



(21)申請案號：109134478

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 10 月 05 日

(51)Int. Cl.：C12N15/113 (2010.01)A61K31/712 (2006.01)

(30)優先權：2019/10/02美國62/909,278

(71)申請人：美商戴瑟納製藥股份有限公司 (美國) DICERNA PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國

(72)發明人：王 為民 WANG, WEIMIN (US)；納澤夫 奈姆 NAZEF, NAIM (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：10 共 98 頁

(54)名稱

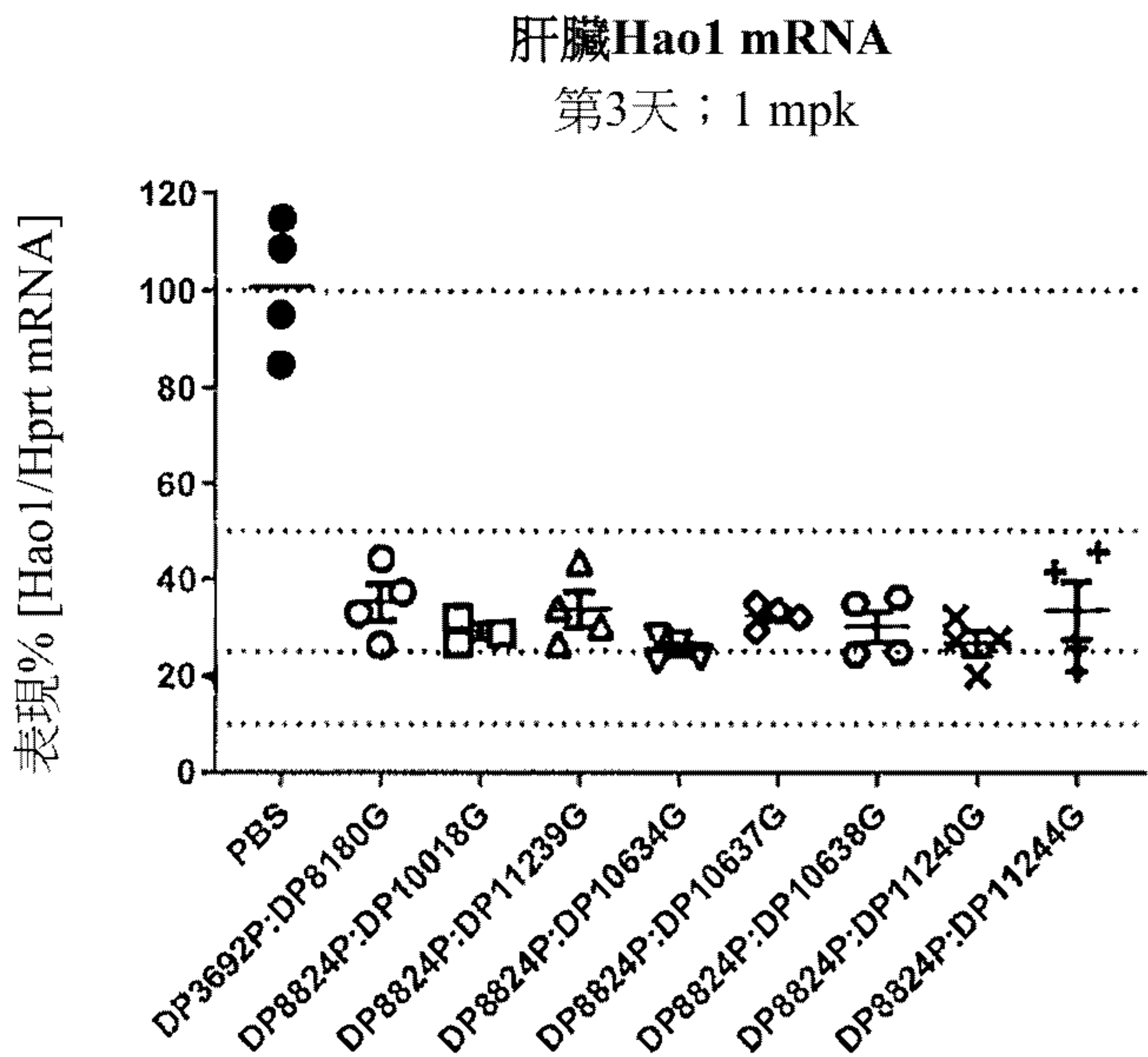
具有最小氟含量之小干擾 RNA 的化學修飾

(57)摘要

本發明提供用於降低基因表現或活性之寡核苷酸、其組合物及使用方法，該寡核苷酸包含 2'-O-甲基(2'-OMe)及 2'-去氧-2'-氟(2'-F)修飾。

The present invention provides oligonucleotides comprising 2´-O-methyl (2´-OMe) and 2´-deoxy-2´-fluoro (2´-F) modifications, compositions thereof, and methods of use for reducing the expression or activity of a gene.

指定代表圖：



【圖7I】



202126809

【發明摘要】

【中文發明名稱】

具有最小氟含量之小干擾RNA的化學修飾

【英文發明名稱】

CHEMICAL MODIFICATIONS OF SMALL INTERFERING RNA
WITH MINIMAL FLUORINE CONTENT

【中文】

本發明提供用於降低基因表現或活性之寡核苷酸、其組合物及使用方法，該寡核苷酸包含2'-O-甲基(2'-OMe)及2'-去氧-2'-氟(2'-F)修飾。

【英文】

The present invention provides oligonucleotides comprising 2'-O-methyl (2'-OMe) and 2'-deoxy-2'-fluoro (2'-F) modifications, compositions thereof, and methods of use for reducing the expression or activity of a gene.

【指定代表圖】

圖7I

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

具有最小氟含量之小干擾RNA的化學修飾

【英文發明名稱】

CHEMICAL MODIFICATIONS OF SMALL INTERFERING RNA
WITH MINIMAL FLUORINE CONTENT

【技術領域】

【0001】 本發明係關於包含2'-O-甲基(2'-OMe)及2'-去氧-2'-氟(2'-F)修飾之寡核苷酸(例如，RNA干擾寡核苷酸)。

【先前技術】

【0002】 已研發出經由RNA干擾(RNAi)路徑降低基因表現之寡核苷酸。舉例而言，已研發出各股具有19至25個核苷酸之大小及至少一個3'突出物具有1至5個核苷酸的RNAi寡核苷酸(參見例如美國專利第8,372,968號)。亦研發出由切丁酶(Dicer)處理以產生活性RNAi產物之較長寡核苷酸(參見例如美國專利第8,883,996號)。進一步的工作產生了經延伸之雙股寡核苷酸，其中至少一個股之至少一端延伸超出雙螺旋靶向區，包括其中該等股中之一者包括熱力學上穩定之四環結構的結構(參見例如美國專利第8,513,207號及第8,927,705號以及WO2010033225，其以全文引用之方式併入本文中)。此類結構可包括單股延伸部分(在分子之一側或兩側)以及雙股延伸部分。

【0003】 此類RNAi寡核苷酸之化學修飾為充分利用此類別之分子之治療潛能所必需的。已研發出各種化學修飾且將其應用於RNAi寡核苷酸以改良其藥代動力學及藥力學特性(Deleavey & Damha, CHEM. BIOL.,

19:937-954, 2012), 且阻斷固有的免疫活化(Judge等人, MOL. THER., 13:494-505, 2006)。最常見的化學修飾之一為核糖核苷酸之呋喃糖之2'-OH, 因為其參與了核酸酶降解。已報導在整個雙螺旋中具有2'-O-甲基(2'-OMe)及2'-去氧-2'-氟(2'-F)之組合的經充分化學修飾之siRNA且其顯示極佳的穩定性及RNAi活性(Morrissey等人, HEPATOLOGY, 41:1349-1356, 2005; Allerson等人, J. MED. CHEM., 48:901-904, 2005; Hassler等人, NUCLEIC ACID RES., 46:2185-2196, 2018)。最近, N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)結合之經化學修飾之siRNA已展示有效的去唾液酸糖蛋白受體(ASGPr)介導之活體內向肝細胞之遞送(Nair等人, J. AM. CHEM. SOC., 136:16958-16961, 2014)。若干GalNAc結合之RNAi平台(包括GalNAc切丁酶-基質結合物(GalXC)平台)已進入用於治療廣泛範圍之人類疾病的臨床研發中。

【0004】 在研發基於寡核苷酸之治療劑(包括RNAi GalNAc結合物)中使用經化學修飾之核苷類似物的一個主要問題為與修飾相關之潛在毒性。治療性寡核苷酸可在患者體內緩慢降解, 從而釋放可潛在地磷酸化且併入至細胞DNA或RNA中之核苷類似物。在抗病毒治療劑之領域中, 在許多小分子核苷酸抑制劑之臨床研發期間已顯現出毒性(Feng等人, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 60:806-817, 2016)。據報導充分硫代磷酸化之反義寡核苷酸之2'-F修飾致使細胞蛋白質減少及雙股DNA斷裂, 從而在活體內產生急性肝毒性(Shen等人, Nucleic Acid Res., 43:4569-4578, 2015; Shen等人, NUCLEIC ACID RES., 46:2204-2217, 2018)。迄今為止, 在RNAi寡核苷酸之情形下未觀測到關於此類2'-F修飾之責任的證據(Janas等人, NUCLEIC ACID

THER., 26:363-371, 2016 ; Janas等人, NUCLEIC ACID THER., 27:11-22, 2016)。此外, 2'-F siRNA在臨床試驗中具有良好耐受性。儘管如此, 仍需要最小化非天然核苷類似物(諸如經2'-F修飾之核苷)在治療性RNA寡核苷酸中之使用。

【0005】 不同於2'-去氧-2'-氟RNA, 2'-O-甲基RNA係在tRNA及其他小RNA中發現的以轉錄後修飾形式出現的天然存在之RNA修飾。另外已知與不太龐大的2'-F修飾相比, 更龐大的2'-O-甲基修飾賦予更佳的代謝穩定性。因此, 在穩定性及耐受性方面, 2'-OMe優於2'-F。然而, 已展示更龐大的2'-OMe若在siRNA之序列中未恰當地定位, 則會干擾RNA蛋白質結合且抑制RNAi活性(Chiu等人, RNA, 9:1034-1048, 2003 ; Prakash等人, J. MED. CHEM., 48:4247-4253, 2005 ; Zheng等人, FASEB J., 27:4017-4026, 2013)。

【0006】 為進一步減少2'-F含量且同時增加2'-OMe含量以使得在不損害RNAi活性之情況下可改善穩定性及耐受性, 在已經展示良好的效能及持續時間之DsiRNA結合物中微調2'-OMe及2'-F之位置(修飾模式)係必需的。最新報導已試圖優化21/23mer siRNA GalNAc結合物平台之修飾模式(Foster等人, Mol. Ther. 26:708-717, 2018)。然而, 該報導並未確定如本文所揭示之賦予寡核苷酸高效能及持續時間的2'-OMe及2'-F之模式, 包括對2'-OMe取代具有較差耐受性之位置。該報導亦未特定針對如本文所揭示之三環及四環GalXC平台鑑別具有最小2'-F含量的先進設計。

【發明內容】

【0007】 本發明係基於用2'-去氧-2'-氟(2'-F)及2'-O-甲基(2'-OMe)修飾寡核苷酸(例如, RNA干擾寡核苷酸)以增加其效能及持續時間的

策略研究。

【0008】 因此，本發明之態樣提供一種寡核苷酸，其包含：包含17至36個核苷酸之有義股，其中該有義股具有第一區(R1)及第二區(R2)，其中該有義股之該第二區包含第一子區(S1)、第二子區(S2)及接合該第一區及該第二區之四環(L)或三環(triL)，其中該第一區及該第二區形成第二雙螺旋(D2)；包含20至22個核苷酸之反義股，其中該反義股在其3'端處包括至少1個單股核苷酸，其中該反義股之位置5處的核苷酸之糖部分經2'-F修飾且該反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分經選自由以下組成之群的修飾修飾：2'-O-炔丙基、2'-O-丙基胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-氟(2'-F)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核糖酸(2'-FANA)，且其中該有義股及該反義股為單獨股；及由該有義股之該第一區及該反義股形成的第一雙螺旋(D1)，其中該第一雙螺旋之長度為12至20個鹼基對且具有7至10個在糖部分之2'-位置處經2'-F修飾的核苷酸。

【0009】 本發明之一或多個實施例之詳情闡述於以下描述中。本發明之其他特徵及優勢將根據若干實施例之詳細描述以及隨附申請專利範圍變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0010】 圖1A至圖1C展示來自有義股結構活性關係(structure activity relationship；SAR)之資料。在HAO1穩定細胞株中轉染不同濃度之帶切口的四環GalNAc結合物之後48小時，量測到HAO1目標mRNA基因表現減弱。效能係以半數最大抑制濃度(IC₅₀)判定。圖1A為展示有義股之效能的圖式，其中該有義股上之位置17及19經2'-F修飾。圖1B為展示有

義股之效能的圖式，其中該有義股之位置19經2'-F修飾且該有義股之位置17經2'-OMe修飾。**圖1C**為展示有義股之效能的圖式，其中該有義股上之位置17及19經2'-OMe修飾。

【0011】 圖2A至圖2D展示反義股結構活性關係(SAR)之數據。在HAO1穩定細胞株中轉染不同濃度之帶切口的四環GalNAc結合物之後48小時，量測到HAO1目標mRNA基因表現減弱。效能係以半數最大抑制濃度(IC₅₀)判定。**圖2A**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股上之位置15、17及19經2'-F修飾。**圖2B**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置15及17經2'-F修飾且該反義股之位置19經2'-OMe修飾。**圖2C**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置15經2'-F修飾且該反義股之位置17及19經2'-OMe修飾。**圖2D**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股上之位置15、17及19經2'-OMe修飾。

【0012】 圖3A至3H展示來自反義股結構活性關係(SAR)之資料。在HAO1穩定細胞株中轉染不同濃度之帶切口的四環GalNAc結合物之後48小時，量測到HAO1目標mRNA基因表現減弱。效能係以半數最大抑制濃度(IC₅₀)判定。**圖3A**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至3及5至10經2'-F修飾且該反義股之位置4經2'-OMe修飾。**圖3B**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至3、5至8及10經2'-F修飾且該反義股之位置4及9經2'-OMe修飾。**圖3C**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至3、5至6、8及10經2'-F修飾且該反義股之位置4、7及9經2'-OMe修飾。**圖3D**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至3、6、8及10經2'-F修飾且該反義股之位置4、5、7及9經2'-OMe修飾。**圖3E**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至2、6、8

及10經2'-F修飾且該反義股之位置3、4、5、7及9經2'-OMe修飾。**圖3F**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至2、8及10經2'-F修飾且該反義股之位置3至7及9經2'-OMe修飾。**圖3G**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至2經2'-F修飾且該反義股之位置3至9經2'-OMe修飾。**圖3H**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至2經2'-F修飾且該反義股之位置3至10經2'-OMe修飾。

【0013】 圖4A至圖4E展示來自反義股結構活性關係(SAR)之資料，其中維持在位置5處之2'-F修飾且用2'-OMe探測位置1至10。在HAO1穩定細胞株中轉染不同濃度之帶切口的四環GalNAc結合物之後48小時，量測到HAO1目標mRNA基因表現減弱。效能係以半數最大抑制濃度(IC₅₀)判定。**圖4A**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至3、6、8、10、14及15經2'-F修飾且該反義股之位置4、5、7、9及11至13經2'-OMe修飾。**圖4B**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至3、6、8、10及14經2'-F修飾且該反義股之位置4、5、7、9、11至13及15經2'-OMe修飾。**圖4C**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1、2、6、8、10、14及15經2'-F修飾且該反義股之位置3至5、7、9、11至13及15經2'-OMe修飾。**圖4D**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2、6、8、10、14及15經2'-F修飾且該反義股之位置1、3至5、7、9及11至13經2'-OMe修飾。**圖4E**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2及14經2'-F修飾且該反義股之位置1、3至13及15經2'-OMe修飾。

【0014】 圖5A至5H展示來自反義股結構活性關係(SAR)之資料，其中維持在位置2及14處之2'-F修飾，同時向位置3至6處之種子區逐漸進行

2'-F之添加。在HAO1穩定細胞株中轉染不同濃度之帶切口的四環GalNAc結合物之後48小時，量測到HAO1目標mRNA基因表現減弱。效能係以半數最大抑制濃度(IC₅₀)判定。**圖5A**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2及14經2'-F修飾且該反義股之位置1及3至13經2'-OMe修飾。**圖5B**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2、3及14經2'-F修飾且該反義股之位置1及4至13經2'-OMe修飾。**圖5C**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2、4及14經2'-F修飾且該反義股之位置1、3及5至13經2'-OMe修飾。**圖5D**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2、5及14經2'-F修飾且該反義股之位置1、3、4及6至13經2'-OMe修飾。**圖5E**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2、6及14經2'-F修飾且該反義股之位置1、3至5、及7至13經2'-OMe修飾。**圖5F**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2、3、5及14經2'-F修飾且該反義股之位置1、4及6至13經2'-OMe修飾。**圖5G**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2、5、6及14經2'-F修飾且該反義股之位置1、3、4及7至13經2'-OMe修飾。**圖5H**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2、3、5、6及14經2'-F修飾且該反義股之位置1、4及7至13經2'-OMe修飾。

【0015】 圖6A至圖6F展示來自反義股結構活性關係(SAR)之資料，其中保持在位置3及5處之2'-F修飾，同時向位置7至10逐漸進行2'-F之添加。在HAO1穩定細胞株中轉染不同濃度之帶切口的四環GalNAc結合物之後48小時，量測到HAO1目標mRNA基因表現減弱。效能係以半數最大抑制濃度(IC₅₀)判定。**圖6A**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1、2、3、5及14經2'-F修飾。**圖6B**為展示反義股之效能的圖式，其

中該反義股之位置1、2、3、5及14經2'-F修飾且該有義股之位置9經2'-OMe修飾。**圖6C**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1、2、3、5、7及14經2'-F修飾且該有義股之位置9經2'-OMe修飾。**圖6D**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1、2、3、5、8及14經2'-F修飾且該有義股之位置9經2'-OMe修飾。**圖6E**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1、2、3、5、9及14經2'-F修飾且該有義股之位置9經2'-OMe修飾。**圖6F**為展示反義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1、2、3、5、10及14經2'-F修飾且該有義股之位置9經2'-OMe修飾。

【0016】 圖7A至圖7H展示來自具有最少2'-F修飾之反義股之結構活性關係(SAR)的資料。在HAO1穩定細胞株中轉染不同濃度之帶切口的四環GalNAc結合物之後48小時，量測到HAO1目標mRNA基因表現減弱。效能係以半數最大抑制濃度(IC₅₀)判定。**圖7A**為展示反義股及有義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1、2、3、5、7、9、11、13至15、17及19經2'-F修飾且該反義股之位置4、6、8、10、12、16及18經2'-OMe修飾，且其中該有義股之位置3、5、7至13、15、17及19經2'-F修飾且該有義股之位置1、2、4、6、14、16及18經2'-OMe修飾。**圖7B**為展示反義股及有義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2、5及14經2'-F修飾且該反義股之位置1、3、4及6至13經2'-OMe修飾，其中該有義股之位置8至11經2'-F修飾且該有義股之位置1至7及12至19經2'-OMe修飾。**圖7C**為展示反義股及有義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1、2、5及14經2'-F修飾且該反義股之位置3、4及6至13經2'-OMe修飾，其中該有義股之位置8至11經2'-F修飾且該有義股之位置1至7及12至19經2'-OMe修飾。**圖7D**為展示反義股及有義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至3、5、7及

14經2'-F修飾且該反義股之位置4、6及8至13經2'-OMe修飾，其中該有義股之位置8至11經2'-F修飾且該有義股之位置1至7及12至19經2'-OMe修飾。**圖7E**為展示反義股及有義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至3、5、10及14經2'-F修飾且該反義股之位置4、6至9及11至13經2'-OMe修飾，其中該有義股之位置8至11經2'-F修飾且該有義股之位置1至7及12至19經2'-OMe修飾。**圖7F**為展示反義股及有義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至3、5、7、9及14經2'-F修飾且該反義股之位置4、6、8及10至13經2'-OMe修飾，其中該有義股之位置8至11經2'-F修飾且該有義股之位置1至7及12至19經2'-OMe修飾。**圖7G**為展示反義股及有義股之效能的圖式，其中該反義股之位置1至3、5、7、10及14經2'-F修飾且該反義股之位置4、6、8、9及11至13經2'-OMe修飾，其中該有義股之位置8至11經2'-F修飾且該有義股之位置1至7及12至19經2'-OMe修飾。**圖7H**為展示反義股及有義股之效能的圖式，其中該反義股之位置2、3、5、7、10及14經2'-F修飾且該反義股之位置4、6、8、9及11至13經2'-OMe修飾，其中該有義股之位置8至11經2'-F修飾且該有義股之位置1至7及12至19經2'-OMe修飾。**圖7I**為展示注射有圖7A至7H中所描繪之寡核苷酸的小鼠中之HAO1 mRNA表現的圖式。

【0017】 圖8為展示注射有表8中所描繪之寡核苷酸的小鼠中之HAO1 mRNA表現的圖式。小鼠注射有PBS作為對照。

【0018】 圖9A至圖9B展示具有最少2'-F修飾之寡核苷酸集合之活體外及活體內資料。**圖9A**為展示經表9中所描繪之寡核苷酸轉染的細胞中之APOC3 mRNA表現的圖式。**圖9B**為展示注射有表9中所描繪之寡核苷酸的小鼠中之APOC3 mRNA表現的圖式。小鼠注射有PBS作為對照。

【0019】 圖10展示環區中具有3個GalNAc結合之核苷酸及高2'-F修飾模式或標記為模式1或模式2之低2'-F修飾模式中之一者的GYS2 dsRNA的活體內資料。反義股在5'端部處含有3個硫代磷酸酯(3PS)或2個硫代磷酸酯(2PS)。

【實施方式】

相關申請案

【0020】 本申請案根據35 U.S.C. § 119(e)之規定主張2019年10月2日申請之美國臨時專利申請案第62/909,278號之權益，其內容以全文引用之方式併入本文中。

【0021】 本發明之態樣提供一種寡核苷酸(例如，RNA干擾寡核苷酸)，其包含修飾模式(例如，2'-去氧-2'-氟(2'-F)及2'-O-甲基(2'-OMe)修飾模式)，相較於其未經修飾之對應物，該等修飾模式改變寡核苷酸之活性。因此，本文中提供之修飾模式可適用於增加寡核苷酸與其目標之結合(又稱為寡核苷酸效能)及/或降低寡核苷酸與非目標之結合(又稱為脫靶效應)。在一些實施例中，本文中提供之修飾模式可適用於增加寡核苷酸降解之抗性及/或增加寡核苷酸於細胞中之持續時間。

(I) 定義

【0022】 大致：如本文中所使用，在應用於一或多個相關值時，術語「大致」或「約」係指與所陳述之參考值類似的值。在某些實施例中，除非另外陳述或以其他方式自上下文顯而易見，否則術語「大致」或「約」係指在任一方向(大於或小於)上處於所陳述參考值之25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小的值內的一系列值(除非

此類數字將超出可能值之100%)。

【0023】 投與：如本文中所使用，術語「投與」或「投藥」意謂以藥理學上適用之方式向個體提供物質(例如，寡核苷酸)(例如，以治療個體之病況)。寡核苷酸亦可藉由使用此項技術中已知之方法的轉染或感染來投與，該等方法包括(但不限於) McCaffrey 等人. (2002), NATURE, 418(6893), 38-9 (流體動力學轉染)或 Xia 等人. (2002), NATURE BIOTECHNOL., 20(10), 第1006-10頁(病毒介導之遞送)中所描述之方法。

【0024】 互補：如本文中所使用，術語「互補」係指核苷酸(例如，相對核酸上或單核酸股之相對區上的兩個核苷酸)之間的准許核苷酸彼此形成鹼基對的結構關係。舉例而言，與相對核酸之嘧啶核苷酸互補的一個核酸之嘌呤核苷酸可藉由彼此形成氫鍵而鹼基配對在一起。在一些實施例中，互補核苷酸可以沃森-克里克方式(Watson-Crick manner)或以允許形成穩定雙螺旋之任何其他方式鹼基配對。在一些實施例中，如本文中所描述，兩個核酸可具有彼此互補以形成互補區之核苷酸序列。

【0025】 去氧核糖核苷酸：如本文中所使用，術語「去氧核糖核苷酸」係指與核糖核苷酸相比較，其戊糖之2'位置處具有氫之核苷酸。經修飾之去氧核糖核苷酸為除在2'位置處外具有一或多個修飾或原子取代(包括糖、磷酸酯基或鹼基中之修飾或取代，或糖、磷酸酯基或鹼基之修飾或取代)的去氧核糖核苷酸。

【0026】 雙股寡核苷酸：如本文中所使用，術語「雙股寡核苷酸」係指實質上呈雙螺旋形式之寡核苷酸。在一些實施例中，雙股寡核苷酸之雙螺旋區之互補鹼基配對係形成於具有共價分離之核酸股之核苷酸的反平

行序列之間。在一些實施例中，雙股寡核苷酸之一或多個雙螺旋區之互補鹼基配對形成於具有共價連接之核酸股之核苷酸的反平行序列之間。在一些實施例中，雙股寡核苷酸之雙螺旋區之互補鹼基配對係由經摺疊(例如，經由髮夾結構)以提供鹼基配對在一起之核苷酸之互補反平行序列的單核酸股形成。在一些實施例中，雙股寡核苷酸包含兩個彼此充分雙螺旋之共價分離的核酸股。然而，在一些實施例中，雙股寡核苷酸包含兩個部分雙螺旋(例如，在一個或兩個端部處具有突出物)之共價分離的核酸股。在一些實施例中，雙股寡核苷酸包含部分互補的核苷酸之反平行序列，且因此可具有一或多個錯配，該等錯配可包括內部錯配或端部錯配。

【0027】 雙螺旋：如本文中所使用，關於核酸(例如，寡核苷酸)之術語「雙螺旋」係指經由互補鹼基配對核苷酸之兩個反平行序列形成的結構。

【0028】 賦形劑：如本文中所使用，術語「賦形劑」係指可包括在組合物中之非治療劑，例如提供或促成所需稠度或穩定效果。

【0029】 環：如本文中所使用，術語「環」係指側接核酸之兩個彼此充分互補之反平行區的核酸(例如，寡核苷酸)之不配對區，使得在適當的雜交條件(例如，於磷酸鹽緩衝液中、於細胞中)下，側接不配對區之兩個反平行區雜交以形成雙螺旋(稱為「莖(stem)」)。

【0030】 經修飾之核苷酸間鍵：如本文中所使用，術語「經修飾之核苷酸間鍵」係指與包含磷酸二酯鍵之參考核苷酸間鍵相比，具有一或多個化學修飾之核苷酸間鍵。在一些實施例中，經修飾之核苷酸間鍵為非天然存在之鍵。通常，經修飾之核苷酸間鍵賦予核酸一或多種所需特性，在該核酸中存在經修飾之核苷酸間鍵。舉例而言，經修飾之核苷酸間鍵可改

善熱穩定性、對降解之抗性、核酸酶抗性、溶解性、生物可用性、生物活性、降低的免疫原性等。

【0031】 經修飾之核苷酸：如本文中所使用，術語「經修飾之核苷酸」係指與對應參考核苷酸相比具有一或多個化學修飾之核苷酸，該對應參考核苷酸係選自：腺嘌呤核糖核苷酸、鳥嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸、腺嘌呤去氧核糖核苷酸、鳥嘌呤去氧核糖核苷酸、胞嘧啶去氧核糖核苷酸及胸苷去氧核糖核苷酸。在一些實施例中，經修飾之核苷酸為非天然存在之核苷酸。在一些實施例中，經修飾之核苷酸在其糖、核鹼基及/或磷酸酯基中具有一或多個化學修飾。在一些實施例中，經修飾之核苷酸具有一或多個與對應參考核苷酸結合之化學部分。通常，經修飾之核苷酸賦予核酸一或多種所需特性，在該核酸中存在經修飾之核苷酸。舉例而言，經修飾之核苷酸可改善熱穩定性、對降解之抗性、核酸酶抗性、溶解性、生物可用性、生物活性、降低的免疫原性等。在某些實施例中，經修飾之核苷酸在核糖環之2'位置處包含2'-O-甲基或2'-F取代。

【0032】 帶切口的四環結構：「帶切口的四環結構」為由單獨有義(隨從)及反義(引導)股之存在表徵的RNAi寡核苷酸之結構，其中有義股具有與反義股互補之區以使得該兩個股形成雙螺旋，且其中該等股中之至少一者(通常有義股)自雙螺旋延伸，其中延伸部分含有一四環及形成鄰接於四環之莖區的兩個自身互補型序列，其中四環經組態以使由至少一個股之自身互補型序列形成之相鄰莖區穩定。

【0033】 寡核苷酸：如本文中所使用，術語「寡核苷酸」係指例如長度小於100個核苷酸之短核酸。寡核苷酸可包含核糖核苷酸、去氧核糖

核苷酸及/或經修飾之核苷酸，包括(例如)經修飾之核糖核苷酸。寡核苷酸可為單股的或雙股的。寡核苷酸可具有或可不具有雙螺旋區。作為非限制性實例之集合，寡核苷酸可為但不限於小干擾RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA)、短髮夾RNA (shRNA)、切丁酶基質干擾RNA (dsiRNA)、反義寡核苷酸、短siRNA或單股siRNA。在一些實施例中，雙股寡核苷酸為RNAi寡核苷酸。

【0034】 突出物：如本文中所使用，術語「突出物」係指由一個股或區延伸超出互補股之末端產生的末端非鹼基配對的核苷酸，該一個股或區與該互補股形成雙螺旋。在一些實施例中，突出物包含自雙股寡核苷酸之5'末端或3'末端處之雙螺旋區延伸的一或多個不配對的核苷酸。在某些實施例中，突出物為雙股寡核苷酸之反義股或有義股上的3'或5'突出物。

【0035】 磷酸酯類似物：如本文中所使用，術語「磷酸酯類似物」係指模擬磷酸酯基之靜電及/或空間特性的化學部分。在一些實施例中，磷酸酯類似物定位於寡核苷酸之5'末端核苷酸，而非5'磷酸酯，後者通常易受酶移除影響。在一些實施例中，5'磷酸酯類似物含有磷酸酶抗性鍵。磷酸酯類似物之實例包括5'磷酸酯，諸如5'亞甲基磷酸酯(5'-MP)及5'-(E)-乙烯基磷酸酯(5'-VP)。在一些實施例中，寡核苷酸在5'末端核苷酸處之糖之4'-碳位置處具有磷酸酯類似物(稱為「4'-磷酸酯類似物」)。4'-磷酸酯類似物之實例為氧基甲基磷酸酯，其中氧基甲基之氧原子結合至糖部分(例如，在其4'-碳處)或其類似物。參見例如2017年9月1日申請之國際專利申請案PCT/US2017/049909、2016年9月2日申請之美國臨時申請案第62/383,207號及2016年9月12日申請之62/393,401，其各者與磷酸酯類似物相關之內容以引用之方式併入本文中。已研發出寡核苷酸之5'端的其他

修飾(參見例如WO 2011/133871；美國專利第8,927,513號；及Prakash等人，(2015)，NUCLEIC ACIDS RES., 43(6):2993-3011，其各者與磷酸酯類似物相關之內容以引用之方式併入本文中)。

【0036】 降低表現：如本文中所使用，術語基因之「降低表現」係指由基因編碼之RNA轉錄物或蛋白質之量的減少及/或與適當參考細胞或個體相比，細胞或個體中基因之活性之量的減少。舉例而言，用雙股寡核苷酸(例如，具有與目標mRNA序列互補之反義股的寡核苷酸)處理細胞的操作可引起與未用雙股寡核苷酸處理之細胞相比，(例如，由目標基因編碼之)RNA轉錄物、蛋白質及/或酶促活性之量的減少。類似地，如本文中所使用之「降低表現」係指引起基因(例如，目標基因)之表現降低的操作。

【0037】 互補區：如本文中所使用，術語「互補區」係指與核苷酸之反平行序列(例如，mRNA內之目標核苷酸序列)充分互補以准許在適當雜交條件(例如，於磷酸酯緩衝液中、於細胞中等)下在核苷酸之兩個序列之間進行雜交的核酸(例如，雙股寡核苷酸)之核苷酸序列。互補區可與核苷酸序列(例如，mRNA內存在之目標核苷酸序列或其部分)完全互補。舉例而言，與mRNA中存在之核苷酸序列完全互補之互補區具有與mRNA中之對應序列互補而無任何錯配或間隙的連續核苷酸序列。替代地，互補區可與核苷酸序列(例如，mRNA中存在之核苷酸序列或其部分)部分互補。舉例而言，與mRNA中存在之核苷酸序列部分互補的互補區具有與mRNA中之對應序列互補但與mRNA中之對應序列相比含有一或多個錯配或間隙(例如，1、2、3個或更多個錯配或間隙)的連續核苷酸序列，其限制條件為互補區仍能夠在適當雜交條件下與mRNA雜交。

【0038】 **核糖核苷酸**：如本文中所使用，術語「核糖核苷酸」係指具有一核糖作為其戊糖之核苷酸，該戊糖在其2'位置處含有羥基。經修飾之核糖核苷酸為除在2'位置處外具有一或多個修飾或原子取代(包括核糖、磷酸酯基或鹼基中之修飾或取代，或核糖、磷酸酯基或鹼基之修飾或取代)的核糖核苷酸。

【0039】 **RNAi寡核苷酸**：如本文中所使用，術語「RNAi寡核苷酸」係指(a)具有有義股(隨從)及反義股(引導)之雙股寡核苷酸，其中反義股或反義股之部分由阿爾古2 (Argonaute 2) (Ago2)核酸內切酶用於裂解目標mRNA，或(b)具有單反義股之單股寡核苷酸，其中該反義股(或反義股之部分)由Ago2核酸內切酶用於裂解目標mRNA。

【0040】 **股**：如本文中所使用，術語「股」係指經由核苷酸間鍵(例如，磷酸二酯鍵、硫代磷酸酯鍵)連接在一起的單一連續核苷酸序列。在一些實施例中，一股具有兩個自由端，例如5'-端及3'-端。

【0041】 **個體**：如本文中所使用，術語「個體」意謂任何哺乳動物，包括小鼠、家兔及人類。在一個實施例中，個體為人類或非人類靈長類。術語「個體(individual)」或「患者」可與「個體(subject)」互換使用。

【0042】 **合成性**：如本文中所使用，術語「合成性」係指人工合成(例如，使用機器(例如，固態核酸合成器))或另外並非衍生自通常產生分子之天然來源(例如，細胞或生物體)的核酸或其他分子。

【0043】 **靶向配位體**：如本文中所使用，術語「靶向配位體」係指選擇性地結合至所關注之組織或細胞之同源分子(例如，受體)且出於將另一物質靶向至所關注之組織或細胞的目的，可與另一物質結合的分子(例

如，碳水化合物、胺糖、膽固醇、多肽或脂質)。舉例而言，在一些實施例中，出於將寡核苷酸靶向至所關注之特定組織或細胞的目的，靶向配位體可結合於寡核苷酸。在一些實施例中，靶向配位體選擇性地結合於細胞表面受體。因此，在一些實施例中，在結合於寡核苷酸時，靶向配位體有助於經由選擇性結合至在細胞表面上表現之受體及包含寡核苷酸、靶向配位體及受體之複合物之細胞核內體內化而將寡核苷酸遞送至特定細胞中。在一些實施例中，靶向配位體經由連接子結合於寡核苷酸，該連接子在細胞內化之後或期間裂解以使得寡核苷酸自細胞中之靶向配位體釋放。

【0044】 四環：如本文中所使用，術語「四環」係指增加藉由雜交核苷酸之側接序列形成的相鄰雙螺旋之穩定性的環。穩定性之增加可偵測為相鄰莖雙螺旋之解鏈溫度(T_m)的增加，其高於自一組由隨機選擇之核苷酸序列組成的相當長度之環平均預期的相鄰莖雙螺旋之 T_m 。舉例而言，四環可賦予包含長度為至少2個鹼基對之雙螺旋的髮夾於10 mM NaHPO_4 中至少50°C、至少55°C、至少56°C、至少58°C、至少60°C、至少65°C或至少75°C之解鏈溫度。在一些實施例中，四環可藉由堆疊相互作用使相鄰莖雙螺旋中之鹼基對穩定。此外，四環中之核苷酸之間的相互作用包括(但不限於)非沃森-克里克鹼基配對、堆疊相互作用、氫鍵結及接觸相互作用(Cheong等人, NATURE 1990年8月16日; 346(6285):680-2; Heus及Pardi, SCIENCE 1991年7月12日; 253(5016):191-4)。在一些實施例中，四環包含3至6個核苷酸或由其組成且通常為4至5個核苷酸。在某些實施例中，四環包含三個、四個、五個或六個核苷酸或由其組成，該等核苷酸可經修飾或可不經修飾(例如，其可結合或可不結合於靶向部分)。在一個實施例中，四環由四個核苷酸組成。任何核苷酸可用於四環中且關於此類

核苷酸之標準 IUPAC-IUB 符號可如 Cornish-Bowden (1985) NUCL. ACIDS RES. 13: 3021-3030中所描述來使用。舉例而言，字母「N」可用於意指可能處於彼位置之任何鹼基，字母「R」可用於展示可能處於彼位置之A (腺嘌呤)或G(鳥嘌呤)，且「B」可用於展示可能處於彼位置之C (胞嘧啶)、G (鳥嘌呤)或T (胸腺嘧啶)。四環之實例包括UNCG四環家族(例如，UUCG)、GNRA四環家族(例如，GAAA)及CUUG四環(Woese等人, PROC NATL ACAD SCI USA. 1990年11月; 87(21):8467-71; Antao等人, NUCLEIC ACIDS RES. 1991年11月11日; 19(21):5901-5)。DNA四環之實例包括d(GNNA)四環家族(例如，d(GTTA))、d(GNRA)四環家族、d(GNAB)四環家族、d(CNNG)四環家族及d(TNCG)四環家族(例如，d(TTCG))。參見例如：Nakano等人, BIOCHEMISTRY, 41 (48), 14281-292, 2002；Shinji等人，NIPPON KAGAKKAI KOEN YOKOSHU 第78卷; 第2期; 第731 (2000)頁，關於其相關揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，四環包含於帶切口的四環結構內。

【0045】 治療：如本文中所使用，術語「治療」係指出於改善個體之保健及/或健康的目的，相對於現有病況(例如，疾病、病症)或相對於預防或減小病況發生之可能性，例如經由向個體投與治療劑(例如，寡核苷酸)而向對其有需要之個體提供照護的操作。在一些實施例中，治療包括降低個體罹患之病況(例如，疾病、病症)之至少一種跡象、症狀或促成因素之頻率或嚴重度。

(II) 寡核苷酸

【0046】 本發明之一個態樣提供具有修飾模式之寡核苷酸，該修飾模式賦予寡核苷酸增加的效能及/或持續時間。如本文中所使用，修飾模

式係指經修飾之核苷酸於寡核苷酸中之某些位置處的排列，以增強寡核苷酸之效能及/或持續時間的(例如，在寡核苷酸中某些位置處用2'-F或2'-OMe進行之修飾)。本文所揭示之修飾模式可併入至具有任何序列之寡核苷酸中(例如，靶向任何序列之寡核苷酸)以增強其效能及/或持續時間。

【0047】 在一些實施例中，本文中所提供之寡核苷酸包含作為分離股的有義股(亦稱為隨從股)及反義股(亦稱為引導股)。在一些實施例中，有義股具有第一區(R1)及第二區(R2)，該第二區包含第一子區(S1)、第二子區(S2)及接合第一區及第二區的四環(L)或三環(triL)。在一些實施例中，第一區及第二區形成第二雙螺旋(D2)。第二雙螺旋(D2)可具有不同長度。在一些實施例中，第二雙螺旋(D2)之長度為1至6個鹼基對。在一些實施例中，第二雙螺旋(D2)之長度為2至6個、3至6個、4至6個、5至6個、1至5個、2至5個、3至5個或4至5個鹼基對。在一些實施例中，第二雙螺旋(D2)之長度為1、2、3、4、5或6個鹼基對。

【0048】 在一些實施例中，第一雙螺旋(D1)係由有義股之第一區及反義股形成。第一雙螺旋(D1)可具有不同長度。在一些實施例中，第一雙螺旋(D1)之長度為12至20個鹼基對。在一些實施例中，第一雙螺旋(D1)之長度為13至20個、14至20個、15至20個、16至20個、17至20個、18至20個或19至20個鹼基對。在一些實施例中，第一雙螺旋(D1)之長度為12至19個、12至18個、12至17個、12至16個、12至15個、12至14個或12至13個鹼基對長度。在一些實施例中，第一雙螺旋(D1)之長度為12、13、14、15、16、17、18、19或20個鹼基對。

【0049】 第一雙螺旋(D1)或第二雙螺旋(D2)可包含至少一個雙環核苷酸或鎖核酸(locked nucleic acid; LNA)。鎖核酸或LNA已為熟習此項

技術者所熟知(Elman等人, 2005 ; Kurreck等人, 2002 ; Crinelli等人, 2002 ; Braasch及Corey, 2001 ; Bondensgaard等人, 2000 ; Wahlestedt等人, 2000)。在一些實施例中, 第一雙螺旋(D1)包含至少1個雙環核苷酸。在一些實施例中, 第二雙螺旋(D2)包含至少1個雙環核苷酸。

【0050】 在一些實施例中, 本文中提供之包含有義股及反義股之寡核苷酸具有不對稱結構。在一些實施例中, 寡核苷酸具有不對稱結構, 其中有義股之長度為36個核苷酸, 且反義股之長度為22個核苷酸, 其中在其3'-末端處具有2個單股核苷酸(亦稱為2個核苷酸3'-突出物)。在一些實施例中, 寡核苷酸具有不對稱結構, 其中有義股之長度為35個核苷酸, 且反義股之長度為21個核苷酸, 其中在其3'-末端處具有2個單股核苷酸。在一些實施例中, 寡核苷酸具有不對稱結構, 其中有義股之長度為37個核苷酸, 且反義股之長度為23個核苷酸, 其中在其3'-末端處具有2個單股核苷酸(亦稱為2個核苷酸3'-突出物)。

【0051】 如本文所提供之具有不對稱結構的寡核苷酸在其3'-末端處可包括任何長度之單股核苷酸。在一些實施例中, 寡核苷酸具有不對稱結構, 其中有義股之長度為36個核苷酸, 且反義股之長度為22個核苷酸, 其中在其3'-末端處具有2個單股核苷酸。在一些實施例中, 寡核苷酸具有不對稱結構, 其中有義股之長度為36個核苷酸, 且反義股之長度為23個核苷酸, 其中在其3'-末端處具有3個單股核苷酸。在一些實施例中, 寡核苷酸在其3'-末端處包括至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個或更多個單股核苷酸。在一些實施例中, 寡核苷酸在其3'-末端處包括2、3、4、5、6、7、8個或更多個單股核苷酸。

【0052】 在一些實施例中，在本文中提供之寡核苷酸中之有義股與反義股之間存在一或多個(例如，1、2、3、4、5個)錯配。若有義股與反義股之間存在超過一個錯配，則其可連續地(例如，連續2個、3個或更多個)定位或穿插於整個互補區中。在一些實施例中，第一雙螺旋(D1)含有一或多個錯配。在一些實施例中，第二雙螺旋(D2)含有一或多個錯配。

(i) **反義股**

【0053】 在一些實施例中，寡核苷酸之反義股可稱為「引導股」。舉例而言，若反義股可與RNA誘導之沉默複合物(RISC)接合且結合至阿爾古蛋白質，或與一或多個類似因子接合或結合且導引目標基因之沉默，則其可稱為引導股。在一些實施例中，與引導股互補之有義股可稱為「隨從股」。

【0054】 本文中揭示之反義股可包含20至22個核苷酸長度。在一些實施例中，反義股包含20至21個核苷酸長度或21至22個核苷酸長度。在一些實施例中，反義股包含20個核苷酸長度、21個核苷酸長度、或22個核苷酸長度。在一些實施例中，反義股為20個核苷酸長度、21個核苷酸長度或22個核苷酸長度。

【0055】 如本文所提供之具有不對稱結構的寡核苷酸可包括在其3'-末端處具有任何長度之單股核苷酸的反義股。在一些實施例中，反義股在其3'末端處包括至少2個單股核苷酸。在一些實施例中，反義股在其3'-末端處包括至少0個、1個、2個、3個、至少4個、至少5個、至少6個或更多個單股核苷酸。在一些實施例中，反義股在其3'-末端處包括2個單股核苷酸。在一些實施例中，反義股在其3'-末端處包括3個單股核苷酸。在一些實施例中，反義股在其3'-末端處包括4個單股核苷酸。在一些實施例中，

反義股在其3'-末端處包括5個單股核苷酸。在一些實施例中，反義股在其3'-末端處包括6個單股核苷酸。

【0056】 在一些實施例中，本文中揭示之寡核苷酸包含具有根據如表1至10（以及圖1至圖10）中之任一者所闡述之修飾模式經2'-F修飾的核苷酸的反義股。在一些實施例中，本文中揭示之寡核苷酸包含包括根據表1至10（以及圖1至圖10）中所闡述之修飾模式經2'-F及2'-OMe修飾的核苷酸的反義股。在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有在位置5處經2'-F修飾之核苷酸之糖部分的反義股。在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的位置5處之核苷酸之糖部分及經本文中提供之修飾修飾的反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分的反義股。

【0057】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的位置2及14處之糖部分的反義股。在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的位置2、5及14處之糖部分的反義股。在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的位置1、2、5及14處之糖部分的反義股。在一些實施例中，本文中所提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的位置1、2、3、5、7及14處之糖部分的反義股。在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的位置1、2、3、5、10及14處之糖部分的反義股。

【0058】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的反義股之位置2、5及14處之核苷酸中之每一者之糖部分及經選自由以下組成之群之修飾修飾的反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分的反義股：2'-O-炔丙基、2'-O-丙基胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-[2-(甲胺

基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【0059】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的反義股之位置1、2、5及14處的核苷酸中之每一者之糖部分及經選自由以下組成之群之修飾修飾的反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分的反義股：2'-O-炔丙基、2'-O-丙基胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【0060】 在一些實施例中，本文中所提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的反義股之位置1、2、3、5、7及14處的核苷酸中之每一者之糖部分及經選自由以下組成之群之修飾修飾的反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分的反義股：2'-O-炔丙基、2'-O-丙基胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【0061】 在一些實施例中，本文中所提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的反義股之位置1、2、3、5、10及14處的核苷酸中之每一者之糖部分及經選自由以下組成之群之修飾修飾的反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分的反義股：2'-O-炔丙基、2'-O-丙基胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【0062】 在一些實施例中，本文中所提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的反義股之位置2、3、5、7、10及14處的核苷酸中之每一者之糖部分及經選自由以下組成之群之修飾修飾的反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分的反義股：2'-O-炔丙基、2'-O-丙基胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【0063】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的位置1、位置2、位置3、位置4、位置5、位置6、位置7、位置8、位置9、位置10、位置11、位置12、位置13、位置14、位置15、位置16、位置17、位置18、位置19、位置20、位置21或位置22處之糖部分的反義股。

【0064】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-OMe修飾的位置1、位置2、位置3、位置4、位置5、位置6、位置7、位置8、位置9、位置10、位置11、位置12、位置13、位置14、位置15、位置16、位置17、位置18、位置19、位置20、位置21或位置22處之糖部分的反義股。

【0065】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含經選自由以下組成之群之修飾修飾的位置1、位置2、位置3、位置4、位置5、位置6、位置7、位置8、位置9、位置10、位置11、位置12、位置13、位置14、位置15、位置16、位置17、位置18、位置19、位置20、位置21或位置22處之糖部分的反義股：2'-O-炔丙基、2'-O-丙基胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、

2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

(ii) 有義股

【0066】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸可包含反義股及有義股。

【0067】 在一些實施例中，有義股包含17至36個核苷酸長度。在一些實施例中，有義股為17個核苷酸長度、18個核苷酸長度、19個核苷酸長度、20個核苷酸長度、21個核苷酸長度、22個核苷酸長度、23個核苷酸長度、24個核苷酸長度、25個核苷酸長度、26個核苷酸長度、27個核苷酸長度、28個核苷酸長度、29個核苷酸長度、30個核苷酸長度、31個核苷酸長度、32個核苷酸長度、33個核苷酸長度、34個核苷酸長度、35個核苷酸長度或36個核苷酸長度。

【0068】 在一些實施例中，有義股具有第一區(R1)及第二區(R2)，該第二區包含第一子區(S1)及第二子區(S2)形成第二雙螺旋(D2)。在一些實施例中，形成於第一子區(S1)與第二子區(S2)之間的第二雙螺旋(D2)之長度為至少1個(例如，至少2個、至少3個、至少4個、至少5個或至少6個)鹼基對。在一些實施例中，形成於第一子區(S1)與第二子區(S2)之間的雙螺旋之長度在1至6個鹼基對之範圍內(例如，長度為1至5個、1至4個、1至3個、1至2個、2至6個、3至6個、4至6個或5至6個鹼基對)。

【0069】 在一些實施例中，第二區(R2)包含接合第一區及第二區之四環(L)或三環(triL)。在一些實施例中，四環或三環在有義股之3'末端處。在一些實施例中，四環或三環在反義股之5'末端處。

【0070】 三環或四環中任何數目之核苷酸可結合於靶向配位體。在

一些實施例中，三環包含結合於配位體之1個核苷酸。在一些實施例中，三環包含結合於配位體之2個核苷酸。在一些實施例中，三環包含結合於配位體之3個核苷酸。在一些實施例中，三環包含結合於配位體之1至3個核苷酸。在一些實施例中，三環包含結合於配位體之1至2個核苷酸或結合於配位體之2至3個核苷酸。

【0071】 在一些實施例中，四環包含結合於配位體之1個核苷酸。在一些實施例中，四環包含結合於配位體之2個核苷酸。在一些實施例中，四環包含結合於配位體之3個核苷酸。在一些實施例中，四環包含結合於配位體之4個核苷酸。在一些實施例中，四環包含結合於配位體之1至4個核苷酸。在一些實施例中，四環包含結合於配位體之1至3個核苷酸、1至2個核苷酸、2至4個核苷酸或3至4個核苷酸。

【0072】 在一些實施例中，四環或三環可含有核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸、經修飾之核苷酸，及其組合。RNA四環之非限制性實例包括(但不限於) UNCG四環家族(例如，UUCG)、GNRA四環家族(例如，GAAA)及CUUG四環。DNA四環之非限制性實例包括(但不限於) d(GNNA)四環家族(例如，d(GTTA))、d(GNRA)四環家族、d(GNAB)四環家族、d(CNNG)四環家族及d(TNCG)四環家族(例如，d(TTCG))。

【0073】 在一些實施例中，本文中揭示之寡核苷酸包含具有根據如表1至10 (以及圖1至圖10)中之任一者所闡述之修飾模式經2'-F修飾的核苷酸的有義股。在一些實施例中，本文中揭示之寡核苷酸包含包括根據表1至10 (以及圖1至圖10)中所闡述之修飾模式經2'-F及2'-OMe修飾的核苷酸的有義股。

【0074】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-F

修飾的位置8至11處之糖部分的有義股。在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'OMe修飾的位置1至7及12至17或12至20處之糖部分的有義股。在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經選自由以下組成之群之修飾修飾的有義股之位置1至7及12至17或12至20處的核苷酸中之每一者之糖部分的有義股：2'-O-炔丙基、2'-O-丙基胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟- β -d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【0075】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-F修飾的位置1、位置2、位置3、位置4、位置5、位置6、位置7、位置8、位置9、位置10、位置11、位置12、位置13、位置14、位置15、位置16、位置17、位置18、位置19、位置20、位置21、位置22、位置23、位置24、位置25、位置26、位置27、位置28、位置29、位置30、位置31、位置32、位置33、位置34、位置35或位置36處之糖部分的有義股。

【0076】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經2'-OMe修飾的位置1、位置2、位置3、位置4、位置5、位置6、位置7、位置8、位置9、位置10、位置11、位置12、位置13、位置14、位置15、位置16、位置17、位置18、位置19、位置20、位置21、位置22、位置23、位置24、位置25、位置26、位置27、位置28、位置29、位置30、位置31、位置32、位置33、位置34、位置35或位置36處之糖部分的有義股。

【0077】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸包含具有經選自由以下組成之群之修飾修飾的位置1、位置2、位置3、位置4、位置5、位置6、位置7、位置8、位置9、位置10、位置11、位置12、位置13、位置

14、位置15、位置16、位置17、位置18、位置19、位置20、位置21、位置22、位置23、位置24、位置25、位置26、位置27、位置28、位置29、位置30、位置31、位置32、位置33、位置34、位置35或位置36處之糖部分的有義股：2'-O-炔丙基、2'-O-丙基胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟- β -d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

(iii)寡核苷酸修飾

【0078】寡核苷酸可以各種方式經修飾以改善或控制特異性、穩定性、遞送、生物可用性、對核酸酶降解之抗性、免疫原性、鹼基配對特性、RNA分佈及細胞攝取以及與治療或研究用途相關之其他特徵。參見例如 Bramsen 等人，NUCLEIC ACIDS RES., 2009, 37, 2867-2881；Bramsen及Kjems (FRONTIERS IN GENETICS, 3 (2012): 1-22)。因此。一些實施例可包括一或多個適合的修飾。在一些實施例中，經修飾之核苷酸在其鹼基(或核鹼基)、糖(例如，核糖、脫氧核糖)或磷酸酯基中具有修飾。

【0079】寡核苷酸上之修飾數目及彼等核苷酸修飾之位置可影響寡核苷酸之特性。舉例而言，寡核苷酸可藉由使其與脂質奈米顆粒(LNP)或類似載劑結合或將其包含於脂質奈米顆粒(LNP)或類似載劑中而進行活體內遞送。然而，當寡核苷酸並未受LNP或類似載劑保護時，可能有利的係其核苷酸中之至少一些經修飾。因此，在本文中提供之寡核苷酸中之任一者的某些實施例中，全部或基本上全部的寡核苷酸之核苷酸經修飾。在某些實施例中，超過一半的核苷酸經修飾。在某些實施例中，小於一半的核

核苷酸經修飾。通常，在裸遞送之情況下，每一種糖在2'-位置處經修飾。此等修飾可為可逆的或不可逆的。在一些實施例中，如本文中所揭示之寡核苷酸具有足以產生所需特徵(例如，防止酶降解、活體內投與之後靶向所需細胞之能力，及/或熱力學穩定性)的一定數量及類型之經修飾核苷酸。

(a) 糖修飾

【0080】 在一些實施例中，經修飾之糖(本文亦稱為糖類似物)包括經修飾之脫氧核糖或核糖部分，例如其中一或多個修飾出現在糖之2'、3'、4'及/或5'碳位置處。在一些實施例中，經修飾之糖亦可包括非天然替代碳結構，諸如存在於鎖核酸(「LNA」)(參見例如Koshkin等人，(1998), TETRAHEDRON 54, 3607-3630)、解鎖核酸(「UNA」)(參見例如Snead等人，(2013), MOLECULAR THERAPY - NUCLEIC ACIDS, 2, e103)及橋接核酸(「BNA」)(參見例如Imanishi及Obika (2002), The Royal Society of Chemistry, CHEM. COMMUN., 1653-1659)中之彼等。Koshkin等人，Snead等人以及Imanishi及Obika關於其與糖修飾相關之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0081】 在一些實施例中，核苷酸之糖部分的修飾包含2'-修飾。在一些實施例中，2'-修飾可為2'-O-炔丙基、2'-O-丙基胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。在一些實施例中，修飾為2'-氟、2'-O-甲基或2'-O-甲氧基乙基。在一些實施例中，糖之修飾包含糖環之修飾，其可包含糖環之一或多個碳之修飾。舉例而言，核苷酸之糖修飾可包含連接至糖之1'-碳或

4'-碳的糖之2'-氧，或經由伸乙基或亞甲基橋鍵連接至1'-碳或4'-碳的2'-氧。在一些實施例中，經修飾之核苷酸具有缺乏2'-碳與3'-碳鍵之非環糖。在一些實施例中，經修飾之核苷酸具有硫醇基，例如在糖之4'位置。

【0082】 在一些實施例中，本文中描述之寡核苷酸包含至少一個經修飾之核苷酸(例如，至少1個、至少5個、至少10個、至少15個、至少20個、至少25個、至少30個、至少35個、至少40個、至少45個、至少50個、至少55個、至少60個或更多個)。在一些實施例中，寡核苷酸之有義股包含至少一個經修飾之核苷酸(例如，至少1個、至少5個、至少10個、至少15個、至少20個、至少25個、至少30個、至少35個或更多個)。在一些實施例中，寡核苷酸之反義股包含至少一個經修飾之核苷酸(例如，至少1個、至少5個、至少10個、至少15個、至少20個或更多個)。

【0083】 在一些實施例中，寡核苷酸之有義股的全部核苷酸係經修飾。在一些實施例中，寡核苷酸之反義股的全部核苷酸係經修飾。在一些實施例中，寡核苷酸之全部核苷酸(亦即，有義股及反義股兩者)係經修飾。在一些實施例中，經修飾之核苷酸包含2'-修飾(例如，2'-氟或2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基及2'-去氧-2'-氟- β -d-阿拉伯核酸)。在一些實施例中，經修飾之核苷酸包含2'-修飾(例如，2'-氟或2'-O-甲基)。

【0084】 本發明提供具有不同修飾模式之寡核苷酸。在一些實施例中，經修飾之寡核苷酸包含具有如表1至10 (以及圖1至圖10)中之任一者所闡述之修飾模式的有義股序列及具有如表1至10 (以及圖1至圖10)中之任一者所闡述之修飾模式的反義股。在一些實施例中，對於此等寡核苷酸，有義股之位置8、9、10或11中之一或多者經2'-F基團修飾。在其他實施例中，對於此等寡核苷酸，有義股中之位置1至7及12至20處之核苷酸

中之每一者之糖部分經2'-O-甲基修飾。

【0085】 在一些實施例中，本發明提供一種寡核苷酸，其為或包含選自表A中列舉之彼等的經修飾或未經修飾之有義股。在一些實施例中，本發明提供一種寡核苷酸，其為或包含選自表A中列舉之彼等的經修飾或未經修飾之反義股。在一些實施例中，本發明提供選自表A中列舉之彼等的經修飾或未經修飾之雙股寡核苷酸。在一些實施例中，本發明提供一種選自表A中列舉之彼等的有義股修飾模式。在一些實施例中，本發明提供一種反義股修飾模式，其選自表A中所列舉之彼等反義股修飾模式。

表A：表1至8中之寡核苷酸之序列資訊。

DP號隨從:引導 修飾模式		具有修飾之序列	相應的未經修飾序列
DP8822P: DP5843G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMFMFMMMMMMMM[prg- peg-GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc]MMMMMM M{MS}{MS}FMFMFFMMMF FFFFFM{FS}{FS}{Px-FS}	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][fA][mU][fU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] [5VPfUs][fAs][fAs][mU][fA][fC][fA][fG][fA][fU][mG] [mG][mG][fA][fA][mA][fA][mU][fA][mUs][mGs][mG]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
DP8823P: DP5843G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMFMMMMMMMM[prg- peg-GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc]MMMMMM M{MS}{MS}FMFMFFMMMF FFFFFM{FS}{FS}{Px-FS}	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][fU][mA][mG][mC] [mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] [5VPfUs][fAs][fAs][mU][fA][fC][fA][fG][fA][fU][mG] [mG][mG][fA][fA][mA][fA][mU][fA][mUs][mGs][mG]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
DP8824P: DP5843G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMMMM[prg- peg-GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc]MMMMMM M{MS}{MS}FMFMFFMMMF FFFFFM{FS}{FS}{Px-FS}	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] [5VPfUs][fAs][fAs][mU][fA][fC][fA][fG][fA][fU][mG] [mG][mG][fA][fA][mA][fA][mU][fA][mUs][mGs][mG]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
DP8824P: DP9316G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMMMM[prg- peg-GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc]MMMMMM M{MS}{MS}FMFMFFMMMF FFFFFM{FS}{FS}{Px-FS}	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m CCGAAAGGCUGC UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC

	peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	M{MS}{MS}MMFMFFMMM	[5VPfUs][fAs][fAs][mU][fA][fC][fA][fG][fA][fU][mG]	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	FFFFFFM{FS}{FS}{Px-FS}	[mG][mG][fA][fA][mA][fA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
		]	
DP8824P: DP9317G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	GalNAc]MMMMMM		
	M{MS}{MS}MMMMFFMM	[5VPfUs][fAs][fAs][mU][fA][fC][fA][fG][fA][fU][mG]	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MFFFFFFM{FS}{FS}{Px-FS}	[mG][mG][fA][fA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][m	
		G]	
DP8824P: DP9318G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	GalNAc]MMMMMM		
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[5VPfUs][fAs][fAs][mU][fA][fC][fA][fG][fA][fU][mG]	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MFFFFFFM{FS}{FS}{Px-FS}	[mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][	
		mG]	
DP8824P: DP9320G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	

	GalNAc]MMMMMM	M{MS}{MS}MMMMFFMM	[5VPfUs][fAs][fAs][mU][fA][fC][fA][fG][mA][fU][mG	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
		MFmFFFFM{FS}{FS}{Px-	][mG][mG][fA][fA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][	
		FS}	mG]	
DP8824P: DP9321G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCTCAUCUGUAUUAGCAG	
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC	
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-		
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-		
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]		
	GalNAc]MMMMMM			
	M{MS}{MS}MMMMFFMM	[5VPfUs][fAs][fAs][mU][fA][fC][mA][fG][mA][fU][m	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG	
	MFmFMFFM{FS}{FS}{Px-	G][mG][mG][fA][fA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][		
	FS}	mG]		
DP8824P: DP9322G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCTCAUCUGUAUUAGCAG	
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC	
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-		
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-		
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]		
	GalNAc]MMMMMM			
	M{MS}{MS}MMMMFFMM	[5VPfUs][fAs][fAs][mU][mA][fC][mA][fG][mA][fU][	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG	
	MFmFMFFM{FS}{FS}{Px-	mG][mG][mG][fA][fA][mA][mA][mU][mA][mUs][mG		
	FS}	s][mG]		
DP8824P: DP9323G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCTCAUCUGUAUUAGCAG	
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC	
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-		
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-		
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]		
	GalNAc]MMMMMM			
	M{MS}{MS}MMMMFFMM	[5VPfUs][fAs][mAs][mU][mA][fC][mA][fG][mA][fU][	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG	
	MFmFMFFM{MS}{FS}{Px-	mG][mG][mG][fA][fA][mA][mA][mU][mA][mUs][mG		

	FS}	s][mG]	
DP8824P: DP9324G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMM[prg- peg-GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc]MMMMMM M{MS}{MS}MMMMFFMM MFMMMMMM{MS}{FS}{Px- FS}	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] [5VPfUs][fAs][mAs][mU][mA][mC][mA][fG][mA][fU] [mG][mG][mG][fA][fA][mA][mA][mU][mA][mUs][m Gs][mG]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
DP8824P: DP9325G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMM[prg- peg-GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc]MMMMMM M{MS}{MS}MMMMFFMM MFMMMMMM{MS}{FS}{Px -FS}	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] [5VPfUs][fAs][mAs][mU][mA][mC][mA][mG][mA][fU] [mG][mG][mG][fA][fA][mA][mA][mU][mA][mUs][m Gs][mG]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
DP8824P: DP9326G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMM[prg- peg-GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc][prg-peg- GalNAc]MMMMMM M{MS}{MS}MMMMFFMM MMMMMMMMMM{MS}{FS}{P x-FS}	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] [5VPfUs][fAs][mAs][mU][mA][mC][mA][mG][mA][m U][mG][mG][mG][fA][fA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
DP8824P:	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG

DP9319G	MMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM M{MS}{MS}MMMMMFMM MFMFMFMM{FS}{FS}{Px-FS}	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] [5VPfUs][fAs][fAs][mU][mA][fC][mA][fG][mA][fU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	CCGAAAGGCUGC UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
DP8824P: DP9327G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM M{MS}{MS}MMMMFFMM MFMFMFMM{MS}{FS}{Px-MS}	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] [5VPmUs][fAs][mAs][mU][mA][fC][mA][fG][mA][fU][mG][mG][mG][fA][fA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
DP8824P: DP9328G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM M{MS}{MS}MMMMMFMM MMMMMMMMMM{MS}{FS}{Px-MS}	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] [5VPmUs][fAs][mAs][mU][mA][mC][mA][mG][mA][mU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
DP8824P: DP10016G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC

	GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMMMMM{MS}{FS}{Px-MS}	mUs][fAs][mAs][mU][mA][mC][mA][mG][mA][mU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
DP8824P: DP10017G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	AUAUUUUCCTCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMMMMM{FS}{FS}{Px-MS}	mUs][fAs][fAs][mU][mA][mC][mA][mG][mA][mU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
DP8824P: DP10024G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	AUAUUUUCCTCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMMMMMF{MS}{FS}{Px-MS}	mUs][fAs][mAs][fU][mA][mC][mA][mG][mA][mU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
DP8824P: DP10018G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc]	AUAUUUUCCTCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC

	GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMMMFM{MS}{FS}{Px	mUs][fAs][mAs][mU][fA][mC][mA][mG][mA][mU][m	
	-MS}	G][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs	
		][mG]	
DP8824P: DP10025G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	GalNAc]MMMMMM		
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMMFMM{MS}{FS}{Px	mUs][fAs][mAs][mU][mA][fC][mA][mG][mA][mU][m	
	-MS}	G][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs	
		][mG]	
DP8824P: DP10019G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	GalNAc]MMMMMM		
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMMMFM{FS}{FS}{Px-	mUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][mA][mG][mA][mU][mG	
	MS}	][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][	
		mG]	
DP8824P: DP10026G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-	

	GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMMFFM{MS}{FS}{Px-MS}	mUs][fAs][mAs][mU][fA][fC][mA][mG][mA][mU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
DP8824P: DP10027G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMMFFM{FS}{FS}{Px-MS}	mUs][fAs][fAs][mU][fA][fC][mA][mG][mA][mU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
DP8824P: DP10633G	{MS}MMMMMMFFFFMMM MMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMMMFM{FS}{FS}{Px-FS}	fUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][mA][mG][mA][mU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
DP10632P: DP10633G	{MS}MMMMMMFMFFMM MMMMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][mC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC

	GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMMMFM{FS}{FS}{Px-FS}	fUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][mA][mG][mA][mU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
DP10632P: DP10634G	{MS}MMMMMMFMFFMM MMMMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][mC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMFMFM{FS}{FS}{Px-FS}	fUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][fA][mG][mA][mU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
DP10632P: DP10635G	{MS}MMMMMMFMFFMM MMMMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][mC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMFMMFM{FS}{FS}{Px-FS}	fUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][mA][fG][mA][mU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
DP10632P: DP10636G	{MS}MMMMMMFMFFMM MMMMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][mC][fC][fA][mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG CCGAAAGGCUGC

	GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMFMMMMFM{FS}{FS}{Px-FS}	fUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][mA][mG][fA][mU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
DP10632P: DP10637G	{MS}MMMMMMFMFFMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][mC][fC][fA]	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	[mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	CCGAAAGGCUGC
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MFMMMMFM{FS}{FS}{Px-FS}	fUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][mG]	
DP3692P: DP8180G	{MS}FMFMFFFFFFFFFMFM	[mAs][mU][fA][mU][fU][mU][fU][fC][fC][fC][fA][fU][AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG	
	FMFMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]MMMMMM	fC][mU][fG][mU][fA][mU][fU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	CCGAAAGGCUGC
	M{MS}{MS}FMFMFFFMFM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	FMFMFM{FS}{FS}{Px-FS}	fUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][fA][mG][fA][mU][fG][mG][fG][fA][fA][mA][fA][mU][fA][mUs][mGs][mG]	
DP8824P: DP11239G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc][prg-peg-GalNAc]	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	CCGAAAGGCUGC

	GalNAc]MMMMMM		
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMMMFM{MS}{FS}{Px	fUs][fAs][mAs][mU][fA][mC][mA][mG][mA][mU][mG	
	-FS}	][mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][	
		mG]	
DP8824P: DP10634G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	GalNAc]MMMMMM		
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMMMFMFM{FS}{FS}{Px-	fUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][fA][mG][mA][mU][mG][	
	FS}	mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][m	
		G]	
DP8824P: DP10637G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	GalNAc]MMMMMM		
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MFMMMMFM{FS}{FS}{Px-	fUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][mA][mG][mA][fU][mG][	
	FS}	mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][m	
		G]	
DP8824P: DP10638G	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	

	GalNAc]MMMMMM		
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MMFMFMFM{FS}{FS}{Px-	fUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][fA][mG][fA][mU][mG][	
	FS}	mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][m	
		G]	
DP8824P:	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
DP11240G	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	GalNAc]MMMMMM		
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MFMMFMFM{FS}{FS}{Px-	fUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][fA][mG][mA][fU][mG][	
	FS}	mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][m	
		G]	
DP8824P:	{MS}MMMMMMFFFFMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mU][fC][fC][fC][fA][	AUAUUUUCCCAUCUGUAUUAGCAG
DP11244G	MMMMMMMMMMMMMM[prg-	mU][mC][mU][mG][mU][mA][mU][mU][mA][mG][m	CCGAAAGGCUGC
	peg-GalNAc][prg-peg-	C][mA][mG][mC][mC][prgG-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][prgA-peg-GalNAc][prgA-peg-	
	GalNAc][prg-peg-	GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	
	GalNAc]MMMMMM		
	M{MS}{MS}MMMMMFMM	[Phosphonate-4O-	UAAUACAGAUGGGAAAAUAUGG
	MFMMFMFM{FS}{FS}{Px-	mUs][fAs][fAs][mU][fA][mC][fA][mG][mA][fU][mG][	
	MS}	mG][mG][fA][mA][mA][mA][mU][mA][mUs][mGs][m	
		G]	

在表A之修飾模式中：

「M」係指經2'-OMe修飾之核苷酸；

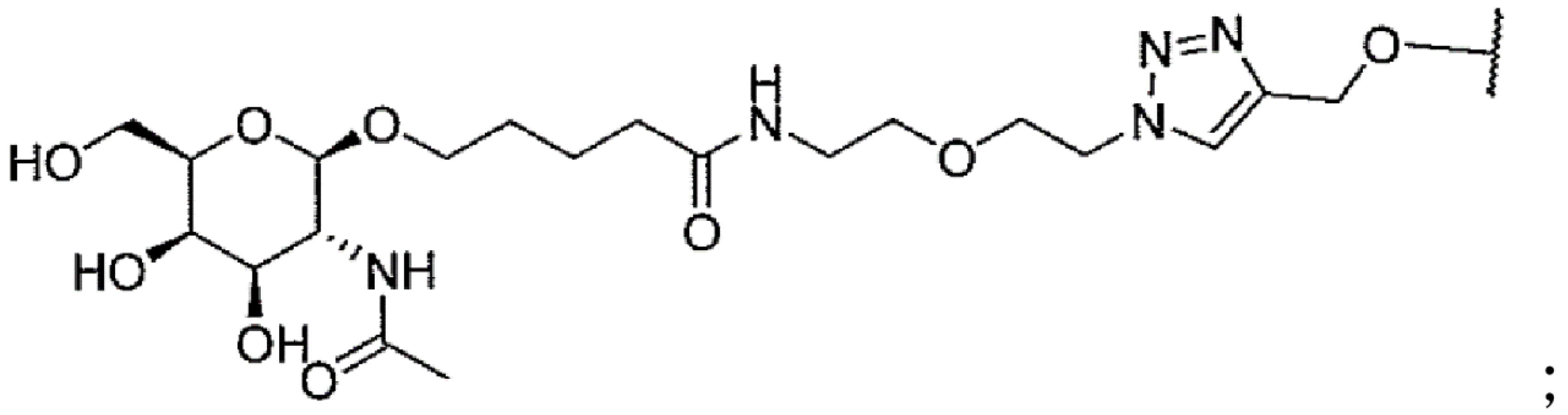
「F」係指經2'-F修飾之核苷酸；

「S」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵之核苷酸；

「{MS}」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵的經2'-OMe修飾之核苷酸；

「{FS}」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵的經2'-F修飾之核苷酸；

「prg-peg-GalNAc」係指具有2'-GalNAc結合物之核苷酸：



「{Px-FS}」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵及5'膦酸酯或乙烯基膦酸酯的經2'-F修飾之核苷酸；

「{Px-MS}」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵及5'膦酸酯或乙烯基膦酸酯的經2'-OMe修飾之核苷酸。

在表A之經修飾序列中：

「[mN]」係指經2'-OMe修飾之核苷酸；

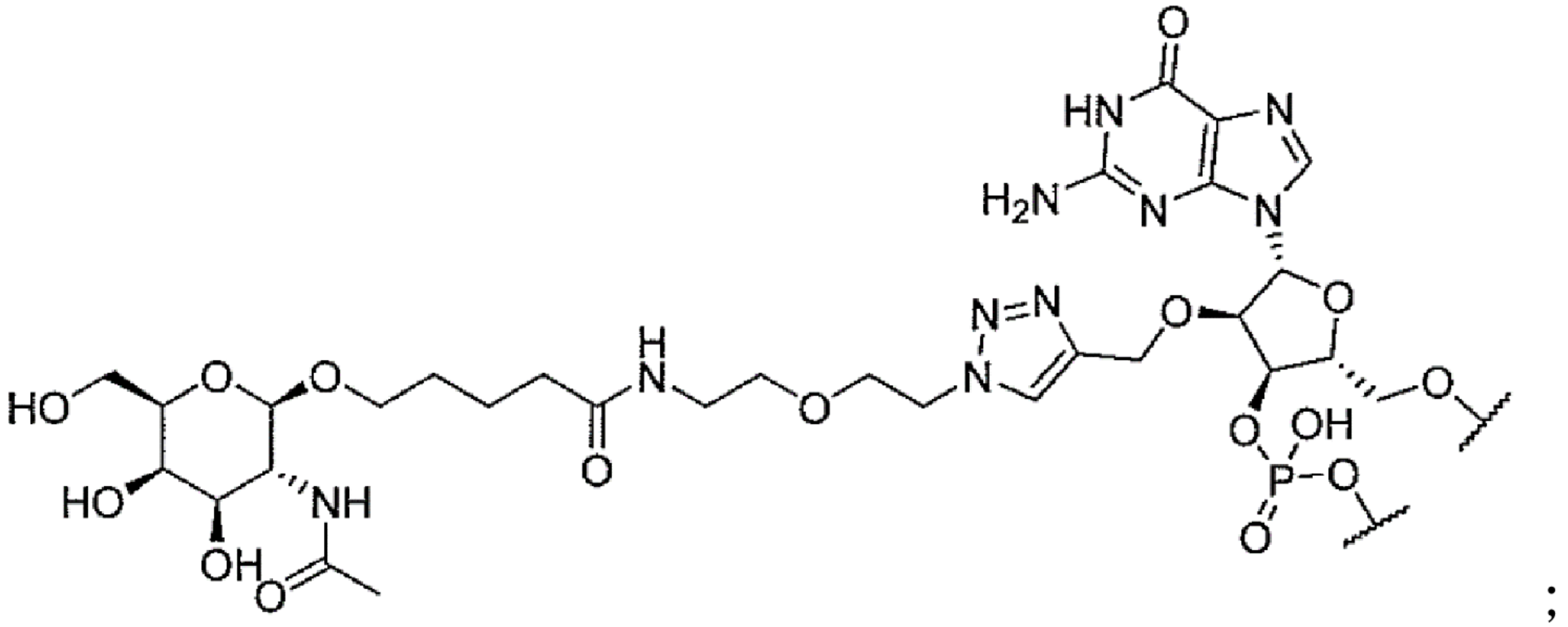
「[fN]」係指經2'-F修飾之核苷酸；

「[Ns]」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵之核苷酸；

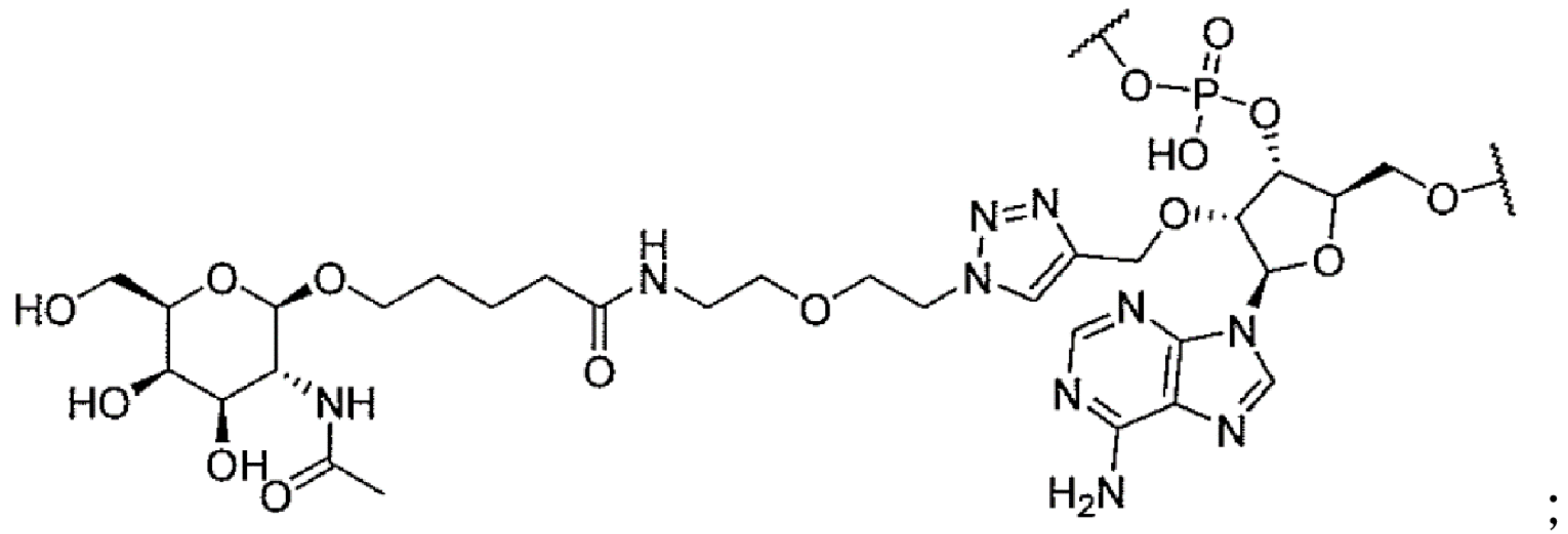
「[mNs]」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵的經2'-OMe修飾之核苷酸；

「[fNs]」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵的經2'-F修飾之核苷酸；

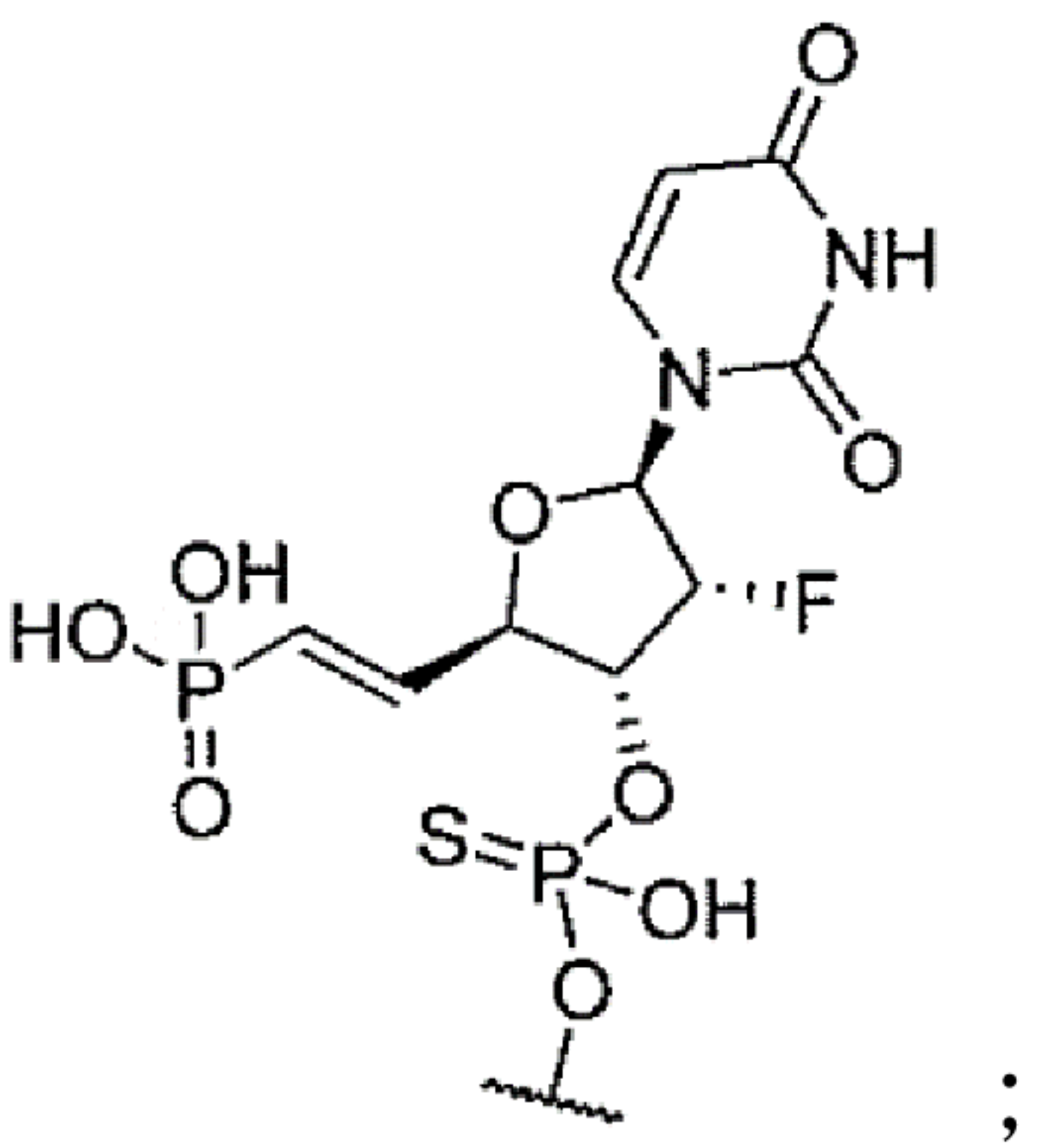
「[prgG-peg-GalNAc]」係指具有2'-GalNAc結合物之G核苷酸：



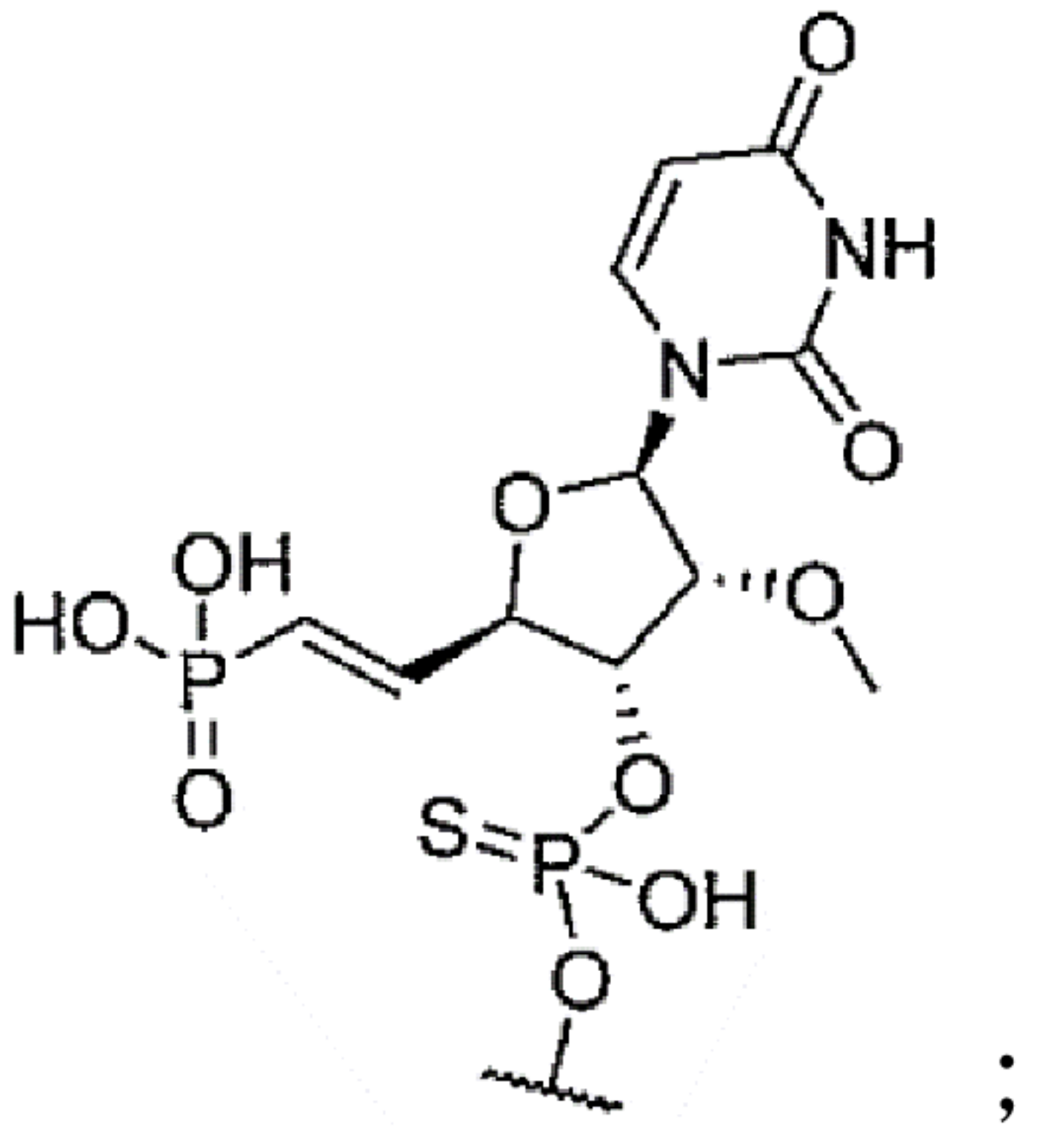
「[prgA-peg-GalNAc]」係指具有2'-GalNAc結合物之A核苷酸：



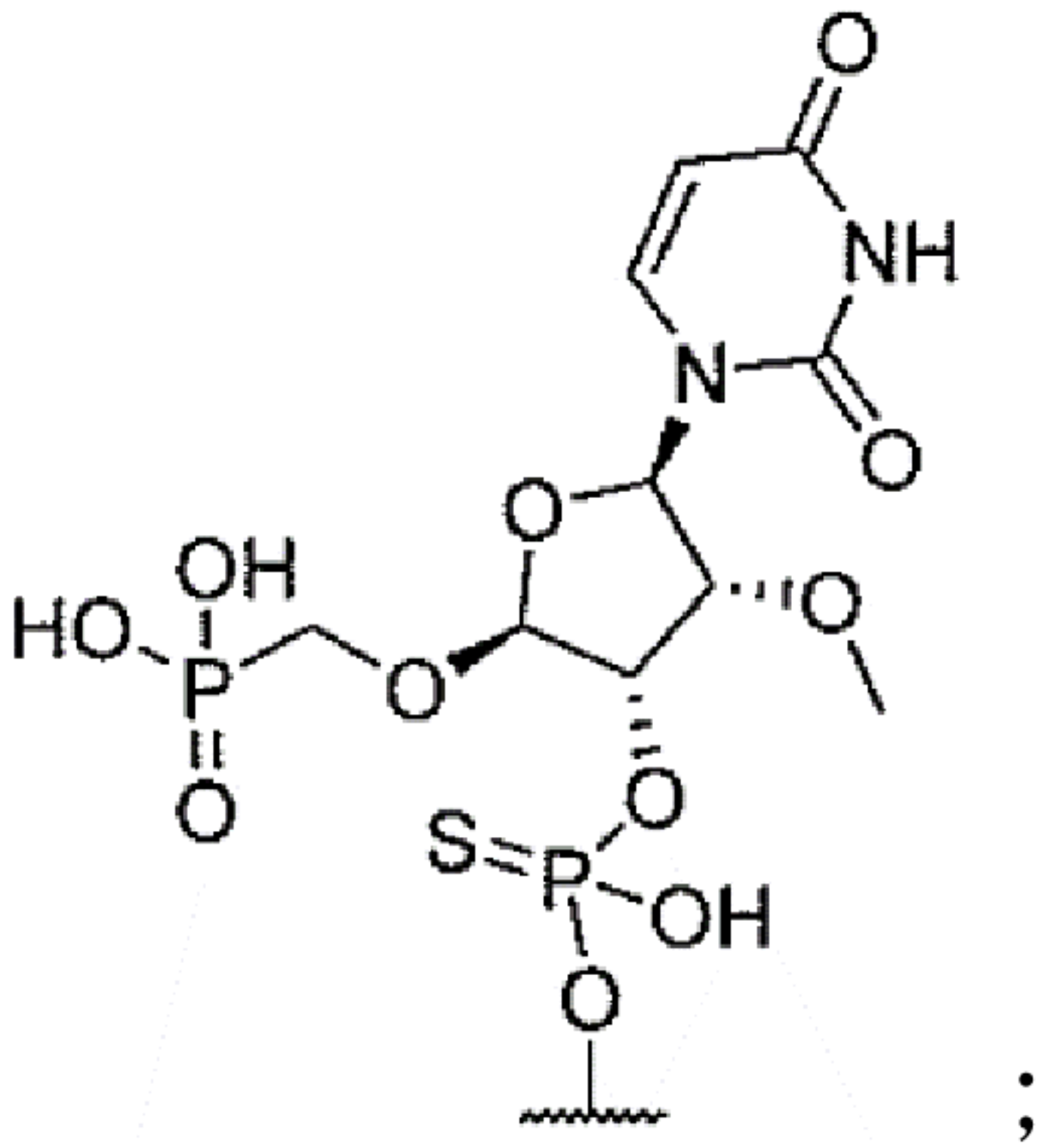
「[5VPfUs]」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵之5'-乙炔基膦酸酯2'-F尿苷：



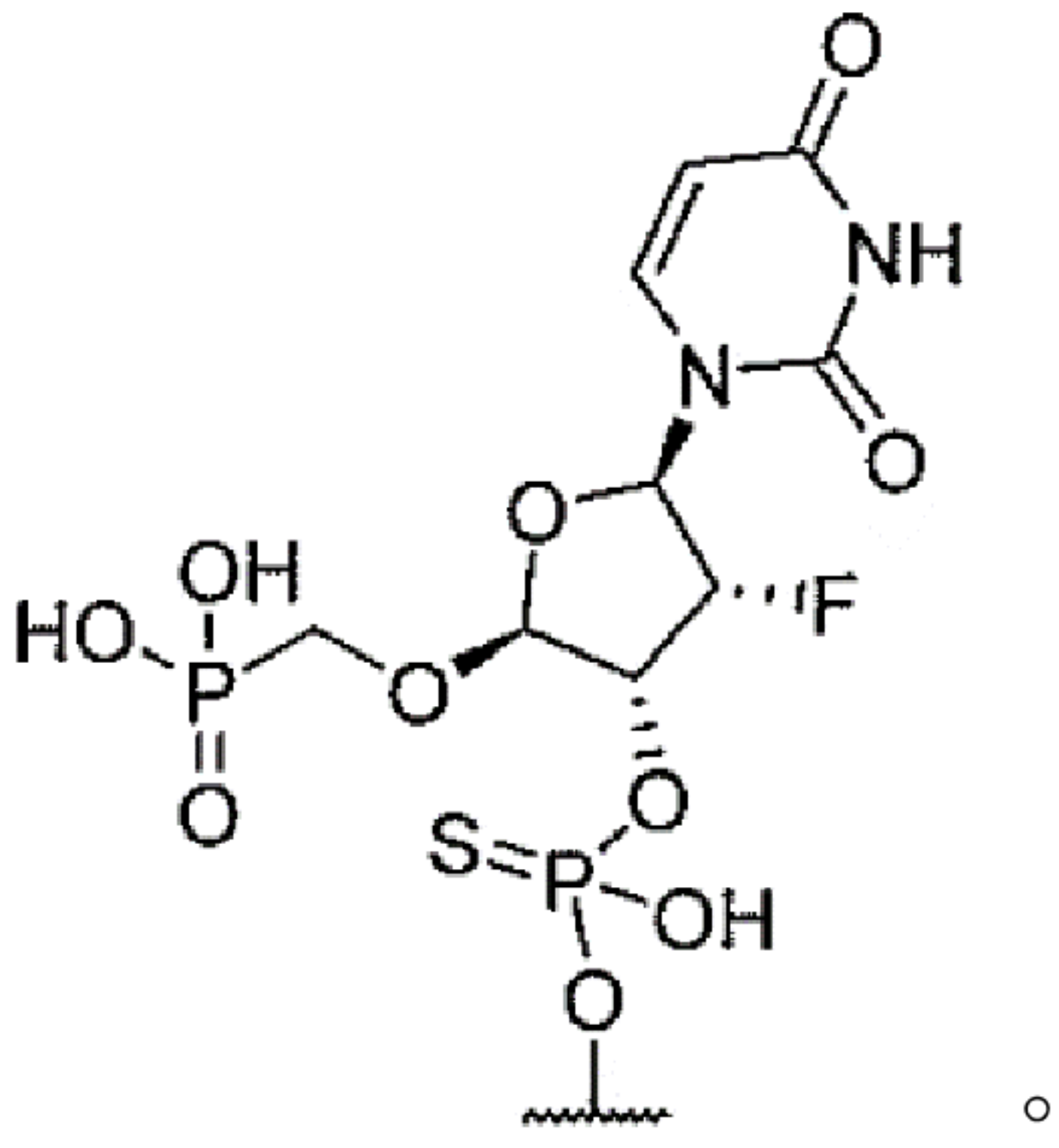
「[5VPmUs]」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵之5'-乙炔基膦酸酯2'-OMe尿苷：



「[Phosphonate-4O-mUs]」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵之5'-膦酸酯-4'-氧基-2'-OMe尿苷：



「[Phosphonate-4O-fUs]」係指具有3'-硫代磷酸酯鍵之5'-磷酸酯-4'-氧基-2'-F尿苷：



【0086】 在一些實施例中，反義股具有3個在糖部分之2'-位置處經2'-F修飾的核苷酸。在一些實施例中，反義股之位置2、5及14處之糖部分及視情況位置1、3、7及10處之至多3個核苷酸經2'-F修飾。在其他實施例中，反義股之位置2、5及14處之位置中之每一者處之糖部分經2'-F修飾。在其他實施例中，反義股之位置1、2、5及14處之位置中之每一者處之糖部分經2'-F修飾。在另其他實施例中，反義股之位置1、2、3、5、7及14處之位置中之每一者處之糖部分經2'-F修飾。在又另一實施例中，反義股之位置1、2、3、5、10及14處之位置中之每一者處之糖部分經2'-F修飾。在另一實施例中，反義股之位置2、3、5、7、10及14處之位置中之每一者處之糖部分經2'-F修飾。

(b) 5'末端磷酸酯

【0087】 在一些實施例中，寡核苷酸之5'-末端磷酸酯基增強與阿爾古2之相互作用。然而，包含5'-磷酸酯基之寡核苷酸可容易經由磷酸酶或其他酶發生降解，此可限制其活體內生物可用性。在一些實施例中，寡核苷酸包括對此類降解具有抗性的5'磷酸酯之類似物。在一些實施例中，磷酸酯類似物可為氧基甲基磷酸酯、乙烯基磷酸酯或丙二醯基磷酸酯。在某些實施例中，寡核苷酸股之1'端連接至模擬天然5'-磷酸酯基(「磷酸酯模擬物」)之靜電及空間特性的化學部分。

【0088】 在一些實施例中，寡核苷酸在糖之4'碳位置處具有磷酸酯類似物(稱為「4'-磷酸酯類似物」)。參見例如2017年9月1日申請之國際專利申請案 PCT/US2017/049909、2016年9月2日申請之標題為 *4'-Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Same* 的美國臨時申請案第62/383,207號及2016年9月12日申請之標題為 *4'-Phosphate*

*Analog and Oligonucleotides Comprising the Same*的美國臨時申請案第62/393,401號，其各者與磷酸酯類似物相關之內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸在5'-末端核苷酸處包含4'-磷酸酯類似物。在一些實施例中，磷酸酯類似物為氧基甲基膦酸酯，其中氧基甲基之氧原子結合至糖部分(例如，在其4'碳處)或其類似物。在其他實施例中，4'-磷酸酯類似物為硫基甲基膦酸酯或胺基甲基膦酸酯，其中硫基甲基之硫原子或胺基甲基之氮原子結合至糖部分或其類似物之4'-碳。在某些實施例中，4'-磷酸酯類似物為氧基甲基膦酸酯。在一些實施例中，氧基甲基膦酸酯由式 $-O-CH_2-PO(OH)_2$ 或 $-O-CH_2-PO(OR)_2$ 表示，其中R係獨立地選自H、 CH_3 、烷基、 CH_2CH_2CN 、 $CH_2OCOC(CH_3)_3$ 、 $CH_2OCH_2CH_2Si(CH_3)_3$ 或保護基。在某些實施例中，烷基為 CH_2CH_3 。更通常，R係獨立地選自H、 CH_3 或 CH_2CH_3 。

(c). 經修飾之核苷內鍵

【0089】 在一些實施例中，寡核苷酸可包含經修飾之核苷間鍵。在一些實施例中，磷酸酯修飾或取代可產生包含至少一個(例如，至少1個、至少2個、至少3個或至少5個)經修飾之核苷酸間鍵的寡核苷酸。在一些實施例中，本文中揭示之寡核苷酸中之任一者包含1至10個(例如，1至10個、2至8個、4至6個、3至10個、5至10個、1至5個、1至3個或1至2個)經修飾之核苷酸間鍵。在一些實施例中，本文中揭示之寡核苷酸中之任一者包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個經修飾之核苷酸間鍵。

【0090】 經修飾之核苷酸間鍵可為二硫代磷酸酯鍵、硫代磷酸酯鍵、磷酸三酯鍵、硫代烷基膦酸酯鍵、硫代烷基膦酸三酯鍵、亞磷醯胺鍵、膦酸酯鍵或硼烷膦酸酯鍵。在一些實施例中，如本文所揭示之寡核苷

酸中之任一者之至少一個經修飾之核苷酸間鍵為硫代磷酸酯鍵。

【0091】 在一些實施例中，本文中描述之寡核苷酸在有義股之位置1及2、反義股之位置1及2、反義股之位置2及3、反義股之位置3及4、反義股之位置20及21及反義股之位置21及22中之一或多者之間具有硫代磷酸酯鍵。在一些實施例中，本文中描述之寡核苷酸在有義股之位置1及2、反義股之位置1及2、反義股之位置2及3、反義股之位置20及21及反義股之位置21及22中之每一者之間具有硫代磷酸酯鍵。

(d) 鹼基修飾

【0092】 在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸具有一或多個經修飾之核鹼基。在一些實施例中，經修飾之核鹼基(在本文中亦被稱作鹼基類似物)連接於核苷酸糖部分之1'位置處。在某些實施例中，經修飾之核鹼基為含氮鹼基。在某些實施例中，經修飾之核鹼基不含氮原子。參見例如美國公開專利申請案第20080274462號。在一些實施例中，經修飾之核苷酸包含通用鹼基。然而，在某些實施例中，經修飾之核苷酸不含有核鹼基(無鹼基)。

【0093】 在一些實施例中，通用鹼基為位於經修飾核苷酸中之核苷酸糖部分之1'位置處或在存在於雙螺旋中時可與超過一個類型之鹼基相反的定位而實質上不更改雙螺旋之結構的核苷酸糖部分取代中之等效位置處的雜環部分。在一些實施例中，相較於與目標核酸完全互補之參考單股核酸(例如，寡核苷酸)，含有通用鹼基之單股核酸與目標核酸形成雙螺旋，該雙螺旋具有比與互補核酸形成之雙螺旋更低的 T_m 。然而，在一些實施例中，相較於其中通用鹼基已經一鹼基置換以產生單一錯配的參考單股核酸，含有通用鹼基之單股核酸與目標核酸形成雙螺旋，該雙螺旋具有比與

包含錯配鹼基之核酸形成之雙螺旋更高的 T_m 。

【0094】 通用結合核苷酸之非限制性實例包括肌苷、1- β -D-呋喃核糖基-5-硝基吡咯及/或1- β -D-呋喃核糖基-3-硝基吡咯(Quay等人之美國專利申請公開案第20070254362號；Van Aerschot等人, *An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside*. NUCLEIC ACIDS RES. 1995年11月11日;23(21):4363-70；Loakes等人, *3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR*. NUCLEIC ACIDS RES. 1995年7月11日;23(13):2361-6；Loakes及Brown, *5-Nitroindole as a universal base analogue*, NUCLEIC ACIDS RES. 1994年10月11日;22(20):4039-43。前述各者關於其與鹼基修飾相關之揭示內容以引用之方式併入本文中)。

(e) 可逆的修飾

【0095】 雖然在達至目標細胞之前可進行保護寡核苷酸免受活體內環境影響之某些修飾，但當寡核苷酸達至目標細胞之胞質液後，此等修飾可降低寡核苷酸之效能或活性。可進行可逆修飾以使得分子在細胞外保留所需特性，接著在進入細胞之胞溶質環境時將該等修飾移除。可例如藉由胞內酶之作用或藉由細胞內部之化學條件(例如，經由胞內麩胱甘肽進行還原)來移除可逆的修飾。

【0096】 在一些實施例中，經可逆修飾之核苷酸包含麩胱甘肽敏感性部分。通常，核酸分子已經環狀二硫鍵部分化學修飾以掩蓋由核苷酸間二磷酸酯鍵產生之負電荷且改善細胞攝取及核酸酶抗性。參見最初讓與 Traversa Therapeutics, Inc. (「Traversa」)之美國公開申請案第2011/0294869號、Solstice Biologics, Ltd. (「Solstice」)之PCT公開案第

WO 2015/188197 號、Meade 等人，NATURE BIOTECHNOLOGY, 2014,32:1256-1263 (「Meade」)、Merck Sharp & Dohme Corp之PCT公開案第WO 2014/088920號，其各者關於其此類修飾之揭示內容以引用之方式併入本文中。核苷酸間二磷酸酯鍵之此可逆修飾經設計以藉由胞質液(例如，麩胱甘肽)之還原環境進行胞內裂解。早期實例包括中和據報導可在細胞內部裂解的磷酸三酯修飾(Dellinger等人，J. AM. CHEM. SOC. 2003, 125:940-950)。

【0097】 在一些實施例中，在寡核苷酸將暴露於核酸酶及其他嚴苛的環境條件(例如，pH)時，此類可逆修飾在活體內投藥期間得到保護(例如，傳輸至血液及/或細胞之溶酶體/核內體隔室)。當釋放至麩胱甘肽含量比胞外空間更高的細胞之胞質液中時，修飾經逆轉，且所得物為經裂解寡核苷酸。與使用不可逆化學修飾可獲得的選項相比，使用可逆的麩胱甘肽敏感性部分，有可能將空間上較大的化學基團引入至所關注之寡核苷酸中。此係因為將在胞質液中移除此等較大化學基團，且因此應該不會干擾寡核苷酸在細胞之胞質液內部的生物活性。因此，此等較大化學基團可經工程改造以賦予核苷酸或寡核苷酸各種優勢，諸如核酸酶抗性、親脂性、電荷、熱穩定性、特異性及降低的免疫原性。在一些實施例中，麩胱甘肽敏感性部分之結構可經工程改造以改變其釋放之動力學。

【0098】 在一些實施例中，麩胱甘肽敏感性部分連接至核苷酸之糖。在一些實施例中，麩胱甘肽敏感性部分連接至經修飾核苷酸之糖之2'-碳。在一些實施例中，麩胱甘肽敏感性部分在糖之5'-碳處，尤其在經修飾之核苷酸為寡核苷酸之5'-末端核苷酸時。在一些實施例中，麩胱甘肽敏感性部分在糖之3'-碳處，尤其在經修飾之核苷酸為寡核苷酸之3'-末

端核苷酸時。在一些實施例中，麩胱甘肽敏感性部分包含磺醯基。參見例如2016年8月23日申請之標題為 **Compositions Comprising Reversibly Modified Oligonucleotides and Uses Thereof** 的美國臨時申請案第62/378,635號，且關於其相關揭示內容，其內容以引用之方式併入本文中。

(iv) 靶向配位體

【0099】 在一些實施例中，可能需要將本發明之寡核苷酸靶向一或多個細胞或一或多個器官。此策略可有助於避免其他器官中之非所需效果或可避免寡核苷酸對將不受益於寡核苷酸之細胞、組織或器官的不當損耗。因此，在一些實施例中，本文中揭示之寡核苷酸可經修飾以有助於特定組織、細胞或器官之靶向，例如以有助於將寡核苷酸遞送至肝臟。在某些實施例中，本文中揭示之寡核苷酸可經修飾以有助於將寡核苷酸遞送至肝臟之肝細胞。在一些實施例中，寡核苷酸包含結合於一或多個靶向配位體之核苷酸。

【0100】 靶向配位體可包含碳水化合物、胺糖、膽固醇、肽、多肽、蛋白質或蛋白質之部分(例如，抗體或抗體片段)或脂質。在一些實施例中，靶向配位體為適體。舉例而言，靶向配位體可為用於靶向腫瘤脈管或神經膠質瘤細胞之 **RGD** 肽、用於靶向腫瘤脈管或氣孔、運鐵蛋白、乳鐵蛋白之 **CREKA** 肽，或靶向在 **CNS** 脈管上表現之目標運鐵蛋白受體的適體，或靶向神經膠質瘤細胞上之 **EGFR** 的抗 **EGFR** 抗體。在某些實施例中，靶向配位體為一或多個 **GalNAc** 部分。

【0101】 在一些實施例中，寡核苷酸之1個或更多個(例如，1、2、3、4、5或6個)核苷酸各自結合於單獨的靶向配位體。在一些實施例中，

寡核苷酸之2至4個核苷酸各自結合於單獨的靶向配位體。在一些實施例中，靶向配位體結合於有義股或反義股之任一端處之2至4個核苷酸(例如，配位體結合於有義股或反義股之5'或3'端上的2至4個核苷酸突出物或延伸部分)以使得靶向配位體類似於牙刷之刷毛且寡核苷酸類似於牙刷。舉例而言，寡核苷酸可包含有義股之5'或3'端處之莖環且莖環之1、2、3或4個核苷酸可單獨地結合於靶向配位體。

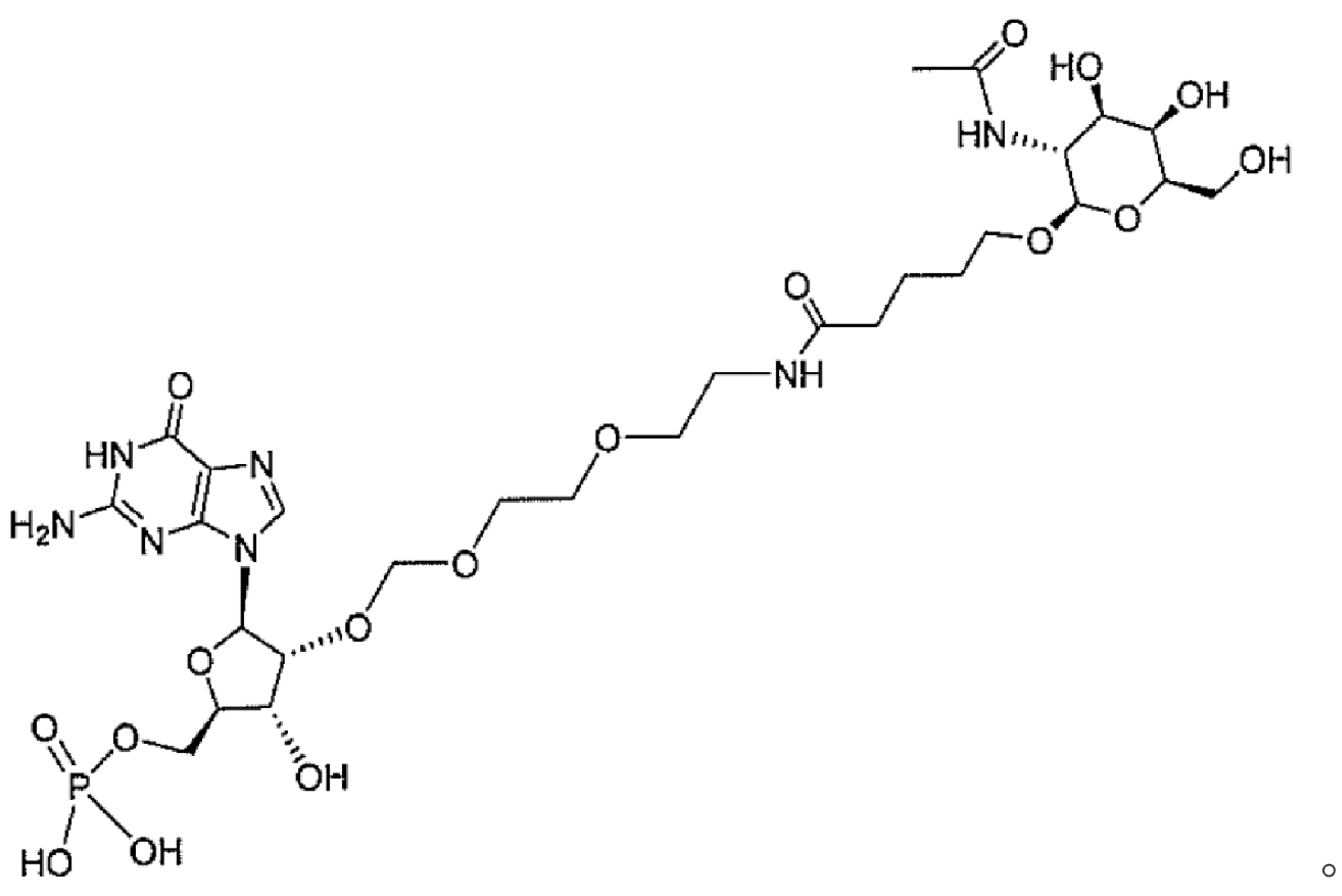
【0102】 GalNAc為去唾液酸醣蛋白受體(ASGPR)之高親和力配位體，該去唾液酸醣蛋白受體主要表現於肝細胞之正弦表面上且在結合、內化及後續清除含有末端半乳糖或N-乙醯基半乳糖胺糖殘基之循環糖蛋白(去唾液酸醣蛋白)中具有主要作用。GalNAc部分與本發明之寡核苷酸的結合(間接或直接)可用於將此等寡核苷酸靶向至在細胞上表現之ASGPR。

【0103】 在一些實施例中，本發明之寡核苷酸直接地或間接地結合於單價GalNAc。在一些實施例中，寡核苷酸直接地或間接地結合於超過一個單價GalNAc (亦即，結合於2、3或4個單價GalNAc部分，且通常結合於3或4個單價GalNAc部分)。在一些實施例中，本發明之寡核苷酸結合於一或多個二價GalNAc、三價GalNAc或四價GalNAc部分。

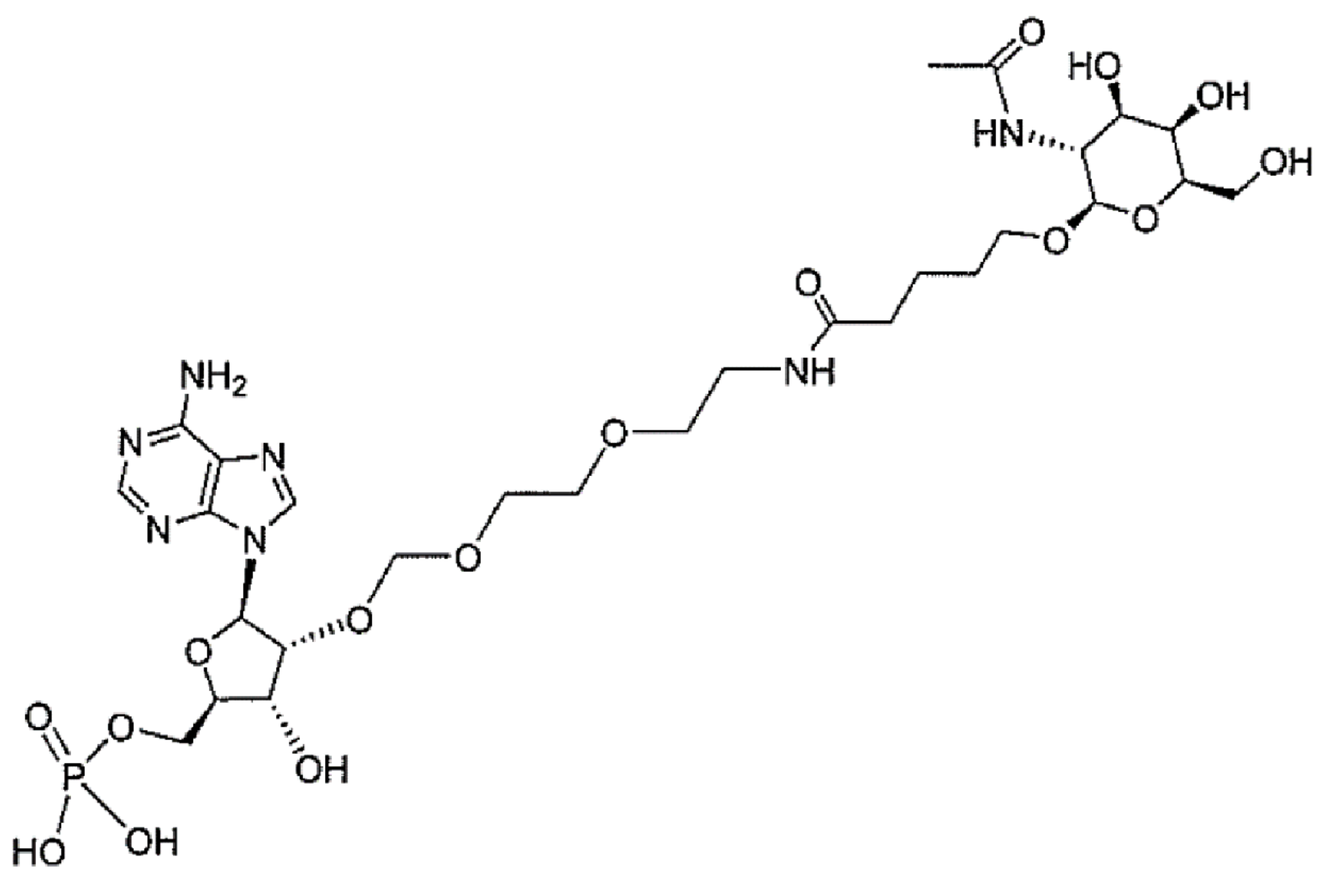
【0104】 在一些實施例中，寡核苷酸之1個或更多個(例如，1、2、3、4、5或6個)核苷酸各自結合於GalNAc部分。在一些實施例中，四環之2至4個核苷酸各自結合於單獨的GalNAc。在一些實施例中，三環之1至3個核苷酸各自結合於單獨的GalNAc。在一些實施例中，GalNAc部分結合於有義股或反義股之任一端處的2至4個核苷酸(例如，GalNAc部分結合於有義股或反義股之5'或3'端上的2至4個核苷酸突出物或延伸部分)以使得GalNAc部分類似於牙刷之刷毛且寡核苷酸類似於牙刷。在一些實施例

中，GalNAc部分結合於有義股之核苷酸。舉例而言，四個GalNAc部分可結合於有義股之四環中之核苷酸，其中各GalNAc部分結合於一個核苷酸。

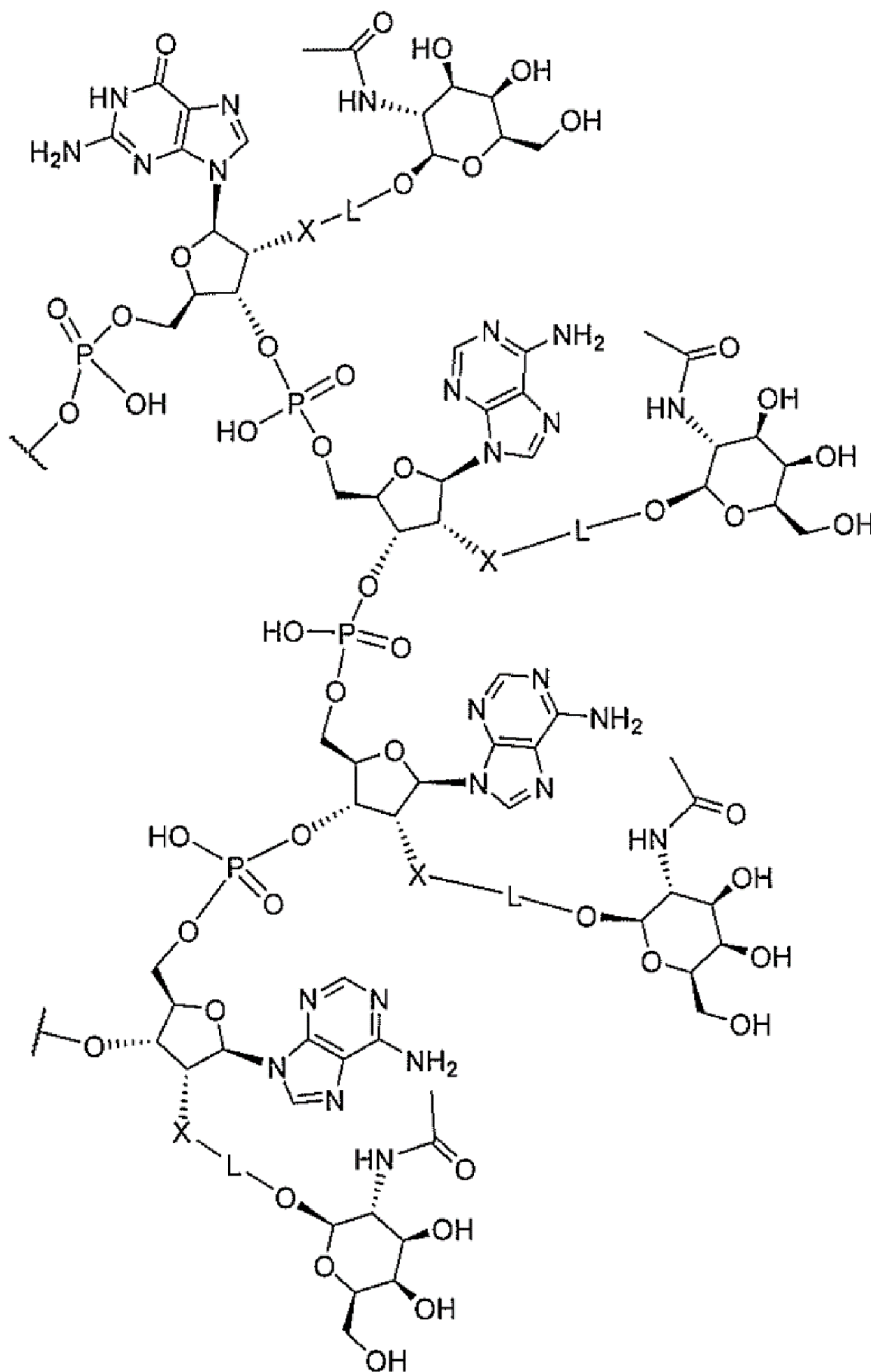
【0105】 在一些實施例中，本文中之寡核苷酸包含連接至胍核苷酸之單價GalNAc，稱為[ademG-GalNAc]或2'-胺基二乙氧基甲醇-胍-GalNAc，如下文所描繪：



【0106】 在一些實施例中，本文中之寡核苷酸包含連接至腺嘌呤核苷酸之單價GalNAc，稱為[ademA-GalNAc]或2'-胺基二乙氧基甲醇-腺嘌呤-GalNAc，如下文所描繪。



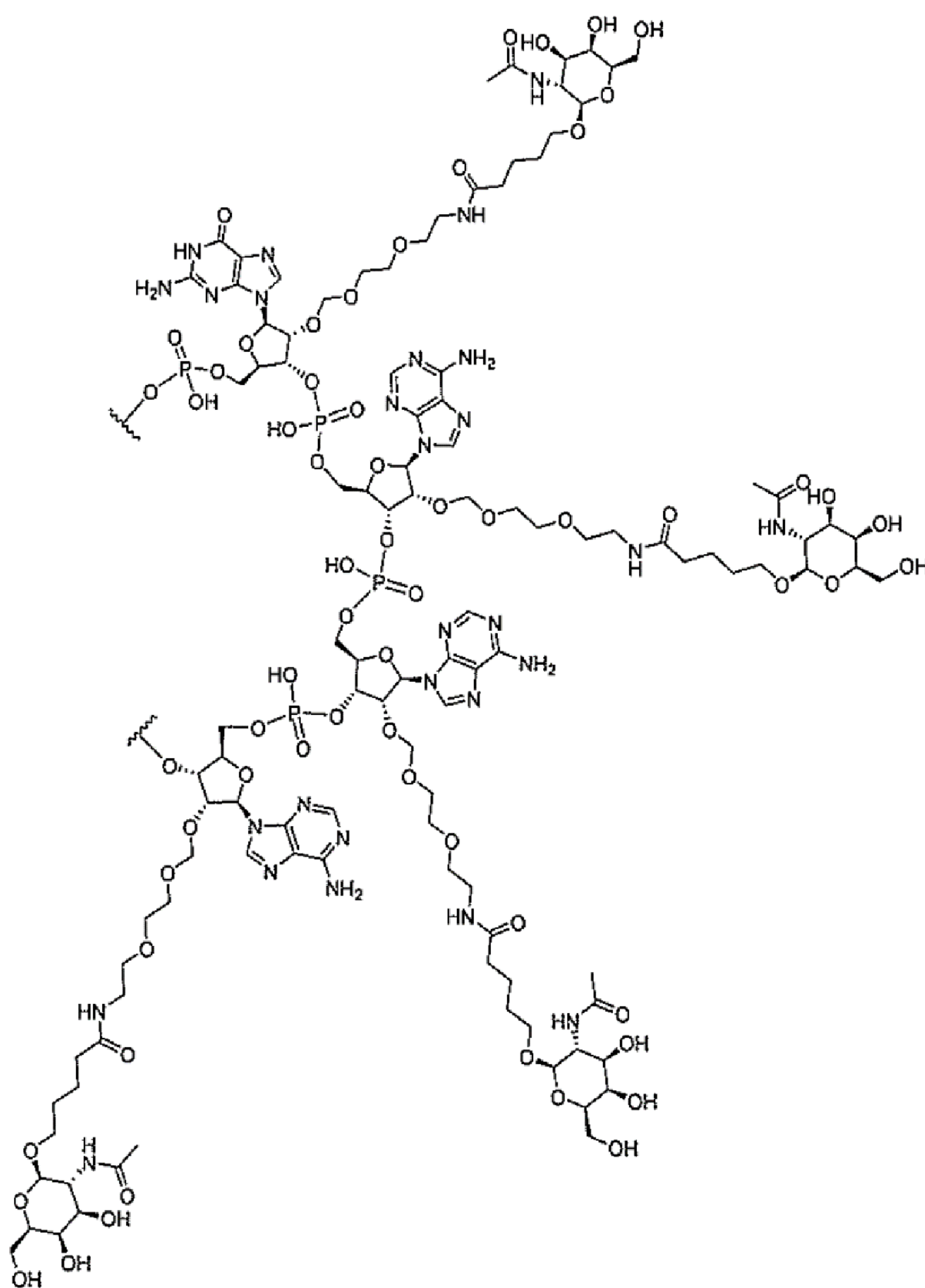
【0107】 此類結合之實例展示於下文，展示自5'至3'包含核苷酸序列GAAA (L=連接子，X=雜原子)莖連接點之環。此環可存在於例如圖1A中所示之分子之位置27至30處。在化學式中，用於描述與寡核苷酸股之連接點。



【0108】 適當的方法或化學(例如，點擊化學)可用於將靶向配位體連接至核苷酸。在一些實施例中，靶向配位體使用點擊連接子結合於核苷酸。在一些實施例中，基於縮醛之連接子用於將靶向配位體結合於本文中描述之寡核苷酸中之任一者之核苷酸。基於縮醛之連接子公開於例如

2016年6月23日公開之國際專利申請公開案第WO2016100401 A1號中，且其內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，連接子為不穩定的連接子。然而，在其他實施例中，連接子係穩定的。

【0109】下文展示針對自5'至3'包含核苷酸GAAA的環之實例，其中GalNac部分使用縮醛連接子連接至環之核苷酸。此環可存在於例如展示於圖10中的分子之位置27至30處。在化學式中，為與寡核苷酸股之連接點。



【0110】任何適當的方法或化學(例如，點擊化學)可用於將靶向配位體連接至核苷酸。在一些實施例中，靶向配位體係使用點擊連接子結合於核苷酸。在一些實施例中，基於縮醛之連接子用於將靶向配位體結合於

本文中描述之寡核苷酸中之任一者之核苷酸。基於縮醛之連接子公開於例如2016年6月23日公開之國際專利申請公開案第WO2016100401 A1號中，且其關於此類連接子之內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，連接子為不穩定的連接子。然而，在其他實施例中，連接子係穩定的。「不穩定的連接子」係指可例如藉由酸性pH裂解之連接子。「極其穩定的連接子」係指不可裂解之連接子。

【0111】 在一些實施例中，雙螺旋延伸部分(例如，長度至多3、4、5或6個鹼基對)會在介於靶向配位體(例如，GalNAc部分)與雙股寡核苷酸之間產生。在一些實施例中，本發明之寡核苷酸不具有所結合之GalNAc。

III. 調配物

【0112】 已研發出促進寡核苷酸用途之各種調配物。舉例而言，可使用調配物將寡核苷酸遞送至個體或細胞環境，該調配物使降解最小化，促進遞送及/或攝取，或為調配物中之寡核苷酸提供另一有益特性。在一些實施例中，將寡核苷酸調配於諸如磷酸鹽緩衝鹽水溶液之緩衝溶液、脂質體、微胞結構及衣殼中。

【0113】 寡核苷酸與陽離子型脂質之調配物可用於促進將寡核苷酸轉染至細胞中。舉例而言，可使用陽離子型脂質(諸如脂質體)、陽離子性型丙三醇衍生物及多陽離子分子(例如，聚離胺酸)。適合脂質包括寡非他命 (Oligofectamine)、脂染胺 (Lipofectamine) (Life Technologies)、NC388 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, Colo.) 或FuGene 6 (Roche)，所有皆可根據製造商的說明書使用。

【0114】 因此，在一些實施例中，調配物包含脂質奈米顆粒。在一

些實施例中，賦形劑包含脂質體、脂質、脂質複合物、微球體、微粒、奈米球或奈米顆粒，或可另外調配以供投與至有需要之個體之細胞、組織、器官或身體(參見例如Remington: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 第22版, Pharmaceutical Press, 2013)。

【0115】 在一些實施例中，如本文所揭示之調配物包含賦形劑。在一些實施例中，賦形劑可賦予組合物經改善的穩定性、經改善的吸收、經改善的溶解性及/或活性成分之治療性增強。在一些實施例中，賦形劑為緩衝劑(例如，檸檬酸鈉、磷酸鈉、tris鹼或氫氧化鈉)或媒劑(例如，緩衝溶液、石蠟油、二甲亞砷或礦物油)。在一些實施例中，寡核苷酸係經凍乾以供延長其儲存期限且隨後在使用前製成溶液(例如，投與至個體)。因此，包含本文中描述之寡核苷酸中之任一者的組合物中之賦形劑可為凍乾保護劑(例如，甘露糖醇、乳糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯啶酮)，或崩潰溫度調節劑(例如，右旋糖苷、聚蔗糖或明膠)。

【0116】 在一些實施例中，醫藥組合物經調配可與其預期投藥途徑相容。投藥途徑之實例包括非經腸，例如靜脈內、皮內、皮下、經口(例如，吸入)、經皮(局部)、經黏膜及經直腸投藥。

【0117】 適於可注射使用之醫藥組合物包括無菌水溶液(在水可溶情況下)或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。對於靜脈內投藥，適合載劑包括生理鹽水、抑菌水、Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。載劑可為含有例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇及液態聚乙二醇及其類似物)及其適合混合物的溶劑或分散介質。在許多情況下，組合物中將較佳包括等張劑，例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化鈉。可藉由將寡核

苷酸以所需量與上文所列舉之一種成分或成分組合併入於所選溶劑中，(視需要)接著過濾滅菌來製備無菌可注射溶液。

【0118】 在一些實施例中，組合物可含有至少約0.1%之治療劑或更多治療劑，但活性成分之百分比可在總組合物之重量或體積之約1%與80%或更多之間。製備此類醫藥調配物之熟習此項技術者應考慮諸如溶解度、生物可用性、生物半衰期、投藥途徑、產物存放期以及其他藥理學考慮因素的因素，且因此，各種劑量及治療方案可為合乎需要的。

【0119】 即使多個實施例係關於本文中揭示之寡核苷酸中之任一者的靶向肝臟之遞送，但亦涵蓋靶向其他組織。

IV. 使用方法

(a) 降低細胞中之RNA表現

【0120】 在一些實施例中，出於降低細胞中RNA之表現的目的，提供向細胞遞送有效量之本文中揭示之寡核苷酸中之任一者的方法。本文提供之方法適用於任何適當的細胞類型。在一些實施例中，細胞為表現RNA之任何細胞(例如，肝細胞、巨噬細胞、單核球衍生之細胞、前列腺癌細胞、大腦細胞、內分泌組織細胞、骨髓細胞、淋巴結細胞、肺細胞、膽囊細胞、肝臟細胞、十二指腸細胞、小腸細胞、胰臟細胞、腎臟細胞、胃腸道細胞、膀胱細胞、脂肪細胞及軟組織細胞及皮膚細胞)。在一些實施例中，細胞為獲自個體且可能經歷有限數目次繼代的初級細胞，使得細胞實質上維持天然的表現型特性。在一些實施例中，向其遞送寡核苷酸之細胞係離體或活體外的(亦即，可遞送至培養物中之細胞或遞送至細胞駐存之生物體)。

【0121】 在一些實施例中，本文中揭示之寡核苷酸可使用適當的核

酸遞送方法引入，該等遞送方法包括注射含有寡核苷酸之溶液、藉由寡核苷酸覆蓋之顆粒進行轟擊、將細胞或生物體暴露於含有寡核苷酸之溶液，或在寡核苷酸之存在下進行細胞膜之電穿孔。可使用其他適當的將寡核苷酸遞送至細胞之方法，諸如脂質介導之載劑轉運、化學介導之轉運及陽離子型脂質體轉染(諸如磷酸鈣)等等。

【0122】 抑制結果可藉由評估細胞或個體之一或多個特性的適當分析或藉由評估指示RNA表現之分子(RNA、蛋白質)的生物化學技術來確認。在一些實施例中，本文中提供之寡核苷酸降低RNA表現量的程度係藉由將表現量(例如，mRNA或蛋白質含量)與適當對照(例如，寡核苷酸尚未遞送之細胞或細胞群與陰性對照已遞送之細胞或細胞群中的RNA表現量)進行比較來評估。在一些實施例中，適當的對照RNAi表現量可為預定量或值，使得不必每次量測對照量。預訂量或值可採用多種形式。在一些實施例中，預定量或值可為單一截止值，諸如中位值或均值。

【0123】 在一些實施例中，投與如本文中所描述之寡核苷酸引起細胞中RNA表現量的降低。在一些實施例中，與適當的對照RNA量相比，RNA表現量的降低可降低至1%或更低、5%或更低、10%或更低、15%或更低、20%或更低、25%或更低、30%或更低、35%或更低、40%或更低、45%或更低、50%或更低、55%或更低、60%或更低、70%或更低、80%或更低、或90%或更低。適當的對照量可為尚未與如本文中所描述之寡核苷酸接觸的細胞或細胞群中之RNAi表現量。在一些實施例中，在有限時間段之後，評定根據本文中揭示之方法將寡核苷酸遞送至細胞的效果。舉例而言，在將寡核苷酸引入至細胞中之後至少8小時、12小時、18小時、24小時；或至少一天、兩天、三天、四天、五天、六天、七天或十

四天，可分析細胞中之RNA量。

【0124】 在一些實施例中，寡核苷酸以經工程改造以在細胞中表現寡核苷酸之轉基因的形式(例如，其有義股及反義股)遞送。在一些實施例中，使用經工程改造以表現本文中所揭示之任何寡核苷酸之轉基因來遞送寡核苷酸。可使用病毒載體(例如，腺病毒、反轉錄病毒、痘瘡病毒、痘病毒、腺相關病毒或單純疱疹病毒)或非病毒載體(例如，質粒或合成性mRNA)來遞送轉基因。在一些實施例中，轉基因可直接注射至個體。

(b)治療方法

【0125】 本發明之態樣係關於用於降低RNA表現以緩解各種疾病之發作或進展的方法。在一些實施例中，本發明提供使用本發明之RNAi寡核苷酸以用於治療患有或疑似患有肝臟病況(諸如膽汁鬱積性肝病、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)及非酒精性脂肪變性肝炎(NASH))之個體的方法。在一些實施例中，本發明提供用於治療患有或疑似患有肝臟病況(諸如膽汁鬱積性肝病、NAFLD及NASH)之個體的本文所描述之RNAi寡核苷酸。在一些實施例中，本發明提供用於製備用於治療患有或疑似患有肝臟病況(諸如膽汁鬱積性肝病、NAFLD及非酒精性脂肪變性肝炎NASH)之個體之藥劑的RNAi。

【0126】 在另一態樣中，本發明係關於一種用於治療患有疾病或處於罹患由目標基因之表現引起之疾病風險下之個體的方法。在此實施例中，寡核苷酸可充當用於控制以下中之一或多者的新穎治療劑：細胞增殖性及/或分化病症、與骨骼代謝相關之病症、免疫病症、造血功能障礙、心臟血管病症、肝臟病症、病毒性疾病或代謝病症。方法包含向患者(例如，人類)投與本發明之醫藥組合物以使得目標基因之表現沉默。由於其

高特異性，本發明之寡核苷酸特異性靶向病變細胞及組織之目標基因之 mRNA。

【0127】 在疾病之預防中，目標基因可為引發或維持疾病所需的基因或已鑑別為與感染疾病之高風險相關的基因。在疾病之治療中，可使寡核苷酸與展現疾病之細胞或組織接觸。舉例而言，可使與全部或部分與癌症相關之突變基因實質上相同的寡核苷酸或在腫瘤細胞中以高含量表現之寡核苷酸(例如極光激酶(*aurora kinase*))與癌細胞或腫瘤基因接觸或引入至癌細胞或腫瘤基因中。

【0128】 細胞增殖及/或分化病症之實例包括癌症(例如，癌瘤、肉瘤)、轉移性病變或造血贅生性病變(例如，白血病)。轉移性腫瘤可由眾多原發性腫瘤類型(包括(但不限於)前列腺、結腸、肺、乳房及肝臟來源之彼等腫瘤)產生。如本文中所使用，術語「癌症」、「過度增殖」及「贅生性」係指細胞具有自主生長能力，亦即由細胞生長激增表徵之異常狀態或狀況。此等術語意欲包括所有類型之癌性生長或致癌過程、轉移性組織或惡性轉化細胞、組織或器官(與組織病理學類型或侵襲階段無關)。增生性病變亦包括造血贅生性病變，包括涉及造血來源之增生性/贅生性細胞的疾病，例如由骨髓、淋巴或紅血球系或其前驅物細胞引起。

【0129】 本發明亦可用於治療各種免疫病症，尤其與基因之過度表現或突變基因之表現相關的彼等免疫病症。造血功能障礙或疾病之實例包括(但不限於)自體免疫疾病(包括例如糖尿病、關節炎(包括類風濕性關節炎、青少年類風濕性關節炎、骨關節炎、牛皮癬性關節炎)、多發性硬化症、腦脊髓炎、重症肌無力、全身性紅斑性狼瘡症、自體免疫甲狀腺炎、皮膚炎(包括異位性皮膚炎及濕疹性皮膚炎)、牛皮癬、休格連氏症候群

(Sjogren's Syndrome)、克羅恩氏病(Crohn's disease)、口瘡潰爛、虹膜炎、結膜炎、角膜結膜炎、潰瘍性結腸炎、哮喘、過敏性哮喘、皮膚紅斑狼瘡、硬皮病、陰道炎、直腸炎、藥物疹、麻風逆轉反應、麻瘋結節性紅斑、自體免疫性葡萄膜炎、過敏性腦脊髓炎、急性壞死性出血性腦病、特發性雙側進行性感音神經性聽力損耗、再生不全性貧血症、純紅血球貧血症、特發性血小板減少症、多軟骨炎、韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)、慢性活性肝炎、史蒂芬斯強森症候群(Stevens-Johnson syndrome)、特發性口瘡、扁平苔癬、格雷夫氏病(Graves' disease)、類肉瘤病、原發性膽汁性肝硬化、後葡萄膜炎及肺間質纖維化)、移植物抗宿主病、移植病例及過敏。

【0130】在另一實施例中，本發明係關於一種用於治療病毒性疾病之方法，該等病毒性疾病包括(但不限於)人類乳頭狀瘤病毒、C型肝炎、B型肝炎、單純疱疹病毒(HSV)、HIV-AIDS、脊髓灰白質炎病毒及天花病毒。本發明之寡核苷酸係如本文所描述來製備，以靶向病毒之表現序列，由此減輕病毒活性及複製。該等分子可用於治療及/或診斷動物及植物兩者之病毒感染組織。另外，此類分子可用於治療病毒相關之癌瘤，諸如肝細胞癌。

【0131】本發明之寡核苷酸亦可用於抑制多抗藥性1基因(「MDR1」)之表現。「多抗藥性」(MDR)廣泛地係指對具有不相關化學結構及不同作用機制之各種化學治療藥物具有抗性的模式。儘管MDR之病因為多因素的，但P-醣蛋白(Pgp)(介導MDR藥物之轉運的膜蛋白質)之過度表現仍為實驗室模型中MDR潛在的最常見改變(Childs及Ling，1994)。此外，在人類癌症中，尤其在白血病、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、

神經母細胞瘤及軟組織肉瘤中，Pgp表現與MDR之進展有關(Fan等人)。近期研究展示，表現MDR相關蛋白(MRP) (Cole等人，1992)、肺抗性蛋白質(LRP) (Scheffer等人，1995)及DNA拓樸異構酶II之突變(Beck，1989)的腫瘤細胞亦可呈現MDR。

【0132】 在一些實施例中，目標基因可為來自任何哺乳動物(諸如人類目標)之目標基因。任何基因可根據本文中描述之方法沉默。例示性目標基因包括(但不限於)因子VII、Eg5、PCSK9、TPX2、apoB、LDHA、SAA、TTR、HBV、HCV、RSV、PDGF β 基因、Erb-B基因、Src基因、CRK基因、GRB2基因、RAS基因、MEKK基因、JNK基因、HMGB1基因、RAF基因、Erk1/2基因、PCNA(p21)基因、MYB基因、JUN基因、FOS基因、BCL-2基因、細胞週期蛋白D基因、VEGF基因、EGFR基因、週期蛋白A基因、週期蛋白素E基因、WNT-1基因、 β -連環蛋白基因、c-MET基因、PKC基因、NFKB基因、STAT3基因、存活素基因、Her2/Neu基因、拓樸異構酶I基因、拓樸異構酶II α 基因、p73基因、p21(WAF1/CIP1)基因、p27(KIP1)基因、PPM1D基因、HAO1基因、小窩蛋白I基因、MIB 1基因、MTAI基因、M68基因、腫瘤抑制基因之突變、p53腫瘤抑制基因、LDHA、HMGB1、HAO1及其組合。

【0133】 本文所描述之方法通常涉及向個體投與有效量之寡核苷酸，亦即能夠產生所需治療結果的量。治療學上可接受之量可為能夠治療疾病或病症之量。任一個體之合適劑量將視某些因素而定，包括個體之身材、體表面積、年齡、待投與之特定組合物、組合物中之活性成分、投藥之時間及途徑、一般健康及待同時投與之其他藥物。

【0134】 在一些實施例中，個體經腸地(例如，經口、利用胃飼管、

利用十二指腸飼管、經由胃造口術或經直腸地)、非經腸地(例如，皮下注射、靜脈內注射或輸注、動脈內注射或輸注、骨內輸注、肌肉內注射、腦內注射、腦室內注射、鞘內)、經表面(例如，上表皮、吸入、經由滴眼劑或經由黏膜)，或藉由直接注射至目標器官(例如，個體之肝臟)投與本文中揭示之組合物中之任一者。通常，本文中揭示之寡核苷酸經靜脈內或皮下投與。

【0135】 作為非限制性實例集合，本發明之寡核苷酸將通常每季度(每三個月一次)、每兩月(每兩個月一次)、每月或每週投與。舉例而言，寡核苷酸可每週或每隔兩週或三週投與。寡核苷酸可每天投與。

【0136】 在一些實施例中，待治療的個體為人類或非人類靈長類或其他哺乳動物個體。其他例示性個體包括家養動物，諸如狗及貓；家畜，諸如馬、牛、豬、綿羊、山羊及雞；及諸如小鼠、大鼠、天竺鼠及倉鼠之動物。

實例

【0137】 為了能更全面地理解本文中描述之發明，闡述以下實例。提供本申請案中描述之實例以說明本文所提供之方法、組合物及系統，且不應理解為以任何方式限制其範疇。

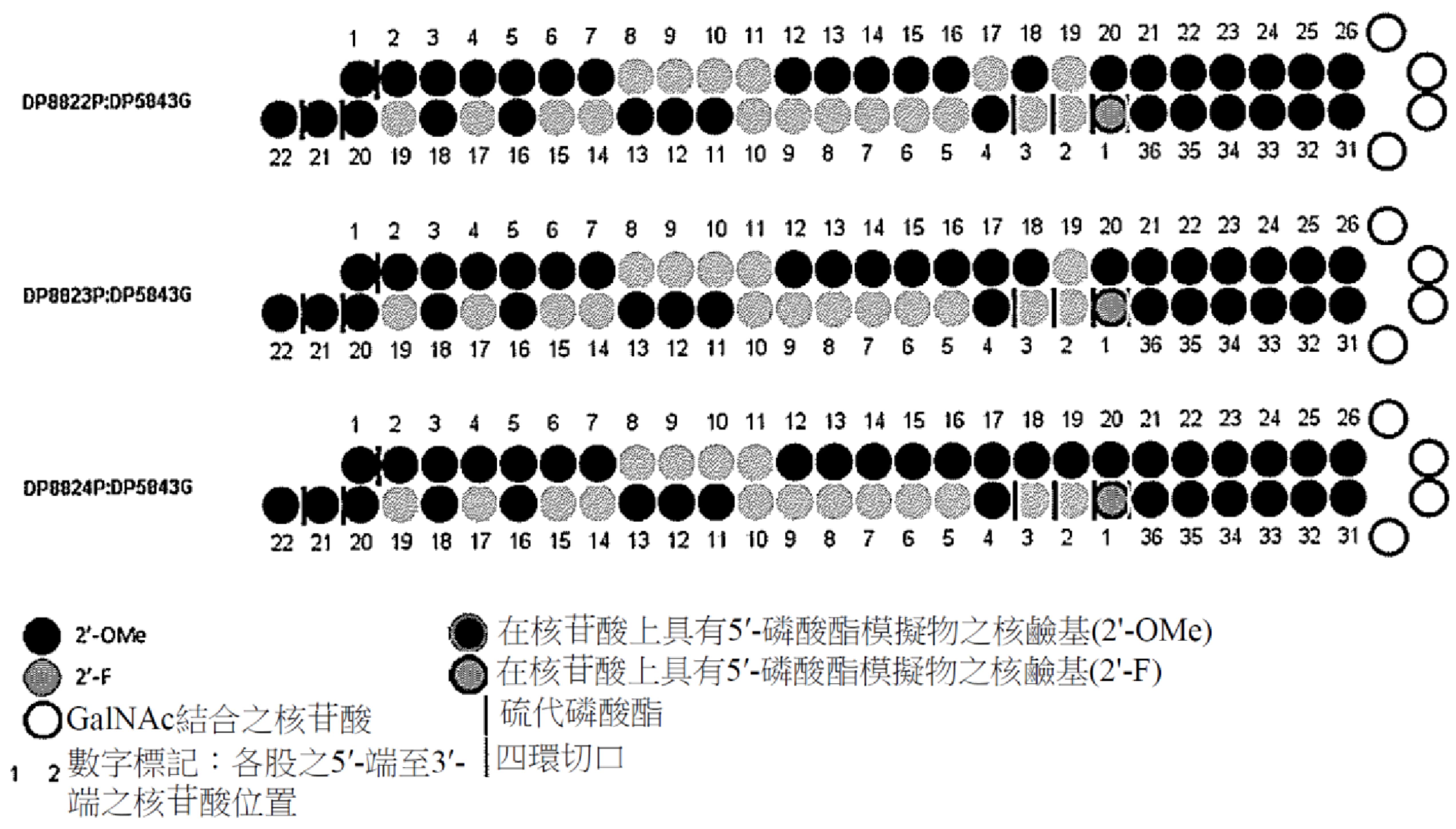
實例1：藉由在位置17及19處用2'-OMe置換2'-F來分析有義股

【0138】 靶向HAO1之雙股RNA (dsRNA)經選擇以用於結構活性關係(SAR)分析。dsRNA包含四環，其中各鹼基結合於單糖、*N*-乙醯基半乳糖(GalNAc)。dsRNA之有義股及反義股分別在位置8至11處及位置2及14處經2'-F修飾。與在相同位置處經2'-OMe修飾之dsRNA相比，此等修飾增加了RNAi效能。因此，剛剛提及之2'-F修飾在本文中描述之SAR期

間保持恆定。

【0139】 為測試用2'-OMe置換2'-F之效果，如表1中所展示構築一系列dsRNA。為分析dsRNA之效能，在HAO1穩定細胞株中轉染不同濃度之dsRNA之後48小時，量測到HAO1 mRNA基因表現減弱。接著將效能計算以半數最大抑制濃度(IC₅₀)呈現。如圖1A至圖1C中所示，測定所測試dsRNA中之每一者的類似效能。綜合而言，此等結果證實2'-OMe修飾對dsRNA之有義股具有良好耐受性。

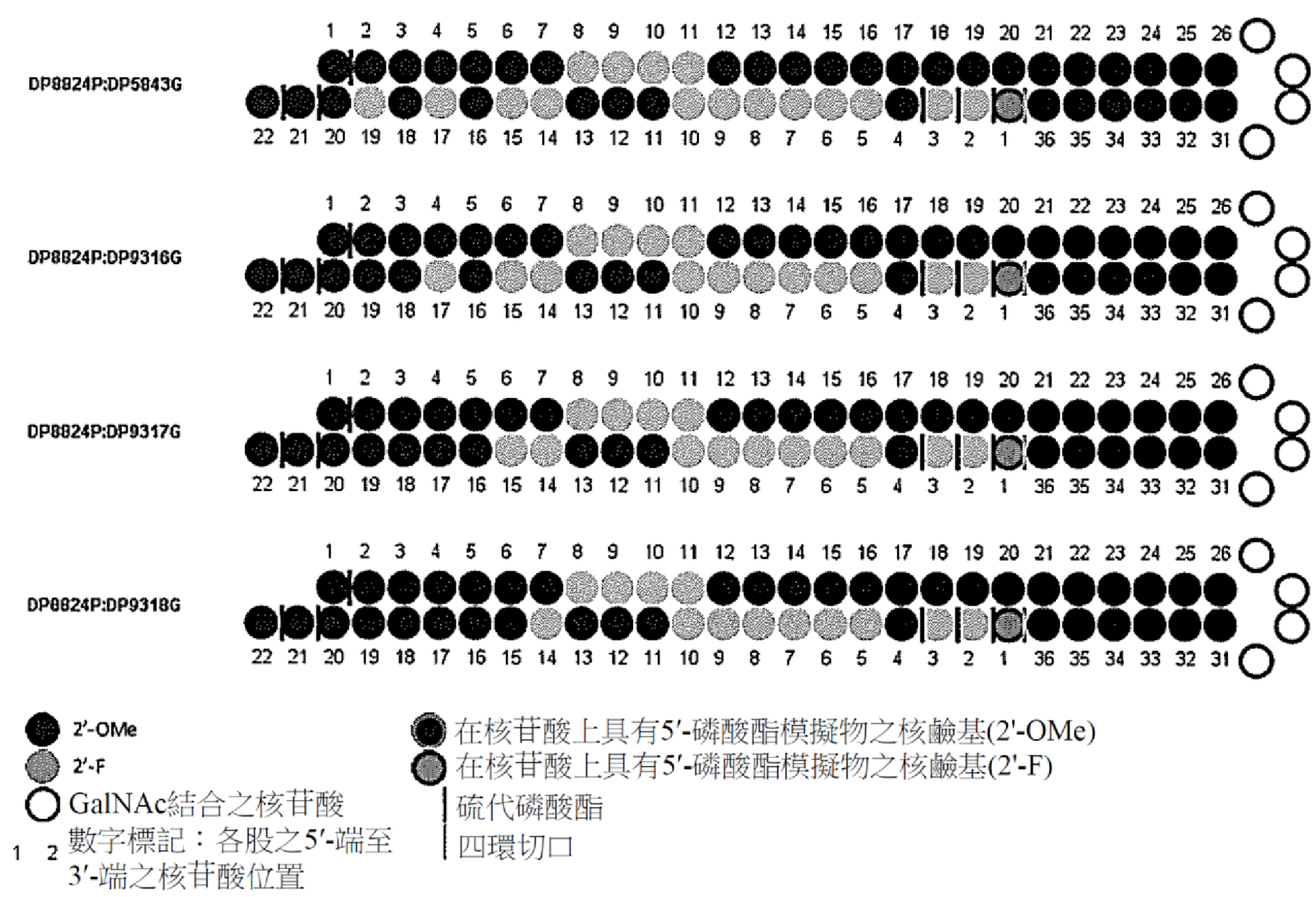
表1.有義股結構活性關係(SAR)。



實例2：藉由在位置15、17及19處用2'-OMe置換2'-F來分析反義股。

【0140】 如表2中所示，藉由在反義股上之位置15、17及19處用2'-OMe置換2'-F來研究反義股。使dsRNA之有義股之修飾在此分析中保持恆定(表2)。如圖2A至圖2D中所示，測定所測試dsRNA中之每一者的類似效能。綜合而言，此等結果證實2'-OMe修飾在dsRNA之反義股之位置15、17及19處具有良好耐受性。

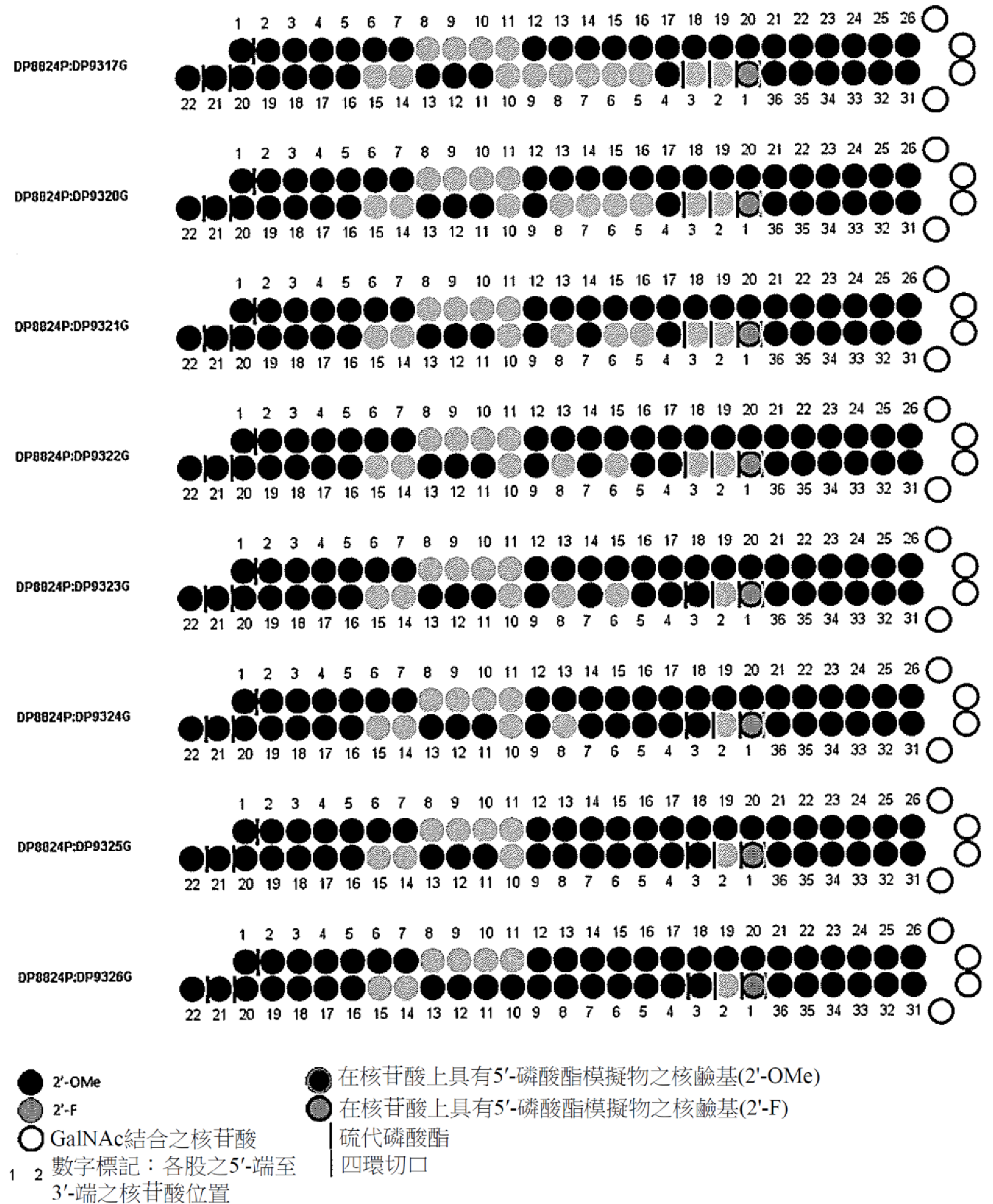
表2.反義股SAR (#1)。



實例3：藉由在位置1至10處用2'-OMe置換2'-F來分析反義股。

【0141】 如表3中所示，藉由在反義股上之位置1至10處(亦稱為種子區)用2'-OMe置換2'-F來研究反義股，如圖3A至圖3H中所示，位置7及9處之2'-OMe修飾具有良好耐受性。然而，當位置2及5及種子區中之其他位置處的2'-F修飾經2'-OMe置換時，如藉由IC₅₀值測定之RNAi效能減小(圖3A至圖3G)。綜合而言，結果證實2'-OMe在反義股之種子區具有不良耐受性，且相比於2'-OMe，位置5偏好經2'-F修飾。

表3.反義股SAR (#2)。

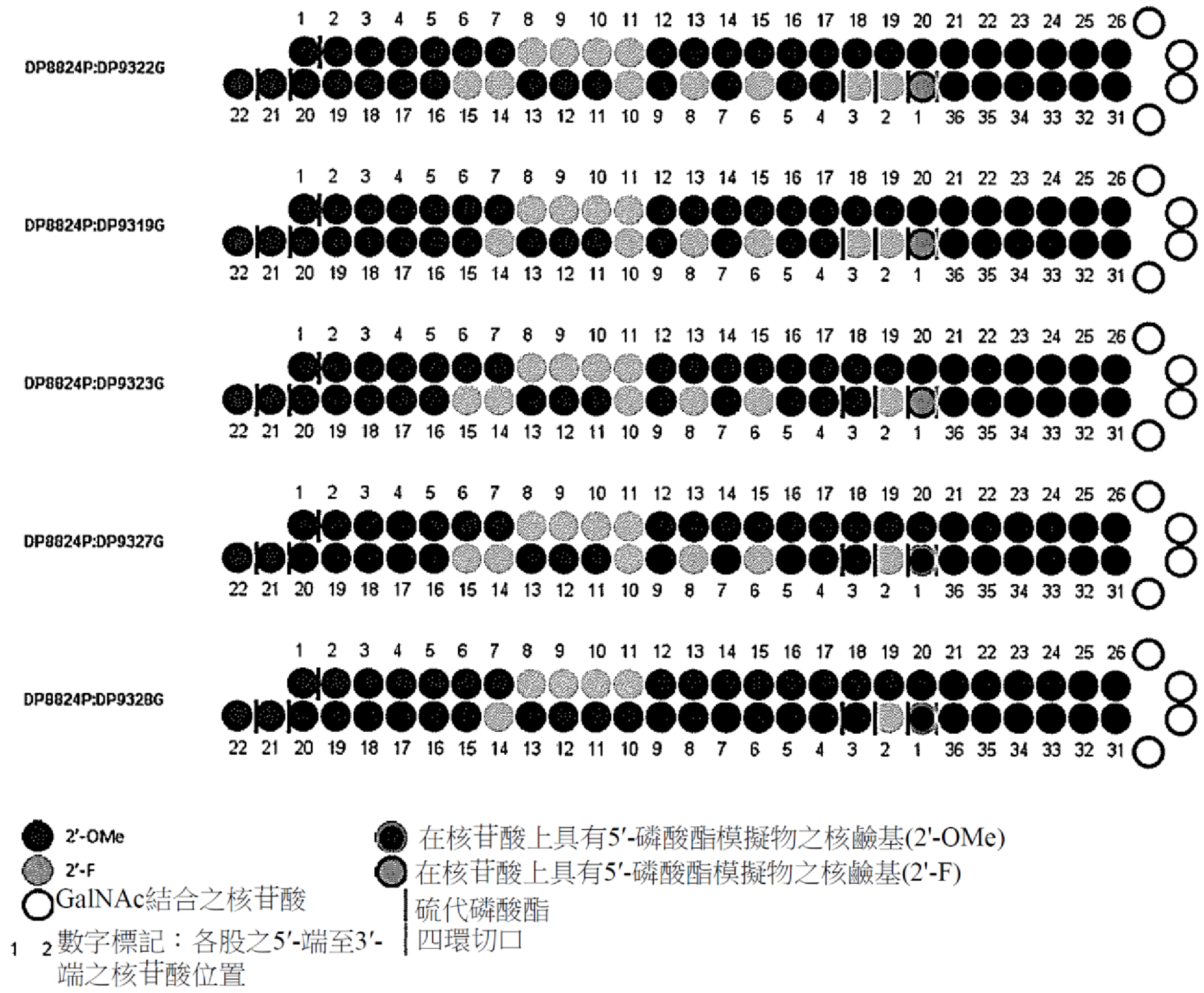


實例4：藉由在位置1、6、8、10及15處用2'-OMe置換2'-F來分析反義股。

【0142】 如表4中所示，藉由在反義股上之位置1、6、8、10及15處用2'-OMe置換2'-F來研究反義股。如圖4A至圖4E中所示，位置15處之2'-

OMe修飾具有良好耐受性，其與實例2中獲得之結果一致。檢查到在5'端上含有磷酸酯模擬物的反義股之位置1上的2'修飾之效果。觀測到位置1上2'-OMe與2'-F之間的類似效能(圖4C至圖4D)。接著，檢查到反義股之僅位置2及14上的2'修飾效果，且與所測試之其他者相比，獲得類似的IC₅₀值(圖4A至圖4E)。綜合而言，結果證實2'-OMe在反義股上具有耐受性。

表4.反義股SAR (#3)。

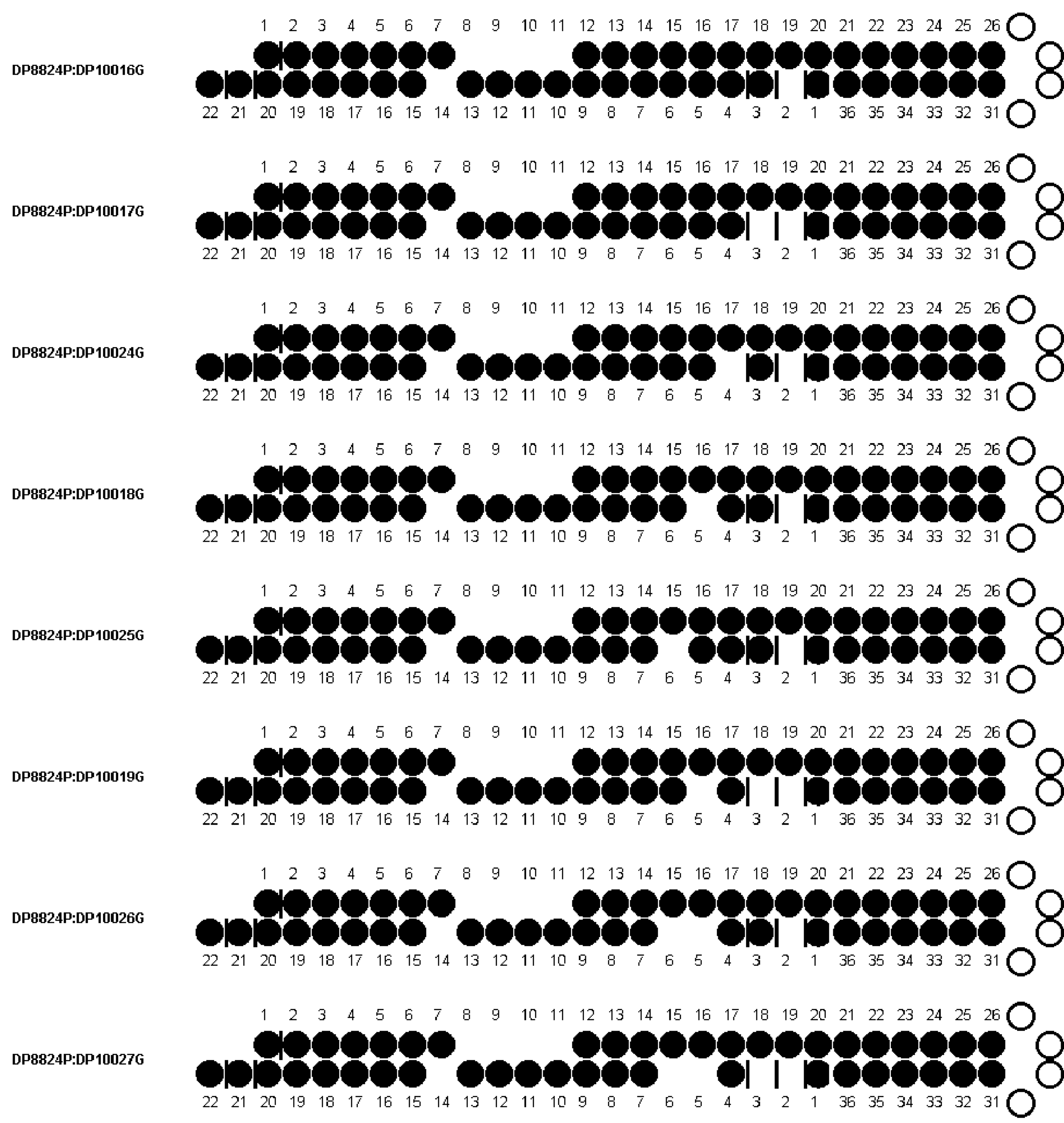


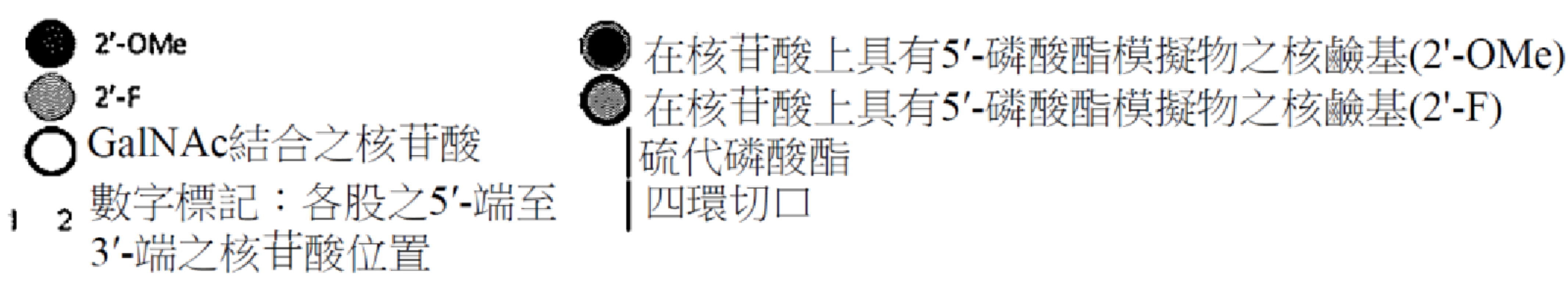
實例5：藉由在位置3至6處添加2'-F來分析反義股。

【0143】 接著，選擇低2'-F模式(反義股之僅位置2及14處的2'-F)作為起始點，且在位置3至6處之種子區逐漸添加2'-F，以探測該區中之敏感性。如表5中所示，起始分子具有與表4中所展示之最末分子相同的修飾模

式，不同之處在於該等分子在反義位置1上含有不同的磷酸酯模擬物。基於IC₅₀結果，位置5處之2'-F修飾展示與位置3、4及6處之2'-F修飾相比，效能增加(圖5A至圖5H)。此等結果進一步確認，在一些2'-F模式中，相比於2'-OMe，位置5可能更偏好2'-F。此外，當與其他位置上之2'-F (諸如位置3或位置6處之2'-F)組合測試位置5上之2'-F時，觀測到增加的效能(圖5A至圖5H)。

表5.反義股SAR種子區(圓形2-位置3至6)。

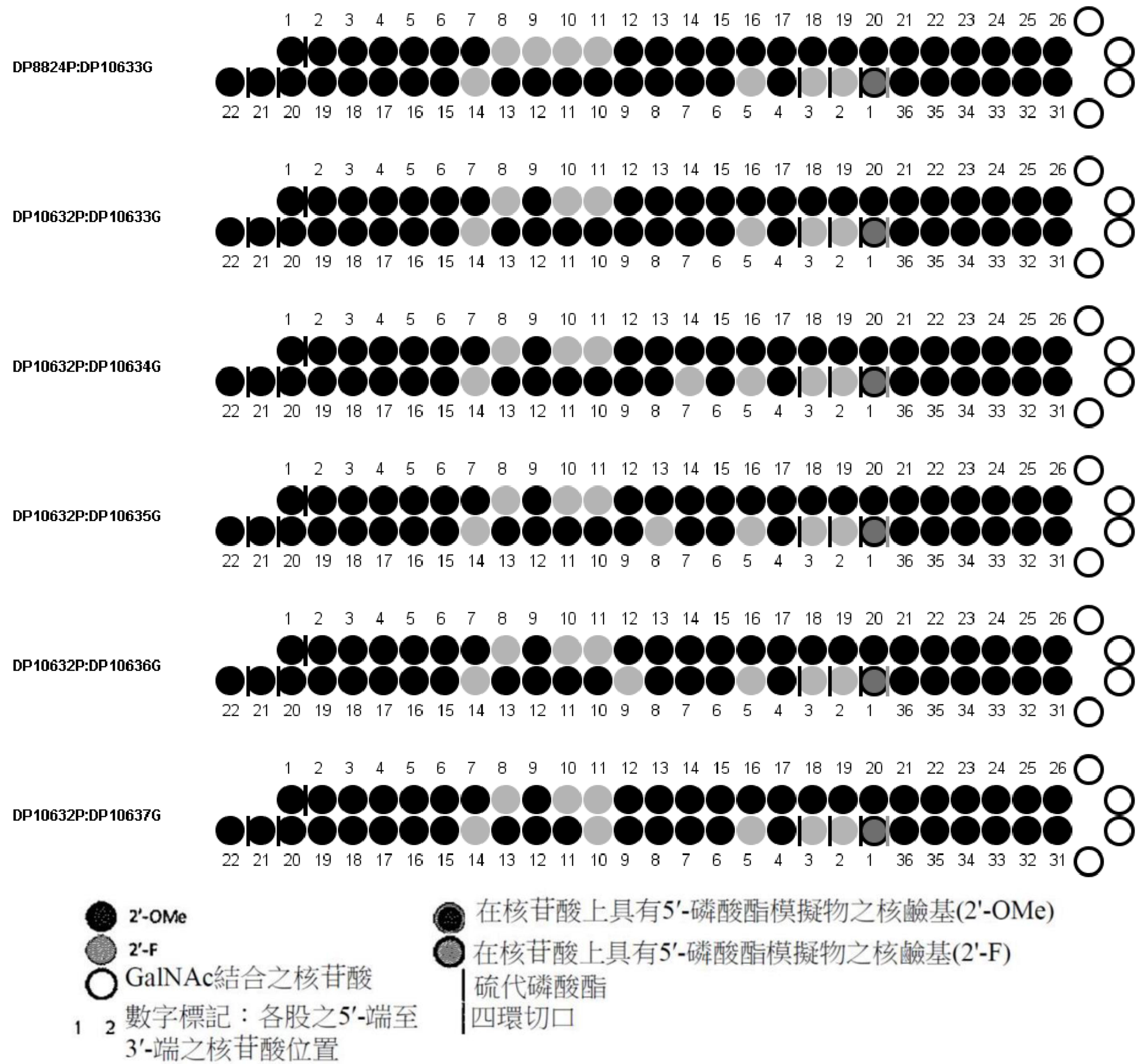




實例6：藉由在位置7至10處用2'-OMe置換2'-F且在位置3及5處保持2'-F來分析反義股。

【0144】 接著，研究反義股上之位置7至10 (表6)。在此分析中，在位置5及3處維持2'-F修飾，且在位置1上維持具有2'-F修飾之磷酸酯模擬物。如圖6A中所示，對照1展示在HAO1穩定細胞株中轉染66小時之後的極佳IC₅₀ (3.5 pM)。為探測2'-F對位置7至10之影響，在有義股之位置9上添加2'-OMe。針對檢查IC₅₀之變化，此修飾將提供更寬的動態範圍。如圖6中所示，對照2之IC₅₀比對照1高>10倍(圖6A至圖6B)。當在位置7至10上取代2'-F時，觀測到效能增加(圖6A至圖6F)。結果展示，在位置7或位置10上用2'-F修飾改善效能，但在位置8或位置9上用2'-F並未改善效能。

表6.反義股SAR (圓形2-位置7至10)。



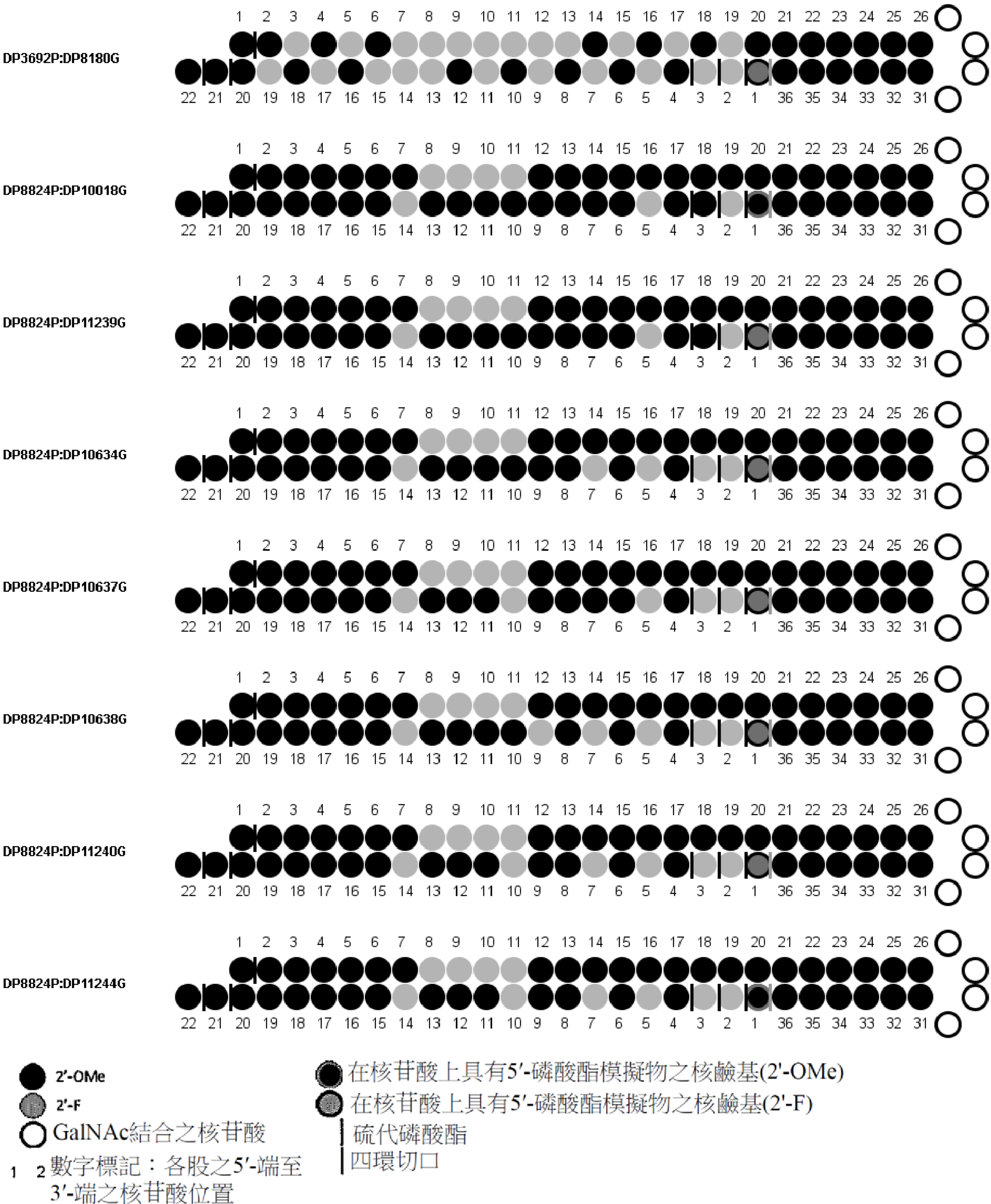
實例7：用於HAO1活體內研究之最小2'-F集合

【0145】 綜合而言，本文中證明之效能實驗結果證實反義股比有義股對2'-OMe修飾更敏感。鑑別出相比於2'-OMe更偏好2'-F的反義股上之位置，其包括位置2、3、5、7、10及14。在位置3、5、7及10當中，在其相比於2'-OMe對2'-F之偏好方面，位置5更明顯。剛剛提及之位置上之修飾模式可提供機會來平衡效能、持續時間及耐受性。實驗結果亦展示有義股可比反義股耐受更多2'-OMe修飾。此外，相比於2'-OMe，有義股上之位置8至11偏好2'-F，但此區中之2'-OMe插入具有耐受性，尤其在與反義

股上之最佳修飾組合時。

【0146】 為測試包含最小2'-F及重2'-OMe修飾模式的HAO1結合物之活體內活性，向小鼠投與HAO1結合物且評估目標基因表現減弱。表7中展示小鼠中測試之HAO1結合物。包含重2'-F之HAO1結合物係用作對照。

表7.用於活體內研究之HAO1結合物。

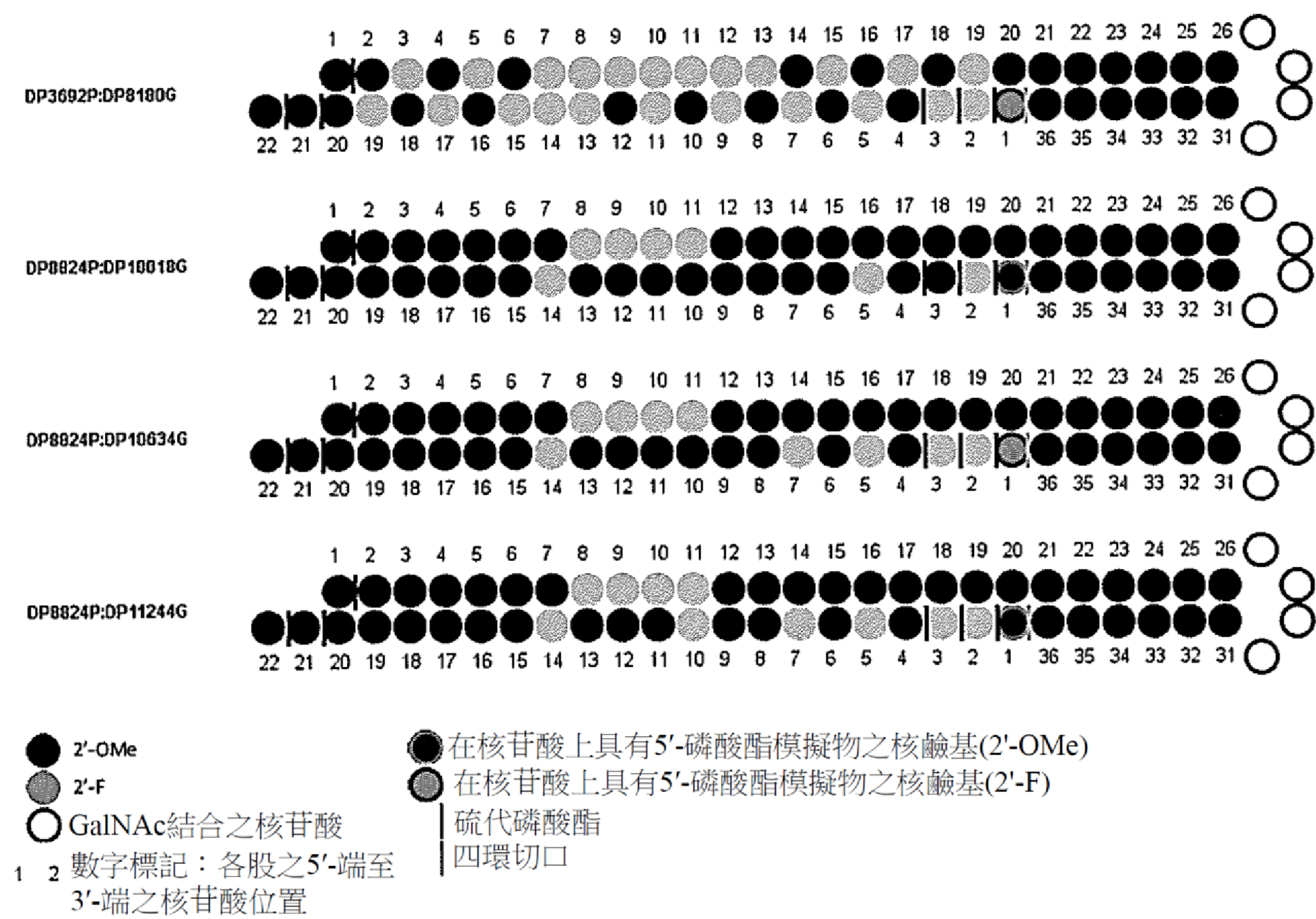


【0147】如圖7A至圖7H中所示，包含最小2'-F及重2'-OMe修飾模式的HAO1結合物在HAO1穩定細胞株中展示極佳的活體外效能(IC₅₀)，且其IC₅₀與重2'-F對照相當。表7中展示之HAO1結合物亦藉由皮下注射1 mpk之單一劑量而投與至小鼠。在給藥後3天量測相對於PBS對照組之肝臟HAO1 mRNA表現。如圖7I中所示，包含最小2'-F及重2'-OMe修飾模式之HAO1結合物展示相較於重2'-F對照之彼等相當的活體內KD活性。在與反義股之位置1上之磷酸酯酮組合的2'-F或2'-OMe修飾直接未偵測到差異。對於與磷酸酯模擬物組合的反義位置1上2'-OMe與2'-F之比較，在第3天未觀測到差異。此等結果證實，本文中描述之包含最小2'-F及重2'-OMe修飾模式的HAO1結合物之活體外與活體內活性之間的相關性。

實例8：HAO1持續時間研究

【0148】相比於經2'-F修飾，經2'-OMe修飾通常提供更佳的朝向核酸酶降解之代謝穩定性。因此，經最小2'-F及重2'-OMe修飾之核酸應在細胞中持續更長時間。為測試經2'-OMe修飾之核酸是否在細胞中保持更長時間，在先前活體內研究中使用所選HAO1結合物測試進行持續時間研究(表8)。如圖8中所示，與重2'-F對照相比，經最小2'-F及重2'-OMe修飾之核酸在較長時間點處展示更佳的mRNA基因表現減弱，且因此更佳的活體內RNAi活性之持續時間。

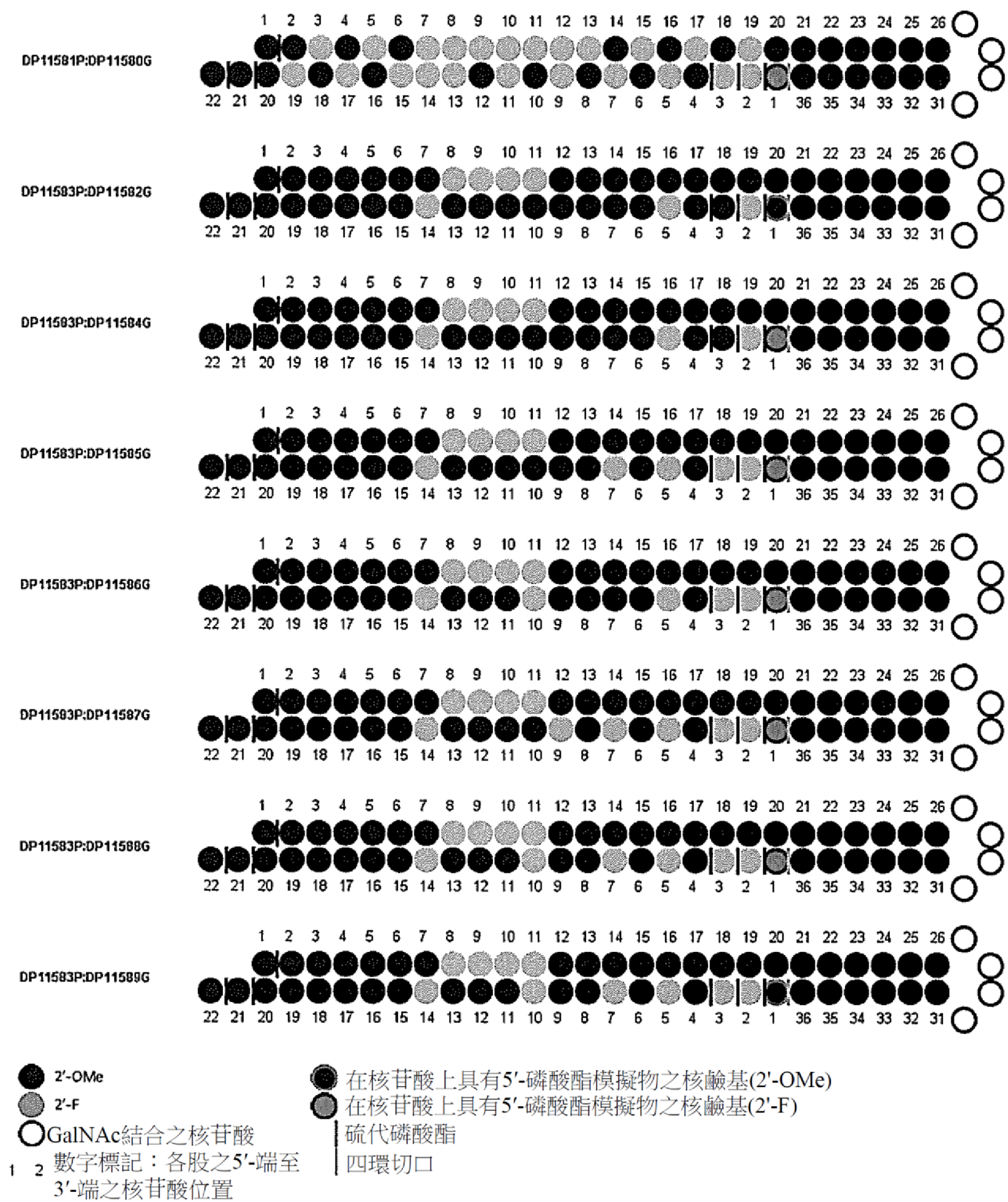
表8.用於HAO1持續時間研究之所選HAO1結合物。



實例9：具有最小2'-F及重2'-OMe修飾之APOC3結合物

【0149】 為確認具有最小2'-F及重2'-OMe修飾模式之核酸可應用於其他目標序列，將表7中展示之HAO1結合物之修飾模式轉移至APOC3序列上。活體外及活體內測試表9中展示之所得APOC3結合物。

表9. APOC3結合物。



【0150】 對於活體外實驗，根據製造商之方案使用Dharmafect Duo試劑(Dharmacon)使HEK-293細胞與100 ng之pcDNA3-mAPOC3質體(含小鼠APOC3之cDNA)及指定濃度之siRNA共轉染。第二天，使細胞裂

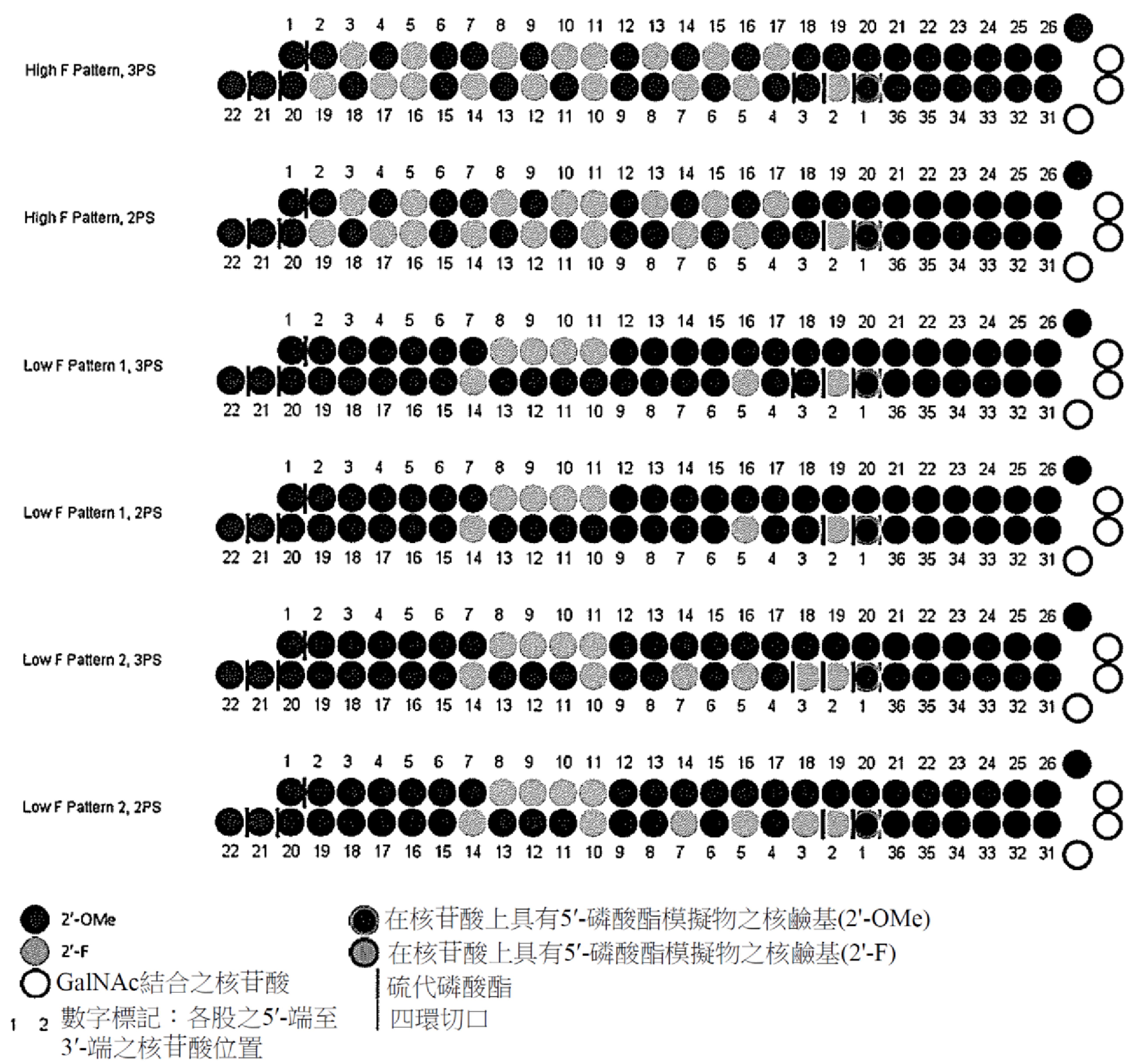
解且使用SV96套組(Promega)純化RNA。使用高容量RT套組(Life Technologies)將經純化RNA反轉錄且使用針對人類SFRS9標準化之小鼠APOC3之基因分析以RT-qPCR定量APOC3 cDNA。如圖9中所示，具有最小2'-F及重2'-OMe修飾模式之APOC3結合物具有良好耐受性且展示與重2'-F對照相比類似的活體外活性。

【0151】對於活體內實驗，將CD-1小鼠劃分成研究組且經皮下給藥有1 mg/kg之指定APOC3結合物。動物在給藥後第7天經由外側尾部靜脈穿刺抽血10 µL之收集體積。將所收集之全血1:5000立即稀釋於冷PBS中，且隨後-20℃下冷凍。最終稀釋度為1:10,000之全血用於使用Cloud Clone Corporation ELISA (SEB890Mu)來測定血漿APOC3含量。如圖9中所見，在給藥後第7天，具有最小2'-F及重2'-OMe修飾模式之APOC3結合物展示良好的活性，而重2'-F對照並未展示活性。

實例10：具有最小2'-F及重2'-OMe修飾之GYS2結合物

【0152】為確認具有最小2'-F及重2'-OMe修飾模式之核酸可應用於其他目標序列，將表7中展示之HAO1結合物之修飾模式轉移至不同GYS2序列上。將所得GYS2結合物展示於表10中。選擇兩種最小2'-F模式且與重2'-F模式進行比較(表10)。對於三種模式中之每一者，3個硫代磷酸酯(3PS)或2個硫代磷酸酯(2PS)包括於反義股之5'-端上。GYS2結合物在環區中含有3個GalNAc結合之核苷酸。測試包含表10中之模式的四種不同GYS2序列。

表10. GYS2結合物之修飾模式。



【0153】 如圖10中所示，相較於重2'-F對照，最小2'-F及重2'-OMe修飾模式1及2具有良好的活體內耐受性，特定言之，此等模式在0.5 mg/kg之單一皮下劑量後4天具有耐受性。獲得所測試之四種GYS2序列中之每一者的類似結果。

【0154】 總之，研發出數個具有降低的2'-F含量及增加的2'-OMe含量之先進四環GalXC設計，此等設計可以最佳效能及持續時間應用於多個目標基因及序列。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種寡核苷酸，其包含：

包含17至36個核苷酸之有義股，其中該有義股具有第一區(R1)及第二區(R2)，其中該有義股之該第二區(R2)包含第一子區(S1)、第二子區(S2)及接合該第一區及該第二區之四環(L)或三環(triL)，其中該第一子區及該第二子區形成第二雙螺旋(D2)；

包含20至22個核苷酸之反義股，其中該反義股在其3'端處包括至少1個單股核苷酸，其中該反義股位置5處的核苷酸之糖部分經2'-F修飾且該反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分經選自由以下組成之群的修飾修飾：2'-O-炔丙基、2'-O-丙胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-氟(2'-F)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)，且其中該有義股及該反義股為單獨股；及

由該有義股之該第一區及該反義股形成的第一雙螺旋(D1)，其中該第一雙螺旋之長度為12至20個鹼基對，且具有7至10個在糖部分之2'-位置處經2'-F修飾的核苷酸。

【請求項2】

如請求項1之寡核苷酸，其中該反義股位置2及14處的糖部分經2'-F修飾。

【請求項3】

如請求項2之寡核苷酸，其中該反義股位置1、3、7及10處至多3個核苷酸中之每一者處的糖部分另外經2'-F修飾。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之寡核苷酸，其中該有義股位置8至11處的核苷酸中之每一者之糖部分另外經2'-F修飾。

【請求項5】

如請求項1之寡核苷酸，其中該有義股位置1至7及12至17或12至20處的核苷酸中之每一者之糖部分經選自由以下組成之群的修飾修飾：2'-O-炔丙基、2'-O-丙胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟- β -d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【請求項6】

如請求項1之寡核苷酸，其中該反義股位置2、5及14處的核苷酸中之每一者之糖部分經2'-F修飾且該反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分經選自由以下組成之群的修飾修飾：2'-O-炔丙基、2'-O-丙胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)及2'-去氧-2'-氟- β -d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【請求項7】

如請求項1之寡核苷酸，其中該反義股位置1、2、5及14處的核苷酸中之每一者之糖部分經2'-F修飾且該反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分經選自由以下組成之群的修飾修飾：2'-O-炔丙基、2'-O-丙胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)及2'-去氧-2'-氟- β -d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【請求項8】

如請求項1之寡核苷酸，其中該反義股位置1、2、3、5、7及14處的

核苷酸中之每一者之糖部分經2'-F修飾且該反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分經選自由以下組成之群的修飾修飾：2'-O-炔丙基、2'-O-丙胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【請求項9】

如請求項1之寡核苷酸，其中該反義股位置2、3、5、7及14處的核苷酸中之每一者之糖部分經2'-F修飾且該反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分經選自由以下組成之群的修飾修飾：2'-O-炔丙基、2'-O-丙胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【請求項10】

如請求項1之寡核苷酸，其中該反義股位置1、2、3、5、10及14處的核苷酸中之每一者之糖部分經2'-F修飾且該反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分經選自由以下組成之群的修飾修飾：2'-O-炔丙基、2'-O-丙胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【請求項11】

如請求項1之寡核苷酸，其中該反義股位置2、3、5、10及14處的核苷酸中之每一者之糖部分經2'-F修飾且該反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分經選自由以下組成之群的修飾修飾：2'-O-炔丙基、2'-O-丙胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【請求項12】

如請求項1之寡核苷酸，其中該反義股位置2、3、5、7、10及14處的核苷酸中之每一者之糖部分經2'-F修飾且該反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分經選自由以下組成之群的修飾修飾：2'-O-炔丙基、2'-O-丙胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)及2'-去氧-2'-氟- β -d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【請求項13】

如請求項1或12之寡核苷酸，其中該反義股具有3個在糖部分之2'-位置處經2'-F修飾的核苷酸。

【請求項14】

如前述請求項中任一項之寡核苷酸，其中該第二雙螺旋之長度為1至6個鹼基對。

【請求項15】

如前述請求項中任一項之寡核苷酸，其中該第二雙螺旋包含至少一個雙環核苷酸。

【請求項16】

如請求項15之寡核苷酸，其中該第二雙螺旋之長度為1至3個鹼基對。

【請求項17】

如前述請求項中任一項之寡核苷酸，其中該三環具有GAA或AAA之核苷酸序列或其中該四環為選自由GAAA、UNCG、GNRA或CUUG組成之群的RNA四環或選自由d(GNAB)、d(CNNG)或d(TNCG)組成之群的DNA四環，其中N為U、A、C、G中之任一者，且R為G或A。

【請求項18】

如請求項1之用於降低RNA表現之寡核苷酸，其中該第二雙螺旋中之各核苷酸之糖部分經2'-O-甲基(2'-OMe)修飾。

【請求項19】

如前述請求項中任一項之用於降低RNA表現之寡核苷酸，其中該四環或該三環中之核苷酸中之至少一者結合於配位體。

【請求項20】

如請求項19之用於降低RNA表現之寡核苷酸，其中該三環中之1至3個核苷酸或該四環中之1至4個核苷酸結合於配位體。

【請求項21】

如請求項19或20之用於降低RNA表現之寡核苷酸，其中該配位體包含N-乙醯基半乳胺糖。

【請求項22】

如前述請求項中任一項之用於降低RNA表現之寡核苷酸，其中該反義股位置1處的核苷酸包含磷酸酯模擬物。

【請求項23】

如前述請求項中任一項之用於降低RNA表現之寡核苷酸，其中該有義股包含36個核苷酸且該反義股包含22個核苷酸。

【請求項24】

一種包含20至22個核苷酸之單股寡核苷酸，其中反義股位置2、5及14處的核苷酸及視情況位置1、3、7及10處的至多3個核苷酸中之每一者之糖部分經2'-F修飾且該反義股之剩餘核苷酸中之每一者之糖部分經選自由以下組成之群的修飾修飾：2'-O-炔丙基、2'-O-丙胺基、2'-胺基、2'-乙基、2'-胺基乙基(EA)、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、

2'-O-[2-(甲胺基)-2-側氧基乙基] (2'-O-NMA)及2'-去氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核酸(2'-FANA)。

【請求項25】

如請求項24之單股寡核苷酸，其中該單股寡核苷酸包含20個核苷酸。

【請求項26】

如請求項24之單股寡核苷酸，其中該單股寡核苷酸包含21個核苷酸。

【請求項27】

如請求項24之單股寡核苷酸，其中該單股寡核苷酸包含20至23個核苷酸。

【請求項28】

一種醫藥組合物，其包含如前述請求項中之任一項之寡核苷酸及醫藥學上可接受之載劑。

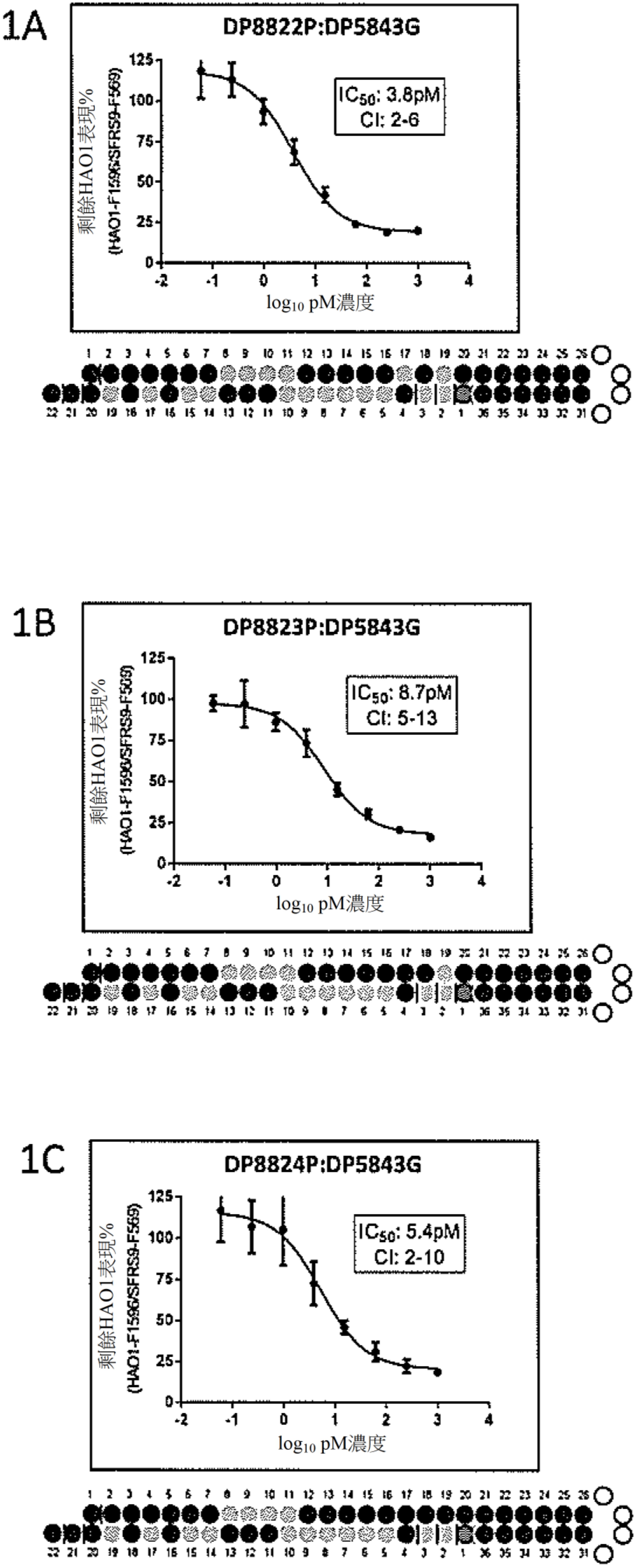
【請求項29】

一種用於降低個體中目標基因之表現的方法，其包含向該個體投與足以降低該個體中目標基因之表現的量之如請求項1至23中任一項之寡核苷酸、如請求項24至27中任一項之單股寡核苷酸或如請求項28之組合物。

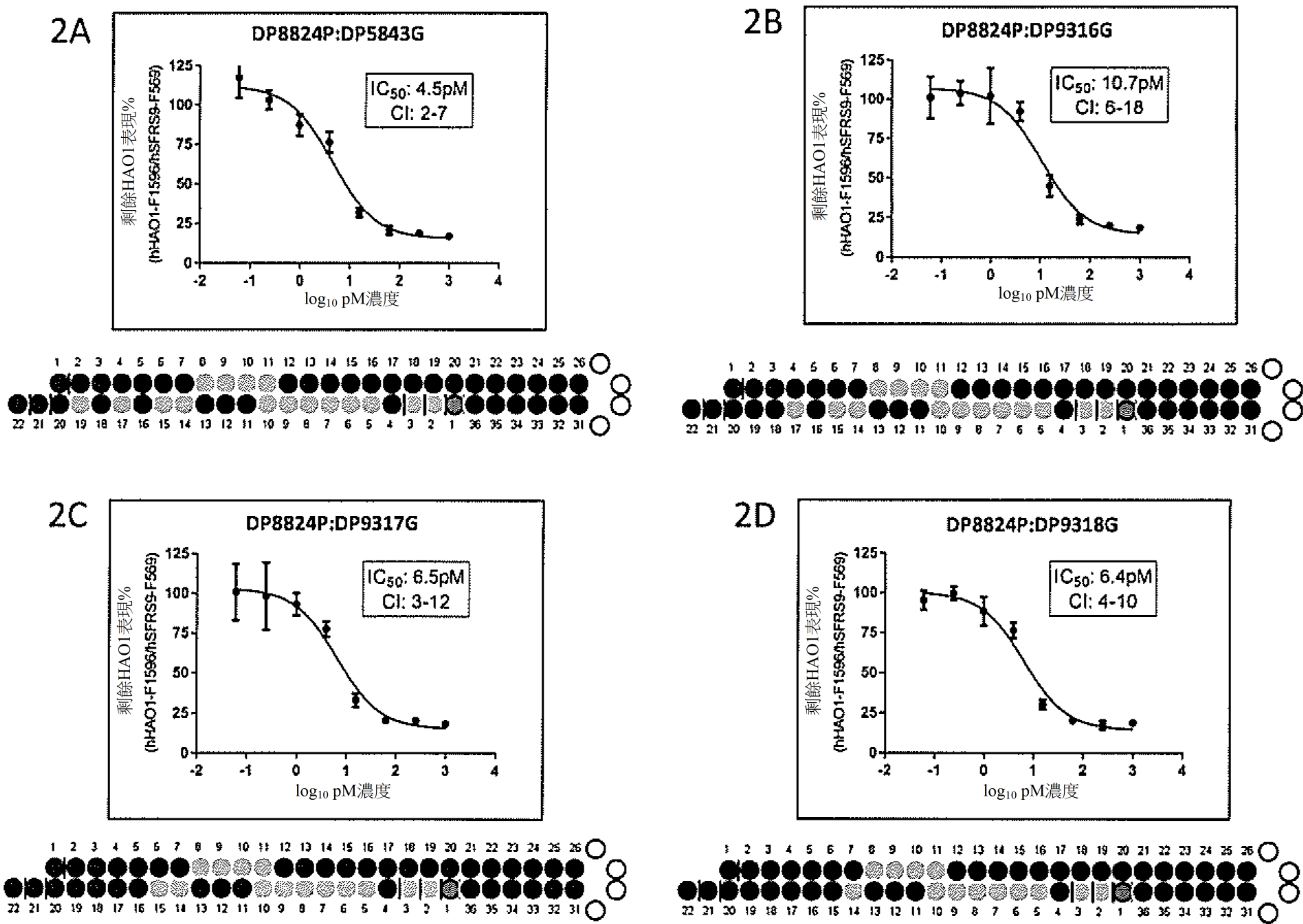
【請求項30】

一種治療或預防個體中疾病或病症之方法，其包含向該個體投與足以抑制引起該個體疾病的基因之表現的量之如請求項1至23中任一項之寡核苷酸、如請求項24至27中任一項之單股寡核苷酸或如請求項28之組合物。

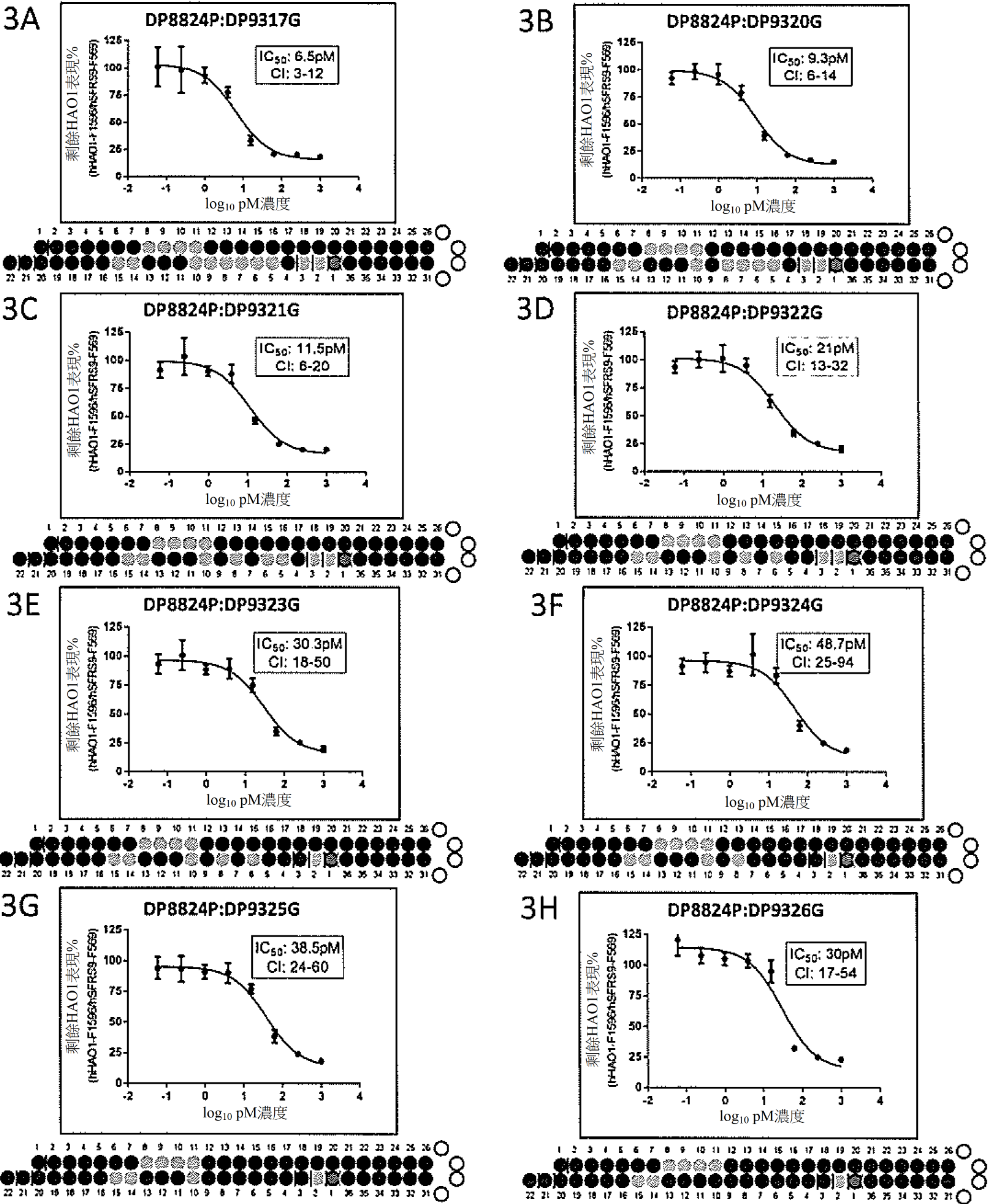
【發明圖式】



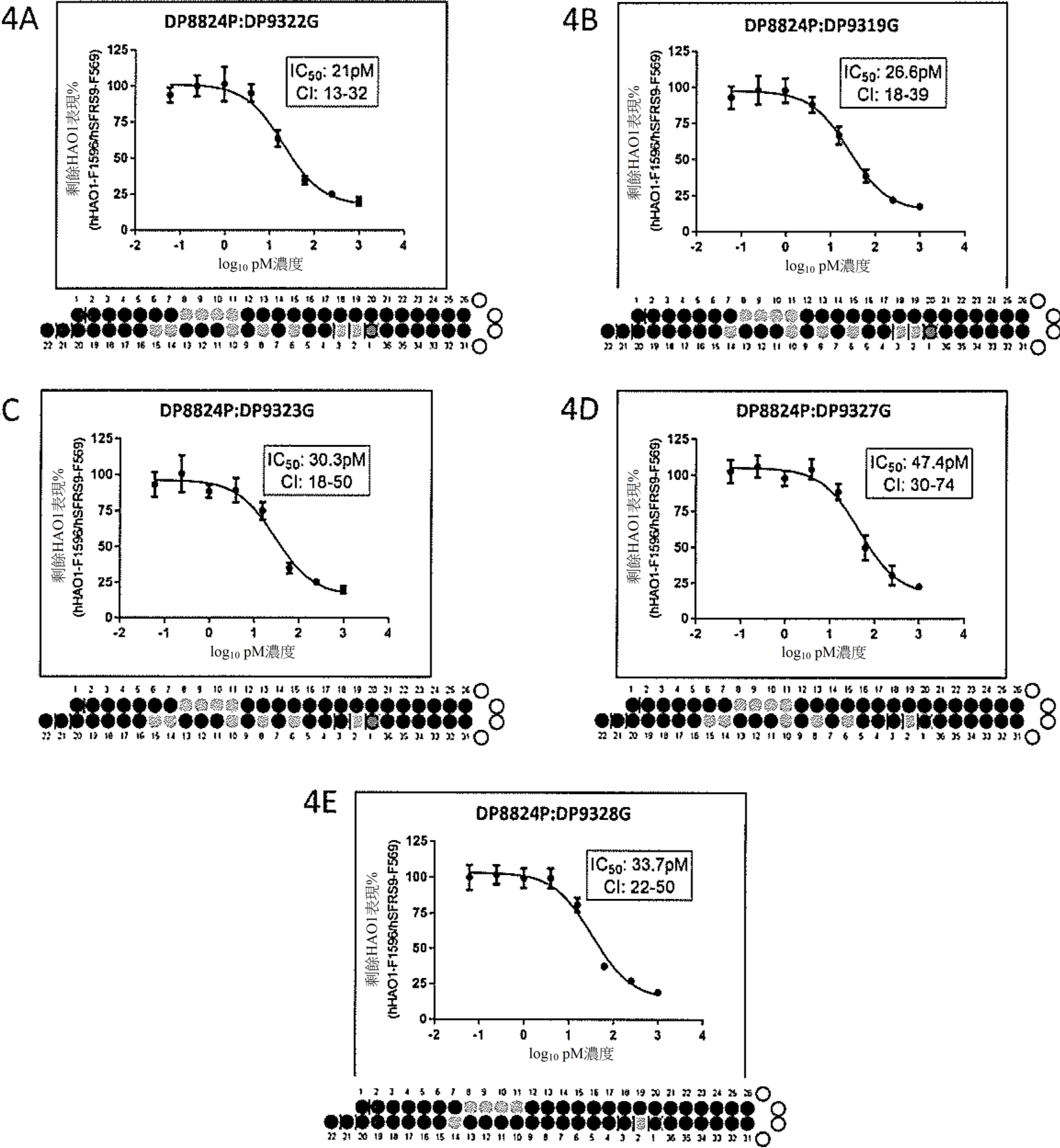
【圖1A至圖1C】



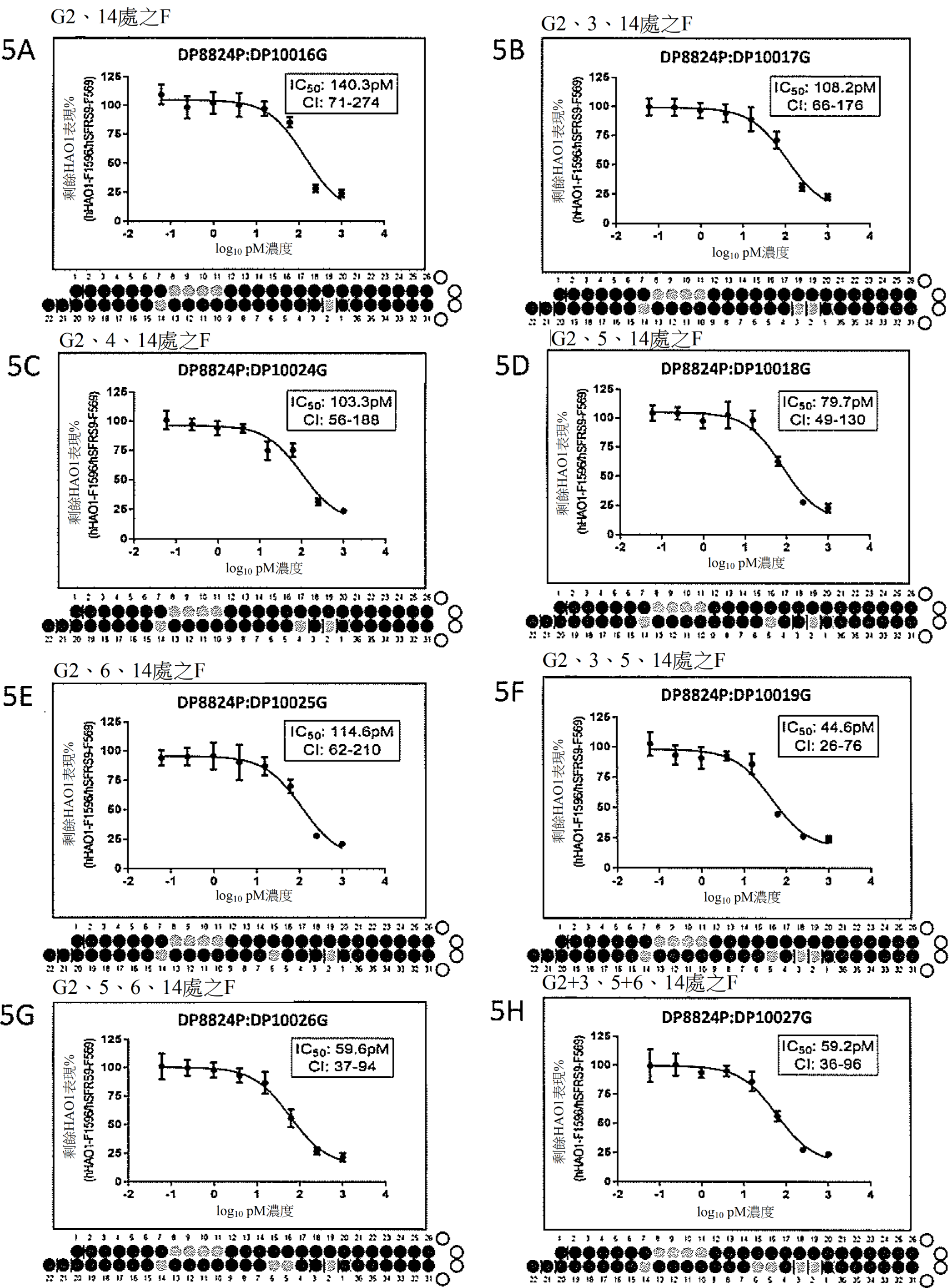
【圖2A至圖2D】



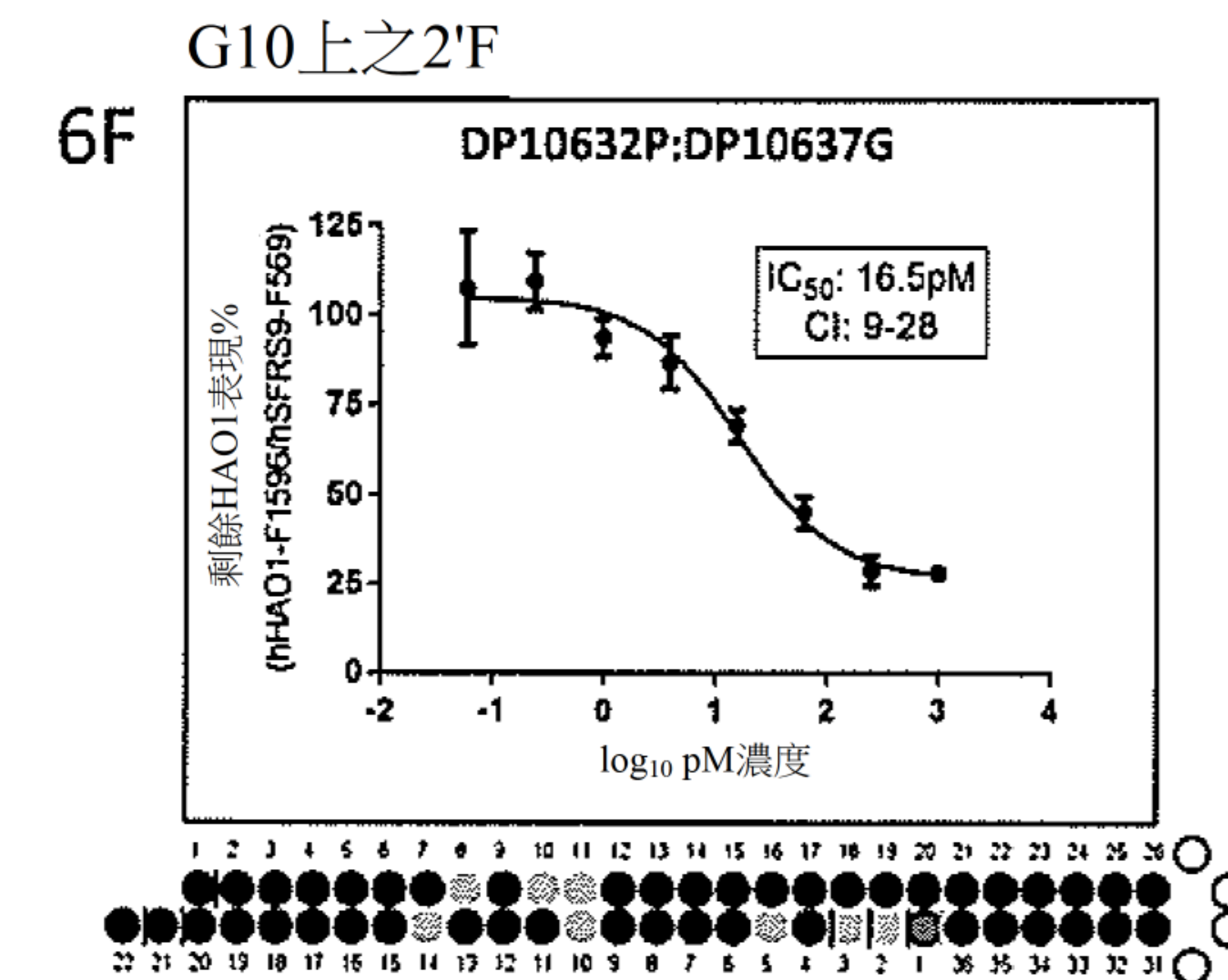
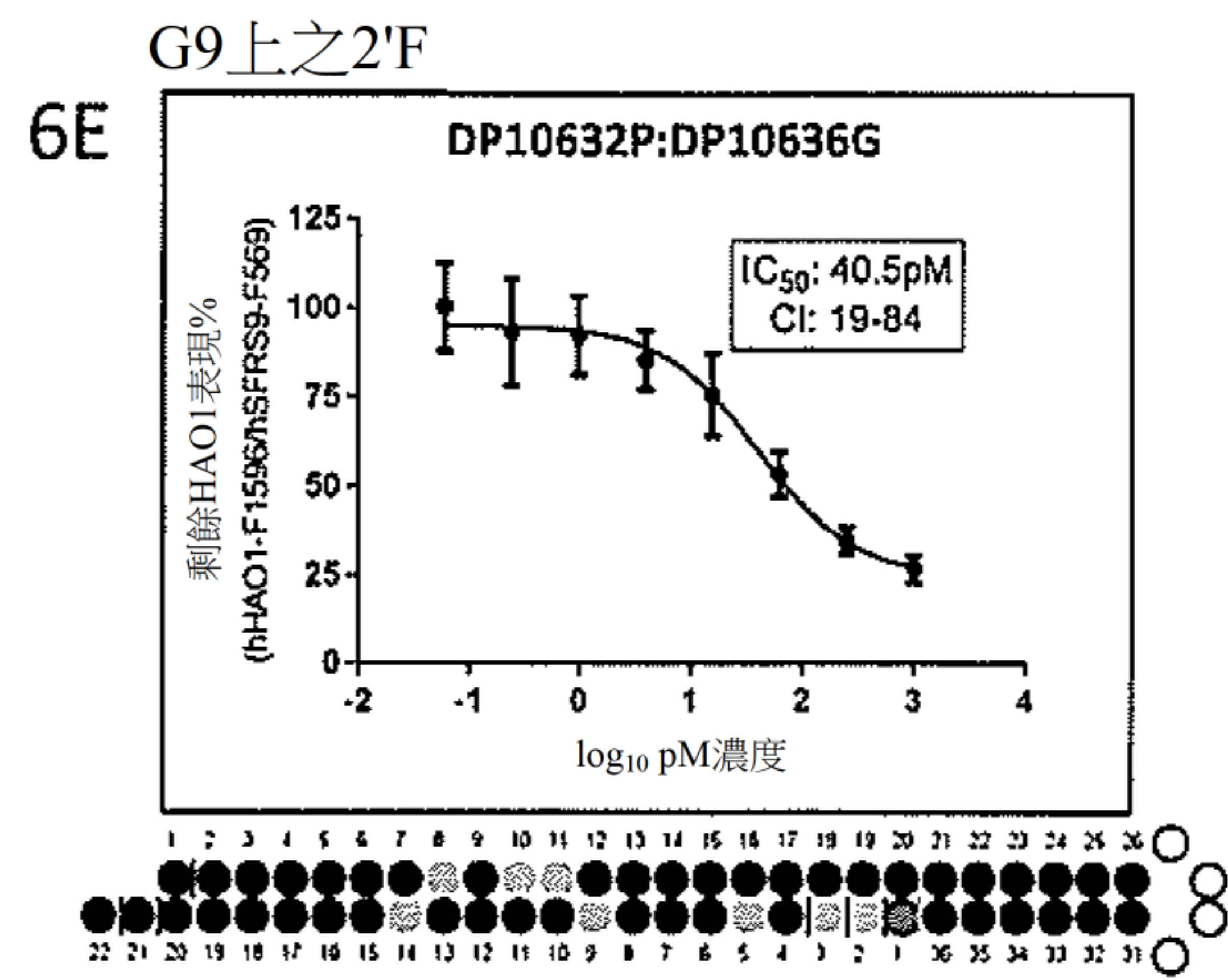
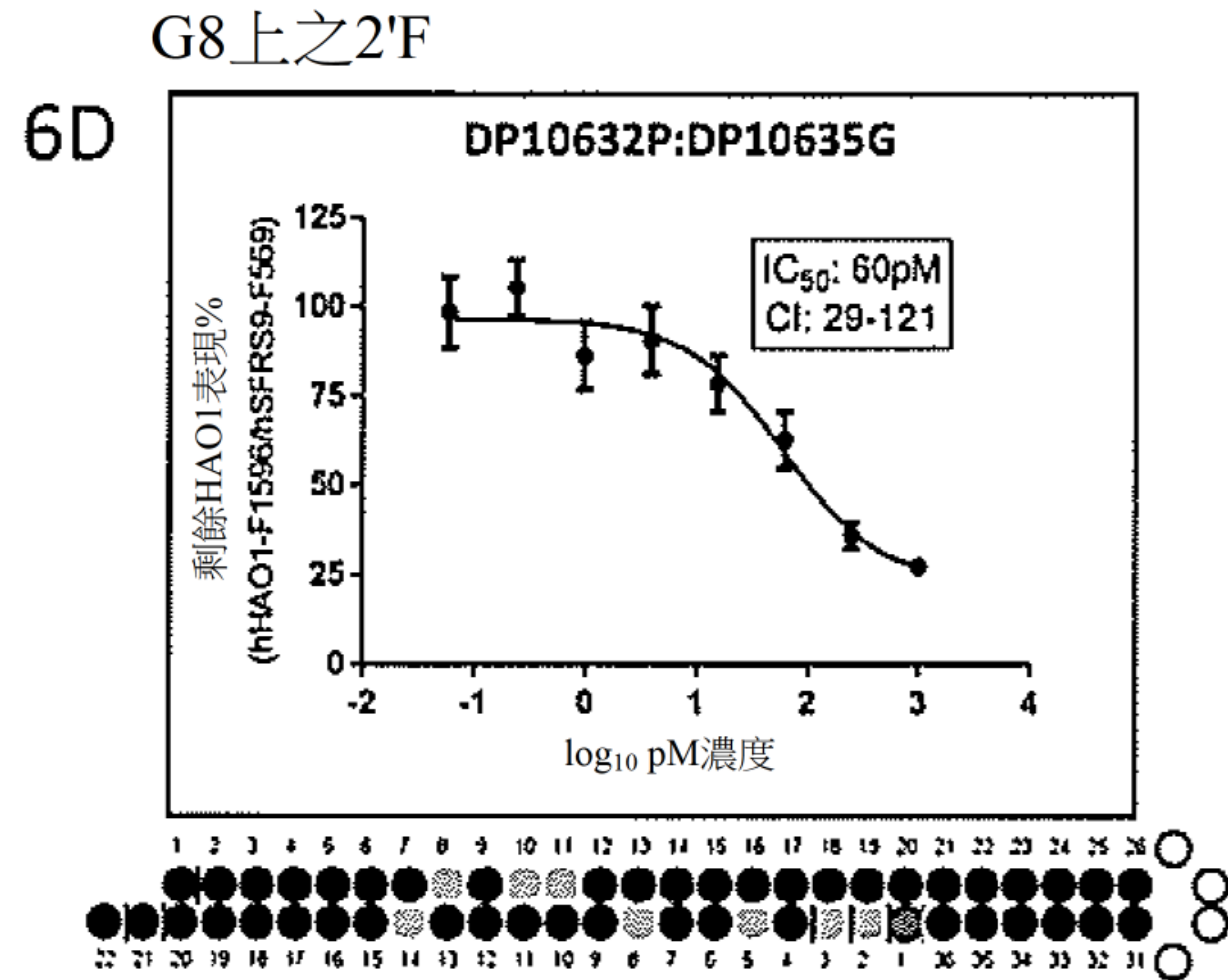
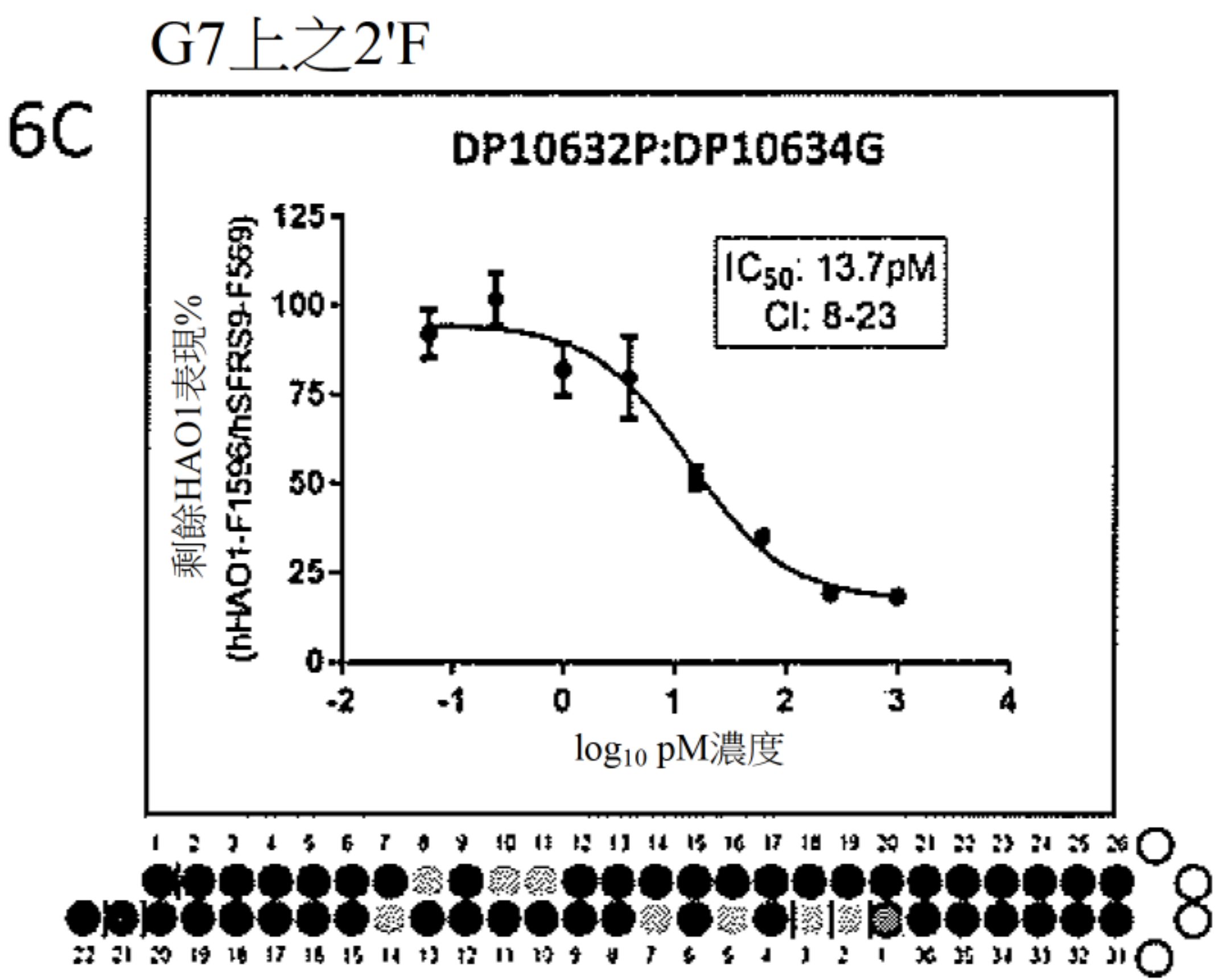
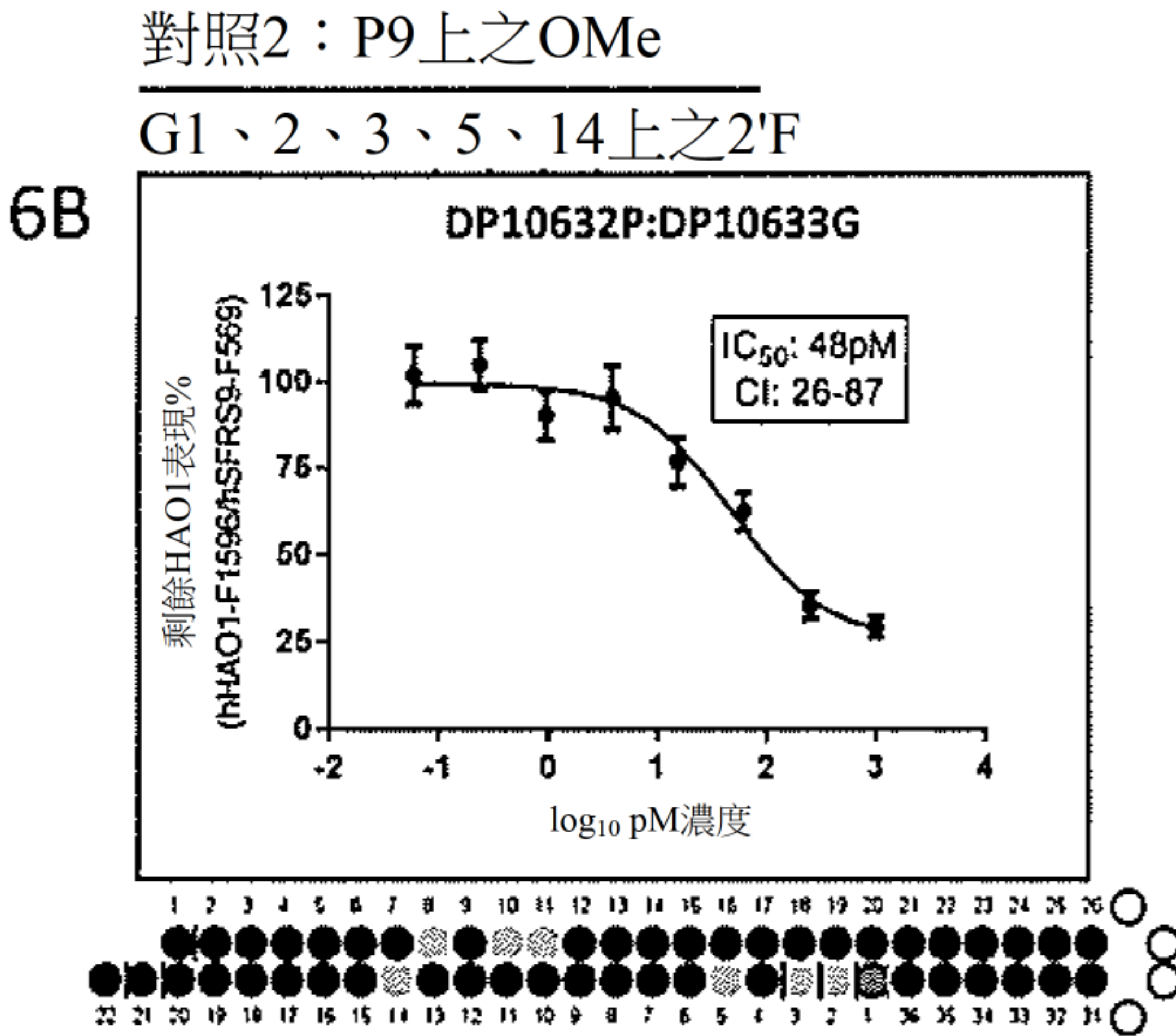
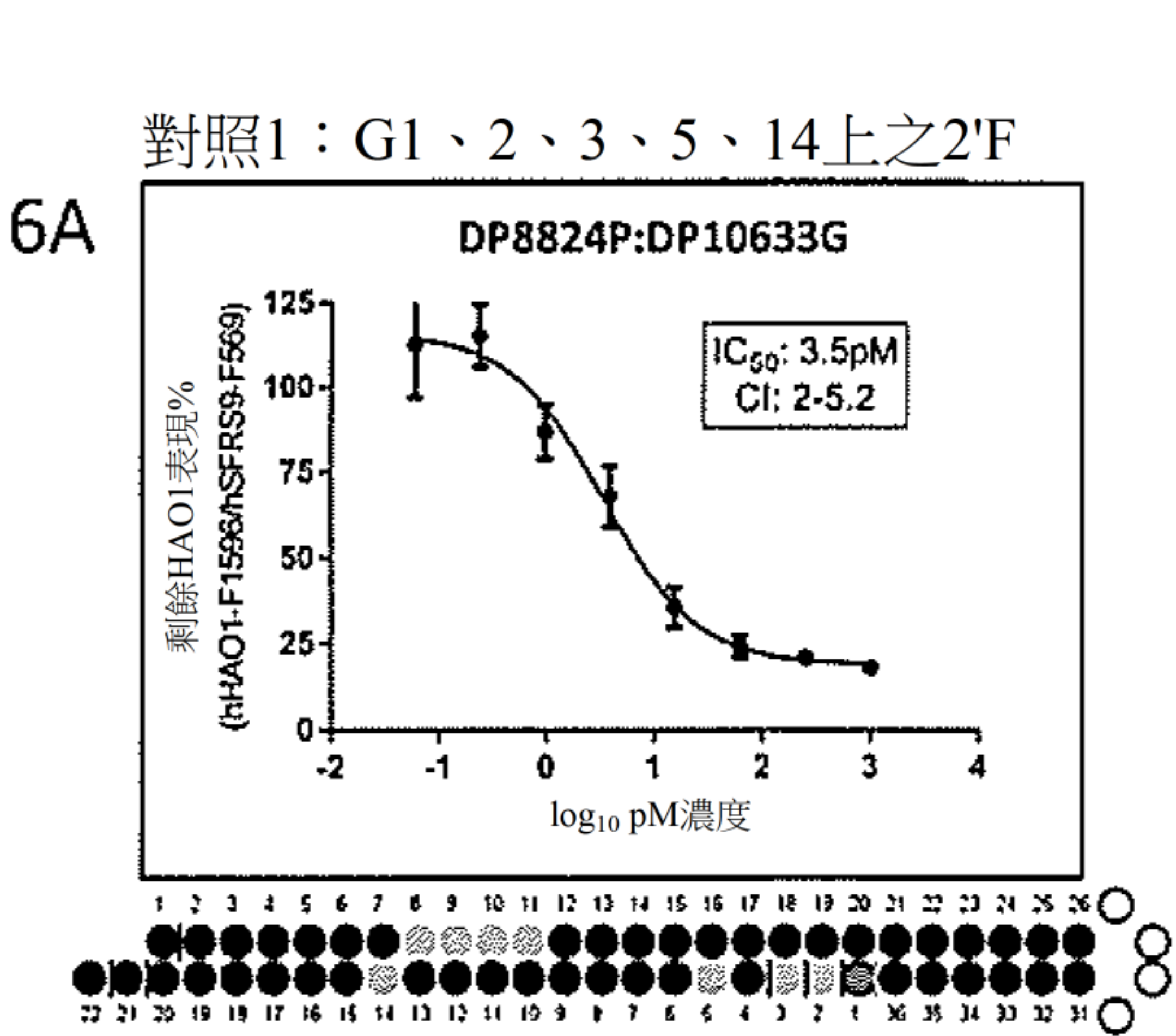
【圖3A至圖3H】



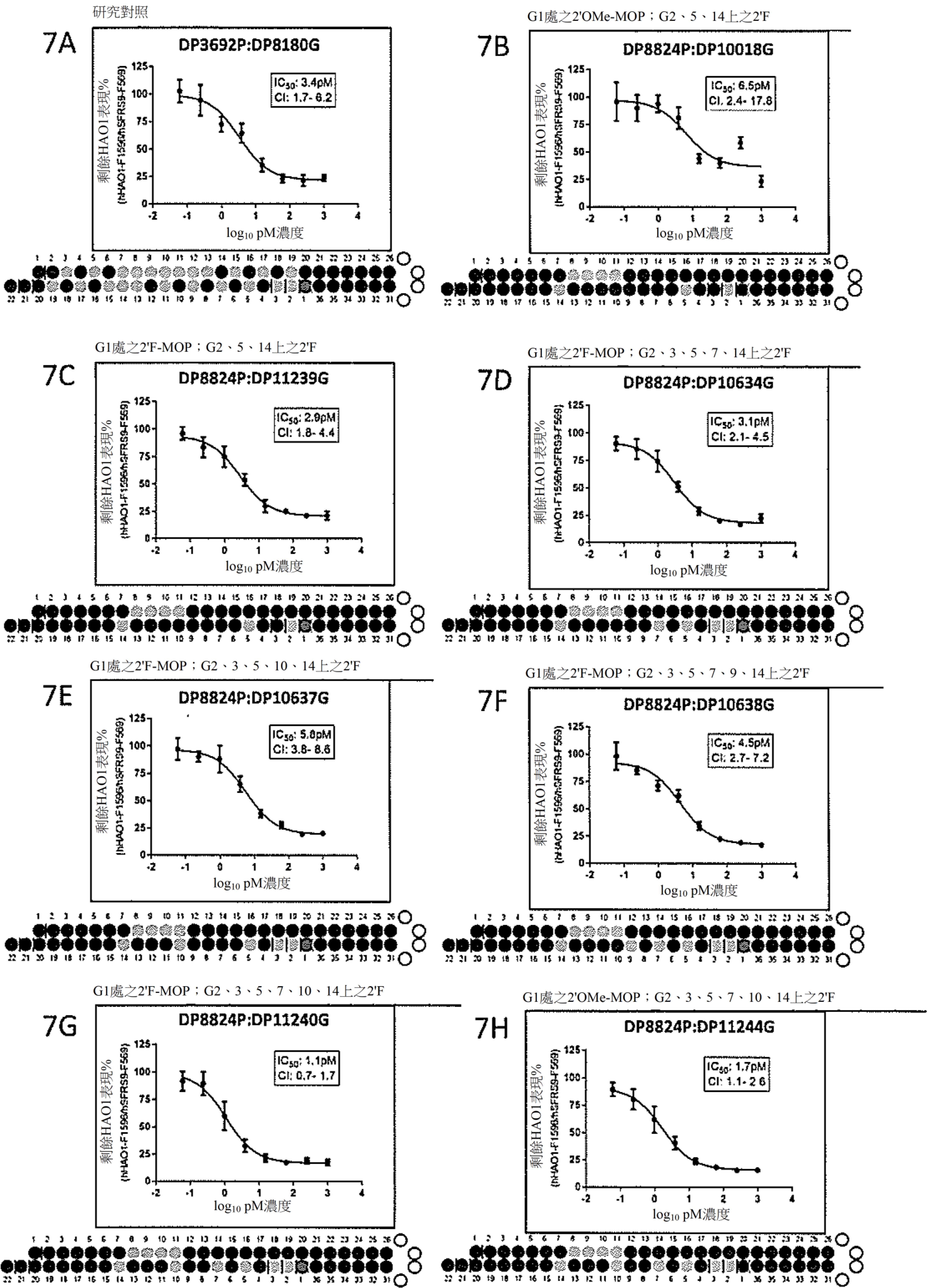
【圖4A至圖4E】



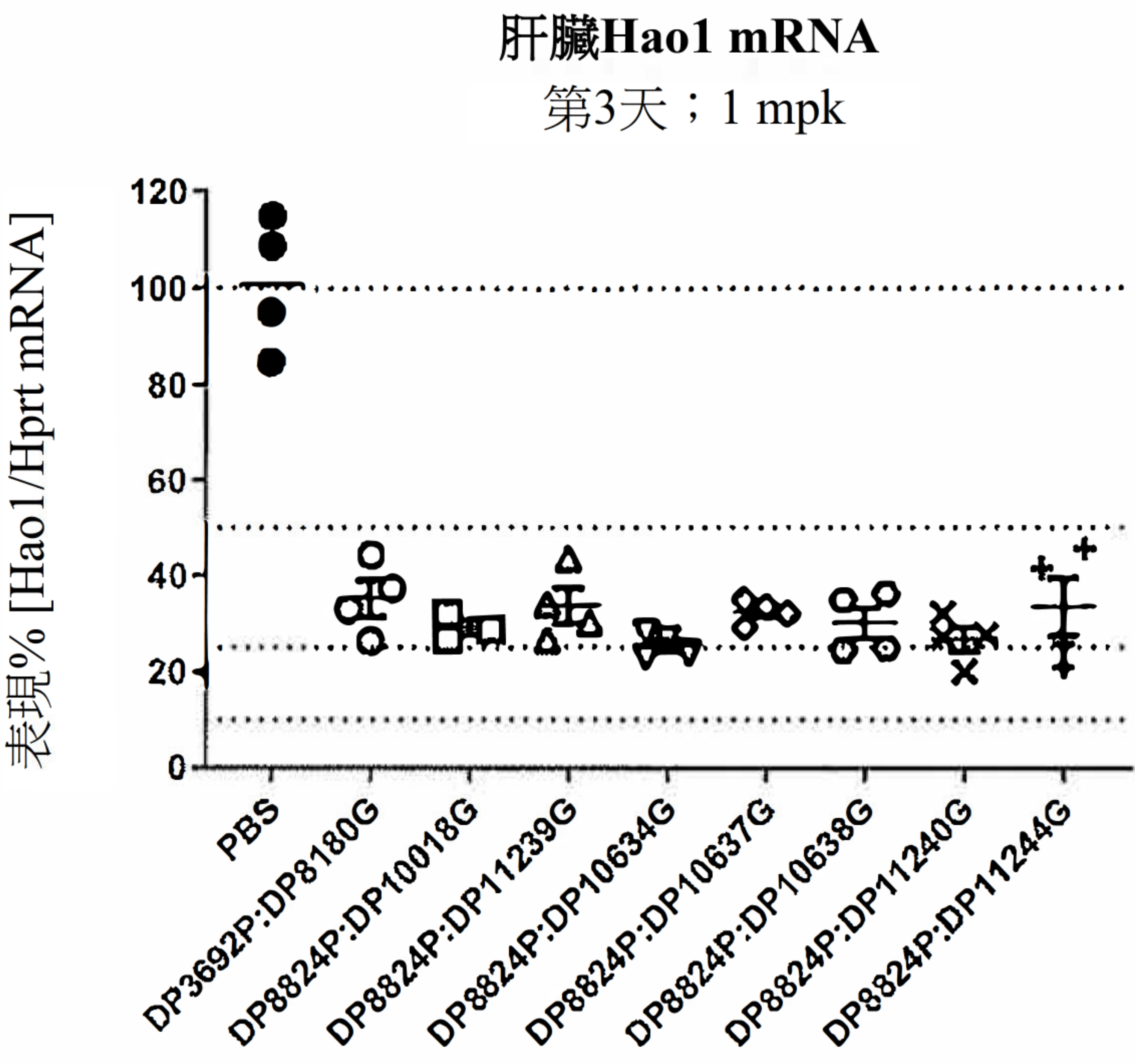
【圖5A至圖5H】



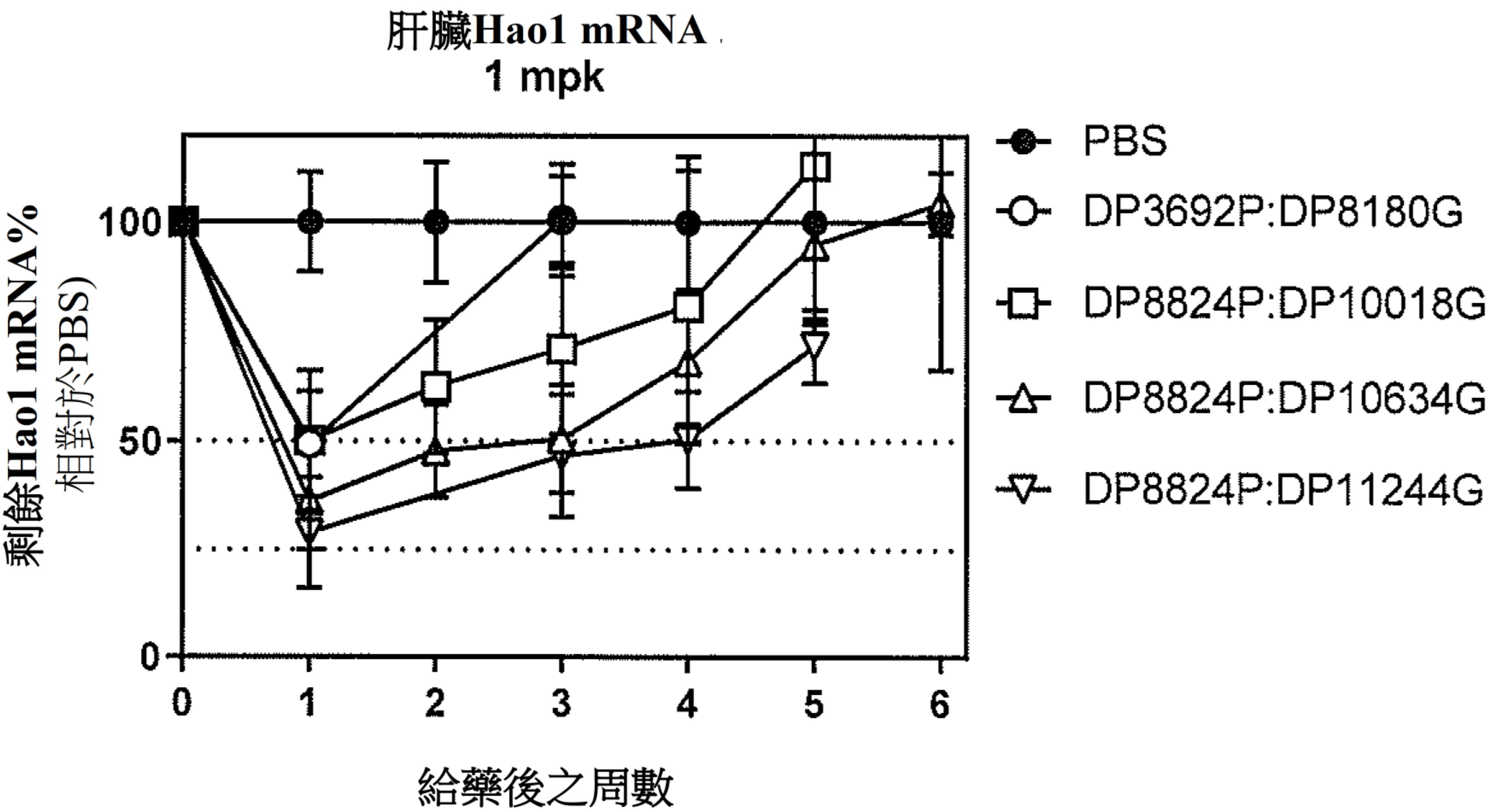
【圖6A至圖6F】



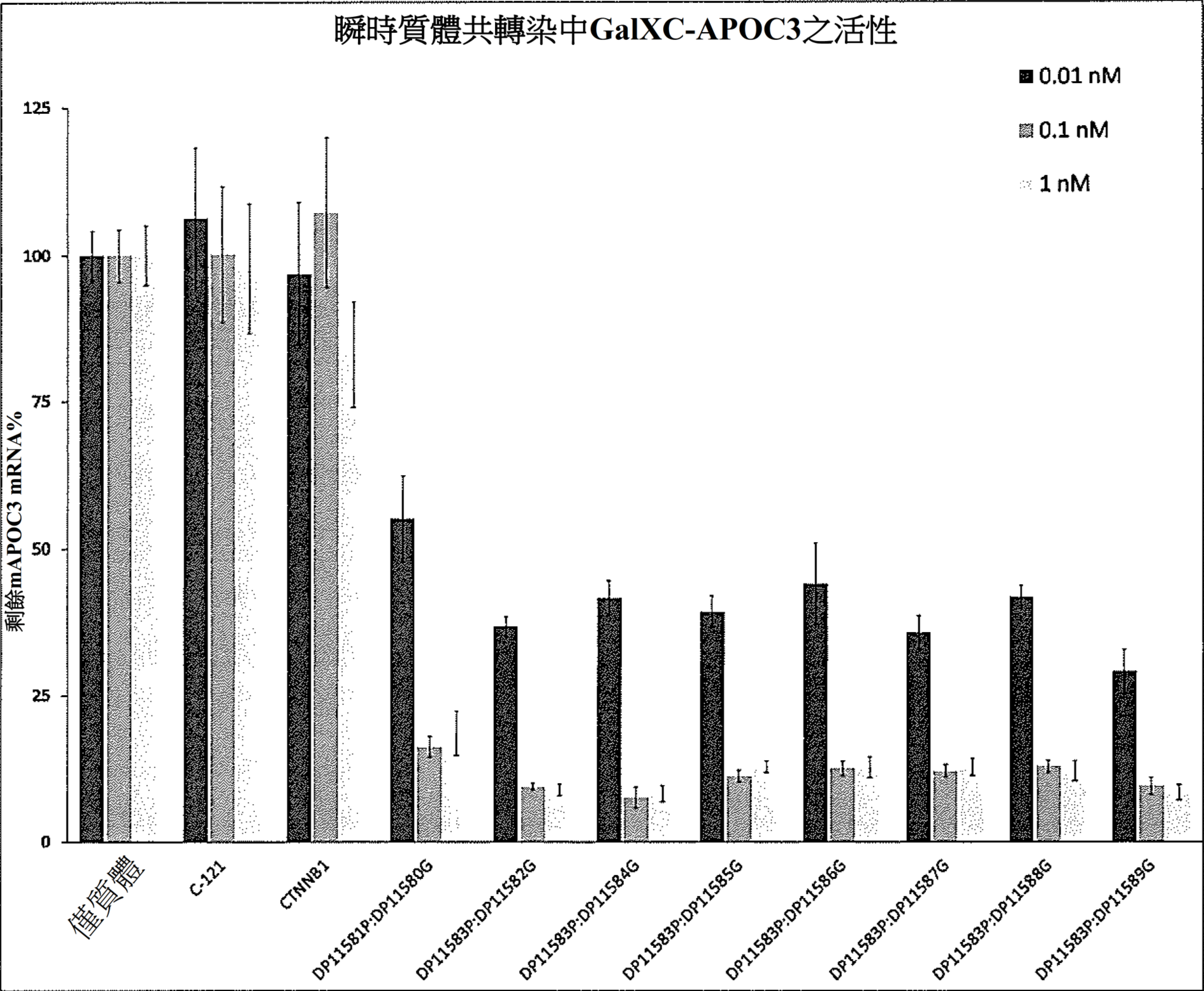
【圖7A至圖7H】



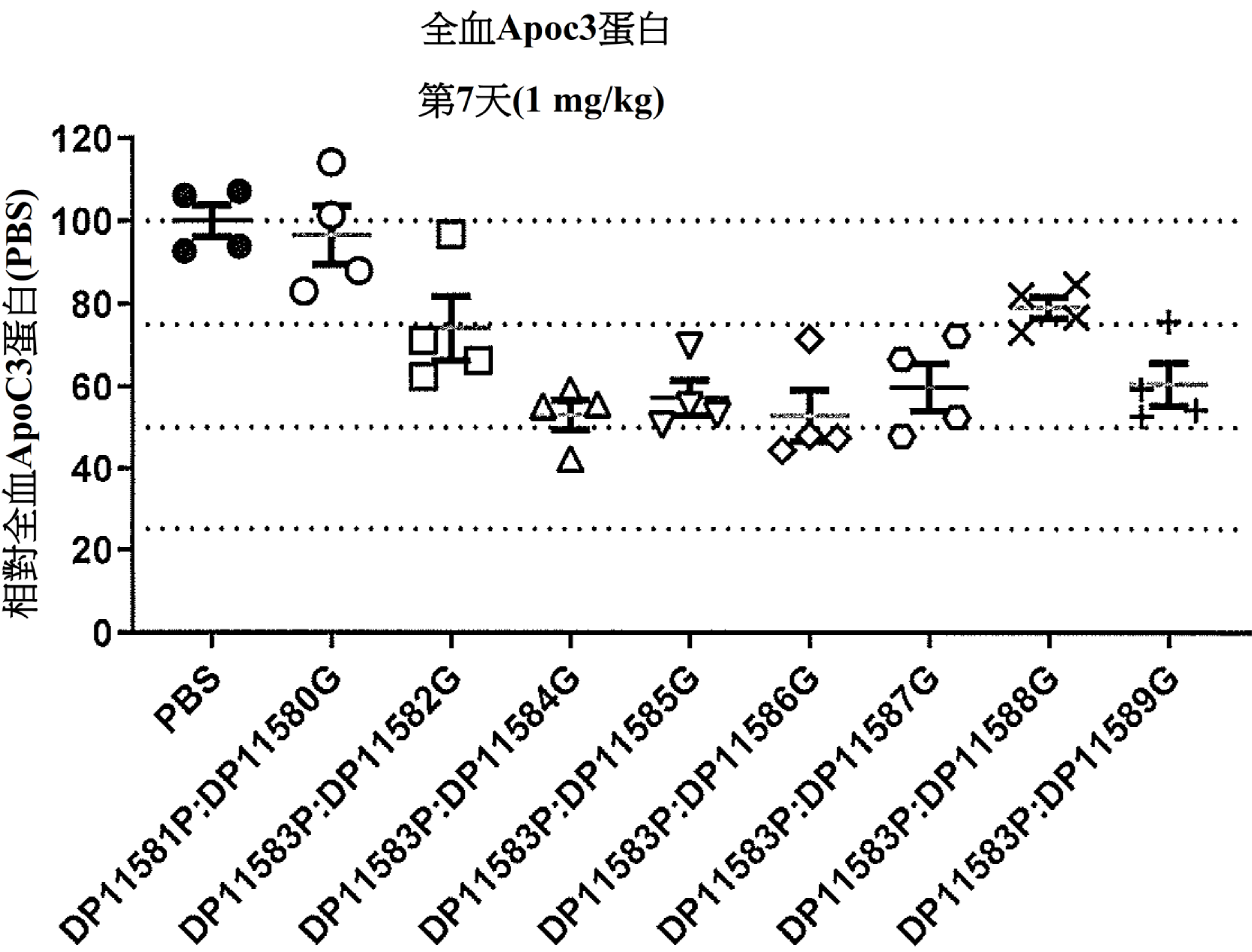
【圖 7I】



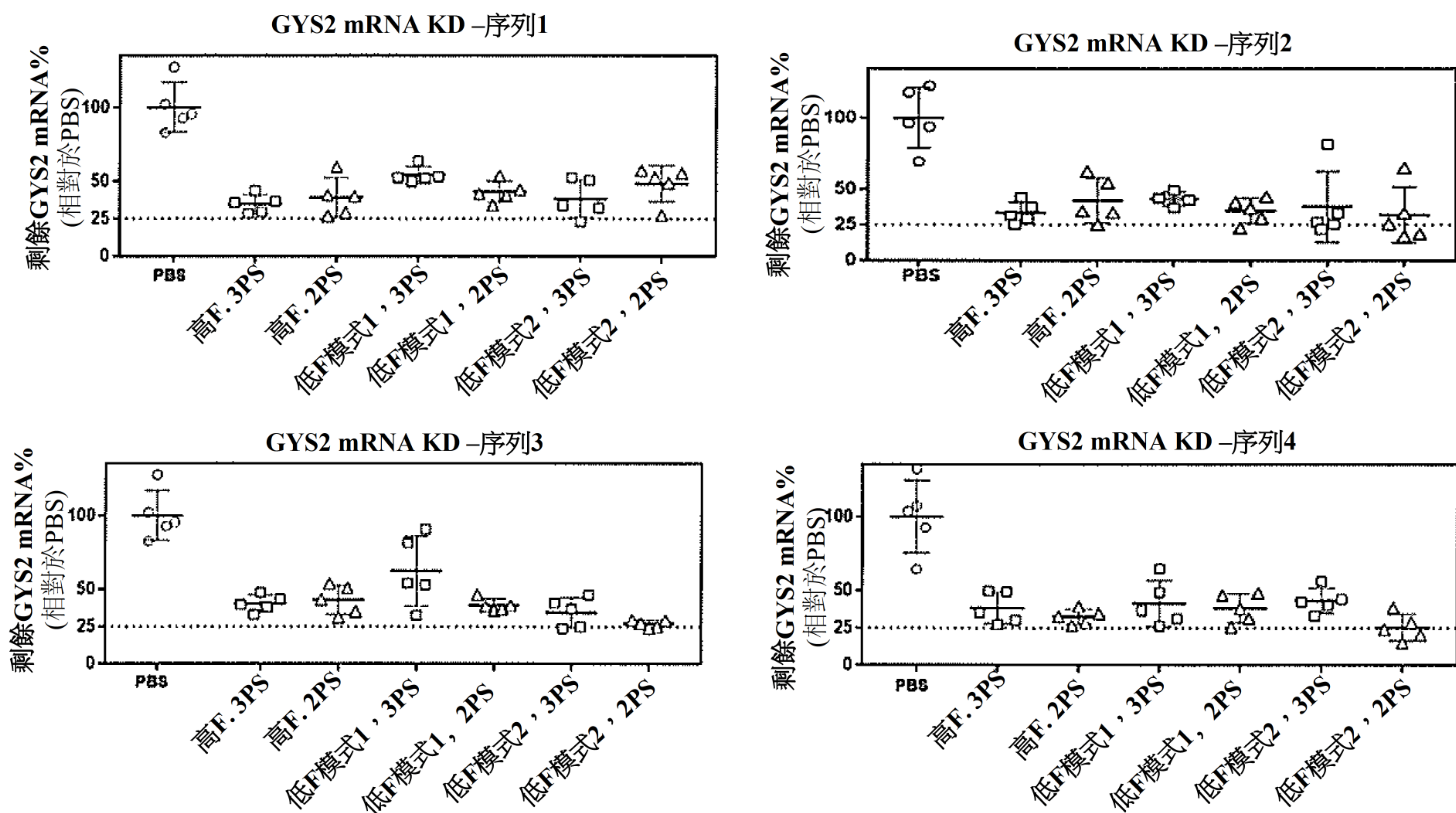
【圖8】



【圖9A】



【圖9B】



【圖10】