

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於使B型肝炎病毒基因表現靜默之組成物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR SILENCING HEPATITIS
B VIRUS GENE EXPRESSION

【技術領域】

【先前技術】

B型肝炎病毒(縮寫為「HBV」)為肝DNA病毒家族之成員。該病毒粒子(有時稱為病毒體)包括外脂質膜及由蛋白質構成之二十面體狀核蛋白殼核心。核蛋白殼囊封病毒DNA及具有反轉錄酶活性之DNA聚合酶。外膜含有參與易感染細胞(典型地，肝臟肝細胞)之病毒結合及進入的嵌埋蛋白質。除感染性病毒粒子以外，可在已感染個體之血清中發現缺乏核心之絲狀及球形體。此等粒子不具傳染性且係由形成被稱為表面抗原(HBsAg)之病毒體之表面的一部分且在病毒生命週期中過量產生之脂質及蛋白質構成。

HBV之基因組由環狀DNA組成，但其不同尋常，此係因為該DNA不完全為雙股。全長股鏈之一端連接於病毒DNA聚合酶。該基因組為3020至3320個核苷酸長(對於全長股鏈)及1700至2800個核苷酸長(對於較短股鏈)。負義(非編碼)與病毒mRNA互補。細胞感染後不久即在核中發現病毒DNA。存在四種已知的由該基因組編碼之基因，稱為C、X、P及S。核心蛋白由基因C (HBcAg)編碼，且其起始密碼子前面為產生前驅核心蛋白之上游同框AUG起始密碼子。HBeAg係由前

驅核心蛋白之蛋白水解處理產生。DNA聚合酶係由基因P編碼。基因S為編碼表面抗原(HBsAg)之基因。HBsAg基因為一個長開放閱讀框，但含有三個同框「起始」(ATG)密碼子，從而將該基因分成三部分，即pre-S1、pre-S2及S。由於多個起始密碼子，故而產生稱為大、中及小之三種不同尺寸之多肽。尚未完全瞭解由基因X編碼之蛋白質之功能，但其與發展肝癌相關。HBV之複製為複雜之過程。儘管複製發生在肝臟中，但該病毒擴散至血液，在已感染人士之血液中發現病毒蛋白質及針對其之抗體。HBV之結構、複製及生物學性質綜述於D. Glebe及C.M.Bremer, *Seminars in Liver Disease*, 第33卷, 第2期, 第103-112頁(2013)中。

人類感染HBV可導致傳染性發炎性肝臟疾病。已感染之個體可能多年不展現症狀。據估計，全世界人口中約有三分之一已在其生命中之某一時間點經感染，包括35000萬長期攜帶者。

該病毒係藉由傳染性血液或體液暴露來傳播。圍產期感染亦可為主要感染途徑。急性疾病造成肝臟發炎、嘔吐、黃疸及可能死亡。慢性B型肝炎最終可能造成肝硬化及肝癌。

儘管大部分感染HBV之人士藉由其免疫系統之作用清除該感染，但一些感染人士遭受侵襲性感染過程(猛暴型肝炎)；而其他為長期感染，從而增加其肝臟疾病之幾率。目前已批准若干種藥療法用於治療HBV感染，但已感染之個體以不同的成功程度響應此等藥療法，且此等藥療法中無一種能自己感染人士體內清除該病毒。

D型肝炎病毒(HDV)為僅可在存在B型肝炎病毒(HBV)之情況下繁殖的小環形包被RNA病毒。特定言之，HDV需要HBV表面抗原蛋白

來繁殖其自身。與僅感染HBV相比，感染HBV及HDV兩者導致更嚴重之併發症。此等併發症包括在急性感染時經歷肝衰竭之可能性更大及快速進展至肝硬化，與慢性感染時發展肝癌之幾率增加。在所有肝炎感染中，D型肝炎與B型肝炎病毒之組合具有最高死亡率。HDV之傳播途徑類似於HBV。感染在很大程度上侷限於處在高HBV感染風險下之人士，尤其是注射藥物使用者，及接受凝血因子濃縮劑之人士。

因而，持續需要用於治療人類之HBV感染以及用於治療人類之HBV/HDV感染的組成物及方法。

【發明內容】

如本文中更充分描述，在一個態樣中，本發明提供經分離之雙股siRNA分子，該等分子各自包括有義股及與該有義股雜交之反義股。本發明之此態樣之siRNA靶向HBV基因組之一或多個基因及/或轉錄產物。本發明之此態樣之siRNA分子之實例為本文中之表A中所闡述之siRNA分子。本發明之siRNA分子當以治療量投與感染HBV或HBV/HDV之人類個體時適用於例如治療HBV感染及/或HDV感染。更一般而言，本發明提供能够在活體外及活體內抑制HBV基因表現或使其靜默之siRNA分子。

在另一態樣中，本發明提供經分離之單股核酸分子，諸如表A中所闡述之siRNA分子之經分離之有義股及反義股。上述經分離之有義股及反義股闡述於本文中之表B中。如本文中更充分描述，本發明之siRNA及單股核酸分子經修飾且包括一或多個UNA部分及/或一或多個2'-O-甲基修飾(參見例如表A及表B)。

本發明亦提供包括一或多個本發明siRNA分子(參見例如表A中所

描述之 siRNA 分子)之組成物，諸如醫藥組成物。在一個實施例中，本發明提供包括兩個不同的本發明 siRNA 分子(例如，選自本文中之表 A 中所揭示之 siRNA 分子的兩個不同的 siRNA 分子)的組成物。在另一實施例中，本發明提供包括三個不同的本發明 siRNA 分子(例如，選自本文中之表 A 中所揭示之 siRNA 分子的三個不同的 siRNA 分子)的組成物。選自本文中之表 A 中所揭示之 siRNA 分子的兩個不同的 siRNA 分子的所有可能之組合(「二元組合」)闡述於本文中之實例 2 中。選自本文中之表 A 中所揭示之 siRNA 分子的三個不同的 siRNA 分子的所有可能之組合(「三元組合」)闡述於本文中之實例 3 中。因而，在一個態樣中，本發明提供包括表 A 中所闡述之 siRNA 之上述二元或三元組合之一的組成物(例如醫藥組成物)。

本發明亦提供核酸-脂質粒子及其調配物，其中該等脂質粒子各自包括本文中所描述之 siRNA、陽離子脂質及非陽離子脂質及視情況存在之抑制粒子聚集之結合脂質中的一或多者(例如混合液)。可包括在本發明脂質粒子中之 siRNA 分子之實例為表 A 中所闡述之 siRNA 分子及上述 siRNA 之組合(例如，本文中所描述之二元及三元組合)。典型地，siRNA 完全囊封在脂質粒子內。本發明之脂質粒子適用於例如向感染 HBV 或 HBV/HDV 之人體細胞(例如，肝細胞)中遞送治療有效量之 siRNA，從而治療 HBV 感染及/或 HDV 感染及/或改善 HBV 感染及/或 HDV 感染之一或多種症狀。

本發明亦提供一種醫藥組成物，其包含靶向 HBV 基因表現之 siRNA 分子之一或其混合液及醫藥學上可接受之載劑。舉例而言，本發明提供各自包括表 A 中所闡述之靶向 HBV 基因表現之 siRNA 分子中

之一個、兩個或三個的醫藥組成物。關於包括囊封於脂質粒子內之 siRNA 混合液的調配物，不同的 siRNA 分子可共囊封於同一脂質粒子中，或混合液中所存在之各類型之 siRNA 種類可囊封在其自身之粒子中，或一些 siRNA 種類可共囊封於同一粒子中，而其他 siRNA 種類囊封在調配物內不同的粒子中。典型地，本發明之 siRNA 分子完全囊封在脂質粒子中。

本發明之核酸-脂質粒子適用於向感染 HBV 或 HBV/HDV 之人類預防性或治療性遞送使一或多個 HBV 基因表現靜默之 siRNA 分子，從而改善人類 HBV 感染及/或 HDV 感染之至少一種症狀。在一些實施例中，將本文中所描述之一或多種 siRNA 分子調配於核酸-脂質粒子中，且將該等粒子投與需要此種治療之哺乳動物(例如，人類)。在某些情況下，可向該哺乳動物投與治療有效量之核酸-脂質粒子，(例如，用於治療人類 HBV 及/或 HDV 感染)。本發明之核酸-脂質粒子特別適用於靶向作為大部分 HBV 基因表現部位之人類肝細胞。核酸-脂質粒子之投與可藉由此項技術中已知的任何途徑，諸如經口、鼻內、靜脈內、腹膜內、肌肉內、關節內、病灶內、氣管內、皮下或皮內。在特定實施例中，核酸-脂質粒子係全身投與，例如經由經腸或非經腸投與途徑。

在一些實施例中，藉由在核酸-脂質粒子投與之後偵測得自哺乳動物之生物樣品中的 HBV RNA 或蛋白水準來判定 HBV 基因表現下調。在其他實施例中，藉由在核酸-脂質粒子投與之後偵測得自哺乳動物之生物樣品中的 HBV mRNA 或蛋白水準來判定 HBV 基因表現下調。在某些實施例中，藉由在粒子投與之後監測哺乳動物中與 HBV 感

染相關之症狀來檢測**HBV**基因表現下調。

在另一實施例中，本發明提供向活細胞中引入使**HBV**基因表現靜默之**siRNA**的方法，該方法包括在**siRNA**得以進入該細胞且使該細胞內之**B**型肝炎病毒基因表現靜默的條件下使該細胞與本發明之核酸-脂質粒子接觸的步驟，其中該核酸-脂質粒子包括靶向**HBV**之**siRNA**。

在另一實施例中，本發明提供一種用於在人類中改善一或多種與**B**型肝炎病毒及/或**D**型肝炎病毒感染相關之症狀的方法，該方法包括向該人類投與治療有效量之本發明核酸-脂質粒子的步驟。在一些實施例中，本發明之此態樣之方法中所使用之核酸-脂質粒子包括獨立地選自表A中所闡述之**siRNA**的一種、兩種或三種或、更多種不同的**siRNA**。

在另一實施例中，本發明提供在有需要之哺乳動物(例如人類)中使**HBV**基因表現靜默之方法，其中該等方法各自包括向該哺乳動物投與本發明之核酸-脂質粒子的步驟。

在另一態樣中，本發明提供用於在人類中治療及/或改善一或多種與**HBV**及/或**HDV**感染相關之症狀的方法，其中該等方法各自包括向該人類投與治療有效量之本發明核酸-脂質粒子的步驟。

本發明之某些實施例提供藉由向感染**HDV**之**HDV**個體投與治療有效量之一或多種抑制**HBV**表面抗原合成之本發明組成物或核酸粒子來抑制**HDV**複製及/或改善**HDV**感染之一或多種症狀的組成物及方法。

在另一態樣中，本發明提供用於在有需要之哺乳動物(例如，感

染HBV或HBV/HDV之人類)中抑制HBV表達之方法，其中該等方法各自包括向該哺乳動物投與治療有效量之本發明核酸-脂質粒子的步驟。

在另一態樣中，本發明提供用於在人類中治療HBV及/或HDV感染之方法，其中該等方法各自包括向該人類投與治療有效量之本發明核酸-脂質粒子的步驟。

在另一態樣中，本發明提供本發明之siRNA分子用於在活細胞中抑制B型肝炎病毒基因表現之用途。

在另一態樣中，本發明提供本發明之醫藥組成物用於在活細胞中抑制B型肝炎病毒基因表現之用途。

本發明之組成物(例如，siRNA分子及其經分離之有義股及反義股，及核酸-脂質粒子)亦適用於例如生物測定法(例如，活體內或活體外測定法)中以得到對一或多種HBV基因及/或轉錄產物之表現的抑制，從而研究HBV及/或HDV複製及生物學，及/或研究或調節一或多種HBV基因或轉錄產物之功能。舉例而言，可使用生物測定法篩選本發明之siRNA分子以鑑別可抑制HBV及/或HDV複製且作為用於治療人類HBV及/或HDV感染及/或改善與人類HBV及/或HDV感染相關之至少一種症狀之候選治療劑的siRNA分子。

根據以下詳細描述及圖，本發明之其他目標、特徵及優勢對熟習此項技術者將顯而易見。

【實施方式】

[相關申請案之交叉引用]

本專利申請案主張2014年10月02日申請之美國申請案序列號

62/059,056及2015年2月24日申請之美國申請案序列號62/120,149之優先權權益，該等申請案係以引用之方式併入本文中。

引言

本文中所描述之siRNA藥物療法有利地提供用於治療人類HBV及/或HDV感染及與其相關之症狀的重要新組成物及方法。本發明之實施例可例如每日一次、每週一次或每若干週一次(例如，每兩週、三週、四週、五週或六週一次)投與。

此外，本文中所描述之核酸-脂質粒子使得能夠將諸如siRNA之核酸藥物有效遞送至體內之靶組織及細胞中。脂質粒子之存在可防止核酸酶在血流中降解，允許優先在靶組織中累積且提供藥物進入siRNA可執行其預定RNA干擾功能之細胞質的手段。

定義

除非另外說明，否則如本文中所使用，以下術語具有屬於其之含義。

術語「B型肝炎病毒」(縮寫為HBV)係指作為病毒之肝病毒家族之一部分且能夠在人類中引起肝臟發炎之正嗜肝DNA病毒(Orthohepadnavirus)屬病毒種類。

術語「D型肝炎病毒」(縮寫為HDV)係指能夠在人類中引起肝臟發炎之D型肝炎病毒屬病毒種類。

如本文中所使用之術語「小干擾RNA」或「siRNA」係指當siRNA與靶基因或序列處於同一細胞中時能夠減少或抑制靶基因或序列之表現(例如，藉由介導與siRNA序列互補之mRNA降解或抑制其轉譯)的雙股RNA(亦即，雙鏈體RNA)。siRNA可與靶基因或序列具有實

質性或完全一致性，或可包含錯配區(亦即，錯配模體)。在某些實施例中，siRNA之長度可為約19至25個(雙鏈體)核苷酸，且長度較佳為約20至24、21至22或21至23個(雙鏈體)核苷酸。siRNA雙鏈體可包含具有約1至約4個核苷酸或約2至約3個核苷酸之3'懸垂物及5'磷酸酯末端。siRNA之實例包括而不限於由兩股獨立之分子組裝之雙股聚核苷酸分子，其中一股為有義股且另一股為互補反義股。

siRNA較佳由化學方式合成。siRNA亦可藉由用大腸桿菌RNA酶III或Dicer使較長dsRNA(例如，長度大於約25個核苷酸之dsRNA)裂解來產生。此等酶將dsRNA處理成生物學活性siRNA(參見例如Yang等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:9942-9947 (2002); Calegari等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:14236 (2002); Byrom等人, Ambion TechNotes, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki等人, Nucleic Acids Res., 31:981-987 (2003); Knight等人, Science, 293:2269-2271 (2001); 及Robertson等人, J. Biol. Chem., 243:82 (1968))。dsRNA之長度較佳為至少50個核苷酸至約100、200、300、400或500個核苷酸。dsRNA之長度可長達1000、1500、2000、5000個核苷酸或更長。dsRNA可編碼完整基因轉錄產物或部分基因轉錄產物。在某些情況下，siRNA可由質體編碼(例如，轉錄為自動摺疊成具有髮夾環之雙鏈體的序列)。

片語「抑制靶基因之表現」係指本發明之siRNA能够使靶基因(例如，HBV基因組內之基因)之表現靜默、減少或受到抑制。為了研究基因靜默之程度，使測試樣品(例如，得自表現該靶基因之相關生物體之生物樣品或表現該靶基因之培養中細胞之樣品)與能使靶基因之表現靜默、減少或受到抑制的siRNA接觸。將測試樣品中靶基因之

表現與未與siRNA接觸之對照樣品(例如，得自表現該靶基因之相關生物體之生物樣品或表現該靶基因之培養中細胞之樣品)中靶基因之表現相比較。對照樣品(例如，表現靶基因之樣品)可分配值100%。在特定實施例中，當測試樣品之值相對於對照樣品(例如，僅緩衝液、靶向不同的基因的siRNA序列、錯義siRNA序列等)為約100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%時，達成靶基因之表現之靜默、抑制或減少。適合之測定法包括而不限於使用熟習此項技術者已知的技術檢查蛋白質或mRNA水準，諸如熟習此項技術者已知的點漬法、北方墨點法、原位雜交、ELISA、免疫沈澱法、酶功能以及表型測定法。諸如siRNA之治療性核酸之「有效量」或「治療有效量」為足以產生所要效應，例如，與在不存在siRNA之情況下所偵測之正常表現水準相比靶序列之表現受到抑制之量。在特定實施例中，當利用siRNA所獲得之值相對於對照(例如，僅緩衝液、靶向不同的基因的siRNA序列、錯義siRNA序列等)為約100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%時，達成對靶基因或靶序列之表現之抑制。適用於量測靶基因或靶序列之表現的測定法包括但不限於使用熟習此項技術者已知的技術檢查蛋白質或mRNA水

準，諸如熟習此項技術者已知的點漬法、北方墨點法、原位雜交、ELISA、免疫沈澱法、酶功能以及表型測定法。

如本文中所使用之術語「核酸」係指含有至少兩個呈單股或雙股形式之核苷酸(亦即，脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)之聚合物且包括DNA及RNA。「核苷酸」含有糖脫氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、鹼基及磷酸基。核苷酸經由磷酸基連接在一起。「鹼基」包括嘌呤及嘧啶，其進一步包括天然化合物腺嘌呤、胸嘧啶、鳥嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷及天然類似物，及嘌呤及嘧啶之合成衍生物，其包括但不限於置放諸如但不限於胺、醇、硫醇、羧酸酯及烷基鹵化物之新反應基團之修飾。核酸包括含已知核苷酸類似物或經修飾之主鏈殘基或鏈聯之核酸，其為合成的、天然存在的及非天然存在的且其具有與參考核酸類似之結合性質。該等類似物及/或經修飾之殘基的實例包括而不限於硫代磷酸酯、磷醯胺、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸及肽-核酸(PNA)。另外，核酸可包括一或多個UNA部分。

術語「核酸」包括任何寡核苷酸或聚核苷酸，其中含有至多60個核苷酸之片段一般稱為寡核苷酸，而更長之片段稱為聚核苷酸。去氧核糖寡核苷酸由稱為去氧核糖的5-碳糖組成，該去氧核糖於該糖之5'與3'碳處被共價接合於磷酸，以形成交替的未分支鏈聚合物。DNA可呈例如反義分子、質體DNA、預凝聚DNA、PCR產物、載體、表現卡匣、嵌合序列、染色體DNA或此等群組之衍生物及組合形式。核糖寡核苷酸由類似之重複結構組成，其中5-碳糖為核糖。RNA可呈以下形式：小干擾RNA (siRNA)、Dicer受質 dsRNA、小髮夾RNA

(shRNA)、不對稱干擾RNA (aiRNA)、微型RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA (vRNA)及其組合。因此，在本發明之上下文中，術語「聚核苷酸」及「寡核苷酸」係指由天然存在之鹼基、糖及糖間(主鏈)鍵聯組成的核苷酸聚合物或寡聚物或核苷單體。術語「聚核苷酸」及「寡核苷酸」亦包括包含非天然存在之單體的聚合物或寡聚物或其具有類似功能之部分。該等經修飾或取代之寡核苷酸往往優於天然形式，此係由於諸多性質之故，舉例而言，諸如增強之細胞攝取、降低之免疫原性及增加之在核酸酶存在下之穩定性。

除非另外指示，否則特定核酸序列亦隱含其經保守修飾之變異體(例如，簡併密碼子取代)、對偶基因、直系同源物、SNP及互補序列以及明確指示之序列。特定言之，簡併密碼子取代可藉由以下方式來達成：產生一或多個所選(或所有)密碼子之第三位混合鹼基及/或去氧肌苷殘基取代之序列(Batzer等, *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka等, *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini等, *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994))。

本發明涵蓋經分離或實質上經純化之核酸分子及含有彼等分子之組成物。在本發明之上下文中，「經分離」或「經純化」之DNA分子或RNA分子為除其天然環境中以外存在之DNA分子或RNA分子。經分離之DNA分子或RNA分子可呈經純化形式存在，或可存在於非天然環境中，舉例而言，諸如轉殖基因宿主細胞。舉例而言，「經分離」或「經純化」之核酸分子或其生物學活性部分當藉由重組技術產生時實質上不含其他細胞物質或培養基或當化學合成時實質上不含化學前驅物或其他化學物質。在一個實施例中，「經分離」之核酸不含

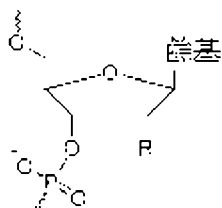
在得到該核酸之生物體之基因組DNA中天然地側接該核酸之序列(亦即，位於該核酸之5'及3'端之序列)。舉例而言，在各種實施例中，經分離之核酸分子可含有少於約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb或0.1 kb在得到該核酸之細胞之基因組DNA中天然地側接該核酸分子之核苷酸序列。

術語「基因」係指包含產生多肽或前驅多肽所必需之編碼序列之部分長度或整個長度的核酸(例如，DNA或RNA)序列。

如本文中所使用之「基因產物」係指諸如RNA轉錄產物或多肽之基因產物。

術語「解鎖核鹼基類似物」(縮寫為「UNA」)係指核糖環之C2'原子與C3'原子非共價鍵聯之非環狀核鹼基。術語「解鎖核鹼基類似物」包括具有稱為結構A之以下結構的核鹼基類似物：

結構A



其中R為羥基，且鹼基為任何天然或非天然鹼基，舉例而言，諸如腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)及胸嘧啶(T)。適用於實施本發明之UNA包括美國專利序列號8,314,227中稱為非環狀2'-3'-閉聯核苷酸單體之分子，該專利係以全文引用之方式併入本文中。

術語「脂質」係指包括但不限於脂肪酸酯之有機化合物群組，且以不溶於水中但可溶於許多有機溶劑中為特徵。其通常分成至少三類：(1)「簡單脂質」，其包括脂肪和油以及蠟；(2)「混配脂質」，其

包括磷脂及糖脂；及(3)「衍生脂質」，諸如類固醇。

術語「脂質粒子」包括可用於向相關靶部位(例如細胞、組織、器官及類似物)遞送治療性核酸(例如siRNA)之脂質調配物。在較佳實施例中，本發明之脂質粒子典型地由陽離子脂質、非陽離子脂質及視情況存在之可防止粒子聚集之已結合脂質形成。包括核酸分子(例如，siRNA分子)之脂質粒子稱為核酸-脂質粒子。典型地，核酸完全囊封在脂質粒子內，從而保護核酸免於酶促降解。

在某些情況下，核酸-脂質粒子非常適用於全身施用，此係由於其在靜脈內(i.v.)注射後可展現較長循環壽命、其可在遠端部位(例如，與投與部位物理上隔開之部位)積聚且其可在此等遠端部位介導靶基因表現之靜默。核酸可與凝聚劑複合且囊封在脂質粒子內，如PCT公開案第WO 00/03683號中所闡述，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

本發明之脂質粒子典型地具有約30 nm 至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約100 nm、約90 nm至約100 nm、約70至約90 nm、約80 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、或約30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm之平均直徑且為實質上無毒的。另外，當存在於本發明之脂質粒子中時，核酸在水溶液中抗核酸酶降解。核酸-脂質粒子及其製備方法揭示於例如美國專利公開案第20040142025號及第20070042031

號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

如本文中所使用，「經脂質囊封」可能係指提供諸如 siRNA 之治療性核酸以完全囊封、部分囊封或兩者之脂質粒子。在一較佳實施例中，核酸(例如，siRNA)完全囊封於脂質粒子中(例如，以形成核酸-脂質粒子)。

術語「脂質結合物」係指抑制脂質粒子聚集之結合脂質。該等脂質結合物包括但不限於 PEG-脂質結合物，諸如與二烷基氧基丙基偶合之 PEG (例如，PEG-DAA 結合物)、與二醯基甘油偶合之 PEG (例如，PEG-DAG 結合物)、與膽固醇偶合之 PEG、與磷脂醯基乙醇胺偶合之 PEG 及與神經醯胺結合之 PEG (參見例如美國專利第 5,885,613 號)、陽離子 PEG 脂質、聚噁唑啉(POZ)-脂質結合物(例如，POZ-DAA 結合物)、聚醯胺寡聚物(例如，ATTA-脂質結合物)及其混合物。POZ-脂質結合物之其他實例描述於 PCT 公開案第 WO 2010/006282 號中。PEG 或 POZ 可直接與脂質結合，或可經由連接子(linker)部分與脂質連接。適合於使 PEG 或 POZ 與脂質偶合之任何連接子部分均可使用，包括例如非含酯連接子部分及含酯連接子部分。在某些較佳實施例中，使用非含酯連接子部分，諸如醯胺或胺基甲酸酯。

術語「兩性脂質」部分係指任何適合之物質，其中該脂質物質之疏水性部分適應疏水相，而親水性部分適應水相。親水性特徵來源於存在諸如碳水化合物、磷酸酯、羧酸、硫酸根、胺基、巰基、硝基、羥基及其他類似基團之極性或帶電基團。可藉由包括非極性基團(包括但不限於長鏈飽和及不飽和脂族烴基)且該等基團經一或多個芳族、環脂族或雜環基團取代而賦予疏水性。兩性化合物之實例包括但

不限於磷脂、胺脂及鞘脂。

磷脂之代表性實例包括但不限於磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、磷脂酸、棕櫚醯油醯磷脂醯膽鹼、溶血磷脂醯膽鹼、溶血磷脂醯乙醇胺、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼、二油醯磷脂醯膽鹼、二硬脂醯磷脂醯膽鹼及二亞麻醯磷脂醯膽鹼。缺乏磷之其他化合物，諸如鞘脂、鞘糖脂家族、二醯基甘油及 β -醯氧基酸，亦在命名為兩性脂質之群組內。另外，上述兩性脂質可與其他脂質混合，包括甘油三酯及固醇。

術語「中性脂質」係指在所選pH值下呈不帶電或中性兩性離子形式存在的許多脂質種類中的任一種。在生理pH值下，該等脂質包括例如二醯基磷脂醯膽鹼、二醯基磷脂醯乙醇胺、神經醯胺、鞘磷脂、腦磷脂、膽固醇、腦苷脂及二醯基甘油。

術語「非陽離子脂質」係指任何兩性脂質以及任何其他中性脂質或陰離子脂質。

術語「陰離子脂質」係指在生理pH值下帶負電之任何脂質。此等脂質包括但不限於磷脂醯甘油、心磷脂、二醯基磷脂醯絲胺酸、二醯基磷脂酸、N-十二醯基磷脂醯乙醇胺、N-琥珀醯磷脂醯乙醇胺、N--戊二醯磷脂醯乙醇胺、離胺醯磷脂醯甘油、棕櫚醯油醯磷脂醯甘油(POPG)及與中性脂質接合之其他陰離子修飾基團。

術語「疏水性脂質」係指具有非極性基團(包括但不限於長鏈飽和及不飽和脂族烴基)且該等基團視情況經一或多個芳族、環脂族或雜環基取代之化合物。適合之實例包括但不限於二醯基甘油、二烷基甘油、N,N-二烷基胺基-1,2-二醯基氧基-3-胺基丙烷及1,2-二烷基-3-胺

基丙烷。

術語「陽離子脂質」及「胺基脂質」在本文中可互換用於包括具有一、二、三或更多個脂肪酸或脂肪烷基鏈及一個pH值可滴定胺基頭部基團(例如烷基胺基或二烷基胺基頭部基團)之彼等脂質及其鹽。陽離子脂質典型地在低於陽離子脂質之 pK_a 的pH值下經質子化(亦即，帶正電)且在高於該 pK_a 之pH值下實質上為中性的。本發明之陽離子脂質亦可稱為可滴定陽離子脂質。在一些實施例中，陽離子脂質包含：可質子化三級胺(例如，pH值可滴定)頭部基團； C_{18} 烷基鏈，其中各烷基鏈獨立地具有0至3 (例如，0、1、2或3)個雙鍵；及介於該頭部基團與烷基鏈之間的醚、酯或酮鍵聯。該等陽離子脂質包括但不限於DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、 γ -DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA (亦稱為DLin-C2K-DMA、XTC2及C2K)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、 γ -DLen-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA (亦稱為MC2)及DLin-M-C3-DMA (亦稱為MC3)。

術語「鹽」包括任何陰離子及陽離子複合物，諸如陽離子脂質與一或多個陰離子之間所形成的複合物。陰離子之非限制性實例包括無機陰離子及有機陰離子，例如氫陰離子、氟離子、氯離子、溴離子、碘離子、草酸根(例如半草酸根)、磷酸根、磷酸根、磷酸氫根、磷酸二氫根、氧離子、碳酸根、碳酸氫根、硝酸根、亞硝酸根、氮陰離子、亞硫酸氫根、硫離子、亞硫酸根、硫酸氫根、硫酸根、硫代硫酸根、硫酸氫根、硼酸根、甲酸根、乙酸根、苯甲酸根、檸檬酸根、酒石酸根、乳酸根、丙烯酸根、聚丙烯酸根、富馬酸根、馬來酸根、

衣康酸根、羥乙酸根、葡糖酸根、蘋果酸根、杏仁酸根、巴豆酸根、抗壞血酸根、水楊酸根、聚甲基丙烯酸根、高氯酸根、氯酸根、亞氯酸根、次氯酸根、溴酸根、次溴酸根、碘酸根、烷基磺酸根、芳基磺酸根、砷酸根、亞砷酸根、鉻酸根、重鉻酸根、氰離子、氰酸根、硫氰酸根、氫氧根、過氧根、高錳酸根及其混合物。在特定實施例中，本文中所揭示之陽離子脂質之鹽為結晶鹽。

術語「烷基」包括含有1至24個碳原子之直鏈或分支鏈、非環狀或環狀飽和脂族烴。代表性飽和直鏈烷基包括但不限於甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基及類似基團，而飽和分支鏈烷基包括但不限於異丙基、第二丁基、異丁基、第三丁基、異戊基及類似基團。代表性飽和環狀烷基包括但不限於環丙基、環丁基、環戊基、環己基及類似基團，而不飽和環狀烷基包括但不限於環戊烯基、環己烯基及類似基團。

術語「烯基」包括在相鄰碳原子之間含有至少一個雙鍵之如以上所定義之烷基。烯基包括順式及反式異構體兩者。代表性直鏈及分支鏈烯基包括但不限於乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、異丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基及類似基團。

術語「炔基」包括在相鄰碳之間另外含有至少一個三鍵之如以上所定義之任何烷基或烯基。代表性直鏈及分支鏈炔基包括但不限於乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基及類似基團。

術語「醯基」包括其中連接點上之碳經如以下所定義之側氧基

取代之任何烷基、烯基或炔基。以下為醯基之非限制性實例： $-\text{C}(=\text{O})$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})$ 烯基及 $-\text{C}(=\text{O})$ 炔基。

術語「雜環」包括5至7員單環或7至10員雙環雜環，其為飽和、不飽和或芳族的，且其含有1或2個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子，且其中該氮及硫雜原子可視情況經氧化，且該氮雜原子可視情況經季鉍化，包括以上雜環中之任一者與苯環稠合之雙環狀環。雜環可經由任何雜原子或碳原子連接。雜環包括但不限於如以下所定義之雜芳基以及嗎啉基、吡咯啉酮、吡咯啉基、哌啉基、哌嗪基、乙內醯脲基、戊內醯胺基、環氧乙烷基、環氧丙烷基、四氫呋喃基、四氫哌喃基、四氫吡啶基、四氫嘧啶基、四氫噻吩基、四氫噻哌喃基、四氫嘧啶基、四氫噻吩基、四氫噻哌喃基及類似基團。

術語「視情況經取代之烷基」、「視情況經取代之烯基」、「視情況經取代之炔基」、「視情況經取代之醯基」及「視情況經取代之雜環」意謂當經取代時至少一個氫原子經取代基置換。在側氧基取代基($=\text{O}$)之情況下，兩個氫原子經置換。就此而言，取代基包括但不限於側氧基、鹵素、雜環、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OR}^x$ 、 $-\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{C}(=\text{O})\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{SO}_2\text{R}^y$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{SO}_n\text{R}^x$ 及 $-\text{SO}_n\text{NR}^x\text{R}^y$ ，其中 n 為0、1或2， R^x 與 R^y 相同或不同且獨立地為氫、烷基或雜環，且烷基及雜環取代基各自可進一步經一或多個以下基團取代：側氧基、鹵素、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ 、烷基、 $-\text{OR}^x$ 、雜環、 $-\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{C}(=\text{O})\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{SO}_2\text{R}^y$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{SO}_n\text{R}^x$ 及 $-\text{SO}_n\text{NR}^x\text{R}^y$ 。術語「視情況經取代」當用於取代基清單之前時意謂該清單中之取代基各自可視情況如本文中所描述經取代。

術語「鹵素」包括氟、氯、溴及碘。

術語「融合性」係指脂質粒子與細胞之膜融合之能力。該等膜可為胞質膜或圍繞胞器(例如內體、核等)之膜。

如本文中所使用，術語「水溶液」係指完全或部分由水構成之組成物。

如本文中所使用，術語「有機脂質溶液」係指完全或部分由具有脂質之有機溶劑構成之組成物。

術語「電子緻密核心」當用於描述本發明之脂質粒子時係指當使用低溫透射電子顯微術(「cryoTEM」)檢視時脂質粒子內部部分之深色外觀。本發明之一些脂質粒子具有電子緻密核心且缺乏脂質雙層結構。本發明之一些脂質粒子具有電子緻密中心，缺乏脂質雙層結構，且具有逆六方相或立方相結構。儘管不希望受理論束縛，但認為非雙層脂質封裝提供內含水及核酸之脂質柱體三維網狀結構，即，基本上為經含核酸之水性通道貫穿之脂質小滴。

如本文中所使用之「遠端位點」係指物理上分開之位點，其不限於相鄰毛細血管床，而是包括廣泛分佈於生物體中之位點。

與核酸-脂質粒子有關之「血清穩定性」意謂該等粒子在暴露於將顯著降解游離DNA或RNA之血清或核酸酶測定後不顯著降解。適合之測定包括例如標準血清測定、DNA酶測定或RNA酶測定。

如本文中所使用，「全身遞送」係指導致諸如siRNA之活性劑在生物體內之廣泛生物分佈的遞送。一些投與技術可導致某些藥劑而非其他藥劑之全身遞送。全身遞送意謂使適用(較佳為治療)量之藥劑暴露於身體之大部分。為了獲得廣泛生物分佈，一般需要一定的血液生

存期，使得所述藥劑在達到投與部位遠端之疾病部位之前不會快速降解或清除(諸如藉由首先通過器官(肝、肺等)或藉由快速非特异性細胞結合)。脂質粒子之全身遞送可藉由此項技術中已知的任何手段來進行，包括例如靜脈內、皮下及腹膜內。在一較佳實施例中，脂質粒子之全身遞送係藉由靜脈內遞送。

如本文中所使用之「局部遞送」係指將諸如siRNA之活性劑直接遞送至生物體內之目標部位。舉例而言，可藉由直接注入疾病部位、其他目標部位或目標器官(諸如肝臟、心臟、胰臟、腎臟及其類似物)中來局部遞送藥劑。

如本文中所使用之術語「病毒粒子負載」係指諸如血液之體液中所存在之病毒粒子(例如，HBV及/或HDV)之數目的度量。舉例而言，粒子負載可表示為例如每毫升血液之病毒粒子數目。粒子負載測試可使用基於核酸擴增之測試以及非基於核酸之測試來進行(參見例如Puren等人, *The Journal of Infectious Diseases*, 201:S27-36 (2010))。

術語「哺乳動物」係指任何哺乳動物種類，諸如人類、小鼠、大鼠、狗、貓、倉鼠、豚鼠、兔、家畜及其類似物。

某些實施例之描述

本發明提供靶向一或多個HBV基因之表現的siRNA分子、包含該等siRNA中之一或多者(例如，混合液)的核酸-脂質粒子以及遞送及/或投與該等核酸-脂質粒子之方法(例如，用於治療人類之HBV及/或HDV感染)。

在一個態樣中，本發明提供靶向一或多個HBV基因之表現的siRNA分子。在某些情況下，本發明提供包含靶向HBV基因組之不同

區域的siRNA之組合(例如，混合液、彙集物或混合物)的組成物。在某些情況下，本發明之siRNA分子能够在活體外或活體內抑制HBV及/或HDV之複製。

在特定實施例中，本發明提供表A中所示之siRNA分子，其中各雙股siRNA分子之上部股鏈自左向右為5'至3'方向上之有義股；且各雙股siRNA分子之下部股鏈自左向右為5'至3'方向上之反義股。如表A中所示，該等siRNA分子可包含一或多個具有2'-O-甲基修飾之核糖核苷酸及/或一或多個UNA部分。以下表A中所示之IC50值係使用實例1中所描述之測定法來測定。

表A.

名稱	雙鏈體序列	IC 50 (nM)
1m	5' <u>A</u> g G u A U g u U G C C C g U u U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:1) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:2)	1.43
2m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:3) 3' U U <u>C</u> g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:4)	0.37
3m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u u C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:5) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:6)	0.06
4m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:7) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:8)	0.31
5m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:9) 3' U U <u>G</u> g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:10)	0.06
6m	5' <u>C</u> u g g C U C A G U U U A C u A g U G U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:11) 3' U U <u>G</u> A C C g A g U C A A A U g A U C A C 5' (SEQ ID NO:12)	0.05
7m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:13) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:14)	0.06
8m	5' <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:15) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:16)	0.24
9m	5' <u>A</u> g G u A U G u U G C C C g U u U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:17) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>u</u> C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:18)	0.13

名稱	雙鏈體序列	IC 50 (nM)
10m	5' <u> </u> <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:19) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:20)	0.34
11m	5' <u> </u> <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:21) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:22)	0.31
12m	5' <u> </u> <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:23) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:24)	0.16
13m	5' <u> </u> <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:25) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:26)	0.2
14m	5' <u> </u> <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:27) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:28)	0.16
15m	5' <u> </u> <u>C</u> u g G C u C A G U U u A C U A G U G <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:29) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> A C C g A G U C A A A U G A U C A C 5' (SEQ ID NO:30)	0.17
小寫字母= 2'-O-甲基修飾 下劃線= LNA部分		

在其他實施例中，如本文中之表B中所闡述，本發明提供表A中所闡述之siRNA分子的經分離之有義股及反義股(亦即，經分離之單股核酸分子)。表B中所闡述之核酸序列佈置為序列配對，其中各配對包括有義股及其互補反義股。各序列配對(有義股加反義股)以對應於表A中所示之名稱的特定名稱加以鑑別。

表B中所示之此等經分離之有義股及反義股適用於例如製造適用於在活體內或活體外減少一或多個HBV基因之表現的siRNA分子。此等經分離之有義股及反義股亦適用於例如作為雜交探針，以用於鑑別及量測得自感染HBV或HBV/HDV之人類的諸如組織或血液樣品之生物材料中的HBV基因組的量。

在特定實施例中，本發明之寡核苷酸(諸如表B中所闡述之有義及反義RNA股)與靶聚核苷酸序列特异性雜交或互補。如本文中所使用之術語「特异性雜交」及「互補」指示互補性程度足以在DNA或RNA標靶與寡核苷酸之間發生穩定且特异性結合。應理解，寡核苷酸未必與其將特异性雜交之靶核酸序列100%互補。在較佳實施例中，

當寡核苷酸與靶序列結合干擾靶序列之正常功能，從而造成其效用或表現損失時，寡核苷酸為可特异性雜交的，且互補性程度足以避免寡核苷酸與非靶序列在需要特异性結合之條件下，亦即，在活體內測定或治療性治療之情況下時在生理條件下或在活體外測定情況下時在進行測定之條件下的非特异性結合。因而，寡核苷酸與其靶向或特异性雜交之基因或 mRNA 序列區域相比可包括 1、2、3 或更多個鹼基取代。

表B.

名稱	有義序列 (5'-3')	反義序列 (5'-3')
1m	<u>A</u> gGuAUguUGCCCgUuUGUU <u>U</u> (SEQ ID NO:1)	ACAAACgGGCAAC <u>Au</u> ACC <u>UUU</u> (SEQ ID NO:2)
2m	<u>G</u> CuCAgUUUACUAGUGCcAU <u>U</u> (SEQ ID NO:3)	UGGCACUAGuAAACUGAgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:4)
3m	<u>C</u> CGUguGCACUuCGCuCA <u>UU</u> (SEQ ID NO:5)	UGAAGCGAAGUgCACACgG <u>UU</u> (SEQ ID NO:6)
4m	<u>G</u> CuCAgUUUACUAGUGCcAU <u>U</u> (SEQ ID NO:7)	UGGCACUAGuAAACUGAgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:8)
5m	<u>C</u> CGUguGCACUuCGCuUCA <u>UU</u> (SEQ ID NO:9)	UGAAGCGAAGUgCACACgG <u>UU</u> (SEQ ID NO:10)
6m	<u>C</u> uggCUAGUUUACuAgUGU <u>U</u> (SEQ ID NO:11)	CACUAgUAAACUGAgCCAGU <u>U</u> (SEQ ID NO:12)
7m	<u>C</u> CGUguGCACUuCGCuUCA <u>UU</u> (SEQ ID NO:13)	UGAAGCGAAGUgCACACgG <u>UU</u> (SEQ ID NO:14)
8m	<u>G</u> CuCAgUUUACuAgUGCCA <u>UU</u> (SEQ ID NO:15)	UGGCACUAGuAAACuGAGCU <u>U</u> (SEQ ID NO:16)
9m	<u>A</u> gGuAUGuUGCCCgUuUGU <u>UU</u> (SEQ ID NO:17)	ACAAACgGGCAAC <u>Au</u> ACC <u>UUU</u> (SEQ ID NO:18)
10m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>Cu</u> gCggAA <u>UU</u> (SEQ ID NO:19)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:20)
11m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>Cu</u> gCggAA <u>UU</u> (SEQ ID NO:21)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:22)
12m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>Cu</u> gCGgAA <u>UU</u> (SEQ ID NO:23)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:24)
13m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>Cu</u> gCGgAA <u>UU</u> (SEQ ID NO:25)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:26)
14m	<u>G</u> CuCAgUUUACuAgUGCCA <u>UU</u> (SEQ ID NO:27)	UGGCACUAGuAAACuGAGCU <u>U</u> (SEQ ID NO:28)
15m	<u>C</u> uGCUcAGUUuACUAGUG <u>UU</u> (SEQ ID NO:29)	CACUAGUAAACUGAgCCAG <u>UU</u> (SEQ ID NO:30)
小寫字母= 2'-O-甲基修飾 下劃綫= UNA 部分		

因而，本發明之某些實施例提供一種經分離之雙股 siRNA 分子，其係選自由 1m (SEQ ID NO:1 及 2)、2m (SEQ ID NO:3 及 4)、3m (SEQ ID NO:5 及 6)、4m (SEQ ID NO:7 及 8)、5m (SEQ ID NO:9 及 10)、6m (SEQ ID NO:11 及 12)、7m (SEQ ID NO:13 及 14)、8m (SEQ ID NO:15

及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)、15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群。

本發明之某些實施例亦提供一種經分離之核酸分子，其係選自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27及SEQ ID NO:29組成之群。

本發明之某些實施例亦提供一種經分離之核酸分子，其係選自由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:30組成之群。

本發明亦提供一種組成物，其包含一或多個本文中所描述之經分離之雙股siRNA分子(例如，表A中所描述之siRNA分子)。

在某些實施例中，該組成物包含選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)、15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群的兩個不同的雙股siRNA分子。在

某些實施例中，該兩個不同的雙股 siRNA 分子之組合係選自實例 2 中所描述之組合中之任一種。

在某些實施例中，該組成物包含選自由 1m (SEQ ID NO:1 及 2)、2m (SEQ ID NO:3 及 4)、3m (SEQ ID NO:5 及 6)、4m (SEQ ID NO:7 及 8)、5m (SEQ ID NO:9 及 10)、6m (SEQ ID NO:11 及 12)、7m (SEQ ID NO:13 及 14)、8m (SEQ ID NO:15 及 16)、9m (SEQ ID NO:17 及 18)、10m (SEQ ID NO:19 及 20)、11m (SEQ ID NO:21 及 22)、12m (SEQ ID NO:23 及 24)、13m (SEQ ID NO:25 及 26)、14m (SEQ ID NO:27 及 28)、15m (SEQ ID NO:29 及 30) 組成之群的三個不同的雙股 siRNA 分子。在某些實施例中，該三個不同的雙股 siRNA 分子之組合係選自實例 3 中所描述之組合中之任一種。

本發明亦提供一種醫藥組成物，其包含一或多種(例如，混合液)本文中所描述之 siRNA 及醫藥學上可接受之載劑。

在某些實施例中，本文中所描述之組成物包含一或多個 siRNA 分子，其使 B 型肝炎病毒基因之表現靜默。

在另一態樣中，本發明提供一種靶向 HBV 基因表現之核酸-脂質粒子。核酸-脂質粒子典型地包含一或多種(例如，混合液)本文中所描述之經分離之雙股 siRNA 分子(例如，如表 A 中所描述)、陽離子脂質及非陽離子脂質。在某些情況下，核酸-脂質粒子進一步包含抑制粒子聚集之結合脂質。核酸-脂質粒子較佳包含一或多種(例如，混合液)本文中所描述之經分離之雙股 siRNA 分子、陽離子脂質、非陽離子脂質及抑制粒子聚集之結合脂質。

在某些實施例中，該核酸-脂質粒子包含選自由 1m (SEQ ID NO:1

及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)、15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群的兩個不同的雙股siRNA分子。在某些實施例中，該兩個不同的雙股siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。

在某些實施例中，該核酸-脂質粒子包含選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)、15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群的三個不同的雙股siRNA分子。在某些實施例中，該三個不同的雙股siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。

在一些實施例中，本發明之siRNA完全囊封在核酸-脂質粒子中。關於包含siRNA混合液之調配物，混合液(例如，具有不同序列的siRNA化合物)中所存在的不同類型siRNA種類可共同囊封於同一粒子中，或混合液中所存在之各類型siRNA種類可囊封在單獨粒子中。siRNA混合液可使用兩種、三種或更多種個別siRNA (各自具有獨特序列)以相同、相似或不同的濃度或莫耳比之混合物調配於本文中所描

述之粒子中。在一個實施例中，使用相同、相似或不同的濃度或莫耳比之各 siRNA 種類調配 siRNA (對應於具有不同的序列的多種 siRNA) 之混合液，且將不同類型之 siRNA 共囊封於同一粒子中。在另一實施例中，混合液中所存在之各類型 siRNA 種類係以相同、相似或不同的 siRNA 濃度或莫耳比囊封在不同的粒子中，且因而形成之粒子(各自含有不同的 siRNA 有效負荷)分開投與(例如，根據治療方案，在不同的時間)，或一起作為單一單位劑量(例如，與醫藥學上可接受之載劑一起)組合併投與。本文中所描述之粒子具有血清穩定性，對核酸酶降解具有抗性，且實質上對諸如人類之哺乳動物無毒。

本發明之核酸-脂質粒子中之陽離子脂質可包含例如具有本文中所描述之式 I 至式 III 之一或多種陽離子脂質或任何其他陽離子脂質種類。在一個實施例中，陽離子脂質為二烷基脂質。在另一實施例中，陽離子脂質為三烷基脂質。在一個特定實施例中，陽離子脂質係選自由以下各項組成之群：1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15))、2,2-二亞麻基-4-(2-二甲基胺基乙基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亞麻基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-DMA)、二亞麻基甲基-3-二甲基胺基丙酸酯(DLin-M-C2-DMA)、4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(DLin-M-C3-DMA；化合物(7))、其鹽及其混合物。

在另一特定實施例中，陽離子脂質係選自由以下各項組成之

群：1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15))、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(DLin-MP-DMA；化合物(8))、4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7))、5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13))、其鹽及其混合物。

在某些實施例中，陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約48莫耳%至約62莫耳%。

本發明之核酸-脂質粒子中的非陽離子脂質可包含例如一或多種陰離子脂質及/或中性脂質。在一些實施例中，非陽離子脂質包含以下中性脂質組分之一：(1)磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物；(2)膽固醇或其衍生物；或(3)磷脂。在某些較佳實施例中，磷脂包含二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)或其混合物。在一較佳實施例中，非陽離子脂質為DPPC與膽固醇之混合物。在一較佳實施例中，非陽離子脂質為DSPC與膽固醇之混合物。

在某些實施例中，非陽離子脂質包含磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物，其中該磷脂佔該粒子中所存在之總脂質的約7莫耳%至約17莫耳%且該膽固醇或其衍生物佔該粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約40莫耳%。

本發明之核酸-脂質粒子中之脂質結合物抑制粒子聚集，且可包含例如本文中所描述之脂質結合物中的一或多種。在一個特定實施例

中，脂質結合物包含PEG-脂質結合物。PEG-脂質結合物之實例包括但不限於PEG-DAG結合物、PEG-DAA結合物及其混合物。在某些實施例中，該PEG-脂質結合物係選自由PEG-二醯基甘油(PEG-DAG)結合物、PEG-二烷基氧基丙基(PEG-DAA)結合物、PEG-磷脂結合物、PEG-神經醯胺(PEG-Cer)結合物及其混合物組成之群。在某些實施例中，PEG-脂質結合物為PEG-DAA結合物。在某些實施例中，脂質粒子中之PEG-DAA結合物可包含PEG-二癸基氧基丙基(C₁₀)結合物、PEG-二月桂基氧基丙基(C₁₂)結合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C₁₄)結合物、PEG-二棕櫚基氧基丙基(C₁₆)結合物、PEG-二硬脂基氧基丙基(C₁₈)結合物或其混合物。在某些實施例中，其中PEG-DAA結合物為PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C₁₄)結合物。在另一實施例中，PEG-DAA結合物為化合物(66) (PEG-C-DMA)結合物。在另一實施例中，脂質結合物包含POZ脂質結合物，諸如POZ-DAA結合物。

在某些實施例中，抑制粒子聚集之結合脂質佔粒子中所存在之總脂質的約0.5莫耳%至約3莫耳%。

在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1之總脂質:siRNA質量比。

在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約30 nm至約150 nm之中值直徑。

在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有電子緻密核心。

在一些實施例中，本發明提供核酸-脂質粒子，其包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)一或多種陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約50莫

耳%至約85莫耳%；(c)一或多種非陽離子脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約13莫耳%至約49.5莫耳%；及(d)一或多種抑制粒子聚集之結合脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約0.5莫耳%至約2莫耳%。

在此實施例之一個態樣中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約52莫耳%至約62莫耳%；(c)磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約36莫耳%至約47莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約1莫耳%至約2莫耳%。在一個特定實施例中，調配物為四組分系統，其包含約1.4莫耳% PEG-脂質結合物(例如，PEG2000-C-DMA)、約57.1莫耳%陽離子脂質(例如，DLin-K-C2-DMA)或其鹽、約7.1莫耳% DPPC (或DSPC)及約34.3莫耳%膽固醇(或其衍生物)。

在此實施例之另一態樣中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約56.5莫耳%至約66.5莫耳%；(c)膽固醇或其衍生物，其佔粒子中所存在之總膽固醇的約31.5莫耳%至約42.5莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約1莫耳%至約2莫耳%。在一個特定實施例中，調配物為三組分系統，其不含磷脂且包含約1.5莫耳% PEG -脂質結合物(例如，PEG2000-C-DMA)、約61.5莫耳%陽離子脂質(例如，DLin-K-C2-DMA)或其鹽及約36.9莫耳%膽固醇(或其衍生物)。

其他調配物描述於PCT公開案第WO 09/127060號及已公開之美國

專利申請公開案第US 2011/0071208 A1號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在其他實施例中，本發明提供核酸-脂質粒子，其包含：(a) 一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)一或多種陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約2莫耳%至約50莫耳%；(c)一或多種非陽離子脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約90莫耳%；及(d)一或多種抑制粒子聚集之結合脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約0.5莫耳%至約20莫耳%。

在此實施例之一個態樣中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約30莫耳%至約50莫耳%；(c)磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約47莫耳%至約69莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約1莫耳%至約3莫耳%。在一個特定實施例中，調配物為四組分系統，其包含約2莫耳% PEG-脂質結合物(例如，PEG2000-C-DMA)、約40莫耳%陽離子脂質(例如，DLin-K-C2-DMA)或其鹽、約10莫耳% DPPC (或DSPC)及約48莫耳%膽固醇(或其衍生物)。

在其他實施例中，本發明提供核酸-脂質粒子，其包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)一或多種陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約50莫耳%至約65莫耳%；(c)一或多種非陽離子脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約45莫耳%；及(d)一或多種抑制粒子聚集之結

合脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約10莫耳%。

在此實施例之一個態樣中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約50莫耳%至約60莫耳%；(c)磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約35莫耳%至約45莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約10莫耳%。在某些情況下，調配物中之非陽離子脂質混合物包含：(i)佔粒子中所存在之總脂質之約5莫耳%至約10莫耳%的磷脂；及(ii)佔粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約35莫耳%的膽固醇或其衍生物。在一個特定實施例中，調配物為四組分系統，其包含約7莫耳% PEG-脂質結合物(例如，PEG750-C-DMA)、約54莫耳%陽離子脂質(例如，DLin-K-C2-DMA)或其鹽、約7莫耳% DPPC (或DSPC)及約32莫耳%膽固醇(或其衍生物)。

在此實施例之另一態樣中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約55莫耳%至約65莫耳%；(c)膽固醇或其衍生物，其佔粒子中所存在之總膽固醇的約30莫耳%至約40莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約10莫耳%。在一個特定實施例中，調配物為三組分系統，其不含磷脂且包含約7莫耳% PEG-脂質結合物(例如，PEG750-C-DMA)、約58莫耳%陽離子脂質(例如，DLin-K-C2-DMA)或其鹽及約35莫耳%膽固醇(或其衍生物)。

適用調配物之其他實施例描述於已公開之美國專利申請公開案

第US 2011/0076335 A1號中，該案出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在本發明之某些實施例中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約48莫耳%至約62莫耳%；(c)磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物，其中磷脂佔粒子中所存在之總脂質的約7莫耳%至約17莫耳%且其中膽固醇或其衍生物佔粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約40莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約0.5莫耳%至約3.0莫耳%。下文包括本發明之此態樣的例示性脂質調配物A-Z。

例示性脂質調配物A包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.2%)、陽離子脂質(53.2%)、磷脂(9.3%)、膽固醇(36.4%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.2%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (53.2%)，磷脂為DPPC (9.3%)，且膽固醇以36.4%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物A，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物A可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的

siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物A可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物B包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(0.8%)、陽離子脂質(59.7%)、磷脂(14.2%)、膽固醇(25.3%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (0.8%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (59.7%)，磷脂為DSPC (14.2%)，且膽固醇以25.3%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物B，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物B可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些

其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物B可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中的任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物C包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.9%)、陽離子脂質(52.5%)、磷脂(14.8%)、膽固醇(30.8%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (1.9%)，陽離子脂質為1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15)) (52.5%)，磷脂為DSPC (14.8%)，且膽固醇以30.8%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物C，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物C可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調

配物C可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物D包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(0.7%)、陽離子脂質(60.3%)、磷脂(8.4%)、膽固醇(30.5%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (0.7%)，陽離子脂質為3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(DLin-MP-DMA；化合物(8)) (60.3%)，磷脂為DSPC (8.4%)，且膽固醇以30.5%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物D，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物D可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例

中，基於核酸脂質粒子之調配物D可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物E包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比): PEG-脂質(1.8%)、陽離子脂質(52.1%)、磷脂(7.5%)、膽固醇(38.5%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.8%)，陽離子脂質為4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7)) (52.1%)，磷脂為DPPC (7.5%)，且膽固醇以38.5%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物E，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物E可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子

之調配物E可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物F包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(0.9%)、陽離子脂質(57.1%)、磷脂(8.1%)、膽固醇(33.8%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (0.9%)，陽離子脂質為1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15)) (57.1%)，磷脂為DSPC (8.1%)，且膽固醇以33.8%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物F，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物F可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在

某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物F可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物G包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.7%)、陽離子脂質(61.6%)、磷脂(11.2%)、膽固醇(25.5%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (1.7%)，陽離子脂質為1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15)) (61.6%)，磷脂為DSPC (11.2%)，且膽固醇以25.5%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物G，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物G可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一

種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物G可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物H包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.1%)、陽離子脂質(55.0%)、磷脂(11.0%)、膽固醇(33.0%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.1%)，陽離子脂質為5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13)) (55.0%)，磷脂為DSPC (11.0%)，且膽固醇以33.0%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物H，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物H可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒

子之調配物H可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物I包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比): PEG-脂質(2.6%)、陽離子脂質(53.1%)、磷脂(9.4%)、膽固醇(35.0%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(**66**)) (2.6%)，陽離子脂質為5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(**13**)) (53.1%)，磷脂為DSPC (9.4%)，且膽固醇以35.0%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物I，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物I可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之

調配物I可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物J包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(0.6%)、陽離子脂質(59.4%)、磷脂(10.2%)、膽固醇(29.8%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (0.6%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (59.4%)，磷脂為DPPC (10.2%)，且膽固醇以29.8%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物J，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物J可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物J可包含三個不同的

siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物K包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(0.5%)、陽離子脂質(56.7%)、磷脂(13.1%)、膽固醇(29.7%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (0.5%)，陽離子脂質為4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7)) (56.7%)，磷脂為DSPC (13.1%)，且膽固醇以29.7%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物K，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物K可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物K可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA

分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物L包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.2%)、陽離子脂質(52.0%)、磷脂(9.7%)、膽固醇(36.2%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (2.2%)，陽離子脂質為1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15)) (52.0%)，磷脂為DSPC (9.7%)，且膽固醇以36.2%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物L，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物L可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物L可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之

組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物M包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.7%)、陽離子脂質(58.4%)、磷脂(13.1%)、膽固醇(25.7%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (2.7%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (58.4%)，磷脂為DPPC (13.1%)，且膽固醇以25.7%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物M，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物M可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物M可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描

述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物N包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(3.0%)、陽離子脂質(53.3%)、磷脂(12.1%)、膽固醇(31.5%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (3.0%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (53.3%)，磷脂為DPPC (12.1%)，且膽固醇以31.5%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物N，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物N可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物N可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至

約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物O包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.5%)、陽離子脂質(56.2%)、磷脂(7.8%)、膽固醇(34.7%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.5%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (56.2%)，磷脂為DPPC (7.8%)，且膽固醇以34.7%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物O，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物O可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物O可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1

或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物P包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.1%)、陽離子脂質(48.6%)、磷脂(15.5%)、膽固醇(33.8%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (2.1%)，陽離子脂質為3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(DLin-MP-DMA；化合物(8)) (48.6%)，磷脂為DSPC (15.5%)，且膽固醇以33.8%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物P，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物P可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物P可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分

數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物Q包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.5%)、陽離子脂質(57.9%)、磷脂(9.2%)、膽固醇(30.3%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(**66**)) (2.5%)，陽離子脂質為5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(**13**)) (57.9%)，磷脂為DSPC (9.2%)，且膽固醇以30.3%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物Q，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Q可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Q可包含三個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總

脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物R包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.6%)、陽離子脂質(54.6%)、磷脂(10.9%)、膽固醇(32.8%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.6%)，陽離子脂質為3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(化合物(8)) (54.6%)，磷脂為DSPC (10.9%)，且膽固醇以32.8%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物R，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物R可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物R可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中

之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物S包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.9%)、陽離子脂質(49.6%)、磷脂(16.3%)、膽固醇(31.3%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (2.9%)，陽離子脂質為5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13)) (49.6%)，磷脂為DPPC (16.3%)，且膽固醇以31.3%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物S，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物S可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物S可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總

脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物T包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(0.7%)、陽離子脂質(50.5%)、磷脂(8.9%)、膽固醇(40.0%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (0.7%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (50.5%)，磷脂為DPPC (8.9%)，且膽固醇以40.0%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物T，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物T可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物T可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實

施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物U包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.0%)、陽離子脂質(51.4%)、磷脂(15.0%)、膽固醇(32.6%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (1.0%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (51.4%)，磷脂為DSPC (15.0%)，且膽固醇以32.6%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物U，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物U可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物U可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，

8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物V包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.3%)、陽離子脂質(60.0%)、磷脂(7.2%)、膽固醇(31.5%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (1.3%)，陽離子脂質為1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA) (60.0%)，磷脂為DSPC (7.2%)，且膽固醇以31.5%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物V，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物V可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物V可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、

9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物W包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.8%)、陽離子脂質(51.6%)、磷脂(8.4%)、膽固醇(38.3%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.8%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (51.6%)，磷脂為DSPC (8.4%)，且膽固醇以38.3%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物W，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物W可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物W可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物X包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.4%)、陽離子脂質(48.5%)、磷脂(10.0%)、膽固醇(39.2%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (2.4%)，陽離子脂質為1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15)) (48.5%)，磷脂為DPPC (10.0%)，且膽固醇以39.2%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物X，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物X可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物X可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物Y包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.6%)、陽離子脂質(61.2%)、磷脂(7.1%)、膽固醇(29.2%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(**66**)) (2.6%)，陽離子脂質為5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(**13**)) (61.2%)，磷脂為DSPC (7.1%)，且膽固醇以29.2%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物Y，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Y可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Y可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物Z包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.2%)、陽離子脂質(49.7%)、磷脂(12.1%)、膽固醇(36.0%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (2.2%)，陽離子脂質為4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7)) (49.7%)，磷脂為DPPC (12.1%)，且膽固醇以36.0%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物Z，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Z可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Z可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

因此，本發明之某些實施例提供一種本文中所描述之核酸-脂質粒子，其中該等脂質係如調配物A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y或Z中之任一種中所描述加以調配。

本發明亦提供包含核酸-脂質粒子及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組成物。

本發明之核酸-脂質粒子適用於例如治療性遞送使一或多個HBV基因之表現靜默的siRNA。在一些實施例中，將靶向HBV基因或轉錄產物之不同區域(例如重疊及/或不重疊序列)的siRNA之混合液調配成相同或不同的核酸-脂質粒子，且將該等粒子投與需要該治療之哺乳動物(例如，人類)。在某些情況下，可向哺乳動物投與治療有效量之核酸-脂質粒子，例如，用於在人類中治療HBV及/或HDV感染。

在某些實施例中，本發明提供一種將本文中所描述之一或多種siRNA分子引入細胞中之方法，其係藉由使該細胞與本文中所描述之核酸-脂質粒子接觸。

在某些實施例中，本發明提供一種用於將使B型肝炎病毒基因之表現靜默的一或多種siRNA分子引入細胞中之方法，該方法係藉由使該細胞與本文中所描述之核酸-脂質粒子在siRNA藉以進入該細胞且使該細胞內之該B型肝炎病毒基因之表現靜默的條件下接觸。在某些實施例中，該細胞處於諸如人類之哺乳動物中。在某些實施例中，該人類已被診斷患有B型肝炎病毒感染或B型肝炎病毒/D型肝炎病毒感染。在某些實施例中，B型肝炎病毒基因表現之靜默使哺乳動物中之B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒粒子負載相對於不存在核酸-脂質粒子

時之**B**型肝炎病毒及/或**D**型肝炎病毒粒子負載減少至少約50% (例如，約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。

在某些實施例中，本發明提供一種用於在細胞中使**B**型肝炎病毒基因之表現靜默的方法，該方法包括使包含已表現之**B**型肝炎病毒基因的細胞與本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)在siRNA藉以進入該細胞且使該細胞內之**B**型肝炎病毒基因表現靜默之條件下接觸的步驟。在某些實施例中，該細胞處於諸如人類之哺乳動物中。在某些實施例中，該人類已被診斷患有**B**型肝炎病毒感染或**B**型肝炎病毒/**D**型肝炎病毒感染。在某些實施例中，該人類已被診斷患有由**B**型肝炎病毒感染或**B**型肝炎病毒/**D**型肝炎病毒感染所造成之肝病。。在某些實施例中，**B**型肝炎病毒基因表現之靜默使哺乳動物中之**B**型肝炎病毒及/或**D**型肝炎病毒粒子負載相對於不存在核酸-脂質粒子時之**B**型肝炎病毒及/或**D**型肝炎病毒粒子負載減少至少約50% (例如，約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。

在一些實施例中，藉由以下投與途徑之一來投與本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)：經口、鼻內、靜脈內、腹膜內、肌肉內、關節內、病灶內、氣管內、皮下及皮內。在特定實施例中，例如經由經腸或非經腸投與途徑全身投與核酸-脂質粒子。

在某些態樣中，本發明提供用於在有需要之哺乳動物(例如，人類)中使**HBV**基因表現靜默之方法，該方法包括向該哺乳動物投與治

療有效量之包含本文中所描述之一或多種siRNA (例如，表A中所示之一或多種siRNA)的核酸-脂質粒子。在一些實施例中，投與包含本文中所描述之一或多種siRNA的核酸-脂質粒子使HBV RNA水準相對於在不存在該siRNA時(例如，緩衝液對照或無關非HBV靶向siRNA對照)所偵測之HBV RNA水準減少至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中之任何範圍)。在其他實施例中，投與包含一或多種HBV靶向siRNA之核酸-脂質粒子使HBV RNA水準相對於負對照(例如，諸如緩衝液對照或無關非HBV靶向siRNA對照)減少至少約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、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100天或更多天(或其中之任何範圍)。

在其他態樣中，本發明提供用於在有需要之哺乳動物(例如，人類)中使HBV基因表現靜默之方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療有效量之包含本文中所描述之一或多種siRNA (例如，表A中所描述之siRNA)的核酸-脂質粒子。在一些實施例中，投與包含一或多種HBV siRNA之核酸-脂質粒子使HBV mRNA水準相對於在不存在該siRNA時(例如，緩衝液對照或無關非HBV靶向siRNA對照)所偵測之HBV mRNA水準減少至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中之任何範圍)。在其他實施例中，投與包含一或多種HBV靶向siRNA之核酸-脂質粒子使HBV mRNA水準相對於負對照(例如，諸如緩衝液對照或無關非HBV靶向siRNA對照)減少至少約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、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100天或更多天(或其中之任何範圍)。

本發明之某些實施例提供本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)，其係用於在哺乳動物(例如，人類)中之細胞中使B型肝炎病毒基因之表現靜默。

本發明之某些實施例提供本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)之用途，其係用以製備用於在哺乳動物(例如，人類)中之細胞中使B型肝炎病毒基因之表現靜默的藥劑。

在其他態樣中，本發明提供用於在有需要之哺乳動物(例如，人類)中治療、預防HBV及/或HDV感染、降低罹患其之風險或可能性(例如，降低易感染性)、延遲其發作及/或改善一或多與其相關之症狀的方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療有效量之包含本文中所描述之靶向HBV基因表現之一或多種siRNA (例如，如表A中所描述)的核酸-脂質粒子。人類中與HBV及/或HDV感染相關之症狀的實例包括發燒、腹痛、尿液色深、關節疼痛、食欲不振、噁心、嘔吐、虛弱、疲勞及皮膚發黃(黃疸)。

本發明之某些實施例提供一種用於在哺乳動物中治療B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染之方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療

有效量之如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)的步驟。

本發明之某些實施例提供一種核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)，其係用於在哺乳動物(例如，人類)中治療B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染。

本發明之某些實施例提供核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)之用途，其係用以製備用於在哺乳動物(例如，人類)中治療B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染之藥劑。

本發明之某些實施例提供一種用於在哺乳動物中改善與B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染相關之一或多種症狀的方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療有效量之包含本文中所描述之一或多種siRNA分子(例如，如表A中所描述)的本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)的步驟。在某些實施例中，粒子係經由全身途徑投與。在某些實施例中，核酸-脂質粒子之siRNA抑制B型肝炎病毒基因在哺乳動物中之表現。在某些實施例中，哺乳動物為人類。在某些實施例中，人類患有肝病。

本發明之某些實施例提供一種如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)，其係用於在哺乳動物(例如，人類)中改善一或多種與B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染相關之症狀。

本發明之某些實施例提供如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)之用途，其係用以製備用於在哺乳動物(例如，人類)中改善一或多種與B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染相關之症狀的藥劑。

本發明之某些實施例提供一種用於在哺乳動物(例如，人類)中抑制HDV之複製及/或改善HDV感染之一或多種症狀的方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療有效量之如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)的步驟，其中該核酸-脂質粒子或組成物抑制HBV表面抗原之合成。

本發明之某些實施例提供一種如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)，其係用於在哺乳動物(例如，人類)中抑制HDV之複製及/或改善HDV感染之一或多種症狀，其中該核酸-脂質粒子或組成物抑制HBV表面抗原之合成。

本發明之某些實施例提供如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)的用途，其係用以製備用於在哺乳動物(例如，人類)中抑制HDV之複製及/或改善HDV感染之一或多種症狀的藥劑，其中該核酸-脂質粒子或組成物抑制HBV表面抗原之合成。

本發明之某些實施例提供一種如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)，其係用於醫學療法中。

在其他態樣中，本發明提供用於在有需要之哺乳動物(例如，人類)(例如，罹患HBV感染或HBV/HDV感染之人類)中使HBV及/或HDV不活化之方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療有效量之包含本文中所描述之靶向HBV基因表現之一或多種siRNA的核酸-脂質粒子。在一些實施例中，投與包含一或多種HBV靶向siRNA之核酸-脂質粒子使HBV蛋白水準(例如，HBV表面抗原蛋白)相對於不存在該siRNA時(例如，緩衝液對照或無關非HBV靶向siRNA對照)所偵測之HBV蛋白水準下降、減少或降低至少約5%、10%、15%、20%、

25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%（或其中之任何範圍）。

舉例而言，可使用分支DNA測定法(QuantiGene®；Affymetrix)量測HBV mRNA。分支DNA測定法為使用bDNA分子擴增來自所俘獲之靶RNA之信號的夾心核酸雜交法。

除其在出於治療目的使任一HBV基因之表現靜默方面之效用以外，本文中所描述之siRNA亦適用於研究及開發應用以及診斷、預防、預後、臨床及其他健康照護應用。作為一非限制性實例，siRNA可用於針對測試HBV基因家族之特定成員是否具有作為治療標靶之潛力的標靶驗證研究。

產生siRNA分子

siRNA可呈若干形式提供，包括例如作為一或多個經分離之小干擾RNA (siRNA)雙鏈體、作為較長之雙股RNA (dsRNA)或作為自DNA質體中之轉錄卡匣轉錄之siRNA或dsRNA。在一些實施例中，可由酶或藉由部分/總有機合成來產生siRNA，且可藉由活體外酶促或有機合成來引入經修飾之核糖核苷酸。在某些情況下，各股係以情況化學方式製備。合成RNA分子之方法在此項技術中為已知的，例如，如Verma及Eckstein (1998)中所描述或如本文中所描述之化學合成方法。

用於分離RNA、合成RNA、使核酸雜交、製造及篩選cDNA庫及進行PCR之方法在此項技術中為熟知的(參見例如Gubler及Hoffman, Gene, 25:263-269 (1983)；Sambrook等人，同上；Ausubel等人，同

上)，PCR方法同樣如此(參見例如美國專利第4,683,195號及第4,683,202號；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis等人編，1990))。表現庫對於熟習此項技術者亦為熟知的。揭示本發明所使用之一般方法的其他基本文稿包括 Sambrook 等人，Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第2版，1989)；Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990)；及Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人編，1994)。此等參考文獻之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

siRNA較佳由化學方式合成。包含本發明之siRNA分子的寡核苷酸可使用此項技術中已知的多種技術中的任一種來合成，諸如以下文獻中所描述之彼等技術：Usman等人，J. Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987)；Scaringe等人，Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990)；Wincott等人，Nucl. Acids Res., 23:2677-2684 (1995)；及Wincott等人，Methods Mol. Bio., 74:59 (1997)。寡核苷酸之合成利用常用核酸保護基及偶合基，諸如5'端之二甲氧基三苯甲基及3'端之亞磷醯胺。作為一非限制性實例，可在Applied Biosystems合成器上使用0.2 μmol 規模方案進行小規模合成。或者，0.2 μmol 規模之合成可在得自Protogene (Palo Alto, CA)之96孔板合成器上進行。然而，更大或更小之合成規模亦在本發明之範疇內。用於寡核苷酸合成之適合試劑、用於RNA脫保護之方法及用於RNA純化之方法對於熟習此項技術者為已知的。

可由兩個不同的寡核苷酸組裝siRNA分子，其中一個寡核苷酸包含siRNA之有義股且另一個包含siRNA之反義股。舉例而言，可分開合成各股且在合成及/或脫保護之後藉由雜交或連接而接合在一起。

含有治療性核酸之載劑系統

A. 脂質粒子

在某些態樣中，本發明提供包含一或多種siRNA分子(例如，表A中所描述之一或多種siRNA分子)及一或多種陽離子(胺基)脂質或其鹽的脂質粒子。在一些實施例中，本發明之脂質粒子進一步包含一或多種非陽離子脂質。在其他實施例中，脂質粒子進一步包含一或多種能够减少或抑制粒子聚集之結合脂質。

本發明之脂質粒子較佳包含一或多種siRNA分子(例如，表A中所描述之siRNA分子)、陽離子脂質、非陽離子脂質及抑制粒子聚集之結合脂質。在一些實施例中，將siRNA分子完全囊封在脂質粒子之脂質部分內，使得脂質粒子中之siRNA分子在水溶液中對核酸酶降解具有抗性。在其他實施例中，本文中所描述之脂質粒子實質上對諸如人類之哺乳動物無毒。本發明之脂質粒子典型地具有約30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm或約70至約90 nm之平均直徑。在某些實施例中，本發明之脂質粒子具有約30 nm至約150 nm之中值直徑。本發明之脂質粒子亦典型地具有約1:1至約100:1、約1:1至約50:1、約2:1至約25:1、約3:1至約20:1、約5:1至約15:1或約5:1至約10:1之脂質:核酸比(例如，脂質:siRNA比)(質量/質量比)。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1之脂質:siRNA質量比。

在較佳實施例中，本發明之脂質粒子為血清穩定性核酸-脂質粒子，其包含一或多種siRNA分子(例如，如表A中所描述之siRNA分子)、陽離子脂質(例如，如本文中所闡述之一或多種具有式I至式III

之陽離子脂質或其鹽)、非陽離子脂質(例如,一或多種磷脂與膽固醇之混合物)及抑制粒子聚集之結合脂質(例如,一或多種PEG-脂質結合物)。脂質粒子可包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個靶向本文中所描述之一或多個基因的siRNA分子(例如,表A中所描述之siRNA分子)。核酸-脂質粒子及其製備方法描述於例如美國專利第5,753,613號、第5,785,992號、第5,705,385號、第5,976,567號、第5,981,501號、第6,110,745號及第6,320,017號以及PCT公開案第WO 96/40964號中,其揭示內容各自出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在本發明之核酸-脂質粒子中,一或多個siRNA分子(例如,如表A中所描述之siRNA分子)可完全囊封在粒子之脂質部分內,從而保護siRNA免於核酸酶降解。在某些情況下,核酸-脂質粒子中之siRNA在該粒子於37℃下暴露於核酸酶至少約20、30、45或60分鐘之後實質上不降解。在某些其他情況下,核酸-脂質粒子中之siRNA在該粒子在37℃下於血清中培育至少約30、45或60分鐘或至少約2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34或36小時之後實質上不降解。在其他實施例中,使siRNA與該粒子之脂質部分複合。本發明調配物之益處之一為核酸-脂質粒子組成物對諸如人類之哺乳動物實質上無毒。

術語「完全囊封」指示核酸-脂質粒子中之siRNA(例如,如表A中所描述之siRNA分子)在暴露於血清或會顯著降解游離DNA或RNA之核酸酶測定之後不顯著降解。在完全囊封之系統中,在正常將降解100%游離siRNA之治療中,較佳少於約25%之處於粒子中之siRNA降

解，更佳少於約10%且最佳少於約5%之處於粒子中之siRNA降解。

「完全囊封」亦指示核酸-脂質粒子為血清穩定的，亦即，其在活體內投與後不快速分解成其組成部分。

在核酸之情形下，完全囊封可藉由進行使用當與核酸締合時具有增強之螢光的染料的膜不滲透性螢光染料排除測定法來測定。諸如OliGreen[®]及RiboGreen[®] (Invitrogen Corp. ; Carlsbad, CA)之特定染料可用於質體DNA、單股脫氧核糖核苷酸及/或單股或雙股核糖核苷酸之定量測定。囊封係藉由向脂質體調配物中添加染料，量測所產生之螢光且將其與添加少量非離子清潔劑後所觀測之螢光相比較來測定。清潔劑介導之脂質體雙層破環釋放所囊封之核酸，從而允許其與膜不滲透性染料相互作用。核酸囊封率可計算為 $E = (I_0 - I)/I_0$ ，其中I及I₀係指添加清潔劑前後之螢光強度(參見Wheeler等人, Gene Ther., 6:271-281 (1999))。

在其他實施例中，本發明提供一種核酸-脂質粒子組成物，其包含多種核酸-脂質粒子。

在一些情況下，核酸-脂質粒子組成物包含完全囊封在粒子之脂質部分內的siRNA分子，使得約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約30%至約95%、約40%至約95%、約50%至約95%、約60%至約95%、約70%至約95%、約80%至約95%、約85%至約95%、約90%至約95%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%或至少約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、

75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99% (或其任何分數或其中之範圍)之粒子中囊封有 siRNA。

在其他情況下，核酸-脂質粒子組成物包含完全囊封在粒子之脂質部分內的 siRNA 分子，使得約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約30%至約95%、約40%至約95%、約50%至約95%、約60%至約95%、約70%至約95%、約80%至約95%、約85%至約95%、約90%至約95%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%或至少約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99% (或其任何分數或其中之範圍)之輸入 siRNA 囊封在粒子中。

視本發明之脂質粒子之預定用途而定，組分之比例可變化且特定調配物之遞送效率可使用例如核內體釋放參數(ERP)測定法加以量測。

1. 陽離子脂質

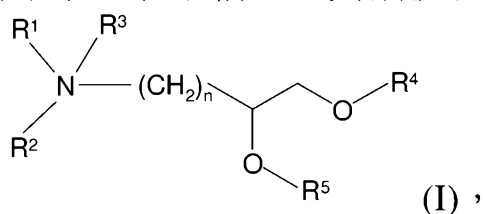
多種陽離子脂質或其鹽中之任一種均可單獨或與一或多種其他陽離子脂質種類或非陽離子脂質種類組合用於本發明之脂質粒子中。陽離子脂質包括其(R)及/或(S)對映異構體。

在本發明之一個態樣中，陽離子脂質為二烷基脂質。舉例而言，二烷基脂質可包括包含兩個飽和或不飽和烷基鏈之脂質，其中該

等烷基鏈各自可經取代或未經取代。在某些實施例中，該兩個烷基鏈各自包含至少例如8個碳原子、10個碳原子、12個碳原子、14個碳原子、16個碳原子、18個碳原子、20個碳原子、22個碳原子或24個碳原子。

在本發明之一個態樣中，陽離子脂質為三烷基脂質。舉例而言，三烷基脂質可包括包含三個飽和或不飽和烷基鏈之脂質，其中該等烷基鏈各自可經取代或未經取代。在某些實施例中，該三個烷基鏈各自包含至少例如8個碳原子、10個碳原子、12個碳原子、14個碳原子、16個碳原子、18個碳原子、20個碳原子、22個碳原子或24個碳原子。

在一個態樣中，具有以下結構之式I陽離子脂質適用於本發明：



或其鹽，其中：

R^1 與 R^2 相同或不同且獨立地為氫(H)或視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基，或 R^1 與 R^2 可接合以形成具有4至6個碳原子及1或2個選自由氮(N)、氧(O)及其混合物組成之群的雜原子的視情況經取代之雜環；

R^3 不存在或為氫(H)或 C_1 - C_6 烷基以提供四級胺；

R^4 與 R^5 相同或不同且獨立地為視情況經取代之 C_{10} - C_{24} 烷基、 C_{10} - C_{24} 烯基、 C_{10} - C_{24} 炔基或 C_{10} - C_{24} 醯基，其中 R^4 及 R^5 中至少一者包含至少兩個不飽和位點；且

n 為0、1、2、3或4。

在一些實施例中， R^1 及 R^2 獨立地為視情況經取代之 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。在一個較佳實施例中， R^1 及 R^2 均為甲基。在其他較佳實施例中， n 為1或2。在其他實施例中，當pH值高於陽離子脂質之 pK_a 時 R^3 不存在且當pH值低於陽離子脂質之 pK_a 時 R^3 為氫，以便將胺基頭部基團質子化。在一替代實施例中， R^3 為視情況經取代之 C_1 - C_4 烷基以提供四級胺。在其他實施例中， R^4 及 R^5 獨立地為視情況經取代之 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烷基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烯基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 炔基或 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 醯基，其中 R^4 及 R^5 中至少一者包含至少兩個不飽和位點。

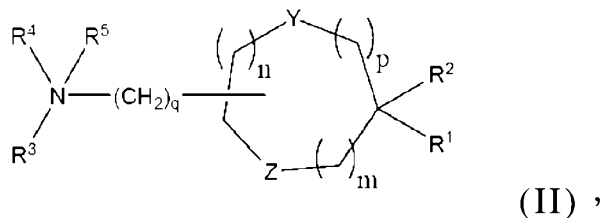
在某些實施例中， R^4 及 R^5 獨立地選自由十二碳二烯基部分、十四碳二烯基部分、十六碳二烯基部分、十八碳二烯基部分、二十碳二烯基部分、十二碳三烯基部分、十四碳三烯基部分、十六碳三烯基部分、十八碳三烯基部分、二十碳三烯基部分、花生四烯醯基部分及二十二碳六烯醯基部分以及其醯基衍生物(例如，亞麻醯基、次亞麻醯基、 γ -亞麻醯基等)組成之群。在一些情況下， R^4 及 R^5 之一包含分支鏈烷基(例如植烷基部分)或其醯基衍生物(例如，植烷醯基部分)。在某些情況下，十八碳二烯基部分為亞麻基部分。在某些其他情況下，十八碳三烯基部分為次亞麻基部分或 γ -次亞麻基部分。在某些實施例中， R^4 及 R^5 均為亞麻基部分、次亞麻基部分或 γ -次亞麻基部分。在特定實施例中，式I之陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亞麻基氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-DLinDMA)、1,2-二亞麻醯氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-

DLinDAP)或其混合物。

在一些實施例中，式I之陽離子脂質與一或多個陰離子形成鹽(較佳為結晶鹽)。在一個特定實施例中，式I之陽離子脂質為其草酸(例如，半草酸)鹽，該鹽較佳為結晶鹽。

諸如DLinDMA及DLenDMA以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於美國專利公開案第20060083780號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。諸如C2-DLinDMA及C2-DLinDAP以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於國際專利申請案第WO2011/000106號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在另一態樣中，具有以下結構之式II之陽離子脂質(或其鹽)適用於本發明：



其中 R^1 與 R^2 相同或不同且獨立地為視情況經取代之 C_{12} - C_{24} 烷基、 C_{12} - C_{24} 烯基、 C_{12} - C_{24} 炔基或 C_{12} - C_{24} 醯基； R^3 與 R^4 相同或不同且獨立地為視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基，或 R^3 與 R^4 可接合以形成具有4至6個碳原子及1或2個選自氮及氧之雜原子的視情況經取代之雜環； R^5 不存在或為氫(H)或 C_1 - C_6 烷基以提供四級胺； m 、 n 及 p 相同或不同且獨立地為0、1或2，其限制條件為 m 、 n 及 p 不同時為0； q 為0、1、2、3或4；且 Y 與 Z 相同或不同且獨立地為O、S或NH。在一較佳實施例中， q 為2。

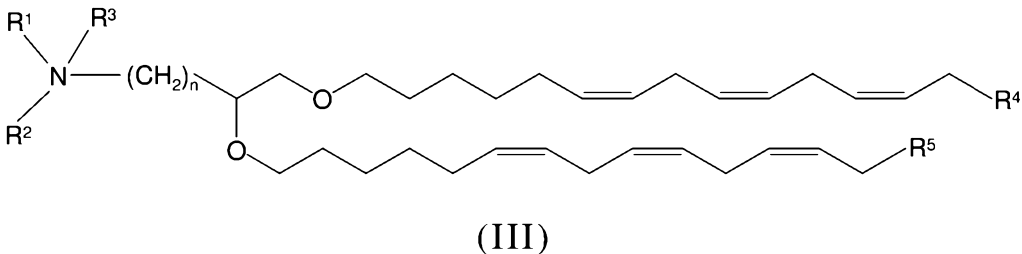
在一些實施例中，式II之陽離子脂質為2,2-二亞麻基-4-(2-二甲基胺基乙基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-C2-DMA；「XTC2」或「C2K」)、2,2-二亞麻基-4-(3-二甲基胺基丙基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-C3-DMA；「C3K」)、2,2-二亞麻基-4-(4-二甲基胺基丁基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-C4-DMA；「C4K」)、2,2-二亞麻基-5-二甲基胺基甲基-[1,3]-二噁烷(DLin-K6-DMA)、2,2-二亞麻基-4-N-甲基哌嗪基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-MPZ)、2,2-二亞麻基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-DMA)、2,2-二油醯基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DO-K-DMA)、2,2-二硬脂醯基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DS-K-DMA)、2,2-二亞麻基-4-N-嗎啉基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-MA)、2,2-二亞麻基-4-三甲基胺基-[1,3]-二氧戊環氯化物(DLin-K-TMA.Cl)、2,2-二亞麻基-4,5-雙(二甲基胺基甲基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-K²-DMA)、2,2-二亞麻基-4-甲基哌嗪-[1,3]-二氧戊環(D-Lin-K-N-甲基哌嗪)或其混合物。在較佳實施例中，式II之陽離子脂質為DLin-K-C2-DMA。

在一些實施例中，式II之陽離子脂質與一或多個陰離子形成鹽(較佳為結晶鹽)。在一個特定實施例中，式II之陽離子脂質為其草酸(例如，半草酸)鹽，該鹽較佳為結晶鹽。

諸如DLin-K-DMA以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於PCT公開案第WO 09/086558號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。諸如DLin-K-C2-DMA、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLin-K6-DMA、DLin-K-MPZ、DO-K-DMA、DS-K-DMA、DLin-K-MA、DLin-K-TMA.Cl、DLin-K²-DMA及D-Lin-K-N-甲基哌嗪以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於

2009年10月9日申請之名為「Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids」之PCT申請案第PCT/US2009/060251號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在另一態樣中，具有以下結構之式III陽離子脂質適用於本發明：



或其鹽，其中： R^1 與 R^2 相同或不同且獨立地為視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基，或 R^1 與 R^2 可接合以形成具有4至6個碳原子及1或2個選自由氮(N)、氧(O)及其混合物組成之群的雜原子的視情況經取代之雜環； R^3 不存在或為氫(H)或 C_1 - C_6 烷基以提供四級胺； R^4 及 R^5 不存在或存在且當存在時相同或不同且獨立地為視情況經取代之 C_1 - C_{10} 烷基或 C_2 - C_{10} 烯基；且n為0、1、2、3或4。

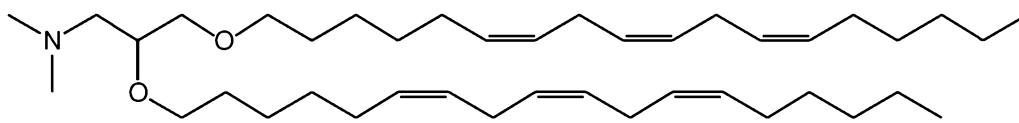
在一些實施例中， R^1 及 R^2 獨立地為視情況經取代之 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。在一較佳實施例中， R^1 及 R^2 均為甲基。在另一較佳實施例中， R^4 及 R^5 均為丁基。在另一較佳實施例中，n為1。在其他實施例中，當pH值高於陽離子脂質之 pK_a 時 R^3 不存在且當pH值低於陽離子脂質之 pK_a 時 R^3 為氫，以便將胺基頭部基團質子化。在一替代實施例中， R^3 為視情況經取代之 C_1 - C_4 烷基以提供四級胺。在其他實施例中， R^4 及 R^5 獨立地為視情況經取代之 C_2 - C_6 或 C_2 - C_4 烷基或 C_2 - C_6 或 C_2 - C_4 烯基。

在一替代實施例中，式III之陽離子脂質包含介於胺基頭部基團

與兩個烷基鏈之一或兩者之間的酯鍵聯。在一些實施例中，式III之陽離子脂質與一或多個陰離子形成鹽(較佳為結晶鹽)。在一個特定實施例中，式III之陽離子脂質為其草酸(例如，半草酸)鹽，該鹽較佳為結晶鹽。

儘管式III中之烷基鏈各自在位置6、9及12上含有順式雙鍵(亦即，順,順,順- $\Delta^6, \Delta^9, \Delta^{12}$)，但在一替代實施例中，兩個烷基鏈之一或兩者中之此等雙鍵中一、二或三個可呈反式構形。

在一尤佳實施例中，式III之陽離子脂質具有以下結構：



γ -DLenDMA (15)。

諸如 γ -DLenDMA (15)以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於2009年7月1日申請之名為「Improved Cationic Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids」之美國臨時申請案第61/222,462號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

諸如DLin-M-C3-DMA (「MC3」)以及其他陽離子脂質(例如，MC3之某些類似物)之陽離子脂質之合成描述於2009年6月10日申請之名為「Novel Lipids and Compositions for the Delivery of Therapeutics」之美國臨時申請案第61/185,800號及2009年12月18日申請之名為「Methods and Compositions for Delivery of Nucleic Acids」之美國臨時申請案第61/287,995號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

可包括在本發明之脂質粒子中的其他陽離子脂質或其鹽之實例包括但不限於陽離子脂質，諸如WO2011/000106中所描述之彼等陽離子脂質，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中；以及陽離子脂質，諸如N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化銨(DODAC)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DODMA)、1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DSDMA)、N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨(DDAB)、N-(1-(2,3-二油醯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)、3-(N-(N',N'-二甲基胺基乙烷)-胺甲醯基)膽固醇(DC-Chol)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥基乙基溴化銨(DMRIE)、2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺-甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙烷三氟乙酸銨(DOSPA)、二(十八烷基)醯胺甘胺醯基精胺(DOGS)、3-二甲基胺基-2-(膽固醇-5-烯-3- β -氧基丁-4-氧基)-1-(順,順-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷(CLinDMA)、2-[5'-(膽固醇-5-烯-3- β -氧基)-3'-氧雜戊氧基]-3-二甲基-1-(順,順-9',12'-十八碳二烯氧基)丙烷(CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油烯基氧基苯甲胺(DMOBA)、1,2-N,N'-二油烯基胺甲醯基-3-二甲基胺基丙烷(DOcarbDAP)、1,2-N,N'-二亞麻基胺甲醯基-3-二甲基胺基丙烷(DLincarbDAP)、1,2-二亞麻基胺甲醯基氧基-3-二甲基胺基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亞麻基氧基-3-(二甲基胺基)乙醯氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亞麻基氧基-3-嗎啉基丙烷(DLin-MA)、1,2-二亞麻醯基-3-二甲基胺基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亞麻基硫-3-二甲基胺基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亞麻醯基-2-亞麻基氧基-3-二甲基胺基丙烷(DLin-2-DMA)、1,2-二亞麻基氧基-3-三

甲基胺基丙烷氯化物鹽(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亞麻醯基-3-三甲基丙烷氯化物鹽(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亞麻基氧基-3-(N-甲基哌嗪基)丙烷(DLin-MPZ)、3-(N,N-二亞麻基胺基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基胺基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亞麻基側氧基-3-(2-N,N-二甲基胺基)環氧丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二油烯基胺甲醯基氧基-3-二甲基胺基丙烷(DO-C-DAP)、1,2-二肉豆蔻基油醯基-3-二甲基胺基丙烷(DMDAP)、1,2-二油醯基-3-三甲基胺基丙烷氯化物(DOTAP.Cl)、二亞麻基甲基-3-二甲基胺基丙酸酯(DLin-M-C2-DMA；亦稱為DLin-M-K-DMA或DLin-M-DMA)及其混合物。可包括在本發明之脂質粒子中的其他陽離子脂質或其鹽描述於美國專利公開案第20090023673號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

諸如CLinDMA以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於美國專利公開案第20060240554號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。諸如DLin-C-DAP、DLinDAC、DlinMA、DLinDAP、DLin-S-DMA、DLin-2-DMAP、DLinTMA.Cl、DLinTAP.Cl、DLinMPZ、DlinAP、DOAP及DLin-EG-DMA以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於PCT公開案第WO 09/086558號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。諸如DO-C-DAP、DMDAP、DOTAP.Cl、DLin-M-C2-DMA以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於2009年10月9日申請之名為「Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids」之PCT申請案第PCT/US2009/060251號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。許多其他陽離子脂質及相

關類似物之合成已描述於美國專利第5,208,036號、第5,264,618號、第5,279,833號、第5,283,185號、第5,753,613號及第5,785,992號以及PCT公開案第WO 96/10390號中，其揭示內容各自出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。另外，可使用陽離子脂質之許多市售製劑，例如，諸如 LIPOFECTIN[®]（包括 DOTMA 及 DOPE，可得自 Invitrogen）； LIPOFECTAMINE[®]（包括 DOSPA 及 DOPE，可得自 Invitrogen）；及 TRANSFECTAM[®]（包括 DOGS，可得自 Promega Corp.）。

在一些實施例中，陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約50莫耳%至約90莫耳%、約50莫耳%至約85莫耳%、約50莫耳%至約80莫耳%、約50莫耳%至約75莫耳%、約50莫耳%至約70莫耳%、約50莫耳%至約65莫耳%、約50莫耳%至約60莫耳%、約55莫耳%至約65莫耳%或約55莫耳%至約70莫耳%（或其任何分數或其中之範圍）。在特定實施例中，陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約50莫耳%、51莫耳%、52莫耳%、53莫耳%、54莫耳%、55莫耳%、56莫耳%、57莫耳%、58莫耳%、59莫耳%、60莫耳%、61莫耳%、62莫耳%、63莫耳%、64莫耳%或65莫耳%（或其任何分數）。

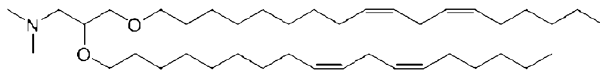
在其他實施例中，陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約2莫耳%至約60莫耳%、約5莫耳%至約50莫耳%、約10莫耳%至約50莫耳%、約20莫耳%至約50莫耳%、約20莫耳%至約40莫耳%、約30莫耳%至約40莫耳%、或約40莫耳%（或其任何分數或其中之範圍）。

適用於本發明之脂質粒子中的陽離子脂質的其他百分比及範圍描述於PCT公開案第WO 09/127060號、美國已公開申請案第US

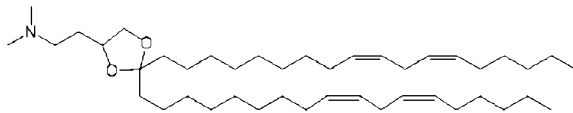
2011/0071208號、PCT公開案第WO2011/000106號及美國已公開申請案第US 2011/0076335號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

應理解，本發明之脂質粒子中所存在之陽離子脂質之百分比為目標量，且調配物中所存在之陽離子脂質之實際量可變化例如 ± 5 莫耳%。舉例而言，在一種例示性脂質粒子調配物中，陽離子脂質之目標量為57.1莫耳%，但陽離子脂質之實際量可為該目標量 ± 5 莫耳%、 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%，調配物之其餘部分由其他脂質組分組成(加和達粒子中所存在之總脂質的100莫耳%；然而，熟習此項技術者應理解，總莫耳%可能由於四捨五入而稍微偏離100%，例如99.9莫耳%或100.1莫耳%)。

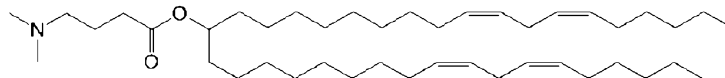
適用於包括在本發明中所使用之脂質粒子中的陽離子脂質之其他實例如下所示：



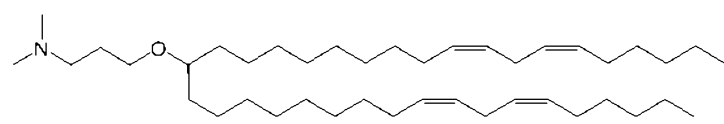
N,N-二甲基-2,3-雙((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)丙-1-胺(5)



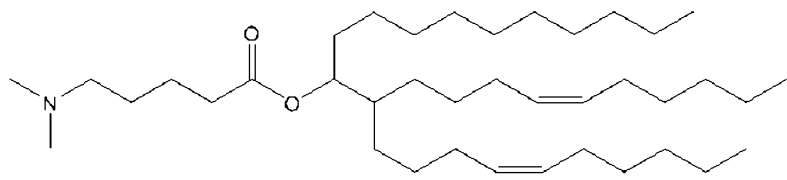
2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊環-4-基)-N,N-二甲基乙胺(6)



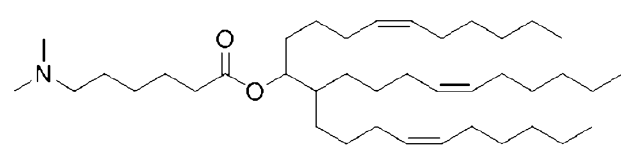
4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(7)



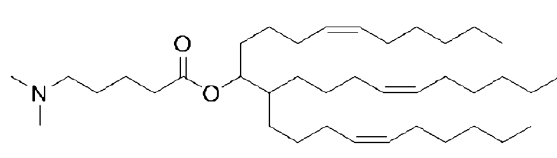
3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(8)



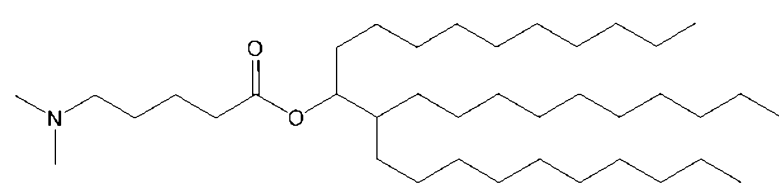
5-(二甲基胺基)戊酸(Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-16-烯-11-基酯(53)



6-(二甲基胺基)己酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(11)



5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(13)



5-(二甲基胺基)戊酸12-癸基二十二烷-11-基酯(14)。

2. 非陽離子脂質

本發明之脂質粒子中所使用之非陽離子脂質可為能够產生穩定複合物之多種中性不帶電、兩性離子或陰離子脂質中之任一種。

非陽離子脂質之非限制性實例包括磷脂，諸如卵磷脂、磷脂醯乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、腦磷脂、心磷脂、磷脂酸、腦苷脂、二鯨蠟基磷酸酯、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼(DPPC)、二油醯基磷脂醯甘油(DOPG)、二棕櫚醯磷脂醯甘油(DPPG)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、棕櫚醯油醯磷脂醯膽鹼(POPC)、棕櫚醯油醯磷脂醯乙醇胺(POPE)、棕櫚醯油醯磷脂醯甘油(POPG)、二油醯基磷脂醯乙醇胺4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕櫚醯磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻醯磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE)、單甲基磷脂醯乙醇胺、二甲基磷脂醯乙醇胺、二反油醯基磷脂醯乙醇胺(DEPE)、硬脂醯油醯磷脂醯乙醇胺(SOPE)、溶血磷脂醯膽鹼、二亞麻醯磷脂醯膽鹼及其混合物。亦可使用其他二醯基磷脂醯膽鹼及二醯基磷脂醯乙醇胺磷脂。此等脂質中之醯基較佳為來源於具有C₁₀-C₂₄碳鏈之脂肪酸的醯基，例如月桂醯基、肉豆蔻醯基、棕櫚醯基、硬脂醯基或油醯基。

非陽離子脂質之其他實例包括固醇，諸如膽固醇及其衍生物。膽固醇衍生物之非限制性實例包括極性類似物，諸如5 α -膽甾烷醇、5 β -膽甾烷醇、膽固醇基-(2'-羥基)-乙醚、膽固醇基-(4'-羥基)-丁基醚及6-酮基膽甾烷醇；非極性類似物，諸如5 α -膽甾烷、膽甾烯酮、5 α -膽甾烷酮、5 β -膽甾烷酮及癸酸膽固醇酯；及其混合物。在較佳實施例中，膽固醇衍生物為極性類似物，諸如膽固醇基-(4'-羥基)-丁基醚。膽固醇基-(2'-羥基)-乙醚之合成描述於PCT公開案第WO

09/127060號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在一些實施例中，脂質粒子中所存在之非陽離子脂質包含一或多種磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物或由其組成。在其他實施例中，脂質粒子中所存在之非陽離子脂質包含一或多種磷脂或由其組成，例如無膽固醇脂質粒子調配物。在其他實施例中，脂質粒子中所存在之非陽離子脂質包含膽固醇或其衍生物或由其組成，例如無磷脂脂質粒子調配物。

適用於本發明中之非陽離子脂質之其他實例包括非含磷脂質，例如，諸如硬脂胺、十二烷胺、十六烷胺、棕櫚酸乙醯酯、蓖麻酸甘油酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸異丙酯、兩性丙烯酸類聚合物、三乙醇胺硫酸月桂酯、烷基芳基硫酸酯聚乙氧基脂肪酸醯胺、二(十八烷基)二甲基溴化銨、神經醯胺、鞘磷脂及其類似物。

在一些實施例中，非陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約10莫耳%至約60莫耳%、約20莫耳%至約55莫耳%、約20莫耳%至約45莫耳%、約20莫耳%至約40莫耳%、約25莫耳%至約50莫耳%、約25莫耳%至約45莫耳%、約30莫耳%至約50莫耳%、約30莫耳%至約45莫耳%、約30莫耳%至約40莫耳%、約35莫耳%至約45莫耳%、約37莫耳%至約45莫耳%或約35莫耳%、36莫耳%、37莫耳%、38莫耳%、39莫耳%、40莫耳%、41莫耳%、42莫耳%、43莫耳%、44莫耳%或45莫耳%(或其任何分數或其中之範圍)。

在脂質粒子含有磷脂與膽固醇或膽固醇衍生物之混合物的實施例中，該混合物可佔粒子中所存在之總脂質的多達約40莫耳%、45莫

耳%、50莫耳%、55莫耳%或60莫耳%。

在一些實施例中，該混合物中之磷脂組分可佔粒子中所存在之總脂質的約2莫耳%至約20莫耳%、約2莫耳%至約15莫耳%、約2莫耳%至約12莫耳%、約4莫耳%至約15莫耳%或約4莫耳%至約10莫耳% (或其任何分數或其中之範圍)。在某些實施例中，該混合物中之磷脂組分佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約17莫耳%、約7莫耳%至約17莫耳%、約7莫耳%至約15莫耳%、約8莫耳%至約15莫耳%或約8莫耳%、9莫耳%、10莫耳%、11莫耳%、12莫耳%、13莫耳%、14莫耳%或15莫耳% (或其任何分數或其中之範圍)。作為一非限制性實例，包含磷脂與膽固醇之混合物的脂質粒子調配物可包含例如相對於粒子中所存在之總脂質佔約7莫耳% (或其任何分數)之諸如DPPC或DSPC之磷脂與佔約34莫耳% (或其任何分數)之膽固醇或膽固醇衍生物的混合物。作為另一非限制性實例，包含磷脂與膽固醇之混合物的脂質粒子調配物可包含例如相對於粒子中所存在之總脂質佔約7莫耳% (或其任何分數)之諸如DPPC或DSPC之磷脂與佔約32莫耳% (或其任何分數)之膽固醇或膽固醇衍生物的混合物。

進一步舉例而言，適用於實施本發明之脂質調配物具有約10:1之脂質與藥物(例如siRNA)比(例如，9.5:1至11:1或9.9:1至11:1或10:1至10.9:1之脂質:藥物比)。在某些其他實施例中，適用於實施本發明之脂質調配物具有約9:1之脂質與藥物(例如siRNA)比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1 9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

在其他實施例中，混合物中之膽固醇組分可佔粒子中所存在之

總脂質的約25莫耳%至約45莫耳%、約25莫耳%至約40莫耳%、約30莫耳%至約45莫耳%、約30莫耳%至約40莫耳%、約27莫耳%至約37莫耳%、約25莫耳%至約30莫耳%或約35莫耳%至約40莫耳% (或其任何分數或其中之範圍)。在某些較佳實施例中，混合物中之膽固醇組分佔粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約35莫耳%、約27莫耳%至約35莫耳%、約29莫耳%至約35莫耳%、約30莫耳%至約35莫耳%、約30莫耳%至約34莫耳%、約31莫耳%至約33莫耳%或約30莫耳%、31莫耳%、32莫耳%、33莫耳%、34莫耳%或35莫耳% (或其任何分數或其中之範圍)。

在脂質粒子不含磷脂之實施例中，膽固醇或其衍生物可佔粒子中所存在之總脂質的多達約25莫耳%、30莫耳%、35莫耳%、40莫耳%、45莫耳%、50莫耳%、55莫耳%或60莫耳%。

在一些實施例中，無磷脂脂質粒子調配物中之膽固醇或其衍生物可佔粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約45莫耳%、約25莫耳%至約40莫耳%、約30莫耳%至約45莫耳%、約30莫耳%至約40莫耳%、約31莫耳%至約39莫耳%、約32莫耳%至約38莫耳%、約33莫耳%至約37莫耳%、約35莫耳%至約45莫耳%、約30莫耳%至約35莫耳%、約35莫耳%至約40莫耳%或約30莫耳%、31莫耳%、32莫耳%、33莫耳%、34莫耳%、35莫耳%、36莫耳%、37莫耳%、38莫耳%、39莫耳%或40莫耳% (或其任何分數或其中之範圍)。作為一非限制性實例，脂質粒子調配物可包含佔粒子中所存在之總脂質的約37莫耳% (或其任何分數)的膽固醇。作為另一非限制性實例，脂質粒子調配物可包含佔粒子中所存在之總脂質的約35莫耳% (或其任何分數)的膽固

醇。

在其他實施例中，非陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約90莫耳%、約10莫耳%至約85莫耳%、約20莫耳%至約80莫耳%、約10莫耳% (例如，僅磷脂)或約60莫耳% (例如，磷脂與膽固醇或其衍生物) (或其任何分數或其中之範圍)。

適用於本發明之脂質粒子中的非陽離子脂質的其他百分比及範圍描述於PCT公開案第WO 09/127060號、美國已公開申請案第US 2011/0071208號、PCT公開案第WO2011/000106號及美國已公開申請案第US 2011/0076335號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

應理解，本發明之脂質粒子中所存在之非陽離子脂質之百分比為目標量，且調配物中所存在之非陽離子脂質之實際量可變化例如 ± 5 莫耳%、 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%。

3. 脂質結合物

除陽離子脂質及非陽離子脂質以外，本發明之脂質粒子可進一步包含脂質結合物。結合脂質為適用的，因為其可防止粒子聚集。適合之結合脂質包括但不限於PEG-脂質結合物、POZ-脂質結合物、ATTA-脂質結合物、陽離子聚合物-脂質結合物(CPL)及其混合物。在某些實施例中，粒子包含PEG-脂質結合物或ATTA-脂質結合物與CPL。

在一較佳實施例中，脂質結合物為PEG-脂質。PEG-脂質之實例包括但不限於如例如PCT公開案第WO 05/026372號中所描述之與二烷

基氧基丙基偶合之 PEG (PEG-DAA)、如例如美國專利公開案第 20030077829 號及第 2005008689 號中所描述之與二醯基甘油偶合之 PEG (PEG-DAG)、與諸如磷脂醯乙醇胺之磷脂偶合之 PEG (PEG-PE)、如例如美國專利第 5,885,613 號中所描述之與神經醯胺結合之 PEG、與膽固醇或其衍生物結合之 PEG 及其混合物。此等專利文獻之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

適用於本發明之其他 PEG-脂質包括而不限於 mPEG2000-1,2-二-O-烷基-sn3-胺甲醯基甘油酯(PEG-C-DOMG)。PEG-C-DOMG 之合成描述於 PCT 公開案第 WO 09/086558 號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。其他適合之 PEG-脂質結合物包括而不限於 1-[8'-(1,2-二肉豆蔻醯-3-丙氧基)-甲醯胺基-3',6'-二氧雜辛基]胺甲醯基- ω -甲基-聚(乙二醇) (2KPEG-DMG)。2KPEG-DMG 之合成描述於美國專利第 7,404,969 號中，該專利出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

PEG 為具有兩個末端羥基之乙烯 PEG 重複單元之綫性水溶性聚合物。PEG 係藉由其分子量加以分類；舉例而言，PEG 2000 具有約 2,000 道爾頓之平均分子量，且 PEG 5000 具有約 5,000 道爾頓之平均分子量。PEG 可購自 Sigma Chemical Co. 及其他公司，且包括但不限於以下各項：單甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、單甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、單甲氧基聚乙二醇-琥珀醯亞胺基琥珀酸酯(MePEG-S-NHS)、單甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH₂)、單甲氧基聚乙二醇-三氟乙磺酸酯(MePEG-TRES)、單甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM)以及含有末端羥基替代末端甲氧基之該等化合物(例如，

HO-PEG-S、HO-PEG-S-NHS、HO-PEG-NH₂等)。其他PEG，諸如美國專利第6,774,180號及第7,053,150號中所描述之彼等PEG（例如，mPEG（20 KDa）胺）亦適用於製備本發明之PEG-脂質結合物。此等專利之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。另外，單甲氧基聚乙二醇-乙酸（MePEG-CH₂COOH）特別適用於製備PEG-脂質結合物，包括例如PEG-DAA結合物。

本文中所描述之PEG-脂質結合物之PEG部分可包含介於約550道爾頓至約10,000道爾頓範圍內之平均分子量。在某些情況下，PEG部分具有約750道爾頓至約5,000道爾頓（例如，約1,000道爾頓至約5,000道爾頓、約1,500道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約2,000道爾頓等）之平均分子量。在較佳實施例中，PEG部分具有約2,000道爾頓或約750道爾頓之平均分子量。

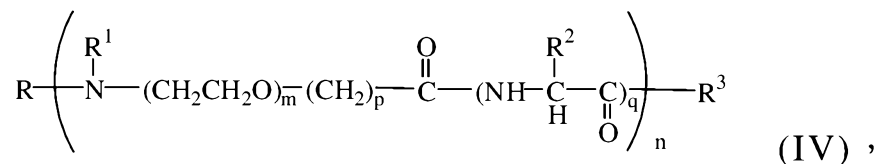
在某些情況下，PEG可視情況由烷基、烷氧基、醯基或芳基取代。PEG可直接與脂質結合，或可經由連接子部分與脂質連接。適合於使PEG與脂質偶合之任何連接子部分均可使用，包括例如非含酯連接子部分及含酯連接子部分。在一較佳實施例中，連接子部分為非含酯連接子部分。如本文中所使用，術語「非含酯連接子部分」係指不含羧酸酯鍵（-OC(O)-）之連接子部分。適合之非含酯連接子部分包括但不限於醯胺基（-C(O)NH-）、胺基（-NR-）、羰基（-C(O)-）、胺基甲酸酯（-NHC(O)O-）、脲（-NHC(O)NH-）、二硫鍵（-S-S-）、醚（-O-）、琥珀醯基（-(O)CCH₂CH₂C(O)-）、琥珀醯胺基（-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-）、醚、二硫鍵以及其組合（諸如含有胺基甲酸酯連接子部分及醯胺基連接子部分之連接子）。在一較佳實施例中，使用胺基甲酸酯連接子使PEG

與脂質偶合。

在其他實施例中，使用含酯連接子部分使PEG與脂質偶合。適合之含酯連接子部分包括例如碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀醯基、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、磺酸酯及其組合。

存在多種具有不同鏈長度及飽和度之醯基鏈基團之磷脂醯乙醇胺可與PEG結合以形成脂質結合物。該等磷脂醯乙醇胺可購自市面，或可使用熟習此項技術者已知的習知技術分離或合成。含有碳鏈長度介於C₁₀至C₂₀範圍內之飽和或不飽和脂肪酸的磷脂醯基-乙醇胺較佳。亦可使用具有單不飽和或雙不飽和脂肪酸及飽和與不飽和脂肪酸之混合物的磷脂醯乙醇胺。適合之磷脂醯乙醇胺包括但不限於二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)及二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE)。

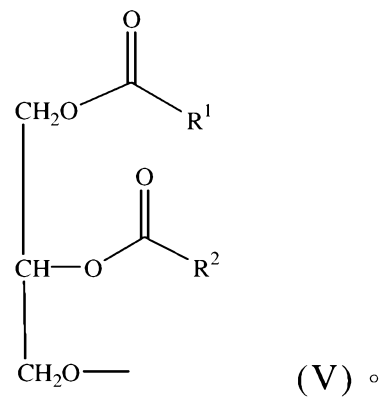
術語「ATTA」或「聚醯胺」包括而不限於美國專利第6,320,017號及第6,586,559號中所描述之化合物，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。此等化合物包括具有下式之化合物：



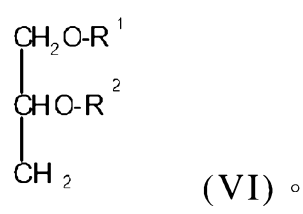
其中R為選自由氫、烷基及醯基組成之群的成員；R¹為選自由氫及烷基組成之群的成員；或視情況，R及R¹與其所結合之氮形成疊氮基部分；R²為選自由氫、視情況經取代之烷基、視情況經取代之芳基及胺基酸側鏈之群的成員；R³為選自由氫、鹵素、羥基、烷氧基、巯基、胍基、胺基及NR⁴R⁵組成之群的成員，其中R⁴及R⁵獨立地為氫或烷基；n為4至80；m為2至6；p為1至4；且q為0或1。熟習此項技術者

應顯而易見，其他聚醯胺可用於本發明化合物中。

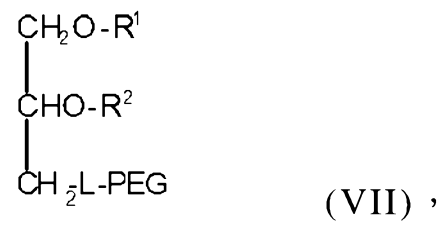
術語「二醯基甘油」或「DAG」包括具有2個脂肪醯基鏈 R^1 及 R^2 之化合物，兩者獨立地具有藉由酯鍵聯與甘油之1位及2位鍵結之介於2與30個之間的碳。醯基可為飽和的或具有不同的不飽和度。適合之醯基包括但不限於月桂醯基(C_{12})、肉豆蔻醯基(C_{14})、棕櫚醯基(C_{16})、硬脂醯基(C_{18})及二十碳醯基(C_{20})。在較佳實施例中， R^1 與 R^2 相同，亦即， R^1 與 R^2 均為肉豆蔻醯基(亦即，二肉豆蔻醯基)， R^1 與 R^2 均為硬脂醯基(亦即，二硬脂醯基)等。二醯基甘油具有以下通式：



術語「二烷基氧基丙基」或「DAA」包括具有2個烷基鏈 R^1 及 R^2 之化合物，兩者獨立地具有介於2與30個之間的碳。烷基可為飽和的或具有不同的不飽和度。二烷基氧基丙基具有以下通式：



在一較佳實施例中，PEG-脂質為具有下式之PEG-DAA結合物：



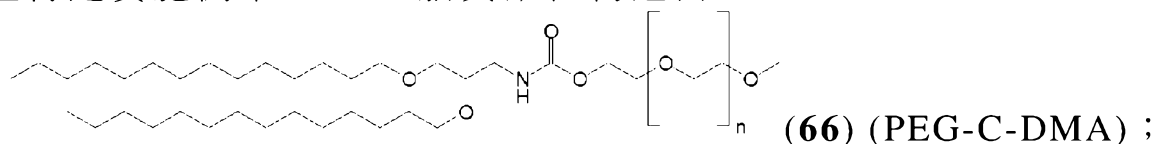
其中 R^1 及 R^2 係獨立地選擇且為具有約10至約22個碳原子之長鏈烷

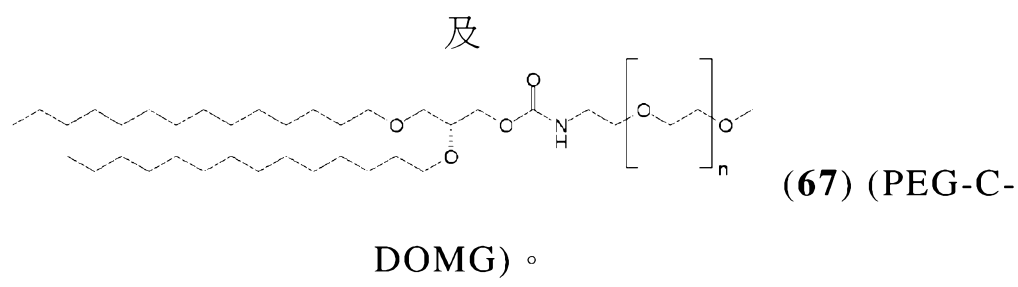
基；PEG為聚乙二醇；且L為如以上所描述之非含酯連接子部分或含酯連接子部分。長鏈烷基可為飽和或不飽和的。適合之烷基包括但不限於癸基(C₁₀)、月桂基(C₁₂)、肉豆蔻基(C₁₄)、棕櫚基(C₁₆)、硬脂基(C₁₈)及二十烷基(C₂₀)。在較佳實施例中，R¹與R²相同，亦即，R¹與R²均為肉豆蔻基(亦即，二肉豆蔻基)，R¹與R²均為硬脂基(亦即，二硬脂基)等。

在以上式VII中，PEG具有介於約550道爾頓至約10,000道爾頓範圍內之平均分子量。在某些情況下，PEG具有約750道爾頓至約5,000道爾頓(例如，約1,000道爾頓至約5,000道爾頓、約1,500道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約2,000道爾頓等)之平均分子量。在較佳實施例中，PEG具有約2,000道爾頓或約750道爾頓之平均分子量。PEG可視情況經烷基、烷氧基、醯基或芳基取代。在某些實施例中，末端羥基經甲氧基或甲基取代。

在一較佳實施例中，「L」為非含酯連接子部分。適合之非含酯連接子包括但不限於醯胺基連接子部分、胺基連接子部分、羰基連接子部分、胺基甲酸酯連接子部分、脲連接子部分、醚連接子部分、二硫鍵連接子部分、琥珀醯胺基連接子部分及其組合。在一較佳實施例中，非含酯連接子部分為胺基甲酸酯連接子部分(亦即，PEG-C-DAA結合物)。在另一較佳實施例中，非含酯連接子部分為醯胺基連接子部分(亦即，PEG-A-DAA結合物)。在另一較佳實施例中，非含酯連接子部分為琥珀醯胺基連接子部分(亦即，PEG-S-DAA結合物)。

在特定實施例中，PEG-脂質結合物選自：





使用熟習此項技術者已知的標準技術及試劑合成 PEG-DAA 結合物。應認識到，PEG-DAA 結合物將含有各種醯胺、胺、醚、硫、胺基甲酸酯及脲鍵聯。熟習此項技術者應認識到，用於形成此等鍵之方法及試劑為熟知的且容易獲得的。參見例如 March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992)；Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989)；及 Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 第 5 版 (Longman 1989)。亦應理解，所存在之任何官能基可能均需要在 PEG-DAA 結合物合成中的不同的時間點進行保護及脫保護。熟習此項技術者應認識到，該等技術為熟知的。參見例如 Green 及 Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991)。

PEG-DAA 結合物較佳為 PEG-二癸基氧基丙基(C₁₀)結合物、PEG-二月桂基氧基丙基(C₁₂)結合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C₁₄)結合物、PEG-二棕櫚基氧基丙基(C₁₆)結合物或 PEG-二硬脂基氧基丙基(C₁₈)結合物。在此等實施例中，PEG 較佳具有約 750 道爾頓或約 2,000 道爾頓之平均分子量。在一個尤佳實施例中，PEG-脂質結合物包含 PEG2000-C-DMA，其中「2000」表示 PEG 之平均分子量，「C」表示胺基甲酸酯連接子部分，且「DMA」表示二肉豆蔻基氧基丙基。在另一尤佳實施例中，PEG-脂質結合物包含 PEG750-C-DMA，其中「750」表示 PEG 之平均分子量，「C」表示胺基甲酸酯連接子部分，

且「DMA」表示二肉豆蔻基氧基丙基。在特定實施例中，PEG之末端羥基經甲基取代。熟習此項技術者應容易瞭解，其他二烷基氧基丙基可用於本發明之PEG-DAA結合物中。

除上述以外，熟習此項技術者應容易瞭解可使用其他親水性聚合物替代PEG。可用於替代PEG之適合聚合物之實例包括但不限於聚乙烯吡咯啉酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羥基丙基甲基丙烯酸醯胺、聚甲基丙烯酸醯胺及聚二甲基丙烯酸醯胺、聚乳酸、聚乙醇酸及衍生纖維素，諸如羥甲基纖維素或羥乙基纖維素。

除上述組分以外，本發明之脂質粒子可進一步包含陽離子聚(乙二醇)(PEG)脂質或CPL(參見例如Chen等人, *Bioconj. Chem.*, 11:433-437 (2000)；美國專利第6,852,334號；PCT公開案第WO 00/62813號，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)。

適合之CPL包括具有式VIII之化合物：



其中A、W及Y如下所描述。

關於式VIII，「A」為充當脂質錨定點之脂質部分，諸如兩性脂質、中性脂質或疏水性脂質。適合之脂質實例包括但不限於二醯基甘油、二烷基甘油、N,N-二烷基胺基-1,2-二醯基氧基-3-胺基丙烷及1,2-二烷基-3-胺基丙烷。

「W」為聚合物或寡聚物，諸如親水性聚合物或寡聚物。親水性聚合物較佳為非免疫原性或具有低固有免疫原性之生物相容性聚合物。或者，親水性聚合物在與適當之佐劑一起使用時可具有弱抗原性。適合之非免疫原性聚合物包括但不限於PEG、聚醯胺、聚乳酸、

聚乙醇酸、聚乳酸/聚乙醇酸共聚物及其組合。在一較佳實施例中，聚合物具有約250至約7,000道爾頓之分子量。

「Y」為聚陽離子部分。術語聚陽離子部分係指在所選pH值下，較佳在生理pH值下具有正電荷，較佳至少2個正電荷之化合物、衍生物或官能基。適合之聚陽離子部分包括鹼性胺基酸及其衍生物，諸如精胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、離胺酸及組胺酸；精胺；亞精胺；陽離子樹枝狀聚合物；聚胺；聚胺糖；及胺基聚糖。聚陽離子部分可為綫性的，諸如結構上呈分枝或樹枝狀之綫性四離胺酸。聚陽離子部分在所選pH值下具有介於約2至約15個之間的正電荷，較佳介於約2至約12個之間的正電荷，且更佳介於約2至約8個之間的正電荷。選擇使用何種聚陽離子部分可由所需粒子應用之類型決定。

聚陽離子部分上之電荷可分佈在整個粒子部分周圍，或替代地，其可為該粒子部分之一個特定區域中的電荷密度之離散性凝集，例如電流衝擊。若電荷密度分佈於粒子上，則電荷密度可平均分佈或不平均分佈。本發明涵蓋聚陽離子部分之電荷分佈之所有變化方案。

脂質「A」及非免疫原性聚合物「W」可藉由各種方法且較佳藉由共價連接來連接。熟習此項技術者已知的方法可用於共價連接「A」與「W」。適合之鍵聯包括但不限於醯胺、胺、羧基、碳酸酯、胺基甲酸酯、酯及脰鍵聯。熟習此項技術者應瞭解，「A」及「W」必須具有互補官能基以實現鍵聯。此兩個基團(一個處於脂質上且另一個處於聚合物上)之反應將提供所要鍵聯。舉例而言，當脂質為二醯基甘油且末端羥基經活化(例如用NHS及DCC)以形成活性酯且隨後與含有胺基之聚合物，諸如與聚醯胺反應時(參見例如美國專利第

6,320,017號及第6,586,559號，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)，該兩個基團之間將形成醯胺鍵。

在某些情況下，聚陽離子部分可具有連接之配位體，諸如靶向配位體或用於複合鈣之螯合部分。較佳地，在連接配位體之後，陽離子部分維持正電荷。在某些情況下，所連接之配位體具有正電荷。適合之配位體包括但不限於具有反應性官能基之化合物或裝置，且包括脂質、兩性脂質、載劑化合物、生物親和性化合物、生物材料、生物聚合物、生物醫學裝置、分析偵測化合物、治療活性化合物、酶、肽、蛋白質、抗體、免疫刺激物、放射性標記、螢光團、生物素、藥物、半抗原、DNA、RNA、聚糖、脂質體、病毒體、膠束、免疫球蛋白、官能基、其他靶向部分或毒素。

在一些實施例中，脂質結合物(例如，PEG-脂質)佔粒子中所存在之總脂質的約0.1莫耳%至約3莫耳%、約0.5莫耳%至約3莫耳%或約0.6莫耳%、0.7莫耳%、0.8莫耳%、0.9莫耳%、1.0莫耳%、1.1莫耳%、1.2莫耳%、1.3莫耳%、1.4莫耳%、1.5莫耳%、1.6莫耳%、1.7莫耳%、1.8莫耳%、1.9莫耳%、2.0莫耳%、2.1莫耳%、2.2莫耳%、2.3莫耳%、2.4莫耳%、2.5莫耳%、2.6莫耳%、2.7莫耳%、2.8莫耳%、2.9莫耳%或3莫耳%(或其任何分數或其中之範圍)。

在其他實施例中，脂質結合物(例如PEG-脂質)佔粒子中所存在之總脂質的約0莫耳%至約20莫耳%、約0.5莫耳%至約20莫耳%、約2莫耳%至約20莫耳%、約1.5莫耳%至約18莫耳%、約2莫耳%至約15莫耳%、約4莫耳%至約15莫耳%、約2莫耳%至約12莫耳%、約5莫耳%至約12莫耳%或約2莫耳%(或其任何分數或其中之範圍)。

在其他實施例中，脂質結合物(例如PEG-脂質)佔粒子中所存在之總脂質的約4莫耳%至約10莫耳%、約5莫耳%至約10莫耳%、約5莫耳%至約9莫耳%、約5莫耳%至約8莫耳%、約6莫耳%至約9莫耳%、約6莫耳%至約8莫耳%或約5莫耳%、6莫耳%、7莫耳%、8莫耳%、9莫耳%或10莫耳%(或其任何分數或其中之範圍)。

應理解，本發明之脂質粒子中所存在之脂質結合物之百分比為目標量，且調配物中所存在之脂質結合物之實際量可變化例如 ± 5 莫耳%、 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%。

適用於本發明之脂質粒子中的脂質結合物的其他百分比及範圍描述於PCT公開案第WO 09/127060號、美國已公開申請案第US 2011/0071208號、PCT公開案第WO2011/000106號及美國已公開申請案第US 2011/0076335號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

熟習此項技術者應瞭解，脂質結合物之濃度可視所採用之脂質結合物及脂質粒子之膜融合速率而變化。

藉由控制脂質結合物之組成及濃度，可控制脂質結合物自脂質粒子中交換出之速率且轉而控制脂質粒子之膜融合速率。舉例而言，當使用PEG-DAA結合物作為脂質結合物時，可改變脂質粒子之膜融合速率，例如藉由改變脂質結合物之濃度、藉由改變PEG之分子量或藉由改變PEG-DAA結合物上之烷基的鏈長度及飽和度。另外，其他變數，包括例如pH值、溫度、離子強度等，可用於改變及/或控制脂質粒子之膜融合速率。在閱讀本發明後，可用於控制脂質粒子之膜融

合速率的其他方法對於熟習此項技術者將顯而易見。此外，藉由控制脂質結合物之組成及濃度，可控制脂質粒子尺寸。

B. 其他載劑系統

適用於本發明之其他基於脂質之載劑系統的非限制性實例包括脂質複合物(參見例如美國專利公開案第20030203865號；及Zhang等人, *J. Control Release*, 100:165-180 (2004))、pH值敏感性脂質複合物(參見例如美國專利公開案第20020192275號)、可逆遮蔽脂質複合物(參見例如美國專利公開案第20030180950號)、基於陽離子脂質之組成物(參見例如美國專利第6,756,054號；及美國專利公開案第20050234232號)、陽離子脂質體(參見例如美國專利公開案第20030229040號、第20020160038號及第20020012998號；美國專利第5,908,635號；及PCT公開案第WO 01/72283號)、陰離子脂質體(參見例如美國專利公開案第20030026831號)、pH值敏感性脂質體(參見例如美國專利公開案第20020192274號；及AU 2003210303)、經抗體塗佈之脂質體(參見例如美國專利公開案第20030108597號；及PCT公開案第WO 00/50008號)、細胞類型特异性脂質體(參見例如美國專利公開案第20030198664號)、含核酸及肽之脂質體(參見例如美國專利第6,207,456號)、含經可釋放親水性聚合物衍生化之脂質的脂質體(參見例如美國專利公開案第20030031704號)、脂質俘獲之核酸(參見例如PCT公開案第WO 03/057190號及第WO 03/059322號)、脂質囊封之核酸(參見例如美國專利公開案第20030129221號；及美國專利第5,756,122號)、其他脂質體組成物(參見例如美國專利公開案第20030035829號及第20030072794號；及美國專利第6,200,599號)、脂

質體與乳液之穩定混合物(參見例如EP1304160)、乳液組成物(參見例如美國專利第6,747,014號)及核酸微乳液(參見例如美國專利公開案第20050037086號)。

適用於本發明之基於聚合物之載劑系統的實例包括但不限於陽離子聚合物-核酸複合物(亦即，聚複合物)。為了形成聚複合物，核酸(例如siRNA分子，諸如表A中所描述之siRNA分子)典型地與將核酸凝集於能够與細胞表面上之陰離子蛋白聚糖相互作用且藉由胞吞作用進入細胞之帶正電粒子中的具有綫性、分支、星形或樹枝狀聚合結構的陽離子聚合物複合。在一些實施例中，聚複合物包含核酸(例如siRNA分子，諸如表A中所描述之siRNA分子)與陽離子聚合物，諸如聚乙烯亞胺(PEI) (參見例如美國專利第6,013,240號；可作為活體內用jetPEI™ (PEI之綫性形式)購自Qbiogene, Inc. (Carlsbad, CA))、聚丙烯亞胺(PPI)、聚乙烯吡咯啶酮(PVP)、聚-L-離胺酸(PLL)、二乙基胺基乙基(DEAE)-葡聚糖、聚(β -胺基酯)(PAE)聚合物(參見例如Lynn等人, J. Am. Chem. Soc., 123:8155-8156 (2001))、殼聚糖、聚醯胺胺(PAMAM)樹枝狀聚合物(參見例如Kukowska-Latallo等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:4897-4902 (1996))、卟啉(參見例如美國專利第6,620,805號)、聚乙烯醚(參見例如美國專利公開案第20040156909號)、多環脒(參見例如美國專利公開案第20030220289號)、包含一級胺、亞胺、胍及/或咪唑基之其他聚合物(參見例如美國專利第6,013,240號；PCT公開案第WO/9602655號；PCT公開案第WO95/21931號；Zhang等人, J. Control Release, 100:165-180 (2004)；及Tiera等人, Curr. Gene Ther., 6:59-71 (2006))及其混合物之複合物。

在其他實施例中，聚複合物包含如美國專利公開案第20060211643號、第20050222064號、第20030125281號及第20030185890號以及PCT公開案第WO 03/066069號中所描述之陽離子聚合物-核酸複合物；如美國專利公開案第20040071654號中所描述之生物可降解聚(β -胺基酯)聚合物-核酸複合物；如美國專利公開案第20040142475號中所描述之含聚合物基質之微粒；如美國專利公開案第20030157030號中所描述之其他微粒組成物；如美國專利公開案第20050123600號中所描述之凝集核酸複合物；及如AU 2002358514及PCT公開案第WO 02/096551號中所描述之奈米膠囊及微膠囊。

在某些情況下，siRNA可與環糊精或其聚合物複合。基於環糊精之載劑系統之非限制性實例包括美國專利公開案第20040087024號中所描述之經環糊精修飾之聚合物-核酸複合物；美國專利第6,509,323號、第6,884,789號及第7,091,192號中所描述之綫性環糊精共聚物-核酸複合物；及美國專利第7,018,609號中所描述之環糊精聚合物複合劑-核酸複合物。在某些其他情況下，siRNA可與肽或多肽複合。基於蛋白質之載劑系統的實例包括但不限於PCT公開案第WO95/21931中所描述之陽離子寡肽-核酸複合物。

脂質粒子之製備

本發明之核酸-脂質粒子，其中核酸(例如，如表A中所描述之siRNA)俘獲在該粒子之脂質部分內且防止降解，可藉由此項技術中已知的任何方法來形成，包括但不限於連續混合法、直接稀釋法及在綫稀釋法。

在特定實施例中，陽離子脂質可包含單獨或與其他陽離子脂質

組合之具有式I至式III之脂質或其鹽。在其他實施例中，非陽離子脂質為卵鞘磷脂(ESM)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、1-棕櫚醯基-2-油醯基-磷脂醯膽鹼(POPC)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、單甲基磷脂醯乙醇胺、二甲基磷脂醯乙醇胺、14:0 PE (1,2-二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺(DMPE))、16:0 PE (1,2-二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE))、18:0 PE (1,2-二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE))、18:1 PE (1,2-二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE))、18:1反式PE (1,2-二反油醯基-磷脂醯乙醇胺(DEPE))、18:0-18:1 PE (1-硬脂醯基-2-油醯基磷脂醯乙醇胺(SOPE))、16:0-18:1 PE (1-棕櫚醯基-2-油醯基磷脂醯乙醇胺(POPE))、基於聚乙二醇之聚合物(例如PEG 2000、PEG 5000、經PEG修飾之二醯基甘油或經PEG修飾之二烷基氧基丙基)、膽固醇、其衍生物或其組合。

在某些實施例中，本發明提供經由連續混合法產生之核酸-脂質粒子，例如，包括如下步驟之方法：在第一儲存器中提供包含siRNA之水溶液；在第二儲存器中提供有機脂質溶液(其中該有機脂質溶液中所存在之脂質溶解於有機溶劑中，例如低碳烷醇，諸如乙醇)；及混合該水溶液與該有機脂質溶液，使得該有機脂質溶液與該水溶液混合以便實質上立即產生脂質囊泡(例如脂質體)，從而將siRNA囊封在脂質囊泡內。此方法及進行此方法之設備詳細描述於美國專利公開案第20040142025號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

向混合環境中，諸如在混合室中連續引入脂質及緩衝溶液之動作引起用緩衝溶液連續稀釋脂質溶液，從而在混合後實質上立即產生

脂質囊泡。如本文中所使用，片語「用緩衝溶液連續稀釋脂質溶液」(及變化形式)一般意謂在水化過程中用足以實現囊泡產生之力度足夠快速地稀釋脂質溶液。藉由混合包含核酸之水溶液與有機脂質溶液，在緩衝溶液(亦即，水溶液)存在下對有機脂質溶液進行連續逐步稀釋以產生核酸-脂質粒子。

使用連續混合法形成之核酸-脂質粒子典型地具有約30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約100 nm、約90 nm至約100 nm、約70 nm至約90 nm、約80 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、小於約120 nm、110 nm、100 nm、90 nm或80 nm、或約30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm (或其任何分數或其中之範圍)之尺寸。因而形成之粒子不會聚集且視情況經尺寸化以達成均勻粒子尺寸。

在另一實施例中，本發明提供經由直接稀釋法產生之核酸-脂質粒子，該方法包括形成脂質囊泡(例如脂質體)溶液並且將該脂質囊泡溶液立即並直接引入含有受控量之稀釋緩衝液的收集容器中。在較佳態樣中，收集容器包括一或多個經配置以攪拌該收集容器之內含物從而促進稀釋的元件。在一個態樣中，收集容器中所存在之稀釋緩衝液的量實質上等於引入其中之脂質囊泡溶液的體積。作為一非限制性實例，處於45%乙醇中之脂質囊泡溶液當引入含有等體積稀釋緩衝液之收集容器中時將有利地產生較小粒子。

在另一實施例中，本發明提供經由在綫稀釋法產生之核酸-脂質粒子，其中含有稀釋緩衝液之第三儲存器與第二混合區流體偶合。在此實施例中，第一混合區中所形成之脂質囊泡(例如脂質體)溶液立即且直接與第二混合區中之稀釋緩衝液混合。在較佳態樣中，第二混合區包括經佈置以使得脂質囊泡溶液及稀釋緩衝液流體作為相對 180° 之流體相遇的T形連接器；然而，可使用提供較淺角度之連接器，例如約 27° 至約 180° (例如約 90°)。泵機構將可控緩衝液流體遞送至第二混合區。在一個態樣中，將供應至第二混合區之稀釋緩衝液的流速控制為實質上等於自第一混合區引入其中之脂質囊泡溶液的流速。此實施例有利地允許進一步控制與第二混合區中之脂質囊泡溶液混合之稀釋緩衝液的流動，且因此亦允許進一步控制第二混合過程中脂質囊泡溶液於緩衝液中之濃度。對稀釋緩衝液流速之此種控制有利地允許在降低之濃度下進行小粒子尺寸形成。

此等方法及進行此等直接稀釋及在綫稀釋方法之設備詳細描述於美國專利公開案第20070042031號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

使用直接稀釋及在綫稀釋方法形成之核酸-脂質粒子典型地具有約30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約100 nm、約90 nm至約100 nm、約70 nm至約90 nm、約80 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、小於約120 nm、110 nm、100 nm、90 nm或80 nm、或約30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95

nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm (或其任何分數或其中之範圍)之尺寸。因而形成之粒子不會聚集且視情況經尺寸化以達成均勻粒子尺寸。

若有需要，則本發明之脂質粒子可藉由可用於對脂質體進行尺寸化之任何方法進行尺寸化。可進行尺寸化以達成所要尺寸範圍及相對狹窄之粒子尺寸分佈。

若干技術可用於將粒子尺寸化至所要尺寸。用於脂質體且同樣適用於本發明粒子的一種尺寸化方法描述於美國專利第4,737,323號中，該專利之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。藉由浴液或探針超聲處理對粒子懸浮液進行超聲處理產生漸進性尺寸減小，使粒子尺寸降至小於約50 nm。均質化為依賴於剪切能從而使較大粒子破碎成較小粒子的另一方法。在一典型均質化程序中，使粒子再循環通過標準乳液均質器直至觀測到所選粒子尺寸，典型地介於約60 nm與約80 nm之間。在兩種方法中，可藉由習知雷射束粒子尺寸辨別法或QELS來監測粒子尺寸分佈。

粒子經由小孔隙聚碳酸酯膜或不對稱陶瓷膜擠出亦為一種用於使粒子尺寸降至相對明確之尺寸分佈的有效方法。典型地，懸浮液循環通過該膜一或多次直至達成所要粒子尺寸分佈。粒子可依次經由更小孔隙之膜擠出，以達成尺寸逐漸減小。

在一些實施例中，粒子中所存在之核酸(例如siRNA分子)如例如美國專利申請案第09/744,103號中所描述進行預凝集，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在其他實施例中，該方法可進一步包括添加適用於使用本發明組成物實現細胞之脂質轉染的非脂質聚陽離子。適合之非脂質聚陽離子之實例包括溴化己二甲銨(以商標名POLYBRENE[®]出售，得自Aldrich Chemical Co.，Milwaukee，Wisconsin，USA)或己二甲銨之其他鹽。其他適合之聚陽離子包括例如聚-L-鳥胺酸、聚-L-精胺酸、聚-L-離胺酸、聚-D-離胺酸、聚烯丙胺及聚乙烯亞胺之鹽。較佳在形成粒子之後添加此等鹽。

在一些實施例中，所形成之核酸-脂質粒子中之核酸(例如siRNA)與脂質比(質量/質量比)將介於約0.01至約0.2、約0.05至約0.2、約0.02至約0.1、約0.03至約0.1或約0.01至約0.08之範圍內。起始物質(輸入)之比亦屬於此範圍內。在其他實施例中，粒子製備使用每10 mg總脂質約400 µg核酸，或約0.01至約0.08且更佳為約0.04之核酸與脂質質量比，此對應於每50 µg核酸1.25 mg總脂質。在其他較佳實施例中，粒子具有約0.08之核酸:脂質質量比。

在其他實施例中，所形成之核酸-脂質粒子中的脂質與核酸(例如siRNA)比(質量/質量比)將介於約1 (1:1)至約100 (100:1)、約5 (5:1)至約100 (100:1)、約1 (1:1)至約50 (50:1)、約2 (2:1)至約50 (50:1)、約3 (3:1)至約50 (50:1)、約4 (4:1)至約50 (50:1)、約5 (5:1)至約50 (50:1)、約1 (1:1)至約25 (25:1)、約2 (2:1)至約25 (25:1)、約3 (3:1)至約25 (25:1)、約4 (4:1)至約25 (25:1)、約5 (5:1)至約25 (25:1)、約5 (5:1)至約20 (20:1)、約5 (5:1)至約15 (15:1)、約5 (5:1)至約10 (10:1)或約5 (5:1)、6 (6:1)、7 (7:1)、8 (8:1)、9 (9:1)、10 (10:1)、11 (11:1)、12 (12:1)、13 (13:1)、14 (14:1)、15 (15:1)、16 (16:1)、17 (17:1)、18

(18:1)、19 (19:1)、20 (20:1)、21 (21:1)、22 (22:1)、23 (23:1)、24 (24:1)或25 (25:1)之範圍或其任何分數或其中之範圍內。起始物質(輸入)之比亦屬於此範圍內。

如先前所論述，結合脂質可進一步包括CPL。本文中論述多種用於製造脂質粒子-CPL (含CPL之脂質粒子)之一般方法。兩種一般技術包括「後插入」技術，亦即，將CPL插入例如預先形成之脂質粒子中；及「標準」技術，其中CPL在例如脂質粒子形成步驟期間包括在脂質混合物中。後插入技術產生CPL主要處於脂質粒子雙層膜之外面中的脂質粒子，而標準技術提供CPL處於內面與外面上的脂質粒子。該方法尤其適用於由磷脂製造之囊泡(其可含有膽固醇)以及含有PEG-脂質之囊泡(諸如PEG-DAA及PEG-DAG)。製造脂質粒子-CPL之方法教示於例如美國專利第5,705,385號、第6,586,410號、第5,981,501號、第6,534,484號及第6,852,334號、美國專利公開案第20020072121號及PCT公開案第WO 00/62813號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

套組

本發明亦提供提供呈套組形式之脂質粒子。在一些實施例中，套組包括經隔室化以容納脂質粒子之各種要素(例如活性劑，諸如siRNA分子及粒子之個別脂質組分)的容器。套組較佳包括容納本發明之脂質粒子的容器(例如小瓶或安瓿)，其中該等粒子係藉由本文中所闡述之方法之一產生。在某些實施例中，該套組可進一步包括核內體膜去穩定劑(例如鈣離子)。該套組典型地含有呈處於醫藥學上可接受之載劑中的懸浮液形式或呈脫水形式的本發明粒子組成物與其復水

(若凍乾)及投與說明書。

本發明之調配物可經改適以優先靶向相關特定細胞、組織或器官。核酸-脂質粒子之優先靶向可藉由控制脂質粒子本身之組成來進行。在特定實施例中，本發明之套組包括此等脂質粒子，其中該等粒子呈懸浮液形式或呈脫水形式存在於容器中。

在某些情況下，可能需要靶向部分連接於脂質粒子表面以進一步增強粒子之靶向。連接靶向部分(例如抗體、蛋白質等)與脂質(諸如本發明粒子中所使用之彼等脂質)之方法為熟習此項技術者已知的。

脂質粒子之投與

一旦形成後，本發明之脂質粒子尤其適用於將siRNA分子(例如表A中所描述之siRNA分子)引入細胞中。因此，本發明亦提供用於將siRNA分子引入細胞中之方法。在特定實施例中，將siRNA分子引入受感染細胞中。該方法可藉由首先如以上所描述形成粒子且隨後使該等粒子與細胞接觸足以將siRNA遞送至細胞之時間段而在活體外或活體內進行。

本發明之脂質粒子(例如核酸脂質粒子)可吸收至幾乎任何與其混合或接觸之細胞類型。一旦吸收後，粒子可由細胞之一部分吞噬，與細胞膜交換脂質，或與細胞融合。粒子之siRNA部分之轉移或併入可經由此等途徑中之任一種來進行。特定言之，當融合發生時，粒子膜併入細胞膜中且粒子之內含物與細胞內液合併。

本發明之脂質粒子(例如核酸-脂質粒子)可單獨或呈與根據投與途徑及標準醫藥實務選擇之醫藥學上可接受之載劑(例如生理鹽水或磷酸鹽緩衝液)之混合物的形式投與。一般而言，將採用正常緩衝生

理鹽水(例如135至150 mM NaCl)作為醫藥學上可接受之載劑。其他適合之載劑包括例如水、緩衝水、0.4%生理鹽水、0.3%甘胺酸及其類似物，包括用於增強穩定性之糖蛋白，諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。其他適合之載劑描述於例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)中。如本文中所使用，「載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、媒劑、包衣劑、稀釋劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑、緩衝劑、載劑溶液、懸浮液、膠體及其類似物。片語「醫藥學上可接受」係指當投與人類時不產生過敏性或類似不良反應的分子實體及組成物。

一般在脂質粒子形成之後添加醫藥學上可接受之載劑。因而，在形成脂質粒子之後，可將粒子稀釋於醫藥學上可接受之載劑中，諸如正常緩衝生理鹽水。

醫藥調配物中之粒子濃度可廣泛變化，亦即，以重量計低於約0.05%，通常為或至少為約2%至5%，至多達約10%至90%，並且將根據所選擇之特定投與模式，主要由流體體積、黏度等加以選擇。舉例而言，可增加濃度以降低與治療相關之流體負載。此在患有動脈粥樣硬化相關之充血性心臟衰竭或嚴重高血壓之患者中可能尤其理想。或者，可將包含刺激性脂質之粒子稀釋至低濃度以減輕投與部位之炎症。

本發明之醫藥組成物可藉由習知熟知滅菌技術進行滅菌。水溶液可經包裝以供使用，或在無菌條件下過濾並凍乾，在投與前將凍乾製劑與無菌水溶液組合。該等組成物可視需要含有醫藥學上可接受之

輔助物質以接近生理條件，諸如pH值調節及緩衝劑、張力調節劑及其類似物，例如乙酸钠、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀及氯化鈣。另外，粒子懸浮液可包括儲存時保護脂質以防自由基及脂質過氧化損傷的脂質保護劑。諸如 α 生育酚之親脂性自由基淬滅劑及諸如鐵草胺之水溶性鐵特异性螯合劑為適合的。

在一些實施例中，本發明之脂質粒子尤其適用於治療性遞送一或多種siRNA分子(例如表A中所描述之siRNA分子)的方法。特定言之，本發明之一個目標在於提供藉由使一或多個HBV基因之轉錄及/或轉譯下調或靜默而在人類中治療HBV及/或HDV感染的活體內方法。

A. 活體內投與

已使用核酸-脂質粒子，諸如PCT公開案第WO 05/007196號、第WO 05/121348號、第WO 05/120152號及第WO 04/002453號中所描述之彼等核酸-脂質粒子達成用於活體內療法之全身性遞送，例如經由身體系統(諸如循環)將本文中所描述之siRNA分子，諸如表A中所描述之siRNA遞送至遠端靶細胞，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。本發明亦提供完全囊封之脂質粒子，其保護siRNA以防在血清中發生核酸酶降解，非免疫原性，尺寸較小且適合於重複給與。另外，一或多種siRNA分子可於本發明之脂質粒子中單獨投與，或與包含肽、多肽或諸如習知藥物之小分子的脂質粒子組合投與(例如共同投與)。

對於活體內投與，投與可用此項技術中已知的任何方式進行，例如藉由注射、經口投與、吸入(例如鼻內或氣管內)、經皮施用或直

腸投與。投與可經由單次或分次劑量來實現。醫藥組成物可非經腸投與，亦即，關節內、靜脈內、腹膜內、皮下或肌肉內。在一些實施例中，藉由推注經靜脈內或腹膜內投與醫藥組成物(參見例如美國專利第5,286,634號)。細胞內核酸遞送亦論述於Straubinger等人，*Methods Enzymol.*, 101:512 (1983)；Mannino等人，*Biotechniques*, 6:682 (1988)；Nicolau等人，*Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989)；及Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:274 (1993)中。投與基於脂質之治療劑的其他方法描述於例如美國專利第3,993,754號、第4,145,410號、第4,235,871號、第4,224,179號、第4,522,803號及第4,588,578號中。脂質粒子可藉由在疾病部位直接注射或藉由在疾病部位之遠端部位注射來投與(參見例如Culver, *HUMAN GENE THERAPY*, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. 第70-71頁(1994))。上述參考文獻之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在本發明之脂質粒子經靜脈內投與之實施例中，該等粒子之總注射劑量中至少約5%、10%、15%、20%或25%在注射之後於血漿中存在約8、12、24、36或48小時。在其他實施例中，該等脂質粒子之總注射劑量中多於約20%、30%、40%且多達約60%、70%或80%在注射之後於血漿中存在約8、12、24、36或48小時。在某些情況下，多種粒子中多於約10%在投與之後於哺乳動物之血漿中存在約1小時。在某些其他情況下，脂質粒子之存在在投與該等粒子之後至少約1小時可偵測到。在一些實施例中，siRNA分子之存在在投與之後約8、12、24、36、48、60、72或96小時可在細胞中偵測到。在其他實施例中，siRNA分子下調靶序列(諸如病毒或宿主序列)之表現在投與之後

約8、12、24、36、48、60、72或96小時可偵測到。在其他實施例中，siRNA分子下調靶序列(諸如病毒或宿主序列)之表現優先在受感染細胞及/或能够被感染之細胞中發生。在其他實施例中，siRNA分子在投與部位之近端或遠端部位之細胞中的存在或效應在投與之後約12、24、48、72或96小時或約6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26或28天可偵測到。在其他實施例中，本發明之脂質粒子非經腸或經腹膜內投與。

本發明之組成物可單獨或與其他適合之組分組合製成氣霧劑調配物(亦即，其可「霧化」)以便經由吸入(例如經鼻內或經氣管內)投與(參見Brigham等人, Am. J. Sci., 298:278 (1989))。氣霧劑調配物可置放於加壓可接受之推進劑中，諸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮氣及其類似物。

在某些實施例中，醫藥組成物可藉由鼻內噴霧、吸入及/或其他氣霧劑遞送媒劑來遞送。用於經由鼻用氣霧劑噴霧將核酸組成物直接遞送至肺部之方法已描述於例如美國專利第5,756,353號及第5,804,212號中。同樣，使用鼻內微粒樹脂及溶血磷脂醯基甘油化合物遞送藥物(美國專利5,725,871)在醫藥技術中亦為熟知的。類似地，呈聚四氟乙烯負載基質形式之透黏膜藥物遞送描述於美國專利第5,780,045號中。上述專利之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

適用於非經腸投與(舉例而言，諸如關節內(關節中)、靜脈內、肌肉內、皮內、腹膜內及皮下途徑)之調配物包括水性及非水性等滲無菌注射溶液，其可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑細菌劑及使得調配物

與預定受體之血液等滲的溶質；以及水性及非水性無菌懸浮液，其可包括懸浮劑、增溶劑、增稠劑、穩定劑及防腐劑。在實施本發明時，舉例而言，較佳藉由靜脈內輸注、經口、局部、腹膜內、囊泡內或鞘內投與組成物。

一般而言，當經靜脈內投與時，脂質粒子調配物係與適合之醫藥載劑一起調配。許多醫藥學上可接受之載劑可用於本發明之組成物及方法中。適用於本發明之調配物見於例如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)中。可使用多種水性載劑，例如水、緩衝水、0.4%生理鹽水、0.3%甘胺酸及其類似物，且可包括用於增強穩定性之糖蛋白，諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。一般而言，將採用正常緩衝生理鹽水(135至150 mM NaCl)作為醫藥學上可接受之載劑，但其他適合之載劑將滿足需要。此等組成物可藉由諸如過濾之習知脂質體滅菌技術進行滅菌。該等組成物可視需要含有醫藥學上可接受之輔助物質以接近生理條件，諸如pH值調節及緩衝劑、張力調節劑、潤濕劑及其類似物，例如乙酸钠、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、單月桂酸脫水山梨醇酯、油酸三乙醇胺酯等。此等組成物可使用以上所提及之技術進行滅菌，或替代地，其可在無菌條件下產生。所得水溶液可經包裝以供使用，或在無菌條件下過濾並凍乾，在投與前將凍乾製劑與無菌水溶液組合。

在某些應用中，本文中所揭示之脂質粒子可經由經口投與個體加以遞送。該等粒子可併有賦形劑且以可食用錠劑、經頰錠劑、喉錠、膠囊劑、丸劑、口含錠、酞劑、嗽口水、懸浮液、經口噴霧、糖

漿、糯米片及其類似物之形式使用(參見例如美國專利第5,641,515號、第5,580,579號及第5,792,451號，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)。此等經口劑量形式亦可含有以下各項：黏合劑、明膠、賦形劑、潤滑劑及/或調味劑。當單位劑型為膠囊劑時，除以上所描述之材料以外，其亦可含有液體載劑。各種其他材料可作為包衣劑存在或以其他方式調節劑量單位之物理形式。固然，用於製備任何單位劑型之任何材料均應為醫藥學純的且在所採用之量下實質上無毒。

典型地，此等經口調配物可含有至少約0.1%或更多脂質粒子，但固然，該等粒子之百分比可變化且宜在總調配物重量或體積之約1%或2%與約60%或70%之間或更大。自然，可能製備之各治療上適用之組成物中的粒子用量使得將在該化合物之任何指定單位劑量下獲得適合劑量。熟習該等醫藥調配物之製備技術者將預見諸如溶解度、生物利用率、生物半衰期、投與途徑、產品貨架壽命以及其他藥理學考量之因素，且因而多種劑量及治療方案可為理想的。

適合於經口投與之調配物可由以下各項組成：(a)液體溶液，諸如有效量之封裝siRNA分子(例如，表A中所描述之siRNA分子)懸浮於諸如水、生理鹽水或PEG 400之稀釋劑中；(b)膠囊劑、扁囊劑或錠劑，各自含有預定量之siRNA分子，呈液體、固體、顆粒或明膠形式；(c)於適當液體中之懸浮液；及(d)適合之乳液。錠劑形式可包括乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、磷酸鈣、玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、微晶纖維素、明膠、膠體二氧化矽、滑石、硬脂酸鎂、硬脂酸及其他賦形劑、著色劑、填充劑、黏合劑、稀釋劑、緩衝劑、潤濕劑、防腐

劑、調味劑、染料、崩解劑及醫藥學上相容之載劑中的一或多種。□含錠形式可包含處於調味劑(例如蔗糖)中之siRNA分子，以及包含處於惰性基質中之治療性核酸的喉錠，諸如明膠及甘油或蔗糖及阿拉伯膠乳液、凝膠及除siRNA分子以外亦含有此項技術中已知的載劑的類似物。

在其用途之另一實例中，脂質粒子可併入多種局部劑型中。舉例而言，含核酸-脂質粒子之懸浮液可調配為凝膠劑、油劑、乳液、局部乳膏、糊劑、軟膏、洗液、泡沫、慕思及其類似物並投與。

當製備本發明脂質粒子之醫藥製劑時，較佳使用大量已經純化以減少或消除空粒子之粒子或與外表面締合之含諸如siRNA之治療劑的粒子。

本發明之方法可在多種宿主中實施。較佳宿主包括哺乳動物物種，諸如靈長類(例如人類及黑猩猩以及其他非人類靈長類)、犬、貓、馬、牛、綿羊、山羊、嚙齒動物(例如大鼠及小鼠)、兔形目動物及豬。

所投與之粒子之量將視siRNA分子與脂質之比、所使用之特定siRNA、所治療之HBV菌株、患者之年齡、體重及病狀以及臨床醫師之判斷而定，但一般將介於每公斤體重約0.01與約50 mg之間，較佳介於約0.1與約5 mg/kg體重之間或每次投與(例如注射)約 10^8 至 10^{10} 個粒子。

B. 活體外投與

對於活體外應用，siRNA分子可遞送至於培養基中生長之任何細胞中。在較佳實施例中，細胞為動物細胞，更佳為哺乳動物細胞且最

佳為人類細胞。

細胞與脂質粒子之間的接觸當在活體外進行時在生物學上相容之培養基中發生。粒子之濃度視特定應用而廣泛變化，但一般介於約 1 μmol 與約 10 mmol 之間。用脂質粒子處理細胞一般在生理溫度(約 37°C)下進行約 1 至 48 小時、較佳約 2 至 4 小時之時間段。

在一組較佳實施例中，將脂質粒子懸浮液添加至 60% 至 80% 匯合接種細胞中，細胞密度為約 10^3 至約 10^5 個細胞/毫升、更佳為約 2×10^4 個細胞/毫升。添加至細胞中之懸浮液的濃度較佳為約 0.01 至 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ，更佳為約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 。

在細胞組織培養可能需要之程度上，在此項技術中為熟知的。舉例而言，Freshney, *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 第 3 版, Wiley-Liss, New York (1994)；Kuchler 等人, *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977) 及其中所引用之參考文獻提供細胞培養之一般指導。培養細胞系統通常呈單細胞層形式，但亦使用細胞懸浮液。

使用核內體釋放參數(ERP)測定法，可優化本發明之核酸-脂質粒子之遞送效率。ERP 測定法詳細描述於美國專利公開案第 20030077829 號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。更特定言之，ERP 測定法之目的在於基於脂質粒子之各種陽離子脂質及輔助脂質組分對結合/吸收或與核內體膜融合/去穩定之相對效應來辨別其效應。此測定法允許定量測定脂質粒子之各組分對遞送效率有何影響，從而優化脂質粒子。通常，ERP 測定法量測報導蛋白質(例如螢光素酶、 β -半乳糖苷酶、綠色螢光蛋白(GFP)等)之表現，

且在一些情況下，經優化以用於表現質體之脂質粒子調配物亦將適用於囊封siRNA。在其他情況下，ERP測定法可能適於量測靶序列在存在或不存在siRNA時之轉錄或轉譯之下調。藉由比較各種脂質粒子各自之ERP，可容易地確定優化系統，例如在細胞中具有最高吸收之脂質粒子。

C. 脂質粒子之偵測

在一些實施例中，在約1、2、3、4、5、6、7、8或更多個小時可在個體中偵測到本發明之脂質粒子。在其他實施例中，可在投與粒子之後約8、12、24、48、60、72或96小時或約6、8、10、12、14、16、18、19、22、24、25或28天在個體中偵測到本發明之脂質粒子。可在得自個體之細胞、組織或其他生物樣品中偵測粒子之存在。該等粒子可例如藉由直接偵測粒子、偵測siRNA序列、偵測相關靶序列(亦即，藉由偵測相關序列之表現或減少之表現)、偵測EBOV蛋白(例如干擾素)調節之化合物、偵測個體中之病毒負載或其組合加以偵測。

1. 粒子之偵測

本發明之脂質粒子可使用此項技術中已知的任何方法加以偵測。舉例而言，可使用此項技術中所熟知的方法使標記直接或間接偶合於脂質粒子之組分。可使用多種標記，其中標記之選擇視所需敏感性、與脂質粒子組分結合之容易性、穩定性要求及可利用之儀器及處理規定而定。適合之標記包括但不限於光譜標記，諸如螢光染料(例如螢光素及衍生物，諸如異硫氰酸螢光素(FITC)及Oregon Green™；若丹明及衍生物，諸如得克薩斯紅、異硫氰酸四若丹明(TRITC)等、洋地黃毒苷、生物素、藻紅蛋白、AMCA、CyDyes™及其類似物；放

射性標記，諸如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 等；酶，諸如辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶等；光譜比色標記，諸如膠態金或有色玻璃或塑膠珠粒，諸如聚苯乙烯、聚丙烯、膠乳等。該標記可使用此項技術中已知的任何手段加以偵測。

2. 核酸之偵測

本文中藉由熟習此項技術者所熟知的許多手段中之任一種來偵測並定量核酸(例如siRNA分子)。核酸之偵測可藉由熟知的方法來進行，諸如南方分析、北方分析、凝膠電泳、PCR、放射性標記、閃爍計數及親和層析法。亦可採用其他分析型生物化學方法，諸如分光光度法、X射綫照相術、電泳、毛細管電泳、高效液相層析法(HPLC)、薄層層析法(TLC)及超擴散層析法。

核酸雜交格式之選擇不重要。熟習此項技術者已知多種核酸雜交格式。舉例而言，常用格式包括夾心測定法及競爭或易位測定法。雜交技術一般描述於例如「Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach」, Hames及Higgins編, IRL Press (1985)中。

可藉由使用放大所偵測之靶核酸的核酸擴增系統來提高雜交測定法之敏感性。適用於擴增序列以用作分子探針或用於產生核酸片段以供隨後次選殖之活體外擴增技術為已知的。足以指導熟習此項技術者進行該等活體外擴增方法之技術的實例，包括聚合酶鏈反應(PCR)、連接酶鏈反應(LCR)、Q β -複製酶擴增及其他RNA聚合酶介導之技術(例如NASBA™)見於以下文獻中：Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000)；及Ausubel等人，SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,

Current Protocols編, Greene Publishing Associates, Inc.及John Wiley & Sons, Inc. (2002)；以及美國專利第4,683,202號；PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis等人編) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990)；Arnheim & Levinson (1990年10月1日), C&EN 36；The Journal Of NIH Research, 3:81 (1991)；Kwoh等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173 (1989)；Guatelli等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 (1990)；Lomell等人, J. Clin. Chem., 35:1826 (1989)；Landegren等人, Science, 241:1077 (1988)；Van Brunt, Biotechnology, 8:291 (1990)；Wu及Wallace, Gene, 4:560 (1989)；Barringer等人, Gene, 89:117 (1990)；以及Sooknanan及Malek, Biotechnology, 13:563 (1995)。活體外選殖經擴增之核酸的改良方法描述於美國專利第5,426,039號中。此項技術中所描述之其他方法為基於核酸序列之擴增 (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario)及Q β -複製酶系統。此等系統可用於直接鑑別突變體，其中設計PCR或LCR引子以便僅在存在所選序列時延伸或連接。或者，一般可使用例如非特异性PCR引子來擴增所選序列且稍後探測所擴增之目標區域中指示突變之特定序列。上述參考文獻之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

用作例如活體外擴增方法中之探針、用作基因探針或用作抑制劑組分之核酸典型地根據由Beaucage等人, Tetrahedron Letts., 22:1859 1862 (1981)所描述之固相亞磷醯胺三酯法，例如，如Needham VanDevanter等人, Nucleic Acids Res., 12:6159 (1984)中所描述使用自動合成儀進行化學合成。必要時典型地藉由如Pearson等人, J. Chrom.,

255:137-149 (1983)中所描述之天然丙烯醯胺凝膠電泳或藉由陰離子交換 HPLC 進行聚核苷酸之純化。可使用 Maxam 及 Gilbert (1980), Grossman 及 Moldave (編) Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65:499 之化學降解法驗證合成聚核苷酸之序列。

用於測定轉錄水準之替代手段為原位雜交。原位雜交測定法為熟知的且一般描述於 Angerer 等人, Methods Enzymol., 152:649 (1987) 中。在原位雜交測定法中，將細胞固定於固體載體，典型地玻璃載物片。若欲探測 DNA，則利用熱或鹼使細胞變性。隨後使細胞與雜交溶液在中等溫度下接觸以允許欲標記之特定探針退火。較佳用放射性同位素或螢光報導基因標記探針。

實例

將藉由特定實例更詳細地描述本發明。以下實例係出於說明之目的而提供，而不欲以任何方式限制本發明。熟習此項技術者應容易地識別可加以變化或修改以產生本質上相同之結果的多種非重要參數。

實例 1.

本實例描述用於測試表 A 中所闡述之 15 個 siRNA 序列之 HBV 基因靜默活性的生物測定。

編輯 HBV 基因組序列(登記號 EU939600.1)以完美匹配所有候選 siRNA。特定言之，在電腦上接合以下四個序列區，包括各序列區域之 5' 及 3' 端上之 30 bp 側接序列且含有候選 siRNA 之靶位點：212 至 803、1062 至 1922、2237 至 2460 及 2783 至 2862。插入六個突變(位置 454 C>T；位置 598 T>C；位置 1206 A>C；位置 1287 A>C；及位置

1461 G>C，相對於EU939600.1)以確保所有候選siRNA與此合成一致HBV靶片段完美互補。合成一致HBV靶片段，其中限制酶位點XhoI及NotI分別添加至5'及3'端，以便有助於選殖於psiCHECK-2雙螢光素酶載體中。XhoI/NotI選殖位點介於psiCHECK-2雙螢光素酶載體上之Renilla螢光素酶之終止密碼子與聚腺苷酸化信號之間。

藉由在Dual-Glo測定系統(Promega，Madison，WI，USA)中量測Renilla螢光素酶(R-Luc)活性相對於螢火蟲螢光素酶(F-Luc)活性之降低來測試候選siRNA之HBV基因靜默活性。簡而言之，將Cos-7細胞以25,000個細胞/孔之密度接種於96孔板中且使用Lipofectamine 2000以每孔100 ng報導質體進行轉染。在37°C/5% CO₂下培育4小時之後，移除培養基且用HBV siRNA以一式四份以不同濃度轉染Cos-7細胞，隨後在以上所描述之條件下再培育20小時。藉由螢光檢測來測定兩種螢光素酶之表現。將經HBV-siRNA處理之樣品的R-Luc/F-Luc表現相對於經陰性(非靶向) siRNA處理之細胞中的R-Luc/F-Luc表現平均值標準化。作為正對照，包括針對R-Luc之siRNA。藉由XLfit功能(IDBS MathIQ)計算50%抑制濃度(IC₅₀)。

實例2.

此實例描述選自名為1m至15m (參見表A)之siRNA群組中的兩個不同的siRNA的所有可能之「二元」組合。如本申請案之實例2及實例3中所使用之術語「組合」意謂所組合之siRNA分子共同存在於同一物質組合物中(例如，一起溶解於同一溶液內；或一起存在於同一脂質粒子內；或一起存在於脂質粒子之同一醫藥調配物中，但醫藥調配物內之各脂質粒子可能包括或可能不包括該siRNA組合之各不同的

siRNA)。所組合之siRNA分子通常不共價連接在一起。

個別siRNA各自以名稱1m至15m加以鑑別，如表A中所示。組合內之各siRNA編號以短劃綫(-)隔開；舉例而言，記法「1m-2m」表示siRNA編號1m與siRNA編號2m之組合。短劃綫不意謂組合內之不同的siRNA分子彼此共價連接。不同的siRNA組合由分號隔開。組合中之siRNA編號之順序不重要。舉例而言，組合1m-2m等效於組合2m-1m，因為此兩個記法描述siRNA編號1m與siRNA編號2m之同一組合。

此實例中所描述之siRNA組合適用於例如實施本發明以便在人類中治療HBV及/或HDV感染且改善與HBV感染及/或HDV感染相關之至少一種症狀。

siRNA 1m至15m之二元siRNA組合為：1m-2m；1m-3m；1m-4m；1m-5m；1m-6m；1m-7m；1m-8m；1m-9m；1m-10m；1m-11m；1m-12m；1m-13m；1m-14m；1m-15m；2m-3m；2m-4m；2m-5m；2m-6m；2m-7m；2m-8m；2m-9m；2m-10m；2m-11m；2m-12m；2m-13m；2m-14m；2m-15m；3m-4m；3m-5m；3m-6m；3m-7m；3m-8m；3m-9m；3m-10m；3m-11m；3m-12m；3m-13m；3m-14m；3m-15m；4m-5m；4m-6m；4m-7m；4m-8m；4m-9m；4m-10m；4m-11m；4m-12m；4m-13m；4m-14m；4m-15m；5m-6m；5m-7m；5m-8m；5m-9m；5m-10m；5m-11m；5m-12m；5m-13m；5m-14m；5m-15m；6m-7m；6m-8m；6m-9m；6m-10m；6m-11m；6m-12m；6m-13m；6m-14m；6m-15m；7m-8m；7m-9m；7m-10m；7m-11m；7m-12m；7m-13m；7m-14m；7m-15m；8m-9m；8m-10m；8m-11m；8m-

12m ; 8m-13m ; 8m-14m ; 8m-15m ; 9m-10m ; 9m-11m ; 9m-12m ;
 9m-13m ; 9m-14m ; 9m-15m ; 10m-11m ; 10m-12m ; 10m-13m ; 10m-
 14m ; 10m-15m ; 11m-12m ; 11m-13m ; 11m-14m ; 11m-15m ; 12m-
 13m ; 12m-14m ; 12m-15m ; 13m-14m ; 13m-15m ; 及 14m-15m 。

實例3.

此實例描述選自名為1m至15m (參見表A)之siRNA分子群組中的三個不同的siRNA的所有可能之「三元」組合。個別siRNA各自以名稱1m至15m加以鑑別，如表A中所示。各siRNA編號以短劃綫(-)隔開；舉例而言，記法「1m-2m-3m」表示siRNA編號1m、siRNA編號2m及siRNA編號3m之組合。短劃綫不意謂組合內之不同的siRNA分子彼此共價連接。不同的siRNA組合由分號隔開。組合中之siRNA編號之順序不重要。舉例而言，組合1m-2m-3m等效於組合3m-2m-1m，因為此兩個記法描述siRNA編號1m與siRNA編號2m及siRNA編號3m之同一組合。

此實例中所描述之siRNA組合適用於例如實施本發明以便在人類中治療HBV及/或HDV感染且改善與HBV感染及/或HDV感染相關之至少一種症狀。

siRNA 1m至15m之三元siRNA組合為：1m-2m-3m；1m-2m-4m；
 1m-2m-5m；1m-2m-6m；1m-2m-7m；1m-2m-8m；1m-2m-9m；1m-
 2m-10m；1m-2m-11m；1m-2m-12m；1m-2m-13m；1m-2m-14m；1m-
 2m-15m；1m-3m-4m；1m-3m-5m；1m-3m-6m；1m-3m-7m；1m-3m-
 8m；1m-3m-9m；1m-3m-10m；1m-3m-11m；1m-3m-12m；1m-3m-
 13m；1m-3m-14m；1m-3m-15m；1m-4m-5m；1m-4m-6m；1m-4m-

7m ; 1m-4m-8m ; 1m-4m-9m ; 1m-4m-10m ; 1m-4m-11m ; 1m-4m-12m ; 1m-4m-13m ; 1m-4m-14m ; 1m-4m-15m ; 1m-5m-6m ; 1m-5m-7m ; 1m-5m-8m ; 1m-5m-9m ; 1m-5m-10m ; 1m-5m-11m ; 1m-5m-12m ; 1m-5m-13m ; 1m-5m-14m ; 1m-5m-15m ; 1m-6m-7m ; 1m-6m-8m ; 1m-6m-9m ; 1m-6m-10m ; 1m-6m-11m ; 1m-6m-12m ; 1m-6m-13m ; 1m-6m-14m ; 1m-6m-15m ; 1m-7m-8m ; 1m-7m-9m ; 1m-7m-10m ; 1m-7m-11m ; 1m-7m-12m ; 1m-7m-13m ; 1m-7m-14m ; 1m-7m-15m ; 1m-8m-9m ; 1m-8m-10m ; 1m-8m-11m ; 1m-8m-12m ; 1m-8m-13m ; 1m-8m-14m ; 1m-8m-15m ; 1m-9m-10m ; 1m-9m-11m ; 1m-9m-12m ; 1m-9m-13m ; 1m-9m-14m ; 1m-9m-15m ; 1m-10m-11m ; 1m-10m-12m ; 1m-10m-13m ; 1m-10m-14m ; 1m-10m-15m ; 1m-11m-12m ; 1m-11m-13m ; 1m-11m-14m ; 1m-11m-15m ; 1m-12m-13m ; 1m-12m-14m ; 1m-12m-15m ; 1m-13m-14m ; 1m-13m-15m ; 1m-14m-15m ; 2m-3m-4m ; 2m-3m-5m ; 2m-3m-6m ; 2m-3m-7m ; 2m-3m-8m ; 2m-3m-9m ; 2m-3m-10m ; 2m-3m-11m ; 2m-3m-12m ; 2m-3m-13m ; 2m-3m-14m ; 2m-3m-15m ; 2m-4m-5m ; 2m-4m-6m ; 2m-4m-7m ; 2m-4m-8m ; 2m-4m-9m ; 2m-4m-10m ; 2m-4m-11m ; 2m-4m-12m ; 2m-4m-13m ; 2m-4m-14m ; 2m-4m-15m ; 2m-5m-6m ; 2m-5m-7m ; 2m-5m-8m ; 2m-5m-9m ; 2m-5m-10m ; 2m-5m-11m ; 2m-5m-12m ; 2m-5m-13m ; 2m-5m-14m ; 2m-5m-15m ; 2m-6m-7m ; 2m-6m-8m ; 2m-6m-9m ; 2m-6m-10m ; 2m-6m-11m ; 2m-6m-12m ; 2m-6m-13m ; 2m-6m-14m ; 2m-6m-15m ; 2m-7m-8m ; 2m-7m-9m ; 2m-7m-10m ; 2m-7m-11m ; 2m-7m-12m ; 2m-7m-13m ; 2m-7m-14m ; 2m-7m-15m ; 2m-

8m-9m ; 2m-8m-10m ; 2m-8m-11m ; 2m-8m-12m ; 2m-8m-13m ; 2m-8m-14m ; 2m-8m-15m ; 2m-9m-10m ; 2m-9m-11m ; 2m-9m-12m ; 2m-9m-13m ; 2m-9m-14m ; 2m-9m-15m ; 2m-10m-11m ; 2m-10m-12m ; 2m-10m-13m ; 2m-10m-14m ; 2m-10m-15m ; 2m-11m-12m ; 2m-11m-13m ; 2m-11m-14m ; 2m-11m-15m ; 2m-12m-13m ; 2m-12m-14m ; 2m-12m-15m ; 2m-13m-14m ; 2m-13m-15m ; 2m-14m-15m ; 3m-4m-5m ; 3m-4m-6m ; 3m-4m-7m ; 3m-4m-8m ; 3m-4m-9m ; 3m-4m-10m ; 3m-4m-11m ; 3m-4m-12m ; 3m-4m-13m ; 3m-4m-14m ; 3m-4m-15m ; 3m-5m-6m ; 3m-5m-7m ; 3m-5m-8m ; 3m-5m-9m ; 3m-5m-10m ; 3m-5m-11m ; 3m-5m-12m ; 3m-5m-13m ; 3m-5m-14m ; 3m-5m-15m ; 3m-6m-7m ; 3m-6m-8m ; 3m-6m-9m ; 3m-6m-10m ; 3m-6m-11m ; 3m-6m-12m ; 3m-6m-13m ; 3m-6m-14m ; 3m-6m-15m ; 3m-7m-8m ; 3m-7m-9m ; 3m-7m-10m ; 3m-7m-11m ; 3m-7m-12m ; 3m-7m-13m ; 3m-7m-14m ; 3m-7m-15m ; 3m-8m-9m ; 3m-8m-10m ; 3m-8m-11m ; 3m-8m-12m ; 3m-8m-13m ; 3m-8m-14m ; 3m-8m-15m ; 3m-9m-10m ; 3m-9m-11m ; 3m-9m-12m ; 3m-9m-13m ; 3m-9m-14m ; 3m-9m-15m ; 3m-10m-11m ; 3m-10m-12m ; 3m-10m-13m ; 3m-10m-14m ; 3m-10m-15m ; 3m-11m-12m ; 3m-11m-13m ; 3m-11m-14m ; 3m-11m-15m ; 3m-12m-13m ; 3m-12m-14m ; 3m-12m-15m ; 3m-13m-14m ; 3m-13m-15m ; 3m-14m-15m ; 4m-5m-6m ; 4m-5m-7m ; 4m-5m-8m ; 4m-5m-9m ; 4m-5m-10m ; 4m-5m-11m ; 4m-5m-12m ; 4m-5m-13m ; 4m-5m-14m ; 4m-5m-15m ; 4m-6m-7m ; 4m-6m-8m ; 4m-6m-9m ; 4m-6m-10m ; 4m-6m-11m ; 4m-6m-12m ; 4m-6m-13m ; 4m-6m-14m ; 4m-6m-

15m ; 4m-7m-8m ; 4m-7m-9m ; 4m-7m-10m ; 4m-7m-11m ; 4m-7m-12m ; 4m-7m-13m ; 4m-7m-14m ; 4m-7m-15m ; 4m-8m-9m ; 4m-8m-10m ; 4m-8m-11m ; 4m-8m-12m ; 4m-8m-13m ; 4m-8m-14m ; 4m-8m-15m ; 4m-9m-10m ; 4m-9m-11m ; 4m-9m-12m ; 4m-9m-13m ; 4m-9m-14m ; 4m-9m-15m ; 4m-10m-11m ; 4m-10m-12m ; 4m-10m-13m ; 4m-10m-14m ; 4m-10m-15m ; 4m-11m-12m ; 4m-11m-13m ; 4m-11m-14m ; 4m-11m-15m ; 4m-12m-13m ; 4m-12m-14m ; 4m-12m-15m ; 4m-13m-14m ; 4m-13m-15m ; 4m-14m-15m ; 5m-6m-7m ; 5m-6m-8m ; 5m-6m-9m ; 5m-6m-10m ; 5m-6m-11m ; 5m-6m-12m ; 5m-6m-13m ; 5m-6m-14m ; 5m-6m-15m ; 5m-7m-8m ; 5m-7m-9m ; 5m-7m-10m ; 5m-7m-11m ; 5m-7m-12m ; 5m-7m-13m ; 5m-7m-14m ; 5m-7m-15m ; 5m-8m-9m ; 5m-8m-10m ; 5m-8m-11m ; 5m-8m-12m ; 5m-8m-13m ; 5m-8m-14m ; 5m-8m-15m ; 5m-9m-10m ; 5m-9m-11m ; 5m-9m-12m ; 5m-9m-13m ; 5m-9m-14m ; 5m-9m-15m ; 5m-10m-11m ; 5m-10m-12m ; 5m-10m-13m ; 5m-10m-14m ; 5m-10m-15m ; 5m-11m-12m ; 5m-11m-13m ; 5m-11m-14m ; 5m-11m-15m ; 5m-12m-13m ; 5m-12m-14m ; 5m-12m-15m ; 5m-13m-14m ; 5m-13m-15m ; 5m-14m-15m ; 6m-7m-8m ; 6m-7m-9m ; 6m-7m-10m ; 6m-7m-11m ; 6m-7m-12m ; 6m-7m-13m ; 6m-7m-14m ; 6m-7m-15m ; 6m-8m-9m ; 6m-8m-10m ; 6m-8m-11m ; 6m-8m-12m ; 6m-8m-13m ; 6m-8m-14m ; 6m-8m-15m ; 6m-9m-10m ; 6m-9m-11m ; 6m-9m-12m ; 6m-9m-13m ; 6m-9m-14m ; 6m-9m-15m ; 6m-10m-11m ; 6m-10m-12m ; 6m-10m-13m ; 6m-10m-14m ; 6m-10m-15m ; 6m-11m-12m ; 6m-11m-13m ; 6m-11m-14m ; 6m-11m-

15m ; 6m-12m-13m ; 6m-12m-14m ; 6m-12m-15m ; 6m-13m-14m ; 6m-13m-15m ; 6m-14m-15m ; 7m-8m-9m ; 7m-8m-10m ; 7m-8m-11m ; 7m-8m-12m ; 7m-8m-13m ; 7m-8m-14m ; 7m-8m-15m ; 7m-9m-10m ; 7m-9m-11m ; 7m-9m-12m ; 7m-9m-13m ; 7m-9m-14m ; 7m-9m-15m ; 7m-10m-11m ; 7m-10m-12m ; 7m-10m-13m ; 7m-10m-14m ; 7m-10m-15m ; 7m-11m-12m ; 7m-11m-13m ; 7m-11m-14m ; 7m-11m-15m ; 7m-12m-13m ; 7m-12m-14m ; 7m-12m-15m ; 7m-13m-14m ; 7m-13m-15m ; 7m-14m-15m ; 8m-9m-10m ; 8m-9m-11m ; 8m-9m-12m ; 8m-9m-13m ; 8m-9m-14m ; 8m-9m-15m ; 8m-10m-11m ; 8m-10m-12m ; 8m-10m-13m ; 8m-10m-14m ; 8m-10m-15m ; 8m-11m-12m ; 8m-11m-13m ; 8m-11m-14m ; 8m-11m-15m ; 8m-12m-13m ; 8m-12m-14m ; 8m-12m-15m ; 8m-13m-14m ; 8m-13m-15m ; 8m-14m-15m ; 9m-10m-11m ; 9m-10m-12m ; 9m-10m-13m ; 9m-10m-14m ; 9m-10m-15m ; 9m-11m-12m ; 9m-11m-13m ; 9m-11m-14m ; 9m-11m-15m ; 9m-12m-13m ; 9m-12m-14m ; 9m-12m-15m ; 9m-13m-14m ; 9m-13m-15m ; 9m-14m-15m ; 10m-11m-12m ; 10m-11m-13m ; 10m-11m-14m ; 10m-11m-15m ; 10m-12m-13m ; 10m-12m-14m ; 10m-12m-15m ; 10m-13m-14m ; 10m-13m-15m ; 10m-14m-15m ; 11m-12m-13m ; 11m-12m-14m ; 11m-12m-15m ; 11m-13m-14m ; 11m-13m-15m ; 11m-14m-15m ; 12m-13m-14m ; 12m-13m-15m ; 12m-14m-15m ; 及 13m-14m-15m 。

實例4.

此實例描述一種建立個別HBV siRNA分子之免疫刺激概況的方

法。

自健康成年志願者收集人類全血於個別含肝素真空容器中。將血液收集管倒置8次以防止凝結且與無菌生理鹽水1:1混合，隨後將180微升(μL)此混合物接種於96孔透明聚苯乙烯組織培養板。同時，使用PBS作為稀釋劑來製備各經LNP調配之siRNA分子之10X溶液。二十微升各10X經LNP調配之siRNA添加至含180 μL 血液:生理鹽水之孔中以產生600 nM之最終siRNA濃度。對於各供體，在三個重複孔中測試各siRNA分子。在37°C/5% CO_2 下將經分離之人類血液與個別siRNA分子一起培育24小時。培育後，藉由使培育板以1200 rpm自旋20分鐘來收集血漿。自各孔收集至少125 μL 血漿且轉移至無菌96孔板中並且用透明乙酸酯板密封件密封。

經由Luminex測定法(Luminex Corp, Austin TX, USA)，藉由定量人類干擾素 $\alpha 2$ ($\text{IFN}\alpha 2$)、介白素1受體拮抗劑(IL-1RA)、介白素6(IL-6)及單核細胞趨化因子蛋白-1 (MCP-1)與跟單獨PBS一起培育之人類全血相比之相對誘導水準來產生各siRNA分子之免疫刺激概況。在Luminex 200系統上俘獲數據且使用xPonent 3.1.871.0軟體使用相對於標準曲綫之邏輯5參數加權擬合進行內插。彙集人類全血三次重複實驗且在技術複製物中加以測定。表1中之數據為經PBS處理之得自十二名供體之血液的變化倍數平均值。對於此實驗，使用未經化學修飾之siRNA (S股序列5'-3'：GAAGGCCAGACGCGAAUUATT；SEQ ID NO:31)作為正對照，對於所指示之細胞因子，相對於經PBS處理之血液產生以下倍數增加：25.1 ($\text{IFN}\alpha 2$)；14.3 (IL-1RA)；1,226.5 (IL-6)；及51.6 (MCP-1)。

表1				
	相對於經PBS處理之血液的變化倍數			
名稱：	IFNa2	IL-1RA	IL-6	MCP-1
1m	0.9	5.7	571.3	16.6
2m	1.0	12.9	1,986.8	43.3
3m	0.8	9.6	1,384.1	31.3
4m	1.1	13.3	2,109.1	45.7
5m	1.0	10.6	1,944.9	37.5
6m	0.9	13.2	1,403.1	43.7
7m	1.0	10.5	1,598.3	34.9
8m	1.0	12.2	1,429.3	45.4
9m	0.9	5.6	479.6	16.3
10m	0.7	9.3	945.7	27.2
11m	0.8	9.7	1,189.9	29.8
12m	0.8	9.4	1,111.4	28.0
13m	0.7	8.8	855.5	20.6
14m	1.0	13.5	1,967.7	49.0
15m	0.9	13.3	1,335.4	46.1

實例5.

作為評估HBV siRNA之有義(S)股是否能夠引起RNAi基因調低之手段，構建基於螢光素酶之報導質體以充當S股靜默之感測器。S股靜默之潛在含義包括對與本文中所描述之HBV siRNA之S股具有互補性之內源性基因之不希望或不合需要之「脫靶」效應。理想siRNA將不顯示S股基因靜默能力。

為了構建S股感測報導質體，將實例1中所描述之HBV靶片段選殖於psi-CHECK2質體載體之逆補體方向，介於Renilla螢光素酶終止密碼子與聚腺苷酸化信號之間。名為「psi-HBV BACKWARD」之所得質體轉錄僅允許由S股而非反義股實現RNAi靜默之Renilla螢光素酶-HBV mRNA。值得注意的是，因為當靶mRNA與所述siRNA股之間存在完美互補性時RNAi基因靜默效應最穩定，故此報導基因設計提供

觀測S股之任何靜默能力的最可能時機。預期部分互補性將僅產生較弱或不產生基因靜默。無所注內源性人類 mRNA與表A中所列出之 siRNA之S股完全互補。

藉由在雙螢光素酶報導基因 (DLR) 測定系統 (Promega，Madison，WI，USA)中量測Renilla螢光素酶(RLuc)活性相對於螢火蟲螢光素酶(FLuc)活性之降低來測試HBV siRNA之基因靜默活性。在逆轉染程序中將Cos-7細胞用於96孔板。各孔含有25,000個細胞及40 ng 質體加所指示濃度之與Lipofectamine 2000複合之siRNA。在37℃ /5% CO2下培育24小時之後，移除培養基且處理細胞以便進行螢光量測。自Dual Luciferase® Reporter套組中，將50 ul被動溶解緩衝液(1×濃縮)添加至各孔，避光保存，且在100 rpm下振盪30 min。藉由螢光偵測來評估溶解產物中兩種螢光素酶之表現。計算RLuc/FLuc比且相對於僅經質體轉染之細胞(「負對照」)進行標準化。

所報導之數據為一式三份轉染孔之平均值(表2)。% RLuc/FLuc相對於負對照值100將指示無基因靜默。

表2

名稱	psi-HBV反向		
	%RLuc/FLuc相對於負對照		
	5		
	50 ng/ml	ng/ml	1 ng/ml
3m	99.5	92.1	104.0
12m	98.6	97.6	106.6

在與實驗樣品相同之劑量下直接靶向Renilla螢光素酶基因之正對照 siRNA分別產生 16.1、37.3及91.1之平均 %Rluc/Fluc相對於負對照

值。

使用此實例中所揭示之細胞類型、轉染方法及劑量水準，所指示之siRNA之中靶基因靜默(亦即，採用「psi-HBV」報導基因質體)產生以下%RLuc/FLuc相對於負對照值，表明此等siRNA之中靶靜默在此細胞類型及轉染條件下確實起作用：

3m：在劑量水準50、5及1 ng/ml下分別為9.7、18.2、54.7；及

12m：在劑量水準50、5及1 ng/ml下分別為11.2、24.9、59.5。

總而言之，此等結果指示本文中所描述之HBV siRNA之S股不顯示明顯RNAi基因靜默能力。因此，S股引發不需要之內源性基因靜默之可能性較低或可忽略。

【序列表】

- <110> 加拿大商帕提瓦生物療法股份有限公司
- <120> 用於使B型肝炎病毒基因表現靜默之組成物及方法
- <130> 08155.035TW1
- <140> TW 104132625
- <141> 2015-10-02
- <150> 62/120,149
- <151> 2015-02-24
- <150> 62/059,056
- <151> 2014-10-02
- <160> 31
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223>人工序列之描述：合成寡核苷酸
- <220>
- <221> 修飾鹼基
- <222> (1)..(1)
- <223> UNA 部份
- <220>
- <221> 修飾鹼基
- <222> (2)..(2)
- <223> 2'-O-甲基修飾
- <220>
- <221> 修飾鹼基
- <222> (4)..(4)
- <223> 2'-O-甲基修飾
- <220>
- <221> 修飾鹼基
- <222> (7)..(8)
- <223> 2'-O-甲基修飾
- <220>
- <221> 修飾鹼基
- <222> (14)..(14)
- <223> 2'-O-甲基修飾
- <220>
- <221> 修飾鹼基
- <222> (16)..(16)
- <223> 2'-O-甲基修飾

<220> <221> 修飾鹼基 <222> (20)..(21) <223> UNA 部份	
<400> 1 agguauguug cccguuuguu u	21
<210> 2 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220> <221> 修飾鹼基 <222> (7)..(7) <223> 2'-O-甲基修飾	
<220> <221> 修飾鹼基 <222> (15)..(15) <223> 2'-O-甲基修飾	
<220> <221> 修飾鹼基 <222> (20)..(21) <223> UNA 部份	
<400> 2 acaaacgggc aacauaccuu u	21
<210> 3 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220> <221> 修飾鹼基 <222> (1)..(1) <223> UNA 部份	
<220> <221> 修飾鹼基 <222> (3)..(4) <223> 2'-O-甲基修飾	
<220> <221> 修飾鹼基 <222> (6)..(6)	

<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (18)..(18)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (21)..(21)	
<223> UNA 部份	
<400> 3	
gcucaguuua cuagugccau u	21
<210> 4	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (10)..(10)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (18)..(18)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<400> 4	
uggcacuagu aaacugagcu u	21
<210> 5	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (1)..(1)	
<223> UNA 部份	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (5)..(6)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	

<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (16)..(17)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> UNA 部份

<400> 5
ccgugugcac uucgcucau u

21

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> UNA 部份

<400> 6
ugaagcgaag ugcacacggu u

21

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> UNA 部份

<220>

<221> 修飾鹼基	
<222> (3)..(4)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (6)..(6)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (18)..(18)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (20)..(21)	
<223> UNA 部份	
<400> 7	
gcucaguuua cuagugccau u	21
<210> 8	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (10)..(10)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (18)..(18)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (20)..(21)	
<223> UNA 部份	
<400> 8	
uggcacuagu aaacugagcu u	21
<210> 9	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> UNA 部份

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (5)..(6)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (21)..(21)
<223> UNA 部份

<400> 9
ccgugugcac uucgcucau u 21

<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-甲基修飾

<400> 10
ugaagcgaag ugcacacggu u 21

<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> UNA 部份

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (2)..(4)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (21)..(21)
<223> UNA 部份

<400> 11
cuggcucagu uuacuagugu u 21

<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-甲基修飾

<400> 12
cacuaguaaa cugagccagu u 21

<210> 13

<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> UNA 部份

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (5)..(6)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (16)..(16)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> UNA 部份

<400> 13
ccgugugcac uucgcucau u

21

<210> 14
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> UNA 部份

<400> 14
ugaagcgaag ugcacacggu u

21

<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> UNA 部份

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> UNA 部份

<400> 15
gcucaguuua cuagugccau u

21

<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (20)..(21)	
<223> UNA 部份	
<400> 16	
uggcacuagu aaacugagcu u	21
<210> 17	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (1)..(1)	
<223> UNA 部份	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (2)..(2)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (4)..(4)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (8)..(8)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (14)..(14)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (16)..(16)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (20)..(21)	
<223> UNA 部份	
<400> 17	
agguauguug cccguuuguu u	21

<210> 18
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> UNA 部份

<400> 18
acaaacgggc aacauaccuu u

21

<210> 19
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> UNA 部份

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (13)..(14)

<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (16)..(17)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (20)..(21)	
<223> UNA 部份	
<400> 19	
gccgauccau acugcggaau u	21
<210> 20	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (8)..(8)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (13)..(13)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (18)..(18)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (20)..(21)	
<223> UNA 部份	
<400> 20	
uuccgcagua uggaucggcu u	21
<210> 21	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修飾鹼基	

<222> (1)..(1)
<223> UNA 部份

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (13)..(14)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (16)..(17)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (21)..(21)
<223> UNA 部份

<400> 21
gccgauccau acugcggaau u 21

<210> 22
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-甲基修飾

<400> 22
uuccgcagua uggaucggcu u 21

<210> 23
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> UNA 部份

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (13)..(14)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (17)..(17)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (21)..(21)
<223> UNA 部份

<400> 23
gccgauccau acugcggaau u

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

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基

<222> (13)..(13)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (18)..(18)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<400> 24	
uuccgcagua uggaucggcu u	21
<210> 25	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (1)..(1)	
<223> UNA 部份	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (4)..(4)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (6)..(6)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (13)..(14)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (17)..(17)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (20)..(21)	
<223> UNA 部份	
<400> 25	
gccgauccau acugcggaau u	21
<210> 26	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> UNA 部份

<400> 26
uuccgcagua uggaucggcu u

21

<210> 27
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> UNA 部份

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'-O-甲基修飾

<220>
<221> 修飾鹼基

<222> (14)..(14)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (21)..(21)	
<223> UNA 部份	
<400> 27	
gcucaguuua cuagugccau u	21
<210> 28	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (15)..(15)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<400> 28	
uggcacuagu aaacugagcu u	21
<210> 29	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (1)..(1)	
<223> UNA 部份	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (2)..(3)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (6)..(6)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (12)..(12)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	

<221> 修飾鹼基	
<222> (20)..(21)	
<223> UNA 部份	
<400> 29	
cuggcucagu uuacuagugu u	21
<210> 30	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (15)..(15)	
<223> 2'-O-甲基修飾	
<220>	
<221> 修飾鹼基	
<222> (20)..(21)	
<223> UNA 部份	
<400> 30	
cacuaguaaa cugagccagu u	21
<210> 31	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 組合DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸	
<400> 31	
gaaggccaga cgcgauuat t	21



【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於使B型肝炎病毒基因表現靜默之組成物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR SILENCING HEPATITIS
B VIRUS GENE EXPRESSION

【中文】

本發明提供包含靶向B型肝炎病毒(HBV)基因表現之諸如siRNA之治療性核酸之組成物、包含該等治療性核酸中之一或多種(例如，組合)之脂質粒子，以及遞送及/或投與該等脂質粒子之方法(例如，用於治療人類之HBV感染及/或HDV感染)。

【英文】

The present invention provides compositions comprising therapeutic nucleic acids such as siRNA that target Hepatitis B virus (HBV) gene expression, lipid particles comprising one or more (e.g., a combination) of the therapeutic nucleic acids, and methods of delivering and/or administering the lipid particles (e.g., for treating HBV infection and/or HDV infection in humans).

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種經分離之核酸分子，其係選自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27及SEQ ID NO:29組成之群。

【第2項】

一種經分離之核酸分子，其係選自由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:30組成之群。

【第3項】

一種經分離之雙股siRNA分子，其係選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)及15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群。

【第4項】

一種組成物，其包含如申請專利範圍第3項之經分離之雙股

siRNA分子。

【第5項】

如申請專利範圍第4項之組成物，其包含選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)及15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群的兩個不同的雙股siRNA分子。

【第6項】

如申請專利範圍第5項之組成物，其中該兩個不同的雙股siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。

【第7項】

如申請專利範圍第4項之組成物，其包含選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)及15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群的三個不同的雙股siRNA分子。

【第8項】

如申請專利範圍第7項之組成物，其中該三個不同的雙股 siRNA 分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。

【第9項】

如申請專利範圍第4項至第8項中任一項之組成物，其中該組成物為包含醫藥學上可接受之載劑的醫藥組成物。

【第10項】

如申請專利範圍第4項至第8項中任一項之組成物，其中該 siRNA 使B型肝炎病毒基因之表現靜默。

【第11項】

如申請專利範圍第4項至第8項中任一項之組成物，其係用於在哺乳動物中之細胞中使B型肝炎病毒基因之表現靜默。

【第12項】

如申請專利範圍第4項至第8項中任一項之組成物，其係用於在哺乳動物中改善一或多種與B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染相關之症狀。

【第13項】

如申請專利範圍第4項至第8項中任一項之組成物，其係用於在哺乳動物中治療B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染。

【第14項】

如申請專利範圍第4項至第8項中任一項之組成物，其係用於醫學療法。

【第15項】

如申請專利範圍第4項至第8項中任一項之組成物，其係用於在

哺乳動物中抑制D型肝炎病毒之複製及/或改善D型肝炎病毒感染之一或多種症狀，其中該核酸-脂質粒子或組成物抑制B型肝炎病毒表面抗原之合成。

【第16項】

一種核酸-脂質粒子，其包含：

(a) 一或多種經分離之雙股siRNA分子，其係選自如申請專利範圍第3項之經分離之雙股siRNA分子；

(b) 陽離子脂質；及

(c) 非陽離子脂質。

【第17項】

如申請專利範圍第16項之核酸-脂質粒子，其中該陽離子脂質係選自由以下各項組成之群：1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15))、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(DLin-MP-DMA；化合物(8))、4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7))、5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13))、其鹽及其混合物。

【第18項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其中該非陽離子脂質為膽固醇或其衍生物。

【第19項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其中該非陽離子脂質為磷脂。

【第20項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其中該非陽離子脂質為磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物。

【第21項】

如申請專利範圍第19項之核酸-脂質粒子，其中該磷脂係選自由二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)及其混合物組成之群。

【第22項】

如申請專利範圍第20項之核酸-脂質粒子，其中該磷脂係選自由二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)及其混合物組成之群。

【第23項】

如申請專利範圍第19項之核酸-脂質粒子，其中該磷脂為DPPC或DSPC。

【第24項】

如申請專利範圍第20項之核酸-脂質粒子，其中該磷脂為DPPC或DSPC。

【第25項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其進一步包含抑制粒子聚集之結合脂質。

【第26項】

如申請專利範圍第25項之核酸-脂質粒子，其中該抑制粒子聚集之結合脂質為聚乙二醇(PEG)-脂質結合物。

【第27項】

如申請專利範圍第26項之核酸-脂質粒子，其中該PEG-脂質結合物係選自由PEG-二醯基甘油(PEG-DAG)結合物、PEG-二烷基氧基丙基(PEG-DAA)結合物、PEG-磷脂結合物、PEG-神經醯胺(PEG-Cer)結合物及其混合物組成之群。

【第28項】

如申請專利範圍第27項之核酸-脂質粒子，其中該PEG-脂質結合物為PEG-DAA結合物。

【第29項】

如申請專利範圍第28項之核酸-脂質粒子，其中該PEG-DAA結合物係選自由PEG-二癸基氧基丙基(C₁₀)結合物、PEG-二月桂基氧基丙基(C₁₂)結合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C₁₄)結合物、PEG-二棕櫚基氧基丙基(C₁₆)結合物、PEG-二硬脂基氧基丙基(C₁₈)結合物及其混合物組成之群。

【第30項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其中該siRNA完全囊封在該粒子中。

【第31項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其中該粒子具有約5:1至約15:1之總脂質:siRNA質量比。

【第32項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其中該粒子具有約30 nm至約150 nm之中值直徑。

【第33項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其中該粒子具有電子緻密核心。

【第34項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其中該陽離子脂質佔該粒子中所存在之總脂質的約48莫耳%至約62莫耳%。

【第35項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其包含磷脂及膽固醇或膽固醇衍生物，其中該磷脂佔該粒子中所存在之總脂質的約7莫耳%至約17莫耳%且該膽固醇或其衍生物佔該粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約40莫耳%。

【第36項】

如申請專利範圍第25項之核酸-脂質粒子，其中該抑制粒子聚集之結合脂質佔該粒子中所存在之總脂質的約0.5莫耳%至約3莫耳%。

【第37項】

如申請專利範圍第34項之核酸-脂質粒子，其中該等脂質係如調配物A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y或Z中之任一種中所描述加以調配。

【第38項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其包含選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、

4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)及15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群的兩個不同的雙股siRNA分子。

【第39項】

如申請專利範圍第38項之核酸-脂質粒子，其中該兩個不同的雙股siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。

【第40項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其包含選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)及15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群的三個不同的雙股siRNA分子。

【第41項】

如申請專利範圍第40項之核酸-脂質粒子，其中該三個不同的雙股siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。

【第42項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其係用於在哺乳

動物中之細胞中使**B**型肝炎病毒基因之表現靜默。

【第43項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其係用於在哺乳動物中改善一或多種與**B**型肝炎病毒及/或**D**型肝炎病毒感染相關之症狀。

【第44項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其係用於在哺乳動物中治療**B**型肝炎病毒及/或**D**型肝炎病毒感染。

【第45項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其係用於醫學療法中。

【第46項】

如申請專利範圍第16或17項之核酸-脂質粒子，其係用於在哺乳動物中抑制**D**型肝炎病毒之複製及/或改善**D**型肝炎病毒感染之一或多種症狀，其中該核酸-脂質粒子或組成物抑制**B**型肝炎病毒表面抗原之合成。

【第47項】

一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第16項至第46項中任一項之核酸-脂質粒子及醫藥學上可接受之載劑。

【第48項】

如申請專利範圍第47項之醫藥組成物，其係用於在哺乳動物中抑制**D**型肝炎病毒之複製及/或改善**D**型肝炎病毒感染之一或多種症狀，其中該核酸-脂質粒子或組成物抑制**B**型肝炎病毒表面抗原之合

成。

【第49項】

一種如申請專利範圍第16項至第46項中任一項之核酸-脂質粒子或如申請專利範圍第47項之醫藥組成物的用途，其係用以製備用於在細胞中使B型肝炎病毒基因之表現靜默的藥劑。

【第50項】

如申請專利範圍第49項之用途，其中該細胞處於哺乳動物中。

【第51項】

如申請專利範圍第50項之用途，其中藉由經由全身途徑向該哺乳動物投與該粒子來接觸該細胞。

【第52項】

如申請專利範圍第50或51項之用途，其中該哺乳動物為人類。

【第53項】

如申請專利範圍第52項之用途，其中該人類已被診斷患有由B型肝炎病毒感染或B型肝炎病毒/D型肝炎病毒感染所造成之肝病。

【第54項】

如申請專利範圍第50或51項之用途，其中該B型肝炎病毒基因表現之靜默使該哺乳動物中之B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒粒子負載相對於不存在該核酸-脂質粒子時之B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒粒子負載減少至少約50%。

【第55項】

一種如申請專利範圍第16項至第46項中任一項之核酸-脂質粒子或如申請專利範圍第47項之醫藥組成物的用途，其係用以製備用於在

哺乳動物中改善一或多種與B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染相關之症狀的藥劑。

【第56項】

如申請專利範圍第55項之用途，其中該粒子係經由全身途徑投與。

【第57項】

如申請專利範圍第55或56項之用途，其中該核酸-脂質粒子之該siRNA抑制B型肝炎病毒基因在該哺乳動物中之表現。

【第58項】

如申請專利範圍第55或56項之用途，其中該哺乳動物為人類。

【第59項】

如申請專利範圍第58項之用途，其中該人類患有肝病。

【第60項】

一種如申請專利範圍第16項至第46項中任一項之核酸-脂質粒子或如申請專利範圍第47項之醫藥組成物的用途，其係用以製備用於在哺乳動物中治療B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染之藥劑。

【第61項】

一種如申請專利範圍第4項至第10項中任一項之組成物的用途，其係用以製備用於在細胞中使B型肝炎病毒基因之表現靜默的藥劑。

【第62項】

如申請專利範圍第61項之用途，其中該細胞處於哺乳動物中。

【第63項】

如申請專利範圍第62項之用途，其中藉由經由全身途徑向該哺

乳動物投與該組成物來接觸該細胞。

【第64項】

如申請專利範圍第61或62項之用途，其中該哺乳動物為人類。

【第65項】

如申請專利範圍第64項之用途，其中該人類已被診斷患有由B型肝炎病毒感染或B型肝炎病毒/D型肝炎病毒感染所造成之肝病。

【第66項】

如申請專利範圍第61或62項之用途，其中該B型肝炎病毒基因表現之靜默使該哺乳動物中之B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒粒子負載相對於不存在該核酸-脂質粒子時之B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒粒子負載減少至少約50%。

【第67項】

一種如申請專利範圍第4項至第8項中任一項之組成物的用途，其係用以製備用於在哺乳動物中改善一或多種與B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染相關之症狀的藥劑。

【第68項】

如申請專利範圍第67項之用途，其中該組成物係經由全身途徑投與。

【第69項】

如申請專利範圍第66或67項之用途，其中該組成物之該siRNA抑制B型肝炎病毒基因在該哺乳動物中之表現。

【第70項】

如申請專利範圍第66或67項之用途，其中該哺乳動物為人類。

【第71項】

如申請專利範圍第70項之用途，其中該人類患有肝病。

【第72項】

一種如申請專利範圍第4項至第8項中任一項之組成物的用途，其係用以製備用於在哺乳動物中治療**B**型肝炎病毒及/或**D**型肝炎病毒感染之藥劑。

【第73項】

一種如申請專利範圍第4項至第10項中任一項之組成物、如申請專利範圍第16項至第46項中任一項之核酸-脂質粒子或如申請專利範圍第47項之醫藥組成物之用途，其係用於製備用以在哺乳動物中抑制**D**型肝炎病毒之複製及/或改善**D**型肝炎病毒感染之一或多種症狀的藥劑，其中該核酸-脂質粒子或組成物抑制**B**型肝炎病毒表面抗原之合成。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於使B型肝炎病毒基因表現靜默之組成物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR SILENCING HEPATITIS
B VIRUS GENE EXPRESSION

【技術領域】

本發明係關於用於靜默B型肝炎病毒基因表現的組合物及方法。特別是，本發明係關於包含諸如靶向B型肝炎病毒基因表現的治療性核酸之組合物、包含一或多個此治療性核酸之脂質粒子、及遞送及/或投與此脂質粒子之方法。

【先前技術】

B型肝炎病毒(縮寫為「HBV」)為肝DNA病毒家族之成員。該病毒粒子(有時稱為病毒體)包括外脂質膜及由蛋白質構成之二十面體狀核蛋白殼核心。核蛋白殼囊封病毒DNA及具有反轉錄酶活性之DNA聚合酶。外膜含有參與易感染細胞(典型地，肝臟肝細胞)之病毒結合及進入的嵌埋蛋白質。除感染性病毒粒子以外，可在已感染個體之血清中發現缺乏核心之絲狀及球形體。此等粒子不具傳染性且係由形成被稱為表面抗原(HBsAg)之病毒體之表面的一部分且在病毒生命週期中過量產生之脂質及蛋白質構成。

HBV之基因組由環狀DNA組成，但其不同尋常，此係因為該DNA不完全為雙股。全長股鏈之一端連接於病毒DNA聚合酶。該基因組為3020至3320個核苷酸長(對於全長股鏈)及1700至2800個核苷酸長(對於較短股鏈)。負義(非編碼)與病毒mRNA互補。細胞感染後不久即在核中發現病毒DNA。存在四種已知的由該基因組編碼之基因，稱為C、X、P及S。核心蛋白由基因C (HBcAg)編碼，且其起始密碼子前面為產生前驅核心蛋白之上游同框AUG起始密碼子。HBeAg係由前

驅核心蛋白之蛋白水解處理產生。DNA聚合酶係由基因P編碼。基因S為編碼表面抗原(HBsAg)之基因。HBsAg基因為一個長開放閱讀框，但含有三個同框「起始」(ATG)密碼子，從而將該基因分成三部分，即pre-S1、pre-S2及S。由於多個起始密碼子，故而產生稱為大、中及小之三種不同尺寸之多肽。尚未完全瞭解由基因X編碼之蛋白質之功能，但其與發展肝癌相關。HBV之複製為複雜之過程。儘管複製發生在肝臟中，但該病毒擴散至血液，在已感染人士之血液中發現病毒蛋白質及針對其之抗體。HBV之結構、複製及生物學性質綜述於D. Glebe及C.M.Bremer, *Seminars in Liver Disease*, 第33卷, 第2期, 第103-112頁(2013)中。

人類感染HBV可導致傳染性發炎性肝臟疾病。已感染之個體可能多年不展現症狀。據估計，全世界人口中約有三分之一已在其生命中之某一時間點經感染，包括35000萬長期攜帶者。

該病毒係藉由傳染性血液或體液暴露來傳播。圍產期感染亦可為主要感染途徑。急性疾病造成肝臟發炎、嘔吐、黃疸及可能死亡。慢性B型肝炎最終可能造成肝硬化及肝癌。

儘管大部分感染HBV之人士藉由其免疫系統之作用清除該感染，但一些感染人士遭受侵襲性感染過程(猛暴型肝炎)；而其他為長期感染，從而增加其肝臟疾病之幾率。目前已批准若干種藥療法用於治療HBV感染，但已感染之個體以不同的成功程度響應此等藥療法，且此等藥療法中無一種能自己感染人士體內清除該病毒。

D型肝炎病毒(HDV)為僅可在存在B型肝炎病毒(HBV)之情況下繁殖的小環形包被RNA病毒。特定言之，HDV需要HBV表面抗原蛋白

來繁殖其自身。與僅感染HBV相比，感染HBV及HDV兩者導致更嚴重之併發症。此等併發症包括在急性感染時經歷肝衰竭之可能性更大及快速進展至肝硬化，與慢性感染時發展肝癌之幾率增加。在所有肝炎感染中，D型肝炎與B型肝炎病毒之組合具有最高死亡率。HDV之傳播途徑類似於HBV。感染在很大程度上侷限於處在高HBV感染風險下之人士，尤其是注射藥物使用者，及接受凝血因子濃縮劑之人士。

因而，持續需要用於治療人類之HBV感染以及用於治療人類之HBV/HDV感染的組成物及方法。

【發明內容】

如本文中更充分描述，在一個態樣中，本發明提供經分離之雙股siRNA分子，該等分子各自包括有義股及與該有義股雜交之反義股。本發明之此態樣之siRNA靶向HBV基因組之一或多個基因及/或轉錄產物。本發明之此態樣之siRNA分子之實例為本文中之表A中所闡述之siRNA分子。本發明之siRNA分子當以治療量投與感染HBV或HBV/HDV之人類個體時適用於例如治療HBV感染及/或HDV感染。更一般而言，本發明提供能够在活體外及活體內抑制HBV基因表現或使其靜默之siRNA分子。

在另一態樣中，本發明提供經分離之單股核酸分子，諸如表A中所闡述之siRNA分子之經分離之有義股及反義股。上述經分離之有義股及反義股闡述於本文中之表B中。如本文中更充分描述，本發明之siRNA及單股核酸分子經修飾且包括一或多個UNA部分及/或一或多個2'O-甲基修飾(參見例如表A及表B)。

本發明亦提供包括一或多個本發明siRNA分子(參見例如表A中所

描述之siRNA分子)之組成物，諸如醫藥組成物。在一個實施例中，本發明提供包括兩個不同的本發明siRNA分子(例如，選自本文中之表A中所揭示之siRNA分子的兩個不同的siRNA分子)的組成物。在另一實施例中，本發明提供包括三個不同的本發明siRNA分子(例如，選自本文中之表A中所揭示之siRNA分子的三個不同的siRNA分子)的組成物。選自本文中之表A中所揭示之siRNA分子的兩個不同的siRNA分子的所有可能之組合(「二元組合」)闡述於本文中之實例2中。選自本文中之表A中所揭示之siRNA分子的三個不同的siRNA分子的所有可能之組合(「三元組合」)闡述於本文中之實例3中。因而，在一個態樣中，本發明提供包括表A中所闡述之siRNA之上述二元或三元組合之一的組成物(例如醫藥組成物)。

本發明亦提供核酸-脂質粒子及其調配物，其中該等脂質粒子各自包括本文中所描述之siRNA、陽離子脂質及非陽離子脂質及視情況存在之抑制粒子聚集之結合脂質中的一或多者(例如混合液)。可包括在本發明脂質粒子中之siRNA分子之實例為表A中所闡述之siRNA分子及上述siRNA之組合(例如，本文中所描述之二元及三元組合)。典型地，siRNA完全囊封在脂質粒子內。本發明之脂質粒子適用於例如向感染HBV或HBV/HDV之人體細胞(例如，肝細胞)中遞送治療有效量之siRNA，從而治療HBV感染及/或HDV感染及/或改善HBV感染及/或HDV感染之一或多種症狀。

本發明亦提供一種醫藥組成物，其包含靶向HBV基因表現之siRNA分子之一或其混合液及醫藥學上可接受之載劑。舉例而言，本發明提供各自包括表A中所闡述之靶向HBV基因表現之siRNA分子中

之一個、兩個或三個的醫藥組成物。關於包括囊封於脂質粒子內之 siRNA 混合液的調配物，不同的 siRNA 分子可共囊封於同一脂質粒子中，或混合液中所存在之各類型之 siRNA 種類可囊封在其自身之粒子中，或一些 siRNA 種類可共囊封於同一粒子中，而其他 siRNA 種類囊封在調配物內不同的粒子中。典型地，本發明之 siRNA 分子完全囊封在脂質粒子中。

本發明之核酸-脂質粒子適用於向感染 HBV 或 HBV/HDV 之人類預防性或治療性遞送使一或多個 HBV 基因表現靜默之 siRNA 分子，從而改善人類 HBV 感染及/或 HDV 感染之至少一種症狀。在一些實施例中，將本文中所描述之一或多種 siRNA 分子調配於核酸-脂質粒子中，且將該等粒子投與需要此種治療之哺乳動物(例如，人類)。在某些情況下，可向該哺乳動物投與治療有效量之核酸-脂質粒子，(例如，用於治療人類 HBV 及/或 HDV 感染)。本發明之核酸-脂質粒子特別適用於靶向作為大部分 HBV 基因表現部位之人類肝細胞。核酸-脂質粒子之投與可藉由此項技術中已知的任何途徑，諸如經口、鼻內、靜脈內、腹膜內、肌肉內、關節內、病灶內、氣管內、皮下或皮內。在特定實施例中，核酸-脂質粒子係全身投與，例如經由經腸或非經腸投與途徑。

在一些實施例中，藉由在核酸-脂質粒子投與之後偵測得自哺乳動物之生物樣品中的 HBV RNA 或蛋白水準來判定 HBV 基因表現下調。在其他實施例中，藉由在核酸-脂質粒子投與之後偵測得自哺乳動物之生物樣品中的 HBV mRNA 或蛋白水準來判定 HBV 基因表現下調。在某些實施例中，藉由在粒子投與之後監測哺乳動物中與 HBV 感

染相關之症狀來檢測HBV基因表現下調。

在另一實施例中，本發明提供向活細胞中引入使HBV基因表現靜默之siRNA的方法，該方法包括在siRNA得以進入該細胞且使該細胞內之B型肝炎病毒基因表現靜默的條件下使該細胞與本發明之核酸-脂質粒子接觸的步驟，其中該核酸-脂質粒子包括靶向HBV之siRNA。

在另一實施例中，本發明提供一種用於在人類中改善一或多種與B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染相關之症狀的方法，該方法包括向該人類投與治療有效量之本發明核酸-脂質粒子的步驟。在一些實施例中，本發明之此態樣之方法中所使用之核酸-脂質粒子包括獨立地選自表A中所闡述之siRNA的一種、兩種或三種或、更多種不同的siRNA。

在另一實施例中，本發明提供在有需要之哺乳動物(例如人類)中使HBV基因表現靜默之方法，其中該等方法各自包括向該哺乳動物投與本發明之核酸-脂質粒子的步驟。

在另一態樣中，本發明提供用於在人類中治療及/或改善一或多種與HBV及/或HDV感染相關之症狀的方法，其中該等方法各自包括向該人類投與治療有效量之本發明核酸-脂質粒子的步驟。

本發明之某些實施例提供藉由向感染HDV之HDV個體投與治療有效量之一或多種抑制HBV表面抗原合成之本發明組成物或核酸粒子來抑制HDV複製及/或改善HDV感染之一或多種症狀的組成物及方法。

在另一態樣中，本發明提供用於在有需要之哺乳動物(例如，感

染HBV或HBV/HDV之人類)中抑制HBV表達之方法，其中該等方法各自包括向該哺乳動物投與治療有效量之本發明核酸-脂質粒子的步驟。

在另一態樣中，本發明提供用於在人類中治療HBV及/或HDV感染之方法，其中該等方法各自包括向該人類投與治療有效量之本發明核酸-脂質粒子的步驟。

在另一態樣中，本發明提供本發明之siRNA分子用於在活細胞中抑制B型肝炎病毒基因表現之用途。

在另一態樣中，本發明提供本發明之醫藥組成物用於在活細胞中抑制B型肝炎病毒基因表現之用途。

本發明之組成物(例如，siRNA分子及其經分離之有義股及反義股，及核酸-脂質粒子)亦適用於例如生物測定法(例如，活體內或活體外測定法)中以得到對一或多種HBV基因及/或轉錄產物之表現的抑制，從而研究HBV及/或HDV複製及生物學，及/或研究或調節一或多種HBV基因或轉錄產物之功能。舉例而言，可使用生物測定法篩選本發明之siRNA分子以鑑別可抑制HBV及/或HDV複製且作為用於治療人類HBV及/或HDV感染及/或改善與人類HBV及/或HDV感染相關之至少一種症狀之候選治療劑的siRNA分子。

根據以下詳細描述及圖，本發明之其他目標、特徵及優勢對熟習此項技術者將顯而易見。

【實施方式】

[相關申請案之交叉引用]

本專利申請案主張2014年10月02日申請之美國申請案序列號

62/059,056及2015年2月24日申請之美國申請案序列號62/120,149之優先權權益，該等申請案係以引用之方式併入本文中。

引言

本文中所描述之siRNA藥物療法有利地提供用於治療人類HBV及/或HDV感染及與其相關之症狀的重要新組成物及方法。本發明之實施例可例如每日一次、每週一次或每若干週一次(例如，每兩週、三週、四週、五週或六週一次)投與。

此外，本文中所描述之核酸-脂質粒子使得能夠將諸如siRNA之核酸藥物有效遞送至體內之靶組織及細胞中。脂質粒子之存在可防止核酸酶在血流中降解，允許優先在靶組織中累積且提供藥物進入siRNA可執行其預定RNA干擾功能之細胞質的手段。

定義

除非另外說明，否則如本文中所使用，以下術語具有屬於其之含義。

術語「B型肝炎病毒」(縮寫為HBV)係指作為病毒之肝病毒家族之一部分且能夠在人類中引起肝臟發炎之正嗜肝DNA病毒(Orthohepadnavirus)屬病毒種類。

術語「D型肝炎病毒」(縮寫為HDV)係指能夠在人類中引起肝臟發炎之D型肝炎病毒屬病毒種類。

如本文中所使用之術語「小干擾RNA」或「siRNA」係指當siRNA與靶基因或序列處於同一細胞中時能夠減少或抑制靶基因或序列之表現(例如，藉由介導與siRNA序列互補之mRNA降解或抑制其轉譯)的雙股RNA(亦即，雙鏈體RNA)。siRNA可與靶基因或序列具有實

質性或完全一致性，或可包含錯配區(亦即，錯配模體)。在某些實施例中，siRNA之長度可為約19至25個(雙鏈體)核苷酸，且長度較佳為約20至24、21至22或21至23個(雙鏈體)核苷酸。siRNA雙鏈體可包含具有約1至約4個核苷酸或約2至約3個核苷酸之3'懸垂物及5'磷酸酯末端。siRNA之實例包括而不限於由兩股獨立之分子組裝之雙股聚核苷酸分子，其中一股為有義股且另一股為互補反義股。

siRNA較佳由化學方式合成。siRNA亦可藉由用大腸桿菌RNA酶III或Dicer使較長dsRNA (例如，長度大於約25個核苷酸之dsRNA)裂解來產生。此等酶將dsRNA處理成生物學活性siRNA (參見例如Yang等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:9942-9947 (2002)；Calegari等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:14236 (2002)；Byrom等人, *Ambion TechNotes*, 10(1):4-6 (2003)；Kawasaki等人, *Nucleic Acids Res.*, 31:981-987 (2003)；Knight等人, *Science*, 293:2269-2271 (2001)；及Robertson等人, *J. Biol. Chem.*, 243:82 (1968))。dsRNA之長度較佳為至少50個核苷酸至約100、200、300、400或500個核苷酸。dsRNA之長度可長達1000、1500、2000、5000個核苷酸或更長。dsRNA可編碼完整基因轉錄產物或部分基因轉錄產物。在某些情況下，siRNA可由質體編碼(例如，轉錄為自動摺疊成具有髮夾環之雙鏈體的序列)。

片語「抑制靶基因之表現」係指本發明之siRNA能够使靶基因(例如，HBV基因組內之基因)之表現靜默、減少或受到抑制。為了研究基因靜默之程度，使測試樣品(例如，得自表現該靶基因之相關生物體之生物樣品或表現該靶基因之培養中細胞之樣品)與能使靶基因之表現靜默、減少或受到抑制的siRNA接觸。將測試樣品中靶基因之

表現與未與siRNA接觸之對照樣品(例如，得自表現該靶基因之相關生物體之生物樣品或表現該靶基因之培養中細胞之樣品)中靶基因之表現相比較。對照樣品(例如，表現靶基因之樣品)可分配值100%。在特定實施例中，當測試樣品之值相對於對照樣品(例如，僅緩衝液、靶向不同的基因的siRNA序列、錯義siRNA序列等)為約100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%時，達成靶基因之表現之靜默、抑制或減少。適合之測定法包括而不限於使用熟習此項技術者已知的技術檢查蛋白質或mRNA水準，諸如熟習此項技術者已知的點漬法、北方墨點法、原位雜交、ELISA、免疫沈澱法、酶功能以及表型測定法。諸如siRNA之治療性核酸之「有效量」或「治療有效量」為足以產生所要效應，例如，與在不存在siRNA之情況下所偵測之正常表現水準相比靶序列之表現受到抑制之量。在特定實施例中，當利用siRNA所獲得之值相對於對照(例如，僅緩衝液、靶向不同的基因的siRNA序列、錯義siRNA序列等)為約100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%時，達成對靶基因或靶序列之表現之抑制。適用於量測靶基因或靶序列之表現的測定法包括但不限於使用熟習此項技術者已知的技術檢查蛋白質或mRNA水

準，諸如熟習此項技術者已知的點漬法、北方墨點法、原位雜交、ELISA、免疫沈澱法、酶功能以及表型測定法。

如本文中所使用之術語「核酸」係指含有至少兩個呈單股或雙股形式之核苷酸(亦即，脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)之聚合物且包括DNA及RNA。「核苷酸」含有糖脫氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、鹼基及磷酸基。核苷酸經由磷酸基連接在一起。「鹼基」包括嘌呤及嘧啶，其進一步包括天然化合物腺嘌呤、胸嘧啶、鳥嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷及天然類似物，及嘌呤及嘧啶之合成衍生物，其包括但不限於置放諸如但不限於胺、醇、硫醇、羧酸酯及烷基鹵化物之新反應基團之修飾。核酸包括含已知核苷酸類似物或經修飾之主鏈殘基或鏈聯之核酸，其為合成的、天然存在的及非天然存在的且其具有與參考核酸類似之結合性質。該等類似物及/或經修飾之殘基的實例包括但不限於硫代磷酸酯、磷醯胺、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸及肽-核酸(PNA)。另外，核酸可包括一或多個UNA部分。

術語「核酸」包括任何寡核苷酸或聚核苷酸，其中含有至多60個核苷酸之片段一般稱為寡核苷酸，而更長之片段稱為聚核苷酸。去氧核糖寡核苷酸由稱為去氧核糖的5-碳糖組成，該去氧核糖於該糖之5'與3'碳處被共價接合於磷酸，以形成交替的未分支鏈聚合物。DNA可呈例如反義分子、質體DNA、預凝聚DNA、PCR產物、載體、表現卡匣、嵌合序列、染色體DNA或此等群組之衍生物及組合形式。核糖寡核苷酸由類似之重複結構組成，其中5-碳糖為核糖。RNA可呈以下形式：小干擾RNA (siRNA)、Dicer受質 dsRNA、小髮夾RNA

(shRNA)、不對稱干擾RNA (aiRNA)、微型RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA (vRNA)及其組合。因此，在本發明之上下文中，術語「聚核苷酸」及「寡核苷酸」係指由天然存在之鹼基、糖及糖間(主鏈)鍵聯組成的核苷酸聚合物或寡聚物或核苷單體。術語「聚核苷酸」及「寡核苷酸」亦包括包含非天然存在之單體的聚合物或寡聚物或其具有類似功能之部分。該等經修飾或取代之寡核苷酸往往優於天然形式，此係由於諸多性質之故，舉例而言，諸如增強之細胞攝取、降低之免疫原性及增加之在核酸酶存在下之穩定性。

除非另外指示，否則特定核酸序列亦隱含其經保守修飾之變異體(例如，簡併密碼子取代)、對偶基因、直系同源物、SNP及互補序列以及明確指示之序列。特定言之，簡併密碼子取代可藉由以下方式來達成：產生一或多個所選(或所有)密碼子之第三位混合鹼基及/或去氧肌苷殘基取代之序列(Batzer等, *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka等, *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini等, *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994))。

本發明涵蓋經分離或實質上經純化之核酸分子及含有彼等分子之組成物。在本發明之上下文中，「經分離」或「經純化」之DNA分子或RNA分子為除其天然環境中以外存在之DNA分子或RNA分子。經分離之DNA分子或RNA分子可呈經純化形式存在，或可存在於非天然環境中，舉例而言，諸如轉殖基因宿主細胞。舉例而言，「經分離」或「經純化」之核酸分子或其生物學活性部分當藉由重組技術產生時實質上不含其他細胞物質或培養基或當化學合成時實質上不含化學前驅物或其他化學物質。在一個實施例中，「經分離」之核酸不含

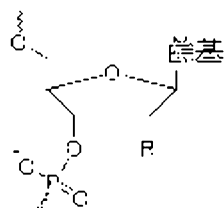
在得到該核酸之生物體之基因組DNA中天然地側接該核酸之序列(亦即，位於該核酸之5'及3'端之序列)。舉例而言，在各種實施例中，經分離之核酸分子可含有少於約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb或0.1 kb在得到該核酸之細胞之基因組DNA中天然地側接該核酸分子之核苷酸序列。

術語「基因」係指包含產生多肽或前驅多肽所必需之編碼序列之部分長度或整個長度的核酸(例如，DNA或RNA)序列。

如本文中所使用之「基因產物」係指諸如RNA轉錄產物或多肽之基因產物。

術語「解鎖核鹼基類似物」(縮寫為「UNA」)係指核糖環之C2'原子與C3'原子非共價鍵聯之非環狀核鹼基。術語「解鎖核鹼基類似物」包括具有稱為結構A之以下結構的核鹼基類似物：

結構A



其中R為羥基，且鹼基為任何天然或非天然鹼基，舉例而言，諸如腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)及胸嘧啶(T)。適用於實施本發明之UNA包括美國專利序列號8,314,227中稱為非環狀2'-3'-閉聯核苷酸單體之分子，該專利係以全文引用之方式併入本文中。

術語「脂質」係指包括但不限於脂肪酸酯之有機化合物群組，且以不溶於水中但可溶於許多有機溶劑中為特徵。其通常分成至少三類：(1)「簡單脂質」，其包括脂肪和油以及蠟；(2)「混配脂質」，其

包括磷脂及糖脂；及(3)「衍生脂質」，諸如類固醇。

術語「脂質粒子」包括可用於向相關靶部位(例如細胞、組織、器官及類似物)遞送治療性核酸(例如siRNA)之脂質調配物。在較佳實施例中，本發明之脂質粒子典型地由陽離子脂質、非陽離子脂質及視情況存在之可防止粒子聚集之已結合脂質形成。包括核酸分子(例如，siRNA分子)之脂質粒子稱為核酸-脂質粒子。典型地，核酸完全囊封在脂質粒子內，從而保護核酸免於酶促降解。

在某些情況下，核酸-脂質粒子非常適用於全身施用，此係由於其在靜脈內(i.v.)注射後可展現較長循環壽命、其可在遠端部位(例如，與投與部位物理上隔開之部位)積聚且其可在此等遠端部位介導靶基因表現之靜默。核酸可與凝聚劑複合且囊封在脂質粒子內，如PCT公開案第WO 00/03683號中所闡述，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

本發明之脂質粒子典型地具有約30 nm 至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約100 nm、約90 nm至約100 nm、約70至約90 nm、約80 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、或約30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm之平均直徑且為實質上無毒的。另外，當存在於本發明之脂質粒子中時，核酸在水溶液中抗核酸酶降解。核酸-脂質粒子及其製備方法揭示於例如美國專利公開案第20040142025號及第20070042031

號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

如本文中所使用，「經脂質囊封」可能係指提供諸如siRNA之治療性核酸以完全囊封、部分囊封或兩者之脂質粒子。在一較佳實施例中，核酸(例如，siRNA)完全囊封於脂質粒子中(例如，以形成核酸-脂質粒子)。

術語「脂質結合物」係指抑制脂質粒子聚集之結合脂質。該等脂質結合物包括但不限於PEG-脂質結合物，諸如與二烷基氧基丙基偶合之PEG (例如，PEG-DAA結合物)、與二醯基甘油偶合之PEG (例如，PEG-DAG結合物)、與膽固醇偶合之PEG、與磷脂醯基乙醇胺偶合之PEG及與神經醯胺結合之PEG (參見例如美國專利第5,885,613號)、陽離子PEG脂質、聚噁唑啉(POZ)-脂質結合物(例如，POZ-DAA結合物)、聚醯胺寡聚物(例如，ATTA-脂質結合物)及其混合物。POZ-脂質結合物之其他實例描述於PCT公開案第WO 2010/006282號中。PEG或POZ可直接與脂質結合，或可經由連接子(linker)部分與脂質連接。適合於使PEG或POZ與脂質偶合之任何連接子部分均可使用，包括例如非含酯連接子部分及含酯連接子部分。在某些較佳實施例中，使用非含酯連接子部分，諸如醯胺或胺基甲酸酯。

術語「兩性脂質」部分係指任何適合之物質，其中該脂質物質之疏水性部分適應疏水相，而親水性部分適應水相。親水性特徵來源於存在諸如碳水化合物、磷酸酯、羧酸、硫酸根、胺基、巰基、硝基、羥基及其他類似基團之極性或帶電基團。可藉由包括非極性基團(包括但不限於長鏈飽和及不飽和脂族烴基)且該等基團經一或多個芳族、環脂族或雜環基團取代而賦予疏水性。兩性化合物之實例包括但

不限於磷脂、胺脂及鞘脂。

磷脂之代表性實例包括但不限於磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、磷脂酸、棕櫚醯油醯磷脂醯膽鹼、溶血磷脂醯膽鹼、溶血磷脂醯乙醇胺、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼、二油醯磷脂醯膽鹼、二硬脂醯磷脂醯膽鹼及二亞麻醯磷脂醯膽鹼。缺乏磷之其他化合物，諸如鞘脂、鞘糖脂家族、二醯基甘油及 β -醯氧基酸，亦在命名為兩性脂質之群組內。另外，上述兩性脂質可與其他脂質混合，包括甘油三酯及固醇。

術語「中性脂質」係指在所選pH值下呈不帶電或中性兩性離子形式存在的許多脂質種類中的任一種。在生理pH值下，該等脂質包括例如二醯基磷脂醯膽鹼、二醯基磷脂醯乙醇胺、神經醯胺、鞘磷脂、腦磷脂、膽固醇、腦苷脂及二醯基甘油。

術語「非陽離子脂質」係指任何兩性脂質以及任何其他中性脂質或陰離子脂質。

術語「陰離子脂質」係指在生理pH值下帶負電之任何脂質。此等脂質包括但不限於磷脂醯甘油、心磷脂、二醯基磷脂醯絲胺酸、二醯基磷脂酸、N-十二醯基磷脂醯乙醇胺、N-琥珀醯磷脂醯乙醇胺、N- γ -戊二醯磷脂醯乙醇胺、離胺醯磷脂醯甘油、棕櫚醯油醯磷脂醯甘油(POPG)及與中性脂質接合之其他陰離子修飾基團。

術語「疏水性脂質」係指具有非極性基團(包括但不限於長鏈飽和及不飽和脂族烴基)且該等基團視情況經一或多個芳族、環脂族或雜環基取代之化合物。適合之實例包括但不限於二醯基甘油、二烷基甘油、N,N-二烷基胺基-1,2-二醯基氧基-3-胺基丙烷及1,2-二烷基-3-胺

基丙烷。

術語「陽離子脂質」及「胺基脂質」在本文中可互換用於包括具有一、二、三或更多個脂肪酸或脂肪烷基鏈及一個pH值可滴定胺基頭部基團(例如烷基胺基或二烷基胺基頭部基團)之彼等脂質及其鹽。陽離子脂質典型地在低於陽離子脂質之 pK_a 的pH值下經質子化(亦即，帶正電)且在高於該 pK_a 之pH值下實質上為中性的。本發明之陽離子脂質亦可稱為可滴定陽離子脂質。在一些實施例中，陽離子脂質包含：可質子化三級胺(例如，pH值可滴定)頭部基團； C_{18} 烷基鏈，其中各烷基鏈獨立地具有0至3 (例如，0、1、2或3)個雙鍵；及介於該頭部基團與烷基鏈之間的醚、酯或酮鍵聯。該等陽離子脂質包括但不限於DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、 γ -DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA (亦稱為DLin-C2K-DMA、XTC2及C2K)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、 γ -DLen-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA (亦稱為MC2)及DLin-M-C3-DMA (亦稱為MC3)。

術語「鹽」包括任何陰離子及陽離子複合物，諸如陽離子脂質與一或多個陰離子之間所形成的複合物。陰離子之非限制性實例包括無機陰離子及有機陰離子，例如氫陰離子、氟離子、氯離子、溴離子、碘離子、草酸根(例如半草酸根)、磷酸根、磷酸根、磷酸氫根、磷酸二氫根、氧離子、碳酸根、碳酸氫根、硝酸根、亞硝酸根、氮陰離子、亞硫酸氫根、硫離子、亞硫酸根、硫酸氫根、硫酸根、硫代硫酸根、硫酸氫根、硼酸根、甲酸根、乙酸根、苯甲酸根、檸檬酸根、酒石酸根、乳酸根、丙烯酸根、聚丙烯酸根、富馬酸根、馬來酸根、

衣康酸根、羥乙酸根、葡萄糖酸根、蘋果酸根、杏仁酸根、巴豆酸根、抗壞血酸根、水楊酸根、聚甲基丙烯酸根、高氯酸根、氯酸根、亞氯酸根、次氯酸根、溴酸根、次溴酸根、碘酸根、烷基磺酸根、芳基磺酸根、砷酸根、亞砷酸根、鉻酸根、重鉻酸根、氰離子、氰酸根、硫氰酸根、氫氧根、過氧根、高錳酸根及其混合物。在特定實施例中，本文中所揭示之陽離子脂質之鹽為結晶鹽。

術語「烷基」包括含有1至24個碳原子之直鏈或分支鏈、非環狀或環狀飽和脂族烴。代表性飽和直鏈烷基包括但不限於甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基及類似基團，而飽和分支鏈烷基包括但不限於異丙基、第二丁基、異丁基、第三丁基、異戊基及類似基團。代表性飽和環狀烷基包括但不限於環丙基、環丁基、環戊基、環己基及類似基團，而不飽和環狀烷基包括但不限於環戊烯基、環己烯基及類似基團。

術語「烯基」包括在相鄰碳原子之間含有至少一個雙鍵之如以上所定義之烷基。烯基包括順式及反式異構體兩者。代表性直鏈及分支鏈烯基包括但不限於乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、異丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基及類似基團。

術語「炔基」包括在相鄰碳之間另外含有至少一個三鍵之如以上所定義之任何烷基或烯基。代表性直鏈及分支鏈炔基包括但不限於乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基及類似基團。

術語「醯基」包括其中連接點上之碳經如以下所定義之側氧基

取代之任何烷基、烯基或炔基。以下為醯基之非限制性實例： $-\text{C}(=\text{O})$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})$ 烯基及 $-\text{C}(=\text{O})$ 炔基。

術語「雜環」包括5至7員單環或7至10員雙環雜環，其為飽和、不飽和或芳族的，且其含有1或2個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子，且其中該氮及硫雜原子可視情況經氧化，且該氮雜原子可視情況經季銨化，包括以上雜環中之任一者與苯環稠合之雙環狀環。雜環可經由任何雜原子或碳原子連接。雜環包括但不限於如以下所定義之雜芳基以及嗎啉基、吡咯啉酮、吡咯啉基、哌啉基、哌嗪基、乙內醯脲基、戊內醯胺基、環氧乙烷基、環氧丙烷基、四氫呋喃基、四氫哌喃基、四氫吡啶基、四氫嘧啶基、四氫噻吩基、四氫噻哌喃基、四氫嘧啶基、四氫噻吩基、四氫噻哌喃基及類似基團。

術語「視情況經取代之烷基」、「視情況經取代之烯基」、「視情況經取代之炔基」、「視情況經取代之醯基」及「視情況經取代之雜環」意謂當經取代時至少一個氫原子經取代基置換。在側氧基取代基($=\text{O}$)之情況下，兩個氫原子經置換。就此而言，取代基包括但不限於側氧基、鹵素、雜環、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OR}^x$ 、 $-\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{C}(=\text{O})\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{SO}_2\text{R}^y$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{SO}_n\text{R}^x$ 及 $-\text{SO}_n\text{NR}^x\text{R}^y$ ，其中 n 為 0、1 或 2， R^x 與 R^y 相同或不同且獨立地為氫、烷基或雜環，且烷基及雜環取代基各自可進一步經一或多個以下基團取代：側氧基、鹵素、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ 、烷基、 $-\text{OR}^x$ 、雜環、 $-\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{C}(=\text{O})\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{SO}_2\text{R}^y$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{SO}_n\text{R}^x$ 及 $-\text{SO}_n\text{NR}^x\text{R}^y$ 。術語「視情況經取代」當用於取代基清單之前時意謂該清單中之取代基各自可視情況如本文中所描述經取代。

術語「鹵素」包括氟、氯、溴及碘。

術語「融合性」係指脂質粒子與細胞之膜融合之能力。該等膜可為胞質膜或圍繞胞器(例如內體、核等)之膜。

如本文中所使用，術語「水溶液」係指完全或部分由水構成之組成物。

如本文中所使用，術語「有機脂質溶液」係指完全或部分由具有脂質之有機溶劑構成之組成物。

術語「電子緻密核心」當用於描述本發明之脂質粒子時係指當使用低溫透射電子顯微術(「cryoTEM」)檢視時脂質粒子內部部分之深色外觀。本發明之一些脂質粒子具有電子緻密核心且缺乏脂質雙層結構。本發明之一些脂質粒子具有電子緻密中心，缺乏脂質雙層結構，且具有逆六方相或立方相結構。儘管不希望受理論束縛，但認為非雙層脂質封裝提供內含水及核酸之脂質柱體三維網狀結構，即，基本上為經含核酸之水性通道貫穿之脂質小滴。

如本文中所使用之「遠端位點」係指物理上分開之位點，其不限於相鄰毛細血管床，而是包括廣泛分佈於生物體中之位點。

與核酸-脂質粒子有關之「血清穩定性」意謂該等粒子在暴露於將顯著降解游離DNA或RNA之血清或核酸酶測定後不顯著降解。適合之測定包括例如標準血清測定、DNA酶測定或RNA酶測定。

如本文中所使用，「全身遞送」係指導致諸如siRNA之活性劑在生物體內之廣泛生物分佈的遞送。一些投與技術可導致某些藥劑而非其他藥劑之全身遞送。全身遞送意謂使適用(較佳為治療)量之藥劑暴露於身體之大部分。為了獲得廣泛生物分佈，一般需要一定的血液生

存期，使得所述藥劑在達到投與部位遠端之疾病部位之前不會快速降解或清除(諸如藉由首先通過器官(肝、肺等)或藉由快速非特异性細胞結合)。脂質粒子之全身遞送可藉由此項技術中已知的任何手段來進行，包括例如靜脈內、皮下及腹膜內。在一較佳實施例中，脂質粒子之全身遞送係藉由靜脈內遞送。

如本文中所使用之「局部遞送」係指將諸如siRNA之活性劑直接遞送至生物體內之目標部位。舉例而言，可藉由直接注入疾病部位、其他目標部位或目標器官(諸如肝臟、心臟、胰臟、腎臟及其類似物)中來局部遞送藥劑。

如本文中所使用之術語「病毒粒子負載」係指諸如血液之體液中所存在之病毒粒子(例如，HBV及/或HDV)之數目的度量。舉例而言，粒子負載可表示為例如每毫升血液之病毒粒子數目。粒子負載測試可使用基於核酸擴增之測試以及非基於核酸之測試來進行(參見例如Puren等人, *The Journal of Infectious Diseases*, 201:S27-36 (2010))。

術語「哺乳動物」係指任何哺乳動物種類，諸如人類、小鼠、大鼠、狗、貓、倉鼠、豚鼠、兔、家畜及其類似物。

某些實施例之描述

本發明提供靶向一或多個HBV基因之表現的siRNA分子、包含該等siRNA中之一或多者(例如，混合液)的核酸-脂質粒子以及遞送及/或投與該等核酸-脂質粒子之方法(例如，用於治療人類之HBV及/或HDV感染)。

在一個態樣中，本發明提供靶向一或多個HBV基因之表現的siRNA分子。在某些情況下，本發明提供包含靶向HBV基因組之不同

區域的siRNA之組合(例如，混合液、彙集物或混合物)的組成物。在某些情況下，本發明之siRNA分子能够在活體外或活體內抑制HBV及/或HDV之複製。

在特定實施例中，本發明提供表A中所示之siRNA分子，其中各雙股siRNA分子之上部股鏈自左向右為5'至3'方向上之有義股；且各雙股siRNA分子之下部股鏈自左向右為5'至3'方向上之反義股。如表A中所示，該等siRNA分子可包含一或多個具有2'-O-甲基修飾之核糖核苷酸及/或一或多個UNA部分。以下表A中所示之IC50值係使用實例1中所描述之測定法來測定。

表A.

名稱	雙鏈體序列	IC 50 (nM)
1m	5' A g G u A U g u U G C C C g U u U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:1) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:2)	1.43
2m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:3) 3' U U <u>C</u> g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:4)	0.37
3m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u u C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:5) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:6)	0.06
4m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:7) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:8)	0.31
5m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:9) 3' U U <u>G</u> g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:10)	0.06
6m	5' <u>C</u> u g g C U C A G U U U A C u A g U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:11) 3' U U <u>G</u> A C C g A g U C A A A U g A U C A C 5' (SEQ ID NO:12)	0.05
7m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:13) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:14)	0.06
8m	5' <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:15) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:16)	0.24
9m	5' A g G u A U G u U G C C C g U u U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:17) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>u</u> C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:18)	0.13

名稱	雙鏈體序列	IC 50 (nM)
10m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:19) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:20)	0.34
11m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:21) 3' U U <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:22)	0.31
12m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:23) 3' U U <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:24)	0.16
13m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:25) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:26)	0.2
14m	5' <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:27) 3' U U <u>C</u> G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:28)	0.16
15m	5' <u>C</u> u g G C u C A G U U u A C U A G U G <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:29) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> A C C g A G U C A A A U G A U C A C 5' (SEQ ID NO:30)	0.17
小寫字母= 2'-O-甲基修飾 下劃線= LNA部分		

在其他實施例中，如本文中之表B中所闡述，本發明提供表A中所闡述之siRNA分子的經分離之有義股及反義股(亦即，經分離之單股核酸分子)。表B中所闡述之核酸序列佈置為序列配對，其中各配對包括有義股及其互補反義股。各序列配對(有義股加反義股)以對應於表A中所示之名稱的特定名稱加以鑑別。

表B中所示之此等經分離之有義股及反義股適用於例如製造適用於在活體內或活體外減少一或多個HBV基因之表現的siRNA分子。此等經分離之有義股及反義股亦適用於例如作為雜交探針，以用於鑑別及量測得自感染HBV或HBV/HDV之人類的諸如組織或血液樣品之生物材料中的HBV基因組的量。

在特定實施例中，本發明之寡核苷酸(諸如表B中所闡述之有義及反義RNA股)與靶聚核苷酸序列特异性雜交或互補。如本文中所使用之術語「特异性雜交」及「互補」指示互補性程度足以在DNA或RNA標靶與寡核苷酸之間發生穩定且特异性結合。應理解，寡核苷酸未必與其將特异性雜交之靶核酸序列100%互補。在較佳實施例中，

當寡核苷酸與靶序列結合干擾靶序列之正常功能，從而造成其效用或表現損失時，寡核苷酸為可特异性雜交的，且互補性程度足以避免寡核苷酸與非靶序列在需要特异性結合之條件下，亦即，在活體內測定或治療性治療之情況下時在生理條件下或在活體外測定情況下時在進行測定之條件下的非特异性結合。因而，寡核苷酸與其靶向或特异性雜交之基因或mRNA序列區域相比可包括1、2、3或更多個鹼基取代。

表B.

名稱	有義序列 (5'-3')	反義序列 (5'-3')
1m	<u>A</u> gGuAUguUGCCCgUuUGUU <u>U</u> (SEQ ID NO:1)	ACAAACgGGCAAC <u>Au</u> ACCU <u>UU</u> (SEQ ID NO:2)
2m	<u>G</u> CuCAgUUUACUAGUGCcAU <u>U</u> (SEQ ID NO:3)	UGGCACUAGuAAACUGAgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:4)
3m	<u>C</u> CGUguGCACUuCGCuCAU <u>U</u> (SEQ ID NO:5)	UGAAGCGAAGUgCACACgGU <u>U</u> (SEQ ID NO:6)
4m	<u>G</u> CuCAgUUUACUAGUGCcAU <u>U</u> (SEQ ID NO:7)	UGGCACUAGuAAACUGAgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:8)
5m	<u>C</u> CGUguGCACUuCGCuUCAU <u>U</u> (SEQ ID NO:9)	UGAAGCGAAGUgCACACgGU <u>U</u> (SEQ ID NO:10)
6m	<u>C</u> uggCUCAGUUUACuAgUGU <u>U</u> (SEQ ID NO:11)	CACUAgUAAACUGAgCCAGU <u>U</u> (SEQ ID NO:12)
7m	<u>C</u> CGUguGCACUuCGCuUCAU <u>U</u> (SEQ ID NO:13)	UGAAGCGAAGUgCACACgGU <u>U</u> (SEQ ID NO:14)
8m	<u>G</u> CuCAgUUUACuAgUGCCA <u>U</u> (SEQ ID NO:15)	UGGCACUAGUAAACuGAGCU <u>U</u> (SEQ ID NO:16)
9m	<u>A</u> gGuAUGuUGCCCgUuUGU <u>U</u> (SEQ ID NO:17)	ACAAACgGGCAAC <u>Au</u> ACCu <u>UU</u> (SEQ ID NO:18)
10m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>Cu</u> gCggAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:19)	UUCCGCAGUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:20)
11m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>Cu</u> gCggAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:21)	UUCCGCAGUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:22)
12m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>Cu</u> gCGgAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:23)	UUCCGCAGUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:24)
13m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>Cu</u> gCGgAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:25)	UUCCGCAGUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:26)
14m	<u>G</u> CuCAgUUUACuAgUGCCA <u>U</u> (SEQ ID NO:27)	UGGCACUAGUAAACuGAGCU <u>U</u> (SEQ ID NO:28)
15m	<u>C</u> uGGuCAGUUuACUAGUG <u>U</u> (SEQ ID NO:29)	CACUAGUAAACUGAgCCAG <u>U</u> (SEQ ID NO:30)
小寫字母= 2'-O-甲基修飾 下劃綫= UNA 部分		

因而，本發明之某些實施例提供一種經分離之雙股siRNA分子，其係選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15

及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)、15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群。

本發明之某些實施例亦提供一種經分離之核酸分子，其係選自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27及SEQ ID NO:29組成之群。

本發明之某些實施例亦提供一種經分離之核酸分子，其係選自由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:30組成之群。

本發明亦提供一種組成物，其包含一或多個本文中所描述之經分離之雙股siRNA分子(例如，表A中所描述之siRNA分子)。

在某些實施例中，該組成物包含選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)、15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群的兩個不同的雙股siRNA分子。在

某些實施例中，該兩個不同的雙股siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。

在某些實施例中，該組成物包含選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)、15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群的三個不同的雙股siRNA分子。在某些實施例中，該三個不同的雙股siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。

本發明亦提供一種醫藥組成物，其包含一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA及醫藥學上可接受之載劑。

在某些實施例中，本文中所描述之組成物包含一或多個siRNA分子，其使B型肝炎病毒基因之表現靜默。

在另一態樣中，本發明提供一種靶向HBV基因表現之核酸-脂質粒子。核酸-脂質粒子典型地包含一或多種(例如，混合液)本文中所描述之經分離之雙股siRNA分子(例如，如表A中所描述)、陽離子脂質及非陽離子脂質。在某些情況下，核酸-脂質粒子進一步包含抑制粒子聚集之結合脂質。核酸-脂質粒子較佳包含一或多種(例如，混合液)本文中所描述之經分離之雙股siRNA分子、陽離子脂質、非陽離子脂質及抑制粒子聚集之結合脂質。

在某些實施例中，該核酸-脂質粒子包含選自由1m (SEQ ID NO:1

及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)、15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群的兩個不同的雙股siRNA分子。在某些實施例中，該兩個不同的雙股siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。

在某些實施例中，該核酸-脂質粒子包含選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)、15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群的三個不同的雙股siRNA分子。在某些實施例中，該三個不同的雙股siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。

在一些實施例中，本發明之siRNA完全囊封在核酸-脂質粒子中。關於包含siRNA混合液之調配物，混合液(例如，具有不同序列的siRNA化合物)中所存在的不同類型siRNA種類可共同囊封於同一粒子中，或混合液中所存在之各類型siRNA種類可囊封在單獨粒子中。siRNA混合液可使用兩種、三種或更多種個別siRNA (各自具有獨特序列)以相同、相似或不同的濃度或莫耳比之混合物調配於本文中所描

述之粒子中。在一個實施例中，使用相同、相似或不同的濃度或莫耳比之各siRNA種類調配siRNA（對應於具有不同的序列的多種siRNA）之混合液，且將不同類型之siRNA共囊封於同一粒子中。在另一實施例中，混合液中所存在之各類型siRNA種類係以相同、相似或不同的siRNA濃度或莫耳比囊封在不同的粒子中，且因而形成之粒子（各自含有不同的siRNA有效負荷）分開投與（例如，根據治療方案，在不同的時間），或一起作為單一單位劑量（例如，與醫藥學上可接受之載劑一起）組合併投與。本文中所描述之粒子具有血清穩定性，對核酸酶降解具有抗性，且實質上對諸如人類之哺乳動物無毒。

本發明之核酸-脂質粒子中之陽離子脂質可包含例如具有本文中所描述之式I至式III之一或多種陽離子脂質或任何其他陽離子脂質種類。在一個實施例中，陽離子脂質為二烷基脂質。在另一實施例中，陽離子脂質為三烷基脂質。在一個特定實施例中，陽離子脂質係選自由以下各項組成之群：1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15))、2,2-二亞麻基-4-(2-二甲基胺基乙基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亞麻基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-DMA)、二亞麻基甲基-3-二甲基胺基丙酸酯(DLin-M-C2-DMA)、4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(DLin-M-C3-DMA；化合物(7))、其鹽及其混合物。

在另一特定實施例中，陽離子脂質係選自由以下各項組成之

群：1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15))、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(DLin-MP-DMA；化合物(8))、4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7))、5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13))、其鹽及其混合物。

在某些實施例中，陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約48莫耳%至約62莫耳%。

本發明之核酸-脂質粒子中的非陽離子脂質可包含例如一或多種陰離子脂質及/或中性脂質。在一些實施例中，非陽離子脂質包含以下中性脂質組分之一：(1)磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物；(2)膽固醇或其衍生物；或(3)磷脂。在某些較佳實施例中，磷脂包含二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)或其混合物。在一較佳實施例中，非陽離子脂質為DPPC與膽固醇之混合物。在一較佳實施例中，非陽離子脂質為DSPC與膽固醇之混合物。

在某些實施例中，非陽離子脂質包含磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物，其中該磷脂佔該粒子中所存在之總脂質的約7莫耳%至約17莫耳%且該膽固醇或其衍生物佔該粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約40莫耳%。

本發明之核酸-脂質粒子中之脂質結合物抑制粒子聚集，且可包含例如本文中所描述之脂質結合物中的一或多種。在一個特定實施例

中，脂質結合物包含PEG-脂質結合物。PEG-脂質結合物之實例包括但不限於PEG-DAG結合物、PEG-DAA結合物及其混合物。在某些實施例中，該PEG-脂質結合物係選自由PEG-二醯基甘油(PEG-DAG)結合物、PEG-二烷基氧基丙基(PEG-DAA)結合物、PEG-磷脂結合物、PEG-神經醯胺(PEG-Cer)結合物及其混合物組成之群。在某些實施例中，PEG-脂質結合物為PEG-DAA結合物。在某些實施例中，脂質粒子中之PEG-DAA結合物可包含PEG-二癸基氧基丙基(C₁₀)結合物、PEG-二月桂基氧基丙基(C₁₂)結合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C₁₄)結合物、PEG-二棕櫚基氧基丙基(C₁₆)結合物、PEG-二硬脂基氧基丙基(C₁₈)結合物或其混合物。在某些實施例中，其中PEG-DAA結合物為PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C₁₄)結合物。在另一實施例中，PEG-DAA結合物為化合物(66) (PEG-C-DMA)結合物。在另一實施例中，脂質結合物包含POZ脂質結合物，諸如POZ-DAA結合物。

在某些實施例中，抑制粒子聚集之結合脂質佔粒子中所存在之總脂質的約0.5莫耳%至約3莫耳%。

在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1之總脂質:siRNA質量比。

在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約30 nm至約150 nm之中值直徑。

在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有電子緻密核心。

在一些實施例中，本發明提供核酸-脂質粒子，其包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)一或多種陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約50莫

耳%至約85莫耳%；(c)一或多種非陽離子脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約13莫耳%至約49.5莫耳%；及(d)一或多種抑制粒子聚集之結合脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約0.5莫耳%至約2莫耳%。

在此實施例之一個態樣中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約52莫耳%至約62莫耳%；(c)磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約36莫耳%至約47莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約1莫耳%至約2莫耳%。在一個特定實施例中，調配物為四組分系統，其包含約1.4莫耳% PEG-脂質結合物(例如，PEG2000-C-DMA)、約57.1莫耳%陽離子脂質(例如，DLin-K-C2-DMA)或其鹽、約7.1莫耳% DPPC (或DSPC)及約34.3莫耳%膽固醇(或其衍生物)。

在此實施例之另一態樣中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約56.5莫耳%至約66.5莫耳%；(c)膽固醇或其衍生物，其佔粒子中所存在之總膽固醇的約31.5莫耳%至約42.5莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約1莫耳%至約2莫耳%。在一個特定實施例中，調配物為三組分系統，其不含磷脂且包含約1.5莫耳% PEG -脂質結合物(例如，PEG2000-C-DMA)、約61.5莫耳%陽離子脂質(例如，DLin-K-C2-DMA)或其鹽及約36.9莫耳%膽固醇(或其衍生物)。

其他調配物描述於PCT公開案第WO 09/127060號及已公開之美國

專利申請公開案第US 2011/0071208 A1號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在其他實施例中，本發明提供核酸-脂質粒子，其包含：(a) 一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)一或多種陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約2莫耳%至約50莫耳%；(c)一或多種非陽離子脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約90莫耳%；及(d)一或多種抑制粒子聚集之結合脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約0.5莫耳%至約20莫耳%。

在此實施例之一個態樣中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約30莫耳%至約50莫耳%；(c)磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約47莫耳%至約69莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約1莫耳%至約3莫耳%。在一個特定實施例中，調配物為四組分系統，其包含約2莫耳% PEG-脂質結合物(例如，PEG2000-C-DMA)、約40莫耳%陽離子脂質(例如，DLin-K-C2-DMA)或其鹽、約10莫耳% DPPC (或DSPC)及約48莫耳%膽固醇(或其衍生物)。

在其他實施例中，本發明提供核酸-脂質粒子，其包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)一或多種陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約50莫耳%至約65莫耳%；(c)一或多種非陽離子脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約45莫耳%；及(d)一或多種抑制粒子聚集之結

合脂質，其佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約10莫耳%。

在此實施例之一個態樣中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約50莫耳%至約60莫耳%；(c)磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約35莫耳%至約45莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約10莫耳%。在某些情況下，調配物中之非陽離子脂質混合物包含：(i)佔粒子中所存在之總脂質之約5莫耳%至約10莫耳%的磷脂；及(ii)佔粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約35莫耳%的膽固醇或其衍生物。在一個特定實施例中，調配物為四組分系統，其包含約7莫耳% PEG-脂質結合物(例如，PEG750-C-DMA)、約54莫耳%陽離子脂質(例如，DLin-K-C2-DMA)或其鹽、約7莫耳% DPPC (或DSPC)及約32莫耳%膽固醇(或其衍生物)。

在此實施例之另一態樣中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約55莫耳%至約65莫耳%；(c)膽固醇或其衍生物，其佔粒子中所存在之總膽固醇的約30莫耳%至約40莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約10莫耳%。在一個特定實施例中，調配物為三組分系統，其不含磷脂且包含約7莫耳% PEG-脂質結合物(例如，PEG750-C-DMA)、約58莫耳%陽離子脂質(例如，DLin-K-C2-DMA)或其鹽及約35莫耳%膽固醇(或其衍生物)。

適用調配物之其他實施例描述於已公開之美國專利申請公開案

第US 2011/0076335 A1號中，該案出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在本發明之某些實施例中，核酸-脂質粒子包含：(a)一或多種(例如，混合液)本文中所描述之siRNA分子(例如，參見表A)；(b)陽離子脂質或其鹽，其佔粒子中所存在之總脂質的約48莫耳%至約62莫耳%；(c)磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物，其中磷脂佔粒子中所存在之總脂質的約7莫耳%至約17莫耳%且其中膽固醇或其衍生物佔粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約40莫耳%；及(d)PEG-脂質結合物，其佔粒子中所存在之總脂質的約0.5莫耳%至約3.0莫耳%。下文包括本發明之此態樣的例示性脂質調配物A-Z。

例示性脂質調配物A包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.2%)、陽離子脂質(53.2%)、磷脂(9.3%)、膽固醇(36.4%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.2%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (53.2%)，磷脂為DPPC (9.3%)，且膽固醇以36.4%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物A，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物A可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的

siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物A可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物B包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(0.8%)、陽離子脂質(59.7%)、磷脂(14.2%)、膽固醇(25.3%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (0.8%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (59.7%)，磷脂為DSPC (14.2%)，且膽固醇以25.3%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物B，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物B可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些

其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物B可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中的任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物C包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.9%)、陽離子脂質(52.5%)、磷脂(14.8%)、膽固醇(30.8%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (1.9%)，陽離子脂質為1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15)) (52.5%)，磷脂為DSPC (14.8%)，且膽固醇以30.8%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物C，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物C可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調

配物C可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物D包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(0.7%)、陽離子脂質(60.3%)、磷脂(8.4%)、膽固醇(30.5%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (0.7%)，陽離子脂質為3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(DLin-MP-DMA；化合物(8)) (60.3%)，磷脂為DSPC (8.4%)，且膽固醇以30.5%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物D，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物D可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例

中，基於核酸脂質粒子之調配物D可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物E包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.8%)、陽離子脂質(52.1%)、磷脂(7.5%)、膽固醇(38.5%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.8%)，陽離子脂質為4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7)) (52.1%)，磷脂為DPPC (7.5%)，且膽固醇以38.5%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物E，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物E可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子

之調配物E可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物F包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(0.9%)、陽離子脂質(57.1%)、磷脂(8.1%)、膽固醇(33.8%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (0.9%)，陽離子脂質為1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15)) (57.1%)，磷脂為DSPC (8.1%)，且膽固醇以33.8%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物F，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物F可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在

某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物F可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物G包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.7%)、陽離子脂質(61.6%)、磷脂(11.2%)、膽固醇(25.5%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (1.7%)，陽離子脂質為1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二-γ-次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ-DLenDMA；化合物(15)) (61.6%)，磷脂為DSPC (11.2%)，且膽固醇以25.5%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物G，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物G可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一

種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物G可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物H包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.1%)、陽離子脂質(55.0%)、磷脂(11.0%)、膽固醇(33.0%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.1%)，陽離子脂質為5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13)) (55.0%)，磷脂為DSPC (11.0%)，且膽固醇以33.0%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物H，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物H可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒

子之調配物H可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物I包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比): PEG-脂質(2.6%)、陽離子脂質(53.1%)、磷脂(9.4%)、膽固醇(35.0%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (2.6%)，陽離子脂質為5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13)) (53.1%)，磷脂為DSPC (9.4%)，且膽固醇以35.0%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物I，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物I可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之

調配物I可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物J包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(0.6%)、陽離子脂質(59.4%)、磷脂(10.2%)、膽固醇(29.8%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (0.6%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (59.4%)，磷脂為DPPC (10.2%)，且膽固醇以29.8%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物J，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物J可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物J可包含三個不同的

siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物K包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比): PEG-脂質(0.5%)、陽離子脂質(56.7%)、磷脂(13.1%)、膽固醇(29.7%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (0.5%)，陽離子脂質為4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7)) (56.7%)，磷脂為DSPC (13.1%)，且膽固醇以29.7%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物K，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物K可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物K可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA

分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物L包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.2%)、陽離子脂質(52.0%)、磷脂(9.7%)、膽固醇(36.2%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (2.2%)，陽離子脂質為1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15)) (52.0%)，磷脂為DSPC (9.7%)，且膽固醇以36.2%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物L，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物L可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物L可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之

組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物M包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比): PEG-脂質(2.7%)、陽離子脂質(58.4%)、磷脂(13.1%)、膽固醇(25.7%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (2.7%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (58.4%)，磷脂為DPPC (13.1%)，且膽固醇以25.7%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物M，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物M可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物M可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描

述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物N包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(3.0%)、陽離子脂質(53.3%)、磷脂(12.1%)、膽固醇(31.5%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (3.0%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (53.3%)，磷脂為DPPC (12.1%)，且膽固醇以31.5%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物N，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物N可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物N可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至

約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物O包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.5%)、陽離子脂質(56.2%)、磷脂(7.8%)、膽固醇(34.7%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.5%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (56.2%)，磷脂為DPPC (7.8%)，且膽固醇以34.7%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物O，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物O可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物O可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1

或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物P包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.1%)、陽離子脂質(48.6%)、磷脂(15.5%)、膽固醇(33.8%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (2.1%)，陽離子脂質為3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(DLin-MP-DMA；化合物(8)) (48.6%)，磷脂為DSPC (15.5%)，且膽固醇以33.8%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物P，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物P可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物P可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分

數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物Q包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.5%)、陽離子脂質(57.9%)、磷脂(9.2%)、膽固醇(30.3%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(**66**)) (2.5%)，陽離子脂質為5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(**13**)) (57.9%)，磷脂為DSPC (9.2%)，且膽固醇以30.3%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物Q，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Q可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Q可包含三個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總

脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物R包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.6%)、陽離子脂質(54.6%)、磷脂(10.9%)、膽固醇(32.8%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.6%)，陽離子脂質為3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(化合物(8)) (54.6%)，磷脂為DSPC (10.9%)，且膽固醇以32.8%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物R，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物R可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物R可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中

之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物S包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.9%)、陽離子脂質(49.6%)、磷脂(16.3%)、膽固醇(31.3%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (2.9%)，陽離子脂質為5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13)) (49.6%)，磷脂為DPPC (16.3%)，且膽固醇以31.3%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物S，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物S可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物S可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總

脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物T包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(0.7%)、陽離子脂質(50.5%)、磷脂(8.9%)、膽固醇(40.0%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (0.7%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (50.5%)，磷脂為DPPC (8.9%)，且膽固醇以40.0%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物T，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物T可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物T可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實

施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物U包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.0%)、陽離子脂質(51.4%)、磷脂(15.0%)、膽固醇(32.6%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (1.0%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (51.4%)，磷脂為DSPC (15.0%)，且膽固醇以32.6%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物U，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物U可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物U可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，

8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物V包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.3%)、陽離子脂質(60.0%)、磷脂(7.2%)、膽固醇(31.5%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (1.3%)，陽離子脂質為1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA) (60.0%)，磷脂為DSPC (7.2%)，且膽固醇以31.5%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如±5% (或例如±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物V，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物V可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物V可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、

9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物W包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(1.8%)、陽離子脂質(51.6%)、磷脂(8.4%)、膽固醇(38.3%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (1.8%)，陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA) (51.6%)，磷脂為DSPC (8.4%)，且膽固醇以38.3%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物W，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物W可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物W可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物X包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.4%)、陽離子脂質(48.5%)、磷脂(10.0%)、膽固醇(39.2%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(66)) (2.4%)，陽離子脂質為1,2-二- γ -次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ -DLenDMA；化合物(15)) (48.5%)，磷脂為DPPC (10.0%)，且膽固醇以39.2%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物X，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物X可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物X可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物Y包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.6%)、陽離子脂質(61.2%)、磷脂(7.1%)、膽固醇(29.2%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DMA (化合物(**66**)) (2.6%)，陽離子脂質為5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(**13**)) (61.2%)，磷脂為DSPC (7.1%)，且膽固醇以29.2%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物Y，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Y可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Y可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

例示性脂質調配物Z包括以下組分(其中組分之百分比值為莫耳百分比)：PEG-脂質(2.2%)、陽離子脂質(49.7%)、磷脂(12.1%)、膽固醇(36.0%)，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。舉例而言，在一個代表性實施例中，PEG-脂質為PEG-C-DOMG (化合物(67)) (2.2%)，陽離子脂質為4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7)) (49.7%)，磷脂為DPPC (12.1%)，且膽固醇以36.0%存在，其中所存在之脂質的實際量可變化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%)。因而，本發明之某些實施例提供一種基於核酸-脂質粒子之調配物Z，其包含本文中所描述之一或多種siRNA分子。舉例而言，在某些實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Z可包含兩個不同的siRNA分子，其中該兩個不同的siRNA分子之組合係選自實例2中所描述之組合中之任一種。在某些其他實施例中，基於核酸脂質粒子之調配物Z可包含三個不同的siRNA分子，其中該三個不同的siRNA分子之組合係選自實例3中所描述之組合中之任一種。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1或約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分數或其中之範圍的總脂質:siRNA質量比。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約9:1之總脂質:siRNA質量比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

因此，本發明之某些實施例提供一種本文中所描述之核酸-脂質粒子，其中該等脂質係如調配物A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y或Z中之任一種中所描述加以調配。

本發明亦提供包含核酸-脂質粒子及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組成物。

本發明之核酸-脂質粒子適用於例如治療性遞送使一或多個HBV基因之表現靜默的siRNA。在一些實施例中，將靶向HBV基因或轉錄產物之不同區域(例如重疊及/或不重疊序列)的siRNA之混合液調配成相同或不同的核酸-脂質粒子，且將該等粒子投與需要該治療之哺乳動物(例如，人類)。在某些情況下，可向哺乳動物投與治療有效量之核酸-脂質粒子，例如，用於在人類中治療HBV及/或HDV感染。

在某些實施例中，本發明提供一種將本文中所描述之一或多種siRNA分子引入細胞中之方法，其係藉由使該細胞與本文中所描述之核酸-脂質粒子接觸。

在某些實施例中，本發明提供一種用於將使B型肝炎病毒基因之表現靜默的一或多種siRNA分子引入細胞中之方法，該方法係藉由使該細胞與本文中所描述之核酸-脂質粒子在siRNA藉以進入該細胞且使該細胞內之該B型肝炎病毒基因之表現靜默的條件下接觸。在某些實施例中，該細胞處於諸如人類之哺乳動物中。在某些實施例中，該人類已被診斷患有B型肝炎病毒感染或B型肝炎病毒/D型肝炎病毒感染。在某些實施例中，B型肝炎病毒基因表現之靜默使哺乳動物中之B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒粒子負載相對於不存在核酸-脂質粒子

時之B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒粒子負載減少至少約50% (例如，約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。

在某些實施例中，本發明提供一種用於在細胞中使B型肝炎病毒基因之表現靜默的方法，該方法包括使包含已表現之B型肝炎病毒基因的細胞與本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)在siRNA藉以進入該細胞且使該細胞內之B型肝炎病毒基因表現靜默之條件下接觸的步驟。在某些實施例中，該細胞處於諸如人類之哺乳動物中。在某些實施例中，該人類已被診斷患有B型肝炎病毒感染或B型肝炎病毒/D型肝炎病毒感染。在某些實施例中，該人類已被診斷患有由B型肝炎病毒感染或B型肝炎病毒/D型肝炎病毒感染所造成之肝病。。在某些實施例中，B型肝炎病毒基因表現之靜默使哺乳動物中之B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒粒子負載相對於不存在核酸-脂質粒子時之B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒粒子負載減少至少約50% (例如，約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。

在一些實施例中，藉由以下投與途徑之一來投與本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)：經口、鼻內、靜脈內、腹膜內、肌肉內、關節內、病灶內、氣管內、皮下及皮內。在特定實施例中，例如經由經腸或非經腸投與途徑全身投與核酸-脂質粒子。

在某些態樣中，本發明提供用於在有需要之哺乳動物(例如，人類)中使HBV基因表現靜默之方法，該方法包括向該哺乳動物投與治

療有效量之包含本文中所描述之一或多種siRNA (例如，表A中所示之一或多種siRNA)的核酸-脂質粒子。在一些實施例中，投與包含本文中所描述之一或多種siRNA的核酸-脂質粒子使HBV RNA水準相對於在不存在該siRNA時(例如，緩衝液對照或無關非HBV靶向siRNA對照)所偵測之HBV RNA水準減少至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中之任何範圍)。在其他實施例中，投與包含一或多種HBV靶向siRNA之核酸-脂質粒子使HBV RNA水準相對於負對照(例如，諸如緩衝液對照或無關非HBV靶向siRNA對照)減少至少約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、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100天或更多天(或其中之任何範圍)。

在其他態樣中，本發明提供用於在有需要之哺乳動物(例如，人類)中使HBV基因表現靜默之方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療有效量之包含本文中所描述之一或多種siRNA (例如，表A中所描述之siRNA)的核酸-脂質粒子。在一些實施例中，投與包含一或多種HBV siRNA之核酸-脂質粒子使HBV mRNA水準相對於在不存在該siRNA時(例如，緩衝液對照或無關非HBV靶向siRNA對照)所偵測之HBV mRNA水準減少至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中之任何範圍)。在其他實施例中，投與包含一或多種HBV靶向siRNA之核酸-脂質粒子使HBV mRNA水準相對於負對照(例如，諸如緩衝液對照或無關非HBV靶向siRNA對照)減少至少約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、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100天或更多天(或其中之任何範圍)。

本發明之某些實施例提供本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)，其係用於在哺乳動物(例如，人類)中之細胞中使B型肝炎病毒基因之表現靜默。

本發明之某些實施例提供本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)之用途，其係用以製備用於在哺乳動物(例如，人類)中之細胞中使B型肝炎病毒基因之表現靜默的藥劑。

在其他態樣中，本發明提供用於在有需要之哺乳動物(例如，人類)中治療、預防HBV及/或HDV感染、降低罹患其之風險或可能性(例如，降低易感染性)、延遲其發作及/或改善一或多與其相關之症狀的方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療有效量之包含本文中所描述之靶向HBV基因表現之一或多種siRNA (例如，如表A中所描述)的核酸-脂質粒子。人類中與HBV及/或HDV感染相關之症狀的實例包括發燒、腹痛、尿液色深、關節疼痛、食欲不振、噁心、嘔吐、虛弱、疲勞及皮膚發黃(黃疸)。

本發明之某些實施例提供一種用於在哺乳動物中治療B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染之方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療

有效量之如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)的步驟。

本發明之某些實施例提供一種核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)，其係用於在哺乳動物(例如，人類)中治療B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染。

本發明之某些實施例提供核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)之用途，其係用以製備用於在哺乳動物(例如，人類)中治療B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染之藥劑。

本發明之某些實施例提供一種用於在哺乳動物中改善與B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染相關之一或多種症狀的方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療有效量之包含本文中所描述之一或多種siRNA分子(例如，如表A中所描述)的本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)的步驟。在某些實施例中，粒子係經由全身途徑投與。在某些實施例中，核酸-脂質粒子之siRNA抑制B型肝炎病毒基因在哺乳動物中之表現。在某些實施例中，哺乳動物為人類。在某些實施例中，人類患有肝病。

本發明之某些實施例提供一種如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)，其係用於在哺乳動物(例如，人類)中改善一或多種與B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染相關之症狀。

本發明之某些實施例提供如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)之用途，其係用以製備用於在哺乳動物(例如，人類)中改善一或多種與B型肝炎病毒及/或D型肝炎病毒感染相關之症狀的藥劑。

本發明之某些實施例提供一種用於在哺乳動物(例如，人類)中抑制HDV之複製及/或改善HDV感染之一或多種症狀的方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療有效量之如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)的步驟，其中該核酸-脂質粒子或組成物抑制HBV表面抗原之合成。

本發明之某些實施例提供一種如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)，其係用於在哺乳動物(例如，人類)中抑制HDV之複製及/或改善HDV感染之一或多種症狀，其中該核酸-脂質粒子或組成物抑制HBV表面抗原之合成。

本發明之某些實施例提供如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)的用途，其係用以製備用於在哺乳動物(例如，人類)中抑制HDV之複製及/或改善HDV感染之一或多種症狀的藥劑，其中該核酸-脂質粒子或組成物抑制HBV表面抗原之合成。

本發明之某些實施例提供一種如本文中所描述之核酸-脂質粒子或組成物(例如，醫藥組成物)，其係用於醫學療法中。

在其他態樣中，本發明提供用於在有需要之哺乳動物(例如，人類)(例如，罹患HBV感染或HBV/HDV感染之人類)中使HBV及/或HDV不活化之方法，該方法包括向該哺乳動物投與治療有效量之包含本文中所描述之靶向HBV基因表現之一或多種siRNA的核酸-脂質粒子。在一些實施例中，投與包含一或多種HBV靶向siRNA之核酸-脂質粒子使HBV蛋白水準(例如，HBV表面抗原蛋白)相對於不存在該siRNA時(例如，緩衝液對照或無關非HBV靶向siRNA對照)所偵測之HBV蛋白水準下降、減少或降低至少約5%、10%、15%、20%、

25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中之任何範圍)。

舉例而言，可使用分支DNA測定法(QuantiGene®；Affymetrix)量測HBV mRNA。分支DNA測定法為使用bDNA分子擴增來自所俘獲之靶RNA之信號的夾心核酸雜交法。

除其在出於治療目的使任一HBV基因之表現靜默方面之效用以外，本文中所描述之siRNA亦適用於研究及開發應用以及診斷、預防、預後、臨床及其他健康照護應用。作為一非限制性實例，siRNA可用於針對測試HBV基因家族之特定成員是否具有作為治療標靶之潛力的標靶驗證研究。

產生siRNA分子

siRNA可呈若干形式提供，包括例如作為一或多個經分離之小干擾RNA (siRNA)雙鏈體、作為較長之雙股RNA (dsRNA)或作為自DNA質體中之轉錄卡匣轉錄之siRNA或dsRNA。在一些實施例中，可由酶或藉由部分/總有機合成來產生siRNA，且可藉由活體外酶促或有機合成來引入經修飾之核糖核苷酸。在某些情況下，各股係以情況化學方式製備。合成RNA分子之方法在此項技術中為已知的，例如，如Verma及Eckstein (1998)中所描述或如本文中所描述之化學合成方法。

用於分離RNA、合成RNA、使核酸雜交、製造及篩選cDNA庫及進行PCR之方法在此項技術中為熟知的(參見例如Gubler及Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983)；Sambrook等人, *同上*；Ausubel等人, *同上*)。

上)，PCR方法同樣如此(參見例如美國專利第4,683,195號及第4,683,202號；*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis等人編，1990))。表現庫對於熟習此項技術者亦為熟知的。揭示本發明所使用之一般方法的其他基本文稿包括 Sambrook 等人，*Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第2版，1989)；Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990)；及 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人編，1994)。此等參考文獻之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

siRNA較佳由化學方式合成。包含本發明之siRNA分子的寡核苷酸可使用此項技術中已知的多種技術中的任一種來合成，諸如以下文獻中所描述之彼等技術：Usman等人，*J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987)；Scaringe等人，*Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990)；Wincott等人，*Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995)；及Wincott等人，*Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997)。寡核苷酸之合成利用常用核酸保護基及偶合基，諸如5'端之二甲氧基三苯甲基及3'端之亞磷醯胺。作為一非限制性實例，可在Applied Biosystems合成器上使用0.2 μmol 規模方案進行小規模合成。或者，0.2 μmol 規模之合成可在得自Protogene (Palo Alto, CA)之96孔板合成器上進行。然而，更大或更小之合成規模亦在本發明之範疇內。用於寡核苷酸合成之適合試劑、用於RNA脫保護之方法及用於RNA純化之方法對於熟習此項技術者為已知的。

可由兩個不同的寡核苷酸組裝siRNA分子，其中一個寡核苷酸包含siRNA之有義股且另一個包含siRNA之反義股。舉例而言，可分開合成各股且在合成及/或脫保護之後藉由雜交或連接而接合在一起。

含有治療性核酸之載劑系統

A. 脂質粒子

在某些態樣中，本發明提供包含一或多種siRNA分子(例如，表A中所描述之一或多種siRNA分子)及一或多種陽離子(胺基)脂質或其鹽的脂質粒子。在一些實施例中，本發明之脂質粒子進一步包含一或多種非陽離子脂質。在其他實施例中，脂質粒子進一步包含一或多種能够减少或抑制粒子聚集之結合脂質。

本發明之脂質粒子較佳包含一或多種siRNA分子(例如，表A中所描述之siRNA分子)、陽離子脂質、非陽離子脂質及抑制粒子聚集之結合脂質。在一些實施例中，將siRNA分子完全囊封在脂質粒子之脂質部分內，使得脂質粒子中之siRNA分子在水溶液中對核酸酶降解具有抗性。在其他實施例中，本文中所描述之脂質粒子實質上對諸如人類之哺乳動物無毒。本發明之脂質粒子典型地具有約30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm或約70至約90 nm之平均直徑。在某些實施例中，本發明之脂質粒子具有約30 nm至約150 nm之中值直徑。本發明之脂質粒子亦典型地具有約1:1至約100:1、約1:1至約50:1、約2:1至約25:1、約3:1至約20:1、約5:1至約15:1或約5:1至約10:1之脂質:核酸比(例如，脂質:siRNA比)(質量/質量比)。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1之脂質:siRNA質量比。

在較佳實施例中，本發明之脂質粒子為血清穩定性核酸-脂質粒子，其包含一或多種siRNA分子(例如，如表A中所描述之siRNA分子)、陽離子脂質(例如，如本文中所闡述之一或多種具有式I至式III

之陽離子脂質或其鹽)、非陽離子脂質(例如,一或多種磷脂與膽固醇之混合物)及抑制粒子聚集之結合脂質(例如,一或多種PEG-脂質結合物)。脂質粒子可包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個靶向本文中所描述之一或多個基因的siRNA分子(例如,表A中所描述之siRNA分子)。核酸-脂質粒子及其製備方法描述於例如美國專利第5,753,613號、第5,785,992號、第5,705,385號、第5,976,567號、第5,981,501號、第6,110,745號及第6,320,017號以及PCT公開案第WO 96/40964號中,其揭示內容各自出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在本發明之核酸-脂質粒子中,一或多個siRNA分子(例如,如表A中所描述之siRNA分子)可完全囊封在粒子之脂質部分內,從而保護siRNA免於核酸酶降解。在某些情況下,核酸-脂質粒子中之siRNA在該粒子於37℃下暴露於核酸酶至少約20、30、45或60分鐘之後實質上不降解。在某些其他情況下,核酸-脂質粒子中之siRNA在該粒子在37℃下於血清中培育至少約30、45或60分鐘或至少約2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34或36小時之後實質上不降解。在其他實施例中,使siRNA與該粒子之脂質部分複合。本發明調配物之益處之一為核酸-脂質粒子組成物對諸如人類之哺乳動物實質上無毒。

術語「完全囊封」指示核酸-脂質粒子中之siRNA(例如,如表A中所描述之siRNA分子)在暴露於血清或會顯著降解游離DNA或RNA之核酸酶測定之後不顯著降解。在完全囊封之系統中,在正常將降解100%游離siRNA之治療中,較佳少於約25%之處於粒子中之siRNA降

解，更佳少於約10%且最佳少於約5%之處於粒子中之siRNA降解。

「完全囊封」亦指示核酸-脂質粒子為血清穩定的，亦即，其在活體內投與後不快速分解成其組成部分。

在核酸之情形下，完全囊封可藉由進行使用當與核酸締合時具有增強之螢光的染料的膜不滲透性螢光染料排除測定法來測定。諸如OliGreen[®]及RiboGreen[®] (Invitrogen Corp. ; Carlsbad, CA)之特定染料可用於質體DNA、單股脫氧核糖核苷酸及/或單股或雙股核糖核苷酸之定量測定。囊封係藉由向脂質體調配物中添加染料，量測所產生之螢光且將其與添加少量非離子清潔劑後所觀測之螢光相比較來測定。清潔劑介導之脂質體雙層破環釋放所囊封之核酸，從而允許其與膜不滲透性染料相互作用。核酸囊封率可計算為 $E = (I_o - I)/I_o$ ，其中 I 及 I_o 係指添加清潔劑前後之螢光強度(參見Wheeler等人, *Gene Ther.*, 6:271-281 (1999))。

在其他實施例中，本發明提供一種核酸-脂質粒子組成物，其包含多種核酸-脂質粒子。

在一些情況下，核酸-脂質粒子組成物包含完全囊封在粒子之脂質部分內的siRNA分子，使得約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約30%至約95%、約40%至約95%、約50%至約95%、約60%至約95%、約70%至約95%、約80%至約95%、約85%至約95%、約90%至約95%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%或至少約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、

75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99% (或其任何分數或其中之範圍)之粒子中囊封有 siRNA。

在其他情況下，核酸-脂質粒子組成物包含完全囊封在粒子之脂質部分內的 siRNA 分子，使得約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約30%至約95%、約40%至約95%、約50%至約95%、約60%至約95%、約70%至約95%、約80%至約95%、約85%至約95%、約90%至約95%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%或至少約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99% (或其任何分數或其中之範圍)之輸入 siRNA 囊封在粒子中。

視本發明之脂質粒子之預定用途而定，組分之比例可變化且特定調配物之遞送效率可使用例如核內體釋放參數(ERP)測定法加以量測。

1. 陽離子脂質

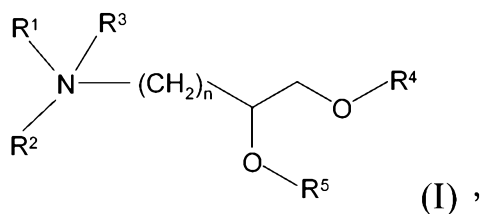
多種陽離子脂質或其鹽中之任一種均可單獨或與一或多種其他陽離子脂質種類或非陽離子脂質種類組合用於本發明之脂質粒子中。陽離子脂質包括其(R)及/或(S)對映異構體。

在本發明之一個態樣中，陽離子脂質為二烷基脂質。舉例而言，二烷基脂質可包括包含兩個飽和或不飽和烷基鏈之脂質，其中該

等烷基鏈各自可經取代或未經取代。在某些實施例中，該兩個烷基鏈各自包含至少例如8個碳原子、10個碳原子、12個碳原子、14個碳原子、16個碳原子、18個碳原子、20個碳原子、22個碳原子或24個碳原子。

在本發明之一個態樣中，陽離子脂質為三烷基脂質。舉例而言，三烷基脂質可包括包含三個飽和或不飽和烷基鏈之脂質，其中該等烷基鏈各自可經取代或未經取代。在某些實施例中，該三個烷基鏈各自包含至少例如8個碳原子、10個碳原子、12個碳原子、14個碳原子、16個碳原子、18個碳原子、20個碳原子、22個碳原子或24個碳原子。

在一個態樣中，具有以下結構之式I陽離子脂質適用於本發明：



或其鹽，其中：

R^1 與 R^2 相同或不同且獨立地為氫(H)或視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基，或 R^1 與 R^2 可接合以形成具有4至6個碳原子及1或2個選自由氮(N)、氧(O)及其混合物組成之群的雜原子的視情況經取代之雜環；

R^3 不存在或為氫(H)或 C_1 - C_6 烷基以提供四級胺；

R^4 與 R^5 相同或不同且獨立地為視情況經取代之 C_{10} - C_{24} 烷基、 C_{10} - C_{24} 烯基、 C_{10} - C_{24} 炔基或 C_{10} - C_{24} 醯基，其中 R^4 及 R^5 中至少一者包含至少兩個不飽和位點；且

n 為0、1、2、3或4。

在一些實施例中， R^1 及 R^2 獨立地為視情況經取代之 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。在一個較佳實施例中， R^1 及 R^2 均為甲基。在其他較佳實施例中， n 為1或2。在其他實施例中，當pH值高於陽離子脂質之 pK_a 時 R^3 不存在且當pH值低於陽離子脂質之 pK_a 時 R^3 為氫，以便將胺基頭部基團質子化。在一替代實施例中， R^3 為視情況經取代之 C_1 - C_4 烷基以提供四級胺。在其他實施例中， R^4 及 R^5 獨立地為視情況經取代之 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烷基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烯基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 炔基或 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 醯基，其中 R^4 及 R^5 中至少一者包含至少兩個不飽和位點。

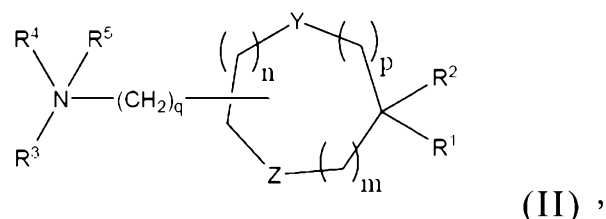
在某些實施例中， R^4 及 R^5 獨立地選自由十二碳二烯基部分、十四碳二烯基部分、十六碳二烯基部分、十八碳二烯基部分、二十碳二烯基部分、十二碳三烯基部分、十四碳三烯基部分、十六碳三烯基部分、十八碳三烯基部分、二十碳三烯基部分、花生四烯醯基部分及二十二碳六烯醯基部分以及其醯基衍生物(例如，亞麻醯基、次亞麻醯基、 γ -亞麻醯基等)組成之群。在一些情況下， R^4 及 R^5 之一包含分支鏈烷基(例如植烷基部分)或其醯基衍生物(例如，植烷醯基部分)。在某些情況下，十八碳二烯基部分為亞麻基部分。在某些其他情況下，十八碳三烯基部分為次亞麻基部分或 γ -次亞麻基部分。在某些實施例中， R^4 及 R^5 均為亞麻基部分、次亞麻基部分或 γ -次亞麻基部分。在特定實施例中，式I之陽離子脂質為1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亞麻基氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-DLinDMA)、1,2-二亞麻醯氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-

DLinDAP)或其混合物。

在一些實施例中，式I之陽離子脂質與一或多個陰離子形成鹽(較佳為結晶鹽)。在一個特定實施例中，式I之陽離子脂質為其草酸(例如，半草酸)鹽，該鹽較佳為結晶鹽。

諸如DLinDMA及DLenDMA以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於美國專利公開案第20060083780號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。諸如C2-DLinDMA及C2-DLinDAP以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於國際專利申請案第WO2011/000106號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在另一態樣中，具有以下結構之式II之陽離子脂質(或其鹽)適用於本發明：



其中R¹與R²相同或不同且獨立地為視情況經取代之C₁₂-C₂₄烷基、C₁₂-C₂₄烯基、C₁₂-C₂₄炔基或C₁₂-C₂₄醯基；R³與R⁴相同或不同且獨立地為視情況經取代之C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基或C₂-C₆炔基，或R³與R⁴可接合以形成具有4至6個碳原子及1或2個選自氮及氧之雜原子的視情況經取代之雜環；R⁵不存在或為氫(H)或C₁-C₆烷基以提供四級胺；m、n及p相同或不同且獨立地為0、1或2，其限制條件為m、n及p不同時為0；q為0、1、2、3或4；且Y與Z相同或不同且獨立地為O、S或NH。在一較佳實施例中，q為2。

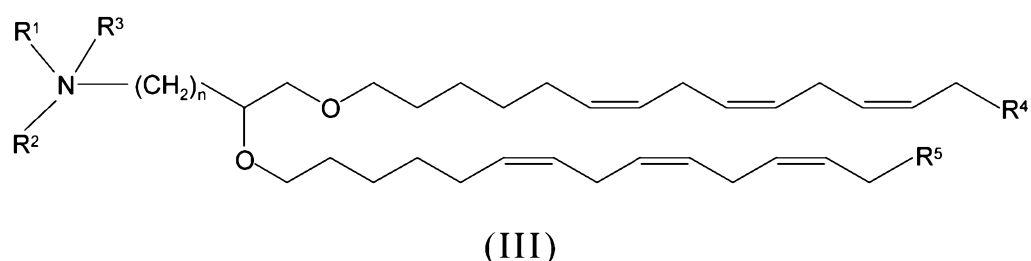
在一些實施例中，式II之陽離子脂質為2,2-二亞麻基-4-(2-二甲基胺基乙基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-C2-DMA；「XTC2」或「C2K」)、2,2-二亞麻基-4-(3-二甲基胺基丙基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-C3-DMA；「C3K」)、2,2-二亞麻基-4-(4-二甲基胺基丁基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-C4-DMA；「C4K」)、2,2-二亞麻基-5-二甲基胺基甲基-[1,3]-二噁烷(DLin-K6-DMA)、2,2-二亞麻基-4-N-甲基哌嗪基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-MPZ)、2,2-二亞麻基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-DMA)、2,2-二油醯基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DO-K-DMA)、2,2-二硬脂醯基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DS-K-DMA)、2,2-二亞麻基-4-N-嗎啉基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-MA)、2,2-二亞麻基-4-三甲基胺基-[1,3]-二氧戊環氯化物(DLin-K-TMA.Cl)、2,2-二亞麻基-4,5-雙(二甲基胺基甲基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-K²-DMA)、2,2-二亞麻基-4-甲基哌嗪-[1,3]-二氧戊環(D-Lin-K-N-甲基哌嗪)或其混合物。在較佳實施例中，式II之陽離子脂質為DLin-K-C2-DMA。

在一些實施例中，式II之陽離子脂質與一或多個陰離子形成鹽(較佳為結晶鹽)。在一個特定實施例中，式II之陽離子脂質為其草酸(例如，半草酸)鹽，該鹽較佳為結晶鹽。

諸如DLin-K-DMA以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於PCT公開案第WO 09/086558號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。諸如DLin-K-C2-DMA、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLin-K6-DMA、DLin-K-MPZ、DO-K-DMA、DS-K-DMA、DLin-K-MA、DLin-K-TMA.Cl、DLin-K²-DMA及D-Lin-K-N-甲基哌嗪以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於

2009年10月9日申請之名為「Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids」之PCT申請案第PCT/US2009/060251號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在另一態樣中，具有以下結構之式III陽離子脂質適用於本發明：



或其鹽，其中： R^1 與 R^2 相同或不同且獨立地為視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基，或 R^1 與 R^2 可接合以形成具有4至6個碳原子及1或2個選自由氮(N)、氧(O)及其混合物組成之群的雜原子的視情況經取代之雜環； R^3 不存在或為氫(H)或 C_1 - C_6 烷基以提供四級胺； R^4 及 R^5 不存在或存在且當存在時相同或不同且獨立地為視情況經取代之 C_1 - C_{10} 烷基或 C_2 - C_{10} 烯基；且n為0、1、2、3或4。

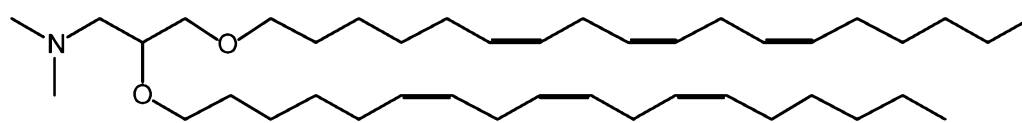
在一些實施例中， R^1 及 R^2 獨立地為視情況經取代之 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。在一較佳實施例中， R^1 及 R^2 均為甲基。在另一較佳實施例中， R^4 及 R^5 均為丁基。在另一較佳實施例中，n為1。在其他實施例中，當pH值高於陽離子脂質之 pK_a 時 R^3 不存在且當pH值低於陽離子脂質之 pK_a 時 R^3 為氫，以便將胺基頭部基團質子化。在一替代實施例中， R^3 為視情況經取代之 C_1 - C_4 烷基以提供四級胺。在其他實施例中， R^4 及 R^5 獨立地為視情況經取代之 C_2 - C_6 或 C_2 - C_4 烷基或 C_2 - C_6 或 C_2 - C_4 烯基。

在一替代實施例中，式III之陽離子脂質包含介於胺基頭部基團

與兩個烷基鏈之一或兩者之間的酯鍵聯。在一些實施例中，式III之陽離子脂質與一或多個陰離子形成鹽(較佳為結晶鹽)。在一個特定實施例中，式III之陽離子脂質為其草酸(例如，半草酸)鹽，該鹽較佳為結晶鹽。

儘管式III中之烷基鏈各自在位置6、9及12上含有順式雙鍵(亦即，順,順,順- $\Delta^6, \Delta^9, \Delta^{12}$)，但在一替代實施例中，兩個烷基鏈之一或兩者中之此等雙鍵中一、二或三個可呈反式構形。

在一尤佳實施例中，式III之陽離子脂質具有以下結構：



γ -DLenDMA (15)。

諸如 γ -DLenDMA (15)以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於2009年7月1日申請之名為「Improved Cationic Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids」之美國臨時申請案第61/222,462號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

諸如DLin-M-C3-DMA (「MC3」)以及其他陽離子脂質(例如，MC3之某些類似物)之陽離子脂質之合成描述於2009年6月10日申請之名為「Novel Lipids and Compositions for the Delivery of Therapeutics」之美國臨時申請案第61/185,800號及2009年12月18日申請之名為「Methods and Compositions for Delivery of Nucleic Acids」之美國臨時申請案第61/287,995號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

可包括在本發明之脂質粒子中的其他陽離子脂質或其鹽之實例包括但不限於陽離子脂質，諸如WO2011/000106中所描述之彼等陽離子脂質，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中；以及陽離子脂質，諸如N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化銨(DODAC)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DODMA)、1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DSDMA)、N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨(DDAB)、N-(1-(2,3-二油醯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)、3-(N-(N',N'-二甲基胺基乙烷)-胺甲醯基)膽固醇(DC-Chol)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥基乙基溴化銨(DMRIE)、2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺-甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙烷三氟乙酸銨(DOSPA)、二(十八烷基)醯胺甘胺醯基精胺(DOGS)、3-二甲基胺基-2-(膽固醇-5-烯-3- β -氧基丁-4-氧基)-1-(順,順-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷(CLinDMA)、2-[5'-(膽固醇-5-烯-3- β -氧基)-3'-氧雜戊氧基]-3-二甲基-1-(順,順-9',12'-十八碳二烯氧基)丙烷(CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油烯基氧基苯甲胺(DMOBA)、1,2-N,N'-二油烯基胺甲醯基-3-二甲基胺基丙烷(DOcarbDAP)、1,2-N,N'-二亞麻基胺甲醯基-3-二甲基胺基丙烷(DLincarbDAP)、1,2-二亞麻基胺甲醯基氧基-3-二甲基胺基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亞麻基氧基-3-(二甲基胺基)乙醯氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亞麻基氧基-3-嗎啉基丙烷(DLin-MA)、1,2-二亞麻醯基-3-二甲基胺基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亞麻基硫-3-二甲基胺基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亞麻醯基-2-亞麻基氧基-3-二甲基胺基丙烷(DLin-2-DMA)、1,2-二亞麻基氧基-3-三

甲基胺基丙烷氯化物鹽(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亞麻醯基-3-三甲基丙烷氯化物鹽(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亞麻基氧基-3-(N-甲基哌嗪基)丙烷(DLin-MPZ)、3-(N,N-二亞麻基胺基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基胺基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亞麻基側氧基-3-(2-N,N-二甲基胺基)環氧丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二油烯基胺甲醯基氧基-3-二甲基胺基丙烷(DO-C-DAP)、1,2-二肉豆蔻基油醯基-3-二甲基胺基丙烷(DMDAP)、1,2-二油醯基-3-三甲基胺基丙烷氯化物(DOTAP.Cl)、二亞麻基甲基-3-二甲基胺基丙酸酯(DLin-M-C2-DMA；亦稱為DLin-M-K-DMA或DLin-M-DMA)及其混合物。可包括在本發明之脂質粒子中的其他陽離子脂質或其鹽描述於美國專利公開案第20090023673號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

諸如CLinDMA以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於美國專利公開案第20060240554號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。諸如DLin-C-DAP、DLinDAC、DlinMA、DLinDAP、DLin-S-DMA、DLin-2-DMAP、DLinTMA.Cl、DLinTAP.Cl、DLinMPZ、DlinAP、DOAP及DLin-EG-DMA以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於PCT公開案第WO 09/086558號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。諸如DO-C-DAP、DMDAP、DOTAP.Cl、DLin-M-C2-DMA以及其他陽離子脂質之陽離子脂質之合成描述於2009年10月9日申請之名為「Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids」之PCT申請案第PCT/US2009/060251號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。許多其他陽離子脂質及相

關類似物之合成已描述於美國專利第5,208,036號、第5,264,618號、第5,279,833號、第5,283,185號、第5,753,613號及第5,785,992號以及PCT公開案第WO 96/10390號中，其揭示內容各自出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。另外，可使用陽離子脂質之許多市售製劑，例如，諸如 LIPOFECTIN[®]（包括 DOTMA 及 DOPE，可得自 Invitrogen）； LIPOFECTAMINE[®]（包括 DOSPA 及 DOPE，可得自 Invitrogen）；及 TRANSFECTAM[®]（包括 DOGS，可得自 Promega Corp.）。

在一些實施例中，陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約50莫耳%至約90莫耳%、約50莫耳%至約85莫耳%、約50莫耳%至約80莫耳%、約50莫耳%至約75莫耳%、約50莫耳%至約70莫耳%、約50莫耳%至約65莫耳%、約50莫耳%至約60莫耳%、約55莫耳%至約65莫耳%或約55莫耳%至約70莫耳%（或其任何分數或其中之範圍）。在特定實施例中，陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約50莫耳%、51莫耳%、52莫耳%、53莫耳%、54莫耳%、55莫耳%、56莫耳%、57莫耳%、58莫耳%、59莫耳%、60莫耳%、61莫耳%、62莫耳%、63莫耳%、64莫耳%或65莫耳%（或其任何分數）。

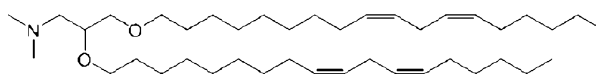
在其他實施例中，陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約2莫耳%至約60莫耳%、約5莫耳%至約50莫耳%、約10莫耳%至約50莫耳%、約20莫耳%至約50莫耳%、約20莫耳%至約40莫耳%、約30莫耳%至約40莫耳%、或約40莫耳%（或其任何分數或其中之範圍）。

適用於本發明之脂質粒子中的陽離子脂質的其他百分比及範圍描述於PCT公開案第WO 09/127060號、美國已公開申請案第US

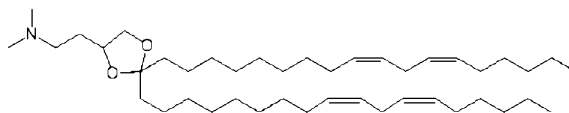
2011/0071208號、PCT公開案第WO2011/000106號及美國已公開申請案第US 2011/0076335號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

應理解，本發明之脂質粒子中所存在之陽離子脂質之百分比為目標量，且調配物中所存在之陽離子脂質之實際量可變化例如 ± 5 莫耳%。舉例而言，在一種例示性脂質粒子調配物中，陽離子脂質之目標量為57.1莫耳%，但陽離子脂質之實際量可為該目標量 ± 5 莫耳%、 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%，調配物之其餘部分由其他脂質組分組成(加和達粒子中所存在之總脂質的100莫耳%；然而，熟習此項技術者應理解，總莫耳%可能由於四捨五入而稍微偏離100%，例如99.9莫耳%或100.1莫耳%)。

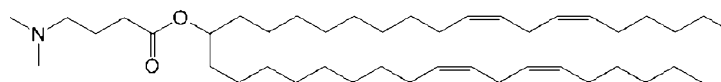
適用於包括在本發明中所使用之脂質粒子中的陽離子脂質之其他實例如下所示：



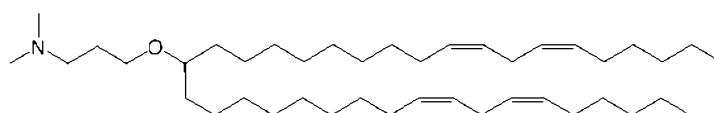
N,N-二甲基-2,3-雙((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)丙-1-胺(5)



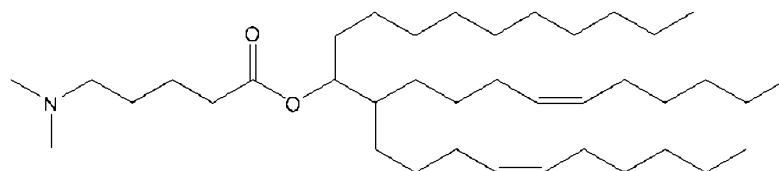
2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊環-4-基)-N,N-二甲基乙胺(6)



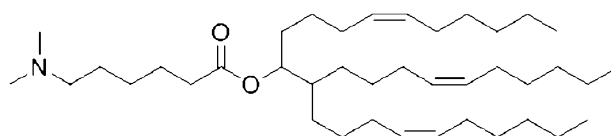
4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(7)



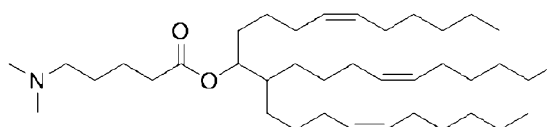
3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(8)



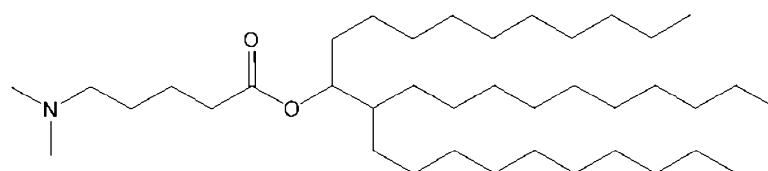
5-(二甲基胺基)戊酸(Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-16-烯-11-基酯(53)



6-(二甲基胺基)己酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(11)



5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(13)



5-(二甲基胺基)戊酸12-癸基二十二烷-11-基酯(14)。

2. 非陽離子脂質

本發明之脂質粒子中所使用之非陽離子脂質可為能够產生穩定複合物之多種中性不帶電、兩性離子或陰離子脂質中之任一種。

非陽離子脂質之非限制性實例包括磷脂，諸如卵磷脂、磷脂醯乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、腦磷脂、心磷脂、磷脂酸、腦苷脂、二鯨蠟基磷酸酯、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二油醯基磷脂醯甘油(DOPG)、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、棕櫚醯油醯磷脂醯膽鹼(POPC)、棕櫚醯油醯磷脂醯乙醇胺(POPE)、棕櫚醯油醯磷脂醯甘油(POPG)、二油醯基磷脂醯乙醇胺4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE)、單甲基磷脂醯乙醇胺、二甲基磷脂醯乙醇胺、二反油醯基磷脂醯乙醇胺(DEPE)、硬脂醯油醯磷脂醯乙醇胺(SOPE)、溶血磷脂醯膽鹼、二亞麻醯基磷脂醯膽鹼及其混合物。亦可使用其他二醯基磷脂醯膽鹼及二醯基磷脂醯乙醇胺磷脂。此等脂質中之醯基較佳為來源於具有C₁₀-C₂₄碳鏈之脂肪酸的醯基，例如月桂醯基、肉豆蔻醯基、棕櫚醯基、硬脂醯基或油醯基。

非陽離子脂質之其他實例包括固醇，諸如膽固醇及其衍生物。膽固醇衍生物之非限制性實例包括極性類似物，諸如5 α -膽甾烷醇、5 β -膽甾烷醇、膽固醇基-(2'-羥基)-乙醚、膽固醇基-(4'-羥基)-丁基醚及6-酮基膽甾烷醇；非極性類似物，諸如5 α -膽甾烷、膽甾烯酮、5 α -膽甾烷酮、5 β -膽甾烷酮及癸酸膽固醇酯；及其混合物。在較佳實施例中，膽固醇衍生物為極性類似物，諸如膽固醇基-(4'-羥基)-丁基醚。膽固醇基-(2'-羥基)-乙醚之合成描述於PCT公開案第WO

09/127060號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在一些實施例中，脂質粒子中所存在之非陽離子脂質包含一或多種磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物或由其組成。在其他實施例中，脂質粒子中所存在之非陽離子脂質包含一或多種磷脂或由其組成，例如無膽固醇脂質粒子調配物。在其他實施例中，脂質粒子中所存在之非陽離子脂質包含膽固醇或其衍生物或由其組成，例如無磷脂脂質粒子調配物。

適用於本發明中之非陽離子脂質之其他實例包括非含磷脂質，例如，諸如硬脂胺、十二烷胺、十六烷胺、棕櫚酸乙醯酯、蓖麻酸甘油酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸異丙酯、兩性丙烯酸類聚合物、三乙醇胺硫酸月桂酯、烷基芳基硫酸酯聚乙氧基脂肪酸醯胺、二(十八烷基)二甲基溴化銨、神經醯胺、鞘磷脂及其類似物。

在一些實施例中，非陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約10莫耳%至約60莫耳%、約20莫耳%至約55莫耳%、約20莫耳%至約45莫耳%、約20莫耳%至約40莫耳%、約25莫耳%至約50莫耳%、約25莫耳%至約45莫耳%、約30莫耳%至約50莫耳%、約30莫耳%至約45莫耳%、約30莫耳%至約40莫耳%、約35莫耳%至約45莫耳%、約37莫耳%至約45莫耳%或約35莫耳%、36莫耳%、37莫耳%、38莫耳%、39莫耳%、40莫耳%、41莫耳%、42莫耳%、43莫耳%、44莫耳%或45莫耳%(或其任何分數或其中之範圍)。

在脂質粒子含有磷脂與膽固醇或膽固醇衍生物之混合物的實施例中，該混合物可佔粒子中所存在之總脂質的多達約40莫耳%、45莫

耳%、50莫耳%、55莫耳%或60莫耳%。

在一些實施例中，該混合物中之磷脂組分可佔粒子中所存在之總脂質的約2莫耳%至約20莫耳%、約2莫耳%至約15莫耳%、約2莫耳%至約12莫耳%、約4莫耳%至約15莫耳%或約4莫耳%至約10莫耳% (或其任何分數或其中之範圍)。在某些實施例中，該混合物中之磷脂組分佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約17莫耳%、約7莫耳%至約17莫耳%、約7莫耳%至約15莫耳%、約8莫耳%至約15莫耳%或約8莫耳%、9莫耳%、10莫耳%、11莫耳%、12莫耳%、13莫耳%、14莫耳%或15莫耳% (或其任何分數或其中之範圍)。作為一非限制性實例，包含磷脂與膽固醇之混合物的脂質粒子調配物可包含例如相對於粒子中所存在之總脂質佔約7莫耳% (或其任何分數)之諸如DPPC或DSPC之磷脂與佔約34莫耳% (或其任何分數)之膽固醇或膽固醇衍生物的混合物。作為另一非限制性實例，包含磷脂與膽固醇之混合物的脂質粒子調配物可包含例如相對於粒子中所存在之總脂質佔約7莫耳% (或其任何分數)之諸如DPPC或DSPC之磷脂與佔約32莫耳% (或其任何分數)之膽固醇或膽固醇衍生物的混合物。

進一步舉例而言，適用於實施本發明之脂質調配物具有約10:1之脂質與藥物(例如siRNA)比(例如，9.5:1至11:1或9.9:1至11:1或10:1至10.9:1之脂質:藥物比)。在某些其他實施例中，適用於實施本發明之脂質調配物具有約9:1之脂質與藥物(例如siRNA)比(例如，8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1之脂質:藥物比，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1 9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

在其他實施例中，混合物中之膽固醇組分可佔粒子中所存在之

總脂質的約25莫耳%至約45莫耳%、約25莫耳%至約40莫耳%、約30莫耳%至約45莫耳%、約30莫耳%至約40莫耳%、約27莫耳%至約37莫耳%、約25莫耳%至約30莫耳%或約35莫耳%至約40莫耳% (或其任何分數或其中之範圍)。在某些較佳實施例中，混合物中之膽固醇組分佔粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約35莫耳%、約27莫耳%至約35莫耳%、約29莫耳%至約35莫耳%、約30莫耳%至約35莫耳%、約30莫耳%至約34莫耳%、約31莫耳%至約33莫耳%或約30莫耳%、31莫耳%、32莫耳%、33莫耳%、34莫耳%或35莫耳% (或其任何分數或其中之範圍)。

在脂質粒子不含磷脂之實施例中，膽固醇或其衍生物可佔粒子中所存在之總脂質的多達約25莫耳%、30莫耳%、35莫耳%、40莫耳%、45莫耳%、50莫耳%、55莫耳%或60莫耳%。

在一些實施例中，無磷脂脂質粒子調配物中之膽固醇或其衍生物可佔粒子中所存在之總脂質的約25莫耳%至約45莫耳%、約25莫耳%至約40莫耳%、約30莫耳%至約45莫耳%、約30莫耳%至約40莫耳%、約31莫耳%至約39莫耳%、約32莫耳%至約38莫耳%、約33莫耳%至約37莫耳%、約35莫耳%至約45莫耳%、約30莫耳%至約35莫耳%、約35莫耳%至約40莫耳%或約30莫耳%、31莫耳%、32莫耳%、33莫耳%、34莫耳%、35莫耳%、36莫耳%、37莫耳%、38莫耳%、39莫耳%或40莫耳% (或其任何分數或其中之範圍)。作為一非限制性實例，脂質粒子調配物可包含佔粒子中所存在之總脂質的約37莫耳% (或其任何分數)的膽固醇。作為另一非限制性實例，脂質粒子調配物可包含佔粒子中所存在之總脂質的約35莫耳% (或其任何分數)的膽固

醇。

在其他實施例中，非陽離子脂質佔粒子中所存在之總脂質的約5莫耳%至約90莫耳%、約10莫耳%至約85莫耳%、約20莫耳%至約80莫耳%、約10莫耳% (例如，僅磷脂)或約60莫耳% (例如，磷脂與膽固醇或其衍生物) (或其任何分數或其中之範圍)。

適用於本發明之脂質粒子中的非陽離子脂質的其他百分比及範圍描述於PCT公開案第WO 09/127060號、美國已公開申請案第US 2011/0071208號、PCT公開案第WO2011/000106號及美國已公開申請案第US 2011/0076335號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

應理解，本發明之脂質粒子中所存在之非陽離子脂質之百分比為目標量，且調配物中所存在之非陽離子脂質之實際量可變化例如 ± 5 莫耳%、 ± 4 莫耳%、 ± 3 莫耳%、 ± 2 莫耳%、 ± 1 莫耳%、 ± 0.75 莫耳%、 ± 0.5 莫耳%、 ± 0.25 莫耳%或 ± 0.1 莫耳%。

3. 脂質結合物

除陽離子脂質及非陽離子脂質以外，本發明之脂質粒子可進一步包含脂質結合物。結合脂質為適用的，因為其可防止粒子聚集。適合之結合脂質包括但不限於PEG-脂質結合物、POZ-脂質結合物、ATTA-脂質結合物、陽離子聚合物-脂質結合物(CPL)及其混合物。在某些實施例中，粒子包含PEG-脂質結合物或ATTA-脂質結合物與CPL。

在一較佳實施例中，脂質結合物為PEG-脂質。PEG-脂質之實例包括但不限於如例如PCT公開案第WO 05/026372號中所描述之與二烷

基氧基丙基偶合之 PEG (PEG-DAA)、如例如美國專利公開案第 20030077829 號及第 2005008689 號中所描述之與二醯基甘油偶合之 PEG (PEG-DAG)、與諸如磷脂醯乙醇胺之磷脂偶合之 PEG (PEG-PE)、如例如美國專利第 5,885,613 號中所描述之與神經醯胺結合之 PEG、與膽固醇或其衍生物結合之 PEG 及其混合物。此等專利文獻之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

適用於本發明之其他 PEG-脂質包括而不限於 mPEG2000-1,2-二-O-烷基-*sn*3-胺甲醯基甘油酯(PEG-C-DOMG)。PEG-C-DOMG 之合成描述於 PCT 公開案第 WO 09/086558 號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。其他適合之 PEG-脂質結合物包括而不限於 1-[8'-(1,2-二肉豆蔻醯-3-丙氧基)-甲醯胺基-3',6'-二氧雜辛基]胺甲醯基- ω -甲基-聚(乙二醇) (2KPEG-DMG)。2KPEG-DMG 之合成描述於美國專利第 7,404,969 號中，該專利出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

PEG 為具有兩個末端羥基之乙烯 PEG 重複單元之綫性水溶性聚合物。PEG 係藉由其分子量加以分類；舉例而言，PEG 2000 具有約 2,000 道爾頓之平均分子量，且 PEG 5000 具有約 5,000 道爾頓之平均分子量。PEG 可購自 Sigma Chemical Co. 及其他公司，且包括但不限於以下各項：單甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、單甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、單甲氧基聚乙二醇-琥珀醯亞胺基琥珀酸酯(MePEG-S-NHS)、單甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH₂)、單甲氧基聚乙二醇-三氟乙磺酸酯(MePEG-TRES)、單甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM)以及含有末端羥基替代末端甲氧基之該等化合物(例如，

HO-PEG-S、HO-PEG-S-NHS、HO-PEG-NH₂等)。其他PEG，諸如美國專利第6,774,180號及第7,053,150號中所描述之彼等PEG（例如，mPEG（20 KDa）胺）亦適用於製備本發明之PEG-脂質結合物。此等專利之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。另外，單甲氧基聚乙二醇-乙酸（MePEG-CH₂COOH）特別適用於製備PEG-脂質結合物，包括例如PEG-DAA結合物。

本文中所描述之PEG-脂質結合物之PEG部分可包含介於約550道爾頓至約10,000道爾頓範圍內之平均分子量。在某些情況下，PEG部分具有約750道爾頓至約5,000道爾頓（例如，約1,000道爾頓至約5,000道爾頓、約1,500道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約2,000道爾頓等）之平均分子量。在較佳實施例中，PEG部分具有約2,000道爾頓或約750道爾頓之平均分子量。

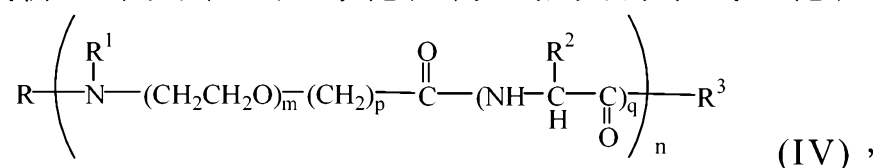
在某些情況下，PEG可視情況由烷基、烷氧基、醯基或芳基取代。PEG可直接與脂質結合，或可經由連接子部分與脂質連接。適合於使PEG與脂質偶合之任何連接子部分均可使用，包括例如非含酯連接子部分及含酯連接子部分。在一較佳實施例中，連接子部分為非含酯連接子部分。如本文中所使用，術語「非含酯連接子部分」係指不含羧酸酯鍵（-OC(O)-）之連接子部分。適合之非含酯連接子部分包括但不限於醯胺基（-C(O)NH-）、胺基（-NR-）、羰基（-C(O)-）、胺基甲酸酯（-NHC(O)O-）、脲（-NHC(O)NH-）、二硫鍵（-S-S-）、醚（-O-）、琥珀醯基（-(O)CCH₂CH₂C(O)-）、琥珀醯胺基（-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-）、醚、二硫鍵以及其組合（諸如含有胺基甲酸酯連接子部分及醯胺基連接子部分之連接子）。在一較佳實施例中，使用胺基甲酸酯連接子使PEG

與脂質偶合。

在其他實施例中，使用含酯連接子部分使PEG與脂質偶合。適合之含酯連接子部分包括例如碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀醯基、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、磺酸酯及其組合。

存在多種具有不同鏈長度及飽和度之醯基鏈基團之磷脂醯乙醇胺可與PEG結合以形成脂質結合物。該等磷脂醯乙醇胺可購自市面，或可使用熟習此項技術者已知的習知技術分離或合成。含有碳鏈長度介於C₁₀至C₂₀範圍內之飽和或不飽和脂肪酸的磷脂醯基-乙醇胺較佳。亦可使用具有單不飽和或雙不飽和脂肪酸及飽和與不飽和脂肪酸之混合物的磷脂醯乙醇胺。適合之磷脂醯乙醇胺包括但不限於二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)及二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE)。

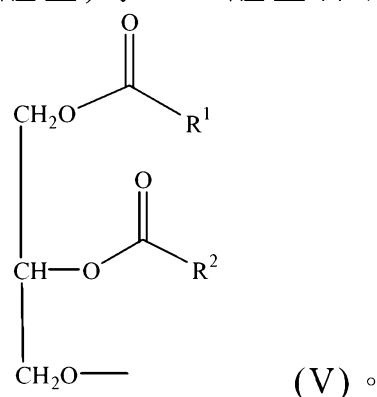
術語「ATTA」或「聚醯胺」包括而不限於美國專利第6,320,017號及第6,586,559號中所描述之化合物，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。此等化合物包括具有下式之化合物：



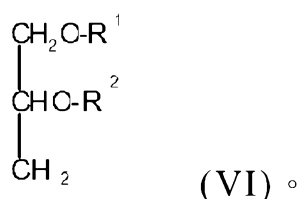
其中R為選自由氫、烷基及醯基組成之群的成員；R¹為選自由氫及烷基組成之群的成員；或視情況，R及R¹與其所結合之氮形成疊氮基部分；R²為選自由氫、視情況經取代之烷基、視情況經取代之芳基及胺基酸側鏈之群的成員；R³為選自由氫、鹵素、羥基、烷氧基、巯基、胍基、胺基及NR⁴R⁵組成之群的成員，其中R⁴及R⁵獨立地為氫或烷基；n為4至80；m為2至6；p為1至4；且q為0或1。熟習此項技術者

應顯而易見，其他聚醯胺可用於本發明化合物中。

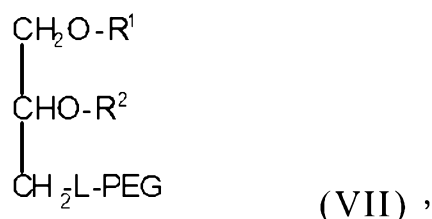
術語「二醯基甘油」或「DAG」包括具有2個脂肪醯基鏈 R^1 及 R^2 之化合物，兩者獨立地具有藉由酯鍵聯與甘油之1位及2位鍵結之介於2與30個之間的碳。醯基可為飽和的或具有不同的不飽和度。適合之醯基包括但不限於月桂醯基(C_{12})、肉豆蔻醯基(C_{14})、棕櫚醯基(C_{16})、硬脂醯基(C_{18})及二十碳醯基(C_{20})。在較佳實施例中， R^1 與 R^2 相同，亦即， R^1 與 R^2 均為肉豆蔻醯基(亦即，二肉豆蔻醯基)， R^1 與 R^2 均為硬脂醯基(亦即，二硬脂醯基)等。二醯基甘油具有以下通式：



術語「二烷基氧基丙基」或「DAA」包括具有2個烷基鏈 R^1 及 R^2 之化合物，兩者獨立地具有介於2與30個之間的碳。烷基可為飽和的或具有不同的不飽和度。二烷基氧基丙基具有以下通式：



在一較佳實施例中，PEG-脂質為具有下式之PEG-DAA結合物：



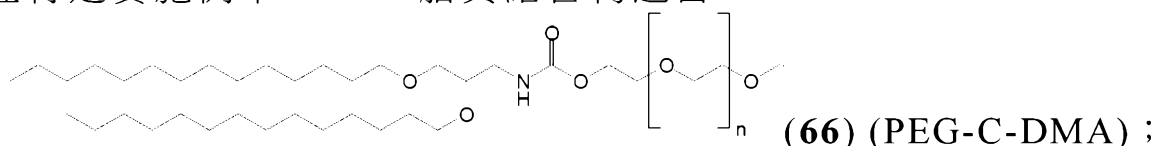
其中 R^1 及 R^2 係獨立地選擇且為具有約10至約22個碳原子之長鏈烷

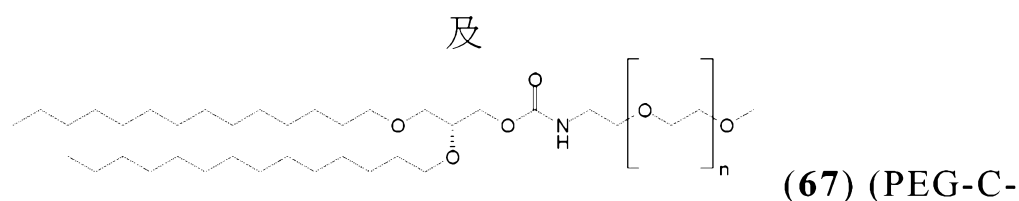
基；PEG為聚乙二醇；且L為如以上所描述之非含酯連接子部分或含酯連接子部分。長鏈烷基可為飽和或不飽和的。適合之烷基包括但不限於癸基(C₁₀)、月桂基(C₁₂)、肉豆蔻基(C₁₄)、棕櫚基(C₁₆)、硬脂基(C₁₈)及二十烷基(C₂₀)。在較佳實施例中，R¹與R²相同，亦即，R¹與R²均為肉豆蔻基(亦即，二肉豆蔻基)，R¹與R²均為硬脂基(亦即，二硬脂基)等。

在以上式VII中，PEG具有介於約550道爾頓至約10,000道爾頓範圍內之平均分子量。在某些情況下，PEG具有約750道爾頓至約5,000道爾頓(例如，約1,000道爾頓至約5,000道爾頓、約1,500道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約2,000道爾頓等)之平均分子量。在較佳實施例中，PEG具有約2,000道爾頓或約750道爾頓之平均分子量。PEG可視情況經烷基、烷氧基、醯基或芳基取代。在某些實施例中，末端羥基經甲氧基或甲基取代。

在一較佳實施例中，「L」為非含酯連接子部分。適合之非含酯連接子包括但不限於醯胺基連接子部分、胺基連接子部分、羰基連接子部分、胺基甲酸酯連接子部分、脲連接子部分、醚連接子部分、二硫鍵連接子部分、琥珀醯胺基連接子部分及其組合。在一較佳實施例中，非含酯連接子部分為胺基甲酸酯連接子部分(亦即，PEG-C-DAA結合物)。在另一較佳實施例中，非含酯連接子部分為醯胺基連接子部分(亦即，PEG-A-DAA結合物)。在另一較佳實施例中，非含酯連接子部分為琥珀醯胺基連接子部分(亦即，PEG-S-DAA結合物)。

在特定實施例中，PEG-脂質結合物選自：





DOMG)。

使用熟習此項技術者已知的標準技術及試劑合成PEG-DAA結合物。應認識到，PEG-DAA結合物將含有各種醯胺、胺、醚、硫、胺基甲酸酯及脲鍵聯。熟習此項技術者應認識到，用於形成此等鍵之方法及試劑為熟知的且容易獲得的。參見例如 March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992)；Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989)；及Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 第 5 版 (Longman 1989)。亦應理解，所存在之任何官能基可能均需要在PEG-DAA結合物合成中的不同的時間點進行保護及脫保護。熟習此項技術者應認識到，該等技術為熟知的。參見例如 Green 及 Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991)。

PEG-DAA結合物較佳為PEG-二癸基氧基丙基(C₁₀)結合物、PEG-二月桂基氧基丙基(C₁₂)結合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C₁₄)結合物、PEG-二棕櫚基氧基丙基(C₁₆)結合物或PEG-二硬脂基氧基丙基(C₁₈)結合物。在此等實施例中，PEG較佳具有約750道爾頓或約2,000道爾頓之平均分子量。在一個尤佳實施例中，PEG-脂質結合物包含PEG2000-C-DMA，其中「2000」表示PEG之平均分子量，「C」表示胺基甲酸酯連接子部分，且「DMA」表示二肉豆蔻基氧基丙基。在另一尤佳實施例中，PEG-脂質結合物包含PEG750-C-DMA，其中「750」表示PEG之平均分子量，「C」表示胺基甲酸酯連接子部分，

且「DMA」表示二肉豆蔻基氧基丙基。在特定實施例中，PEG之末端羥基經甲基取代。熟習此項技術者應容易瞭解，其他二烷基氧基丙基可用於本發明之PEG-DAA結合物中。

除上述以外，熟習此項技術者應容易瞭解可使用其他親水性聚合物替代PEG。可用於替代PEG之適合聚合物之實例包括但不限於聚乙烯吡咯啉酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羥基丙基甲基丙烯酸醯胺、聚甲基丙烯酸醯胺及聚二甲基丙烯酸醯胺、聚乳酸、聚乙醇酸及衍生纖維素，諸如羥甲基纖維素或羥乙基纖維素。

除上述組分以外，本發明之脂質粒子可進一步包含陽離子聚(乙二醇) (PEG)脂質或CPL (參見例如Chen等人, *Bioconj. Chem.*, 11:433-437 (2000)；美國專利第6,852,334號；PCT公開案第WO 00/62813號，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)。

適合之CPL包括具有式VIII之化合物：



其中A、W及Y如下所描述。

關於式VIII，「A」為充當脂質錨定點之脂質部分，諸如兩性脂質、中性脂質或疏水性脂質。適合之脂質實例包括但不限於二醯基甘油、二烷基甘油、N,N-二烷基胺基-1,2-二醯基氧基-3-胺基丙烷及1,2-二烷基-3-胺基丙烷。

「W」為聚合物或寡聚物，諸如親水性聚合物或寡聚物。親水性聚合物較佳為非免疫原性或具有低固有免疫原性之生物相容性聚合物。或者，親水性聚合物在與適當之佐劑一起使用時可具有弱抗原性。適合之非免疫原性聚合物包括但不限於PEG、聚醯胺、聚乳酸、

聚乙醇酸、聚乳酸/聚乙醇酸共聚物及其組合。在一較佳實施例中，聚合物具有約250至約7,000道爾頓之分子量。

「Y」為聚陽離子部分。術語聚陽離子部分係指在所選pH值下，較佳在生理pH值下具有正電荷，較佳至少2個正電荷之化合物、衍生物或官能基。適合之聚陽離子部分包括鹼性胺基酸及其衍生物，諸如精胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、離胺酸及組胺酸；精胺；亞精胺；陽離子樹枝狀聚合物；聚胺；聚胺糖；及胺基聚糖。聚陽離子部分可為綫性的，諸如結構上呈分枝或樹枝狀之綫性四離胺酸。聚陽離子部分在所選pH值下具有介於約2至約15個之間的正電荷，較佳介於約2至約12個之間的正電荷，且更佳介於約2至約8個之間的正電荷。選擇使用何種聚陽離子部分可由所需粒子應用之類型決定。

聚陽離子部分上之電荷可分佈在整個粒子部分周圍，或替代地，其可為該粒子部分之一個特定區域中的電荷密度之離散性凝集，例如電流衝擊。若電荷密度分佈於粒子上，則電荷密度可平均分佈或不平均分佈。本發明涵蓋聚陽離子部分之電荷分佈之所有變化方案。

脂質「A」及非免疫原性聚合物「W」可藉由各種方法且較佳藉由共價連接來連接。熟習此項技術者已知的方法可用於共價連接「A」與「W」。適合之鍵聯包括但不限於醯胺、胺、羧基、碳酸酯、胺基甲酸酯、酯及脰鍵聯。熟習此項技術者應瞭解，「A」及「W」必須具有互補官能基以實現鍵聯。此兩個基團(一個處於脂質上且另一個處於聚合物上)之反應將提供所要鍵聯。舉例而言，當脂質為二醯基甘油且末端羥基經活化(例如用NHS及DCC)以形成活性酯且隨後與含有胺基之聚合物，諸如與聚醯胺反應時(參見例如美國專利第

6,320,017號及第6,586,559號，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)，該兩個基團之間將形成醯胺鍵。

在某些情況下，聚陽離子部分可具有連接之配位體，諸如靶向配位體或用於複合鈣之螯合部分。較佳地，在連接配位體之後，陽離子部分維持正電荷。在某些情況下，所連接之配位體具有正電荷。適合之配位體包括但不限於具有反應性官能基之化合物或裝置，且包括脂質、兩性脂質、載劑化合物、生物親和性化合物、生物材料、生物聚合物、生物醫學裝置、分析偵測化合物、治療活性化合物、酶、肽、蛋白質、抗體、免疫刺激物、放射性標記、螢光團、生物素、藥物、半抗原、DNA、RNA、聚糖、脂質體、病毒體、膠束、免疫球蛋白、官能基、其他靶向部分或毒素。

在一些實施例中，脂質結合物(例如，PEG-脂質)佔粒子中所存在之總脂質的約0.1莫耳%至約3莫耳%、約0.5莫耳%至約3莫耳%或約0.6莫耳%、0.7莫耳%、0.8莫耳%、0.9莫耳%、1.0莫耳%、1.1莫耳%、1.2莫耳%、1.3莫耳%、1.4莫耳%、1.5莫耳%、1.6莫耳%、1.7莫耳%、1.8莫耳%、1.9莫耳%、2.0莫耳%、2.1莫耳%、2.2莫耳%、2.3莫耳%、2.4莫耳%、2.5莫耳%、2.6莫耳%、2.7莫耳%、2.8莫耳%、2.9莫耳%或3莫耳%(或其任何分數或其中之範圍)。

在其他實施例中，脂質結合物(例如PEG-脂質)佔粒子中所存在之總脂質的約0莫耳%至約20莫耳%、約0.5莫耳%至約20莫耳%、約2莫耳%至約20莫耳%、約1.5莫耳%至約18莫耳%、約2莫耳%至約15莫耳%、約4莫耳%至約15莫耳%、約2莫耳%至約12莫耳%、約5莫耳%至約12莫耳%或約2莫耳%(或其任何分數或其中之範圍)。

在其他實施例中，脂質結合物(例如PEG-脂質)佔粒子中所存在之總脂質的約4莫耳%至約10莫耳%、約5莫耳%至約10莫耳%、約5莫耳%至約9莫耳%、約5莫耳%至約8莫耳%、約6莫耳%至約9莫耳%、約6莫耳%至約8莫耳%或約5莫耳%、6莫耳%、7莫耳%、8莫耳%、9莫耳%或10莫耳% (或其任何分數或其中之範圍)。

應理解，本發明之脂質粒子中所存在之脂質結合物之百分比為目標量，且調配物中所存在之脂質結合物之實際量可變化例如±5莫耳%、±4莫耳%、±3莫耳%、±2莫耳%、±1莫耳%、±0.75莫耳%、±0.5莫耳%、±0.25莫耳%或±0.1莫耳%。

適用於本發明之脂質粒子中的脂質結合物的其他百分比及範圍描述於PCT公開案第WO 09/127060號、美國已公開申請案第US 2011/0071208號、PCT公開案第WO2011/000106號及美國已公開申請案第US 2011/0076335號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

熟習此項技術者應瞭解，脂質結合物之濃度可視所採用之脂質結合物及脂質粒子之膜融合速率而變化。

藉由控制脂質結合物之組成及濃度，可控制脂質結合物自脂質粒子中交換出之速率且轉而控制脂質粒子之膜融合速率。舉例而言，當使用PEG-DAA結合物作為脂質結合物時，可改變脂質粒子之膜融合速率，例如藉由改變脂質結合物之濃度、藉由改變PEG之分子量或藉由改變PEG-DAA結合物上之烷基的鏈長度及飽和度。另外，其他變數，包括例如pH值、溫度、離子強度等，可用於改變及/或控制脂質粒子之膜融合速率。在閱讀本發明後，可用於控制脂質粒子之膜融

合速率的其他方法對於熟習此項技術者將顯而易見。此外，藉由控制脂質結合物之組成及濃度，可控制脂質粒子尺寸。

B. 其他載劑系統

適用於本發明之其他基於脂質之載劑系統的非限制性實例包括脂質複合物(參見例如美國專利公開案第20030203865號；及Zhang等人, *J. Control Release*, 100:165-180 (2004))、pH值敏感性脂質複合物(參見例如美國專利公開案第20020192275號)、可逆遮蔽脂質複合物(參見例如美國專利公開案第20030180950號)、基於陽離子脂質之組成物(參見例如美國專利第6,756,054號；及美國專利公開案第20050234232號)、陽離子脂質體(參見例如美國專利公開案第20030229040號、第20020160038號及第20020012998號；美國專利第5,908,635號；及PCT公開案第WO 01/72283號)、陰離子脂質體(參見例如美國專利公開案第20030026831號)、pH值敏感性脂質體(參見例如美國專利公開案第20020192274號；及AU 2003210303)、經抗體塗佈之脂質體(參見例如美國專利公開案第20030108597號；及PCT公開案第WO 00/50008號)、細胞類型特异性脂質體(參見例如美國專利公開案第20030198664號)、含核酸及肽之脂質體(參見例如美國專利第6,207,456號)、含經可釋放親水性聚合物衍生化之脂質的脂質體(參見例如美國專利公開案第20030031704號)、脂質俘獲之核酸(參見例如PCT公開案第WO 03/057190號及第WO 03/059322號)、脂質囊封之核酸(參見例如美國專利公開案第20030129221號；及美國專利第5,756,122號)、其他脂質體組成物(參見例如美國專利公開案第20030035829號及第20030072794號；及美國專利第6,200,599號)、脂

質體與乳液之穩定混合物(參見例如EP1304160)、乳液組成物(參見例如美國專利第6,747,014號)及核酸微乳液(參見例如美國專利公開案第20050037086號)。

適用於本發明之基於聚合物之載劑系統的實例包括但不限於陽離子聚合物-核酸複合物(亦即，聚複合物)。為了形成聚複合物，核酸(例如siRNA分子，諸如表A中所描述之siRNA分子)典型地與將核酸凝集於能够與細胞表面上之陰離子蛋白聚糖相互作用且藉由胞吞作用進入細胞之帶正電粒子中的具有綫性、分支、星形或樹枝狀聚合結構的陽離子聚合物複合。在一些實施例中，聚複合物包含核酸(例如siRNA分子，諸如表A中所描述之siRNA分子)與陽離子聚合物，諸如聚乙烯亞胺(PEI) (參見例如美國專利第6,013,240號；可作為活體內用jetPEI™ (PEI之綫性形式)購自Qbiogene, Inc. (Carlsbad, CA))、聚丙烯亞胺(PPI)、聚乙烯吡咯啶酮(PVP)、聚-L-離胺酸(PLL)、二乙基胺基乙基(DEAE)-葡聚糖、聚(β -胺基酯)(PAE)聚合物(參見例如Lynn等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:8155-8156 (2001))、殼聚糖、聚醯胺胺(PAMAM)樹枝狀聚合物(參見例如Kukowska-Latallo等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:4897-4902 (1996))、卟啉(參見例如美國專利第6,620,805號)、聚乙烯醚(參見例如美國專利公開案第20040156909號)、多環脒(參見例如美國專利公開案第20030220289號)、包含一級胺、亞胺、胍及/或咪唑基之其他聚合物(參見例如美國專利第6,013,240號；PCT公開案第WO/9602655號；PCT公開案第WO95/21931號；Zhang等人, *J. Control Release*, 100:165-180 (2004)；及Tiera等人, *Curr. Gene Ther.*, 6:59-71 (2006))及其混合物之複合物。

在其他實施例中，聚複合物包含如美國專利公開案第20060211643號、第20050222064號、第20030125281號及第20030185890號以及PCT公開案第WO 03/066069號中所描述之陽離子聚合物-核酸複合物；如美國專利公開案第20040071654號中所描述之生物可降解聚(β -胺基酯)聚合物-核酸複合物；如美國專利公開案第20040142475號中所描述之含聚合物基質之微粒；如美國專利公開案第20030157030號中所描述之其他微粒組成物；如美國專利公開案第20050123600號中所描述之凝集核酸複合物；及如AU 2002358514及PCT公開案第WO 02/096551號中所描述之奈米膠囊及微膠囊。

在某些情況下，siRNA可與環糊精或其聚合物複合。基於環糊精之載劑系統之非限制性實例包括美國專利公開案第20040087024號中所描述之經環糊精修飾之聚合物-核酸複合物；美國專利第6,509,323號、第6,884,789號及第7,091,192號中所描述之綫性環糊精共聚物-核酸複合物；及美國專利第7,018,609號中所描述之環糊精聚合物複合劑-核酸複合物。在某些其他情況下，siRNA可與肽或多肽複合。基於蛋白質之載劑系統的實例包括但不限於PCT公開案第WO95/21931中所描述之陽離子寡肽-核酸複合物。

脂質粒子之製備

本發明之核酸-脂質粒子，其中核酸(例如，如表A中所描述之siRNA)俘獲在該粒子之脂質部分內且防止降解，可藉由此項技術中已知的任何方法來形成，包括但不限於連續混合法、直接稀釋法及在綫稀釋法。

在特定實施例中，陽離子脂質可包含單獨或與其他陽離子脂質

組合之具有式I至式III之脂質或其鹽。在其他實施例中，非陽離子脂質為卵鞘磷脂(ESM)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、1-棕櫚醯基-2-油醯基-磷脂醯膽鹼(POPC)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、單甲基磷脂醯乙醇胺、二甲基磷脂醯乙醇胺、14:0 PE (1,2-二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺(DMPE))、16:0 PE (1,2-二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE))、18:0 PE (1,2-二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE))、18:1 PE (1,2-二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE))、18:1反式PE (1,2-二反油醯基-磷脂醯乙醇胺(DEPE))、18:0-18:1 PE (1-硬脂醯基-2-油醯基磷脂醯乙醇胺(SOPE))、16:0-18:1 PE (1-棕櫚醯基-2-油醯基磷脂醯乙醇胺(POPE))、基於聚乙二醇之聚合物(例如PEG 2000、PEG 5000、經PEG修飾之二醯基甘油或經PEG修飾之二烷基氧基丙基)、膽固醇、其衍生物或其組合。

在某些實施例中，本發明提供經由連續混合法產生之核酸-脂質粒子，例如，包括如下步驟之方法：在第一儲存器中提供包含siRNA之水溶液；在第二儲存器中提供有機脂質溶液(其中該有機脂質溶液中所存在之脂質溶解於有機溶劑中，例如低碳烷醇，諸如乙醇)；及混合該水溶液與該有機脂質溶液，使得該有機脂質溶液與該水溶液混合以便實質上立即產生脂質囊泡(例如脂質體)，從而將siRNA囊封在脂質囊泡內。此方法及進行此方法之設備詳細描述於美國專利公開案第20040142025號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

向混合環境中，諸如在混合室中連續引入脂質及緩衝溶液之動作引起用緩衝溶液連續稀釋脂質溶液，從而在混合後實質上立即產生

脂質囊泡。如本文中所使用，片語「用緩衝溶液連續稀釋脂質溶液」(及變化形式)一般意謂在水化過程中用足以實現囊泡產生之力度足夠快速地稀釋脂質溶液。藉由混合包含核酸之水溶液與有機脂質溶液，在緩衝溶液(亦即，水溶液)存在下對有機脂質溶液進行連續逐步稀釋以產生核酸-脂質粒子。

使用連續混合法形成之核酸-脂質粒子典型地具有約30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約100 nm、約90 nm至約100 nm、約70 nm至約90 nm、約80 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、小於約120 nm、110 nm、100 nm、90 nm或80 nm、或約30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm (或其任何分數或其中之範圍)之尺寸。因而形成之粒子不會聚集且視情況經尺寸化以達成均勻粒子尺寸。

在另一實施例中，本發明提供經由直接稀釋法產生之核酸-脂質粒子，該方法包括形成脂質囊泡(例如脂質體)溶液並且將該脂質囊泡溶液立即並直接引入含有受控量之稀釋緩衝液的收集容器中。在較佳態樣中，收集容器包括一或多個經配置以攪拌該收集容器之內含物從而促進稀釋的元件。在一個態樣中，收集容器中所存在之稀釋緩衝液的量實質上等於引入其中之脂質囊泡溶液的體積。作為一非限制性實例，處於45%乙醇中之脂質囊泡溶液當引入含有等體積稀釋緩衝液之收集容器中時將有利地產生較小粒子。

在另一實施例中，本發明提供經由在綫稀釋法產生之核酸-脂質粒子，其中含有稀釋緩衝液之第三儲存器與第二混合區流體偶合。在此實施例中，第一混合區中所形成之脂質囊泡(例如脂質體)溶液立即且直接與第二混合區中之稀釋緩衝液混合。在較佳態樣中，第二混合區包括經佈置以使得脂質囊泡溶液及稀釋緩衝液流體作為相對 180° 之流體相遇的T形連接器；然而，可使用提供較淺角度之連接器，例如約 27° 至約 180° (例如約 90°)。泵機構將可控緩衝液流體遞送至第二混合區。在一個態樣中，將供應至第二混合區之稀釋緩衝液的流速控制為實質上等於自第一混合區引入其中之脂質囊泡溶液的流速。此實施例有利地允許進一步控制與第二混合區中之脂質囊泡溶液混合之稀釋緩衝液的流動，且因此亦允許進一步控制第二混合過程中脂質囊泡溶液於緩衝液中之濃度。對稀釋緩衝液流速之此種控制有利地允許在降低之濃度下進行小粒子尺寸形成。

此等方法及進行此等直接稀釋及在綫稀釋方法之設備詳細描述於美國專利公開案第20070042031號中，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

使用直接稀釋及在綫稀釋方法形成之核酸-脂質粒子典型地具有約30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約100 nm、約90 nm至約100 nm、約70 nm至約90 nm、約80 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、小於約120 nm、110 nm、100 nm、90 nm或80 nm、或約30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95

nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm (或其任何分數或其中之範圍)之尺寸。因而形成之粒子不會聚集且視情況經尺寸化以達成均勻粒子尺寸。

若有需要，則本發明之脂質粒子可藉由可用於對脂質體進行尺寸化之任何方法進行尺寸化。可進行尺寸化以達成所要尺寸範圍及相對狹窄之粒子尺寸分佈。

若干技術可用於將粒子尺寸化至所要尺寸。用於脂質體且同樣適用於本發明粒子的一種尺寸化方法描述於美國專利第4,737,323號中，該專利之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。藉由浴液或探針超聲處理對粒子懸浮液進行超聲處理產生漸進性尺寸減小，使粒子尺寸降至小於約50 nm。均質化為依賴於剪切能從而使較大粒子破碎成較小粒子的另一方法。在一典型均質化程序中，使粒子再循環通過標準乳液均質器直至觀測到所選粒子尺寸，典型地介於約60 nm與約80 nm之間。在兩種方法中，可藉由習知雷射束粒子尺寸辨別法或QELS來監測粒子尺寸分佈。

粒子經由小孔隙聚碳酸酯膜或不對稱陶瓷膜擠出亦為一種用於使粒子尺寸降至相對明確之尺寸分佈的有效方法。典型地，懸浮液循環通過該膜一或多次直至達成所要粒子尺寸分佈。粒子可依次經由更小孔隙之膜擠出，以達成尺寸逐漸減小。

在一些實施例中，粒子中所存在之核酸(例如siRNA分子)如例如美國專利申請案第09/744,103號中所描述進行預凝集，該案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在其他實施例中，該方法可進一步包括添加適用於使用本發明組成物實現細胞之脂質轉染的非脂質聚陽離子。適合之非脂質聚陽離子之實例包括溴化己二甲銨(以商標名POLYBRENE[®]出售，得自Aldrich Chemical Co.，Milwaukee，Wisconsin，USA)或己二甲銨之其他鹽。其他適合之聚陽離子包括例如聚-L-鳥胺酸、聚-L-精胺酸、聚-L-離胺酸、聚-D-離胺酸、聚烯丙胺及聚乙烯亞胺之鹽。較佳在形成粒子之後添加此等鹽。

在一些實施例中，所形成之核酸-脂質粒子中之核酸(例如siRNA)與脂質比(質量/質量比)將介於約0.01至約0.2、約0.05至約0.2、約0.02至約0.1、約0.03至約0.1或約0.01至約0.08之範圍內。起始物質(輸入)之比亦屬於此範圍內。在其他實施例中，粒子製備使用每10 mg總脂質約400 µg核酸，或約0.01至約0.08且更佳為約0.04之核酸與脂質質量比，此對應於每50 µg核酸1.25 mg總脂質。在其他較佳實施例中，粒子具有約0.08之核酸:脂質質量比。

在其他實施例中，所形成之核酸-脂質粒子中的脂質與核酸(例如siRNA)比(質量/質量比)將介於約1 (1:1)至約100 (100:1)、約5 (5:1)至約100 (100:1)、約1 (1:1)至約50 (50:1)、約2 (2:1)至約50 (50:1)、約3 (3:1)至約50 (50:1)、約4 (4:1)至約50 (50:1)、約5 (5:1)至約50 (50:1)、約1 (1:1)至約25 (25:1)、約2 (2:1)至約25 (25:1)、約3 (3:1)至約25 (25:1)、約4 (4:1)至約25 (25:1)、約5 (5:1)至約25 (25:1)、約5 (5:1)至約20 (20:1)、約5 (5:1)至約15 (15:1)、約5 (5:1)至約10 (10:1)或約5 (5:1)、6 (6:1)、7 (7:1)、8 (8:1)、9 (9:1)、10 (10:1)、11 (11:1)、12 (12:1)、13 (13:1)、14 (14:1)、15 (15:1)、16 (16:1)、17 (17:1)、18

(18:1)、19 (19:1)、20 (20:1)、21 (21:1)、22 (22:1)、23 (23:1)、24 (24:1)或25 (25:1)之範圍或其任何分數或其中之範圍內。起始物質(輸入)之比亦屬於此範圍內。

如先前所論述，結合脂質可進一步包括CPL。本文中論述多種用於製造脂質粒子-CPL (含CPL之脂質粒子)之一般方法。兩種一般技術包括「後插入」技術，亦即，將CPL插入例如預先形成之脂質粒子中；及「標準」技術，其中CPL在例如脂質粒子形成步驟期間包括在脂質混合物中。後插入技術產生CPL主要處於脂質粒子雙層膜之外面中的脂質粒子，而標準技術提供CPL處於內面與外面上的脂質粒子。該方法尤其適用於由磷脂製造之囊泡(其可含有膽固醇)以及含有PEG-脂質之囊泡(諸如PEG-DAA及PEG-DAG)。製造脂質粒子-CPL之方法教示於例如美國專利第5,705,385號、第6,586,410號、第5,981,501號、第6,534,484號及第6,852,334號、美國專利公開案第20020072121號及PCT公開案第WO 00/62813號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

套組

本發明亦提供提供呈套組形式之脂質粒子。在一些實施例中，套組包括經隔室化以容納脂質粒子之各種要素(例如活性劑，諸如siRNA分子及粒子之個別脂質組分)的容器。套組較佳包括容納本發明之脂質粒子的容器(例如小瓶或安瓿)，其中該等粒子係藉由本文中所闡述之方法之一產生。在某些實施例中，該套組可進一步包括核內體膜去穩定劑(例如鈣離子)。該套組典型地含有呈處於醫藥學上可接受之載劑中的懸浮液形式或呈脫水形式的本發明粒子組成物與其復水

(若凍乾)及投與說明書。

本發明之調配物可經改適以優先靶向相關特定細胞、組織或器官。核酸-脂質粒子之優先靶向可藉由控制脂質粒子本身之組成來進行。在特定實施例中，本發明之套組包括此等脂質粒子，其中該等粒子呈懸浮液形式或呈脫水形式存在於容器中。

在某些情況下，可能需要靶向部分連接於脂質粒子表面以進一步增強粒子之靶向。連接靶向部分(例如抗體、蛋白質等)與脂質(諸如本發明粒子中所使用之彼等脂質)之方法為熟習此項技術者已知的。

脂質粒子之投與

一旦形成後，本發明之脂質粒子尤其適用於將siRNA分子(例如表A中所描述之siRNA分子)引入細胞中。因此，本發明亦提供用於將siRNA分子引入細胞中之方法。在特定實施例中，將siRNA分子引入受感染細胞中。該方法可藉由首先如以上所描述形成粒子且隨後使該等粒子與細胞接觸足以將siRNA遞送至細胞之時間段而在活體外或活體內進行。

本發明之脂質粒子(例如核酸脂質粒子)可吸收至幾乎任何與其混合或接觸之細胞類型。一旦吸收後，粒子可由細胞之一部分吞噬，與細胞膜交換脂質，或與細胞融合。粒子之siRNA部分之轉移或併入可經由此等途徑中之任一種來進行。特定言之，當融合發生時，粒子膜併入細胞膜中且粒子之內含物與細胞內液合併。

本發明之脂質粒子(例如核酸-脂質粒子)可單獨或呈與根據投與途徑及標準醫藥實務選擇之醫藥學上可接受之載劑(例如生理鹽水或磷酸鹽緩衝液)之混合物的形式投與。一般而言，將採用正常緩衝生

理鹽水(例如135至150 mM NaCl)作為醫藥學上可接受之載劑。其他適合之載劑包括例如水、緩衝水、0.4%生理鹽水、0.3%甘胺酸及其類似物，包括用於增強穩定性之糖蛋白，諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。其他適合之載劑描述於例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)中。如本文中所使用，「載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、媒劑、包衣劑、稀釋劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑、緩衝劑、載劑溶液、懸浮液、膠體及其類似物。片語「醫藥學上可接受」係指當投與人類時不產生過敏性或類似不良反應的分子實體及組成物。

一般在脂質粒子形成之後添加醫藥學上可接受之載劑。因而，在形成脂質粒子之後，可將粒子稀釋於醫藥學上可接受之載劑中，諸如正常緩衝生理鹽水。

醫藥調配物中之粒子濃度可廣泛變化，亦即，以重量計低於約0.05%，通常為或至少為約2%至5%，至多達約10%至90%，並且將根據所選擇之特定投與模式，主要由流體體積、黏度等加以選擇。舉例而言，可增加濃度以降低與治療相關之流體負載。此在患有動脈粥樣硬化相關之充血性心臟衰竭或嚴重高血壓之患者中可能尤其理想。或者，可將包含刺激性脂質之粒子稀釋至低濃度以減輕投與部位之炎症。

本發明之醫藥組成物可藉由習知熟知滅菌技術進行滅菌。水溶液可經包裝以供使用，或在無菌條件下過濾並凍乾，在投與前將凍乾製劑與無菌水溶液組合。該等組成物可視需要含有醫藥學上可接受之

輔助物質以接近生理條件，諸如pH值調節及緩衝劑、張力調節劑及其類似物，例如乙酸钠、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀及氯化鈣。另外，粒子懸浮液可包括儲存時保護脂質以防自由基及脂質過氧化損傷的脂質保護劑。諸如 α 生育酚之親脂性自由基淬滅劑及諸如鐵草胺之水溶性鐵特异性螯合劑為適合的。

在一些實施例中，本發明之脂質粒子尤其適用於治療性遞送一或多種siRNA分子(例如表A中所描述之siRNA分子)的方法。特定言之，本發明之一個目標在於提供藉由使一或多個HBV基因之轉錄及/或轉譯下調或靜默而在人類中治療HBV及/或HDV感染的活體內方法。

A. 活體內投與

已使用核酸-脂質粒子，諸如PCT公開案第WO 05/007196號、第WO 05/121348號、第WO 05/120152號及第WO 04/002453號中所描述之彼等核酸-脂質粒子達成用於活體內療法之全身性遞送，例如經由身體系統(諸如循環)將本文中所描述之siRNA分子，諸如表A中所描述之siRNA遞送至遠端靶細胞，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。本發明亦提供完全囊封之脂質粒子，其保護siRNA以防在血清中發生核酸酶降解，非免疫原性，尺寸較小且適合於重複給與。另外，一或多種siRNA分子可於本發明之脂質粒子中單獨投與，或與包含肽、多肽或諸如習知藥物之小分子的脂質粒子組合投與(例如共同投與)。

對於活體內投與，投與可用此項技術中已知的任何方式進行，例如藉由注射、經口投與、吸入(例如鼻內或氣管內)、經皮施用或直

腸投與。投與可經由單次或分次劑量來實現。醫藥組成物可非經腸投與，亦即，關節內、靜脈內、腹膜內、皮下或肌肉內。在一些實施例中，藉由推注經靜脈內或腹膜內投與醫藥組成物(參見例如美國專利第5,286,634號)。細胞內核酸遞送亦論述於Straubinger等人，*Methods Enzymol.*, 101:512 (1983)；Mannino等人，*Biotechniques*, 6:682 (1988)；Nicolau等人，*Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989)；及Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:274 (1993)中。投與基於脂質之治療劑的其他方法描述於例如美國專利第3,993,754號、第4,145,410號、第4,235,871號、第4,224,179號、第4,522,803號及第4,588,578號中。脂質粒子可藉由在疾病部位直接注射或藉由在疾病部位之遠端部位注射來投與(參見例如Culver, HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. 第70-71頁(1994))。上述參考文獻之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在本發明之脂質粒子經靜脈內投與之實施例中，該等粒子之總注射劑量中至少約5%、10%、15%、20%或25%在注射之後於血漿中存在約8、12、24、36或48小時。在其他實施例中，該等脂質粒子之總注射劑量中多於約20%、30%、40%且多達約60%、70%或80%在注射之後於血漿中存在約8、12、24、36或48小時。在某些情況下，多種粒子中多於約10%在投與之後於哺乳動物之血漿中存在約1小時。在某些其他情況下，脂質粒子之存在在投與該等粒子之後至少約1小時可偵測到。在一些實施例中，siRNA分子之存在在投與之後約8、12、24、36、48、60、72或96小時可在細胞中偵測到。在其他實施例中，siRNA分子下調靶序列(諸如病毒或宿主序列)之表現在投與之後

約8、12、24、36、48、60、72或96小時可偵測到。在其他實施例中，siRNA分子下調靶序列(諸如病毒或宿主序列)之表現優先在受感染細胞及/或能够被感染之細胞中發生。在其他實施例中，siRNA分子在投與部位之近端或遠端部位之細胞中的存在或效應在投與之後約12、24、48、72或96小時或約6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26或28天可偵測到。在其他實施例中，本發明之脂質粒子非經腸或經腹膜內投與。

本發明之組成物可單獨或與其他適合之組分組合製成氣霧劑調配物(亦即，其可「霧化」)以便經由吸入(例如經鼻內或經氣管內)投與(參見Brigham等人, *Am. J. Sci.*, 298:278 (1989))。氣霧劑調配物可置放於加壓可接受之推進劑中，諸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮氣及其類似物。

在某些實施例中，醫藥組成物可藉由鼻內噴霧、吸入及/或其他氣霧劑遞送媒劑來遞送。用於經由鼻用氣霧劑噴霧將核酸組成物直接遞送至肺部之方法已描述於例如美國專利第5,756,353號及第5,804,212號中。同樣，使用鼻內微粒樹脂及溶血磷脂醯基甘油化合物遞送藥物(美國專利5,725,871)在醫藥技術中亦為熟知的。類似地，呈聚四氟乙烯負載基質形式之透黏膜藥物遞送描述於美國專利第5,780,045號中。上述專利之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

適用於非經腸投與(舉例而言，諸如關節內(關節中)、靜脈內、肌肉內、皮內、腹膜內及皮下途徑)之調配物包括水性及非水性等滲無菌注射溶液，其可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑細菌劑及使得調配物

與預定受體之血液等滲的溶質；以及水性及非水性無菌懸浮液，其可包括懸浮劑、增溶劑、增稠劑、穩定劑及防腐劑。在實施本發明時，舉例而言，較佳藉由靜脈內輸注、經口、局部、腹膜內、囊泡內或鞘內投與組成物。

一般而言，當經靜脈內投與時，脂質粒子調配物係與適合之醫藥載劑一起調配。許多醫藥學上可接受之載劑可用於本發明之組成物及方法中。適用於本發明之調配物見於例如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)中。可使用多種水性載劑，例如水、緩衝水、0.4%生理鹽水、0.3%甘胺酸及其類似物，且可包括用於增強穩定性之糖蛋白，諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。一般而言，將採用正常緩衝生理鹽水(135至150 mM NaCl)作為醫藥學上可接受之載劑，但其他適合之載劑將滿足需要。此等組成物可藉由諸如過濾之習知脂質體滅菌技術進行滅菌。該等組成物可視需要含有醫藥學上可接受之輔助物質以接近生理條件，諸如pH值調節及緩衝劑、張力調節劑、潤濕劑及其類似物，例如乙酸钠、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、單月桂酸脫水山梨醇酯、油酸三乙醇胺酯等。此等組成物可使用以上所提及之技術進行滅菌，或替代地，其可在無菌條件下產生。所得水溶液可經包裝以供使用，或在無菌條件下過濾並凍乾，在投與前將凍乾製劑與無菌水溶液組合。

在某些應用中，本文中所揭示之脂質粒子可經由經口投與個體加以遞送。該等粒子可併有賦形劑且以可食用錠劑、經頰錠劑、喉錠、膠囊劑、丸劑、口含錠、酏劑、嗽口水、懸浮液、經口噴霧、糖

漿、糯米片及其類似物之形式使用(參見例如美國專利第5,641,515號、第5,580,579號及第5,792,451號，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)。此等經口劑量形式亦可含有以下各項：黏合劑、明膠、賦形劑、潤滑劑及/或調味劑。當單位劑型為膠囊劑時，除以上所描述之材料以外，其亦可含有液體載劑。各種其他材料可作為包衣劑存在或以其他方式調節劑量單位之物理形式。固然，用於製備任何單位劑型之任何材料均應為醫藥學純的且在所採用之量下實質上無毒。

典型地，此等經口調配物可含有至少約0.1%或更多脂質粒子，但固然，該等粒子之百分比可變化且宜在總調配物重量或體積之約1%或2%與約60%或70%之間或更大。自然，可能製備之各治療上適用之組成物中的粒子用量使得將在該化合物之任何指定單位劑量下獲得適合劑量。熟習該等醫藥調配物之製備技術者將預見諸如溶解度、生物利用率、生物半衰期、投與途徑、產品貨架壽命以及其他藥理學考量之因素，且因而多種劑量及治療方案可為理想的。

適合於經口投與之調配物可由以下各項組成：(a)液體溶液，諸如有效量之封裝siRNA分子(例如，表A中所描述之siRNA分子)懸浮於諸如水、生理鹽水或PEG 400之稀釋劑中；(b)膠囊劑、扁囊劑或錠劑，各自含有預定量之siRNA分子，呈液體、固體、顆粒或明膠形式；(c)於適當液體中之懸浮液；及(d)適合之乳液。錠劑形式可包括乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、磷酸鈣、玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、微晶纖維素、明膠、膠體二氧化矽、滑石、硬脂酸鎂、硬脂酸及其他賦形劑、著色劑、填充劑、黏合劑、稀釋劑、緩衝劑、潤濕劑、防腐

劑、調味劑、染料、崩解劑及醫藥學上相容之載劑中的一或多種。□含錠形式可包含處於調味劑(例如蔗糖)中之siRNA分子，以及包含處於惰性基質中之治療性核酸的喉錠，諸如明膠及甘油或蔗糖及阿拉伯膠乳液、凝膠及除siRNA分子以外亦含有此項技術中已知的載劑的類似物。

在其用途之另一實例中，脂質粒子可併入多種局部劑型中。舉例而言，含核酸-脂質粒子之懸浮液可調配為凝膠劑、油劑、乳液、局部乳膏、糊劑、軟膏、洗液、泡沫、慕思及其類似物並投與。

當製備本發明脂質粒子之醫藥製劑時，較佳使用大量已經純化以減少或消除空粒子之粒子或與外表面締合之含諸如siRNA之治療劑的粒子。

本發明之方法可在多種宿主中實施。較佳宿主包括哺乳動物物種，諸如靈長類(例如人類及黑猩猩以及其他非人類靈長類)、犬、貓、馬、牛、綿羊、山羊、嚙齒動物(例如大鼠及小鼠)、兔形目動物及豬。

所投與之粒子之量將視siRNA分子與脂質之比、所使用之特定siRNA、所治療之HBV菌株、患者之年齡、體重及病狀以及臨床醫師之判斷而定，但一般將介於每公斤體重約0.01與約50 mg之間，較佳介於約0.1與約5 mg/kg體重之間或每次投與(例如注射)約 10^8 至 10^{10} 個粒子。

B. 活體外投與

對於活體外應用，siRNA分子可遞送至於培養基中生長之任何細胞中。在較佳實施例中，細胞為動物細胞，更佳為哺乳動物細胞且最

佳為人類細胞。

細胞與脂質粒子之間的接觸當在活體外進行時在生物學上相容之培養基中發生。粒子之濃度視特定應用而廣泛變化，但一般介於約 1 μmol 與約 10 mmol 之間。用脂質粒子處理細胞一般在生理溫度(約 37°C)下進行約 1 至 48 小時、較佳約 2 至 4 小時之時間段。

在一組較佳實施例中，將脂質粒子懸浮液添加至 60% 至 80% 匯合接種細胞中，細胞密度為約 10^3 至約 10^5 個細胞/毫升、更佳為約 2×10^4 個細胞/毫升。添加至細胞中之懸浮液的濃度較佳為約 0.01 至 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ，更佳為約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 。

在細胞組織培養可能需要之程度上，在此項技術中為熟知的。舉例而言，Freshney, *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 第 3 版, Wiley-Liss, New York (1994)；Kuchler 等人, *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977)及其中所引用之參考文獻提供細胞培養之一般指導。培養細胞系統通常呈單細胞層形式，但亦使用細胞懸浮液。

使用核內體釋放參數(ERP)測定法，可優化本發明之核酸-脂質粒子之遞送效率。ERP 測定法詳細描述於美國專利公開案第 20030077829 號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。更特定言之，ERP 測定法之目的在於基於脂質粒子之各種陽離子脂質及輔助脂質組分對結合/吸收或與核內體膜融合/去穩定之相對效應來辨別其效應。此測定法允許定量測定脂質粒子之各組分對遞送效率有何影響，從而優化脂質粒子。通常，ERP 測定法量測報導蛋白質(例如螢光素酶、 β -半乳糖苷酶、綠色螢光蛋白(GFP)等)之表現，

且在一些情況下，經優化以用於表現質體之脂質粒子調配物亦將適用於囊封siRNA。在其他情況下，ERP測定法可能適於量測靶序列在存在或不存在siRNA時之轉錄或轉譯之下調。藉由比較各種脂質粒子各自之ERP，可容易地確定優化系統，例如在細胞中具有最高吸收之脂質粒子。

C. 脂質粒子之偵測

在一些實施例中，在約1、2、3、4、5、6、7、8或更多個小時可在個體中偵測到本發明之脂質粒子。在其他實施例中，可在投與粒子之後約8、12、24、48、60、72或96小時或約6、8、10、12、14、16、18、19、22、24、25或28天在個體中偵測到本發明之脂質粒子。可在得自個體之細胞、組織或其他生物樣品中偵測粒子之存在。該等粒子可例如藉由直接偵測粒子、偵測siRNA序列、偵測相關靶序列(亦即，藉由偵測相關序列之表現或減少之表現)、偵測EBOV蛋白(例如干擾素)調節之化合物、偵測個體中之病毒負載或其組合加以偵測。

1. 粒子之偵測

本發明之脂質粒子可使用此項技術中已知的任何方法加以偵測。舉例而言，可使用此項技術中所熟知的方法使標記直接或間接偶合於脂質粒子之組分。可使用多種標記，其中標記之選擇視所需敏感性、與脂質粒子組分結合之容易性、穩定性要求及可利用之儀器及處理規定而定。適合之標記包括但不限於光譜標記，諸如螢光染料(例如螢光素及衍生物，諸如異硫氰酸螢光素(FITC)及Oregon Green™；若丹明及衍生物，諸如得克薩斯紅、異硫氰酸四若丹明(TRITC)等、洋地黃毒苷、生物素、藻紅蛋白、AMCA、CyDyes™及其類似物；放

射性標記，諸如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 等；酶，諸如辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶等；光譜比色標記，諸如膠態金或有色玻璃或塑膠珠粒，諸如聚苯乙烯、聚丙烯、膠乳等。該標記可使用此項技術中已知的任何手段加以偵測。

2. 核酸之偵測

本文中藉由熟習此項技術者所熟知的許多手段中之任一種來偵測並定量核酸(例如siRNA分子)。核酸之偵測可藉由熟知的方法來進行，諸如南方分析、北方分析、凝膠電泳、PCR、放射性標記、閃爍計數及親和層析法。亦可採用其他分析型生物化學方法，諸如分光光度法、X射綫照相術、電泳、毛細管電泳、高效液相層析法(HPLC)、薄層層析法(TLC)及超擴散層析法。

核酸雜交格式之選擇不重要。熟習此項技術者已知多種核酸雜交格式。舉例而言，常用格式包括夾心測定法及競爭或易位測定法。雜交技術一般描述於例如「Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach」, Hames及Higgins編, IRL Press (1985)中。

可藉由使用放大所偵測之靶核酸的核酸擴增系統來提高雜交測定法之敏感性。適用於擴增序列以用作分子探針或用於產生核酸片段以供隨後次選殖之活體外擴增技術為已知的。足以指導熟習此項技術者進行該等活體外擴增方法之技術的實例，包括聚合酶鏈反應(PCR)、連接酶鏈反應(LCR)、Q β -複製酶擴增及其他RNA聚合酶介導之技術(例如NASBA™)見於以下文獻中：Sambrook等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000)；及Ausubel等人，*SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*,

Current Protocols編, Greene Publishing Associates, Inc.及John Wiley & Sons, Inc. (2002)；以及美國專利第4,683,202號；PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis等人編) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990)；Arnheim & Levinson (1990年10月1日), *C&EN* 36；*The Journal Of NIH Research*, 3:81 (1991)；Kwoh等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173 (1989)；Guatelli等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874 (1990)；Lomell等人, *J. Clin. Chem.*, 35:1826 (1989)；Landegren等人, *Science*, 241:1077 (1988)；Van Brunt, *Biotechnology*, 8:291 (1990)；Wu及Wallace, *Gene*, 4:560 (1989)；Barringer等人, *Gene*, 89:117 (1990)；以及Sooknanan及Malek, *Biotechnology*, 13:563 (1995)。活體外選殖經擴增之核酸的改良方法描述於美國專利第5,426,039號中。此項技術中所描述之其他方法為基於核酸序列之擴增 (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario)及Qβ-複製酶系統。此等系統可用於直接鑑別突變體，其中設計PCR或LCR引子以便僅在存在所選序列時延伸或連接。或者，一般可使用例如非特异性PCR引子來擴增所選序列且稍後探測所擴增之目標區域中指示突變之特定序列。上述參考文獻之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

用作例如活體外擴增方法中之探針、用作基因探針或用作抑制劑組分之核酸典型地根據由Beaucage等人, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859 1862 (1981)所描述之固相亞磷醯胺三酯法，例如，如Needham VanDevanter等人, *Nucleic Acids Res.*, 12:6159 (1984)中所描述使用自動合成儀進行化學合成。必要時典型地藉由如Pearson等人, *J. Chrom.*,

255:137-149 (1983)中所描述之天然丙烯醯胺凝膠電泳或藉由陰離子交換HPLC進行聚核苷酸之純化。可使用Maxam及Gilbert (1980), Grossman及Moldave (編) Academic Press, New York, *Methods in Enzymology*, 65:499之化學降解法驗證合成聚核苷酸之序列。

用於測定轉錄水準之替代手段為原位雜交。原位雜交測定法為熟知的且一般描述於Angerer等人, *Methods Enzymol.*, 152:649 (1987)中。在原位雜交測定法中，將細胞固定於固體載體，典型地玻璃載物片。若欲探測DNA，則利用熱或鹼使細胞變性。隨後使細胞與雜交溶液在中等溫度下接觸以允許欲標記之特定探針退火。較佳用放射性同位素或螢光報導基因標記探針。

實例

將藉由特定實例更詳細地描述本發明。以下實例係出於說明之目的而提供，而不欲以任何方式限制本發明。熟習此項技術者應容易地識別可加以變化或修改以產生本質上相同之結果的多種非重要參數。

實例1.

本實例描述用於測試表A中所闡述之15個siRNA序列之HBV基因靜默活性的生物測定。

編輯HBV基因組序列(登記號EU939600.1)以完美匹配所有候選siRNA。特定言之，在電腦上接合以下四個序列區，包括各序列區域之5'及3'端上之30 bp側接序列且含有候選siRNA之靶位點：212至803、1062至1922、2237至2460及2783至2862。插入六個突變(位置454 C>T；位置598 T>C；位置1206 A>C；位置1287 A>C；及位置

1461 G>C，相對於EU939600.1)以確保所有候選siRNA與此合成一致HBV靶片段完美互補。合成一致HBV靶片段，其中限制酶位點XhoI及NotI分別添加至5'及3'端，以便有助於選殖於psiCHECK-2雙螢光素酶載體中。XhoI/NotI選殖位點介於psiCHECK-2雙螢光素酶載體上之Renilla螢光素酶之終止密碼子與聚腺苷酸化信號之間。

藉由在Dual-Glo測定系統(Promega，Madison，WI，USA)中量測Renilla螢光素酶(R-Luc)活性相對於螢火蟲螢光素酶(F-Luc)活性之降低來測試候選siRNA之HBV基因靜默活性。簡而言之，將Cos-7細胞以25,000個細胞/孔之密度接種於96孔板中且使用Lipofectamine 2000以每孔100 ng報導質體進行轉染。在37°C/5% CO₂下培育4小時之後，移除培養基且用HBV siRNA以一式四份以不同濃度轉染Cos-7細胞，隨後在以上所描述之條件下再培育20小時。藉由螢光檢測來測定兩種螢光素酶之表現。將經HBV-siRNA處理之樣品的R-Luc/F-Luc表現相對於經陰性(非靶向) siRNA處理之細胞中的R-Luc/F-Luc表現平均值標準化。作為正對照，包括針對R-Luc之siRNA。藉由XLfit功能(IDBS MathIQ)計算50%抑制濃度(IC₅₀)。

實例2.

此實例描述選自名為1m至15m (參見表A)之siRNA群組中的兩個不同的siRNA的所有可能之「二元」組合。如本申請案之實例2及實例3中所使用之術語「組合」意謂所組合之siRNA分子共同存在於同一物質組合物中(例如，一起溶解於同一溶液內；或一起存在於同一脂質粒子內；或一起存在於脂質粒子之同一醫藥調配物中，但醫藥調配物內之各脂質粒子可能包括或可能不包括該siRNA組合之各不同的

siRNA)。所組合之siRNA分子通常不共價連接在一起。

個別siRNA各自以名稱1m至15m加以鑑別，如表A中所示。組合內之各siRNA編號以短劃綫(-)隔開；舉例而言，記法「1m-2m」表示siRNA編號1m與siRNA編號2m之組合。短劃綫不意謂組合內之不同的siRNA分子彼此共價連接。不同的siRNA組合由分號隔開。組合中之siRNA編號之順序不重要。舉例而言，組合1m-2m等效於組合2m-1m，因為此兩個記法描述siRNA編號1m與siRNA編號2m之同一組合。

此實例中所描述之siRNA組合適用於例如實施本發明以便在人類中治療HBV及/或HDV感染且改善與HBV感染及/或HDV感染相關之至少一種症狀。

siRNA 1m至15m之二元siRNA組合為：1m-2m；1m-3m；1m-4m；1m-5m；1m-6m；1m-7m；1m-8m；1m-9m；1m-10m；1m-11m；1m-12m；1m-13m；1m-14m；1m-15m；2m-3m；2m-4m；2m-5m；2m-6m；2m-7m；2m-8m；2m-9m；2m-10m；2m-11m；2m-12m；2m-13m；2m-14m；2m-15m；3m-4m；3m-5m；3m-6m；3m-7m；3m-8m；3m-9m；3m-10m；3m-11m；3m-12m；3m-13m；3m-14m；3m-15m；4m-5m；4m-6m；4m-7m；4m-8m；4m-9m；4m-10m；4m-11m；4m-12m；4m-13m；4m-14m；4m-15m；5m-6m；5m-7m；5m-8m；5m-9m；5m-10m；5m-11m；5m-12m；5m-13m；5m-14m；5m-15m；6m-7m；6m-8m；6m-9m；6m-10m；6m-11m；6m-12m；6m-13m；6m-14m；6m-15m；7m-8m；7m-9m；7m-10m；7m-11m；7m-12m；7m-13m；7m-14m；7m-15m；8m-9m；8m-10m；8m-11m；8m-

12m ; 8m-13m ; 8m-14m ; 8m-15m ; 9m-10m ; 9m-11m ; 9m-12m ;
9m-13m ; 9m-14m ; 9m-15m ; 10m-11m ; 10m-12m ; 10m-13m ; 10m-
14m ; 10m-15m ; 11m-12m ; 11m-13m ; 11m-14m ; 11m-15m ; 12m-
13m ; 12m-14m ; 12m-15m ; 13m-14m ; 13m-15m ; 及14m-15m 。

實例3.

此實例描述選自名為1m至15m (參見表A)之siRNA分子群組中的三個不同的siRNA的所有可能之「三元」組合。個別siRNA各自以名稱1m至15m加以鑑別，如表A中所示。各siRNA編號以短劃綫(-)隔開；舉例而言，記法「1m-2m-3m」表示siRNA編號1m、siRNA編號2m及siRNA編號3m之組合。短劃綫不意謂組合內之不同的siRNA分子彼此共價連接。不同的siRNA組合由分號隔開。組合中之siRNA編號之順序不重要。舉例而言，組合1m-2m-3m等效於組合3m-2m-1m，因為此兩個記法描述siRNA編號1m與siRNA編號2m及siRNA編號3m之同一組合。

此實例中所描述之siRNA組合適用於例如實施本發明以便在人類中治療HBV及/或HDV感染且改善與HBV感染及/或HDV感染相關之至少一種症狀。

siRNA 1m至15m之三元siRNA組合為：1m-2m-3m；1m-2m-4m；
1m-2m-5m；1m-2m-6m；1m-2m-7m；1m-2m-8m；1m-2m-9m；1m-
2m-10m；1m-2m-11m；1m-2m-12m；1m-2m-13m；1m-2m-14m；1m-
2m-15m；1m-3m-4m；1m-3m-5m；1m-3m-6m；1m-3m-7m；1m-3m-
8m；1m-3m-9m；1m-3m-10m；1m-3m-11m；1m-3m-12m；1m-3m-
13m；1m-3m-14m；1m-3m-15m；1m-4m-5m；1m-4m-6m；1m-4m-

7m ; 1m-4m-8m ; 1m-4m-9m ; 1m-4m-10m ; 1m-4m-11m ; 1m-4m-12m ; 1m-4m-13m ; 1m-4m-14m ; 1m-4m-15m ; 1m-5m-6m ; 1m-5m-7m ; 1m-5m-8m ; 1m-5m-9m ; 1m-5m-10m ; 1m-5m-11m ; 1m-5m-12m ; 1m-5m-13m ; 1m-5m-14m ; 1m-5m-15m ; 1m-6m-7m ; 1m-6m-8m ; 1m-6m-9m ; 1m-6m-10m ; 1m-6m-11m ; 1m-6m-12m ; 1m-6m-13m ; 1m-6m-14m ; 1m-6m-15m ; 1m-7m-8m ; 1m-7m-9m ; 1m-7m-10m ; 1m-7m-11m ; 1m-7m-12m ; 1m-7m-13m ; 1m-7m-14m ; 1m-7m-15m ; 1m-8m-9m ; 1m-8m-10m ; 1m-8m-11m ; 1m-8m-12m ; 1m-8m-13m ; 1m-8m-14m ; 1m-8m-15m ; 1m-9m-10m ; 1m-9m-11m ; 1m-9m-12m ; 1m-9m-13m ; 1m-9m-14m ; 1m-9m-15m ; 1m-10m-11m ; 1m-10m-12m ; 1m-10m-13m ; 1m-10m-14m ; 1m-10m-15m ; 1m-11m-12m ; 1m-11m-13m ; 1m-11m-14m ; 1m-11m-15m ; 1m-12m-13m ; 1m-12m-14m ; 1m-12m-15m ; 1m-13m-14m ; 1m-13m-15m ; 1m-14m-15m ; 2m-3m-4m ; 2m-3m-5m ; 2m-3m-6m ; 2m-3m-7m ; 2m-3m-8m ; 2m-3m-9m ; 2m-3m-10m ; 2m-3m-11m ; 2m-3m-12m ; 2m-3m-13m ; 2m-3m-14m ; 2m-3m-15m ; 2m-4m-5m ; 2m-4m-6m ; 2m-4m-7m ; 2m-4m-8m ; 2m-4m-9m ; 2m-4m-10m ; 2m-4m-11m ; 2m-4m-12m ; 2m-4m-13m ; 2m-4m-14m ; 2m-4m-15m ; 2m-5m-6m ; 2m-5m-7m ; 2m-5m-8m ; 2m-5m-9m ; 2m-5m-10m ; 2m-5m-11m ; 2m-5m-12m ; 2m-5m-13m ; 2m-5m-14m ; 2m-5m-15m ; 2m-6m-7m ; 2m-6m-8m ; 2m-6m-9m ; 2m-6m-10m ; 2m-6m-11m ; 2m-6m-12m ; 2m-6m-13m ; 2m-6m-14m ; 2m-6m-15m ; 2m-7m-8m ; 2m-7m-9m ; 2m-7m-10m ; 2m-7m-11m ; 2m-7m-12m ; 2m-7m-13m ; 2m-7m-14m ; 2m-7m-15m ; 2m-

8m-9m ; 2m-8m-10m ; 2m-8m-11m ; 2m-8m-12m ; 2m-8m-13m ; 2m-8m-14m ; 2m-8m-15m ; 2m-9m-10m ; 2m-9m-11m ; 2m-9m-12m ; 2m-9m-13m ; 2m-9m-14m ; 2m-9m-15m ; 2m-10m-11m ; 2m-10m-12m ; 2m-10m-13m ; 2m-10m-14m ; 2m-10m-15m ; 2m-11m-12m ; 2m-11m-13m ; 2m-11m-14m ; 2m-11m-15m ; 2m-12m-13m ; 2m-12m-14m ; 2m-12m-15m ; 2m-13m-14m ; 2m-13m-15m ; 2m-14m-15m ; 3m-4m-5m ; 3m-4m-6m ; 3m-4m-7m ; 3m-4m-8m ; 3m-4m-9m ; 3m-4m-10m ; 3m-4m-11m ; 3m-4m-12m ; 3m-4m-13m ; 3m-4m-14m ; 3m-4m-15m ; 3m-5m-6m ; 3m-5m-7m ; 3m-5m-8m ; 3m-5m-9m ; 3m-5m-10m ; 3m-5m-11m ; 3m-5m-12m ; 3m-5m-13m ; 3m-5m-14m ; 3m-5m-15m ; 3m-6m-7m ; 3m-6m-8m ; 3m-6m-9m ; 3m-6m-10m ; 3m-6m-11m ; 3m-6m-12m ; 3m-6m-13m ; 3m-6m-14m ; 3m-6m-15m ; 3m-7m-8m ; 3m-7m-9m ; 3m-7m-10m ; 3m-7m-11m ; 3m-7m-12m ; 3m-7m-13m ; 3m-7m-14m ; 3m-7m-15m ; 3m-8m-9m ; 3m-8m-10m ; 3m-8m-11m ; 3m-8m-12m ; 3m-8m-13m ; 3m-8m-14m ; 3m-8m-15m ; 3m-9m-10m ; 3m-9m-11m ; 3m-9m-12m ; 3m-9m-13m ; 3m-9m-14m ; 3m-9m-15m ; 3m-10m-11m ; 3m-10m-12m ; 3m-10m-13m ; 3m-10m-14m ; 3m-10m-15m ; 3m-11m-12m ; 3m-11m-13m ; 3m-11m-14m ; 3m-11m-15m ; 3m-12m-13m ; 3m-12m-14m ; 3m-12m-15m ; 3m-13m-14m ; 3m-13m-15m ; 3m-14m-15m ; 4m-5m-6m ; 4m-5m-7m ; 4m-5m-8m ; 4m-5m-9m ; 4m-5m-10m ; 4m-5m-11m ; 4m-5m-12m ; 4m-5m-13m ; 4m-5m-14m ; 4m-5m-15m ; 4m-6m-7m ; 4m-6m-8m ; 4m-6m-9m ; 4m-6m-10m ; 4m-6m-11m ; 4m-6m-12m ; 4m-6m-13m ; 4m-6m-14m ; 4m-6m-

15m ; 4m-7m-8m ; 4m-7m-9m ; 4m-7m-10m ; 4m-7m-11m ; 4m-7m-12m ; 4m-7m-13m ; 4m-7m-14m ; 4m-7m-15m ; 4m-8m-9m ; 4m-8m-10m ; 4m-8m-11m ; 4m-8m-12m ; 4m-8m-13m ; 4m-8m-14m ; 4m-8m-15m ; 4m-9m-10m ; 4m-9m-11m ; 4m-9m-12m ; 4m-9m-13m ; 4m-9m-14m ; 4m-9m-15m ; 4m-10m-11m ; 4m-10m-12m ; 4m-10m-13m ; 4m-10m-14m ; 4m-10m-15m ; 4m-11m-12m ; 4m-11m-13m ; 4m-11m-14m ; 4m-11m-15m ; 4m-12m-13m ; 4m-12m-14m ; 4m-12m-15m ; 4m-13m-14m ; 4m-13m-15m ; 4m-14m-15m ; 5m-6m-7m ; 5m-6m-8m ; 5m-6m-9m ; 5m-6m-10m ; 5m-6m-11m ; 5m-6m-12m ; 5m-6m-13m ; 5m-6m-14m ; 5m-6m-15m ; 5m-7m-8m ; 5m-7m-9m ; 5m-7m-10m ; 5m-7m-11m ; 5m-7m-12m ; 5m-7m-13m ; 5m-7m-14m ; 5m-7m-15m ; 5m-8m-9m ; 5m-8m-10m ; 5m-8m-11m ; 5m-8m-12m ; 5m-8m-13m ; 5m-8m-14m ; 5m-8m-15m ; 5m-9m-10m ; 5m-9m-11m ; 5m-9m-12m ; 5m-9m-13m ; 5m-9m-14m ; 5m-9m-15m ; 5m-10m-11m ; 5m-10m-12m ; 5m-10m-13m ; 5m-10m-14m ; 5m-10m-15m ; 5m-11m-12m ; 5m-11m-13m ; 5m-11m-14m ; 5m-11m-15m ; 5m-12m-13m ; 5m-12m-14m ; 5m-12m-15m ; 5m-13m-14m ; 5m-13m-15m ; 5m-14m-15m ; 6m-7m-8m ; 6m-7m-9m ; 6m-7m-10m ; 6m-7m-11m ; 6m-7m-12m ; 6m-7m-13m ; 6m-7m-14m ; 6m-7m-15m ; 6m-8m-9m ; 6m-8m-10m ; 6m-8m-11m ; 6m-8m-12m ; 6m-8m-13m ; 6m-8m-14m ; 6m-8m-15m ; 6m-9m-10m ; 6m-9m-11m ; 6m-9m-12m ; 6m-9m-13m ; 6m-9m-14m ; 6m-9m-15m ; 6m-10m-11m ; 6m-10m-12m ; 6m-10m-13m ; 6m-10m-14m ; 6m-10m-15m ; 6m-11m-12m ; 6m-11m-13m ; 6m-11m-14m ; 6m-11m-

15m ; 6m-12m-13m ; 6m-12m-14m ; 6m-12m-15m ; 6m-13m-14m ; 6m-13m-15m ; 6m-14m-15m ; 7m-8m-9m ; 7m-8m-10m ; 7m-8m-11m ; 7m-8m-12m ; 7m-8m-13m ; 7m-8m-14m ; 7m-8m-15m ; 7m-9m-10m ; 7m-9m-11m ; 7m-9m-12m ; 7m-9m-13m ; 7m-9m-14m ; 7m-9m-15m ; 7m-10m-11m ; 7m-10m-12m ; 7m-10m-13m ; 7m-10m-14m ; 7m-10m-15m ; 7m-11m-12m ; 7m-11m-13m ; 7m-11m-14m ; 7m-11m-15m ; 7m-12m-13m ; 7m-12m-14m ; 7m-12m-15m ; 7m-13m-14m ; 7m-13m-15m ; 7m-14m-15m ; 8m-9m-10m ; 8m-9m-11m ; 8m-9m-12m ; 8m-9m-13m ; 8m-9m-14m ; 8m-9m-15m ; 8m-10m-11m ; 8m-10m-12m ; 8m-10m-13m ; 8m-10m-14m ; 8m-10m-15m ; 8m-11m-12m ; 8m-11m-13m ; 8m-11m-14m ; 8m-11m-15m ; 8m-12m-13m ; 8m-12m-14m ; 8m-12m-15m ; 8m-13m-14m ; 8m-13m-15m ; 8m-14m-15m ; 9m-10m-11m ; 9m-10m-12m ; 9m-10m-13m ; 9m-10m-14m ; 9m-10m-15m ; 9m-11m-12m ; 9m-11m-13m ; 9m-11m-14m ; 9m-11m-15m ; 9m-12m-13m ; 9m-12m-14m ; 9m-12m-15m ; 9m-13m-14m ; 9m-13m-15m ; 9m-14m-15m ; 10m-11m-12m ; 10m-11m-13m ; 10m-11m-14m ; 10m-11m-15m ; 10m-12m-13m ; 10m-12m-14m ; 10m-12m-15m ; 10m-13m-14m ; 10m-13m-15m ; 10m-14m-15m ; 11m-12m-13m ; 11m-12m-14m ; 11m-12m-15m ; 11m-13m-14m ; 11m-13m-15m ; 11m-14m-15m ; 12m-13m-14m ; 12m-13m-15m ; 12m-14m-15m ; 及 13m-14m-15m 。

實例4.

此實例描述一種建立個別HBV siRNA分子之免疫刺激概況的方

法。

自健康成年志願者收集人類全血於個別含肝素真空容器中。將血液收集管倒置8次以防止凝結且與無菌生理鹽水1:1混合，隨後將180微升(μL)此混合物接種於96孔透明聚苯乙烯組織培養板。同時，使用PBS作為稀釋劑來製備各經LNP調配之siRNA分子之10X溶液。二十微升各10X經LNP調配之siRNA添加至含180 μL 血液:生理鹽水之孔中以產生600 nM之最終siRNA濃度。對於各供體，在三個重複孔中測試各siRNA分子。在37°C/5% CO_2 下將經分離之人類血液與個別siRNA分子一起培育24小時。培育後，藉由使培育板以1200 rpm自旋20分鐘來收集血漿。自各孔收集至少125 μL 血漿且轉移至無菌96孔板中並且用透明乙酸酯板密封件密封。

經由Luminex測定法(Luminex Corp, Austin TX, USA)，藉由定量人類干擾素 $\alpha 2$ ($\text{IFN}\alpha 2$)、介白素1受體拮抗劑(IL-1RA)、介白素6(IL-6)及單核細胞趨化因子蛋白-1 (MCP-1)與跟單獨PBS一起培育之人類全血相比之相對誘導水準來產生各siRNA分子之免疫刺激概況。在Luminex 200系統上俘獲數據且使用xPonent 3.1.871.0軟體使用相對於標準曲綫之邏輯5參數加權擬合進行內插。彙集人類全血三次重複實驗且在技術複製物中加以測定。表1中之數據為經PBS處理之得自十二名供體之血液的變化倍數平均值。對於此實驗，使用未經化學修飾之siRNA (S股序列5'-3'：GAAGGCCAGACGCGAAUUATT；SEQ ID NO:31)作為正對照，對於所指示之細胞因子，相對於經PBS處理之血液產生以下倍數增加：25.1 ($\text{IFN}\alpha 2$)；14.3 (IL-1RA)；1,226.5 (IL-6)；及51.6 (MCP-1)。

表1				
	相對於經PBS處理之血液的變化倍數			
名稱：	IFNa2	IL-1RA	IL-6	MCP-1
1m	0.9	5.7	571.3	16.6
2m	1.0	12.9	1,986.8	43.3
3m	0.8	9.6	1,384.1	31.3
4m	1.1	13.3	2,109.1	45.7
5m	1.0	10.6	1,944.9	37.5
6m	0.9	13.2	1,403.1	43.7
7m	1.0	10.5	1,598.3	34.9
8m	1.0	12.2	1,429.3	45.4
9m	0.9	5.6	479.6	16.3
10m	0.7	9.3	945.7	27.2
11m	0.8	9.7	1,189.9	29.8
12m	0.8	9.4	1,111.4	28.0
13m	0.7	8.8	855.5	20.6
14m	1.0	13.5	1,967.7	49.0
15m	0.9	13.3	1,335.4	46.1

實例5.

作為評估HBV siRNA之有義(S)股是否能夠引起RNAi基因調低之手段，構建基於螢光素酶之報導質體以充當S股靜默之感測器。S股靜默之潛在含義包括對與本文中所描述之HBV siRNA之S股具有互補性之內源性基因之不希望或不合需要之「脫靶」效應。理想siRNA將不顯示S股基因靜默能力。

為了構建S股感測報導質體，將實例1中所描述之HBV靶片段選殖於psi-CHECK2質體載體之逆補體方向，介於Renilla螢光素酶終止密碼子與聚腺苷酸化信號之間。名為「psi-HBV BACKWARD」之所得質體轉錄僅允許由S股而非反義股實現RNAi靜默之Renilla螢光素酶-HBV mRNA。值得注意的是，因為當靶mRNA與所述siRNA股之間存在完美互補性時RNAi基因靜默效應最穩定，故此報導基因設計提供

觀測S股之任何靜默能力的最可能時機。預期部分互補性將僅產生較弱或不產生基因靜默。無所注內源性人類mRNA與表A中所列出之siRNA之S股完全互補。

藉由在雙螢光素酶報導基因 (DLR) 測定系統 (Promega，Madison，WI，USA)中量測Renilla螢光素酶(RLuc)活性相對於螢火蟲螢光素酶(FLuc)活性之降低來測試HBV siRNA之基因靜默活性。在逆轉染程序中將Cos-7細胞用於96孔板。各孔含有25,000個細胞及40 ng 質體加所指示濃度之與Lipofectamine 2000複合之siRNA。在37℃ /5% CO2下培育24小時之後，移除培養基且處理細胞以便進行螢光量測。自Dual Luciferase® Reporter套組中，將50 ul被動溶解緩衝液(1×濃縮)添加至各孔，避光保存，且在100 rpm下振盪30 min。藉由螢光偵測來評估溶解產物中兩種螢光素酶之表現。計算RLuc/FLuc比且相對於僅經質體轉染之細胞(「負對照」)進行標準化。

所報導之數據為一式三份轉染孔之平均值(表2)。% RLuc/FLuc相對於負對照值100將指示無基因靜默。

表2

名稱	psi-HBV反向		
	%RLuc/FLuc相對於負對照		
	5		
	50 ng/ml	ng/ml	1 ng/ml
3m	99.5	92.1	104.0
12m	98.6	97.6	106.6

在與實驗樣品相同之劑量下直接靶向Renilla螢光素酶基因之正對照siRNA分別產生16.1、37.3及91.1之平均%Rluc/Fluc相對於負對照

值。

使用此實例中所揭示之細胞類型、轉染方法及劑量水準，所指示之siRNA之中靶基因靜默(亦即，採用「psi-HBV」報導基因質體)產生以下%RLuc/FLuc相對於負對照值，表明此等siRNA之中靶靜默在此細胞類型及轉染條件下確實起作用：

3m：在劑量水準50、5及1 ng/ml下分別為9.7、18.2、54.7；及

12m：在劑量水準50、5及1 ng/ml下分別為11.2、24.9、59.5。

總而言之，此等結果指示本文中所描述之HBV siRNA之S股不顯示明顯RNAi基因靜默能力。因此，S股引發不需要之內源性基因靜默之可能性較低或可忽略。

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種經分離之雙股siRNA分子，其係選自由1m (SEQ ID NO:1及2)、2m (SEQ ID NO:3及4)、3m (SEQ ID NO:5及6)、4m (SEQ ID NO:7及8)、5m (SEQ ID NO:9及10)、6m (SEQ ID NO:11及12)、7m (SEQ ID NO:13及14)、8m (SEQ ID NO:15及16)、9m (SEQ ID NO:17及18)、10m (SEQ ID NO:19及20)、11m (SEQ ID NO:21及22)、12m (SEQ ID NO:23及24)、13m (SEQ ID NO:25及26)、14m (SEQ ID NO:27及28)及15m (SEQ ID NO:29及30)組成之群。