



(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 I842117 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 05 月 11 日

(21)申請案號：111137872

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 07 日

(51)Int. Cl. : A61K47/54 (2017.01)

A61K31/713 (2006.01)

C07H15/04 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/03/07 美國

62/304,652

2016/08/04 美國

62/370,754

2016/11/28 美國

62/426,916

(71)申請人：美商愛羅海德製藥公司 (美國) ARROWHEAD PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國(72)發明人：羅茲馬 大衛 B ROZEMA, DAVID B. (US)；維克菲爾德 戴倫 H
WAKEFIELD, DARREN H. (US)；布洛克希 安卓 V BLOKHIN, ANDREI V.
(US)；班森 強納森 D BENSON, JONATHAN D. (US)；李 LI, ZHEN
(US)；裴 濤 PEI, TAO (US)；弗立茲 佛瑞德 FLEITZ, FRED (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW I727009B

TW I783434B

審查人員：方冠岳

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：18 共 123 頁

(54)名稱

治療性化合物之標靶性配體

(57)摘要

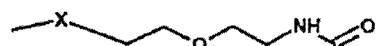
本文闡述可連接至化合物(例如治療性化合物)之新穎標靶性配體，其可用於將該等化合物引導至活體內標靶。本文所揭示之該等標靶性配體可用於使表現抑制性寡聚化合物(例如 RNAi 藥劑)靶向肝臟細胞以調節基因表現。本文所揭示之該等標靶性配體在偶聯至表現抑制性寡聚化合物時可用於各種如說明書所定義之應用中。包括本文所揭示之該等標靶性配體之組合物在連接至表現抑制性寡聚化合物時能調介標靶核酸序列於肝臟細胞(例如肝細胞)中之表現，該等組合物可用於治療對細胞、組織或生物體中之基因表現或活性之抑制有反應之疾病或病況。

Described are novel targeting ligands that may be linked to compounds, such as therapeutic compounds, that are useful in directing the compounds to the target in vivo. The targeting ligands disclosed herein can serve to target expression-inhibiting oligomeric compounds, such as RNAi agents, to liver cells to modulate gene expression. The targeting ligands disclosed herein, when conjugated to an expression-inhibiting oligomeric compound, may be used in a variety of applications, as defined in the specification. Compositions including the targeting ligands disclosed herein when linked to expression-inhibiting oligomeric compounds are capable of mediating expression of target nucleic acid sequences in liver cells, such as hepatocytes, which may be useful in the treatment of diseases or conditions that respond to inhibition of gene expression or activity in a cell, tissue, or organism.

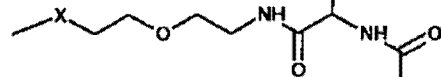
指定代表圖：



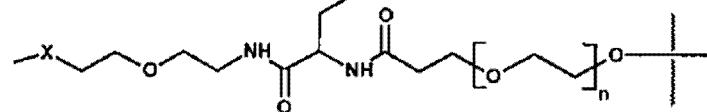
標靶性部分



標靶性部分



標靶性部分





I842117

【發明摘要】

【中文發明名稱】

治療性化合物之標靶性配體

【英文發明名稱】

TARGETING LIGANDS FOR THERAPEUTIC COMPOUNDS

【中文】

本文闡述可連接至化合物(例如治療性化合物)之新穎標靶性配體，其可用於將該等化合物引導至活體內標靶。本文所揭示之該等標靶性配體可用於使表現抑制性寡聚化合物(例如RNAi藥劑)靶向肝臟細胞以調節基因表現。本文所揭示之該等標靶性配體在偶聯至表現抑制性寡聚化合物時可用於各種如說明書所定義之應用中。包括本文所揭示之該等標靶性配體之組合物在連接至表現抑制性寡聚化合物時能調介標靶核酸序列於肝臟細胞(例如肝細胞)中之表現，該等組合物可用於治療對細胞、組織或生物體中之基因表現或活性之抑制有反應之疾病或病況。

【英文】

Described are novel targeting ligands that may be linked to compounds, such as therapeutic compounds, that are useful in directing the compounds to the targetin vivo. The targeting ligands disclosed herein can serve to target expression-inhibiting oligomeric compounds, such as RNAi agents, to liver cells to modulate gene expression. The targeting ligands disclosed herein, when conjugated to an expression-inhibiting oligomeric compound, may be used in a variety of applications, as defined in the specification. Compositions including the

targeting ligands disclosed herein when linked to expression-inhibiting oligomeric compounds are capable of mediating expression of target nucleic acid sequences in liver cells, such as hepatocytes, which may be useful in the treatment of diseases or conditions that respond to inhibition of gene expression or activity in a cell, tissue, or organism.

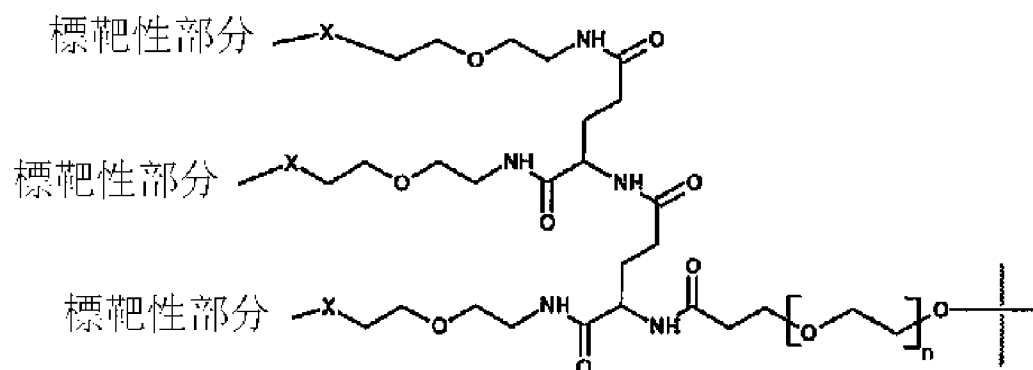
【指定代表圖】

圖6

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

治療性化合物之標靶性配體

【英文發明名稱】

TARGETING LIGANDS FOR THERAPEUTIC COMPOUNDS

【技術領域】

本發明係關於治療性化合物之標靶性配體、其組合物及其使用方法。

【先前技術】

許多化合物需要遞送至特定部位(例如，期望之細胞)以具有治療效應或可用於診斷目的。當嘗試在活體內遞送治療性化合物時通常係此情形。另外，能將化合物有效地遞送至特定部位可限制或潛在地消除可能由該化合物之投與造成之不期望結果(例如脫靶效應)。一種促進化合物(例如治療性化合物)在活體內遞送至期望部位之方法係將化合物連接或附接至標靶性配體。

可使用標靶性配體靶向之一類治療性化合物係寡聚化合物。具有與標靶核酸至少部分地互補之序列之寡聚化合物已顯示可改變活體外及活體內標靶之功能及活性。當遞送至含有標靶核酸(例如mRNA)之細胞時，寡聚化合物已顯示可調節標靶之表現從而改變標靶核酸之轉錄或轉譯。在某些情況下，寡聚化合物可藉由抑制核酸標靶及/或觸發標靶核酸之降解而減少基因之表現。

若標靶核酸係mRNA，則表現抑制性寡聚化合物可調節mRN標靶之表現之一種機制係藉助RNA干擾。RNA干擾係RNA或RNA樣分子(例如化

學修飾之RNA分子)藉助降解能使基因表現沉默之生物過程。認為轉錄後基因沉默之過程係用來防止外來基因表現之進化保守型細胞防禦機制。

合成RNA及RNA樣分子已顯示可在活體內引發RNA干擾。例如，Elbashir等人(*Nature*2000, 411, 494-98)闡述藉由在所培養哺乳動物細胞中引入合成之21-核苷酸RNA分子之雙股體而誘導之RNAi。可觸發RNAi反應機制之合成RNA或RNA樣分子之類型可包括經修飾之核苷酸及/或一種或多種非磷酸二酯鏈接。

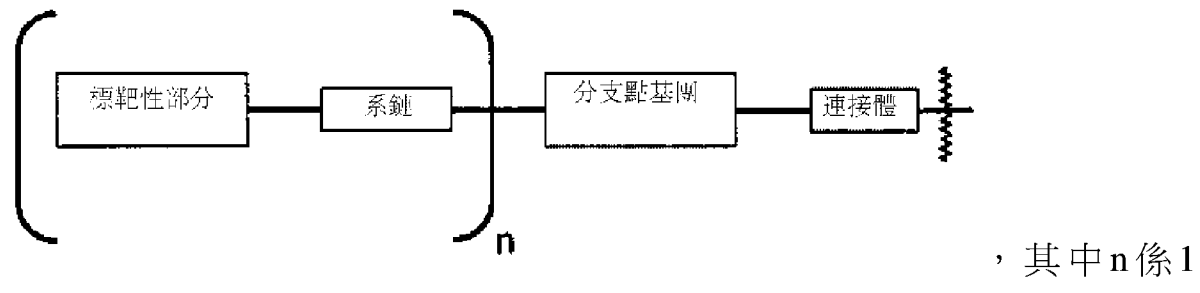
另外，單股RNA及RNA樣分子亦可包括經修飾之核苷酸且具有一或多個非磷酸二酯鏈接，其亦可改變標靶核酸(例如標靶mRNA)之表現。

【發明內容】

本文揭示可在個體(例如人類患者或動物)內增強治療性化合物遞送至特定標靶位點(例如特定器官或組織)之標靶性配體。在一些實施例中，本文所闡述之標靶性配體可增強表現抑制性寡聚化合物之靶向遞送。在一些實施例中，標靶性配體可增強表現抑制性寡聚化合物至肝臟之遞送。

本文所揭示之標靶性配體包括一或多個標靶性部分、一或多個繫鏈、一或多個分支點基團及一或多個連接體或由其組成。

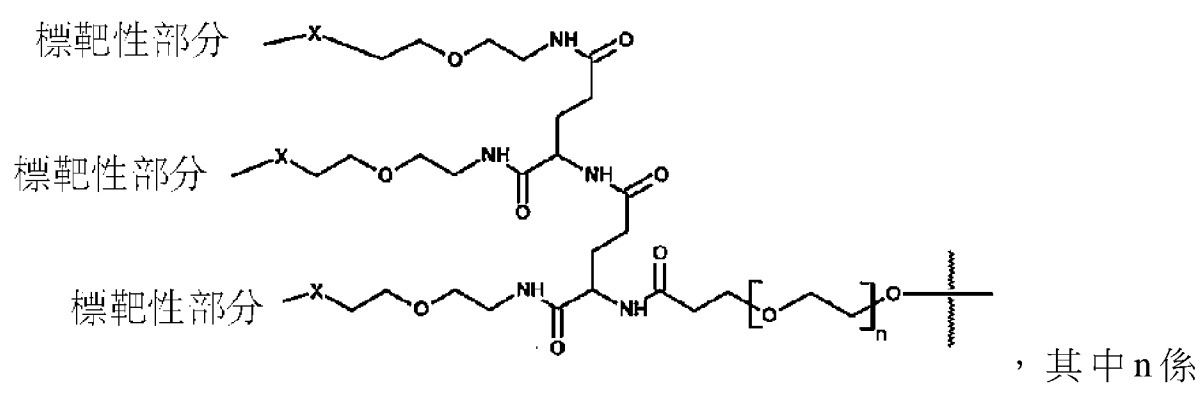
本文揭示包括式A之一般結構、由其組成或基本上由其組成之標靶性配體：



至4之整數(例如1、2、3或4)。

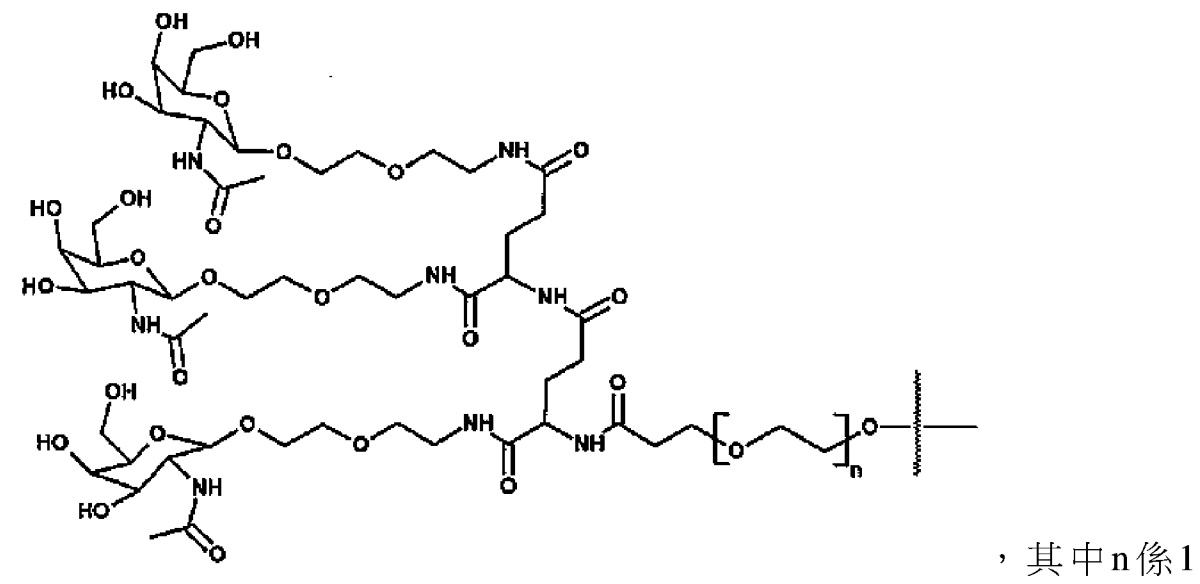
在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體包括式B之結構、由其組

成、或基本上由其組成：



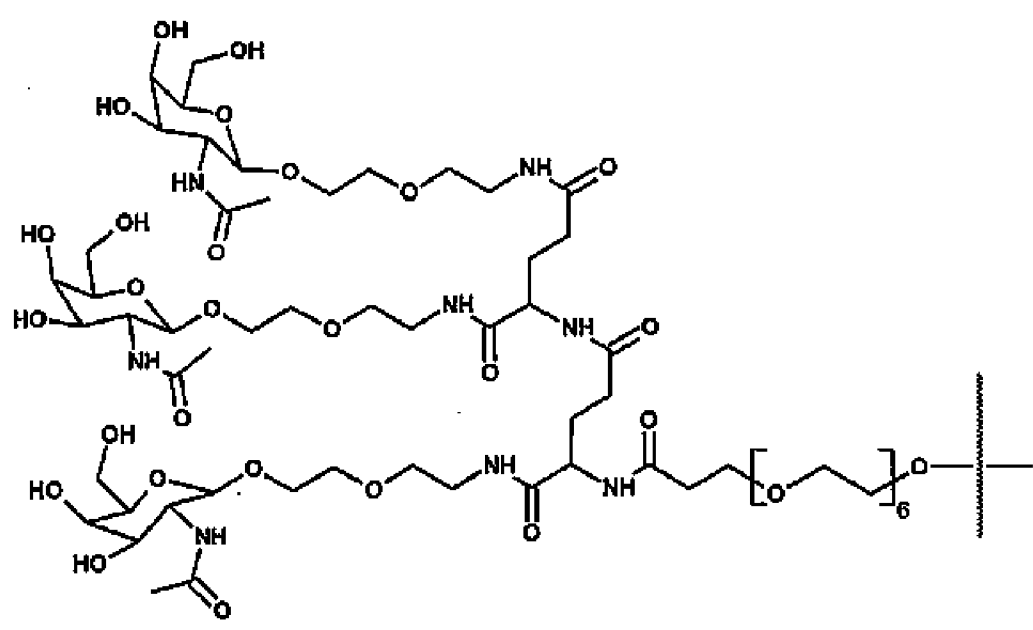
1至20之整數(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)；X係O、S或NH；且標靶性部分係選自由以下組成之群：N-乙醯基-半乳胺糖、半乳糖、半乳胺糖、N-甲醯基-半乳胺糖、N-丙醯基-半乳胺糖、N-正-丁醯基半乳胺糖及N-異-丁醯基半乳胺糖。

在一些實施例中，本文所揭示包括以下結構、由其組成、或基本上由其組成之標靶性配體：



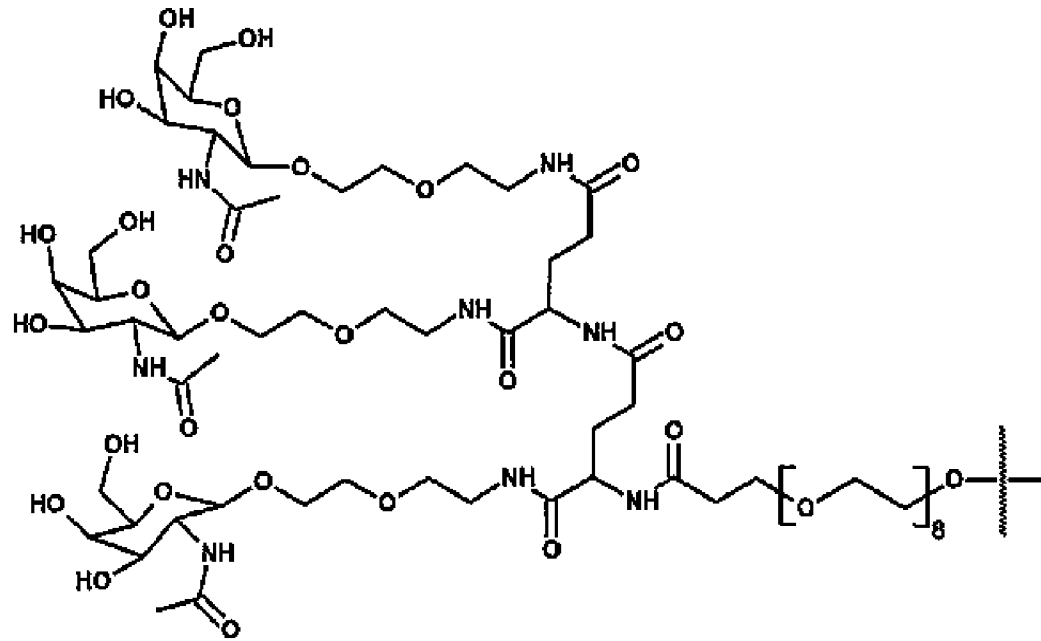
至20之整數(結構1)。

在一些實施例中，所揭示之標靶性配體包括選自以下之結構、由其組成、或基本上由其組成：



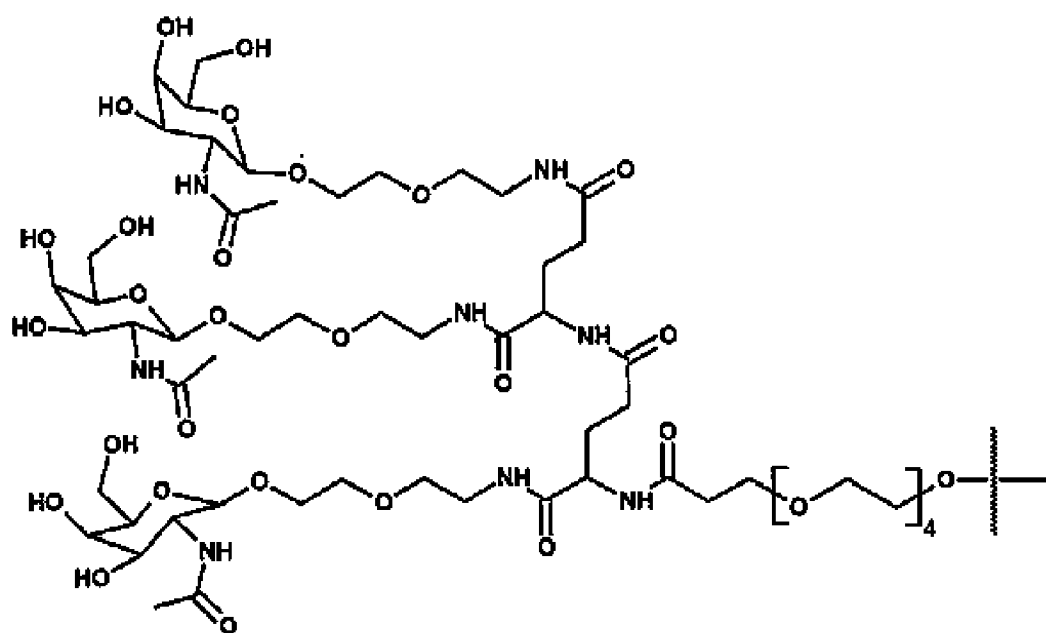
(結 構

101) ;



(結 構

102) ; 及



(結構

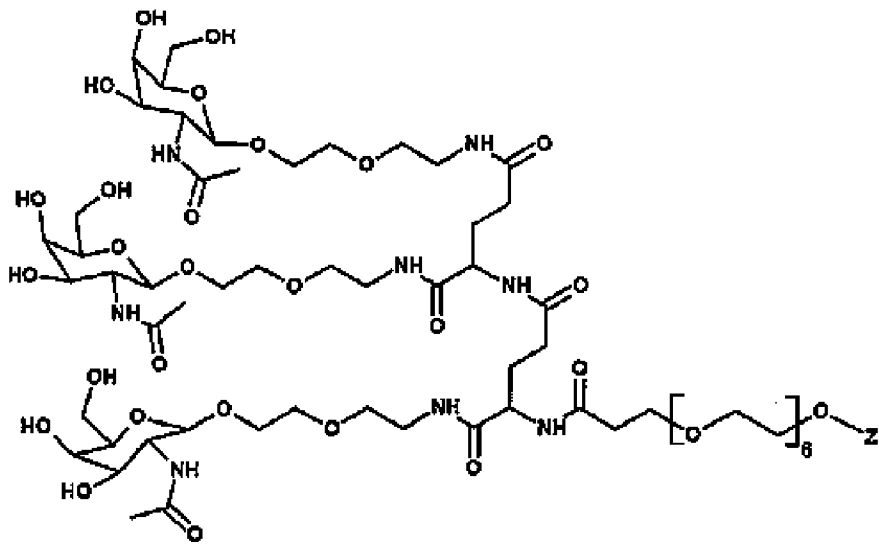
103)。

本文所揭示之標靶性配體包括一或多個標靶性部分。在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體包括N-乙醯基-半乳糖作為標靶性部分。

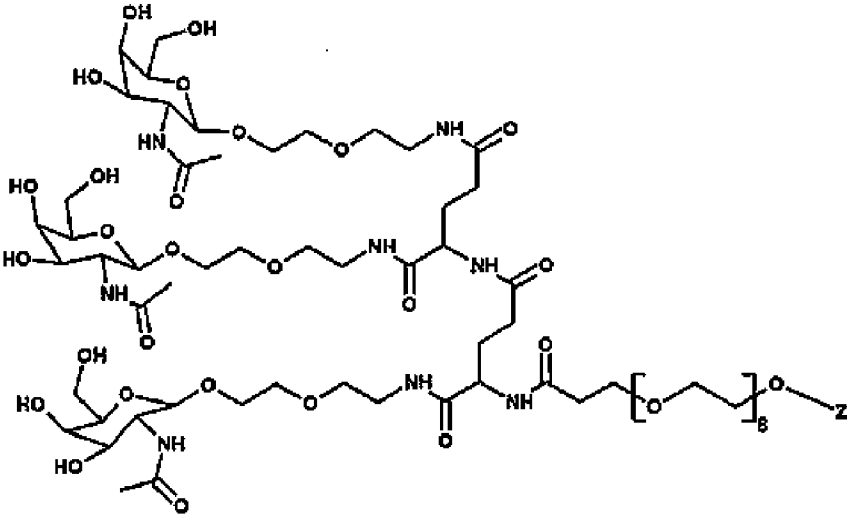
本文所揭示之標靶性配體可直接或間接連接至化合物，例如治療性化合物，例如表現抑制性寡聚化合物，例如，至表現抑制性寡聚化合物之3'或5'末端。在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物包括一或多種經修飾之核苷酸。在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係RNAi藥劑，例如雙股RNAi藥劑。在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體連接至雙股RNAi藥劑之有義股之5'末端。在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體在雙股RNAi藥劑之有義股之5'末端經由磷酸酯、硫代磷酸酯或膦酸酯基團連接至RNAi藥劑。

本文揭示包括標靶性配體及表現抑制性寡聚化合物之組合物。本文所揭示包括標靶性配體及RNAi藥劑之組合物。

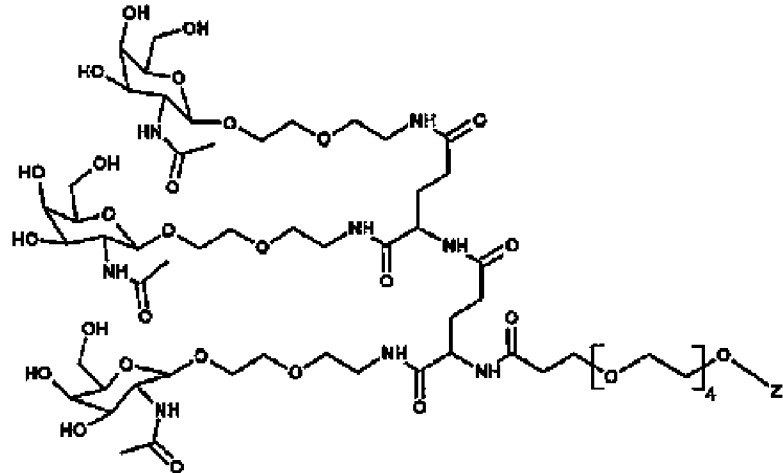
在一些實施例中，本文所揭示包括標靶性配體及RNAi藥劑之組合物具有由以下表示之結構：



，其中Z包含表現抑制性寡聚化合物(結構101a)；



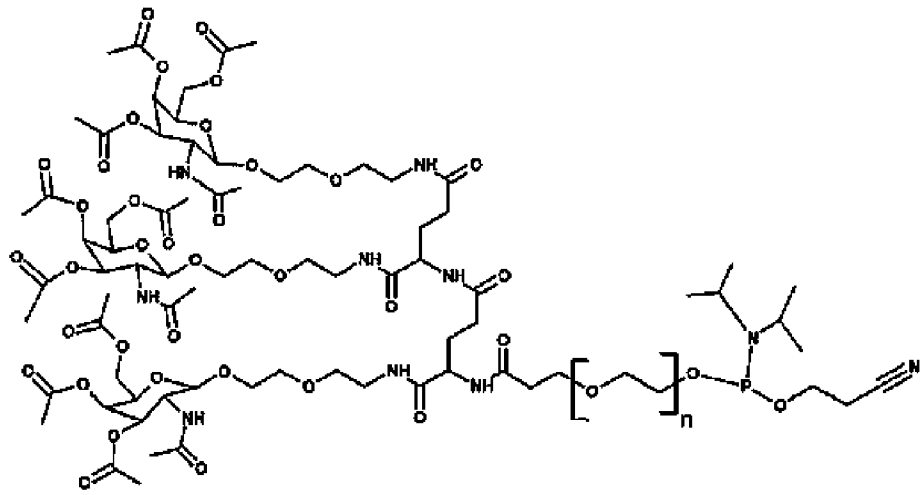
，其中Z包含表現抑制性寡聚化合物(結構102a)；及



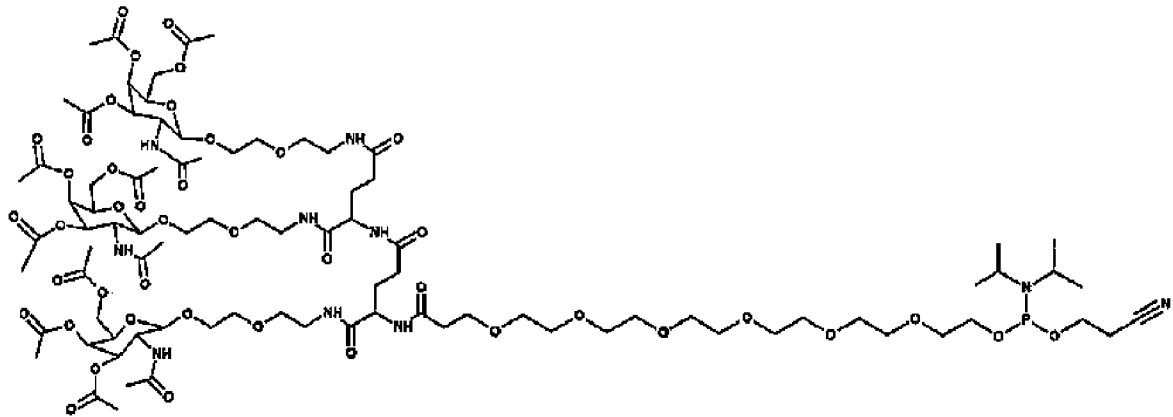
，其中Z包含表現抑制性寡聚化合物(結構103a)。

本文所揭示包括標靶性配體之亞磷醯胺化合物。

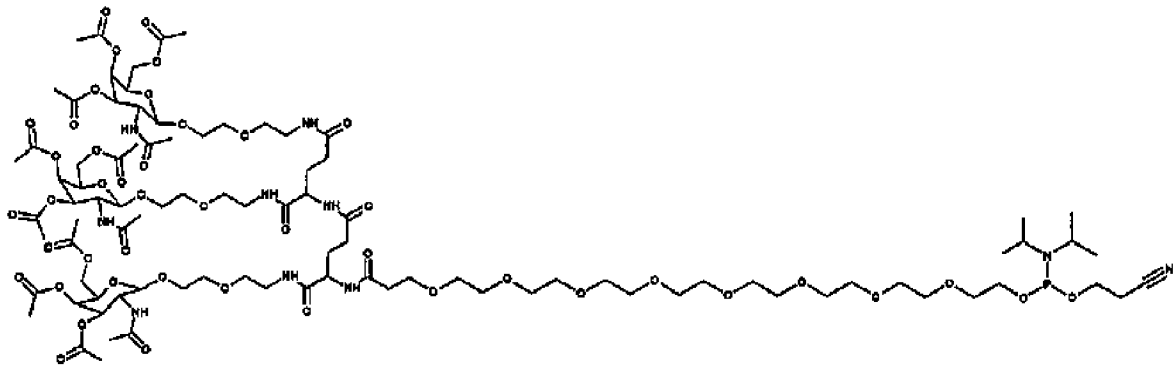
在一些實施例中，本文所揭示包括標靶性配體之亞磷醯胺化合物具有由以下表示之結構：



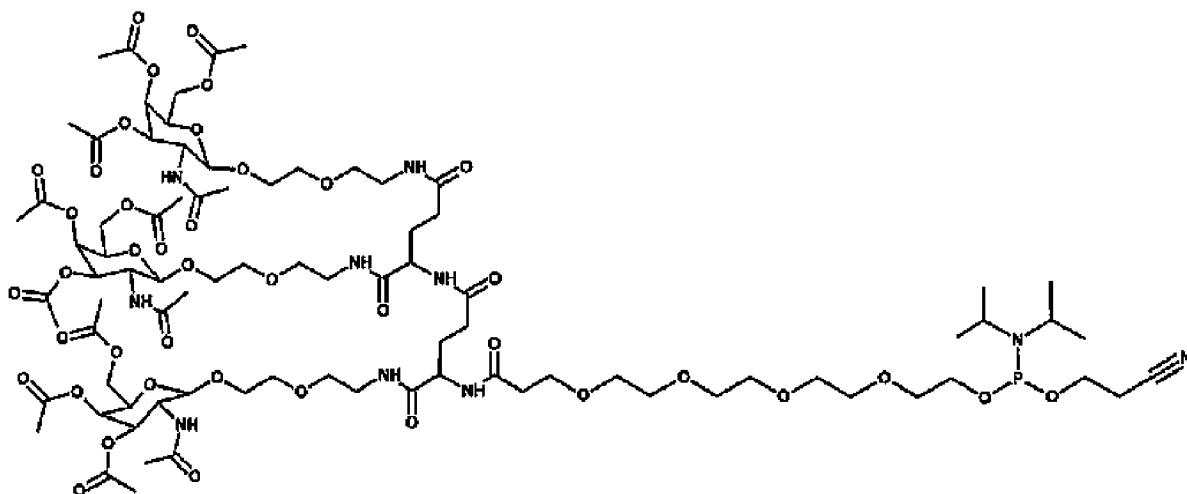
，其中n係1至20之整數(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20) (結構1d)；



(結構101d)；



(結構102d)；或



(結構103d)。

本文亦揭示包括本文所揭示之標靶性配體之醫藥組合物。

本文揭示治療將受益於治療性寡聚化合物之投與之疾病或病症之方法，該方法包括向個體投與本文所揭示連接至標靶性配體之治療性寡聚化合物。

本文揭示抑制個體中標靶核酸之表現之方法，該方法包括投與治療量之本文所揭示連接至之標靶性配體之表現抑制性寡聚化合物。

本文揭示將表現抑制性寡聚化合物活體內遞送至肝臟之方法，其包含向個體投與本文所揭示連接至標靶性配體之表現抑制性寡聚化合物。

如本文所用術語「經連接」在指兩個分子之間之連接時意指兩個分子係藉由共價鍵結合或兩個分子係經由非共價鍵(例如氫鍵或離子鍵)締合。在一些實例中，倘若術語「經連接」係指兩個分子之間經由非共價鍵之締合，則兩個不同分子之間之締合具有在生理上可接受之緩衝液(例如磷酸鹽緩衝鹽水)中小於 1×10^{-4} M (例如小於 1×10^{-5} M，小於 1×10^{-6} M，或小於 1×10^{-7} M)之 K_D 。

如本文所用術語「直接連接」係指第一化合物或基團連接至第二化合物或基團而沒有任何插入原子或原子之基團。如本文所用術語「間接連

接」係指第一化合物藉助中間基團、化合物或分子(例如連接基團)連接至第二化合物或基團。除非另有闡述，否則如本文所用術語「經連接」包括「直接連接」及「間接連接」，彼等術語係如本文所定義。

如本文所用「寡聚化合物」係含有約10至50個核苷酸或核苷酸鹼基對之核苷酸序列。在一些實施例中，寡聚化合物具有與在細胞內表現之標靶核酸或標靶基因中之編碼序列至少部分地互補之核鹼基序列。在一些實施例中，寡聚化合物在遞送至表現基因之細胞時能抑制潛在基因之表現且在本文中稱作「表現抑制性寡聚化合物」。基因表現可在活體外或活體內經抑制。「寡聚化合物」包括(但不限於)：寡核苷酸、單股寡核苷酸、單股反義寡核苷酸、短干擾RNA (siRNA)、雙股RNA (dsRNA)、微小RNA (miRNA)、短髮夾RNA (shRNA)、核酶、干擾RNA分子及dicer受質。

如本文所用術語「寡核苷酸」意指經連接核苷之聚合物，該等核苷中之每一者均可獨立地經修飾或未經修飾。

如本文所用術語「單股寡核苷酸」意指具有與標靶mRNA至少部分地互補之序列之單股寡聚化合物，該序列在哺乳動物生理條件(或活體外相當的條件)下藉助氫鍵結能與標靶mRNA雜交。在一些實施例中，單股寡核苷酸係單股反義寡核苷酸。

如本文所用「RNAi藥劑」意指含有能以序列特異方式降解或抑制標靶mRNA之信使RNA (mRNA)轉錄本之轉譯之RNA或RNA樣(例如化學修飾之RNA)寡核苷酸分子之藥劑。如本文所用RNAi藥劑可藉助RNA干擾機制(即，藉助與哺乳動物細胞之RNA干擾路徑機構(RNA誘導之沉默複合體或RISC)相互作用誘導RNA干擾)或藉由任一替代機制或路徑起作用。儘管認為RNAi藥劑(當該術語在本文中使用时)主要藉助RNA干擾機制起

作用，但所揭示之RNAi藥劑並不受任一具體作用路徑或機制約束或限制。RNAi藥劑包括(但不限於)：單股寡核苷酸、單股反義寡核苷酸、短干擾RNA (siRNA)、雙股RNA (dsRNA)、微小RNA (miRNA)、短髮夾RNA (shRNA)及dicer受質。本文所闡述之RNAi藥劑包括具有與所靶向mRNA至少部分地互補之股之寡核苷酸。在一些實施例中，本文所闡述之RNAi藥劑係雙股的且包括反義股及與反義股至少部分地互補之有義股。RNAi藥劑可包括經修飾之核苷酸及/或一或多個非磷酸二酯鏈接。在一些實施例中，本文所闡述之RNAi藥劑係單股的。

如本文所用術語「沉默」、「減少」、「抑制」、「下調」或「敲低」在指給定基因之表現時，意指如與未經連接至本文所述標靶性配體之寡聚化合物治療之另一或多個細胞、細胞群、組織、器官或個體相比，當細胞、細胞群、組織、器官或個體經如此治療時，基因之表現減少，該表現係自基因轉錄之RNA之含量或自在基因經轉錄之細胞、細胞群、組織、器官或個體中之mRNA轉譯的多肽、蛋白質或蛋白質亞單位之含量測得。

如本文所用術語「序列」或「核苷酸序列」意指使用標準核苷酸命名法用一連串字母闡述之核鹼基或核苷酸之次序或順序。

如本文所用且除非另有指示，否則術語「互補」在用於相對於第二核苷酸序列(例如單股反義寡核苷酸或雙股RNAi藥劑反義股)闡述第一核苷酸序列(例如RNAi藥劑有義股或經靶向mRNA)時，意指包括第一核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸能與包括第二核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸雜交(在哺乳動物生理條件(或活體外相當的條件)下形成鹼基對氫鍵)且在某些條件下形成雙股體或雙螺旋結構。互補序列包括Watson-Crick鹼

基對或非Watson-Crick鹼基對且包括天然或經修飾之核苷酸或核苷酸模擬物，其程度至少滿足上述關於雜交能力之要求。

如本文所用「完美互補」或「完全互補」意指第一多核苷酸之鄰接序列中所有(100%)鹼基將與第二多核苷酸之鄰接序列中相同數量之鹼基雜交。鄰接序列可包含第一或第二核苷酸序列之全部或一部分。

如本文所用「部分地互補」意指在雜交之核鹼基序列對中，第一多核苷酸之鄰接序列中至少70%但並非所有鹼基將與第二多核苷酸之鄰接序列中相同數量之鹼基雜交。

如本文所用「基本上互補」意指在雜交之核鹼基序列對中，第一多核苷酸之鄰接序列中至少85%但並非所有鹼基將與第二多核苷酸之鄰接序列中相同數量之鹼基雜交。在本文中關於雙股RNAi藥劑之有義股與反義股之間、雙股RNAi藥劑之反義股與標靶mRNA之序列之間、或單股反義寡核苷酸與標靶mRNA之序列之間的鹼基匹配，可使用術語「互補」、「完全互補」及「基本上互補」。

如本文所用術語「治療(treat)」、「治療(treatment)」及諸如此類意指用於緩解或緩和個體之疾病之一或多種症狀之數量、嚴重性及/或頻率所採取之方法或步驟。

如本文所用片語「引入細胞中」在涉及寡聚化合物時意指在功能上將寡聚化合物遞送至細胞中。片語「功能遞送」意指以使得寡聚化合物能夠具有預期生物活性(例如，基因表現之序列特異性抑制)之方式將寡聚化合物遞送至細胞。

除非另有闡述，否則如本文所用符號  之使用意指根據本文所述本發明之範圍之任一或多個基團均可連接至其。

如本文所用術語「異構物」係指具有相同分子式但性質或其原子之鍵結順序或其原子之空間排列不同之化合物。其原子之空間排列不同之異構物稱為「立體異構物」。彼此不為鏡像之立體異構物稱為「非鏡像異構物」，且為非重疊鏡像之立體異構物稱為「鏡像異構物」或有時光學異構物。與四個不相同取代基鍵結之碳原子稱為「手性中心」。

除非明確鑑別結構具有具體構象，否則如本文所用，對於存在不對稱中心且因此產生鏡像異構物、非鏡像異構物或其他立體異構物構形之每一結構、本文所揭示之每一結構意欲表示所有該等可能的異構物，包括其光學純及外消旋形式。

如本文所用術語「經取代」意指指定原子(通常為碳、氧或氮原子)上之任一或多個氫可經如本文所定義之任一基團替代，前提係不超過該指定原子之正常價且該取代產生穩定化合物。取代基之非限制性實例包括C1-C6烷基、C2-C6烯基、C2-C6炔基、氰基、羥基、側氧基、羧基、環烷基、環烯基、雜環基、雜芳基、芳基、酮基、烷氧基羰基、芳基氧基羰基、雜芳基氧基羰基或鹵素(例如F、Cl、Br、I)。在取代基係酮基或側氧基(即=O)時，則原子上之兩(2)個氫經替代。如本文所用環雙鍵係於兩個毗鄰環原子之間形成之雙鍵(例如，C=C、C=N、N=N等)。

本發明之一些化合物可以亦意欲涵蓋在本發明之範圍內之互變異構物形式存在。「互變異構物」係其結構在原子排列上顯著不同但以容易且快速之平衡存在之化合物。應瞭解本發明之化合物可繪示為不同互變異構物。亦應瞭解當化合物具有互變異構物形式時，所有互變異構物形式皆意欲在本發明之範圍內且化合物之命名並不排除任一互變異構物形式。

本發明之化合物及醫藥上可接受之鹽可以一或多種互變異構物形式

存在，包括酮-烯醇、醯胺-脛、內醯胺-內醯亞胺、醯胺-醯亞胺酸互變異構(在雜環方面)(例如在核鹼基鳥嘌呤、胸腺嘧啶及胞嘧啶方面)、胺-烯胺及烯胺-烯胺及幾何異構物及其混合物。藉由葡萄糖及其他糖展現之環鏈互變異構係由於糖鏈分子中之醛基團(-CHO)與同一分子中之一個羥基(-OH)反應而使其成為環狀(環型)形式而產生。所有該等互變異構物形式皆包括在本發明之範圍內。互變異構物以互變異構物集於溶液中之混合物存在。在固體形式中，通常一種互變異構物佔主導。即便可能闡述一種互變異構物，但本發明包括本文所揭示化合物之所有互變異構物。可藉由互變異構化互相轉化之互變異構物之概念稱為互變異構。在互變異構中，電子及氫原子同時發生移位。

互變異構化係藉由以下來催化：鹼：1.去質子化；2.非定域陰離子(例如烯醇鹽)之形成；3.在陰離子之不同位置處質子化；酸：1.質子化；2.非定域陽離子之形成；3.在毗鄰陽離子之不同位置處去質子化。

除非另有說明，否則如本文所用術語「烷基」係指具有1至10個碳原子之飽和直鏈或具支鏈脂肪族烴基團。例如，「C1-C6烷基」包括具有1個、2個、3個、4個、5個或6個碳呈直鏈或具支鏈排列之烷基。如本文所用術語「胺基烷基」係指在正常化合價允許之任一位置處經一或多個胺基取代之如上文所定義之烷基。胺基可未經取代、經單取代或經二取代。

除非另有說明，否則如本文所用術語「環烷基」意指具有3至14個碳原子之飽和或不飽和非芳香族烴環基團。環烷基之實例包括(但不限於)環丙基、甲基-環丙基、2, 2-二甲基-環丁基、2-乙基-環戊基、環己基等。環烷基可包括多個螺環或稠合環。環烷基視情況在正常化合價允許之任一位置處經單取代、二取代、三取代、四取代或五取代。

除非另有說明，否則如本文所用術語「烯基」係指含有至少一個碳-碳雙鍵且具有2至10個碳原子之直鏈或具支鏈非芳香族烴基團。該等基團中可存在至多五個碳-碳雙鍵。例如，「C2-C6」烯基係定義為具有2至6個碳原子之烯基。烯基之實例包括(但不限於)乙烯基、丙烯基、丁烯基及環己烯基。烯基之直鏈、具支鏈或環狀部分可含有雙鍵且在正常化合價所允許之任一位置視情況經單取代、二取代、三取代、四取代或五取代。術語「環烯基」意指具有指定數量碳原子及至少一個碳-碳雙鍵之單環烴基團。

除非另有說明，否則如本文所用術語「炔基」係指含有2至10個碳原子且含有至少一個碳-碳三鍵之直鏈或具支鏈烴基團。可存在至多5個碳-碳三鍵。因此，「C2-C6炔基」意指具有2至6個碳原子之炔基。炔基之實例包括(但不限於)乙炔基、2-丙炔基及2-丁炔基。炔基之直鏈或具支鏈部分可含有正常化合價所允許之三鍵，且可視情況在正常化合價所允許之任一位置處經單取代、二取代、三取代、四取代或五取代。

如本文所用「烷氧基(alkoxyl或alkoxy)」係指指定數量碳原子藉助氧橋附接之如上文所定義之烷基。C₁₋₆烷氧基意欲包括C₁、C₂、C₃、C₄、C₅及C₆烷氧基。C₁₋₈烷氧基意欲包括C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇及C₈烷氧基。烷氧基之實例包括(但不限於)甲氧基、乙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、第二丁氧基、第三丁氧基、正戊氧基、第二戊氧基、正庚氧基及正辛氧基。

如本文所用「酮基」係指藉助羰基橋附接之如本文所定義之任一烷基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、雜環基、雜芳基或芳基。酮基之實例包括(但不限於)烷醯基(例如乙醯基、丙醯基、丁醯基、戊醯基、己醯

基)、烯醯基(例如丙烯醯基)、炔醯基(例如乙炔醯基、丙炔醯基、丁炔醯基、戊炔醯基、己炔醯基)、芳醯基(例如苯甲醯基)、雜芳醯基(例如吡咯醯基、咪唑醯基、喹啉醯基、吡啶醯基)。

如本文所用「烷氧基羰基」係指藉助羰基橋附接之如上文所定義之任一烷氧基(即， $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 烷基)。烷氧基羰基之實例包括(但不限於)甲氧基羰基、乙氧基羰基、異-丙氧基羰基、正丙氧基羰基、第三-丁氧基羰基、苄基氧基羰基或正戊氧基羰基。

如本文所用「芳基氧基羰基」係指藉助氧基羰基橋附接之如本文所定義之任一芳基(即， $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 芳基)。芳基氧基羰基之實例包括(但不限於)苯氧基羰基及萘氧基羰基。

如本文所用「雜芳基氧基羰基」係指藉助氧基羰基橋附接之如本文所定義之任一雜芳基(即， $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 雜芳基)。雜芳基氧基羰基之實例包括(但不限於)，2-吡啶基氧基羰基、2-噁唑基氧基羰基、4-噻唑基氧基羰基或嘧啶基氧基羰基。

如本文所用「芳基」或「芳香族」意指每一環中具有至多7個原子之任一穩定單環或多環碳環，其中至少一個環係芳香族。芳基之實例包括(但不限於)苯基、萘基、蒽基、四氫萘基、二氫茚基及聯苯基。在芳基取代基係雙環且一個環係非芳族環之情形下，應理解，經由芳族環進行附接。芳基視情況在正常化合價所允許之任一位置上經單取代、二取代、三取代、四取代或五取代。

如本文所用術語「雜芳基」表示在每一環中具有至多7個原子之穩定單環或多環，其中至少一個環係芳香族且含有1至4個選自由O、N及S組成之群之雜原子。雜芳基之實例包括(但不限於)吡啶基、呋唑基、吡啶

基、喹啉基、吡啶基、吲哚基、苯并三唑基、呋喃基、噻吩基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并咪唑啉酮基、苯并噁唑酮基、喹啉基、異喹啉基、二氫異吲哚酮基、咪唑并吡啶基、異吲哚酮基、吲唑基、噁唑基、噁二唑基、異噁唑基、吲哚基、吡嗪基、嗒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、四氫喹啉。「雜芳基」亦應理解為包括任一含氮雜芳基之*N*-氧化物衍生物。在雜芳基取代基系雙環且一個環系非芳族或不含雜原子之情形下，在一實施例中，分別經由含有之雜原子芳族環進行附接。雜芳基在正常化合價所允許之任一位置上視情況經單取代、二取代、三取代、四取代或五取代。

如本文所用術語「雜環」、「雜環狀」或「雜環基」意指含有1至4個選自由O、N及S組成之群之雜原子之3至14員芳香族或非芳香族雜環，包括多環基團。如本文所用術語「雜環狀」亦視為與術語「雜環」及「雜環基」同義且理解為亦具有如本文所闡述之相同定義。「雜環基」包括上文所提及之雜芳基以及其二氫及四氫類似物。雜環基之實例包括(但不限於)氮雜環丁基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并呋喃基、苯并吡啶基、苯并三唑基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、吡啶基、噻吩基、呋喃基、咪唑基、吲哚基、吲哚基、吲哚拉嗪基(indolazinyI)、吲唑基、異苯并呋喃基、異吲哚基、異喹啉基、異噻唑基、異噁唑基、蔡吡啶基、噁二唑基、側氧基噁唑啉基、噁唑基、噁唑啉、側氧基六氫吡嗪基、側氧基吡咯啉基、側氧基嗎啉基、異噁唑啉、氧雜環丁基、吡喃基、吡嗪基、吡啶基、嗒嗪基、吡啶并吡啶基、嗒嗪基、吡啶基、吡啶酮基、嘧啶基、嘧啶酮基、吡咯基、喹啉基、喹啉基、喹啉基、四氫吡喃基、四氫呋喃基、四氫噻喃基、四氫異喹啉基、四唑基、四唑并吡啶基、噻二唑基、噻

唑基、噻吩基、三唑基、1,4-二噁烷基、六氫氮呋基、六氫吡嗪基、六氫吡啶基、吡啶-2-酮基、吡咯啶基、嗎啉基、硫嗎啉基、二氫苯并咪唑基、二氫苯并呋喃基、二氫苯并噻吩基、二氫苯并噁唑基、二氫呋喃基、二氫咪唑基、二氫吡啶基、二氫異噁唑基、二氫異噻唑基、二氫噁二唑基、二氫噻二唑基、二氫吡嗪基、二氫吡唑基、二氫吡啶基、二氫嘧啶基、二氫吡咯基、二氫喹啉基、二氫四唑基、二氫噻二唑基、二氫噻唑基、二氫噻吩基、二氫三唑基、二氫氮雜環丁基、二氧橋硫嗎啉基、亞甲基二氧基苯甲醯基、四氫呋喃基及四氫噻吩基及其N-氧化物。雜環基取代基可經由碳原子或經由雜原子進行附接。雜環基視情況在正常化合價所允許之任一位置上經單取代、二取代、三取代、四取代或五取代。

熟習此項技術者可易於理解並瞭解本文所揭示之化合物及組合物可以質子化或去質子化狀態具有某些原子(例如N、O或S原子)，此端視化合物或組合物放置之環境而定。因此，如本文所用本文所揭示之結構設想某些官能基(例如OH、SH或NH)可經質子化或去質子化。本發明在本文中意欲涵蓋所揭示化合物及組合物，而不管其基於環境pH之質子化狀態如何，如熟習此項技術者可容易地瞭解。

除非另有定義，否則本文所使用之所有技術及科學術語皆具有與熟習本發明所屬領域者通常理解相同的含義。儘管在本發明之實踐或測試中可使用與本文所述方法及材料類似或等效之方法及材料，但下文闡述適宜之方法及材料。本文所提及之所有出版物、專利申請案、專利及其他參考文獻之全部內容皆以引用方式併入本文中。倘若出現衝突，則將以本說明書(包括定義)為準。此外，材料、方法及實例僅具有闡釋性而不欲具有限制性。

自以下詳細說明及申請專利範圍將瞭解本發明之其他特徵及優點。

【圖式簡單說明】

圖1係化合物3之¹H NMR光譜(其闡述於下文實例1中)。

圖2係化合物4之¹H NMR光譜(其闡述於下文實例1中)。

圖3係化合物6之¹H NMR光譜(其闡述於下文實例1中)。

圖4係化合物7之¹H NMR光譜(其闡述於下文實例1中)。

圖5係化合物9之¹H NMR光譜(其闡述於下文實例1中)。

圖6係化合物10之¹H NMR光譜(其在本文中係結構101d且闡述於下文實例1中)。

圖7係化合物13之¹H NMR光譜(其在本文中係結構103d且闡述於下文實例2中)。

圖8係化合物16之¹H NMR光譜(其在本文中係結構102d且闡述於下文實例3中)。

圖9係偶聯至結構103d之AM03704之HPLC層析圖(其闡述於下文實例5中)。

圖10係偶聯至結構101d之AM03704之HPLC層析圖(其闡述於下文實例5中)。

圖11係偶聯至結構102d之AM03704之HPLC層析圖(其闡述於下文實例5中)。

圖12係圖解說明正規化小鼠Factor 12 (mF12)蛋白質含量之圖形(其闡述於下文實例6中)。

圖13係圖解說明正規化小鼠Factor 12 (F12)蛋白質含量之圖形(其闡述於下文實例7)。

圖14係圖解說明正規化脂蛋白(a) (Lp(a))粒子含量之圖形(其闡述於下文實例8中)。

圖15係圖解說明正規化脂蛋白(a) (Lp(a))粒子含量之圖形(其闡述於下文實例9中)。

圖16係圖解說明正規化apo(a)含量之圖形(其闡述於下文實例10中)。

圖17係圖解說明食蟹猴中正規化cF12蛋白質含量之圖形(其闡述於下文實例11中)。

圖18係圖解說明PiZ轉基因小鼠中正規化AAT (Z-AAT)蛋白質含量之圖形(其闡述於下文實例12中)。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

此申請案主張2016年3月7日申請之美國臨時專利申請案第62/304,652號及2016年8月4日申請之美國臨時專利申請案第62/370754號及2016年11月28日申請之美國臨時專利申請案第62/426,916號之優先權，其各自之內容係以全文引用方式併入本文中。

本文闡述連接至化合物(例如治療性或診斷性表現抑制性寡聚化合物)之新穎標靶性配體。在一些實施例中，連接至本文所闡述之標靶性配體之化合物包括為RNAi藥劑之治療性化合物或由其組成。標靶性配體可用於將治療性化合物靶向標靶核酸或標靶基因之期望部位。本文亦闡述包括標靶性配體及治療性化合物之組合物，例如包括標靶性配體及表現抑制性寡聚化合物或由其組成之組合物。

本文所揭示之新穎標靶性配體提供有效靶向或生物分佈、充足的活體內及活體外穩定性且適於作為亞磷醯胺合成，此可降低製造之成本及負

擔，且可增加對連接至表現抑制性寡聚化合物(例如RNAi藥劑)之先前所考慮標靶性配體之效能。

標靶性配體

標靶性配體包括一或多個標靶性基團或標靶性部分，其可用於增強其所連接化合物之藥物動力學或生物分佈性質並改良偶聯組合物之細胞特異性或組織特異性分佈及細胞特異性攝取。一般而言，標靶性配體輔助指導其所連接之治療性化合物至期望標靶位點之遞送。在一些情形下，標靶性部分可結合至細胞或細胞受體且開始胞吞作用以促進治療性化合物進入細胞中。標靶性部分可包括對細胞受體或細胞表面分子或抗體具有親和性之化合物。含有標靶性部分之各種標靶性配體均可連接至治療劑及其他化合物以使藥劑靶向細胞及特定細胞受體。標靶性部分之類型包括碳水化合物、膽固醇及膽固醇基及類固醇。可結合至細胞受體之標靶性部分包括糖，例如半乳糖、半乳糖衍生物(例如N-乙醯基-半乳糖胺糖)、甘露糖及甘露糖衍生物；其他碳水化合物；聚醣；半抗原；維生素；葉酸鹽；生物素；適配體；及肽，例如含RGD肽、胰島素、EGF及運鐵蛋白。

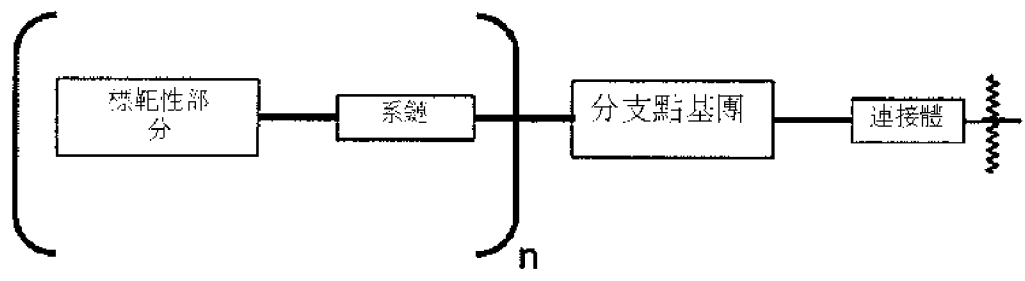
已知結合至去唾液酸基醣蛋白受體(ASGPR)之標靶性部分尤其可用於指導寡聚化合物遞送至肝臟。去唾液酸基醣蛋白受體大量表現於肝臟細胞(包括肝細胞)上。靶向ASGPR之細胞受體標靶性部分包括半乳糖及半乳糖衍生物。具體而言，半乳糖衍生物之簇(包括包括兩個、三個或四個N-乙醯基-半乳糖胺糖之簇(GalNAc或NAG))可促進肝臟細胞中某些化合物之攝取。偶聯至寡聚化合物之GalNAc簇用於將組合物指導至肝臟，其中N-乙醯基-半乳糖胺糖能結合至肝臟細胞表面上之去唾液酸基醣蛋白受體。據信與去唾液酸基醣蛋白受體之結合可開始受體介導之胞吞作用，藉此促進

化合物進入細胞之內部。

本文所揭示之標靶性配體可包括一個、兩個、三個、四個或四個以上標靶性部分。在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體可包括一個、兩個、三個、四個或四個以上連接至分支點基團之標靶性部分。在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體可包括一個、兩個、三個、四個或四個以上連接至分支點基團之標靶性部分，其中每一標靶性部分經由繫鏈連接至分支點基團。

在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體可包括一個、兩個、三個、四個或四個以上連接至分支點基團之去唾液酸基醣蛋白受體(ASGPR)標靶性部分。在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體可包括一個、兩個、三個、四個或四個以上連接至分支點基團之ASGPR標靶性部分，其中每一ASGPR標靶性部分經由繫鏈連接至分支點基團。

本文所闡述之標靶性配體係由下式I表示：



其中n係1至4之整數(例如1、2、3或4) (式I)。在一些實施例中，式I中之n係1至3、1至2、2至4、2至3或3至4之整數。

本文所揭示之標靶性配體可連接至治療性化合物，例如寡聚化合物。在一些實施例中，標靶性配體經由另一連接體及/或可裂解部分連接至治療性化合物，其然後連接至治療性化合物。在一些實施例中，標靶性配體連接至治療性化合物本身。

在一些實施例中，治療性化合物係表現抑制性寡聚化合物。在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係RNAi藥劑。在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係雙股RNAi藥劑。

在一些實施例中，標靶性配體直接或間接連接至雙股RNAi藥劑之有義股之5'端。在一些實施例中，標靶性配體直接或間接連接至雙股RNAi藥劑之有義股之3'端。在一些實施例中，標靶性配體直接或間接連接至雙股RNAi藥劑之反義股之5'端或3'端。在一些實施例中，標靶性配體直接或間接連接至單股RNAi藥劑之5'端或3'端。

在一些實施例中，標靶性配體在雙股RNAi藥劑之有義股之末端核苷之5'端處經由磷酸酯、膦酸酯、硫代磷酸酯或其他核苷間連接基團連接至雙股RNAi藥劑。

在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體包括可裂解部分。在一些實施例中，可裂解部分包括磷酸酯或可裂解之其他核苷間連接基團或由其組成。在一些實施例中，標靶性配體係經由可裂解部分連接至治療性化合物。

在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體係連接至另一或多個包括可裂解部分之基團。在一些實施例中，標靶性配體連接至可裂解部分，其然後連接至表現抑制性寡聚化合物。

在一些實施例中，標靶性配體係含有亞磷醯胺之化合物。包括本文所述標靶性配體之亞磷醯胺化合物可用於使用亞磷醯胺合成業內通常已知之方法使標靶性配體容易地附接至治療性化合物或其他基團。在一些實施例中，使用業內通常已知之方法使包括標靶性配體之亞磷醯胺化合物連接至表現抑制性寡聚化合物。在一些實施例中，含有亞磷醯胺之標靶性配體

連接至雙股RNAi藥劑之有義股之5'端。

在一些實施例中，連接至標靶性配體之表現抑制性寡聚化合物包括單股寡核苷酸。在一些實施例中，單股寡核苷酸係單股反義寡核苷酸。在一些實施例中，標靶性配體係直接連接至單股反義寡核苷酸。在一些實施例中，在標靶性配體與單股寡核苷酸之間插入其他基團。

在一些實施例中，連接至RNAi藥劑之標靶性配體包括一或多種N-乙醯基-半乳胺糖作為一或多個標靶性部分。

在一些實施例中，連接至表現抑制性寡聚化合物之標靶性配體包括包括聚乙二醇(PEG)之繫鏈。在一些實施例中，繫鏈由PEG組成。在一些實施例中，繫鏈包括具有1至10個乙二醇單元之PEG。在一些實施例中，繫鏈包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個乙二醇單元之PEG。

在一些實施例中，連接至RNAi藥劑之標靶性配體包含聚乙二醇(PEG)作為連接體。在一些實施例中，連接體包含PEG。在一些實施例中，連接體由PEG組成。在一些實施例中，連接體包含具有1至20個乙二醇單元之PEG。在一些實施例中，繫鏈包含具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個乙二醇單元之PEG。

在一些實施例中，連接至本文所揭示標靶性配體中之任一者之表現抑制性寡聚化合物包括RNAi藥劑。在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體直接或間接連接至RNAi藥劑。

在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體直接連接至RNAi藥劑。在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體間接連接至RNAi藥劑，乃因在RNAi藥劑與標靶性配體之連接體之間插入其他基團。在一些實施例

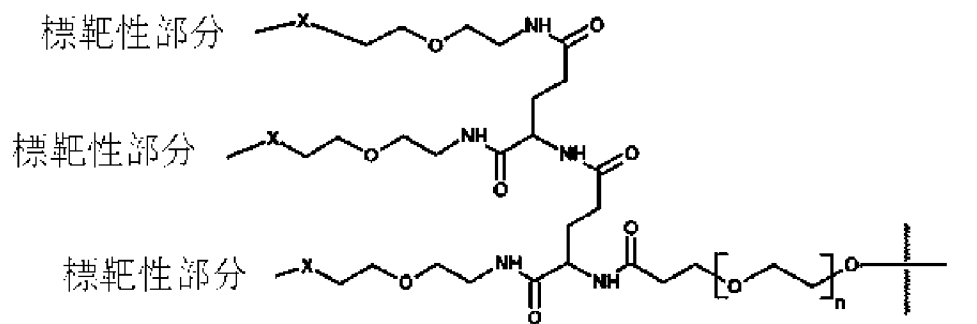
中，在連接體與治療性化合物之間包括另一連接體。

標靶性配體結構及包括標靶性配體之亞磷醯胺化合物。

本文所揭示之標靶性配體可包括一或多個標靶性部分、繫鏈、分支點基團及連接體。本文所揭示之標靶性配體可含有一個、兩個、三個、四個或四個以上標靶性部分。

在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體經合成呈亞磷醯胺化合物之形式。亞磷醯胺廣泛用於RNA及DNA之化學合成中。在一些實施例中，本文所揭示含有亞磷醯胺之標靶性配體係添加至雙股RNAi藥劑之有義股之5'端。當標靶性配體欲連接至表現抑制性寡聚化合物之5'末端時，可尤其有利地作為亞磷醯胺製備標靶性配體。不希望限於理論，應瞭解當標靶性配體連接至表現抑制性寡聚化合物之5'末端時，作為亞磷醯胺製備標靶性配體不僅容許標靶性配體之鏈接作為最後組份(因此降低製造成本)，以及當標靶性配體附接至雙股RNAi藥劑之有義股之5'末端時，其潛在地允許標靶性配體阻斷有義股至RISC中之負載。當表現抑制性寡聚化合物係雙股RNAi藥劑時，當標靶性配體欲連接至RNAi藥劑之有義股之5'末端時，標靶性配體可作為亞磷醯胺化合物來製備。

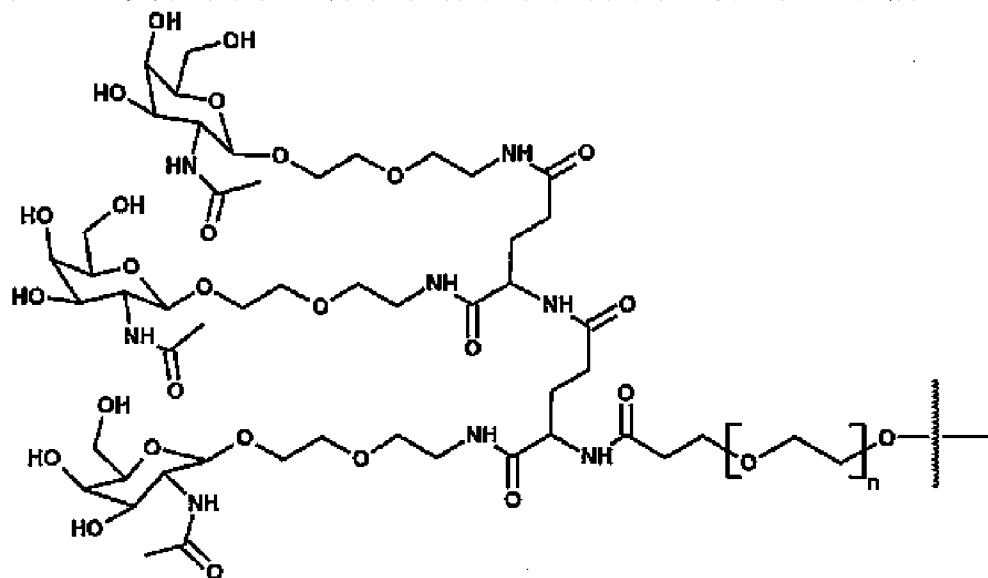
在一些實施例中，標靶性配體係由下式B表示：



其中n係1至20之整數；X係O、S或NH；且標靶性部分係選自由半乳糖、半乳胺糖、N-甲醯基-半乳胺糖、N-乙醯基-半乳胺糖、N-丙醯基-半

乳胺糖、N-正-丁醯基半乳胺糖或N-異-丁醯基半乳胺糖組成之群。(式B)。在一些實施例中， n 等於6。在一些實施例中， n 等於8。在一些實施例中， n 等於4。

在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構：

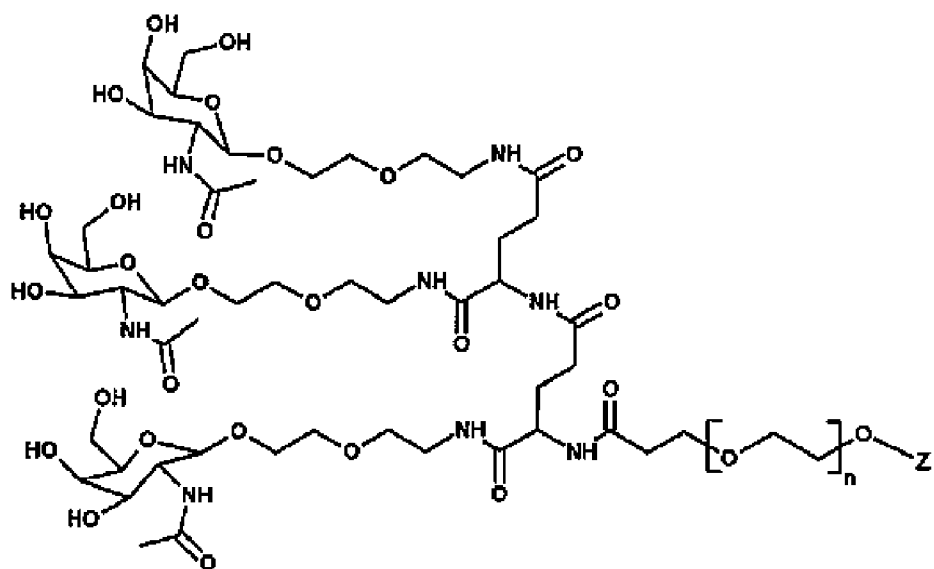


，其中 n 係

1至20之整數(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20)(結構1)。

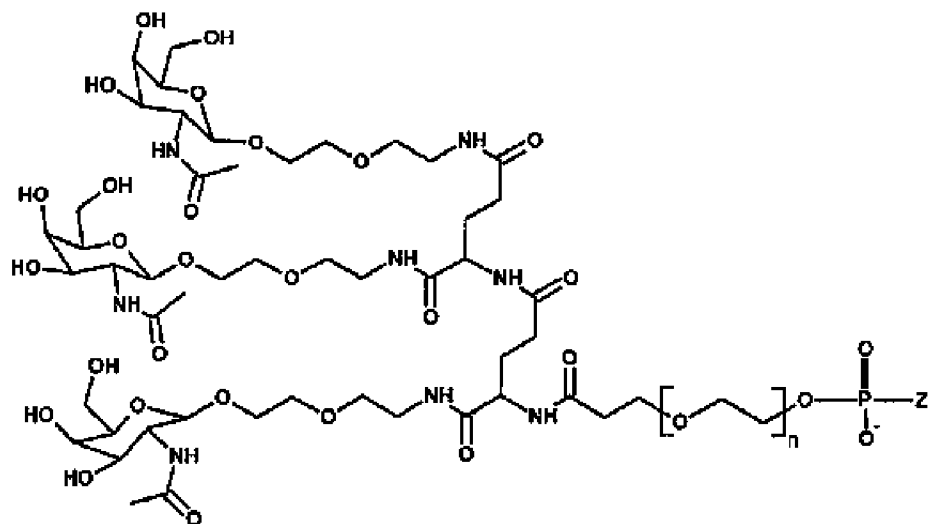
在一些實施例中，標靶性配體具有由結構1表示之結構，其中 $n = 6$ 。在一些實施例中，標靶性配體具有由結構1表示之結構，其中 $n = 8$ 。在一些實施例中，標靶性配體具有由結構1表示之結構，其中 $n = 4$ 。

在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



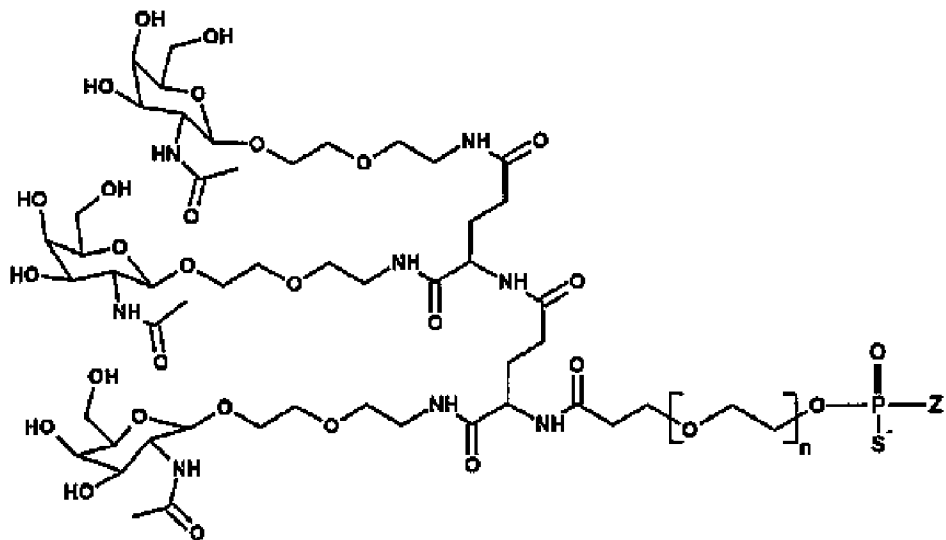
，其中Z包括表現抑制性寡聚化合物(結構1a)。

在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



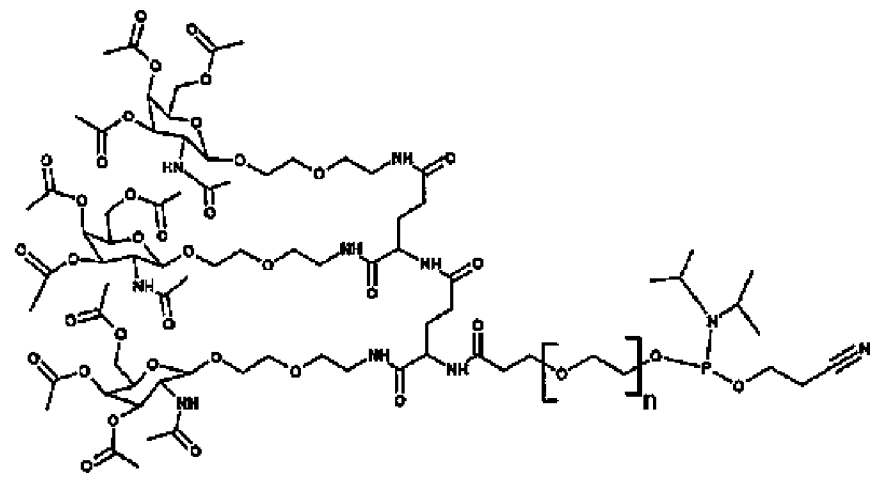
，其中Z由表現抑制性寡聚化合物(結構1b)組成或包括該化合物。

在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



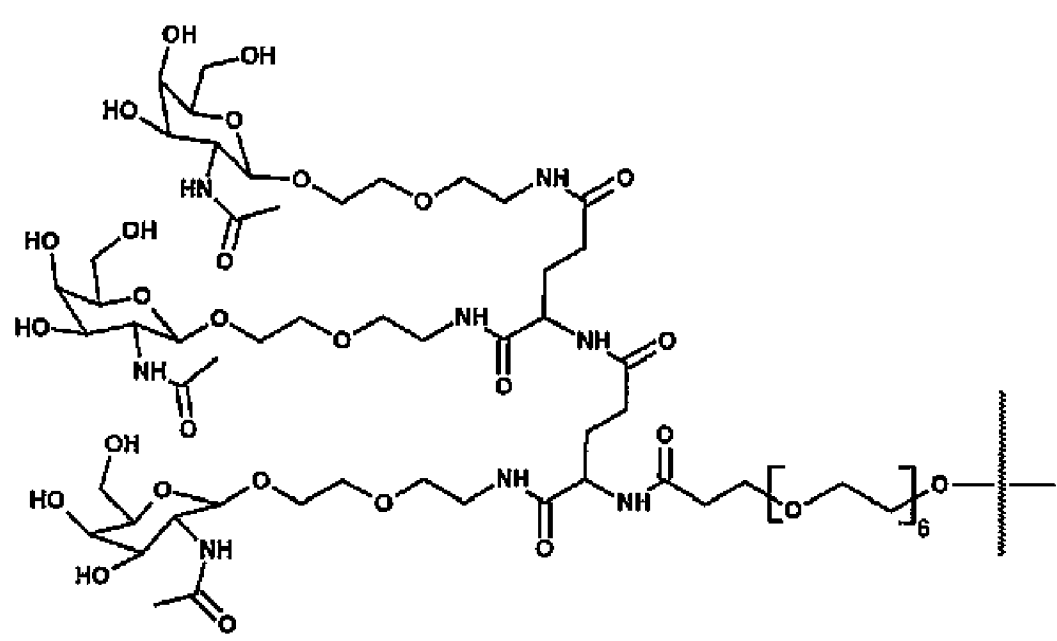
，其中Z由表現抑制性寡聚化合物(結構1c)組成或包括該化合物。

在一些實施例中，標靶性配體係含有具有由下式表示之結構之亞磷醯胺之化合物：



，其中n係1至20之整數(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20)(結構1d)。

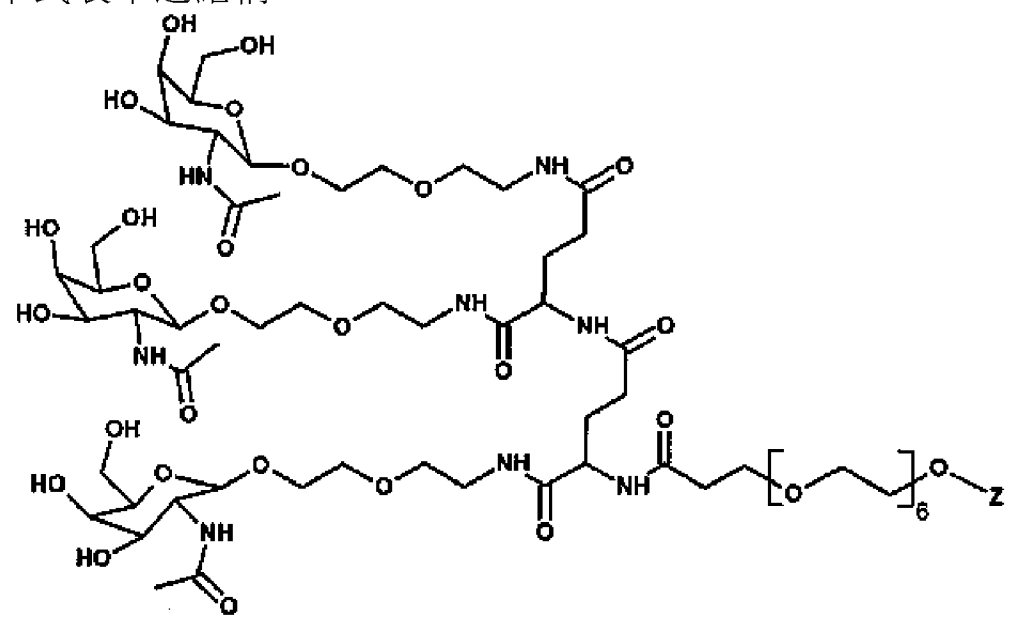
在一些實施例中，標靶性配體包含由下式表示之結構或由其組成：



(結 構

101) 。

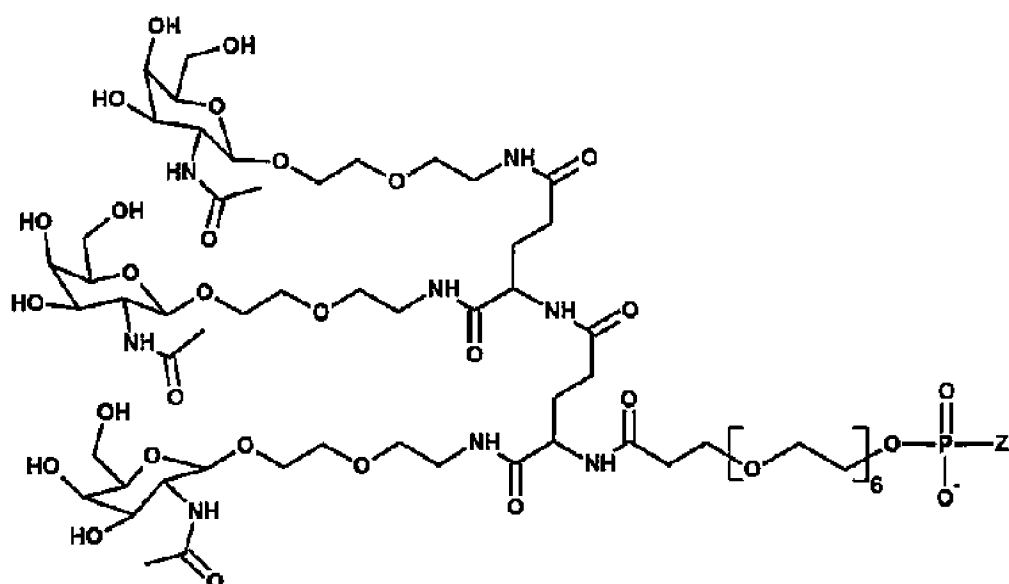
在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



，其中Z包

括表現抑制性寡聚化合物(結構101a)。

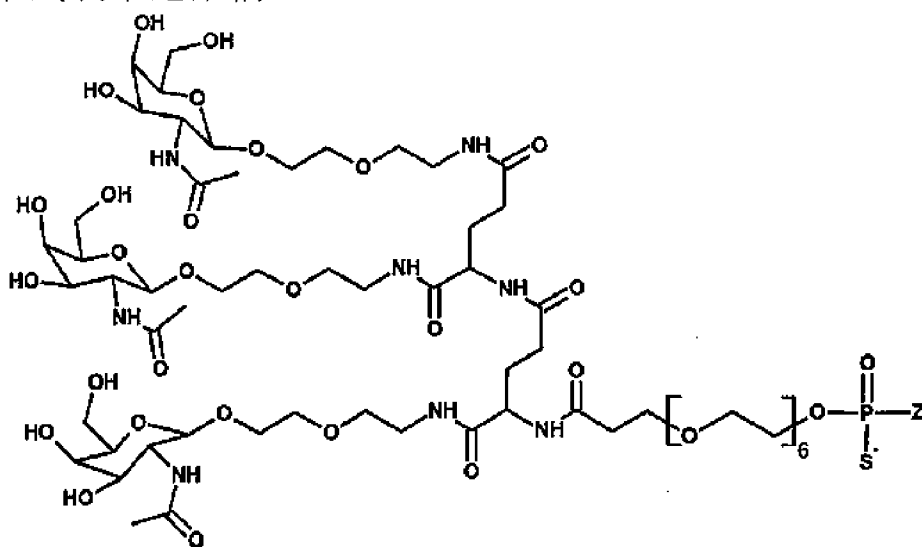
在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



，其中Z

由表現抑制性寡聚化合物(結構101b)組成或包括該化合物。

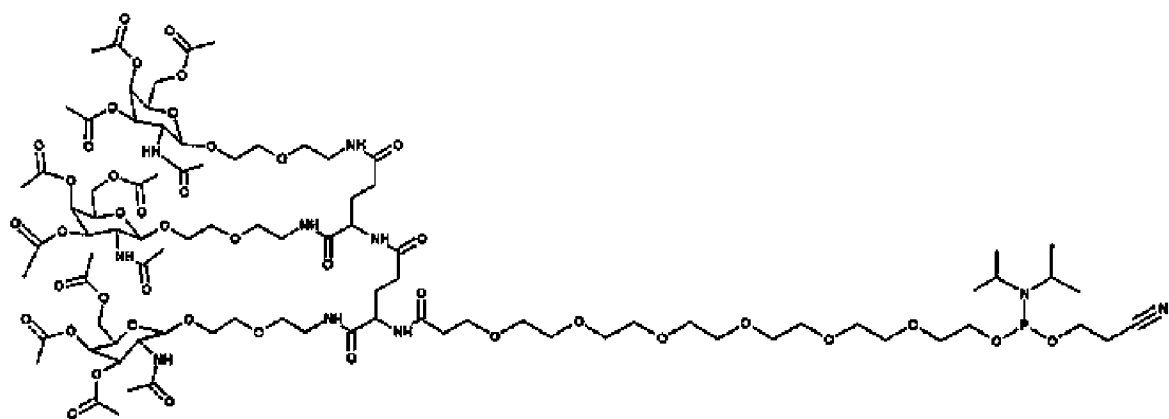
在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



，其中Z由該

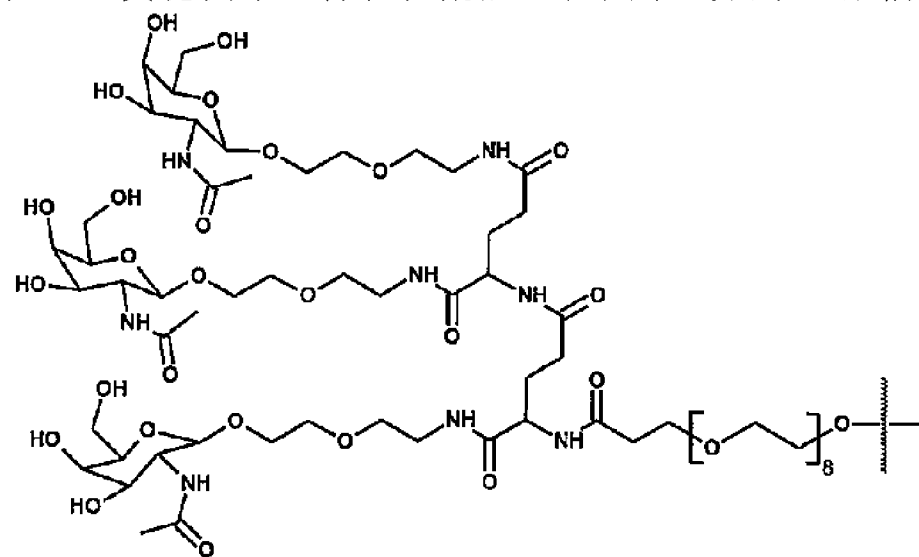
化合物表現抑制性寡聚化合物(結構101c)組成或包括該化合物。

在一些實施例中，標靶性配體係具有由下式表示之結構之含有亞磷醯胺之化合物：



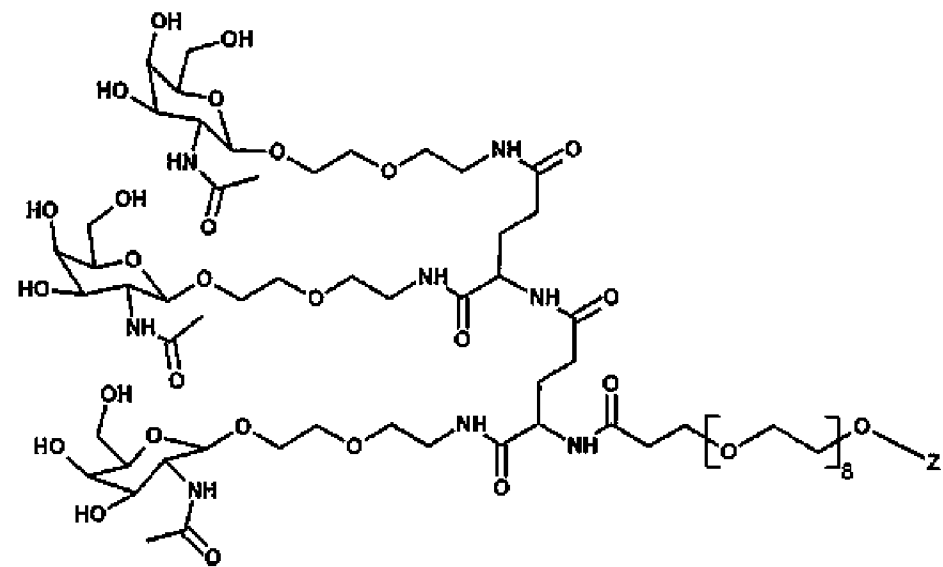
(結構101d)。

在一些實施例中，標靶性配體包含由下式表示之結構或由其組成：



(結構102)。

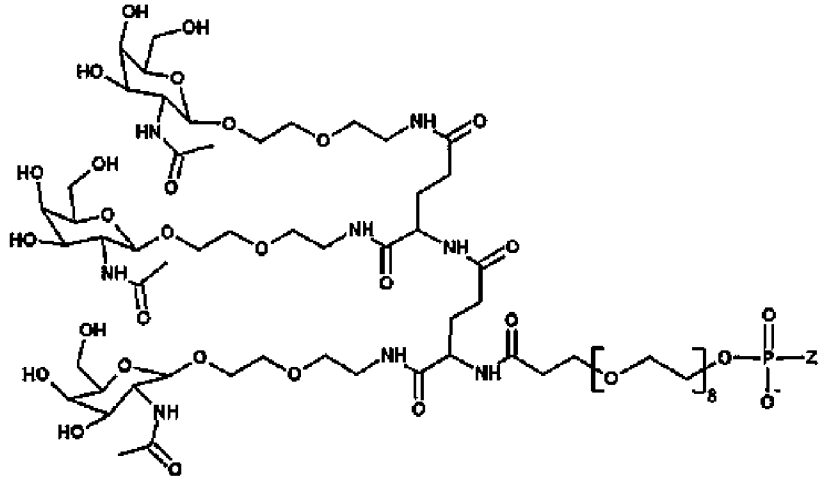
在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



，其中Z包括

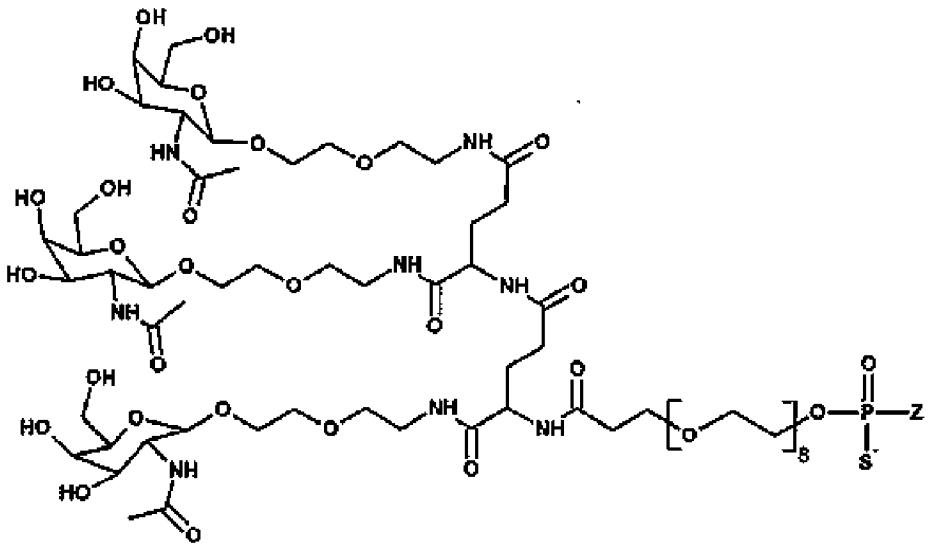
表現抑制性寡聚化合物(結構102a)。

在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



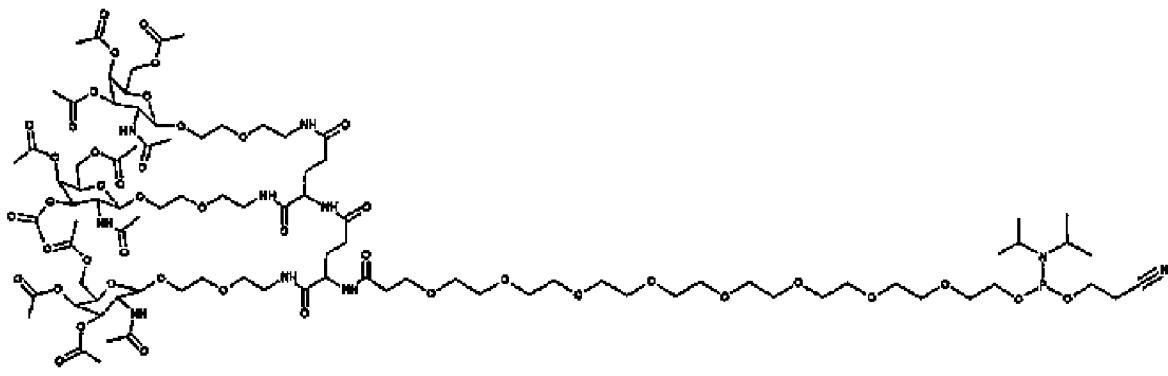
，其中Z由表現抑制性寡聚化合物(結構102b)組成或包括該化合物。

在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



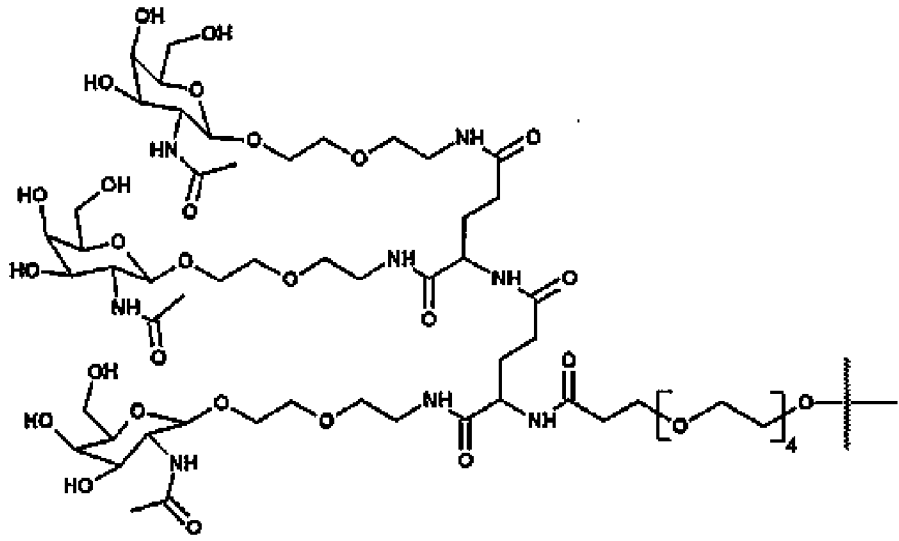
，其中Z由表現抑制性寡聚化合物(結構102c)組成或包括該化合物。

在一些實施例中，標靶性配體係具有由下式表示之結構之含有亞磷醯胺之化合物：



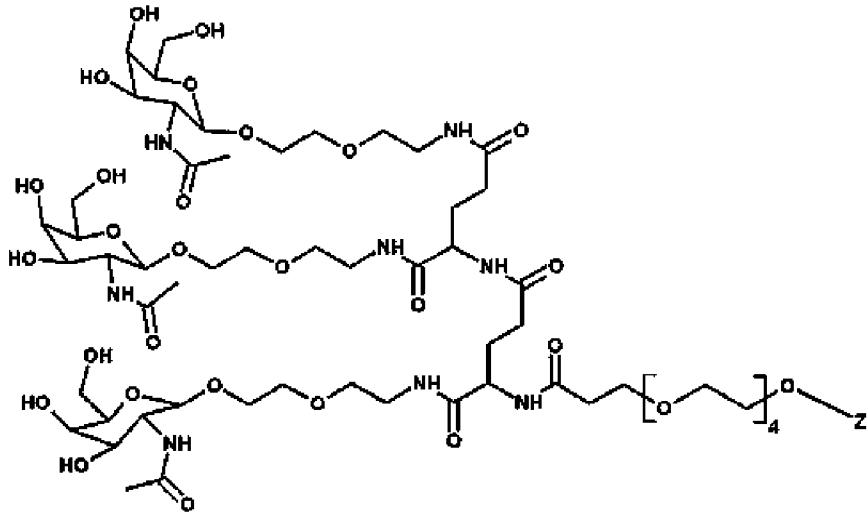
(結構102d)。

在一些實施例中，標靶性配體包含由下式表示之結構或由其組成：



(結構103)。

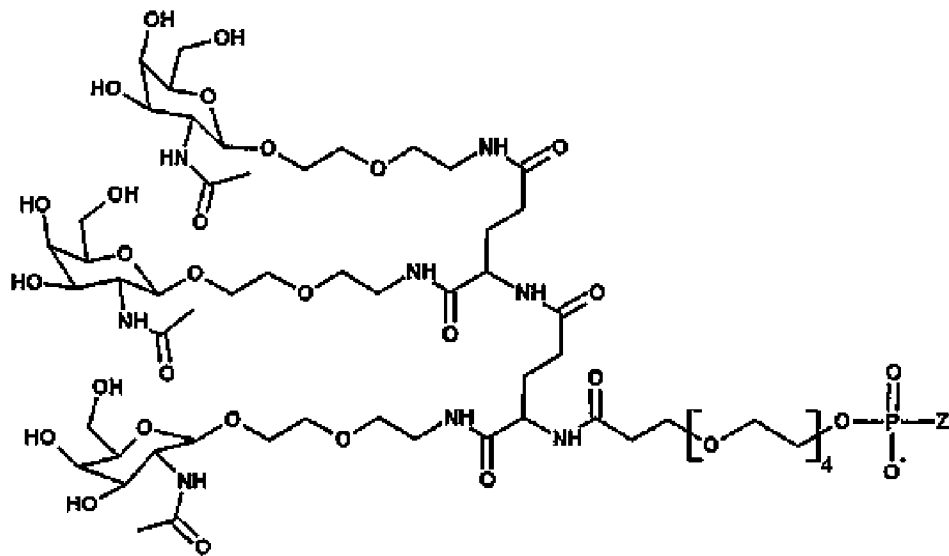
在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



，其中Z包括表現

抑制性寡聚化合物(結構103a)。

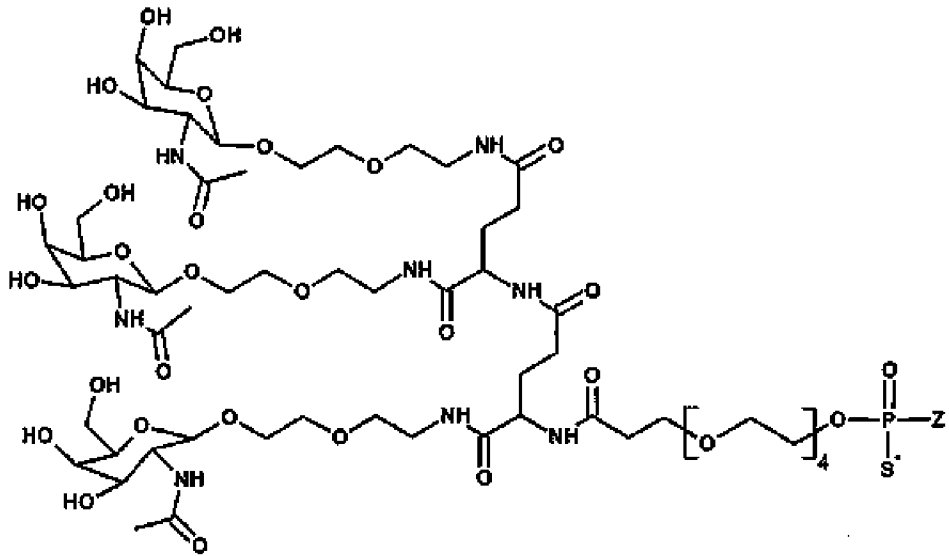
在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



，其中Z由表

現抑制性寡聚化合物(結構103b)組成或包括該化合物。

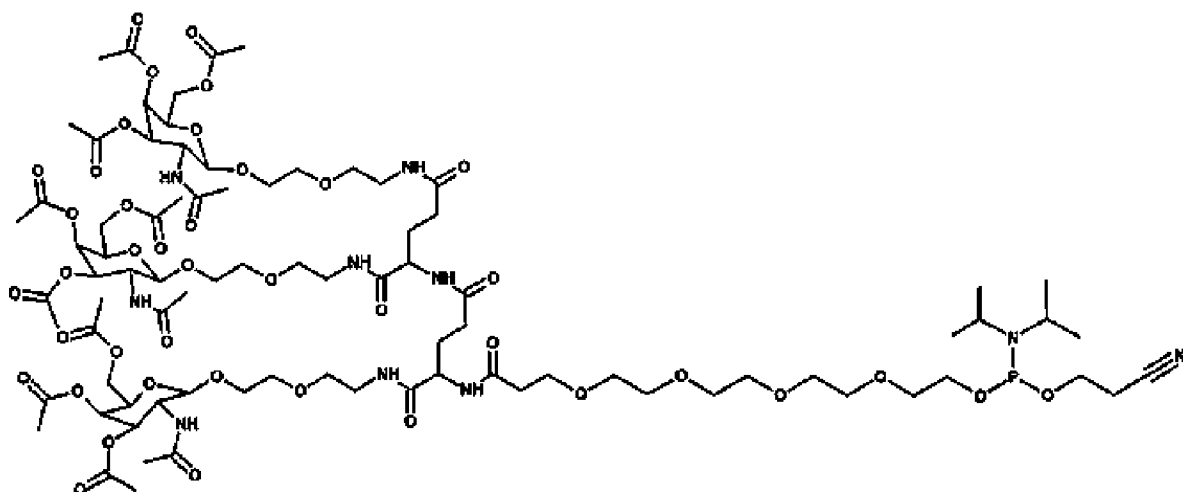
在一些實施例中，標靶性配體係連接至表現抑制性寡聚化合物且具有由下式表示之結構：



，其中Z由表

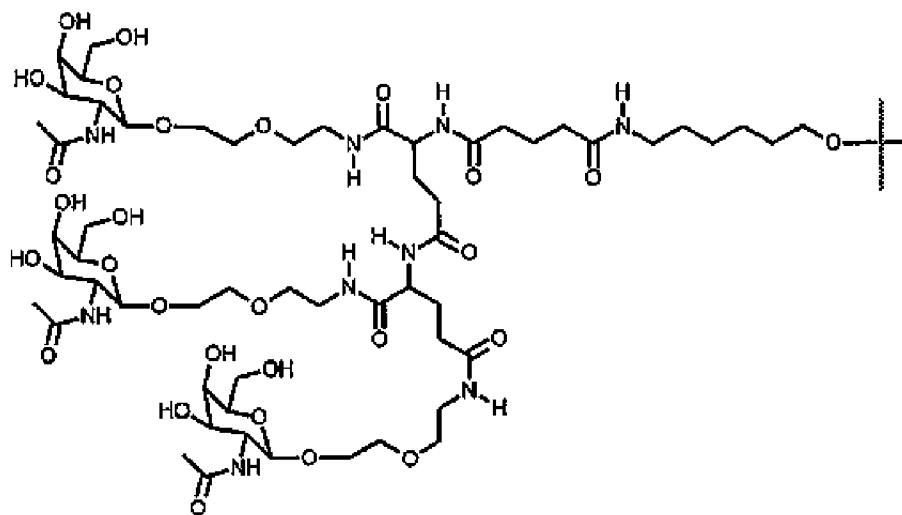
現抑制性寡聚化合物(結構103c)組成或包括該化合物。

在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構之含有亞磷醯胺之化合物：



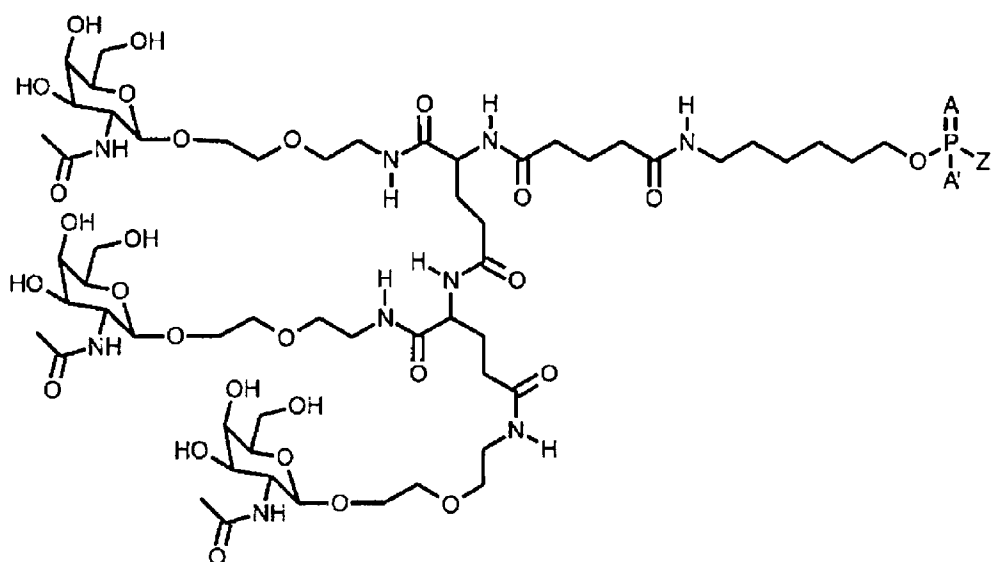
(結構103d)。

在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構：



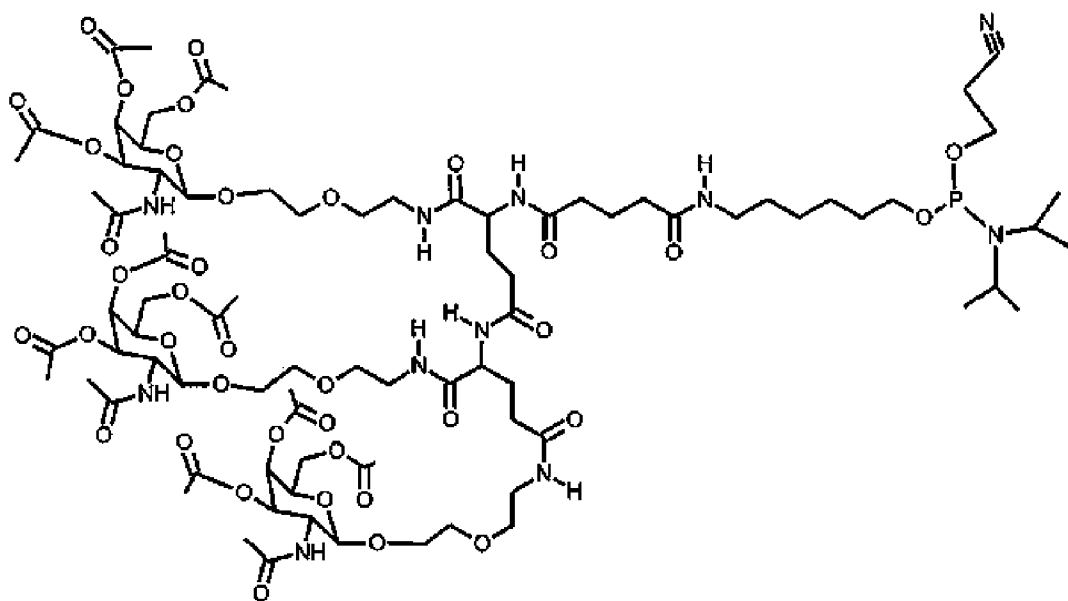
(結構2)。

在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係連接至標靶性配體且具有由下式表示之結構：



表現抑制性寡聚化合物組成或包括該化合物；A係O或S；且A'係O⁻、S⁻或NH⁻（結構2b）。

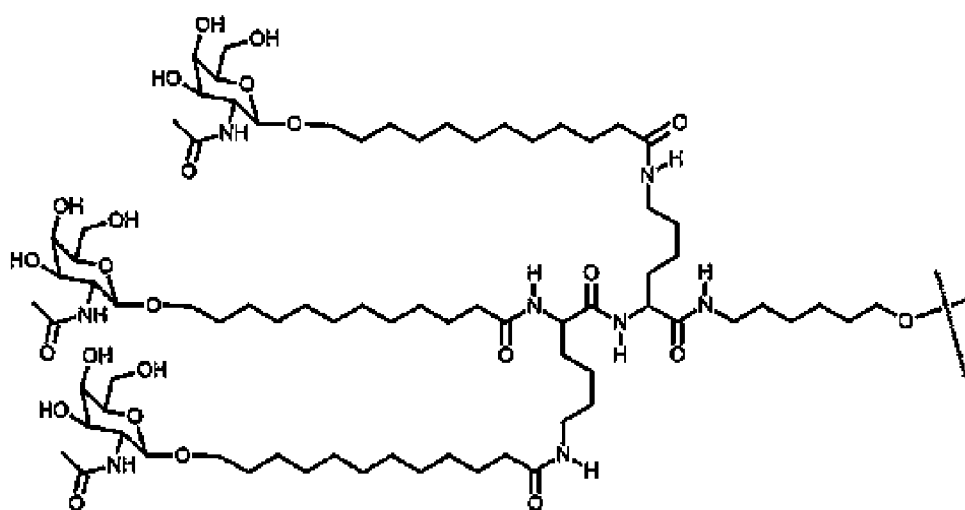
在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構之含有亞磷醯胺之化合物：



(結構

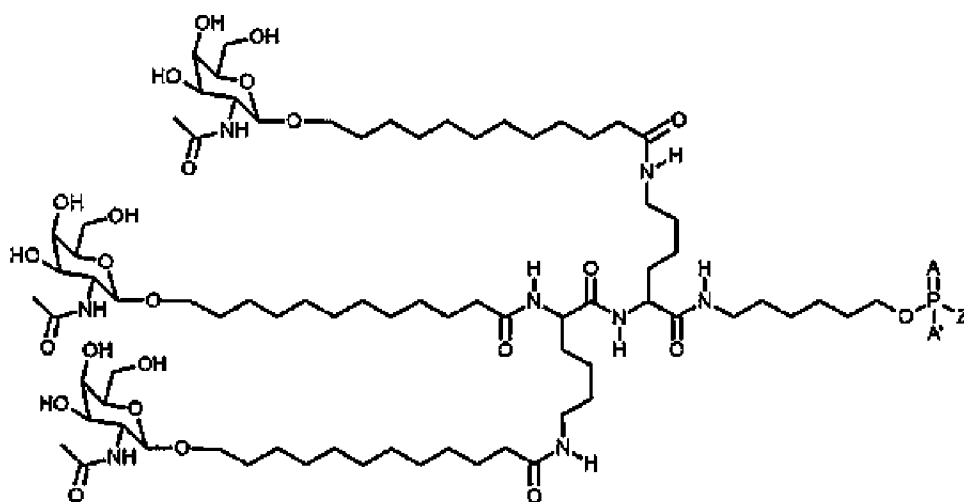
2d) $\circ$

在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構：



(結構3)。

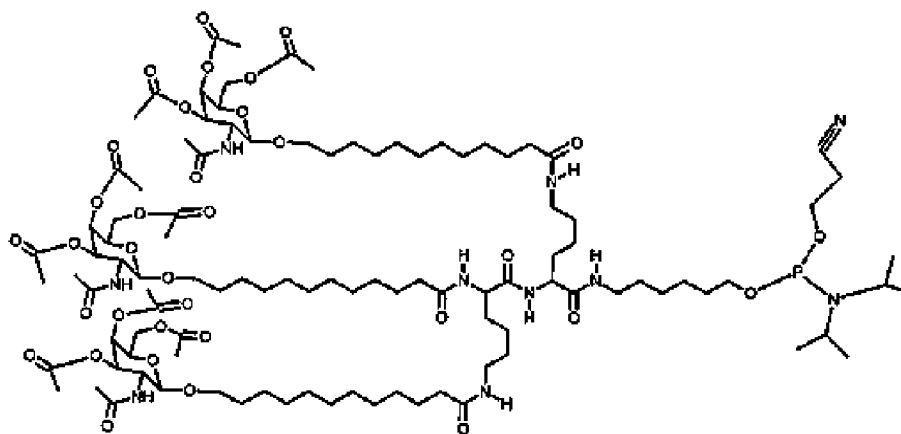
在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係連接至標靶性配體且具有由下式表示之結構：



，其中R由

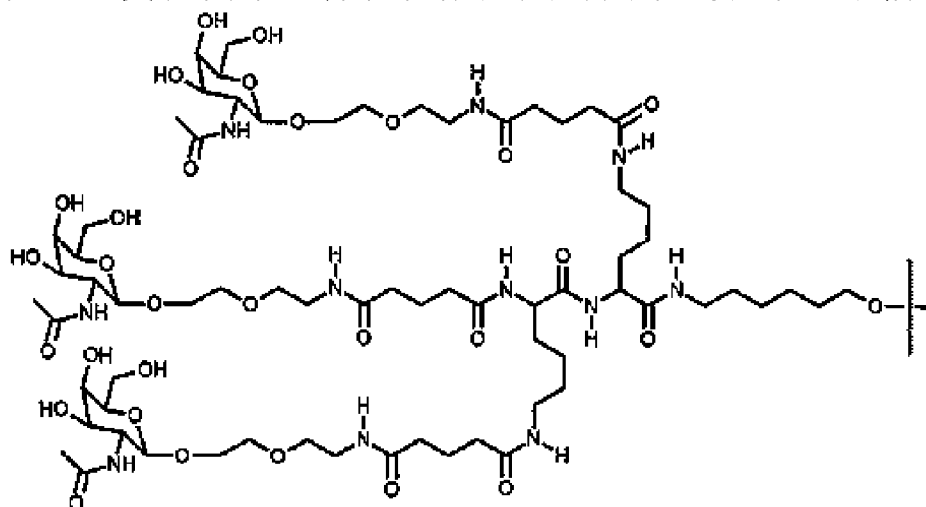
表現抑制性寡聚化合物組成或包括該化合物；A係O或S；且A'係O⁻、S⁻或NH⁻(結構3b)。

在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構之含有亞磷鹽胺之化合物：



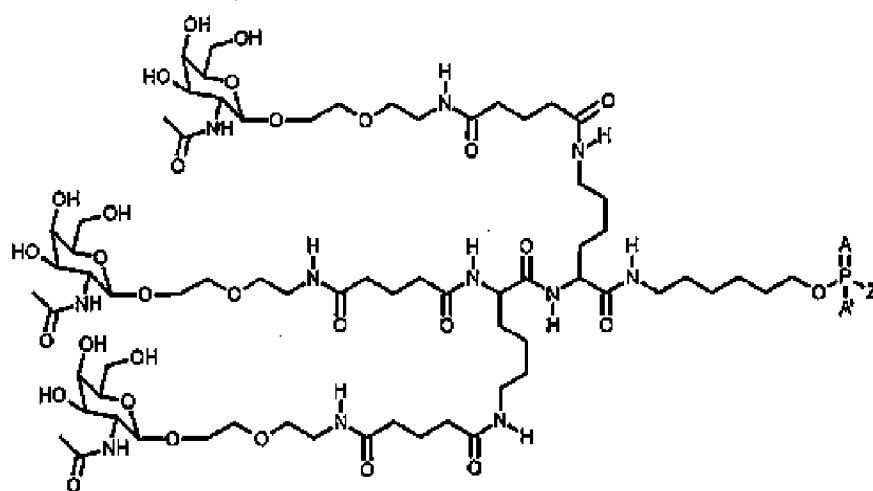
(結構3d)。

在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構：



(結構4)。

在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係連接至標靶性配體且具有由下式表示之結構：

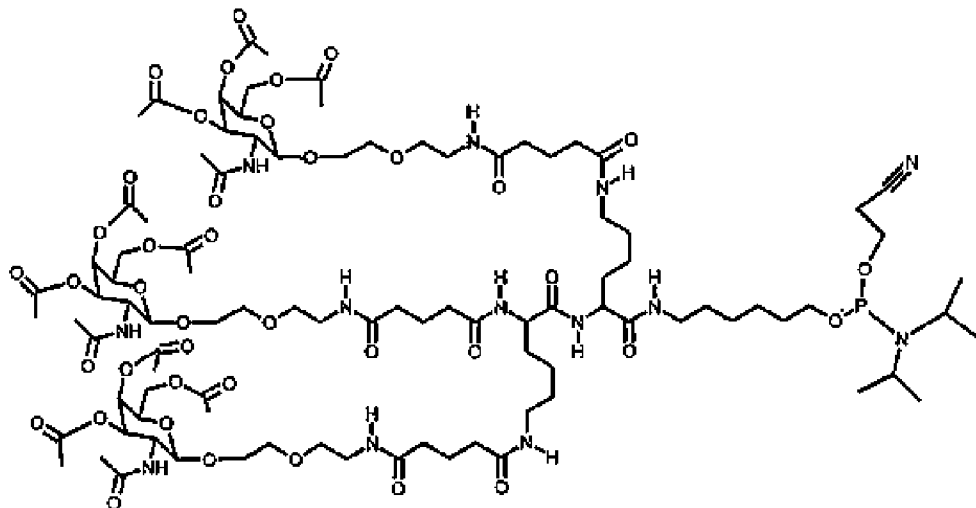


，其中Z由表現抑

制性寡聚化合物組成或包括該化合物；A係O或S；且A⁻係O⁻、S⁻或NH⁻

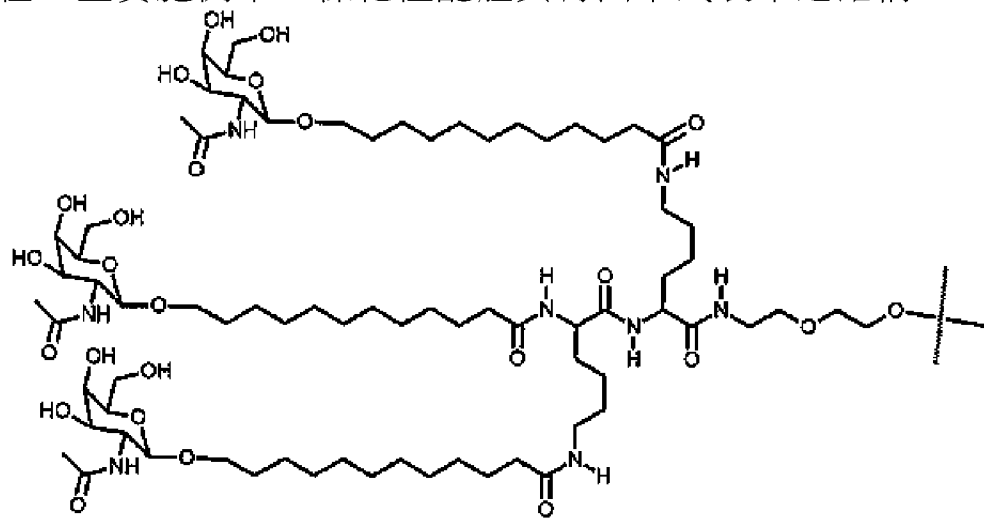
(結構4b)。

在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構之含有亞磷鹽胺之化合物：



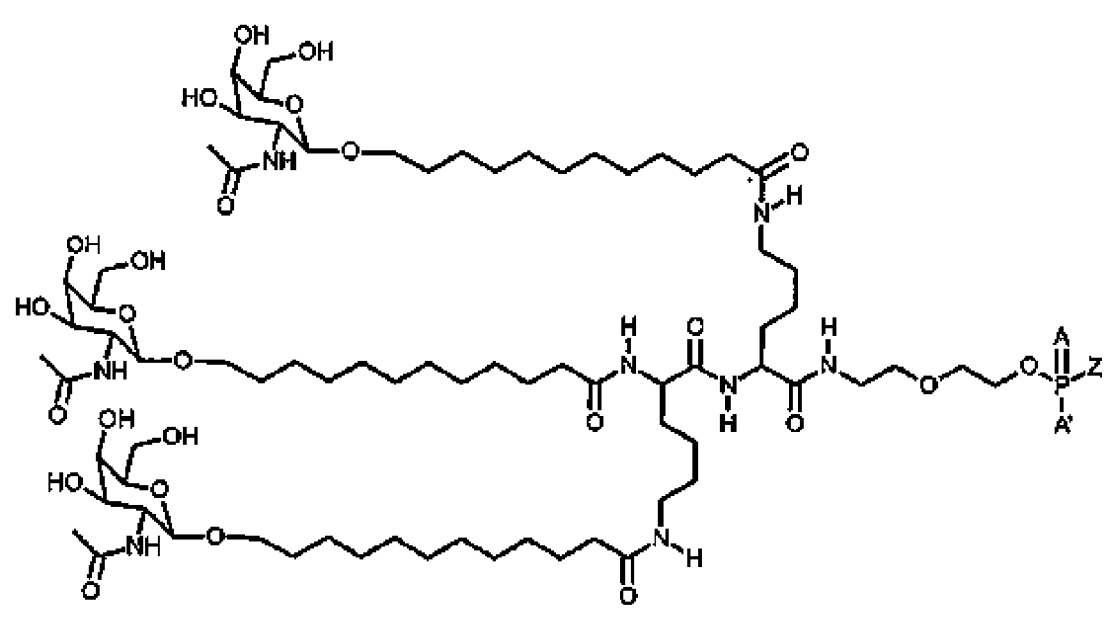
(結構4d)。

在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構：



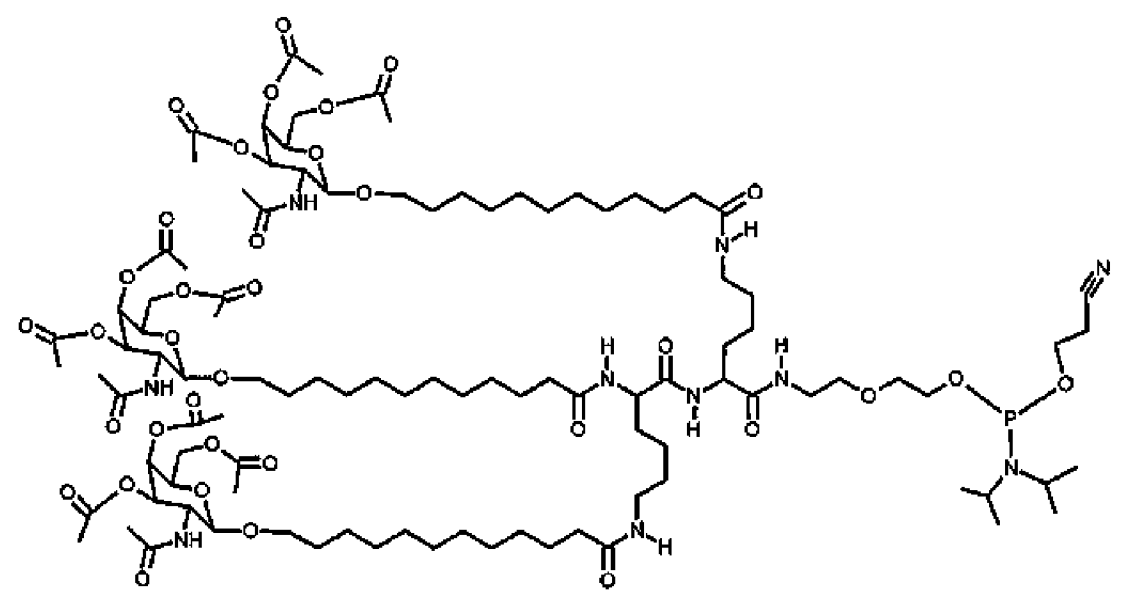
(結構5)。

在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係連接至標靶性配體且具有由下式表示之結構：



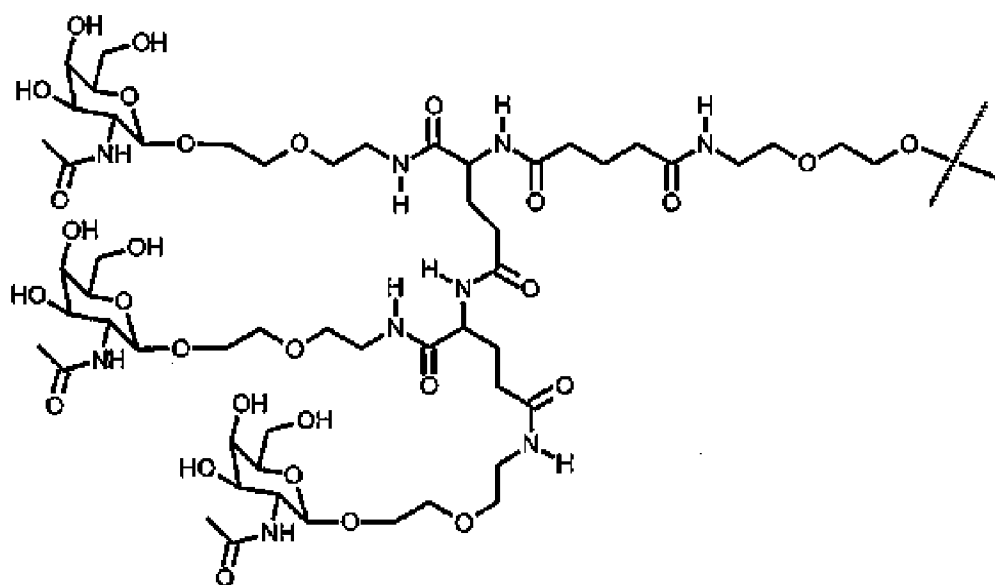
，其中Z由表現抑制性寡聚化合物組成或包括該化合物；A係O或S；且A'係O⁻、S⁻或NH⁻。(結構5b)。

在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構之含有亞磷醯胺之化合物：



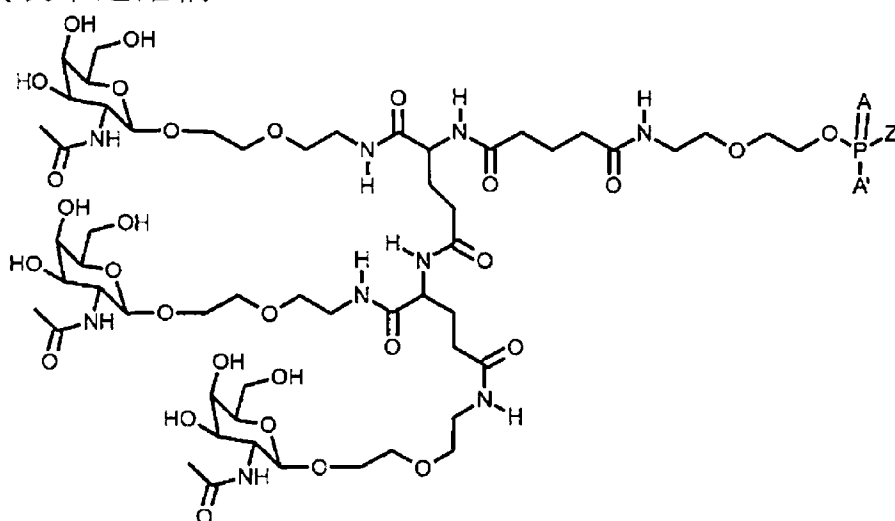
(結構5d)。

在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構：



(結構6)。

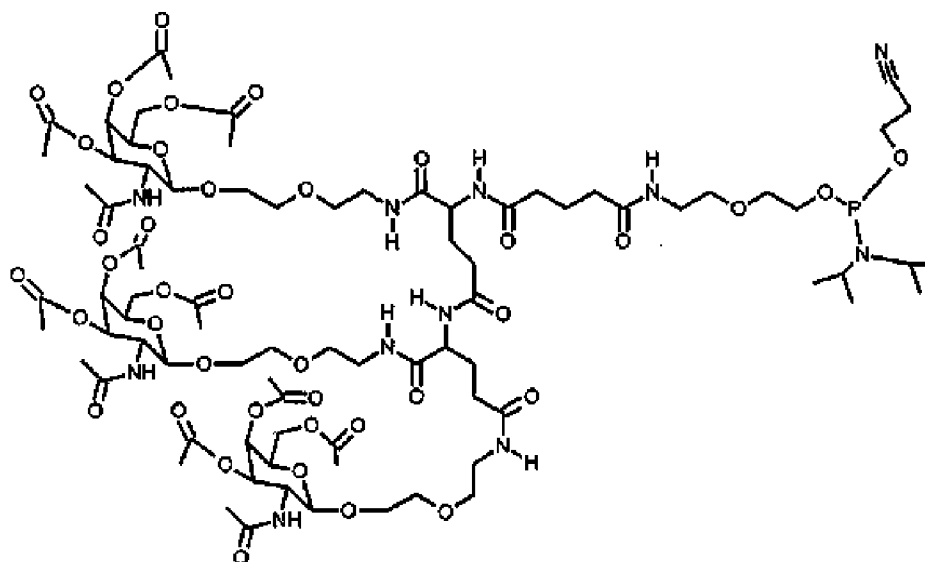
在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係連接至標靶性配體且具有由下式表示之結構：



，其中Z由表

現抑制性寡聚化合物組成或包括該化合物；A係O或S；且A'係O⁻、S⁻或NH⁻ (結構6b)。

在一些實施例中，標靶性配體具有由下式表示之結構之含有亞磷鹽胺之化合物：



(結構6d)。

在一些實施例中，標靶性配體係呈半乳糖簇之形式。如本文所用半乳糖簇包括具有兩個至四種末端半乳糖衍生物之標靶性配體。如本文所用術語半乳糖衍生物包括半乳糖及針對去唾液酸基醣蛋白受體之親和力等於或大於半乳糖之半乳糖衍生物。半乳糖衍生物係為標靶性部分之類型之糖。末端半乳糖衍生物可藉助糖之C-1碳連接至繫鏈。

在一些實施例中，標靶性配體包括三個末端半乳胺糖或半乳胺糖衍生物(例如N-乙醯基-半乳胺糖)，每一者針對去唾液酸基醣蛋白受體均具有親和力。在一些實施例中，標靶性配體包括三個末端N-乙醯基-半乳胺糖(GalNAc或NAG)作為標靶性部分。

在一些實施例中，標靶性配體包括四種末端半乳胺糖或半乳胺糖衍生物(例如N-乙醯基-半乳胺糖)，每一者針對去唾液酸基醣蛋白受體均具有親和力。在一些實施例中，標靶性配體包括四種末端N-乙醯基-半乳胺糖(GalNAc或NAG)作為標靶性部分。

在一些實施例中，每一標靶性部分均包括為N-乙醯基-半乳胺糖之半乳胺糖衍生物。可用作標靶性部分之針對去唾液酸基醣蛋白受體具有親和力之其他糖可選自包括以下之清單：半乳糖、半乳胺糖、N-甲醯基-半乳

胺糖、N-乙醯基-半乳胺糖、N-丙醯基-半乳胺糖、N-正-丁醯基半乳胺糖及N-異-丁醯基半乳胺糖。多種半乳糖衍生物針對去唾液酸基醣蛋白受體之親和力已得到研究(例如參見：Iobst, S.T.及Drickamer, K. *J.B.C.* 1996, 271, 6686)或使用業內熟知且常用之方法易於測定。

業內常用術語在指三個末端N-乙醯基-半乳胺糖時包括三支、三價及三聚體。

連接體

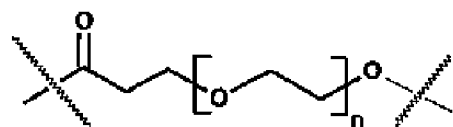
本文所揭示之標靶性配體包含連接體。

連接體係如下的一組原子：在一端上連接至分支點基團，且在另一端上連接至治療性化合物(或當標靶性配體係作為亞磷醯胺化合物合成時，藉助與亞磷醯胺形成試劑發生亞磷醯化反應而連接至亞磷醯胺之磷原子)。在一些實施例中，連接體在一端上連接至分支點基團且在另一端上連接至一或多個基團，其然後連接至表現抑制性寡聚化合物。在一些實施例中，連接體係直接連接至寡聚化合物。在一些實施例中，連接體連接至可裂解部分，其然後連接至寡聚化合物。可裂解部分之實例包括(例如)磷酸酯基團、包括二硫化物部分之基團及/或可裂解之其他核苷間鏈接。在一些實施例中，連接體不連接至可裂解部分。在一些實施例中，連接體連接至硫代磷酸酯或膦酸酯基團。

在一些實施例中，連接體由聚乙二醇(「PEG」)部分組成或包括該部分。將PEG部分納入連接體中可對某些其他連接體(例如由經取代或未經取代之烷基鏈組成或包括該烷基鏈之連接體)賦予某些有益性質。例如，如與含有烷基鏈連接體之化合物相比，將PEG部分納入連接體中可增加含有亞磷醯胺化合物之標靶性配體在核苷酸合成常用溶劑中之溶解性，從而

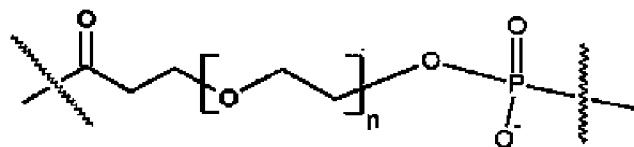
可簡化製程。

在一些實施例中，標靶性配體包含具有以下結構之連接體：



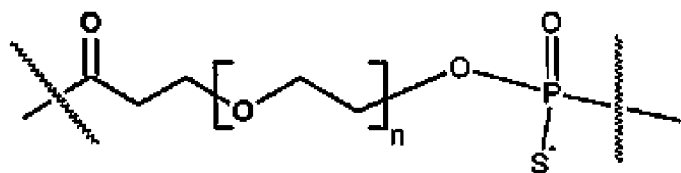
，其中n係1至20之整數(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20)(結構1001)。

在一些實施例中，標靶性配體包含連接至磷酸酯基團且具有以下結構之連接體：



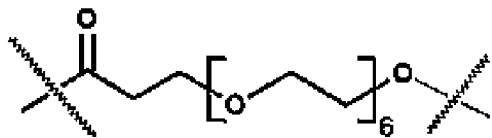
，其中n係選自1至20之整數(結構1002)。

在一些實施例中，標靶性配體包含連接至硫代磷酸酯基團且具有以下結構之連接體：



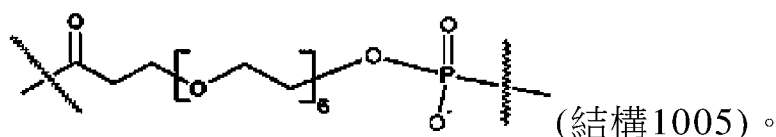
，其中n係選自1至20之整數(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20)(結構1003)。

在一些實施例中，標靶性配體包含具有以下結構之連接體：

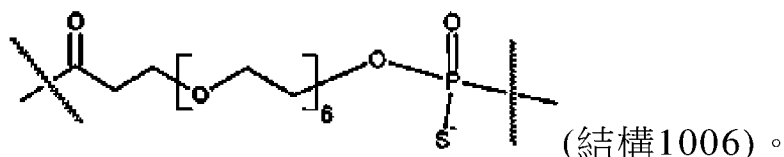


(結構1004)。

在一些實施例中，標靶性配體包含連接至磷酸酯基團且具有以下結構之連接體：



在一些實施例中，標靶性配體包含連接至硫代磷酸酯基團且具有以下結構之連接體：



在一些實施例中，連接體係連接至為雙股RNAi藥劑之表現抑制性寡聚化合物。在一些實施例中，連接體係連接至雙股RNAi藥劑之有義股之5'端。在一些實施例中，連接體係連接至雙股RNAi藥劑之有義股之3'端。在一些實施例中，連接體係連接至雙股RNAi藥劑之反義股之3'端。在一些實施例中，連接體係連接至雙股RNAi藥劑之反義股之5'端。

在一些實施例中，連接體係連接至可裂解部分。在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物之末端磷酸酯基團可用作可裂解部分。在一些實施例中，獨立地經選擇之可裂解部分連接至連接體。如本文所用可裂解部分係在細胞外部穩定但在進入靶細胞中後裂解之基團。可裂解部分在某些條件(例如pH，或某些裂解劑，例如促進降解之分子或氧化還原劑)下易於裂解。

在一些實施例中，可裂解部分可易受pH之影響。例如，已知胞內體及溶酶體較人類血液(約7.35至7.45之pH)通常具有更酸之pH (約4.5至6.5之pH)且因此可促進可裂解部分之裂解。

在一些實施例中，可裂解部分係磷酸酯基團。磷酸酯基團可藉由已知降解或水解磷酸酯基團之藥劑來裂解。

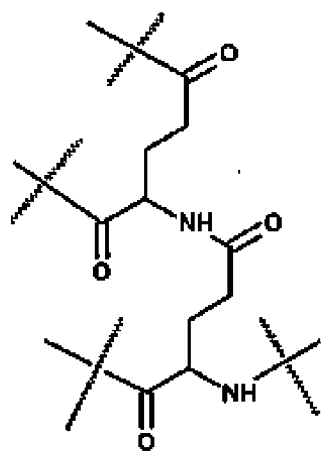
分支點基團

本文所揭示之標靶性配體包含至少一個分支點基團。本文所揭示標靶性配體之分支點基團係附接至連接體。在一些實施例中，本文所揭示標靶性配體之分支點基團係在一端上連接至連接體且分支點基團係在另一端上連接至一或多個繫鏈。在一些實施例中，分支點基團係附接至連接體及一或多個繫鏈。在一些實施例中，分支點基團係間接(例如經由連接體)附接至表現抑制性寡聚化合物。在一些實施例中，分支點基團係經由其他一或多個基團連接至表現抑制性寡聚化合物。

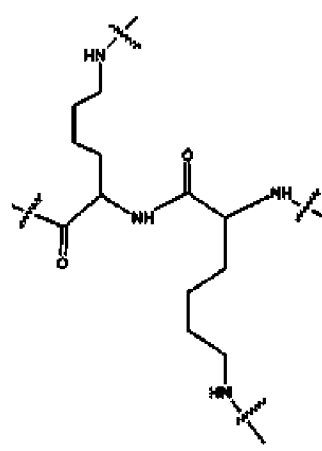
本文所揭示之分支點基團可具有允許一或多個標靶性部分之附接且進一步允許附接至連接體之基團。

本文所揭示之分支點基團可具有允許兩個、三個或四個半乳糖衍生物之附接且進一步允許分支點附接至連接體之任一基團。

在一些實施例中，標靶性配體包含具有以下結構之分支點：



(結構2001)，



(結構2002)。

繫鏈

本文所揭示之標靶性配體包含一或多個繫鏈。繫鏈係在分支點基團與每一標靶性部分之間連接。在一些實施例中，繫鏈在一端上直接連接至標靶性配體且在另一端上直接連接至分支點基團。在一些實施例中，繫鏈在一端上直接連接至標靶性配體且在另一端上間接連接至分支點基團。在一些實施例中，繫鏈在一端上間接連接至標靶性配體且在另一端上間接連

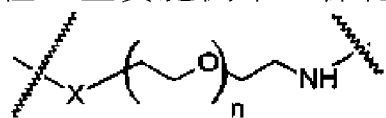
接至分支點基團。在一些實施例中，本文所闡述之標靶性配體包括三個繫鏈及三個標靶性部分。在一些實施例中，本文所闡述之標靶性配體包括四個繫鏈及四個標靶性部分。在一些實施例中，本文所闡述之標靶性配體包括一個繫鏈及一個標靶性部分。在一些實施例中，本文所闡述之標靶性配體包括多個繫鏈及多個標靶性部分。

在一些實施例中，在繫鏈與標靶性部分之間插入其他繫鏈或其他基團。在一些實施例中，在繫鏈與標靶性部分之間插入第二繫鏈。在一些實施例中，在繫鏈與標靶性部分之間插入第二繫鏈及第三繫鏈。在一些實施例中，在繫鏈與標靶性部分之間插入第二、第三及第四繫鏈。如本文所揭示，對於每一標靶性部分存在至少一個繫鏈。在一些實施例中，對於每一標靶性部分存在一個以上繫鏈。本文所揭示之標靶性配體意欲涵蓋該等組合物。

在一些實施例中，在繫鏈與分支點基團之間可插入其他基團。

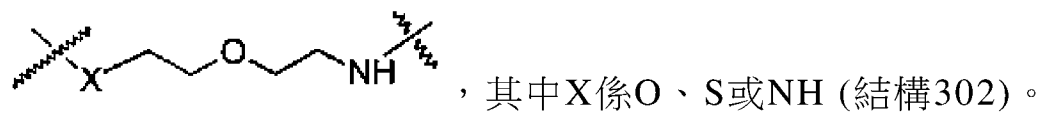
如本文所揭示，繫鏈用作間隔體，其可進一步為標靶性部分與分支點基團之間之鏈接、連接體及治療性化合物增添撓性及/或長度。在一些實施例中，繫鏈包括烷基(包括環烷基)、烯基(包括環烯基)、炔基、芳基、芳烷基、芳烯基或芳炔基。在一些實施例中，繫鏈包括一或多種雜原子、雜環、雜芳基、胺基酸、核苷酸或糖。

在一些實施例中，標靶性配體包括具有以下結構之繫鏈：

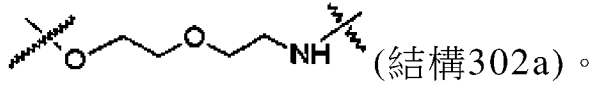


，其中 n 係1至20之整數(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)且 X 係O、S或NH(結構301)。

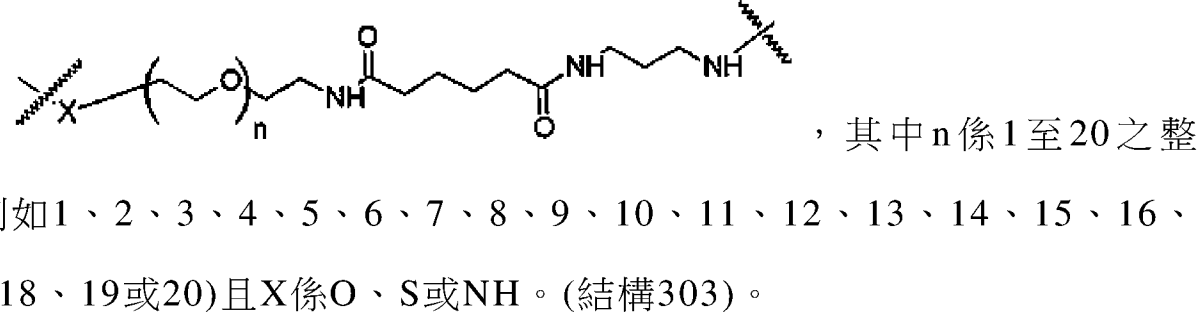
在一些實施例中，標靶性配體包括具有以下結構之繫鏈：



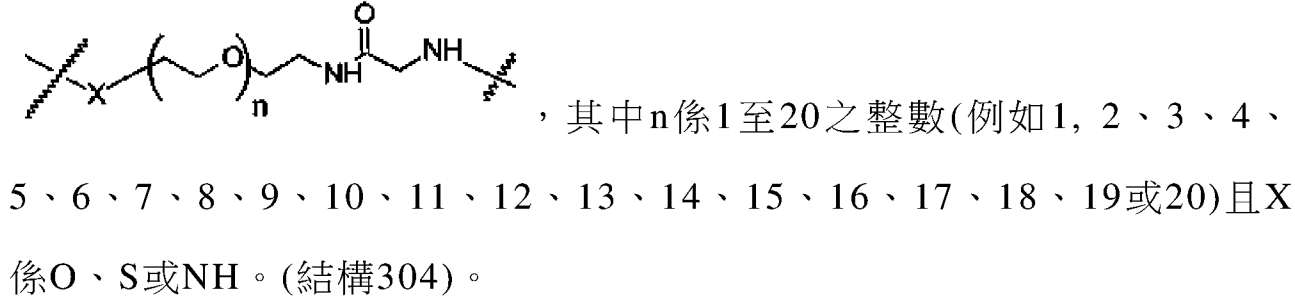
在一些實施例中，標靶性配體包括具有以下結構之繫鏈：



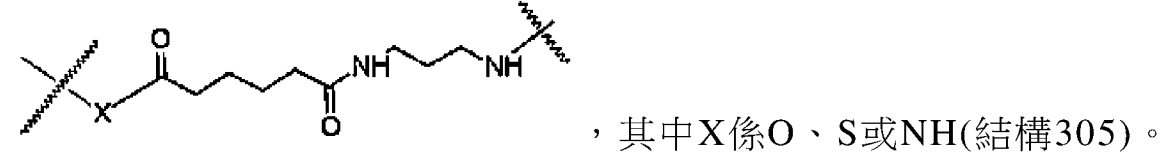
在一些實施例中，標靶性配體包括具有以下結構之繫鏈：



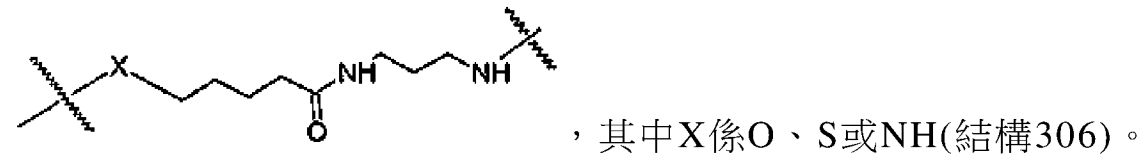
在一些實施例中，標靶性配體包括具有以下結構之繫鏈：



在一些實施例中，標靶性配體包括具有以下結構之繫鏈：



在一些實施例中，標靶性配體包括具有以下結構之繫鏈：



在一些實施例中，標靶性配體包括一種以上類型之繫鏈。在一些實施例中，繫鏈充當撓性親水間隔體(例如參見U.S. 5, 885,968；及Biessen等人*J. Med. Chem.* 1995, 39, 1538-1546，其二者係以全文引用方式併入本文中)且包括PEG間隔體。在其他實施例中，PEG間隔體具有1至20個伸

乙基單元(PEG₁至PEG₂₀)。例如，PEG間隔體具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個伸乙基單元。

標靶性部分：

本文所揭示之標靶性配體可包括一個至四個或四個以上標靶性部分。

在一些實施例中，標靶性配體可為半乳糖簇。如本文所用半乳糖簇包括具有兩個至四個末端半乳糖衍生物之標靶性配體。如本文所用術語半乳糖衍生物包括半乳糖及針對去唾液酸基醣蛋白受體之親和力等於或大於半乳糖之半乳糖衍生物。半乳糖衍生物係為標靶性部分類型之糖。末端半乳糖衍生物係藉助糖之C-1碳連接至繫鏈。

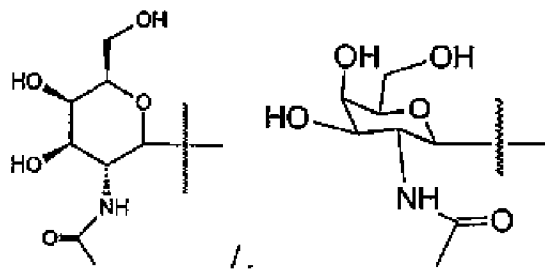
在一些實施例中，標靶性配體包括三個末端半乳糖或半乳糖衍生物(例如N-乙醯基-半乳糖)，每一者針對去唾液酸基醣蛋白受體均具有親和力。在一些實施例中，標靶性配體包括三個末端N-乙醯基-半乳糖(GalNAc或NAG)作為標靶性部分。例如，結構1、101、102及103中之每一者係具有三個末端N-乙醯基-半乳糖作為標靶性部分之標靶性配體。

在一些實施例中，每一標靶性部分包括為N-乙醯基-半乳糖之半乳糖衍生物。可用作標靶性部分且針對去唾液酸基醣蛋白受體具有親和力之其他糖可選自包括以下之清單：半乳糖、半乳糖、N-甲醯基-半乳糖、N-丙醯基-半乳糖、N-正-丁醯基半乳糖及N-異-丁醯基半乳糖。多種半乳糖衍生物對去唾液酸基醣蛋白受體之親和力已經研究(例如參見Iobst, S.T.及Drickamer, K. *J.B.C.* 1996, 271, 6686，其係以全文引

用方式併入本文中)或使用業內熟知且常用之方法容易地測定。

在一些實施例中，標靶性部分係靶細胞之部分。

在一些實施例中，標靶性部分包括N-乙醯基-半乳糖胺：



在一些實施例中，標靶性配體包括三個標靶性部分。在一些實施例中，標靶性配體包括四個標靶性部分。在一些實施例中，標靶性配體包括一個標靶性部分。在一些實施例中，標靶性配體包括兩個標靶性部分。在一些實施例中，標靶性配體包括四個或更多個標靶性部分。

在一些實施例中，標靶性部分包括半乳糖、半乳糖胺、N-甲醯基-半乳糖胺、N-乙醯基-半乳糖胺、N-丙醯基-半乳糖胺、N-正-丁醯基半乳糖胺或N-異-丁醯基半乳糖胺中之一或多者。

例如，在一些實施例中，結構1至6中之任一者中之N-乙醯基-半乳糖胺標靶性部分可經替代標靶性部分替代。在一些實施例中，結構101、102或103中之任一者中之N-乙醯基-半乳糖胺標靶性部分可經替代標靶性部分替代。該等替代標靶性部分包括(例如)半乳糖、半乳糖胺、N-甲醯基-半乳糖胺、N-乙醯基-半乳糖胺、N-丙醯基-半乳糖胺、N-正-丁醯基半乳糖胺或N-異-丁醯基半乳糖胺。

另外，在一些實施例中，結構1至6之標靶性部分可經以下替代：例如，其他碳水化合物；聚醣；半抗原；維生素；葉酸鹽；生物素；適配體；及/或肽，例如含有RGD之肽、胰島素、EGF及/或運鐵蛋白。在一些實施例中，結構101、102或103之標靶性部分可經以下替代：例如，其他

碳水化合物；聚醣；半抗原；維生素；葉酸鹽；生物素；適配體；及/或肽，例如含有RGD之肽、胰島素、EGF及/或運鐵蛋白。

在一些實施例中，標靶性配體係呈N-乙醯基-半乳胺糖三聚體之形式。在一些實施例中，標靶性配體係呈N-乙醯基-半乳胺糖四聚體之形式。

寡聚化合物

本文所揭示之標靶性配體可連接至寡聚化合物。在一些實施例中，寡聚化合物係表現抑制性寡聚化合物。在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係RNAi藥劑。在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係雙股RNAi藥劑。在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係單股寡核苷酸。表現抑制性寡聚化合物可使用業內常用之方法來合成。

表現抑制性寡聚化合物可包括一或多種經修飾之核苷酸。核苷酸鹼基(或核鹼基)係雜環嘧啶或嘌呤化合物，其係所有核酸之組份且包括腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)及尿嘧啶(U)。如本文所用術語「核苷酸」可包括經修飾之核苷酸或核苷酸模擬物、無鹼基位點或代用品替代部分。如本文所用「經修飾之核苷酸」係除核糖核苷酸(2'-羥基核苷酸)以外之核苷酸、核苷酸模擬物、無鹼基位點或代用品替代部分。在一些實施例中，經修飾之核苷酸包括2'-經修飾之核苷酸(亦即在5員糖環之2'位具有與羥基不同之基團之核苷酸)。經修飾之核苷酸包括(但不限於)：2'-修飾之核苷酸、2'-O-甲基核苷酸(在本文中在核苷酸序列中表示為小寫字母「n」)、2'-去氧-2'-氟核苷酸(在本文中表示為Nf，在本文中亦表示為2'-氟核苷酸)、2'-去氧核苷酸(在本文中表示為dN)、2'-甲氧基乙基(2'-O-2-甲氧基乙基)核苷酸(在本文中表示為NM

或2'-MOE)、2'-胺基核苷酸、2'-烷基核苷酸、3'至3'鏈接(反向)核苷酸(在本文中表示為invdN、invN、invn、invX)、非天然鹼基，包括核苷酸、鎖核苷酸、橋接核苷酸、肽核酸、2',3'-開環核苷酸模擬物(解鎖核鹼基類似物，在本文中表示為N_{UNA}或NUNA)、鎖核苷酸(在本文中表示為N_{LNA}或NLNA)、3'-O-甲氧基(2'核苷酸間經連接)核苷酸(在本文中表示為3'-OMen)、2'-F-阿拉伯糖基核苷酸(在本文中表示為NfANA或Nf_{ANA})、嗎啉基核苷酸、乙烯基磷酸酯去氧核糖核苷酸(在本文中表示為vpdN)、乙烯基磷酸酯核苷酸及無鹼基核苷酸(在本文中表示為X或Ab)。給定化合物中之所有位置並不一定必須均勻地經修飾。相反，可在單一表現抑制性寡聚化合物中或甚至在其單一核苷酸中納入一種以上修飾。表現抑制性寡聚化合物可藉由業內已知之方法來合成及/或修飾。每一核苷酸處之修飾均獨立於其他核苷酸之修飾。

經修飾之核鹼基包括合成及天然核鹼基，例如5-取代之嘧啶、6-氮雜嘧啶、N-2-、N-6-及O-6-取代之嘌呤(例如2-胺基丙基腺嘌呤)、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羥基甲基胞嘧啶、黃嘌呤、次黃嘌呤、2-胺基腺嘌呤、腺嘌呤及鳥嘌呤之6-甲基及其他烷基衍生物、腺嘌呤及鳥嘌呤之2-丙基及其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶、2-硫胞嘧啶、5-鹵基尿嘧啶、5-鹵基胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮-尿嘧啶、6-偶氮-胞嘧啶、6-偶氮-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-硫代烷基、8-羥基及其他8-取代之腺嘌呤及鳥嘌呤、5-取代之尿嘧啶及胞嘧啶(例如5-鹵基尿嘧啶及胞嘧啶(例如5-溴尿嘧啶及5-溴胞嘧啶)、5-三氟甲基尿嘧啶、5-三氟甲基胞嘧啶)、7-甲基鳥嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮雜鳥

嘌呤、8-氮雜腺嘌呤、7-去氮鳥嘌呤、7-去氮腺嘌呤、3-去氮鳥嘌呤及3-去氮腺嘌呤。

對於本文所闡述之表現抑制性寡聚化合物，任何經修飾之核苷酸均可藉由含有磷酸酯或含有非磷酸酯之共價核苷間鏈接連接。經修飾之核苷間鏈接或主鏈包括(但不限於)5'-硫代磷酸酯基團(在本文中表示為在核苷酸前之小寫「s」，如在sN、sn、sNf或sdN中)、手性硫代磷酸酯、硫磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基-磷酸三酯、甲基及其他烷基磷酸酯(包括3'-仲烷基磷酸酯及手性磷酸酯)、亞磷酸酯、胺基磷酸酯(包括3'-胺基胺基磷酸酯及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、嗎啉基鏈接、具有正常3'-5'鏈接之硼烷磷酸酯、硼烷磷酸酯及具有反向極性之硼烷磷酸酯之2'-5'連接型類似物，其中核苷單元之毗鄰對係3'-5'連接至5'-3'或2'-5'連接至5'-2'。在一些實施例中，經修飾之核苷間鏈接或主鏈缺乏磷原子。缺乏磷原子之經修飾之核苷間鏈接包括(但不限於)短鏈烷基或環烷基糖間鏈接、混合型雜原子及烷基或環烷基糖間鏈接或一或多種短鏈雜原子或雜環糖間鏈接。在一些實施例中，經修飾之核苷間主鏈包括(但不限於)矽氧烷主鏈、硫化物主鏈、亞碲主鏈、碲主鏈、甲醯乙醯基及硫甲醯乙醯基主鏈、亞甲基甲醯乙醯基及硫甲醯乙醯基主鏈、含有烯烴之主鏈、胺基磺酸酯主鏈、亞甲基亞胺基及亞甲基胍基主鏈、磺酸酯及磺醯胺主鏈、醯胺主鏈及具有混合之N、O、S及CH₂組份之其他主鏈。

在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係雙股RNAi藥劑且包括有義股及反義股，該等股彼此至少部分地互補(至少70%互補)。反義股含有具有與標靶mRNA中之序列完美互補(100%互補)或至少基本上互補(至少

85%互補)之序列之區。雙股RNAi藥劑有義股及反義股各自之長度可為16至30個核苷酸之長度。有義股及反義股可具有相同長度或其可具有不同長度。在一些實施例中，有義股為約19個核苷酸之長度，而反義股為約21個核苷酸之長度。在一些實施例中，有義股為約21個核苷酸之長度，而反義股為約23個核苷酸之長度。在其他實施例中，有義股及反義股各自獨立地為17至21個核苷酸之長度。在一些實施例中，有義股及反義股各自為21至26個核苷酸之長度。在一些實施例中，有義股及反義股各自為26個核苷酸之長度。在一些實施例中，有義股及反義股各自獨立地為17至26個核苷酸之長度。在一些實施例中，雙股RNAi藥劑具有約16、17、18、19、20、21、22、23或24個核苷酸之雙股體長度。有義股與反義股之間之完美或基本互補之此區通常為15至25個(例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25個核苷酸之長度)核苷酸之長度且在反義股之5'端處或附近出現。

偶聯至本文所揭示配體之表現抑制性寡聚化合物在核心序列之3'端、5'端或3'及5'端視情況且獨立地包括另外1、2、3、4、5或6個核苷酸(作為延伸)。該等其他核苷酸(若存在)與靶向mRNA中之相應序列可或可不互補。

在一些實施例中，當雙股RNAi藥劑偶聯至本文所揭示之標靶性配體時，其他有義股其他核苷酸(若存在)與靶向mRNA中之相應序列可或不相同。其他反義股其他核苷酸(若存在)與有義股之相應的其他核苷酸(若存在)可或可不互補。

雙股RNAi藥劑可藉由用有義股使反義股退火形成。

在一些實施例中，標靶性配體在RNAi藥劑之有義股或反義股之3'

或5'端連接至RNAi藥劑。在一些實施例中，標靶性配體連接至有義股之5'端。在一些實施例中，標靶性配體連接至有義股之3'端。在一些實施例中，標靶性配體經由不穩定、可裂解或可逆鍵連接至RNAi藥劑。在一些實施例中，不穩定、可裂解或可逆鍵包括在RNAi藥劑與標靶性配體之間添加之可裂解部分內。

在一些實施例中，表現抑制性寡聚化合物係單股寡核苷酸。在一些實施例中，單股寡核苷酸利用RNA干擾機制來抑制標靶mRNA之表現。在一些實施例中，單股寡核苷酸在藉助與RNA干擾不同之機制減少標靶核酸之表現方面具有活性。

在一些實施例中，相對於投與前之個體或相對於未接受標靶性配體偶聯物之個體，投與偶聯至表現抑制性寡聚化合物之所闡述標靶性配體之個體中標靶之基因表現程度及/或mRNA含量減少至少約5%，例如，至少約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。在細胞、細胞群及/或個體之組織中，個體中之基因表現程度及/或mRNA含量可降低。在一些實施例中，相對於投與標靶性配體偶聯物前之個體或相對於未接受標靶性配體偶聯物之個體，已投與偶聯至表現抑制性寡聚化合物之所闡述標靶性配體之個體中之蛋白質含量減少至少約5%，例如，至少約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。在細胞、細胞群、組織、血液及/或個體之其他體液中，個體中之蛋白質含量可降低。基因表現、mRNA或蛋白質含量之降低可藉由業內已知之任何方法來評價。mRNA含量及/或蛋白質含量之降低或減少在本文中統稱為抑制、減少或

降低靶向基因之表現。

可與所揭示標靶性配體一起使用之特定表現抑制性寡聚化合物在業內為人熟知。具體而言，多個參考文獻揭示可偶聯至本文所揭示之標靶性配體以將組合物遞送至肝臟之表現抑制性寡聚化合物。非限制性實例包括美國專利申請案第15/281,309號，其標題為**Compositions and Methods for Inhibiting Gene Expression of LPA**，其係以全文引用方式併入本文中，其揭示靶向人類脂蛋白元(a)基因[*LPA*] (以抑制為脂蛋白(a)粒子之一部分之apo(a)蛋白及藉此脂蛋白(a)粒子(Lp(a))之表現)之各種雙股表現抑制性寡聚化合物標，該等化合物適於與本文所揭示之標靶性配體一起使用。類似地，例如，美國專利申請案第15/229,314號(其標題為**RNAi Therapy for Hepatitis B Virus Infection**，其亦以全文引用方式併入本文中)揭示靶向B型肝炎病毒之各種雙股表現抑制性寡聚化合物，該等化合物適於與本文所揭示之標靶性配體一起使用。另外，作為另一實例，美國專利申請案第15/229,314號(其標題為**Compositions and Methods for Inhibiting Gene Expression of Factor XII**，其係以全文引用方式併入本文中)揭示靶向Factor XII (或Factor 12, F12)基因之各種雙股表現抑制性寡聚化合物，該等化合物適於與本文所揭示之標靶性配體一起使用。另外，作為另一實例，美國專利申請案第14/740,307號(其標題為**Compositions and Methods for Inhibiting Gene Expression of Alpha-1 AntiTrypsin**，其係以全文引用方式併入本文中)揭示靶向 α -1抗胰蛋白酶(或AAT)基因之各種雙股表現抑制性寡聚化合物，該等化合物適於與本文所揭示之標靶性配體一起使用。另外，WO 2016/01123(其標題為**Organic Compositions to Treat APOC3-Related Diseases**，其係以全文引用方式併入本文中)揭示靶

向人類脂蛋白元III (APOC3)之各種雙股表現抑制性寡聚化合物，該等化合物適於與本文所揭示之標靶性配體一起使用。業內亦可參見揭示可適於與本文所揭示之標靶性配體一起使用之各種治療性化合物(包括表現抑制性寡聚化合物)之其他參考文獻。該等化合物包括(但不限於)靶向肝臟可能不合意之組合物。

醫藥組合物及調配物

本文所揭示之標靶性配體在連接至寡聚化合物時可用於治療患有將受益於化合物之投與之疾病或病症之個體(例如人類或哺乳動物)。在一些實施例中，本文所揭示之標靶性配體在連接至表現抑制性寡聚化合物時可用於治療患有將受益於標靶mRNA之表現降低或抑制之疾病或病症之個體(例如人類)。向個體投與治療有效量之任一或多種表現抑制性寡聚化合物(例如RNAi藥劑)，該化合物係連接至本文所揭示之標靶性配體。個體可為人類、患者或人類患者。個體可為成年人、青少年、兒童或嬰兒。可使用包括連接至表現抑制性寡聚化合物之標靶性配體之所述醫藥組合物來提供治療性治療疾病之方法。該等方法包括向人類或動物投與本文所闡述之醫藥組合物。

本文所揭示之醫藥組合物及方法可減少細胞、細胞群、細胞群、組織或個體中標靶mRNA之含量，該方法包括：向個體投與治療有效量之連接至標靶性配體之本文所述表現抑制性寡聚化合物，藉此抑制個體中標靶mRNA之表現。在一些實施例中，先前已鑑別個體為在靶向細胞或組織中具有標靶基因之病原性上調。

在一些實施例中，醫藥組合物包括至少一種連接至標靶性配體之表現抑制性寡聚化合物。該等醫藥組合物尤其可用於抑制靶細胞、細胞群、

組織或生物體中標靶mRNA之表現。該等醫藥組合物可用於治療患有將受益於標靶mRNA之含量降低或標靶基因之表現抑制之疾病或病症之個體。該等醫藥組合物可用於治療具有發生將受益於標靶mRNA之含量降低或標靶基因之表現抑制之疾病或病症之風險的個體。在一個實施例中，該方法包括向欲治療之個體投與包括連接至表現抑制性寡聚化合物(例如RNAi藥劑)之本文所述標靶性配體之組合物。在一些實施例中，將一或多種醫藥上可接受之賦形劑(包括媒劑、載劑、稀釋劑及/或遞送聚合物)添加至包括連接至表現抑制性寡聚化合物之標靶性配體之醫藥組合物，藉此形成適於活體內遞送至人類之醫藥調配物。

在一些實施例中，包括連接至表現抑制性寡聚化合物之標靶性配體之所述醫藥組合物用於治療或管控與標靶mRNA之表現相關之臨床呈現。在一些實施例中，將治療上或預防上有效量之一或多種醫藥組合物投與需要該治療、預防或管控之個體。在一些實施例中，可使用共價連接至寡聚化合物之偶聯配體中之任一者之投與來減少個體之疾病症狀之數量、嚴重性及/或頻次。

包括連接至表現抑制性寡聚化合物之標靶性配體之所述醫藥組合物可用於治療患有將受益於標靶mRNA之表現減少或抑制之疾病或病症之個體的至少一種症狀。在一些實施例中，向個體投與治療有效量之一或多種包括連接至本文所述標靶性配體之表現抑制性寡聚化合物(例如RNAi藥劑)之醫藥組合物，藉此治療症狀。在其他實施例中，向個體投與預防性有效量之一或多種表現抑制性寡聚化合物藉此預防至少一種症狀。

在一些實施例中，相對於未接受醫藥組合物之個體，投與連接至本文所揭示標靶性配體之表現抑制性寡聚化合物之個體中標靶mRNA之表現

或含量減少至少約5%，例如但至少約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。在細胞、細胞群及/或個體之組織中，個體中之基因表現程度可降低。在一些實施例中，mRNA之含量降低。在其他實施例中，所表現之蛋白質含量降低。在一些實施例中，相對於未接受醫藥組合物之個體，投與連接至本文所揭示標靶性配體之表現抑制性寡聚化合物之個體中蛋白質之含量減少至少約5%，例如但至少約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。表現、mRNA含量或蛋白質含量之降低可藉由業內已知之任何方法來評價。mRNA含量及/或蛋白質含量之降低或減少在本文中統稱為標靶RNA降低或減少或標靶mRNA之表現抑制或降低。

投與途徑係使表現抑制性寡聚化合物與身體接觸之路徑。一般而言，投與用於治療哺乳動物之藥物及核酸之方法在業內為人熟知且可用來投與本文所闡述之組合物。連接至本文所述標靶性配體之表現抑制性寡聚化合物可在針對具體途徑進行適當調整之製劑中經由任一適宜途徑來投與。因此，可藉由注射(例如靜脈內、肌內、皮內、皮下、關節內或腹腔內)投與本文所闡述之醫藥組合物。在一些實施例中，本文闡述醫藥組合物且其係經由吸入來投與。

可使用業內已知之寡核苷酸遞送技術將包括連接至本文所述標靶性配體之表現抑制性寡聚化合物之醫藥組合物遞送至細胞、細胞群、腫瘤、組織或個體。一般而言，業內公認用於遞送核酸分子(活體外或活體內)之任一適宜方法可適於與本文所闡述之組合物一起使用。例如，遞送可藉由局部投與(例如直接注射、植入或局部投與)、全身投與或皮下、靜脈內、

腹膜內或非經腸途徑(包括顱內(例如室內、實質內及鞘內)、肌內、經皮、氣道(氣溶膠)、鼻、口腔、直腸或局部(包括經頰及舌下)投與)進行。在某些實施例中，組合物係藉由皮下或靜脈內輸注或注射投與。

因此，在一些實施例中，本文所闡述之醫藥組合物可包含一或多種醫藥上可接受之賦形劑。在一些實施例中，本文所闡述之醫藥組合物可經調配以投與個體。

如本文所用醫藥組合物或藥劑包括藥理學上有效量之所述治療性化合物中之至少一者及一或多種醫藥上可接受之賦形劑。醫藥上可接受之賦形劑(賦形劑)係與活性醫藥成分(API，治療性產品，例如F12 RNAi藥劑)不同且故意包括在藥物遞送系統內之物質。賦形劑在預期劑量下不發揮或並非意欲發揮治療效應。賦形劑可用於a)在製造期間輔助處理藥物遞送系統，b)保護、支持或增強API之穩定性、生物利用度或患者可接受性，c)輔助產品鑑別，及/或d)增強儲存或使用期間API遞送之總體安全性、有效性之任何其他屬性。醫藥上可接受之賦形劑可或可不為惰性物質。

賦形劑包括(但不限於)：吸收增強劑、抗黏著劑、消泡劑、抗氧化劑、黏合劑、緩衝劑、載劑、包覆劑、顏料、遞送增強劑、遞送聚合物、聚葡萄糖、右旋糖、稀釋劑、崩解劑、乳化劑、增量劑、填充劑、矯味劑、助流劑、保濕劑、潤滑劑、油、聚合物、防腐劑、鹽水、鹽、溶劑、糖、懸浮劑、持續釋放基質、甜味劑、增稠劑、張力劑、媒劑、防水劑及潤濕劑。

適於注射使用之醫藥組合物包括無菌水溶液(倘若水可溶)或用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之分散液及無菌粉末。對於靜脈內投與而言，適宜載劑包括生理鹽水、抑菌水、克列莫佛(Cremophor)ELTM

(BASF, Parsippany, NJ)或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。其在製造及儲存條件下應穩定且應針對諸如細菌及真菌等微生物之污染作用進行防腐。載劑可為溶劑或分散液介質，其含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液體聚乙二醇)及其適宜混合物。可(例如)藉由使用包衣(例如卵磷脂)、在分散液情形下藉由維持所需粒徑及藉由使用表面活性劑來維持適當流動性。在許多情形中，組合物中較佳包括等滲劑，例如，糖、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)及氯化鈉。可藉由將可延遲吸收之試劑(例如，單硬脂酸鋁及明膠)納入組合物中來延長可注射組合物之吸收。

無菌可注射溶液可藉由以下方式製備：將所需量之活性化合物與上文所列舉之成份中之一者或組合納入適當溶劑中，視需要隨後過濾滅菌。通常，分散液係藉由將活性化合物納入含有鹼性分散介質及來自彼等上文所列舉者之所需其他成份之無菌媒劑中來製備。在利用無菌粉末製備無菌可注射溶液之情形中，製備方法包括真空乾燥及冷凍乾燥，其可產生活性成份加任一額外期望成份(來自其先前經無菌過濾之溶液)之粉末。

適於關節內投與之調配物可呈現可呈微晶形式之藥物之無菌水性製劑之形式，例如，呈水性微晶懸浮液之形式。亦可使用脂質體調配物或生物可降解聚合物系統使藥物適於關節內及經眼投與。

適於局部投與(包括眼睛治療)之調配物包括液體或半液體製劑，例如擦劑、洗劑、凝膠、塗劑、水包油或油包水乳液，例如乳霜、軟膏劑或膏糊；或溶液或懸浮液(例如滴劑)。用於局部投與皮膚表面之調配物可藉由用皮膚病學上可接受之載劑分散藥物來製備(例如洗劑、乳霜、軟膏劑或肥皂)。可使用之載劑能夠在皮膚上形成薄膜或層以局部化施加並抑制去除。對於局部投與內部組織表面，可將藥劑分散於液體組織黏著劑或已知

可增強至組織表面之吸附之其他物質中。例如，可有利地使用羥丙基纖維素或纖維蛋白原/凝血酶溶液。或者，可使用組織塗覆溶液，例如含有果膠之調配物。

對於吸入治療，可使用經噴霧罐、霧化器或噴霧器分配粉末(自動推進或噴霧式調配物)來吸入。該等調配物可呈自粉末吸入裝置用於肺投與之精細粉末或自動推進式粉末分配調配物之形式。在自動推進溶液及噴霧調配物之情形中，該效應可藉由選擇具有期望噴霧特徵(即，能產生具有期望粒徑之噴霧)之閥門或藉由以粒徑受控之懸浮粉末形式納入活性成分來達成。對於藉由吸入投與而言，化合物亦可自含有適宜推進劑(例如，諸如二氧化碳等氣體)或噴霧劑之加壓容器或分配器以氣溶膠噴霧之形式遞送。

亦可藉由經黏膜或經皮方式來實施全身投與。對於經黏膜或經皮投與而言，在調配物中使用適用於擬透過障壁之滲透劑。該等滲透劑在業內通常為人習知且對於經黏膜投與而言包括(例如)清潔劑及膽鹽。經黏膜投與可藉助使用鼻噴霧劑或栓劑來實現。對於經皮投與來說，如業內通常已知，可將活性化合物調配成軟膏、藥膏、凝膠或乳液。

活性化合物可利用將保護化合物免於自體內快速消除之載劑(例如控制釋放調配物，包括植入體及微囊化遞送系統)來製備。可使用生物可降解之生物相容聚合物，例如伸乙基乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原、聚原酸酯及聚乳酸。該等調配物之製備方法將為熟習此項技術者明瞭。亦可使用脂質體懸浮液作為醫藥上可接受之載劑。該等調配物可根據熟習此項技術者已知之方法來製備，例如，如美國專利第4,522,811號中所述。

以劑量單位形式調配口服或非經腸組合物以便於投與且使劑量均勻。劑量單位形式係指適合作為單位劑量用於欲治療個體之物理分散單位；每一單位含有預定量之活性化合物，此預定量經計算可與所需醫藥載劑一起產生期望治療效應。本發明之劑量單位形式之規格取決於且直接依賴於下列因素：活性化合物之獨特特徵及欲達成之治療效應，及複合此一活性化合物以治療個體之技術中固有之限制。此外，投與可藉由週期性注射濃注進行，或可藉由自外部儲存器(例如靜脈內袋)進行靜脈內、肌內或腹膜內投與而更為連續。

結合本發明之方法，可考慮藥物基因體學(即，個體基因型與該個體對外來化合物或藥物之反應之間之關係的研究)。治療劑之代謝差異可因改變藥理學活性藥物之劑量與血液濃度之間之關係而導致嚴重毒性或治療失敗。因此，醫師或臨床醫師考慮應用在相關藥物基因體學研究中在確定是否投與藥物時獲得之知識以及調整藥物治療之劑量及/或治療方案。

醫藥組合物可含有通常見於醫藥組合物中之其他額外組份。該等額外組份包括(但不限於)：止癢劑、收斂劑、局部麻醉劑或消炎劑(例如抗組織胺、苯海拉明(diphenhydramine)等)。亦設想可使用表現或包含本文所定義之RNAi藥劑之細胞、組織或離體器官作為「醫藥組合物」。如本文所用「藥理學有效量」、「治療有效量」或單純的「有效量」係指RNAi藥劑產生藥理學、治療或預防結果之量。

通常，活性化合物之有效量將在約0.1mg/kg體重/天至約100 mg/kg體重/天之範圍內，例如約1.0mg/kg體重/天至約50 mg/kg體重/天。在一些實施例中，活性化合物之有效量將在約0.25 mg/kg體重/劑量約5 mg/kg體重/劑量之範圍內。在一些實施例中，活性成分之有效量將在約0.5

mg/kg體重/劑量至約3 mg/kg體重/劑量之範圍內。所投與之量將亦可能取決於諸如以下等變量：患者之整體健康狀態、所遞送化合物之相對生物效能、藥物之配方、調配物中賦形劑之存在及類型及投與途徑。而且，應瞭解可使所投與之初始劑量增加超過上限量以便快速達成期望之血液含量或組織含量，或初始劑量可小於最佳劑量。

對於疾病之治療或對於用於治療疾病之藥劑或組合物之形成，可將包括連接至標靶性配體之表現抑制性寡聚化合物(例如RNAi藥劑)之本文所述醫藥組合物與賦形劑或另一治療劑或治療組合，該另一治療劑或治療包括(但不限於)另一或其他表現抑制性寡聚化合物、小分子藥物、抗體、抗體片段及/或疫苗。

所述標靶性配體在連接至表現抑制性寡聚化合物時及在添加至醫藥上可接受之賦形劑或佐劑中時可包裝至套組、容器、包裹或分配器中。本文所闡述之醫藥組合物可包裝於預填充之注射器或小瓶中。

現利用以下非限制性實例闡釋上文所提供之實施例。

實例

以下實例不具限制性且意欲闡釋本文所揭示之實施例。

實例之合成之以下實驗細節中所使用之一些縮寫定義如下：h或hr = 小時；min = 分鐘；mol = 莫耳；mmol = 毫莫耳；M = 莫耳； μ M = 微莫耳；g = 克； μ g = 微克；rt或RT = 室溫；L = 公升；mL = 毫升；wt = 重量；Et₂O = 乙醚；THF = 四氫呋喃；DMSO = 二甲亞砜；EtOAc = 乙酸乙酯；Et₃N或TEa = 三乙胺；*i*-Pr₂NEt或DIPEA或DIEA = 二異丙基乙胺；CH₂Cl₂或DCM = 二氯甲烷；CHCl₃ = 氯仿；CDCl₃ = 氘化氯仿；CCl₄ = 四氯化碳；MeOH = 甲醇；EtOH = 乙醇；DMF = 二甲基甲醯

胺；BOC = 第三丁氧基羰基；CBZ = 苄基氧基羰基；TBS = 第三丁基二甲基矽基；TBSCl = 第三丁基二甲基矽基氯化物；TFA = 三氟乙酸；DMAP = 4-二甲基胺基吡啶；NaN₃ = 疊氮化鈉；Na₂SO₄ = 硫酸鈉；NaHCO₃ = 碳酸氫鈉；NaOH = 氫氧化鈉；MgSO₄ = 硫酸鎂；K₂CO₃ = 碳酸鉀；KOH = 氫氧化鉀；NH₄OH = 氫氧化銨；NH₄Cl = 氯化銨；SiO₂ = 二氧化矽；Pd-C = 碳載鈀；HCl = 氯化氫或鹽酸；NMM = *N*-甲基嗎啉；H₂ = 氫氣；KF = 氟化鉀；EDC-HCl = *N*-(3-二甲基胺基丙基)-*N*'-乙基碳二亞胺鹽酸鹽；MTBE = 甲基-第三丁基醚；MeOH = 甲醇；Ar = 氫；SiO₂ = 二氧化矽；R_T = 滯留時間。

另外，適於與本文所揭示之標靶性配體一起使用之實例性表現抑制性寡聚化合物闡述於以下實例中之各個表中。對於各表中所闡述之本文所揭示序列，使用以下符號來指示經修飾之核苷酸：

N = 2'-OH (未經修飾之)核糖核苷酸(無f或d指示之大寫字母)

n = 2'-OMe修飾之核苷酸

Nf = 2'-氟修飾之核苷酸

dN = 2'-去氧核苷酸

N_{UNA} = 2', 3'-開環核苷酸模擬物(解鎖核鹼基類似物)

N_{LNA} = 鎖核苷酸

Nf_{ANA} = 2'-F-阿拉伯糖基核苷酸

NM = 2'-甲氧基乙基核苷酸

X或Ab = 無鹼基核糖

R = 核糖醇

(invdN) = 反向去氧核糖核苷酸(3'-3' 連接型核苷酸)

(invAb) = 反向無鹼基核苷酸

(invX) = 反向無鹼基核苷酸

(invn) = 反向2'-OMe核苷酸

S = 硫代磷酸酯連接之核苷酸

vpdN = 乙烯基膦酸酯去氧核糖核苷酸

(3'OMe) = 3'-OMe核昔酸

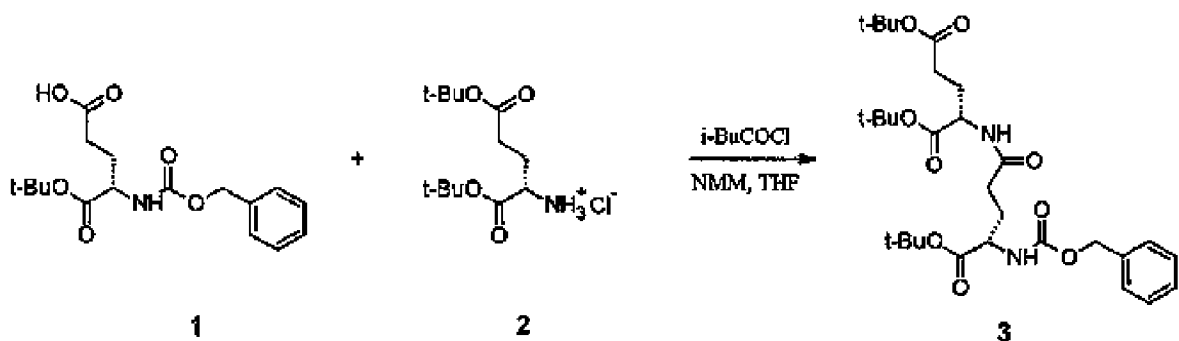
(5Me-Nf) = 5'-Me, 2'-氟核苷酸

cPrp = 環丙基膦酸酯

可使用熟習此項技術者已知之合成化學技術製備本發明化合物。

實例1. 標靶性配體亞磷醯胺化合物結構101b之合成.

1) *N*-[*N*-(苄基氧基羰基)-*L*- γ -麩胺醯基]-*L*-麩胺酸三-第三丁基酯(3)之
製備



向配備有熱電偶、磁力攪拌棒、氮入口及粉末漏斗之氮沖洗之250-mL 3頸圓底燒瓶中相繼添加1 (10.00 g, 29.64 mmol)及THF (100 mL)。攪拌所得溶液並添加N-甲基嗎啉(7.82 mL, 71.15 mmol)。

用橡膠隔片替代粉末漏斗並使用冰浴使混合物冷卻至0°C。經10分鐘將氯甲酸異丁基酯(*i*BuCOCl, 3.85 mL, 29.64 mmol, 1.0當量)逐滴添加至反應混合物中，維持小於4.0°C之罐溫度。在添加後，將混合物攪拌40分鐘以上並用粉末漏斗替代隔片。經15分鐘向反應混合物中逐滴添加2

(8.767 g, 29.64 mmol, 1.0當量)，維持小於4.0℃之罐溫度。在添加2後，去除冰浴及粉末漏斗並在剩餘步驟之過程期間使反應升溫至環境溫度。在添加2後，使澄清無色溶液老化25分鐘。

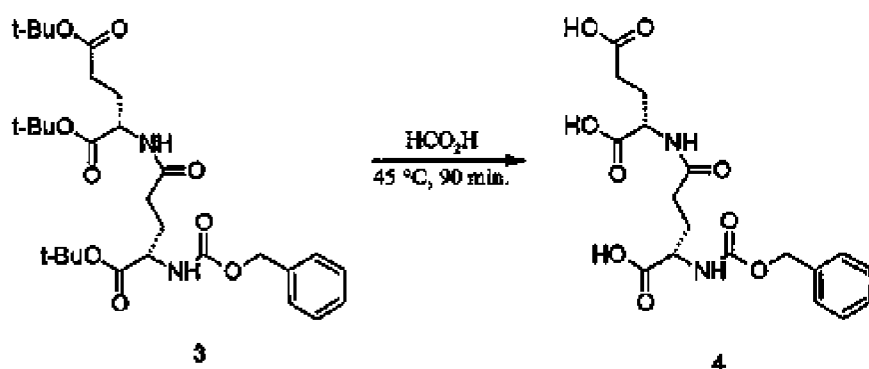
在開始添加2後40分鐘取出反應試樣(在5mL容量瓶中將98 μ L稀釋至5.0 mL CAN中)，並藉由RP-HPLC分析轉化百分比。發現1剩餘23%，因此在反應60分鐘後，依序添加其他*i*BuCOCl (1.16 mL, 30 mol%)及2 (2.63 g, 30 mol%)。使溶液老化另外60分鐘，直至試樣顯示大於99%轉化率(藉由HPLC)為止。自2之初始添加開始，總反應時間為2.5小時。

將反應溶液倒入在冰浴上冷凍至3℃之0.5 M HCl_(aq)之攪拌溶液中並攪拌約5分鐘。將驟冷之反應混合物轉移至500 mL分液漏斗中，並添加乙酸乙酯(100 mL)。分離各層並用鹽水(100 mL)洗滌有機相，經MgSO₄乾燥，過濾至500mL圓底燒瓶中並在真空中濃縮，得到濃稠無色油狀物。將該油狀物溶解於MTBE (100 mL)中並再次在真空中濃縮，得到濃稠無色油狀物。

向攪拌油狀物中添加己烷(100 mL)。溶液中出现白色煙霧，其然後在進一步攪拌後消失。添加晶種晶體並將混合物攪拌40分鐘，在此時間期間緩慢形成白色晶體。

在20分鐘內，漿液之稠度足以妨礙攪拌並添加其他己烷(50 mL)。40分鐘後，在粗孔燒結漏斗上過濾漿液，用己烷洗滌三次(每次約10 mL)並在漏斗中風乾1小時，得到精細白色粉末狀3 (15.64 g, 91%)。化合物3之¹H NMR顯示於圖1處。在75克規模上，產率為917%，且純度為99%。

2) *N*-[*N*-(苄基氧基羰基)-*L*- γ -麩胺鹽基]-*L*-麩胺酸(4)之製備

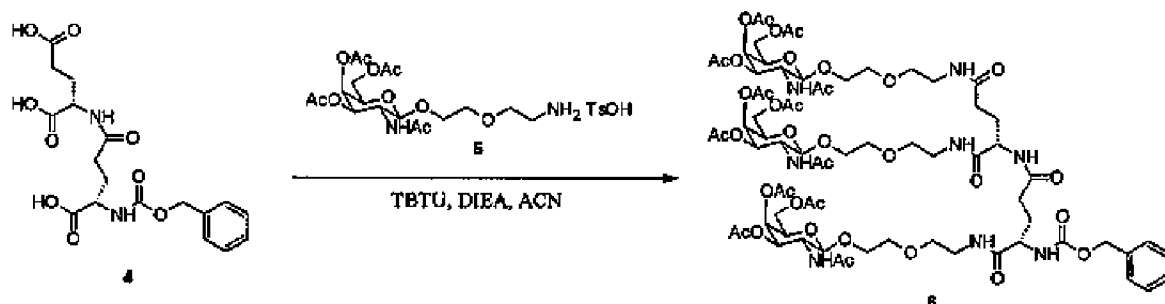


向配備有頂置式攪拌器、粉末漏斗、熱電偶及加熱包之3000-mL3頸圓底燒瓶中添加3 (72.57 g, 125.4 mmol)及甲酸(試劑級, >95%, 1.45 L, 20 vol.當量)。用塞子/ N_2 替代粉末漏斗並將所得溶液加熱至45°C並攪拌1小時, 且藉由RP-HPLC監測。當剩餘小於2.0面積%之單-第三丁基酯時, 認為反應完成。

在添加甲酸後60分鐘取出反應物之試樣(50 μL 稀釋至950 μL H_2O 中)並藉由RP-HPLC分析試樣中剩餘單-第三丁基酯之百分比。分析顯示剩餘1.8%單-*t*-Bu酯; 因此, 在90分鐘時, 去除熱量。

用甲苯及乙腈(CAN, 各1500 mL)稀釋反應物並在真空中濃縮混合物。將甲酸與1:1 ACN:甲苯(約600 mL)一起共沸去除且與ACN一起去除兩次(每次約500 mL)。在高真空上將該物質乾燥過夜, 以得到白色泡沫固體狀化合物4 (54.3 g, 定量產量)。化合物4之 ^1H NMR (L/N 1321-063B)顯示於圖2處。

3) *N*-[*N*-(苄基氧基羰基)-*L*- γ -麩胺鹽基]-*L*-麩胺酸, 三-[NAG-PEG₂]-醯胺(6)之製備



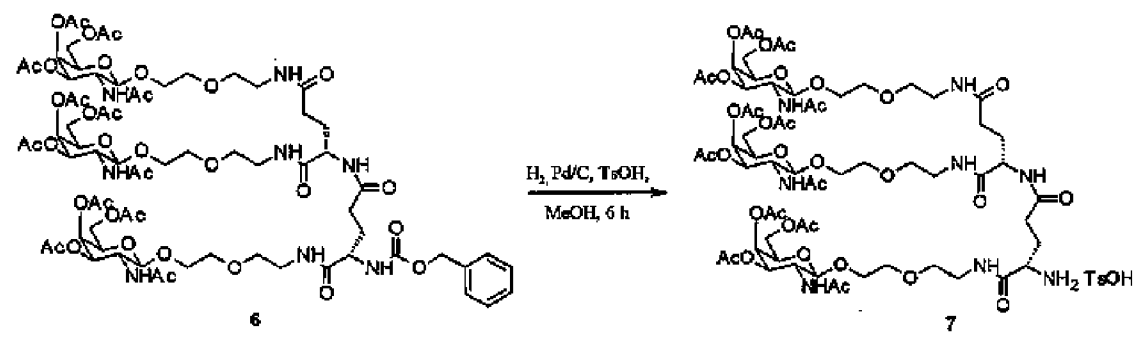
向1公升圓底燒瓶中添加NAG-胺對甲苯磺酸鹽(5, 59.19 g, 97.6 mmol, 4.13當量)及Z-雙-Glu三酸(4, 10.01 g, 23.6 mmol, 1.0當量)。將混合物溶解於乙腈(500 mL)中並在真空中濃縮以共沸去除水。將殘餘物溶解於新鮮乙腈(400 mL)中並將其轉移至含有攪拌棒且配備有熱電偶之氮沖洗之1公升3頸圓底燒瓶中。藉由KF量測水含量(257 ppm)。

在氮下經由粉末漏斗向攪拌溶液中添加TBTU (28.20 g, 87.8 mmol, 3.7當量)。使用額外乙腈(100 mL)將漏斗上之殘餘TBTU沖洗至反應物中。經20分鐘經由注射器逐滴添加DIPEA (34.0 mL, 25.2 g, 8.0當量)，維持反應溫度低於25°C。自DIPEA添加開始將混合物攪拌2小時，且藉由HPLC監測。78分鐘時之分析顯示起始材料完全消耗。

兩個小時後，在真空中去除溶劑。將所得濃稠油狀物溶解於二氯甲烷(1000 mL)中並用1.0 N HCl_(aq) (3 × 500 mL)及飽和NaHCO_{3(aq)} (3 × 500 mL)洗滌。經Na₂SO₄乾燥有機層，過濾並在真空中濃縮，以得到灰白色蠟狀固體(33.5 g)。

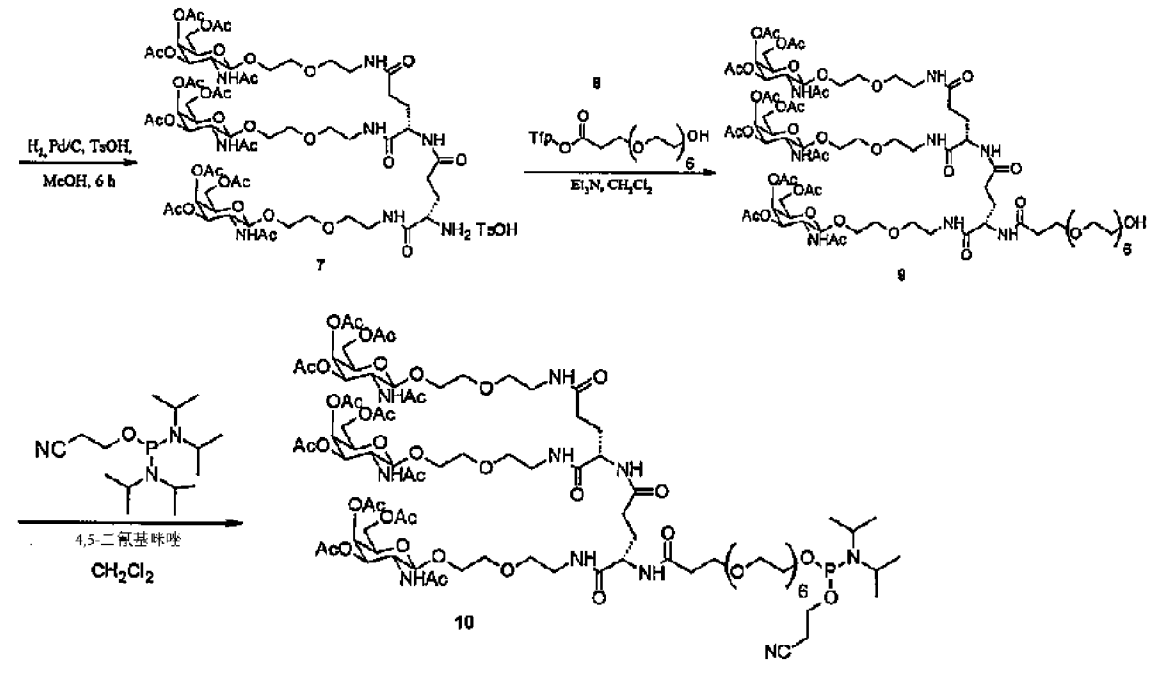
在ISCO CombiFlash自動化純化系統上使用氯仿及甲醇作為溶析液實施急速管柱層析。基於藉由HPLC分析之UV層析圖(220 nm)懷疑所有流份皆含有產物，且彙集並濃縮含有至少97.0% AUC之產物之所有流份，以得到18.75 g (97.0%純度) 6。彙集不純的流份以得到額外12.2 g (78.8%純度) 6。6之總產率為70.9%。化合物6之¹H NMR顯示於圖3處。

4) 三-NAG-雙-Glu-NH₂甲苯磺酸鹽(7)之製備。



將於具有 p -TsOH-H₂O (0.657 g, 3.46 mmol)之MeOH (155 mL)中之化合物6 (5.737 g, 3.46 mmol)在Pd/C 10% (688 mg)存在下氫化6 h。TLC (CHCl₃;MeOH= 8.5:1.5)證實至該時間反應完成。用Ar填充反應燒瓶，添加EtOH(200 mL)並藉助矽藻土餅過濾溶液。濃縮產物並在真空中乾燥。產生4.81 g產物甲苯磺酸鹽7。化合物7之¹H NMR顯示於圖4處。

5) 三-NAG-雙-Glu-NH-PEG₆-OH (9)之製備：



程序A (若三-NAG胺鹽7小於96%純)：將NAG胺鹽7 (約90%純, 18.50 g, 10.90 mmol)及HO-PEG₆-CO₂TFP酯8 (6.57 g, 13.08 mmol)溶解於二氯甲烷(185 mL)中並冷卻至0℃。向此溶液中添加三乙胺(6.10 mL, 43.59 mmol)。使溶液升溫至室溫並攪拌18小時，且藉由HPLC監測。用飽和NaHCO₃水溶液及鹽水(1:1, 140 mL)驟冷反應物，在RT下攪拌30

min並分離各層。用飽和 NaHCO_3 水溶液($3 \times 140 \text{ mL}$)及鹽水(1:1)洗滌有機層並用 Na_2SO_4 乾燥。過濾乾燥劑並濃縮溶液並經由急速層析純化，此得到白色固體物質之9 (13.56 g, 67%)。化合物9之 ^1H NMR顯示於圖5處。

在ISCO CombiFlash自動化純化系統上使用二氯甲烷及甲醇作為溶析液實施急速管柱層析。彙集純流份並濃縮，以得到13.56g 9 (99%純度)。彙集不純的流份以得到4.9 g 9 (約95%純度)。

程序B (若三-NAG胺鹽7大於96%純)：將於DCM (40mL)中之產物7 (1.94 g, 1.272 mmol)在Ar下與HO-PEG₆-CO₂TFP酯8 (767 mg, 1.526 mmol)及DIPEA (443 μL , 2.544 mmol)一起攪拌16h。在真空中濃縮反應混合物，將其溶解於 CHCl_3 中並逐滴添加至攪拌 Et_2O (90 mL)中。分離沈澱物，用 Et_2O ($3 \times 35 \text{ mL}$)沖洗並在真空中乾燥。產量2.275 g (96%)。

三-NAG-雙-Glu-NH-PEG₆亞磷醯胺(10)之製備：

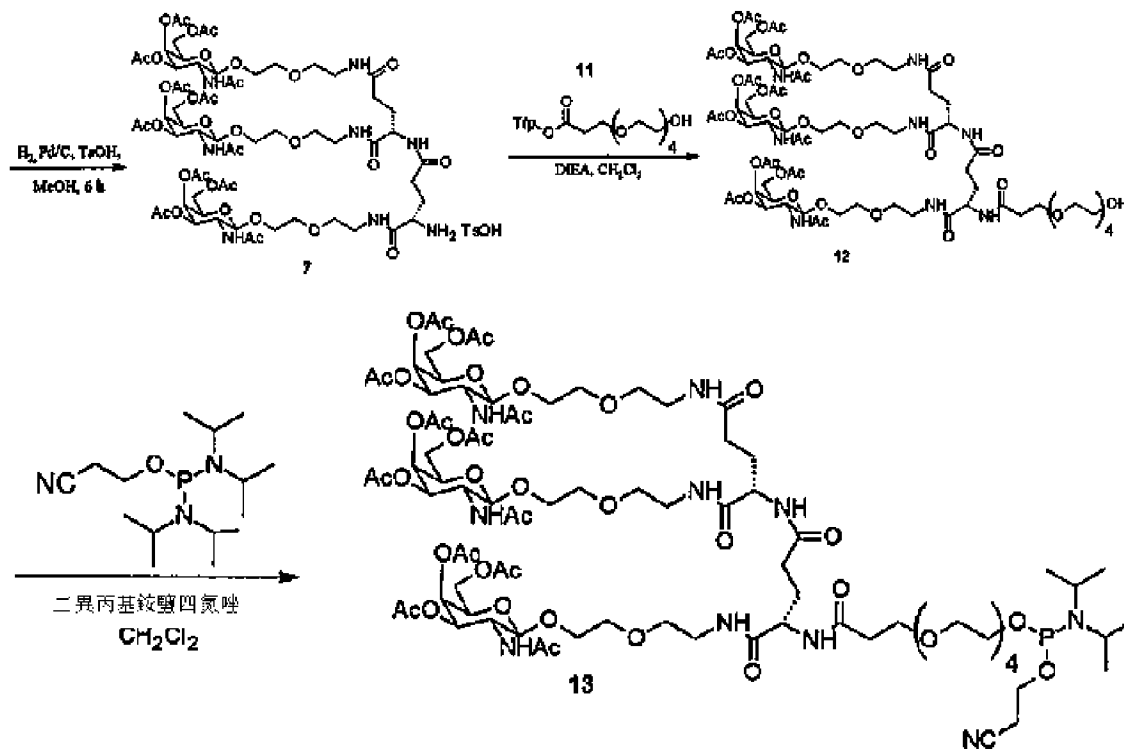
將化合物9 (6.62 g, 3.56 mmol)及4,5-二氰基咪唑(0.11 g, 0.89 mmol)溶解於無水二氯甲烷(230 mL)中並將其放置在氮氣氛下。經5分鐘向此混合物中逐滴添加2-氰基乙基-N,N,N',N'-四異丙基亞磷醯二胺(「Phos試劑」, 1.46 mL, 4.62 mmol)於無水二氯甲烷(5 mL)中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌3 h，同時監測HPLC (剩餘<1% SM)。

用飽和 NaHCO_3 水溶液($2 \times 150 \text{ mL}$)、3% DMF水溶液(v/v, $2 \times 150 \text{ mL}$)、 H_2O ($3 \times 150 \text{ mL}$)及鹽水($1 \times 150 \text{ mL}$)洗滌反應混合物並用 Na_2SO_4 乾燥有機層。過濾乾燥劑並在真空中濃縮溶液以得到粗產物。將粗產物懸浮於5%甲苯-己烷(50 mL)中並攪拌5分鐘，此後傾析溶劑。用5%甲苯-己烷($1 \times 50 \text{ mL}$)及己烷($2 \times 50 \text{ mL}$)重複該過程。將固體經真空乾燥，得到

6.69 g 白色固體物質之10 (91%) (化合物10)。化合物10 (本文中之結構101d)之¹H NMR顯示於圖6處。

實例2. 標靶性配體亞磷醯胺化合物結構103d之合成.

1) 三-NAG-雙-Glu-NH-PEG₄-OH (12)之製備：



將來自上述實例1之產物7 (2.44 g, 1.44 mmol)溶解於DCM (30 mL)中並放置在氮氣氛下。向溶液中添加HO-PEG₄-CO₂TFP酯11 (717 mg, 1.73 mmol)及DIPEA (502 μ L, 2.88 mmol)。將所得混合物攪拌16 h。在真空中濃縮反應混合物並將其再溶解於CHCl₃中。然後將溶液逐滴添加至攪拌Et₂O (90 mL)中。分離沈澱物，用Et₂O沖洗並在真空中乾燥，以得到2.60 g (102%)產物12，其不經進一步純化即使用。

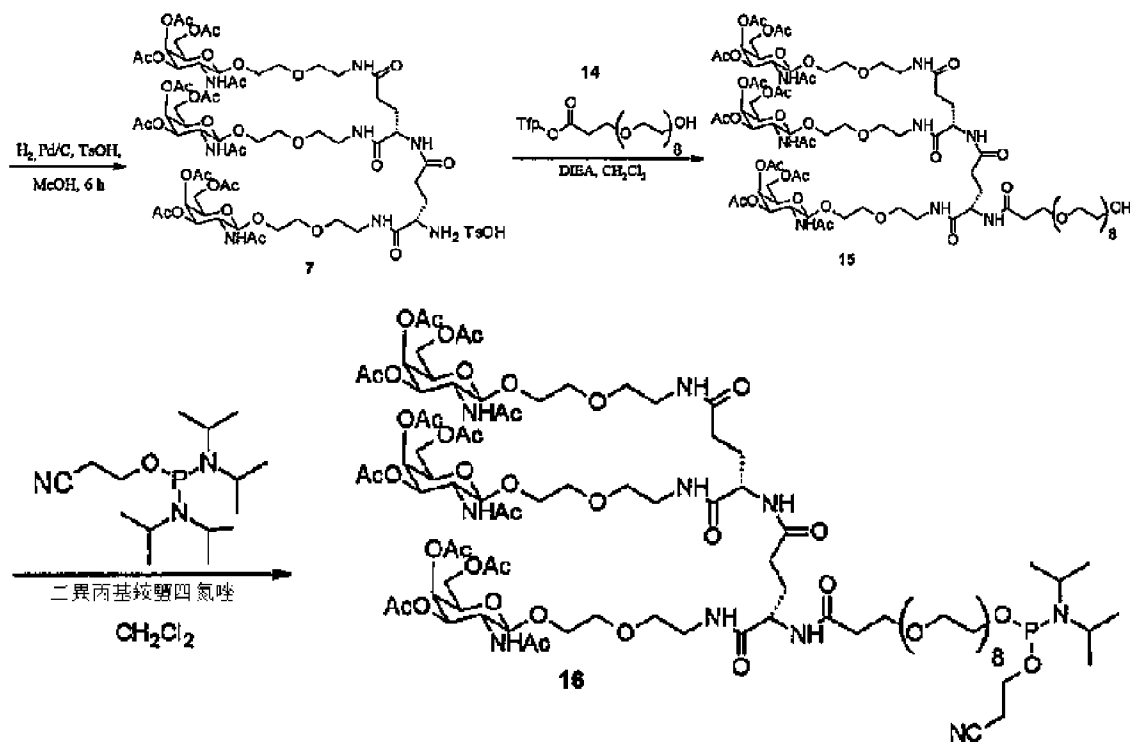
2) 三-NAG-雙-Glu-NH-PEG₄亞磷醯胺(13)之製備：

將產物12 (1.80 g, 1.01 mmol)與吡啶一起共蒸發兩次，之後將其溶解於無水二氯甲烷(25 mL)中並放置在氮氣氛下。向溶液中添加二異丙基銨鹽四氮唑(87 mg, 0.51 mmol)及2-氰基乙基-N,N,N',N'-四異丙基亞磷醯

二胺(458 mg, 1.52 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌5 h，且藉由TLC (CHCl₃: MeOH: Et₃N 95:5:2)監測。在所有起始材料皆已消耗後，用DCM (250 mL)稀釋反應混合物並用飽和NaHCO₃水溶液(100 mL)及飽和鹽水水溶液(100 mL)洗滌。將有機層經硫酸鈉乾燥，過濾，並濃縮。藉由管柱層析(DCM: MeOH: Et₃N 97:3:2)純化粗製物，以得到1.04 g (53%)化合物13。化合物13 (本文中之結構103d)之¹H NMR顯示於圖7處。

實例3. 標靶性配體亞磷醯胺化合物結構102d之合成。

1) 三-NAG-雙-Glu-NH-PEG₈-OH (15)之製備：



將來自上文實例1之產物7 (3.09 g, 1.82 mmol)溶解於DCM (30 mL)中並將其放置在氮氣氛下。向溶液中添加HO-PEG₈-CO₂TFP酯14 (1.29 g, 2.18 mmol)及DIPEA (634 μL, 3.64 mmol)。將所得混合物攪拌16 h。在真空中濃縮反應混合物並將其再溶解於CHCl₃中。然後將溶液逐滴添加至攪拌Et₂O (180 mL)中。分離沈澱物，用Et₂O沖洗並在真空中乾燥，以得到3.54 g (99%)產物15，其不經進一步純化即使用。

2) 三-NAG-雙-Glu-NH-PEG₈亞磷醯胺(16)之製備：

將產物15 (1.79 g, 0.92 mmol)與吡啶一起共蒸發兩次，之後將其溶解於無水二氯甲烷(25 mL)中並將其放置在氮氣氛下。向溶液中添加二異丙基銨鹽四氫唑(79 mg, 0.46 mmol)及2-氰基乙基-*N,N,N',N'*-四異丙基亞磷醯二胺(416 mg, 1.38 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌3 h，且藉由TLC (CHCl₃: MeOH: Et₃N 95:5:2)監測。在所有起始材料皆已消耗後，在真空中濃縮反應混合物並將其再溶解於DCM中。然後將溶液逐滴添加至攪拌Et₂O (90 mL)中。分離沈澱物，用Et₂O沖洗並乾燥。藉由管柱層析 (CHCl₃: MeOH: Et₃N 97:3:2)純化粗製物，以得到950 mg (48%)化合物16。化合物16 (本文中之結構102d)之¹H NMR顯示於圖8處。

實例4.寡核苷酸組合物合成.

A. 合成.根據亞磷醯胺技術在寡核苷酸合成中所使用之固相上合成RNAi藥劑。端視規模，使用MerMade96E® (Bioautomation)或MerMade12® (Bioautomation)。在由可控孔徑玻璃(CPG, 500 Å或600Å, 獲自Prime Synthesis, Aston, PA, USA)製得之固體載體上實施合成。所有RNA及2'-修飾之RNA亞磷醯胺皆購自Thermo Fisher Scientific (Milwaukee, WI, USA)。特定而言，使用以下2'-O-甲基亞磷醯胺：(5'-O-二甲氧基三苯甲基-N⁶-(苯甲醯基)-2'-O-甲基-腺苷-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二異丙基-胺基)亞磷醯胺、5'-O-二甲氧基-三苯甲基-N⁴-(乙醯基)-2'-O-甲基-胞苷-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二異丙基-胺基)亞磷醯胺、(5'-O-二甲氧基三苯甲基-N²-(異丁醯基)-2'-O-甲基-鳥苷-3'-O-(2-氰基-乙基-N,N-二異丙基胺基)亞磷醯胺及5'-O-二甲氧基-三苯甲基-2'-O-甲基-尿苷-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二異丙基胺基)亞磷醯胺。2'-

去氧-2'-氟-亞磷醯胺攜載相同保護基團作為2'-O-甲基RNA亞磷醯胺化物。將含有亞磷醯胺之標靶性配體溶解於無水二氯甲烷或無水乙腈(50 mM)中，同時將所有其他亞磷醯胺化物溶解於無水乙腈(50 mM)中並添加分子篩(3Å)。使用5-苄基硫代-1H-四唑(BTT, 250 mM於乙腈中)或5-乙基硫代-1H-四唑(ETT, 250 mM於乙腈中)作為活化劑溶液。偶合時間為10 min (RNA)、15 min (標靶性配體)、90 sec (2'-OMe)及60 sec (2'-F)。為引入硫代磷酸酯鏈接，採用3-苯基1,2,4-二噻唑啉-5-酮(POS, 獲自PolyOrg, Inc., Leominster, MA, USA)於無水乙腈中之100 mM溶液。

*B. 載體結合之寡聚物之裂解及去保護.*在固相合成結束後，在30 °C下用40wt.%甲胺水溶液及28%氫氧化銨溶液之1:1體積溶液(Aldrich)將乾燥固體載體處理兩個小時。蒸發溶液並在水中重構固體殘餘物(見下文)。

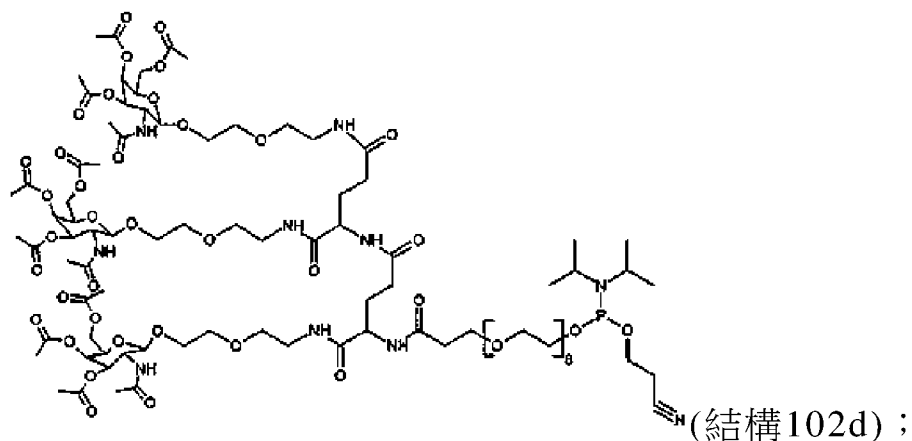
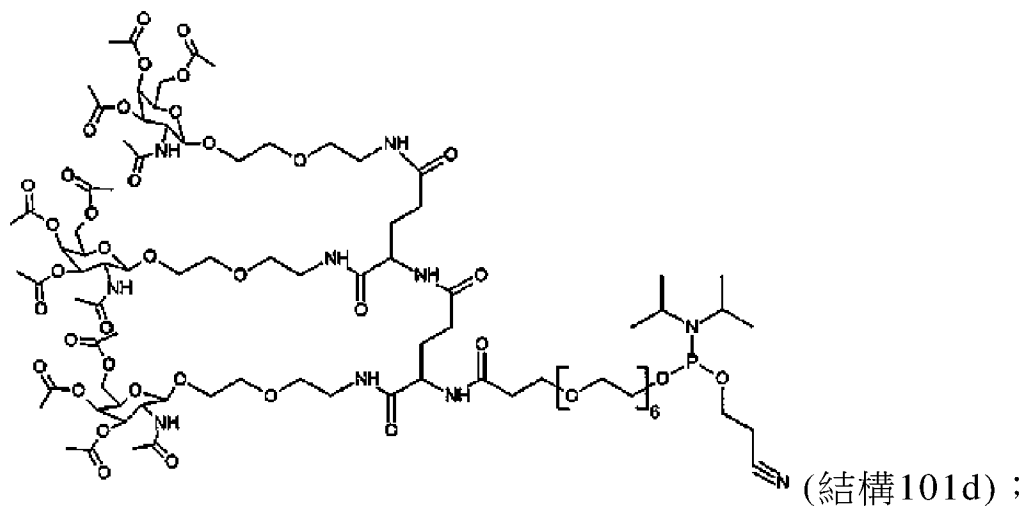
*C. 純化.*藉由陰離子交換HPLC使用TKSgel SuperQ-5PW 13u管柱及Shimadzu LC-8系統純化粗製寡聚物。緩衝液A為20mM Tris、5mM EDTA (pH 9.0)且含有20%乙腈，且緩衝液B與緩衝液A相同，且添加了1.5 M氯化鈉。記錄260nm下之UV蹤跡。彙集適當流份，然後在使用填充有Sephadex G-25介質之GE Healthcare XK 16/40管柱且利用100mM碳酸氫銨(pH6.7)及20%乙腈之運行緩衝液之粒徑篩析HPLC上運行。

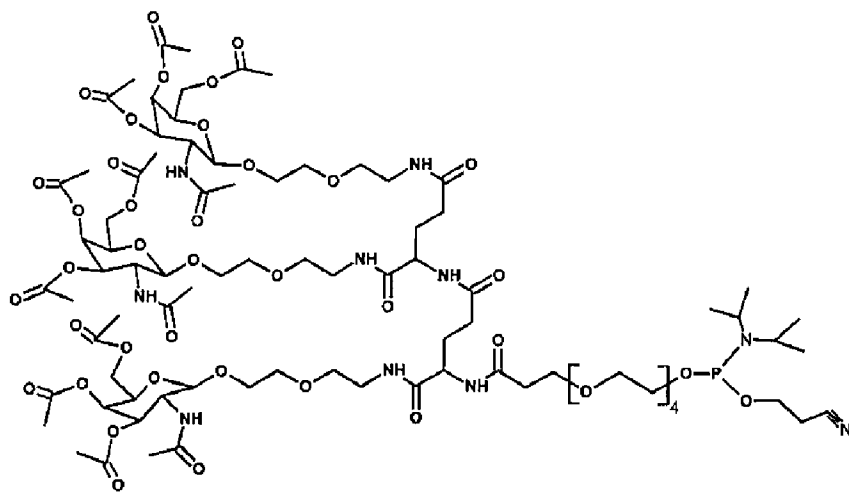
*D. 退火.*藉由在0.2× PBS (磷酸鹽緩衝鹽水，1×，Corning，Cellgro)中合併等莫耳RNA溶液(有義股及反義)混合互補股以形成RNAi藥劑。將此溶液置於70°C下之熱混合器中，將其加熱至95°C，在95°C下保持5min並緩慢冷卻至室溫。將一些RNAi藥劑凍乾並在-15°C至-25°C下儲存。藉由在0.2× PBS中在UV-Vis光譜儀上量測溶液吸光度來測定雙股體

濃度。然後將260 nm下之溶液吸光度乘以換算因數及稀釋因數以測定雙股體濃度。除非另有闡述，否則所有換算因數皆為0.037 mg/(mL·cm)。對於一些實驗，換算因數係自實驗測定之消光係數計算。

實例5. 具有不同長度之PEG連接體之標靶性配體之性質.

根據上文實例1至4中所揭示之方法合成以下標靶性配體亞磷醯胺化合物：





(結構103d)。

以16當量遞送結構101d、102d及103d之亞磷醯胺化合物中之每一者以在單股寡核苷酸AM03704-SS之5’端偶聯，該單股寡核苷酸係有義股，其可用於合成雙股RNAi藥劑標靶性F12。AM03704具有下表中所顯示之核苷酸序列：

表1.實例5之有義股序列.

	5’ → 3’	SEQ ID NO:
有義股序列： (AM03704-SS)	uauaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(inv dA)	1

將組合物溶解於二氯甲烷(DCM)中並經篩乾。結構103d (即，具有PEG-4連接體)之亞磷醯胺化合物在0.05M及0.25M下呈現膠凝問題。如圖9中所顯示，在該等條件下，僅極少量之標靶性配體結構103d能偶聯至寡核苷酸AM03704-SS之5’末端。

結構101d及102d均顯示標靶性配體至寡核苷酸之偶聯。圖9顯示偶聯至結構101d之AM03704之HPLC層析圖。據測定對於結構101之標靶性配體，形成約78%之標靶性配體偶聯之寡核苷酸(FLP = 全長產物)。圖10顯示偶聯至結構102d之AM03704之HPLC層析圖。形成約40%之標靶性配體

偶聯之寡核苷酸，同時約60%之寡核苷酸保持未偶聯。

令人驚奇且出乎意料地，在16當量下，關於在序列之5’端與寡核苷酸之偶聯，結構101d基本上優於結構102d及結構103d。另外，結構101d及102d均顯示大於結構103d之溶解性。如上所述，使用於寡核苷酸合成而言典型之標準濃度及溶劑條件，結構103d難以溶解。連接至表現抑制性寡聚化合物且具有結構103之標靶性配體之標靶性配體之製造(藉由使用結構103d之亞磷醯胺化合物)需要添加極性更強勁的溶劑。

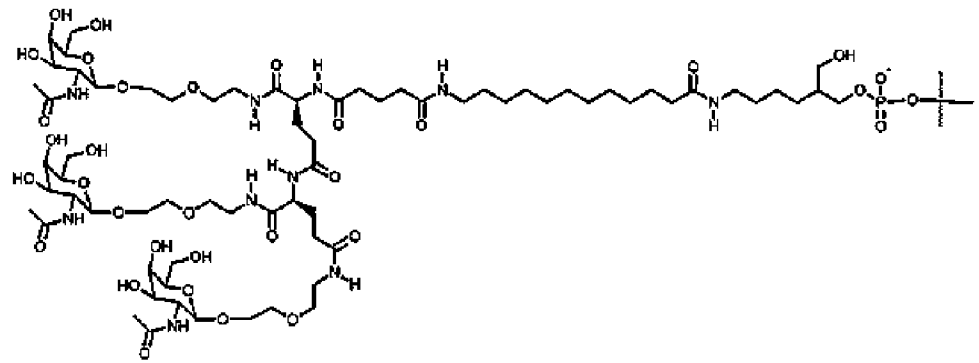
實例6. 在野生型小鼠中使用F12表現抑制性寡聚化合物比較用於GalNAc標靶性配體之3’及5’有義股附接位點.

為評價在有義股之3’末端與5’末端之間GalNAc配體之附接位點之差異，製備具有下表2中所闡述序列之針對F12之表現抑制性寡聚化合物(雙股RNAi藥劑) (在本文中稱作F12 RNAi藥劑)：

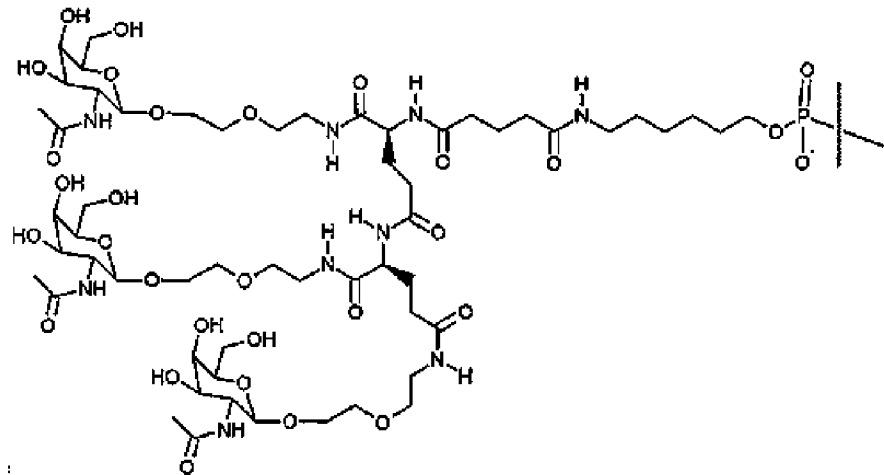
表2.實例6之F12表現抑制性寡聚化合物(RNAi藥劑雙股體).

雙股體ID：AD02803	5’ → 3’	SEQ ID NO:
有義股序列： (AM03628-SS)	uAuAugscsccaagaAfaGfugaaagacca(NAG15)	2
反義股序列： (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsusc uAu	3
雙股體ID：AD02807	5’ → 3’	SEQ ID NO:
有義股序列： (AM03632-SS)	(NAG18)uauaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(inv dA)	4
反義股序列： (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsusc uAu	5

在上表2中，使用以下符號：



(NAG15)=



(NAG 18)= :

(NAG18)具有由本文中之結構2表示之化學結構。

根據亞磷醯胺技術在用於寡核苷酸合成之固相上使用MerMade96E® (Bioautomation)或MerMade12® (Bioautomation)合成F12 RNAi藥劑之每一股，且遵循本文實例4中通常闡述之方法，藉由在0.2× PBS (磷酸鹽緩衝鹽水，1×，Corning，Cellgro)中合併等莫耳RNA溶液(有義及反義)混合互補股以形成雙股體。

在業內已知之醫藥上可接受之緩衝液中合併偶聯至各別GalNAc配體(即，(NAG15)或(NAG18))之F12 RNAi藥劑用於皮下(SC)注射。

經由SC注射遞送連接至各別GalNAc配體之F12 RNAi藥劑。在第1天，將含有鹽水或3 mg/kg (mpk)劑量於緩衝鹽水中之兩種F12 RNAi藥劑(AD02803或AD02807)中之一者之200 μl溶液/20g小鼠SC注射至肩部之間

背部上之鬆弛皮膚中。每一治療組有三(3)隻野生型小鼠。如上文所顯示，AD02803包括附接至有義股之3’末端之(NAG15)，而AD 2807包括附接至有義股之5’端之(NAG18)。

在第8天、第15天、第22天及第29天取出經治療小鼠之血清試樣以監測敲低。藉由內部研發之mF12 αLISA® (Perkin Elmer)量化血清中之循環小鼠F12蛋白質(mF12)含量測定敲低。將特定流血日期之表現正規化為該同一日期鹽水對照組之平均值。

圖12顯示此研究之結果。在底點(第22天)，AD02803顯示循環F12含量降低約70%，而AD02807顯示大於80%之降低。該數據亦顯示敲低效應之長度之差異，因為在第29天，與AD2807治療之小鼠相比，AD02803治療之小鼠顯示更快的返回至基線。該等數據支持GalNAc配體在有義股之5’端上之鏈接優於在3’有義股之鏈接。

實例7. 在野生型小鼠中使用F12表現抑制性寡聚化合物對於GalNAc標靶性配體而言3’及5’有義股附接位點之進一步比較.

為進一步評價GalNAc配體在雙股表現抑制性寡聚化合物(雙股RNAi藥劑)之有義股之3’及5’末端上之附接位點，製備具有下表3中所述序列之針對F12基因之組合物：

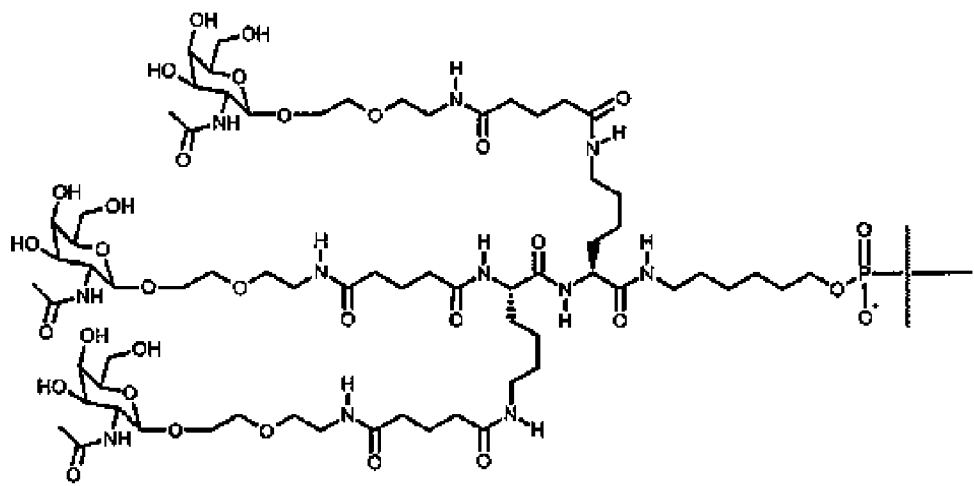
表3.實例7之F12表現抑制性寡聚化合物(RNAi藥劑雙股體).

雙股體ID：AD02815	5’ → 3’	SEQ ID NO:
有義股序列： (AM03640-SS)	(NAG20)uauaugscsccaagaAfaGfugaaa gacc(inv dA)	6
反義股序列： (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscu Au	7

雙股體ID：AD02816	5' → 3'	SEQ ID NO:
有義股序列： (AM03632-SS)	uAuAugscsccaagaAfaGfugaaagacca(N AG20)	8
反義股序列： (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscu Au	9

在上表3中，使用以下符號：

(NAG20)=



(NAG20)具有由本文中之結構4表示之化學結構。

根據亞磷醯胺技術在用於寡核苷酸合成之固相上使用MerMade96E® (Bioautomation)或MerMade12® (Bioautomation)合成F12 RNAi藥劑之每一股，且遵循本文實例4中通常闡述之方法，藉由在0.2× PBS (磷酸鹽緩衝鹽水, 1×, Corning, Cellgro)中合併等莫耳RNA溶液(有義及反義)混合互補股以形成雙股體。

在業內已知之醫藥上可接受之緩衝液中合併連接至各別GalNAc配體(即，(NAG 20))之F12 RNAi藥劑用於皮下(SC)注射。

經由SC注射遞送連接至各別GalNAc配體之F12 RNAi藥劑。在第1天，將含有鹽水或3 mg/kg (mpk)劑量於緩衝鹽水中之兩種RNAi藥劑中之一者(AD02815或AD02816)之200 µl溶液/20g小鼠SC注射至肩部之間背部上之鬆弛皮膚中。每一治療組有三(3)隻野生型小鼠。如上表3中所顯示，AD02815包括附接至有義股之5'端之(NAG20)，而AD02816包括附接至有義股之3'末端之(NAG20)。

在第8天、第15天、第22天及第29天取出經治療小鼠之血清試樣以監測敲低。藉由內部研發之mF12 αLISA® (Perkin Elmer)量化血清中循環小鼠之F12蛋白質(mF12)含量測定敲低。將特定流血日期之表現正規化為該同一日期鹽水對照組之平均值。

圖13顯示此實驗之結果。在底點(第22天)，AD02816顯示循環F12蛋白質含量降低約60%，而AD02815顯示79%降低。該數據亦顯示敲低效應之長度之差異。在第29天，AD02816治療之小鼠顯示自鹽水含量40%敲低，而AD02815治療之小鼠顯示71%敲低。該等數據支持GalNAc配體在有義股之5'末端鏈接。

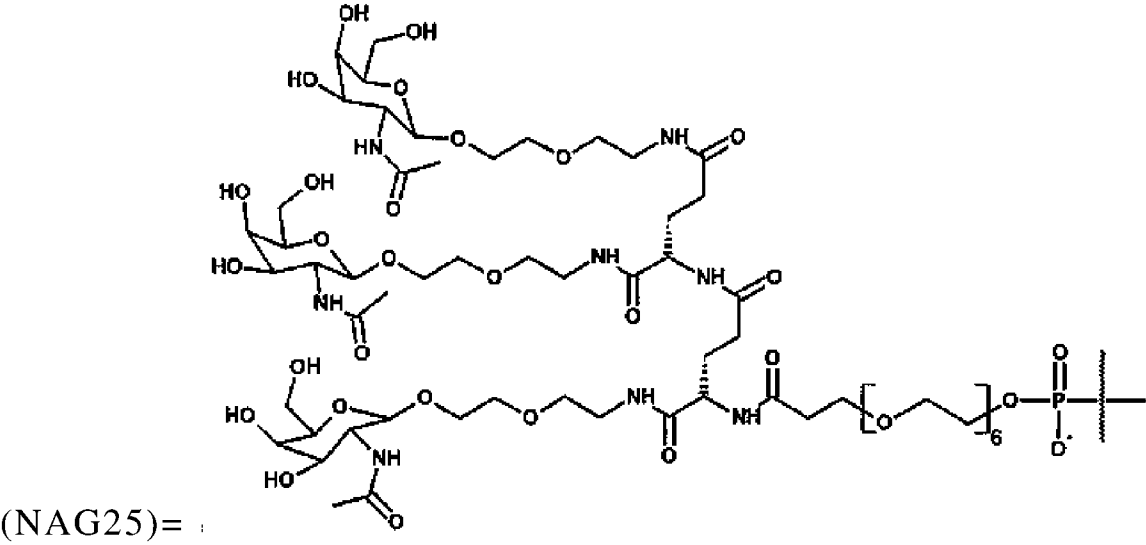
實例8. 在Lp(a)轉基因(Tg)小鼠中連接至結構1003之標靶性配體之Lp(a)表現抑制性寡聚化合物(雙股RNAi藥劑)。

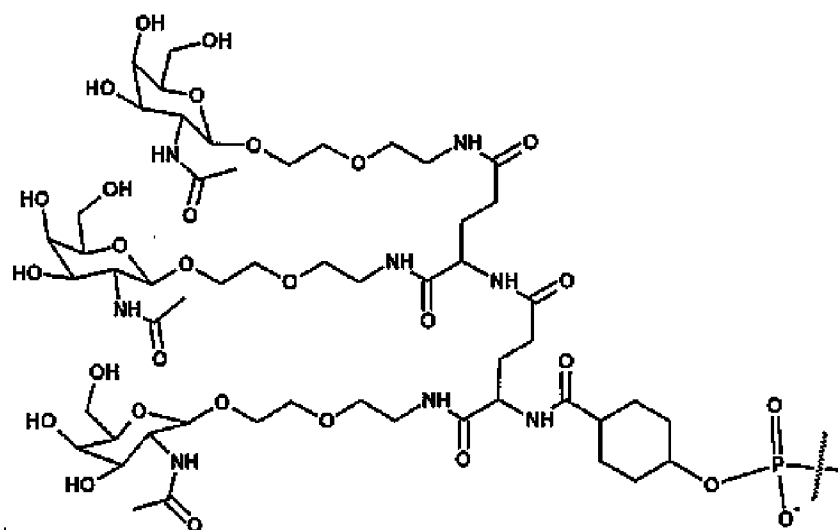
製備具有下表5中所述序列之Lp(a)表現抑制性寡聚化合物(雙股Lp(a) RNAi藥劑)：

表4. 實例8之LP(a)表現抑制性寡聚化合物(RNAi藥劑雙股體).

雙股體ID：AD03547	5' → 3'	SEQ ID NO:
有義股 序 列：(AM04498-SS)	(NAG29)uauauaasuuaucgaGfGfcucauuc ucsa(invAb)	10
反義股 序 列：(AM04507-AS)	usGfsasGfaAfuGfaGfccuCfgAfuAfausu AUAUA	11
雙股體ID：AD03549	5' → 3'	SEQ ID NO:
有義股 序 列：(AM04502-SS)	(NAG25)uauauaasuuaucgaGfGfcucauuc ucsa(invAb)	12
反義股 序 列：(AM04507-AS)	usGfsasGfaAfuGfaGfccuCfgAfuAfausu AUAUA	13

在上表4中，使用以下符號：





(NAG 29)= :

(NAG29)具有由本文中之結構1003表示之化學結構。

根據亞磷醯胺技術在用於寡核苷酸合成之固相上使用MerMade96E® (Bioautomation)或MerMade12® (Bioautomation)合成Lp(a) RNAi藥劑之每一股，且遵循本文實例10中通常闡述之方法，藉由在0.2× PBS (磷酸鹽緩衝鹽水，1×，Corning，Cellgro)中合併等莫耳RNA溶液(有義及反義)混合互補股以形成雙股體。

使用Lp(a)轉基因(Tg)小鼠(Frazer KA等人1995, NatureGenetics 9:424-431)來評估具有偶聯之N-乙醯基-半乳胺糖配體之雙股RNAi藥劑在活體內之效能。此小鼠自含有完整LPA基因(編碼apo(a)蛋白質)且在5'及3'均具有其他序列之YAC表現人類apo(a)，以及人類apoB-100，藉此產生人類化Lp(a)粒子(在下文中稱作「Lp(a) Tg小鼠」)。(Callow MJ等人1994, PNAS 91:2130-2134)。

在業內已知之醫藥上可接受之緩衝液中合併連接至各別GalNAc配體(即，(NAG 25)或(NAG29))之Lp(a) RNAi藥劑用於皮下(SC)注射。

經由SC注射遞送在有義股之5'端連接至各別GalNAc配體(即，(NAG25)或(NAG29))之Lp(a) RNAi藥劑。在第1天，將含有鹽水或1

mg/kg (mpk)劑量於緩衝鹽水中之各別Lp(a) RNAi藥劑(AD03547或AD03549)之200 µl溶液/20g小鼠SC注射至肩部之間背部上之鬆弛皮膚中。每一治療組有四(4)隻Lp(a) Tg小鼠。

在第-1天(劑量前)、第5天、第11天、第16天、第22天、第29天及第36天取出經治療小鼠之血清試樣。藉由計算血清中之循環Lp(a)粒子含量測定敲低。Lp(a)粒子含量係在Cobas® Integra 400 (Roche Diagnostics)上根據製造商之建議測得。為進行正規化，將每一動物在某一時間點之Lp(a)含量除以該動物中劑量前之表現量(在此情形下在第-1天)以測定「正規化為第-1天之」表現比率。然後藉由將個別動物之「正規化為第-1天之」比率除以鹽水對照組中所有小鼠之平均的「正規化為第-1天之」比率，將特定時間點之表現正規化為鹽水對照組。此使得每一時間點之表現正規化為對照組之表現。實驗誤差係作為標準偏差給出。

結果顯示於圖14中。AD03549 (NAG25)在底點(第16天)顯示71%敲低及AD03547 (NAG29)在底點(第11天)顯示81%敲低。兩種觸發在底點後均顯示類似的恢復曲線，其中在第36天敲低小於26%。該等數據支持所顯示GalNAc配體在Lp(a) Tg小鼠中在初始敲低活性及敲低持續時間方面與單一1 mg/kg劑量係相當的。

實例9. 在投與連接至標靶性配體結構101之Lp(a)表現抑制性寡聚化合物(雙股RNAi藥劑)之後Lp(a)轉基因(Tg)小鼠中之Lp(a)敲低。

製備具有下表5中所述序列之Lp(a)表現抑制性寡聚化合物(雙股Lp(a) RNAi藥劑)：

表5. 實例9之LP(a)表現抑制性寡聚化合物(RNAi藥劑雙股體).

雙 股 體 ID :	5' → 3'	SEQ ID NO:
AD03272		
有義股序列： (AM04138-SS)	(NAG25)uauausasguuaucgAfGfGfcucauucuc(in vdA)	14
反義股序列： (AM02860-AS)	usGfsaGfaAfuGfaGfccuCfgAfuAfaCfucsusuAu	15

在表5中，(NAG25)具有與上文實例8中所顯示相同之結構且具有由本文中之結構101表示之化學結構。

根據亞磷醯胺技術在用於寡核苷酸合成之固相上使用MerMade96E® (Bioautomation)或MerMade12® (Bioautomation)合成Lp(a) RNAi藥劑之每一股，且遵循本文實例4中通常闡述之方法，藉由在0.2× PBS (磷酸鹽緩衝鹽水，1×，Corning，Cellgro)中合併等莫耳RNA溶液(有義及反義)混合互補股以形成雙股體。

使用Lp(a) Tg小鼠來評估具有偶聯之N-乙醯基-半乳胺糖配體之雙股RNAi藥劑在活體內之效能。

在業內已知之醫藥上可接受之緩衝液中合併連接至標靶性配體結構101之Lp(a) RNAi藥劑用於皮下(SC)注射。

經由SC注射遞送在有義股之5'端連接至標靶性配體之Lp(a) RNAi藥劑。在第1天，將鹽水或1 mg/kg (mpk)劑量於緩衝鹽水中之RNAi藥劑AD03272之200 µl溶液/20g小鼠SC注射至肩部之間背部上之鬆弛皮膚中。每一治療組有四(4)隻Lp(a) Tg小鼠。

在第-1天(劑量前)、第8天、第15天、第22天、第29天、第36天及第43天取出經治療小鼠之血清試樣。藉由計算血清中之循環Lp(a)粒子含量

測定敲低。Lp(a)粒子含量係在Cobas® Integra 400 (Roche Diagnostics) 上根據製造商之建議測得。為進行正規化，將每一動物在某一時間點之Lp(a)含量除以該動物中劑量前之表現量(在此情形下在第-1天)以測定「正規化為第-1天之」表現比率。然後藉由將個別動物之「正規化為第-1天之」比率除以鹽水對照組中所有小鼠之平均的「正規化為第-1天之」比率，將特定時間點之表現正規化為鹽水對照組。此使得每一時間點之表現正規化為對照組中之表現。實驗誤差係作為標準偏差給出。

結果顯示於圖15中。AD03272在底點(第15天)顯示88%敲低且在第29天維持75%之敲低。該等數據支持在轉基因小鼠中結構1008之標靶性配體可使靶LPA之RNAi藥劑靶向肝臟且利用單一1 mg/kg劑量獲得>85%敲低。

實例10. 在apo(a)轉基因(Tg)小鼠中在投與連接至標靶性配體結構101、102及103之Lp(a)表現抑制性寡聚化合物(雙股RNAi藥劑)之後的脂蛋白元(a) (apo(a))敲低。

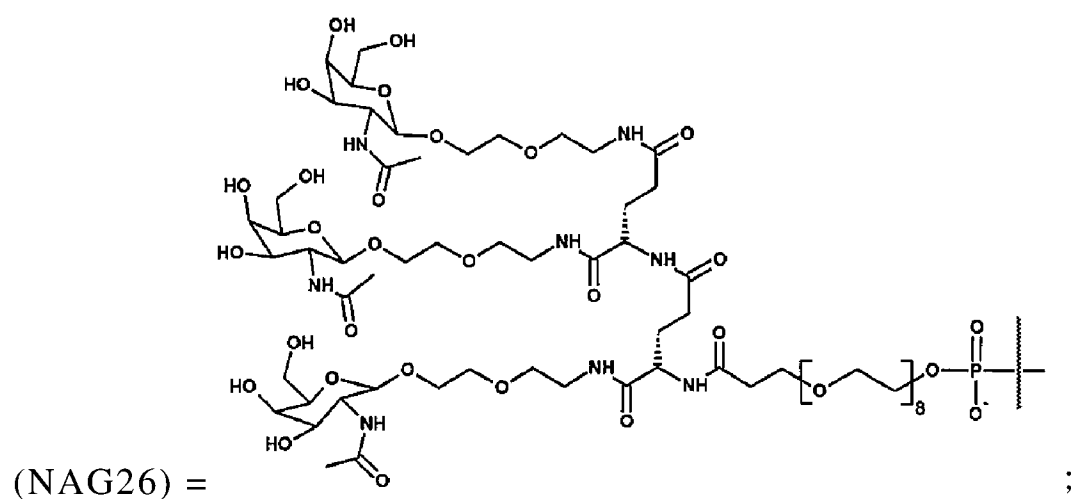
製備具有下表4中所述序列之Lp(a)表現抑制性寡聚化合物(雙股Lp(a) RNAi藥劑)：

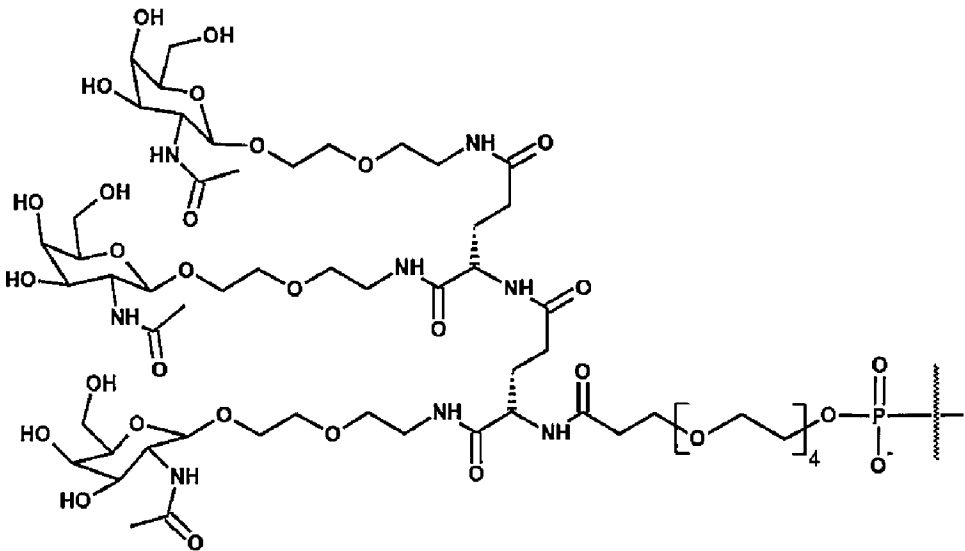
表6. 實例10之LP(a)表現抑制性寡聚化合物(RNAi藥劑雙股體).

雙股體ID：	5' → 3'	SEQ ID
AD03275		NO:
有義股序列：	(NAG25)uauausasguuauucgAfGfGfcucauuc	16
(AM04138-SS)	uc(inv dA)	
反義	usGfsagaauGfaGfccuCfgauaacucsusuau	17
股序列：		
(AM04133-AS)		

雙股體ID： AD03341	5' → 3'	SEQ ID NO:
有義股序列： (AM04499-SS)	(NAG26)uauausasguuauCGAfGfGfcuauuc uCM(inv dA)	18
反義 股序列： (AM04133-AS)	usGfsagaauGfaGfccuCfgauaacucsusuau	19
雙股體ID： AD03421	5' → 3'	SEQ ID NO:
有義股序列： (AM04500-SS)	(NAG27)uauausasguuauCGAfGfGfcuauuc uCM(inv dA)	20
反義 股序列： (AM04133-AS)	usGfsagaauGfaGfccuCfgauaacucsusuau	21

在上表6中，使用以下符號：





另外，(NAG25)具有與上文實例8中相同之結構且具有由本文中之結構101表示之化學結構。(NAG27)具有由本文中之結構102表示之化學結構。(NAG28)具有由本文中之結構103表示之化學結構。如上表7中所顯示，除所選擇之不同標靶性配體以外，組合物係相同的。

根據亞磷醯胺技術在用於寡核苷酸合成之固相上使用MerMade96E® (Bioautomation)或MerMade12® (Bioautomation)合成Lp(a) RNAi藥劑之每一股，且遵循本文實例10中通常闡述之方法，藉由在0.2× PBS (磷酸鹽緩衝鹽水，1×，Corning，Cellgro)中合併等莫耳RNA溶液(有義及反義)混合互補股以形成雙股體。

使用Apo(a)轉基因(Tg)小鼠來評估具有偶聯之N-乙醯基-半乳胺糖配體之雙股RNAi藥劑在活體內之效能。Apo(a) Tg小鼠(Frazer KA等人1995, NatureGenetics 9:424-431)自含有全部LPA基因(編碼apo(a)蛋白質)且在5'及3'均具有其他序列之YAC表現人類apo(a) (在下文中稱作「apo(a) Tg小鼠」)。

在業內已知之醫藥上可接受之緩衝液中合併連接至各別GalNAc配體(即，(NAG 25)、(NAG26)或(NAG27))之Lp(a) RNAi藥劑用於皮下(SC)

注射。

經由SC注射遞送在有義股之5'端連接至各別GalNAc配體(即，(NAG25)、(NAG26)或(NAG37))之Lp(a) RNAi藥劑。在第1天，將含有鹽水或1 mg/kg (mpk)劑量於緩衝鹽水中之各別RNAi藥劑(AD03275、AD03341或AD03421)之200 µl溶液/20g小鼠SC注射至肩部之間背部上之鬆弛皮膚中。每一治療組有三(3)隻apo(a) Tg小鼠。

在第-1天(劑量前)、第8天、第15天、第22天、第29天、第36天及第43天取出經治療小鼠之血清試樣。藉由使用針對apo(a)之ELISA (Abcam)監測血清中之循環apo(a)蛋白質含量測定敲低。為進行正規化，將每一動物在某一時間點之apo(a)含量除以該動物中治療前之表現量(在此情形下在第-1天)以測定「正規化為第-1天之」表現比率。然後藉由將個別動物之「正規化為第-1天之」比率除以鹽水對照組中所有小鼠之平均的「正規化為第-1天之」比率，將特定時間點之表現正規化為鹽水對照組。此使得每一時間點之表現正規化為對照組中之表現。實驗誤差係作為平均值之標準誤差給出。

結果顯示於圖16中。含有標靶性配體結構101 (NAG25)之Lp(a) RNAi藥劑AD03275在底點(第22天)顯示82%敲低且在第29天維持72%之敲低。含有標靶性配體結構102 (NAG26)之Lp(a) RNAi藥劑AD03341在底點(第15天)顯示87%敲低，然而，在第29天之敲低為45%，此指示增加之比率返回至劑量前位準。含有標靶性配體結構103 (NAG27)之Lp(a) RNAi藥劑AD03421在底點(第15天)顯示70%敲低且第29天之敲低為50%。該等數據支持結構101 (NAG25)、結構102 (NAG26)及結構103 (NAG27)最初皆顯示類似的敲低活性。然而，該等數據顯示AD03275 (結

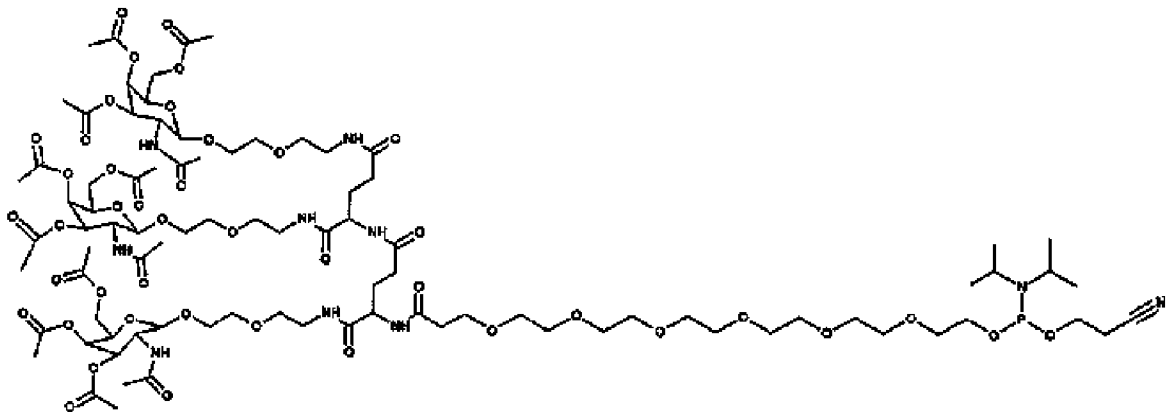
構101 (NAG25))具有優於結構102 (NAG26)及結構103 (NAG27)之持續時間且直至第29天一直維持敲低(在第29天72%敲低)。

實例11. 食蟹猴中連接至標靶性配體結構101之LP(a)表現抑制性寡聚化合物(雙股RNAi藥劑).

製備五種不同的連接至由結構101表示之標靶性配體之LPARNAi藥劑來評估其在以下食蟹猴獼猴(長尾獼猴(*Macaca fascicularis*))靈長類動物中之性能：AD03460、AD03536、AD03851、AD03853及AD04110。

根據亞磷醯胺技術在用於寡核苷酸合成之固相上使用MerMade96E® (Bioautomation)或MerMade12® (Bioautomation)合成Lp(a) RNAi藥劑之每一股，且遵循本文實例4中通常闡述之方法，藉由在0.2× PBS (磷酸鹽緩衝鹽水，1×，Corning，Cellgro)中合併等莫耳RNA溶液(有義及反義)混合互補股以形成雙股體。

使用本文通常闡述且在業內已知之非核苷亞磷醯胺合成將針對所有五(5)種Lp(a) RNAi藥劑之標靶性配體添加至有義股之5'末端。使用以下亞磷醯胺化合物藉助非核苷亞磷醯胺合成為每一Lp(a) RNAi藥劑添加標靶性配體：

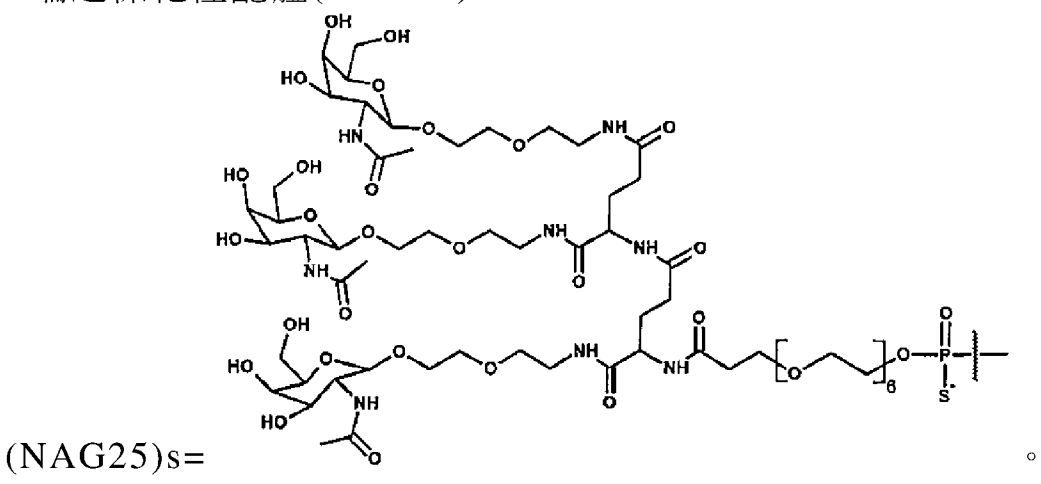


(結構101d)。

AD03460及AD03536包括偶聯至各別RNAi藥劑之有義股之5'端之標

靶性配體(NAG25)。(NAG25)具有與上文實例8中所顯示相同之結構。

AD03851、AD03853及AD04110含有偶聯至各別RNAi藥劑之有義股之5'端之標靶性配體(NAG25)s。



抽吸血液試樣並分析第8天及第15天之脂蛋白(a)含量。將Lp(a)含量正規化為三個劑量前值之平均值。正規化之Lp(a)含量報告於下表中：

	正規化之Lp(a) 第8天	正規化之Lp(a) 第15天
鹽水	1.01 ±0.06	1.15±0.07
AD03460	0.68 ±0.12	0.40±0.13
AD03536	0.54 ±0.07	0.21±0.06
AD03851	0.41 ±0.08	0.18±0.08
AD03853	0.50 ±0.23	0.27±0.17
AD04110	0.59 ±0.13	0.43±0.10

該等數據顯示在食蟹猴中在2mg/kg (mpk)劑量之多種不同的偶聯至本文中之結構101之同一標靶性配體結構Lp(a) RNAi藥劑下達成顯著敲低。

實例12：在食蟹猴中連接至結構101之標靶性配體之F12表現抑制性寡聚化合物(雙股RNAi藥劑)。

製備具有下表7中所述序列之F12表現抑制性寡聚化合物(雙股F12

RNAi藥劑)：

表7.實例12之F12表現抑制性寡聚化合物(RNAi藥劑雙股體).

雙股體ID：	5' → 3'	SEQ ID NO:
AD03635		
有義股序列： (AM04130-SS)	(NAG25)uauaugscsccaagaAfaGfugaaagacc (invdA)	22
反義 股序列： (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	23

在上表7中，(NAG25)表示與上文實例8中所顯示相同之結構且係由本文中之結構101表示。

製備在有義股之5'端偶聯至標靶性配體之F12 RNAi藥劑並在業內已知之醫藥上可接受之緩衝液中合併用於皮下(SC)注射。

在第1天，用3 mg/kg AD03635皮下注射食蟹猴獼猴(長尾獼猴)靈長類動物。每一治療組對三(3)隻猴進行給藥。

在第-7天及第1天(劑量前)及在第8天、第15天及第22天取出經治療食蟹猴之血清試樣以監測敲低。敲低係藉由人類 F12ELISA 套組 (Molecular Innovations) 量化血清中之循環 cynoF12 蛋白 (cF12) 含量測得。將各別時間點每一動物之 cF12 含量除以該動物中之治療前表現量(第-7天及第1天之平均值)以測定「正規化為劑量前之」表現比率。實驗誤差係作為標準偏差給出。

圖17顯示結果。在食蟹猴中，連接至NAG25 (結構101)之F12 RNAi藥劑顯示敲低。

實例13：在*PiZ*轉基因小鼠中連接至結構101之標靶性配體之 α -1抗胰蛋白

酶表現抑制性寡聚化合物(雙股RNAi藥劑).

為評估在活體內針對α-1抗胰蛋白酶(AAT)基因之RNAi藥劑，使用轉基因PiZ小鼠模型(PiZ小鼠)。PiZ小鼠具有人類PiZ AAT突變等位基因及模型人類AATD (Carlson等人，Journal of Clinical Investigation 1989)。

製備具有下表8中所述序列之AAT表現抑制性寡聚化合物(雙股RNAi藥劑)：

表8. 實例13之AAT表現抑制性寡聚化合物(RNAi藥劑雙股體).

雙 股 體 ID :	5' → 3'	SEQ ID NO:
AD04454		
有義股 股序列： (AM05662-SS)	(NAG25)scsgauaucaUfCfAfccaaguuccsa(in vAb)	24
反義股序列： (AM05663-AS)	usGfsgAfaCfuugguGfaUfgAfuAfusCfsg	25

在表8中，(NAG25)s具有如上文實例11中所顯示之化學結構。

在醫藥上可接受之鹽水緩衝液中製備AAT RNAi藥劑，並藉由皮下(SC)注射將200 µl溶液/20 g小鼠投與至PiZ小鼠肩部之間背部上之鬆弛皮膚中以評估AAT基因表現之敲低。每一小鼠接受5 mg/kg (mpk)單一SC劑量之AD04454。利用AAT RNAi藥劑對三隻小鼠進行投藥(n = 3)。

抽吸血漿試樣並在第-1天、第1天(劑量前)、第8天及第15天分析AAT (Z-AAT)蛋白質含量。將AAT含量正規化為第1天(劑量前)之AAT血漿含量。蛋白質含量係藉由ELISA套組量化血漿中之循環人類Z-AAT含量測得。

平均正規化之AAT (Z-AAT)含量顯示於圖18中。在PiZ轉基因小鼠

中，連接至本文中之結構101之標靶性配體之AAT RNAi藥劑顯示敲低。

其他實施例

應理解，儘管已結合本發明之詳細闡述闡述了本發明，但上述闡述意欲闡釋而非限制本發明之範圍，本發明之範圍係由隨附申請專利範圍之範圍來界定。其他態樣、優點及修改在以下申請專利範圍之範圍內。

【序列表】

<110> 美商愛羅海德製藥公司
大衛 B 羅茲馬
戴倫 H 維克菲爾德
安卓 V 布洛克希
強納森 D 班森
李
裴濤
佛瑞德 弗立茲

<120> 治療性化合物之標靶性配體

<130> 30649-US1

<150> US 62/304,652

<151> 2016-03-07

<150> US 62/370,754

<151> 2016-08-04

<150> US 62/426,916

<151> 2016-11-28

<160> 25

<210> 1

<211> 25

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RNAi 藥劑有義股

<400>

uauaugccca agaaagugaa agacc 25

<210> 2

<211> 26

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RNAi 藥劑有義股

<400>

uauaugccca agaaagugaa agacca 26

<210> 3
<211> 26
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi 藥劑反義股

<400>
uggucuuuca cuuucuuggg cucuau 26

<210> 4
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi 藥劑有義股

<400>
uauaugccca agaaagugaa agacc 25

<210> 5
<211> 26
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi 藥劑反義股

<400>
uggucuuuca cuuucuuggg cucuau 26

<210> 6
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi 藥劑有義股

<400>
uauaugccca agaaagugaa agacc 25

<210> 7

<211> 26
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi藥劑反義股

<400>
uggucuuuca cuuucuuggg cucuau 26

<210> 8
<211> 26
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi藥劑有義股

<400>
uauaugccca agaaagugaa agacca 26

<210> 9
<211> 26
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi藥劑反義股

<400>
uggucuuuca cuuucuuggg cucuau 26

<210> 10
<211> 26
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi藥劑有義股

<400>
uauauaaaua ucgaggcuca uucuca 26

<210> 11
<211> 26
<212> RNA

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNAi 藥劑反義股	
<400>		
ugagaaugag	ccucgauaau uauaua	26
<210>	12	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNAi 藥劑有義股	
<400>		
uauauaaaua	ucgaggcuca uucuca	26
<210>	13	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNAi 藥劑反義股	
<400>		
ugagaaugag	ccucgauaau uauaua	26
<210>	14	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNAi 藥劑有義股	
<400>		
uauauaguua	ucgaggcuca uucuc	25
<210>	15	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	

<220>
<223> RNAi 藥劑反義股

<400>
ugagaaugag ccucgauaac ucuuau 26

<210> 16
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi 藥劑有義股

<400>
uauauaguua ucgaggcuca uucuc 25

<210> 17
<211> 26
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi 藥劑反義股

<400>
ugagaaugag ccucgauaac ucuuau 26

<210> 18
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi 藥劑有義股

<400>
uauauaguua ucgacgcuca uucuc 25

<210> 19
<211> 26
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi 藥劑反義股

<400>

ugagaaugag ccucgauaac ucuuau

26

<210> 20

<211> 25

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RNAi 藥劑有義股

<400>

uauauaguua ucgaggcuca uucuc

25

<210> 21

<211> 26

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RNAi 藥劑反義股

<400>

ugagaaugag ccucgauaac ucuuau

26

<210> 22

<211> 26

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RNAi 藥劑有義股

<400>

ugagaaugag ccucgauaac ucuuau

26

<210> 23

<211> 26

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RNAi 藥劑反義股

<400>

uggucuuuca cuuucuuggg cucuau 26

<210> 24
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> RNAi藥劑有義股

<400>
cgauaucauc accaaguucc a 21

<210> 25
<211> 21
212> RNA
<213> 人工序列

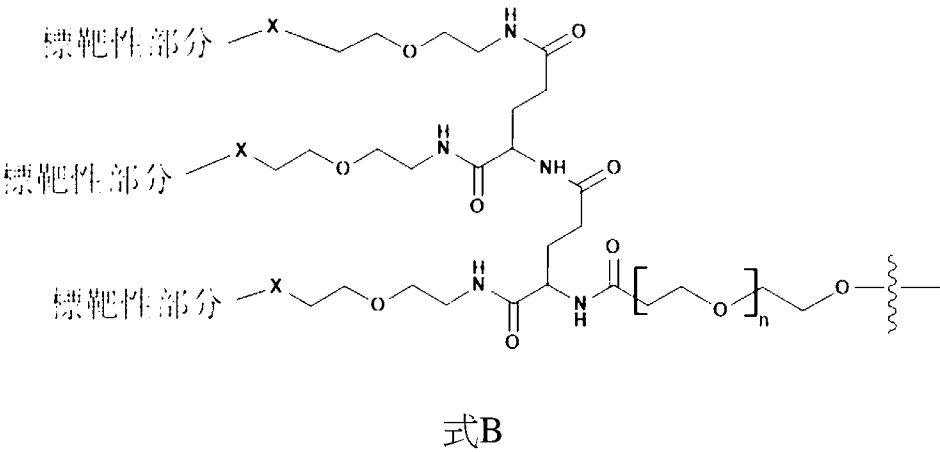
<220>
<223> RNAi藥劑反義股

<400>
uggaacuugg ugaugauauc g 21

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽，其包含式B之結構：



其中

n係1至5、7或9至20之整數；

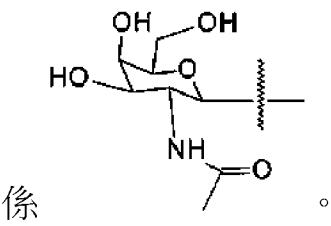
X係O、S或NH；且

該標靶性部分係選自由以下組成之群：N-乙醯基-半乳胺糖、半乳糖、半乳胺糖、N-甲醯基-半乳胺糖、N-丙醯基-半乳胺糖、N-正-丁醯基半乳胺糖及N-異-丁醯基半乳胺糖；

其中該標靶性配體係連接至包含一或多種經修飾之核苷酸之RNAi藥劑，且其中該RNAi藥劑係雙股的且該RNAi藥劑係在該RNAi藥劑之有義股之3’末端附接至該標靶性配體。

【請求項2】

如請求項1之標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽，其中該標靶性部分



【請求項3】

如請求項1之標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽，其中X為O。

【請求項4】

如請求項1之標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽，其中n為4。

【請求項5】

一種將RNAi藥劑引入哺乳動物細胞中之醫藥組合物，該醫藥組合物包含治療量之如請求項1至4中任一項之標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽。

【請求項6】

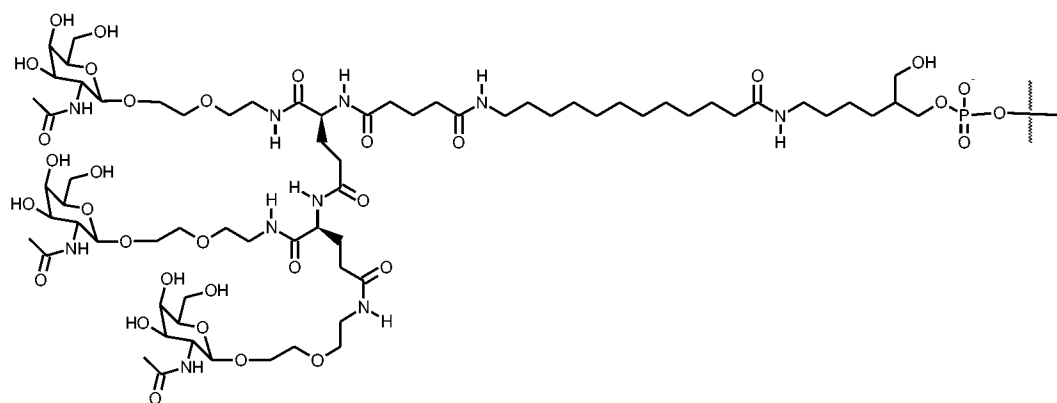
一種用於治療將受益於RNAi藥劑之投與之疾病或病症之醫藥組合物，該醫藥組合物包含治療量之如請求項1至4中任一項之標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽。

【請求項7】

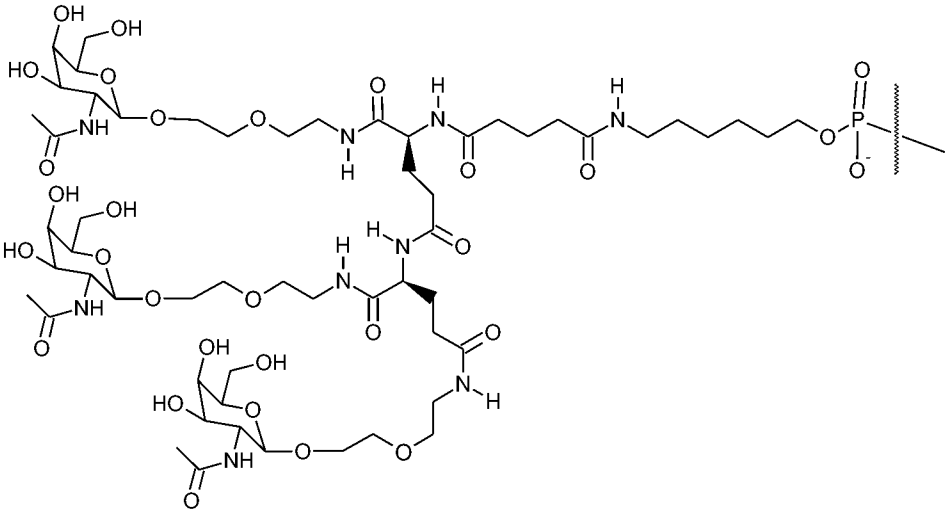
一種用於抑制個體之標靶核酸之表現之醫藥組合物，該醫藥組合物包含治療量之如請求項1至4中任一項之標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽。

【請求項8】

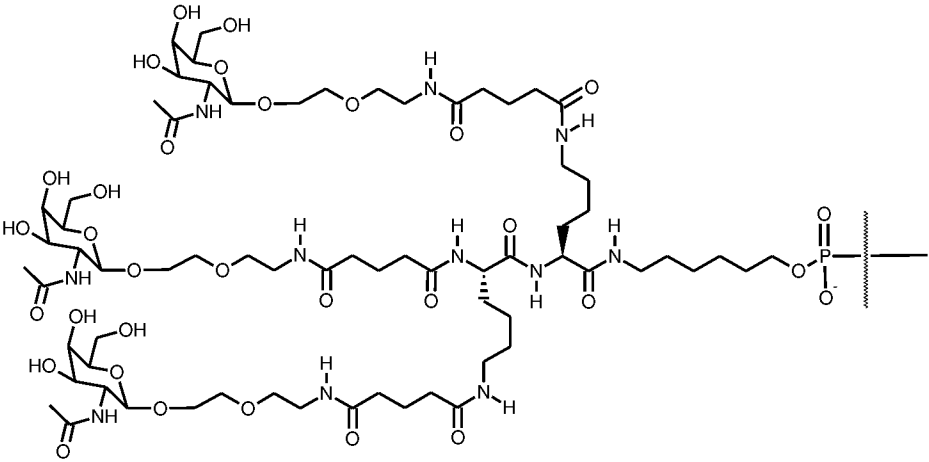
一種標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽，其包含選自由以下所組成之群之結構：



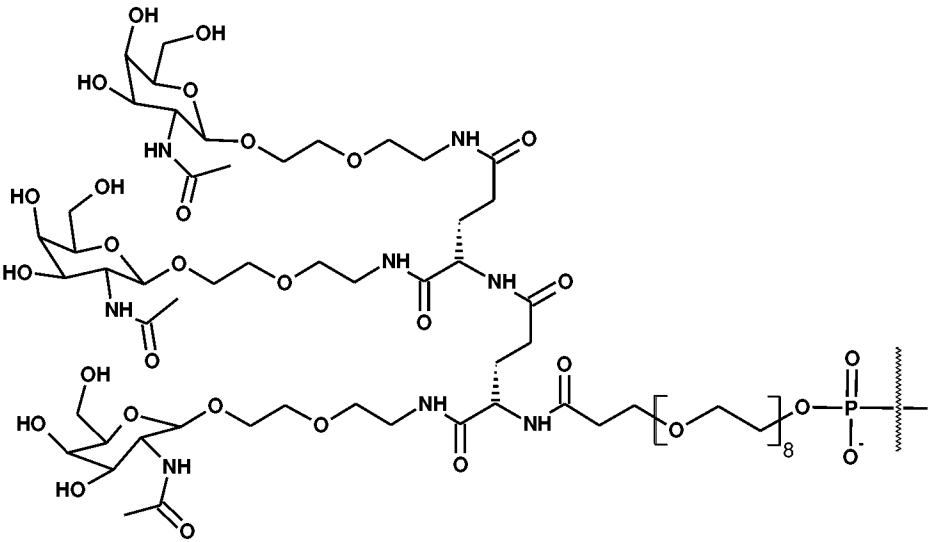
NAG15、



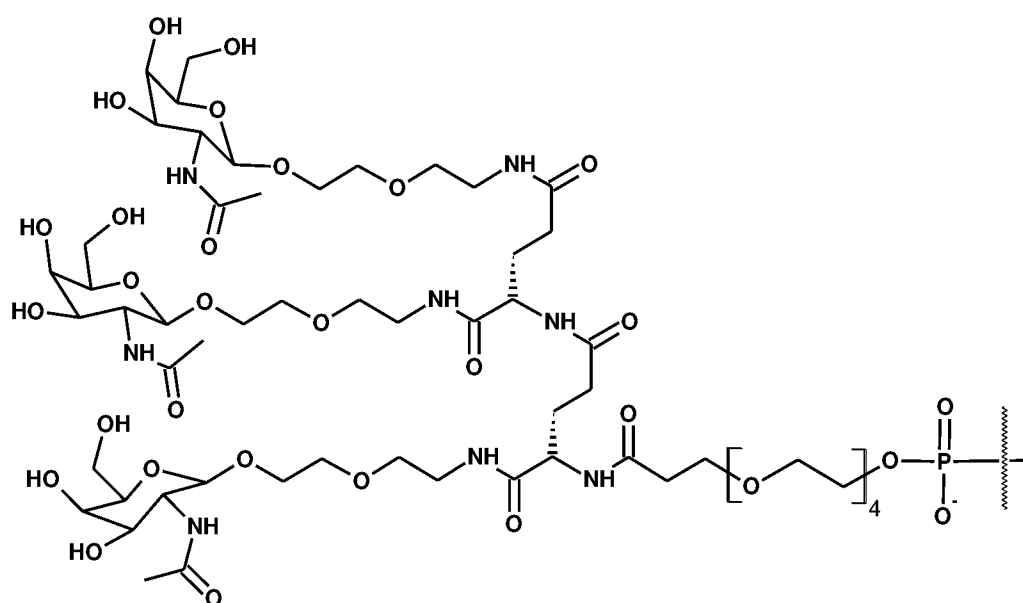
NAG18、



NAG20、



NAG26、及



NAG27，

其中該標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽係連接至表現抑制性寡聚化合物。

【請求項9】

一種抑制個體之標靶核酸之表現之醫藥組合物，該醫藥組合物包含偶聯至如請求項8之標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽之表現抑制性寡聚化合物。

【請求項10】

一種將表現抑制性寡聚化合物引入哺乳動物細胞中之方法，該方法包含使哺乳動物細胞與連接至該表現抑制性寡聚化合物之如請求項8之標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽接觸，其中該細胞係在體外。

【請求項11】

如請求項10之方法，其中該表現抑制性寡聚化合物係RNAi藥劑。

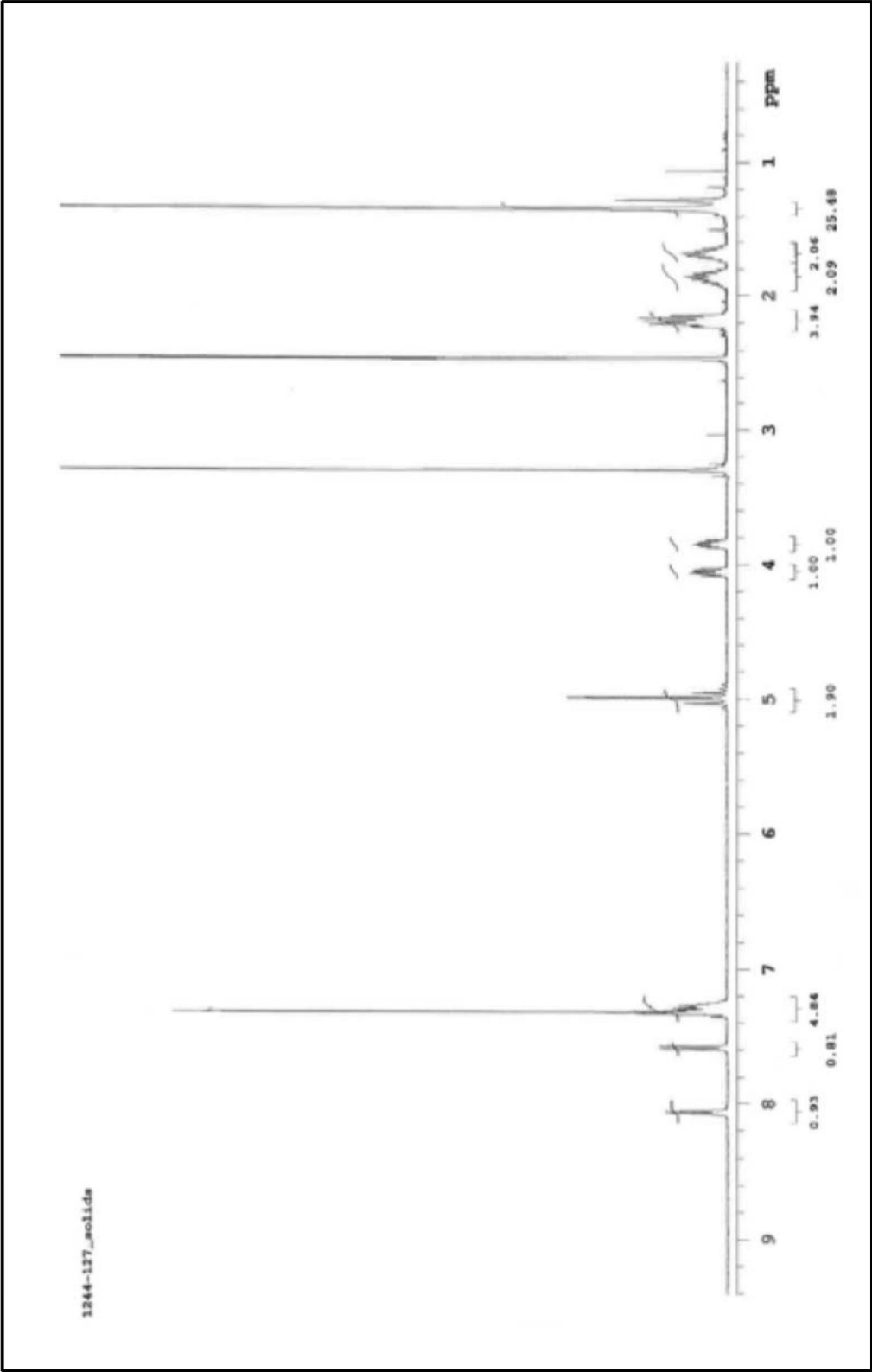
【請求項12】

一種用於治療將受益於表現抑制性寡聚化合物之投與之疾病或病症之醫藥組合物，該醫藥組合物包含治療量之連接至該表現抑制性寡聚化合物之如請求項8之標靶性配體或其醫藥上可接受之鹽。

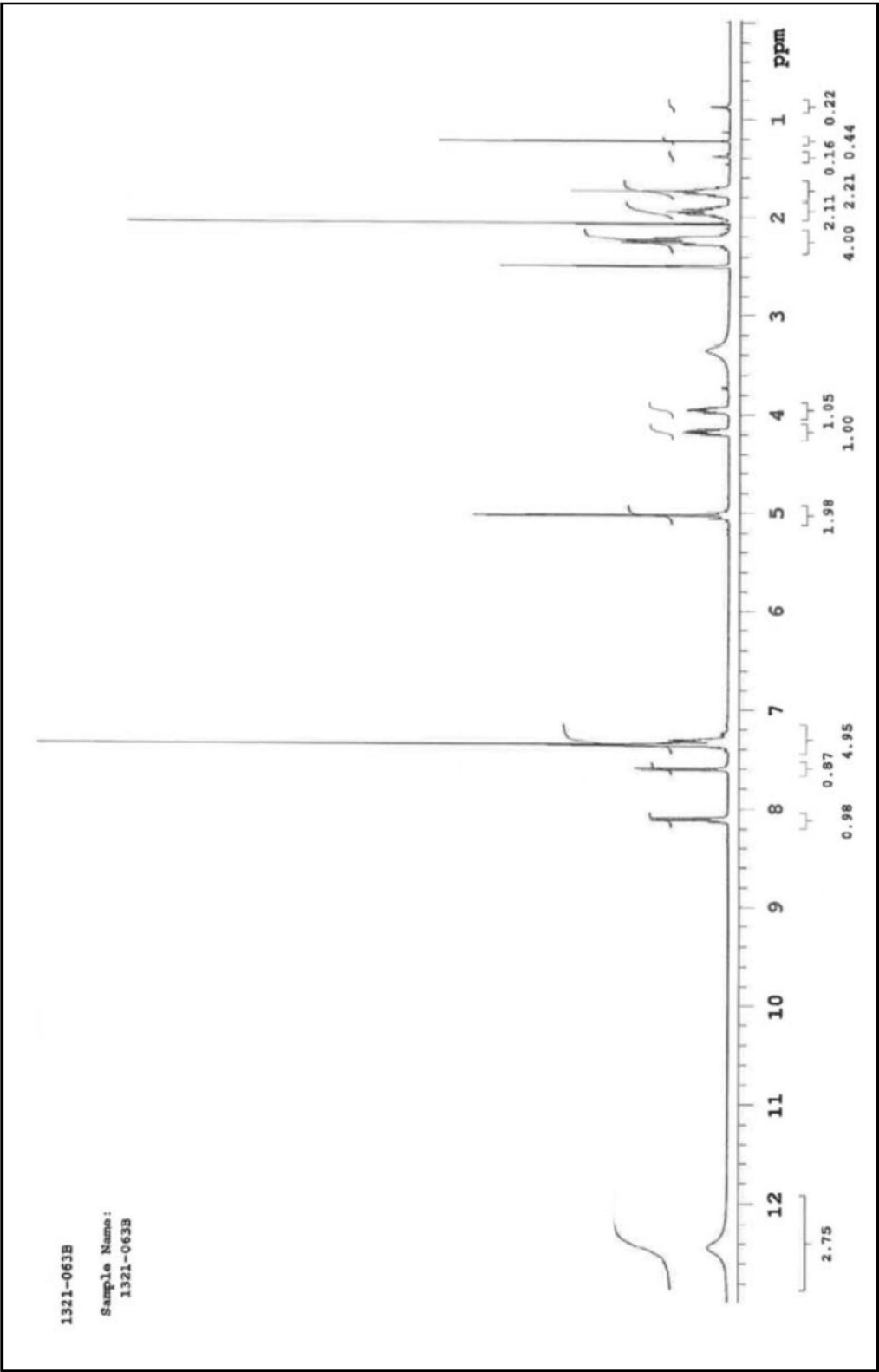
【請求項13】

如請求項12之醫藥組合物，其中該表現抑制性寡聚化合物係RNAi藥劑。

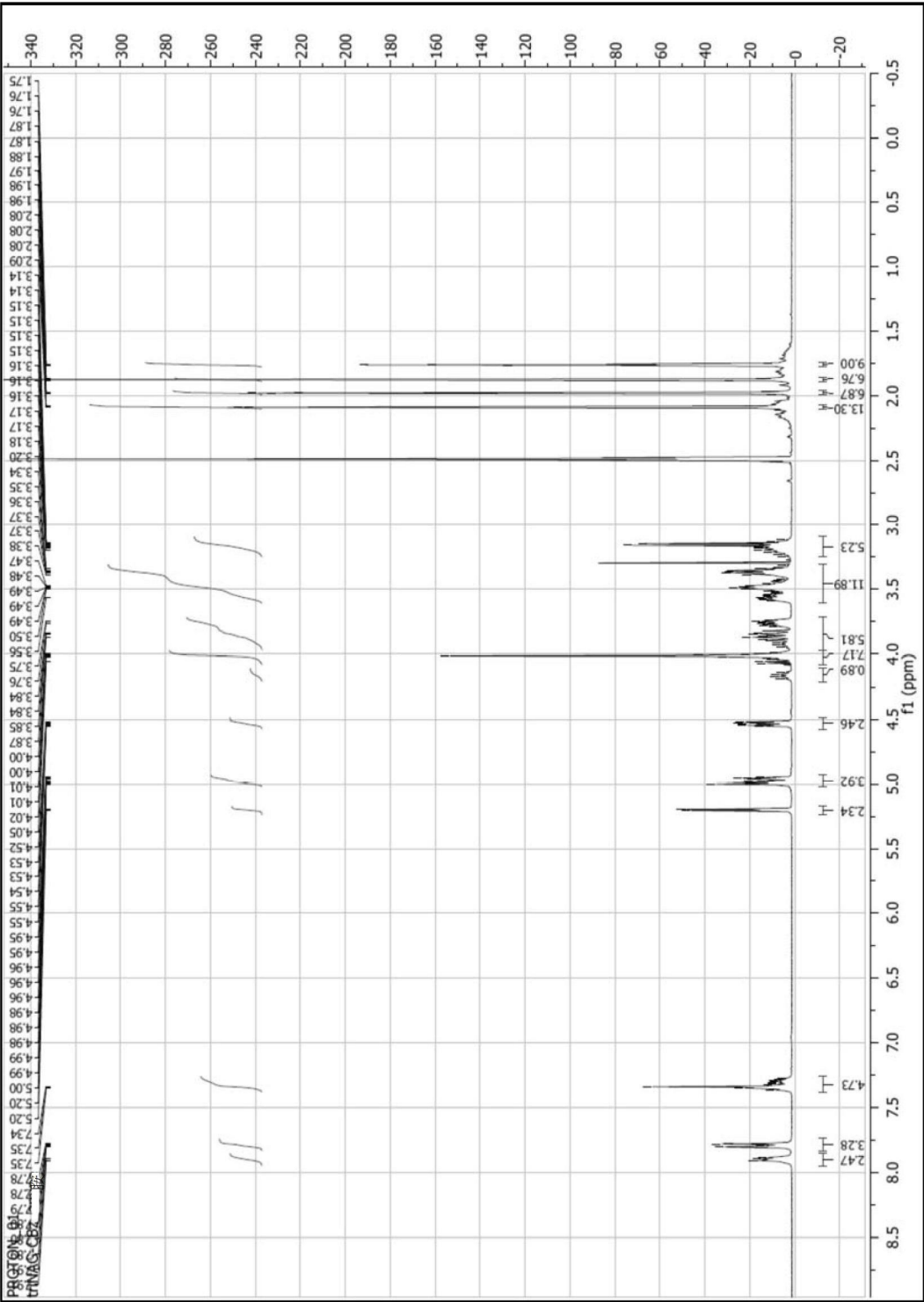
【發明圖式】



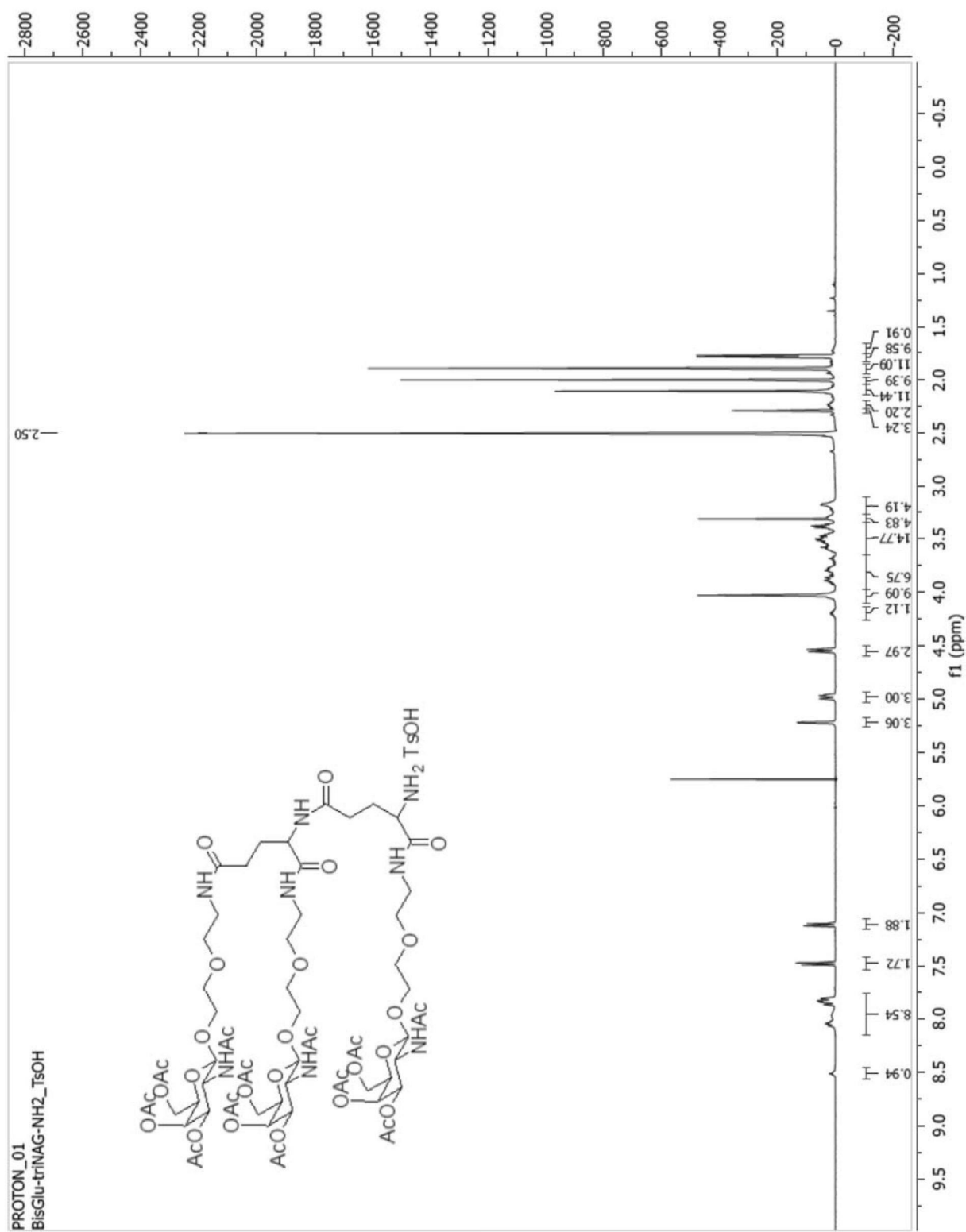
【圖 1】



【圖 2】

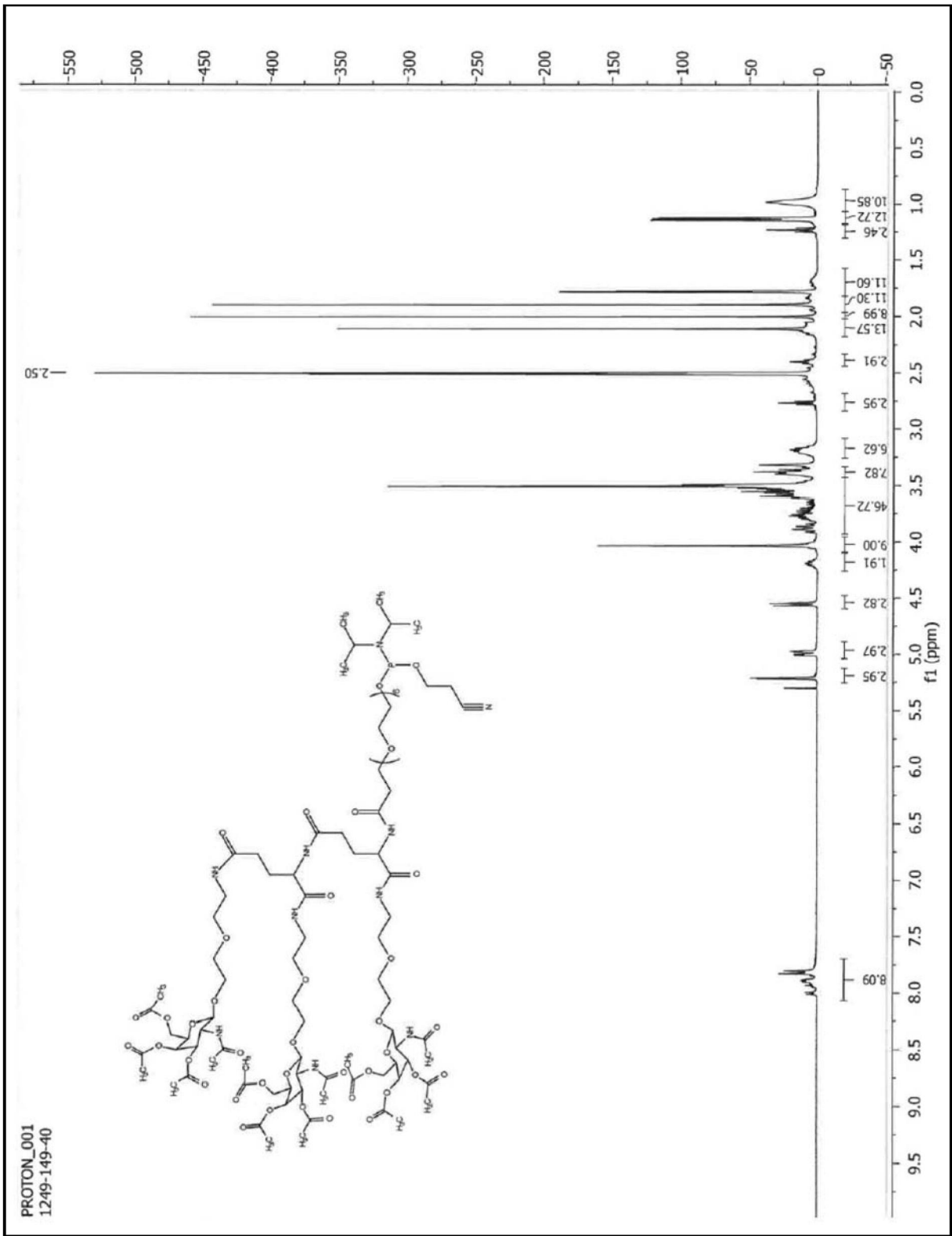


【圖 3】

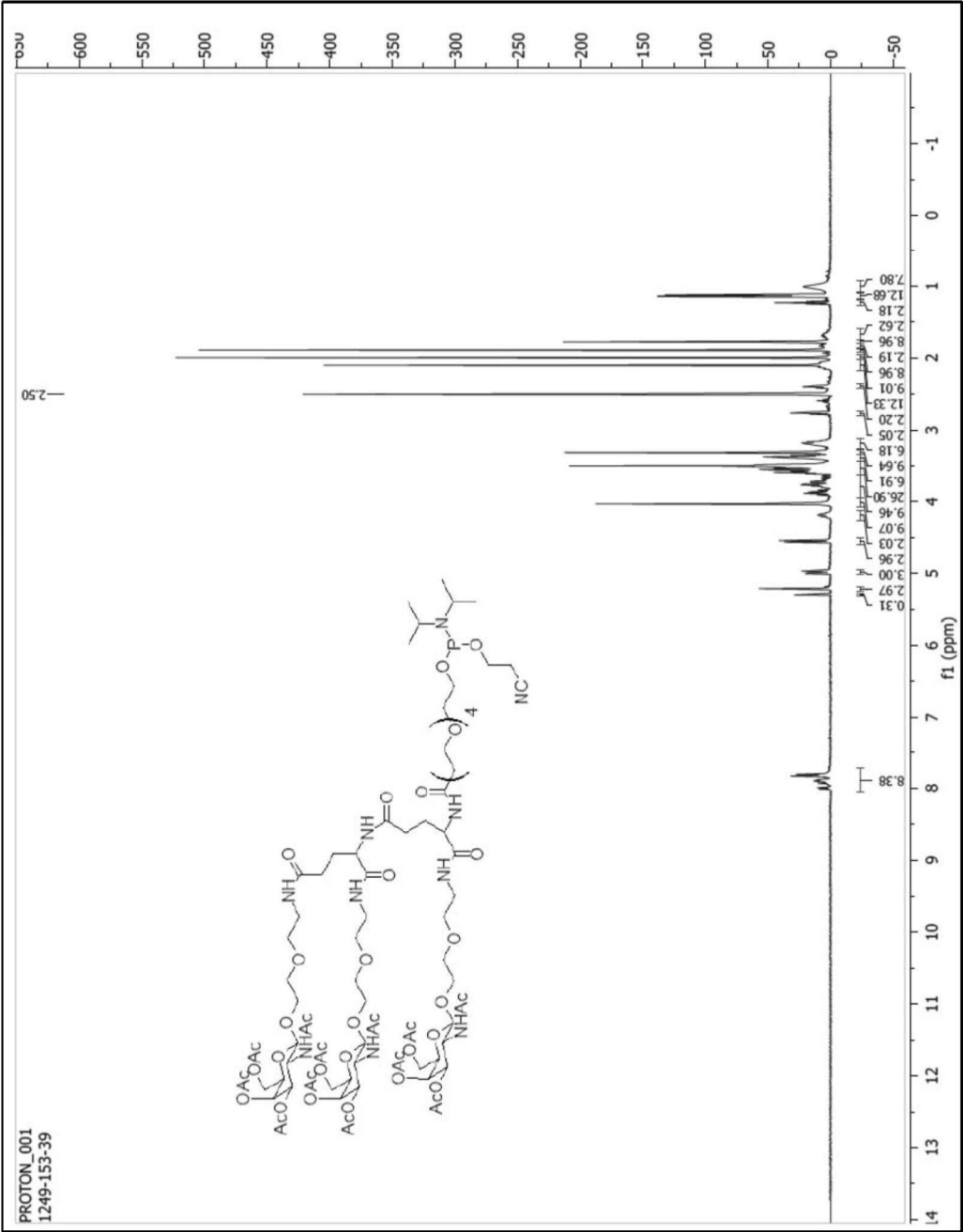


【圖 4】

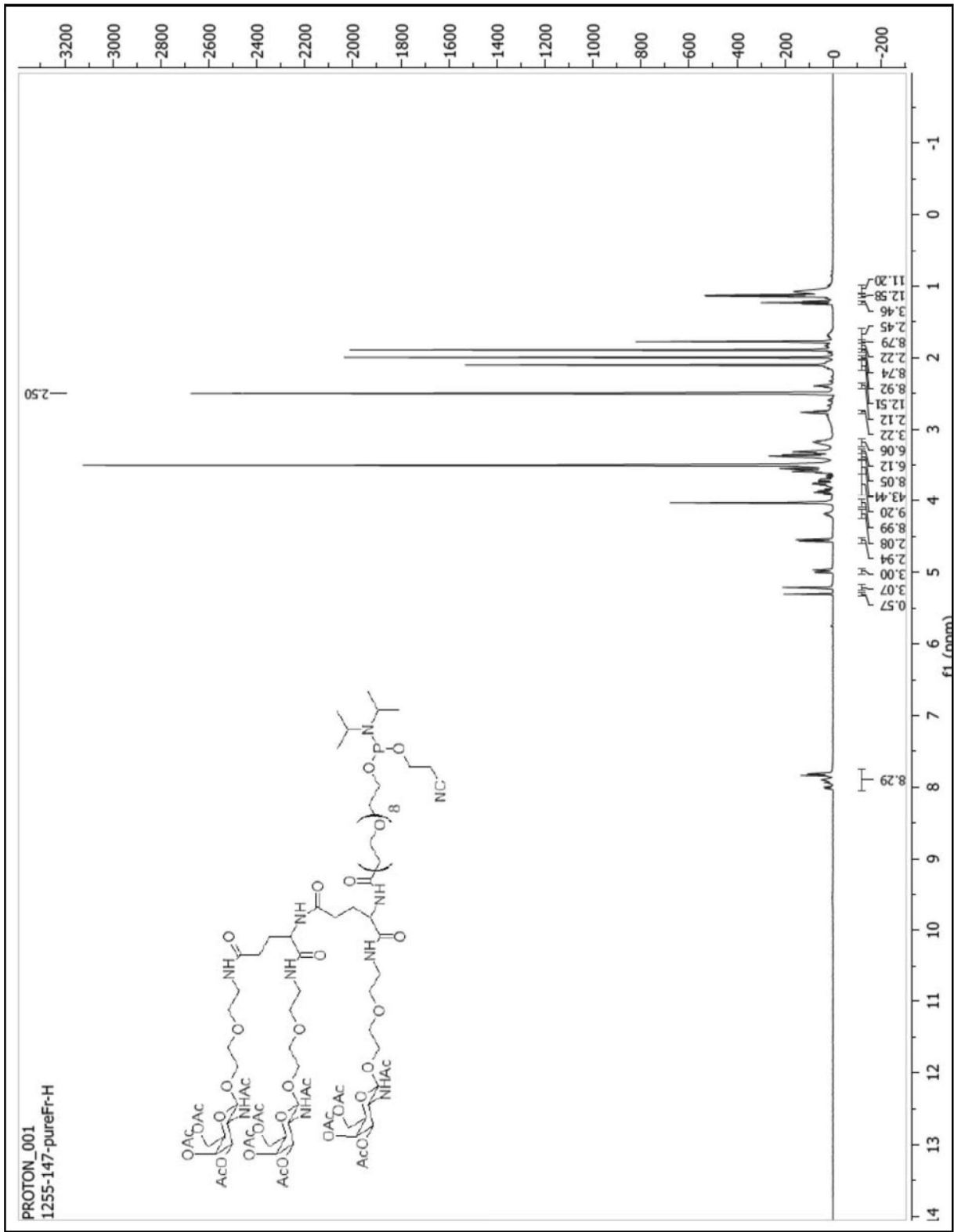
【5回】



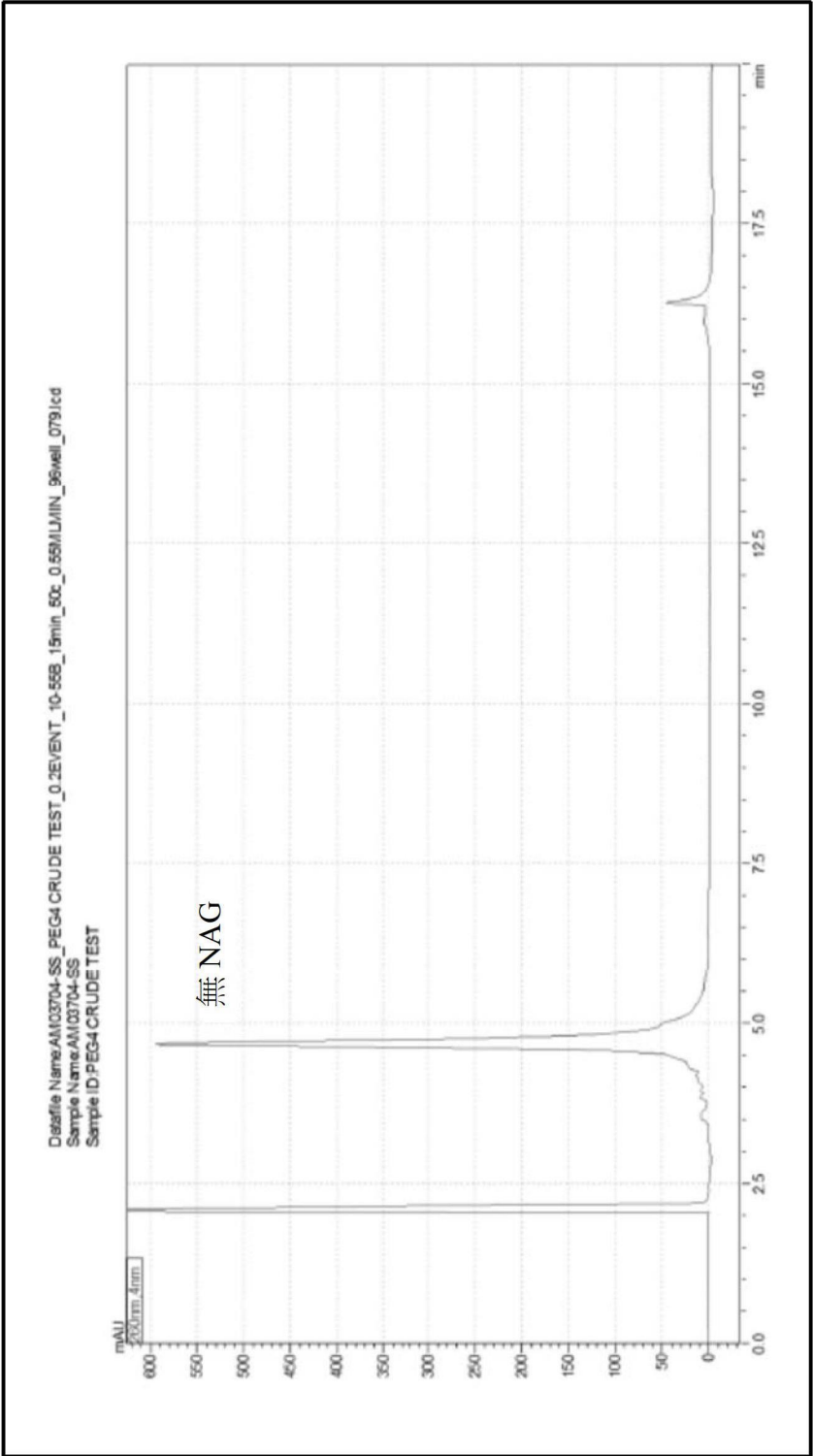
【圖 6】



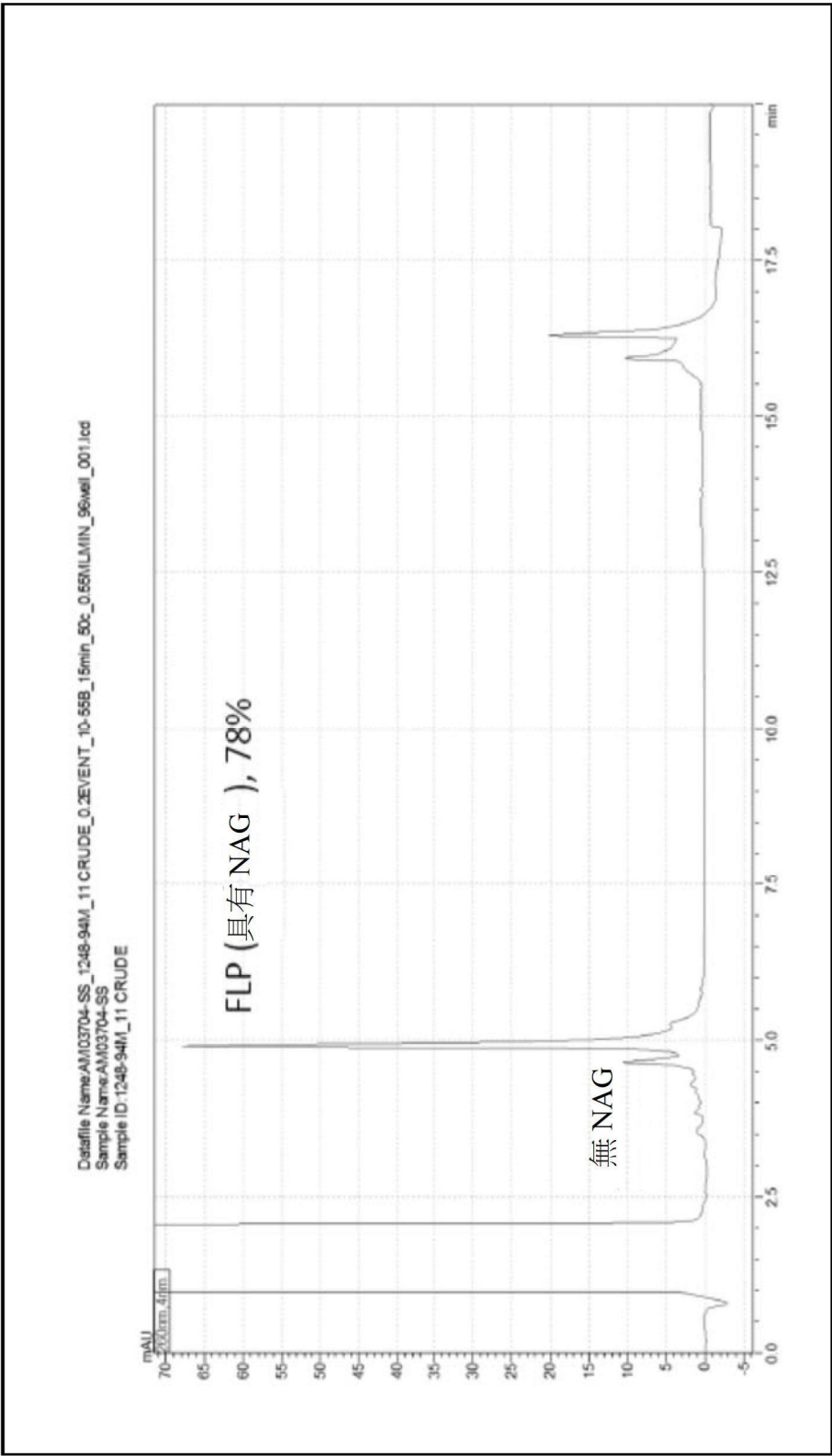
【圖 7】



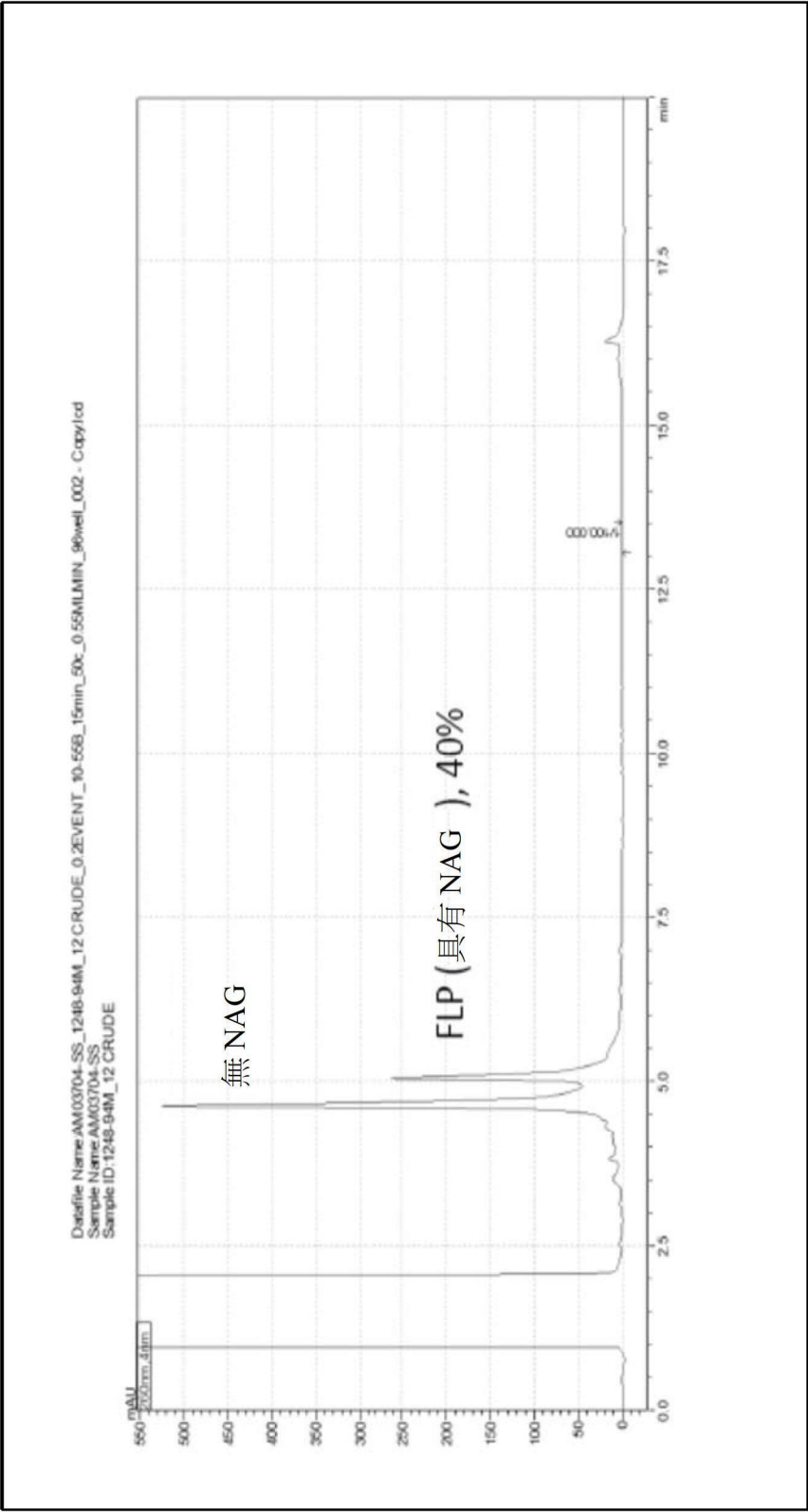
【圖 8】



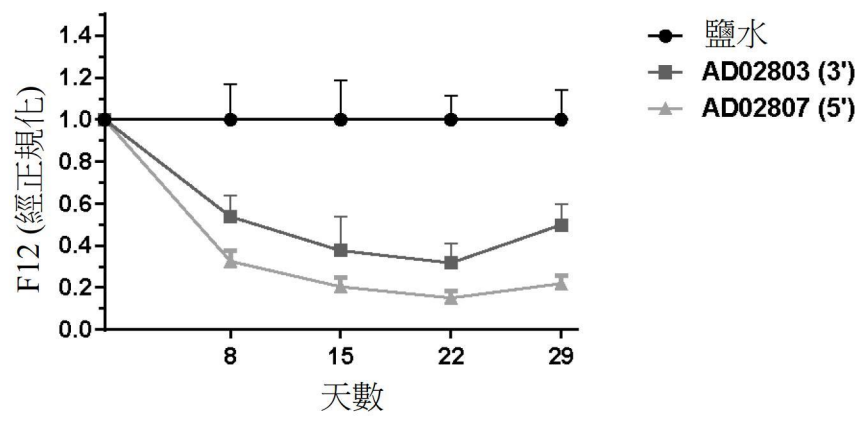
【圖 9】



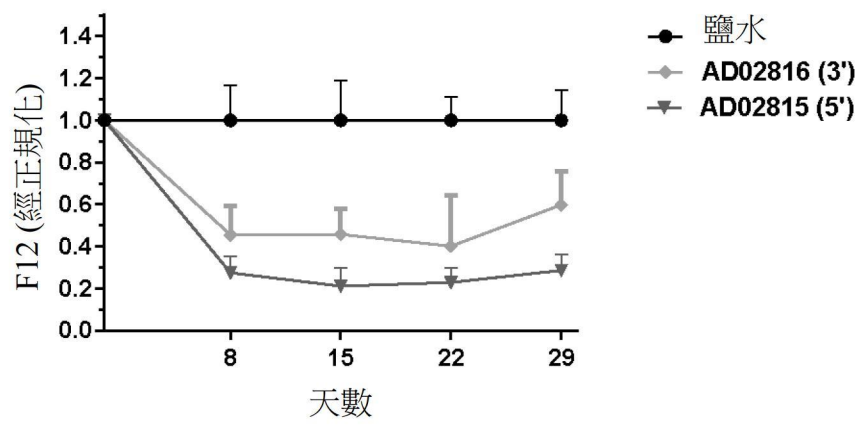
【圖 10】



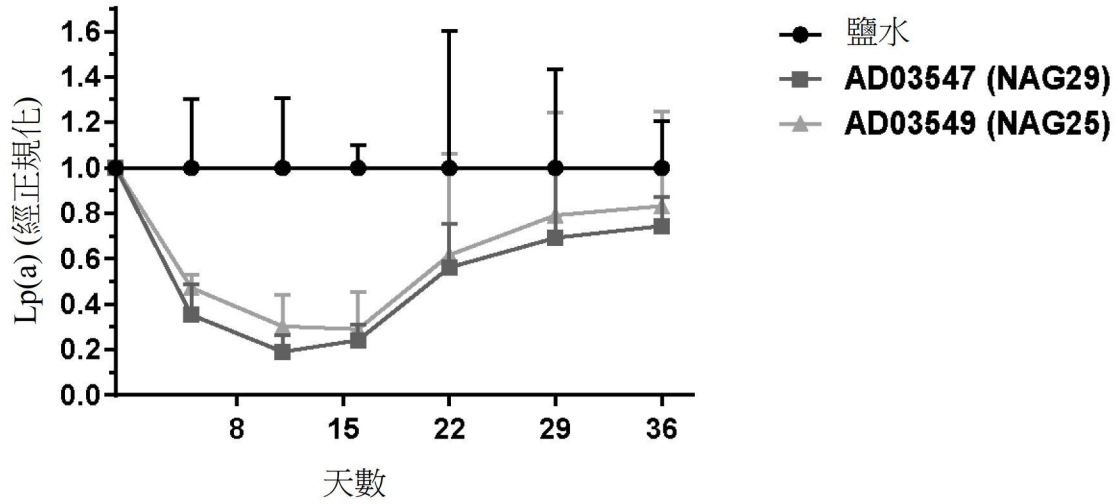
【圖 11】



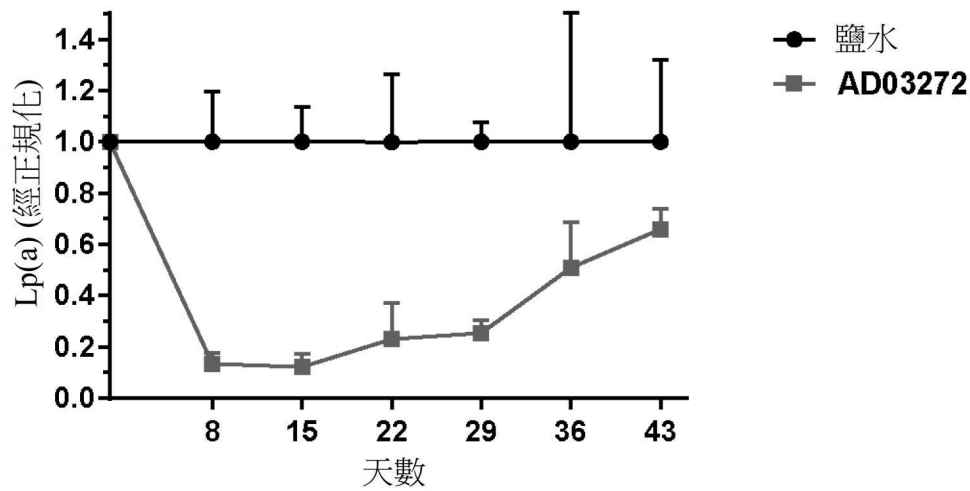
【圖 12】



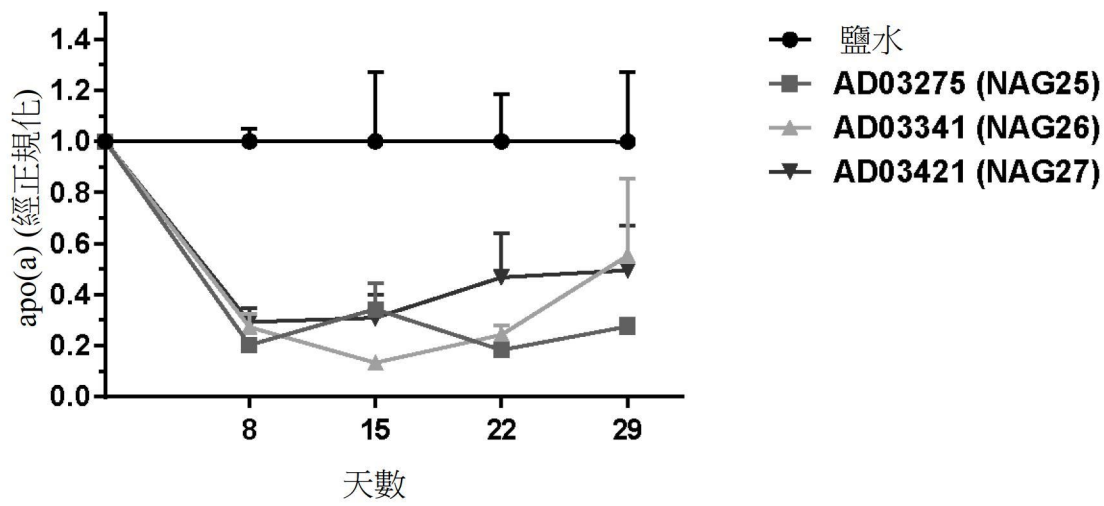
【圖 13】



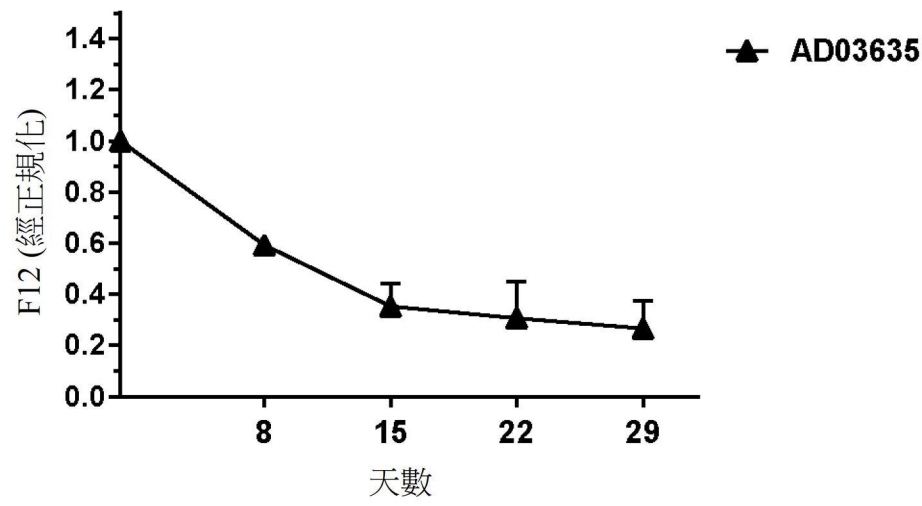
【圖 14】



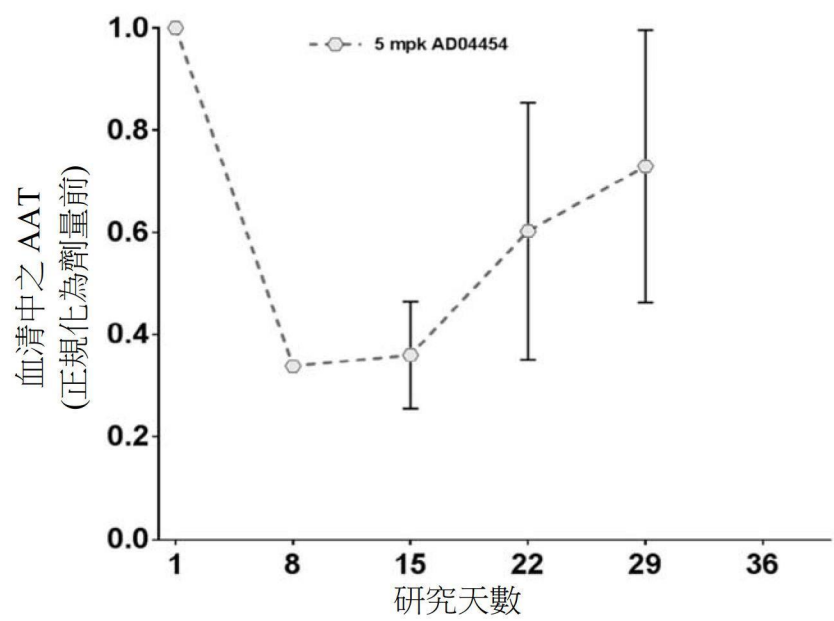
【圖 15】



【圖 16】



【圖 17】



【圖 18】