202028465

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202028465 A

(43)公開日： 中華民國 109 (2020) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：108134875　(22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 09 月 26 日

(51)Int. Cl.：　*C12N15/113 (2010.01)*　*A61K31/713 (2006.01)*

(30)優先權：2018/09/28　美國　62/738,256

2019/05/07　美國　62/844,174

(71)申請人：美商阿尼拉製藥公司 (美國) ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.　(US)

美國

(72)發明人：納爾　傑亞拉卡斯K NAIR, JAYAPRAKASH K. (US)；馬爾　馬丁A MAIER, MARTIN A. (DE)；基哈夫　瓦聖特R JADHAV, VASANT R. (US)；奇汀　馬克 KEATING, MARK (US)；費茲吉爾德　凱文 FITZGERALD, KEVIN (US)；米史坦史特爾 MILSTEIN, STUART (US)；布朗　柯克 BROWN, KIRK (US)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：104 項　圖式數：10　共 331 頁

(54)名稱

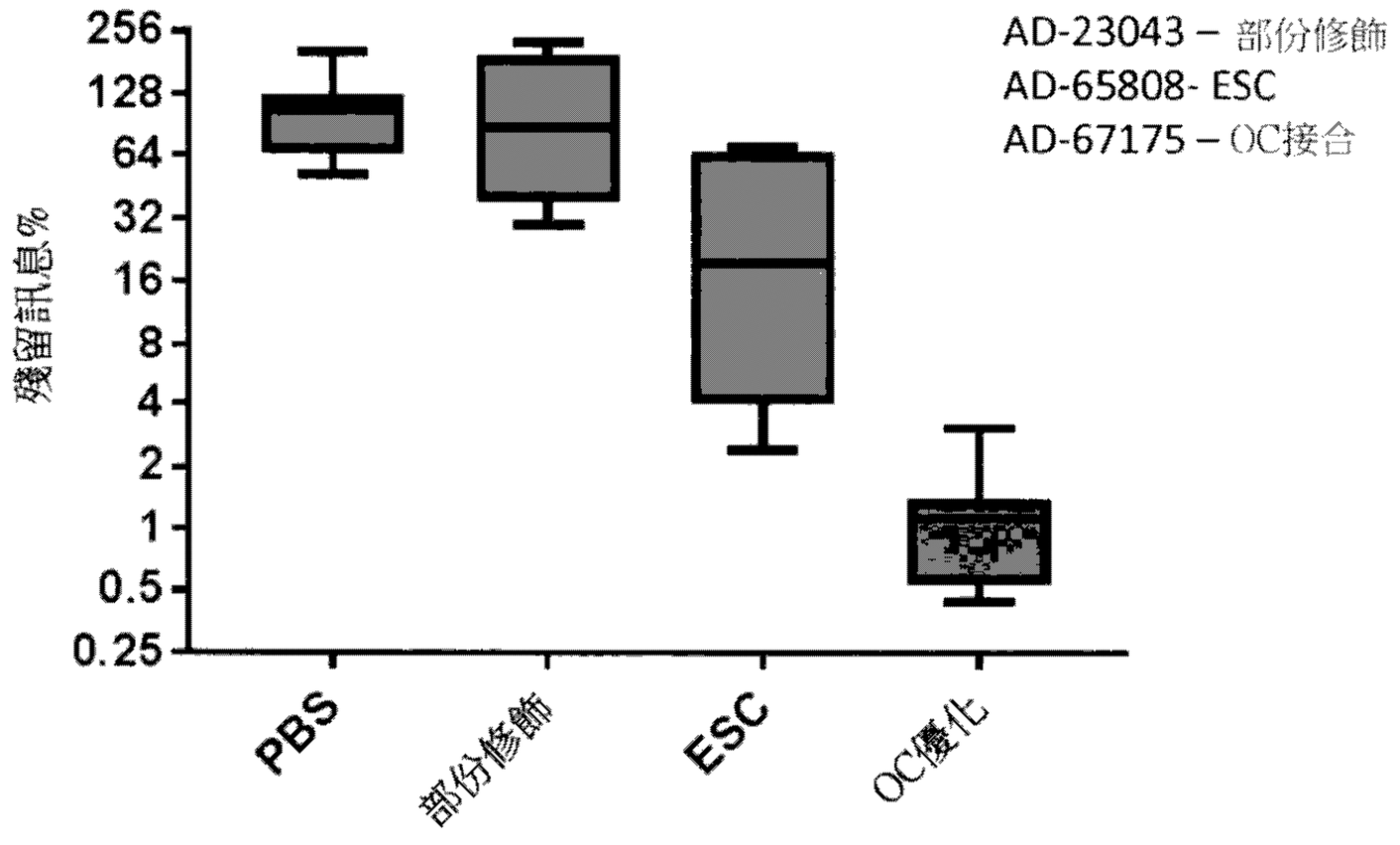
甲狀腺素運載蛋白（ＴＴＲ）ｉＲＮＡ組成物及其治療或預防ＴＴＲ相關眼部疾病之使用方法

(57)摘要

本發明提供一種 iRNA 劑，例如，靶向甲狀腺素運載蛋白(TTR)基因之雙股 iRNA 劑，及使用此等 iRNA 劑治療或預防 TTR 相關眼部疾病之方法。

The present invention provides iRNA agents, e.g., double stranded iRNA agents, that target the transthyretin (TTR) gene and methods of using such iRNA agents for treating or preventing TTR-associated ocular diseases.

指定代表圖：


256
128
64
32
16
8
4
2
1
0.5
0.25
殘留訊息%
PBS
部份修飾
ESC
OC優化
AD-23043 – 部份修飾
AD-65808- ESC
AD-67175 – OC接合

【第1圖】

202028465

【發明摘要】

【中文發明名稱】 甲狀腺素運載蛋白(TTR) iRNA組成物及其治療或預防TTR相關眼部疾病之使用方法

【英文發明名稱】 TRANSTHYRETIN (TTR) iRNA COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF FOR TREATING OR PREVENTING TTR-ASSOCIATED OCULAR DISEASES

【中文】

本發明提供一種iRNA劑，例如，靶向甲狀腺素運載蛋白(TTR)基因之雙股iRNA劑，及使用此等iRNA劑治療或預防TTR相關眼部疾病之方法。

【英文】

The present invention provides iRNA agents, *e.g.*, double stranded iRNA agents, that target the transthyretin (TTR) gene and methods of using such iRNA agents for treating or preventing TTR-associated ocular diseases.

【指定代表圖】 第1圖

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 甲狀腺素運載蛋白(TTR) iRNA組成物及其治療或預防TTR相關眼部疾病之使用方法

【英文發明名稱】 TRANSTHYRETIN (TTR) iRNA COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF FOR TREATING OR PREVENTING TTR-ASSOCIATED OCULAR DISEASES

【技術領域】

相關申請案

【0001】 本申請案主張美國臨時申請案案號62/738,256(2018年9月28日申請)與美國臨時申請案案號62/844,174(2019年5月7日申請)之優先權，其等完整內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0002】 本申請案係有關美國臨時申請案案號62/668,072(2018年5月7日申請)、美國臨時申請案案號62/738,747(2018年9月29日申請)、美國臨時申請案案號62/773,082(2018年11月29日申請)、與國際申請案案號PCT/US2019/031170(2019年5月7日申請)，其等完整內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0003】 本申請案亦有關美國臨時申請案案號61/615,618(2012年3月26日申請)、美國臨時申請案案號61/680,098(2012年8月6日申請)、美國申請案案號14/358,972(2014年5月16日申請)、目前為美國專利案案號9,399,775(2016年7月26日頒發)、美國申請案案號15/188,317(2016年6月

21日申請)、與國際申請案案號PCT/US2012/065691(2012年11月16日申請)且於2013年5月23日公開為WO 2013/075035，其等完整內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0004】此外，本申請案亦有關美國臨時申請案案號62/199,563(2015年7月31日申請)、美國臨時申請案案號62/287,518(2016年1月27日申請)、國際申請案案號PCT/US2016/044359(2016年7月28日申請)且於2017年2月9日公開為WO 2017/023660、美國申請案案號15/221,651(2016年6月28日申請)、目前為美國專利案案號10,208,307(2019年2月19日頒發)、與美國申請案案號16/223,362(2018年12月18日申請)，其等完整內容已分別以引用之方式併入本文中。

序列表

【0005】本申請案包含之序列表已呈ASCII格式電子檔交付，其完整內容已以引用之方式併入本文中。該於2019年9月25日製作之ASCII複本名稱為121301_09320_SL.txt 檔案大小為31,250個位元組。

【先前技術】

【0006】甲狀腺素運載蛋白(TTR)(亦稱為前白蛋白)運載視黃醇-結合性蛋白質(RBP)與甲狀腺素(T4)，亦透過其與血液及CSF中之RBP締合而成為視黃醇(維生素A)之載子。甲狀腺素運載蛋白係依其運載甲狀腺素與視黃醇(**trans**port of **thy**roxine and **reti**nol)而得名。TTR亦作用為蛋白酶且可以裂解蛋白質，包括apoA-I (主要HDL載脂蛋白)、類澱粉蛋白β-肽、與神經肽Y。參見Liz, M.A.等人(2010) IUBMB Life, 62(6):429-435。

【0007】TTR係四個相同之127個胺基酸亞單位(單體)之四聚體，其

富集β折疊結構。每個單體具有2個4-股β折疊與長橢圓體形。由反平行β-折疊交互作用連結單體成二聚體。源自每個單體之短環形成主要二聚體-二聚體交互作用。這兩對環分隔二聚體之相對外凸β-折疊，形成內部通道。

【0008】 肝臟為TTR之主要表現部位。然而，TTR亦表現在其他部位，包括脈絡叢、視網膜(特定言之視網膜色素上皮細胞(RPE)與睫狀上皮細胞(CE))與胰臟。

【0009】 甲狀腺素運載蛋白為形成類澱粉蛋白原纖維之前體蛋白質之至少27種不同蛋白質中之一種。參見Guan, J.等人(Nov. 4, 2011)之*Current perspectives on cardiac amyloidosis, Am J Physiol Heart Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011。器官與組織中類澱粉蛋白原纖維之細胞外沉積為類澱粉蛋白變性之特徵。類澱粉蛋白原纖維係由錯誤摺疊蛋白質凝集物組成，其可能由前體蛋白質之過量生產或特異性突變所致。TTR的類澱粉蛋白生成之可能性可能與其廣泛性β折疊結構相關；X-光結晶學研究顯示，某些類澱粉蛋白生成性突變使蛋白質之四聚體結構失穩。參見例如，Saraiva M.J.M. (2002) Expert Reviews in Molecular Medicine, 4(12):1-11。

【0010】 類澱粉蛋白變性係一群類澱粉蛋白疾病之通稱名詞，其特徵在於類澱粉蛋白沉積。類澱粉蛋白疾病依據其前體蛋白質分類；例如，類澱粉蛋白以「A」開頭，隨後為前體蛋白質之縮寫，例如，ATTR係指類澱粉蛋白生成性甲狀腺素運載蛋白(**a**mloidogenic **trans**th**y**retin)。參見上述文獻。

【0011】 TTR相關疾病有許多種，大多數為類澱粉蛋白疾病。正常序列TTR係與老年人心臟類澱粉蛋白變性相關，稱為老年全身性類澱粉蛋白變性(SSA)(亦稱為老年心臟類澱粉蛋白變性(SCA)或心臟類澱粉蛋白變

性)。SSA經常在許多其他器官中伴隨出現顯微沉積。TTR類澱粉蛋白變性呈現各種不同型式。當周邊神經系統受到較顯著影響時，該疾病稱為家族性類澱粉蛋白多發性神經病變(FAP)。當主要涉及心臟但未涉及神經系統時，該疾病稱為家族性類澱粉蛋白心肌病(FAC)。第三種主要TTR類澱粉蛋白變性型式為柔腦膜類澱粉蛋白變性，亦稱為軟腦膜或腦膜血管類澱粉蛋白變性、中樞神經系統(CNS)類澱粉蛋白變性、或類澱粉蛋白變性VII型。TTR突變亦造成類澱粉蛋白變性玻璃體混濁、腕隧道症候群、及甲狀腺功能正常的高甲狀腺素血症，其為因突變TTR分子提高對甲狀腺素親和性以致提高甲狀腺素與TTR締合性所繼發之非類澱粉蛋白變性疾病。參見，例如，Moses等人(1982) *J. Clin. Invest.*, 86, 2025-2033。

【0012】 異常類澱粉蛋白生成性蛋白質可能為先天性或後天性經由體細胞突變所致。Guan, J. *et al.* (Nov. 4, 2011) Current perspectives on cardiac amyloidosis, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011. 1。與甲狀腺素運載蛋白相關之ATTR為最常見之遺傳性全身性類澱粉蛋白變性。Lobato, L. (2003) *J. Nephrol.*, 16:438-442。TTR突變加速TTR類澱粉蛋白形成過程，且為發展出ATTR之最重要之風險因子。已知有超過85種類澱粉蛋白生成性TTR變異體造成家族性全身性類澱粉蛋白變性。TTR突變通常會產生全身性類澱粉蛋白沉積，其特別涉及周邊神經系統，但有些突變仍與心肌病變或玻璃體混濁有關。參見上述文獻。

【0013】 V30M突變為最普遍之TTR突變。參見例如，Lobato, L. (2003) *J Nephrol*, 16:438-442。3.9%非裔美國人口帶有V122I突變，且係FAC之最常見肇因。Jacobson, D.R.等人(1997) *N. Engl. J. Med.* 336 (7): 466–73。據估測，SSA影響超過25%之80歲以上人口。Westermark, P.等人

(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (7): 2843–5。

【0014】 直到最近才核准之靶向肝TTR之雙股RNAi劑帕特斯蘭(Patisiran)之前，肝臟移植為治療TTR相關疾病之唯一療法。然而，值得關注的是肝臟移植並無法抑制與TTR突變相關之眼部疾病(Hara等人(2010) *Arch Opthamol* 128:206-210)。因此，靶向肝中所產生TTR之帕特斯蘭不抑制TTR相關眼部疾病，因為在活體內要有效傳遞iRNA劑至細胞時，需要特異性靶向且需實質保護遠離細胞外環境，尤指血清蛋白質。因此，將siRNA送至肝臟外之組織仍有困難，而限制了以siRNA為主之療法之用途。

【0015】 如上述，限制iRNA劑之活體內實驗與醫療用途之因素之一為有效地傳遞完整siRNA之能力。特別的困難係與非病毒基因於活體內轉移進入視網膜相關。其中一項挑戰為克服內部限制膜，其阻擋視網膜之轉染。此外，玻璃體中帶負電荷之糖已顯示與正電荷DNA-轉染劑複合物交互作用，促使其等凝集，阻擋擴散及細胞吸收。

【0016】 因此，需要可於活體內傳遞siRNA分子進入肝臟外組織之新的及改良的組成物及方法，供治療TTR相關眼部疾病與病變。

【發明內容】

【0017】 本發明提供一種靶向甲狀腺素運載蛋白(TTR)基因之RNAi劑(例如，雙股RNAi劑)及組成物。本發明亦提供一種使用本發明RNAi劑(例如，雙股RNAi劑)抑制TTR表現之方法及治療或預防個體之TTR相關眼部疾病之方法。本發明至少一部份基於發現一種RNAi劑，其由親脂性部份體接合至靶向TTR之雙股iRNA劑至少一股的一個或多個內部位置，或接合至靶向TTR之雙股iRNA劑之雙股區內至少一股的一個或多個位置，提供活體內傳遞雙股iRNA至眼內之驚人良好結果，達成有效進入眼部組織，及有

效內化至眼部系統之細胞中。

【0018】 因此，一項態樣中，本發明提供一種雙股RNAi劑，其包含與反義股互補之正義股，其中該反義股包含與編碼甲狀腺素運載蛋白(TTR)之一部份mRNA互補之區，其中各股獨立地具有14至30個核苷酸，其中該雙股RNAi劑係由式(III)代表：

正義：5' np -Na -(X X X)i-Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'

反義股： 3' np′-Na′-(X′X′X′)k-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-(Z′Z′Z′)l-Na′- nq′ 5'(III)

其中i、j、k、與l分別獨立地為0或1，但其限制條件為i、j、k、與l中至少一者為1；p、p’、q、與q′分別獨立地為0-6；各Na與Na′獨立地代表包含2-20個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列，各序列包含至少兩個經不同修飾之核苷酸；各Nb與Nb′獨立地代表包含1-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；各np、np′、nq、與nq′分別獨立地代表突出核苷酸；XXX、YYY、ZZZ、X′X′X′、Y′Y′Y′，及Z′Z′Z′分別獨立地代表在三個連續核苷酸具有三個相同修飾之一個基序；及其中一個或多個親脂性部份體係接合至少一股的一個或多個內部位置。

【0019】 某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、位置15、位置7、位置6、或位置2(從該股之5’端算起)、或反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、位置15、或位置7(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、或位置15(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合反義股之位置16(從該股之5’端算起)。

【0020】某些具體例中，雙股RNAi劑之反義股包含與5'-TGGGATTTCATGTAACCAAGA – 3' (SEQ ID NO：11)互補之序列。

【0021】另一項態樣中，本發明提供一種雙股RNAi劑，其包含與反義股互補之正義股，其中該反義股包含與甲狀腺素運載蛋白(TTR)基因(SEQ ID NO：1)之核苷酸504至526互補之序列，其中正義股之長度為21個核苷酸，及反義股之長度為23個核苷酸，其中該雙股RNAi劑係由式(III)代表：

正義：5' np -Na -(X X X)i-Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'

反義股： 3' np′-Na′-(X′X′X′)k-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-(Z′Z′Z′)l-Na′- nq′ 5'(III)

其中j = 1；及i、k、與l為0；p'為2；p、q、與q'為0；各Na與Na′獨立地代表包含2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；各Nb與Nb′獨立地代表包含0-7個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；np′代表突出核苷酸；YYY、ZZZ、與Y′Y′Y′分別獨立地代表在三個連續核苷酸為三個相同修飾之一個基序，其中Y核苷酸包含2'-氟修飾，Y'核苷酸包含2'-O-甲基修飾，及Z核苷酸包含2'-O-甲基修飾；及其中一個或多個親脂性部份體係接合至少一股的一個或多個內部位置。

【0022】某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、位置15、位置7、位置6、或位置2(從該股之5'端算起)、或反義股之位置16(從該股之5'端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、位置15、或位置7(從該股之5'端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、或位置15(從該股之5'端算起)。某些具體例中，親脂性部

份體係接合正義股之位置6(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合反義股之位置16(從該股之5’端算起)。

【0023】 另一項態樣中，本發明提供一種抑制細胞中TTR表現之雙股RNAi劑，其中該雙股RNAi劑包含形成雙股區之正義股與反義股；其中正義股包含核苷酸序列 5’ – UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA – 3’ (SEQ ID NO：12)，及反義股包含核苷酸序列 5’-UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC -3’ (SEQ ID NO：13)；其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸均包含修飾；及其中一個或多個親脂性部份體係接合至少一股的一個或多個內部位置。某些具體例中，正義股之長度為21個核苷酸，及親脂性部份體係接合正義股之位置20、位置15、位置7、位置6、或位置2(從該股之5’端算起)、或反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、位置15、或位置7(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、或位置15(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置6(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含在反義股5’-端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0024】 另一項態樣中，本發明提供一種抑制細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含之正義股與核苷酸序列5’-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga – 3’ (SEQ ID NO：10)之差異不超過4個經修飾核苷酸，及包含之反義股與核苷酸序列 5’-

usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：7)之差異不超過4個經修飾核苷酸，其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；及s為硫代磷酸酯鏈結；及其中一個或多個親脂性部份體係接合至少一股的一個或多個內部位置。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、位置15、位置7、位置6、或位置2(從該股之5’端算起)、或反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、位置15、或位置7(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、或位置15(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步在反義股5’-端包含磷酸酯或磷酸酯擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0025】 另一項態樣中，本發明提供一種雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，其中正義股包含核苷酸序列 5’-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga – 3’ (SEQ ID NO：10)，及反義股包含核苷酸序列 5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：7)，其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；及s為硫代磷酸酯鏈結；及其中一個或多個

親脂性部份體係接合至少一股的一個或多個內部位置。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、位置15、位置7、位置6、或位置2(從該股之5’端算起)，或反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、位置15、或位置7(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、或位置15(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含在反義股5’-端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0026】 另一項態樣中，本發明提供一種抑制細胞中TTR表現之雙股RNAi劑，其中該雙股RNAi劑包含形成雙股區之正義股與反義股；其中正義股包含核苷酸序列 5’ – UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA – 3’ (SEQ ID NO : 12)，及反義股包含核苷酸序列 5’-UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC -3’ (SEQ ID NO：13)；其中正義股之實質上所有核苷酸與反義股之實質上所有核苷酸均包含修飾；及其中一個或多個親脂性部份體係接合雙股區內至少一股的一個或多個位置。某些具體例中，正義股之長度為21個核苷酸，及親脂性部份體係接合正義股之位置21、位置20、位置15、位置1、位置7、位置6、或位置2(從該股之5’端算起)、或反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置21、位置20、位置15、位置1、或位置7(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置21、位置20、或位置15(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股

之位置20、或位置15(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置6(從該股之5’端算起)。某些具體例中，反義股之長度為23個核苷酸，且親脂性部份體係接合反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步在反義股5’-端包含磷酸酯或磷酸酯擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0027】另一項態樣中，本發明提供一種抑制細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含之正義股與核苷酸序列5’-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga – 3’ (SEQ ID NO：10)之差異不超過4個經修飾核苷酸，及包含之反義股與核苷酸序列 5’-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：7)之差異不超過4個經修飾核苷酸，其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；及s為硫代磷酸酯鍵結；及其中一個或多個親脂性部份體係接合雙股區內至少一股的一個或多個位置。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置21、位置20、位置15、位置1、位置7、位置6、或位置2(從該股之5’端算起)、或反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置21、位置20、位置15、位置1、或位置7(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置21、位置20、或位置15(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、或位置15(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置

6(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步在反義股5’-端包含磷酸酯或磷酸酯擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0028】 另一項態樣中，本發明提供一種雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，其中正義股包含核苷酸序列 5’-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga – 3’ (SEQ ID NO：10)，及反義股包含核苷酸序列 5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：7)，其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；及s為硫代磷酸酯鏈結；及其中一個或多個親脂性部份體係接合雙股區內至少一股的一個或多個位置。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置21、位置20、位置15、位置1、位置7、位置6、或位置2(從該股之5’端算起)、或反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置21、位置20、位置15、位置1、或位置7(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置21、位置20、或位置15(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置20、或位置15(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合正義股之位置6(從該股之5’端算起)。某些具體例中，親脂性部份體係接合反義股之位置16(從該股之5’端算起)。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含在反義股5’-端之磷酸酯或磷酸酯

擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5'-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0029】 某些具體例中，一個或多個親脂性部份體係利用鏈結基或載子接合雙股RNAi劑之至少一股的一個或多個內部位置。某些具體例中，一個或多個親脂性部份體係利用鏈結基或載子接合雙股區內至少一股的一個或多個位置。

【0030】 某些具體例中，採用logKow測定之親脂性部份體之親脂性超過0。

【0031】 某些具體例中，由雙股iRNA劑在血漿蛋白質結合分析法中之未結合部分所測定之雙股iRNA劑之疏水性超過0.2。

【0032】 某些具體例中，血漿蛋白質結合分析法為採用人類血清白蛋白蛋白質之電泳移動性位移分析法。

【0033】 某些具體例中，內部位置包括除了雙股RNAi劑之至少一股之各端起的末端兩個位置以外之所有位置。

【0034】 某些具體例中，內部位置包括除了雙股RNAi劑之至少一股之各端起的末端三個位置以外之所有位置。

【0035】 某些具體例中，內部位置不包括雙股RNAi劑正義股之裂解位點區。某些具體例中，雙股區內之位置不包括雙股RNAi劑正義股之裂解位點區。

【0036】 某些具體例中，內部位置包括除了雙股RNAi劑正義股從5'-端算起位置9-12以外之所有位置。

【0037】 某些具體例中，內部位置包括除了雙股RNAi劑正義股從3'-端算起位置11-13以外之所有位置。

【0038】 某些具體例中，內部位置不包括雙股RNAi劑反義股之裂解位點區。

【0039】 某些具體例中，內部位置包括除了雙股RNAi劑反義股從5’-端算起位置12-14以外之所有位置。

【0040】 某些具體例中，內部位置包括除了雙股RNAi劑正義股從3’-端算起位置11-13與RNAi劑反義股從5’-端算起位置12-14以外之所有位置。

【0041】 某些具體例中，一個或多個親脂性部份體接合由正義股位置4-8與13-18及反義股位置6-10與15-18所成群組選擇一個或多個內部位置，其係從RNAi劑各股5’-端算起。

【0042】 某些具體例中，一個或多個親脂性部份體接合由正義股位置5、6、7、15、與17及反義股位置15與17所成群組選擇一個或多個內部位置，其係從RNAi劑各股5’-端算起。

【0043】 某些具體例中，親脂性部份體為脂系、脂環系、或多脂環系化合物。

【0044】 某些具體例中，親脂性部份體係選自下列各者所成群組：脂質、膽固醇、視黃酸、膽酸、金剛烷乙酸、1-芘丁酸、雙氫睾酮、1,3-雙-O(十六碳基)甘油、香葉草基氧己醇(geranyloxyhexyanol)、十六碳基甘油、龍腦、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七碳基、棕櫚酸、肉豆蔻酸、O3-(油醯基)石膽酸、O3-(油醯基)膽烯酸、二甲氧基三苯甲基、或吩噁吡。

【0045】 某些具體例中，親脂性部份體包含飽和或不飽和C4-C30烴鏈，與自下列各者所成群組選擇之視需要之官能基：羥基、胺、羧酸、磺

酸酯、磷酸酯、硫醇、疊氮化物、與炔。

【0046】 某些具體例中，親脂性部份體包含飽和或不飽和C6-C18烴鏈。

【0047】 某些具體例中，親脂性部份體包含飽和或不飽和C16烴鏈。

【0048】 某些具體例中，飽和或不飽和C16烴鏈係接合從雙股RNAi劑之一股5’-端算起之位置6。某些具體例中，飽和或不飽和C16烴鏈係接合從雙股RNAi劑之正義股5’-端算起之位置6。

【0049】 某些具體例中，親脂性部份體係利用置換雙股RNAi劑之股內部位置之一個或多個核苷酸之載子接合。某些具體例中，親脂性部份體係利用置換雙股區中一個或多個核苷酸之載子接合。

【0050】 某些具體例中，該載子為自下列各者所成群組選擇之環狀基團：吡咯啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、哌啶基、哌吩基、[1,3]二氧雜環戊烷基、噁唑啶基、異噁唑啶基、嗎啉基、噻唑啶基、異噻唑啶基、喹噁啉基、嗒吩酮基、四氫呋喃基、與十氫萘基；或為基於絲胺醇主幹或二乙醇胺主幹之無環部份體。

【0051】 某些具體例中，親脂性部份體係利用包含醚、硫醚、脲、碳酸酯、胺、醯胺、馬來醯亞胺-硫醚、二硫化物、磷酸二酯、磺醯胺鏈結、點擊反應(click reaction)產物、或胺甲酸酯之鏈結基接合雙股iRNA劑。

【0052】 某些具體例中，親脂性部份體係接合核鹼基、糖部份體、或核苷間鏈結。

【0053】 某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含介導傳遞至眼部組織之配體。

【0054】 有些具體例中，介導傳遞至眼部組織之配體為靶向介導傳遞至眼部組織之受體之靶向配體。

【0055】 某些具體例中，靶向配體係選自下列各者所成群組：反式視黃醇、RGD肽、LDL受體配體、與基於碳水化合物之配體。

【0056】 某些具體例中，RGD肽為H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-Cys-OH (SEQ ID NO：14)或環(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys)。

【0057】 某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含靶向肝組織之靶向配體。

【0058】 某些具體例中，靶向配體為GalNAc接合物。

【0059】 某些具體例中，親脂性部份體或靶向配體係利用自下列各者所成群組選擇之生物可裂解性鏈結基接合雙股RNAi劑：DNA，RNA，二硫化物，醯胺，半乳糖胺、葡糖胺、葡萄糖、半乳糖、甘露糖之官能基化單糖或寡醣，及其組合。

【0060】 某些具體例中，雙股RNAi正義股之3’端係利用封端基保護，其為具有胺之環狀基團，該環狀基團係選自下列各者所成群組：吡咯啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、哌啶基、哌吩基、[1,3]二氧雜環戊烷基、嗯唑啶基、異嗯唑啶基、嗎啉基、噻唑啶基、異噻唑啶基、喹嗯啉基、嗒吩酮基、四氫呋喃基、與十氫萘基。

【0061】 某些具體例中，RNAi劑包含出現在反義股3’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Sp組態之鏈結磷原子)、出現在反義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Rp組態之鏈結磷原子)、與出現在正義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具

有呈Rp組態或Sp組態之鏈結磷原子)。

【0062】 某些具體例中，RNAi劑包含出現在反義股3’端第一個與第二個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Sp組態之鏈結磷原子)、出現在反義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Rp組態之鏈結磷原子)、與出現在正義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Rp或Sp組態之鏈結磷原子)。

【0063】 某些具體例中，RNAi劑包含出現在反義股3’端第一個、第二個與第三個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Sp組態之鏈結磷原子)、出現在反義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Rp組態之鏈結磷原子)、與出現在正義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Rp或Sp組態之鏈結磷原子)。

【0064】 某些具體例中，RNAi劑包含出現在反義股3’端第一個與第二個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Sp組態之鏈結磷原子)、出現在反義股3’端第三個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Rp組態之鏈結磷原子)、出現在反義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Rp組態之鏈結磷原子)、與出現在正義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Rp或Sp組態之鏈結磷原子)。

【0065】 某些具體例中，RNAi劑包含出現在反義股3’端第一個與第二個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Sp組態之鏈結磷原子)、出現在反義股5’端第一個與第二個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Rp組態之鏈結磷原子)、與出現在正義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾(其具有呈Rp或Sp組態之鏈結磷原子)。

【0066】 某些具體例中，雙股RNAi劑係由式(III)代表：

正義：5' np -Na -(X X X)i-Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'

反義：3' np′-Na′-(X′X′X′)k-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-(Z′Z′Z′)l-Na′- nq′ 5'(III)

其中j為1或2；或其中l為1；或其中j與l均為1。

【0067】 某些具體例中，雙股RNAi劑係由式(III)代表：

正義：5' np -Na -(X X X)i-Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'

反義：3' np′-Na′-(X′X′X′)k-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-(Z′Z′Z′)l-Na′- nq′ 5'(III)

其中XXX係與X′X′X′互補，YYY係與Y′Y′Y′互補，及ZZZ係與Z′Z′Z′互補。

【0068】 某些具體例中，YYY基序出現在或接近雙股RNAi劑正義股之裂解位點；或其中Y′Y′Y′基序出現在雙股RNAi劑反義股從5'-端起之11、12與13位置。

【0069】 有些具體例中，式(III)係由式(IIIa)代表：

正義： 5' np -Na -Y Y Y -Nb -Z Z Z -Na-nq 3'

反義： 3' np′-Na′-Y′Y′Y′-Nb′-Z′Z′Z′-Na′nq′ 5'

(IIIa)

其中各Nb與Nb′獨立地代表包含1-5個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；

或

式(III)係由式(IIIb)代表：

正義： 5' np-Na-X X X -Nb-Y Y Y -Na-nq 3'

反義： 3' np′-Na′-X′X′X′-Nb′-Y′Y′Y′-Na′-nq′ 5'

(IIIb)

其中各Nb與Nb′獨立地代表包含1-5個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；

或

式(III)係由式(IIIc)代表：

正義： 5' np-Na-X X X -Nb-Y Y Y -Nb-Z Z Z -Na-nq 3'

反義： 3' np′-Na′-X′X′X′-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-Z′Z′Z′-Na′-nq′ 5'

(IIIc)

其中各Nb與Nb′獨立地代表包含1-5個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列，及各Na與Na′獨立地代表包含2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0070】 某些具體例中，雙股RNAi劑之核苷酸之修飾係選自下列各者所成群組：去氧-核苷酸、3’-末端去氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修飾之核苷酸、2'-氟修飾之核苷酸、2'-去氧修飾之核苷酸、鎖核苷酸、非鎖核苷酸、構形限制核苷酸、約束乙基核苷酸、無鹼基核苷酸、2’-胺基修飾之核苷酸、2’-O-烯丙基修飾之核苷酸、2’-C-烷基修飾之核苷酸、2’-甲氧基乙基修飾之核苷酸、2’-O-烷基修飾之核苷酸、N-嗎啉基核苷酸、胺基磷酸酯、含非天然鹼基之核苷酸、四氫哌喃修飾之核苷酸、1,5-脫水己糖醇修飾之核苷酸、環己烯基修飾之核苷酸、含硫代磷酸根之核苷酸、含甲基膦酸根之核苷酸、含5’-磷酸酯之核苷酸、及含5’-磷酸酯擬似物之核苷酸、及其組合。

【0071】 某些具體例中，核苷酸之修飾為2’-O-甲基、2’-氟或二者。

【0072】 某些具體例中，式(III)之Y′為2′-O-甲基。

【0073】 某些具體例中，式(III)之Z核苷酸含有2’-O-甲基修飾。

【0074】 某些具體例中，式(III)Na、Na’、Nb、與Nb’核苷酸之修飾

為2’-O-甲基、2’-氟或二者。

【0075】 某些具體例中，RNAi劑之正義股與反義股形成長度為15-30核苷酸對之雙螺旋區。

【0076】 某些具體例中，雙螺旋區之長度為17-25核苷酸對。

【0077】 某些具體例中，RNAi劑之正義股與反義股之長度分別為15至30個核苷酸。

【0078】 某些具體例中，RNAi劑之正義股與反義股分別之長度為19至25個核苷酸。

【0079】 某些具體例中，RNAi劑之各正義股與反義股獨立地具有21至23個核苷酸。

【0080】 某些具體例中，RNAi劑之正義股共具有21個核苷酸，及RNAi劑之反義股共具有23個核苷酸。

【0081】 某些具體例中，RNAi劑進一步包含至少一個硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結。

【0082】 某些具體例中，硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結係在一股之3’-末端。

【0083】 某些具體例中，硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結係在反義股3’-末端。某些具體例中，雙股RNAi劑係由式(III)代表，其中p′=2。

【0084】 某些具體例中，雙股RNAi劑係由式(III)代表，其中至少一個np′係利用硫代磷酸酯鏈結與相鄰核苷酸連結。

【0085】 某些具體例中，雙股RNAi劑係由式(III)代表，其中所有np′均利用硫代磷酸酯鏈結與相鄰核苷酸連結。

【0086】 某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含在反義股5’-端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。

【0087】 某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0088】 某些具體例中，雙股RNAi雙螺旋的反義股5’-端1位置之鹼基對為AU鹼基對。

【0089】 某些具體例中，雙股RNAi劑正義股包含核苷酸序列 5’ – UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA – 3’(SEQ ID NO：12)。

【0090】 某些具體例中，RNAi劑正義股包含核苷酸序列 5’ – UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA – 3’(SEQ ID NO：12)，及RNAi劑反義股包含核苷酸序列 5’- UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC -3’ (SEQ ID NO：13)。

【0091】 某些具體例中，雙股RNAi劑之正義股與反義股包含核苷酸序列5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：16)，其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；s為硫代磷酸酯鏈結；及(Uhd)為2'-O-十六碳基-尿苷-3'-磷酸酯。

【0092】 某些具體例中，雙股RNAi劑之正義股與反義股包含核苷酸序列5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa– 3’ (SEQ ID NO：15)與5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc– 3’ (SEQ ID NO：17)，其中a、

c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；s為硫代磷酸酯鏈結；(Uhd)為2'-O-十六碳基-尿苷-3'-磷酸酯；及VP為乙烯基膦酸酯。

【0093】 另一項態樣中，本發明提供一種抑制細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含之正義股與核苷酸序列5’-usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)之差異不超過4個經修飾核苷酸，及包含之反義股與核苷酸序列 5’-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：16)之差異不超過4個經修飾核苷酸，其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；s為硫代磷酸酯鏈結；及(Uhd)為2'-O-十六碳基-尿苷-3'-磷酸酯。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含在反義股5’-端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0094】 某些具體例中，雙股RNAi劑正義股與核苷酸序列5’-usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)之差異不超過3個經修飾核苷酸，及反義股與核苷酸序列 5’-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：16)之差異不超過3個經修飾核苷酸。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含在反義股5’-

端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0095】某些具體例中，雙股RNAi劑正義股與核苷酸序列5’-usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)之差異不超過2個經修飾核苷酸，及反義股與核苷酸序列 5’-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：16)之差異不超過2個經修飾核苷酸。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含在反義股5’-端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0096】某些具體例中，雙股RNAi劑正義股與核苷酸序列5’-usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)之差異不超過1個經修飾核苷酸，及反義股與核苷酸序列 5’-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：16)之差異不超過1個經修飾核苷酸。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含在反義股5’-端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0097】某些具體例中，雙股RNAi劑之正義股包含核苷酸序列 5’-usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)，及反義股包含核苷酸序列5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3 (SEQ ID NO：16)。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含在反義股5’-端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0098】某些具體例中，雙股RNAi劑包含正義股與反義股，其包含

自下列各者所成群組選擇之正義股與反義股核苷酸序列：

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-291845) (SEQ ID NO：16)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagsadTdTL10 -3’ (SEQ ID NO：59)與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc -3’ (AD-70191) (SEQ ID NO：17)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL10 -3’ (SEQ ID NO：60)與

5’-VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc -3’ (AD70500) (SEQ ID NO：17)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL57 – 3’ (SEQ ID NO：61)與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc- 3’ (AD-290674) (SEQ ID NO：17)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuausas(Ahd)- 3’ (SEQ ID NO：96)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu- 3’ (AD-307586) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuaus(Ahds)a – 3’ (SEQ ID NO：95)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307585) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuausasa-3 (SEQ ID NO：97)’and

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfc(Ahd)cuguususu – 3’ (AD-307601) (SEQ ID NO：101)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugc(Uhd)cuausasa- 3’ (SEQ ID NO：94)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’ (AD-307580) (SEQ ID NO：98)；

5’- (Ahds)ascaguGfuUfCfUfugcucuausasa- 3’ (SEQ ID NO：87)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307566) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascagu(Ghd)uUfCfUfugcucuausasa -3’ (SEQ ID NO：91)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307572) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa- 3’ (SEQ ID NO：90)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’(AD-307571) (SEQ ID NO：98)；

5’- as(Ahds)caguGfuUfCfUfugcucuausasa -3’ (SEQ ID NO：88)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’(AD-307567) (SEQ ID NO：98)；

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- VPuCfuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-291846) (SEQ ID NO：62)；

5’ - usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’ - VPusCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-592744) (SEQ ID NO：102)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa -3’ (SEQ ID NO：103)與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3’ (AD-538697) (SEQ ID NO：17)；及

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-597979) (SEQ ID NO：16)，

其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；(Ahd)、(Ghd)、與(Uhd)分別為2'-O-十六碳基-腺苷-3'-磷酸酯、2'-O-十六碳基-鳥苷-3'-磷酸酯、與2'-O-十六碳基-尿苷-3'-磷酸酯；s為硫代磷酸酯鍵結；VP為乙烯基膦酸酯；L10為與該股3’端接合之N-(膽固醇基羧醯胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-Chol)；及L57為與該股3’端接合之N-(硬脂基羧醯胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-C18)。某些具體例中，雙股RNAi劑包含正義股與反義股，其包含雙螺旋AD-291845之核苷酸序列。

【0099】 某些具體例中，雙股RNAi劑包含自下列各者所成群組選擇之正義股與反義股核苷酸序列組成之正義股與反義股：

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-291845) (SEQ ID NO：16)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagsadTdTL10 -3’ (SEQ ID NO：59)

與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc -3’ (AD-70191) (SEQ ID NO：17)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL10 -3’ (SEQ ID NO：60)與

5’-VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc -3’ (AD70500) (SEQ ID NO：17)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL57 – 3’ (SEQ ID NO：61)與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc- 3’ (AD-290674) (SEQ ID NO：17)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuausas(Ahd)- 3’ (SEQ ID NO：96)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu- 3’ (AD-307586) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuaus(Ahds)a – 3’ (SEQ ID NO：95)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307585) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuausasa-3’ (SEQ ID NO：97)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfc(Ahd)cuguususu – 3’ (AD-307601) (SEQ ID NO：101)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugc(Uhd)cuausasa- 3’ (SEQ ID NO：94)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’ (AD-307580) (SEQ ID NO：98)；

5’- (Ahds)ascaguGfuUfCfUfugcucuausasa- 3’ (SEQ ID NO：87)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307566) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascagu(Ghd)uUfCfUfugcucuausasa -3’ (SEQ ID NO：91)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307572) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa- 3’ (SEQ ID NO：90)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’(AD-307571) (SEQ ID NO：98)；

5’- as(Ahds)caguGfuUfCfUfugcucuausasa -3’ (SEQ ID NO：88)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’(AD-307567) (SEQ ID NO：98)；

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- VPuCfuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-291846) (SEQ ID NO：62)；

5’ - usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’ - VPusCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-592744) (SEQ ID NO：102)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa -3’ (SEQ ID NO：103)與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3’ (AD-538697) (SEQ ID NO：17)；及

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-597979) (SEQ ID NO：16)，

其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；(Ahd)、(Ghd)、與(Uhd)分別為2'-O-十六碳基-腺苷-3'-磷酸酯、2'-O-十六碳基-鳥苷-3'-磷酸酯、與2'-O-十六碳基-尿苷-3'-磷酸酯；s為硫代磷酸酯鍵結；VP為乙烯基膦酸酯；L10為與該股3’端接合之N-(膽固醇基羧醯胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-Chol)；及L57為與該股3’端接合之N-(硬脂基羧醯胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-C18)。某些具體例中，雙股RNAi劑包含由雙螺旋AD-291845核苷酸序列組成之正義股與反義股。

【0100】 另一項態樣中，本發明提供一種抑制細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，其中正義股包含之核苷酸序列與自下列各者所成群組選擇之雙螺旋正義股核苷酸序列之差異不超過4個經修飾核苷酸：AD-291845、AD-70191、AD70500、AD-290674、AD-307586、AD-307585、AD-307601、AD-307580、AD-307566、AD-307572、AD-307571、AD-307567、AD-291846 AD-592744、AD-538697、與AD-597979，及其中該反義股包含之核苷酸序列與對應雙螺旋反義股核苷酸序列之差異不超過4個經修飾核苷酸。某些具體例中，該雙螺旋為AD-291845。

【0101】 另一項態樣中，本發明提供一種抑制細胞中甲狀腺素運載蛋

白(TTR)表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，其中正義股包含之核苷酸序列與自下列各者所成群組選擇之雙螺旋正義股核苷酸序列之差異不超過3個經修飾核苷酸：AD-291845、AD-70191、AD70500、AD-290674、AD-307586、AD-307585、AD-307601、AD-307580、AD-307566、AD-307572、AD-307571、AD-307567、AD-291846 AD-592744、AD-538697、與AD-597979，及其中該反義股包含之核苷酸序列與對應雙螺旋反義股核苷酸序列之差異不超過3個經修飾核苷酸。某些具體例中，該雙螺旋為AD-291845。

【0102】 另一項態樣中，本發明提供一種抑制細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，其中正義股包含之核苷酸序列與自下列各者所成群組選擇之雙螺旋正義股核苷酸序列之差異不超過2個經修飾核苷酸：AD-291845、AD-70191、AD70500、AD-290674、AD-307586、AD-307585、AD-307601、AD-307580、AD-307566、AD-307572、AD-307571、AD-307567、AD-291846 AD-592744、AD-538697、與AD-597979，及其中該反義股包含之核苷酸序列與對應雙螺旋反義股核苷酸序列之差異不超過2個經修飾核苷酸。某些具體例中，該雙螺旋為AD-291845。

【0103】 另一項態樣中，本發明提供一種抑制細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，其中正義股包含之核苷酸序列與自下列各者所成群組選擇之雙螺旋正義股核苷酸序列之差異不超過1個經修飾核苷酸：AD-291845、AD-70191、AD70500、AD-290674、AD-307586、AD-307585、AD-307601、AD-307580、AD-

307566、AD-307572、AD-307571、AD-307567、AD-291846 AD-592744、AD-538697、與AD-597979，及其中該反義股包含之核苷酸序列與對應雙螺旋反義股核苷酸序列之差異不超過1個經修飾核苷酸。某些具體例中，該雙螺旋為AD-291845。

【0104】 某些具體例中，雙股RNAi劑正義股係由核苷酸序列 5’-usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)組成，及雙股 RNAi 劑 反 義 股 係 由 核 苷 酸 序 列 5’-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：16)組成。某些具體例中，雙股RNAi劑進一步包含在反義股5’-端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。某些具體例中，該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0105】 某些具體例中，雙股RNAi劑之正義股與反義股係由核苷酸序列5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa– 3’ (SEQ ID NO：15)與5’-VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc– 3’ (SEQ ID NO：17)組成，其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；s為硫代磷酸酯鏈結；(Uhd)為2'-O-十六碳基-尿苷-3'-磷酸酯；及VP為乙烯基膦酸酯。

【0106】 另一項態樣中，本發明提供一種包含本發明任何雙股RNAi劑之醫藥組成物。

【0107】 另一項態樣中，本發明提供一種抑制眼部細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之方法，該方法包括將細胞與本發明雙股RNAi劑接觸，

藉以抑制眼部細胞中之TTR基因表現。

【0108】 某些具體例中，細胞在個體內。

【0109】 某些具體例中，個體為人類。

【0110】 某些具體例中，個體罹患TTR相關眼部疾病。

【0111】 再另一態樣中，本發明提供一種治療罹患TTR相關眼部疾病之個體之方法，其包括對該個體投與醫療有效量之本發明雙股RNAi劑。

【0112】 某些具體例中，TTR相關眼部疾病或病變係選自下列各者所成群組：TTR相關青光眼、TTR相關玻璃體混濁、TTR相關視網膜異常、TTR相關視網膜類澱粉蛋白沉積、TTR相關視網膜血管病變、TTR相關虹膜類澱粉蛋白沉積、TTR相關扇貝樣虹膜、與TTR相關水晶體的類澱粉蛋白沉積。

【0113】 某些具體例中，個體帶有與TTR相關疾病之發展相關之TTR基因突變。

【0114】 某些具體例中，TTR相關疾病係選自下列各者所成群組：老年全身性類澱粉蛋白變性(SSA)、全身性家族性類澱粉蛋白變性、家族性類澱粉蛋白多發性神經病變(FAP)、家族性類澱粉蛋白心肌病變(FAC)、腦膜/中樞神經系統(CNS)類澱粉蛋白變性、與高甲狀腺素血症。

【0115】 某些具體例中，雙股RNAi劑投與個體係經由眼周、結膜、Tenon氏囊下、前房內、玻璃體內、眼內、前部或後部鞏膜旁、視網膜下、結膜下、眼球後、或小管內投與法。

【0116】 某些具體例中，雙股RNAi劑係長期投與人類個體。

【0117】 某些具體例中，該方法進一步包括投與個體額外醫療劑。

【0118】 某些具體例中，額外醫療劑為TTR四聚體安定劑及/或非類固醇消炎劑。

【0119】 某些具體例中，個體已接受或將接受肝臟移植。

【0120】 某些具體例中，對個體投與固定劑量約0.01 mg至約1 mg之雙股RNAi劑。某些具體例中，對個體投與固定劑量約0.001 mg至約1 mg之雙股RNAi劑。某些具體例中，對個體投與固定劑量約0.001 mg至約0.1 mg之雙股RNAi劑。

【0121】 某些具體例中，對個體投與雙股RNAi劑降低個體眼睛之睫狀體上皮層(CE)與視網膜色素上皮層(RPE)中由甲狀腺素運載蛋白介導之類澱粉蛋白變性(ATTR類澱粉蛋白變性)。

【0122】 本發明藉由下列詳細說明與圖式進一步說明。

【圖式簡單說明】

【0123】 **第1圖**為出示大鼠眼睛經玻璃體內接受投與單一50 μg劑量之指定dsRNA劑後，對眼部TTR表現之抑制性之圖式。

【0124】 **第2A圖**為出示大鼠經玻璃體內接受投與單一50 μg劑量之指定dsRNA劑後，對後部眼部組織中TTR表現之抑制性之圖式。

【0125】 **第2B圖**為出示大鼠經玻璃體內接受投與單一50 μg劑量之指定dsRNA劑後，對前部眼部組織中TTR表現之抑制性之圖式。

【0126】 **第2C圖**為大鼠經玻璃體內接受投與作為對照物之PBS後，眼部組織之組織病理學分析之影像。

【0127】 **第2D圖**為大鼠經玻璃體內接受投與單一50 μg劑量之指定dsRNA劑後，眼部組織之組織病理學分析之影像。

【0128】 **第3A圖**為出示基因轉殖小鼠眼睛經玻璃體內接受投與單一2.5 μg或7.5 μg劑量之AD-70191後，對眼部人類TTR表現之抑制性之圖式。

【0129】 **第3B圖**為出示基因轉殖小鼠眼睛經玻璃體內接受投與單一2.5 μg或7.5 μg劑量之AD-70191後，對眼部小鼠TTR表現之抑制性之圖式。

【0130】 **第3C圖**為出示基因轉殖小鼠眼睛經玻璃體內接受投與單一2.5 μg或7.5 μg劑量之AD-70191後，對眼部小鼠視錐視桿同源盒表現之抑制性之圖式。

【0131】 **第3D圖**為出示基因轉殖小鼠眼睛經玻璃體內接受投與單一2.5 μg或7.5 μg劑量之AD-7019後，對眼部小鼠視紫質表現之抑制性之圖式。

【0132】 **第4圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與單一3 mg劑量之AD-291845或AD-70500後，對視網膜色素上皮層(RPE)與睫狀體上皮層(CE)中眼部TTR表現之抑制性之圖式。

【0133】 **第5A圖**為非人類靈長類經玻璃體內接受投與作為對照之PBS後，眼部組織中TTR蛋白質表現之免疫組織化學(IHC)分析之影像。RPE係最下面一張影像，及TTR染色為深灰及中灰色。

【0134】 **第5B圖**為非人類靈長類經玻璃體內接受投與單一3 mg劑量之AD-291845後，眼部組織中TTR蛋白質表現之免疫組織化學(IHC)分析之影像。RPE係最下面一張影像，及TTR染色為深灰及中灰色。

【0135】 **第6A圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一0.1 mg、0.3 mg、1.0 mg、或3.0 mg劑量之AD-291845，在投與後第28天，對睫狀體(CE)或視網膜色素上皮層(RPE)中眼部TTR mRNA表現之抑制性之圖式。

【0136】 **第6B圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單

一0.1 mg、0.3 mg、1.0 mg、或3.0 mg劑量之AD-291845，在投與後第28天，對玻璃狀液中眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【0137】 **第6C圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一0.1 mg、0.3 mg、1.0 mg、或3.0 mg劑量之AD-291845，在投與後第28天，對房水中眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【0138】 **第7A圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一1.0 mg或3.0 mg劑量之AD-291845，在投與後第84天，對視網膜色素上皮層(RPE)中眼部TTR mRNA表現之抑制性之圖式。

【0139】 **第7B圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一1.0 mg或3.0 mg劑量之AD-291845，在投與後第84天，對睫狀體(CE)中眼部TTR mRNA表現之抑制性之圖式。

【0140】 **第7C圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受PBS、單一0.1 mg或0.3 mg劑量之AD-291845投與後第28天，或接受單一1.0 mg或3.0 mg劑量之AD-291845投與後第28、56、與84天，對玻璃狀液中眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【0141】 **第7D圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受PBS、單一0.1 mg或0.3 mg劑量之AD-291845投與後第28天，或接受單一1.0 mg或3.0 mg劑量之AD-291845投與後第28、56、與84天，對房水中眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【0142】 **第8A圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一0.003 mg、0.03 mg、0.1 mg、或0.3 mg劑量之AD-291845，在投與後第28天，對房水中眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【0143】 **第8B圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一0.003 mg、0.03 mg、0.1 mg、或0.3 mg劑量之AD-291845，在投與後第

28天、第84天、與第168天，對房水中眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【0144】 **第8C圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一0.003 mg、0.03 mg、0.1 mg、或0.3 mg劑量之AD-291845，在投與後第168天，對睫狀體中眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【0145】 **第8D圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一0.003 mg、0.03 mg、0.1 mg、或0.3 mg劑量之AD-291845，在投與後第168天，對視網膜色素上皮層(RPE)中眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【0146】 **第9A圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一1.0 mg劑量之AD-592744、AD-538697、或AD-597979，在投與後第28天、第84天、與第168天，對房水之眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【0147】 **第9B圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一1.0 mg劑量之AD-592744、AD-538697、或AD-597979，在投與後第168天，對睫狀體中眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【0148】 **第9C圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一1.0 mg劑量之AD-592744、AD-538697、或AD-597979，在投與後第168天，對視網膜色素上皮層(RPE)中眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【0149】 **第10圖**為出示非人類靈長類經玻璃體內接受投與PBS或單一指定劑量之AD-538697、AD-579797、AD-291845、AD291846、或AD-592744後，對房水中眼部TTR蛋白質表現之抑制性之圖式。

【實施方式】

【0150】 本發明提供RNAi劑，例如，雙股RNAi劑，及靶向甲狀腺素運載蛋白(TTR)基因之組成物。本發明亦提供一種使用本發明RNAi劑(例

如，雙股RNAi劑)為個體抑制TTR表現之方法，及治療或預防TTR相關眼部疾病之方法。本發明至少一部份基於發現由親脂性部份體與靶向TTR之雙股iRNA劑之至少一股的一個或多個內部位置接合，或與靶向TTR之雙股iRNA劑之雙股區內至少一股的一個或多個位置接合，提供於活體內經玻璃體內傳遞雙股iRNA之驚人良好結果，造成有效進入眼部組織及有效內化至眼部系統之細胞中。

【0151】 下列詳細說明揭示如何製造及使用包含選擇性抑制眼部細胞中TTR基因表現之iRNA之組成物，及供治療患有可因抑制及/或降低眼部細胞中TTR基因表現而受益之TTR相關眼部疾病與病變之個體之組成物、用途、與方法。

I. 定義

【0152】 為了更容易了解本發明，首先定義某些術語。此外應注意，不論何時出示之參數數值或數值範圍，其均指示該等所出示數值之間之數值與範圍亦為本發明一部份。

【0153】 本文所採用冠詞「一種」與「一個」係指該文法上主詞為一個(種)或超過一個(種)(亦即至少一個(種))。例如，「一個元素」係指一個元素或超過一個元素，例如，複數個元素。

【0154】 本文所採用術語「包括」意指片語「包括(但不限於)，」，並可與其交換使用。

【0155】 本文所採用術語「或」意指「及/或」，並可與其交換使用，除非內文另有明確說明。

【0156】 本文所採用術語「約」係指在相關技藝典型之容許範圍內。例如，咸了解「約」可在平均值之約2個標準偏差範圍內。某些具體例中，約係指+10%。某些具體例中，約係指+5%。當「約」出現在一系列數字或

範圍之前時，咸了解「約」可修飾該系列數字或範圍。

【0157】 在一個數字或一系列數字之前之術語「至少」咸了解係包括與術語「至少」相鄰之數字，且由內容得知，邏輯上包括所有接續之數字或整數。例如，核酸分子中之核苷酸數量必需為整數。例如，「含21個核苷酸之核酸分子中至少19個核苷酸」意指19、20、或21個核苷酸具有指定之性質。當「至少」出現在一系列數字或範圍之前時，咸了解「至少」可修飾該一系列數字或範圍中每一個數字。

【0158】 本文所採用「不超過」或「低於」咸了解係指與該片語相鄰且邏輯上較低之數值或整數，以內文邏輯而言，可低達零。例如，具有「不超過2個核苷酸」之突出之雙螺旋具有2、1、或0個核苷酸突出。當「不超過」出現在一系列數字或範圍之前時，咸了解，「不超過」可修飾該系列或範圍內每個數字。本文所採用「範圍」同時包括上限與下限。

【0159】 若序列與其在轉錄物或其他序列的指定位點之間有矛盾時，以本說明書中指示之核苷酸序列優先。

【0160】 本文所採用「甲狀腺素運載蛋白」(「TTR」)係指習知之基因與蛋白質。TTR亦稱為前白蛋白、HsT2651、PALB、與TBPA。TTR之功能為視黃醇-結合性蛋白質(RBP)、甲狀腺素(T4)與視黃醇之運載體，亦作用為蛋白酶。肝臟分泌TTR進入血液，及脈絡叢分泌TTR進入腦脊髓液。TTR亦表現在胰臟與視網膜色素上皮層。TTR之最大臨床相關性為正常與突變TTR蛋白質均可形成類澱粉蛋白原纖維，其集結形成細胞外沉積，造成類澱粉蛋白變性。其概述可參見例如，Saraiva M.J.M.(2002) *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(12):1-11。大鼠甲狀腺素運載蛋白之分子選殖與核苷酸序列、及mRNA表現之分佈已說明於Dickson, P.W.等人(1985) *J. Biol. Chem.* 260(13)8214-8219。人類TTR之X-光結晶結構說明

於Blake, C.C.等人(1974) *J Mol Biol 88*, 1-12。人類TTR mRNA轉錄物之序列可參見國家生技資訊中心(National Center for Biotechnology Information)(NCBI) RefSeq登錄號NM_000371(例如，SEQ ID NO：1及5)。小鼠TTR mRNA之序列可參見RefSeq登錄號NM_013697.2，及大鼠TTR mRNA之序列可參見RefSeq登錄號NM_012681.1。TTR mRNA序列之其他實施例很容易利用可公開取得之資料庫取得，例如，GenBank、UniProt、與OMIM。

【0161】 本文所採用「標靶序列」係指在TTR基因轉錄期間所形成mRNA分子之核苷酸序列中之連續部份，包括作為主要轉錄產物之RNA加工產物之mRNA。一項具體例中，該序列之標靶部份之長度至少足以作為受質，供iRNA主導在TTR基因轉錄期間所形成mRNA分子之核苷酸序列部份之位置或附近進行裂解。一項具體例中，該標靶序列係在TTR基因之蛋白質編碼區內。另一項具體例中，該標靶序列係在TTR基因之3' UTR內。

【0162】 該標靶序列之長度可為約9至36個核苷酸，例如，約15至30個核苷酸之長度。例如，該標靶序列可為約15-30個核苷酸、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個核苷酸之長度。有些具體例中，標靶序列為約19至約30個核苷酸之長度。其他具體例中，標靶序列為約19至約25個核苷酸之長度。再其他具體例中，標靶序列為約19至約23個核苷酸之長度。有些具體例中，標靶序列為約21至約23個核苷酸之長度。上述範

圍與長度之間之範圍與長度亦涵括為本發明之一部份。

【0163】 本發明有些具體例中，TTR基因之標靶序列包含SEQ ID NO：1之核苷酸615-637或SEQ ID NO：5之核苷酸505-527(亦即5’-GATGGGATTTCATGTAACCAAGA – 3’；SEQ ID NO：4)。

【0164】 本文所採用術語「包含序列之股」係指包含核苷酸鏈之寡核苷酸，其係採用標準核苷酸命名法之序列說明。

【0165】 「G」、「C」、「A」、「T」與「U」各一般代表分別包含鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸苷與尿嘧啶作為鹼基之核苷酸。然而，咸了解，術語「核糖核苷酸」或「核苷酸」亦指經修飾核苷酸，如下文中進一步說明，或改用置換部份體替代(參見例如，表3)。習此相關技藝者咸了解，鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤與尿嘧啶可在不實質上改變該包含帶有此等置換部份體之核苷酸之寡核苷酸鹼基配對性質下改用其他部份體置換。例如(但不限於)：包含肌苷作為其鹼基之核苷酸可與包含腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之核苷酸形成鹼基對。因此，如本發明所說明特徵之dsRNA之核苷酸序列中包含尿嘧啶、鳥嘌呤或腺嘌呤之核苷酸可被包含例如，肌苷之核苷酸置換。另一項實施例中，寡核苷酸中之任何腺嘌呤與胞嘧啶均可分別被鳥嘌呤與尿嘧啶置換，分別與標靶mRNA形成G-U搖擺鹼基配對(Wobble base pairing)。包含此等置換部份體之序列適合如本發明所說明特徵之組成物與方法。

【0166】 本文所採用術語「iRNA」、「RNAi劑」、「iRNA劑」、「RNA干擾劑」可在本文中交換使用，係指包含如本文術語定義之RNA之製劑，其可經由RNA誘發靜默複合物(RISC)途徑來介導靶向裂解RNA轉錄物。iRNA透過已知為RNA干擾(RNAi)之過程來主導mRNA之序列專一性降解。該iRNA調控(例如，抑制)細胞(例如，個體，如哺乳動物個體內細胞)

中之TTR基因表現。

【0167】 一項具體例中，本發明RNAi劑包括與標靶RNA序列(例如，TTR標靶mRNA序列)交互作用之單股RNA，以主導裂解標靶RNA。在不希望受到理論之限制下，咸信進入細胞中之長雙股RNA被稱為Dicer之第III型內切核酸酶分解成包含正義股與反義股之雙股短型干擾RNA(siRNA)(Sharp 等人(2001)*Genes Dev*. 15：485)。Dicer係一種類似核糖核酸酶-III之酵素，其處理此等dsRNA成為19至23對鹼基之短型干擾RNA，其特徵在於含兩個鹼基之3'突出(Bernstein等人(2001) *Nature* 409：363)。該等siRNA隨即進入RNA誘發靜默複合物(RISC)中，其中一或多種解螺旋酶解開siRNA雙螺旋，讓互補反義股導引標靶辨識(Nykanen等人(2001) *Cell* 107：309)。一旦與適當標靶mRNA結合，RISC內之一或多種內切核酸酶裂解標靶，誘發靜默(Elbashir等人(2001)*Genes Dev*. 15：188)。因此本發明一項態樣係有關一種在細胞內產生之單股siRNA(ssRNA)(siRNA雙螺旋之反義股)，其促進形成RISC複合物，引起標靶基因(亦即TTR基因)靜默。因此，本文中亦採用術語「siRNA」意指如上述之RNAi。

【0168】 另一項具體例中，RNAi劑可為被導入細胞或生物體中抑制標靶mRNA之單股RNA。單股RNAi劑與RISC內切核酸酶Argonaute 2結合，然後裂解標靶mRNA。該單股siRNA通常為15至30個核苷酸，且經過化學修飾。單股siRNA之設計與試驗說明於美國專利案案號8,101,348與Lima等人(2012) *Cell* 150：883-894，其完整內容已分別以引用之方式併入本文中。本文說明之任何反義核苷酸序列均可作為本文說明之單股siRNA使用或可採用Lima等人(2012) *Cell* 150：883-894說明之方法進行化學修飾。

【0169】 另一項具體例中，本發明組成物、用途與方法所使用之「iRNA」係雙股RNA，本文中稱為「雙股RNAi劑」、「雙股RNA(dsRNA)分子」、「dsRNA劑」或「dsRNA」。術語「dsRNA」係指核糖核酸分子之複合物，其具有雙螺旋結構，包含兩個反向平行且實質上互補之核酸股，相對於標靶RNA(亦即TTR基因)具有「正義」與「反義」取向。本發明有些具體例中，雙股RNA(dsRNA)透過轉錄後基因-靜默機轉(本文稱為RNA干擾或RNAi)啟動標靶RNA(例如，mRNA)之降解。

【0170】 通常，dsRNA分子之各股之大多數核苷酸為核糖核苷酸，但如同本文之詳細說明，各股或兩股亦可包括一個或多個非核糖核苷酸，例如，去氧核糖核苷酸及/或經修飾核苷酸。此外，本說明書所採用「RNAi劑」可能包括具有化學修飾之核糖核苷酸；RNAi劑可能在多重核苷酸包括實質修飾。

【0171】 本文所採用術語「經修飾核苷酸」 係指核苷酸獨立地具有經修飾之糖部份體、經修飾之核苷酸間鏈結、及/或經修飾之核鹼基。因此，術語經修飾核苷酸涵括在核苷間鏈結、糖部份體、或核鹼基的取代、增加或移除例如，官能基或原子。適用於本發明製劑之修飾包括本文所揭示或相關技藝上已知之所有修飾型態。用於siRNA型分子之任何此等修飾均涵括在針對本說明書與申請專利範圍目的之「RNAi劑」中。

【0172】 雙螺旋區之長度可為所需之標靶RNA透過RISC途徑容許專一性降解之任何長度，且可能在約9至36對鹼基之長度範圍，例如，約15-30對鹼基之長度，例如，約9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、或36對鹼基之長度，如約15-30、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對鹼基之長度。上述範圍與長度之間之範圍與長度亦涵括為本發明之一部份。

【0173】 形成雙螺旋結構之兩股可能為一個較大RNA分子之不同部份，或其等可能為分開之RNA分子。若這兩股為一個較大RNA分子之一部份，且因此利用形成該雙螺旋結構之其中一股之3'-端與另一股之5'-端之間未中斷之核苷酸鏈連接時，該連接之RNA鏈稱為「髮夾環」。髮夾環可包含至少一個未配對之核苷酸。有些具體例中，髮夾環可包含至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少20個、至少23個、或更多個未配對之核苷酸。有些具體例中，該髮夾環可為10個或更少個核苷酸。有些具體例中，該髮夾環可為8個或更少個未配對之核苷酸。有些具體例中，該髮夾環可為4-10個未配對之核苷酸。有些具體例中，該髮夾環可為4-8個核苷酸。

【0174】 某些具體例中，雙股寡聚化合物之兩股可共同連結。兩股可在兩端、或僅在一端彼此連結。連結在一端意指由第一股之5'-端連結第二股之3'-端，或由第一股之3'-端連結第二股之5'-端。當兩股在兩端彼此連結時，係由第一股之5'-端連結第二股之3'-端，及由第一股之3'-端連結第二股之5'-端。兩股可以利用寡核苷酸鏈結基共同連結，包括(但不限於)，(N)n；其中N獨立地為經修飾或未經修飾核苷酸，及n為3-23。有些具體例中，n為3-10，例如，3、4、5、6、7、8、9、或10。有些具體例中，寡核苷酸鏈結基係選自下列各者所成群組：GNRA、(G)4、(U)4、與(dT)4，其中N為經

修飾或未經修飾核苷酸，及R為經修飾或未修飾嘌呤核苷酸。鏈結基中有些核苷酸可涉及與鏈結基中其他核苷酸之鹼基配對交互作用。兩股亦可利用非核苷鏈結基(例如，本文說明之鏈結基)連結在一起。習此相關技藝者咸了解，本文說明之任何寡核苷酸化學修飾或變化均可用於寡核苷酸鏈結基。

【0175】 髮夾與啞鈴型寡聚化合物具有之雙螺旋區等於或至少14、15、15、16、17、18、19、29、21、22、23、24、或25核苷酸對。雙螺旋區之長度可以等於或少於200、100、或50。有些具體例中，雙螺旋區之長度範圍為15至30、17至23、19至23、與19至21核苷酸對。

【0176】 髮夾寡聚化合物可具有單股突出或末端未配對區，有些具體例中，在3'，及有些具體例中，在髮夾之反義側。有些具體例中，突出之長度為1-4個，更佳為2-3個核苷酸。可誘發RNA干擾之髮夾寡聚化合物在本文中亦稱為「shRNA」。

【0177】 若dsRNA之兩個實質上互補股包含在分開之RNA分子上時，彼等分子不一定需要，但可以共價連接。若這兩股利用除了形成該雙螺旋結構之其中一股之3'-端與另一股之5'-端之間未中斷之核苷酸鏈以外之其他連接方式連接時，該連接結構稱為「鏈結基」。RNA股可能具有相同或不同數量之核苷酸。鹼基對之最大數量即為dsRNA中最短股之核苷酸數量減去雙螺旋中任何突出後之數量。除了雙螺旋結構外，RNAi可包含含一個或多個核苷酸之突出。

【0178】 一項具體例中，本發明RNAi劑為每股長度為24-30個核苷酸之dsRNA，其與標靶RNA序列(例如，TTR標靶mRNA序列)交互作用，主導裂解標靶RNA。在不希望受到理論之限制下，進入細胞中之長的雙股RNA被稱為Dicer之第III型內切核酸酶分解成siRNA(Sharp 等人(2001)*Genes Dev.* 15：485)。Dicer係類似核糖核酸酶-III之酵素，其處理

dsRNA成19至23對鹼基之短型干擾RNA，其特徵在於含兩個鹼基之3'突出(Bernstein等人(2001) *Nature* 409：363)。該等siRNA隨後再進入RNA誘發靜默複合物(RISC)中，其中一或多種解螺旋酶解開siRNA雙螺旋，讓該互補反義股可以導引標靶辨識(Nykanen等人(2001) *Cell* 107：309)。一旦與適當標靶mRNA結合，RISC內之一種或多種內切核酸酶即裂解標靶而誘發靜默(Elbashir等人(2001)*Genes Dev.* 15：188)。

【0179】 一項具體例中，本發明RNAi劑為dsRNA劑，其各股包括與TTR RNA序列交互作用之19至23個核苷酸，以主導裂解標靶RNA。在不希望受到理論之限制下，咸信進入細胞中之長的雙股RNA被稱為Dicer之第III型內切核酸酶分解成siRNA(Sharp 等人(2001)*Genes Dev.* 15：485)。Dicer係一種類似核糖核酸酶-III之酵素，其處理dsRNA成為19至23對鹼基之短型干擾RNA，其特徵在於含兩個鹼基之3'突出(Bernstein等人(2001) *Nature* 409：363)。該等siRNA隨後進入RNA誘發靜默複合物(RISC)中，其中一或多種解螺旋酶解開siRNA雙螺旋，讓互補反義股導引標靶辨識(Nykanen等人(2001) *Cell* 107：309)。一旦與適當標靶mRNA結合，RISC內之一或多種內切核酸酶裂解標靶，誘發靜默(Elbashir等人(2001)*Genes Dev.* 15：188)。一項具體例中，本發明RNAi劑為一種24至30個核苷酸之dsRNA劑，其與TTR RNA序列交互作用，以主導裂解標靶。

【0180】 本文所採用術語「核苷酸突出」係指至少一個未配對之核苷酸從iRNA雙螺旋結構(例如，dsRNA)中伸出。例如，當dsRNA中一股之3'-端超出另一股5'-端，或反之亦然時，即有一個核苷酸突出。dsRNA可包含至少一個核苷酸之突出；或者，該突出可包含至少兩個核苷酸、至少三個核苷酸、至少四個核苷酸、至少五個核苷酸或更多個。核苷酸突出可包含或由核苷酸/核苷類似物組成，包括去氧核苷酸/核苷。該(等)突出可位於正

義股、反義股或其任何組合。此外，突出之核苷酸(群)可出現在dsRNA之反義股或正義股之5'-端、3'-端或兩端。dsRNA之一項具體例中，至少一股包含至少1個核苷酸之3’突出。另一項具體例中，至少一股包含至少2個核苷酸之3’突出，例如，2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、或15個核苷酸。其他具體例中，RNAi劑之至少一股包含至少1個核苷酸之5’突出。某些具體例中，至少一股包含至少2個核苷酸之5’突出，例如，2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、或15個核苷酸。又其他具體例中，RNAi劑中一股之3’與5’兩端包含至少1個核苷酸之突出。

【0181】 一項具體例中，dsRNA之反義股可在3’-端及/或5’-端具有1至10個核苷酸，例如，0-3、1-3、2-4、2-5、4-10、5-10個，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10個核苷酸之突出。一項具體例中，dsRNA之正義股可在3’-端及/或5’-端具有1至10個核苷酸，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10個核苷酸之突出。另一項具體例中，突出中一個或多個核苷酸被核苷硫代磷酸酯置換。

【0182】 某些具體例中，正義股或反義股或二者之突出可包括超過10個核苷酸之延伸長度，例如，1至30個核苷酸、2至30個核苷酸、10至30個核苷酸、或10至15個核苷酸之長度。某些具體例中，延伸之突出係在雙螺旋之正義股。某些具體例中，延伸之突出出現在雙螺旋正義股之3’端。某些具體例中，延伸之突出出現在雙螺旋正義股之5’端。某些具體例中，延伸之突出係在雙螺旋之反義股。某些具體例中，延伸之突出出現在雙螺旋反義股之3’端。某些具體例中，延伸之突出出現在雙螺旋反義股之5’端。某些具體例中，突出中一個或多個核苷酸被核苷硫代磷酸酯置換。某些具體例中，該突出包括自我互補部份，因此該突出得以形成在生理條件下穩定之髮夾結構。

【0183】「鈍」或「鈍端」意指雙股RNAi劑之端沒有未配對之核苷酸，亦即沒有核苷酸突出。「鈍端」之RNAi劑為該dsRNA之整個長度均為雙股，亦即該分子之任一末端均沒有核苷酸突出。本發明RNAi劑包括在一端具有核苷酸突出(亦即具有一個突出與一個鈍端之製劑)之RNAi劑或兩個端均具有核苷酸突出之RNAi劑。

【0184】術語「反義股」或「導引股」係指iRNA(例如，dsRNA)之該股包括一個與標靶序列(例如，TTR mRNA)實質上互補之區。本文所採用術語「互補區」係指反義股與如本文定義之序列(例如，標靶序列，例如，TTR核苷酸序列)實質上互補之區。若當互補區與標靶序列未完全互補時，可能在分子內部或末端區發生錯配。通常，最能忍受之錯配係在末端區內，例如，iRNA之5'-及/或3'-末端之5、4、3、2或1個核苷酸內。一項具體例中，本發明雙股RNAi劑在反義股中包括一個核苷酸錯配。另一項具體例中，本發明雙股RNAi劑在正義股中包括一個核苷酸錯配。一項具體例中，該核苷酸錯配係在例如，從iRNA之3'-末端起5、4、3、2、或1個核苷酸內。另一項具體例中，該核苷酸錯配係在例如，iRNA之3'-末端核苷酸。

【0185】本文所採用術語「正義股」或「過客股」係指該iRNA之股包括與如本文所定義反義股區實質上互補之區。

【0186】本文所採用術語「裂解區」係指位在緊鄰裂解位點之區。裂解位點係在標靶上發生裂解之位點。有些具體例中，裂解區在任一端且在緊鄰裂解位點包含三個鹼基。有些具體例中，裂解區在任一上且在緊鄰裂解位點包含兩個鹼基。有些具體例中，裂解位點明確發生在與反義股之核苷酸10與11結合之位點，且裂解區包含核苷酸11、12與13。

【0187】除非另有說明，否則當本文採用術語「互補」說明第一核苷酸序列與第二核苷酸序列之關係時，係指包含該第一核苷酸序列之寡核苷

酸或多核苷酸在習此相關技藝者咸了解之某些條件下與包含第二核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸雜交並形成雙螺旋結構之能力。此等條件可為例如，嚴苛條件，其中嚴苛條件包括：400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA，50°C或70°C下12-16小時，然後洗滌(參見例如，「Molecular Cloning：A Laboratory manual，Sambrook等人(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press」)。可採用其他條件，如生物體內部可能遭遇到之生理相關條件。習此相關技藝者均可依據最終雜交核苷酸之用途，決定最適合測試兩個序列之互補性之條件。

【0188】 iRNA(例如，本文說明之dsRNA)內之互補序列包括包含第一核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸與包含第二核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸沿著其中一或兩個核苷酸序列之整個長度之鹼基配對。此等序列可稱為其彼此「完全互補」。然而，若第一序列相對於本文第二序列稱為「實質上互補」時，則該等兩個序列可能完全互補，或當具有多達30個鹼基對之雙螺旋在雜交時，其可能形成一或多對，通常不會有超過5、4、3或2個錯配鹼基對，同時在與其最終用途(例如，經由RISC途徑抑制基因表現)最相關之條件下仍保留雜交能力。然而，若兩個寡核苷酸之設計在於雜交時形成一個或多個單股突出時，則此等突出不應在決定互補性時視為錯配。例如，包含一個長度為21個核苷酸之寡核苷酸與另一個長度為23個核苷酸之寡核苷酸之dsRNA中，包含一個與該較短寡核苷酸完全互補之21個核苷酸序列之較長寡核苷酸在本發明所說明目的下，仍可稱為「完全互補」。

【0189】 本文所採用「互補」序列亦可包括非華生-克里克(non-Watson-Crick)鹼基對及/或由非天然與經修飾之核苷酸形成之鹼基對，或完全由其等形成，只要符合上述雜交能力之要求即可。此等非華生-克里克鹼基對包括(但不限於)，G：U搖擺或胡斯坦(Hoogstein)鹼基配對。

【0190】 本文中有關dsRNA之正義股與反義股之間或iRNA劑之反義股與標靶序列之間鹼基匹配之內容所採用之術語「互補」、「完全互補」與「實質上互補」可由其用途之內容中了解。

【0191】 本文所採用與信使RNA(mRNA)之「至少一部份實質上互補」之聚核苷酸係指該多核苷酸與所需mRNA(例如，編碼TTR基因之mRNA)之連續部份實質上互補。例如，若該序列係與編碼TTR基因之mRNA之非中斷部份實質上互補時，則該多核苷酸係與至少一部份TTR mRNA互補。

【0192】 因此有些具體例中，本文所揭示之反義多核苷酸係與該標靶TTR序列完全互補。

【0193】 其他具體例中，本文所揭示之反義多核苷酸係與標靶TTR序列實質上互補，且包含之連續核苷酸序列之總長度係與任一SEQ ID NO：2或任一SEQ ID NO：1、2、與5之片段之核苷酸序列之同等區至少約80%互補，如約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約 91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約 96%、約97%、約98%、或約99%互補。

【0194】 一項具體例中，本發明RNAi劑包括實質上與反義多核苷酸(其進而與標靶TTR序列互補)互補之正義股，且其中該正義股多核苷酸包含之連續核苷酸序列之總長度係與表4中任一序列之核苷酸序列之同等區至少約80%互補，如約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約% 91%、約 92%、約93%、約94%、約95%、約 96%、約97%、約98%、或約99%互補。

【0195】 另一項具體例中，本發明RNAi劑包括實質上與該標靶TTR

序列互補之反義股，且包含之連續核苷酸序列之總長度係與表4中任一序列之核苷酸序列之同等區至少約80%互補，如約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約% 91%、約 92%、約93%、約94%、約95%、約 96%、約97%、約98%、或約99%互補。

【0196】 有些具體例中，雙股iRNA劑之雙股區之長度係等於或至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、23、24、25、26、27、28、29、30個或更多個核苷酸。

【0197】 有些具體例中，雙股iRNA劑之反義股之長度係等於或至少14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、23、24、25、26、27、28、29、或30個核苷酸。

【0198】 有些具體例中，雙股iRNA劑之正義股之長度係等於或至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、23、24、25、26、27、28、29、或30個核苷酸。

【0199】 一項具體例中，雙股iRNA劑之正義股與反義股之長度分別為15至30個核苷酸。

【0200】 一項具體例中，雙股iRNA劑之正義股與反義股之長度分別為19至25個核苷酸。

【0201】 一項具體例中，雙股iRNA劑之正義股與反義股之長度分別為21至23個核苷酸。

【0202】 一項具體例中，iRNA劑之正義股之長度為21個核苷酸，及反義股之長度為23個核苷酸，其中該股形成21個連續鹼基對之雙股區，其在3'-端具有2個核苷酸長之單股突出。

【0203】 有些具體例中，每一股之大多數核苷酸為核糖核苷酸，但如同本文之詳細說明，各股或兩股亦可包括一或多個非核糖核苷酸，例如，去氧核糖核苷酸及/或經修飾核苷酸。此外，「iRNA」可能包括經過化學修飾之核糖核苷酸。此等修飾可能包括本文所揭示或相關技藝上已知之所有修飾型態。基於本說明書與申請專利範圍之目的，「iRNA」包括任何用於iRNA分子之此等修飾。

【0204】 本發明一項態樣中，本發明方法與組成物所採用之製劑為經由反義抑制機轉來抑制標靶mRNA之單股反義核酸分子。單股反義RNA分子係與標靶mRNA內之序列互補。單股反義寡核苷酸可與mRNA進行鹼基配對，依化學計量方式抑制轉譯，並以物理方式阻礙轉譯機轉，參見Dias,N.等人(2002) *Mol Cancer Ther* 1：347-355。單股反義RNA分子之長度可為約15至約30個核苷酸且具有與標靶序列互補之序列。例如，單股反義RNA分子可能包含自本文所說明反義序列任一者之至少約15、16、17、18、19、20、或更多個連續核苷酸之序列。

【0205】 本文所採用「TTR 相關疾病」計畫包括與 TTR 基因或蛋白質相關之任何疾病。此等疾病可能由例如，過量產生 TTR 蛋白質、TTR 基因突變、TTR 蛋白質異常裂解、TTR 與其他蛋白質或其他內因性或外因性物質之間之異常交互作用引起。「TTR 相關疾病」包括任何型態之 TTR 類澱粉蛋白變性(ATTR)，其中 TTR 在異常細胞外凝集物或類澱粉蛋白沉積之形成過程中扮演某種角色。TTR 相關疾病包括(但不限於)，老年全身性類澱粉蛋白變性(SSA)、全身性家族性類澱粉蛋白變性、家族性類澱粉蛋白多發性神經病變(FAP)、家族性類澱粉蛋白心肌病變(FAC)、腦膜/中樞神經

系統(CNS)類澱粉蛋白變性、類澱粉蛋白玻璃體混濁、腕隧道症候群、與高甲狀腺素血症。TTR 類澱粉蛋白變性之症狀包括感覺神經病變(例如，感覺錯亂、肢體末稍感覺減退)、自律神經病變(例如，胃腸道功能障礙，如胃潰瘍、或姿態性低血壓)、運動神經病變、痙攣、失智、脊髓病變、多發性神經炎、腕隧道症候群、自律性機能不全、心肌病變、玻璃體混濁、腎臟機能不全、腎臟病變、mBMI(修正體質量指數)實質減低、顱神經功能障礙、與網格狀角膜營養不良。

【0206】「TTR相關眼部疾病或病變」包括與眼睛TTR基因或蛋白質相關之任何疾病或病變。此等疾病之肇因可為例如，過度產生之TTR蛋白質、TTR基因突變、TTR蛋白質之異常裂解、TTR與眼睛中其他蛋白質或其他內因性或外因性物質之異常交互作用。「TTR相關眼部疾病或病變」包括任何型態之TTR類澱粉蛋白變性(ATTR)，其中TTR在異常細胞外凝集物或類澱粉蛋白沉積之形成過程中扮演某種角色。

【0207】 TTR相關眼部疾病或病變包括(但不限於)，TTR相關青光眼、TTR相關玻璃體混濁、TTR相關視網膜異常、TTR相關視網膜類澱粉蛋白沉積、TTR相關視網膜血管病變、TTR相關虹膜類澱粉蛋白沉積、TTR相關扇貝樣虹膜、與TTR相關水晶體的類澱粉蛋白沉積。

II. 親脂性部份體

【0208】 本發明提供dsRNA劑，其包含正義股與反義股，形成靶向一部份TTR基因之雙股區，其中一個或多個親脂性部份體係視需要利用鏈結基或載子，接合在雙股iRNA雙股區中至少一股的一個或多個內部位置、或至少一股的一個或多個位置。本發明dsRNA劑包含一個或多個親脂性部份

體，其係接合在雙股iRNA雙股區中至少一股的一個或多個內部核苷酸、或至少一股的一個或多個位置，而具有加強活體內傳遞dsRNA至眼部細胞之最佳疏水性。

【0209】 術語「親脂物」或「親脂性部份體」廣義指對脂質具有親和性之任何化合物或化學部份體。一種判別親脂性部份體之親脂性特徵之方式為藉由辛醇-水分配係數，$\log K_{ow}$，其中K_{ow}為當兩相系統達平衡時，化合物在辛醇相中之濃度對其在水相中之濃度之比例。辛醇-水分配係數為實驗室測定之物質性質。然而，亦可採用第一原理(*First Principle)*或實驗性方法計算與化學物之結構組份相關之係數來估算(參見例如，Tetko等人，*J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41:1407-21-(2001)，其完整內容已以引用之方式併入本文中。其提供一種測定物質傾向非水性或油性環境而不傾向水之熱力學趨勢之數值(亦即其親水性/親脂性平衡值)。原則上，當化學物質之$\log K_{ow}$ 超過0時，則其為親脂性。通常，親脂性部份體具有之$\log K_{ow}$超過1、超過1.5、超過2、超過3、超過4、超過5、或超過10。例如，預估例如，6-胺基己醇之$\log K_{ow}$為約0.7。採用相同方法，預估膽固醇基N-(己烷-6-醇)胺甲酸酯之$\log K_{ow}$為10.7。

【0210】 分子之親脂性會隨其帶有之官能基變化。例如，在親脂性部份體端添加羥基或胺基，會增加或降低該親脂性部份體之分配係數(例如，$\log K_{ow}$)值。

【0211】 或者，接合一個或多個親脂性部份體之雙股iRNA劑，可藉由其蛋白質結合特性來測定疏水性。例如，可以在雙股iRNA劑之血漿蛋白質結合分析法中測定未結合比例與雙股iRNA劑之相對疏水性呈正相關性，

該相對疏水性則與雙股iRNA劑之靜默活性呈正相關性。

【0212】 一項具體例中，所測定之血漿蛋白質結合分析法係使用人類血清白蛋白蛋白質進行之電泳移動性位移分析法(EMSA)。在結合分析法中，由未結合之siRNA比例測定之雙股iRNA劑疏水性超過0.15、超過0.2、超過0.25、超過0.3、超過0.35、超過0.4、超過0.45、或超過0.5，加強活體內傳遞siRNA。

【0213】 因此，由親脂性部份體接合雙股iRNA劑之內部位置(群)，或RNAi劑雙股部份內之位置(群)，提供加強活體內眼部傳遞siRNA之最佳疏水性。

【0214】 某些具體例中，親脂性部份體為脂系、環狀，如脂環系、或多環系，如多脂環系化合物，如類固醇(例如，固醇)或線性或分支脂系烴。親脂性部份體通常可以包含烴鏈，其可為環狀或非環狀。烴鏈可包含各種不同取代基及/或一個或多個雜原子，如氧原子或氮原子。此等親脂性脂系部份體包括(但不限於)，飽和或不飽和C_4-C_{30}烴(例如，C_6-C_{18}烴)、飽和或不飽和脂肪酸、蠟類(例如，脂肪酸與脂肪二醯胺之單羥基醇酯)、萜烯類(例如，C_{10}萜烯、C_{15}倍半萜烯、C_{20}二萜烯、C_{30}三萜烯、與C_{40}四萜烯)、與其他多脂環系烴類。例如，親脂性部份體可含有C_4-C_{30}烴鏈(例如，C_4-C_{30}烷基或烯基)。有些具體例中，親脂性部份體含有飽和或不飽和C_6-C_{18}烴鏈(例如，線性C_6-C_{18}烷基或烯基)。一項具體例中，親脂性部份體含有飽和或不飽和C_{16}烴鏈(例如，線性C_{16}烷基或烯基)。

【0215】 親脂性部份體可藉由相關技藝已知之任何方法附接iRNA劑，包括藉由已存在於親脂性部份體中或經導入iRNA劑中之官能基，如羥

基(例如，—CO—CH_2—OH)。已存在於親脂性部份體中或經導入iRNA劑中之官能基包括(但不限於)，羥基、胺、羧酸、磺酸酯、磷酸酯、硫醇、疊氮化物、與炔。

【0216】 iRNA劑與親脂性部份體之接合可以例如，透過羥基與烷基R—、烷醯基RCO—或經取代之胺甲醯基RNHCO—之間形成之醚或羧酸酯或胺甲醯基酯鏈結來達成。烷基R可為環狀(例如，環己基)或非環(例如，直鏈或分支；及飽和或不飽和)。烷基R可為丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一碳基、十二碳基、十三碳基、十四碳基、十五碳基、十六碳基、十七碳基或十八碳基，或類似物。

【0217】 有些具體例中，親脂性部份體係利用含有醚、硫醚、脲、碳酸酯、胺、醯胺、馬來醯亞胺-硫醚、二硫化物、磷酸二酯、磺醯胺鏈結、點擊反應產物(例如，來自疊氮化物-炔環加成反應之三唑)、或胺甲酸酯之鏈結基接合雙股iRNA劑。

【0218】 另一項具體例中，親脂性部份體為類固醇，如固醇。類固醇為含有全氫-1,2-環戊并菲環系之多環化合物。類固醇包括(但不限於)， 膽汁酸(例如，膽酸、去氧膽酸與去氫膽酸)、皮質素、地高辛(digoxigenin)、睾酮、膽固醇、與陽離子性類固醇，如皮質素。「膽固醇衍生物」係指衍生自膽固醇之化合物，例如，經由取代、加成或脫除取代基。

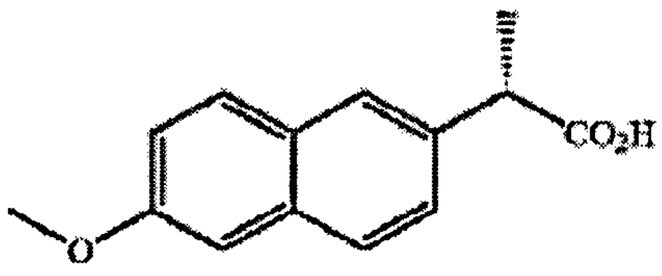
【0219】 另一項具體例中，親脂性部份體為芳香系部份體。本內文中，術語「芳香系」係廣義指單-與多芳香系烴類。芳香系基團包括(但不限於)，包含1至3個芳香環之C_6-C_{14}芳基部份體，其可視需要經取代；「芳烷基」或「芳基烷基」，其包含與烷基共價連結之芳基，此二者獨立地可視需要經

取代或未經取代；及「雜芳基」。本文所採用術語「雜芳基」係指具有5至14個環原子，較佳為5、6、9、或10個環原子；在環狀排列中共用6、10、或14個π電子，且除了碳原子以外，再具有自下列各者所成群組選擇之1至約3個雜原子：氮(N)、氧(O)、與硫(S)。

【0220】 本文所採用「經取代之」烷基、環烷基、芳基、雜芳基、或雜環狀基團係指具有1至約4個，較佳1至約3個，更佳1或2個非氫取代基。合適取代基包括(但不限於)，鹵基、羥基、硝基、鹵烷基、烷基、烷芳基、芳基、芳烷基、烷氧基、芳基氧基、胺基、醯基胺基、烷基胺甲醯基、芳基胺甲醯基、胺基烷基、烷氧基羰基、羧基、羥基烷基、烷磺醯基、芳香烴磺醯基、烷磺醯胺基、芳香烴磺醯胺基、芳烷基磺醯胺基、烷基羰基、醯基氧基、氰基、與脲基。

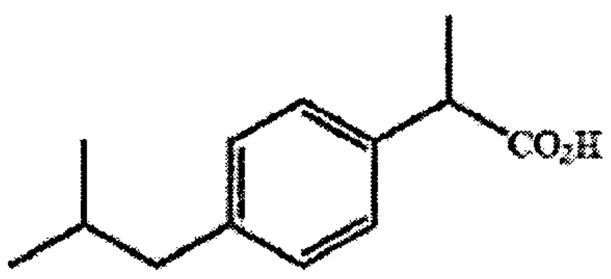
【0221】 有些具體例中，親脂性部份體為芳烷基，例如，2-芳基丙醯基部份體。所選擇之芳烷基結構特徵使得親脂性部份體在活體內結合至少一種蛋白質。某些具體例中，所選擇之芳烷基結構特徵使得親脂性部份體結合血清、血管、或細胞蛋白質。某些具體例中，芳烷基之結構特徵促進與白蛋白、免疫球蛋白、脂蛋白、α-2-巨球蛋白、或α-1-醣蛋白之結合。

【0222】 某些具體例中，配體為納普生(naproxen)或納普生之結構衍生物。納普生之合成法可參見美國專利案案號3,904,682與美國專利案案號4,009,197，其等完整內容已以引用方式併入本文中。納普生之化學名稱為(S)-6-甲氧基-α-甲基-2-萘乙酸，結構式為



。

【0223】 某些具體例中，配體為布洛芬(ibuprofen)或布洛芬之結構衍生物。納普生之合成法可參見美國專利案案號3,228,831，其完整內容已以引用方式併入本文中。布洛芬之結構式為



。

【0224】 另一項例示性芳烷基示於美國專利案案號7,626,014，其完整內容已以引用之方式併入本文中。

【0225】 另一項具體例中，合適親脂性部份體包括脂質、膽固醇、視黃酸、膽酸、金剛烷乙酸、1-芘丁酸、雙氫睾酮、1,3-雙-O(十六碳基)甘油、香葉草基氧己基、十六碳基甘油、龍腦、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七碳基、棕櫚酸、肉豆蔻酸、O3-(油醯基)石膽酸、O3-(油醯基)膽烯酸、布洛芬(ibuprofen)、納普生(naproxen)、二甲氧基三苯甲基、或吩噁唅。

【0226】 某些具體例中，超過一個親脂性部份體可進入雙股iRNA劑中，特別當親脂性部份體具有低的親脂性或疏水性時。一項具體例中，由兩個或更多個親脂性部份體進入雙股iRNA劑之同一股中。一項具體例中，由一個或多個親脂性部份體進入雙股iRNA劑之各股中。一項具體例中，由兩個或更多個親脂性部份體進入雙股iRNA劑之同一個位置(亦即，同一個核鹼基、同一個糖部份體、或同一個核苷間鏈結)。此點可藉由例如，利用載子將兩個或更多個親脂性部份體及/或利用分支鏈結基將兩個或更多個

親脂性部份體、及/或利用一個或多個鏈結基將兩個或更多個親脂性部份體，與連續連結親脂性部份體的一個或多個鏈結基接合。

【0227】 親脂性部份體可以藉由直接附接iRNA劑之核糖接合iRNA劑。或者，親脂性部份體可以藉由鏈結基或載子接合雙股iRNA劑。

【0228】 某些具體例中，親脂性部份體可以藉由一個或多個鏈結基(繫鏈)接合iRNA劑。

【0229】 一項具體例中，親脂性部份體係利用含有醚、硫醚、脲、碳酸酯、胺、醯胺、馬來醯亞胺-硫醚、二硫化物、磷酸二酯、磺醯胺鏈結、點擊反應產物(例如，來自疊氮化物-炔環加成反應之三唑)、或胺甲酸酯之鏈結基接合雙股iRNA劑。有些例示性鏈結示於第1圖、實施例2、3、5、6、與7。

A. 鏈結基/繫鏈

【0230】 鏈結基/繫鏈係在「繫鏈附接點(TAP)」連接親脂性部份體。鏈結基/繫鏈可包括任何含C_1-C_{100}碳之部份體(例如，C_1-C_{75}、C_1-C_{50}、C_1-C_{20}、C_1-C_{10}；C_1、C_2、C_3、C_4、C_5、C_6、C_7、C_8、C_9、或C_{10})，且可具有至少一個氮原子。某些具體例中，氮原子形成鏈結基/繫鏈之末端胺基或醯胺基(NHC(O)-)之一部份，其可作為親脂性部份體之連接點。鏈結基/繫鏈(下加線)之不設限實施例包括TAP-$(CH_2)_n$NH-；TAP-C(O)$(CH_2)_n$NH-；TAP-NR''''$(CH_2)_n$NH-、TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)-；TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)O-；TAP-C(O)-O-；TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-NH-C(O)-；TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-；TAP-C(O)-NH-；TAP-C(O)-；TAP-$(CH_2)_n$-C(O)-；TAP-$(CH_2)_n$-C(O)O-；TAP-$(CH_2)_n$-；或TAP-$(CH_2)_n$-NH-C(O)-;，其中n為1-20 (例如，

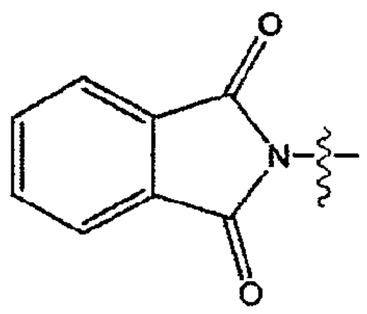
1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20)，及R’’’’為C_1-C_6烷基。較佳係n為5、6、或11。其他具體例中，氮可形成末端氧胺基(例如，-ONH_2)或肼基-$NHNH_2$一部份。鏈結基/繫鏈可視需要經取代，例如，經羥基、烷氧基、全鹵烷基取代，及/或視需要穿插一個或多個額外雜原子，例如，N、O、或S。較佳系鏈之配體可包括例如，TAP-$(CH_2)_nNH$(配體)；TAP-$C(O)(CH_2)_nNH$(配體)；TAP-$NR’’’’(CH_2)_nNH$(配體)；TAP-$(CH_2)_nONH$(配體)；TAP-$C(O)(CH_2)_nONH$(配體)；TAP-$NR’’’’(CH_2)_nONH$(配體)；TAP-$(CH_2)_nNHNH_2$(配體)、TAP-$C(O)(CH_2)_nNHNH_2$(配體)；TAP-$NR’’’’(CH_2)_nNHNH_2$(配體)；TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)(配體)；TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)O(配體)；TAP-C(O)-O(配體)；TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-NH-C(O)(配體)；TAP-C(O)-$(CH_2)_n$(配體)；TAP-C(O)-NH(配體)；TAP-C(O)(配體)；TAP-$(CH_2)_n$-C(O) (配體)；TAP-$(CH_2)_n$-C(O)O(配體)；TAP-$(CH_2)_n$(配體)；或TAP-$(CH_2)_n$-NH-C(O)(配體)。有些具體例中，以胺基為末端之鏈結基/繫鏈(例如，NH_2、ONH_2、NH_2NH_2)可與配體形成亞胺基鍵(亦即C=N)。有些具體例中，以胺基為末端之鏈結基/繫鏈(例如，NH_2、ONH_2、NH_2NH_2)可經醯化，例如，經$C(O)CF_3$醯化。

【0231】 有些具體例中，鏈結基/繫鏈之末端可為氫硫基(亦即SH)或烯烴(例如，$CH=CH_2$)。例如，繫鏈可為TAP-$(CH_2)_n$-SH、TAP-$C(O)(CH_2)_nSH$、TAP-$(CH_2)_n$-$(CH=CH_2)$、或TAP-$C(O)(CH_2)_n(CH=CH_2)$，其中n可如本文中內文說明。繫鏈可視需要經取代，例如，經羥基、烷氧基、全鹵烷基取代，及/或視需要穿插一個或多個額外雜原子，例如，N、O、或

S。雙鍵可為順式或反式或*E*或*Z*。

【0232】 其他具體例中，鏈結基/繫鏈可包括親電子性部份體，較佳位在鏈結基/繫鏈之末端位置。例示性親電子性部份體包括例如，醛、烷基鹵化物、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、萘磺酸酯、或對溴苯磺酸酯，或活化羧酸酯，例如， NHS酯、或五氟苯基酯。較佳鏈結基/繫鏈(下加線)包括TAP-$(CH_2)_n$CHO；TAP-C(O)$(CH_2)_n$CHO；或TAP-NR’’’’$(CH_2)_n$CHO，其中n為1-6，及R’’’’為C_1-C_6烷基；或TAP-$(CH_2)_n$C(O)ONHS；TAP-C(O)$(CH_2)_n$C(O)ONHS；或TAP-NR’’’’$(CH_2)_n$C(O)ONHS，其中n為1-6，及R’’’’為C_1-C_6烷基；TAP-$(CH_2)_n$C(O)OC_6F_5；TAP-C(O)$(CH_2)_n$C(O) OC_6F_5；或TAP-NR’’’’$(CH_2)_n$C(O) OC_6F_5，其中n為1-11及 R’’’’為C_1-C_6烷基；或-$(CH_2)_n$$CH_2$LG；TAP-C(O)$(CH_2)_n$$CH_2$LG；或TAP-NR’’’’$(CH_2)_n$$CH_2$LG，其中n可如本文中其他說明，及R’’’’為$C_1$-$C_6$烷基(LG可為脫離基，如鹵化物、甲磺酸根、甲苯磺酸根、萘磺酸根、對溴苯磺酸根)。可由配體之親核性基團(例如，硫醇或胺基)與繫鏈之親電子基團之偶聯來進行系鏈。

【0233】 其他具體例中，單體需要在鏈結基/繫鏈之末端位置包含酞醯亞胺基(K)



K 。

【0234】 其他具體例中，鏈結基/繫鏈之末端位置可為其他受保護之胺基，例如，烯丙氧基羰基(alloc)、單甲氧基三苯甲基(MMT)、三氟乙醯基、Fmoc、或芳基磺醯基(例如，芳基部份可為鄰-硝苯基或鄰、對-二硝基

苯基)。

【0235】 本文說明之任何鏈結基/繫鏈可以進一步包括一個或多個額外鏈結基，例如，-O-$(CH_2)_n$-、-$(CH_2)_n$-SS-、-$(CH_2)_n$-、或-(CH=CH)-。

B. 可裂解性鏈結基/繫鏈

【0236】 有些具體例中，至少一個鏈結基/繫鏈可為氧化還原可裂解性鏈結基、酸可裂解性鏈結基、酯酶可裂解性鏈結基、磷酸酶可裂解性鏈結基、或肽酶可裂解性鏈結基。

【0237】 一項具體例中，至少一個鏈結基/繫鏈可為氧化還原可裂解性鏈結基(例如，二硫基)。

【0238】 一項具體例中，至少一個鏈結基/繫鏈可為酸可裂解性鏈結基(例如，腙基、酯基、縮醛基、或縮酮基)。

【0239】 一項具體例中，至少一個鏈結基/繫鏈可為酯酶可裂解性鏈結基(例如，酯基)。

【0240】 一項具體例中，至少一個鏈結基/繫鏈可為磷酸酶可裂解性鏈結基 (例如，磷酸根)。

【0241】 一項具體例中，至少一個鏈結基/繫鏈可為肽酶可裂解性鏈結基(例如，肽鍵)。

【0242】 可裂解性鏈結基團可感受裂解劑之作用，例如，pH、氧化還原電位或降解性分子之存在。通常，裂解劑於細胞內部之存在或含量或活性較高於其在血清或血液中者。此等降解劑的實例包括：針對特定受質選擇或沒有受質專一性之氧化還原劑，包括例如，存在於細胞中之氧化性或還原性酵素或還原劑，如氫硫醇，其可利用還原作用降解氧化還原可裂解

性鏈結基團；酯酶；核內體或可產生酸性環境之製劑，例如，彼等造成pH 5或更低之製劑；可水解或降解酸可裂解性鏈結基團之酵素(其作用為一般酸類)、肽酶(其可為受質專一性)、與磷酸酶。

【0243】 可裂解性鏈結基團(如二硫鏈)對pH敏感。人類血清之pH為7.4，而細胞內平均pH稍低，在約7.1-7.3之範圍內。核內體具有較酸之pH，在5.5-6.0之範圍內，溶小體之pH甚至更酸，約5.0。有些繫鏈具有之鏈結基團可在較佳pH裂解，藉以在細胞內從配體(例如，靶向或可通透細胞之配體，如膽固醇)釋放iRNA劑，或進入所需之細胞隔室內。

【0244】 連結配體與iRNA劑之化學結點(例如，鏈結基團)可包括二硫鍵。當藉由內吞作用吸收iRNA劑/配體複合物進入細胞時，胞內體之酸性環境導致二硫鍵裂解，讓配體釋放iRNA劑(Quintana等人，*Pharm Res.* 19:1310-1316, 2002；Patri等人，*Curr. Opin. Curr. Biol.* 6:466-471, 2002)。配體可以為靶向配體或可以彌補iRNA劑之醫療效應之第二醫療劑。

【0245】 繫鏈可包括可被特定酵素裂解之鏈結基團。進入繫鏈中之鏈結基團型態可依iRNA劑所靶向之細胞而定。例如，靶向肝細胞中mRNA之iRNA可接合包括酯基之繫鏈。肝細胞富含酯酶，因此該繫鏈在肝細胞中之裂解效率高於在沒有富含酯酶之細胞型態中之效率。繫鏈裂解後，從附接在繫鏈遠端之配體釋放iRNA劑，藉以強化iRNA劑之靜默活性。其他富含酯酶之細胞型態包括肺、腎皮質與睪丸之細胞。

【0246】 含有肽鍵之繫鏈可以接合靶向富含肽酶之細胞型態(如肝細胞與滑液膜細胞)之iRNA劑。例如，靶向滑液膜細胞之iRNA劑，如用於治療發炎疾病(例如，類風濕關節炎)，可以接合含有肽鍵之繫鏈。

【0247】 通常，可藉由測試降解劑裂解候選鏈結基團之能力(或條件)來分析該候選之可裂解性鏈結基團之合適性。亦需要亦測試候選之可裂解性鏈結基團於血液中或當與其他非標靶組織(例如，當投與個體時可能曝露到iRNA劑之組織)接觸時阻抗裂解之能力。因此，可以決定第一與第二條件之間對裂解作用之相對敏感性，其中所選擇之第一條件係其於標靶細胞中之裂解指標，所選擇之第二條件係其於其他組織或生物液體(例如，血液或血清)中之裂解指標。該評估可於無細胞系統、細胞、細胞培養物、器官或組織培養物、或在完整動物體中進行。其可適用於在無細胞或於培養條件下進行初次分析，並進一步在完整動物體內確認。較佳具體例中，適用之候選化合物在細胞(或在選擇擬似細胞內條件之活體外條件下)之裂解速度比在血液或血清(或在選擇擬似細胞外條件之活體外條件下)至少快2、4、10或100倍。

i. 氧化還原可裂解性鏈結基團

【0248】 一類可裂解性鏈結基團為氧化還原可裂解性鏈結基團，其可在還原或氧化時裂解。氧化還原可裂解性鏈結基團實施例為二硫醚鏈結基團(-S-S-)。可參見本文說明之方法來決定該候選之可裂解鏈結基團是否為合適之「氧化還原可裂解性鏈結基團」，或例如，是否適用於帶有特定iRNA部份體與特定靶向劑。例如，可藉由與二硫蘇糖醇(DTT)或其他還原劑培養，使用相關技藝上已知擬似細胞(例如，標靶細胞)中所觀察到之裂解速率之試劑來分析候選物。該等候選物亦可在選擇擬似血液或血清之條件下分析。較佳具體例中，候選化合物在血液中至多裂解約10%。較佳具體例中，適用之候選化合物在細胞(或在選擇擬似細胞內條件之活體外條件下)之裂

解速度比在血液(或在選擇擬似細胞外條件之活體外條件下)至少快2、4、10、或100倍。候選化合物之裂解速率可採用標準酵素動力學分析法，在選擇擬似細胞內介質條件下測定，並與選擇擬似細胞外介質之條件下之結果比較。

ii. 基於磷酸根之可裂解性鏈結基團

【0249】 基於磷酸根之鏈結基團係被可降解或水解磷酸根之製劑裂解。該可於細胞中裂解磷酸根之製劑實例為酵素，如細胞中之磷酸酶。基於磷酸根之鏈結基實例為—O—P(O)(ORk)-O—、—O—P(S)(ORk)-O—、—O—P(S)(SRk)-O—、—S—P(O)(ORk)-O—、—O—P(O)(ORk)-S—、—S—P(O)(ORk)-S—、—O—P(S)(ORk)-S—、—S—P(S)(ORk)-O—、—O—P(O)(Rk)-O—、—O—P(S)(Rk)-O—、—S—P(O)(Rk)-O—、—S—P(S)(Rk)-O—、—S—P(O)(Rk)-S—、—O—P(S)(Rk)-S—。較佳具體例為—O—P(O)(OH)—O—、—O—P(S)(OH)—O—、—O—P(S)(SH)—O—、—S—P(O)(OH)—O—、—O—P(O)(OH)—S—、—S—P(O)(OH)—S—、—O—P(S)(OH)—S—、—S—P(S)(OH)—O—、—O—P(O)(H)—O—、—O—P(S)(H)—O—、—S—P(O)(H)—O—、—S—P(S)(H)—O—、—S—P(O)(H)—S—、—O—P(S)(H)—S—。較佳具體例為-O-P(O)(OH)-O-。此等候選物可採用類似上述之方法分析。

iii. 酸可裂解性鏈結基團

【0250】 酸可裂解性鏈結基團為可在酸性條件下裂解之鏈結基團。較佳具體例中，酸可裂解性鏈結基團為在pH約6.5或更低(例如，約6.0、5.5、5.0或更低)之酸性環境下裂解，或被如同一般酸之作用之製劑(如酵素)裂解

之基團。在細胞中，特定之低pH細胞器(如核內體與溶小體)可為酸可裂解性鏈結基團提供裂解環境。酸可裂解性鏈結基團實例包括(但不限於)，腙類、縮酮、縮醛、酯類、及胺基酸之酯類。酸可裂解性基團具有通式-C=NN-、C(O)O，或-OC(O)。較佳具體例為當附接酯之氧(烷氧基)之碳為芳基、經取代之烷基、或三級烷基(如二甲基戊基或第三丁基)時。此等候選物可採用類似彼等上述方法分析。

iv. 基於酯之鏈結基團

【0251】 基於酯之鏈結基團可被細胞中之酵素裂解，如酯酶與醯胺酶。基於酯之可裂解性鏈結基團實施例包括(但不限於)，伸烷基、伸烯基與伸炔基之酯類。可裂解性酯鏈結基團具有通式-C(O)O-或-OC(O)-。此等候選物可採用類似彼等上述方法分析。

v. 基於肽之裂解基團

【0252】 基於肽之鏈結基團可被細胞中酵素裂解，如肽酶與蛋白酶。該基於肽之可裂解性鏈結基團係在胺基酸之間為了產生寡肽(例如，二肽、三肽等等)與多肽所形成之肽鍵。該基於肽之可裂解基團不包括醯胺基(-C(O)NH-)。醯胺基可在任何伸烷基、伸烯基或伸炔基之間形成。肽鍵係在胺基酸之間為了產生肽與蛋白質所形成之一種特別型態之醯胺鍵。該基於肽之裂解基團通常限於在胺基酸之間為了產生肽與蛋白質所形成之肽鍵(亦即醯胺鍵)，且不包括整個醯胺官能基。肽可裂解性鏈結基團具有通式—$NHCHR^1C(O)NHCHR^2C(O)$—，其中R^1與R^2為兩個相鄰胺基酸之R基團。

此等候選物可採用彼等類似上述之方法分析。

vi. 生物可裂解性鏈結基/系鏈

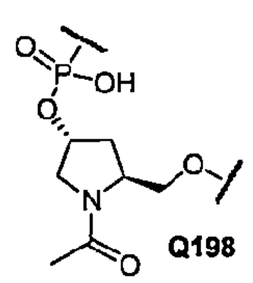
【0253】 鏈結基亦可包括生物可裂解性鏈結基，其係連接一個分子之兩個部份(例如，兩個個別siRNA分子之一股或兩股來形成雙(siRNA))之核苷酸與非核苷酸鏈結基或其組合。有些具體例中，兩個個別siRNA之間之靜電或疊合交互作用可以代表鏈結基。非核苷酸鏈結基包括衍生自單糖、雙糖、寡醣與其衍生物、脂系、脂環系、雜環系、與其組合之繫鏈或鏈結基。

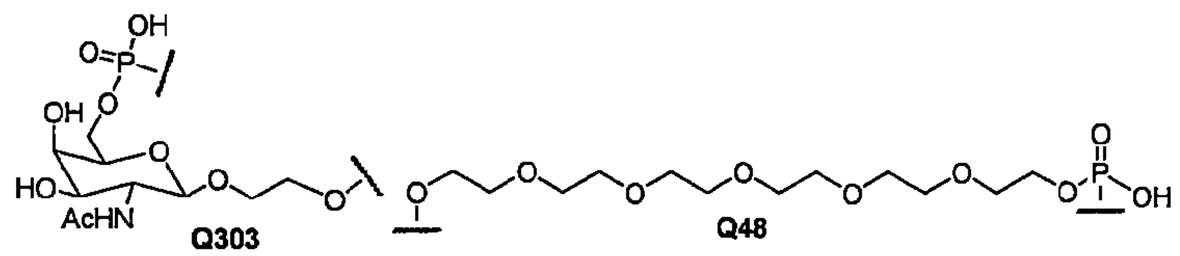
【0254】 有些具體例中，至少一個鏈結基(繫鏈)為自下列各者所成群組選擇之生物可裂解性鏈結基：DNA、RNA、二硫化物、醯胺、官能化單糖，或半乳糖胺、葡萄糖胺、葡萄糖、半乳糖、與甘露糖之寡醣、及其組合。

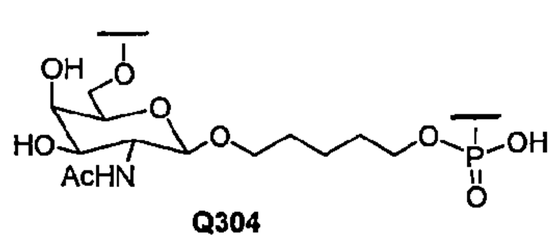
【0255】 一項具體例中，生物可裂解性碳水化合物鏈結基可以具有1至10個醣單位，其可具有至少一個可以連接兩個siRNA單位之變旋異構性鏈結。當存在兩個或更多個醣時，此等單位可以利用1-3、1-4、或1-6糖鏈

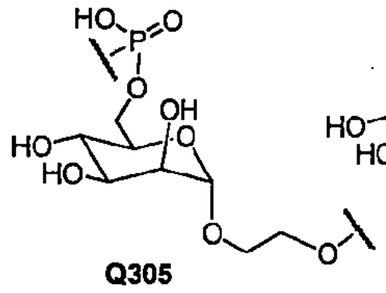
結、或利用烷基鏈連結。

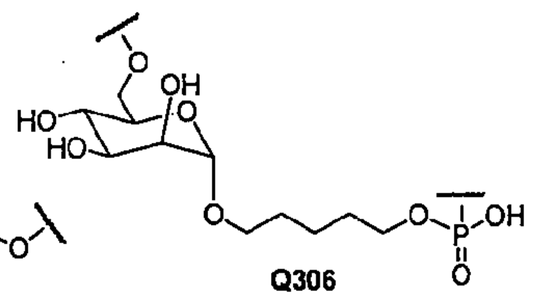
【0256】 生物可裂解性鏈結基實例包括：

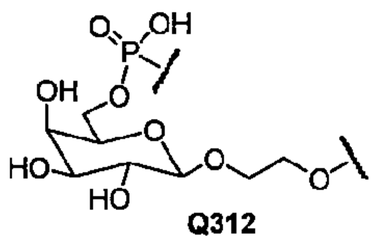

Q198

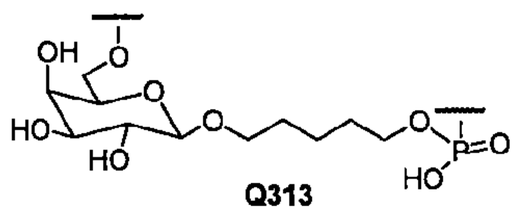

Q303 Q48

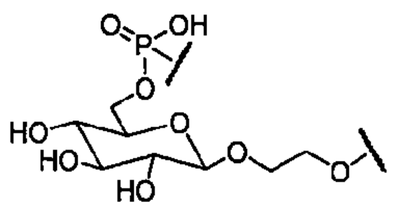

Q304

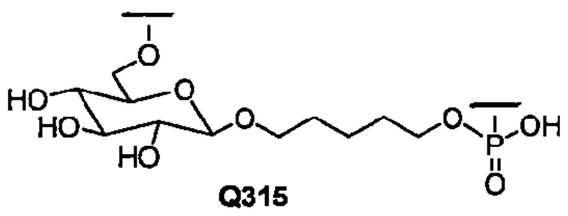

Q305

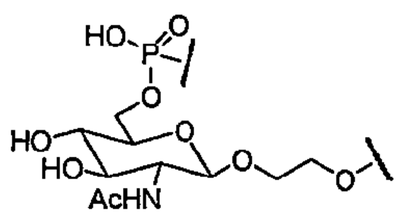

Q306

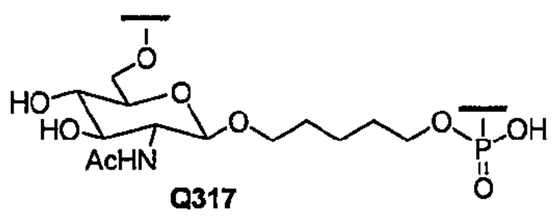

Q312

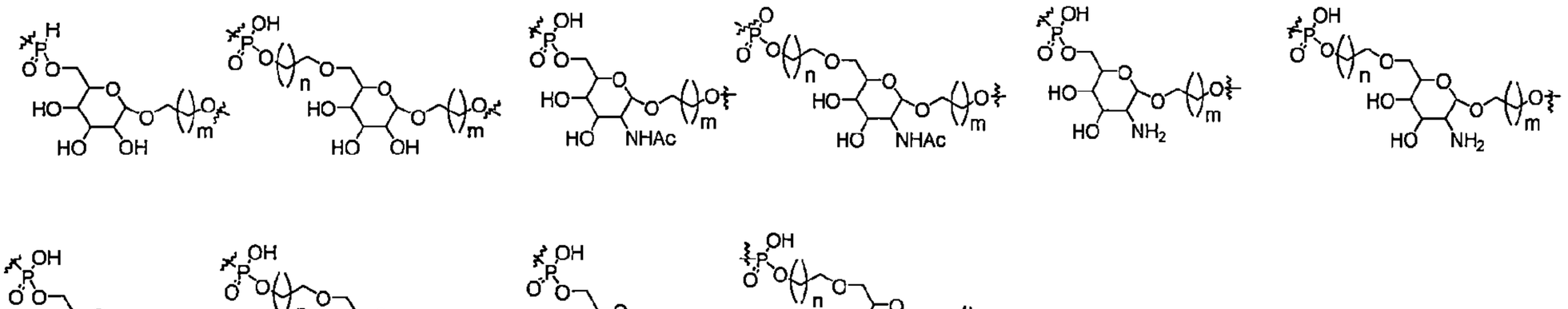

Q313

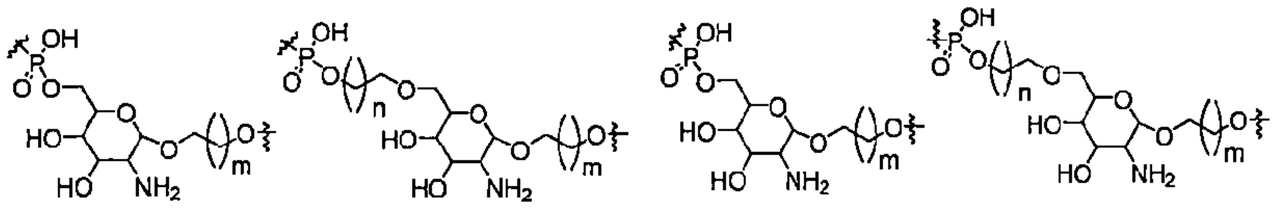

Q314

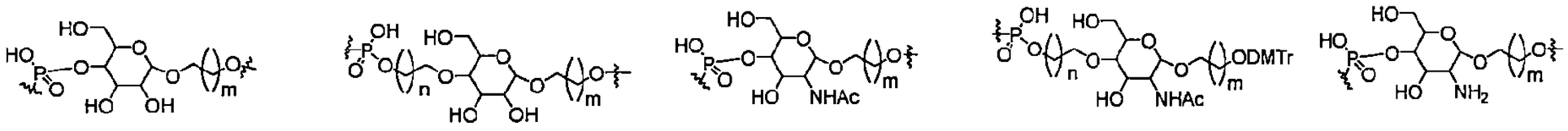

Q315

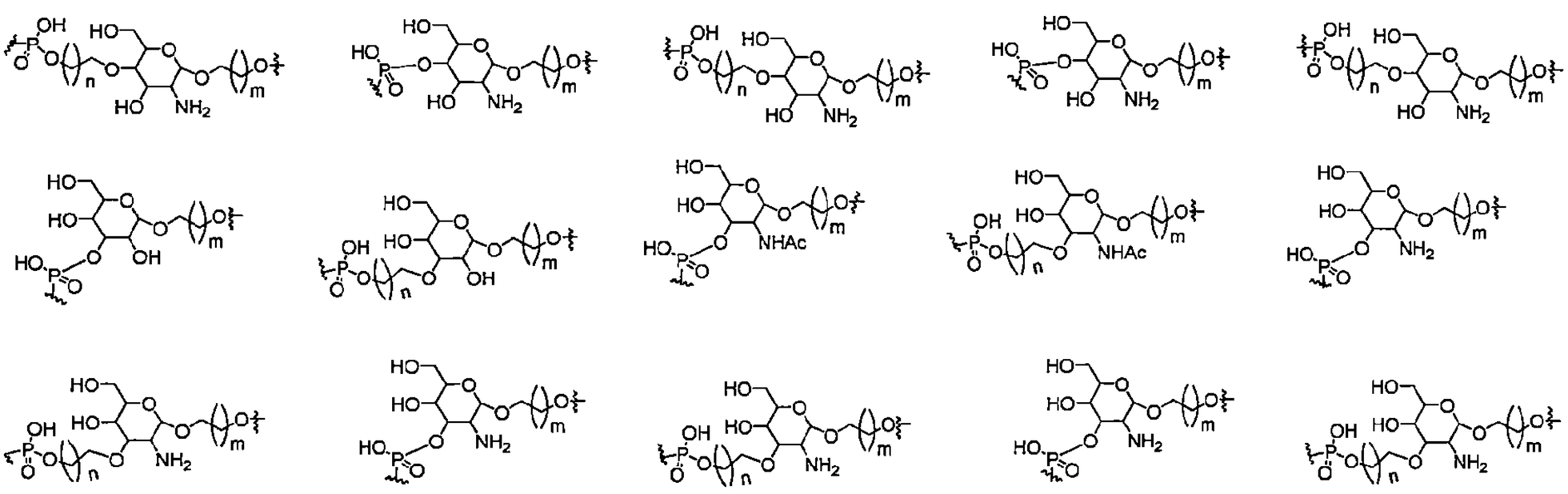

Q316

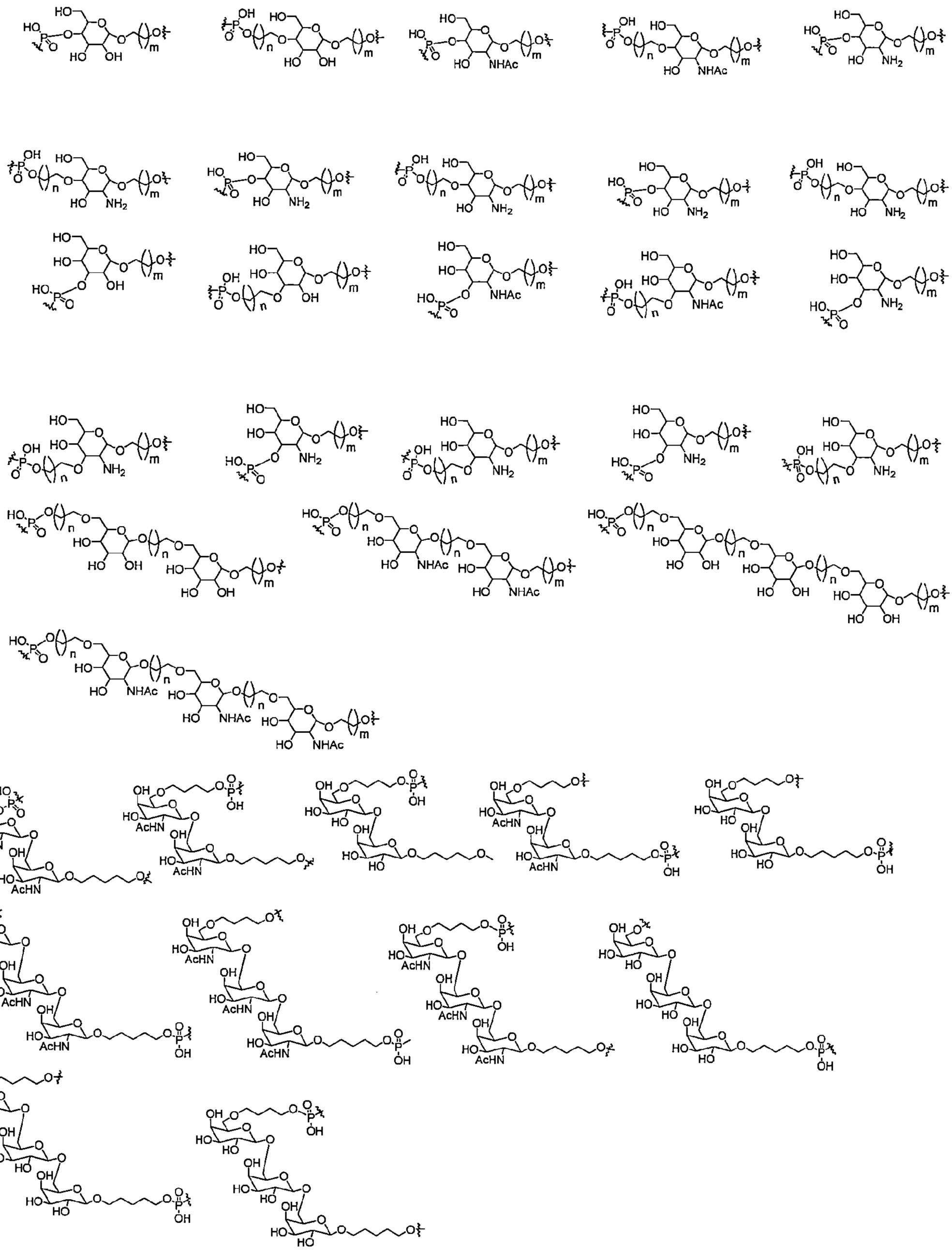

Q317

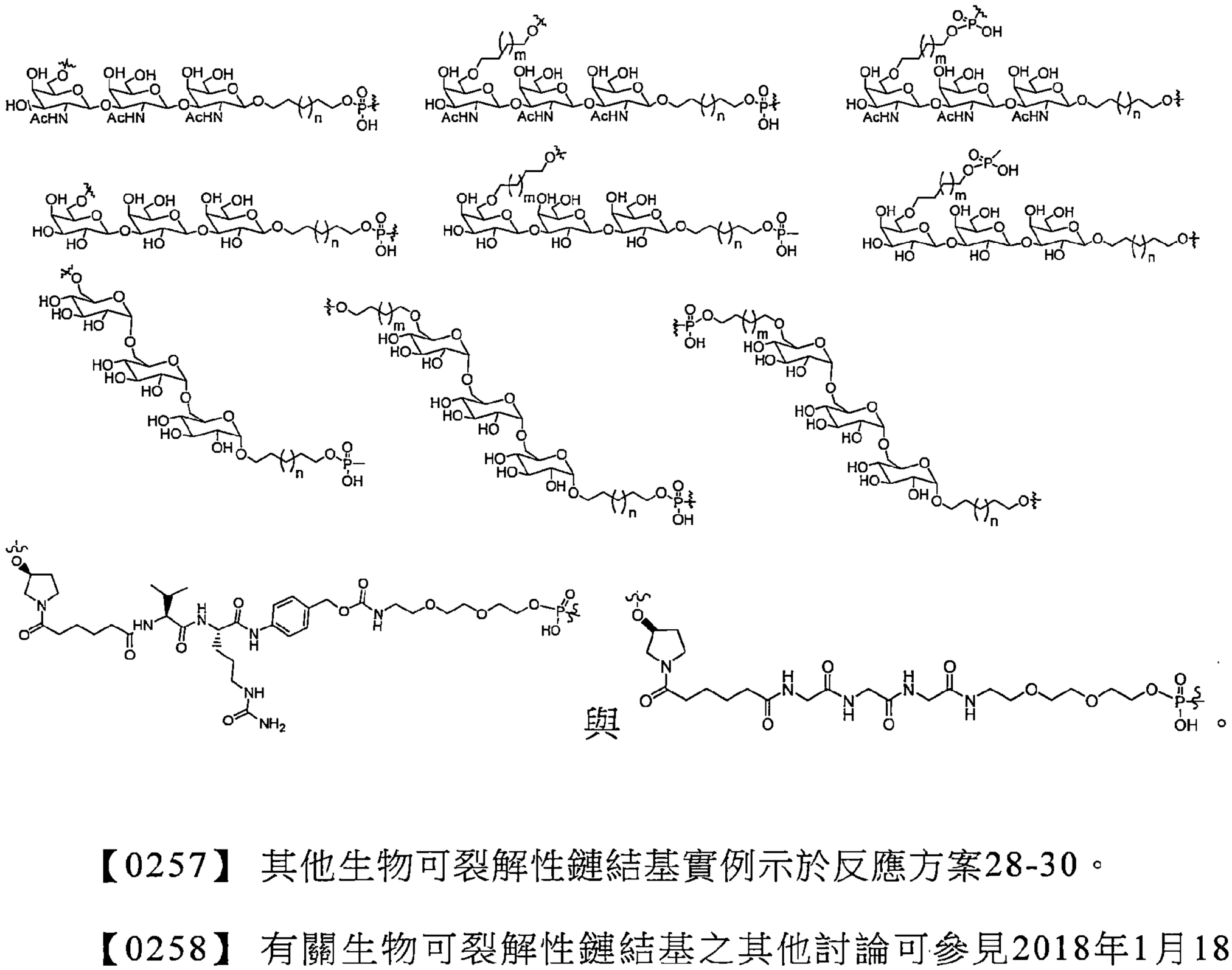












【0257】 其他生物可裂解性鏈結基實例示於反應方案28-30。

【0258】 有關生物可裂解性鏈結基之其他討論可參見2018年1月18日申請之PCT申請案案號PCT/US18/14213，名稱為「胞內體可裂解性鏈結基(Endosomal Cleavable Linkers)」，其完整內容已以引用之方式併入本文中。

C. 載子

【0259】 某些具體例中，親脂性部份體係利用可置換一個或多個核苷酸之載子接合iRNA劑。

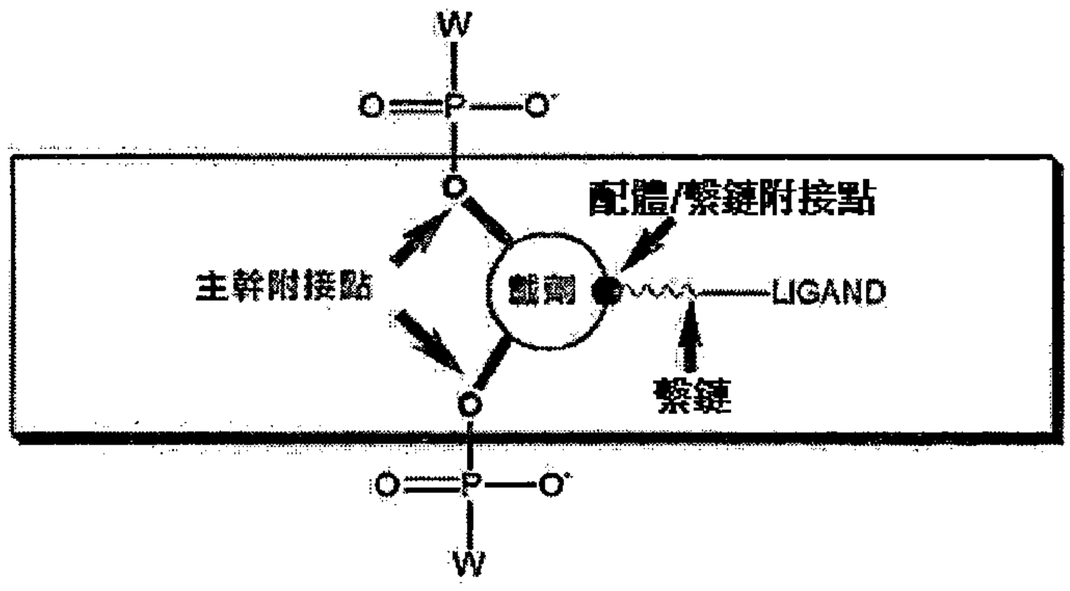
【0260】 載子可為環狀基團或無環基團。一項具體例中，環狀基團係選自下列各者所成群組：吡咯啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、哌啶基、哌吩基、[1,3]二氧雜環戊烷基、噁唑啶基、異噁唑啶基、嗎啉基、噻唑啶基、異噻唑啶基、喹噁啉基、嗒吩酮基、四氫呋喃

基、與十氫萘。一項具體例中，無環基團為基於絲胺醇主幹或二乙醇胺主幹之部份體。

【0261】 有些具體例中，載子置換雙股iRNA劑內部位置中一個或多個核苷酸。有些具體例中，載子置換雙股iRNA劑雙股部份中一個或多個核苷酸。

【0262】 其他具體例中，載子置換正義股或反義股末端之核苷酸。一項具體例中，載子置換正義股3'端之末端核苷酸，藉以作為保護正義股3'端之封端基。一項具體例中，載子為具有胺之環狀基團，例如，載子可為吡咯啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、哌啶基、哌吩基、[1,3]二氧雜環戊烷基、噁唑啶基、異噁唑啶基、嗎啉基、噻唑啶基、異噻唑啶基、喹噁啉基、嗒吩酮基、四氫呋喃基、或十氫萘基。

【0263】 亞單位中核糖之核糖經置換的核苷酸亞單位在本文中稱為核糖置換修飾亞單位(RRMS)。載子可為環狀或非環狀部份體，且包括兩個「主幹附接點」(例如，羥基)與配體(例如，親脂性部份體)。親脂性部份體可直接附接載子或利用如上述穿插之鏈結基/繫鏈而間接附接載子。

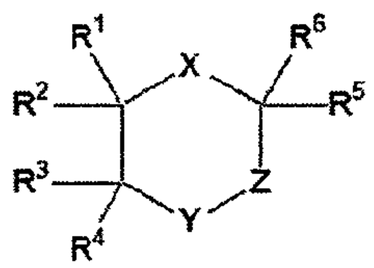


【0264】 與配體接合之單體亞單位可為iRNA分子之5'或3'末端亞單位，亦即兩個「W」基團其中之一可為羥基，另一個「W」基團可為兩個或

更多個未經修飾或經修飾核糖核苷酸之鏈。或者，與配體接合之單體亞單位可能佔據內部位置、或雙股區內之位置，及兩個「W」基團均可為一個或多個未經修飾或經修飾之核糖核苷酸。iRNA劑中可存在超個一個與配體接合之單體亞單位。

i. 基於糖置換之單體，例如，與配體接合之單體(環狀)

【0265】 基於糖置換之環狀單體，例如，與基於糖置換之配體接合之單體在本文中亦稱為RRMS單體化合物。載子可具有以下所示通式(**LCM-2**)(該結構式之較佳主幹附接點可選自R^1或R^2；R^3或R^4；或R^9與R^{10}(若Y為CR^9R^{10}時)(所選擇之兩個位置產生兩個主幹附接點，例如，R^1與R^4、或R^4與R^9))。較佳繫鏈附接點包括R^7；R^5或R^6(當X為CH_2時)。載子係如下說明之實體，其可以進入一股中。因此，咸了解，該結構亦涵蓋其中一個(若為末端位置時)或兩個(若為內部位置時)附接點(例如，R^1或R^2；R^3或R^4；或R^9或R^{10} (當Y為CR^9R^{10}時))係連接磷酸酯、或經修飾磷酸酯之情況，例如，含硫主幹。例如，上述名為R基團之一者可為-CH_2-，其中一個鍵連接載子，一個鍵連接主幹原子，例如，鍵結性氧或中心磷原子。



(LCM-2)

其中：

X為$N(CO)R^7$、NR^7或CH_2；

Y為NR^8、O、S、CR^9R^{10}；

Z為$CR^{11}R^{12}$或不存在；

各R^1、R^2、R^3、R^4、R^9、與R^{10}獨立地為H、OR^a、或$(CH_2)_nOR^b$，但其限制條件為R^1、R^2、R^3、R^4、R^9、與R^{10}中至少兩者為OR^a及/或$(CH_2)_nOR^b$；

各R^5、R^6、R^{11}、與R^{12}獨立地為配體、H、視需要經1-3個R^{13}取代之C_1-C_6烷基、或$C(O)NHR^7$；或R^5與R^{11}共同為視需要經R^{14}取代之C_3-C_8環烷基；

R^7可為配體，例如，R^7可為R^d，或R^7可為間接繫鏈載子之配體，例如，透過繫鏈部份體，例如，經NR^cR^d取代之C_1-C_{20}烷基；或經$NHC(O)R^d$取代之C_1-C_{20}烷基；

R^8為H或C_1-C_6烷基；

R^{13}為羥基、C_1-C_4烷氧基、或鹵基；

R^{14}為NR^cR^7；

R^{15}為視需要經氰基取代之C_1-C_6烷基、或C_2-C_6烯基；

R^{16}為C_1-C_{10}烷基；

R^{17}為液相或固相擔體試劑；

L為$-C(O)(CH_2)_qC(O)-$、或$-C(O)(CH_2)_qS-$；

R^a為保護基，例如，CAr_3；(例如，二甲氧基三苯甲基)或$Si(X^{5'})(X^{5''})(X^{5'''})$，其中$(X^{5'})$、$(X^{5''})$、與$(X^{5'''})$係如本文內文中說明；

R^b為$P(O)(O^-)H$、$P(OR^{15})N(R^{16})_2$或$L\text{-}R^{17}$；

R^c為H或C_1-C_6烷基；

R^d為H或配體；

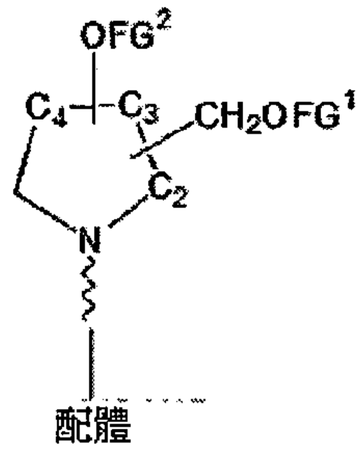
各Ar獨立地為視需要經C_1-C_4烷氧基取代之C_6-C_{10}芳基；

n為1-4；及q為0-4。

【0266】 例示性載子包括彼等其中例如，X為$N(CO)R^7$或NR^7，Y為

CR^9R^{10}，及Z不存在；或X為$N(CO)R^7$或NR^7，Y為CR^9R^{10}，及Z為$CR^{11}R^{12}$；或X為$N(CO)R^7$或NR^7，Y為NR^8，及Z為$CR^{11}R^{12}$；或X為$N(CO)R^7$或NR^7，Y為O，及Z為$CR^{11}R^{12}$；或X為CH_2；Y為CR^9R^{10}；Z為$CR^{11}R^{12}$，及R^5與R^{11}共同形成C_6環烷基(**H**，z = 2)，或茚滿環系，例如，X為CH_2；Y為CR^9R^{10}；Z為$CR^{11}R^{12}$，及R^5與R^{11}共同形成C_5環烷基(**H**，z = 1)。

【0267】某些具體例中，載子可基於吡咯啉環系或4-羥基脯胺酸環系，例如，X為$N(CO)R^7$或NR^7，Y為CR^9R^{10}，且Z不存在(**D**)。

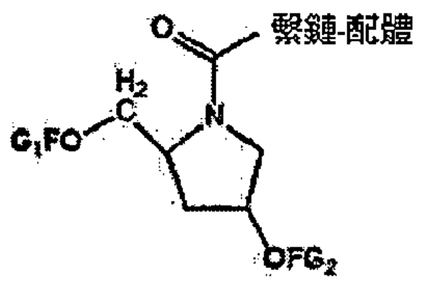


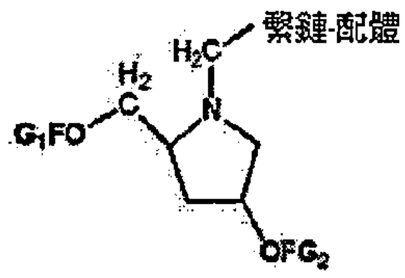
D

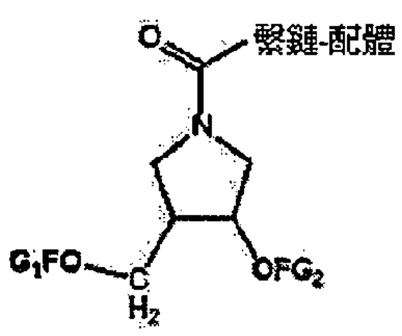
。

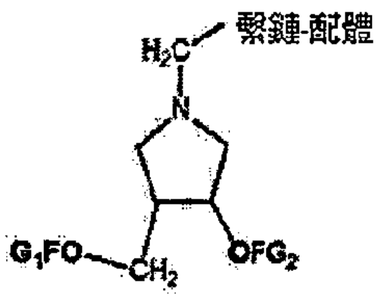
OFG^1較佳係附接一級碳，例如，環外伸烷基，例如，亞甲基，連接5員環中一個碳(**D**之$-CH_2OFG^1$)。OFG^2較佳係直接附接5員環中一個碳(**D**之-OFG^2)。基於吡咯啉之載子中，$-CH_2OFG^1$可附接C-2及OFG^2可附接C-3；或$-CH_2OFG^1$可附接C-3及OFG^2可附接C-4。某些具體例中，CH_2OFG^1與OFG^2可偕取代在上述碳之一者。基於3-羥基脯胺酸之載子中，$-CH_2OFG^1$可附接C-2及OFG^2可附接C-4。基於吡咯啉-與4-羥基脯胺酸之單體可能因此含有鏈結(例如，碳-碳鍵)其中鍵旋轉受到特定鏈結限制，例如，因環之存在造成之限制。因此上述任何成對CH_2OFG^1與OFG^2可彼此呈順式或反式。因此，該表示法包括所有順式/反式異構物。單體亦可含有一個或多個不對稱中心，因此出現消旋物與消旋混合物、單一對映異構物、個別非對映異構物與非對映異構性混合物。該表示法包括該單體之所有此等異構型

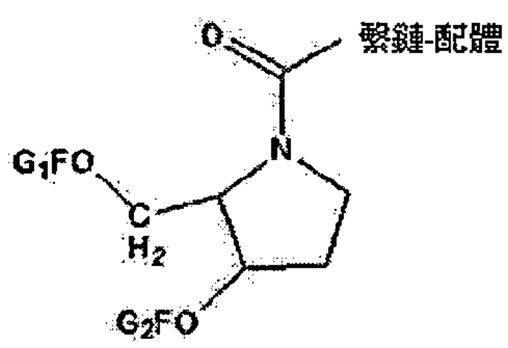
(例如，帶有CH_2OFG^1與OFG^2之中心可以均呈R組態；或均呈S組態；或一個中心呈R組態，另一個中心呈S組態，反之亦然)。繫鏈附接點較佳為氮。載子**D**之較佳實施例包括下列：

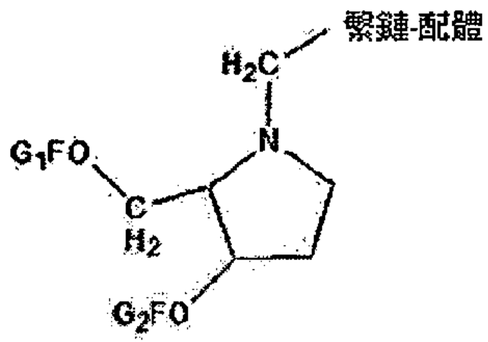




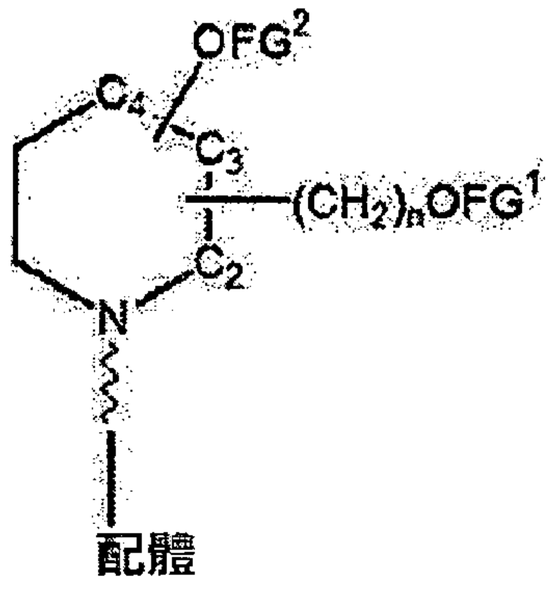








【0268】 某些具體例中，載子可基於哌啶環系(**E**)，



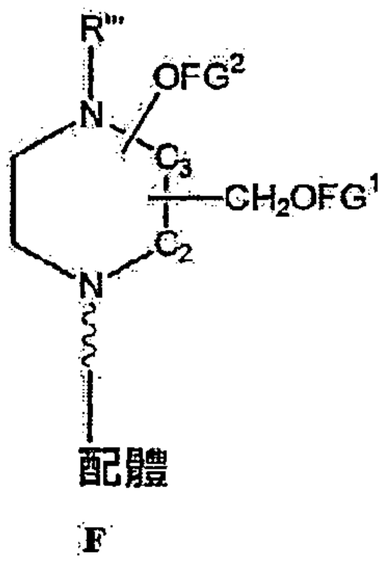
E

例如，X為$N(CO)R^7$或NR^7，Y為CR^9R^{10}，及Z為$CR^{11}R^{12}$。

【0269】 OFG^1較佳係附接一級碳，例如，環外伸烷基，例如，亞甲基(n=1)或伸乙基(n=2)，連接6員環中一個碳(**E**之$-(CH_2)_nOFG^1$)。OFG^2較佳

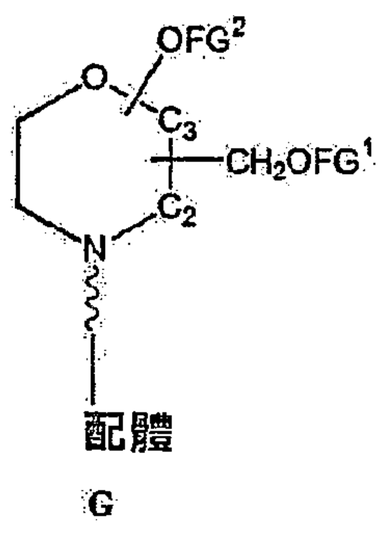
係直接附接6員環中一個碳(**E**之-OFG^2)。-$(CH_2)_nOFG^1$與OFG^2可以偕形式在環，亦即兩個基團可附接同一個碳，例如，在C-2、C-3、或C-4。或者-$(CH_2)_nOFG^1$與OFG^2可以鄰形式在環，亦即兩個基團可附接相鄰環碳原子，例如，-$(CH_2)_nOFG^1$可附接C-2及OFG^2可附接C-3；-$(CH_2)_nOFG^1$可附接C-3及OFG^2可附接C-2；-$(CH_2)_nOFG^1$可附接C-3及OFG^2可附接C-4；或-$(CH_2)_nOFG^1$可附接C-4及OFG^2可附接C-3。該基於哌啶之單體可能因此含有鏈結(例如，碳-碳鍵)其中鏈旋轉受到特定鏈結限制，例如，因環之存在造成之限制。因此上述任何成對-$(CH_2)_nOFG^1$與OFG^2可彼此呈順式或反式。因此，上述表示法包括所有順式/反式異構物。單體亦可含有一個或多個不對稱中心，因此出現消旋物與消旋混合物、單一對映異構物、個別非對映異構物與非對映異構性混合物。該表示法包括該單體之所有此等異構型(例如，帶有CH_2OFG^1與OFG^2之中心可以均呈R組態；或均呈S組態；或一個中心呈R組態，另一個中心呈S組態，反之亦然)。繫鏈附接點較佳為氮。

【0270】 某些具體例中，載子可為基於哌啡之環系(**F**)，例如，X為$N(CO)R^7$或NR^7，Y為NR^8，及Z為$CR^{11}R^{12}$、或基於嗎啉之環系(**G**)，例如，X為$N(CO)R^7$或NR^7，Y為O，及Z為$CR^{11}R^{12}$。



配體

F



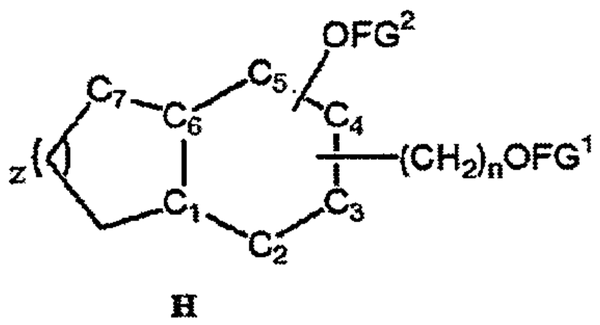
配體

G

。

OFG^1較佳係附接一級碳，例如，環外伸烷基，例如，亞甲基，連接6員環中一個碳(**F或G**之-CH_2OFG^1)。OFG^2較佳係直接附接6員環中一個碳(**F或G**之-OFG^2)。**F**與**G**二者之-CH_2OFG^1可附接C-2及OFG^2可附接C-3；或反之亦然。某些具體例中，CH_2OFG^1與OFG^2可偕取代在上述碳之一者。基於哌咁與嗎啉之單體可能因此含有鏈結(例如，碳-碳鍵)使其中鍵旋轉受到特定鏈結限制，例如，因環之存在造成之限制。因此上述任何成對CH_2OFG^1與OFG^2可彼此呈順式或反式。因此，上述表示法包括所有順式/反式異構物。單體亦可含有一個或多個不對稱中心，因此出現消旋物與消旋混合物、單一對映異構物、個別非對映異構物與非對映異構性混合物。該表示法包括該單體之所有此等異構型(例如，帶有CH_2OFG^1與OFG^2之中心可以均呈R組態；或均呈S組態；或一個中心呈R組態，另一個中心呈S組態，反之亦然)。R'''可為例如，C_1-C_6烷基，較佳為CH_3。**F**與**G**二者中之繫鏈附接點較佳為氮。

【0271】 某些具體例中，載子可基於十氫萘環系，例如，X為CH_2；Y為CR^9R^{10}；Z為$CR^{11}R^{12}$，及R^5與R^{11}共同形成C_6環烷基(**H**，z = 2)、或基於茚滿環系，例如，X為CH_2；Y為CR^9R^{10}；Z為$CR^{11}R^{12}$，及R^5與R^{11}共同形成C_5環烷基(**H**，z = 1)。



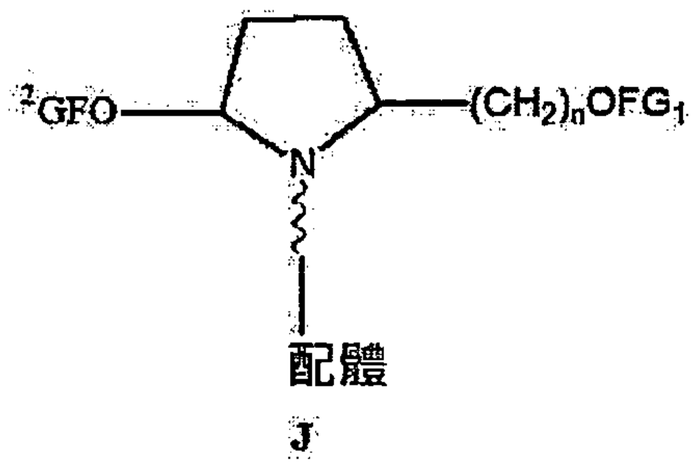
H

。

OFG^1較佳係附接一級碳，例如，由環外亞甲基(n=1)或伸乙基(n=2)連接其中一個C-2、C-3、C-4、或C-5[**H**之-$(CH_2)_nOFG^1$]。OFG^2較佳係直接附接

其中一個C-2、C-3、C-4、或C-5(**H**之-OFG^2)。-$(CH_2)_nOFG^1$與OFG^2可以偕方式在環，亦即兩個基團可附接同一個碳，例如，在C-2、C-3、C-4、或C-5。或者，-$(CH_2)_nOFG^1$與OFG^2可以鄰方式在環，亦即兩個基團可附接相鄰環碳原子，例如，-$(CH_2)_nOFG^1$可附接C-2及OFG^2可附接C-3；-$(CH_2)_nOFG^1$可附接C-3及OFG^2可附接C-2；-$(CH_2)_nOFG^1$可附接C-3及OFG^2可附接C-4；或-$(CH_2)_nOFG^1$可附接C-4及OFG^2可附接C-3；-$(CH_2)_nOFG^1$可附接C-4及OFG^2可附接C-5；或-$(CH_2)_nOFG^1$可附接C-5及OFG^2可附接C-4。基於十氫萘或基於茚滿之單體可因此含有鍵結(例如，碳-碳鍵)其中鍵旋轉受到特定鍵結限制，例如，因環之存在造成之限制。因此，上述任何成對之-$(CH_2)_nOFG^1$與OFG^2可彼此呈順式或反式。因此，該表示法包括所有順式/反式異構物。單體亦可含有一個或多個不對稱中心，因此出現消旋物與消旋混合物、單一對映異構物、個別非對映異構物與非對映異構性混合物。該表示法包括該單體之所有此等異構型(例如，帶有CH_2OFG^1與OFG^2之中心可以均呈**R**組態；或均呈**S**組態；或一個中心呈**R**組態，另一個中心呈**S**組態，反之亦然)。較佳具體例中，C-1與C-6之取代基彼此呈反式。繫鏈附接點較佳為C-6或C-7。

【0272】 其他載子可包括彼等基於3-羥基脯胺酸(**J**)者。



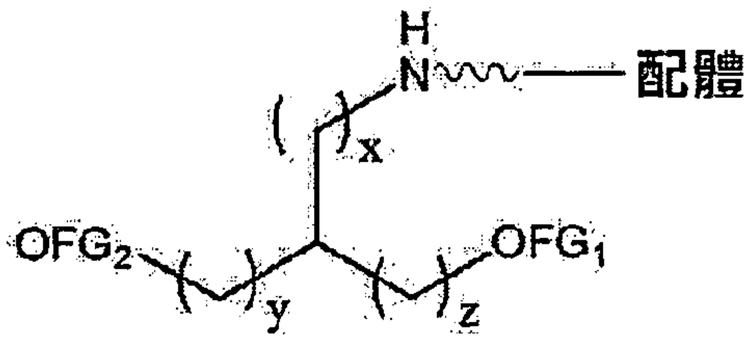
。

因此，-$(CH_2)_nOFG^1$與OFG^2可彼此呈順式或反式。因而該表示法包括所有順式/反式異構物。單體亦可含有一個或多個不對稱中心，因此出現消旋物與消旋混合物、單一對映異構物、個別非對映異構物與非對映異構性混合物。該表示法包括該單體之所有此等異構型(例如，帶有CH_2OFG^1與OFG^2之中心可以均呈R組態；或均呈S組態；或一個中心呈R組態，另一個中心呈S組態，反之亦然)。繫鏈附接點較佳為氮。

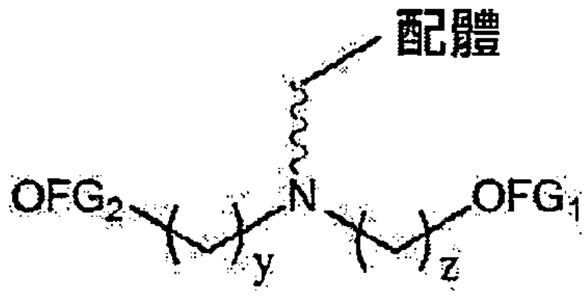
【0273】 有關更具代表性之基於環狀糖置換之載子可參見美國專利案案號7,745,608與8,017,762，其等完整內容已以引用方式併入本文中。

ii. 基於糖置換之單體(無環)

【0274】 基於糖置換之無環單體，例如，與基於糖置換之配體接合之單體，本文中亦稱為核糖置換單體亞單位(RRMS)單體化合物。較佳之無環載子可具有式 **LCM-3** 或 **LCM-4**：



LCM-3



LCM-4

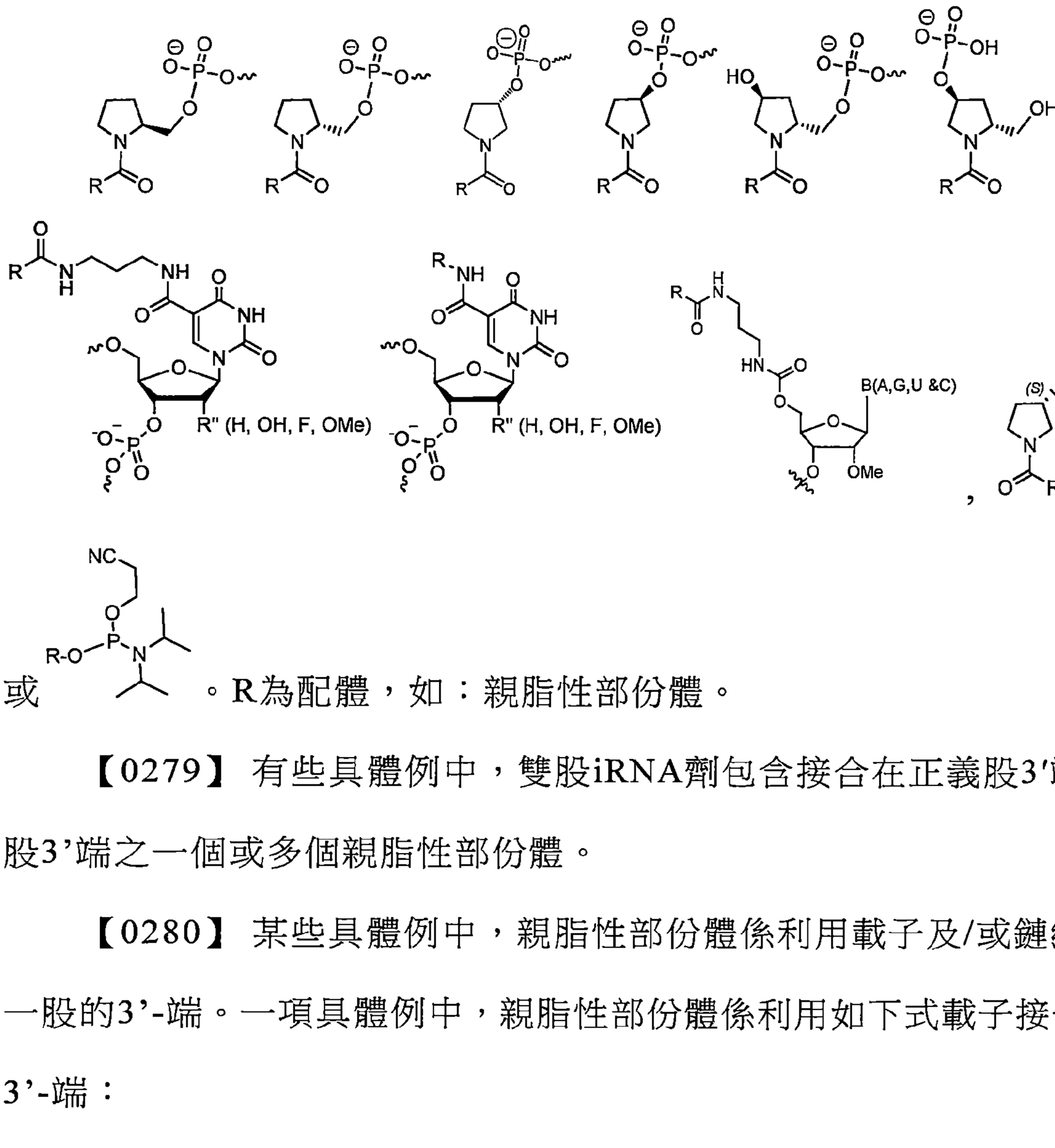
【0275】 有些具體例中，各x、y、與z可彼此獨立地為0、1、2、或3。式**LCM-3**中，當y與z相異時，則三級碳可呈R或S組態。較佳具體例中，式**LCM-3**中之x為0，及y與z分別為1(例如，基於絲胺醇)，及式**LCM-3**中之y與z分別為1。下式**LCM-3**或**LCM-4**分別可視需要經取代，例如，經羥基、烷氧基、全鹵烷基取代。

【0276】 有關更具代表性之基於糖置換之無環載子可參見美國專利

案案號 7,745,608 與 8,017,762，其等完整內容已以引用方式併入本文中。

【0277】 有些具體例中，雙股iRNA劑包含接合在正義股5'端或反義股5'端之一個或多個親脂性部份體。

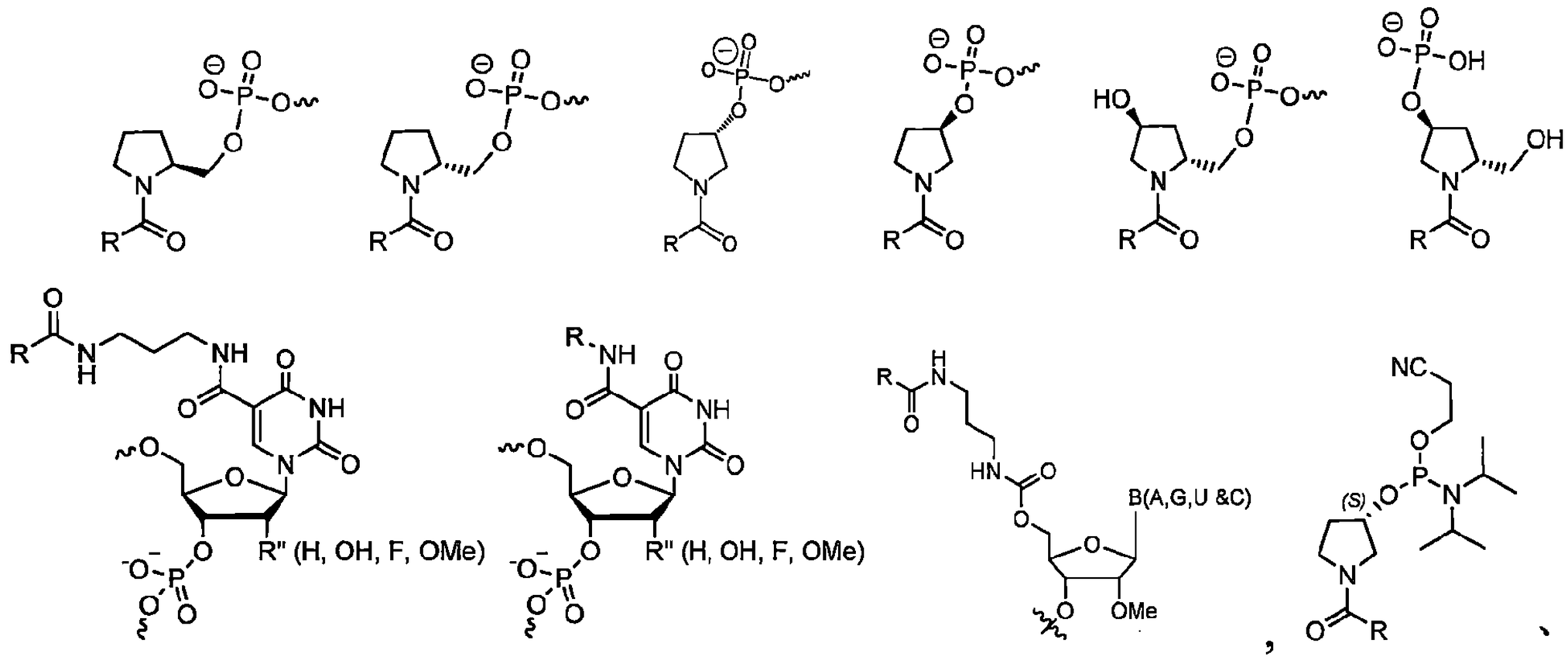
【0278】 某些具體例中，親脂性部份體係利用載子及/或鏈結基接合一股的5'-端。一項具體例中，親脂性部份體係利用如下式載子接合一股的5'-端



或 。R為配體，如：親脂性部份體。

【0279】 有些具體例中，雙股iRNA劑包含接合在正義股3'端或反義股3'端之一個或多個親脂性部份體。

【0280】 某些具體例中，親脂性部份體係利用載子及/或鏈結基接合一股的3'-端。一項具體例中，親脂性部份體係利用如下式載子接合一股的3'-端：



或 。R為配體，如：親脂性部份體。

【0281】 有些具體例中，雙股iRNA劑包含接合在正義股兩端之一個或多個親脂性部份體。

【0282】 有些具體例中，雙股iRNA劑包含接合在反義股兩端之一個或多個親脂性部份體。

【0283】 有些具體例中，雙股iRNA劑包含接合在正義股5'端或3'端之一個或多個親脂性部份體，與接合在反義股5'端或3'端之一個或多個親脂性部份體。

【0284】 有些具體例中，親脂性部份體係利用一個或多個鏈結基(繫鏈)及/或載子接合一股之末端。

【0285】 一項具體例中，親脂性部份體係利用一個或多個鏈結基(繫鏈)接合一股之末端。

【0286】 一項具體例中，親脂性部份體係利用環狀載子，視需要利用一個或多個穿插之鏈結基(繫鏈)接合正義股或反義股之5'端。

【0287】 有些具體例中，親脂性部份體係接合至少一股的一個或多個內部位置。股之內部位置係指除了該股3’端與5’端起之末端位置以外之股的任何位置之核苷酸(例如，不包括2個位置：從3’端算起之位置1與從5’端算起之位置1)。

【0288】 一項具體例中，親脂性部份體係接合至少一股的一個或多個內部位置，其包括除了該股各端起末端兩個位置以外之所有位置(例如，不包括4個位置：從3’端算起之位置1與2及從5’端算起之位置1與2)。一項具體例中，親脂性部份體係接合至少一股的一個或多個內部位置，其包括除了該股各端起末端三個位置以外之所有位置(例如，不包括6個位置：從3’端算起之位置1、2、與3及從5’端算起之位置1、2、與3)。

【0289】 一項具體例中，親脂性部份體係接合至少一股的一個或多個內部位置，但除了正義股之裂解位點區以外，例如，親脂性部份體不接合從正義股5’-端算起之位置9-12。或者，內部位置不包括從正義股3’-端算起之位置11-13。

【0290】 一項具體例中，親脂性部份體係接合至少一股的一個或多個內部位置，其不包括反義股之裂解位點區。例如，內部位置不包括從反義股5’-端算起之位置12-14。

【0291】 一項具體例中，親脂性部份體係接合至少一股的一個或多個內部位置，其不包括正義股從3’-端算起之位置11-13及反義股從5’-端算起之位置12-14。

【0292】 一項具體例中，一個或多個親脂性部份體係接合一個或多個下列內部位置：正義股之位置4-8與13-18，及反義股之位置6-10與15-18，

其係從各股之5’端算起。

【0293】 一項具體例中，一個或多個親脂性部份體係接合一個或多個下列內部位置：正義股之位置5、6、7、15、與17，及反義股之位置15與17，其係從各股之5’端算起。

【0294】 有些具體例中，親脂性部份體係接合至少一股的雙股區中一個或多個位置。該雙股區不包括單股突出或髮夾環區。

【0295】 有些具體例中，親脂性部份體係接合雙股iRNA劑之核鹼基、糖部份體、或核苷間鏈結。

【0296】 可在任何位置接合嘌呤核鹼基或其衍生物，包括環內與環外原子。有些具體例中，嘌呤核鹼基之 2-、6-、7-、或 8-位置係附接接合物部份體。亦可在任何位置接合嘧啶核鹼基或其衍生物。有些具體例中，嘧啶核鹼基之 2-、5-、與 6-位置可經接合物部份體取代。當親脂性部份體接合核鹼基時，較佳位置係不干擾雜交之位置，亦即不干擾鹼基配對所需之氫鍵交互作用之位置。一項具體例中，親脂性部份體可利用含有烷基、烯基或醯胺鏈結之鏈結基接合核鹼基。親脂性部份體與核鹼基之例示性接合說明於第 1 圖與實施例 7。

【0297】 可在任何碳原子接合核苷之糖部份體。可附接親脂性部份體之糖部份體的例示性碳原子包括2'、3'、與5'碳原子。親脂性部份體亦可附接1'位置，如無鹼基殘基。一項具體例中，親脂性部份體可利用2'-O修飾，使用或不使用鏈結基，接合糖部份體。親脂性部份體與糖部份體(利用2'-O修飾)之例示性接合說明於第1圖與實施例1、2、3、與6。

【0298】 核苷間鏈結亦可帶有親脂性部份體。對於含磷基團鏈結(例

如，磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、與類似物)，親脂性部份體可直接附接磷原子或與磷原子結合之O、N、或S原子。對於含胺-或醯胺之核苷間鏈結(例如，PNA)，親脂性部份體可附接胺或醯胺之氮原子或附接相鄰碳原子。

【0299】 有許多種方法用以製備寡核苷酸之接合物。通常，寡核苷酸與接合物部份體之附接係由寡核苷酸之反應性基團(例如，OH、SH、胺、羧基、醛、與類似物)與接合物部份體之反應性基團接觸。有些具體例中，一個反應性基團為親電子性，另一個則為親核性。

【0300】 例如，親電子性基團可為含羰基官能基，及親核性基團可為胺或硫醇。對於核酸與相關寡聚化合物利用及不利用鏈結基團接合之方法已詳細說於文獻中，如，例如，Manoharan 述於Antisense Research and Applications，Crooke與LeBleu編輯，CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993，第17章，其完整內容已以引用之方式併入本文中。

【0301】 一項具體例中，第一(互補)RNA股與第二(正義)RNA股可以分開合成，其中RNA股之一者包含側接親脂性部份體，且第一與第二RNA股可以混合形成dsRNA。合成RNA股之步驟較佳涉及固相合成法，其中個別核苷酸在連續合成循環中，透過形成核苷酸之間3’-5’磷酸二酯鍵，而端對端連接。

【0302】 一項具體例中，在最後合成循環中，具有亞胺基磷酸酯基之親脂性分子與第一(互補)或第二(正義)RNA 股之3'-端或5’-端偶聯。在RNA之固相合成法中，核苷酸係起始呈核苷亞胺基磷酸酯之形式。每一個合成循環中，下一個核苷亞胺基磷酸酯連結先前經併入之核苷酸之-OH基團。

若親脂性分子具有亞胺基磷酸酯基時，其可依類似核苷亞胺基磷酸酯之方式，與先前在固相合成法中合成之RNA之游離OH端偶聯。該合成法可採用傳統之RNA合成儀，以自動且標準化之方式合成。具有亞胺基磷酸酯基之親脂性分子之合成法可包括游離羥基之亞磷酸化，產生亞胺基磷酸酯基。

【0303】 與親脂性部份體接合之亞胺基磷酸酯之合成法例示說明於實施例1、2、4、5、6、與7。親脂性部份體或其他配體之合成後接合法的實例說明於實施例3。

【0304】 通常，寡核苷酸可採用相關技藝習知之製程合成，例如，說明於Caruthers等人，*Methods in Enzymology* (1992) 211:3-19；WO 99/54459；Wincott等人，Nucl. Acids Res. (1995) 23:2677-2684；Wincott等人，*Methods Mol. Bio.*, (1997) 74:59；Brennan等人，*Biotechnol. Bioeng.* (1998) 61:33-45；及美國專利案案號6,001,311；其完整內容已分別以引用方式併入本文中。通常，寡核苷酸之合成法涉及傳統之核酸保護基與偶合基，如5'-端之二甲氧基三苯甲基，與3'-端之亞胺基磷酸酯。一項非限制實例中，小規模合成法係於Applied Biosystems, Inc. (Weiterstadt, Germany)出售之Expedite 8909 RNA合成儀，使用由ChemGenes Corporation (Ashland, Mass.)出售之核糖核苷亞胺基磷酸酯進行。或者，合成法可在96-孔盤合成儀(如Protogene (Palo Alto, Calif.)生產之儀器)或採用彼等說明於Usman等人，*J. Am. Chem. Soc.* (1987) 109:7845；Scaringe等人，*Nucl. Acids Res.* (1990) 18:5433；Wincott,等人，*Nucl. Acids Res.* (1990) 23:2677-2684；及Wincott等人，*Method Mol. Bio.* (1997) 74:595之方法進行，其等完整內容已分別以引用方式併入本文中。

【0305】 本發明核酸分子可以分開合成，合成後再連接在一起，例如，採用黏合法(Moore等人，*Science* (1992) 256:9923；WO 93/23569；Shabarova等人，*Nucl. Acids Res.* (1991) 19:4247；Bellon等人，*Nucleosides & Nucleotides* (1997) 16:951; Bellon等人，*Bioconjugate Chem.* (1997) 8:204)；或在合成及/或脫除保護後雜交。核酸分子可經過凝膠電泳法，採用傳統方法純化或可採用高壓液相層析法純化(HPLC；參見如上述之Wincott等人文獻，其完整內容已以引用之方式併入本文中)，並再懸浮於水中。

III. 本發明iRNA

【0306】 本發明提供選擇性抑制一或多種TTR基因表現之iRNA。一項具體例中，iRNA劑包括在眼部細胞，如在個體(如罹患TTR相關眼部疾病之個體，例如，哺乳動物，如人類)之眼部細胞中，抑制TTR基因表現之雙股核糖核酸(dsRNA)分子。該dsRNA包括之反義股具有可與在TTR基因表現形成之mRNA之至少一部份互補之互補區。該互補區之長度為約30個或更少個核苷酸(例如，約30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19或18個或更少個核苷酸之長度)。當接觸到表現TTR基因之眼部細胞時，由例如，PCR或基於分支DNA(bDNA)之方法、或基於蛋白質之方法，如免疫螢光分析法，使用例如，西方墨點或流式細胞計技術分析，該iRNA選擇性抑制TTR基因(例如，人類、靈長類、非靈長類、或鳥類TTR基因)之表現至少約10%。

【0307】 dsRNA包括兩個RNA股，其可在dsRNA所採用之條件下互補並雜交形成雙螺旋結構。dsRNA之其中一股(反義股)包括與標靶序列實

質上互補，且通常完全互補之互補區。該標靶序列可衍生自TTR基因表現期間所形成mRNA之序列。另一股(正義股)包括與反義股互補之區，因此當在合適條件下組合時，這兩股可雜交並形成雙螺旋結構。如本文所說明且相關技藝上已知，亦可含有dsRNA之互補序列作為單一核酸分子之自我互補區，此點與出現在分開之寡核苷酸之方式相反。

【0308】 通常，雙螺旋結構之長度為15至30鹼基對之間，例如，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鹼基對之間之長度。上述範圍與長度之間之範圍與長度亦涵括為本發明之一部份。

【0309】 同樣地，標靶序列之互補區之長度為15至30個核苷酸之間，例如，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個核苷酸之間之長度。上述範圍與長度之間之範圍與長度亦涵括為本發明之一部份。

【0310】 有些具體例中，dsRNA之長度為約15至約20個核苷酸、或長

度為約25至約30個核苷酸。通常，dsRNA之長度足以作為Dicer酵素之受質。例如，相關技藝上已知，長度超過約21至23個核苷酸之dsRNA可以作為Dicer之受質。習此相關技藝者亦咸了解，靶向裂解之RNA區最常為較大RNA分子(經常為mRNA分子)之一部份。若相關時，mRNA標靶之「一部份」為mRNA標靶之連續序列，其長度足以允許作為RNAi所主導裂解作用(亦即透過RISC途徑裂解)之受質。

【0311】 習此相關技藝者亦咸了解，雙螺旋區為dsRNA之主要功能部份，例如，約9至36鹼基對之雙螺旋區，例如，約10-36、11-36、12-36、13-36、14-36、15-36、9-35、10-35、11-35、12-35、13-35、14-35、15-35、9-34、10-34、11-34、12-34、13-34、14-34、15-34、9-33、10-33、11-33、12-33、13-33、14-33、15-33、9-32、10-32、11-32、12-32、13-32、14-32、15-32、9-31、10-31、11-31、12-31、13-32、14-31、15-31、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鹼基對。因此一項具體例中，為了可供處理成為功能性雙螺旋(例如，15至30鹼基對)以靶向所需裂解之RNA，以具有超過30鹼基對之雙螺旋區之RNA分子或RNA分子之複合物作為dsRNA。因此習此相關技藝者咸了解，在一項具體例中，miRNA為dsRNA。另一項具體例中，dsRNA不為天然miRNA。另一項具體

例中，適用於靶向TTR基因表現之iRNA劑不在標靶細胞中由較大dsRNA裂解產生。

【0312】 本文所說明dsRNA可進一步包括一個或多個單股核苷酸突出，例如，含1、2、3、或4個核苷酸。具有至少一個核苷酸突出之dsRNA令人意外地具有比其鈍端之對應物更優異之抑制性質。核苷酸突出可包含或其組成為核苷酸/核苷類似物，包括去氧核苷酸/核苷。該(等)突出可位於正義股、反義股或其任何組合。此外，突出之核苷酸(群)可出現在dsRNA之反義股或正義股之5'-端、3'-端或兩端。某些具體例中，可能有更長的延長突出。

【0313】 dsRNA可採用相關技藝上已知標準方法合成，其進一步說明如下，例如，使用自動化DNA合成儀，如自商品取得者，例如，Biosearch, Applied Biosystems, Inc。

【0314】 本發明iRNA化合物可採用兩個步驟製程製備。首先，分開製備雙股RNA分子之個別股。然後黏合組成分股。siRNA化合物之個別股可採用溶液相或固相有機合成法或二者製備。有機合成法之優點在於容易製備包含非天然或經修飾之核苷酸之寡核苷酸股。本發明單股寡核苷酸可採用溶液相或固相有機合成法或二者製備。

【0315】 可以採用各種不同方法製備例如，大量siRNA。例示性方法包括：有機合成法與RNA裂解法，例如，活體外裂解法。

【0316】 siRNA之製法可以分開合成單股RNA分子，或雙股RNA分子之個別股，然後黏合該組成分股。

【0317】 可採用較大的生物反應器，例如，來自Pharmacia Biotec AB

(Uppsala Sweden)之OligoPilot II，針對指定siRNA大量生產特定RNA股。該OligoPilot II反應器僅使用1.5莫耳過量之亞胺基磷酸酯核苷酸，即可有效偶聯核苷酸。為了製造RNA股，可採用核糖核苷酸亞胺酸酯。可採用單體加成法之標準循環來合成siRNA之含21至23個核苷酸之股。通常，分開製造兩個互補股後，再黏合，例如，在從固態擔體釋出及脫除保護後。

【0318】 可採用有機合成法製造獨立地之siRNA物質。很容易判別該物質與TTR基因之互補性。例如，該物質可與包括多形性(例如，單一核苷酸多形性)之區互補。進一步可以精確界定該多形性之位置。有些具體例中，多形性位在內部區，例如，從一個或兩個末端起至少4、5、7、或9個核苷酸。

【0319】 一項具體例中，所產生之RNA經過小心純化脫除端。iRNA例如，使用Dicer或對等之基於RNAse III之活性，於活體外裂解成多個siRNA。例如，dsiRNA可於來自果蠅(*Drosophila*)之活體外抽出物中培養或使用純化之組份，例如，純化之RNAse或RISC複合物(RNA誘發靜默複合物)培養。參見例如，Ketting等人之*Genes Dev* 2001 Oct 15;15(20):2654-9與Hammond *Science* 2001 Aug 10;293(5532):1146-50。

【0320】 dsiRNA裂解後通常產生許多種siRNA物質，其分別為原始dsiRNA分子之特定21至23核苷酸(nt)片段。例如，可能存在包括與dsiRNA來源分子之重疊區及相鄰區互補之序列之siRNA。

【0321】 不論何種合成法，siRNA製劑可在適合調配之溶液中製備(例如，水性及/或有機溶液)。例如，siRNA製劑可於雙蒸餾純水中沉澱及再溶解，及凍乾。乾燥之siRNA隨後再懸浮於適合所計劃調配製程之溶液

中。

【0322】 一項態樣中，本發明之dsRNA包括至少兩個核苷酸序列：正義序列與反義序列。正義股係選自表4所提供序列之群中，且該正義股之相應反義股係選自表4所提供序列之群中。此態樣中，兩個序列中之一個序列係與該兩個序列中另一個序列互補，其中一個序列實質上與在TTR基因表現時所產生之mRNA序列互補。因此，此態樣中，dsRNA將包括兩個寡核苷酸，其中一個寡核苷酸為說明於表4之正義股，第二個寡核苷酸為說明於表4中該正義股之對應反義股。一項具體例中，dsRNA之實質上互補序列係包含在分開寡核苷酸。另一項具體例中，dsRNA之實質上互補序列係包含在單一寡核苷酸。

【0323】 咸了解，雖然本文所提供之有些序列係說明為經修飾及/或接合序列，但本發明iRNA(例如，本發明之dsRNA)之RNA可能包含本文所提供任一個序列，其係未經修飾、未接合、及/或不同於本文所說明之修飾及/或接合。

【0324】 習此相關技藝者咸了解，具有約20至23鹼基對(例如，21鹼基對)之雙螺旋結構之dsRNA已聲稱可特別有效誘發RNA干擾(Elbashir等人，*EMBO* 2001, 20:6877-6888)。然而，其他人已發現較短或較長RNA雙螺旋結構亦有效(Chu與Rana(2007) *RNA* 14：1714-1719；Kim 等人(2005) *Nat Biotech* 23：222-226)。上述具體例中，基於表4所提供寡核苷酸序列之性質，本文說明之dsRNA可包括至少一個長度為至少21個核苷酸之股。合理認為，具有表4中一個序列之較短雙螺旋僅在其中一端或兩端減去幾個核苷酸時，仍與上述dsRNA具有類似有效性。因此，本發明範圍亦包括具

有衍生自表4中一個序列之至少15、16、17、18、19、20、或更多個連續核苷酸之序列，且其抑制TTR基因表現之能力與包含完整序列之dsRNA之抑制性之差異不超過約5、10、15、20、25、或30 %。

【0325】 此外，表4所提供之RNA判別TTR轉錄物中可以感受RISC所介導之裂解之位點(群)。因此，本發明之進一步特徵在於靶向其中一個位點之iRNA。若iRNA促進轉錄物內任何特定位置裂解時，則稱本文所採用iRNA係靶向RNA轉錄物中該特定位點。此等iRNA通常包括來自表4所提供之一個序列之至少約15個連續核苷酸再與來自TTR基因中所選定序列之鄰接區之其他核苷酸序列偶聯。

【0326】 雖然標靶序列之長度通常為約15至30個核苷酸，但為了主導裂解任何指定標靶RNA，特定序列仍隨其適宜性在此範圍內有很大變化。已有各種不同套裝軟體與本文所出示之指引可指導針對任何特定基因標靶判別最佳標靶序列，但亦可採取實驗方法，其中將指定大小(其非限制性實施例為21個核苷酸)之「窗口」或「遮蔽」事實上或表象上(包括例如，經由電腦模擬)置於標靶RNA序列，以在該大小範圍內判別可作為標靶序列之序列。藉由從初始標靶序列位置向上游或向下游逐一移動一個核苷酸而移動該序列「窗口」，即可判別下一個可能之標靶序列，直到針對任何所選定之標靶大小判別整組可能序列為止。此過程再偶聯系統性合成法，並測試已判別之序列(採用本文說明或相關技藝上已知之分析法)，來判別彼等最適合用於判別彼等可作為iRNA劑標靶來介導最佳抑制標靶基因表現之RNA序列之序列。因此，雖然在例如，表4所判別之序列代表有效之標靶序列，但仍希望可藉由指定序列向上游或向下游逐一移動一個核苷酸來「移

行窗口」，以判別具有同等或更佳抑制特性之序列，以便進一步達到最佳抑制效力。

【0327】 此外，希望使在例如，表4中判別之任何序列進一步藉由系統性添加或移除核苷酸，來產生較長或較短序列，並由彼等所產生之序列從標靶RNA這一點開始，向上或向下移行該較長或較短序列窗口來進行測試，以便進一步最適化。同樣，由這種產生新的候選標靶之方法併用根據相關技藝上已知及/或本文所說明之抑制性分析法，測試基於彼等標靶序列之iRNA之有效性，可以進一步改善其抑制效力。再者，可調整此等最適化序列，例如，引進本文所說明或相關技藝上已知之經修飾核苷酸、添加或改變突出、或相關技藝上已知及/或本文所討論之其他修飾法，可進一步最適化分子(例如，增加血清安定性或循環半衰期、增加熱穩定性、加強穿膜傳遞性、靶向特定位置或細胞型態、增加與靜默途徑酵素之交互作用、增加從核內體釋出)，作為表現抑制劑。

【0328】 本文說明之iRNA可含有與標靶序列之一個或多個錯配。一項具體例中，本文說明之iRNA含有不超過3個錯配。若iRNA之反義股包含與標靶序列之錯配時，該錯配之區域最好不位在互補區之中心。若iRNA之反義股含有與標靶序列之錯配時，該錯配最好侷限在互補區之5'-或3'-端起之最後5個核苷酸內。例如，對23個核苷酸之iRNA劑而言，作為TTR基因之互補區之該股通常不在中心13個核苷酸內含有任何錯配。可採用本文說明之方法或相關技藝上已知方法決定含有與標靶序列錯配之iRNA是否可以有效抑制TTR基因表現。具有錯配之iRNA於抑制TTR基因表現上之效力考量很重要，尤其若已知TTR基因中之特定互補區在族群中具有多形性序

列變異時。

A. 包含經修飾核苷酸之本發明iRNA

【0329】 有些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含至少一個本文說明之核酸修飾。例如，至少一個修飾係選自下列各者所成群組：經修飾之核苷間鏈結、經修飾之核鹼基、經修飾之糖、與其任何組合。在不受限制下，此等修飾可出現在本發明雙股iRNA劑之任何位置。例如，修飾可出現在其中一個RNA分子。

【0330】 核苷之天然鹼基部份通常為雜環鹼基。最常見之兩類此等雜環鹼基為嘌呤類與嘧啶類。彼等包括呋喃戊糖基糖之核苷中，磷酸根可連結糖之2'、3'或5'羥基部份體。在形成寡核苷酸時，彼等磷酸根係彼此共價連結相鄰之核苷，形成線性聚合化合物。在寡核苷酸內，磷酸根通常係指形成寡核苷酸之核苷之間主幹。RNA與DNA之天然鏈結或主幹為3'往5'之磷酸二酯鏈結。

【0331】 除了「未經修飾」或「天然」核鹼基，如嘌呤核鹼基腺嘌呤(A)與鳥嘌呤(G)，及嘧啶核鹼基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)與尿嘧啶(U)以外，許多相關技藝已知之經修飾核鹼基或核鹼基擬似物適用於本文說明之化合物。未經修飾或天然核鹼基可經修飾或置換，產生具有改良性質之iRNA。例如，可使用此等鹼基或使用合成性及天然性核鹼基(例如，肌苷、黃嘌呤、次黃嘌呤、次黃苷(nubularine)、異鳥苷、或塊菌素(tubercidine))及本文說明之任一種寡聚物修飾來製備核酸酶抗性寡核苷酸。或者，可使用上述任何鹼基與「通用鹼基」之經取代或經修飾之類似物。當天然鹼基被非天然及/或通用鹼基置換時，則本文稱該核苷酸包含經修飾核鹼基及/或核鹼基

修飾。經修飾核鹼基及/或核鹼基修飾亦包括天然、非天然與通用鹼基，其包括接合部份體，例如，本文說明之配體。供與核鹼基接合之較佳接合物部份體包括陽離子性胺基，其可利用適當烷基、烯基或具有醯胺鏈結之鏈結基來接合核鹼基。

【0332】 本文說明之寡聚化合物亦可包括核鹼基(相關技藝中經常稱為「鹼基」)修飾或取代。本文所採用「未經修飾」或「天然」核鹼基包括嘌呤鹼基腺嘌呤(A)與鳥嘌呤(G)，與嘧啶鹼基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)與尿嘧啶(U)。例示性經修飾核鹼基包括(但不限於)，，其他合成性與天然性核鹼基，如肌苷、黃嘌呤、次黃嘌呤、次黃苷(nubularine)、異鳥苷、塊菌素(tubercidine)、2-(鹵基)腺嘌呤、2-(烷基)腺嘌呤、2-(丙基)腺嘌呤、2-(胺基)腺嘌呤、2-(胺基烷基)腺嘌呤、2-(胺基丙基)腺嘌呤、2-(甲基硫)-N6-(異戊烯基)腺嘌呤、6-(烷基)腺嘌呤、6-(甲基)腺嘌呤、7-(去氮雜)腺嘌呤、8-(烯基)腺嘌呤、8-(烷基)腺嘌呤、8-(炔基)腺嘌呤、8-(胺基)腺嘌呤、8-(鹵基)腺嘌呤、8-(羥基)腺嘌呤、8-(硫烷基)腺嘌呤、8-(硫醇)腺嘌呤、N6-(異戊基)腺嘌呤、N6-(甲基)腺嘌呤、N6, N6-(二甲基)腺嘌呤、2-(烷基)鳥嘌呤、2-(丙基)鳥嘌呤、6-(烷基)鳥嘌呤、6-(甲基)鳥嘌呤、7-(烷基)鳥嘌呤、7-(甲基)鳥嘌呤、7-(去氮雜)鳥嘌呤、8-(烷基)鳥嘌呤、8-(烯基)鳥嘌呤、8-(炔基)鳥嘌呤、8-(胺基)鳥嘌呤、8-(鹵基)鳥嘌呤、8-(羥基)鳥嘌呤、8-(硫烷基)鳥嘌呤、8-(硫醇)鳥嘌呤、N-(甲基)鳥嘌呤、2-(硫基)胞嘧啶、3-(去氮雜)-5-(氮雜)胞嘧啶、3-(烷基)胞嘧啶、3-(甲基)胞嘧啶、5-(烷基)胞嘧啶、5-(炔基)胞嘧啶、5-(鹵基)胞嘧啶、5-(甲基)胞嘧啶、5-(丙炔基)胞嘧啶、5-(丙炔基)胞嘧啶、5-(三氟甲基)胞嘧啶、6-(偶氮)胞嘧啶、N4-(乙醯基)胞嘧

啶、3-(3-胺基-3-羧基丙基)尿嘧啶、2-(硫基)尿嘧啶、5-(甲基)-2-(硫基)尿嘧啶、5-(甲基胺基甲基)-2-(硫基)尿嘧啶、4-(硫基)尿嘧啶、5-(甲基)-4-(硫基)尿嘧啶、5-(甲基胺基甲基)-4-(硫基)尿嘧啶、5-(甲基) 2,4-(二硫)尿嘧啶、5-(甲基胺基甲基)-2,4-(二硫)尿嘧啶、5-(2-胺基丙基)尿嘧啶、5-(烷基)尿嘧啶、5-(炔基)尿嘧啶、5-(烯丙基胺基)尿嘧啶、5-(胺基烯丙基)尿嘧啶、5-(胺基烷基)尿嘧啶、5-(胍鎓烷基)尿嘧啶、5-(1,3-二唑-1-烷基)尿嘧啶、5-(氰基烷基)尿嘧啶、5-(二烷基胺基烷基)尿嘧啶、5-(二甲基胺基烷基)尿嘧啶、5-(鹵基)尿嘧啶、5-(甲氧基)尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸、5-(甲氧基羰基甲基)-2-(硫基)尿嘧啶、5-(甲氧基羰基-甲基)尿嘧啶、5-(丙炔基)尿嘧啶、5-(丙炔基)尿嘧啶、5-(三氟甲基)尿嘧啶、6-(偶氮)尿嘧啶、二氫尿嘧啶、N3-(甲基)尿嘧啶、5-尿嘧啶(亦即假尿嘧啶)、2-(硫基)假尿嘧啶、4-(硫基)假尿嘧啶、2,4-(二硫)假尿嘧啶、5-(烷基)假尿嘧啶、5-(甲基)假尿嘧啶、5-(烷基)-2-(硫基)假尿嘧啶、5-(甲基)-2-(硫基)假尿嘧啶、5-(烷基)-4-(硫基)假尿嘧啶、5-(甲基)-4-(硫基)假尿嘧啶、5-(烷基)-2,4-(二硫)假尿嘧啶、5-(甲基)-2,4-(二硫)假尿嘧啶、1-經取代之假尿嘧啶、1-經取代之2-(硫基)-假尿嘧啶、1-經取代之4-(硫基)假尿嘧啶、1-經取代之2,4-(二硫)假尿嘧啶、1-(胺基羰基乙烯基)-假尿嘧啶、1-(胺基羰基乙烯基)-2(硫基)-假尿嘧啶、1-(胺基羰基乙烯基)-4-(硫基)假尿嘧啶、1-(胺基羰基乙烯基)-2,4-(二硫)假尿嘧啶、1-(胺基烷基胺基羰基乙烯基)-假尿嘧啶、1-(胺基烷基胺基-羰基乙烯基)-2(硫基)-假尿嘧啶、1-(胺基烷基胺基羰基乙烯基)-4-(硫基)假尿嘧啶、1-(胺基烷基胺基羰基乙烯基)-2,4-(二硫)假尿嘧啶、1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噁呅-1-基、1-(氮雜)-2-(硫基)-3-(氮雜)-吩噁呅-1-基、1,3-(二氮雜)-

2-(側氧基)-吩噻呫-1-基、1-(氮雜)-2-(硫基)-3-(氮雜)-吩噻呫-1-基、7-經取代之1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噚呫-1-基、7-經取代之1-(氮雜)-2-(硫基)-3-(氮雜)-吩噚呫-1-基、7-經取代之1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噻呫-1-基、7-經取代之1-(氮雜)-2-(硫基)-3-(氮雜)-吩噻呫-1-基、7-(胺基烷基羥基)-1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噚呫-1-基、7-(胺基烷基羥基)-1-(氮雜)-2-(硫基)-3-(氮雜)-吩噚呫-1-基、7-(胺基烷基羥基)-1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噻呫-1-基、7-(胺基烷基羥基)-1-(氮雜)-2-(硫基)-3-(氮雜)-吩噻呫-1-基、7-(胍鎓烷基羥基)-1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噚呫-1-基、7-(胍鎓烷基羥基)-1-(氮雜)-2-(硫基)-3-(氮雜)-吩噚呫-1-基、7-(胍鎓烷基-羥基)-1,3-(二氮雜)-2-(側氧基)-吩噻呫-1-基、7-(胍鎓烷基羥基)-1-(氮雜)-2-(硫基)-3-(氮雜)-吩噚呫-1-基、1,3,5-(三氮雜)-2,6-(二氧雜)-萘、肌苷、黃嘌呤、次黃嘌呤、次黃苷、塊菌素、異鳥苷、肌苷基、2-氮雜-肌苷基、7-去氮雜-肌苷基、硝基咪唑基、硝基吡唑基、硝基苯并咪唑基、硝基吲唑基、胺基吲哚基、吡咯并嘧啶基、3-(甲基)異喹啉酚(isocarbostyril)、5-(甲基)異喹啉酚、3-(甲基)-7-(丙炔基)異喹啉酚、7-(氮雜)吲哚基、6-(甲基)-7-(氮雜)吲哚基、咪唑并吡啶基、9-(甲基)-咪唑并吡啶基、吡咯并吡咁基、異喹啉酚(isocarbostyril)、7-(丙炔基)異喹啉酚、丙炔基-7-(氮雜)吲哚基、2,4,5-(三甲基)苯基、4-(甲基)吲哚基、4,6-(二甲基)吲哚基、苯基、萘基、蒽基、菲基、芘基、苝基、稠四苯基(tetracenyl)、稠五苯基(pentacenyl)、二氟甲苯基、4-(氟)-6-(甲基)苯并咪唑、4-(甲基)苯并咪唑、6-(偶氮)胸腺嘧啶、2-吡啶酮、5-硝基吲哚、3-硝基吡咯、6-(氮雜)嘧啶、2-(胺基)嘌呤、2,6-(二胺基)嘌呤、5-取代之嘧啶、N2-經取代之嘌呤、N6-經取代之嘌呤、O6-經

取代之嘌呤、經取代之1,2,4-三唑、吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、對位經取代之6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、鄰位經取代之6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、雙-鄰位經取代之6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、對-(胺基烷基羥基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、鄰-(胺基烷基羥基)- 6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、雙-鄰-(胺基烷基羥基)- 6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、吡啶并嘧啶-3-基、2-側氧基7-胺基-吡啶并嘧啶-3-基、2-側氧基吡啶并嘧啶-3-基、或其任何O-烷基化或N-烷基化衍生物。或者，可使用上述任何鹼基與「通用鹼基」之經取代或經修飾之類似物。

【0333】 本文所採用通用核鹼基為任何可與所有四種天然發生之核鹼基進行鹼基配對且不會影響熔解性質、被細胞內酵素辨識或iRNA雙螺旋活性之核鹼基。有些例示性通用核鹼基包括(但不限於)，2,4-二氟甲苯、硝基吡咯基、硝基吲哚基、8-氮雜-7-去氮雜腺嘌呤、4-氟-6-甲基苯并咪唑、4-甲基苯并咪唑、3-甲基異喹啉酚、5-甲基異喹啉酚、3-甲基-7-丙炔基異喹啉酚、7-氮雜吲哚基、6-甲基-7-氮雜吲哚基、咪唑并吡啶基、9-甲基-咪唑并吡啶基、吡咯并吡啡基、異喹啉酚、7-丙炔基異喹啉酚、丙炔基-7-氮雜吲哚基、2,4,5-三甲基苯基、4-甲基吲哚基、4,6-二甲基吲哚基、苯基、萘基、蒽基、菲基、芘基、苝基、稠四苯基(tetracenyl)、稠五苯基(pentacenyl)、與其結構衍生物(參見例如，Loakes, 2001, *Nucleic Acids Research*, 29, 2437-2447)。

【0334】 其他核鹼基包括彼等揭示於美國專利案案號3,687,808；彼等揭示於2009年3月26申請之國際申請案案號PCT/US09/038425；彼等揭示於「Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering」，

p.858-859, Kroschwitz, J. I.編輯，John Wiley & Sons, 1990；彼等揭示於English等人，「Angewandte Chemie」，國際版，1991, 30, 613；彼等揭示於「Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine」，Herdewijin, P.編輯，Wiley-VCH, 2008；及彼等揭示於Sanghvi, Y.S.之*dsRNA Research and Applications*，第15章，p.289-302, Crooke, S.T.與Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993。上述文獻所有內容已以引用方式併入本文中。

【0335】某些具體例中，經修飾核鹼基為在結構上相當類似親代核鹼基之核鹼基，如，例如，7-去氮雜嘌呤、5-甲基胞嘧啶、或G夾(G-clamp)。某些具體例中，核鹼基擬似物包括更複雜之結構，如例如，三環狀吩噁啡核鹼基擬似物。製備上述經修飾核鹼基之方法係彼等習此相關技藝者習知。

【0336】本文提供之本發明雙股iRNA劑可包含一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個或更多個)單體，包括具有經修飾糖部份體之核苷或核苷酸。例如，核苷之呋喃糖基糖環可經許多方式修飾，包括(但不限於)，取代基加成、兩個非偕環原子的橋接形成鎖核酸或雙環狀核酸。某些具體例中，寡聚化合物包含一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多個)為LNA之單體。

【0337】有些鎖核酸之具體例中，呋喃糖基之2′位置係利用分別獨立地選自下列之鏈結基連接4’位置：–[C(R1)(R2)]$_n$–、–[C(R1)(R2)]$_n$–O–、–[C(R1)(R2)]$_n$-N(R1)–、–[C(R1)(R2)]$_n$-N(R1)–O-、—[C(R1R2)]$_n$-O-N(R1)—、–C(R1)=C(R2)–O–、–C(R1)=N–、–C(R1)=N–O-、—C(=NR1)-、

—C(=NR1)-O-、—C(=O)—、—C(=O)O—、—C(=S)—、—C(=S)O—、—C(=S)S—、—O—、—Si(R1)2-、—S(=O)$_x$-與—N(R1)-；

其中：

X為0、1、或2；

n為1、2、3、或4；

各R1與R2獨立地為H、保護基、羥基、C1-C12烷基、經取代之C1-C12烷基、C2-C12烯基、經取代之C2-C12烯基、C2-C12炔基、經取代之C2-C12炔基、C5-C20芳基、經取代之C5-C20芳基、雜環基、經取代之雜環基、雜芳基、經取代之雜芳基、C5-C7脂環系基團、經取代之C5-C7 脂環系基團、鹵素、OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、COOJ1、醯基(C(=O)—H)、經取代之醯基、CN、磺醯基(S(=O)2-J1)、或磺醯氧基(S(=O)-J1)；及

各J1與J2獨立地為H、C1-C12烷基、經取代之C1-C12烷基、C2-C12烯基、經取代之C2-C12烯基、C2-C12炔基、經取代之C2-C12炔基、C5-C20芳基、經取代之C5-C20芳基、醯基(C(=O)—H)、經取代之醯基、雜環基、經取代之雜環基、C1-C12 胺基烷基、經取代之C1-C12 胺基烷基或保護基。

【0338】有些具體例中，LNA化合物之各鏈結基獨立地為—[C(R1)(R2)]n-、—[C(R1)(R2)]n-O—、—C(R1R2)-N(R1)-O—或—C(R1R2)-O—N(R1)-。另一項具體例中，各該鏈結基獨立地為4′-CH$_2$-2′、4′-(CH$_2$)$_2$-2′、4′-(CH$_2$)$_3$-2′、4′-CH$_2$-O-2′、4′-(CH$_2$)$_2$-O-2′、4′-CH$_2$-O—N(R1)-2′與4′-CH$_2$-N(R1)-O-2′-，其中各R1獨立地為H、保護基或C1-C12烷基。

【0339】專利案文獻及科學文獻中已經製成及揭示某些LNA(Singh

等人，*Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456；Koshkin等人，Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630；Wahlestedt等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97, 5633-5638；Kumar等人，*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222；WO 94/14226；WO 2005/021570；Singh等人，*J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039；揭示LNA 之已頒發美國專利案及已公告申請案之實施例包括例如，美國專利案案號7,053,207；6,268,490；6,770,748；6,794,499；7,034,133；及6,525,191；及美國早期公開(U.S. Pre-Grant Publication)案號2004-0171570；2004-0219565；2004-0014959；2003-0207841；2004-0143114；及20030082807。

【0340】 本文亦提供之LNA係其中由核糖基糖環之2′-羥基連結糖環之4′碳原子，藉以形成亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′)鏈結，而形成雙環狀糖部份體(參見Elayadi等人，*Curr. Opinion Invens. Drugs*, 2001, 2, 558-561；Braasch等人，*Chem. Biol.*, 2001, 8 1-7；及Orum等人，*Curr. Opinion Mol. Ther.*, 2001, 3, 239-243；亦參見美國專利案案號6,268,490與6,670,461)。該鏈結可為橋接2′氧原子與4′碳原子之亞甲基(—CH_2-)，該術語亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′)LNA係用於雙環狀部份體；若此位置為伸乙基時，則採用術語伸乙基氧(4′-CH_2CH_2-O-2′)LNA(Singh等人，*Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456: Morita等人，*Bioorganic Medicinal Chemistry*, 2003, 11, 2211-2226)。亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′)LNA與其他雙環狀糖類似物在與互補DNA及RNA之雙螺旋上展現極高熱穩定性(Tm=+3至+10°C)，對3′-外切核酸酶降解之安定性及良好之溶解性質。包含BNA之強效且非毒性反義寡核苷酸已有說明(Wahlestedt等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97,

5633-5638)。

【0341】 亦討論亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′)LNA之異構物為α-L-亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′)LNA，其已在對抗3′-外切核酸酶上顯示優異安定性。α-L-亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′) LNA係進入顯示強力反義活性之反義接合體(gapmer)與嵌合體中(Frieden等人，*Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372)。

【0342】 亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′)LNA單體腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶與尿嘧啶之合成與製備，及其等寡聚合法、及核酸辨識性質已有說明(Koshkin等人，*Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630)。BNA與其製法亦說明於WO 98/39352與WO 99/14226。

【0343】 亦已製備亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′)LNA之類似物，硫代磷酸酯-亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′) LNA與2′-硫-LNA(Kumar等人，*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222)。作為核酸聚合酶受質之包含寡去氧核糖核苷酸雙螺旋之鎖核苷類似製法亦已有說明(Wengel等人，WO 99/14226)。此外，相關技藝上已說明2′-胺基-LNA(係一種新穎之受構形限制之高親和性寡核苷酸類似物)(Singh等人，*J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039)。此外，過去已製成2′-胺基-與2′-甲基胺基-LNA，並報告其與互補RNA及DNA股之雙螺旋之熱穩定性。

【0344】 經修飾糖部份體係習知者，且可用於改變(通常為提高)反義化合物對其標靶之親和性及/或提高核酸酶抗性。較佳經修飾糖之代表性列表包括(但不限於)，雙環狀經修飾糖，包括亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′) LNA與伸乙基氧基(4′-$(CH_2)_2$-O-2′橋基)ENA；經取代之糖，尤指具有2′-F、2′-

OCH_3或2′-$O(CH_2)_2$-OCH_3取代基之2′-經取代之糖；及經4′-硫修飾之糖。糖亦可被糖擬似基團等等置換。製備經修飾糖之方法係彼等習此相關技藝者習知。教示此等經修飾糖製法之有些代表性專利案與公告案包括(但不限於)，美國專利案案號4,981,957；5,118,800；5,319,080；5,359,044；5,393,878；5,446,137；5,466,786；5,514,785；5,519,134；5,567,811；5,576,427；5,591,722；5,597,909；5,610,300；5,627,053；5,639,873；5,646,265；5,658,873；5,670,633；5,792,747；5,700,920；6,531,584；及6,600,032；及WO 2005/121371。

【0345】「氧基」-2′羥基修飾實施例包括烷氧基或芳基氧基(OR，例如，R= H、烷基、環烷基、芳基、芳烷基、雜芳基或糖)；聚乙二醇(PEG)、$O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$、n =1-50；「鎖」核酸(LNA)，其中核苷之呋喃糖部份包括連接呋喃糖環的兩個碳原子之橋基，藉以形成雙環狀環系；O-AMINE或$O-(CH_2)_n$AMINE(n = 1-10，AMINE = NH_2；烷基胺基、二烷基胺基、雜環基、芳基胺基、二芳基胺基、雜芳基胺基、二雜芳基胺基、伸乙基二胺或聚胺基)；及$O-CH_2CH_2(NCH_2CH_2NMe_2)_2$。

【0346】「去氧」修飾包括氫(亦即去氧核糖之糖，其等係與單股突出特別相關)；鹵基(例如，氟)；胺基(例如，NH_2；烷基胺基、二烷基胺基、雜環基、芳基胺基、二芳基胺基、雜芳基胺基、二雜芳基胺基、或胺基酸)；$NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$-AMINE(AMINE = NH_2；烷基胺基、二烷基胺基、雜環基、芳基胺基、二芳基胺基、雜芳基胺基、或二雜芳基胺基)；-NHC(O)R (R =烷基、環烷基、芳基、芳烷基、雜芳基或糖)；氰基；氫硫基；烷基-硫-烷基；硫烷氧基；硫烷基；烷基；環烷基；芳基；烯基與炔基，

及可視需要經例如，胺基官能基取代。

【0347】 其他合適2'-修飾(例如，經修飾MOE)說明於美國專利申請公開案案號20130130378，其內容已以引用方式併入本文中。

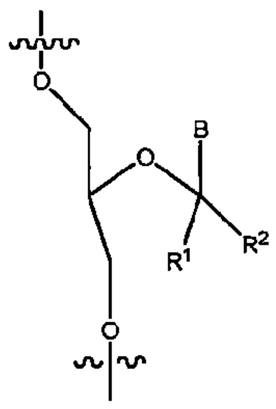
【0348】 2'位置之修飾可呈阿拉伯糖組態。術語「阿拉伯糖組態」係指核糖C2'之取代基被置換之組態係與阿拉伯糖之2'-OH呈相同組態。

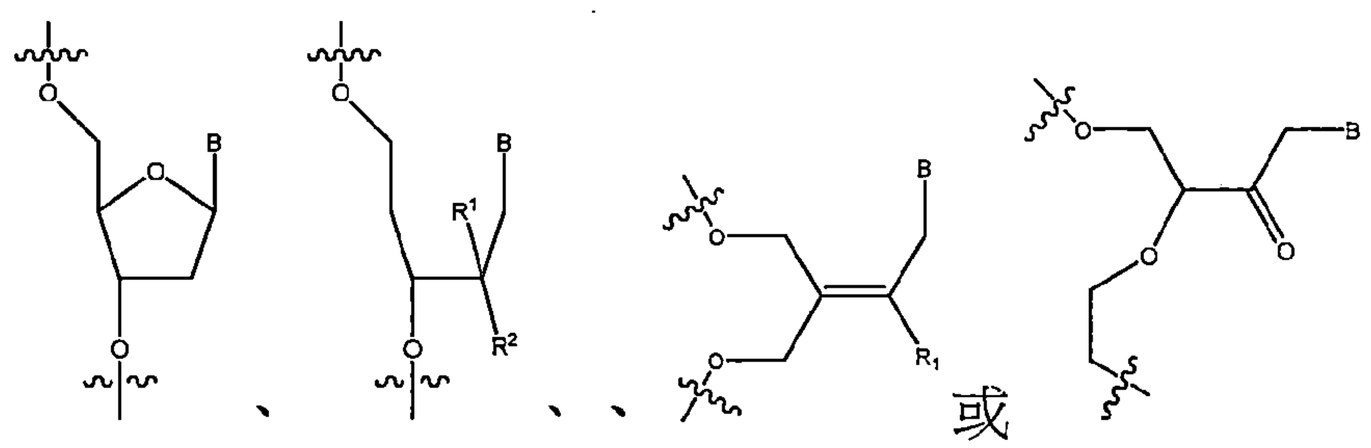
【0349】 該糖可在糖之同一個碳包含兩種不同修飾，例如，同一個位置(*gem*)之修飾。糖基亦可含有一個或多個在立體化學組態與核糖中對應碳相反的碳。因此寡聚化合物可包括一個或多個含有例如，阿拉伯糖作為糖之單體。該單體可在糖1'位置具有α鏈結，例如，α-核苷。該單體亦可在4'-位置具有相反組態，例如，C5'與H4'或置換其等之取代基可以彼此交換。當C5'與H4'或置換其等之取代基彼此交換時，則稱該糖係在4'位置進行修飾。

【0350】 本文揭示之本發明雙股iRNA劑亦可包括無鹼基糖，亦即C-1'沒有核鹼基之糖或在C1'具有其他化學基團替代核鹼基之糖。參見例如，美國專利案案號5,998,203，其完整內容已以引用方式併入本文中。此等無鹼基糖亦可進一步在一個或多個組成糖原子含有修飾。本發明雙股iRNA劑亦可包含一個或多個呈L異構物之糖，例如，L-核苷。糖基之修飾亦可包括使用硫、視需要經取代之氮、或CH_2基團置換4'-O。有些具體例中，C1'與核鹼基之間鏈結係呈α組態。

【0351】 糖修飾亦可包括無環核苷酸，其中核苷酸中核糖碳之間沒有C-C鍵(例如，C1'-C2'、C2'-C3'、C3'-C4'、C4'-O4'、C1'-O4')及/或獨立地或組合之至少一個核糖碳或氧(例如，C1'、C2'、C3'、C4'或O4')。有些

具體例中，無環核苷酸為





其中B為經修飾或未修飾核鹼基，R_1與R_2獨立地為H、鹵素、OR_3、或烷基；及R_3為H、烷基、環烷基、芳基、芳烷基、雜芳基或糖。

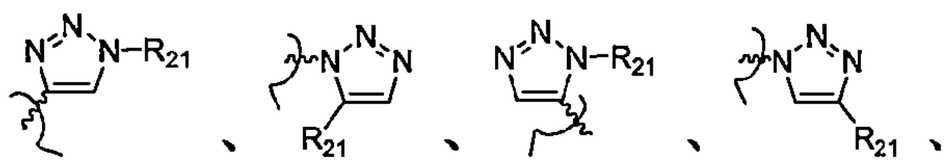
【0352】 有些具體例中，糖修飾係選自下列各者所成群組：2’-H、2′-*O*-Me (2′-*O*-甲基)、2′-*O*-MOE (2′-*O*-甲氧基乙基)、2’-F、2′-*O*-[2-(甲基胺基)-2-側氧基乙基] (2′-*O*-NMA)、2’-*S*-甲基、2’-O-CH_2-(4’-C) (LNA)、2’-O-CH_2CH_2-(4’-C) (ENA)、2'-O-胺基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基胺基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基胺基丙基 (2'-O-DMAP)、2'-O-二甲基胺基乙基氧乙基(2'-O-DMAEOE)、及同一位置之2’-OMe/2’F，其中2’-O-Me係呈阿拉伯糖組態。

【0353】 咸了解，當特定核苷酸透過其2’-位置連結下一個核苷酸時，本文說明之糖修飾可以位在該特定核苷酸(例如，透過其2’-位置連結之核苷酸)之糖之3’-位置。3’位置之修飾可呈木糖組態。術語「木糖組態」係指核糖C3’取代基之置換係與木糖之糖3’-OH呈相同組態。

【0354】 附接C4’及/或C1’之氫可被直鏈-或分支之視需要經取代之

烷基、視需要經取代之烯基、視需要經取代之炔基置換，其中烷基、烯基與炔基之主幹可含有一個或多個O、S、S(O)、SO_2、N(R')、C(O)、N(R')C(O)O、OC(O)N(R')、CH(Z')、含磷鏈結、視需要經取代之芳基、視需要經取代之雜芳基、視需要經取代之雜環或視需要經取代之環烷基，其中R'為氫、醯基或視需要經取代之脂系，Z'係選自下列各者所成群組：

OR_{11}、COR_{11}、CO_2R_{11}、

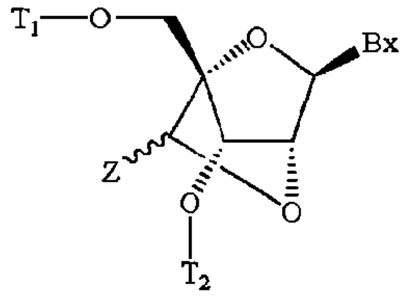


$NR_{21}R_{31}$、$CONR_{21}R_{31}$、$CON(H)NR_{21}R_{31}$、$ONR_{21}R_{31}$、$CON(H)N=CR_{41}R_{51}$、$N(R_{21})C(=NR_{31})NR_{21}R_{31}$、$N(R_{21})C(O)NR_{21}R_{31}$、$N(R_{21})C(S)NR_{21}R_{31}$、$OC(O)NR_{21}R_{31}$、$SC(O)NR_{21}R_{31}$、$N(R_{21})C(S)OR_{11}$、$N(R_{21})C(O)OR_{11}$、$N(R_{21})C(O)SR_{11}$、$N(R_{21})N=CR_{41}R_{51}$、$ON=CR_{41}R_{51}$、$SO_2R_{11}$、$SOR_{11}$、$SR_{11}$、與經取代之或未經取代之雜環；$R_{21}$與$R_{31}$在每次出現時獨立地為氫、醯基、未經取代之或經取代之脂系、芳基、雜芳基、雜環、OR_{11}、COR_{11}、CO_2R_{11}、或$NR_{11}R_{11}$'；或R_{21}與R_{31}與其等附接之原子共同形成雜環狀環；R_{41}與R_{51}在每次出現時獨立地為氫、醯基、未經取代或經取代之脂系、芳基、雜芳基、雜環、OR_{11}、COR_{11}、或CO_2R_{11}、或$NR_{11}R_{11}$'；及R_{11}與R_{11}'獨立地為氫、脂系、經取代之脂系、芳基、雜芳基、或雜環。有些具體例中，附接5'末端核苷酸之C4'之氫被置換。

【0355】 有些具體例中，C4'與C5'共同形成視需要經取代之雜環，較佳係包含至少一個-PX(Y)-，其中X為H、OH、OM、SH、視需要經取代之烷基、視需要經取代之烷氧基、視需要經取代之烷基硫基、視需要經取代

之烷基胺基或視需要經取代之二烷基胺基，其中M在每次出現時獨立地為總電荷為+1之鹼金屬或過渡金屬；及Y為O、S、或NR'，其中R'為氫、視需要經取代之脂系。較佳係此修飾在iRNA之5'末端。

【0356】 某些具體例中，LNA包括如下式之雙環狀核苷：



其中：

Bx為雜環狀鹼基部份體；

T_1為H或羥基保護基；

T_2為H、羥基保護基或反應性磷基；

Z為C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、經取代之C_1-C_6烷基、經取代之C_2-C_6烯基、經取代之C_2-C_6炔基、醯基、經取代之醯基、或經取代之醯胺。

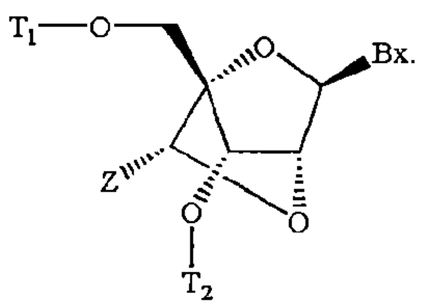
【0357】 有些具體例中，各經取代之基團獨立地經以獨立地選自下列之視需要經保護之取代基單取代或多取代：鹵素、側氧基、羥基、OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J1、OC(=X)NJ1J2、NJ3C(=X)NJ1J2與CN，其中各J1、J2與J3獨立地為H或C_1-C_6烷基，及X為O、S或NJ1。

【0358】 某些此等具體例中，各經取代之基團獨立地經以獨立地選自下列之取代基單取代或多取代：鹵素、側氧基、羥基、OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J1、與NJ3C(=X)NJ1J2，其中各J1、J2與J3獨立地為H、C_1-C_6烷基、或經取代之C_1-C_6烷基，及X為O或NJ1。

【0359】 某些具體例中，Z基團為經一個或多個Xx取代之C_1-C_6烷基，其中各Xx獨立地為OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J1、OC(=X)NJ1J2、NJ3C(=X)NJ1J2或CN；其中各J1、J2與J3獨立地為H或C_1-C_6烷基，及X為O、S或NJ1。另一項具體例中，Z基團為經一個或多個Xx取代之C_1-C_6烷基，其中各Xx獨立地為鹵基(例如，氟)、羥基、烷氧基(例如，CH_3O—)、經取代之烷氧基或疊氮基。

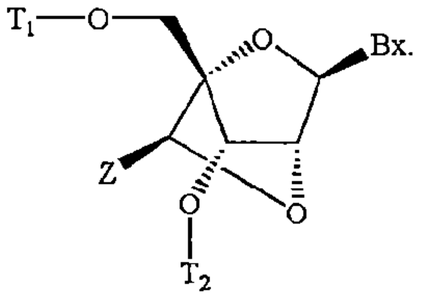
【0360】 某些具體例中，Z基團為—CH_2Xx，其中Xx為OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J1、OC(=X)NJ1J2、NJ3C(=X)NJ1J2或CN；其中各J1、J2與J3獨立地為H或C_1-C_6烷基，及X為O、S或NJ1。另一項具體例中，Z基團為—CH_2Xx，其中Xx為鹵基(例如，氟)、羥基、烷氧基(例如，CH_3O—)或疊氮基。

【0361】 某些此等具體例中，Z基團係呈(R)-組態：



。

【0362】 某些此等具體例中，Z基團係呈(S)-組態：



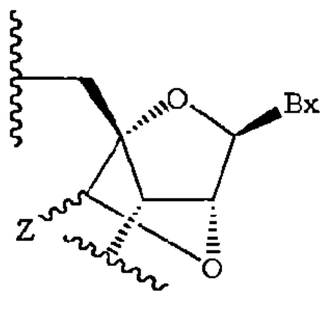
。

【0363】 某些具體例中，各T_1與T_2為羥基保護基。較佳羥基保護基列表包括苯甲基、苯甲醯基、2,6-二氯苯甲基、第三丁基二甲基矽基、第三丁基二苯基矽基、甲磺醯基、甲苯磺醯基、二甲氧基三苯甲基(DMT)、9-苯基黃嘌呤-9-基(Pixyl)與9-(對甲氧基苯基)黃嘌呤-9-基(MOX)。某些具體例

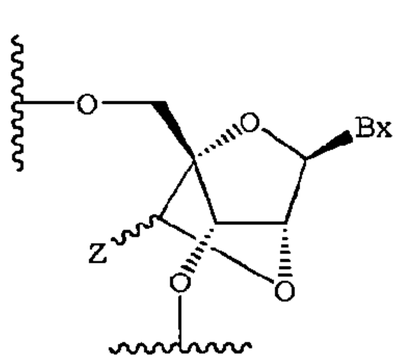
中，T_1為選自下列之羥基保護基：乙醯基、苯甲基、第三丁基二甲基矽基、第三丁基二苯基矽基、與二甲氧基三苯甲基，其中更佳羥基保護基T_1，其係4,4′-二甲氧基三苯甲基。

【0364】 某些具體例中，T_2為反應性磷基，其中較佳反應性磷基包括二異丙基氰基乙氧基亞胺基磷酸酯與H-膦酸酯，某些具體例中，T_1為4,4′-二甲氧基三苯甲基，及T_2為二異丙基氰基乙氧基亞胺基磷酸酯。

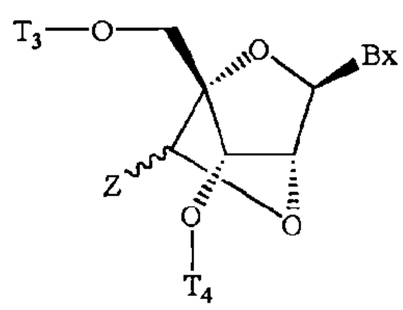
【0365】 某些具體例中，本發明化合物包含至少一個如下式單體：



或如下式：



或如下式：



其中

Bx為雜環狀鹼基部份體；

T_3為H、羥基保護基、附接核苷、核苷酸、寡核苷、寡核苷酸、單體亞單位或寡聚化合物之鏈結接合物基團或核苷間鏈結基團；

T_4為H、羥基保護基、附接核苷、核苷酸、寡核苷、寡核苷酸、單體亞單位或寡聚化合物之鏈結接合物基團或核苷間鏈結基團；

其中T_3與T_4中至少一個為附接核苷、核苷酸、寡核苷、寡核苷酸、單體亞單位或寡聚化合物之核苷間鏈結基團；及

Z為C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、經取代之C_1-C_6烷基、經取代之C_2-C_6烯基、經取代之C_2-C_6炔基、醯基、經取代之醯基、或經取代之醯胺。

【0366】 有些具體例中，各經取代之基團獨立地經以獨立地選自下列之視需要經保護之取代基單取代或多取代：鹵素、側氧基、羥基、OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J1、OC(=X)NJ1J2、NJ3C(=X)NJ1J2與CN，其中各J1、J2與J3獨立地為H或C1-C6烷基，及X為O、S或NJ1。

【0367】 有些具體例中，各經取代之基團獨立地經以獨立地選自下列之取代基單取代或多取代：鹵素、側氧基、羥基、OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J1、與NJ3C(=X)NJ1J2，其中各J1、J2與J3獨立地為H或C_1-C_6烷基，及X為O或NJ1。

【0368】 某些此等具體例中，至少一個Z為C_1-C_6烷基或經取代之C_1-C_6烷基。某些具體例中，各Z獨立地為C_1-C_6烷基或經取代之C_1-C_6烷基。某些具體例中，至少一個Z為C_1-C_6烷基。某些具體例中，各Z獨立地為C_1-C_6烷基。某些具體例中，至少一個Z為甲基。某些具體例中，各Z為甲基。某些具體例中，至少一個Z為乙基。某些具體例中，各Z為乙基。某些具體例中，至少一個Z為經取代之C_1-C_6烷基。某些具體例中，各Z獨立地為經取代之C_1-C_6烷基。某些具體例中，至少一個Z為經取代之甲基。某些具體例中，

各Z為經取代之甲基。某些具體例中，至少一個Z為經取代之乙基。某些具體例中，各Z為經取代之乙基。

【0369】 某些具體例中，至少一個取代基為C_1-C_6烷氧基(例如，至少一個Z為經一個或多個C_1-C_6烷氧基取代之C_1-C_6烷基)。另一項具體例中，各取代基獨立地為C_1-C_6烷氧基(例如，各Z獨立地為經一個或多個C_1-C_6烷氧基取代之C_1-C_6烷基)。

【0370】 某些具體例中，至少一個C_1-C_6烷氧基取代基為CH_3O— (例如，至少一個Z為CH_3OCH_2-)。另一項具體例中，各C_1-C_6烷氧基取代基為CH_3O— (例如，各Z為CH_3OCH_2-)。

【0371】 某些具體例中，至少一個取代基為鹵素(例如，至少一個Z為經一個或多個鹵素取代之C_1-C_6烷基)。某些具體例中，各取代基\獨立地為鹵素(例如，各Z分別獨立地為經一個或多個鹵素取代之C_1-C_6烷基)。某些具體例中，至少一個鹵素取代基為氟(例如，至少一個Z為CH_2FCH_2-、CHF_2CH_2-或CF_3CH_2-)。某些具體例中，各鹵基取代基為氟(例如，各Z獨立地為CH_2FCH_2-、CHF_2CH_2-或CF_3CH_2-)。

【0372】 某些具體例中，至少一個取代基為羥基(例如，至少一個Z為經一個或多個羥基取代之C1-C6烷基)。某些具體例中，各取代基獨立地為羥基(例如，各Z獨立地為經一個或多個羥基取代之C_1-C_6烷基)。某些具體例中，至少一個Z為$HOCH_2$-。另一項具體例中，各Z為$HOCH_2$-。

【0373】 某些具體例中，至少一個Z為CH_3-、CH_3CH_2-、CH_2OCH_3-、CH_2F—或$HOCH_2$-。某些具體例中，各Z獨立地為CH_3-、CH_3CH_2-、CH_2OCH_3-、CH_2F—或$HOCH_2$-。

【0374】某些具體例中，至少一個Z基團為經一個或多個Xx取代之C_1-C_6烷基，其中各Xx獨立地為OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J1、OC(=X)NJ1J2、NJ3C(=X)NJ1J2或CN；其中各J1、J2與J3獨立地為H或C_1-C_6烷基，及X為O、S或NJ1。另一項具體例中，至少一個Z基團為經一個或多個Xx取代之C_1-C_6烷基，其中各Xx獨立地為鹵基(例如，氟)、羥基、烷氧基(例如，CH_3O—)或疊氮基。

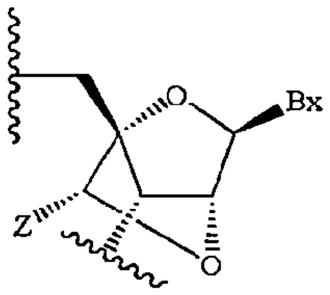
【0375】某些具體例中，各Z基團獨立地為經一個或多個Xx取代之C_1-C_6烷基，其中各Xx獨立地為OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J1、OC(=X)NJ1J2、NJ3C(=X)NJ1J2或CN；其中各J1、J2與J3獨立地為H或C_1-C_6烷基，及X為O、S或NJ1。另一項具體例中，各Z基團獨立地為經一個或多個Xx取代之C_1-C_6烷基，其中各Xx獨立地為鹵基(例如，氟)、羥基、烷氧基(例如，CH_3O—)或疊氮基。

【0376】某些具體例中，至少一個Z基團為—CH_2Xx，其中Xx為OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J1、OC(=X)NJ1J2、NJ3C(=X)NJ1J2或CN；其中各J1、J2與J3獨立地為H或C_1-C_6烷基，及X為O、S或NJ1。某些具體例中，至少一個Z基團為—CH_2Xx，其中Xx為鹵基(例如，氟)、羥基、烷氧基(例如，CH_3O—)或疊氮基。

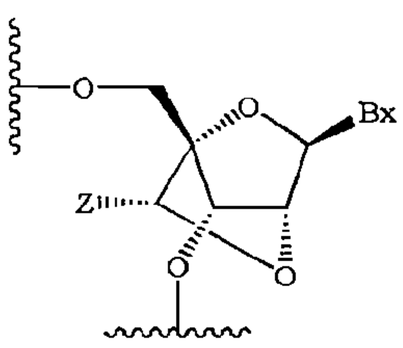
【0377】某些具體例中，各Z基團獨立地為—CH_2Xx，其中各Xx獨立地為OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J1、OC(=X)NJ1J2、NJ3C(=X)NJ1J2或CN；其中各J1、J2與J3獨立地為H或C_1-C_6烷基，及X為O、S或NJ1。另一項具體例中，各Z基團獨立地為—CH_2Xx，其中各Xx獨立地為鹵基(例如，氟)、羥基、烷氧基(例如，CH_3O—)或疊氮基。

【0378】 某些具體例中，至少一個Z為CH_3-。另一項具體例中，各Z為CH_3-。

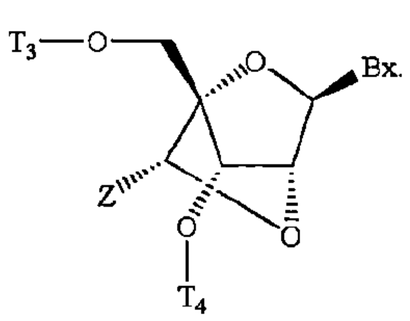
【0379】 某些具體例中，至少一個單體之Z基團係呈(R)組態，如下式代表：



或如下式代表：



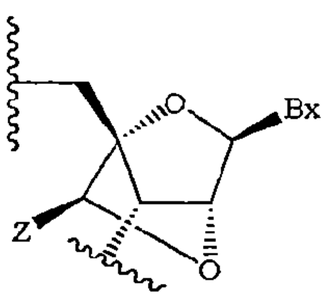
或如下式代表：



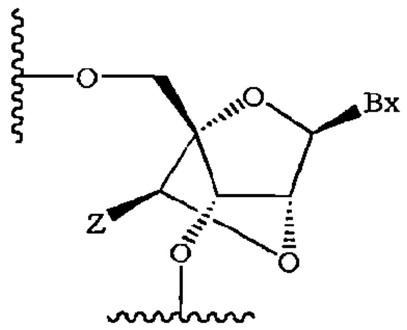
。

【0380】 某些具體例中，如上式各單體中Z基團係呈(R)—組態。

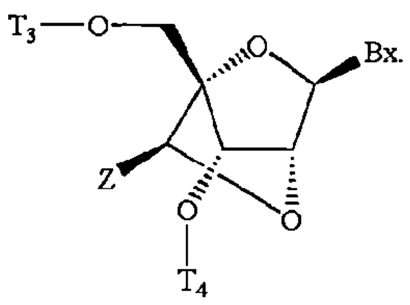
【0381】 某些具體例中，至少一個單體中Z基團係呈(S)—組態，如下式代表：



或如下式代表：



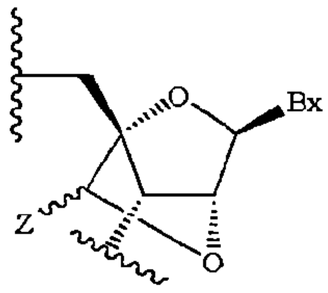
或如下式代表：



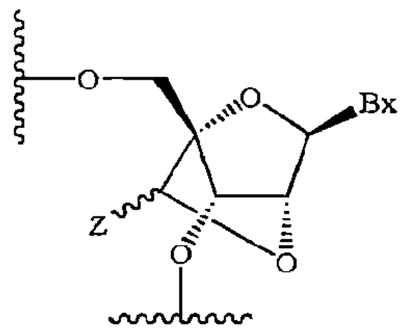
【0382】 某些具體例中，如上式各單體中Z基團係呈(S)—組態。

【0383】 某些具體例中，T_3為H或羥基保護基。某些具體例中，T_4為H或羥基保護基。另一項具體例中，T_3為附接核苷、核苷酸或單體亞單位之核苷間鏈結基團。某些具體例中，T_4為附接核苷、核苷酸或單體亞單位之核苷間鏈結基團。某些具體例中，T_3為附接寡核苷或寡核苷酸之核苷間鏈結基團。某些具體例中，T_4為附接寡核苷或寡核苷酸之核苷間鏈結基團。某些具體例中，T_3為附接寡聚化合物之核苷間鏈結基團。某些具體例中，T_4為附接寡聚化合物之核苷間鏈結基團。某些具體例中，T_3與T_4中至少一個包含選自磷酸二酯或硫代磷酸酯之核苷間鏈結基團。

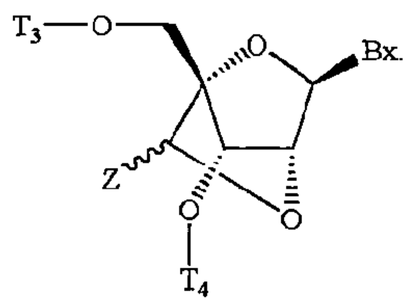
【0384】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含具有至少連續兩個如下式單體之至少一區：



或如下式：

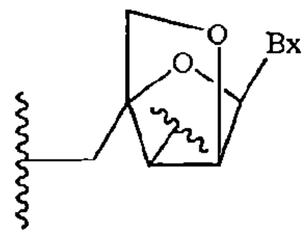


或如下式：

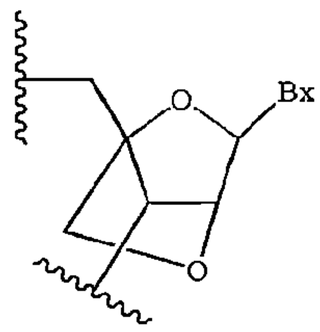


【0385】某些此等具體例中，LNA包括(但不限於)，(A) α-L-亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′) LNA、(B) β-D-亞甲基氧基(4′-CH_2-O-2′) LNA、(C) 伸乙基氧基(4′-$(CH_2)_2$-O-2′) LNA、(D)胺基氧基(4′-CH_2-O—N(R)-2′) LNA與(E)氧胺基 (4′-CH_2-N(R)—O-2′) LNA，如下所示：

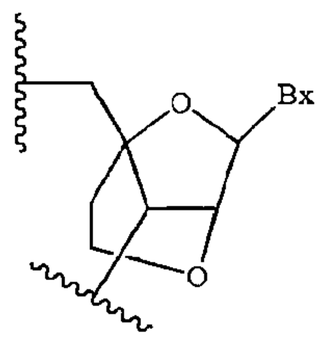
(A)



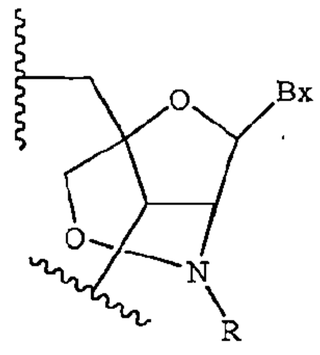
(B)



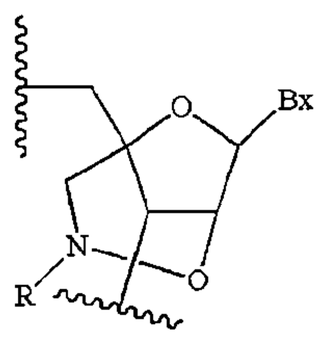
(C)



(D)

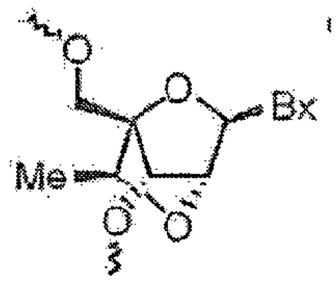


(E)



【0386】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含具有至少兩個連續如上式單體之至少兩區。某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含有間隙的基序。某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含至少一區約8至約14個連續β-D-2′-去氧核糖呋喃糖基核苷。某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含至少一區約9至約12個連續β-D-2′-去氧核糖呋喃糖基核苷。

【0387】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含至少一個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多個)如下式(S)-cEt單體：



S-cEt (C)

其中BX為雜環狀鹼基部份體。

【0388】 某些具體例中，單體包括糖擬似物。某些此等具體例中，採用擬似物替代糖或糖-核苷間鏈結組合，並維持核鹼基用於與所選定之標靶雜交。糖擬似物之代表性實例包括(但不限於)，環己烯基或N-嗎啉基。糖-核苷間鏈結組合之擬似物之代表性實例包括(但不限於)，肽核酸(PNA)與利用無電荷非對掌性鏈結連結之N-嗎啉基。有些例子中採用擬似物替代核鹼基。代表性核鹼基擬似物係相關技藝習知者，且包括(但不限於)，三環狀吩噁吡類似物與通用鹼基(Berger等人，*Nuc Acid Res.* 2000, 28:2911-14，其內容已以引用之方式併入本文中)。糖、核苷與核鹼基擬似物之合成方法係係彼等習此相關技藝者習知。

【0389】 本文說明共同連結單體(包括(但不限於)，經修飾與未經修飾之核苷與核苷酸)之鏈結基團，藉以形成寡聚化合物，例如，寡核苷酸。此等鏈結基團亦稱為糖間鏈結。由磷原子之存在或不存在來界定兩大類鏈結基團。代表性含磷的鏈結基團包括(但不限於)，磷酸二酯(P=O)、磷酸三酯、甲基膦酸酯、胺基磷酸酯、與硫代磷酸酯(P=S)。代表性非含磷鏈結基團包括(但不限於)，亞甲基甲基亞胺基(—CH_2-$N(CH_3)$-O—CH2-)、硫二酯(—O—C(O)—S—)、硫代胺甲酸酯(—O—C(O)(NH)—S—)；矽氧烷(—O—$Si(H)_2$-O—)；與N,N′-二甲基肼(—CH_2-$N(CH_3)$-$N(CH_3)$-)。相較於天然磷

酸二酯鏈結，可採用經修飾鏈結來改變(通常為增加)寡核苷酸之核酸酶抗性。某些具體例中，具有對掌性原子之鏈結可以製成消旋混合物、製成分開之對映異構物。代表性對掌性鏈結包括(但不限於)，烷基膦酸酯與硫代磷酸酯。製備含磷與非含磷鏈結之方法係彼等習此相關技藝者習知。

【0390】 鏈結基團中之磷酸酯基團可藉由其中一個氧被不同取代基置換予以修飾。此修飾之結果之一可為增加寡核苷酸對核分解之抗性。經修飾磷酸酯基團的實例包括硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷磷酸酯之酯類、膦酸氫酯、胺基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯與磷酸三酯。有些具體例中，鏈結中一個非橋接磷酸酯氧原子可被下列任一者置換：S、Se、BR_3 (R為氫、烷基、芳基)、C (亦即烷基、芳基等等)、H、NR_2 (R為氫、視需要經取代之烷基、芳基)、或OR (R為視需要經取代之烷基或芳基)。未經修飾之磷酸酯基團之磷原子為非對掌性。然而，以一個上述原子或原子之基團置換其中一個非橋接氧時，賦予磷原子對掌性；換言之，依此方式修飾之磷酸酯基團中之磷原子為立體性中心。該立體性磷原子可具有「R」組態(本文稱為Rp)或「S」組態(本文稱為Sp)。

【0391】 二硫代磷酸酯中兩個非橋接氧均被硫置換。二硫代磷酸酯之磷中心為非對掌性，不會形成寡核苷酸非對映異構物。因此，在不希望受到理論限制下，希望兩個非橋接氧之修飾會消除對掌性中心，例如，形成二硫代磷酸酯，因而不會產生非對映異構物混合物。因此，非橋接氧可獨立地為O、S、Se、B、C、H、N、或OR (R為烷基或芳基)中任一者。

【0392】 磷酸酯鏈結基之修飾亦可置換橋接氧(亦即連結磷酸酯與單體之糖之氧)、氮(橋接之胺基磷酸酯)、硫(橋接之硫代磷酸酯)與碳(橋接之

亞甲基膦酸酯)。該置換可以發生在其中一個鏈結氧或兩個鏈結氧。當橋接氧為核苷之3'-氧時，較佳係以碳置換。當橋接氧為核苷之5'-氧時，較佳係以氮置換。

【0393】 經修飾磷酸酯鏈結中至少一個與磷酸酯鏈結之氧已被置換，或磷酸酯基團已被非磷基團置換時，亦稱為「非磷酸二酯之糖間鏈結」或「非磷酸二酯鏈結基」。

【0394】 某些具體例中，磷酸酯基團可被含非磷連接基(例如，去磷鏈結基)置換。去磷鏈結基在本文中亦稱為非磷酸二酯鏈結基。在不希望受到理論限制下，咸信帶電荷之磷酸二酯基團為核分解降解作用之反應中心，其被中性結構擬似物置換，應會賦與加強之核酸酶安定性。再者，在不希望受到理論限制下，有些具體例中，希望引進變化，其中帶電荷之磷酸酯基團被中性部份體置換。

【0395】 可置換磷酸酯基團之部份體實施例包括(但不限於)，醯胺(例如，醯胺-3 (3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5')與醯胺-4 (3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5'))、羥基胺基、矽氧烷(二烷基矽氧烷)、羧醯胺、碳酸根、羧基甲基、胺甲酸根、羧酸酯、硫醚、環氧乙烷鏈結基、硫化物、磺酸根、磺醯胺、磺酸酯、硫代甲縮醛(3'-S-CH_2-O-5')、甲縮醛(3'-O-CH_2-O-5')、肟、亞甲基亞胺基、亞甲基羰基胺基、亞甲基甲基亞胺基(MMI，3'-CH_2-N(CH_3)-O-5')、亞甲基伸肼基、亞甲基二甲基伸肼基、亞甲基氧基甲基亞胺基、醚類(C3'-O-C5')、硫醚類(C3'-S-C5')、硫代乙醯胺基(C3'-N(H)-C(=O)-CH_2-S-C5')、C3'-O-P(O)-O-SS-C5'、C3'-CH_2-NH-NH-C5'、3'-NHP(O)(OCH_3)-O-5'與3'-NHP(O)(OCH_3)-O-5'及含混合N、O、S與CH_2組份之非離子性鏈

結。參見例如，Carbohydrate Modifications in Antisense Research；Y.S. Sanghvi與P.D. Cook編輯；ACS研討會系列580；第3與4章(pp. 40-65)。較佳具體例包括亞甲基甲基亞胺基(MMI)、亞甲基羰基胺基、醯胺、胺甲酸根與環氧乙烷鏈結基。

【0396】習此相關技藝者咸了解，某些例子中置換非橋接氧時，會促使增強糖之間鏈結被相鄰之2'-OH裂解，因此在許多例子中，非橋接氧之修飾有必要修飾2'-OH，例如，不參與裂解相鄰之糖間鏈結之修飾，例如，阿拉伯糖、2'-O-烷基、2'-F、LNA與ENA。

【0397】較佳非磷酸二酯之糖間鏈結包括硫代磷酸酯、Sp異構物之對映異構性超量為至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高之硫代磷酸酯、Rp異構物之對映異構性超量為至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高之硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基磷酸三酯、烷基-膦酸酯(例如，甲基-膦酸酯)、硒代磷酸酯、胺基磷酸酯(例如，N-烷基胺基磷酸酯)、與溴烷膦酸酯。

【0398】有些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含至少一個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多個或至多包括所有)經修飾或非磷酸二酯鏈結。有些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含至少一個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多個或至多包括所有)硫代磷酸酯鏈結。

【0399】本發明雙股iRNA劑亦可構築成其中磷酸酯鏈結基與糖均被核酸酶抗性核苷或核苷酸替代物置換。在不希望受到理論限制下，咸信缺

少帶重複電荷主幹時，會消除與辨識聚陰離子之蛋白質之結合性(例如，核酸酶)。再者，在不希望受到理論限制下，有些具體例中，希望引進變化，其中鹼基利用中性替代主幹系鏈。實例包括N-嗎啉基、環丁基、吡咯啶、肽核酸(PNA)、胺基乙基甘胺醯基PNA(*aeg*PNA)與延長主幹之吡咯啶PNA(*bep*PNA)核苷替代物。較佳替代物為PNA替代物。

【0400】 本文說明之本發明雙股iRNA劑可包含一個或多個不對稱中心，因此產生對映異構物、非對映異構物、與立體異構性組態，其等可依絕對立體化學定義為(R)或(S)，如糖變旋異構物，或呈(D)或(L)，如胺基酸等等。包括於本文所提供之本發明雙股iRNA劑為所有此等可能異構物，及其消旋性與純光學性型。

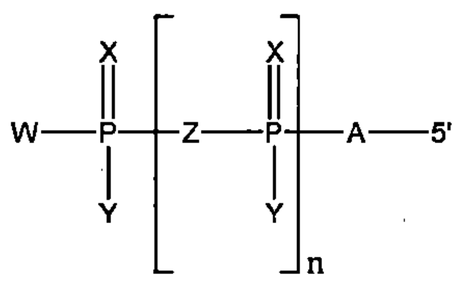
【0401】 有些具體例中，雙股iRNA劑進一步包含在反義股5'-端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。一項具體例中，該磷酸酯擬似物為5'-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0402】 有些具體例中，雙股iRNA劑反義股5'-端不含有5'-乙烯基膦酸酯(VP)。

【0403】 本發明iRNA劑之末端可為經修飾。此等修飾可在一端或兩端。例如，iRNA之3′及/或5′端可以接合其他官能分子實體，如標記部份體，例如，螢光團(例如，芘、TAMRA、螢光素、Cy3或Cy5染劑)或保護基(基於例如，硫、矽、硼或酯)。官能分子實體可以透過磷酸酯基團及/或鏈結基來附接糖。鏈結基之末端原子可以連接或置換磷酸酯基團之鏈結原子或糖之C-3′或C-5′ O、N、S或C基團。或者，鏈結基可以連接或置換核苷酸替代物(例如，PNA)之末端原子。

【0404】 當鏈結基/磷酸酯-官能分子實體-鏈結基/磷酸酯之配置穿插在雙股寡聚化合物兩股之間時，此配置可以替代髮夾型寡聚化合物中之髮夾環。

【0405】 適用於調控活性之末端修飾包括使用磷酸酯或磷酸酯類似物修飾iRNA之5'端。某些具體例中，iRNA之`5'端經磷酸化或包括磷醯基類似物。例示性5'-磷酸酯修飾包括彼等可與RISC所介導基因靜默相容者。5'-末端之修飾亦適用於刺激或抑制個體之免疫系統。有些具體例中，寡聚化合物之5'-端包含修飾



，

其中W、X與Y為分別獨立地選擇自下列各者所成群組：O、或(R為氫、烷基、芳基)、S、Se、BR_3 (R為氫、烷基、芳基)、BH_3^-、C (亦即烷基、芳基等等)、H、NR_2 (R為氫、烷基、芳基)、或OR (R為氫、烷基或芳基)；A與Z在每次出現時分別獨立地為不存在、O、S、CH_2、NR (R為氫、烷基、芳基)、或視需要經取代之伸烷基，其中伸烷基之主幹可以在內部及/或在末端包含一個或多個O、S、SS與NR (R為氫、烷基、芳基)；及n為0-2。有些具體例中，n為1或2。咸了解，A置換與糖之5'碳連結之氧。當n為0時，W與Y連同其等所附接之P一起形成視需要經取代之5-8員雜環，其中W與Y分別獨立地為O、S、NR'或伸烷基。較佳係該雜環經芳基或雜芳基取代。有些具體例中，5'-末端核苷酸之C5'的一或兩個氫被鹵素(例如，F)置換。

【0406】 例示性5'-修飾包括(但不限於)，5'-單磷酸酯($(HO)_2(O)P$-O-

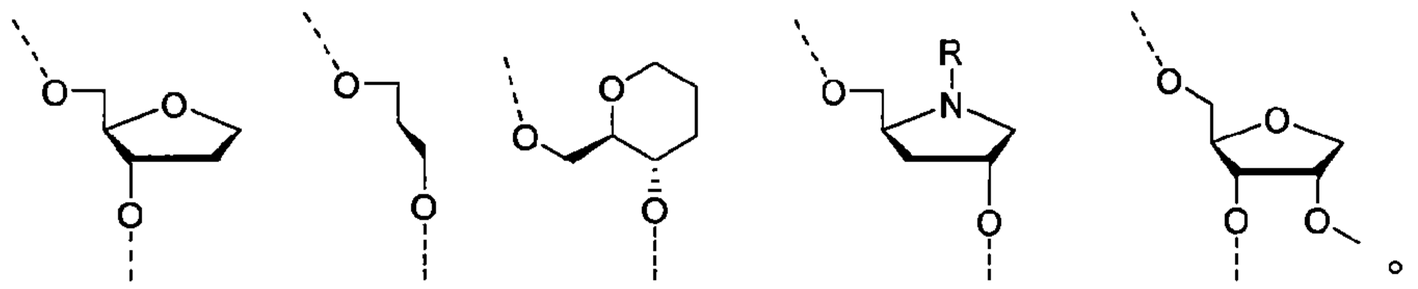
5')；5'-二磷酸酯($(HO)_2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$)；5'-三磷酸酯($(HO)_2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$)；5'-單硫代磷酸酯(硫代磷酸酯；(HO)2(S)P-O-5')；5'-單二硫代磷酸酯(二硫代磷酸酯；(HO)(HS)(S)P-O-5')、5'-硫醇磷酸酯((HO)2(O)P-S-5')；5'-α-硫代三磷酸酯；5'-β-硫代三磷酸酯；5'-γ-硫代三磷酸酯；5'-胺基磷酸酯($(HO)_2(O)P-NH-5'$、$(HO)(NH_2)(O)P-O-5'$)。其他5'-修飾包括 5'-烷基膦酸酯(R(OH)(O)P-O-5'，R=烷基，例如，甲基、乙基、異丙基、丙基等等)、5'-烷基醚膦酸酯(R(OH)(O)P-O-5'，R=烷基醚，例如，甲氧基甲基(CH_2OMe)、乙氧基甲基等等)。其他例示性5'-修飾包括其中Z為視需要經取代至少一次之烷基，例如，$((HO)_2(X)P-O[-(CH_2)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-5'$、$((HO)_2(X)P-O[-(CH_2)_a-P(X)(OH)-O]_b-5'$、((HO)2(X)P-[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$- 5'；二烷基末端磷酸酯與磷酸酯擬似物：$HO[-(CH_2)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-5'$、$H_2N[-(CH_2)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-5'$、$H[-(CH_2)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-5'$、$Me_2N[-(CH_2)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-5'$、$HO[-(CH_2)_a-P(X)(OH)-O]_b-5'$、$H_2N[-(CH_2)_a-P(X)(OH)-O]_b-5'$、$H[-(CH_2)_a-P(X)(OH)-O]_b-5'$、$Me_2N[-(CH_2)_a-P(X)(OH)-O]_b-5'$，其中a與b分別獨立地為1-10。其他具體例包括使用BH_3、BH_3^-及/或Se置換氧及/或硫。

【0407】 末端修飾亦適用於追蹤分佈，此時可添加之較佳基團包括螢光團，例如，螢光素或Alexa染劑，例如，Alexa 488。末端修飾亦適用於加強吸收，此時適用之修飾包括靶向配體。末端修飾亦適用於使寡核苷酸與另一個部份體交聯；此時適用之修飾包括絲裂黴素C、補骨脂素、與其衍生物。

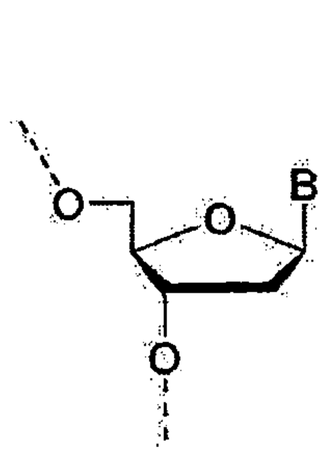
【0408】 本發明化合物，如：iRNA或dsRNA劑，可在正義股與反義股種子區(亦即在反義股5'-端位置2-8)之相反位點中引進熱失穩修飾，提高iRNA雙螺旋解離或熔解之傾向(降低雙螺旋結合之自由能)，以優化RNA干擾。此修飾可以提高雙螺旋在反義股種子區中解離或熔解之傾向。

【0409】 熱失穩修飾可包括無鹼基修飾；與相反股中相反核苷酸之錯配；及糖修飾，如：2'-去氧修飾或無環核苷酸，例如，非鎖核酸(UNA)或甘油核酸(GNA)。

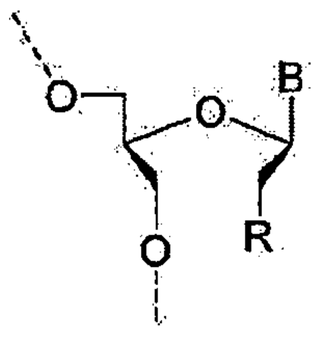
【0410】 例舉的無鹼基修飾為：



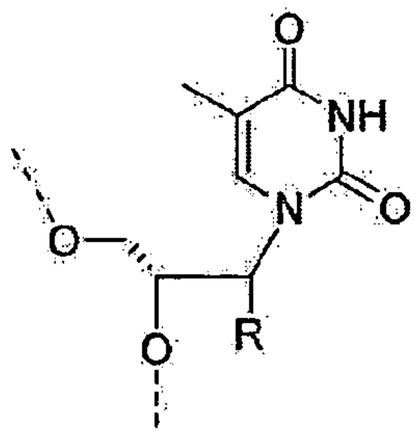
【0411】 例舉的糖修飾為：



2'-去氧

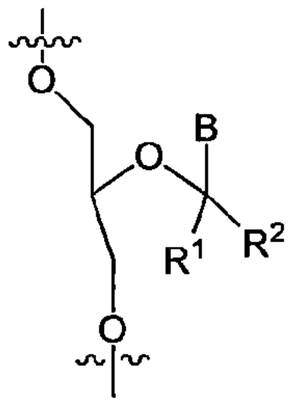
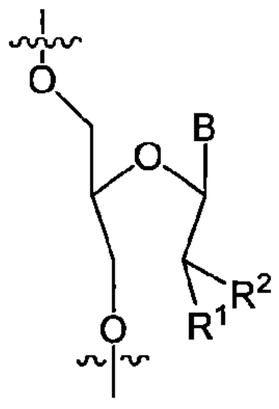
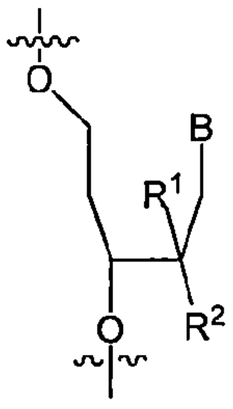
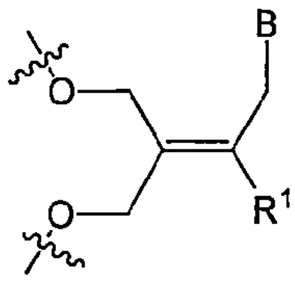
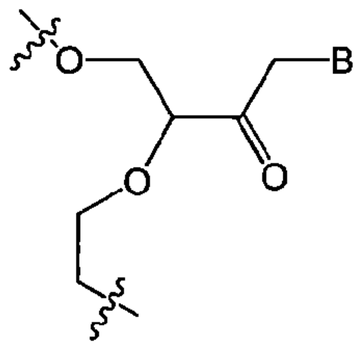


非鎖核酸
R= H, OH, O-烷基



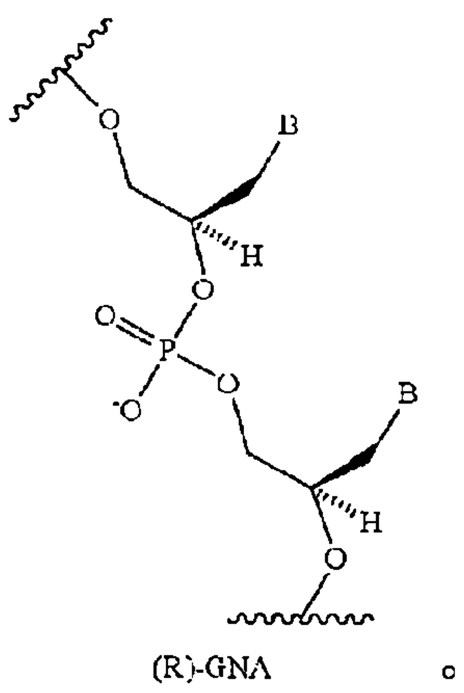
甘油核酸
R= H, OH, O-烷基

【0412】 術語「無環核苷酸」係指任何具有無環狀核糖之核苷酸，例如，其中核糖碳之間(例如，C1'-C2'、C2'-C3'、C3'-C4'、C4'-O4'、或C1'-O4')沒有任何鍵及/或核苷酸中沒有獨立地或組合之至少一個核糖碳或氧(例如，C1'、C2'、C3'、C4'或O4')。有些具體例中，無環核苷酸

為  、  、  、  或  ，

其中B為經修飾或未修飾核鹼基，R^1與R^2獨立地為H、鹵素、OR_3、或烷基；及R_3為H、烷基、環烷基、芳基、芳烷基、雜芳基或糖。術語「UNA」指非鎖無環核酸，其中已排除糖之任何鍵，形成非鎖「糖」殘基。一項實例中，UNA亦涵括已排除C1'-C4'之間鍵結(亦即C1'與C4'碳之間之共價碳-氧-碳鍵)之單體。另一項實施例中，已排除糖之C2'-C3'鍵(亦即C2'與C3'碳之間之共價碳-碳鍵)(參見Mikhailov等人，*Tetrahedron Letters*, 26 (17): 2059 (1985)；及Fluiter等人，*Mol. Biosyst.*, 10: 1039 (2009)，其等完整內容已以引用方式併入本文中)。無環衍生物提供更大的主幹撓性，不會影響華生-克里克配對(Watson-Crick pairing)。無環核苷酸可利用2'-5'或3'-5'鏈結連結。

【0413】 術語「GNA」係指甘醇核酸，其為類似DNA或RNA之聚合物，但其「主幹」組成份之差異在於其係利用磷酸二酯鍵連結之重複甘油單位：



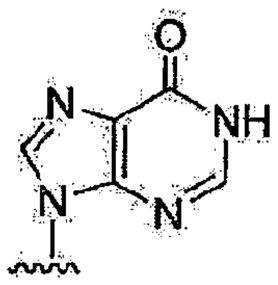
(R)-GNA。

【0414】 熱失穩修飾可為dsRNA雙螺旋內熱失穩性核苷酸與相反股中相反核苷酸之間之錯配(亦即非互補鹼基對)。例示性錯配鹼基對包括G：G、G：A、G：U、G：T、A：A、A：C、C：C、C：U、C：T、U：U、T：T、U：T、或其組合。相關技藝已知之其他錯配鹼基對亦適合本發明。錯配會發生在天然核苷酸或經修飾核苷酸之核苷酸間，亦即錯配鹼基對會發生在來自個別核苷酸之核鹼基間，不受核苷酸之核糖上修飾影響。某些具體例中，本發明化合物(如siRNA或iRNA劑)在錯配對中包含至少一個核鹼基，其為2'-去氧核鹼基；例如，2'-去氧核鹼基係在正義股。

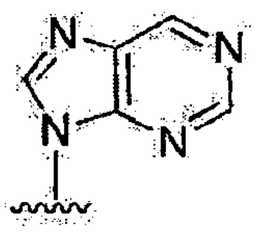
【0415】 無鹼基核苷酸、無環核苷酸修飾(包括UNA與GNA)、與錯配修飾之更多實例詳細說明於WO 2011/133876，其完整內容已以引用方式併入本文中。

【0416】 熱失穩修飾亦可包括已降低或廢除與相反鹼基形成氫鍵能力之通用鹼基，及磷酸酯修飾。

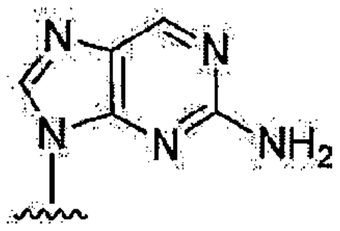
【0417】 已破壞或完全廢除與相反股中相反鹼基形成氫鍵能力之核鹼基修飾已經過評估，分析dsRNA雙螺旋中心區之失穩性，其說明於WO 2010/0011895，其完整內容已以引用方式併入本文中。例示性核鹼基修飾為：



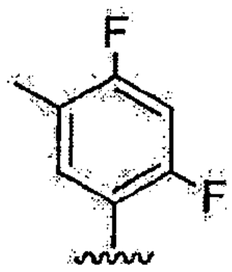
肌苷



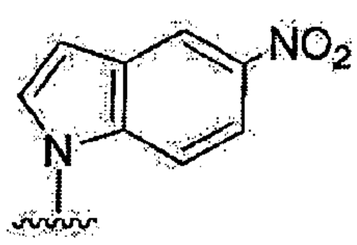
次黃苷



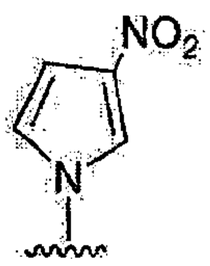
2-胺基嘌呤



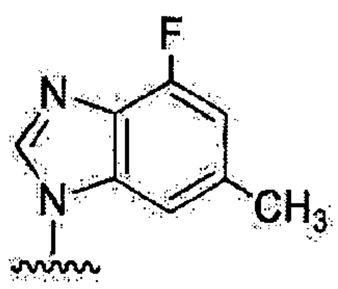
2,4-
二氟甲苯



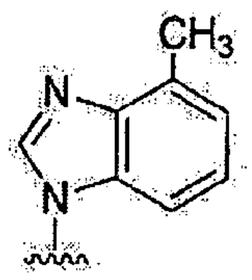
5-硝基吲哚



3-硝基吡咯

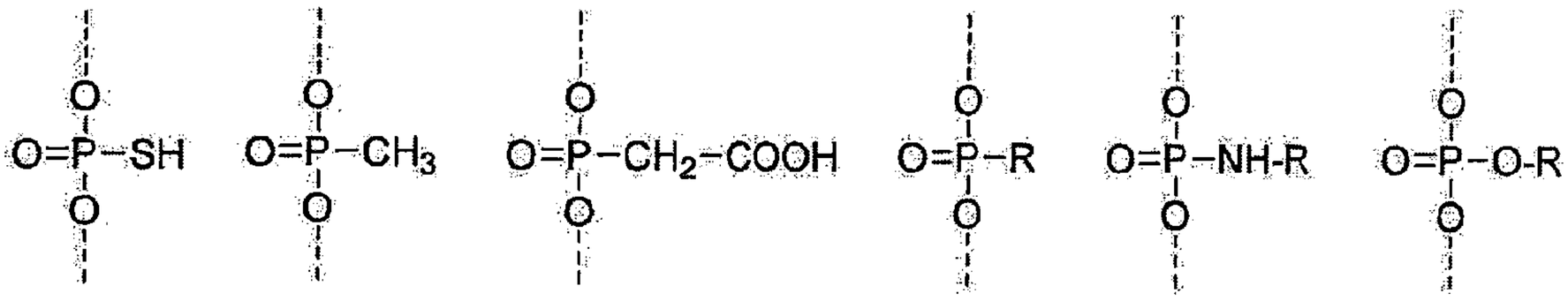


4-氟-6-
甲基苯并咪唑



4-甲基苯并咪唑

【0418】 相較於天然磷酸二酯鍵結，已知降低dsRNA雙螺旋之熱穩定性的例示性磷酸酯修飾為：



R= 烷基

。

【0419】 有些具體例中，本發明化合物可包含2'-5'鏈結(具有2'-H、2'-OH與2'-OMe，及P=O或P=S)。例如，2'-5'鏈結修飾可用於促進核酸酶抗性或抑制正義股與反義股之結合，或可用於正義股5'端，以避免正義股被RISC激活。

【0420】 另一項具體例中，本發明化合物可包含L糖類(例如，L核糖、具有2'-H、2'-OH與2'-OMe之L-阿拉伯糖)。例如，此等L糖修飾可用於促進核酸酶抗性或抑制正義股與反義股之結合，或可用於正義股5'端 ，以避免正義股被RISC激活。

【0421】 一項具體例中，本發明iRNA劑係利用載子接合配體，其中

該載子可為環狀基團或無環基團；較佳為該環狀基團係選自：吡咯啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、哌啶基、哌吩基、[1,3]二氧雜環戊烷基、噁唑啶基、異噁唑啶基、嗎啉基、噻唑啶基、異噻唑啶基、喹噁啉基、嗒吩酮基、四氫呋喃基、與十氫萘基；較佳係該無環基團選自：絲胺醇主幹或二乙醇胺主幹。

【0422】 有些具體例中，本文所揭示本發明iRNA劑中至少一股為5’磷酸化或在5’最末端包括磷醯基類似物。5'-磷酸酯修飾包括彼等可與RISC介導基因靜默作用相容者。合適修飾包括：5'-單磷酸酯 ((HO)2(O)P-O-5')；5'-二磷酸酯((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-三磷酸酯 ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-鳥苷封端基(7-甲基化或非甲基化) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-腺苷封端基(Appp)、及任何經修飾或未經修飾核苷酸封端基結構(N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-單硫代磷酸酯(硫代磷酸酯；(HO)2(S)P-O-5')；5'-單二硫代磷酸酯(二硫代磷酸酯；(HO)(HS)(S)P-O-5')、5'-硫醇磷酸酯((HO)2(O)P-S-5')；被任何額外氧/硫組合置換之單磷酸酯、二磷酸酯與三磷酸酯(例如，5'-α-硫代三磷酸酯、5'-γ-硫代三磷酸酯等等)、5'-胺基磷酸酯((HO)2(O)P-NH-5'、(HO)(NH2)(O)P-O-5')、5'-烷基膦酸酯(R=烷基=甲基、乙基、異丙基、丙基等等，例如，RP(OH)(O)-O-5'-)、5'-烯基膦酸酯(亦即乙烯基、經取代之乙烯基)、(OH)2(O)P-5'-CH2-)、5'-烷基醚膦酸酯(R=烷基醚=甲氧基甲基(MeOCH2-)、乙氧基甲基等等，例如，RP(OH)(O)-O-5'-)。

B. 包含本發明基序之經修飾iRNA

【0423】 本發明某些態樣中，本發明雙股RNAi劑包括具有如例如，2012年11月16日申請之WO 2013/075035所揭示之化學修飾之製劑，其完整內容已以引用之方式併入本文中。

【0424】 因此，本發明提供雙股可以於活體內抑制眼部細胞中標靶基因(亦即TTR)表現之RNAi劑。RNAi劑包含正義股與反義股。RNAi劑各股之長度可為12-30個核苷酸之範圍。例如，各股可為介於14-30個核苷酸之長度、17-30個核苷酸之長度、25-30個核苷酸之長度、27-30個核苷酸之長度、17-23個核苷酸之長度、17-21個核苷酸之長度、17-19個核苷酸之長度、19-25個核苷酸之長度、19-23個核苷酸之長度、19-21個核苷酸之長度、21-25個核苷酸之長度、或21-23個核苷酸之長度。

【0425】 正義股與反義股通常形成雙螺旋雙股RNA (「dsRNA」)，本文亦稱為「RNAi劑」。該RNAi劑雙螺旋區之長度可能為12至30核苷酸對。例如，該雙螺旋區可為14至30核苷酸對之長度、17至30核苷酸對之長度、27至30核苷酸對之長度、17至23核苷酸對之長度、17至21核苷酸對之長度、17至19核苷酸對之長度、19至25核苷酸對之長度、19至23核苷酸對之長度、19至21核苷酸對之長度、21至25核苷酸對之長度、或21至23核苷酸對之長度。另一項實例中，該雙螺旋區之長度係選自：15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、與27個核苷酸。

【0426】 一項具體例中，RNAi劑可在其中一股或兩股之3'-端或5'-端或兩端包含一個或多個突出區及/或封端基團。該突出之長度可為1-6個核苷酸，例如，2-6個核苷酸之長度、1-5個核苷酸之長度、2-5個核苷酸之長度、1-4個核苷酸之長度、2-4個核苷酸之長度、1-3個核苷酸之長度、2-3個

核苷酸之長度、或1-2個核苷酸之長度。該突出可能為其中一股比另一股長的結果或兩股呈交錯之相同長度的結果。該突出可與標靶mRNA形成錯配或可與所靶向之基因序列互補或可為另一個序列。第一股與第二股亦可以結合，例如，利用額外之鹼基結合形成髮夾，或利用其他非鹼基鏈結基結合。

【0427】 一項具體例中，RNAi劑突出區之核苷酸可分別獨立地為經修飾或未經修飾核苷酸，包括(但不限於)，2’-糖修飾，如2-F、2’-O甲基、胸苷(T)、2`-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷(Teo)、2`-O-甲氧基乙基腺苷(Aeo)、2`-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷(m5Ceo)與其任何組合。例如，TT可為任一股的任一末端之突出序列。突出可與標靶mRNA形成錯配，或其可與所靶向之基因序列互補或可為另一個序列。

【0428】 RNAi劑之正義股、反義股或兩股之5’-或3’-突出可經過磷酸化。有些具體例中，突出區含有兩個核苷酸，其在這兩個核苷酸之間具有硫代磷酸酯，其中這兩個核苷酸可相同或不同。一項具體例中，突出存在於正義股、反義股或兩股之3’-端。一項具體例中，此3’-突出存在於反義股。一項具體例中，此3’-突出存在於正義股。

【0429】 RNAi劑可能僅含有單一突出，其可強化RNAi之干擾活性，不會影響整體安定性。例如，單股突出係位於正義股之3'末端，或者在反義股之3'末端。RNAi亦可能在反義股之5’-端(或正義股之3’-端)具有鈍端，或反之亦然。通常RNAi反義股在3’-端具有核苷酸突出，且5’-端為鈍端。在不希望受到理論限制下，反義股5’-端之不對稱鈍端與反義股3’-端之突出有利於該引導股進入RISC過程。

【0430】 一項具體例中，RNAi劑為兩個端均為長度為19個核苷酸之鈍端，其中該正義股含有在5’端起之位置7、8、9三個連續核苷酸為三個2’-F修飾之至少一個基序。反義股含有在5’端起之位置11、12、13三個連續核苷酸為三個2’-O-甲基修飾之至少一個基序。

【0431】 另一項具體例中，RNAi劑為兩個端均為長度為20個核苷酸之鈍端，其中該正義股含有在5’端起之位置8、9、10三個連續核苷酸為三個2’-F修飾之至少一個基序。反義股含有在5’端起之位置11、12、13三個連續核苷酸為三個2’-O-甲基修飾之至少一個基序。

【0432】 再一項具體例中，RNAi劑為兩個端均為長度為21個核苷酸之鈍端，其中該正義股含有在5’端起之位置9、10、11三個連續核苷酸為三個2’-F修飾之至少一個基序。反義股含有在5’端起之位置11、12、13三個連續核苷酸為三個2’-O-甲基修飾之至少一個基序。

【0433】 一項具體例中，RNAi劑包含21個核苷酸之正義股與23個核苷酸之反義股，其中該正義股含有在5’端起之位置9、10、11三個連續核苷酸為三個2’-F修飾之至少一個基序；反義股含有在5’端起之位置11、12、13三個連續核苷酸為三個2’-O-甲基修飾之至少一個基序，其中RNAi劑之一端為鈍端，而另一端包含2個核苷酸之突出。較佳係該2個核苷酸之突出位在反義股之3’-端。

【0434】 當2個核苷酸之突出在反義股3’-端時，可能在末端三個核苷酸之間有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結，其中這三個核苷酸中有兩個為突出核苷酸，第三個核苷酸為鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。一項具體例中，RNAi劑在正義股5’-端與反義股5’-端這兩端，在末端三個核苷酸之

間額外具有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結。一項具體例中，RNAi劑之正義股與反義股中每一個核苷酸(包括作為基序一部份之核苷酸)為經修飾核苷酸。一項具體例中，各殘基獨立地經2'-O-甲基或3'-氟修飾，例如，在交替基序。可視需要，RNAi劑進一步包含配體(較佳為GalNAc3)。

【0435】 一項具體例中，RNAi劑包含正義與反義股，其中正義股之長度為25-30個核苷酸殘基，其中從第一股5'末端核苷酸開始(位置1)位置1至23包含至少8個核糖核苷酸；反義股之長度為36-66個核苷酸殘基，且從3'末端核苷酸開始，在與正義股位置1-23配對形成雙螺旋之位置包含至少8個核糖核苷酸；其中至少反義股之3'末端核苷酸未與正義股配對，且至多6個連續3'末端核苷酸未與正義股配對，藉以形成1-6個核苷酸之3'單股突出；其中反義股5'末端包含10-30個未與正義股配對之連續核苷酸，藉以形成10至30個核苷酸之單股5'突出；其中當正義與反義股依最大互補性進行排比時，至少正義股5'末端及3'末端核苷酸與反義股之核苷酸形成鹼基對，藉以在正義股與反義股之間形成實質上雙螺旋區；且該反義股沿著反義股的至少19個核糖核苷酸長度與標靶RNA充份互補，可在該雙股核酸進入哺乳動物眼部細胞中時，降低標靶基因表現；且其中該正義股含有在三個連續核苷酸為三個2'-F修飾之至少一個基序，其中至少一個基序出現在裂解位點或接近裂解位點處。該反義股在裂解位點或接近裂解位點處含有在三個連續核苷酸為三個2'-O-甲基修飾之至少一個基序。

【0436】 一項具體例中，RNAi劑包含正義與反義股，其中RNAi劑包含長度為至少25個及至多29個核苷酸之第一股及長度為至多30個核苷酸之第二股，其具有自5'端起位置11、12、13連續三個核苷酸為三個2'-O-甲

基修飾之至少一個基序；其中第一股3’端與第二股5’端形成鈍端，且第二股之3’端比第一股長1至4個核苷酸，其中雙螺旋區之長度為至少25個核苷酸，且第二股與標靶mRNA沿著第二股至少19個核苷酸長度充份互補，當RNAi劑進入哺乳動物細胞中時，可以降低標靶基因表現，且其中dicer裂解RNAi劑較佳係產生包含第二股3’端之siRNA，藉以降低標靶基因在哺乳動物中之表現。該RNAi劑可視需要進一步包含配體。

【0437】 一項具體例中，RNAi劑之正義股有在三個連續核苷酸為三個相同修飾之至少一個基序，其中一個基序出現在正義股之裂解位點。

【0438】 一項具體例中，RNAi劑之反義股亦可含有在三個連續核苷酸為三個相同修飾之至少一個基序，其中一個基序出現在反義股之裂解位點或接近裂解位點處。

【0439】 當RNAi劑具有長度為17至23個核苷酸之雙螺旋區時，反義股之裂解位點通常約在自5’端起之10、11與12位置。因此，三個相同修飾之基序可能出現在反義股之9、10、11位置；10、11、12位置；11、12、13位置；12、13、14位置；或13、14、15位置，其係從反義股5’端起之第一個核苷酸開始算起，或從反義股5’端起之雙螺旋區內第一核苷酸對開始算起。反義股中之裂解位點亦可能隨RNAi從5’-端開始之雙螺旋區長度變化。

【0440】 RNAi劑之正義股可能在該股之裂解位點含有在三個連續核苷酸為三個相同修飾之至少一個基序；且反義股可能在該股之裂解位點或接近裂解位點處具有在三個連續核苷酸為三個相同修飾之至少一個基序。當正義股與反義股形成dsRNA雙螺旋時，正義股與反義股之排比可讓正義股的三個核苷酸之一個基序與反義股的三個核苷酸之一個基序具有至少一

個核苷酸重疊，亦即正義股之基序中三個核苷酸之至少一個與反義股之基序中三個核苷酸之至少一個形成鹼基對。或者，可能至少兩個核苷酸重疊，或可能所有三個核苷酸重疊。

【0441】 一項具體例中，RNAi 劑正義股可能含有在三個連續核苷酸為三個相同修飾之超過一個基序。該第一基序可能出現在該股之裂解位點或接近裂解位點，且該其他基序可能為側翼修飾。本文中術語「側翼修飾」係指出現在該股之另一部份之基序，其與出現在相同股之裂解位點或接近裂解位點之基序分開。該側翼修飾係與第一基序相鄰或分隔至少一個或更多個核苷酸。當彼等基序彼此緊鄰時，則該等基序之化學係彼此獨立地，且當基序之間分隔一個或多個核苷酸時，則其化學可能相同或不同。可能出現兩個或更多個側翼修飾。例如，當存在兩個側翼修飾時，各側翼修飾可能存在於相對於該裂解位點或接近裂解位點之第一基序之一端或在該前導基序之另一邊。

【0442】 如同正義股，RNAi劑之反義股可能包有在三個連續核苷酸為三個相同修飾之超過一個基序，其中至少一個基序出現在該股之裂解位點或接近裂解位點。此反義股亦可能包含一個或多個側翼修飾，其排比應類似出現在正義股之側翼修飾。

【0443】 一項具體例中，RNAi劑之正義股或反義股之側翼修飾通常不包括該股之3’-端、5’-端或兩端的第一個或兩個末端核苷酸。

【0444】 另一項具體例中，RNAi劑之正義股或反義股之側翼修飾通常不包括該股之3’-端、5’-端或兩端的雙螺旋區內第一對或兩對配對之核苷酸。

【0445】 當RNAi劑之正義股與反義股各含有至少一個側翼修飾時，該側翼修飾可能落在雙螺旋區之相同端，且具有一、二或三個核苷酸重疊。

【0446】 當RNAi劑之正義股與反義股各含有至少兩個側翼修飾時，正義股與反義股之排比可使各衍生自一股之兩個修飾落在雙螺旋區的一端，具有一、二或三個核苷酸重疊；各衍生自一股之兩個修飾落在雙螺旋區的另一端，具有一、二或三個核苷酸重疊；各衍生自一股之兩個修飾落在前導基序之每一邊，且在雙螺旋區有一、二或三個核苷酸重疊。

【0447】 一項具體例中，RNAi劑之正義股與反義股中每一個核苷酸(包括作為基序之一部份之核苷酸)可能經過修飾。各核苷酸可能經過相同或不同修飾法修飾，其可包括以下一或多種修改：一個或兩個非鏈結性磷酸酯態氧及/或一個或多個鏈結性磷酸酯態氧；修改核糖之組成，例如，核糖之2′羥基；以「去磷酸」鏈結基完全置換磷酸酯部份體；修飾或置換天然鹼基；及置換或修飾核糖-磷酸酯主幹。

【0448】 由於核酸為亞單位之聚合物，因此許多修飾出現在核酸內之重複位置，例如，鹼基或磷酸酯部份體或磷酸酯部份體之非鏈結性O之修飾。有些例子中，將在核酸之所有指定位置進行修飾，但許多例子中並未進行修飾。例如，可能僅在3’或5’末端位置進行修飾，可能僅在一個末端區進行，例如，在末端核苷酸之位置或在一股之最後2、3、4、5或10個核苷酸。可能在雙股區、單股區或二者進行修飾。可能僅在RNA之雙股區或可能僅在RNA之單股區進行修飾，例如，在非鏈結O位置之硫代磷酸酯修飾可能僅在一個或兩個末端、可能僅在末端區(例如，在一股之末端核苷酸位置或最後2、3、4、5、或10個核苷酸)、或可能在雙股與單股區(特定言之末

端)進行。一個或多個5’端可經磷酸化。

【0449】 為了例如，加強安定性，可能在突出中包括特定鹼基，或在單股突出(例如，5’或3’突出或二者)包括經修飾之核苷酸或核苷酸替代物。例如，希望在在突出中包括嘌呤核苷酸。有些具體例中，3’或5’突出中所有或有些鹼基可經修飾，例如，具有本文所說明之修飾。修飾法可包括，例如，可採用相關技藝上已知之修飾法在核糖之2’位置進行修飾，例如，改用去氧核糖核苷酸、2’-去氧-2’-氟(2’-F)或2’-O-甲基修飾替代核鹼基之核糖；及磷酸酯基團之修飾，例如，硫代磷酸酯修飾法。突出不一定與標靶序列同源。

【0450】 一項具體例中，正義股與反義股之各殘基獨立地經LNA、CRN、cET、UNA、HNA、CeNA、2’-甲氧基乙基、2’- O-甲基、2’-O-烯丙基、2’ -C-烯丙基、2’-去氧、2’-羥基、或2’-氟修飾。該股包含超過一個修飾。一項具體例中，正義股與反義股之各殘基獨立地經2’- O-甲基或2’-氟修飾。

【0451】 正義股與反義股通常出現至少兩種不同修飾。這兩種修飾可能為2’- O-甲基或2’-氟修飾，或其他。

【0452】 一項具體例中，N_a及/或N_b包含交替修飾型態。本文所採用語「交替基序」係指具有一或多種修飾之基序，各修飾係在一股之交替核苷酸進行。該交替核苷酸可能係指每隔一個核苷酸有一個修飾或每隔三個核苷酸有一個修飾，或類似型態。例如，若A、B與C分別代表核苷酸的一種修飾時，則該交替基序可為「ABABABABABAB...」、「AABBAABBAABB...」、「AABAABAABAAB...」、

「 AAABAAABAAAB... 」、「 AAABBBAAABBB... 」、或「ABCABCABCABC...」等等。

【0453】 交替基序中可能包括相同或不同之修飾型態。例如，若A、B、C、D分別代表核苷酸的一種修飾型態時，交替型態(亦即每隔一個核苷酸之修飾)可能相同，但各正義股或反義股之修飾型態可能分別選自交替基序中之數種修飾可能性，如:「ABABAB...」、「ACACAC...」、「BDBDBD...」或「CDCDCD...」等等。

【0454】 一項具體例中，本發明RNAi劑包含在正義股的交替基序之修飾型態相對於反義股的交替基序之修飾型態出現位移。該位移可使正義股核苷酸之經修飾基團對應於反義股核苷酸之經不同修飾之基團，且反之亦然。例如，當正義股與dsRNA雙螺旋中的反義股配對時，雙螺旋區內之正義股之交替基序可能始於該股之5'-3'之「ABABAB」，而反義股之交替基序可能始於該股之5'- 3'之「BABABA」。另一項實施例中，雙螺旋區內之正義股之交替基序可能始於該股之5'-3'之「AABBAABB」，而反義股之交替基序可能始於該股之5'-3'之「BBAABBAA」，因此正義股與反義股之間之修飾型態會出現完全或部份位移。

【0455】 一項具體例中，RNAi劑包含在正義股起始的2'-O-甲基修飾與2'-F修飾之交替基序型態相對於在反義股起始的2'-O-甲基修飾與2'-F修飾之交替基序型態出現位移，亦即正義股之2'-O-甲基修飾之核苷酸與反義股2'-F修飾之核苷酸形成鹼基對，且反之亦然。正義股之1-位置可能始於2'-F修飾，及反義股之1-位置可能始於2'-O-甲基修飾。

【0456】 在正義股及/或反義股引進一個或多個在三個連續核苷酸為

三個相同修飾之基序時，打斷正義股及/或反義股之原始修飾型態。這種在正義及/或反義股中引進一個或多個在三個連續核苷酸為三個相同修飾之基序而打斷正義及/或反義股之修飾型態時，驚人地加強該基因對標靶基因之靜默活性。

【0457】 一項具體例中，當在任一股中引進在三個連續核苷酸為三個相同修飾之基序時，鄰接該基序之核苷酸修飾為不同於該基序修飾之修飾。例如，包含該基序之序列部份為「...NaYYYNb...」，其中「Y」代表在三個連續核苷酸為三個相同修飾之基序之修飾，及「N_a」與「N_b」代表鄰接基序「YYY」之核苷酸之修飾，其不同於Y之修飾，且其中N_a與N_b可為相同或不同修飾。或者，當出現側翼修飾時，N_a及/或N_b可能存在或不存在。

【0458】 RNAi劑可能進一步包含至少一個硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結修飾可能出現在正義股或反義股或兩股之股中任何位置之任何核苷酸。例如，核苷酸間鏈結修飾可能出現在正義股及/或反義股之每一個核苷酸；各核苷酸間鏈結修飾可能呈交替型態出現在正義股及/或反義股；或正義股或反義股可能含有呈交替型態之兩種核苷酸間鏈結修飾。正義股核苷酸間鏈結之交替修飾型態可能與反義股相同或不同，正義股核苷酸間鏈結之交替修飾型態相對於反義股核苷酸間鏈結之交替修飾型態可能出現位移。一項具體例中，雙股RNAi劑包含6-8個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結。一項具體例中，反義股包含在5'-末端之兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結及在3'-末端之兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結，及正義股包含在5'-末端或3'-末端之至少兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結。

【0459】 一項具體例中，RNAi包含在突出區之硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結修飾。例如，突出區可能含有兩個核苷酸，其在兩個核苷酸之間具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結。亦可能進行核苷酸間鏈結基修飾來連結突出核苷酸與雙螺旋區內末端配對之核苷酸。例如，至少2、3、4個、或所有突出核苷酸可透過硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結來連結，且可視需要可能有額外硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結來連結該突出核苷酸與鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。例如，末端三個核苷酸之間可能有至少兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結，三個核苷酸中有兩個為突出核苷酸，第三個為鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。較佳係這三個末端核苷酸可在反義股3'-端、正義股3'-端、反義股5'-端、及/或反義股5'端。

【0460】 一項具體例中，2個核苷酸之突出在反義股3'-端，在末端三個核苷酸之間有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結，其中這三個核苷酸中的兩個為突出核苷酸，第三個核苷酸為鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。視需要，RNAi劑可以在正義股5'-端與反義股5'-端等兩端之末端三個核苷酸之間額外具有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結。

【0461】 一項具體例中，RNAi劑在雙螺旋內包含與標靶錯配(群)，或其組合。錯配可能發生於突出區或雙螺旋區。鹼基對可能依據其促進解離或熔解之傾向排序(例如，依據特定一對之結合或解離之自由能，最簡單之方法為逐對檢視該成核苷酸對，但亦可針對鄰接核苷酸，或採用類似分析法)。以促進解離而言：A：U優於G：C；G：U優於G：C；及I：C優於G：C (I=肌苷)。錯配，例如，非典型或典型以外之配對(如本文中其他說明)優

於典型(A：T、A：U、G：C)配對；且包括通用鹼基之配對優於典型配對。

【0462】 一項具體例中，RNAi劑包含雙螺旋區內反義股5’-端起前1、2、3、4、或5對鹼基中至少一對，其係分別獨立地選自：A：U、G：U、I：C，及錯配對，例如，非典型或典型以外之配對或包括通用鹼基之配對，以促進雙螺旋反義股5’-端之解離。

【0463】 一項具體例中，雙螺旋區中反義股5’-端起1-位置之核苷酸係選自下列各者所成群組：A、dA、dU、U、與dT。或者，雙螺旋區中反義股5’-端起第1、2或3鹼基對中至少一對為AU鹼基對。例如，雙螺旋區中反義股5’-端起第一鹼基對為AU鹼基對。

【0464】 另一項具體例中，正義股3’-端之核苷酸為去氧-胸腺嘧啶(dT)。另一項具體例中，反義股3’-端之核苷酸為去氧-胸腺嘧啶(dT)。一項具體例中，在正義股及/或反義股3’-端有短的去氧-胸腺嘧啶核苷酸序列，例如，兩個dT核苷酸。

【0465】 一項具體例中，正義股序列可由式(I)代表：

5' np-Na-(X X X)i-Nb-Y Y Y -Nb-(Z Z Z)j-Na-nq 3' (I)

其中：

i與j分別獨立地為0或1；

p與q分別獨立地為0-6；

各Na獨立地代表包含0-25個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列，各序列包含至少兩個經不同修飾之核苷酸；

各Nb獨立地代表包含0-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；；

各np與nq獨立地代表突出核苷酸；

其中Nb與Y不具有相同修飾；及

XXX、YYY與ZZZ分別獨立地代表在三個連續核苷酸為三個相同修飾之一個基序。較佳係YYY均為2'-F修飾核苷酸。

【0466】 一項具體例中，Na及/或Nb包含交替型態修飾。

【0467】 一項具體例中，YYY基序出現在或接近正義股之裂解位點。例如，當RNAi劑具有長度為17至23個核苷酸之雙螺旋區時，YYY基序可出現在正義股之裂解位點或接近裂解位點(例如，可出現在位置6、7、8；7、8、9；8、9、10；9、10、11；10、11、12；或11、12、13)，其係從5'-端第一個核苷酸開始算起；或可視需要從雙螺旋區內5'-端第一配對核苷酸對始算起。

【0468】 一項具體例中，i為1及j為0，或i為0及j為1，或i與j均為1。正義股因此可如下式代表：

5' np-Na-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3' (Ib)；

5' np-Na-XXX-Nb-YYY-Na-nq 3' (Ic)；或

5' np-Na-XXX-Nb-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3' (Id)。

【0469】 當正義股由式(Ib)代表時，N_b代表包含0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各N_a可獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0470】 當正義股由式(Ic)代表時，各N_b獨立地代表包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各N_a可獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0471】 當正義股由式(Id)代表時，各N_b獨立地代表包含0-10、0-7、

0-5、0-4、0-2或0個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。較佳係N_b為0、1、2、3、4、5或6。各N_a可獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0472】 各X、Y與Z可彼此相同或不同。

【0473】 其他具體例中，i為0及j為0，且正義股可如下式代表：

5' np-Na-YYY- Na-nq 3' (Ia)。

【0474】 當正義股由式(Ia)代表時，各Na獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0475】 一項具體例中，RNAi之反義股序列可由式(II)代表：

5' nq'-Na'-(Z'Z'Z')k-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(X'X'X')l-N'a-np' 3' (II)

其中：

k與l分別獨立地為0或1；

p'與q'分別獨立地為0-6；

各Na'獨立地代表包含0-25個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列，各序列包含至少兩個經不同修飾之核苷酸；

各Nb'獨立地代表包含0-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；

各np'與nq'分別獨立地代表突出核苷酸；

其中Nb'與Y'不具有相同修飾；及

X'X'X'、Y'Y'Y'與Z'Z'Z'分別獨立地代表在三個連續核苷酸為三個相同修飾之一個基序。

【0476】 一項具體例中，Na'及/或Nb'包含交替型態之修飾。

【0477】 Y'Y'Y'基序出現在或接近反義股裂解位點。例如，當RNAi

劑之雙螺旋區長度為17至23個核苷酸時，該Y'Y'Y'基序可發生於反義股之位置9、10、11；10、11、12；11、12、13；12、13、14；或13、14、15，其係從5'-端之第一個核苷酸開始計算；或可視需要從雙螺旋區內5'-端之第一配對核苷酸開始計算。較佳係該Y'Y'Y'基序出現在位置11、12、13。

【0478】 一項具體例中，Y'Y'Y'基序均為2'-OMe修飾核苷酸。

【0479】 一項具體例中，k為1及l為0，或k為0及l為1，或k與l均為1。

【0480】 因此反義股可如下式代表：

5' nq'-Na'-Z'Z'Z'-Nb'-Y'Y'Y'-Na'-np' 3'　(IIb)；

5' nq'-Na'-Y'Y'Y'-Nb'-X'X'X'-np' 3'　(IIc)；或

5' nq'-Na'- Z'Z'Z'-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'- X'X'X'-Na'-np' 3'　(IId)。

【0481】 當反義股由式(IIb)代表時，Nb'代表包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各Na'獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0482】 當反義股由式(IIc)代表時，Nb'代表代表包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各Na'獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0483】 當反義股由式(IId)代表時，各Nb'分別獨立地代表代表包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各Na'獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。較佳係Nb為0、1、2、3、4、5或6。

【0484】 其他具體例中，k為0及l為0，及反義股可如下式代表：

5' np'-Na'-Y'Y'Y'- Na'-nq' 3'　(Ia)。

【0485】 當反義股由式(IIa)代表時，各Na'獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0486】 各X'、Y'與Z'可彼此相同或不同。

【0487】 正義股與反義股之每一個核苷酸可獨立地經LNA、CRN、UNA、cEt、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C- 烯丙基、2'-羥基、或2'-氟修飾。例如，正義股與反義股之每一個核苷酸獨立地經2'-O-甲基或2'-氟修飾。特定言之，各X、Y、Z、X'、Y'與Z'可代表2'-O-甲基修飾或2'-氟修飾。

【0488】 一項具體例中，當RNAi劑之雙螺旋區為21個核苷酸時，其正義股可能含有出現在該股9、10與11位置之YYY基序，其係從5'-端第一個核苷酸開始算起，或可視需要從雙螺旋區內5'-端第一核苷酸對開始算起；及Y代表2'-F修飾。正義股可另外在雙螺旋區之相反末端含有XXX基序或ZZZ基序作為側翼修飾；及XXX與ZZZ分別獨立地代表2'-OMe修飾或2'-F修飾。

【0489】 一項具體例中，反義股可能包含出現在該股11、12與13位置之Y'Y'Y'基序，其係從5'-端第一個核苷酸開始算起，或可視需要從雙螺旋區內5'-端第一配對核苷酸開始算起；及Y'代表2'-O-甲基修飾。反義股可另外在雙螺旋區之相反末端包含X'X'X'基序或Z'Z'Z'基序作為側翼修飾；及X'X'X'基序或Z'Z'Z'分別獨立地代表2'-OMe修飾或2'-F修飾。

【0490】 由上式(Ia)、(Ib)、(Ic)、與(Id)中任一者代表之正義股可分別與式(IIa)、(IIb)、(IIc)、與(IId)中任一者代表之反義股形成雙螺旋。

【0491】 因此，本發明RNAi劑可包含正義股與反義股，每一股具有

14 至30個核苷酸，該RNAi雙螺旋係如式(III)代表：

正義： 5' np -Na-(X X X)i -Nb- Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j-Na-nq 3'

反義： 3' np'-Na'-(X'X'X')k-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(Z'Z'Z')l-Na'-nq' 5'

(III)

其中：

i、j、k、與l分別獨立地為0或1；

p、p'、q、與q'分別獨立地為0-6；

各Na與Na'獨立地代表包含0-25個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列，各序列包含至少兩個經不同修飾之核苷酸；

各Nb與Nb'獨立地代表包含0-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；

其中各np'、np、nq'、與nq，分別可能存在或不存在，獨立地代表突出核苷酸；及

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'，及Z'Z'Z'分別獨立地代表在三個連續核苷酸為三個相同修飾之一個基序。

【0492】 一項具體例中，i為0及j為0；或i為1及j為0；或i為0及j為1；或i與j均為0；或i與j均為1。另一項具體例中，k為0及l為0；或k為1及l為0；k為0及l為1；或k與l均為0；或k與l均為1。

【0493】 形成RNAi雙螺旋之正義股與反義股之例示性組合包括下式：

5' np - Na -Y Y Y -Na-nq 3'

3' np'-Na'-Y'Y'Y' -Na'nq' 5'

(IIIa)

5' np -Na -Y Y Y -Nb -Z Z Z -Na-nq 3'

3' np'-Na'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na'nq' 5'

(IIIb)

5' np-Na- X X X -Nb -Y Y Y - Na-nq 3'

3' np'-Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Na'-nq' 5'

(IIIc)

5' np -Na -X X X -Nb-Y Y Y -Nb- Z Z Z -Na-nq 3'

3' np'-Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na-nq' 5'

(IIId)

【0494】 當RNAi劑由式(IIIa)代表時，各Na獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0495】 當RNAi劑由式(IIIb)代表時，各Nb獨立地代表包含1-10、1-7、1-5或1-4個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各Na獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0496】 當RNAi劑由式(IIIc)代表時，各Nb、Nb'獨立地代表代表包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各Na獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0497】 當RNAi劑由式(IIId)代表時，各Nb、Nb'獨立地代表包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各Na、Na'獨立地代表包含2-20、2-15、或2-10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各Na、Na'、Nb與Nb'獨立地包含交替型態之修飾。

【0498】 式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、與(IIId)中各X、Y與Z可彼此相同或不同。

【0499】 當RNAi劑由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、與(IIId)代表時、至少一個Y核苷酸可與一個Y'核苷酸形成鹼基對。或者，至少兩個Y核苷酸與對應Y'核苷酸形成鹼基對；或所有三個Y核苷酸均與對應Y'核苷酸形成鹼基對。

【0500】 當RNAi劑由式(IIIb)或(IIId)代表時，至少一個Z核苷酸可與一個Z'核苷酸形成鹼基對。或者，至少兩個Z核苷酸可與對應Z'核苷酸形成鹼基對；或所有三個Z核苷酸均與對應Z'核苷酸形成鹼基對。

【0501】 當RNAi劑由式(IIIc)或(IIId)代表時，至少一個X核苷酸可與一個X'核苷酸形成鹼基對。或者，至少兩個X核苷酸可與對應X'核苷酸形成鹼基對；或所有三個X核苷酸均與對應X'核苷酸形成鹼基對。

【0502】 一項具體例中，Y核苷酸之修飾不同於Y'核苷酸之修飾，Z核苷酸之修飾不同於Z'核苷酸之修飾，及/或X核苷酸之修飾不同於X'核苷酸之修飾。

【0503】 一項具體例中，當RNAi劑由式(IIId)代表時，Na修飾為2'-O-甲基或2'-氟修飾。另一項具體例中，當RNAi劑由式(IIId)代表時，Na修飾為2--O-甲基或2--氟修飾，及np' >0，及至少一個np'利用硫代磷酸酯鏈結連結相鄰核苷酸。再另一項具體例中，當RNAi劑由式(IIId)代表時，Na修飾為2--O-甲基或2-氟修飾，np' >0，及至少一個np'利用硫代磷酸酯鏈結連結相鄰核苷酸，及正義股係接合透過二價或三價分支鏈結基(如下說明)附接之一個或多個GalNAc衍生物。另一項具體例中，當RNAi劑由式(IIId)

代表時，Na修飾為2-O-甲基或2-氟修飾，np′>0，及至少一個np′利用硫代磷酸酯鏈結連結相鄰核苷酸，正義股包含至少一個硫代磷酸酯鏈結，及正義股係接合透過二價或三價分支鏈結基附接之一個或多個GalNAc衍生物。

【0504】 一項具體例中，當RNAi劑由式(IIIa)代表時，Na修飾為2-O-甲基或2-氟修飾，np′ >0，及至少一個np′利用硫代磷酸酯鏈結連結相鄰核苷酸，正義股包含至少一個硫代磷酸酯鏈結，及正義股係接合透過二價或三價分支鏈結基附接之一個或多個GalNAc衍生物。

【0505】 一項具體例中，RNAi劑為包含至少兩個如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、與(IIId)代表之雙螺旋之多聚體，其中雙螺旋係利用鏈結基連接。該鏈結基可以裂解或不可以裂解。該多聚體可視需要進一步包含配體。各雙螺旋可靶向相同基因或兩個不同基因；或各雙螺旋可靶向兩個不同標靶位點之相同基因。

【0506】 一項具體例中，RNAi劑為包含三個、四個、五個、六個或更多個如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、與(IIId)所代表雙螺旋之多聚體，其中雙螺旋係利用鏈結基連接。該鏈結基可以裂解或不可以裂解。該多聚體可視需要進一步包含配體。各雙螺旋可靶向相同基因或兩個不同基因；或各雙螺旋可靶向兩個不同標靶位點之相同基因。

【0507】 一項具體例中，兩個如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、與(IIId)代表之RNAi劑係在5’端彼此連接，且其中一個或兩個3’端可視需要接合配體。各製劑可靶向相同基因或兩個不同基因；或各製劑可靶向兩個不同標靶位點之相同基因。

【0508】 某些具體例中，本發明RNAi劑可含有少量含2’-氟修飾之核

苷酸，例如，10個或更少個具2'-氟修飾之核苷酸。例如，RNAi劑可含有10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0個具2'-氟修飾之核苷酸。明確具體例中，本發明RNAi劑含有10個具2'-氟修飾之核苷酸，例如，在正義股的4個具2'-氟修飾之核苷酸，及在反義股的6個具2'-氟修飾之核苷酸。另一項明確具體例中，本發明RNAi劑含有6個具2'-氟修飾之核苷酸，例如，在正義股的4個具2'-氟修飾之核苷酸，及在反義股的2個具2'-氟修飾之核苷酸。

【0509】 其他具體例中，本發明RNAi劑可含有超少量含2'-氟修飾之核苷酸，例如，2個或更少個含2'-氟修飾之核苷酸。例如，RNAi劑可含有2、1或0個具2'-氟修飾之核苷酸。在明確具體例中，RNAi劑可含有2個具2'-氟修飾之核苷酸，例如，在正義股的0個具2'-氟修飾之核苷酸及在反義股的2個具2'-氟修飾之核苷酸。

【0510】 有各種不同文獻說明本發明方法可使用之多聚體RNAi劑。此等文獻包括 WO2007/091269、美國專利案案號7858769、WO2010/141511、WO2007/117686、WO2009/014887與WO2011/031520，其完整內容已分別以引用之方式併入本文中。

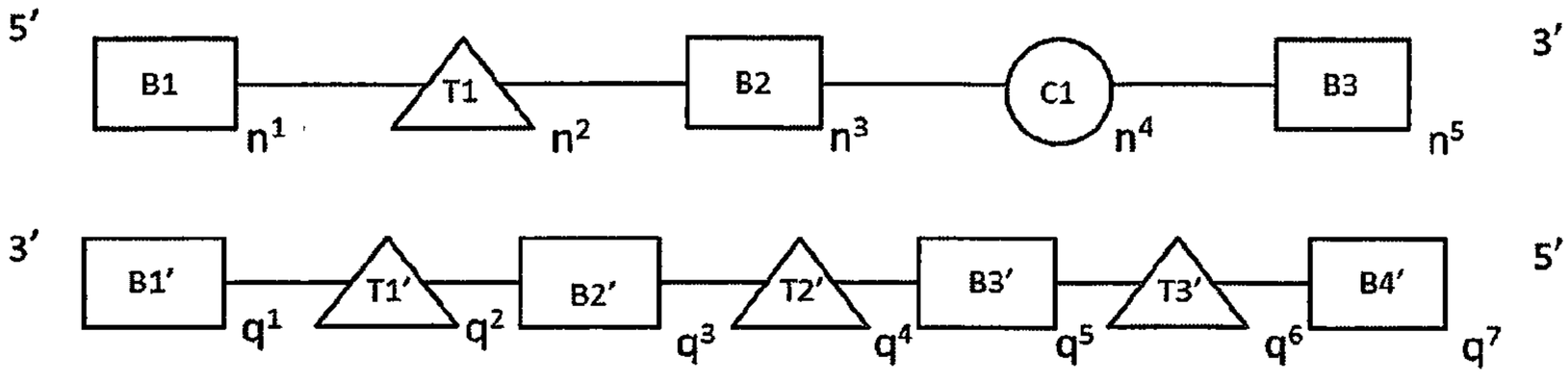
【0511】 如下文更詳細說明，含有一或多個碳水化合物部份體與RNAi劑之接合物之RNAi劑可使一或多種RNAi劑之性質達最佳化。許多例子中，由碳水化合物部份體附接RNAi劑之經修飾亞單位。例如，dsRNA劑之一個或多個核糖核苷酸亞單位之核糖可被另一個部份體置換，例如，附接碳水化合物配體之非碳水化合物(較佳為環狀)載子。依此方式置換亞單位中核糖之核糖核苷酸亞單位在本文中稱為核糖置換修飾亞單位(RRMS)。環狀載子可能為碳環狀環系(亦即所有環原子均為碳原子)或雜環狀環系

(亦即一個或多個環原子可能為雜原子，例如，氮、氧、硫)。該環狀載子可能為單環狀環系，或可能包含兩個或更多個環，例如，稠合環。環狀載子可能為完全飽和環系，或其可能包含一個或多個雙鍵。

【0512】 配體可利用載子附接多核苷酸。載子包括(i)至少一個「主幹附接點」，較佳係兩個「主幹附接點」，與(ii)至少一個「繫鏈附接點」。本文所採用「主幹附接點」係指官能基，例如，羥基，或通常為可用於或適合將載子納入主幹中之鍵結，例如，核糖核酸之磷酸根、或經修飾磷酸根(例如，含硫)主幹。有些具體例中，「繫鏈附接點」(TAP)係指環狀載子之環組成原子，例如，碳原子或雜原子(不同於提供一個主幹附接點之原子)，其連接所選定之部份體。部份體可為例如，碳水化合物，例如，單糖、雙醣、參醣、肆醣、寡醣、與多醣。視需要，該選定之部份體係利用穿插之系鏈連接該環狀載子。因此該環狀載子經常包括適合引進或系鏈另一個化學實體(例如，配體)至組成環之官能基，例如，胺基，或通常提供一個鍵結。

【0513】 RNAi劑可利用載子接合配體，其中該載子可為環狀基團或無環基團；較佳係該環狀基團選自：吡咯啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、哌啶基、哌呯基、[1,3]二氧雜環戊烷基、噁唑啶基、異噁唑啶基、嗎啉基、噻唑啶基、異噻唑啶基、喹噁啉基、嗒呯酮基、四氫呋喃基、與十氫萘；較佳係該無環基團選自：絲胺醇主幹或二乙醇胺主幹。

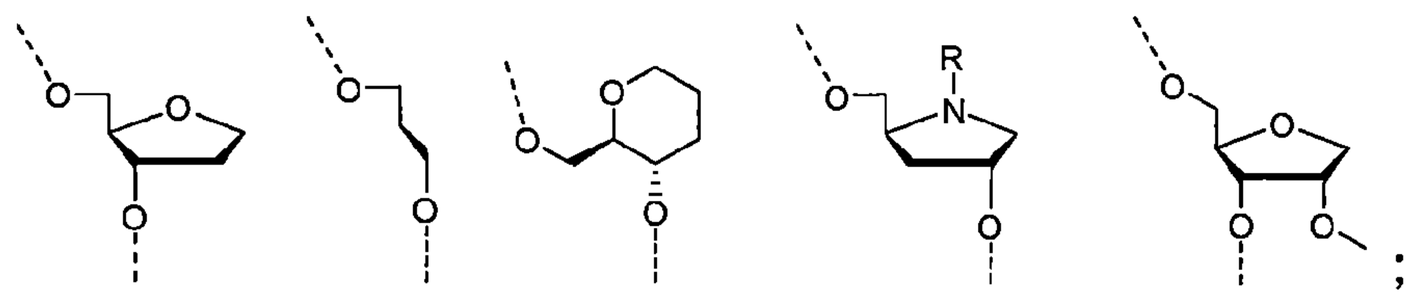
【0514】 另一項態樣中，該dsRNA劑包含正義股與反義股，各股具有14至40個核苷酸。dsRNA劑係由式(I)代表：



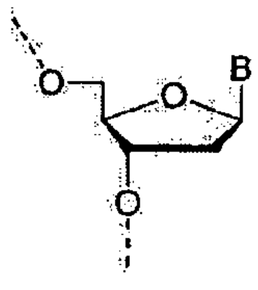
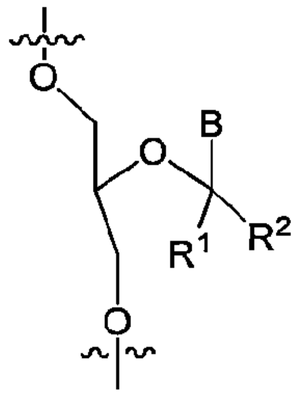
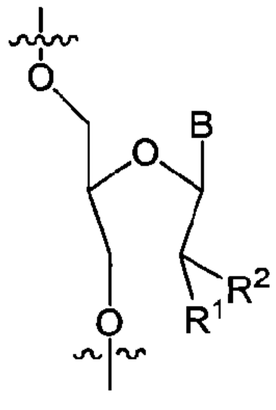
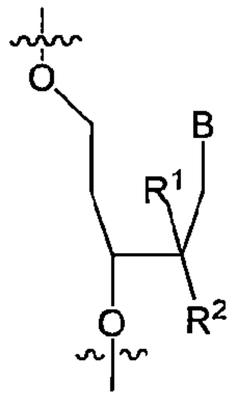
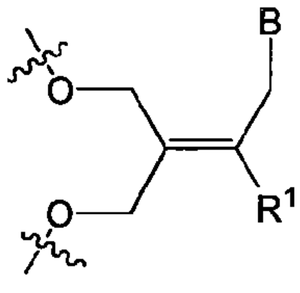
(I)，

式(I)中，B1、B2、B3、B1’、B2’、B3’、與B4’分別獨立地為含有自下列各者所成群組選擇之修飾之核苷酸：2’-O-烷基、2’-經取代之烷氧基、2’-經取代之烷基、2’-鹵基、ENA、與BNA/LNA。一項具體例中，B1、B2、B3、B1’、B2’、B3’、與B4’分別含有2’-OMe修飾。一項具體例中，B1、B2、B3、B1’、B2’、B3’、與B4’分別含有2’-OMe或2’-F修飾。一項具體例中，B1、B2、B3、B1’、B2’、B3’、與B4’中至少一個含有2'-O-N-甲基乙醯胺基(2'-O-NMA)修飾。

【0515】 C1為在反義股種子區(亦即在反義股5’-端之位置2-8)之相反位點之熱失穩性核苷酸。例如，C1在正義股之位置係反義股5’-端位置2-8之核苷酸配對。一項實施例中，C1在正義股5’-端起之位置15。C1核苷酸帶有熱失穩修飾，其可包括無鹼基修飾；與雙螺旋中相反核苷酸之錯配；及糖修飾，如2’-去氧修飾或無環核苷酸，例如，非鎖核酸(UNA)或甘油核酸(GNA)。一項具體例中，C1具有自下列各者所成群組選擇之熱失穩修飾：i)與反義股中相反核苷酸之錯配；ii)自下列各者所成群組選擇之無鹼基修飾：



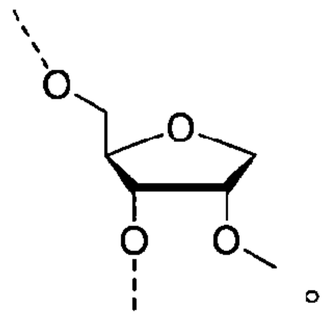
及iii) 自下列各者所成群組選擇之糖修飾：

2'-去氧 、 、 、 、 、與

，

其中B為經修飾或未修飾核鹼基，R1與R2獨立地為H、鹵素、OR3、或烷基；及R3為H、烷基、環烷基、芳基、芳烷基、雜芳基或糖。一項具體例中，C1中之熱失穩修飾為自下列各者所成群組選擇之錯配：G：G、G：A、G：U、G：T、A：A、A：C、C：C、C：U、C：T、U：U、T：T、與U：T；及視需要在錯配對中至少一個核鹼基為2'-去氧核鹼基。一項實施例中，C1中熱失穩修飾為GNA或



。

【0516】 T1、T1'、T2'、與T3'分別獨立地代表核苷酸，其包含之修飾可以讓該核苷酸之立體位阻低於或等於2'-OMe修飾之立體位阻。立體位阻係指修飾之立體效應總和。測定核苷酸修飾之立體效應之方法係相關技藝習知者。該修飾可在核苷酸之核糖之糖2'位置，或可修飾成非核糖核苷酸、無環核苷酸、或讓核苷酸之主幹類似或等於核糖之糖2'位置，並讓該核苷酸之立體位阻低於或等於2'-OMe修飾之立體位阻。例如，T1、T1'、T2'、與T3'分別獨立地選自：DNA、RNA、LNA、2'-F、與2'-F-5'-甲基。

一項具體例中，T1為DNA。一項具體例中，T1’為DNA、RNA或LNA。一項具體例中，T2’為DNA或RNA。一項具體例中，T3’為DNA或RNA。

【0517】 n1、n3、與q1分別獨立地為4至15個核苷酸之長度。

【0518】 n5、q3、與q7分別獨立地為1-6個核苷酸之長度。

【0519】 n4、q2、與q6分別獨立地為1-3個核苷酸之長度；或者，n4為0。

【0520】 q5分別獨立地為0-10個核苷酸之長度。

【0521】 n2與q4分別獨立地為0-3個核苷酸之長度。

【0522】 或者，n4為0-3個核苷酸之長度。

【0523】 一項具體例中，n4可為0。一項實施例中，n4為0，及q2與q6為1。另一項具體例中，n4為0，及q2，及q6為1，其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。

【0524】 一項具體例中，n4、q2、與q6各為1。

【0525】 一項具體例中，n2、n4、q2、q4、與q6各為1。

【0526】 一項具體例中，當正義股之長度為19-22個核苷酸，及n4為1時，C1在正義股5’-端之位置14-17。一項具體例中，C1在正義股5’-端之位置15。

【0527】 一項具體例中，T3’始於反義股5’端起之位置2。一項實施例中，T3’在反義股5’端起之位置2及q6等於1。

【0528】 一項具體例中，T1’始於反義股5’端起之位置14。一項實施

例中，T1’在反義股5’端起之位置14及q2等於1。

【0529】 一項實施例中，T3’始於反義股5’端起之位置2及T1’始於反義股5’端起之位置14。一項實施例中，T3’始於反義股5’端起之位置2及q6等於1，及T1’始於反義股5’端起之位置14及q2等於1。

【0530】 一項具體例中，T1’與T3’分隔11個核苷酸之長度(亦即不算入T1’與T3’核苷酸)。

【0531】 一項具體例中，T1’在反義股5’端起之位置14。一項實施例中，T1’在反義股5’端起之位置14及q2等於1，及該修飾係在2’位置或或在非核糖、無環或主幹可提供低於2’-OMe核糖之立體位阻之位置。

【0532】 一項具體例中，T3’在反義股5’端起之位置2。一項實施例中，T3’在反義股5’端起之位置2及q6等於1，及該修飾係在2’位置或在非核糖、無環或主幹可提供低於或等於2’-OMe核糖之立體位阻之位置。

【0533】 一項具體例中，T1係在正義股之裂解位點。一項實例中，當正義股之長度為19-22個核苷酸及n2為1時，T1在從正義股5’端起之位置11。一項具體例中，當正義股之長度為19-22個核苷酸及n2為1時，T1係在正義股從正義股5’端起之位置11之裂解位點。

【0534】 一項具體例中，T2’始於反義股5’端之位置6。一項實施例中，T2’在反義股5’端起之位置6-10及q4為1。

【0535】 一項例示性具體例中，當正義股之長度為19-22個核苷酸及n2為1時，T1係在正義股之裂解位點，例如，在從正義股5’端起之位置11；T1’在反義股5’端起之位置14及q2等於1，及T1’之修飾係在核糖之糖2’位置或在非核糖、無環或主幹可提供低於2’-OMe核糖之立體位阻之位置；T2’

在反義股5’端起之位置6-10及q4為1；及T3’在反義股5’端起之位置2及q6等於1，及T3’之修飾係在2’位置或在非核糖、無環或主幹可提供低於或等於2’-OMe核糖之立體位阻之位置。

【0536】 一項具體例中，T2’始於從反義股5’端起之位置8。一項實施例中，T2’始於從反義股5’端起之位置8及q4為2。

【0537】 一項具體例中，T2’始於從反義股5’端起之位置9。一項實施例中，T2’為從反義股5’端起之位置9及q4為1。

【0538】 一項具體例中，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為1，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為6，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。

【0539】 一項具體例中，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為1，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為6，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。

【0540】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2

為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。

【0541】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。

【0542】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為6，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為7，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。

【0543】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為6，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為7，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間

鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。

【0544】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為1，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為6，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。

【0545】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為1，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為6，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。

【0546】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為5，T2’為2’-F，q4為1，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；視需要在反義股3’-端具有至少2個額外的TT。

【0547】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2

為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為5，T2’為2’-F，q4為1，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；視需要在反義股3’-端具有至少2個額外的TT；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。

【0548】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。

【0549】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)。

【0550】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2

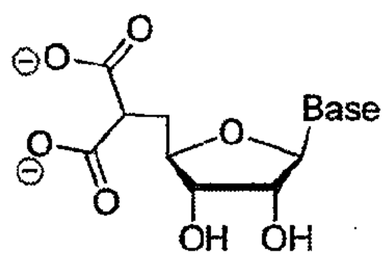
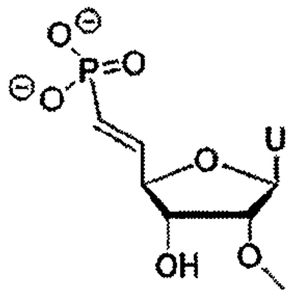
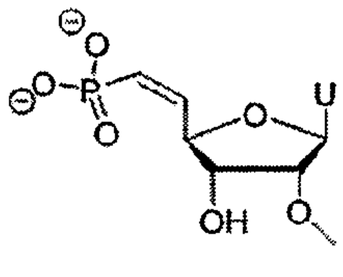
為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1。

【0551】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。

【0552】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1。

【0553】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正

義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。

【0554】 dsRNA劑可在正義股或反義股5’-端包含含磷基團。5’-端含磷基團可為5’-端磷酸酯(5’-P)、5’-端硫代磷酸酯(5’-PS)、5’-端二硫代磷酸酯(5’-PS2)、5’-端乙烯基膦酸酯(5’-VP)、5’-端甲基膦酸酯(MePhos)、或5’-去氧-5’-C-丙二醯基()。當5’-端含磷基團為5’-端乙烯基膦酸酯(5’-VP)時，該5’-VP可為5’-E-VP異構物(亦即反式乙烯基磷酸酯， )、5’-Z-VP異構物(亦即順式乙烯基磷酸酯， )、或其混合物。

【0555】 一項具體例中，該dsRNA劑在正義股5’-端包含含磷基團。一項具體例中，該dsRNA劑在反義股5’-端包含含磷基團。

【0556】 一項具體例中，該dsRNA劑包含5’-P。一項具體例中，該dsRNA劑在反義股中包含5’-P。

【0557】 一項具體例中，該dsRNA劑包含5’-PS。一項具體例中，該dsRNA劑在反義股中包含5’-PS。.

【0558】 一項具體例中，該dsRNA劑包含5’-VP。一項具體例中，該

dsRNA劑在反義股中包含5’-VP。一項具體例中，該dsRNA劑在反義股中包含5’-E-VP。一項具體例中，該dsRNA劑在反義股中包含5’-Z-VP。

【0559】 一項具體例中，該dsRNA劑包含5’-PS2。一項具體例中，該dsRNA劑在反義股中包含5’-PS2。

【0560】 一項具體例中，該dsRNA劑包含5’-PS2。一項具體例中，該dsRNA劑在反義股中包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基。

【0561】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-PS。

【0562】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-P。

【0563】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-VP。5’-VP可為5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合。

【0564】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’- PS2。

【0565】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基。

【0566】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-P。

【0567】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-

OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-PS。

【0568】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-VP。5’-VP可為5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合。

【0569】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’- PS2。

【0570】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2

為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基。

【0571】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-P。

【0572】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-PS。

【0573】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及

q7為1。dsRNA劑亦包含5’-VP。5’-VP可為5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合。

【0574】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-PS2。

【0575】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基。

【0576】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-P。

【0577】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為

0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-PS。

【0578】一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-VP。5’-VP可為5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合。

【0579】一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-PS2。

【0580】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基。

【0581】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’- P。

【0582】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’- PS。

【0583】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-

F，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’- VP。5’-VP可為5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合。

【0584】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-PS2。

【0585】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基。

【0586】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’- P。

【0587】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe

或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’- PS。

【0588】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’- VP。5’-VP可為5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合。

【0589】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間

鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-PS2。

【0590】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基。

【0591】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’- P。

【0592】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’- PS。

【0593】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為

0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’- VP。5’-VP可為5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合。

【0594】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-PS2。

【0595】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基。

【0596】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’- P。

【0597】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe

或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’- PS。

【0598】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’- VP。5’-VP可為5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合。

【0599】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾

(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-PS2。

【0600】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基。

【0601】 一項具體例中，本發明dsRNA劑之100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%或30%係經修飾。例如，當50% dsRNA劑經修飾時，dsRNA劑中所有核苷酸之50%含有本文說明之修飾。

【0602】 一項具體例中，dsRNA劑之各正義股與反義股獨立地經無環核苷酸、LNA、HNA、CeNA、2’-甲氧基乙基、2’- O-甲基、2’-O-烯丙基、2’-C-烯丙基、2’-去氧、2’-氟、2'-O-N-甲基乙醯胺基(2'-O-NMA)、2'-O-二甲基胺基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-胺基丙基 (2'-O-AP)、或2'-ara-F修飾。

【0603】 一項具體例中，dsRNA劑之各正義股與反義股含有至少兩種不同修飾。

【0604】 一項具體例中，式(I)dsRNA劑進一步包含長度為1-10個核苷酸之3’及/或5’突出。一項實施例中，式(I)dsRNA劑包含在反義股3’-端之

3’突出與反義股5’-端之鈍端。另一項實施例中，dsRNA劑在正義股5’-端具有5’突出。

【0605】 一項具體例中，本發明dsRNA劑不含有任何2’-F修飾。

【0606】 一項具體例中，dsRNA劑之正義股及/或反義股包含一段或多段之硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結區段。一項實施例中，正義股包含一段兩個硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結區段。一項實施例中，反義股包含兩段兩個硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結區段。例如，兩段硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結區段之間分隔16-18個磷酸酯之核苷酸間鏈結。

【0607】 一項具體例中，dsRNA劑之各正義股與反義股具有15-30個核苷酸。一項實例中，正義股具有19-22個核苷酸，及反義股具有19-25個核苷酸。另一項實例中，正義股具有21個核苷酸，及反義股具有23個核苷酸。

【0608】 一項具體例中，雙螺旋反義股5’-端位置1之核苷酸係選自下列各者所成群組：A、dA、dU、U、與dT。一項具體例中，從反義股5’-端起第一、第二、與第三鹼基對中至少一對為AU鹼基對。

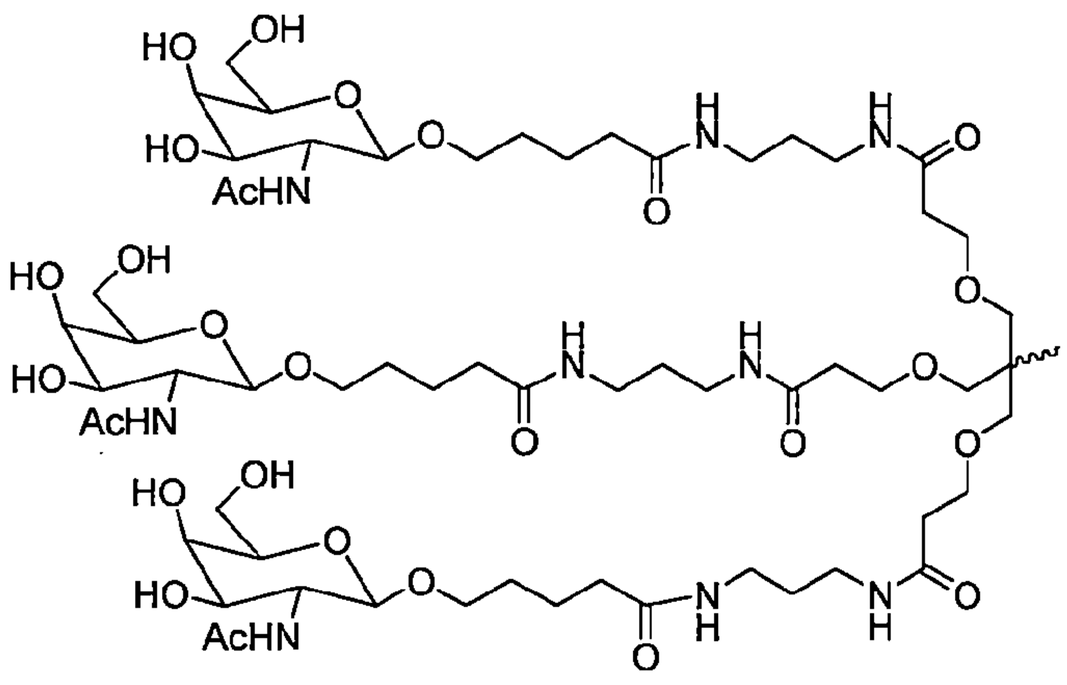
【0609】 一項具體例中，本發明dsRNA劑之反義股係與標靶RNA呈100%互補雜交，並透過RNA干擾來抑制其表現。另一項具體例中，本發明dsRNA劑之反義股係與標靶RNA至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%、或至少50%互補。

【0610】 一項態樣中，本發明係有關一種如本文定義之可以抑制標靶基因表現之dsRNA劑。dsRNA劑包含正義股與反義股，各股具有14至40個

核苷酸。正義股包含至少一個熱失穩性核苷酸，其中至少一個該熱失穩性核苷酸出現在或接近與反義股種子區(亦即反義股5'-端之位置2-8)相反之位點。本說明書中與式(I)代表之dsRNA相關之各具體例與態樣亦可應用在包含熱失穩性核苷酸之dsRNA。

【0611】 當正義股之長度為21個核苷酸時，熱失穩性核苷酸可以出現在例如，正義股5'-端之位置14-17之間。反義股包含至少兩個經修飾核酸，其在立體位阻上小於2'-OMe修飾。較佳係該兩個在立體位阻小於2'-OMe之經修飾核酸係分隔11個核苷酸之長度。例如，兩個經修飾核酸位在反義股5'端之位置2與14。

【0612】 一項具體例中，dsRNA劑進一步包含至少一個ASGPR配體。例如，ASGPR配體為透過二價或三價分支鏈結基附接之一個或多個GalNAc衍生物，如：



。一項實例中，ASGPR配體係附接正義股3'端。

【0613】 例如，如本文定義之dsRNA劑可包含i)在正義股或反義股5'-端之含磷基團；ii)其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5'-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之

核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)；及iii)在正義股或反義股5’-端或3’-端之配體，如：ASGPR配體(例如，一個或多個GalNAc衍生物) 例如，配體可在正義股3’-端。

【0614】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-P與靶向配體。一項具體例中，5’-P係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0615】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-PS與靶向配體。一項具體例中，5’-PS係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0616】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2

為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-VP (例如，5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合)、與靶向配體。一項具體例中，5’-VP係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0617】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’- PS2與靶向配體。一項具體例中，5’-PS2係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0618】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-

OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基與靶向配體。一項具體例中，5’-去氧-5’-C-丙二醯基係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0619】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-P與靶向配體。一項具體例中，5’-P係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0620】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從

5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-PS與靶向配體。一項具體例中，5’-PS係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0621】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-VP (例如，5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合)與靶向配體。一項具體例中，5’-VP係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0622】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-PS2與靶向配體。一項具體例中，5’-PS2係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0623】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2

為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-OMe，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基與靶向配體。一項具體例中，5’-去氧-5’-C-丙二醯基係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0624】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-P與靶向配體。一項具體例中，5’-P係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0625】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-

F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-PS與靶向配體。一項具體例中，5’-PS係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0626】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-VP (例如，5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合)與靶向配體。一項具體例中，5’-VP係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0627】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間

鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-PS2與靶向配體。一項具體例中，5’-PS2係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0628】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，T2’為2’-F，q4為2，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為5，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基與靶向配體。一項具體例中，5’-去氧-5’-C-丙二醯基係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0629】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-P與靶向配體。一項具體例中，5’-P係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0630】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2

為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’- PS與靶向配體。一項具體例中，5’-PS係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0631】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’- VP (例如，5’-E-VP、5’-Z-VP、或其組合)與靶向配體。一項具體例中，5’-VP係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0632】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為

1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’- PS2與靶向配體。一項具體例中，5’-PS2係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0633】 一項具體例中，B1為2’-OMe或2’-F，n1為8，T1為2’F，n2為3，B2為2’-OMe，n3為7，n4為0，B3為2’-OMe，n5為3，B1’為2’-OMe或2’-F，q1為9，T1’為2’-F，q2為1，B2’為2’-OMe或2’-F，q3為4，q4為0，B3’為2’-OMe或2’-F，q5為7，T3’為2’-F，q6為1，B4’為2’-F，及q7為1；其中在正義股之位置1-5內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從正義股5’-端算起)，及在反義股之位置1與2有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾及在反義股之位置18-23內有兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結修飾(從反義股5’-端算起)。dsRNA劑亦包含5’-去氧-5’-C-丙二醯基與靶向配體。一項具體例中，5’-去氧-5’-C-丙二醯基係在反義股5’-端，及靶向配體係在正義股3’-端。

【0634】 一項特定具體例中，本發明dsRNA劑包含：

正義股，其具有：

21個核苷酸之長度；

(ii) 視需要附接3’-端之ASGPR配體，其中該ASGPR配體包含透過三價分支鏈結基附接之三個GalNAc衍生物；及

(iii) 在位置1、3、5、7、9至11、13、17、19、與21之2’-F修飾，及在位置2、4、6、8、12、14至16、18、與20之2’-OMe修飾(從5’端算起)；

及

(b) 反義股，其具有：

23個核苷酸之長度；

(ii)在位置1、3、5、9、11至13、15、17、19、21、與23之2’-OMe修飾，及在位置2、4、6至8、10、14、16、18、20、與22之2’F修飾(從5’端算起)；及

(iii)在核苷酸位置21與22之間及在核苷酸位置22與23之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

其中dsRNA劑具有在反義股3’-端之兩個核苷酸之突出，及反義股5’-端之鈍端。

【0635】 另一項特定具體例中，本發明dsRNA劑包含：

正義股，其具有：

21個核苷酸之長度；

(ii)視需要附接3’-端之ASGPR配體，其中該ASGPR配體包含透過三價分支鏈結基附接之三個GalNAc衍生物；

(iii)在位置1、3、5、7、9至11、13、15、17、19、與21之2’-F修飾，及在位置2、4、6、8、12、14、16、18、與20之2’-OMe修飾(從5’端算起)；及

(iv)在核苷酸位置1與2之間及在個核苷酸位置2與3之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

及

(b)反義股，其具有：

23個核苷酸之長度；

(ii)在位置1、3、5、7、9、11至13、15、17、19、與21至23之2'-OMe修飾，及位置2、4、6、8、10、14、16、18、與20之2'F修飾(從5'端算起)；及

(iii)在核苷酸位置1與2之間、在核苷酸位置2與3之間、在核苷酸位置21與22之間、及在核苷酸位置22與23之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5'端算起)；

其中dsRNA劑具有在反義股3'-端之兩個核苷酸之突出，及反義股5'-端之鈍端。

【0636】 另一項特定具體例中，本發明dsRNA劑包含：

正義股，其具有：

21個核苷酸之長度；

(ii) 視需要附接3'-端之ASGPR配體，其中該ASGPR配體包含透過三價分支鏈結基附接之三個GalNAc衍生物；

(iii) 位置1至6、8、10、與12至21之2'-OMe修飾、位置7與9之2'-F修飾、及位置11之去氧-核苷酸(例如，dT) (從5'端算起)；及

(iv) 在核苷酸位置1與2之間及在核苷酸位置2與3之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5'端算起)；

及

(b)反義股，其具有：

23個核苷酸之長度；

(ii)在位置1、3、7、9、11、13、15、17、與19至23之2'-OMe修飾，及在位置2、4至6、8、10、12、14、16、與18之2'-F修飾(從5'端算起)；及

(iii)在核苷酸位置1與2之間、在核苷酸位置2與3之間、在核苷酸位置21與22之間、及在核苷酸位置22與23之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

其中dsRNA劑具有在反義股3’-端之兩個核苷酸之突出，及反義股5’-端之鈍端。

【0637】 另一項特定具體例中，本發明dsRNA劑包含：

正義股，其具有：

21個核苷酸之長度；

(ii) 視需要附接3’-端之ASGPR配體，其中該ASGPR配體包含透過三價分支鏈結基附接之三個GalNAc衍生物；

(iii)在位置1至6、8、10、12、14、與16至21之2’-OMe修飾，及在位置7、9、11、13、與15之2’-F修飾；及

(iv) 在核苷酸位置1與2之間及在核苷酸位置2與3之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

及

(b)反義股，其具有：

23個核苷酸之長度；

(ii)在位置1、5、7、9、11、13、15、17、19、與21至23之2’-OMe修飾，及在位置2至4、6、8、10、12、14、16、18、與20之2’-F修飾(從5’端算起)；及

(iii) 在核苷酸位置1與2之間、在核苷酸位置2與3之間、在核苷酸位置21與22之間、及在核苷酸位置22與23之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

其中dsRNA劑具有在反義股3’-端之兩個核苷酸之突出，及反義股5’-端之鈍端。

【0638】 另一項特定具體例中，本發明dsRNA劑包含：

正義股，其具有：

21個核苷酸之長度；

(ii) 視需要附接3’-端之ASGPR配體，其中該ASGPR配體包含三個透過三價分支鏈結基附接之三個GalNAc衍生物；

(iii) 在位置1至9、與12至21之2’-OMe修飾，及在位置10與11之2’-F修飾；及

(iv) 在核苷酸位置1與2之間、在核苷酸位置2與3之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

及

(b)反義股，其具有：

23個核苷酸之長度；

(ii)在位置1、3、5、7、9、11至13、15、17、19、與21至23之2’-OMe修飾，及在位置2、4、6、8、10、14、16、18、與20之2’-F修飾(從5’端算起)；及

(iii)在核苷酸位置1與2之間、在核苷酸位置2與3之間、在核苷酸位置21與22之間、及在核苷酸位置22與23之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

其中dsRNA劑具有在反義股3’-端之兩個核苷酸之突出，及反義股5’-端之鈍端。

【0639】 另一項特定具體例中，本發明dsRNA劑包含：

正義股，其具有：

21個核苷酸之長度；

(ii)　視需要附接3’-端之ASGPR配體，其中該ASGPR配體包含透過三價分支鏈結基附接之三個GalNAc衍生物；

(iii)在位置1、3、5、7、9至11、與13之2’-F修飾，及在位置2、4、6、8、12、與14至21之2’-OMe修飾；及

(iv)　在核苷酸位置1與2之間，及在核苷酸位置2與3之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

及

(b)反義股，其具有：

23個核苷酸之長度；

(ii)在位置1、3、5至7、9、11至13、15、17至19、與21至23之2’-OMe修飾，及在位置2、4、8、10、14、16、與20之2’-F修飾(從5’端算起)；及

(iii)在核苷酸位置1與2之間、在核苷酸位置2與3之間、在核苷酸位置21與22之間、及在核苷酸位置22與23之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

其中dsRNA劑具有在反義股3’-端之兩個核苷酸之突出，及反義股5’-端之鈍端。

【0640】 另一項特定具體例中，本發明dsRNA劑包含：

正義股，其具有：

21個核苷酸之長度；

(ii)　視需要附接3’-端之ASGPR配體，其中該ASGPR配體包含透過三價分支鏈結基附接之三個GalNAc衍生物；

(iii)　在位置1、2、4、6、8、12、14、15、17、與19至21之2’-OMe修飾，及在位置3、5、7、9至11、13、16、與18之2’-F修飾；及

(iv)　在核苷酸位置1與2之間、及在核苷酸位置2與3之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

及

(b)反義股，其具有：

25個核苷酸之長度；

(ii)在位置1、4、6、7、9、11至13、15、17、與19至23之2’-OMe修飾、在位置2、3、5、8、10、14、16、與18之2’-F修飾，及在位置24與25之去氧-核苷酸 (例如，dT)(從5’端算起)；及

(iii)在核苷酸位置1與2之間、在核苷酸位置2與3之間、在核苷酸位置21與22之間、及在核苷酸位置22與23之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

其中dsRNA劑具有在反義股3’-端之四個核苷酸之突出，及反義股5’-端之鈍端。

【0641】 另一項特定具體例中，本發明dsRNA劑包含：

正義股，其具有：

21個核苷酸之長度；

(ii)　視需要附接3’-端之ASGPR配體，其中該ASGPR配體包含透過三價分支鏈結基附接之三個GalNAc衍生物；

(iii)在位置1至6、8、與12至21之2’-OMe修飾，及在位置7、與9至11之2’-F修飾，及

(iv)在核苷酸位置1與2之間、及在核苷酸位置2與3之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

及

(b)反義股，其具有：

23個核苷酸之長度；

(ii)在位置1、3至5、7、8、10至13、15、與17至23之2’-OMe修飾，及在位置2、6、9、14、與16之2’-F修飾(從5’端算起)；及

(iii)在核苷酸位置1與2之間、在核苷酸位置2與3之間、在核苷酸位置21與22之間、及在核苷酸位置22與23之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

其中dsRNA劑具有在反義股3’-端之兩個核苷酸之突出，及在反義股5’-端之鈍端。

【0642】 另一項特定具體例中，本發明dsRNA劑包含：

正義股，其具有：

21個核苷酸之長度；

(ii) 視需要附接3’-端之ASGPR配體，其中該ASGPR配體包含透過三價分支鏈結基附接之三個GalNAc衍生物；

(iii) 在位置1至6、8、與12至21之2’-OMe修飾，及在位置7、與9至11之2’-F修飾；及

(iv) 在核苷酸位置1與2之間、及在核苷酸位置2與3之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

及

(b)反義股，其具有：

23個核苷酸之長度；

(ii)在位置1、3至5、7、10至13、15、與17至23之2’-OMe修飾，及在位置2、6、8、9、14、與16之2’-F修飾(從5’端算起)；及

(iii)在核苷酸位置1與2之間、在核苷酸位置2與3之間、在核苷酸位置21與22之間、及在核苷酸位置22與23之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

其中dsRNA劑具有在反義股3’-端之兩個核苷酸之突出，及反義股5’-端之鈍端。

【0643】 另一項特定具體例中，本發明dsRNA劑包含：

正義股，其具有：

19個核苷酸之長度；

(ii) 視需要附接3’-端之ASGPR配體，其中該ASGPR配體包含透過三價分支鏈結基附接之三個GalNAc衍生物；

(iii) 在位置1至4、6、與10至19之2’-OMe修飾，及在位置5、與7至9之2’-F修飾；及

(iv) 在核苷酸位置1與2之間、及在核苷酸位置2與3之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

及

(b)反義股，其具有：

21個核苷酸之長度；

(ii)在位置1、3至5、7、10至13、15、與17至21之 2’-OMe修飾，及在位置2、6、8、9、14、與16之2’-F修飾(從5’端算起)；及

(iii)在核苷酸位置1與2之間、在核苷酸位置2與3之間、在核苷酸位置19與20之間、與在核苷酸位置20與21之間之硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結(從5’端算起)；

其中dsRNA劑具有在反義股3’-端之兩個核苷酸之突出，及反義股5’-端之鈍端。

【0644】 各種不同公告案已說明多聚siRNA，且可與本發明iRNA一起使用。此等公開案包括WO2007/091269、美國專利案案號7858769、WO2010/141511、WO2007/117686、WO2009/014887與WO2011/031520，其等完整內容已以引用方式併入本文中。

【0645】 有些具體例中，本發明iRNA劑中100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、02%、91%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%或30%經修飾。

【0646】 有些具體例中，iRNA劑之各正義股與反義股係獨立地經無環核苷酸、LNA、HNA、CeNA、2’-甲氧基乙基、2’- O-甲基、2’-O-烯丙基、2’-C-烯丙基、2’-去氧、2’-氟、2'-O-N-甲基乙醯胺基(2'-O-NMA)、2'-O-二甲基胺基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-胺基丙基 (2'-O-AP)、或2'-ara-F修飾。

【0647】 有些具體例中，iRNA劑之各正義股與反義股含有至少兩種不同修飾。

【0648】 有些具體例中，本發明雙股iRNA劑不含有任何2’-F修飾。

【0649】 有些具體例中，本發明雙股iRNA劑含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或12個2’-F修飾。一項實施例中，本發明雙股iRNA劑

含有9或10個2’-F修飾。

【0650】 本發明iRNA劑可能進一步包含至少一個硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結修飾可能出現在正義股或反義股或二者之任何核苷酸，在股之任何位置。例如，核苷酸間鏈結修飾可能出現在正義股或反義股之每一個核苷酸；各核苷酸間鏈結修飾可能以交替方式出現在正義股或反義股；或正義股或反義股可能以交替方式包含兩種核苷酸間鏈結修飾。正義股之交替型態核苷酸間鏈結修飾可能與反義股相同或相異，及正義股交替型態核苷酸間鏈結修飾可能與反義股交替型態核苷酸間鏈結修飾出現位移。

【0651】 一項具體例中，iRNA在突出區包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結修飾。例如，突出區可能包含在兩個核苷酸之間具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結之兩個核苷酸。核苷酸間鏈結修飾亦可能利用雙螺旋區內末端配對之核苷酸來連結突出核苷酸。例如，至少2、3、4個、或所有突出核苷酸可能利用硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結來連結，且視需要，可能有額外的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結，來連結突出核苷酸與鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。例如，可能在末端三個核苷酸之間具有至少兩個硫代磷酸酯之核苷酸間鏈結，其中三個核苷酸中有兩個為突出核苷酸，及第三個為鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。較佳係此等末端三個核苷酸可能在反義股之3’-端。

【0652】 有些具體例中，iRNA劑之正義股及/或反義股包含一段或多段硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結區段。一項實施例中，正義股包含一段兩個硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結區段。一項實施例

中，反義股包含兩段兩個硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結區段。例如，兩段硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結區段係由16-18個磷酸酯之核苷酸間鏈結分隔。

【0653】 有些具體例中，本發明iRNA劑之反義股係與標靶RNA 100%互補而雜交，並透過RNA干擾來抑制其表現。另一項具體例中，本發明iRNA劑之反義股係與標靶RNA 至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%、或至少50%互補。

【0654】 一項態樣中，本發明係有關可以抑制標靶基因表現之iRNA劑。iRNA劑包含正義股與反義股，各股具有14至40個核苷酸。正義股包含至少一個熱失穩性核苷酸，其中至少一個該熱失穩性核苷酸出現在或接近反義股種子區(亦即反義股5'-端之位置2-8)之相反位點。例如，當正義股之長度為21個核苷酸時，熱失穩性核苷酸出現在正義股5'-端位置14-17之間。反義股包含至少兩個在立體位阻小於2'-OMe修飾之經修飾核酸。較佳係該兩個在立體位阻小於2'-OMe修飾之經修飾核酸分隔11個核苷酸之長度。例如，該兩個經修飾核酸在反義股5'端之位置2與14。

IV. 與配體接合之iRNA

【0655】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑之進一步修飾係共價附接一個或多個接合基團。通常，接合基團修飾所附接之本發明雙股iRNA劑之一種或多種性質，包括(但不限於)，藥效學、藥物動力學、結合性、吸收性、細胞分佈性、細胞吸收性、電荷與清除性。接合基團常用於化學技藝，且直接附接或利用視需要之鏈結部份體或鏈結基團附接母化合物，如寡聚

化合物。接合基團之較佳列表包括(但不限於)，螯合劑、報導子分子、多元胺、聚醯胺、聚乙二醇、硫醚、聚醚、膽固醇、硫代膽固醇、膽酸部份體、葉酸鹽、脂質、磷脂、生物素、吩吡(phenazine)、菲啶、蒽醌、金剛烷、吖啶、螢光素、若丹明(rhodamine)、香豆素與染劑。

【0656】 有些具體例中，雙股iRNA劑進一步包含靶向配體，其靶向介導傳遞至特異性CNS組織之受體。此等靶向配體可以與親脂性部份體組合進行接合，可以特異性經鞘內與全身性傳遞。

【0657】 靶向介導傳遞至CNS組織之受體之靶向配體實施例為肽配體，如血管胜肽素-2(Angiopep-2)、脂蛋白受體相關蛋白質(LRP)配體、bEnd.3細胞結合性配體；轉鐵蛋白受體(TfR)配體(其可利用腦中鐵轉運系統，轉運進入腦實質)；甘露糖受體配體(其靶向嗅鞘細胞)、葡萄糖轉運子蛋白質、與LDL受體配體。

【0658】 有些具體例中，雙股iRNA劑進一步包含靶向配體，其靶向介導傳遞至特異性眼部組織之受體。此等靶向配體可以與親脂性部份體組合進行接合，可以特異性經玻璃體內及全身性傳遞。例示性靶向介導傳遞至眼部組織之受體之靶向配體為親脂性配體，如全反式視黃醇(其靶向視黃酸受體)；RGD肽(其靶向視網膜色素上皮細胞)，如H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-Cys-OH (SEQ ID NO：14)或環(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys；LDL受體配體；及基於碳水化合物之配體(其靶向後眼部內皮細胞)。

【0659】 適合本發明之較佳接合基團包括脂質部份體，如膽固醇部份體(Letsinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553)；膽酸(Manoharan等人，Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053)；硫醚，例如，

己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人，Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306；Manoharan等人，Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765)；硫膽固醇(Oberhauser等人，Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533)；脂系鏈，例如，十二碳烷二醇或十一碳基(Saison-Behmoaras等人，EMBO J., 1991, 10, 111；Kabanov等人，FEBS Lett., 1990, 259, 327；Svinarchuk等人，Biochimie, 1993, 75, 49)；磷脂，例如，二-十六碳基-消旋性-甘油或1,2-二-O-十六碳基-消旋性-甘油基-3-膦酸三乙基銨鹽(Manoharan等人，Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651；Shea等人，Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777)；多元胺或聚乙二醇鏈(Manoharan等人，*Nuclosides & Nuclotides*, 1995, 14, 969)；金剛烷乙酸(Manoharan等人，Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651)；棕櫚基部份體 (Mishra等人，Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229)；或十八碳基胺或己基胺基-羰基-氧膽固醇部份體(Crooke等人，J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923)。

【0660】 通常，有許多種實體(例如，配體)可與本文說明之寡聚化合物偶聯。配體可包括天然分子，或重組或合成性分子。配體實施例包括(但不限於)，聚離胺酸(PLL)、聚L-天冬胺酸、聚L-麩胺酸、苯乙烯-馬來酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-馬來酸酐共聚物、N-(2-羥基丙基)甲基丙烯基醯胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG，例如，PEG-2K、PEG-5K、PEG-10K、PEG-12K、PEG-15K、PEG-20K、PEG-40K)、MPEG、$[MPEG]_2$、聚乙烯醇(PVA)、聚胺基甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-異丙基丙烯基醯胺聚合物、聚磷腈、聚乙烯亞胺、陽離子基團、精胺、精脒、多胺、偽肽-多胺、肽擬似性多胺、樹枝狀多胺、精胺酸、脒、

魚精蛋白、陽離子性脂質、陽離子性紫質、多胺之四級鹽、促甲狀腺激素、促黑激素、凝集素、醣蛋白、表面活性蛋白質A、黏蛋白、糖基化聚胺基酸、轉鐵蛋白、雙膦酸、聚麩胺酸、聚天冬胺酸、適體(aptamer)、去唾夜酸胎蛋白(asialofetuin)、玻尿酸(hyaluronan)、前膠原蛋白、免疫球蛋白(例如，抗體)、胰島素、轉鐵蛋白、白蛋白、糖-白蛋白接合物、螯合劑(例如，吖啶類)、交鏈劑(例如，補骨脂素、絲裂黴素C)、紫質(例如，TPPC4、德卟啉(texaphyrin)、噻啉(Sapphyrin))、多環狀芳香烴(例如，吩吡、二氫吩吡)、人造內切核酸酶(例如，EDTA)、親脂性分子(例如，類固醇、膽汁酸、膽固醇、膽酸、金剛烷乙酸、1-芘丁酸、雙氫睾酮、1,3-雙-O(十六碳基)甘油、香葉草基氧己基、十六碳基甘油、龍腦、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七碳基、棕櫚酸、肉豆蔻酸、O3-(油基)石膽酸、O3-(油基)膽烯酸、二甲氧基三苯甲基、或吩噁吡)、肽類(例如，α螺旋肽、兩親性肽、RGD肽、細胞通透肽、胞內體裂解性/融合性肽)、烷化劑、磷酸酯、胺基、氫硫基、聚胺基、烷基、經取代之烷基、標記放射性之標記物、酵素、半抗原(例如，生物素)、運載/吸收促進劑(例如，納普生(naproxen)、阿斯匹靈、維生素E、葉酸)、合成性核糖核酸酶(例如，咪唑、雙咪唑、組織胺、咪唑簇集物、吖啶-咪唑接合物、四氮雜大環之Eu3+複合物)、二硝基苯基、HRP、AP、抗體、激素與激素受體、凝集素、碳水化合物、多價碳水化合物、維生素(例如，維生素A、維生素E、維生素K、維生素B，例如，葉酸、B12、核黃素、生物素與吡哆醛)、維生素輔因子、脂多醣、p38 MAP激酶之活化劑、NF-κB之活化劑、紫杉酚(taxon)、長春新鹼(vincristine)、長春花鹼(vinblastine)、細胞鬆弛素(cytochalasin)、諾考達唑(nocodazole)、茉莉酮(japlakinolide)、紅

海海綿蛋白A(latrunculin A)、鬼筆環肽(phalloidin)、海洋苔蘚素A(swinholide A)、茚滿諾星(indanocine)、肌基質蛋白(myoservin)、腫瘤壞死因子α(TNFα)、介白素-1β、γ干擾素、天然或重組低密度脂蛋白(LDL)、天然或重組高密度脂蛋白(HDL)、與細胞通透劑(例如，α螺旋細胞通透劑)。

【0661】 肽或肽擬似物配體包括彼等具有天然或經修飾肽，例如，D或L肽；α、β、或γ肽；N-甲基肽；氮雜肽；具有一個或多個醯胺之肽，亦即鏈結被一個或多個脲、硫脲、胺甲酸酯、或磺醯脲置換之肽；或環狀肽。肽擬似物(本文亦稱為寡肽擬似物)為可以折疊成類似天然肽之限定三維結構之分子。該肽或肽擬似物配體之長度可為約5-50個胺基酸，例如，約5、10、15、20、25、30、35、40、45、或50個胺基酸之長度。

【0662】 例示性兩親性肽包括(但不限於)，天蠶素(cecropins)、狼蛛蛋白毒素(lycotoxins)、帕拉達辛(paradaxins)、蟾蜍苷元(buforin)、CPF、類似鈴蟾抗菌肽(bombinin)之肽(BLP)、抗菌肽(cathelicidins)、實蠅蛋白毒素(ceratotoxins)、海鞘(*S. clava*)肽類、盲鰻腸抗菌肽(HFIAP)、爪蟾抗菌肽(magainines)、蛙類抗菌肽-2(brevinins-2)、兩棲動物抗菌肽(dermaseptins)、蜂毒素(melittins)、魚源抗菌肽(pleurocidin)、H_2A肽、爪蟾(Xenopus)肽、艾庫尼絲-1(esculentinis-1)、與卡靈素(caerins)。

【0663】 本文所採用術語「胞內體裂解性配體」係指具有胞內體裂解性質之分子。胞內體裂解性配體會促進本發明組成物或其組份裂解及/或從細胞隔室(如：胞內體、溶小體、內質網(ER)、高基氏體(Golgi apparatus)、微小管、過氧化體、或細胞內其他囊泡體)轉運至細胞之細胞質。有些胞內體裂解性配體實施例包括(但不限於)，咪唑、聚或寡咪唑、線性或分支聚伸

乙基亞胺(PEI)、線性與分支多元胺，例如，精胺、陽離子性線性與分支多元胺、聚羧酸酯類、聚陽離子、遮蔽寡或聚陽離子或陰離子、縮醛、聚縮醛、縮酮/聚縮酮、原酸酯、帶有遮蔽或未遮蔽陽離子電荷或陰離子電荷之線性或分支聚合物、帶有遮蔽或未遮蔽陽離子電荷或陰離子電荷之樹狀物、聚陰離子性肽、聚陰離子性肽擬似物、pH-敏感性肽、天然與合成性融合脂質、天然與合成性陽離子性脂質。

【0664】例示性胞內體裂解性/融合性肽包括(但不限於)，AALEALAEALEALAEALEALAEAAAAGGC (GALA) (SEQ ID NO：18)；AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC (EALA) (SEQ ID NO：19)；ALEALAEALEALAEA (SEQ ID NO：20)；GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG (INF-7) (SEQ ID NO：21)；GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG (Inf HA-2) (SEQ ID NO：22)；

GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGCGLFEAIEGFIENGWEGMID GWYGC (diINF-7) (SEQ ID NO：23)；

GLFEAIEGFIENGWEGMIDGGCGLFEAIEGFIENGWEGMIDGGC (diINF-3) (SEQ ID NO：24)；

GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAGGSC (GLF) (SEQ ID NO：25)；GLFEAIEGFIENGWEGLAEALAEALEALAAGGSC (GALA-INF3) (SEQ ID NO：26)；GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG K GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG (INF-5，n為正白胺酸) (SEQ ID NO：27)；LFEALLELLESLWELLLEA (JTS-1) (SEQ ID NO：28)；GLFKALLKLLKSLWKLLLKA (ppTG1) (SEQ ID NO：29)；

GLFRALLRLLRSLWRLLLRA (ppTG20) (SEQ ID NO：30)；WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA (KALA) (SEQ ID NO：31)；GLFFEAIAEFIEGGWEGLIEGC (HA) (SEQ ID NO：32)；GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (蜂毒素(Melittin)) (SEQ ID NO：33)；H_5WYG (SEQ ID NO：34)；及CHK_6HC (SEQ ID NO：35)。

【0665】 在不希望受到理論限制下，融合性脂質係與膜融合，接著使其失去穩定性。融合性脂質通常具有小的頭基與不飽和醯基鏈。融合性脂質實施例包括(但不限於)，1,2-二油醯基-sn-3-磷乙醇胺(DOPE)、磷脂醯基乙醇胺(POPE)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯基膽鹼(POPC)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-醇(Di-Lin)、N-甲基(2,2-二((9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯基)-1,3-二氧雜環戊烷-4-基)甲烷胺(DLin-k-DMA)與N-甲基-2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯基)-1,3-二氧雜環戊烷-4-基)乙胺(本文亦稱為XTC)。

【0666】 適用於本發明之具有胞內體裂解性活性脂之合成性聚合物說明於美國專利申請公開案案號(U.S. Pat. App. Pub. Nos.) 2009/0048410；2009/0023890；2008/0287630；2008/0287628；2008/0281044；2008/0281041；2008/0269450；2007/0105804；20070036865；及2004/0198687，其等完整內容已以引用方式併入本文中。

【0667】 例示性細胞通透肽包括(但不限於)，RQIKIWFQNRRMKWKK (穿透肽(penetratin)) (SEQ ID NO：36)；GRKKRRQRRRPPQC (Tat 片段 48-60) (SEQ ID NO：37)；GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (基於訊號序列之肽) (SEQ

ID NO：38)；LLIILRRRIRKQAHAHSK (PVEC) (SEQ ID NO：39)；GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL (轉運肽(transportan)) (SEQ ID NO：40)；KLALKLALKALKAALKLA (兩親模式肽) (SEQ ID NO：41)；RRRRRRRRR (Arg9) (SEQ ID NO：42)；KFFKFFKFFK (細菌細胞壁通透肽) (SEQ ID NO：43)；LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES (LL-37) (SEQ ID NO：44)；SWLSKTAKK水晶體AKKRISEGIAIAIQGGPR (天蠶素(cecropin)P1) (SEQ ID NO：45)；ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC (α-防禦素(defensin)) (SEQ ID NO：46)；DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK (β-防禦素(defensin)) (SEQ ID NO：47)；RRRPRPPYLPRPRPPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPGKR-NH2 (PR-39) (SEQ ID NO：48)；ILPWKWPWWPWRR-NH2 (鹼性抗生肽(indolicidin)) (SEQ ID NO：49)；AAVALLPAVLLALLAP (RFGF) (SEQ ID NO：50)；AALLPVLLAAP (RFGF類似物) (SEQ ID NO：51)；及RKCRIVVIRVCR (牛抗菌肽(bactenecin)) (SEQ ID NO：52)。

【0668】 例示性陽離子性基團包括(但不限於)，質子化胺基，其係衍生自例如，O-AMINE(AMINE = NH_2；烷基胺基、二烷基胺基、雜環基、芳基胺基、二芳基胺基、雜芳基胺基、或二雜芳基胺基、伸乙基二胺、聚胺基)；胺基烷氧基，例如，$O(CH_2)_nAMINE$(例如，AMINE = NH_2；烷基胺基、二烷基胺基、雜環基、芳基胺基、二芳基胺基、雜芳基胺基、或二

雜芳基胺基、伸乙基二胺、聚胺基)；胺基(例如，NH_2；烷基胺基、二烷基胺基、雜環基、芳基胺基、二芳基胺基、雜芳基胺基、二雜芳基胺基、或胺基酸)；及$NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$- AMINE(AMINE = NH_2；烷基胺基、二烷基胺基、雜環基、芳基胺基、二芳基胺基、雜芳基胺基、或二雜芳基胺基)。

【0669】 本文所採用術語「靶向配體」係指可加強對所選定標靶(例如，細胞、細胞型態、組織、器官或身體區域、或隔室(例如，細胞、組織或器官隔室))之親和性之任何分子。有些靶向配體實施例包括(但不限於)，抗體、抗原、葉酸鹽、受體配體、碳水化合物、適體(aptamer)、整合素受體配體、趨化素受體配體、轉鐵蛋白、生物素、血清素受體配體、PSMA、內皮肽、GCPII、體抑素(somatostatin)、LDL與HDL配體。

【0670】 基於碳水化合物之靶向配體包括(但不限於)，D-半乳糖、多價半乳糖、N-乙醯基-D-半乳糖胺(GalNAc)、多價GalNAc，例如，$GalNAc_2$與$GalNAc_3$ (GalNAc與多價GalNAc在本文中統稱為GalNAc接合物)；D-甘露糖、多價甘露糖、多價乳糖、N-乙醯基-葡萄糖胺、葡萄糖、多價葡萄糖、多價岩藻糖、糖基化聚胺基酸與凝集素。術語「多價」係指存在超過一個單糖。此等單糖亞單位可以透過糖苷鏈結彼此連結或連結主幹分子。

【0671】 有許多種適用為本發明配體之葉酸鹽與葉酸類似物說明於美國專利案案號2,816,110；5,552,545；6,335,434與7,128,893，其等完整內容已以引用之方式併入本文中。

【0672】 本文所採用術語「PK調控配體」與「PK調控劑」係指可調控本發明組成物藥物動力學之分子。有些PK調控劑實施例包括(但不限於)，

親脂性分子、膽汁酸、固醇、磷脂類似物、肽類、蛋白質結合劑、維生素、脂肪酸、吩噁吡、阿斯匹靈、納普生(naproxen)、布洛芬(ibuprofen)、蘇普芬(suprofen)、酮洛芬(ketoprofen)、(S)-(+)-普拉洛芬(pranoprofen)、卡洛芬(carprofen)、PEG、生物素、及甲狀腺素運載蛋白結合性配體(例如，四碘甲腺乙酸(tetraiidothyroacetic acid)、2,4,6-三碘苯酚與氟苯那酸(flufenamic acid))。亦已知包含許多硫代磷酸酯之糖之間鏈結之寡聚化合物可以結合血清蛋白質，因此短的寡聚化合物，例如，包含約5至30個核苷酸(例如，5至25個核苷酸，較佳係5至20個核苷酸，例如，5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20個核苷酸)且在主幹中包含許多硫代磷酸酯鏈結之寡核苷酸亦適用為本發明配體(例如，作為PK調控配體)。PK調控性寡核苷酸可包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多個硫代磷酸酯及/或二硫代磷酸酯鏈結。有些具體例中，PK調控性寡核苷酸中所有核苷酸間鏈結均為硫代磷酸酯及/或二硫代磷酸酯鏈結。此外，與血清組份(例如，血清蛋白質)結合之適體亦適用為本發明PK調控配體。可由白蛋白結合分析法預測與血清組份(例如，血清蛋白質)之結合性，如彼等說明於Oravcova等人，Journal of Chromatography B (1996), 677: 1-27。

【0673】 當存在兩個或更多個配體時，該等配體可以均具有相同性質、均具有不同性質、或有些配體有相同性質而其他則有不同性質。例如，配體可以具有靶向性質、具有胞內體裂解性活性或具有PK調控性質。較佳具體例中，所有配體具有不同性質。

【0674】 當單體納入本發明雙股iRNA劑之組份(例如，本發明雙股

iRNA劑或鏈結基)中時，該單體可以出現配體或繫鏈配體。有些具體例中，在「前驅物」單體已納入本發明雙股iRNA劑之組份(例如，本發明雙股iRNA劑或鏈結基)中後，配體可以藉由偶聯法納入該「前妻物」單體中。例如，具有例如，以胺基為末端之繫鏈(亦即沒有相聯的配體)之單體，例如，單體-鏈結基-NH_2，可以納入本發明化合物之組份(例如，本發明雙股iRNA劑或鏈結基)。在後續操作中，亦即在前驅物單體納入本發明化合物之組份(例如，本發明雙股iRNA劑或鏈結基)中後，具有親電子基團之配體(例如，五氟苯基酯或醛基)可以接著由配體之親電子基團偶聯前趨物單體之系鏈末端親核性基團來附接前驅物單體。

【0675】 另一項實施例中，可以納入具有適合參與點擊化學反應(Click Chemistry reaction)之化學基團之單體，例如，以疊氮基或炔為末端之繫鏈/鏈結基。在後續操作中，亦即在前驅物單體納入該股中後，具有互補化學基團(例如，炔或疊氮基)之配體可藉由一起偶聯疊氮基或炔來附接前驅物單體。

【0676】 有些具體例中，配體可以接合本發明雙股iRNA劑之核鹼基、糖部份體、或核苷間鏈結。嘌呤核鹼基或其衍生物可以接合在任何位置，包括環內與環外原子。有些具體例中，在嘌呤核鹼基之2-、6-、7-、或8-位置附接接合物部份體。嘧啶核鹼基或其衍生物亦可接合在任何位置。有些具體例中，嘧啶核鹼基之2-、5-、與6-位置可經接合物部份體取代。當配體接合核鹼基時，較佳位置為不干擾雜交之位置，亦即不干擾鹼基配對所需之氫鍵交互作用之位置。

【0677】 核苷之糖部份體的接合可發生在任何碳原子。例示性糖部份

體可附接接合物部份體之碳原子包括2'、3'、與5'碳原子。1'位置亦可附接接合物部份體，如呈無鹼基殘基。核苷間鏈結亦可帶有接合物部份體。以含磷之鏈結(例如，磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、與類似物)為例，接合物部份體可直接附接磷原子或附接已與磷原子結合之O、N、或S原子。以含胺-或醯胺之核苷間鏈結(例如，PNA)為例，接合物部份體可附接胺或醯胺之氮原子或附接相鄰碳原子。

【0678】 有許多種方法可以製備寡核苷酸之接合物。通常，寡核苷酸與接合物部份體之附接法係由寡核苷酸之反應性基團(例如，OH、SH、胺、羧基、醛、與類似物)與接合物部份體之反應性基團接觸。有些具體例中，一個反應性基團為親電子性，另一個則為親核性。

【0679】 例如，親電子性基團可為含羰基官能基，及親核性基團可為胺或硫醇。由核酸與相關寡聚化合物利用及不利用鏈結基接合之方法已詳細說於文獻中，如，例如，Manoharan 述於Antisense Research and Applications，Crooke與LeBleu編輯，CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993，第17章，其完整內容已以引用之方式併入本文中。

【0680】 配體可利用鏈結基或載子單體(例如，配體載子)附接本發明雙股iRNA劑。載子包括(i)至少一個「主幹附接點」，較佳係兩個「主幹附接點」，與(ii)至少一個「繫鏈附接點」。本文所採用「主幹附接點」係指官能基，例如，羥基，或通常為可用於或適合將載子單體納入主幹中之鍵結，例如，寡核苷酸之磷酸根、或經修飾(例如，含硫)磷酸根之主幹。「繫鏈附接點」(TAP)係指載子單體之原子，例如，碳原子或雜原子(不同於提供一個主幹附接點之原子)，其連接所選定之部份體。部份體可為例如，碳

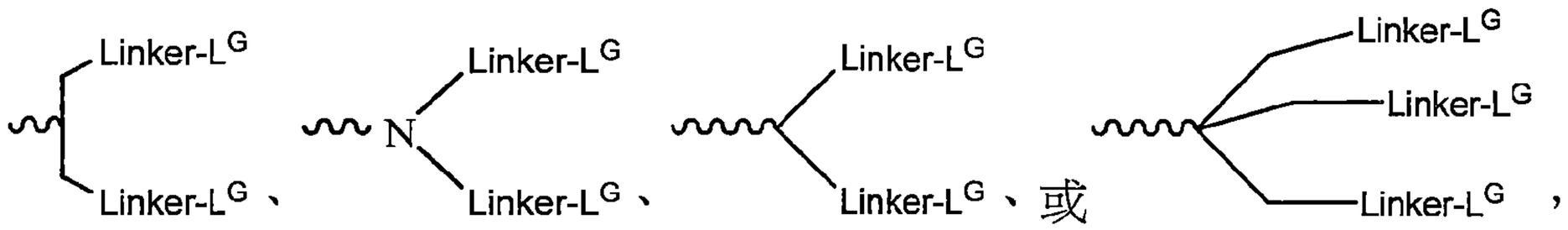
水化合物，例如，單糖、雙醣、參醣、肆醣、寡醣、與多醣。視需要，該選定之部份體係利用穿插之繫鏈連接該載子單體。因此該載子經常包括適合引進或繫鏈另一個化學部份體(例如，配體)至組成原子之官能基，例如，胺基，或通常提供一個鍵結。

【0681】 教示核酸接合物製法之代表性美國專利案包括(但不限於)，美國專利案案號4,828,979；4,948,882；5,218, 105；5,525,465；5,541,313；5,545,730；5,552,538；5,578, 717, 5,580,731；5,580,731；5,591,584；5,109,124；5,118, 802；5,138,045；5,414,077；5,486,603；5,512,439；5,578, 718；5,608,046；4,587,044；4,605,735；4,667,025；4,762, 779；4,789,737；4,824,941；4,835,263；4,876,335；4,904, 582；4,958,013；5,082,830；5,112,963；5,214,136；5,082, 830；5,112,963；5,149,782；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；5,672,662；5,688,941；5,714,166；6,153, 737；6,172,208；6,300,319；6,335,434；6,335,437；6,395, 437；6,444,806；6,486,308；6,525,031；6,528,631；6,559, 279；其等完整內容已以引用之方式併入本文中。

【0682】 有些具體例中，雙股iRNA劑進一步包含靶向肝臟組織之靶向配體。有些具體例中，靶向配體為基於碳水化合物之配體。一項具體例中，靶向配體為GalNAc接合物。

【0683】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑進一步包含具有如下所

示結構式之配體：

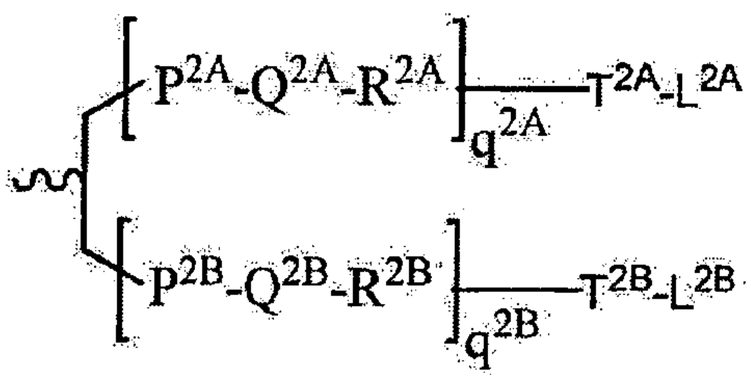


其中：

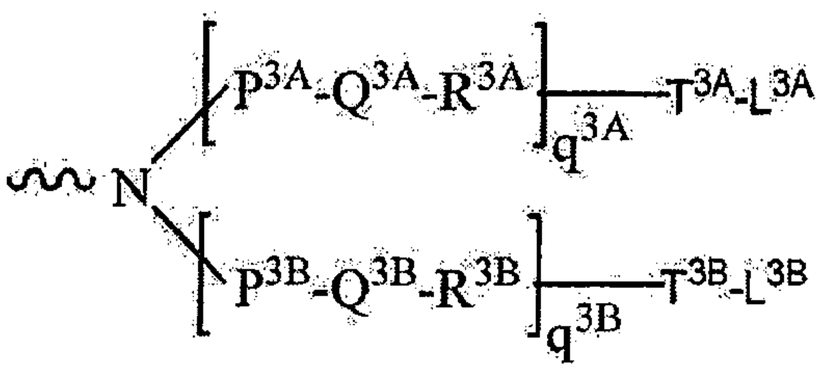
L^G在每次出現時分別獨立地為配體，例如，碳水化合物，例如，單糖、雙醣、參醣、肆醣、多醣；及

Z’、Z”、Z”’與Z””在每次出現時分別獨立地為O或S。

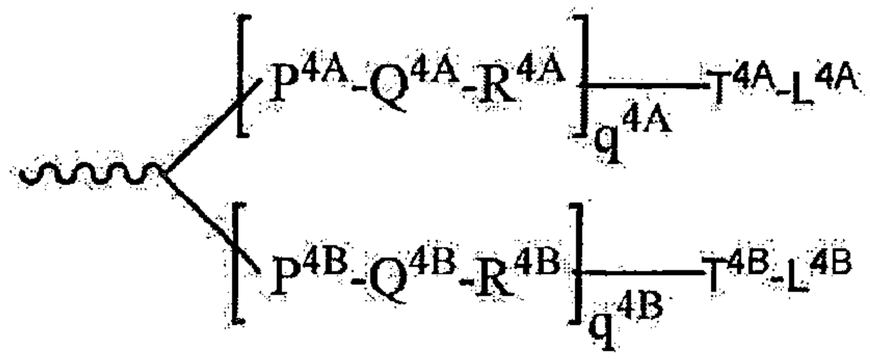
【0684】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含式(II)、(III)、(IV)或(V)之配體：



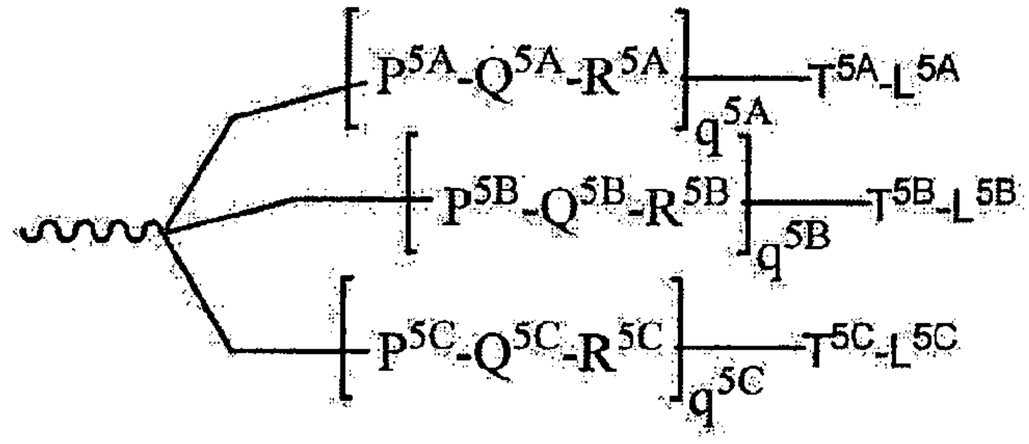
式 (II)



式 (III)



式 (IV)，或



式 (V)，

其中：

q^{2A}、q^{2B}、q^{3A}、q^{3B}、$q4^{A}$、q^{4B}、q^{5A}、q^{5B}與q^{5C}在每次出現時獨立地代表0-20，且其中重複單位可相同或相異；

Q與Q’在每次出現時分別獨立地為不存在、$-(P^{7}-Q^{7}-R^{7})_{p}-T^{7}-$或$-T^{7}-Q^{7}-T^{7'}-B-T^{8'}-Q^{8}-T^{8}$；

P^{2A}、P^{2B}、P^{3A}、P^{3B}、P^{4A}、P^{4B}、P^{5A}、P^{5B}、P^{5C}、P^{7}、T^{2A}、T^{2B}、T^{3A}、T^{3B}、T^{4A}、T^{4B}、T^{4A}、T^{5B}、T^{5C}、T^{7}、$T^{7'}$、T^{8}與$T^{8'}$在每次出現時分別獨立地為不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH_2、CH_2NH或CH_2O；

B為$-CH_2-N(B^{L})-CH_2-$；

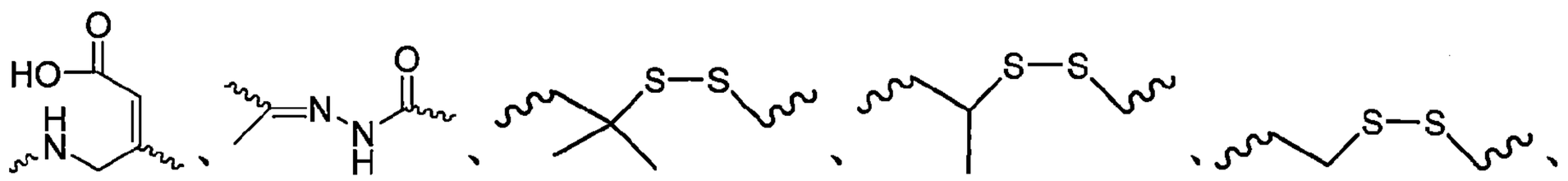
B^{L}為$-T^{B}-Q^{B}-T^{B'}-R^{x}$；

Q^{2A}、Q^{2B}、Q^{3A}、Q^{3B}、Q^{4A}、Q^{4B}、Q^{5A}、Q^{5B}、Q^{5C}、Q^{7}、Q^{8}與Q^{B}在每次出現時獨立地為不存在、伸烷基、經取代之伸烷基，且其中一個或多個亞甲基之間可穿插或末端可為一個或多個O、S、S(O)、SO_2、$N(R^{N})$、C(R’)=C(R’)、C≡C或C(O)；

T^B與$T^{B'}$在每次出現時分別獨立地為不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、OC(O)O、NHC(O)、NHC(O)NH、NHC(O)O、CH_2、CH_2NH或CH_2O；

R^x為親脂物(例如，膽固醇、膽酸、金剛烷乙酸、1-茋丁酸、雙氫睾酮、1,3-雙-O(十六碳基)甘油、香葉草基氧己基、十六碳基甘油、龍腦、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七碳基、棕櫚酸、肉豆蔻酸、O3-(油基)石膽酸、O3-(油基)膽烯酸、二甲氧基三苯甲基、或吩噁吡)、維生素(例如，葉酸、維生素A、維生素E,生物素、吡哆醛)、肽、碳水化合物 (例如，單糖、雙醣、參醣、肆醣、寡醣、多醣)、胞內體裂解性組份、類固醇(例如，熊果醇(uvaol)、番麻皂素(hecigenin)、薯蕷皂素(diosgenin))、萜烯(例如，三萜，例如，菝葜皂苷(sarsasapogenin)、無羈萜(Friedelin)、由表無羈萜醇(epifriedelanol)衍生之石膽酸)、或陽離子性脂質；

R^1、R^2、R^{2A}、R^{2B}、R^{3A}、R^{3B}、R^{4A}、R^{4B}、R^{5A}、R^{5B}、R^{5C}、R^7在每次出現時分別獨立地為不存在、NH、O、S、CH_2、C(O)O、C(O)NH、$NHCH(R^a)C(O)$、$-C(O)-CH(R^a)-NH-$、CO、CH=N-O、



或雜環基；

L^1、L^{2A}、L^{2B}、L^{3A}、L^{3B}、L^{4A}、L^{4B}、L^{5A}、L^{5B}與L^{5C}在每次出現時分別獨立地為碳水化合物，例如，單糖、雙醣、參醣、肆醣、寡醣、與多醣；

R'與R"分別獨立地為H、C_1-C_6烷基、OH、SH、或$N(R^N)_2$；

R^N在每次出現時獨立地為H、甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基或苯甲基；

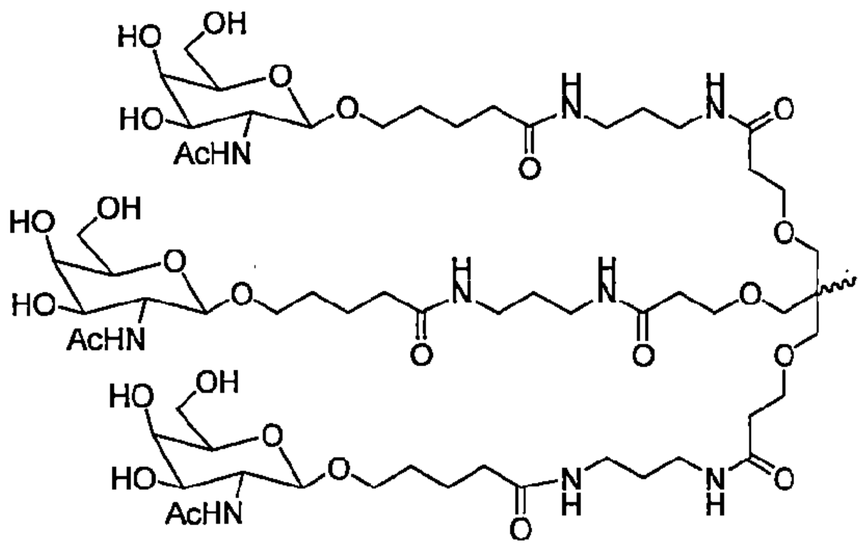
R^a為H或胺基酸側鏈；

Z’、Z”、Z”’與Z””在每次出現時分別獨立地為O或S；

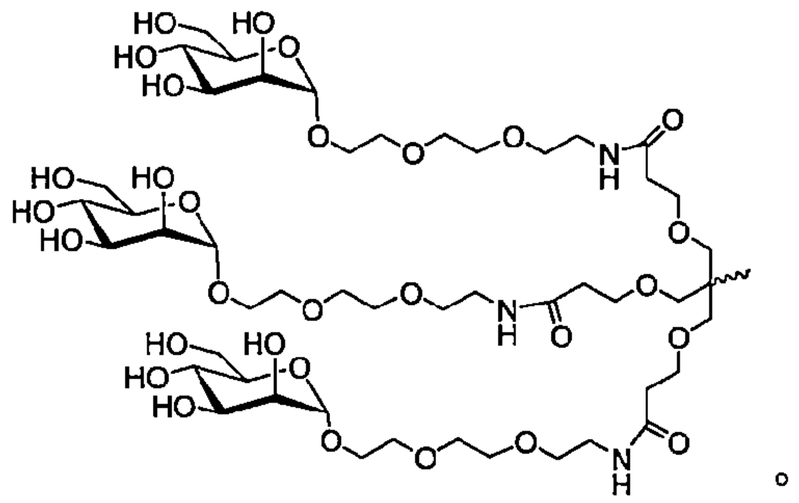
P在每次出現時獨立地代表0-20。

【0685】 如上文討論，由於配體可以利用鏈結基或載子接合iRNA劑，且由於鏈結基或載子可包含分支鏈結基，因此iRNA劑可藉由與載子相同或相異之主幹附接點，或藉由分支鏈結基(群)而包含多重配體。例如，分支鏈結基之分支點可為兩價、三價、四價、五價、或六價原子，或帶有此等價數之基團。某些具體例中，分支點為-N、-N(Q)-C、-O-C、-S-C、-SS-C、-C(O)N(Q)-C、-OC(O)N(Q)-C、-N(Q)C(O)-C、或-N(Q)C(O)O-C；其中Q在每次出現時分別獨立地為H或視需要經取代之烷基。其他具體例中，分支點為甘油或甘油衍生物。

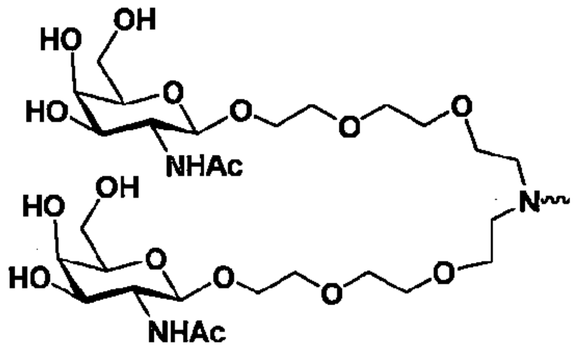
【0686】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



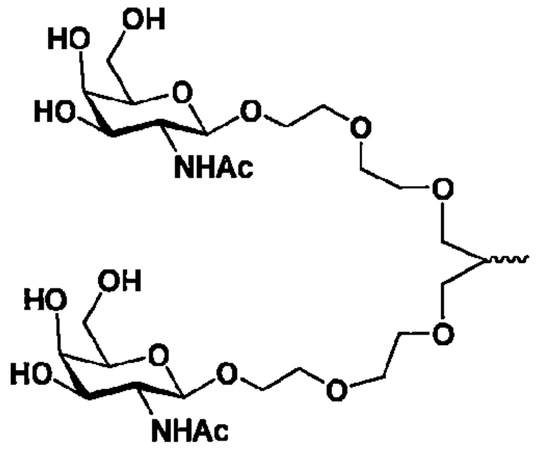
【0687】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



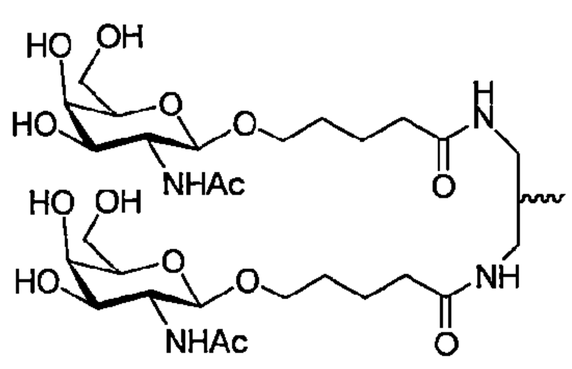
【0688】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



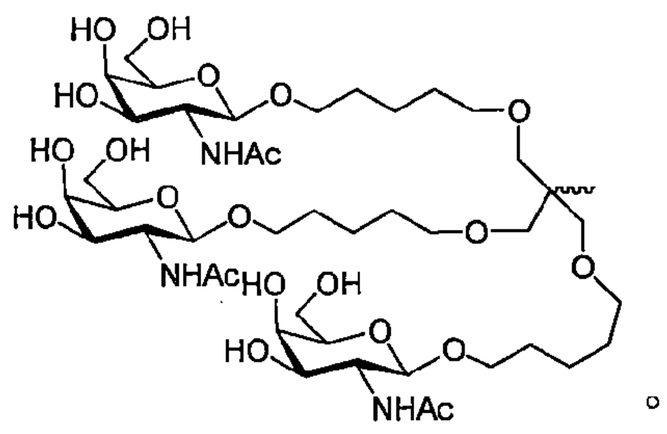
【0689】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



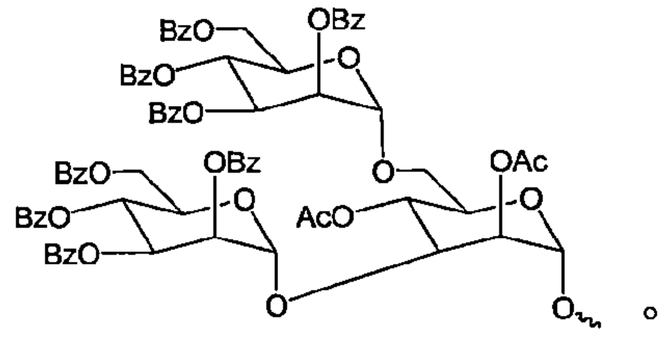
【0690】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



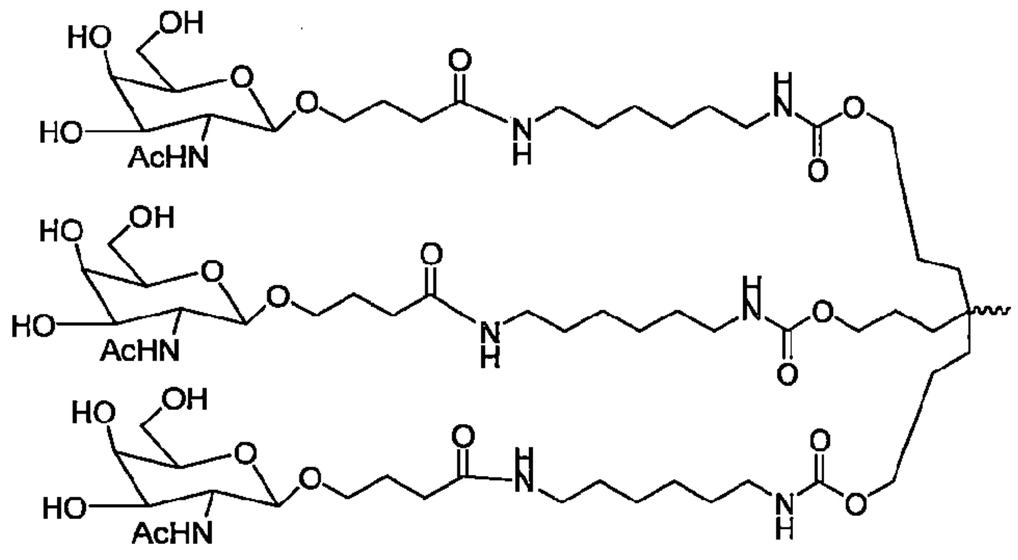
【0691】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



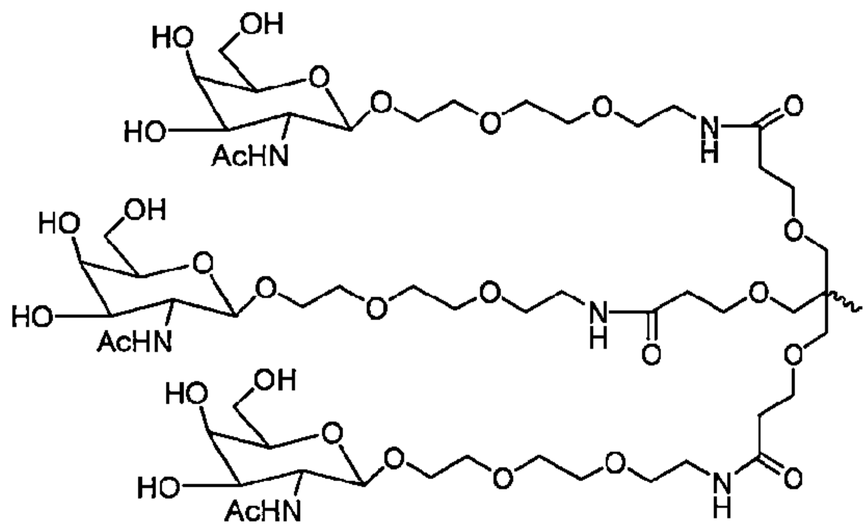
【0692】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



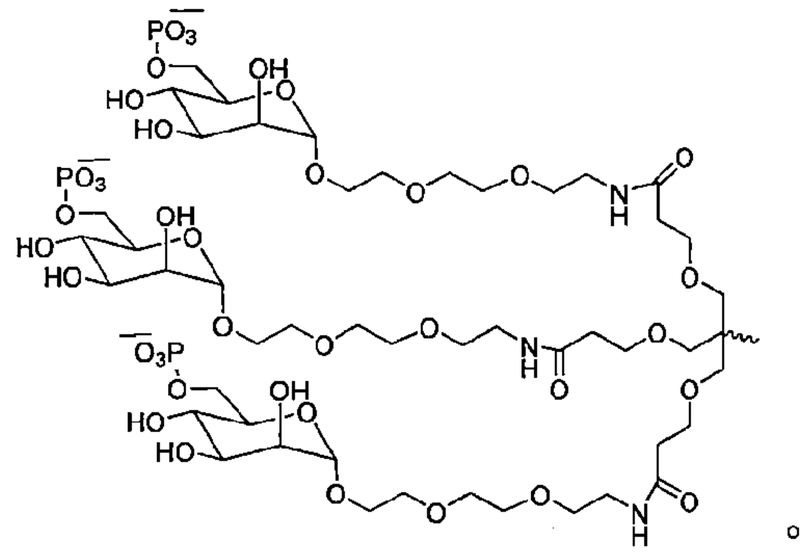
【0693】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



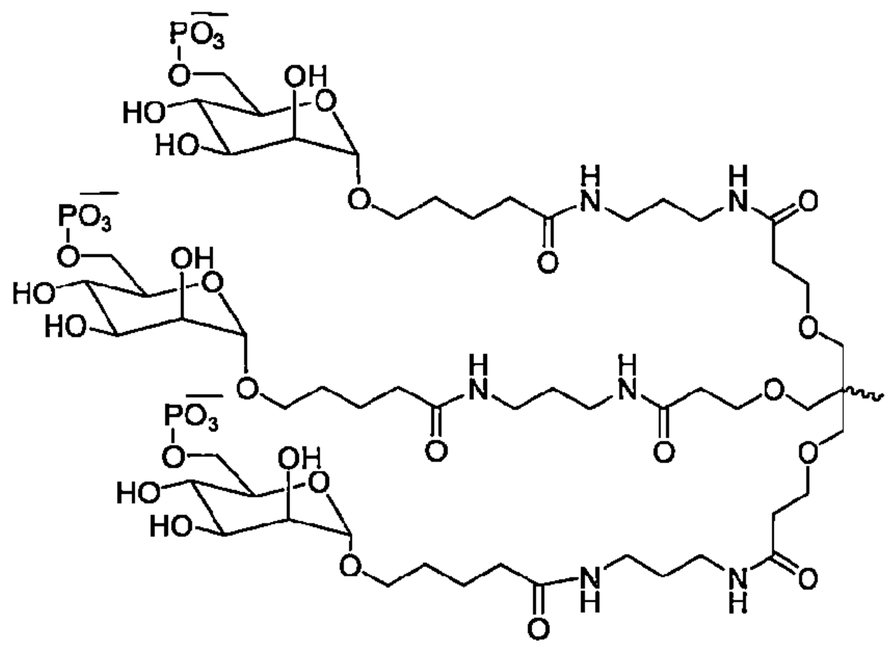
【0694】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



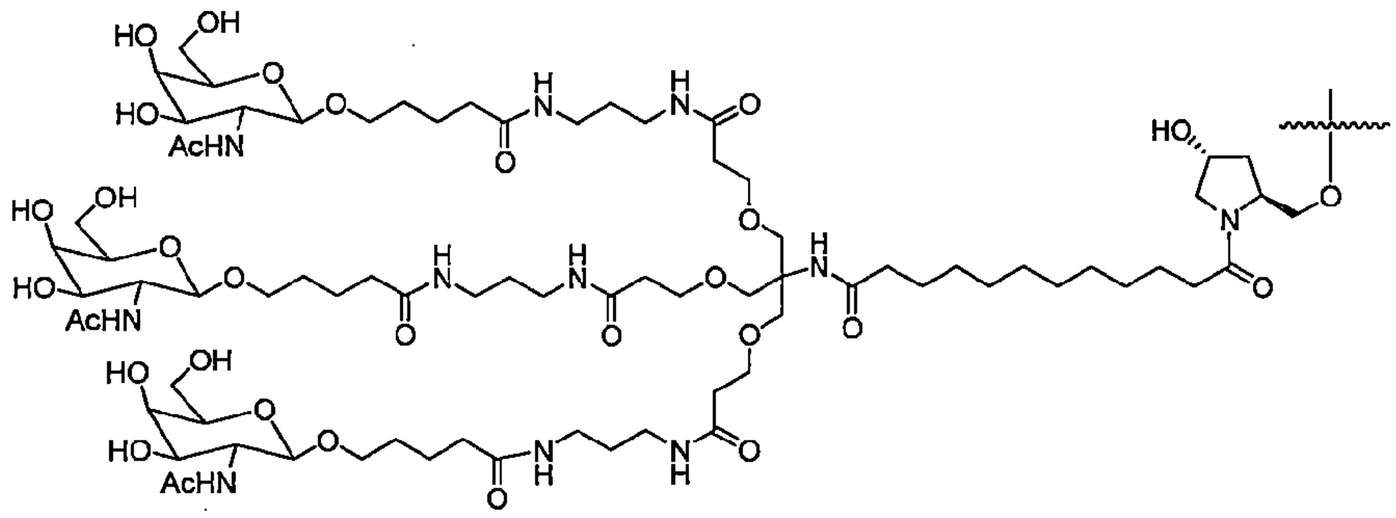
【0695】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



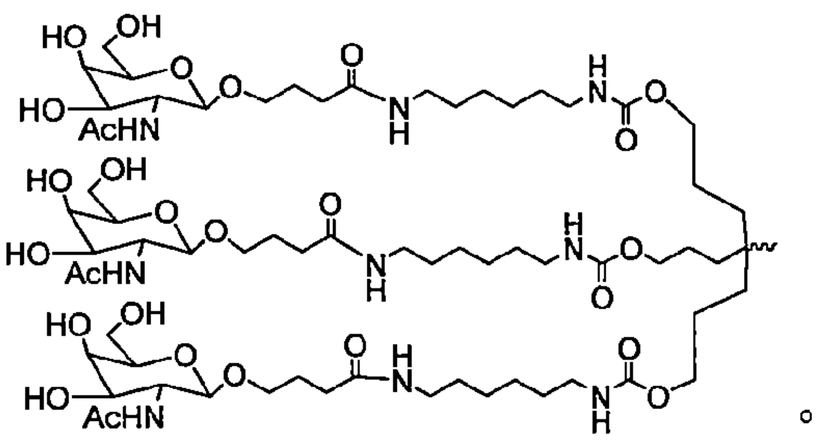
【0696】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



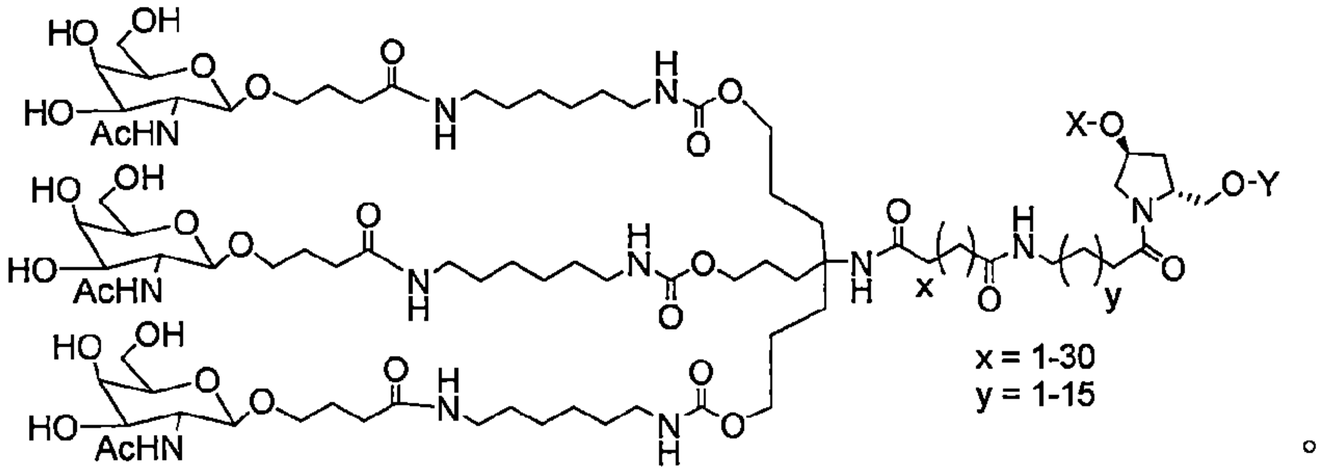
【0697】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



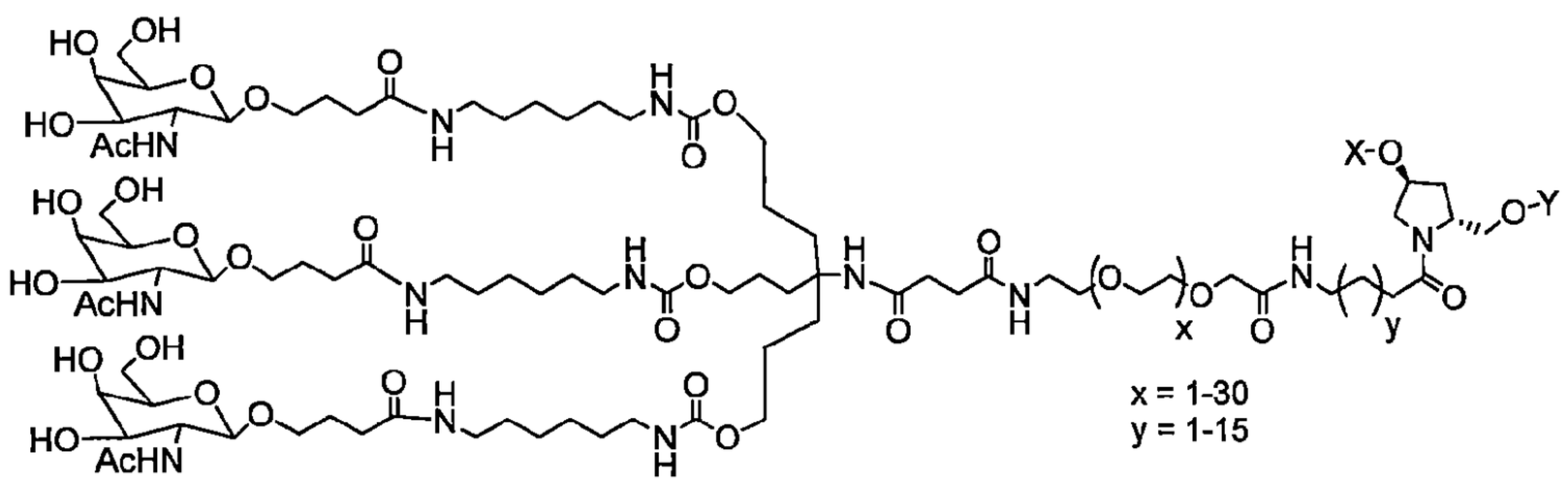
【0698】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



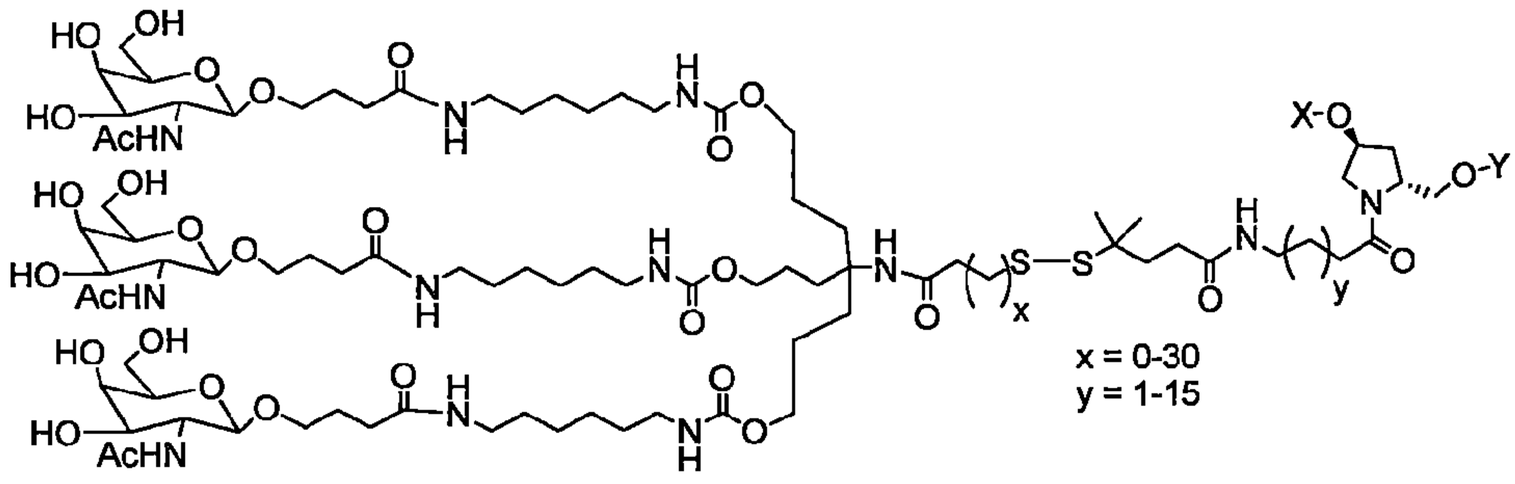
【0699】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



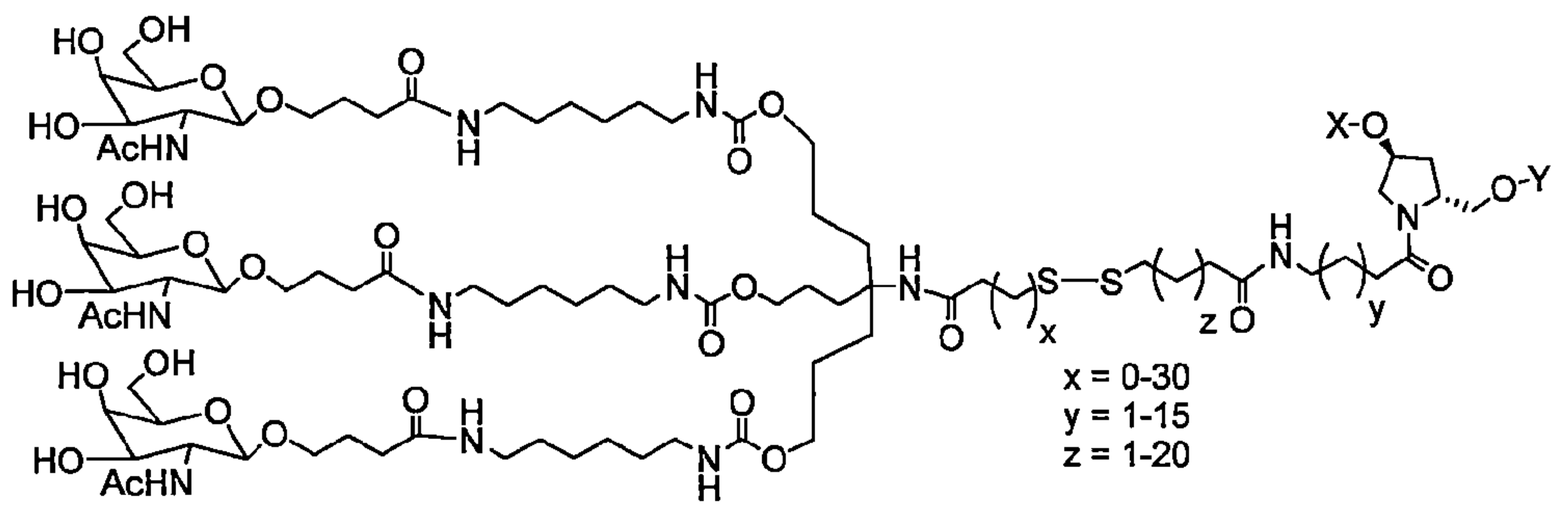
【0700】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



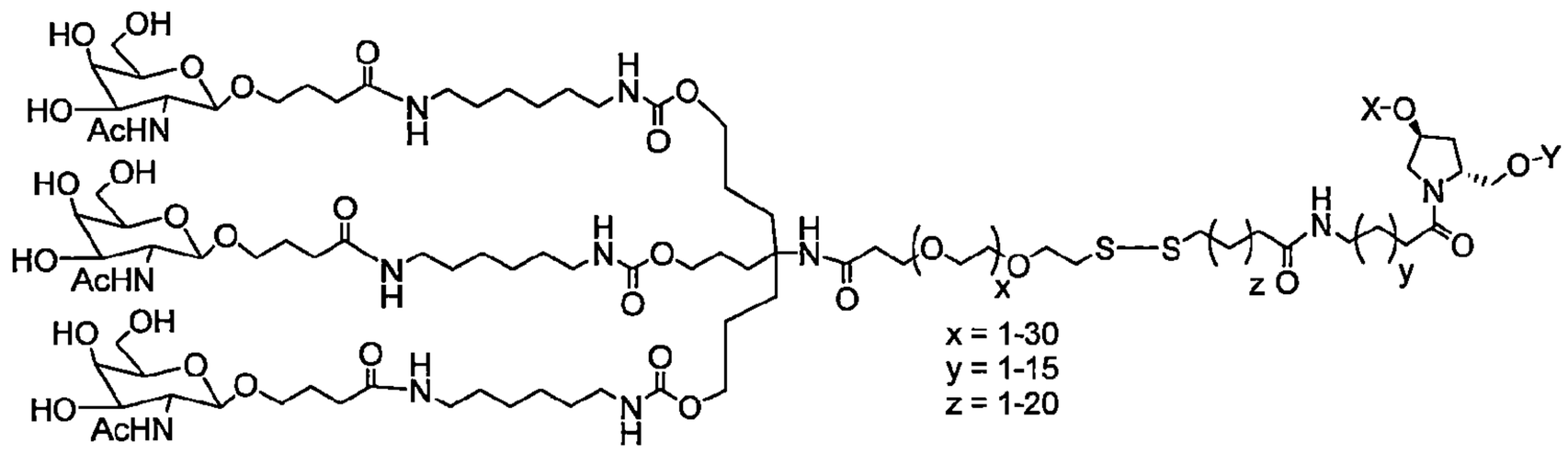
【0701】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



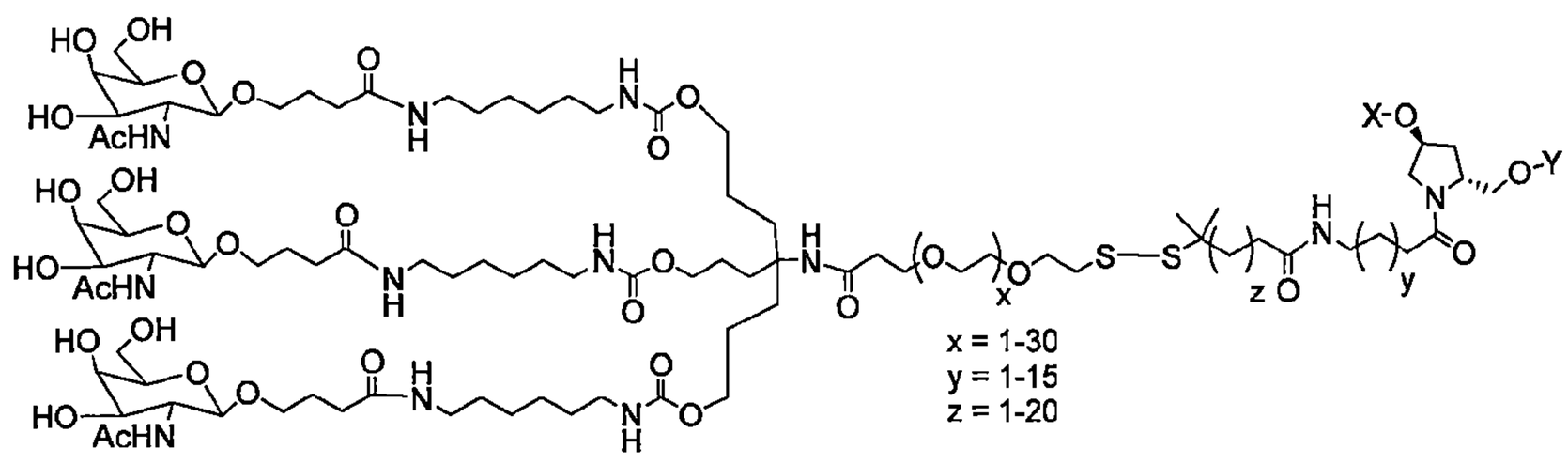
【0702】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



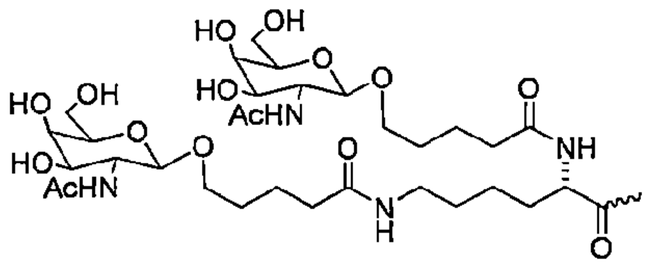
【0703】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



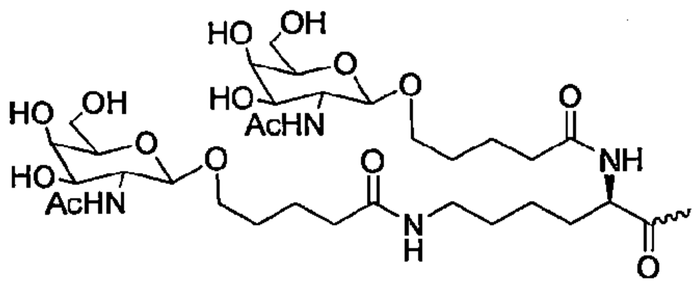
【0704】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



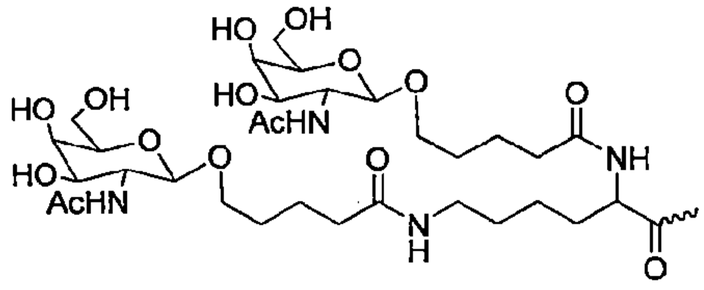
【0705】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



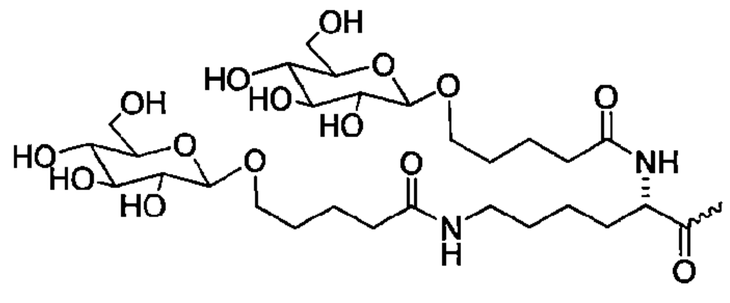
【0706】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



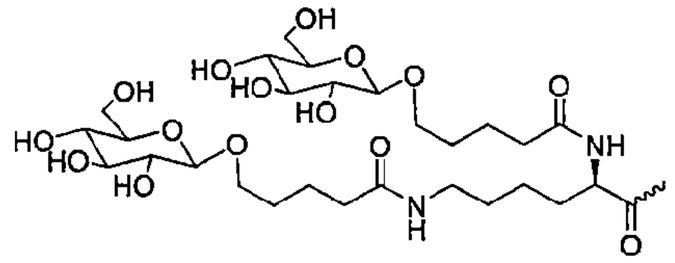
【0707】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



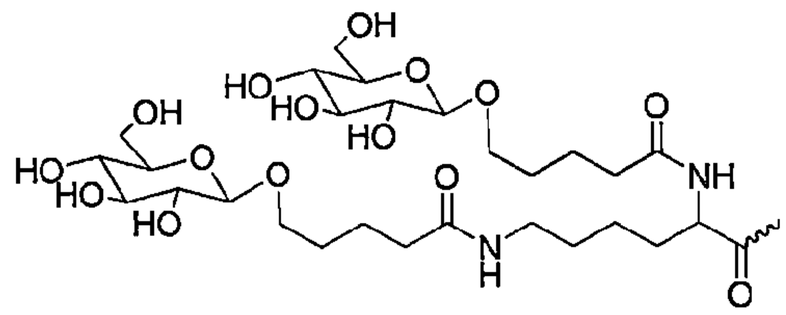
【0708】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



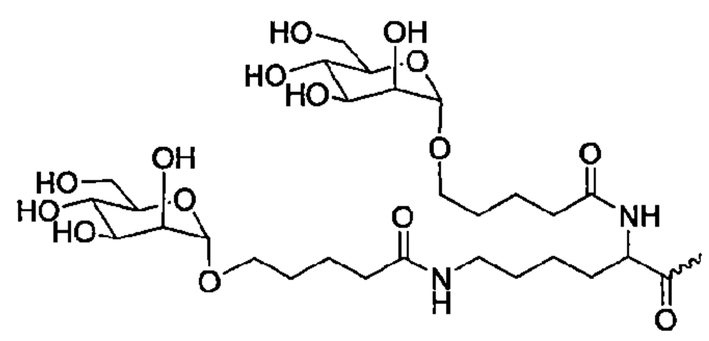
【0709】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



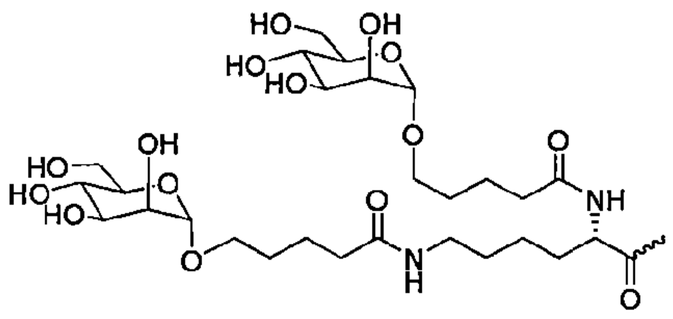
【0710】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



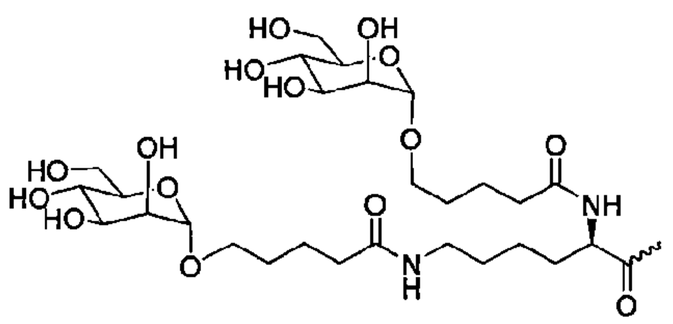
【0711】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



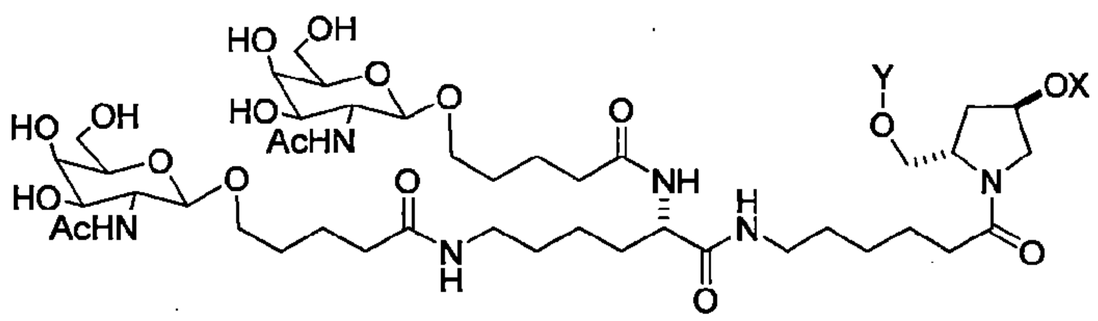
【0712】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



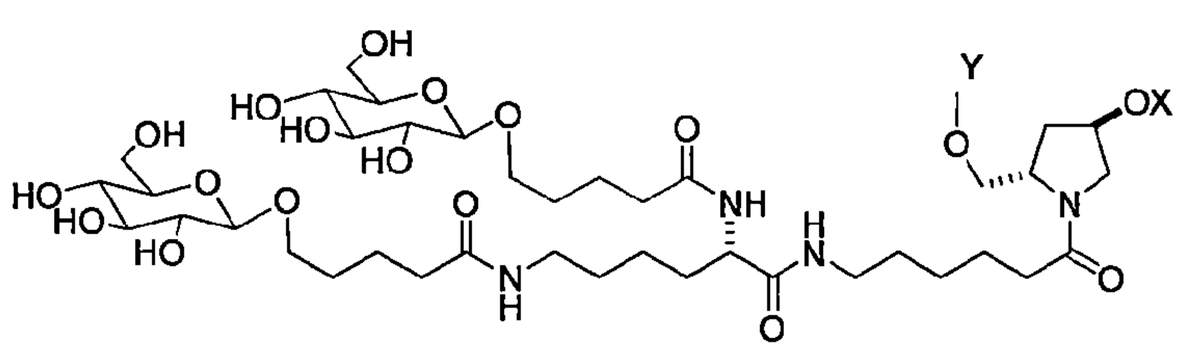
【0713】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：



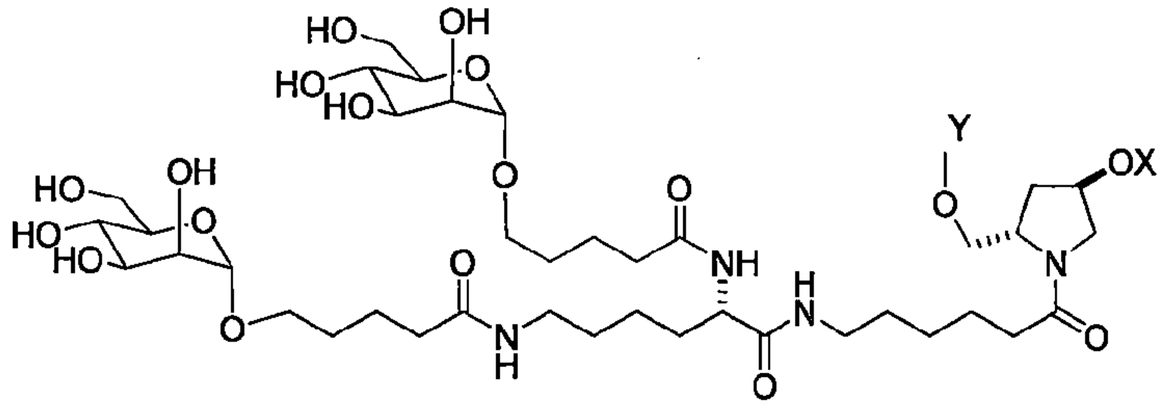
【0714】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



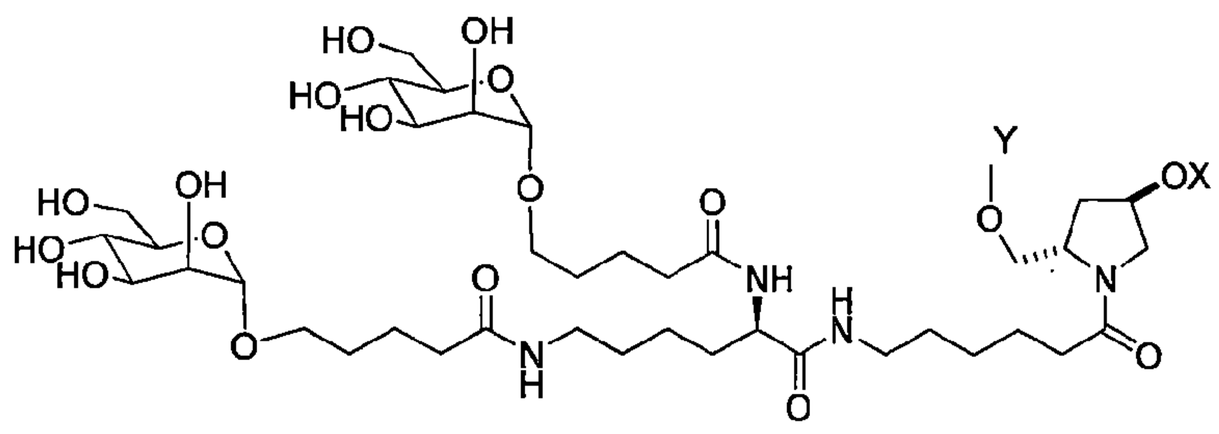
【0715】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



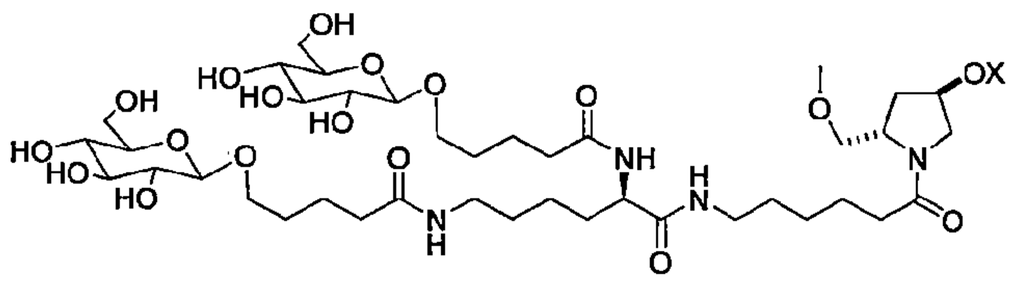
【0716】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



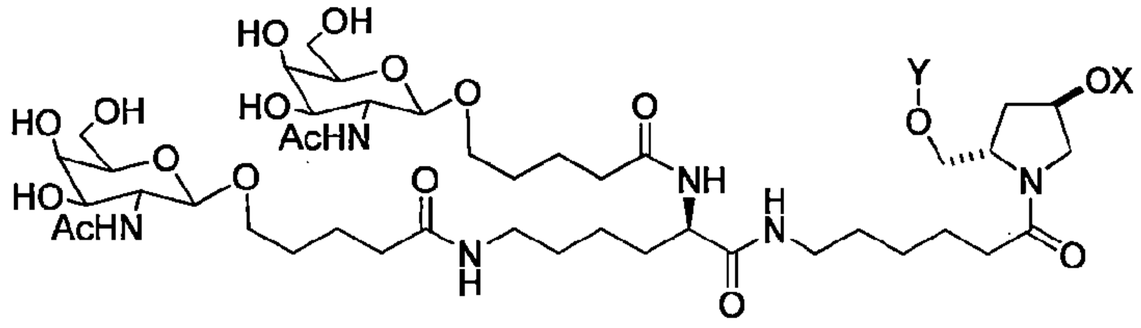
【0717】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



【0718】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



【0719】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



【0720】 有些具體例中，L^{2A}與L^{2B}二者相異。

【0721】 有些較佳具體例中，L^{3A}與L^{3B}二者相同。

【0722】 有些具體例中，L^{3A}與L^{3B}二者相異。

【0723】 有些較佳具體例中，L^{4A}與L^{4B}二者相同。

【0724】 有些具體例中，L^{4A}與L^{4B}二者相異。

【0725】 有些較佳具體例中，L^{5A}、L^{5B}與L^{5C}均相同。

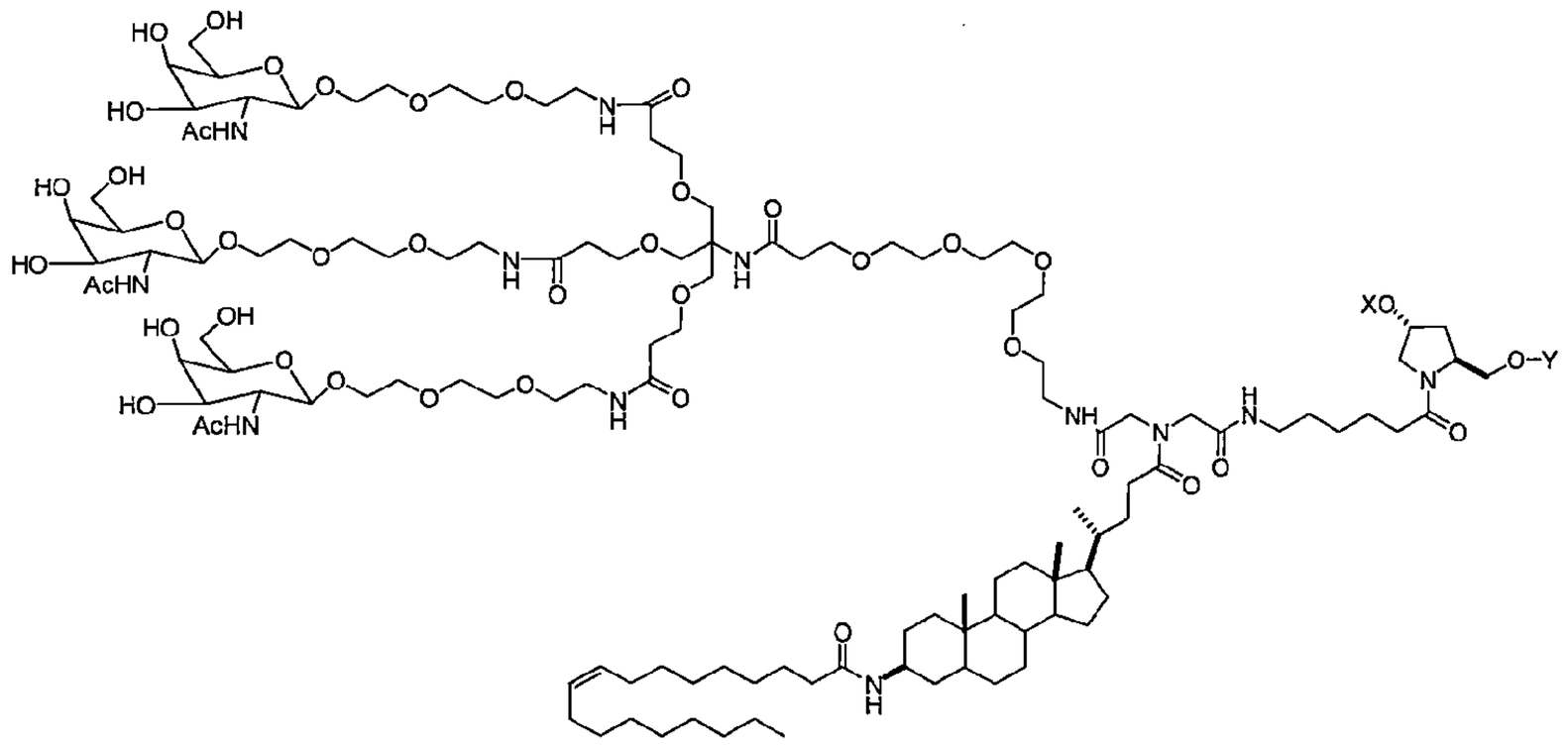
【0726】 有些具體例中，L^{5A}、L^{5B}與L^{5C}其中二者相同。

【0727】 有些具體例中，L^{5A}與L^{5B}相同。

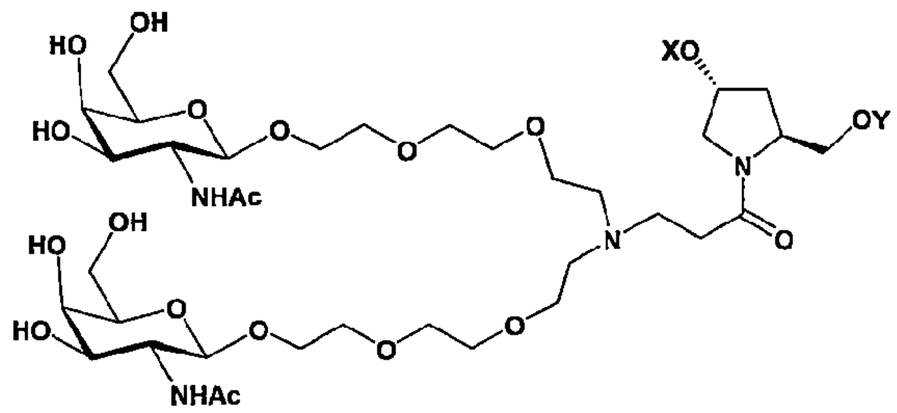
【0728】 有些具體例中，L^{5A}與L^{5C}相同。

【0729】 有些具體例中，L^{5B}與L^{5C}相同。

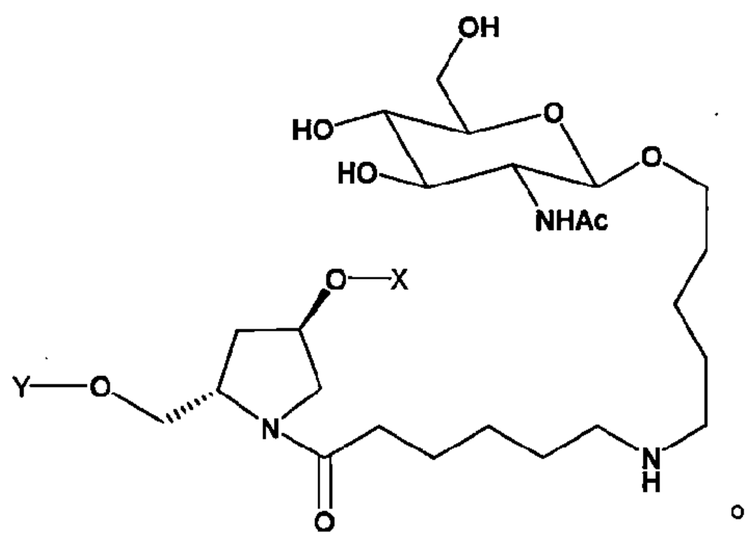
【0730】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



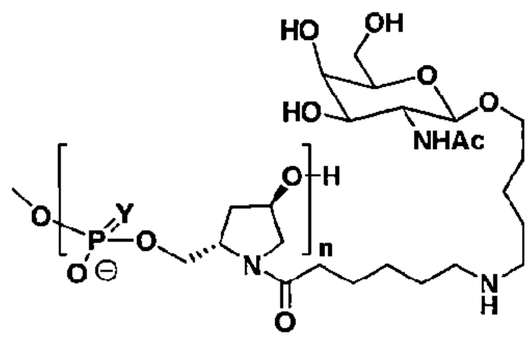
【0731】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



【0732】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：

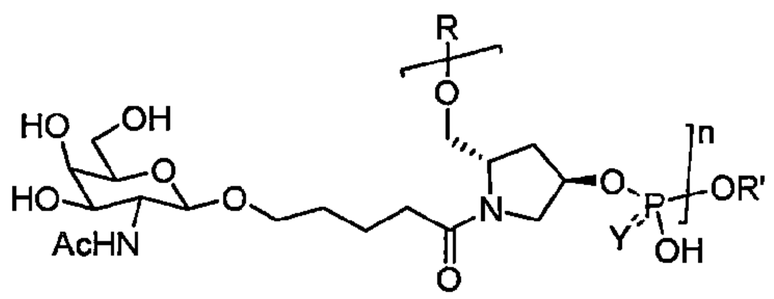


【0733】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



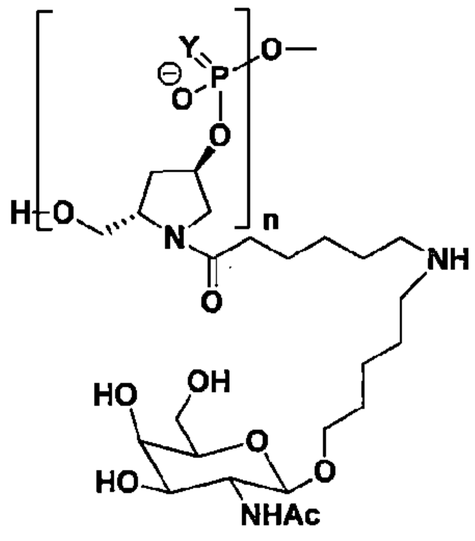
，其中Y為O或S，及n為1-6。

【0734】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



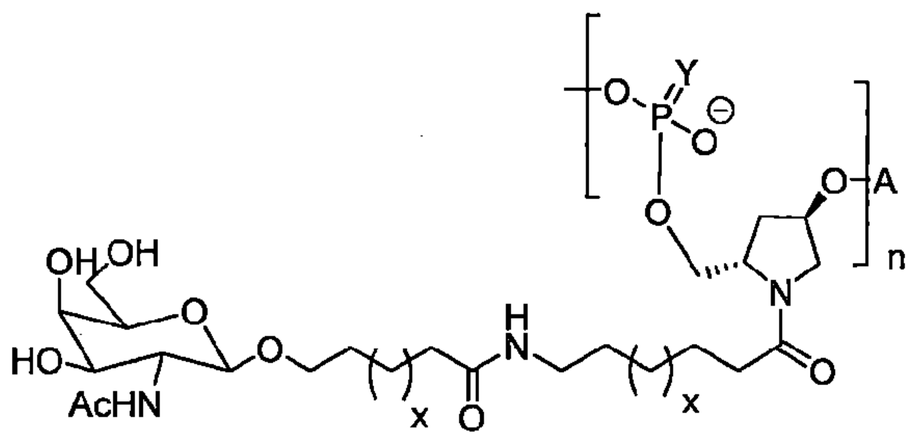
，其中Y為O或S，n為1-6，R為氫或核酸，及R’為核酸。

【0735】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



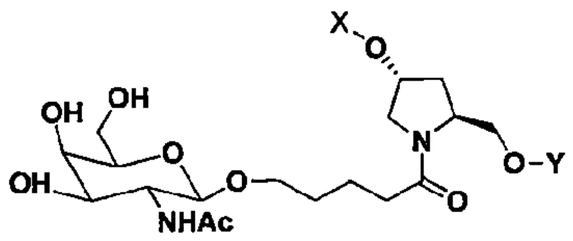
，其中Y為O或S，及n為1-6。

【0736】 某些具體例中，本文說明之寡聚化合物包括(但不限於)，本發明雙股iRNA劑，其包含如下結構式之單體：



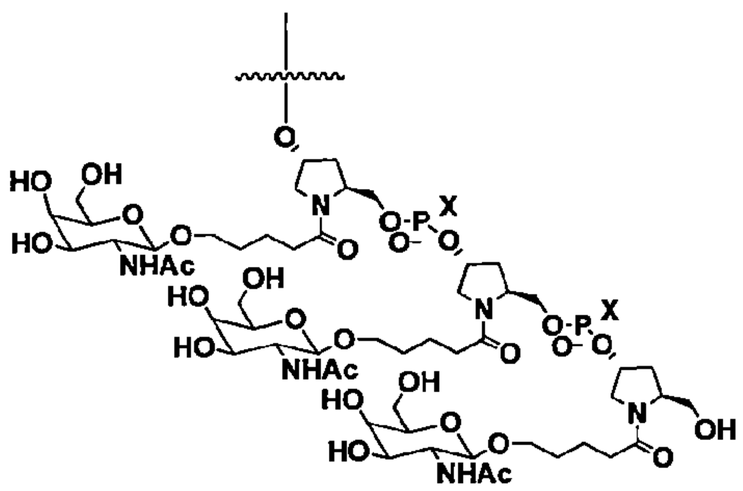
，其中Y為O或S，n為2-6，X為1-6，及A為H或磷酸酯鏈結。

【0737】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含至少1、2、3或4個如下結構式之單體：



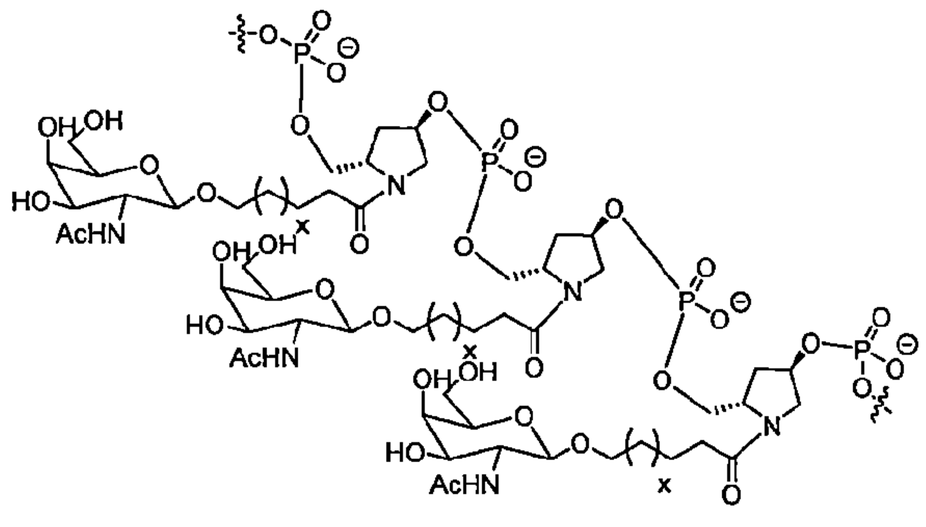
。

【0738】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



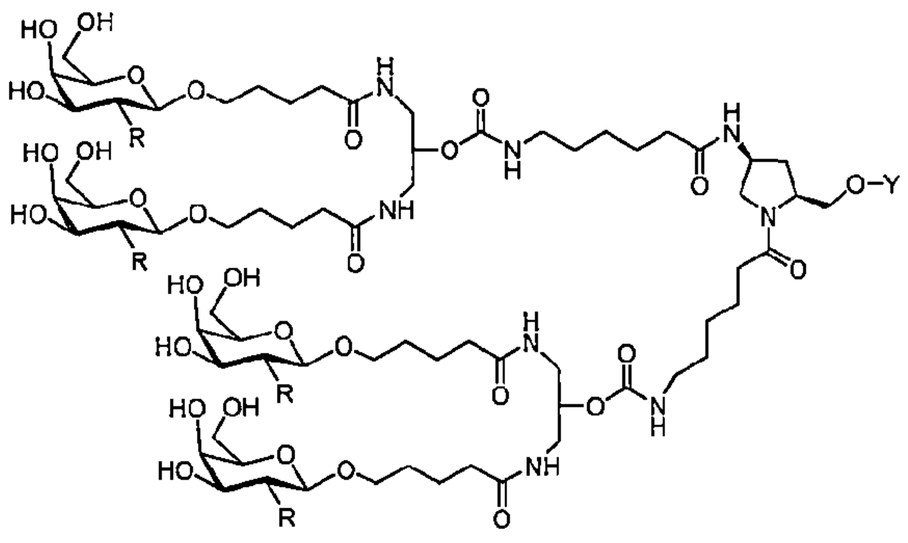
，其中X為O或S。

【0739】 某些具體例中，本文說明之寡聚化合物(包括(但不限於)，本發明雙股iRNA劑)包含如下結構式之單體：



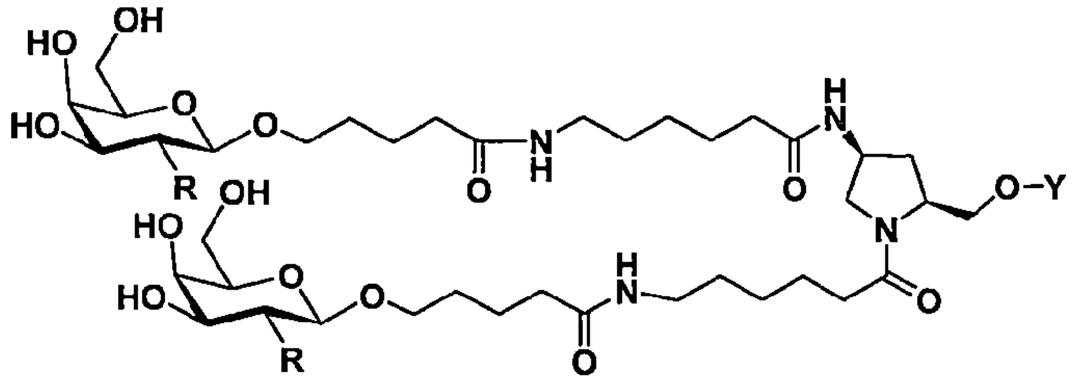
，其中x為1-12。

【0740】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



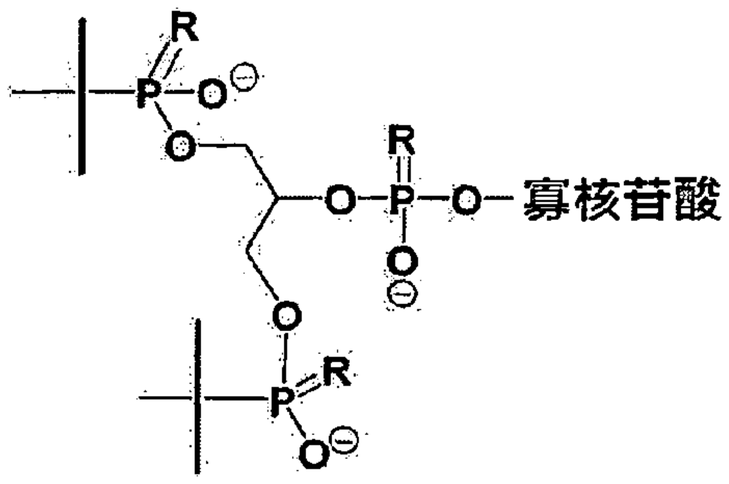
，其中R為OH或$NHCOCH_3$。

【0741】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



，其中R為OH或$NHCOCH_3$。

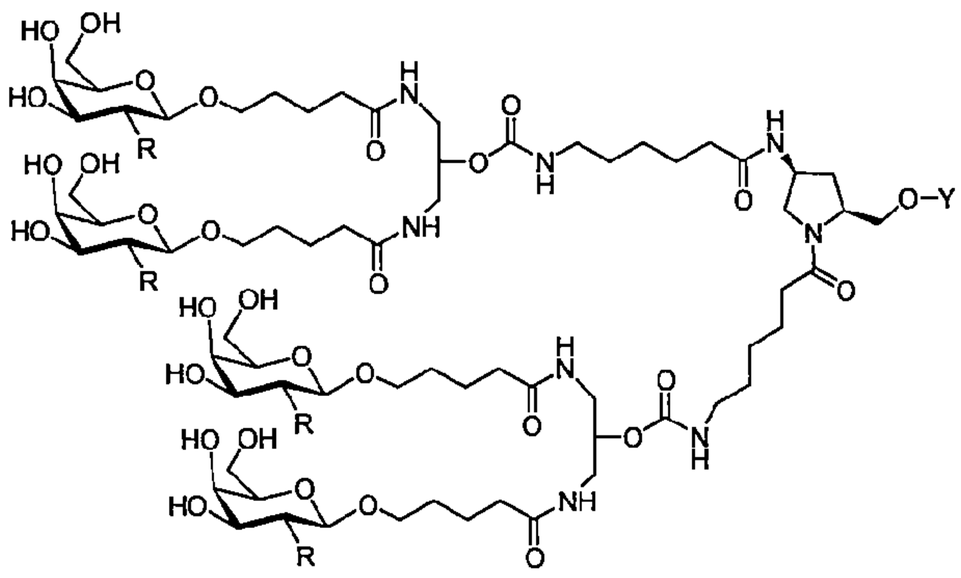
【0742】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



式 (VII)

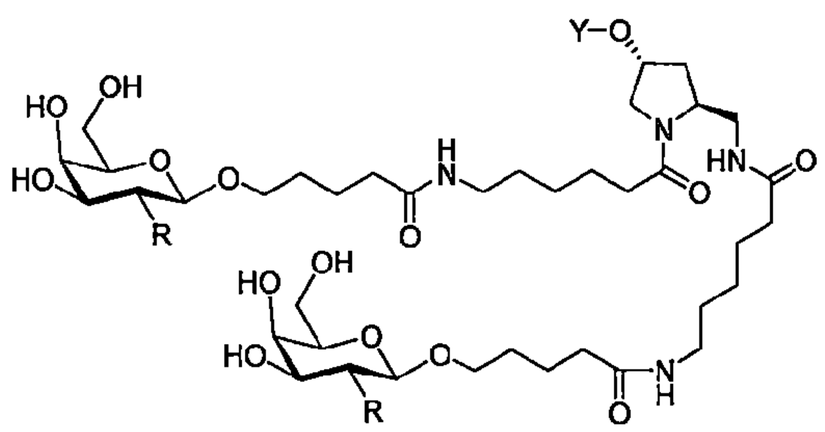
，其中R為O或S。

【0743】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



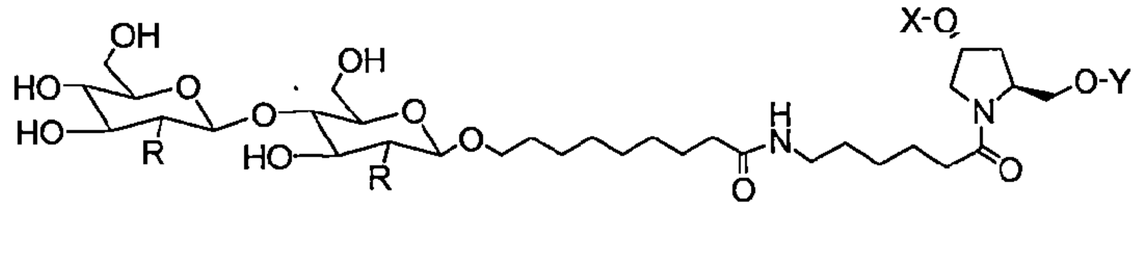
，其中R為OH或$NHCOCH_3$。

【0744】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



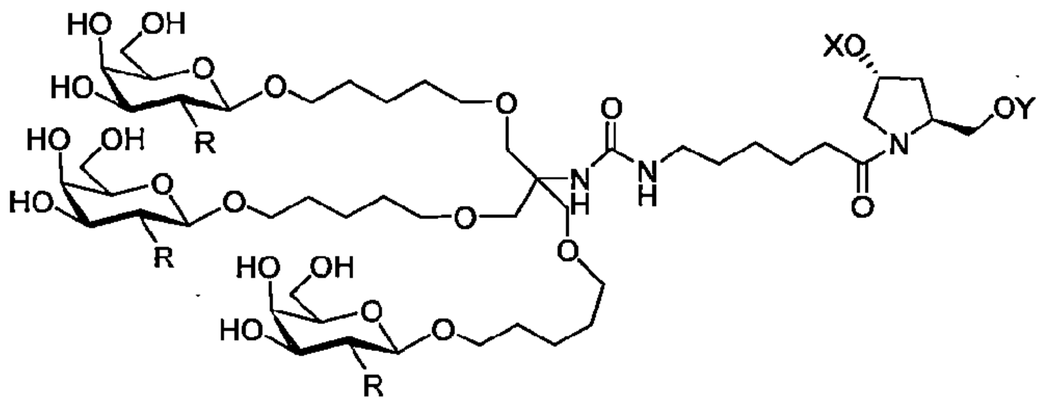
。

【0745】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



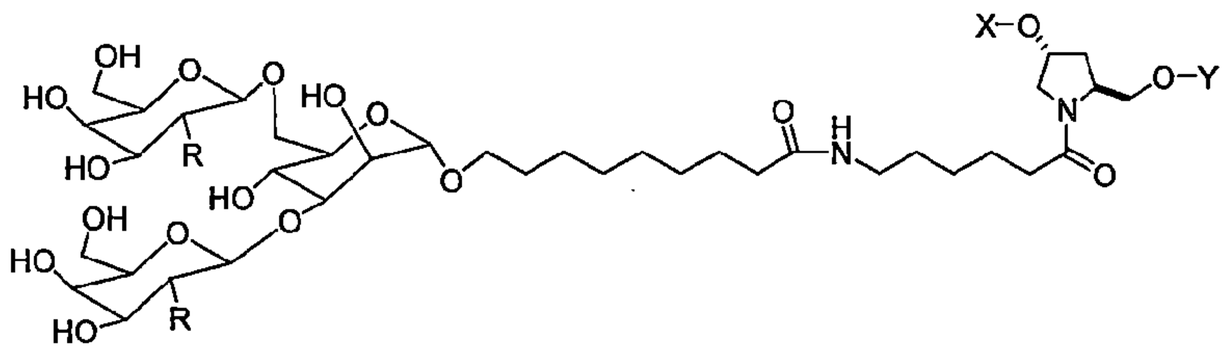
，其中R為OH或$NHCOCH_3$。

【0746】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



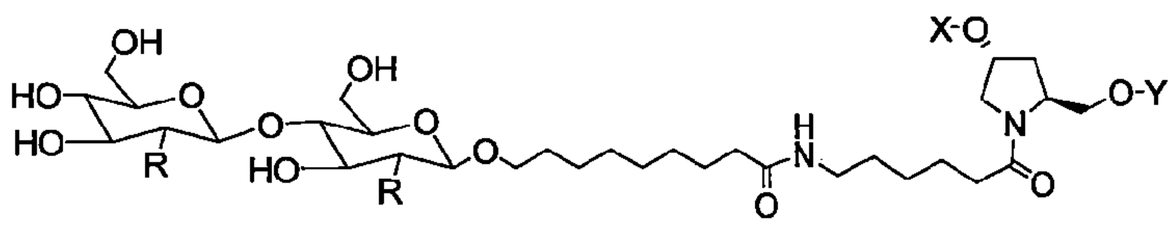
，其中R為OH或$NHCOCH_3$。

【0747】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



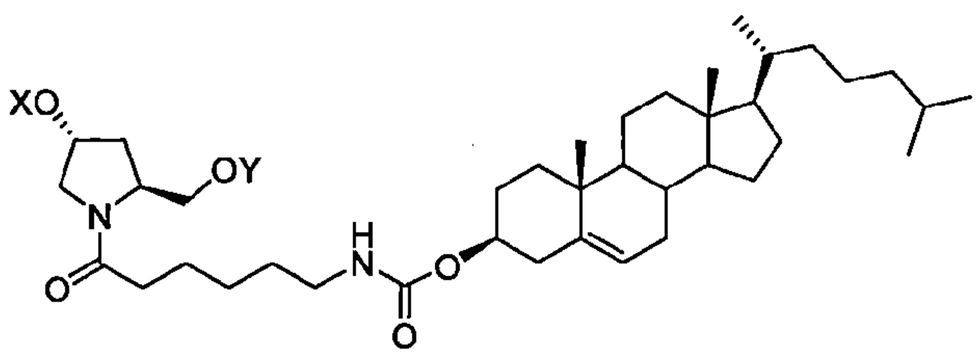
，其中R為OH或$NHCOCH_3$。

【0748】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



，其中R為OH或$NHCOCH_3$。

【0749】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：

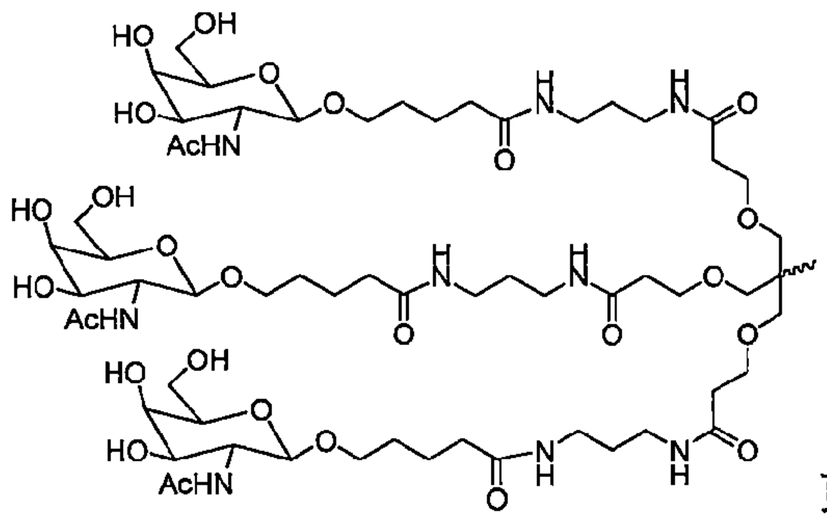


。

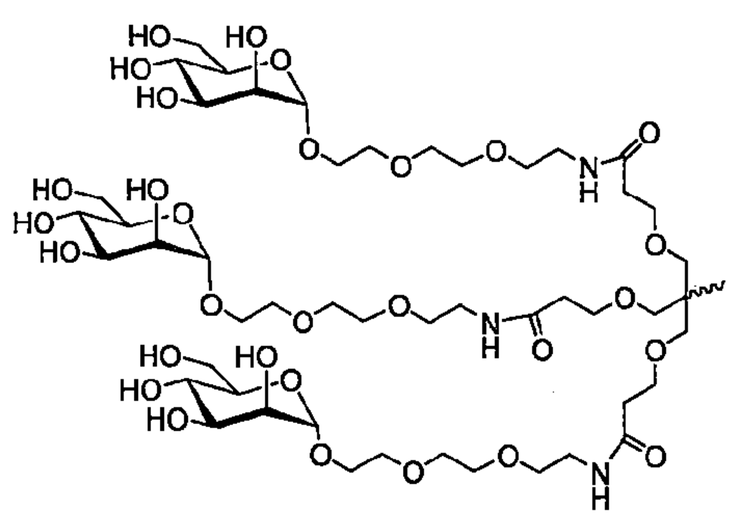
【0750】 上述單體中，X與Y在每次出現時分別獨立地為H、保護基、磷酸酯基團、磷酸二酯基團、活化之磷酸酯基團、活化之亞磷酸酯基團、亞胺基磷酸酯、固體擔體、-P(Z')(Z")O-核苷、-P(Z')(Z")O-寡核苷酸、脂質、PEG、類固醇、聚合物、核苷酸、核苷、或寡核苷酸；及Z'與Z"在每次出現時分別獨立地為O或S。

【0751】 某些具體例中，本發明雙股iRNA劑為與如下結構式之配體

之接合物：

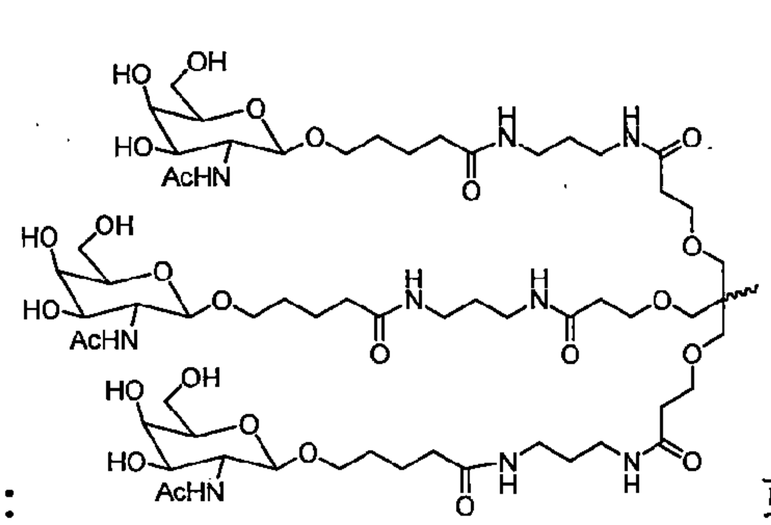


或

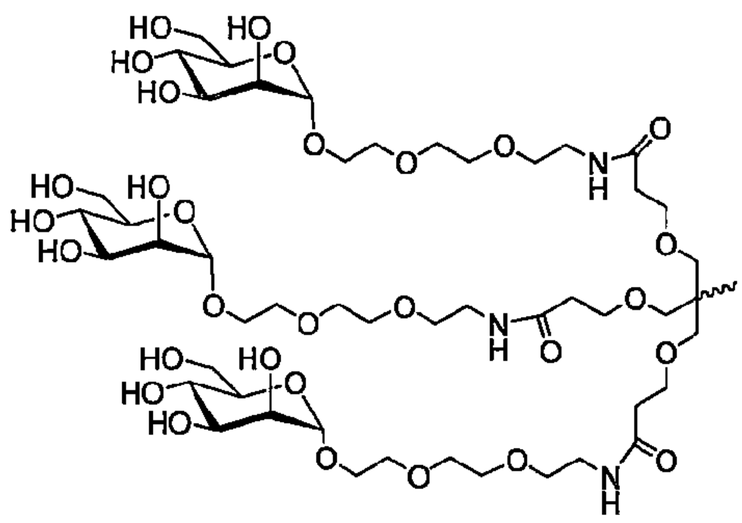


。

【0752】某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之配體：

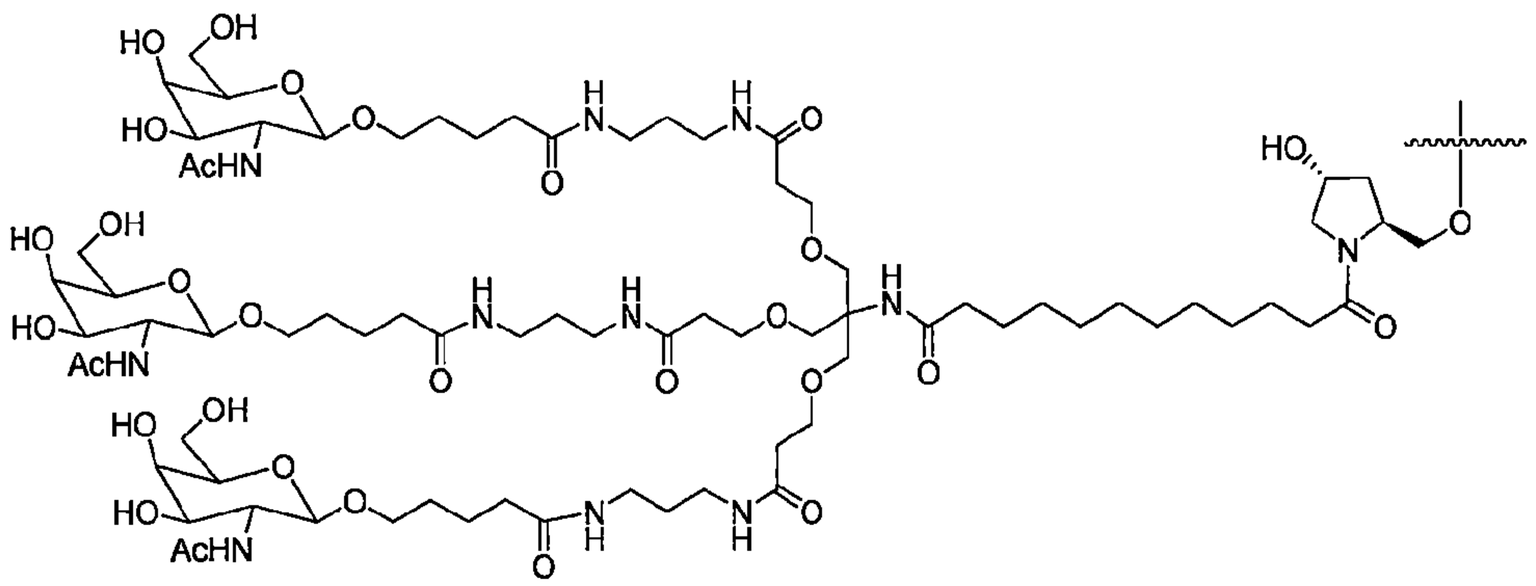


或

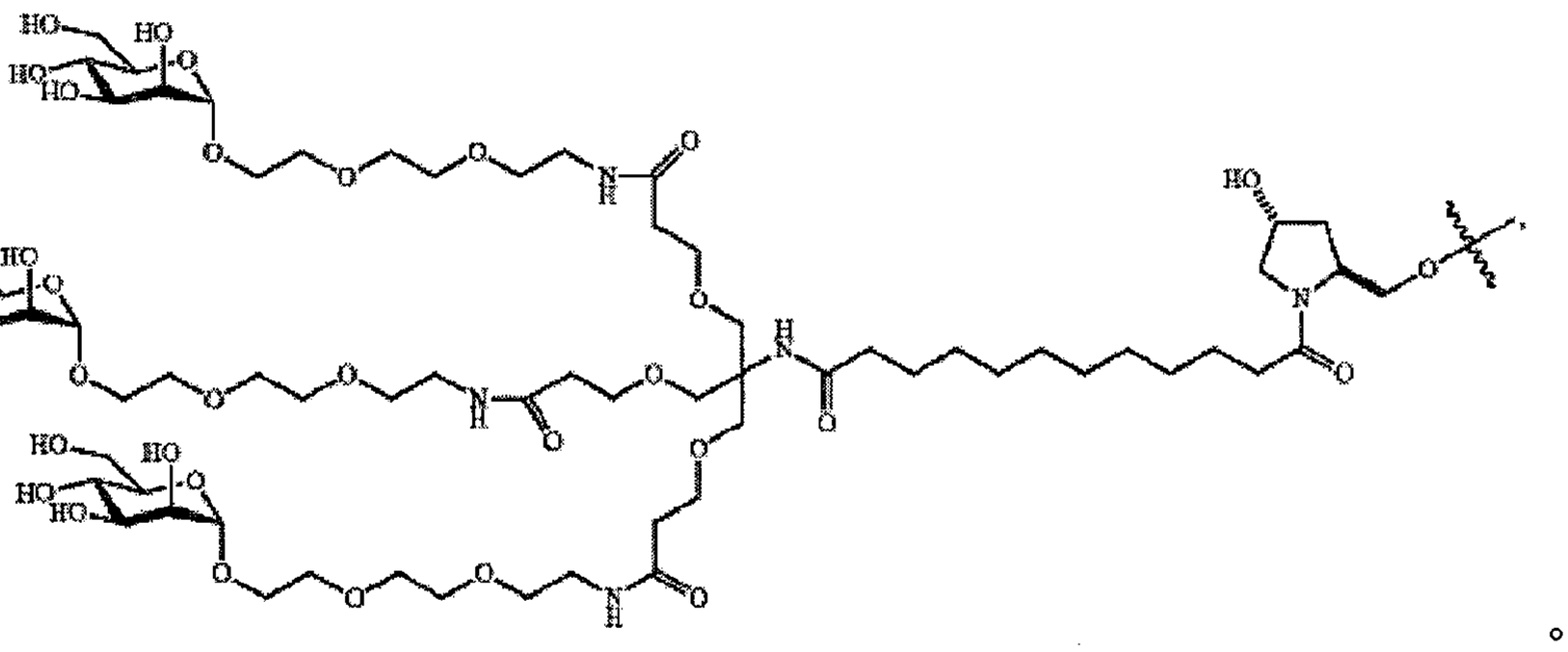


：。

【0753】某些具體例中，本發明雙股iRNA劑包含如下結構式之單體：



或



。

【0754】 上述配體與單體之合成法說明於例如，美國專利案案號8,106,022，其完整內容已以引用之方式併入本文中。

V. 適合眼部傳遞之醫藥組成物

【0755】 本發明亦包括包含本發明iRNA之醫藥組成物與調配物。一項具體例中，本文提供適合眼部傳遞之包含本文所說明iRNA與醫藥上可接受之載子之醫藥組成物。該包含iRNA之醫藥組成物適用於治療個體之眼部疾病或與TTR基因表現(例如，眼睛中TTR基因表現)相關之病變。本發明醫藥組成物可以投與足以抑制眼部細胞中TTR基因表現時之量。

【0756】 供眼部投與時，可採用相關技藝已知之眼部傳遞系統，如施藥器或滴眼劑，傳遞油膏或滴劑液體。此等組成物可包括黏液擬似物如玻尿酸、硫酸軟骨素、羥丙基甲基纖維素或聚(乙烯醇)，防腐劑如山梨酸、EDTA或苯甲基苯扎氯銨(benzylchronium chloride)、及一般用量之稀釋劑及/或載子。

【0757】 供眼部投與時，可施用siRNA(本發明雙股RNA劑)至眼睛表面或附近組織，例如，眼皮內。其等可局部施用，例如，噴霧、滴液、洗眼液、或油膏。可由個體或另一個人(例如，照護者)投與。醫藥可呈定劑量提供或含在配藥器中，再傳遞固定劑量。醫藥亦可投送至眼睛內部，並可利用針頭或其他可送至所選定區域或結構之傳遞裝置投送。

【0758】 一項具體例中，siRNA(本發明雙股RNA劑)係呈醫藥組成物，採用局部投與途徑投與至眼部細胞。

【0759】 一項具體例中，適合眼部傳遞之醫藥組成物可包括siRNA化合物與局部傳遞劑混合。局部傳遞劑可為許多顯微囊泡。顯微囊泡可為

脂質體。有些具體例中，脂質體為陽離子性脂質體。

【0760】 另一項具體例中，dsRNA劑係與局部滲透加強劑混合。一項具體例中，局部滲透加強劑為脂肪酸。脂肪酸可為花生四烯酸、油酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕櫚酸、硬脂酸、亞油酸、亞麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、單油酸酯、二月桂酸酯、甘油基1-單癸酸酯、1-十二碳基氮雜環庚烷-2-酮、醯基肉鹼、醯基膽鹼、或C_{1-10}烷基酯、單酸甘油酯、二酸甘油酯或其醫藥上可接受之鹽。

【0761】 另一項具體例中，局部滲透加強劑為膽汁酸鹽。膽汁酸鹽可為膽酸、去氫膽酸、去氧膽酸、葡膽酸、糖膽酸、糖去氧膽酸、牛黃膽酸、牛黃去氧膽酸、鵝去氧膽酸、熊去氧膽酸、牛黃-24,25-二氫-夫西地酸(fusidate)鈉、甘胺二氫夫西地酸、聚氧伸乙基-9-月桂基醚或其醫藥上可接受之鹽。

【0762】 另一項具體例中，滲透加強劑為螯合劑。螯合劑可為EDTA、檸檬酸、水楊酸、膠原蛋白之N-醯基衍生物、月桂基醚(laureth)-9、β-二酮之N-胺基醯基衍生物或其混合物。

【0763】 另一項具體例中，滲透加強劑為界面活性劑，例如，離子性或非離子性界面活性劑。界面活性劑可為月桂基硫酸鈉、聚氧伸乙基-9-月桂基醚、聚氧伸乙基-20-鯨蠟基醚、全氟化學乳液或其混合物。

【0764】 另一項具體例中，滲透加強劑可選擇自下列各者所成群組：不飽和環狀脲類、1-烷基-烷酮類、1-烯基氮雜環-烷酮類、類固醇消炎劑與其混合物。再另一項具體例中，滲透加強劑可為甘醇、吡咯、氮酮(azone)、或萜烯。

【0765】 一項態樣中，本發明之特徵在於一種包含siRNA化合物與傳遞媒劑之適合眼部投與之醫藥組成物。一項具體例中，siRNA化合物為(a)長度19-25個核苷酸，例如，21-23個核苷酸，(b)與內因性標靶RNA互補，及視需要(c)包括至少一個長度1-5個核苷酸之3'突出。

【0766】 一項具體例中，傳遞媒劑可藉由局部投與途徑傳遞siRNA化合物(例如，雙股siRNA化合物)、或ssiRNA化合物(例如，前驅物(例如，可以加工成為ssiRNA化合物之較大型siRNA化合物)、或編碼siRNA化合物(例如，雙股siRNA化合物、或ssiRNA化合物、或其前驅物)之DNA)至眼部細胞。傳遞媒劑可為顯微囊泡。一項實施例中，顯微囊泡為脂質體。有些具體例中，脂質體為陽離子性脂質體。另一項實施例中，顯微囊泡為微胞。一項態樣中，本發明之特徵在於包括siRNA化合物(例如，雙股siRNA化合物、或ssiRNA化合物(例如，前驅物(例如，可以加工成為ssiRNA化合物之較大型siRNA化合物)、或編碼siRNA化合物(例如，雙股siRNA化合物、或ssiRNA化合物、或其前驅物)之DNA)之注射劑型醫藥組成物。一項具體例中，注射劑型醫藥組成物包括無菌水性溶液或勻散液與無菌粉末。有些具體例中，無菌溶液可包括稀釋劑，如水；生理鹽水；固定油類、聚乙二醇、甘油、或丙二醇。

【0767】 本發明iRNA分子可以納入適合眼部投與之醫藥組成物中。此等組成物通常包括一或多種iRNA物質與醫藥上可接受之載子。本文用語「醫藥上可接受之載子」意指包括任何及所有可與投與至眼細胞之醫藥相容之溶劑、勻散介質、包衣、抗細菌與抗真菌劑、等滲劑與延遲吸收劑等等。此等醫藥活性物質之介質與製劑係相關技藝上習知者。任何習知介質

或製劑除非無法與活性化合物相容，否則均可用於組成物。組成物中亦可包含補充性活性化合物。

【0768】 某些具體例中，雙股iRNA劑可以藉由眼部組織注射，如眼周、結膜、Tenon氏囊下、前房內、玻璃體內、眼內、前部或後部鞏膜旁、視網膜下、結膜下、眼球後、或小管內注射，直接傳遞至眼睛，其係利用導管或其他固定裝置直接施用至眼睛，如：包含多孔性、無孔性、或凝膠狀材料之視網膜片、眼內嵌入物、栓劑或植入物；藉由局部用眼部滴劑或油膏；或藉由在盲管(cul-de-sac)中或植入在鞏膜旁邊(穿透鞏膜)或在鞏膜內(鞏膜內)或眼睛內之緩釋裝置。可透過角膜進行前房內注射至前房，讓藥劑到達小樑組織。小管內注射係注射至靜脈收集通道排放Schlemm氏管或至Schlemm氏管中。

【0769】 一項具體例中，雙股iRNA劑可採用玻璃體內注射，如可供醫護人員現場注射用之預填充針筒，投與至眼睛中，例如，眼睛玻璃體腔室內。

【0770】 供眼部傳遞之雙股iRNA劑可與眼部可接受之防腐劑、共溶劑、界面活性劑、黏度加強劑、滲透加強劑、緩衝劑、氯化鈉、或水組合，形成水性、無菌眼用懸浮液或溶液。溶液調配物製法可由接合物溶於生理上可接受之等滲性緩衝水溶液中。此外，溶液可包括可接受之界面活性劑，以協助溶解雙股iRNA劑。可以添加黏度構成劑，如羥甲基纖維素、羥乙基纖維素、甲基纖維素、聚乙烯基吡咯啶酮、或類似物至醫藥組成物中，以改善雙股iRNA劑之滯留性。

【0771】 製備無菌眼用油膏調配物時，由雙股iRNA劑與防腐劑，於

適當媒劑(如礦物油、綿羊油、或白色石蠟)中組合。無菌眼用凝膠調配物製法可依據相關技藝已知方法，由雙股iRNA劑懸浮於由例如，CARBOPOL®-940 (BF Goodrich, Charlotte, N.C.)、或類似物組成之親水性基質中。

【0772】 醫藥組成物可以一天投與一次，或iRNA可以在一天內依適當間隔投與2次、3次或更多次小劑量，或透過控制釋放調配物傳遞。此時，包含各小劑量中之iRNA含量必需相對較少，以達到總日劑量。該劑量單位亦可組合以供持續傳遞數天，例如，採用常用之持續釋放調配物，其可持續釋放iRNA數天。持續釋放調配物係相關技藝上已知，且特別適用於在特定部位傳遞該製劑，如可與本發明製劑一起使用。此具體例中，該劑量單位包含對應之多重日劑量。

【0773】 其他具體例中，醫藥組成物之單一劑量可以為長效性。本發明有些具體例中，本發明醫藥組成物之單一劑量係兩個月投與一次(bi-monthly)。其他具體例中，本發明醫藥組成物之單一劑量係一個月投與一次。再其他具體例中，本發明醫藥組成物單一劑量係一季投與一次。再其他具體例中，本發明醫藥組成物單一劑量係一年投與兩次(bi-annually)。

【0774】 習此相關技藝者，咸了解某些因素會影響有效治療個體時所需之劑量與投與時間，包括(但不限於)，疾病或病變之嚴重性、過去之治療、該個體之一般健康及/或年齡、及其他現有疾病。此外，以醫療有效量之組成物治療該個體時，可包括單次治療或連續治療。本發明所包括之個別iRNA可採用習知方法或使用本文說明之適當動物模式，依據活體內試驗，估測其有效劑量及活體內半衰期。

VI. 抑制眼部細胞TTR表現之方法

【0775】 本發明亦提供一種抑制眼部細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之方法。該方法包括由眼部細胞與可有效抑制眼部細胞中TTR表現之用量之RNAi劑(例如，雙股RNAi劑)接觸，藉以抑制眼部細胞中TTR表現。

【0776】 可能於活體外或活體內，由眼部細胞與RNAi劑(例如，雙股RNAi劑)接觸。於活體內眼部細胞與RNAi劑之接觸法包括由個體(例如，人類個體)內之眼部細胞或眼部細胞群與RNAi劑接觸。亦可能組合於活體外及活體內與眼部細胞或眼部細胞群接觸之方法。如上文曾討論，可能直接或間接接觸眼部細胞或眼部細胞群。此外，眼部細胞或眼部細胞群可能利用接合在dsRNA劑至少一股的一個或多個內部位置、或接合在dsRNA劑雙股區中至少一股的一個或多個位置之一個或多個親脂性部份體，及/或利用靶向配體(包括本文說明或相關技藝上已知之任何配體)進行接觸。一項具體例中，靶向配體為主導RNAi劑到達所需部位(例如，個體之眼部細胞)之配體。

【0777】 本文所採用術語「抑制」可與「降低」、「靜默」、「下調」、「壓制」及其他類似術語交換使用，且包括任何程度之抑制作用。較佳係該抑制性包括統計上顯著或臨床上顯著抑制。

【0778】 片語 「抑制TTR表現」意指抑制任何TTR基因(如例如，小鼠TTR基因、大鼠TTR基因、猴TTR基因、或人類TTR基因)及TTR基因之變異體或突變體之表現。因此，在經過遺傳操作之眼部細胞、眼部細胞群或生物體中，TTR基因可能為野生型TTR基因、突變體TTR基因(如造成類

澱粉蛋白沉積之突變體TTR基因)、或轉殖TTR基因。

【0779】「抑制TTR基因表現」包括TTR基因之任何抑制程度，例如，至少部份壓制TTR基因表現。TTR基因表現可依據與TTR基因表現有關之任何變數之程度或程度變化來分析，例如，TTR mRNA含量、TTR蛋白質含量，或類澱粉蛋白沉積之數量或程度。此程度可在個別眼部細胞中或在眼部細胞群中(包括例如，源自個體之檢體)中分析。

【0780】可由與TTR表現相關之一或多種變數與對照含量比較其絕對或相對減低程度，來分析抑制性。對照含量可能為相關技藝上採用之任何對照含量，例如，投與前之基線值或由未處理或接受對照物處理(如，例如，僅含緩衝劑之對照物或含無活性劑之對照物)之類似個體、眼部細胞或檢體所測得之含量。

【0781】有些本發明方法之具體例中，眼部細胞之TTR基因表現係受到抑制至少約5%、至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約35%,至少約 40%、至少約45%、至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%%、或達分析檢測程度以下。有些具體例中，抑制TTR基因表現會造成恢復正常TTR基因程度，以致處理前之程度與正常對照組程度之間差異減少至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%。有些具體例中，該抑制性為臨床上相關抑制性。

【0782】對 TTR 基因表現之抑制性可由其中 TTR 基因已轉錄且已接

受處理(例如，由眼部細胞或眼部細胞群與本發明 RNAi 劑接觸，或對含有該細胞或細胞群之個體投與本發明 RNAi 劑)之第一組眼部細胞或眼部細胞群(此等細胞可能存在於例如，源自個體之檢體)之 mRNA 表現量之減低程度來表示，因此當與實質上與該第一組眼部細胞或眼部細胞群相同，但未曾接受處理之第二組眼部細胞或眼部細胞群(對照組細胞(群))比較時，TTR 基因表現已受到抑制。較佳具體例中，採用下列公式，由處理組細胞中之 mRNA 表現量相對於對照組細胞中 mRNA 量之百分比來分析抑制性：

$$\frac{\text{(對照組細胞之mRNA)-(處理組細胞之mRNA)}}{\text{(對照組細胞之mRNA)}} \times 100\%$$

【0783】 或者，對TTR基因表現之抑制性可藉由在功能上與TTR基因表現相關之參數之減低程度來分析，例如，TTR蛋白質表現、視黃醇結合性蛋白質含量、維生素A含量、或包含TTR之類澱粉蛋白沉積之存在。可於任何組成性表現或經過基因組工程處理而表現TTR之眼部細胞中，採用相關技藝上已知分析法測定TTR基因靜默。

【0784】 對TTR蛋白質表現之抑制性可由眼部細胞或眼部細胞群之TTR蛋白質表現之減低程度來分析(例如，源自個體之檢體中之蛋白質表現量)。如上文中mRNA抑制性分析法之說明，處理組眼部細胞或眼部細胞群之蛋白質表現量之抑制性同樣可由相對於對照組眼部細胞或眼部細胞群之

蛋白質含量之百分比表示。

【0785】 可用於分析TTR基因表現之抑制性之對照組眼部細胞或眼部細胞群包括未曾與本發明RNAi劑接觸之眼部細胞或眼部細胞群。例如，對照組眼部細胞或眼部細胞群可能源於接受RNAi劑治療前之個體(例如，人類或動物個體)。

【0786】 眼部細胞或眼部細胞群之TTR mRNA表現量或循環中之TTR mRNA含量可採用相關技藝上已知用於分析mRNA表現之任何方法測定。一項具體例中，測定檢體中TTR表現量時，係檢測轉錄之聚核苷酸或其一部份，例如，TTR基因之mRNA。可能採用RNA萃取技術，包括例如，使用酸苯酚/胍異硫氰酸酯萃取法(RNAzol B；Biogenesis)、RNeasy RNA製備套組(Qiagen)或PAXgene(PreAnalytix，瑞士)，從細胞中萃取RNA。利用核糖核酸雜交法之典型分析法包括核連綴分析法、RT-PCR、RNase保護分析法(Melton等人，Nuc. Acids Res. 12:7035)、北方墨點法、原位雜交法、與微陣列分析法。循環中之TTR mRNA可採用PCT/US2012/043584說明之方法檢測，其等完整內容已以引用之方式併入本文中。.

【0787】 一項具體例中，使用核酸探針測定TTR表現量。本文所採用術語「探針」係指可以選擇性結合特異性TTR之任何分子。探針可由習此相關技藝者合成，或衍生自適當之生物製劑。探針可能特別設計帶有標記物。可用為探針之分子實施例包括(但不限於)，RNA、DNA、蛋白質、抗體與有機分子。

【0788】 單離之mRNA可用於雜交或擴增分析法，其包括(但不限於)，南方或北方分析法、聚合酶鏈反應(PCR)分析法與探針陣列法。其中

一種測定mRNA含量之方法涉及由單離之mRNA與可與TTR mRNA雜交之核酸分子(探針)接觸。一項具體例中，mRNA係固定在固態表面上，並與探針接觸，例如，讓單離之mRNA流經瓊脂凝膠，讓mRNA從凝膠轉移至膜(如：硝基纖維素)上。另一項具體例中，由探針(群)固定在固態表面上，讓mRNA與探針(群)接觸，例如，使用Affymetrix基因晶片陣列。習此相關技藝者很容易擷用已知之mRNA檢測法來測定TTR mRNA含量。

【0789】 另一種測定檢體中TTR表現量之方法涉及例如，檢體中mRNA之核酸擴增及/或逆轉錄酶過程(製備cDNA)，例如，RT-PCR(述於Mullis之1987年美國專利案案號4,683,202之實驗具體例)、連接酶鏈反應(Barany(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88：189-193)、自主序列複製(Guatelli 等人(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87：1874-1878)、轉錄擴增系統(Kwoh 等人(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86：1173-1177)、Q-β複製酶(Lizardi 等人(1988) *Bio/Technology* 6:1197)、滾環式複製(Lizardi 等人，美國專利案案號5,854,033)或任何其他核酸擴增方法，然後採用習此相關技藝者習知之技術檢測擴增之分子。若核酸分子含量極低時，此等檢測程序特別適用於檢測此等核酸分子。本發明特別態樣中，由定量性產螢光式RT-PCR(亦即TaqMan™系統)測定TTR表現量。

【0790】 可使用膜墨點(如：用於雜交分析之如：北方、南方、斑點等等分析法)，或顯微分析孔、檢體試管、凝膠、珠粒或纖維(或任何包含已結合核酸之固態擔體)追蹤TTR mRNA之表現量。參見美國專利案案號5,770,722、5,874,219、5,744,305、5,677,195與5,445,934，其等已以引用之方式併入本文中。亦包括於溶液中使用核酸探針測定TTR表現量。

【0791】較佳具體例中，採用分支DNA(bDNA)分析法或實時PCR(qPCR)分析mRNA表現量。

【0792】可採用相關技藝上已知用於測定蛋白質含量之任何方法測定TTR蛋白質表現量。此等方法包括例如，電泳法、毛細管電泳法、高效液相層析法(HPLC)、薄層層析法(TLC)、高擴散性層析法、液相或凝膠沉澱反應、吸光光譜分析、比色分析法、光譜光度分析法、流式細胞計、免疫擴散法(單相或雙向)、免疫電泳、西方墨點、放射免疫分析法(RIA)、酵素-聯結免疫吸附分析法(ELISA)、免疫螢光分析法、電化學發光分析法等等。

【0793】有些具體例中，可檢測或追蹤類澱粉蛋白TTR沉積之減低程度，來追蹤本發明方法之效力。本文所採用「減低類澱粉蛋白TTR沉積」包括個體之眼睛或眼睛區域內TTR沉積之任何大小、數量或嚴重度之減少，或預防或降低TTR沉積形成，其可於活體外或活體內採用相關技藝上已知方法分析。例如，有些分析類澱粉蛋白沉積之方法說明於Gertz, M.A. & Rajukumar, S.V. (Editors) (2010), Amyloidosis: Diagnosis and Treatment, New York: Humana Press。分析類澱粉蛋白沉積之方法可包括生物化學分析法，及目視或電腦化分析類澱粉蛋白沉積，目視法可採用例如，免疫組織化學染色法、螢光標示法、光學顯微鏡、電子顯微鏡、螢光顯微鏡、或其他型式之顯微鏡。可採用侵入性或非侵入性顯影模式，包括例如，CT、PET或NMR/MRI顯影法，分析類澱粉蛋白沉積。

【0794】本文所採用術語「檢體」係統稱從個體單離之類似眼部流體、眼部細胞或眼部組織，及個體內之眼部流體、眼部細胞或眼部組織。生物

流體實施例包括眼部流體等等。組織檢體可包括來自組織、器官或局部區域之檢體。例如，檢體可能衍生自特定器官、器官之一部份、或彼等器官內之流體或細胞。某些具體例中，檢體可能衍生自視網膜或部份視網膜(例如，視網膜色素上皮層及/或睫狀體)。較佳具體例中，「衍生自個體之檢體」係指衍生自個體之視網膜組織。

【0795】 有些本發明方法之具體例中，對該個體投與RNAi劑，使RNAi劑傳遞至該個體內之特定部位。可在該個體內特定部位之流體或組織所衍生自之檢體中測定TTR mRNA或TTR蛋白質含量或含量變化，來分析對TTR表現之抑制性。一項具體例中，該部位係視網膜。另一項具體例中，該部位係肝臟。該部位亦可為上述任何一個部位之細胞之小部份或子群(例如，肝細胞或視網膜色素上皮層)。該部位可能亦包括表現特定受體型態之細胞(例如，表現脫唾液酸醣蛋白受體之肝細胞)。

VII. 治療或預防TTR相關眼部疾病之方法

【0796】 本發明亦提供一種治療或預防個體之TTR相關眼部疾病之方法。該等方法包括對該個體投與醫療有效量或預防有效量之本發明RNAi劑。

【0797】 本文所採用「個體」為動物，如：哺乳動物，包括靈長類(如人類、非人類靈長類，例如，猴、與黑猩猩)、非靈長類(如牛、豬、駱駝、大羊駝、馬、山羊、兔、綿羊、倉鼠、天竺鼠、貓、狗、大鼠、小鼠、馬、與鯨魚)、或鳥(例如，鴨或鵝)。個體可包括基因轉殖生物體。

【0798】 一項具體例中，該個體為人類，如接受治療或評估如本文所說明可能因降低眼部細胞中TTR基因表現而受益之疾病、病變或病症之人

類；處於罹患可能因減低眼部細胞中TTR基因表現而受益之疾病、病變或病症之風險之人類；罹患可能因減低眼部細胞中TTR基因表現而受益之疾病、病變或病症之人類；及/或正接受治療可能因減低眼部細胞中TTR基因表現而受益之疾病、病變或病症之人類。

【0799】有些具體例中，個體罹患TTR相關眼部疾病，例如，過去曾治療或正接受治療TTR突變之其他症候之患有TTR突變之個體，例如，患有TTR相關疾病，如老年全身性類澱粉蛋白變性(SSA)；全身性家族性類澱粉蛋白變性；家族性類澱粉蛋白多發性神經病變(FAP)；家族性類澱粉蛋白心肌病變(FAC)；及腦膜類澱粉蛋白變性，亦稱為腦膜或腦膜腦血管類澱粉蛋白變性、中樞神經系統(CNS)類澱粉蛋白變性、或第VII型類澱粉蛋白變性之個體。

【0800】一項具體例中，本發明RNAi劑係投與罹患家族性類澱粉蛋白心肌病(FAC)之個體。另一項具體例中，本發明RNAi劑係投與罹患混合表型FAC之個體，亦即同時患有心臟與神經缺損之個體。又另一項具體例中，本發明RNAi劑係投與罹患混合表型FAP之個體，亦即同時患有神經與心臟缺損之個體。一項具體例中，本發明RNAi劑係投與罹患FAP並已接受同種原位肝移植(OLT)治療之個體。另一項具體例中，本發明RNAi劑係投與罹患老年全身性類澱粉蛋白變性(SSA)之個體。本發明方法之其他具體例中，本發明RNAi劑係投與罹患家族性類澱粉蛋白心肌病(FAC)與老年全身性類澱粉蛋白變性(SSA)之個體。正常-序列TTR在老年人中引起心臟類澱粉蛋白變性，稱為老年全身性類澱粉蛋白變性(SSA)(亦稱為老年心臟類澱粉蛋白變性(SCA)或心臟類澱粉蛋白變性)。SSA經常在許多其他器官中

伴隨出現顯微沉積。TTR突變加速TTR類澱粉蛋白形成過程，成為發展出臨床上顯著TTR類澱粉蛋白變性(亦稱為ATTR(類澱粉蛋白變性-甲狀腺素運載蛋白型))之最重要風險因子。已知有超過85種類澱粉蛋白變性形成性*TTR*變異體會引起家族性全身性類澱粉蛋白變性。

【0801】 本發明方法之有些具體例中，本發明RNAi劑係投與罹患甲狀腺素運載蛋白(TTR)-相關性家族性類澱粉蛋白多發性神經病變(FAP)之個體。

【0802】 其他具體例中，該個體為處於發展出TTR相關眼部疾病風險之個體，例如，具有與發展出TTR相關眼部疾病相關之TTR基因突變之個體(例如，出現可能發展成TTR眼部類澱粉蛋白變性之癥兆或症狀之前)、具有TTR相關眼部疾病家族病史之個體(例如，出現可能發展成TTR眼部類澱粉蛋白變性之癥兆或症狀之前)、或已出現可能發展成TTR眼部類澱粉蛋白變性之癥兆或症狀之個體。

【0803】 「TTR相關眼部疾病」包括任何型態之TTR類澱粉蛋白變性(ATTR)，其中TTR會影響眼睛中異常細胞外凝集物或類澱粉蛋白沉積之形成。TTR相關眼部疾病或病變包括(但不限於)，TTR相關青光眼、TTR相關玻璃體混濁、TTR相關視網膜異常、TTR相關視網膜類澱粉蛋白沉積、TTR相關視網膜血管病變、TTR相關虹膜類澱粉蛋白沉積、TTR相關扇貝樣虹膜、及TTR相關水晶體的類澱粉蛋白沉積。

【0804】 一項態樣中，本發明RNAi劑係經眼內投與罹患TTR相關眼部疾病之個體，如TTR相關青光眼、TTR相關玻璃體混濁、TTR相關視網膜異常、TTR相關視網膜類澱粉蛋白沉積、TTR相關視網膜血管病變、TTR相

關虹膜類澱粉蛋白沉積、TTR相關扇貝樣虹膜、及TTR相關水晶體的類澱粉蛋白沉積。

【0805】 眼內投與法可經由眼周、結膜、Tenon氏囊下、前房內、玻璃體內、眼內、前部或後部鞏膜旁、視網膜下、結膜下、眼球後、或小管內注射投與。

【0806】 有些具體例中，RNAi劑對個體之投與量可以在個體之眼部細胞(如：RPE及/或CE細胞)中，有效抑制之TTR表現。可以採用上述方法分析該可以在個體之眼部細胞中有效抑制TTR表現時之用量，該等方法包括涉及分析對TTR mRNA、TTR蛋白質、或相關變數(如類澱粉蛋白沉積)之抑制。

【0807】 有些具體例中，對個體投與醫療或預防有效量之RNAi劑。

【0808】 本文所採用「醫療有效量」意指包括RNAi劑之用量，當投與患者供治療TTR相關眼部疾病時，其用量足以治療疾病(例如，減輕、緩解或維持現有疾病或疾病之一或多種症狀)。「醫療有效量」可能隨RNAi劑、該製劑之投與法、該疾病與其嚴重性、及病史、年齡、體重、家庭病史、基因組態、受TTR表現介導之病理過程階段、可能進行之過去或併行之任何治療、及接受治療之患者之其他個別特徵而異。

【0809】 本文所採用「預防有效量」意指包括RNAi劑之用量，當投與尚未經歷或出現TTR相關疾病症狀但可能發展出該疾病之個體時，該用量足以預防或緩解該疾病或疾病之一或多種症狀。可緩解之症狀包括視力降低、夜間視力降低、周邊視覺減弱、視網膜血管衰退、視網膜血管扭曲、角膜敏感、視網膜靜脈閉鎖、及角膜格狀失養症，及其他眼底鏡症狀或與

TTR相關眼部病變相關之病症。一項具體例中，RNAi劑係投與罹患玻璃體類澱粉蛋白變性之個體。一項具體例中，RNAi劑係投與睫狀體上皮層(CE)中罹患眼部類澱粉蛋白變性之個體。另一項具體例中，RNAi劑係投與視網膜色素上皮層(RPE)中罹患眼部類澱粉蛋白變性之個體。緩解疾病包括減緩疾病過程或降低後續發展之疾病嚴重性。「預防有效量」可能隨RNAi劑、該製劑之投與法、該疾病風險程度、及病史、年齡、體重、家庭病史、基因組態、可能進行之過去或併行之任何治療、及接受治療之患者之其他個別特徵而定。

【0810】「醫療有效量」或「預防有效量」亦包括可以在適用於任何治療之合理效益/風險比值下產生某些所需局部或全身性效應時之RNAi劑用量。本發明方法所採用RNAi劑可能投與足以產生適用於此等治療之合理效益/風險比值時之量。

【0811】本文所採用片語「醫療有效量」與「預防有效量」亦包括可以在治療、預防、或處理由TTR表現所介導病理過程或病理過程之症狀(群)上提供效益時之用量。TTR類澱粉蛋白變性症狀包括視力降低、夜間視力降低、周邊視覺減弱、視網膜血管衰退、視網膜血管扭曲、角膜敏感、視網膜靜脈閉鎖、及角膜格狀失養症，及其他眼底鏡症狀或與TTR相關眼部病變相關之病症。

【0812】投與個體RNAi劑之劑量應經過設計，以平衡該特定劑量之風險與效益，例如，達到所需TTR基因壓制程度(例如，依據如上述定義之TTR mRNA壓制、TTR蛋白質表現或減少類澱粉蛋白沉積)或所需之醫療性或預防性效應，同時避免不期望之副作用。

【0813】 有些具體例中，該製劑係經玻璃體內投與個體。有些具體例中，經皮下投與之RNAi劑劑量係含在小於或等於1 ml體積之例如，醫藥上可接受之載子中。

【0814】 有些具體例中，係經由儲積式注射法投與。儲積式注射可依持續方式長期釋放RNAi劑。因此儲積式注射法可減少為了達到所需效果(例如，需要抑制TTR，或醫療性或預防性效果)時之投與頻率。

【0815】 有些具體例中，係利用幫浦投與。該幫浦可能為體外幫浦或手術植入之幫浦。

【0816】 有些具體例中，RNAi劑對個體之投與量可以在個體內眼部細胞中有效抑制TTR表現。可以採用上述方法分析該可以在個體中眼部細胞中有效抑制TTR表現時之用量，該等方法包括涉及分析對TTR mRNA、TTR蛋白質、或相關變數(如類澱粉蛋白沉積)之抑制。

【0817】 本發明方法亦改善接受治療之個體之預後。例如，本發明方法可以降低個體在治療期間之臨床惡化事件機率。

【0818】 投與個體之RNAi劑劑量可經過設計，以平衡該特定劑量之風險與效益，例如，達到所需TTR基因壓制程度(例如，依據如上述定義之TTR mRNA壓制、TTR蛋白質表現或減少類澱粉蛋白沉積所分析)或所需之醫療性或預防性效應，同時避免不期望之副作用。

【0819】 一項具體例中，本發明iRNA劑係依體重計之劑量投與個體。「依體重計之劑量」(例如，以mg/kg計之劑量)為隨個體體重變化之iRNA劑劑量。另一項具體例中，iRNA劑係呈固定劑量投與個體。「固定劑量」(例如，以毫克計之劑量)意指不論任何特定個體相關因子(如體重)，所有個

體均使用單一劑量之iRNA劑。一項特定具體例中，本發明iRNA劑之固定劑量係依據預定體重或年齡決定。

【0820】 可對個體投與醫療量之iRNA，如約0.01 mg/kg至約50 mg/kg dsRNA。該出示數值之間之數值與範圍亦為本發明一部份。

【0821】 有些具體例中，RNAi劑係投與約0.01 mg至約1 mg之間之固定劑量。某些具體例中，對個體投與固定劑量約0.001 mg至約1 mg之雙股RNAi劑。某些具體例中，對個體投與固定劑量約0.001 mg至約0.1 mg之雙股RNAi劑。某些具體例中，該製劑係約一個月傳遞一次。某些具體例中，該製劑係一季投與一次(亦即約每三個月一次)。某些具體例中，該製劑係每半年投與一次(亦即約每6個月一次)。

【0822】 某些具體例中，RNAi劑係以約0.001、0.003、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、或約1 mg之固定劑量投與個體，其係每個月一次、每兩個月一次、每三個月一次(亦即每季一次)、每四個月一次、每五個月一次、每六個月一次(亦即每年兩次)、或一年一次。

【0823】 有些具體例中，RNAi劑係投與二個或更多個劑量。若需要促進重覆或經常輸注時，建議植入傳送裝置。有些具體例中，後續劑量之數量或用量係依據要達成之所需效應(例如，壓制TTR基因)，或要達成之醫療性或預防性效應(例如，降低類澱粉蛋白沉積或降低TTR相關眼部疾病症狀)而定。

【0824】 有些具體例中，RNAi劑係與其他醫療製劑或其他醫療性療程組合。例如，適合治療TTR相關疾病之其他製劑或其他醫療性療程可包

括：肝臟移植，其可減少體內突變體TTR含量；帕特斯蘭(Patisiran)(ONPATTRO™)；塔法米得(Tafamidis)(Vyndaqel)，其可在動力學上安定TTR四聚體，防止TTR類澱粉蛋白形成作用中所需之四聚體解離作用發生；利尿劑，其可用於例如，降低涉及心臟之TTR類澱粉蛋白變性之水腫。

【0825】 一項具體例中，該個體係先接受投與起始劑量，然後接受一劑或多劑維持劑量之RNAi劑。該或該等維持劑量可與起始劑量相同或更低，例如，起始劑量之一半。此外，治療療程可持續一段時間，端賴該特定疾病之性質、其嚴重性、及患者之整體條件而定。治療後，可追蹤患者之病情變化。若患者對當前劑量程度沒有顯著反應時，可以提高RNAi劑劑量，或若觀察到疾病狀態已緩和、或若疾病狀態已消除、或若觀察到不期望之副作用時，可以降低劑量。

VIII. 本發明套組

【0826】 本發明亦提供實施任何本發明方法之套組。此等套組包括一或多種RNAi劑與使用說明書，例如，指示其可用於抑制眼部細胞中TTR表現之說明書，其說明讓眼部細胞與可以有效抑制眼部細胞中TTR表現之RNAi劑用量接觸。該套組可視需要再包含讓眼部細胞接觸RNAi劑之方式(例如，注射裝置或輸注幫浦)、或測定TTR抑制性之方式(例如，測定TTR mRNA或TTR蛋白質抑制性之方式)。此等測定TTR抑制性之方式可能包括從個體取得檢體。本發明套組可視需要再包含對個體投與RNAi劑之方式或用於測定醫療有效量或預防有效量之方。

【0827】 RNAi劑可呈任何合宜型式提供，如含於無菌注射用水中之

溶液。

【0828】 本發明利用下列不應構成進一步限制之實施例說明。本申請案全文所摘錄之所有參考文獻、申請中之專利申請案與公開專利案均已以引用之方式併入本文中。

實施例

【0829】 下列實驗證實，由一個或多個親脂性部份體與雙股RNAi劑至少一股的一個或多個內部位置或在雙股區內之接合對靶向眼部細胞中TTR之RNAi劑之靜默活性之有利效應。

實施例1. 對大鼠眼部TTR表現之抑制性

【0830】 對大鼠經玻璃體內投與已優化用於眼部細胞傳遞之dsRNA劑，例如，包含介導傳遞至眼部細胞之配體之dsRNA劑(OC接合；AD-67175)、或經部份修飾之dsRNA劑(例如，並非正義股與反義股之所有核苷酸均包含核苷酸修飾)(AD-23043)、或已優化用於肝傳遞之dsRNA劑(例如，包含靶向傳遞dsRNA劑至肝細胞之配體之dsRNA劑(ESC；AD-65808)，以測定此等製劑對抑制眼部TTR之效力。

【0831】 此等製劑之經修飾正義股與反義股核苷酸序列示於下表。

雙螺旋	寡聚物	標靶	股	經修飾序列 (從5’向3’)	SEQ ID NO：

AD-23043.1	A-51593.1	TTR_rodent(囓齒動物)	正義	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdTsL10	53
	A-32756.1	TTR	反義	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT	54
AD-65808.1	A-130279.1	mTTRsc	正義	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfasAfdTdTL10	55
	A-117800.10	m/r TTR	反義	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	56
AD-67175.1	A-130279.1	mTTRsc	正義	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfasAfdTdTL10	55
	A-130284.1	mTTRsc	反義	VPusUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	57

【0832】 對每一隻老鼠其中一個眼睛，經玻璃體內注射投與單一50μg劑量之優化供眼部細胞傳遞之dsRNA劑(OC接合)、或單一50μg劑量之經部份修飾之dsRNA劑、或單一50μg劑量之優化供肝傳遞之dsRNA劑(ESC)、或PBS (作為對照組)。

【0833】 在投與後14天，測定TTR mRNA含量，以評估治療效力。簡言之，取出眼睛，排出玻璃體液。採用Foster D.J.等人(2018) *Mol. Ther.* 26:708說明之程序製備組織溶胞液。採用定量性bDNA分析法(Panomics)分析眼部mRNA含量。計算各組mRNA含量，並相對於無處理組組織檢體校正，得到相對TTR mRNA，以相對於無處理組組織之殘留訊息%表示。

【0834】 如第1圖所示，相較於經部份修飾之製劑或具有ESC修飾之

製劑，OC接合之製劑顯著降低大鼠眼部組織中TTR之mRNA含量。

【0835】 過去曾顯示，TTR蛋白質主要在眼睛視網膜色素上皮細胞(RPE)與睫狀上皮細胞(CE)中產生(參見例如，Hara等人(2010) *Arch Ophthalmal* 128: 206、與Kawaji等人*Exp Eye Res*, 81, 2005, 306)。

【0836】 因此，為了證實OC接合製劑特異性抑制RPE與CE中之TTR表現，從接受經玻璃體內投與單一50 μg劑量之OC接合dsRNA劑(AD-67175)或未接合dsRNA劑(未接合；AD-77745)之大鼠眼睛中，單離後部組織(視網膜、視網膜色素上皮層、脈絡膜、與鞏膜)與前部組織(睫狀上皮層、角膜、水晶體、虹膜、與房水)，如上述說明測定此等組織中之TTR mRNA含量。

【0837】 此等製劑之經修飾正義股與反義股核苷酸序列示於下表。

雙螺旋	寡聚物	標靶	股	經修飾序列 (從5'向3')	SEQ ID NO：
AD-67175.1	A-130279.1	mTTRsc	正義	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfasAfdTdTL10	55
	A-130284.1	mTTRsc	反義	VPusUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	57
AD-77745.1	A-147399.1	m/rTTR	正義	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfsasAf	58
	A-130284.2	mTTRsc	反義	VPusUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	57

【0838】 如第2A與2B圖所示，OC接合製劑在後部組織與前部組織

中，均顯著降低TTR表現。

【0839】 此外，如第2D圖所示，後部與前部眼睛組織之組織病理學分析證實，經玻璃體內投與之OC接合製劑並未與任何治療相關之病理微症狀有關。

實施例2. 在基因轉殖小鼠中對人類眼部TTR表現之抑制性

【0840】 為了分析已優化供眼部傳遞來抑制人類TTR表現之RNAi劑之特異性，對表現人類TTR且具有V30M突變之基因轉殖小鼠投與供眼部傳遞之OC接合RNAi劑，AD-70191(參見Santos, SD., Fernaandes, R.與Saraiva, MJ. (2010) *Neurobiology of Aging*, 31, 280-289)。已知V30M突變會造成人類第I型家族性類澱粉蛋白多發性神經病變。參見例如，Lobato, L. (2003) *J Nephrol.*, 16(3):438-42。

【0841】 在第0天，對基因轉殖小鼠經玻璃體內投與單一2.5 μg或7.5 μg劑量之AD-70191。第7天時，收集眼部組織，如上述測定TTR之mRNA含量。為了比較，亦測定小鼠TTR、小鼠錐桿同源框、與小鼠視紫質之mRNA含量。

【0842】 AD-70191之經修飾正義股與反義股核苷酸序列示於下表中。

雙螺旋	寡聚物	標靶	股	經修飾序列 (從5'向3')	SEQ ID NO：
AD-70191.1	A-139575.1	hTTRsc02	正義	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagsadTdTL10	59

	A-131902.1	h/c TTR	反義	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17

【0843】 如第3A圖所示，單一2.5 μg或7.5 μg劑量之AD-70191顯著降低基因轉殖小鼠中hTTR表現。7.5 μg劑量比2.5 μg劑量更有效。反之，如第3B-3D圖所示，小鼠TTR、錐桿同源框與視紫質之mRNA含量未減低，表示AD-AD-70191特異性靶向人類TTR。

實施例3. 對非人類靈長類之眼部TTR表現之抑制性

【0844】 亦在非人類靈長類眼睛中分析供眼部傳遞之經各種不同修飾之dsRNA劑之效力：AD-291845、AD-70500、AD-290674、AD-290676、與AD-290675。第0天，對雄性食蟹獼猴(Cynomolgous monkeys)(n=3)經玻璃體內投與單一1 mg或3 mg劑量之AD-291845、AD-70500、AD-290674、AD-290676、或AD-290675。投與後31天，收集眼睛。切下組織(RPE與CE)，從組織製備溶胞液。如上述測定TTR mRNA含量。

【0845】 此等製劑之經修飾與未修飾正義股與反義股核苷酸序列示於下表中。

【0846】 如第4圖所示，單一3 mg劑量之AD-291845或AD-70500均顯著降低睫狀體上皮層(CE)與視網膜色素上皮層(RPE)二者中TTR之mRNA含量。

【0847】 此外，如第5B圖所示，免疫組織化學(IHC)分析顯示，投與單一3 mg劑量之AD-29185，在第31天，顯著降低TTR蛋白質。

【0848】 接受注射之眼睛在第-7、3、8、與30天之眼底鏡檢查(表1)及在第31天之組織病理學檢查(表2)顯示，沒有出現與經玻璃體內投與之AD-

29185相關之顯著治療相關性病理症狀。

【0849】 此等數據證實，AD-291845特異地且有效地降低眼部組織中之TTR mRNA與蛋白質。

雙螺旋	寡聚物	標靶	股	經修飾序列 (從5’向3’)	SEQ ID NO：	配體
AD-70500.1	A-140611	hTTRsc02	正義	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL10	60	3’- 膽固醇
	A-131902	h/c TTR	反義	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17	
AD-290674.1	A-515644	h/c TTR	正義	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL57	61	3’-C18
	A-131902	h/c TTR	反義	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17	
AD-290675.1	A-515644	h/c TTR	正義	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL57	61	3’-C18
	A-265470	TTR	反義	VPuCfuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	62	
AD-290676.1	A-140611	hTTRsc02	正義	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL10	60	3’- 膽固醇
	A-265470	TTR	反義	VPuCfuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	62	
AD-291845.1	A-555719	TTR	正義	usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa	15	C16

雙螺旋	寡聚物	標靶	股	經修飾序列 (從5’向3’)	SEQ ID NO：	配體
	A-131902	h/c TTR	反義	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17	

表1. 非人類靈長類於投與後第-7、3、8、與30天之眼底鏡檢查綜合說明

PBS (動物個體，N=3)	TTR siRNA -AD-291845 (動物個體，N=3)
正常	正常
眼瞼炎眼睛/右眼	正常
正常	正常

表2. 非人類靈長類之組織病理學綜合說明(第31天)

右眼	PBS (N=3)	TTR siRNA -AD-291845 (N=3)
單核浸潤(睫狀體、葡萄膜、鞏膜)	正常	正常
退化；水晶體	正常	正常
退化視網膜	正常	正常
退化視神經	正常	正常

【0850】 下表綜合說明實施例1-3所使用之未經修飾與經修飾正義股與反義股核苷酸序列。

雙螺旋	寡聚物	經修飾序列 (從5’向3’)	SEQ ID NO:	股	未經修飾序列	SEQ ID NO:	標靶

AD-23043	A-51593	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdTsL10	53	正義	CAGUGUUCUUGCUCUAUAA	63	TTR_rodent (嚙齒動物)
	A-32756	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT	54	反義	UUAUAGAGCAAGAACACUG	64	TTR
AD-65808	A-130279	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfasAfdTdTL10	55	正義	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA	65	mTTRsc
	A-117800	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	56	反義	UUAUAGAGCAAGAACACUGUUUU	66	m/r TTR
AD-70191	A-139575	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfasAfdTdTL10	55	正義	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA	65	mTTRsc
	A-130284	VPusUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	57	反義	UUAUAGAGCAAGAACACUGUUUU	66	mTTRsc
AD-70191	A-139575	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagsadTdTL10	59	正義	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	hTTRsc02
	A-131902	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17	反義	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13	h/c TTR

AD-70500	A-140611	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL10	60	正義	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	hTTRsc02
	A-131902	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17	反義	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13	h/c TTR
AD-77745	A-147399	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfsasAf	58	正義	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA	65	m/rTTR
	A-130284	VPusUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	57	反義	UUAUAGAGCAAGAACACUGUUUU	66	mTTRsc
AD-291845	A-555719	usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa	15	正義	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	TTR
	A-131902	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17	反義	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13	h/c TTR

雙螺旋	寡聚物	經修飾序列 (從5'向3')	SEQ ID	股	未經修飾序列	SEQ ID	標靶
AD-70500	A-140611	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL10	60	正義	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	hTTRsc02
	A-131902	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17	反義	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13	h/c TTR
AD-290674	A-515644	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL57	61	正義	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	h/c TTR
	A-131902	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17	反義	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13	h/c TTR
AD-290675	A-515644	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL57	61	正義	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	h/c TTR
	A-265470	VPuCfuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	62	反義	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13	TTR
AD-290676	A-140611	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL10	60	正義	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	hTTRsc02
	A-265470	VPuCfuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	62	反義	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13	TTR
AD-291845	A-555719	usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa	15	正義	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	TTR
	A-131902	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17	反義	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13	h/c TTR

表3. 所出示核酸序列中所使用核苷酸單體之縮寫。咸了解，當此等單體出現在於寡核苷酸中時，係利用5'-3'-磷酸二酯鍵相互連結。

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

N	任何核苷酸(G、A、C、T或U)
a	2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯
as	2'-O-甲基腺苷-3’-硫代磷酸酯
c	2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯
cs	2'-O-甲基胞苷-3’-硫代磷酸酯
g	2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯
gs	2'-O-甲基鳥苷-3’-硫代磷酸酯
t	2’-O-甲基-5-甲基胸腺嘧啶-3’-磷酸酯
ts	2’-O-甲基-5-甲基胸腺嘧啶-3’-硫代磷酸酯
u	2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯
us	2'-O-甲基尿苷-3’-硫代磷酸酯
s	硫代磷酸酯鏈結
L96	N-[參(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇 Hyp-(GalNAc-烷基)3
dA	去氧-腺苷
dC	去氧-胞苷
dG	去氧-鳥苷
(dT)	2`-去氧胸苷-3`-磷酸酯
Y34	2-羥基甲基-四氫呋喃-4-甲氧基-3-磷酸酯 (無鹼基2'-OMe呋喃糖)
Y44	2-羥基甲基-四氫呋喃-5-磷酸酯
P	磷酸酯
VP	乙烯基-膦酸酯

(Ahd)	2'-O-十六碳基-腺苷-3'-磷酸酯
(Ahds)	2'-O-十六碳基-腺苷-3'-硫代磷酸酯
(Chd)	2'-O-十六碳基-胞苷-3'-磷酸酯
(Chds)	2'-O-十六碳基-胞苷-3'-硫代磷酸酯
(Ghd)	2'-O-十六碳基-鳥苷-3'-磷酸酯
Ghds)	2'-O-十六碳基-鳥苷-3'-硫代磷酸酯
(Uhd)	2'-O-十六碳基-尿苷-3'-磷酸酯
(Uhds)	2'-O-十六碳基-尿苷-3'-硫代磷酸酯
L10	N-(膽固醇基羧醯胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇 (Hyp-C6-Chol)
L57	N-(硬脂基羧醯胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇 (Hyp-C6-C18)

表4. TTR dsRNA之未修飾正義股與反義股序列實施例

雙螺旋 ID	**正義序列 (從5'向3')**	SEQ ID NO：	**相對於 NM_000371.2 之反義起始位點**	**反義序列 (從5'向3')**	SEQ ID NO：
AD-68322.2	AUGGGAUUUCAUG UAACCAAA	67	504	UUUGGUUACAUGA AAUCCCAUCC	77
AD-60668.3	AUGGGAUUUCAUG UAACCAAA	67	504	UUUGGUUACAUGA AAUCCCAUCC	77
AD-68330.1	AUGGGAUUUCAUG UAACCAAA	67	504	UUUGGUUACAUGA AAUCCCAUCC	77

AD-64474.4	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	505	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13
AD-65468.2	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	505	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13
AD-65492.1	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	505	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13
AD-65480.2	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA	12	505	UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC	13
AD-60636.3	UUUCAUGUAACCAAGAGUAUU	68	510	AAUACUCUUGGUUACAUGAAAUC	78
AD-68320.2	UUUCAUGUAACCAAGAGUAUU	68	510	AAUACUCUUGGUUACAUGAAAUC	78
AD-68326.1	UUUCAUGUAACCAAGAGUAUU	68	510	AAUACUCUUGGUUACAUGAAAUC	78
AD-60611.4	UGUAACCAAGAGUAUUCCAUU	69	515	AAUGGAAUACUCUUGGUUACAUG	79
AD-68331.1	UGUAACCAAGAGUAUUCCAUU	69	515	AAUGGAAUACUCUUGGUUACAUG	79
AD-68315.2	UGUAACCAAGAGUAUUCCAUU	69	515	AAUGGAAUACUCUUGGUUACAUG	79
AD-68319.2	AACCAAGAGUAUUCCAUUUUU	70	518	AAAAAUGGAAUACUCUUGGUUAC	80

AD-60612.5	AACCAAGAGUAUUCCAUUUUU	70	518	AAAAAUGGAAUACUCUUGGUUAC	80
AD-68316.2	AACCAAGAGUAUUCCAUUUUU	70	518	AAAAAUGGAAUACUCUUGGUUAC	80
AD-60664.3	UUUUUACUAAAGCAGUGUUUU	71	534	AAAACACUGCUUUAGUAAAAAUG	81
AD-68321.2	UUUUUACUAAAGCAGUGUUUU	71	534	AAAACACUGCUUUAGUAAAAAUG	81
AD-68318.2	UUUUUACUAAAGCAGUGUUUU	71	534	AAAACACUGCUUUAGUAAAAAUG	81
AD-60665.5	UUACUAAAGCAGUGUUUCAA	72	537	UUGAAAACACUGCUUUAGUAAAAA	82
AD-60642.4	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA	73	540	UAGGUGAAAACACUGCUUUAGUA	83
AD-68329.1	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA	73	540	UAGGUGAAAACACUGCUUUAGUA	83
AD-68334.1	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA	73	540	UAGGUGAAAACACUGCUUUAGUA	83
AD-68328.1	GGCAGAGACAAUAAAACAUUA	74	582	UAAUGUUUUAUUGUCUCUGCCUG	84
AD-68333.1	GGCAGAGACAAUAAAACAUUA	74	582	UAAUGUUUUAUUGUCUCUGCCUG	84

AD-60639.3	GGCAGAGACAAUAAAACAUUA	74	582	UAAUGUUUUAUUGUCUCUGCCUG	84
AD-60643.4	CAGAGACAAUAAAACAUUCCU	75	584	AGGAAUGUUUUAUUGUCUCUGCC	85
AD-68317.2	CAGAGACAAUAAAACAUUCCU	75	584	AGGAAUGUUUUAUUGUCUCUGCC	85
AD-68335.1	CAGAGACAAUAAAACAUUCCU	75	584	AGGAAUGUUUUAUUGUCUCUGCC	85
AD-68327.1	CAAUAAAACAUUCCUGUGAAA	76	590	UUUCACAGGAAUGUUUUAUUGUC	86
AD-68332.1	CAAUAAAACAUUCCUGUGAAA	76	590	UUUCACAGGAAUGUUUUAUUGUC	86
AD-60637.2	CAAUAAAACAUUCCUGUGAAA	76	590	UUUCACAGGAAUGUUUUAUUGUC	86

實施例4. 非人類靈長類中眼部TTR表現之劑量-效應抑制性

【0851】 以劑量-效應試驗法分析dsRNA劑AD-291845減弱非人類靈長類眼睛中眼部TTR表現之效力。於第0天，對雄性食蟹獼猴(每組n=2)經玻璃體內投與單一0.1 mg、0.3 mg、1 mg、或3 mg劑量之AD-291845，總體積為50 μl。收集眼睛之玻璃狀液與房水。切下眼部組織(RPE與CE)。從眼部組織、肝臟、與腎臟製備溶胞液。如上述測定TTR mRNA含量。採用ELISA與免疫組織化學(IHC)測定TTR蛋白質含量。

【0852】 如第6A圖所示，單一0.1 mg、0.3 mg、1 mg、或3 mg劑量

之AD-291845，在第28天，顯著降低睫狀上皮層與視網膜色素上皮層中TTR之mRNA含量。結果由IHC證實。如ELISA所測定，即使投與最低劑量之AD-291854，仍可在第28天造成幾乎完全降低玻璃狀液(第6B圖)與房水(第6C圖)之TTR蛋白質。

【0853】 此外，在所有測定時間點均可觀察到顯著減弱TTR。單一1 mg或3 mg劑量之AD-291845在第28、56、與84天，顯著降低睫狀體上皮層(第7A圖)與視網膜色素上皮層(第7B圖)二者之TTR之mRNA含量。如ELISA所測定，單一1 mg或3 mg劑量之AD-291845，在單一0.1 mg或0.3 mg劑量下第28天，或單一1 mg或3 mg劑量下第28、56、與84天，幾乎完全降低玻璃狀液(第7C圖)與房水(第7D圖)之TTR蛋白質。

【0854】 此等數據證實，AD-291845可靠地且持久地降低眼部組織中之TTR mRNA與蛋白質。

實施例5. 非人類靈長類中眼部TTR表現之低劑量抑制性

已證實經玻璃體內投與低達0.1 mg/隻眼睛之AD-291845劑量可以可靠地且持久地減弱TTR mRNA與蛋白質，因此在另一個非人類靈長類試驗中測試更低劑量之AD-291845。

雙螺旋	寡聚物	標靶	股	經修飾序列 (從5'向3')	SEQ ID NO：
AD-291845	A-555719	TTR	正義	usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa	15

	A-131902	h/c TTR	反義	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17

【0855】 於第0天，對雌性食蟹獼猴(每組n=2)經玻璃體內投與單一0.003 mg、0.03 mg、0.1 mg、或0.3 mg劑量之AD-291845，總體積為50 µl。於第28天收集玻璃狀液。於投與後第168天收集眼睛、肝臟、與腎臟。從眼睛收集玻璃狀液與房水。切下眼部組織(RPE與CE)。從眼部組織、肝臟、與腎臟製備溶胞液。如上述測定TTR mRNA含量。採用ELISA與免疫組織化學(IHC)測定TTR蛋白質含量。

【0856】 如第8A圖所示，如ELISA所測定，相較於PBS處理對照組，單一0.003 mg、0.03 mg、0.1 mg、或0.3 mg劑量之AD-291845在第28天時，造成幾乎完全降低房水中之TTR蛋白質。依四種劑量，分別在注射後第28、84、與168天，房水中TTR蛋白質相對於PBS對照組之殘留百分比示於第8B圖。結果顯示，較高劑量之AD-291845之劑量效應提供更高程度且更持續地減弱房水中之TTR。

【0857】 在168天最終時間點，收集眼睛，單離睫狀體與視網膜色素上皮層(RPE)，測定相對於PBS處理對照組之TTR訊息殘留程度。結果分別示於第8C與8D圖。結果再次顯示，較高劑量之AD-291845之劑量效應在睫狀體與RPE二者均提供更大之TTR mRNA減弱程度。

【0858】 此等數據證實，AD-291845即使在低劑量下，仍可靠地且持久地降低眼部組織中之TTR mRNA與蛋白質表現。

實施例6. 對小鼠中眼部TTR表現之抑制性

【0859】 進一步設計具有與上文所提供AD-65808及AD-67175相同

之核苷酸序列，但在各種不同位置具有C16修飾之dsRNA劑。該等製劑示於表5。

表5. 小鼠特異性TTR dsRNA之經修飾正義股與反義股序列

雙 螺 旋 名稱	正義序列 (從5'向3')	SEQ ID NO:	反義序列 (從5'向3')	SEQ ID NO:
AD-307566	(Ahds)ascaguGfuUfCfUfugcuc uausasa		VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguus usu	98
AD-307567	as(Ahds)caguGfuUfCfUfugcuc uausasa	87	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguus usu	98
AD-307570	asasca(Ghd)uGfuUfCfUfugcuc uausasa	88	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguus usu	98
AD-307571	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcuc uausasa	89	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguus usu	98
AD-307572	asascagu(Ghd)uUfCfUfugcucu ausasa	90	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguus usu	98
AD-307575	asascaguGfuUf(Chd)Ufugcucu ausasa	91	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguus usu	98
AD-307576	asascaguGfuUfCf(Uhd)ugcucu ausasa	92	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguus usu	98
AD-307580	asascaguGfuUfCfUfugc(Uhd)c uausasa	93	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguus usu	98

AD-307585	asascaguGfuUfCfUfugcucuaus(Ahds)a	94	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	98
AD-307586	asascaguGfuUfCfUfugcucuaus as(Ahd)	95	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	98
AD-307590	asascaguGfuUfCfUfugcucuaus asa	96	VPuUfau(Ahd)GfagcaagaAfcAfcuguususu	99
AD-307600	asascaguGfuUfCfUfugcucuaus asa	97	VPuUfauaGfagcaagaAf(Chd)Afcuguususu	100
AD-307601	asascaguGfuUfCfUfugcucuaus asa	97	VPuUfauaGfagcaagaAfc(Ahd)cuguususu	101

【0860】 於第0天，對雌性C57BL/6小鼠(n=3隻小鼠，每組6個眼睛)經玻璃體內投與單一7.5 μg/隻眼睛之表5所列其中一種雙螺旋或PBS對照物。第13天時，收集眼睛，並與PBS對照組比較小鼠TTR mRNA之殘留百分比。結果示於表6。

表6. 於小鼠眼睛中之mTTR單一7.5 μg劑量篩選

雙螺旋	**平均值**	**標準偏差**
PBS	100.00	11.19
原始物	114.18	24.76
AD-307566	10.65	10.52
AD-307567	18.34	11.53
AD-307570	51.94	15.25
AD-307571	18.13	3.02

AD-307572	13.91	2.87
AD-307575	84.73	21.65
AD-307576	42.42	9.26
AD-307580	8.27	2.65
AD-307585	6.67	3.86
AD-307586	5.82	5.72
AD-307590	30.77	9.60
AD-307600	34.37	16.23
AD-307601	7.97	3.86

【0861】 此等數據證實，C16修飾之位置會改變小鼠眼睛中之mTTR靜默程度。

實施例7. 對非人類靈長類中眼部TTR表現之抑制性

【0862】 於非人類靈長類中測試其他dsRNA劑對TTR表現之抑制性。於第0天，對雌性食蟹獼猴(每組n=2)經玻璃體內投與單一1 mg劑量之AD-592744、AD-538697、或AD-597979，總體積為50 µl。於投與後第28、84、與168天收集房水。於投與後第168天收集眼睛。切下眼部組織(RPE與CE)。從眼部組製備溶胞液。如上述測定TTR mRNA含量。採用ELISA與免疫組織化學(IHC)測定TTR蛋白質含量。

表7. 於NHP眼睛中之TTR單一1 mg劑量篩選

雙螺旋	**寡聚物**	**標靶**	**股**	**經修飾序列 (從5'向3')**	SEQ ID NO：

AD-592744	A-555719	TTR	正義	usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa	15
	A-1104003	TTR	反義	VPusCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc	102
AD-538697	A-801811	h/Cttr	正義	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa	103
	A-131902	h/c TTR	反義	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17
AD-579797	A-555719	TTR	正義	usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa	15
	A-131359	TTR	反義	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	16

【0863】 結果示於第9A圖至第9C圖。三種dsRNA劑分別在注射後第28、84、與168天，房水中TTR蛋白質相對於PBS對照組之殘留百分比之圖解示於第9A圖。

【0864】 在168天最終時間點，收集眼睛，單離睫狀體與視網膜色素上皮層(RPE)，測定相對於PBS處理對照組之TTR訊息殘留程度。結果分別示於第9B與9C圖。結果顯示，所有三種dsRNA劑對睫狀體與RPE二者均有效減弱mRNA。

【0865】 此等數據證實，AD-592744、AD-538697、與AD-597979均可靠地且持久地降低眼部組織中之TTR mRNA與蛋白質表現。

實施例8. 對非人類靈長類中眼部TTR表現之抑制性

【0866】 於非人類靈長類中測試其他dsRNA劑對TTR表現之抑制性。於第0天，對雌性食蟹獼猴(每組n=2)經玻璃體內投與單一劑量之dsRNA劑，

總體積為50 μl，如下表所示。

表8. 於NHP眼睛中之TTR單一劑量篩選

雙螺旋	寡聚物	股	經修飾序列 (從5'向3')	SEQ ID NO：	劑 量 (mg)
AD-291845	A-555719	正義	usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa	15	0.01；0.003
	A-131902	反義	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17	
AD-291846	A-555719	正義	usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa	15	0.003
	A-265470	反義	VPuCfuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	62	
AD-592744	A-555719	正義	usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa	15	0.01；0.003
	A-1104003	反義	VPusCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc	102	
AD-538697	A-801811	正義	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa	103	0.03；0.01
	A-131902	反義	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	17	
AD-579797	A-555719	正義	usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa	15	0.01
	A-131359	反義	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	16	

【0867】 於投與後第28天收集房水。亦在投與後第56與85天收集房水。於投與後第85天收集眼睛，供分析TTR減弱與組織學。三種dsRNA劑

分別在注射後第28天，房水中TTR蛋白質相對於PBS對照組之殘留百分比之圖解示於第10圖。

此等數據證實，dsRNA劑即使在低劑量下，尤指含有C16親脂性部份體之dsRNA接合物，仍可在NHP之眼睛中有效減弱TTR表現。

等效物：

【0868】 習此相關技藝者咸了解，或使用一般例行實驗即可確定，有許多等同本文所說明具體例與方法之等效物。此等等效物均計畫包括在下列申請專利範圍中。

【符號說明】

無。

【序列表】

<110> 阿尼拉製藥公司

<120> 甲狀腺素運載蛋白(TTR) iRNA 組成物及其治療或預防 TTR 相關眼部疾病之使用方法

<130> 121301-09320

<140>
<141>

<150> 62/844,174
<151> 2019-05-07

<150> 62/738,256
<151> 2018-09-28

<160> 103

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 938
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1
gttgactaag tcaataatca gaatcagcag gtttgcagtc agattggcag ggataagcag 60

cctagctcag gagaagtgag tataaaagcc ccaggctggg agcagccatc acagaagtcc 120

actcattctt ggcaggatgg cttctcatcg tctgctcctc ctctgccttg ctggactggt 180

atttgtgtct gaggctggcc ctacgggcac cggtgaatcc aagtgtcctc tgatggtcaa 240

agttctagat gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcatg tgttcagaaa 300

ggctgctgat gacacctggg agccatttgc ctctgggaaa accagtgagt ctggagagct 360

gcatgggctc acaactgagg aggaatttgt agaagggata tacaaagtgg aaatagacac 420

caaatcttac tggaaggcac ttggcatctc cccattccat gagcatgcag aggtggtatt 480

cacagccaac gactccggcc cccgccgcta caccattgcc gccctgctga gcccctactc 540

ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc ctccagtgga 600

cctgaaggac gagggatggg atttcatgta accaagagta ttccattttt actaaagcag 660

tgttttcacc tcatatgcta tgttagaagt ccaggcagag acaataaaac attcctgtga 720

aaggcacttt tcattccact ttaacttgat tttttaaatt cccttattgt cccttccaaa 780

aaaaagagaa tcaaaatttt acaaagaatc aaaggaattc tagaaagtat ctgggcagaa 840

cgctaggaga gatccaaatt tccattgtct tgcaagcaaa gcacgtatta aatatgatct 900

gcagccatta aaaagacaca ttctgtaaaa aaaaaaaa 938

<210> 2

<400> 2
000

<210> 3

<400> 3
000

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4
gatgggattt catgtaacca aga 23

<210> 5
<211> 650
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5
acagaagtcc actcattctt ggcaggatgg cttctcatcg tctgctcctc ctctgccttg 60

ctggactggt atttgtgtct gaggctggcc ctacgggcac cggtgaatcc aagtgtcctc 120

tgatggtcaa agttctagat gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcatg 180

tgttcagaaa ggctgctgat gacacctggg agccatttgc ctctgggaaa accagtgagt 240

ctggagagct gcatgggctc acaactgagg aggaatttgt agaagggata tacaaagtgg 300

aaatagacac caaatcttac tggaaggcac ttggcatctc cccattccat gagcatgcag 360

aggtggtatt cacagccaac gactccggcc cccgccgcta caccattgcc gccctgctga 420

gcccctactc ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc 480

ctccagtgga cctgaaggac gagggatggg atttcatgta accaagagta ttccattttt 540

actaaagcag tgttttcacc tcatatgcta tgttagaagt ccaggcagag acaataaaac 600

attcctgtga aaggcacttt tcattccaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 650

<210> 6

<400> 6
000

<210> 7

<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 7
ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 8
<400> 8
000

<210> 9

<400> 9
000

<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 10
ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 11
tgggatttca tgtaaccaag a 21

<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 12
ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 13
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 13
ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的肽"

<400> 14
Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys Cys
1 5

<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 15
ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 16
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 16
ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 17
<211> 23

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 17
ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 18
<211> 29
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述：GALA 肽"

<400> 18
Ala Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
1 5 10 15

Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys
20 25

<210> 19
<211> 30
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述：EALA 肽"

<400> 19
Ala Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys
20 25 30

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述：核內體破裂性/融合性肽"

<400> 20
Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
1 5 10 15

<210> 21
<211> 22
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: INF-7 肽"

<400> 21
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Trp Asp Tyr Gly
20

<210> 22
<211> 23
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: InfHA-2 肽"

<400> 22
Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly
20

<210> 23
<211> 48
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: diINF-7 肽"

<400> 23
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Cys Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly
20 25 30

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Cys
35 40 45

<210> 24
<211> 44
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述：diINF-3肽"

<400> 24
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Gly Cys Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile
20 25 30

Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Ile Asp Gly Gly Cys
35 40

<210> 25
<211> 35
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述：GLF肽"

<400> 25
Gly Leu Phe Gly Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu
1 5 10 15

His Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ser Cys
35

<210> 26
<211> 34
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述：GALA-INF3肽"

<400> 26
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala Gly Gly
20 25 30

Ser Cys

<210> 27
<211> 41
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: INF-5 肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> 正白胺酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (38)..(38)
<223> 正白胺酸

<400> 27
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Xaa Ile Asp Gly Lys Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu
20 25 30

Asn Gly Trp Glu Gly Xaa Ile Asp Gly
35 40

<210> 28
<211> 19
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: JTS-1 肽"

<400> 28
Leu Phe Glu Ala Leu Leu Glu Leu Leu Glu Ser Leu Trp Glu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Glu Ala

<210> 29

<211> 20
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: ppTG1 肽"

<400> 29
Gly Leu Phe Lys Ala Leu Leu Lys Leu Leu Lys Ser Leu Trp Lys Leu
1 5 10 15
Leu Leu Lys Ala
20

<210> 30
<211> 20
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: ppTG20 肽"

<400> 30
Gly Leu Phe Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu
1 5 10 15
Leu Leu Arg Ala
20

<210> 31
<211> 30
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: KALA 肽"

<400> 31
Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His
1 5 10 15
Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala
20 25 30

<210> 32
<211> 22
<212> PRT
<213> 未知

<220>

<221> 來源
<223> /註="未知的敘述：HA 肽"

<400> 32
Gly Leu Phe Phe Glu Ala Ile Ala Glu Phe Ile Glu Gly Gly Trp Glu
1 5 10 15

Gly Leu Ile Glu Gly Cys
20

<210> 33
<211> 26
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述：Melittin 肽"

<400> 33
Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu
1 5 10 15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
20 25

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述：核內體破裂性/融合性肽"

<400> 34
His His His His His Trp Tyr Gly
1 5

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述：核內體破裂性/融合性肽"

<400> 35
Cys His Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Cys
1 5 10

<210> 36

<211> 16
<212> PRT
<213> 果蠅(Drosophila sp.)

<400> 36
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 37
<211> 14
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒(Human immunodeficiency virus)

<400> 37
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Cys
1 5 10

<210> 38
<211> 27
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述：基於信號序列的肽"

<400> 38
Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

<210> 39
<211> 18
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus sp.)

<400> 39
Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
1 5 10 15

Ser Lys

<210> 40
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的肽"

<400> 40
Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Lys Ile Asn Leu Lys
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 41
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的肽"

<400> 41
Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的肽"

<400> 42
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的肽"

<400> 43
Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys
1 5 10

<210> 44
<211> 37
<212> PRT

<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: LL-37 肽"

<400> 44
Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
20 25 30

Pro Arg Thr Glu Ser
35

<210> 45
<211> 31
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述:抗菌胜肽 P1 肽"

<400> 45
Ser Trp Leu Ser Lys Thr Ala Lys Lys Leu Glu Asn Ser Ala Lys Lys
1 5 10 15

Arg Ile Ser Glu Gly Ile Ala Ile Ala Ile Gln Gly Gly Pro Arg
20 25 30

<210> 46
<211> 30
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: α-防禦素肽"

<400> 46
Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
20 25 30

<210> 47
<211> 36
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述： β-防禦素肽"

<400> 47
Asp His Tyr Asn Cys Val Ser Ser Gly Gly Gln Cys Leu Tyr Ser Ala
1 5 10 15

Cys Pro Ile Phe Thr Lys Ile Gln Gly Thr Cys Tyr Arg Gly Lys Ala
20 25 30

Lys Cys Cys Lys
35

<210> 48
<211> 42
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述： PR-39 肽"

<400> 48
Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro
1 5 10 15

Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro Gly Lys Arg
35 40

<210> 49
<211> 13
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述： 牛鹼性抗生肽(indolicidin 肽)"

<400> 49
Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg
1 5 10

<210> 50
<211> 16
<212> PRT

<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: RFGF 肽"

<400> 50
Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: RFGF 類似物肽"

<400> 51
Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10

<210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 來源
<223> /註="未知的敘述: 牛抗菌肽(bactenecin 肽)"

<400> 52
Arg Lys Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg
1 5 10

<210> 53
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述: 合成的寡核苷酸"

<220>
<221> 來源
<223> /註="組合的 DNA/RNA 分子的敘述: 合成的寡核苷酸"

<400> 53
caguguucuu gcucuauaat t 21

<210> 54
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<220>
<221> 來源
<223> /註="組合的 DNA/RNA 分子的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 54
uuauagagca agaacacugt t 21

<210> 55
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<220>
<221> 來源
<223> /註="組合的 DNA/RNA 分子的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 55
aacaguguuc uugcucuaua att 23

<210> 56
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 56
uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 57
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 57
uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 58
<211> 21

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 58
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 59
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<220>
<221> 來源
<223> /註="組合的 DNA/RNA 分子的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 59
ugggauuuca uguaaccaag att 23

<210> 60
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 60
ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 61
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 61
ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 62
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 62
ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 63
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 63
caguguucuu gcucuauaa 19

<210> 64
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 64
uuauagagca agaacacug 19

<210> 65
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 65
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 66
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 66
uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 67
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 67
augggauuuc auguaaccaa a 21

<210> 68
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 68
uuucauguaa ccaagaguau u 21

<210> 69
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 69
uguaaccaag aguauuccau u 21

<210> 70
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 70
aaccaagagu auuccauuuu u 21

<210> 71
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 71
uuuuuacuaa agcaguguuu u 21

<210> 72
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 72
uuacuaaagc aguguuuuca a 21

<210> 73
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 73
cuaaagcagu guuuucaccu a 21

<210> 74
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 74
ggcagagaca auaaaacauu a 21

<210> 75
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 75
cagagacaau aaaacauucc u 21

<210> 76
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 76
caauaaaaca uuccugugaa a 21

<210> 77
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 77
uuugguuaca ugaaauccca ucc 23

<210> 78
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 78
aauacucuug guuacaugaa auc 23

<210> 79
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 79
aauggaauac ucuugguuac aug 23

<210> 80
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源

<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 80
aaaaauggaa uacucuuggu uac 23

<210> 81
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 81
aaaacacugc uuuaguaaaa aug 23

<210> 82
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 82
uugaaaacac ugcuuuagua aaa 23

<210> 83
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 83
uaggugaaaa cacugcuuua gua 23

<210> 84
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 84
uaauguuuua uugucucugc cug 23

<210> 85

<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 85
aggaauguuu uauugucucu gcc 23

<210> 86
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 86
uuucacagga auguuuuauu guc 23

<210> 87
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 87
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 88
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 88
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 89
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 89
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 90
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 90
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 91
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"
"

<400> 91
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 92
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 92
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 93
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 93
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 94
<211> 21

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 94
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 95
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 95
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 96
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 96
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 97
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 97
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 98
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 98
uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 99
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 99
uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 100
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 100
uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 101
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 101
uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 102
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<220>
<221> 來源
<223> /註="組合的 DNA/RNA 分子的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 102
ucuuggtuac augaaauccc auc 23

<210> 103
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列的敘述：合成的寡核苷酸"

<400> 103
ugggauuuca uguaaccaag a

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種雙股RNAi劑，其包含與反義股互補之正義股，其中該反義股包含與編碼甲狀腺素運載蛋白(TTR)之一部份mRNA互補之區，其中各股獨立地具有14至30個核苷酸，其中該雙股RNAi劑係由式(III)代表：

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

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

(III)

其中：

i、j、k、與l分別獨立地為0或1，但其限制條件為i、j、k、與l中至少一者為1；

p、p'、q、與q'分別獨立地為0至6；

各N_a與N_a'獨立地代表包含2至20個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列，各序列包含至少兩個經不同修飾之核苷酸；

各N_b與N_b'獨立地代表包含1至10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；

各n_p、np'、nq、與n_q'獨立地代表突出核苷酸；

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、與Z'Z'Z'分別獨立地代表在三個連續核苷酸為三個相同修飾之一個基序；及

其中一個或多個親脂性部份體係接合在至少一股的一個或多個內部位置。

【第2項】 如申請專利範圍第1項所述之雙股RNAi劑，其中該反義股包含與5'- TGGGATTTCATGTAACCAAGA – 3' (SEQ ID NO：11)互補之序列。

【第3項】 一種雙股RNAi劑，其包含與反義股互補之正義股，其中該反義股包含與甲狀腺素運載蛋白(TTR)基因(SEQ ID NO：1)核苷酸504至526互補之序列，其中正義股之長度為21個核苷酸，及反義股之長度為23個核苷酸，其中該雙股RNAi劑係由式(III)代表：

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

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

(III)

其中：

j = 1；及i、k、與l為0；

p'為2；p、q、與q'為0；

各N_a與N_a'獨立地代表包含2至10個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；

各N_b與N_b'獨立地代表包含0至7個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；

n_p'代表突出核苷酸；

YYY、ZZZ、與Y'Y'Y'分別獨立地代表在三個連續核苷酸為三個相同修飾之一個基序，其中Y核苷酸含有2'-氟修飾，Y'核苷酸含有2'-O-甲基修飾，及Z核苷酸含有2'-O-甲基修飾；及

其中一個或多個親脂性部份體係接合在至少一股的一個或多個內部位置。

【第4項】 一種抑制細胞中TTR表現之雙股RNAi劑，

其中該雙股RNAi劑包含形成雙股區之正義股與反義股；

其中該正義股包含核苷酸序列 5' – UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA – 3' (SEQ ID NO：12)，及反義股包含

核苷酸序列5’- UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC -3’ (SEQ ID NO：13)；

其中該正義股之實質上所有核苷酸與該反義股之實質上所有核苷酸包含修飾；及

其中一個或多個親脂性部份體係接合在至少一股的一個或多個內部位置。

【第5項】 一種抑制細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含之正義股與核苷酸序列5’-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga – 3’ (SEQ ID NO：10)之差異不超過4個經修飾核苷酸，及包含之反義股與核苷酸序列 5’-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：7)之差異不超過4個經修飾核苷酸，

其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；及s為硫代磷酸酯鏈結；且其中一個或多個親脂性部份體係接合在至少一股的一個或多個內部位置。

【第6項】 一種雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，其中該正義股包含核苷酸序列5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga – 3’ (SEQ ID NO：10)，及反義股包含核苷酸序列5’-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：7)，

其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、

Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；及s為硫代磷酸酯鏈結；及

其中一個或多個親脂性部份體係接合在至少一股的一個或多個內部位置。

【第7項】 如申請專利範圍第1至6項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該一個或多個親脂性部份體係利用鏈結基或載子接合在至少一股的一個或多個內部位置。

【第8項】 一種抑制細胞中TTR表現之雙股RNAi劑，

其中該雙股RNAi劑包含形成雙股區之正義股與反義股；

其中該正義股包含核苷酸序列 5’ – UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA – 3’ (SEQ ID NO：12)，及反義股包含核苷酸序列5’- UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC -3’ (SEQ ID NO：13)；

其中該正義股之實質上所有核苷酸與該反義股之實質上所有核苷酸包含修飾；及

其中一個或多個親脂性部份體係接合在至少一股的雙股區中一個或多個位置。

【第9項】 一種抑制細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含之正義股與核苷酸序列5’-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga – 3’ (SEQ ID NO：10)之差異不超過4個經修飾核苷酸，及包含之反義股與核苷酸序列 5’-

usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：7)之差異不超過4個經修飾核苷酸，

其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；及s為硫代磷酸酯鏈結；及

其中一個或多個親脂性部份體係接合在至少一股的雙股區中一個或多個位置。

【第10項】 一種雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，其中該正義股包含核苷酸序列5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga – 3’ (SEQ ID NO：10)，及反義股包含核苷酸序列5’-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (SEQ ID NO：7)，

其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；及s為硫代磷酸酯鏈結；及

其中一個或多個親脂性部份體係接合在至少一股的雙股區中一個或多個位置。

【第11項】 如申請專利範圍第8至10項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該一個或多個親脂性部份體係利用鏈結基或載子接合在至少一股的雙股區中一個或多個位置。

【第12項】 如申請專利範圍第1至11項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中以$logK_{ow}$測定之親脂性部份體之親脂性超過0。

【第13項】 如申請專利範圍第1至12項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中以雙股iRNA劑在血漿蛋白質結合分析法中之未結合比例測定之雙股iRNA劑疏水性超過0.2。

【第14項】 如申請專利範圍第13項所述之雙股RNAi劑，其中血漿蛋白質結合分析法係採用人類血清白蛋白蛋白質之電泳移動性位移分析法。

【第15項】 如申請專利範圍第1至7、與12至14項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該內部位置包括除了至少一股各端之最後兩個位置以外之所有位置。

【第16項】 如申請專利範圍第15項所述之雙股RNAi劑，其中該內部位置包括除了至少一股各端之最後三個位置以外之所有位置。

【第17項】 如申請專利範圍第15或16項所述之雙股RNAi劑，其中該內部位置不包括正義股之裂解位點區。

【第18項】 如申請專利範圍第17項所述之雙股RNAi劑，其中該內部位置包括除了從正義股5'-端算起位置9至12以外之所有位置。

【第19項】 如申請專利範圍第17項所述之雙股RNAi劑，其中該內部位置包括除了從正義股3'-端算起位置11至13以外之所有位置。

【第20項】 如申請專利範圍第15或16項所述之雙股RNAi劑，其中該內部位置不包括反義股之裂解位點區。

【第21項】 如申請專利範圍第20項所述之雙股RNAi劑，其中該內部位置包括除了從反義股5'-端算起位置12至14以外之所有位置。

【第22項】 如申請專利範圍第15或16項所述之雙股RNAi劑，其中內部位置包括除了從正義股3'-端算起位置11至13，及從反義股5'-端算起位置12至14以外之所有位置。

【第23項】 如申請專利範圍第1至7、與12至14項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該一個或多個親脂性部份體係接合在一個或多個選自下列各位置所成群組之內部位置：正義股位置4至8與13至18，及反義股位置6至10與15至18，其係從各股之5'端算起。

【第24項】 如申請專利範圍第23項所述之雙股RNAi劑，其中該一個或多個親脂性部份體係接合在一個或多個選自下列各位置所成群組之內部位置：正義股位置5、6、7、15、與17，及反義股位置15與17，其係從各股之5'端算起。

【第25項】 如申請專利範圍第8至14項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該雙股區中之位置不包括正義股之裂解位點區。

【第26項】 如申請專利範圍第1至25項所述之雙股RNAi劑，其中該親脂性部份體為脂系、脂環系、或多脂環系化合物。

【第27項】 如申請專利範圍第26項所述之雙股RNAi劑，其中親脂性部份體係選自下列各者所成群組：脂質、膽固醇、視黃酸、膽酸、金剛烷乙酸、1-芘丁酸、雙氫睾酮、1,3-雙-O(十六碳基)甘油、香葉草基氧己醇(geranyloxyhexyanol)、十六碳基甘油、龍腦、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七碳基、棕櫚酸、肉豆蔻酸、O3-(油醯基)石膽酸、O3-(油醯基)膽烯酸、二甲氧基三苯甲基、或吩噁啡(phenoxazine)。

【第28項】 如申請專利範圍第27項所述之雙股RNAi劑，其中該親脂性部份體包含飽和或不飽和C4-C30烴鏈，及視需要之自下列各者所成群組

選擇之官能基：羥基、胺、羧酸、磺酸酯、磷酸酯、硫醇、疊氮化物、與炔。

【第29項】 如申請專利範圍第28項所述之雙股RNAi劑，其中該親脂性部份體包含飽和或不飽和C6-C18烴鏈。

【第30項】 如申請專利範圍第29項所述之雙股RNAi劑，其中該親脂性部份體包含飽和或不飽和C16烴鏈。

【第31項】 如申請專利範圍第30項所述之雙股RNAi劑，其中該飽和或不飽和C16烴鏈係接合在從正義股5'-端算起之位置6。

【第32項】 如申請專利範圍第1至31項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該親脂性部份體係利用置換內部位置或雙股區中一個或多個核苷酸之載子接合。

【第33項】 如申請專利範圍第32項所述之雙股RNAi劑，其中該載子為自下列各者所成群組選擇之環狀基團：吡咯啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、哌啶基、哌吩基、[1,3]二氧雜環戊烷基、噁唑啶基、異噁唑啶基、嗎啉基、噻唑啶基、異噻唑啶基、喹噁啉基、嗒吩酮基、四氫呋喃基、與十氫萘基；或為基於絲胺醇主幹或二乙醇胺主幹之無環部份體。

【第34項】 如申請專利範圍第1至31項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該親脂性部份體係利用含有醚、硫醚、脲、碳酸酯、胺、醯胺、馬來醯亞胺-硫醚、二硫化物、磷酸二酯、磺醯胺鍵結、點擊反應(click reaction)產物、或胺甲酸酯之鍵結基接合雙股iRNA劑。

【第35項】 如申請專利範圍第1至34項中任一項所述之雙股iRNA劑，其中該親脂性部份體係接合核鹼基、糖部份體、或核苷間鍵結。

【第36項】 如申請專利範圍第1至35項中任一項所述之雙股RNAi劑，其進一步包含介導傳遞至眼部組織之配體。

【第37項】 如申請專利範圍第36項所述之雙股RNAi劑，其中該介導傳遞至眼部組織之配體為靶向介導傳遞至眼部組織之受體之靶向配體。

【第38項】 如申請專利範圍第37項所述之雙股RNAi劑，其中該靶向配體係選自下列各者所成群組：反式視黃醇、RGD肽、LDL受體配體、與基於碳水化合物之配體。

【第39項】 如申請專利範圍第38項所述之雙股RNAi劑，其中RGD肽為 H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-Cys-OH 或 環 (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys) (SEQ ID NO：14)。

【第40項】 如申請專利範圍第1至39項中任一項所述之雙股RNAi劑，其進一步包含靶向肝組織之靶向配體。

【第41項】 如申請專利範圍第40項所述之雙股RNAi劑，其中該靶向配體為GalNAc接合物。

【第42項】 如申請專利範圍第1至41項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該親脂性部份體或靶向配體係利用自下列各者所成群組選擇之生物可裂解性鏈結基接合：DNA，RNA，二硫化物，醯胺，半乳糖胺、葡萄糖胺、葡萄糖、半乳糖、甘露糖之官能基化單糖或寡醣，與其組合。

【第43項】 如申請專利範圍第1至42項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股之3’端係利用具有胺之環狀基團作為封端基來保護，該環狀基團係選自下列各者所成群組：吡咯啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、哌啶基、哌吩基、[1,3]二氧雜環戊烷基、噁唑啶基、異噁唑啶基、嗎啉基、噻唑啶基、異噻唑啶基、喹噁啉基、嗒吩酮基、四氫呋喃基、與十氫萘基。

【第44項】 如申請專利範圍第1至3、7、與12至43項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中j為1或2；或其中l為1；或其中j與l均為1。

【第45項】 如申請專利範圍第1至3、7、與12至44項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中XXX係與X'X'X'互補，YYY係與Y'Y'Y'互補，及ZZZ係與Z'Z'Z'互補。

【第46項】 如申請專利範圍第1至3、7、與12至45項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中YYY基序出現在或接近正義股之裂解位點；或其中Y'Y'Y'基序出現在反義股從5'-端算起之11、12與13位置。

【第47項】 如申請專利範圍第1至4、與7至46項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該核苷酸之修飾係選自下列各者所成群組：去氧-核苷酸、3'-末端去氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修飾之核苷酸、2'-氟修飾之核苷酸、2'-去氧修飾之核苷酸、鎖核苷酸、非鎖核苷酸、構形限制核苷酸、約束乙基核苷酸、無鹼基核苷酸、2'-胺基修飾之核苷酸、2'-O-烯丙基修飾之核苷酸、2'-C-烷基修飾之核苷酸、2'-甲氧基乙基修飾之核苷酸、2'-O-烷基修飾之核苷酸、N-嗎啉基核苷酸、胺基磷酸酯、含非天然鹼基之核苷酸、四氫哌喃修飾之核苷酸、1,5-脫水己糖醇修飾之核苷酸、環己烯基修飾之核苷酸、含硫代磷酸根之核苷酸、含甲基膦酸根之核苷酸、含5'-磷酸酯之核苷酸、及含5'-磷酸酯擬似物之核苷酸、及其組合。

【第48項】 如申請專利範圍第1至4、7、與12至47項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該核苷酸之修飾為2'-O-甲基、2'-氟或二者。

【第49項】 如申請專利範圍第1至3、7、與12至48項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該Y'為2'-O-甲基。

【第50項】 如申請專利範圍第1至3、7、與12至49項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該Z核苷酸包含2'-O-甲基修飾。

【第51項】 如申請專利範圍第1至3、7、與12至50項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該N_a、N_a'、N_b、與N_b'核苷酸之修飾為2′-O-甲基、2′-氟或二者。

【第52項】 如申請專利範圍第1至51項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股與該反義股形成長度為15至30核苷酸對之雙螺旋區。

【第53項】 如申請專利範圍第52項所述之雙股RNAi劑，其中該雙螺旋區之長度為17至25核苷酸對。

【第54項】 如申請專利範圍第1至53項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股與該反義股之長度分別為15至30個核苷酸。

【第55項】 如申請專利範圍第1至54項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股與該反義股之長度分別為19至25個核苷酸。

【第56項】 如申請專利範圍第1至55項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股與該反義股分別獨立地具有21至23個核苷酸。

【第57項】 如申請專利範圍第1至56項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股共具有21個核苷酸，及該反義股共具有23個核苷酸。

【第58項】 如申請專利範圍第1至57項中任一項所述之雙股RNAi劑，其進一步包含至少一個硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結。

【第59項】 如申請專利範圍第58項所述之雙股RNAi劑，其中該硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸間鏈結係在一股的3'-末端。

【第60項】 如申請專利範圍第59項所述之雙股RNAi劑，其中該股為反義股。

【第61項】 如申請專利範圍第1至60項中任一項所述之雙股RNAi劑，其進一步包含

出現在反義股3’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Sp組態之鏈結磷原子，

出現在反義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Rp組態之鏈結磷原子，及

出現在正義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Rp組態或Sp組態之鏈結磷原子。

【第62項】 如申請專利範圍第1至60項中任一項所述之雙股RNAi劑，其進一步包含

出現在反義股3’端第一個核苷酸間鏈結與第二個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Sp組態之鏈結磷原子，

出現在反義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Rp組態之鏈結磷原子，及

出現在正義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Rp或Sp組態之鏈結磷原子。

【第63項】 如申請專利範圍第1至60項中任一項所述之雙股RNAi劑，其進一步包含

出現在反義股3’端第一個核苷酸間鏈結、第二個核苷酸間鏈結、與第三個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Sp組態之鏈結磷原子，

出現在反義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Rp組態之鏈結磷原子，及

出現在正義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Rp或Sp組態之鏈結磷原子。

【第64項】 如申請專利範圍第1至60項中任一項所述之雙股RNAi劑，其進一步包含

出現在反義股3’端第一個核苷酸間鏈結與第二個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Sp組態之鏈結磷原子，

出現在反義股3’端第三個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Rp組態之鏈結磷原子，

出現在反義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Rp組態之鏈結磷原子，

出現在正義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Rp或Sp組態之鏈結磷原子。

【第65項】 如申請專利範圍第1至60項中任一項所述之雙股RNAi劑，其進一步包含

出現在反義股3’端第一個核苷酸間鏈結與第二個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Sp組態之鏈結磷原子，

出現在反義股5’端第一個核苷酸間鏈結與第二個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Rp組態之鏈結磷原子，及

出現在正義股5’端第一個核苷酸間鏈結之末端對掌性修飾，其具有呈Rp或Sp組態之鏈結磷原子。

【第66項】 如申請專利範圍第7至11項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股之長度為21個核苷酸，該反義股之長度為23個核苷酸，及該親脂性部份體係接合在正義股位置21、位置20、位置15、位置1、位置7、位置6、或位置2，或反義股位置16。

【第67項】 如申請專利範圍第66項所述之雙股RNAi劑，其中該親脂性部份體係接合在正義股位置21、位置20、位置15、位置1、或位置7。

【第68項】 如申請專利範圍第66項所述之雙股RNAi劑，其中該親脂性部份體係接合在正義股位置21、位置20、或位置15。

【第69項】 如申請專利範圍第66項所述之雙股RNAi劑，其中該親脂性部份體係接合在正義股位置20、或位置15。

【第70項】 如申請專利範圍第66項所述之雙股RNAi劑，其中該親脂性部份體係接合在反義股位置16。

【第71項】 如申請專利範圍第1至3、7、與12至70項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中p′=2。

【第72項】 如申請專利範圍第1至3、7、與12至71項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中至少一個np′係利用硫代磷酸酯鏈結與相鄰核苷酸連結。

【第73項】 如申請專利範圍第72項所述之雙股RNAi劑，其中所有np′均利用硫代磷酸酯鏈結與相鄰核苷酸連結。

【第74項】 如申請專利範圍第1至73項中任一項所述之雙股RNAi劑，其進一步包含在反義股5’-端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。

【第75項】 如申請專利範圍第74項所述之雙股RNAi劑，其中該磷酸酯擬似物為5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

【第76項】 如申請專利範圍第1至75項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該雙螺旋反義股5’-端1位置之鹼基對為AU鹼基對。

【第77項】 如申請專利範圍第1至3、7、與12至76項中任一項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股包含核苷酸序列 5’ – UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA – 3’ (SEQ ID NO：12)。

【第78項】 如申請專利範圍第77項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股包含核苷酸序列 5’ – UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA – 3’ (SEQ ID NO ： 12) ， 及 該 反 義 股 包 含 核 苷 酸 序 列 5’-UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC -3’ (SEQ ID NO：13)。

【第79項】 如申請專利範圍第78項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股與該反義股包含自下列各者所成群組選擇之正義股與反義股核苷酸序列：

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-291845) (SEQ ID NO：16)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagsadTdTL10 -3’ (SEQ ID NO：59)與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc -3’ (AD-70191) (SEQ ID NO：17)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL10 -3’ (SEQ ID NO：60)與

5’-VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc -3’ (AD70500) (SEQ ID NO：17)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL57 – 3’ (SEQ ID NO：61)與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc- 3’ (AD-290674) (SEQ ID NO：17)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuausas(Ahd)- 3’ (SEQ ID NO：96)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu- 3’ (AD-307586) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuaus(Ahds)a – 3’ (SEQ ID NO：95)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307585) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuausasa-3’ (SEQ ID NO：97)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfc(Ahd)cuguususu – 3’ (AD-307601) (SEQ ID NO：101)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugc(Uhd)cuausasa- 3’ (SEQ ID NO：94)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’ (AD-307580) (SEQ ID NO：98)；

5’- (Ahds)ascaguGfuUfCfUfugcucuausasa- 3’ (SEQ ID NO：87)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307566) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascagu(Ghd)uUfCfUfugcucuausasa -3’ (SEQ ID NO：91)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307572) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa- 3’ (SEQ ID NO：90)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’(AD-307571) (SEQ ID NO：98)；

5’- as(Ahds)caguGfuUfCfUfugcucuausasa -3’ (SEQ ID NO：88)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’(AD-307567) (SEQ ID NO：98)；

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- VPuCfuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-291846) (SEQ ID NO：62)；

5’ - usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’ - VPusCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-592744) (SEQ ID NO：102)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa -3’ (SEQ ID NO：103)與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3’ (AD-538697) (SEQ ID NO：17)；及

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-597979) (SEQ ID NO：16)，

其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；(Ahd)、(Ghd)、與(Uhd)分別為2'-O-十六碳基-腺苷-3'-磷酸酯、2'-O-十六碳基-鳥苷-3'-磷酸酯、與2'-O-十六碳基-尿苷-3'-磷酸酯；s為硫代磷酸酯鏈結；VP為乙烯基膦酸酯；L10為與該股3’端接合之N-(膽固醇基羧醯胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-Chol)；及L57為與該股3’端接合之N-(硬脂基羧醯胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-C18)。

【第80項】 一種抑制細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之雙股核糖核酸(RNAi)劑，其包含正義股與反義股，

其中各正義股與反義股獨立地包含之核苷酸序列與自下列各者所成群組選擇之雙螺旋之正義股與反義股核苷酸序列之差異不超過4個經修飾核苷酸：

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-291845) (SEQ ID NO：16)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagsadTdTL10 -3’ (SEQ ID NO：59)與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc -3’ (AD-70191) (SEQ ID NO：17)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL10 -3’ (SEQ ID NO：60)與

5’-VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc -3’ (AD70500) (SEQ ID NO：17)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL57 – 3’ (SEQ ID NO：61)與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc- 3’ (AD-290674) (SEQ ID NO：17)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuausas(Ahd)- 3’ (SEQ ID NO：96)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu- 3’ (AD-307586) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuaus(Ahds)a – 3’ (SEQ ID NO：95)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307585) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugcucuausasa-3’ (SEQ ID NO：97)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfc(Ahd)cuguususu – 3’ (AD-307601) (SEQ ID NO：101)；

5’- asascaguGfuUfCfUfugc(Uhd)cuausasa- 3’ (SEQ ID NO：94)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’ (AD-307580) (SEQ ID NO：98)；

5’- (Ahds)ascaguGfuUfCfUfugcucuausasa- 3’ (SEQ ID NO：87)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307566) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascagu(Ghd)uUfCfUfugcucuausasa -3’ (SEQ ID NO：91)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu – 3’ (AD-307572) (SEQ ID NO：98)；

5’- asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa- 3’ (SEQ ID NO：90)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’(AD-307571) (SEQ ID NO：98)；

5’- as(Ahds)caguGfuUfCfUfugcucuausasa -3’ (SEQ ID NO：88)與

5’- VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu-3’(AD-307567) (SEQ ID NO：98)；

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- VPuCfuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-291846) (SEQ ID NO：62)；

5’ - usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’ - VPusCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-592744) (SEQ ID NO：102)；

5’- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa -3’ (SEQ ID NO：103)與

5’- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3’ (AD-538697) (SEQ ID NO：17)；及

5’- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3’ (SEQ ID NO：15)與

5’- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3’ (AD-597979) (SEQ ID NO：16),

其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3’-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3’-磷酸酯；Af、Cf、Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；(Ahd)、(Ghd)、與(Uhd)分別為2'-O-十六碳基-腺苷-3'-磷酸酯、2'-O-十六碳基-鳥苷-3'-磷酸酯、與2'-O-十六碳基-尿苷-3'-磷酸酯；s為硫代磷酸酯鍵結；VP為乙烯基膦酸酯；L10為與該股3’端接合之N-(膽固醇基羧醯胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-Chol)；及L57為與該股3’端接合之N-(硬脂基羧醯胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-C18)。

【第81項】 如申請專利範圍第80項所述之雙股RNAi劑，其中各正義股與反義股獨立地包含之核苷酸序列與雙螺旋之正義股與反義股核苷酸序列之差異不超過3個經修飾核苷酸。

【第82項】 如申請專利範圍第80項所述之雙股RNAi劑，其中各正義股與反義股獨立地包含之核苷酸序列與雙螺旋之正義股與反義股核苷酸序列之差異不超過2個經修飾核苷酸。

【第83項】 如申請專利範圍第80項所述之雙股RNAi劑，其中各正義股與反義股獨立地包含之核苷酸序列與雙螺旋之正義股與反義股核苷酸序列之差異不超過1個經修飾核苷酸。

【第84項】 如申請專利範圍第80項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股包含核苷酸序列5'- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3' (SEQ ID NO：15)，及該反義股包含核苷酸序列5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3' (SEQ ID NO：16)。

【第85項】 如申請專利範圍第80項所述之雙股RNAi劑，其中該正義股係由核苷酸序列 5'- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa – 3' (SEQ ID NO：15)組成，及該反義股係由核苷酸序列 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3' SEQ ID NO：16)組成。

【第86項】 如申請專利範圍第80至85項中任一項所述之雙股RNAi劑，其進一步包含在反義股5'-端之磷酸酯或磷酸酯擬似物。

【第87項】 如申請專利範圍第86項所述之雙股RNAi劑，其中該磷酸酯擬似物為5'-乙烯基膦酸酯(VP)。

【第88項】 一種雙股RNAi劑，其包含與反義股互補之正義股，該正義股包含核苷酸序列s 5'- usgsgga(Uhd)UfuCfAfUfguaaccaasgsa– 3' (SEQ ID NO：15)，及該反義股包含核苷酸序列 5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc– 3' (SEQ ID NO：17)，

其中a、c、g、與u分別為2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯、2'-O-甲基鳥苷-3'-磷酸酯、與2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯；Af、Cf、

Gf、與Uf分別為2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-氟鳥苷-3’-磷酸酯、與2’-氟尿苷-3’-磷酸酯；s為硫代磷酸酯 鏈結；(Uhd)為2'-O-十六碳基-尿苷-3'-磷酸酯；及VP為乙烯基膦酸酯。

【第89項】 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第1至88項中任一項所述之雙股RNAi劑。

【第90項】 一種抑制眼部細胞中甲狀腺素運載蛋白(TTR)表現之方法，該方法包括：

由細胞與如申請專利範圍第1至88項中任一項所述之雙股RNAi劑接觸，藉以抑制眼部細胞中之TTR基因表現。

【第91項】 如申請專利範圍第90項所述之方法，其中該細胞在個體內。

【第92項】 如申請專利範圍第91項所述之方法，其中該個體為人類。

【第93項】 如申請專利範圍第92項所述之方法，其中該個體罹患TTR相關眼部疾病。

【第94項】 一種治療罹患TTR相關眼部疾病之個體之方法，其包括對該個體投與醫療有效量之如申請專利範圍第1至88項中任一項所述之雙股RNAi劑，藉以治療該個體。

【第95項】 如申請專利範圍第94項所述之方法，其中該TTR相關眼部疾病或病變係選自下列各者所成群組：TTR相關青光眼、TTR相關玻璃體混濁、TTR相關視網膜異常、TTR相關視網膜類澱粉蛋白沉積、TTR相關視網膜血管病變、TTR相關虹膜類澱粉蛋白沉積、TTR相關扇貝樣虹膜、與TTR相關水晶體的類澱粉蛋白沉積。

【第96項】 如申請專利範圍第94或95項所述之方法，其中該個體帶有與TTR相關疾病之發展有關之TTR基因突變。

【第97項】 如申請專利範圍第96項所述之方法，其中該TTR相關疾病係選自下列各者所成群組：老年全身性類澱粉蛋白變性(SSA)、全身性家族性類澱粉蛋白變性、家族性類澱粉蛋白多發性神經病變(FAP)、家族性類澱粉蛋白心肌病變(FAC)、腦膜/中樞神經系統(CNS)類澱粉蛋白變性、與高甲狀腺素血症。

【第98項】 如申請專利範圍第94至97項中任一項所述之方法，其中該雙股RNAi劑係經由眼周、結膜、Tenon氏囊下、前房內、玻璃體內、眼內、前部或後部鞏膜旁、視網膜下、結膜下、眼球後、或小管內投與法投與個體。

【第99項】 如申請專利範圍第94至98項中任一項所述之方法，其中該雙股RNAi劑係長期投與人類個體。

【第100項】 如申請專利範圍第94至99項中任一項所述之方法，其進一步包括對該個體投與額外醫療劑。

【第101項】 如申請專利範圍第100項所述之方法，其中該額外醫療劑為TTR四聚體安定劑及/或非類固醇消炎劑。

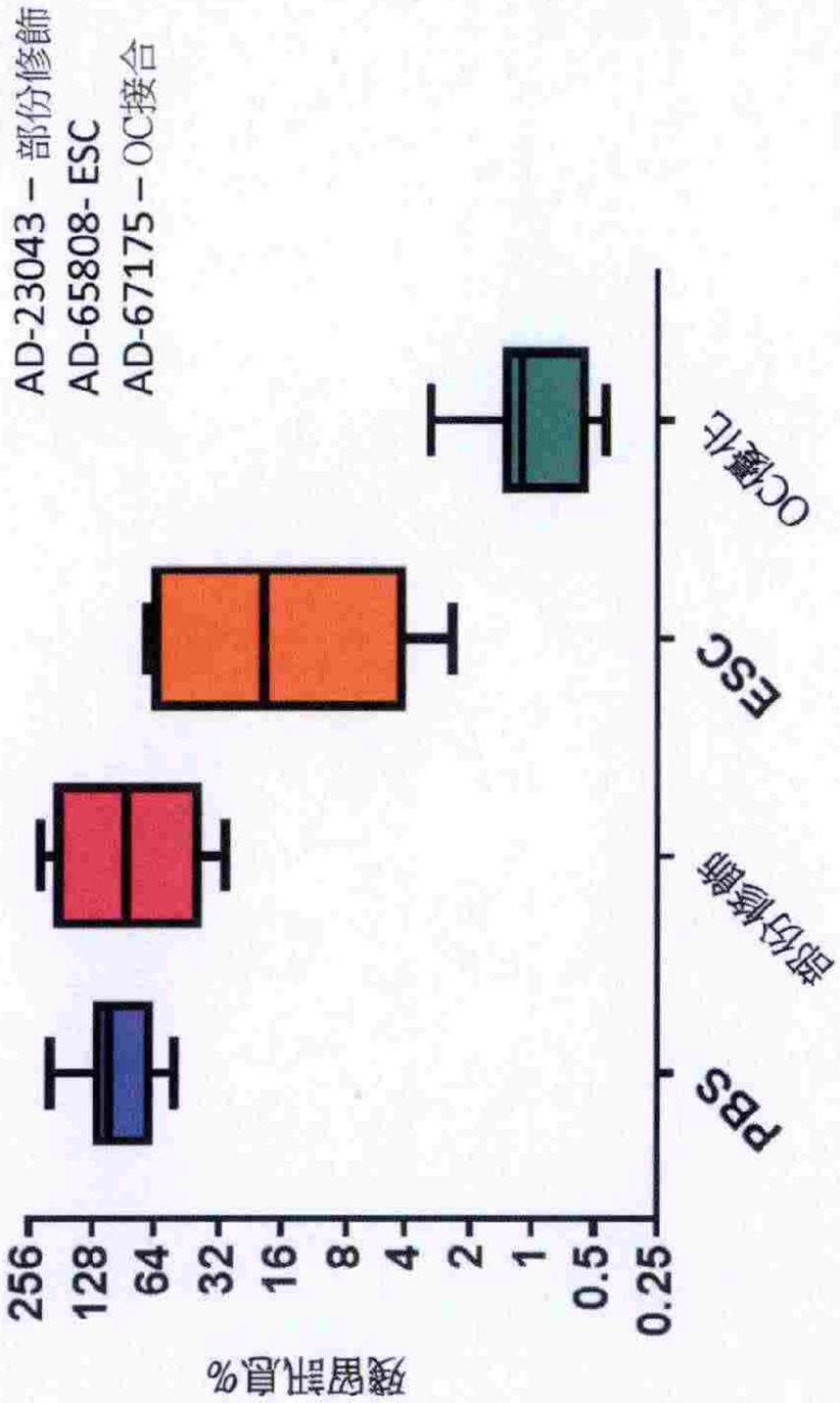
【第102項】 如申請專利範圍第90至101項中任一項所述之方法，其中該個體已接受或將接受肝臟移植。

【第103項】 如申請專利範圍第90至102項中任一項所述之方法，其中對個體投與固定劑量約0.01 mg至約1 mg之雙股RNAi劑。

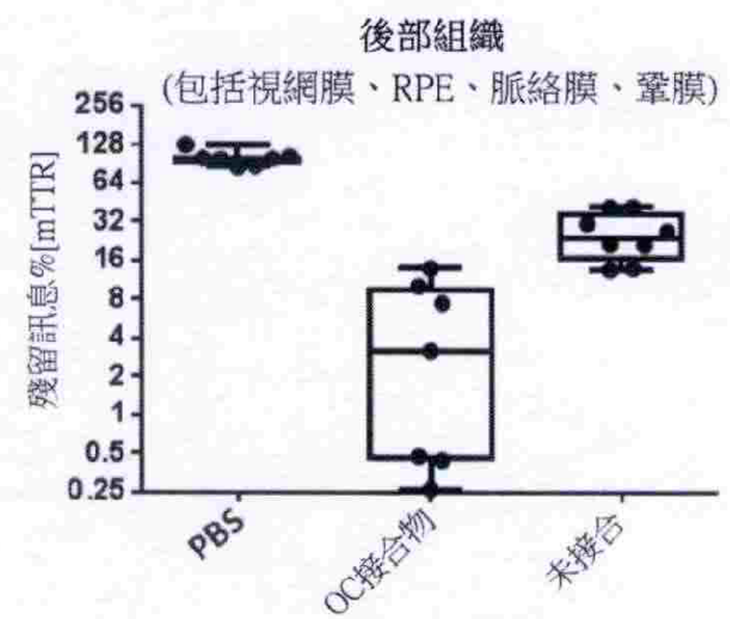
【第104項】 如申請專利範圍第90至103項中任一項所述之方法，其中對該個體投與雙股RNAi劑，以降低個體眼睛中睫狀體上皮層(CE)與視網膜

色素上皮層(RPE)之甲狀腺素運載蛋白介導之類澱粉蛋白變性(ATTR類澱粉蛋白變性)。

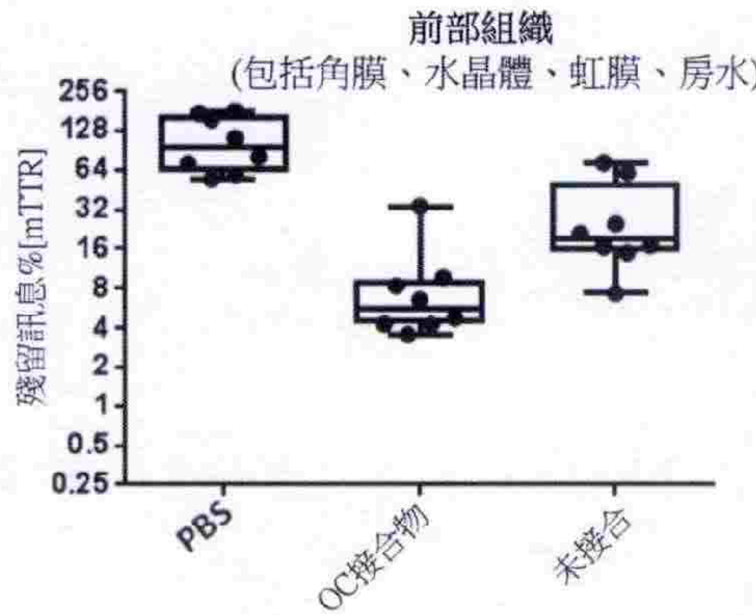
【發明圖式】


AD-23043 – 部份修飾
AD-65808- ESC
AD-67175 – OC接合
OC攝護
ESC
部份修飾
PBS
256
128
64
32
16
8
4
2
1
0.5
0.25
殘留訊息%

【第1圖】



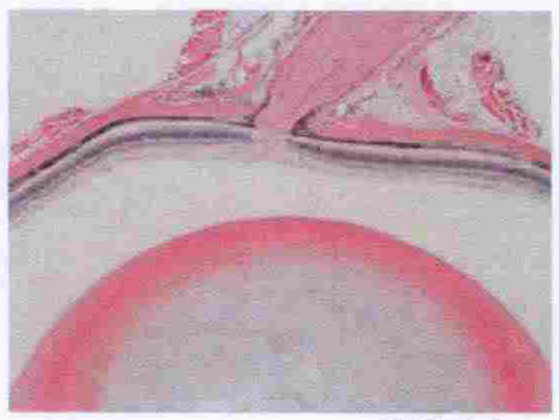
【第2A圖】



AD-67175 – OC接合物
AD-77745 - 未接合

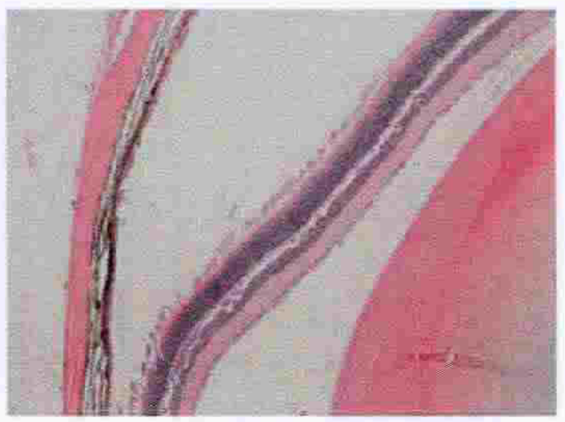
【第2B圖】

組織病理學



對照組

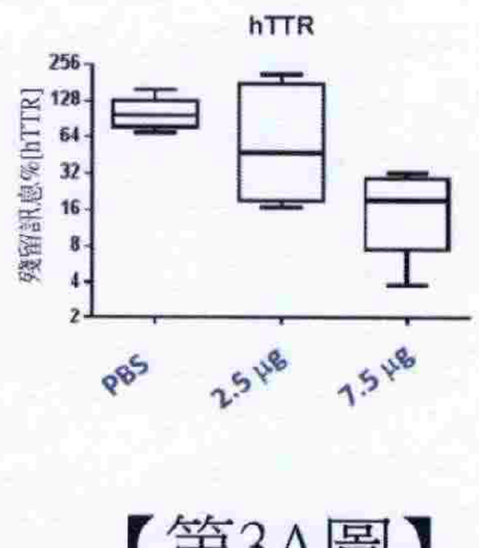
【第2C圖】



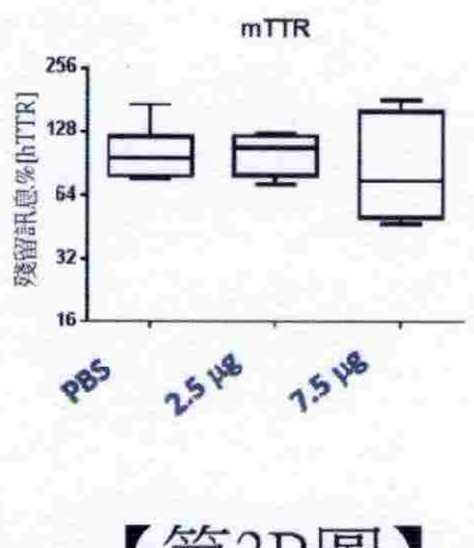
接合物

【第2D圖】

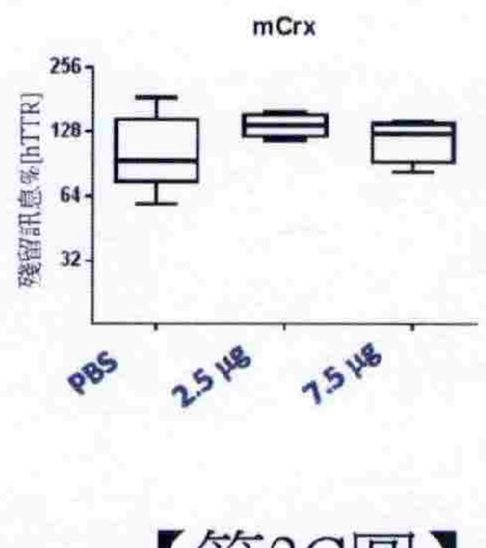
AD-67175 – OC接合物
AD-77745 - 未接合



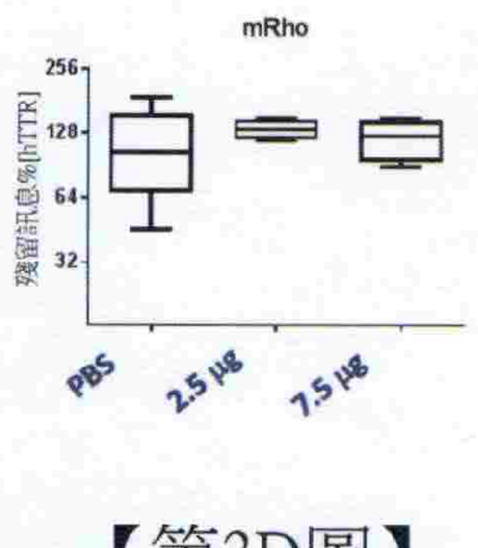
【第3A圖】



【第3B圖】

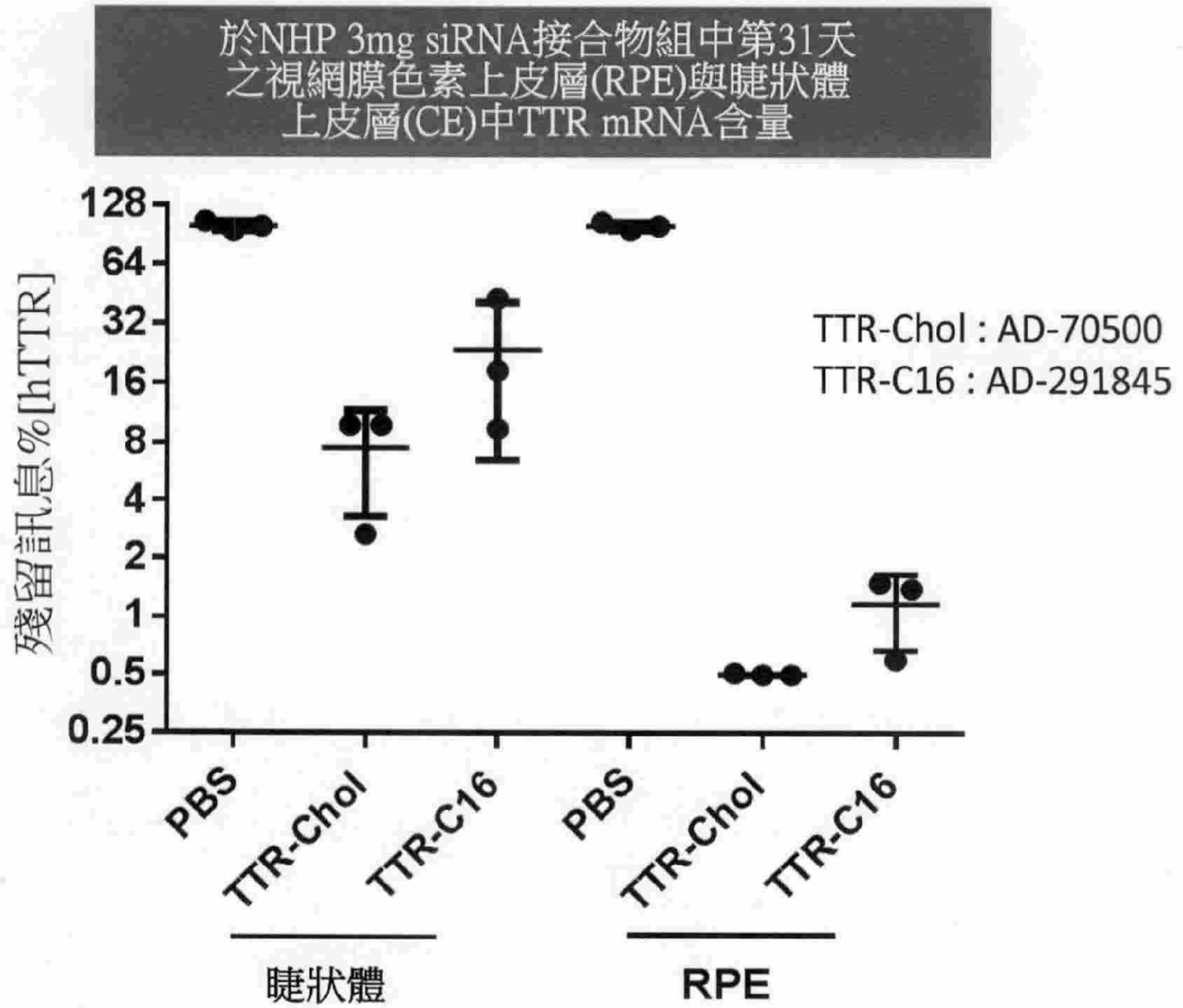


【第3C圖】

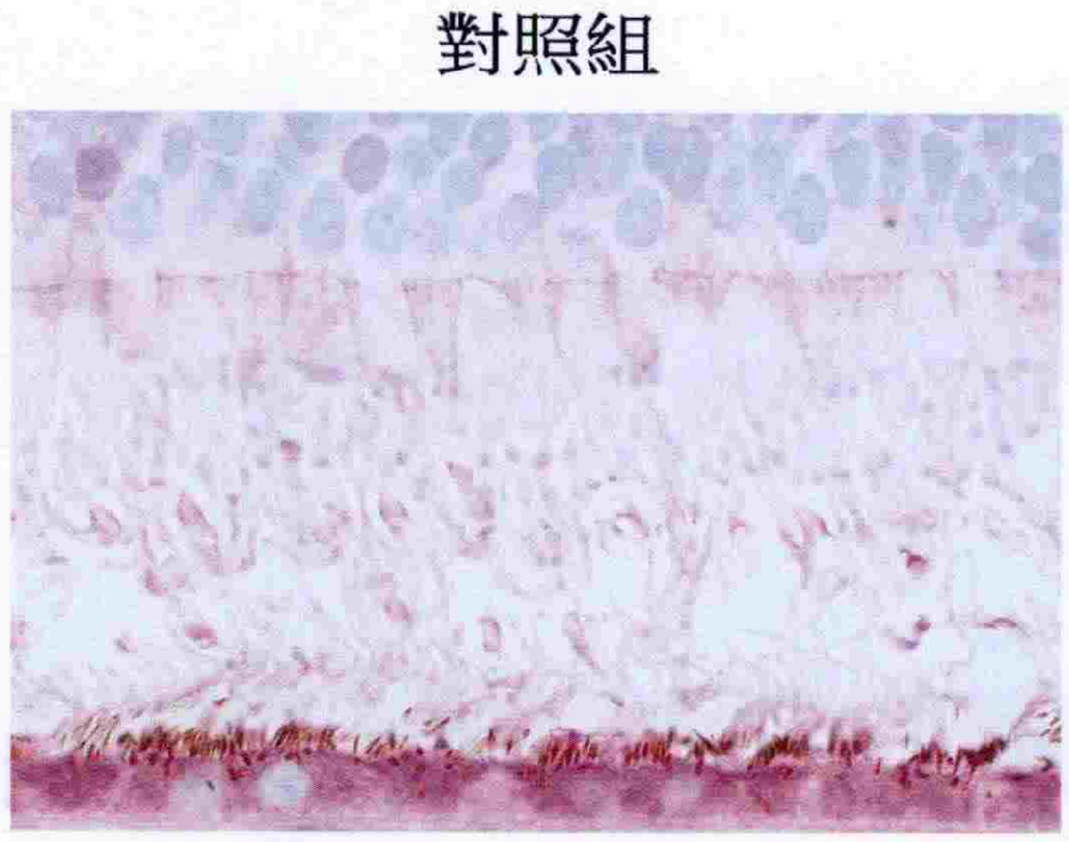


【第3D圖】

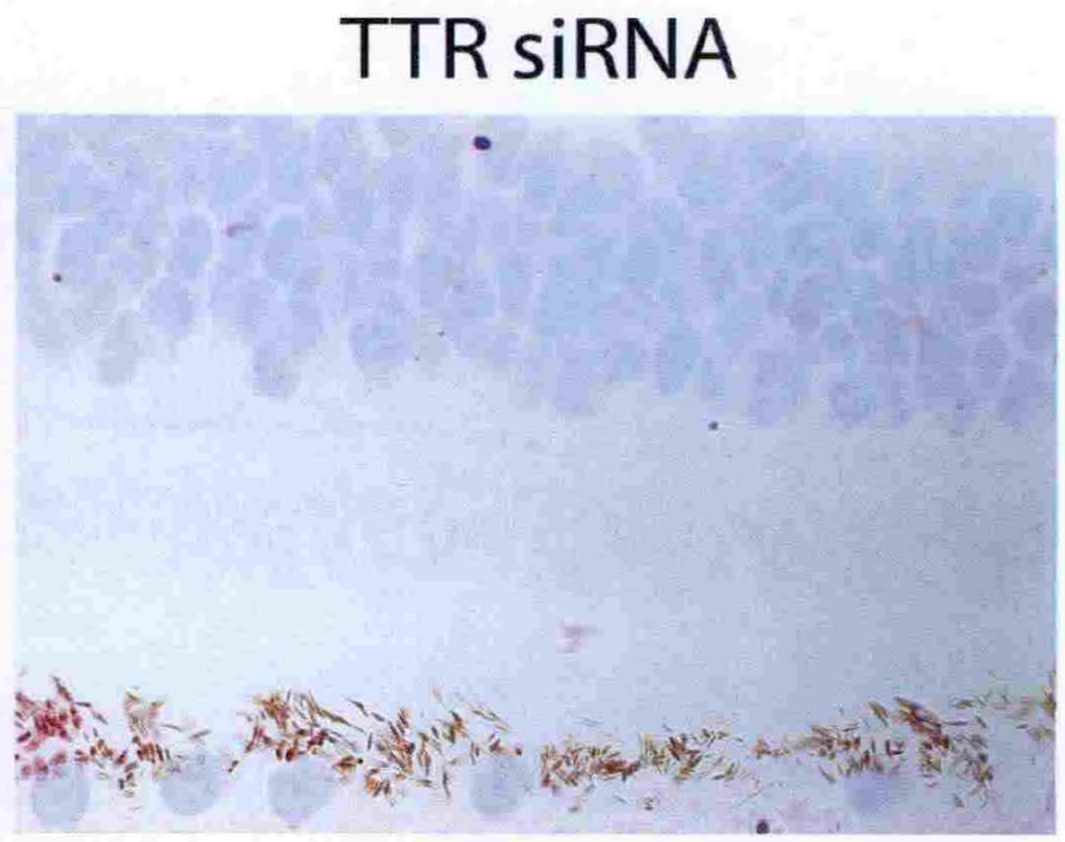
202028465



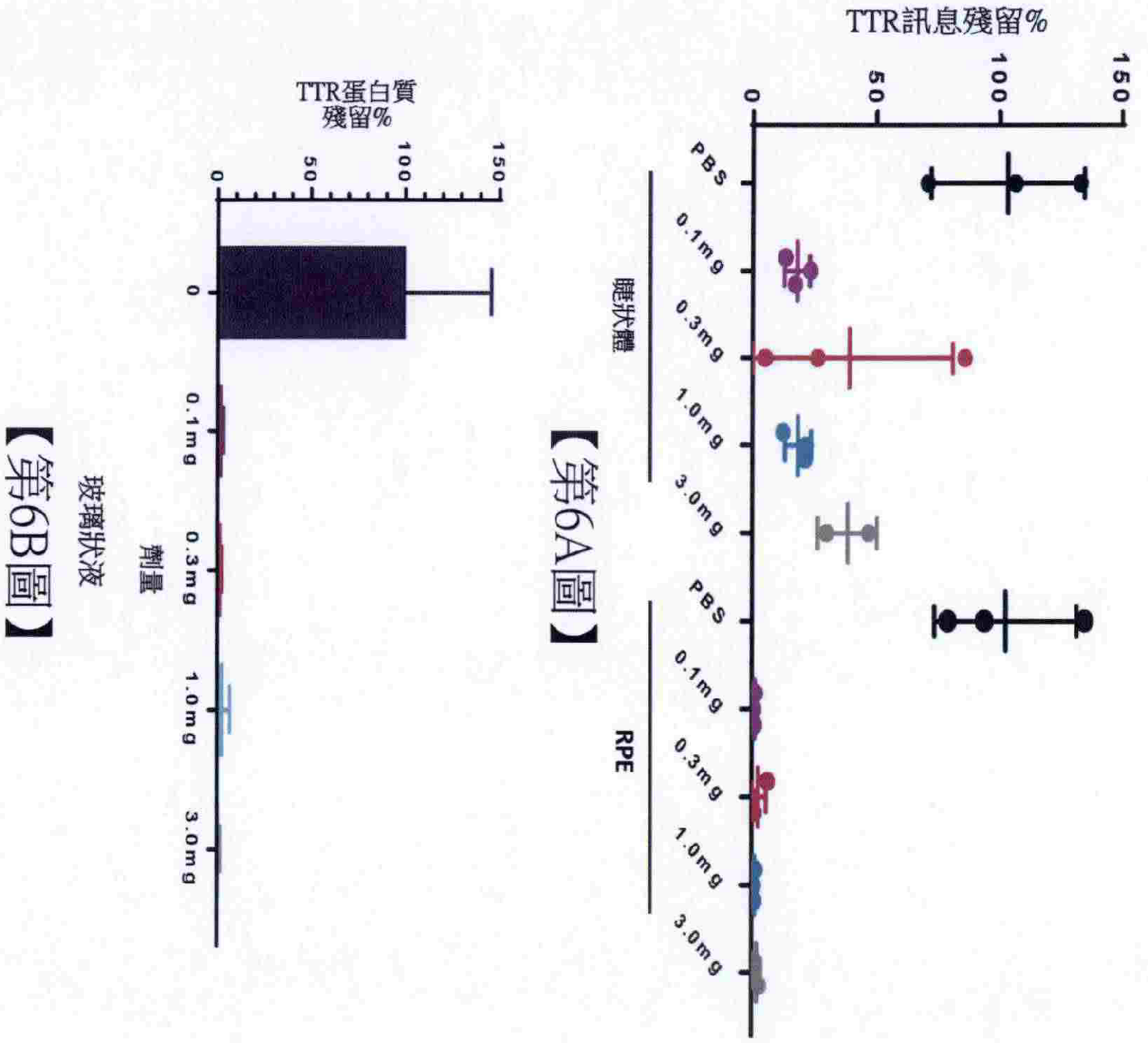
【第4圖】



【第5A圖】

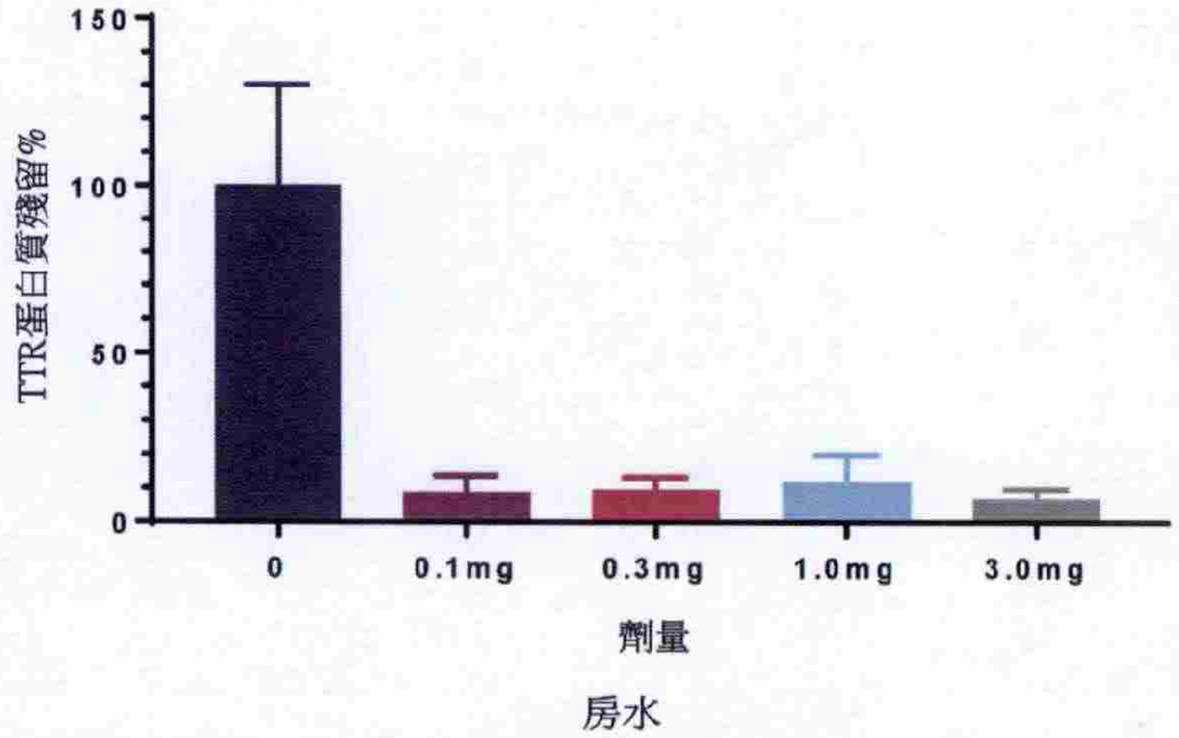


【第5B圖】

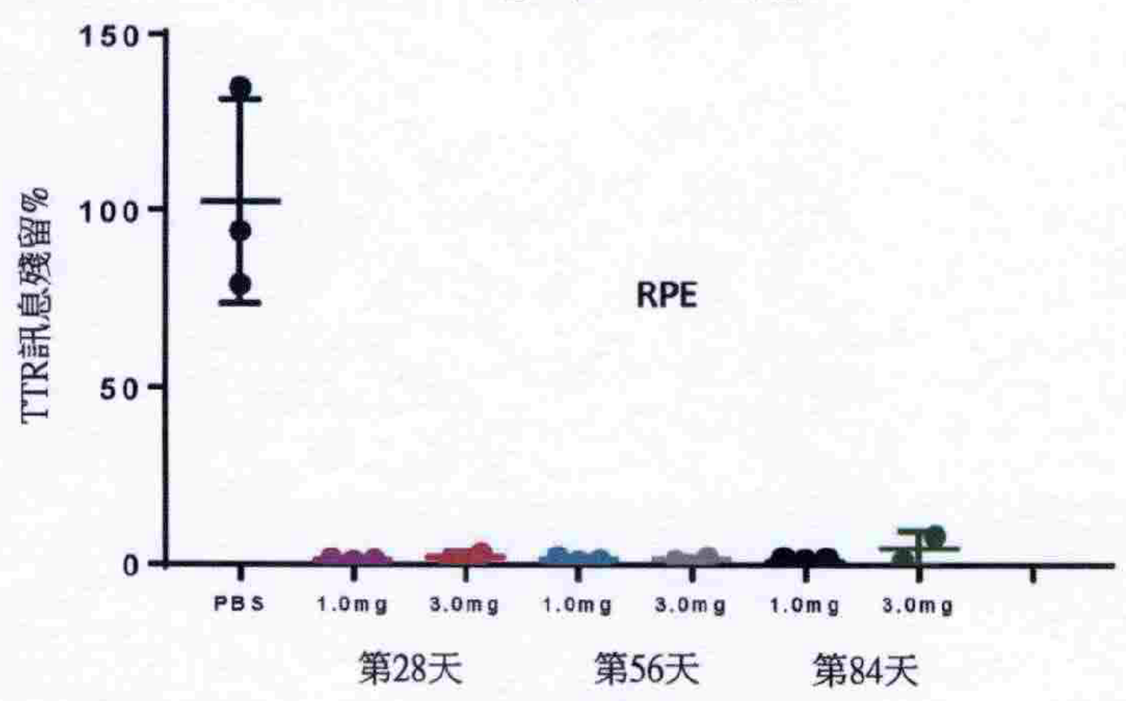

TTR訊息殘留%
0
50
100
150
PBS
0.1mg
0.3mg
1.0mg
3.0mg
PBS
0.1mg
0.3mg
1.0mg
3.0mg
睫狀體
RPE
TTR蛋白質
殘留%
0
50
100
150
0
0.1mg
0.3mg
1.0mg
3.0mg
劑量
玻璃狀液

【第6A圖】

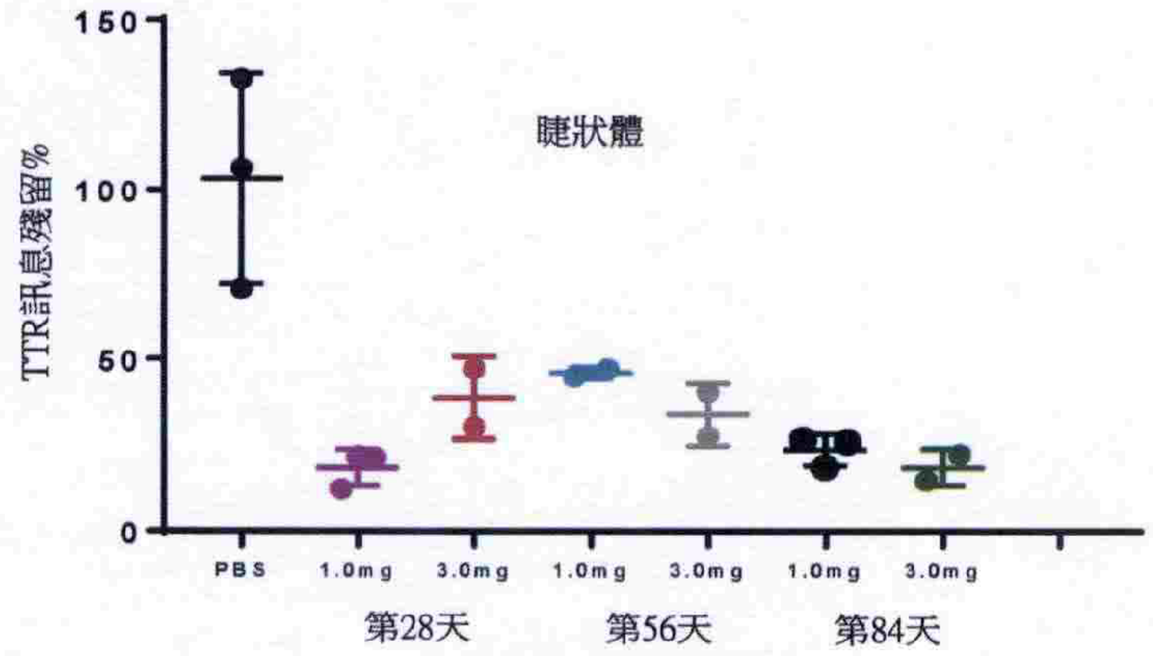
【第6B圖】


150
100
50
0
TTR蛋白質殘留%
0
0.1mg
0.3mg
1.0mg
3.0mg
劑量
房水

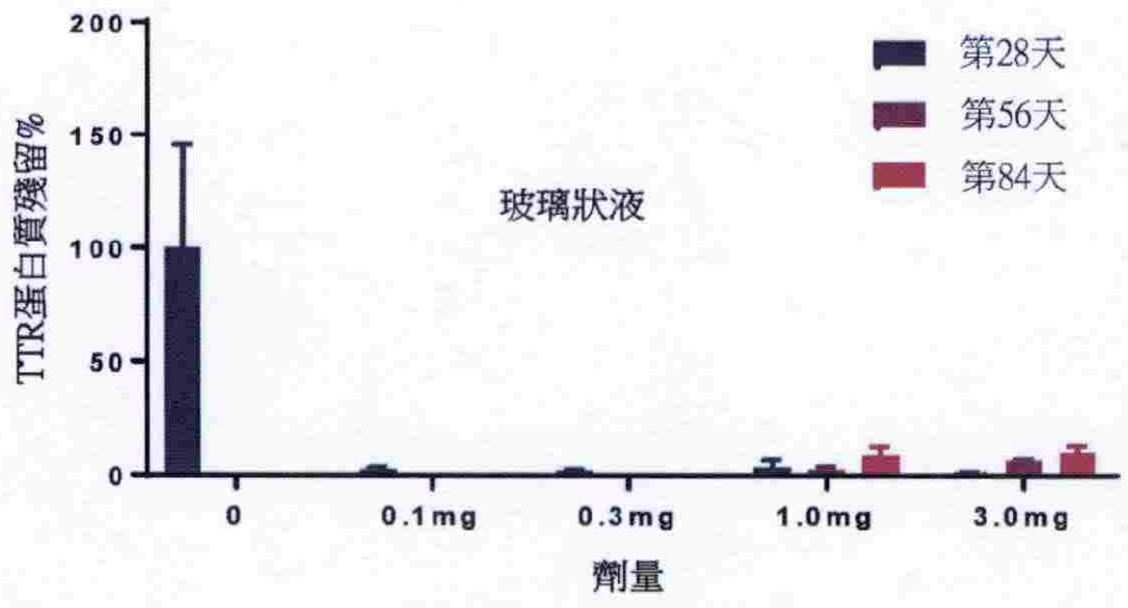
【第6C圖】


150
100
50
0
TTR訊息殘留%
RPE
PBS
1.0mg
3.0mg
1.0mg
3.0mg
1.0mg
3.0mg
第28天
第56天
第84天

【第7A圖】

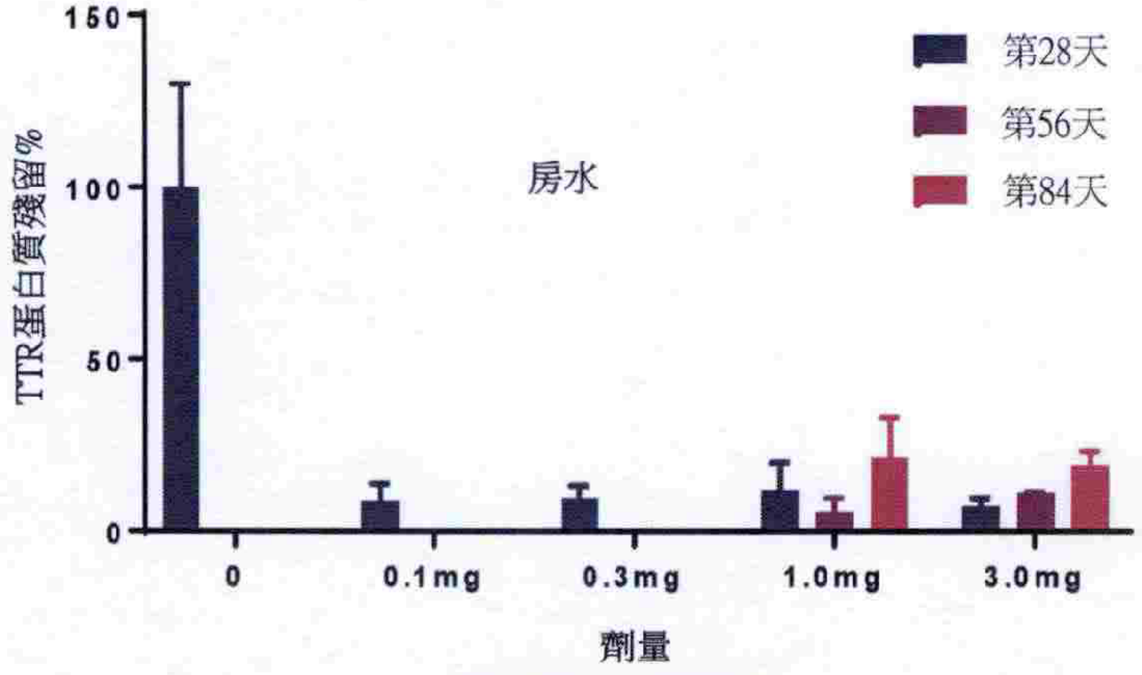

睫狀體
TTR訊息殘留%
150
100
50
0
PBS
1.0mg
3.0mg
1.0mg
3.0mg
1.0mg
3.0mg
第28天
第56天
第84天

【第7B圖】

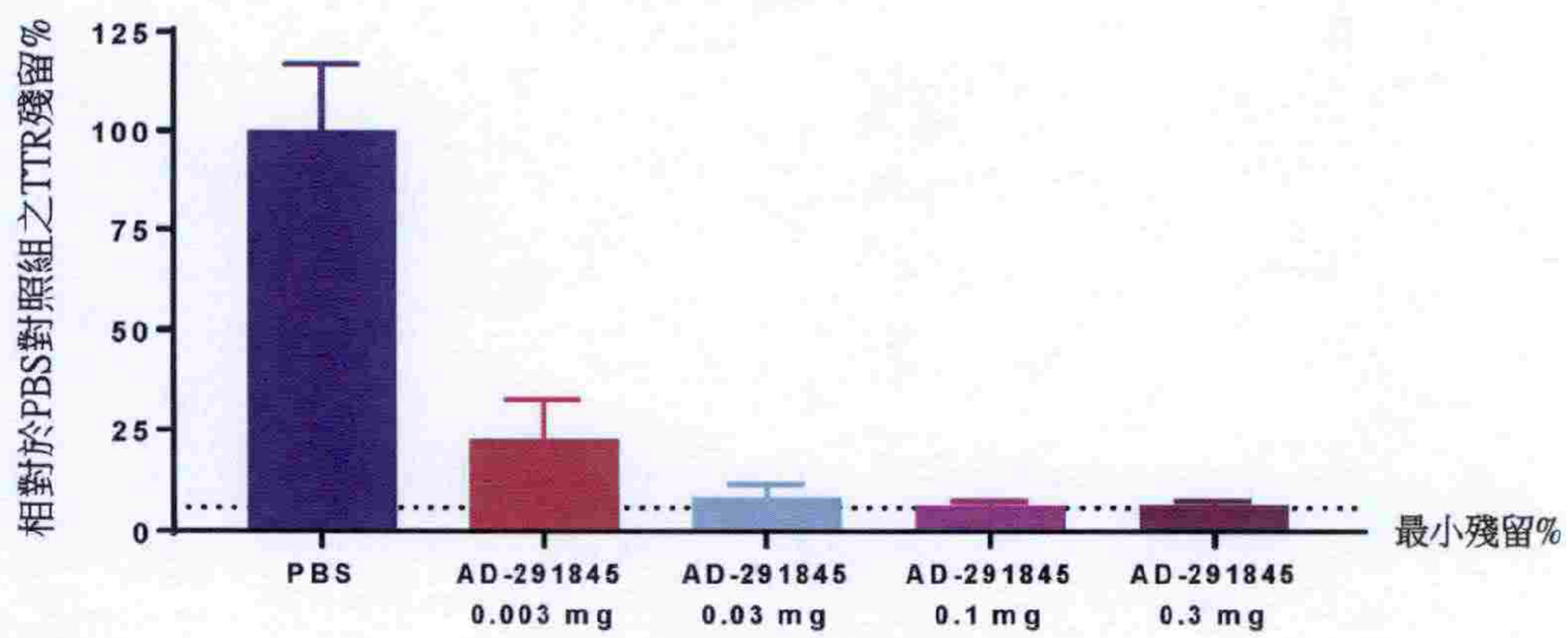

玻璃狀液
TTR蛋白質殘留%
200
150
100
50
0
第28天
第56天
第84天
0
0.1mg
0.3mg
1.0mg
3.0mg
劑量

【第7C圖】

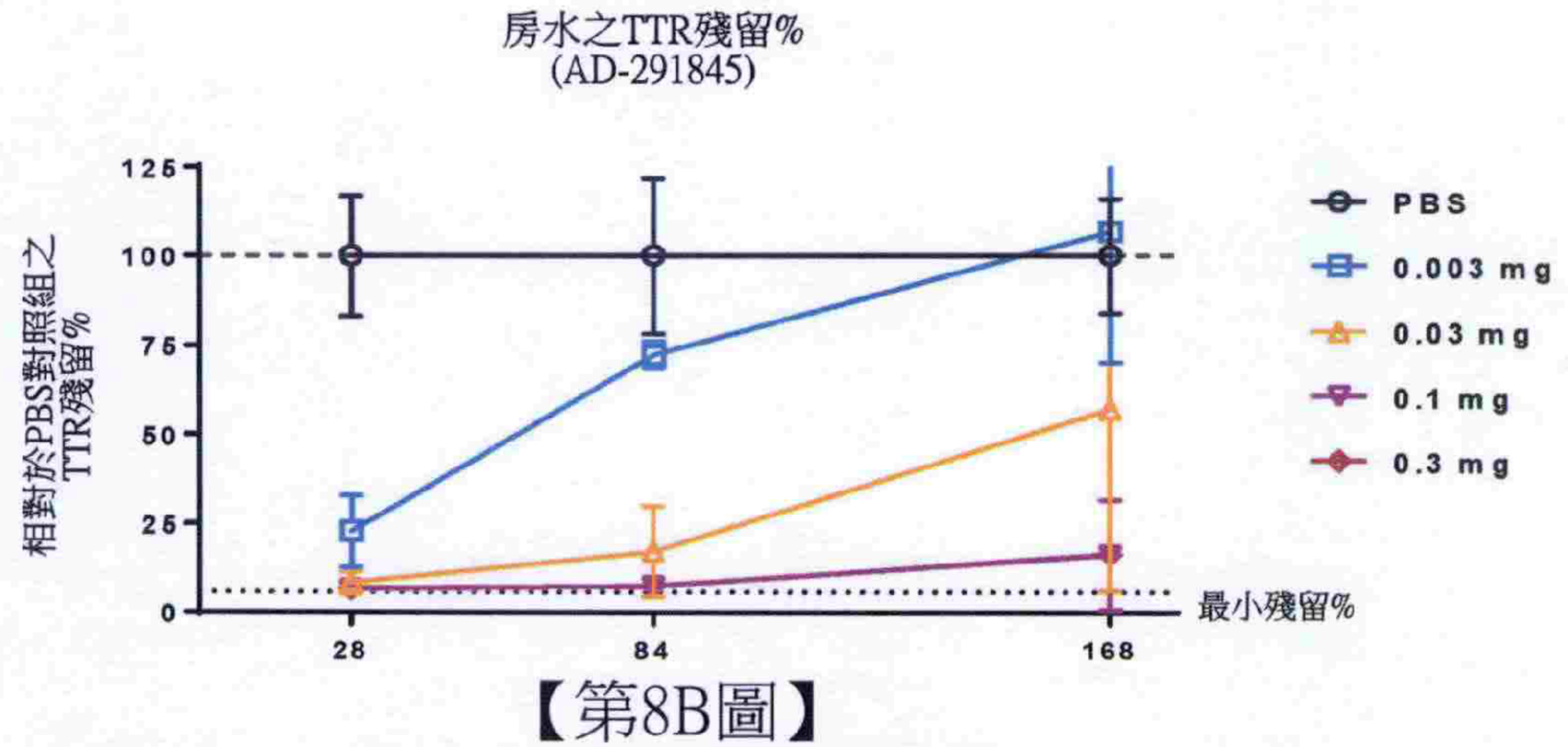
202028465



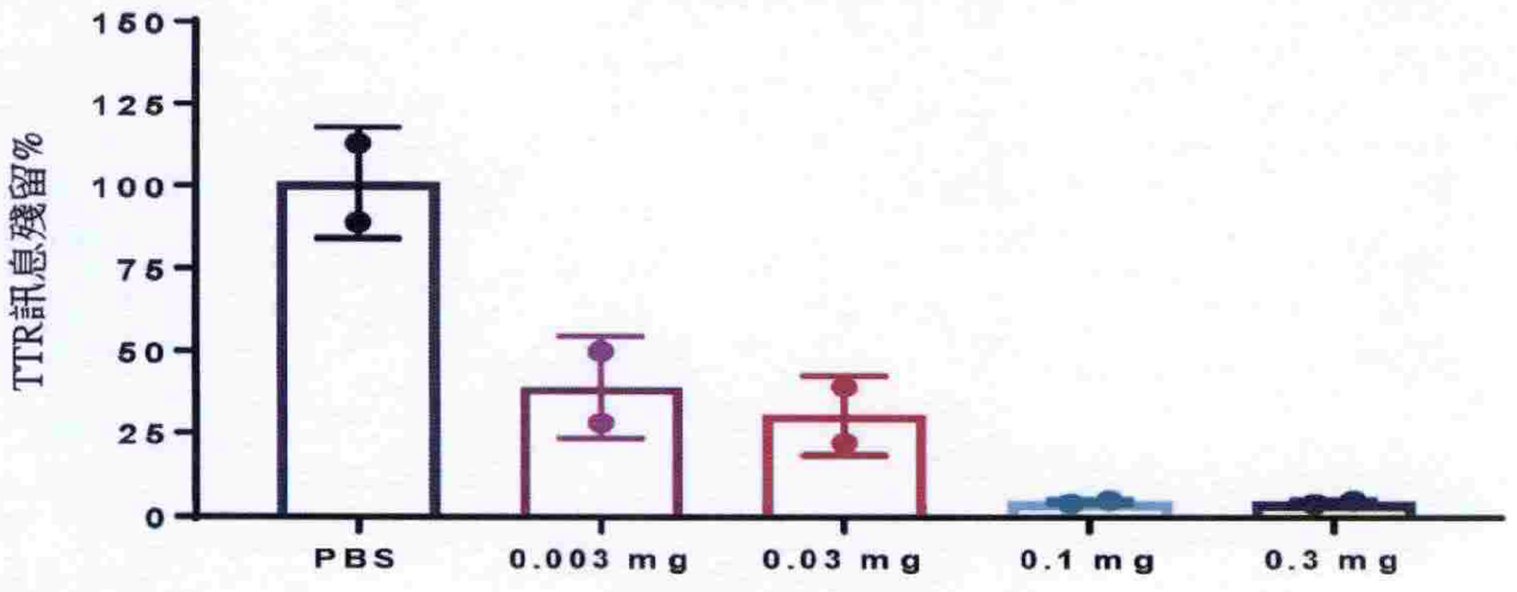
【第7D圖】



【第8A圖】

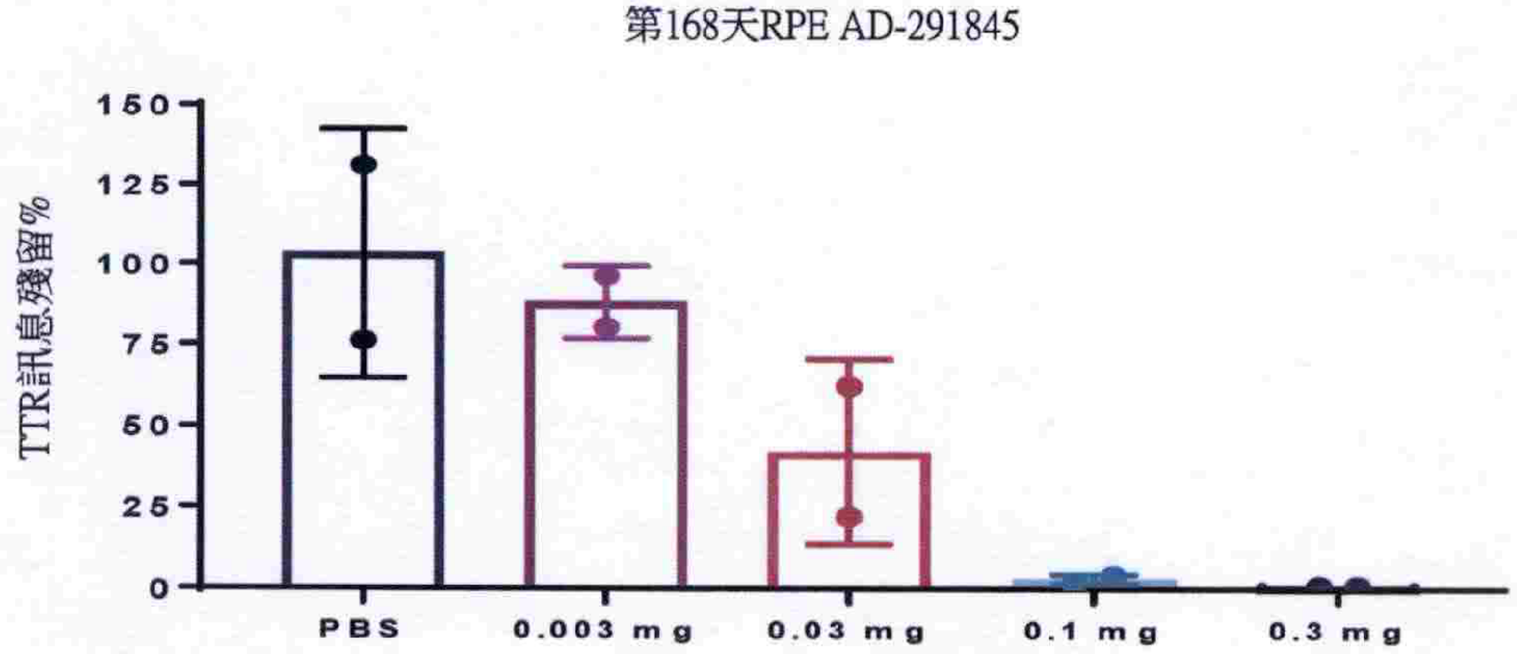

房水之TTR殘留%
(AD-291845)
相對於PBS對照組之TTR殘留%
125
100
75
50
25
0
28
84
168
PBS
0.003 mg
0.03 mg
0.1 mg
0.3 mg
最小殘留%

【第8B圖】

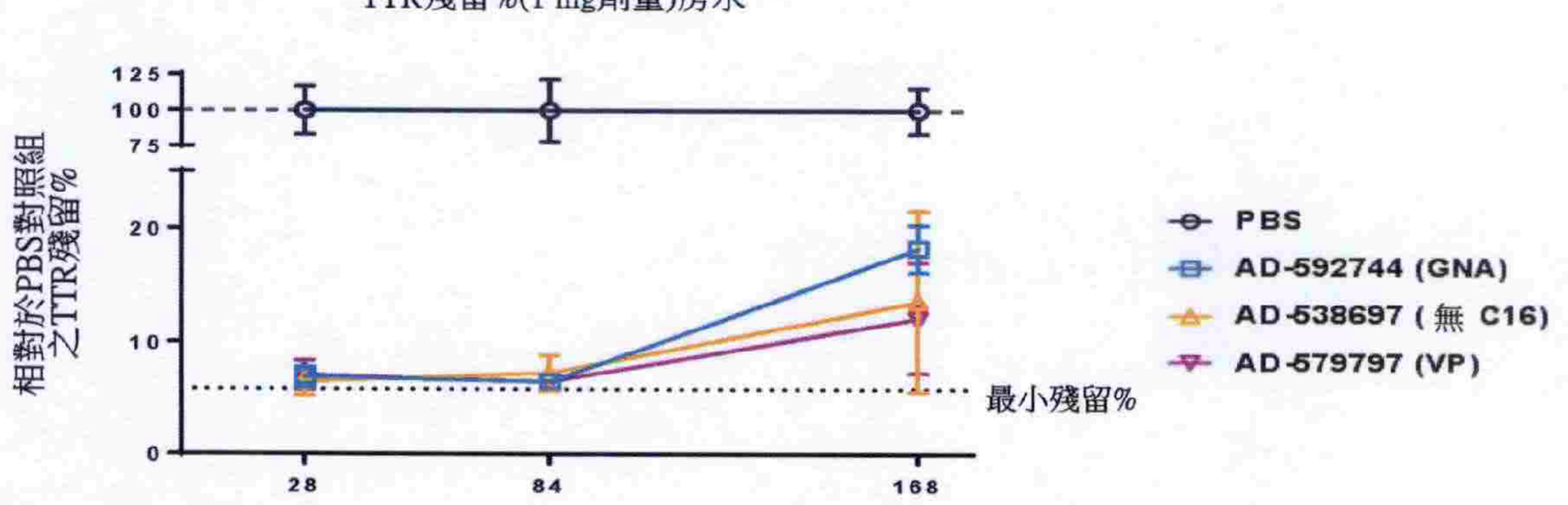

第168天睫狀體AD-291845
TTR訊息殘留%
150
125
100
75
50
25
0
PBS
0.003 mg
0.03 mg
0.1 mg
0.3 mg

【第8C圖】

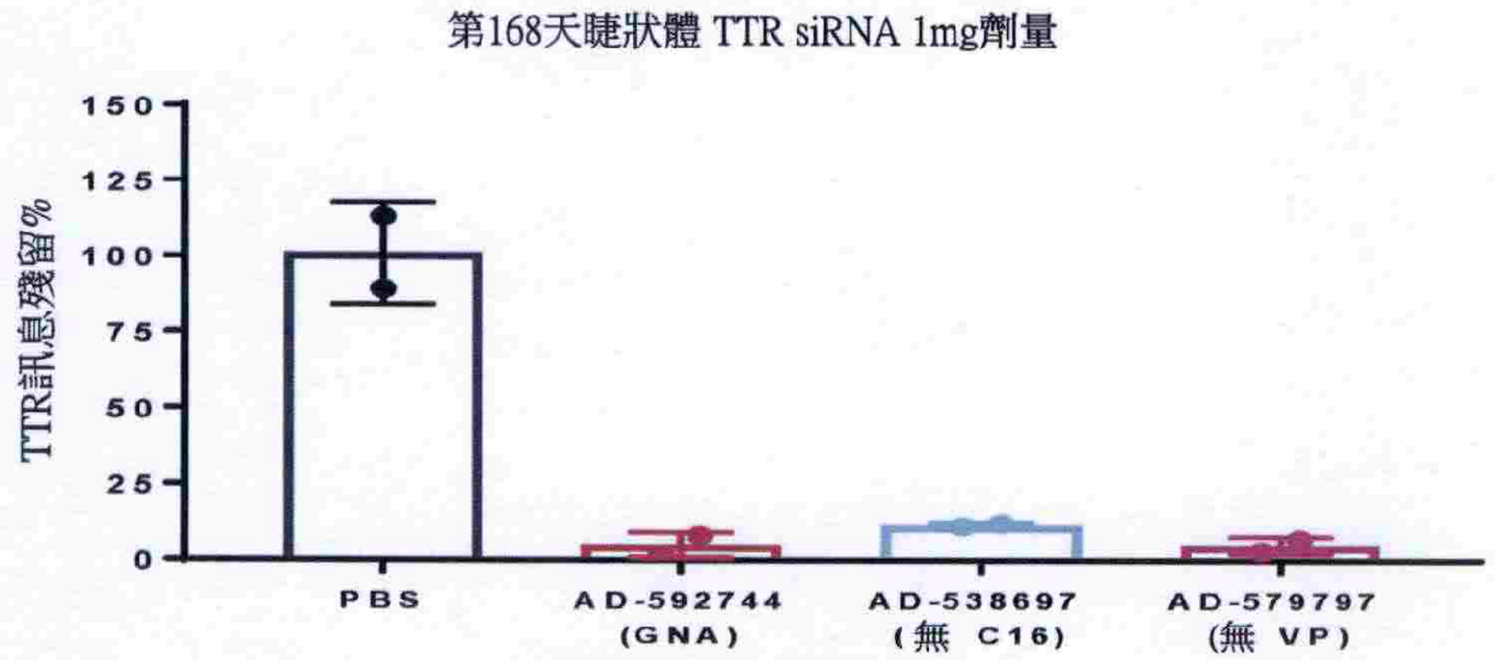
202028465



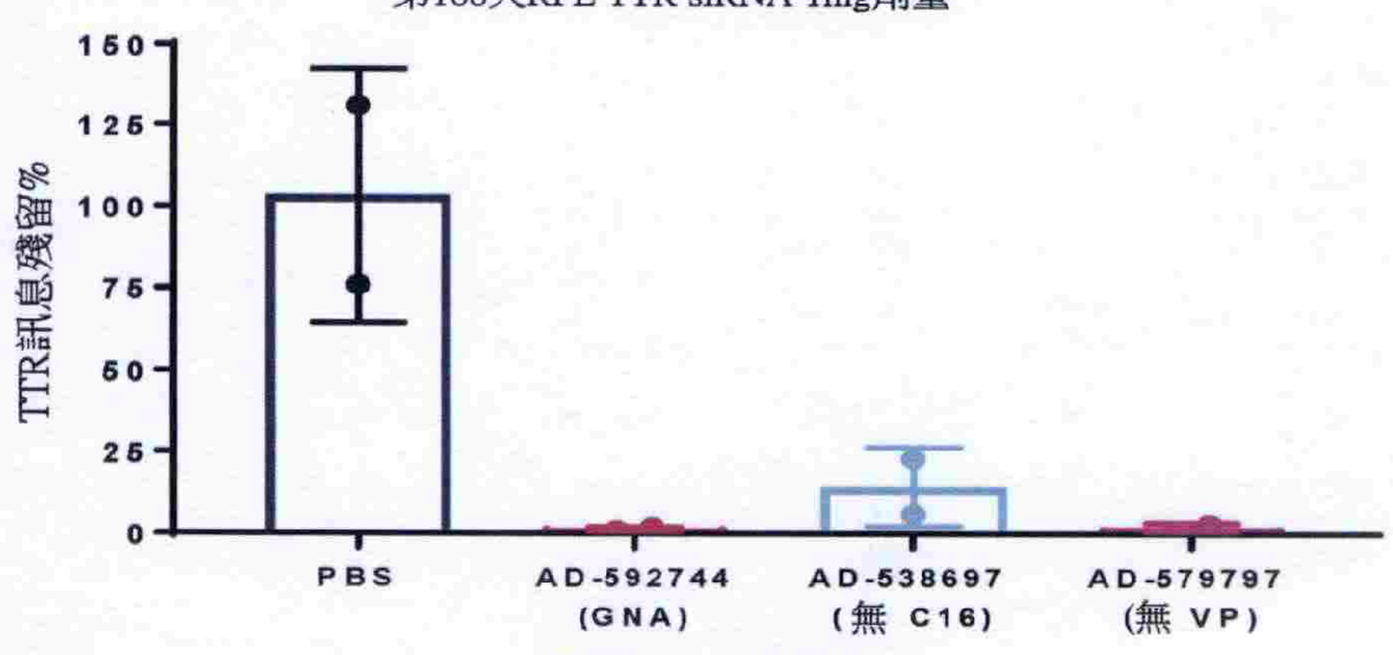
【第8D圖】



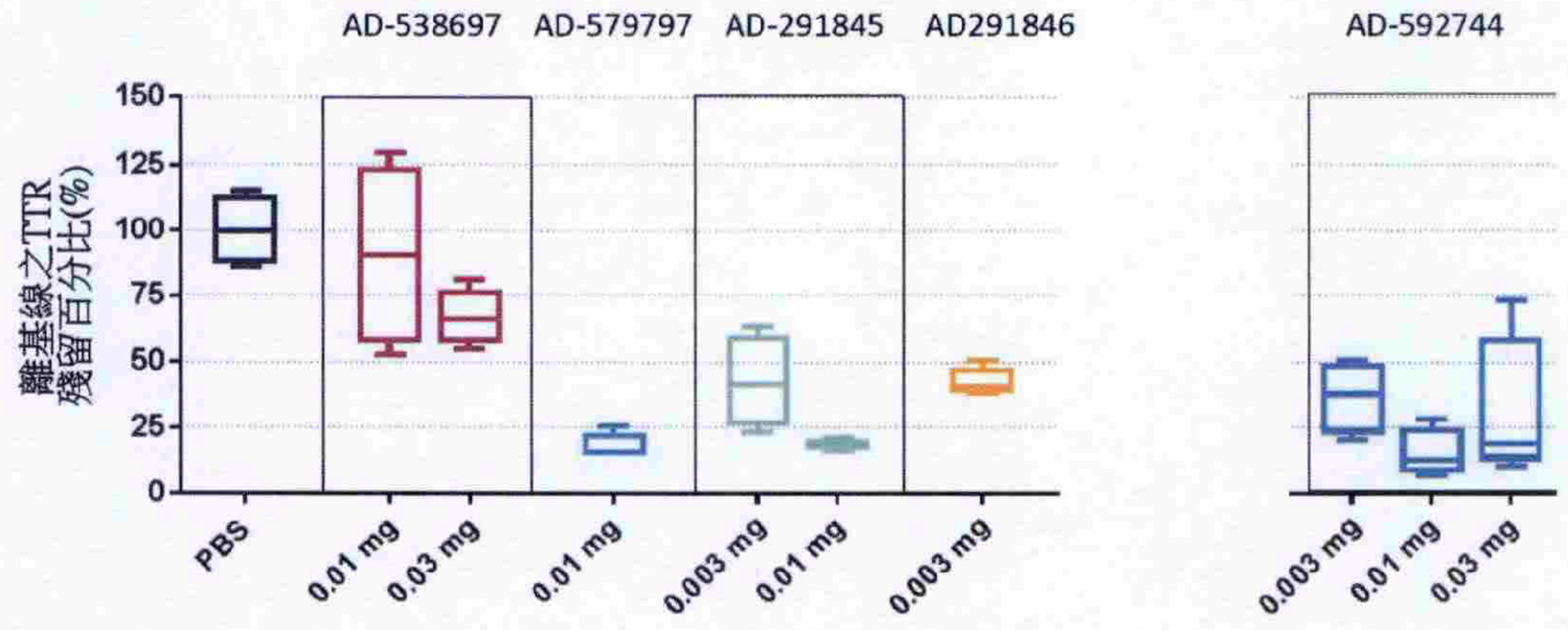
【第9A圖】


第168天睫狀體 TTR siRNA 1mg劑量
TTR訊息殘留%
150
125
100
75
50
25
0
PBS
AD-592744
(GNA)
AD-538697
(無 C16)
AD-579797
(無 VP)

【第9B圖】


第168天RPE TTR siRNA 1mg劑量
TTR訊息殘留%
150
125
100
75
50
25
0
PBS
AD-592744
(GNA)
AD-538697
(無 C16)
AD-579797
(無 VP)

【第9C圖】



【第10圖】

202028465