202421206

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202421206 A

(43)公開日： 中華民國 113 (2024) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：112133947 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 09 月 06 日

(51)Int. Cl.： *A61K48/00 (2006.01)* *A61K31/713 (2006.01)*
A61P27/02 (2006.01)

(30)優先權：2022/09/06 歐洲專利局 22194224.6

(71)申請人：瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士

(72)發明人：柏利卻爾 科雷德 BLEICHER, KONRAD (DE)；方德 艾瑞克 FUNDER, ERIK (DK)；雅各布森 赫勒 JACOBSEN, HELLE (DK)；漢生 丹尼斯 丘爾 HANSEN, DENNIS JUL (DK)；凱勒 麥可 KELLER, MICHAEL (CH)；拉森 茵娜 雅伯多爾夫 LARSEN, INNA APPELDORFF (DK)；桑托斯 費雷拉 提亞戈 法蘭西斯科 SANTOS FERREIR, TIAGO FRANCISCO (PT)；溫舍 洛特 WINTHER, LOTTE (DK)；渥姆 賈斯柏 WORM, JESPER (DK)；威斯 莉娜 WYSS, LENA (CH)

(74)代理人：陳長文；王淑靜；朱淑尹

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：53 項 圖式數：5 共 83 頁

(54)名稱

用於投予至眼睛之雙股ＲＮＡ分子

(57)摘要

本發明涉及與至少一個結合物部分結合之用於局部投予至眼睛的雙股 RNA 分子及其醫藥組成物。該雙股 RNA 分子係與表現於該眼睛中的標靶互補，諸如完全互補，且能夠抑制表現於該眼睛中的標靶之表現。該雙股 RNA 分子可以用於治療該眼睛之病症及疾病。

The present invention relates to double-stranded RNA molecules conjugated to at least one conjugate moiety for topical administration to the eye, and pharmaceutical compositions thereof. The double-stranded RNA molecules are complementary, such as fully complementary, to targets expressed in the eye, and are capable of inhibiting expression of targets expressed in the eye. The double-stranded RNA molecules can be used in the treatment of conditions and diseases of the eye.

指定代表圖：

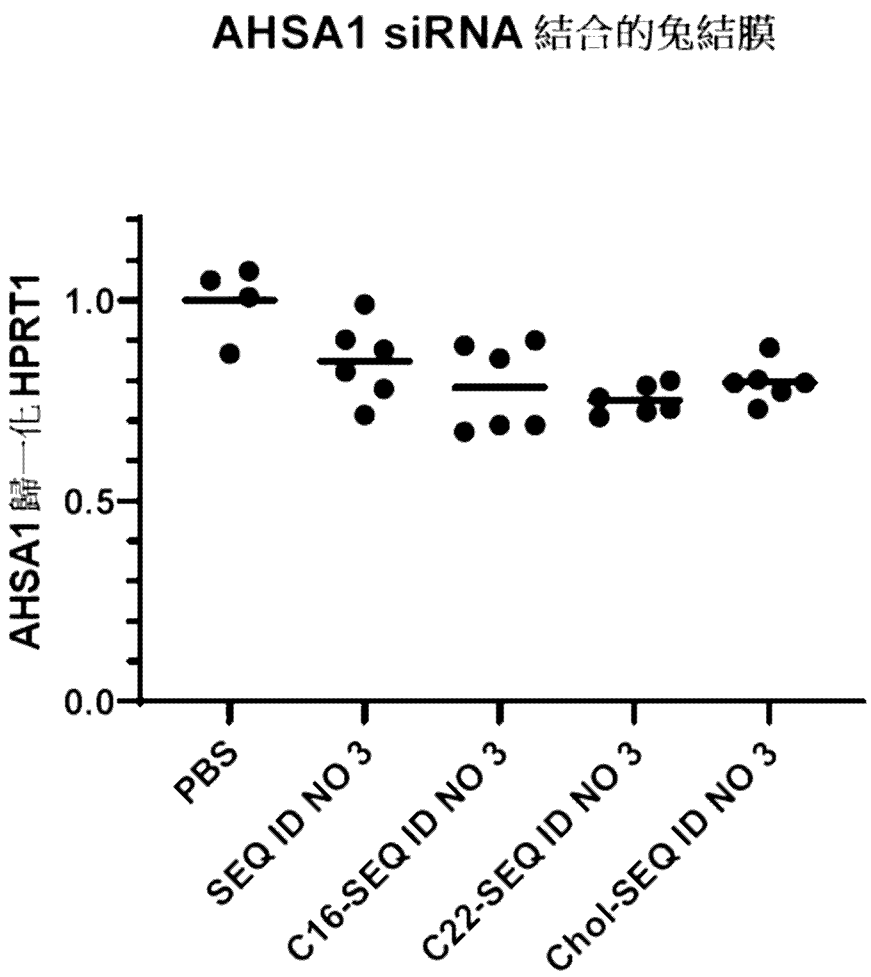

AHSA1 siRNA 結合的兔結膜
AHSA1歸一化HPRT1
1.0
0.5
0.0
PBS
SEQ ID NO 3
C16-SEQ ID NO 3
C22-SEQ ID NO 3
Chol-SEQ ID NO 3

圖 1

202421206

【發明摘要】

【中文發明名稱】　用於投予至眼睛之雙股 RNA 分子

【英文發明名稱】　DOUBLE-STRANDED RNA MOLECULE FOR ADMINISTRATION TO THE EYE

【中文】本發明涉及與至少一個結合物部分結合之用於局部投予至眼睛的雙股 RNA 分子及其醫藥組成物。該雙股 RNA 分子係與表現於該眼睛中的標靶互補，諸如完全互補，且能夠抑制表現於該眼睛中的標靶之表現。該雙股 RNA 分子可以用於治療該眼睛之病症及疾病。

【英文】The present invention relates to double-stranded RNA molecules conjugated to at least one conjugate moiety for topical administration to the eye, and pharmaceutical compositions thereof. The double-stranded RNA molecules are complementary, such as fully complementary, to targets expressed in the eye, and are capable of inhibiting expression of targets expressed in the eye. The double-stranded RNA molecules can be used in the treatment of conditions and diseases of the eye.

【指定代表圖】

圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　用於投予至眼睛之雙股 RNA 分子

【英文發明名稱】　DOUBLE-STRANDED RNA MOLECULE FOR ADMINISTRATION TO THE EYE

【技術領域】

【0001】 本發明涉及與至少一個結合物部分結合之用於局部投予至眼睛的雙股 RNA 分子及其醫藥組成物；及其在治療眼睛病症及疾病中的用途。

【先前技術】

【0002】 雙股 RNA 分子諸如 siRNA 分子可以調節標靶核酸的表現，特別是藉由抑制標靶核酸的表現，藉由在轉錄後與互補 mRNA 結合，通常導致標靶 mRNA 的降解及轉譯損失。

【0003】 siRNA 分子能夠在細胞的細胞質中的經由 RNA 誘導緘默化複合物 (RISC) 誘導 RNA 依賴性基因緘默，其中它們與催化 RISC 組分 argonaute 相互作用。

【0004】 雙股 RNA 分子向組織部位或特定細胞的遞送可被多種因素損害或阻止，此等因素降低雙股 RNA 分子的穩定性或阻止雙股 RNA 分子被有效遞送至其標靶位點。此等因素包括但不限於對內源性 RNA 酶的敏感性、半衰期短及穩定性差、被免疫系統識別、大尺寸及電荷以及內體捕獲。

【0005】 眼睛是遞送過程中面臨特殊挑戰的一個組織位點，它可能受到多種病症、病變及疾病的影響。將雙股 RNA 分子遞送至眼睛可能會產生有益的治療效果，因為雙股 RNA 分子靶向並抑制在眼睛中表現的所關注的基因，這些基因可能參與引起病變。

【0006】 需要一種有效的機制來將雙股 RNA 分子遞送至眼睛。

【發明內容】

【0007】 本發明提供了一種用於局部投予至眼睛之雙股 RNA 分子，其中該雙股 RNA 分子能夠與標靶序列結合，其中該雙股 RNA 分子包含具有 5' 端及 3' 端的第一股，以及具有 5' 端及 3' 端的第二股，其中該第一股係與該第二股互補，其中該第一股包含長度為至少 8 個核苷酸之連續核苷酸序列，該連續核苷酸序列係與標靶序列互補，且其中該雙股 RNA 分子係與至少一個結合物部分結合。

【0008】 在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以為小干擾 RNA (siRNA) 分子。在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以為小髮夾 RNA (shRNA) 分子。

【0009】 在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以能夠抑制標靶的表現。

【0010】 雙股 RNA 分子與至少一個結合物部分結合。在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以與至少兩個或至少三個結合物部分結合。在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以與兩個結合物部分結合。在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以與三個結合物部分結合。

【0011】 在一些實施例中，一或更多個結合物部分可以共價接附至雙股 RNA 分子。

【0012】 在一些實施例中，結合物部分可以為脂肪酸分子或膽固醇分子。

【0013】 在其中存在多於一個結合物部分的實施例中，結合物部分可以為一種或多種脂肪酸分子及一種或多種膽固醇分子的組合，或者可以為兩種或更多種脂肪酸分子的組合，或者可以為兩種或更多種膽固醇分子的組合。在其

中存在多於一個結合物部分的實施例中，各結合物部分係經獨立地選擇，使得接附至雙股 RNA 分子的結合物部分可以相同或可以不相同。

【0014】在一些實施例中，結合物部分可以為脂肪酸分子。

【0015】在一些實施例中，脂肪酸分子係選自由以下所組成之清單：C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、C21、C22、C23、C24、C25、C26、C27、C28、C29、C30、C31、C32、C33、C34、C35、C36、C37、C38、C39 及 C40。

【0016】在一些實施例中，脂肪酸分子可以為 C16。

【0017】在一些實施例中，脂肪酸分子可以為 C22。

【0018】在一些實施例中，脂肪酸分子為支鏈的。在一些實施例中，脂肪酸分子為非支鏈的。

【0019】在一些實施例中，脂肪酸分子為飽和的。在一些實施例中，脂肪酸分子為不飽和的。

【0020】在一些實施例中，脂肪酸分子包含一或更多個雙鍵。在一些實施例中，脂肪酸分子包含二或更多、三或更多、四或更多、五或更多、六或更多、七或更多、八或更多、九或更多、十或更多、十一或更多、十二或更多、十三或更多、十四或更多、十五或更多、十六或更多、十七或更多、十八或更多、或者十九或更多個碳雙鍵。

【0021】在一些實施例中，脂肪酸分子包含一或更多個三鍵。在一些實施例中，脂肪酸分子包含二或更多、三或更多、四或更多、五或更多、六或更多、七或更多、八或更多、九或更多、十或更多、十一或更多、十二或更多、十三或更多、十四或更多、十五或更多、十六或更多、十七或更多、十八或更多、或者十九或更多個碳三鍵。

【0022】在一些實施例中，脂肪酸分子係選自由以下所組成之清單：C3:0；C4:0；C4:1；C5:0；C5:1；C6:0；C6:1；C6:2；C7:0；C7:1；C7:2；C8:0；C8:1；C8:2；C8:3；C9:0；C9:1；C9:2；C9:3；C10:0；C10:1；C10:2；C10:3；C10:4；C11:0；C11:1；C11:2；C11:3；C11:4；C12:0；C12:1；C12:2；C12:3；C12:4；C12:5；C13:0；C13:1；C13:2；C13:3；C13:4；C13:5；C14:0；C14:1；C14:2；C14:3；C14:4；C14:5；C14:6；C15:0；C15:1；C15:2；C15:3；C15:4；C15:5；C15:6；C16:0；C16:1；C16:2；C16:3；C16:4；C16:5；C16:6；C16:7；C17:0；C17:1；C17:2；C17:3；C17:4；C17:5；C17:6；C17:7；C18:0；C18:1；C18:2；C18:3；C18:4；C18:5；C18:6；C18:7；C18:8；C19:0；C19:1；C19:2；C19:3；C19:4；C19:5；C19:6；C19:7；C19:8；C20:0；C20:1；C20:2；C20:3；C20:4；C20:5；C20:6；C20:7；C20:8；C20:9；C21:0；C21:1；C21:2；C21:3；C21:4；C21:5；C21:6；C21:7；C21:8；C21:9；C22:0；C22:1；C22:2；C22:3；C22:4；C22:5；C22:6；C22:7；C22:8；C22:9；C22:10；C23:0；C23:1；C23:2；C23:3；C23:4；C23:5；C23:6；C23:7；C23:8；C23:9；C23:10；C24:0；C24:1；C24:2；C24:3；C24:4；C24:5；C24:6；C24:7；C24:8；C24:9；C24:10；C24:11；C25:0；C25:1；C25:2；C25:3；C25:4；C25:5；C25:6；C25:7；C25:8；C25:9；C25:10；C25:11；C26:0；C26:1；C26:2；C26:3；C26:4；C26:5；C26:6；C26:7；C26:8；C26:9；C26:10；C26:11；C26:12；C27:0；C27:1；C27:2；C27:3；C27:4；C27:5；C27:6；C27:7；C27:8；C27:9；C27:10；C27:11；C27:12；C28:0；C28:1；C28:2；C28:3；C28:4；C28:5；C28:6；C28:7；C28:8；C28:9；C28:10；C28:11；C28:12；C28:13；C29:0；C29:1；C29:2；C29:3；C29:4；C29:5；C29:6；C29:7；C29:8；C29:9；C29:10；C29:11；C29:12；C29:13；C30:0；C30:1；

C30:2；C30:3；C30:4；C30:5；C30:6；C30:7；C30:8；C30:9；C30:10；C30:11；C30:12；C30:13；C30:14；C31:0；C31:1；C31:2；C31:3；C31:4；C31:5；C31:6；C31:7；C31:8；C31:9；C31:10；C31:11；C31:12；C31:13；C31:14；C32:0；C32:1；C32:2；C32:3；C32:4；C32:5；C32:6；C32:7；C32:8；C32:9；C32:10；C32:11；C32:12；C32:13；C32:14；C32:15；C33:0；C33:1；C33:2；C33:3；C33:4；C33:5；C33:6；C33:7；C33:8；C33:9；C33:10；C33:11；C33:12；C33:13；C33:14；C33:15；C34:0；C34:1；C34:2；C34:3；C34:4；C34:5；C34:6；C34:7；C34:8；C34:9；C34:10；C34:11；C34:12；C34:13；C34:14；C34:15；C34:16；C35:0；C35:1；C35:2；C35:3；C35:4；C35:5；C35:6；C35:7；C35:8；C35:9；C35:10；C35:11；C35:12；C35:13；C35:14；C35:15；C35:16；C36:0；C36:1；C36:2；C36:3；C36:4；C36:5；C36:6；C36:7；C36:8；C36:9；C36:10；C36:11；C36:12；C36:13；C36:14；C36:15；C36:16；C36:17；C37:0；C37:1；C37:2；C37:3；C37:4；C37:5；C37:6；C37:7；C37:8；C37:9；C37:10；C37:11；C37:12；C37:13；C37:14；C37:15；C37:16；C37:17；C38:0；C38:1；C38:2；C38:3；C38:4；C38:5；C38:6；C38:7；C38:8；C38:9；C38:10；C38:11；C38:12；C38:13；C38:14；C38:15；C38:16；C38:17；C38:18；C39:0；C39:1；C39:2；C39:3；C39:4；C39:5；C39:6；C39:7；C39:8；C39:9；C39:10；C39:11；C39:12；C39:13；C39:14；C39:15；C39:16；C39:17；C39:18；C40:0；C40:1；C40:2；C40:3；C40:4；C40:5；C40:6；C40:7；C40:8；C40:9；C40:10；C40:11；C40:12；C40:13；C40:14；C40:15；C40:16；C40:17；C40:18；C40:19。

【0023】在其中存在多於一種脂肪酸分子的實施例中，各脂肪酸分子係經獨立地選擇，使得接附至雙股 RNA 分子的脂肪酸分子可以相同或可以不相同。

【0024】在一些實施例中，結合物部分可以為膽固醇分子。

【0025】在一些實施例中，膽固醇分子可以係選自由以下所組成之群組：3'-膽固醇基-TEG CPG、5'-膽固醇-TEG-CE 亞磷醯胺、5'-膽固醇-CE 亞磷醯胺及膽固醇基-TEG-CE 亞磷醯胺。在其中存在多於一個膽固醇部分的實施例中，膽固醇部分可以為選自由以下所組成之群組的組合：3'-膽固醇基-TEG CPG、5'-膽固醇-TEG-CE 亞磷醯胺、5'-膽固醇-CE 亞磷醯胺及膽固醇基-TEG-CE 亞磷醯胺。

【0026】在其中存在多於一種膽固醇分子的實施例中，各膽固醇分子係經獨立地選擇，使得接附至雙股 RNA 分子的膽固醇分子可以相同或可以不相同。

【0027】在其中存在多於一個結合物部分的實施例中，結合物部分可以為選自 C16、C22 或膽固醇分子的一者或多者的組合。

【0028】在一些實施例中，結合物部分可以位於雙股 RNA 分子的股中之一條股的 5' 端或 3' 端。在一些實施例中，結合物部分可以位於雙股 RNA 分子之第一股的 3' 端。第一股可以處於有義定向 (亦即第一股為有義股)。在一些實施例中，結合物部分可以位於雙股 RNA 分子之有義股的 3' 端。

【0029】在一些實施例中，連接子可以位於雙股 RNA 分子與結合物部分之間。在一些實施例中，連接子可以為 C6。在一些實施例中，連接子可以為 TEG。在一些實施例中，連接子為二核苷酸。在一些實施例中，二核苷酸為 CA (換言之，在一些實施例中連接子為 CA 二核苷酸)。

【0030】在其中雙股 RNA 分子包含多於一個結合物部分的一些實施例中，連接子可以位於雙股 RNA 分子與結合物部分中之各者之間。在一些實施例中，連接子可以位於結合物部分中之各者之間。

【0031】在一些實施例中，連接子可為可截切連接子。

【0032】在一些實施例中，連續核苷酸序列長度為至少 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 個核苷酸。

【0033】在一些實施例中，連續核苷酸序列長度可以為至少 20 個核苷酸。在一些實施例中，連續核苷酸序列長度可以為 20、21、22、23 或 24 個核苷酸。

【0034】在一些實施例中，第一股可以由連續核苷酸序列組成。

【0035】在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以用於投予至眼睛的前部。

【0036】在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以用於投予至眼睛的結膜或眼睛的角膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以用於投予至眼球結膜、眼瞼結膜、眼結膜及/或穹窿結膜。

【0037】在一些實施例中，連續核苷酸序列可以與標靶序列至少約 75% 互補。連續核苷酸序列可以與標靶序列至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 95% 或完全 (諸如約 100%) 互補。在一些實施例中，連續核苷酸序列可以包含相對於標靶序列之 1、2、3、4、5、6、7、8 個或更多個錯配。

【0038】在一些實施例中，標靶可以為 AHA-1。在一些實施例中，AHA-1 標靶可以包含以下或由以下組成：SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2。

【0039】在一些實施例中，連續核苷酸序列可以與 AHA-1 標靶序列互補。在一些實施例中，連續核苷酸序列可以包含與 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 互補的核苷酸序列。在一些實施例中，連續核苷酸序列可以包含以下或由以下組成：SEQ ID NO: 3。

【0040】在一些實施例中，與對照相比，標靶的表現可被抑制約 10%、約 15%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約

55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 95% 或約 100%。應當理解，上文提到的標靶表現的 % 抑制將為相對於對照的 % 降低，其中術語「對照」係指未暴露於本發明之雙股 RNA 分子的細胞中標靶之表現。

【0041】 在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以包含一或更多個修飾核苷。一或更多個修飾核苷可以為獨立地選自由以下所組成之群組的一或更多個 2' 糖修飾核苷：2'-O-烷基-RNA；2'-O-甲基 RNA (2'-OMe)；2'-O-甲氧基乙基-RNA (2'-MOE)、2'-烷氧基-RNA；2'-胺基-DNA；2'-氟-RNA；2'-氟-DNA；阿拉伯糖核酸 (ANA)；2'-氟-ANA；鎖核酸 (LNA)，及其任何組合。在一些實施例中，2' 糖修飾之核苷可為親和力增強型 2' 糖修飾之核苷。

【0042】 在一些實施例中，位於連續核苷酸序列上的核苷之間的核苷間鍵結中之一者或多者可以係經修飾的。在一些實施例中，位於連續核苷酸序列上的核苷之間的核苷間鍵結中之至少約 75%、至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 95% 或約 100% 可以係經修飾的。

【0043】 在一些實施例中，經修飾的核苷間鍵結中之一者或多者或全部可以包含硫代磷酸酯鍵結。在一些實施例中，存在於雙股 RNA 分子中之所有核苷間鍵結可以為硫代磷酸酯核苷間鍵結。

【0044】 在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子可以呈醫藥上可接受之鹽的形式。該醫藥上可接受之鹽可以為鈉鹽或鉀鹽。

【0045】 雙股 RNA 分子可以為分離的雙股 RNA 分子或純化的雙股 RNA 分子。在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子是製造的 (人造的) 雙股 RNA 分子。

【0046】 本發明亦提供一種醫藥組成物，該醫藥組成物包含本發明之雙股 RNA 分子以及醫藥上可接受之稀釋劑、溶劑、載劑、鹽及/或佐劑。

【0047】本發明亦提供一種治療或預防個體之疾病的方法，其包含向有此需要之個體投予治療或預防有效量之如本發明之雙股 RNA 分子或如本發明之醫藥組成物。

【0048】本發明亦提供如本發明之雙股 RNA 分子或如本發明之醫藥組成物，其用為藥物在治療疾病中使用。

【0049】本發明亦提供如本發明之雙股 RNA 分子或如本發明之醫藥組成物用於製備醫藥之用途，該醫藥用於治療或預防疾病。

【0050】在一些實施例中，疾病可以為結膜炎、乾眼症或炎症。

【0051】在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以每天一次、每天兩次、每天三次或每天多於三次投予至眼睛。

【0052】在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以投予持續少於一天或持續一天、兩天、三天、四天、五天、六天、七天或多於七天。

【0053】在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以投予持續一段時間：

(i) 一週、兩週、三週、四週、五週、六週或多於六週；或者

(ii) 一個月、兩個月、三個月、四個月、五個月、六個月或多於 6 個月；或者

(iii) 一年、兩年、三年、四年、五年或多於五年。

【0054】在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以投予至一隻眼睛或雙眼。

【0055】本發明亦提供一種調節細胞中標靶之表現的*活體外*方法，該方法包含以有效量向細胞投予本發明之雙股 RNA 分子或本發明之醫藥組成物。

【圖式簡單說明】

【0056】

圖 1 - 最後一次給藥後 96 小時，兔眼瞼結膜樣本中 AHSA1 表現標準化為 HPRT。對於包含 SEQ ID NO: 3 的序列的 siRNA 分子，在整個結膜中觀察到

20-25% 的敲低，與裸 (亦即未結合的 siRNA) siRNA 相比，與 C16-、C22-以及膽固醇結合的 AHSA1 siRNA 具有更優異的敲低。

圖 2：最後一次給藥後 96 小時，兔眼結膜樣本中 AHSA1 siRNA 含量。對於包含 SEQ ID NO: 3 的序列的 siRNA 分子，在結膜中觀察到增加的含量，與裸 (亦即未結合的 siRNA) siRNA 相比，與 C16-、C22-以及特別是膽固醇結合的 AHA1 siRNA 具有更優異的含量。

圖 3.最後一次給藥後 96 小時，EYEPRIM 兔眼球結膜樣本中 AHSA1 表現標準化為 HPRT。將 EYEPRIM 結膜樣品中的 69% 敲低 (C16 結合的 SEQ ID NO: 3)、65% 敲低 (C22 結合的 SEQ ID NO: 3) 及 61% 敲低 (膽固醇結合的 SEQ ID NO: 3) 與裸 (亦即未結合的 siRNA) siRNA (SEQ ID NO: 3 (無結合)) 之 4% 進行比較，與裸 siRNA 相比，與 C16- 結合的具有顯著優異的敲低 (p=0.02 學生 t 檢驗) 以及與 C22- 及膽固醇結合的 AHSA1 siRNA 具有更優異的敲低。

圖 4.不同的脂肪酸結合的 AHA-1 特異性 siRNAs (FA-siRNA) 之生物物理學分析第 3 列顯示了不同脂肪酸結合物在 25 μM 濃度下以不同寡聚態存在的傾向 (通過 AUC 測量的最終寡聚態)；第 4 列顯示了不同 FA-siRNA 在 25 μM PBS 中溶解時的單體百分比；第 5 列顯示了與小鼠血清白蛋白 (MSA；由 ITC 測定) 的結合親和力；第 6 列顯示了與 MSA 結合的 FA-siRNA 結合物的數量。

圖 5.對於包含 SEQ ID NO: 3 的序列的裸 siRNA 分子、包含 SEQ ID NO: 3 的序列的 C16 結合的 siRNA 分子、包含 SEQ ID NO: 3 的序列的 C22 結合的 siRNA 分子及包含 SEQ ID NO: 3 的序列的膽固醇結合的 siRNA 分子，觀察到結膜組織 ISH 染色，表明與裸 AHSA1 siRNA 相比，C16、C22 及膽固醇 AHSA1 siRNA 具有更優異的敲低，而與裸及膽固醇 AHSA1 siRNA 相比，C16 及 C22 AHAS1 siRNA 顯示出最優異的結果。此外，裸 AHSA1 siRNA 的染色主要位於

結膜淺層，而 C16、C22 和膽固醇 AHSA1 siRNA 的染色也位於結膜組織基質中。

【實施方式】

序列表

【0057】 隨本申請呈送的序列表藉由引用方式併入本文。

【0058】 核酸分子

【0059】 本文所用的術語「核酸分子」或「治療性核酸分子」的定義如同具有通常技術者所知，係指包含兩個或多個共價連結核苷的分子 (亦即核苷酸序列)。

【0060】 本發明中提到的核酸分子通常為長度低於 50 個核苷酸的治療性寡核苷酸。

【0061】 如本文所用，術語「多核苷酸」、「核苷酸」、「核酸」、「核酸分子」及「核酸序列」旨在彼此同義。

【0062】 核酸分子通常在實驗室中製作，先經固相化學合成後再加以純化及分離。提及核酸分子的序列時，是指共價連結核苷酸或核苷的核鹼基部分或其修飾的序列或順序。本發明之核酸分子為人造的，且為化學合成的，通常經過純化或分離。本發明之核酸分子可以包含一或更多個經修飾核苷或核苷酸。

【0063】 本發明之核酸分子可以包含一或更多個經修飾核苷，諸如 2' 糖修飾核苷。本發明之核酸分子可以包含一或更多個經修飾的核苷間鍵結，諸如一或更多個硫代磷酸酯核苷間鍵結。

【0064】 寡核苷酸

【0065】 如本文所用，術語「寡核苷酸」一詞的定義如同具有通常技術者所知，係指包含兩個或多個共價連結核苷的分子。該等共價鍵結核苷亦可稱為核酸分子或寡聚物。

【0066】 雙股 RNA 分子

【0067】 本文中，術語「RNA 干擾 (RNAi) 分子」、「RNAi 分子」或「RNAi」係指能夠在細胞的細胞質中經由 RNA 誘導緘默化複合物 (RISC) 誘導 RNA 依賴性基因緘默的短的、通常雙股的 RNA 分子，其中它們與催化 RISC 組分 argonaute 相互作用。RNAi 分子的一種類型是小干擾 RNA (siRNA)，它是一種典型的雙股 RNA 分子，藉由在轉錄後與互補 mRNA 結合，通常導致 mRNA 的降解及轉譯損失。換言之，本文使用的術語「siRNA 分子」定義為能夠藉由與標靶核酸、特別是與標靶核酸上的連續序列結合來調節標靶表現的核酸分子。siRNA 分子的長度通常為 20-24 個鹼基對，並且通常具有磷酸化的 5' 端及帶有兩個突出的核苷酸的羥基化的 3' 端。小干擾 RNA (siRNA) 也可稱為短干擾 RNA 或緘默 RNA。

【0068】 在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子可以為小干擾 RNA (siRNA) 分子。

【0069】 本發明之雙股 RNA 分子包含具有 5' 端及 3' 端的第一股，以及具有 5' 端及 3' 端的第二股，其中第一股與第二股互補。

【0070】 雙股 RNA 分子可以描述為包含有義股及反義股。

【0071】 在一些實施例中，第一股可以為有義股 (亦即處於有義定向) 並且第二股可以為反義股 (亦即處於反義定向)。

【0072】 在一些實施例中，第一股可以為反義股 (亦即處於反義定向) 並且第二股可以為有義股 (亦即處於有義定向)。

【0073】另一種類型的 RNAi 分子是小髮夾 RNA (shRNA)，它是一種具有髮夾結構的人工 RNA 分子，在表現時能夠經由 DICER 及 RNA 減少緘默化複合物 (RISC) 來降低標靶 mRNA 的水平。小髮夾 RNA (shRNA) 也可稱為短髮夾 RNA。在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子可以為小髮夾 RNA (shRNA) 分子。

【0074】RNAi 分子可以基於所關注的基因的 RNA 序列進行設計。然後對應的 RNAi 分子可以化學合成或藉由*活體外*轉錄合成，或者從載體或 PCR 產物表現。

【0075】siRNA 及 shRNA 分子的長度通常在 20 至 50 個核苷酸之間，諸如長度在 25 至 35 個核苷酸之間，並且可以與被稱為 Dicer 的核酸內切酶相互作用，該核酸內切酶被認為將 dsRNA 處理成 19-23 個鹼基對短干擾 RNA (siRNA) (具有特徵性的兩個鹼基 3' 突出)，然後將該 siRNA 整合到 RNA 誘導的緘默化複合物 (RISC) 中。Dicer 底物的有效延伸形式已描述於 US 8,349,809 及 US 8,513,207 中，其藉由引用併入本文。與適當的標靶 mRNA 結合後，RISC 內的一種或多種核酸內切酶切割標靶以誘導緘默。RNAi 劑可以使用經修飾的核苷酸間連結及高親和力核苷進行化學修飾，諸如 2'-4' 雙環核糖修飾核苷，包括 LNA 及 cET。

【0076】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為約 8 至 50 個核苷酸。

【0077】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為約 12 至 50 個核苷酸，諸如約 15 至 45 個，諸如約 20 至 40 個，諸如約 25 至 35 個連續核苷酸。

【0078】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為約 18-25 個核苷酸。在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下

所組成：長度為約 18-30 個核苷酸。在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為約 18-35 個核苷酸。在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為約 20-25 個核苷酸。在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為約 20-30 個核苷酸。在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為約 20-35 個核苷酸。應知在本文中給定之所有範圍均包括範圍端點。據此，若雙股 RNA 分子包括 10 至 30 個核苷酸，則約 10 及約 30 個核苷酸的長度均包含在內。

【0079】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：約 50 個或更少的核苷酸、約 45 個或更少的核苷酸、約 40 個或更少的核苷酸、約 35 個或更少的核苷酸、約 30 個或更少的核苷酸、約 25 個或更少的核苷酸、約 20 個或更少的核苷酸，或者約 15 個或更少的核苷酸。

【0080】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：約 10 個或更多個核苷酸、約 15 個或更多個核苷酸、約 20 個或更多個核苷酸、約 25 個或更多個核苷酸、約 30 個或更多個核苷酸、約 35 個或更多個核苷酸、約 40 個或更多個核苷酸，或者約 45 個或更多個核苷酸。

【0081】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 個核苷酸。

【0082】在一些實施例中，雙股 RNA 分子長度可以為至少約 20 個核苷酸。雙股 RNA 分子長度可以為 20、21、22、23 或 24 個核苷酸。

【0083】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 18 個核苷酸。

【0084】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 19 個核苷酸。

【0085】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 20 個核苷酸。

【0086】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 21 個核苷酸。

【0087】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 22 個核苷酸。

【0088】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 23 個核苷酸。

【0089】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 24 個核苷酸。

【0090】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 25 個核苷酸。

【0091】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 26 個核苷酸。

【0092】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 27 個核苷酸。

【0093】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 28 個核苷酸。

【0094】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 29 個核苷酸。

【0095】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 30 個核苷酸。

【0096】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 31 個核苷酸。

【0097】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 32 個核苷酸。

【0098】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 33 個核苷酸。

【0099】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 34 個核苷酸。

【0100】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 35 個核苷酸。

【0101】雙股 RNA 分子與動物眼睛、特別是哺乳動物眼睛中表現的標靶核酸結合。在一些實施例中，雙股 RNA 分子通常用於抑制及/或調節在眼睛中表現的標靶核酸序列的表現。

【0102】**連續核苷酸序列**

【0103】術語「連續核苷酸序列」係指雙股 RNA 分子的與標靶核酸互補的區域，該連續核苷酸序列可以為或可以包含寡核苷酸模體序列。該術語在本文中與術語“連續核鹼基序列”可互換使用。

【0104】雙股 RNA 分子的股中之一條股包含連續核苷酸序列或由連續核苷酸序列組成。在一些實施例中，第一股包含連續核苷酸序列或由連續核苷酸序列組成。在一些實施例中，第二股包含連續核苷酸序列或由連續核苷酸序列組成。

【0105】在一些實施例中，包含連續核苷酸序列或由連續核苷酸序列組成的雙股 RNA 分子的股，可視情況包含進一步的核苷酸，例如可用於將官能

基團 (例如，結合物基團) 接附至該連續核苷酸序列之核苷酸連接子區域。所述核苷酸連接子區域可與標靶核酸互補或不互補。

【0106】 應理解，連續核苷酸序列不能比雙股 RNA 分子 (或其股) 本身更長，並且雙股 RNA 分子 (或其股) 不能比連續核苷酸序列更短。

【0107】 在一些實施例中，雙股 RNA 分子的第一股或第二股的所有核苷可構成連續核苷酸序列。

【0108】 連續核苷酸序列係本發明之雙股 RNA 分子的第一股或第二股中與標靶核酸、標靶序列或標靶位點序列互補並且在某些情況下完全互補之核苷酸序列。

【0109】 在一些實施例中，連續核苷酸序列長度為約 8 至 50 個核苷酸。

【0110】 在一些實施例中，本發明之連續核苷酸序列長度可以包含或由以下各項組成：長度為約 12 至 50 個核苷酸，諸如約 15 至 45 個，諸如約 20 至 40 個，諸如約 25 至 35 個連續核苷酸。

【0111】 在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為約 18-25 個核苷酸。在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為約 18-30 個核苷酸。在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為約 18-35 個核苷酸。在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為約 20-25 個核苷酸。在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為約 20-30 個核苷酸。在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為約 20-35 個核苷酸。應知在本文中給定之所有範圍均包括範圍端點。據此，若連續核苷酸序列包括 10 至 30 個核苷酸，則約 10 及約 30 個核苷酸均包含在內。

【0112】 在一些實施例中，連續核苷酸序列可以包含或由以下各項組成：約 50 個或更少的核苷酸、約 45 個或更少的核苷酸、約 40 個或更少的核

苷酸、約 35 個或更少的核苷酸、約 30 個或更少的核苷酸、約 25 個或更少的核苷酸、約 20 個或更少的核苷酸，或者約 15 個或更少的核苷酸。

【0113】在一些實施例中，連續核苷酸序列可以包含或由以下各項組成：約 10 個或更多個核苷酸、約 15 個或更多個核苷酸、約 20 個或更多個核苷酸、約 25 個或更多個核苷酸、約 30 個或更多個核苷酸、約 35 個或更多個核苷酸、約 40 個或更多個核苷酸，或者約 45 個或更多個核苷酸。

【0114】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 個核苷酸。

【0115】在一些實施例中，連續核苷酸序列長度為至少約 20 個核苷酸。連續核苷酸序列長度可以為 20、21、22、23 或 24 個核苷酸。

【0116】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 18 個核苷酸。

【0117】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 19 個核苷酸。

【0118】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 20 個核苷酸。

【0119】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 21 個核苷酸。

【0120】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 22 個核苷酸。

【0121】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 23 個核苷酸。

【0122】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 24 個核苷酸。

【0123】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 25 個核苷酸。

【0124】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 26 個核苷酸。

【0125】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 27 個核苷酸。

【0126】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 28 個核苷酸。

【0127】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 29 個核苷酸。

【0128】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 30 個核苷酸。

【0129】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 31 個核苷酸。

【0130】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 32 個核苷酸。

【0131】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 33 個核苷酸。

【0132】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 34 個核苷酸。

【0133】在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：長度為 35 個核苷酸。

【0134】在一些實施例中，連續核苷酸序列與雙股 RNA 分子的第一股及/或第二股長度相同。

【0135】在一些實施例中，雙股 RNA 分子的第一股或第二股由連續核苷酸序列組成。

【0136】在一些實施例中，雙股 RNA 分子的第一股或第二股為連續的核苷酸序列。

【0137】**結合物部分**

【0138】本發明人已經鑑定，能夠結合標靶序列的雙股 RNA 分子可以藉由將雙股 RNA 分子結合至至少一個結合物部分來有效地投予至眼睛。

【0139】如實例中所示，將本發明之雙股 RNA 分子投予至眼睛可以抑制標靶，特別是在眼睛中表現的標靶的表現。

【0140】本發明之雙股 RNA 分子接附至至少一個結合物部分。在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以接附至多於一個結合物部分。

【0141】在一些實施例中，結合物部分可被稱為本發明之結合物。在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以共價接附至至少一個結合物部分。

【0142】就雙股 RNA 分子及結合物部分而言，術語「接附」、「定位」、「連結」及「結合」可互換。

【0143】本文使用的術語「結合物」係指與結合物部分連結 (諸如共價連結) 的雙股 RNA 分子。結合物部分可以直接連結 (諸如共價連結) 至雙股 RNA 分子，或者結合物部分可以經由連結基團連結至雙股 RNA 分子。

【0144】寡核苷酸結合物及其合成業經報導於 Manoharan 在 Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S.T.Crooke 編輯，第 16 章, Marcel Dekker, Inc., 2001 中之綜合評論及 Manoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103。

【0145】在一些實施例中，結合物部分選自由以下所組成之群組：碳水化合物、細胞表面受體配體、原料藥、荷爾蒙、親脂性物質、聚合物、蛋白質、胜肽、毒素 (例如細菌毒素)、維生素、病毒蛋白質 (例如衣殼) 及其組合。

【0146】在一些實施例中，結合物部分可以為脂肪酸分子。在一些實施例中，結合物部分可以為脂肪酸分子。

【0147】「脂肪酸」為通常由碳原子鏈組成的分子，通常氫原子沿著鏈的長度與碳原子鍵合。換言之，脂肪酸分子包含烴。氫原子通常也存在於脂肪酸分子鏈的一端 (或末端)，並且羧基 (-COOH) 通常存在於鏈的另一端 (或末端)。事實上，正是羧基使分子成為酸 (例如羧酸)。本文使用的術語「脂肪酸」及「脂肪酸分子」被認為是可互換的。

【0148】術語「脂肪酸」涵蓋一種單一脂肪酸分子以及兩種或更多種脂肪酸分子的混合物，諸如兩種或更多種不同的脂肪酸分子。

【0149】在其中多於一種脂肪酸分子接附至雙股 RNA 分子的實施例中，各脂肪酸分子係經獨立地選擇，使得接附至雙股 RNA 分子的脂肪酸分子可以相同或可以不相同。

【0150】在一些實施例中，兩種或更多種脂肪酸可以用連接子連接。應當理解，連接兩種或更多種脂肪酸的連接子可以接附至兩種或更多種脂肪酸分子中的每一種上的任何點。

【0151】脂肪酸分子可以為包含碳原子的分子。脂肪酸分子可具有式 CX，其中 C 表示碳，且 X 係指存在於脂肪酸分子中的碳原子總數 (例如碳鏈長度) (例如「C12」係指具有 12 個碳的脂肪酸分子)。

【0152】在一些實施例中，脂肪酸分子可以為具有 3-40 個碳原子 (例如 C3-C40) 的分子。

【0153】在一些實施例中，脂肪酸分子係選自由以下所組成之清單：C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、C21、C22、C23、C24、C25、C26、C27、C28、C29、C30、C31、C32、C33、C34、C35、C36、C37、C38、C39 及 C40。

【0154】在一些實施例中，脂肪酸分子可以為具有 12-24 個碳原子 (例如 C12-C24) 的分子。

【0155】在一些實施例中，脂肪酸分子係選自由以下所組成之清單：C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、C21、C22、C23 及 C24。

【0156】在一些實施例中，脂肪酸分子為 C10。

【0157】在一些實施例中，脂肪酸分子為 C16。

【0158】在一些實施例中，脂肪酸分子為 C18。

【0159】在一些實施例中，脂肪酸分子為 C22。

【0160】在一些實施例中，脂肪酸分子可以為脂肪酸分子的鹽 (例如脂肪酸鹽)。

【0161】在一些實施例中，脂肪酸分子可以為支鏈的或非支鏈的。換言之，脂肪酸分子可以包含支鏈或可以包含非支鏈。應當理解，「非支鏈」係指原子直鏈，例如與氫原子 (例如 CH2 基團) 鍵合的碳原子直鏈，其中碳原子亦藉由碳-碳鍵連結。

【0162】還應當理解，「支鏈」係指原子非直鏈，例如，其中一或更多個碳基團藉由接附至與氫原子鍵合的另一碳原子鏈 (例如 CH2 基團) 而形成支鏈，其中碳原子亦藉由碳-碳鍵連結。諸如，支鏈脂肪酸分子可以包含接附至碳原子鏈的一或更多個碳基團 (諸如甲基基團)。形成支鏈的一或更多個碳基團可

以接附在沿碳鏈的任何點處 (亦即接附至位置 C2 至 CN-1 中的一或更多個，其中 C 表示碳，N 表示直鏈中的碳原子總數)。

【0163】 應當理解，當兩種或更多種脂肪酸藉由連接子連結時，所有脂肪酸可以為支鏈的。還應當理解，當兩種或更多種脂肪酸藉由連接子連結時，所有脂肪酸可以為非支鏈的。還應當理解，當兩種或更多種脂肪酸藉由連接子連結時，一種或多種脂肪酸可以為支鏈的，並且剩餘的一種或多種脂肪酸可以為非支鏈的。

【0164】 應當理解，不包含碳雙鍵 (例如 C＝C 鍵) 的脂肪酸可以稱為飽和脂肪酸。應當理解，術語「飽和」是指最大可能數量的原子 (例如氫原子) 鍵合到分子中的每個碳上。

【0165】 在一些實施例中，脂肪酸分子可以為飽和脂肪酸。在一些實施例中，脂肪酸分子可以為完全飽和的 (亦即包含碳單鍵但不包含碳雙鍵或碳三鍵)。在一些實施例中，脂肪酸分子可以為部分飽和的 (亦即，包含以下組合：(i) 一或更多個碳單鍵；及 (ii) 一或更多個碳非單鍵 (亦即碳雙鍵及/或碳三鍵))。

【0166】 在一些實施例中，脂肪酸分子可以包含碳雙鍵 (例如 C＝C 鍵)。在一些實施例中，脂肪酸分子可以包含碳三鍵 (例如 C≡C 鍵)。在一些實施例中，脂肪酸分子可以包含碳雙鍵 (例如 C＝C 鍵) 及碳三鍵 (例如 C≡C 鍵) 的組合。應當理解，當脂肪酸分子包含碳雙鍵及/或碳三鍵時，脂肪酸分子中的剩餘鍵可以為碳單鍵 (例如 C-C 鍵)。

【0167】 應當理解，包含一或更多個碳雙鍵及/或一或更多個碳三鍵的脂肪酸可稱為不飽和脂肪酸。包含一個碳雙鍵或一個碳三鍵的不飽和脂肪酸可以稱為單不飽和脂肪酸。包含二或更多個非單鍵 (亦即碳雙鍵及/或碳三鍵) 的不飽和脂肪酸可稱為多不飽和脂肪酸。

【0168】在一些實施例中，脂肪酸分子可以為不飽和脂肪酸。在一些實施例中，脂肪酸分子可以為單不飽和脂肪酸。在一些實施例中，脂肪酸分子可以為多不飽和脂肪酸。

【0169】在一些實施例中，脂肪酸分子可以為完全不飽和的 (亦即包含碳雙鍵及/或碳三鍵但不包含碳單鍵)。在一些實施例中，脂肪酸分子可以為部分不飽和的 (亦即包含以下組合：(i) 一或更多個碳非單鍵 (亦即碳雙鍵及/或碳三鍵)；及(ii)一或更多個碳單鍵)。

【0170】應當理解，當兩種或更多種脂肪酸藉由連接子連結時，所有脂肪酸可以為飽和的。還應當理解，當兩種或更多種脂肪酸藉由連接子連結時，所有脂肪酸可以為不飽和的。還應當理解，當兩種或更多種脂肪酸藉由連接子連結時，一種或多種脂肪酸可以為飽和的，並且剩餘的一種或多種脂肪酸可以為不飽和的。

【0171】應當理解，飽和或不飽和脂肪酸分子可以為支鏈或非支鏈的。

【0172】在一些實施例中，飽和脂肪酸分子可以為支鏈的或非支鏈的。

【0173】在一些實施例中，不飽和脂肪酸分子可以為支鏈的或非支鏈的。在一些實施例中，單不飽和脂肪酸分子可以為支鏈的或非支鏈的。在一些實施例中，多不飽和脂肪酸分子可以為支鏈的或非支鏈的。

【0174】在一些實施例中，支鏈脂肪酸分子可以為完全飽和的、完全不飽和的、或者可以為飽和及不飽和的混合物。在一些實施例中，非支鏈脂肪酸分子可以為完全飽和的、完全不飽和的、或者可以為飽和及不飽和的混合物。

【0175】在一些實施例中，至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%，至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或約 100% 的脂肪酸分子包含雙鍵。

【0176】在一些實施例中，至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%，至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或約 100% 的脂肪酸分子包含三鍵。

【0177】在一些實施例中，脂肪酸分子包含一或更多個雙鍵。在一些實施例中，脂肪酸分子包含一或更多個三鍵。在一些實施例中，脂肪酸分子包含一或更多個碳雙鍵及一或更多個碳三鍵的組合。應當理解，當脂肪酸分子包含一或更多個碳雙鍵及/或碳三鍵時，脂肪酸分子中的剩餘鍵可以為碳單鍵 (例如 C-C 鍵)。

【0178】在一些實施例中，脂肪酸分子包含二或更多、三或更多、四或更多、五或更多、六或更多、七或更多、八或更多、九或更多、十或更多、十一或更多、十二或更多、十三或更多、十四或更多、十五或更多、十六或更多、十七或更多、十八或更多、或者十九或更多個碳雙鍵。

【0179】在一些實施例中，脂肪酸分子包含二或更多、三或更多、四或更多、五或更多、六或更多、七或更多、八或更多、九或更多、十或更多、十一或更多、十二或更多、十三或更多、十四或更多、十五或更多、十六或更多、十七或更多、十八或更多、或者十九或更多個碳三鍵。

【0180】在一些實施例中，脂肪酸分子包含以下組合：二或更多、三或更多、四或更多、五或更多、六或更多、七或更多、八或更多、九或更多、十或更多、十一或更多、十二或更多、十三或更多、十四或更多、十五或更多、十六或更多、十七或更多、十八或更多、或者十九或更多個碳雙鍵及碳三鍵。

【0181】應當理解，本發明中可以使用超過十九個碳雙鍵。應當理解，在本發明中可以使用超過十九個碳三鍵。

【0182】碳雙鍵可以為*順式*構型或*反式*構型。碳三鍵可以為*順式*構型或*反式*構型。應當理解，*順式*構型是指與碳雙鍵或碳三鍵相鄰的兩個官能團 (例如氫原子) 伸出在鏈的同一側，而*反式*構型是指與碳雙鍵或碳三鍵相鄰的兩個官能團 (例如氫原子) 位於鏈的*相對*側。

【0183】在一些實施例中，脂肪酸分子可以為*順式*不飽和脂肪酸分子。

【0184】在一些實施例中，脂肪酸分子可以為*反式*不飽和脂肪酸分子。

【0185】在一些實施例中，脂肪酸分子可以包含*順式*不飽和脂肪酸組分及*反式*不飽和脂肪酸組分的組合。在一些實施例中，脂肪酸分子可以包含*順式*及*反式*雙鍵的組合。在一些實施例中，脂肪酸分子可以包含*順式*及*反式*三鍵的組合。在一些實施例中，脂肪酸分子可以包含*順式*及*反式*雙鍵以及*順式*及*反式*三鍵的組合。

【0186】脂肪酸分子可具有式 CX:Y，其中 C 表示碳，其中 X 係指脂肪酸分子中存在的碳原子總數 (亦即碳鏈長度)，並且其中 Y 係指脂肪酸分子中存在的不飽和/非單碳鍵 (亦即碳雙鍵及/或碳三鍵) 的數量 (例如「C16:5」係指長度為 16 個碳的脂肪酸分子，其總長度為總共 5 個不飽和/非單碳鍵 (亦即，可以存在 5 個碳雙鍵，或者可以存在 5 個碳三鍵，或者可以存在總共 5 個非單鍵的碳雙鍵及碳三鍵的組合)。換言之，冒號之前的數字 X 指定碳原子的數量，並且冒號之後的數字 Y 指定脂肪酸分子中不飽和/非單鍵 (亦即雙鍵及/或三鍵) 的總數。X 可以為任何正自然數 (亦即 1、2、3 等)。X 不能為 0 或負值。Y 可以為任何非負數 (亦即 0、1、2、3 等)。

【0187】然而，對於給定的 X 數 (在 CX:Y 中)，雙鍵及/或三鍵的最大數 Y 等於 X/2-1 (亦即 Y= (X/2)-1)。換言之，對於脂肪酸分子中給定的 X 個碳原子數，雙鍵及/或三鍵的數量 Y 可以為任何非負數 (亦即 0、1、2、3 等)，最大為 Y=(X/2)-1。因此，在脂肪酸分子具有式 CX:Y 的一些實施例中，Y 可以等於

X/2-1 的最大值 (亦即 Y＝(X/2)-1)。如果 X 是奇數，則結果 (為半數) 必須向下舍入到最接近的自然數。例如，當 X=7 時，(X/2)-1 的結果為 2,5，其必須向下舍入到 2。換言之，對於 X=7，雙鍵及/或三鍵的最大數量為 Y=2；對於 X=9，雙鍵及/或三鍵的最大數量為 Y=3 等。當 X 為偶數時，Y 的結果不需要向下舍入：如果 X=8，則 Y=3；如果 X=10，則 Y=4 等。這意味著對於 X=8 或 9 (亦即對於具有 8 或 9 個碳的脂肪酸分子)，雙鍵及/或三鍵的最大可能數量為 3；並且註釋 C8:Y 或 C9:Y 中的 Y 值可以為 0 到 3 之間的任何自然數 (亦即 0、1、2 或 3)。換言之，對於 X=8，可能的脂肪酸為 C8:0、C8:1、C8:2 及 C8:3；對於 X=9，可能的脂肪酸為 C9:0、C9:1、C9:2 及 C9:3。這同樣適用於任何其他 X 值 (X 是正自然數，亦即非空且非負)。

【0188】在一些實施例中，脂肪酸分子係選自由以下所組成之清單：C3:0；C4:0；C4:1；C5:0；C5:1；C6:0；C6:1；C6:2；C7:0；C7:1；C7:2；C8:0；C8:1；C8:2；C8:3；C9:0；C9:1；C9:2；C9:3；C10:0；C10:1；C10:2；C10:3；C10:4；C11:0；C11:1；C11:2；C11:3；C11:4；C12:0；C12:1；C12:2；C12:3；C12:4；C12:5；C13:0；C13:1；C13:2；C13:3；C13:4；C13:5；C14:0；C14:1；C14:2；C14:3；C14:4；C14:5；C14:6；C15:0；C15:1；C15:2；C15:3；C15:4；C15:5；C15:6；C16:0；C16:1；C16:2；C16:3；C16:4；C16:5；C16:6；C16:7；C17:0；C17:1；C17:2；C17:3；C17:4；C17:5；C17:6；C17:7；C18:0；C18:1；C18:2；C18:3；C18:4；C18:5；C18:6；C18:7；C18:8；C19:0；C19:1；C19:2；C19:3；C19:4；C19:5；C19:6；C19:7；C19:8；C20:0；C20:1；C20:2；C20:3；C20:4；C20:5；C20:6；C20:7；C20:8；C20:9；C21:0；C21:1；C21:2；C21:3；C21:4；C21:5；C21:6；C21:7；C21:8；C21:9；C22:0；C22:1；C22:2；C22:3；C22:4；C22:5；C22:6；C22:7；C22:8；C22:9；C22:10；C23:0；

C23:1；C23:2；C23:3；C23:4；C23:5；C23:6；C23:7；C23:8；C23:9；C23:10；C24:0；C24:1；C24:2；C24:3；C24:4；C24:5；C24:6；C24:7；C24:8；C24:9；C24:10；C24:11；C25:0；C25:1；C25:2；C25:3；C25:4；C25:5；C25:6；C25:7；C25:8；C25:9；C25:10；C25:11；C26:0；C26:1；C26:2；C26:3；C26:4；C26:5；C26:6；C26:7；C26:8；C26:9；C26:10；C26:11；C26:12；C27:0；C27:1；C27:2；C27:3；C27:4；C27:5；C27:6；C27:7；C27:8；C27:9；C27:10；C27:11；C27:12；C28:0；C28:1；C28:2；C28:3；C28:4；C28:5；C28:6；C28:7；C28:8；C28:9；C28:10；C28:11；C28:12；C28:13；C29:0；C29:1；C29:2；C29:3；C29:4；C29:5；C29:6；C29:7；C29:8；C29:9；C29:10；C29:11；C29:12；C29:13；C30:0；C30:1；C30:2；C30:3；C30:4；C30:5；C30:6；C30:7；C30:8；C30:9；C30:10；C30:11；C30:12；C30:13；C30:14；C31:0；C31:1；C31:2；C31:3；C31:4；C31:5；C31:6；C31:7；C31:8；C31:9；C31:10；C31:11；C31:12；C31:13；C31:14；C32:0；C32:1；C32:2；C32:3；C32:4；C32:5；C32:6；C32:7；C32:8；C32:9；C32:10；C32:11；C32:12；C32:13；C32:14；C32:15；C33:0；C33:1；C33:2；C33:3；C33:4；C33:5；C33:6；C33:7；C33:8；C33:9；C33:10；C33:11；C33:12；C33:13；C33:14；C33:15；C34:0；C34:1；C34:2；C34:3；C34:4；C34:5；C34:6；C34:7；C34:8；C34:9；C34:10；C34:11；C34:12；C34:13；C34:14；C34:15；C34:16；C35:0；C35:1；C35:2；C35:3；C35:4；C35:5；C35:6；C35:7；C35:8；C35:9；C35:10；C35:11；C35:12；C35:13；C35:14；C35:15；C35:16；C36:0；C36:1；C36:2；C36:3；C36:4；C36:5；C36:6；C36:7；C36:8；C36:9；C36:10；C36:11；C36:12；C36:13；C36:14；C36:15；C36:16；C36:17；C37:0；C37:1；C37:2；C37:3；C37:4；C37:5；C37:6；C37:7；C37:8；C37:9；C37:10；C37:11；C37:12；C37:13；

C37:14；C37:15；C37:16；C37:17；C38:0；C38:1；C38:2；C38:3；C38:4；C38:5；C38:6；C38:7；C38:8；C38:9；C38:10；C38:11；C38:12；C38:13；C38:14；C38:15；C38:16；C38:17；C38:18；C39:0；C39:1；C39:2；C39:3；C39:4；C39:5；C39:6；C39:7；C39:8；C39:9；C39:10；C39:11；C39:12；C39:13；C39:14；C39:15；C39:16；C39:17；C39:18；C40:0；C40:1；C40:2；C40:3；C40:4；C40:5；C40:6；C40:7；C40:8；C40:9；C40:10；C40:11；C40:12；C40:13；C40:14；C40:15；C40:16；C40:17；C40:18；C40:19。

【0189】碳雙鍵可以位於脂肪酸分子中的任何點 (亦即任何一對相鄰碳原子之間)。碳雙鍵可以位於脂肪酸分子中的任何點 (亦即多對相鄰碳原子之間)。碳三鍵可以位於脂肪酸分子中的任何點 (亦即任何一對相鄰碳原子之間)。碳三鍵可以位於脂肪酸分子中的任何點 (亦即多對相鄰碳原子之間)。

【0190】在一些實施例中，脂肪酸分子可以包含一種或多種修飾及/或取代。在一些實施例中，脂肪酸分子可以包含一種或多種氨基酸。在一些實施例中，脂肪酸分子可包含一種或多種糖或碳水化合物分子。應當理解，可以對飽和、不飽和、單不飽和及多不飽和脂肪酸分子進行修飾及/或取代。還應當理解，可以對支鏈及非支鏈脂肪酸分子進行修飾及/或取代。

【0191】應當理解，如圖 4 所示，本發明的雙股 RNA 分子的結合強度可以藉由所使用的脂肪酸分子/部分的長度有目的地控制 (例如調整)。在不希望被理論束縛的情況下，可以認為本發明的雙股 RNA 分子 (亦即與脂肪酸分子結合) 的結合強度可能與脂肪酸的長度成比例，如圖 4 中 C10、C16 及 C22 脂肪酸結合物的示例，特別是在白蛋白用作運輸載體的情況下。

【0192】在一些實施例中，可以根據本發明的雙股 RNA 分子的特定預期用途的需要，根據所需的結合強度選擇用作結合物部分的脂肪酸分子/部分。

【0193】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子可以與白蛋白組合投予。白蛋白可以為血清白蛋白，諸如小鼠血清白蛋白或人血清白蛋白。

【0194】不希望被理論束縛，本發明的雙股 RNA 分子與白蛋白的結合可能是本發明的雙股 RNA 分子可以被運輸 (例如進入細胞) 的機制之一。

【0195】在不希望被理論束縛的情況下，本發明的雙股 RNA 分子的結合強度可以被利用來影響 (i) 本發明的雙股 RNA 在血漿中的循環譜；(ii) 本發明的雙股 RNA 在生物液體 (例如淚液) 中的穩定性；以及 (iii) 本發明的雙股 RNA 進入疾病相關組織的細胞內攝取。

【0196】在一些實施例中，本發明的雙股 RNA 分子的脂肪酸分子可以是與白蛋白具有合適結合強度的脂肪酸分子，以影響本發明的雙股 RNA 在血漿中的循環譜。在一些實施例中，合適的結合強度可以是適合與白蛋白結合的結合強度。

【0197】在一些實施例中，與本發明的雙股 RNA 結合的脂肪酸分子可以是與白蛋白具有合適結合強度的脂肪酸分子，以影響本發明的雙股 RNA 在生物液體 (例如淚液) 中的穩定性。在一些實施例中，合適的結合強度可以是適合與白蛋白結合的結合強度。

【0198】在一些實施例中，與本發明的雙股 RNA 結合的脂肪酸分子可以是與白蛋白具有合適結合強度的脂肪酸分子，以影響本發明的雙股 RNA 進入疾病相關組織的細胞內攝取。在一些實施例中，合適的結合強度可以是適合與白蛋白結合的結合強度。

【0199】在一些實施例中，結合物部分為膽固醇分子。在一些實施例中，結合物部分可以為膽固醇分子。應當理解，術語「膽固醇分子」及「膽固醇部分」是可互換的。

【0200】在其中多於一種膽固醇分子接附至雙股 RNA 分子的實施例中，各膽固醇分子係經獨立地選擇，使得接附至雙股 RNA 分子的膽固醇分子可以相同或可以不相同。

【0201】在一些實施例中，兩種或更多種膽固醇分子可以用連接子連結。應當理解，接附兩種或更多種膽固醇分子的連接子可以接附至兩種或更多種膽固醇分子中的每一種上的任何點。

【0202】在一些實施例中，膽固醇部分選自包含以下之群組：3'-膽固醇基-TEG CPG、5'-膽固醇-TEG-CE 亞磷醯胺、5'-膽固醇-CE 亞磷醯胺或膽固醇基-TEG-CE 亞磷醯胺 (TEG= 三甘醇，CPG= 可控孔玻璃合成支持物，又名 CPG 支持物)。

【0203】在一些實施例中，膽固醇部分為 3'-膽固醇基-TEG-CPG。在一些實施例中，膽固醇部分來源於 3'-膽固醇基-TEG-CPG。例如，3'-膽固醇基-TEG CPG 可用作在雙股 RNA 分子的股中之一條股的 3' 端引入膽固醇部分的試劑。

【0204】在一些實施例中，膽固醇部分為 5'-膽固醇-TEG-CE 亞磷醯胺。在一些實施例中，膽固醇部分來源於 5'-膽固醇-TEG-CE 亞磷醯胺。例如，5'-膽固醇-TEG-CE 亞磷醯胺可用作在雙股 RNA 分子的股中之一條股的 5' 端引入膽固醇部分的試劑。

【0205】在一些實施例中，膽固醇部分為 5'-膽固醇-CE 亞磷醯胺。在一些實施例中，膽固醇部分來源於 5'-膽固醇-CE 亞磷醯胺。例如，5'-膽固醇-CE 亞磷醯胺可用作在雙股 RNA 分子的股中之一條股的 5' 端引入膽固醇部分的試劑。

【0206】在一些實施例中，膽固醇部分為膽固醇基-TEG-CE 亞磷醯胺。在一些實施例中，膽固醇部分來源於膽固醇基-TEG-CE 亞磷醯胺。例如，膽固

醇基-TEG-CE 亞磷醯胺可以用作在雙股 RNA 分子的股中之一條股的端引入膽固醇部分的試劑。

【0207】 在一些實施例中，雙股 RNA 分子的股可以藉由使用規則的亞醯胺或反向的亞醯胺來合成。

【0208】 在一些實施例中，膽固醇分子或膽固醇部分藉由使用反向亞醯胺 (例如核苷亞磷醯胺) 接附在雙股 RNA 分子的股中之一條股的 3' 端。換言之，藉由使用反向亞醯胺構建股，然後在合成端使用任何 5' 膽固醇亞醯胺，可以將膽固醇接附至股中之一條股的 3' 端，這將導致膽固醇位於股的 3' 端。

【0209】 在一些實施例中，結合物部分 (例如，脂肪酸分子或膽固醇分子) 位於雙股 RNA 分子的股中之一條股的 5' 端或 3' 端。

【0210】 在一些實施例中，結合物部分位於雙股 RNA 分子之第一股的 5' 端。在一些實施例中，結合物部分位於雙股 RNA 分子之第一股的 3' 端。

【0211】 在一些實施例中，結合物部分位於雙股 RNA 分子之第二股的 5' 端。在一些實施例中，結合物部分位於雙股 RNA 分子之第二股的 3' 端。

【0212】 雙股 RNA 分子可以描述為包含有義股及反義股。

【0213】 在一些實施例中，結合物部分位於雙股 RNA 分子之有義股的 5' 端。在一些實施例中，結合物部分位於雙股 RNA 分子之有義股的 3' 端。

【0214】 在一些實施例中，結合物部分位於雙股 RNA 分子之反義股的 5' 端。在一些實施例中，結合物部分位於雙股 RNA 分子之反義股的 3' 端。

【0215】 在一些實施例中，結合物部分不位於任一股的端末端位置 (亦即，結合物部分不位於任一股的 5' 端或 3' 端)。例如，結合物部分可以接附至連續核苷酸序列的中間或中心區域中的位置。本文中術語「中間」及「中心」旨在表示結合物部分不位於股之任一端，並且不是表示結合物部分與每一端等距的位置。

【0216】在一些實施例中，結合物部分位於連續核苷酸序列的任何位置。在一些實施例中，結合物部分位於雙股 RNA 分子上的任何位置。

【0217】**連接子**

【0218】鍵結、連接子或間隔子是兩個原子之間的連結，用以將一個所關注的化學基團或區段經由一或更多個共價鍵連結至另一個所關注的化學基團或區段。結合物部分可直接或經由連結部分 (例如連接子或間隔子) 接附至雙股 RNA 分子。連接子用於將結合物部分共價連結至雙股 RNA 分子或其連續核苷酸序列。

【0219】本文使用的術語「連接子」及「間隔子」可互換。

【0220】在本發明之一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子可以包含位於雙股 RNA 分子及結合物部分之間的連接子 (也稱為「連接子區域」)。連接子可以接附至與標靶核酸及結合物部分互補的雙股 RNA 分子的股的連續核苷酸序列。

【0221】在一些實施例中，連接子為 C6。

【0222】在一些實施例中，連接子為 TEG。

【0223】在一些實施例中，連接子為二核苷酸。在一些實施例中，連接子為 CA 二核苷酸。

【0224】在一些實施例中，連接子為生物可切割連接子。生物可切割連接子包含生理不穩定鍵或由其組成，該生理不穩定鍵在正常情況下或類似於哺乳動物體內遇到的條件下可切割。生理不安定連接子經歷化學轉換 (例如，切斷) 的條件包括化學條件，諸如 pH、溫度、氧化或還原條件或作用劑，以及哺乳動物細胞內所常態存在或與之類似的鹽濃度。哺乳動物細胞內條件亦包括通常存在於哺乳動物細胞中的酵素活性，諸如蛋白分解酶或水解酶或核酸酶的活性。在一些實施例中，生物可切割型連接子易感於 S1 核酸酶切割。在某些實

施例中，核酸酶敏感性連接子包含 1 至 5 個核苷，諸如包含至少兩個連續磷酸二酯鍵結的一或多個 DNA 核苷。在 WO 2014/076195 中更詳細地闡述了包含磷酸二酯的可生物裂解的連接子。

【0225】 在一些實施例中，連接子非生物可切割連接子。已知連接子不一定是可生物裂解的，但主要用於將結合物部分共價連接至寡核苷酸。這些連接子可以包含鏈結構或重複單元的寡聚物，諸如乙二醇、胺基酸單元或胺基烷基基團，或其組合。在一些實施例中，連接子為胺基烷基，諸如 C2 至 C36 胺基烷基基團，包括例如 C6 至 C12 胺基烷基基團。

【0226】 外加 5' 及/或 3' 核苷

【0227】 在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子的一條或兩條股還可以包含外加 5' 及/或 3' 核苷。換言之，在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子除了連續核苷酸序列之外還可以包含 5' 及/或 3' 核苷。

【0228】 進一步的 5' 及/或 3' 核苷可與或不與標靶核酸為互補、諸如完全互補。

【0229】 進一步的 5' 及/或 3' 核苷的加入可用於將連續核苷酸序列接合至結合物部分或另一官能基團。當用於接合連續核苷酸序列與結合物部分時，其可做為生物可切割型連接子。替代性地，其可用於提供核酸外切酶保護或促進合成或製造。

【0230】 進一步的 5' 及/或 3' 核苷可以獨立包含或具有 1、2、3、4、5 或多於 5 個外加核苷酸，其可與該標靶核酸為互補或不為互補。

【0231】 進一步的 5' 及/或 3' 核苷可以充當核酸酶敏感的生物可切割連接子。在某些實施例中，所述外加 5' 及/或 3' 端核苷酸是與磷酸二酯鍵結連結，且為 DNA 或 RNA。適用此類用途的核苷酸基生物可切斷型連接子可參照 WO2014/076195 的揭露，舉例而言可包括磷酸二酯連結 DNA 二核苷酸。生物

可切斷型連接子在聚寡核苷酸構造中的使用是揭示於 WO2015/113922，在該案中其係用於連結單一寡核苷酸中的多重反義構造。

【0232】 在一些實施例中，定位在外加 5' 及/或 3' 核苷與連續核苷酸序列之間的核苷間鍵結為磷酸二酯鍵結。

【0233】 投予至眼睛

【0234】 將本發明之雙股 RNA 分子局部投予至眼睛 (例如經眼投予)。

【0235】 應當理解，本發明之雙股 RNA 分子可以投予至眼睛的任何部分。

【0236】 在一些實施例中，雙股 RNA 分子係用於投予至眼睛之前部。

【0237】 結膜及角膜都是眼睛的組成部分。在一些實施例中，雙股 RNA 分子係用於投予至結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子係用於投予至角膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子靶向結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子靶向角膜。

【0238】 結膜包括眼球結膜、眼瞼結膜、眼結膜及穹窿結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子係用於投予至眼球結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子係用於投予至眼瞼結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子係用於投予至眼結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子係用於投予至穹窿結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子係用於投予至眼球結膜、眼瞼結膜、眼結膜及穹窿結膜中的一者或多者。在一些實施例中，雙股 RNA 分子靶向眼球結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子靶向眼瞼結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子靶向眼結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子靶向穹窿結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子靶向眼球結膜、眼瞼結膜、眼結膜及穹窿結膜中的一者或多者。

【0239】在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以用於投予至角膜及結膜。在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以靶向角膜及結膜。

【0240】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子可以與白蛋白組合投予。白蛋白可以為血清白蛋白，諸如小鼠血清白蛋白或人血清白蛋白。

【0241】**與標靶序列的互補性**

【0242】本發明之雙股 RNA 分子的連續核苷酸序列可以與標靶核酸序列互補，例如標靶 mRNA 的核酸序列。

【0243】在一些實施例中，連續核苷酸序列可以與標靶核酸序列完全，諸如約 100% 互補。

【0244】在一些實施例中，連續核苷酸序列可以與標靶核酸序列部分互補，例如與標靶核酸序列至少約 75%、至少約 80%、至少約 81%、至少約 82%、至少約 83%、至少約 84%、至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98% 或至少約 99% 互補。

【0245】在一些實施例中，連續核苷酸序列可包括 1、2、3、4、5、6、7、8 或更多個錯配，其中錯配為連續核苷酸序列內不與其標靶鹼基配對的核苷酸。

【0246】標靶核酸序列可以為在眼睛中表現或存在的標靶核酸序列，諸如 mRNA 序列。

【0247】在一些實施例中，標靶可以為眼睛中存在的任何標靶。在一些實施例中，標靶核酸序列可以為在眼睛中表現或存在的任何核酸序列。在一些實施例中，標靶核酸序列可以為在眼睛中表現或存在的任何 mRNA 序列。應當

理解，本文提及的眼睛包括眼睛的任何部分。還應當理解，本文對眼睛的提及包括眼睛的任何部分的組合，包括但不限於眼睛的前部或眼睛的所有部分。

【0248】 在一些實施例中，標靶可以為與眼睛病變、眼睛疾病或眼睛病症關聯的任何標靶。在一些實施例中，標靶可以為與一種或多種眼睛病變、眼睛疾病或眼睛病症關聯的任何標靶。

【0249】 在一些實施例中，標靶核酸序列可以為與眼睛病變、眼睛疾病或眼睛病症關聯的任何核酸序列。在一些實施例中，標靶核酸序列可以為與一種或多種眼睛病變、眼睛疾病或眼睛病症關聯的任何核酸序列。

【0250】 在一些實施例中，標靶核酸序列可以為與眼睛病變、眼睛疾病或眼睛病症關聯的任何 mRNA 序列。在一些實施例中，標靶核酸序列可以為與一種或多種眼睛病變、眼睛疾病或眼睛病症關聯的任何 mRNA 序列。

【0251】 應當理解，與眼睛病變、眼睛疾病或眼睛病症關聯的標靶 (或標靶核酸序列或標靶 mRNA 序列) 包括但不限於引起眼睛病變、眼睛疾病或眼睛病症，促成眼睛病變、眼睛疾病或眼睛病症，或者是眼睛病變、眼睛疾病或眼睛病症的標誌的任何標靶 (或標靶核酸序列或標靶 mRNA 序列)。

【0252】 可用於本發明之特定標靶的實例為 AHA-1。應當理解，AHA-1 為標靶的非限制性實例。還應當理解，本發明涵蓋多個其他標靶。

【0253】 AHA1 (或 AHA-1)，特別是 AHA1 基因，也稱為 p38；AHSA1；hAha1；C14orf3。在本發明之上下文中，應當理解「AHA1」、「p38」、「AHSA1」、「hAha1」及 C14orf3 為可互換的術語。

【0254】 在一些實施例中，標靶為 AHA-1 核酸序列。

【0255】 AHA-1 標靶核酸序列可以包含以下或由以下組成：SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2。

【0256】 SEQ ID NO: 1 (人 AHA1 標靶序列：第 488-507 位，NCBI 參考序列：NM_012111.3)。

5'-AATCTCGTGGCCTTAATGAAA-3'

【0257】 SEQ ID NO: 2 (兔 AHA1 標靶序列：第 548-567 位，NCBI 參考序列：XM_002719625.3)。

5'-AATCTCGTGGCCTTAATGAAG-3

【0258】 應當理解，與 SEQ ID NO: 1 相比，SEQ ID NO: 2 中存在「擺動」鹼基對錯配 (亦即最後一個核苷酸位置中的 A 至 G 在 SEQ ID NO: 1 與 SEQ ID NO: 2 之間是不同的)。不希望受理論束縛，這種錯配不應影響雙股 RNA 的活性，因為 A 或 G 仍然可以與雙股 RNA 分子股的連續核苷酸序列中的互補 U 雜交 (例如，藉由擺動鹼基配對)。如果存在擺動鹼基對錯配，則應當理解該錯配不應影響雙股 RNA 分子的活性。

【0259】 在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：與 AHA-1 標靶序列互補的核苷酸序列。

【0260】 在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：與 SEQ ID NO: 1 互補的核苷酸序列。

【0261】 在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：與 SEQ ID NO: 2 互補的核苷酸序列。

【0262】 在一些實施例中，連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：SEQ ID NO: 3。

【0263】 SEQ ID NO: 3 (AHA-1 siRNA 反義股)：

5'-UUUCAUUAAGGCCACGAGAUU-3'

【0264】在一些實施例中，AHA-1 可以在眼球結膜及/或眼瞼結膜中表現。在一些實施例中，可以在眼球結膜及/或眼瞼結膜中觀察到 AHA-1 表現的減少。

【0265】抑制標靶

【0266】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子可以能夠抑制標靶的表現。換言之，雙股 RNA 分子可以能夠降低標靶的表現水平。

【0267】標靶可以為標靶核酸序列 (諸如標靶 mRNA序列) 或標靶蛋白。

【0268】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子可以能夠將標靶的表現相對於對照抑制至少約 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 60%、至少約 70%、至少約 80%、至少約 90%、或至少約 100%。

【0269】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子能夠將標靶 mRNA 的表現相對於對照抑制至少約 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 60%、至少約 70%、至少約 80%、至少約 90%、或至少約 100%。

【0270】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子能夠將標靶蛋白的表現相對於對照抑制至少約 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 60%、至少約 70%、至少約 80%、至少約 90%、或至少約 100%。

【0271】應當理解，上文提到的標靶表現的 % 抑制將為相對於對照的 % 降低，其中術語「對照」係指未暴露於本發明之雙股 RNA 分子的細胞中標靶之表現。

【0272】在一些實施例中，對照可以為模擬轉染，例如用 PBS 處理細胞。本文中，標靶表現的降低包括標靶 mRNA 水平的降低及/或標靶蛋白水平的降低。

【0273】核苷酸和核苷

【0274】核苷酸和核苷為寡核苷酸及聚核苷酸的建構組元，在本發明中，包括自然產生及非自然產生核苷酸和核苷。在本質上，諸如 DNA 及 RNA 核苷酸等核苷酸包含核糖部分、核鹼基部分以及一或更多個磷酸根 (核苷中則無磷酸根)。核苷及核苷酸亦可互換稱為「單元」或「單體」。

【0275】經修飾的雙股 RNA 分子

【0276】本發明之雙股 RNA 分子可以為經修飾的雙股 RNA 分子。

【0277】術語「經修飾的雙股 RNA 分子」涵蓋包含一或更多個糖修飾核苷及/或經修飾的核苷間鍵合的雙股 RNA 分子。

【0278】在一些實施例中，雙股 RNA 分子或連續核苷酸序列因此可包括修飾核鹼基，其在鹼基配對中有所示的核鹼基之作用，例如，可使用 5-甲基胞嘧啶代替甲基胞嘧啶。肌苷可用以作為通用鹼基。

【0279】應當理解的是，例如可以修飾連續核鹼基序列（模體序列）以增加核酸酶抗性及/或對標靶核酸結合的親和力。

【0280】將經修飾之核苷（諸如高親和力經修飾之核苷）併入寡核苷酸序列的模式，通常稱為寡核苷酸設計。

【0281】在一些實施例中，可以使用高親和力經修飾核苷。

【0282】在一個實施例中，雙股 RNA 分子包含至少 1 個經修飾核苷，諸如至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、至少 20、至少 21、至少 22、至少 23、至少 24、至少 25、至少

26、至少 27、至少 28、至少 29、至少 30、至少 31、至少 32、至少 33、至少 34、至少 35、至少 36、至少 37、至少 38、至少 39、至少 40、至少 41、至少 42、至少 43、至少 44、至少 45、至少 46、至少 47、至少 48、至少 49 或至少 50 個經修飾核苷。

【0283】 合適修飾如本文所述。

【0284】 經修飾之核苷間鍵結

【0285】 在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子可以包含一或更多個經修飾核苷間鍵結。

【0286】 術語「經修飾的核苷間鍵結」，如具有通常技術者所知之定義，指除磷酸二酯 (PO) 鍵結以外，可將兩個核苷共價連結在一起的鍵結。本發明之雙股 RNA 分子可因此包含一或更多個經修飾的核苷間鍵結，諸如一或更多個硫代磷酸酯核苷間鍵結。

【0287】 在一些實施例中，雙股 RNA 分子或其連續核苷酸序列中的至少 50% 的核苷間鍵結係經修飾的，雙股 RNA 分子或其連續核苷酸序列中的諸如至少 60%、諸如至少 70%、諸如至少 75%、諸如至少 80%、諸如至少 85%、諸如至少 90%、諸如至少 95% 或更多的核苷間鍵結係經修飾的。在一些實施例中，雙股 RNA 分子或其連續核苷酸序列的核苷間鍵結之全部係經修飾的。

【0288】 在一些實施例中，經修飾的核苷間鍵結中之一者或多者或全部包含硫代磷酸酯鍵結。

【0289】 在一些實施例中，雙股 RNA 分子或其連續核苷酸序列中的至少 50% 的核苷間鍵結為硫代磷酸酯，雙股 RNA 分子或其連續核苷酸序列中的諸如至少 60%、諸如至少 70%、諸如至少 75%、諸如至少 80%、諸如至少 85%、諸如至少 90%、諸如至少 95% 或更多的核苷間鍵結為硫代磷酸酯。在一些實施

例中，雙股 RNA 分子或其連續核苷酸序列的核苷間鍵結之全部為硫代磷酸酯。

【0290】 在一進一步實施例中，雙股 RNA 分子包含至少一個經修飾的核苷間鍵結。在一些實施例中，連續核苷酸序列內核苷間鍵結的至少 75% (諸如所有) 為硫代磷酸酯或硼酸磷酸核苷間鍵結。

【0291】 在一些實施例中，雙股 RNA 分子的連續核苷酸序列中的核苷間鍵結之全部可以為硫代磷酸酯，或雙股 RNA 分子的核苷間鍵結之全部可以為硫代磷酸酯鍵結。

【0292】 修飾核苷

【0293】 在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子可以包含一或更多個修飾核苷。

【0294】 本文中所用的術語「修飾核苷」或「核苷修飾」意指藉由導入糖部分或 (核) 鹼基部分的一個或多個修飾，對照相等 DNA 或 RNA 核苷進行修飾的核苷。

【0295】 在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子之一或更多個修飾核苷可以包含修飾糖部分。術語經修飾之核苷在本文中亦可與「核苷類似物」或修飾「單元」或修飾「單體」等詞互換使用。本文中將具有未修飾 DNA 或 RNA 糖部分的核苷稱為 DNA 或 RNA 核苷。在 DNA 或 RNA 核苷的鹼基區域中包含修飾的核苷，若允許瓦特生克立克 (Watson Crick) 鹼基配對，則大體上仍稱為 DNA 或 RNA。可用於本發明之雙股 RNA 分子的例示性修飾核苷包括 LNA、2'-O-MOE、2'oMe 及 N-嗎啉基核苷類似物。

【0296】 核鹼基

【0297】 術語核鹼基包括存在於核苷及核苷酸中的嘌呤 (例如腺嘌呤及鳥嘌呤) 和嘧啶 (例如尿嘧啶、胸腺嘧啶及胞嘧啶) 部分，其在核酸雜交中形成氫鍵。

【0298】 在本發明範圍內，核鹼基一詞亦涵蓋與自然產生核鹼基不同但在核酸雜交期間具有功能性的修飾核鹼基。於本說明書中，「核鹼基」意指諸如腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、黃嘌呤和次黃嘌呤等自然產生核鹼基以及非自然產生變異體。此類變異體例如描述於 Hirao 等人，2012, Accounts of Chemical Research, 45, 2055-2065 及 Bergstrom, 2009, Curr. Protoc.Nucleic Acid Chem., 37, 1.4.1-1.4.32 中。

【0299】 在某些實施例中，核鹼基部分藉由將嘌呤或嘧啶改變為經修飾的嘌呤或嘧啶而經修飾，諸如被取代的嘌呤或被取代的嘧啶，諸如選自異胞嘧啶、偽異胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-噻唑并-胞嘧啶、5-丙炔基-胞嘧啶、5-丙炔基-尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-噻唑并-尿嘧啶、2-硫代-尿嘧啶、2'硫代-胸腺嘧啶、肌苷、二胺基嘌呤、6-胺基嘌呤、2-胺基嘌呤、2,6-二胺基嘌呤及 2-氯-6-胺基嘌呤的核鹼基。

【0300】 該核鹼基部分可用每一對應核鹼基的字母代碼表示，例如 A、T、G、C 或 U，其中各字母可視情況包括對等功能的修飾核鹼基。例如，在例示的寡核苷酸中，所述核鹼基部分選自 A、T、G、C 及 5-甲基胞嘧啶。視情況，5-甲基胞嘧啶 LNA 核苷可用於 LNA 缺口體。5-甲基胞嘧啶可表示為「E」。

【0301】 高親和力經修飾之核苷

【0302】 高親和力修飾核苷係一種修飾核苷酸，當併入該寡核苷酸中時，可增強寡核苷酸對其互補標靶之親和力，例如以融化溫度 (T^m) 測量。本發明之高親和力修飾核苷較佳地導致每一修飾核苷之融化溫度增加 +0.5°C 至

+12℃ 之間，更佳地 +1.5℃ 至 +10℃ 之間，最佳地 +3℃ 至 +8℃ 之間。該技術領域中已有眾多已知之高親和力修飾核苷，包括例如許多 2' 取代之核苷以及鎖核酸 (LNA) (參見*例如* Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 及 Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 203-213)。

【0303】 **糖修飾**

【0304】 本發明之雙股 RNA 分子可以包含一或更多個具有修飾糖部分之核苷，*亦即*與 DNA 及 RNA 中的核糖部分相較為經過修飾的糖部分。

【0305】 目前已製成了眾多包含經修飾核糖部分的核苷，主要目的為改善寡核苷酸的特定特性，諸如親和力及/或核酸酶抗性。

【0306】 這些修飾包括對核糖環結構的修飾，例如取代為己糖環 (HNA)，或通常在核糖環上的 C2 與 C4 碳原子之間具有雙自由基橋的雙環 (LNA)，或通常在 C2 與 C3 碳原子之間無鍵結的未連結核糖環 (例如 UNA)。其他糖修飾核苷包括，例如，雙環己糖核酸 (WO 2011/017521) 或三環核酸 (WO 2013/154798)。修飾核苷也包括將糖部分取代為非糖部分的核苷，例如胜肽核酸 (PNA) 或 N-嗎啉基核酸的情形。

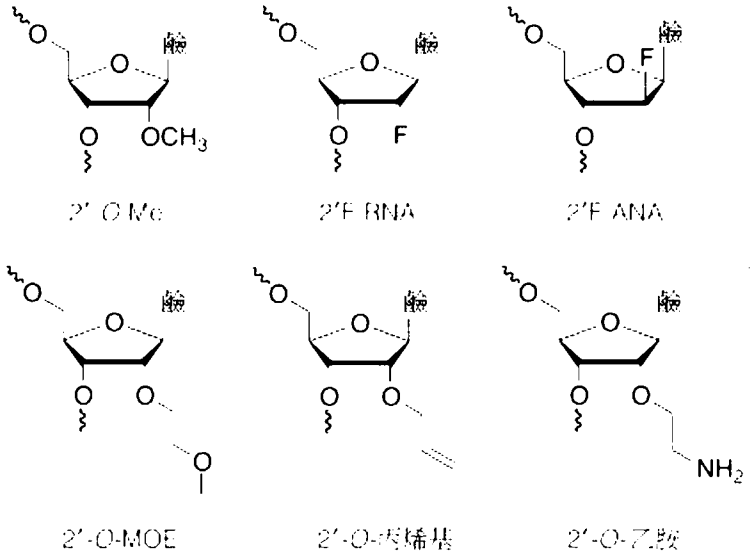
【0307】 糖修飾也包括經由將核糖環上的取代基團改變為除在 DNA 及 RNA 核苷中自然存有的氫或 2'-OH 基團以外的基團來進行修飾。取代基可例如在 2'、3'、4' 或 5' 位置導入。

【0308】 **2' 糖修飾核苷**

【0309】 2' 糖修飾核苷係在 2' 位置 (2' 經取代核苷) 具有非 H 或 -OH 的取代基的核苷或包含能夠在核糖環中的 2' 碳與第二碳之間形成架橋的 2' 連結雙自由基的核苷，諸如 LNA (2' 至 4' 雙自由基架橋) 核苷。

【0310】 更確切地，2' 糖取代核苷的開發頗受關注，目前也已發現許多 2' 經取代核苷在併入寡核苷酸中時具有有益特性。例如，2' 經修飾糖可加強該寡

核苷酸的結合親和力及/或增加該寡核苷酸的核酸酶抗性。2' 經取代修飾核苷之實例為 2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA (2'oMe)。2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA (MOE)、2'-胺基-DNA、2'-氟-RNA 基 2'-F-ANA 核苷。更多實例參見*例如* Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 及 Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 203-213 及 Deleavey 與 Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937。以下為 2' 經取代修飾核苷之圖解。



【0311】在本發明中，2' 取代糖修飾核苷並不包括 2' 橋接核苷，如 LNA。

【0312】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含一或更多糖修飾核苷，諸如 2' 糖修飾核苷。

【0313】在一些實施例中，雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：長度為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 個糖修飾核苷。

【0314】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子包含一或更多個 2' 糖修飾核苷，其獨立地選自由以下所組成之群組：2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA (2'oMe)、2'-O-甲氧基乙基-RNA (2'MOE)、2'-烷氧基-RNA、2'-胺基-DNA、2'-氟-RNA 2'-氟-DNA、阿拉伯糖核酸 (ANA)、2'-氟-ANA 及 LNA 核苷。在一些實施例中，修飾核苷之一或更多個可以為 LNA。

【0315】在一些實施例中，2' 糖修飾核苷為親和力增強型 2' 糖修飾核苷。

【0316】**鎖核酸核苷 (LNA 核苷)**

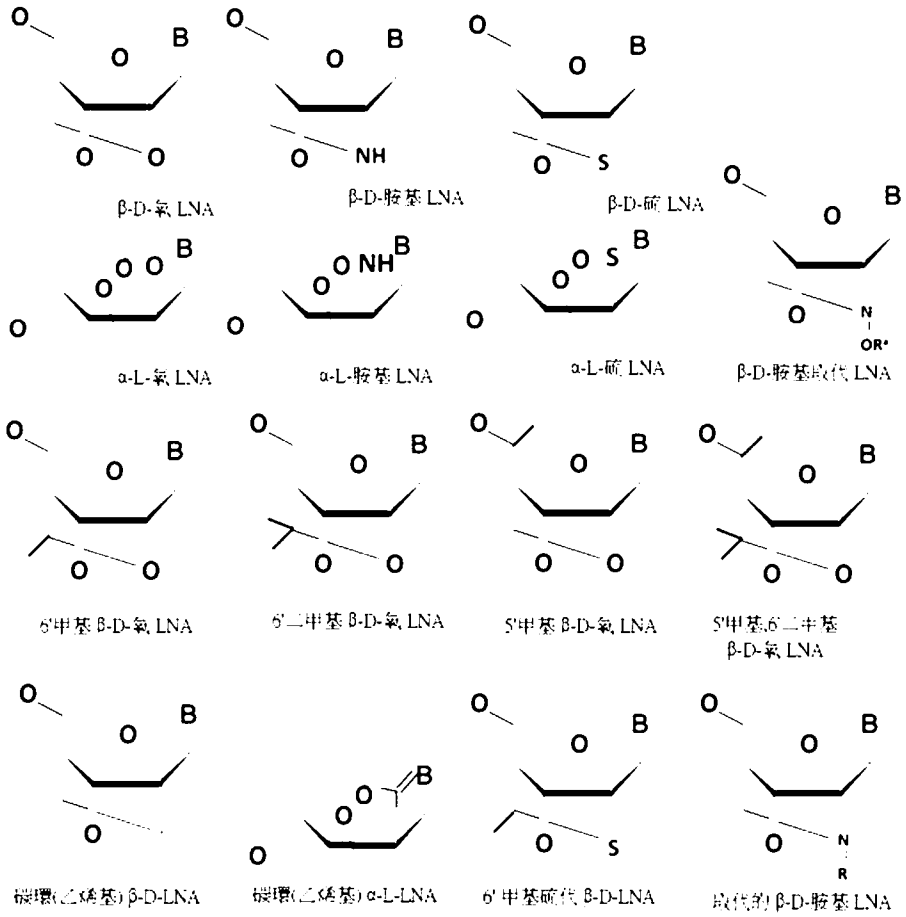
【0317】「LNA 核苷」為一種 2'-經修飾核苷，其包含連結該核苷的核糖環之 C2' 與 C4' 的雙自由基 (此雙自由基亦稱為「2' - 4' 架橋」)，其可限制或鎖定該核糖環之構造。

【0318】該等核苷於文獻中也稱為橋接核酸或雙環核酸 (BNA)。鎖定核糖的構造，可在將 LNA 併入寡核苷酸中而產生互補 RNA 或 DNA 分子時提升雜交親和力 (雙股螺旋穩定化)。藉由測量寡核苷酸/補體雙股螺旋的融化溫度，可對此進行常規的判定。

【0319】非限制性地，例示性 LNA 核苷揭示於以下文獻中：WO 99/014226；WO 00/66604；WO 98/039352；WO 2004/046160；WO 00/047599；WO 2007/134181；WO 2010/077578；WO 2010/036698；WO 2007/090071；WO 2009/006478；WO 2011/156202；WO 2008/154401；WO 2009/067647；WO 2008/150729；Morita 等人, Bioorganic & Med.Chem.12, 73-76, Seth 等人 J. Org.Chem. 2010, Vol 75(5) pp. 1569-81，Mitsuoka 等人，Nucleic Acids Research 2009, 37(4), 1225-1238 及 Wan 與 Seth，J. Medical Chemistry 2016, 59, 9645−9667 中揭示。

【0320】方案 1 中揭露了其他非限制性例示 LNA 核苷。

【0321】**方案 1：**

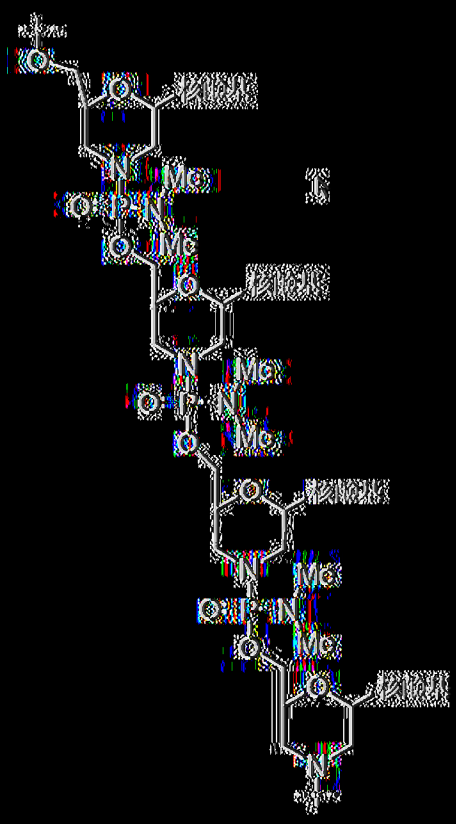


【0322】特定 LNA 核苷為 β-D-氧-LNA、6'-甲基-β-D-氧 LNA，諸如 (S)-6'-甲基-β-D-氧-LNA (ScET) 及 ENA。

【0323】具有特定優勢的 LNA 為 β-D-氧-LNA。

【0324】**N-嗎啉基寡核苷酸**

【0325】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子包含以下或由以下所組成：N-嗎啉基核苷 (*亦即*，為 N-嗎啉基寡聚體並且作為磷二醯胺酯 N-嗎啉基寡聚體 (PMO))。剪接調節 N-嗎啉基寡核苷酸已被批准用於臨床-例如參見伊特普森 (eteplirsen)，一種靶向 DMD 中框移突變的 30 nt 的 N-嗎啉基寡核苷酸，用於治療杜顯氏肌肉萎縮症。N-嗎啉基寡核苷酸具有接附至六員 N-嗎啉基環上而非核糖上的核酸酶，諸如透過磷二醯胺酯基團連結的亞甲基嗎啉環，諸如以下 4 個連續的 N-嗎啉基核苷酸的繪示：



[0326] 在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子長度可以為例如 18-50 個 N-嗎啉基核苷酸。

[0327] 互補性

[0328] 「互補性」一詞是用來形容核苷/核苷酸的瓦特生克立克 (Watson-Crick) 鹼基配對能力。瓦特生克立克 (Watson-Crick) 鹼基對是鳥嘌呤 (G)-胞嘧啶 (C) 及腺嘌呤 (A)-胸腺嘧啶 (T)/尿嘧啶 (U)。

[0329] 應知寡核苷酸可以包含具有修飾核鹼基的核苷，例如 5-甲基胞嘧啶經常用來取代胞嘧啶，因此術語互補性包括非修飾核鹼基與修飾核鹼基之間的瓦特生克立克 (Watson-Crick) 鹼基配對 (參見例如 Hirao 等人，2012, Accounts of Chemical Research, 45, 2055 及 Bergstrom, 2009, Curr. Protoc.Nucleic Acid Chem., 37, 1.4.1)。

[0330] 本文所用的「%互補」係指核酸分子 (例如寡核苷酸) 中的連續核苷酸序列中與參考序列 (例如標靶序列或序列模體) 互補的核苷酸所佔的比例

(百分比)，所述核酸分子橫跨所述連續核苷酸序列。互補性百分率的計算方式是先算出兩個序列間互補（形成華生-克立克 (Watson-Crick) 鹼基對）的對齊核鹼基（當對齊於標靶序列 5'-3' 及寡核苷酸序列 3'-5'）的數目，將該數字除以該寡核苷酸中的核苷酸總數，再乘以 100。在該等比對中，未對齊 (形成鹼基對) 的核鹼基/核苷酸稱為錯配。計算連續核苷酸序列的 % 互補性時不可進行插入和刪除。

【0331】 應知在判定互補性時，只要核鹼基形成瓦特生克立克 (Watson-Crick) 鹼基配對的功能留存，即可不考量核鹼基的化學修飾 (例如在計算 % 相同度時，5'-甲基胞嘧啶與胞嘧啶視為相同)。

【0332】 **身份**

【0333】 本文所用的「同一性 (identity)」一詞係指核酸分子 (例如 siRNA 分子) 中的連續核苷酸序列與參考序列 (例如序列模體) 完全相同的核苷酸所佔的比例 (以百分比表現)，該核酸分子橫跨該連續核苷酸序列。

【0334】 相同度百分比的計算方式是，算出兩個序列 (在本發明之化合物的連續核苷酸序列中及在參考序列中) 之間相同 (為一個匹配) 的對齊核鹼基的數目，將該數字除以寡核苷酸中的核苷酸總數，再乘以 100。因此，相同度百分比 = (匹配數 x 100)/對齊區域 (例如連續核苷酸序列) 長度。計算連續核苷酸序列的相同度百分比時不可對序列進行插入和刪除。應知在判定相同度時，只要核鹼基形成瓦特生克立克 (Watson-Crick) 鹼基配對的功能留存，即可不考量核鹼基的化學修飾 (例如在計算 % 相同度時，5'-甲基胞嘧啶與胞嘧啶視為相同)。

【0335】 因此應當理解的是，同一性及互補性之間存在關係，使得本發明之雙股 RNA 分子內與標靶序列互補之連續核苷酸序列亦與該互補序列共享一定百分比之同一性。

【0336】 **雜交**

【0337】 本文所用的「雜交」一詞理解為兩股核酸鏈 (例如寡核苷酸及目標核酸) 在相對股上的鹼基對之間形成氫鍵，從而形成雙鏈體 (duplex)。兩股核酸之間的結合親和力是指雜交的強度。其通常用融化溫度 (T_m) 來描述，所述融化溫度的定義是一半寡核苷酸與標靶核酸形成雙股螺旋時的溫度。在生理條件下，T_m 並非確實與親和力成比例（Mergny 及 Lacroix, 2003, Oligonucleotides 13:515–537）。標準狀態吉布斯自由能 ΔG° 更能準確代表結合親和力，並且與反應的離解常數 (K_d) 之間具有 $\Delta G^\circ = -RT\ln(K_d)$ 的關係，其中 R 是氣體常數，而 T 是絕對溫度。因此，寡核苷酸與該標靶核酸之間的反應的非常低的 ΔG° 體現該寡核苷酸與該標靶核酸之間的強勢雜交。ΔG° 為與其中含水濃度為 1M、pH 為 7、溫度為 37°C 之反應關聯的能量。寡核苷酸與標靶核酸之雜交為自發性反應，而自發性反應之 ΔG° 小於零。ΔG° 可經由實驗來測量：例如，利用如 Hansen 等人 1965 年在 *Chem.Comm.*36–38 及 Holdgate 等人, 2005, *Drug Discov Today* 中所述之等溫滴定量熱法 (ITC)。具有通常技術者應知，市面上可購得用於測量 ΔG° 的商用設備。ΔG° 亦可透過數值方式進行估計，例如藉由利用 SantaLucia 於 1998 年在 *Proc Natl Acad Sci USA*.95: 1460–1465 中描述的最近鄰模型或利用 Sugimoto 等人，1995, *Biochemistry* 34:11211-11216 及 McTigue 等人，2004, *Biochemistry* 43:5388-5405 中描述的適當取得之熱力學參數。

【0338】 於一些實施例中，該雜交之程度或強度藉由標準狀態吉布斯自由能 ΔG° 來測量。寡核苷酸可以低於-10 kcal 範圍的估計 ΔG° 值雜交至標靶核酸，諸如低於 -15 kcal，諸如低於 -20 kcal，及諸如低於 -25 kcal。在某些實施例中，以 -10 至 -60 kcal、諸如 -12 至 -40 kcal、諸如 -15 至 -30 kcal、或 -16 至 -27 kcal、諸如 -18 至 -25 kcal 的估計 ΔG° 值，該寡核苷酸與標靶核酸雜交。

【0339】 **鹽**

【0340】如本文所用，術語「鹽」符合其通常已知之含義，亦即陰離子及陽離子之離子組合體。

【0341】本發明提供一種本發明之雙股 RNA 分子之醫藥上可接受之鹽類。換言之，本發明提供了本發明之雙股 RNA 分子，其中該雙股 RNA 分子為醫藥上可接受之鹽的形式。

【0342】在某些實施例中，該醫藥上可接受之鹽可為鈉鹽或鉀鹽。

【0343】本發明提供一種本發明之雙股 RNA 分子之醫藥上可接受之鈉鹽。

【0344】本發明提供一種本發明之雙股 RNA 分子之醫藥上可接受之鉀鹽。

【0345】雙股 RNA 分子之遞送

【0346】本發明之雙股 RNA 分子可以囊裝於基於脂質的遞送載體中，共價連結至或囊裝於樹枝狀聚合物中，或者與適體結合。

【0347】這可能是為了將本發明之雙股 RNA 分子遞送至標靶細胞及/或改善該雙股 RNA 分子之藥物動力學。

【0348】基於脂質的遞送載體之實例包括水包油乳液、微胞、脂質體及脂質奈米顆粒。

【0349】應當理解，當本發明之雙股 RNA 分子結合至至少一個結合部分時，除了將雙股 RNA 分子結合至至少一個結合部分之外，還包封雙股 RNA 分子，與僅結合至結合物部分相比，其可以提供外加優勢。

【0350】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子可以與白蛋白組合投予。白蛋白可以為血清白蛋白，諸如小鼠血清白蛋白或人血清白蛋白。在不希望被理論束縛的情況下，白蛋白可以作為運輸載體和/或可以促進或增強本發明的雙股 RNA 分子進入相關組織或細胞的攝取。

【0351】 **醫藥組成物**

【0352】 本發明提供一種醫藥組成物，該醫藥組成物包含本發明之雙股 RNA 分子以及醫藥上可接受之稀釋劑、溶劑、載劑、鹽及/或佐劑。

【0353】 本發明提供一種包含本發明之雙股 RNA 分子及醫藥上可接受之鹽的醫藥組成物。例如，該鹽可包含金屬陽離子，諸如鈉鹽或鉀鹽。

【0354】 本發明提供了本發明之醫藥組成物，其中該醫藥組成物包含本發明之雙股 RNA 分子及水性稀釋劑或溶劑。

【0355】 本發明提供了一種溶液，諸如本發明之雙股 RNA 分子的磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液。在一些實施例中，本發明之溶液 (諸如磷酸鹽緩衝生理食鹽水) 為無菌溶液。

【0356】 本發明之醫藥組成物可以局部投予至眼睛 (例如經眼投予)。應當理解，本發明之雙股 RNA 分子可以投予至眼睛的任何部分。

【0357】 在一些實施例中，醫藥組成物係用於投予至眼睛之前部。在一些實施例中，醫藥組成物係用於投予至結膜。在一些實施例中，醫藥組成物係用於投予至角膜。在一些實施例中，醫藥組成物係用於投予至眼球結膜。在一些實施例中，醫藥組成物係用於投予至眼瞼結膜。在一些實施例中，醫藥組成物係用於投予至眼結膜。在一些實施例中，醫藥組成物係用於投予至穹窿結膜。在一些實施例中，醫藥組成物係用於投予至眼球結膜、眼瞼結膜、眼結膜及穹窿結膜中的一者或多者。

【0358】 在一些實施例中，本發明的藥物組合物可包含白蛋白。白蛋白可以為血清白蛋白，諸如小鼠血清白蛋白或人血清白蛋白。

【0359】 **製造方法**

【0360】 在一進一步態樣中，本發明提供製造本發明之雙股 RNA 分子之方法，該方法包含使核苷酸單元反應並藉此形成包含在寡核苷酸中的共價連結

之連續核苷酸單元。較佳地，該方法使用亞磷醯胺化學 (參見例如 Caruthers 等人，1987, Methods in Enzymology 第 154 卷，第 287-313 頁)。在一進一步實施例中，該方法進一步包含使連續核苷酸序列與結合部分反應，以使結合物部分接附 (例如共價接附) 至雙股 RNA 分子。在一進一步態樣中，提供一種用以製造本發明之組成物之方法，該方法包含將本發明之雙股 RNA 分子與醫藥上可接受之稀釋劑、溶劑、載劑、鹽及/或佐劑混合。

【0361】 **治療**

【0362】 如本文所用，「治療」一詞意指治療既有疾病 (*例如*本文所提及之疾病或病症)，或防範疾病 (*亦即*預防)。因此應知，本文中所稱之治療，於一些實施例中，係預防性的。

【0363】 本發明提供用於治療或預防疾病之方法，該方法包含向罹患或易患該疾病之個體投予治療或預防有效量之本發明之雙股 RNA 分子或本發明之醫藥組成物。

【0364】 本發明提供了如本發明之雙股 RNA 分子，其用為藥物在治療疾病中使用。

【0365】 本發明提供用於治療之本發明之雙股 RNA 分子。

【0366】 本發明提供本發明之雙股 RNA 分子，其用於製備用於治療或預防疾病的藥物。

【0367】 本發明提供用為藥物之本發明之醫藥組成物。

【0368】 本發明提供用於治療之本發明之醫藥組成物。

【0369】 本發明提供本發明之醫藥組成物用於製備用於治療或預防疾病的藥物。

【0370】 該疾病可以為與眼睛關聯的疾病。該疾病可以為影響眼睛的疾病。

【0371】該疾病可以為眼睛 (或與眼睛關聯) 的感染。該疾病可以為眼睛 (或與眼睛關聯) 的炎症。

【0372】在一些實施例中，疾病可以為結膜炎、乾眼症或眼睛的炎症。

【0373】在一些實施例中，待治療個體為動物，較佳地為哺乳動物 (諸如小鼠、大鼠、倉鼠或猴) 或較佳地為人。在一些實施例中，該個體為人。

【0374】在一些實施例中，本發明之雙股 RNA 分子或本發明之醫藥組成物用於與另一種治療劑的組合治療。

【0375】**投予策略**

【0376】應當理解，本發明之雙股 RNA 分子或本發明之醫藥組成物可以向個體投予一次，或者可以在數小時、數天、數週、數月或數年之時段內投予。

【0377】在一些實施例中，雙股 RNA 分子或醫藥組成物的投予可以為長期投予。

【0378】在一些實施例中，將本發明之雙股 RNA 分子或醫藥組成物投予至僅一隻眼睛。

【0379】在一些實施例中，將本發明之雙股 RNA 分子或醫藥組成物投予至雙眼。可以同時或依次投予至雙眼。

【0380】在一些實施例中，將雙股 RNA 分子每天一次、每天兩次、每天三次或每天多於三次投予至一隻 (或每隻) 眼睛。例如，雙股 RNA 分子可以每天 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多次投予至一隻 (或每隻) 眼睛。

【0381】在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以每 1 小時、每 2 小時、每 3 小時、每 4 小時、每 5 小時、每 6 小時、每 7 小時、每 8 小時、每 9 小時、每 10 小時、每 11 小時或每 12 小時投予至一隻 (或每隻) 眼睛。在一些實施例中，雙股 RNA 分子可以每 4 小時投予至一隻 (或每隻) 眼睛。

【0382】在一些實施例中，將雙股 RNA 分子投予至一隻 (或每隻) 眼睛持續少於一天、或持續一天、或連續兩天、連續三天、連續四天、連續五天、連續六天、連續七天、連續八天、連續九天、連續十天或連續多於十天。例如，雙股 RNA 分子可以投予至一隻 (或每隻) 眼睛持續 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 或多於 31 天。

【0383】在一些實施例中，將雙股 RNA 分子投予至一隻 (或每隻) 眼睛持續一週、兩週、三週、四週、五週、六週或多於六週之時段。例如，雙股 RNA 分子可以投予至一隻 (或每隻) 眼睛持續 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52 或多於 52 週。

【0384】在一些實施例中，將雙股 RNA 分子投予至一隻 (或每隻) 眼睛持續一個月、兩個月、三個月、四個月、五個月、六個月或多於六個月之時段。例如，雙股 RNA 分子可以投予至一隻 (或每隻) 眼睛持續 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或多於 12 個月。

【0385】在一些實施例中，將雙股 RNA 分子投予至一隻 (或每隻) 眼睛持續一年、兩年、三年、四年、五年或多於五個月之時段。例如，雙股 RNA 分子可以投予至一隻 (或每隻) 眼睛持續 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 或多於 25 年。

【0386】調節表現之方法

【0387】本發明提供一種用以調節細胞中標靶之表現的方法，該方法包含對該細胞施以有效量的本發明之雙股 RNA 分子或本發明之醫藥組成物。

【0388】在某些實施例中，該方法是*體外*方法。

【0389】在某些實施例中，該方法是*體內*方法。

【0390】在一些實施例中，細胞為動物細胞，較佳地為哺乳動物細胞，諸如小鼠細胞、大鼠細胞、倉鼠細胞或猴子細胞或較佳地為人細胞。

【0391】在一些實施例中，細胞為哺乳動物細胞。

【0392】在一些實施例中，該細胞是人類細胞。

【0393】在一些實施例中，細胞為眼睛的細胞。在一些實施例中，細胞為人眼睛的細胞。

【0394】在一些實施例中，可以藉由採樣醫療裝置來收集細胞。在一些實施例中，細胞可以來自眼睛的眼表面的結膜細胞的集合。

【0395】**應用**

【0396】本發明之雙股 RNA 分子可用作例如診斷、治療及預防的研究試劑。

【0397】在研究中，此類雙股 RNA 分子可用於抑制實驗動物的眼睛中表現的標靶的表現，從而促進標靶的功能分析或評估其作為治療介入標靶的實用性。

【0398】本揭露不受本文揭露的示例性方法和材料的限制，任何與本文描述的方法和材料類似或等同的方法和材料可用於本揭露的實施例的實踐或測試。數值範圍包括界定該範圍之數字。除非另有說明，任何核酸序列以 5' 至 3' 定向從左至右書寫；氨基酸序列分別從左到右按氨基到羧基定向書寫。

【0399】本文所論述之出版物僅由於其揭示內容先於本申請案的申請日期而提供。本文中之內容皆不應視為承認該等出版物構成隨附申請專利範圍的先前技術。

【0400】本發明現在將藉由實例的方式進一步描述，這些實例旨在幫助所屬技術領域中具有通常知識者實施本發明，並且不打算以任何方式限制本發明的範圍。

【0401】**實例**

【0402】**實例 1：**

【0403】新西蘭白兔在左眼及右眼中均藉由局部投予給藥，每天 3 次，給藥間隔至少 4 h，持續 5 天，使用 20 µl 25 µg/µL 溶液 (每劑量 500 µg) 的裸或 C16-、C22-或膽固醇結合的 siRNA 分子 (包含在 PBS 中配製的 SEQ ID NO: 3 的序列)。最後一次給藥後四天，處死兔，並且從每隻眼睛採集眼瞼結膜樣本 (鹽水 n=4，siRNA 治療組 n=6)，並藉由數字液滴 PCR 分析 AHSA1 mRNA 敲低。

【0404】添加金屬珠後，使用 TissueLyser II (Qiagen) 在 500 µL MagnaPure 組織裂解緩衝液 (Roche LifeScience) 中均質結膜組織，並根據製造商的說明 (Roche LifeScience) 使用 MagNA Pure 96 系統從 350 µL 裂解緩衝液中萃取 mRNA 並在 50 µL 無 RNA 酶水中萃取。cDNA 合成使用 4 µL 輸入 RNA 且使用用於 RT-qPCR 之 IScript 高級 cDNA 合成套組 (Bio-Rad) 進行，且根據製造商的協議，2 µL 用作數字液滴 PCR 的輸入，其使用 ddPCR supermix 作為探針（無 dUTP） (Bio-Rad)。

【0405】使用以下 TaqMan 基因表現測定：

【0406】AHSA1 (FAM)：Oc06762465_g1 (目錄號：4351372, TaqMan Thermofisher Scientific) 及 HPRT1 (VIC)：Oc03399461_m1 (目錄號：4331182, TaqMan Thermofisher Scientific)

【0407】使用 QuantaSoft 軟體 (Bio-Rad) 相對於管家基因 HPRT 量化 AHSA1 mRNA 濃度，並將其標準化為 PBS 處理的兔 (設置為值 1)。

【0408】結果顯示於圖 1。對於包含 SEQ ID NO: 3 的序列的裸 siRNA 分子、包含 SEQ ID NO: 3 的序列的 C16 結合的 siRNA 分子、包含 SEQ ID NO: 3 的序列的 C22 結合的 siRNA 分子及包含 SEQ ID NO: 3 的序列的膽固醇結合的 siRNA 分子，在整個結膜中觀察到 20-25% 的敲低，表明與裸 AHSA1 siRNA 相比，C16、C22 及膽固醇 AHSA1 siRNA 具有更優異的敲低。

【0409】**實例 2：**

【0410】新西蘭白兔藉由局部投予在眼睛中給藥，每天 3 次，投予間隔至少 4 h，持續 5 天，使用 20 µl 25 µg/µL 溶液 (每劑量 500 µg) 的裸或 C16-、C22-或膽固醇結合的 siRNA 分子 (包含在 PBS 中的 SEQ ID NO: 3 的序列)。最後一次給藥後四天，處死兔，並且從採集眼瞼結膜樣本 (鹽水 n=4，siRNA 治療組 n=6)，並藉由 hELISA 進行 AHSA1 siRNA 含量分析。

【0411】添加金屬珠後，使用 TissueLyser II (Qiagen) 在 500 µL MagnaPure 組織裂解緩衝液 (Roche LifeScience) 中對結膜組織 (~5 mg) 進行均質。使用 hELISA，使用生物素化捕獲探針及與反義 siRNA 股結合的地高辛結合的檢測探針確定 siRNA 含量。將所得裂解物稀釋並與 35 nM 生物素化捕獲探針及 30 nM 地高辛偶聯檢測探針在 SSCT 緩衝液 (5x 檸檬酸鈉緩衝液 [SSC 緩衝液 20x 濃縮液，Sigma-Aldrich，編號 6639] 96 孔板中含有 0.05% Tween 20 [Sigma-Aldrich，編號 P9416]) 中室溫孵育 30 min。然後將組裝的複合物捕獲在鏈黴親和素包被的 ELISA 板 (Nunc 436014) 上 1 h，並在使用 2 x SSCT 緩衝液進行三個洗滌步驟後，將每個孔與抗地高辛鹼性磷酸酶 (AP)-Fab 片段 (Roche，編號 11093274910) 在室溫一起孵育 1 h。經過三個外加洗滌步驟後，將 BluePhos 受質 (Kirkegaard & Perry Labs [KPL]，編號 50-88-00) 添加到板中，並在 20 min 後在 615 nm 處藉由分光光度法測量顯色情況。對於寡核苷酸含量分析，測量每個樣品的幾種稀釋度 (50x、100x、200x、400x、800x 及 1,600x)。

返回計算各自的組織重量並對不同稀釋度的有效值求平均值 (亦即標準曲線線性範圍內的讀數)，生成以 nmol/g 結膜組織重量為單位的藥濃度。

【0412】 結果顯示於圖 2。對於包含 SEQ ID NO: 3 的序列的裸 siRNA 分子、包含 SEQ ID NO: 3 的序列的 C16 結合的 siRNA 分子、包含 SEQ ID NO: 3 的序列的 C22 結合的 siRNA 分子及包含 SEQ ID NO: 3 的序列的膽固醇結合的 siRNA 分子，在結膜中觀察到的增加的含量，表明與裸 siRNA 相比，C16、C22 及特別是膽固醇結合的 AHA1 siRNA 具有更優異的含量。

【0413】 **實例 3：**

【0414】 新西蘭白兔藉由局部投予在眼睛中給藥，每天 3 次，投予間隔至少 4 h，持續 5 天，使用 20 µl 25 µg/µL 溶液 (每劑量 500 µg) 的裸或 C16-、C22-或膽固醇結合的 siRNA 分子 (包含在 PBS 中的 SEQ ID NO: 3 的序列)。最後一次給藥 EYEPRIM (OPIA 技術) 後四天，從眼球結膜採集樣本 (鹽水 n=4，siRNA 治療組 n=6)。對動物實施安樂死後，將暴露眼球結膜，並將 EYEPRIM 膜壓在下眼球結膜上持續 3 秒。然後將膜從 EYEPRIM 上取下。這樣做時，在彈出時用鑷子夾住膜以避免膜掉落/飛走。將膜快速冷凍到 2mL Eppendorf 管中。

【0415】 添加金屬珠後，使用 TissueLyser II (Qiagen) 在 500 µL MagnaPure 組織裂解緩衝液 (Roche LifeScience) 中均質 EYEPRIM 樣品，並根據製造商的說明 (Roche LifeScience) 使用 MagNA Pure 96 系統從 350 µL 裂解緩衝液中萃取 mRNA 並在 50 µL 無 RNA 酶水中萃取。cDNA 合成使用 4 µL 輸入 RNA 且使用用於 RT-qPCR 之 IScript 高級 cDNA 合成套組 (Bio-Rad) 進行，且根據製造商的協議，2 µL 用作數字液滴 PCR 的輸入，其使用 ddPCR supermix 作為探針（無 dUTP） (Bio-Rad)。

【0416】 使用以下 TaqMan 基因表現測定：

【0417】 AHSA1 (FAM)：Oc06762465_g1 (目錄號：4351372, TaqMan Thermofisher Scientific) 及 HPRT1 (VIC)：Oc03399461_m1 (目錄號：4331182, TaqMan Thermofisher Scientific)。

【0418】 使用 QuantaSoft 軟體 (Bio-Rad) 相對於管家基因 HPRT 量化 AHSA1 mRNA 濃度，並將其標準化為 PBS 處理的兔 (PBS 設置為 1)。

【0419】 結果顯示於圖 3。將 EYEPRIM 結膜樣品中的 69% 敲低 (C16 結合的 SEQ ID NO: 3)、65% 敲低 (C22 結合的 SEQ ID NO: 3) 及 61% 敲低 (膽固醇結合的 SEQ ID NO: 3) 與裸 siRNA (SEQ ID NO: 3) 之 54% 進行比較，與裸 siRNA 相比，與 C16- 結合的具有顯著優異的敲低 (p=0.02 學生 t 檢驗) 以及與 C22- 及膽固醇結合的 AHSA1 siRNA 具有更優異的敲低。

【0420】 **實例 4**

【0421】 *等溫滴定量熱法 (ITC)*

【0422】 實驗在測定設置中的自動 PEAQ ITC (Malvern Panalytical，Malvern，英國) 中進行，其中標靶蛋白存在於注射器中，且被注射到放置在細胞中的 FA-siRNA 樣品中。注射器中的小鼠血清白蛋白 (MSA，目錄號 A3139-100 mg，基本上不含脂肪酸) (25-450 μM) 和細胞中的 FA-siRNA (3-60 μM)，根據測定的化學計量和結合親和力，使用透析中過濾和脫氣的緩衝液進行調整。ITC 分析在 25°C 進行，具有以下實驗參數：攪拌速度：750 rpm，間隔：150 s，注射持續時間：3 s，參考功率 10 μcal/s。初始延遲設定為 60 s，且過濾週期設定為 5 s，分別進行 13 次或 19 次注射，滴定體積分別為 2.0 或 3.0，以收集分析相互作用的焓資料。進行對照滴定以校正稀釋熱 (緩衝液註入 FA-siRNA，MSA 註入緩衝液，以及緩衝液註入緩衝液)。MSA 溶解在 DPBS (目錄號 14190-094，Gibco/Thermo Fisher Scientific，Basel，瑞士) 中，並且使用帶有 Slide-A-Lyzer 透析盒 20K MWCO 的 DPBS (目錄號 66003，Thermo

ScientificTM，Waltham，MA) 在 ITC 分析之前進行進一步透析。FA-siRNA 粉末溶解在 DPBS 中。透析的蛋白質及 FA-siRNA 濃度分別在 280 nm 及 260 nm 處用紫外光譜測定 (根據 Beer-Lambert 定律方程式)。從 FA-siRNA 滴定過程中產生的反應熱中減去偏移熱及 MSA 稀釋熱。手動調整基線 (如果需要)，並使用 MicroCal PEAQ ITC 分析軟體，版本 1.3 (Malvern 儀器，Malvern，英國) 中的單位點結合模型擬合校正後的反應熱。在 FA-siRNA ITC 研究之前進行 MSA 滴入華法林 (DPBS + 2% DMSO (v/v)) 的對照 ITC 實驗。

【0423】 *分析型超離心 (AUC)*

【0424】 樣品在分析型超離心機 XLI 及 Optima-AUC (Beckman Coulter，CA) 上進行沉降速度 (SV) 和沉降平衡 (SE) 實驗，根據測試濃度 (1-75 μM) 進行吸光度檢測 (範圍為 260-295 nm)。單個樣品溶解在 DPBS (目錄號 14190-094，Gibco/Thermo Fisher Scientific，Basel，瑞士) 中，並用 DPB 稀釋。AUC-SV 實驗在 60000 rpm 下及 20°C 運行，使用 3 mm 和 12 mm Ti 中心件 (Nanolytics Instruments，Potsdam，德國) 及 An-60 Ti 轉子 (Beckman Coulter，CA)。SE 實驗採用多轉速模式 (針對 FA Bis C16 和 FA C24 結合物的轉速分別為 10、15 及 20 krpm 或 7、10 和 14 krpm)，且 FA-siRNA 的結合物濃度分別設為 6 和 25 μM。SE 分析使用 3 mm Ti 中心件 (Nanolytics Instruments，Potsdam，德國) 及 An-60 Ti 轉子 (Beckman Coulter，CA)。用密度計和黏度計 (分別為 DMA 5000 M 和 AMVn；Anton Paar，Aarau，瑞士) 測定緩衝液的密度和黏度。使用螢光檢測系統 (Aviv Biomedical，NJ)，以吸光度 (290-305 nm) 和/或螢光檢測在 SV 模式下分析 FA-siRNA 結合物與 MSA 的相互作用。

【0425】 *結果*

【0426】 結果顯示於圖 4，其提供了不同的脂肪酸結合的 AHA-1 特異性 siRNAs (FA-siRNA) 之生物物理學分析。第 3 列：不同脂肪酸結合物在 25 μM

濃度下以不同寡聚態存在的傾向 (通過 AUC 測量的最終寡聚態)；第 4 列：不同 FA-siRNA 在 25 μM PBS 中溶解時的單體百分比；第 5 列：與小鼠血清白蛋白 (MSA；由 ITC 測定) 的結合親和力；第 6 列：與 MSA 結合的 FA-siRNA 結合物的數量。

【0427】 結果表明：(i) 脂肪酸結合 siRNA分子 的結合強度可以藉由脂肪酸的長度來調節/修飾；(ii) 引入雙鍵 (例如硬脂酸與油酸) 不會影響脂肪酸與白蛋白的結合；(iii) 白蛋白結合可作為脂肪酸結合 siRNA 分子的運輸載體，且結合強度可根據需要調整。

【0428】 **實例 5：**

【0429】 新西蘭白兔在左眼及右眼中均藉由局部投予給藥，每天 3 次，給藥間隔至少 4 h，持續 5 天，使用 20 μl 25 μg/μL 溶液 (每劑量 500 μg) 的裸或 C16-、C22-或膽固醇結合的 siRNA 分子 (包含在 PBS 中配製的 SEQ ID NO: 3 的序列)。最後一次給藥後三天，處死兔，並且從每隻眼睛 (n= 2 隻眼睛) 採集上、下眼瞼結膜樣本，並用原位雜交 (ISH) 針對結膜組織中 siRNA 分子分佈分析組織切片 (n= 3-8 隻眼睛)。

【0430】 將結膜組織解剖，在 10% NBF 中固定過夜，然後進行標准脫水處理，且第二天包埋在石蠟中。橫向結膜組織切片 (5 μm) 使用自動 Ventana Discovery ULTRA 自動染色機 (Roche Diagnostics) 進行染色。自動方案設計為烘烤 (60°C，持續 20min)，脫膠 (69°C，持續 24 min) 及 ISH 蛋白酶 3 處理 (一滴，32min)。載玻片用 DISC 抑制劑 (一滴，12 min) 處理，並用反應緩衝液 (1x) 洗滌。將靶向 SEQ ID NO: 3 的 DIG 標記探針在 miRCURY LNA miRNA ISH Buffer (1x 在無RNA 酶的水中) 中稀釋至終濃度為 0.25 nM，手動塗於載玻片上。載玻片在 90°C 變性持續 8 min，然後在 65°C 雜交持續 16 min。然後用 0.1x SSC 洗滌載玻片 (5x 在 54°C 持續 4 min)。使用抗 DIG-HRP (一滴，4°C，

不加熱)，然後藉由施加 DISC AMP TSA BF 和 DISC AMP H2O2 BF (各一滴，不加熱，持續 4 min) 以及藉由 DISC 抗 BF HRP (各一滴，不加熱，持續 4 min) 檢測 DIG 分子。用 DAB (棕色) 檢測試劑盒來檢測 HRP。在 EcoMount 培養基上裱片之前，載玻片用蘇木精 II 反染 (不加熱 4 min)，然後用發藍試劑處理 (不加熱 4 min)。使用 Olympus VS120 型載玻片掃描儀以 20x 放大率掃描載玻片以顯示結果。使用 Halo, Indica Labs (V3.6.4134.166) 進行陽性染色的定量。

【0431】 使用以下試劑：ISH-蛋白酶 3 (05273331001)、Disc抑制劑 (07017944001)、抗 DIG HRP (07256299001)、Disc抗 BF HRP (07529422001)、DISC AMP TSA BF (07529422001)、蘇木精 II (05277965001)、發藍試劑 (05266769001)、SSC 溶液 (10x) (05353947001)、反應緩衝濃縮物 (10x) (05353955001)、DISCChromoMap DAB RUO (05266645001)，全部購自Roche Diagnostics。miRCURY LNA miRNA ISH 緩衝液 (#1108512) 和靶向 SEQ ID NO: 3 的 DIG 標記探針 (自訂 miRCURY LNA/5DiGN/CGTGGCCTTAATGAA/3DiG_N/) 購自 Qiagen。

【0432】 結果顯示於圖 5：對於包含 SEQ ID NO: 3 的序列的裸 siRNA 分子、包含 SEQ ID NO: 3 的序列的 C16 結合的 siRNA 分子、包含 SEQ ID NO: 3 的序列的 C22 結合的 siRNA 分子及包含 SEQ ID NO: 3 的序列的膽固醇結合的 siRNA 分子，觀察到 0.3-0.4% 的結膜組織 ISH 染色，表明與裸 AHSA1 siRNA 相比，C16、C22 及膽固醇 AHSA1 siRNA 具有更優異的敲低，而與裸及膽固醇 AHSA1 siRNA 相比，C16 及 C22 AHAS1 siRNA 顯示出最優異的結果。此外，裸 AHSA1 siRNA 的染色主要位於結膜淺層，而 C16、C22 和膽固醇 AHSA1 siRNA 的染色也位於結膜組織基質中。

【0433】 上述說明書中所提及之所有出版物皆以引用方式併入本文中。本發明之所闡述方法及系統之各種修改及變化為熟習此項技術者所明瞭，其並

不背離本發明之範圍及精神。儘管已結合具體較佳實施例闡述了本發明，但應理解，所主張之本發明不應過度地限於該等具體實施例。實際上，熟習分子生物學或相關領域者所明瞭之對於用於實施本發明之所闡述模式之各種修改皆意欲屬下列申請專利範圍的範圍內。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="C258940SEQA.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-12-
27">
 <ApplicantFileReference>P125894EP</ApplicantFileReference>
 <ApplicantName languageCode="zh">瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (F. Hoffmann-La Roche
AG)</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>F. Hoffmann-La Roche AG</ApplicantNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="en">DOUBLE-STRANDED RNA MOLECULE FOR
ADMINISTRATION TO THE EYE</InventionTitle>
 <InventionTitle languageCode="zh">用於投予至眼睛之雙股 RNA 分子
</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>3</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q1">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>aatctcgtggccttaatgaaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q2">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aatctcgtggccttaatgaag</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q3">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>tttcattaaggccacgagatt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種用於局部投予至眼睛之雙股核糖核酸 (RNA) 分子，其中該雙股 RNA 分子能夠與標靶序列結合，其中該雙股 RNA 分子包含具有 5' 端及 3' 端的第一股，以及具有 5' 端及 3' 端的第二股，其中該第一股係與該第二股互補，其中該第一股包含長度為至少 8 個核苷酸之連續核苷酸序列，該連續核苷酸序列係與標靶序列互補，且其中該雙股 RNA 分子係與至少一個結合物部分結合。

【請求項2】

如請求項 1 之雙股 RNA 分子，其中該雙股 RNA 分子為 siRNA 分子。

【請求項3】

如請求項 1 或請求項 2 之雙股 RNA 分子，其中該雙股 RNA 分子能夠抑制標靶之表現。

【請求項4】

如請求項 1 至 3 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該結合物部分為脂肪酸分子或膽固醇分子。

【請求項5】

如請求項 4 之雙股 RNA 分子，其中該脂肪酸分子係選自由以下所組成之清單：C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、C21、C22、C23、C24、C25、C26、C27、C28、C29、C30、C31、C32、C33、C34、C35、C36、C37、C38、C39 及 C40。

【請求項6】

如請求項 4 或請求項 5 之雙股 RNA 分子，其中該脂肪酸分子為 C16。

【請求項7】

如請求項 4 或請求項 5 之雙股 RNA 分子，其中該脂肪酸分子為 C22。

【請求項8】

如請求項 4 至 7 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該脂肪酸分子為支鏈的。

【請求項9】

如請求項 4 至 7 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該脂肪酸分子為非支鏈的。

【請求項10】

如請求項 4 至 9 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該脂肪酸分子為飽和的。

【請求項11】

如請求項 4 至 9 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該脂肪酸分子為不飽和的。

【請求項12】

如請求項 11 之雙股 RNA 分子，其中該脂肪酸分子包含一或更多、二或更多、三或更多、四或更多、五或更多、六或更多、七或更多、八或更多、九或更多、十或更多、十一或更多、十二或更多、十三或更多、十四或更多、十五或更多、十六或更多、十七或更多、十八或更多、或者十九或更多個碳雙鍵。

【請求項13】

如請求項 11 或請求項 12 之雙股 RNA 分子，其中該脂肪酸分子包含一或更多、二或更多、三或更多、四或更多、五或更多、六或更多、七或

更多、八或更多、九或更多、十或更多、十一或更多、十二或更多、十三或更多、十四或更多、十五或更多、十六或更多、十七或更多、十八或更多、或者十九或更多個碳參鍵。

【請求項14】

如請求項 11 至 13 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該脂肪酸分子係選自由以下所組成之清單： C3:0；C4:0；C4:1；C5:0；C5:1；C6:0；C6:1；C6:2；C7:0；C7:1；C7:2；C8:0；C8:1；C8:2；C8:3；C9:0；C9:1；C9:2；C9:3；C10:0；C10:1；C10:2；C10:3；C10:4；C11:0；C11:1；C11:2；C11:3；C11:4；C12:0；C12:1；C12:2；C12:3；C12:4；C12:5；C13:0；C13:1；C13:2；C13:3；C13:4；C13:5；C14:0；C14:1；C14:2；C14:3；C14:4；C14:5；C14:6；C15:0；C15:1；C15:2；C15:3；C15:4；C15:5；C15:6；C16:0；C16:1；C16:2；C16:3；C16:4；C16:5；C16:6；C16:7；C17:0；C17:1；C17:2；C17:3；C17:4；C17:5；C17:6；C17:7；C18:0；C18:1；C18:2；C18:3；C18:4；C18:5；C18:6；C18:7；C18:8；C19:0；C19:1；C19:2；C19:3；C19:4；C19:5；C19:6；C19:7；C19:8；C20:0；C20:1；C20:2；C20:3；C20:4；C20:5；C20:6；C20:7；C20:8；C20:9；C21:0；C21:1；C21:2；C21:3；C21:4；C21:5；C21:6；C21:7；C21:8；C21:9；C22:0；C22:1；C22:2；C22:3；C22:4；C22:5；C22:6；C22:7；C22:8；C22:9；C22:10；C23:0；C23:1；C23:2；C23:3；C23:4；C23:5；C23:6；C23:7；C23:8；C23:9；C23:10；C24:0；C24:1；C24:2；C24:3；C24:4；C24:5；C24:6；C24:7；C24:8；C24:9；C24:10；C24:11；C25:0；C25:1；C25:2；C25:3；C25:4；C25:5；C25:6；C25:7；C25:8；C25:9；C25:10；C25:11；C26:0；C26:1；C26:2；C26:3；C26:4；C26:5；C26:6；C26:7；C26:8；C26:9；C26:10；C26:11；C26:12；C27:0；C27:1；C27:2；

C27:3；C27:4；C27:5；C27:6；C27:7；C27:8；C27:9；C27:10；C27:11；C27:12；C28:0；C28:1；C28:2；C28:3；C28:4；C28:5；C28:6；C28:7；C28:8；C28:9；C28:10；C28:11；C28:12；C28:13；C29:0；C29:1；C29:2；C29:3；C29:4；C29:5；C29:6；C29:7；C29:8；C29:9；C29:10；C29:11；C29:12；C29:13；C30:0；C30:1；C30:2；C30:3；C30:4；C30:5；C30:6；C30:7；C30:8；C30:9；C30:10；C30:11；C30:12；C30:13；C30:14；C31:0；C31:1；C31:2；C31:3；C31:4；C31:5；C31:6；C31:7；C31:8；C31:9；C31:10；C31:11；C31:12；C31:13；C31:14；C32:0；C32:1；C32:2；C32:3；C32:4；C32:5；C32:6；C32:7；C32:8；C32:9；C32:10；C32:11；C32:12；C32:13；C32:14；C32:15；C33:0；C33:1；C33:2；C33:3；C33:4；C33:5；C33:6；C33:7；C33:8；C33:9；C33:10；C33:11；C33:12；C33:13；C33:14；C33:15；C34:0；C34:1；C34:2；C34:3；C34:4；C34:5；C34:6；C34:7；C34:8；C34:9；C34:10；C34:11；C34:12；C34:13；C34:14；C34:15；C34:16；C35:0；C35:1；C35:2；C35:3；C35:4；C35:5；C35:6；C35:7；C35:8；C35:9；C35:10；C35:11；C35:12；C35:13；C35:14；C35:15；C35:16；C36:0；C36:1；C36:2；C36:3；C36:4；C36:5；C36:6；C36:7；C36:8；C36:9；C36:10；C36:11；C36:12；C36:13；C36:14；C36:15；C36:16；C36:17；C37:0；C37:1；C37:2；C37:3；C37:4；C37:5；C37:6；C37:7；C37:8；C37:9；C37:10；C37:11；C37:12；C37:13；C37:14；C37:15；C37:16；C37:17；C38:0；C38:1；C38:2；C38:3；C38:4；C38:5；C38:6；C38:7；C38:8；C38:9；C38:10；C38:11；C38:12；C38:13；C38:14；C38:15；C38:16；C38:17；C38:18；C39:0；C39:1；C39:2；C39:3；C39:4；C39:5；C39:6；C39:7；C39:8；C39:9；C39:10；C39:11；C39:12；C39:13；C39:14；C39:15；C39:16；C39:17；C39:18；C40:0；C40:1；C40:2；C40:3；C40:4；

C40:5；C40:6；C40:7；C40:8；C40:9；C40:10；C40:11；C40:12；C40:13；C40:14；C40:15；C40:16；C40:17；C40:18；C40:19。

【請求項15】

如請求項 4 之雙股 RNA 分子，其中該膽固醇分子係選自由以下所組成之群組：3'-膽固醇基-TEG CPG、5'-膽固醇-TEG-CE 亞磷醯胺、5'-膽固醇-CE 亞磷醯胺及膽固醇基-TEG-CE 亞磷醯胺。

【請求項16】

如請求項 1 至 15 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該結合物部分係 (i) 位於該第一股之該 5' 端或該 3' 端；或 (ii) 位於該第二股之該 5' 端或該 3' 端。

【請求項17】

如請求項 1 至 16 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該結合物部分係位於該第一股之該 3' 端。

【請求項18】

如請求項 1 至 17 中任一項之雙股 RNA 分子，其中連接子係位於該雙股 RNA 分子與該結合物部分之間。

【請求項19】

如請求項 1 至 18 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該連接子為 (i) C6；(ii) TEG；或 (iii) 二核苷酸，視情況其中該二核苷酸為 CA。

【請求項20】

如請求項 1 至 19 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該連續核苷酸序列的長度為至少 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 個核苷酸。

【請求項21】

如請求項 1 至 20 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該連續核苷酸序列的長度為至少 20 個核苷酸。

【請求項22】

如請求項 21 之雙股 RNA 分子，其中該連續核苷酸序列的長度為 20、21、22、23 或 24 個核苷酸。

【請求項23】

如請求項 1 至 22 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該第一股由該連續核苷酸序列所組成。

【請求項24】

如請求項 1 至 23 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該雙股 RNA 分子係用於投予至該眼睛之前部。

【請求項25】

如請求項 1 至 24 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該雙股 RNA 分子係用於投予至該眼睛之結膜或該眼睛之角膜。

【請求項26】

如請求項 25 之雙股 RNA 分子，其中該雙股 RNA 分子係用於投予至眼球結膜、眼瞼結膜、眼結膜及/或穹窿結膜。

【請求項27】

如請求項 1 至 26 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該連續核苷酸序列係與標靶序列至少 75% 互補。

【請求項28】

如請求項 27 之雙股 RNA 分子，其中該連續核苷酸序列係與標靶序列至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或 100% 互補。

【請求項29】

如請求項 1 至 28 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該連續核苷酸序列包含相對於標靶序列之 1、2、3、4、5、6、7、8 個或更多個錯配。

【請求項30】

如請求項 2 至 29 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該標靶為 AHA-1。

【請求項31】

如請求項 30 之雙股 RNA 分子，其中該 AHA-1 標靶包含以下或由以下所組成：SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2。

【請求項32】

如請求項 1 至 31 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該連續核苷酸序列係與 AHA-1 標靶序列互補。

【請求項33】

如請求項 32 之雙股 RNA 分子，其中該連續核苷酸序列包含與 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 互補的核苷酸序列。

【請求項34】

如請求項 1 至 33 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該連續核苷酸序列包含以下或由以下所組成：SEQ ID NO: 3。

【請求項35】

如請求項 2 至 34 中任一項之雙股 RNA 分子，其中與對照相比，該標靶之該表現被抑制 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、95% 或100%。

【請求項36】

如請求項 1 至 35 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該雙股 RNA 分

子包含一或更多個修飾核苷。

【請求項37】

如請求項 36 之雙股 RNA 分子，其中該一或更多個修飾核苷為獨立地選自由以下所組成之群組的 2' 糖修飾核苷：2'-O-烷基-RNA；2'-O-甲基 RNA (2'-OMe)；2'-O-甲氧基乙基-RNA (2'-MOE)、2'-烷氧基-RNA；2'-胺基-DNA；2'-氟-RNA；2'-氟-DNA；阿拉伯糖核酸 (ANA)；2'-氟-ANA；鎖核酸 (LNA)，及其任何組合。

【請求項38】

如請求項 37 之雙股 RNA 分子，其中該 2' 糖修飾核苷為親和力增強型 2' 糖修飾核苷。

【請求項39】

如請求項 1 至 38 中任一項之雙股 RNA 分子，其中位於該連續核苷酸序列上的該等核苷之間的核苷間鍵結中之一者或多者係經修飾的。

【請求項40】

如請求項 39 之雙股 RNA 分子，其中位於該連續核苷酸序列上的該等核苷之間的該等核苷間鍵結中之至少約 75%、至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 95% 或約 100% 係經修飾的。

【請求項41】

如請求項 39 或請求項 40 之雙股 RNA 分子，其中經修飾的核苷間鍵結中之一者或多者或所有包含硫代磷酸酯鍵結。

【請求項42】

如請求項 41 之雙股 RNA 分子，其中存在於該雙股 RNA 分子中的所有核苷間鍵結為硫代磷酸酯核苷間鍵結。

【請求項43】

如請求項 1 至 42 中任一項之雙股 RNA 分子，其中該雙股 RNA 分子為醫藥上可接受之鹽的形式。

【請求項44】

如請求項 43 之雙股 RNA 分子，其中該鹽為鈉鹽或鉀鹽。

【請求項45】

一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 至 44 中任一項之雙股 RNA 分子，以及醫藥上可接受之稀釋劑、溶劑、載劑、鹽及/或佐劑。

【請求項46】

一種治療或預防個體之疾病的方法，其包含向有此需要之個體投予治療或預防有效量之如請求項 1 至 44 中任一項之雙股 RNA 分子或如請求項 45 之醫藥組成物。

【請求項47】

如請求項 1 至 44 中任一項之雙股 RNA 分子或如請求項 45 之醫藥組成物，其用於作為藥物在治療疾病中使用。

【請求項48】

一種如請求項 1 至 44 中任一項之雙股 RNA 分子或如請求項 45 之醫藥組成物用於製備藥物之用途，該藥物用於治療或預防疾病。

【請求項49】

如請求項 46 之方法；如請求項 47 使用之雙股 RNA 分子或醫藥組成物；或如請求項 48 之用途；其中該疾病為結膜炎、乾眼症或炎症。

【請求項50】

如請求項 46 之方法；如請求項 47 使用之雙股 RNA 分子或醫藥組成物；如請求項 48 之用途；或如請求項 49 之方法、使用之雙股 RNA 分子或醫藥組成物、或用途；其中該雙股 RNA 分子係每天一次、每天兩次、每

天三次或每天多於三次投予至該眼睛；視情況其中該雙股 RNA 分子係投予至雙眼。

【請求項51】

如請求項 46 之方法；如請求項 47 使用之雙股 RNA 分子或醫藥組成物；如請求項 48 之用途；或如請求項 49 或請求項 50 之方法、使用之雙股 RNA 分子或醫藥組成物、或用途；其中該雙股 RNA 分子係投予持續少於一天，或持續一天、兩天、三天、四天、五天、六天、七天或多於七天；視情況其中該雙股 RNA 分子係投予至雙眼。

【請求項52】

如請求項 46 之方法；如請求項 47 使用之雙股 RNA 分子或醫藥組成物；如請求項 48 之用途；或如請求項 49 或請求項 50 之方法、使用之雙股 RNA 分子或醫藥組成物、或用途；其中該雙股 RNA 分子係投予持續 (i) 一週、兩週、三週、四週、五週、六週或多於六週，或 (ii) 一個月、兩個月、三個月、四個月、五個月、六個月或多於六個月，或 (iii) 一年、兩年、三年、四年、五年或多於五年之時段；視情況其中該雙股 RNA 分子係投予至雙眼。

【請求項53】

一種調節細胞中標靶之表現的活體外方法，該方法包含以有效量向該細胞投予如請求項 1 至 44 中任一項之雙股 RNA 分子或如請求項 45 之醫藥組成物。

（發明圖式）

AHSA1 siRNA結合的集結膜

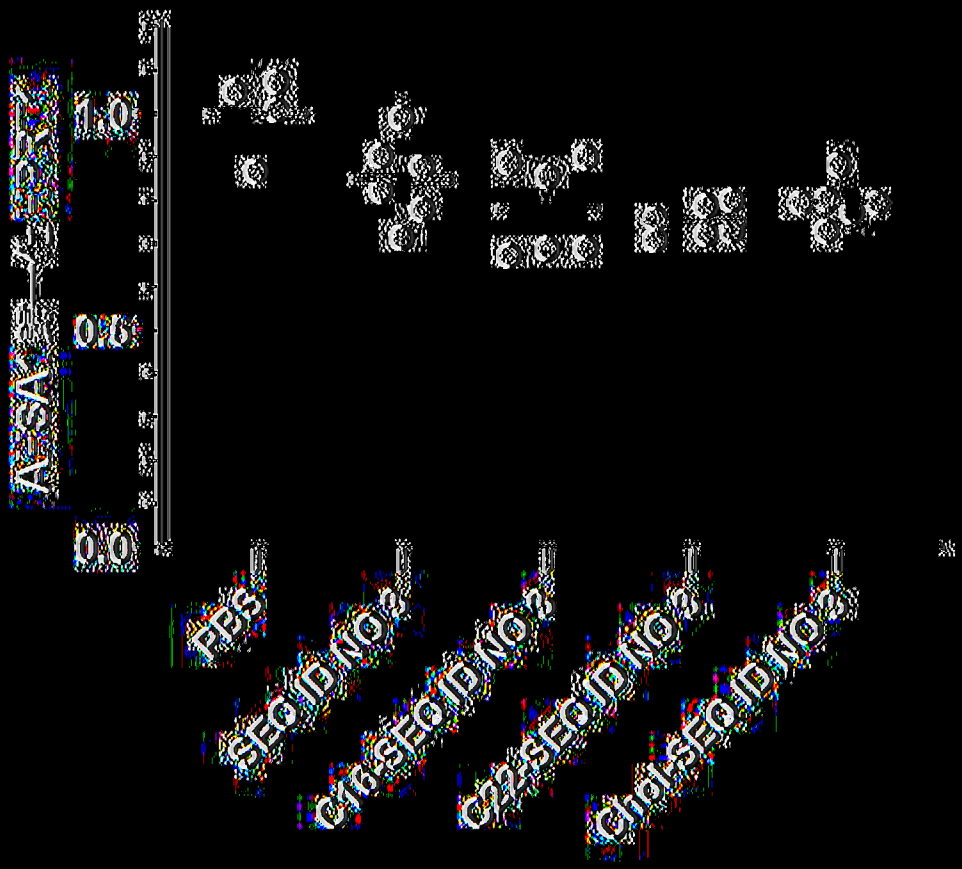


圖 1

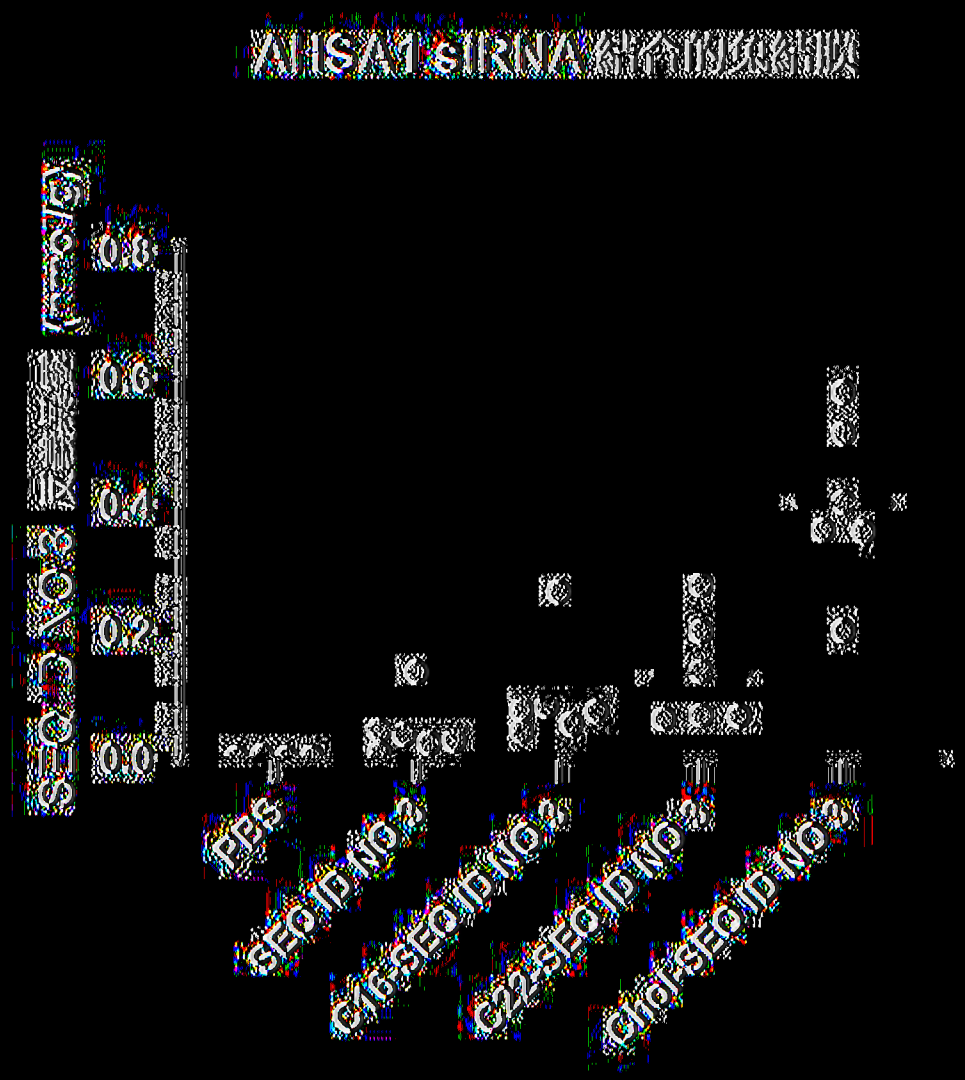

AHSA1 siRNA結合的線結膜
SEQ-2 VO.3
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
PBS
SEQ ID NO.2
C16-SEQ ID NO.2
C22-SEQ ID NO.2
Chol-SEQ ID NO.2

圖2

AHSA1-sIRNA 結合的免結膜
EYE PRIM™

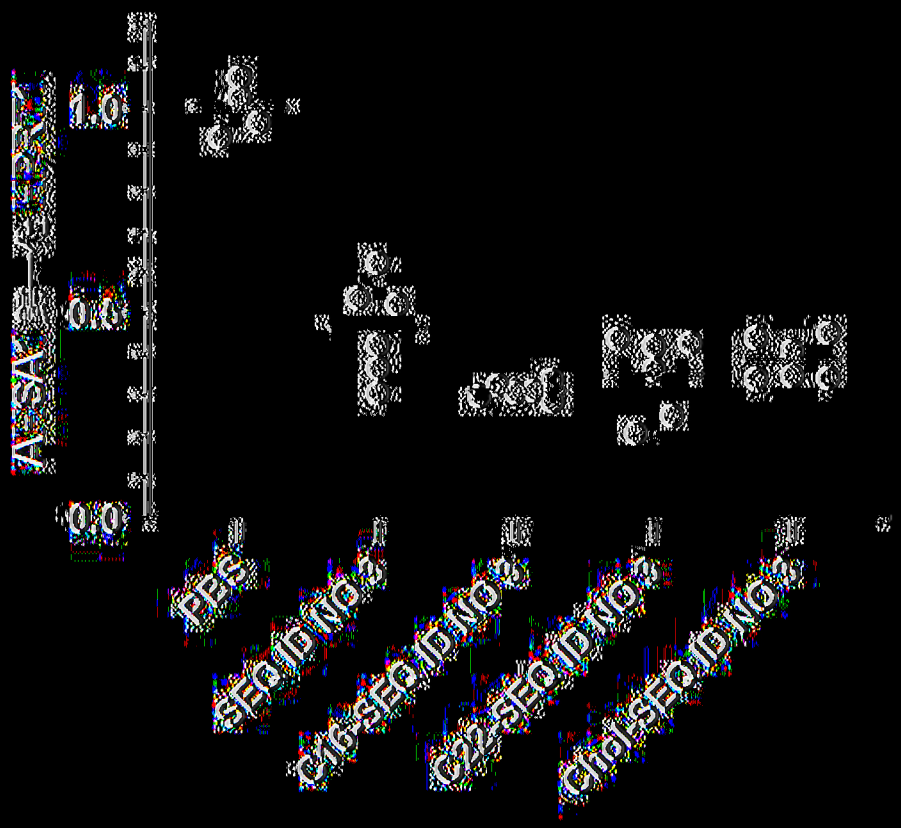


圖3

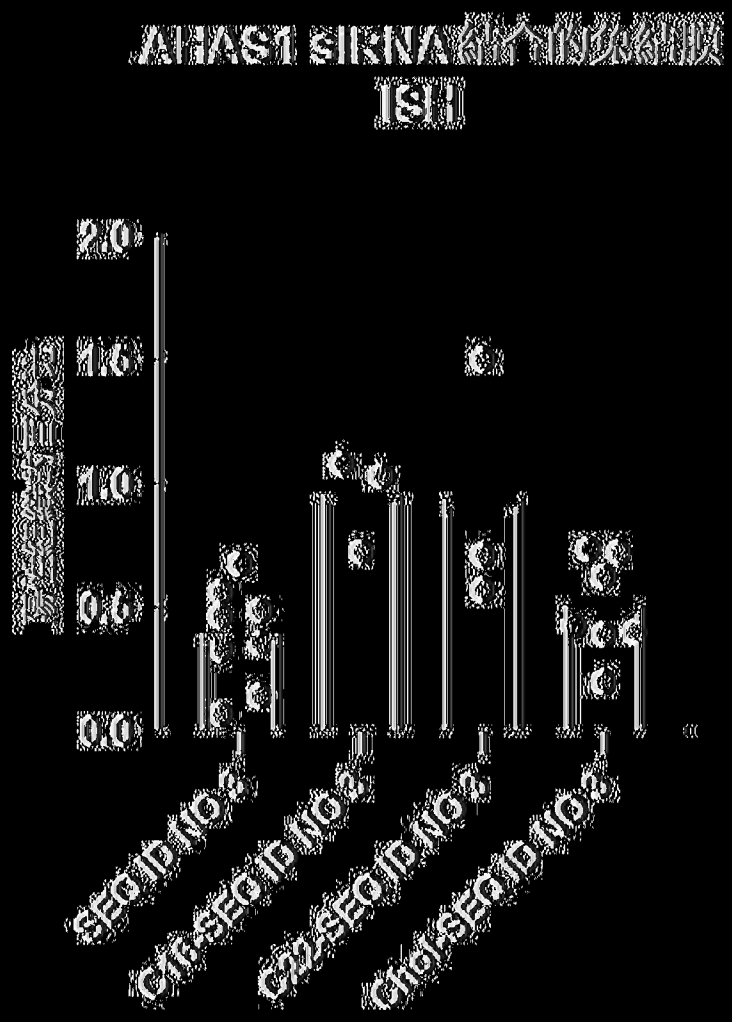

AHAS1 siRNA結合的免結膜
ISH
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
SEQ ID NO:3
C16-SEQ ID NO:3
C22-SEQ ID NO:3
Chol-SEQ ID NO:3

圖5