



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111093771 A

(43)申请公布日 2020.05.01

(21)申请号 201880058130.7

(72)发明人 A·埃金

(22)申请日 2018.07.10

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 史悦

(30)优先权数据

62/530,518 2017.07.10 US

62/599,223 2017.12.15 US

62/614,111 2018.01.05 US

62/673,424 2018.05.18 US

(51)Int.Cl.

A61P 7/04(2006.01)

A61K 31/713(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/041400 2018.07.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/014187 EN 2019.01.17

(71)申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

权利要求书6页 说明书87页

序列表10页 附图54页

(54)发明名称

在患有血友病的受试者中治疗出血事件的方法和组合物

(57)摘要

本发明涉及一种靶向Serpinc1基因的iRNA(例如,双链核糖核酸(dsRNA))组合物、及使用所述iRNA(例如,dsRNA)组合物在患有血友病(例如,具有或不具有抑制剂)的受试者中治疗出血事件的方法。

1. 一种在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法,其包括对该受试者施用固定剂量约30mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,

其中所述双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中所述有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及

对该受试者施用治疗有效量的置换因子,其中该置换因子的有效量低于该置换因子的建议有效量,

由此在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

2. 一种在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法,其包括对该受试者施用固定剂量约30mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,

其中所述双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中所述有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及

对该受试者施用治疗有效量的绕过剂,其中该绕过剂有效量低于该绕过剂的建议有效量,

由此在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

3. 一种在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法,其包括对该受试者施用固定剂量约40mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,

其中所述双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及

对该受试者施用治疗有效量的置换因子,其中该置换因子有效量低于该置换因子的建议有效量,

由此在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

4. 一种在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法,其包括对该受试者施用固定剂量约40mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,

其中所述双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及

对该受试者施用治疗有效量的绕过剂,其中该绕过剂有效量低于该绕过剂的建议有效量,

由此在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中向所述受试者一个月一次、每六周一次、每2个月一次或每季度一次施用固定剂量的双链RNAi剂。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中所述双链RNAi剂以固定剂量约50mg施用于受试者。

7. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中所述双链RNAi剂以固定剂量约80mg施用于受试者。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法, 其中所述双链RNAi剂经皮下施用于受试者。

9. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法, 其中该受试者为人类。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其中该血友病为血友病A、血友病B或血友病C。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法, 其中有义链的所有核苷酸与反义链的所有核苷酸为经修饰的核苷酸。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法, 其中该经修饰的核苷酸独立地选自下组: 2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、锁核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-烷基-修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、及包含非天然碱基的核苷酸。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法, 其中该互补区的长度为至少17个核苷酸。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法, 其中该互补区的长度为19-21个核苷酸。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中该互补区的长度为19个核苷酸。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法, 其中该各链的长度不超过30个核苷酸。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法, 其中该有义链与反义链的长度分别独立为19至25个核苷酸。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法, 其中该有义链与反义链的长度分别独立为21至23个核苷酸。

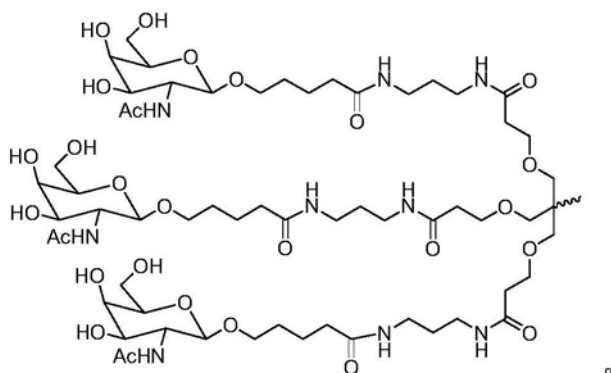
19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法, 其中该有义链的长度为21个核苷酸, 及反义链的长度为23个核苷酸。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中至少一个链包含具有至少1个核苷酸的3'突出。

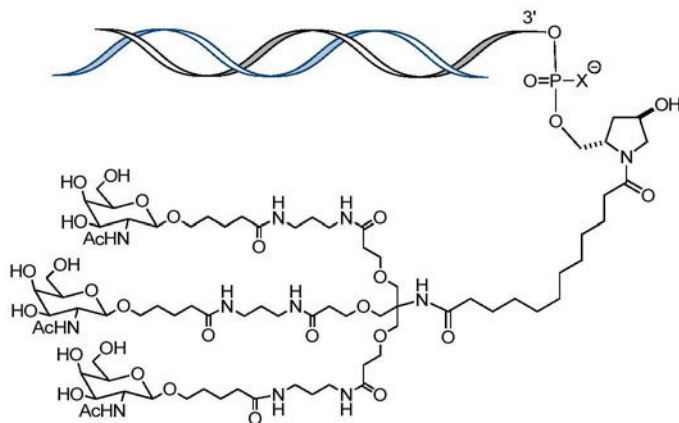
21. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中至少一个链包含具有至少2个核苷酸的3'突出。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中该配体为N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)衍生物。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中该配体为



24. 根据权利要求23所述的方法, 其中该双链RNAi剂以如下方案所示缀合于配体:



且其中X为O或S。

25. 根据权利要求24项所述所述的方法, 其中X为O。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法, 其中该互补区由核苷酸序列5' -UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO:15) 组成。

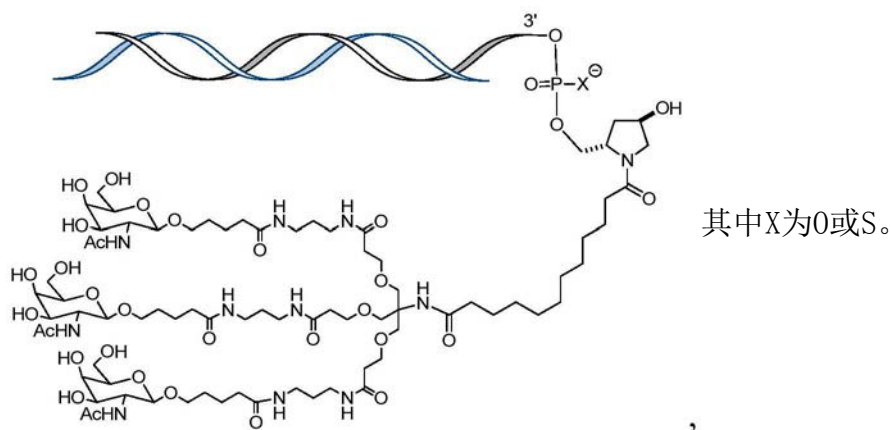
27. 根据权利要求1至26中任一项所述的方法, 其中该双链RNAi剂包含有义链(其包含核苷酸序列5' -GGUUAACACCAUUUACUUCAA-3' (SEQ ID NO:16)), 与反义链(其包含核苷酸序列5' -UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO:15))。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中该有义链包含5' -GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13) 及反义链包含5' -usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO:14), 其中a、c、g和u为2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G或U; Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U; 及s为硫代磷酸酯键。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法, 其中该有义链包含5' -GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13), 及反义链包含5' -usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO:14),

其中a、c、g和u为2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G或U; Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U; 及s为硫代磷酸酯键; 及

其中有义链以如下方案所示缀合于配体:



30. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法, 其中该双链RNAi剂作为药物组合物施用于所述受试者。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的方法, 其中对该受试者施用dsRNA剂可使Serpinc1活性降低约75%或更多。

32. 根据权利要求1、3和5至31中任一项所述的方法, 其中该置换因子为因子VIII。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中该施用于受试者的因子VIII的治疗有效量低于约200IU/kg或低于约190IU/kg或低于约180IU/kg或低于约170IU/kg或低于约160IU/kg或低于约150IU/kg或低于约140IU/kg或低于约130IU/kg或低于约120IU/kg或低于约110IU/kg或低于约100IU/kg或低于约90IU/kg或低于约80IU/kg或低于约70IU/kg或低于约60IU/kg或低于约50IU/kg或低于约40IU/kg或低于约30IU/kg或低于约20IU/kg或低于约10IU/kg。

34. 根据权利要求32所述的方法, 其中该施用于受试者的因子VIII的治疗有效量降低为因子VIII的建议有效量约1/1.5至约1/5。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中该施用于受试者的因子VIII的治疗有效量为约10至约20IU/kg的剂量。

36. 根据权利要求1、3和5至28中任一项所述的方法, 其中该置换因子为因子IX。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中该施用于受试者的因子IX的治疗有效量低于约200IU/kg或低于约190IU/kg或低于约180IU/kg或低于约170IU/kg或低于约160IU/kg或低于约150IU/kg或低于约140IU/kg或低于约130IU/kg或低于约120IU/kg或低于约110IU/kg或低于约100IU/kg或低于约90IU/kg或低于约80IU/kg或低于约70IU/kg或低于约60IU/kg或低于约50IU/kg或低于约40IU/kg或低于约30IU/kg或低于约20IU/kg或低于约10IU/kg。

38. 根据权利要求36所述的方法, 其中该施用于受试者的因子IX的治疗有效量降低为因子IX的建议有效量的约1/2至约1/6。

39. 根据权利要求38所述的方法, 其中该施用于受试者的因子IX的治疗有效量为约20至约30IU/kg的剂量。

40. 根据权利要求2和4至31中任一项所述的方法, 其中该绕过剂为经活化的凝血酶原复合物浓缩物(aPCC)。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其中该施用于受试者的aPCC的治疗有效量低于约100U/kg或低于约90U/kg或低于约80U/kg或低于约70U/kg或低于约60U/kg或低于约50U/kg或低于约40U/kg或低于约30U/kg或低于约20U/kg或低于约10U/kg。

42. 根据权利要求40所述的方法, 其中该施用于受试者的aPCC的治疗有效量降低为aPCC的建议有效量的约1/2至约1/3。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中该施用于受试者的aPCC的治疗有效量为约30至约50U/kg的剂量。

44. 根据权利要求2和4至31中任一项所述的方法, 其中该绕过剂为重组因子VIIa (rFVIIa)。

45. 根据权利要求44所述的方法, 其中该施用于受试者的rFVIIa的治疗有效量低于约120 μ g/kg或低于约110 μ g/kg或低于约100 μ g/kg或低于约90 μ g/kg或低于约80 μ g/kg或低于约70 μ g/kg或低于约60 μ g/kg或低于约50 μ g/kg或低于约40 μ g/kg或低于约30 μ g/kg或低于约20 μ g/kg。

46. 根据权利要求45所述的方法, 其中该施用于受试者的rFVIIa的治疗有效量降低为rFVIIa的建议有效量约1/2。

47. 根据权利要求46所述的方法, 其中该施用于受试者的rFVIIa的治疗有效量为约45μg/kg的剂量。

48. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法,其进一步包括测定受试者中的凝血酶水平。

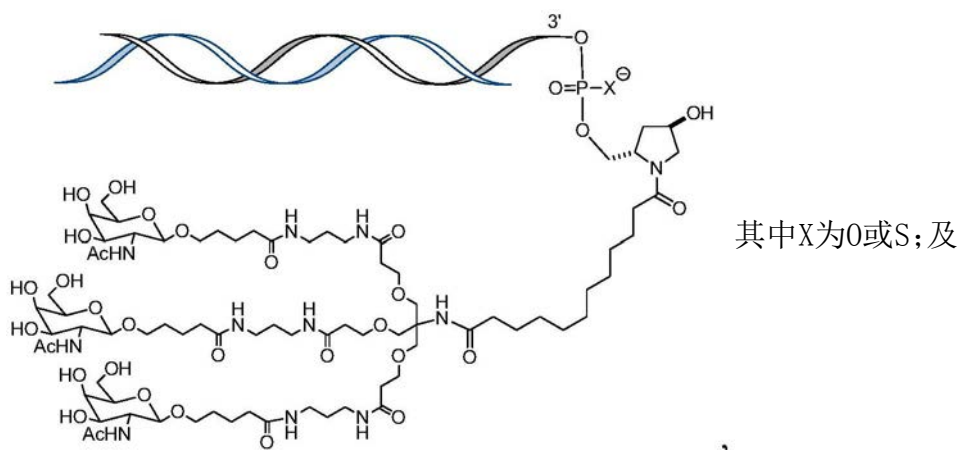
49. 根据权利要求1至48中任一项所述的方法,其进一步包括测定受试者中的置换因子水平。

50. 一种在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法,其包括对该受试者施用固定剂量约80mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,

其中有义链包含5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13),及反义链包含5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO:14),

其中a、c、g和u为2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G或U;Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U;及s为硫代磷酸酯键;且

其中有义链的3'-端如下方案所示缀合于配体:



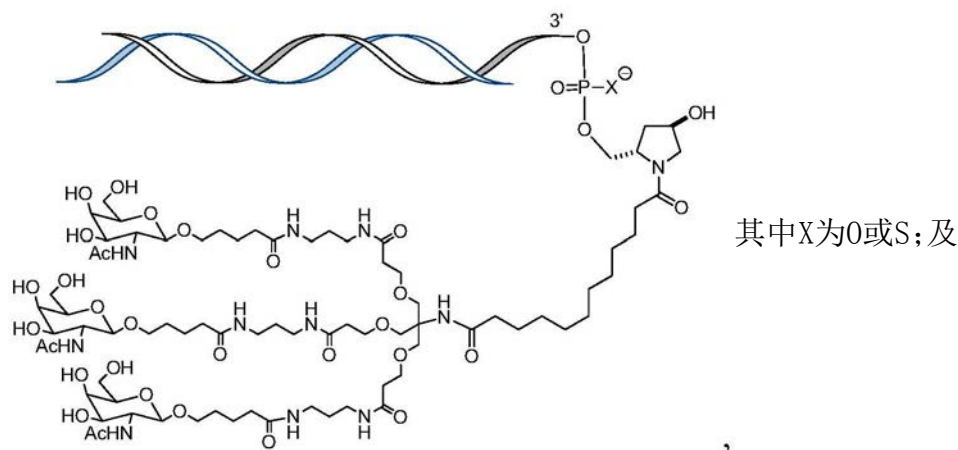
对该受试者施用治疗有效量的置换因子,其中置换因子之有效量低于该置换因子的建议有效量,

由此在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

51. 一种在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法,其包括对该受试者施用固定剂量约80mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,其中有义链包含5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13),及反义链包含5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO:14),

其中a、c、g和u为2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G或U; Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U;及s为硫代磷酸酯键;及

其中有义链之3'-端如下方案所示缀合于配体:



对该受试者施用治疗有效量的绕过剂,其中该绕过剂有效量低于该绕过剂的建议有效量,

由此在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

52. 根据权利要求51或52所述的方法,其中该固定剂量之RNAi剂皮下施用于受试者。

53. 根据权利要求51或52所述的方法,其中该固定剂量之RNAi剂一个月一次施用于受试者。

54. 根据权利要求51或52所述的方法,其中该血友病为血友病A。

55. 根据权利要求51或52所述的方法,其中该血友病为血友病B。

56. 根据权利要求51或52所述的方法,其中该血友病为血友病C。

在患有血友病的受试者中治疗出血事件的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求美国临时专利申请号62/530,518(申请日:2017年7月10日)、美国临时专利申请号62/599,223(申请日:2017年12月15日)、美国临时专利申请号62/614,111(申请日:2018年1月5日)和美国临时专利申请号62/673,424(申请日:2018年5月18日)的优先权。上述各专利申请的完整内容已通过提述并入本文。

[0003] 本申请还涉及国际申请号PCT/US2016/065245(申请日:2016年12月7日)、美国临时专利申请号62/264,013(申请日:2015年12月7日)、美国临时专利申请号62/315,228(申请日:2016年3月30日)、美国临时专利申请号62/366,304(申请日:2016年7月25日)和美国临时专利申请号62/429,241(申请日:2016年12月2日)。上述各专利申请的完整内容已通过提述并入本文。

[0004] 此外,本申请涉及美国临时专利申请号61/992,057(申请日:2014年5月12日)、美国临时专利申请号62/089,018(申请日:2014年12月8日)、美国临时专利申请号62/102,281(申请日:2015年1月12日)和国际申请号PCT/US2015/030337(申请日:2015年5月12日)。上述各专利申请的完整内容已通过提述并入本文。

[0005] 本申请还涉及美国临时专利申请号61/638,952(申请日:2012年4月26日)、美国临时专利申请号61/669,249(申请日:2012年7月9日)、美国临时专利申请号61/734,573(申请日:2012年12月7日)、美国专利申请号13/837,129(申请日:2013年3月15日)(目前为美国专利号9,127,274)、美国专利申请号14/806,084(申请日:2015年7月22日)(目前为美国专利号9,376,680)、美国专利申请号15/070,358(申请日:2016年3月15日)和国际申请号PCT/US2013/038218(申请日:2013年4月25日)。本申请还涉及国际申请号PCT/US2012/065601(申请日:2012年11月16日)。上述各专利申请的完整内容已通过提述并入本文。

[0006] 序列表

[0007] 本申请包含序列表,其已呈ASCII格式电子提交并由此以其整体通过提述并入本文。该于2018年7月2日生成的ASCII拷贝名称为117811-02720_SL.TXT,档案大小为21,147字节。

[0008] 发明背景

[0009] Serpinc1为丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin)超级家族的成员。Serpinc1为一种血浆蛋白酶抑制剂,其抑制凝血酶及凝血系统之其他活化丝氨酸蛋白酶,如因子X、IX、XI、XII及VII,因此调节血液凝结级联反应。Serpinc1的抗凝血活性会因肝素及催化凝血酶:抗凝血酶(TAT)复合物形成的其他相关的糖胺聚糖的存在而增强。

[0010] 出血病症不论先天或后天,均是血液凝结不足的病况。例如,血友病即为一种先天性遗传出血病症,其破坏身体调控血液凝结或凝血的能力。血友病A为涉及缺乏功能性凝血因子VIII的隐性X-连锁遗传病症,且占血友病病例之80%。血友病B为涉及缺乏功能性凝血因子IX的隐性X-连锁遗传病症。其占约20%血友病病例。血友病C为涉及缺乏功能性凝血因子XI的常染色体遗传病症。血友病C并非完全隐性,因为杂合子的个体亦显示出血增加。

[0011] 虽然目前仍无法治愈血友病,但可以藉由定期输注所缺乏的凝血因子(例如,血友

病A中的因子VIII)来控制。然而,有些血友病患者会对所接受的置换因子产生抗体(抑制剂),因此对置换凝血因子产生难治性。因此,无法适当调控所述受试者中的出血。

[0012] 针对例如因子VIII及其他凝血因子开发高效价抑制剂是血友病疗法中最严重的并发症,且使出血的治疗极具挑战性。目前,阻止所述受试者出血的唯一策略为使用「绕过剂」,如第八因子抑制剂绕过活性(FEIBA)及活化重组因子VII(rFVIIa)、血浆分离术、连续因子置换、及免疫耐受疗法,其中无一是完全有效的。因此,本技术领域中存在为患有出血病症(如:血友病)的受试者提供替代疗法的需要。

发明内容

[0013] 本发明至少部分基于令人惊讶的发现,即,对患有不带抑制剂的血友病受试者施用治疗有效量的iRNA组合物,其导致RNA诱发静默复合物(RISC)介导的Serpinc1基因之RNA转录本的裂解,可利用低于例如世界血友病联盟(World Federation of Hemophilia)(参见例如,Srivastava等,「Guidelines for the Management of Hemophilia」,Hemophilia(2012年7月6日电子书);DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x)和/或食品药品监督管理局(Food and Drug Administration)建议有效量的治疗有效量的置换因子(如因子VIII或因子XI)治疗出血事件;而在带抑制剂的患有血友病受试者中,施用治疗有效量的iRNA组合物,其导致RNA诱发静默复合物(RISC)介导的Serpinc1基因之RNA转录本裂解,可利用低于例如世界血友病联盟(参见例如,Srivastava等,「Guidelines for the Management of Hemophilia」,Hemophilia(2012年7月6日电子书);DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x)和/或食品药品监督管理局建议有效量的治疗有效量的绕过剂(如:经活化的凝血酶原复合物浓缩物(aPCC)或重组因子VIIa(rFVIIa))治疗出血事件。

[0014] 因此在一个方面中,本发明提供一种为患有出血病症(如不带抑制剂的血友病)受试者治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约30mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其中该双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及对该受试者施用治疗有效量的置换因子,其中该置换因子有效量低于该置换因子的建议有效量,由此为患有不带抑制剂的血友病的受试者治疗出血事件。

[0015] 另一方面中,本发明提供一种为患有出血病症(如带抑制剂的血友病)受试者治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约30mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其中该双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及对该受试者施用治疗有效量的绕过剂,其中该绕过剂有效量低于该绕过剂的建议有效量,由此在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

[0016] 本发明一个方面提供一种为患有出血病症(如不带抑制剂的血友病)的受试者治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约40mg至约90mg的抑制Serpinc1

表达的双链核糖核酸 (RNAi) 剂, 其中该双链RNAi剂包含有义链与反义链, 所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区, 其包含至少15个连续核苷酸, 其与核苷酸序列5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO:15) 的差异不超过3个核苷酸, 其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸, 且其中有义链缀合于附接在3' -末端的配体; 及对该受试者施用治疗有效量的置换因子, 其中该置换因子有效量低于该置换因子的建议有效量, 由此为患有不带抑制剂的血友病的受试者治疗出血事件。

[0017] 另一方面中, 本发明提供一种为患有出血病症 (如带抑制剂的血友病) 的受试者治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约40mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸 (RNAi) 剂, 其中该双链RNAi剂包含有义链与反义链, 所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区, 其包含至少15个连续核苷酸, 其与核苷酸序列5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO:15) 的差异不超过3个核苷酸, 其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸, 且其中有义链缀合于附接在3' -末端的配体; 及对该受试者施用治疗有效量的绕过剂, 其中该绕过剂有效量低于该绕过剂的建议有效量, 由此为患有带抑制剂的血友病的受试者治疗出血事件。

[0018] 双链RNAi剂可以2剂或更多剂施用于受试者。

[0019] 在一些实施例中, 双链RNAi剂一个月一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次、每2个月一次、每季度一次或依需要施用于受试者。

[0020] 在一个实施例中, 双链RNAi剂一个月一次施用于受试者。在另一个实施例中, 双链RNAi剂每六周一次施用于受试者。在一个实施例中, 双链RNAi剂每2个月一次施用于受试者。在又一个实施例中, 双链RNAi剂每季度一次施用于受试者。

[0021] 双链RNAi剂可呈固定剂量施用于受试者, 例如, 约25mg-约100mg, 例如, 约25mg-约95mg、约25mg-约90mg、约25mg-约85mg、约25mg-约80mg、约25mg-约75mg、约25mg-约70mg、约25mg-约65mg、约25mg-约60mg、约25mg-约50mg、约50mg-约100mg、约50mg-约95mg、约50mg-约90mg、约50mg-约85mg、约50mg-约80mg、约30mg-约100mg、约30mg-约90mg、约30mg-约80mg、约40mg-约100mg、约40mg-约90mg、约40mg-约80mg、约60mg-约100mg、约60mg-约90mg、约25mg-约55mg、约25mg-约65mg、约30mg-约95mg、约30mg-约85mg、约30mg-约75mg、约30mg-约65mg、约30mg-约55mg、约40mg-约95mg、约40mg-约85mg、约40mg-约75mg、约40mg-约65mg、约40mg-约55mg或约45mg-约95mg。

[0022] 在一些实施例中, 双链RNAi剂可以约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg或约100mg的固定剂量施用。

[0023] 在一些实施例中, 双链RNAi剂以约25mg; 或固定剂量约50mg; 或固定剂量约80mg; 或固定剂量约100mg的固定剂量施用于受试者。

[0024] 在一个实施例中, 双链RNAi剂经皮下施用于受试者。

[0025] 在一个实施例中, 该受试者为人类。

[0026] 血友病可为血友病A、血友病B或血友病C。

[0027] 在一个实施例中, 有义链的所有核苷酸与反义链的所有核苷酸为经修饰的核苷酸。

[0028] 在一个实施例中, 该经修饰的核苷酸独立选自下组: 2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷

酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、锁核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-烷基-修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、及包含非天然碱基的核苷酸。

[0029] 互补区可为至少17个核苷酸的长度或19个核苷酸的长度。

[0030] 在一个实施例中，互补区长度为19-21个核苷酸。在另一个实施例中，互补区长度为21-23个核苷酸。

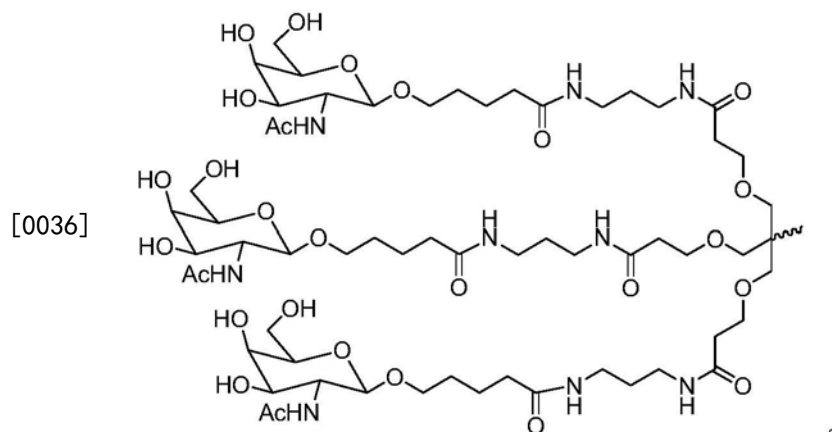
[0031] 在一个实施例中，各链长度不超过30个核苷酸。

[0032] 双链RNAi剂的至少一个链可包含至少1个核苷酸的3' 突出或至少2个核苷酸的3' 突出，例如，2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。其他实施例中，RNAi剂之至少一个链包含至少1个核苷酸之5' 突出。某些实施例中，至少一个链包含至少2个核苷酸的5' 突出，例如，2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。再其他实施例中，RNAi剂之一链之3' 与5' 两端均包含至少1个核苷酸的突出。

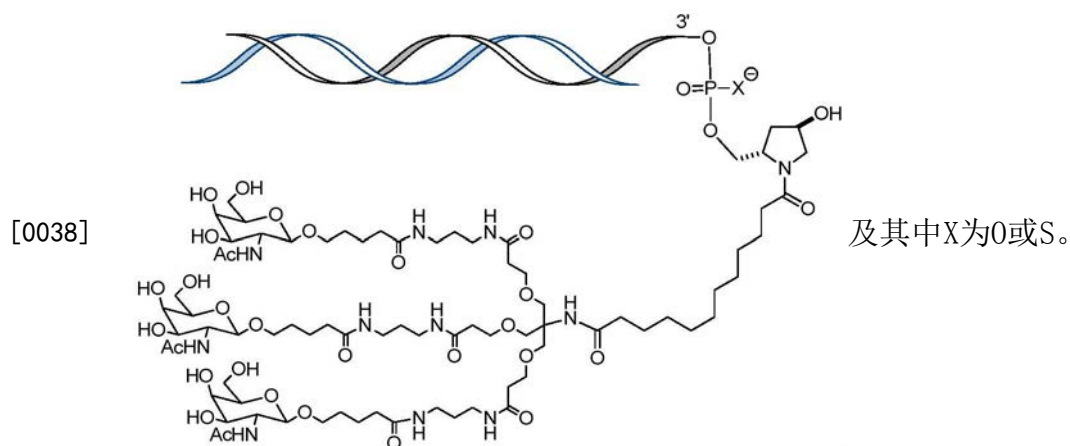
[0033] 某些实施例中，配体为N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)。配体可为一或多个GalNAc透过单价、二价或三价分支接头附接至RNAi剂。该配体可缀合双链RNAi剂有义链之3' 端、双链RNAi剂有义链之5' 端、双链RNAi剂反义链之3' 端、双链RNAi剂反义链之5' 端。

[0034] 在一些实施例中，本发明双链RNAi剂包含复数个，例如，2、3、4、5或6个GalNAc，每一个分别独立透过复数个单价接头附接至双链RNAi剂之复数个核苷酸。

[0035] 某些实施例中，该配体为



[0037] 在一个实施例中，RNAi剂如下述方案所示缀合于配体：



[0039] 在一个实施例中，X为O。

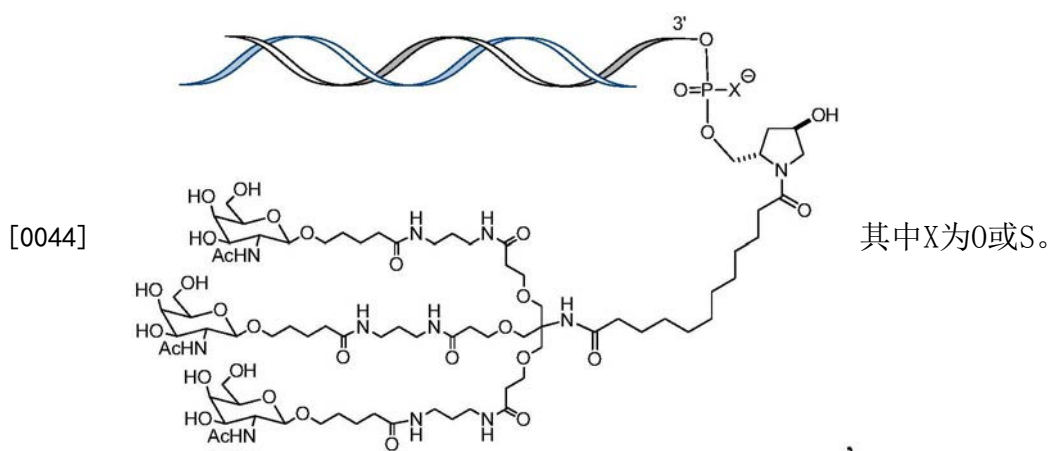
[0040] 在一个实施例中，互补区系由核苷酸序列5' -UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ

ID NO:15) 组成。

[0041] 在一个实施例中, 双链RNAi剂包含有义链, 其包含核苷酸序列5' - GGUUACACCAUUUACUCAA-3' (SEQ ID NO:16); 及反义链, 其包含核苷酸序列5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO:15)。

[0042] 在一个实施例中, 有义链包含5' -GfsGsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13), 及反义链包含5' -usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO:14), 其中a、c、g和u为2'-O-甲基 (2'-OMe) A、C、G或U; Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U; 及s为硫代磷酸酯键。

[0043] 在一个实施例中, 有义链包含5' -GfsGsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13), 及反义链包含5' -usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO:14), 其中a、c、g和u为2'-O-甲基 (2'-OMe) A、C、G或U; Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U; 及s为硫代磷酸酯键; 且其中有义链如下述方案所示缀合于配体:



[0045] 在一个实施例中, 该剂作为药物组合物施用。在一个实施例中, 该RNAi剂在未缓冲的溶液 (如: 盐水或水) 中施用。

[0046] 在另一个实施例中, siRNA系使用缓冲溶液施用, 如包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合的缓冲溶液。在一个实施例中, 该缓冲溶液为磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。

[0047] 在一个实施例中, 对该受试者施用dsRNA剂使Serpinc1活性降低约75%或更高。

[0048] 在一个实施例中, 该置换因子为因子VIII。施用于受试者的因子VIII的治疗有效量可低于约200IU/kg或低于约190IU/kg或低于约180IU/kg或低于约170IU/kg或低于约160IU/kg或低于约150IU/kg或低于约140IU/kg或低于约130IU/kg或低于约120IU/kg或低于约110IU/kg或低于约100IU/kg或低于约90IU/kg或低于约80IU/kg或低于约70IU/kg或低于约60IU/kg或低于约50IU/kg或低于约40IU/kg或低于约30IU/kg或低于约20IU/kg或低于约10IU/kg。在一个实施例中, 施用于受试者的因子VIII的治疗有效量降低为因子VIII的建议有效量的约1/1.5至约1/5, 例如, 剂量为约5IU/kg至约20IU/kg或约10IU/kg至约20IU/kg, 例如, 约5、10、15或20IU/kg。在一个实施例中, 出血事件系中度出血事件。在另一个实施例中, 出血事件系重度出血事件。

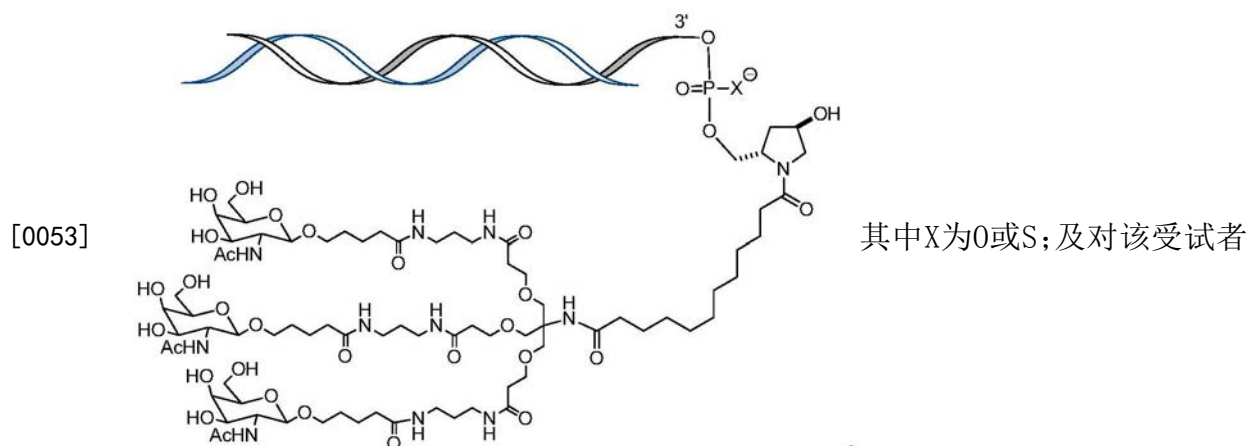
[0049] 在另一个实施例中, 置换因子为因子IX。因子IX的治疗有效量可低于约200IU/kg或低于约190IU/kg或低于约180IU/kg或低于约170IU/kg或低于约160IU/kg或低于约

150IU/kg或低于约140IU/kg或低于约130IU/kg或低于约120IU/kg或低于约110IU/kg或低于约100IU/kg或低于约90IU/kg或低于约80IU/kg或低于约70IU/kg或低于约60IU/kg或低于约50IU/kg或低于约40IU/kg或低于约30IU/kg或低于约20IU/kg或低于约10IU/kg。在一个实施例中,施用于受试者的因子IX的治疗有效量降低为因子IX的建议有效量的约1/2至约1/6,例如,剂量约10IU/kg至约30IU/kg或约20至约30IU/kg,例如,约10、15、20、25或约30IU/kg。在一个实施例中,出血事件系中度出血事件。在另一个实施例中,出血事件系重度出血事件。

[0050] 在一个实施例中,绕过剂为经活化的凝血酶原复合物浓缩物(aPCC)。aPCC的治疗有效量可低于约100U/kg或低于约90U/kg或低于约80U/kg或低于约70U/kg或低于约60U/kg或低于约50U/kg或低于约40U/kg或低于约30U/kg或低于约20U/kg或低于约10U/kg。在一个实施例中,施用于受试者之aPCC的治疗有效量降低为aPCC的建议有效量的约1/2至约1/3,例如,剂量约30至约50U/kg。在一个实施例中,出血事件系中度出血事件。在另一个实施例中,出血事件系重度出血事件。

[0051] 在另一个实施例中,绕过剂为重组因子VIIa(rFVIIa)。绕过剂的治疗有效量可低于约120μg/kg或低于约110μg/kg或低于约100μg/kg或低于约90μg/kg或低于约80μg/kg或低于约70μg/kg或低于约60μg/kg或低于约50μg/kg或低于约40μg/kg或低于约30μg/kg或低于约20μg/kg。在一个实施例中,施用于受试者之rFVIIa的治疗有效量降低为rFVIIa的建议有效量的约1/2,例如,剂量约45μg/kg。在一个实施例中,出血事件系中度出血事件。在另一个实施例中,出血事件系重度出血事件。

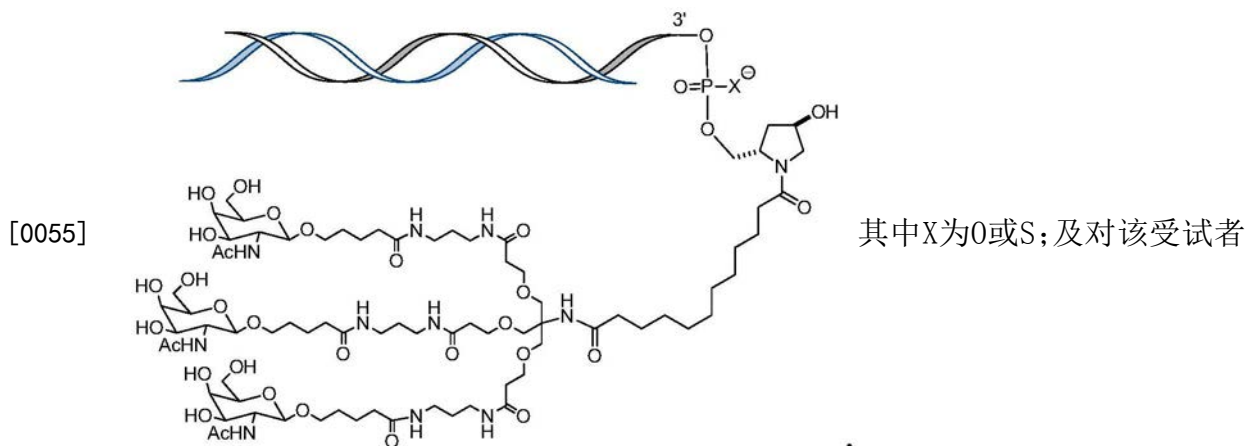
[0052] 一个方面中,本发明提供一种为患有血友病(例如,不带抑制剂的血友病A、血友病B或血友病C)的受试者治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用(例如,经皮下施用)固定剂量约80mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,其中有义链包含5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3'(SEQ ID NO:13),及反义链包含5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3'(SEQ ID NO:14),其中a、c、g和u为2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G或U;Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U;及s为硫代磷酸酯键;且其中有义链之3'-端如下述方案所示缀合于配体:



施用治疗有效量的置换因子,其中置换因子有效量低于该置换因子的建议有效量,由此为患有不带抑制剂的血友病的受试者治疗出血事件。

[0054] 另一个方面中,本发明提供一种为患有血友病(例如,带抑制剂的血友病A、血友病

B或血友病C)的受试者治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用(例如,经皮下施用)固定剂量约80mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,其中有义链包含5'-GfsGsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3'(SEQ ID NO:13)与反义链包含5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3'(SEQ ID NO:14),其中a、c、g和u为2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G或U;Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U;及s为硫代磷酸酯键;且其中有义链之3'-端如下述方案所示缀合于配体:



施用治疗有效量的绕过剂,其中该绕过剂有效量低于该绕过剂的建议有效量,由此为患有带抑制剂的血友病的受试者治疗出血事件。

[0056] 在一个实施例中,固定剂量之RNAi剂经皮下施用于受试者。

[0057] 在一个实施例中,固定剂量之RNAi剂一个月一次施用于受试者。

[0058] 血友病可为血友病A、血友病B或血友病C。

[0059] 附图简述

[0060] 图1A为描绘单一皮下0.03mg/kg剂量之AT3SC-001在一位健康人类受试者中,对血浆凝血酶产生水平的作用的图。

[0061] 图1B为描绘单一皮下0.03mg/kg剂量之AT3SC-001在一位健康人类受试者中,对血浆凝血酶产生水平的作用的图。

[0062] 图1C为描绘单一皮下0.03mg/kg剂量之AT3SC-001在一位健康人类受试者中,对血浆凝血酶产生水平的作用的图。

[0063] 图1D为描绘单一皮下0.03mg/kg剂量之AT3SC-001在一位健康人类受试者中,对血浆凝血酶产生水平的作用的图。

[0064] 图2A为描绘单一皮下0.03mg/kg剂量之AT3SC-001在一位健康人类受试者中,对血浆AT(Serpinc1)蛋白质水平的作用的图。

[0065] 图2B为描绘单一皮下0.03mg/kg剂量之AT3SC-001在一位健康人类受试者中,对血浆AT(Serpinc1)蛋白质水平的作用的图。

[0066] 图3为描绘在接受施用单一皮下0.03mg/kg剂量之AT3SC-001之健康受试者中,AT(Serpinc1)敲低百分比与峰值凝血酶产生的增加百分比之间相关性的图。

[0067] 图4为描绘在患有血友病A或B之人类受试者中,多重0.015mg/kg、0.045mg/kg或0.075mg/kg剂量之AT3SC-001对血浆AT(Serpinc1)蛋白质水平的作用的图。

[0068] 图5A为描绘在患有血友病A或B之人类受试者中,多重0.225mg/kg、0.450mg/kg、

0.900mg/kg、1.800mg/kg或80mg剂量之AT3SC-001对血浆AT (Serpinc1) 蛋白质水平的作用的图。

[0069] 图5B为描绘在人类受试者中AT3SC-001对血浆AT (Serpinc1) 蛋白质水平的剂量依赖性作用的图。

[0070] 图6A为描绘在患有血友病A或B之人类受试者中,多重0.015mg/kg或0.045mg/kg剂量之AT3SC-001对峰值凝血酶水平的作用的图。

[0071] 图6B为描绘在患有血友病A或B之人类受试者中,多重0.015mg/kg或0.045mg/kg剂量之AT3SC-001对凝血酶产生作为相对于组基线变化百分比的作用的图。

[0072] 图7为描绘在一位患有血友病A的受试者(受试者101-009)中,多重0.045mg/kg剂量之AT3SC-001对血块形成时间及凝结时间的作用的图。

[0073] 图8为描绘以每月同等剂量降低之平均最大AT下降的图。

[0074] 图9为描绘多重剂量之AT3SC-001对AT下降四分位数时之凝血酶产生的作用的图。

[0075] 图10A为描绘在接受施用225mcg/kg qM之AT3SC-001的受试者中,测定相对AT活性与利用因子VIII所达成峰值凝血酶产生百分比的相关性的图。

[0076] 图10B为描绘在接受施用1800mcg/kg qM之AT3SC-001的受试者中,测定相对AT活性与利用因子VIII所达成峰值凝血酶产生百分比的相关性的图。

[0077] 图10C为描绘在接受施用80mg qM之AT3SC-001的受试者中,测定相对AT活性与利用因子VIII所达成峰值凝血酶产生百分比的相关性的图。

[0078] 图11为描绘多重剂量之AT3SC-001对AT下降四分位数时之出血事件的作用的图。

[0079] 图12为显示参与AT3SC-001之第I期临床试验C部分的受试者之出血事件数据的列表。

[0080] 图13A为显示在AT3SC-001之第I期临床试验C部分中,所有剂量组在实验开始之前、实验开始时、及实验观察期间之中值年出血率(ABR)的图。

[0081] 图13B为显示在AT3SC-001之第I期临床试验C部分中,每个月80mg (80mg qM x3)组在实验开始之前、实验开始时、及实验观察期间之中值年出血率(ABR)的图。

[0082] 图14A为描绘在接受施用每个月固定50mg剂量之AT3SC-001之带抑制剂受试者中,测定相对AT活性与因子VIII所达到峰值凝血酶产生百分比的相关性的图。

[0083] 图14B为描绘在接受施用每个月固定50mg剂量之AT3SC-001之带抑制剂受试者中,测定相对AT活性与因子VIII所达到峰值凝血酶产生百分比的相关性的图。

[0084] 图14C为描绘在接受施用每个月固定50mg剂量之AT3SC-001之带抑制剂受试者中,测定相对AT活性与因子VIII所达到峰值凝血酶产生百分比的相关性的图。

[0085] 图14D为描绘在接受施用每个月固定50mg剂量之AT3SC-001之带抑制剂受试者中,测定相对AT活性与因子VIII所达到峰值凝血酶产生百分比的相关性的图。

[0086] 图14E为描绘在接受施用每个月固定50mg剂量之AT3SC-001之带抑制剂受试者中,测定相对AT活性与因子VIII所达到峰值凝血酶产生百分比的相关性的图。

[0087] 图14F为描绘在接受施用每个月固定50mg剂量之AT3SC-001之带抑制剂受试者中,测定相对AT活性与因子VIII所达到峰值凝血酶产生百分比的相关性的图。

[0088] 图15为描绘在患有带抑制剂的血友病A或B人类受试者中,多重50mg或80mg剂量之AT3SC-001对相对于基线之平均AT (Serpinc1) 活性的作用的图。

[0089] 图16为描绘患有血友病A的受试者中,多重50mg剂量之AT3SC-001之AT下降效应与增加的凝血酶产生的相关性的图。

[0090] 图17A为显示参与AT3SC-001之第I期临床试验D部分的受试者之出血事件数据的列表。

[0091] 图17B为显示AT3SC-001之第I期临床试验D部分中,所有受试者在实验开始之前、实验开始时、及实验观察期间之中值年出血率 (ABR) 的图。

[0092] 图18为描绘AT3SC-001之第II期开放标签延伸 (OLE) 研究中,在患有不带抑制剂的血友病人类受试者中,多重80mg剂量之AT3SC-001对相对于基线之平均AT (Serpinc1) 活性的作用的图。

[0093] 图19A为描绘AT3SC-001之第II期开放标签延伸 (OLE) 研究中,在患有具有或不具有抑制剂之血友病A或B人类受试者中,多重50mg或80mg剂量之AT3SC-001对相对于基线之平均AT (Serpinc1) 活性的作用的图。

[0094] 图19B为描绘AT3SC-001之第II期开放标签延伸 (OLE) 研究中,在患有具有或不具有抑制剂之血友病A或B人类受试者中,多重50mg或80mg剂量之AT3SC-001对峰值凝血酶产生的作用的图。图中阴影部分代表健康人类自愿者 (HV) 在实例1说明之AT3SC-001之第I期试验中接受施用AT3SC-001且AT敲低小于25%时,所观察到之峰值凝血酶水平的范围。通过HV范围之虚线代表健康人类自愿者 (HV) 在实例1说明之AT3SC-001之第I期试验中接受施用AT3SC-001且AT敲低小于25%时观察到之中值的峰值凝血酶水平。

[0095] 图20A为显示AT3SC-001之第II期OLE临床试验中,患有不带抑制剂的血友病A或B受试者在实验开始之前、实验开始时、及实验观察期间之中值年出血率 (ABR) 图。

[0096] 图20B为显示AT3SC-001之第II期OLE临床试验中,患有带抑制剂的血友病A或B受试者在实验开始之前及实验观察期间之中值年出血率 (ABR) 图。

[0097] 图21为显示AT3SC-001之第II期OLE临床试验中,具有或不具有抑制剂之血友病A或B患者所经历之出血事件特征的列表。

[0098] 图22为显示AT3SC-001之第II期OLE临床试验中,不带抑制剂的血友病A或B患者所经历出血事件之处理的列表。

[0099] 图23为显示AT3SC-001之第II期OLE临床试验中,带抑制剂的血友病A或B患者所经历出血事件特征的列表。

[0100] 图24A为显示不带抑制剂的血友病A受试者中,每个月固定剂量50mg或80mg之AT3SC-001对处理出血时之因子VIII需要量的作用的图。

[0101] 图24B为显示不带抑制剂的血友病B受试者中,每个月固定剂量50mg或80mg之AT3SC-001对处理出血时之因子IX需要量的作用的图。

[0102] 图24C为显示带抑制剂的血友病A或B受试者中,每个月固定剂量50mg或80mg之AT3SC-001对处理出血时之rFVIIa需要量的作用的图。

[0103] 图24D为显示带抑制剂的血友病A或B受试者中,每个月固定剂量50mg或80mg之AT3SC-001对处理出血时之aPCC需要量的作用的图。

[0104] 图25A为描绘有带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线),之添加aPCC对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0105] 图25B为描绘患有带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的

线)与之后(较上方的线),之添加rFVIIa对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0106] 图26A为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加aPCC对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0107] 图26B为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加rFVIIa对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0108] 图26C为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加aPCC对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0109] 图26D为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加rFVIIa对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0110] 图26E为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加aPCC对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0111] 图26F为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加rFVIIa对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0112] 图26G为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加aPCC对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0113] 图26H为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加rFVIIa对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0114] 图26I为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加aPCC对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0115] 图26J为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加rFVIIa对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0116] 图26K为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加aPCC对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0117] 图26L为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加rFVIIa时来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0118] 图26M为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方

的线)与之后(较上方的线)之添加aPCC对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0119] 图26N为描绘患有不带抑制剂的血友病A受试者接受施用AT3SC-001之前(较下方的线)与之后(较上方的线)之添加rFVIIa对来自该受试者的血浆样本中凝血酶产生的作用的图。

[0120] 图27A为描绘在第I/II期开放标签延伸(OLE)临床样本中,多重剂量之AT3SC-001对AT下降四分位数时之凝血酶产生的作用的图。

[0121] 图27B为描绘多重剂量之AT3SC-001对AT下降四分位数时之凝血酶产生之模拟效应的图。

[0122] 图27C为描绘模拟TG(图27B)与实测TG(图27A)之间强相关性的散布图。

[0123] 图28A描绘各种不同AT含量与0.1%因子FVIII(模拟严重血友病A)的电脑模拟凝血酶产生曲线。

[0124] 图28B为严重血友病A在各种不同因子VIII剂量(单剂)与AT含量之峰值凝血酶的热图表示。

[0125] 图28C为严重血友病B在各种不同FIX剂量(单剂)与AT浓度下之峰值凝血酶的热图表示。

[0126] 图29A为描绘在5、10、20与50IU/kg之因子FVIII及AT在100%下,模拟之峰值凝血酶潜势(nM)作为时间的函数的图。

[0127] 图29B为描绘在5、10、20IU/kg之因子FVIII及AT在基线之20%下,模拟之峰值凝血酶潜势(nM)作为时间的函数的图。

[0128] 发明详述

[0129] 本发明至少部分基于惊人地发现,患有不带抑制剂的血友病(例如,血友病A、血友病B或血友病C)受试者接受施用治疗有效量的iRNA组合物,其导致RNA诱发静默复合物(RISC)介导Serpinc1基因之RNA转录本的裂解,即可利用治疗有效量的置换因子(如:因子VIII或因子XI)治疗出血事件,其剂量低于世界血友病联盟(参见例如,Srivastava等,「Guidelines for the Management of Hemophilia」,Hemophilia(2012年7月6日电子书);DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x,其完整内容已通过提述并入本文)和/或食品药品监督管理局的建议有效量(参见例如,艾非特(ADVATE)(抗血友病因子(重组体))产品插页;11/2016;贝尼克(BeneFIX)(凝血因子IX(重组体))产品插页;11/2011;其完整内容已通过提述并入本文)。因此,本发明提供一种在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约30mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其中与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及对该受试者施用治疗有效量的置换因子,其中置换因子之有效量低于置换因子的建议有效量,由此在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

[0130] 另一个方面中,本发明提供一种在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约40mg至约90mg的抑制Serpinc1表达

的双链核糖核酸(RNAi)剂,其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及对该受试者施用治疗有效量的置换因子,其中置换因子之有效量低于置换因子的建议有效量,由此在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

[0131] 本发明亦至少部分基于如下发现,即,患有带抑制剂的血友病(例如,血友病A、血友病B或血友病C)受试者接受施用治疗有效量的iRNA组合物,其导致RNA诱发静默复合物(RISC)介导Serpinc1基因之RNA转录本的裂解,可利用治疗有效量的绕过剂(如:经活化的凝血酶原复合物浓缩物(aPCC)或重组因子VIIa(rFVIIa))治疗出血事件,其剂量低于世界血友病联盟(参见例如,Srivastava等,[Guidelines for the Management of Hemophilia],Hemophilia(2012年7月6日电子书);DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x)和/或食品药物管理局的建议有效量(参见例如,NovoSeven RT,凝血因子VIIA(重组)产品插页;07/2014;FEIBA,抗抑制剂凝血复合物(Anti-Inhibitor Coagulation Complex)产品插页;11/2013;其完整内容已分别通过提述并入本文)。

[0132] 因此,本发明另一方面提供一种在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约30mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及对该受试者施用治疗有效量的绕过剂,其中绕过剂之有效量低于例如,由食品药物管理局所核准绕过剂的建议有效量,由此在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

[0133] 本发明另一方面提供一种在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约40mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及对该受试者施用治疗有效量的绕过剂,其中绕过剂之有效量低于例如,由食品药物管理局所核准绕过剂的建议有效量,由此在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

[0134] 本发明方法所使用的iRNA剂一般包括RNA链(反义链),其具有一区长度约30个或更少核苷酸,例如,15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷酸长度,该区实质上与

Serpinc1基因之mRNA转录本之至少一部分互补。

[0135] 其他实施例中,本发明双链RNAi剂之一链或两链的长度为多至66个核苷酸,例如,36-66、26-36、25-36、31-60、22-43、27-53个核苷酸长度,其中有一区至少19个连续核苷酸系实质上与Serpinc1基因之mRNA转录本之至少一部分互补。在一些实施例中,有义链与反义链形成18-30个连续核苷酸之双链体。

[0136] 在一些实施例中,本发明方法所使用的iRNA剂包括RNA链(反义链),其长度为多至66个核苷酸,例如,36-66、26-36、25-36、31-60、22-43、27-53个核苷酸长度,其中有一区至少19个连续核苷酸系实质上与Serpinc1基因之mRNA转录本之至少一部分互补。在一些实施例中,所述具有更长长度反义链的iRNA剂可能包括20-60个核苷酸长度之第二RNA链(有义链),其中有义链与反义链形成18-30个连续核苷酸之双链体。

[0137] 下列详细说明揭示如何制造及使用供抑制Serpinc1基因表达之包含iRNA之组合物,及供治疗患有可因抑制和/或降低此基因表达而受益之疾病与病症的受试者之组合物、用途及方法。

[0138] I. 定义

[0139] 为了更容易了解本发明,首先定义某些术语。此外应注意,不论何时记载参数数值或数值范围,其均指该等所记载数值之间的数值与范围也意欲为本发明一部分。

[0140] 本文所采用冠词「一种」与「一个」指一个(种)或超过一个(种)(亦即至少一个(种))物品的语法对象。例如,「一个元素/元件」指一个元素/元件或超过一个元素/元件,例如,复数个元素/元件。

[0141] 本文所采用术语「包括」意指术语「包括但不限于」,并可与其交换使用。

[0142] 本文所采用术语「或」意指「和/或」,并可与其交换使用,除非文中另有说明。

[0143] 本文所采用「Serpinc1」意指于细胞中表达之特定多肽。Serpinc1亦称为丝氨酸肽酶抑制剂C型(抗凝血酶;AT),成员1;抗凝血酶III;AT3;抗凝血酶;及肝素辅因子1。人类Serpinc1 mRNA转录本之序列可参见例如,GenBank登录号GI:254588059(NM_000488;SEQ ID NO:1)。普通猕猴Serpinc1 mRNA之序列可参见例如,GenBank登录号GI:157167169(NM_001104583;SEQ ID NO:2)。小鼠Serpinc1 mRNA的序列可参见例如,GenBank登录号GI:237874216(NM_080844;SEQ ID NO:3)。大鼠Serpinc1 mRNA的序列可参见例如,GenBank登录号GI:58865629(NM_001012027;SEQ ID NO:4)。

[0144] 本文所采用术语「Serpinc1」亦指由Serpinc1基因之天然发生DNA序列变异(如:Serpinc1基因中之单一核苷酸多形性)于细胞中表达之特定多肽。已经鉴定出Serpinc1基因内许多SNP,且可参见例如,NCBI dbSNP(参见例如,www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)。Serpinc1基因内之SNP之不设限实例可参见NCBI dbSNP登录号rs677;rs5877;rs5878;rs5879;rs941988;rs941989;rs1799876;rs19637711;rs2008946;及rs2227586。

[0145] 本文所采用「受试者」为动物,如哺乳动物,包括灵长类(如人类)、非人类灵长类(例如,猴子与黑猩猩)、非灵长类(如牛、猪、骆驼、大羊驼、马、山羊、兔子、绵羊、仓鼠、天竺鼠、猫、狗、大鼠、小鼠、马与鲸鱼)或鸟类(例如,鸭或鹅)。在一个实施例中,该受试者为人类,如接受治疗或评估如本文所说明可因降低Serpinc1表达而受益之疾病、病症或病况之人类;处于患有可因降低Serpinc1表达而受益之疾病、病症或病况之风险之人类;患有可因降低Serpinc1表达而受益之疾病、病症或病况之人类;和/或正接受治疗可因降低Serpinc1

表达而受益之疾病、病症或病况之人类。

[0146] 本文所采用术语「治疗」或「处理」指下列有利或所需结果,包括但不限于,减轻或缓和一或多种症状;降低出血程度;稳定(亦即不恶化)出血状态;缓和或减缓出血,不论可检测或不可检测;或解除出血。「治疗」亦可意指比没有接受治疗时之预期存活性延长其存活。本发明方法中,治疗包括依需要处理及调控出血发作、手术前后期间之出血处理、及例行预防减少出血发作频率。

[0147] 在受试者或疾病标记物或症状中之Serpinc1含量之相关内容中使用之术语「降低」意指所述含量在统计上显著降低。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,且优选系降至未患有所述病症的受试者之正常范围内之可接受程度。

[0148] 本文所采用「防止」或「预防」当用在可因降低Sertpinc1基因表达而受益之疾病、病症或其病况时,意指可以降低受试者将发展出与所述疾病、病症或病况有关之症状(例如,如出血之症状)之可能性。例如,当具有一个或多个出血之危险因子的受试者未出现出血或所出现之出血严重性比具有相同危险因子但未接受如本文所说明治疗法的受试者减轻时,即系降低发展出出血之可能性。未发展出疾病、病症或病况,或所发展出与所述疾病、病症或病况有关之症状减轻(例如,针对该疾病或病症之临床上可接受指标减轻至少约10%)或延迟出现后来的症状(例如,延迟数天、数周、数月或数年)时,即视为有效预防。

[0149] 本文所采用术语「出血病症」为造成血液凝结不良和/或过度出血之疾病或病症。出血病症可为先天性病症,如血友病或温韦伯氏疾病(von Willebrand's disease),或相关之后天性病症,例如,弥漫性血管内凝血和怀孕相关之子痫症、维生素K缺乏、自体免疫病症、炎性肠病、溃疡性结肠炎、皮肤病症(例如,牛皮癣、天疱疮)、呼吸疾病(例如,哮喘、慢性阻塞性肺病)、过敏性药物反应(例如,医药结果,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、恶性或固体肿瘤(例如,前列腺、肺、结肠、胰脏、胃、胆管、头颈、子宫颈、乳房、黑色素瘤、肾脏、和/或血液性恶病质)。在一个实施例中,该先天性出血病症为血友病,例如,血友病A、B或C。在一个实施例中,患有先天性出血病症(例如,血友病)的受试者已经对置换凝血疗法产生抑制剂,例如,同种异体抗体抑制剂,本文中称为「带抑制剂受试者」。在一个实施例中,该带抑制剂受试者患有血友病A。在另一个实施例中,该带抑制剂受试者患有血友病B。又在另一个实施例中,该带抑制剂受试者患有血友病C。

[0150] 在一个实施例中,出血病症为罕见出血病症(RBD)。RBD可为后天型RBD或遗传型RBD。遗传型RBD包括与缺乏凝血因子纤维蛋白原、FII、FV、组合的FV与FVIII、FVII、FX、FXI、FXIII、及先天性缺乏维生素K依赖型因子(VKCFD)相关之病症。其等通常呈常染色体隐性病况遗传,但有些病例(如FXI与纤维蛋白原不良血症)可能为常染色体显性。在大多数群体中,因同型合子或双重异型合子发生RBD之机率从FVII缺陷的500,000分之一至凝血酶原与FXIII缺陷的2至3百万分之一。群体之间会有相对频率上的变异,血亲或同族婚姻较普遍的群体中由于特定突变基因之频率增加,频率较高。

[0151] RBD实例包括无纤维蛋白原血症(纤维蛋白原;因子I缺陷);低纤维蛋白原血症(纤维蛋白原;因子I缺陷);纤维蛋白原不良血症(纤维蛋白原;因子I缺陷);低纤维蛋白原不良血症(纤维蛋白原;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);血栓形成体质(凝血酶原;因子II缺陷);先天性抗凝血酶III缺陷(凝血质;因子III;组织因子);类血友病(促凝血球蛋白原;因子V;易变因子);奥伦氏症(Owren's disease)(促凝血球蛋白原;因子V;易变因子);活化蛋白质C抗性(促凝血球蛋白原;因子V;易变因子);亚历山大症(Alexander's disease)(稳定因子前转化素(proconvertin);因子VII);先天性前转化素/因子VII缺陷(稳定因子前转化素;因子VII);史道特-鲍尔(Stuart-Prower)缺陷(史道特-鲍尔因子(Stuart-Prower factor);因子X);先天性因子XIIIa/b缺陷(纤维蛋白稳定因子;因子XIII);遗传因子XIII缺陷(纤维蛋白稳定因子;因子XIII);及纤维蛋白稳定因子缺陷(纤维蛋白稳定因子;因子XIII)。

[0152] 本文所采用「治疗有效量」意指所包括RNAi剂用量当施用患有出血病症及出血中的受试者时,足以治疗疾病(例如,减轻、缓解或维持现有疾病或疾病之一或多种症状)。「治疗有效量」可能随RNAi剂、该制剂之施用法、该疾病及其严重程度、及病史、年龄、体重、家庭病史、基因组态、可能进行之过去或并行之任何治疗、及接受治疗的受试者之其他个人特征而异。

[0153] 本文所采用「预防有效量」意指所包括iRNA剂用量当施用患有出血病症但未在出血中的受试者,例如,患有出血病症且意欲接受手术的受试者(手术前后期间治疗)时,足以预防或缓解疾病或疾病之一或多种症状。疾病之缓解包括减慢疾病过程或降低后来发展之疾病之严重性。「预防有效量」可能随iRNA剂、该制剂之施用法、该疾病之严重程度、及病史、年龄、体重、家庭病史、基因组态、可能进行之过去或并行之任何治疗、及接受治疗之患者之其他个人特征而异。

[0154] 「治疗有效量」或「预防有效量」亦包括RNAi剂可以在适用于任何治疗之合理效益/风险比值下产生某些所需局部或全身性效应时之量。本发明方法所采用iRNA可能施用足以产生适用于所述治疗之合理效益/风险比值之量。

[0155] 「置换因子之建议治疗有效量」与「绕过剂之建议治疗有效量」系分别指置换因子或绕过剂的剂量,其足以在出现出血的受试者中产生凝血酶并解除出血和/或足以达到血浆因子峰值浓度,如世界血友病联盟(参见例如,Srivastava等,「Guidelines for the Management of Hemophilia」,Hemophilia(2012年7月6日电子书);DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x;艾非特(ADVATE)(抗血友病因子(重组体))产品插页;11/2016;及贝尼克(BeneFIX)(凝血因子IX(重组体)产品插页;11/2011所提供。前述的完整内容通过提述并入本文。

[0156] 例如,针对患有轻度出血的受试者,置换因子或绕过剂之建议剂量为足以使峰值血浆因子VIII浓度达到约10-40IU/dL时的剂量;针对患有中度出血的受试者的置换因子或绕过剂之建议剂量为足以使峰值血浆因子VIII浓度达到约30-60IU/dL时的剂量;针对患有重度出血的受试者的置换因子或绕过剂之建议剂量为足以使峰值血浆因子VIII浓度达到约60-100IU/dL时的剂量;针对手术前后期间的受试者的置换因子或绕过剂之建议剂量为足以使峰值血浆因子VIII浓度达到约30-60IU/dL时的剂量(参见例如,艾非特(ADVATE)(抗血友病因子(重组))产品插页;11/2016的表1与2)。

[0157] 针对患有轻度出血的受试者的置换因子或绕过剂之建议剂量为足以使峰值血浆因子IX浓度达到约10-30IU/dL时的剂量;针对患有中度出血的受试者的置换因子或绕过剂之建议剂量为足以使峰值血浆因子IX浓度达到约25-50IU/dL时的剂量;针对患有重度出血

的受试者的置换因子或绕过剂之建议剂量为足以使峰值血浆因子IX浓度达到约50-100IU/dL时的剂量。

[0158] 本文所采用术语「医药上可接受」指那些在完整之医学判断下适合与人类受试者及动物之组织接触,且在合理之效益/风险比值下不会有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0159] 本文所采用术语「医药上可接受之载剂」意指医药上可接受之材料、组合物或载剂,如液态或固态填料、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如,润滑剂、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌或硬脂酸)或溶剂包埋材料,其涉及从一个器官或身体之一部分携带或转运该主题化合物至另一个器官或身体之一部分。各载剂必需在可与调配物中其他成份相容之意义上为「可接受」,且对接受治疗的受试者无害。可作为医药上可接受之载剂之有些材料实例包括:(1)糖类,如乳糖、葡萄糖与蔗糖;(2)淀粉,如玉米淀粉与马铃薯淀粉;(3)纤维素和其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素与乙酸纤维素;(4)黄蓍胶粉末;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠与滑石;(8)赋形剂,如可可奶油与栓剂用蜡;(9)油类,如花生油、玉米籽油、葵花油、芝麻油、橄榄油、玉米油与大豆油;(10)甘醇类,如丙二醇;(11)多元醇类,如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;(12)酯类,如油酸乙酯与月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁与氢氧化铝;(15)藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液(Ringer's solution);(19)乙醇;(20)pH缓冲液;(21)聚酯类、聚碳酸盐 and/或聚酸酐;(22)增积剂,如多肽类与氨基酸;(23)血清组分,如血清白蛋白、HDL与LDL;与(24)用于医药调配物中之其他无毒性相容物质。

[0160] 本文所采用「标靶序列」指在Serpinc1基因转录期间所形成mRNA分子的核苷酸序列中之连续部分,包括作为主要转录产物之RNA处理产物之mRNA。在一个实施例中,该序列之标靶部分应为至少足够长以作为底物用于在或接近Serpinc1基因转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列之一部分的iRNA定向的裂解。

[0161] 标靶序列长度可为约9-36个核苷酸,例如,约15-30个核苷酸长度。例如,标靶序列长度可为约15-30个核苷酸、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷酸。亦涵盖上述范围与长度之间之范围与长度作为本发明的一部分。

[0162] 本文所采用术语「包含序列之链」指包含核苷酸链之寡核苷酸,其系采用标准核苷酸命名法之序列说明。

[0163] 「G」、「C」、「A」、「T」与「U」一般分别代表核苷酸,其分别包含鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶与尿嘧啶作为碱基。然而,咸了解,术语「核糖核苷酸」或「核苷酸」亦指经修饰的核苷酸,如下文中进一步说明,或改用置换部分基团(参见例如,表1)。本领域的技术人员咸了解,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤与尿嘧啶可在不会实质上改变该包含带有所述置换部分基团的核苷酸之寡核苷酸碱基配对性质下改用其他部分基团置换。例如(但不限于),包含肌苷作为其碱基的核苷酸可与包含腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸形成碱基对。因此,如本发明所说明特征之dsRNA的核苷酸序列中,包含尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可被包含

例如,肌苷的核苷酸置换。另一项实例中,寡核苷酸中之任何腺嘌呤与胞嘧啶均可分别被鸟嘌呤与尿嘧啶置换,与标靶mRNA形成G-U摇摆碱基对。包含所述置换部分基团之序列适合如本发明所说明特征之组合物与方法。

[0164] 本所采用术语「iRNA」、「RNAi剂」、「iRNA剂」、「RNA干扰剂」可交换使用,其意指包含如本文术语所定义之RNA之制剂,其可藉由RNA诱发静默复合物(RISC)途径介导RNA转录本的靶向裂解。iRNA透过称为RNA干扰(RNAi)之过程主导依序列专一性裂解mRNA。iRNA调控(例如,抑制)Serpinc1于细胞(例如,受试者,如哺乳动物受试者之细胞)中的表达。

[0165] 在一个实施例中,本发明RNAi剂包括与标靶RNA序列(例如,Serpinc1标靶mRNA序列)交互作用之单链RNA,以主导标靶RNA的裂解。在不希望受到理论限制下,据信进入细胞中之长双链RNA被称为Dicer之第III型内切核酸酶分解成siRNA(Sharp等(2001) Genes Dev.15:485)。Dicer系一种类似核糖核酸酶-III之酶,可处理dsRNA形成19至23对碱基之短干扰RNA,其特征在于两个碱基之3'突出(Bernstein等(2001) Nature 409:363)。siRNA随后进入RNA诱发静默复合物(RISC)中,其中一或多种解螺旋酶解开siRNA双链体,让互补反义链可以指挥识别标靶(Nykanen等(2001) Cell 107:309)。当与适当标靶mRNA结合时,RISC内之一或多种内切核酸酶会裂解标靶,引发静默(Elbashir等(2001) Genes Dev.15:188)。因此一个方面中,本发明涉及一种在细胞内产生之单链RNA(siRNA),其促进形成RISC复合物,导致标靶基因(亦即Serpinc1基因)静默。因此,本文所采用术语「siRNA」亦指上述RNAi。

[0166] 在另一个实施例中, RNAi剂可为进入细胞或生物体中来抑制标靶mRNA之单链siRNA。单链RNAi剂结合RISC内切核酸酶Argonaute 2,然后其裂解标靶mRNA。单链siRNA一般为15至30个核苷酸且经化学修饰。单链siRNA之设计与试验说明于美国专利号8,101,348与Lima等(2012) Cell 150:883-894,其完整内容已分别通过提述并入本文。本文所说明之任何反义核苷酸序列均可作为本文说明之单链siRNA使用或可采用Lima等(2012) Cell 150:883-894说明的方法进行化学修饰。

[0167] 在另一个实施例中,本发明组合物、用途与方法所使用之「iRNA」系双链RNA,本文中称为「双链RNAi剂」、「双链RNA(dsRNA)分子」、「dsRNA剂」或「dsRNA」。术语「dsRNA」指核糖核酸分子之复合物,其具有双链体结构,包含两个反向平行且实质上互补之核酸链,具有相对于标靶RNA(亦即Serpinc1基因)之「正义」与「反义」取向。有些本发明实施例中,双链RNA(dsRNA)透过转录后基因-静默机转(本文称为RNA干扰或RNAi)触发标靶RNA(例如,mRNA)的降解。

[0168] 通常,dsRNA分子之各链之大多数核苷酸为核糖核苷酸,但如同本文之详细说明,各链或两链亦可包括一个或多个非核糖核苷酸,例如,脱氧核糖核苷酸和/或经修饰的核苷酸。此外,本说明书所采用「RNAi剂」可能包括经化学修饰之核糖核苷酸;RNAi剂可能在多个核苷酸包括实质修饰。

[0169] 本文所采用术语「经修饰的核苷酸」意指分别独立具有经修饰之糖部分基团、经修饰的核苷酸之间键联和/或经修饰之核碱基的核苷酸。因此,术语「经修饰的核苷酸」包括在核苷酸之间键联、糖部分基团或核碱基的取代、加成或排除例如,官能基或原子。适用于本发明制剂之修饰法包括本文所揭示或相关技艺已知之所有修饰型态。针对本说明书与申请专利范围的目的,「RNAi剂」包括用于siRNA型分子的任何所述修饰。

[0170] 双链区的长度可为容许所需之标靶RNA透过RISC途径进行专一性降解之任何长

度,且可能在约9至36对碱基的长度范围内,例如,约15-30对碱基的长度,例如,约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对碱基的长度,如约15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22对碱基的长度。上述范围与长度之间之范围与长度亦包括为本发明之一部分。

[0171] 形成双链体结构之两链可能为一个较大RNA分子之不同部分,或其可能为分开之RNA分子。若这两链为一个较大分子之一部分,且因此在形成该双链体结构之其中一链之3'-端与另一链之5'-端之间利用未中断的核苷酸链连接时,该连接之RNA链称为「发夹环」。发夹环可包含至少一个未配对的核苷酸。在一些实施例中,发夹环可包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少20个、至少23个或更多个未配对的核苷酸。

[0172] 若dsRNA之两个实质上互补链包含在分开之RNA分子上时,那些分子不一定需要但可以共价连接。若这两链在形成该双链体结构之其中一链之3'-端与另一链之5'-端之间利用除了未中断的核苷酸链以外之其他连接方式共价连接时,该连接结构称为「接头」。RNA链可能具有相同或不同数量的核苷酸。碱基对之最高数量即为dsRNA中最短链的核苷酸数量减去双链体中任何突出后之数量。除了双链体结构外,RNAi亦可包含一个或多个核苷酸突出。

[0173] 在一个实施例中,本发明RNAi剂为24-30个核苷酸之dsRNA,其与标靶RNA序列(例如,Serpinc1标靶mRNA序列)交互作用,主导标靶RNA的裂解。在不希望受到理论之限制下,进入细胞中之长的双链RNA被称为Dicer之第III型内切核酸酶分解成siRNA(Sharp等,(2001) Genes Dev.15:485)。Dicer系类似核糖核酸酶-III之酶,其处理dsRNA形成19-23对碱基之短干扰型RNA,其特征在于两个碱基之3'突出(Bernstein等,(2001) Nature 409:363)。该等siRNA随后再进入RNA诱发静默复合物(RISC)中,其中一或多种解螺旋酶解开siRNA双链体,让该互补反义链可以指挥识别标靶(Nykanen等,(2001) Cell1107:309)。当与适当标靶mRNA结合时,RISC内之一或多种内切核酸酶即裂解标靶而诱发静默(Elbashir等,(2001) Genes Dev.15:188)。

[0174] 本文所采用术语「核苷酸突出」指至少一个未配对的核苷酸从iRNA双链体结构(例如,dsRNA)中突出。例如,当dsRNA中一链之3'-端超出另一链5'-端,或反之亦然时,即有一个核苷酸突出。dsRNA可包含含有至少一个核苷酸之突出;或者,该突出可包含至少两个核苷酸、至少三个核苷酸、至少四个核苷酸、至少五个或更多个核苷酸。核苷酸突出可包含或其组成可为核苷酸/核苷类似物,包括脱氧核苷酸/核苷。该(等)突出可位于有义链、反义链或其任何组合。此外,突出的核苷酸(群)可出现在dsRNA之反义或有义链之5'-端、3'-端或两端。

[0175] 在一个实施例中,dsRNA之反义链可在3'-端和/或5'-端具有1至10个核苷酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸)之突出。在一个实施例中,dsRNA之有义链可在3'-端和/或5'-端具有1至10个核苷酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸)之突出。在另一

个实施例中,突出中一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸酯置换。

[0176] 某些实施例中,有义链或反义链或二者之突出可包括延长超过10个核苷酸的长度,例如,10至30个核苷酸、10至25个核苷酸、10至20个核苷酸或10至15个核苷酸长度。某些实施例中,延长之突出出现在双链体之有义链。某些实施例中,延长之突出出现在双链体有义链之3'端。某些实施例中,延长之突出出现在双链体有义链之5'端。某些实施例中,延长之突出出现在双链体之反义链。某些实施例中,延长之突出出现在双链体反义链之3'端。某些实施例中,延长之突出出现在双链体反义链之5'端。某些实施例中,延长突出中一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸酯置换。

[0177] 「钝」或「钝端」意指双链RNAi剂之端没有未配对的核苷酸,亦即没有核苷酸突出。「钝端」RNAi剂为其整个长度均为双链之dsRNA,亦即该分子之任一端均没有核苷酸突出。本发明RNAi剂包括在一端具有核苷酸突出之RNAi剂(亦即具有一个突出与一个钝端之制剂)之RNAi剂或两端均具有核苷酸突出之RNAi剂。

[0178] 术语「反义链」或「引导链」指iRNA(例如,dsRNA)之该链包括一个与标靶序列(例如,Serpinc1 mRNA)实质上互补之区。本文所采用术语「互补区」指反义链与序列(例如,标靶序列,例如,如本文定义之Serpinc1核苷酸序列)实质上互补之区。若当互补区未与标靶序列完全互补时,可能在分子内部或末端区发生错配。通常,最能忍受之错配系在末端区内,例如,iRNA之5'-和/或3'-末端之5、4、3或2个核苷酸内。

[0179] 本文所采用术语「有义链」或「过客链」指该iRNA之链包括一个与如本文术语所定义反义链区实质上互补之区。

[0180] 本文所采用术语「裂解区」指位在紧邻裂解位点之区。裂解位点系在标靶发生裂解之位点。在一些实施例中,裂解区包含三个碱基在裂解位点之任一端且紧邻裂解位点。在一些实施例中,裂解区包含二个碱基在裂解位点任一端且紧邻裂解位点。在一些实施例中,裂解位点明确位于与反义链的核苷酸10与11结合之位点,且裂解区包含核苷酸11、12与13。

[0181] 除非另有说明,否则当本文采用术语「互补」说明第一核苷酸序列与第二核苷酸序列之关系时,指包含该第一核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸在如本领域的技术人员所理解的某些条件下与包含第二核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸杂交并形成双链体结构之能力。所述条件可为例如,严紧条件,其中严紧条件包括:400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA,50℃或70℃为12-16小时,然后洗涤(参见例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Sambrook等,(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press))。可采用其他条件,如生物体内部可能遇到之生理上相关条件。本领域的技术人员均可依据最终杂交核苷酸之用途,决定一组最适合测试两个序列之互补性之条件。

[0182] iRNA(例如,本文说明之dsRNA)内之互补序列包括包含第一核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸沿着其中一或两个核苷酸序列之整个长度之碱基配对。所述序列在本文中可称为其彼此「完全互补」。然而,若第一序列相对于本文第二序列称为「实质上互补」时,则该等两个序列可能完全互补,或当具有多至30对碱基之双链体在杂交时,其可能形成一或多对,通常不会有超过5、4、3或2对错配碱基,反而在与其最终用途(例如,经由RISC途径抑制基因表达)最相关之条件下仍保留杂交能力。然而,若两个寡核苷酸之设计在于杂交时形成一个或多个单链突出时,则所述突出不应在决定互补性时视为错配。例如,包含一个长度为21个核苷酸之寡核苷酸与另一个长度为

23个核苷酸之寡核苷酸之dsRNA中,包含一个与该较短寡核苷酸完全互补之21个核苷酸序列之较长寡核苷酸在本发明所说明目的下,仍可称为「完全互补」。

[0183] 本文所采用「互补」序列亦可包括非华生-克里克(Watson-Crick)碱基对和/或由非天然与经修饰的核苷酸形成之碱基对,或完全由其组成,只要符合上述杂交能力之要求即可。所述非华生-克里克(Watson-Crick)碱基对包括但不限于,G:U摇摆或胡斯坦(Hoogsteen)碱基配对。

[0184] 本文中有关dsRNA之有义链与反义链之间或iRNA剂之反义链与标靶序列之间碱基配对之内容所采用之术语「互补」、「完全互补」与「实质上互补」可由其用途之内容中了解。

[0185] 本文所采用与信使RNA(mRNA)之「至少一部分实质上互补」之多核苷酸指该多核苷酸与所需mRNA(例如,编码Serpinc1之mRNA)之连续部分实质上互补。例如,若该序列系与编码Serpinc1之mRNA之非中断部分实质上互补时,则该多核苷酸系与Serpinc1 mRNA的至少一部分互补。

[0186] 因此在一些实施例中,本文所揭示反义链多核苷酸系与标靶Serpinc1序列完全互补。其他实施例中,本文所揭示反义链多核苷酸系与标靶Serpinc1序列实质上互补,且所包含之连续核苷酸序列与核苷酸序列SEQ ID NO:1之同等区之完整长度或SEQ ID NO:1之片段至少约80%互补,如约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%互补。

[0187] 在一个实施例中,本发明RNAi剂包括与反义多核苷酸实质上互补之有义链,该反义链再与标靶Serpinc1序列互补,且其中该有义链多核苷酸所包含之连续核苷酸序列与核苷酸序列SEQ ID NO:5之同等区之完整长度或任一SEQ ID NO:5之片段至少约80%互补,如约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%互补。

[0188] 本发明一个方面中,本发明方法与组合物所采用之制剂为经由反义抑制机转来抑制标靶mRNA之单链反义RNA分子。单链反义RNA分子系与标靶mRNA内之序列互补。单链反义寡核苷酸可藉由与mRNA进行碱基配对,依化学计量方式抑制转译,并以物理方式封阻转译机转,参见Dias,N.等,(2002) Mol Cancer Ther 1:347-355。单链反义RNA分子的长度可为约15至约30个核苷酸且具有与标靶序列互补之序列。例如,单链反义RNA分子可能包含选自本文所说明任一种反义序列且具有至少约15、16、17、18、19、20或更多个连续核苷酸之序列。

[0189] 本文所采用术语「抑制」可与「降低」、「静默」、「下调」、「压制」及其他类似术语交换使用,且包括任何程度之抑制作用。

[0190] 术语「抑制Serpinc1表达」包括抑制任何Serpinc1基因(如,例如,小鼠Serpinc1基因、大鼠Serpinc1基因、猴Serpinc1基因或人类Serpinc1基因)及编码Serpinc1蛋白质之Serpinc1基因之变异体或突变体的表达。

[0191] 「抑制Serpinc1基因的表达」包括Serpinc1基因之任何抑制程度,例如,至少部分压制Serpinc1基因的表达,如抑制至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少

约98%或至少约99%。

[0192] Serpinc1基因的表达式可依据与Serpinc1基因表达相关之任何变数来分析,例如, Serpinc1 mRNA含量、Serpinc1蛋白质水平或例如,用于测定凝血酶形成潜力之凝血酶:抗凝血酶复合物含量、出血时间、凝血酶原时间(PT)、血小板计数和/或活化之部分凝血质时间(aPTT)。可由其中一或多种变数与对照组含量比较其绝对或相对下降程度,来分析抑制性。对照组含量可能为相关技艺上采用之任何型态之对照组含量,例如,施用前之基线值或由未处理或接受对照物(如,例如,仅使用缓冲剂之对照物或含无活性剂之对照物)处理之类似受试者、细胞或样本所测得之含量。

[0193] 在一个实施例中,对Serpinc1基因表达之至少部分压制性可由从其中Serpinc1基因已转录且已接受处理以致抑制Serpinc1基因表达之第一细胞或细胞群中所分离或所检测之Serpinc1 mRNA相对于实质上与该第一细胞或细胞群相同但未曾接受如此处理之第二细胞或细胞群(对照细胞)之降低程度来分析。采用下列公式来表示抑制程度:

$$[0194] \quad \frac{(\text{对照细胞之mRNA}) - (\text{处理细胞之mRNA})}{(\text{对照细胞之mRNA})} \times 100\%$$

[0196] 本文所采用术语「细胞与RNAi剂(如dsRNA)接触」,包括依任何可能方式接触细胞。细胞与RNAi剂之接触包括细胞于活体外与iRNA接触或细胞于活体内与iRNA接触。该接触可能直接或间接进行。因此例如,可能由执行该方法的受试者让RNAi剂与细胞进行物理性接触,或者,可能让RNAi剂处于容许或导致其随后得以接触细胞之状态下。

[0197] 细胞于活体外之接触可能为例如,细胞与RNAi剂培养。细胞于活体内之接触可能为例如,注射RNAi剂至该细胞所在之组织内或附近,或注射RNAi剂至另一个区域,例如,血流或皮下空间,因此该剂随后即可到达希望接触之细胞所在之组织位置。例如, RNAi剂可能包含和/或可能偶联配体,例如, GalNAc3,其主导RNAi剂至所需位点,例如,肝脏。亦可能组合活体外与活体内接触方法。例如,细胞亦可于活体外与RNAi剂接触,随后再移植入受试者内。

[0198] 在一个实施例中,细胞与iRNA之接触包括藉由促进或引发接收或吸收至细胞内,而「引入」或「递送iRNA至细胞内」。可透过无助力下之扩散或主动细胞过程,或透过辅剂或装置,吸收或接收iRNA。可能于活体外和/或活体内引入iRNA至细胞内。例如,于活体内引入iRNA时,将其注射至组织位点或全身性施用。亦可利用β-葡聚糖递送系统于活体内递送,如那些说明于美国专利号5,032,401与5,607,677和美国公开号2005/0281781中者,其完整内容已通过提述并入本文。于活体外引至细胞中的方法包括本领域已知方法,如电穿孔法与脂染法。其他方法说明于下文和/或是本领域中已知的。

[0199] II. 本发明方法

[0200] 本发明提供一种在患有血友病(例如,血友病A、血友病B或血友病C)的受试者中治疗出血事件之医疗方法,其包括对该受试者施用本发明iRNA剂或包含本发明iRNA剂之药物组合物,例如,其用量可使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多,及施用置换因子或绕过剂,其治疗有效量低于置换因子或绕过剂之建议治疗有效量,例如,世界血友病联盟(参见例如, Srivastava等,「Guidelines for the Management of Hemophilia」, Hemophilia(2012年7月6日电子书); DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x,其完整内

容已通过提述并入本文)和/或食品药品监督管理局之建议(参见例如,艾非特(ADVATE)(抗血友病因子(重组))产品插页;11/2016;贝尼克(BeneFIX)(凝血因子IX(重组体)产品插页;11/2011)(例如,其量足以产生凝血酶及解除出血(形成血块)。上述各文献的完整内容已通过提述并入本文。

[0201] 如下文实例中之说明,已惊人地发现在患有具有或不具有抑制剂之血友病(例如,血友病A、血友病B或血友病C)受试者中以使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多的量施用抑制Serpinc1表达之RNAi剂,降低中值年出血率及自发性年出血率,并可处理出血(产生凝血酶及解除出血),并接受治疗有效量的置换因子或绕过剂,其用量低于置换因子或绕过剂的建议有效量。

[0202] 适用于本发明方法的置换因子包括因子VIII,例如,艾非特(Advate)、艾拉特(Eloctate)、赫满特(Haemate)、希利特(Helixate)、英姆特(Immunate)、欧康特(Octanate)、立康贝(Recombinate)和立法克(Refacto),或因子IX,例如,安美克(Aimafix)、贝尼克(Benefix)、英姆尼(Immunine)和立法克(Refacto)。适用于本发明方法之绕过剂包括经活化的凝血酶原复合物浓缩物(aPCC),例如,FEIBA与Prothromplex,及重组因子VIIa(rFVIIa),例如,NovoSeven。

[0203] 本发明方法中,置换因子可为因子VIII,且施用于受试者的置换因子的治疗有效量为足以达到峰值血浆因子VIII含量约10至100IU/dL时的剂量,例如,约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或约100IU/dL。

[0204] 例如,施用于受试者的因子VIII置换因子的治疗有效量可低于约200IU/kg或低于约190IU/kg或低于约180IU/kg或低于约170IU/kg或低于约160IU/kg或低于约150IU/kg或低于约140IU/kg或低于约130IU/kg或低于约120IU/kg或低于约110IU/kg或低于约100IU/kg或低于约90IU/kg或低于约80IU/kg或低于约70IU/kg或低于约60IU/kg或低于约50IU/kg或低于约40IU/kg或低于约30IU/kg或低于约20IU/kg或低于约10IU/kg。在一个实施例中,施用于受试者的因子VIII的治疗有效量降低为置换因子的建议有效量的约1/1.5至约1/5,如剂量为约5至约20IU/kg或约10至约20IU/kg,例如,5、10、15或20IU/kg。在一个实施例中,出血事件系中度出血事件。在另一个实施例中,出血事件系重度出血事件。

[0205] 本发明方法中,置换因子可为因子IX,且施用于受试者的置换因子的治疗有效量为足以达到峰值血浆因子IX含量约10至100IU/dL时的剂量,例如,约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或约100IU/dL。

[0206] 例如,因子IX置换因子的治疗有效量可低于约200IU/kg或低于约190IU/kg或低于约180IU/kg或低于约170IU/kg或低于约160IU/kg或低于约150IU/kg或低于约140IU/kg或低于约130IU/kg或低于约120IU/kg或低于约110IU/kg或低于约100IU/kg或低于约90IU/kg或低于约80IU/kg或低于约70IU/kg或低于约60IU/kg或低于约50IU/kg或低于约40IU/kg或低于约30IU/kg或低于约20IU/kg或低于约10IU/kg。在一个实施例中,施用于受试者的因子IX的治疗有效量降低为置换因子的建议有效量的约1/2至约1/6,例如,剂量约10至约30IU/kg或约20至约30IU/kg,如约10、15、20、25或30IU/kg。在一个实施例中,出血事件系中度出血事件。在另一个实施例中,出血事件为重度出血事件。

[0207] 本发明方法中,绕过剂可为aPCC,且施用于受试者之绕过剂的治疗有效量为足以产生凝血酶及解除出血时的剂量。

[0208] 例如,绕过剂aPCC的治疗有效量可低于约100U/kg或低于约90U/kg或低于约80U/kg或低于约70U/kg或低于约60U/kg或低于约50U/kg或低于约40U/kg或低于约30U/kg或低于约20U/kg或低于约10U/kg。在一个实施例中,施用于受试者之aPCC的治疗有效量降低为置换因子的建议有效量的约1/2至约1/3,例如,剂量约30至约50U/kg,如约30、35、40、45或50U/kg。在一个实施例中,出血事件系中度出血事件。在另一个实施例中,出血事件系重度出血事件。

[0209] 本发明方法中,绕过剂可为rFVIIa,且施用于受试者之绕过剂的治疗有效量为足以产生凝血酶及解除出血时的剂量。

[0210] 例如,绕过剂rFVIIa的治疗有效量系低于约120 μ g/kg或低于约110 μ g/kg或低于约100 μ g/kg或低于约90 μ g/kg或低于约80 μ g/kg或低于约70 μ g/kg或低于约60 μ g/kg或低于约50 μ g/kg或低于约40 μ g/kg或低于约30 μ g/kg或低于约20 μ g/kg。在一个实施例中,施用于受试者之rFVIIa的治疗有效量降低为置换因子的建议有效量的约1/2,例如,剂量约45 μ g/kg。在一个实施例中,出血事件系中度出血事件。在另一个实施例中,出血事件为重度出血事件。

[0211] 在一些实施例中,RNAi剂系施用固定剂量约25mg-约100mg,例如,约25mg-约95mg、约25mg-约90mg、约25mg-约85mg、约25mg-约80mg、约25mg-约75mg、约25mg-约70mg、约25mg-约65mg、约25mg-约60mg、约25mg-约50mg、约50mg-约100mg、约50mg-约95mg、约50mg-约90mg、约50mg-约85mg、约50mg-约80mg、约30mg-约100mg、约30mg-约90mg、约30mg-约80mg、约40mg-约100mg、约40mg-约90mg、约40mg-约80mg、约60mg-约100mg、约60mg-约90mg、约25mg-约55mg、约25mg-约65mg、约30mg-约95mg、约30mg-约85mg、约30mg-约75mg、约30mg-约65mg、约30mg-约55mg、约40mg-约95mg、约40mg-约85mg、约40mg-约75mg、约40mg-约65mg、约40mg-约55mg或约45mg-约95mg。

[0212] 在一些实施例中,RNAi剂系施用固定剂量约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg或约100mg。

[0213] 在一个实施例中,施用于受试者之RNAi剂剂量可使Serpinc1活性降低约75%或更多。

[0214] 因此,本发明一个方面提供一种在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约30mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂(例如,可使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时的剂量),其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及对该受试者施用治疗有效量的置换因子,其中置换因子之有效量低于置换因子的建议有效量(例如,足以达到峰值血浆因子VIII含量约10至100IU/dL时的剂量(例如,剂量低于约200IU/kg之因子VIII,例如,剂量约5至约20IU/kg之因子VIII);或足以达到峰值血浆因子IX含量约10至100IU/dL时的剂量(例如,剂量低于约200IU/kg之因子IX,例如,剂量约10至约30IU/kg之因子IX)),由此在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

[0215] 另一个方面中,本发明提供一种在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约30mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂(例如,可使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量),其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及对该受试者施用治疗有效量的绕过剂,其中绕过剂之有效量低于绕过剂的建议有效量(例如,足以产生凝血酶及解除出血降低时的剂量,例如,剂量低于约100U/kg之aPCC(例如,剂量约30至50U/kg之PCC);剂量低于约120μg/kg之rFVIIa(例如,剂量约45μg/kg之rFVIIa)),由此在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

[0216] 本发明另一方面提供一种在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约40mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量),其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及对该受试者施用治疗有效量的置换因子,其中置换因子之有效量低于置换因子的建议有效量(例如,足以达到峰值血浆因子VIII含量约10至100IU/dL之量(例如,剂量低于约200IU/kg之因子VIII,例如,剂量约5至约20IU/kg之因子VIII);或足以达到峰值血浆因子IX含量约10至100IU/dL时之量(例如,剂量低于约200IU/kg之因子IX,例如,剂量约10至约30IU/kg之因子IX)),由此在患有不具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

[0217] 另一个方面中,本发明提供一种在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件的方法。该方法包括对该受试者施用固定剂量约40mg至约90mg的抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量),其中双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;及对该受试者施用治疗有效量的绕过剂,其中绕过剂之有效量低于绕过剂的建议有效量(例如,足以产生凝血酶及解除出血时之量,例如,剂量低于约100U/kg之aPCC(例如,剂量约30至50U/kg之aPCC);剂量低于约120μg/kg之rFVIIa(例如,剂量约45μg/kg之rFVIIa)),由此在患有具有抑制剂的血友病的受试者中治疗出血事件。

[0218] 本发明一个方面提供一种抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其适合施用于受试者固定剂量约30mg至90mg(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量);及置换因子,其适合施用于受试者的剂量低于置换因子的建议有效量(例如,足以达到峰值血浆因子VIII含量约10-100IU/dL时之量(例如,剂量低于约200IU/kg之因子VIII,例如,剂量约5至约20IU/kg之因子VIII);或足以达到峰值血浆因子IX含量约10-

100IU/dl时之量(例如,剂量低于约200IU/kg之因子IX,例如,剂量约10至约30IU/kg之因子IX)),用于为患有不带抑制剂的血友病(例如,血友病A、血友病B或血友病C)受试者治疗出血事件。该RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体。

[0219] 本发明另一方面提供一种抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其适合施用于受试者固定剂量约30mg至90mg(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量);及绕过剂,其适合施用于受试者的剂量低于绕过剂的建议有效量(例如,足以产生凝血酶及解除出血时之量,例如,剂量低于约100U/kg之aPCC(例如,剂量约30至50U/kg之aPCC);剂量低于约120μg/kg之rFVIIa(例如,剂量约45μg/kg之rFVIIa))用于为患有带抑制剂的血友病(例如,血友病A、血友病B或血友病C)受试者治疗出血事件。该RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体。

[0220] 本发明一个方面提供一种抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其适合施用于受试者固定剂量约40mg至90mg(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量);及置换因子,其适合施用于受试者的剂量低于置换因子的建议有效量(例如,足以达到峰值血浆因子VIII含量约10至100IU/dL时之量(例如,剂量低于约200IU/kg之因子VIII,例如,剂量约5至约20IU/kg之因子VIII);或足以达到峰值血浆因子IX含量约10-100IU/dl时之量(例如,剂量低于约200IU/kg之因子IX,例如,剂量约10至约30IU/kg之因子IX)),用于为患有不带抑制剂的血友病(例如,血友病A、血友病B或血友病C)受试者治疗出血事件。该RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体。

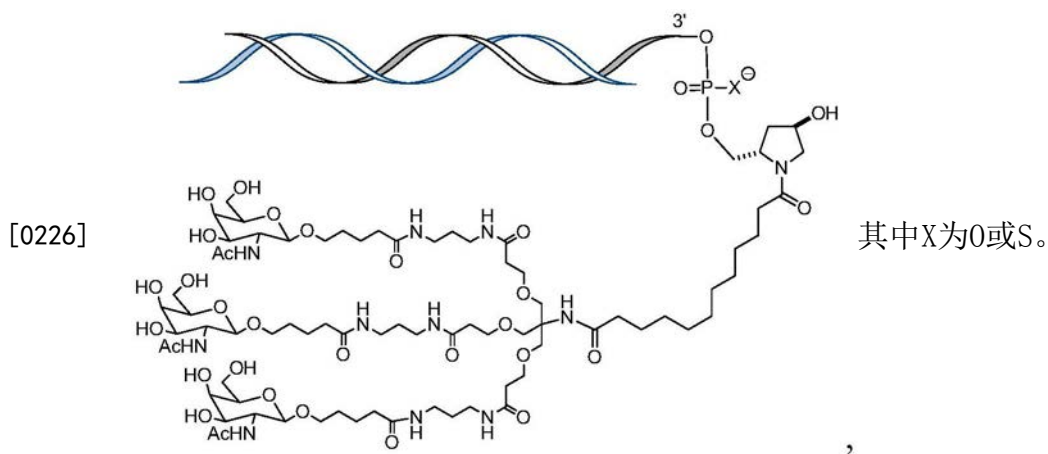
[0221] 本发明另一方面提供一种抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其适合施用于受试者固定剂量约40mg至90mg(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量);及绕过剂,其适合施用于受试者的剂量低于绕过剂的建议有效量(例如,足以产生凝血酶及解除出血时之量,例如,剂量低于约100U/kg之aPCC(例如,剂量约30至50U/kg之aPCC);剂量低于约120μg/kg之rFVIIa(例如,剂量约45μg/kg之rFVIIa)),用于为患有带抑制剂的血友病(例如,血友病A、血友病B或血友病C)受试者治疗出血事件。RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体。

[0222] 在一个实施例中,上述方法与用途中,互补区由核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)组成。

[0223] 在一个实施例中,双链RNAi剂包含有义链,其包含核苷酸序列5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA-3' (SEQ ID NO:16),与反义链,其包含核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO:15)。

[0224] 在一个实施例中,有义链包含5'-GfsGsfUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13)及反义链包含5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO:14),其中a、c、g和u为2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G或U; Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U;及s为硫代磷酸酯键。

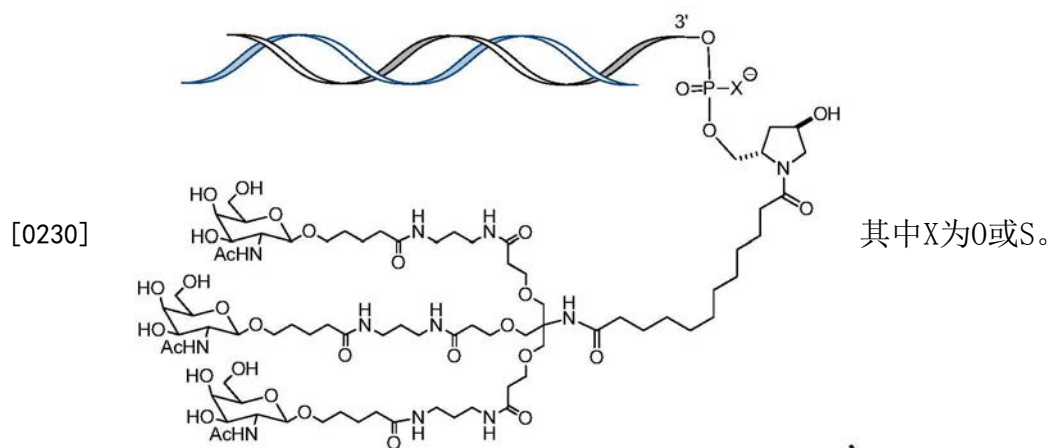
[0225] 在一个实施例中,有义链包含5'-GfsGsfUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13)及反义链包含5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO:14),其中a、c、g和u为2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G或U; Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U;及s为硫代磷酸酯键;且其中有义链如下述方案所示缀合于配体:



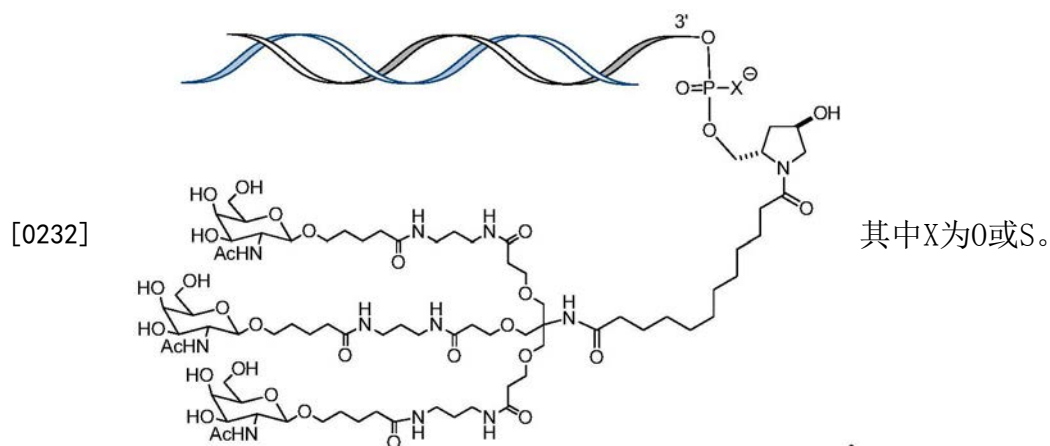
[0227] 在一个实施例中,该制剂系呈药物组合物施用。在一个实施例中,该RNAi剂系含在未缓冲之溶液(如盐水或水)中施用。

[0228] 在另一个实施例中,RNAi剂使用缓冲溶液(如包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合的缓冲溶液)施用。在一个实施例中,该缓冲溶液为磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0229] 本发明一个方面提供一种抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其适合施用于受试者固定剂量约80mg(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量);及置换因子,其适合施用于受试者的剂量低于置换因子的建议有效量(例如,足以达到峰值血浆因子VIII含量约10-100IU/dL时之量(例如,剂量低于约200IU/kg之因子VIII,例如,剂量约5至约20IU/kg之因子VIII);或足以达到峰值血浆因子IX含量约10-100IU/dL时之量(例如,剂量低于约200IU/kg之因子IX,例如,剂量约10至约30IU/kg之因子IX)),用于为患有不帶抑制剂的血友病(例如,血友病A、血友病B或血友病C)受试者治疗出血事件。该RNAi剂包含有义链与反义链,其中有义链包含5'-GfsGsfUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13)及反义链包含5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO:14),其中a、c、g和u为2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G或U; Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U;及s为硫代磷酸酯键;且其中有义链之3'-端如下述方案所示缀合于配体:



[0231] 本发明另一方面提供一种抑制Serpinc1表达的双链核糖核酸(RNAi)剂,其适合施用于受试者固定剂量约80mg(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量);及绕过剂,其适合施用于受试者的剂量低于绕过剂的建议有效量(例如,足以产生凝血酶及解除出血时之量,例如,剂量低于约100U/kg之aPCC(例如,剂量约30至50U/kg之aPCC);剂量低于约120μg/kg之rFVIIa(例如,剂量约45μg/kg之rFVIIa)),用于为患有带抑制剂的血友病(例如,血友病A、血友病B或血友病C)受试者治疗出血事件。该RNAi剂包含有义链与反义链,其中有义链包含5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfUfuAfcUfuCfaAf-3'(SEQ ID NO:13),及反义链包含5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3'(SEQ ID NO:14),其中a、c、g和u为2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G或U;Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U;及s为硫代磷酸酯键;且其中有义链之3'-端如下述方案所示缀合于配体:



[0233] 在一个实施例中,该固定剂量之RNAi剂适合经皮下施用。

[0234] 在一个实施例中,该固定剂量之RNAi剂适合一个月一次施用该受试者。

[0235] 本发明亦提供一种为患有可因降低Serpinc1表达而受益之病症(例如,出血病症,例如,血友病)的受试者预防至少一种症状的方法。该方法包括对该受试者施用预防有效剂量,例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量(例如,固定剂量约25mg至约100mg)之本发明iRNA剂,例如,dsRNA(例如,包含本发明dsRNA之药物组合物),由此为患有可因降低Serpinc1表达而受益之病症的受试者预防至少一种症状。在一个实施例中,该方法包括对该受试者施用预防有效剂量,例如,固定剂量约50mg之本发明iRNA剂,例如,dsRNA(例如,包含本发明dsRNA之药物组合物),由此为患有可因降低Serpinc1表达而受益

之病症的受试者预防至少一种症状。在另一个实施例中，该方法包括对该受试者施用预防有效剂量（例如，固定剂量约80mg）之本发明iRNA剂，例如，dsRNA（例如，包含本发明dsRNA之药物组合物），由此为患有可因降低Serpinc1表达而受益之病症的受试者预防至少一种症状。

[0236] 另一个方面中，本发明提供一种治疗患有可因降低Serpinc1表达而受益之病症（例如，出血病症，例如，血友病）的受试者的方法，其包括对该受试者（例如，人类）施用医疗有效剂量（例如，使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量，例如，固定剂量约25mg至约100mg）之靶向Serpinc1基因的iRNA剂或包含靶向Serpinc1基因的iRNA剂之药物组合物，由此治疗患有可因降低Serpinc1表达而受益之病症的受试者。在一个实施例中，该方法包括对该受试者施用医疗有效剂量（例如，固定剂量约50mg）之本发明iRNA剂，例如，dsRNA（例如，包含本发明dsRNA之药物组合物），由此治疗患有可因降低Serpinc1表达而受益之病症的受试者。在另一个实施例中，该方法包括对该受试者施用医疗有效剂量，例如，固定剂量约80mg之本发明iRNA剂，例如，dsRNA（例如，包含本发明dsRNA之药物组合物），由此治疗患有可因降低Serpinc1表达而受益之病症的受试者。

[0237] 另一个方面中，本发明提供一种以预防有效剂量（例如，使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量，例如，固定剂量约25mg至约100mg）之本发明iRNA（例如，dsRNA）为患有可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益之病症（如出血病症，例如，血友病）的受试者预防至少一种症状之用途。在一个实施例中，本发明提供一种以预防有效剂量（例如，固定剂量约50mg）之本发明iRNA（例如，dsRNA）为患有可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益之病症（如出血病症，例如，血友病）的受试者预防至少一种症状之用途。在另一个实施例中，本发明提供一种以预防有效剂量（例如，固定剂量约80mg）之本发明iRNA（例如，dsRNA）为患有可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益之病症（如出血病症，例如，血友病）的受试者预防至少一种症状之用途。

[0238] 另一方面中，本发明提供一种以预防有效剂量（例如，使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量，例如，固定剂量约25mg至约100mg）之本发明iRNA剂于制造医药之用途，为患有可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益之病症（如出血病症，例如，血友病）的受试者预防至少一种症状。在一个实施例中，本发明提供一种以预防有效剂量（例如，固定剂量约50mg）之本发明iRNA剂于制造医药之用途，为患有可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益之病症（如出血病症，例如，血友病）的受试者预防至少一种症状。在另一个实施例中，本发明提供一种以预防有效剂量（例如，固定剂量约80mg）之本发明iRNA剂于制造医药之用途，为患有可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益之病症（如出血病症，例如，血友病）的受试者预防至少一种症状。

[0239] 另一个方面中，本发明提供一种以医疗有效剂量（例如，使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量，例如，固定剂量约25mg至约100mg）之本发明iRNA剂于治疗受试者（例如，可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益的受试者）之用途。在一个实施例中，本发明提供一种以医疗有效剂量（例如，固定剂量约50mg）之本发明iRNA剂于治疗受试者（例如，可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益的受试者）之用途。在另一个实施例中，本发明提供一种以医疗有效剂量（例如，固定剂量约80mg）之本发明iRNA剂，于治疗受试者（例如，可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益的受试者）之用途。

[0240] 又另一方面中,本发明提供一种以本发明靶向Serpinc1基因的iRNA剂(例如,dsRNA)或包含医疗有效剂量(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量,例如,固定剂量约25mg至约100mg)之靶向Serpinc1基因的iRNA剂之药物组合物于制造医药之用途,供治疗受试者,例如,可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益的受试者,如患有出血病症,例如,血友病的受试者。在一个实施例中,本发明提供一种以本发明靶向Serpinc1基因的iRNA剂(例如,dsRNA)或包含医疗有效剂量(例如,固定剂量约50mg)之靶向Serpinc1基因的iRNA剂之药物组合物于制造医药之用途,供治疗受试者,例如,可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益的受试者,如患有出血病症,例如,血友病的受试者。在另一个实施例中,本发明提供一种以本发明靶向Serpinc1基因的iRNA剂(例如,dsRNA)或包含医疗有效剂量(例如,固定剂量约80mg)之靶向Serpinc1基因的iRNA剂之药物组合物于制造医药之用途,供治疗受试者,例如,可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益的受试者,如患有出血病症,例如,血友病的受试者。

[0241] 本发明在一些实施例中,例如,当双链RNAi剂包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO:15) 的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体时,所述制剂系施用固定剂量约25mg至约100mg,例如,固定剂量约25mg;或固定剂量约50mg;或固定剂量约80mg;或固定剂量约100mg。在一个实施例中,该固定剂量为50mg。在另一个实施例中,该固定剂量为80mg。

[0242] 因此,本发明一个方面提供一种为患有可因降低Serpinc1表达而受益之病症(例如,出血病症,例如,血友病)的受试者预防至少一种症状的方法。该方法包括对该受试者施用预防有效剂量,例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量(例如,固定剂量约25mg至约100mg)之双链核糖核酸(RNAi)剂,其包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO:15) 的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体(例如,包含该RNAi剂之药物组合物),由此为患有可因降低Serpinc1表达而受益之病症的受试者预防至少一种症状。在一个实施例中,该固定剂量为50mg。在另一个实施例中,该固定剂量为80mg。

[0243] 另一个方面中,本发明提供一种治疗患有可因降低Serpinc1表达而受益之病症(例如,出血病症,例如,血友病)的受试者的方法,其包括对该受试者(例如,人类)施用医疗有效剂量(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量,例如,固定剂量约25mg至约100mg)之双链核糖核酸(RNAi)剂,其包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO:15) 的差异不超过3个核苷酸,且其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体;或施用包含靶向Serpinc1基因的iRNA剂之药物组合物,由此治疗患有可因降低Serpinc1表达而受益之病症的受试者。在一个实施例中,该固定剂量为50mg。在另一个实施例中,该固定剂量为80mg。

[0244] 另一个方面中,本发明提供一种以预防有效剂量(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量,例如,固定剂量约25mg至约100mg)之双链核糖核酸(RNAi)剂,其包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体,为患有可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益之病症(如出血病症,例如,血友病)的受试者预防至少一种症状之用途。在一个实施例中,该固定剂量为50mg。在另一个实施例中,该固定剂量为80mg。

[0245] 另一方面中,本发明提供一种以预防有效剂量(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量,例如,固定剂量约25mg至约100mg)之双链核糖核酸(RNAi)剂,其包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体,于制造医药之用途,为患有可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益之病症(如出血病症,例如,血友病)的受试者预防至少一种症状。在一个实施例中,该固定剂量为50mg。在另一个实施例中,该固定剂量为80mg。

[0246] 另一个方面中,本发明提供一种以医疗有效剂量(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量,例如,固定剂量约25mg至约100mg)之双链核糖核酸(RNAi)剂,其包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体,于治疗受试者,例如,可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益的受试者之用途。在一个实施例中,该固定剂量为50mg。在另一个实施例中,该固定剂量为80mg。

[0247] 又另一方面中,本发明提供一种以本发明靶向Serpinc1基因的iRNA剂(例如,dsRNA)或包含医疗有效剂量(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量(例如,固定剂量约25mg至约100mg)之双链核糖核酸(RNAi)剂(其包含有义链与反义链,所述反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体)之药物组合物于制造医药之用途,供治疗受试者,例如,可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益的受试者,如患有出血病症,例如,血友病的受试者。在一个实施例中,该固定剂量为50mg。在另一个实施例中,该固定剂量为80mg。

[0248] 本发明的方法及用途包括施用本文所说明之组合物,由此降低标靶Serpinc1基因的表达,如为期约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或约80天。在一个实施例中,标靶Serpinc1基因的表达可长期降低,例如,至少约7天或更久,例如,约一周、两周、三周、约四周、约5周或约6周、约2个月、约一季或

更久。

[0249] 可采用本领域已知之任何方法分析基因表达之降低程度。例如,可采用本领域的技术人员已知之例如,北方墨点法、qRT-PCR等例行方法之一,测定Serpinc1之mRNA表达量;采用本领域的技术人员已知之如西方墨点法、免疫技术等例行方法之一,测定Serpinc1之蛋白质水平;和/或测定Serpinc1之生物活性,如影响与细胞血液凝结机转有关(或在活体内与血液凝结本身有关)之一或多种分子,来决定Serpinc1表达之降低程度。在一个实施例中,使用例如,全血之**ROTEM®**血栓弹性分析,测定凝血酶形成时间、血块形成时间和/或凝血时间,以分析Serpinc1表达。

[0250] 根据本发明方法及用途施用dsRNA可能降低患有Serpinc1-相关疾病之患者之所述疾病或病症之严重性、征兆、症状和/或标记物。本文中「降低」意指在统计学上显著降低所述含量。该降低量可为例如,至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约100%。

[0251] 治疗或预防疾病之效力之评估法可为例如,测定疾病恶化、疾病消退、症状严重性、出血频率、疼痛减轻、生活品质,需要维持治疗效果时之医药剂量、适合该所治疗疾病或预防目标之疾病标记物含量或任何其他可测量之参数值。本领域的技术人员均有能力藉由测定其中任一种参数或任何参数组合,来追踪治疗或预防之效力。例如,可能藉由例如,定期追踪凝血酶:抗凝血酶水平,来评估出血病症之治疗效力。由后来之读数与原始之读数比较,即可指示医师该治疗是否有效。本领域的技术人员均有能力藉由测定其中任一种参数或任何参数组合,来追踪治疗或预防之效力。在施用靶向Serpinc1的iRNA或其药物组合物之相关内容中,「有效对抗」出血病症指依临床上适当方式施用,可以让至少统计上显著比例之患者得到有利效应,如改善症状、治愈、减轻疾病、延长寿命、改善生活品质或熟悉治疗出血病症与相关病因之医师通常认定为正向之其他效应。

[0252] 当一或多种疾病状态之参数出现统计上显著改善时,或原本预期之症状不会再恶化或发展时,即证实该治疗或预防效果。例如,疾病之可测定参数之有利变化为至少10%,优选为至少20%、30%、40%、50%或更高,即表示为有效之治疗。针对特定iRNA药物或该药物之调配物之效力亦可采用本领域已知针对该疾病之实验动物模式来判断。当采用实验动物模式时,当观察到标记物或症状在统计学上显著下降时,即证实有治疗效力。

[0253] 或者,可由诊断领域的技术人员依据临床上可接受之疾病严重性量表决定疾病严重性之降低程度,来测定其效力。采用适当量表测定之任何正向变化结果(例如,减轻疾病严重性)均代表使用本文所说明iRNA或iRNA调配物之适当治疗。

[0254] 该iRNA(或包含该iRNA之药物组合物)可施用该受试者约一周一次、约一个月2次、约每6周一次或约每2个月一次或每季度一次。

[0255] 该双链iRNA剂可施用于受试者一剂或多剂。例如,双链iRNA剂可施用于受试者每个月一剂约0.200mg/kg至约1.825mg/kg。或者,双链iRNA剂可施用于受试者固定剂量约25mg至约100mg。

[0256] 在一个实施例中,包含有义链与反义链之双链RNAi剂,反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区,其包含至少15个连续核苷酸,其与核苷酸序列5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO:15)的差异不超过3个核苷酸,其中有义链的基本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附

接在3'-末端的配体,系施用于受试者固定剂量约25至约100mg,例如,约25mg、50mg、80mg或100mg。在一个实施例中,该固定剂量为50mg。在另一个实施例中,该固定剂量为80mg。

[0257] 该施用可以重复,例如,定期重复,如每个月为期一个月、两个月、三个月、四个月或更久。经过初期疗程后,该治疗法可以减少施用频率。例如,经过每个月施用为期3个月,可以每季重复施用一次,为期一年或更久。

[0258] 因此在一些实施例中,RNAi剂之施用疗程包括频繁施用之「加载期」,然后为RNAi剂之施用间隔时间较长之「维持期」。

[0259] 加载施用时程和/或维持施用时程任选地重复一或多次。重复次数可随所需达成效果(例如,压制Serpinc1基因)和/或达成医疗或预防效果(例如,增加血液凝结、缩短血块形成时间,和/或缩短凝血时间)而定。

[0260] 施用iRNA可使例如,患者之细胞、组织、血液、尿液或其他区间中之Serpinc1含量降低至少约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%或至少约99%或更多。

[0261] 该iRNA可采用静脉内输注施用,历时如,5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或约25分钟期间。

[0262] 施用全剂量的iRNA之前,患者可先接受施用较小剂量,如,输注5%,并监测不良效应,如过敏反应。另一项实例中,可监测患者之不期望之免疫刺激效应,如,细胞激素(例如,TNF- α 或INF- α)水平增加。

[0263] 由于根据本发明组合物或由其制成之药物组合物对Serpinc1表达具有抑制效应,因此可提高生活品质。

[0264] 本发明iRNA可呈「裸」型施用,或呈「游离iRNA」施用。裸iRNA系在没有药物组合物之存在下施用。裸iRNA可含于合适缓冲溶液中。该缓冲溶液可能包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合。在一个实施例中,缓冲溶液为磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可以调整包含iRNA之缓冲溶液之pH与渗透压,以便适合施用于受试者。

[0265] 或者,本发明iRNA可呈药物组合物施用,如,dsRNA脂质体调配物。

[0266] 可因降低和/或抑制Serpinc1基因表达而受益的受试者为那些患有出血病症,例如,如本文所说明先天性出血病症或后天性出血病症的受试者。在一个实施例中,该患有先天性出血病症的受试者患有血友病,例如,血友病A、B或C。在一个实施例中,该患有先天性出血病症(例如,血友病)的受试者为带抑制剂受试者(对置换凝血因子变得顽抗的受试者)。在一个实施例中,该带抑制剂受试者患有血友病A。在另一个实施例中,该带抑制剂受试者患有血友病B。又在另一个实施例中,该带抑制剂受试者患有血友病C。可因降低和/或抑制Serpinc1基因表达而受益的受试者之治疗法包括医疗性(例如,依需要,例如,该受试者在出血中(自发性出血或因创伤所致之出血)且无法凝血)及预防性(例如,该受试者未出血和/或待接受手术)处理。

[0267] 本发明进一步提供一种使用iRNA或其药物组合物的方法及用途,例如,用于治疗可因降低和/或抑制Serpinc1表达而受益的受试者,例如,患有出血病症的受试者,其系与其他医药和/或其他医疗方法组合,例如,与已知医药和/或已知医疗方法(如,例如,那些目前用于治疗所述病症的方法)组合。

[0268] 例如,某些实施例中,靶向Serpinc1的iRNA系与例如,适用于治疗本文所说明出血病症之剂组合。例如,适用于治疗可因降低Serpinc1表达而受益的受试者(例如,患有出血病症的受试者)之其他医疗剂及医疗方法包括新鲜冷冻血浆(FFP);重组FVIIa;重组FIX;FXI浓缩剂;含病毒灭活之vWF之FVIII浓缩剂;去敏化疗法,其可包括大剂量之FVIII或FIX,及类固醇或静脉注射免疫球蛋白(IVIG)与环磷酰胺;血浆分离术组合免疫抑制及输注FVIII或FIX,采用或不采用抗纤维蛋白溶解疗法;诱发免疫耐受性(ITI),采用或不采用免疫抑制疗法(例如,环磷酰胺、泼尼松(prednisone)和/或抗-CD20);去胺加压素(desmopressin)乙酸盐[DDAVP];抗纤维蛋白溶酶剂,如氨基己酸及传明酸(tranexamic acid);活化凝血酶原复合物浓缩剂(PCC);抗血友病剂;皮质类固醇;免疫抑制剂;及雌激素。

[0269] iRNA与外加医疗剂和/或治疗法可同时施用和/或在相同组合中施用,例如,非经肠式,或该外加医疗剂可做为分开组合物之一部分施用,或在分开时间施用,和/或采用本领域已知或本文说明之另一种方法施用。

[0270] 在一个实施例中,本发明提供一种治疗患有出血病症(例如,血友病)的受试者的方法,其系对该受试者经皮下施用化合物AT3SC-001(AD-57213-有义链:5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3'(SEQ ID NO:13)与反义链:5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3'(SEQ ID NO:14),其中a、c、g和u为2'-O-甲基(2'-OMe)A、C、G或U;Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U;及s为硫代磷酸酯键)固定剂量约25mg至约100mg,例如,固定剂量约25mg、约50mg、约80mg或约100mg(例如,使该受试者之Serpinc1活性降低约75%或更多时之量)。在一个实施例中,该固定剂量为50mg。在另一个实施例中,该固定剂量为80mg。

[0271] III. 用于本发明方法的iRNA

[0272] 本文说明的方法系使用改良之双链RNAi剂,其抑制细胞中,如受试者(例如,哺乳动物,如患有Serpinc1-相关病症(例如,出血病症,例如,血友病)之人类)之细胞中之Serpinc1基因表达。

[0273] 因此,本发明提供一种双链RNAi剂,其具有可于活体内抑制标靶基因(亦即Serpinc1基因)表达之化学修饰。本发明某些方面中,本发明iRNA的实质上所有核苷酸均经修饰。本发明其他实施例中,本发明iRNA之所有核苷酸均经修饰。本发明的iRNA中「实质上所有核苷酸均经修饰」系大部分但不一定全部经修饰,且可包括不超过5、4、3、2或1个未修饰的核苷酸。

[0274] RNAi剂包含有义链与反义链。RNAi剂之链长度可为12-30个核苷酸。例如,各链可为14-30个核苷酸长度、17-30个核苷酸长度、19-30个核苷酸长度、25-30个核苷酸长度、27-30个核苷酸长度、17-23个核苷酸长度、17-21个核苷酸长度、17-19个核苷酸长度、19-25个核苷酸长度、19-23个核苷酸长度、19-21个核苷酸长度、21-25个核苷酸长度或21-23个核苷酸长度。

[0275] 有义链及反义链通常形成双链体双链RNA(「dsRNA」),本文中亦称为「RNAi剂」。

RNAi剂之双链区长度可为12-30对核苷酸。例如,双链区可为14-30对核苷酸长度、17-30对核苷酸长度、27-30对核苷酸长度、17-23对核苷酸长度、17-21对核苷酸长度、17-19对核苷酸长度、19-25对核苷酸长度、19-23对核苷酸长度、19-21对核苷酸长度、21-25对核苷酸长度或21-23对核苷酸长度。另一项实例中,双链区的长度选自:15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、及27个核苷酸。

[0276] 在一个实施例中, RNAi剂可在其中一链或两链之3'-端、5'-端或两端包含一个或多个突出区和/或封端基团。该突出可为1-6个核苷酸长度,例如,2-6个核苷酸长度、1-5个核苷酸长度、2-5个核苷酸长度、1-4个核苷酸长度、2-4个核苷酸长度、1-3个核苷酸长度、2-3个核苷酸长度或1-2个核苷酸长度。该突出系由其中一链的长度超过另一链所造成,或由相同长度之两链交错造成。该突出可与标靶mRNA形成错配或其可与所靶向之基因序列互补或可为另一个序列。可以连接第一与第二链,例如,利用外加碱基形成发夹型,或利用其他非碱基接头。

[0277] 在一个实施例中, RNAi剂之突出区的核苷酸可彼此分别独立为经修饰或未经修饰的核苷酸,包括但不限于,2'-糖修饰,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),及其任何组合。例如,TT可为任一链之任一端之突出序列。突出可与标靶mRNA形成错配,或其可与所靶向之基因序列互补或可为另一个序列。

[0278] RNAi剂之有义链、反义链或两链之5'-或3'-突出可经过磷酸化。在一些实施例中,突出区(群)包含两个核苷酸,其在这两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯,其中这两个核苷酸可相同或不同。在一个实施例中,突出存在于有义链、反义链或两链之3'-端。在一个实施例中,此3'-突出存在于反义链。在一个实施例中,此3'-突出存在于有义链。

[0279] RNAi剂可能仅包含单一突出,其可强化RNAi之干扰活性,不会影响整体稳定性。例如,单链突出可能位于有义链之3'末端,或者在反义链之3'末端。RNAi亦可能在反义链之5'-端(或有义链之3'-端)具有钝端,或反之亦然。通常RNAi之反义链在3'-端具有核苷酸突出,且5'-端为钝端。在不希望受到理论限制下,反义链5'-端之不对称钝端与反义链3'-端之突出有利该引导链进入RISC过程。

[0280] 任何如本发明所说明特征之核酸均可采用相关技艺上习知的方法合成和/或修饰,如那些说明于[Current protocols in nucleic acid chemistry], Beaucage, S.L.等(编), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, 其完整内容已通过提述并入本文。修饰法包括例如,末端修饰,例如,5'-端修饰(磷酸化、缀合、反向连接体)或3'-端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向连接体等等);碱基修饰,例如使用稳定化碱基、去稳定化碱基或会与对象之扩张区之碱基配对之碱基置换、排除碱基(无碱基核苷酸)或缀合碱基;糖修饰(例如,位于2'-位置或4'-位置)或置换糖;和/或主链修饰,包括修饰或置换磷酸二酯连接体。适用于本文所说明实施例的iRNA化合物之明确实例包括但不限于,包含经修饰主链或没有天然核苷之间连接体之RNA。具有经修饰主链之RNA特别包括那些主链中没有磷原子者。针对本说明书之目的及相关技艺上有时候提及者,其核苷之间主链中没有磷原子之经修饰RNA亦可视为寡核苷。在一些实施例中,经修饰的iRNA将在其核苷之间主链中具有一个磷原子。

[0281] 经修饰之RNA主链包括例如,硫代磷酸酯、对掌性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基与其他烷基之磷酸酯(包括磷酸3'-伸烷基酯与对掌性磷酸

酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯与氨基烷基氨基磷酸酯)、硫羰基氨基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯、及具有正常3'-5'连接体之硼代磷酸酯、它们的2'-5'-连接类似物、及那些具有反向极性者,其中相邻之成对核苷单位系依3'-5'连接5'-3'或2'-5'连接5'-2'。亦包括各种不同盐类、混合盐类与游离酸型。

[0282] 教导上述含磷连接体制法之代表性美国专利包括但不限于,美国专利号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;与US Pat RE39464,其完整内容已分别通过提述并入本文。

[0283] 其中不包括磷原子之经修饰RNA主链所具有之主链系由短链烷基或环烷基核苷之间连接体、混合杂原子、及烷基或环烷基核苷之间连接体或一个或多个短链杂原子或杂环核苷之间连接体形成。所述包括那些具有N-吗啉代连接体(一部分从核苷之糖部分基团形成);硅氧烷主链;硫醚、亚砷与砷主链;甲酰乙酰基(formacetyl)与硫甲酰乙酰基主链;亚甲基甲酰乙酰基与硫甲酰乙酰基主链;含烯烃主链;胺磺酸根主链;亚甲基亚氨基及亚甲基胍基主链;磺酸根与磺酰胺主链;酰胺主链;及其他具有混合N、O、S与CH₂组分者。

[0284] 教导上述寡核苷制法之代表性美国专利包括但不限于,美国专利号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;与5,677,439,其完整内容已分别通过提述并入本文。

[0285] 其他实施例中,希望包括合适RNA模拟物用于iRNA,其中核苷酸单位之糖与核苷之间连接体(亦即主链)二者均被新颖基团置换。该等碱基单位维持与适当核酸靶化合物杂交。其中一种寡聚化合物为RNA模拟物,已显示具有优异之杂交性质,称为肽核酸(PNA)。PNA化合物中,RNA之糖主链被包含酰胺之主链(特别是氨基乙基甘氨酸主链)置换。核碱基则保留并直接或间接结合主链之酰胺部分之氮杂态氮原子。教导PNA化合物制法之代表性美国专利包括但不限于,美国专利号5,539,082;5,714,331;与5,719,262,其完整内容已分别通过提述并入本文。适用于本发明iRNA之其他PNA化合物说明于例如,Nielsen等,Science,1991,254,1497-1500。

[0286] 如本发明所说明特征之某些实施例包括具有硫代磷酸根主链之RNA与具有杂原子主链之寡核苷,特别是上述美国专利号5,489,677之--CH₂--NH--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[称为亚甲基(甲基亚胺基)或MMI主链]、--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--及--N(CH₃)--CH₂--CH₂--[其中天然磷酸二酯主链系由--O--P--O--CH₂--代表],及上述美国专利号5,602,240之酰胺主链。在一些实施例中,如本文所说明特征之RNA具有上述美国专利号5,034,506之N-吗啉代主链结构。

[0287] 经修饰之RNA亦可包含一个或多个经取代之糖部分基团。如本文所说明特征之该等iRNA(例如,dsRNA)包括在2'-位置具有下列其中一项: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,其中该烷基、烯基与炔基可为经取代或未经取代之C₁至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基与炔基。合适修饰实例包括O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、及O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂,其中n与m为1至约10。其他实施例中,dsRNA在2'-位置包括下列其中一项:C₁至C₁₀低碳数烷基、经取代之低碳数烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、经取代之硅烷基、RNA裂解基团、报导子基团、嵌入剂、改善iRNA之药物动力学性质之基团或改善iRNA之药效学性质之基团、及具有类似性质之其他取代基。在一些实施例中,该修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃,亦称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等,Helv.Chim.Acta,1995,78:486-504),亦即烷氧-烷氧基。另一种修饰实例为2'-二甲基氨基氧乙氧基,亦即O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基团(亦称为2'-DMAOE,其说明于下文实例中)与2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(相关技艺上亦称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),亦即2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂。

[0288] 其他修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)与2'-氟(2'-F)。亦可在iRNA之RNA上其他位置进行类似修饰,特别是在3'末端核苷酸之糖之3'位置或在2'-5'连接dsRNA与5'末端核苷酸之5'位置。iRNA亦可改具有糖模拟物(如环丁基部分基团)替代呋喃戊糖基糖。教导所述经修饰糖结构制法之代表性美国专利包括但不限于,美国专利号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,其中某些专利已成为本申请共同拥有。上述之完整内容已分别通过提述并入本文。

[0289] iRNA亦包括核碱基(相关技艺上通常简称「碱基」)修饰或取代。本文所采用「未经修饰」或「天然」核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)与鸟嘌呤(G),及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)与尿嘧啶(U)。经修饰之核碱基包括其他合成性与天然核碱基,如脱氧-胸腺嘧啶(dT)、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟基甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤与鸟嘌呤之6-甲基与其他烷基衍生物、腺嘌呤与鸟嘌呤之2-丙基与其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶与2-硫胞嘧啶、5-卤尿嘧啶与胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶与胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶与胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤基、8-氨基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羟基及其他8-经取代之腺嘌呤与鸟嘌呤、5-卤基(特别是5-溴)、5-三氟甲基及其他5-经取代之尿嘧啶与胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤与7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤与8-氮杂腺嘌呤、7-去氮杂鸟嘌呤与7-去氮杂腺嘌呤及3-去氮杂鸟嘌呤与3-去氮杂腺嘌呤。其他核碱基包括那些揭示于美国专利号3,687,808、那些揭示于Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. 编, Wiley-VCH, 2008; 那些揭示于The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, p.858-859, Kroschwitz, J.L. 编 John Wiley & Sons, 1990; 所述揭示于Englisch等, Angewandte Chemie, 国际版, 1991, 30, 613, 及那些揭示于Sanghvi, Y. S., dsRNA Research and Applications, p.289-302, 第15章, Crooke, S.T. 与 Lebleu, B. 编, CRC Press, 1993。其中某些核碱基特别适用于提高如本发明所说明特征之寡聚化合物之结合亲和性。所述包括5-经取代之嘧啶、6-氮杂嘧啶与N-2、N-6与O-6经取代之嘌呤, 包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶与5-丙

炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已显示可使核酸双链体稳定性提高0.6-1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. 与 Lebleu, B. 编, dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) 且成为碱基取代实例, 甚至更特别当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0290] 教导上述某些经修饰之核碱基及其他经修饰之核碱基制法之代表性美国专利包括但不限于, 上述美国专利号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, 其等完整内容已分别通过提述并入本文。

[0291] iRNA之RNA亦可经修饰, 以包括一个或多个双环糖部分基团。「双环糖」为经两个原子之桥基修饰之呋喃糖基环。「双环核苷」(「BNA」) 为具有糖部分基团之核苷, 该糖部分基团包含由糖环之两个碳原子连接之桥基, 由此形成双环系。某些实施例中, 该桥基连接糖环之4'-碳与2'-碳。因此, 在一些实施例中, 本发明制剂可包括iRNA之RNA亦可经修饰, 以包括一个或多个锁核酸(LNA)。锁核酸为具有经修饰之核糖部分基团的核苷酸, 其中该核糖部分基团额外包含连接2'与4'碳之桥基。换言之, LNA为一种包含双环糖部分基团(其包含4'-CH₂-O-2'-桥基)的核苷酸。此结构有效地「封锁」3'-内部结构构形内之核糖。添加锁核酸至siRNA中时, 已显示可以提高siRNA在血清中之稳定性, 并降低脱靶效应(Elmen, J. 等, (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, OR. 等(2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. 等(2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193)。

[0292] 用于本发明多核苷酸之双环核苷实例包括但不限于, 在4'与2'核糖基环原子之间包含桥基之核苷。某些实施例中, 本发明反义多核苷酸剂包括一个或多个包含一个4'至2'桥基之双环核苷。所述4'至2'桥连双环核苷实例包括但不限于, 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (亦称为「限制性乙基」或「cEt」) 及4'-CH(CH₂CH₃)-O-2' (及其类似物; 参见例如, 美国专利号7,399,845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (及其类似物; 参见例如, 美国专利号8,278,283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (及其类似物; 参见例如, 美国专利号8,278,425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (参见例如, 美国专利公开号2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', 其中R为H、C₁-C₁₂烷基或保护基(参见例如, 美国专利号7,427,672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (参见例如, Chattopadhyaya等, J.Org.Chem., 2009, 74, 118-134); 及4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (及其类似物; 参见例如, 美国专利号8,278,426)。上述各文献之完整内容已分别通过提述并入本文。

[0293] 其他教导锁核酸核苷酸制法之代表性美国专利及美国专利公告案包括但不限于下列, 美国专利号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, 它们的完整内容已分别通过提述并入本文。

[0294] 上述任何双环核苷可制成具有一或多种立体化学糖组态, 包括例如, α-L-呋喃核糖及β-D-呋喃核糖(参见WO 99/14226)。

[0295] iRNA之RNA亦可经修饰, 以包括一个或多个限制性乙基核苷酸。本文所采用「限制

性乙基核苷酸」或「cEt」为一种包含双环糖部分基团(其含有4'-CH(CH₃)-O-2'桥基)之锁核酸。在一个实施例中,该限制性乙基核苷酸系呈S构形,本文称为「S-cEt」。

[0296] 本发明iRNA亦可包括一个或多个「限制构形核苷酸」(「CRN」)。CRN系核苷酸类似物,其具有连接核糖之C2'与C4'碳或核糖之C3与-C5'碳之接头。CRN锁住核糖环成为稳定之构形,并提高其与mRNA之杂交亲合性。该接头的长度足以让氧置于最适合稳定性与亲和性之位置,因此较少核糖环折皱。

[0297] 教导上述某些CRN之制法之代表性公开文献包括但不限于,美国专利公开号2013/0190383;及PCT公开案WO 2013/036868,它们的完整内容已分别通过提述并入本文。

[0298] 本发明iRNA之一个或多个核苷酸亦可包括经羟甲基取代的核苷酸。「经羟甲基取代的核苷酸」为无环2'-3'-开环(seco)-核苷酸,亦称为「非锁核酸」(「UNA」)修饰。

[0299] 教导UNA制法之代表性美国公开案包括但不限于,美国专利号8,314,227;及美国专利公开号2013/0096289;2013/0011922;及2011/0313020,它们的完整内容已分别通过提述并入本文。

[0300] RNA分子末端之可能稳定化修饰法包括:N-(乙酰基氨基己酰基)-4-羟基脯胺醇(Hyp-C6-NHAc)、N-(己酰基)-4-羟基脯胺醇(Hyp-C6)、N-(乙酰基)-4-羟基脯胺醇(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-脱氧胸苷(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟基脯胺醇(Hyp-C6-氨基)、2-廿二碳烷酰基-尿苷-3"-磷酸酯、反转碱基dT(idT)等等。此修饰法之公开内容可参见PCT公开号WO 2011/005861。

[0301] 包含本发明基序之经修饰iRNA

[0302] 本发明某些方面中,本发明双链RNAi剂包括依例如,美国临时申请号61/561,710(申请日2011年11月18日)或PCT/US2012/065691(申请日2012年11月16日)之完整内容进行化学修饰之制剂,其完整内容已分别通过提述并入本文。

[0303] 如本文,临时申请号61/561,710、及PCT/US2012/065691所示,藉由在RNAi剂之有义链和/或反义链(特别是在裂解位点或接近裂解位点处)引入一个或多个在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序,可得到优异结果。在一些实施例中,RNAi剂之有义链与反义链可能完全经修饰。引入所述基序会中断正义和/或反义链上可能存在之修饰型态。RNAi剂任选地例如,在有义链缀合GalNAc衍生物配体。所得RNAi剂即具有优异基因静默活性。

[0304] 更明确言之,已惊人地发现,当双链RNAi剂之有义链与反义链经过修饰而在RNAi剂之至少一个链之裂解位点或接近裂解位点处具有一个或多个在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序时,可优异地提高RNAi剂之基因静默活性。

[0305] 在一个实施例中,该RNAi剂为两端均为钝端之19个核苷酸长度,其中该有义链包含至少一个在5'端起之位置7、8、9三个连续核苷酸上具有三个2'-F修饰之基序。反义链包含至少一个在5'端起之位置11、12、13三个连续核苷酸具有三个2'-O-甲基修饰之基序。

[0306] 在另一个实施例中,该RNAi剂为两端均为钝端之20个核苷酸长度,其中该有义链包含至少一个在5'端起之位置8、9、10三个连续核苷酸具有三个2'-F修饰之基序。反义链包含至少一个在5'端起之位置11、12、13三个连续核苷酸具有三个2'-O-甲基修饰之基序。

[0307] 再在另一个实施例中,该RNAi剂为两端均为钝端之21个核苷酸长度,其中该有义链包含至少一个在5'端起之位置9、10、11三个连续核苷酸具有三个2'-F修饰之基序。反义链包含至少一个在5'端起之位置11、12、13三个连续核苷酸具有三个2'-O-甲基修饰之基

序。

[0308] 在一个实施例中,该RNAi剂包含21个核苷酸之有义链与23个核苷酸之反义链,其中该有义链包含至少一个在5'端起之位置9、10、11三个连续核苷酸具有三个2'-F修饰之基序;反义链包含至少一个在5'端起之位置11、12、13三个连续核苷酸具有三个2'-O-甲基修饰之基序,其中RNAi剂之一端为钝端,而另一端包含具有2个核苷酸之突出。优选系该2个核苷酸突出位在反义链之3'-端。当该2个核苷酸突出位在反义链之3'-端时,末端三个核苷酸之间可能有两个硫代磷酸酯的核苷酸间连接,其中该三个核苷酸中有两个为突出核苷酸,第三个核苷酸为邻接该突出核苷酸之配对核苷酸。在一个实施例中,RNAi剂在有义链5'-端与反义链5'-端之两端之末端三个核苷酸之间另外具有两个硫代磷酸酯的核苷酸间连接。在一个实施例中,RNAi剂之有义链与反义链中每一个核苷酸(包括作为基序之一部分的核苷酸)均为经修饰的核苷酸。一项实施例,各残基系分别独立经2'-O-甲基或3'-氟修饰,例如,在交替之基序上。RNAi剂任选地再包含配体(优选为GalNAc₃)。

[0309] 在一个实施例中,该RNAi剂包含正义与反义链,其中RNAi剂包含长度为至少25个及至多29个核苷酸之第一链及长度为至多30个核苷酸之第二链,其具有至少一个自5'末端起位置11、12、13连续三个核苷酸之三个2'-O-甲基修饰之基序;其中第一链3'端与第二链5'端形成钝端,且第二链之3'端比第一链长1至4个核苷酸,其中双链区的长度为至少25个核苷酸,且第二链与标靶mRNA沿着第二链至少19个核苷酸长度充份互补,当RNAi剂引入哺乳动物细胞中时,可以降低标靶基因表达,且其中dicer裂解RNAi剂偏向于产生包含第二链3'端之siRNA,由此降低标靶基因在哺乳动物中之表达。任选地,该RNAi剂还包含配体。

[0310] 在一个实施例中,该RNAi剂之有义链剂包含至少一个在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序,其中一个基序出现在有义链之裂解位点处。

[0311] 在一个实施例中,该RNAi剂之反义链亦可包含至少一个在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序,其中一个基序出现在反义链之裂解位点或接近裂解位点处。

[0312] 当RNAi剂具有长度为17至23个核苷酸之双链区时,反义链之裂解位点通常约在自5'-端起之10、11与12位置。因此,三个相同修饰之基序可能出现在反义链之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,其系从反义链5'-端起之第一个核苷酸开始计数,或从反义链5'-端起之双链区内第一对核苷酸开始计数。反义链中之裂解位点亦可能随RNAi从5'-端开始之双链区长度变化。

[0313] RNAi剂之有义链可能在该链之裂解位点包含至少一个在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序;且反义链可能在该链之裂解位点或接近裂解位点处具有至少一个在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序。当有义链与反义链形成dsRNA双链体时,有义链与反义链之排比可让有义链之三个核苷酸之一基序与反义链三个核苷酸之一基序具有至少一个核苷酸重叠,亦即有义链之基序之三个核苷酸之至少一者与反义链至少一个三之基序之三个核苷酸之至少一者形成碱基对。或者,可能至少两个核苷酸重叠,或可能所有三个核苷酸重叠。

[0314] 在一个实施例中,RNAi剂有义链可能包含超过一个在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序。该第一基序可能出现在该链之裂解位点或接近裂解位点,且其他基序可能为侧翼修饰。本文中术语「侧翼修饰」指出现在该链之另一部分之基序,其与出现在相同链之裂解位点或接近裂解位点之基序分开。该侧翼修饰系与第一基序相邻或分隔至少一个或更

多个核苷酸。当那些基序彼此紧邻时,则该等基序之化学系彼此独立,且当基序之间分隔一个或多个核苷酸时,则其化学可能相同或不同。可能出现两个或更多个侧翼修饰。例如,当存在两个侧翼修饰时,各侧翼修饰可能出现于相对于在该裂解位点或接近裂解位点之第一基序之一端或在该前导基序之任一侧。

[0315] 如同有义链, RNAi 剂之反义链可能包含超过一个在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序,其中至少一个基序出现在该链之裂解位点或接近裂解位点。此反义链亦可能包含一个或多个侧翼修饰,其排比应类似可能出现在有义链上之侧翼修饰。

[0316] 在一个实施例中, RNAi 剂之有义链或反义链之侧翼修饰通常不包括该链之 3' -端、5' -端或两端之第一个或两个末端核苷酸。

[0317] 在另一个实施例中, RNAi 剂之有义链或反义链之侧翼修饰通常不包括该链之 3' -端、5' -端或两端之双链区内第一个或两个配对的核苷酸。

[0318] 当 RNAi 剂之有义链与反义链各包含至少一个侧翼修饰时,该侧翼修饰可能落在双链区之相同端,且具有一、二或三个核苷酸重叠。

[0319] 当 RNAi 剂之有义链与反义链各包含至少两个侧翼修饰时,有义链与反义链之排列可使分别来自一链之两个修饰落在双链区之一端,具有一、二或三个核苷酸重叠;分别来自一链之两个修饰落在双链区之另一端,具有一、二或三个核苷酸重叠;一链之两个修饰落在前导基序之每一侧,且在双链区有一、二或三个核苷酸重叠。

[0320] 在一个实施例中, RNAi 剂之有义链与反义链中每一个核苷酸(包括作为基序之一部分的核苷酸)可能经过修饰。各核苷酸可能经过相同或不同修饰法修饰,其可包括以下一或多种修改:一个或两个非连接性磷酸态氧和/或一个或多个连接性磷酸态氧;修改核糖之组成,例如,核糖之 2' 羟基;以「去磷酸」接头完全置换磷酸根部分基团;修饰或置换天然碱基;及置换或修饰核糖-磷酸根主链。

[0321] 由于核酸为亚基之聚合物,因此许多修饰会出现在核酸内之重复位置,例如,碱基或磷酸根部分基团或磷酸根部分基团之非连接性 O 之修饰。有些例子中,将在核酸之所有个别位置进行修饰,但许多例子中并未进行修饰。例如,可能仅在 3' 或 5' 末端位置进行修饰,可能仅在一个末端区进行,例如,在一链之末端核苷酸或最后 2、3、4、5 或 10 个核苷酸之位置。可能在双链区、单链区或二者进行修饰。可能仅在 RNA 之双链区或可能仅在 RNA 之单链区进行修饰。例如,在非连接性 O 位置之硫代磷酸根修饰可能仅在一个或两个末端进行、可能仅在末端区进行,例如,在一链之末端核苷酸或最后 2、3、4、5 或 10 个核苷酸位置,或可能在双链与单链区,特别是末端进行。5' 端或末端可经磷酸化。

[0322] 为了例如,加强稳定性,可能在突出中包括特定碱基,或在单链突出,例如,5' 或 3' 突出或二者中包括经修饰的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。在一些实施例中,3' 或 5' 突出中所有或有些碱基可经修饰,例如,具有本文所说明之修饰。修饰法可包括例如,采用本领域已知之修饰法在核糖之 2' 位置进行修饰,例如,改用脱氧核糖核苷酸、2' -脱氧-2' -氟(2' -F)或 2' -O-甲基修饰替代核碱基之核糖;及磷酸根之修饰,例如,硫代磷酸根修饰法。突出不一定与标靶序列同源。

[0323] 在一个实施例中,有义链与反义链之各残基分别独立经 LNA、HNA、CeNA、2' -甲氧基乙基、2' -O-甲基、2' -O-烯丙基、2' -C-烯丙基、2' -脱氧、2' -羟基或 2' -氟修饰。该等链可包含超过一个修饰。在一个实施例中,有义链与反义链之各残基分别独立经 2' -O-甲基或 2' -

氟修饰。

[0324] 有义链与反义链通常出现至少两种不同修饰。这两种修饰可能为2'-O-甲基或2'-氟修饰,或其他。

[0325] 在一个实施例中, N_a 和/或 N_b 包含交替修饰型态。本文所采用术语「交替基序」指具有一或多种修饰之基序,各修饰系在一链之交替核苷酸进行。该交替核苷酸可能指每隔一个核苷酸有一种修饰或每隔三个核苷酸有一种修饰,或类似型态。例如,若A、B与C分别代表核苷酸之一种修饰时,则该交替基序可为「ABABABABABAB...」、「AABBAABBAABB...」、「AABAABAABAAB...」、「AAABAAABAAAB...」、「AAABBBAAABBB...」或「ABCABCABCABC...」等等。

[0326] 包含在交替基序中之修饰型态可能相同或不同。例如,若A、B、C、D分别代表核苷酸之一种修饰型态时,交替型态(亦即每隔一个核苷酸之修饰型态)可能相同,但各有义链或反义链之修饰型态可能分别选自交替基序中之数种修饰可能性,如「ABABAB...」、「ACACAC...」、「BDBDBD...」或「CDCDCD...」等等。

[0327] 在一个实施例中,本发明RNAi剂包含在有义链之交替基序之修饰型态相对于反义链之交替基序之修饰型态出现位移。该位移可使有义链核苷酸之经修饰基团对应于反义链核苷酸之经不同修饰之基团,且反之亦然。例如,当有义链与dsRNA双链体中反义链配对时,双链区内之有义链之交替基序可能始于该链之5'-3'之「ABABAB」,而反义链之交替基序可能始于该链之5'-3'之「BABABA」。另一项实例中,双链区内之有义链之交替基序可能始于该链之5'-3'之「AABBAABB」,而反义链之交替基序可能始于该链之5'-3'之「BBAABBAA」,因此有义链与反义链之间之修饰型态会出现完全或部分位移。

[0328] 在一个实施例中,RNAi剂包含在原始有义链之2'-O-甲基修饰与2'-F修饰之交替基序型态相对于在原始反义链之2'-O-甲基修饰与2'-F修饰之交替基序型态出现位移,亦即有义链之2'-O-甲基修饰的核苷酸与反义链之2'-F修饰的核苷酸形成碱基配对,且反之亦然。有义链之1-位置可能始于2'-F修饰,及反义链之1-位置可能始于2'-O-甲基修饰。

[0329] 在有义链和/或反义链之引入一个或多个在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序时,可中断有义链和/或反义链之原始修饰型态。这种在正义和/或反义链中引入一个或多个在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序而中断正义和/或反义链之修饰型态时,惊人地加强针对靶基因之基因静默活性。

[0330] 在一个实施例中,当在任一链中引入在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序时,邻接该基序的核苷酸修饰为不同于该基序修饰之修饰。例如,包含该基序之序列部分为「... N_a YYY N_b ...」,其中「Y」代表在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序之修饰,及「 N_a 」与「 N_b 」代表邻接该基序「YYY」的核苷酸之修饰,其不同于Y之修饰,且其中 N_a 与 N_b 可为相同或不同修饰。或者,当出现侧翼修饰时, N_a 和/或 N_b 可能存在或不存在。

[0331] RNAi剂可能进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯的核苷酸间连接。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯的核苷酸间连接修饰可能出现在有义链或反义链或两链之链中任何位置之任何核苷酸。例如,核苷酸间连接修饰可能出现在有义链和/或反义链之每一个核苷酸;各核苷酸间连接修饰可能呈交替型态出现在有义链和/或反义链;或有义链或反义链可能包含呈交替型态之两种核苷酸间连接之修饰。有义链核苷酸间连接之交替修饰型态可能与反义链相同或不同,有义链核苷酸间连接之交替修饰型态相对于反义链核苷酸间连接之交替修饰型态可能出现位移。

[0332] 在一个实施例中, RNAi在突出区包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯的核苷酸间连接修饰。例如, 突出区可能包含两个核苷酸, 其在两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯的核苷酸间连接。亦可能进行核苷酸间连接修饰来连接突出核苷酸与双链区内末端配对的核苷酸。例如, 至少2、3、4个或所有突出核苷酸可能利用硫代磷酸酯或甲基膦酸酯的核苷酸间连接连接, 且任选地可能有额外硫代磷酸酯或甲基膦酸酯的核苷酸间连接连接该突出核苷酸与邻接该突出核苷酸之配对核苷酸。例如, 末端三个核苷酸之间可能有至少两个硫代磷酸酯的核苷酸间连接, 三个核苷酸中有两个为突出核苷酸, 第三个为邻接该突出核苷酸之配对核苷酸。末端这三个核苷酸可在反义链3'-端、有义链3'-端、反义链5'-端和/或反义链5'-端。

[0333] 在一个实施例中, 该2个核苷酸突出系在反义链3'-端, 且末端三个核苷酸之间有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接, 这三个核苷酸中有两个为突出核苷酸, 第三个核苷酸为邻接该突出核苷酸之配对核苷酸。任选地, 该RNAi剂可在有义链5'-端与反义链5'-端两个末端, 于末端三个核苷酸之间另外具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接。

[0334] 在一个实施例中, RNAi剂在双链体内包含与靶错配(群), 或其组合。「错配」可为核苷酸之非典型碱基配对或典型以外之配对。错配可能发生于突出区或双链区。碱基对可能依据其促进解离或熔解之倾向排序(例如, 依据特定配对之结合或解离之自由能, 最简单的方法为检视个别成对核苷酸, 但亦可针对相邻核苷酸或采用类似分析法)。以促进解离而言: A:U优于G:C; G:U优于G:C; 及I:C优于G:C(I=肌苷)。错配, 例如, 非典型或典型以外之配对(如本文中其他说明) 优于典型(A:T、A:U、G:C) 配对; 且包括通用碱基之配对优于典型配对。「通用碱基」为有能力置换四种正常碱基(G、C、A和U) 中任一种且不会显著破坏相邻碱基对交互作用之稳定性或破坏所修饰寡核苷酸之所期望功能性生化用途之碱基。通用碱基之不限实例包括2'-脱氧肌苷(次黄嘌呤脱氧核苷酸) 或其衍生物、硝基唑类似物、及疏水性芳族非氢键键结碱基。

[0335] 在一个实施例中, RNAi剂包含双链区内反义链5'-端起前1、2、3、4或5对碱基中至少一对, 其系分别独立选自: A:U、G:U、I:C, 及错配对, 例如, 非典型或典型以外之配对或包括通用碱基之配对, 以促进双链体反义链5'-端之解离。

[0336] 在一个实施例中, 双链区中反义链5'-端起1-位置的核苷酸选自下列各物所组成群中: A、dA、dU、U和dT。或者, 双链区中反义链5'-端起第1、2或3对碱基中至少一对为AU碱基对。例如, 双链区中反义链5'-端起第一对碱基为AU碱基对。

[0337] 在另一个实施例中, 有义链3'-端的核苷酸为脱氧-胸腺嘧啶(dT)。在另一个实施例中, 反义链3'-端的核苷酸为脱氧-胸腺嘧啶(dT)。在一个实施例中, 正义和/或反义链之3'-端有一个脱氧-胸腺嘧啶核苷酸短序列, 例如, 两个dT核苷酸。

[0338] 在一个实施例中, 有义链序列可如式(I) 代表:

[0339] $5'_{n_p}\text{-N}_a\text{-(X X X)}_i\text{-N}_b\text{-Y Y Y-N}_b\text{-(Z Z Z)}_j\text{-N}_a\text{-n}_q\text{ }3'$ (I)

[0340] 其中:

[0341] i与j分别独立为0或1;

[0342] p与q分别独立为0-6;

[0343] 各N_a分别独立代表包含0-25个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列, 各序列包含至少2个经不同修饰的核苷酸;

- [0344] 各 N_b 分别独立代表包含0-10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列；
- [0345] 各 n_p 及 n_q 分别独立代表突出核苷酸；
- [0346] 其中 N_b 及 Y 不具有相同修饰；及
- [0347] XXX、YYY及ZZZ分别独立代表在三个连续核苷酸有三个相同修饰之一基序。优选系YYY为均经2'-F修饰的核苷酸。
- [0348] 在一个实施例中，该 N_a 和/或 N_b 包含交错型态修饰。
- [0349] 在一个实施例中，该YYY基序出现在有义链之裂解位点或接近裂解位点。例如，当RNAi剂具有17-23个核苷酸长度之双链区时，该YYY基序可出现在有义链之裂解位点或接近裂解位点处（例如，可出现在位置6、7、8、7、8、9、8、9、10、9、10、11、10、11、12，或11、12、13），其系从5'-端之第一个核苷酸开始计数；或任选地从双链区内5'-端之第一对核苷酸开始计数。
- [0350] 在一个实施例中， i 为1及 j 为0，或 i 为0及 j 为1，或 i 与 j 二者均为1。因此有义链由下式代表：
- [0351] $5' n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'$ (Ib)；
- [0352] $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q 3'$ (Ic)；或
- [0353] $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'$ (Id)。
- [0354] 当有义链由式(Ib)代表时， N_b 代表包含0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 可分别独立代表包含2-20、2-15或2-10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。
- [0355] 当有义链由式(Ic)代表时， N_b 代表包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 可分别独立代表包含2-20、2-15或2-10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。
- [0356] 当有义链由式(Id)代表时，各 N_b 分别独立代表包含0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。优选为 N_b 为0、1、2、3、4、5或6。各 N_a 可分别独立代表包含2-20、2-15或2-10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。
- [0357] 各 X 、 Y 与 Z 可彼此相同或不同。
- [0358] 其他实施例中， i 为0及 j 为0，且有义链可由下式代表：
- [0359] $5' n_p - N_a - YYY - N_a - n_q 3'$ (Ia)。
- [0360] 当有义链由式(Ia)代表时，各 N_a 可分别独立代表包含2至20、2至15或2至10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。
- [0361] 在一个实施例中，RNAi之反义链序列可由式(II)代表：
- [0362] $5' n_q' - N_a' - (Z' Z' Z')_k - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - (X' X' X')_l - N_a' - n_p' 3'$ (II)
- [0363] 其中：
- [0364] k 与 l 分别独立为0或1；
- [0365] p' 与 q' 分别独立为0至6；
- [0366] 各 N_a' 分别独立代表包含0至25个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列，各序列包含至少2个经不同修饰的核苷酸；
- [0367] 各 N_b' 分别独立代表包含0至10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列；
- [0368] 各 n_p' 及 n_q' 分别独立代表突出核苷酸；

[0369] 其中 N_b' 及 Y' 不具有相同修饰;

[0370] 及

[0371] $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 及 $Z'Z'Z'$ 分别独立代表在三个连续核苷酸有三个相同修饰之一一个基序。

[0372] 在一个实施例中,该 N_a' 和/或 N_b' 包含交替之修饰型态。

[0373] $Y'Y'Y'$ 基序出现在反义链之裂解位点或接近裂解位点。例如,当RNAi剂之双链区长度为17至23个核苷酸时,该 $Y'Y'Y'$ 基序可出现在反义链之位置9、10、11;10、11、12;11、12、13;12、13、14;或13、14、15,其系从5'-端之第一个核苷酸开始计数;或任选地从双链区内5'-端之第一对核苷酸开始计数。优选系该 $Y'Y'Y'$ 基序出现在位置11、12、13。

[0374] 在一个实施例中, $Y'Y'Y'$ 基序为均经2'-OMe修饰的核苷酸。

[0375] 在一个实施例中,k为1及1为0,或k为0及1为1,或k与1二者均为1。

[0376] 因此反义链可由下式代表:

[0377] $5'n_q-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p,3'$ (IIb);

[0378] $5'n_q-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p,3'$ (IIc);或

[0379] $5'n_q-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p,3'$ (IId)。

[0380] 当反义链由式(IIb)代表时, 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个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a' 分别独立代表包含2至20、2至15或2至10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。

[0381] 当反义链由式(IIc)代表时, 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个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a' 分别独立代表包含2至20、2至15或2至10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。

[0382] 当反义链由式(IId)代表时,各 N_b' 分别独立代表包含0至10、0至7、0至10、0至7、0至5、0至4、0至2或0个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a' 分别独立代表包含2至20、2至15或2至10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。优选为 N_b 为0、1、2、3、4、5或6。

[0383] 其他实施例中,k为0及1为0,且该反义链可由下式代表:

[0384] $5'n_p-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q,3'$ (Ia)。

[0385] 当反义链由式(IIa)代表时,各 N_a' 分别独立代表包含2至20、2至15或2至10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。

[0386] 各 X' 、 Y' 与 Z' 可彼此相同或不同。

[0387] 有义链与反义链之各核苷酸可能分别独立经LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-羟基或2'-氟修饰。例如,有义链与反义链之各核苷酸系分别独立经2'-O-甲基或2'-氟修饰。特别是,各 X 、 Y 、 Z 、 X' 、 Y' 与 Z' 可代表2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰。

[0388] 在一个实施例中,当RNAi剂之双链区为21聚体时,其有义链可能包含出现在该链9、10与11位置之YYY基序,其系从5'-端第一个核苷酸开始计数,或任选地从双链区内5'-端第一对核苷酸开始计数;及Y代表2'-F修饰。有义链可另外在双链区之相反末端包含XXX基序或ZZZ基序作为侧翼修饰;及XXX与ZZZ各分别独立代表2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0389] 在一个实施例中,反义链可能包含出现在该链之位置11、12、13之 $Y'Y'Y'$ 基序,其系从5'-端第一个核苷酸开始计数,或任选地从双链区内5'-端第一对核苷酸开始计数;及

Y'代表2'-O-甲基修饰。该反义链可另外在双链区之相反末端包含X'X'X'基序或Z'Z'Z'基序作为侧翼修饰；及X'X'X'与Z'Z'Z'各分别独立代表2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0390] 由上式 (Ia)、(Ib)、(Ic) 与 (Id) 中任一式代表之有义链可分别与上式 (IIa)、(IIb)、(IIc) 与 (IId) 中任一式代表之反义链形成双链体。

[0391] 因此,本发明方法所使用之RNAi剂可包含有义链与反义链,每一链具有14至30个核苷酸,该RNAi双链体系如式 (III) 代表:

[0392] 正义: 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'

[0393] 反义: 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'

[0394] (III)

[0395] 其中:

[0396] i、j、k、及l分别独立为0或1;

[0397] p、p'、q、及q'分别独立为0至6;

[0398] 各N_a及N_a'分别独立代表包含0至25个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列,各序列包含至少2个经不同修饰的核苷酸;

[0399] 各N_b及N_b'分别独立代表包含0至10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列;

[0400] 其中

[0401] 各n_p'、n_p、n_q'、及n_q,其分别可能存在或不存在,分别独立代表一个突出核苷酸;及

[0402] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、及Z'Z'Z'分别独立代表在三个连续核苷酸有三个相同修饰之一基序。

[0403] 在一个实施例中,i为0及j为0;或i为1及j为0;或i为0及j为1;或i与j二者均为0;或i与j二者均为1。在另一个实施例中,k为0及l为0;或k为1及l为0;k为0及l为1;或k与l二者均为0;或k与l二者均为1。

[0404] 形成RNAi双链体之有义链与反义链之组合实例包括下式:

[0405] 5' n_p-N_a-Y Y Y-N_a-n_q 3'

[0406] 3' n_p-N_a-Y'Y'Y'-N_a' n_q' 5'

[0407] (IIIa)

[0408] 5' n_p-N_a-Y Y Y-N_b-Z Z Z-N_a-n_q 3'

[0409] 3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a' n_q' 5'

[0410] (IIIb)

[0411] 5' n_p-N_a-X X X-N_b-Y Y Y-N_a-n_q 3'

[0412] 3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 5'

[0413] (IIIc)

[0414] 5' n_p-N_a-X X X-N_b-Y Y Y-N_b-Z Z Z-N_a-n_q 3'

[0415] 3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a-n_q' 5'

[0416] (IIId)

[0417] 5'-N_a-Y Y Y-N_a-3'

[0418] 3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a' 5'

[0419] (IIIe)

[0420] 当RNAi剂如式 (IIIa) 代表时,各N_a分别独立代表包含2至20、2至15或2至10个经修

饰核苷酸之寡核苷酸序列。

[0421] 当RNAi剂如式(IIIb)代表时,各 N_b 分别独立代表包含1至10、1至7、1至5或1至4个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 分别独立代表包含2至20、2至15或2至10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。

[0422] 当RNAi剂如式(IIIc)代表时,各 N_b 、 N_b' 分别独立代表包含0至10、0至7、0至10、0至7、0至5、0至4、0至2或0个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 分别独立代表包含2至20、2至15或2至10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。

[0423] 当RNAi剂如式(IIId)代表时,各 N_b 、 N_b' 分别独立代表包含0至10、0至7、0至10、0至7、0至5、0至4、0至2或0个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 、 N_a' 分别独立代表包含2至20、2至15或2至10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 、 N_a' 、 N_b 与 N_b' 分别独立包含交替之修饰型态。

[0424] 当RNAi剂如式(IIId)代表时,各 N_b 、 N_b' 分别独立代表包含0至10、0至7、0至10、0至7、0至5、0至4、0至2或0个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 、 N_a' 分别独立代表包含2至20、2至15或2至10个经修饰核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 、 N_a' 、 N_b 与 N_b' 分别独立包含交替之修饰型态。

[0425] 当RNAi剂如式(IIIe)代表时,各 N_a 及 N_a' 分别独立代表包含0至25个经修饰或未修饰或其组合的核苷酸之寡核苷酸序列,各序列包含至少2个经不同修饰的核苷酸。

[0426] 式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)和(IIIe)中各X、Y及Z可彼此相同或不同。

[0427] 当RNAi剂如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)与(IIIe)代表时,至少一个Y核苷酸可与一个Y'核苷酸形成碱基对。或者,至少两个Y核苷酸与对应Y'核苷酸形成碱基对;或所有三个Y核苷酸均与对应Y'核苷酸形成碱基对。

[0428] 当RNAi剂如式(IIIb)或(IIId)代表时,至少一个Z核苷酸可与一个Z'核苷酸形成碱基对。或者,至少两个Z核苷酸可与对应Z'核苷酸形成碱基对;或所有三个Z核苷酸均与对应Z'核苷酸形成碱基对。

[0429] 当RNAi剂如式(IIIc)或(IIId)代表时,至少一个X核苷酸可与一个X'核苷酸形成碱基对。或者,至少两个X核苷酸可与对应X'核苷酸形成碱基对;或所有三个X核苷酸均与对应X'核苷酸形成碱基对。

[0430] 在一个实施例中,Y核苷酸之修饰不同于Y'核苷酸之修饰,Z核苷酸之修饰不同于Z'核苷酸之修饰,和/或X核苷酸之修饰不同于X'核苷酸之修饰。

[0431] 在一个实施例中,当RNAi剂如式(IIId)代表时, N_a 修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰。在另一个实施例中,当RNAi剂如式(IIId)代表时, N_a 修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰,且 $n_p' > 0$,及至少一个 n_p' 系利用硫代磷酸酯键连接相邻核苷酸。在另一个实施例中,当RNAi剂如式(IIId)代表时,该 N_a 修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰, $n_p' > 0$,及至少一个 n_p' 系利用硫代磷酸酯键连接相邻核苷酸,且有义链系缀合一或多种利用单价、二价或三价之分支接头附接之GalNAc衍生物。在另一个实施例中,当RNAi剂如式(IIId)代表时,该 N_a 修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰, $n_p' > 0$,及至少一个 n_p' 系利用硫代磷酸酯键连接相邻核苷酸,有义链包含至少一个硫代磷酸酯键,且有义链系缀合一或多种利用单价、二价或三价之分支接头附接之GalNAc衍生物。

[0432] 在一个实施例中,当RNAi剂如式(IIIa)代表时, N_a 修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰, $n_p' > 0$,及至少一个 n_p' 系利用硫代磷酸酯键连接相邻核苷酸,有义链包含至少一个硫代磷酸酯键,且有义链系缀合一或多种利用单价、二价或三价之分支接头附接之GalNAc衍生物。

[0433] 在一个实施例中, RNAi剂为包含至少两个如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)与(IIIe)代表之双链体之多聚体,其中该双链体系利用接头连接。该接头可以裂解或不可以裂解。该多聚体任选地进一步包含配体。各双链体可靶向相同基因或两个不同基因;或各双链体可靶向相同基因于两个不同靶位点。

[0434] 在一个实施例中, RNAi剂为包含三个、四个、五个、六个或更多个如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)与(IIIe)代表之双链体之多聚体,其中双链体系利用接头连接。该接头可以裂解或不可以裂解。该多聚体任选地进一步包含配体。各双链体可靶向相同基因或两个不同基因;或各双链体可靶向相同基因于两个不同靶位点。

[0435] 在一个实施例中,两个如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)与(IIIe)代表之RNAi剂系在5'端及其中一个或两个3'端彼此连接,且任选地缀合配体。各制剂可靶向相同基因或两个不同基因;或各制剂可靶向相同基因于两个不同靶位点。

[0436] 各种不同文献说明之多聚体RNAi剂均可用于本发明方法。所述文献包括包括W02007/091269、美国专利号7858769、W02010/141511、W02007/117686、W02009/014887与W02011/031520,其等完整内容已分别通过提述并入本文。

[0437] 包含一或多个碳水化合物部分基团与RNAi剂之缀合物之RNAi剂可以优化一或多种RNAi剂之性质。许多例子中,由碳水化合物部分基团附接RNAi剂之经修饰亚基。例如, dsRNA剂之一或多个核糖核苷酸亚基之核糖可被另一个部分基团置换,例如,附接碳水化合物配体之非碳水化合物(优选为环状)载剂。依此方式置换亚基中核糖之核糖核苷酸亚基在本文中称为核糖置换修饰亚基(RRMS)。环状载剂可能为碳环状环系(亦即所有环原子均为碳原子)或杂环状环系(亦即一个或多个环原子可能为杂原子,例如,氮、氧、硫)。该环状载剂可能为单环状环系,或可能包含两个或更多个环,例如,稠合环。环状载剂可能为完全饱和环系,或其可能包含一个或多个双键。

[0438] 配体可能利用载剂附接多核苷酸。该载剂包括(i)至少一个「主链附接点」,优选为两个「主链附接点」,及(ii)至少一个「系链附接点」。本文所采用「主链附接点」指可用于且适于让载剂进入主链(例如,核糖核酸之磷酸酯或经修饰磷酸酯(例如,含硫)主链)中之官能基,例如,羟基,或通常为一个键结。在一些实施例中,「系链附接点」(TAP)指环状载剂之组成环原子,例如,碳原子或杂原子(不同于提供主链附接点之原子),其连接所选定之部分基团。该部分基团可为例如,碳水化合物,例如,单糖、二糖、三糖、四糖、寡糖和多糖。该选定之部分基团任选地利用穿插之系链连接该环状载剂。因此该环状载剂经常包括适合引入或系链另一个化学部分基团(例如,配体)至组成环之官能基,例如,氨基,或通常提供一个键结。

[0439] 该RNAi剂可能利用载剂缀合配体,其中该载剂可为环状基团或无环基团;优选为该环状基团选自:吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉代、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪基、四氢呋喃基和萘烷;优选该无环基团选自:丝氨酸主链或二乙醇胺主链。

[0440] 某些明确实施例中,用于本发明方法之RNAi剂为AT3SC-001(AD-57213-有义链:

5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13) 与反义链:5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO:14), 其中a、c、g和u为2'-O-甲基 (2'-OMe) A、C、G或U; Af、Cf、Gf或Uf为2'-氟A、C、G或U; 及s为硫代磷酸酯键。

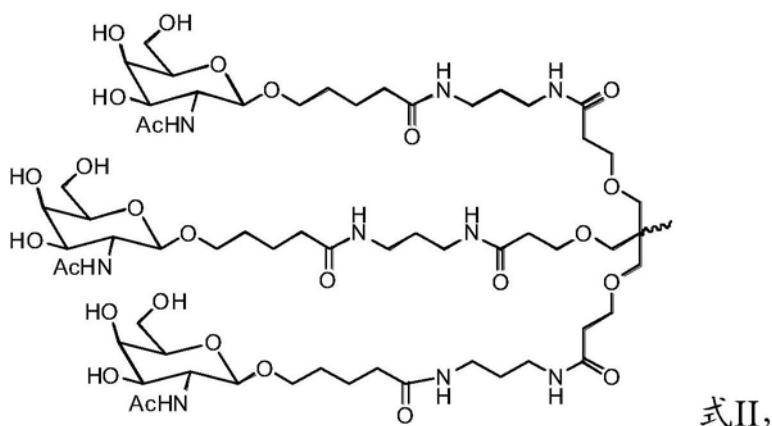
[0441] 所述制剂可进一步包含配体。

[0442] 配体

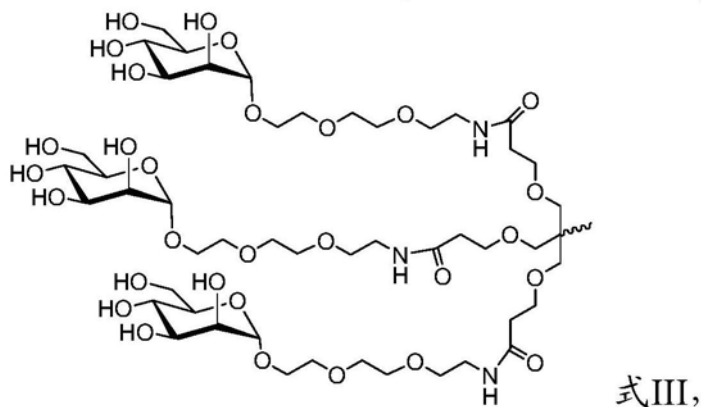
[0443] 本发明双链RNA (dsRNA) 剂任选地缀合一个或多个配体。该等配体可附接有义链、反义链或两链之3'-端、5'-端或两端。例如, 配体可缀合有义链。优选实施例中, 配体系缀合有义链之3'-端。

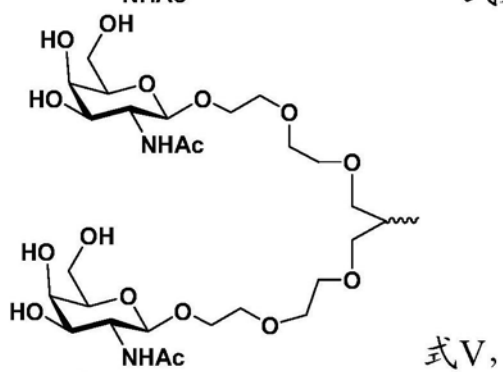
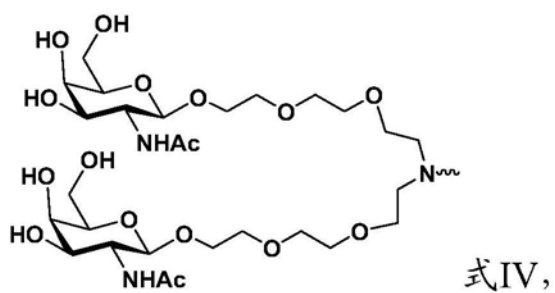
[0444] 在一个实施例中, 该配体为碳水化合物缀合物, 如单糖。在一个实施例中, 该配体为N-乙酰基半乳糖胺 (GalNAc) GalNAc或GalNAc衍生物。某些本发明实施例中, GalNAc或GalNAc衍生物系利用单价接头附接本发明iRNA剂。在一些实施例中, GalNAc或GalNAc衍生物系利用二价接头附接本发明iRNA剂。本发明又其他实施例中, GalNAc或GalNAc衍生物系利用三价接头附接本发明iRNA剂。

[0445] 在一个实施例中, 本发明组合物与方法所使用碳水化合物缀合物选自下列所组成群中:

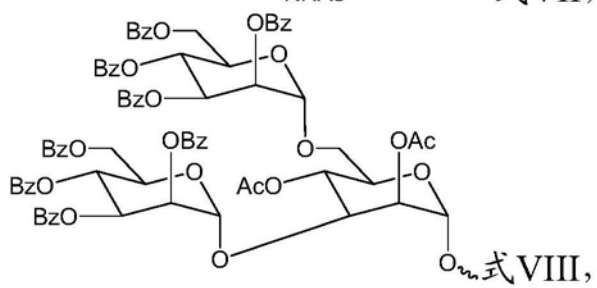
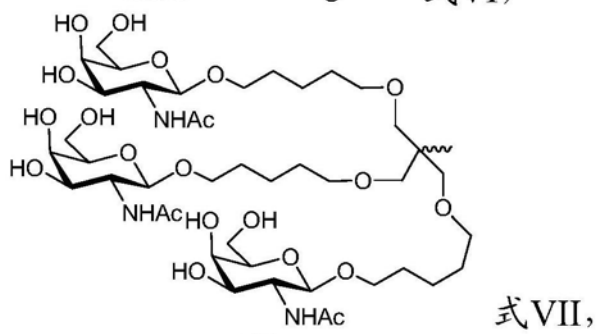
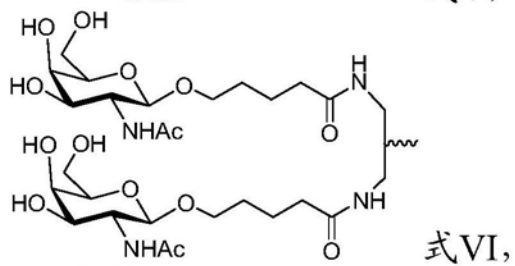


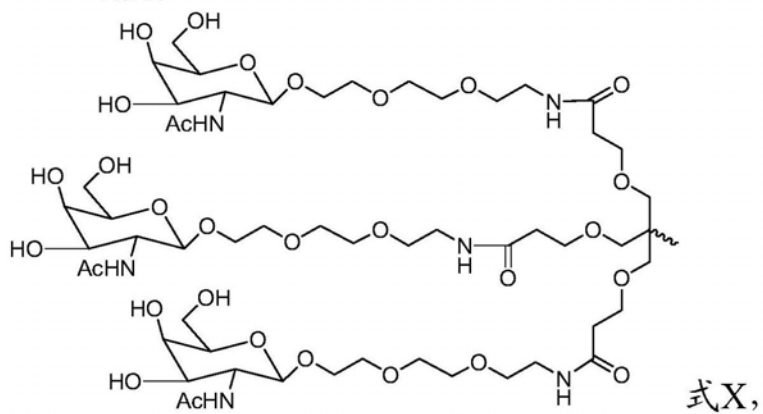
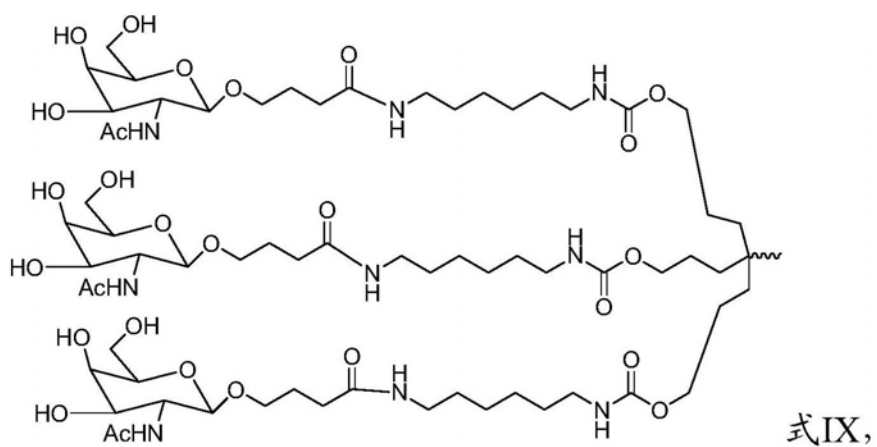
[0446]



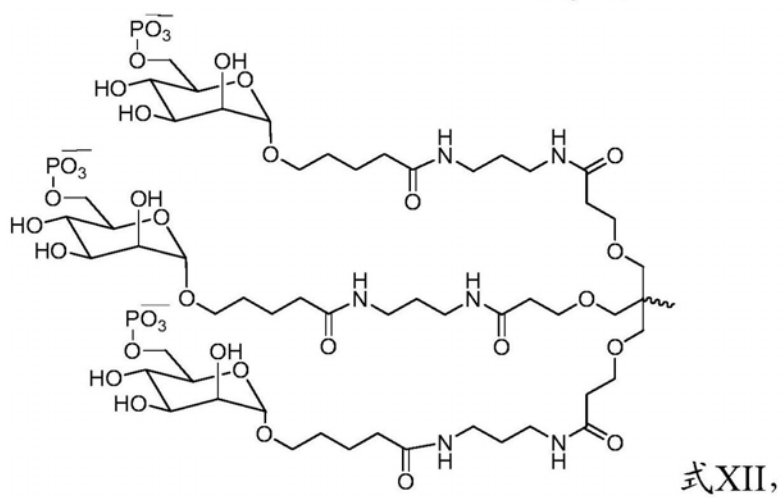
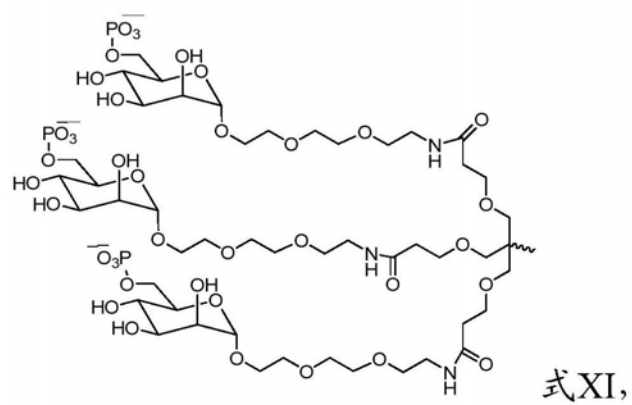


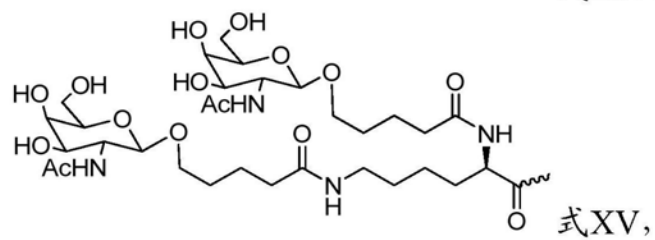
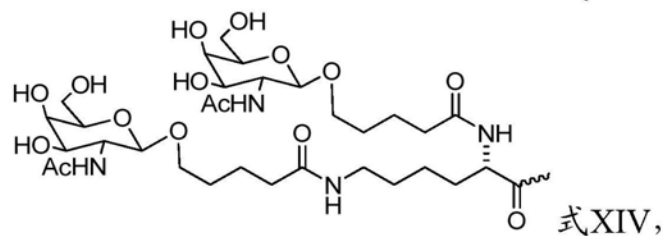
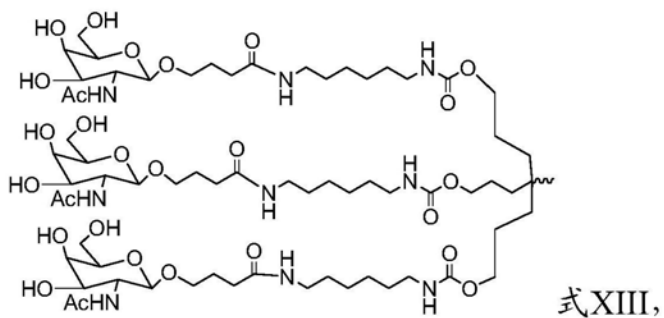
[0447]



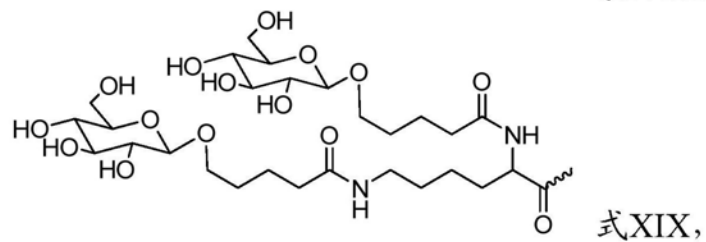
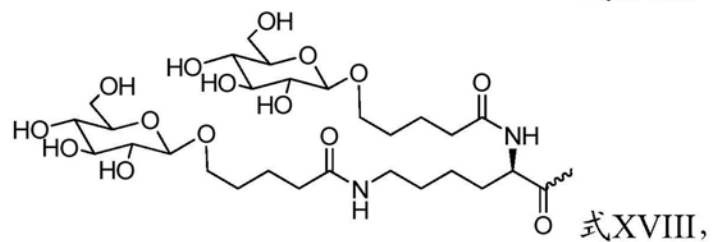
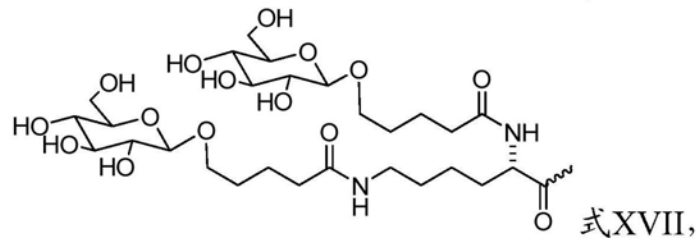
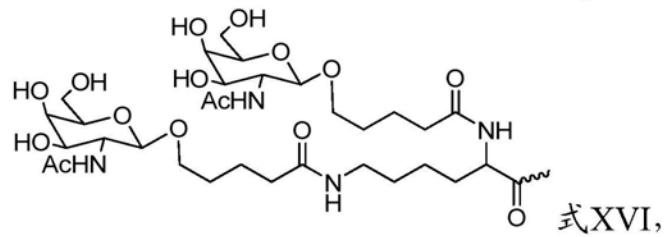


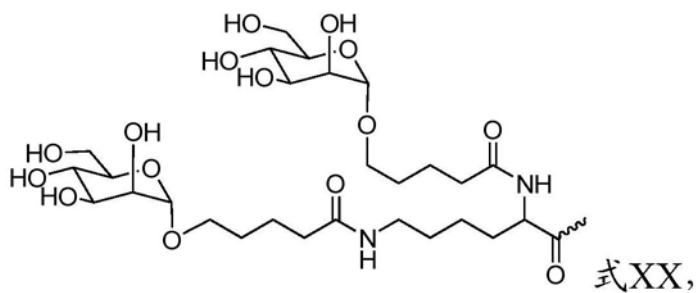
[0448]



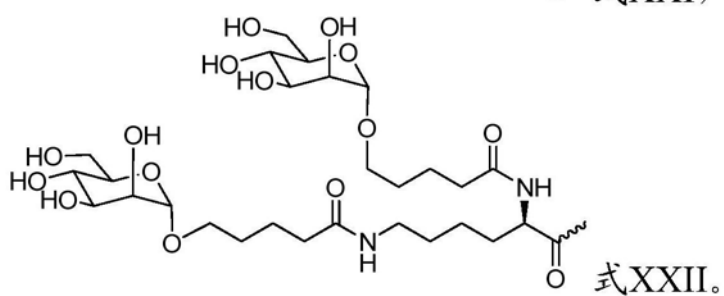
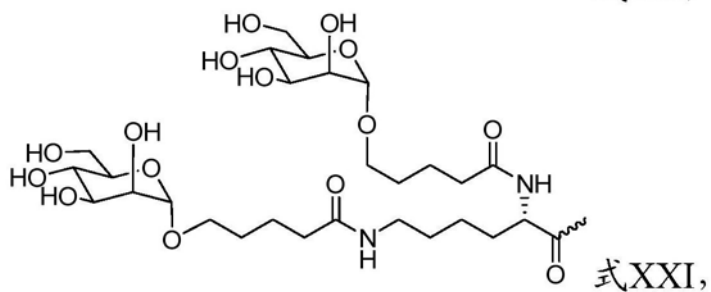


[0449]

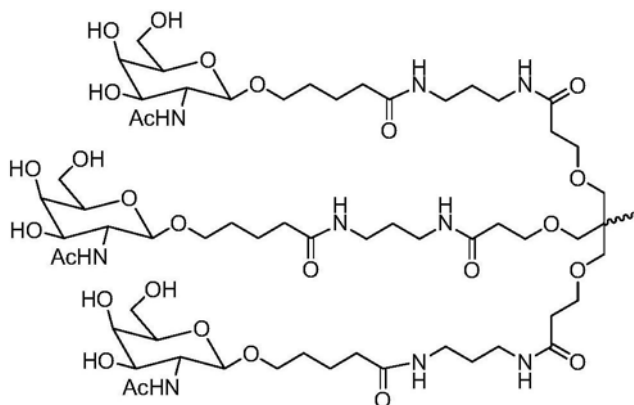




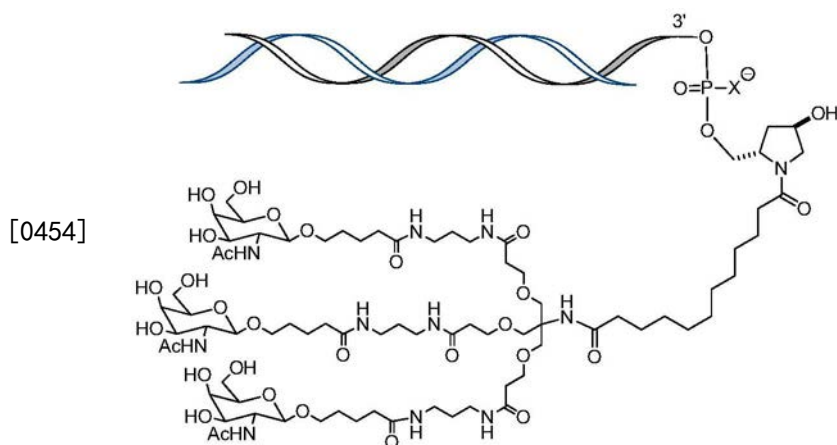
[0450]

[0451] 在一个实施例中,该GalNAc或GalNAc衍生物为GalNAc₃:

[0452]



[0453] 在一些实施例中,该配体(例如,GalNAc配体)附接于该RNAi剂之3'端。在一个实施例中,该RNAi剂如下述方案所示缀合于配体,例如,GalNAc配体。



[0455] 其中X为O或S。在一个实施例中,X为O。

[0456] 本发明RNAi剂可与许多不同部分基团偶联。优选部分基团为直接偶联或利用穿插之系链间接偶联(优选系共价偶联)的配体。

[0457] 优选实施例中,引入配体后会改变该分子之分布、靶向或寿命。优选实施例中,例如,相较于没有所述配体之物种,该等配体可加强对所选定标靶(例如,对分子、细胞或细胞型态、隔室、受体(例如,细胞或器官隔室)、组织、器官或身体区域)之亲和力。对选定之标靶具有加强亲和力的配体亦称为靶向配体。

[0458] 有些配体具有核内体裂解性质。该核内体裂解性配体会促进核内体溶解和/或从核内体转运本发明组合物或其组分至细胞之细胞质中。核内体裂解性配体可为显示pH-依赖性膜活性与基因融合性之聚阴离子性肽或肽模拟物。在一个实施例中,核内体裂解性配体在核内体pH下呈现其活性构形。「活性」构形为其中核内体裂解性配体促进核内体溶解和/或从核内体转运本发明组合物或其组分至细胞之细胞质中之构形。核内体裂解性配体实例包括GALA肽(Subbarao等,Biochemistry,1987,26:2964-2972)、EALA肽(Vogel等,J. Am. Chem. Soc., 1996,118:1581-1586)和其衍生物(Turk等,Biochem. Biophys. Acta, 2002,1559:56-68)。在一个实施例中,核内体裂解性组分可包含可以随pH变化而改变价数或质子化之化学基团(例如,氨基酸)。核内体裂解性组分可为线性或分支。

[0459] 配体可改善所产生天然或经修饰寡核糖核苷酸或包含本文所说明单体之任何组合和/或天然或经修饰核糖核苷酸之聚合分子之转运、杂交和专一性,且亦可改善核酸酶抗性。

[0460] 配体通常可包括医疗修饰剂,例如,加强吸收;诊断性化合物或报导子基团,例如,用于监测分布;交联剂;及赋予核酸酶抗性之部分基团。其一般实例包括脂质、类固醇、维生素、糖类、蛋白质、肽类、多胺类和肽模拟物。

[0461] 配体可包括天然物质,如蛋白质(例如,人类血清白蛋白(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、普鲁蓝多糖(pullulan)、几丁质、几丁聚糖、菊糖、环糊精或玻尿酸);或脂质。配体亦可为重组或合成性分子,如合成性聚合物,例如,合成性聚氨基酸、寡核苷酸(例如,适体)。聚氨基酸实例包括聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸等聚氨基酸;苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟基丙基)甲基丙烯基酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨基甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯

基酰胺聚合物或聚磷腓。多元胺实例包括：聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、精脒、多胺、伪肽-多胺、肽模拟性多胺、树枝状多胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子性脂质、阳离子性卟啉、多胺的季盐或 α 螺旋肽。

[0462] 配体亦可包括靶向基团，例如，靶向细胞或组织之制剂，例如，凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质，例如，结合特定细胞型态(如肾脏细胞)之抗体。靶向基团可为促甲状腺激素、促黑激素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白质A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺、多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双膦酸盐、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸盐、维生素B12、生物素、RGD肽、RGD肽模拟物或适体。

[0463] 其他配体实例包括染料、螯合剂(例如，吡啶类)、交联剂(例如，补骨脂内酯、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德卟啉(texaphyrin)、噻卟啉(Sapphyrin))、多环状芳香烃(例如，吩嗪、二氢吩嗪)、人造内切核酸酶或螯合剂(例如，EDTA)、亲脂性分子(例如，胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-苾丁酸、双氢睾酮、1,3-双-(十六碳烷基)甘油、香叶基氧己基、十六碳烷基甘油、龙脑、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七碳烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油基)石胆酸、03-(油基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪)与肽缀合物(例如，触足肽(antennopedia)、Tat肽)、烷化剂、磷酸盐、氨基、巯基、PEG(例如，PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚氨基、烷基、经取代之烷基、标记放射性的标记物、酶、半抗原(例如，生物素)、转运/吸收促进剂(例如，阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成性核糖核酸酶(例如，咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇集物、吡啶-咪唑缀合物、四氮杂大环的Eu³⁺复合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0464] 配体可为蛋白质(例如，糖蛋白)或肽(例如，对辅配体具有专一亲和性之分子)或抗体(例如，结合特异化细胞型态(如：癌细胞、内皮细胞或骨细胞)之抗体)。配体亦可包括激素与激素受体。其亦可包括非肽物质，如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺、多价甘露糖或多价岩藻糖。配体可为例如，脂多糖、p38 MAP激酶之活化剂或NF- κ B之活化剂。

[0465] 配体可为例如药物之促进细胞吸收iRNA剂之物质，藉由例如，破坏细胞之细胞骨架，例如，破坏细胞之微小管、微丝和/或中间丝。该药物可为例如，紫杉醇(taxol)、长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、细胞松弛素(cytochalasin)、诺考达唑(nocodazole)、促进微丝聚合剂(japlakinolide)、微丝解聚剂(latrunculin A)、毒伞素(phalloidin)、红海海绵抗菌素(swinholide A)、茚酮衍生物(indanocine)或迈尔素(myoservin)。

[0466] 配体可藉由例如，活化发炎反应，提高细胞吸收寡核苷酸。具有所述效力的配体实例包括肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白介素-1 β 或 γ 干扰素。

[0467] 一个方面中，配体为脂质或基于脂质之分子。所述脂质或基于脂质之分子优选系与血清蛋白质，例如，人类血清白蛋白(HSA)结合。HSA结合性配体可以让缀合物分布在标靶组织，例如，身体之非肾脏标靶组织。例如，该标靶组织可为肝脏，包括肝之实质细胞。其他可结合HSA之分子亦可作为配体使用。例如，可使用纳普生(naproxen)或阿司匹林。脂质或基于脂质配体可以(a)提高缀合物对降解之抗性，(b)提高靶向或转运至标靶细胞或细胞膜，和/或(c)可用于调整与血清蛋白质(例如，HSA)之结合性。

[0468] 基于脂质的配体可用于调节(例如，调控)缀合物与标靶组织之结合性。例如，脂质

或基于脂质的配体与HSA之结合性越强时,越不容易靶向肾脏,因此越不容易从身体清除。可使用与HSA之结合性较低之脂质或基于脂质配体,让该缀合物靶向肾脏。

[0469] 一项优选实施例中,该基于脂质的配体结合HSA。优选系其与HSA具有充份亲和性,以使该缀合物优选分布至非肾脏组织。然而,该亲和性最好不要太强导致无法逆转HSA-配体结合性。

[0470] 另一项优选实施例中,该基于脂质配体与HSA之亲和性弱或完全没有亲和性,因此该缀合物将会优先分布至肾脏。除了基于脂质的配体外,亦可改用或额外使用其他靶向肾脏细胞之部分基团。

[0471] 另一个方面中,该配体为部分基团,例如,维生素,其可被标靶细胞(例如,增殖细胞)吸收。其等特别适用于治疗特征在于不期望之细胞增生之病症,例如,恶性或非恶性型,例如,癌细胞。维生素实例包括维生素A、E和K。其他维生素实例包括维生素B群,例如,叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或其他维生素或可被癌细胞吸收之营养素。亦包括HSA、低密度脂蛋白(LDL)与高密度脂蛋白(HDL)。

[0472] 另一个方面中,该配体为细胞渗透剂,优选为螺旋细胞渗透剂。该制剂优选为两亲性。该制剂实例为肽,如tat或触足肽。若该制剂为肽时,其可经修饰,包括肽基模拟物、反转异构体、非肽或伪肽连接体,及使用D-氨基酸。该螺旋剂优选为 α -螺旋剂,其优选具有亲脂相与疏脂相。

[0473] 配体可为肽或肽模拟物。肽模拟物(本文亦称为寡肽模拟物)为可以折叠成类似天然肽之限定三度空间结构之分子。该肽或肽模拟物部分基团的长度可为约5至50个氨基酸,例如,长度约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸。该肽或肽模拟物可为例如,细胞渗透肽、阳离子性肽、两亲性肽或疏水性肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分基团可为树枝状肽、限制性肽或交链肽。或者,肽部分基团可包括疏水性膜转送序列(MTS)。含疏水性MTS之肽实例为具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:9)之RFGF。包含疏水性MTS之RFGF类似物(例如,氨基酸序列AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:10))亦可作为靶向部分基团。该肽部分基团可为「递送」肽,其可携带大型极性分子(包括肽、寡核苷酸与蛋白质)穿越细胞膜。已发现例如,衍生自HIV Tat蛋白质 (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:11))与果蝇触足肽(*Drosophila antennapedia*)蛋白质(RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:12))之序列具有作为递送肽之功能。肽或肽模拟物可由DNA之随机序列编码,如从噬菌体展示库或一珠一化合物(one-bead-one-compound (OBOC))组合库(Lam等, *Nature*, 354:82-84, 1991)中鉴定之肽。藉由引入之单体单位与dsRNA剂进行系链之优选肽或肽模拟物为靶向细胞之肽,如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分基团的长度范围可为约5个氨基酸至约40个氨基酸。该肽部分基团具有之结构修饰可提高稳定性或主导构形性质。可采用下文说明之任何结构修饰。可采用RGD肽部分基团靶向肿瘤细胞,如内皮肿瘤细胞或乳癌肿瘤细胞(Zitzmann等, *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002)。RGD肽可促进iRNA剂靶向各种不同其他组织之肿瘤,包括肺、肾脏、脾或肝脏(Aoki等, *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001)。优选系该RGD肽促进iRNA剂靶向肾脏。该RGD肽可为线性或环状,且可经过修饰,例如,糖基化或甲基化,以促进靶向特定组织。例如,糖基化RGD肽可以传送iRNA剂至表达 $\alpha_v\beta_3$ 之肿瘤细胞(Haubner等, *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001)。可采用靶向富集在增殖细胞中之标记物之肽。例如,包含RGD之肽与肽模拟物可靶向癌细胞,特别是具有整合素之细胞。因此可使用

RGD肽、包含RGD之环状肽、包括D-氨基酸之RGD肽,及合成性RGD模拟物。除了RGD外,尚可使用靶向整合素配体之其他部分基团。通常可使用所述配体来调控增生之细胞与血管新生作用。这种配体之优选缀合物系靶向PECAM-1、VEGF或其他癌基因,例如,本文说明之癌基因。

[0474] 「细胞渗透性肽」可以通透细胞,例如,微生物细胞,如细菌或真菌细胞,或哺乳动物细胞,如人类细胞。可通透微生物细胞之肽可为例如, α -螺旋线性肽(例如,LL-37或Ceropin P1)、包含二硫键之肽(例如, α -防御素(defensin)、 β -防御素或制菌肽(bactenecin)),或仅包含一个或两个主要氨基酸之肽(例如,PR-39或吡啶啉肽(indolicidin))。细胞渗透性肽亦可包括核定位信号(NLS)。例如,细胞渗透性肽可为二部组合之两亲性肽,如MPG,其系衍生自HIV-1gp41与SV40大型T抗原之NLS之耦合肽功能域(Simeoni等,Nucl.Acids Res.31:2717-2724,2003)。

[0475] 在一个实施例中,靶向肽可为两亲性 α -螺旋肽。两亲性 α -螺旋肽实例包括但不限于,天蚕素(cecropins)、鸟蛛毒素(lycotoxins)、鳐鱼肽(paradaxins)、蟾蜍抗菌肽(buforin)、CPF、铃蟾抗菌肽样(bombinin-like)肽(BLP)、青环海蛇抗菌肽(cathelidins)、地中海蜡实蝇抗菌肽(ceratotoxins)、柄海鞘(S.clava)肽、盲鳗肠抗微生物肽(HFIAP)、爪蟾抗菌肽(magainines)、东方蛙抗菌肽(brevinins)-2、树蛙抗菌肽(dermaseptins)、蜂毒肽(melittins)、比目鱼抗菌肽(pleurocidin)、H₂A肽、爪蟾(Xenopus)肽、抗菌肽(esculentinis)-1和澳洲蛙活性肽(caerins)。有许多因子被视为较适合维持螺旋完整稳定性。例如,将利用最大螺旋稳定残基数(例如,leu,ala或lys),及利用最小螺旋失稳残基数(例如,脯氨酸或环状单体单位)。可考虑使用封端残基(例如,Gly为N-封端残基实例)和/或C-末端酰胺化来提供额外H-键,以稳定螺旋。带相反电价且分隔 $i \pm 3$ 或 $i \pm 4$ -位置之残基之间所形成之盐桥基可提供稳定性。例如,阳离子性残基(如赖氨酸、精氨酸、高精氨酸、鸟氨酸或组氨酸)可与阴离子残基(如谷氨酸或天冬氨酸)形成盐桥基。

[0476] 肽与肽模拟物配体包括那些具有天然肽或经修饰肽者,例如,D或L肽; α 、 β 或 γ 肽;N-甲基肽;氮杂肽;有一个或多个酰胺连接体(亦即肽连接体)被一个或多个脲、硫脲、胺甲酸酯或磺酰脲连接体置换之肽;或环状肽。

[0477] 靶向配体可为任何可以靶向特定受体的配体。其实例为叶酸盐、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、半乳糖聚集物或适体。聚集物为两个或多个糖单位之组合。靶向配体亦包括整合素受体配体、趋化激素受体配体、转铁蛋白、生物素、血清素受体配体、PSMA、内肽肽、GCPII、体抑素、LDL与HDL配体。配体亦可以核酸为基础,例如,适体。适体可未经修饰或具有本文所揭示之任何修饰组合。

[0478] 核内体释放剂包括咪唑类、聚咪唑或寡咪唑、PEI、肽、基因融合肽、聚羧酸酯、聚阳离子剂、遮蔽之寡或聚阳离子或阴离子、缩醛、聚缩醛、缩酮/聚缩酮、原酸酯、带有遮蔽或未遮蔽阳离子或阴离子电价之聚合物、带有遮蔽或未遮蔽阳离子或阴离子电价之树枝状聚合物。

[0479] PK调节剂代表药动力学调节剂。PK调节剂包括亲脂物、胆汁酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素等等。PK调节剂实例包括但不限于,胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰基甘油酯、磷脂、鞘脂质、纳普生(naproxen)、异布洛芬(ibuprofen)、维生素E、生物素等等。包含许多硫代磷酸酯键之寡核苷酸亦已知与血清蛋白质结合,因此在主链中包含多个硫代磷酸酯键之短寡核苷酸,例如,约5个碱基、10个碱基、

15个碱基或20个碱基之寡核苷酸亦适合作为本发明的配体(例如,作为PK调节配体)。

[0480] 此外,会结合血清组分(例如,血清蛋白质)之适体亦适合作为本发明之PK调节配体。

[0481] 其他适合本发明的配体缀合物说明于美国专利申请USSN:10/916,185,申请日2004年8月10日;USSN:10/946,873,申请日2004年9月21日;USSN:10/833,934,申请日2007年8月3日;USSN:11/115,989,申请日2005年4月27日及USSN:11/944,227,申请日2007年11月21日,其完整内容已通过提述完全并入本文用于所有目的。

[0482] 当存在两个或多个配体时,配体可均具有相同性质、均具有不同性质或有些配体具有相同性质而其他则具有不同性质。例如,配体可具有靶向性质、具有核内体裂解活性或具有PK调节性质。优选实施例中,所有配体均具有不同性质。

[0483] 配体可在不同位置偶联寡核苷酸,例如,3'-端、5'-端和/或内部位置。优选实施例中,该配体系利用穿插之系链(例如,本文说明之载剂)附接寡核苷酸。当引入单体纳入加长中之链中时,该配体或系链配体可能出现在单体上。在一些实施例中,该配体可在「前体」单体已纳入生长中之链中后,藉由偶联「前体」单体而纳入。例如,具有例如,氨基末端系链(亦即没有结合配体)之单体,例如,TAP-(CH₂)_nNH₂即可进入生长中之寡核苷酸链中。随后之操作中,亦即在前体单体纳入链中后,具有亲电子基(例如,五氟苯基酯或醛基)的配体随即可藉由配体之亲电子基而与前体单体之系链之末端亲核性基团偶联,来附接于前体单体。

[0484] 另一项实例中,可引入具有适合参与克里克(Click)化学反应之化学基团之单体,例如,以叠氮化物或炔为末端之系链/接头。随后操作中,亦即在前体单体纳入链中后,具有互补化学基团(例如,炔或叠氮化物)的配体可藉由共同偶联炔与叠氮化物来附接于前体单体。

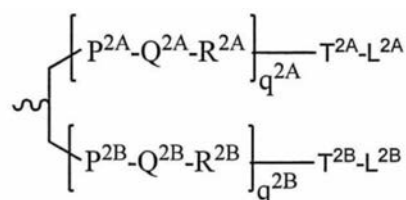
[0485] 针对双链寡核苷酸,配体可附接一链或双链。在一些实施例中,双链iRNA剂包含缀合有义链的配体。其他实施例中,双链iRNA剂包含缀合反义链的配体。

[0486] 在一些实施例中,配体可缀合核碱基、糖部分基团或核酸分子之核苷之间连接体。与嘌呤核碱基或其衍生物之缀合可能发生在任何位置,包括环内与环外原子。在一些实施例中,嘌呤核碱基之2-、6-、7-或8-位置系附接缀合物部分基团。与嘧啶核碱基或其衍生物之缀合可能发生在任何位置。在一些实施例中,嘧啶核碱基之2-、5-和6-位置可经缀合物部分基团取代。与核苷之糖部分基团之缀合可能发生在任何位置。可附接缀合物部分基团之糖部分基团之碳原子实例包括2'、3'和5'碳原子。1'-位置亦可附接缀合物部分基团,如无碱基残基。核苷之间连接体亦可带有缀合物部分基团。针对含磷之连接体(例如,磷二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等等),缀合物部分基团可以直接附接磷原子或已与磷原子键结之O、N或S原子。针对含胺或酰胺之核苷之间连接体(例如,PNA),该缀合物部分基团可附接胺或酰胺之氮原子或附接相邻碳原子。

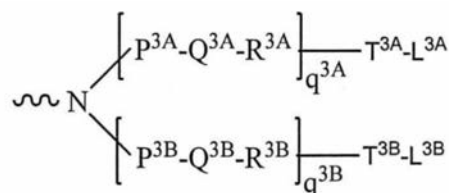
[0487] RNA干扰领域中任何合适的配体均可使用,但配体通常为碳水化合物,例如,单糖(如GalNAc)、二糖、三糖、四糖、多糖。

[0488] 缀合配体与核酸之接头包括那些如上述者。例如,该配体可为一或多种利用单价、二价或三价之分支接头附接之GalNAc(N-乙酰基葡萄糖胺)衍生物。

[0489] 在一个实施例中,本发明dsRNA系缀合二价与三价之分支接头,包括式(IV)-(VII)中任一式所示之结构:

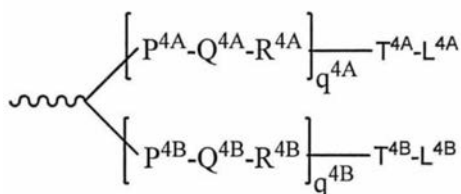


式 (IV)

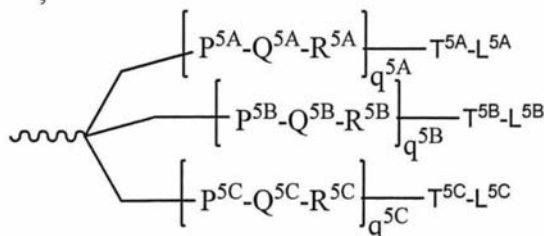


式 (V)

[0490]



式 (VI)

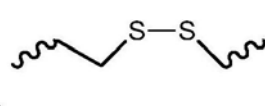
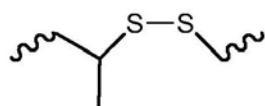
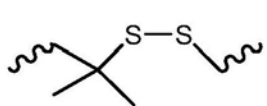
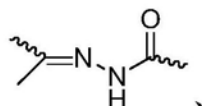
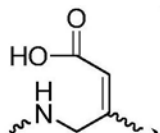


式 (VII)

, 或

;

[0491] 其中:

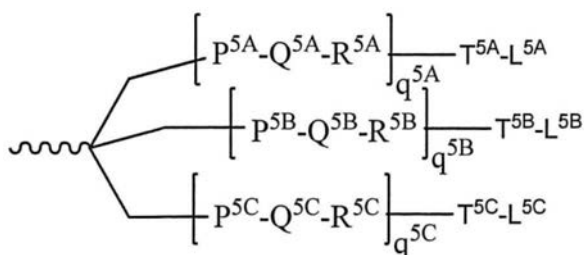
[0492] $q^{2\text{A}}$ 、 $q^{2\text{B}}$ 、 $q^{3\text{A}}$ 、 $q^{3\text{B}}$ 、 $q^{4\text{A}}$ 、 $q^{4\text{B}}$ 、 $q^{5\text{A}}$ 、 $q^{5\text{B}}$ 及 $q^{5\text{C}}$ 每次出现时分别独立代表0至20,且其中重复单位可相同或不同,[0493] $P^{2\text{A}}$ 、 $P^{2\text{B}}$ 、 $P^{3\text{A}}$ 、 $P^{3\text{B}}$ 、 $P^{4\text{A}}$ 、 $P^{4\text{B}}$ 、 $P^{5\text{A}}$ 、 $P^{5\text{B}}$ 、 $P^{5\text{C}}$ 、 $T^{2\text{A}}$ 、 $T^{2\text{B}}$ 、 $T^{3\text{A}}$ 、 $T^{3\text{B}}$ 、 $T^{4\text{A}}$ 、 $T^{4\text{B}}$ 、 $T^{5\text{A}}$ 、 $T^{5\text{B}}$ 、 $T^{5\text{C}}$ 每次出现时分别独立为不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NH或CH₂O;[0494] $Q^{2\text{A}}$ 、 $Q^{2\text{B}}$ 、 $Q^{3\text{A}}$ 、 $Q^{3\text{B}}$ 、 $Q^{4\text{A}}$ 、 $Q^{4\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{A}}$ 、 $Q^{5\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{C}}$ 每次出现时分别独立为不存在、伸烷基、经取代之伸烷基(其中一个或多个亚甲基可藉由一个或多个O、S、S(O)、SO₂、N(R^N)、C(R')=C(R'')、C≡C或C(O)穿插或在末端;[0495] $R^{2\text{A}}$ 、 $R^{2\text{B}}$ 、 $R^{3\text{A}}$ 、 $R^{3\text{B}}$ 、 $R^{4\text{A}}$ 、 $R^{4\text{B}}$ 、 $R^{5\text{A}}$ 、 $R^{5\text{B}}$ 、 $R^{5\text{C}}$ 每次出现时分别独立为不存在、NH、O、S、CH₂、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、

或杂环基;

[0496] $L^{2\text{A}}$ 、 $L^{2\text{B}}$ 、 $L^{3\text{A}}$ 、 $L^{3\text{B}}$ 、 $L^{4\text{A}}$ 、 $L^{4\text{B}}$ 、 $L^{5\text{A}}$ 、 $L^{5\text{B}}$ 及 $L^{5\text{C}}$ 代表配体;亦即每次出现时分别独立为单糖(如:GalNAc)、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖;及[0497] R^a为H或氨基酸侧链。

[0498] 三价缀合GalNAc衍生物特别适用于RNAi剂,供抑制标靶基因的表达,如那些如式(VII)者:

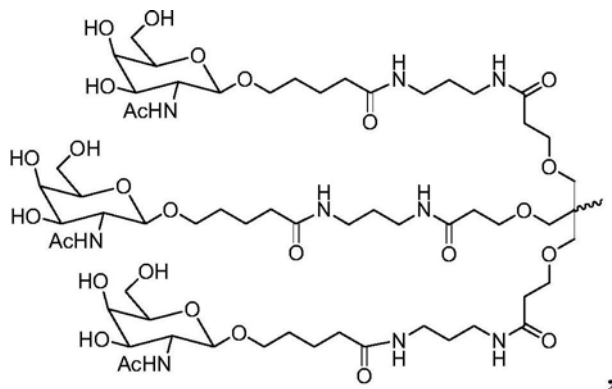
[0499]



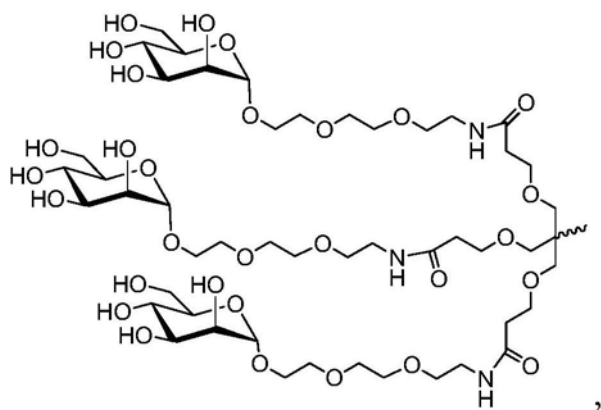
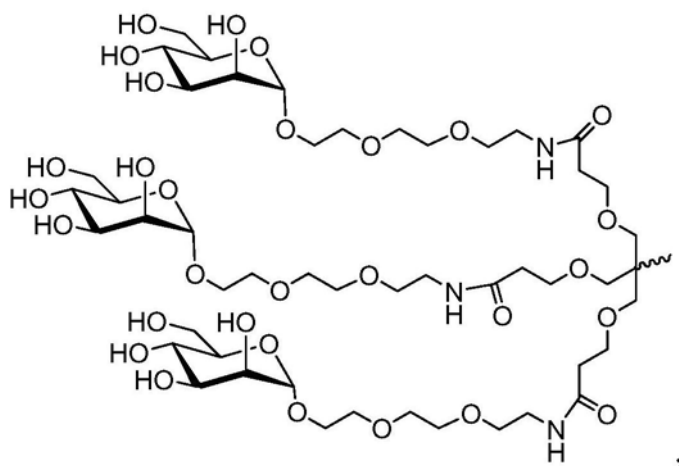
式 (VII)

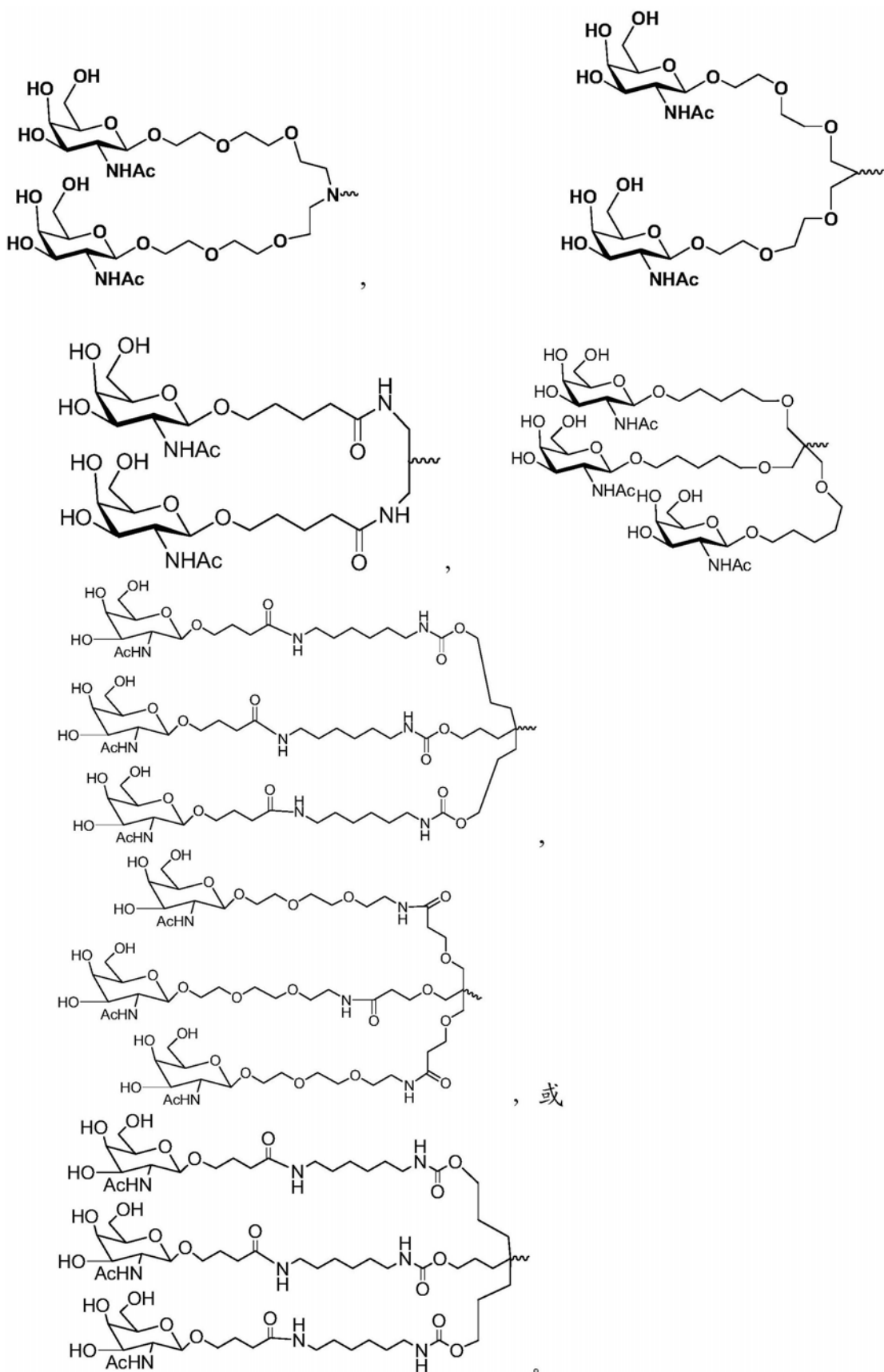
[0500] 其中L^{5A}、L^{5B}及L^{5C}代表单糖,如GalNAc衍生物。

[0501] 缀合GalNAc衍生物之合适二价与三价之分支接头实例包括但不限于下列化合物:



[0502]





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与5,688,941;6,294,664;6,320,017;6,576,752;6,783,931;6,900,297;7,037,646;8,106,022,上述各文献之完整内容已分别通过提述并入本文。

[0505] 上述化合物不一定所有位置均经一致修饰,事实上可在单一化合物中或甚至在iRNA中之单一核苷引入超过一个上述修饰。本发明亦包括呈嵌合化合物的iRNA化合物。

[0506] 本发明内容中,「嵌合」iRNA化合物或「嵌合体」为包含两个或更多个化学上独立区的iRNA化合物,优选为dsRNA,该各区分别由至少一个单体单位组成,亦即以dsRNA化合物为例,为由核苷酸组成。所述iRNA通常包含至少一个区,其中RNA系经修饰,以致提高iRNA对抗核酸酶降解之抗性,提高细胞吸收性,和/或提高对标靶核酸之结合亲和性。iRNA之额外一区可作为可以裂解RNA:DNA或RNA:RNA杂交体之酶之底物。例如,RNase H为细胞内切核酸酶,其裂解RNA:DNA双链体之RNA链。因此活化RNase H造成裂解RNA标靶,由此大幅加强iRNA抑制基因表达之效力。结果,当采用嵌合性dsRNA时,经常可以采用较短的iRNA得到类似硫代磷酸酯脱氧dsRNA与相同标靶区杂交后得到之结果。RNA标靶之裂解作用照例可采用凝胶电泳分析法检测,且若必要时,可联合采用本领域已知之核酸杂交技术。

[0507] 某些例子中,iRNA之RNA可经过非配体基团修饰。许多种非配体分子已与iRNA缀合,以加强iRNA之活性、细胞分布性或细胞吸收性,且进行所述缀合法之程序可从科学文献中取得。所述非配体部分基团包括脂质部分基团,如胆固醇(Kubo,T.等,Biochem.Biophys.Res.Comm.,2007,365(1):54-61;Letsinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86:6553)、胆酸(Manoharan等,Biorg.Med.Chem.Lett.,1994,4:1053)、硫醚,例如,己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660:306;Manoharan等,Biorg.Med.Chem.Lett.,1993,3:2765)、硫胆固醇(Oberhauser等,Nucl.Acids Res.,1992,20:533)、脂系链,例如,十二碳烷二醇或十一碳烷基(Saison-Behmoaras等,EMBO J,1991,10:1111;Kabanov等,FEBS Lett.,1990,259:327;Svinarchuk等,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-磷酸三乙基铵盐(Manoharan等,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651;Shea等,Nucl.Acids Res.,1990,18:3777)、多胺或聚乙二醇链(Manoharan等,Nuclosides&Nuclotides,1995,14:969)或金刚烷乙酸(Manoharan等,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651)、棕榈基部分基团(Mishra等,Biochim.Biophys.Acta,1995,1264:229)或十八碳烷基胺或己基氨基-羰基氧-胆固醇部分基团(Crooke等,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277:923)。教导所述RNA缀合物制法之代表性美国专利已如上述。典型缀合法程序涉及在序列之一个或多个位置带有氨基接头之RNA之合成法。该氨基再与准备缀合之分子采用适当偶联或活化试剂反应。该缀合反应可在RNA仍结合在固态担体时进行或可在裂解RNA后,在溶液相中进行。采用HPLC法纯化RNA缀合物,通常产生纯缀合物。

[0508] 在一些实施例中,本发明双链RNAi剂为AT3SC-001(AD-57213)。

[0509] VI. 本发明iRNA之递送法

[0510] 可采用许多不同方式递送本发明iRNA至细胞中,例如,受试者(如:人类受试者,例如,有此需要的受试者,如患有出血病症的受试者)之细胞。例如,可能藉由细胞与本发明iRNA于活体外或活体内接触,进行递送。亦可直接施用包含iRNA(例如,dsRNA)之组合物给受试者,进行活体内递送法。或者,可能间接施用编码并主导iRNA表达之一或多种载体,进行活体内递送。所述替代法更进一步于下文中说明。

[0511] 通常,本发明iRNA可采用任何递送核酸分子的方法(活体外或活体内)(参见例如,Akhtar S.与Julian RL.(1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144与W094/02595,其等完整内容已通过提述并入本文)。用于活体内递送时,要递送iRNA分子之考量因素包括例如,所递送分子之生物稳定性、预防所递送分子在标靶组织中之非特异性效应及累积。可藉由局部施用法使iRNA之非特异性效应降至最低,例如,采用直接注射或植入组织中或局部施用制剂。局部施用至治疗位点时,可使该制剂达最大局部浓度,限制该制剂曝露在可能会受到制剂伤害且使制剂降解之全身组织,并可以降低iRNA分子之总施用剂量。数项研究已显示,当局部施用iRNA时,可成功减弱基因产物。例如,在猕猴(cynomolgus monkeys)玻璃体内注射(Tolentino, MJ.等(2004) Retina 24:132-138)及在小鼠视网膜下注射(Reich, SJ.等(2003) Mol. Vis. 9:210-216),以经眼内递送VEGF dsRNA时,均显示可在老年性黄斑部病变之实验模式中预防新血管形成。此外,直接在小鼠肿瘤内注射dsRNA时,可缩小肿瘤体积(Pille, J.等(2005) Mol. Ther. 11:267-274),并可延长带肿瘤小鼠之寿命(Kim, WJ.等(2006) Mol. Ther. 14:343-350; Li, S.等(2007) Mol. Ther. 15:515-523)。RNA干扰法亦已显示可藉由直接注射法成功局部递送至CNS(Dorn, G.,等(2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH.等(2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H.等(2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT.等(2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER.等(2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y.等(2005) J. Neurophysiol. 93:594-602)及藉由鼻内施用法施用肺部(Howard, KA.等(2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X.等(2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V.等(2005) Nat. Med. 11:50-55)。全身施用iRNA以治疗疾病时, RNA可经修饰或改用药物递送系统递送;这两种方法均可预防dsRNA于活体内被内切-与外切-核酸酶快速降解。修饰RNA或医药载剂亦可以让iRNA组合物靶向标靶组织,并避免不期望之脱靶效应。iRNA分子可采用化学法缀合亲脂性基团(如胆固醇)进行修饰,以加强细胞吸收并预防降解。例如,由主导对抗ApoB的iRNA与亲脂性胆固醇部分基团之缀合物全身注射至小鼠,结果减弱肝与空肠中之apoB mRNA(Soutschek, J.等(2004) Nature 432:173-178)。iRNA与适体之缀合物已在小鼠摄护腺癌模式中显示可抑制肿瘤生长,并介导肿瘤消退(McNamara, JO.等(2006) Nat. Biotechnol. 24:1005-1015)。另一项实施例,可使用药物递送系统(如纳米粒子、树枝状物、聚合物、脂质体或阳离子性递送系统)递送iRNA。带正电荷之阳离子性递送系统可促进iRNA分子(带负电荷)之结合性,亦加强在带负电荷之细胞膜之交互作用,让细胞有效吸收iRNA。阳离子性脂质、树枝状物或聚合物可与iRNA结合,或诱发形成包埋iRNA之囊泡或微胞(参见例如, Kim SH.等(2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116)。形成囊泡或微胞可在全身施用时进一步预防iRNA降解。制造及施用阳离子性-iRNA复合物的方法系本领域的技术人员之能力范围内(参

见例如, Sorensen, DR. 等 (2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766; Verma, UN. 等 (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS 等 (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, 其完整内容已通过提述并入本文)。适用于全身性递送 iRNA 之药物递送系统之有些非限制性实例包括 DOTAP (Sorensen, DR. 等 (2003), 如上述文献; Verma, UN. 等 (2003), 如上述文献)、寡染胺 (Oligofectamine)、「固体核酸脂质粒子」(Zimmermann, TS. 等 (2006) *Nature* 441:111-114)、心磷脂 (cardiolipin) (Chien, PY. 等 (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A. 等 (2005) *Int. J. Oncol.* 26:1087-1091)、聚乙烯亚胺 (Bonnet ME. 等 (2008) *Pharm. Res.* 8月16日电子书 (Epub ahead of print); Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 7:1659)、Arg-Gly-Asp (RGD) 肽类 (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) 和聚酰胺基胺类 (Tomalia, DA. 等 (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H. 等 (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804)。在一些实施例中, iRNA 与环糊精形成复合物, 供全身性施用。iRNA 与环糊精之施用方法与药物组合物可参见美国专利号 7,427,605, 其完整内容已通过提述并入本文。

[0512] A. 编码本发明 iRNA 之载体

[0513] 靶向 *Serpinc1* 基因的 iRNA 可由嵌入 DNA 或 RNA 载体中之转录单位表达 (参见例如, Couture, A 等 TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A. 等, 国际 PCT 公开号 WO 00/22113、Conrad 之国际 PCT 公开号 WO 00/22114 和 Conrad 之美国专利号 6,054,299)。该表达可为过渡性 (数小时至数周) 或持续性 (数周至数月或更久), 依所采用之特定构建体与标靶组织或细胞型态而定。所述转殖基因可呈线性构建体、环状质粒或病毒载体引入, 其可为整合或非整合载体。亦可构筑该转殖基因, 使其得以呈染色体外质粒遗传 (Gassmann 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292)。

[0514] iRNA 之个别链或两链可由表达载体之启动子转录。当希望这两个分开链可以表达产生例如, dsRNA 时, 可以将两个分开之表达载体共同引入 (例如, 转染或感染) 至标靶细胞中。或者, dsRNA 之各个别链可利用均位于相同表达质粒上之启动子转录。在一个实施例中, dsRNA 系呈利用接头多核苷酸序列连接之反向重复序列多核苷酸表达, 因此 dsRNA 具有茎与环结构。

[0515] iRNA 表达载体通常为 DNA 质粒或病毒载体。可采用可与真核生物细胞相容, 优选为那些与脊椎动物细胞相容之表达载体来制造重组构建体, 供表达本文所说明的 iRNA。真核生物细胞表达载体相关技艺上习知, 且可从许多商品来源取得。通常, 所提供之所述载体包含合宜之限制酶切割位点, 供嵌入所需之核酸节段。可经全身性递送 iRNA 表达载体, 如经静脉内或经肌内施用、施用至从患者取出之标靶细胞后再引入患者体内, 或采用可以进入所需标靶细胞中之任何其他手段。

[0516] iRNA 表达质粒可与阳离子性脂质载剂 (例如, 寡染胺 (Oligofectamine) 或基于非阳离子性脂质之载剂 (例如, Transit-TKO™) 形成复合物转染至标靶细胞。本发明范围内亦包括持续一周或更久之多重脂质转染法, 供 iRNA 介导减弱靶向标靶 RNA 之不同区。可采用各种不同已知方法追踪成功引入载体进入宿主细胞。例如, 过渡转染可以标记报导子为信号, 如萤光标记物, 如绿色萤光蛋白质 (GFP)。采用可让转染细胞对特定环境因子 (例如, 抗生素与药物) 具有抗性之标记物 (如潮霉素 B (hygromycin B) 抗性) 来确认离体细胞之稳定转染。

[0517] 本文所说明方法与组合物可利用之病毒载体系统包括但不限于, (a) 腺病毒载体; (b) 逆转录病毒载体, 包括但不限于, 慢病毒 (lentivirus) 载体、莫洛尼氏白血病毒

(moloney murine leukemia virus) 等等; (c) 腺相关病毒载体; (d) 单纯疱疹病毒载体; (e) SV 40载体; (f) 多瘤病毒载体; (g) 乳突病毒载体; (h) 小核糖核酸病毒载体; (i) 痘病毒载体, 如正痘 (orthopox), 例如, 牛痘病毒载体或鸟痘, 例如, 金丝雀痘或禽痘; 与 (j) 辅助病毒依赖性或不肠腺病毒。复制缺陷病毒亦有利。细胞基因组中不一定会引入不同载体。若需要时, 该构建体可包括用于转录之病毒序列。或者, 该构建体可引入可以进行附加体型复制之载体, 例如, EPV与EBV载体。用于iRNA之重组表达之构建体通常需要调节元素, 例如, 启动子、增强子等等, 以确保iRNA于标靶细胞中之表达。下文将进一步说明有关载体与构建体之其他方面。

[0518] 有用于递送iRNA之载体包括足以在所需标靶细胞或组织中表达iRNA之调节元件(启动子、增强子等等)。可选择该等调节元件来提供组成性或调节/诱发性表达。

[0519] 可以例如, 利用对某些生理调节剂(例如, 循环葡萄糖含量或激素)敏感之诱发性调节序列准确调节iRNA之表达(Docherty等, 1994, FASEB J. 8: 20-24)。所述适用于细胞中或哺乳动物中调控dsRNA表达之诱发性表达系统包括例如, 利用蜕皮激素、雌激素、黄体酮、四环素、二聚合之化学诱发剂和异丙基- β -D1-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)之调节作用。本领域的技术人员将有能力依据iRNA转殖基因之意欲用途选择适当之调节/启动子序列。

[0520] 可使用包含编码iRNA之核酸序列之病毒载体。例如, 可使用逆转录病毒载体(参见Miller等, Meth. Enzymol. 217: 581-599 (1993))。所述逆转录病毒载体包含正确包裹病毒基因组并整合进入宿主细胞DNA时所必要之组分。选殖编码iRNA之核酸序列进入一或多个载体中, 促进递送核酸至患者中。有关逆转录病毒载体之更详细说明可参见例如, Boesen等, Biotherapy 6: 291-302 (1994), 其说明使用逆转录病毒载体递送mdr1基因至造血干细胞, 以便制造更能抵抗化疗之干细胞。其他说明逆转录病毒载体于基因疗法中用途之参考文献为: Clowes等, J. Clin. Invest. 93: 644-651 (1994); Kiem等, Blood 83: 1467-1473 (1994); Salmons与Gunzberg, Human Gene Therapy 4: 129-141 (1993); 与Grossman与Wilson, Curr. Opin. In Genetics and Devel. 3: 110-114 (1993)。意欲使用的慢病毒载体包括例如, 美国专利号6,143,520; 5,665,557; 与5,981,276所说明之基于HIV之载体, 其完整内容已通过提述并入本文。

[0521] 还意欲使用腺病毒来递送本发明iRNA。腺病毒为特别值得注意之载剂, 例如, 用于递送基因至呼吸上皮。腺病毒会自然感染呼吸上皮, 在此造成轻度疾病。基于腺病毒之递送系统之其他标靶为肝脏、中枢神经系统、内皮细胞和肌肉。腺病毒之优点在于可以感染非分裂细胞。Kozarsky与Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503 (1993) 提出有关基于腺病毒之基因疗法之概论。Bout等, Human Gene Therapy 5: 3-10 (1994) 证实使用腺病毒载体转移基因至恒河猴之呼吸上皮。腺病毒于基因疗法中之其他用途实例可参见Rosenfeld等, Science 252: 431-434 (1991); Rosenfeld等, Cell 68: 143-155 (1992); Mastrangeli等, J. Clin. Invest. 91: 225-234 (1993); PCT公开案W094/12649; 与Wang等, Gene Therapy 2: 775-783 (1995)。适合表达如本文所说明特征的iRNA之AV载体、构筑重组AV载体的方法及递送载体至标靶细胞的方法说明于Xia H等(2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010。

[0522] 亦可使用腺相关病毒(AAV)载体来递送本发明iRNA(Walsh等, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 (1993); 美国专利号5,436,146)。在一个实施例中,

可由具有例如,U6或H1 RNA启动子或巨细胞病毒(CMV)启动子之重组AAV载体表达iRNA,其系呈两个分开之互补单链RNA分子。适合表达如本发明所说明特征之dsRNA之AAV载体、构筑重组AV载体的方法及递送载体至靶细胞的方法说明于Samulski R等(1987), J.Virol.61:3096-3101;Fisher K J等(1996), J.Virol,70:520-532;Samulski R等(1989), J.Virol.63:3822-3826;美国专利号5,252,479;美国专利号5,139,941;国际专利申请号W0 94/13788;与国际专利申请号W0 93/24641,其完整内容已通过提述并入本文。

[0523] 另一种适合递送本发明iRNA之病毒载体为痘病毒,如牛痘病毒,例如,减毒牛痘,如经修饰之安卡拉(Ankara)病毒(MVA)或NYVAC、鸟痘,如禽痘或金丝雀痘。

[0524] 病毒载体之向性可利用外套膜蛋白假性病毒载体或来自其他病毒之其他表面抗原进行修饰,或适当时改用不同病毒外鞘蛋白质取代。例如,慢病毒载体可利用来自水泡性病毒(VSV)、狂犬病、伊波拉(Ebola)、莫科拉(Mokola)等等的表面蛋白质进行假型改造。AAV载体可经过工程改造,让载体表达不同外鞘蛋白质血清型,而靶向不同细胞;参见例如, Rabinowitz J E等(2002), J Virol 76:791-801,其完整内容已通过提述并入本文。

[0525] 载体之医药制剂中可包括含在可接受之稀释剂中之载体,或可包括其中已包埋基因递送载剂之缓释基质。或者,若可从重组细胞(例如,逆转录病毒载体)完整产生完整基因递送载体时,医药制剂可包括产生基因递送系统之一或多种细胞。

[0526] V. 本发明药物组合物

[0527] 本发明亦提供一种包含本发明iRNA之药物组合物与调配物。在一个实施例中,本文提供包含本文说明的iRNA与医药上可接受之载剂之药物组合物。该包含iRNA之药物组合物适用于治疗与Serpinc1基因表达或活性相关之疾病或病症,例如,Serpinc1-相关疾病。所述药物组合物系依据递送模式调配。其中一项实例为一种调配成以非经肠式递送而全身性施用之组合物,例如,经皮下(SC)或经静脉内(IV)递送。另一项实例为调配成直接递送至脑实质之组合物,例如,采用如连续帮浦输注至脑内。本发明药物组合物可施用足以抑制Serpinc1基因表达的剂量。

[0528] 本发明某些实施例中,例如,当该药物组合物包含之双链RNAi剂包括一个或多个在三个连续核苷酸有三个相同修饰之基序(包括一个在该制剂之裂解位点或接近裂解位点之所述基序)、6个硫代磷酸酯键、及GalNAc配体时,所述组合物之施用剂量为0.200至约1.825mg/kg、0.200至约1.800mg/kg、约0.200至约1.700mg/kg、约0.200至约1.600mg/kg、约0.200至约1.500mg/kg、约0.200至约1.400mg/kg、约0.200至约1.400mg/kg、约0.200至约1.200mg/kg、约0.200至约1.100mg/kg、约0.200至约1.000mg/kg、约0.200至约0.900mg/kg、约0.200至约0.800mg/kg、约0.200至约0.700mg/kg、约0.200至约0.600mg/kg、约0.200至约0.500mg/kg、约0.200至约0.400mg/kg、约0.225至约1.825mg/kg、约0.225至约1.800mg/kg、约0.225至约1.700mg/kg、约0.225至约1.600mg/kg、约0.225至约1.500mg/kg、约0.225至约1.400mg/kg、约0.225至约1.400mg/kg、约0.225至约1.200mg/kg、约0.225至约1.100mg/kg、约0.225至约1.000mg/kg、约0.225至约0.900mg/kg、约0.225至约0.800mg/kg、约0.225至约0.700mg/kg、约0.225至约0.600mg/kg、约0.225至约0.500mg/kg、约0.225至约0.400mg/kg、约0.250至约1.825mg/kg、约0.250至约1.800mg/kg、约0.250至约1.700mg/kg、约0.250至约1.600mg/kg、约0.250至约1.500mg/kg、约0.250至约1.400mg/kg、约0.250至约1.400mg/kg、约0.250至约1.200mg/kg、约0.250至约1.100mg/kg、约0.250至约1.000mg/kg、约0.250至约

0.900mg/kg、约0.250至约0.800mg/kg、约0.250至约0.700mg/kg、约0.250至约0.600mg/kg、约0.250至约0.500mg/kg、约0.250至约0.400mg/kg、约0.425至约1.825mg/kg、约0.425至约1.800mg/kg、约0.425至约1.700mg/kg、约0.425至约1.600mg/kg、约0.425至约1.500mg/kg、约0.425至约1.400mg/kg、约0.425至约1.400mg/kg、约0.425至约1.200mg/kg、约0.425至约1.100mg/kg、约0.425至约1.000mg/kg、约0.425至约0.900mg/kg、约0.425至约0.800mg/kg、约0.425至约0.700mg/kg、约0.425至约0.600mg/kg、约0.425至约0.500mg/kg、约0.450至约1.825mg/kg、约0.450至约1.800mg/kg、约0.450至约1.700mg/kg、约0.450至约1.600mg/kg、约0.450至约1.500mg/kg、约0.450至约1.400mg/kg、约0.450至约1.400mg/kg、约0.450至约1.200mg/kg、约0.450至约1.100mg/kg、约0.450至约1.000mg/kg、约0.450至约0.900mg/kg、约0.450至约0.800mg/kg、约0.450至约0.700mg/kg、约0.450至约0.600mg/kg、约0.450至约0.500mg/kg、约0.475至约1.825mg/kg、约0.475至约1.800mg/kg、约0.475至约1.700mg/kg、约0.475至约1.600mg/kg、约0.475至约1.500mg/kg、约0.475至约1.400mg/kg、约0.475至约1.400mg/kg、约0.475至约1.200mg/kg、约0.475至约1.100mg/kg、约0.475至约1.000mg/kg、约0.475至约0.900mg/kg、约0.475至约0.800mg/kg、约0.475至约0.700mg/kg、约0.475至约0.600mg/kg、约0.475至约0.500mg/kg、约0.875至约1.825mg/kg、约0.875至约1.800mg/kg、约0.875至约1.700mg/kg、约0.875至约1.600mg/kg、约0.875至约1.500mg/kg、约0.875至约1.400mg/kg、约0.875至约1.400mg/kg、约0.875至约1.200mg/kg、约0.875至约1.100mg/kg、约0.875至约1.000mg/kg、约0.875至约0.900mg/kg、约0.900至约1.825mg/kg、约0.900至约1.800mg/kg、约0.900至约1.700mg/kg、约0.900至约1.600mg/kg、约0.900至约1.500mg/kg、约0.900至约1.400mg/kg、约0.900至约1.400mg/kg、约0.900至约1.200mg/kg、约0.900至约1.100mg/kg、约0.900至约1.000mg/kg、约0.925至约1.825mg/kg、约0.925至约1.800mg/kg、约0.925至约1.700mg/kg、约0.925至约1.600mg/kg、约0.925至约1.500mg/kg、约0.925至约1.400mg/kg、约0.925至约1.400mg/kg、约0.925至约1.200mg/kg、约0.925至约1.100mg/kg或约0.925至约1.000mg/kg。上示数值之间之数值与范围亦包括为本发明之一部分，例如，该RNAi剂施用该受试者的剂量可为约0.015mg/kg至约0.45mg/kg。

[0529] 例如，该RNAi剂（例如，药物组合物中的RNAi剂）之施用剂量可为约0.2mg/kg、0.225mg/kg、0.25mg/kg、0.275mg/kg、0.3mg/kg、0.325mg/kg、0.35mg/kg、0.375mg/kg、0.4mg/kg、0.425mg/kg、0.45mg/kg、0.475mg/kg、约0.5mg/kg、0.525mg/kg、0.55mg/kg、0.575mg/kg、约0.6mg/kg、0.625mg/kg、0.65mg/kg、0.675mg/kg、约0.7mg/kg、0.725mg/kg、0.75mg/kg、0.775mg/kg、约0.8mg/kg、0.925mg/kg、0.95mg/kg、0.975mg/kg、约1.0mg/kg、1.025mg/kg、1.05mg/kg、1.075mg/kg、约1.1mg/kg、1.125mg/kg、1.15mg/kg、1.175mg/kg、约1.2mg/kg、1.225mg/kg、1.25mg/kg、1.275mg/kg、约1.3mg/kg、1.325mg/kg、1.35mg/kg、1.375mg/kg、约1.4mg/kg、1.425mg/kg、1.45mg/kg、1.475mg/kg、约1.5mg/kg、1.525mg/kg、1.55mg/kg、1.575mg/kg、约1.6mg/kg、1.625mg/kg、1.65mg/kg、1.675mg/kg、约1.7mg/kg、1.725mg/kg、1.75mg/kg、1.775mg/kg或约1.8mg/kg。上述数值之间之数值亦为本发明之一部分。

[0530] 本发明在一些实施例中，例如，当双链RNAi剂包含有义链及反义链，反义链包含与编码Serpinc1的mRNA互补的区，其包含至少15个连续核苷酸，其与核苷酸序列5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO:15) 的差异不超过3个核苷酸，其中有义链的基

本上所有核苷酸与反义链的基本上所有核苷酸为经修饰的核苷酸,且其中有义链缀合于附接在3'-末端的配体时,所述含在药物组合物中之制剂之施用剂量为约0.200至约1.825mg/kg、0.200至约1.800mg/kg、约0.200至约1.700mg/kg、约0.200至约1.600mg/kg、约0.200至约1.500mg/kg、约0.200至约1.400mg/kg、约0.200至约1.400mg/kg、约0.200至约1.200mg/kg、约0.200至约1.100mg/kg、约0.200至约1.000mg/kg、约0.200至约0.900mg/kg、约0.200至约0.800mg/kg、约0.200至约0.700mg/kg、约0.200至约0.600mg/kg、约0.200至约0.500mg/kg、约0.200至约0.400mg/kg、约0.225至约1.825mg/kg、约0.225至约1.800mg/kg、约0.225至约1.700mg/kg、约0.225至约1.600mg/kg、约0.225至约1.500mg/kg、约0.225至约1.400mg/kg、约0.225至约1.400mg/kg、约0.225至约1.200mg/kg、约0.225至约1.100mg/kg、约0.225至约1.000mg/kg、约0.225至约0.900mg/kg、约0.225至约0.800mg/kg、约0.225至约0.700mg/kg、约0.225至约0.600mg/kg、约0.225至约0.500mg/kg、约0.225至约0.400mg/kg、约0.250至约1.825mg/kg、约0.250至约1.800mg/kg、约0.250至约1.700mg/kg、约0.250至约1.600mg/kg、约0.250至约1.500mg/kg、约0.250至约1.400mg/kg、约0.250至约1.400mg/kg、约0.250至约1.200mg/kg、约0.250至约1.100mg/kg、约0.250至约1.000mg/kg、约0.250至约0.900mg/kg、约0.250至约0.800mg/kg、约0.250至约0.700mg/kg、约0.250至约0.600mg/kg、约0.250至约0.500mg/kg、约0.250至约0.400mg/kg、约0.425至约1.825mg/kg、约0.425至约1.800mg/kg、约0.425至约1.700mg/kg、约0.425至约1.600mg/kg、约0.425至约1.500mg/kg、约0.425至约1.400mg/kg、约0.425至约1.400mg/kg、约0.425至约1.200mg/kg、约0.425至约1.100mg/kg、约0.425至约1.000mg/kg、约0.425至约0.900mg/kg、约0.425至约0.800mg/kg、约0.425至约0.700mg/kg、约0.425至约0.600mg/kg、约0.425至约0.500mg/kg、约0.450至约1.825mg/kg、约0.450至约1.800mg/kg、约0.450至约1.700mg/kg、约0.450至约1.600mg/kg、约0.450至约1.500mg/kg、约0.450至约1.400mg/kg、约0.450至约1.400mg/kg、约0.450至约1.200mg/kg、约0.450至约1.100mg/kg、约0.450至约1.000mg/kg、约0.450至约0.900mg/kg、约0.450至约0.800mg/kg、约0.450至约0.700mg/kg、约0.450至约0.600mg/kg、约0.450至约0.500mg/kg、约0.475至约1.825mg/kg、约0.475至约1.800mg/kg、约0.475至约1.700mg/kg、约0.475至约1.600mg/kg、约0.475至约1.500mg/kg、约0.475至约1.400mg/kg、约0.475至约1.400mg/kg、约0.475至约1.200mg/kg、约0.475至约1.100mg/kg、约0.475至约1.000mg/kg、约0.475至约0.900mg/kg、约0.475至约0.800mg/kg、约0.475至约0.700mg/kg、约0.475至约0.600mg/kg、约0.475至约0.500mg/kg、约0.875至约1.825mg/kg、约0.875至约1.800mg/kg、约0.875至约1.700mg/kg、约0.875至约1.600mg/kg、约0.875至约1.500mg/kg、约0.875至约1.400mg/kg、约0.875至约1.400mg/kg、约0.875至约1.200mg/kg、约0.875至约1.100mg/kg、约0.875至约1.000mg/kg、约0.875至约0.900mg/kg、约0.900至约1.825mg/kg、约0.900至约1.800mg/kg、约0.900至约1.700mg/kg、约0.900至约1.600mg/kg、约0.900至约1.500mg/kg、约0.900至约1.400mg/kg、约0.900至约1.400mg/kg、约0.900至约1.200mg/kg、约0.900至约1.100mg/kg、约0.900至约1.000mg/kg、约0.925至约1.825mg/kg、约0.925至约1.800mg/kg、约0.925至约1.700mg/kg、约0.925至约1.600mg/kg、约0.925至约1.500mg/kg、约0.925至约1.400mg/kg、约0.925至约1.400mg/kg、约0.925至约1.200mg/kg、约0.925至约1.100mg/kg或约0.925至约1.000mg/kg。上述数值之间之数值亦为本发明之一部分,例如,RNAi剂可施用于受试者的剂量为约0.015mg/kg至约0.45mg/kg。

[0531] 例如, 药物组合物中之RNAi剂, 例如, RNAi剂之施用剂量可为约0.2mg/kg、0.225mg/kg、0.25mg/kg、0.275mg/kg、0.3mg/kg、0.325mg/kg、0.35mg/kg、0.375mg/kg、0.4mg/kg、0.425mg/kg、0.45mg/kg、0.475mg/kg、约0.5mg/kg、0.525mg/kg、0.55mg/kg、0.575mg/kg、约0.6mg/kg、0.625mg/kg、0.65mg/kg、0.675mg/kg、约0.7mg/kg、0.725mg/kg、0.75mg/kg、0.775mg/kg、约0.8mg/kg、0.925mg/kg、0.95mg/kg、0.975mg/kg、约1.0mg/kg、1.025mg/kg、1.05mg/kg、1.075mg/kg、约1.1mg/kg、1.125mg/kg、1.15mg/kg、1.175mg/kg、约1.2mg/kg、1.225mg/kg、1.25mg/kg、1.275mg/kg、约1.3mg/kg、1.325mg/kg、1.35mg/kg、1.375mg/kg、约1.4mg/kg、1.425mg/kg、1.45mg/kg、1.475mg/kg、约1.5mg/kg、1.525mg/kg、1.55mg/kg、1.575mg/kg、约1.6mg/kg、1.625mg/kg、1.65mg/kg、1.675mg/kg、约1.7mg/kg、1.725mg/kg、1.75mg/kg、1.775mg/kg或约1.8mg/kg。上述数值之间之数值亦为本发明之一部分。

[0532] 在一些实施例中, 包含iRNA剂之药物组合物系以固定剂量施用于受试者。「固定剂量」(例如, 以mg计的剂量) 意指用于所有受试者之一剂iRNA剂剂量, 不受任何特定受试者相关因素影响, 如体重。一项特定实施例中, 本发明iRNA剂固定剂量系依据预定体重或年龄计。

[0533] 在一些实施例中, 包含iRNA剂之药物组合物系施用固定剂量约25mg-约100mg, 例如, 约25mg-约95mg、约25mg-约90mg、约25mg-约85mg、约25mg-约80mg、约25mg-约75mg、约25mg-约70mg、约25mg-约65mg、约25mg-约60mg、约25mg-约50mg、约50mg-约100mg、约50mg-约95mg、约50mg-约90mg、约50mg-约85mg、约50mg-约80mg、约30mg-约100mg、约30mg-约90mg、约30mg-约80mg、约40mg-约100mg、约40mg-约90mg、约40mg-约80mg、约60mg-约100mg、约60mg-约90mg、约25mg-约55mg、约30mg-约95mg、约30mg-约85mg、约30mg-约75mg、约30mg-约65mg、约30mg-约55mg、约40mg-约95mg、约40mg-约85mg、约40mg-约75mg、约40mg-约65mg、约40mg-约55mg或约45mg-约95mg。

[0534] 在一些实施例中, 包含iRNA剂之药物组合物系施用固定剂量约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg或约100mg。

[0535] 包含iRNA剂之药物组合物可施用于受试者约一个月一次、约每五周一次、约每六周一次、约每2个月一次或每季度一次。

[0536] 包含iRNA剂之药物组合物可施用于受试者一剂或多剂。在一些实施例中, 包含双链iRNA剂之药物组合物可施用于受试者每个月一次剂量约0.200mg/kg至约0.250mg/kg、每个月一次剂量约0.425mg/kg至约0.475mg/kg、每个月一次剂量约0.875mg/kg至约0.925mg/kg或每个月一次剂量约1.775mg/kg至约1.825mg/kg。在一些实施例中, 包含双链iRNA剂之药物组合物可施用于受试者固定剂量约25mg至约100mg, 例如, 约25mg、约50mg、约80mg或约100mg。

[0537] 该药物组合物可经静脉输注施用一段时间, 如历时5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、及21、22、23、24或约25分钟之时间。可以重复施用, 例如, 定期重复, 如每周、双周(亦即每两周)、每个月、每两个月、每三个月、每四个月或更久。经过初次疗程后, 该疗法可以减少施用频率。例如, 经过每周或双周施用为期3个月后, 可以每个月重复施用一次, 为期6个月或一年或更久。

[0538] 药物组合物可以一天施用一次,或iRNA可在一天内依适当间隔施用两个、三个或更多个小剂量,或甚至使用连续输注或透过调控释放之调配物递送。此时,各小剂量中的iRNA含量必需相对减少,以达到总日剂量。该剂量单位亦可组合以供持续递送数天,例如,采用常用之持续释放调配物,其可历时数天持续释放iRNA。持续释放调配物系本领域已知,且特别适用于在特定位置递送该制剂,如可与本发明制剂一起使用。此实施例中,该剂量单位包含对应之多重日剂量。

[0539] 其他实施例中,药物组合物之单一剂量可以为长效性,因此下一个剂量可在间隔不超过1、2、3、4、5、6、7或8周内施用。本发明在一些实施例中,本发明药物组合物之单一剂量系一个月施用一次。

[0540] 本领域的技术人员咸了解,某些因素会影响有效治疗受试者时所需的剂量与施用时间,包括但不限于,疾病或病症之严重性、过去之治疗、该受试者之一般健康和/或年龄、及其他现有疾病。此外,以治疗有效量的组合物治疗该受试者时,可包括单次治疗或连续治疗。本发明所包括之个别iRNA可采用习知方法或使用本文说明之适当动物模式,依据活体内试验估测其有效剂量及活体内半衰期。

[0541] 小鼠基因学上之进展已产生许多小鼠模式,供探讨各种不同人类疾病,如可因降低Serpinc1表达而受益之出血病症。所述模式可用于活体内测试iRNA,并决定医疗有效剂量。合适小鼠模式系本领域已知,且包括例如,血友病A小鼠模式及血友病B小鼠模式,例如,含有剔除凝血因子基因之小鼠,如那些说明于Bolliger等(2010)Thromb Haemost 103:1233-1238;Bi L等(1995)Nat Genet 10:119-21;Lin等(1997)Blood 90:3962-6;Kundu等(1998)Blood 92:168-74;Wang等(1997)Proc Natl Acad Sci U S A 94:11563-6;与Jin等(2004)Blood 104:1733。

[0542] 本发明药物组合物可依许多方式施用,端赖是否需要局部或全身性治疗及需要治疗之区域而定。施用法可能为局部(例如,采用穿皮式贴布)、经肺部,例如,吸入或吹入粉剂或气雾剂,包括利用喷雾器;经气管内、经鼻内、经表皮与穿皮、经口或非经肠式。非经肠式施用法包括经静脉内、经动脉内、经皮下、经腹膜内或经肌内注射或输注;皮下,例如,经由植入装置;或经颅内,例如,经脑实质内、鞘内或脑室内施用。

[0543] iRNA可依靶向方式递送到特定组织,如肝脏(例如,肝脏之肝细胞)。

[0544] 供局部施用之药物组合物与调配物可包括穿皮式贴布、油膏、洗液、乳霜、凝胶、滴剂、栓剂、喷液、液体与粉剂。可能必须或需要使用常用之医药载剂、水性、粉状或油性基质、增稠剂等等。有涂层之保险套、手套等等亦适用。合适之局部调配物包括那些由如本发明所说明特征的iRNA与局部递送剂(如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯类、类固醇、螯合剂与表面活性剂)混合者。局部调配物详细说明于美国专利号6,747,014,其完整内容已通过提述并入本文。

[0545] A. 其他调配物

[0546] i. 乳剂

[0547] 本发明组合物可制造并调配成乳剂。乳剂为一种液体呈直径通常超过0.1 μ m之液滴型态匀散在另一种液体中之典型不均相系统(参见例如,Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. 与 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams&Wilkins(第8版), New York, NY; Idson述于 Pharmaceutical Dosage Forms,

Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.199;Rosoff述于Parmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.245;Block述于Parmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第2册,p.335;Higuchi等述于Remington's Parmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1985,p.301)。乳剂液通常为双相系统,其包含两个彼此密切混合与分散之不可混溶之液相。通常,乳剂可为油包水(w/o)型或水包油(o/w)型。当水相呈小液滴均匀分布且分散在大体积之油相中时,所得组合物称为油包水性(w/o)乳剂。或者,当油相呈小液滴均匀分布且分散在大体积之水相中时,所得组合物称为水包油性(o/w)乳剂。乳剂中除了分散相外,可再包含其他组分,且活性药物可呈溶液存在于水相、油相或本身另呈一相。需要时,乳剂中亦可包含医药赋形剂,如乳化剂、稳定剂、染剂和抗氧化剂。医药乳剂亦可为由超过两相组成之多相乳剂,如,例如,以油包水包油性(o/w/o)及水包油包水性(w/o/w)乳剂为例。所述复合调配物经常提供单纯二元乳剂没有之优点。其中o/w乳剂之个别油滴包埋小水滴之多相乳剂即构成w/o/w乳剂。同样地,由油滴包埋在于油连续相中稳定化之水球中之系统即提供o/w/o乳剂。

[0548] 乳剂之特征在于很低或没有热动力学稳定性。通常,乳剂之分散相或不连续相均匀分布在外相或连续相内,并利用乳化剂或调配物之粘度维持此型式。乳剂之任一相可以为半固体或固体,如乳剂型油膏基质与乳霜。其他稳定乳剂方式可以使用乳化剂,引入乳剂之任一相中。乳化剂可广义分为四类:合成性表面活性剂、天然乳化剂、吸收基质和均匀分散之固体(参见例如,Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.与Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Idson述于Parmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.199)。

[0549] 合成性表面活性剂亦已知为表面活性剂,已广泛用于乳剂之调配物,且已于文献中说明(参见例如,Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.与Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Rieger述于Parmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.285;Idson述于Parmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger与Banker(编),Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,1988,第1册,p.199)。表面活性剂通常为两亲性,其包含亲水性与疏水性部分。表面活性剂之亲水性对疏水性性质之比值称为亲水物/亲脂物平衡值(HLB),系在制备调配物时用于分类及选择表面活性剂之有利工具。表面活性剂可依据亲水性基团性质分成不同类型:非离子性、阴离子性、阳离子性和两亲性(参见例如,Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.与Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Rieger述于Parmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.285)。

[0550] 用于乳剂调配物之天然乳化剂包括羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂与阿拉伯胶。吸收性基质具有亲水性性质,因此可吸水形成w/o乳剂,但仍保留其半固态坚实度,如无水羊毛脂与亲水性石蜡。亦可使用细碎固体作为良好乳化剂,尤其与表面活性剂组合及用于粘性

制剂中时。所述包括极性无机固体,如重金属氢氧化物、非膨胀性粘土,如膨润土、凹凸棒石、锂蒙脱石、高岭土、蒙脱石、胶体硅酸铝与胶体硅酸镁铝、色素和非极性固体,如碳或三硬脂酸甘油酯。

[0551] 乳剂调配物中亦可包括许多种不同之非乳化材料,其可赋与乳剂性质。所述物质包括脂肪、油类、蜡类、脂肪酸、脂肪醇类、脂肪酯类、保湿剂、亲水性胶体、防腐剂与抗氧化剂(Block述于*Parmaceutical Dosage Forms*,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.335;Idson述于*Parmaceutical Dosage Forms*,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.199)。

[0552] 亲水性胶体或水胶体包括天然胶质与合成性聚合物,如多糖类(例如,阿拉伯胶、琼脂、藻酸、角叉菜胶、瓜尔豆胶、卡拉胶与黄蓍胶)、纤维素衍生物(例如,羧甲基纤维素与羧丙基纤维素)和合成性聚合物(例如,卡波姆(carbomers)、纤维素醚与羧乙烯基聚合物)。所述物质于水中分散或膨胀,形成胶体溶液,藉由在分散相之液滴周围形成强力界面膜并提高外相之粘度,而稳定该乳剂。

[0553] 由于乳剂经常包含许多如碳水化合物、蛋白质、固醇类和磷脂之成份,很容易支持微生物生长,因此所述调配物经常添加防腐剂。常包括于乳剂调配物中之防腐剂包括对羟基苯甲酸甲基酯、对羟基苯甲酸丙基酯、季铵盐类、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸之酯类和硼酸。亦经常添加抗氧化剂至乳剂调配物中,以防止破坏调配物。所使用之抗氧化剂可为游离基清除剂,如生育酚、没食子酸烷基酯、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯,或还原剂,如抗坏血酸和偏亚硫酸氢钠,与抗氧化促效剂,如柠檬酸、酒石酸与卵磷脂。

[0554] 乳剂调配物经由皮肤、口和非经肠式途径之施用法与其制造方法已有文献说明(参见例如,Ansel's *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*,Allen,LV.,Popovich NG.与Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Idson述于*Parmaceutical Dosage Forms*,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.199)。用于经口递送之乳剂调配物因为容易调配,且从吸收效力与生体可用率观点,已极广泛使用(参见例如,Ansel's *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*,Allen,LV.,Popovich NG.与Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Rosoff述于*Parmaceutical Dosage Forms*,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.245;Idson述于*Parmaceutical Dosage Forms*,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.199)。基于矿物油之缓泻剂、油溶性维生素与高脂肪营养制剂为常作为o/w乳剂经口施用之材料。

[0555] ii.微乳剂

[0556] 本发明在一个实施例中,iRNA与核酸之组合物系调配成微乳剂。微乳剂之定义为由水、油与两亲物形成光学上各向同性且热动力学稳定之单一液体溶液之系统(参见例如,Ansel's *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*,Allen,LV.,Popovich NG.与Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Rosoff述于*Parmaceutical Dosage Forms*,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.245)。典型微乳剂为先让油分散在水性表面活性剂溶液中,

然后添加足量之第四组分所形成之系统,通常添加中链长醇类,以形成透明系统。因此,微乳剂亦称为两种不混溶液体之动力学稳定之各向同性透明分散液,其系利用表面活性分子之界面膜稳定化(Leung与Shah述于:Controlled Release of Drugs:Polymers and Aggregate System,Rosoff,M,编,1989,VCH Publishers,New York,p.185-215)。微乳剂通常系由3至5种组分组合制成,其包括油、水、表面活性剂、辅表面活性剂与电解质。该微乳剂为油包水(w/o)或水包油(o/w)型端赖所使用油及表面活性剂之性质及表面活性剂分子之极性头端与烃尾端之结构与几何堆叠而定(Schott之Remington's Parmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1985,p.271)。

[0557] 利用相图之现象学方法已有深入研究,且已产生大量知识,让本领域的技术人员了解如何调配微乳剂(参见例如,Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.与Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Rosoff述于Parmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.245;Block述于Parmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger与Banker(编),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1册,p.335)。相较于一般乳剂,微乳剂之优点在于可在自发性形成之热动力学稳定之液滴之调配物中溶解水不溶性药物。

[0558] 制备微乳剂时所使用之表面活性剂包括但不限于,离子性表面活性剂、非离子性表面活性剂、Brij 96、聚氧乙烯油基醚类、聚甘油脂肪酸酯类、单月桂酸四甘油酯(ML310)、单油酸四甘油酯(M0310)、单油酸六甘油酯(P0310)、五油酸六甘油酯(P0500)、单癸酸十甘油酯(MCA750)、单油酸十甘油酯(M0750)、倍半油酸十甘油酯(S0750)、十油酸十甘油酯(DA0750),其可单独使用或与辅表面活性剂组合使用。辅表面活性剂通常为短链醇,如乙醇、1-丙醇和1-丁醇,其藉由渗透入表面活性剂膜,在表面活性剂分子之间产生空隙,因此造成无序膜,而提高界面流动性。然而不需要使用辅表面活性剂亦可制备微乳剂,且本领域已知不含醇之可自行乳化之微乳剂系统。典型之水相为(但不限于),水、药物水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇、及乙二醇之衍生物。该油相可包括但不限于,下列材料,如Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯类、中链(C8-C12)单酸-、二酸-和三酸甘油酯、聚氧乙基化甘油基脂肪酸酯类、脂肪醇类、聚二醇化甘油酯类、饱和聚二醇化C8-C10甘油酯类、植物油与硅油类。

[0559] 从药物溶解度与加强药物吸收性之观点而言,微乳剂特别值得注意。已提出基于脂质之微乳剂(包括o/w与w/o)来加强药物(包括肽)之口服生体可用率(参见例如,美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;Constantinides等,Pharmaceutical Research,1994,11,1385-1390;Ritschel之Meth.Find.Exp.Clin.Pharmacol.,1993,13,205)。微乳剂提供之优点为改善药物溶解性、保护药物免于酶水解、可能基于表面活性剂诱发改变膜流动性与通透性而加强药物吸收性、容易制备、比固态剂型容易经口施用、改善临床效力、及降低毒性(参见例如,美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;Constantinides等,Pharmaceutical Research,1994,11,1385;Ho等,J.Pharm.Sci.,1996,85,138-143)。当于环境温度下将微乳剂组分组合在一起时,经常可自发性形成微乳剂。当调配对热敏感之药物、肽或iRNA时,微乳剂特别有利。微乳剂亦可在化妆品与医药用途上有效地穿皮式递送活性组分。预期本发明微乳剂组合物与调配物将可促进从胃肠道提

高iRNA与核酸之全身吸收性,并改善局部细胞吸收iRNA与核酸。

[0560] 本发明微乳剂亦可包含其他组分与添加剂,如山梨坦单硬脂酸酯(Grill3)、聚乙二醇-8-辛酸/癩酸酯(Labrasol)与渗透增强剂,以改善调配物性质,及加强本发明iRNA与核酸之吸收性。本发明微乳剂所采用之渗透增强剂可分为1至5大类-表面活性剂、脂肪酸类、胆汁盐类、螯合剂与非螯合性非表面活性剂(Lee等Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,p.92)。各类所述物质已于上文中说明。

[0561] iii.微粒子

[0562] 本发明RNAi剂可以纳入粒子中,例如,微粒子中。微粒子可由喷雾干燥法产生,但亦可采用其他方法,包括冷冻干燥、蒸发、流化床、真空干燥或所述技术之组合。

[0563] iv.渗透增强剂

[0564] 在一个实施例中,本发明使用各种不同渗透增强剂,让核酸(特定言的iRNA)有效递送至动物皮肤。大多数药物在溶液中系呈离子化与非离子化型。然而,通常仅有脂溶性或亲脂性药物容易通过细胞膜。已发现,若所要通过的膜经过渗透增强剂处理时,即使非亲脂性药物亦可穿过细胞膜。除了协助非亲脂性药物扩散通过细胞膜外,渗透增强剂亦可加强亲脂性药物之通透性。

[0565] 渗透增强剂可分成1至5大类,亦即表面活性剂、脂肪酸类、胆汁盐类、螯合剂和非螯合性非表面活性剂(参见例如,Malmsten,M.,Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,New York,NY,2002;Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,p.92)。上述各类渗透增强剂将更详细说明于下文中。

[0566] 表面活性剂(或「表面活性剂」)为一种在溶于水溶液中时可以降低溶液之表面张力或水溶液与另一种液体之间之界面张力之化学物质,结果将加强iRNA通过粘膜之吸收性。除了胆汁盐类与脂肪酸外,所述渗透增强剂包括例如,月桂基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂基醚与聚氧乙烯-20-鲸蜡基醚(参见例如,Malmsten,M.,Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,New York,NY,2002;Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,p.92);及全氟化学乳剂,如FC-43(Takahashi等J.Pharm.Pharmacol.,1988,40,252)。

[0567] 可作为渗透增强剂之各种不同脂肪酸与其衍生物包括例如,油酸、月桂酸、癩酸(正癩酸)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癩酸酯、三癩酸酯、甘油单油酸酯(1-单油基-消旋性-甘油)、甘油二月桂酸酯、辛酸、花生四烯酸、1-单癩酸甘油酯、1-十二碳烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、其C₁₋₂₀烷基酯(例如,甲基酯、异丙基酯与第三丁基酯)、及其单甘油酯和二甘油酯(亦即油酸酯、月桂酸酯、癩酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯、亚油酸酯等等)(参见例如,Touitou,E.等,Enhancement in Drug Delivery,CRC Press,Danvers,MA,2006;Lee等,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,J.Pharm.Pharmacol.,1992,44,651-654)。

[0568] 胆汁之生理性角色包括促进脂质与脂溶性维生素分散与吸收(参见例如,Malmsten,M.之Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,New York,NY,2002;Brunton述于:Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of

Therapeutics,第9版,第38章,Hardman等编,McGraw-Hill,New York,1996,pp.934-935)。各种不同天然胆汁盐类与其合成性衍生物均可作为渗透增强剂。因此术语「胆汁盐类」包括胆汁之任何天然组分及其任何合成性衍生物。合适胆汁盐包括例如,胆酸(或其医药上可接受之钠盐、胆酸钠)、去氢胆酸(去氢胆酸钠)、脱氧胆酸(脱氧胆酸钠)、葡胆酸(葡胆酸钠)、甘胆酸(甘胆酸钠)、脱氧甘胆酸(脱氧甘胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、牛磺脱氧胆酸(牛磺脱氧胆酸钠)、鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸钠)、熊脱氧胆酸(UDCA)、牛磺-24,25-二氢-褐霉酸钠(STDHF)、甘胺二氢褐霉酸钠与聚氧乙烯-9-月桂基醚(POE)(参见例如,Malmsten,M.之Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,New York,NY,2002;Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,p.92;Swinyard述于:Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,第39章,Gennaro编,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1990,p.782-783;Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33;Yamamoto等,J.Pharm.Exp.Ther.,1992,263,25;Yamashita等,J.Pharm.Sci.,1990,79,579-583)。

[0569] 本发明所使用之螯合剂可定义为可让溶液中金属离子与其形成复合物而由此排除之化合物,结果可以藉此加强iRNA通过粘膜之吸收性。螯合剂在本发明中作为渗透增强剂之相关用法中,其附加价值在于亦可作为DNase抑制剂,因为大多数已判断特征之DNA核酸酶均需要二价金属离子,供进行催化作用,因此可被螯合剂抑制(Jarrett, J.Chromatogr.,1993,618,315-339)。合适螯合剂包括但不限于,乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、柠檬酸、水杨酸盐(例如,水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸盐与高香兰酸盐)、胶原蛋白之N-酰基衍生物、月桂基醚-9与 β -二酮之N-氨基酰基衍生物(烯胺类)(参见例如,Katdare,A.等,Excipient development for pharmaceutical,biotechnology,and drug delivery,CRC Press,Danvers,MA,2006;Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,p.92;Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33;Buur等,J.Control Rel.,1990,14,43-51)。

[0570] 本文所采用非螯合性非表面活性剂渗透加强化合物可定义为已证实没有显著螯合剂或表面活性剂活性,但仍可加强iRNA透过消化道粘膜吸收之化合物(参见例如,Muranishi之Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33)。此类渗透增强剂包括例如,不饱和环状脲类、1-烷基-与1-烯基氮杂环-烷酮类衍生物(Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,p.92);及非类固醇消炎剂,如双氯芬酸钠(diclofenac sodium)、吲哚美辛(indomethacin)与苯丁吡唑酮(phenylbutazone)(Yamashita等,J.Pharm.Pharmacol.,1987,39,621-626)。

[0571] 亦可添加可在细胞层级上加强吸收iRNA之制剂至本发明医药与其他组合物中。亦已知例如,阳离子性脂质,如脂质体(lipofectin)(Junichi等,美国专利号5,705,188)、阳离子性甘油衍生物和聚阳离子性分子,如聚赖氨酸(Lollo等,PCT申请WO 97/30731)可加强细胞吸收dsRNA。可自商品取得之转染剂实例包括例如,LipofectamineTM(Invitrogen; Carlsbad,CA)、Lipofectamine 2000TM(Invitrogen;Carlsbad,CA)、293fectinTM(Invitrogen;Carlsbad,CA)、CellfectinTM(Invitrogen;Carlsbad,CA)、DMRIE-CTM(Invitrogen;Carlsbad,CA)、FreeStyleTMMAX(Invitrogen;Carlsbad,CA)、LipofectamineTM2000CD(Invitrogen;Carlsbad,CA)、LipofectamineTM(Invitrogen;

Carlsbad, CA)、RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA)、OligofectamineTM (Invitrogen; Carlsbad, CA)、OptifectTM (Invitrogen; Carlsbad, CA)、X-tremeGENE Q2转染试剂 (Roche; Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOTAP脂质体转染试剂 (Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOSPER脂质体转染试剂 (Grenzacherstrasse, Switzerland) 或Fugene (Grenzacherstrasse, Switzerland)、Transfectam[®] 试剂 (Promega; Madison, WI)、TransFastTM转染试剂 (Promega; Madison, WI)、TfxTM-20试剂 (Promega; Madison, WI)、TfxTM-50试剂 (Promega; Madison, WI)、DreamFectTM (OZ Biosciences; Marseille, France)、EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, France)、TransPassa D1转染试剂 (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA)、LyoVecTM/LipoGenTM (Invitrogen; San Diego, CA, USA)、PerFectin转染试剂 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、NeuroPORTER转染试剂 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、GenePORTER转染试剂 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、GenePORTER 2转染试剂 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、Cytofectin转染试剂 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、BaculoPORTER转染试剂 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、TroganPORTERTM转染试剂 (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HiFectTM (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA) 等等。

[0572] 其他可用于加强所施用核酸之渗透性之制剂包括二醇类(如乙二醇与丙二醇)、吡咯类(如2-吡咯)、氮酮类与萜烯类,如柠檬烯与薄荷酮。

[0573] v. 载剂

[0574] 某些本发明组合物亦可在调配物中纳入载剂化合物。本文所采用「载剂化合物」或「载剂」可指核酸或其类似物,其系惰性(亦即本身没有生物活性),但仍可在活体内过程中被识别为核酸,该过程系藉由例如,降解生物活性核酸或促进其从循环过程中排出,而降低该具有生物活性之核酸之生体可用率。共同施用核酸与载剂化合物(后者物质通常使用过量)可以大幅降低肝脏、肾脏或其他外循环器官之核酸回收量,可能归因于载剂化合物与核酸竞争共用受体所致。例如,当与聚肌苷酸、葡聚糖硫酸盐、聚胞苷酸或4-乙酰胺基-4'异硫氰酰基-芪-2,2'-二磺酸共同施用,可减少肝脏组织回收部分硫代磷酸dsRNA (Miyao等, DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura等, DsRNA&Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

[0575] vi. 赋形剂

[0576] 与载剂化合物相反,「医药载剂」或「赋形剂」为递送一或多种核酸至动物体之医药上可接受之溶剂、悬浮剂或任何其他医药惰性载剂。赋形剂可呈液态或固态,并依意欲之施用方式选择,以在与核酸及指定之药物组合物中其他组分组合时提供所需之填充体积、坚实度等等。典型医药载剂包括但不限于,结合剂(例如,预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟基丙基甲基纤维素等等); 填料(例如,乳糖与其他糖类、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等等); 润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石、硅石、胶体二氧化硅、硬脂酸、硬脂酸金属盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等等); 崩解剂(例如,淀粉、淀粉乙醇酸钠等等); 与湿化剂(例如,月桂基硫酸钠等等)。

[0577] 亦可使用适合非肠胃道外施用且不与核酸有不利反应之医药上可接受之有机或无机赋形剂来调配本发明组合物。合适之医药上可接受之载剂包括但不限于,水、盐溶液、醇类、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等等。

[0578] 供局部施用核酸之调配物可包括无菌与非无菌水溶液、于常用溶剂(如醇类)中之非水性溶液或含核酸之液态或固态油基质溶液。溶液中亦可包含缓冲剂、稀释剂与其他合适添加剂。可使用适合非-肠胃道外施用且不会与核酸有不利反应之医药上可接受之有机或无机赋形剂。

[0579] 合适之医药上可接受之赋形剂包括但不限于,水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等等。

[0580] vii. 其他组分

[0581] 本发明组合物可再包含药物组合物中常用且相关技艺上已建立用量之其他辅助组分。因此例如,组合物可再包含其他可相容之医药活性材料,如,例如,止痒剂、收敛剂、局部麻醉药或消炎剂,或可包含其他适用于物理性调配本发明组合物各种不同剂型之材料,如染料、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、不透明剂、增稠剂与稳定剂。然而,当添加所述材料时,不应不当干扰本发明组合物中组分之生物活性。调配物可经过杀菌,且若需要时,可与不会与调配物之核酸(群)出现不良交互作用之辅剂混合,例如,润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿化剂、乳化剂、影响渗透压之盐类、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香物质等等。

[0582] 水性悬浮液可包含提高悬浮液粘度之物质,包括例如,羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和/或葡聚糖。该悬浮液亦可包含稳定剂。

[0583] 在一些实施例中,如本发明所说明特征之药物组合物包括(a)一或多种iRNA化合物与(b)一或多种其功能为非RNAi机制且适用于治疗溶血病症之制剂。所述制剂实例包括但不限于,消炎剂、抗脂肪变性剂、抗病毒剂和/或抗纤维化剂。此外,亦可使用其他常用于保护肝脏之物质(如:水飞蓟(silymarin))与本文说明的iRNA组合使用。其他适用于治疗肝脏疾病之制剂包括替比夫定(telbivudine)、恩替卡韦(entecavir)与蛋白质酶抑制剂(如特拉匹韦(telaprevir)),及其他揭示于例如,Tung等,美国申请公开案号2005/0148548、2004/0167116、及2003/0144217;及Hale等,美国申请公开案号2004/0127488。

[0584] 所述化合物之毒性与医疗效力可采用标准医药制程,于细胞培养中或实验动物中测定,例如,测定LD50(造成50%群体死亡时的剂量)与ED50(有效医疗50%群体时的剂量)。毒性与医疗效应之间的剂量比值即为医疗指数,以LD50/ED50比值表示。以医疗指数高之化合物为优选。

[0585] 可采用由细胞培养分析法与动物研究得到之数据来调配用于人类的剂量范围。如本发明所说明特征之组合物的剂量通常落在包括极低毒性或无毒性之ED50之循环浓度范围内。剂量可依所采用剂型及所利用之施用途径,在此范围内变化。如本发明所说明特征的方法所使用任何化合物之医疗有效剂量可先从细胞培养分析法估测。可在动物模式中调配剂量,以使该化合物或若适当时使标靶序列之多肽产物之循环血浆浓度达到(例如,造成多肽浓度降低)包括细胞培养物所决定ISERPINC10(亦即试验化合物使症状达到一半最大抑制性时之浓度)在内之范围。所述资讯可用于更精确决定适用于人类的剂量。可藉由例如,高效液相层析法测定血浆浓度。

[0586] 除了如上述施用法外,如本发明所说明特征的iRNA可与其他已知可有效治疗受SERPINC1表达所介导之病理过程之制剂组合施用。任何情况下,施用之医师均可依据采用本领域已知或本文所说明标准效力测定法所观察到之结果来调整iRNA之施用量与施用时间。

[0587] VI. 套组

[0588] 本发明亦提供一种实施任何本发明方法之套组。所述套组包括一或多种RNAi剂与使用说明书,例如,指示施用预防或治疗有效量的RNAi剂之说明书。该套组任选地再包含施用RNAi剂之方式(例如,注射装置)或测定Serpinc1抑制性之方式(例如,测定Serpinc1 mRNA、Serpinc1蛋白质和/或Serpinc1活性之方式)。所述测定Serpinc1抑制性之方式可能包括从受试者取得样本,如,例如,血浆样本之方式。本发明套组任选地进一步包含测定治疗有效量或预防有效量之方式。

[0589] 除非另有说明,否则本文中所有技术与科学术语均如熟悉本发明所属相关技术者咸了解之相同定义。虽然可在操作或试验如本发明所说明特征的iRNA与方法时使用类似或等同如本文所说明之那些方法与材料,但下文仍将说明合适的方法与材料。本文所述及所有公开文献、专利申请、专利、及其他参考文献之完整内容已通过提述完全并入本文。此外,该等材料、方法、及实例仅供举例说明,并未加以限制。

[0590] 实例

[0591] 表1:所显示核酸序列中所采用的核苷酸单体缩写。咸了解,所述单体当存在于寡核苷酸中时,系利用5'-3'-磷酸二酯键彼此互相连接。

[0592]

缩写	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	鸟苷-3'-磷酸

缩写	核苷酸
Gf	2'-氟鸟苷-3'-磷酸
Gfs	2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸
Gs	鸟苷-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
Ufs	2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸
Us	尿苷-3'-硫代磷酸
[0593] 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-甲基鸟苷-3'-磷酸
gs	2'-O-甲基鸟苷-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	硫代磷酸酯键
L96	N-[参(GalNAc-烷基)-酰胺基癸酰基]-4-羟基脯胺醇 Hyp-(GalNAc-烷基)3

[0594] 实例1:对健康人体施用单剂AT3SC-001

[0595] 由24位健康人类自愿者分成3:1组(活性物组:安慰剂组),接受一剂0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.6mg/kg或1.0mg/kg之AT3SC-001(正义(5'至3'):GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96(SEQ ID NO:13);反义(5'至3'):usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg(SEQ ID NO:14))。于施用后第0、1、2、3、7、10、14、21、28、42、56和70天收集血浆样本,以监测AT蛋白质水平、AT活性、及AT蛋白质静默效力持续期。采用ELISA监测AT蛋白质水平,及使用校正自动化凝血酶测定系统(Calibrated Automated Thromboscope)产生凝血酶产生曲线(组织因子=1pM),监测AT活性程度。计算每位受试者之峰值凝血酶相对于施用前之两个峰值凝血酶平均值之倍数变化。

[0596] 没有严重之不良反应,有3位出现之轻度不良反应似乎与所施用制剂无关,有1位之轻度不良反应(头痛)可能与所施用之制剂有关。没有注射部位反应,且所有受试者之身体检查、生命迹象、及心电图均在正常限值内。此外,所有受试者在试验期间之所有肝功能检测、总胆红素含量、凝血酶原时间之国际标准化比值(P T/INR)、血小板计数、血红素含量、及凝血检测(亦即活化之部分凝血质时间(APTT)、凝血酶原时间(P T)、纤维蛋白原含量、及纤维蛋白D-二聚体含量)均没有变化,且均在正常限值内。

[0597] 图1A至图1D与第2A至2B图显示单剂0.03mg/kg之AT3SC-001造成AT蛋白质水平降低约20%，且至高33% (图2A及图2B)，且相应地降低AT活性 (图1A至图1D)，维持下降超过60天。

[0598] 图3进一步证实AT敲低与峰值凝血酶产生之间有显著相关性。明确言之，观察到峰值凝血酶产生增加高达152%，峰值凝血酶平均最高增加138%±8.9% (平均值±SEM)。此外，当随着AT持续减弱而增加凝血酶产生时，因子VIII或IX之含量仍正常。

[0599] 实例2:对患有血友病A或B之人体施用多重剂量之AT3SC-001

[0600] 第I期-临床试验B、C和D部分

[0601] AT3SC-001 (正义 (5' 至3') :GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO:13); 反义 (5' 至3') :usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO:14)) 之第I期临床试验B部分,由三位患有血友病A (n=2) 或B (n=1) 患者接受每周皮下施用0.015mg/kg之AT3SC-001持续三周 (15微克/kg qwx3;15mcg/kg);六位患有血友病A患者每周接受皮下施用0.045mg/kg之AT3SC-001连续三周 (45微克/kg qwx3;45mcg/kg);及三位患有血友病A (n=2) 或B (n=1) 患者接受每周皮下施用0.075mg/kg之AT3SC-001连续三周 (75微克/kg qwx3;75mcg/kg)。

[0602] AT3SC-001 (正义 (5' 至3') :GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO:13); 反义 (5' 至3') :usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO:14)) 之第I期临床试验之C部分,由三位患有血友病A (n=2) 或B (n=1) 患者接受每个月皮下施用0.225mg/kg剂量之AT3SC-001连续三个月 (225微克/kg qmx3;225mcg/kg);三位患有血友病A (n=2) 或B (n=1) 患者接受每个月皮下施用0.450mg/kg剂量之AT3SC-001连续三个月 (450微克/kg qmx3;450mcg/kg);三位患有血友病A患者接受每个月皮下施用0.900mg/kg剂量之AT3SC-001连续三个月 (900微克/kg qmx3;900mcg/kg);三位患有血友病A患者接受每个月皮下施用1.800mg/kg剂量之AT3SC-001连续三个月 (1800微克/kg qmx3;1800mcg/kg);及六位患有血友病A (n=3) 或B (n=3) 患者接受每个月一次皮下施用固定剂量80mg之AT3SC-001连续三个月 (80mg qMx3)。

[0603] AT3SC-001 (正义 (5' 至3') :GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO:13); 反义 (5' 至3') :usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO:14)) 之第I期临床试验D部分,由六位患有带抑制剂的血友病A (n=5) 或B (n=1) 并利用绕过剂 (BPA) 处理出血之患者接受每个月皮下施用固定剂量50mg之AT3SC-001连续三个月 (50mg qMx3);及10位患有血友病A并利用绕过剂 (BPA) 处理出血之患者接受每个月皮下施用固定剂量80mg之AT3SC-001连续三个月 (80mg qMx3)。

[0604] 于施用AT3SC-001后收集血浆样本,以监测AT蛋白质水平、AT活性、及AT蛋白质静默效力持续期。采用ELISA监测AT蛋白质水平,及使用校正自动化凝血酶测定系统 (Calibrated Automated Thromboscope) 产生凝血酶产生曲线 (组织因子=1pM),监测AT活性程度。计算每位受试者之峰值凝血酶相对于施用前之两个峰值凝血酶平均值之倍数变化。

[0605] 参与该试验B、C和D部分之患者之人口统计资料与基线特征提供于表2。

[0606] 表2. 参与试验者之人口统计资料与基线特征

	B部分 皮下 每周 × 3			C部分 皮下 每个月 × 3				D部分 皮下 每个月 × 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
[0607] 年龄, 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	2	6	2	2	2	3	3	3	5	10
血友病B	1	0	1	1	1	0	0	3	1	0
重度	3	6	3	2	3	2	3	5	6	10
中度	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
体重(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

[0608] 该试验之B、C和D部分中,没有出现严重副作用、没有中断、没有注射部位反应,且所有患者之身体检查、生命迹象和心电图均在正常限值内。此外,所有患者在试验期间之所有肝功能检测与全套血液检查均没有变化,并均在正常限值内。本试验期间,亦没有任何患者出现血栓事件,且纤维蛋白D-二聚体含量没有出现临床上显著增加。任何出血事件均被施用之标准置换因子或绕过剂成功处理。此外,没有病例形成抗药物抗体(ADA)。

[0609] 15mcg/kg、45mcg/kg和75mcg/kg组中AT程度减弱系以平均AT相对于基线之减弱表示,如图4所示。图4证实每周剂量0.015mg/kg之AT3SC-001连续三周造成平均最大AT敲低 $29\% \pm 12\%$ (平均值 \pm SEM)。最大AT敲低至高53%。图4亦证实每周剂量0.045mg/kg之AT3SC-001连续三周造成平均最大AT敲低 $55 \pm 9\%$ (平均值 \pm SEM),且最大AT敲低86%。此外,图4亦证实每周剂量0.075mg/kg之AT3SC-001连续三周造成平均最大AT敲低 $61 \pm 8\%$ (平均值 \pm SEM),且最大AT敲低74%。

[0610] 225mcg/kg、450mcg/kg、900mcg/kg、1800mcg/kg和80mg组之AT水平的敲低以平均AT敲低相对于基线表示,如图5A所示。图5A证实每个月剂量0.225mg/kg之AT3SC-001连续三个月造成平均最大AT敲低 $70\% \pm 9\%$ (平均值 \pm SEM)。最大AT敲低多至80%。图5A亦证实每个月剂量0.450mg/kg之AT3SC-001连续三个月造成平均最大AT敲低 $77 \pm 5\%$ (平均值 \pm SEM),且最大AT敲低85%。此外,图5A亦证实每个月剂量0.900mg/kg之AT3SC-001连续三个月造成平均最大AT敲低 $78 \pm 7\%$ (平均值 \pm SEM),且最大AT敲低88%。此外,图5A证实每个月剂量1.800mg/kg之AT3SC-001连续三个月造成平均最大AT敲低 $79 \pm 3\%$ (平均值 \pm SEM),且最大AT敲低84%。图5A亦证实每个月剂量80mg之AT3SC-001连续三个月造成平均最大AT敲低 $87 \pm 1\%$ (平均值 \pm SEM)。

[0611] 由AT3SC-001剂量对AT蛋白质水平相对最低点作图之图5B所证实,对人类患者施用AT3SC-001可随剂量变化降低AT蛋白质水平。

[0612] 评价健康人类自愿者(实例1)及患有血友病A或B的受试者之凝血酶产生时,证实每周剂量之AT3SC-001造成血友病受试者之凝血酶产生增加达334% (相对于基线值),凝血

酶产生平均增加 $112 \pm 38\%$ ($p < 0.05$) (相对于基线值), 而此时AT敲低 $\geq 50\%$ (图5B)。图6A证实接受每周剂量施用AT3SC-001之血友病A或B受试者所达到之最大峰值凝血酶系在正常受试者之凝血酶产生量之低范围内。

[0613] 来自一位受试者(受试者101-009)之全血之ROTEM®血栓弹性分析(参见例如, Young等, (2013) Blood 121:1944)证实每周施用 0.045mg/kg 之AT3SC-001连续3周时, 不仅提高凝血酶形成峰值, 而且亦显著且持续改善全血之血块形成, 此点由血块形成时间及凝血时间缩短可证实(图7)。受试者101-009从第2天起即没有发生出血事件, 且持续47天均没有出血。

[0614] AT下降四分位数时之凝血酶产生(B与C部分)之事后分析(post-hoc analysis)证实, 在AT下降最高四分位数(AT下降 $>75\%$)时, 平均凝血酶产生相对于基线增加 289% (图9)。此凝血酶产生水平在健康自愿者所观察到之凝血酶产生的范围内。

[0615] 以三位患者之小组试验探讨施用AT3SC-001与施用因子VIII之等效性。简言之, 对三位患者分别施用因子VIII, 并在施用后-0.5、1、2、6、24和48小时收集患者血浆。分析每位受试者样本之因子VIII含量与凝血酶产生量, 并用于建立个别化之因子VIII-峰值凝血酶产生的相关性。然后采用此数据与施用AT3SC-001时所达成之峰值凝血酶产生比较。如图10A至图10C所示, 施用AT3SC-001足以使受试者达到之峰值凝血酶产生系与对该受试者施用因子VIII时所达到程度大约相同, 并足以使超过约 40% 受试者达到峰值凝血酶产生。

[0616] 由AT下降四分位数(B与C部分)时之出血事件事后分析证实, 出血倾向随着AT下降程度的增加而减少, 在AT下降四分位数的最高时, 平均估算年出血率(ABR)为 5 ± 2 (中值=1) (图11)。此分析包括16位患者中AT下降 $>75\%$ 之超过1100累计天数。

[0617] 亦在C部分组进行出血事件事后分析。图12提供本分析所采用之患者数据。如图13A所证实, 参与C组且接受预防性(PPx)置换因子之所有患者之历史中值ABR为2, 而参与C组且依需要接受(OD)置换因子之所有患者之历史中值ABR为28。对所述患者施用AT3SC-001造成中值ABR显著下降。特别是, 在观察期间(第29天至最后一次试验访诊或最后一剂+56天, 以先到的时间为准)施用AT3SC-001, 所产生报告零出血之患者中值为 53% , 而在观察期间报告零自发性出血之患者中值为 82% 。图13B证实C组中每个月接受 80mg 剂量之AT3SC-001及接受预防性(PPx)置换因子之患者之中值历史ABR为6。然而施用AT3SC-001后, 观察期间之中值ABR为0。

[0618] 第I期试验之D部分, 在患有血友病A或B且已对置换因子发展出抗体(抑制剂)且因此对置换凝血因子之治疗有难治性之患者中评估施用AT3SC-001之效应。因此, 为了在施用AT3SC-001之前先评估所述患者之峰值凝血酶反应, 由分配至 50mg 组之患者接受施用标准绕过剂(BPA) (例如, 经活化的凝血酶原复合物浓缩物(APCC) 和/或重组活化之FVII(rFVIIa)), 于施用BPA之后-1、2、6和24小时收集血浆样本, 分析样本之凝血酶产生。如图14A至图14F所示, 带抑制剂且接受施用AT3SC-001之患者之AT下降与凝血酶产生量相当于非带抑制剂患者接受施用类似剂量AT3SC-001后所观察到之AT下降与凝血酶产生。此外, 图14A至图14F证实施用AT3SC-001后之凝血酶产生持续超过施用BPA时所达到之暂时水平。

[0619] 如图15所证实, 在带抑制剂的血友病患者中, 每个月一次皮下施用 50mg 与 80mg 之AT3SC-001, 可随剂量变化, 使AT下降约 80% 。此外, 如图16所证实, 接受施用AT3SC-001之患者所达成之AT下降效应系与增加凝血酶产生有相关性。

[0620] 亦在该试验之D部分之患者中进行出血事件之事后分析。图17A显示,患有带抑制剂的血友病A或B患者接受每个月一次施用剂量50mg或80mg之AT3SC-001时,造成试验前ABR显著下降。此外,如图17B证实,第I期试验D部分中所有接受施用AT3SC-001之带抑制剂患者之中值年出血率(ABR)为0,且56%患者没有出血,69%患者经历零自发性出血。

[0621] 总而言之,带与不带抑制剂的血友病A与B患者对AT3SC-001之耐受性良好。没有与试验药物相关之SAE,且没有血栓事件。数据证实其在非带抑制剂患者中具有临床活性且修正血友病表型。数据进一步证实,以随计剂量变化之方式,使AT下降及增加凝血酶产生,其中每个月一次皮下施用疗程及施用固定50mg或80mg剂量之AT3SC-001,使AT持续下降约80%。

[0622] 此外,数据证实对带抑制剂患者施用AT3SC-001会造成AT下降及增加凝血酶产生,此点与非带抑制剂患者一致,且凝血酶产生持续增加超过施用BPA时暂时达到之程度。

[0623] 实例3:对患有血友病A或B之人类患者施用多重剂量之AT3SC-001

[0624] 第II期开放标签延伸(OLE)临床试验

[0625] 在AT3SC-001(正义(5'至3'):GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96(SEQ ID NO:13);反义(5'至3'):usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg(SEQ ID NO:14))之第II期OLE试验中,曾于上述第I期临床试验B与C部分中接受施用AT3SC-001之具有或不具有抑制剂患者可合格参与第II期开放标签延伸(OLE)研究。来自第I期试验B部分之15位患有不带抑制剂的血友病A或B患者已接受每周皮下施用0.015mg/kg之AT3SC-001连续三周(15微克/kg qwx3;15mcg/kg);或已接受每周皮下施用0.045mg/kg之AT3SC-001连续三周(45微克/kg qwx3;45mcg/kg);或已接受每周皮下施用0.075mg/kg之AT3SC-001连续三周(75微克/kg qwx3;75mcg/kg);及来自第I期试验C部分之18位患有不带抑制剂的血友病A或B患者已接受每个月皮下施用0.225mg/kg剂量之AT3SC-001连续三个月(225微克/kg qmx3;225mcg/kg);或已接受每个月皮下施用0.450mg/kg剂量之AT3SC-001连续三个月(450微克/kg qmx3;450mcg/kg);或已接受每个月皮下施用0.900mg/kg剂量之AT3SC-001连续三个月(900微克/kg qmx3;900mcg/kg);或已接受每个月皮下施用1.800mg/kg剂量之AT3SC-001连续三个月(1800微克/kg qmx3;1800mcg/kg);或已接受每个月皮下施用固定剂量80mg之AT3SC-001连续三个月(80mg qMx3);及来自第I期试验D部分之16位患有带抑制剂的血友病A或B患者已接受每个月皮下施用固定剂量50mg之AT3SC-001连续三个月(50mg qMx3);或已接受每个月皮下施用固定剂量80mg之AT3SC-001连续三个月(80mg qMx3),均合格参与本试验。

[0626] 33位参与本试验之患者中有29位患者继续试验,5位患者中止试验(4位撤回同意书及与1位归因AE)。10位患有不带抑制剂的血友病A(n=7)或血友病B(n=3)患者接受每个月皮下施用固定剂量50mg之AT3SC-001连续三个月(50mg qMx3);及9位患有不带抑制剂的血友病A(n=7)或血友病B(n=2)患者接受每个月皮下施用固定剂量80mg之AT3SC-001连续三个月(50mg qMx3)。同样地,3位患有带抑制剂的血友病A(n=3)患者接受每个月皮下施用固定剂量50mg之AT3SC-001连续三个月(50mg qMx3);及11位患有带抑制剂的血友病A(n=11)或血友病B(n=1)患者接受每个月皮下施用固定剂量80mg之AT3SC-001连续三个月(50mg qMx3)。参与本试验之患者之人口统计资料、基线特征及曝露到AT3SC-001之连续时间期示于下表3。

[0627] 表3. 参与试验者之人口统计资料与基线特征

[0628]		不带抑制剂患者		带抑制剂患者	
		50 mg [†] N=10	80 mg [†] N=9	50 mg [†] N=3	80 mg [†] N=11
	年龄, 岁; 平均值(范围)	36 (19-61)	40 (24-58)	31 (22-36)	34 (21-41)
[0629]	体重, kg; 平均值(范围)	78 (58-94)	73 (58-80)	82 (70-100)	72 (52-108)
	血友病A	7	7	3	10
	血友病B	3	2	-	1
	重度	9	7	3	11
	中度	1	2	-	-
	阳性C型肝炎病史	8	8	2	9
	暴露月数; 中值(范围)	13 (5-20)	14 (3-18)	11 (5-12)	6 (0-12)

[0630] 在第II期OLE中, 不带抑制剂之患者一般可良好耐受AT3SC-001。有6位患者报告严重不良事件 (SAE), 其中2件SAE被视为可能与施用AT3SC-001有关; 其中一位患有慢性HCV感染的受试者出现ALT与AST升高, 随后停止试验, 其中一位有癫痫病史的受试者患者出现发作意识混乱。没有血栓事件或病理性血块形成之实验室证据。大部分不良事件 (AE) 之严重性为轻度或中度, 且与施用AT3SC-001无关。在11位患者中观察到无症状之丙氨酸氨基转氨酶 (ALT) 升高, 超过3倍正常上限值 (ULN), 胆红素没有同时上升超过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换因子或绕过剂成功处理。此外, 没有任何病例形成抗-药物抗体 (ADA)。

[0631] 图18、图19A与图19B进一步证实所施用AT3SC-001之临床活性。明确言之, 如图18所证实, 每个月一次皮下施用80mg之AT3SC-001可以持续达到AT下降。如图19A所证实, 每个月一次皮下施用50mg或80mg之AT3SC-001可依剂量变化, 在低的患者之间变异性下, 使AT下降~80%, 且如图19B所证实, 每个月一次皮下施用50mg或80mg之AT3SC-001, 可使凝血酶产生量达到正常范围之下限值。

[0632] 在第II期OLE试验中, 带抑制剂与不带抑制剂患者亦进行出血事件之事后分析。图20A显示, 对患有不带抑制剂的血友病A或B患者每个月一次施用剂量50mg或80mg之AT3SC-001, 造成试验前ABR显著下降, 且图20B显示, 对患有带抑制剂的血友病A或B患者每个月一次施用剂量50mg或80mg之AT3SC-001, 造成试验前ABR显著下降。综合参与OLE试验之所有患者之中值ABR, 48% (16/33) 患者在观察期没有出现出血, 且观察期间之整体中值ABR为1。此外, 67%患者在观察期报告零自发性出血, 且观察期间之整体ABR为0。带与不带抑制剂患者在OLE试验期间出现出血事件之特征示于图21。当抗凝血酶下降 $\geq 75\%$ 时, 分析受试者之出血事件。

[0633] 图22提供处理不带抑制剂的血友病A或B患者所出现出血事件之细节, 且图23提供处理带抑制剂的血友病A或B患者所出现出血事件之细节。惊人地发现, 患有不带抑制剂的血友病A或B受试者与患有带抑制剂的血友病A或B受试者接受施用每个月一次剂量50mg或80mg之AT3SC-001时, 其出现出血事件时, 所需要的置换因子或绕过剂剂量显著低于用于治疗出血之建议剂量, 例如, 较低剂量之因子VIII或较低剂量之aPCC。

[0634] 总言之,带与不带抑制剂的血友病A与B患者一般均可良好耐受AT3SC-001。此外,数据证实AT3SC-001在每个月一次皮下施用50mg与80mg下具有临床活性,可随剂量变化,使AT下降达到~80%,且患者之间变异性低,凝血酶产生量达到正常范围之下限值。此外,患有具有或不具有抑制剂之血友病A或B患者中,出血事件之探索性事后分析证实,施用AT3SC-001使中值ABR降至1,及中值年自发性出血率(AsBR)降至零。在观察期间,33位患者中有16位(48%)患者没有出现出血,33位患者中有22位(67%)为零自发性出血。所有出血事件均使用置换因子或绕过剂成功处理。

[0635] 实例4:最新出血处理施用原则:降低置换因子/绕过剂剂量

[0636] 从上文所示第I期与第I/II期OLE试验所得数据证实,对患有带与不带抑制剂的血友病A或B受试者每个月一次皮下施用固定剂量50mg或80mg之AT3SC-001时,均一致使AT下降约80%,且AT下降及凝血酶产生量上升与依随剂量变化。

[0637] 电脑模拟数据支持所述观察,预测可因应AT程度下降而加强凝血酶产生,包括在在有些实施例中,AT程度下降约75%或低于75%。来自带与不带抑制剂的血友病A与B患者之血浆样本所得数据显示,对患者施用AT3SC-001后,会因应置换因子与绕过剂而加强凝血酶产生。此外,临床数据证实,患有不带抑制剂的血友病A或B患者(图22)与患有带抑制剂的血友病A或B患者(图23)接受每个月一次施用AT3SC-001剂量50mg或80mg,且出现出血事件者使用置换因子或绕过剂的剂量低于处理出血之建议剂量,例如,较低剂量之因子VIII或较低剂量之因子IX或较低剂量之延长半衰期因子IX或较低剂量之重组因子VIIa或较低剂量之aPCC。

[0638] 图24A至图24D所示其他临床出血处理数据进一步证实接受施用AT3SC-001与较低量的置换因子或绕过剂的受试者成功治疗出血。

[0639] 因此,本文呈现之数据支持对接受施用AT3SC-001,亦即接受每个月施用固定皮下剂量50mg或80mg的受试者(例如,其中对该受试者施用之dsRNA剂可使Serpinc1活性降低约75%或更多)施用较低剂量的置换因子或绕过剂。因此,如表4所示,对每个月接受皮下剂量50mg或80mg之AT3SC-001的受试者之处理出血原则已经更新,且所述出血将可使用较低剂量的置换因子或绕过剂处理。

[0640] 例如,为患有不带抑制剂的血友病A受试者治疗出血(例如,中度出血或重度出血)时,置换因子(因子VIII)的建议有效量为约30至50IU/kg。然而,为患有血友病A且接受每个月施用固定皮下剂量之50mg或80mg之AT3SC-001的受试者(例如,其中施用该受试者之dsRNA剂可使Serpinc1活性降低约75%或更多)治疗出血(例如,中度出血或重度出血)时,可使用剂量约5至约20IU/kg之因子VIII。对患有不带抑制剂的血友病B的受试者治疗出血(例如,重度出血)的置换因子(因子IX或延长半衰期因子IX)的建议有效量为约65至130IU/kg。然而,为患有血友病B且接受每个月施用固定皮下剂量之50mg或80mg之AT3SC-001的受试者(例如,其中施用该受试者之dsRNA剂可使Serpinc1活性降低约75%或更多)治疗出血(例如,重度出血)时,可使用剂量约10至约30IU/kg之因子IX或延长半衰期因子IX。为患有带抑制剂的血友病A或B的受试者治疗出血(例如,中度出血或重度出血)之绕过剂(经活化的凝血酶原复合物浓缩物;aPCC)的建议有效量为约100U/kg。然而,为患有带抑制剂的血友病A或B且接受每个月施用固定皮下剂量之50mg或80mg之AT3SC-001的受试者(例如,其中施用该受试者之dsRNA剂可使Serpinc1活性降低约75%或更多)治疗出血(例如,中度出血或

重度出血)时,可使用剂量约30至约50U/kg之aPCC。为患有带抑制剂的血友病A或B受试者治疗出血(例如,中度出血或重度出血)之绕过剂(重组因子VIIa;rFVIIa)的建议有效量为约90微克/kg。然而,为患有带抑制剂的血友病A或B且接受每个月施用固定皮下剂量50mg或80mg之AT3SC-001的受试者(例如,其中施用该受试者之dsRNA剂使Serpinc1活性降低约75%或更多)治疗出血(例如,中度出血或重度出血)时,可使用剂量约10至约45μg/kg之rFVIIa。

[0641] 表4.最新出血处理原则

[0642]

	因子VIII	因子IX 标准半衰期	因子IX 延长半衰期	aPCC	重组因子VIIa
建议单剂	10 IU/kg	20 IU/kg	20 IU/kg	30 U/kg	≅45μg/kg
单剂不应超过	20 IU/kg	30 IU/kg	30 IU/kg	50 U/kg	45μg/kg

[0643]

重复剂量指示	在施用第二剂之前强制通知临床试验中心 考量在临床试验中心之评估与治疗 (参见第5.4节)				在施用第三剂之前强制通知 试验地点
	不应在短于 24小时之内 重复	不应在短于 24小时之内 重复	不应在短于 5至7天之内 重复	不应在短于 24小时之内 重复	不应在短于2 小时之内重复
	若需要2剂以上,应在48-72小时内 出现在地点 (参见评估之SOA)				若需要3剂以上,应在48-72 小时内出现在 地点
<p>需要更高剂量、更高施用频率、多次重复剂量时, 建议与医学试验负责人及临床指导人讨论,并应考虑AT置换</p> <p>抗纤维蛋白溶酶剂不可与因子或BPA合并使用</p>					

[0644] 注:rFVIIa及aPCC已完整包括在内。出血发作之辅助处理应依据标准照护法进行。

[0645] 预期所述不带抑制剂患者将例行接受FVIII与FIX处理。

[0646] 实例5:在用AT3SC-001治疗用于治疗血友病A的人类患者的血浆中增加绕过剂的凝血酶产生响应

[0647] 如实例4所示,从带与不带抑制剂的血友病A患者血浆样本中得到之数据显示,继AT3SC-001之后对患者施用置换因子与绕过剂(BPA),会加强凝血酶产生反应。特别是,从第II期OLE试验所得数据证实,增加使用BPA时,皮下施用AT3SC-001可使施用后之血浆样本中之凝血酶产生比施用前血浆样本加强;此表示可能使用较低剂量之BPA来达成类似之止血效应。

[0648] 为了在来自接受AT3SC-001-介导AT下降之患者之选定血浆样本中探讨其因应BPA之凝血酶产生反应,在使用AT3SC-001治疗之前及之后,从8位血友病A患者(7位不带抑制剂,1位带抑制剂)中收集没有血小板之血浆。采用以FXa-活性为主之显色分析法(SIEMENS INNOVANCE®抗凝血酶)测定患者血浆AT活性,并相对于正常收集之血浆校正。在离体

血浆中添加各种不同剂量之BPA:aPCC (0.5或1U/mL; 分别相当于剂量37.5与75U/kg) 或 rFVIIa (0.75、1.75或2.5 μ g/mL; 相当于剂量27、63与90 μ g/kg)。采用校正自动化凝血酶测定系统 (Calibrated Automated Thromboscope) 产生凝血酶产生曲线 (组织因子=1pM), 监测凝血酶产生反应与AT活性程度。所有试剂, 包括凝血酶校正剂、FluCa套组和PPP-试剂-低 (1pM组织因子[TF]与4 μ M磷脂) 均得自Thrombinoscope BV。

[0649] 图25A至图26N中呈现之数据证实, 藉由施用AT3SC-001, 在得自AT下降后的受试者之血浆样本中达成加强凝血酶产生。事实上, 单由AT下降即可提高峰值凝血酶产生。aPCC与 rFVIIa二者当加至接受经过AT3SC-001处理之患者血浆中时, 均造成峰值凝血酶产生呈线性增加。在带抑制剂 (图25A与图25B) 或不带抑制剂 (图26A-图26N) 之血友病A患者中, 较低剂量之aPCC即足以产生等同那些全剂量aPCC在AT3SC-001处理前血浆中所达到之峰值凝血酶产生。所有患者之血浆中, 在AT下降之血浆中添加所有用量之rFVIIa, 使凝血酶产生到达但仍低于正常范围之下限 (LLN)。

[0650] 总言之, 增加绕过剂时, 施用AT3SC-001可使施用后血浆样本之比施用前血浆样本加强凝血酶产生。所述结果进一步支持使用低于建议剂量之绕过剂剂量即可使在AT3SC-001治疗期间经历突破性出血之患者达成止血 (如上述实例4所述), 包括例如, 降低置换因子或绕过剂之初始剂量, 及降低置换因子或绕过剂之最大剂量、剂量之间之最小间隔、及在小于24小时时间间隔时间内不再重复施用置换因子或绕过剂 (rFVIIa除外)。

[0651] 实例6: 在AT下降与因子置换并行下预估凝血酶产生之定量系统药理学 (Quantitative Systems Pharmacology (QSP))

[0652] 血友病A与B为特征在于分别归因于因子VIII与IX缺陷以致凝血酶产生不足之出血病症。如上述, AT3SC-001为每个月一次皮下施用之研究用RNAi医疗剂, 其靶向抗凝血酶 (AT), 作为针对具有或不具有抑制剂之血友病A与血友病B患者改善凝血酶产生及促进止血之手段。尽管如此, 接受AT3SC-001之患者仍可能经历突破性出血, 而可能需要置换因子治疗。如上述, 临床数据与离体外加试剂数据支持使用低于建议剂量之绕过剂与置换因子, 以使在AT3SC-001治疗期间经历突破性出血之患者达成止血。

[0653] 为了进一步支持使用低于建议剂量之绕过剂与置换因子可使在AT3SC-001治疗期间经历突破性出血之患者达成止血, 并提供深入了解AT程度、因子施用和凝血酶形成 (TG) 之间之关系, 采用说明凝血级联作用之电脑模拟定量系统药理学 (QSP) 动态模式 (Nayak等 (2015) CPT:pharmacometrics&systems pharmacology 4.7:396-405) 来模拟离体凝血酶形成 (TG) 分析法。特别是, 该模式系由66个反应与106个参数说明, 改变初始血浆因子浓度来模拟血友病与罕见出血病症。此外, 由于受试者之间之血浆因子浓度变化 $\pm 50\%$, 因此采用蒙地卡罗法 (Monte Carlo method) 来模拟TG正常范围: 平均-140nM; 范围50-250nM。

[0654] 下表提供在各种不同疾病状态下用于建模之输入因子浓度。

[0655]

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

X	160 (100U/dL)	因子X缺陷	0.1,0.5,1,2,5,10,100
---	---------------	-------	----------------------

[0656] 如图27A至图27C所示,使用QSP模式产生之数据可预测随着AT下降之凝血酶形成(TG)。明确言之,TG之临床正常范围与QSP预测一致,并在AT下降之患者之临床测定值与模式预测之TG之间观察到相关性。图27A说明来自中期1(A至C部分)之测定TG结果,图27B说明模拟之TG(基于AT敲低),分别以AT下降四分位数框框表示。图27C为描绘模拟之TG数据与测定之TG数据之间有强力相关性之散点图。

[0657] 亦采用电脑模拟QSP模式来定量严重血友病A之TG、AT下降和因子VIII剂量之间之非线性关系(图28A)。显示随着AT下降与因子VIII施用剂量之TG热制图证实在使用AT3SC-001时所观察到之AT程度(10-25%)下,5至10IU/kg之间之因子VIII即足以达到正常TG(图28B)。同样地,显示随着AT下降与因子IX施用剂量之TG热制图证实在10-25%AT下,10至20IU/kg之因子IX即足以使TG标准化(图28C)。

[0658] 整合因子药物代谢动力学(单室模式)与QSP模式,以施用因子后之时间为函数,来模拟峰值凝血酶潜势(PTP)。图29B(20%基线AT)相对于图29A(100%AT)说明在严重血友病A患者中施用因子时之时间过程影响,并证实在突破性出血发作时,在施用FVIII后之最高时间点与最低时间点,AT下降均加强凝血酶产生。

序列表

<110> 建新公司 (Genzyme Corporation)

<120> 在患有血友病的受试者中治疗出血事件的方法和组合物

<130> 117811-02720

<140>

<141>

<150> 62/530,518

<151> 2017-07-10

<150> 62/599,223

<151> 2017-12-15

<150> 62/614,111

<151> 2018-01-05

<150> 62/673,424

<151> 2018-05-18

<160> 16

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 1599

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

```
tctgccccac cctgtcctct ggaacctctg cgagatttag aggaaagaac cagttttcag 60
gcggattgcc tcagatcaca ctatctccac ttgccagcc ctgtggaaga ttagcggcca 120
tgtattccaa tgtgatagga actgtaacct ctggaaaaag gaaggtttat cttttgtcct 180
tgctgctcat tggcttctgg gactgcgtga cctgtcacgg gagccctgtg gacatctgca 240
cagccaagcc gcgggacatt cccatgaatc ccatgtgcat ttaccgctcc ccggagaaga 300
aggcaactga ggatgagggc tcagaacaga agatcccgga ggccaccaac cggcgtgtct 360
gggaactgtc caaggccaat tcccgtttg ctaccacttt ctatcagcac ctggcagatt 420
ccaagaatga caatgataac attttctgt caccctgag tatctccacg gcttttgcta 480
tgaccaagct ggggtgcctgt aatgacaccc tccagcaact gatggaggta ttttaagtttg 540
acaccatatc tgagaaaaca tctgatcaga tccacttctt ctttgccaaa ctgaactgcc 600
gactctatcg aaaagccaac aaatcctcca agttagtatc agccaatcgc ctttttgag 660
acaaatccct taccttcaat gagacctacc aggacatcag tgagttggta tatggagcca 720
agctccagcc cctggacttc aaggaaaatg cagagcaatc cagagcggcc atcaacaaat 780
gggtgtccaa taagaccgaa ggccgaatca ccgatgtcat tccctcggaa gccatcaatg 840
agctcactgt tctgggtgctg gttaacacca tttacttcaa gggcctgtgg aagtcaaagt 900
tcagccctga gaacacaagg aaggaactgt tctacaaggc tgatggagag tcgtgttcag 960
catctatgat gtaccaggaa ggcaagttcc gttatcggcg cgtggctgaa ggcaccagc 1020
```

tgcttgagtt gcccttcaaa ggtgatgaca tcacatggt cctcatcttg cccaagcctg 1080
 agaagagcct ggccaaggta gagaaggaaac tcaccccaga ggtgctgcaa gaggggctgg 1140
 atgaattgga ggagatgatg ctgggtggtcc acatgccccg cttccgcatt gaggacggct 1200
 tcagtttgaa ggagcagctg caagacatgg gccttgctga tctgttcagc cctgaaaagt 1260
 ccaaactccc aggtattgtt gcagaaggcc gagatgacct ctatgtctca gatgcattcc 1320
 ataaggcatt tcttgaggta aatgaagaag gcagtgaagc agctgcaagt accgctgttg 1380
 tgattgctgg ccgttcgcta aaccccaaca gggtgacttt caaggccaac aggcctttcc 1440
 tggtttttat aagagaagtt cctctgaaca ctattatctt catgggcaga gtagccaacc 1500
 cttgtgttaa gtaaaatgtt cttattcttt gcacctcttc ctatttttgg tttgtgaaca 1560
 gaagtaaaaa taaatacaaa ctacttccat ctcacatta 1599

<210> 2

<211> 1545

<212> DNA

<213> 猕猴 (Macaca mulatta)

<400> 2

ggcacgagga ccatctccac ttgccagcc ctgtggaaga ttagcgacca tgtattccaa 60
 tgtgatagga accgtagcct ctggaaaaag gaaggtttat cttctgtcct tgctgctcat 120
 tggcctctgg gactgtatga cctgtcacgg gagccctgtg gacatctgca cagccaagcc 180
 gcgggacatt cccatgaatc ccatgtgcat ttaccgctcc ccggagaaga aggcaactga 240
 ggatgagggc tcagaacaga agatccccga ggccaccaac cggcgctctt gggaactgtc 300
 caaggccaat tcccgcttg ctaccacttt ctatcagcac ctggcagatt ccaagaacga 360
 caaggataac attttcctgt caccctgag tgtctccacg gcttttgcta tgaccaagct 420
 ggggtgcctgt aatgacaccc tcaagcaact gatggaggta ttttaagttg acaccatctc 480
 tgagaaaaca tctgatcaga tccacttctt ctttgccaaa ctgaactgcc gactctatcg 540
 aaaagccaac aaatcctcca agttagtatc agccaatcgc ctttttgag acaaatccct 600
 taccttcaat gagacctacc aggacatcag tgagttggta tacggagcca agctccagcc 660
 cctggacttc aaggaataat cagagcaatc cagagcggcc atcaacaaat ggggtgtccaa 720
 taagaccgaa ggccgaatca ccgatgtcat tccccggaa gccatcaacg agctcactgt 780
 tctgggtgctg gtaaacacca tttacttcaa gggcctgtgg aagtcaaagt ttagccctga 840
 gaacacaagg atggaaccgt tctacaaggc tgatggagag tcgtgttcag cgtctatgat 900
 gtaccaggaa ggcaagttct gttatcggcg cgtggctgaa ggcacccagg tgcttgagtt 960
 gcccttcaag ggtgatgaca tcacatggt gctcatctg cccaagcctg agaagagcct 1020
 gaccaagggt gagcaggaac tcaccccaga ggtgctgcag gaggggctgg atgagttgga 1080
 ggagatgatg ctgggtggtc acatgccccg cttccgcatt gaggacggct tcagtttgaa 1140
 ggagcagctg caagacatgg gccttgctga tctgttcagc cctgaaaagt ccaaactccc 1200
 aggtattgtt gcagaaggcc gggatgacct ctatgtctcc gatgcattcc ataaggcatt 1260
 tcttgaggta aatgaagaag gcagtgaagc agctgcaagt accgccattg ggattgctgg 1320
 ccgttcgcta aaccccaaca gggtgacctt caaggccaac aggcctttcc tggtttttat 1380
 aagagaagtt cctctgaaca ctattatctt catgggcaga gtagccaacc cttgtgtgag 1440

ctaaactggt cttattcttt gtacctcttc ctattttggt ttgtgaatag aagtaaaaat 1500
 aaatacaact actcccatct tacattaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1545
 <210> 3
 <211> 2171
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 3
 ataggtaatt ttagaaatag atctgatttg tatctgagac attttagtga agtggtgaga 60
 tataagacat aatcagaaga catatctacc tgaagacttt aaggggagag ctccctcccc 120
 cacctggcct ctggacctct cagatttagg ggaaagaacc agttttcgga gtgatcgtct 180
 cagtcagcac catctctgta ggagcatcgg ccatgtattc ccctggggca ggaagtgggg 240
 ctgctggtga gaggaagctt tgtctcctct ctctgctcct catcggtgcc ttgggctgtg 300
 ctatctgtca cggaaaccct gtggacgaca tctgcatagc gaagccccga gacatccccg 360
 tgaatccctt gtgcatttac cgctcccttg ggaagaaggc caccgaggag gatggctcag 420
 agcagaaggt tccagaagcc accaaccggc gggctctggga actgtccaag gccaatcgc 480
 gatttgccac taacttctac cagcacctgg cagactccaa gaatgacaac gacaacattt 540
 tcctgtcacc cttgagcatc tccactgctt ttgctatgac caagctgggt gcctgtaacg 600
 acactctcaa gcagctgatg gaggttttta aatttgatac catctccgag aagacatccg 660
 accagatcca cttcttcttt gccaaactga actgccgact ctatcgaaaa gccacaagt 720
 cctctgactt ggtatcagcc aaccgccttt ttggagacaa atccctcacc ttcaacgaga 780
 gctatcaaga tgtagtgag gttgtctatg gagccaagct ccagcccctg gacttcaagg 840
 agaatccgga gcaatccaga gtgaccatca acaactgggt agctaataag actgaaggcc 900
 gcatcaaaga tgcatccca cagggcgcca ttaacgagct cactgccctg gttctggtta 960
 acaccattta cttcaagggc ctgtggaagt caaagttcag ccctgagaac acaaggaagg 1020
 aaccgttcta taaggctgat gggcagtcac gccagtgcc tatgatgtac caggaaggca 1080
 aattcaaata ccggcgcgtg gcagagggca cccaggtgct agagctgccc ttcaaggggg 1140
 atgacatcac catggtgctc atcctgccc agcctgagaa gagcctggcc aaggtggagc 1200
 aggagctcac cccagagctg ctgcaggagt ggctggatga gctgtcagag actatgcttg 1260
 tgggtccacat gccccgcttc cgcaccgagg atggttcag tctgaaggag cagctgcaag 1320
 acatgggcct cattgatctc ttcagccctg aaaagtccca actcccagg atcgttgctg 1380
 gaggcaggga cgacctctat gtctccgacg cattccaca agcatttctt gaggtaaatg 1440
 aggaaggcag tgaagcagca gcgagtactt ctgtcgtgat tactggccgg tctactgaacc 1500
 ccaatagggt gaccttcaag gccaacaggc ctttctggt tcttataagg gaagttgcac 1560
 tgaacactat tatattcatg gggagagtgg ctaatccttg tgtgaactaa aatattctta 1620
 atctttgcac cttttcctac tttggtgttt gtgaatagaa gtaaaaataa atacgactgc 1680
 cacctcacga gaatggactt ttccacttga agacgagaga ctggagtaca gatgctacac 1740
 cacttttggg caagtgaagg gggagcagcc agccacggtg gcacaaacct atatcctggt 1800
 gcttttgaag gtagaagcag ggcggtcagg agttaaggcc agttgaggct gggctgcaga 1860
 gtgaaagacc atgtctcaag atggtctttc tcctcccca agtagaaaag aaaaccataa 1920

aaacaagagg taaatatatt actatttcat cttagaggat agcaggcatc ttgaaagggt 1980
 agagggacct taaattctca ttattgcccc catactacaa actaaaaaac aaacccgaat 2040
 caatctccca taaagacaga gattcaaata agagtattaa acgtttttatt tctcaaacca 2100
 ctcacatgca taatgttctt atacacagtg tcaaaaataaa gagaaatgca tttttataca 2160
 aaaaaaaaaa a 2171

<210> 4

<211> 1561

<212> DNA

<213>大鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400> 4

cggagggatt gctcagcact gtctccacgg cttctctgca gaagcgtcca ccatgtattc 60
 cccgggaata ggaagtgcgg ttgctggaga gaggaagctt tgtctcctct ctctgctact 120
 cattgggtgcc ttgggctgtg ctgtctgtca tggaaacct gtggacgaca tctgcatagc 180
 gaagccccga gacatccccg tgaaccccat gtgcatttac cgctcccctg cgaagaaggc 240
 cacggaggag gatgtcctag agcagaaggt tccggaagcc accaaccggc gggctctggga 300
 actgtccaag gccaatcttc gatttgccac taacttctat cagcacctgg cagactccaa 360
 gaacgacaac gacaacattt tctgttcacc cttgagcatc tccacggcgt ttgctatgac 420
 caagctgggt gcttghtaata acaccctcaa gcagctgatg gaggttttta aatttgatac 480
 catctccgag aagacatccg accagatcca cttcttcttt gccaaactga actgccgact 540
 ctatcgaaaa gccacaagt cctctaactt ggtgtcagcc aaccgccttt ttggagacaa 600
 atcccttacc ttcaatgaga gctatcaaga cgttagttag attgtctatg gagccaagct 660
 tcagccccctg gacttcaagg agaatccgga gcaatccaga gtgaccatca acaactgggt 720
 agctaataag actgaaggcc gcatcaaaga cgtcatcccc caaggagcca ttgatgagct 780
 cactgccctg gtgctgggta acaccattta cttcaagggc ctgtggaagt caaagttcag 840
 ccctgagaac acaaggaagg aaccattcca caaagttgat gggcagtcac gcctgggtgcc 900
 catgatgtac caggaaggca aattcaaata caggcgtgtg ggagagggta cccaggtgct 960
 agagatgccc ttcaaggggg acgacatcac catggtgctc atcctgccc agcctgagaa 1020
 gagcctggct aaggtggagc aggaactcac cccggagctg ctgcaggagt ggctggatga 1080
 gctgtcggag gtcatgcttg tgggtccacgt gccccgett cgcacagagg acagcttcag 1140
 tctgaaggag cagctgcaag acatgggcct tgttgatctc ttcagccctg agaagtccca 1200
 actcccaggg atcattgctg aaggcaggga cgacctctt gtctccgatg cattccacaa 1260
 agcgtttctt gaggtaaatg aggaaggcag tgaagcagca gcgagtactt ctgtcgtgat 1320
 tactggccgg tcaactgaacc ccagtagggt gaccttcaag gccaacaggc ctttcttgg 1380
 tcttataagg gaagtcgcac tgaacactat tatattcatg gggagagtgt ctaatccttg 1440
 tgtgaactaa aatattctta atctttgcac cttttctat ctcggtgttt gttaatggaa 1500
 gtaaaaataa atatgactgc cacctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560
 a 1561

<210> 5

<211> 1599

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 5

```

taatgtgaga tggaagtagt ttgtatttat ttttacttct gttcacaaac caaaaatagg 60
aagaggtgca aagaataaga acattttact taacacaagg gttggctact ctgcccataga 120
agataatagt gttcagagga acttctctta taaaaaccag gaaaggcctg ttggccttga 180
aagtcaccct gttgggggtt agcgaacggc cagcaatcac aacagcggta cttgcagctg 240
cttcaactgcc ttcttcattt acctcaagaa atgccttatg gaatgcatct gagacataga 300
ggatcatctcg gccttctgca acaataacct ggagtttggg cttttcaggg ctgaacagat 360
cgacaaggcc catgtcttgc agctgctcct tcaaaactgaa gccgtcctca atgcggaagc 420
ggggcatgtg gaccaccagc atcatctcct ccaattcacc cagccactct tgcagcacct 480
ctgggggtgag ttcttctctt accttggtcca ggctcttctc aggttggggc aagatgagga 540
ccatgggtgat gtcatcacct ttgaaggcca actcaagcac ctgggtgcct tcagccacgc 600
gccgataacg gaacttgcct tcctggtaca tcatagatgc tgaacacgac tctccatcag 660
cctttagtaga cagttccttc cttgtgttct cagggctgaa ctttgacttc cacaggccct 720
tgaagtaaata ggtgttaacc agcaccagaa cagtgaagctc attgatggct tccgagggaa 780
tgacatcggg gattcggcct tcggtcttat tggacacca tttgttgatg gccgctctgg 840
attgctctgc attttccttg aagtccaggg gctggagctt ggctccatat accaactcac 900
tgatgtcctg gtaggtctca ttgaaggtaa gggatttgtc tccaaaaagg cgattggctg 960
atactaactt ggaggatttg ttggcttttc gatagagtcg gcagttcagt ttggcaaaga 1020
agaagtggat ctgatcagat gttttctcag atatggtgtc aaacttaaata acctccatca 1080
gttgctggag ggtgtcatta caggcaccca gcttgggtcat agcaaaagcc gtggagatac 1140
tcaggggtga caggaaaatg ttatcattgt cattcttgga atctgccagg tgctgataga 1200
aagtggtagc aaagcgggaa ttggccttgg acagttccca gacacgccgg ttggtggcct 1260
ccgggatctt ctgttctgag ccctcatcct cagttgcctt cttctccggg gagcggtaaa 1320
tgcacatggg attcatggga atgtcccgcg gcttggctgt gcagatgtcc acagggtctc 1380
cgtgacaggt cacgcagtcc cagaagccaa tgagcagcaa ggacaaaaga taaaccttcc 1440
tttttccaga ggttacagtt cctatcacat tggaatacat ggccgctaata cttccacagg 1500
gctgggcaag tggagatagt gtgatctgag gcaatccgcc tgaaaactgg ttctttctct 1560
taaattctcg agaggttcca gaggacaggg tggggcaga 1599

```

<210> 6

<211> 1545

<212> DNA

<213> 猕猴(Macaca mulatta)

<400> 6

```

tttttttttt ttttttttta atgtaagatg ggagtagttg tatttatatt tacttctatt 60
cacaaaccaa aataggaaga ggtacaaaga ataagaacag tttagctcac acaagggttg 120
gctactctgc ccatgaagat aatagtgttc agaggaaact ctcttataaa aaccaggaaa 180
ggcctgttgg ccttgaaggt caccctgttg gggtttagcg aacggccagc aatcccaatg 240

```

gcggtacttg cagctgcttc actgccttct tcatttacct caagaaatgc cttatggaat 300
 gcatcggaga catagaggtc atccccgcct tctgcaacaa tacctgggag tttggacttt 360
 tcagggctga acagatcgac aaggcccatg tcttgagct gctcctcaa actgaagccg 420
 tcctcaatgc ggaagcgggg catgtgaacc accagcatca tctcctcaa ctcatccagc 480
 cactcctgca gcacctctgg ggtgagttcc tgctccacct tggtcaggct cttctcaggc 540
 ttgggcagga tgagcaccat ggtgatgtca tcacccttga agggcaactc aagcacctgg 600
 gtgccttcag ccacgcgccg ataacagaac ttgccttctt ggtacatcat agacgctgaa 660
 cactactctc catcagcctt gtagaacggt tccatccttg tgttctcagg gctaaacttt 720
 gacttccaca ggcccttgaa gtaaatggtg ttaaccagca ccagaacagt gagctcgttg 780
 atggcttccg ggggaatgac atcggtgatt cggccttcgg tcttattgga caccattttg 840
 ttgatggccg ctctggattg ctctgcattt tccttgaagt ccaggggctg gagcttggct 900
 ccgtatacca actcactgat gtcttgtag gtctcattga aggtaaggga tttgtctcca 960
 aaaaggcgat tggctgatac taacttggag gatttgttgg cttttcgata gagtcggcag 1020
 ttcagtttgg caaagaagaa gtggatctga tcagatgttt tctcagatat ggtgtcaaac 1080
 ttaataacct ccatcagttg cttgagggtg tcattacagg caccagctt ggtcatagca 1140
 aaagccgtgg agacactcag gggtagacagg aaaatgttat ccttgctcgtt cttggaatct 1200
 gccagggtgct gatagaaaagt ggtagcaaag cgggaattgg ccttgagacag ttcccagacg 1260
 cgccggttgg tggcctcggg gatcttctgt tctgagccct catcctcagt tgccttcttc 1320
 tccggggagc ggtaaatgca catgggattc atgggaatgt cccgcggctt ggctgtgcag 1380
 atgtccacag ggctcccgtg acaggtcata cagtcccaga ggccaatgag cagcaaggac 1440
 agaagataaa ccttcctttt tccagaggct acggttcccta tcacattgga atacatggtc 1500
 gctaatacttc cacagggtg ggcaagtgga gatggtcctc gtgcc 1545

<210> 7

<211> 2171

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 7

tttttttttt ttgtataaaa atgcatttct ctttattttg acactgtgta taagaacatt 60
 atgcatgtga gtggtttgag aaataaaacg tttataactc ttatttgaat ctctgtcttt 120
 atgggagatt gattcgggtt tgtttttttag tttgtagtat gggggcaata atgagaattt 180
 aagggtccctc taccctttca agatgcctgc tatectctaa gatgaaatag taatatattt 240
 acctcttgtt tttatggttt tcttttctac tttggggagg agaaagacca tcttgagaca 300
 tggctctttca ctctgcagcc cagcctcaac tggccttaac tctgaccgc cctgcttcta 360
 ccttcaaaaag caccaggata taggtttgtg ccaccgtggc tggctgctcc cccttcaactt 420
 gcccaaaagt ggtgtagcat ctgtactcca gtctctcgtc ttcaagtgga aaagtccatt 480
 ctctgtagggt ggcagtcgta tttatttttta cttctattca caaacaccaa agtaggaaaa 540
 ggtgcaaaga ttaagaatat tttagttcac acaaggatta gccactctcc ccatgaatat 600
 aatagtgttc agtgcaactt cccttataag aaccaggaag ggcctgttgg ccttgaagggt 660
 caccctattg gggttcagtg accggccagt aatcacgaca gaagtactcg ctgctgcttc 720

actgccttcc tcatttacct caagaaatgc tttgtggaat gcgtcggaga catagaggtc 780
 gtccctgcct ccagcaacga tccctgggag ttgggacttt tcagggtga agagatcaat 840
 gaggcccatg tcttgacgct gctccttcag actgaagcca tcctcgggtgc ggaagcgggg 900
 catgtggacc acaagcatag tctctgacag ctcatccagc cactcctgca gcagctctgg 960
 ggtgagctcc tgctccacct tggccaggct cttctcaggc ttgggcagga tgagcaccat 1020
 ggtgatgtca tcccccttga agggcagctc tagcacctgg gtgccctctg ccacgcgccg 1080
 gtatttgaat ttgccttcct ggtacatcat aggcaactgg catgactgcc catcgacctt 1140
 atagaacggt tccttccttg tgttctcagg gctgaacttt gacttccaca ggcccttgaa 1200
 gtaaatggtg ttaaccagaa ccagggcagt gagctcgta atggcgccct gtgggatgac 1260
 atctttgatg cggccttcag tcttattagc taccagttg ttgatggtca ctctggattg 1320
 ctccggattc tccttgaagt ccaggggctg gagcttggct ccatagacaa cctcactaac 1380
 atcttgatag ctctcggtga aggtgaggga tttgtctcca aaaaggcggg ttgctgatac 1440
 caagtcagag gacttggttg cttttcgata gagtcggcag ttcagtttgg caaagaagaa 1500
 gtggatctgg tcggatgtct tctcggagat ggtatcaaat ttaaaaacct ccatcagctg 1560
 cttgagagtg tcgttacagg caccagctt ggtcatagca aaagcagtgg agatgctcaa 1620
 gggtgacagg aaaatgttgt cgttgtcatt cttggagtct gccagggtgct ggtagaagtt 1680
 agtggcaaat cggaattgg ccttgacag ttcccagacc cgccggttgg tggcttctgg 1740
 aaccttctgc tctgagccat cctcctcggg gcccttcttc ccaggggagc ggtaaattgca 1800
 caagggattc acggggatgt ctccgggctt cgctatgcag atgtcgtcca cagggtttcc 1860
 gtgacagata gcacagccca aggcaccgat gaggagcaga gagaggagac aaagcttctc 1920
 ctcaccagca gcccacttc ctgccccagg ggaatacatg gccgatgctc ctacagagat 1980
 ggtgctgact gagacgatca ctccgaaaac tggttcttcc ccctaaatct gagagggtcca 2040
 gaggccagggt gggggaggga gctctcccct taaagtcttc aggtagatat gtcttctgat 2100
 tatgtcttat atctcaccac ttcactaaaa tgtctcagat acaaatcaga tctatttcta 2160
 aaattaccta t 2171

<210> 8

<211> 1561

<212> DNA

<213>大鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400> 8

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttgaggt ggcagtcata tttattttta 60
 cttccattaa caaacaccga gataggaaaa ggtgcaaaga ttaagaatat ttagttcac 120
 acaaggatta gacactctcc ccatgaatat aatagtgttc agtgcgactt cccttataag 180
 aaccaggaag ggctgttgg cettgaaggt caccctactg gggttcagtg accggccagt 240
 aatcacgaca gaagtactcg ctgctgcttc actgccttcc tcatttacct caagaaacgc 300
 tttgtggaat gcatcggaga caaagaggtc gtccctgcct tcagcaatga tccctgggag 360
 ttgggacttc tcagggtga agagatcaac aaggcccatg tcttgacgct gctccttcag 420
 actgaagctg tcctcgatgc ggaagcgggg cacgtggacc acaagcatga cctccgacag 480
 ctcatccagc cactcctgca gcagctccgg ggtgagttcc tgctccacct tagccaggct 540

cttctcaggc ttgggcagga tgagcaccat ggtgatgtcg tcccccttga agggcatctc 600
 tagcacctgg gtacctctc ccacacgcct gtatttgaat ttgccttcct ggtacatcat 660
 gggcaccagg catgactgcc catcaacttt gtggaatggt tccttccttg tgttctcagg 720
 gctgaacttt gacttcaca ggcccttgaa gtaaattggt ttaaccagca ccagggcagt 780
 gagctcatca atggctcctt gggggatgac gtctttgatg cggccttcag tcttattagc 840
 taccagttg ttgatggtca ctctggattg ctccggattc tccttgaagt ccaggggctg 900
 aagcttggct ccatagacaa tctcactaac gtcttgatag ctctcattga aggtaaggga 960
 tttgtctcca aaaaggcggg ttgctgacac caagttagag gacttggttg cttttcgata 1020
 gagtcggcag ttcagtttgg caaagaagaa gtggatctgg tcggatgtct tctcggagat 1080
 ggtatcaaat ttaaaaacct ccatcagctg cttgagggtg ttattacaag caccagctt 1140
 ggtcatagca aacgccgtgg agatgtcaa gggtgacagg aaaatgttgt cgttgctcgtt 1200
 cttggagtct gccagggtgt gatagaagtt agtggcaaat cgagaattgg ccttgacag 1260
 ttcccagacc cgccggttgg tggttccgg aaccttctgc tctaggacat cctcctcgt 1320
 ggcttcttc gcaggggagc ggtaaatgca catggggttc acggggatgt ctcggggctt 1380
 cgctatgcag atgtcgtcca cagggtttcc atgacagaca gcacagcca aggcaccaat 1440
 gagtagcaga gagaggagac aaagcttcct ctctccagca accgcacttc ctattcccgg 1500
 ggaatacatg gtggacgctt ctgcagagaa gccgtggaga cagtgtgag caatccctcc 1560
 g 1561

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> 来源

<223> /注="未知的描述: RFGF肽"

<400> 9

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro

1 5 10 15

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> 来源

<223> /注="未知的描述: RFGF类似物肽"

<400> 10

Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro

1 5 10

<210> 11

<211> 13
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus)
 <400> 11
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 果蝇 (Drosophila sp.)
 <400> 12
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 13
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"
 <400> 13
 gguuaacacc auuuacuuca a 21
 <210> 14
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"
 <400> 14
 uugaaguaaa ugguguuaac cag 23
 <210> 15
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"
 <400> 15

uugaaguaaa ugguguuaac cag 23

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"

<400> 16

gguaaacacc auuuacuua a 21

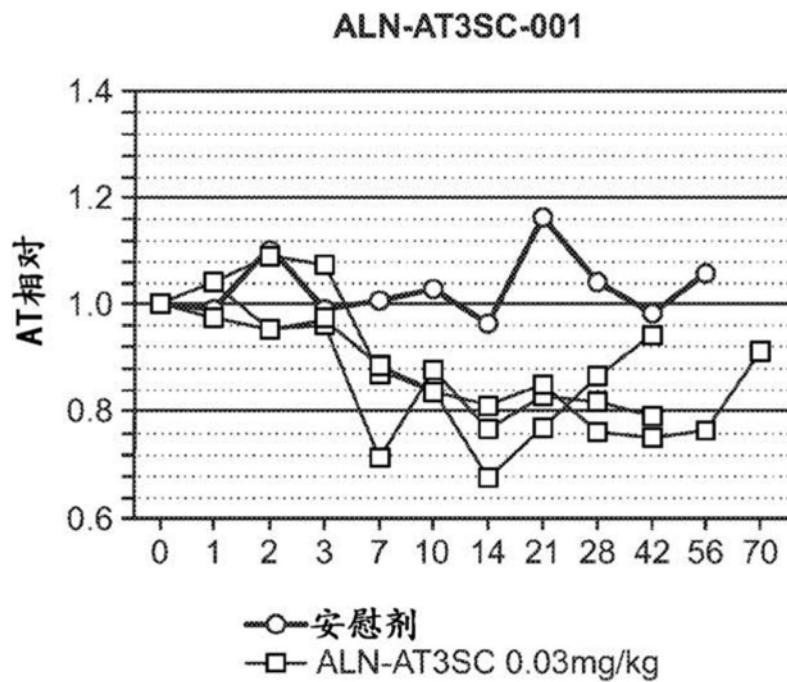


图1A

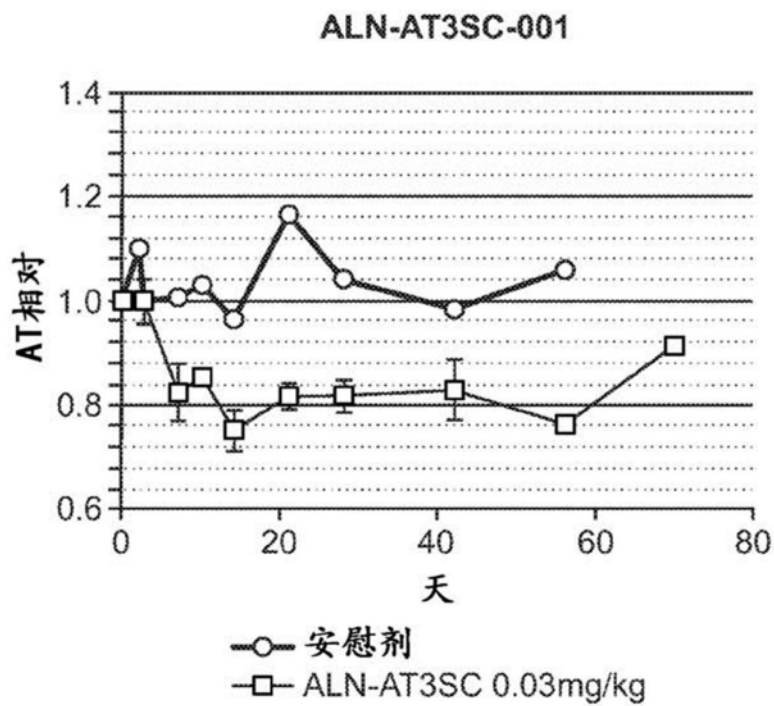


图1B

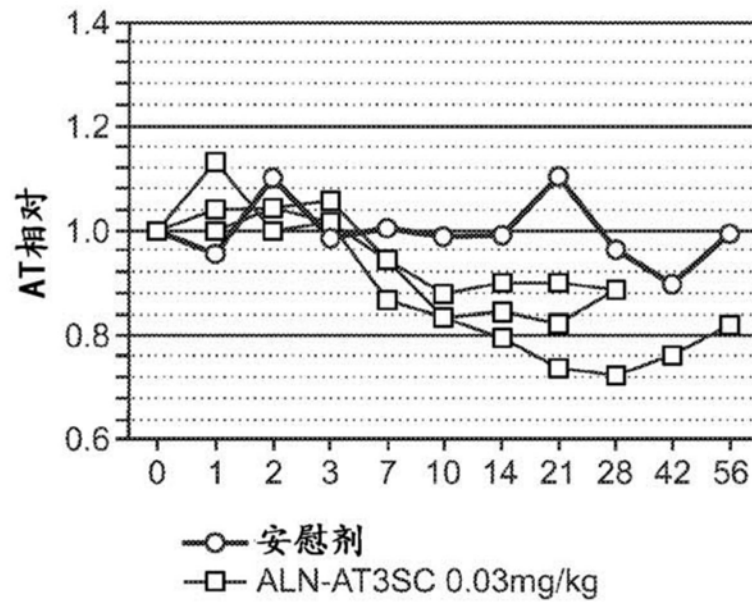


图1C

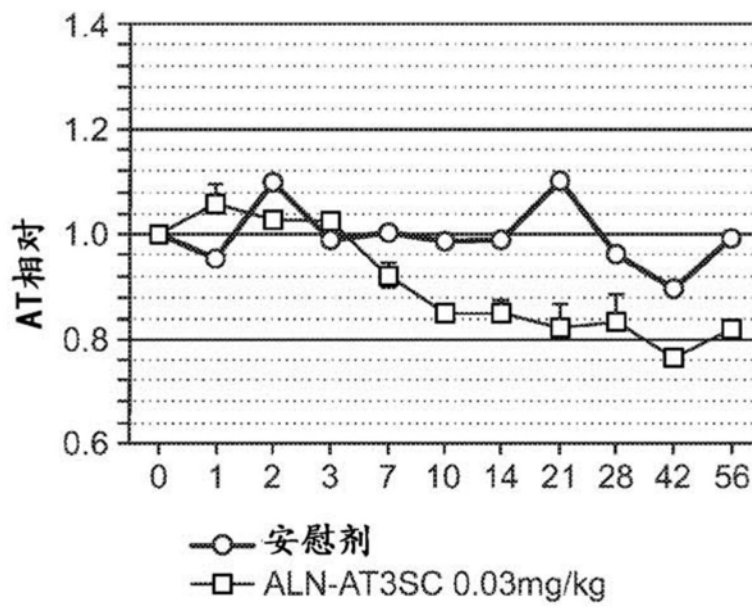


图1D

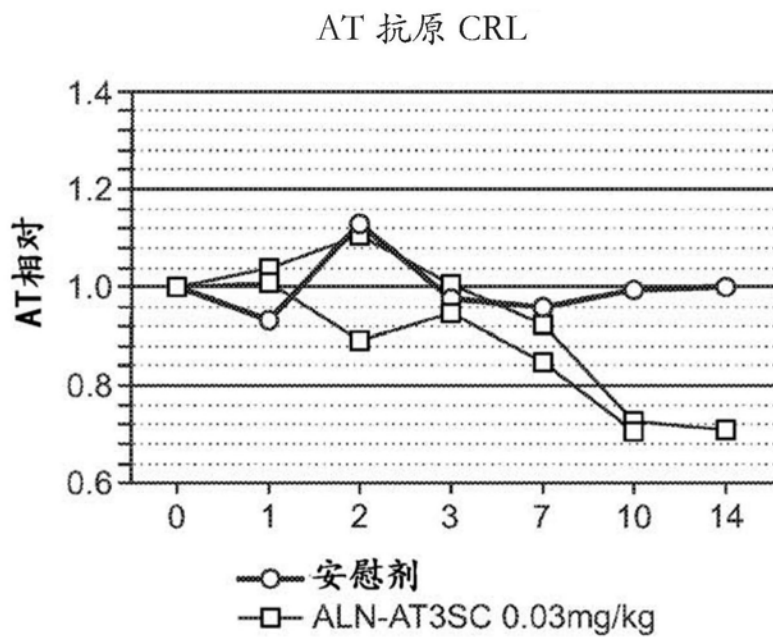


图2A

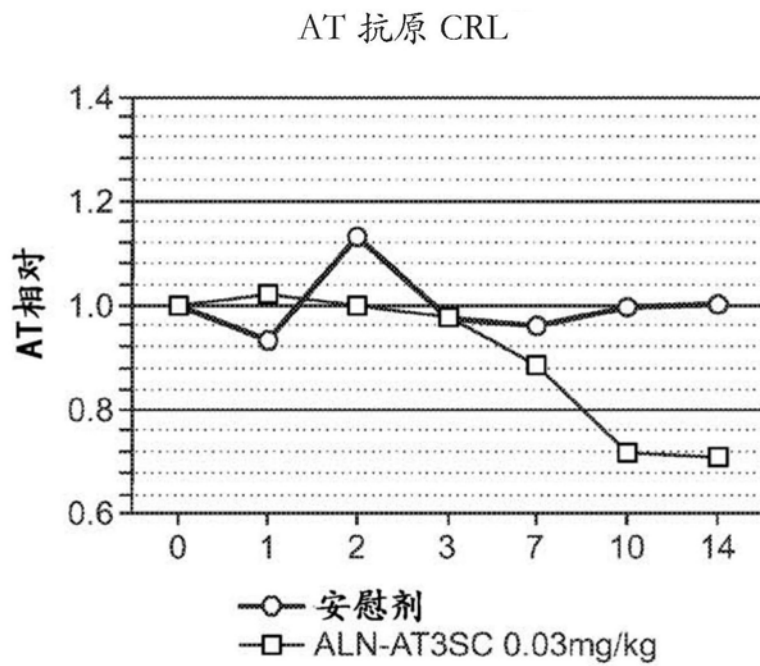


图2B

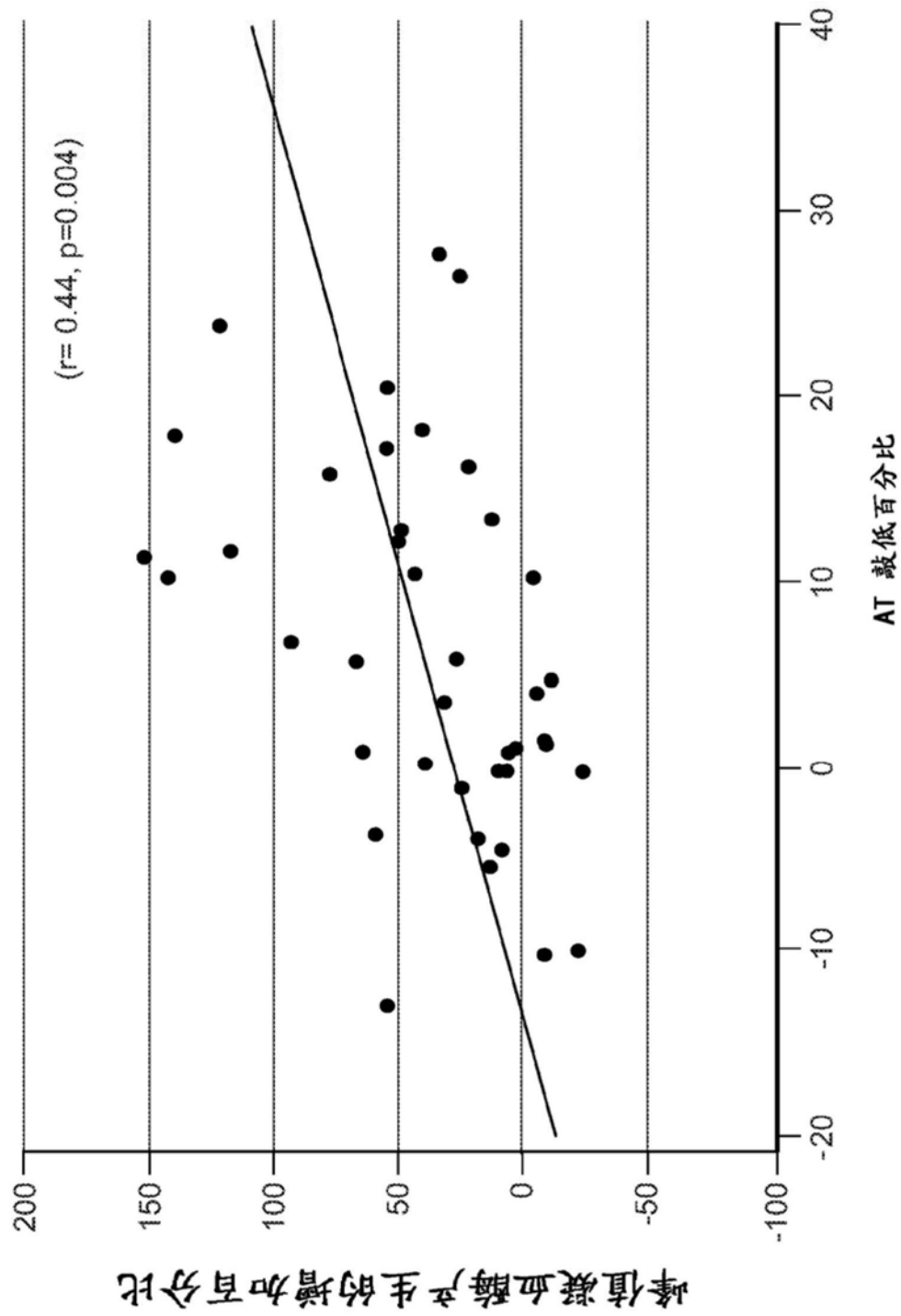


图3

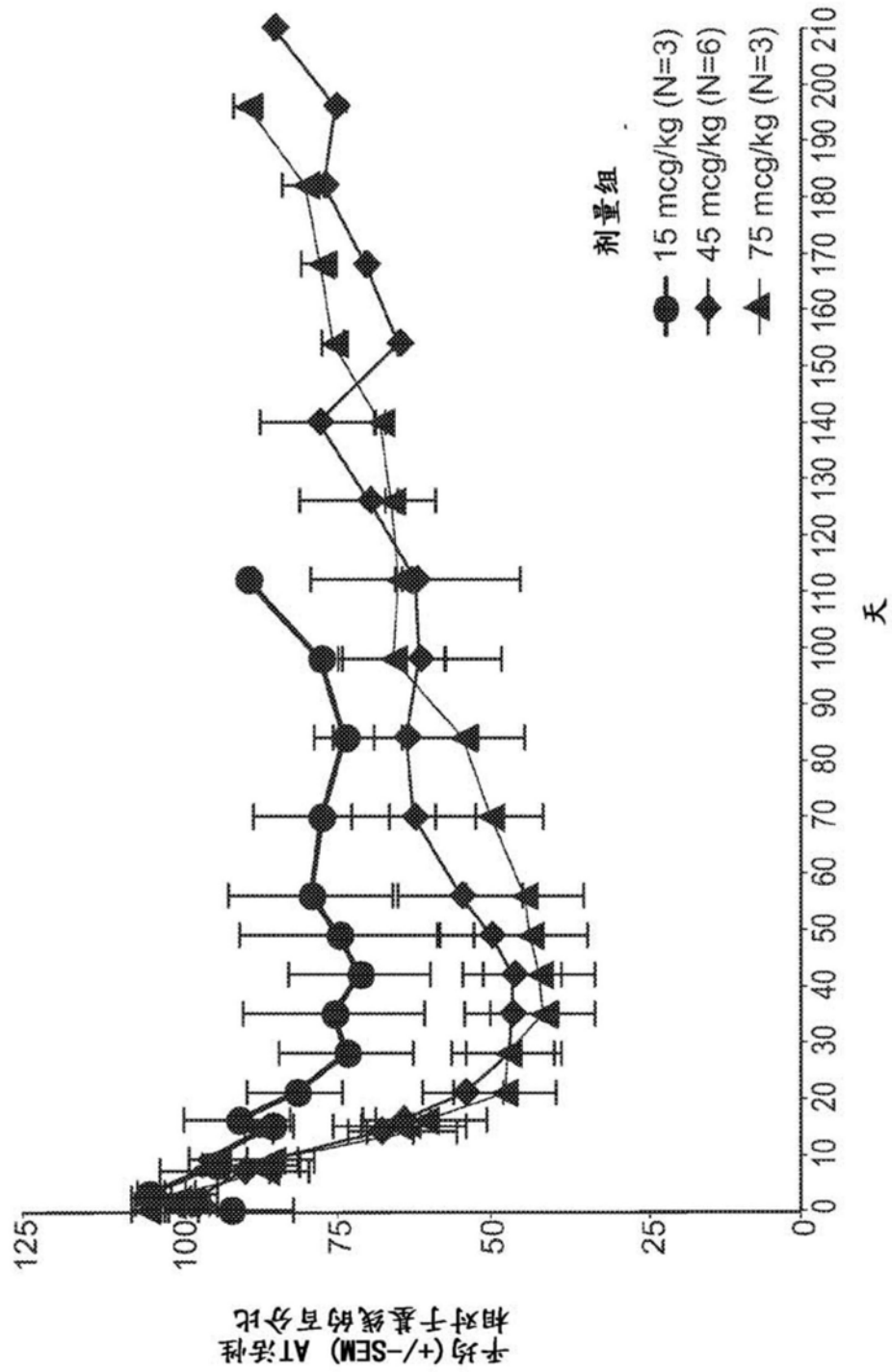


图4

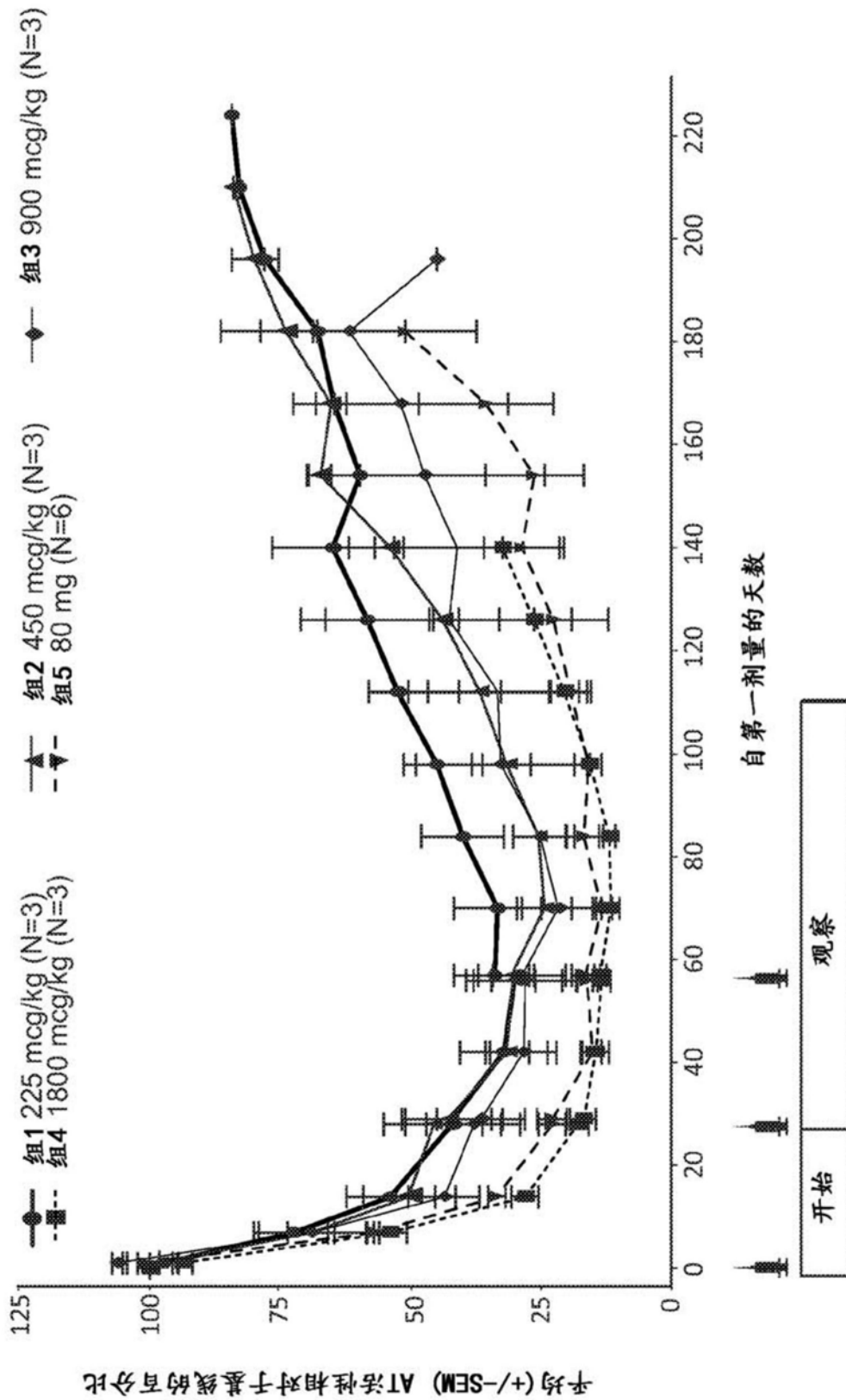


图5A

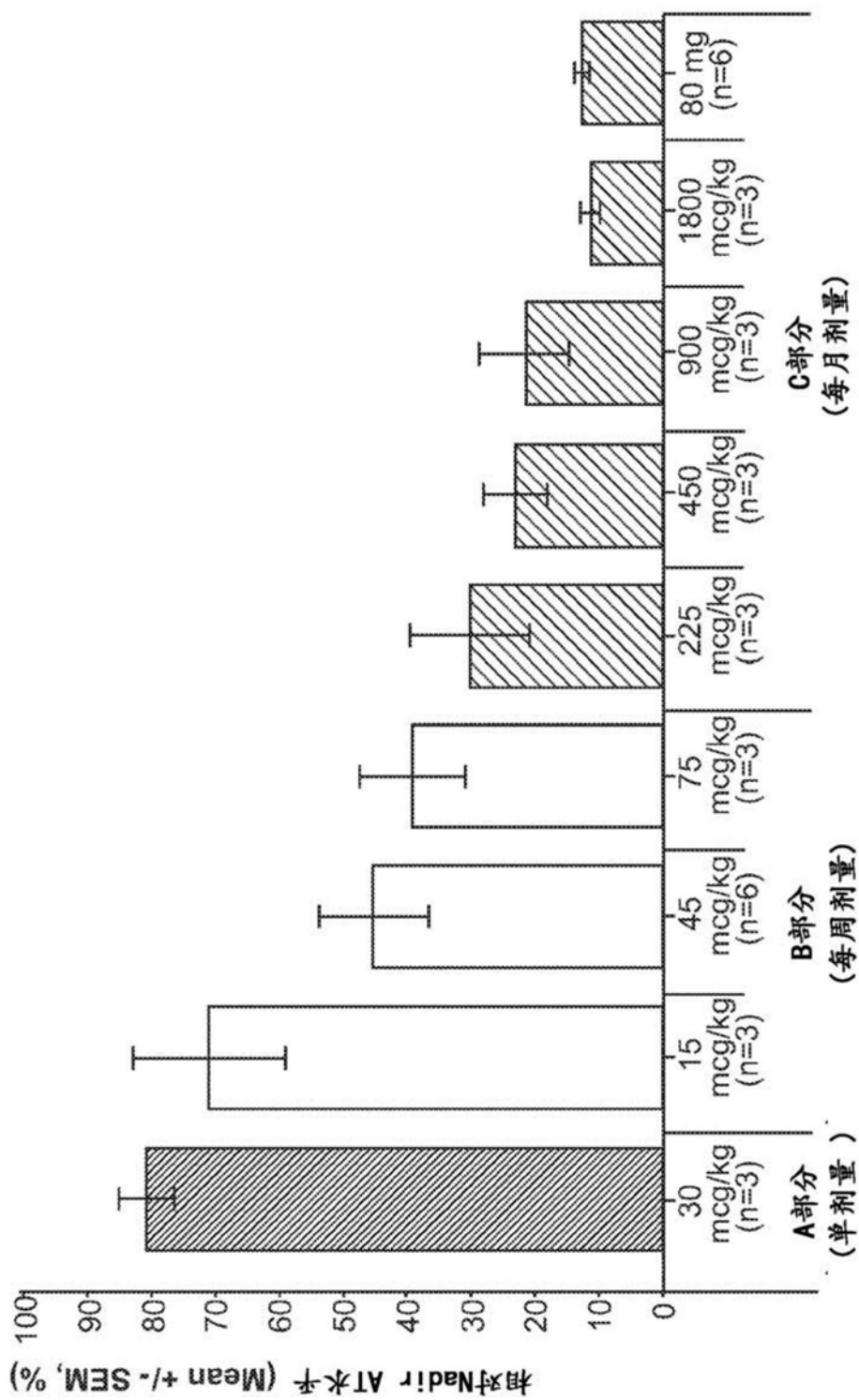


图5B

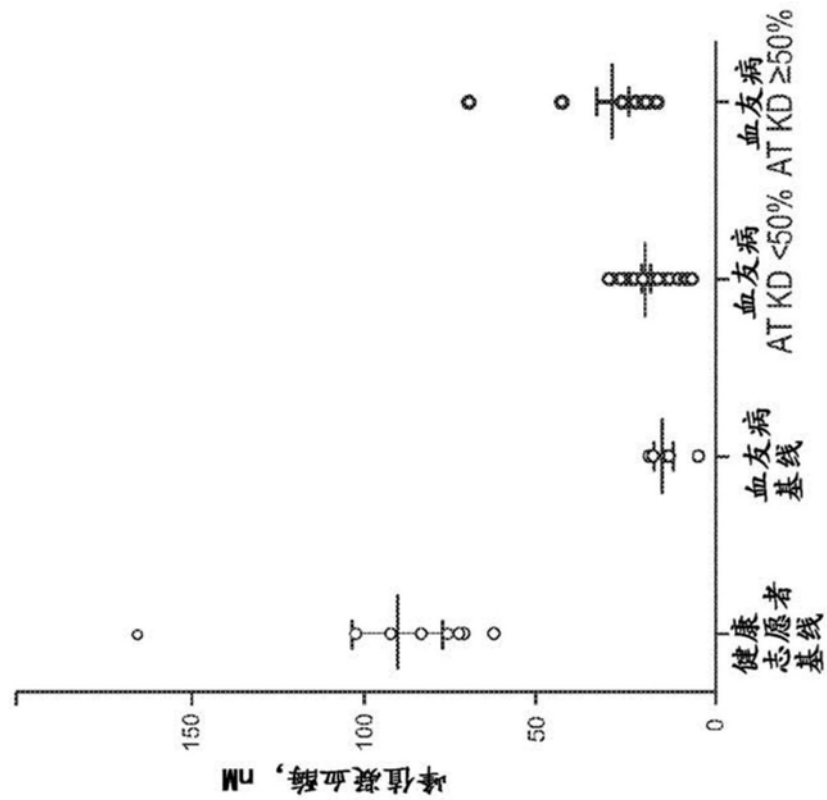


图6A

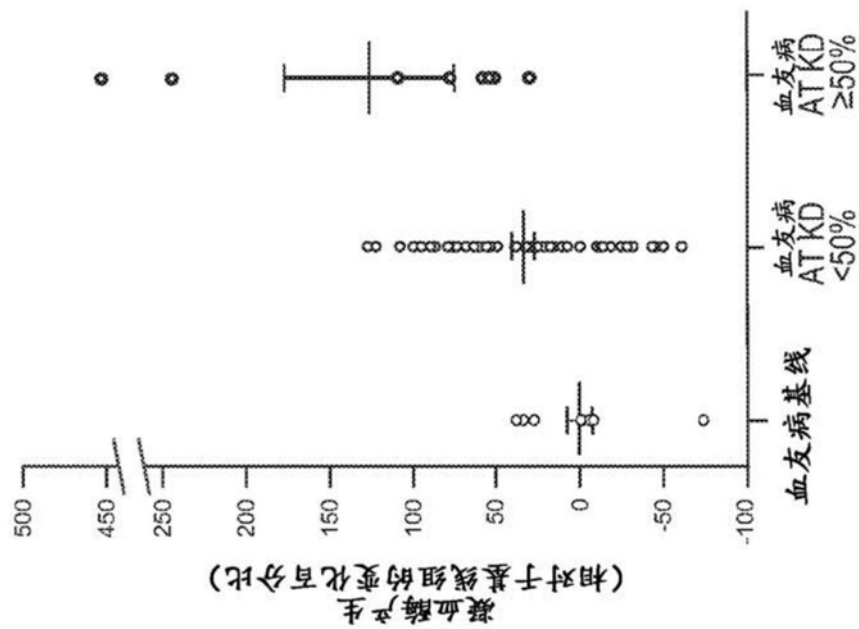


图6B

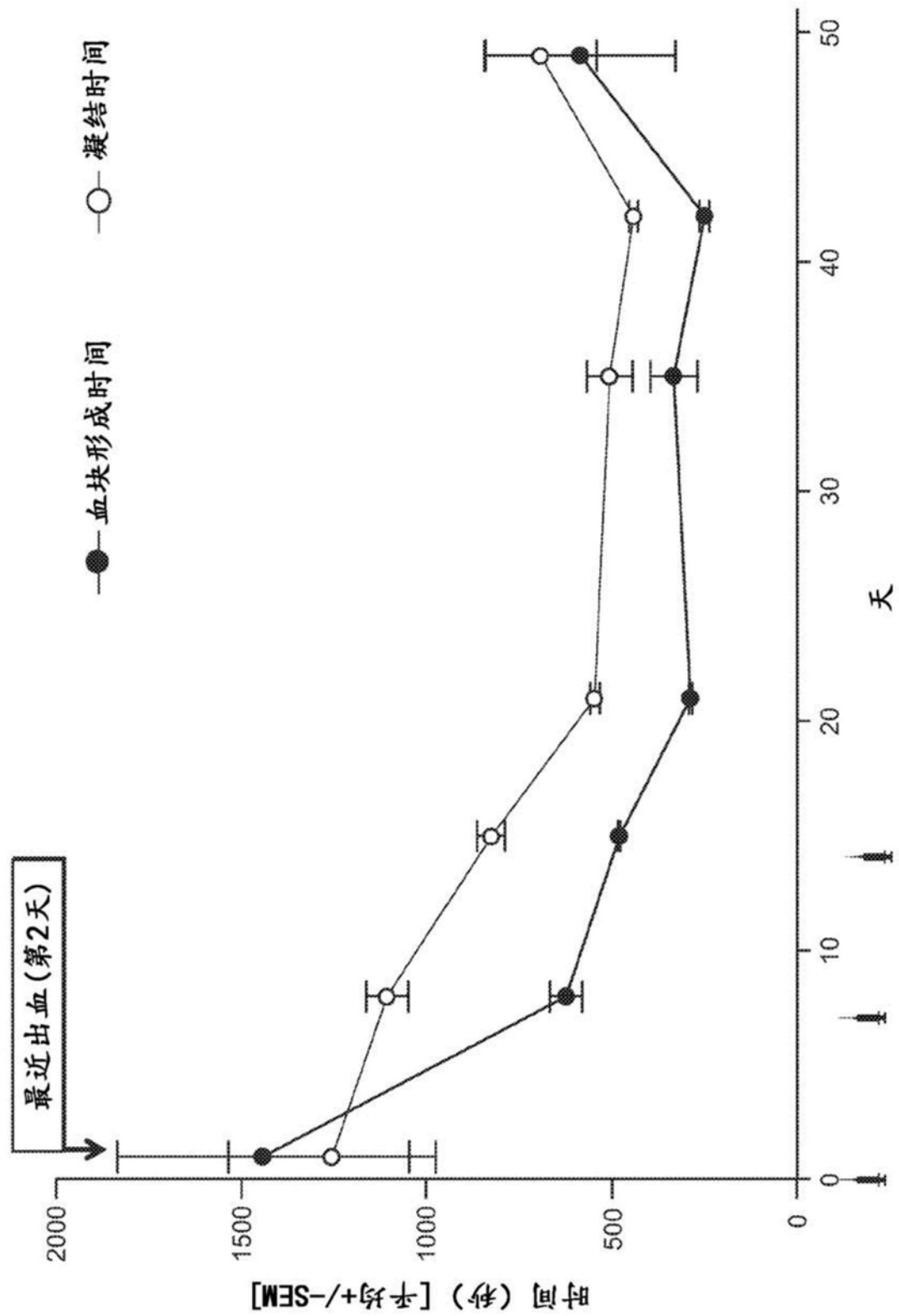


图7

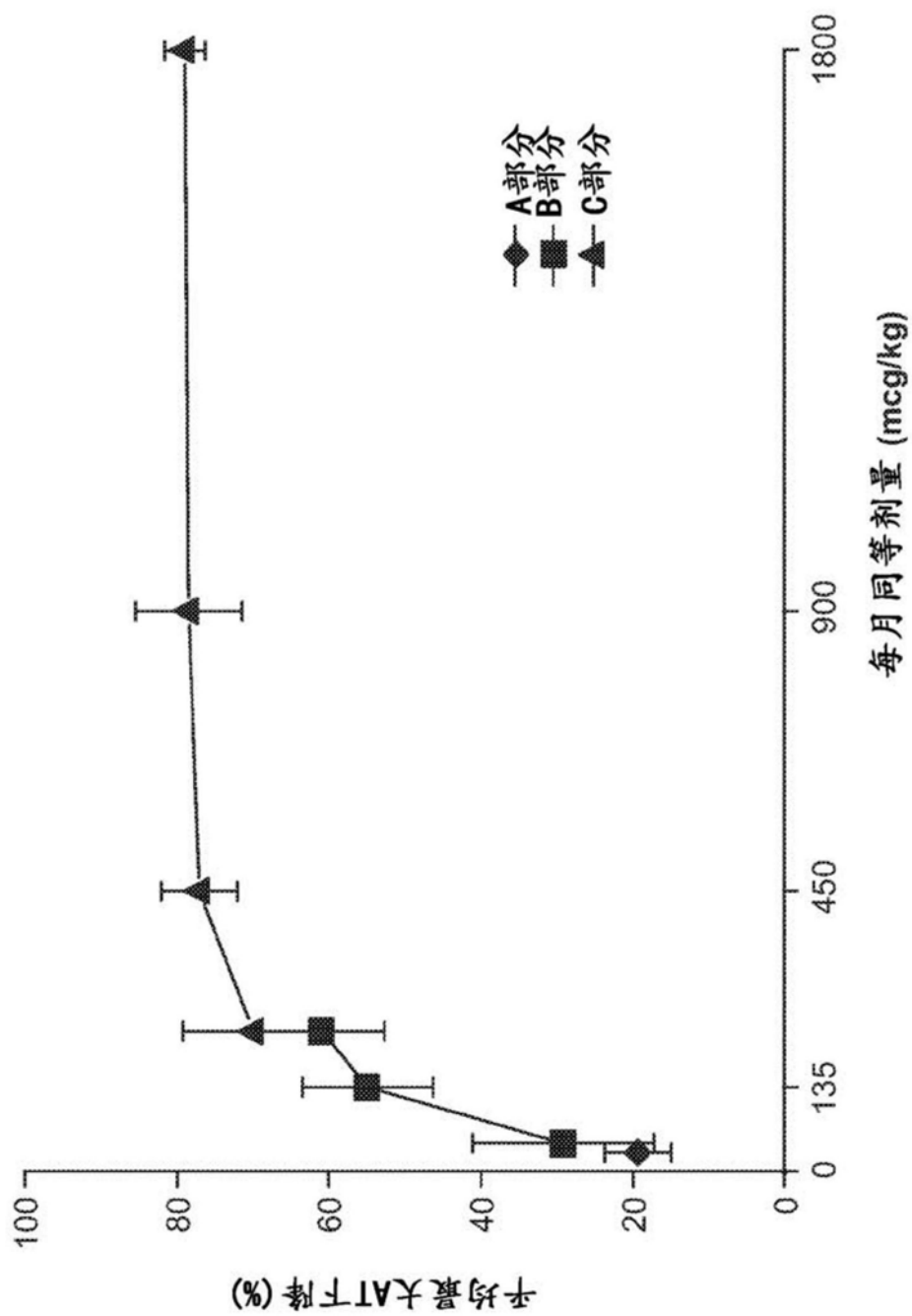
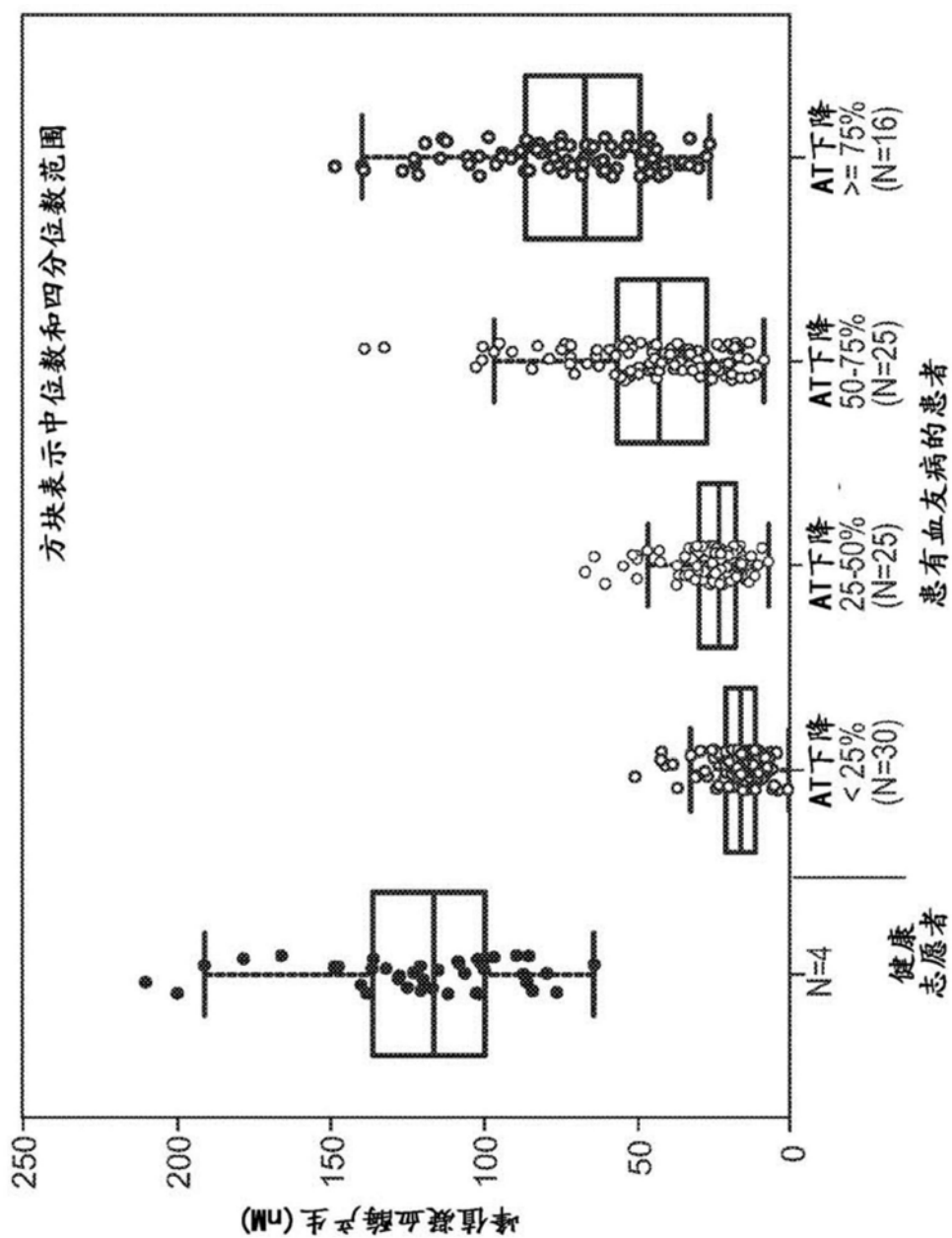
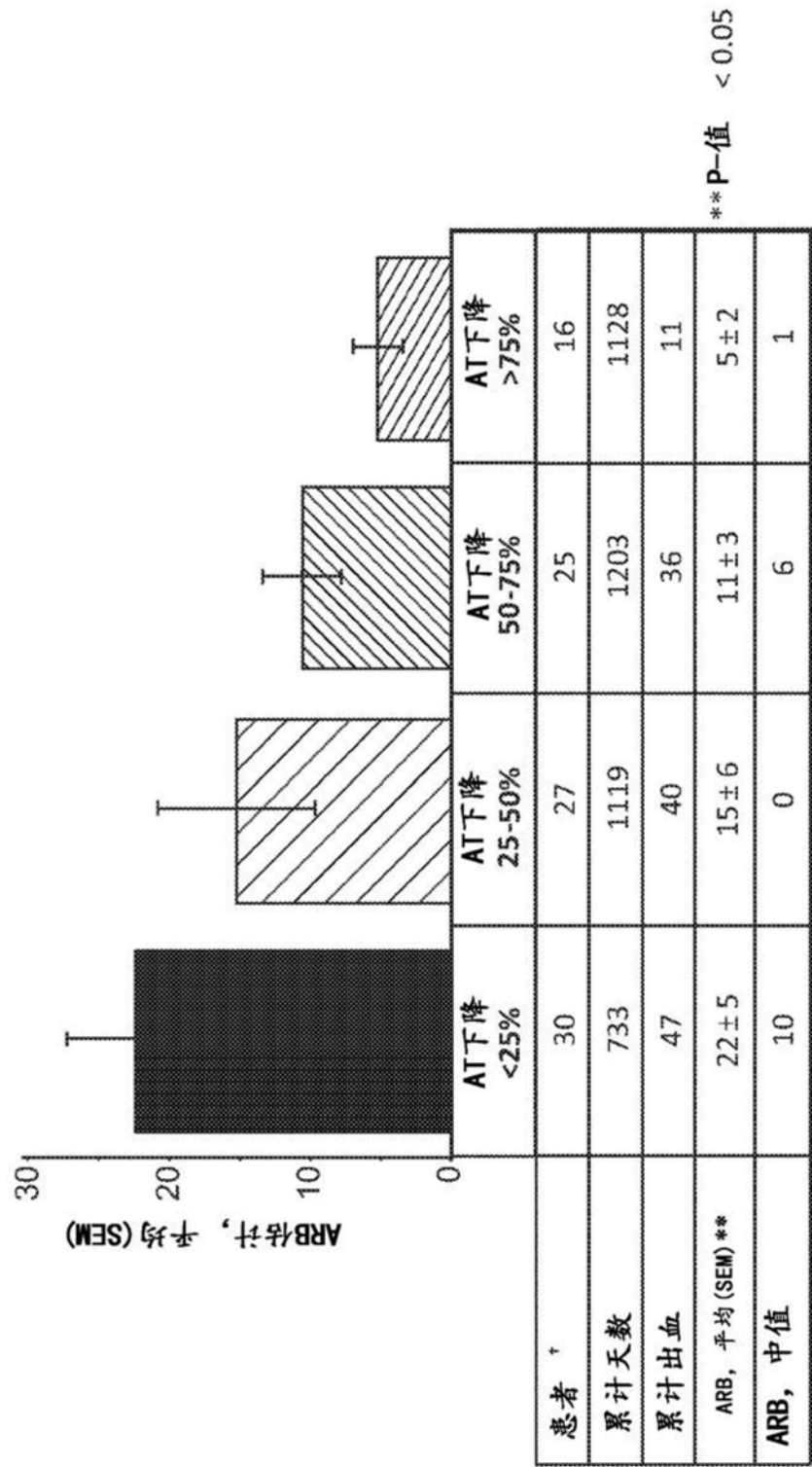


图8



峰值TG的变化百分比: 当与AT下降<25%组相比时, 通过Mann-Whitney检验 $p < 0.001$

图9



ABR, 年出血率; SEM, 平均的标准误差
[†]花费时间在四分位数上的患者数目; ‡对于每个患者, 各四分位数上的ABR通过365. 算
24*(出血事件的数目/各四分位数上的天数)计

图11

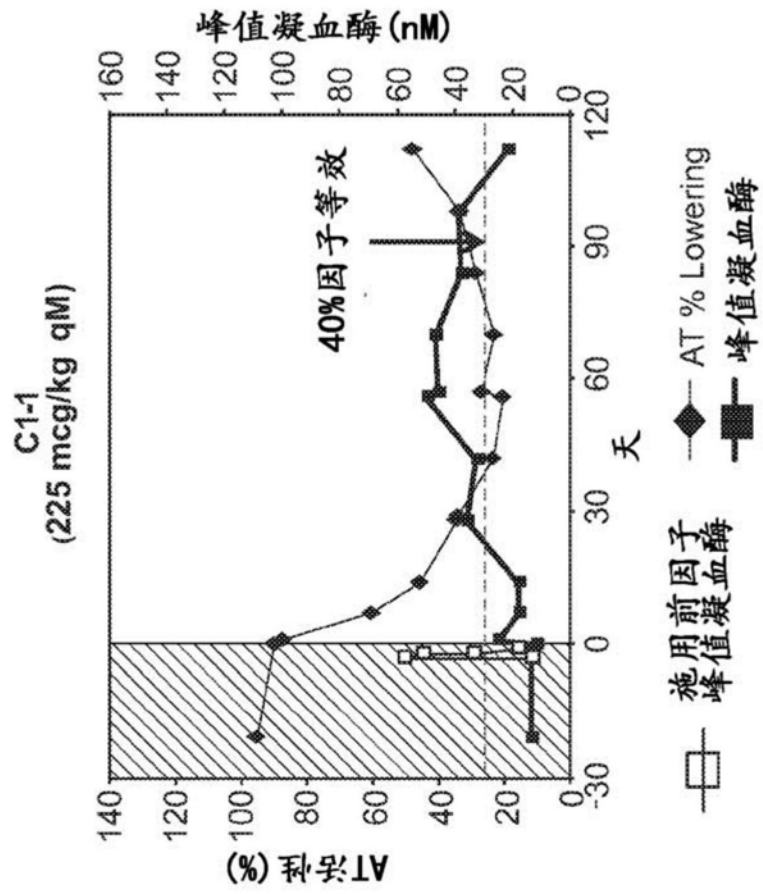


图10A

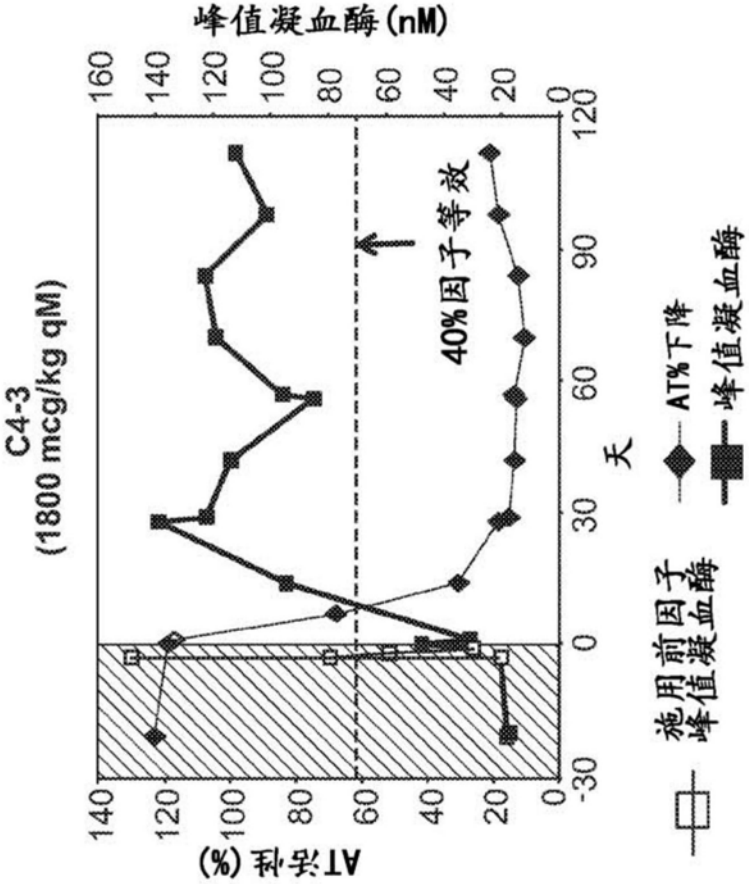


图10B

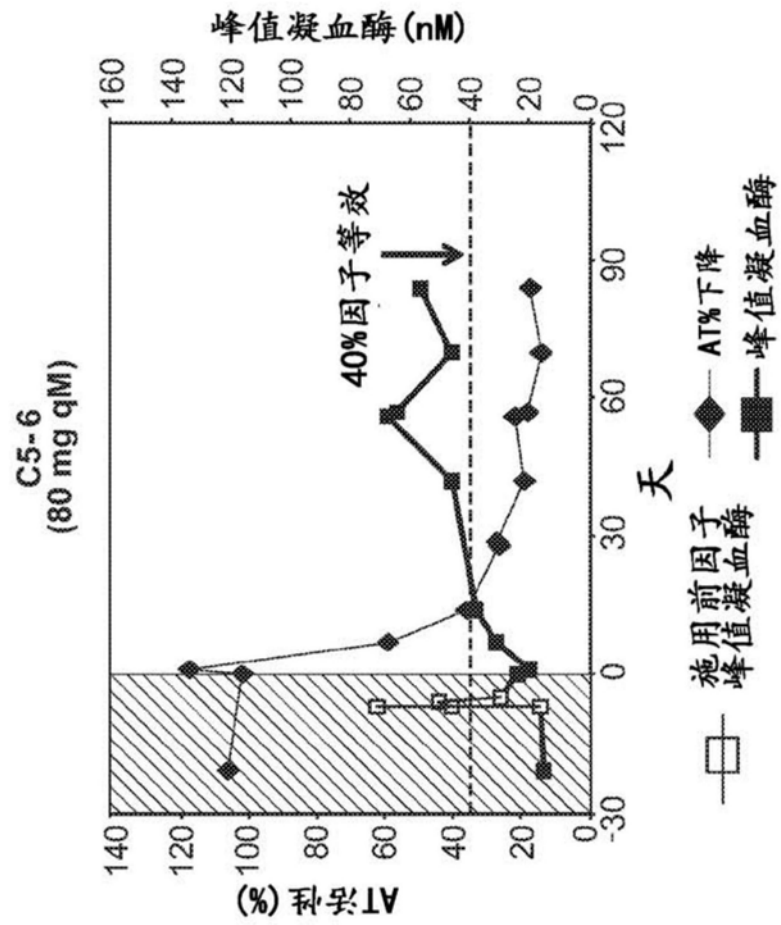


图10C

剂量	患者	先前Tx	研究前ABR	开始 ABR	观察期			
					所有出血, n	ABR	自发出血, n	AsBR
225 mcg/kg	C1-1	PPx	2	13	1	4	1	4
	C1-2	PPx	0	0	1	4	0	0
	C1-3	PPx	0	50	4	17	0	0
450 mcg/kg	C2-1	PPx	4	25	4	17	3	13
	C2-2	OD	38	13	0	0	0	0
	C2-3	PPx	4	0	1	4	0	0
900 mcg/kg	C3-1	PPx	0	0	0	0	0	0
	C3-2	OD	20	25	3	13	0	0
	C3-3	OD	32	25	0	0	0	0
1800 mcg/kg	C4-1	PPx	0	25	0	0	0	0
	C4-2	OD	24	0	0	0	0	0
	C4-3	PPx	0	25	0	0	0	0
80 mg**	C5-1	PPx	12	13	2	9	1	4
	C5-2	PPx	16	0	0	0	0	0
	C5-3	PPx	6	13	2	9	0	0
	C5-5	PPx	6	13	0	0	0	0
	C5-6	PPx	0	13	0	0	0	0

PPx: 预防, OD: 按需, ABR: 年出血率; AsBR: 年自发出血率
† 在开始 (0-28天) 和观察期 (第29天至最后一次研究随访的或最后一次给药+56天, 以较早者为准)
过程中治疗的出血事件的事后分析Pre-study ABR...: 由医学记录得到的研究前ABR
** 患者C5-4退出, 从分析者排除

图12

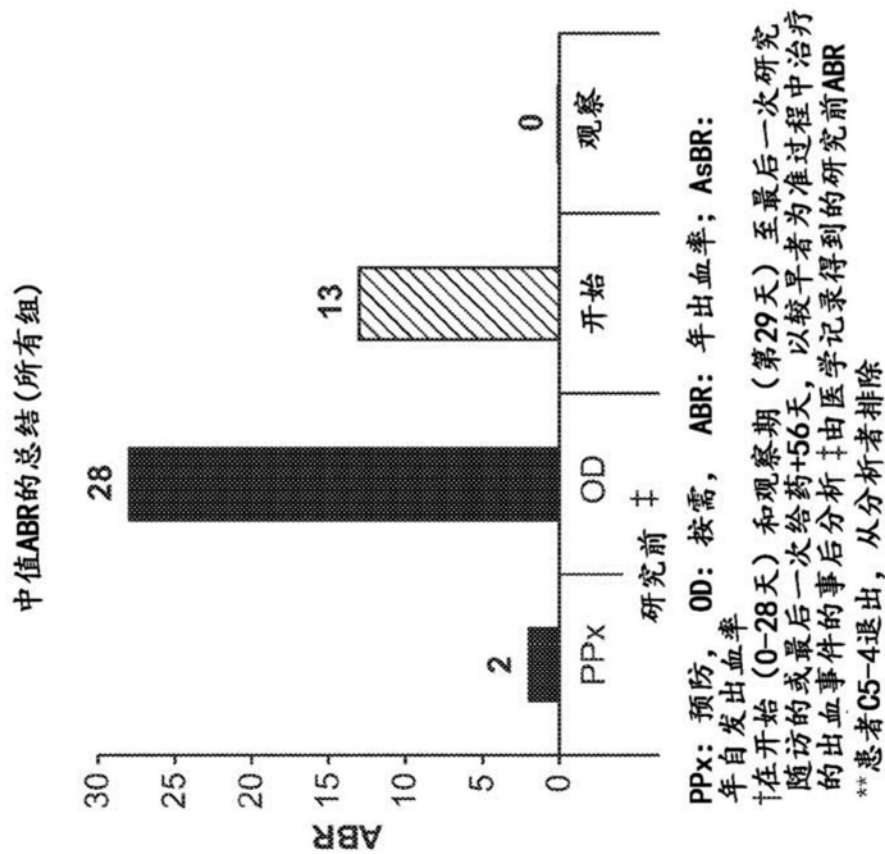


图13A

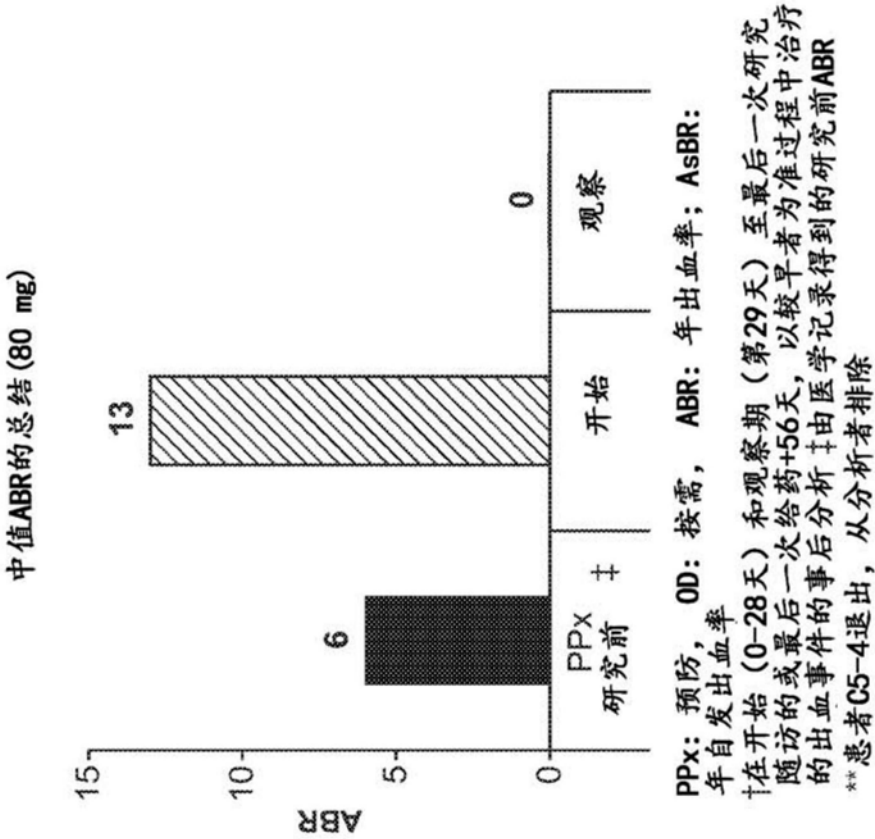


图13B

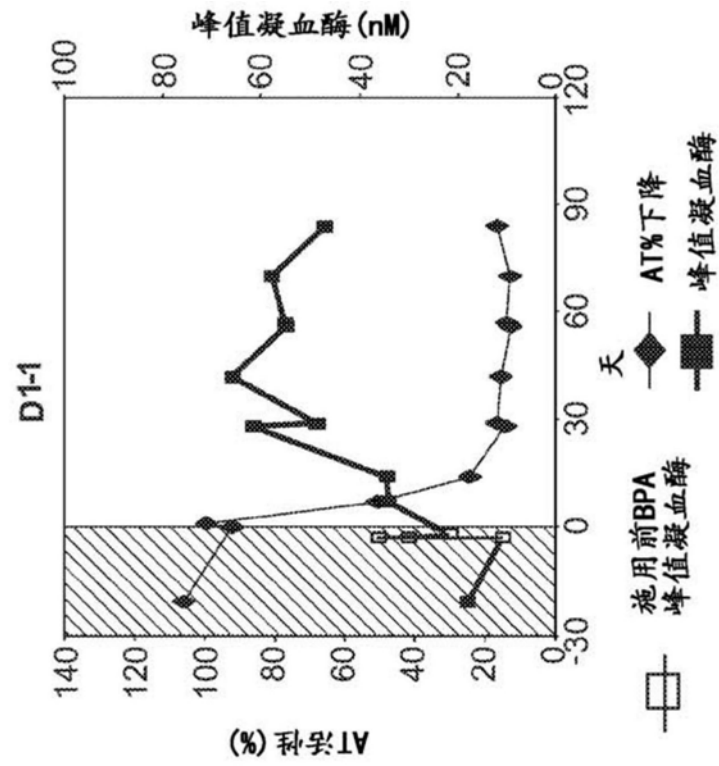


图14A

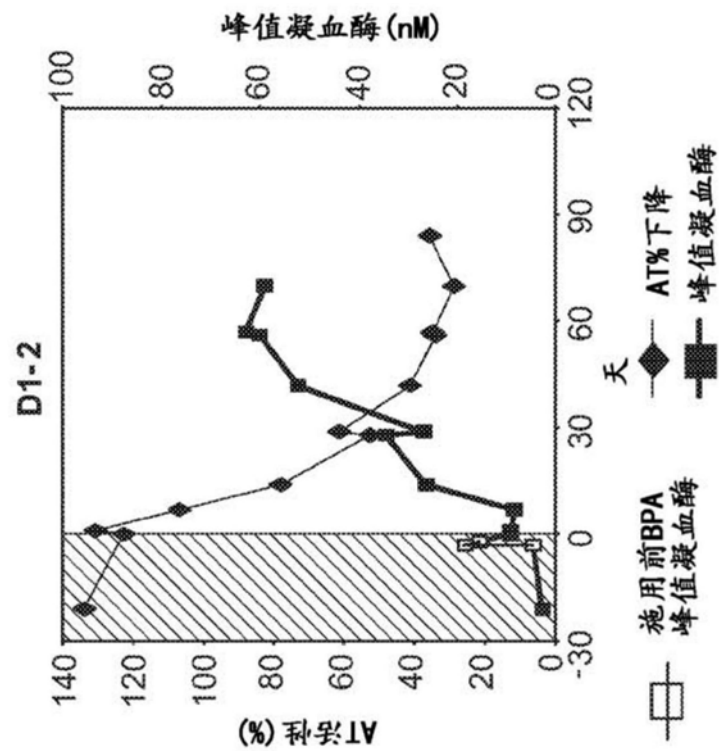


图14B

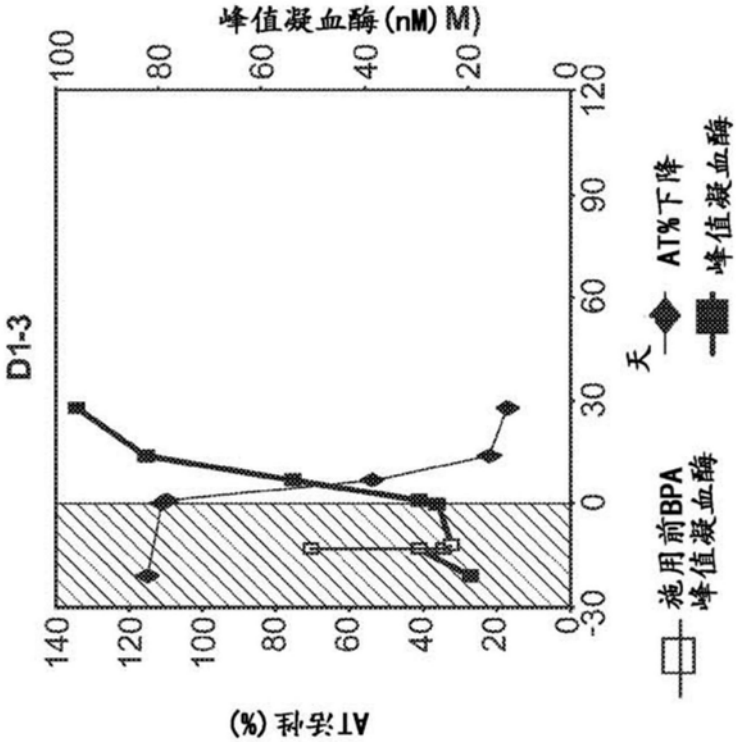


图14C

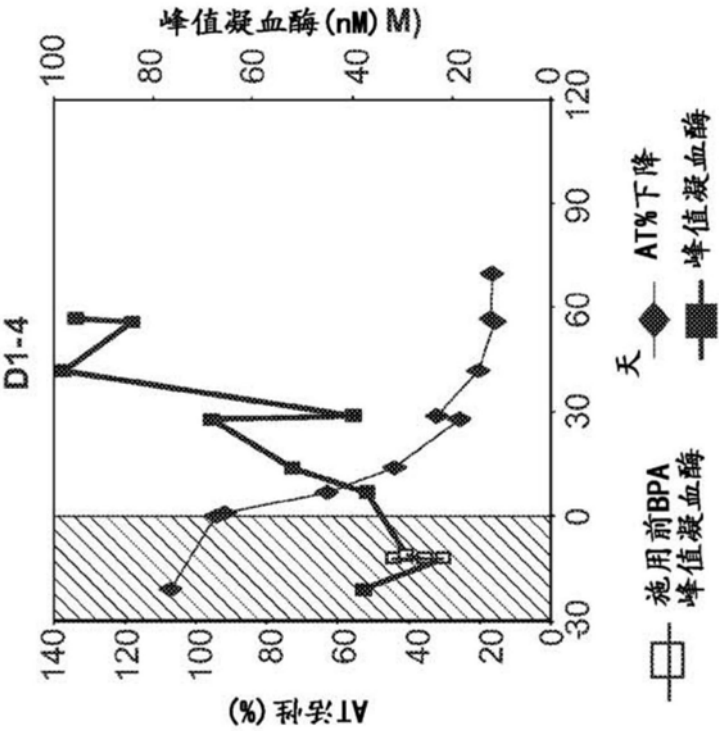


图14D

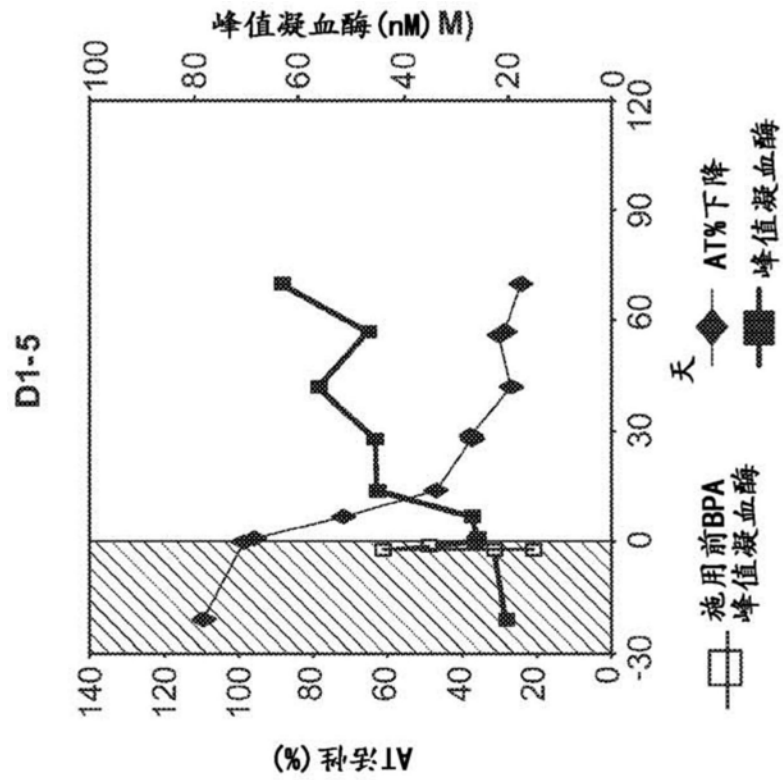


图14E

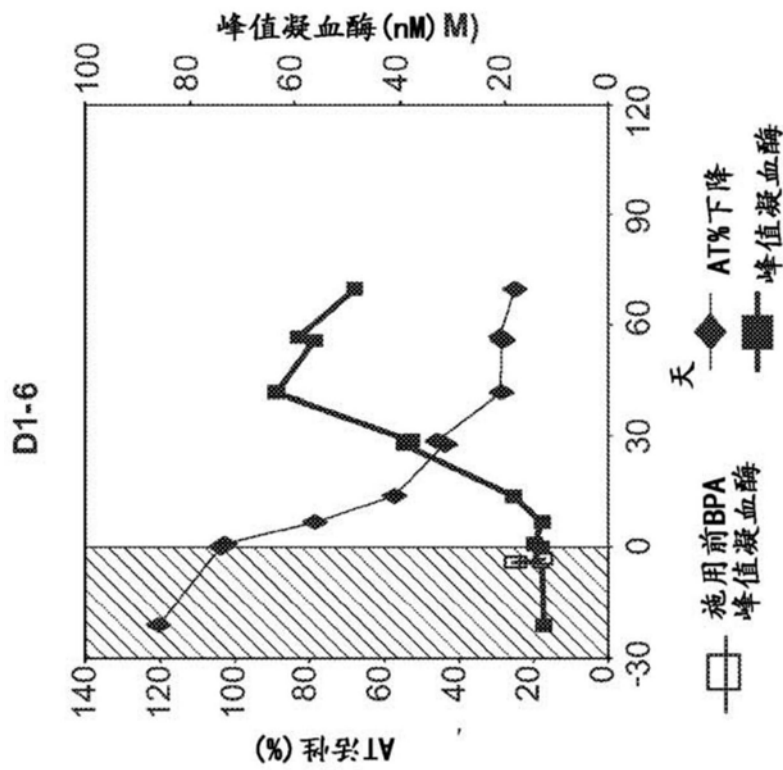


图14F

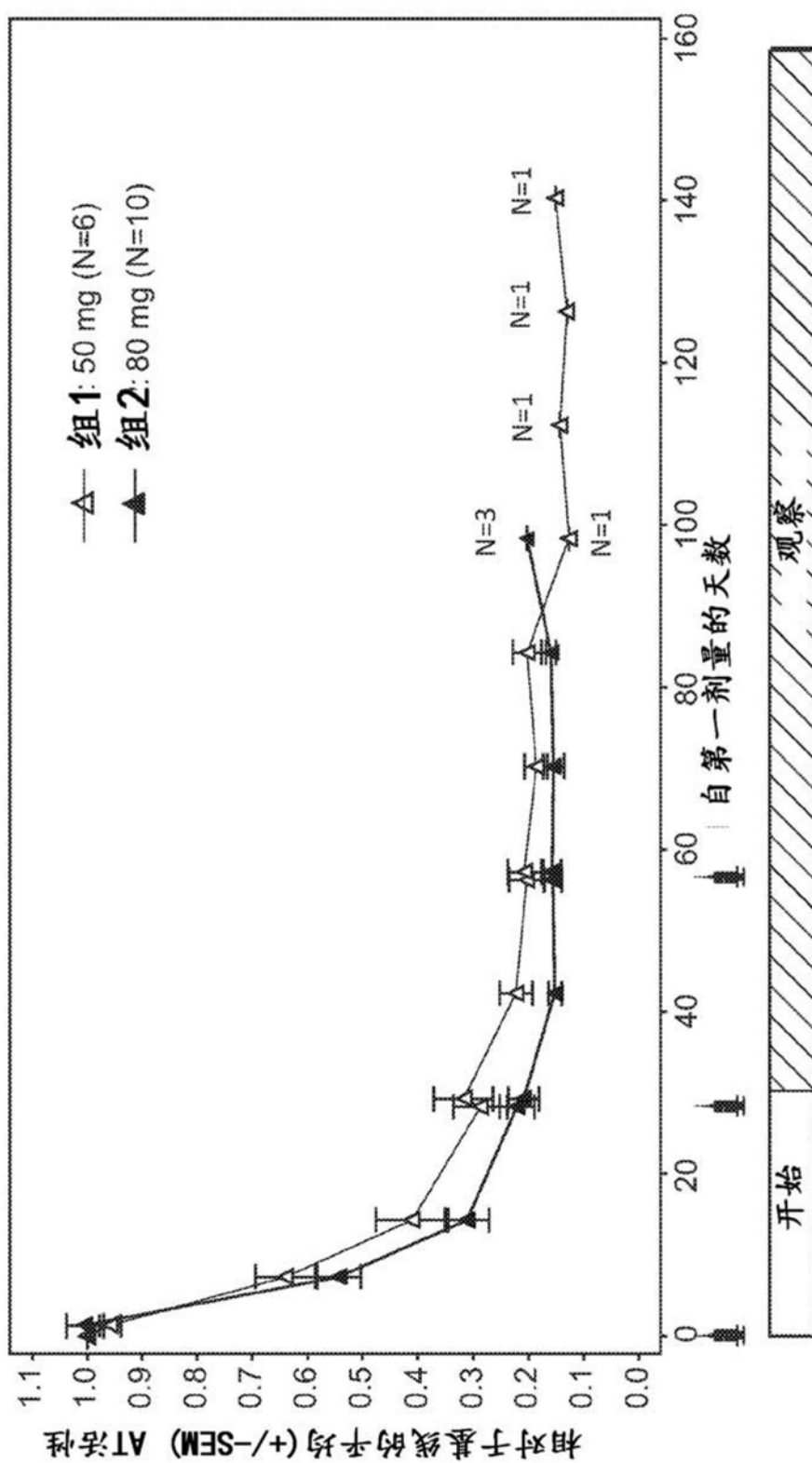


图15

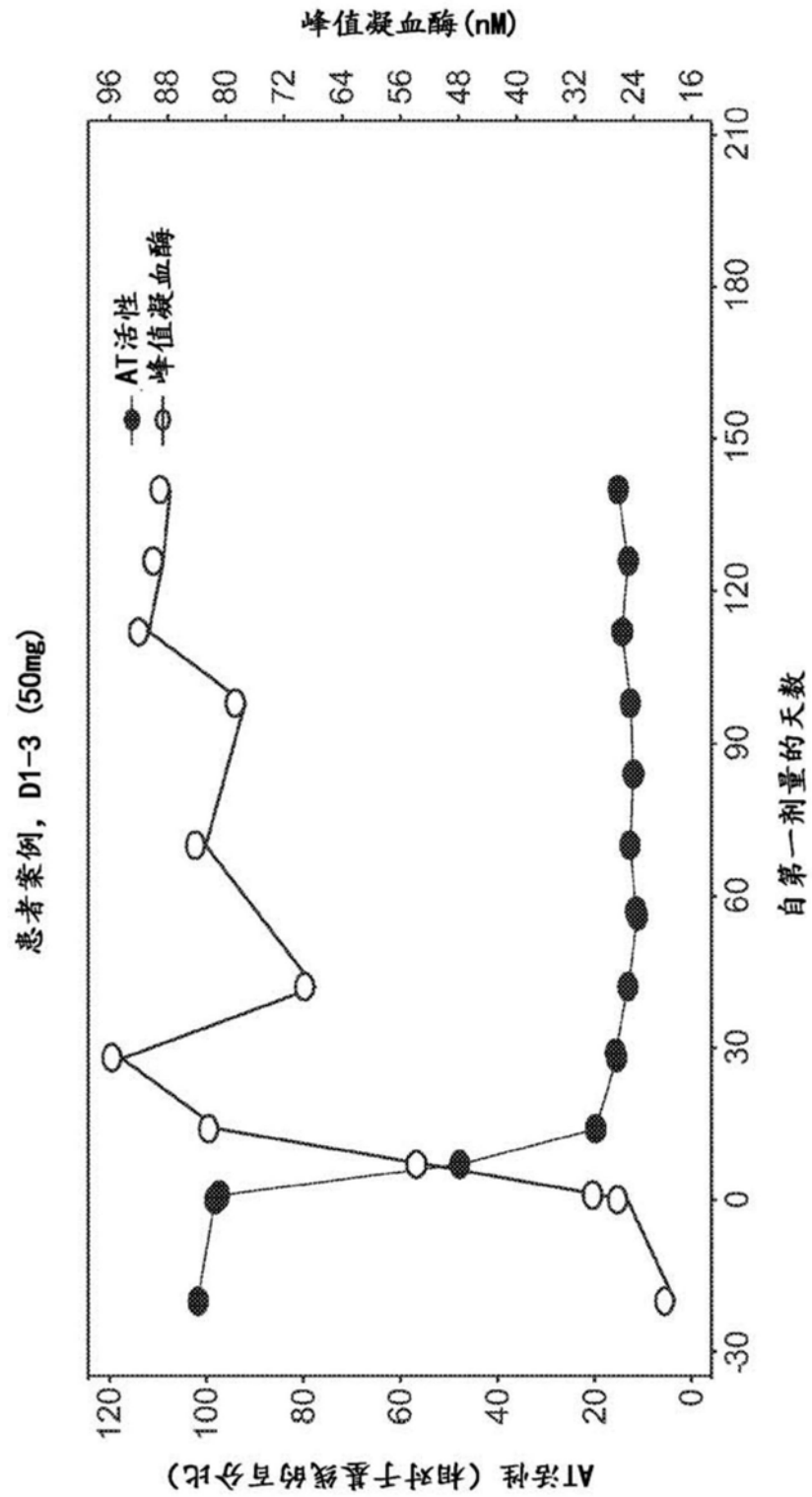
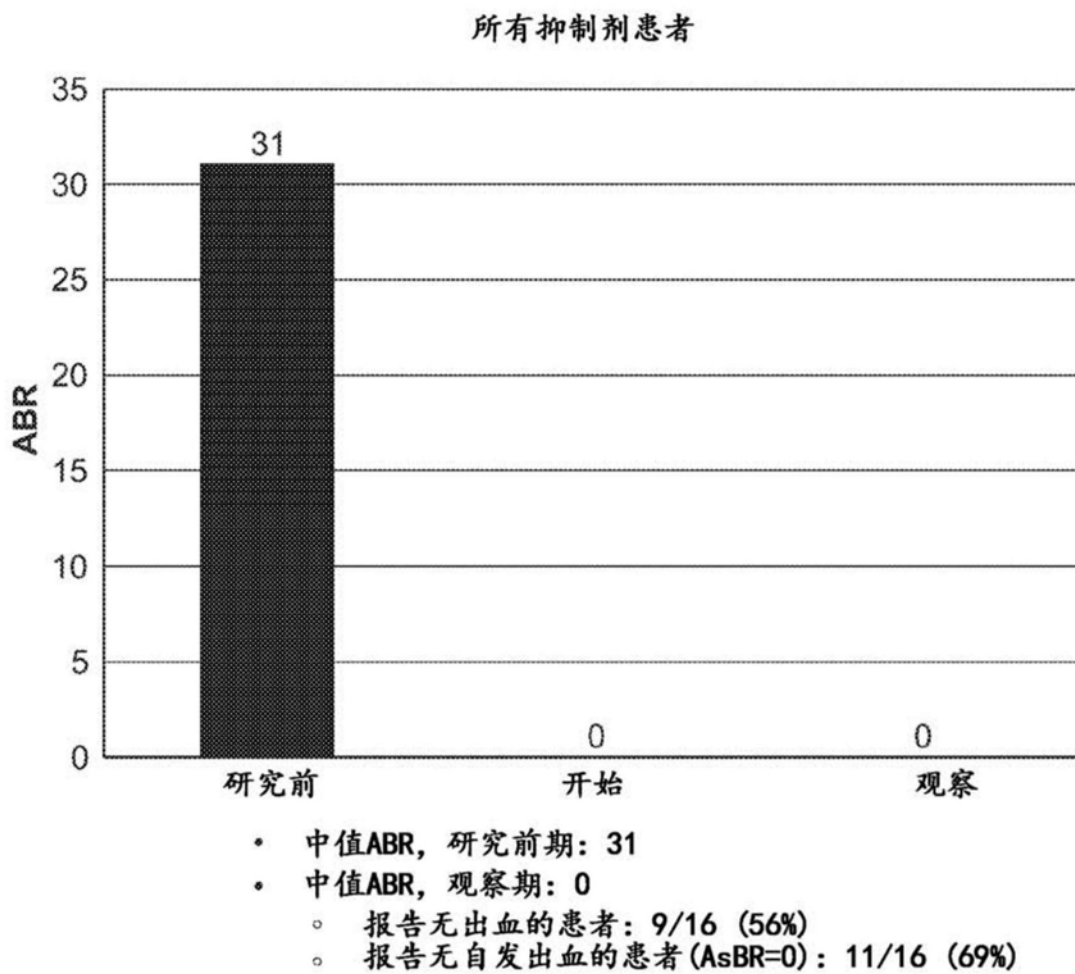


图16

患者	剂量	研究前ABR	开始 ABR	观察期				
				观察期 的天数	所有出血, n	ABR	自发出血, 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: 开放标签延长, ABR: 年出血率; AsBR: 年自发出血率
† 在开始 (0-28天) 和观察期 (第29天至最后一次研究随访的或最后一次给药+56天, 以较早者为准) 过程中治疗的出血事件的事后分析 ‡ 由医学记录得到的研究前ABR
*患者过渡到2期OLE作为数据截止

图17A



OLE：开放标签延长， ABR：年出血率； AsBR：年自发出血率

图17B

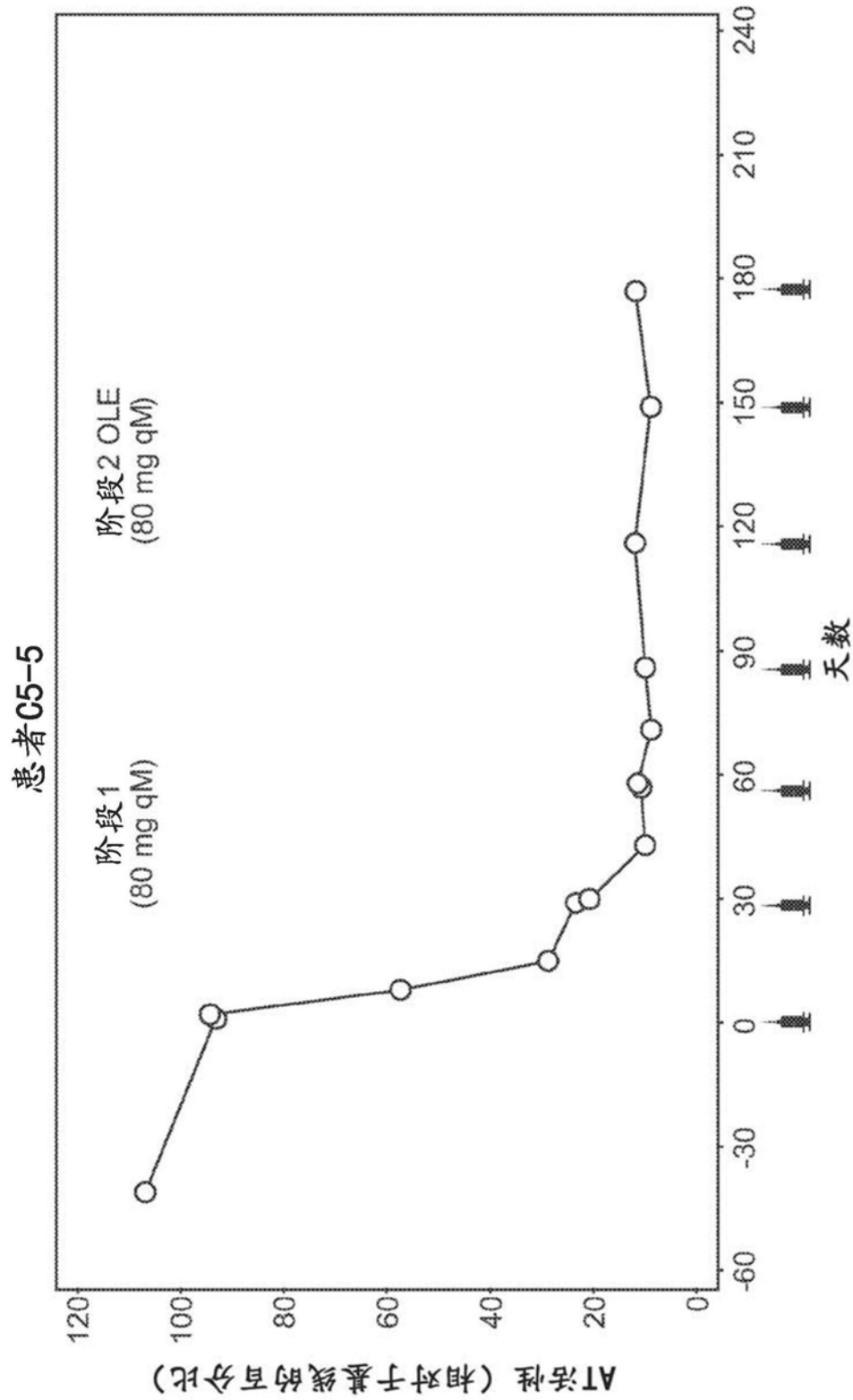


图18

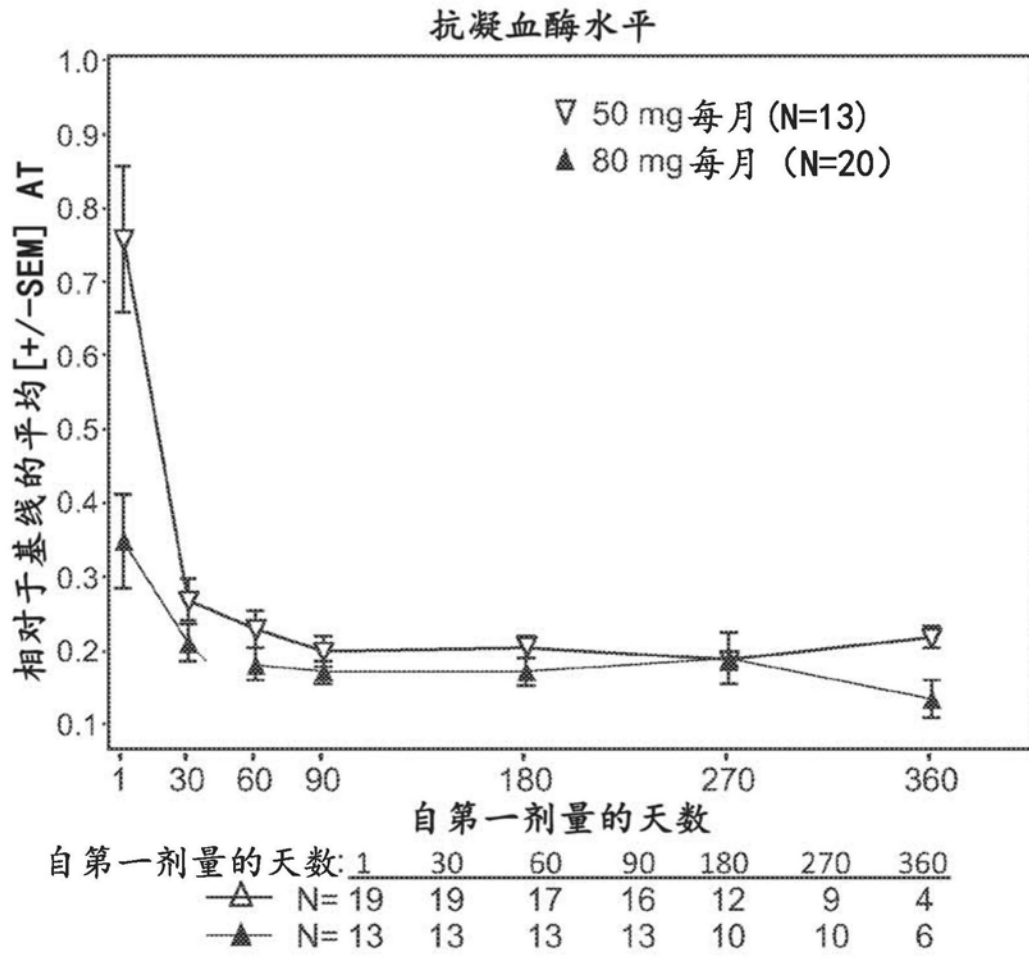


图19A

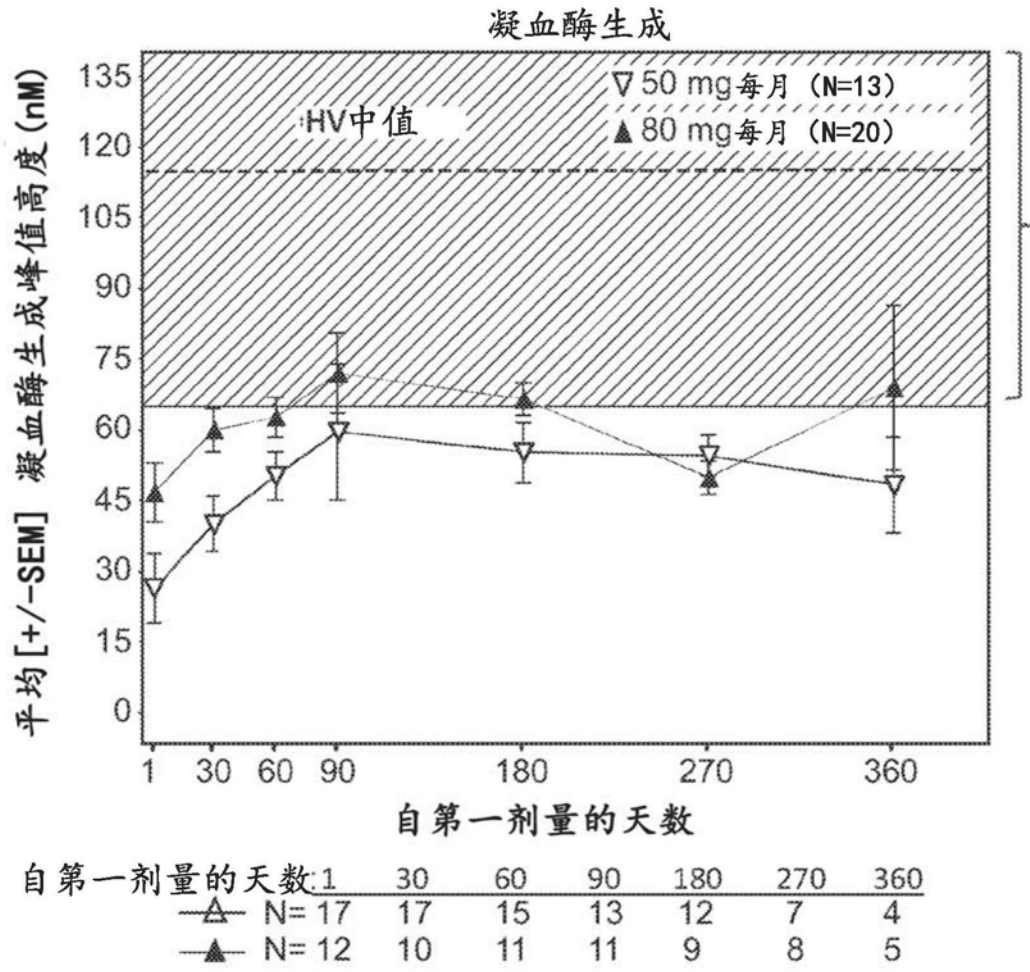
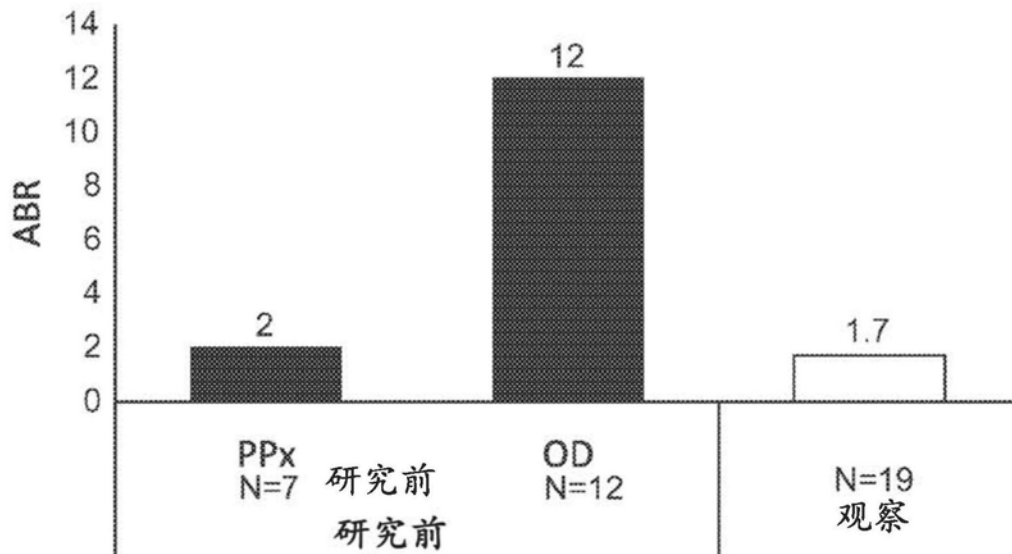


图19B

• 不具有抑制剂的患者中的中值ABR的总结



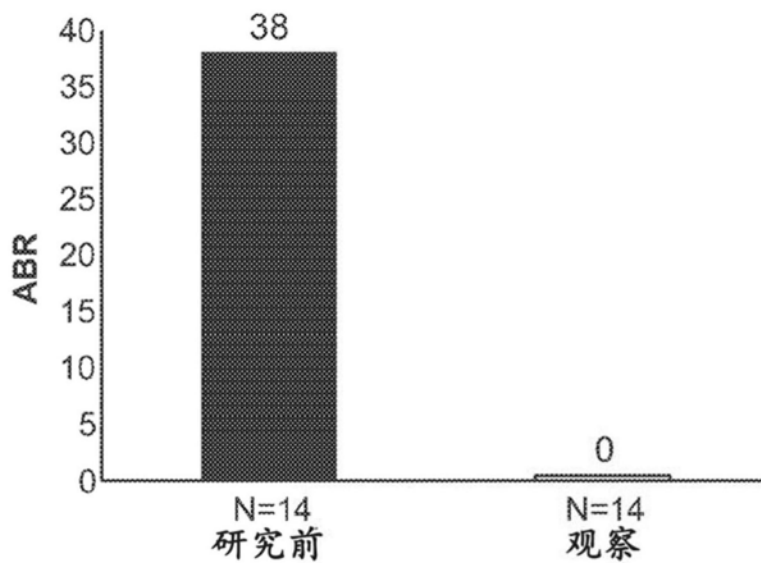
- 观察期中的中值持续时间：13个月[范围：2-19]
- 观察期中的平均AT活性(相对于基线)：22%

†观察其定义为治疗的第29天至数据转移或最后剂量之后56天中的较早者

ABR：年出血率；AsBR：年自发出血率；PPx：预防；OD：按需

图20A

具有抑制剂的患者中的中值ABR的总结



- 观察期中的中值持续时间：6个月[范围：1-11]
- 观察期中的平均AT活性(相对于基线)：18%

†观察其定义为治疗的第29天至数据转移
或最后剂量之后56天中的较早者

ABR：年出血率；AsBR：年自发出血率；PPx：预防；OD：按需

图20B

特征	不具有抑制剂的患者 (n=19)	具有抑制剂的患者 (n=14)
总出血, n	25	68
经历出血的患者, n	10	5
因果关系		
自发	8	50
创伤	16	18
其他†	1	-
位置		
关节	19	54
肌肉	1	14
内部	2	-
皮肤/粘膜	3	-

†该患者因腹痛而接受因子治疗，因为不确定是否出血。后来意识到并不是出血。

图21

出血的治疗	FVIII (n=8)	FIX (n=2)
来自规程的推荐	不多于30 IU/kg; 如果症状为减轻, 24小时后再次给药	不多于50 IU/kg; 如果症状为减轻, 24小时后再次给药
总出血, n	18	7
总施用, n	20	27
每次出血的 平均施用(中值; 范围)	1 (1.5; 1-7)	3.9 (3; 1-8)
每次注射的平均剂量	17 (5 – 31) IU/kg	18 (9 – 27) IU/kg
与Fitusiran之前相比, 每次出血使用较少或 相同量的因子的百分比	100%	100%
每次出血的 因子的平均总量	19 IU/kg	70 IU/kg

FVIII, 因子 VIII; FIX, 因子 IX
使用的置换因子产品: Advate, Aimafix, Benefix, Eloctate, Haemate, Helixate, Immunate, Immunine, Octanate, Recombinate, Refacto

图22

出血的治疗	aPCC (n=4)	rFVIIa (n=1)
来自规程的推荐	在12小时间隔中，对于少量至中度出血多至75 U/kg，和对于大量出血多至100 U/kg (不多于200 U/kg/天)；继续直到临床改善的清晰迹象	每2个小时多至90 μg/kg，基于出血的严重性可调节直到实现止血。对于严重出血，实现止血后每3-6个小时多至90 μg/kg
总出血， n	56	3
总施用， n	82	8
每次出血的平均施用(中值；范围)	1.5 (1; 1-3)	2.7 (3; 2-3)
每次注射的平均剂量	27 (14 – 37) U/kg	59 (37 – 62) μg/kg
与Fitusiran之前相比，每次出血使用较少或相同量的BPA的百分比	95% (53)	100% (3)
每次出血的BPA的平均总量	40 U/kg	156 μg/kg

aPCC, 经活化的凝血酶原复合物浓缩物; rFVIIa, 重组因子VIIa; BPA, 绕过剂使用的绕过剂: FEIBA, NovoSeven, Prothromplex

图23

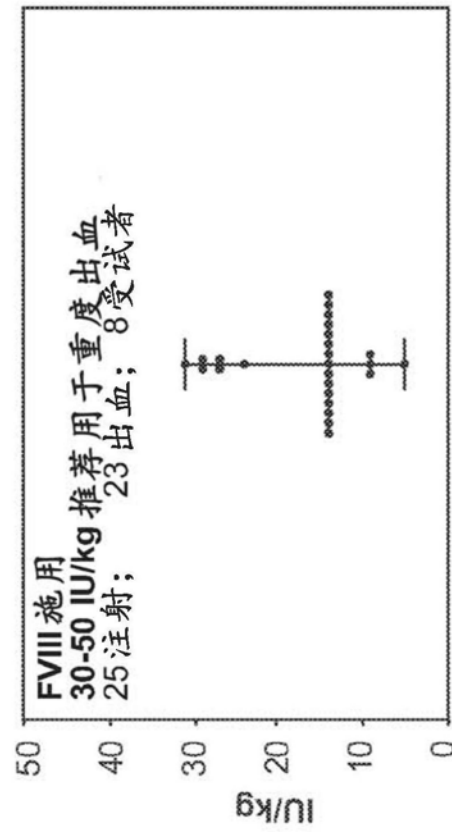


图24A

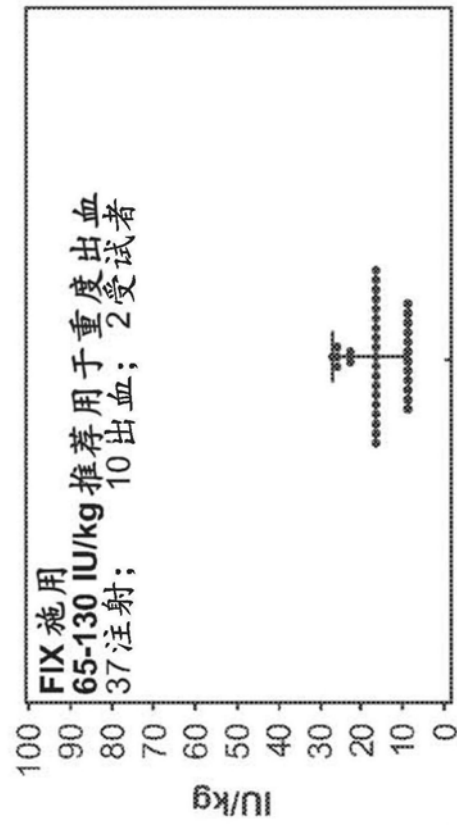


图24B

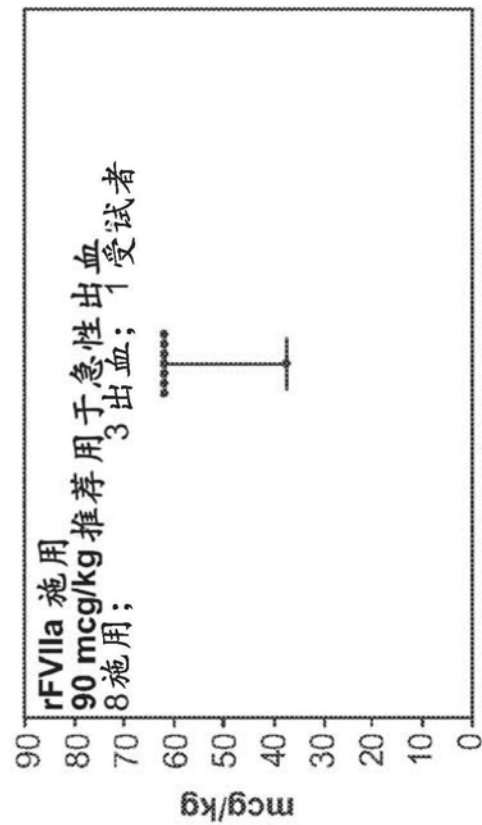


图24C

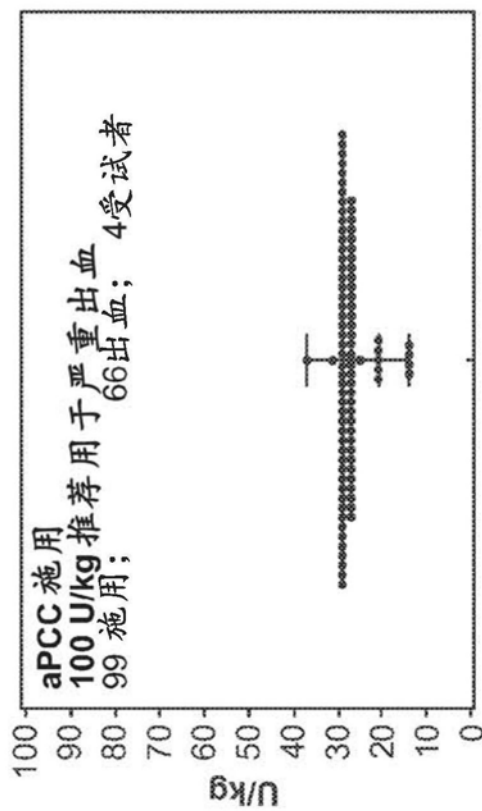


图24D

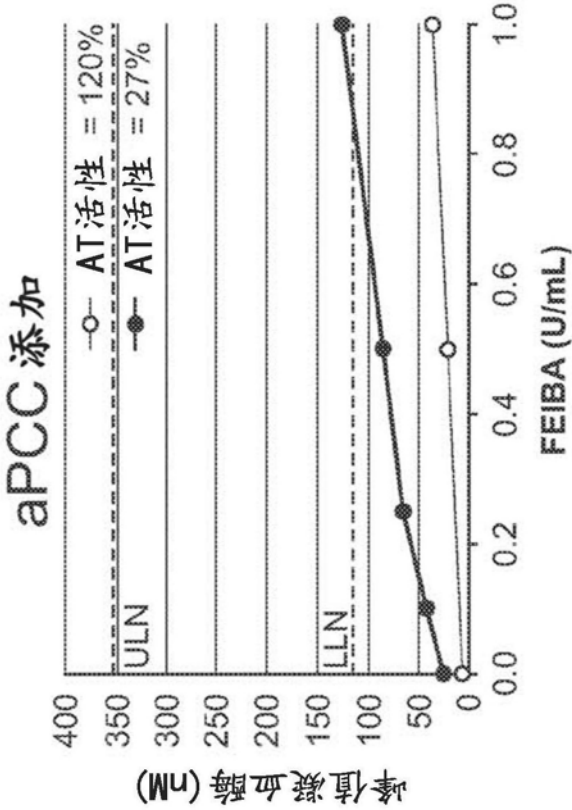


图25A

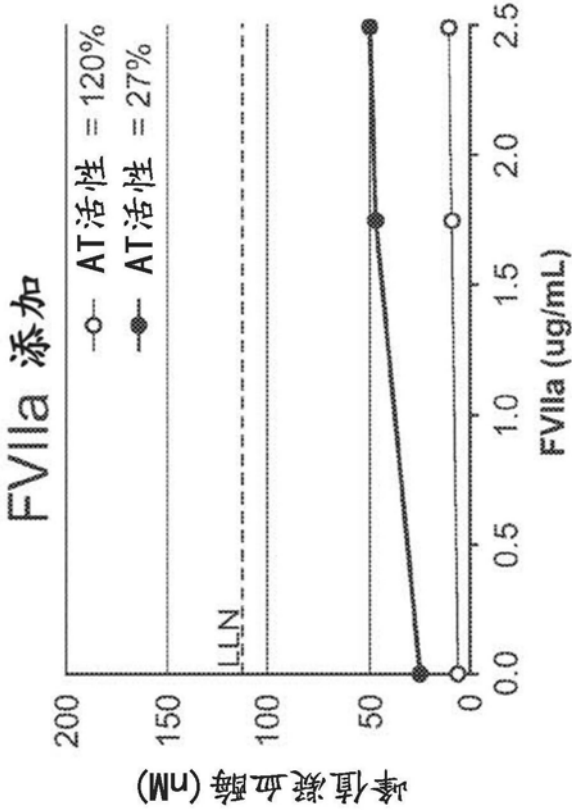


图25B

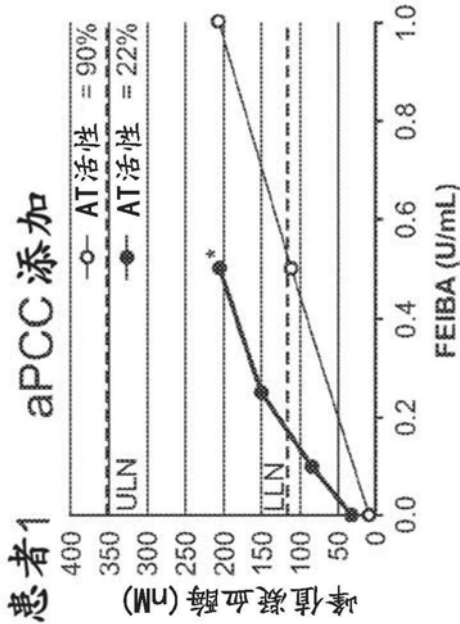


图26A

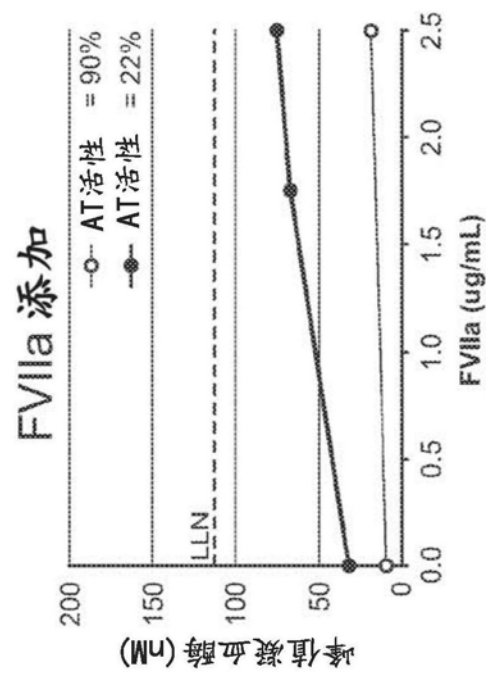


图26B

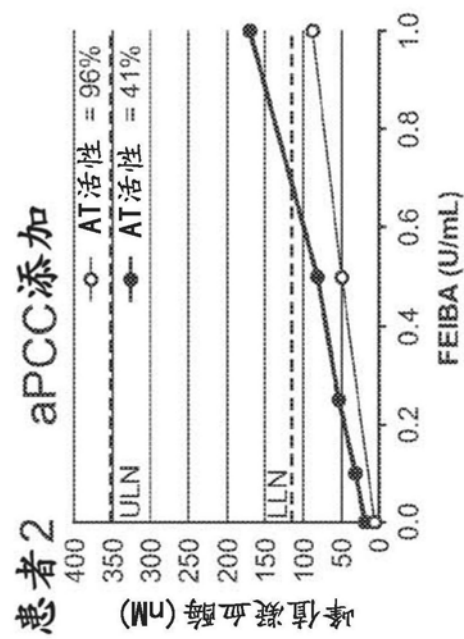


图26C

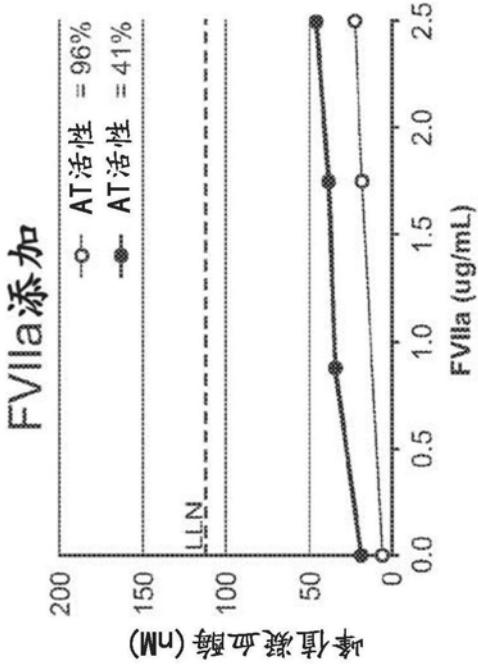


图26D

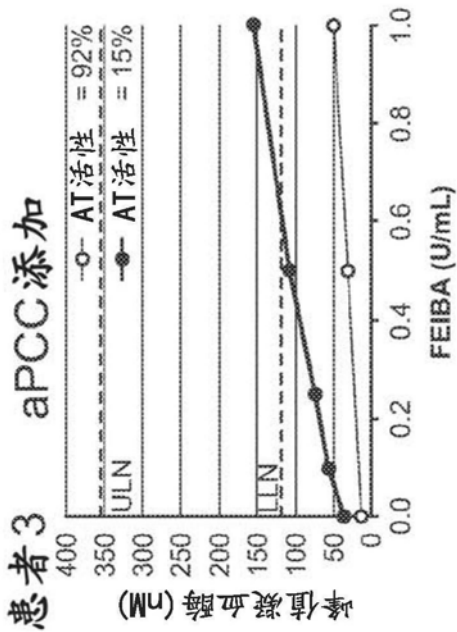


图26E

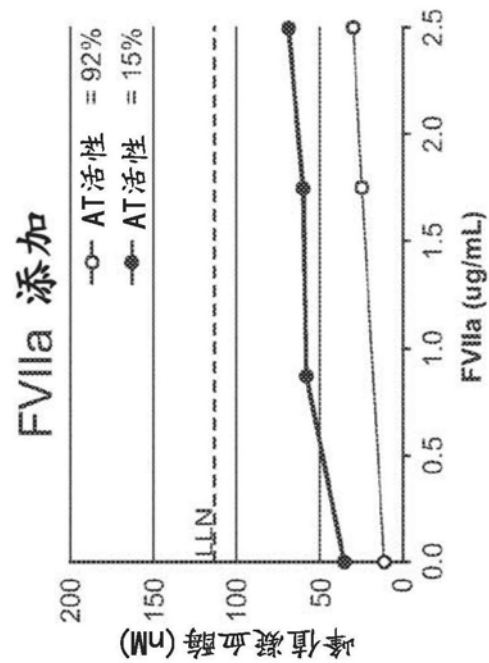


图26F

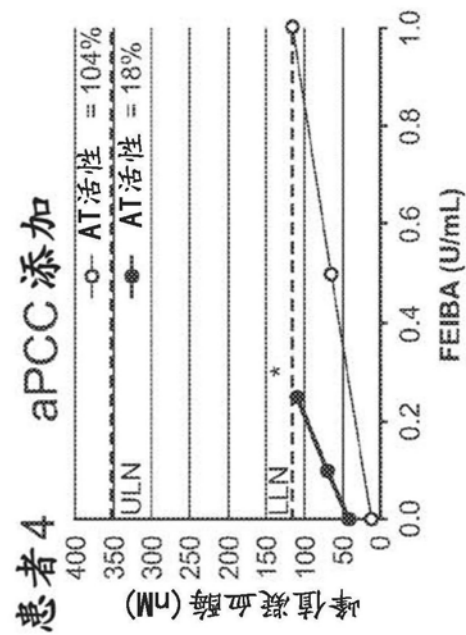


图26G

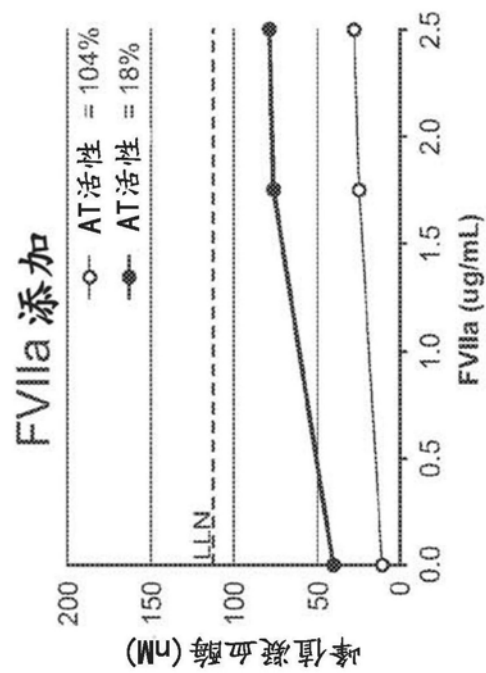


图26H

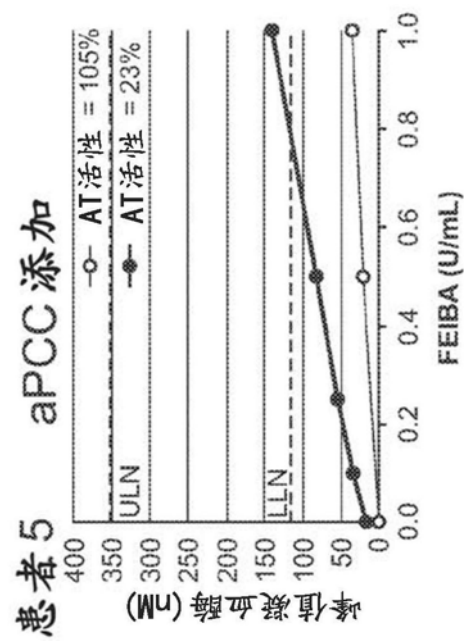


图26I

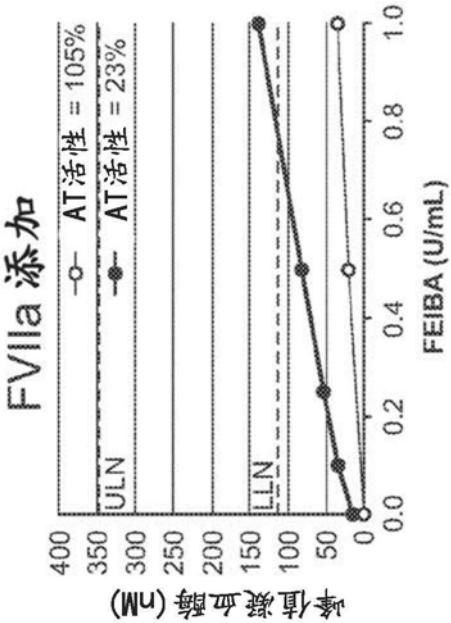


图26J

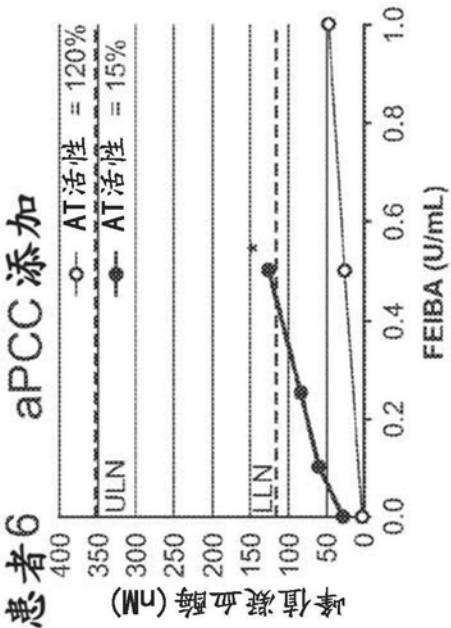


图26K

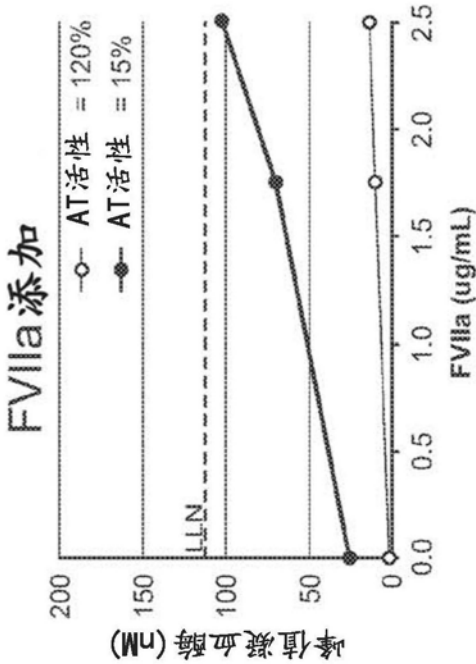


图26L

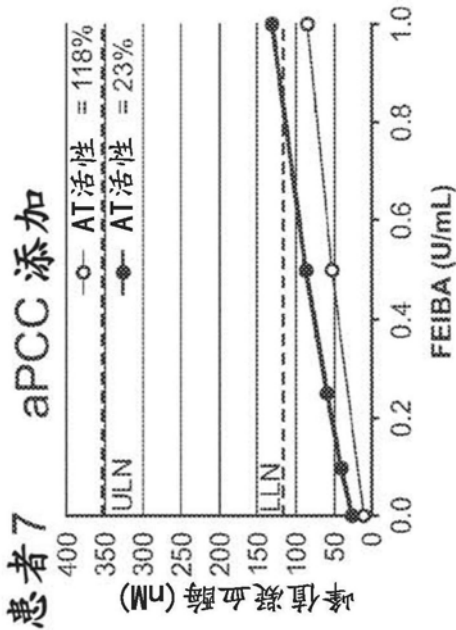


图26M

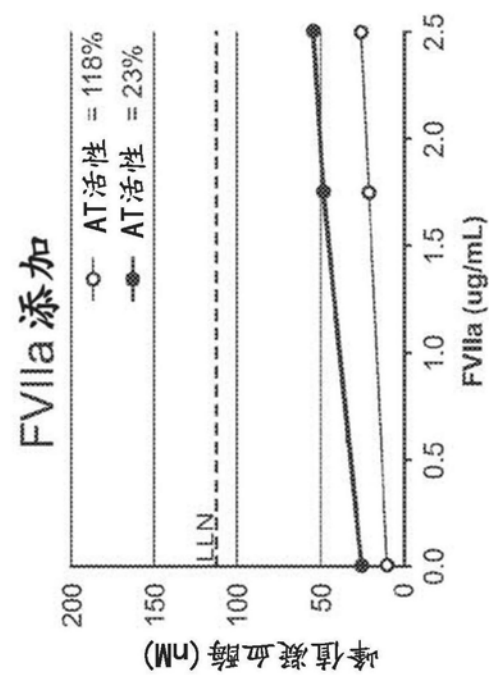


图26N

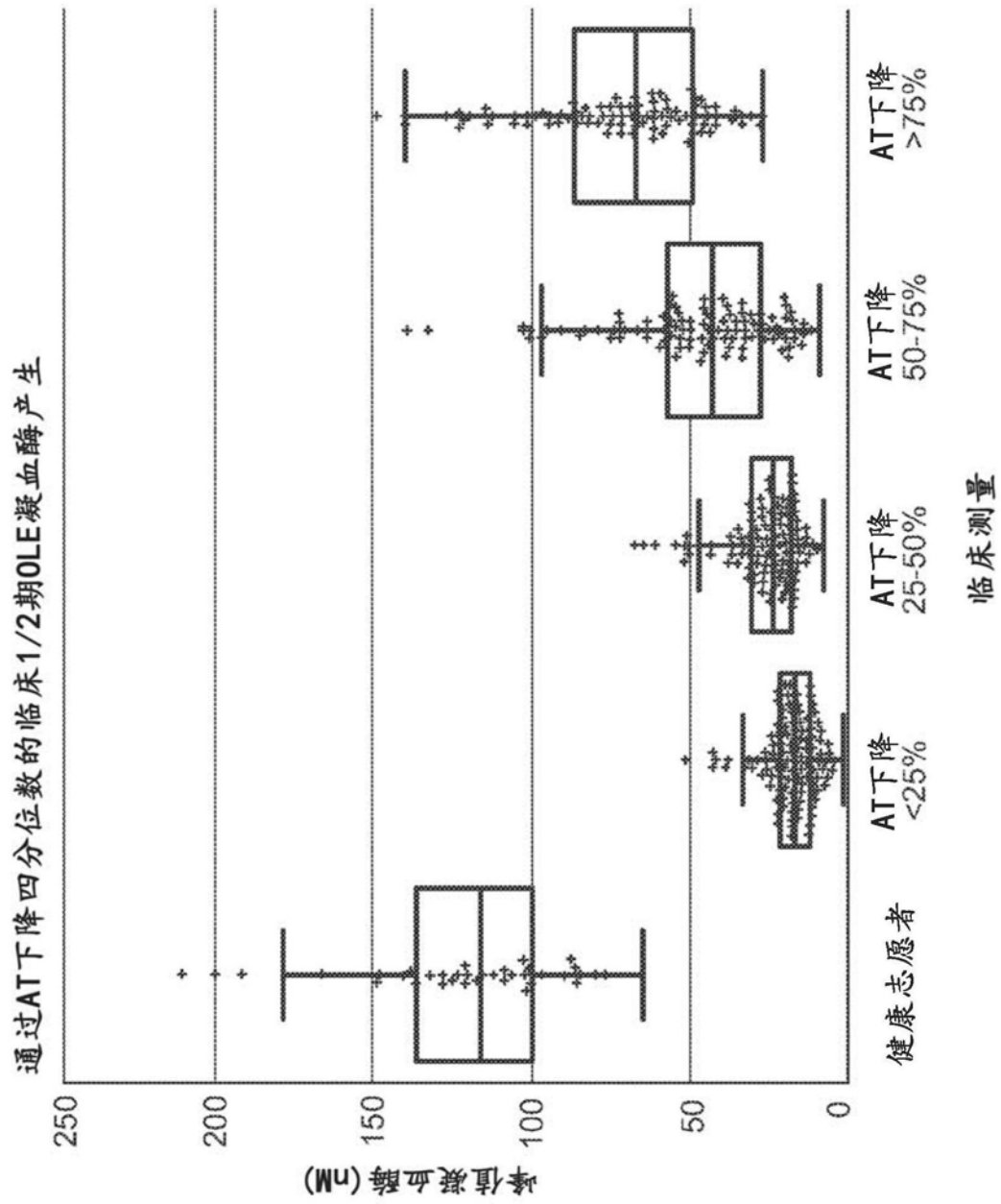


图27A

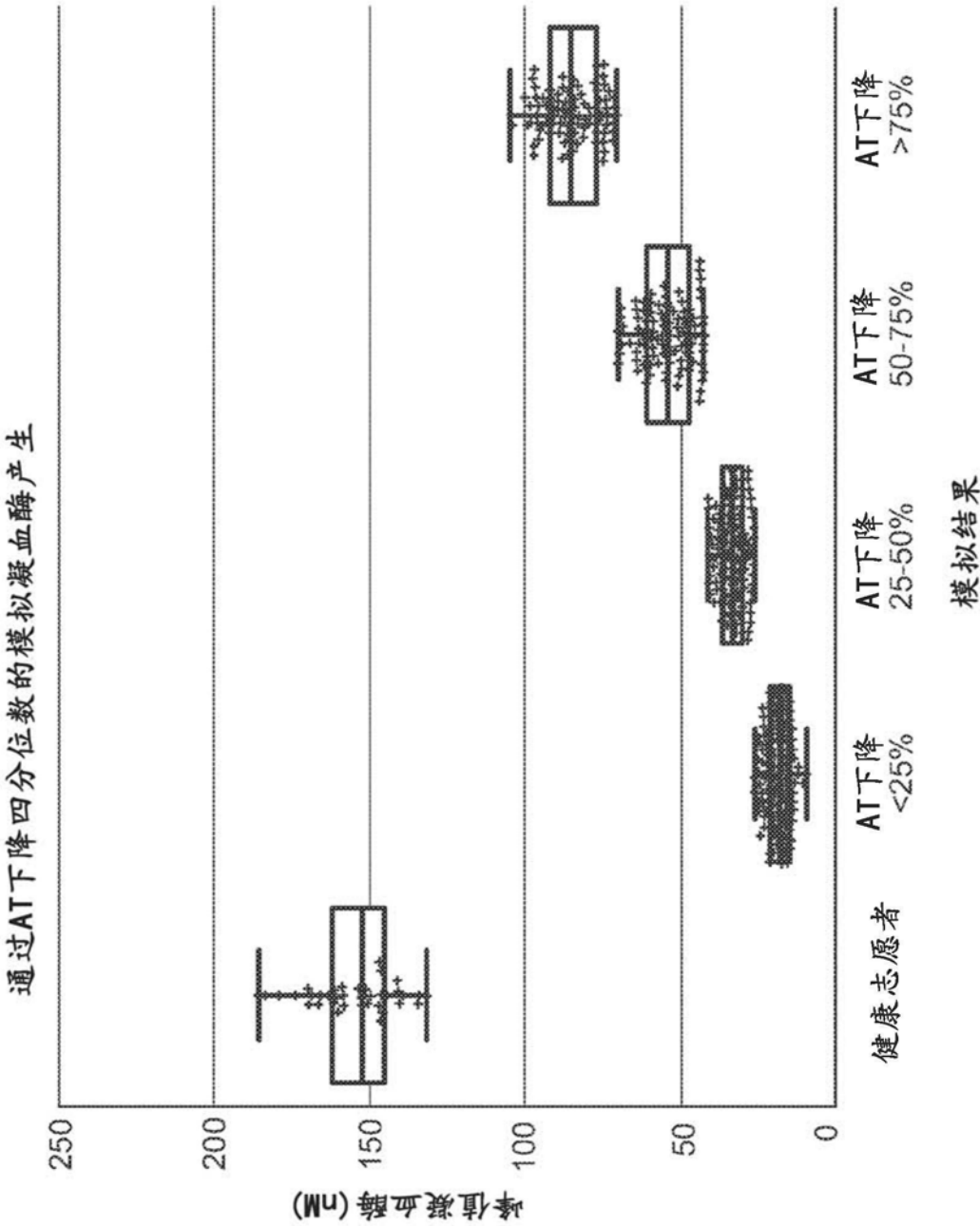


图27B

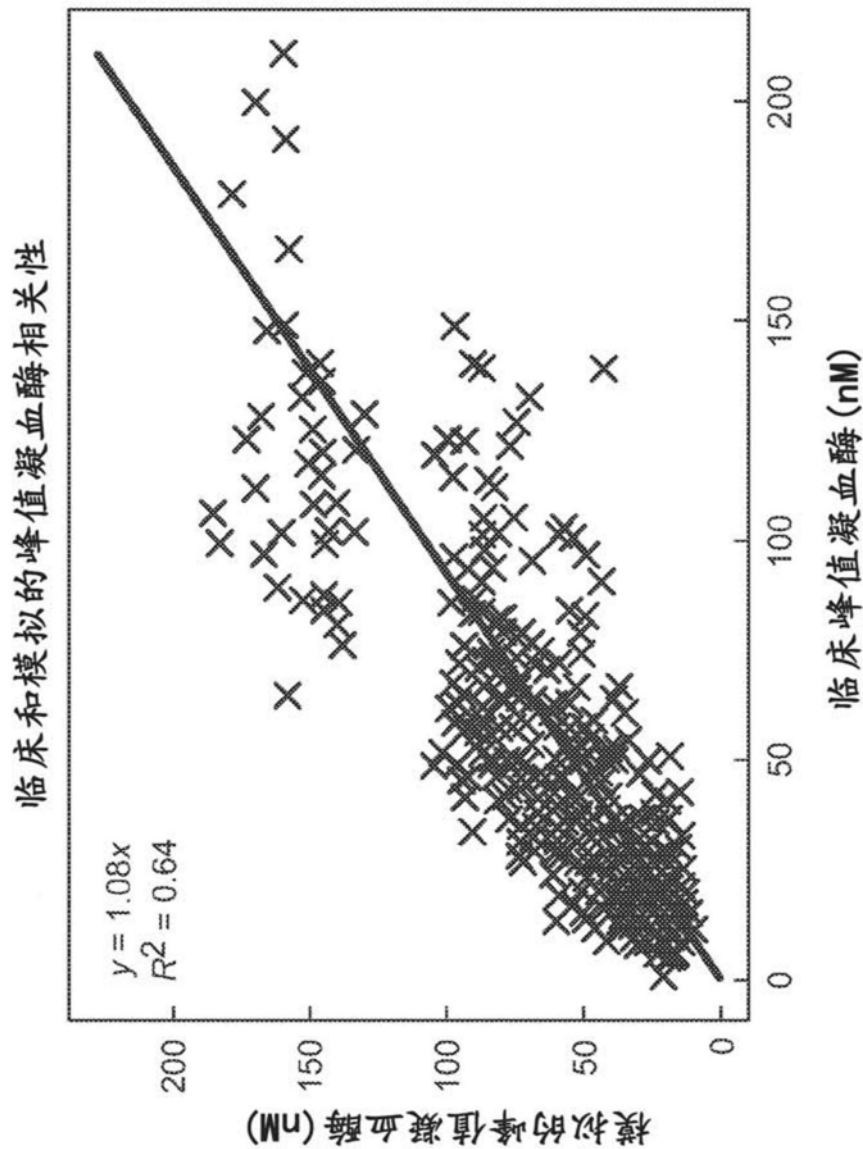


图27C

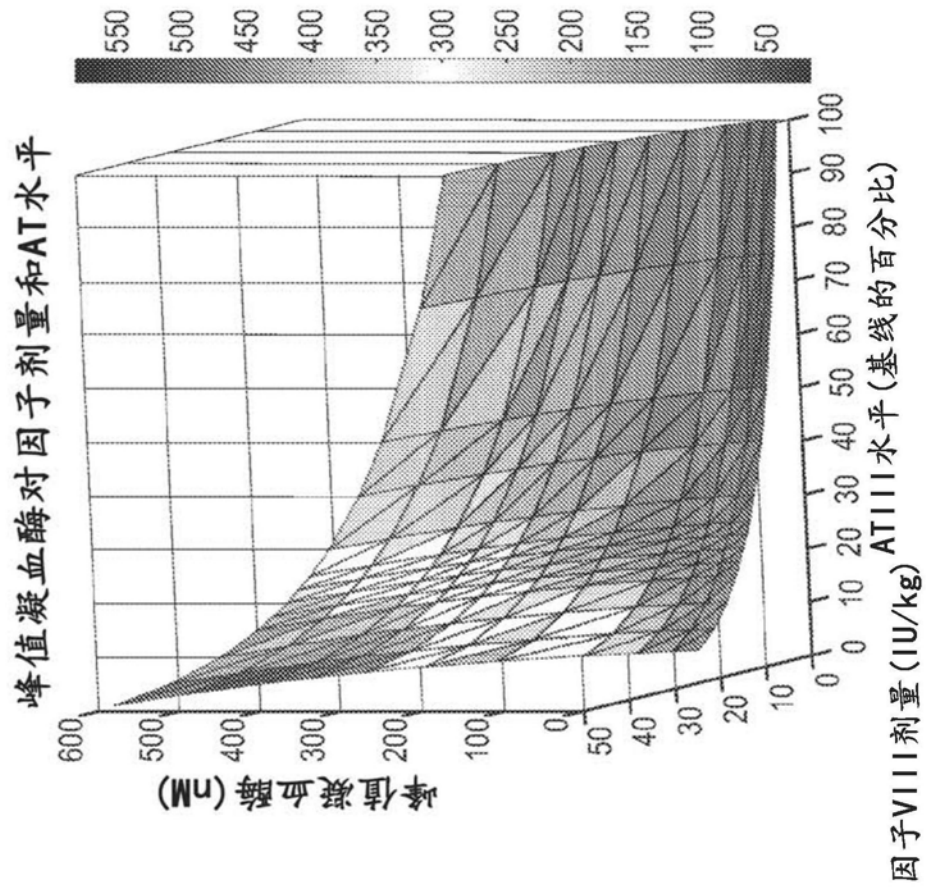


图28A

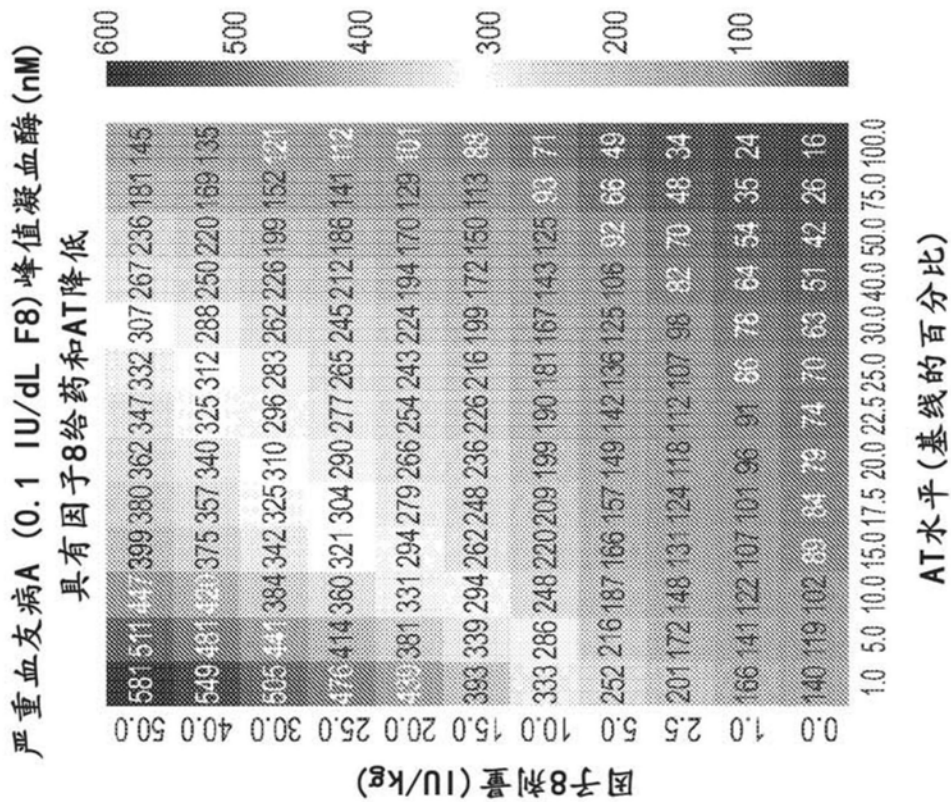


图28B

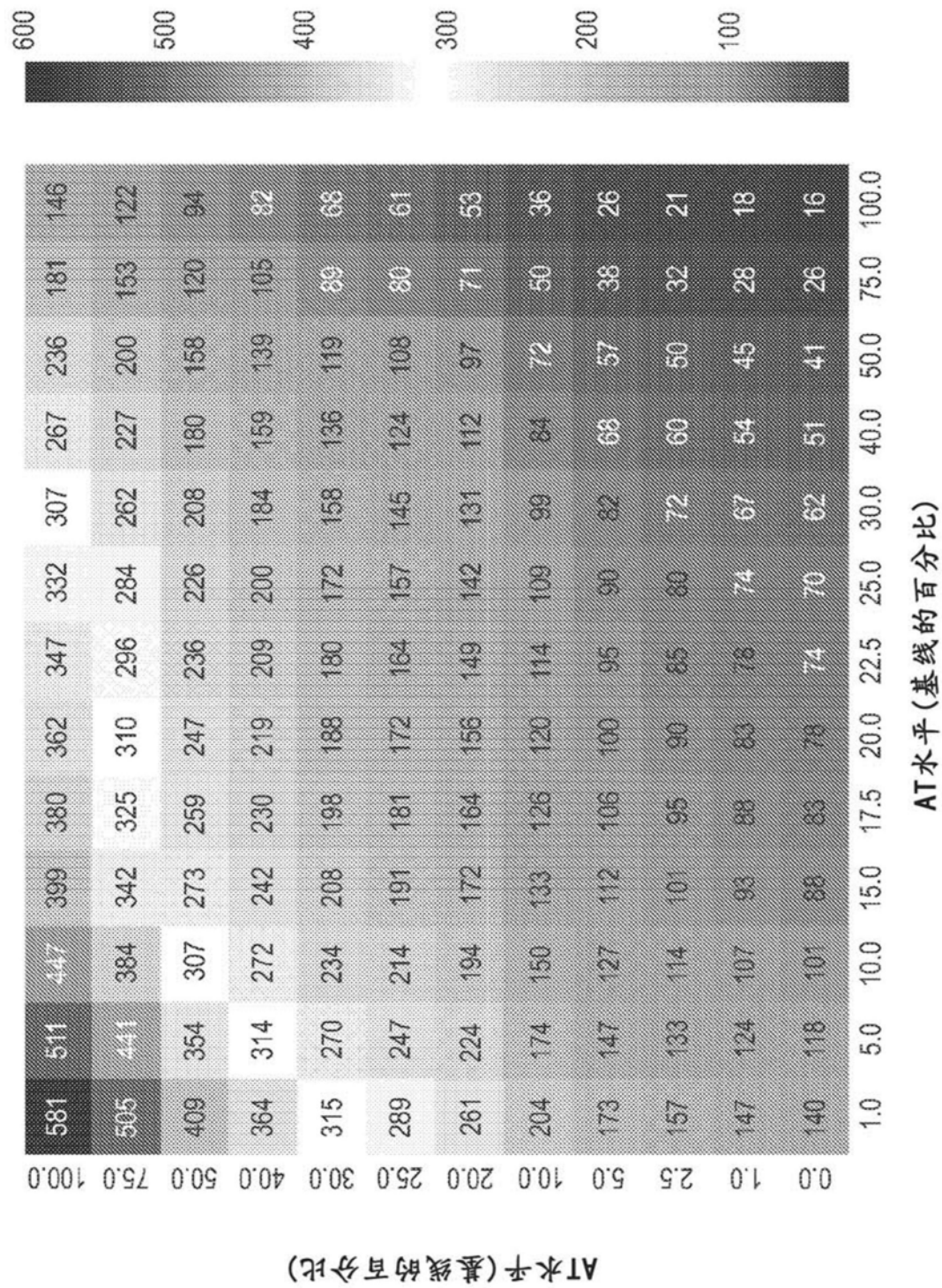


图28C

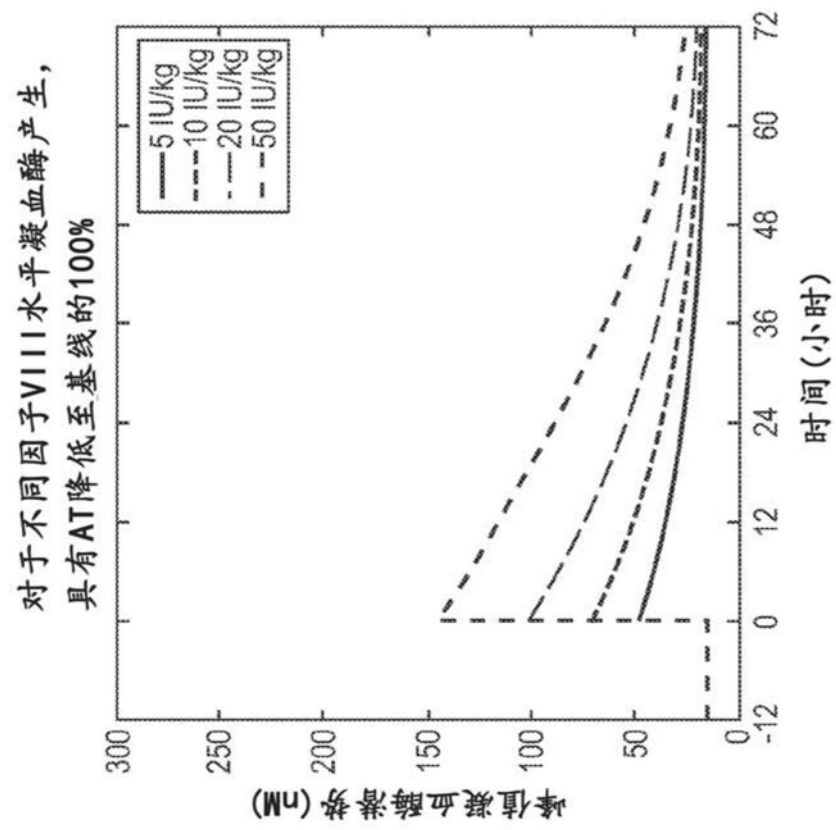


图29A

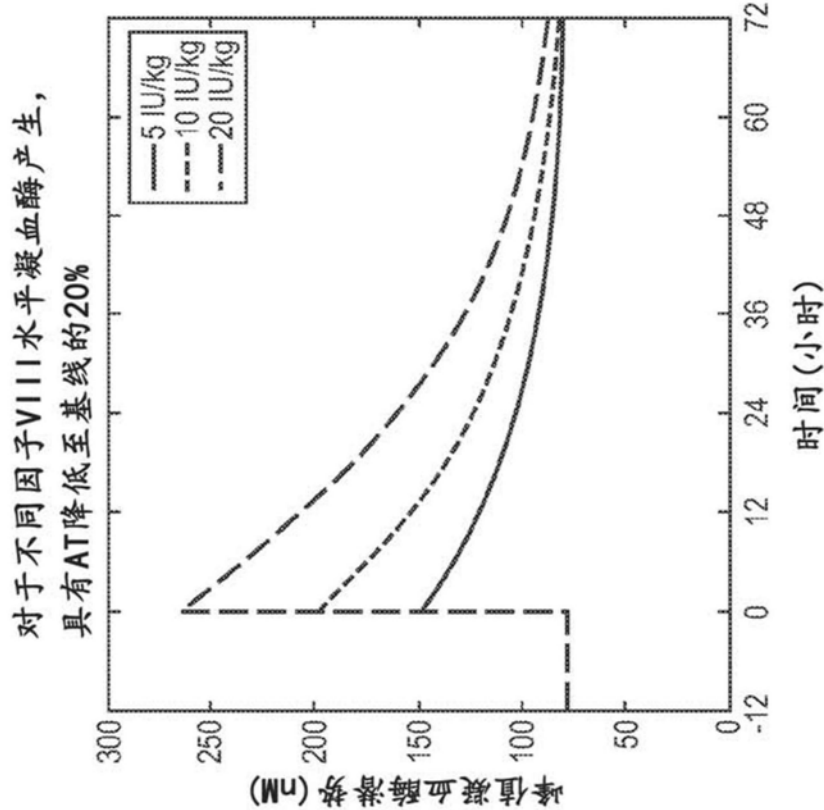


图29B