劑化合物。本文所採用「載劑化合物」或「載劑」可指核酸或其類似物，其係惰性(亦即本身沒有生物活性)，但仍可在活體內過程中被辨識為核酸，該過程係藉由例如，降解生物活性核酸或促進其從循環過程中排出，而降低該具有生物活性之核酸之生體可用率。共同投與核酸與載劑化合物(後者物質通常使用過量)可以大幅降低肝臟、腎臟或其他外循環器官之核酸回收量，可能歸因於載劑化合物與核酸競爭共用受體所致。例如，當與聚肌苷酸、葡聚糖硫酸鹽、聚胞苷酸或 4-乙醯胺基-4'異硫氰醯基-芪-2,2'-二磺酸共同投藥時，可減少肝臟組

織回收部份硫代磷酸 dsRNA(Miyao 等人之 DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121；Takakura 等人之 DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

【0507】

vi. 賦形劑

與載劑化合物相反，「醫藥載劑」或「賦形劑」為供傳遞一或多種核酸至動物體之醫藥上可接受之溶劑、懸浮劑或任何其他醫藥惰性媒劑。賦形劑可呈液態或固態，並依計畫之投藥方式選擇，以在與核酸及指定之醫藥組成物中其他組份組合時提供所需之填充體積、堅實度等等。典型醫藥載劑包括(但不限於)，結合劑(例如，預糊化玉米澱粉、聚乙烯吡咯啶酮或羥基丙基甲基纖維素等等)；填料(例如，乳糖與其他糖類、微晶纖維素、果膠、明膠、硫酸鈣、乙基纖維素、聚丙烯酸酯或磷酸氫鈣等等)；潤滑劑(例如，硬脂酸鎂、滑石、矽石、膠體二氧化矽、硬脂酸、硬脂酸金屬鹽、氫化植物油、玉米澱粉、聚乙二醇、苯甲酸鈉、乙酸鈉等等)；崩解劑(例如，澱粉、澱粉乙醇酸鈉等等)；與濕化劑(例如，月桂基硫酸鈉等等)。

【0508】 亦可使用適合非腸胃道外投藥且不與核酸有不利反應之醫藥上可接受之有機或無機賦形劑來調配本發明組成物。合適之醫藥上可接受之載劑包括(但不限於)，水、鹽溶液、醇類、聚乙二醇、明膠、乳糖、直鏈澱粉、硬脂酸鎂、滑石、矽酸、黏性石蠟、羥甲基纖維素、聚乙烯吡咯啶酮等等。

【0509】 供局部投與核酸之調配物可包括無菌與非無菌水溶液、於常用溶劑(如醇類)中之非水性溶液、或含核酸之液態或固態油基質溶液。溶液中亦可包含緩衝劑、稀釋劑與其他合適添加劑。可使用適合非-腸胃道外投藥且不會與核酸有不利反應之醫藥上可接受之有機或無機賦形劑。

【0510】 合適之醫藥上可接受之賦形劑包括(但不限於)，水、鹽溶液、醇、聚乙二醇、明膠、乳糖、直鏈澱粉、硬脂酸鎂、滑石、矽酸、黏性石蠟、羥甲基纖維素、聚乙烯吡咯啶酮等等。

【0511】

vii. 其他組份

本發明組成物可再包含醫藥組成物中常用且相關技藝上已建立用量之其他輔助組份。因此例如，組成物可再包含其他可相容之醫藥活性材料，如，例如，止癢劑、收斂劑、局部麻醉藥或消炎劑，或可包含其他適用於物理性調配本發明組成物各種不同劑型之材料，如染劑、調味劑、防腐劑、抗氧化劑、不透明劑、增稠劑與穩定劑。然而，當添加此等材料時，不應不當干擾本發明組成物中組份之生物活性。調配物可經過殺菌，且若需要時，可與不會與調配物之核酸(群)出現不良交互作用之輔劑混合，例如，潤滑劑、防腐劑、穩定劑、濕化劑、乳化劑、影響滲透壓之鹽類、緩衝劑、著色劑、調味劑與/或芳香物質等等。

【0512】 水性懸浮液可包含提高懸浮液黏度之物質，包括例如，羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇與/或葡聚糖。該懸浮

液亦可包含穩定劑。

【0513】 有些實施例中，如本發明所說明特徵之醫藥組成物包括(a)一或多種 iRNA 化合物與(b)一或多種其功能為非 RNAi 機轉且適用於治療溶血疾患之製劑。此等製劑實例包括(但不限於)，消炎劑、抗脂肪變性劑、抗病毒劑與/或抗纖維化劑。此外，亦可使用其他常用於保護肝臟之物質(如：水飛蓟(silymarin))與本文說明之 *iRNA* 組合使用。其他適用於治療肝臟疾病之製劑包括替比夫定(telbivudine)、恩替卡韋(entecavir)與蛋白質酶抑制劑(如特拉匹韋(telaprevir))，及其他揭示於例如，Tung 等人之美國申請案公開案號 2005/0148548、2004/0167116、及 2003/0144217；及 Hale 等人之美國申請案公開案號 2004/0127488。

【0514】 此等化合物之毒性與醫療效力可採用標準醫藥製程，於細胞培養中或實驗動物中測定，例如，測定 LD50(造成 50%族群死亡時之劑量)與 ED50(有效醫療 50%族群時之劑量)。毒性與醫療效應之間之劑量比值即為醫療指數，以 LD50/ED50 比值表示。以醫療指數高之化合物較佳。

【0515】 可採用由細胞培養分析法與動物研究得到之數據來調配用於人類之劑量範圍。如本發明所說明特徵之組成物之劑量通常落在包括極低毒性或無毒性之 ED50 之循環濃度範圍內。劑量可依所採用劑型及所利用之投藥途徑，在此範圍內變化。如本發明所說明特徵之方法所使用任何化合

物之醫療有效劑量可先從細胞培養分析法估測。可在動物模式中調配劑量，以使該化合物或若適當時使標靶序列之多肽產物之循環血漿濃度達到(例如，造成多肽濃度降低)包括細胞培養物所決定 ISERPINC10(亦即試驗化合物使症狀達到一半最大抑制性時之濃度)在內之範圍。此等資訊可用於更精確決定適用於人類之劑量。可藉由例如，高效液相層析法測定血漿濃度。

【0516】 除了如上述投藥法外，如本發明所說明特徵之 iRNA 可與其他已知可有效治療受 SERPINC1 表現所介導之病理過程之製劑組合投藥。任何情況下，投藥之醫師均可依據採用相關技藝上已知或本文所說明標準效力測定法所觀察到之結果來調整 iRNA 之投藥量與投藥時間。

【0517】

VI. 套組

本發明亦提供一種實施任何本發明方法之套組。此等套組包括一或多種 RNAi 劑與使用說明書，例如，指示投與預防或醫療有效量之 RNAi 劑之說明書。該套組可視需要再包含投與 RNAi 劑之方式(例如，注射裝置)、或測定 Serpinc1 抑制性之方式(例如，測定 Serpinc1 mRNA、Serpinc1 蛋白質、與/或 Serpinc1 活性之方式)。此等測定 Serpinc1 抑制性之方式可能包括從個體取得樣本，如，例如，血漿樣本之方式。本發明套組可視需要進一步包含測定醫療有效量或預防有效量之方式。

【0518】 除非另有說明，否則本文中所有技術與科學

術語均如熟悉本發明所屬相關技術者咸了解之相同定義。雖然可在操作或試驗如本發明所說明特徵之 iRNA 與方法時使用類似或等同如本文所說明之彼等方法與材料，但下文仍將說明合適之方法與材料。本文所述及所有公開文獻、專利申請案、專利案、及其他參考文獻之揭示內容已以引用之方式完全併入本文中。此外，該等材料、方法、及實例僅供舉例說明，並未加以限制。

【0519】

實例

表 1：所出示核酸序列中所採用之核苷酸單體縮寫。咸了解，此等單體當存在於寡核苷酸中時，係利用 5'-3'-磷酸二酯鍵彼此互相連接。

縮寫	**核苷酸**
A	腺苷-3'-磷酸
Af	2'-氟腺苷-3'-磷酸
Afs	2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸
As	腺苷-3'-硫代磷酸
C	胞苷-3'-磷酸
Cf	2'-氟胞苷-3'-磷酸
Cfs	2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸
Cs	胞苷-3'-硫代磷酸
G	鳥苷-3'-磷酸
Gf	2'-氟鳥苷-3'-磷酸
Gfs	2'-氟鳥苷-3'-硫代磷酸
Gs	鳥苷-3'-硫代磷酸
T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸
Tf	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-磷酸
Tfs	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
Ts	5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
U	尿苷-3'-磷酸
Uf	2'-氟尿苷-3'-磷酸

縮寫	核苷酸
Ufs	2’-氟尿苷-3’-硫代磷酸
Us	尿苷-3’-硫代磷酸
N	任何核苷酸(G、A、C、T 或 U)
a	2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸
as	2'-O-甲基腺苷-3’-硫代磷酸
c	2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸
cs	2'-O-甲基胞苷-3’-硫代磷酸
g	2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸
gs	2'-O-甲基鳥苷-3’-硫代磷酸
t	2’-O-甲基-5-甲基尿苷-3’-磷酸
ts	2’-O-甲基-5-甲基尿苷-3’-硫代磷酸
u	2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸
us	2'-O-甲基尿苷-3’-硫代磷酸
s	硫代磷酸酯鍵聯
L96	N-[參(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇 Hyp-(GalNAc-烷基)3

【0520】

實例 1：對健康人體投與單劑 AT3SC-001

由 24 位健康人類自願者分成 3：1 組(活性物組：安慰劑組)，接受一劑 0.03 mg/kg、0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、0.6 mg/kg、或 1.0 mg/kg 之 AT3SC-001 (正義(5’至 3’)：GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO：13)；反義(5’至 3’)：usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO：14))。於投藥後第 0、1、2、3、7、10、14、21、28、42、56、與 70 天收集血漿樣本，以偵測 AT 蛋白質含量、AT 活性、及 AT 蛋白質靜默效力持續期。採用 ELISA 偵測 AT 蛋白質含量，及使用校正自動化凝血酶測定系統(Calibrated Automated Thromboscope)產生凝血酶產生

曲線(組織因子= 1pM)，偵測 AT 活性程度。計算每位個體之峰值凝血酶相對於投藥前之兩個峰值凝血酶平均值之倍數變化。

【0521】 沒有嚴重之不良反應，有 3 位出現之輕度不良反應似乎與所投與製劑無關，有 1 位之輕度不良反應(頭痛)可能與所投與之製劑有關。沒有注射部位反應，且所有個體之身體檢查、生命跡象、及心電圖均在正常限值內。此外，所有個體在試驗期間之所有肝功能檢測、總膽紅素含量、凝血酶原時間之國際標準化比值(PT/INR)、血小板計數、血紅素含量、及凝血檢測(亦即活化之部分凝血質時間(APTT)、凝血酶原時間(PT)、纖維蛋白原含量、及纖維蛋白 D-二聚體含量)均沒有變化，且均在正常限值內。

【0522】 第 1A 至 1D 圖與第 2A 至 2B 圖顯示單劑 0.03 mg/kg 之 AT3SC-001 造成 AT 蛋白質含量降低約 20%，且至高 33%(第 2A 及 2B 圖)，且相應地降低 AT 活性(第 1A 至 1D 圖)，維持下降超過 60 天。

【0523】 第 3 圖進一步證實 AT 減弱與峰值凝血酶產生之間有顯著相關性。明確言之，觀察到峰值凝血酶產生增加高達 152%，峰值凝血酶平均最高增加 138% ± 8.9% (平均值± SEM)。此外，當隨著 AT 持續減弱而增加凝血酶產生時，因子 VIII 或 IX 之含量仍正常。

【0524】

實例 2：對患有血友病 A 或 B 之人體投與多重劑量之 AT3SC-001

第 I 期 – 臨床試驗 B、C、與 D 部份

AT3SC-001 (正義(5'至 3')：GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO：13)；反義(5'至 3')：usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO：14))之第 I 期臨床試驗 B 部份，由三位患有血友病 A (n=2)或 B (n=1)患者接受每週皮下投與 0.015 mg/kg 之 AT3SC-001 持續三週(15 微克/kg qw x 3；15 mcg/kg)；六位患有血友病 A 患者每週接受皮下投與 0.045 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三週(45 微克/kg qw x 3；45 mcg/kg)；及三位患有血友病 A(n=2)或 B (n=1)患者接受每週皮下投與 0.075 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三週(75 微克/kg qw x 3；75 mcg/kg)。

【0525】 AT3SC-001 (正義(5'至 3')：GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO：13)；反義(5'至 3')：usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO：14))之第 I 期臨床試驗之 C 部份，由三位患有血友病 A(n=2)或 B (n=1)患者接受每個月皮下投與 0.225 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 連續三個月(225 微克/kg qm x 3；225 mcg/kg)；三位患有血友病 A (n=2)或 B (n=1)患者接受每個月皮下投與 0.450 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 連續三個月(450 微克/kg qm x 3；450 mcg/kg)；三位患有血友病 A 患者接受每個月皮下投與 0.900 mg/kg 劑量之

AT3SC-001 連續三個月(900 微克/kg qm x 3；900 mcg/kg)；三位患有血友病 A 患者接受每個月皮下投與 1.800 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 連續三個月(1800 微克/kg qm x 3；1800 mcg/kg)；及六位患有血友病 A (n=3)或 B (n=3)患者接受每個月一次皮下投與固定劑量 80 mg 之 AT3SC-001 連續三個月(80 mg qM x 3)。

【0526】 AT3SC-001 (正義(5’至 3’)：GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO：13)；反義(5’至 3’)：usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO：14))之第 I 期臨床試驗 D 部份，由六位患有帶抑制劑之血友病 A(n=5)或 B(n=1)並利用繞徑劑(BPA)處理出血之患者接受每個月皮下投與固定劑量 50 mg 之 AT3SC-001 連續三個月(50 mg qM x 3)；及 10 位患有血友病 A 並利用繞徑劑(BPA)處理出血之患者接受每個月皮下投與固定劑量 80 mg 之 AT3SC-001 連續三個月(80 mg qM x 3)。

【0527】 於投與 AT3SC-001 後收集血漿樣本，以偵測 AT 蛋白質含量、AT 活性、及 AT 蛋白質靜默效力持續期。採用 ELISA 偵測 AT 蛋白質含量，及使用校正自動化凝血酶測定系統(Calibrated Automated Thromboscope)產生凝血酶產生曲線(組織因子= 1pM)，偵測 AT 活性程度。計算每位個體之峰值凝血酶相對於投藥前之兩個峰值凝血酶平均值之倍數變化。

【0528】 參與該試驗 B、C、與 D 部份之患者之人口

統計資料與基線特徵提供於表 2。

【0529】

表 2. 參與試驗者之人口統計資料與基線特徵

	B部份 皮下 每週 x 3			C部份 皮下 每個月x 3					D部份 皮下 每個月x 3	
	15 mcg/kg N=3	45 mcg/kg N=6	75 mcg/kg N=3	225 mcg/kg N=3	450 mcg/kg N=3	900 mcg/kg N=3	1800 mcg/kg N=3	80 mg N=6	50 mg N=6	80 mg N=10
年齡，平均值(SD)	28 (9)	42 (14)	40 (4)	37 (21)	37 (15)	38 (16)	46 (12)	32 (12)	32 (7)	37
血友病A 血友病B	2 1	6 0	2 1	2 1	2 1	3 0	3 0	3 3	5 1	10 0
重度 中度	3 0	6 0	3 0	2 1	3 0	2 1	3 0	5 1	6 0	10 0
體重(kg)，平均值(SD)	76 (10)	80 (22)	82 (8)	85 (12)	76 (16)	76 (2)	71 (12)	74 (10)	73 (17)	73
C型肝炎病史									3	9

【0530】 該試驗之 B、C、與 D 部份中，沒有出現嚴重副作用、沒有中斷、沒有注射部位反應，且所有患者之身體檢查、生命跡象、與心電圖均在正常限值內。此外，所有患者在試驗期間之所有肝功能檢測與全套血液檢查均沒有變化，並均在正常限值內。本試驗期間，亦沒有任何患者出現血栓事件，且纖維蛋白 D-二聚體含量沒有出現臨床上顯著增加。任何出血事件均被投與之標準置換因子或繞徑劑成功處理。此外，沒有病例形成抗藥物抗體(ADA)。

【0531】 15 mcg/kg、45 mcg/kg、與 75 mcg/kg 組中 AT 程度減弱係以平均 AT 相對於基線之減弱表示，如第 4 圖所示。第 4 圖證實每週劑量 0.015 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三週造成平均最大 AT 減弱 29% ± 12% (平均值± SEM)。最大 AT 減弱至高 53%。第 4 圖亦證實每週劑量 0.045 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三週造成平均最大 AT 減弱 55 ± 9%(平均值± SEM)，且最大 AT 減弱 86%。此外，第 4 圖亦證實每週劑量 0.075 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三週造成平均最大 AT 減弱 61 ± 8%(平均值± SEM)，且最大 AT 減弱 74%。

【0532】 225 mcg/kg、450 mcg/kg、900 mcg/kg、1800 mcg/kg、與 80 mg 組之 AT 程度減弱係以平均 AT 相對於基線之減弱表示，如第 5A 圖所示。第 5A 圖證實每個月劑量 0.225 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三個月造成平均最大 AT 減弱 70% ± 9%(平均值± SEM)。最大 AT 減弱至高 80%。第 5A 圖亦證實每個月劑量 0.450 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三個月造成平均最大 AT 減弱 77 ± 5%(平均值± SEM)，且最大 AT 減弱 85%。此外，第 5A 圖亦證實每個月劑量 0.900 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三個月造成平均最大 AT 減弱 78 ± 7%(平均值± SEM)，且最大 AT 減弱 88%。此外，第 5A 圖證實每個月劑量 1.800 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三個月造成平均最大 AT 減弱 79 ± 3%(平均值± SEM)，且最大 AT 減弱 84%。第 5A 圖亦證實每個月劑量 80 mg 之 AT3SC-001 連續三個月造成

平均最大 AT 減弱 87 ± 1%(平均值± SEM)。

【0533】 由 AT3SC-001 劑量對 AT 蛋白質含量相對最低點作圖之第 5B 圖所證實，對人類患者投與 AT3SC-001 可隨劑量變化降低 AT 蛋白質含量。

【0534】 分析健康人類自願者(實例 1)及患有血友病 A 或 B 之個體之凝血酶產生時，證實每週劑量之 AT3SC-001 造成血友病個體之凝血酶產生增加達 334%(相對於基線值)，凝血酶產生平均增加 112 ± 38% ($p<0.05$)(相對於基線值)，而此時 AT 減弱≥50% (第 5B 圖)。第 6A 圖證實接受每週劑量投與 AT3SC-001 之血友病 A 或 B 個體所達到之最大峰值凝血酶係在正常個體之凝血酶產生量之低範圍內。

【0535】 來自一位個體(個體 101-009)之全血之 ROTEM®血栓彈性分析(參見例如，Young 等人(2013) *Blood* 121:1944)證實每週投與 0.045 mg/kg 之 AT3SC-001 連續 3 週時，不僅提高凝血酶形成峰值，而且亦顯著且持續改善全血之血塊形成，此點由血塊形成時間及凝血時間縮短可證實(第 7 圖)。個體 101-009 從第 2 天起即沒有發生出血事件，且持續 47 天均沒有出血。

【0536】 AT 下降四分位數時之凝血酶產生(B 與 C 部份)之事後比較分析法(post-hoc analysis)證實，在 AT 下降最高四分位數(AT 下降>75%)時，平均凝血酶產生相對於基線增加 289%(第 9 圖)。此凝血酶產生量在健康自願者所觀察到之凝血酶產生的範圍內。

【0537】 以三位患者之小組試驗探討投與 AT3SC-001 與投與因子 VIII 之等效性。簡言之，對三位患者分別投與因子 VIII，並在投藥後-0.5、1、2、6、24、與 48 小時收集患者血漿。分析每位個體樣本之因子 VIII 含量與凝血酶產生量，並用於建立個別化之因子 VIII-峰值凝血酶產生的相關性。然後採用此數據與投與 AT3SC-001 時所達成之峰值凝血酶產生比較。如第 10A 至 10C 圖所示，投與 AT3SC-001 足以使個體達到之峰值凝血酶產生係與對該個體投與因子 VIII1 時所達到程度大約相同，並足以使超過約 40%個體達到峰值凝血酶產生。

【0538】 由 AT 下降四分位數(B 與 C 部份)時之出血事件事後比較分析法證實，出血傾向隨著 AT 下降程度的增加而減少，在 AT 下降四分位數的最高時，平均估算年出血率(ABR)為 5 ± 2 (中值= 1)(第 11 圖)。此分析包括 16 位患者中 AT 下降 >75%之超過 1100 累計天數。

【0539】 亦在 C 部份組進行出血事件事後比較分析法。第 12 圖提供本分析所採用之患者數據。如第 13A 圖所證實，參與 C 組且接受預防性(PPx)置換因子之所有患者之歷史中值 ABR 為 2，而參與 C 組且依需要接受(OD)置換因子之所有患者之歷史中值 ABR 為 28。對此等患者投與 AT3SC-001 造成中值 ABR 顯著下降。特定言之，在觀察期間(第 29 天至最後一次試驗訪診或最後一劑+ 56 天，以先到的時間為準)投與 AT3SC-001，所產生報告零出血之患者中值為 53%，而在觀察期間報告零自發性出血之患者中值

為 82%。第 13B 圖證實 C 組中每個月接受 80 mg 劑量之 AT3SC-001 及接受預防性(PPx)置換因子之患者之中值歷史 ABR 為 6。然而投與 AT3SC-001 後，觀察期間之中值 ABR 為 0。

【0540】 第 I 期試驗之 D 部份，在患有血友病 A 或 B 且已對置換因子發展出抗體(抑制劑)且因此對置換凝血因子之治療有頑抗性之患者中評估投與 AT3SC-001 之效應。因此，為了在投與 AT3SC-001 之前先評估此等患者之峰值凝血酶反應，由分配至 50 mg 組之患者接受投與標準繞徑劑(BPA)(例如，經活化之凝血酶原複合物濃聚物(APCC)與/或重組活化之 FVII (rFVIIa))，於投與 BPA 之後-1、2、6、與 24 小時收集血漿樣本，分析樣本之凝血酶產生。如第 14A 至 14F 圖所示，帶抑制劑且接受投與 AT3SC-001 之患者之 AT 下降與凝血酶產生量相當於非帶抑制劑患者接受投與類似劑量 AT3SC-001 後所觀察到之 AT 下降與凝血酶產生。此外，第 14A 至 14F 圖證實投與 AT3SC-001 後之凝血酶產生持續超過投與 BPA 時所達到之暫時程度。

【0541】 如第 15 圖所證實，在帶抑制劑之血友病患者中，每個月一次皮下投與 50 mg 與 80 mg 之 AT3SC-001，可隨劑量變化，使 AT 下降約 80%。此外，如第 16 圖所證實，接受投與 AT3SC-001 之患者所達成之 AT 下降效應係與增加凝血酶產生有相關性。

【0542】 亦在該試驗之 D 部份之患者中進行出血事件之事後比較分析法。第 17A 圖顯示，患有帶抑制劑之血友病

A 或 B 患者接受每個月一次投與劑量 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 時，造成試驗前 ABR 顯著下降。此外，如第 17B 圖證實，第 I 期試驗 D 部份中所有接受投與 AT3SC-001 之帶抑制劑患者之中值年出血率(ABR)為 0，且 56%患者沒有出血，69%患者經歷零自發性出血。

【0543】 總言之，帶與不帶抑制劑之血友病 A 與 B 患者對 AT3SC-001 之耐受性良好。沒有與試驗藥物相關之 SAE，且沒有血栓事件。數據證實其在非帶抑制劑患者中具有臨床活性且修正血友病表型。數據進一步證實，以隨計劑量變化之方式，使 AT 下降及增加凝血酶產生，其中每個月一次皮下投藥療程及投與固定 50 mg 或 80 mg 劑量之 AT3SC-001，使 AT 持續下降約 80%。

【0544】 此外，數據證實對帶抑制劑患者投與 AT3SC-001 會造成 AT 下降及增加凝血酶產生，此點與非帶抑制劑患者一致，且凝血酶產生持續增加超過投與 BPA 時暫時達到之程度。

【0545】

實例 3：對患有血友病 A 或 B 之人類患者投與多重劑量之 AT3SC-001

第 II 期開放性延伸(OLE)臨床試驗

在 AT3SC-001 (正義(5’至 3’)：GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO：13)；反義(5’至 3’)：usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID

NO：14))之第 II 期 OLE 試驗中，曾於上述第 I 期臨床試驗 B 與 C 部份中接受投與 AT3SC-001 之帶或不帶抑制劑患者可合格參與第 II 期開放性延伸(OLE)試驗。來自第 I 期試驗 B 部份之 15 位患有不帶抑制劑之血友病 A 或 B 患者已接受每週皮下投與 0.015 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三週(15 微克/kg qw x 3；15 mcg/kg)；或已接受每週皮下投與 0.045 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三週(45 微克/kg qw x 3；45 mcg/kg)；或已接受每週皮下投與 0.075 mg/kg 之 AT3SC-001 連續三週(75 微克/kg qw x 3；75 mcg/kg)；及來自第 I 期試驗 C 部份之 18 位患有不帶抑制劑之血友病 A 或 B 患者已接受每個月皮下投與 0.225 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 連續三個月(225 微克/kg qm x 3；225 mcg/kg)；或已接受每個月皮下投與 0.450 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 連續三個月(450 微克/kg qm x 3；450 mcg/kg)；或已接受每個月皮下投與 0.900 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 連續三個月(900 微克/kg qm x 3；900 mcg/kg)；或已接受每個月皮下投與 1.800 mg/kg 劑量之 AT3SC-001 連續三個月(1800 微克/kg qm x 3；1800 mcg/kg)；或已接受每個月皮下投與固定劑量 80 mg 之 AT3SC-001 連續三個月(80 mg qM x 3)；及來自第 I 期試驗 D 部份之 16 位患有帶抑制劑之血友病 A 或 B 患者已接受每個月皮下投與固定劑量 50 mg 之 AT3SC-001 連續三個月(50 mg qM x 3)；或已接受每個月皮下投與固定劑量 80 mg 之 AT3SC-001 連續三個月(80 mg qM x 3)，均合格參

與本試驗。

【0546】 33 位參與本試驗之患者中有 29 位患者繼續試驗，5 位患者中止試驗(4 位撤回同意書及與 1 位歸因 AE)。10 位患有不帶抑制劑之血友病 A(n=7)或血友病 B(n=3)患者接受每個月皮下投與固定劑量 50 mg 之 AT3SC-001 連續三個月(50 mg qM x 3)；及 9 位患有不帶抑制劑之血友病 A (n=7)或血友病 B(n=2)患者接受每個月皮下投與固定劑量 80 mg 之 AT3SC-001 連續三個月(50 mg qM x 3)。同樣地，3 位患有帶抑制劑之血友病 A(n=3)患者接受每個月皮下投與固定劑量 50 mg 之 AT3SC-001 連續三個月(50 mg qM x 3)；及 11 位患有帶抑制劑之血友病 A (n=11)或血友病 B (n=1)患者接受每個月皮下投與固定劑量 80 mg 之 AT3SC-001 連續三個月(50 mg qM x 3)。參與本試驗之患者之人口統計資料、基線特徵及曝露到 AT3SC-001 之連續時間期示於下表 3。

【0547】

表 3. 參與試驗者之人口統計資料與基線特徵

	不帶抑制劑患者		帶抑制劑患者	
	50 mg† N=10	**80 mg† N=9**	**50 mg† N=3**	**80 mg† N=11**
年齡，歲；平均值(範圍)	36 (19 – 61)	40 (24 – 58)	31 (22 – 36)	34 (21 – 41)
體重，kg；平均值(範圍)	78 (58 – 94)	73 (58 – 80)	82 (70 – 100)	72 (52 – 108)
血友病A 血友病B	7 3	7 2	3 -	10 1
重度 中度	9 1	7 2	3 -	11 -
陽性C型肝炎病史	8	8	2	9
曝露月數；中值(範圍)	13 (5 – 20)	14 (3 – 18)	11 (5 – 12)	6 (0 – 12)

【0548】 在第 II 期 OLE 中，不帶抑制劑之患者一般可良好耐受 AT3SC-001。有 6 位患者報告嚴重不良事件(SAE)，其中 2 件 SAE 被視為可能與投與 AT3SC-001 有關；其中一位患有慢性 HCV 感染之個體出現 ALT 與 AST 升高，隨後停止試驗，其中一位有癲癇病史之個體患者出現發作意識混亂。沒有血栓事件或病理性血塊形成之實驗室證據。大部份不良事件(AE)之嚴重性為輕度或中度，且與投與 AT3SC-001 無關。在 11 位患者中觀察到無症狀之丙胺酸胺基轉化酶(ALT)升高，超過 3 倍正常上限值(ULN)，膽紅素沒有同時上升超過 2 倍 ULN，其等均有 C 型肝炎感染病史。所有突破性出血事件均使用置換因子或繞徑劑成功處理。此外，沒有任何病例形成抗-藥物抗體(ADA)。

【0549】 第 18、19A 與 19B 圖進一步證實所投與 AT3SC-001 之臨床活性。明確言之，如第 18 圖所證實，每個月一次皮下投與 80 mg 之 AT3SC-001 可以持續達到 AT 下降。如第 19A 圖所證實，每個月一次皮下投與 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 可依劑量變化，在低的患者之間變異性下，使 AT 下降~80%，且如第 19B 圖所證實，每個月一次皮下投與 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001，可使凝血酶產生量達到正常範圍之下限值。

【0550】 在第 II 期 OLE 試驗中，帶抑制劑與不帶抑制劑患者亦進行出血事件之事後比較分析法。第 20A 圖顯示，對患有不帶抑制劑之血友病 A 或 B 患者每個月一次投與

劑量 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001，造成試驗前 ABR 顯著下降，且第 20B 圖顯示，對患有帶抑制劑之血友病 A 或 B 患者每個月一次投與劑量 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001，造成試驗前 ABR 顯著下降。綜合參與 OLE 試驗之所有患者之中值 ABR，48%(16/33)患者在觀察期沒有出現出血，且觀察期間之整體中值 ABR 為 1。此外，67%患者在觀察期報告零自發性出血，且觀察期間之整體 ABR 為 0。帶與不帶抑制劑患者在 OLE 試驗期間出現出血事件之特徵示於第 21 圖。當抗凝血酶下降≥75%時，即分析個體之出血事件。

【0551】 第 22 圖提供處理不帶抑制劑之血友病 A 或 B 患者所出現出血事件之細節，且第 23 圖提供處理帶抑制劑之血友病 A 或 B 患者所出現出血事件之細節。驚人地發現，患有不帶抑制劑之血友病 A 或 B 個體與患有帶抑制劑之血友病 A 或 B 個體接受投與每個月一次劑量 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 時，其出現出血事件時，所需要之置換因子或繞徑劑劑量顯著低於用於治療出血之建議劑量，例如，較低劑量之因子 VIII 或較低劑量之 aPCC。

【0552】 總言之，帶與不帶抑制劑之血友病 A 與 B 患者一般均可良好耐受 AT3SC-001。此外，數據證實 AT3SC-001 在每個月一次皮下投與 50 mg 與 80 mg 下具有臨床活性，可隨劑量變化，使 AT 下降達到~80%，且患者之間變異性低，凝血酶產生量達到正常範圍之下限值。此外，患有帶或不帶抑制劑之血友病 A 或 B 患者中，出血事件

之探索性事後比較分析法證實，投與 AT3SC-001 使中值 ABR 降至 1，及中值年自發性出血率(AsBR)降至零。在觀察期間，33 位患者中有 16 位(48%)患者沒有出現出血，33 位患者中有 22 位(67%)為零自發性出血。所有出血事件均使用置換因子或繞徑劑成功處理。

【0553】

實例 4: 最新出血處理投藥原則：降低置換因子/繞徑劑劑量

從上文所示第 I 期與第 I/II 期 OLE 試驗所得數據證實，對患有帶與不帶抑制劑之血友病 A 或 B 個體每個月一次皮下投與固定劑量 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 時，均一致使 AT 下降約 80%，且 AT 下降及凝血酶產生量上升與依隨劑量變化。

【0554】 電腦模擬數據支持此等觀察，預測可因應 AT 程度下降而加強凝血酶產生，包括在有些實施例中，AT 程度下降約 75%或低於 75%。來自帶與不帶抑制劑之血友病 A 與 B 患者之血漿樣本所得數據顯示，對患者投與 AT3SC-001 後，會因應置換因子與繞徑劑而加強凝血酶產生。此外，臨床數據證實，患有不帶抑制劑之血友病 A 或 B 患者(第 22 圖)與患有帶抑制劑之血友病 A 或 B 患者(第 23 圖)接受每個月一次投與 AT3SC-001 劑量 50 mg 或 80 mg，且出現出血事件者使用置換因子或繞徑劑之劑量低於處理出血之建議劑量，例如，較低劑量之因子 VIII、或較低劑量之因子 IX、或較低劑量之延長半衰期因子 IX、或較低劑量之

重組因子 VIIa、或較低劑量之 aPCC。

【0555】 第 24A 至 24D 圖所示其他臨床出血處理數據進一步證實接受投與 AT3SC-001 與較低量之置換因子或繞徑劑之個體成功治療出血。

【0556】 因此，本文呈現之數據支持對接受投與 AT3SC-001，亦即接受每個月投與固定皮下劑量 50 mg 或 80 mg 之個體(例如，其中對該個體投與之 dsRNA 劑可使 Serpinc1 活性降低約 75%或更多)投與較低劑量之置換因子或繞徑劑。因此，如表 4 所示，對每個月接受皮下劑量 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 之個體之處理出血原則已經更新，且此等出血將可使用較低劑量之置換因子或繞徑劑處理。

【0557】 例如，為患有不帶抑制劑之血友病 A 個體治療出血(例如，中度出血或重度出血)時，置換因子(因子 VIII)之建議有效量為約 30 至 50 IU/kg。然而，為患有血友病 A 且接受每個月投與固定皮下劑量之 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 之個體(例如，其中投與該個體之 dsRNA 劑可使 Serpinc1 活性降低約 75%或更多)治療出血(例如，中度出血或重度出血)時，可使用劑量約 5 至約 20 IU/kg 之因子 VIII。對患有不帶抑制劑之血友病 B 之個體治療出血(例如，重度出血)之置換因子(因子 IX 或延長半衰期因子 IX)之建議有效量為約 65 至 130 IU/kg。然而，為患有血友病 B 且接受每個月投與固定皮下劑量之 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 之個體(例如，其中投與該個體之 dsRNA 劑可

使 Serpinc1 活性降低約 75%或更多)治療出血(例如，重度出血)時，可使用劑量約 10 至約 30 IU/kg 之因子 IX 或延長半衰期因子 IX。為患有帶抑制劑之血友病 A 或 B 之個體治療出血(例如，中度出血或重度出血)之繞徑劑(經活化之凝血酶原複合物濃聚物；aPCC)之建議有效量為約 100 U/kg。然而，為患有帶抑制劑之血友病 A 或 B 且接受每個月投與固定皮下劑量之 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 之個體(例如，其中投與該個體之 dsRNA 劑可使 Serpinc1 活性降低約 75%或更多)治療出血(例如，中度出血或重度出血)時，可使用劑量約 30 至約 50 U/kg 之 aPCC。為患有帶抑制劑之血友病 A 或 B 個體治療出血(例如，中度出血或重度出血)之繞徑劑(重組因子 VIIa；rFVIIa)之建議有效量為約 90 微克/kg。然而，為患有帶抑制劑之血友病 A 或 B 且接受每個月投與固定皮下劑量 50 mg 或 80 mg 之 AT3SC-001 之個體(例如，其中投與該個體之 dsRNA 劑使 Serpinc1 活性降低約 75%或更多)治療出血(例如，中度出血或重度出血)時，可使用劑量約 10 至約 45 μg/kg 之 rFVIIa。

【0558】

表 4. 最新出血處理原則

	因子 VIII	因子 IX 標準半衰期	因子 IX 延長半衰期	aPCC	重組因子 VIIa
建議單劑	10 IU/kg	20 IU/kg	20 IU/kg	30 U/kg	≦45μg/kg
單劑不應	20 IU/kg	30 IU/kg	30 IU/kg	50 U/kg	45μg/kg

<table>
<tr><td>超過</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="3">重複劑量指示</td><td colspan="4">在投與第二劑之前強制通知臨床試驗中心
考量在臨床試驗中心之評估與治療
(參見第 5.4 節)</td><td>在投與第三劑之前強制通知試驗地點</td></tr>
<tr><td>不應在短於 24 小時之內重複</td><td>不應在短於 24 小時之內重複</td><td>不應在短於 5 至 7 天之內重複</td><td>不應在短於 24 小時之內重複</td><td>不應在短於 2 小時之內重複</td></tr>
<tr><td colspan="4">若需要 2 劑以上，應在 48-72 小時內出現在地點
(參見評估之 SOA)</td><td>若需要 3 劑以上，應在 48-72 小時內出現在地點</td></tr>
<tr><td colspan="6">需要更高劑量、更高投藥頻率、多次重複劑量時，建議與醫學試驗負責人及臨床指導人討論，並應考慮 AT 置換

抗纖維蛋白溶酶劑不可與因子或 BPA 合併使用</td></tr>
</table>

註：rFVIIa 及 aPCC 已完整包括在內。出血發作之輔助處理應依據標準照護法進行。預期此等不帶抑制劑患者將例行接受 FVIII 與 FIX 處理。

【0559】

實例 5：為接受 AT3SC-001 治療之人類患者治療血友病 A 時增加繞徑劑對血漿中凝血酶形成之效應

如實例 4 所示，從帶與不帶抑制劑之血友病 A 患者血漿樣本中得到之數據顯示，繼 AT3SC-001 之後對患者投與置換因子與繞徑劑(BPA)，會加強凝血酶產生反應。特定言之，從第 II 期 OLE 試驗所得數據證實，增加使用 BPA 時，皮下投與 AT3SC-001 可使投藥後之血漿樣本中之凝血酶產生比投藥前血漿樣本加強；此表示可能使用較低劑量之

BPA 來達成類似之止血效應。

【0560】 為了在來自接受 AT3SC-001-介導 AT 下降之患者之選定血漿樣本中探討其因應 BPA 之凝血酶產生反應，在使用 AT3SC-001 治療之前及之後，從 8 位血友病 A 患者(7 位不帶抑制劑，1 位帶抑制劑)中收集沒有血小板之血漿。採用以 FXa-活性為主之顯色分析法(SIEMENS INNOVANCE®抗凝血酶)測定患者血漿 AT 活性，並相對於正常收集之血漿校正。在離體血漿中添加各種不同劑量之 BPA：aPCC (0.5 或 1 U/mL；分別相當於劑量 37.5 與 75 U/kg)或 rFVIIa (0.75、1.75 或 2.5 μg/mL；相當於劑量 27、63 與 90 μg/kg)。採用校正自動化凝血酶測定系統(Calibrated Automated Thromboscope)產生凝血酶產生曲線(組織因子= 1pM)，偵測凝血酶產生反應與 AT 活性程度。所有試劑，包括凝血酶校正劑、FluCa 套組、與 PPP-試劑-低(1 pM 組織因子[TF]與 4 μM 磷脂)均得自 Thrombinoscope BV。

【0561】 第 25A 至 26N 圖中呈現之數據證實，藉由投與 AT3SC-001，在得自 AT 下降後之個體之血漿樣本中達成加強凝血酶產生。事實上，單由 AT 下降即可提高峰值凝血酶產生。aPCC 與 rFVIIa 二者當加至接受經過 AT3SC-001 處理之患者血漿中時，均造成峰值凝血酶產生呈線性增加。在帶抑制劑(第 25A 與 25B 圖)或不帶抑制劑(第 26A-26N 圖)之血友病 A 患者中，較低劑量之 aPCC 即足以產生等同彼等全劑量 aPCC 在 AT3SC-001 處理前血漿中所達到

之峰值凝血酶產生。所有患者之血漿中，在 AT 下降之血漿中添加所有用量之 rFVIIa，使凝血酶產生到達但仍低於正常範圍之下限(LLN)。

【0562】 總言之，增加繞徑劑時，投與 AT3SC-001 可使投藥後血漿樣本之比投藥前血漿樣本加強凝血酶產生。此等結果進一步支持使用低於建議劑量之繞徑劑劑量即可使在 AT3SC-001 治療期間經歷突破性出血之患者達成止血(如上述實例 4 所述)，包括例如，降低置換因子或繞徑劑之初始劑量，及降低置換因子或繞徑劑之最大劑量、劑量之間之最小間隔、及在小於 24 小時間隔時間內不再重複投與置換因子或繞徑劑(rFVIIa 除外)。

【0563】

實例 6：在 AT 下降與因子置換併行下預估凝血酶產生之定量系統藥理學(Quantitative Systems Pharmacology (QSP))

血友病 A 與 B 為特徵在於分別歸因於因子 VIII 與 IX 缺陷以致凝血酶產生不足之出血疾患。如上述，AT3SC-001 為每個月一次皮下投與之研究用 RNAi 醫療劑，其靶向抗凝血酶(AT)，作為針對帶或不帶抑制劑之血友病 A 與血友病 B 患者改善凝血酶產生及促進止血之手段。儘管如此，接受 AT3SC-001 之患者仍可能經歷突破性出血，而可能需要置換因子治療。如上述，臨床數據與離體外加試劑數據支持使用低於建議劑量之繞徑劑與置換因子，以使在 AT3SC-001 治療期間經歷突破性出血之患者達成止血。

【0564】 為了進一步支持使用低於建議劑量之繞徑劑與置換因子可使在 AT3SC-001 治療期間經歷突破性出血之患者達成止血，並提供深入了解 AT 程度、因子投藥、與凝血酶形成(TG)之間之關係，採用說明凝血級聯作用之電腦模擬定量系統藥理學(QSP)動態模式(Nayak 等人(2015) *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 4.7: 396-405)來模擬離體凝血酶形成(TG)分析法。特定言之，該模式係由 66 個反應與 106 個參數說明，改變初始血漿因子濃度來模擬血友病與罕見出血疾患。此外，由於個體之間之血漿因子濃度變化± 50%，因此採用蒙地卡羅法(Monte Carlo method)來模擬 TG 正常範圍：平均 – 140nM；範圍 50-250 nM。

【0565】 下表提供在各種不同疾病狀態下用於建模之輸入因子濃度。

ATIII	3400	接受弗特思蘭(Fitusiran)	1-100
VIII	0.7 (100 IU/dL)	血友病A	0.1,0.5,1,2,5,10,100
IX	90 (100 IU/dL)	血友病B	0.1,0.5,1,2,5,10,100
V	20 (100 U/dL)	因子V缺陷	0.1,0.5,1,2,5,10,100
VII	10 (100 U/dL)	因子VII缺陷	0.1,0.5,1,2,5,10,100
X	160 (100 U/dL)	因子X缺陷	0.1,0.5,1,2,5,10,100

【0566】 如第 27A 至 27C 圖所示，使用 QSP 模式產生之數據可預測隨著 AT 下降之凝血酶形成(TG)。明確言之，TG 之臨床正常範圍與 QSP 預測一致，並在 AT 下降之患者之臨床測定值與模式預測之 TG 之間觀察到相關性。第 27A 圖說明來自中期 1 (A 至 C 部份)之測定 TG 結果，第 27B 圖說明模擬之 TG (依據 AT 減弱)，分別以 AT 下降四分位數框框表示。第 27C 圖為說明模擬之 TG 數據與測定之 TG 數據之間有強力相關性之散點圖。

【0567】 亦採用電腦模擬 QSP 模式來定量嚴重血友病 A 之 TG、AT 下降、與因子 VIII 劑量之間之非線性關係(第 28A 圖)。出示隨著 AT 下降與因子 VIII 投藥劑量之 TG 熱製圖證實在使用 AT3SC-001 時所觀察到之 AT 程度(10-25%)下，5 至 10 IU/kg 之間之因子 VIII 即足以達到正常 TG(第 28B 圖)。同樣地，出示隨著 AT 下降與因子 IX 投藥劑量之 TG 熱製圖證實在 10-25% AT 下，10 至 20 IU/kg 之因子 IX 即足以達到正常 TG (第 28C 圖)。

【0568】 整合因子藥物代謝動力學(單室模式)與 QSP 模式，以投與因子後之時間為函數，來模擬峰值凝血酶潛勢(PTP)。第 29B 圖 (20%基線 AT)相對於第 29A 圖(100% AT)說明在嚴重血友病 A 患者中投與因子時之時間過程影響，並證實在突破性出血發作時，在投與 FVIII 後之最高時間點與最低時間點，AT 下降均加強凝血酶產生。

【符號說明】

無。

申請專利範圍

1. 一種為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法，其包括

對該個體投與固定劑量約 30 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，

其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3'(SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體；及

對該個體投與醫療有效量之置換因子，其中該置換因子有效量低於該置換因子之建議有效量，

藉以為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

2. 一種為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法，其包括

對該個體投與固定劑量約 30 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，

其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-

UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3’(SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3’-末端之配體；及

對該個體投與醫療有效量之繞徑劑，其中該繞徑劑有效量低於該繞徑劑之建議有效量，

藉以為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

3. 一種為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法，其包括

對該個體投與固定劑量約 40 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，

其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3’(SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3’-末端之配體；及

對該個體投與醫療有效量之置換因子，其中該置換因子有效量低於該置換因子之建議有效量，

藉以為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事

件。

4. 一種為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法，其包括

對該個體投與固定劑量約 40 mg 至約 90 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，

其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，反義股包含與編碼 Serpinc1 之 mRNA 互補之區，其包含至少 15 個連續核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG－3'(SEQ ID NO： 15)之差異不超過 3 個核苷酸，其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且其中正義股係接合至附接在 3'-末端之配體；及

對該個體投與醫療有效量之繞徑劑，其中該繞徑劑有效量低於該繞徑劑之建議有效量，

藉以為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所述之方法，其中投與個體固定劑量之雙股 RNAi 劑係一個月一次、每六週一次、每 2 個月一次、或每季一次。

6. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所述之方法，其中雙股 RNAi 劑係以固定劑量約 50 mg 投與個體。

7. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所述之方法，其中雙股 RNAi 劑係以固定劑量約 80 mg 投與個體。

8. 如申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項所述之方法，其中雙股 RNAi 劑係經皮下投與個體。

9. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之方法，其中該個體為人類。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之方法，其中該血友病為血友病 A、血友病 B、或血友病 C。

11. 如申請專利範圍第 1 至 10 項中任一項所述之方法，其中正義股之所有核苷酸與反義股之所有核苷酸為經修飾之核苷酸。

12. 如申請專利範圍第 1 至 11 項中任一項所述之方法，其中該經修飾之核苷酸係分別獨立選自下列所成群組：2'-去氧-2'-氟修飾之核苷酸、2'-去氧-修飾之核苷酸、鎖核苷酸、無鹼基核苷酸、2'-胺基-修飾之核苷酸、2'-烷基-修飾之核苷酸、N-嗎啉基核苷酸、胺基磷酸酯、及包含非天然鹼基之核苷酸。

13. 如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項所述之方法，其中該互補區之長度為至少 17 個核苷酸。

14. 如申請專利範圍第 1 至 13 項中任一項所述之方法，其中該互補區之長度為 19 至 21 個核苷酸之間。

15. 如申請專利範圍第 14 項所述之方法，其中該互補區之長度為 19 個核苷酸。

16. 如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項所述之方法，其中該各股之長度不超過 30 個核苷酸。

17. 如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項所述之方法，

其中該正義股與反義股之長度分別獨立為 19 至 25 個核苷酸。

18.如申請專利範圍第 1 至 17 項中任一項所述之方法，其中該正義股與反義股之長度分別獨立為 21 至 23 個核苷酸。

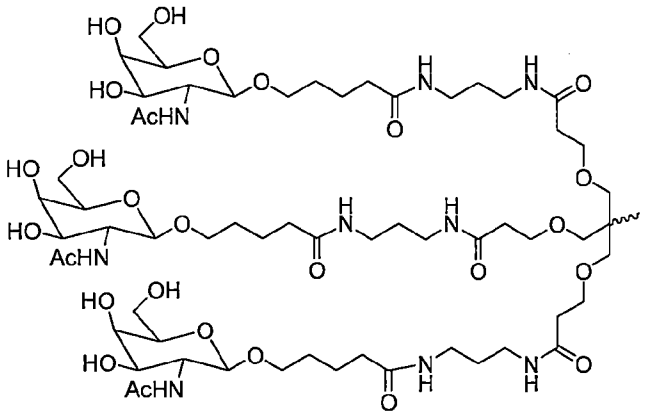
19.如申請專利範圍第 1 至 18 項中任一項所述之方法，其中該正義股之長度為 21 個核苷酸，及反義股之長度為 23 個核苷酸。

20.如申請專利範圍第 1 至 19 項中任一項所述之方法，其中至少一股包含具有至少 1 個核苷酸之 3'突出。

21.如申請專利範圍第 1 至 19 項中任一項所述之方法，其中至少一股包含具有至少 2 個核苷酸之 3'突出。

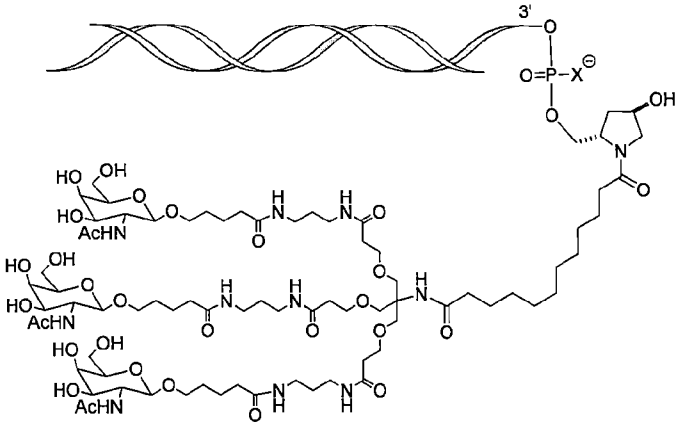
22.如申請專利範圍第 1 至 21 項中任一項所述之方法，其中該配體為 N-乙醯基半乳糖胺(GalNAc)衍生物。

23.如申請專利範圍第 22 項所述之方法，其中該配體為



。

24.如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該雙股 RNAi 劑係如下方案所示接合至配體：



且其中 X 為 O 或 S。

25.如申請專利範圍第 24 項所述所述之方法，其中 X 為 O。

26.如申請專利範圍第 1 至 25 項中任一項所述之方法，其中該互補區係由核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO： 15)組成。

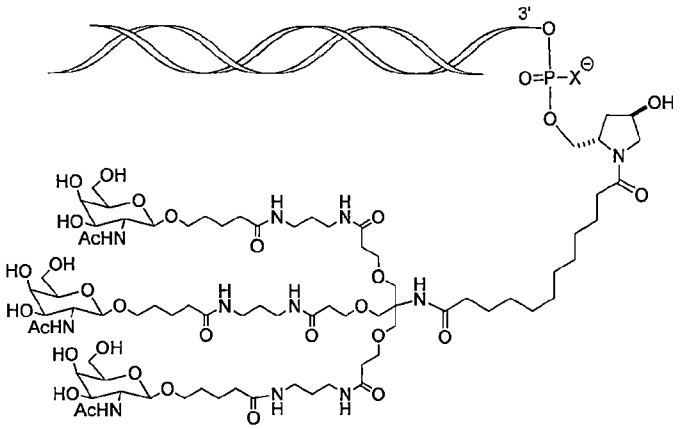
27.如申請專利範圍第 1 至 26 項中任一項所述之方法，其中該雙股 RNAi 劑包含正義股(其包含核苷酸序列 5'- GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3' (SEQ ID NO： 16))，與反義股(其包含核苷酸序列 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO： 15))。

28.如申請專利範圍第 27 項所述之方法，其中該正義股包含 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf –3' (SEQ ID NO：13)及反義股包含 5'-

usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg－3’(SEQ ID NO：14)，其中a、c、g、與u為2′-O-甲基(2′-OMe)A、C、G、或U；Af、Cf、Gf、或Uf為2′-氟A、C、G、或U；及s為硫代磷酸酯鍵聯。

29.如申請專利範圍第1至28項中任一項所述之方法，其中該正義股包含5’-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf－3’(SEQ ID NO：13)，及反義股包含5’-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg－3’(SEQ ID NO：14)，其中a、c、g、與u為2′-O-甲基(2′-OMe)A、C、G、或U；Af、Cf、Gf、或Uf為2′-氟A、C、G、或U；及s為硫代磷酸酯鍵聯；及

其中正義股係如下方案所示接合至配體：



，其中X為O或S。

30.如申請專利範圍第1至29項中任一項所述之方法，其中該雙股RNAi劑係呈醫藥組成物投與個體。

31.如申請專利範圍第 1 至 30 項中任一項所述之方法，其中對該個體投與 dsRNA 劑可使 Serpinc1 活性降低約 75%或更多。

32.如申請專利範圍第 1、3 與 5 至 31 項中任一項所述之方法，其中該置換因子為因子 VIII。

33.如申請專利範圍第 32 項所述之方法，其中該投與個體之因子 VIII 之醫療有效量低於約 200 IU/kg、或低於約 190 IU/kg、或低於約 180 IU/kg、或低於約 170 IU/kg、或低於約 160 IU/kg、或低於約 150 IU/kg、或低於約 140 IU/kg、或低於約 130 IU/kg、或低於約 120 IU/kg、或低於約 110 IU/kg、或低於約 100 IU/kg、或低於約 90 IU/kg、或低於約 80 IU/kg、或低於約 70 IU/kg、或低於約 60 IU/kg、或低於約 50 IU/kg、或低於約 40 IU/kg、或低於約 30 IU/kg、或低於約 20 IU/kg、或低於約 10 IU/kg。

34.如申請專利範圍第 32 項所述之方法，其中該投與個體之因子 VIII 之醫療有效量比因子 VIII 之建議有效量降低約 1.5 倍至約 5 倍。

35.如申請專利範圍第 34 項所述之方法，其中該投與個體之因子 VIII 之醫療有效量為約 10 至約 20 IU/kg 之劑量。

36. 如申請專利範圍第 1、3、與 5 至 28 項中任一項所

述之方法，其中該置換因子為因子 IX。

37.如申請專利範圍第 36 項所述之方法，其中該投與個體之因子 IX 之醫療有效量低於約 200 IU/kg、或低於約 190 IU/kg、或低於約 180 IU/kg、或低於約 170 IU/kg、或低於約 160 IU/kg、或低於約 150 IU/kg、或低於約 140 IU/kg、或低於約 130 IU/kg、或低於約 120 IU/kg、或低於約 110 IU/kg、或低於約 100 IU/kg、或低於約 90 IU/kg、或低於約 80 IU/kg、或低於約 70 IU/kg、或低於約 60 IU/kg、或低於約 50 IU/kg、或低於約 40 IU/kg、或低於約 30 IU/kg、或低於約 20 IU/kg、或低於約 10 IU/kg。

38.如申請專利範圍第 36 項所述之方法，其中該投與個體之因子 IX 之醫療有效量比因子 IX 之建議有效量降低約 2 倍至約 6 倍。

39.如申請專利範圍第 38 項所述之方法，其中該投與個體之因子 IX 之醫療有效量為約 20 至約 30 IU/kg 之劑量。

40.如申請專利範圍第 2 與 4 至 31 項中任一項所述之方法，其中該繞徑劑為經活化之凝血酶原複合物濃聚物(aPCC)。

41.如申請專利範圍第 40 項所述之方法，其中該投與個體之 aPCC 之醫療有效量低於約 100 U/kg、或低於

約 90 U/kg、或低於約 80 U/kg、或低於約 70 U/kg、或低於約 60 U/kg、或低於約 50 U/kg、或低於約 40 U/kg、或低於約 30 U/kg、或低於約 20 U/kg、或低於約 10 U/kg。

42.如申請專利範圍第 40 項所述之方法，其中該投與個體之 aPCC 之醫療有效量比 aPCC 之建議有效量降低約 2 倍至約 3 倍。

43.如申請專利範圍第 42 項所述之方法，其中該投與個體之 aPCC 之醫療有效量為約 30 至約 50 U/kg 之劑量。

44.如申請專利範圍第 2 與 4 至 31 項中任一項所述之方法，其中該繞徑劑為重組因子 VIIa (rFVIIa)。

45.如申請專利範圍第 44 項所述之方法，其中該投與個體之 rFVIIa 之醫療有效量低於約 120 μg/kg、或低於約 110 μg/kg、或低於約 100 μg/kg、或低於約 90 μg/kg、或低於約 80 μg/kg、或低於約 70 μg/kg、或低於約 60 μg/kg、或低於約 50 μg/kg、或低於約 40 μg/kg、或低於約 30 μg/kg、或低於約 20 μg/kg。

46.如申請專利範圍第 45 項所述之方法，其中該投與個體之 rFVIIa 之醫療有效量比 rFVIIa 之建議有效量降低約 2 倍。

47.如申請專利範圍第 46 項所述之方法，其中該投與個體之 rFVIIa 之醫療有效量為約 45 μg/kg 之劑量。

48.如申請專利範圍第1至47項中任一項所述之方法，其進一步包括測定個體中之凝血酶含量。

49.如申請專利範圍第1至48項中任一項所述之方法，其進一步包括測定個體中之置換因子含量。

50.一種為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法，其包括

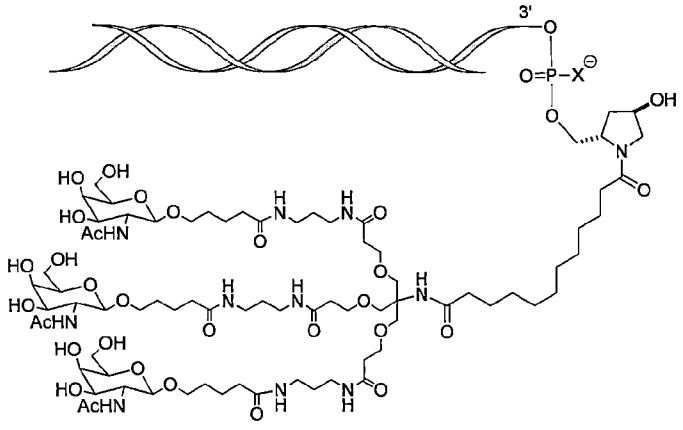
對該個體投與固定劑量約80 mg之抑制Serpinc1表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，

其中雙股RNAi劑包含正義股與反義股，

其中正義股包含5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf–3'(SEQ ID NO：13)，及反義股包含5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg–3'(SEQ ID NO：14)，

其中a、c、g、與u為2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G、或U；Af、Cf、Gf、或Uf為2'-氟A、C、G、或U；及s為硫代磷酸酯鍵聯；及

其中正義股之3'-端係如下方案所示接合至配體：



，其中 X 為 O 或 S；及

對該個體投與醫療有效量之置換因子，其中置換因子之有效量低於該置換因子之建議有效量，

藉以為患有不帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

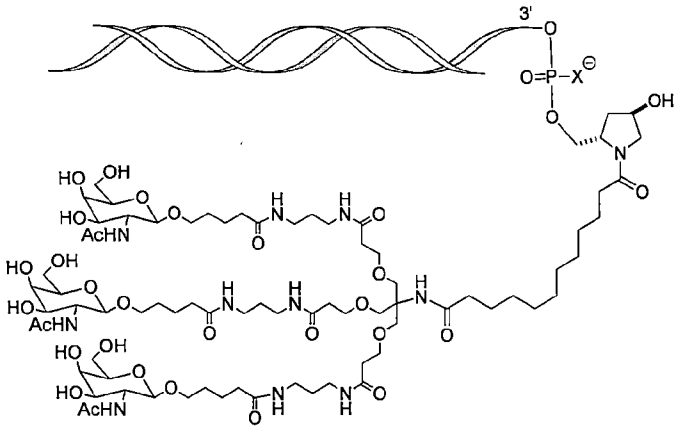
51.一種為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件之方法，其包括

對該個體投與固定劑量約 80 mg 之抑制 Serpinc1 表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，

其中雙股 RNAi 劑包含正義股與反義股，其中正義股包含 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf－3'(SEQ ID NO：13)，及反義股包含 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg－3'(SEQ ID NO：14)，

其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、或 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鍵聯；及

其中正義股之 3'-端係如下方案所示接合至配體：



，其中 X 為 O 或 S；及

對該個體投與醫療有效量之繞徑劑，其中該繞徑劑有效量低於該繞徑劑之建議有效量，

藉以為患有帶抑制劑之血友病個體治療出血事件。

52.如申請專利範圍第 51 或 52 項所述之方法，其中該固定劑量之 RNAi 劑係經皮下投與個體。

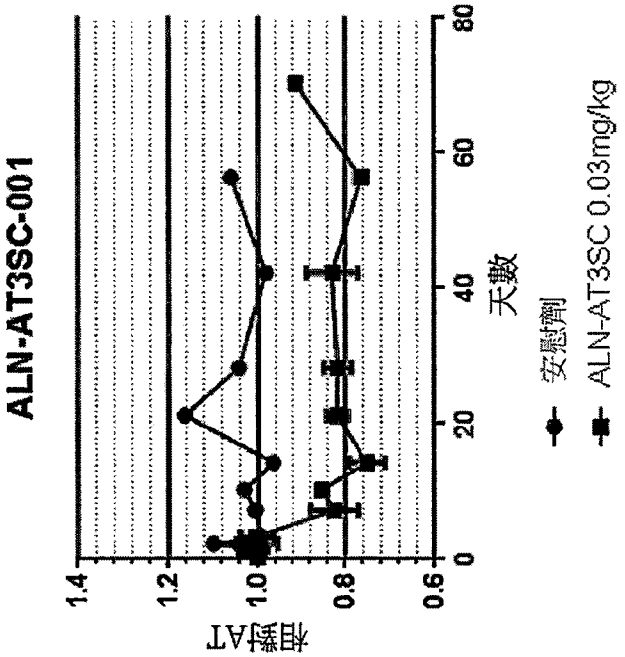
53.如申請專利範圍第 51 或 52 項所述之方法，其中該固定劑量之 RNAi 劑係一個月一次投與個體。

54.如申請專利範圍第 51 或 52 項所述之方法，其中該血友病為血友病 A。

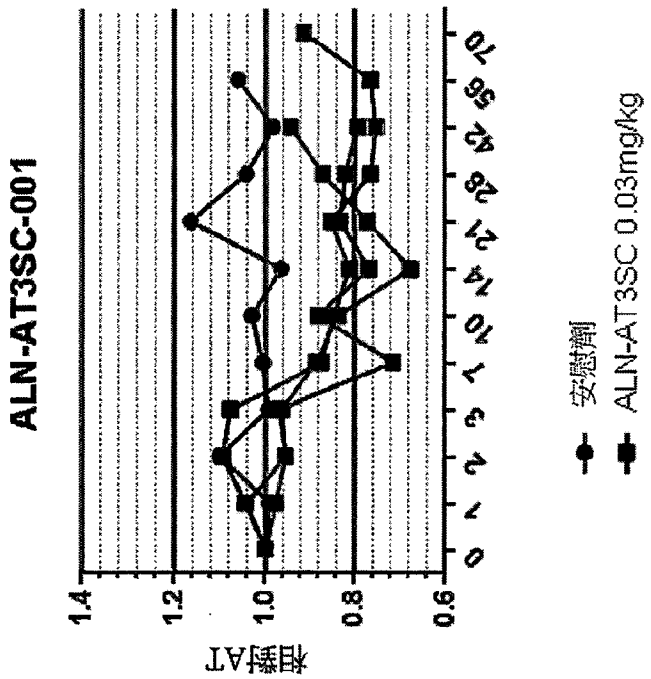
55.如申請專利範圍第 51 或 52 項所述之方法，其中該血友病為血友病 B。

56.如申請專利範圍第 51 或 52 項所述之方法，其中該血友病為血友病 C。

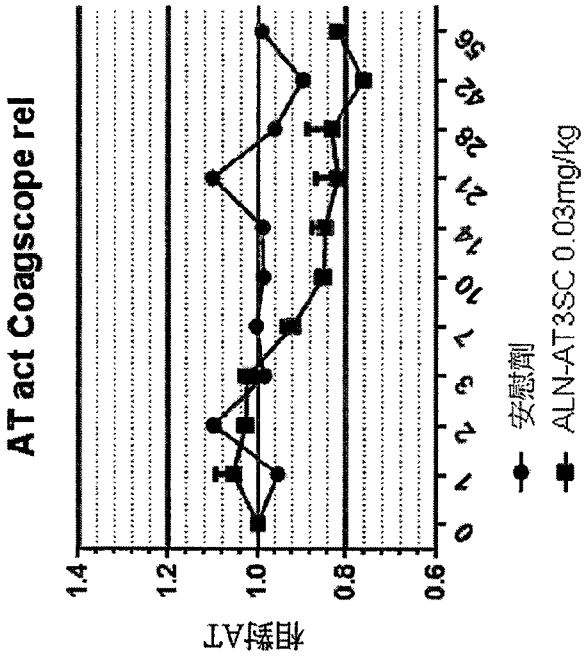
【發明圖式】



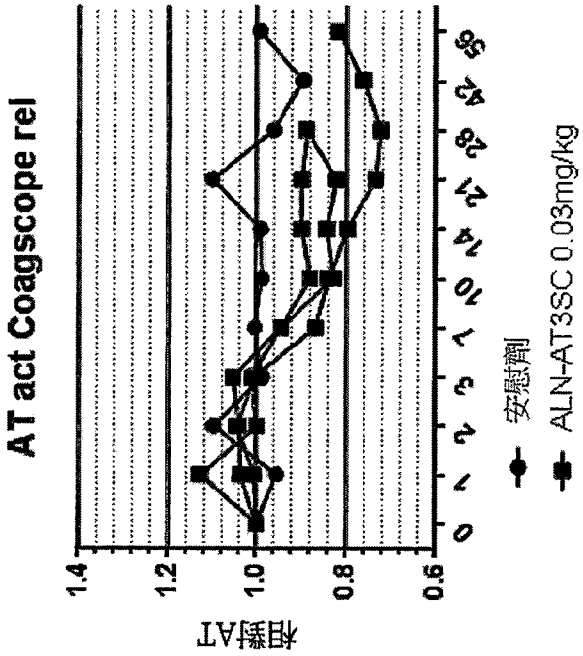
【第1B圖】



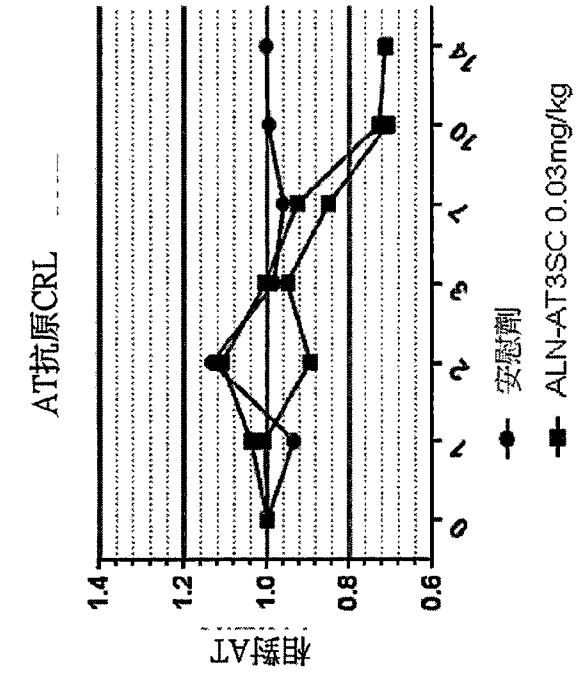
【第1A圖】


AT act Coagscope rel
相對AT
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0
1
2
3
7
10
14
21
28
42
56
安慰劑
ALN-AT3SC 0.03mg/kg

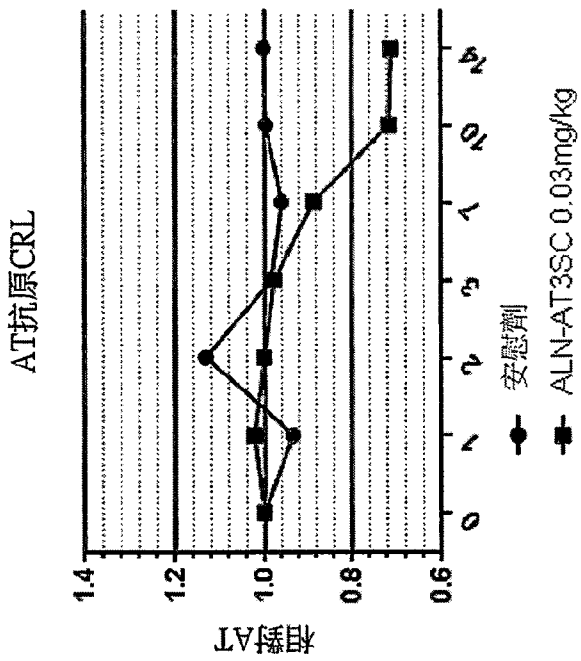
【第1D圖】


AT act Coagscope rel
相對AT
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0
1
2
3
7
10
14
21
28
42
56
安慰劑
ALN-AT3SC 0.03mg/kg

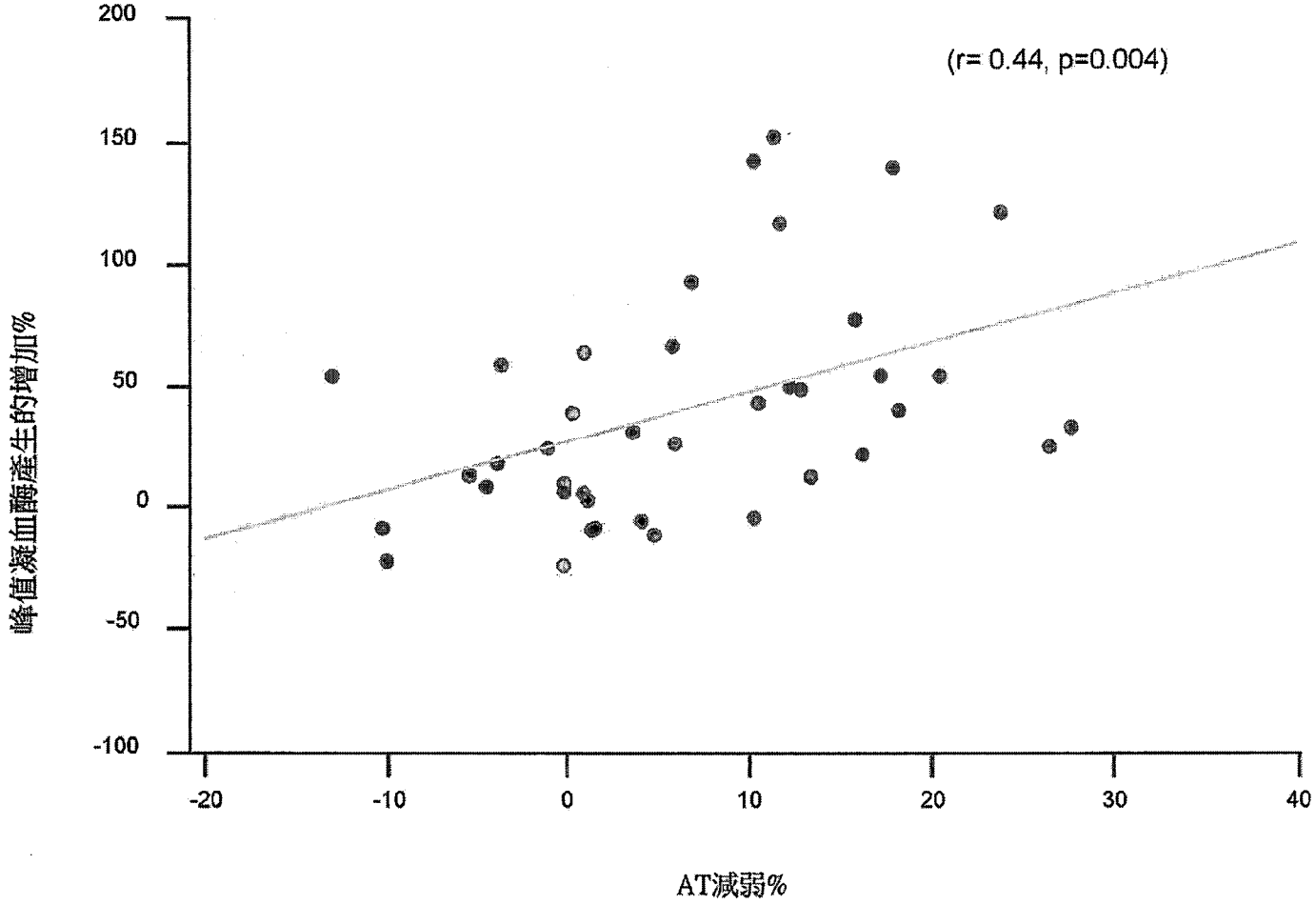
【第1C圖】


AT抗原CRL
相對AT
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0
1
2
3
7
10
14
安慰劑
ALN-AT3SC 0.03mg/kg

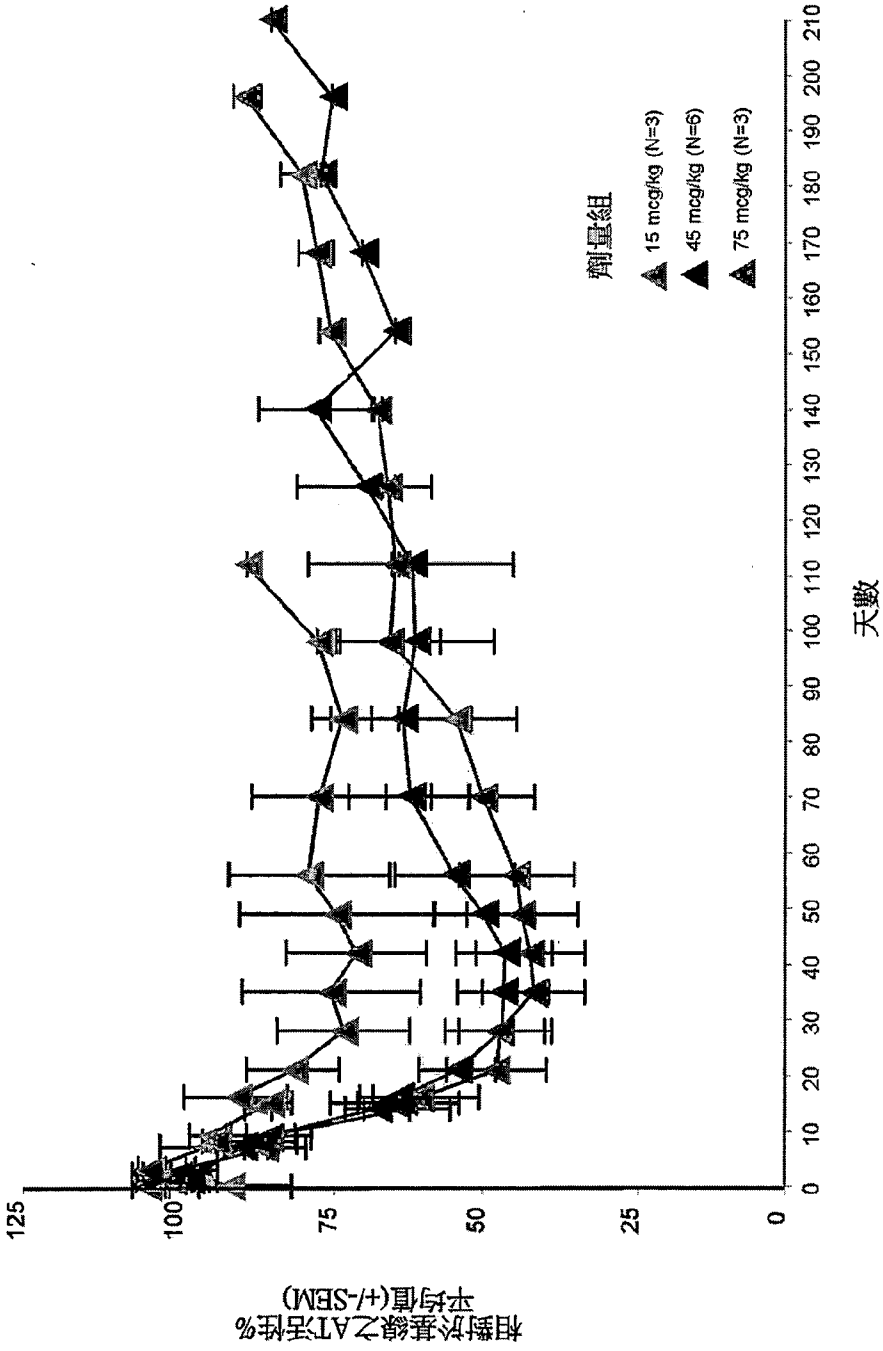
【第2A圖】


AT抗原CRL
相對AT
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0
1
2
3
7
10
14
安慰劑
ALN-AT3SC 0.03mg/kg

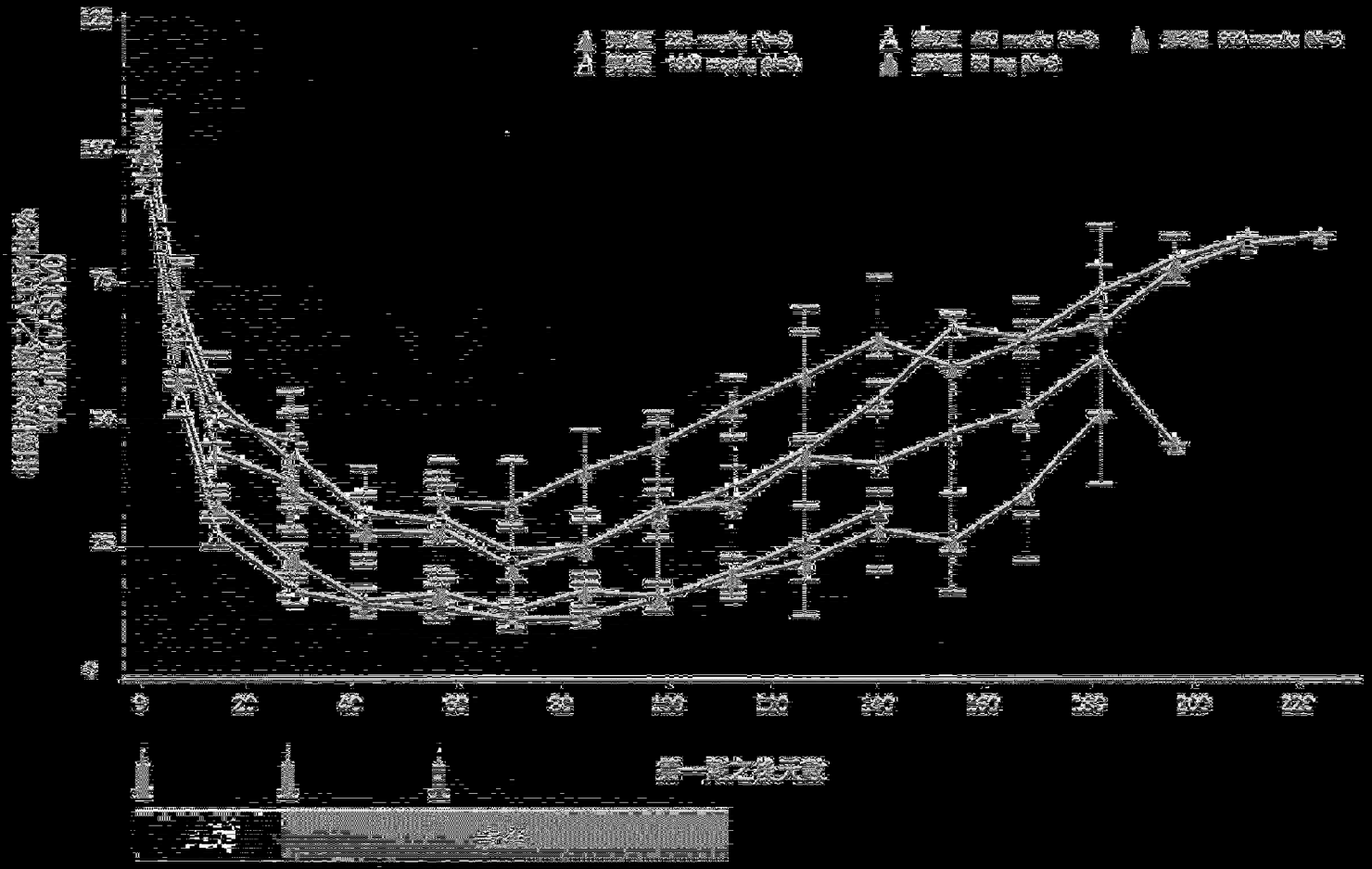
【第2B圖】


(r= 0.44, p=0.004)
200
150
100
50
0
-50
-100
-20
-10
0
10
20
30
40
峰值凝血酶產生的增加%
AT減弱%

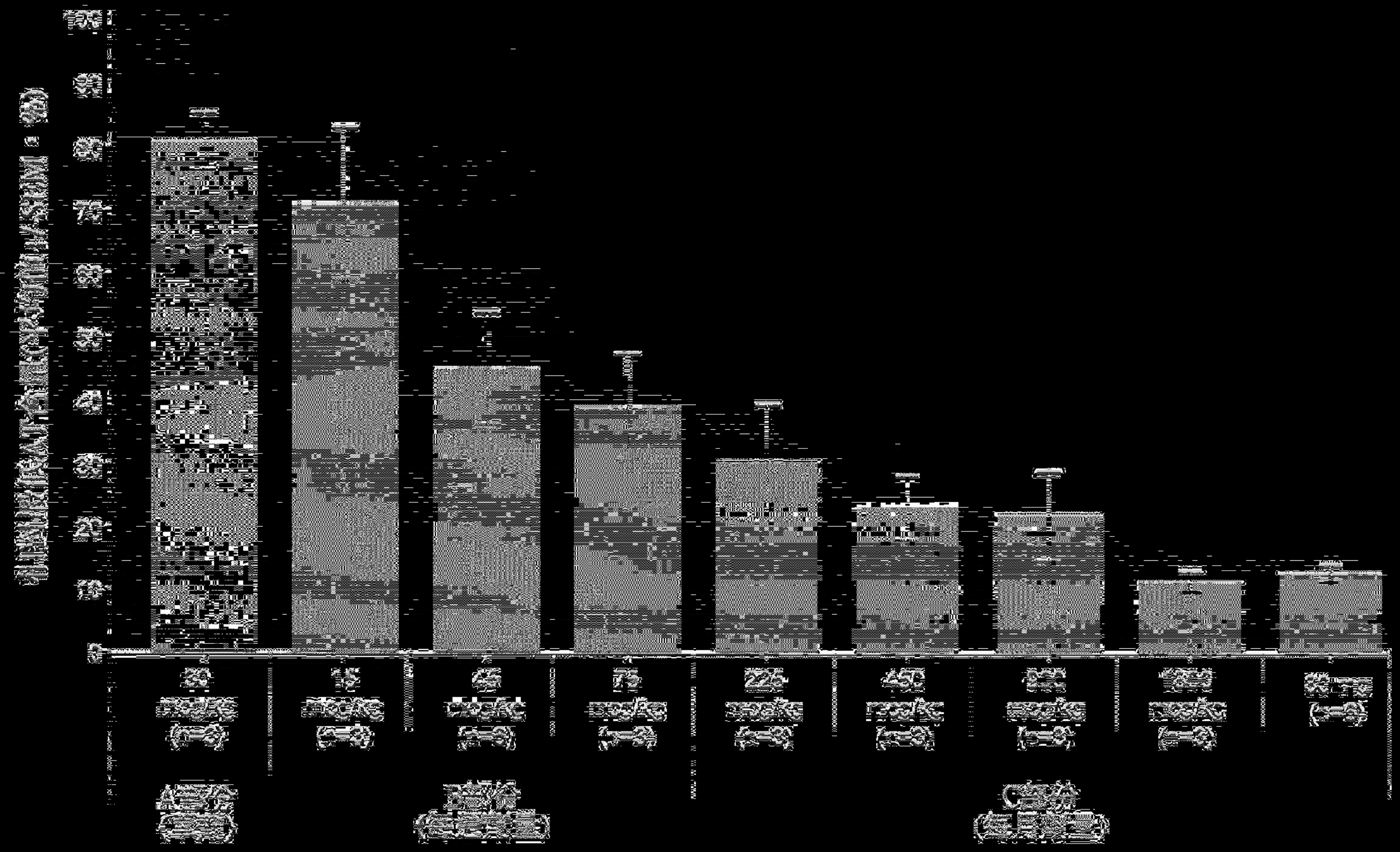
【第3圖】


相對於基線之AT活性%
平均值(+/-SEM)
125
100
75
50
25
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
天數
劑量組
15 mcg/kg (N=3)
45 mcg/kg (N=6)
75 mcg/kg (N=3)

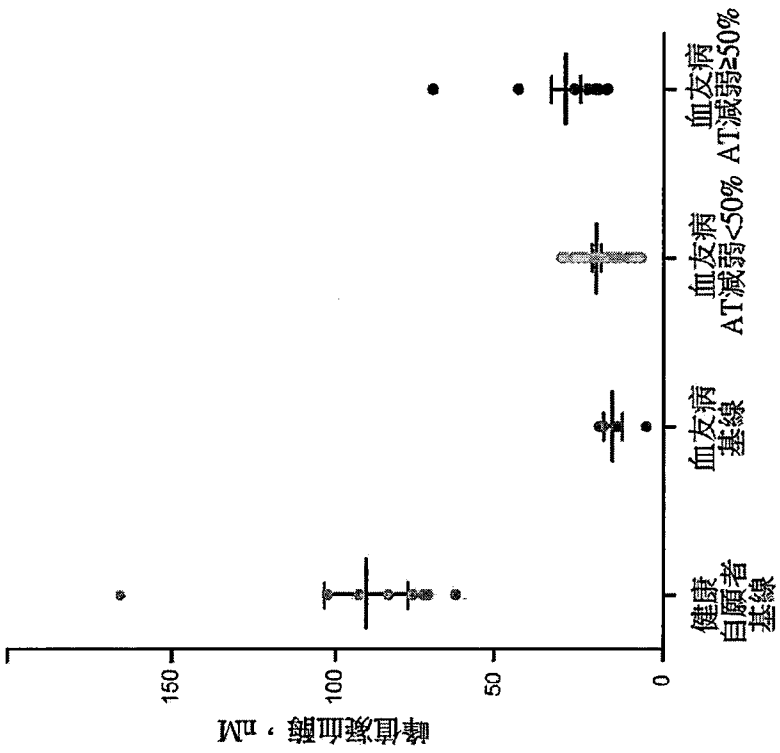
【第4圖】



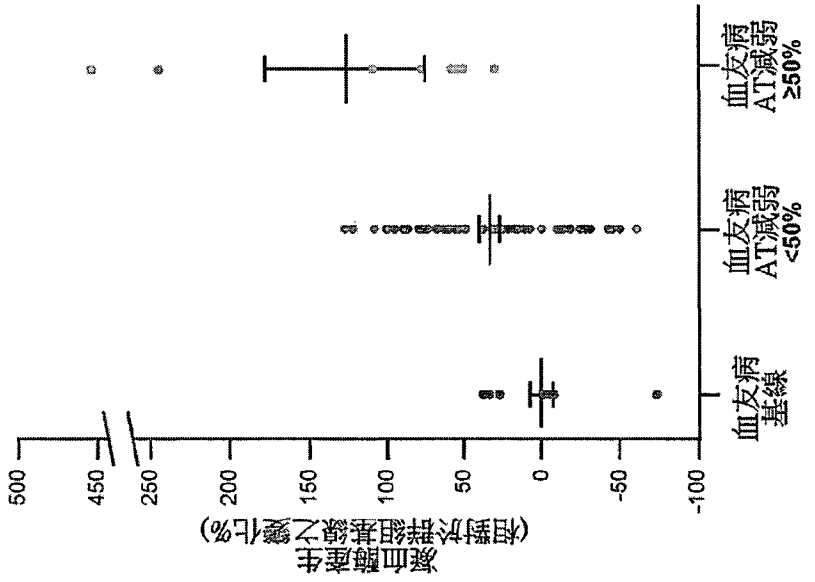
【第5A図】


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
30 mg/kg (n=3)
15 mg/kg (n=3)
45 mg/kg (n=3)
75 mg/kg (n=3)
225 mg/kg (n=3)
450 mg/kg (n=3)
900 mg/kg (n=3)
1800 mg/kg (n=3)
(n=3)
A部分 (單劑)
B部分 (每週劑量)
C部分 (每月劑量)

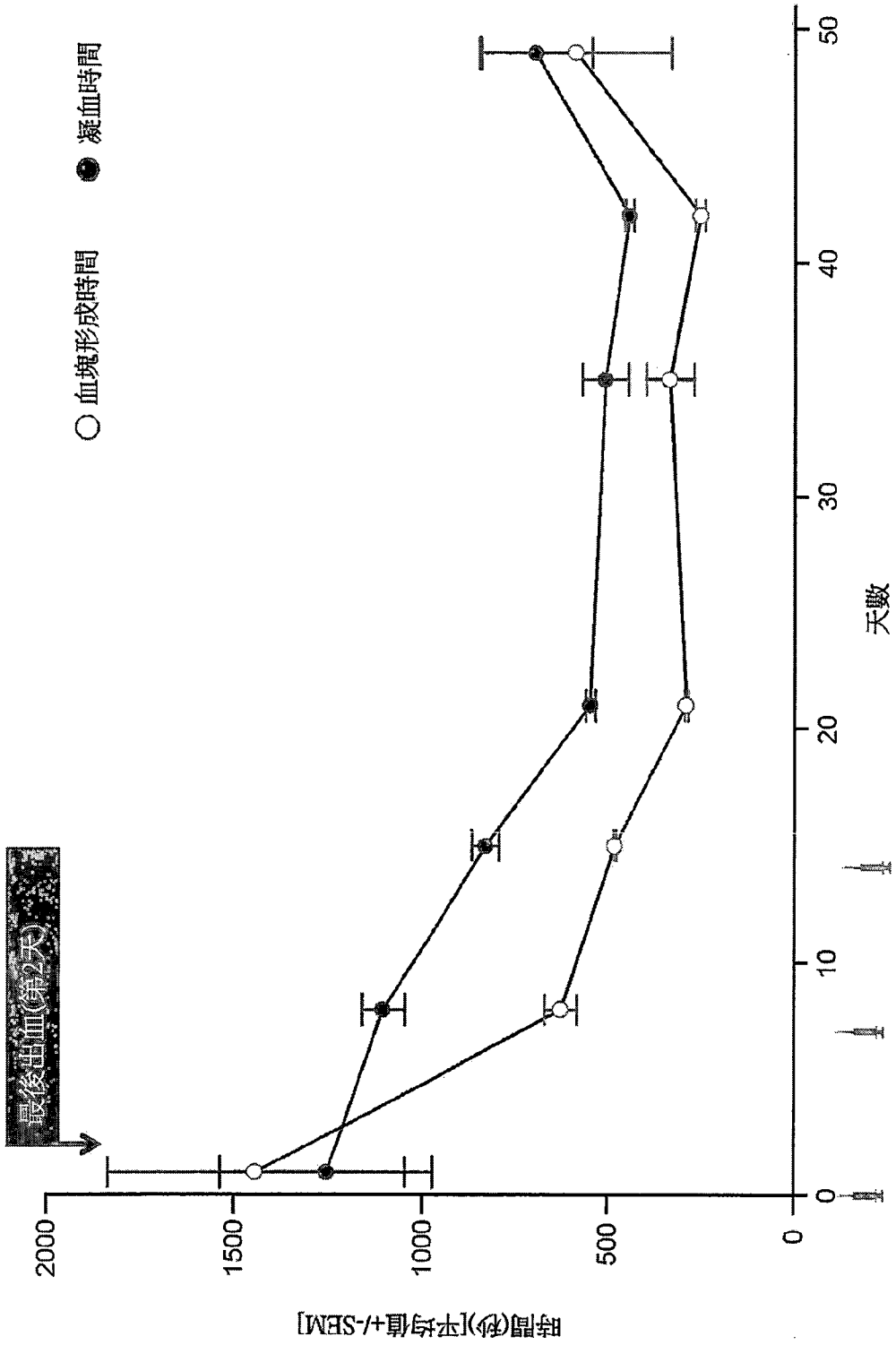
【第5B圖】


峰值凝血酶，nM
150
100
50
0
健康自願者基線
血友病基線
血友病AT減弱<50%
血友病AT減弱≥50%

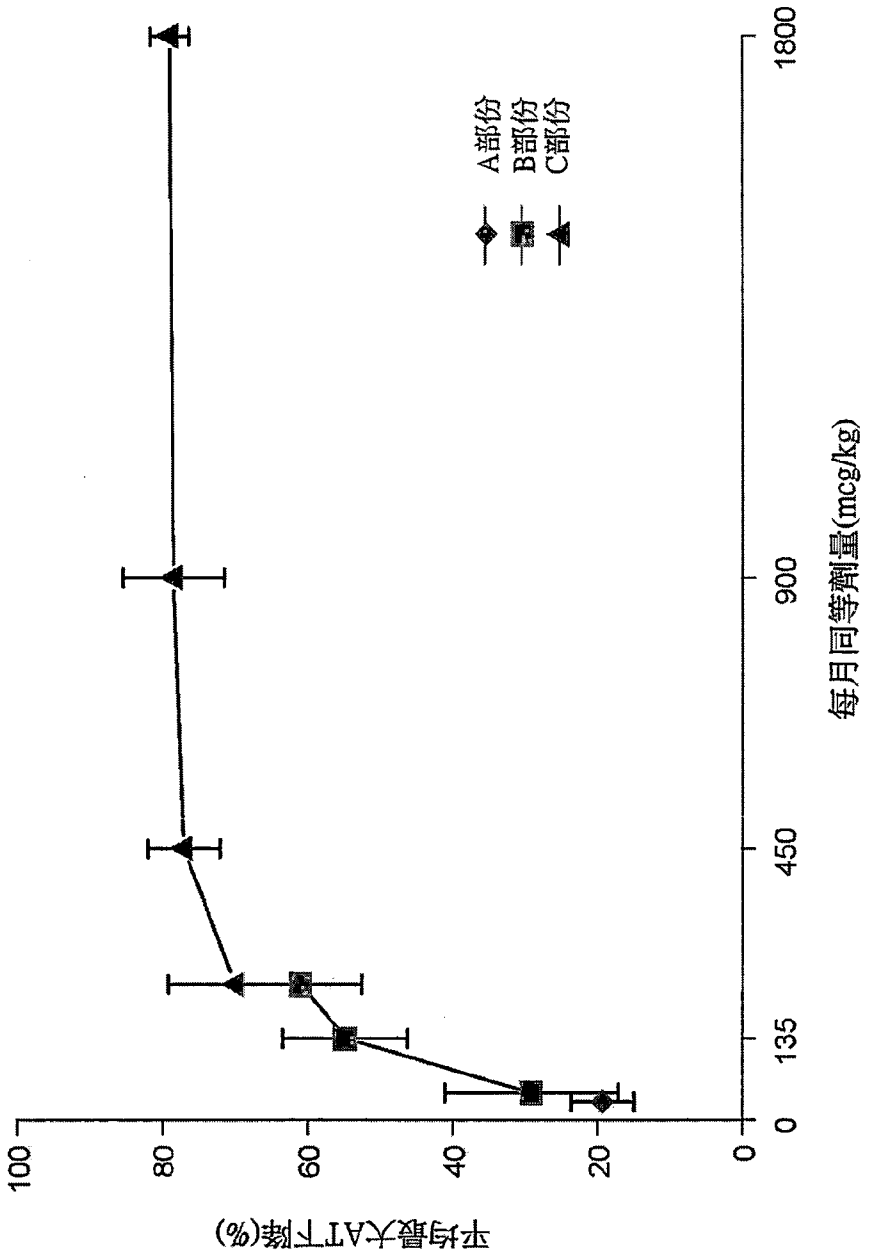
【第6A圖】


凝血酶產生
(相對於群組基線之變化%)
500
450
250
200
150
100
50
0
-50
-100
血友病基線
血友病AT減弱<50%
血友病AT減弱≥50%

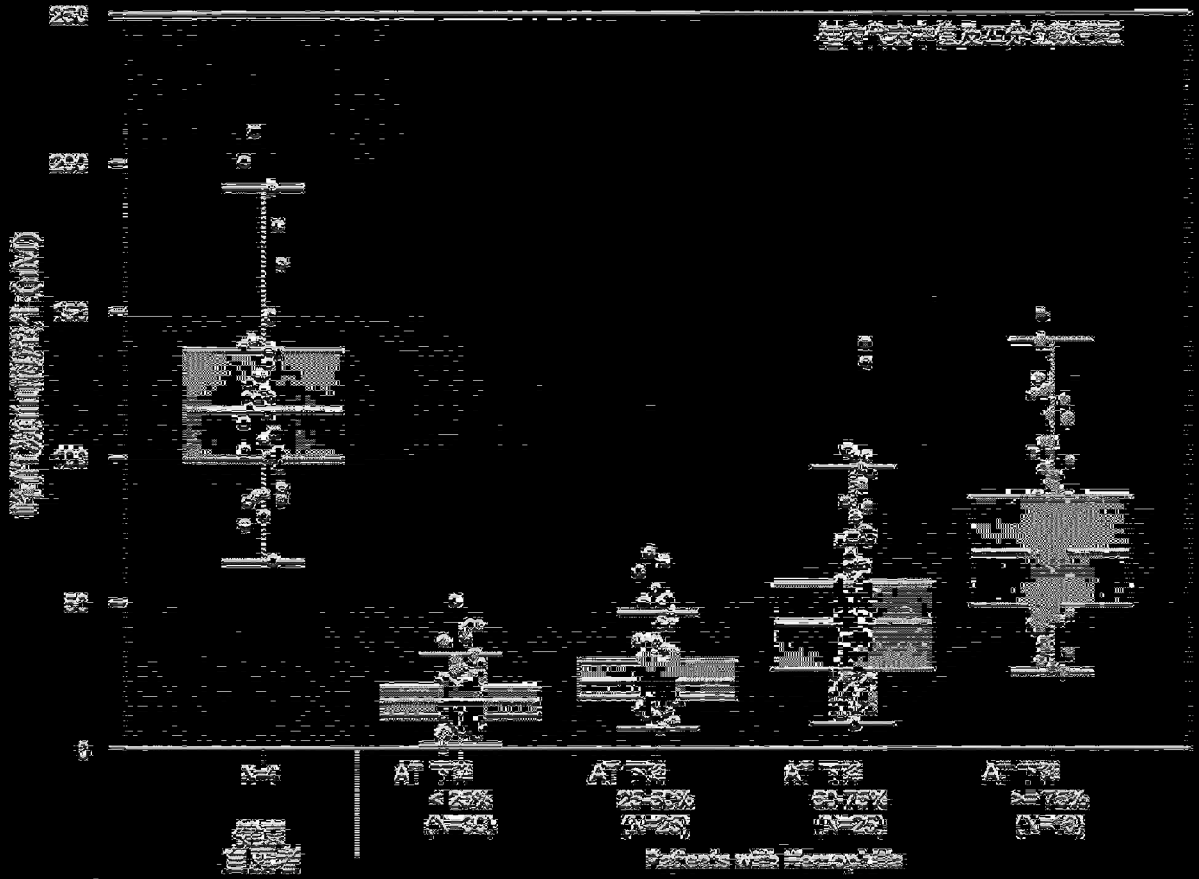
【第6B圖】


○ 血塊形成時間
● 凝血時間
最後出血(第2天)
時間(秒)[平均値+/-SEM]
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
天數

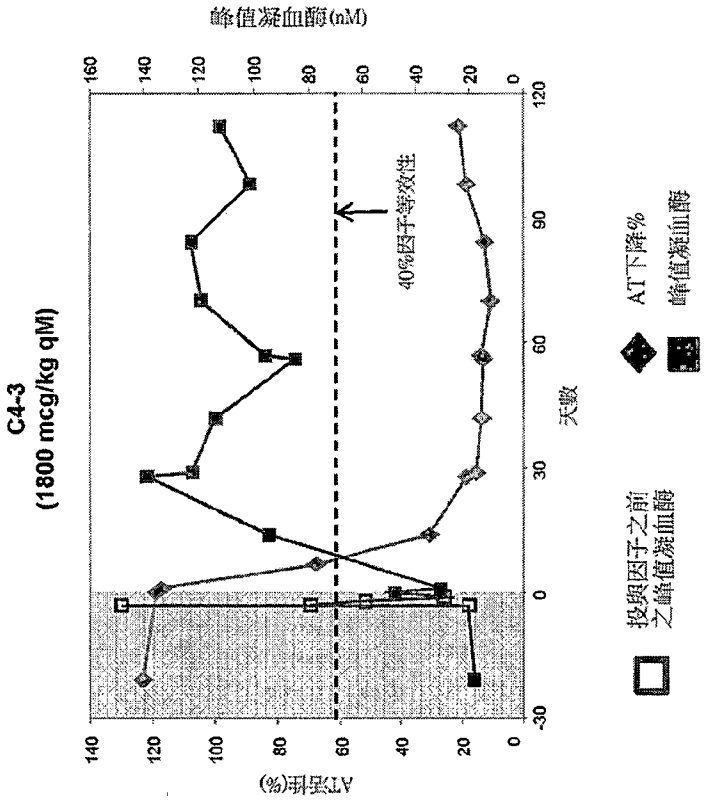
【第7圖】


平均最大AT下降(%)
100
80
60
40
20
0
0
135
450
900
1800
每月同等劑量(mcg/kg)
A部份
B部份
C部份

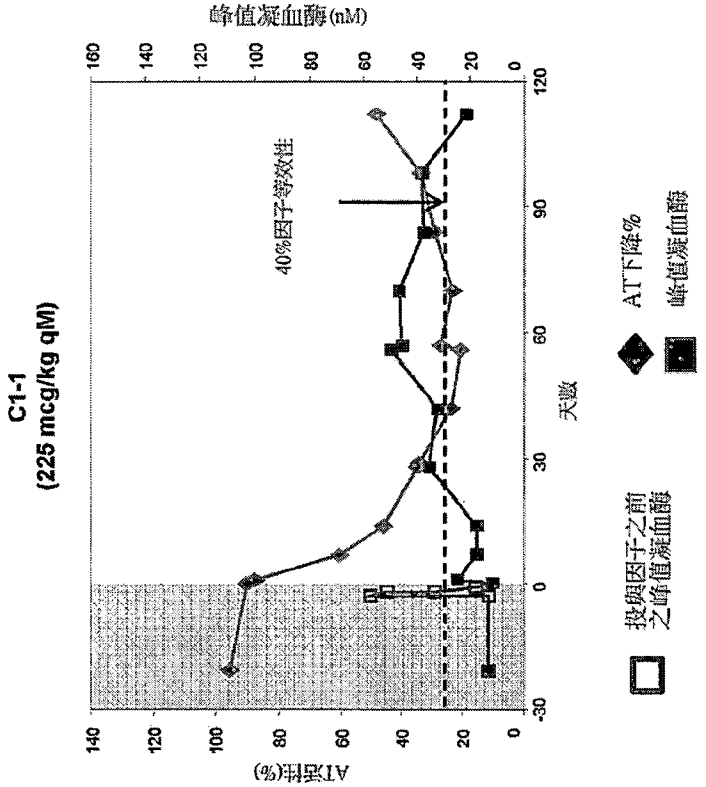
【第8圖】



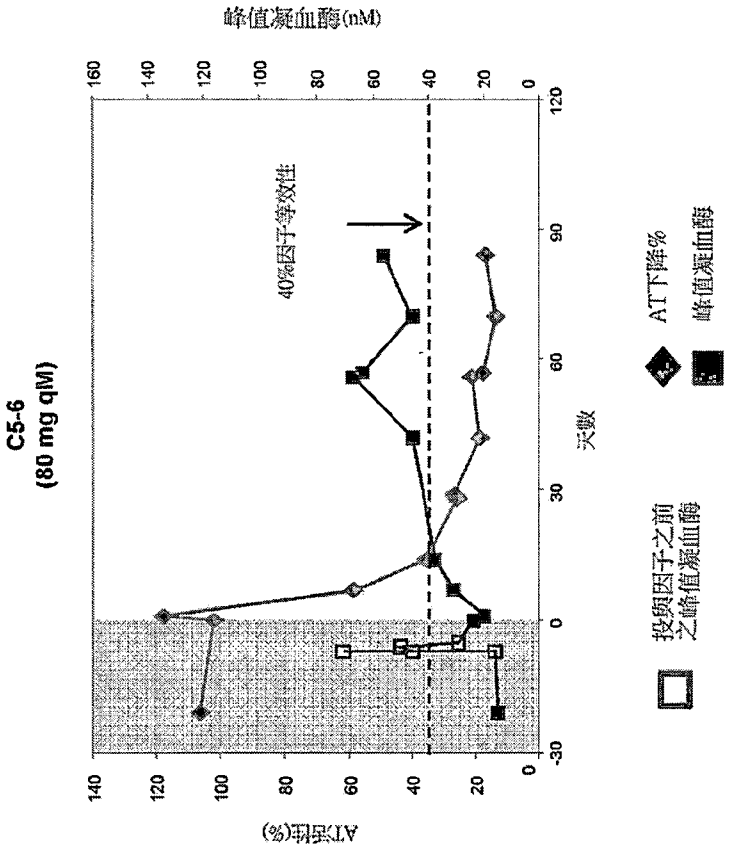
【第9図】


C4-3
(1800 mcg/kg qM)
峰值凝血酶(nM)
AT活性(%)
天數
40%因子等效性
投與因子之前之峰值凝血酶
AT下降%
峰值凝血酶

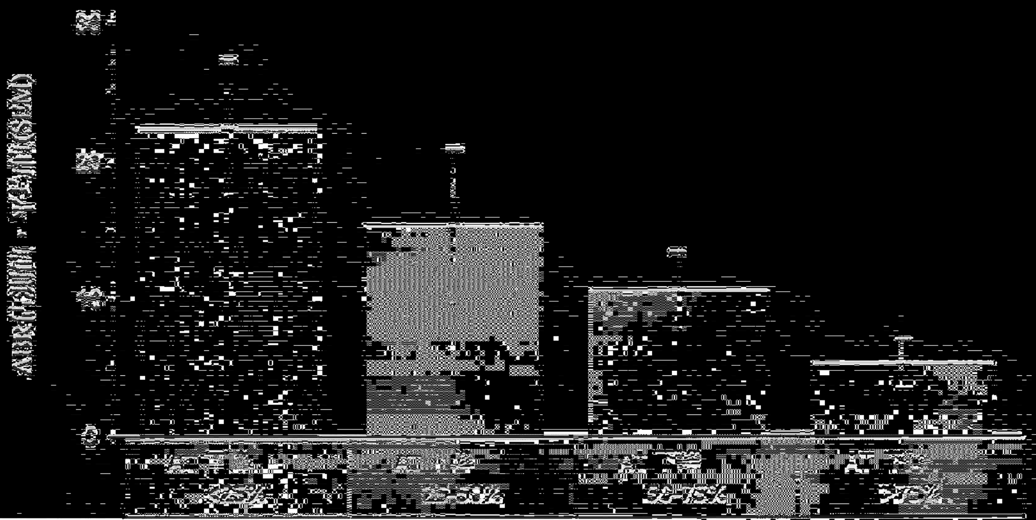
【第10B圖】


C1-1
(225 mcg/kg qM)
峰值凝血酶(nM)
AT活性(%)
天數
40%因子等效性
投與因子之前之峰值凝血酶
AT下降%
峰值凝血酶

【第10A圖】


C5-6
(80 mg qM)
峰值凝血酶(nM)
ATt活性(%)
天數
40%因子等效性
投與因子之前
之峰值凝血酶
AT下降%
峰值凝血酶

【第10C圖】



患者	30	27	25	16
累計天數	733	1139	1203	1172
累計[illegible]天數	17	20	36	11
ADR平均值(SEM)**	22±5	13±5	11±3	3±2
ADR患者	[illegible]	9	5	4

**P值<0.05

ADR：藥物不良反應；SEM：平均值之標準誤差
*[illegible]之累計天數；**每位患者[illegible]之ADR總次數
除以*[illegible]之天數計算

【第11圖】

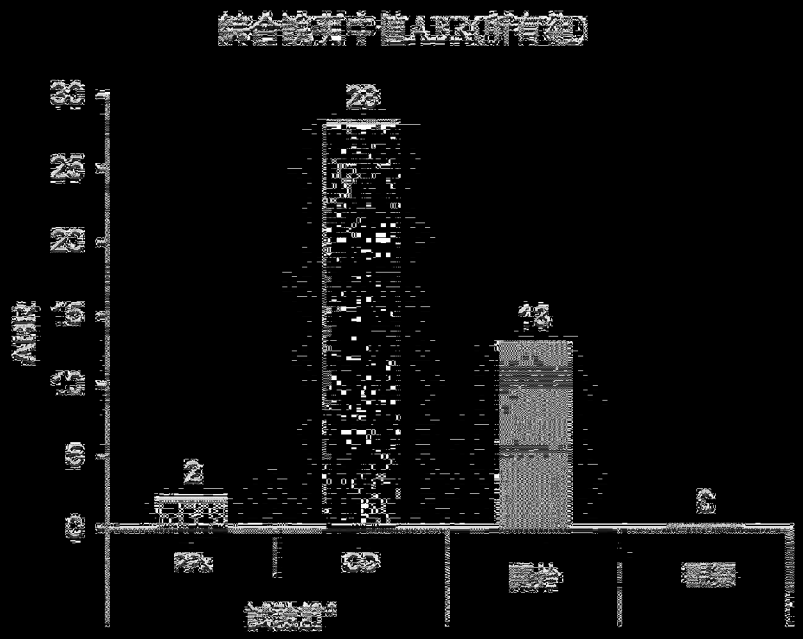
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	C-2	[illegible]	2	33	1	[illegible]	[illegible]	1	[illegible]
225 mg/kg	C-2	[illegible]	0	0	1	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	C-3	[illegible]	0	33	4	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	C-1	[illegible]	4	25	4	[illegible]	[illegible]	3	[illegible]
450 mg/kg	C-2	[illegible]	33	33	0	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	C-3	[illegible]	4	9	1	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	C-1	[illegible]	0	9	0	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
900 mg/kg	C-2	[illegible]	20	25	3	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	C-3	[illegible]	20	25	2	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	C-1	[illegible]	0	25	0	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
2000 mg/kg	C-2	[illegible]	24	0	0	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	C-3	[illegible]	0	25	0	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	C-1	[illegible]	12	[illegible]	1	[illegible]	[illegible]	1	[illegible]
[illegible]	C-2	[illegible]	16	0	0	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	C-3	[illegible]	8	33	2	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	C-5	[illegible]	6	0	0	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	C-6	[illegible]	2	[illegible]	0	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]

[illegible] OD [illegible] ADR [illegible] ADR [illegible]

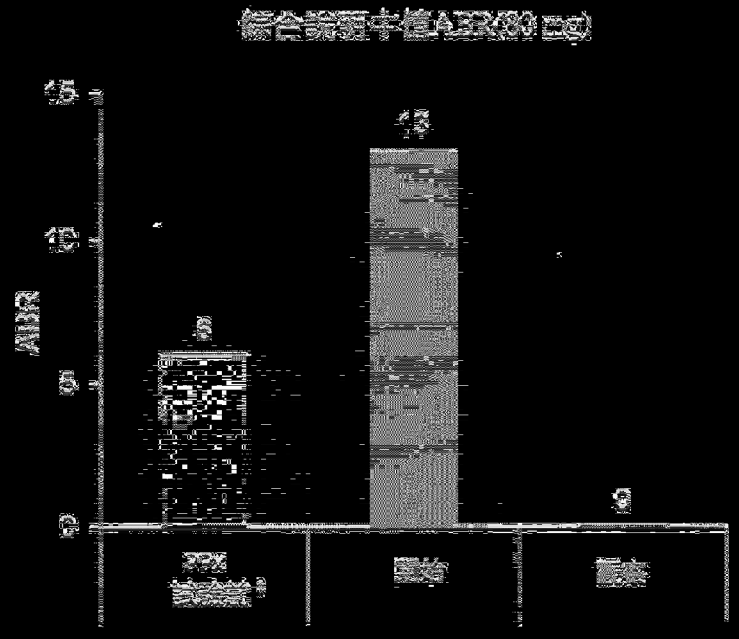
[illegible]

[illegible]

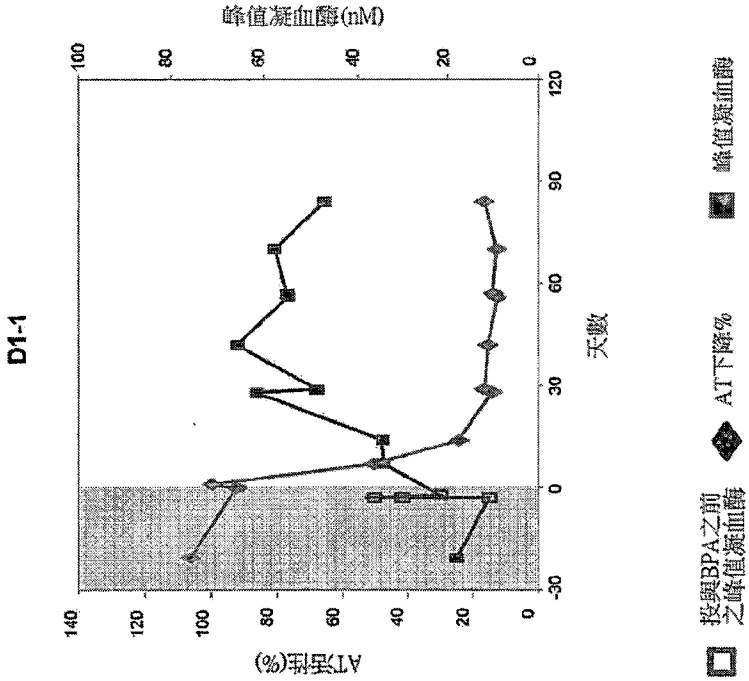
【第2図】


綜合試験中値ABR(対有効)
ABR
30
25
20
15
10
5
0
2
23
13
6
[illegible]

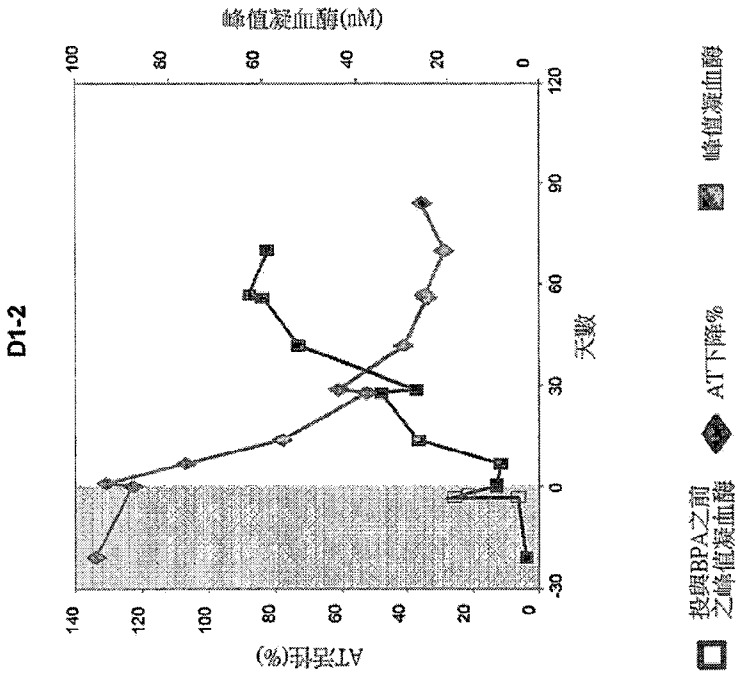
【第13A図】


綜合試験中値ABR(30 pg)
ABR
15
10
5
0
6
13
9
[illegible]

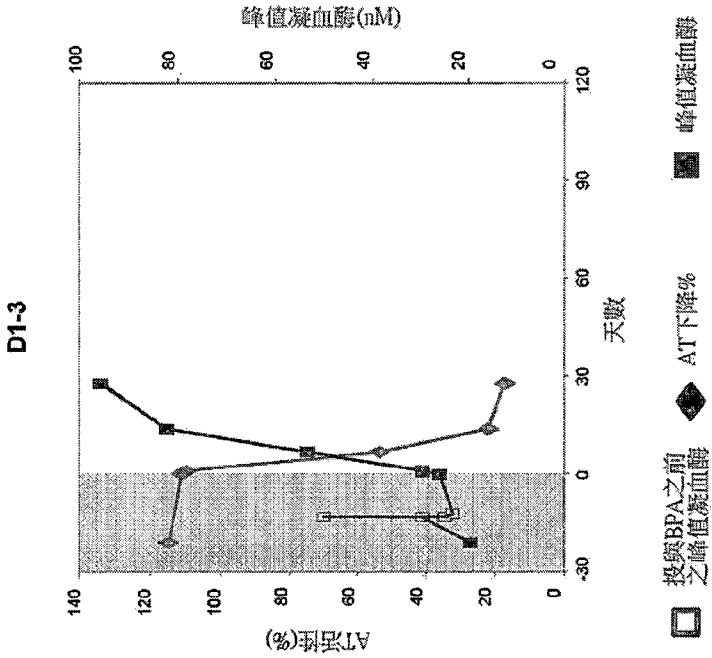
【第13B図】


D1-1
AT活性(%)
峰值凝血酶(nM)
天數
140
120
100
80
60
40
20
0
-30
0
30
60
90
120
投與BPA之前之峰值凝血酶
AT下降%
峰值凝血酶

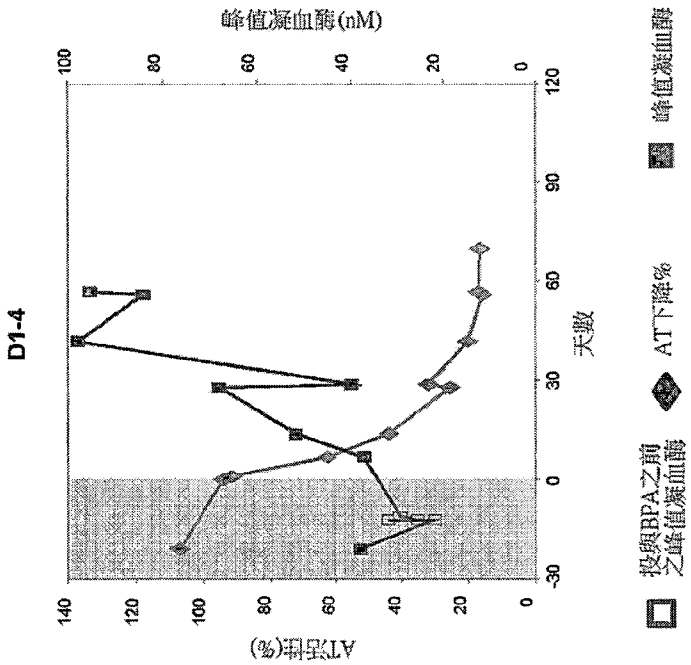
【第14A圖】


D1-2
AT活性(%)
峰值凝血酶(nM)
天數
140
120
100
80
60
40
20
0
-30
0
30
60
90
120
投與BPA之前之峰值凝血酶
AT下降%
峰值凝血酶

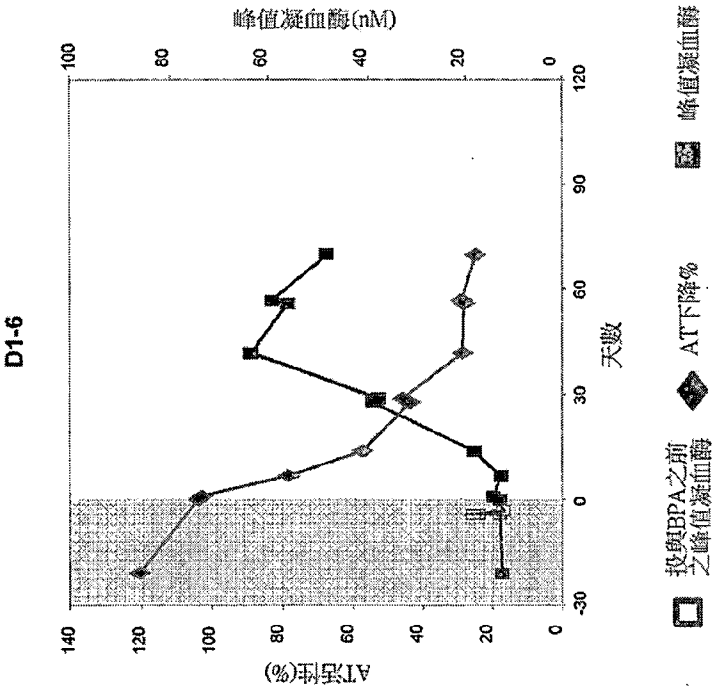
【第14B圖】


D1-3
AT活性(%)
峰值凝血酶(nM)
天數
140
120
100
80
60
40
20
0
-30
0
30
60
90
120
投與BPA之前之峰值凝血酶
AT下降%
峰值凝血酶

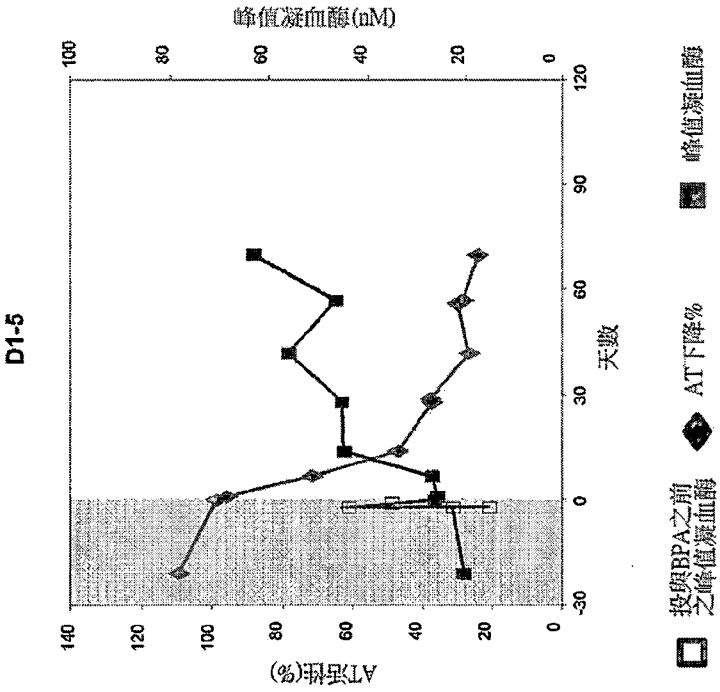
【第14C圖】


D1-4
AT活性(%)
峰值凝血酶(nM)
天數
140
120
100
80
60
40
20
0
-30
0
30
60
90
120
投與BPA之前之峰值凝血酶
AT下降%
峰值凝血酶

【第14D圖】


D1-6
AT活性(%)
峰值凝血酶(nM)
天數
投與BPA之前之峰值凝血酶
AT下降%
峰值凝血酶

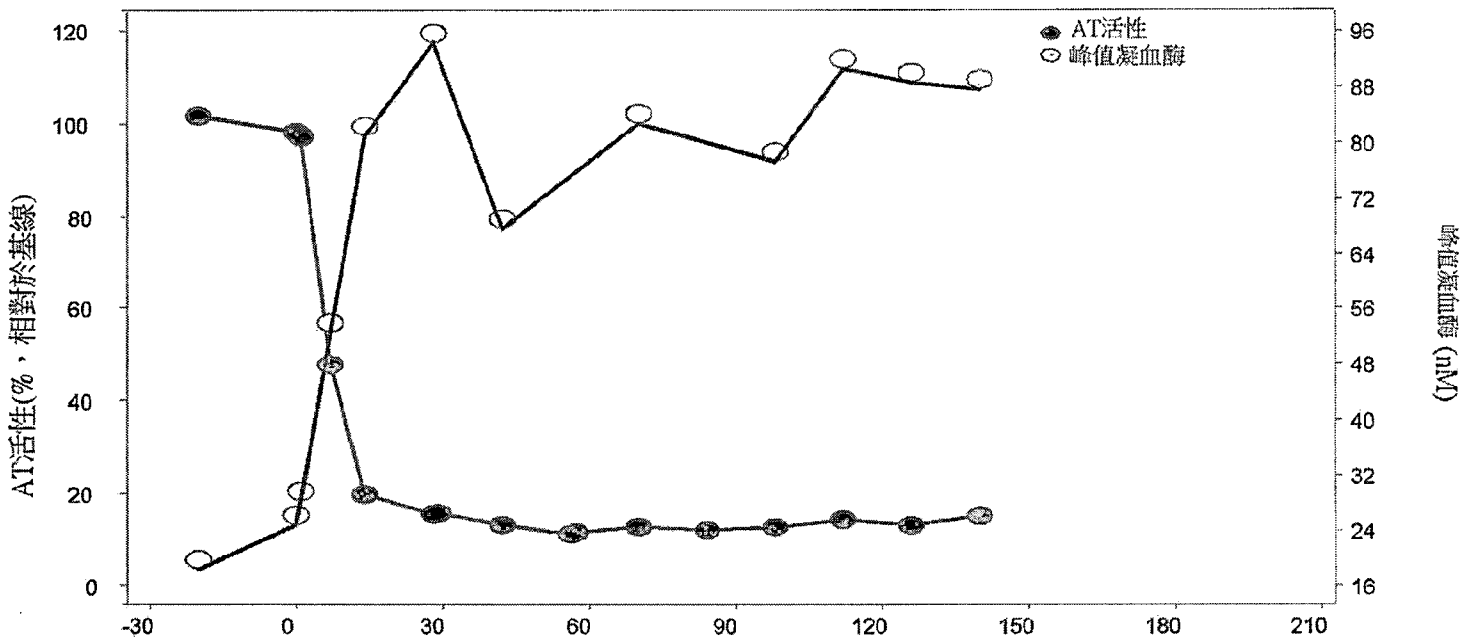
【第14F圖】


D1-5
AT活性(%)
峰值凝血酶(nM)
天數
投與BPA之前之峰值凝血酶
AT下降%
峰值凝血酶

【第14E圖】

图5

患者病例，D1-3(50mg)



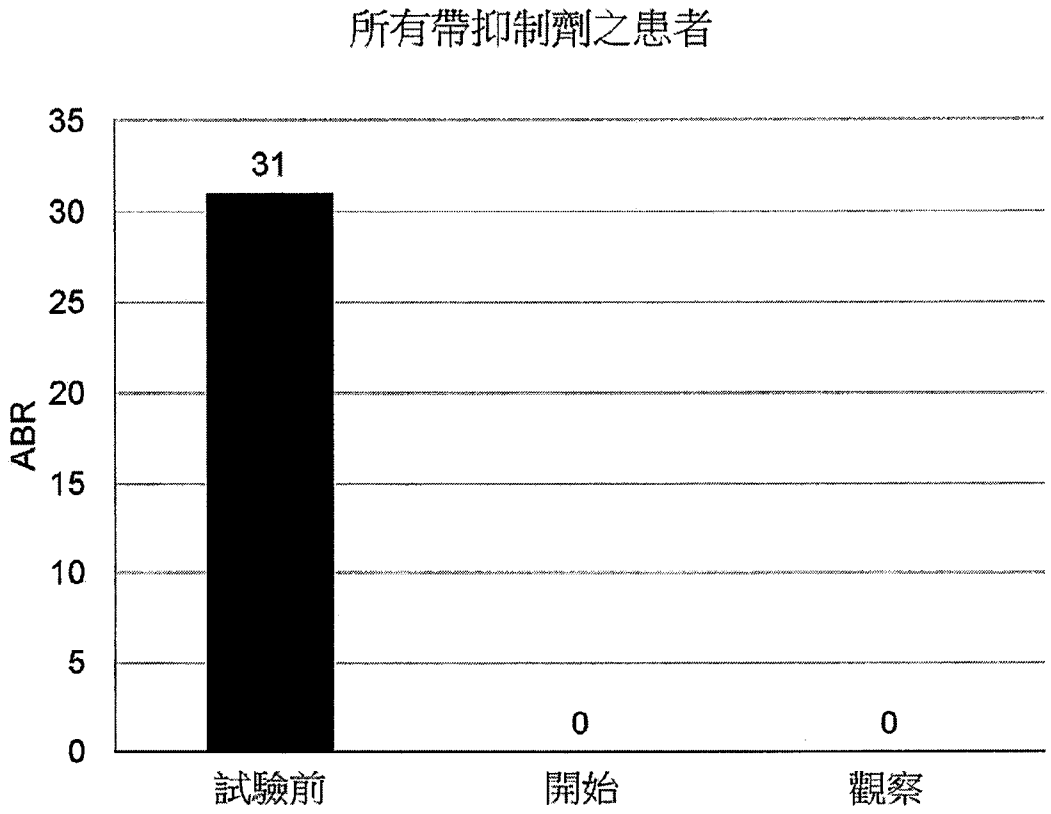
第一劑之後天數

【第16圖】

患者	劑量	試驗前 ABR‡	開始 ABR	觀察期				
				觀察期天數	全出血，n	ABR	自發性出血，n	AsBR
D1-1^	50 mg	40	13	191	3	5.7	2	3.8
D1-2^	50 mg	26	13	180	5	10.1	3	6.1
D1-3	50 mg	0	0	84	0	0	0	0
D1-4^	50 mg	52	38	162	11	25	9	20
D1-5^	50 mg	80	38	160	20	46	12	27
D1-6^	50 mg	16	13	156	0	0	0	0
D2-1	80 mg	48	0	48	1	7.6	0	0
D2-2	80 mg	48	0	41	0	0	0	0
D2-3	80 mg	8	0	72	0	0	0	0
D2-4^	80 mg	48	13	56	0	0	0	0
D2-5	80 mg	36	0	69	0	0	0	0
D2-6	80 mg	20	0	69	1	5.3	0	0
D2-7^	80 mg	14	0	55	0	0	0	0
D2-8	80 mg	20	13	55	2	13.3	2	13.3
D2-9	80 mg	12	0	13	0	0	0	0
D2-10	80 mg	44	0	13	0	0	0	0

OLE：開放標籤延伸；ABR：年出血率；AsBR：年自發性出血率；
†在開始期間(第0至28天)及觀察期(第29天至最後一次試驗訪診或最後一劑+ 56天，以先到的時間為準)之已處理出血事件之事後比較分析　‡試驗前ABR係來自醫學記錄
^患者因數據中斷而移至第2期OLE

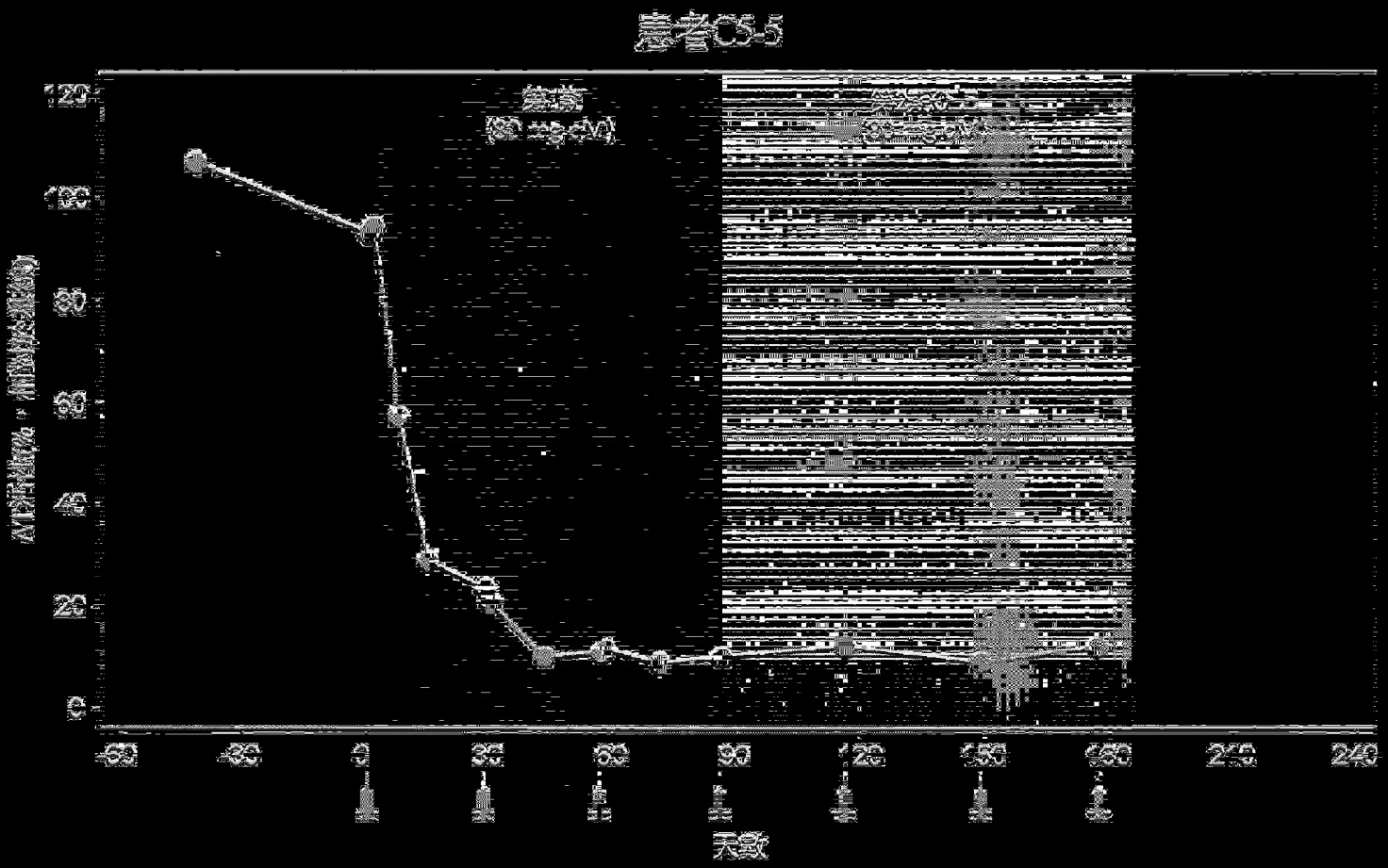
【第17A圖】



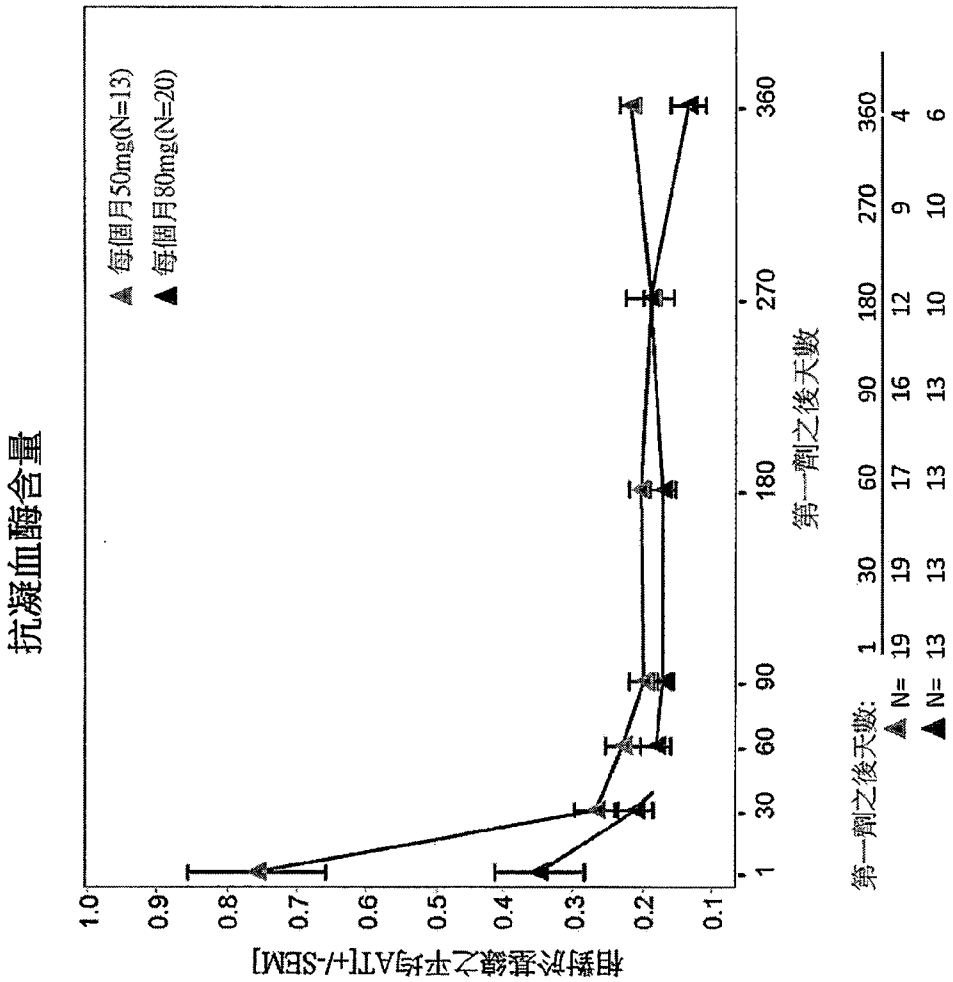
- 中值ABR，試驗前之期間：31
- 中值ABR，觀察期：0
  - 報告零出血之患者：9/16(56%)
  - 報告零自發性出血之患者(AsBR=0)：11/16(69%)

OLE：開放性延伸；ABR：年出血率；AsBR：年自發性出血率；

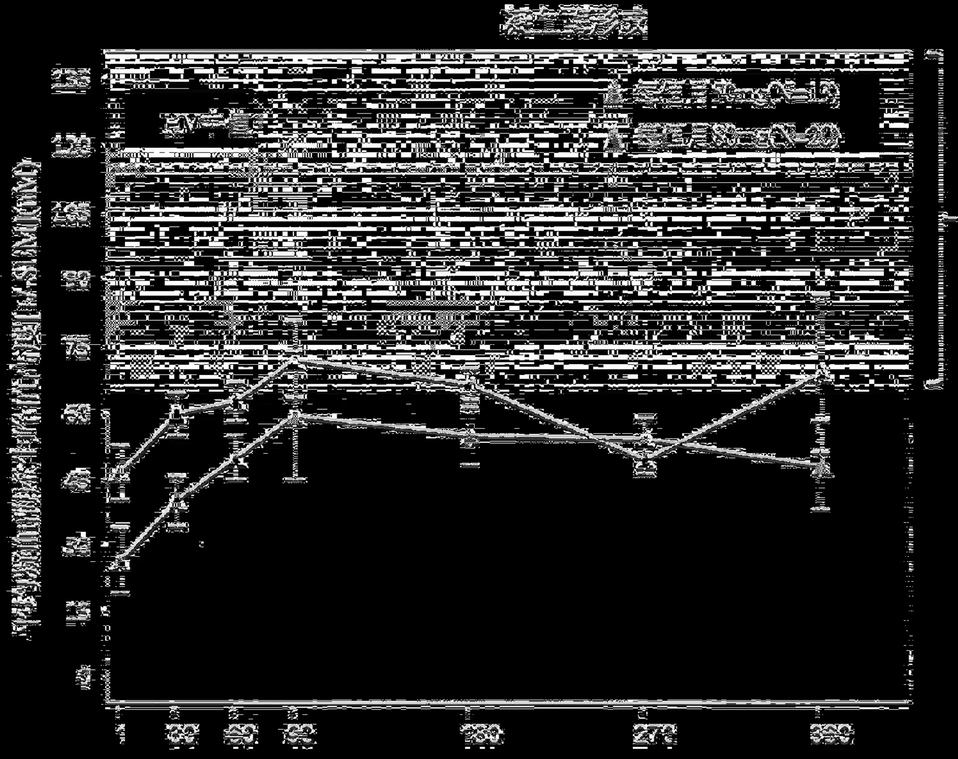
【第17B圖】


実施例5-5
実施
(80 mg/dl)
ATBF指数（相当量%）
120
100
80
60
40
20
0
-60
-30
0
30
60
90
120
150
180
210
240
日数

【第18図】


抗凝血酶含量
▲ 每個月50mg(N=13)
▲ 每個月80mg(N=20)
相對於基線之平均ATT[+/-SEM]
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
1
30
60
90
180
270
360
第一劑之後天數
第一劑之後天數: 1 30 60 90 180 270 360
▲ N= 19 19 17 16 12 9 4
▲ N= 13 13 13 13 10 10 6

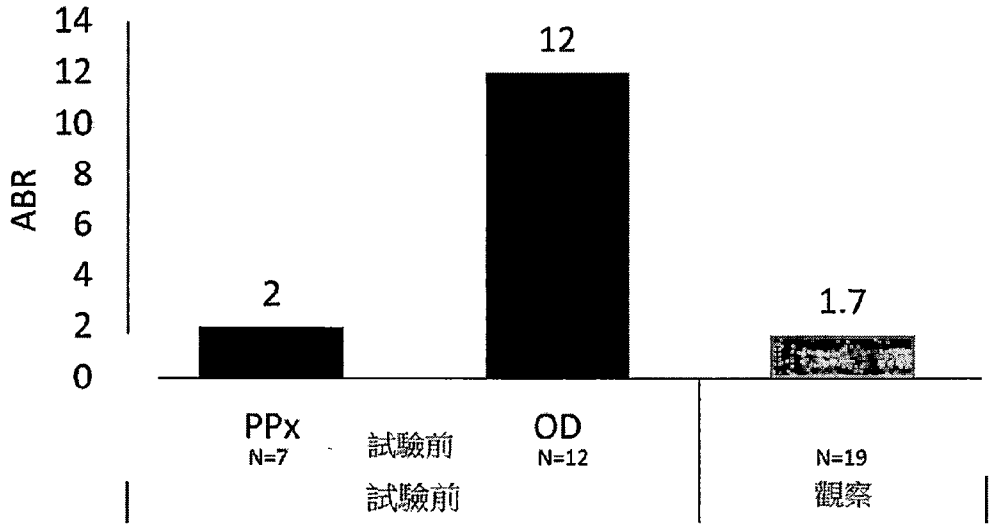
【第19A圖】



第一劑之後天數	1	30	60	90	180	270	360
▲ N=	17	17	13	13	12	7	4
△ N=	12	10	11	11	9	8	5

【第193圖】

- 不帶抑制劑之患者之中值ABR綜合說明

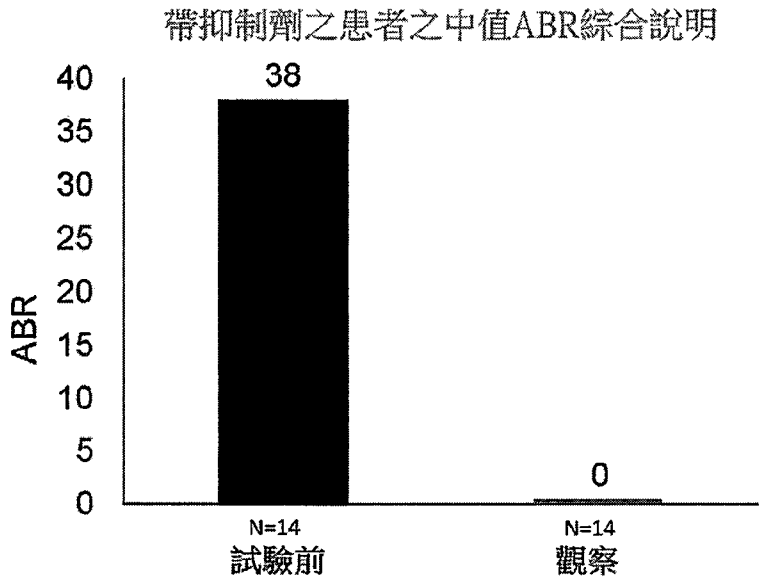


- 觀察期之中值持續時間：13個月[範圍2-19]
- 觀察期之平均AT活性(相對於基線)：22%

† 觀察期之定義為處理第29天至數據轉移或最後一劑之後56天，以先到的時間為準

ABR：年出血率；AsBR：年自發性出血率；PPx：預防性；OD：依需要

【第20A圖】



- 觀察期之中值持續時間：6個月[範圍1-11]
- 觀察期之平均AT活性(相對於基線)：18%

† 觀察期之定義為處理第29天至數據轉移或最後一劑之後56天，以先到的時間為準

ABR：年出血率；AsBR：年自發性出血率；
PPx：預防性；OD：依需要

【第20B圖】

被験者	乙群	甲群
総合評価	25	68
被験者	10	5
症状		
自覚症	8	30
他覚症	15	18
悪化	2	-
副作用		
眠気	19	34
頭痛	1	14
倦怠	2	-
皮膚発疹	3	-

※ 被験者数は、右下顎骨骨折の患者を治療対象とし、
重複して登録した。

【第21図】

[illegible]	FVIII (n=3)	FIX (n=2)
[illegible]	不超過50 IU/kg [illegible] [illegible] 24小時之後 [illegible]	不超過50 IU/kg [illegible] [illegible] 24小時之後 [illegible]
總治療次數	18	7
[illegible]	20	27
每次治療之平均輸注次數(中位數，範圍)	2 (1.5; 1-7)	3.9 (3; 1-8)
每次注射之平均劑量	17 (5 – 32) IU/kg	18 (9 – 27) IU/kg
[illegible]	100%	100%
每次[illegible]之[illegible]平均[illegible]	19 IU/kg	70 IU/kg

FVIII，因子VIII；FIX，因子IX

所使用之重組因子產品：艾得凝(Advate)、[illegible](Alprolix)、[illegible](BeneFIX)、[illegible](Eloctate)、[illegible] ([illegible])、[illegible]([illegible])、[illegible]([illegible])、[illegible]([illegible])、[illegible]([illegible])、[illegible](Recombinate)、[illegible](Refacto)

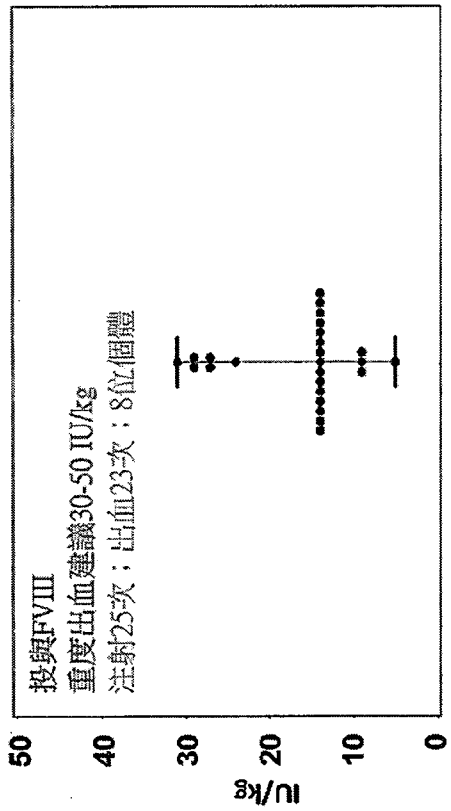
【第22圖】

特徴	対照（n=4）	実験（n=4）
年齢	10歳以上 7歳以下	10歳以上 7歳以下
体重	30kg以上 20kg以下	30kg以上 20kg以下
輸血の回数，n	56	3
輸血の頻度，%	82	8
輸血1回当たりの赤血球濃厚液（RBC）量	1.5 (1; 1-3)	2.7 (3; 2-3)
輸血1回当たりのFFP量	27 (14–37) U/kg	59 (37–82) mL/kg
輸血1回当たりのPC量	95% (53)	100% (3)
輸血1回当たりのEPA量	40 U/kg	150 U/kg

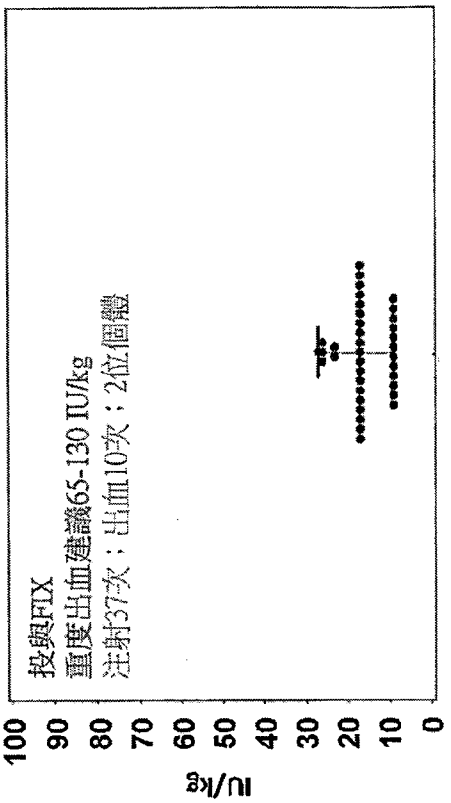
RCC：赤血球濃厚液；FFP：凍結血漿；PC：血小板；EPA：赤血球

所属機関：NEBA、NovoSeven、Professionsjour

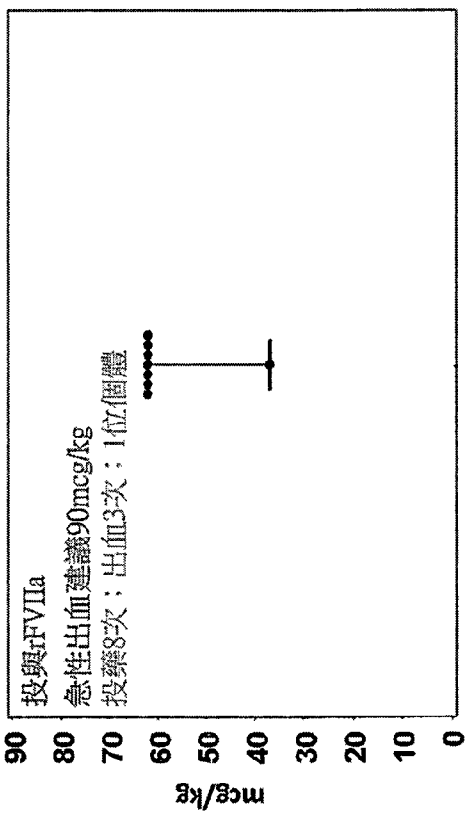
【第23頁】



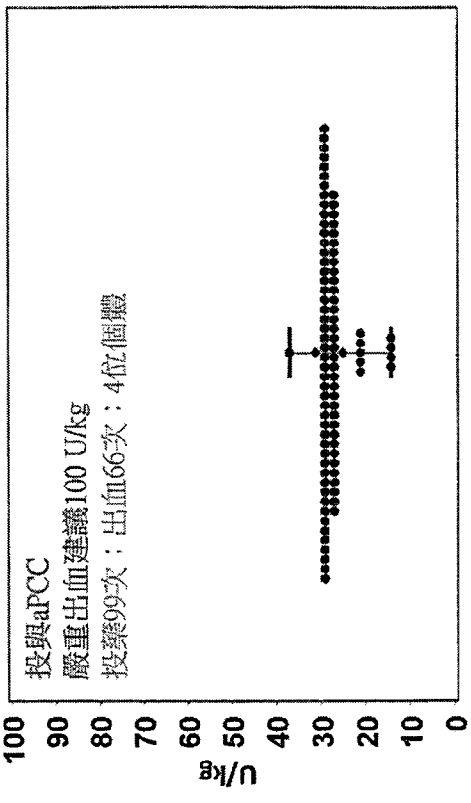
【第24A圖】



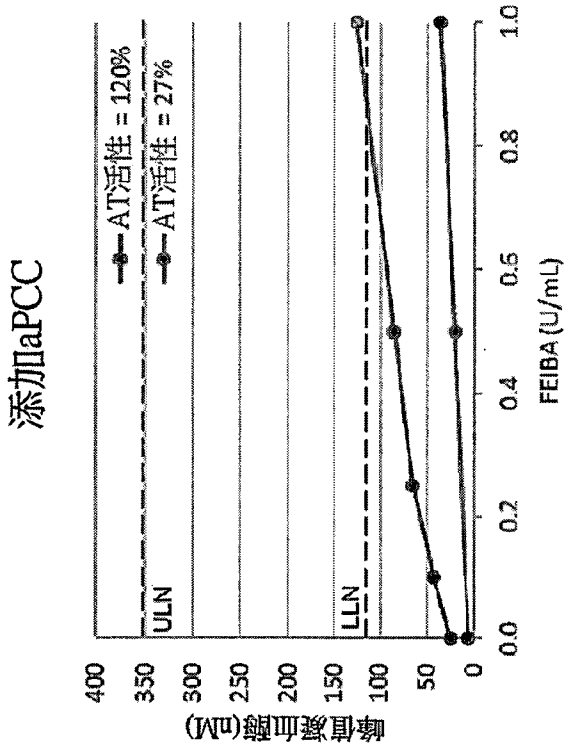
【第24B圖】



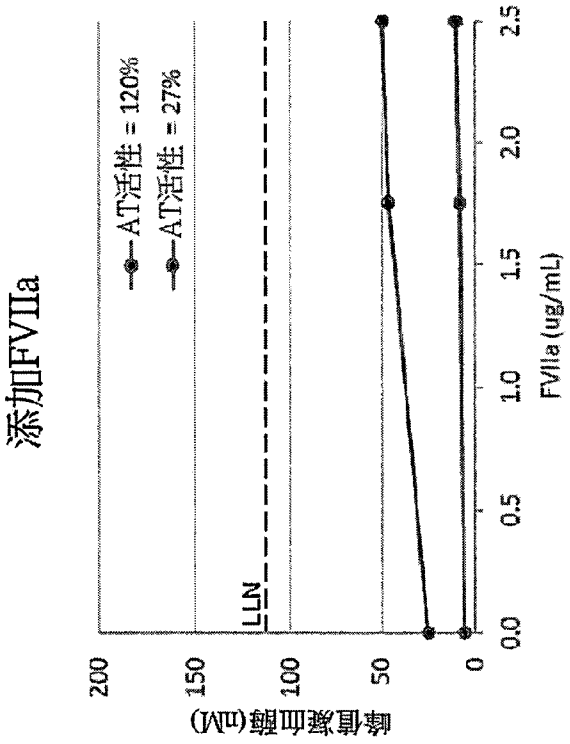
【第24C圖】



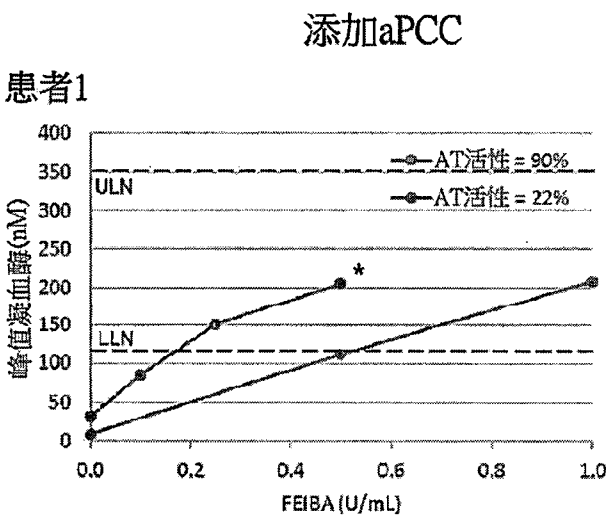
【第24D圖】


添加aPCC
AT活性 = 120%
AT活性 = 27%
ULN
LLN
峰值凝血酶(nM)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
FEIBA (U/mL)

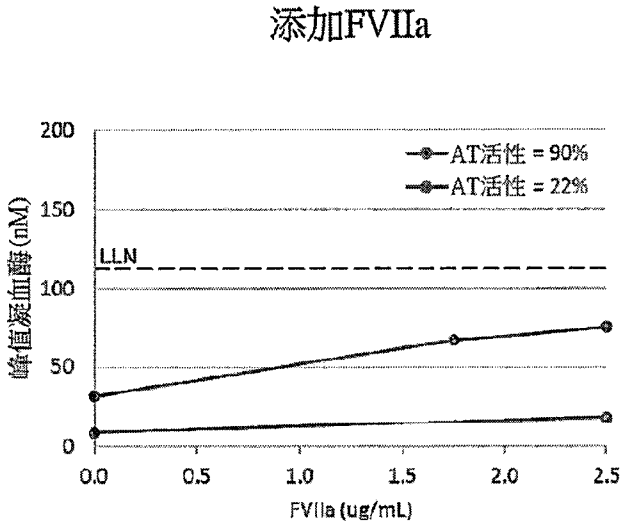
【第25A圖】


添加FVIIa
AT活性 = 120%
AT活性 = 27%
LLN
峰值凝血酶(nM)
200
150
100
50
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
FVIIa (ug/mL)

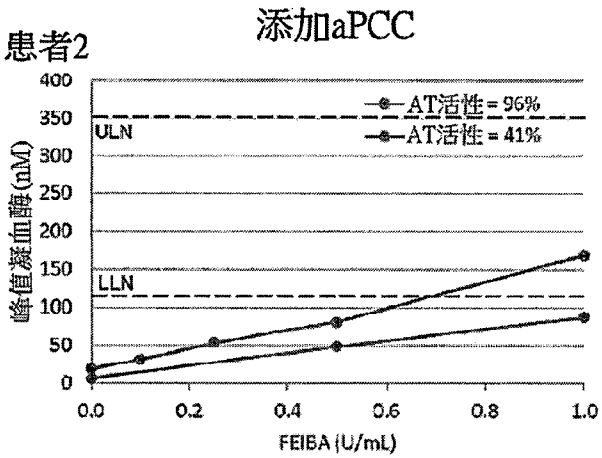
【第25B圖】



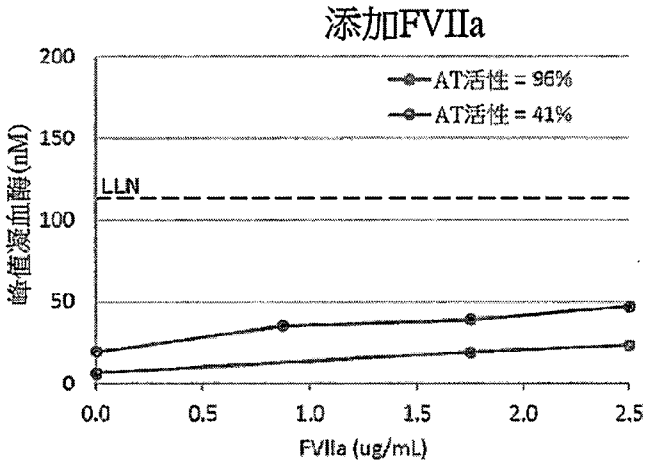
【第26A圖】



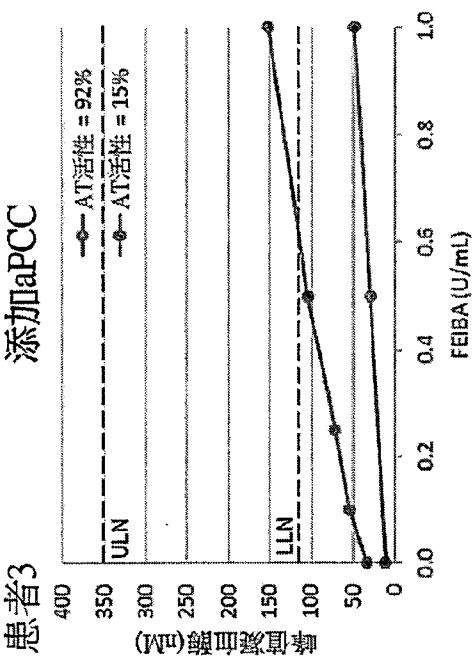
【第26B圖】



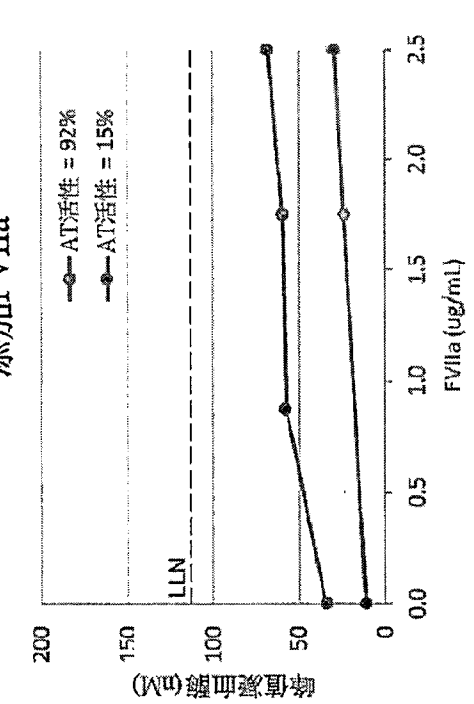
【第26C圖】



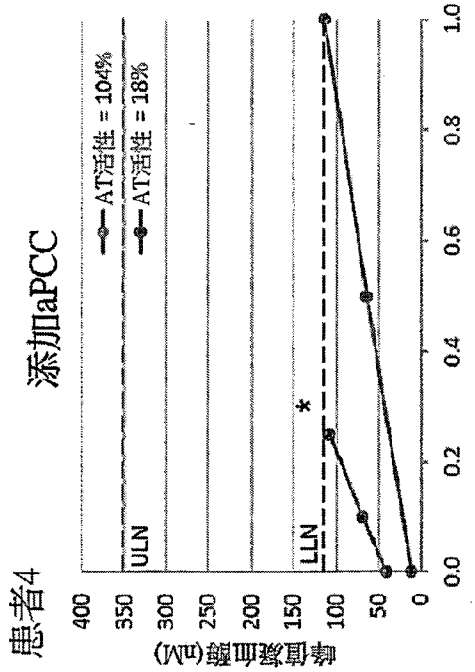
【第26D圖】



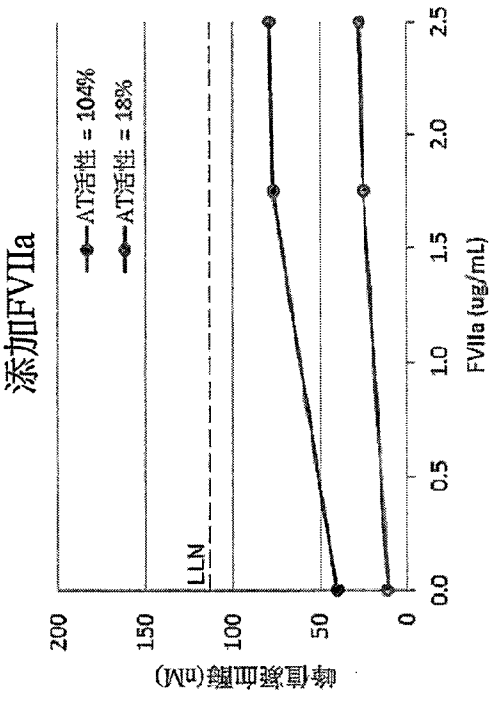
【第26E圖】



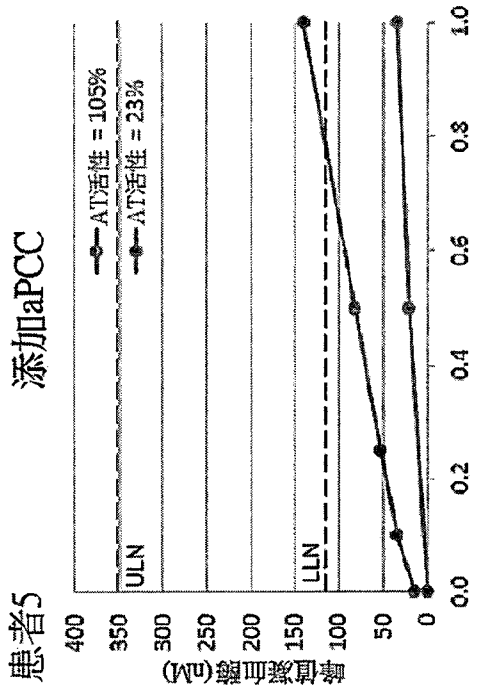
【第26F圖】



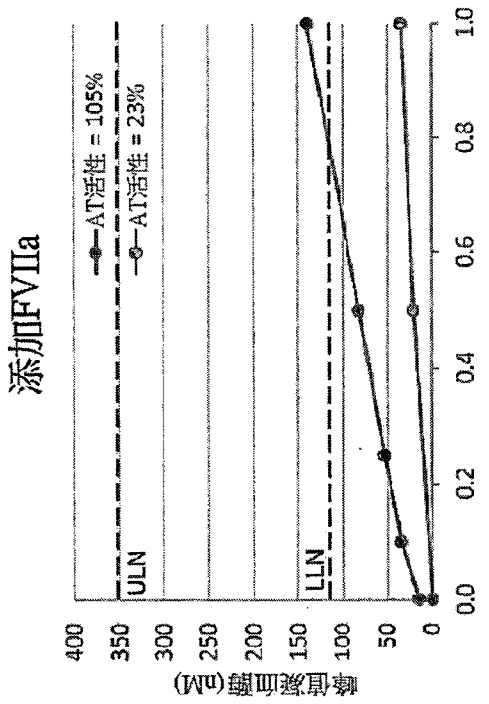
【第26G圖】



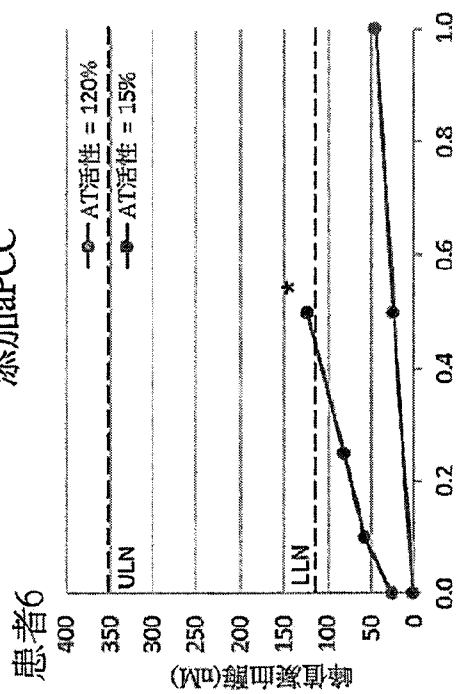
【第26H圖】



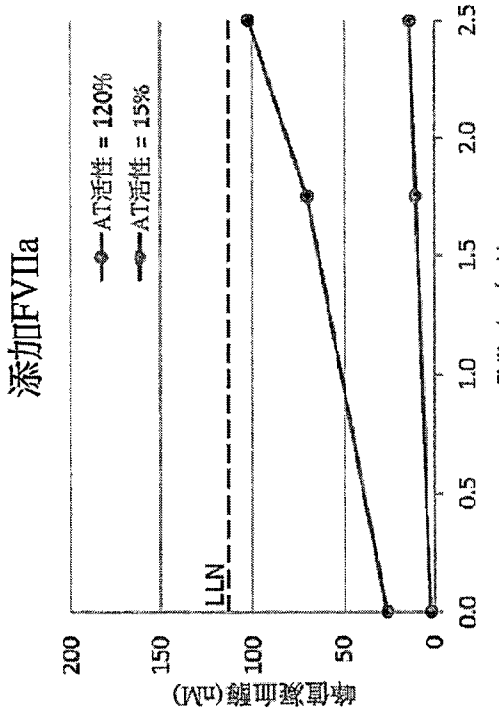
【第26I圖】



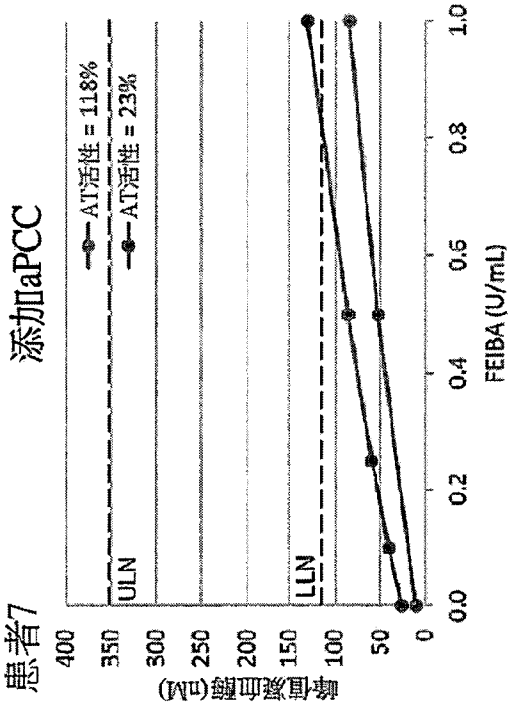
【第26J圖】



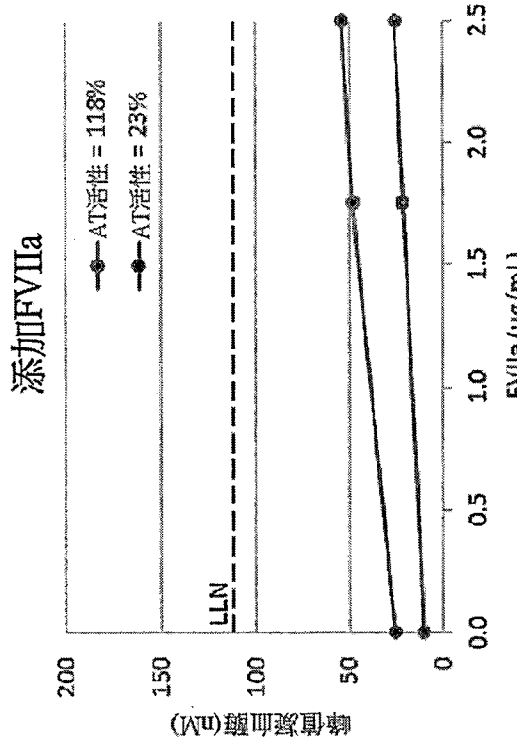
【第26K圖】



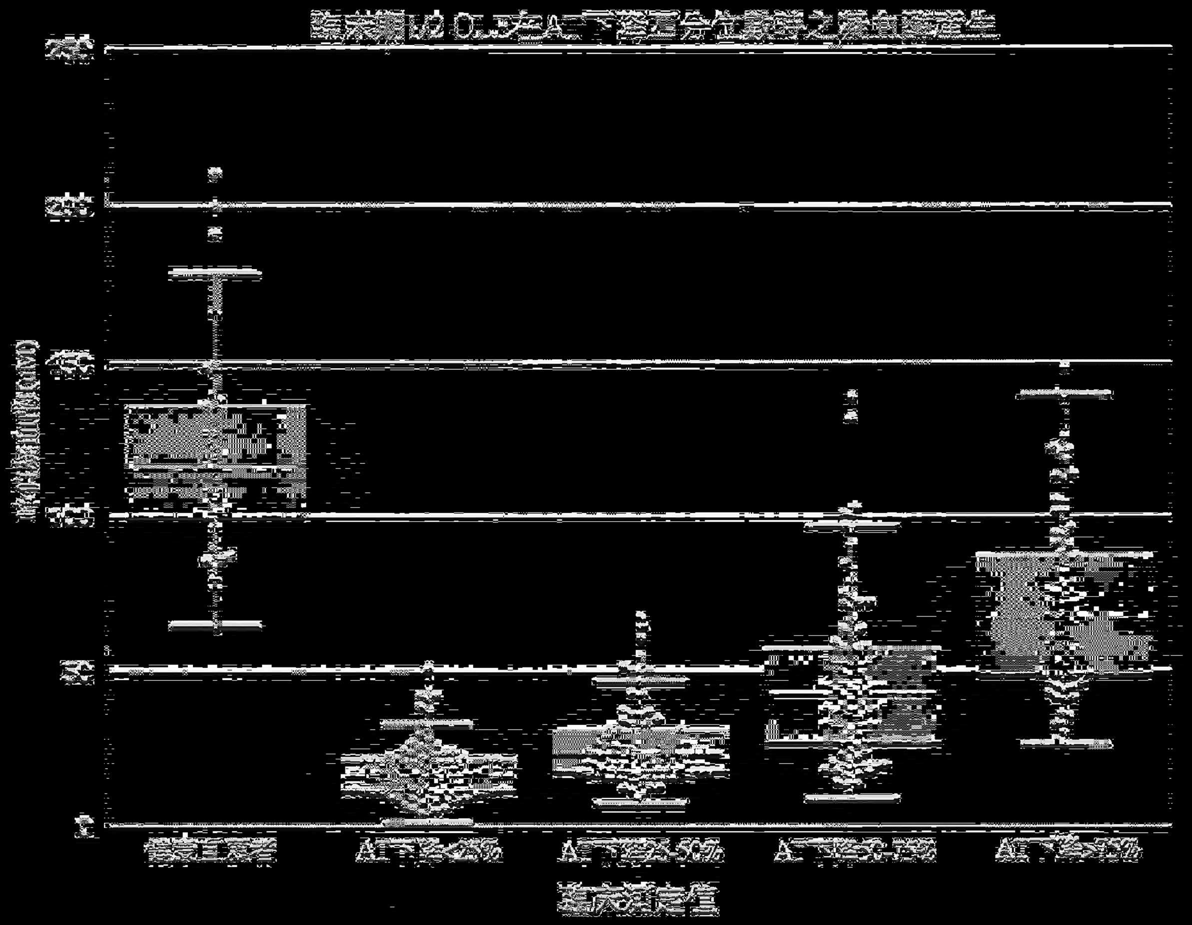
【第26L圖】


患者7
添加aPCC
AT活性 = 118%
AT活性 = 23%
ULN
LLN
峰值凝血酶(nM)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
FEIBA (U/mL)

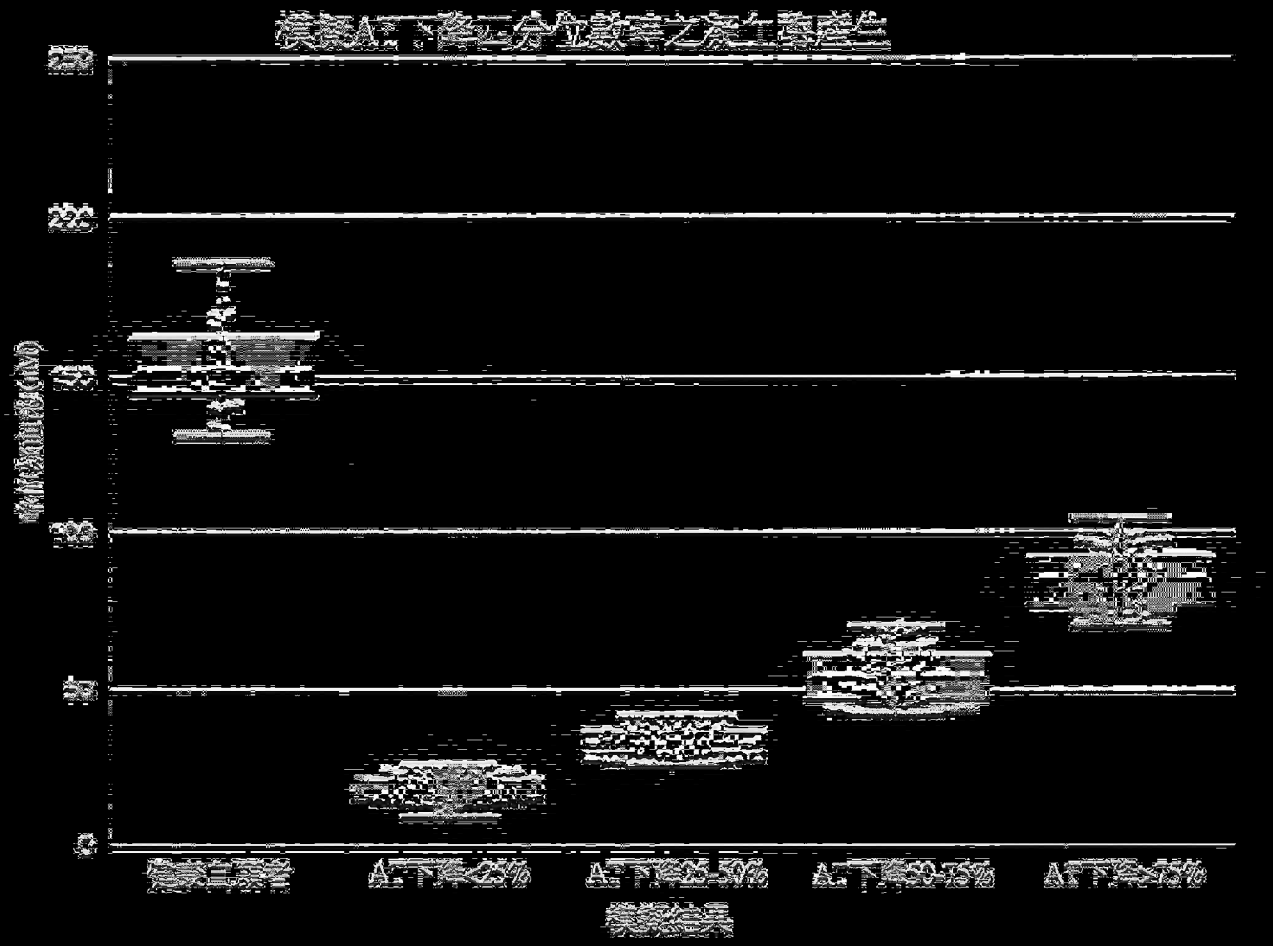
【第26M圖】


添加FVIIa
AT活性 = 118%
AT活性 = 23%
LLN
峰值凝血酶(nM)
200
150
100
50
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
FVIIa (ug/mL)

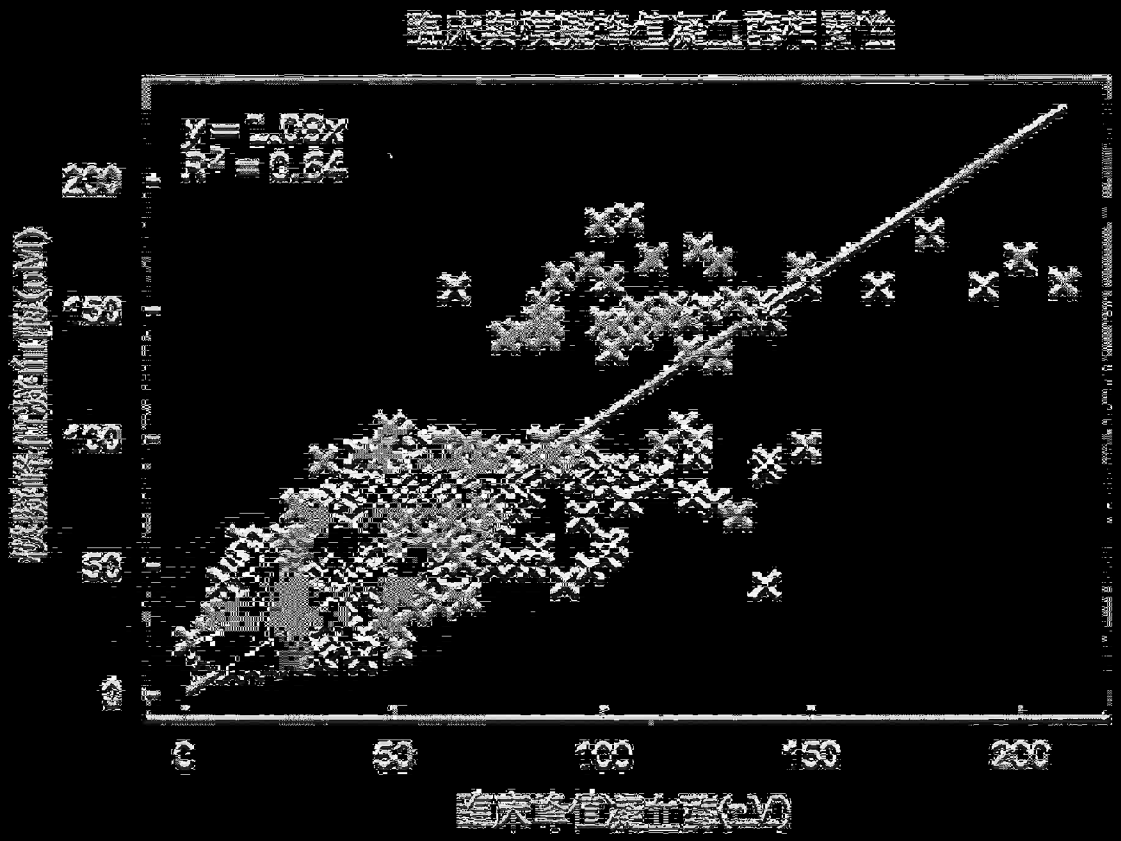
【第26N圖】


臨床第1/2期OLE在AT下降百分位數時之凝血酶產生
峰值凝血酶(nM)
250
200
150
100
50
0
健康自願者
AT下降<25%
AT下降25-50%
AT下降50-75%
AT下降>75%
達成穩定值

【第27A圖】


模型AF下降百分比数字之家庭聚类
250
200
150
100
50
0
价格敏感指数(CNY)
ΔFT<25%
ΔFT=25-50%
ΔFT=50-75%
ΔFT>75%
聚类结果

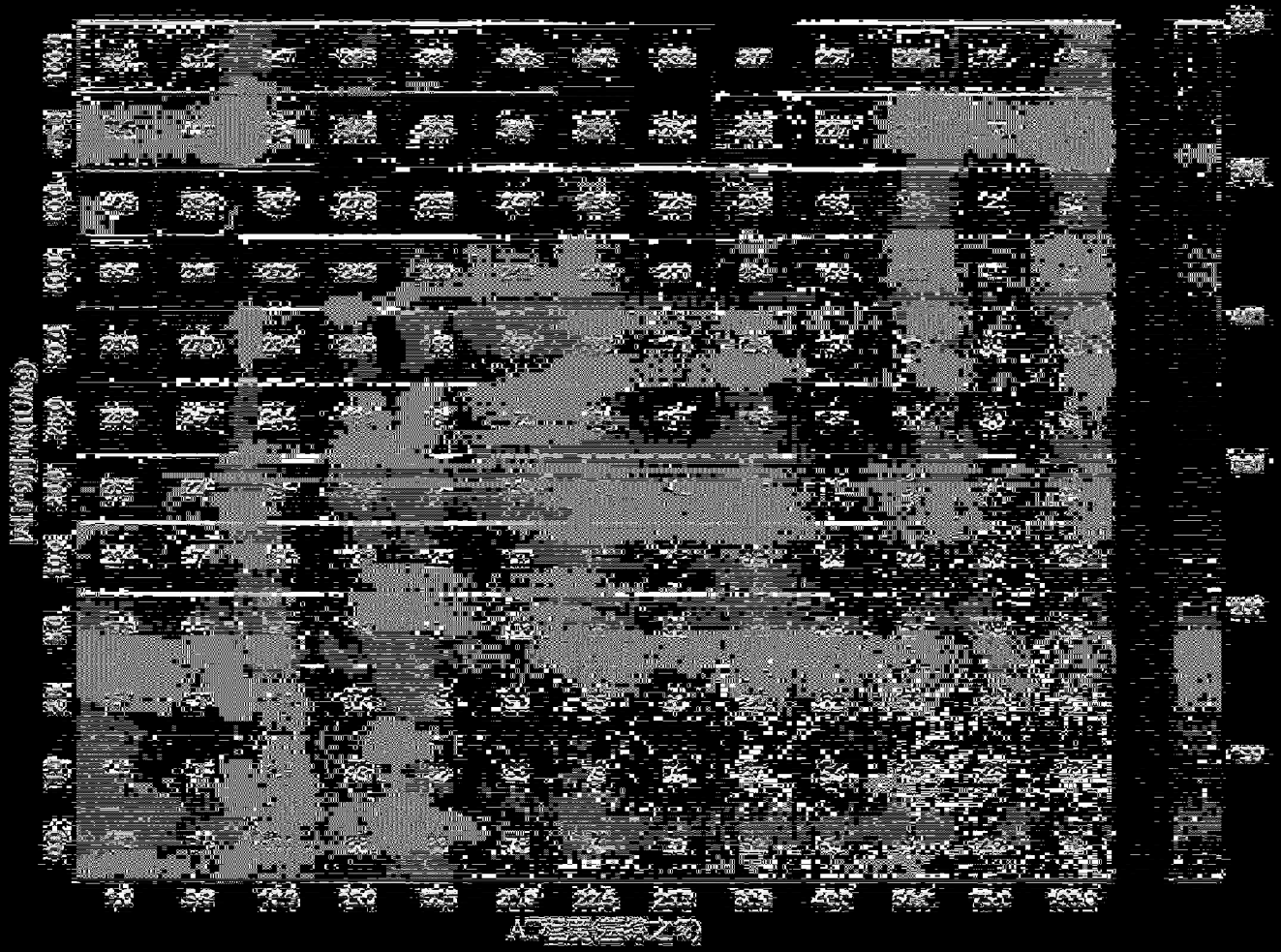
【第27B章】


最大高度脂肪组织血管密度
y = 1.09x
R² = 0.64
0
50
100
150
200
0
50
100
150
200
最大高度脂肪组织血管密度(μM)
最大高度血管密度(μM)

【图27C】

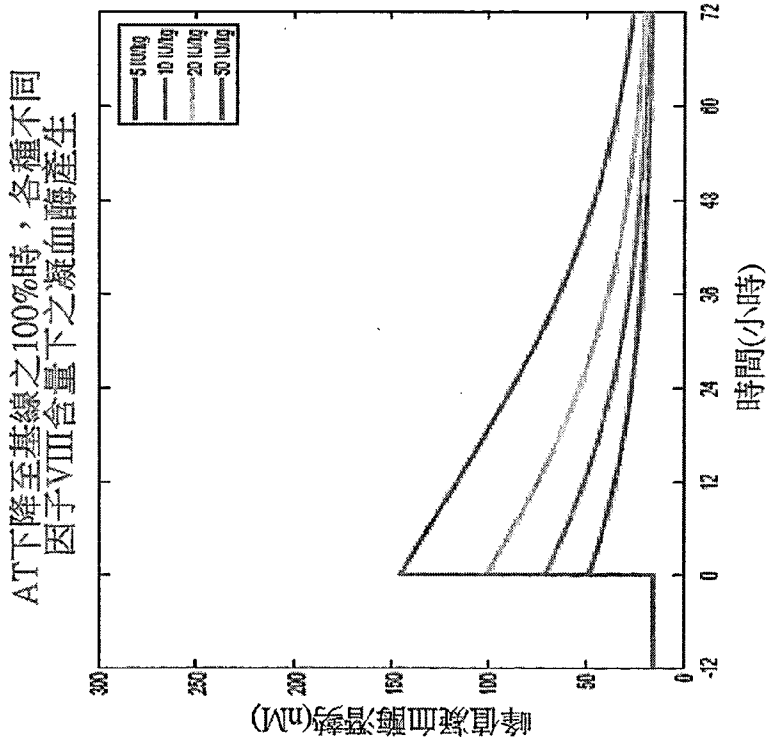
MEASURED(0/0)
ATTENUATION(dB)
FIG.28B

FIG.28A



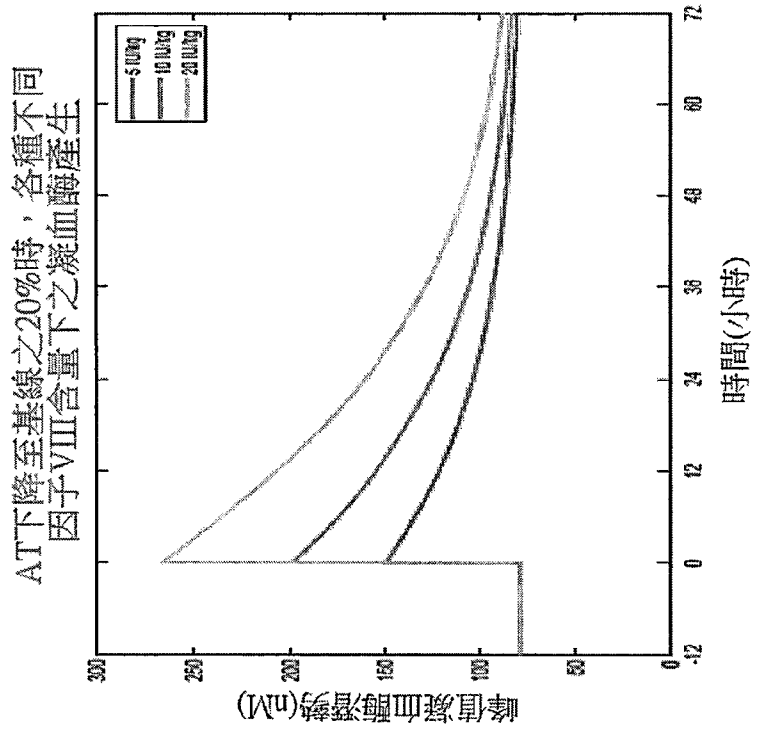
【第28C图】

A



【第29A圖】

B



【第29B圖】