



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I790217 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 21 日

(21)申請案號：106144180

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 15 日

(51)Int. Cl. : C12N15/113 (2010.01)

A61K31/713 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/12/16 美國

62/435,127

(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：陳 艾咪 CHAN, AMY (US)；凡斯特 約翰 VEST, JOHN (US)；羅畢 卡瑞爾
ROBBIE, GABRIEL (US)；阿塔瓦拉 杭沙恩 Z ATTARWALA, HUSSAIN Z.
(IN)；高爾 瓦祿恩 GOEL, VARUN (IN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

CN 104080794A

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：33 項 圖式數：1 共 210 頁

(54)名稱

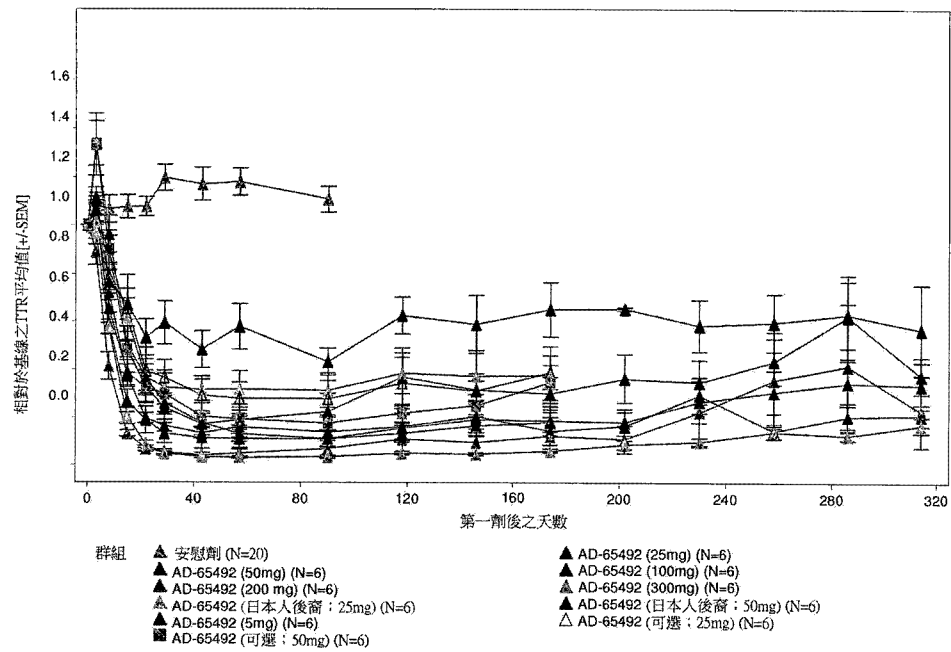
使用甲狀腺素運載蛋白 (TTR) iRNA 組成物於治療或預防 TTR 相關疾病之方法

(57)摘要

本發明提供一種使用靶向甲狀腺素運載蛋白(TTR)基因之 iRNA 劑，例如雙股 iRNA 劑，治療或預防 TTR 相關疾病之方法。

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

指定代表圖：



【第1圖】

I790217

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

使用甲狀腺素運載蛋白(TTR) iRNA 組成物於治療或預防 TTR 相關疾病之方法

METHODS FOR TREATING OR PREVENTING
TTR-ASSOCIATED DISEASES USING TRANSTHYRETIN
(TTR) iRNA COMPOSITIONS

【中文】

本發明提供一種使用靶向甲狀腺素運載蛋白(TTR)基因之 iRNA 劑，例如雙股 iRNA 劑，治療或預防 TTR 相關疾病之方法。

【英文】

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

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無元件符號。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無代表化學式。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

使用甲狀腺素運載蛋白(TTR) iRNA 組成物於治療或預防 TTR 相關疾病之方法

METHODS FOR TREATING OR PREVENTING
TTR-ASSOCIATED DISEASES USING TRANSTHYRETIN
(TTR) iRNA COMPOSITIONS

【0001】

相關申請案

本申請案主張美國臨時專利申請案案號 62/435,127 (2016 年 12 月 16 日申請)之優先權，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

本申請案係有關國際申請案案號 PCT/US2016/044359 (2016 年 11 月 28 日申請)、美國臨時專利申請案案號 62/199,563(2015 年 7 月 31 日申請)、與美國臨時專利申請案案號 62/287,518(2016 年 1 月 27 日申請)。上述申請案之完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

本申請案亦有關美國臨時專利申請案案號 61/881,257 (2013 年 9 月 23 日申請)、與國際申請案案號 PCT/US2014/056923 (2014 年 9 月 23 日申請)，其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。此外，本申請案係有關美國臨時申請案案號 61/561,710(2011 年 11 月 18 日申請)、國際申請案案號 PCT/US2012/065601(2012 年 11 月 16 日申請)、美國臨時

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)、與國際申請案案號 PCT/US2012/065691(2012 年 11 月 16 日申請)，其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0002】

序列表

本申請案包含之序列表已呈 ASCII 格式電子檔交付，且已以引用之方式完整併入本文中。該於 2017 年 12 月 7 日製作之 ASCII 複本名稱為 121301_07020_SL.txt，檔案大小為 9,480 位元組。

【技術領域】

【0003】 本發明提供一種治療或預防甲狀腺素運載蛋白(TTR)相關疾病之方法，該方法係使用靶向 TTR 基因之 RNAi 劑抑制 TTR 表現。

【先前技術】

【0004】 甲狀腺素運載蛋白(TTR)(亦稱為前白蛋白)出現在血清與腦脊髓液(CSF)中。TTR 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 結合而成為視黃醇(維生素 A)之載劑。甲狀腺素運載蛋白係依其運載甲狀腺素與視黃醇(transport of thyroxine and retinol)而得名。TTR 亦具有蛋白酶功能，可以裂解蛋白質，包括 apoA-I(主要 HDL 脂蛋白元)、澱粉樣蛋白 β -肽、與神經肽 Y。參見 Liz, M.A.等人(2010) *IUBMB*

Life, 62(6):429-435。

【0005】 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 折板結構。每個單體有 2 個 4-股 β 折板與長橢球面。由反平行 β -折板交互作用連接單體形成二聚體。自每個單體之短環圈形成主要二聚體-二聚體交互作用。這兩對環圈分隔二聚體之反向外凸 β -折板，形成內部通道。

肝臟為 TTR 之主要表現部位。其他顯著表現部位包括脈絡叢、視網膜(特定言之視網膜色素上皮)與胰臟。

【0006】 甲狀腺素運載蛋白為形成澱粉樣蛋白小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) Current perspectives on cardiac amyloidosis, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011。器官與組織中澱粉樣蛋白小纖維之細胞外沉積為澱粉樣蛋白變性之特徵。澱粉樣蛋白小纖維係由錯誤摺疊蛋白質聚集體組成，其可能由前體蛋白質之過量生產或特異性突變所致。TTR 形成澱粉樣蛋白變性之可能性可能與其廣泛性 β 折板結構相關；X-光結晶學研究顯示某些澱粉樣蛋白變性形成性突變會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。

澱粉樣蛋白變性係一群澱粉樣蛋白疾病之通稱名詞，其特徵在於澱粉樣蛋白沉積。澱粉樣蛋白疾病依據其前體蛋白質分類；例如澱粉樣蛋白名稱以「A」開頭，隨

後為前體蛋白質之縮寫，例如 ATTR 係指澱粉樣蛋白形成性甲狀腺素運載蛋白(amyloidogenic transthyretin)。參見上述文獻。

【0007】 TTR 相關疾病有許多種，大多數為澱粉樣蛋白疾病。正常序列 TTR 係與老年人心臟澱粉樣蛋白變性相關，稱為老年全身性澱粉樣蛋白變性(SSA)(亦稱為老年心臟澱粉樣蛋白變性(SCA)或心臟澱粉樣蛋白變性)。SSA 經常在許多其他器官中伴隨出現顯微沉積。TTR 澱粉樣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，該疾病稱為家族性澱粉樣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，該疾病稱為家族性澱粉樣蛋白心肌病(FAC)。第三種主要 TTR 澱粉樣蛋白變性型式為柔腦膜澱粉樣蛋白變性，亦稱為柔腦膜或腦膜血管澱粉樣蛋白變性、中樞神經系統(CNS)澱粉樣蛋白變性、或澱粉樣蛋白變性 VII 型。TTR 突變亦會造成澱粉樣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，其可能因突變 TTR 分子提高對甲狀腺素親和性以致提高甲狀腺素與 TTR 結合性所繼發之非澱粉樣蛋白變性疾病。參見，例如 Moses 等人(1982) *J. Clin. Invest.*, 86, 2025-2033。

【0008】 異常澱粉樣蛋白變性形成性蛋白質可能為先天性或由後天體細胞突變所致。Guan, J.等人(Nov. 4, 2011) Current perspectives on cardiac amyloidosis, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011。

與甲狀腺素運載蛋白相關之 ATTR 為最常見之遺傳性全身性澱粉樣蛋白變性。Lobato, L.(2003) *J. Nephrol.*, 16:438-442。TTR 突變加速 TTR 澱粉樣蛋白形成過程，為發展出 ATTR 之最重要之風險因素。已知有超過 85 種澱粉樣蛋白變性形成性 TTR 變異體會造成家族性全身性澱粉樣蛋白變性。TTR 突變通常會產生全身性澱粉樣蛋白沉積，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。

【0009】 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 80 歲以上超過 25%之人口。Westermarck, P.等人(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(7): 2843-5。

因此，相關技藝上需要 TTR 相關疾病之有效治療法。

【發明內容】

【0010】 本發明提供一種使用靶向 TTR 基因之 RNAi 劑，例如雙股 RNAi 劑，於人類個體抑制 TTR 表現之方法，及治療或預防甲狀腺素運載蛋白(TTR)相關疾病之方法。本發明至少一部份基於發現一種 RNAi 劑，其中正義股之實質上所有核苷酸及反義股之實質上所有核苷酸均為經修飾之核苷酸，且其包含於正義股不超過 8 個 2'-氟修飾、於反義股不超過 6 個 2'-氟修飾、正義股 5'-端之 2 個硫代磷酸酯鏈結基、反義股 5'-端之 2 個硫代磷酸酯鏈結基、及一

個配體，例如 GalNAc₃ 配體，在本文中顯示可以有效靜默 TTR 基因之活性。此等製劑顯示驚人之加強 TTR 基因靜默活性。在不希望受到理論限制下，咸信此等 RNAi 劑中，上述修飾與特定標靶位點之組合與次組合賦與本發明 RNAi 劑改良之效力、安定性、藥效、及持久性。

【0011】 因此在一項態樣中，本發明提供一種治療罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體之方法。該等方法包括對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 至約 50 mg(例如約 25、30、35、40、45、或約 50 mg)之雙股 RNAi 劑，其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股，其中該正義股包括核苷酸序列 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10)，及反義股包括核苷酸序列 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7)，其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鏈結基，藉以治療罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體。

【0012】 另一態樣中，本發明提供一種為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體改善神經損傷或生活品質之至少一指標之方法。該方法包括對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 至約 50 mg 之雙股 RNAi 劑，其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股，其中該正義股包括核苷酸序列 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10)，及該反

義股包括核苷酸序列 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7), 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U; Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U; 及 s 為硫代磷酸酯鏈結基, 藉以改善該人類個體之神經損傷或生活品質之至少一指標。

【0013】 一項實施例中, 該指標為神經損傷指標, 例如神經病變損傷指數(NIS)或經修正 NIS 指數(mNIS+7)。另一項實施例中, 該指標為生活品質指標, 例如選自下列所組成之群中之生活品質指標: SF-36®健康評估指數(SF-36® health survey score)、Norfolk 生活品質-糖尿病性神經病變(Norfolk Quality of Life-Diabetic Neuropathy)(Norfolk QOL-DN)指數、NIS-W 指數、羅氏整體失能量表(Rasch-built Overall Disability Scale)(R-ODS)指數、複合式自律神經症狀指數(composite autonomic symptom score)(COMPASS-31)、中位體質量指數(median body mass index)(mBMI)評分、6 分鐘步行檢查(6MWT)指數、與 10 米步行檢查指數。

【0014】 另一態樣中, 本發明提供一種為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體降低、減緩或遏止神經病變損傷指數(NIS)或經修正 NIS (mNIS+7)之方法。該等方法包括對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 至約 50 mg(例如約 25、30、35、40、45、或約 50 mg)之雙股 RNAi 劑, 其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股, 其中該正義股包括核苷酸序列 5'-

usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3'(SEQ ID NO: 10), 及該反義股包括核苷酸序列 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3'(SEQ ID NO: 7), 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U; Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U; 及 s 為硫代磷酸酯鏈結基, 藉以降低、減緩或遏止該人類個體之神經病變損傷指數(NIS)或經修正 NIS (mNIS+7)。

【0015】 另一態樣中, 本發明提供一種為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體提高 6 分鐘步行檢查(6MWT)之方法。該方法包括對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 至約 50 mg(例如約 25、30、35、40、45、或約 50 mg)之雙股 RNAi 劑, 其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股, 其中該正義股包括核苷酸序列 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10), 及反義股包括核苷酸序列 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3'(SEQ ID NO: 7), 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U; Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U; 及 s 為硫代磷酸酯鏈結基, 藉以為該人類個體提高 6 分鐘步行檢查(6MWT)。

【0016】 一項實施例中, 該人類個體為罹患 TTR 相關疾病之人類個體。另一項實施例中, 該人類個體為處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體。另一項實施例中, 該人類個體帶有與發展出 TTR 相關疾病有關之 TTR 基因

突變。一項實施例中，該 TTR 相關疾病係選自下列所組成之群：老年全身性澱粉樣蛋白變性(SSA)、全身性家族性澱粉樣蛋白變性、家族性澱粉樣多發性神經病變(FAP)、家族性澱粉樣蛋白心肌病(FAC)、柔腦膜/中樞神經系統(CNS)澱粉樣蛋白變性、與高甲狀腺素血症。另一項實施例中，該人類個體患有甲狀腺素運送蛋白介導之澱粉樣蛋白變性(ATTR amyloidosis)，且該方法降低澱粉樣蛋白 TTR 在人類個體中之沉積。ATTR 可為遺傳性 ATTR(h-ATTR)或非遺傳性 ATTR(wt ATTR)。

【0017】 雙股 RNAi 劑可經由選自下列所組成群中之投藥方式投藥給人類個體：皮下、靜脈內、肌內、支氣管內、胸膜內、腹膜內、動脈內、淋巴、腦脊髓、與其任何組合。

【0018】 一項實施例中，該雙股 RNAi 劑係經由皮下、肌內或靜脈內投藥給人類個體。又另一項實施例中，該雙股 RNAi 劑係經由皮下投藥給人類個體。一項實施例中，該皮下投藥係自我投藥。一項實施例中，該自我投藥係利用預先填充之針筒或自動注射器針筒投藥。

【0019】 本發明方法可進一步包括在來自該人類個體之檢體中分析 TTR mRNA 表現量或 TTR 蛋白質表現量。

【0020】 雙股 RNAi 劑可以每 3 個月、每 4 個月、每 5 個月、或每 6 個月投與人類個體。一項實施例中，雙股 RNAi 劑之固定劑量係約每 3 個月一次投與人類個體。另一項實施例中，雙股 RNAi 劑之固定劑量係約每 6 個月一

次投與人類個體。

【0021】 一項實施例中，雙股 RNAi 劑係長期投與人
類個體。

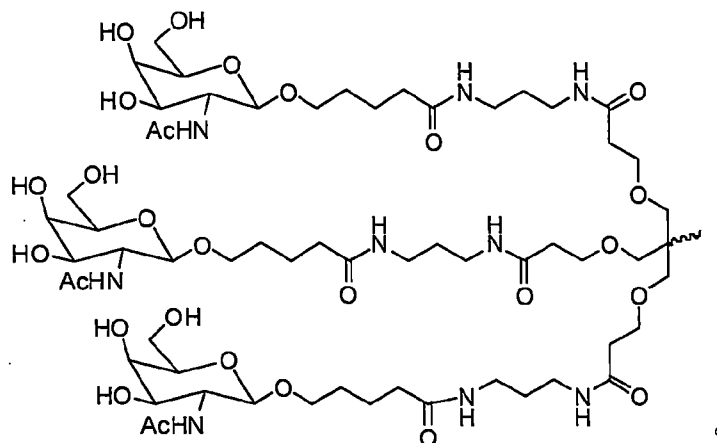
【0022】 一項實施例中，雙股 RNAi 劑係以固定劑量約 25 mg 投與人類個體。另一項實施例中，雙股 RNAi 劑係以固定劑量約 50 mg 投與人類個體。

【0023】 一項實施例中，本發明方法可進一步包括提供個體其他醫療處理法，例如正位肝臟移植、植入心臟節律器、心臟移植、及/或對該人類個體再投與其他適用於治療 TTR 相關疾病之醫療劑，例如 TTR 四聚物安定劑，例如塔法米得(tafamidis)、與/或非類固醇消炎藥(NSAID)，例如二氟尼柳(diflunisal)。

【0024】 一項實施例中，雙股 RNAi 劑之正義股係接合至少一個配體。

【0025】 一項實施例中，該配體係經由二價或三價分支鏈結體附接一或多個 GalNAc 衍生物。

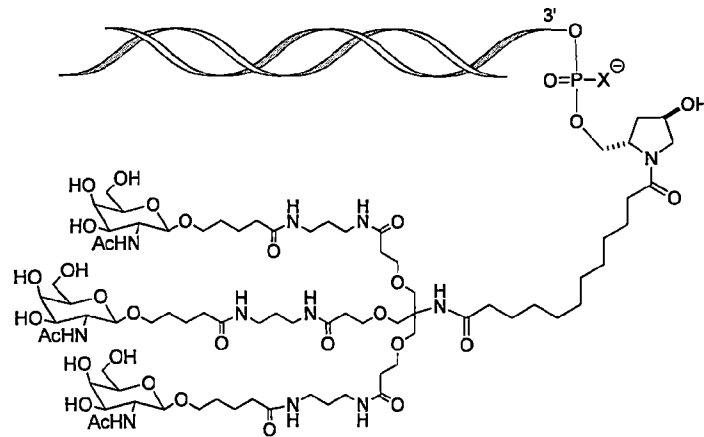
【0026】一項實施例中，該配體為



【0027】一項實施例中，該配體係附接正義股之 3'

端。

【0028】 一項實施例中，RNAi 劑係接合如下方案所示之配體



其中 X 為 O 或 S。

【0029】 一項實施例中，RNAi 劑之正義股包括核苷酸序列 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96-3' (SEQ ID NO : 15)，及 RNAi 劑之反義股包括核苷酸序列 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO : 7)，其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；s 為硫代磷酸酯鏈結基；及 L96 為 N-[三(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇。

【0030】 一項態樣中，本發明提供一種治療罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體之方法。該方法包括約每 3 個月一次，對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 之雙股 RNAi 劑，其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股，其中該正義股包括核苷酸序列 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96-3' (SEQ ID NO :

17) , 及反義股包括核苷酸序列 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO : 7) , 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U ; Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U ; s 為硫代磷酸酯鏈結基 ; 及 L96 為 N-[三(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇, 藉以治療罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體。

【0031】 另一態樣中, 本發明提供一種治療罹患 TTR-相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體之方法。該方法包括約每 6 個月一次, 對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 之雙股 RNAi 劑, 其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股, 其中該正義股包括核苷酸序列 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96-3' (SEQ ID NO : 15) , 及反義股包括核苷酸序列 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO : 7) , 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U ; Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U ; s 為硫代磷酸酯鏈結基 ; 及 L96 為 N-[三(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇, 藉以治療罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體。

【0032】 一項態樣中, 本發明提供一種治療罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體之方法。該方法包括約每 3 個月一次, 對該人類個體投與固定劑量約 50 mg 之雙股 RNAi 劑, 其中該雙股 RNAi 劑包

含與反義股互補之正義股，其中該正義股包括核苷酸序列 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96-3' (SEQ ID NO : 15) ， 及 反 義 股 包 括 核 苷 酸 序 列 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO : 7) ， 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U； Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U； s 為硫代磷酸酯鏈結基；及 L96 為 N-[三(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇，藉以治療罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體。

【0033】 另一態樣中，本發明提供一種治療罹患 TTR-相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體之方法。該方法包括約每 6 個月一次，對該人類個體投與固定劑量約 50 mg 之雙股 RNAi 劑，其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股，其中該正義股包括核苷酸序列 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96-3' (SEQ ID NO : 15) ， 及 反 義 股 包 括 核 苷 酸 序 列 5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO : 7) ， 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U； Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U； s 為硫代磷酸酯鏈結基；及 L96 為 N-[三(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇，藉以治療罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體。

【0034】 一項態樣中，本發明提供一種為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體改

善神經損傷或生活品質之至少一指標之方法。該方法包括約每 3 個月一次，對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 之雙股 RNAi 劑，其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股，其中該正義股包括核苷酸序列

【0035】 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96-3'
(SEQ ID NO : 15)，及反義股包括核苷酸序列 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO : 7)，其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；s 為硫代磷酸酯鏈結基；及 L96 為 N-[三(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇，藉以為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體改善神經損傷或生活品質之至少一指標。

【0036】 另一態樣中，本發明提供一種為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體改善神經損傷或生活品質之至少一指標之方法。該方法包括約每 6 個月一次，對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 之雙股 RNAi 劑，其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股，其中該正義股包括核苷酸序列

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96-3' (SEQ ID NO : 15)，及反義股包括核苷酸序列 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO : 7)，其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；s 為硫代磷

酸酯鏈結基；及 L96 為 N-[三(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇，藉以為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體改善神經損傷或生活品質之至少一指標。

【0037】 一項態樣中，本發明提供一種為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體改善神經損傷或生活品質之至少一指標之方法。該方法包括約每 3 個月一次，對該人類個體投與固定劑量約 50 mg 之雙股 RNAi 劑，其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股，其中該正義股包括核苷酸序列

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96-3' (SEQ ID NO : 15) ， 及 反 義 股 包 括 核 苷 酸 序 列 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO : 7) ， 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；s 為硫代磷酸酯鏈結基；及 L96 為 N-[三(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇，藉以為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體改善神經損傷或生活品質之至少一指標。

【0038】 另一態樣中，本發明提供一種為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體改善神經損傷或生活品質之至少一指標之方法。該方法包括約每 6 個月一次，對該人類個體投與固定劑量約 50 mg 之雙股 RNAi 劑，其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之

正義股，其中該正義股包括核苷酸序列

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96-3' (SEQ ID NO : 15) ， 及 反 義 股 包 括 核 苷 酸 序 列 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO : 7) ， 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U； Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U； s 為硫代磷酸酯鏈結基；及 L96 為 N-[三(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇，藉以為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體改善神經損傷或生活品質之至少一指標。

【0039】 一項實施例中，該指標為神經損傷指標，例如神經病變損傷指數(NIS)或經修正 NIS 指數(mNIS+7)。另一項實施例中，該指標為生活品質指標，例如選自下列所組成群中之生活品質指標：SF-36®健康評估指數(SF-36® health surveyscore)、Norfolk 生活品質-糖尿病性神經病變(Norfolk Quality of Life-Diabetic Neuropathy)(Norfolk QOL-DN)指數、NIS-W 指數、羅氏整體失能量表(Rasch-built Overall Disability Scale)(R-ODS)指數、複合式自律神經症狀指數(composite autonomic symptom score) (COMPASS-31)、中位體質量指數(median body mass index)(mBMI)指數、6 分鐘步行檢查(6MWT)指數、與 10 米步行檢查指數。

【0040】 本發明亦提出一種供進行本發明任一種方法之套組。該套組可包括雙股 RNAi 劑；及包含使用說明

書之標籤。

【0041】 本發明利用下列詳細說明與圖式進一步說明。

【圖式簡單說明】

【0042】

第 1 圖為指示接受皮下投與單劑 5 mg、25 mg、50 mg、100 mg、200 mg、或 300 mg 之 AD-65492 之健康人類自願者之 TTR 蛋白質抑制性之圖。該圖顯示各組相對於基線值之 TTR 平均值[+/- SEM]隨時間之變化。

【實施方式】

【0043】 本發明提供一種使用靶向 TTR 基因之 RNAi 劑(例如雙股 RNAi 劑)抑制 TTR 表現之方法及治療或預防人類個體之甲狀腺素運載蛋白(TTR)相關疾病之方法。本發明至少部份基於發現一種 RNAi 劑，其中正義股之實質上所有核苷酸及反義股之實質上所有核苷酸為經修飾之核苷酸，且包含於正義股不超過 8 個 2'-氟修飾(例如不超過 7 個 2'-氟修飾、不超過 6 個 2'-氟修飾、不超過 5 個 2'-氟修飾、不超過 4 個 2'-氟修飾、不超過 5 個 2'-氟修飾、不超過 4 個 2'-氟修飾、不超過 3 個 2'-氟修飾、或不超過 2 個 2'-氟修飾)及於反義股不超過 6 個 2'-氟修飾(例如不超過 5 個 2'-氟修飾、不超過 4 個 2'-氟修飾、不超過 3 個 2'-氟修飾、或不超過 2 個 2'-氟修飾)、正義股 5'-端之 2 個硫代磷酸酯鏈結基、反義股 5'-端之 2 個硫代磷酸酯鏈結基、及配體(例如 GalNAc₃ 配體)，其已顯示可以有效選擇性靜

默 TTR 基因之活性。此等製劑顯示驚人地加強 TTR 基因靜默活性。在不希望受到理論限制下，咸信上述修飾與專一性標靶位點在此等 RNAi 劑中之組合或次組合賦與本發明 RNAi 劑改良之效力、安定性、藥效、與持久性。

【0044】 下列詳細說明揭示如何製造及使用包含 iRNA 之組成物來選擇性抑制 TTR 基因表現，及揭示用於治療罹患可能因抑制與/或降低 TTR 基因表現而受益之疾病與病變之個體之組成物、用途與方法。

【0045】

I. 定義

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

【0046】 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。

【0047】 本文所採用術語「包括」意指「包括但不限於」，並可與該詞句交換使用。

【0048】 本文所採用術語「或」意指「與/或」，並可與其交換使用，除非另有說明。

【0049】 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。某些實施例中，「約」係指+10%。某些實施例中，「約」係指+5%。當「約」出現在一系列數字或範圍之前時，咸了解「約」可修飾該系列或範圍內的每個數字。

【0050】 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，亦具有蛋白酶作用。肝臟分泌TTR至血液，及脈絡叢分泌TTR至腦脊髓液。TTR亦表現在胰臟與視網膜色素上皮。TTR之最大臨床相關性為正常與突變TTR蛋白質均可形成澱粉樣蛋白小纖維，其集結形成細胞外沉積，造成澱粉樣蛋白變性。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 轉錄本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 序列之其他實例利用可公開取得之資料庫很容易取得，例如

GenBank、UniProt、與 OMIM。

【0051】 本文所採用「TTR 相關疾病」意指包括與 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」包括任何型態之甲狀腺素運載蛋白介導之澱粉樣蛋白變性(ATTR 澱粉樣蛋白變性)，其中 TTR 在異常細胞外聚集體或澱粉樣蛋白沉積之形成過程中扮演某種角色，例如遺傳性 ATTR (h-ATTR) 或非遺傳性 ATTR (wt ATTR)。TTR 相關疾病包括老年全身性澱粉樣蛋白變性(SSA)、全身性家族性澱粉樣蛋白變性、家族性澱粉樣多發性神經病變(FAP)、家族性澱粉樣蛋白心肌病(FAC)、柔腦膜/中樞神經系統(CNS)澱粉樣蛋白變性、澱粉樣蛋白變性玻璃體混濁、腕隧道症候群、與高甲狀腺素血症。TTR 澱粉樣蛋白變性之症狀包括感覺神經病變(例如感覺錯亂、肢體末梢感覺減退)、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(修正體質指數)顯著下降、顱神經功能障礙、與角膜格狀失養症。

【0052】 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，包括主要轉錄產物經 RNA 處理後之 mRNA 產物。一項實

施例中，該序列之標靶部份之長度至少足以作為供 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之受質。一項實施例中，該標靶序列係在 TTR 基因之蛋白質編碼區內。另一項實施例中，該標靶序列係在 TTR 基因之 3' UTR 內。

【0053】 標靶序列可為約 9-36 個核苷酸之長度，例如約 15-30 個核苷酸之長度。例如標靶序列可為約 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。有些實施例中，標靶序列為約 19 至約 30 個核苷酸之長度。其他實施例中，標靶序列為約 19 至約 25 個核苷酸之長度。又其他實施例中，標靶序列為約 19 至約 23 個核苷酸之長度。有些實施例中，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。

有些本發明實施例中，該 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)。

【0054】 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。

【0055】 「G」、「C」、「A」、「T」與「U」分別一般代表核苷酸，其分別包含鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸苷與尿嘧啶作為鹼基。然而，咸了解，術語「核糖核苷酸」或「核苷酸」亦指經修飾之核苷酸，如下文中進一步說明，或改用置換部份體(參見例如表 2)。熟悉此相關技術者咸了解，鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤與尿嘧啶可在不會實質上改變該包含帶有此等置換部份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，如本發明所說明之 dsRNA 核苷酸序列中包含尿嘧啶、鳥嘌呤或腺嘌呤之核苷酸可被包含例如肌苷之核苷酸置換。另一項實例中，寡核苷酸中之任何腺嘌呤與胞嘧啶均可分別被鳥嘌呤與尿嘧啶置換，與標靶 mRNA 形成配對之 G-U 搖擺鹼基(Wobble base)。包含此等置換部份體之序列適合如本發明所說明之組成物與方法。

【0056】 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 轉錄本。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(例如個體內細胞，個體，如哺乳動物個體)中之 TTR 基因表現。

【0057】 一項實施例中，本發明 RNAi 劑包括會與標靶 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，感信進入細胞中之長雙股 RNA 會被稱為 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，其會處理此等 dsRNA 成為具有兩個鹼基之 3'突出特徵的 19 至 23 對鹼基之短型干擾 RNA(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，讓互補反義股指揮辨識標靶(Nykanen 等人(2001) *Cell* 107: 309)。當與適當標靶 mRNA 結合時，RISC 內之一或多種內切核酸酶會裂解標靶，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 RNA(siRNA)(ssRNA)(siRNA 雙螺旋的反義股)，其會促進形成 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。

【0058】 另一項實施例中，RNAi 劑可為進入細胞或生物體中抑制標靶 mRNA 之單股 RNA。單股 RNAi 劑會與 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, 其完整揭示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 RNA 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。

【0059】 另一項實施例中，本發明組成物、用途與方法所使用之「iRNA」係雙股 RNA，本文中稱為「雙股 RNAi 劑」、「雙股 RNA(dsRNA)分子」、「dsRNA 劑」或「dsRNA」。術語「dsRNA」係指核糖核酸分子之複合物，其具有雙螺旋結構，包含兩個反向平行且實質上互補之核酸股，相對於標靶 RNA(亦即 TTR 基因)具有「正義」與「反義」取向。本發明有些實施例中，雙股 RNA(dsRNA)透過轉錄後基因-靜默機轉(本文稱為 RNA 干擾或 RNAi)啟動標靶 RNA(例如 mRNA)之降解。

【0060】 通常，dsRNA 分子之各股之大多數核苷酸為核糖核苷酸，但如同本文之詳細說明，各股或兩股亦可包括一個或多個非核糖核苷酸，例如去氧核糖核苷酸與/或經修飾之核苷酸。此外，本說明書所採用「RNAi 劑」可能包括經化學修飾之核糖核苷酸；RNAi 劑可以包括在多個核苷酸上大量的修飾。

【0061】 本文所採用術語「經修飾之核苷酸」係指分別獨立具有經修飾之糖部份體、經修飾之核苷酸之間之鏈結基、與/或經修飾之核鹼基之核苷酸。因此，經修飾之

核苷酸術語包括在核苷之間之鏈結基、糖部份體、或核鹼基上的取代、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。

【0062】 雙螺旋區之長度可為容許所需之標靶 RNA 透過 RISC 途徑進行專一性降解之任何長度，且可能在約 9 至 36 對鹼基之長度範圍內，例如約 15-30 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。

【0063】 形成雙螺旋結構之兩股可能為一個較大 RNA 分子之不同部份，或其可能為分開之 RNA 分子。若這兩股為一個較大 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。有些實施例中，髮夾環可包含至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個、至少 5 個、至少 6 個、至少 7 個、至少 8 個、至少 9 個、至少 10 個、至少 20 個、至少 23 個、或更多個未配對之核苷酸。有些實施例中，該髮夾環可為 10 個或更少個核苷酸。有些實施例中，該髮夾環可為 8 個或更少個未配對之核苷酸。有些實施例中，該髮夾環可為 4-10 個未配對之核苷酸。有些實施例中，該髮夾環可為 4-8 個核苷酸。

【0064】 若 dsRNA 實質上互補之兩股包含在分開之 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共價連接方式連接時，該連接結構稱為「鏈結體」。RNA 股可能具有相同或不同數量之核苷酸。鹼基對之最高數量即為 dsRNA 中最短股之核苷酸數量減去雙螺旋中任何突出後之數量。除了雙螺旋結構外，RNAi 亦可包含含一個或多個核苷酸之突出。

【0065】 一項實施例中，本發明 RNAi 劑為每股長度為 24-30 個核苷酸之 dsRNA，其會與標靶 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，進入細胞中之長雙股 RNA 會被稱為 Dicer 之第 III 型內切核酸酶分解成 siRNA(Sharp 等人(2001)*Genes Dev.* 15: 485)。Dicer 係類似核糖核酸酶-III 之酵素，其處理 dsRNA 形成具有兩個鹼基之 3'突出特徵的

19 至 23 對鹼基之短型干擾 RNA(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，讓該互補反義股可以指揮辨識標靶(Nykanen 等人(2001) *Cell* 107 : 309)。當與適當標靶 mRNA 結合時，RISC 內之一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)。RNAi 劑之一項實施例中，至少一股包含含有至少 1 個核苷酸之 3'突出。另一項實施例中，至少一股包含含有至少 2 個核苷酸之 3'突出，例如 2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、或 15 個核苷酸。其他實施例中，RNAi 劑之至少一股包含含有至少 1 個核苷酸之 5'突出。某些實施例中，至少一股包含含有至少 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。又其他實施例中，RNAi 劑中一股之 3'與 5'兩端都包含含有至少 1 個核苷酸之突出。

【0066】 一項實施例中，本發明 RNAi 劑為一種 dsRNA 劑，其各股包括會與 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，感信進入細胞中之長雙股 RNA 會被稱為 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，其會處理 dsRNA 成為具有兩個鹼基之 3'突出特徵的 19 至 23 對鹼基之短型干擾 RNA(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，讓互補反義股指揮辨識標靶(Nykanen 等人(2001) *Cell* 107: 309)。當與適當標靶 mRNA 結合時，RISC 內之一或多種內切核酸酶會裂解標靶，誘發靜默(Elbashir 等人(2001) *Genes Dev.* 15: 188)。一項實施例中，本發明 RNAi 劑為一種 24 至 30 個核苷酸之 dsRNA 劑，其會與 TTR RNA 序列交互作用，以主導裂解標靶 RNA。

【0067】 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 siRNA 雙螺旋結構(例如 dsRNA)中突出。例如當 dsRNA 中一股之 3'-端超出另一股 5'-端，或反之亦然時，即有一個核苷酸突出。dsRNA 可包含含有至少一個核苷酸之突出；或者，該突出可包含至少兩個核苷酸、至少三個核苷酸、至少四個核苷酸、至少五個核苷酸或更多個。核苷酸突出可包含或其組成可為核苷酸/核苷類似物，包括去氧核苷酸/核苷。該(等)突出可位於正義股、反義股或其任何組合。此外，突出之核苷酸(群)可出現在 dsRNA 之反義或正義股之 5'-端、3'-端或兩端。dsRNA 之一項實施例中，至少一股包含含有至少 1 個核苷酸之 3'突出。另一項實施例中，至少一股包含含有至少 2 個核苷酸之 3'突出，例如 2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、或 15 個核苷酸。其他實施例中，RNAi 劑之至少一股包含含有至少 1 個核苷酸之 5'突出。某些實施例中，至少一股包含含有至少 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

實施例中，RNAi 劑中一股之 3'與 5'兩端均包含含有至少 1 個核苷酸之突出。

【0068】 一項實施例中，dsRNA 之反義股可在 3'-端與/或 5'-端具有含 1 至 10 個核苷酸，例如 0-3、1-3、2-、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。一項實施例中，dsRNA 之正義股可在 3'-端與/或 5'-端具有含 1 至 10 個核苷酸，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸之突出。另一項實施例中，突出中一個或多個核苷酸被核苷硫代磷酸置換。

【0069】 某些實施例中，正義股或反義股或二者上之突出可包括超過 10 個核苷酸之延伸長度，例如 1-30 個核苷酸，2-30 個核苷酸，10-30 個核苷酸，或 10-15 個核苷酸之長度。某些實施例中，延伸之突出係在雙螺旋之正義股上。某些實施例中，延伸之突出出現在雙螺旋正義股之 3'端。某些實施例中，延伸之突出出現在雙螺旋正義股之 5'端。某些實施例中，延伸之突出雙螺旋之反義股上。某些實施例中，延伸之突出出現在雙螺旋之反義股 3'端。某些實施例中，延伸之突出出現在雙螺旋之反義股 5'端。某些實施例中，突出中一個或多個核苷酸被核苷硫代磷酸置換。某些實施例中，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。

【0070】 「鈍」或「鈍端」意指雙股 RNAi 劑之末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 劑或兩端均具有核苷酸突出之 RNAi 劑。

【0071】 術語「反義股」或「引導股」係指 iRNA(例如 dsRNA)之該股包括一個與標靶序列(例如 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，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'-與/或 3'-末端之 5、4、3、2 或 1 個核苷酸內。一項實施例中，本發明雙股 RNAi 劑在反義股中包括一個核苷酸錯配。另一項實施例中，本發明雙股 RNAi 劑在正義股中包括一個核苷酸錯配。一項實施例中，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。另一項實施例中，該核苷酸錯配係在例如 iRNA 之 3'-末端核苷酸內。

【0072】 本文所採用術語「正義股」或「過客股」係指 iRNA 之一股，其包括一個與如本文所定義反義股區實質上互補之區。

【0073】 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。有些實施例中，裂解區緊鄰裂解位點兩端的三個鹼基。有些實施例中，裂解區包含緊鄰裂解位點兩端的兩個鹼基。有些實施例中，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。

【0074】 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，係指在熟悉此相關技術者應了解之某些條件下，包含該第一核苷酸序列之寡核苷酸或聚核苷酸與包含第二核苷酸序列之寡核苷酸或聚核苷酸雜交，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。熟悉此相關技術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。

【0075】 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聚核苷酸，與包含第二核苷酸序列之寡核苷酸或聚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，或當具有至多 30 對鹼基之雙螺旋在雜交時，其可能形成一或多對，通常不會有超過 5、4、3 或 2 對錯配鹼基，同時能在與其最終用途(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，若兩個寡核苷酸設

計在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」。

【0076】 本文所採用「互補」序列亦可包括或完全由其組成的非華生-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，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。

【0077】 本文中所採用之術語「互補」、「完全互補」與「實質上互補」可使用於 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的鹼基配對，可由其使用內容中了解。

【0078】 本文所採用與信使 RNA(mRNA)「之至少一部份實質上互補」之聚核苷酸係指該聚核苷酸與所需 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，則該聚核苷酸係與至少一部份 TTR mRNA 互補。

【0079】 因此有些實施例中，本文所揭示之反義聚核苷酸係與該標靶 TTR 序列完全互補。其他實施例中，本文所揭示之反義聚核苷酸係與 SEQ ID NO：2 (5'-

UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')完全互補。一項實施例中，該反義聚核苷酸序列為 5'-UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC -3' (SEQ ID NO : 3)。

【0080】 其他實施例中，本文所揭示之反義聚核苷酸係與該標靶 TTR 序列實質上互補，且包含之連續核苷酸序列係與任一 SEQ ID NO : 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA -3')、或任一 SEQ ID NO : 1、2、與 5 之片段之核苷酸序列之同等區之總長度至少約 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。

【0081】 一項實施例中，本發明 RNAi 劑包括實質上與反義聚核苷酸互補之正義股，該反義聚核苷酸進而與標靶 TTR 序列互補，且其中該正義股聚核苷酸包含之連續核苷酸序列係與表 1 中任一序列之核苷酸序列之同等區至少約總長度之 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。

【0082】 另一項實施例中，本發明 RNAi 劑包括與該標靶 TTR 序列實質上互補之反義股，且包含之連續核苷酸序列係與表 1 中任一序列之核苷酸序列之同等區至少約總長度之 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。

【0083】 有些實施例中，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種非核糖核苷酸，例如去氧核糖核苷酸與/或經修飾之核苷酸。此外，「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。

【0084】 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。單股反義寡核苷酸藉由與 mRNA 進行鹼基配對以物理方式封阻轉譯機構，依化學計量方式抑制轉譯，參見 Dias,N.等人(2002) *Mol Cancer Ther* 1: 347-355。單股反義 RNA 分子之長度可為約 15 至約 30 個核苷酸且具有與標靶序列互補之序列。例如單股反義 RNA 分子可能包含選自本文所說明任一種反義序列且具有至少約 15、16、17、18、19、20、或更多個連續核苷酸之序列。

【0085】

II.治療或預防 TTR 相關疾病之方法

本發明提供一種為人類個體治療或預防 TTR 相關疾病，如甲狀腺素運送蛋白介導之澱粉樣蛋白變性(ATTR 澱粉樣蛋白變性)，例如遺傳性 ATTR (h-ATTR)或非遺傳性 ATTR (wt ATTR)之方法。該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。

【0086】 一項態樣中，本發明提供一種治療罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體之方法。該方法包括對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 至約 50 mg(例如約 25、30、35、40、45、或約 50 mg)之本發明雙股 RNAi 劑。

【0087】 另一態樣中，本發明提供一種為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體改善神經損傷或生活品質之至少一指標之方法。該方法包括對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 至約 50 mg(例如約 25、30、35、40、45、或約 50 mg)之本發明雙股 RNAi 劑。

【0088】 另一態樣中，本發明提供一種為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體降低、減緩、或遏止神經病變損傷指數(NIS)或經修正 NIS(mNIS+7)之方法。該方法包括對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 至約 50 mg(例如約 25、30、35、40、45、或約 50 mg)之本發明雙股 RNAi 劑。

【0089】 另一態樣中，本發明提供一種為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體提高 6 分鐘步行檢查(6MWT)之方法。該方法包括對該人類個體投與固定劑量約 25 mg 至約 50 mg(例如約 25、30、35、40、45、或約 50 mg)之本發明雙股 RNAi 劑。

【0090】 一項實施例中，該個體為接受治療或評估如本文所說明可能因降低 TTR 基因表現而受益之疾病、病變或病症之人類；處於罹患可能因降低 TTR 基因表現而受

益之疾病、病變或病症之風險之人類；罹患可能因降低 TTR 基因表現而受益之疾病、病變或病症之人類；與/或正接受治療可能因降低 TTR 基因表現而受益之疾病、病變或病症之人類。

【0091】 有些實施例中，該個體係罹患 TTR 相關疾病。其他實施例中，該個體為處於發展出 TTR 相關疾病風險之個體，例如具有與發展出 TTR 相關疾病有關之 TTR 基因突變之個體(例如出現可能發展成 TTR 澱粉樣蛋白變性之癥兆或症狀之前)、具有 TTR 相關疾病家族病史之個體(例如出現可能發展成 TTR 澱粉樣蛋白變性之癥兆或症狀之前)、或出現可能發展成 TTR 澱粉樣蛋白變性之癥兆或症狀之個體。

【0092】 本文所採用「TTR 相關疾病」包括任何由澱粉樣蛋白沉積之形成所引起或與其相關之疾病，其中小纖維前體係由變異體或野生型 TTR 蛋白質組成。突變型與野生型 TTR 會產生各種不同型式之澱粉樣蛋白沉積(澱粉樣蛋白變性)。澱粉樣蛋白變性涉及錯誤摺疊蛋白質之形成與凝集，造成細胞外沉積而損害器官功能。與 TTR 凝集相關之臨床症狀包括例如老年全身性澱粉樣蛋白變性(SSA)；家族性全身性澱粉樣蛋白變性；家族性澱粉樣蛋白多發性神經病變(FAP)；家族性澱粉樣蛋白心肌病(FAC)；與柔腦膜澱粉樣蛋白變性，亦稱為柔腦膜或腦膜血管澱粉樣蛋白變性、中樞神經系統(CNS)澱粉樣蛋白變性、或澱粉樣蛋白變性 VII 型。

【0093】 一項實施例中，本發明 RNAi 劑係投與罹患家族性澱粉樣蛋白心肌病(FAC)之個體。另一項實施例中，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損傷之個體。又另一項實施例中，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損傷之個體。一項實施例中，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。另一項實施例中，本發明 RNAi 劑係投與罹患老年全身性澱粉樣蛋白變性(SSA)之個體。本發明方法之其他實施例中，本發明 RNAi 劑係投與罹患家族性澱粉樣蛋白心肌病(FAC)與老年全身性澱粉樣蛋白變性(SSA)之個體。正常序列 TTR 會在老年人中引起心臟澱粉樣蛋白變性，稱為老年全身性澱粉樣蛋白變性(SSA)(亦稱為老年心臟澱粉樣蛋白變性(SCA)或心臟澱粉樣蛋白變性)。SSA 經常在許多其他器官中伴隨出現顯微沉積。TTR 突變會加速 TTR 澱粉樣蛋白形成過程，成為發展出臨床上顯著 TTR 澱粉樣蛋白變性(亦稱為 ATTR(澱粉樣蛋白變性-甲狀腺素運載蛋白型))之最重要風險因子。已知有超過 85 種澱粉樣蛋白變性形成性 TTR 變異體會引起家族性全身性澱粉樣蛋白變性。

【0094】 本發明方法之有些實施例中，本發明 RNAi 劑係投與罹患甲狀腺素運載蛋白(TTR)相關性家族性澱粉樣蛋白多發性神經病變(FAP)之個體。此等個體可能罹患眼睛症狀，如玻璃體混濁與青光眼。熟悉此相關技術者已知

由視網膜色素上皮(RPE)合成之澱粉樣蛋白變性形成性甲狀腺素運載蛋白(ATTR)在眼睛澱粉樣蛋白變性之發展上扮演重要角色。過去的研究已顯示全視網膜光凝固雷射會減少 RPE 細胞，防止玻璃體中發展出澱粉樣蛋白沉積，此表示有效抑制 RPE 中 ATTR 表現可能成為眼睛澱粉樣蛋白變性之新療法(參見例如 Kawaji, T.等人之 *Ophthalmology*. (2010) 117: 552-555)。本發明方法適用於治療眼睛之 TTR 相關性 FAP 症狀，例如眼睛澱粉樣蛋白變性。該 RNAi 劑可依適合靶向特定組織(如眼睛)之方式傳送。眼睛傳送模式包括眼球後、皮下眼瞼、結膜下、眼球筋膜腔下、前房或玻璃體內注射(或內部注射或輸注)。供眼睛傳送之特定調配物包括眼藥水或眼藥膏。

【0095】 另一種 TTR 相關疾病為高甲狀腺素血症，亦稱為「異常甲狀腺素運載蛋白高甲狀腺素血症」或「異常前白蛋白高甲狀腺素血症」。這種高甲狀腺素血症可能因突變 TTR 分子提高與甲狀腺素之親和性而增加甲狀腺素與 TTR 之結合所引起。參見，例如 Moses 等人(1982) *J. Clin. Invest.*, 86, 2025-2033。

【0096】 本發明 RNAi 劑可採用相關技藝上已知之任何投藥模式投與個體，包括但不限於皮下、靜脈內、肌內、眼內、支氣管內、胸膜內、腹膜內、動脈內、淋巴、腦脊髓、與其任何組合。

較佳實施例中，該製劑係經皮下投與個體。

【0097】 有些實施例中，對該個體經由皮下注射投

與單劑 RNAi 劑，例如腹部、大腿或上臂注射。其他實施例中，對該個體經由皮下注射投與分割劑量之 RNAi 劑。一項實施例中，在該個體兩個不同解剖學位置上，對該個體經由皮下注射投與分割劑量之 RNAi 劑。例如對該個體皮下注射，在右臂注射約 25 mg 之分割劑量(例如約 50 mg 劑量之一半劑量)，及在左臂注射約 25 mg。有些本發明實施例中，皮下投藥法係自我投藥，例如利用預填充之針筒或自動注射器針筒投藥。有些實施例中，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劑中。

【0098】 有些實施例中，係經由儲積式注射法投藥。儲積式注射可持續一致地長期釋放 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)之投藥頻率。儲積式注射法亦可提供更穩定之血清濃度。儲積式注射法可包括皮下注射或肌肉注射。較佳實施例中，儲積式注射法為皮下注射法。

【0099】 有些實施例中，係利用幫浦投藥。該幫浦可能為體外幫浦或手術植入之幫浦。某些實施例中，該幫浦為經皮下植入之滲透壓幫浦。其他實施例中，該幫浦為輸注幫浦。該輸注幫浦可能用於經靜脈內、皮下、動脈或硬膜外輸注。較佳實施例中，該輸注幫浦為皮下輸注幫浦。其他實施例中，該幫浦為手術植入之幫浦，其可傳遞 RNAi 劑至肝臟。

【0100】 在經由皮下輸注幫浦投與 RNAi 劑之實施例中，單劑 RNAi 劑投與個體之時間可歷經約 45 分鐘至約 5 分鐘，例如約 45 分鐘、約 40 分鐘、約 35 分鐘、約 30 分鐘、約 25 分鐘、約 20 分鐘、約 15 分鐘、約 10 分鐘、或約 5 分鐘。

【0101】 其他投藥模式包括硬膜外、腦內、腦室內、鼻內投藥、動脈內、心腔內、骨內輸注、鞘內、與眼球玻璃體內、及肺部。可依據是否需要局部或全身治療及依據治療區域選擇投藥模式。可選擇投藥途徑與部位來加強靶向性。

【0102】 有些實施例中，RNAi 劑對個體之投藥量可以在個體之細胞中有效抑制 TTR 表現。可以採用下列討論之方法分析該可以在個體之細胞中有效抑制 TTR 表現時之用量，該等方法包括涉及對 TTR mRNA、TTR 蛋白質、或相關變數(如：澱粉樣蛋白沉積)之抑制的分析。

有些實施例中，對個體投與醫療或預防有效量之 RNAi 劑。

【0103】 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、該製劑之投藥法、該疾病與其嚴重性、及病史、年齡、體重、家族病史、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。

【0104】 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 TTR 相關疾病之個體時，該用量足以預防或緩解該疾病或疾病之一或多種症狀。可緩解之症狀包括感覺神經病變(例如感覺錯亂、肢體末梢感覺減退)、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、多發性神經病變、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)顯著下降、顱神經功能障礙、與角膜格狀失養症。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、該製劑之投藥法、該疾病風險程度、及病史、年齡、體重、家族病史、基因組態、任何過去或併行之治療、及接受治療之患者之其他個別特徵而異。

【0105】 「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。

【0106】 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 澱粉樣蛋白變性症狀包括感覺神經病變(例如感覺

錯亂、肢體末梢感覺減退)、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、多發性神經病變、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(修正體質指數)顯著下降、顱神經功能障礙、與角膜格狀失養症。

【0107】 一項實施例中，例如當該個體患有 FAP、FAP 混合表型、FAC 混合表型、或 FAP 及曾患有 OLT 時，使用本發明 dsRNA 劑治療該個體劑可以減緩神經病變的進展。另一項實施例中，例如當個體患有 FAP、FAP 混合表型、FAC 混合表型、SSA、或 FAP 及曾患有 OLT 時，使用本發明 dsRNA 劑治療該個體劑可以減緩神經病變與心臟病變惡化。另一項實施例中，例如當涉及個體的心臟時，本發明方法改善心臟結構與功能，包括例如該方法降低左心室壁厚度平均值與縱向型變，及降低心臟應力生物標記物：胺端原生 B 型利鈉尿勝肽(N-terminal pro b-type natriuretic peptide)之表現程度。

【0108】 投與醫療或預防有效量之本發明 RNAi 劑亦適用於為罹患 TTR 相關疾病或處於發展成 TTR 相關疾病風險之個體改善神經損傷與/或生活品質之至少一指標。

【0109】 例如，一項實施例中，本發明方法為個體改善神經損傷之至少一指標。為個體「改善神經損傷之至少一指標」係指本發明方法減緩、降低、或遏止神經損傷，或改善任何與神經損傷相關之症狀之能力。可採用任何合

適之神經損傷測定法來決定個體是否已降低、減緩、或遏止神經損傷，或是否已改善與神經損傷相關之症狀。

【0110】 一種合適測定法為神經病變損傷指數 (NIS)。NIS 係指測量衰弱、感覺與反射，尤指與周邊神經病變相關之評分系統。NIS 指數評估標準群組肌肉衰弱度 (1 為 25%衰弱，2 為 50%衰弱，3 為 75%衰弱，3.25 為對抗地心引力移動，3.5 為在沒有地心引力下移動，3.75 為沒有移動下肌肉顫動，及 4 為癱瘓)、標準群組肌肉強度反射 (0 為正常，1 為下降，2 為沒有)、與觸壓、振動、關節位置與動作、及針刺 (均在食指與大腳趾上測試：0 為正常，1 為下降，2 為沒有)。依據年齡、性別、與體適能進行評估校正。

【0111】 一項實施例中，本發明方法使 NIS 降低至少 10%。其他實施例中，本發明方法造成 NIS 降低至少 5、10、15、20、25、30、40、或至少 50%。其他實施例中，該等方法遏止 NIS 指數上升，例如該等方法造成 NIS 指數上升 0%。再另一項實施例中，本發明方法減緩 NIS 指數上升速度，例如由接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 NIS 指數上升速度與未接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 NIS 指數上升速度比較。

【0112】 測定人類個體 NIS 之方法係習此相關技藝者習知，且可參見例如 Dyck, PJ 等人，(1997) *Neurology* 1997. 49(1): pgs. 229-239); Dyck PJ. (1988) *Muscle Nerve*. Jan; 11(1):21-32。

【0113】 另一種測定神經損傷之合適方法為修正之神經病變損傷指數(mNIS+7)。如習此相關技藝者習知，mNIS+7 係指臨床檢測神經損傷評估(NIS)合併小神經與大神經纖維功能之電生理測定(NCS 與 QST)、及測定自主功能(體位性血壓)。mNIS+7 指數為修正之 NIS+7 指數(代表 NIS 加七種測試)。NIS+7 分析衰弱度及肌肉強度反射。七項測試中有五項包括神經傳導屬性。此等屬性為腓神經複合肌肉動作電位振幅、運動神經傳導速度與運動神經傳導遠端潛期(MNDL)、脛骨 MNDL、及腓腸感覺神經動作電位振幅。此等數值係依據年齡、性別、身高與體重等變數校正。七項測試中其餘兩項包括振動感覺偵測閾值(vibratory detection threshold)及深度呼吸下之心跳減慢。

【0114】 mNIS+7 指數(修正之 NIS+7)將下列檢查加入考量：智慧型軀幹圖定量感覺檢查(Smart Somatotopic Quantitative Sensation Testing)、新型自主神經功能分析(new autonomic assessments)、及採用尺骨、腓骨、與脛骨神經之複合肌肉動作電位振幅、與尺骨及腓腸神經之感覺神經動作電位振幅(Suanprasert, N.等人，(2014) *J. Neurol. Sci.*, 344(1-2): pgs. 121-128)。

【0115】 一項實施例中，本發明方法使 mNIS+7 降低至少 10%。其他實施例中，本發明方法造成 mNIS+7 指數降低至少 5、10、15、20、25、30、40、或至少 50%。其他實施例中，該等方法遏止 mNIS+7 指數上升，例如該等方法造成 mNIS+7 指數上升 0%。再另一項實施例中，本發

明方法減緩 NIS+7 指數上升速度，例如由接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 NIS+7 指數上升速度與未接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 NIS+7 指數上升速度比較。

【0116】 另一項實施例中，本發明方法改善個體之生活品質之至少一指標。為個體「改善生活品質之至少一指標」係指本發明方法減緩、降低、或遏止生活品質惡化或改善生活品質之能力。可採用任何合適之生活品質測定法來決定個體是否已降低、減緩、或遏止生活品質惡化或改善生活品質。

【0117】 例如，SF-36®健康分析提供一種自我報告及測定 8 項健康參數之多項量表：身體功能、因身體健康問題引起之角色限制、身體疼痛、整體健康、生命力(活力與疲勞)、社交功能、因情緒問題引起之角色限制、與心智健康(心理壓力與心理幸福感)。該分析法亦提供一種身體構面總評及心理構面總評。

【0118】 一項實施例中，本發明方法使個體相對於基線，改善了至少一項 SF-36 身體健康相關參數(身體健康、因身體健康所引起的角色限制(role-physical)、身體疼痛、與/或整體健康)，與/或至少一項 SF-36 心理健康相關參數(生命力、社交功能、因情緒問題引起之角色限制、與/或心智健康)。此等改善可使量表之任何一個或多個參數提高至少 1 點，例如至少 2 或至少 3 點。

【0119】 其他實施例中，本發明方法遏止 SF-36 之任一種或多種參數之參數得分下降，例如該方法使 SF-36 降

低 0%。又其他實施例中，本發明方法減緩 SF-36 指數下降速率，例如由接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 SF-36 指數下降速率與未接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 SF-36 指數下降速率比較。

【0120】 另一種生活品質之合適測定法為 Norfolk 生活品質-糖尿病性神經病變(Norfolk Quality of Life-Diabetic Neuropathy)(Norfolk QOL-DN)問卷。Norfolk QOL-DN 為設計用於了解與大纖維、小纖維、及自主神經病變有關之全面 DN 範圍之有效深入問卷，其等係目前儀器仍無法取得者。

【0121】 一項實施例中，本發明方法使個體相對於基線，改善 Norfolk QOL-DN 指數，例如改變約 -2.5、-3.0、-3.5、-4.0、-4.5、-5.0、-5.5、-6.0、-6.7、-7.0、-7.5、-8.0、-8.5、-9.0、-9.5、或約 -10.0。其他實施例中，該方法遏止 Norfolk QOL-DN 指數上升，例如該方法使 Norfolk QOL-DN 指數下降 0%。又其他實施例中，本發明方法減緩 QOL-DN 指數上升速率，例如由接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 QOL-DN 指數上升速率與未接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 QOL-DN 指數上升比較。

【0122】 另一種生活品質之合適測定法為由例如 NIS-W 指數分析之運動強度。NIS-W 指數為綜合頭部、軀幹與四肢肌肉衰弱度的複合指數。採用 NIS(W)(係指量測衰弱度之量表部分)分析肌肉力為正常(0)或完全癱瘓(4)，及中間等級；1 代表由臨床強度試驗認定 25%衰弱，2 為

50%衰弱，3 為 75%衰弱，3.25 為對抗地心引力移動，3.50 為在沒有地心引力下移動，及 3.75 為肌肉顫動。

【0123】 一項實施例中，本發明方法使個體相對於基線，改善 NIS-W 指數。此等改善型式可為個體之 NIS-W 指數上升至少 1 點，例如至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、或至少 10 點，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 點。其他實施例中，該方法遏止 NIS-W 指數下降，例如該方法使 NIS-W 指數下降 0%。又其他實施例中，本發明方法減緩 NIS-W 指數下降速率，例如由接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 NIS-W 指數下降速率與未接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 NIS-W 指數下降速率比較。

【0124】 另一種生活品質之合適指標為羅氏整體失能量表(Rasch-built Overall Disability Scale)(R-ODS)，其為設計用於了解患者之活動與社交限制之患者問卷。一項實施例中，本發明方法使個體相對於基線，改善 R-ODS 指數。此等改善型式可為個體之 R-ODS 指數上升至少 0.1 點，例如至少 0.2、至少 0.3、至少 0.4、或至少 0.5，例如 0.1、0.2、0.3、0.4、或 0.5 點。其他實施例中，該方法遏止 R-ODS 指數下降，例如該方法使 R-ODS 指數下降 0%。又其他實施例中，本發明方法減緩 R-ODS 指數下降速率，例如由接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 R-ODS 指數下降速率與未接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 R-ODS 指數下降速率比較。

【0125】 複合式自律神經症狀指數 (composite autonomic symptom score)(COMPASS-31)係分析自主神經功能異常之患者問卷，為另一種合適的生活品質指標。一項實施例中，本發明方法使個體相對於基線，改善 COMPASS-31 指數。此等改善型式為使個體之 COMPASS-31 指數上升至少 0.1 點，例如至少 0.2、至少 0.3、至少 0.4、或至少 0.5 點，例如 0.1、0.2、0.3、0.4、或 0.5 點。其他實施例中，該方法遏止 COMPASS-31 指數下降，例如該方法使 COMPASS-31 指數下降 0%。又其他實施例中，本發明方法減緩 COMPASS-31 指數下降速率，例如由接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 COMPASS-31 指數下降速率與未接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 COMPASS-31 指數下降速率比較。

【0126】 其他生活品質指標可包括營養狀態(例如分析中位體質量指數(median body mass index)(mBMI)之變化)。一項實施例中，本發明方法使個體相對於基線，改善 mBMI。此等改善型式可為 mBMI 指數下降約 2、5、7、10、12、15、20、或約 25。其他實施例中，該方法包括遏止 mBMI 指數上升，例如該方法使 mBMI 指數上升 0%。又其他實施例中，本發明方法減緩 mBMI 指數上升速率，例如由接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 mBMI 指數上升速率與未接受本發明 RNAi 劑治療之個體之 mBMI 指數上升速率比較。

【0127】 另一種生活品質指標包括分析運動能力。

一種運動能力之合適測定法為 6 分鐘步行檢查(6MWT)，其測定該個體在 6 分鐘內可以行走的距離，亦即，6 分鐘步行距離(6MWD)。一項實施例中，本發明方法使該個體在 6MWD 中，相對於基線增加至少約 10 分鐘，例如約 10、15、20、或約 30 分鐘。

【0128】 另一種合適測定法為測量行走速度之 10 米步行檢查。一項實施例中，本發明方法使個體於 10 米步行檢查中，相對於基線增加至少約 10 分鐘，例如約 0.025、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、或約 5.0 米/秒。

【0129】 本發明方法亦可改善所治療個體之預後。例如本發明方法可提供個體減少治療期間出現臨床惡化事件之機率、及/或延長壽命、及/或減少住院。

【0130】 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 蛋白質表現或減少澱粉樣蛋白沉積所分析)或所需之醫療性或預防性效應，同時避免不期望之副作用。

【0131】 一項實施例中，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。另一項實施例中，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)，所有個體均使用之 iRNA 劑單一劑量。一項特定實施

例中，本發明 iRNA 劑之固定劑量係依據預定體重或年齡決定。

【0132】 有些實施例中，RNAi 劑係投與約 15 mg 至約 100 mg 之間之固定劑量，例如約 15 mg、約 20 mg、約 25 mg、約 30 mg、約 35 mg、約 40 mg、約 45 mg、約 50 mg、約 55 mg、約 60 mg、約 65 mg、約 70 mg、約 75 mg、約 80 mg、約 85 mg、約 90 mg, 約 95 mg, 或約 100 mg。

【0133】 一項實施例中，RNAi 劑係每 3 個月一次(亦即一季一次)投與個體固定劑量約 15、20、25、30、35、40、45、或約 50 mg。另一項實施例中，RNAi 劑係每 4 個月一次投與個體固定劑量約 15、20、25、30、35、40、45、或約 50 mg。又另一項實施例中，RNAi 劑係每 5 個月一次投與個體固定劑量約 15, 20, 25、30、35、40、45、或約 50 mg。另一項實施例中，RNAi 劑係每 6 個月一次係投與個體固定劑量約 15、20、25、30、35、40、45、或約 50 mg。一項實施例中，該投藥法係經皮下投藥，例如，利用例如預填充之針筒或自動注射器針筒自我投藥。有些實施例中，供皮下投藥之 RNAi 劑劑量係含在小於或等於 1ml 體積之例如醫藥上可接受之載劑中。

【0134】 有些實施例中，RNAi 劑係投與兩劑或更多劑。若需要促進重複或頻繁輸注時，建議植入傳送裝置，例如幫浦、半永久性支架(例如靜脈內、腹膜內、腦池內或囊內)、或儲積器。有些實施例中，皮下投藥之次數或劑量係依所要達成之效果而定，例如壓制 TTR 基因，或依所要

達成之醫療或預防效果而定，例如降低澱粉樣蛋白沉積或降低 TTR 相關疾病之病症。

【0135】 有些實施例中，RNAi 劑係依據時程投藥。例如 RNAi 劑可以每週投藥 2 次、每週投藥 3 次、每週投藥 4 次、或每週投藥 5 次。有些實施例中，該時程涉及規律間隔投藥。其他實施例中，該時程涉及在緊密間隔下投藥後，接著一段更長時間不投與藥劑。某些實施例中，隨時間拉長間隔或依據所要達成效果而定。

【0136】 任何此等時程均可視需要重複一次或多次。重複次數可依所要達成之效果而定，例如壓制 TTR 基因、視黃醇結合性蛋白質含量、維生素 A 含量、與/或所達成之醫療性或預防性效果，例如降低澱粉樣蛋白沉積或降低 TTR 相關疾病症狀。

【0137】 有些實施例中，RNAi 劑係與其他醫療製劑或其他醫療性療程組合投藥。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、心臟移植、植入心臟節律器、可降低體內突變 TTR 含量之製劑；塔法米得(tafamidis)(INN、或 Fx-1006A 或 Vyndaqel)，其可在動力學上安定 TTR 四聚體，防止發生 TTR 澱粉樣蛋白形成作用中所需之四聚體解離作用；非類固醇消炎藥(NSAIDS)，例如二氟尼柳(diflunisal)；與利尿劑，其可用於例如降低涉及心臟之 TTR 澱粉樣蛋白變性發生水腫。

【0138】 一項實施例中，該個體係先接受投與初劑量與一劑或多劑維持劑量之 RNAi 劑。該或該等維持劑量

可與初劑量相同或更低，例如初劑量之一半。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。某些實施例中，該劑量之傳送可以不超過每天一次，例如不超過每 24、36、48 或更多小時一次，例如不超過每 5 或 8 天一次。治療後，可追蹤患者之病症變化。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。

【0139】 本發明方法之有些實施例中，TTR 基因之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%、或低至分析之檢測程度以下。有些實施例中，抑制 TTR 基因表現會造成恢復正常 TTR 基因程度，以致處理組與正常對照組之間程度差異減少至少 30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或 95%。有些實施例中，該抑制性為臨床上相關之抑制性。

【0140】 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

任何程度之抑制性。較佳係該抑制性包括統計上顯著或臨床上顯著抑制。

【0141】 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，在遺傳操作細胞、細胞群或生物體中，TTR 基因可為野生型 TTR 基因、突變體 TTR 基因(如造成澱粉樣蛋白沉積之突變體 TTR 基因)、或轉殖 TTR 基因。

【0142】 「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，或澱粉樣蛋白沉積之數量或程度。此程度可在個別細胞中或在細胞群中(包括例如源自個體之檢體)中分析。

【0143】 可由與 TTR 表現相關之一或多種變數與對照組含量比較其絕對或相對下降程度，來分析抑制性。對照組含量可能為相關技藝上採用之任何對照組含量，例如投藥前之基線值或由未處理或已接受對照物處理(如，例如僅含緩衝劑之對照物或無活性劑之對照物)之類似個體、細胞或檢體所測得之含量。

【0144】 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(例如由細胞或細胞群與本發明 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)之第一細胞或細胞群(此等細胞可能存在於例

如源自個體之檢體)之 mRNA 表現量之下降程度來表示，因此當與實質上與該第一細胞或細胞群相同，但未曾接受處理之第二細胞或細胞群(對照組細胞(群))比較時，TTR 基因表現已受到抑制。較佳實施例中，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：

$$\frac{(\text{對照組細胞之 mRNA}) - (\text{處理組細胞之 mRNA})}{(\text{對照組細胞之 mRNA})} \cdot 100\%$$

【0145】 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下降程度來分析，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 之澱粉樣蛋白沉積之存在。可於經組成性表現或經過基因組工程處理而表現 TTR 之任何細胞中，採用相關技藝上已知分析法測定 TTR 基因靜默。肝臟為 TTR 表現之主要部位。其他重要之表現部位包括脈絡叢、視網膜與胰臟。

【0146】 對 TTR 蛋白質表現之抑制性可由細胞或細胞群之 TTR 蛋白質表現之下降程度來分析(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，處理組細胞或細胞群之蛋白質表現量之抑制性同樣可由相對於對照組細胞或細胞群之蛋白質含量之百分比表示。

【0147】 可用於分析 TTR 基因表現之抑制性之對照組細胞或細胞群包括未曾與本發明 RNAi 劑接觸之細胞或細胞群。例如對照組細胞或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)。

【0148】 細胞或細胞群之 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。一項實施例中，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 製劑套組(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(nuclear run-on assay)、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，其完整內容已以引用之方式併入本文中。

【0149】 一項實施例中，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專一性 TTR 之任何分子。探針可由熟悉此相關技術者合成，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例包括但不限於 RNA、DNA、蛋白質、抗體與有機分子。

【0150】 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。一項實施例中，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。另一項實施例中，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。熟悉此相關技術者很容易擷用已知之 mRNA 檢測法來測定 TTR mRNA 含量。

【0151】 另一種測定檢體中 TTR 表現量之方法涉及例如檢體中 mRNA 之核酸擴增與/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 之實驗實施例)、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，然後採用熟悉此相關技術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 TaqManTM 系統)測定 TTR 表現量。

【0152】 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、樣本試管、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，其等揭示內容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。

【0153】 較佳實施例中，採用分支 DNA(bDNA)分析法或實時 PCR(qPCR)分析 mRNA 表現量。此等方法之用法舉例說明於本文所出示之實例中。

【0154】 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、吸光光譜分析計、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。

【0155】 有些實施例中，可檢測或追蹤澱粉樣蛋白 TTR 沉積之減少程度來追蹤本發明方法之效力。本文所採用「減少澱粉樣蛋白 TTR 沉積」包括個體之器官或區域內所形成 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。例如有些分析澱粉樣蛋白沉積之方法說明於 Gertz, M.A. & Rajukumar, S.V.(編輯)(2010)，

Amyloidosis: Diagnosis and Treatment, New York: Humana Press。分析澱粉樣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澱粉樣蛋白沉積，經使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使其可目視。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)分析澱粉樣蛋白沉積。

【0156】 本發明方法可在身體之任何數量之組織或區域中減少 TTR 沉積，包括但不限於心臟、肝臟、脾臟、食道、胃、腸(迴腸、十二指腸與結腸)、腦、坐骨神經、背根神經節、腎臟與視網膜。

【0157】 本文所採用術語「檢體」係指從個體中分離之類似流體、細胞或組織之組合，及個體內之流體、細胞或組織。生物流體實例包括血液、血清與漿液、血漿、腦脊髓液、眼內液、淋巴液、尿液、唾液等等。組織檢體可包括衍生自組織、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。某些實施例中，檢體可能衍生自肝臟(例如全肝臟或肝臟之某些節段或肝臟中某些細胞型態，如，例如肝細胞)、視網膜或部份視網膜(例如視網膜色素上皮)、中樞神經系統或部份中樞神經系統(例如腦室或脈絡叢)、或胰臟或胰臟之某些細胞或部份。較佳實施例中，「衍生自個體之檢體」係指血液，或從該個體抽出之血液所得之血漿或血清。另一項實施例中，「衍生自個體之檢體」係指衍生自該

個體之肝臟組織(或其次組份)或血液組織(或其次組份，例如血清)。

【0158】 本發明方法之有些實施例中，對該個體投與 RNAi 劑，使 RNAi 劑傳遞至該個體內之特定部位。可在衍生自該個體特定部位之流體或組織之檢體中測定 TTR mRNA 或 TTR 蛋白質含量或含量變化，來分析 TTR 表現之抑制性。較佳實施例中，該部位係選自下列各物所組成群中：肝臟、脈絡叢、視網膜、與胰臟。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)。該部位可能亦包括表現特定受體型態之細胞(例如表現去唾液酸醣蛋白受體之肝細胞)。

【0159】

III. 本發明 iRNA

適用本發明方法所使用之 iRNA 包括在細胞中，如：在個體(例如哺乳動物，如罹患 TTR 相關疾病之人類)之細胞中抑制 TTR 基因表現之雙股核糖核酸(dsRNA)分子。該 dsRNA 包括具有可與在 TTR 基因表現中形成之 mRNA 之至少一部份互補之互補區之反義股。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，如使用例如西方墨點或流式細胞計技術分析之免疫螢光分析法，該 iRNA 會選擇性抑制 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%。

【0160】 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，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，相對於出現在個別寡核苷酸之 dsRNA 互補序列，該互補序列亦可由單一核酸分子之自我互補區所涵蓋。

【0161】 通常，雙螺旋結構為 15 至 30 對鹼基之長度，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 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。

【0162】 同樣地，標靶序列之互補區為 15 至 30 個核苷酸之長度，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】 有些實施例中，dsRNA 之長度為約 15 至約 20 個核苷酸，或約 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。熟悉此相關技術者亦咸了解，作為裂解標靶之這一區 RNA 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，其長度應足以作為 RNAi 所主導裂解作用(亦即透過 RISC 途徑裂解)之受質。

【0164】 熟悉此相關技術者亦咸了解，雙螺旋區為 dsRNA 之主要功能部份，例如約 9 至 36 對鹼基之雙螺旋區，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 對鹼基。因此一項實施例中，為了可供處理成功能性雙螺旋(例如 15 至 30 對鹼基)以靶向所需裂解之 RNA，以具有超過 30 對鹼基之雙螺旋區之 RNA 分子或 RNA 分子之複合物作為 dsRNA。因此熟悉此相關技術者咸了解，在一項實施例中，miRNA 為 dsRNA。另一項實施例中，dsRNA 不為天然 miRNA。另一項實施例中，適用於靶向 TTR 表現之 iRNA 劑不會在標靶細胞中由較大 dsRNA 裂解產生。

【0165】 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 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 之反義或正義股之 5'-端、3'-端或兩端。某些實施例中，可能有更長的延長突出。

【0166】 dsRNA 可採用相關技藝上已知標準方法合成，其進一步說明於下文，例如使用自動化 DNA 合成儀，如：自商品取得者，例如 Biosearch, Applied Biosystems,

Inc.

【0167】 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。然後將組成股黏合。siRNA 化合物之個別股可採用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液相或固相有機合成法或二者製備。

【0168】 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 1 所提供序列之群中，且該正義股之相應反義股係選自表 1 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 1 中之正義股，第二個寡核苷酸為對應於表 1 所說明正義股之反義股。一項實施例中，dsRNA 之實質上互補序列係包含在分開的寡核苷酸。另一項實施例中，dsRNA 之實質上互補序列係包含在單一寡核苷酸。

【0169】 咸了解，雖然表 1 所說明之序列為經修飾與/或接合序列，但本發明 iRNA(例如本發明之 dsRNA)之 RNA 可能包含表 1 中所示之任一個序列，其係未經修飾、未接合、及/或不同於本文所說明之修飾與/或接合。

【0170】 熟悉此相關技術者咸了解，具有約 20 至 23 對鹼基(例如 21 對鹼基)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)。上述實施例中, 基於表 1 所提供寡核苷酸序列之性質, 本文說明之 dsRNA 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 1 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, 具有衍生自表 1 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 %之 dsRNA 亦包括在本發明範圍內。

【0171】 此外, 表 1 所提供之 RNA 判別 TTR 轉錄本中可以感受 RISC 所介導裂解之位點(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 促進轉錄本內任何特定位點裂解時, 則稱本文所採用 iRNA 係靶向 RNA 轉錄本中該特定位點。此等 iRNA 通常包括來自表 1 所提供之其中一個序列之至少約 15 個連續核苷酸, 其與來自 TTR 基因中所選定序列之鄰接區之其他核苷酸序列偶合。

【0172】 雖然標靶序列之長度通常為約 15 至 30 個核苷酸, 但於此範圍內之特定序列在主導裂解任何指定標靶 RNA 上之適宜性仍有很大變化。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指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(其非限制性實例為 21 個核苷酸)之「窗口」或「遮蔽」係事實上或表象上(包括例如經由電腦模擬)置於標靶 RNA 序列上，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或向下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)，以判別彼等最適合之序列，可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。因此，雖然在例如表 1 所示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或向下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，以便進一步優化抑制效力。

【0173】 此外，希望任何經判別之序列，例如表 1，可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，以達到進一步優化。此外，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，可調整此等優化序列，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、或相關技藝上已知與/或本文所討論之其他修飾法，可進一步優化該分子(例如提高血清安定性或循環半衰期、提高熱安定性、加強穿膜傳遞性、靶向特定位置或細胞型態、提高與靜默途徑酵素之交互作用、促進從胞內體釋出)，作為表現抑制劑。

【0174】 本文說明之 iRNA 可包含與標靶序列之一個或多個錯配。一項實施例中，本文說明之 iRNA 包含不超過 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 之反義股包含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會在中心 13 個核苷酸內包含任何錯配。可採用本文說明之方法或相關技藝上已知方法決定包含與標靶序列錯配之 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。

【0175】

IV. 本發明之經修飾 iRNA

一項實施例中，本發明方法所使用 iRNA(例如 dsRNA)之 RNA 未經過修飾，且不包含例如相關技藝上已知及本文說明之化學修飾與/或接合。另一項實施例中，本發明方法所使用之 iRNA(例如 dsRNA)之 RNA 係經過化學修飾，以

加強安定性或其他有利特性。本發明某些實施例中，本發明 iRNA 之實質上所有核苷酸均經修飾。本發明其他實施例中，本發明 iRNA 之所有核苷酸均經修飾。有些實施例中，本發明 iRNA 之實質上所有核苷酸經修飾，且該 iRNA 包含在正義股不超過 8 個 2'-氟修飾(例如不超過 7 個 2'-氟修飾、不超過 6 個 2'-氟修飾、不超過 5 個 2'-氟修飾、不超過 4 個 2'-氟修飾、不超過 3 個 2'-氟修飾、或不超過 2 個 2'-氟修飾)，及在反義股不超過 6 個 2'-氟修飾(例如不超過 5 個 2'-氟修飾、不超過 4 個 2'-氟修飾、不超過 3 個 2'-氟修飾、或不超過 2 個 2'-氟修飾)。其他實施例中，本發明 iRNA 之所有核苷酸均經修飾，且該 iRNA 包含在正義股不超過 8 個 2'-氟修飾(例如不超過 7 個 2'-氟修飾、不超過 6 個 2'-氟修飾、不超過 5 個 2'-氟修飾、不超過 4 個 2'-氟修飾、不超過 3 個 2'-氟修飾、或不超過 2 個 2'-氟修飾)，及在反義股不超過 6 個 2'-氟修飾(例如不超過 5 個 2'-氟修飾、不超過 4 個 2'-氟修飾、不超過 3 個 2'-氟修飾、或不超過 2 個 2'-氟修飾)。本發明 iRNA 中「實質上所有核苷酸均為經修飾」係指大部份，但非全部經修飾，且可包括不超過 5、4、3、2 或 1 個未經修飾之核苷酸。

【0176】 如本發明所說明特徵之核酸可採用相關技藝上已建立之方法合成與/或修飾，如：彼等說明於「*Current protocols in nucleic acid chemistry*」，Beaucage, S.L. 等人(編輯)，John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA，其揭示內容已以引用之方式併入本文中。修飾法包括例如末端

修飾，例如 5'-端修飾(磷酸化、接合、反向鏈結基)或 3'-端修飾(接合、DNA 核苷酸、反向鏈結基等等)；鹼基修飾，例如使用安定之鹼基、失安定化之鹼基、或會與擴張對象配對之鹼基之置換，移除鹼基(無鹼基核苷酸)、或接合鹼基；糖修飾(例如位於 2'-位置或 4'-位置)或置換糖；與/或主幹修飾，包括修飾或置換磷酸二酯鏈結基。適用於本文所說明實施例之 iRNA 化合物之明確實例包括但不限於包含經修飾主幹或沒有天然核苷之間鏈結基之 RNA。具有經修飾主幹之 RNA 包括彼等主幹中沒有磷原子者。針對本說明書之目的及相關技藝上有時候提及者，其核苷之間主幹中沒有磷原子之經修飾 RNA 亦可視為寡核苷。有些實施例中，經修飾之 iRNA 將在其核苷之間主幹中具有一個磷原子。

【0177】 經修飾之 RNA 主幹包括例如硫代磷酸酯、對掌性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基磷酸三酯、甲基與其他烷基之磷酸酯(包括磷酸 3'-伸烷基酯與對掌性磷酸酯)、次磷酸酯、胺基磷酸酯(包括 3'-胺基胺基磷酸酯與胺基烷基胺基磷酸酯)、硫羰基胺基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯、與具有正常 3'-5'鏈結基之硼代磷酸酯、其 2'-5'-鏈結類似物、及彼等具有反向極性者，其中相鄰成對核苷單位係以 3'-5'鏈結 5'-3'或 2'-5'鏈結 5'-2'。亦包括各種不同鹽類、混合鹽類與游離酸型。

【0178】 教示上述含磷鏈結基製法之代表性美國專利案包括但不限於美國專利案案號 3,687,808；4,469,863；

4,476,301 ; 5,023,243 ; 5,177,195 ; 5,188,897 ; 5,264,423 ;
 5,276,019 ; 5,278,302 ; 5,286,717 ; 5,321,131 ; 5,399,676 ;
 5,405,939 ; 5,453,496 ; 5,455,233 ; 5,466,677 ; 5,476,925 ;
 5,519,126 ; 5,536,821 ; 5,541,316 ; 5,550,111 ; 5,563,253 ;
 5,571,799 ; 5,587,361 ; 5,625,050 ; 6,028,188 ; 6,124,445 ;
 6,160,109 ; 6,169,170 ; 6,172,209 ; 6,239,265 ; 6,277,603 ;
 6,326,199 ; 6,346,614 ; 6,444,423 ; 6,531,590 ; 6,534,639 ;
 6,608,035 ; 6,683,167 ; 6,858,715 ; 6,867,294 ; 6,878,805 ;
 7,015,315 ; 7,041,816 ; 7,273,933 ; 7,321,029 ; 與 US Pat
 RE39464 , 其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文
 中。

【0179】 其中不包括磷原子之經修飾 RNA 主幹所具有之主幹係由短鏈烷基或環烷基核苷之間鏈結基、混合雜原子、及烷基或環烷基之核苷之間鏈結基、或一個或多個短鏈雜原子或雜環核苷之間鏈結基形成。此等包括彼等具有嗎啉基鏈結基(一部份由核苷之糖部份形成)；矽氧烷主幹；硫醚、亞碲與碲主幹；甲醯乙醯基(formacetyl)與硫甲醯乙醯基主幹；亞甲基甲醯乙醯基與硫甲醯乙醯基主幹；含烯烴主幹；胺磺酸根主幹；亞甲基亞胺基及亞甲基胍基主幹；磺酸根與磺醯胺主幹；醯胺主幹；與其他具有混合 N、O、S 與 CH₂ 組成份者。

【0180】 教示上述寡核苷製法之代表性美國專利案包括但不限於美國專利案案號 5,034,506 ; 5,166,315 ;
 5,185,444 ; 5,214,134 ; 5,216,141 ; 5,235,033 ; 5,64,562 ;

5,264,564 ; 5,405,938 ; 5,434,257 ; 5,466,677 ; 5,470,967 ;
 5,489,677 ; 5,541,307 ; 5,561,225 ; 5,596,086 ; 5,602,240 ;
 5,608,046 ; 5,610,289 ; 5,618,704 ; 5,623,070 ; 5,663,312 ;
 5,633,360 ; 5,677,437 ; 與 5,677,439 , 其完整揭示內容已
 分別以引用之方式併入本文中。

【0181】 其他實施例中，希望包括合適 RNA 擬似物
 用於 iRNA，其中核苷酸單位之糖與核苷之間鏈結基(亦即
 主幹)二者均被新穎基團置換。該等鹼基單位維持與適當核
 酸標靶化合物雜交。其中一種寡聚化合物為已顯示具有優
 異雜交性質之 RNA 擬似物，稱為肽核酸(PNA)。PNA 化
 合物中，RNA 之糖主幹被包含醯胺之主幹(特定言之胺基乙
 基甘胺酸主幹)置換。核鹼基則保留並直接或間接結合主幹
 之醯胺部份之氮雜態氮原子。教示 PNA 化合物製法之代表
 性美國專利案包括但不限於美國專利案案號 5,539,082 ;
 5,714,331 ; 與 5,719,262，其完整揭示內容已分別以引用之
 方式併入本文中。適用於本發明 iRNA 之其他 PNA 化合物
 說明於例如 Nielsen 等人，*Science*, 1991, 254, 1497-1500。

【0182】 如本發明所說明特徵之某些實施例包括具
 有硫代磷酸酯主幹之 RNA 與具有雜原子主幹之寡核苷，特
 定言之上述美國專利案案號 No. 5,489,677 之
 --CH₂--NH--CH₂-、--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[稱為亞甲基
 (甲基亞胺基)或 MMI 主幹]、--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--、
 --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--與 --N(CH₃)--CH₂--CH₂--[其
 中天然磷酸二酯主幹係由 --O--P--O--CH₂--代表]，與上述

美國專利案案號 5,602,240 之鹽胺主幹。有些實施例中，如本文所說明特徵之 RNA 具有上述美國專利案案號 5,034,506 之 N-嗎啉基主幹結構。

【0183】 經修飾之 RNA 亦可包含一個或多個經取代之糖部份體。如本文所說明特徵之該等 iRNA(例如 dsRNA) 在 2'-位置包括下列其中一項：OH；F；O-、S-、或 N-烷基；O-、S-、或 N-烯基；O-、S-或 N-炔基；或 O-烷基-O-烷基，其中該烷基、烯基與炔基可為經取代或未經取代之 C_1 至 C_{10} 烷基或 C_2 至 C_{10} 烯基與炔基。合適修飾實例包括 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、與 $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ ，其中 n 與 m 為 1 至約 10。其他實施例中，dsRNA 在 2'-位置包括下列其中一項： C_1 至 C_{10} 低碳數烷基、經取代之低碳數烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或 O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、雜環烷基、雜環烷芳基、胺基烷基胺基、聚烷基胺基、經取代之矽基、RNA 裂解基團、報導子基團、嵌入劑、改善 iRNA 之藥物動力學之基團、或改善 iRNA 之藥效學性質之基團、及具有類似性質之其他取代基。有些實施例中，該修飾包括 2'-甲氧基乙氧基(2'-O--CH₂CH₂OCH₃，亦稱為 2'-O-(2-甲氧基乙基)或 2'-MOE)(Martin 等人，*Helv. Chim. Acta*, 1995, 78: 486-504)，亦即烷氧基-烷氧基。另一種修飾實例為 2'-二甲基胺基氧乙氧基，亦即 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基團(亦稱為 2'-DMAOE，其說明於下文實例中)與 2'-二甲

基胺基乙氧基乙氧基(相關技藝上亦稱為 2'-O-二甲基胺基乙氧基乙基或 2'-DMAEOE), 亦即 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂。

【0184】 其他修飾包括 2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-胺基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)與 2'-氟(2'-F)。亦可在 iRNA 之 RNA 上其他位置進行類似修飾, 特定言之在 3'末端核苷酸上糖之 3'位置或在 2'-5'鏈結 dsRNA 與 5'末端核苷酸之 5'位置。iRNA 亦可改具有糖擬似物(如環丁基部份體)替代呋喃戊糖基糖。教示此等經修飾糖結構製法之代表性美國專利案包括但不限於美國專利案案號 4,981,957 ; 5,118,800 ; 5,319,080 ; 5,359,044 ; 5,393,878 ; 5,446,137 ; 5,466,786 ; 5,514,785 ; 5,519,134 ; 5,567,811 ; 5,576,427 ; 5,591,722 ; 5,597,909 ; 5,610,300 ; 5,627,053 ; 5,639,873 ; 5,646,265 ; 5,658,873 ; 5,670,633 ; 及 5,700,920 , 其中有些專利案係與本申請案共同擁有。其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0185】 本發明 iRNA 之 RNA 亦可包括核鹼基(相關技藝上通常簡稱「鹼基」)修飾或取代。本文所採用「未經修飾」或「天然」核鹼基包括嘌呤鹼基腺嘌呤(A)與鳥嘌呤(G), 及嘧啶鹼基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)與尿嘧啶(U)。經修飾之核鹼基包括其他合成性與天然核鹼基, 如去氧-胸腺嘧啶(dT)、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羥基甲基胞嘧啶、黃嘌呤、次黃嘌呤、2-胺基腺嘌呤、及腺嘌呤與鳥嘌呤之 6-甲基與其他烷基衍生物、腺嘌呤與鳥嘌呤之 2-丙基與其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶與 2-硫胞

嘧啶、5-鹵尿嘧啶與胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶與胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶與胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-鹵基、8-胺基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羥基與其他 8-經取代之腺嘌呤與鳥嘌呤、5-鹵基(特定言之 5-溴、5-三氟甲基)與其他 5-經取代之尿嘧啶與胞嘧啶、7-甲基鳥嘌呤與 7-甲基腺嘌呤、8-氮雜鳥嘌呤與 8-氮雜腺嘌呤、7-去氮雜鳥嘌呤與 7-去氮雜腺嘌呤與 3-去氮雜鳥嘌呤與 3-去氮雜腺嘌呤。其他核鹼基包括彼等揭示於美國專利案案號 3,687,808、彼等揭示於「Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn. P 編輯, Wiley-VCH, 2008」; 彼等揭示於「The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, p. 858-859, Kroschwitz, J. L. 編輯, John Wiley & Sons, 1990」; 彼等揭示於 Englisch 等人之「Angewandte Chemie, 國際版, 1991, 30, 613」; 與彼等揭示於 Sanghvi, Y S 之「dsRNA Research and Applications, 第 15 章, p.289-302, Crooke, S. T. 與 Lebleu, B. 編輯, CRC Press, 1993」。其中某些核鹼基特別適用於提高如本發明所說明特徵之寡聚化合物之結合親和性。此等包括 5-經取代之嘧啶、6-氮雜嘧啶與 N-2、N-6 與 O-6 經取代之嘌呤, 包括 2-胺基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶與 5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代法已顯示可使核酸雙螺旋安定性提高 0.6-1.2°C (Sanghvi, Y. S.、Crooke, S. T. 與 Lebleu, B. 編輯之 dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)

且成為鹼基取代實例，甚至更特定言之當與 2'-O-甲氧基乙基糖修飾組合時。

【0186】 教示上述某些經修飾之核鹼基及其他經修飾之核鹼基製法之代表性美國專利案包括但不限於上述美國專利案案號 3,687,808；4,845,205；5,130,30；5,134,066；5,175,273；5,367,066；5,432,272；5,457,187；5,459,255；5,484,908；5,502,177；5,525,711；5,552,540；5,587,469；5,594,121, 5,596,091；5,614,617；5,681,941；5,750,692；6,015,886；6,147,200；6,166,197；6,222,025；6,235,887；6,380,368；6,528,640；6,639,062；6,617,438；7,045,610；7,427,672；及 7,495,088，其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0187】 iRNA 之 RNA 亦可經修飾，以包括一個或多個雙環糖部份體。「雙環糖」為藉由兩個原子之橋基修飾之呋喃糖基環。「雙環核苷」(「BNA」)為具有糖部份體之核苷，其包含連接糖環兩個碳原子之橋基，藉以形成雙環系。某些實施例中，該橋基連接糖環之 4'-碳與 2'-碳。因此，有些實施例中，本發明製劑可包括一個或多個鎖核酸(LNA)。鎖核酸為具有經修飾之核糖部份體之核苷酸，其中該核糖部份體額外包含連接 2'與 4'碳之橋基。換言之，LNA 為包含雙環糖部份體之核苷酸，該雙環糖部份體則包含 4'-CH₂-O-2'橋基。此結構有效地「封鎖」3'-內部結構構形內之核糖。添加鎖核酸至 siRNA 中時，已顯示可以提高血清中 siRNA 安定性，並降低偏離標靶之效應(Elmen, J.

等人，(2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447；Mook, OR.等人，(2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843；Grunweller, A.等人，(2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193)。

用於本發明聚核苷酸之雙環核苷實例包括(但不限於)包含 4'與 2'核糖基環原子之間橋基之核苷。某些實施例中，本發明反義聚核苷酸劑包括一個或多個包含 4'與 2'之間橋基之雙環核苷。此等 4'與 2'之間橋連之雙環核苷實例包括但不限於 4'-(CH₂)—O-2' (LNA)；4'-(CH₂)—S-2'；4'-(CH₂)₂—O-2' (ENA)；4'-CH(CH₃)—O-2'(亦稱為「限制乙基」或「cEt」)與 4'-CH(CH₂OCH₃)—O-2' (及其類似物；參見例如美國專利案案號 7,399,845)；4'-C(CH₃)(CH₃)—O-2' (及其類似物；參見例如美國專利案案號 8,278,283)；4'-CH₂—N(OCH₃)-2' (及其類似物；參見例如美國專利案案號 8,278,425)；4'-CH₂—O—N(CH₃)-2' (參見例如美國專利公告案案號 2004/0171570)；4'-CH₂—N(R)—O-2'，其中 R 為 H、C₁-C₁₂ 烷基、或保護基(參見例如美國專利案案號 7,427,672)；4'-CH₂—C(H)(CH₃)-2' (參見例如 Chattopadhyaya 等人，*J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134)；及 4'-CH₂—C(=CH₂)-2' (及其類似物；參見例如美國專利案案號 8,278,426)。上述文獻之完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0188】 教示鎖核酸核苷酸製法之其他代表性美國專利案及美國專利公告案包括但不限於下列美國專利案案號 6,268,490；6,525,191；6,670,461；6,770,748；6,794,499；

6,998,484 ; 7,053,207 ; 7,034,133;7,084,125 ; 7,399,845 ;
7,427,672 ; 7,569,686 ; 7,741,457 ; 8,022,193 ; 8,030,467 ;
8,278,425 ; 8,278,426 ; 8,278,283 ; US 2008/0039618 ; 及
US 2009/0012281，其完整揭示內容已分別以引用之方式併
入本文中。

上述任何雙環核苷均可製成具有一個或多個立體化學糖組態，其包括例如 α -L-呋喃核糖及 β -D-呋喃核糖(參見 WO 99/14226)。

【0189】 iRNA 之 RNA 亦可經修飾，以包括一個或多個限制乙基核苷酸。本文所採用「限制乙基核苷酸」或「cEt」為包含雙環糖部份體(其包含 4'-CH(CH₃)-O-2'橋基)之鎖核酸。一項實施例中，限制乙基核苷酸為 S 組態，本文中稱為「S-cEt」。

【0190】 本發明 iRNA 亦可包括一個或多個「構形限制核苷酸」(「CRN」)。CRN 為具有連接核糖之 C2'與 C4'碳或核糖之 C3 與-C5'碳之鏈結體之核苷酸類似物。CRN 封鎖核糖環形成安定構型，並提高與 mRNA 之雜交親和性。鏈結體之長度足以讓氧置入針對安定性與親和性之最適當位置，以造成較低之核糖環折皺。

【0191】 教示上述某些 CRN 製法之代表性公開案包括但不限於美國專利公開案案號 2013/0190383；及 PCT 公告案 WO 2013/036868，其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0192】 本發明 iRNA 之一個或多個核苷酸亦可包

括經羥基甲基取代之核苷酸。「經羥基甲基取代之核苷酸」為無環 2'-3'-開環(seco)-核苷酸，亦稱為「非鎖核酸」(「UNA」)修飾。

【0193】 教示 UNA 製法之代表性美國公告案包括但不限於美國專利案案號 8,314,227；及美國專利公開案案號 2013/0096289；2013/0011922；及 2011/0313020，其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0194】 RNA 分子末端之可能安定化修飾包括 N-(乙醯基胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-NHAc)、N-(己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6)、N-(乙醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-去氧胸苷(醚)、N-(胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-胺基)、2-二十二碳烷醯基-尿苷-3"-磷酸酯、反向鹼基 dT(idT)等等。此修飾之揭示內容可參見 PCT 公告案案號 WO 2011/005861。

【0195】 本發明 iRNA 之核苷酸之其他修飾包括 5'磷酸酯或 5'磷酸酯擬似物，例如 RNAi 劑之反義股上 5'-末端磷酸酯或磷酸酯擬似物。合適之磷酸酯擬似物揭示於例如美國專利公開案案號 2012/0157511，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0196】

A. 包含本發明星序之經修飾 iRNA。

本發明某些態樣中，本發明方法所使用雙股 RNAi 劑包括經過如例如美國臨時申請案案號 61/561,710(申請日：2011 年 11 月 18 日)或 PCT/US2012/065691(申請日：

2012 年 11 月 16 日)之揭示內容進行之化學修飾，其完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0197】 更明確言之，已驚訝地發現，當雙股 RNAi 劑之正義股與反義股經過修飾而在該 RNAi 劑之至少一股之裂解位點或接近裂解位點具有一個或多個在三個連續核苷酸有三種相同修飾之基序時，可優異地加強該 RNAi 劑之基因靜默活性。

【0198】 因此，本發明提供一種可於活體內抑制標靶基因(亦即，TTR 基因)表現之雙股 RNAi 劑。該 RNAi 劑包含正義股與反義股。該 RNAi 劑各股之長度可為 12 至 30 個核苷酸範圍。例如各股可為 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。

【0199】 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 劑之雙螺旋區可為 12-30 對核苷酸之長度。例如該雙螺旋區可為 14-30 對核苷酸之長度、17-30 對核苷酸之長度、27-30 對核苷酸之長度、17 - 23 對核苷酸之長度、17-21 對核苷酸之長度、17-19 對核苷酸之長度、19-25 對核苷酸之長度、19-23 對核苷酸之長度、19-21 對核苷酸之長度、21-25 對核苷酸之長度、或 21-23 對核苷酸之長度。另一項實例中，

該雙螺旋區係選自 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、與 27 個核苷酸之長度。

【0200】 一項實施例中，該 RNAi 劑可在一股或二股之 3'-端、5'-端、或兩端包含一個或多個突出區與/或封端基。該突出可為 1-6 個核苷酸之長度，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。該突出可為其中一股比另一股長所造成之結果，或為相同長度的兩股錯開造成之結果。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。第一股與第二股亦可例如利用額外鹼基結合形成髮夾，或利用其他非鹼基鏈結體結合。

【0201】 一項實施例中，RNAi 劑突出區之核苷酸可分別獨立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 可為任一股上任一端之突出序列。突出可與標靶 mRNA 形成錯配，或其可與所靶向之基因序列互補或可為另一個序列。

【0202】 RNAi 劑之正義股、反義股或兩股之 5'-或 3'-突出可經過磷酸化。有些實施例中，突出區包含兩個核苷酸，其在這兩個核苷酸之間具有硫代磷酸酯，其中這兩個核苷酸可相同或不同。一項實施例中，突出出現在正義

股、反義股或兩股之 3'-端。一項實施例中，此 3'-突出出現在反義股。一項實施例中，此 3'-突出出現在正義股。

【0203】 RNAi 劑可能僅包含單一突出，其可強化 RNAi 之干擾活性，不會影響整體安定性。例如單股突出可位於正義股之 3'末端，或者在反義股之 3'末端。RNAi 亦可能在反義股之 5'-端(或正義股之 3'-端)具有鈍端，或反之亦然。通常 RNAi 之反義股在 3'-端具有核苷酸突出，且 5'-端為鈍端。在不希望受到理論限制下，反義股 5'-端之不對稱鈍端與反義股 3'-端突出有利於該引導股進入 RISC 過程。

【0204】 一項實施例中，RNAi 劑包含 21 個核苷酸之正義股與 23 個核苷酸之反義股，其中正義股包含至少一個在 5'端起之位置 9、10、11 三個連續核苷酸有三個 2'-F 修飾之基序；反義股包含至少一個在 5'端起之位置 11、12、13 三個連續核苷酸有三個 2'-O-甲基修飾之基序，其中 RNAi 劑之一端為鈍端，而另一端則包含含 2 個核苷酸之突出。較佳係該含 2 個核苷酸之突出位在反義股之 3'-端。

【0205】 當該含 2 個核苷酸之突出位在反義股之 3'-端時，可能在末端三個核苷酸之間有兩個硫代磷酸酯核苷酸之間鏈結基，該等三個核苷酸中有兩個為突出核苷酸，且第三個核苷酸為鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。一項實施例中，RNAi 劑另外在正義股 5'-端與反義股 5'-端兩端之末端三個核苷酸之間具有兩個硫代磷酸酯核苷酸之間

鏈結基。一項實施例中，RNAi 劑之正義股及反義股中每一個核苷酸(包括作為基序之一部份之核苷酸)均為經修飾之核苷酸。一項實施例中，各殘基分別獨立經 2'-O-甲基或 3'-氟修飾，例如於交替之基序中。一項實施例中，本發明 iRNA 之所有核苷酸均經修飾，且 iRNA 包含在正義股不超過 8 個 2'-氟修飾(例如不超過 7 個 2'-氟修飾、不超過 6 個 2'-氟修飾、不超過 5 個 2'-氟修飾、不超過 4 個 2'-氟修飾、不超過 3 個 2'-氟修飾、或不超過 2 個 2'-氟修飾)，及在反義股不超過 6 個 2'-氟修飾(例如不超過 5 個 2'-氟修飾、不超過 4 個 2'-氟修飾、不超過 3 個 2'-氟修飾、或不超過 2 個 2'-氟修飾)。視需要，RNAi 劑進一步包含配體(較佳為 GalNAc₃)。

【0206】 一項實施例中，RNAi 劑之正義股包含至少一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序，其中一個基序出現在正義股之裂解位點處。

【0207】 一項實施例中，RNAi 劑之反義股亦可包含至少一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序，其中一個基序出現在反義股之裂解位點或接近裂解位點處。

【0208】 當 RNAi 劑具有長度為 17 至 23 個核苷酸之雙螺旋區時，反義股之裂解位點通常約在自 5'-端起之 10、11 與 12 位置。因此，三個相同修飾之基序可能出現在反義股之 9、10、11 位置；10、11、12 位置；11、12、13 位置；12、13、14 位置；或 13、14、15 位置，其係從反義股 5'-端起之第一個核苷酸開始計數，或從反義股 5'-端

之雙螺旋區內第一對核苷酸開始計數。反義股中之裂解位點亦可能隨 RNAi 從 5'-端開始之雙螺旋區長度變化。

【0209】 RNAi 劑之正義股可能在該股之裂解位點包含至少一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序；且反義股可能在該股之裂解位點或接近裂解位點處具有至少一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序。當正義股與反義股形成 dsRNA 雙螺旋時，正義股與反義股之排比可讓正義股的一個三個核苷酸之基序與反義股的一個三個核苷酸之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。

【0210】 一項實施例中，RNAi 劑之正義股與反義股中每一個核苷酸(包括作為基序之一部份之核苷酸)可能經過修飾。各核苷酸可能經過相同或不同修飾法修飾，其可包括以下一或多種修改：一個或兩個非鏈結性磷酸酯態氧與/或一個或多個鏈結性磷酸酯態氧；修改核糖之組成，例如核糖上之 2' 羥基；以「去磷酸」鏈結體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。

【0211】 由於核酸為亞單位之聚合物，因此許多修飾會出現在核酸內之重複位置，例如鹼基或磷酸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，將在核酸之所有相關位置進行修飾，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。

【0212】 可能為了例如加強安定性，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。例如希望在突出中包括嘌呤核苷酸。有些實施例中，3'或 5'突出中所有或有些鹼基可經修飾，例如具有本文所說明之修飾。修飾法可包括，例如可採用相關技藝上已知之修飾法在核糖之 2'位置上進行修飾，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。

【0213】 一項實施例中，正義股與反義股之各殘基分別獨立經 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。該股可包含超過一個修飾。一項實施例中，正義股與反義股之各殘基分別獨立經 2'-O-甲基或 2'-氟修飾。

【0214】 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。

一項實施例中， N_a 與/或 N_b 包含交替修飾型態。本文所採用語「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 分別代表在核苷酸之一種修飾時，則該交替基序可為「ABABABABABAB...」、「AABBAABBAABB...」、「AABAABAABAAB...」、「AAABAAABAAAB...」、「AAABBBAAABBB...」或「ABCABCABCABC...」、等等。

【0215】 交替基序中包含之修飾型態可能相同或不同。例如若 A、B、C、D 分別代表在核苷酸之一種修飾型態時，交替型態(亦即每隔一個核苷酸之修飾型態)可能相同，但各正義股或反義股之修飾型態可能分別選自交替基序中之數種修飾可能性，如：「ABABAB...」、「ACACAC...」、「BDBDBD...」或「CDCDCD...」、等等。

【0216】 一項實施例中，本發明 RNAi 劑包含在正義股交替基序之修飾型態相對於反義股交替基序之修飾型態出現位移。該位移可使正義股核苷酸之經修飾基團對應於反義股核苷酸之經不同修飾之基團，且反之亦然。例如當正義股與 dsRNA 雙螺旋中反義股配對時，雙螺旋區內之正義股之交替基序可能始於該股之 5'-3'之「ABABAB」，而反義股之交替基序可能始於該股之 5'-3'之「BABABA」。

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

【0217】 一項實施例中，該 RNAi 劑包含在原始正義股之 2'-O-甲基修飾與 2'-F 修飾之交替基序型態相對於在原始反義股之 2'-O-甲基修飾與 2'-F 修飾之交替基序型態出現位移，亦即在正義股之 2'-O-甲基修飾之核苷酸與在反義股之 2'-F 修飾之核苷酸形成鹼基配對，且反之亦然。正義股之 1-位置可能以 2'-F 修飾開始，及反義股之 1-位置可能以 2'-O-甲基修飾開始。

【0218】 在正義股與/或反義股引進一個或多個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序時，可干擾正義股與/或反義股之原始修飾型態。這種在正義與/或反義股中引進一個或多個在三個連續核苷酸上有三個相同修飾之基序而干擾正義與/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。

【0219】 一項實施例中，當在任一股中引進在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序時，鄰接該基序之核苷酸修飾為不同於該基序修飾之修飾。例如包含該基序之序列部份為「...N_aYYYN_b...」，其中「Y」代表在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序之修飾，及「N_a」與「N_b」代表鄰接基序「YYY」之核苷酸之修飾且不同於 Y 之修飾，且其中 N_a 與 N_b 可為相同或不同修飾。或者，當出現側翼

修飾時， N_a 與 / 或 N_b 可能存在或不存在。

【0220】 RNAi 劑可能進一步包含至少一個硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸之間鏈結基。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸之間鏈結基修飾可能出現在正義股或反義股或兩股之股中任何位置之任何核苷酸。例如核苷酸之間鏈結基修飾可能出現在正義股與 / 或反義股之每一個核苷酸；各核苷酸之間鏈結基修飾可能呈交替型態出現在正義股與 / 或反義股；或正義股或反義股可能包含呈交替型態之兩種核苷酸之間鏈結基之修飾。正義股之核苷酸之間鏈結基之交替修飾型態可能與反義股相同或不同，正義股之核苷酸之間鏈結基之交替修飾型態相對於反義股之核苷酸之間鏈結基之交替修飾型態可能出現位移。一項實施例中，雙股 RNAi 劑包含 6 至 8 個硫代磷酸酯之核苷酸之間鏈結基。一項實施例中，反義股在 5'-末端包含兩個硫代磷酸酯之核苷酸之間鏈結基及在 3'-末端包含兩個硫代磷酸酯之核苷酸之間鏈結基，正義股則在 5'-末端或 3'-末端包含至少兩個硫代磷酸酯之核苷酸之間鏈結基。

【0221】 一項具體實施例中，RNAi 在突出區包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸之間鏈結基修飾。例如突出區可能包含兩個核苷酸，其在兩個核苷酸之間具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸之間鏈結基。亦可能進行核苷酸之間鏈結基修飾來連接突出核苷酸與雙螺旋區內末端配對之核苷酸。例如至少 2、3、4 個或所有突出核苷酸可能利用硫代磷酸酯或甲基膦酸酯之核苷酸之間鏈結基連

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

【0222】 一項實施例中，該含 2 個核苷酸之突出係在反義股 3'-端，且末端三個核苷酸之間有兩個硫代磷酸酯之核苷酸之間鏈結基，這三個核苷酸中有兩個為突出核苷酸，第三個核苷酸為鄰接該突出核苷酸之配對核苷酸。該 RNAi 劑可視需要再於正義股 5'-端與反義股 5'-端兩個末端，於末端三個核苷酸之間另包含兩個硫代磷酸酯之核苷酸之間鏈結基。

【0223】 一項實施例中，RNAi 劑在雙螺旋內包含與標靶錯配(群)，或其組合。錯配可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，最簡單之方法為檢視該一對核苷酸對另一對核苷酸，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。

【0224】 一項實施例中，RNAi 劑包含雙螺旋區內反義股 5'-端起前 1、2、3、4、或 5 對鹼基中至少一對，其餘分別獨立選自：A：U、G：U、I：C，及錯配對，例如非典型或典型以外之配對或包括通用鹼基之配對，以促進雙螺旋反義股 5'-端之解離。

【0225】 一項實施例中，雙螺旋區中反義股 5'-端起 1-位置之核苷酸係選自下列各物所組成群中：A、dA、dU、U、與 dT。或者，雙螺旋區中反義股 5'-端起前 1、2 或 3 對鹼基中至少一對為 AU 鹼基對。例如雙螺旋區中反義股 5'-端起第一對鹼基為 AU 鹼基對。

【0226】 一項實施例中，正義股序列可由式(I)代表：

$$5' \text{ } n_p\text{-}N_a\text{-(X X X)}_i\text{-}N_b\text{-}Y Y Y\text{-}N_b\text{-(Z Z Z)}_j\text{-}N_a\text{-}n_q \text{ } 3' \quad (\text{I})$$

其中：

i 與 j 分別獨立為 0 或 1；

p 與 q 分別獨立為 0-6；

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

各 N_b 分別獨立代表包含 0 至 10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列；

各 n_p 及 n_q 分別獨立代表突出核苷酸；

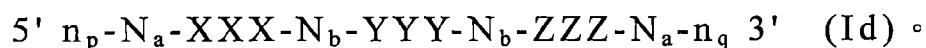
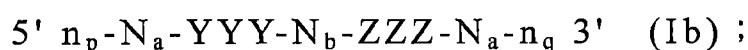
其中 N_b 及 Y 不具有相同修飾；及

XXX、YYY 及 ZZZ 分別獨立代表一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序。較佳係 YYY 為均經 2'-F 修飾之核苷酸。

【0227】 一項實施例中 N_a 與/或 N_b 包含交替型態之修飾。

【0228】 一項實施例中，該 YYY 基序出現在或接近正義股之裂解位點。例如當 RNAi 劑具有 17 至 23 個核苷酸長度之雙螺旋區時，YYY 基序可出現在正義股之裂解位點或附近(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)，從 5'-端之第一個核苷酸開始計數；或可視需要，從 5'-端雙螺旋區內第一對配對核苷酸開始計數。

【0229】 一項實施例中， i 為 1 及 j 為 0，或 i 為 0 及 j 為 1，或 i 與 j 二者均為 1。因此正義股可由下式代表：



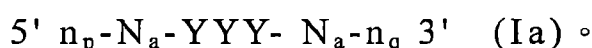
【0230】 當正義股由式 (Ib) 代表時， N_b 代表包含 0-10、0-7、0-5、0-4、0-2 或 0 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 可分別獨立代表包含 2-20、2-15、或 2-10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0231】 當正義股由式 (Ic) 代表時， N_b 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 可分別獨立代表包含 2-20、2-15、或 2-10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0232】 當正義股由式 (Id) 代表時，各 N_b 分別獨立代表包含 0-10、0-7、0-5、0-4、0-2 或 0 個經修飾核苷酸

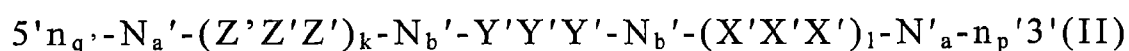
之寡核苷酸序列。較佳係 N_b 為 0、1、2、3、4、5 或 6。各 N_a 可分別獨立代表包含 2-20、2-15、或 2-10 個經修飾之核苷酸之寡核苷酸序列。各 X、Y 及 Z 彼此可分別相同或相異。

【0233】 其他實施例中，i 為 0 及 j 為 0，及正義股可由下式代表：



【0234】 當正義股由式(Ia)代表時，各 N_a 可分別獨立代表包含 2-20、2-15、或 2-10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0235】 一項實施例中，RNAi 之反義股序列可由式(II)代表：



其中：

k 與 l 分別獨立為 0 或 1；

p'與 q'分別獨立為 0-6；

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

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

各 n_p' 及 n_q' 分別獨立代表突出核苷酸；

其中 N_b' 及 Y'不具有相同修飾；及

$X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 及 $Z'Z'Z'$ 分別獨立代表一個在三個連續核苷酸上有三個相同修飾之基序。

【0236】 一項實施例中， N_a' 與/或 N_b' 包含交替型態之修飾。

【0237】 $Y'Y'Y'$ 基序出現在反義股之裂解位點或附近。例如當 RNAi 劑具有 17-23 個核苷酸長度之雙螺旋區時，該 $Y'Y'Y'$ 基序可出現在反義股位置 9、10、11；10、11、12；11、12、13；12、13、14；或 13、14、15，從 5'-端第一個核苷酸開始計數；或可視需要從 5'-端雙螺旋區內第一對配對核苷酸開始計數。較佳係該 $Y'Y'Y'$ 基序出現在位置 11、12、13。

【0238】 一項實施例中， $Y'Y'Y'$ 基序為均經 2'-OMe 修飾之核苷酸。

【0239】 一項實施例中， k 為 1 及 1 為 0，或 k 為 0 及 1 為 1，或 k 及 1 二者均為 1。

【0240】 因此反義股可由下式代表：

$5' n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p, 3' \quad (IIb) ;$

$5' n_q'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p, 3' \quad (IIc) ;$ 或

$5' n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p, 3' \quad (IId) .$

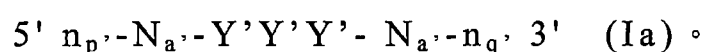
【0241】 當反義股由式(IIb)代表時， N_b' 代表包含 0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2 或 0 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a' 分別獨立代表包含 2-20、2-15、或 2-10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0242】 當反義股由式(IIc)代表時， N_b' 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' 分別獨立代表包含 2-20、2-15、

或 2-10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0243】 當反義股由式(IIId)代表時，各 N_b ' 分別獨立代表包含 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 ' 分別獨立代表包含 2-20、2-15、或 2-10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。較佳係 N_b 為 0、1、2、3、4、5 或 6。

【0244】 其他實施例中， k 為 0 及 1 為 0，且反義股可由下式代表：



【0245】 當反義股由式(IIa)代表時，各 N_a ' 分別獨立代表包含 2-20、2-15、或 2-10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

各 X' 、 Y' 與 Z' 可能彼此相同或相異。

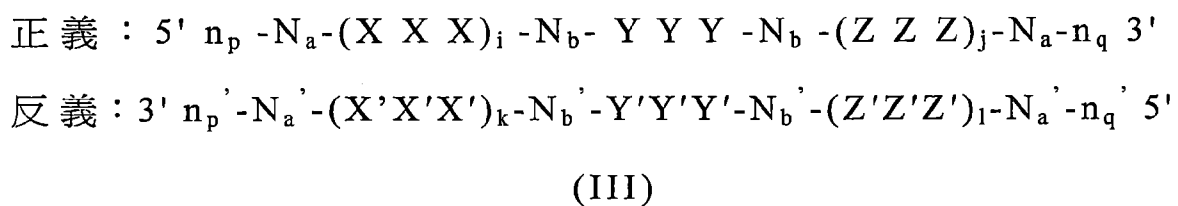
【0246】 正義股與反義股之各核苷酸可能分別獨立經 LNA、CRN、UNA、cEt、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-羥基、或 2'-氟修飾。例如正義股與反義股之各核苷酸係分別獨立經 2'-O-甲基或 2'-氟修飾。特定言之，各 X 、 Y 、 Z 、 X' 、 Y' 與 Z' 可代表 2'-O-甲基修飾或 2'-氟修飾。

【0247】 一項實施例中，當 RNAi 劑之雙螺旋區為 21 個核苷酸時，其正義股可能包含出現在該股 9、10 與 11 位置之 YYY 基序，其係從 5'-端第一個核苷酸開始計數，或可視需要從 5'-端雙螺旋區內第一對配對核苷酸開始計數；及 Y 代表 2'-F 修飾。

【0248】 一項實施例中，反義股可能包含出現在該股位置 11、12 與 13 之 Y'Y'Y'基序，其係從 5'-端第一個核苷酸開始計數，或可視需要從 5'-端雙螺旋區內第一對配對核苷酸開始計數；及 Y'代表 2'-O-甲基修飾。

【0249】 由上式(Ia)、(Ib)、(Ic)、與(Id)中任一式代表之正義股可分別與式(IIa)、(IIb)、(IIc)、與(IIId)中任一式代表之反義股形成雙螺旋。

【0250】 因此，本發明方法所使用之 RNAi 劑可包含正義股與反義股，每一股具有 14 至 30 個核苷酸，該 RNAi 雙螺旋係如式(III)代表：



其中：

i、j、k、與 l 分別獨立為 0 或 1；

p、p'、q、與 q'分別獨立為 0-6；

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

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

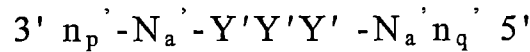
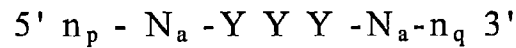
其中各 n_p 、 n_p 、 n_q 、及 n_q ，其可能存在或可能不存在，分別獨立代表突出核苷酸；及

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、與 Z'Z'Z'分別獨

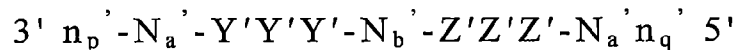
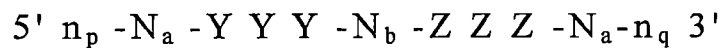
立代表一個在三個連續核苷酸有三個相同修飾之基序。

【0251】 一項實施例中，i 為 0 及 j 為 0；或 i 為 1 及 j 為 0；或 i 為 0 及 j 為 1；或 i 與 j 二者均為 0；或 i 與 j 二者均為 1。另一項實施例中，k 為 0 及 l 為 0；或 k 為 1 及 l 為 0；或 k 為 0 及 l 為 1；或 k 與 l 二者均為 0；或 k 與 l 二者均為 1。

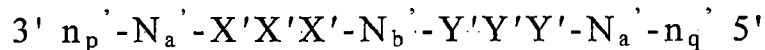
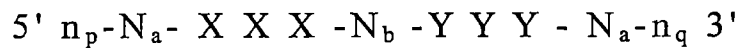
形成 RNAi 雙螺旋之正義股與反義股組合實例包括下式：



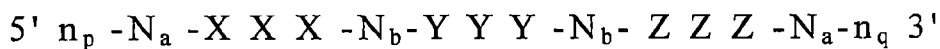
(IIIa)



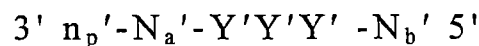
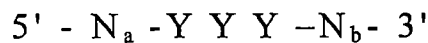
(IIIb)



(IIIc)



(IIId)



(IIIe)

【0252】 當 RNAi 劑由式(IIIa)代表時，各 N_a 分別獨立代表包含 2-20、2-15、或 2-10 個經修飾核苷酸之寡核苷

酸序列。

【0253】 當 RNAi 劑由式(IIIb)代表時，各 N_b 分別獨立代表包含 1-10、1-7、1-5 或 1-4 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 分別獨立代表包含 2-20、2-15、或 2-10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0254】 當 RNAi 劑由式(IIIc)代表時，各 N_b 、 N_b' 分別獨立代表包含 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 分別獨立代表包含 2-20、2-15、或 2-10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。

【0255】 當 RNAi 劑由式(IIId)代表時，各 N_b 、 N_b' 分別獨立代表包含 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 、 N_a' 分別獨立代表包含 2-20、2-15、或 2-10 個經修飾核苷酸之寡核苷酸序列。各 N_a 、 N_a' 、 N_b 及 N_b' 分別獨立包含交替型態之修飾。

【0256】 當 RNAi 劑由式(IIIe)時，各 N_a 、 N_a' 、 N_b 、與 N_b' 分別獨立代表包含 0 至 25 個經修飾或未經修飾或其組合之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。

【0257】 式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)、與(IIIe)中各 X、Y 與 Z 可能彼此相同或相異。

【0258】 當 RNAi 劑由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)、與(IIIe)代表時，至少一個 Y 核苷酸可與一個 Y' 核苷酸形成鹼基對。或者，至少兩個 Y 核苷酸與對應之 Y'

核苷酸形成鹼基對；或所有三個 Y 核苷酸均與對應之 Y' 核苷酸形成鹼基對。

【0259】 當 RNAi 劑由式(IIIb)或(IIIId)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 核苷酸與對應之 Z'核苷酸形成鹼基對；或所有三個 Z 核苷酸均與對應之 Z'核苷酸形成鹼基對。

【0260】 當 RNAi 劑由式(IIIc)或(IIIId)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 核苷酸與對應之 X'核苷酸形成鹼基對；或所有三個 X 核苷酸均與對應之 X'核苷酸形成鹼基對。

【0261】 一項實施例中，該 Y 核苷酸之修飾不同於該 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。

【0262】 一項實施例中，當 RNAi 劑由式(IIIId)代表時， N_a 修飾為 2'-O-甲基或 2'-氟修飾。另一項實施例中，當 RNAi 劑由式(IIIId)代表時， N_a 修飾為 2'-O-甲基或 2'-氟修飾，及 $n_{p'} > 0$ ，及至少一個 $n_{p'}$ 係利用硫代磷酸酯鏈結基鏈結鄰接之核苷酸。再另一項實施例中，當 RNAi 劑由式(IIIId)代表時， N_a 修飾為 2'-O-甲基或 2'-氟修飾， $n_{p'} > 0$ ，及至少一個 $n_{p'}$ 係利用硫代磷酸酯鏈結基鏈結鄰接之核苷酸，且正義股係透過二價或三價分支鏈結體接合至附接之一或多個 GalNAc 衍生物(於下文說明)。另一項實施例中，當 RNAi 劑由式(IIIId)代表時， N_a 修飾為 2'-O-甲基或 2'-氟修飾， $n_{p'} > 0$ ，及至少一個 $n_{p'}$ 係利用硫代磷酸酯鏈結基

鏈結鄰接之核苷酸，正義股包含至少一個硫代磷酸酯鏈結基，且正義股係透過二價或三價分支鏈結體接合至附接之一或多個 GalNAc 衍生物。

【0263】 一項實施例中，當 RNAi 劑如式(IIIa)代表時， N_a 修飾為 2'-O-甲基或 2'-氟修飾， $n_p' > 0$ ，及至少一個 n_p' 係利用硫代磷酸酯鏈結基鏈結相鄰核苷酸，正義股包含至少一個硫代磷酸酯鏈結基，且正義股係利用二價或三價之分支鏈結體接合附接之一或多個 GalNAc 衍生物。

【0264】 一項實施例中，兩個如式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、(IIId)、與(IIIe)代表之 RNAi 劑係在 5'端及其中一個或兩個 3'端彼此鏈結，且可視需要接合配體。各製劑可靶向相同基因或兩個不同基因；或各製劑可靶向相同基因上之兩個不同標靶位點。

有各種不同文獻說明可本發明方法所使用之多聚體 RNAi 劑。此等公開文獻包括 WO2007/091269、美國專利案案號 7858769、WO2010/141511、WO2007/117686、WO2009/014887 與 WO2011/031520，其等完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0265】 如下文中更詳細說明，包含一或多個碳水化合物部份體與 RNAi 劑之接合物之 RNAi 劑可以優化一或多種 RNAi 劑之性質。許多例子中，由碳水化合物部份體附接 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

劑。依此方式置換亞單位中核糖之核糖核苷酸亞單位在本文中稱為核糖置換修飾亞單位(RRMS)。環狀載劑可能為碳環狀環系(亦即所有環原子均為碳原子)或雜環狀環系(亦即一個或多個環原子可能為雜原子，例如氮、氧、硫)。該環狀載劑可能為單環狀環系，或可能包含兩個或更多個環，例如稠合環。環狀載劑可能為完全飽和環系，或其可能包含一個或多個雙鍵。

【0266】 配體可能利用載劑附接聚核苷酸。該載劑包括(i)至少一個「主幹附接點」，較佳為兩個「主幹附接點」與(ii)至少一個「系鏈附接點」。本文所採用「主幹附接點」係指可用於且適於讓載劑進入核糖核酸之主幹(例如磷酸酯或經修飾磷酸酯(例如含硫)主幹)中之官能基，例如羥基，或通常為一個鍵。有些實施例中，「系鏈附接點」(TAP)係指環狀載劑之組成環原子，例如碳原子或雜原子(不同於提供主幹附接點之原子)，其連接所選定之部份體。該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。該選定之部份體可視需要利用穿插之系鏈連接該環狀載劑。因此該環狀載劑經常包括適合引進或系鏈另一個化學部份體(例如配體)至組成環之官能基，例如胺基，或通常提供一個鍵。

【0267】 RNAi 劑可能利用載劑接合配體，其中該載劑可為環狀基團或無環基團；較佳為該環狀基團係選自：吡咯啉基、吡唑啉基、吡唑啉基、咪唑啉基、咪唑啉基、嘧啶基、嘧啶基、[1,3]二氧雜環戊烷、嘧啶基、異嘧啶

啖基、嗎啉基、噻唑啖基、異噻唑啖基、喹啉基、嗒咩酮基、四氫呋喃基、與蔡滿；較佳係該無環基團係選自：絲胺醇主幹或二乙醇胺主幹。

【0268】 某些明確實施例中，例如本發明方法所使用之 RNAi 劑為表 1 所列製劑之群中。此等製劑可進一步包含配體。

【0269】 一項實施例中，RNAi 劑之反義股包含選自下列各物所組成群中之核苷酸序列：

5'- usCfsuugguuacaugAfaaucccasusc-3' (SEQ ID NO：6)、
5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO：7)、
5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO：8)、與
5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO：9)，其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鏈結基；及 VP 為 5'-磷酸酯擬似物。

【0270】 一項實施例中，RNAi 劑之正義股與反義股包含選自下列各物所組成群中之核苷酸序列：

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO：10)與
5'- usCfsuugguuacaugAfaaucccasusc-3' (SEQ ID NO：6)；
5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO：10)與
5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO：7)；
5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO：10)與

5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3'(SEQ ID NO : 8) ; 及

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO : 10)與

5'-VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3'(SEQ ID NO :

9) , 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、

或 U ; Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U ; 及 s

為硫代磷酸酯鏈結基 ; 及 VP 為 5'-磷酸酯擬似物。另一項

實施例中 , 正義股與反義股包含核苷酸序列 5'-

usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO : 10) 與

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO :

7) , 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、

或 U ; Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U ; 及 s

為硫代磷酸酯鏈結基。

【0271】 又另一項實施例中 , 正義股與反義股包含核苷酸序列

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96-3' (SEQ ID NO : 15)

與 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3'(SEQ ID NO :

7) , 其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、

或 U ; Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U ; 及 s

為硫代磷酸酯鏈結基。又另一項實施例中 , 該 RNAi 劑為

AD-65492。

【0272】

V. iRNA 接合配體

本發明 iRNA 中 RNA 之另一種修飾涉及化學鏈結 RNA

與一個或多個可加強 iRNA 之活性、細胞分佈或細胞吸收之配體、部份體或接合物。此等部份體包括但不限於脂質部份體，如：膽固醇部份體(Letsinger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86 : 6553-6556)、膽酸(Manoharan 等人，*Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4 : 1053-1060)、硫醚，例如己基-S-三苯甲基硫醇(*beryl-S-tritylthiol*) (Manoharan 等人，*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660 : 306-309；Manoharan 等人，*Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3 : 2765-2770)、硫膽固醇(Oberhauser 等人，*Nucl. Acids Res.*, 1992, 20 : 533-538)、脂系鏈，例如十二碳烷二醇或十一碳烷基(Saison-Behmoaras 等人，*EMBO J*, 1991, 10 : 1111-1118；Kabanov 等人，*FEBS Lett.*, 1990, 259 : 327-330；Svinarchuk 等人，*Biochimie*, 1993, 75 : 49-54)、磷脂，例如二-十六碳烷基-消旋性-甘油或 1,2-二-O-十六碳烷基-消旋性-甘油基-3-磷酸三乙基銨鹽(Manoharan 等人，*Tetrahedron Lett.*, 1995, 36 : 3651-3654；Shea 等人，*Nucl. Acids Res.*, 1990, 18 : 3777-3783)、多元胺或聚乙二醇鏈(Manoharan 等人，*Nuclosides & Nuclotides*, 1995, 14 : 969-973)、或金剛烷乙酸(Manoharan 等人，*Tetrahedron Lett.*, 1995, 36 : 3651-3654)、棕櫚基部份體(Mishra 等人，*Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264 : 229-237)、或十八碳烷基胺或己基胺基-羰基氧膽固醇部份體(Crooke 等人，*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277 : 923-937)。

【0273】 一項實施例中，iRNA 劑引進配體後會改變

其分佈、靶向或壽命。較佳實施例中，相較於例如沒有此等配體之物種，該等配體可加強對所選定標靶(例如對分子、細胞或細胞型態、隔室(例如細胞或器官隔室)、組織、器官或身體區域)之親和性。較佳配體將不會參與雙螺旋核酸中之雙螺旋配對。

【0274】 配體可包括天然物質，如：蛋白質(例如人類血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)、或球蛋白)；碳水化合物(例如葡聚糖、普藍多醣(pullulan)、幾丁質、幾丁聚醣、菊糖、環糊精、N-乙醯基半乳糖胺或玻尿酸)；或脂質。配體亦可為重組或合成性分子，如：合成性聚合物，例如合成性聚胺基酸。聚胺基酸實例包括聚離胺酸(PLL)、聚 L-天冬胺酸、聚 L-麩胺酸等聚胺基酸；苯乙烯-馬來酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-馬來酸酐共聚物、N-(2-羥基丙基)甲基丙烯基醯胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚胺基甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-異丙基丙烯基醯胺聚合物、或聚磷腈。多元胺實例包括：聚乙烯亞胺、聚離胺酸(PLL)、精胺、精脒、多元胺、偽肽-多元胺、肽擬似性多元胺、樹枝狀多元胺、精胺酸、脒、魚精蛋白、陽離子性脂質、陽離子性紫質、多元胺之四級鹽、或 α 螺旋肽。

【0275】 配體亦可包括靶向基團，例如細胞或組織靶向劑，例如凝集素、醣蛋白、脂質或蛋白質，例如會結合特定細胞型態(如：腎臟細胞)之抗體。靶向基團可為促甲狀腺激素、促黑激素、凝集素、醣蛋白、表面活性蛋白

質 A、黏蛋白碳水化合物、多價乳糖、單價半乳糖、N-乙醯基-半乳糖胺、N-乙醯基-葡萄糖胺、多價甘露糖、多價岩藻糖、糖基化聚胺基酸、多價半乳糖、轉鐵蛋白、雙膦酸酯、聚麩胺酸、聚天冬胺酸、脂質、膽固醇、類固醇、膽汁酸、葉酸鹽、維生素 B12、維生素 A、生物素、或 RGD 肽或 RGD 肽擬似物。某些實施例中，配體包括單價或多價半乳糖。某些實施例中，配體包括膽固醇。

【0276】 其他配體實例包括染料、螯合劑(例如吡啶類)、交鏈劑(例如補骨脂內酯(psoralene)、絲裂黴素 C)、紫質(TPPC4、德卟啉(texaphyrin)、嚙啉(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(例如膽固醇、膽酸、金剛烷乙酸、1-萘丁酸、雙氫甾酮、1,3-雙-O(十六碳烷基)甘油、香葉草基氧己基、十六碳烷基甘油、龍腦、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七碳烷基、棕櫚酸、肉豆蔻酸、O3-(油基)石膽酸、O3-(油基)膽烯酸、二甲氧基三苯甲基、或吩吡)與肽接合物(例如觸足肽(antennopodia)、Tat 肽)、烷化劑、磷酸鹽、胺基、氫硫基、PEG(例如 PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚胺基、烷基、經取代之烷基、標記放射性之標記物、酵素、半抗原(例如生物素)、運載/吸收促進劑(例如阿斯匹靈、維生素 E、葉酸)、合成性核糖核酸酶(例如咪唑、雙咪唑、組織胺、咪唑簇集物、吡啶-咪唑接合物、四氫雜大環之 Eu³⁺複合物)、二硝基苯基、HRP、或 AP。

【0277】 配體可為蛋白質(例如醣蛋白)、或肽(例如

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

【0278】 配體可為例如可藉由例如破壞細胞之細胞骨架，例如破壞細胞之微小管、微絲、與/或中間絲而促進細胞吸收 iRNA 劑之藥物物質。該藥物可為例如紫杉酚(taxon)、長春新鹼、長春花鹼、細胞鬆弛素(cytochalasin)、諾考達唑(nocodazole)、促進微絲聚合劑(japlakinolide)、微絲解聚劑(latrunculin A)、毒傘素(phalloidin)、紅海海綿抗菌素(swinholide A)、茛酮衍生物(indanocine)、或邁爾素(myoservin)。

【0279】 有些實施例中，附接本文所說明 iRNA 之配體之作用為藥物動力學調控劑(PK 調控劑)。PK 調控劑包括：親脂物、膽汁酸、類固醇、磷脂類似物、肽類、蛋白質結合劑、PEG、維生素等等。PK 調控劑實例包括但不限於膽固醇、脂肪酸、膽酸、石膽酸、二烷基甘油酯、二醯基甘油酯、磷脂類、鞘脂類、納普生(naproxen)、布洛芬(ibuprofen)、維生素 E、生物素等等。亦已知包含許多硫代磷酸酯鏈結基之寡核苷酸可以結合血清蛋白質，因此在主幹中包含許多硫代磷酸酯鏈結基之短寡核苷酸，例如約

5 個鹼基、10 個鹼基、15 個鹼基或 20 個鹼基之寡核苷酸亦適用為本發明之配體(例如作為 PK 調控配體)。此外，在本文說明之實施例中，可結合血清組份(例如血清蛋白質)之適體亦適用為 PK 調控配體。

【0280】 本發明配體-接合寡核苷酸可利用帶有側接反應性官能基之寡核苷酸合成，如：由鏈結分子附接在寡核苷酸上所衍生者(如下文說明)。此反應性寡核苷酸可能直接與自商品取得之配體、經由合成而帶有任何各種不同保護基之配體、或已附接鏈結性部份體之配體反應。

【0281】 本發明接合物所使用之寡核苷酸可能適宜且照例採用習知之固相合成技術製造。此等合成法之儀器係由數個供應商提供，包括例如 Applied Biosystems (Foster City, Calif.)。亦可額外使用或改用相關技藝上已知任何其他方式進行此等合成法。亦已知使用類似技術來製備其他寡核苷酸，如：硫代磷酸酯與烷基化衍生物。

【0282】 本發明配體-接合寡核苷酸與帶有配體分子之序列專一性鏈結核苷中，可能在合適之 DNA 合成儀，利用標準核苷酸或核苷前體、或已經帶有鏈結性部份體之核苷酸或核苷接合物前體、已經帶有配體分子之配體-核苷酸或核苷-接合物前體、或帶有非核苷配體之構成嵌段組裝成寡核苷酸與寡核苷。

【0283】 當使用已經帶有鏈結性部份體之核苷酸-接合物前體時，通常先完成與序列專一性鏈結之核苷之合成法，然後由配體分子與鏈結性部份體反應，形成配體-接合

寡核苷酸。有些實施例中，本發明寡核苷酸或鏈結核苷係採用自動化合成儀，除了使用可自商品購得常用於合成寡核苷酸之標準亞胺基磷酸酯與非標準亞胺基磷酸酯外，尚可使用衍生自配體-核苷接合物之亞胺基磷酸酯合成。

【0284】

A. 脂質接合物

一項實施例中，配體或接合物為脂質或基於脂質之分子。此等脂質或基於脂質之分子較佳係與血清蛋白質，例如人類血清白蛋白(HSA)結合。HSA 結合性配體可以讓接合物分佈在標靶組織上，例如身體之非腎臟標靶組織。例如該標靶組織可為肝臟，包括肝之實質細胞。其他可結合 HAS 之分子亦可作為配體使用。例如可使用納普生(naproxen)或阿斯匹靈。脂質或基於脂質配體可以(a)提高接合物對降解之抗性，(b)提高靶向或轉運至標靶細胞或細胞膜，及/或(c)可用於調整與血清蛋白質(例如 HAS)之結合性。

【0285】 基於脂質之配體可用於抑制(例如調控)接合物與標靶組織之結合性。例如脂質或基於脂質之配體與 HAS 之結合性越強時，越不容易靶向腎臟，因此越不容易從身體清除。與 HAS 之結合性較低之脂質或基於脂質配體可用於讓該接合物靶向腎臟。

【0286】 一項較佳實施例中，該基於脂質之配體會結合 HAS。較佳係其與 HAS 具有充份親和性，以使該接合物較佳係分佈至非腎臟組織。然而，該親和性最好不會太強導致無法逆轉 HSA-配體結合性。

【0287】 另一項較佳實施例中，該基於脂質配體與 HAS 之親和性弱或完全沒有親和性，因此該接合物將會優先分佈至腎臟。除了基於脂質之配體外，亦可改用或額外使用其他靶向腎臟細胞之部份體。

【0288】 另一項態樣中，該配體為例如維生素之部份體，其可被標靶細胞(例如增生細胞)吸收。其等特別適用於治療特徵在於不期望之細胞增生之病變，例如惡性或非惡性型，例如癌細胞。維生素實例包括維生素 A、E、與 K。其他可被標靶細胞(如：肝細胞)吸收之維生素實例包括 B 維生素，例如葉酸、B12、核黃素、生物素、吡哆醛或其他維生素，或營養素。亦包括 HSA 與低密度脂蛋白 (LDL)。

【0289】

B. 細胞滲透劑

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

【0290】 配體可為肽或肽擬似物。肽擬似物(本文亦稱為寡肽擬似物)為可以折疊成類似天然肽之限定三度空間結構之分子。在 iRNA 劑上附接肽及肽擬似物時，可以藉由如：加強細胞辨識與吸收來影響 iRNA 之藥物動力學分佈性。該肽或肽擬似部份體之長度可為約 5 至 50 個胺基

酸，例如長度約 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 個胺基酸。

【0291】 肽或肽擬似物可為例如細胞滲透肽、陽離子性肽、兩親性肽、或疏水性肽(例如主要由 Tyr、Trp 或 Phe 組成)。肽部份體可為樹枝狀肽、限定構象肽或交鏈肽。或者，肽部份體可包括疏水性跨膜序列(MTS)。含疏水性 MTS 之肽實例為具有下列胺基酸序列之 RFGF：AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO: 11)。含有疏水性 MTS 之 RFGF 類似物(例如胺基酸序列 AALLPVLLAAP(SEQ ID NO: 12)亦可作為靶向部份體。該肽部份體可為「傳遞」肽，其可攜帶大型極性分子(包括肽、寡核苷酸與蛋白質)穿越細胞膜。已發現例如來自 HIV Tat 蛋白質(GRKKRRQRRRPPQ)(SEQ ID NO: 13)及果蠅觸足肽(*Drosophila antennapedia*)蛋白質(RQIKIWFQNRRMKWKK)(SEQ ID NO: 14)之序列具有作為傳遞肽之功能。肽或肽擬似物可由 DNA 之隨機序列編碼，如：從噬菌體展示庫或一樹脂球一種化合物(one-bead-one-compound(OBOC))組合庫(Lam 等人，*Nature*, 354 : 82-84, 1991)判別之肽。為了靶向細胞目的而藉由引進之單體單位與 dsRNA 劑系鏈之肽或肽擬似物實例為精胺酸-甘胺酸-天冬胺酸(RGD)-肽、或 RGD 擬似物。肽部份體之長度範圍可為約 5 個胺基酸至約 40 個胺基酸。該肽部份體可具有結構修飾，如：供提高安定性或主導構型性質。可採用下文說明之任何結構修飾法。

【0292】 本發明組成物與方法所使用之 RGD 肽可為

線性或環狀，且可經過修飾，例如糖基化或甲基化，以促進靶向特定組織(群)。包含 RGD 之肽與肽擬似物可包括 D-胺基酸及合成性 RGD 擬似物。除了 RGD 外，尚可使用靶向整合素配體之其他部份體。此配體之較佳接合物係靶向 PECAM-1 或 VEGF。

【0293】 「細胞滲透性肽」可以通透細胞，例如微生物細胞，如：細菌或真菌細胞，或哺乳動物細胞，如：人類細胞。可通透微生物細胞之肽可為例如 α -螺旋線性肽(例如 LL-37 或 Ceropin P1)、包含二硫鍵之肽(例如 α -防禦素(defensin)、 β -防禦素或制菌肽(bactenecin))，或僅包含一個或兩個主要胺基酸之肽(例如 PR-39 或吲哚抗生肽(indolicidin))。細胞滲透性肽亦可包括核定位訊號(NLS)。例如細胞滲透性肽可為二部組合之兩親性肽，如：MPG，其係衍生自 HIV-1 gp41 與 SV40 大型 T 抗原之 NLS 之融合肽功能域(Simeoni 等人，Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003)。

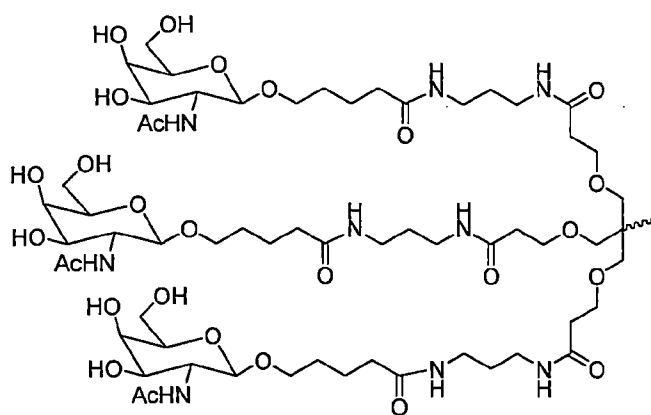
【0294】

C. 碳水化合物接合物

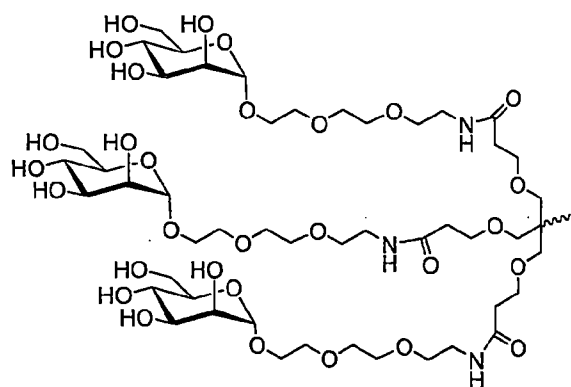
本發明組成物與方法之有些實施例中，iRNA 寡核苷酸進一步包含碳水化合物。接合碳水化合物之 iRNA 適合在活體內傳遞核酸，且其組成物適合活體內之醫療用途，如本文所說明。本文所採用「碳水化合物」係指其本身即為由一個或多個具有至少 6 個碳原子(其可為線性、分支或環狀)且在各碳原子上鍵結氧、氮或硫原子之單糖單位所組

成碳水化合物之化合物；或具有由一個或多個具有至少 6 個碳原子(其可為線性、分支或環狀)且在各碳原子上鍵結氧、氮或硫原子之單糖單位所組成之碳水化合物部分體作為其中一部份之化合物。代表性碳水化合物包括糖類(單糖、雙糖、參糖與包含約 4、5、6、7、8、或 9 個單糖單位之寡糖類)，與多糖類，如：澱粉、肝糖、纖維素與多醣膠質。明確之單糖包括 TTR 與更多碳(例如 TTR、C6、C7、或 C8)之糖類；雙糖與參糖包括具有兩個或三個該單糖單位之糖類(例如 TTR、C6、C7、或 C8)。

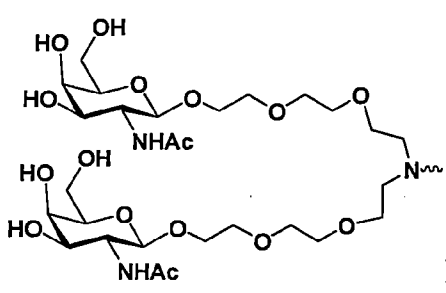
【0295】 一項實施例中，本發明組成物與方法所使用之碳水化合物接合物為單糖。另一項實施例中，本發明組成物與方法所使用之碳水化合物接合物係選自下列各物所組成之群中：



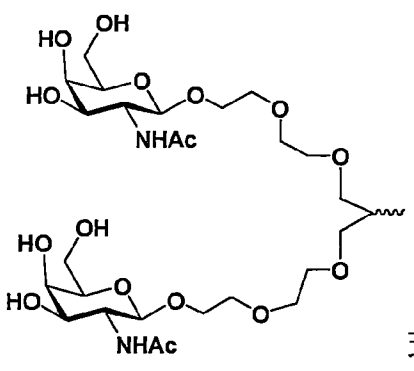
式 II，



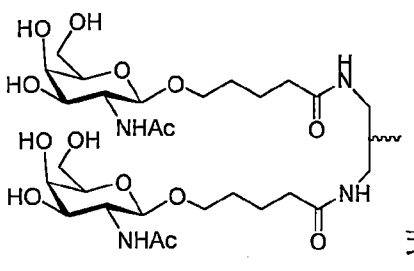
式 III，



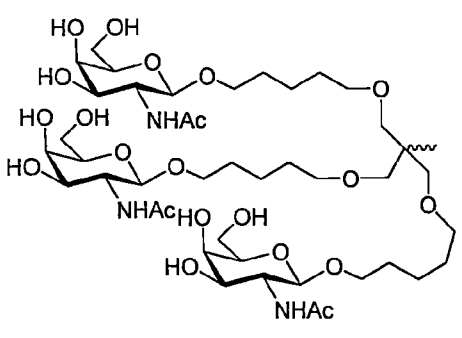
式 IV ,



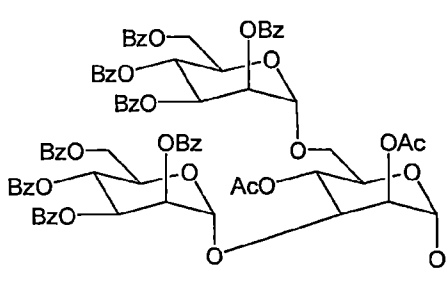
式 V ,



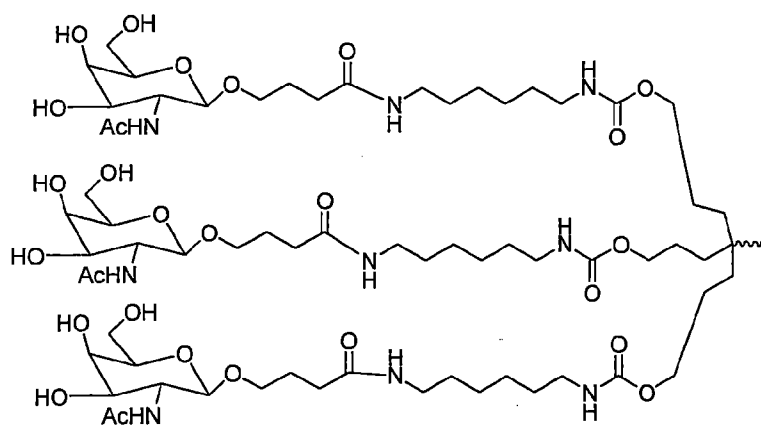
式 VI ,



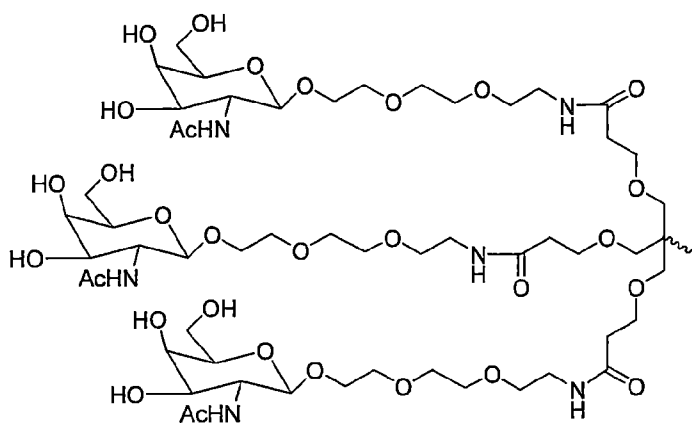
式 VII ,



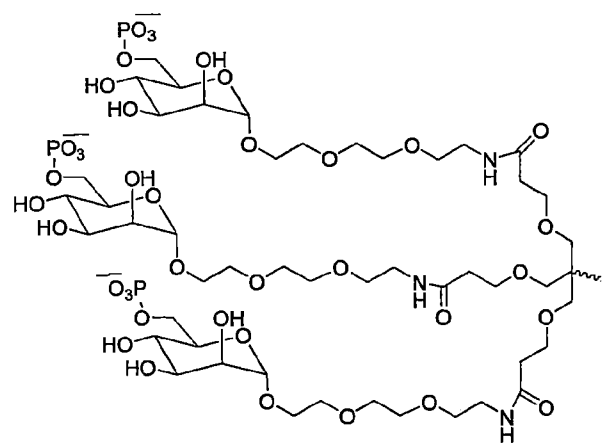
式 VIII ,



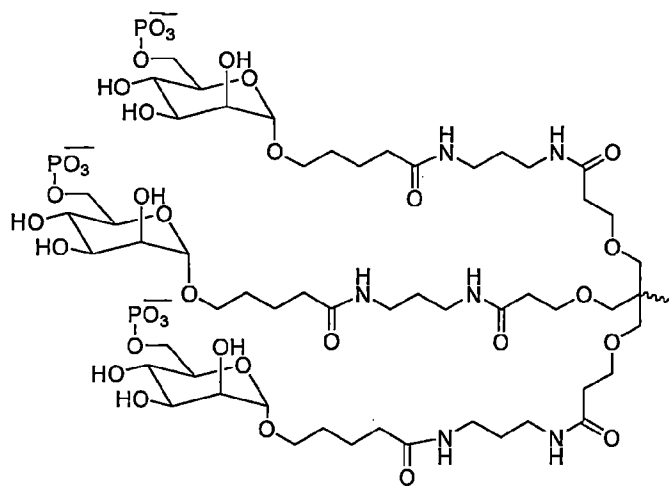
式 IX ,



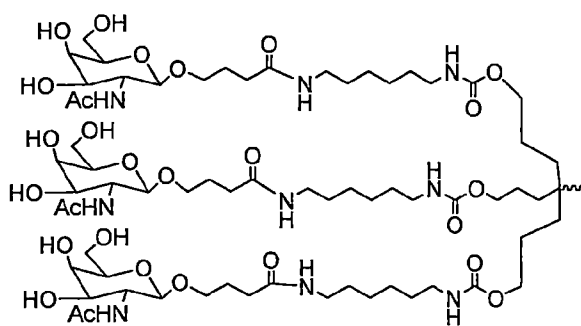
式 X ,



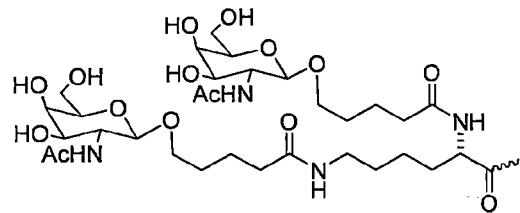
式 XI ,



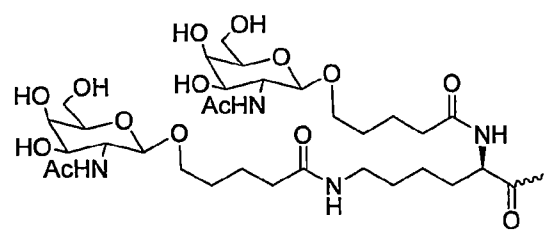
式 XII ,



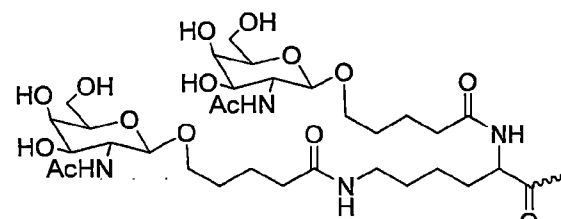
式 XIII ,



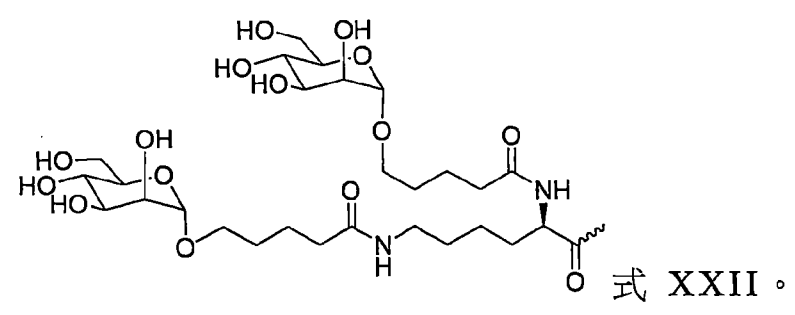
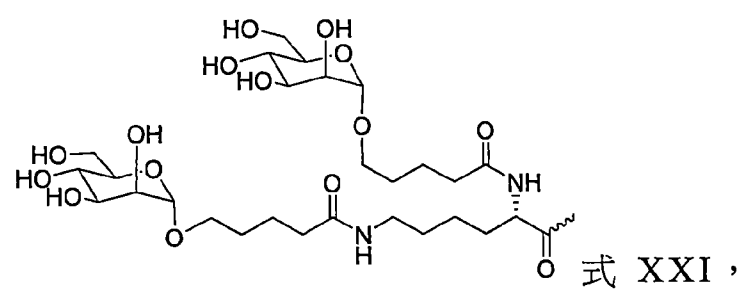
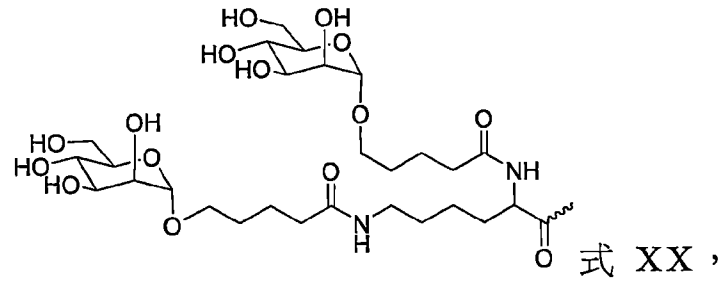
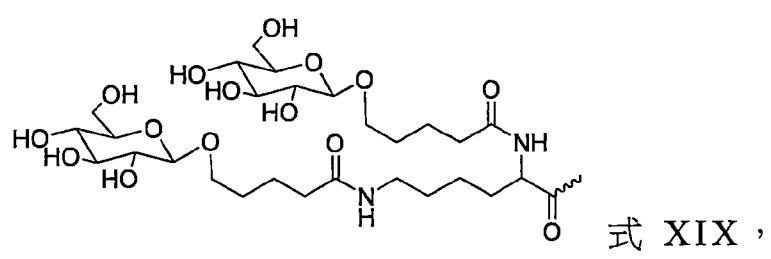
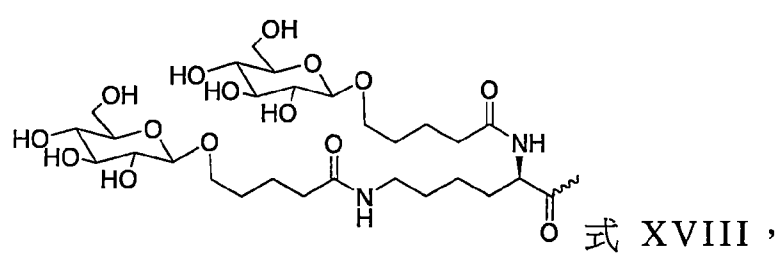
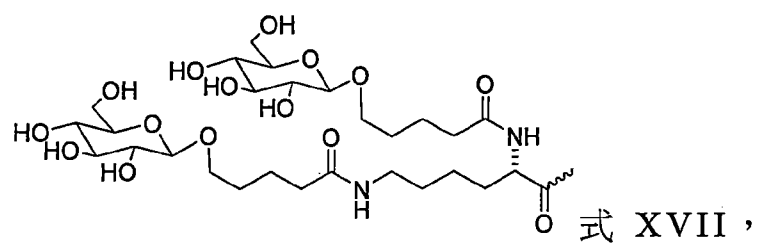
式 XIV ,



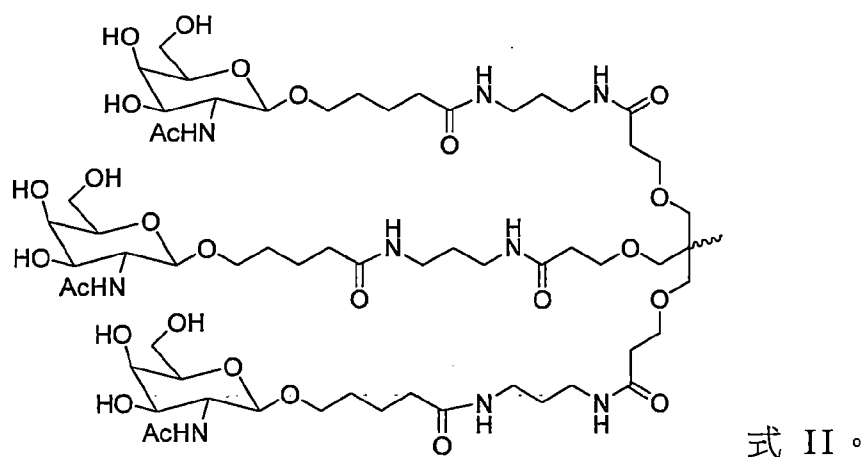
式 XV ,



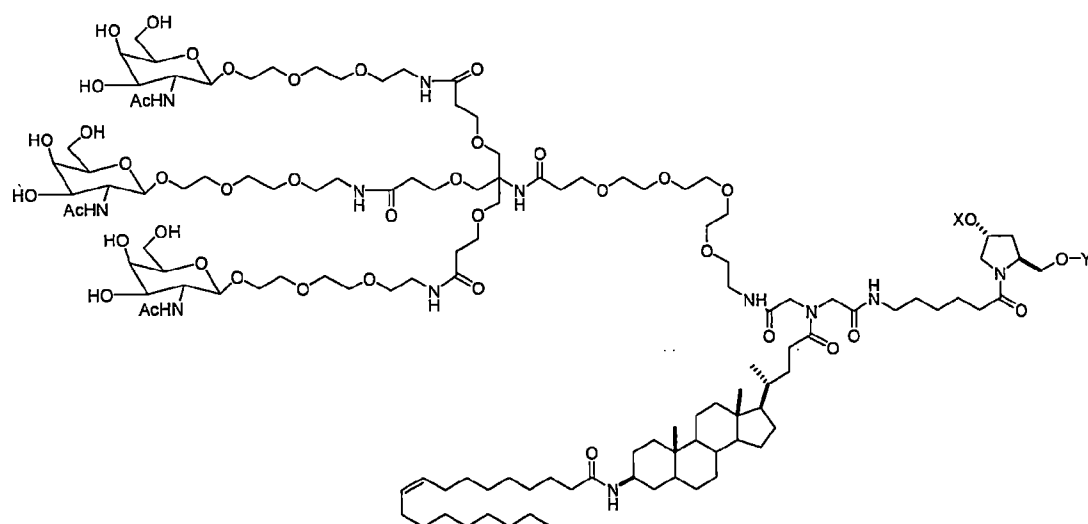
式 XVI ,



【0296】 一項實施例中，單糖為 N-乙醯基半乳糖胺，
如：



【0297】 本文所說明實施例可使用之另一項代表性
碳水化合物接合物包括但不限於



(式 XXIII)，當 X 或 Y 中之一為寡核苷酸時，另一個
為氫。

【0298】 本發明某些實施例中，GalNAc 或 GalNAc
衍生物係利用單價鏈結體附接本發明 iRNA 劑。有些實施
例中，GalNAc 或 GalNAc 衍生物係利用二價鏈結體附接本
發明 iRNA 劑。又另一項本發明實施例中，GalNAc 或
GalNAc 衍生物係利用三價鏈結體附接本發明 iRNA 劑。

【0299】 一項實施例中，本發明雙股 RNAi 劑包含一個 GalNAc 或 GalNAc 衍生物附接 iRNA 劑。另一項實施例中，本發明雙股 RNAi 劑包含複數個(例如 2、3、4、5、或 6 個)GalNAc 或 GalNAc 衍生物，各分別獨立利用複數個單價鏈結體附接該雙股 RNAi 劑之複數個核苷酸。

【0300】 有些實施例中，例如當本發明 iRNA 劑之兩股成為一個更大分子之一部份，利用一股的 3'-端與另一股的 5'-端之間未被中斷之核苷酸鏈連接形成髮夾環時，其包含複數個未配對之核苷酸，該髮夾環內各未配對之核苷酸可分別獨立包含利用單價鏈結體附接之 GalNAc 或 GalNAc 衍生物。該髮夾環亦可由雙螺旋之一股中延伸之突出形成。

【0301】 有些實施例中，碳水化合物接合物進一步包含一個或多個其他上述配體，如但不限於 PK 調控劑與/或細胞滲透性肽。

【0302】 其他適用於本發明之碳水化合物接合物包括彼等說明於 PCT 公開案案號 WO 2014/179620 與 WO 2014/179627 者，其等完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0303】

D. 鏈結體

有些實施例中，本文說明之接合物或配體可利用各種不同可以裂解或不可裂解之鏈結體附接 iRNA 寡核苷酸。

【0304】 術語「鏈結體」或「鏈結基」意指連接化合物之兩個部份之有機部份體，例如共價附接化合物之兩

個部份。該鏈結體通常包含一個直接鍵結或原子(如：氧或硫)、單位(如： NR_8 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 SO 、 SO_2 、 SO_2NH 或原子鏈)，如但不限於經取代或未經取代之烷基、經取代或未經取代之烯基、經取代或未經取代之炔基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、雜芳基烷基、雜芳基烯基、雜芳基炔基、雜環基烷基、雜環基烯基、雜環基炔基、芳基、雜芳基、雜環基、環烷基、環烯基、烷基芳基烷基、烷基芳基烯基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基雜芳基烷基、烷基雜芳基烯基、烷基雜芳基炔基、烯基雜芳基烷基、烯基雜芳基烯基、烯基雜芳基炔基、炔基雜芳基烷基、炔基雜芳基烯基、炔基雜芳基炔基、烷基雜環基烷基、烷基雜環基烯基、烷基雜環基炔基、烯基雜環基烷基、烯基雜環基烯基、烯基雜環基炔基、炔基雜環基烷基、炔基雜環基烯基、炔基雜環基炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基雜芳基、烯基雜芳基、炔基雜芳基，其中一個或多個亞甲基可穿插或末端為 O 、 S 、 $\text{S}(\text{O})$ 、 SO_2 、 $\text{N}(\text{R}_8)$ 、 $\text{C}(\text{O})$ 、經取代或未經取代之芳基、經取代或未經取代之雜芳基、經取代或未經取代之雜環；其中 R_8 為氫、鹼基、脂系或經取代之脂系。一項實施例中，鏈結體為約 1-24 個原子、2-24、3-24、4-24、5-24、6-24、6-18、7-18、8-18 個原子之間、7-17、8-17、6-16、7-16、或 8-16 個原子之間。

【0305】 可裂解之鏈結基為在細胞外具有充份安定

性，但當進入標靶細胞內時即會裂解而釋出鏈結體所共同固定之兩個部份之基團。較佳實施例中，可裂解之鏈結基在標靶細胞中或在第一參考條件(其可為例如選擇模擬或代表細胞內條件)之裂解速度比在個體血液中或在第二參考條件(其可為例如選擇模擬或代表血液或血清中之條件)至少快約 10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍或更多倍，或至少快約 100 倍。

【0306】 可裂解性鏈結基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高於其在血清或血液中。此等降解劑實例包括：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可經氧化還原性裂解之鏈結基；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。

【0307】 可裂解性鏈結基(如：二硫鍵)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。有些鏈結體具有可在較佳 pH 裂解之可裂解性鏈結基，藉以在細胞內從配體釋放陽離子性脂質，或進入所需之細胞隔室內。

【0308】 鏈結體可包括可被特定酵素裂解之可裂解

性鏈結基。引進鏈結體中之可裂解性鏈結基型態依所靶向之細胞而定。例如靶向肝之配體可透過包含酯基之鏈結體鏈結陽離子性脂質。肝細胞富含酯酶，因此該鏈結體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。其他富含酯酶之細胞型態包括肺、腎皮質與睪丸之細胞。

【0309】 當靶向富含肽酶之細胞型態(如：肝細胞與滑液膜細胞)時，可使用包含肽鍵之鏈結體。

【0310】 通常，測試降解劑(或條件)裂解候選鏈結基之能力，以分析該候選之可裂解性鏈結基之合適性。亦需要亦測試候選之可裂解性鏈結基於血液中或當與其他非標靶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。該分析法可於無細胞系統、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。其適用於在無細胞或培養條件下進行初次分析，並進一步在完整動物體內確認。較佳實施例中，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)至少快約 2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90、或約 100 倍。

【0311】

i. 可經氧化還原裂解之鏈結基

一項實施例中，可裂解性鏈結基為可經氧化還原裂解之鏈結基，亦即可在還原或氧化時裂解。可經還原性裂解之鏈結基實例為二硫鏈結基(-S-S-)。可參見本文說明之方法來決定該候選之可裂解性鏈結基是否為合適之「可經還原性裂解之鏈結基」，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。其中一種候選化合物在血液中至多裂解約 10%。其他實施例中，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)至少快約 2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90、或約 100 倍。候選化合物之裂解速度可採用標準酵素動力學分析法，在選擇擬似細胞內基質條件下分析，並與選擇擬似細胞外基質之條件下之結果比較。

【0312】

ii. 基於磷酸酯之可裂解性鏈結基

另一項實施例中，可裂解性鏈結體包含基於磷酸酯之可裂解性鏈結基。基於磷酸酯之可裂解性鏈結基係被可降解或水解磷酸酯之製劑裂解。該可於細胞中裂解磷酸酯之製劑實例為如：細胞中之磷酸酶之酵素。基於磷酸酯之鏈結基實例為 -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-。較佳實施例為
 -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-。較佳實施例為-O-P(O)(OH)-O-。此等候選物可採用類似上述之方法分析。

【0313】

iii. 酸可裂解之鏈結基

另一項實施例中，該可裂解性鏈結體包含酸可裂解之鏈結基。酸可裂解之鏈結基為可在酸性條件下裂解之鏈結基。較佳實施例中，酸可裂解之鏈結基為在 pH 約 6.5 或更低(例如約 6.0、5.75、5.5、5.25、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，明確之低 pH 細胞器(如：核內體與溶小體)可為該酸可裂解之鏈結基提供裂解環境。該酸可裂解之鏈結基實例包括但不限於脙類、酯類及胺基酸之酯類。酸可裂解之基團具有通式-C=NN-、C(O)O，或-OC(O)。較佳實施例為當附接酯之氧(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。

【0314】

iv. 基於酯之鏈結基

另一項實施例中，可裂解性鏈結基包含基於酯之可裂解性鏈結基。該基於酯之可裂解性鏈結基可被細胞中如酯酶與醯胺酶之酵素裂解。基於酯之可裂解性鏈結基實例包括但不限於伸烷基、伸烯基與伸炔基之酯類。可裂解之酯鏈結基具有通式 $-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-$ 。此等候選物可採用類似彼等上述方法分析。

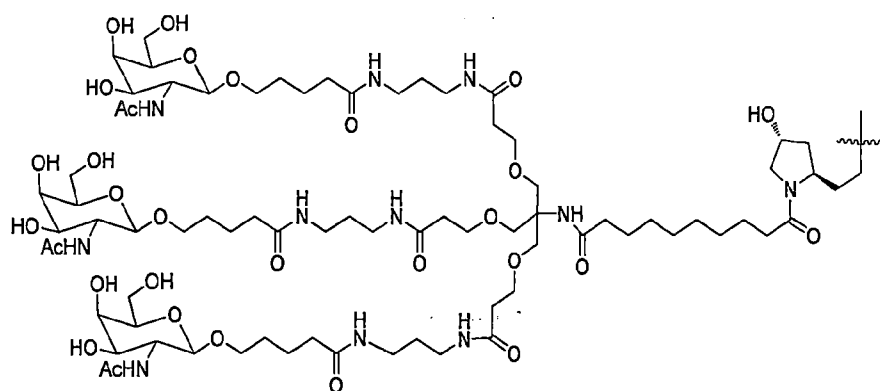
【0315】

v. 基於肽之裂解基

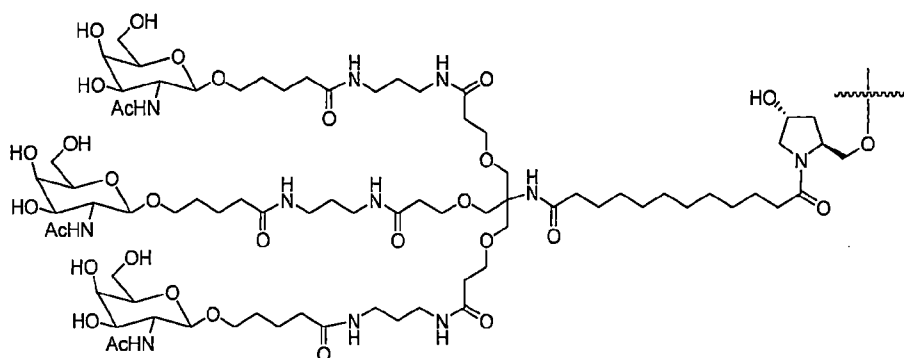
再另一項實施例中，該可裂解之鏈結體包含基於肽之可裂解性鏈結基。該基於肽之可裂解性鏈結基可被細胞中如：肽酶與蛋白酶之酵素裂解。該基於肽之可裂解性鏈結基係在胺基酸之間為了產生寡肽(例如二肽、三肽等等)與多肽所形成之肽鍵。該基於肽之可裂解基團不包括醯胺基 $(-C(O)NH-)$ 。醯胺基可在任何伸烷基、伸烯基或伸炔基之間形成。肽鍵係在胺基酸之間為了產生肽與蛋白質所形成之一種特別型態之醯胺鍵。該基於肽之裂解基團通常限於在胺基酸之間為了產生肽與蛋白質所形成之肽鍵(亦即醯胺鍵)，且不包括整個醯胺官能基。該基於肽之可裂解性鏈結基具有通式 $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ ，其中 RA 與 RB 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。

【0316】 一項實施例中，本發明 iRNA 透過鏈結體接

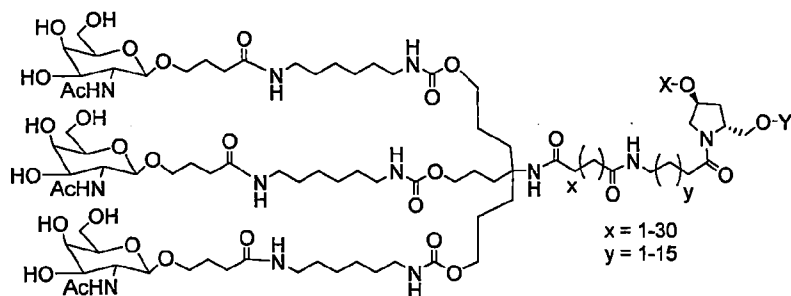
合碳水化合物。使用本發明組成物與方法之鏈結體之 iRNA
碳水化合物接合物之無限制實例包括但不限於



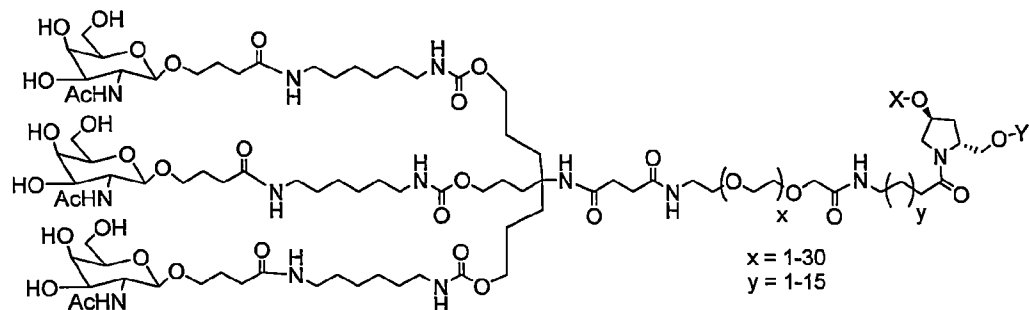
(式 XXIV) ,



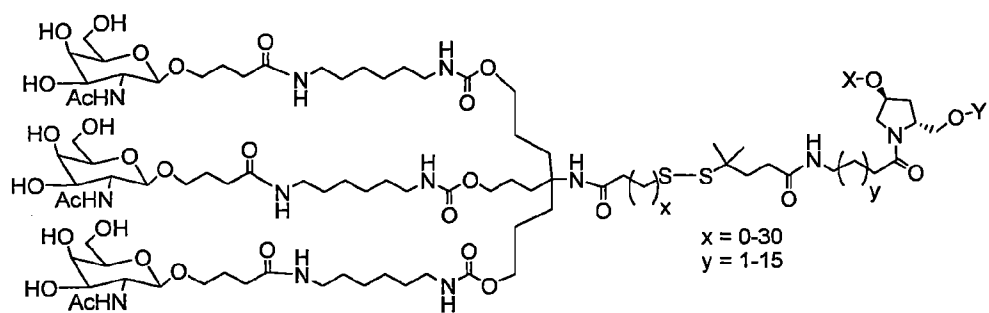
(式 XXV) ,



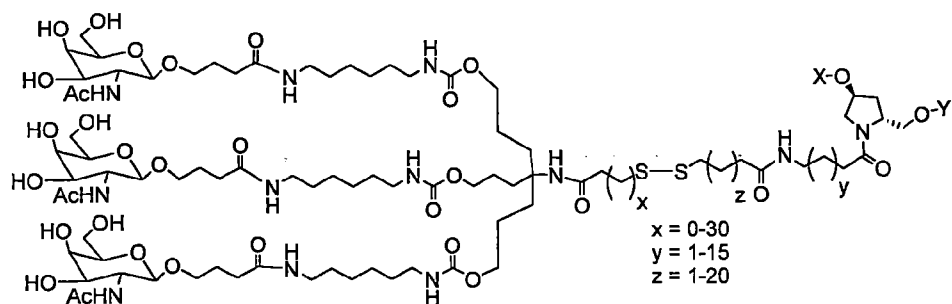
(式 XXVI) ,



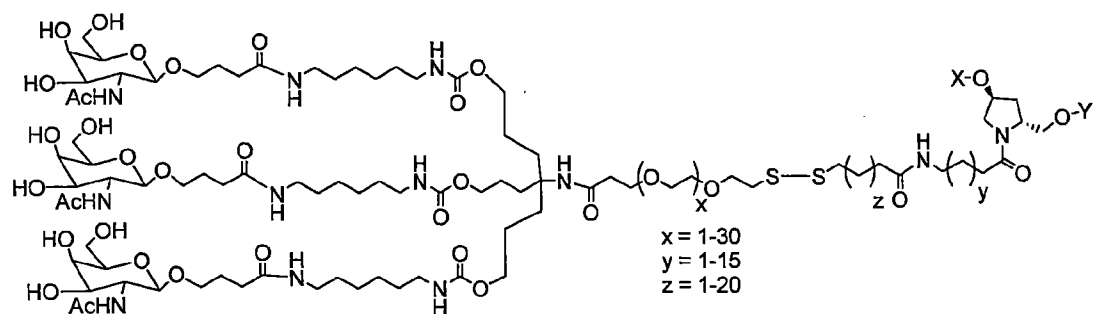
(式 XXVII) ,



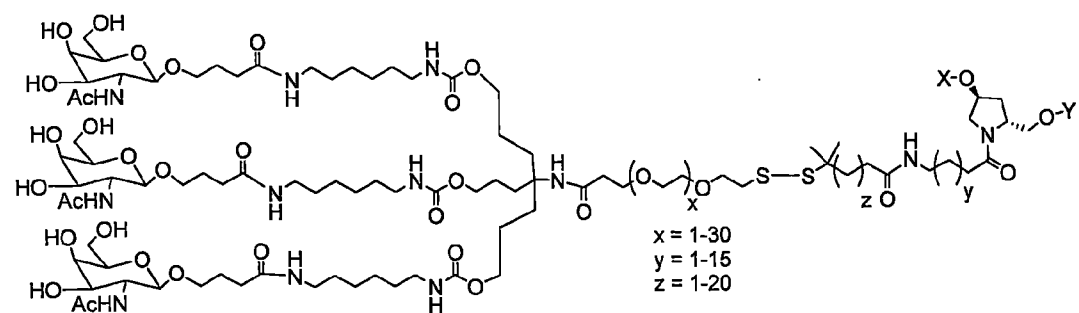
(式 XXVIII) ,



(式 XXIX) ,



(式 XXX) , 與



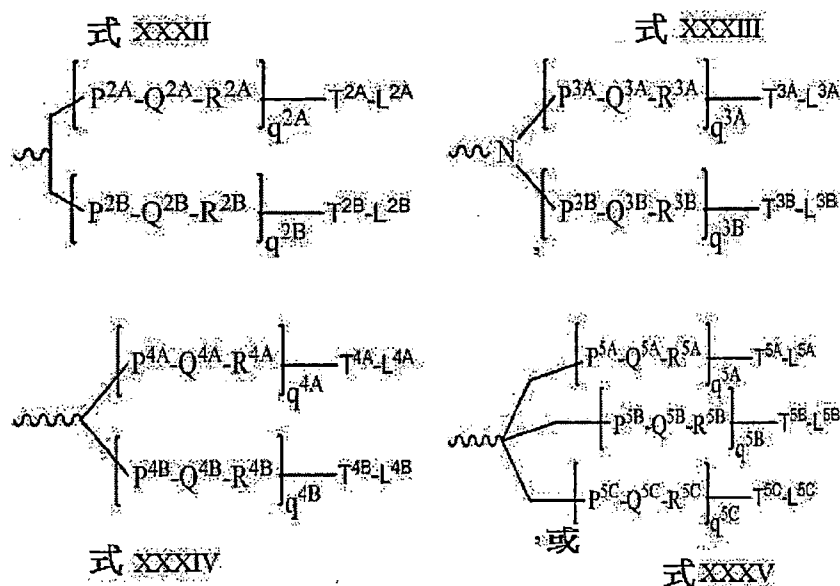
(式 XXXI) ,

【0317】 當 X 或 Y 中之一為寡核苷酸時，另一個為氫。

【0318】 本發明組成物與方法之某些實施例中，配體係透過二價或三價之分支鏈結體附接之一或多個

「GalNAc」(N-乙醯基半乳糖胺)衍生物。

【0319】 一項實施例中，本發明 dsRNA 係接合二價或三價之分支鏈結體，其係選自式(XXXII)-(XXXV)中任一式所示結構之群中：



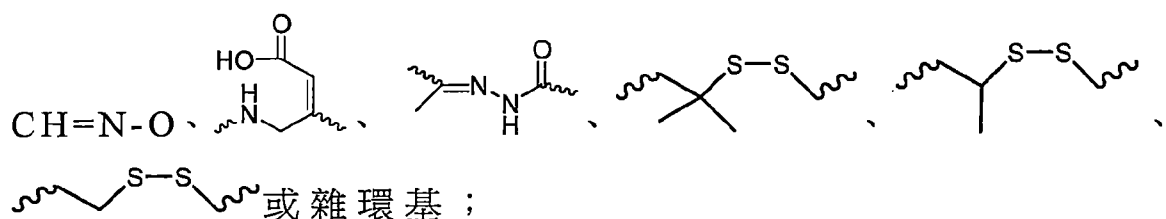
其中：

q2A、q2B、q3A、q3B、q4A、q4B、q5A、q5B 及 q5C 每次出現時，分別獨立代表 0 至 20，且其中重複單位可相同或不同；

P^{2A}、P^{2B}、P^{3A}、P^{3B}、P^{4A}、P^{4B}、P^{5A}、P^{5B}、P^{5C}、T^{2A}、T^{2B}、T^{3A}、T^{3B}、T^{4A}、T^{4B}、T^{5A}、T^{5B}、T^{5C} 每次出現時，分別獨立為不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NH 或 CH₂O；

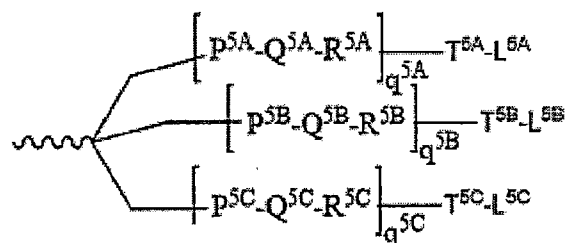
Q^{2A}、Q^{2B}、Q^{3A}、Q^{3B}、Q^{4A}、Q^{4B}、Q^{5A}、Q^{5B}、Q^{5C} 每次出現時分別獨立為不存在、伸烷基、經取代之伸烷基，其中可在一個或多個亞甲基中穿插或末端基團為一個或多個 O、S、S(O)、SO₂、N(R^N)、C(R')=C(R'')、C≡C 或 C(O)；

R^{2A} 、 R^{2B} 、 R^{3A} 、 R^{3B} 、 R^{4A} 、 R^{4B} 、 R^{5A} 、 R^{5B} 、 R^{5C} 每次出現時，分別獨立為不存在、NH、O、S、 CH_2 、 $C(O)O$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHCH(R^a)C(O)$ 、 $-C(O)-CH(R^a)-NH-$ 、CO、



L^{2A} 、 L^{2B} 、 L^{3A} 、 L^{3B} 、 L^{4A} 、 L^{4B} 、 L^{5A} 、 L^{5B} 與 L^{5C} 代表配體；亦即每次出現時，分別獨立為單糖(如：GalNAc)、雙糖、參糖、肆糖、寡糖或多糖；及 R^a 為 H 或胺基酸側鏈。RNAi 劑特別適合使用三價接合 GalNAc 衍生物來抑制標靶基因表現，如：彼等式(XXXVI)：

式 XXXVI



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

【0320】 接合 GalNAc 衍生物之合適二價與三價分支鏈結基實例包括但不限於如上述式 II、VII、XI、X 與 XIII 之結構。

【0321】 教示 RNA 接合物製法之代表性美國專利案包括但不限於美國專利案案號 4,828,979；4,948,882；5,218,105；5,525,465；5,541,313；5,545,730；5,552,538；5,578,717, 5,580,731；5,591,584；5,109,124；5,118,802；

5,138,045 ; 5,414,077 ; 5,486,603 ; 5,512,439 ; 5,578,718 ;
 5,608,046 ; 4,587,044 ; 4,605,735 ; 4,667,025 ; 4,762,779 ;
 4,789,737 ; 4,824,941 ; 4,835,263 ; 4,876,335 ; 4,904,582 ;
 4,958,013 ; 5,082,830 ; 5,112,963 ; 5,214,136 ; 5,082,830 ;
 5,112,963 ; 5,214,136 ; 5,245,022 ; 5,254,469 ; 5,258,506 ;
 5,262,536 ; 5,272,250 ; 5,292,873 ; 5,317,098 ; 5,371,241,
 5,391,723 ; 5,416,203, 5,451,463 ; 5,510,475 ; 5,512,667 ;
 5,514,785 ; 5,565,552 ; 5,567,810 ; 5,574,142 ; 5,585,481 ;
 5,587,371 ; 5,595,726 ; 5,597,696 ; 5,599,923 ; 5,599,928
 與 5,688,941 ; 6,294,664 ; 6,320,017 ; 6,576,752 ; 6,783,931 ;
 6,900,297 ; 7,037,646 ; 8,106,022，其等完整揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0322】 所指定化合物不一定所有位置均經一致修飾，事實上可在單一化合物中或甚至在 iRNA 中之單一核苷上引進超過一個上述修飾。本發明亦包括呈嵌合化合物之 iRNA 化合物。

【0323】 本發明內容中，「嵌合」iRNA 化合物或「嵌合體」為包含兩個或更多個化學上獨立區之 iRNA 化合物，較佳為 dsRNA，該各區分別由至少一個單體單位組成，亦即以 dsRNA 化合物為例，為由核苷酸組成。此等 iRNA 通常包含至少一個區，其中 RNA 係經修飾，以致提高 iRNA 對抗核酸酶降解之抗性，提高細胞吸收性，及/或提高對標靶核酸之結合親和性。iRNA 之另一區可作為可以裂解 RNA：DNA 或 RNA：RNA 雜交體之酵素之受質。

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

【0324】 某些例子中，iRNA 之 RNA 可經過非配體基團修飾。許多種非配體分子已與 iRNA 接合，以加強 iRNA 之活性、細胞分佈性或細胞吸收性，且進行此等接合法之程序可從科學文獻中取得。此等非配體部份體包括脂質部份體，如：膽固醇(Kubo, T.等人，*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1)：54-61；Letsinger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86：6553)、膽酸(Manoharan 等人，*Biorg. Med. Chem. 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，*Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3：2765)、硫膽固醇(Oberhauser 等人，*Nucl. Acids Res.*, 1992, 20：533)、脂系鏈，例如十二碳烷二醇或十一碳烷基(Saison-Behmoaras 等人，*EMBO J*, 1991, 10：1111；Kabanov 等人，*FEBS Lett.*, 1990, 259：327；Svinarchuk 等人，*Biochimie*, 1993, 75：49)、磷脂，例如二-十六碳烷基-消旋性-甘油或 1,2-二-O-十六碳烷基-消旋性-甘油基-3-磷酸三乙基銨鹽(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)、或金剛烷乙酸 (Manoharan 等人 , *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36 : 3651)、棕櫚基部份體 (Mishra 等人 , *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264 : 229)、或十八碳烷基胺或己基胺基-羰基氧膽固醇部份體 (Crooke 等人 , *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277 : 923)。教示此等 RNA 接合物製法之代表性美國專利案已如上述。典型接合法程序涉及合成在序列之一個或多個位置帶有胺基鏈結體之 RNA。該胺基再與準備接合之分子採用適當偶合或活化試劑反應。該接合反應可在 RNA 仍結合在固態擔體上時進行或可在裂解 RNA 後，在液相中進行。通常採用 HPLC 法純化 RNA 接合物，產生純接合物。

【0325】

VI. 本發明 iRNA 之傳遞法

可採用許多不同方式傳遞本發明 iRNA 至細胞中，例如人類個體(例如有此需要之個體，如罹患與接觸活化途徑基因表現相關之疾病、病變或病症之個體)內之細胞。例如可能由細胞與本發明 iRNA 於活體外或活體內接觸，進行傳遞。亦可直接投與包含 iRNA(例如 dsRNA)之組成物給個體，進行活體內傳遞。或者，可能間接投與編碼並主導 iRNA 表現之一或多種載體，進行活體內傳遞。此等替代法更進一步於下文中說明。

【0326】 通常，本發明 iRNA 可採用任何傳遞核酸分

子之方法(活體外或活體內)(參見例如 Akhtar S.與 Julian RL.(1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 與 WO94/02595, 其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中)。用於活體內傳遞時, 要傳遞 iRNA 分子之考量因素包括例如所傳遞分子之生物安定性、預防所傳遞分子在標靶組織中之非特異性效應及累積。可藉由局部投藥法使 iRNA 之非特異性效應降至最低, 例如採用直接注射或植入組織中或局部投與製劑。局部投藥至治療位點時, 可使該製劑達最大局部濃度, 限制該製劑曝露在可能會受到製劑傷害或使製劑降解之全身組織, 並可以降低 iRNA 分子之總投藥劑量。數項研究已成功顯示, 當局部投與 iRNA 時, 可成功減弱基因產物。例如在獼猴(cynomolgus monkeys)玻璃體內注射 (Tolentino, MJ., 等人(2004) *Retina* 24: 132-138)及在小鼠視網膜下注射 (Reich, SJ., 等人(2003) *Mol. Vis.* 9: 210-216), 以經眼內傳遞 VEGF dsRNA 時, 均顯示可在老年性黃斑部病變之實驗模式中預防新血管形成。此外, 直接在小鼠腫瘤內注射 dsRNA 時, 可縮小腫瘤體積 (Pille, J., 等人(2005) *Mol. Ther.* 11: 267-274), 並可延長帶腫瘤小鼠之壽命 (Kim, WJ., 等人(2006) *Mol. Ther.* 14: 343-350; Li, S., 等人(2007) *Mol. Ther.* 15: 515-523)。RNA 干擾法亦已顯示可藉由直接注射法成功局部傳遞至 CNS (Dorn, G., 等人(2004) *Nucleic Acids* 32: e49; Tan, PH., 等人(2005) *Gene Ther.* 12: 59-66; Makimura, H., 等人(2002) *BMC Neurosci.* 3: 18; Shishkina, GT., 等人(2004) *Neuroscience* 129: 521-

528 ; Thakker, ER., 等人 (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 : 17270-17275 ; Akaneya, Y., 等人 (2005) *J. Neurophysiol.* 93 : 594-602) 及藉由鼻內投藥法投與肺部 (Howard, KA., 等人 (2006) *Mol. Ther.* 14 : 476-484 ; Zhang, X., 等人 (2004) *J. Biol. Chem.* 279 : 10677-10684 ; Bitko, V., 等人 (2005) *Nat. Med.* 11 : 50-55)。全身投與 iRNA 以治療疾病時，RNA 可經修飾或改用藥物傳遞系統傳遞；這兩種方法均可預防 dsRNA 於活體內被內切-與外切-核酸酶快速降解。修飾 RNA 或醫藥載劑亦可讓 iRNA 組成物靶向標靶組織，並避免不期望之偏離標靶效應。iRNA 分子可採用化學法接合親脂性基團(如：膽固醇)進行修飾，以加強細胞吸收並預防降解。例如由主導對抗 ApoB 之 iRNA 與親脂性膽固醇部份體之接合物全身注射至小鼠，結果減弱肝與空腸中之 apoB mRNA (Soutschek, J., 等人 (2004) *Nature* 432 : 173-178)。iRNA 與適體之接合物已在小鼠攝護腺癌模式中顯示可抑制腫瘤生長，並介導腫瘤消退 (McNamara, JO., 等人 (2006) *Nat. Biotechnol.* 24 : 1005-1015)。另一項實施例，可使用藥物傳遞系統(如：奈米粒子、樹枝狀物、聚合物、脂質體或陽離子性傳遞系統)傳遞 iRNA。帶正電荷之陽離子性傳遞系統可促進 iRNA 分子(帶負電荷)之結合性，亦加強在帶負電荷之細胞膜之交互作用，讓細胞有效吸收 iRNA。陽離子性脂質、樹枝狀物、或聚合物可與 iRNA 結合，或誘發形成包埋 iRNA 之囊泡或微胞(參見例如 Kim SH., 等人 (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2) : 107-

116)。形成囊泡或微泡可在全身投藥時進一步預防 iRNA 降解。製造及投與陽離子性-iRNA 複合物之方法係熟悉此相關技術者之能力範圍內(參見例如 Sorensen, DR.,等人(2003) *J. Mol. Biol* 327 : 761-766 ; Verma, UN.,等人(2003) *Clin. Cancer Res.* 9 : 1291-1300 ; Arnold, AS 等人(2007) *J. Hypertens.* 25 : 197-205 , 其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中)。適用於全身性傳遞 iRNA 之藥物傳遞系統之有些非限制性實例包括 DOTAP(Sorensen, DR.,等人(2003) , 如上述文獻 ; Verma, UN.,等人(2003) , 如上述文獻)、寡胺(Oligofectamine)「固態核酸脂質粒子」(Zimmermann, TS., 等人(2006) *Nature* 441 : 111-114)、心磷脂(cardiolipin) (Chien, PY.,等人(2005) *Cancer Gene Ther.* 12 : 321-328 ; Pal, A.,等人(2005) *Int J. Oncol.* 26 : 1087-1091)、聚乙二亞胺(Bonnet ME.,等人(2008) *Pharm. Res.* 8 月 16 日電子書 (Epub ahead of print) ; Aigner, A.(2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659)、Arg-Gly-Asp(RGD)肽類(Liu, S.(2006) *Mol. Pharm.* 3 : 472-487)、與聚醯胺基胺類(Tomalia, DA.,等人(2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35 : 61-67 ; Yoo, H.,等人(1999) *Pharm. Res.* 16 : 1799-1804)。有些實施例中，iRNA 與環糊精形成複合物，供全身性投藥。iRNA 與環糊精之投藥方法與醫藥組成物可參見美國專利案案號 7,427,605，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0327】

A. 編碼本發明 iRNA 之載體

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

【0328】 iRNA 之個別股或雙股可由表現載體上之啓動子轉錄。當希望這兩個分開股可以表現產生例如 dsRNA 時,可以將兩個分開之表現載體共同引進(例如轉染或感染)至標靶細胞中。或者, dsRNA 之各個別股可利用均位於相同表現質體上之啓動子轉錄。一項實施例中, dsRNA 係呈利用鏈結體聚核苷酸序列連接之反向重複序列聚核苷酸表現,因此 dsRNA 具有莖與環結構。

【0329】 iRNA 表現載體通常為 DNA 質體或病毒載體。可採用可與真核生物細胞相容,較佳為彼等與脊椎動物細胞相容之表現載體來製造重組構築體,供表現本文所說明之 iRNA。真核生物細胞表現載體係相關技藝上習知,且可從許多商品來源取得。通常,所提供之此等載體包含合宜之限制酶切割位點,供嵌入所需之核酸節段。可經全

身性傳遞 iRNA 表現載體，如經靜脈內或經肌內投藥、投藥至從患者取出之標靶細胞後再引進患者體內、或採用可以進入所需標靶細胞中之任何其他方式。

【0330】 iRNA 表現質體可與陽離子性脂質載劑(例如寡染胺(Oligofectamine)或基於非陽離子性脂質之載劑(例如 Transit-TKO™)形成複合物轉染至標靶細胞。本發明範圍內亦包括持續一週或更久之多重脂質轉染法，供 iRNA 介導減弱靶向標靶 RNA 之不同區。可採用各種不同已知方法追蹤成功引進載體進入宿主細胞。例如過渡轉染可以標記報導子為訊號，如螢光標記物，如綠色螢光蛋白質(GFP)。採用可讓轉染細胞對特定環境因子(例如抗體與藥物)具有抗性之標記物，如潮黴素 B(hygromycin B)來確認離體細胞之穩定轉染。

【0331】 本文所說明方法與組成物可利用之病毒載體系統包括但不限於(a)腺病毒載體；(b)逆轉錄病毒載體，包括但不限於慢病毒(lentivirus)載體、莫洛尼氏白血病毒(moloney murine leukemia virus)等等；(c)腺相關病毒載體；(d)單純疱疹病毒載體；(e) SV 40 載體；(f)多瘤病毒載體；(g)乳突病毒載體；(h)小核糖核酸病毒載體；(i)痘病毒載體，如正痘(orthopox)，例如牛痘病毒載體或鳥痘，例如金絲雀痘或禽痘；與(j)輔助病毒依賴性或無腸腺病毒。複製缺陷病毒亦有利。細胞基因組中不一定會引進不同載體。若需要時，該構築體可包括用於轉錄之病毒序列。或者，該構築體可引至可以進行附加體型複製之載體中，

例如 EPV 與 EBV 載體。用於 iRNA 之重組表現之構築體通常需要調節元素，例如啟動子、加強子等等，以確保 iRNA 於標靶細胞中之表現。下文將進一步說明有關載體與構築體之其他態樣。

【0332】 適用於傳遞 iRNA 之載體包括足以在所需標靶細胞或組織中表現 iRNA 之調節元素(啟動子、加強子等等)。可選擇該等調節元素來提供組成性或調節/誘發性表現。

【0333】 可以例如利用對某些生理調節劑(例如循環葡萄糖含量或激素)敏感之誘發性調節序列準確調節 iRNA 之表現(Docherty 等人，1994, *FASEB J.* 8: 20-24)。此等適用於細胞中或哺乳動物中控制 dsRNA 表現之誘發性表現系統包括例如利用蛻皮激素、雌激素、黃體酮、四環素、二聚合之化學誘發劑、與異丙基- β -D1-硫代呷喃半乳糖苷(IPTG)之調節作用。熟悉此相關技術者將有能力依據 iRNA 轉殖基因之計畫用途選擇適當之調節/啟動子序列。

【0334】 可使用包含編碼 iRNA 之核酸序列之病毒載體。例如可使用逆轉錄病毒載體(參見 Miller 等人，*Meth. Enzymol.* 217: 581-599(1993))。此等逆轉錄病毒載體包含正確包裹病毒基因組並整合進入宿主細胞 DNA 時所必要之組份。選殖編碼 iRNA 之核酸序列進入一或多種載體中，促進傳遞核酸至患者中。有關逆轉錄病毒載體之更詳細說明可參見例如 Boesen 等人之 *Biotherapy* 6: 291-302 (1994)，其說明使用逆轉錄病毒載體傳遞 *mdr1* 基因至造血

幹細胞，以便製造更能抵抗化療之幹細胞。其他說明逆轉錄病毒載體於基因療法中用途之參考文獻為：Clowes 等人，*J. Clin. Invest.* 93：644-651(1994)；Kiem 等人，*Blood* 83：1467-1473(1994)；Salmons 與 Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4：129-141(1993)；及 Grossman 與 Wilson, *Curr. Opin. In Genetics and Devel.* 3：110-114 (1993)。計畫使用之慢病毒載體包括例如美國專利案案號 6,143,520；5,665,557；與 5,981,276 所說明之基於 HIV 之載體，其等揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0335】 亦計畫使用腺病毒來傳遞本發明 iRNA。腺病毒為特別值得注意之媒劑，例如用於傳遞基因至呼吸上皮。腺病毒會自然感染呼吸上皮，在此造成輕度疾病。基於腺病毒之傳遞系統之其他標靶為肝臟、中樞神經系統、內皮細胞、與肌肉。腺病毒之優點在於可以感染非分裂細胞。Kozarsky 與 Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3：499-503(1993)提出有關基於腺病毒之基因療法之概論。Bout 等人, *Human Gene Therapy* 5：3-10(1994)證實使用腺病毒載體轉移基因至恒河猴之呼吸上皮。腺病毒於基因療法中之其他用途實例可參見 Rosenfeld 等人，*Science* 252：431-434(1991)；Rosenfeld 等人，*Cell* 68：143-155(1992)；Mastrangeli 等人，*J. Clin. Invest.* 91：225-234(1993)；PCT 公開案 WO94/12649；與 Wang 等人之 *Gene Therapy* 2：775-783(1995)。適合表現如本文所說明特徵之 iRNA 之 AV 載體、構築重組 AV 載體之方法、及傳遞載體

至標靶細胞之方法說明於 Xia H 等人(2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010。

【0336】 亦可使用腺相關病毒(AAV)載體來傳遞本發明 iRNA(Walsh 等人, *Proc. Soc. Exp. Biol.Med.* 204: 289-300(1993); 美國專利案案號 5,436,146)。一項實施例中, 可由具有例如 U6 或 H1 RNA 啟動子或巨細胞病毒(CMV)啟動子之重組 AAV 載體表現 iRNA, 其係呈兩個分開之互補單股 RNA 分子。適合表現如本發明所說明特徵之 dsRNA 之 AAV 載體、構築重組 AV 載體之方法、及傳遞載體至標靶細胞之方法說明於 Samulski R 等人(1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J 等人(1996), *J. Virol.* 70: 520-532; Samulski R 等人(1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; 美國專利案案號 5,252,479; 美國專利案案號 5,139,941; 國際專利申請案案號 WO 94/13788; 及國際專利申請案案號 WO 93/24641, 其等完整揭示內容已以引用之方式併入。

【0337】 另一種適合傳遞本發明 iRNA 之病毒載體為痘病毒, 如牛痘病毒, 例如減毒牛痘, 如經修飾之安卡拉(Ankara)病毒(MVA)或 NYVAC、鳥痘, 如禽痘或金絲雀痘。

【0338】 病毒載體之向性可利用外套膜蛋白假性載體或來自其他病毒之其他表面抗原進行修飾, 或適當時改用不同病毒外鞘蛋白質取代。例如慢病毒載體可利用來自水泡性口炎病毒(VSV)、狂犬病、伊波拉(Ebola)、蒙古拉(mokola)等等之表面蛋白質進行假性處理。AAV 載體可經

過處理，讓載體表現不同外鞘蛋白質血清型，而靶向不同細胞；參見例如 Rabinowitz J E 等人(2002), *J Virol* 76 : 791-801，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0339】 載體之醫藥製劑中可包括含在可接受之稀釋劑中之載體，或可包括其中已包埋基因傳遞媒劑之緩釋基質。或者，若可從重組細胞完整產生完整基因傳遞載體(例如逆轉錄病毒載體)時，醫藥製劑可包括產生基因傳遞系統之一或多種細胞。

【0340】

VII. 本發明醫藥組成物

本發明亦包括一種包含本文所說明 iRNA 之醫藥組成物與調配物，用於本發明之方法。一項實施例中，本文提供包含本文所說明 iRNA 與醫藥上可接受之載體之醫藥組成物。包含該 iRNA 之醫藥組成物適用於治療與 TTR 基因之表現或活性有關之疾病或病變。此等醫藥組成物係依據傳遞模式調配。其中一項實例為一種調配成以非經腸式傳遞而全身性投藥之組成物，例如經皮下(SC)或經靜脈內(IV)傳遞。另一項實例為調配成直接傳遞至腦實質之組成物，例如採用如：連續幫浦輸注至腦內。本發明醫藥組成物可投與足以抑制 TTR 基因表現之劑量。一項實施例中，本發明 iRNA 劑，例如 dsRNA 劑，係於醫藥上可接受之載劑中調配以供皮下投藥。

【0341】 醫藥組成物可經靜脈內輸注持續一段時間，如：持續 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、

16、17、18、19、20、與 21、22、23、24、或約 25 分鐘時間。可能例如依規律方式重複投藥，如：每週、雙週(亦即每兩週)持續一個月、兩個月、三個月，四個月或更久。亦可例如依每月一次、或每季一次之規律，例如約每 12 週重複投藥。經過初次處理療程後，即可依較少頻率投藥治療。例如經過每週或每兩週投藥一次持續三個月後，可以每個月重複一次，持續六個月或一年或更久。

【0342】 醫藥組成物可以一天投藥一次，或 iRNA 可在一天內依適當間隔投與兩個、三個或更多個小劑量，或甚至使用連續輸注或透過控制釋放之調配物傳遞。此時，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，其可歷經數天持續釋放 iRNA。持續釋放調配物係相關技藝上已知，且特別適用於在特定部位傳遞該製劑，如：可與本發明製劑一起使用。此實施例中，該劑量單位包含對應之多重日劑量。

【0343】 其他實施例中，醫藥組成物之單一劑量可以為長效性，因此下一個劑量可在間隔不超過 3、4 或 5 天內或間隔不超過 1、2、3 或 4 週內、或間隔不超過 9、10、11、或 12 週內投藥。本發明有些實施例中，本發明醫藥組成物之單一劑量係每週投藥一次。本發明其他實施例中，本發明醫藥組成物之單一劑量係每兩個月投藥。其他實施例中，本發明醫藥組成物之單一劑量係每個月投藥。又其他實施例中，本發明醫藥組成物之單一劑量係每季投

藥。其他實施例中，本發明醫藥組成物之單一劑量係每 4 個月投藥一次。另一項實施例中，本發明醫藥組成物之單一劑量係每 5 個月投藥一次。其他實施例中，本發明醫藥組成物之單一劑量係每 6 個月投藥一次。

【0344】 熟悉此相關技術者咸了解，某些因素會影響有效治療個體時所需之劑量與投藥時間，包括但不限於疾病或病變之嚴重性、過去之治療、個體之一般健康與/或年齡、及其他現有疾病。此外，以醫療有效量之組成物治療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。

【0345】 本發明醫藥組成物可依許多方式投藥，端賴是否需要局部或全身性治療及需要治療之區域而定。投藥法可能為局部(例如採用穿皮式貼布)、經肺部，例如吸入或吹入粉劑或氣霧劑，包括利用噴霧器；經氣管內、經鼻內、經表皮與穿皮、經口或非經腸式。非經腸式投藥法包括經靜脈內、經動脈內、經皮下、經腹膜內或經肌內注射或輸注；皮下，例如經由植入裝置；或經顱內，例如經腦實質內、鞘內或腦室內投藥。

【0346】 iRNA 可依靶向特定組織，如：肝臟(例如肝臟之肝細胞)之方式傳遞。

【0347】 供局部投藥之醫藥組成物與調配物可包括穿皮式貼布、油膏、洗液、乳霜、凝膠、滴劑、栓劑、噴液、液體與粉劑。可能必須或需要使用常用之醫藥載劑、

水性、粉狀或油性基質、增稠劑等等。有塗層之保險套、手套等等亦適用。合適之局部調配物包括彼等由如本發明所說明特徵之 iRNA 與局部傳遞劑(如：脂質、脂質體、脂肪酸、脂肪酸酯類、類固醇、螯合劑與界面活性劑)混合者。合適脂質與脂質體包括中性(例如二油醯基磷脂醯基 DOPE 乙醇胺、二肉豆蔻醯基磷脂醯基膽鹼 DMPC、二硬脂醯基磷脂醯基膽鹼)、陰性(例如二肉豆蔻醯基磷脂醯基甘油 DMPG)、與陽離子性(例如二油醯基四甲基胺基丙基 DOTAP 與二油醯基磷脂醯基乙醇胺 DOTMA)。如本發明所說明特徵之 iRNA 可包埋在脂質體內或可與其(特定言之與陽離子性脂質體)形成複合物。或者，iRNA 可與脂質(特定言之與陽離子性脂質)複合。合適脂肪酸與酯類包括但不限於花生四烯酸、油酸、廿碳烷酸、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、單油酸甘油酯、二月桂酸甘油酯、1-單癸酸甘油酯、1-十二碳烷基氮雜環庚烷-2-酮、醯基肉鹼、醯基膽鹼、或 C₁₋₂₀ 烷基酯(例如肉豆蔻酸異丙基酯 IPM)、單酸甘油酯、二酸甘油酯或其醫藥上可接受之鹽)。局部調配物詳細說明於美國專利案案號 6,747,014，其揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0348】

A. 包含膜分子組合之 iRNA 調配物

本發明組成物與方法所使用之 iRNA 可調配物成含在膜分子組合(例如脂質體或微胞)中傳遞。本文所採用術語

「脂質體」係指由兩親性脂質排成至少一個雙層(例如一個雙層或複數個雙層)所組成之囊泡。脂質體包括單層與多層囊泡，其具有由親脂性材料形成之膜與水性內部。該水性部份包含 iRNA 組成物。親脂性材料隔離該水性內部與水性外部(其通常不包括 iRNA 組成物，但某些實例中可能包括)。脂質體適用於轉運及傳遞活性成份至作用部位。由於脂質體膜之結構類似生物膜，因此當施加脂質體至組織時，脂質體雙層會與細胞膜之雙層融合。當脂質體併入且繼續進行細胞過程時，包括 iRNA 之內部水性內容物即傳遞至細胞中，此時 iRNA 專一性結合標靶 RNA，並可介導 iRNA。有時候，脂質體亦會例如主導 iRNA 專一性靶向特定細胞型態。

【0349】 包含 iRNA 劑之脂質體可依各種不同方法製備。一項實例中，脂質體之脂質成分溶於清潔劑中，因此與脂質組份形成微胞。例如脂質成分可為兩親性陽離子性脂質或脂質接合物。清潔劑具有高的臨界微胞濃度，且可能為非離子性。清潔劑實例包括膽酸鹽、CHAPS、辛基葡萄糖苷、去氧膽酸鹽、與月桂醯基肌胺酸。然後添加 iRNA 製劑至包括脂質組份之微胞中。脂質上之陽離子性基團會與 iRNA 劑交互作用，在 iRNA 劑周圍縮合，形成脂質體。濃縮後，排除清潔劑(例如採用透析法)，產生 iRNA 劑之脂質體製劑。

【0350】 若必要時，可在縮合反應期間添加(例如採用控制添加法)促進縮合之載劑化合物。例如載劑化合物可

為核酸以外之聚合物(例如精胺或精脒)。亦可調整 pH 以便有利於縮合。

【0351】 引進聚核苷酸/陽離子性脂質複合物作為該傳遞媒劑之結構組份來製造安定之聚核苷酸傳遞媒劑之方法進一步說明於例如 WO 96/37194，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。脂質體調配物亦包括以下文獻所說明方法實例之一個或多個態樣：Felgner, P. L. 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413-7417, 1987；美國專利案案號 4,897,355；美國專利案案號 5,171,678；Bangham 等人 *M. Mol. Biol.* 23:238, 1965；Olson 等人 *Biochim. Biophys. Acta* 557:9, 1979；Szoka 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194, 1978；Mayhew 等人 *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984；Kim 等人 *Biochim. Biophys. Acta* 728:339, 1983；及 Fukunaga 等人 *Endocrinol.* 115:757, 1984。常用於製備適當大小之脂質凝集物作為傳遞媒劑使用之技術包括音波處理法與冷凍-解凍加擠壓法(參見例如 Mayer 等人 *Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986)。當需要一致之小(50 至 200 nm)且相當均一之凝集物時，可使用微流體化法(Mayhew 等人 *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984)。很容易採用此等方法來包裹 iRNA 劑製劑進入脂質體中。

【0352】 脂質體分成兩大類。陽離子性脂質體為帶正電荷之脂質體，其會與帶著負電荷之核酸分子交互反應，形成安定複合物。帶正電荷之核酸/脂質體複合物會與帶負電荷之細胞表面結合，並在核內體中內化。由於核內

體中為酸性 pH，因此脂質體會瓦解，釋出其內容物進入細胞質中(Wang 等人，*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985)。

【0353】 對 pH-敏感或帶負電荷之脂質體會包埋核酸，而不是與其複合。由於核酸與脂質均帶類似電荷，因此會發生排斥而不是形成複合物。儘管如此，有些核酸會包埋在此等脂質體之水性內部中。對 pH 敏感之脂質體已被用於傳遞編碼胸苷激酶基因之核酸至培養物之細胞單層中。已在標靶細胞中檢測到外源性基因之表現(Zhou 等人，*Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274)。

【0354】 其中一種主要脂質體組成物型態包括除了天然衍生之磷脂醯基膽鹼以外之磷脂質。中性脂質體組成物可由例如二肉豆蔻醯基磷脂醯基膽鹼(DMPC)或二棕櫚醯基磷脂醯基膽鹼(DPPC)形成。陰離子性脂質體組成物通常係由二肉豆蔻醯基磷脂醯基甘油形成，而陰離子性基因融合性脂質體則主要由二油醯基磷脂醯基乙醇胺(DOPE)形成。另一種脂質體組成物係由磷脂醯基膽鹼(PC)形成，如，例如大豆 PC 與蛋 PC。另一種係由磷脂質與/或磷脂醯基膽鹼與/或膽固醇之混合物形成。

【0355】 於活體外及活體內引進脂質體進入細胞之其他方法實例包括美國專利案案號 5,283,185；美國專利案案號 5,171,678；WO 94/00569；WO 93/24640；WO 91/16024；Felgner, *J. Biol. Chem.* 269:2550, 1994；Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11307, 1993；Nabel, *Human Gene*

Ther. 3:649, 1992 ; Gershon, *Biochem.* 32:7143, 1993 ; 及 Strauss *EMBO J.* 11:417, 1992 。

【0356】 亦曾檢視非離子性脂質體系統，以判斷其傳遞藥物至皮膚之用途，特定言之包含非離子性界面活性劑與膽固醇之系統。曾利用包含 Novasome™ I(二月桂酸甘油基酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)與 Novasome™ II(二硬脂酸甘油基酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)之非離子性脂質體調配物傳遞環孢素-A 進入小鼠皮膚之真皮。結果顯示，此等非離子性脂質體系統可以有效促進環孢素-A 沉積在不同皮膚層內(Hu 等人, *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4(6) 466)。

【0357】 脂質體亦包括「立體上安定之」脂質體，本文所採用該名詞係指包含一或多種特異化脂質之脂質體，當引進脂質體中時，其可比缺乏此等特異化脂質之脂質體更延長其循環壽命。立體上安定之脂質體實例為彼等在脂質體形成囊泡之脂質部份中，(A)包含一或多種配醣脂，如單唾液酸神經節苷脂 G_{M1}，或(B)係經過一或多種親水性聚合物衍化，如聚乙二醇(PEG)部份體。雖然不希望受到任何特定理論之限制，但相關技藝上認為，至少針對包含神經節苷脂、鞘磷脂或 PEG-衍生之脂質之立體上安定之脂質體，可以藉由減少吸收進入網狀內皮系統(RES)之細胞中來延長此等立體上安定之脂質體之循環半衰期(Allen 等人, *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu 等人, *Cancer Research*, 1993, 53, 3765)。

【0358】 相關技藝上已知各種不同包含一或多種配醣脂之脂質體。Papahadjopoulos 等人(*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64)提出單唾液酸神經節苷脂 G_{M1} 、半乳糖腦苷脂硫酸酯與磷脂醯基肌醇改善脂質體之血液半衰期之能力。此等結果已闡述於 Gabizon 等人(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949)。均頒與 Allen 等人之美國專利案案號 4,837,028 與 WO 88/04924 揭示之脂質體包含(1)鞘磷脂與(2)神經節苷脂 G_{M1} 或半乳糖腦苷脂硫酸酯。美國專利案案號 5,543,152(Webb 等人)揭示包含鞘磷脂之脂質體。WO 97/13499(Lim 等人)揭示包含 1,2-sn-二肉豆蔻醯基磷脂醯基膽鹼之脂質體。

【0359】 一項實施例中，使用陽離子性脂質體。陽離子性脂質體之優點在於可與細胞膜融合。非陽離子性脂質體雖然無法如同漿膜一般有效融合，但可於活體內被巨噬細胞吸收，並可用於傳遞 iRNA 劑至巨噬細胞。

【0360】 脂質體之其他優點包括：得自天然磷脂質之脂質體具有生物相容性與生物降解性；脂質體可進入許多種水可溶性與脂質可溶性藥物中；脂質體可保護包埋在其內部隔室內之 iRNA 劑免於被代謝與降解(Rosoff 說明於「*Parmaceutical Dosage Forms*」，Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯)，1988，第一冊，p.245)。製備脂質體調配物時之重要考量為脂質表面電荷、囊泡大小及脂質體之水性體積。

【0361】 帶正電荷之合成性陽離子性脂質:N-[1-(2,3-

二油基氧)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)可用於形成小脂質體，其會與核酸自發性交互反應，形成脂質-核酸複合物，其可再與組織培養細胞之細胞膜之帶負電荷脂質融合，造成傳遞 RNAi 劑(有關 DOTMA 及其使用 DNA 之方法之說明可參見例如 Felgner, P. L.等人之 Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 與美國專利案案號 4,897,355)。

【0362】 DOTMA 類似物：1,2-雙(油醯基氧)-3-(三甲基銨)丙烷(DOTAP)可與磷脂質組合使用，形成與 DNA-複合之囊泡。Lipofectin™(Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.)為一種傳遞高陰離子性核酸進入活組織培養細胞之有效劑，其包含帶正電荷之 DOTMA 脂質體，會與帶負電荷之聚核苷酸自發性交互作用，形成複合物。當使用帶充份正電荷之脂質體時，所得複合物上淨電荷亦帶正電。依此方式製得之帶正電荷複合物會自發性附接帶負電荷細胞表面，與漿膜融合，有效傳遞功能性核酸至例如組織培養細胞中。另一種可自商品取得之陽離子性脂質：1,2-雙(油醯基氧)-3,3-(三甲基銨)丙烷(「DOTAP」)(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana)不同於 DOTMA 之處在於該油醯基部份體係利用酯而非醚鏈結基鏈結。

【0363】 其他提出之陽離子性脂質化合物包括彼等已接合各種不同部份體者，包括例如羧基精胺，其已接合兩種脂質中之一，且包括化合物，如 5-羧基精胺基甘胺酸

二辛醯基油醯基醯胺(「DOGS」)(Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin)與二棕櫚醯基磷脂醯基乙醇胺 5-羧基精胺基-醯胺(「DPPE」)(參見例如美國專利案案號 5,171,678)。

【0364】 另一種陽離子性脂質接合物包括經過膽固醇衍化之脂質(「DC-Chol」)，其已與 DOPE 組合調配至脂質體中(參見 Gao, X.與 Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179 : 280, 1991)。有報告提出由聚離胺酸接合 DOPE 製成之脂聚離胺酸可以在血清之存在下有效轉染(Zhou, X.等人, *Biochim. Biophys. Acta* 1065 : 8, 1991)。某些細胞株中，此等包含接合之陽離子性脂質之脂質體據稱比包含 DOTMA 之組成物具有更低之毒性，並可提供更有效之轉染。其他可自商品取得之陽離子性脂質產品包括 DMR1E 與 DMR1E-HP(Vical, La Jolla, California)與脂染胺(Lipofectamine)(DOSPA)(Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland)。其他適合傳遞寡核苷酸之陽離子性脂質說明於 WO 98/39359 與 WO 96/37194。

【0365】 脂質體調配物特別適合局部投藥，脂質體比其他調配物具有數項優點。此等優點包括降低與全身性高度吸收所投與藥物有關之副作用、提高所投與藥物在所需標靶處之累積量、及投與 iRNA 劑至皮膚中之能力。有些實施例中，採用脂質體傳遞 iRNA 劑至表皮細胞，且亦加強 iRNA 劑滲透進入皮膚組織，例如皮膚中。例如脂質體可局部施用。藥物調配成脂質體局部傳遞至皮膚之作用

已有文獻說明(參見例如 Weiner 等人, *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 與 du Plessis 等人, *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265 ; Mannino, R. J. 與 Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. 等人 *Gene* 56:267-276. 1987 ; Nicolau, C.等人 *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987 ; Straubinger, R. M.與 Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983 ; Wang, C. Y.與 Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987)。

【0366】 亦曾檢測非離子性脂質體系統來判斷其於傳遞藥物至皮膚之用途，特定言之包含非離子性界面活性劑與膽固醇之系統。採用包含 Novasome I(二月桂酸甘油基酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)與 Novasome II(二硬脂酸甘油基酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)之非離子性脂質體調配物來傳遞藥物至小鼠皮膚之真皮。此等使用 iRNA 劑之調配物適用於治療皮膚病變。

【0367】 包括 iRNA 之脂質體可具有高度變形性。此等變形性讓脂質體得以滲透比脂質體平均半徑更小之小孔。例如類轉移體(transfersomes)即為一種可變形之脂質體。可以添加表面邊界活化劑(通常為界面活性劑)至標準脂質體組成物中來製備類轉移體。包括 iRNA 劑之類轉移體例如可經皮下注射傳遞，以傳遞 iRNA 劑至皮膚中之角質細胞。為了穿過完整之哺乳動物皮膚，脂質囊泡必需在合適之跨皮梯度下穿過一系列細孔，每個孔之直徑均小於 50 nm。此外，基於脂質之性質，此等類轉移體可以自我

優化(配合例如皮膚中小孔形狀)、自我修補，並經常不需要切斷即可到達其標靶，並經常可自我裝載。

其他適用於本發明之調配物說明於 PCT 公開案案號 WO 2008/042973，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0368】 類轉移體(Transfersome)為另一種脂質體型態，且為可高度變形之脂質凝集體，其係傳遞藥物之媒劑之值得注意之候選物。類轉移體可稱為脂質液滴，其可高度變形，因此容易穿透小於液滴之小孔。類轉移體可適應所使用之環境，例如其可自我優化(配合皮膚之孔形狀)、自我修補，並經常不需要切斷即可到達其標靶，並經常可自我裝載。可以添加表面邊界活化劑(通常為界面活性劑)至標準脂質體組成物中來製備類轉移體。類轉移體曾用於傳遞血清白蛋白至皮膚。類轉移體所介導傳遞血清白蛋白已顯示與經皮下注射包含血清白蛋白之溶液一樣有效。

【0369】 界面活性劑可廣泛用於如：乳液(包括微乳液)與脂質體之調配物。許多不同型態之界面活性劑(包括天然與合成性)之性質最常用之分類與分級方式為親水性/疏水性平衡值(HLB)。親水性基團(亦稱為「頭基」)之性質為調配物中所採用不同界面活性劑提供最適用之分類方式(Rieger 述於「Pharmaceutical Dosage Forms」, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

【0370】 若界面活性劑分子未離子化，則歸類於非離子性界面活性劑。非離子性界面活性劑廣泛用於醫藥與

美容產品，且適用於大範圍之 pH 值。通常其 HLB 值範圍為 2 至約 18，依其結構而定。非離子性界面活性劑包括非離子性酯類，如：乙二醇酯類、丙二醇酯類、甘油基酯類、聚甘油基酯類、山梨糖醇酐酯類、蔗糖酯類、與乙氧基化酯類。此類界面活性劑亦包非離子性烷醇醯胺類與醚類，如：脂肪醇乙氧化物、丙氧化醇類、與乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物。聚氧乙烯界面活性劑為最常用之非離子性界面活性劑類之成員。

【0371】 若界面活性劑分子溶解或分散於水中時會攜帶負電荷，則該界面活性劑歸類為陰離子性。陰離子性界面活性劑包括羧酸鹽類，如：皂類、乳醯乳酸醯基酯類、胺基酸之醯基醯胺類、硫酸之酯類(如：硫酸烷基酯與乙氧基化硫酸烷基酯類)、磺酸酯類(如：苯磺酸烷基酯、羥乙基磺酸醯基酯、牛磺酸醯基酯與磺基琥珀酸酯類)、與磷酸酯類。陰離子性界面活性劑類之最重要成員為硫酸烷基酯類與皂類。

【0372】 若界面活性劑分子溶解或分散於水中時攜帶正電荷，則該界面活性劑歸類為陽離子性。陽離子性界面活性劑包括四級銨鹽類與乙氧基化胺類。該四級銨鹽類為此類物質之最常用成員。

【0373】 若界面活性劑分子有能力攜帶正電荷或負電荷時，該界面活性劑則歸類於兩親性。兩親性界面活性劑包括丙烯酸衍生物、經取代之烷基醯胺類、N-烷基甜菜鹼與磷脂。

界面活性劑於藥品、調配物與乳液中之用法已有說明 (Rieger 述於「Pharmaceutical Dosage Forms」, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

【0374】 本發明方法所使用之 siRNA 亦可呈微胞調配物提供。本文中「微胞」之定義為一種特別之分子集合型態，其中兩親性分子呈球狀結構排列，因此分子之所有疏水性部份均向內，讓親水性部份與周圍水相接觸。若環境為疏水性時，其排列則相反。

【0375】 適合穿過皮膚膜傳遞之混合微胞調配物之可能製法為混合 siRNA 組成物之水溶液、C₈至 C₂₂ 烷基硫酸之鹼金屬鹽與微胞形成性化合物。微胞形成性化合物實例包括卵磷脂、玻尿酸、玻尿酸之醫藥上可接受之鹽、乙醇酸、乳酸、洋甘菊萃取物、小黃瓜萃取物、油酸、亞油酸、亞麻酸、單油酸甘油酯、單油酸酯、單月桂酸酯、琉璃苣油、月見草油、薄荷醇、三羥基側氧基膽烷基甘胺酸與其醫藥上可接受之鹽、甘油、聚甘油、離胺酸、聚離胺酸、三油酸甘油酯、聚氧乙烯醚類與其類似物、聚多卡醇 (polidocanol) 烷基醚類與其類似物、鵝去氧膽酸鹽、去氧膽酸鹽、與其混合物。微胞形成性化合物可能在添加烷基硫酸鹼金屬鹽之同時或之後添加。實質上任何一種成份混合法均可形成混合微胞，但需要激烈混合，以提供較小微胞。

【0376】 其中一種方法中，製備包含 siRNA 組成物且至少包含烷基硫酸鹼金屬鹽之第一微胞組成物。該第一

微胞組成物再與至少三種微胞形成性化合物形成混合微胞組成物。另一種方法中，微胞組成物製法為混合 siRNA 組成物、烷基硫酸鹼金屬鹽與至少一種微胞形成性化合物，然後在激烈混合下添加其餘微胞形成性化合物。

【0377】 可能添加苯酚與/或間甲酚至混合微胞組成物中，以安定調配物，並保護防止細菌生長。或者，苯酚與/或間甲酚可能與微胞形成性成份一起添加。亦可在形成混合微胞組成物後添加等滲劑，如：甘油。

【0378】 呈噴液方式傳遞微胞調配物時，調配物可裝進氣霧劑配送器中，在該配送器中填裝推進劑。配送器中之推進劑在加壓下呈液態。調整成份比例，以使水相與推進劑相合而為一，亦即呈單一相。若出現兩相時，必需先搖動配送器，再通過例如定量閥門，配送一部份內容物。將會從定量閥門呈細霧推送出所配送劑量之醫藥劑。

【0379】 推進劑可包括含氫之氯氟碳化合物、含氫之氟碳化合物、二甲基醚與乙醚。某些實施例中，可使用 HFA 134a(1,1,1,2 四氟乙烷)。

【0380】 必要成份之明確濃度可由相當直接之實驗決定。從口腔吸收時，經常需要使劑量比透過注射或經過胃腸道投藥之劑量提高例如至少兩倍或三倍。

【0381】

B. 脂質粒子

本發明 iRNA，例如 dsRNA 可以完全包埋在脂質調配物中，例如 LNP，或其他核酸-脂質粒子中。

【0382】 本文所採用術語「LNP」係指安定之核酸-脂質粒子。LNP 通常包含陽離子性脂質、非陽離子性脂質、與防止粒子(例如 PEG-脂質接合物)凝集之脂質。LNP 極適用於全身性投藥用途，因為其在經靜脈內(i.v.)注射後，具有延長之循環壽命，並可在遠方部位(例如離開投藥位點之身體部位)累積。LNP 包括「pSPLP」，其包括包埋之縮合劑-核酸複合物，其說明於 PCT 公開案號 WO 00/03683。本發明粒子典型地具有平均直徑約 50 nm 至約 150nm，更典型為約 60 nm 至約 130 nm，更典型為約 70 nm 至約 110 nm，最典型為約 70 nm 至約 90 nm，且實質上無毒。此外，當核酸存在於本發明之核酸-脂質粒子中時，可以在水溶液中抵抗核酸酶之降解。核酸-脂質粒子與其製法揭示於例如美國專利案案號 5,976,567；5,981,501；6,534,484；6,586,410；6,815,432；美國公開案案號 2010/0324120 及 PCT 公開案案號 WO 96/40964。

【0383】 一項實施例中，脂質對藥物之比值(質量/質量比值)(例如脂質對 dsRNA 比值)將在約 1：1 至約 50：1 之範圍，約 1：1 至約 25：1、約 3：1 至約 15：1、約 4：1 至約 10：1、約 5：1 至約 9：1、或約 6：1 至約 9：1。上述範圍之間之範圍亦包括在本發明之一部份。

【0384】 該陽離子性脂質可為例如 N,N-二油基-N,N-二甲基氯化銨(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨(DDAB)、N-(1-(2,3-二油醯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)、N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基

氯化銨 (DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油基氧基)丙基胺 (DODMA)、1,2-二亞油基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷 (DLinDMA)、1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷 (DLinDMA)、1,2-二亞油基胺甲醯基氧基-3-二甲基胺基丙烷 (DLin-C-DAP)、1,2-二亞油基氧基-3-(二甲基胺基)乙醯氧基丙烷 (DLin-DAC)、1,2-二亞油基氧基-3-嗎啉基丙烷 (DLin-MA)、1,2-二亞油基醯基-3-二甲基胺基丙烷 (DLinDAP)、1,2-二亞油基硫基-3-二甲基胺基丙烷 (DLin-S-DMA)、1-亞油基醯基-2-亞油基氧基-3-二甲基胺基丙烷 (DLin-2-DMA)、1,2-二亞油基氧基-3-三甲基胺基丙烷氯化物鹽 (DLin-TMA.Cl)、1,2-二亞油基醯基-3-三甲基胺基丙烷氯化物鹽 (DLin-TAP.Cl)、1,2-二亞油基氧基-3-(N-甲基哌啶基)丙烷 (DLin-MPZ)、或 3-(N,N-二亞油基胺基)-1,2-丙二醇 (DLinAP)、3-(N,N-二油基胺基)-1,2-丙二醇 (DOAP)、1,2-二亞油基側氧基-3-(2-N,N-二甲基胺基)乙氧基丙烷 (DLin-EG-DMA)、1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷 (DLinDMA)、2,2-二亞油基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧雜環戊烷 (DLin-K-DMA)或其類似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氫-3aH-環戊并[d][1,3]二氧雜環戊烯-5-胺 (ALN100)、4-(二甲基胺基)丁酸 (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯 (MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二碳烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二碳烷基)胺基)乙基)哌啶-1-基)乙基氮烷二基(azanediyl))二-十二碳烷-2-醇 (Tech G1)、或其混合物。

陽離子性脂質可佔粒子中總脂質含量之約 20 莫耳%至約 50 莫耳%或約 40 莫耳%。

【0385】 另一項實施例中，可使用化合物 2,2-二亞油基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷製備脂質-siRNA 奈米粒子。2,2-二亞油基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷之合成法說明於美國臨時專利申請案案號 61/107,998(申請日：2008 年 10 月 23 日)，其揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0386】 一項實施例中，脂質-siRNA 粒子包括 40% 2,2-二亞油基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷：10% DSPC：40% 膽固醇：10% PEG-C-DOMG(莫耳百分比)，粒度為 63.0 ± 20 nm，及 0.027 siRNA/脂質比值。

【0387】 該離子化/非陽離子性脂質可為陰離子性脂質或中性脂質，包括但不限於二硬脂醯基磷脂醯基膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯基膽鹼(DOPC)、二棕櫚醯基磷脂醯基膽鹼(DPPC)、二油醯基磷脂醯基甘油(DOPG)、二棕櫚醯基磷脂醯基甘油(DPPG)、二油醯基-磷脂醯基乙醇胺(DOPE)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯基膽鹼(POPC)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯基乙醇胺(POPE)、二油醯基-磷脂醯基乙醇胺 4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-羧酸鹽(DOPE-mal)、二棕櫚醯基磷脂醯基乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻醯基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂醯基-磷脂醯基-乙醇胺(DSPE)、16-O-單甲基 PE、16-O-二甲基 PE、18-1-反式 PE、1-硬脂醯基-2-油醯基-磷脂醯基乙醇胺(SOPE)、膽固醇、或其混合物。

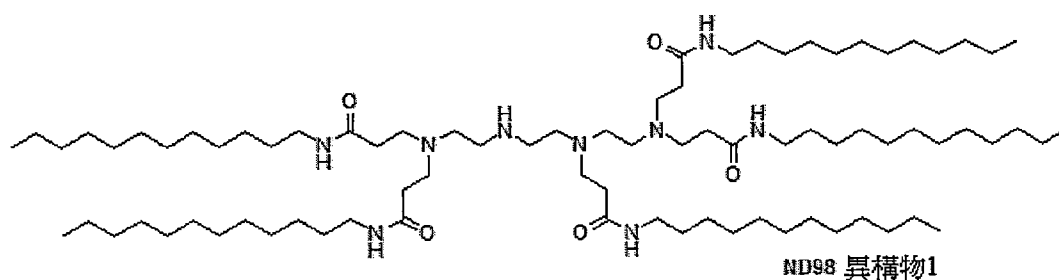
若包含膽固醇時，該非陽離子性脂質可佔粒子中總脂質含量之約 5 莫耳%至約 90 莫耳%、約 10 莫耳%、或約 58 莫耳%。

【0388】 該抑制粒子凝集之接合脂質可為例如聚乙二醇(PEG)-脂質，包括但不限於 PEG-二醯基甘油(DAG)、PEG-二烷基氧丙基(DAA)、PEG-磷脂質、PEG-神經醯胺(Cer)，或其混合物。PEG-DAA 接合物可為例如 PEG-二月桂基氧丙基(Ci₂)、PEG-二肉荳蔻基氧丙基(Ci₄)、PEG-二棕櫚基氧丙基(Ci₆)、或 PEG-二硬脂基氧丙基(Ci₈)。該防止粒子凝集之接合脂質可佔粒子中總脂質含量之 0 莫耳%至約 20 莫耳%或約 2 莫耳%。

【0389】 有些實施例中，該核酸-脂質粒子可進一步包括膽固醇，例如佔粒子中總脂質含量之約 10 莫耳%至約 60 莫耳%或約 48 莫耳%。

一項實施例中，可使用類脂質 ND98·4HCl(MW 1487) (參見美國專利申請案案號 12/056,230，申請日：3/26/2008，其揭示內容已以引用之方式併入本文中)、膽固醇(Sigma-Aldrich)、與 PEG-神經醯胺 C16(Avanti Polar Lipids)製備脂質-dsRNA 奈米粒子(亦即 LNP01 粒子)。分別於乙醇中製備各儲備液如下：ND98，133 mg/ml；膽固醇，25 mg/ml；PEG-神經醯胺 C16，100 mg/ml。然後由 ND98、膽固醇、與 PEG-神經醯胺 C16 儲備液依例如 42：48：10 莫耳比組合。組合之脂質溶液再與 dsRNA 水溶液(例如乙酸钠溶液，pH 5)混合，使最終乙醇濃度為約 35-45%，最

終乙酸鈉濃度為約 100-300 mM。通常會在混合時自發形成脂質-dsRNA 奈米粒子。依所需粒度分佈而定，所得奈米粒子混合物可使用例如熱桶擠押機，如：Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc)，經過聚碳酸膜(例如截斷值 100 nm)擠押。有時候可以省略擠押步驟。可採用例如透析或切向流過濾法排除乙醇，並同時進行緩衝液交換。緩衝液可與例如約 pH 7，例如約 pH 6.9、約 pH 7.0、約 pH 7.1、約 pH 7.2、約 pH 7.3、或約 pH 7.4 之磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS)交換。



式 1

【0390】 LNP01 調配物說明於例如國際申請案公開案案號 WO 2008/042973，其揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0391】 其他脂質-dsRNA 調配物實例說明於表 A。

表 A

	可離子化/陽離子性脂質	陽離子性脂質/非陽離子性脂質/膽固醇/PEG-脂質接合物 脂質：siRNA 比值
SNALP-1	1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷 (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/膽固醇/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂質：siRNA ~ 7 : 1
2-XTC	2,2-二亞油基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DPPC/膽固醇/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂質：siRNA ~ 7 : 1
LNP05	2,2-二亞油基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質：siRNA ~ 6 : 1
LNP06	2,2-二亞油基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質：siRNA ~ 11 : 1
LNP07	2,2-二亞油基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質：siRNA ~ 6 : 1
LNP08	2,2-二亞油基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5 , 脂質：siRNA ~ 11 : 1
LNP09	2,2-二亞油基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA 10 : 1

LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氫-3aH-環戊并[d][1,3]二氧雜環戊烯-5-胺(ALN100)	ALN100/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA 10：1
LNP11	4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(MC3)	MC-3/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA 10：1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二碳烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二碳烷基)胺基)乙基)吡啶-1-基)乙基氮烷二基(azanediyl))二-十二碳烷-2-醇(Tech G1)	Tech G1/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA 10：1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA：33：1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂質：siRNA：11：1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂質：siRNA：11：1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA：7：1

LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA：10：1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA：12：1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂質：siRNA：8：1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA：10：1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA：7：1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA：10：1

DSPC：二硬脂醯基磷脂醯基膽鹼

DPPC：二棕櫚醯基磷脂醯基膽鹼

PEG-DMG：PEG-二肉豆蔻醯基甘油(C14-PEG 或 PEG-C14)
(PEG 平均分子量為 2000)

PEG-DSG：PEG-二硬脂基甘油(C18-PEG 或 PEG-C18)(PEG
平均分子量為 2000)

PEG-cDMA：PEG-胺甲醯基-1,2-二肉豆蔻基氧丙基胺(PEG
平均分子量為 2000)

【0392】 包含 SNALP(1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA))之調配物說明於國際公開案案號 WO2009/127060(申請日：2009 年 4 月 15 日)，其揭示內容已以引用之方式併入本文中於表 1。

【0393】 包含 XTC 之調配物說明於例如美國臨時序號 61/148,366(申請日 2009 年 1 月 29 日)；美國臨時序號 61/156,851(申請日 2009 年 3 月 2 日)；美國臨時序號(申請日 2009 年 6 月 10 日)；美國臨時序號 61/228,373(申請日 2009 年 7 月 24 日)；美國臨時序號 61/239,686(申請日 2009 年 9 月 3 日)；及國際申請案案號 PCT/US2010/022614 (申請日 2010 年 1 月 29 日)，其等完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0394】 包含 MC3 之調配物說明於例如美國公開案案號 2010/0324120(申請日 2010 年 6 月 10 日)，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0395】 包含 ALNY-100 之調配物說明於國際專利申請案案號 PCT/US09/63933(申請日 2009 年 11 月 10 日)，其完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0396】 包含 C12-200 之調配物說明於美國臨時序號 61/175,770(申請日 2009 年 5 月 5 日)與國際申請案案號 PCT/US10/33777(申請日 2010 年 5 月 5 日)，其等完整揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【0397】 供經口投藥之組成物與調配物包括粉劑或粒劑、微粒、奈米粒、含於水性或非水性介質中之懸浮液

或溶液、膠囊、明膠囊、藥包、錠劑或迷你錠劑。可能需要增稠劑、調味劑、稀釋劑、乳化劑、分散助劑或結合劑。有些實施例中，經口調配物為彼等其中由如本發明所說明特徵之 dsRNA 與一或多種滲透加強劑界面活性劑及螯合劑組合投藥。合適界面活性劑包括脂肪酸與/其或酯類或鹽類、膽汁酸與/或其鹽類。合適膽汁酸/鹽類包括鵝去氧膽酸(CDCA)與熊去氧膽酸(UDCA)、膽酸、去氫膽酸、去氧膽酸、葡膽酸、甘膽酸、去氧甘膽酸、牛磺膽酸、牛磺去氧膽酸、牛磺-24,25-二氫-褐黴酸鈉與醣二氫褐黴酸鈉。合適脂肪酸包括花生四烯酸、十一碳烷酸、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、單油酸甘油酯、二月桂酸甘油酯、1-單癸酸甘油酯、1-十二碳烷基氮雜環庚烷-2-酮、醯基肉鹼、醯基膽鹼、或單酸甘油酯、二酸甘油酯或其醫藥上可接受之鹽(例如鈉鹽)。有些實施例中，可使用滲透加強劑之組合，例如脂肪酸/鹽類與膽汁酸/鹽類之組合。其中一種組合實例為月桂酸之鈉鹽、癸酸與 UDCA 之組合。其他滲透加強劑包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-鯨蠟基醚。如本發明所說明特徵之 dsRNA 可呈包括噴霧乾燥之粒子或複合形成微粒或奈米粒子之粒型經口傳遞。dsRNA 複合劑包括聚-胺基酸；聚亞胺；聚丙烯酸酯；聚烷基丙烯酸酯、聚氧雜環丁烷(oxethane)、聚烷基氰基丙烯酸酯；陽離子化明膠、白蛋白、澱粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)與澱粉；聚烷基氰基丙烯酸酯；DEAE-衍生之聚亞

胺、短梗黴多醣(pollulans)、纖維素與澱粉。合適複合劑包括幾丁聚醣、N-三甲基幾丁聚醣、聚-L-離胺酸、聚組胺酸、聚鳥胺酸、聚精胺、魚精蛋白，聚乙烯吡啶、聚硫二乙基胺基甲基乙烯 P(TDAE)、聚胺基苯乙烯(例如對胺基)、聚(甲基氰基丙烯酸酯)、聚(乙基氰基丙烯酸酯)、聚(丁基氰基丙烯酸酯)、聚(異丁基氰基丙烯酸酯)、聚(異己基氰基丙烯酸酯)、DEAE-甲基丙烯酸酯、DEAE-己基丙烯酸酯、DEAE-丙烯醯胺、DEAE-白蛋白與 DEAE-葡聚糖、聚甲基丙烯酸酯、聚己基丙烯酸酯、聚(D,L-乳酸)、聚(DL-乳酸-共-乙醇酸(PLGA)、藻酸鹽、與聚乙二醇(PEG)。dsRNA之口服調配物與其製法詳細說明於美國專利案 6,887,906、美國公開案案號 20030027780 與美國專利案案號 6,747,014，其揭示內容已分別以引用之方式併入本文中。

【0398】 供非經腸式、(腦)實質內、鞘內、腦室內或肝內投藥之組成物與調配物可包括無菌水溶液，其中亦可包含緩衝劑、稀釋劑與其他合適添加劑，如但不限於滲透加強劑、載劑化合物與其他醫藥上可接受之載劑或賦形劑。

【0399】 本發明醫藥組成物包括但不限於溶液、乳液與包含脂質體之調配物。此等組成物可由各種不同組份產生，包括但不限於預形成之液體、自我乳化之固體與自我乳化之半固體。當治療肝病變(如肝癌瘤)時，以靶向肝臟之調配物特別佳。

【0400】 適合呈單位劑型之本發明醫藥調配物可依據醫藥業習知技術製備。此等技術包括組合活性成份與醫

藥載劑(群)或賦形劑(群)之步驟。通常，調配物之製法為均勻且密切組合活性成份與液態載劑或細碎固態載劑或二者，然後若必要時，使產物成型。

【0401】 本發明組成物可調配成許多可能劑型中之任一種，如但不限於錠劑、膠囊、明膠囊、液態糖漿、軟明膠囊、栓劑與灌腸劑。本發明組成物亦可於水性、非水性或混合介質中調配成懸浮液。水性懸浮液可進一步包含可提高該懸浮液黏度之物質，包括例如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇與/或葡聚糖。該懸浮液亦可包含安定劑。

【0402】

C. 其他調配物

i. 乳液

本發明組成物可製造並調配成乳液。乳液為其中一種液體呈直徑通常不超過 $0.1\mu\text{m}$ 之液滴型態勻散在另一種液體中之典型不均相系統(參見例如「Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems」, Allen, LV.、Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins(第 8 版), New York, NY; Idson 述於「Pharmaceutical Dosage Forms」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 199; Rosoff 述於「Pharmaceutical Dosage Forms」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 245; Block 述於「Pharmaceutical Dosage Forms」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker,

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

【0403】 乳液之特徵在於很低或沒有熱力學安定性。通常，乳液之分散相或不連續相均勻分佈在外相或連續相內，並利用乳化劑或調配物之黏度維持此型式。乳液之任一相可以為半固體或固體，如乳液型油膏基質與乳霜。其他安定乳液方式可以使用乳化劑，引進乳液之任一相中。乳化劑可廣義分為四類：合成性界面活性劑、天然乳化劑、吸收基質、與均勻分散之固體(參見例如「Ansel's

Dosage Forms and Drug Delivery Systems」, Allen, LV.、Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins(第 8 版), New York, NY; Idson 述於「*Parmaceutical Dosage Forms*」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 199)。

【0404】 合成性界面活性劑亦已知為表面活性劑，已廣泛用於乳液之調配物，且已於文獻中說明(參見例如「*Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems*」, Allen, LV.、Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins(第 8 版), New York, NY; Rieger 述於「*Parmaceutical Dosage Forms*」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 285; Idson 述於「*Parmaceutical Dosage Forms*」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, 第一冊, p. 199)。界面活性劑通常為兩親性，其包含親水性與疏水性部份。界面活性劑之親水性對疏水性性質之比值稱為親水性/親脂性平衡值(HLB)，係在製備調配物時用於分類及選擇界面活性劑之有利工具。界面活性劑可依據親水性基團性質分成不同類型：非離子性、陰離子性、陽離子性、與兩親性(參見例如「*Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems*」, Allen, LV.、Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins(第 8 版), New York, NY; Rieger 述於「*Parmaceutical Dosage Forms*」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker,

Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 285)。

【0405】 用於乳液調配物之天然乳化劑包括羊毛脂、蜂蠟、磷脂、卵磷脂與阿拉伯膠。吸收性基質具有親水性性質，因此可被水吸收形成 w/o 乳液，但仍保留其半固態堅實度，如：無水羊毛脂與親水性石蠟。亦可使用細碎固體作為良好乳化劑，尤其與界面活性劑組合及用於黏性製劑中時。此等包括極性無機固體，如重金屬氫氧化物、非膨脹性黏土，如皂土、矽鎂土、鋰蒙脫石、高嶺土、蒙脫土、膠體矽酸鋁與膠體矽酸鎂鋁、色素、與非極性固體，如：碳或三硬脂酸甘油酯。

【0406】 乳液調配物中亦可包括許多種不同之非乳化材料，其可賦與乳液性質。此等物質包括脂肪、油類、蠟類、脂肪酸、脂肪醇類、脂肪酯類、保濕劑、親水性膠體、防腐劑與抗氧化劑(Block 述於「*Parmaceutical Dosage Forms*」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 335; Idson 述於「*Parmaceutical Dosage Forms*」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 199)。

【0407】 親水性膠體或水膠體包括天然膠質與合成性聚合物，如多醣類(例如阿拉伯膠、洋菜、藻酸、鹿角菜膠、關華豆膠、卡拉膠與黃蓍膠)、纖維素衍生物(例如羧甲基纖維素與羧丙基纖維素)、與合成性聚合物(例如卡波姆(carbomers)、纖維素醚、及羧乙烯基聚合物)。此等物質

於水中分散或膨脹，形成膠體溶液，藉由在分散相之液滴周圍形成強力介面膜並提高外相之黏度，而安定該乳液。

【0408】 由於乳液經常包含許多如：碳水化合物、蛋白質、固醇類、與磷脂之成份，很容易支持微生物生長，因此此等調配物經常添加防腐劑。常用於包括在乳液調配物中之防腐劑包括對羥基苯甲酸甲基酯、對羥基苯甲酸丙基酯、四級銨鹽類、氯化苄二甲烴銨、對羥基苯甲酸之酯類、與硼酸。亦經常添加抗氧化劑至乳液調配物中，以防止調配物劣化。所使用之抗氧化劑可為游離基清除劑，如生育酚、沒食子酸烷基酯、丁基化羥基苯甲醚、丁基化羥基甲苯，或還原劑，如抗壞血酸與偏亞硫酸氫鈉，與抗氧化促效劑，如檸檬酸、酒石酸與卵磷脂。

【0409】 乳液調配物經由皮膚、口、與非經腸式途徑之用途與其製造方法已有文獻說明(參見例如「Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems」, Allen, LV.、Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins(第 8 版), New York, NY; Idson 述於「Pharmaceutical Dosage Forms」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 199)。用於經口傳遞之乳液調配物因為容易調配，且從吸收效力與生體可用率觀點，已極廣泛使用(參見例如「Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems」, Allen, LV.、Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins(第 8 版), New York, NY; Rosoff 述於「Pharmaceutical Dosage

Forms」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 245; Idson 述於「Parmaceutical Dosage Forms」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 199)。以礦物油為基質之緩瀉劑、油溶性維生素與高脂肪營養製劑為常用於呈 o/w 乳液經口投藥之材料。

【0410】

ii. 微乳液

本發明一項實施例中, iRNA 與核酸之組成物係調配成微乳液。微乳液之定義為由水、油與兩親物形成單一之光學上各向同性且熱力學上安定之液體溶液之系統(參見例如「Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems」, Allen, LV.、Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins(第 8 版), New York, NY; Rosoff 述於「Parmaceutical Dosage Forms」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 245)。典型微乳液為先讓油分散在水性界面活性劑溶液中, 然後添加足量之第四組份所形成之系統, 通常添加中鏈長醇類, 以形成透明系統。因此, 微乳液亦稱為兩種不混溶液體之動力學上安定之各向同性透明分散液, 其係利用表面活性分子之界面膜安定化(Leung 與 Shah 述於:「Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate System」, Rosoff, M,編輯, 1989, VCH Publishers, New York, p.185-215)。微乳液通常係由 3 至 5 種組份組合

製成，其包括油、水、界面活性劑、輔界面活性劑與電解質。該微乳液為油包水(w/o)或水包油(o/w)型端賴所使用油與界面活性劑之性質及界面活性劑分子之極性頭端與烴尾端之結構與幾何堆疊而定(Schott 述於「Remington's Pharmaceutical Sciences」, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271)。

【0411】 利用相態圖之現象學方法已有深入研究，且已產生大量知識，讓熟悉此相關技術者了解如何調配微乳液(參見例如「Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems」, Allen, LV.、Popovich NG.與 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins(第8版), New York, NY; Rosoff 述於「Pharmaceutical Dosage Forms」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 245; Block 述於「Pharmaceutical Dosage Forms」, Lieberman、Rieger 與 Banker(編輯), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第一冊, p. 335)。相較於一般乳液，微乳液之優點在於可在自發性形成之熱力學上安定之液滴之調配物中溶解水不溶性藥物。

【0412】 製備微乳液時所使用之界面活性劑包括但不限於離子性界面活性劑、非離子性界面活性劑、Brij 96、聚氧乙烯油基醚類、聚甘油脂肪酸酯類、單月桂酸四甘油酯(ML310)、單油酸四甘油酯(MO310)、單油酸六甘油酯(PO310)、五油酸六甘油酯(PO500)、單癸酸十甘油酯(MCA750)、單油酸十甘油酯(MO750)、倍半油酸十甘油酯

(SO750)、十油酸十甘油酯(DAO750)，其可單獨使用或與輔界面活性劑組合使用。輔界面活性劑通常為短鏈醇，如：乙醇、1-丙醇、與 1-丁醇，其藉由滲透至界面活性劑膜中，在界面活性劑分子之間產生空隙，因此造成無序膜，而提高界面流動性。然而不需要使用輔界面活性劑亦可製備微乳液，且相關技藝上已知不含醇之可自我乳化之微乳液系統。典型之水相為但不限於水、藥物水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇、與乙二醇之衍生物。該油相可包括但不限於下列材料，如：Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯類、中鏈(C8-C12)單酸-、二酸-、與三酸甘油酯、聚氧乙基化甘油基脂肪酸酯類、脂肪醇類、聚二醇化甘油酯類、飽和聚二醇化 C8-C10 甘油酯類、植物油與矽酮油類。

【0413】 從藥物溶解度與加強藥物吸收性之觀點而言，微乳液特別值得注意。已提出基於脂質之微乳液(o/w 與 w/o 二者)來加強藥物(包括肽)之口服生體可用率(參見例如美國專利案案號 6,191,105；7,063,860；7,070,802；7,157,099；Constantinides 等人，*Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390；Ritschel 之 *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205)。微乳液提供之優點為改善藥物溶解性、保護藥物免於酵素水解、可能基於界面活性劑誘發改變膜流動性與通透性而加強藥物吸收性、容易製備、比固態劑型容易經口投藥、改善臨床效力、及降低毒性(參見例如美國專利案案號 6,191,105；7,063,860；7,070,802；

7,157,099; Constantinides 等人, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho 等人, *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143)。當於環境溫度下將微乳液組份組合在一起時，經常可自發性形成微乳液。當調配對熱敏感之藥物、肽、或 iRNA 時，微乳液特別有利。微乳液亦可在化妝品與醫藥用途上有效地穿皮式傳遞活性組份。預期本發明微乳液組成物與調配物將可促進提高 iRNA 與核酸在胃腸道之全身吸收性，並改善局部細胞吸收 iRNA 與核酸。

【0414】 本發明微乳液亦可包含其他組份與添加劑，如：山梨糖醇酐單硬脂酸酯(Grill 3)、聚乙二醇-8-辛酸/癩酸酯(Labrasol)與滲透加強劑，以改善調配物性質，及加強本發明 iRNA 與核酸之吸收性。本發明微乳液所採用之滲透加強劑可分為 1 至 5 大類：界面活性劑、脂肪酸類、膽汁鹽類、螯合劑與非螯合性非界面活性劑(Lee 等人「Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems」, 1991, p. 92)。各類此等物質已於上文中討論。

【0415】

iii. 微粒子

本發明 iRNA 劑可以併至粒子，例如微粒子。微粒子可由噴霧乾燥法產生，但亦可採用其他方法，包括冷凍乾燥、蒸發、流化床乾燥法、真空乾燥、或此等技術之組合。

【0416】

iv. 滲透加強劑

一項實施例中，本發明使用各種不同滲透加強劑，讓

核酸(特定言之 iRNA)有效傳遞至動物皮膚。大多數藥物在溶液中係呈離子化與非離子化型。然而，通常僅有脂質可溶性或親脂性藥物容易通過細胞膜。已發現，若膜經過滲透加強劑處理時，即使非親脂性藥物亦可穿過細胞膜。除了協助非親脂性藥物擴散通過細胞膜，滲透加強劑亦可加強親脂性藥物之通透性。

【0417】 滲透加強劑可分成 1 至 5 大類，亦即界面活性劑、脂肪酸、膽汁鹽類、螯合劑、與非螯合性非界面活性劑(參見例如 Malmsten, M.之「Surfactants and polymers in drug delivery」, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee 等人之「Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems」, 1991, p.92)。上述各類滲透加強劑將更詳細說明於下文中。

【0418】 界面活性劑(或「表面活性劑」)為一種在溶於水溶液中時可以降低溶液之表面張力或水溶液與另一種液體之間之界面張力之化學物質，結果將加強 iRNA 通過黏膜之吸收性。除了膽汁鹽類與脂肪酸外，此等滲透加強劑包括例如月桂基硫酸鈉、聚氧乙烯-9-月桂基醚與聚氧乙烯-20-鯨蠟基醚(參見例如 Malmsten, M.之「Surfactants and polymers in drug delivery」, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee 等人之「Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems」, 1991, p.92)；與全氟化學乳液，如：FC-43。Takahashi 等人，*J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252)。

【0419】 可作為滲透加強劑之各種不同脂肪酸與其衍生物包括例如油酸、月桂酸、癸酸(正癸酸)、肉豆蔻酸、棕櫚酸、硬脂酸、亞油酸、亞麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、單油酸甘油酯(1-單油基-消旋性-甘油)、二月桂酸甘油酯、辛酸、花生四烯酸、1-單癸酸甘油酯、1-十二碳烷基氮雜環庚烷-2-酮、醯基肉鹼、醯基膽鹼、其 C_{1-20} 烷基酯(例如甲基酯、異丙基酯與第三丁基酯)、及其單酸-與二酸甘油酯(亦即油酸酯、月桂酸酯、癸酸酯、肉豆蔻酸酯、棕櫚酸酯、硬脂酸酯、亞油酸酯等等)(參見例如 Touitou, E.等人之「Enhancement in Drug Delivery」, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee 等人「Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems」, 1991, p.92; Muranishi 之「Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems」, 1990, 7, 1-33; El Hariri 等人, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654)。

【0420】 膽汁之生理性角色包括促進脂質與脂溶性維生素分散與吸收(參見例如 Malmsten, M.之「Surfactants and polymers in drug delivery」, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton 述於:「Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics」, 第 38 章, 第 9 版, Hardman 等人編輯, McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935)。各種不同天然膽汁鹽類與其合成性衍生物均可作為滲透加強劑。因此術語「膽汁鹽類」包括膽汁之任何天然組份及其任何合成性衍生物。合適膽汁鹽包括例如膽

酸(或其醫藥上可接受之鈉鹽、膽酸鈉)、去氫膽酸(去氫膽酸鈉)、去氧膽酸(去氧膽酸鈉)、葡膽酸(葡膽酸鈉)、甘膽酸(甘膽酸鈉)、去氧甘膽酸(去氧甘膽酸鈉)、牛磺膽酸(牛磺膽酸鈉)、牛磺去氧膽酸(牛磺去氧膽酸鈉)、鵝去氧膽酸(鵝去氧膽酸鈉)、熊去氧膽酸(UDCA)、牛磺-24,25-二氫-褐黴酸鈉(STDHF)、甘油二氫褐黴酸鈉與聚氧乙烯-9-月桂基醚(POE)(參見例如 Malmsten, M.之「Surfactants and polymers in drug delivery」, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee 等人之「Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems」, 1991, p.92; Swinyard 述於:「Remington's Pharmaceutical Sciences」, 第 18 版, 第 39 章, Gennaro 編輯, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, p. 782-783; Muranishi 之「Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems」, 1990, 7, 1-33; Yamamoto 等人, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita 等人, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583)。

【0421】 本發明所使用之螯合劑可定義為可讓溶液中金屬離子與其形成複合物而藉以排除之化合物，結果可以藉此加強 iRNA 透過黏膜之吸收性。螯合劑在本發明中作為滲透加強劑之相關用法中，其附加優勢在於亦可作為 DNase 抑制劑，因為大多數已判斷特徵之 DNA 核酸酶均需要二價金屬離子進行催化作用，因此可被螯合劑抑制 (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339)。合適螯合劑包括但不限於乙二胺四乙酸二鈉(EDTA)、檸檬酸、水楊酸

鹽(例如水楊酸鈉、5-甲氧基水楊酸鹽與高碳香蘭酸鹽)、
 膠原蛋白之 N-醯基衍生物、月桂基醚-9 與 β -二酮之 N-胺
 基醯基衍生物(烯胺類)(參見例如 Katdare, A. 等人之
 「Excipient development for pharmaceutical, biotechnology,
 and drug delivery」, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee
 等人「Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier
 Systems」, 1991, p. 92; Muranishi 之「Critical Reviews in
 Therapeutic Drug Carrier Systems」, 1990, 7, 1-33; Buur
 等人, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51)。

【0422】 本文所採用非螯合性非界面活性劑之加強
 滲透性化合物可定義為已證實沒有顯著螯合劑或界面活性
 劑活性，但仍可加強 iRNA 透過消化道黏膜吸收之化合物
 (參見例如 Muranishi 之「Critical Reviews in Therapeutic
 Drug Carrier Systems」, 1990, 7, 1-33)。此類滲透加強劑
 包括例如不飽和環狀脲類、1-烷基-與-1-烯基氮雜環-烷酮
 類衍生物(Lee 等人「Critical Reviews in Therapeutic Drug
 Carrier Systems」, 1991, p.92); 及非類固醇消炎劑，如：
 雙氯芬酸鈉(diclofenac sodium)、吲哚美辛(indomethacin)
 與苯丁吡唑酮(phenylbutazone)(Yamashita 等人, *J. Pharm.
 Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626)。

【0423】 亦可在本發明醫藥與其他組成物中添加可
 在細胞層級上加強吸收 iRNA 之製劑。亦已知例如陽離子
 性脂質，如：脂染素(lipofectin)(Junichi 等人，美國專利案
 案號 5,705,188)、陽離子性甘油衍生物、與聚陽離子性分

子，如：聚離胺酸(Lollo 等人，PCT 申請案 WO 97/30731)可加強細胞吸收 dsRNA。可自商品取得之轉染劑實例包括例如 Lipofectamine™(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine 2000™(Invitrogen; Carlsbad, CA)、293fectin™(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA)、DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA)、FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA)、iRNAMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Oligofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA)、X-tremeGENE Q2 轉染試劑(Roche; Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOTAP 脂質體轉染試劑(Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOSPER 脂質體轉染試劑(Grenzacherstrasse, Switzerland)、或 Fugene (Grenzacherstrasse, Switzerland)、Transfectam® 試劑(Promega; Madison, WI)、TransFast™ 轉染試劑(Promega; Madison, WI)、Tfx™-20 試劑(Promega; Madison, WI)、Tfx™-50 試劑(Promega; Madison, WI)、DreamFect™ (OZ Biosciences; Marseille, France)、EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, France)、TransPass^a D1 轉染試劑(New England Biolabs; Ipswich, MA, USA)、LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, USA)、PerFectin 轉染試劑(Genlantis; San Diego, CA, USA)、NeuroPORTER 轉染試劑(Genlantis; San Diego, CA, USA)、GenePORTER 轉

染試劑(Genlantis; San Diego, CA, USA)、GenePORTER 2 轉染試劑(Genlantis; San Diego, CA, USA)、Cytofectin 轉染試劑(Genlantis; San Diego, CA, USA)、BaculoPORTER 轉染試劑(Genlantis; San Diego, CA, USA)、TroganPORTER™ 轉染試劑(Genlantis; San Diego, CA, USA)、RiboFect (Bioline; Taunton, MA, USA)、PlasFect (Bioline; Taunton, MA, USA)、UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA)、SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA)、或 HiFect™ (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA 等等。

【0424】 其他可用於為所投與核酸加強滲透之製劑包括二醇類如乙二醇與丙二醇、吡咯類如 2-吡咯、氮酮類與萜烯類，如檸檬烯與薄荷酮。

【0425】

v. 載劑

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

酸或 4-乙醯胺基-4'異硫氰基-芪-2,2'-二磺酸共同投藥時，可減少肝臟組織回收部份硫代磷酸 dsRNA(Miyao 等人，DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura 等人，DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

【0426】

vi. 賦形劑

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

【0427】 亦可使用適合非-非經腸式投藥且不會與核酸有不利反應之醫藥上可接受之有機或無機賦形劑來調配本發明組成物。合適之醫藥上可接受之載劑包括但不限於水、鹽溶液、醇類、聚乙二醇、明膠、乳糖、直鏈澱粉、硬脂酸鎂、滑石、矽酸、黏性石蠟、羥甲基纖維素、聚乙

烯吡咯啉酮等等。

【0428】 供局部投與核酸之調配物可包括無菌與非無菌水溶液、於常用溶劑(如醇類)中之非水性溶液、或含核酸之液態或固態油基質溶液。溶液中亦可包含緩衝劑、稀釋劑與其他合適添加劑。可使用適合非-非經腸式投藥且不會與核酸有不利反應之醫藥上可接受之有機或無機賦形劑。

【0429】 合適之醫藥上可接受之賦形劑包括但不限於水、鹽溶液、醇、聚乙二醇、明膠、乳糖、直鏈澱粉、硬脂酸鎂、滑石、矽酸、黏性石蠟、羥甲基纖維素、聚乙烯吡咯啉酮等等。

【0430】

vii. 其他組份

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

【0431】 水性懸浮液可包含提高懸浮液黏度之物質，包括例如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇與/或葡聚糖。該懸浮液亦可包含安定劑。

【0432】 有些實施例中，如本發明所說明特徵之醫藥組成物包括(a)一或多種 iRNA 化合物與(b)一或多種其功能為非 iRNA 機轉且適用於治療 TTR 相關病變之製劑。

【0433】 此外，亦可使用其他常用於保護肝臟之物質(如：水飛薊(silymarin))與本文說明之 iRNA 組合使用。其他適用於治療肝臟疾病之製劑包括替比夫定(telbivudine)、恩替卡韋(entecavir)與蛋白質酶抑制劑(如：特拉匹韋(telaprevir))與其他揭示於例如 Tung 等人之美國申請案公開案號 2005/0148548、2004/0167116、與 2003/0144217；及 Hale 等人之美國申請案公開案號 2004/0127488 中者。

【0434】 此等化合物之毒性與醫療效力可採用標準醫藥製程，於細胞培養中或實驗動物中測定，例如測定 LD50(造成 50%族群死亡時之劑量)與 ED50(有效醫療 50%族群時之劑量)。毒性與醫療效應之間之劑量比值即為醫療指數，以 LD50/ED50 比值表示。以醫療指數高之化合物較佳。

【0435】 可採用由細胞培養分析法與動物研究得到之數據來調配用於人類之劑量範圍。如本發明所說明特徵之組成物之劑量通常落在包括極低或無毒性之 ED50 之循環濃度範圍內。劑量可依所採用劑型及所利用之投藥途徑，在此範圍內變化。用於如本發明所說明特徵之方法所

使用之任何化合物之醫療有效劑量可先從細胞培養分析法估測。可在動物模式中調配劑量，以使該化合物或若適當時使標靶序列之多肽產物之循環血漿濃度範圍達到(例如降低多肽濃度達到)包括細胞培養物所決定 IC50(亦即試驗化合物使症狀達到一半最大抑制性時之濃度)在內之範圍。此等資訊可用於更精確決定適用於人類之劑量。可藉由例如高效液相層析法測定血漿中濃度。

【0436】 除了如上述投藥法外，如本發明所說明特徵之 iRNA 可與其他已知可有效治療受 TTR 表現介導之病理過程之製劑組合投藥。任何情況下，投藥之醫師均可依據採用相關技藝上已知或本文所說明標準效力測定法所觀察到之結果來調整 iRNA 之投藥量與投藥時間。

【0437】

VIII. 套組

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雙股 RNAi 劑及提供使用說明之標籤，其指示該雙股製劑可用於任何本發明方法。該套組可視需要再包含讓細胞接觸 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，如，例如血漿檢體。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式。

【0438】 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。例如 RNAi 劑可於注射用無菌水中形成 500 mg/ml、450 mg/ml、400 mg/ml、350 mg/ml、300 mg/ml、250 mg/ml、200 mg/ml、150 mg/ml、100 mg/ml、50 mg/ml、25 mg/ml、20 mg/ml、15 mg/ml、或 10 mg/ml 溶液提供。

【0439】 本發明利用下列不應構成限制之實例說明。本申請案所摘錄之所有參考文獻與公開專利案與專利申請案之揭示內容已以引用之方式併入本文中。

[實例]

【0440】 下表 1 提供本發明方法所使用雙股 RNAi 劑實例。下表 B 出示核酸序列代表中所採用之核苷酸單體縮寫。咸了解，此等單體當存在於寡核苷酸中時，係利用 5'-3'-磷酸二酯鍵彼此互相鏈結。

表 B.

縮寫	核苷酸
A	腺苷-3'-磷酸
Af	2'-氟腺苷-3'-磷酸
Afs	2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸酯
As	腺苷-3'-硫代磷酸酯
C	胞苷-3'-磷酸
Cf	2'-氟胞苷-3'-磷酸
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
Gf	2'-氟鳥苷-3'-磷酸
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
Tf	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-磷酸
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
Uf	2'-氟尿苷-3'-磷酸
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
as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯

縮寫	核苷酸
c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸
cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸
g	2'-O-甲基鳥苷-3'-磷酸
gs	2'-O-甲基鳥苷-3'-硫代磷酸
t	2'-O-甲基-5-甲基胸腺嘧啶-3'-磷酸
ts	2'-O-甲基-5-甲基胸腺嘧啶-3'-硫代磷酸
u	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸
us	2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
s	硫代磷酸酯鏈結基
L96	N-[三(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
Y34	2-羥基甲基-四氫呋喃-4-甲氧基-3-磷酸(無鹼 基 2'-OMe 呋喃糖)
Y44	2-羥基甲基-四氫呋喃-5-磷酸
(Cgn)	胞苷-乙二醇核酸(GNA)
P	磷酸酯
VP	乙烯基-磷酸酯

表1. TTR dsRNA之經修飾之正義與反義股序列

雙螺旋 ID	正義 ID	正義序列 5'往3'	SEQ ID NO	反義 ID	反義序列 5'往3'	SEQ ID NO
AD-51547	A-106305	UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaacCfaAfgAfl96	16	A-102978	uCfuUfgGfgUfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	23
AD-58142	A-117240	UfsgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaacCfaAfgAfl96	17	A-117241	usCfsuUfgGfgUfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasusc	24
AD-64527	A-128512	usgsggauuucadTguaacaagaL96	18	A-128525	usdCsuuggguuadCaugdAaauccecasusc	25
AD-65367	A-128499	usgsggAfuUfuCfAfUfgUfaaccaagAfl96	19	A-128520	usCfsuuggguuacaugAfaauecccasusc	6
AD-65489	A-131365	usgsggauuucadTguaacaagaL96	20	A-128520	usCfsuuggguuacaugAfaauecccasusc	6
AD-65481	A-131354	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	15	A-131364	UfsCfsuugGfuuacaugAfaAfuucccasusc	26
AD-65488	A-131354	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	15	A-131358	PusCfsuugGfuuacaugAfaAfuucccasusc	27
AD-65496	A-131354	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	15	A-131360	PusCfsuugGfuuAfcAugAfaAfuucccasusc	28
AD-65491	A-128557	usgsggauuucadTguaacY34aagaL96	21	A-128525	usdCsuuggguuadCaugdAaauccecasusc	25
AD-65495	A-131353	usgsggauUfuCfAfUfguaaCfcaagaL96	22	A-128516	usCfsuugGfgUfAfcAugAfaAfuucccasusc	29
AD-65367	A-128499	usgsggAfuUfuCfAfUfgUfaaccaagAfl96	19	A-128520	usCfsuuggguuacaugAfaauecccasusc	6
AD-65493	A-128512	usgsggauuucadTguaacaagaL96	18	A-131366	PusCfsuuggguuacaugAfaauecccasusc	30
AD-65494	A-128512	usgsggauuucadTguaacaagaL96	18	A-128526	PusdCsuuggguuadCaugdAaauccecasusc	31
AD-64527	A-128512	usgsggauuucadTguaacaagaL96	18	A-128525	usdCsuuggguuadCaugdAaauccecasusc	25
AD-66016	A-131354	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	15	A-128520	usCfsuuggguuacaugAfaauecccasusc	6
AD-65492	A-131354	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	15	A-131359	usCfsuugGfuuAfcAugAfaAfuucccasusc	7
AD-66017	A-131354	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	15	A-131903	UfsCfsuugGfuuAfcAugAfaAfuucccasusc	8
AD-66018	A-131354	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	15	A-131902	VPusCfsuugGfuuAfcAugAfaAfuucccasusc	9

【 0441】

實例 1：對健康人體投與單劑之 AD-65492

在第 I 期，隨機，單盲，以安慰劑對照之實驗中，對健康人類自願者投與單劑 5 mg (n=6)、25 mg (n = 6)、50 mg (n=6)、100 mg (n=6)、200 mg (n=6)、或 300 mg (n=6)之 AD-65492 (正義：5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10); 反義：5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7))。表 2 出示參與實驗之個體之人口統計表。

【0442】 參與此第 I 期，隨機，單盲，以安慰劑對照之實驗之另一組健康人類自願者群組亦接受投與單劑之 AD-65492 (正義：5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10); 反義：5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7))。明確言之，此等組別包括非日本人後裔個體，接受單劑 25 mg 之 AD-65492 (n=6)；非日本人後裔個體，接受單劑 50 mg 之 AD-65492 (n=6)；日本人後裔個體，接受單劑 25 mg 之 AD-65492 (n=6)；及日本人後裔個體，接受單劑 50 mg 之 AD-65492 (n=6)。

亦有 20 位個體接受單劑之安慰劑(n=20)。

【0443】 從安慰劑組之個體與來自所有處理組之個體收集血漿樣本，並於第 1、2、3、8、15、22、29、43、57、90 天及針對活性處理組個體，在隨後每 28 天，採用 ELISA 分析法測定樣本中 TTR 蛋白質濃度，直到 TTR 回復到理前濃度之 80%時為止(直到投藥後約一年)(參見例如 Coelho，等人(2013) *N Engl J Med* 369:819)。

表2. 投藥處理組之人口統計表

	安慰劑 (N=12)	5mg (N=6)	25mg (N=6)	50mg (N=6)	100mg (N=6)	200mg (N=6)	300mg (N=6)	總 AD- 65492 (n=36)
年齡中值 (範圍)	32 years (20 – 44)	31 years (20 – 41)	32 years (22 – 37)	30 years (24 – 38)	35 years (19 – 43)	30 years (22 – 33)	27 years (22 – 43)	29 years (19 – 43)
男性 (%)	7 (58%)	4 (67%)	2 (33%)	2 (33%)	3 (50%)	3 (50%)	4 (67%)	18 (50%)
人種(%)								
白人	7 (58%)	5 (83%)	4 (67%)	4 (67%)	3 (50%)	2 (33%)	4 (67%)	22 (61%)
黑人/AA*	2 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	1 (17%)	3 (50%)	2 (33%)	7 (19%)
其他**	3 (25%)	0 (0%)	1 (17%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (6%)
亞洲人	0 (0%)	1 (17%)	1 (17%)	0 (0%)	2 (33%)	1 (17%)	0 (0%)	5 (14%)
平均體重 (範圍)	71 kg (58 – 81)	76 kg (64 – 99)	77 kg (66 – 88)	69 kg (54 – 92)	68 kg (56 – 86)	72 kg (53 – 83)	76 kg (67 – 82)	73 kg (53 – 99)
平均 劑量***	0mg/kg	0.07mg/kg	0.3mg/kg	0.7mg/kg	1.5mg/kg	2.8mg/kg	3.9mg/kg	N/A

* AA = 非裔美國人
** 有些個體選自超過一種人種且包括在「其他」類別中
*** 平均劑量 (mg/kg) = 固定mg/平均體重(kg)

健康人類自願者通常對投與之 AD-65492 有良好耐受性。沒有出現嚴重副作用(SAE)或因副作用而停止實驗。接受投與 AD-65492 之個體報告之所有副作用(AE)之嚴重

性均為輕度或中度。有一部份報告之 AE 被認為可能與 AD-65492 之治療有關。所有此等 AE 均為輕度，且包括注射部位紅斑、注射部位疼痛、瘙癢、咳嗽、噁心、疲勞、與腹部疼痛。注射部位反應(ISR)輕度且暫時。在身體檢查、ECG、生命徵兆、或臨床實驗參數，例如腎功能、血液參數、與肝功能(例如白胺酸胺基轉化酶(ALT)、天冬胺酸胺基轉化酶(AST))沒有臨床上顯著的變化。

【0444】 此研究結果證實，單劑皮下劑量之 AD-65492 可以隨劑量變化之方式，有效且持續減弱 TTR 蛋白質含量。明確言之，第 1 圖證實，單劑皮下劑量之 AD-65492 造成 TTR 減弱最大值為 98.4%，平均最大值為 $98.4\% \pm 0.5\%$ 。表 3 綜合說明處理組之 TTR 減弱最大值。此外，第 1 圖證實 AD-65492 為高度持續之效力。

表 3.

	N	FU (天)	最大值 TTR KD (%)		平均值 (SEM) TTR KD (%)		
			個別	平均值 (SEM)	第29天	第90天	第174天
安慰劑	20	90	41.9	15.5 (3.4)	-16.3 (5.1)	-7.7 (5.2)	N/A
5mg	6	314	74.7	57.1 (5.7)	40.4 (9.0)	56.7 (5.6)	34.8 (11.3)^
25mg	6	314	93.7	85.5 (3.8)	76.1 (5.2)	77.7 (7.8)	70.0 (6.9) [†]
25mg; 重複	6	174	92.5	80.3 (3.6)	65.4 (6.7)	74.0 (7.3)	63.4 (6.9) [†]
25 mg; 非日本人 總數 #	12	174	93.7	82.9 (2.6)	70.7 (4.4)	75.8 (5.1)	66.7 (4.7) [~]
25mg; 日本人	6	174	93.0	75 (6.3)	67.9 (7.2)	69.1 (7.3)	62.5 (12) [†]
50mg	6	314	94.5	87.0 (4.0)	83.6 (2.6)^	86.2 (3.9)	85.9 (5.9)^
50mg; 重複	6	174	94.6	75.9 (9.4)	70.3 (9.5) [†]	82.8 (3.5) [†]	65.9 (7.7) [†]
50 mg; 非日本人 總數 #	12	174	94.6	81.4 (5.1)	76.2 (5.6) [§]	84.7 (2.6)*	74.8 (5.9) [§]
50mg; 日本人	6	174	94.7	89.8 (2.9)	74.2 (4.1)	89.3 (3.1)	82.1 (4.2) [†]

100mg	6	314	97.6	90.7 (3.5)	86.8 (4.3)	89.1 (3.6)	81.6 (6.1)
200mg	6	314	98.3	96.6 (1.2)	94.8 (1.1)	93.4 (4.1)	88.1 (6.6) [†]
300mg	6	314	98.4	97.1 (0.5)	95.4 (0.9)	96.7 (0.6)	94.2 (0.8)
#分別包括25mg與50mg之初始投藥組與重複投藥組之組合數據 ^ n=4; † n=5; § n=9; ~ =10; * n=11							

【 0445】

等效物：

習此相關技藝者咸了解或僅藉由例行實驗即可確認

本文所說明之明確實施例與方法之許多等效物。此等等效物均計畫涵括在下列申請專利範圍內。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商阿尼拉製藥公司(ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.)
<120> 使用甲狀腺素運載蛋白(TTR)irRNA 組成物於治療或預防 TTR 相關疾病之方法
<130> 121301-07020

<140> 106144180
<141> 2017-12-15

<150> US62/435,127
<151> 2016-12-16

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 938
<212> DNA
<213> 智人

<400> 1	
gttgactaag tcaataatca gaatcagcag gtttgcagtc agattggcag ggataagcag	60
cctagctcag gagaagtgag tataaaagcc ccaggctggg agcagccatc acagaagtcc	120
actcattctt ggcaggatgg ctctcctcg tctgctctc ctctgccttg ctggactggt	180
atttgtgtct gaggctggcc ctacgggcac cggatgaatcc aagtgtctc tgatgggtcaa	240
agttctagat gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcatg tgttcagaaa	300
ggctgctgat gacacctggg agccatttgc ctctgggaaa accagtgagt ctggagagct	360
gcatgggctc acaactgagg aggaatttgt agaagggata tacaagtgg aaatagacac	420
caaactttac tggaaggcac ttggcatctc cccattccat gagcatgcag aggtggtatt	480
cacagccaac gactccggcc cccgccgcta caccattgcc gccctgctga gccctactc	540
ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc ctccagtgga	600
cctgaaggac gagggatggg atttcatgta accaagagta ttccattttt actaaagcag	660
tgttttcacc tcatatgcta tgttagaagt ccaggcagag acaataaaaac attcctgtga	720
aaggcacttt tcattccact ttaacttgat ttttaaatt cccttattgt cccttccaaa	780
aaaaagagaa tcaaaatttt acaagaatc aaaggaatc tagaaagtat ctgggcagaa	840
cgctaggaga gatccaaatt tccattgtct tgcaagcaaa gcacgtatta aatatgatct	900
gcagccatta aaaagacaca ttctgtaaaa aaaaaaaaa	938

<210> 2

<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 2	
ugggauuuca uguaaccaag a	21
<210> 3	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 3	
ucuuggguuac augaaaucce auc	23
<210> 4	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 4	
gatgggattt catgtaacca aga	23
<210> 5	
<211> 650	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 5	
acagaagtcc actcattctt ggcaggatgg cttctcatcg tctgtcctc ctctgccttg	60
ctggactgggt atttgtgtct gaggctggcc ctacgggcac cggtgaatcc aagtgtcctc	120
tgatgggtcaa agttctagat gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcatg	180
tgttcagaaa ggctgctgat gacacctggg agccatttgc ctctgggaaa accagtgagt	240
ctggagagct gcatgggctc acaactgagg aggaatttgt agaagggata tacaagtgg	300
aaatagacac caaatcttac tggaaggcac ttggcatctc ccattccat gagcatgcag	360
agggtggatt cacagccaac gactccggcc ccgccgcta caccattgcc gccctgctga	420
gcccctactc ctattccacc acggtgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc	480
ctccagtgga cctgaaggac gagggatggg atttcatgta accaagagta ttccattttt	540
actaaagcag tgttttcacc tcatatgcta tgtagaagt ccaggcagag acaataaaac	600

attcctgtga aaggcacttt tcattccaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 650

<210> 6
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸

<400> 6
ucuugguuac augaaaucce auc 23

<210> 7
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸

<400> 7
ucuugguuac augaaaucce auc 23

<210> 8
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸

<400> 8
ucuugguuac augaaaucce auc 23

<210> 9
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸

<400> 9
ucuugguuac augaaaucce auc 23

<210> 10
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸

<400> 10

ugggauuuca uguaaccaag a

21

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 未知物

<220>

<223> 未知物說明：RFGF 肽

<400> 11

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

1 5 10 15

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知物

<220>

<223> 未知物說明：RFGF 類似物肽

<400> 12

Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro

1 5 10

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> 人類免疫缺乏症病毒

<400> 13

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln

1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 果蠅屬(Drosophila sp.)

<400> 14

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 15

<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 15	
ugggauuuca uguaaccaag a	21
<210> 16	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 16	
ugggauuuca uguaaccaag a	21
<210> 17	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 17	
ugggauuuca uguaaccaag a	21
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<220>	
<223> 組合 DNA/RNA 分子說明：合成性寡核苷酸	
<400> 18	
ugggauuuca tguaacaaag a	21
<210> 19	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 19	
ugggauuuca .uguaaccaag a	21
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<220>	
<223> 組合 DNA/RNA 分子說明：合成性寡核苷酸	
<400> 20	
ugggauuuca tguaacaaag a	21
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<220>	
<223> 組合 DNA/RNA 分子說明：合成性寡核苷酸	
<400> 21	
ugggauuuca tguaacaaga	20
<210> 22	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 22	
ugggauuuca uguaaccaag a	21
<210> 23	
<211> 23	
<212> RNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 23	
ucuuggguuac augaaaucce auc	23
<210> 24	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 24	
ucuuggguuac augaaaucce auc	23
<210> 25	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 25	
ucuuggguuac augaaaucce auc	23
<210> 26	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 26	
ucuuggguuac augaaaucce auc	23
<210> 27	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 27	

ucuugguuac augaaauccc auc	23
<210> 28	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 28	
ucuugguuac augaaauccc auc	23
<210> 29	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 29	
ucuugguuac augaaauccc auc	23
<210> 30	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 30	
ucuugguuac augaaauccc auc	23
<210> 31	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列說明：合成性寡核苷酸	
<400> 31	
ucuugguuac augaaauccc auc	23

申請專利範圍

1. 一種雙股 RNAi 劑於製備用於治療罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體之藥物的用途，其中該藥物係適合以固定劑量約 25 mg 至約 50 mg 投藥，

其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股，

其中該正義股包括核苷酸序列

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3'(SEQ ID NO: 10)，

及反義股包括核苷酸序列

5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3'(SEQ ID NO: 7)，

其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鏈結基，藉以治療罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體。

2. 一種雙股 RNAi 劑於製備用於為罹患 TTR 相關疾病或處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體改善神經損傷或生活品質之至少一指標之藥物的用途，其中該藥物係適合以固定劑量約 25 mg 至約 50 mg 投藥，

其中該雙股 RNAi 劑包含與反義股互補之正義股，

其中該正義股包含核苷酸序列

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3'(SEQ ID NO: 10)，

及該反義股包含核苷酸序列

5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3'(SEQ ID NO: 7)

7) ,

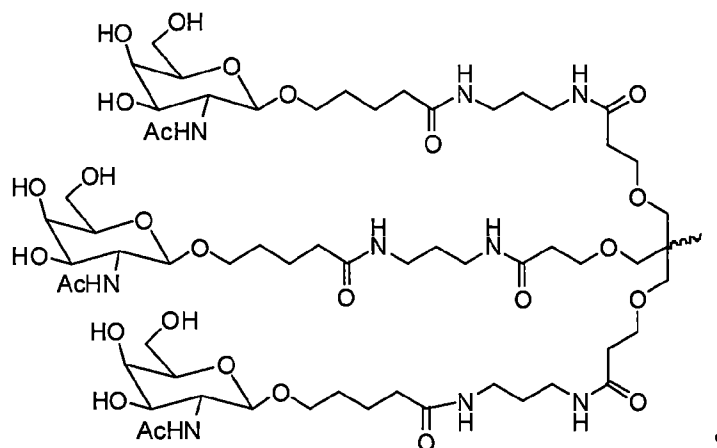
其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；及 s 為硫代磷酸酯鏈結基，藉以改善該人類個體之神經損傷或生活品質之至少一指標。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述之用途，其中該指標為神經損傷指標。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之用途，其中該神經損傷指標為神經病變損傷指數(NIS)或經修正 NIS 指數(mNIS+7)。
5. 如申請專利範圍第 2 項所述之用途，其中該指標為生活品質指標。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之用途，其中該生活品質指標係選自下列所組成之群中：SF-36®健康評估指數(SF-36® health survey score)、Norfolk 生活品質-糖尿病性神經病變(Norfolk Quality of Life-Diabetic Neuropathy)(Norfolk QOL-DN)指數、NIS-W 指數、羅氏整體失能量表(Rasch-built Overall Disability Scale)(R-ODS)指數、複合式自律神經症狀指數(composite autonomic symptom score)(COMPASS-31)、中位體質量指數(median body mass index)(mBMI) 評分、6 分鐘步行檢查(6MWT)指數、與 10 米步行檢查指數。
7. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該人類個體為罹患 TTR 相關疾病之人類個體。

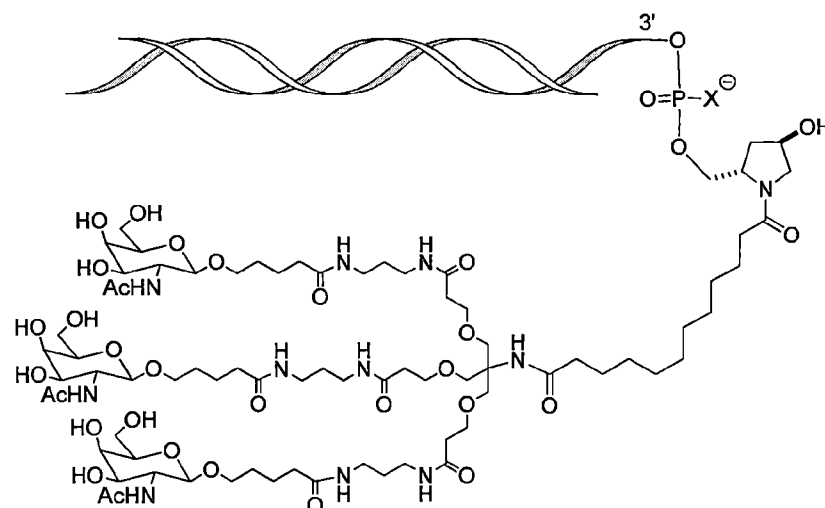
8. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該人類個體為處於發展出 TTR 相關疾病風險之人類個體。
9. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該人類個體帶有與發展出 TTR 相關疾病有關之 TTR 基因突變。
10. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該 TTR 相關疾病係選自下列所組成之群：老年全身性澱粉樣蛋白變性(SSA)、全身性家族性澱粉樣蛋白變性、家族性澱粉樣多發性神經病變(FAP)、家族性澱粉樣蛋白心肌病(FAC)、柔腦膜/中樞神經系統(CNS)澱粉樣蛋白變性、與高甲狀腺素血症。
11. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該人類個體患有甲狀腺素運送蛋白介導之澱粉樣蛋白變性(ATTR amyloidosis)，及該用途降低澱粉樣蛋白 TTR 在該人類個體中之沉積。
12. 如申請專利範圍第 11 項所述之用途，其中該 ATTR 為遺傳性 ATTR(h-ATTR)。
13. 如申請專利範圍第 11 項所述之用途，其中該 ATTR 為非遺傳性 ATTR(wt ATTR)。
14. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該藥物係適合以選自下列所組成群中之投藥方式投藥：皮下、靜脈內、肌內、支氣管內、胸膜內、腹膜內、動脈內、淋巴、腦脊髓、與其任何組合。

15. 如申請專利範圍第 14 項所述之用途，其中該藥物係適合皮下、肌內或靜脈內投藥。
16. 如申請專利範圍第 15 項所述之用途，其中該藥物係適合皮下投藥。
17. 如申請專利範圍第 16 項所述之用途，其中該藥物係適合皮下自我投藥。
18. 如申請專利範圍第 17 項所述之用途，其中該適合皮下自我投藥之藥物係利用預填充之針筒或自動注射針筒。
19. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中 TTR mRNA 表現量或 TTR 蛋白質表現量係於來自人類個體之檢體中進行分析。
20. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該藥物係適合每 3 個月、每 4 個月、每 5 個月、每 6 個月、每 9 個月、或每 12 個月投藥。
21. 如申請專利範圍第 20 項所述之用途，其中該藥物係適合約每 3 個月一次投藥。
22. 如申請專利範圍第 20 項所述之用途，其中該藥物係適合約每 6 個月一次投藥。
23. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該藥物係適合長期投藥。
24. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該藥物係適合以固定劑量約 25 mg 投藥。
25. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該藥物係適合以固定劑量約 50 mg 投藥。

26. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該藥物係包括其他醫療劑。
27. 如申請專利範圍第 26 項所述之用途，其中該其他醫療劑為 TTR 四聚物安定劑與/或非類固醇消炎劑。
28. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該雙股 RNAi 劑之正義股係接合至少一個配體。
29. 如申請專利範圍第 28 項所述之用途，其中該配體係透過二價或三價分支鏈結體附接一或多個 GalNAc 衍生物。
30. 如申請專利範圍第 28 項所述之用途，其中該配體為



31. 如申請專利範圍第 28 項所述之用途，其中該配體係附接正義股之 3'端。
32. 如申請專利範圍第 31 項所述之用途，其中該 RNAi 劑係接合如下方案所示之配體



其中 X 為 O 或 S。

33. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之用途，其中該 RNAi 劑之正義股包含核苷酸序列

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96-3'(SEQ ID NO :

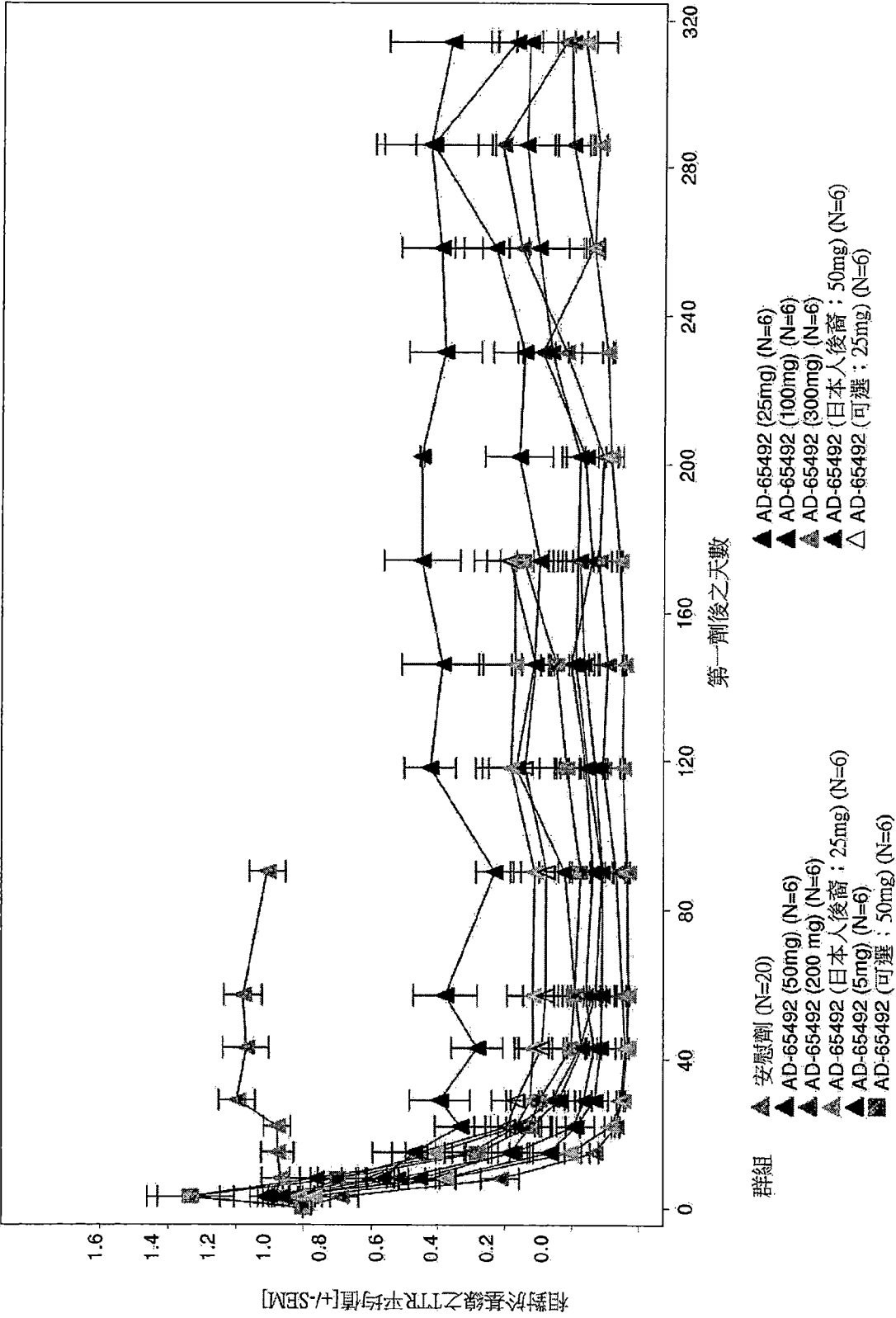
15)，及該 RNAi 劑之反義股包含核苷酸序列

5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3'(SEQ ID NO :

7)，

其中 a、c、g、與 u 為 2'-O-甲基(2'-OMe) A、C、G、或 U；Af、Cf、Gf、與 Uf 為 2'-氟 A、C、G、或 U；s 為硫代磷酸酯鏈結基；及 L96 為 N-[三(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇。

【發明圖式】



【第1圖】