



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I788312 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：106140110

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 11 月 20 日

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

C07H21/02 (2006.01)

A61K31/713 (2006.01)

(30)優先權：2016/11/23 美國 62/425,907
 2017/08/22 美國 62/548,589
 2017/08/23 美國 62/549,099
 2017/09/21 美國 62/561,514

(71)申請人：美商阿尼拉製藥公司(美國) ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (US)
 美國

(72)發明人：史奇蓋爾 馬克 K SCHLEGEL, MARK K. (US)；傑納斯 馬傑 JANAS, MAJA (PL)；基哈夫 瓦聖特 R JADHAV, VASANT R. (US)；福斯特 唐那德 FOSTER, DONALD (US)；馬諾哈拉 莫司 MANOHARAN, MUTHIAH (US)；拉傑 卡拉 司塔司爾 G RAJEEV, KALLANTHOTTATHIL G. (US)；凱林 安德魯 V KEL'IN, ALEXANDER V. (BY)；奇瑞斯 克拉司 CHARISSE, KLAUS (DE)；納爾 傑亞 拉卡斯 K NAIR, JAYAPRAKASH K. (US)；馬爾 馬丁 MAIER, MARTIN (DE)；松田重雄 MASUDA, SHIGEO (JP)；傑亞拉馬恩 穆斯沙麥 JAYARAMAN, MUTHUSAMY (US)；塞加爾 阿非卡 SEHGAL, ALFICA (US)；布朗 克里斯多 夫 BROWN, CHRISTOPHER (US)；夫特葛拉德 凱文 FITZGERALD, KEVIN (US)；米史坦 史特爾 MILSTEIN, STUART (US)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

TW 201508005A

WO 2016/028649A1

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：42 項 圖式數：3 共 360 頁

(54)名稱

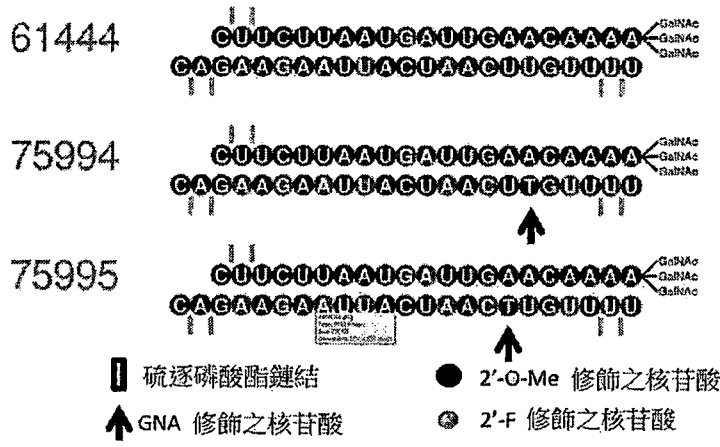
絲胺酸蛋白酶抑制因子 A l i R N A 組成物及其使用方法

(57)摘要

本發明係關於以 Serpina1 基因為靶向之 RNAi 劑，如雙股 RNAi 劑，以及使用該 RNAi 劑以抑制 Serpina1 之表現的方法及處置患有 Serpina1 相關疾病如肝臟病變之個體的方法。

The invention relates to RNAi agents, e.g., double stranded RNAi agents, targeting the Serpina1 gene, and methods of using such RNAi agents to inhibit expression of Serpina1 and methods of treating subjects having a Serpina1 associated disease, such as a liver disorder.

指定代表圖：



【第1A圖】

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

絲胺酸蛋白酶抑制因子 A1 iRNA 組成物及其使用方法
SERPINA1 iRNA COMPOSITIONS AND METHODS OF
USE THEREOF

【中文】

本發明係關於以 *Serpina1* 基因為靶向之 RNAi 劑，如雙股 RNAi 劑，以及使用該 RNAi 劑以抑制 *Serpina1* 之表現的方法及處置患有 *Serpina1* 相關疾病如肝臟病變之個體的方法。

【英文】

The invention relates to RNAi agents, e.g., double stranded RNAi agents, targeting the *Serpina1* gene, and methods of using such RNAi agents to inhibit expression of *Serpina1* and methods of treating subjects having a *Serpina1* associated disease, such as a liver disorder.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1A ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

該代表圖無元件符號及其代表之意義。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無代表化學式

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

絲胺酸蛋白酶抑制因子 A1 iRNA 組成物及其使用方法
SERPINA1 iRNA COMPOSITIONS AND METHODS OF
USE THEREOF

[相關申請]

【0001】 本申請案主張於 2016 年 11 月 23 日遞交之第 62/425,907 號(代理人案號 ALN-260PRO1)美國專利臨時申請案、於 2017 年 8 月 22 日遞交之第 62/548,589 號(代理人案號 ALN-260PRO2)美國專利臨時申請案、於 2017 年 8 月 23 日遞交之第 62/549,099 號(代理人案號 ALN-273PRO1)美國專利臨時申請案、及於 2017 年 9 月 21 日遞交之第 62/561,514 號(代理人案號 ALN-260PRO3)美國專利臨時申請案之優先權。前述申請案各自之整體內容係藉由引用而因此併入本文。

【0002】 本申請案係與於 2013 年 5 月 22 日遞交之第 61/826,125 號美國專利臨時申請案；於 2013 年 11 月 1 日遞交之第 61/898,695 號美國專利臨時申請案；於 2014 年 4 月 15 日遞交之第 61/979,727 號美國專利臨時申請案；於 2014 年 5 月 6 日遞交之第 61/989,028 號美國專利臨時申請案；第 14/284,745 號美國專利申請案，已於 2017 年 2 月 21 日公告為第 9,574,192 號美國專利；於 2017 年 1 月 6 日遞交之第 15/399,820 號美國專利申請案；以及於 2014

年 5 月 22 日遞交之第 PCT/US2014/039109 號國際專利申請案有關。前述申請案各自之整體內容係藉由引用而因此併入本文。

[序列表]

【0003】 本申請係含有序列表，該序列表已經以 ASCII 格式進行電子版提交，並因此藉由引用而以其整體併入本文。所述 ASCII 複本於 2017 年 11 月 16 日創建，名為 121301-07820_SL.txt，大小為 129,236 B。

【技術領域】

【0004】 本發明係關於以絲胺酸蛋白酶抑制因子 1 基因為靶向之 RNAi 劑，以及使用該 RNAi 劑的方法。

【先前技術】

【0005】 Serpinal 係編碼 α -1-抗胰蛋白酶，該酶係主要與肝細胞、單核細胞、肺泡巨噬細胞、腸細胞、及骨髓細胞所產生之中性白細胞彈性蛋白酶複合並抑制後者之活性。在該 Serpinal 基因之一個或兩個複本中具有變異的個體可能遭受 α -1-抗胰蛋白酶缺乏之苦，且由於肺及肝內超過正常之彈性蛋白酶活性，處在發展出肺氣腫及/或慢性肝病之風險下。

【0006】 於受到影響之個體中，該 α -1-抗胰蛋白酶之缺乏係野生型、功能性 α -1-抗胰蛋白酶之缺乏。一些情形中，在該 Serpinal 基因之一個或兩個複本中具有變異的個體係攜帶無效等位基因。其他情形中，在該 Serpinal 基因之一個或兩個複本中具有變異的個體係攜帶缺陷性等位

基因。

【0007】 舉例而言，具有 *Serpina1* 之缺陷性等位基因如 *PIZ* 等位基因之個體，可能產生錯誤折疊蛋白質，而該錯誤折疊蛋白質不能被適當地從合成位點運送至身體內其用動位點。此類個體典型係處於發展出肺病及/或肝病之風險。具有 *Serpina1* 無效等位基因之個體，如 *PINULL* (*Granite Falls*)，典型係僅處於發展出肺病之風險。

【0008】 由 α -1-抗胰蛋白酶缺乏導致之肝病係於肝細胞內產生變體形式之 α -1-抗胰蛋白酶的結果，該變體形式之 α -1-抗胰蛋白酶係錯誤折疊且因此不容易被運送出該細胞。這導致錯誤折疊之蛋白質於該肝細胞內之堆積，且可造成肝臟之一個或多個疾病或病變，包括但不限於，慢性肝病、肝炎、肝硬化、肝纖維化、及/或肝細胞癌。

【0009】 當前，對於處置患有由 α -1-抗胰蛋白酶缺乏引起之肝病之患者的選擇非常有限，包括肝炎疫苗、維持性療法、及避免使用有害之劑(如，醇及 NSAID)。儘管可使用 α -1-抗胰蛋白酶之替代物，此處置對於此等個體體內之肝病無作用，但肝臟移植可能有效，而肝臟移植係困難、昂貴且有風險之過程，且肝臟器官不容易取得。

【0010】 據此，該技藝中存在對於 *Serpina1* 相關疾病如慢性肝病、肝炎、肝硬化、肝纖維化、及/或肝細胞癌之有效處置存在需求。

【發明內容】

【0011】 如下文中更詳細揭示者，本文係揭露包含

靶向 *Serpina1* 之劑的組成物，該劑如 RNAi 劑，如雙股 iRNA 劑。亦揭露使用本發明之組成物來抑制 *Serpina1* 表現以及處置 *Serpina1* 相關疾病如慢性肝病、肝炎、肝硬化、及/或肝細胞癌的方法。

【0012】 本發明係至少部分地基於對以 *Serpina1* 為靶向之 dsRNA 劑之有效的核苷酸或化學結構組元之發現，該等 dsRNA 劑在抑制靶標基因表現方面有優勢，且同時具有降低之脫靶基因靜默效應，以及包含此等適用於治療性用途之劑的組成物。更詳而言，尤其業經發現，其反義股係於該種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之自 5'端計數的位置 2 至 9)內包含至少一個對該雙鏈之熱減穩修飾的以 *Serpina1* 為靶向之 dsRNA 劑及/或解鏈(melting)溫度為自約 40°C 至約 80°C 之範圍的 dsRNA 劑，在媒介 RNA 干擾方面可能比缺失該減穩修飾之親代 dsRNA 劑更為有效。

【0013】 據此，一方面，本發明係提供一種抑制絲胺酸胺酶抑制劑分支 A 成員 1(*Serpina1*)靶標基因序列之表現的雙股 RNA(dsRNA)劑，其係包含正義股及反義股，其中，該反義股係與靶標序列具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾；其中，該反義股係包含位於 5'區域之最先 9 個核苷酸位置內之至少一個熱減穩修飾或其前驅物；其中，該正義股係包含脫唾液酸醣蛋白受體(ASGPR)配位子；以及，其中，該正義股與該反義股之長度係各自獨立為 14 至 40 個核苷酸。

【0014】 一方面，本發明係提供一種抑制絲胺酸胺酶抑制劑分支 A 成員 1(Serpina1)基因之表現的雙股 RNA (dsRNA)劑，其係包含形成雙股區域之正義股與反義股，其中，該正義股係包含至少 15 個接續之核苷酸，其與 SEQ ID NO:1 之核苷酸序列相異不超過 3 個核苷酸；且該反義股係包含至少 15 個接續之核苷酸，其與 SEQ ID NO: 15 之核苷酸序列相異不超過 3 個核苷酸；其中，該反義股係包含位於 5'區域之最先 9 個核苷酸位置內之至少一個熱減穩修飾或其前驅物；其中，該正義股係包含脫唾液酸醣蛋白受體(ASGPR)配位子；以及，其中，該正義股與該反義股之長度係各自獨立為 14 至 40 個核苷酸。

【0015】 又一方面，本發明係提供提供一種抑制絲胺酸胺酶抑制劑分支 A 成員 1 (Serpina1)基因之表現的雙股 RNA (dsRNA)劑，其係包含形成雙股區域之正義股與反義股，該反義股係包含與編碼 Serpina1 之 mRNA 互補之區域，其中，該互補區域係包含至少 15 個接續之核苷酸，其與 SEQ ID NO:15 之核苷酸序列相異不超過 3 個核苷酸；其中，該反義股係包含位於 5'區域之最先 9 個核苷酸位置內之至少一個熱減穩修飾或其前驅物；其中，該正義股係包含脫唾液酸醣蛋白受體(ASGPR)配位子；以及，其中，該正義股與該反義股之長度係各自獨立為 14 至 40 個核苷酸。

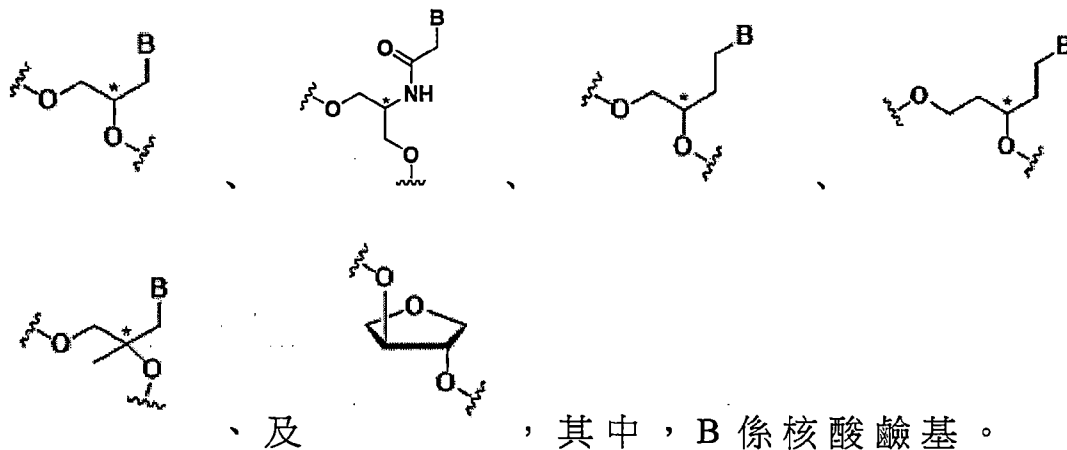
於一態樣中，該 dsRNA 劑係包含至少 4 個包含 2'-氟修飾之核苷酸。

【0016】 於一態樣中，該 dsRNA 劑係具有下述特徵：a) 該熱減穩修飾係定位於該反義股之 5' 區域之位置 4 至 8；b) 該正義股與該反義股係各自獨立包含至少 2 個包含 2'-氟修飾之核苷酸；以及 c) 附接於該正義股任一端之 ASGPR 配位子。

【0017】 另一態樣中，該反義股係具有下述特徵之至少兩者：a) 該熱減穩修飾係定位於該反義股之位置 4 至 8；b) 至少 2 個核苷酸係包含 2'-氟修飾；c) 位於位置 1 與 2 (自 5' 端計數) 核苷酸之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及 d) 18 至 35 個核苷酸之長度。

【0018】 於一態樣中，該正義股係具有下述特徵之至少一者：a) 該 ASGPR 配位子係附接於該正義股之任一端；b) 至少 2 個核苷酸係包含 2'-氟修飾；c) 該正義股與該反義股係形成跨越至少 19 個核苷酸位置之雙股區域，其中，該熱減穩修飾係定位於該雙股區域內。

【0019】 於一態樣中，該熱減穩修飾係選自下列所組成之群組：

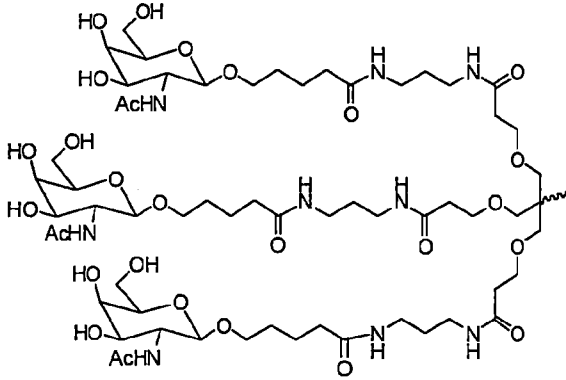


，其中，B 係核酸鹼基。

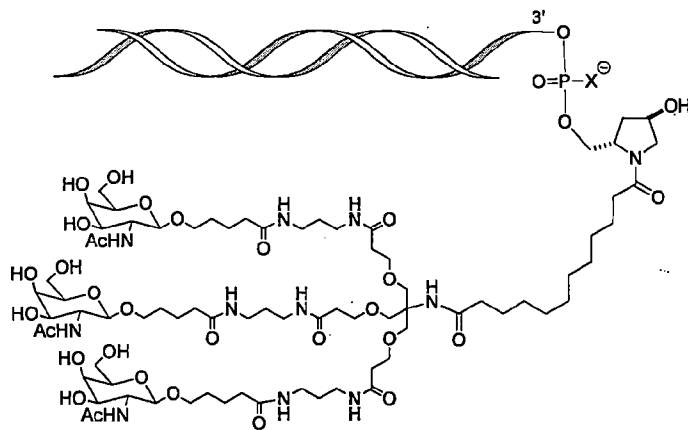
於一態樣中，該減穩修飾係定位於該反義股之位置 7。

【0020】 於一態樣中，該 ASGPR 配位子係透過二價或三價分枝鏈鏈結基附接之一個或多個 GalNAc 衍生物。

【0021】 於一態樣中，該 ASGPR 配位子係：



【0022】 於一態樣中，該 dsRNA 劑係如下方案中所示者接合至該配位子：



其中，X 係 O 或 S。

【0023】 一方面，本發明係提供一種抑制絲胺酸胺酶抑制劑分支 A 成員 1 (Serpina1) 靶標基因序列之表現的雙股 RNA (dsRNA) 劑，係包含正義股與反義股，其中，該反義股係與靶標序列具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾；其中，該反義股係包含位於 5' 區域之最先 9 個核苷酸位置內之至少一個熱減穩修飾；其中，該正義股與該反義股之長度係各自獨立為 14 至 40 個核苷酸；以及，其中，該 dsRNA

之解鏈溫度(melting temperature)係自約 40°C 至約 80°C。

【0024】 一方面，本發明係提供一種抑制絲胺酸胺酶抑制劑分支 A 成員 1(Serpinal)靶標基因序列之表現的雙股 RNA(dsRNA)劑，係包含正義股與反義股，其中，該正義股係包含至少 15 個接續之核苷酸，其與 SEQ ID NO: 1 之核苷酸序列相異不超過 3 個核苷酸；且該反義股係包含至少 15 個接續之核苷酸，其與 SEQ ID NO: 15 之核苷酸序列相異不超過 3 個核苷酸；其中，該反義股係包含位於 5' 區域之最先 9 個核苷酸位置內之至少一個熱減穩修飾；其中，該正義股與該反義股之長度係各自獨立為 14 至 40 個核苷酸；以及，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度係自約 40°C 至約 80°C。

【0025】 又一方面，本發明係提供一種抑制絲胺酸胺酶抑制劑分支 A 成員 1(Serpinal)靶標基因序列之表現的雙股 RNA(dsRNA)劑，係包含正義股與反義股，其中，該反義股係包含與編碼 Serpinal 之 mRNA 互補的區域，其中，該互補區域係包含至少 15 個接續之核苷酸，其與 SEQ ID NO: 15 之核苷酸序列相異不超過 3 個核苷酸；其中，該反義股係包含位於 5' 區域之最先 9 個核苷酸位置內之至少一個熱減穩修飾；其中，該正義股與該反義股之長度係各自獨立為 14 至 40 個核苷酸；以及，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度係自約 40°C 至約 80°C。

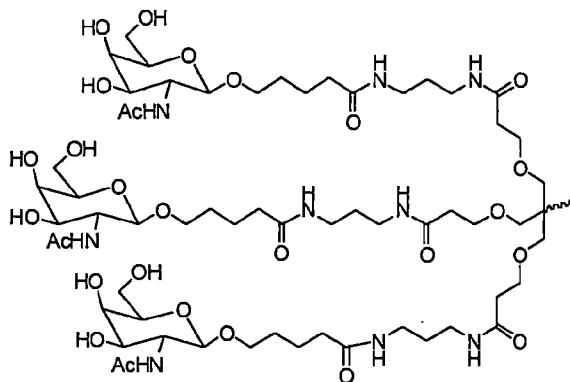
【0026】 於一態樣中，該 dsRNA 劑之解鏈溫度係自約 55°C 至約 67°C。另一態樣中，該 dsRNA 劑之解鏈溫度

係自約 60°C 至約 67°C。

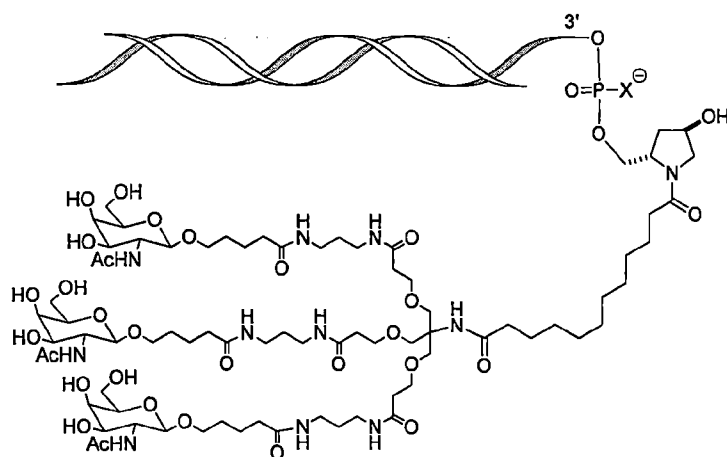
於一態樣中，該 dsRNA 劑復包含脫唾液酸醣蛋白 (ASGPR) 配位子。

【0027】 於一態樣中，該 ASGPR 配位子係透過二價或三價之分枝鏈鏈結基而附接之一個或多個 GalNAc 衍生物。

【0028】 於一態樣中，該 ASGPR 配位子係：



【0029】 於一態樣中，該 dsRNA 劑係如下方案顯示者接合至該配位子：



其中，X 係 O 或 S。

【0030】 於一態樣中，該 dsRNA 劑復具有下述特徵之至少一者：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個包含 2'-氟修飾之核苷酸；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個

硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個包含 2'-氟修飾之核苷酸；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個包含 2'-氟修飾之核苷酸；(vii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙股區域；以及(viii) 位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0031】 於一些態樣中，該 dsRNA 劑之各股可具有 15 至 30 個核苷酸、19 至 30 個核苷酸；或該正義股可具有 21 個核苷酸，且該反義股可具有 23 個核苷酸。

【0032】 於一態樣中，該反義股係包含互補區域，該互補區域係包含至少 15 個接續之核苷酸，其與 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1441 至 1479、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1442 至 1478、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1443 至 1477、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1444 至 1476、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1445 至 1475、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1446 至 1474、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1447 至 1473、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1448 至 1473、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1448 至 1472、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1448 至 1471、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1448 至 1470、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1447 至 1469、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1446 至 1478、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1449 至 1471、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1450 至 1472、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1475、或

SEQ ID NO:1 之核苷酸 1445 至 1480、或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1445 至 1475 相異不超過 3 個核苷酸。

【0033】 於一態樣中，該互補區域係包含至少 15 個接續之核苷酸，其與核苷酸序列 5'-UUUUGUUCAAUCAUUAAGAAGAC-3' (SEQ ID NO: 419) 相異不超過 3 個核苷酸。

【0034】 於一態樣中，該正義股係包含核苷酸序列 5'-CUUCUUA AUGAUUGAACAAAA-3' (SEQ ID NO: 417)，且該反義股係包含核苷酸序列 5'-UUUUGUUCAAUCAUUAAGAAGAC-3' (SEQ ID NO: 419)。

【0035】 於一態樣中，該正義股係包含核苷酸序列 5'-csusucuuAfaUfGfAfuugaacaaaa-3' (SEQ ID NO: 33)，且該反義股係包含核苷酸序列 5'-usUfsuugu(Tgn)caaucaUfuAfagaagsasc-3' (SEQ ID NO: 34)，其中，a、g、c、及 u 分別係 2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C、及 U；Af、Gf、Cf 及 Uf 分別係 2'-氟 A、G、C 及 U；s 係硫代磷酸酯鏈結；以及，(Tgn)係胸苷-二醇核酸(GNA) S-異構物。

【0036】 一方面，本發明係提供一種抑制絲胺酸胺酶抑制劑分支 A 成員 1(Serpina1)基因之表現的雙股 RNA (dsRNA)劑，係包含形成雙股區域之正義股與反義股，其中，該正義股係包含核苷酸序列 5'-csusucuuAfaUfGfAfuugaacaaaaL96-3' (SEQ ID NO: 35)，且該反義股係包含核苷酸序列 5'-

usUfsuugu(Tgn)caaucaUfuAfagaagsasc-3'(SEQ ID NO: 34), 其中, a、g、c、及 u 分別係 2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C、及 U; Af、Gf、Cf 及 Uf 分別係 2'-氟 A、G、C 及 U; s 係硫代磷酸酯鏈結; (Tgn)係胸苷-二醇核酸(GNA) S-異構物; 以及, L96 係 N-[參(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇。

【0037】 一方面, 本發明係提供一種抑制絲胺酸胺酶抑制劑分支 A 成員 1(Serpinal)基因之表現的 dsRNA 劑, 其係包含正義股與反義股, 各股係具有 14 至 40 個核苷酸, 其中, 該反義股係與 Serpinal 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性, 以媒介 RNA 干擾, 以及, 其中, 該反義股係包含位於種子區域內(亦即, 位於該反義股之 5'端之自該 5'端計數之位置 2 至 9)之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾, 且該 dsRNA 復具有下述特徵之至少一者(如, 一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者、八者或全部九者): (i) 解鏈溫度(T_m)為自約 40°C 至約 80°C; (ii) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾; (iii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結; (iv) 該正義股係與配位子接合; (v) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾; (vi) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結; (vii) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾; (viii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域; 以及(ix) 位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0038】 一些態樣中，本發明係提供一種抑制絲胺酸胺酶抑制劑分支 A 成員 1(Serpina1)基因之表現的 dsRNA 劑，其係包含正義股與反義股，每一股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 Serpina1 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，以及，其中，該反義股係包含位於種子區域內(亦即，位於該反義股之 5'端之自該 5'端計數之位置 2 至 9)之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，且該 dsRNA 復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者、八者或全部九者)：(i) 解鏈溫度(T_m)為自約 40°C 至約 80°C；(ii) 該反義股係包含 6、7、8、9、10、11 或 12 個 2'-OMe 修飾；(iii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iv) 該正義股係與配位子接合；(v) 該正義股係包含 6、7、8、9、10、11 或 12 個 2'-OMe 修飾；(vi) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vii) 該 dsRNA 係包含至少 1、2、3、4 或 5 個 2'-去氧修飾；(viii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域；以及(ix) 位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0039】 一些態樣中，該 dsRNA 之解鏈溫度之範圍下限為約 40°C、45°C、50°C、55°C、60°C 或 65°C，且該範圍之上限為約 70°C、75°C 或 80°C。一些態樣中，該 dsRNA 之解鏈溫度之範圍係自約 55°C 至約 70°C。一些態樣中，該 dsRNA 之解鏈溫度之範圍係自約 57°C 至約 67°C。於一些

具體態樣中，該 dsRNA 之解鏈溫度之範圍係自約 60°C 至約 67°C。於一些其他態樣中，該 dsRNA 之解鏈溫度之範圍係自約 62°C 至約 66°C。

【0040】 業經發現，解鏈溫度為至少 60°C 之 dsRNA 劑於體內及體外更為有效。因此，一些態樣中，該 dsRNA 之解鏈溫度的係至少 60°C。

【0041】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 Serpinal 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，以及，其中，該反義股係包含位於種子區域內(亦即，位於該反義股之 5' 端之自該 5' 端計數之位置 2 至 9)之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，該 dsRNA 之解鏈溫度(T_m)係自約 40°C 至約 80°C，且該 dsRNA 係視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者或全部八者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域；以及(viii) 位於該反義股之 5' 端的鈍端。

【0042】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係具有長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域，其中，該反義股係包含位於種

子區域內(亦即，位於該反義股之 5'端之自該 5'端計數之位置 2 至 9)之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，且該 dsRNA 之解鏈溫度(T_m)係自約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 係視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；以及(vii) 位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0043】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係具有長度為 19、21、22 或 23 核苷酸鹼基對之雙鏈區域，其中，該反義股係含有定位於該反義股之種子區域(亦即，該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內的至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C。

【0044】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係具有長度為 19、21、22 或 23 個核苷酸鹼基對之雙鏈區域，其中，該反義股係含有定位於該反義股之種子區域(亦即，該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內的至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C (如，40°C、50°C、60°C、70°C 或 80°C)。

【0045】 於一些特別之態樣中，該雙鏈之熱減穩修飾係位於該反義股之位置 5、6、7、或 8，自該反義股之 5'

端計數。

於一些特別之態樣中，該雙鏈之熱減穩修飾係位於該反義股之位置 6，自該反義股之 5'端計數。

於一些特別之態樣中，該雙鏈之熱減穩修飾係位於該反義股之位置 7，自該反義股之 5'端計數。

【0046】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，以及，其中，該反義股係包含位於種子區域內(亦即，位於該反義股之 5'端之自該 5'端計數之位置 2 至 9)之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度係約 40°C 至約 80°C，且該反義股復包含下述特徵之一者或兩者：

(i) 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；以及

(ii) 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及

該正義股係包含下述特徵之一者、兩者或三者：

(i) 與該正義股接合之配位子；

(ii) 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；以及

(iii) 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結。

【0047】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，以及，其中，該反義股係包含位於自該 5'端計數之最先 9 個核苷酸位置

之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，且配位子係與該正義股接合，以及，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C。

【0048】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，以及，其中，該反義股係包含位於自該 5'端計數之最先 9 個核苷酸位置之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，且配位子係與該正義股接合，以及，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾。

【0049】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含位於自該 5'端計數之最先 9 個核苷酸位置之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，該正義股係包含配位子，以及，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C。於一些進一步之態樣中，該配位子係 ASGPR 配位子。

【0050】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該反義股係包含定位於自該 5'端計數之位置 4 至 8 的該雙鏈之

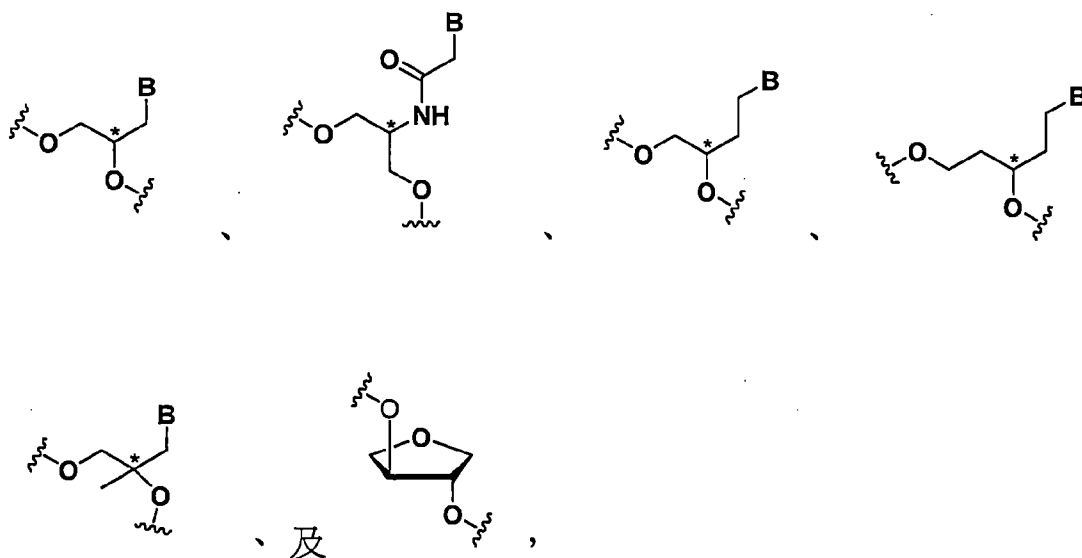
至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，其中，該正義股與反義股係各自包含至少 2 個 2'-氟修飾，以及，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C。於此之一些態樣中，該配位子係 ASGPR 配位子。

【0051】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 Serpina1 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含定位於自該 5'端計數之最先 9 個核苷酸位置內的該雙鏈之至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該正義股係包含配位子，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該反義股復包含下述特徵之至少兩者：(i) 該雙鏈之熱減穩修飾係定位於該反義股之位置 4 至 8；(ii) 至少 2 個 2'-氟修飾；(iii) 核苷酸位置 1 與 2 (自 5'端計數)之間之硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及，該反義股之長度為 18 至 35 個核苷酸。於一些進一步之態樣中，該配位子係 ASGPR 配位子。

【0052】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 Serpina1 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含定位於自該 5'端計數之最先 9 個核苷酸位置內的該雙鏈之至少一個熱

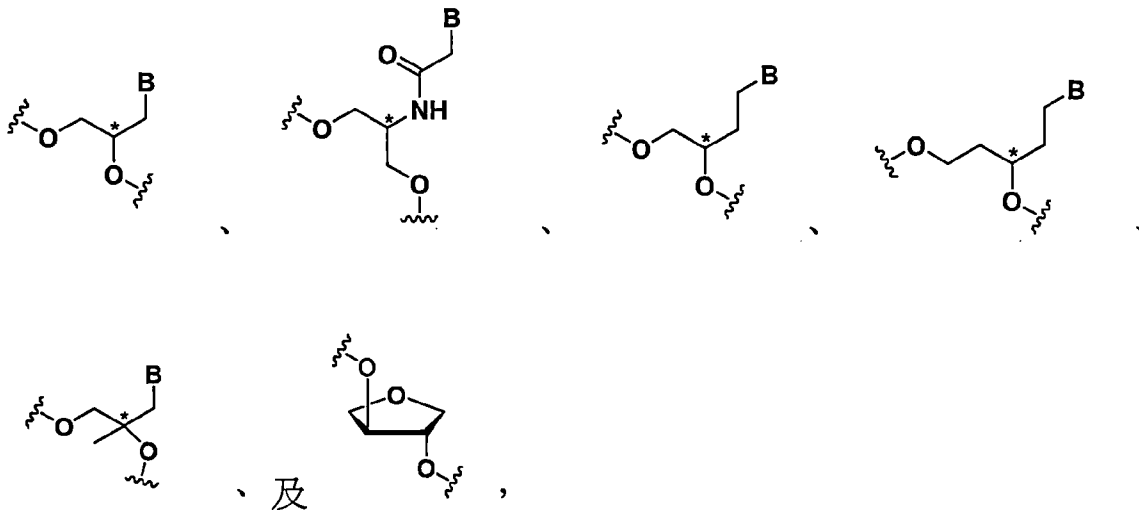
減穩修飾，以及，其中，該正義股係包含配位子，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，且該正義股係具有下述特徵之至少一者：(i) 該配位子係附接於該正義股之任一端；(ii) 正義股係包含至少 2 個 2'-氟修飾；以及 (iii) 該正義股及該反義股係顯示足夠之互補性，以形成跨越至少 19 個核苷酸位置之雙股區域，以及，其中，該雙鏈之熱減穩修飾係定位於該雙股區域內。

【0053】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 Serpina1 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含定位於自該 5'端計數之最先 9 個核苷酸位置內的該雙鏈之至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該正義股係包含一配位子，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該雙鏈之熱減穩修飾係選自下列所組成之群組：



其中，B 係經修飾或未修飾之核酸鹼基，且在各結構之星號係表示 R、S 或外消旋物。

【0054】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 Serpina1 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該反義股係包含定位於自該 5'端計數之位置 4 至 8 的該雙鏈之至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，以及，其中，該正義股與反義股係各自包含至少 2 個 2'-氟修飾，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該雙鏈之熱減穩修飾係選自下列所組成之群組：

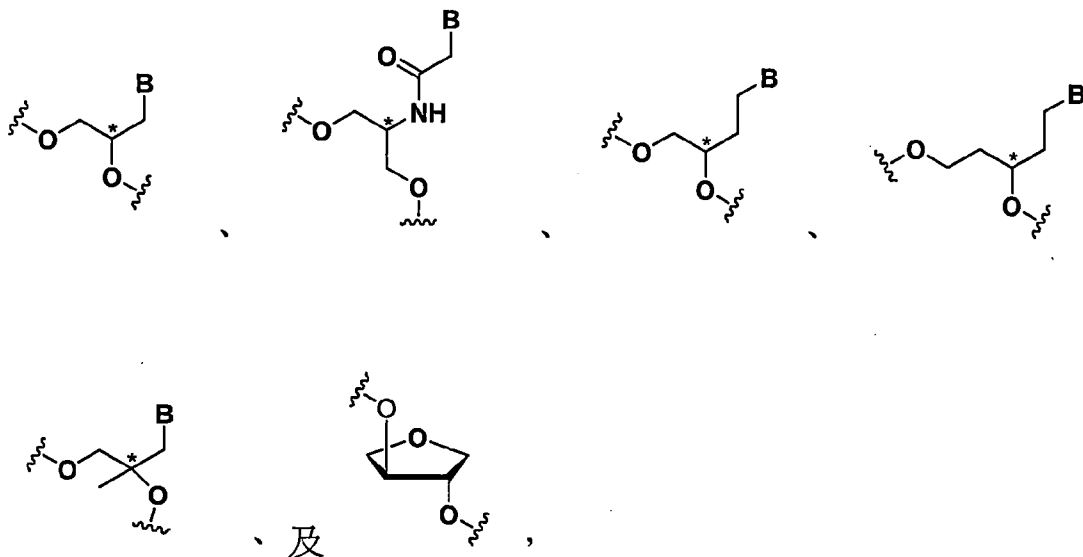


其中，B 係經修飾或未修飾之核酸鹼基，且其在各結構之星號係表示 R、S 或外消旋物。

【0055】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 Serpina1 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA

係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含定位於自該反義股之 5'端計數之位置 7 的該雙鏈之至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，以及，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C。

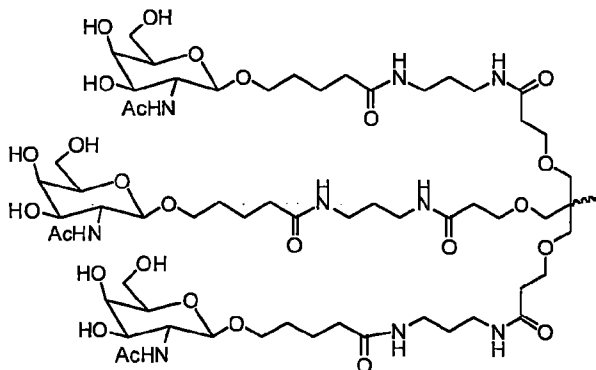
【0056】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 Serpinal 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該反義股係包含定位於自該反義股之 5'端計數之位置 7 的該雙鏈之至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，以及，其中，該正義股與反義股係各自包含至少 2 個 2'-氟修飾，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該雙鏈之熱減穩修飾係選自下列所組成之群組：



其中，B 係經修飾或未修飾之核酸鹼基，且在各結構之星號係表示 R、S 或外消旋物。

【0057】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含定位於自該 5'端計數之最先 9 個核苷酸位置內的該雙鏈之至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該配位子係包含透過二價或三價之分枝鏈鏈結基附接之一個或多個 GalNAc 衍生物。

【0058】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含定位於自該 5'端計數之最先 9 個核苷酸位置內的該雙鏈之至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該正義股係包含配位子，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該配位子係下述結構之 ASGPR 配位子：



【0059】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含 3 個或 4 個 2'-氟修飾，且包含 0、1 或 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含 3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾，包含 2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C；以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有至少為兩個核苷酸之突出。

【0060】 一些態樣中，該正義股與反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係處於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9 股)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含位於位置 7、10 及 11 或位於位置 7、9、10 及 11 (自該正義股之 5'端計數)之 2'-氟修飾，且視需要包含於核苷酸位置 1 與 2 之間、以及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含 3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾，包含 2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈

結；其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C；以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有至少為兩個核苷酸之突出。

【0061】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含 3 個或 4 個 2'-氟修飾，且包含 0 或 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含位於位置 2、6、8、9、14 或 16，或位於位置 2、6、14 或 16，或位於位置 2、14 及 16 之 2'-氟修飾；其中，該反義股係包含核苷酸位置 21 與 22 之間、以及核苷酸位置 22 與 23 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C；以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有至少為兩個核苷酸之突出。

【0062】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度

係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含 3 個或 4 個 2'-氟修飾，且包含 0 或 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含位於位置 2、6、8、9、14 或 16，或位於位置 2、6、14 或 16，或位於位置 2、14 及 16 之 2'-氟修飾；其中，該反義股係包含核苷酸位置 21 與 22 之間、核苷酸位置 22 與 23 之間、核苷酸位置 1 與 2 之間、以及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C；以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有至少為兩個核苷酸之突出。

【0063】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸；其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含位於位置 7、10 及 11 或位於位置 7、9、10 及 11 (自該正義股之 5'端計數)之 2'-氟修飾，且視需要包含核苷酸位置 1 與 2 之間、以及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷

酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含位於位置 2、6、8、9、14 或 16，或位於位置 2、6、14 或 16，或位於位置 2、14 及 16 之 2'-氟修飾；其中，該反義股係包含核苷酸位置 21 與 22 之間、以及核苷酸位置 22 與 23 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C；以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有至少為兩個核苷酸之突出。

【0064】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者或全部八者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vii) 該 dsRNA

係包含長度為 18、19、21、22、23、24 或 24 核苷酸對之雙鏈區域；以及(viii) 該 dsRNA 係包含位於該正義股之 5' 端的鈍端。一些具體態樣中，正義股之長度係 19、20 或 21 或 22 個核苷酸，且反義股之長度係 20、21 或 22 個核苷酸。

【0065】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含位於位置 7、10 及 11 或位於位置 7、9、10 及 11(自該正義股之 5'端計數)之 2'-氟修飾，且視需要包含核苷酸位置 1 與 2 之間、以及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含位於位置 2、6、8、9、14 或 16，或位於位置 2、6、14 或 16，或位於位置 2、14 及 16 之 2'-氟修飾；其中，該反義股係包含核苷酸位置 21 與 22 之間、核苷酸位置 22 與 23 之間、核苷酸位置 1 與 2 之間、以及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C；以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有至少為兩個核苷酸之突出。

【0066】 一些態樣中，該 dsRNA 之一端係鈍端，而另一端係具有突出，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：
(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；
(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；以及(vii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域。一些態樣中，該突出係位於該反義股之 3'端，而該鈍端係位於該反義股之 5'端。一些具體態樣中，該突出之長度係 2、3 或 4 個核苷酸。

【0067】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係具有長度為 19、21、22 或 23 個核苷酸鹼基對的雙鏈區域，其中，該 dsRNA 之一端係鈍端而另一端係具有突出，其中，該反義股係含有定位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者或全部六者)：(i) 該反義

股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾，且視需要，該 2 個核苷酸之突出係位於該反義股之 3'端，且該鈍端係該反義股之 5'端。一些態樣中，該突出係位於該反義股之 3'端，而該鈍端係該反義股之 5'端。

【0068】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑亦可於該 dsRNA 雙鏈之兩端具有兩個鈍端。

【0069】 一些態樣中，該 dsRNA 係於該雙鏈之兩端均具有鈍端，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；以及(vii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域。

【0070】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係具有長度為 19、21、22 或 23 個核苷酸鹼基對的雙鏈區域，且於該雙鏈之兩端均具有鈍端，其中，該 dsRNA 之一端係鈍端而另一端係具有突出，其中，該反義股係含有定位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者或全部六者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾。

【0071】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含 21 個核苷酸(nt)之正義股與 23 個核苷酸(nt)之反義股，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係出現於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內，其中，該 dsRNA 之一端係鈍端，而另一端係包含一 2 nt 之突出，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4

個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；以及(vii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端。較佳地，該 2 nt 之突出係位於該反義股之 3'端。

【0072】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，其中：該正義股之長度係 25 至 30 個核苷酸殘基，其中，自該 5'末端核苷酸(位置 1)開始，該正義股之位置 1 至 23 係包含至少 8 個核糖核苷酸；反義股之長度係 36 至 66 個核苷酸殘基，且自 3'末端核苷酸開始，該等位置中之至少 8 個核糖核苷酸係與正義股之位置 1 至 23 中配對以形成雙鏈；其中，至少該反義股之 3'末端核苷酸係未與正義股配對，且多達 6 個連續之 3'末端核苷酸係未與正義股配對，從而形成 1 至 6 個核苷酸之 3'單股突出；其中，該反義股之 5'末端係包含 10 至 30 個未與正義股配對之連續核苷酸，從而形成 10 至 30 個核苷酸之單股 5'突出；其中，當將該正義股與反義股以最大互補性對準，從而於該正義股與反義股之間形成實質上雙鏈之區域時，至少該正義股之 5'末端核苷酸及 3'末端核苷酸係未與反義股之核苷酸配對的鹼基；且當將該雙股核酸引入哺乳動物細胞內時，該反義股係沿著反義股長度之至少 19 個核糖核苷酸與靶標 RNA 足夠互補，以降低 *Serpina1* 靶標基因表現；以及，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其

中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內，以及，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C。舉例而言，該熱減穩核苷酸係出現於與該正義股之 5'端之位置 14 至 17 相反或互補的位置之間，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；以及(vii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 30 核苷酸對的雙鏈區域。

【0073】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，其中，該 dsRNA 劑係包含長度為至少 25 且最多 29 個核苷酸之正義股，以及長度為最多 30 個核苷酸之反義股，且該正義股係包含一位於 5'端之位置 11 處之對於酶促降解敏感的修飾核苷酸，其中，該正義股之 3'端與該反義股之 5'端係形成鈍端，且該反義股係於其 3'端較該正義股長 1 至 4 個核苷酸，其中，該雙鏈區域之長度係至少 25 個核苷酸，且當將該 dsRNA 劑引入哺乳動物細胞內時，該反義股係沿著該反義股長度之至少 19 nt 而與 Serinal1 靶標 mRNA 足夠互補，以降低靶標基因表現；以及，其中，該 dsRNA 之切丁酶(dicer)裂解係優先導致包

含該反義股之該 3'端的 siRNA，從而降低該靶標基因於該哺乳動物體內之表現，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；以及(vii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 29 核苷酸對的雙鏈區域。

【0074】 一些態樣中，該反義股係包含核苷酸位置 21 與 22 之間、及核苷酸位置 22 與 23 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結，其中，該反義股係含有定位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者或全部八者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；

(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對的雙鏈區域；以及(viii) 該 dsRNA 係具有位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0075】 一些態樣中，該反義股係包含核苷酸位置 1 與 2 之間、核苷酸位置 2 與 3 之間、核苷酸位置 21 與 22 之間、以及核苷酸位置 22 與 23 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結，其中，該反義股係含有定位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者或全部八者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該正義股係與配位子接合；(iii) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(iv) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(v) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vi) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域；(vii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域；以及(viii) 該 dsRNA 係具有位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0076】 一些態樣中，該正義股係包含核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結，其中，該反義股係含有定位於該反義股之種子區

域(亦即，位於該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者或全部八者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域；以及(viii) 該 dsRNA 係具有位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0077】 一些態樣中，該正義股係包含核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結，該反義股係包含核苷酸位置 1 與 2 之間、核苷酸位置 2 與 3 之間、核苷酸位置 21 與 22 之間、以及核苷酸位置 22 與 23 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結，其中，該反義股係含有定位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該 dsRNA 之解鏈溫度為約 40°C 至約 80°C，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該正義股係與配位子接合；(iii) 該正義股係包含 2、3、4 或

5 個 2'-氟修飾；(iv) 該正義股係包含 3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(v) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vi) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域；以及(vii) 該 dsRNA 係具有位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0078】 一方面，本發明係提供一種能抑制 *Serpinal* 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 之表現的 dsRNA 劑，其係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與該 *Serpinal* 靶標序列如 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，以及，其中，該反義股係包含位於該種子區域(亦即，該反義股之 5'端的位置 2 至 9，自該 5'端計數)內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，以及，該 dsRNA 復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者或全部八者)：

- (i)該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；
- (ii)該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；
- (iii)該正義股係與配位子接合；
- (iv)該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；
- (v)該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；
- (vi)該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；
- (vii)該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈

區域；以及

(viii)位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0079】 於一些特別之態樣中，該雙鏈之熱減穩修飾係位於該反義股之自該反義股 5'端計數之位置 7。

【0080】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與靶標序列具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，以及，其中，該反義股係包含位於該種子區域(亦即，該反義股之 5'端的位置 2 至 9，自該 5'端計數)內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，以及，該反義股復包含下述特徵之一者或兩者：

(iii)2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；以及

(iv)1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及該正義股係包含下述特徵之一者、兩者或三者：

(iv)與該正義股接合之配位子；

(v)2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；以及

(vi)1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結。

【0081】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，以及，其中，該反義股係包含位於自 5'端計數之最先 9 個核苷酸位置內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，以及，配位子係與該正義股接合。

【0082】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，以及，其中，該反義股係包含位於自 5'端計數之最先 9 個核苷酸位置內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，配位子係與該正義股接合，以及，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾。

【0083】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含位於自 5'端計數之最先 9 個核苷酸位置內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該正義股係包含配位子。於此之一些進一步之態樣中，該配位子係 ASGPR 配位子。

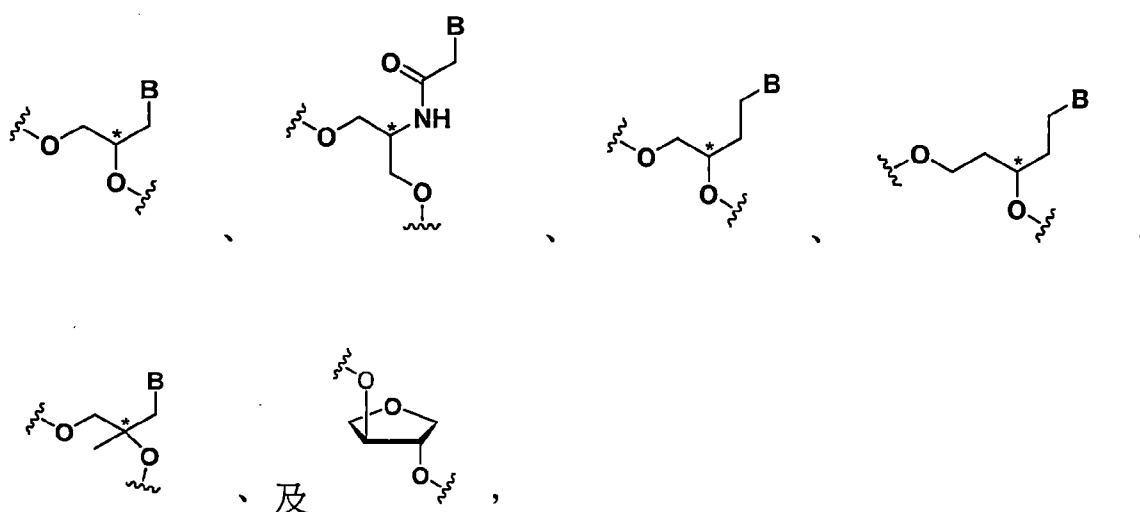
【0084】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該反義股係包含定位於自 5'端計數之位置 4 至 8 之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，以及，其中，該正義股與該反義股係各自包含至少 2 個 2'-氟修飾。於此之一些進一步之態樣總，該配位子係 ASGPR 配位子。

【0085】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含位於自 5' 端計數之最先 9 個核苷酸位置內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，以及，其中，該反義股復包含下述特徵之至少兩者：(i) 該雙鏈之熱減穩修飾係定位於該反義股之位置 4 至 8；(ii) 至少 2 個 2'-氟修飾；(iii) 核苷酸位置 1 與 2(自 5' 端計數)之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及，反義股之長度係 18 至 35 個核苷酸。於一些進一步之態樣中，該配位子係 ASGPR 配位子。

【0086】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含位於自 5' 端計數之最先 9 個核苷酸位置內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，以及，該正義股復包含下述特徵之至少一者：(i) 該配位子係附接於該正義股之任一端；(ii) 正義股係包含至少 2 個 2'-氟修飾；以及(iii) 該正義股與該反義股係顯示足夠之互補性，以形成跨越至少 19 個核苷酸位置之雙股區域，以及，其中，該雙

鏈之熱減穩修飾係定位於該雙股區域內。

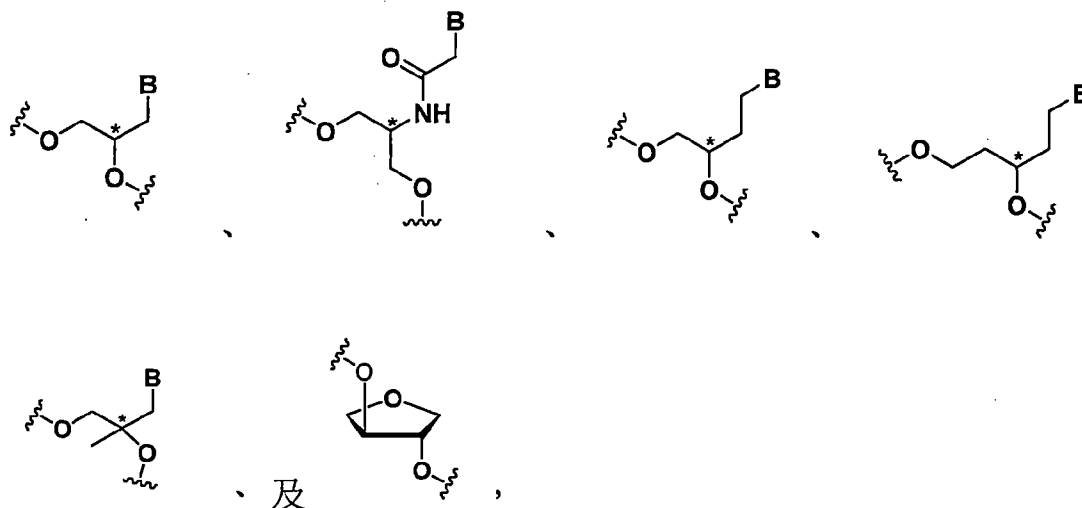
【0087】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 Serpina1 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含位於自 5' 端計數之最先 9 個核苷酸位置內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，以及，其中，該雙鏈之熱減穩修飾係選自由下列所組成之群組：



其中，B 係經修飾或未修飾之核酸鹼基，且在各結構之星號係表示 R、S 或外消旋物。

【0088】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 Serpina1 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該反義股係包含定位於自 5' 端計數之位置 4 至 8 之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，其中，

該正義股與該反義股係各自包含至少 2 個 2'-氟修飾，以及，其中，該雙鏈之熱減穩修飾係選自由下列所組成之群組：

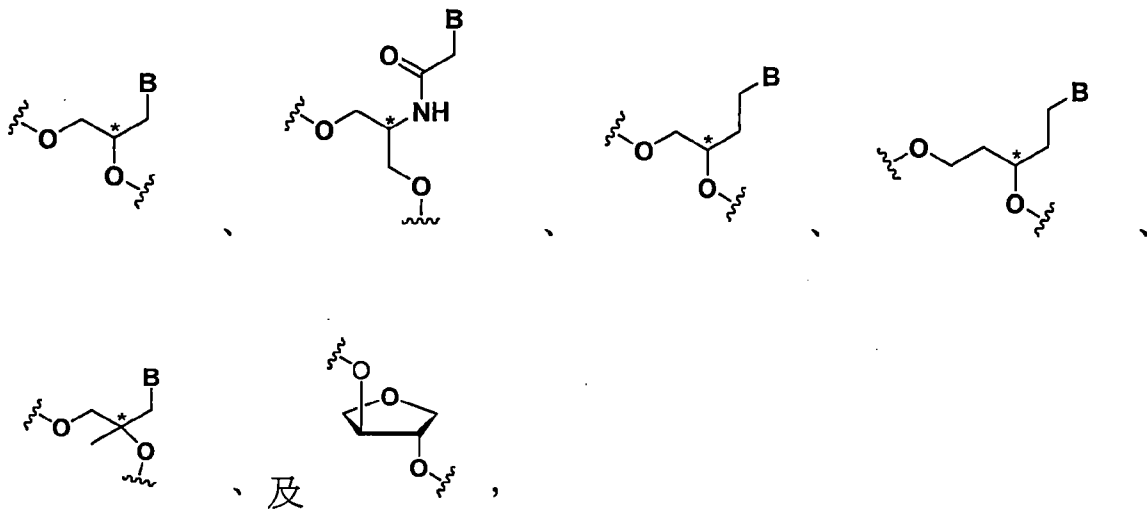


其中，B 係經修飾或未修飾之核酸鹼基，且在各結構之星號係表示 R、S 或外消旋物。

【0089】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含定位於自該反義股之 5'端計數之位置 7 的至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該正義股係包含配位子。

【0090】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 *Serpina1* 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該反義股係包含定位於自該反義股之 5'端計數之位置 7 的至少

一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，以及，其中，該正義股與該反義股係各自包含至少 2 個 2'-氟修飾，以及，其中，該雙鏈之熱減穩修飾係選自由下列所組成之群組：

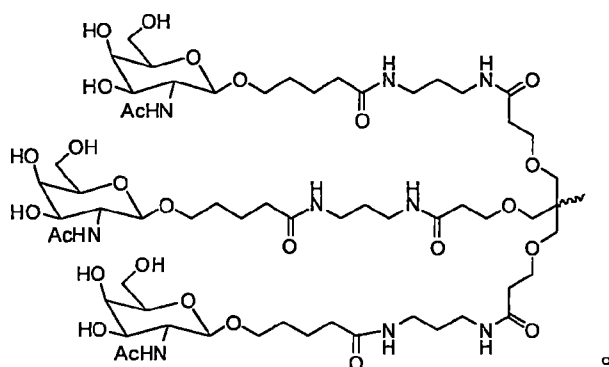


其中，B 係經修飾或未修飾之核酸鹼基，且在各結構之星號係表示 R、S 或外消旋物。

【0091】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股係與 Serpina1 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含位於自 5' 端計數之最先 9 個核苷酸位置內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，其中，該配位子係包含透過二價或三價之分枝鏈鏈結基附接之一個或多個 GalNAc 衍生物。

【0092】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含正義股與反義股，各股係具有 14 至 40 個核苷酸，其中，該反義股

係與 *Serpinal* 靶標序列如 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1480 具有足夠之互補性，以媒介 RNA 干擾，其中，該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟，其中，該反義股係包含位於自 5' 端計數之最先 9 個核苷酸位置內之該雙鏈的至少一個熱減穩修飾，其中，該正義股係包含配位子，其中，該配位子係下述結構之 ASGPR 配位子：



【0093】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含 3 或 4 個 2'-氟修飾，且包含 0、1 或 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含 3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾，包含 2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及，其中，該 dsRNA 係視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有至少為兩個核苷酸之突出。

【0094】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含位於位置 7、10 及 11 或位於位置 7、9、10 及 11 (自該正義股之 5'端計數)之 2'-氟修飾，且視需要包含核苷酸位置 1 與 2 之間、以及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含 3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾，包含 2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及，其中，該 dsRNA 係視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有至少為兩個核苷酸之突出。

【0095】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含 3 或 4 個 2'-氟修飾，且包含 0 或 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含位於位置 2、6、8、9、14 或 16，或位於位置 2、6、14 或 16，或位於位置 2、14 及 16 之 2'-氟修飾；其中，該反義股係包含核苷酸位置

21 與 22 之間、以及核苷酸位置 22 與 23 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及，其中，該 dsRNA 係視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有至少為兩個核苷酸之突出。

【0096】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含 3 或 4 個 2'-氟修飾，且包含 0 或 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含位於位置 2、6、8、9、14 或 16，或位於位置 2、6、14 或 16，或位於位置 2、14 及 16 之 2'-氟修飾；其中，該反義股係包含核苷酸位置 21 與 22 之間、核苷酸位置 22 與 23 之間、核苷酸位置 1 與 2 之間、以及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及，其中，該 dsRNA 係視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有一至少為兩個核苷酸之突出。

【0097】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度

係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含位於位置 7、10 及 11 或位於位置 7、9、10 及 11 (自該正義股之 5'端計數)之 2'-氟修飾，且視需要包含核苷酸位置 1 與 2 之間、以及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含位於位置 2、6、8、9、14 或 16，或位於位置 2、6、14 或 16，或位於位置 2、14 及 16 之 2'-氟修飾；其中，該反義股係包含核苷酸位置 21 與 22 之間、以及核苷酸位置 22 與 23 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及，其中，該 dsRNA 係視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：

(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有一至少為兩個核苷酸之突出。

【0098】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸；該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內；其中，該正義股係與配位子接合，包含位於位置 7、10 及 11 或位於位置 7、9、10 及 11(自該正義股之 5'端計數)之 2'-氟修飾，且視需要包含核苷酸

位置 1 與 2 之間、以及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；其中，該反義股係包含位於位置 2、6、8、9、14 或 16，或位於位置 2、6、14 或 16，或位於位置 2、14 及 16 之 2'-氟修飾；其中，該反義股係包含核苷酸位置 21 與 22 之間、以及核苷酸位置 22 與 23 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及，其中，該 dsRNA 係視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者或全部三者)：

(i) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 25 核苷酸對之雙鏈區域；(ii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端；以及(iii) 該 dsRNA 係於該反義股之 3'端具有一至少為兩個核苷酸之突出。

【0099】 於具體之態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含：

(a)正義股，係具有：

(i)21 個核苷酸之長度；

(ii)附接於 3'端之 ASGPR 配位子，其中，該 ASGPR 配位子係包含透過三價之分枝鏈鏈結基附接之三個 GalNAc 衍生物；以及

(iii)位於位置 7、10 及 11 (自 5'端計數)之 2'-F 修飾；
以及

(b)反義股，係具有：

(i)23 個核苷酸之長度；

(ii)位於位置 2、6 至 8、9、14、及 16 (自 5'端計數)之 2'-F 修飾；

(iii)核苷酸位置 21 與 22 之間、及核苷酸位置 22 與 23 (自 5'端計數)之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及

(iv)位於位置 7 (自 5'端計數)之該雙鏈的熱減穩修飾；

其中，該 dsRNA 劑係具有位於該反義股之 3'端的一包含 2 個核苷酸之突出，以及位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0100】 於另一具體之態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含：

(a)正義股，係具有：

(i)21 個核苷酸之長度；

(ii)附接於 3'端之 ASGPR 配位子，其中，該 ASGPR 配位子係包含透過三價之分枝鏈鏈結基附接之三個 GalNAc 衍生物；以及

(iii)位於位置 7、9、10 及 11 (自 5'端計數)之 2'-F 修飾；以及

(iv)核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 (自 5'端計數)之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；

以及

(b)反義股，係具有：

(i)23 個核苷酸之長度；

(ii)位於位置 2、6、14、及 16 (自 5'端計數)之 2'-F 修飾；

(iii)核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 之間、核苷酸位置 21 與 22 之間、及核苷酸位置 22 與 23 (自 5'端計數)之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及

(iv)位於位置 7 (自 5'端計數)之該雙鏈的熱減穩修飾；
其中，該 dsRNA 劑係具有位於該反義股之 3'端的一
包含 2 個核苷酸之突出，以及位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0101】 於另一具體之態樣中，本發明之 dsRNA 劑
係包含：

(a)正義股，係具有：

(i)21 個核苷酸之長度；

(ii)附接於 3'端之 ASGPR 配位子，其中，該 ASGPR
配位子係包含透過三價之分枝鏈鏈結基附接之三個
GalNAc 衍生物；以及

(iii)位於位置 7、9、10 及 11 (自 5'端計數)之 2'-F 修
飾；以及

(iv)核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 (自
5'端計數)之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；

以及

(b)反義股，係具有：

(i)23 個核苷酸之長度；

(ii)位於位置 2、14、及 16 (自 5'端計數)之 2'-F 修飾；

(iii)核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 之
間、核苷酸位置 21 與 22 之間、及核苷酸位置 22 與 23 (自
5'端計數)之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及

(iv)位於位置 6 或 7 (自 5'端計數)之該雙鏈的熱減穩修
飾；

其中，該 dsRNA 劑係具有位於該反義股之 3'端的一

包含 2 個核苷酸之突出，以及位於該反義股之 5' 端的鈍端。

【0102】 於另一具體之態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含：

(a) 正義股，係具有：

(i) 21 個核苷酸之長度；

(ii) 附接於 3' 端之 ASGPR 配位子，其中，該 ASGPR 配位子係包含透過三價之分枝鏈鏈結基附接之三個 GalNAc 衍生物；以及

(iii) 位於位置 7、9、10 及 11 (自 5' 端計數) 之 2'-F 修飾；以及

(iv) 核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 (自 5' 端計數) 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；

以及

(b) 反義股，係具有：

(i) 23 個核苷酸之長度；

(ii) 位於位置 2、6、8、9、14、及 16 (自 5' 端計數) 之 2'-F 修飾；

(iii) 核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 之間、核苷酸位置 21 與 22 之間、及核苷酸位置 22 與 23 (自 5' 端計數) 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及

(iv) 位於位置 7 (自 5' 端計數) 之該雙鏈的熱減穩修飾；

其中，該 dsRNA 劑係具有位於該反義股之 3' 端的一包含 2 個核苷酸之突出，以及位於該反義股之 5' 端的鈍端。

【0103】 於另一具體之態樣中，本發明之 dsRNA 劑

係包含：

(a)一正義股，係具有：

(i)21個核苷酸之長度；

(ii)附接於3'端之ASGPR配位子，其中，該ASGPR配位子係包含透過三價之分枝鏈鏈結基附接之三個GalNAc衍生物；以及

(iii)位於位置7、9、10及11(自5'端計數)之2'-F修飾；以及

(iv)核苷酸位置1與2之間、及核苷酸位置2與3(自5'端計數)之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；

以及

(b)一反義股，係具有：

(i)23個核苷酸之長度；

(ii)位於位置2、14、及16(自5'端計數)之2'-F修飾；

(iii)核苷酸位置1與2之間、及核苷酸位置2與3之間、核苷酸位置21與22之間、及核苷酸位置22與23(自5'端計數)之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及

(iv)位於位置7(自5'端計數)之該雙鏈的熱減穩修飾；

其中，該dsRNA劑係具有位於該反義股之3'端的一包含2個核苷酸之突出，以及位於該反義股之5'端的鈍端。

【0104】於另一具體之態樣中，本發明之dsRNA劑係包含反義股，該反義股係具有：

(i)位於位置2、14、及16(自5'端計數)之2'-F修飾；

以及

(ii)位於位置 6 或 7 (自 5'端計數)之該雙鏈的熱減穩修飾。

【0105】 於另一具體之態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含：

(a)正義股，係具有：

(i)ASGPR 配位子，其中該 ASGPR 配位子；

(ii)核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 (自 5'端計數)之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；

以及

(b)反義股，係具有：

(i)位於位置 2、14、及 16 (自 5'端計數)之 2'-F 修飾；

(ii)位於位置 6 或 7 (自 5'端計數)之該雙鏈的熱減穩修飾。

【0106】 於另一具體之態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含：

(a)正義股，係具有：

(i)ASGPR 配位子，其中，該 ASGPR 配位子係包含透過三價之分枝鏈鏈結基附接之三個 GalNAc 衍生物；

(ii)核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 (自 5'端計數)之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；

以及

(b)反義股，係具有：

(i)位於位置 2、14、及 16 (自 5'端計數)之 2'-F 修飾；

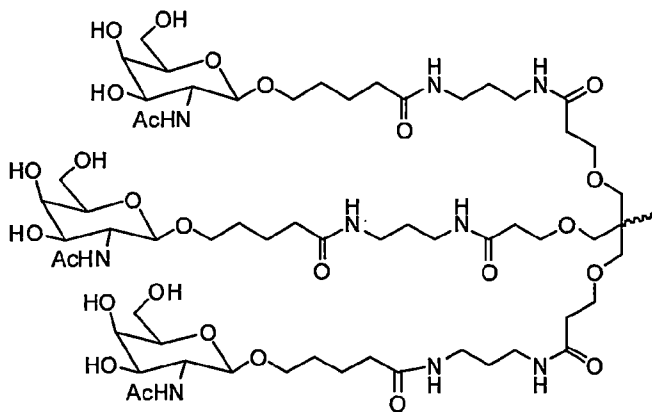
(ii)核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 之間、

核苷酸位置 21 與 22 之間、及核苷酸位置 22 與 23 (自 5' 端計數)之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及

(iii)位於位置 6 或 7 (自 5'端計數)之該雙鏈的熱減穩修飾；

其中，該 dsRNA 劑係具有位於該反義股之 3'端的一包含 2 個核苷酸之突出，以及位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0107】 一些態樣中，該 dsRNA 劑復包含至少一個 ASGPR 配位子。舉例而言，該 ASGPR 配位子係透過二價或三價之分枝鏈鏈結基附接之一個或多個 GalNAc 衍生物，如：



【0108】 一個實例中，該 ASGPR 配位子係附接至該正義股之 3'端。

【0109】 作為本文中揭示之任何 dsRNA 劑之靶標的 Serpinal mRNA 之區域可係：SEQ ID NO:1 之核苷酸 1440 至 1480；或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1441 至 1479；或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1442 至 1478；或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1443 至 1477；或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1444 至 1476；或 SEQ ID NO:1 之核苷酸 1445 至 1475；或 SEQ ID NO:1

之核苷酸 1446 至 1474；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1447 至 1473；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1448 至 1473；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1448 至 1472；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1448 至 1471；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1448 至 1470；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1447 至 1469；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1446 至 1478；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1449 至 1471；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1450 至 1472；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1440 至 1475；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1445 至 1480；或 SEQ ID NO: 1 之核苷酸 1445 至 1475。

【0110】 本發明亦提供包含本發明之 dsRNA 劑的載體、細胞、及醫藥組成物。

【0111】 本發明之醫藥組成物可係非緩衝溶液，如鹽水或水；或緩衝溶液，如包含醋酸鹽、枸橼酸鹽、醇溶穀蛋白 (prolamine)、碳酸鹽、或磷酸鹽或其任意組合之緩衝溶液，或磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS)。

【0112】 一方面，本發明係提供一種抑制細胞內 *Serpina1* 表現的方法。該方法係包括令該細胞與前述本發明之 dsRNA 劑或醫藥組成物之任意者接觸，從而抑制該細胞內 *Serpina1* 基因之表現。

於一態樣中，該細胞係處於個體如人類個體體內。

【0113】 於一態樣中，該 *Serpina1* 之表現係被抑制至少約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 95%、約 98%、或約 100%。

【0114】 一方面，本發明係提供一種處置患有

Serpinal 相關疾病之個體的方法。該方法係包括對該個體投藥治療有效量的前述本發明之 dsRNA 劑或醫藥組成物的任意者，從而處置該個體。

於一態樣中，該個體係人。

【0115】 於一態樣中，該 Serpinal 相關疾病係肝臟病變。

【0116】 於一態樣中，該肝臟病變係選自由慢性肝病、肝炎、肝硬化、肝纖維化、及/或肝細胞癌所組成之群組。

【0117】 另一方面，本發明係提一種於具有 Serpinal 缺陷性變體之個體抑制肝細胞癌之發展的方法。該方法係包括對該個體投藥治療有效量的前述本發明之 dsRNA 劑或醫藥組成物的任意者，從而於該個體抑制肝細胞癌之發展。

【0118】 又一方面，本發明係提供一種於具有 Serpinal 缺陷性變體之個體的肝臟內降低錯誤折疊之 Serpinal 蓄積的方法。該方法係包括對該個體投藥治療有效量的前述本發明之 dsRNA 劑或醫藥組成物的任意者，從而降低該個體的肝臟內錯誤折疊之 Serpinal 的蓄積。

【0119】 該 dsRNA 劑可以約 0.01 mg/kg 至約 10 mg/kg 或約 0.5 mg/kg 至約 50 mg/kg 之劑量、或以約 10 mg/kg 至約 30 mg/kg 之劑量投藥至該個體。

【0120】 該 dsRNA 劑可經皮下或經靜脈投藥至該個體。

【0121】 該 dsRNA 劑可以兩劑或更多劑投藥至該個體。

【圖式簡單說明】

【0122】 本發明係藉由前述詳細說明及圖式進一步例示性說明。

第 1A 圖係圖式性說明 AD-61444、AD-75994、及 AD-75995 之經修飾之正義股及反義股核苷酸序列。按出現之次序，第 1A 圖係分別揭露 SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 36 及 SEQ ID NO: 39。

第 1B 圖係說明投藥所標註之 dsRNA 劑對 AAT (Serpina)表現水準之體內影響的圖。所顯示之 AAT 表現水準係相對於出血前之 AAT 表現水準。

第 1C 圖係圖式性說明 AD-61444、AD-77404、及 AD-77412 之經修飾之正義股及反義股核苷酸序列。按出現之次序，第 1C 圖係分別揭露 SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 36 及 SEQ ID NO: 39。

第 1D 圖係說明投藥所標註之 dsRNA 劑對 AAT (Serpina)表現水準之體內影響的圖。

第 2A 圖係說明，處置後 16 小時，AD-61444 於以 10 nM 之 dsRNA 劑轉染之 Hep3B 細胞內的脫靶效應。

第 2B 圖係說明，處置後 16 小時，AD-77412 於以 10 nM 之 dsRNA 劑轉染之 Hep3B 細胞內的脫靶效應。

第 3A 圖係說明，在投藥 0.3 mg/kg 單劑之所標註之劑的非人靈長類動物 (NHP) 體內，AAT 靜默之效能及耐久性。所顯示之 AAT 表現水準係相對於投藥前第 -7 天及第 -1 天測得之出血前之 AAT 表現水準。

第 3B 圖係說明，在投藥 1 mg/kg 單劑之所標註之劑的非人靈長類動物體內，AAT 靜默之耐久性。所顯示之 AAT 表現水準係相對於投藥前第 -7 天及第 -1 天測得之出血前之 AAT 表現水準。

第 3C 圖係說明，在投藥 3 mg/kg 單劑之所標註之劑的非人靈長類動物體內，AAT 靜默之耐久性。所顯示之 AAT 表現水準係相對於投藥前第 -7 天及第 -1 天測得之出血前之 AAT 表現水準。

第 3D 圖係說明，在投藥 10 mg/kg 單劑之所標註之劑的非人靈長類動物體內，AAT 靜默之耐久性。所顯示之 AAT 表現水準係相對於投藥前第 -7 天及第 -1 天測得之出血前之 AAT 表現水準。

【實施方式】

【0123】 本發明係提供包含以 *Serpina1* 為靶向之劑如 RNAi 劑如雙股 iRNA 劑的組成物。亦揭露使用本發明之組成物來抑制 *Serpina1* 表現以及處置 *Serpina1* 相關疾病如慢性肝病、肝炎、肝硬化、及/或肝細胞癌的方法。

【0124】 本發明係至少部分地基於對以 *Serpina1* 為靶向之 dsRNA 之有效之核苷酸或化學結構組元之發現，該等 dsRNA 劑在抑制靶標基因表現方面有優勢，且同時具有

降低之脫靶基因靜默效應，以及包含此等適用於治療性用途之劑的組成物。更詳而言，尤其業經發現，其反義股係於該種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之自 5'端計數的位置 2 至 9)內包含至少一個對該雙鏈之熱減穩修飾的以 *Serpina1* 為靶向之 dsRNA 劑及/或解鏈溫度為自約 40°C 至約 80°C 之範圍的 dsRNA 劑，在媒介 RNA 干擾方面可能比缺失該減穩修飾之親代 dsRNA 劑更為有效。

【0125】

I. 定義

為了更容易理解本發明，首先定義某些術語。此外，應注意，每當引用參數值之數值或範圍時，其意圖係位於所應用之數值之間的該等數值及範圍亦係本發明之一部分。

【0126】 本中所使用之冠詞「一」係指稱一個或超過一個(亦即，至少一個)之該冠詞之文法受詞。舉例來說，「一元件」係意指一個元件或超過一個元件，如複數個元件。

【0127】 本文中所使用之術語「包括」係意指短語「包括但不限於」，且可與該短語互換使用。

【0128】 本文中所使用之術語「或」係意指術語「及/或」，且除語境中明確排除者，可與後者互換使用。

【0129】 本文中，「*Serpina1*」係指稱絲胺酸蛋白酶抑制劑(*serpin*)肽酶抑制劑分支 A 成員 1 基因或蛋白。*Serpina1* 係作為 α -1-抗胰蛋白酶、AAT、蛋白酶抑制劑 1、

PI、PI1、抗彈性蛋白酶、及抗胰蛋白酶而為人所知。

【0130】 術語 *Serpina1* 係包括人類 *Serpina1*，其胺基酸序列及核苷酸序列可於，舉例而言，基因銀行登錄號 (GenBank Accession No) GI:189163524 (SEQ ID NO:1)、GI:189163525 (SEQ ID NO:2)、GI:189163526 (SEQ ID NO:3)、GI:189163527 (SEQ ID NO:4)、GI:189163529 (SEQ ID NO:5)、GI:189163531 (SEQ ID NO:6)、GI:189163533 (SEQ ID NO:7)、GI:189163535 (SEQ ID NO:8)、GI:189163537 (SEQ ID NO:9)、GI:189163539 (SEQ ID NO:10)、及/或 GI:189163541 (SEQ ID NO:11)中找到；恆河獼猴 *Serpina1*，其胺基酸序列及核苷酸序列可於，舉例而言，基因銀行登錄號 GI:402766667 (SEQ ID NO:12)、GI:297298519 (SEQ ID NO:13)、及/或 GI: 297298520 (SEQ ID NO:14)中找到；小鼠 *Serpina1*，其胺基酸序列及核苷酸序列可於，舉例而言，基因銀行登錄號 GI:357588423 及/或 GI:357588426 中找到；及大鼠 *Serpina1*，其胺基酸序列及核苷酸序列可於，舉例而言，基因銀行登錄號 GI:77020249 中找到。*Serpina1* mRNA 序列之其他實例可使用基因銀行 (GenBank) 及 OMIM 輕易獲取。

【0131】 超過 120 個 *Serpina1* 之等位基因業經得以鑒定，且「M」等位基因係被認為是野生型或「正常」等位基因 (如，「PIM1-ALA213」(亦稱為 PI、M1A)、「PIM1-VAL213」(亦稱為 PI、M1V)、「PIM2」、「PIM3」、及「PIM4」)。其他變體可於，舉例而言，A(1)ATVar 資料

庫中找到(參見, 如, Zaimidou, S., *et al.* (2009) *Hum Mutat.* 230(3):308-13 及 www.goldenhelix.org/A1ATVar)。

【0132】 本文中, 術語「Serpinal 缺陷性等位基因」係指稱一產生蛋白質的變體等位基因, 該蛋白質係不能適當地折疊且可能於細胞內集聚並因此不能被適當地自其在肝臟內之合成位點運輸至身體內之作用位點。

【0133】 例示性 Serpinal 缺陷性等位基因係包括,「Z 等位基因」、「S 等位基因」、「PIM(Malton)等位基因」、及「PIM(Procida)等位基因」。

【0134】 本文中, 術語「Z 等位基因」、「PIZ」、及「Z-AAT」係指稱 Serpinal 之變體等位基因, 其中, 該蛋白之位置 342 處之胺基酸係從麩胺醯胺變為離胺酸, 此係相關密碼子從 GAG 變為 AAG 之結果。攜帶有同型結合之 Z 等位基因的個體可指稱為「PIZZ」。Z-AAT 突變係佔 Serpinal 缺陷性患者之 95%, 且估計在美國, 此類患者數為 100,000, 而全世界範圍內此類個體數為約 3,000,000。該 Z 等位基因在高加索人種中達到多型性頻率, 而在黃種人及黑人中罕見或不存在。同型結合之 ZZ 表型係與肺氣腫及肝病兩者之高風險相關。Z-AAT 蛋白並未在內質網中正確折疊, 導致環-片聚合物的產生, 該聚合物係集聚並降低分泌、未折疊蛋白應答之誘發、細胞凋亡、內質網過載應答、自體吞噬、線粒體應激、及肝細胞功能改變。

【0135】 本文中, 術語「PIM(Malton)」及「M(Malton)-AAT」係指稱 Serpinal 之一種變體等位基因,

其中，位於成熟蛋白質之位置 51 或 52 處之相鄰苯丙胺酸殘基之一者被刪除。這一胺基酸之刪除縮短了 β -片層 B6 之一股，從而防止其在肝臟中之正常處理及分泌，此係與肝細胞包含物及該蛋白質從肝臟中之分泌受損有關。

【0136】 本文中，術語「PIS」係指稱 *Serpinal* 之一種變體等位基因，其中，位置 264 處之麩胺酸係替代為纈胺酸。儘管這一變體蛋白之大部分係可經細胞內降解，但在高加索人種群中 PIS 等位基因出現之頻率高，因此，與 Z 等位基因或無效等位基因複合之複合物雜合子頻繁出現。

【0137】 本文中，「靶標序列」係指稱於 *Serpinal* 基因之轉錄過程中形成之 mRNA 分子之核苷酸序列的連續部分，包括作為主要轉錄產物之 RNA 處理產物的 mRNA。

【0138】 本文中，術語「包含序列之股」係指稱包含核苷酸鏈之寡核苷酸，其中，該核苷酸鏈係藉由使用標準核苷酸命名法所指稱之序列而揭示者。

【0139】 通常，「G」、「C」、「A」及「U」係各自分別代表含有鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤及尿嘧啶作為鹼基之核苷酸。本文中，「T」與「dT」係可互換使用，且係指稱其核糖鹼基為胸腺嘧啶之去氧核糖核苷酸，如，去氧核糖胸腺嘧啶、2'-去氧胸苷、或胸苷。惟，應理解，術語「核糖核苷酸」或「核苷酸」或「去氧核糖核苷酸」亦可指稱如下文進一步詳述之修飾核苷酸、或作為替代品之替換部分。熟練之人士係知悉，鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、及尿

嘧啶可由其他部分替換，而實質上並不改變包含帶有此替換部分之核苷酸之寡核苷酸的鹼基配對特性。舉例而言，但不限於，包含肌苷作為其鹼基之核苷酸可與含有腺嘌呤、胞嘧啶、或尿嘧啶之核苷酸進行鹼基配對。故，本發明之核苷酸序列中的含有尿嘧啶、鳥嘌呤、或腺嘌呤之核苷酸可替換為含有諸如肌苷之核苷酸。包含此等替換部分之序列係本發明之態樣。

【0140】 「多核苷酸」，亦指稱為「寡核苷酸」，係透過相鄰之核苷酸彼此共價鏈結以形成線性聚合性寡核苷酸而形成。於該多核苷酸結構內，磷酸酯基團一般係指稱為形成該多核苷酸之核苷酸間鏈結。多核苷酸可係 RNA 或 DNA，且舉例而言，其長度為小於約 100、200、300、約 400 個核苷酸。

【0141】 如本文中可互換使用之術語「iRNA」、「RNAi 劑」、「iRNA 劑」、「RNA 干擾劑」，係指稱一劑，其係含有如本文中定義之術語的 RNA，且其係經由 RNA 誘導靜默複合物(RISC)途徑而媒介 RNA 轉錄本之靶向裂解。iRNA 係引導透過稱為 RNA 干擾(RNAi)之製程而進行的 mRNA 之序列特異性降解。該 iRNA 係調節如抑制細胞如個體如哺乳動物個體體內之細胞中 *Serpina1* 的表現。

【0142】 本文中，短語「媒介 RNAi」係指稱以序列特異性方式靜默靶標 RNA 之能力。儘管不欲受縛於理論，咸信，靜默係使用該 RNAi 機構或進程、以及一導引 RNA 如 21 至 23 個核苷酸之 siRNA 劑。

【0143】 於一態樣中，本發明之 RNAi 劑係包括單股 RNA，其與靶標 RNA 序列如 *Serpinal* 靶標 mRNA 序列相互作用以引導該靶標 RNA 之裂解。不欲受縛於理論，咸信，被引入細胞內之長雙股 RNA 係藉由稱為切丁酶 (Dicer) 之 III 型核酸內切酶而分解為 siRNA (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485)。切丁酶，一種核糖核酸酶-III 之酶，係將該 dsRNA 加工為 19 至 23 鹼基對之短干擾 RNA，該短干擾 RNA 之特徵係具備一含有 2 個鹼基之 3' 突出 (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363)。隨後，該等 siRNA 係經併入 RNA 誘導靜默複合物 (RISC)，其中，一個或多個螺旋酶將該 siRNA 雙鏈解旋，令該互補性反義股能引導靶標識別 (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309)。一旦結合至適宜之靶標 mRNA，該 RISC 內之一種或多種核酸內切酶係裂解該靶標以誘導靜默 (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188)。因此，一方面，本發明係關於單股 RNA (sssiRNA)，該單股 RNA 係於細胞內生成且促進 RISC 複合物之形成以影響靶標基因亦即 *Serpinal* 基因之靜默。據此，術語「siRNA」亦用於本發明中以指稱上揭之 RNAi。

【0144】 另一態樣中，該 RNAi 劑可係一種單股 RNAi 劑，其係經引入細胞或有機體內以抑制靶標 mRNA。單股 RNAi 劑 (ssRNAi) 係結合至 RISC 核酸內切酶 Argonaute 2，該酶隨後裂解該靶標 mRNA。該單股 siRNA 通常係含有 15 至 30 個核苷酸且係經化學修飾。單股 RNAi 劑之設計及測試係揭示於第 8,101,348 號美國專利及 Lima *et al.*, (2012)

Cell 150: 883-894 中，其各自之整體內容係藉由引用而併入本文。本文中揭示之任何反義核苷酸序列可作為本文中揭示之單股 siRNA 或作為藉由 Lima et al., (2012) *Cell* 150:883-894 中揭示之方法予以化學修飾者而使用。

【0145】 另一態樣中，用於本發明之組成物及方法中之「iRNA」係雙股 RNA，且於本文中係指稱為「雙股 RNAi 劑」、「雙股 RNA (dsRNA) 分子」、「dsRNA 劑」、或「dsRNA」。術語「dsRNA」係指稱核糖核酸分子之複合物，其係具有包含兩條反平行且實質上互補之核酸股的雙鏈結構，該兩股係分別指稱為具有相對於靶標 RNA 亦即 *Serpinal* 基因之「正義」及「反義」取向。於本發明之一些態樣中，雙股 RNA (dsRNA) 係透過本文中指稱為 RNA 干擾或 RNAi 之轉錄後基因靜默機制而觸發靶標 RNA 如 mRNA 之降解。

【0146】 通常，dsRNA 劑之各股之大部分核苷酸係核糖核苷酸，但如本文中詳細揭示者，各股或兩股亦可包括一個或多個非核糖核苷酸如去氧核糖核苷酸及/或修飾核苷酸。此外，如本說明書中所使用者，「RNAi 劑」可包括具有化學修飾之核糖核苷酸；RNAi 劑可包括位於多個核苷酸之實質性修飾。本文中，術語「修飾核苷酸」係指稱獨立具有經修飾之糖部分、經修飾之核苷酸間鏈結、及/或經修飾之核酸鹼基的核苷酸。因此，術語「修飾核苷酸」係涵蓋諸如核苷酸間鏈結、糖部分、或核酸鹼基之官能基或原子之取代、加成或移除。適用於本發明之劑的修飾係

包括本文中揭露的或該技藝中習知的所有類型之修飾。對於本說明書及申請專利範圍之目的，任何此類修飾，如在 siRNA 類型分子中所使用者，係由「RNAi 劑」所涵蓋。

【0147】 該雙鏈區域之長度可係容許所欲之靶標 RNA 透過 RISC 途徑進行特異性降解之任意者，且長度可係自約 9 至 36 鹼基對之範圍，如，長度為約 15 至 30 鹼基對，舉例而言，長度為約 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、或 36 鹼基對，如長度為約 15 至 30、15 至 29、15 至 28、15 至 27、15 至 26、15 至 25、15 至 24、15 至 23、15 至 22、15 至 21、15 至 20、15 至 19、15 至 18、15 至 17、18 至 30、18 至 29、18 至 28、18 至 27、18 至 26、18 至 25、18 至 24、18 至 23、18 至 22、18 至 21、18 至 20、19 至 30、19 至 29、19 至 28、19 至 27、19 至 26、19 至 25、19 至 24、19 至 23、19 至 22、19 至 21、19 至 20、20 至 30、20 至 29、20 至 28、20 至 27、20 至 26、20 至 25、20 至 24、20 至 23、20 至 22、20 至 21、21 至 30、21 至 29、21 至 28、21 至 27、21 至 26、21 至 25、21 至 24、21 至 23、或 21 至 22 鹼基對。處於上文引用之範圍及長度之間的範圍及長度亦視為本發明之一部分。

【0148】 形成該雙鏈結構之兩股可係一個更長 RNA 分子之不同部位，或他們可係個別之 RNA 分子。若該兩股係一個更大分子之部分，且因此藉由界於一股之 3'端與形

成該雙鏈結構之相對另一股之 5'端製劑的不間斷之核苷酸鏈而連接，則該連接之 RNA 鏈係指稱為「髮夾環」。髮夾環可包含至少一個未配對之核苷酸。一些態樣中，該髮夾環可包含至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 20、至少 23 個或更多個未配對之核苷酸。

【0149】 若 dsRNA 之兩條實質上互補之股係由個別之 RNA 分子所構成，則彼等分子無需但可以經共價連接。若該兩股係藉由非於一股之 3'端與形成該雙鏈結構之相對另一股之 5'端製劑之間的不間斷之核苷酸鏈外之手段而連接，則該連接結構係指稱為「鏈結基」。該等 RNA 股可具有相同或不同數目之核苷酸。鹼基對之最大數目係該 dsRNA 之最短股中的核苷酸數減去該雙鏈中存在之任何突出。除了該雙鏈結構外，RNAi 可包含一個或多個核苷酸突出。

【0150】 於一態樣中，本發明之 RNAi 劑係 dsRNA，其各股係包含 19 至 23 個核苷酸，其係與靶標 RNA 序列如 *Serpinal* 靶標 mRNA 序列交互作用，以引導該靶標 RNA 之裂解。不欲受縛於理論，被引入細胞內之長雙股 RNA 係由稱為切丁酶之 III 型核酸內切酶分解為 siRNA (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485)。切丁酶，一種核糖核酸酶-III 之酶，係將該 dsRNA 加工為 19 至 23 個鹼基對之短干擾 RNA，該短干擾 RNA 之特徵係具備一含有 2 個鹼基之 3'突出 (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363)。隨後，

該等 siRNA 係經併入 RNA 誘導靜默複合物(RISC)，其中，一個或多個螺旋酶將該 siRNA 雙鏈解旋，令該互補性反義股能引導靶標識別(Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309)。一旦結合至適宜之靶標 mRNA，該 RISC 內之一種或多種核酸內切酶係裂解該靶標以誘導靜默(Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188)。

【0151】 本文中，術語「核苷酸突出」係指稱至少一個未配對之核苷酸，其係自 iRNA 如 dsRNA 之雙鏈結構突出。舉例而言，當 dsRNA 之一股的 3'端延伸超過另一股之 5'端時，則存在核苷酸突出，反之亦然。dsRNA 可包含具有至少一個核苷酸之突出；或者，該突出可包含至少 2 個核苷酸、至少 3 個核苷酸、至少 4 個核苷酸、至少 5 個核苷酸或更多。核苷酸突出可包含核苷酸/核苷類似物或由核苷酸/核苷類似物組成，該核苷酸/核苷類似物係包括去氧核苷酸/核苷。該突出可位於正義股、反義股或其任意組合。再者，突出中之核苷酸可存在於 dsRNA 之反義股或正義股之任一者的 5'端、3'端或兩端。

【0152】 於一態樣中，dsRNA 之反義股係具有 1 至 10 個核苷酸，如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸，突出係位於 3'端及/或 5'端。於一態樣中，dsRNA 之正義股係具有 1 至 10 個核苷酸，如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸，突出係位於 3'端及/或 5'端。另一態樣中，該突出中之一個或多個核苷係替換為核苷酸硫代磷酸酯。

【0153】 於某些態樣中，位於正義股或反義股或兩者之突出可包括超過 10 個核苷酸之延伸長度，如長度為 10 至 30 個核苷酸、10 至 25 個核苷酸、10 至 20 個核苷酸或 10 至 15 個核苷酸。於某些態樣中，延伸之突出係位於該雙鏈之正義股。於某些態樣中，延伸之突出係存在於該雙鏈之正義股的 3'端。於某些態樣中，延伸之突出係存在於該雙鏈之正義股的 5'端。於某些態樣中，延伸之突出係位於該雙鏈之反義股。於某些態樣中，延伸之突出係位於該雙鏈之反義股的 3'端。於某些態樣中，延伸之突出係位於該雙鏈之反義股的 5'端。於某些態樣中，延伸之突出中的一個或多個核苷酸係替換為核苷硫代磷酸酯。

【0154】 本文中，關於 dsRNA 之術語「鈍」或「鈍端」係意指，於 dsRNA 之給定末端不存在未配對之核苷酸或核苷酸類似物，亦即，無核苷酸突出。dsRNA 之一端或兩端可係鈍者。若 dsRNA 之兩端皆為鈍者，則稱該 dsRNA 係鈍端。明確起見，「鈍端」之 dsRNA 係兩端皆鈍，亦即，該分子之任一端均無核苷酸突出之 dsRNA。通常來說，此分子於其整體長度將皆為雙股。

【0155】 術語「反義股」或「導引股」係指稱 iRNA 如 dsRNA 之一股，該股係包括實質上與靶標序列如 *Serpinal* mRNA 互補之區域。

【0156】 本文中，術語「互補之區域」係指稱該反義股與序列實質上互補之區域，舉例而言，該序列係靶標序列，如本文中定義之 *Serpinal* 核苷酸序列。若該互補之

區域並非與該靶標序列完全互補，則誤配可位於該分子之中部或末端區域。通常，最可容忍之誤配係位於末端區域，如位於該 iRNA 之 5' 末端及/或 3' 末端的 5、4、3、或 2 個核苷酸內。

【0157】 本文中，術語「正義股」或「過客股」係指稱 iRNA 之一股，其係包括實質上與如反義股之本文中定義之術語者的區域互補的區域。

【0158】 本文中，術語「裂解區域」係指稱定位於緊鄰該裂解位點之區域。裂解位點係位於靶標之裂解出現處之位點。一些態樣中，該裂解位點係包含位於該裂解位點之任一端且緊鄰該裂解位點之 3 個鹼基。一些態樣中，該裂解區域係包含位於該裂解位點之任一端且緊鄰該裂解位點之 2 個鹼基。一些態樣中，該裂解位點係特異性地出現於由該反義股之核苷酸 10 及 11 界定之位點處，且該裂解區域係包含核苷酸 11、12 及 13。

【0159】 本文中，且除非明確排除，當使用術語「互補」來相對於第二核苷酸序列而揭示第一核苷酸序列時，該術語係指稱，於某些條件下，包含第一核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸與包含第二核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸雜交並形成雙鏈結構的能力，如該領域技術人員將會理解者。此等條件可係，舉例而言，嚴苛之條件，其中，嚴苛之條件可包括：400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA，50°C 或 70°C，12 至 16 小時，之後洗滌。可採用其他條件，如可與有機體內遭遇之生理學相關條件。

舉例而言，互補序列係足以許可該核酸進行之相關功能如 RNAi。該領域技術人員將能確定最適用於根據該雜交核苷酸之獨特應用而測試兩個序列之互補性的成套條件。

【0160】 當該第一核苷酸序列之核苷酸與該第二核苷酸序列之核苷酸在該第一及第二核苷酸序列之整體長度均存在鹼基配對時，則該等序列可係「完全互補」。惟，本文中，若第一序列係指稱為與第二序列「實質上互補」，則兩個序列可係完全互補，或他們可於雜交時形成一個或多個但通常不超過 4、3 或 2 個誤配鹼基對，同時保持在與其獨特應用組相關之條件下的雜交能力。惟，若兩個寡核苷酸係設計為在雜交時形成一個或多個單股之突出，則此等突出在確定互補性時不應被視為誤配。舉例而言，包含一長度為 21 個核苷酸之寡核苷酸以及另一長度為 23 個核苷酸之寡核苷酸的 dsRNA，且該較長之寡核苷酸係包含一與該較短之寡核苷酸完全互補之 21 個核苷酸的序列，則對於本文中揭示之目的，該 dsRNA 仍可指稱為「完全互補」。

【0161】 本文中，「互補」序列亦可包括非 Watson-Crick 鹼基對及/或自非天然及經修飾之核苷酸形成的鹼基對，或完全由非 Watson-Crick 鹼基對及/或自非天然及經修飾之核苷酸形成的鹼基對形成，只要滿足上述關於其雜交能力之要求即可。此類非 Watson-Crick 鹼基對係包括，但不限於，G:U Wobble 或 Hoogsteen 鹼基配對。

【0162】 本文中，術語「互補」、「完全互補」及「實質上互補」可關於 dsRNA 之正義股與反義股之間、或

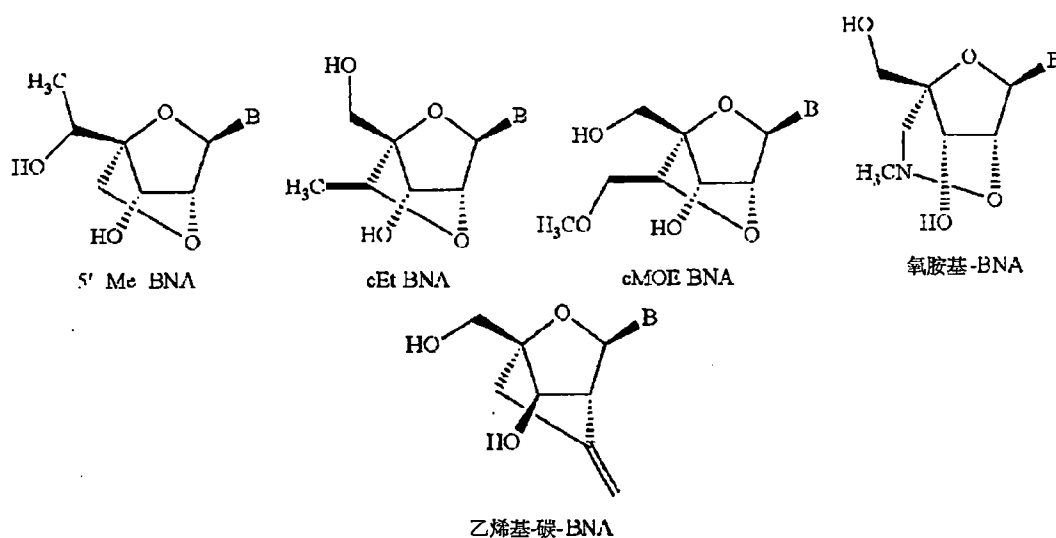
dsRNA 之反義股與靶標序列之間的鹼基匹配而使用，如自其使用情境可理解者。

【0163】本文中，與信使 RNA (mRNA) 之「至少一部分實質上互補」的多核苷酸係指稱一多核苷酸，其係實質上與感興趣之 mRNA (如，編碼 Serpina1 之 mRNA) 的包括 5' UTR、開放閱讀框架 (ORF)、或 3' UTR 之部位互補。舉例而言，若該序列係與編碼 Serpina1 之 mRNA 的非中斷部位實質上互補，則多核苷酸係與 Serpina1 mRNA 之至少一部分互補。

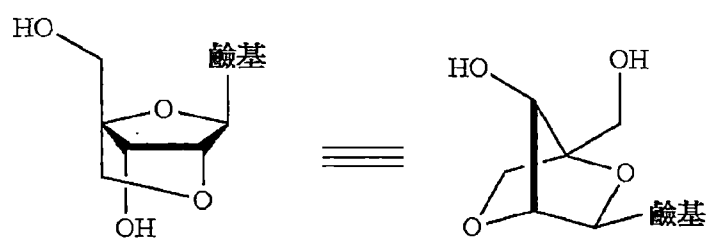
【0164】一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係與 Serpina1 靶標 RNA 如靶標 mRNA「足夠互補」，故該 dsRNA 劑由該靶標 mRNA 所編碼之蛋白質的產生而靜默。另一態樣中，本發明之 dsRNA 劑係與靶標 RNA 如該靶標 mRNA「精確互補」或「完全互補」，則該 dsRNA 雙鏈劑降溫黏合，以諸如在精確互補之區域內形成僅僅由 Watson-Crick 鹼基對作成之雜交物。「足夠互補」之靶標 RNA 可包括與靶標 RNA 精確互補之內部區域 (如，至少 10 個核苷酸)。此外，一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係特異性地區分單核苷酸差異。於此情形中，若在該單核苷酸差異區域 (如，該區域之 7 個核苷酸中) 發現精確互補，則該 dsRNA 劑僅媒介 RNAi。

【0165】術語「BNA」係指稱橋接核酸，且一般係指稱為約束性或難接近之 RNA。BNA 可含有具備「固定」之 C3' 環內糖皺折的 5 員、6 員、或甚至 7 員之橋接結構。該

橋典型係併入核糖之 2'位、4'位，以提供 2',4'-BNA 核苷酸(如，LNA、或 ENA)。BNA 核苷酸之實例係包括下述核苷酸：



【0166】 術語「LNA」係指稱鎖核酸，其一般係指稱為約束性或難接近之 RNA。LNA 係經修飾之 RNA 核苷酸。LNA 核苷酸之核糖部分係以將 2' 羥基連接至相同核糖之 4' 碳之外接橋(如，亞甲基橋或伸乙基橋)修飾。例如，該橋可將該核糖「鎖」為 3' 環內 North) 構象：



【0167】 術語「ENA」係指稱伸乙基橋接之核酸，且一般係指稱為約束性或難接近之 RNA。

【0168】 本文中，術語「抑制」係與「降低」、「靜默」、「下調」、「壓制」、及其他類似術語互換使用，且包括

任何水準之抑制。

【0169】 本文中，短語「抑制 Serpinal 之表現」係包括對任何 Serpinal 基因(如，小鼠 Serpinal 基因、大鼠 Serpinal 基因、猴 Serpinal 基因、或人 Serpinal 基因)以及 Serpinal 基因之變體(如，天然出現之變體)或突變體之表現的抑制。因此，Serpinal 基因可係野生型 Serpinal 基因、變體 Serpinal 基因、突變體 Serpinal 基因、或於遺傳學操作之細胞、細胞群組或有機體中之基因轉殖 Serpinal 基因。

【0170】 「抑制 Serpinal 基因之表現」係包括對 Serpinal 基因之任何水準的抑制，如，對 Serpinal 基因之表現的至少部分壓制，如至少約 5%、至少約 10%、至少約 15%、至少約 20%、至少約 25%、至少約 30%、至少約 35%、至少約 40%、至少約 45%、至少約 50%、至少約 55%、至少約 60%、至少約 65%、至少約 70%、至少約 75%、至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%、或至少約 99%之抑制。

【0171】 Serpinal 基因之表現可基於任何與 Serpinal 基因表現相關之變量如 Serpinal mRNA 水準、Serpinal 蛋白水準、或血清 AAT 水準予以評估。抑制可藉由此等變量之一者或多者的絕對值或相對值與對照水準相比之下降而評估。該對照水準可係該技藝中使用之任何類型之對照水準，如，投藥前基線水準、或自未處置或以對

照物(如，僅緩衝液之對照物或無活性劑之對照物)處置之類似個體、細胞或樣本測得之水準。

【0172】本文中，短語「細胞與雙股 RNAi 劑接觸」係包括，藉由任何可能之手段接觸細胞。細胞與雙股 RNAi 劑接觸係包括，細胞於體外與該 RNAi 劑接觸或細胞於體內與該 RNAi 劑接觸。該接觸可直接或間接完成。因此，舉例而言，可藉由個別施行該方法將該 RNAi 劑置於與該細胞物理接觸，或者，可經該 RNAi 劑置於將會容許或造成其後續與該細胞接觸之情況中。

【0173】舉例而言，於體外接觸細胞可藉由以該 RNAi 劑培育該細胞而進行。舉例而言，於體內接觸細胞可藉由下述而進行：將該 RNAi 劑注射入該細胞所處之組織內或鄰近該組織處，或藉由將該 RNAi 劑注射入另一區域、血流或皮下空間內，故該劑將隨後到達待接觸之細胞所處之組織。舉例而言，該 RNAi 劑可含有配位子及/或與配位子偶合，如 GalNAc3 配位子，該配位子係引導該 RNAi 劑至感興趣之位點如肝臟者。體外接觸方法與體內接觸方法之組合亦係可能者。對於本發明之方法，細胞亦可於體外與 RNAi 劑接觸，並隨後移植入個體體內。

【0174】本文中，「患者」或「個體」係意圖包括人類或非人之動物，較佳係哺乳動物，如猴。最佳地，該個體或患者係人。

【0175】本文中，「Serpinal 相關疾病」係意圖包括與 Serpinal 基因或蛋白相關之任何疾病、病變、或病症。

此疾病之肇因可係，舉例而言，Serpinal 蛋白之錯誤折疊、Serpinal 蛋白(如，錯誤折疊之 Serpinal 蛋白)之細胞內蓄積、Serpinal 蛋白之過量產生、Serpinal 基因變體、Serpinal 基因突變、Serpinal 蛋白之不正常裂解、Serpinal 與其他蛋白或其他內源性或外源性物質之間的不正常交互作用。Serpinal 相關疾病可係肝病及/或肺病。

【0176】 本文中，「肝病」係包括影響肝臟及/或其功能之疾病、病變、或病症。肝臟病變可係 Serpinal 蛋白於肝臟及/或肝細胞內蓄積之結果。肝臟病變之實例係包括源自病毒性感染、寄生蟲感染、遺傳預先傾向性、自體免疫疾病、曝露於輻射、曝露於肝毒性化合物、機械性損傷、多種環境性毒素、醇、乙醯胺酚、醇與乙醯胺酚之組合、吸入麻醉劑、菸酸、化學療法、抗生素、鎮痛藥、止吐藥及草藥補充品卡瓦胡椒(herbal supplement kava)、及其組合的結果。

【0177】 舉例而言，與 Serpinal 缺陷相關之肝臟病變可更常出現於具有某些等位基因(如，PIZ、PiM(Malton)、及/或 PIS 等位基因)之一種或多種複本的個體。不欲受縛於理論，據稱，與 α -1-抗胰蛋白酶肝病發展之較大風險相關的等位基因係編碼遭受錯誤折疊且不能適當地自肝細胞分泌之 Serpinal 型。對此等錯誤折疊之蛋白質的細胞性應答可包括未折疊蛋白應答(UPR)、內質網相關之降解(ERAD)、細胞凋亡、ER 過載應答、自體吞噬、線粒體應激及肝細胞功能改變。肝細胞之該等損傷可導致症狀，例

如但不限於，發炎、膽汁鬱積、肝纖維化、肝硬化、梗阻性黃疸之延長、胺基轉移酶之增加、門靜脈高壓及/或肝細胞癌。不欲受縛於理論，此疾病之高度可變之臨床進程係表現出變更或「二次發作(second hits)」，此係有助於發展出症狀或嚴重性加重。

【0178】 舉例而言，攜帶 PIZ 等位基因之個體可能對丙型肝炎感染或酗酒更敏感，且於曝露於此等因子時更有可能發展出肝臟病變。攜帶 PIZ 等位基因之另外之囊性纖維化(CF)個體係處於發展出具有門靜脈高壓之嚴重肝病的較大風險。Serpina1 之缺陷亦可造成或有助於早發性肺氣腫、壞死性脂層炎、支氣管擴張、及/或延長之新生兒黃疸的發展。當他們具有被 α -1-抗胰蛋白酶缺陷影響之家族成員時，一些具有 α -1-抗胰蛋白酶缺陷或處於具有該缺陷之風險的患者係藉由篩選而得以鑒別。

【0179】 例示性肝臟病變係包括，但不限於，肝炎、慢性肝病、肝硬化、肝纖維化、肝細胞癌、肝壞死、脂肪肝、膽汁鬱積及/或減少、及/或肝細胞功能喪失。

【0180】 「肝硬化」係與慢性肝受損相關之病理學狀態，其係包括廣泛性纖維化及肝臟中之再生性結節。

【0181】 「纖維化」係肝臟中纖維母細胞之增殖及疤痕組織之形成。

【0182】 短語「肝功能」係指稱藉由肝臟實施之眾多生理學功能之一者或多者。此等功能係包括，但不限於，調節血糖濃度、內分泌調節、酶系統、代謝物之互變(如，

酮體、固醇類、及類固醇與胺基酸)；製造血蛋白，如纖維蛋白原、血清白蛋白、及膽鹼酯酶；紅血球生成功能；解毒作用；膽汁形成；及維生素儲存。若干用來檢查肝功能之測試係該技藝中習知者，包括，舉例而言，量測丙胺酸胺基轉移酶(ALT)、鹼性磷酸酶、膽紅素、凝血素、及白蛋白。

【0183】本文中，「治療有效量」係意圖包括，當將 RNAi 劑投藥至患者用於處置 Serpinal 相關疾病時，該劑之足以對該疾病進行有效處置的量(如，藉由衰減、緩解或維持現存疾病或疾病之一種或多種症狀)。該「治療有效量」可依據該 RNAi 劑、該劑如何投藥、疾病及其嚴重性、及待處置之患者之病史、年齡、體重、家族病史、基因組成、藉由 Serpinal 表現媒介之病理學進程之階段、先前或聯合處置之類型(若存在)、以及其他個體特徵而改變。

【0184】本文中，「預防有效量」係意圖包括，當將 RNAi 劑投藥至尚未經歷 Serpinal 相關疾病或顯現該疾病症狀但易罹患該疾病之患者而用於處置 Serpinal 相關疾病時，該 RNAi 劑之足以預防或緩解該疾病或該疾病之一種或多種症狀的量。緩解該疾病係包括減慢該疾病之進程或降低後來發展之疾病的嚴重。該「預防有效量」可依據該 RNAi 劑、該劑如何投藥、疾病風險之程度、及處置之患者之病史、年齡、體重、家族病史、基因組成、先前或聯合處置之類型(若存在)、以及待其他個體特徵而改變。

【0185】「治療有效量」或「預防有效量」亦包括

RNAi 劑之量，該量係以適用於任何處置之合理之效益/風險比而產生一些所欲之局部或全身性效果。於本發明之方法中採用的 RNAi 劑可以足夠之量投藥，以產生使用於此類處置之合理之效益/風險比。

【0186】 本文中，術語「樣本」係包括自個體分離之相似流體、細胞或組織之集合，以及個體體內存在之流體、細胞或組織。生物學流體之實例係包括血液、血清及漿膜液、血漿、尿液、淋巴、腦脊髓液、眼液、唾液等。組織樣本可包括來自組織、器官或指定區域之樣本。舉例而言，樣本可係源自特定之器官、器官之部分、或彼等器官內之流體或細胞。於某些態樣中，樣本可係源自肝臟(如，全肝或肝臟之某些節段或肝臟中某些類型之細胞，如，肝細胞)。於較佳之態樣中，「源自個體之樣本」係指稱自該個體抽取之血液或血漿。於進一步之態樣中，「源自個體之樣本」係指稱源自該個體之肝臟組織(或其亞組分)。

【0187】

II. 本發明之 iRNA

本文中揭示者係改善之雙股 RNAi 劑，其係抑制 *Serpinal* 基因於細胞中之表現，該細胞係例如個體如哺乳動物如具有 *Serpinal* 相關疾病如肝病如慢性肝病、肝炎、肝硬化、肝纖維化、及/或肝細胞癌之人類體內的細胞。

【0188】 據此，本發明係提供具有能於體內抑制靶標基因(亦即，*Serpinal* 基因)之表現之化學修飾的雙股 RNAi 劑。於本發明之某些方面，本發明之 iRNA 的核苷酸

實質上全部經修飾。於本發明之其他態樣中，本發明之 iRNA 的核苷酸全部係經修飾。本發明之其「核苷酸實質上全部經修飾」的 iRNA 係經大量但非完全修飾，且可包括不超過 5、4、3、2、或 1 個未修飾之核苷酸。

【0189】 該 RNAi 劑係包含正義股與反義股。該 RNAi 劑之各股之長度可係 12 至 30 個核苷酸之範圍。舉例而言，各股可界於長度為 14 至 30 個核苷酸之間、長度為 17 至 30 個核苷酸、長度為 19 至 30 個核苷酸、長度為 25 至 30 個核苷酸、長度為 27 至 30 個核苷酸、長度為 17 至 23 個核苷酸、長度為 17 至 21 個核苷酸、長度為 17 至 19 個核苷酸、長度為 19 至 25 個核苷酸、長度為 19 至 23 個核苷酸、長度為 19 至 21 個核苷酸、長度為 21 至 25 個核苷酸、或長度為 21 至 23 個核苷酸。

【0190】 該正義股與反義股典型係形成雙鏈雙股 RNA (「dsRNA」)，本文中亦指稱為「RNAi 劑」。RNAi 劑之雙鏈區域的長度可係 12 至 30 核苷酸對。舉例而言，該雙鏈區域之長度可係 14 至 30 核苷酸對、17 至 30 核苷酸對、27 至 30 核苷酸對、17 至 23 核苷酸對、17 至 21 核苷酸對、17 至 19 核苷酸對、19 至 25 核苷酸對、19 至 23 核苷酸對、19 至 21 核苷酸對、21 至 25 核苷酸對、或 21 至 23 個核苷酸。於另一實例中，該雙鏈區域之長度係選自 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、及 27 個核苷酸。

【0191】 於一態樣中，該 RNAi 劑可於一股或兩股之

3'端、5'端或兩端含有一個或多個突出區域及/或封端基團。該突出可係 1 至 6 個核苷酸之長度，例如，2 至 6 個核苷酸之長度、1 至 5 個核苷酸之長度、2 至 5 個核苷酸之長度、1 至 4 個核苷酸之長度、2 至 4 個核苷酸之長度、1 至 3 個核苷酸之長度、2 至 3 個核苷酸之長度、或 1 至 2 個核苷酸之長度。該突出可係一股長於另一股之結果，或係相同長度之兩股交錯排列之結果。該突出可與該靶標 mRNA 形成誤配，或其可與待作為靶標之基因序列互補，或可係另一序列。該第一股及第二股亦可經連接，例如，藉由額外之鹼基形成髮夾圈，或藉由另一非鹼基鏈結基而連接。

【0192】 於一態樣中，該 RNAi 劑之突出區域內之核苷酸可各自獨立為經修飾或未經修飾之核苷酸，包括但不限於，經 2'-糖修飾，如，2-F、2'-O-甲基、胸苷(T)、2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷(Teo)、2'-O-甲氧基乙基腺苷(Aeo)、2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷(m5Ceo)、及其任意組合。舉例而言，TT 可係用於任一股之任一端之突出序列。該突出可與靶標 mRNA 形成誤配，或其可與待作為靶標之序列互補，或可係另一序列。

【0193】 位於該 RNAi 劑之正義股、反義股、或兩股之 5'-或 3'-突出可經磷酸化。一些態樣中，該突出區域係含有在其之間具有硫代磷酸酯的兩個核苷酸，其中，該兩個核苷酸可係相同或相異。於一態樣中，該突出係存在於該正義股、反義股、或兩股之 3'端。於一態樣中，這一 3'-

突出係存在於反義股中。於一態樣中，這一 3'-突出係存在於正義股中。

【0194】 該 RNAi 劑可僅含有單個突出，其可強化該 RNAi 之干擾活性，而不影響其整體安定性。舉例而言，該單股之突出係定位於該正義股之 3' 末端或者該反義股之 3' 末端。該 RNAi 亦可具有定位於該反義股之 5' 端(或正義股之 3' 端)的鈍端，反之亦然。通常，該 RNAi 之反義股係具有位於 3' 端之核苷酸突出，而 5' 端係鈍端。不欲受縛於理論，位於該反義股 5' 端與位於該反義股 3' 端之突出的不對稱的鈍端係更易於將該導引股輸入 RISC 製程中。

【0195】 本發明提出之任意核酸可藉由該技藝中習知之方法合成及/或修飾，該方法係諸如於《核酸化學實驗室指南》(Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA)中揭示者，該文獻係藉由引用而併入本文。修飾係包括，舉例而言，端修飾，如 5' 端修飾(磷酸化、接合、反向鏈結)或 3' 端修飾(接合、DNA 核苷酸、反向鏈結等)；鹼基修飾，如替換為安定化鹼基、去安定化鹼基、或與對方之擴展庫進行鹼基配對之鹼基，鹼基之移除(無鹼基核苷酸)、或接合之鹼基；糖修飾(如，位於 2'-位或 4'-位)或糖之替換；及/或骨幹修飾，包括磷酸二酯類鏈結之修飾或替換。可用於本文中揭示之態樣之 iRNA 化合物的具體實例係包括，但不限於，含有經修飾之骨幹或不含有天然核苷間鏈結的 RNA。具有經修飾之骨幹的 RNA 包括，

尤其是彼等於骨幹中不具有磷原子者。對於本說明書之目的，且如該技藝中有時所參照者，於其核苷間骨幹中不具有磷原子之經修飾的 RNA 亦可視為寡核苷酸。一些態樣中，經修飾之 iRNA 將於其核苷間骨幹中具有磷原子。

【0196】 其內部不包括磷原子之經修飾的 RNA 骨幹係具有下述骨幹：其係藉由短鏈烷基或環烷基之核苷間鏈結、混合之雜原子與烷基或環烷基之核苷間鏈結、或一種或多種短鏈雜原子或雜環之核苷間鏈結所形成。此等係包括彼等具有下列者：N-嗎啉基鏈結(部分地自核苷之糖部分形成)；矽氧烷骨幹；硫醚、亞砷、及砷骨幹；甲醯基及硫代甲醯基骨幹；亞甲基甲醯基及硫代甲醯基骨幹；含有伸烷基之骨幹；胺基磺酸酯骨幹；亞甲基亞胺基及亞甲基胍基骨幹；磺酸酯及磺醯胺骨幹；醯胺骨幹；以及其他具有混合之 N、O、S 及 CH₂ 組分元件之骨幹。

【0197】 教示上述寡核苷酸之製備的代表性美國專利係包括，但不限於，第 5,034,506 號、第 5,166,315 號、第 5,185,444 號、第 5,214,134 號、第 5,216,141 號、第 5,235,033 號、第 5,64,562 號、第 5,264,564 號、第 5,405,938 號、第 5,434,257 號、第 5,466,677 號、第 5,470,967 號、第 5,489,677 號、第 5,541,307 號、第 5,561,225 號、第 5,596,086 號、第 5,602,240 號、第 5,608,046 號、第 5,610,289 號、第 5,618,704 號、第 5,623,070 號、第 5,663,312 號、第 5,633,360 號、第 5,677,437 號、及第 5,677,439 號美國專利，此等專利之整體內容係藉由引用而併入本文。

【0198】 於其他態樣中，適宜之 RNA 模擬物係預期用於 iRNA 中，其中該核苷酸單元之糖及核苷間鏈結亦即骨幹兩者係替換為新穎之基團。該等鹼基單元係被保持，用於與適宜之核酸靶標化合物雜交。業經顯示為具有優異之雜交特性之一此類寡聚化合物——RNA 模擬物，係指稱為肽核酸(PNA)。於 PNA 化合物中，RNA 之糖骨幹係替換為含有醯胺之骨幹特別是胺基乙基甘胺酸骨幹。該等核酸鹼基係得以保留，且係直接或間接鍵結至該骨幹之醯胺部分的氮雜氮原子。教示 PNA 化合物之製備的代表性美國專利係包，但不限於，第 5,539,082 號、第 5,714,331 號、及第 5,719,262 號美國專利，該等專利之整體內容係藉由引用而併入本文。適用於本發明之 iRNA 中的其他 PNA 化合物係揭示於，舉例而言，Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500 中。

【0199】 本發明提出之一些態樣係包括具有硫代磷酸酯骨幹之 RNA 及具有雜原子骨幹之寡核苷，且尤其係上文參考之第 5,489,677 號美國專利的 $--CH_2--NH--CH_2-$ 、 $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [作為亞甲基(甲基亞胺基)或 MMI 骨幹而為人所知]、 $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$ 、 $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2-$ 及 $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ [其中，原生磷酸二酯骨幹係表示為 $--O--P--O--CH_2--$]，以及上文參考之第 5,602,240 號美國專利的醯胺骨幹。一些態樣中，本文提出的 RNA 係具有上文參考之第 5,034,506 號美國專利的嗎啉骨幹結構。

【0200】 經修飾之 RNA 亦可含有一個或多個經取代之糖部分。本文中提出之 iRNA 如 dsRNA 可包括位於 2' 位置之下述一者：OH；F；O-烷基、S-烷基、N-烷基；O-烯基、S-烯基、N-烯基；O-炔基、S-炔基、N-炔基；或 O-烷基-O-烷基，其中，該烷基、烯基及炔基可係經取代或未經取代之 C₁ 至 C₁₀ 烷基或 C₂ 至 C₁₀ 烯基及炔基。例示性適宜之修飾係包括 O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、及 O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂，其中，n 與 m 係自 1 至約 10。於其他態樣中，dsRNA 係包括位於 2' 位置之下述一者：C₁ 至 C₁₀ 低級烷基、經取代之低級烷基、烷基芳基、芳基烷基、O-烷基芳基或 O-芳基烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、雜環烷基、雜環烷基芳基、胺基烷基胺基、多烷基胺基、經取代之矽基、RNA 裂解基團、報告基團、嵌入基團、用於改善 iRNA 之藥物代謝動力學的基團、或用於改善 iRNA 之藥效動力學特性的基團，以及其他具有相似特性的取代基。一些態樣中，該修飾係包括 2'-甲氧基乙氧基 (2'-O--CH₂CH₂OCH₃，亦稱為 2'-O-(2-甲氧基乙基) 或 2'-MOE)(Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504)，亦即，烷氧基-烷氧基。另一例示性修飾係 2'-二甲胺基氧乙氧基，亦即，O(CH₂)₂ON(CH₃)₂ 基團，亦稱為 2'-DMAOE，如下文之實施例中揭示者；以及 2'-二甲胺基乙氧基乙氧基 (該技藝中亦稱為 2'-O-二甲胺基乙氧基乙基或

2'-DMAEOE), 亦即, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂。再者, 例示性修飾係包括: 5'-Me-2'-F 核苷酸、5'-Me-2'-OMe 核苷酸、5'-Me-2'-去氧核苷酸(於此等三個家族中, R 異構物及 S 異構物兩者); 2'-烷氧基烷基; 以及 2'-NMA (N-甲基乙醯胺)。

【0201】 其他修飾係包括 2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-胺基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)及 2'-氟(2'-F)。類似之修飾亦可於 iRNA 之 RNA 的其他位置處作成, 特別是在 3' 末端核苷酸或 2'-5' 鏈結 dsRNA 中之糖之 3' 位、以及 5' 末端核苷酸之 5' 位。iRNA 亦可具有替代呋喃戊糖基形式之糖的糖模擬物, 如環丁基部分。教示此等經修飾之糖結構之製備的代表性美國專利係包括, 但不限於, 第 4,981,957 號、第 5,118,800 號、第 5,319,080 號、第 5,359,044 號、第 5,393,878 號、第 5,446,137 號、第 5,466,786 號、第 5,514,785 號、第 5,519,134 號、第 5,567,811 號、第 5,576,427 號、第 5,591,722 號、第 5,597,909 號、第 5,610,300 號、第 5,627,053 號、第 5,639,873 號、第 5,646,265 號、第 5,658,873 號、第 5,670,633 號、及第 5,700,920 號美國專利, 某些此等專利一般係由本申請案所擁有。前述各專利之整體內容係藉由引用而併入本文。

【0202】 本發明之 iRNA 亦可包括核酸鹼基(該技藝中通常簡稱為「鹼基」)修飾或替代。本文中, 「未修飾」或「天然」之核酸鹼基係包括嘌呤鹼基腺嘌呤(A)及鳥嘌呤(G), 以及嘧啶鹼基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。

經修飾之核酸鹼基係包括其他合成及天然之核酸鹼基，如 5-甲基胞嘧啶 (5-me-C)；5-羥甲基胞嘧啶；黃嘌呤；次黃嘌呤；2-胺基腺嘌呤；腺嘌呤及鳥嘌呤之 6-甲基及其他烷基衍生物；腺嘌呤及鳥嘌呤之 2-丙基及其他烷基衍生物；2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶、2-硫胞嘧啶；5-鹵尿嘧啶及 5-鹵胞嘧啶；5-丙炔基尿嘧啶及 5-丙炔基胞嘧啶；6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶及 6-偶氮胸腺嘧啶；5-尿嘧啶(假尿嘧啶)；4-硫尿嘧啶；8-鹵、8-胺基、8-巰基、8-硫烷基、8-羥基及其他 8-取代之腺嘌呤及鳥嘌呤；5-鹵，特別是 5-溴、5-三氟甲基及其他 5-取代之尿嘧啶及胞嘧啶；7-甲基鳥嘌呤及 7-甲基腺嘌呤；8-氮雜鳥嘌呤及 8-氮雜腺嘌呤；7-去氮鳥嘌呤及 7-去氮腺嘌呤；以及，3-去氮鳥嘌呤及 3-去氮腺嘌呤。其他核酸鹼基包括彼等於第 3,687,808 號美國專利中揭示者、彼等於《生物化學、生物技術及醫藥中之修飾核苷酸》(Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008)中揭示者、彼等於《聚合物科學與工程簡明百科全書》第 858 至 859 頁(The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990)中揭示者、彼等由 Englisch et al., (1991) *Angewandte Chemie, International Edition*, 30:613 揭示者、以及彼等由 Sanghvi, Y S.在《dsRNA 研究與應用》第 15 章第 289 至 302 頁(Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T.

and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993)中揭示者。此等核酸鹼基中之某些係尤其有用於增加本發明中提出之寡聚化合物的結合親和性。此等係包括 5-取代之嘧啶、6-氮雜嘧啶及 N-2、N-6 及 O-6 取代之嘌呤，包括 2-胺基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶及 5-丙炔基胞嘧啶。業經顯示，5-甲基胞嘧啶替代係將核酸雙鏈安定性增加 0.6 至 1.2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)，且係例示性之鹼基替代，當與 2'-O-甲氧基乙基糖修飾組合時，該替代之效果尤其明顯。

【0203】 教示上文引述之經修飾之核酸鹼基以及其他經修飾之核酸鹼基之製備的代表性美國專利係包括，但不限於，上文引述之第 3,687,808 號、4,845,205 號、第 5,130,30 號、第 5,134,066 號、第 5,175,273 號、第 5,367,066 號、第 5,432,272 號、第 5,457,187 號、第 5,459,255 號、第 5,484,908 號、第 5,502,177 號、第 5,525,711 號、第 5,552,540 號、第 5,587,469 號、第 5,594,121、第 5,596,091 號、第 5,614,617 號、第 5,681,941 號、第 5,750,692 號、第 6,015,886 號、第 6,147,200 號、第 6,166,197 號、第 6,222,025 號、第 6,235,887 號、第 6,380,368 號、第 6,528,640 號、第 6,639,062 號、第 6,617,438 號、第 7,045,610 號、第 7,427,672 號、及第 7,495,088 號美國專利，其各自之整體內容係藉由引用而併入本文。

【0204】 本發明之 iRNA 亦可經修飾，以包括一種或

多種鎖核酸(LNA)。鎖核酸係具有經修飾之核糖部分的核苷酸，其中，該核糖部分係包含連結 2' 碳與 4' 碳之外橋。這一結構有效地將該核糖「鎖定」為 3' 內結構構象。業經顯示，將鎖核酸加至 siRNA 係增加血清中 siRNA 之安定性，並降低脫靶效應(Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193)。

【0205】 本發明之 iRNA 亦可經修飾，以包括一種或多種雙環之糖部分。「雙環之糖」係藉由兩個原子之橋接而修飾之呋喃糖基環。「雙環之核苷」(「BNA」)係具有糖部分之核苷，該糖部分係包含連結該糖環之兩個原子的橋，從而形成雙環狀環系統。於某些態樣中，該橋係連結該糖環之 4' 碳與 2' 碳。因此，於一些態樣中，本發明之劑可包括一種或多種鎖核酸(LNA)。鎖核酸係具有經修飾之核糖部分的核苷酸，其中，該核糖部分係包含連結 2' 碳與 4' 碳之外橋。換言之，LNA 係包含雙環狀糖部分之核苷酸，其中，該糖部分係包含 4'-CH₂-O-2' 橋。這一結構有效地將該核糖「鎖」為 3' 內結構構象。業經顯示，將鎖核酸加至 siRNA 係增加血清中 siRNA 之安定性，並降低脫靶效應(Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193)。用於本發明之多核苷酸中之雙環核苷的實例

係包括，而不限於，包含界於 4'核糖基環原子與 2'核糖基環原子間之橋的核苷。於某些態樣中，本發明之反義多核苷酸劑係包括一種或多種包含 4'至 2'橋之雙環狀核苷。此 4'至 2'橋接之雙環狀核苷的實例係包括，但不限於，4'-(CH₂)-O-2' (LNA)；4'-(CH₂)-S-2'；4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA)；4'-CH(CH₃)-O-2' (亦指稱為「約束之乙基」或「cEt」) 及 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (及其類似物；參見，如，第 7,399,845 號美國專利)；4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (及其類似物；參見，如，第 8,278,283 號美國專利)；4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (及其類似物；參見，如，第 8,278,425 號美國專利)；4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (參見，如，第 2004/0171570 號美國專利公開案)；4'-CH₂-N(R)-O-2'，其中，R 係 H、C1-C12 烷基、或保護基團(參見，如，第 7,427,672 號美國專利)；4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (參見，如，Chattopadhyaya et al., *J. Org. Chem.*, 2009; 74, 118-134)；以及，4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (及其類似物；參見，如，第 8,278,426 號美國專利)。前述者各自之整體內容係藉由引用而併入本文。

【0206】 教示鎖核酸核苷酸之製備的其他代表性美國專利及美國專利公開案係包括，但不限於，下列：第 6,268,490 號、第 6,525,191 號、第 6,670,461 號、第 6,770,748 號、第 6,794,499 號、第 6,998,484 號、第 7,053,207 號、第 7,034,133 號；第 7,084,125 號、第 7,399,845 號、第 7,427,672 號、第 7,569,686 號、第 7,741,457 號、第 8,022,193 號、第 8,030,467 號、第 8,278,425 號、第 8,278,426 號、

第 8,278,283 號美國專利，以及第 2008/0039618 號及第 2009/0012281 號美國專利公開案，其各自之整體內容係藉由引用而併入本文。前述雙環狀核苷之任意者可製備為具有一種或多種立體化學糖構型，包括，舉例而言， α -L-呋喃核糖及 β -D-呋喃核糖(參見，WO 99/14226)。

【0207】 本發明之 iRNA 亦可經修飾，以包括一種或多種約束之乙基核苷酸。本文中，「約束之乙基核苷酸」或「cEt」係包含雙環狀糖部分之鎖定之核酸，其中，該糖部分係包含 4'-CH(CH₃)-O-2' 橋。於一態樣中，約束之乙基核苷酸係 S 構型，本文中指稱為「S-cEt」。

【0208】 本發明之 iRNA 亦可包括一種或多種「構型限定之核苷酸」(「CRN」)。CRN 係具有連結核糖之 C2' 碳與 C4' 碳或 C3 碳與 C5' 碳之鏈結基的核苷酸類似物。CRN 係將該核糖環鎖為安定之構型，且增加與 mRNA 之雜交親和性。該鏈結基係足夠長，以將氧置於對於安定性及親和性為最優之位置，獲得更少之核糖環褶皺。

【0209】 教示某些上文引述者之製備的代表性出版物係包括，但不限於，第 2013/0190383 號美國專利公開案及第 WO 2013/036868 號 PCT 公開案，其各自之整體內容係藉由引用而併入本文。

【0210】 一些態樣中，本發明之 iRNA 係包含一種或多種作為 UNA (未鎖核酸)核苷酸之單體。UNA 係未鎖非環狀核酸，其中，該糖之任一鍵係業經移除，形成未鎖之「糖」殘基。一個實例中，UNA 亦包含 C1'-C4' 間之鍵(亦

即，C1'碳與 C4'碳之間的碳-氧-碳共價鍵)業經移除的單體。另一實例中，該糖之 C2'-C3'鍵(亦即，C2'碳與 C3'碳之間的碳-氧-碳共價鍵)業經移除(參見，*Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008)亦即 Fluiter et al., *Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039，藉由引用而併入本文)。

【0211】 教示 UNA 之製備的代表性美國出版物係包括，但不限於，第 8,314,227 號美國專利，以及第 2013/0096289 號、第 2013/0011922 號、及第 2011/0313020 號美國專利公開案，其各自之整體內容係藉由引用而併入本文。

【0212】 對 RNA 分子端之潛在安定化修飾係包括 N-(乙醯基胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-NHAc)、N-己醯基-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6)、N-乙醯基-4-羥基脯胺醇(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-去氧胸苷(醚)、N-(胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-amino)、2-十二碳醯基-尿苷-3''-磷酸酯、反轉鹼基 dT(idT)等。這一修飾之揭露可於第 WO 2011/005861 號 PCT 公開案中發現。

【0213】 對本發明之 iRNA 的其他修飾係包括 5'-磷酸酯或 5'-磷酸酯模擬物，如，RNAi 劑之反義股的 5'末端磷酸酯或磷酸酯模擬物。適當之磷酸酯模擬物係揭露於，舉例而言，第 2012/0157511 號美國專利公開案中，其整體內容係藉由引用而併入本文。

【0214】

A. 包含熱滅穩修飾之 iRNA

如本文中揭示，尤其業經發現，以 *Serpina1* 為靶向之

dsRNA 劑的脫靶效應可藉由將熱減穩核苷酸合併於該 dsRNA 之反義股中的某些位置處而得以降低或抑制。透過處於反義股某些位置之此等熱減穩修飾，該 dsRNA 劑能保持與親代 dsRNA 相似之基因靜默活性，同時具有降低之脫靶基因靜默。再者，與親代 dsRNA 相比，藉由包含此等熱減穩修飾之 dsRNA 劑，亦降低經下調或上調之脫靶基因的數目。

【0215】 如是，一方面，本發明係提供能抑制 *Serpina1* 靶標基因之表現的雙股 RNAi (dsRNA)劑。通常，本發明之 dsRNA 劑係顯示高的上靶基因靜默，同時降低或最小化脫靶基因靜默及/或毒性。無限制，本發明之 dsRNA 劑可替代該 dsRNA 劑，且可用於基於基因靜默技術之 RNA 干擾，包括但不限於，體外或體內之應用。

【0216】 通常，該 dsRNA 劑係包含正義股(亦指稱為過客股)及反義股(亦指稱為引導股)。該 dsRNA 劑之各股的長度可係自 12 至 40 個核苷酸之範圍。舉例而言，各股可係界於 14 至 40 個核苷酸之長度、17 至 37 個核苷酸之長度、25 至 37 個核苷酸之長度、27 至 30 個核苷酸之長度、17 至 23 個核苷酸之長度、17 至 21 個核苷酸之長度、17 至 19 個核苷酸之長度、19 至 25 個核苷酸之長度、19 至 23 個核苷酸之長度、19 至 21 個核苷酸之長度、21 至 25 個核苷酸之長度、或 21 至 23 個核苷酸之長度。無限制，該正義股與反義股可係相等之長度或不等之長度。

【0217】 一些態樣中，該反義股之長度係 18 至 35

個核苷酸。於一些態樣中，該反義股之長度係 21 至 25、19 至 25、19 至 21 或 21 至 23 個核苷酸。於一些特定之態樣中，該反義股之長度係 23 個核苷酸。與該反義股類似，一些態樣中，該正義股之長度係 18 至 35 個核苷酸。於一些態樣中，該正義股之長度係 21 至 25、19 至 25、19 至 21 或 21 至 23 個核苷酸。於一些特定之態樣中，該反義股之長度係 21 個核苷酸。

【0218】 一些態樣中，該正義股與該反義股之長度係獨立為 19、20、21、22、23、24 或 25 個核苷酸，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者或全部八者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vii) 該 dsRNA 係包含一長度為 18、19、21、22、23、24 或 24 核苷酸對之雙鏈區域；以及(viii) 該 dsRNA 係包含位於該正義股之 5'端的鈍端。於一些特定之態樣中，正義股之長度係 19、20、21 或 22 個核苷酸，且該反義股之長度係 20、21 或 22 個核苷酸。

【0219】 該正義股與反義股典型係形成雙鏈 dsRNA。dsRNA 劑之雙鏈區域可係 12 至 40 核苷酸對之長度。舉例而言，該雙鏈區域可係界於 14 至 40 核苷酸對之長度、17 至 30 核苷酸對之長度、25 至 35 核苷酸對之長度、27 至 35 核苷酸對之長度、17 至 23 核苷酸對之長度、17 至 21 核苷酸對之長度、17 至 19 核苷酸對之長度、19 至 25 核苷酸對之長度、19 至 23 核苷酸對之長度、19 至 21 核苷酸對之長度、21 至 25 核苷酸對之長度、或 21 至 23 核苷酸對之長度。於另一實例中，該雙鏈區域係選自 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、及 27 核苷酸對之長度。

【0220】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係具有長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5' 端之位置 2 至 9)內，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；以及(vii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5' 端的鈍端。於一些特定之

態樣中，該雙鏈區域之長度係 18、19、20、21、22 或 23 核苷酸對。於特定之態樣中，該雙鏈區域之長度係 21 核苷酸對。

【0221】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含位於一股之 3'端、或 5'端或兩端的一個或多個突出區域及/或 dsRNA 劑之封端基團。該突出可係 1 至 10 個核苷酸之長度、1 至 6 個核苷酸之長度，例如，2 至 6 個核苷酸之長度、1 至 5 個核苷酸之長度、2 至 5 個核苷酸之長度、1 至 4 個核苷酸之長度、2 至 4 個核苷酸之長度、1 至 3 個核苷酸之長度、2 至 3 個核苷酸之長度、或 1 至 2 個核苷酸之長度。該突出可係一股長於另一股之結果，或係相同長度之兩股交錯排列之結果。該突出可與靶標 mRNA 形成誤配，或其可與待作為靶標之基因序列互補或可係另一序列。該第一股與第二股亦可鏈接，如，藉由額外之鹼基連接以形成髮夾圈，或藉由其他非鹼基鏈結基連接。

【0222】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑之突出區域中的核苷酸可各自獨立為經修飾或未修飾之核苷酸，包括但不限於，2'-糖修飾，如，2-F、2'-O-甲基胸苷(T)；2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷(Teo)；2'-O-甲氧基乙基腺苷(Aeo)；2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷(m5Ceo)；及其任意組合。舉例而言，TT 可係用於任一股之任一端之突出序列。該突出可與靶標 mRNA 形成誤配，或其可與待作為靶標之基因序列互補或可係另一序列。

【0223】 位於本發明之 dsRNA 劑之正義股、反義股

或兩股之 5'-或 3'-突出可經磷酸化。一些態樣中，該突出區域係含有兩個核苷酸，且於該兩個核苷酸之間具有硫代磷酸酯，其中，該兩個核苷酸可係相同或相異。一些態樣中，該突出係存在於正義股、反義股或兩股之 3'端。一些態樣中，這一 3'-突出係存在於反義股中。一些態樣中，這一 3'-突出係存在於正義股中。

【0224】 本發明之 dsRNA 劑可僅包含一個突出，其可強化該 dsRNA 之干擾活性，而不影響其整體安定性。舉例而言，該單股之突出係定位於該正義股之 3'末端，或者，定位於該反義股之 3'末端。該 dsRNA 亦可具有定位於該反義股之 5'端(或該正義股之 3'端)，反之亦然。通常，該 dsRNA 之反義股係具有位於 3'端之核苷酸，而 5'端係鈍端。儘管未受縛於理論，位於反義股之 5'端的與該反義股之 3'端突出不對稱的鈍端係易於將該引導股進行 RISC 製程。舉例而言，該單個突出之長度係包含至少 2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個核苷酸。一些態樣中，該 dsRNA 係具有位於反義股之 3'端的 2 個核苷酸，以及位於反義股 5'端的鈍端。

【0225】 一些態樣中，該 dsRNA 之一端係鈍端而另一端係具有突出，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內，其中，該 dsRNA 係視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：

(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vii) 以及，該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域。一些態樣中，該突出係位於反義股之 3'端，而該鈍端係位於反義股之 5'端。於一些特定之態樣中，該突出之長度係 2、3 或 4 個核苷酸。

【0226】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係具有長度為 19、21、22 或 23 核苷酸鹼基對之雙鏈區域，其中，該 dsRNA 之一端係鈍端而另一端係具有突出，其中，該反義股係含有位於該反義股之種子區域內(亦即，位於該反義股之 5'端的位置 2 至 9)的該雙鏈之至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者或全部六者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾，且視需要，該 2 個核苷酸之突出係位於該反義股之 3'端，且該鈍端係該反義股之 5'端。一些態樣中，該突出係位於反義股之 3'端，且該鈍端係位於反義股之 5'端。

【0227】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑亦可具有位於該 dsRNA 雙鏈兩端之兩個鈍端。

【0228】 一些態樣中，該 dsRNA 係具有位於該雙鏈之兩端的鈍端，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端之位置 2 至 9)內，其中，該 dsRNA 係視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；以及(vii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域。

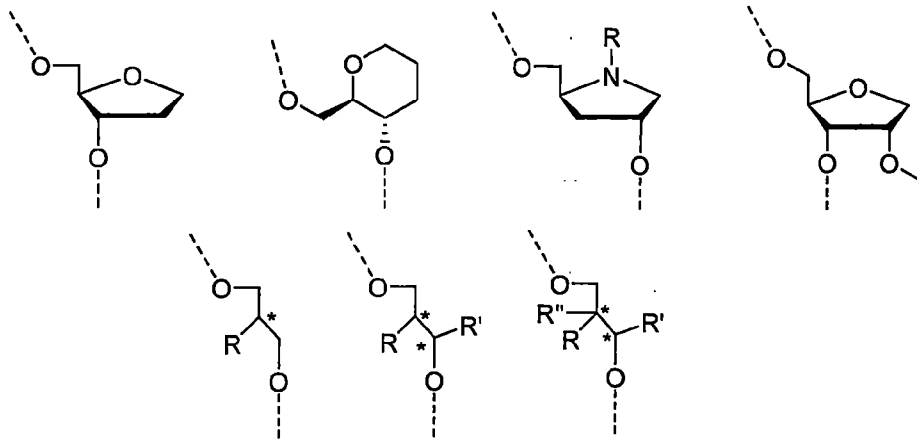
【0229】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係具有長度為 19、21、22 或 23 核苷酸鹼基對之雙鏈區域且於該雙鏈之兩端均具有鈍端，其中，該 dsRNA 之一端係鈍端而另一端係具有突出，其中，該反義股係含有位於該反義股之種子區域內(亦即，位於該反義股之 5'端的位置 2 至 9)的該雙鏈之至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者或全部六者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷

酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾。

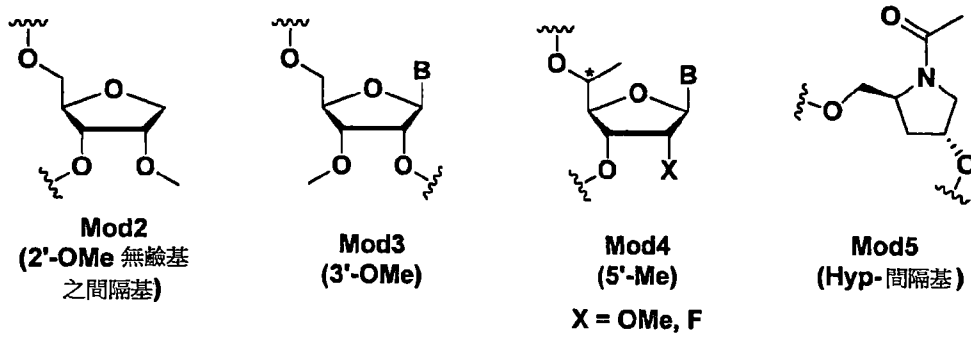
【0230】 一些態樣中，該反義股係包含位於該反義股 5'區域最先 9 個核苷酸位置內之該雙鏈的至少一個(如，一個、兩個、三個、四個、五個或更多個)熱減穩修飾。一些態樣中，該雙鏈之熱減穩修飾係定位於該反義股之自 5'端計數的位置 2 至 9，或較佳係位於位置 4 至 8。於一些進一步之態樣中，該雙鏈之熱減穩修飾係定位於該反義股之自 5'端計數的位置 6、7 或 8。於再一些進一步之態樣中，該雙鏈之熱減穩修飾係定位於該反義股之自 5'端計數的位置 7。術語「熱減穩修飾」係包括將會導致具有較低之整體解鏈溫度(T_m)(較佳係比不具有此修飾之 dsRNA 之 T_m 低 1、2、3 或 4 度的 T_m)的修飾。

【0231】 該熱減穩修飾可包括，但不限於，無鹼基之修飾；與相對股中之相核苷酸對的誤配；以及糖修飾，如 2'-去氧修飾或非環狀核苷酸，如，未鎖核酸(UNA)或二醇核酸(GNA)。

【0232】 例示性無鹼基之修飾係包括，但不限於下列：

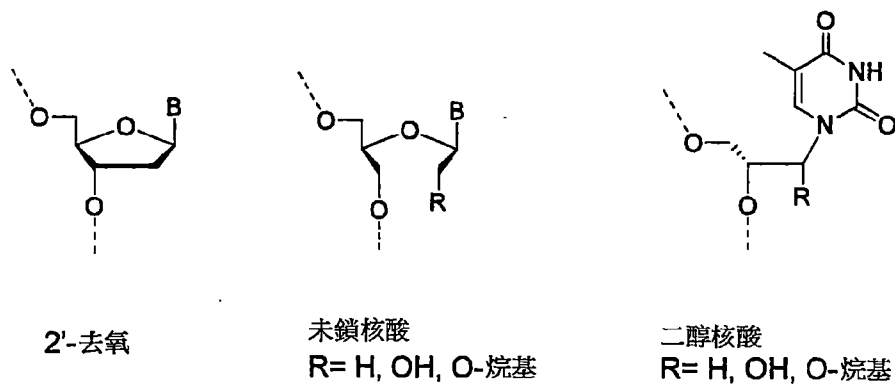


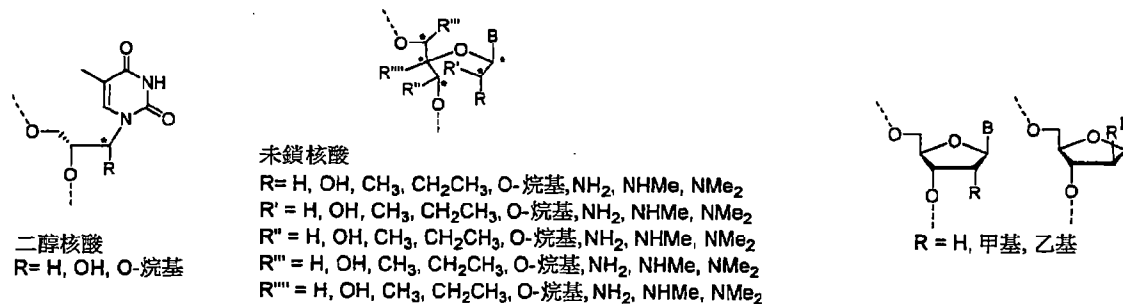
其中，R 係 H、Me、Et 或 OMe；R' 係 H、Me、Et 或 OMe；R'' 係 H、Me、Et 或 OMe，



其中，B 係經修飾或未經修飾之核苷酸。

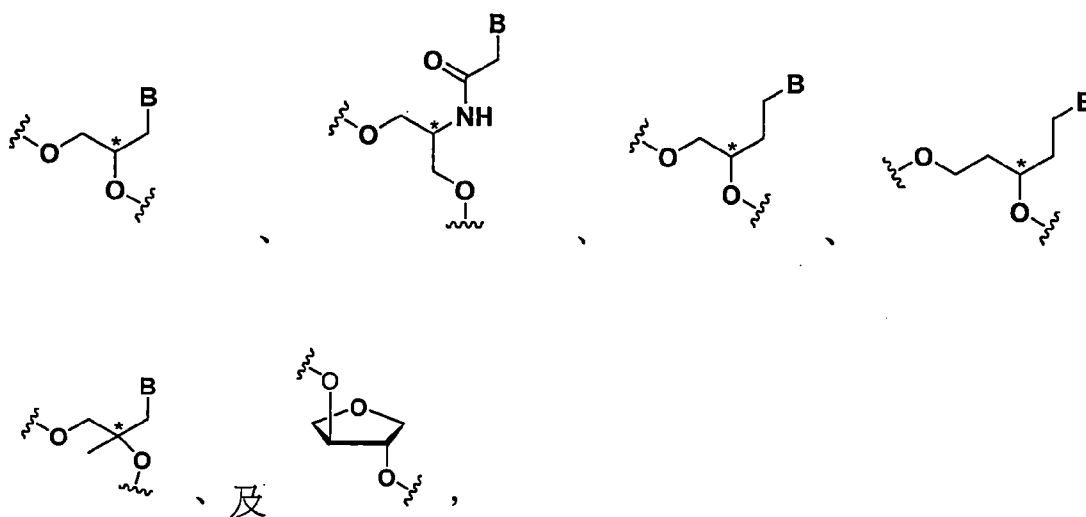
【0233】 例示性糖修飾係包括，但不限於下列：





其中，B 係經修飾或未經修飾之核酸鹼基。

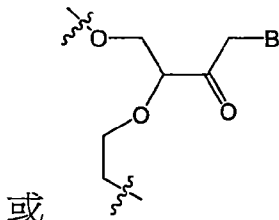
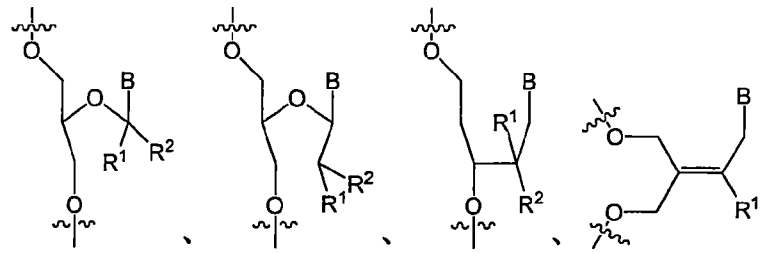
【0234】 一些態樣中，該雙鏈之熱減穩修飾係選自下列所組成之群組：

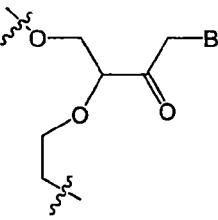


其中，B 係經修飾或未經修飾之核酸鹼基。

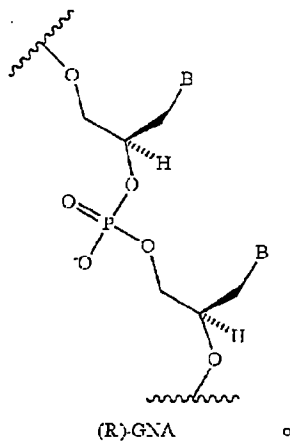
【0235】 術語「非環狀核苷酸」係指稱具有非環狀核糖之任意核苷酸，舉例而言，其中，界於核糖碳之間的任意鍵(如，C1'-C2'、C2'-C3'、C3'-C4'、C4'-O4'、或 C1'-O4')係不存在及/或核糖碳或氧之至少一者(如，C1'、C2'、C3'、C4'或 O4')係獨立地或組合地自該核苷酸缺失。一些態樣

中，非環狀核苷酸係



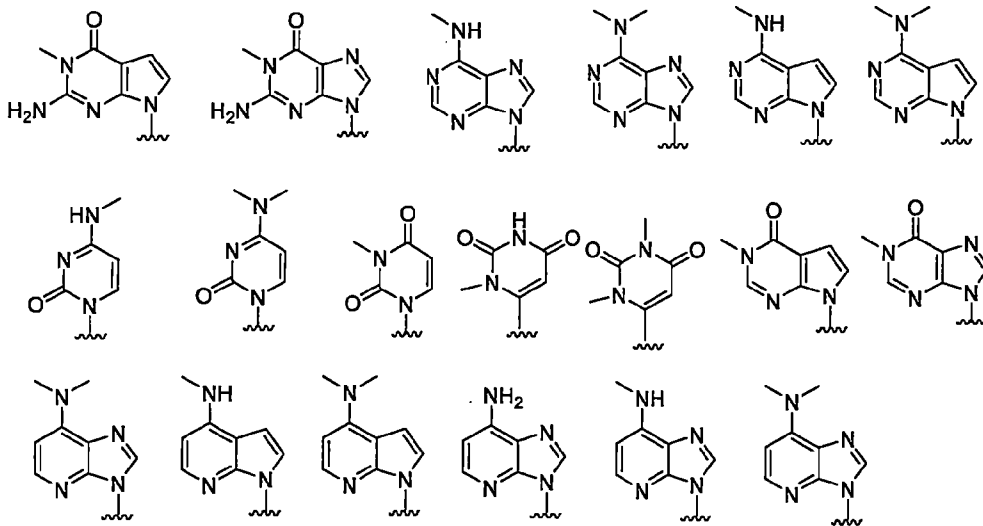
或 ，其中，B 係經修飾或未經修飾之核酸鹼基， R^1 與 R^2 係各自獨立為 H、鹵素、 OR_3 、或烷基；以及， R_3 係 H、烷基、環烷基、芳基、芳烷基、雜芳基或糖)。術語「UNA」係指稱未鎖非環狀核酸，其中，該糖之任意鍵係業經移除，形成未鎖「糖」殘基。一個實例中，UNA 亦涵蓋其 C1'-C4' 間之鍵(亦即，界於 C1' 碳與 C4' 碳間之共價碳-氧-碳鍵)業經移除之單體。另一實例中，該糖之 C2'-C3' 鍵(亦即，界於 C2' 碳與 C3' 碳間之共價碳-碳鍵)業經移除(參見，Mikhailov et. al., *Tetrahedron Letters*, 26 (17): 2059 (1985)；以及 Fluiter et al., *Mol. Biosyst.*, 10: 1039 (2009)，其係藉由引用而以其整體併入本文)。該非環狀之衍生物係提供更大之骨幹撓性，而不影響 Watson-Crick 配對。該非環狀之核苷酸可經由 2'-5' 或 3'-5' 鏈結方式而鏈結。

【0236】 術語「GNA」係指稱二醇核酸，其係類似於 DNA 或 RNA 但在「骨幹」組成上與 DNA 或 RNA 相異之聚合物，「GNA」之骨幹係由藉由磷酸二酯鍵鏈結之重複的甘油單元構成：



【0237】 該雙鏈之熱減穩修飾可係該熱減穩核苷酸與 dsRNA 雙鏈內相對股中之相核苷酸對間的誤配(亦即，非互補性鹼基對)。例示性誤配鹼基對係包括 G:G、G:A、G:U、G:T、A:A、A:C、C:C、C:U、C:T、U:U、T:T、U:T、或其組合。該技藝中已知之其他誤配鹼基配對亦為本發明所覆蓋。誤配可出現於作為天然出現之核苷酸或經修飾之核苷酸的核苷酸之間，亦即，該誤配鹼基配對可出現於來自獨立於該核苷酸之核糖之修飾的個別核苷酸的核酸鹼基之間。於某些態樣中，該 dsRNA 劑係於該誤配中含有至少一個作為 2'-去氧核酸鹼基的核酸鹼基；如，該正義股中之 2'-去氧核苷酸。

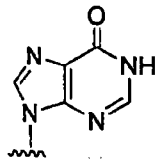
【0238】 一些態樣中，該反義股之種子區域內之該雙鏈的熱減穩修飾係包括下述核苷酸，該核苷酸與靶標 mRNA 之互補鹼基間之 W-C H-鍵結受損，例如：



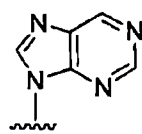
【0239】 無鹼基之核苷酸、非環狀之核苷酸修飾(包括 UNA 及 GNA)、亦即誤配修飾的更多實例業經詳細揭示於 WO 2011/133876 中，該專利係藉由引用而以其整體併入本文。

【0240】 該熱減穩修飾亦可包括具有經降低或廢除之與相對鹼基形成氫鍵之能力的通用鹼基、以及磷酸酯修飾。

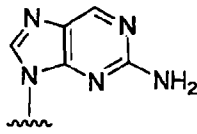
【0241】 一些態樣中，該雙鏈之熱減穩修飾係包括具有非經典之鹼基的核苷酸，例如，但不限於，具有受損或經不完全廢除之與相對股中之鹼基形成氫鍵之能力的核酸鹼基修飾。業經評估此等核酸鹼基修飾對於該 dsRNA 雙鏈之中心區域的減穩作用，如 WO 2010/0011895 中所揭示，該專利係藉由引用而以其整體併入本文。例示性核酸鹼基修飾係：



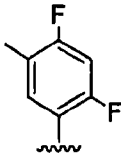
肌苷



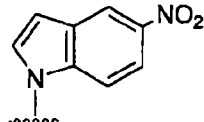
水粉葦素



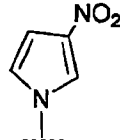
2-胺基咪唑



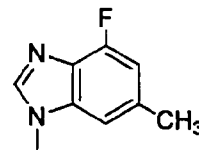
2,4-二氟甲苯



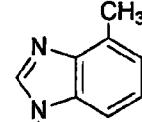
5-硝基咪唑



3-硝基咪唑

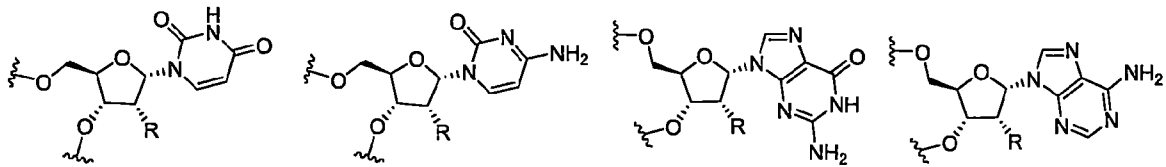


4-氟-6-甲基苯並咪唑



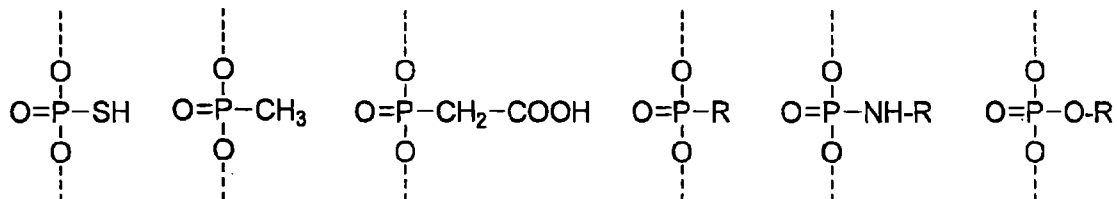
4-甲基苯並咪唑

【0242】 一些態樣中，位於該反義股之種子區域內的雙鏈之熱減穩修飾係包括一種或多種與靶標 mRNA 之鹼基互補的 α -核苷酸，例如：



其中，R 係 H、OH、OCH₃、F、NH₂、NHMe、NMe₂ 或 O-烷基。

【0243】 習知之用以相比磷酸二酯鏈結而降低 dsRNA 雙鏈之熱安定性的例示性磷酸酯修飾係：



R = 烷基

【0244】 用於 R 基團之烷基可係 C₁-C₆ 烷基。用於 R 基團之具體烷基係包括，但不限於，甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、戊基及己基。

【0245】 除了該包含熱減穩修飾之反義股之外，該 dsRNA 亦可包含一種或多種安定化修飾。舉例而言，該 dsRNA 可包含至少 2 個(如，2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個)安定化修飾。該安定化修飾係可全部存在於一股中而無限制。一些態樣中，該正義股及反義股兩者皆包含至少 2 個安定化修飾。該安定化修飾可出現於正義股或反義股之任何核苷酸。例如，該安定化修飾可出現於正義股及/或反義股上之每一核苷酸；每一安定化修飾可以交替模式出現於正義股或反義股；或該正義股或反義股兩者皆包含以交替模式出現之安定化修飾。該正義股的安定化修飾之交替模式可與反義股相同或相異，且正義股之安定化修飾之全部交替模式可具有相對於反義股之安定化修飾之交替模式的位移。

【0246】 一些態樣中，該反義股係包含至少 2 個(如，2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個)安定化修飾。該反義股中之安定化修飾可存在於任意位置而無限制。一些態樣中，該反義股係包含位於自 5'端計數之位置 2、6、8、9、14 及 16 的安定化修飾。一些其他態樣中，該反義股係包含位於自 5'端計數之位置 2、6、14 及 16 的安定化修飾。一些再其他態樣中，該反義股係包含位於自 5'端計數之位置 2、14 及 16 的安定化修飾。

【0247】 一些態樣中，該反義股係包含與該減穩修飾相鄰之至少一個安定化修飾。舉例而言，該安定化修飾可係位於該減穩修飾之 5'端或 3'端之核苷酸，亦即，位於

自該減穩修飾之位置計數的位置-1 或+1。一些態樣中，該反義股係包含各自位於該減穩修飾之 5'端及 3'端的安定化修飾，亦即，位於自該減穩修飾之位置計數的位置-1 及+1。

【0248】 一些態樣中，該反義股係包含位於該減穩修飾之 3'端的至少 2 個安定化修飾，亦即，位於自該減穩修飾之位置計數的位置-1 及+1。

【0249】 一些態樣中，該正義股係包含至少 2 個(如，2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個)安定化修飾。該正義股中之安定化修飾可存在於任何位置而無限制。一些態樣中，該正義股係包含位於自 5'端計數之位置 7、10 及 11 的安定化修飾。一些其他態樣中，該正義股係包含位於自 5'端計數之位置 7、9、10 及 11 的安定化修飾。一些態樣中，該正義股係包含位於與反義股之自該反義股 5'端計數之位置 11、12 及 15 相對或互補之位置的安定化修飾。一些其他態樣中，該正義股係包含位於與反義股之自該反義股 5'端計數之位置 11、12、13 及 15 相對或互補之位置的安定化修飾。一些態樣中，該正義股係包含 2、3 或 4 個安定化修飾之嵌段。

【0250】 一些態樣中，該正義股不包含位於與反義股中雙鏈之熱減穩修飾相對或互補之位置的安定化修飾。

例示性熱穩定化修飾係包括，但不限於，2'-氟修飾。

【0251】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 係包含至少 4 個(如，4、5、6、7、8、9、10 或更多個) 2'-氟核苷酸。該 2'-氟核苷酸可全部存在於一股中而無限制。一些態樣

中，該正義股及反義股兩者皆包含至少 2 個 2'-氟核苷酸。該 2'-氟修飾可出現於正義股或反義股之任意核苷酸。例如，該 2'-氟修飾可出現於正義股及/或反義股之每一核苷酸；各 2'-氟修飾可以交替模式出現於正義股或反義股；或正義股或反義股兩者皆包含以交替模式出現之 2'-氟修飾。該正義股之 2'-氟修飾之交替模式可與該反義股相同或相異，其該正義股之 2'-氟修飾的交替模式可具有相對於該反義股之 2'-氟修飾之交替模式的位移。

【0252】 一些態樣中，該反義股係包含至少 2 個 (如，2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個) 2'-氟核苷酸。該反義股中之 2'-氟修飾可存在於任何位置而無限制。一些態樣中，該反義股係包含位於自 5'端計數之位置 2、6、8、9、14 及 16 的 2'-氟核苷酸。一些其他態樣中，該反義股係包含位於自 5'端計數之位置 2、6、14 及 16 的 2'-氟核苷酸。一些再其他態樣中，該反義股係包含位於自 5'端計數之位置 2、14 及 16 的 2'-氟核苷酸。

【0253】 一些態樣中，該反義股係包含與該減穩修飾相鄰之至少 1 個 2'-氟核苷酸。舉例而言，該 2'-氟核苷酸可係位於該減穩修飾之 5'端或 3'端的核苷酸，亦即，位於自該減穩修飾之位置計數的位置-1 或+1。一些態樣中，該反義股係包含各自位於該減穩修飾之 5'端及 3'端的 2'-氟核苷酸，亦即，位於自該減穩修飾之位置計數的位置-1 及+1。

【0254】 一些態樣中，該反義股係包含位於該減穩

修飾之 3'端的至少 2 個 2'-氟核苷酸，亦即，位於自該減穩修飾之位置計數的位置 -1 及 +1。

【0255】 一些態樣中，該正義股係包含至少 2 個(如，2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個) 2'-氟核苷酸。該正義股中之 2'-氟修飾可存在於任何位置而無限制。一些態樣中，該反義股係包含位於自 5'端計數之位置 7、10 及 11 的 2'-氟核苷酸。一些其他態樣中，該正義股係包含位於自 5'端計數之位置 7、9、10 及 11 的 2'-氟核苷酸。一些態樣中，該正義股係包含位於與反義股之自該反義股 5'端計數之位置 11、12 及 15 相對或互補之位置的 2'-氟核苷酸。一些其他態樣中，該正義股係包含位於與反義股之自該反義股 5'端計數之位置 11、12、13 及 15 相對或互補之位置的 2'-氟核苷酸。一些態樣中，該正義股係包含 2、3 或 4 個 2'-氟核苷酸之嵌段。

【0256】 一些態樣中，該正義股不包含位於與該反義股中雙鏈之熱減穩修飾相對或互補之位置的 2'-氟核苷酸。

【0257】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含一 21 個核苷酸(nt)之正義股及一 23 個核苷酸(nt)之反義股，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係出現於該反義股之種子區域(亦即，位於該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內，其中，該 dsRNA 之一端係鈍端，而另一端係包含一 2 nt 之突出，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一

者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；以及(vii) 該 dsRNA 係包含位於該反義股之 5'端的鈍端。較佳地，該 2 nt 之突出係位於反義股之 3'端。

【0258】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，其中，該正義股之長度係 25 至 30 個核苷酸殘基，其中，自 5'末端核苷酸(位置 1)起始，該正義股之位置 1 至 23 係包含至少 8 個核糖核苷酸；反義股之長度係 36 至 66 個核苷酸殘基，且自 3'末端核苷酸起始，該等位置中之至少 8 個核糖核苷酸係與正義股之位置 1 至 23 配對以形成雙鏈；其中，至少該反義股之 3'末端核苷酸係未與正義股配對，且最多 6 個連續之 3'末端核苷酸未與正義股配對，從而形成包含 1 至 6 個核苷酸之 3'單股突出；其中，反義股之 5'末端係包含未與正義股配對之 10 至 30 個連續之核苷酸，從而形成包含 10 至 30 個核苷酸之單股 5'突出；其中，當正義股與反義股以最大互補性對準時，至少該正義股之 5'末端核苷酸及 3'末端核苷酸與反義股之核苷酸形成鹼基配對，從而於正義股與反義股之間形成實質上雙鏈化之區域；且反義股係沿著該反義股長度之至少 19 個核糖核苷酸而與靶標 RNA 足夠互補，以在將該雙股

核酸引入哺乳動物細胞內時，降低靶標基因之表現；以及，其中，該反義股係含有至少一個熱減穩核苷酸，其中，該至少一個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域(亦即，該反義股之 5'端的位置 2 至 9)內，舉例而言，該熱減穩核苷酸係出現於與該正義股之 5'端之位置 14 至 17 相對或互補的位置，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；以及(vii) 該 dsRNA 係包含一長度為 12 至 30 核苷酸對的雙鏈區域。

【0259】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含正義股及反義股，其中，該 dsRNA 劑係包含其長度為至少 25 個核苷酸且至多 29 個核苷酸之正義股以及其長度至多為 30 個核苷酸之反義股，且該正義股係包含易進行酶促降解之位於自 5'端計數之位置 11 的經修飾之核苷酸，其中，該正義股之 3'端與該反義股之 5'端係形成鈍端，且該反義股係於其 3'端比該正義股長 1 至 4 個核苷酸，其中，該雙鏈區域之長度為至少 25 個核苷酸，以及，該反義股係沿著該反義股長度之至少 19 nt 與靶標 mRNA 足夠互補，以在將該 dsRNA 劑引入哺乳動物細胞內時，降低靶標基因之表

現，以及，其中，該 dsRNA 之切丁酶裂解係優先而導致包含該反義股之 3' 端的 siRNA，從而減少靶標基因在哺乳動物體內的表現，其中，該反義股係含有至少 1 個熱減穩核苷酸，其中，該至少 1 個熱減穩核苷酸係位於該反義股之種子區域內(亦即，位於該反義股 5' 端之位置 2 至 9)，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；以及(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；以及(vii) 該 dsRNA 係具有長度為 12 至 29 核苷酸對之雙鏈區域。

【0260】 一些態樣中，該 dsRNA 劑中之正義股及反義股中的每一個核苷酸均可經修飾。各核苷酸可經相同或相異之修飾進行修飾，該修飾可包括一個或兩個非鏈結磷酸酯氧及/或一個或多個鏈結磷酸酯氧的一種或多種修改；核糖之成分如核糖之 2' 羥基的修改；磷酸酯部分大規模替換為「去磷」鏈結基；對天然出現之鹼基的修飾或替換；以及，對核糖-磷酸酯骨幹的替換或修飾。

【0261】 由於核酸係子單元之聚合物，多數修飾係存在於核酸之重複位置，如，鹼基、磷酸酯部分、或磷酸酯部分之非鏈結 O 的修飾。一些情形中，修飾將出現在該

核酸之全部主題位置，但在多數情形中不會如此。舉例而言，修飾可僅出現於 3' 或 5' 末端位置，可僅出現於末端區域內，如出現於末端核苷酸之位置或出現於一股之最末 2、3、4、5、或 10 個核苷酸中。修飾可出現於雙股區域內、單股區域內、或兩者中。修飾可僅出現於 RNA 之雙股區域內，或可僅出現於 RNA 之單股區域內。例如，位於非鏈結 O 位置之硫代磷酸酯修飾可僅出現於一個或兩個末端；可僅出現於末端區域內，如出現於末端核苷酸之位置或出現於一股之最末 2、3、4、5、或 10 個核苷酸中；或可出現於雙股劑單股區域中，特別是末端。5' 端或兩端可經磷酸化。

【0262】 下述者可係可能：提升安定性、於突出中包括特定之鹼基、或於單股突出如 5' 突出或 3' 突出或兩者中包括經修飾之核苷酸或核苷酸替代品。例如，所欲者可係於突出中包括嘌呤核苷酸。於一些態樣中，3' 突出或 5' 突出中之全部或一些鹼基可使用諸如本文中揭示之修飾予以修飾。修飾可包括，如，使用該技藝中習知之修飾於核糖之 2' 位置進行修飾，如使用經去氧核糖核苷酸、2'-去氧-2'-氟 (2'-F)、或 2'-O-甲基修飾者替代核酸鹼基中之核糖；以及磷酸酯基團中之修飾，如，硫代磷酸酯修飾。突出無需與該靶標序列同源。

【0263】 一些態樣中，該正義股及反義股之每一殘基係獨立經 LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-去氧、或 2'-氟修飾。

該等股可含有超過一種之修飾。一些態樣中，該正義股及反義股之每一殘基係獨立經 2'-O-甲基或 2'-氟修飾。應理解，此等修飾係除存在於該反義股中之雙鏈之至少一種熱減穩修飾以外者。

【0264】 該正義股及反義股典型係存在至少兩種不同之修飾。彼等兩種修飾可係 2'-去氧、2'-O-甲基或 2'-氟修飾；非環狀之核苷酸；或其他。一些態樣中，該正義股及反義股係各自包含兩種經選自 2'-O-甲基或 2'-去氧之不同修飾的核苷酸。一些態樣中，該正義股及反義股之每一殘基係獨立經 2'-O-甲基核苷酸、2'-去氧核苷酸、2'-去氧氟核苷酸、2'-O-N-甲基乙醯胺基(2'-O-NMA)核苷酸、2'-O-二甲胺基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)核苷酸、2'-O-胺基丙基(2'-O-AP)核苷酸、或 2'-芳基-F 核苷酸修飾。再一次，應理解，此等修飾係除存在於該反義股中之雙鏈之至少一種熱減穩修飾以外者。

【0265】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含交替模式之修飾，尤其在 B1、B2、B3、B1'、B2'、B3'、B4' 區域內。本文中所使用之術語「交替組元」或「交替模式」係指稱一組元，其係具有一種或多種修飾且每一修飾係出現於一股之交替核苷酸。該交替核苷酸可指稱每兩個核苷酸中一個或每三個核苷酸中一個，或類似之模式。舉例而言，若 A、B 及 C 係各自代表一種類型之核苷酸修飾，則該交替組元可係「ABABABABABAB...」、「AABBAABBAABB...」、「AABAABAABAAB...」、「AAABAAABAAAB...」、

「AAABBBAAABBB...」、或「ABCABCABCABC...」等。

【0266】 該交替組元中含有之修飾的類型可係相同或相異。舉例而言，若 A、B、C、D 各自代表核苷酸之一種類型之修飾，則該交替模式，亦即，每兩個核苷酸之修飾，可係相同者，但正義股或反義股可係各自選自諸如「ABABAB...」、「ACACAC...」、「BDBDBD...」、或「CDCDCD...」等結構組元內之修飾的若干種可能性。

【0267】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含，用於正義股交替組元之修飾模式係相對於用於反義股交替組元之修飾模式位移。該位移可係如此，以致正義股之核苷酸之經修飾基團係對應於反義股之核苷酸之經不同修飾的基團，反之亦然。舉例而言，當 dsRNA 雙鏈中之正義股與反義股配對時，該正義股中之交替組元可自該股之 5' 至 3' 方向以「ABABAB」起始，而該反義股中之交替組元可於雙鏈區域內自該股之 3' 至 5' 方向以「BABABA」起始。作為另一實例，該正義股中之交替組元可自該股之 5' 至 3' 方向以「AABBAABB」起始，而該反義股中之交替組元可於雙鏈區域內自該股之 3' 至 5' 方向以「BBAABBAA」起始，故該正義股之修飾模式與該反義股之修飾模式之間存在完全或部分之位移。

【0268】 本發明之 dsRNA 劑可復包含至少一個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結。該硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾可出現於該正義股或反義股或兩者之該股任意位置之任意核苷酸。例如，該核苷酸間鏈結修飾

可出現於正義股及/或反義股之每一核苷酸；各核苷酸間鏈結修飾可以交替模式出現於該正義股或反義股；或該正義股或反義股係包含交替模式之兩種核苷酸間鏈結修飾。該正義股之核苷酸間鏈結修飾的交替模式可與反義股相同或相異，且該正義股之核苷酸間鏈結修飾的交替模式可具有相對於該反義股核苷酸間鏈結修飾之交替模式的位移。

【0269】 一些態樣中，該 dsRNA 劑係包含位於突出區域中之硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。舉例而言，該突出區域係包含兩個核苷酸，且與該兩個核苷酸間具有硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結。核苷酸間鏈結修飾亦可作成以鏈結該突出核苷酸與雙鏈區域內之末端之配對的核苷酸。舉例而言，至少 2、3、4 個或全部之突出核苷酸可透過硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結得以鏈結，且視需要，可能存在鏈結該突出核苷酸與緊鄰該突出核苷酸之配對核苷酸對之額外的硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結。例如，可能於末端三個核苷酸之間存在至少 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結，其中，該三個核苷酸中之兩者係突出核苷酸，且第三個係緊鄰該突出核苷酸之配對核苷酸對。較佳地，此等末端之三個核苷酸可位於反義股之 3'端。

【0270】 一些態樣中，該 dsRNA 劑之正義股係包含 1 至 10 個嵌段，各嵌段為 2 至 10 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結，此等嵌段係藉由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 個磷酸酯核苷酸間

鏈結分隔之，其中，該等硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結之一者係置於寡核苷酸序列之任意位置，且該正義股係與包含硫代磷酸酯、磷酸甲酯及磷酸酯核苷酸間鏈結之任意組合的反義股配對或與包含硫代磷酸酯或磷酸甲酯或磷酸酯鏈結之反義股配對。

【0271】 一些態樣中，該 dsRNA 劑之反義股係包含 2 個嵌段，各嵌段為 2 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結，此等嵌段係藉由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或 18 個磷酸酯類核苷酸間鏈結分隔之，其中，該等硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結之一者係置於寡核苷酸序列之任意位置，且該反義股係與包含硫代磷酸酯、磷酸甲酯及磷酸酯類核苷酸間鏈結之任意組合的正義股配對或與包含硫代磷酸酯或磷酸甲酯或磷酸酯鏈結之正義股配對。

【0272】 一些態樣中，該 dsRNA 劑之反義股係包含 2 個嵌段，各嵌段為 3 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結，此等嵌段係藉由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 個磷酸酯核苷酸間鏈結分隔之，其中，該等硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結之一者係置於寡核苷酸序列之任意位置，且該反義股係與包含硫代磷酸酯、磷酸甲酯及磷酸酯核苷酸間鏈結之任意組合的正義股配對或與包含硫代磷酸酯或磷酸甲酯或磷酸酯鏈結之正義股配對。

【0273】 一些態樣中，該 dsRNA 劑之反義股係包含

4 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結的 2 個嵌段，此等嵌段係藉由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 個磷酸酯核苷酸間鏈結分隔之，其中，該等硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結之一者係置於寡核苷酸序列之任意位置，且該反義股係與包含硫代磷酸酯、磷酸甲酯及磷酸酯核苷酸間鏈結之任意組合的正義股配對或與包含硫代磷酸酯或磷酸甲酯或磷酸酯鏈結之正義股配對。

【0274】 一些態樣中，該 dsRNA 劑之反義股係包含 5 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結的 2 個嵌段，此等嵌段係藉由 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 個磷酸酯核苷酸間鏈結分隔之，其中，該等硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結之一者係置於寡核苷酸序列之任意位置，且該反義股係與包含硫代磷酸酯、磷酸甲酯及磷酸酯類核苷酸間鏈結之任意組合的正義股配對或與包含硫代磷酸酯或磷酸甲酯或磷酸酯鏈結之正義股配對。

【0275】 一些態樣中，該 dsRNA 劑之反義股係包含 6 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結的 2 個嵌段，此等嵌段係藉由 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個磷酸酯核苷酸間鏈結分隔之，其中，該等硫代磷酸酯類或磷酸甲酯類核苷酸間鏈結之一者係置於寡核苷酸序列之任意位置，且該反義股係與包含硫代磷酸酯、磷酸甲酯及磷酸酯類核苷酸間鏈結之任意組合的正義股配對或與包含硫代磷酸酯或磷酸甲酯或磷酸酯鏈結之正義股配對。

【0276】 一些態樣中，該 dsRNA 劑之反義股係包含

7 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結的 2 個嵌段，此等嵌段係藉由 1、2、3、4、5、6、7 或 8 個磷酸酯核苷酸間鏈結分隔之，其中，該等硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結之一者係置於寡核苷酸序列之任意位置，且該反義股係與包含硫代磷酸酯、磷酸甲酯及磷酸酯類核苷酸間鏈結之任意組合的正義股配對或與包含硫代磷酸酯或磷酸甲酯或磷酸酯鏈結之正義股配對。

【0277】 一些態樣中，該 dsRNA 劑之反義股係包含 8 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結的 2 個嵌段，此等嵌段係藉由 1、2、3、4、5 或 6 個磷酸酯核苷酸間鏈結分隔之，其中，該等硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結之一者係置於寡核苷酸序列之任意位置，且該反義股係與包含硫代磷酸酯、磷酸甲酯及磷酸酯類核苷酸間鏈結之任意組合的正義股配對或與包含硫代磷酸酯或磷酸甲酯或磷酸酯鏈結之正義股配對。

【0278】 一些態樣中，該 dsRNA 劑之反義股係包含 9 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結的 2 個嵌段，此等嵌段係藉由 1、2、3 或 4 個磷酸酯核苷酸間鏈結分隔之，其中，該等硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結之一者係置於寡核苷酸序列之任意位置，且該反義股係與包含硫代磷酸酯、磷酸甲酯及磷酸酯類核苷酸間鏈結之任意組合的正義股配對或與包含硫代磷酸酯或磷酸甲酯或磷酸酯鏈結之正義股配對。

【0279】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位

於該正義股及/或反義股 1 至 10 個之末端位置內之一個或多個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。舉例而言，至少 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個核苷酸可透過位於該正義股及/或反義股之一端或兩端的硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結得以鏈結。

【0280】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於該正義股及/或反義股各自之雙鏈之內部區域之 1 至 10 個位置內之一個或多個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。舉例而言，至少 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個核苷酸可透過位於該正義股之雙鏈區域自 5'端計數之位置 8 至 16 的硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結得以鏈結；該 dsRNA 劑可視需要復包含位於末端之 1 至 10 位置內的一個或多個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0281】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於該正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 1 至 5 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 的 1 至 5 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 以及位置 18 至 23 的 1 至 5 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0282】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 1 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'

端計數)之位置 1 及 2 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 2 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0283】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 1 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 2 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0284】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 2 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 2 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0285】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 2 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 1 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0286】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 1 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 2 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0287】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 1 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 1 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0288】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 1 個硫代磷酸酯類或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0289】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18

至 23 內的 2 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0290】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 1 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 1 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0291】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 1 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 2 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0292】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 至 5 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 1 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 18 至 23 內的 2 個硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸間鏈結修飾。

【0293】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 2 個硫代磷酸酯核

苷酸間鏈結修飾以及位於位置 20 及 21 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 21 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾。

【0294】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 21 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 20 及 21 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾。

【0295】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 20 及 21 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 21 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾。

【0296】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 21 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 21 及 22 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾。

【0297】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 2 個硫代磷酸酯

核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 22 及 23 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 21 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾。

【0298】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑復包含位於正義股(自 5'端計數)之位置 1 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 21 的 1 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾，以及位於反義股(自 5'端計數)之位置 1 及 2 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾以及位於位置 22 及 23 的 2 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結修飾。

【0299】 一些態樣中，該反義股係包含位於核苷酸位置 21 與 22 之間、以及核苷酸位置 22 與 23 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結，其中，該反義股係含有定位於該反義股種子區域內(亦即，位於該反義股 5'端之位置 2 至 9)的雙鏈之至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者或全部八者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vii) 該 dsRNA 係包長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域；以及(viii) 該 dsRNA 係具有位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0300】 一些態樣中，該反義股係包含位於核苷酸位置 1 與 2 之間、核苷酸位置 2 與 3 之間、核苷酸位置 21 與 22 之間、以及核苷酸位置 22 與 23 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結，其中，該反義股係含有定位於該反義股種子區域內(亦即，位於該反義股 5'端之位置 2 至 9)的雙鏈之至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者或全部八者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該正義股係與配位子接合；(iii) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(iv) 該正義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(v) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vi) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域；(vii) 該 dsRNA 係包含長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域；以及(viii) 該 dsRNA 係具有位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0301】 一些態樣中，該正義股係包含位於核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結，其中，該反義股係含有定位於該反義股種子區域內(亦即，位於該反義股 5'端之位置 2 至 9)的雙鏈之至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者、七者或全部八者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該反義股係包含 1、2、3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(iii) 該正義股係與配位子接

合；(iv) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(v) 該正義股係包 3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(vi) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vii) 該 dsRNA 係包長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域；以及(viii) 該 dsRNA 係具有位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0302】 一些態樣中，該正義股係包含位於核苷酸位置 1 與 2 之間、及核苷酸位置 2 與 3 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結，該反義股係包含位於核苷酸位置 1 與 2 之間、核苷酸位置 2 與 3 之間、核苷酸位置 21 與 22 之間、及核苷酸位置 22 與 23 之間的硫代磷酸酯核苷酸間鏈結，其中，該反義股係含有定位於該反義股種子區域內(亦即，位於該反義股 5'端之位置 2 至 9)的雙鏈之至少一個熱減穩修飾，以及，其中，該 dsRNA 視需要復具有下述特徵之至少一者(如，一者、兩者、三者、四者、五者、六者或全部七者)：(i) 該反義股係包含 2、3、4、5 或 6 個 2'-氟修飾；(ii) 該正義股係與配位子接合；(iii) 該正義股係包含 2、3、4 或 5 個 2'-氟修飾；(iv) 該正義股係包 3 或 4 個硫代磷酸酯核苷酸間鏈結；(v) 該 dsRNA 係包含至少 4 個 2'-氟修飾；(vi) 該 dsRNA 係包長度為 12 至 40 核苷酸對之雙鏈區域；以及(vii) 該 dsRNA 係具有位於該反義股之 5'端的鈍端。

【0303】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係於雙鏈內包含與靶標之誤配或其組合。該誤配可出現於突出區域或雙鏈區域內。該鹼基配對可基於其促進解離或解鏈(如，

在特定配對之聯合或解離之自由能，最簡單之途徑係基於獨立配對而檢查該等配對，但亦可使用近鄰分析或相似分析)之優先性而排名。以促進解離之觀點來看：A:U 係優於 G:C；G:U 係優於 G:C；且 I:C 係優於 G:C (I 係肌苷)。誤配，如非經典配對或除經典配對外者(如本文中他處所揭示)係優於經典(A:T、A:U、G:C)配對；且包括通用鹼基之配對係優於經典配對。

【0304】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係包含，該雙鏈區域內自反義股 5'端計數之最先 1、2、3、4、或 5 鹼基對中的至少一個可獨立選自下述群組：A:U、G:U、I:C、及誤配之配對，如，包括通用鹼基之非典型配對或除經典配對之外者，以促進該反義股於該雙鏈之 5'端解離。

【0305】 一些態樣中，位於該反義股中該雙鏈區域內自 5'端計數之位置 1 的核苷酸係選自下列所組成之群組：A、dA、dU、U、及 dT。或者，該雙鏈區域內自反義股 5'端計數之最先 1、2 或 3 鹼基對之至少一者係 AU 鹼基對。舉例而言，該雙鏈區域自該反義股 5'端計數之第一對鹼基係 AU 鹼基對。

【0306】 業經發現，將 4'-修飾及/或 5'-修飾之核苷酸引入單股寡核苷酸或雙股寡核苷酸之任意位置處之二核苷酸之磷酸二酯(PO)、硫代磷酸酯(PS)、及/或二硫代磷酸酯(PS2)鏈結之 3'端，可賦予該核苷酸間鏈結以立體效果，並因此保護或安定化其不被核酸酶影響。

【0307】 一些態樣中，5'-修飾之核苷係引入單股或

雙股 siRNA 之任意位置處之二核苷酸的 3'端。例如，可將 5'-烷基化核苷引入單股或雙股 siRNA 之任意位置處之二核苷酸的 3'端。該位於核糖之 5'位置的烷基可係外消旋或手性純之 *R* 或 *S* 異構物。例示性之 5'-烷基化核苷係 5'-甲基核苷。該 5'-甲基可係外消旋或手性純之 *R* 或 *S* 異構物。

【0308】 一些態樣中，4'-修飾之核苷係引入單股或雙股 siRNA 之任意位置處之二核苷酸的 3'端。例如，可將 4'-烷基化核苷引入單股或雙股 siRNA 之任意位置處之二核苷酸的 3'端。該位於核糖之 4'位置的烷基可係外消旋或手性純之 *R* 或 *S* 異構物。例示性之 4'-烷基化核苷係 4'-甲基核苷。該 4'-甲基可係外消旋或手性純之 *R* 或 *S* 異構物。或者，可將 4'-*O*-烷基化核苷引入單股或雙股 siRNA 之任意位置處之二核苷酸的 3'端。該核糖之 4'-*O*-烷基可係外消旋或手性純之 *R* 或 *S* 異構物。例示性之 4'-*O*-烷基化核苷係 4'-*O*-甲基核苷。該 4'-*O*-甲基可係外消旋或手性純之 *R* 或 *S* 異構物。

【0309】 一些態樣中，可將 5'-烷基化核苷引入 dsRNA 之正義股或反義股之任意位置，且此修飾係維持或改善該 dsRNA 之潛能。該 5'-烷基可係外消旋或手性純之 *R* 或 *S* 異構物。例示性 5'-烷基化核苷係 5'-甲基核苷。該 5'-甲基可係外消旋或手性純之 *R* 或 *S* 異構物。

【0310】 一些態樣中，可將 4'-烷基化核苷引入 dsRNA 之正義股或反義股之任意位置，且此修飾係維持或改善該 dsRNA 之潛能。該 4'-烷基可係外消旋或手性純之

R 或 *S* 異構物。例示性 4'-烷基化核苷係 4'-甲基核苷。該 4'-甲基可係外消旋或手性純之 *R* 或 *S* 異構物。

【0311】 一些態樣中，可將 4'-*O*-烷基化核苷引入 dsRNA 之正義股或反義股之任意位置，且此修飾係維持或改善該 dsRNA 之潛能。該 4'-*O*-烷基可係外消旋或手性純之 *R* 或 *S* 異構物。例示性 4'-*O*-烷基化核苷係 4'-*O*-甲基核苷。該 4'-*O*-甲基可係外消旋或手性純之 *R* 或 *S* 異構物。

【0312】 一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑可包含 2'-5' 鏈結(具有 2'-H、2'-OH 及 2'-OMe 且具有 P=O 或 P=S)。舉例而言，該 2'-5' 鏈結修飾可用來促進核酸酶抗性或用來抑制正義股至反義股之結合，或可用於正義股之 5' 端以避免正義股被 RISC 激活。

【0313】 另一態樣中，本發明之 dsRNA 劑可包含 L 糖類(如，具有 2'-H、2'-OH 及 2'-OMe 之 L-核糖、L-阿拉伯糖)。舉例而言，此等 L 糖類修飾可用來促進核酸酶抗性或用來抑制正義股至反義股之結合，或可用於正義股之 5' 端以避免正義股被 RISC 激活。

【0314】 多種出版物揭示了多體 siRNA，且可全部與本發明之 dsRNA 合用。此等出版物係包括 WO2007/091269、第 7858769 號美國專利、WO2010/141511、WO2007/117686、WO2009/014887 及 WO2011/031520，其係藉由引用而以其整體併入本文。

【0315】 如下文中詳述者，含有一個或多個碳水化合物部分至 dsRNA 劑之接合的 dsRNA 劑可優化該 dsRNA

劑之一種或多種特性。多種情形中，該碳水化合物部分將附接至該 dsRNA 劑之經修飾之子單元。例如，dsRNA 劑之一個或多個核糖核苷酸子單元的核糖可替換為另一部分，如，其附接有碳水化合物配位子之非碳水化合物(較佳係環狀)載劑。本文中，其核糖業經如是替換之核糖核苷酸子單元係指稱為核糖替換修飾子單元(RRMS)。環狀載劑可係碳環系環系統，亦即，全部環原子皆為碳原子；或係雜環系環系統，亦即，一個或多個環原子可係雜原子，如，氮、氧、硫。該環狀載劑可係單環系環系統，或可含有兩個或更多個環，如稠環。該環狀載劑可係完全飽和之環系統，或其可含有一個或多個雙鍵。

【0316】 該配位子可經由載劑而附接至該多核苷酸。該等載劑係包括(i)至少一個「骨幹附接點」，較佳兩個「骨幹附接點」；以及(ii)至少一個「繫帶附接點」。本文中使用的「骨幹附接點」係指稱官能基，如，羥基；或通常，可用於且適用於將載劑併入骨幹，如，核糖核酸之磷酸酯，或經修飾之磷酸酯如含硫之磷酸酯骨幹。於一些態樣中，「繫帶附接點」(TAP)係指稱該環狀載劑之構件環原子，如碳原子或雜原子(不同於提供骨幹附接點之原子)，其係連結所選擇之部分。該部分可係，如，碳水化合物如單糖、二醣、三醣、四醣、寡醣及多醣。視需要，所選擇之部分係藉由介導繫帶連結至該環狀載劑。因此，該環狀載劑一般將包括官能基，如胺基，或通常，係提供適用於將另一化學整體如配位子合併或繫帶至該構件環之

鍵。

【0317】 於一態樣中，本發明之 dsRNA 劑係經由載劑接合至配位子，其中，該載劑可係環狀基團或非環狀基團；較佳地，該環狀基團係選自吡咯啉基、吡啶基、吡啶烷基、咪啶基、咪啶烷基、哌啶基、哌啶基、[1,3]二氧雜環戊烷、嘔啶基、異嘔啶基、嗎啶基、噻啶基、異噻啶基、喹啶基、塔吡酮基、四氫呋喃基及十氫萘基；較佳地，該非環狀基團係選自絲胺醇骨幹或二乙醇胺骨幹。

【0318】 本發明之雙股 RNA(dsRNA)劑可視需要經接合至一個或多個配位子。該配位子可經附接至正義股、反義股或兩股之 3'端、5'端或兩端。例如，該配位子可接合至正義股，尤其是正義股之 3'端。

【0319】 於一些態樣中，本發明之 dsRNA 劑係經 5'磷酸化，或係包括位於 5'首要終端之磷醯基類似物。5'-磷酸酯修飾係包括彼等與 RISC 介導之基因靜默相容者。適當之修飾係包括：5'-單磷酸酯((HO)₂(O)P-O-5')；5'-二磷酸酯((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-三磷酸酯((HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-鳥苷封帽(7-甲基化或非甲基化)(7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-腺苷封帽(Appp)，以及任何經修飾或未修飾之核苷酸封帽結構(N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-單硫代磷酸酯(硫代磷酸酯；(HO)₂(S)P-O-5')；5'-單二

硫代磷酸酯(二硫代磷酸酯；(HO)(HS)(S)P-O-5')、5'-硫代磷酸酯((HO)₂(O)P-S-5')；氧/硫經替換之單磷酸酯、二磷酸酯、及三磷酸酯之任何額外之組合(如，5'- α -硫代三磷酸酯、5'- γ -硫代三磷酸酯等)、5'-磷醯胺化物((HO)₂(O)P-NH-5'、(HO)(NH₂)(O)P-O-5')、5'-烷基磷酸酯(R=烷基=甲基、乙基、異丙基、丙基等，如，RP(OH)(O)-O-5'-、5'-烯基磷酸酯(亦即，乙烯基、經取代之乙烯基)、(OH)₂(O)P-5'-CH₂-)、5'-烷基醚磷酸酯(R=烷基醚=甲氧基甲基(MeOCH₂-)、乙氧基甲基等，如，RP(OH)(O)-O-5'-)。於一實施例中，該修飾可置於 dsRNA 劑之反義股中。

【0320】

III. 接合至配位子之 iRNA

本發明之 iRNA 之 RNA 的另一修飾係牽涉將一個或多個提升該 iRNA 之活性、細胞分佈、或細胞攝取入攝取入細胞的配位子、部分或化學鏈結至該 iRNA。此等部分係包括但不限於脂質部分，如膽固醇部分(Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556)。於其他態樣中，該配位子係膽酸(Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Let.*, 1994, 4:1053-1060)；硫醚，如綠柱石-S-三苯基甲硫醇(Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309；Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Let.*, 1993, 3:2765-2770)；硫代膽固醇(Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538)；脂肪族鏈，如十二碳二醇

或十一烷基殘基 (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118 ; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330 ; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54) ; 磷脂質，如，二-十六烷基-rac-甘油或 1,2-二-O-十六烷基-rac-甘油-3-磷酸三乙基銻 (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654 ; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783) ; 聚胺或聚乙二醇鏈 (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973) ; 或金剛烷乙酸 (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654) ; 棕櫚基部分 (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237) ; 或十八烷基胺或己基胺-羧基膽固醇部分 (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937) 。

【0321】 於某些態樣中，配位子係變更其所併入之 iRNA 劑之分佈、靶向或壽命。於較佳之態樣中，配位子係提供諸如較不存在此配位子者提升之對所選靶標如分子、細胞或細胞類型、隔室如細胞或器官隔室、組織、器官或身體之區域。較佳之配位子並不參與雙鏈核酸中之雙鏈配對。

【0322】 配位子可包括天然出現之物質，如蛋白質 (如，人血清白蛋白 (HSA)、低密度脂蛋白 (LDL)、或球蛋白) ; 碳水化合物 (如，葡聚糖、支鏈澱粉、幾丁質、幾丁聚醣、菊糖、環糊精、N-乙醯基葡糖胺、N-乙醯基半乳糖胺、或玻尿酸) ; 或脂質。該配位子亦可係重組或合成分子，

如合成聚合物，如合成聚胺基酸。聚胺基酸之實例係包括聚離胺酸(PLL)、聚 L-天冬胺酸、聚 L-麩胺酸、苯乙烯-馬來酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-馬來酸酐共聚物、N-(2-羥基丙基)甲基丙烯醯胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚胺酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-異丙基丙烯醯胺聚合物、或聚磷吡。聚醯胺之實例係包括：聚乙烯基亞胺、聚離胺酸(PLL)、精胺、亞精胺、聚胺、偽肽-聚胺、類肽聚胺、樹枝狀聚胺、精胺酸、脘、精蛋白、陽離子脂質、陽離子吡啶、聚胺之四級鹽、或 α -螺旋肽。

【0323】 配位子亦可包括靶向基團，如細胞或組織靶向劑，如凝集素、糖蛋白、脂質或蛋白質，如抗體，其係結合至具體之細胞類型如腎細胞。靶向基團可係促甲狀腺素、促黑素、凝集素、糖蛋白、界面活性劑蛋白 A、黏蛋白碳水化合物、多價乳糖、多價半乳糖、N-乙醯基半乳糖胺、N-乙醯基葡萄糖胺、多價甘露糖、多價海藻糖、糖基化之聚胺基酸、多價半乳糖、運鐵蛋白、雙磷酸鹽、聚麩胺酸鹽、聚天冬胺酸鹽、脂質、膽固醇、類固醇、膽汁酸、葉酸、維生素 B12、維生素 A、生物素、或 RGD 肽或 RGD 肽模擬物。

【0324】 於一態樣中，該配位子係去唾液酸糖蛋白受體配位子。本文中所使用之「去唾液酸糖蛋白受體配位子」或「ASGPR 配位子」係一種配位子，如碳水化合物配位子(下文檢討)，其係令本發明之 dsRNA 劑以肝細胞為靶

標。於某些態樣中，該配位子係一種或多種半乳糖，如，N-乙醯基半乳糖胺 (GalNAc) 或一種或多種 GalNAc 衍生物。

【0325】 配位子之其他實例係包括染料、插入劑 (如，吡啶類)、交聯劑 (如，補骨脂素、絲裂黴素 C)、卟啉類 (TPPC4、塔克沙菲瑞 (texaphyrin)、沙菲瑞 (Sapphyrin))、多環芳香族烴類 (如，啡咾、二氫啡咾)、人工核酸內切酶 (如，EDTA)、親脂性分子 (如，膽固醇、膽酸、金剛烷乙酸、1-萘丁酸、二氫翠酮、1,3-雙-O-(十六烷基)甘油、香葉基氧己基、十六烷基甘油、茨醇、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕櫚酸、肉豆蔻酸、O3-(油醯基)石膽酸、O3-(油醯基)膽烯酸、二甲氧基三苯甲基、或啡啶) 及肽接合物 (如，黑複果蠅觸足肽、Tat 肽)、烷基化劑、磷酸酯、胺基、巰基、PEG (如，PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚胺基、烷基、經取代之烷基、放射標記之標記物、酶、半抗原 (如，生物素)、運輸/吸收促進因子 (如，阿司匹林、維生素 E、葉酸)、合成核糖核酸酶 (如，咪唑、雙咪唑、組胺、咪唑簇、吡啶-咪唑接合物、四氫雜大環類之 Eu³⁺錯合物)、二硝基苯基、HRP、或 AP。

【0326】 配位子可係蛋白質如糖蛋白，或肽如具有與共配位子之特異親和性的分子，或抗體如結合至具體之細胞類型如肝細胞的抗體。配位子亦可包括激素及激素受體。他們亦可包括非肽者，如脂質、凝集素類、碳水化合物類、維生素類、輔因子類、多價乳糖、多價半乳糖、N-

乙醯基半乳糖胺、N-乙醯基葡萄糖胺、多價甘露糖、或多價海藻糖。該配位子可係，舉例而言，脂多醣、p38 MAP 激酶之活化因子、或 NF- κ B 之活化因子。

【0327】 該配位子可係一物質，如可藉由諸如打斷細胞之細胞骨架，如藉由打斷細胞之微管、微絲、或中間絲而增加該 iRNA 劑至細胞內之攝取的藥物。該藥物可係，舉例而言，紫杉醇、長春新鹼、長春鹼、細胞鬆弛素、諾考達啞(nocodazole)、促微絲聚合劑(japlakinolide)、拉春庫林(latrunculin A)、鬼筆環肽(phalloidin)、海洋苔蘚素(swinholide) A、茛滿諾星(indanocine)、或肌基質蛋白(myoservin)。

【0328】 一些態樣中，如本文中揭示者附接至 iRNA 之配位子係藥物動力學調節因子(PK 調節因子)。PK 調節因子係包括親脂物、膽汁酸、類固醇、磷脂類似物、肽、蛋白結合劑、PEG、維生素等。例示性 PK 調節因子係包括，但不限於，膽固醇、脂肪酸、膽酸、石膽酸、二烷基甘油酯、二醯基甘油酯、磷脂質、神經脂質、萘普生(naproxen)、布洛芬(ibuprofen)、維生素 E、生物素。亦習知，包含大量硫代磷酸酯鏈結之寡核苷酸係結合至血清蛋白，故於骨幹中包含多個硫代磷酸酯鏈結之短核苷酸如約 5 個鹼基、10 個鹼基、15 個鹼基、或 20 個鹼基之寡核苷酸亦可作為本發明中之配位子(如，作為 PK 調節配位子)。此外，結合血清組分(如，血清蛋白)之適配體亦適合作為 PK 調節配位子用於本文所揭示之態樣中。

【0329】 本發明之接合配位子之 iRNA 可藉由使用承載側鏈反應性官能基之寡核苷酸而合成，該寡核苷酸例如自附接鏈結分子於該寡核苷酸而衍生者(揭示於下)。這一反應性寡核苷酸可直接與可商購之配位子、合成為承載多種保護基團之任一者的配位子、或具有附接於其之鏈結部分的配位子反應。

【0330】 於本發明之接合物中使用之寡核苷酸可透過習知之固相合成技術便利且常規地合成。用於此合成之設備係由若干供應商販售，該供應商係包括，舉例而言，應用生物系統公司 (Applied Biosystems®(Foster City, Calif.))。可額外或另行採用該技藝中習知之用於此合成之任何其他方法。亦習知，使用相似之技術製備其他寡核苷酸，如該硫代磷酸酯及烷基化之衍生物。

【0331】 於本發明之接合配位子之 iRNA 及承載配位子分子的序列特異性鏈結之核苷酸中，可使用標準核苷酸或核苷前驅物、或已經承載鏈結部分之核苷酸或核苷接合物前驅物、或已經承載該配位子分子之配位子-核苷酸或核苷接合物、或承載非核苷配位子之構件模塊而將該寡核苷酸及寡核苷可組裝於適當之 DNA 合成器。

【0332】 當使用已經承載鏈結部分之核苷酸接合物前驅物時，該序列特異性鏈結之核苷的合成典型係完全，且該配位子分子隨後係與鏈結部分反應以形成接合配位子之寡核苷酸。一些態樣中，本發明之寡核苷酸或經鏈結之核苷係藉由使用自配位子-核苷接合物以及可商購且可於

寡核苷酸合成中便利使用之標準亞磷醯胺及非標準亞磷醯胺的自動合成器合成。

【0333】

A. 脂質接合物

於某些態樣中，該配位子或接合物係脂質或脂質系分子。此脂質或脂質系分子較佳係結合至血清蛋白，如人血清白蛋白(HSA)。HAS 結合配位子係容許接合物分配至靶標組織，如身體之非腎臟靶標組織。舉例而言，該靶標組織可係肝臟，包括肝臟之實質細胞。亦可使用可結合 HAS 之其他分子作為配位子。舉例而言，可使用萘普生或阿司匹林。脂質或脂質系配位子可 (a) 增加對於該接合物之降解的抗性，(b) 增加靶向或運輸至靶標細胞或細胞膜內，或(c) 可用以調節至血清蛋白如 HAS 之結合。

【0334】 脂質系配位子可用以抑制，如調控該接合物至靶標組織之結合。舉例而言，更強地結合至 HAS 之脂質或脂質系配位子將會更不可能以腎臟為靶標，並因此更不可能從身體清除。不太強地結合至 HAS 之脂質或脂質系配位子可用以令該接合物以腎臟為靶標。

【0335】 於某些態樣中，該脂質系配位子係結合 HAS。較佳地，其係以足夠之親和性結合 HAS，因此該接合物較佳將係分配至非腎臟之組織。惟，較佳係該親和力不足夠強，故該 HSA-配位子結合係不可逆。

【0336】 於其他態樣中，該脂質系配位子係與 HAS 弱結合或完全不結合，因此，該接合物較佳將分配至腎臟。

其他以腎細胞為靶標之部分亦可用來替換該脂質系配位子，或除使用該脂質系配位子外亦使用該其他部分。

【0337】 另一方面，該配位子係由靶標細胞如增殖細胞攝取之部分，如維生素。此等係尤其有用於治療以非所欲之細胞增殖如惡性或非惡性類型細胞如癌細胞之增殖為特徵的病變。例示性維生素係包括維生素 A、E、及 K。其他例示性微生物係 B 族微生物，如葉酸、B12、核黃素、生物素、吡哆醛、或其他維生素，或被靶標細胞如肝細胞攝取之其他維生素或營養物。亦包括 HAS 及低密度脂蛋白 (LDL)。

【0338】

B. 細胞滲透劑

另一方面，該配位子係細胞滲透劑，較佳係螺旋狀細胞滲透劑。較佳地，該劑係兩性。例示性劑係肽，如 tat 或果蠅觸足肽 (antennopedia)。若該劑係肽，其可經修飾，包括擬肽、反轉異構物、非肽或假肽鏈結，以及使用 D-胺基酸者。該螺旋狀劑較佳係 α -螺旋狀劑，其較佳係具有親脂相及疏脂相。

【0339】 該配位子可係肽或擬肽。擬肽 (本文中亦指稱為寡擬肽) 係能折疊為所定義之與天然肽類似的三維結構。肽及擬肽至 iRNA 劑之附接可影響 iRNA 之藥物動力學之分配，如藉由提升細胞識別及吸收。該肽或擬肽部分可係約 5 至 50 個胺基酸之長度，如，約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、或 50 個胺基酸之長度。

【0340】 肽或擬肽可係，舉例而言，細胞滲透肽、陽離子肽、兩性肽、或疏水性肽(如，主要由 Tyr、Trp、或 Phe 組成)。該肽部分可係二聚體肽、約束肽或交聯肽。於另一選擇中，該肽部分可包括疏水性膜轉位序列(MTS)。例示性之含疏水性 MTS 的肽係具有胺基酸序列 AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:29)之 RFGF。含有疏水性 MTS 之 RFGF 類似物(如，胺基酸序列 AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:30))亦可係靶向部分。該肽部分可係「輸送」肽，其可攜帶大的極性分子穿越細胞膜，該大的極性分子係包括肽、寡核苷酸、及蛋白質。舉例而言，業經發現，來自 HIV Tat 蛋白之序列(GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:31)及果蠅觸足肽(*Drosophila Antennapedia*)蛋白之序列(RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:32)能作為輸送肽而發揮功能。肽或擬肽可藉由 DNA 之隨機序列編碼，如從噬菌體展示庫、或一珠一物(OBoc)組合庫中鑒定之肽(Lam *et al.*, *Nature*, 354:82-84, 1991)。經由用於細胞靶向目的之合併之單體單元而繫帶至 dsRNA 劑之肽或擬肽的實例係精胺酸-甘胺酸-天冬胺酸(RGD)肽，或 RGD 模擬物。肽部分之長度可係自約 5 個胺基酸至約 40 個胺基酸之範圍。該等肽部分可具有結構性修飾，以諸如增加安定性或引導構象性特性。可使用下揭之任何結構性修飾。

【0341】 於本發明之組成物及方法中使用之 RGD 肽可係線性或環狀，且可經修飾，如糖基化或甲基化，以促進其至特定組織之靶向。含有 RGD 之肽及擬肽可包括 D-

胺基酸，以及合成性 RGD 模擬物。除 RGD 之外，亦可使用以整合素配位子為靶標之其他部分。此配位子之接合物較佳係以 PECAM-1 或 VEGF 為靶標。

【0342】 「細胞滲透肽」能滲透細胞，如，微生物細胞如細菌或真菌細胞，或哺乳動物細胞如人細胞。微生物細胞滲透肽可係，舉例而言， α -螺旋線性肽(如，LL-37 或天蠶抗菌肽(Ceropin) P1)、含二硫鍵之肽(如， α -防禦素、 β -防禦素或牛抗菌肽(bactenecin))、或僅含有一種或兩種支配性胺基酸之肽(如，PR-39 或鹼性抗菌肽(indolicidin))。細胞滲透肽亦可包括核定位訊號(NLS)。舉例而言，細胞滲透肽可係由兩部分構成之兩性肽，如 MPG，其係衍生自 HIV-1 gp41 之融合肽域及 SV40 大 T 抗原之 NLS (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003)。

【0343】

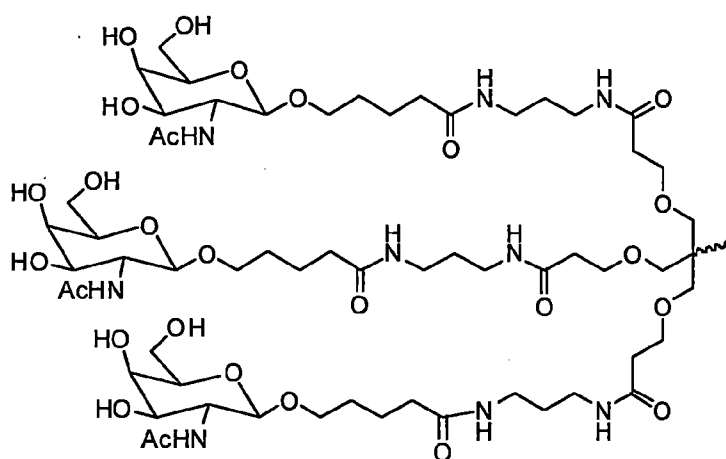
C. 碳水化合物接合物

於本發明之組成物及方法的一些態樣中，iRNA 復包含碳水化合物。該接合碳水化合物接合物之 iRNA 自核酸之體內輸送方面有優勢，且該組成物係適用於體內治療用途，如本文所述。本文中使用的「碳水化合物」係指稱一化合物，其或為碳水化合物自身，由一個或多個具有至少 6 個碳原子(其可係線性、分支鏈或環狀)且氧、氮或硫原子鍵結至各碳原子之單糖單元作成；或其一部分為碳水化合物部分的化合物，由一個或多個各自具有至少 6 個碳原子(其可係線性、分支鏈或環狀)且氧、氮或硫原子鍵結至各

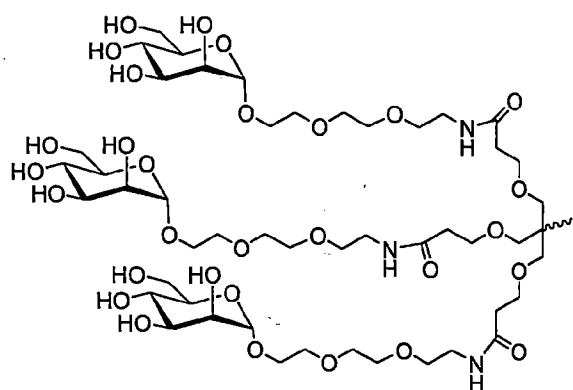
碳原子之單糖單元作成。代表性碳水化合物係包括糖類(單糖、二醣、三醣、及含有約 4、5、6、7、8、或 9 個單糖單元之寡醣)、及多醣如澱粉、糖原、纖維素及多醣膠。具體之單糖係包括 C5 及以上(如, C5、C6、C7、或 C8)糖類; 二醣及三醣係包括具有兩個或三個單糖單元(如, C5、C6、C7、或 C8)之糖類。

【0344】 於某些態樣中, 用於本發明之組成物及方法中的碳水化合物接合物係單糖。

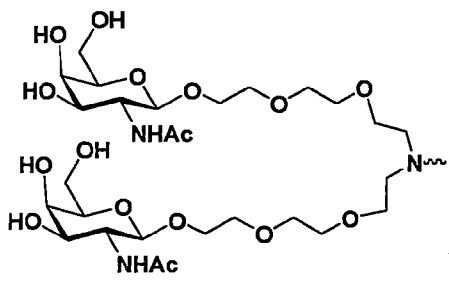
【0345】 於一態樣中, 用於本發明之組成物及方法中的碳水化合物接合物係選自下列所組成之群組:



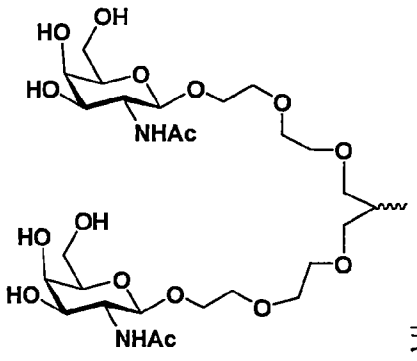
式 II ;



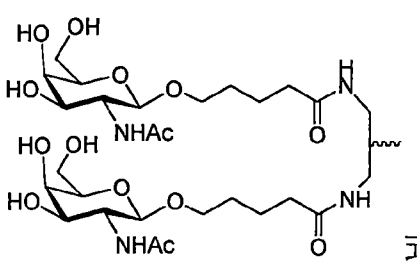
式 III ;



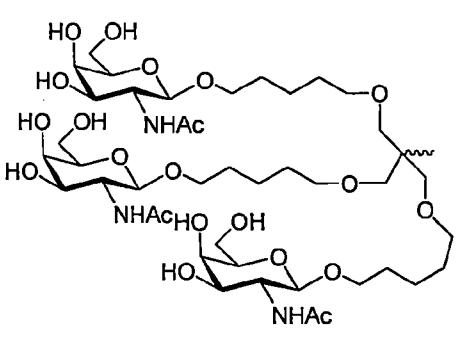
式 IV ;



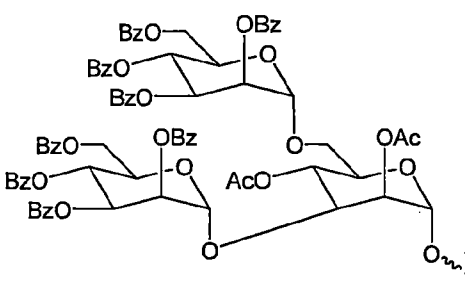
式 V ;



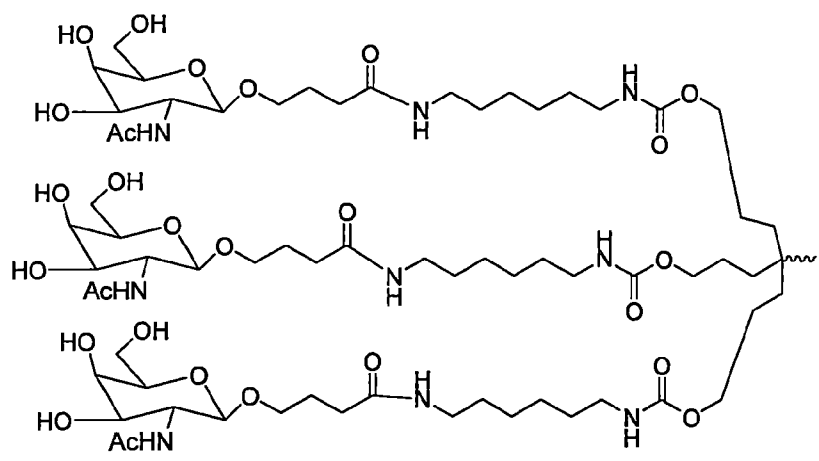
式 VI ;



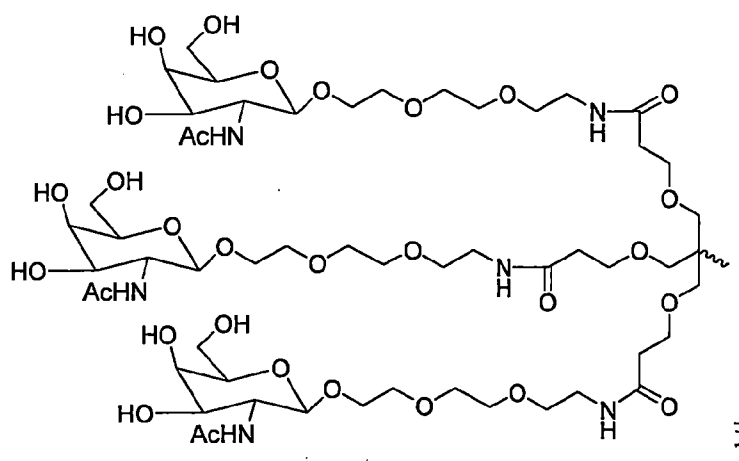
式 VII ;



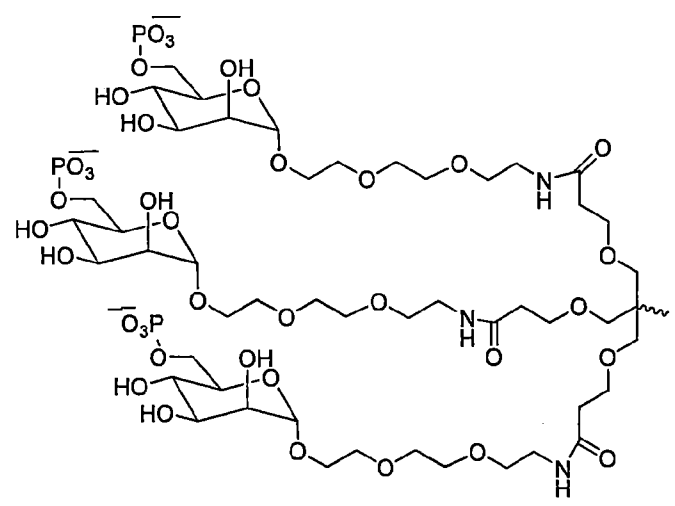
式 VIII ;



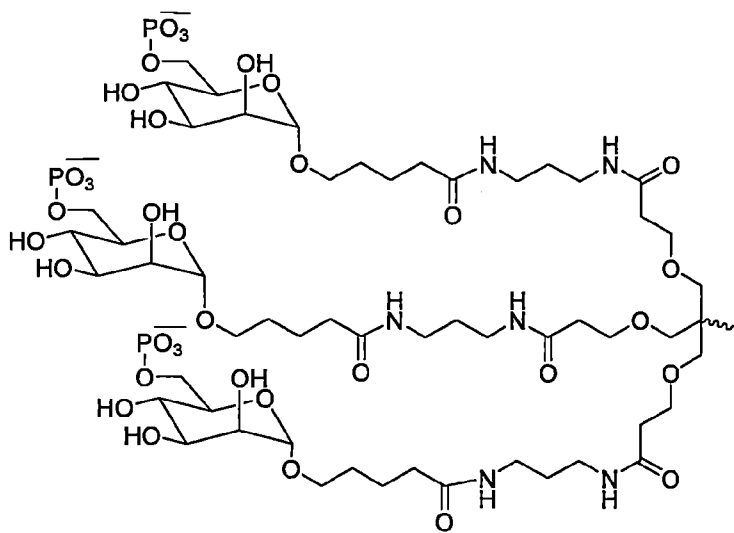
式 IX ;



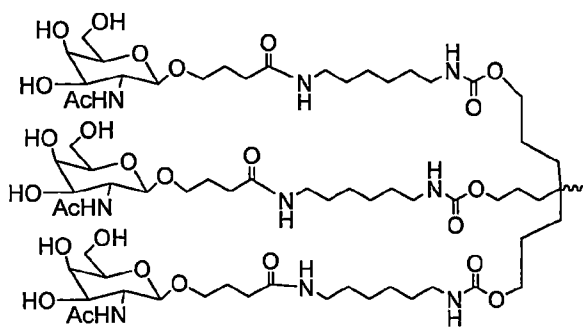
式 X ;



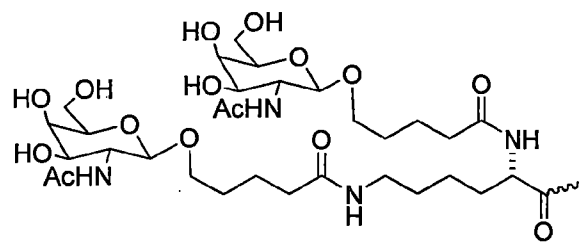
式 XI ;



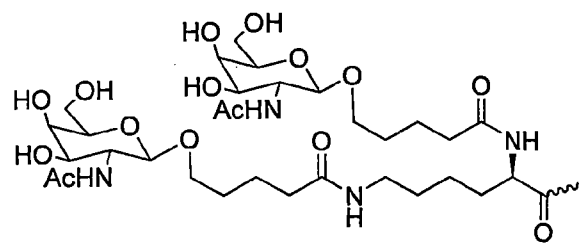
式 XII ;



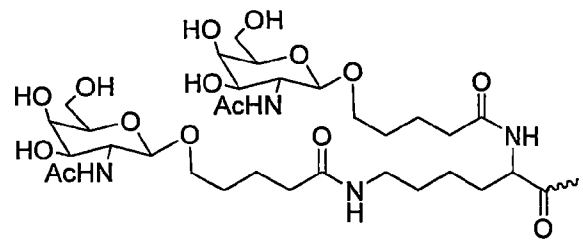
式 XIII ;



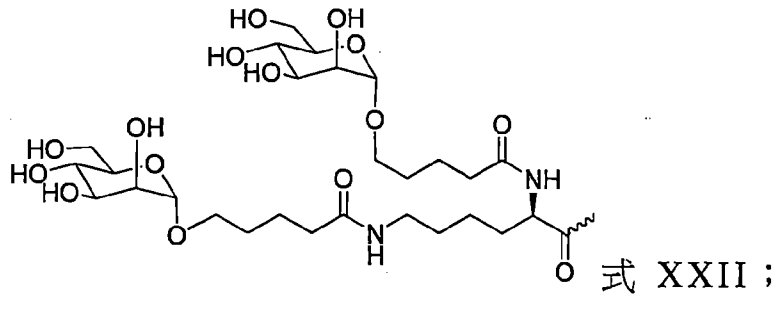
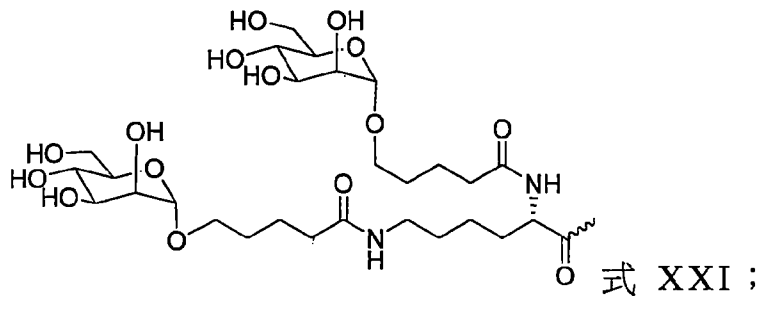
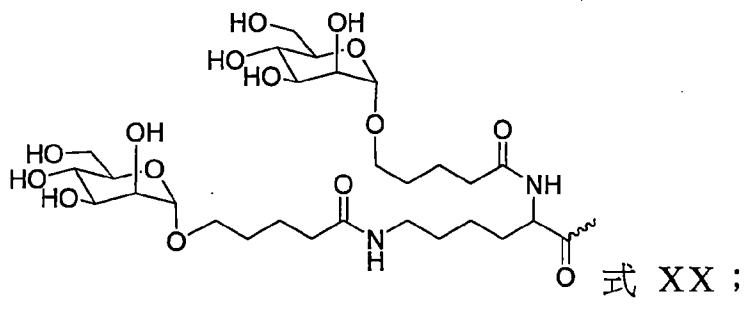
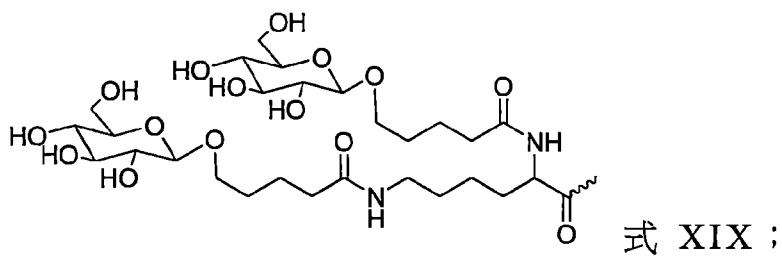
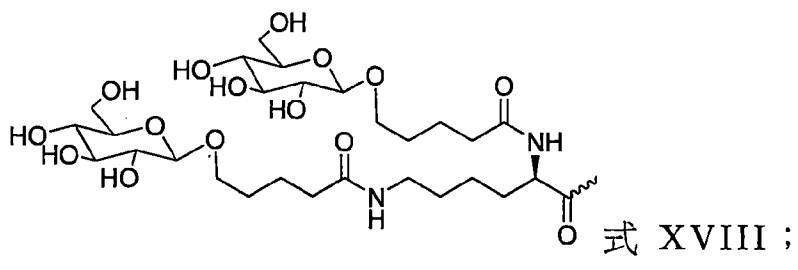
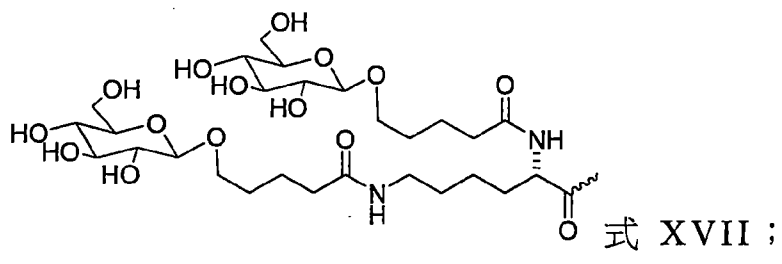
式 XIV ;

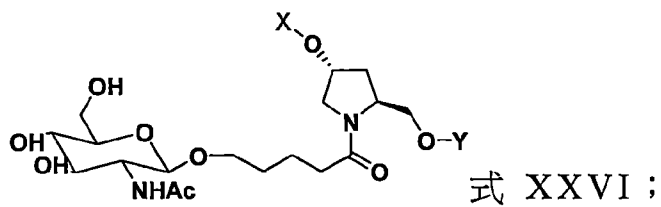
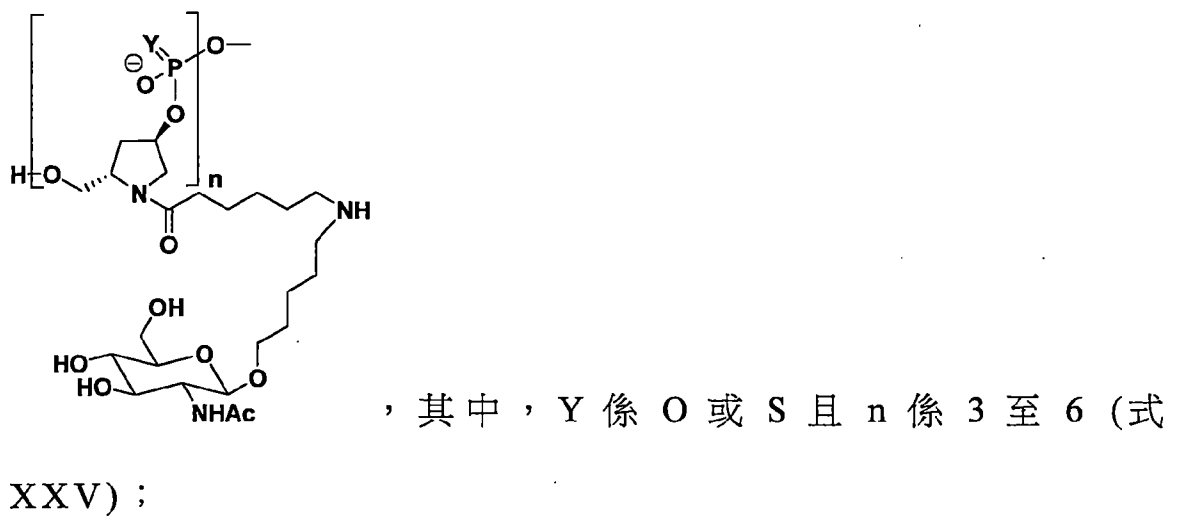
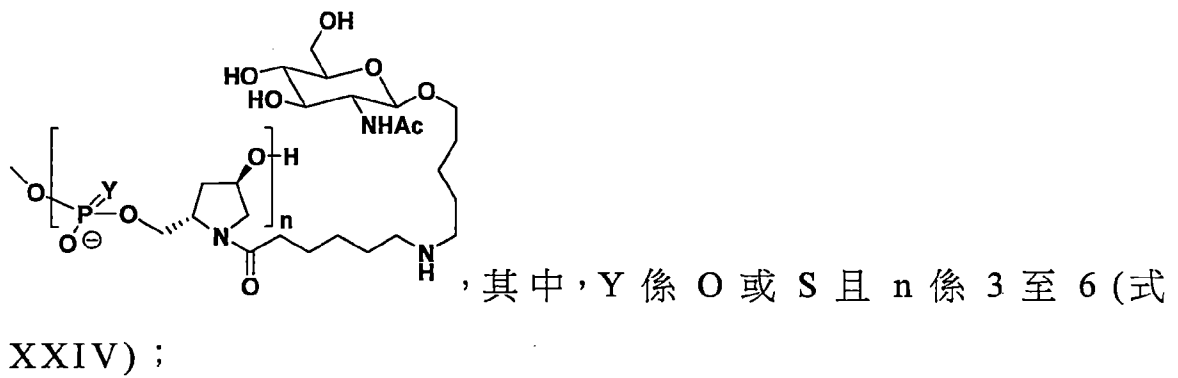
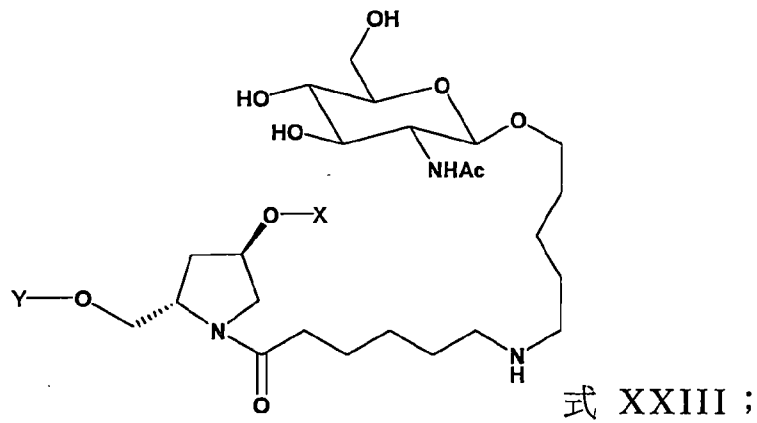


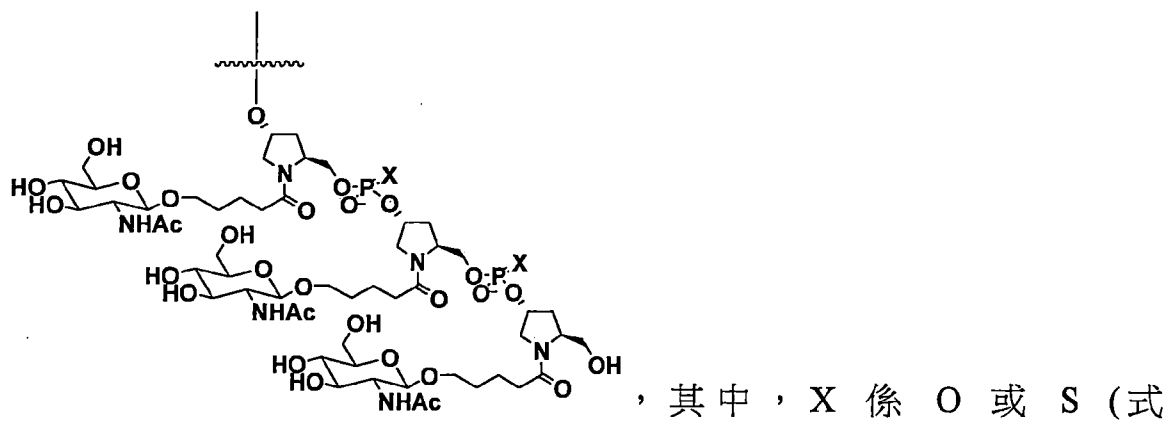
式 XV ;



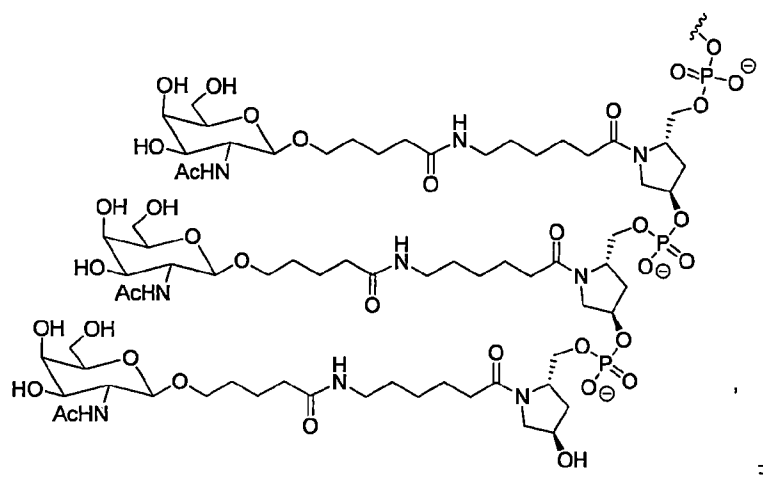
式 XVI ;



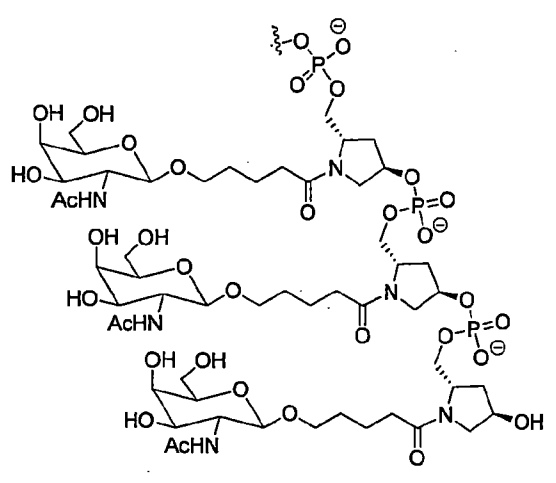




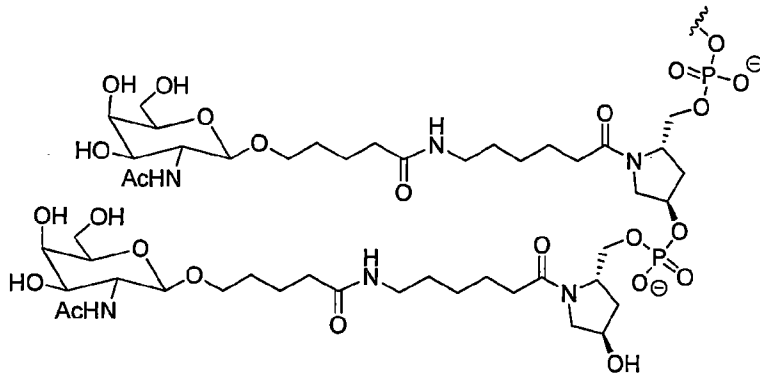
XXVII) ;



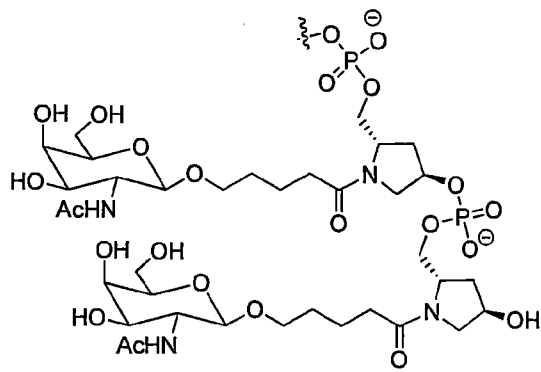
式 XXVII ;



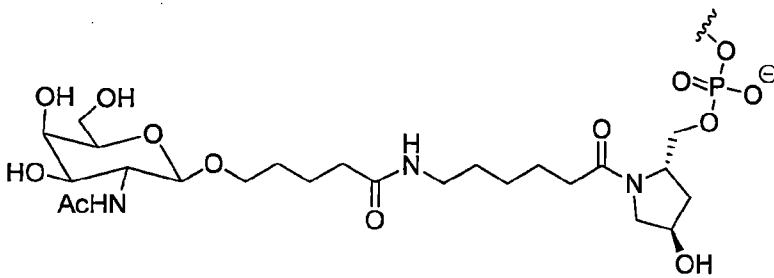
式 XXIX ;



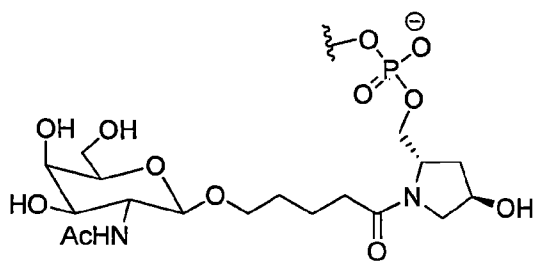
式 XXX ;



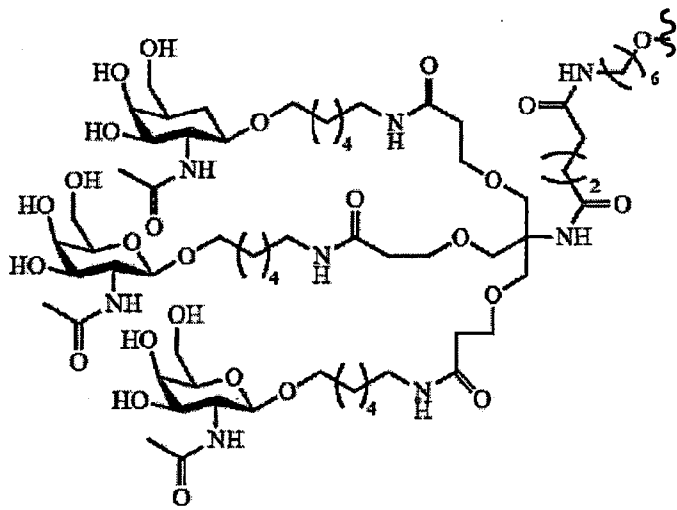
式 XXXI ;



式 XXXII ;

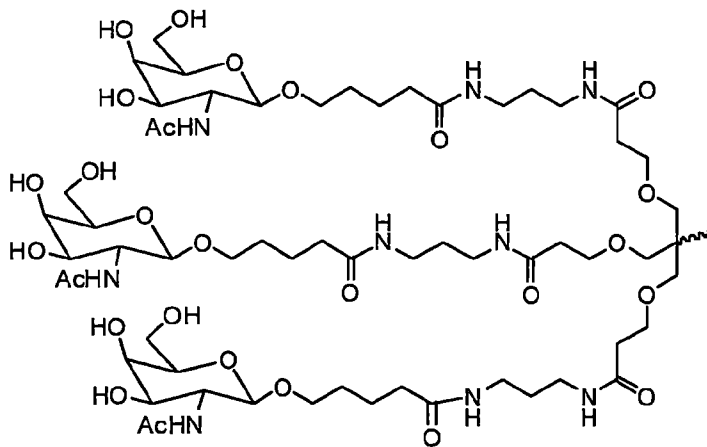


式 XXXIII ; 以及



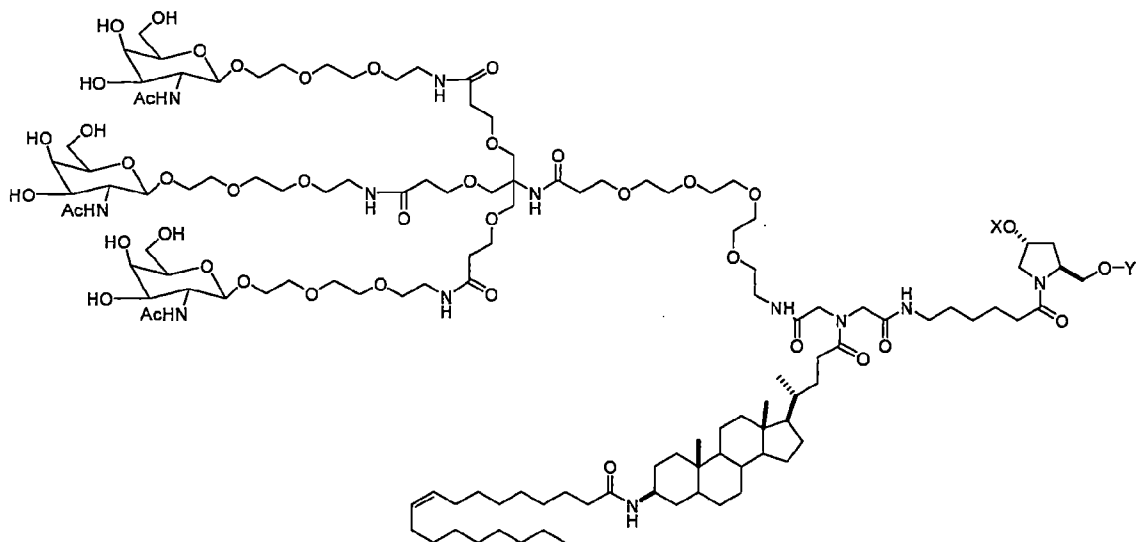
式 XXXIV。

【0346】 另一態樣中，用於本發明之組成物及方法之碳水化合物接合物係單糖。於一態樣中，該單糖係 N-乙醯基半乳糖胺，如



式 II。

【0347】 於本文中揭示之態樣中使用之另一代表性碳水化合物接合物係包括，但不限於，



(式 XXXVI)，當 X 或 Y 之一者係寡核苷酸時，另一者係氫。

【0348】 於本發明之某些態樣中，該 GalNAc 或 GalNAc 衍生物係經由單價鏈結基而附接至本發明之 iRNA 劑。一些態樣中，該 GalNAc 或 GalNAc 衍生物係經由二價鏈結基而附接至本發明之 iRNA 劑。於本發明之再其他態樣中，該 GalNAc 或 GalNAc 衍生物係經由三價鏈結基而附接至本發明之 iRNA 劑。

【0349】 於一態樣中，本發明之雙股 RNAi 劑係包含一個 GalNAc 或 GalNAc 衍生物，其係附接至該 iRNA 劑，如 dsRNA 劑之正義股的 5'端、或雙靶標 RNAi 劑之一個或兩個正義股的 5'端，如本文中揭示。另一態樣中，本發明之雙股 RNAi 劑係包含複數個(如，2、3、4、5、或 6 個) GalNAc 或 GalNAc 衍生物，其係透過複數個單價鏈結基而各自獨立附接至雙股 RNAi 劑之複數個核苷酸。

【0350】 一些態樣中，舉例而言，當本發明之 iRNA 劑的兩股係一個較大分子的一部分且該較大分子係藉由不間斷之核苷酸鏈而於一股之 3'端與各自另一個之 5'端之間

連結以形成包含複數個未配核苷酸對之髮夾環圈時，該髮夾環中每一未配對之核苷酸可獨立包含經由單價之鏈結基而附接之 GalNAc 或 GalNAc 衍生物。

【0351】 一些態樣中，該碳水化合物接合物復包含一個或多個上揭之其他配位子，例如，但不限於，PK 調節子或細胞滲透肽。

【0352】 適用於本發明之額外之碳水化合物接合物及鏈接基係包括彼等於第 WO 2014/179620 號及第 WO 2014/179627 號 PCT 申請案中揭示者，該等申請案各自之整體內容係藉由引用而併入本文。

【0353】

D. 鏈結基

一些態樣中，本文中揭示之接合物或配位子可附接至 iRNA 寡核苷酸，且該寡核苷酸係具有多個可裂解或不可裂解之鏈結基。

【0354】 術語「鏈結基」或「鏈結基團」係意指連結化合物之兩個部分的有機體，如，共價附接化合物之兩個部分。鏈結基典型係包含直接鏈結或原子如氧或硫；單元如 NR₈、C(O)、C(O)NH、SO、SO₂、SO₂NH 或原子之鏈，例如，但不限於，經取代或未經取代之烷基、經取代或未經取代之烯基、經取代或未經取代之炔基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、雜芳基烷基、雜芳基烯基、雜芳基炔基、雜環基烷基、雜環基烯基、雜環基炔基、芳基、雜芳基、雜環基、環烷基、環烯基、烷基芳基烷基、烷基芳基

烯基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基雜芳基烷基、烷基雜芳基烯基、烷基雜芳基炔基、烯基雜芳基烷基、烯基雜芳基烯基、烯基雜芳基炔基、炔基雜芳基烷基、炔基雜芳基烯基、炔基雜芳基炔基、烷基雜環基烷基、烷基雜環基烯基、烷基雜環基炔基、烯基雜環基烷基、烯基雜環基烯基、烯基雜環基炔基、炔基雜環基烷基、炔基雜環基烯基、炔基雜環基炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基雜芳基、烯基雜芳基、炔基雜芳基，其中，一個或多個亞甲基可由 O、S、S(O)、SO₂、N(R8)、C(O)、經取代或未經取代之芳基、經取代或未經取代之雜芳基、或經取代或未經取代之雜環基中斷或封端；其中，R8 係氫、鹼基、脂肪族基、或經取代之脂肪族基。於一態樣中，該鏈結基係約 1 至 24 個原子、2 至 24、3 至 24、4 至 24、5 至 24、6 至 24、6 至 18、7 至 18、8 至 18、7 至 17、8 至 17、6 至 16、7 至 17、或 8 至 16 個原子。

【0355】 可裂解之鏈結基團係於細胞外部足夠安定者，但其一旦進入靶標細胞即裂解以釋放由該鏈結基保持在一起之兩個部分。於一較佳態樣中，該可裂解之基團於靶標細胞或於第一參考條件(其可例如經選擇以模擬或代表細胞內條件)下之裂解係較之於個體之血液中或於第二參考條件(例如，其可經選擇以模擬或代表於血液或血清中發現之條件)下之裂解快至少約 10 倍、20 倍、30 倍、40

倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、或更高、或至少 100 倍。

【0356】 可裂解之鏈結基團係易受裂解劑，如 pH、氧化還原電位、或降解性分子之存在之影響。通常，裂解劑在細胞內部比血清或血液中更普遍，或被發現在前者中具有更高之水準或活性。此類降解性劑之實例係包括：氧化還原劑，其係經選擇用於特定之受質或其係不具有受質特異性，包括，如，細胞內存在之氧化性或還原性酶、或還原性劑如硫醇，其可藉由還原反應而降解氧化還原可理解之基團；酯酶；可創建酸性環境之核內體或劑，如，彼等導致 5 或更低之 pH 者；可藉由作為一般性酸而作動以水解或降解酸可裂解之基團的酶、肽酶(其可係受質特異性)、及磷酸酶。

【0357】 可裂解之鏈結基團，如二硫鍵，係易受 pH 之影響。人血清之 pH 係 7.4，而細胞內之平均 pH 略低，為約 7.1 至 7.3 之範圍。核內體具有更為酸性之 pH，為 5.5 至 6.0 之範圍；而溶酶體則具有更為酸性之 pH，為 5.0 作用。一些鏈結基將會具有可裂解之鏈結基團，該鏈接基團於較佳之 pH 裂解，從而將陽離子脂質從該配位子釋放入細胞內，或釋放入該細胞之所欲之隔室內。

【0358】 鏈結基可包括可藉由特定酶而裂解可裂解之鏈結基團。併入鏈結基中之可裂解之鏈結基團的類型可取決於待作為靶標之細胞。舉例而言，肝靶向配位子可透過一包括酯基團之鏈結基而鏈結至陽離子脂質。肝細胞係

富含酯酶，因此，該鏈結基在肝細胞中將會比在並非富含酯酶之細胞類型中更有效地裂解。其他富含酯酶之細胞類型係包括非細胞、腎皮質細胞、及睪丸細胞。

【0359】 當靶向細胞類型係富含肽酶者如肝細胞及滑膜細胞時，可使用含有肽鍵之鏈結基。

【0360】 通常，可藉由測試降解性劑(或條件)裂解備選之可裂解之鏈結基團而評估該備選之鏈結基團的適用性。亦所欲者係，亦測試該備選之可裂解之鏈結基團於血液中或當與另一非靶標組織接觸時對抗裂解之能力。因此，可測定第一條件與第二條件之間裂解的相對易感性，其中，該第一條件係選擇為標示靶標細胞中之裂解，而第二條件係選擇為標示其他組織或生物流體如血液或血清中之裂解。該評估可於無細胞系統中、細胞內、細胞培養物中、器官或組織培養物中、或全動物體內進行。於無細胞或培養條件下作成初始評估並藉由在全動物體內之進一步評估予以證實，可能係有用者。於較佳之態樣中，可用之備選化合物與細胞內(或選擇為模擬細胞內條件之體外條件下)之裂解比血液或血清中(或選擇為模擬細胞外條件之體外條件下)之裂解快至少約 2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90、或 100 倍。

【0361】

i. 氧化還原可裂解之鏈結基團

於某些態樣中，可裂解之鏈結基團係氧化還原可裂解之鏈接基團，該鏈接基團於還原或氧化時裂解。還原性可

裂解之鏈結基團的實例係二硫鏈結基團(-S-S-)。為了測定備選之可裂解之鏈結基團是否適用於「還原性可裂解之鏈結基團」，或舉例而言，適用於與可預期用於本文中揭示之方法的特定之 iRNA 部分及特定之靶向劑合用。舉例而言，可藉由使用二硫蘇糖醇(DTT)或使用該技藝中習知之試劑之其他還原劑而評估備選物，其係模擬將會在細胞如靶標細胞內觀察到之裂解。該等備選物亦可於選擇為模擬血液或血清條件之條件下評估。一個態樣中，備選之化合物於血液中係裂解至多約 10%。其他態樣中，可用之備選化合物於細胞內(或選擇為模擬細胞內條件之體外條件)之降解比血液中(或選擇為模擬細胞外條件之體外條件下)之降解快至少約 2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90、或約 100 倍。可使用標準酶動力學檢驗在選擇為模擬細胞內介質中測定備選化合物之裂解速率，并與選擇為模擬細胞外介質之條件下測得者比較。

【0362】

ii. 磷酸酯系可裂解之鏈結基團

其他態樣中，可裂解之鏈結基係包含磷酸酯系可裂解之鏈結基團。磷酸酯系可裂解之鏈結基團係藉由降解或水解該磷酸酯基團之劑裂解。於細胞內裂解磷酸酯基團之劑的實例係酶，如細胞內之磷酸酶。磷酸酯系鏈結基團之實例係 -O-P(O)(ORk)-O-、-O-P(S)(ORk)-O-、-O-P(S)(SRk)-O-、-S-P(O)(ORk)-O-、-O-P(O)(ORk)-S-、-S-P(O)(ORk)-S-、-O-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(ORk)-O-、-O-P(O)(Rk)-O-、

-O-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-O-、-S-P(S)(Rk)-O-、
 -S-P(O)(Rk)-S-、-O-P(S)(Rk)-S-。較佳之態樣係
 -O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、
 -S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、
 -O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、
 -O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O-、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-、
 及-O-P(S)(H)-S-。較佳之態樣係-O-P(O)(OH)-O-。此等備
 選物可使用與上揭之彼等類似之方法評估。

【0363】

iii. 酸可裂解之鏈結基團

另一個態樣中，可裂解之鏈結基係包含酸可裂解之鏈結基團。酸可裂解之鏈結基團係於酸性條件下裂解之鏈結基團。於較佳之態樣中，酸可裂解之鏈結基團係於 pH 為約 6.5 或更低(如，約 6.0、5.5、5.0、或更低)之酸性條件下裂解，或藉由可作為一般性酸而作動之劑如酶裂解。於細胞中，特異性低 pH 細胞器，如核內體及溶酶體，可向酸可裂解之鏈結基團提供裂解環境。酸可裂解之鏈結基團的實例係包括但不限於脙類、酯類、及胺基酸之酯類。酸可了解之基團可具有通式-C=NN-、C(O)O、或-OC(O)。較佳之態樣係，當碳附接至酯之氧(烷氧基)時，芳基、經取代之烷基、或第三烷基如二甲基戊基或第三丁基。此等備選物可使用與上揭之彼等類似之方法評估。

【0364】

iv. 酯系鏈結基團

於其他態樣中，可裂解之鏈結基係包含酯系可裂解之鏈結基團。酯系可裂解之鏈結基團係藉由細胞內之酶如酯酶及醯胺酶裂解。酯系可裂解之鏈結基團的實例係包括，但不限於，伸烷基之酯類、伸烯基之酯類、及伸炔基之酯類。酯可裂解之鏈結基團係具有通式 $-C(O)O-$ 、或 $-OC(O)-$ 。此等備選物可使用與上揭之彼等類似之方法評估。

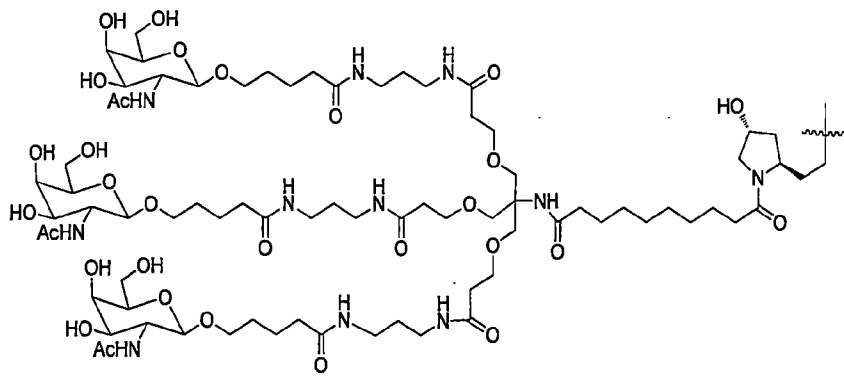
【0365】

v. 肽系可裂解基團

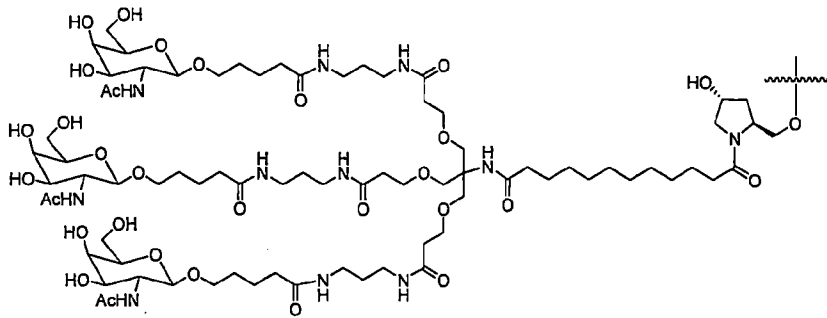
於再其他之態樣中，可裂解之鏈結基係包括肽系可裂解之鏈結基團。肽系可裂解之鏈結基團係藉由細胞內之酶如肽酶及蛋白酶裂解。肽系可裂解之鏈結基團係於胺基酸之間形成以獲得寡肽(如，二肽、三肽等)及多肽之肽鍵。肽系可裂解之基團並不包括醯胺基團 $(-C(O)NH-)$ 。該醯胺基團可形成於任何伸烷基、伸烯基或伸炔基之間。肽鍵係形成於胺基酸之間以獲得肽及蛋白質的具體類型之醯胺鍵。肽系可裂解基團通常係限制為形成於胺基酸之間而獲得肽及蛋白的肽鍵(亦即，醯胺鍵)且並不包括整個醯胺官能基。肽系可裂解之鏈結基團係具有通式 $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ ，其中，RA 及 RB 係兩個相鄰胺基酸之 R 基團。此等備選物可使用與上揭之彼等類似之方法評估。

【0366】 一些態樣中，本發明之 iRNA 係透過鏈結基接合至碳水化合物。本發明之組成物及方法之具有鏈結基之 iRNA 碳水化合物接合物的非限制性實例係包括，但不

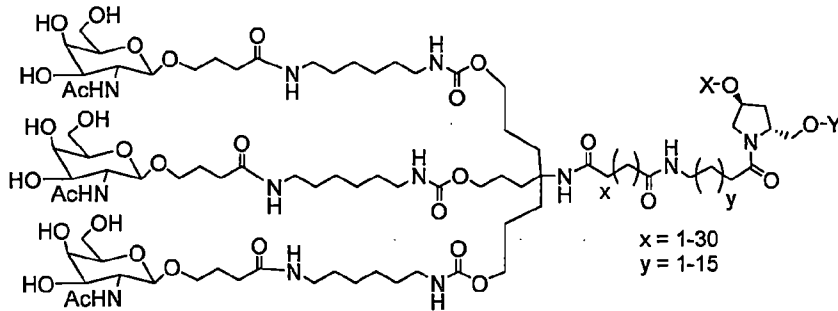
包括，



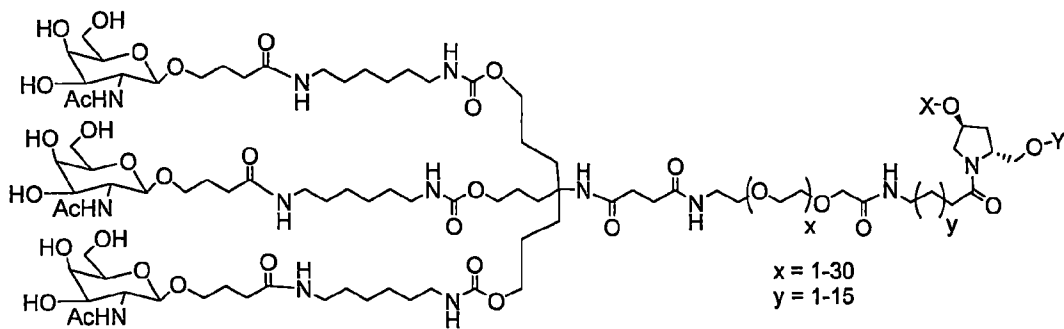
(式 XXXVII)、



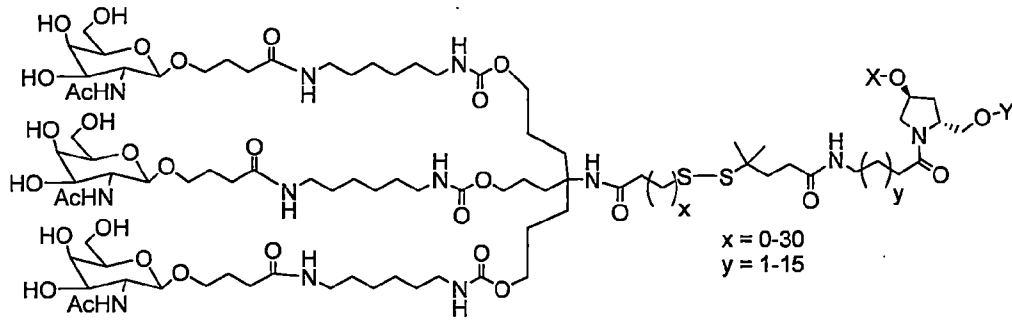
(式 XXXVIII)、



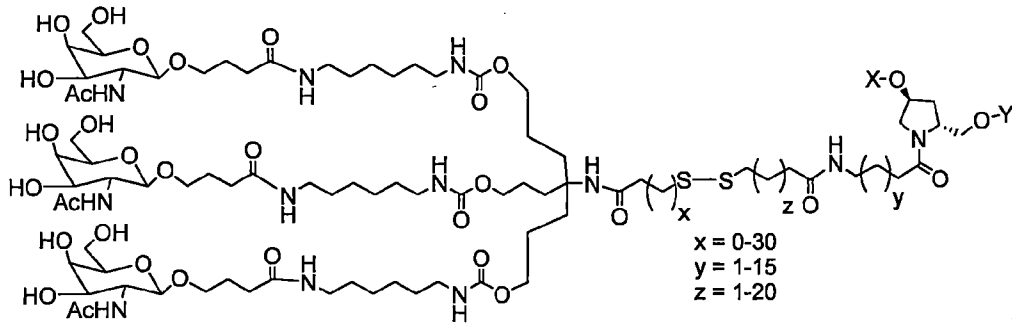
(式 XXXIX)、



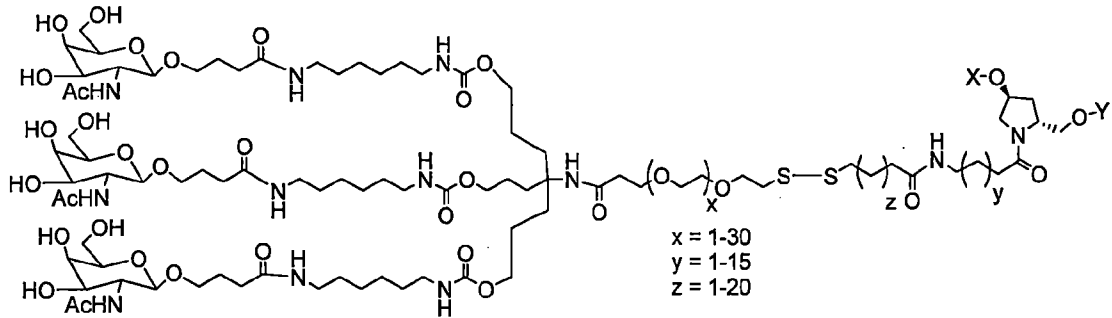
(式 XL)、



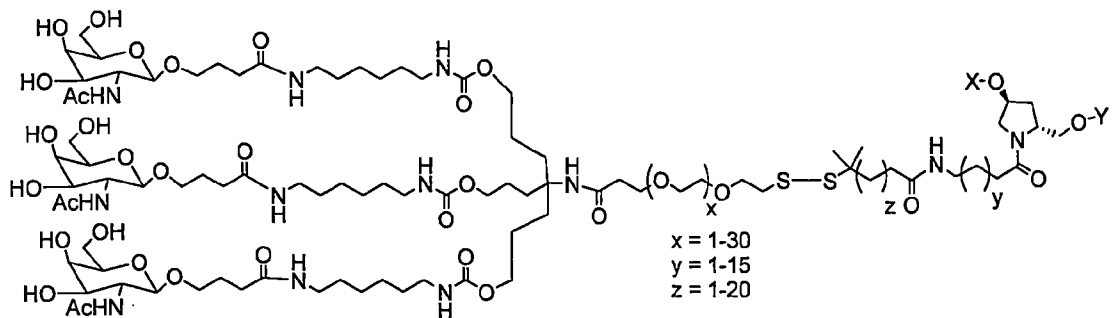
(式 XLI) 、



(式 XLII) 、



(式 XLIII) 、 及



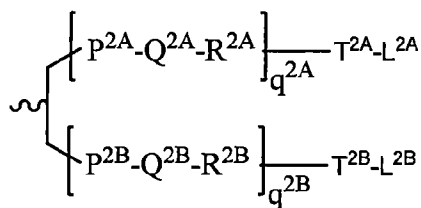
(式 XLIV) ， 當 X 或 Y 之一者為寡核苷酸時， 另一者係氫。

【0367】 於本發明之組成物及方法之某些態樣中， 配位子係透過二價或三鍵之分支鏈鏈結基附接的一個或多

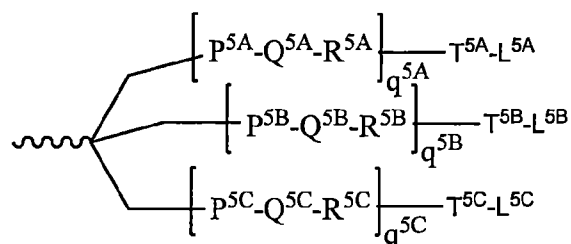
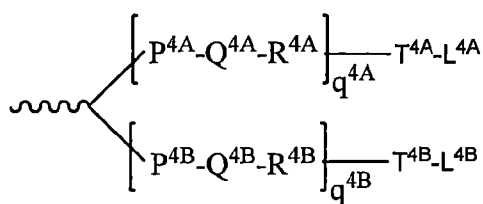
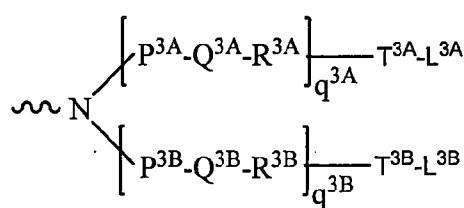
個「GalNAc」(N-乙醯基半乳糖胺)衍生物。

【0368】 於一態樣中，本發明之 dsRNA 係接合至選自式 (XLV) 至 (XLVI) 之任一者所示之結構所組成之群組的二價或三價分支鏈鏈結基：

式 XXXXV



式 XLVI



式 XLVII

式 XLVIII；

其中：

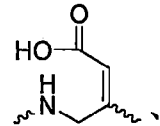
q^{2A} 、 q^{2B} 、 q^{3A} 、 q^{3B} 、 q^{4A} 、 q^{4B} 、 q^{5A} 、 q^{5B} 及 q^{5C} 於每次出現時係獨立表示 0 至 20，其中，該重複單元可係相同或相異；


P^{2A} 、 P^{2B} 、 P^{3A} 、 P^{3B} 、 P^{4A} 、 P^{4B} 、 P^{5A} 、 P^{5B} 、 P^{5C} 、 T^{2A} 、 T^{2B} 、 T^{3A} 、 T^{3B} 、 T^{4A} 、 T^{4B} 、 T^{5A} 、 T^{5B} 、 T^{5C} 於每次出現時係各自獨立為不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、 CH_2 、 CH_2NH 或 CH_2O ；

Q^{2A} 、 Q^{2B} 、 Q^{3A} 、 Q^{3B} 、 Q^{4A} 、 Q^{4B} 、 Q^{5A} 、 Q^{5B} 、 Q^{5C} 於每次出現係獨立為不存在、伸烷基、經取代之伸烷基，其

中，一個或多個亞甲基可藉由 O、S、S(O)、SO₂、N(RN)、C(R')=C(R'')、C≡C 或 C(O)之一者或多者中斷或封端；

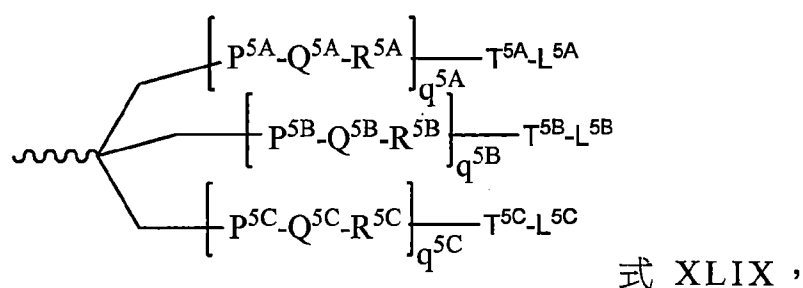
R^{2A}、R^{2B}、R^{3A}、R^{3B}、R^{4A}、R^{4B}、R^{5A}、R^{5B}、R^{5C} 於每次出現係獨立為不存在、NH、O、S、CH₂、C(O)O、C(O)NH、

NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、、

或雜

環基；

L^{2A}、L^{2B}、L^{3A}、L^{3B}、L^{4A}、L^{4B}、L^{5A}、L^{5B} 及 L^{5C} 係表示配位子，亦即，於每次出現時係各自獨立為單糖(如 GalNAc)、二糖、三糖、四糖、寡糖、或多糖；以及，R^a 係 H 或胺基酸側鏈。三價接合 GalNAc 衍生物係尤其有用於與 RNAi 劑合用，用於抑制靶標基因之表現，例如，式 (XLIX) 之彼等：



其中，L^{5A}、L^{5B} 及 L^{5C} 係表示單糖，如 GalNAc 衍生物。

【0369】 適當之接合 GalNAc 衍生物之二價及三價分支鏈鏈結基團的實例係包括，但不限於，上文中作為式 II、VII、XI、X、及 XIII 引述的結構。

【0370】 教示 RNA 接合物之製備的代表性美國專利係包括，但不限於，第 4,828,979 號、第 4,948,882 號、第 5,218,105 號、第 5,525,465 號、第 5,541,313 號、第 5,545,730 號、第 5,552,538 號、第 5,578,717 號、第 5,580,731 號、第 5,591,584 號、第 5,109,124 號、第 5,118,802 號、第 5,138,045 號、第 5,414,077 號、第 5,486,603 號、第 5,512,439 號、第 5,578,718 號、第 5,608,046 號、第 4,587,044 號、第 4,605,735 號、第 4,667,025 號、第 4,762,779 號、第 4,789,737 號、第 4,824,941 號、第 4,835,263 號、第 4,876,335 號、第 4,904,582 號、第 4,958,013 號、第 5,082,830 號、第 5,112,963 號、第 5,214,136 號、第 5,082,830 號、第 5,112,963 號、第 5,214,136 號、第 5,245,022 號、第 5,254,469 號、第 5,258,506 號、第 5,262,536 號、第 5,272,250 號、第 5,292,873 號、第 5,317,098 號、第 5,371,241 號、第 5,391,723 號、第 5,416,203 號、第 5,451,463 號、第 5,510,475 號、第 5,512,667 號、第 5,514,785 號、第 5,565,552 號、第 5,567,810 號、第 5,574,142 號、第 5,585,481 號、第 5,587,371 號、第 5,595,726 號、第 5,597,696 號、第 5,599,923 號、第 5,599,928 號、第 5,688,941 號、第 6,294,664 號、第 6,320,017 號、第 6,576,752 號、第 6,783,931 號、第 6,900,297 號、第 7,037,646 號、及第 8,106,022 號美國專利，其各自之整體內容係藉由引用而併入本文。

【0371】 並非給定化合物中全部位置必需經均勻修飾，且事實上，超過一種前述之修飾可併入單一化合物中，

或甚至併入 iRNA 內之單一核苷處。本發明亦包括作為嵌合化合物之 iRNA 化合物。

【0372】 於本發明之前後文中，「嵌合」iRNA 化合物或「嵌合體」係 iRNA 化合物，較佳係 dsRNAi 劑，其係含有兩個或更多個化學上截然不同之區域，各區域係由至少一個單體單元作成，亦即，於 dsRNA 化合物之例子中的核苷酸。此等 iRNA 典型係含有至少一個區域，其中，該 RNA 係經修飾，以賦予該 iRNA 以增加之對於核酸酶降解之抗性、增加之細胞攝取、或增加之對於靶標核酸之結合親和性。該 iRNA 之額外之區域可用作用於能裂解 RNA:DNA 或 RNA:RNA 雜交體之受質。舉例而言，RNase H 係細胞之核酸內切酶，其係裂解 RNA:DNA 雙鏈之 RNA 股。因此，RNase H 之活化係導致該 RNA 靶標之裂解，從而極大增強對基因表現之 RNA 抑制的效率。結果，當使用嵌合 dsRNA 時，通常可使用較短之 iRNA 獲得與硫代磷酸酯去氧 dsRNA 雜交至相同靶標區域者相當之結果。RNA 靶標之裂解可藉由凝膠電泳以及，若需要，輔以該領域中習知之核酸雜交技術常規地偵檢之。

【0373】 於某些情形中，iRNA 之 RNA 可由非配位子基團修飾。大量非配位子分子業經接合至 iRNA，以增強該 iRNA 之活性、細胞分配或細胞攝取，且用於實施此接合之過程係可於科學文獻中獲得。此等非配位子部分係具有所包括之脂質部分，如膽固醇(Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553) 、 膽酸 (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053) 、 硫醚如己基-S-三苯甲基硫醇 (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306 ; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765) 、 硫代膽固醇 (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533) 、 脂肪族鏈如十二碳二醇或十一烷基殘基 (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J.*, 1991, 10:111 ; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327 ; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49) 、 磷脂質如二-十六烷基-rac-甘油或 1,2-二-O-十六烷基-rac-甘油-3-H-磷酸三乙基銨 (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651 ; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777) 、 聚胺或聚乙二醇鏈 (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) 、 或金剛烷乙酸 (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651) 、 棕櫚基部分 (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) 、 或硬脂胺或己胺-羰基-氧膽固醇部分 (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923) 。 教示此 RNA 接合物之製備的代表性美國專利業經列述於上。典型之接合策略係牽涉於序列之一個或多個位置承載胺基鏈結基之 RNA 的合成。該胺基隨後與使用適宜之耦合劑或活化劑接合之分子反應。該結合反應可於溶液相中使用仍鍵結至固體支撐物之 RNA 實施，或於該 RNA 之裂解後實施。藉由 HPLC 進行之 RNA 接合物的純化典型係提供純接合物。

【0374】

IV. 本發明之 iRNA 的輸送

本發明之 iRNA 至細胞如個體如人體內之細胞內的輸送，可以大量不同途徑達成。舉例而言，輸送可藉由令細胞與本發明之 iRNA 於體外或體內接觸而實施。體內輸送亦可藉由投藥包含 iRNA 如 dsRNA 之組成物至個體而直接實施。或者，體內輸送可藉由投藥編碼並引導該 iRNA 之表現的一種或多種載體而間接實施。此等選擇係進一步檢討於下。

【0375】 通常，任何(體外或體內)輸送核酸分子之方法可令其適應於使用本發明之 iRNA (參見，如，Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 以及 WO94/02595，其係藉由引用而以其整體併入本文)。對於體內輸送，為了輸送 iRNA 分子而慮及之因素係包括，舉例而言，所輸送之分子的生物學安定性、非特異性效應之預防、以及所輸送之分子於靶標組織內之蓄積。iRNA 之非特異性效應可藉由局部投藥而得以最小化，舉例而言，藉由直接注射或植入組織內或外用投藥該製劑。局部投藥至治療部位係最大化該劑之局部濃度，限制該劑曝露於可能反而受害於該劑或可降解該劑之全身性組織，並容許待投藥至 iRNA 分子之較低總劑量。若干研究業經顯示，當局部投藥 dsRNAi 劑時，成功剔除了基因產物。舉例而言，藉由對食蟹猴進行行玻璃體內注射 (Tolentino, MJ, *et al* (2004) *Retina* 24:132-138) 以及對小鼠進行視網膜下注射

完成之 VEGF dsRNA 的眼內輸送(Reich, S.J., *et al* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216), 兩者皆顯示預防了年齡相關性黃斑變性之實驗模型體內的新血管形成。此外, 於小鼠體內之 dsRNA 的直接腫瘤內注射縮小了腫瘤體積(Pille, J., *et al* (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274), 且可延長荷瘤小鼠之存活期(Kim, W.J., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., *et al* (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523)。藉由直接注射之 CNS 的局部輸送(Dorn, G., *et al.* (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, P.H., *et al* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., *et al* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, G.T., *et al* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, E.R., *et al* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., *et al* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602)以及藉由鼻內投藥至肺部(Howard, K.A., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., *et al* (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., *et al* (2005) *Nat. Med.* 11:50-55), RNA 干擾亦業經顯示成功。對於全身性投藥 iRNA 用於預防感染, 該 RNA 可經敘述或使用藥物輸送系統輸送; 兩種方法皆作動以防止 dsRNA 被核酸內切酶及核酸外切酶於體內快速降解。RNA 或該藥學載劑之修飾亦可容許該 iRNA 以靶標組織為靶向並避免非所欲之脫靶效應。iRNA 分子可藉由化學接合至親脂性基團如膽固醇而改性, 以增強細胞攝取並防止降解。舉例而言, 將引導對抗 ApoB 之接合至親脂性膽固醇部分的 iRNA 全身性注射入小鼠體內, 並導致肝臟及空

腸兩者內之 apoB mRNA 的剔除 (Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432:173-178)。iRNA 至適配體之接合業績顯示，其抑制前列腺癌鼠模型體內之腫瘤生長並介導腫瘤退化 (McNamara, JO, *et al* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015)。於一可選擇之態樣中，可使用藥物輸送系統如奈米顆粒、樹狀聚合物、聚合物、在或脂質體、或陽離子輸送系統來輸送該 iRNA。正電荷之陽離子輸送系統係促進 iRNA 分子(負電荷)之結合，亦提升在負電荷之細胞膜處之相互作用，以容許 iRNA 被細胞有效攝取。陽離子脂質、樹狀聚合物、或聚合物可鍵結至 iRNA、或經誘導以形成環繞 iRNA 之囊泡或微胞(參見，如，Kim SH, *et al* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116)。當全身投藥時，囊泡或微胞之形成進一步防止 iRNA 之降解。用於作成及投藥陽離子-iRNA 錯合物之方法係處於熟識該技藝者之能力範圍內(參見，如，Sorensen, DR, *et al* (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766；Verma, UN, *et al* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300；Arnold, AS *et al* (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205，其係藉由引用而以其整體併入本文)。可用於 iRNA 之全身性輸送之藥物輸送系統的一些非限制性實例係包括 DOTAP (Sorensen, DR., *et al* (2003)，如前；Verma, UN, *et al* (2003)，如前)、Oligofectamine，「固體核酸脂質顆粒」(Zimmermann, TS, *et al* (2006) *Nature* 441:111-114)、心磷脂 (Chien, PY, *et al* (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328；Pal, A, *et al* (2005) *Int J. Oncol.*

26:1087-1091)、聚伸乙基亞胺(Bonnet ME, *et al* (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 7:1659)、Arg-Gly-Asp (RGD)肽(Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487)、及聚醯胺基胺(Tomalia, DA, *et al* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., *et al* (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804)。一些態樣中，iRNA 與環糊精形成複合物用於全身性投藥。用於投藥之方法及 iRNA 及環糊精之醫藥組成物可於第 7,427,605 號美國專利中找到，該專利係藉由引用而以其整體併入本文。

【0376】

A. 編碼本發明之 iRNA 的載體

以 *Serpinal* 基因為靶向之 iRNA 可從插入至 DNA 或 RNA 載體內之轉錄單元表現(參見，如，Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A 等人之第 WO 00/22113 號國際 PCT 公開案; Conrad 之第 WO 00/22114 號國際 PCT 公開案; 以及，Conrad 之第 6,054,299 號美國專利)。表現可係暫時(幾小時至幾週之時段)或持續(幾週至幾個月或更久)，取決於所使用之具體構造及靶標組織或細胞類型。此等轉基因可作為線性構造、環狀質體、或病毒載體而引入，該載體可係整合或非整合載體。該轉基因亦可構建為容許其作為染色體外質體而被繼承(Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292)。

【0377】 iRNA 之獨立股或多股可從位於表現載體之啟動子轉錄。其中，兩個獨立之股係經表現以生成諸如

dsRNA，兩個獨立之表現載體可共引入(如，藉由轉染或感染)至靶標細胞內。或者，dsRNA 之各獨立股可藉由啟動子而轉錄，且兩個啟動子係定位於相同之表現質體。於一態樣中，dsRNA 係表現為藉由鏈結基聚核苷酸序列連接之反向重複多核苷酸，因此，該 dsRNA 係具有莖環結構。

【0378】 iRNA 表現載體通常係 DNA 質體或病毒載體。與真核細胞相容之表現載體，較佳係與脊椎動物細胞相容者，可用來產生用於表現本文中揭示之 iRNA 的重組構造。真核細胞表現載體係該技藝中習知者，且可自大量商業來源獲得。典型地，此等載體係提供為含有便利之用於插入所欲之核酸節段的限制性位點。iRNA 表現載體之輸送可係全身性，如藉由靜脈內或肌肉內投藥、藉由投藥至從該患者外植之靶標細胞並隨後再次引入至該患者體內、或藉由任何允許引入至所欲之靶標細胞內的其他手段而輸送。

【0379】 可與本文中揭示之方法及組成物合用之病毒載體系統係包括，但不限於，(a) 腺病毒載體；(b) 逆轉錄病毒載體，包括但不限於，慢病毒載體、莫洛尼鼠白血病毒等；(c) 腺相關病毒載體；(d) 單純疱疹病毒載體；(e) SV 40 載體；(f) 多瘤病毒載體；(g) 乳突淋瘤病毒載體；(h) 小核糖核酸病毒載體；(i) 痘病毒載體，如天花如牛痘病毒載體或禽痘如金絲雀痘病毒或雞痘病毒載體；以及(j) 輔助病毒依賴性腺病毒載體或裸腺病毒載體。複製缺陷型病毒亦可具有優勢。不同之載體將變為或不變為併

入該細胞之基因組中。若必要，該構造可包括用於轉染之病毒序列。或者，該構造可併入能進行游離基因複製之載體如 EPV 載體及 EBV 載體中。用於 iRNA 之重組表現的構造通常將需要調節元件如啟動子、增強子等，以確保該 iRNA 於靶標細胞內之表現。用於載體或構造而慮及之其他方面係該領域中習知者。

【0380】

V. 本發明之醫藥組成物

本發明亦包括醫藥組成物及調配物，其係包括本發明之 iRNA。於一態樣中，本文係提供含有本文中揭示之 iRNA、以及藥學可接受之載劑的醫藥組成物。該含有 iRNA 之醫藥組成物係可用於治療與 Serpina1 基因之表現或活性相關之疾病或病變，如，與 Serpina1 缺陷相關之病變，如 Serpina1 缺陷型肝病。此等醫藥組成物係基於輸送模式而配製。一個實例係配製為用於經由腸胃外輸送如藉由靜脈內(IV)輸送行全身性投藥的組成物。另一實例係配製為用於直接輸送至腦實質的組成物，如藉由輸液如藉由連續幫浦輸液至腦部。

【0381】 包含本發明之 RNAi 劑的醫藥組成物可係，舉例而言，具有或不具有緩衝劑之溶液，或含有藥學可接受之載劑的組成物。此等組成物係包括，舉例而言，水性或結晶性組成物、脂質調配物、微胞調配物、乳液、及基因治療載體。

【0382】 於本發明之方法中，該 RNAi 劑可於溶液中

投藥。游離之 RNAi 劑可於非緩衝溶液中如於鹽水或水中投藥。或者，該游離之 siRNA 亦可於適當之緩衝溶液中投藥。該緩衝溶液可包含醋酸鹽、檸檬酸鹽、醇溶穀蛋白 (prolamine)、碳酸鹽、或磷酸鹽，或其任意組合。於一較佳之態樣中，該緩衝溶液係磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS)。該含有 RNAi 劑之緩衝溶液的 pH 及滲透壓可經調解，故其係適用於投藥至個體。

【0383】 一些態樣中，該緩衝溶液復包含用於調控該溶液之滲透壓之劑，故該滲透壓係維持在所欲之值，如人血漿之生理學之值。可加至該緩衝溶液以調控滲透壓之溶質係包括，但不限於，蛋白質、肽、胺基酸、非經代謝之聚合物、維生素、離子、糖、代謝物、有機酸、脂質、或鹽。一些態樣中，該用於調控該溶液之滲透壓之劑係鹽。於某些態樣中，該用於調控該溶液之滲透壓之劑係氯化鈉或氯化鉀。

【0384】 本發明之醫藥組成物係以足以抑制 *Serpina1* 基因之表現的劑量投藥。通常，本發明之 iRNA 的適當劑量係約 0.001 至約 200.0 毫克每千克接受者體重每天之範圍，通常為約 1 至 50 mg 每千克體重每天之範圍。舉例而言，該 dsRNA 可以每單劑量約 0.01 mg/kg、約 0.05 mg/kg、約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 3 mg/kg、約 10 mg/kg、約 20 mg/kg、約 30 mg/kg、約 40 mg/kg、或約 50 mg/kg 量投藥。

【0385】 該醫藥組成物可每天投藥一次，或該 iRNA

可在全天時間內以適宜之間隔投藥兩次、三次或更多次亞劑量，或甚至使用連續輸液或透過控釋調配物輸送。若如是，則為了達成日總劑量，每一亞劑量中含有之 iRNA 必須相應地較小。該劑量單位亦可復配為用於在若干天內輸送，如，使用在若干天內提供 iRNA 之持續釋放的傳統持續釋放調配物。持續釋放調配物係該技藝中習知者，且係尤其可用於在特定部位釋放劑，如將與本發明之劑合用者。於此態樣中，該劑量單位係含有相應之多個日劑量。

【0386】 於其他態樣中，單劑量之醫藥組成物可係長效，故後續之劑量係以不超過 3、4、或 5 天之間隔投藥，或以不超過 1、2、3、或 4 週之間隔投藥。於本發明之一些態樣中，單劑量之本發明之醫藥組成物係每週投藥一次。於本發明之另一態樣中，單劑量之本發明之醫藥組成物係每兩個月投藥一次。

【0387】 熟練之技術人員將知悉，某些因素可能影響有效治療個體所需之劑量及投藥時機，該等因素包括但不限於，疾病或病變之嚴重性、先前之治療、該個體之一般健康情況及/或年齡、及存在之其他疾病。此外，使用治療有效量之組成物治療個體可包括單一治療或一系列治療。對本發明所涵蓋之個別 iRNA 之有效劑量及體內半衰期的評估可使用傳統之方法或基於使用適宜動物模型之體外測試而作成，如本文中他處所揭示者。

【0388】 鼠遺傳性之進展業經生成大量用於研究多種人類疾病如將會受益於 Serpina1 表現下降之肝病的鼠模

型。此等模型可用於 iRNA 之體內測試，以及用於確定治療有效之劑量。適當之鼠模型係該技藝中習知者，且包括，舉例而言，含有表現人 *Serpina1* 之轉基因的鼠。

【0389】 本發明之醫藥組成物可以多種途徑投藥，取決於局部或全身性治療是否係所欲者以及取決於待治療之面積。投藥可係外用(如，藉由透皮貼劑)；肺部投藥，如藉由粉末或氣溶膠之吸入或吹入，包括藉由噴霧器；氣管內投藥；鼻內投藥；表皮投藥及透皮投藥；口服或腸胃外投藥。腸胃外投藥係包括靜脈內、動脈內、皮下、腹膜內或肌肉內注射或輸液；皮下投藥，如經由植入之裝置投藥；或顱內投藥，如藉由薄壁組織內、囊內或心室內投藥。該 iRNA 可使用以特定組織如肝臟(如，肝臟之肝細胞)為靶標之模式輸送。

【0390】 用於外用投藥之醫藥組成物及調配物可包括透皮貼劑、軟膏劑、洗劑、霜劑、凝膠劑、滴劑、栓劑、噴霧劑、液體劑及粉末劑。傳統之藥學載劑、水性、粉末或油性基、增稠劑等可能係必需者或所欲者。經塗覆之避孕套、手套等亦可係有用者。適當之外用調配物係包括下述之彼等：其中，本發明提出之 iRNA 係與外用輸送劑如脂質、脂質體、脂肪酸、脂肪酸酯、類固醇、螯合劑及界面活性劑混合。適當之脂質及脂質體係包括中性(如，二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼)、陰性(如，二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG))及陽離子性(如，二油醯基四甲基胺

基丙基(DOTAP)及二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOTMA))。本發明提出之 iRNA 亦可封裝於脂質體內，或可與脂質體形成錯合物，該脂質體尤指陽離子脂質體。或者，iRNA 可與脂質尤其是陽離子脂質錯合。適當之脂肪酸及酯類係包括但不限於，花生四烯酸、油酸、二十酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕櫚酸、硬脂酸、亞油酸、亞麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油單油酸酯、甘油二月桂酸酯、甘油 1-單癸酸酯、1-十二烷基氮雜環庚-2-酮、乙醯基肉毒鹼、乙醯基膽鹼、或 C₁₋₂₀ 烷基酯(如，肉豆蔻酸異丙酯(IPM))、甘油單酯、甘油二酯、或其藥學可接受之鹽。外用調配物係詳細揭示於藉由引用而併入本文之第 6,747,014 號美國專利中。

【0391】

A. 包含膜性分子組裝體之 iRNA 調配物

用於本發明之組成物及方法中之 iRNA 可配製為用於膜性分子組裝體如脂質體或微胞中輸送。本文中，術語「脂質體」係指稱由排列為至少一個雙層如一個雙層或多個雙層之兩親性脂質構成的運載劑。脂質體係包括單層及多層之運載劑，其係具有自親脂性材料形成之膜及親水性之內腔。該水性部分係含有該 iRNA 組成物。該親脂性材料係將該水性內腔與水性外部隔離，而該外部典型並不包括該 iRNA 組成物，但在一些實例中，該外部可包括該 iRNA 組成物。脂質體係可用於轉移病輸送活性成分至作動部位。因為該脂質體膜在結構上類似於生物膜，當將脂質體施用

至組織時，該脂質體雙層與細胞膜之雙層熔接。隨著該脂質體與細胞之融合的進行，包括該 iRNA 之內部水性內容物被輸送至細胞內，而該 iRNA 可特異性結合之靶標 RNA 並可介導 RNAi。一些例子中，該脂質體亦可係靶標特異性，以諸如引導該 iRNA 至特定之細胞類型。

【0392】 含有 RNAi 劑之脂質體可藉由多種方法製備。一個實例中，脂質體之脂質組分係溶解於洗滌劑中，故該脂質組分形成微胞。舉例而言，該脂質組分可係兩親性陽離子性脂質或脂質接合物。該洗滌劑可具有高臨界微胞濃度且可係非離子性。例示性洗滌劑係包括膽酸鹽、CHAPS、辛基葡糖苷、去氧膽酸鹽、及月桂醯基肌胺酸。隨後將該 RNAi 劑製劑加至包括該脂質組分之微胞中。該脂質之陽離子性基團與該 RNAi 劑交互反應，並密集環繞該 RNAi 劑以形成脂質體。縮合後，藉由諸如滲析移除該洗滌劑，以獲得 RNAi 劑之脂質體製劑。

【0393】 若必要，於該縮合反應過程中，可加入輔助縮合之載劑化合物，如受控加入。舉例而言，該載劑化合物可係除核酸之外的聚合物(如，精胺或亞精胺)。亦可調節 pH 以輔助縮合。

【0394】 用於生產安定之多核苷酸輸送運載劑之方法係進一步揭示於例如其整體內容藉由引用而併入本文之 WO 96/37194 中，其中，該方法係將多核苷酸/陽離子脂質錯合物作為結構性組分併入該輸送運載劑中。脂質體成形亦可包括下列中揭示之例示性方法之一方面或多方面：

Felgner, P. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413-7417, 1987; 第 4,897,355 號美國專利; 第 5,171,678 號美國專利; Bangham, *et al. M. Mol. Biol.* 23:238, 1965; Olson, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 557:9, 1979; Szoka, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194, 1978; Mayhew, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984; Kim, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 728:339, 1983; 以及, Fukunaga, *et al. Endocrinol.* 115:757, 1984。用於製備適宜尺寸之用作輸送運載劑之脂質聚集體的常用技術係包括超音波處理及凍融加上押出(參見, 如, Mayer, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986)。當所欲者係小(50 至 200 nm)且相對均之一致性聚集體時, 可使用微流化技術(Mayhew, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984)。此等方法已經適用於將 RNAi 劑製劑封裝入脂質體中。

【0395】 脂質體係分為兩個大類。陽離子脂質體係荷正電之脂質體, 其與荷負電之核酸分子相互作用以形成安定之錯合物。該荷正電之核酸/脂質體錯合物係結合至荷負電之細胞表面, 且係內在化於核內體中。由於核內體內之酸性 pH, 該脂質體被破壞, 將其內容為釋放入細胞之細胞質內(Wang *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985)。

【0396】 pH 敏感性或荷負電之脂質體係入陷核酸而非與之錯合。由於核酸及脂質兩者皆荷有相似電荷, 係出現排斥而非形成錯合物。然而, 一些核酸被入陷於此等脂

質體之水性內腔中。pH 敏感性脂質體業經用以輸送編碼胸苷激酶基因之核酸至培養物中之細胞單層。於靶標細胞內偵檢到外源性基因之表現 (Zhou *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274)。

【0397】 一種主要類型之脂質組成物係包括除天然衍生之磷脂醯膽鹼之外的磷脂質。中性脂質體組成物，舉例而言，可自二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)或二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)形成。陰離子性脂質體組成物通常係自二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油形成，而陰離子性膜融合(fusogenic)脂質體係主要自二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)形成。另一類型之脂質體組成物係自磷脂醯膽鹼(PC)如，舉例而言，大豆 PC 及卵 PC 形成。另一類型係自磷脂質及/或磷脂醯膽鹼及/或膽固醇之混合物形成。

【0398】 用以在體外及體內將脂質體引入細胞之其他方法的實例係包括第 5,283,185 號美國專利；第 5,171,678 號美國專利；WO 94/00569；WO 93/24640；WO 91/16024；Felgner, *J. Biol. Chem.* 269:2550, 1994；Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11307, 1993；Nabel, *Human Gene Ther.* 3:649, 1992；Gershon, *Biochem.* 32:7143, 1993；以及，Strauss *EMBO J.* 11:417, 1992。

【0399】 亦業經檢查非離子性脂質體系統，尤其是包含非離子性界面活性劑及膽固醇之系統，以確定其在輸送藥物至皮膚中的可用性。包含 Novasome™ I (甘油二月桂酸酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)及 Novasome™ II

(甘油二硬脂酸酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)之非離子性脂質體調配物係用以輸送環孢菌素-A 至鼠皮膚之真皮內。結果表明，此等非離子性脂質體系統係有效於促進環孢菌素 A 分解進入皮膚之不同層中 (Hu *et al.* *S.T.P.Pharma. Sci.*, 1994, 4(6) 466)。

【0400】 脂質體亦包括「空間安定化之」脂質體，如本文中所使用，該術語係指稱包含一種或多種具化之脂質，當將其併入脂質體中時，導致其該脂質體之循環壽命相對於缺少此等具化之脂質之脂質體增強。空間安定化之脂質體的實例係下述之彼等：其中，該脂質體之形成運載劑之脂質部分(A) 係包含一種或多種糖脂質，如單唾液酸神經節苷脂 G_{M1} ，或(B) 係使用一種或多種親水性聚合物如聚乙二醇(PEG)部分衍生。儘管不欲受縛於任何特定之理論，該技藝中認為，至少對於含有神經節苷脂、鞘磷脂、或 PEG 衍生之脂質的空間安定化之脂質體，此等空間安定化之脂質體之增強的循環半衰期係緣於網狀內皮系統(RES)之細胞對其之攝取減少 (Allen *et al.*, *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu *et al.*, *Cancer Research*, 1993, 53, 3765)。

【0401】 多種包含一種或多種糖脂質之脂質體係該技藝中習知者。Papahadjopoulos 等人 (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) 報導了單唾液酸神經節苷脂 G_{M1} 、硫酸半乳糖腦苷脂及磷脂醯肌醇改善脂質體之血液半衰期的能力。此等發現係由 Gabizon 等人 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949) 詳細說明。第 4,837,028 號美國專利及 WO

88/04924，兩者均頒予於 Allen 等人，係揭露包含(1) 鞘磷脂及(2) 神經節苷脂 GM1 或硫酸半乳糖腦苷脂之脂質體。第 5,543,152 號美國專利 (Webb *et al.*) 係揭露包含鞘磷脂之脂質體。包含 1,2-sn-二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼之脂質體係揭露於 WO 97/13499 (Lim *et al.*) 中。

【0402】 於一態樣中，係使用陽離子性脂質體。陽離子性脂質體係具有能融合至細胞膜之優點。儘管非陽離子性脂質體不能如與漿膜融合一樣有效地融合，但能被巨噬細胞於體外攝取且可用以輸送 RNAi 劑至巨噬細胞。

【0403】 脂質體之其他優點係包括：自天然磷脂質獲得之脂質體係生物相容且生物可降解；脂質體可合併寬範圍之水溶性及脂溶性藥物；脂質體可保護封裝於其內部隔室內之 RNAi 劑不被代謝劑降解 (Rosoff, 《藥物劑型 (Pharmaceutical Dosage Forms)》, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245)。於脂質體調配物之製備中之重要考量係該脂質表面電荷、運載劑大小及該脂質體之水性體積。

【0404】 一種荷正電之合成性陽離子脂質，N-[1-(2,3-二油醯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨 (DOTMA)，可用以形成小脂質體，該小脂質體自發地與核酸交互作用以形成能與組織培養細胞之細胞膜的荷負電之脂質融合的脂質-核酸錯合物，導致 RNAi 劑之輸送 (參見，如，Felgner, P. L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 及第 4,897,355 號美國專利，用於揭示

DOTMA 及其與 DNA 合用之用途)。

【0405】 一種 DOTMA 類似物，1,2-雙(油醯基氧基)-3-(三甲基氮)丙烷(DOTAP)，可與磷脂質組合以形成 DNA 錯合運載劑。Lipofectin™(Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.)係用於將高度陰離子化核酸輸送如活體組織培養細胞中的有效之劑，其係包含荷正電之 DOTMA 脂質體，且該脂質體自發地與荷負電之多核苷酸交互作用以形成錯合物。當使用荷有足量正電荷之脂質體時，所得錯合物之淨電荷亦為正。以此途徑製備之荷正電之錯合物係自發地附接至荷負電之細胞表面，與漿膜融合，且將功能性核酸有效地輸送至例如組織培養細胞內。另一可商購之陽離子脂質，1,2-雙(油醯基氧基)-3,3-(三甲基氮)丙烷(DOTAP)(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana)與 DOTMA 之不同之處在於，前者之油醯基部分係藉由酯而非醚鏈結而鏈結。

【0406】 其他報導之陽離性脂質化合物係包括彼等業經接合至多種部分者，該等部分係包括，舉例而言，羧基精胺，其業經接合至一種或兩種類型之脂質，且係包括化合物如 5-羧基精胺基甘胺酸二-八油醯基醯胺(DOGS)(Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin)及二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺 5-羧基精胺基-醯胺(DPPES)(參見，如，U.S. Pat. No. 5,171,678)。

【0407】 另一陽離子性脂質接合物係包括使用膽固醇衍生脂質者(DC-Chol)，其業經配製為脂質體與 DOPE 組

合(See, Gao, X. and Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991)。藉由將聚離胺酸接合至 DOPE 而作成之 Lipopolylysine，業經被報導其係有效於血清存在下之轉染(Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991)。對於某些細胞系，此等含有經接合之陽離子脂質的脂質體，據稱係顯現較低毒性且提供比含有 DOTMA 之組成物更有效之轉染。其它可商購之陽離子脂質產品係包括 DMRIE 及 DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California)以及 Lipofectamine (DOSPA)(Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland)。其他適用於輸送寡核苷酸之陽離子脂質係揭示於 WO 98/39359 及 WO 96/37194 中。

【0408】 脂質體調配物係尤其適用於外用投藥，較之於其他調配物，脂質體係存在若干優勢。此等優勢係包括，與所投予之藥物之高度全身性吸收有關的副作用減少、所投予之藥物於所欲之靶標處之蓄積增加、以及將 RNAi 劑投藥至皮膚內之能力。於一些實施中，脂質體係用於輸送 RNAi 劑至表皮細胞，且亦用以增強 RNAi 劑至真皮組織如皮膚內之滲透。舉例而言，該等脂質體可外用。將配製為脂質體之藥物外用輸送至皮膚業經有文獻報導(參見，如，Weiner *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2,405-410 及 du Plessis *et al.*, *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265；Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988；Itani, T. *et al.* *Gene* 56:267-276. 1987；Nicolau, C. *et al.* *Meth. Enz.*

149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987)。

【0409】 亦業經檢查非離子性脂質體系統，尤其是包含非離子性界面活性劑及膽固醇之系統，以確定其在輸送藥物至皮膚中之可用性。包含 Novasome I (甘油二月桂酸酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)及 Novasome II (甘油二硬脂酸酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)之非離子性脂質體調配物係用以輸送藥物至鼠皮膚之真皮內。此等具有 RNAi 劑之調配物係可用於治療皮膚病。

【0410】 包括 iRNA 之脂質體可作成高度可變形。此可變形性可令脂質體滲透通過小於該脂質體平均半徑之孔。舉例而言，傳遞體係一種類型之可變形之脂質體。傳遞體可藉由將表面邊緣活化因子，通常為界面活性劑，加入標準脂質體組成物中而作成。為了將 RNAi 劑輸送至皮膚之角質細胞，可藉由諸如感染而經皮下輸送包括 RNAi 劑之傳遞體。為了跨越完整之哺乳動物皮膚，脂質運載劑必須在適當之經皮梯度之影響下穿過一系列各自之直徑係小於 50 nm 的細孔。此外，由於脂質之特性，此等傳遞體可經自優化(適應於孔如皮膚內之孔的形狀)、自修復，且可頻繁到達其靶標而不碎裂，且一般係自負載。

【0411】 其他遵從本發明之調配物係揭示於 2008 年 1 月 2 日遞交之第 61/018,616 號美國臨時專利申請案；2008 年 1 月 2 日遞交之第 61/018,611 號美國臨時專利申請案；

2008年3月26日遞交之第61/039,748號美國臨時專利申請案；2008年4月22日遞交之第61/047,087號美國臨時專利申請案以及2008年5月8日遞交之第61/051,528號美國臨時專利申請案中。2007年10月3日遞交之第PCT/US2007/080331號PCT申請案亦揭示了遵從本發明之調配物。

【0412】 傳遞體係又一類型之脂質體，且係高度可變形之脂質聚集體，其係用於藥物輸送運載劑之引人注目之備選。傳遞體可揭示為脂質液滴，其可變形性如此之高，以至於他們容易地能滲透通過小於該液滴之孔。傳遞體係適應於其所使用之環境，如，其係自優化(適應於孔如皮膚內之孔的形狀)、自修復，且可頻繁到達其靶標而不碎裂，且一般係自負載。為了作成傳遞體，可將表面邊緣活化因子，通常為界面活性劑，加入標準脂質體組成物中。傳遞體業經用以輸送血清白蛋白至皮膚。業經顯示，血清白蛋白之該傳遞體介導之輸送係與含有血清白蛋白之皮下注射同樣有效。

【0413】 界面活性劑於調配物如乳液(包括微乳液)及脂質體中具有廣泛應用。將多種不同類型之天然及合成性兩種界面活性劑歸類及排序之最常用途徑係藉由使用親水/親脂平衡(HLB)進行。親水性基團(亦稱為「頭部」)之特性係提供用於將調配物中使用之不同界面活性劑分類的最有用之手段(Rieger, 《Pharmaceutical Dosage Forms》, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

【0414】 若該界面活性劑分子未經離子化，其係歸類為非離子性界面活性劑。非離子性界面活性劑在製藥產品及化粧品中具有廣泛應用，且在寬的 pH 值範圍內可用。通常，其 HLB 值係 2 至約 18 之範圍，取決於其結構。非離子性界面活性劑係包括非離子性酯類，如乙二醇酯類、丙二醇酯類、甘油酯類、聚甘油酯類、失水山梨醇酯類、蔗糖酯類、及乙氧基化之酯類。非離子性烷醇醯胺類及醚類如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化之醇類、及乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物亦包括於此類中。聚氧乙烯類界面活性劑係非離子性界面活性劑類別中最常見之成員。

【0415】 若當界面活性劑分子溶解或分散於水中時係攜帶負電荷，則該界面活性劑係歸類為陰離子性。陰離子性界面活性劑係包括羧基化物，如皂類；醯基乳酸酯類；胺基酸之醯基醯胺類；硫酸酯類，如硫酸烷基酯類及硫酸乙氧基化烷基酯類；磺酸酯類，如苯磺酸烷基酯類、醯基羥乙基磺酸酯類、醯基牛磺酸酯類及磺醯基琥珀酸酯類；以及磷酸酯類。陰離子性界面活性劑類別之最重要之成員係硫酸烷基酯類及皂類。

【0416】 若當界面活性劑分子溶解或分散於水中時係攜帶正電荷，則該界面活性劑係歸類為陽離子性。陽離子性界面活性劑係包括四級銨鹽類及乙氧基化之胺類。四級銨鹽類係此類別中最常用之成員。

【0417】 若當界面活性劑分子具有攜帶或正電荷或負電荷之能力時，則該界面活性劑係歸類為兩性。兩性界

面活性劑係包括丙烯酸衍生物類、經取代之烷基醯胺類、N-烷基甜菜鹼類及磷脂類。

【0418】 界面活性劑於藥物產品、調配物及乳液中之用途業經得以檢討回顧(Rieger, 《Pharmaceutical Dosage Forms》, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

【0419】 用於本發明之方法中之 iRNA 亦可提供為微胞調配物。本文中,「微胞」係定義為特定類型之分子組裝體,其中,兩性分子係以球形結構排列,故該等分子之所有疏水性部分係朝內,留下親水性部分與周圍之水相接觸。若環境為疏水性,則存在逆向排列。

【0420】 可藉由混合 siRNA 組成物之水溶液、鹼金屬 C₈ 至 C₂₂ 烷基硫酸鹽、及微胞形成化合物,製備適用於透過透皮膜輸送之混合微胞調配物。例示性微胞形成化合物係包括卵磷脂、玻尿酸、玻尿酸之藥學可接受之鹽類、乙醇酸、乳酸、洋甘菊提取物、黃瓜提取物、油酸、亞油酸、亞麻酸、單油酸甘油酯、單油酸酯、單月桂酸酯、琉璃苣油、月見草油、薄荷醇、三羥基氧代膽烷基甘胺酸及其藥學可接受之鹽類、甘油、聚甘油、離胺酸、聚離胺酸、甘油三油酸酯、聚氧乙烯醚類及其類似物、聚多卡醇烷基醚類及其類似物、鵝去氧膽酸酯、去氧膽酸酯、及其混合物。該等微胞形成化合物可於相同時間加入或於加入鹼金屬烷基硫酸鹽後加入。為了提供較小尺寸之微胞,混合之微胞將與該等成分以除劇烈混合之外實質上任何種類之混

合形成。

【0421】 一種方法中，係製備含有該 siRNA 組成物以及至少一種鹼金屬烷基硫酸鹽之第一微胞組成物。該第一微胞組成物隨後與至少三種微胞形成化合物混合，以形成混合之微胞組成物。另一方法中，該微胞組成物係藉由下述製備：混合該 siRNA 組成物、該鹼金屬烷基硫酸鹽及至少一種微胞形成化合物，之後於劇烈混合下加入剩餘之微胞形成混合物。

【0422】 可將苯酚及/或間甲酚加至該混合之微胞組成物中，以安定化該調配物並保護其對抗細菌生長。或者，苯酚及/或間甲酚可與該微胞形成組分同時加入。亦可於該混合之微胞組成物形成後，加入等滲劑如甘油。

【0423】 對於該微胞調配物作為噴霧劑之輸送，可將該調配物置於氣溶膠分配器內，且該分配器係充有推進劑。該推進劑係於壓力下以液體形式存在於該分配器內。調節該等組分之比，故該水性與推進劑向係變為一相，亦即，僅存在一相。若存在兩相，則必需於如透過限量閥分配該內容物之部分之前振盪該分配器。經分配之劑量的藥劑係以細霧之形式從該限量閥被推進。

【0424】 推進劑可包括含氫之氯氟碳、含氫之氟碳、二甲基醚及乙醚。於某些態樣中，可使用 HFA 134a (1,1,1,2-四氟乙烷)。

【0425】 可藉由相對直接之實驗測得主要成分之具體濃度。對於經由口腔之吸收，一般所欲者係增加，如透

過注射或透過胃腸道投藥劑量之至少 2 倍或 2 倍。

【0426】

B. 脂質顆粒

本發明之 iRNA 如 dsRNA 可完全封裝脂質調配物中，如 LNP 或其他核酸-脂質顆粒。

【0427】 本文中，術語「LNP」係指稱安定之核酸-脂質顆粒。LNP 係含有陽離子脂質、非陽離子脂質、以及防止該顆粒聚集之脂質(如，PEG-脂質接合物)。LNP 係極其有用於全身性應用，蓋因其係顯現於靜脈(i.v.)注射後之延長之循環壽命且於遠端部位(如，與投藥部位物理上分離之部位)蓄積。LNP 係包括「pSPLP」，其係包括封裝之濃縮劑-核酸錯合物，如第 WO 00/03683 號 PCT 公開案中所詳述。本發明之顆粒典型係具有約 50 nm 至約 150 nm，更典型約 60 nm 至約 130 nm，更典型約 70 nm 至約 110 nm，最典型約 70 nm 至約 90 nm 之平均直徑；且係實質上非毒性。此外，當存在於本發明之核酸-脂質顆粒中時，該等核酸係與水溶液中對抗核酸酶造成之降解。核酸-脂質顆粒及其製備方法係揭露於例如第 5,976,567 號、第 5,981,501 號、第 6,534,484 號、第 6,586,410 號、第 6,815,432 號美國專利中；第 2010/0324120 號美國專利公開案中及第 WO 96/40964 號 PCT 公開案中。

【0428】 於一態樣中，該脂質與藥物之比(質量/質量比)(如，脂質與 dsRNA 之比)將係自約 1:1 至約 50:1、自約 1:1 至約 25:1、自約 3:1 至約 15:1、自約 4:1 至約 10:1、自

約 5:1 至約 9:1、或約 6:1 至約 9:1 之範圍。於上文引述範圍之間的範圍亦預期為本發明之一部分。

【0429】 該陽離子脂質可係，舉例而言，N,N-二油醯基-N,N-二甲基氯化銨(DODAC)、N,N-二硬脂醯基-N,N-二甲基溴化銨(DDAB)、N-(I-(2,3-二油醯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)、N-(I-(2,3-二油醯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油醯基氧基)丙胺(DODMA)、1,2-二亞麻油醯基氧基-N,N-二甲胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亞麻油醯基氧基-N,N-二甲胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亞麻油基胺基甲醯基氧-3-二甲胺基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亞麻油醯氧基-3-(二甲胺基)乙醯氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亞麻油醯氧基-3-(N-嗎啶基)丙烷(DLin-MA)、1,2-二亞麻油醯基-3-二甲胺基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亞油醯基硫基-3-二甲胺基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亞麻油醯基-2-亞油醯基氧基-3-二甲胺基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-亞麻油醯基氧基-3-三甲胺基丙烷氯鹽(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亞麻油醯基-3-三甲胺基丙烷氯鹽(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亞油醯基氧基-3-(N-甲基哌啶基)丙烷(DLin-MPZ)、或 3-(N,N-二亞油醯基胺基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油醯基胺基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亞油醯基側氧基-3-(2-N,N-二甲胺基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二亞麻油醯基氧基-N,N-二甲胺基丙烷(DLinDMA)、2,2-二亞油醯基-4-二甲胺基甲基-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-DMA)或其類似物、

(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氫-3aH-環戊[d][1,3]二氧雜環戊烷-5-胺(ALN100)、(6Z,9Z;28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲胺基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)哌啶-1-基)乙基)氮烷二基)二-十二碳-2-醇(Tech G1)、或其混合物。該陽離子脂質可包含該顆粒中存在之總脂質的約 20 mol%至約 50 mol%或約 40 mol%。

【0430】 另一態樣中，化合物 2,2-二亞麻油醯基-4-二甲胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷可用以製備脂質-siRNA 奈米顆粒。2,2-二亞麻油醯基-4-二甲胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷之合成係揭示於 2008 年 10 月 23 日遞交之第 61/107,998 號美國臨時專利申請案中，該申請案係藉由引用而併入本文。

【0431】 於一態樣中，該脂質-siRNA 顆粒係包括 40%之 2,2-二亞麻油醯基-4-二甲胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷、10%之 DSPC、40%之膽固醇及 10%之 PEG-C-DOMG (莫耳百分比)，顆粒大小為 63.0 ± 20 nm，且具有 0.027 之 siRNA/脂質比。

【0432】 該可離子化之/非陽離子性脂質可係陰離子性脂質或中性脂質，係包括，但不限於，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)、

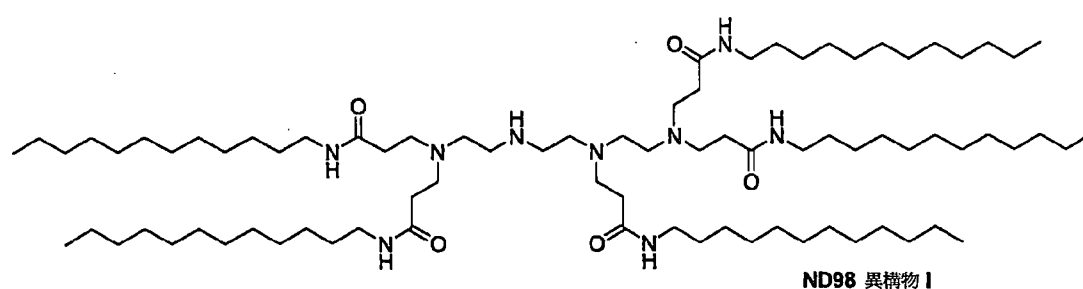
棕櫚醯基油醯基磷脂醯膽鹼(POPC)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯乙醇胺(POPE)、二油醯基-磷脂醯乙醇胺 4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二硬脂醯基-磷脂醯-乙醇胺(DSPE)、16-O-單甲基 PE、16-O-二甲基 PE、18-1-反式 PE、1-硬脂醯基-2-油醯基-磷脂醯乙醇胺(SOPE)、膽固醇、或其混合物。若包括膽固醇，則該非陽離子性脂質可係該顆粒中存在之總脂質的約 5 mol%至約 90 mol%、約 10 mol%、或約 58 mol%。

【0433】 抑制顆粒之聚集之經接合的脂質可係，舉例而言，聚乙二醇(PEG)-脂質，包括而不限於，PEG-二醯基甘油(DAG)、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂質、PEG-神經醯胺(Cer)、或其混合物。該 PEG-DAA 接合物可係，舉例而言，PEG-二月桂基氧基丙基(C₁₂)、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C₁₄)、PEG-二棕櫚基氧基丙基(C₁₆)、或 PEG-二硬脂基氧基丙基(C₁₈)。防止顆粒之聚集之經接合的脂質可係該顆粒中存在之總脂質的 0 mol%至約 20 mol%或約 2 mol%。

【0434】 一些態樣中，該核酸-脂質顆粒復包括膽固醇，其量為諸如該顆粒中存在之總脂質的約 10 mol%至約 60 mol%或約 48 mol%。

【0435】 於一態樣中，該類脂質 ND98·4HCl(MW 1487)(參見，2008年3月26日遞交之第 12/056,230 號美國專利申請案，其係藉由引用而併入本文)、膽固醇(Sigma-Aldrich)、及 PEG-神經醯胺 C16(Avanti Polar Lipids)

可用以製備脂質-dsRNA 奈米顆粒(亦即，LNP01 顆粒)。各自於乙醇中之原料溶液可製備如下：ND98，133 mg/ml；膽固醇，25 mg/ml，PEG-神經醯胺 C16，100 mg/ml。該 ND98、膽固醇、及 PEG-神經醯胺 C16 原料溶液隨後可以諸如 42:48:10 之莫耳比合併。經合併之脂質溶液可與水性 dsRNA (如，於 pH 5 之醋酸鈉溶液中)混合，故最終之乙醇濃度為約 35%至 45%，且最終之醋酸鈉濃度為約 100 至 300 mM。脂質-dsRNA 奈米顆粒典型係於混合時即自發形成。依據所欲之顆粒尺寸分佈，所得奈米顆粒混合物可使用例如熱筒押出機如 Lipex 押出機(Northern Lipids, Inc)透過聚碳酸酯膜(如，100 nm 截留)押出。一些情形中，該押出步驟可省略。舉例而言，可藉由滲析或正切流動過濾完成乙醇之移除及同步之緩衝劑交換。緩衝劑可與例如磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)於約 pH 7，如約 pH 6.9、約 pH 7.0、約 pH 7.1、約 pH 7.2、約 pH 7.3、或約 pH 7.4 交換。



式 1

【0436】 LNP01 調配物係揭示於例如第 WO 2008/042973 號國際專利公開案中，其係藉由引用而併入本文。

【0437】 其他例示性脂質-dsRNA 調配物係揭示於表 A 中。

表 A

	可離子化/陽離子脂質	陽離子脂質/非陽離子脂質/膽固醇/PEG-脂質接合物 脂質:siRNA 比
LNP-1	1,2-二亞麻油醯基氧-N,N-二甲胺基丙烷(DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/膽固醇 /PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂質:siRNA ~ 7:1
2-XTC	2,2-二亞油醯基-4-二甲胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DPPC/膽固醇/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂質:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-二亞油醯基-4-二甲胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-二亞油醯基-4-二甲胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-二亞麻油烯基-4-二甲胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-二亞油醯基-4-二甲胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-二亞油醯基-4-二甲胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)	XTC/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基	ALN100/DSPC/膽固醇

	-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氫-3aH-環戊[d][1,3]二氧雜環戊烷-5-胺(ALN100)	/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲胺基)丁酸酯(MC3)	MC-3/DSPC/膽固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)哌啶-1-基)乙基)氮烷二基)二-十二烷-2-醇(Tech G1)	Tech G1/DSPC/膽固醇 /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂質:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂質:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5

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

DSPC：二硬脂醯基磷脂醯膽鹼

DPPC：二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼

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

PEG-DSG：PEG-二苯乙炔基甘油 (C18-PEG，或 PEG-C18) (PEG 之平均分子量為 2000)

PEG-cDMA：PEG-胺基甲醯基-1,2-二肉豆蔻基氧基丙基胺 (PEG 之平均分子量為 2000)

LNP：包含(1,2-二亞麻油醯基氧基-N,N-二甲胺基丙烷 (DLinDMA))之調配物係揭示於 2009 年 4 月 15 日遞交之第

WO2009/127060 號國際申請案中，其係藉由引用而併入本文。

【0438】 包含 XTC 之調配物係揭示於例如 2009 年 1 月 29 日遞交之第 61/148,366 號美國專利臨時申請案中；2009 年 3 月 2 日遞交之第 61/156,851 號美國專利臨時申請案中；2009 年 6 月 10 日遞交之第號美國專利臨時申請案中；2009 年 7 月 24 日遞交之第 61/228,373 號美國專利臨時申請案中；2009 年 9 月 3 日遞交之第 61/239,686 號美國專利臨時申請案中；以及，2010 年 1 月 29 日遞交之第 PCT/US2010/022614 號國際申請案中，該等申請案係藉由引用而併入本文。

【0439】 包含 MC3 之調配物係揭示於例如 2010 年 6 月 10 日遞交之第 2010/0324120 號美國專利公開案中，其整體內容係藉由引用而併入本文。

【0440】 包含 ALNY-100 之調配物係揭示於例如 2009 年 11 月 10 日遞交之第 PCT/US09/63933 號國際專利申請案中，其整體內容係藉由引用而併入本文。

【0441】 包含 C12-200 之調配物係揭示於例如 2009 年 5 月 5 日遞交之第 61/175,770 號美國專利臨時申請案及 2010 年 5 月 5 日遞交之第 PCT/US10/33777 號國際申請案中，其係藉由引用而併入本文。

【0442】

可離子化之/陽離子性脂質的合成

本發明之核酸-脂質顆粒中使用之任何化合物如陽離

子性脂質等，均可藉由已知之有機合成技術包括實施例中更詳細揭示之方法製備。除非明確排除，所有取代基係如下文定義。

【0443】 「烷基」係意指含有 1 至 24 個碳原子之直鏈或分支鏈、非環狀或環狀、飽和脂肪族烴。代表性飽和直鏈烷基係包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等；而飽和分支鏈烷基係包括異丙基、第二丁基、異丁基、第三丁基、異戊基等。代表性飽和環狀烷基係包括環丙基、環丁基、環戊基、環己基等；而不飽和環狀烷基係包括環戊烯基及環己烯基等。

【0444】 「烯基」係意指含有至少一個位於相鄰碳原子間之雙鍵的上文定義之烷基。烯基係包括順式及反式兩種異構物。代表性直鏈及分支鏈烯基係包括乙烯基、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-丁烯基等。

【0445】 「炔基」係意指額外含有至少一個位於相鄰碳間之三鍵的上文定義之任意烷基或烯基。代表性直鏈及分支鏈炔基係包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基等。

【0446】 「醯基」係意指任何烷基、烯基或炔基，其中，位於附接點之碳係經側氧基取代，如下文定義。舉例而言， $-C(=O)$ 烷基、 $-C(=O)$ 烯基、及 $-C(=O)$ 炔基係醯基。

【0447】 「雜環」係意指 5 員至 7 員至單環、或 7

員至 10 員至雙環之雜環狀環，其可係飽和、不飽和、或芳香族，且其係含有獨立選自氮、氧及硫之 1 或 2 個雜原子，其中，該氮及硫雜原子可視需要經氧化，且該氮雜原子可視需要經四級化，雜環係包含其中任何上述雜環係稠合至苯環之雙環。該雜環可經由任何雜原子或碳原子附接。雜環係包括如下述定義之雜芳基。雜環係包括嗎啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌啶基、乙內醯脲基、戊內醯胺基、環氧乙烷基、氧環丁烷基、四氫呋喃基、四氫吡喃基、四氫吡啶基、四氫嘧啶基、四氫噁吩基、四氫噁喃基、四氫嘧啶基、四氫噁吩基、四氫噁喃基等。

【0448】 術語「視需要經取代之烷基」、「視需要經取代之烯基」、「視需要經取代之炔基」、「視需要經取代之芳基」、及「視需要經取代之雜環」係意指，當取代時，至少一個氫原子被取代基替代。於側氧取代基(=O)之情形中，兩個氫原子被替代。就此而言，取代基係包括側氧基、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 係 0、1 或 2， R_x 與 R_y 係相同或相異且獨立為氫、烷基或雜環，且該烷基及雜環取代基各自可進一步經側氧基、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 $-\text{SO}_n\text{NR}_x\text{R}_y$ 之一者或多者取代。

【0449】 「鹵素」係意指氟、氯、溴及碘。

【0450】 一些態樣中，本發明之方法可能需要使用保護基。保護基方法係彼等熟識該技藝者所習知者(參見，舉例而言， *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999)。簡而言之，本發明之語境中的保護基係降低或消除官能基之非所欲之反應性的任意基團。保護基可加至官能基，以屏蔽其在某些反應過程中之反應性，隨後移除以透露原始之官能基。於一些態樣中，係使用「醇保護基」。「醇保護基」係降低或消除醇官能基之非所欲之反應性的任意基團。可使用該技藝中習知之技術加入及移除保護基。

【0451】 用於口服投藥之組成物及調配物係包括粉末或顆粒、微粒、奈米顆粒、於水或非水性介質中之懸浮液或溶液、膠囊、凝膠膠囊、袋劑、片劑或小片劑。增稠劑、芳香劑、稀釋劑、乳化劑、分散助劑或黏合劑可係所欲者。一些態樣中，口服調配物係下述之彼等：其中，本發明提出之 dsRNA 係與一種或多種滲透增強劑界面活性劑及螯合劑協同投藥。適當之界面活性劑係包括脂肪酸及/或其酯或鹽、膽汁酸類及/或其鹽。適當之膽汁酸類/鹽係包括鵝去氧膽酸(CDCA)及熊去氧鵝去氧膽酸(UDCA)、膽酸、去氫膽酸、去氧膽酸、麩胺膽酸(glucholic acid)、甘胺膽酸(glycholic acid)、甘胺去氧膽酸、牛磺膽酸、牛磺去氧膽酸、牛磺-24,25-二氫-梭鏈孢酸鈉及甘胺二氫梭鏈孢酸鈉。適當之脂肪酸係包括花生四烯酸、十一烷酸、油酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕櫚酸、硬脂酸、亞油

酸、亞麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、單油酸甘油酯、二月桂酸甘油酯、甘油 1-單癸酸酯、1-十二烷基氮雜環庚-2-酮、乙醯肉毒鹼、乙醯膽鹼、或甘油單酯、甘油二酯或其藥學可接受之鹽(如：鈉鹽)。一些態樣中，係使用滲透增強劑之組合，舉例而言，脂肪酸/鹽與膽汁酸/鹽組合。一種例示性組合係月桂酸之鈉鹽、癸酸與 UDCA 之組合。其他滲透增強劑係包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-鯨蠟基醚。本發明提出之 DsRNA 可以包括噴霧乾燥之顆粒的粒狀形式或經錯合為微粒或奈米顆粒形式經口投藥。DsRNA 錯合劑係包括聚胺基酸；聚亞胺；聚丙烯酸酯；聚丙烯酸烷基酯、聚氧乙烷、聚氰基丙烯酸烷基酯；陽離子化之明膠、白蛋白、澱粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)及澱粉；聚氰基丙烯酸烷基酯；經 DEAE 衍生之聚亞胺、支鏈澱粉、纖維素及澱粉。適當之錯合劑係包括幾丁聚醣、N-三甲基幾丁聚醣、聚-L-離胺酸、聚組胺酸、聚鳥胺酸、聚精胺、魚精蛋白、聚乙烯基吡啶、聚硫代二乙基胺基甲基乙烯(P(TDAE))、聚胺基苯乙烯(如，聚對胺基苯乙烯)、聚氰基丙烯酸甲酯、聚氰基丙烯酸乙酯、聚氰基丙烯酸丁酯、聚氰基丙烯酸異丁酯、聚氰基丙烯酸異己酯、DEAE-甲基丙烯酸酯、DEAE-己基丙烯酸酯、DEAE-丙烯醯胺、DEAE-白蛋白及 DEAE-葡聚糖、聚丙烯酸記載、聚丙烯酸己酯、聚(D,L-乳酸)、聚(DL-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、藻酸鹽、及聚乙二醇(PEG)。dsRNA 之口服調配物及其製備係詳細揭示於第 6,887,906 號美國專利、第 20030027780

號美國專利公開案、及第 6,747,014 號美國專利中，其各自係藉由引用而併入本文。

【0452】 用於腸胃外投藥、薄壁組織內(至腦內)投藥、鞘內投藥、心室內投藥或肝內投藥之組成物及調配物可包括無菌水溶液，其亦可含有緩衝劑、稀釋劑及其他適當之添加劑，例如但不限於，滲透增強劑、載劑化合物及其他藥學可接受之載劑或賦形劑。

【0453】 本發明之醫藥組成物係包括，但不限於，溶液、乳液、及含有脂質體之調配物。此等組成物可自包括但不限於，預成型液體、自乳化固體及自乳化半固體之多種組分生成。當治療肝臟病變如肝癌時，特佳者係以肝臟為靶標之調配物。

【0454】 可便利地以單位劑型存在的本發明之醫藥組成物，可根據醫藥工業中習知之傳統技術製備。此等技術係包括將活性成分帶至與藥學載劑或賦形劑聯合之步驟。通常，該等調配物係藉由下述而製備：將活性組分均勻且密切地帶至與液體載劑或精細分散之固體載劑或兩者聯合，隨後，若需要，將產物塑形。

【0455】 本發明之組成物可配製為多種可能之劑型的任意者，例如但不限於，片劑、膠囊劑、凝膠膠囊劑、液體糖漿、軟膠囊劑、栓劑、及灌腸劑。本發明之組成物亦可配製為水性、非水性或混合介質中之懸浮劑。水性懸浮劑可復含有增加該懸浮劑之黏性的物質，舉例而言，羧甲基纖維素鈉、山梨醇及/或葡聚糖。該懸浮劑亦可含有安

定劑。

【0456】

C. 其他調配物

i. 乳液

本發明之組成物可製備及配製為乳液。乳液係一種液體一通常直徑超過 $0.1\mu\text{m}$ 之液滴分散於另一液體中的典型之非均質系統(參見，如，Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301)。乳液一般係包含兩個不互混之液相的雙相系統，該兩相係密切混合且分散於彼此之中。通常，乳液可係油包水(w/o)種類或水包油(o/w)種類之任一者。當水相係經細分隔並作為小液滴分散於大體積之油相中時，所得組成物係稱為油包水(w/o)乳液。或者，當油相係經細分隔並作為小液滴分散於大體積之水相中時，所

得組成物係稱為水包油(o/w)乳液。乳液除了含有分散相外，亦可含有其他組分，且該活性藥物可作為溶液存在於水相、油相中或其自身作為單獨一相存在。如需要，藥學賦形劑如乳化劑、安定劑、染料、及抗氧化劑亦可存在於乳液中。藥學乳液亦可係由超過兩相組成之多重乳液，舉例而言，於油包水包油(o/w/o)及水包油包水(w/o/w)乳液之情形中。此等複雜調配物一般係提供簡單雙相乳液並不具備之某些優勢。於多重乳液中，o/w 乳液的獨立之油液滴圍繞小水滴而構建 w/o/w 乳液。同樣，油滴為在連續油相中安定化之水球所圍繞的系統係提供 o/w/o 乳液。

【0457】 乳液之特徵在於小或沒有熱力學安定性。通常，乳液之分散或不連續相係良好分散於外部或連續相中，且透過乳化劑或調配物之黏度的手段維持為此形式。乳液之任一相可係半固體或固體，如乳液型油膏基質及乳霜之情形下者。其他安定化乳液之手段係需要使用可併入該乳液之任一相中的乳化劑。廣義上，乳化劑可分為四類：合成性界面活性劑、天然出現之乳化劑、吸收基質、及細分散之固體(參見，如，Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【0458】 合成性界面活性劑，亦稱為表面活性劑，

業經廣泛應用於乳液之調配物中，且業經於文獻中檢討回顧(參見，如，Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199)。界面活性劑典型係兩性，且包含親水性部分及疏水性部分。界面活性劑中親水特性與疏水特性之比業經表述為術語親水/親油平衡(HLB)，且係於調配物之製備中歸類並選擇界面活性劑的有價值之工具。基於界面活性劑之親水基團的特性，界面活性劑可歸類為不同之類別：非離子性、陰離子性、陽離子性及兩性(參見，如，Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285)。

【0459】 用於乳液調配物中之天然出現之乳化劑係包括羊毛脂、蜂蠟、磷脂類、卵磷脂及阿拉伯膠。吸收基質係具有親水性質，故他們可吸取水以形成 w/o 乳液而仍

保持其半固體一致性，如無水羊毛脂及親水性石蠟脂。精細分割之固體亦業經用作乳化劑，尤其是與界面活性劑組合以及於黏性製劑中。此等係包括極性無機固體，如重金屬氫氧化物、非膨脹性黏土如皂土、綠坡縷石、水輝石、高嶺土、蒙脫石、膠體矽酸鋁及膠體矽酸鎂鋁、顏料及非極性固體如碳或甘油三硬脂酸酯。

【0460】 大量非乳化材料亦包括於乳液調配物中且有貢獻於乳液之性質。此等係包括脂肪、油、蠟、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、濕潤劑、親水性膠體、防腐劑及抗氧化劑 (Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335 ; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【0461】 親水性膠體或水凝膠係包括天然出現之膠類及合成性聚合物如多醣(舉例而言，阿拉伯樹膠、瓊脂、海藻酸、角叉菜膠、瓜爾膠、刺梧桐膠、及黃芪膠)、纖維素衍生物(舉例而言，羧甲基纖維素及羧丙基纖維素)、及合成性聚合物(舉例而言，卡波姆、纖維素醚類、及羧基乙烯基聚合物)。此等係分散或溶脹於水中以形成膠體溶液，其藉由形成環繞分散相液滴之強的界面膜且藉由增加外部相之黏度而安定乳液。

【0462】 由於乳液通常含有可容易支持微生物生長之大量成分，如碳水化合物類、蛋白質類、固醇類及磷脂

類，此等調配物一般係合併有防腐劑。一般於該乳液調配物中使用之防腐劑係包括對羥苯甲酸甲酯、對羥苯甲酸丙酯、四級銨鹽、氯化苯甲烴銨、對羥基苯甲酸之酯類、及硼酸。抗氧化劑一般亦加入乳液調配物中，以防止該調配物之劣化。所使用之抗氧化劑可係自由基捕捉劑，如生育酚、五倍子酸烷基酯、丁基化羥基茴香醚、丁基化羥基甲苯；或還原劑如抗壞血酸及焦亞硫酸鈉；以及抗氧化劑增效劑，如枸橼酸、酒石酸、及卵磷脂。

【0463】 乳液調配物經由護膚、口服及腸胃外途徑之應用及其製造方法業經於文獻中檢討回顧(參見，如，Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。用於口服輸送之乳液調配物業經廣泛使用，蓋因其易於配製以及在吸收劑生物利用性觀點之效能(參見，如，Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and

Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。礦物油系輕瀉劑、油溶性維生素及高脂肪營養製劑係屬於一般作為水包油乳液經口投藥的材料。

【0464】

ii. 微乳液

於本發明之一態樣中，該 iRNA 與核酸之組成物係配製為微乳液。微乳液可定義為水、油及兩親分子之系統，其係光學各向同性且熱力學安定之溶液(參見，如，Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245)。典型地，微乳液係藉由下述者製備之系統：將油分散於界面活性劑水溶液中；隨後加入足量之第四組分，通常係中等鏈長之醇，以形成透明之系統。因此，微乳液亦業經揭示為兩種不互混之液體的熱力學安定、各向同性之澄清分散液，其係藉由表面活性分子之界面膜而予以安定化(Leung and Shah, *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215)。微乳液一般係經由將包括油、水、界面活性劑、助界面活性劑及電解質之三至五種組分組合而製備。該微乳液是否為油包水(w/o)或水包油(o/w)類型，係取決於所使用之油及界面活性劑之

性質以及該界面活性劑分子之極性頭部與烴尾部之結構及幾何封裝 (Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271)。

【0465】 使用相圖之現象學研究途徑業經得以廣泛研究，且熟識該技藝者業經獲得如何配製微乳液之全面知識 (參見，如，Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY；Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245；Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335)。與傳統之乳液相比，微乳液係提供將水不溶性藥物溶解於自發形成之熱力學安定液滴的調配物中。

【0466】 於微乳液之製備中使用的界面活性劑係包括，但不限於，離子性界面活性劑、非離子性界面活性劑、Brij 96、聚氧乙烯油基醚、聚甘油脂肪酸酯、四甘油單月桂酸酯 (ML310)、四甘油單油酸酯 (MO310)、六甘油單油酸酯 (PO310)、六甘油五油酸酯 (PO500)、十甘油單癸酸酯 (MCA750)、十甘油單油酸酯 (MO750)、十甘油倍半油酸酯 (SO750)、十甘油十油酸酯 (DAO750)，單獨使用或與助界面活性劑合用。該助界面活性劑通常係短鏈醇，如乙醇、

1-丙醇、及 1-丁醇，用以藉由滲透入該界面活性劑膜內，並因為在界面活性劑分子之間產生孔洞空間而創建混亂之膜，因此增加界面流動性。惟，微乳液可不使用助界面活性劑而製備之，且不含醇之自乳化微乳液系統係該技藝中習知者。水相典型可係，但不限於，水、藥物之水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇、及乙二醇衍生物。油相可包括，但不限於，材料如 Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯、中鏈(C8-C12)單酸甘油酯、中鏈(C8-C12)二酸甘油酯、中鏈(C8-C12)三酸甘油酯、聚氧乙基化之甘油脂肪酸酯、脂肪醇、聚二醇化之甘油酯、飽和聚二醇化之 C8-C10 甘油酯、植物油及矽油。

【0467】 自藥物溶解及增強藥物吸收之觀點看來，微乳液係尤其感興趣者。脂質基微乳液(o/w 及 w/o 兩者)業經被提議增強包括肽在內之藥物的口服生物利用性(參見，如，U.S. Patent Nos. 6,191,105；7,063,860；7,070,802；7,157,099；Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390；Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205)。微乳液係提供下述優勢：改善之藥物溶解性、保護藥物不被酶水解、由於界面活性劑引發之膜流動性及滲透性之改變而可能增強藥物吸收、易於製備、易於以固體劑型口服投藥、改善臨床潛能、以及降低之毒性(參見，如，U.S. Patent Nos. 6,191,105；7,063,860；7,070,802；7,157,099；Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385；Ho et al., *J.*

Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143)。通常，當將微乳液之組分於室溫帶至一起時，可自發形成微乳液。當配製熱不穩定之藥物、肽或 iRNA 時，這尤其具有優勢。微乳液亦業經在化粧品及醫藥應用中有效地經皮輸送活性組分。人們希望，本發明之微乳液組成物及調配物將會促進對 iRNA 及核酸從胃腸道進行的全身性吸收，以及將會改善對 iRNA 及核酸的局部細胞攝取。

【0468】 本發明之微乳液亦可含有額外之組分及添加劑，如失水山梨醇單硬脂酸酯(Grill 3)、Labrasol 及滲透增強劑，以改善該調配物之性質並提升對本發明之 iRNA 及核酸的吸收。本發明之微乳液中使用的滲透增強劑可歸類為屬於下述五大類別之一：界面活性劑、脂肪酸、膽汁鹽、螯合劑、及非螯合非界面活性劑 s (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)。此等類別各自業經檢討於上。

【0469】

iii. 微粒

本發明之 RNAi 劑可併入顆粒如微粒中。微粒可藉由噴灑乾燥而生產，但亦可藉由其他方法包括凍乾、蒸發、流動床乾燥、真空乾燥或此等技術之組合而生產。

【0470】

iv. 滲透增強劑

於一態樣中，本發明係採用多種滲透增強劑以影響核酸，尤其是 iRNA，至動物皮膚內的有效輸送。大多數藥

物係以離子化及非離子化之形式存在於溶液中。惟，通常僅脂質可溶性或親脂性藥物容易地越過細胞膜。業經發現，若待越過之細胞膜經滲透增強劑處理時，甚至非親脂性藥物亦可越過該細胞膜。除了有助於非親脂性藥物之擴散越過細胞膜外，滲透增強劑亦提升親脂性藥物之滲透性。

【0471】 滲透增強劑亦可歸類為術語下述五大類之一者：亦即，界面活性劑、脂肪酸、膽汁鹽、螯合劑、及非螯合非界面活性劑(參見，如，Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002；Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92)。上揭之滲透增強劑類別係各自更詳細揭示於下。

【0472】 界面活性劑(或「表面活性劑」)係一化學整體，當將其溶解於水溶液時，其係降低該溶液之表面張力或該水溶液與另一液體之間的界面張力，結果提升透過黏膜之對 iRNA 的吸收。此等滲透增強劑處理膽汁鹽及脂肪酸外，亦包括，舉例而言，十二烷基硫酸鈉、聚氧乙烯-9-月桂基醚及聚氧乙烯-20-鯨蠟基醚)(參見，如，Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002；Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92)；及全氟化學乳液，如 FC-43 (Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252)。

【0473】 用作滲透增強劑之多種脂肪酸及其衍生物

係包括，舉例而言，油酸、月桂酸、癸酸(正癸酸)、肉豆蔻酸、棕櫚酸、硬脂酸、亞油酸、亞麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油單油酸酯(1-單油醯基-*rac*-甘油)、甘油二月桂酸酯、辛酸、花生四烯酸、甘油 1-單癸酸酯、1-十二烷基氮雜環庚-2-酮、乙醯基肉毒鹼、乙醯基膽鹼、其 C1-20 烷基酯類(如，甲酯、異丙酯及第三丁酯)、及其單甘酯及雙甘酯(亦即，油酸酯、月桂酸酯、癸酸酯、肉豆蔻酸酯、棕櫚酸酯、硬脂酸酯、亞麻酸酯等)(參見，如，Touitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006；Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92；Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33；El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654)。

【0474】 膽汁之生理學角色係包括促進脂質及脂溶性維生素之分散及吸收(參見，如，Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002；Brunton, Chapter 38 in: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935)。多種天然膽汁鹽類及其合成性衍生物，係用作滲透增強劑。因此，術語「膽汁鹽」係包括天然出現之膽汁組分之任意者以及其合成性衍生物之任意者。適當之膽汁鹽係包括，舉例而言，膽酸(或其藥學可接受之鈉鹽，膽酸鈉)、去氫膽酸(去氫膽酸鈉)、去氧

膽酸(去氧膽酸鈉)、麩胺膽酸(glucholic acid) (麩胺膽酸鈉)、甘胺膽酸(glycholic acid) (甘胺膽酸鈉)、甘胺去氧膽酸(甘胺去氧膽酸鈉)、牛磺膽酸(牛磺膽酸鈉)、牛磺去氧膽酸(牛磺去氧膽酸鈉)、鵝去氧膽酸(鵝去氧膽酸鈉)、烏索去氧膽酸(UDCA)、牛磺-24,25-二氫-梭鏈孢酸鈉(STDHF)、甘胺二氫梭鏈孢酸鈉及聚氧乙烯-9-月桂基醚(POE) (參見, 如, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583)。

【0475】 當螯合劑用於本發明中時，螯合劑可定義為藉由與金屬離子形成錯合物而自溶液中移除該金屬離子之化合物，結果為提升透過黏膜之對 siRNA 的吸收。關於他們作為滲透增強劑於本發明中的用途，螯合劑業經增加亦用作 DNase 抑制劑之優勢，蓋因大多數經表徵的 DNA 核酸酶需要用於催化之二價金屬離子並因此被螯合劑抑制 (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339)。適當之螯合劑係包括但不限於，乙二胺四乙酸二鈉(EDTA)、枸橼酸、

柳酸鹽(如, 柳酸鈉、5-甲氧基柳酸鹽及均香蘭酸鹽(homovanilate))、膠原之 N-乙醯基衍生物、laureth-9 及 β -二酮之 N-胺基乙醯基衍生物(烯胺類)(參見, 如, Katdare, A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51)。

【0476】本文中, 非螯合非界面活性劑滲透增強化合物可定義為下述化合物: 其證明無關緊要之作為螯合劑或作為界面活性劑之活性, 但儘管如此, 其仍提升透過消化道黏膜之對 iRNA 的吸收(參見, 如, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33)。此類滲透增強劑係包括, 舉例而言, 不飽和之環狀脲、1-烷基-及 1-烯基之氮雜環-烷酮衍生物(Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92); 以及非類固醇抗炎劑如雙氯芬酸鈉、吲哚美辛(indomethacin)及苯基丁氮酮(Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626)。

【0477】提升對 iRNA 之細胞水準之攝取的劑亦可加至本發明之藥學及其他組成物中。舉例而言, 陽離子性脂質如 lipofectin (Junichi et al, U.S. Pat. No. 5,705,188)、陽離子性甘油衍生物、及聚陽離子性分子如聚離胺酸

(Lollo et al., PCT Application WO 97/30731), 亦已知增強 dsRNA 之細胞攝取。可商購之轉染試劑之實例係包括, 舉例而言, Lipofectamine™(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine 2000™(Invitrogen; Carlsbad, CA)、293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA)、DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA)、FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA)、RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Oligofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA)、X-tremeGENE Q2 轉染試劑 (Roche; Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOTAP 脂質體轉染試劑 (Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOSPER 脂質體轉染試劑 (Grenzacherstrasse, Switzerland)、或 Eugene (Grenzacherstrasse, Switzerland)、Transfectam® 試劑 (Promega; Madison, WI)、TransFast™ 轉染試劑 (Promega; Madison, WI)、Tfx™-20 試劑 (Promega; Madison, WI)、Tfx™-50 試劑 (Promega; Madison, WI)、DreamFect™ (OZ Biosciences; Marseille, France)、EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, France)、TransPass^a D1 轉染試劑 (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA)、LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, USA)、PerFectin 轉染試劑 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、NeuroPORTER 轉染試劑 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、GenePORTER 轉

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

【0478】 其他劑可用以提升所投藥之核酸之滲透，包括二醇類如乙二醇及丙二醇、吡咯類如 2-吡咯、氮酮類、及萜類如檸檬烯及薄荷酮。

【0479】

v. 載劑

本發明之某些組成物亦將載劑化合物併入調配物中。本文中，「載劑化合物」或「載劑」可指稱核酸或其類似物，其係惰性(亦即，本身不具有生物學活性)但係作為核酸而被體內製程識別，而該製程係藉由例如降解生物學活性核酸或促進該核酸從循環移除而降低核酸之生物應用性。將核酸及典型過量之載劑化合物共同投藥，可導致於肝臟、腎臟或循環系統外之其他存儲器官中回收之核酸量的實質性下降，這可能是由於該載劑化合物與該核酸之間對於共同受體之競爭。舉例而言，當將部分硫代磷酸酯化

之 dsRNA 與聚肌苷酸、硫酸葡聚糖、多胞苷酸 (polycytidic acid) 或 4-乙醯胺基-4'-異硫氰基-苣-2,2'-二磺酸共同投藥時，於肝組織中回收之該部分硫代磷酸酯化之 dsRNA 的量減少 (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121 ; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

【0480】

vi. 賦形劑

與載劑化合物對照，「藥學載劑」或「賦形劑」係藥學可接受之溶劑、懸浮劑或任何其他用於將一種或多種核酸輸送至動物之藥理學惰性運載劑。該賦形劑可係液體或固體，其係慮及計劃之投藥方式而選擇，以當與核酸及給定醫藥組成物之組分混合時，提供所欲之體積、一致性等。典型之藥學載劑係包括，但不限於，黏合劑(如，預糊化之玉米澱粉、聚乙烯基吡咯烷酮或羥丙基甲基纖維素等)；填料(如，乳糖及其他糖類、微晶纖維素、果膠、明膠、硫酸鈣、乙基纖維素、聚丙烯酸酯或磷酸氫鈣等)；潤滑劑(如，硬脂酸鎂、滑石、氧化矽、膠體二氧化矽、硬脂酸、金屬硬脂酸鹽、氫化植物油、玉米澱粉、聚乙二醇、苯甲酸鈉、醋酸鈉等)；崩解劑(如，澱粉、羥基乙酸澱粉鈉等)；以及，潤濕劑(如，十二烷基硫酸鈉等)。

【0481】 適用於非腸胃外投藥之不與核酸進行有害反應之藥學可接受的有機或無機賦形劑亦可用以配製本發明之組成物。適當之藥學可接受之載劑係包括，但不限於，

水、鹽溶液、醇類、聚乙二醇、明膠、乳糖、直鏈澱粉、硬脂酸鎂、滑石矽酸、黏性石蠟、羥甲基纖維素、聚乙烯基吡咯烷酮等。

【0482】 用於核酸之外用投藥的調配物可包括無菌及非無菌之水溶液、於一般溶劑如醇類中之非水溶液、或核酸於液體或固體基質中之溶液。該等溶液亦可含有緩衝劑、稀釋劑及其他適當之添加劑。可使用適用於非腸胃外投藥之不與核酸進行有害反應的藥學可接受之有機或無極賦形劑。

【0483】 適當之藥學可接受之賦形劑係包括，但不限於，水、鹽溶液、醇類、聚乙二醇、明膠、乳糖、直鏈澱粉、硬脂酸鎂、滑石、矽酸、黏性石蠟、羥甲基纖維素、聚乙烯基吡咯烷酮等。

【0484】

vii. 其他組分

本發明之組成物可額外含有傳統上以其技藝確定之用量發現於醫藥組成物中之其他佐劑組分。因此，舉例而言，該組成物可含有額外、可相容、藥學活性之材料如，舉例而言，止癢劑、收斂劑、局部麻醉劑或抗炎劑；或可含有可用於物理上配製之本發明之組成物之多種劑型的額外材料，如染料、芳香劑、防腐劑、抗氧化劑、遮光劑、增稠劑、及安定劑。惟，當加入此等材料時，此等材料不應過度影響本發明之組成物之組分的生物學活性。該等調配物可經無菌化，且若需要，與不與該調配物之核酸進行

有害相互作用之助劑如潤滑劑、防腐劑、安定劑、濕潤劑、乳化劑、用於影響滲透壓之鹽類、緩衝劑、著色劑、芳香劑及/或芳族物質等混合。

【0485】 水性懸浮液可含有增加該懸浮液黏性之物質，舉例而言，羧甲基纖維素鈉、山梨醇及/或葡聚糖。該懸浮液亦可含有安定劑。

【0486】 一些態樣中，本發明提出之醫藥組成物係包括(a)一種或多種 iRNA 化合物及(b)一種或多種藉由非 RNAi 機制而發揮功能且可用於治療出血病變之劑。此等劑之實例係包括，但不限於，抗炎劑、抗脂肪變性劑、抗病毒及/或抗纖維化劑。此外，一般用以保護肝臟之其他物質如水飛薊素亦可用於與本文中揭示之 iRNA 合用。其他可用於治療肝病之劑係包括替比夫定(telbivudine)、恩替卡韋(entecavir)、及蛋白酶抑制劑如特拉匹韋(telaprevir)及其他諸如 Tung 等人於第 2005/0148548 號、第 2004/0167116 號、及第 2003/0144217 號美國專利申請案中揭示者；以及 Hale 等人於第 2004/0127488 號美國專利申請案中揭示者。

【0487】 此等化合物之毒性及療效可藉由標準藥學過程於細胞培養物或實驗動物如用於測定 LD50(將群體之半數致死之劑量)及 ED50(對群體之半數治療上有效之劑量)者之體內測定。毒性與療效之間之劑量比係治療指數，其可表現為 LD50/ED50 比。顯現高治療指數之化合物係較佳者。

【0488】 自細胞培養物檢定及動物研究獲得之資料

可用於制訂用於人之劑量範圍。本發明提出之組成物的劑量通常係處於包括 ED50 且具有低毒或無毒之循環濃度範圍內。該劑量可於此範圍內依據所採用之劑型及所使用之投藥途徑而變。對於在本發明所提出之方法中使用的任意化合物，治療有效劑量最初可自細胞培養物檢定預估之。可制訂用於動物模型以達成循環血漿濃度範圍之化合物劑量，或者，當適宜時，靶標序列之多肽產物的劑量(如，達成降低之多肽濃度)，該劑量係包括於細胞培養物中測定之該 IC50(亦即，測試化合物達成對症狀之半最大抑制的濃度)。此訊息可用以更準確地測定可用於人之劑量。舉例而言，可藉由高效液相色層分析量測血漿中之水準。

【0489】 除了如上文檢討之投藥之外，本發明提出之 iRNA 可與其他已知之有效於治療由 *Serpina1* 表現介導之病理學進程的劑合用。無論如何，基於使用該技藝中已知或本文中揭示之標準效能量測所觀察到之結果，投藥醫師可調整 iRNA 投藥之量及時機。

【0490】

VI. 抑制 *Serpina1* 表現之方法

本發明係提供抑制 *Serpina1* 於細胞內之表現的方法。該方法係包括令細胞與 RNAi 劑如雙股 RNAi 劑接觸，後者之量係有效於抑制該細胞內之 *Serpina1* 表現，從而抑制 *Serpina1* 於該細胞內之表現。

【0491】 細胞與雙股 RNAi 劑之接觸可於體外或體內進行。令細胞於體內與 RNAi 劑接觸係包括，令個體如

人類個體體內之細胞或細胞群組與該 RNAi 劑接觸。體外及體內接觸方法之組合亦係可能者。接觸可係直接或間接，如上文檢討者。再者，與細胞之接觸可經由靶向配位子予以實施，該配位子係包括本文中揭示或該技藝中已知之任意配位子。於較佳之態樣中，該靶向配位子係碳水化合物部分，如 GalNAc₃ 配位子，或將該 RNAi 劑引導至感興趣之部位如個體之肝臟的任意其他配位子。

【0492】 本文中，術語「抑制」係與「降低」、「靜默」、「下調」及其他類似術語互換使用，且係包括任意程序之抑制。

【0493】 短語「抑制 Serpina1 之表現」係意圖指稱對任何 Serpina1 基因(例如，小鼠 Serpina1 基因、大鼠 Serpina1 基因、猴 Serpina1 基因、或人 Serpina1 基因)以及 Serpina1 基因之變體或突變體的抑制。因此，於經基因性操作之細胞、細胞群組或有機體之上下文中，Serpina1 基因可係野生型 Serpina1 基因、突變 Serpina1 基因、或轉基因 Serpina1 基因。

【0494】 「抑制 Serpina1 基因之表現」係包括對 Serpina1 基因之任意程度的抑制，如，對 Serpina1 基因之表現的至少部分阻抑。可基於與 Serpina1 基因表現有關之任意變量之程度或程度之變化如 Serpina1 mRNA 程度、Serpina1 蛋白程度、或脂質程度而評估 Serpina1 基因之表現。這一程度可於單個細胞內或細胞群組，包括，如源自個體之樣品內評估。

【0495】 可藉由一個或多個與 *Serpinal* 表現相關之變量之絕對或相對程度相對於對照程度之降低而評估抑制。該對照程度可係該技藝中使用之任意類型之對照程度，如，初始劑量基線程度、或從相似之個體、細胞或未經處理或經對照(如，僅緩衝劑對照或非活性劑對照)處理之樣本測得之程度。

【0496】 於本發明之方法的一些態樣中，*Serpinal* 基因之表現被抑制至少約 5%、至少約 10%、至少約 15%、至少約 20%、至少約 25%、至少約 30%、至少約 35%、至少約 40%、至少約 45%、至少約 50%、至少約 55%、至少約 60%、至少約 65%、至少約 70%、至少約 75%、至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%、或至少約 99%。

【0497】 對 *Serpinal* 基因表現之抑制可藉由第一細胞或細胞群組(此等細胞可存在於例如源自個體之樣本內)內所表現之 mRNA 量的下降而得以證明，於該細胞或細胞群組中，*Serpinal* 基因被轉錄，且該細胞業經處理(如，藉由令該細胞或細胞群組與本發明之 RNAi 劑接觸，或藉由投藥本發明之 RNAi 劑至體內存在或曾經存在該等細胞之個體)，故，與實質上與該第一細胞或細胞群組一致但未經如是處理之第二細胞或細胞群組(對照細胞)相比，*Serpinal* 基因之表現得以抑制。於較佳之態樣中，該抑制係藉由使用下式將經處理細胞內之 mRNA 程度表現為對照細胞內

mRNA 程度之百分比而評估之：

$$\frac{(\text{對照細胞內 mRNA}) - (\text{經處理細胞內之 mRNA})}{(\text{對照細胞內 mRNA})} \cdot 100\%$$

【0498】 或者，對 Serpinal 基因表現之抑制可以參數之下降方面評估之，該參數係與 Serpinal 基因表現如 Serpinal 蛋白表現如 ALT、鹼性磷酸酶、膽紅素、凝血素及白蛋白功能性相關。藉由該技藝中已知之任意檢定，可於任何或結構性地或藉由基因工程而表現 Serpinal 之細胞內測得 Serpinal 基因靜默。肝臟係 Serpinal 表現之主要部位。其他表現之顯著部位係包括肺及腸。

【0499】 對 Serpinal 蛋白表現之抑制可藉由細胞或細胞群組(如，於源自個體之樣本內所表現之蛋白質程度)所表現之 Serpinal 蛋白程度的下降而得以證明。如上文對於 mRNA 阻抑評估之解釋，對經處理之細胞或細胞群組內蛋白表現程度之抑制可類似地表現為相對於對照細胞或細胞群組內蛋白程度的百分比。

【0500】 可用以評估對 Serpinal 基因表現之一種的對照細胞或細胞群組係包括尚未與本發明之 RNAi 劑接觸的細胞或細胞群組。舉例而言，該對照細胞或細胞群組可源自使用 RNAi 劑治療個別個體之前的該個體(如，人或動物個體)。

【0501】 細胞或細胞群組所表現之 Serpinal mRNA 的程度可使用該技藝中習知之用於評估 mRNA 表現的任意方法測得。於一態樣中，樣本中 Serpinal 表現之程度係藉

由偵檢所轉錄之多核苷酸或其部分如 *Serpinal* 基因之 mRNA 而測得。可使用 RNA 提取技術從細胞提取 RNA，該技術係包括，舉例而言，使用酸酚/異硫氰酸胍提取 (RNazol B; Biogenesis)、RNeasy RNA 製備套組 (Qiagen) 或 PAXgene (PreAnalytiX、Switzerland)。使用核糖核酸雜交之典型檢定格式係包括核連綴檢錄檢定 (nuclear run-on assay)、RT-PCR、RNase 保護檢定 (Melton et al., *Nuc. Acids Res.* 12:7035)、北方墨點法、原位雜交、及微陣列分析。

【0502】 於一態樣中，係使用核酸探針測得 *Serpinal* 表現之程度。本文中，術語「探針」係指稱能選擇性結合至特定 *Serpinal* 之任意分子。探針可由熟識該技藝者合成，或係源自適宜之生物學製劑。探針可經特異性設計以待標記。可用作探針之分子的實例係包括，但不限於，RNA、DNA、蛋白質、抗體及有機分子。

【0503】 單離之 mRNA 可用於雜交及擴增檢定中，該等檢定係包括，但不限於，南方或北方分析、聚合酶鏈反應 (PCR) 分析及探針陣列。用於測定 mRNA 程度之一種方法係包括，令該單離之 mRNA 與可雜交至 *Serpinal* mRNA 之核酸分子 (探針) 接觸。於一態樣中，該 mRNA 係固定於股本表面且與探針接觸，舉例而言，藉由令該單離之 mRNA 於瓊脂糖凝膠上跑動，並將該 mRNA 自該凝膠轉移至膜如硝基纖維素膜。於一備選之態樣中，該探針係固定於固體表面，且該 mRNA 係與該探針接觸，舉例而言，於 Affymetrix 基因晶片陣列中。熟練之技工可輕易適應將

已知之 mRNA 偵檢方法用於 Serpinal mRNA 程度之測定中。

【0504】 另一用於測定樣本中 Serpinal 表現之程度的可選方法係包括核酸擴增製程及/或諸如樣本中之 mRNA 的逆轉錄酶製程(用以製備 cDNA)，如，藉由 RT-PCR (實驗態樣係詳述於 Mullis 於 1987 年獲准之第 4,683,202 號美國專利中)、連接酶鏈反應(Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193)、自維持序列複製(Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878)、轉錄擴增系統(Kwoh et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177)、Q-β 複製酶(Lizardi et al.(1988) *Bio/Technology* 6:1197)、滾環複製(Lizardi 等人，第 5,854,033 號美國專利)或任何其他核酸擴增方法，之後使用該領域技術人員所習知之技術偵檢所擴增之分子。此等偵檢方案係尤其有用於以非常低之數量存在的核酸分子之偵檢。於本發明之特別方法中，係藉由定量螢光 RT-PCR (亦即，TaqMan™ 系統)測定 Serpinal 表現之水準。

【0505】 可使用膜印跡(如用於雜交分析如北方印跡、南方印跡及點印跡等中者)、或微孔、樣本管、凝膠、珠或纖維(或包含經鏈結之核酸之任意固體支撐物)監控 Serpinal mRNA 之表現程度。參見，第 5,770,722 號、第 5,874,219 號、第 5,744,305 號、第 5,677,195 號及第 5,445,934 號美國專利中，其係藉由引用而併入本文。Serpinal 表現水準之測定亦可包含於溶液中使用核酸探

針。

【0506】 於較佳之態樣中，使用分支鏈 DNA (bdNA) 檢定或實時 PCR (qPCR) 評估 mRNA 表現之程度。此等方法之使用係揭示並例示性說明於本文中存在之實施例中。

【0507】 可使用該技藝中已知之用於量測蛋白質程度之任意方法測定 Serpina1 蛋白表現之程度。此等方法係包括，舉例而言，電泳、毛細管電泳、高效液相色層分析 (HPLC)、薄層色層分析 (TLC)、高擴散色層分析、流體或凝膠沈澱素反應、吸收光譜、比色檢定、分光光度檢定、流式細胞分析、免疫擴散(單或雙)、免疫電泳、西方印跡法、放射免疫檢定 (RIA)、酶聯免疫吸收檢定 (ELISAs)、免疫螢光檢定、電化學發光檢定等。

【0508】 本文中，術語「樣本」係指稱從個體分離之相似流體、細胞或組織之集合，以及個體體內存在之流體、細胞或組織。生物學流體之實例係包括血液、血清及漿膜液、血漿、淋巴、尿液、腦脊髓液、唾液、眼液等。組織樣本可包括來自組織、器官或局部區域之樣本。舉例而言，樣本可係源自特定之器官、器官之部分、或彼等器官內之流體或細胞。於某些態樣中，樣本可係源自肝臟(如，整個肝臟或肝臟之某些片段或肝臟內之某些類型之細胞如肝細胞)。於較佳之態樣中，「源自個體之樣本」係指稱自該個體抽取之血液或血漿。於進一步之態樣中，「源自個體之樣本」係指稱源自該個體之肝臟組織。

【0509】 於本發明之方法的一些態樣中，RNAi 劑係

投藥至個體，故該 RNAi 劑係輸送至該個體體內之特定部位。可使用源自來自該個體體內特定部位之體液或組織之樣本中 *Serpina1* mRNA 或 *Serpina1* 蛋白之程度或程度之改變的測量，來評估對 *Serpina1* 表現的抑制。於較佳之態樣中，該部位係肝臟。該部位亦可係來自前述任一者之細胞的小分區或小群。該部位亦可包括表現特定類型之受體的細胞。

【0510】

VII. 治療或預防 *Serpina1* 相關疾病之方法

本發明亦提供治療或預防可藉由調節 *Serpina1* 基因表現而予以調整之疾病及病症的方法。舉例而言，本文中揭示之組成物可用以治療 *Serpina1* 相關疾病，如肝病，如慢性肝病、肝炎、肝硬化、肝纖維化、及/或肝細胞癌、以及其他可能與此等病變相關之病理狀況如肺炎、肺氣腫、及 COPD。

【0511】 本發明亦提供抑制個體體內如具有 *Serpina1* 缺陷性變體之個體體內肝細胞癌之發展的方法。該方法係包括將治療有效量之本發明之組成物投藥至該個體，從而抑制該個體體內肝細胞癌之發展。

【0512】 本發明亦提供本發明之組成物用於降低錯誤折疊之 *Serpina1* 於個體如具有 *Serpina1* 缺陷性變體之個體之肝臟中蓄積的方法及用途。該等方法係包括，投藥治療有效量的本發明之組成物至該個體，從而降低錯誤折疊之 *Serpina1* 於該個體之肝臟中的蓄積。

【0513】 本文中，「個體」係包括人或非人動物，較佳係脊椎動物，更佳係哺乳動物。個體可包括轉基因之有機體。最佳地，該個體係人，如苦於或易發展與 *Serpina1* 相關之疾病的人。於一態樣中，該苦於或易發展與 *Serpina1* 相關之疾病的人係具有一種或多種 *Serpina1* 缺陷等位基因，如 PIZ、PIS、或 PIM(Malton)等位基因。

【0514】 於本發明進一步之態樣中，本發明之 iRNA 劑係與額外之治療劑組合投藥。該 iRNA 劑及額外之治療劑可於同一組成物中組合投藥如腸道外投藥，或該額外之治療劑可作為獨立組成物之一部分投藥或藉由本文中揭示之另一方法投藥。

【0515】 適用於本發明之方法之額外之治療劑的實例係包括彼等已知用以治療肝臟病變如肝硬化之劑。舉例而言，本發明所提出之 iRNA 劑可與諸如下列者同時投藥：烏索去氧膽酸(UDCA)、免疫阻抑劑、甲氨蝶呤、皮質類固醇、環孢菌素、秋水仙鹼、止癢治療如抗組胺、消膽胺(cholestyramine)、考來替泊(colestipol)、利福平(rifampin)、屈大麻酚(dronabinol (Marinol))、及血漿去除(plasmapheresis)、預防性抗生素、紫外光、鋅補充劑、甲肝疫苗、流感疫苗及肺炎雙球菌疫苗。

【0516】 於本發明之方法的一些態樣中，*Serpina1* 表現係經降低延長之持續時間，如至少 1 週、2 週、3 週、或 4 週或更久。舉例而言，於某些例子中，藉由投藥本文中揭示之 iRNA 劑，*Serpina1* 基因之表現被阻抑至少約

5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、或 55%。一些態樣中，藉由投藥該 iRNA 劑，Serpina1 基因被阻抑至少約 60%、70%、或 80%。一些態樣中，藉由投藥該 iRNA 劑，Serpina1 基因被阻抑至少約 85%、90%、或 95%。

【0517】 本發明之 iRNA 劑可使用該技藝中已知之任意投藥模式投藥至個體，該模式係包括但不限於，皮下投藥、靜脈投藥、肌肉投藥、眼內投藥、支氣管投藥、胸膜投藥、腹膜投藥、動脈投藥、淋巴管投藥、腦脊髓投藥、及其任意組合。於較佳之態樣中，該 iRNA 劑係經皮下投藥。

【0518】 一些態樣中，該投藥係經由積存注射完成。積存注射可於較長之時間段內以一致之方式釋放 iRNA 劑。因此，積存注射可減少獲得所欲之效果如所欲之對 Serpina1 之抑制、或治療或預防效果所需之投藥頻次。積存注射亦可提供更一致之血清濃度。積存注射可包括皮下注射或肌肉注射。於較佳之態樣中，該積存注射係皮下注射。

【0519】 一些態樣中，該投藥係經由幫浦進行。該幫浦可係外部幫浦或經外科手術植入之幫浦。於某些態樣中，該幫浦係經皮下植入之滲透幫浦。於其他態樣中，該幫浦係輸液幫浦。輸液幫浦可用於靜脈輸液、皮下輸液、動脈輸液或硬膜外輸液。於較佳之態樣中，該輸液幫浦係皮下輸液幫浦。於其他態樣中，該幫浦係經外科手術植入

之將該 RNAi 劑輸送至肝臟之幫浦。

【0520】 其他投藥模式係包括硬膜外投藥、腦內投藥、腦室內投藥、鼻腔投藥、動脈投藥、心內投藥、骨內輸液、鞘內投藥、玻璃體內投藥、及肺內投藥。投藥之模式可基於所欲者是否為局部或全身性治療以及基於待治療之面積而選擇。可選擇投藥之路徑及部位以提升靶向性。

【0521】 本發明之方法係包括以足以阻抑/降低 *Serpina1* mRNA 程度達至少 5 天，更佳 7、10、14、21、25、30 或 40 天之劑量投藥 iRNA 劑；以及，視需要，投藥第二次單劑之該 iRNA 劑，其中，該第二次單劑係於第一次單劑投藥後至少 5 天，更佳 7、10、14、21、25、30 或 40 天後投藥，從而抑制個體體內 *Serpina1* 基因之表現。

【0522】 於一態樣中，多劑之本發明之 iRNA 劑的投藥係不超過每四週一次、不超過每三週一次、不超過每兩週一次、或不超過每週一次。於另一態樣中，該投藥可維持 1、2、3、或 6 個月，或 1 年或更久。

【0523】 通常，該 iRNA 劑並不激活免疫系統，如，其並不增加細胞因子程度，如 TNF- α 或 IFN- α 程度。舉例而言，當藉由檢定如本文中揭示之體外 PBMC 檢定進行量測時，TNF- α 或 IFN- α 程度之增加係少於以對照 iRNA 劑如不以 *Serpina1* 為靶標之 iRNA 劑處理之對照細胞的 30%、20% 或 10%。

【0524】 舉例而言，可對個體投藥治療量之 iRNA 劑，如 0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、1.5 mg/kg、2.0 mg/kg、或

2.5 mg/kg dsRNA。該 iRNA 劑可藉由靜脈輸液投藥，投藥時長為例如 5 分鐘、10 分鐘、15 分鐘、20 分鐘、或 25 分鐘。該投藥係重複進行，舉例而言，基於規律間隔，如每雙週一次(即，每兩週一次)，持續 1 個月、2 個月、3 個月、4 個月或更久。

【0525】 於初始之治療方案後，該治療可以較低頻次進行。舉例而言，每雙週投藥一次，持續 3 個月後，投藥可每個月重複一次，持續 6 個月或一年或更久。該 iRNA 劑之投藥可將諸如細胞、組織、血液、尿液、器官(如，肝臟)或該患者之其他部位內之 *Serpina1* 水準降低至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80% 或至少 90% 或更多。

【0526】 於投藥全劑量之 iRNA 劑之前，可對患者投藥較小之劑量，並監控副反應，如過敏反應，或監控提高之脂質程度或血壓。於另一實例中，可監控患者之非所欲之免疫刺激效果，如增加之細胞因子(如，TNF- α 或 INF- α) 水準。例示性較小劑量係導致小於或等於 5% 之輸液反應發生的劑量。

【0527】 舉例而言，可藉由量測疾病進展、疾病緩解、症狀嚴重性、疼痛減輕、生活品質、持續治療效果所需之藥物劑量、疾病標記物之程度或適用於待治療或待作為預防靶標之給定疾病之任意其他可量測之參數，而評估疾病之治療或預防效能。藉由量測此等參數之任一者或參

數之任意組合而監控治療或預防之效能，係完全處於熟識該技藝者之能力範圍內。舉例而言，藉由週期性監控肝纖維化標記物： α -2-巨球蛋白(α -MA)、運鐵蛋白、載脂蛋白 A1、玻尿酸(HA)、層黏連蛋白、N-端原膠原 III(PIIINP)、7S 膠原 IV (7S-IV)、總膽紅素、間接膽紅素、丙胺酸胺基轉移酶(ALT)、天冬胺酸胺基轉移酶(AST)、AST/ALT、 γ -麩胺醯轉胺酶(GGT)、鹼性磷酸酶(ALP)、白蛋白、白蛋白/球蛋白、血尿素氮(BUN)、肌酸酐(Cr)、甘油三酸酯、膽固醇、高密度脂蛋白及低密度脂蛋白、及肝臟穿刺活體組織切片，可評估對肝纖維化或肝纖維化改善之治療效能。可於治療前(初始讀數)及治療方案過程中之後續(後來讀數)施行肝纖維化標記物之量測及/或肝臟穿刺活體組織切片。

【0528】 將後續讀數與初始讀數比較，向醫師提供治療是否有效之指示。藉由量測此等參數之任一者或參數之任意組合而監控治療或預防之效能，係完全處於熟識該技藝者之能力範圍內。與以 Serpinal 為靶向之 iRNA 劑或其醫藥組成物之投藥相關聯，「有效對抗」與 Serpinal 相關之疾病如肝病如肝纖維化病症，表明，以臨床適宜之方式投藥本發明之 iRNA 劑係導致對至少統計學顯著分數之患者的有益效果，如症狀之改善、治愈、疾病負荷之減輕、腫瘤質量或細胞數目之下降、生命之延長、生活品質之改善、或通常被熟悉肝病治療之醫生認為積極的其他效果。

【0529】 於本發明之方法中，如本文中揭示之 iRNA

劑可用以治療具有與 Serpinal 相關疾病如肝病如肝炎、肝硬化、肝纖維化及/或肝細胞癌之跡象、症狀及/或標記物、或被診斷患有該疾病、或處於罹患該疾病風險的個體。熟識該技藝之人士可容易地監控接受如本文中揭示之 iRNA 劑之個體體內此等病變的跡象、症狀、及/或標記物，並檢定此等跡象、症狀及/或標記物之至少 10% 的下降，且較佳係下降至代表肝病低風險之臨床程度。

【0530】 當疾病狀態之一個或多個參數存在統計學顯著改善時，或未出現若不經處理則預期之症狀的惡化或發展時，則證實治療或預防之效果。作為實例，疾病之可量測參數(如前文所述之肝功能)向有利方向改變至少 10%，較佳至少 20%、30%、40%、50% 或更高，可表明有效之治療。

【0531】 對於本發明之給定 iRNA 劑或該 iRNA 劑之調配物的效能，亦可使用用於該技藝中已知之給定疾病之實驗動物予以判斷。當使用實驗動物模型時，當觀察到標記物或症狀的統計學顯著之下降時，則證實治療之效能。

【0532】 當一種或多種症狀被降低或緩解時，亦證實治療或預防之效果。舉例而言，當虛弱、疲憊、體重減輕、惡心、嘔吐、腹部腫脹、肢端腫脹、極度瘙癢、及眼及/或皮膚之黃疸之一者或多者得以降低或緩解時，則治療或預防有效。

【0533】 對於某些適應症，可藉由 Serpinal 蛋白之血清程度的增加而量測該效能。作為實例，正確折迭之

Serpinal 的血清程度增加至少 10%、至少 20%、至少 50%、至少 100%、至少 200%或更高，可係有效治療之指徵。

【0534】 或者，可藉由疾病嚴重性之減輕而量測該效能，該減輕係藉由熟識該技藝者基於臨床接受之疾病嚴重性分級量表診斷而測得，該分級量表係例如 CP 評分 (Child-Pugh score) (有時為 CTP 評分 (Child-Turcotte-Pugh score))。於此實例中，係藉由五個臨床測量值：膽紅素、血清白蛋白、INR、腹水、及肝性腦病，來量測慢性肝病，主要是肝硬化的預後。每一標記物係賦值 1 至 3，而總值係用以提供分類為 A (5 至 6 個點)、B (7 至 9 個點)、或 C (10 至 15 個點)之評分，該評分可能與一年及兩年存活率相關聯，。測定及分析 CP 評分之方法係該技藝中習知者 (Farnsworth et al, Am J Surgery 2004 188:580-583 ; Child and Turcotte. Surgery and portal hypertension. In: The liver and portal hypertension. Edited by CG Child. Philadelphia: Saunders 1964:50-64 ; Pugh et al, Br J Surg 1973;60: 648-52)。於此實例中，可藉由患者從例如「B」至「A」之移動而量測效能。任何導致例如使用適宜評分量測之疾病嚴重性減輕的積極改變，皆表示使用如本文中揭示之 iRNA 或 iRNA 調配物之治療係勝任者。

【0535】 於一態樣中，該 RNAi 劑之投藥劑量係約 0.25 mg/kg 至約 50 mg/kg 之間，如，約 0.25 mg/kg 至約 0.5 mg/kg 之間、約 0.25 mg/kg 至約 1 mg/kg 之間、約 0.25 mg/kg 至約 5 mg/kg 之間、約 0.25 mg/kg 至約 10 mg/kg 之

間、約 1 mg/kg 至約 10 mg/kg 之間、約 5 mg/kg 至約 15 mg/kg 之間、約 10 mg/kg 至約 20 mg/kg 之間、約 15 mg/kg 至約 25 mg/kg 之間、約 20 mg/kg 至約 30 mg/kg 之間、約 25 mg/kg 至約 35 mg/kg 之間、或約 40 mg/kg 至約 50 mg/kg 之間。

【0536】 可調整投藥至個體之 RNAi 劑的劑量，以平衡特定劑量之風險與利益之平衡，舉例而言，以達成所欲之 *Serpina1* 基因阻抑程度(如基於諸如 *Serpina1* mRNA 阻抑、*Serpina1* 蛋白表現而評估者)或所欲之治療性或預防性效果，同時避免非所欲之副作用。

【0537】 一些態樣中，該 RNAi 劑係以兩劑或更多劑投藥。若所欲者係促進重複或頻繁之輸液，則可採取輸送裝置如幫浦、半永久性支架(如，靜脈內支架、腹膜內支架、腦池內支架、或囊內支架)、或蓄積池之植入。一些態樣中，後續劑量之數目或量係取決於所欲效果如對 *Serpina1* 基因之阻抑的達成，或治療性或預防性效果如減少肝病症狀的達成。一些態樣中，該 RNAi 劑係根據時間表投藥。舉例而言，該 RNAi 劑可投藥每週一次、每週兩次、每週三次、每週四次、或每週五次。一些態樣中，該時間表係包括規律間隔之投藥，如每小時、每 4 小時、每 6 小時、每 8 小時、每 12 小時、每天、每 2 天、每 3 天、每 4 天、每 5 天、每週、每雙週、每月。於其他態樣中，該時間表係包括短間隔之投藥，之後為不投藥該劑之較長時間段。一些態樣中，該 RNAi 劑係以下述計量方案投藥，該方案係包

括短間隔投藥之「負載期」，其後可為該 RNAi 劑以較長之時間間隔投藥的「維持期」。

【0538】 此等時間表之任意者可視需要重複一次或多次。重複之次數可取決於所欲之效果如對 *Serpinal* 基因之抑制的達成，及/或治療性或預防性效果如減輕與 *Serpinal* 相關疾病如肝病之症狀的達成。

【0539】 另一方面，本發明係提出指導末端使用者如護理者或個體如何投藥本文中揭示之 iRNA 劑的方法。該方法係包括，視需要，向末端使用者提供一劑或多劑之 iRNA 劑，指導該末端使用者以本文中揭示之方案投藥該 iRNA 劑，從而指導該末端使用者。

【0540】 遺傳易感性於靶標基因相關疾病如肝病之發展中扮演角色。因此，需要 siRNA 之患者可藉由家族病史而鑒別，或者，舉例而言，藉由篩查一種或多種遺傳標記物或變體而鑒別。據此，一方面，本發明係提供藉由基於患者具有 *Serpinal* 缺陷性或 *Serpinal* 缺陷性基因變體如 PIZ、PIS、或 PIM(Malton)等位基因選擇患者而治療該患者的方法。該方法係包括對該患者投藥治療有效量之 iRNA 劑。

【0541】 健康護理提供者如醫生、護士、或家庭成員，可於開藥或投藥本發明之 iRNA 劑前取得家族病史。此外，可施行測試以測定基因型或表型。舉例而言，對來自該患者之樣本如血液樣本可施行 DNA 測試，以於將 *Serpinal* dsRNA 投藥至患者之前鑒別該患者之 *Serpinal* 基

因型及/或表型。

【0542】

VIII. 套組

本發明亦提供使用任意該 iRNA 劑及/或實施本發明之任意方法的套組。此等套組係包括一種或多種 RNAi 劑及其使用說明書，如藉由令細胞與其量有效易抑制 Serpina1 表現之該 RNAi 劑接觸而抑制該細胞內 Serpina1 表現的使用說明書。該等套組可視需要復包含令該細胞與該 RNAi 劑結束之元件(如，注射裝置)、或量測對 Serpina1 之抑制的元件(如，量測對 Serpina1 mRNA 之抑制的元件)。此等量測對 Serpina1 之抑制的元件可包含從個體獲取樣本如血漿樣本的元件。本發明之套組可視需要復包含投藥該 RNAi 劑至個體之元件，或確定治療有效量或預防有效量之元件。

【0543】 除非定義排除，本文中使用的之所有科技術語皆具有與具有本發明所屬領域通常知識者所一般理解者相同的意義。儘管與本文中揭示之彼等相似或等價之方法及材料可用於本發明提出之 iRNA 及方法的實踐及測試中，但適當之方法及材料係揭示於下。本文中提及之所有出版物、專利申請案、專利、及其他參考文獻係藉由引用而以其整體併入本文。若衝突，則以本說明書包括定義為準。此外，該等材料、方法、及實施例係僅用於例示性說明，而非意圖限制。

[實施例]

【0544】

實施例 1. 脫靶效應及體內毒性之減輕

RNA 干擾或「RNAi」最初由 Fire 及其合作者創造，以揭示雙股 RNAi(dsRNA)可阻斷基因表現之觀察結果 (Fire et al.(1998) *Nature* 391, 806-811; Elbashir et al. (2001) *Genes Dev.* 15, 188-200)。短 dsRNA 係於多種有機體包括脊椎動物體內導引基因特異性、轉錄後靜默，且業經提供用於研究基因功能之新的工具。RNAi 係由 RNA 誘導靜默複合物(RISC)介導，該複合物係序列特異性、多組分之核酸酶，其摧毀同調於該靜默觸發因子之信使 RNA。已知，RISC 係含有源自雙股 RNA 觸發因子之短 RNA (大約 22 個核苷酸)，但此活性之蛋白組成仍係未知。

【0545】 siRNA 之脫靶效應之一係 miRNA 樣效應，亦即，阿爾谷蛋白(argonaute protein)，其係 RNA 干擾中之核心效應子，其處理 siRNA，而該 siRNA 係為了誘導 RNA 干擾而作為 miRNA (microRNA)被人工引入者(Lam et al.(2015)*Molecular Therapy Nucleic Acids*(2015)4, e252)。該 miRNA 主要透過種子區域(5'端之位置 2 至 7)與用於基因阻抑之靶標 mRNA 間的鹼基配對來識別靶標基因。由 siRNA 造成之脫靶係發源於 siRNA 之該加載有 RISC 之反義股的種子區域與一種或多種 mRNA 之間的鹼基互補性。siRNA 中之該 miRNA 樣脫靶效應業經報導於若干研究中，且依據種子區域之序列而影響多數基因之表現，且其嚴重程度足以在基於 siRNA 之表型篩查中造成高達 30%的陽性採樣。此外，於 miRNA 之情形中，他們亦被報導，

當種子區域與靶標間之相互作用變弱時，他們透過其 3' 末端區域內之補償性配對(3'-補償性配對)而靜默靶標基因，暗示 miRNA 樣脫靶效應有可能為此機制所介導。

【0546】 如下文所述，業經發現，其中反義股係包含位於種子區域(亦即，反義股之自 5'端計數之 5'端的位置 2 至 9)內之雙鏈之至少一個熱減穩修飾的 dsRNA 劑及/或解鏈溫度為自約 40°C 至約 80°C 範圍內之 dsRNA 劑，在介導 RNA 干擾方面，可能比缺乏該減穩修飾之親本 dsRNA 劑更為有效。此等劑在抑制靶標基因表現方面具有優勢，同時具有降低之脫靶基因靜默效應，且 RNAi 組成物係使用於治療性用途。

【0547】

材料與方法

下述材料與方法係用於實施例中。

【0548】

siRNA 設計

選擇以絲胺酸胺酶抑制因子分支 A 成員 1(Serpinal1) (AAT)為靶向之前導發展備選 dsRNA 劑用於本文中所揭示之實驗中的評估。如下文揭示者，設計、合成且評估以 Serpinal1 為靶向之 dsRNA 劑，該劑係具有經修飾之親本前導發展備選之核苷酸序列，且具有包含該種子區域(亦即，自反義股之 5'端計數，位於該 5'端之位置 2 至 9)內之雙鏈之至少一個熱減穩修飾的反義股，及/或具有約 40°C 至約 80°C 範圍內之解鏈溫度。

【0549】 具體地，如 2013 年 5 月 22 日遞交之第 61/826,125 號美國臨時專利申請案；2013 年 11 月 1 日遞交之第 61/898,695 號美國臨時專利申請案；2014 年 4 月 15 日遞交之第 61/979,727 號美國臨時專利申請案；2014 年 5 月 6 日遞交之第 61/989,028 號美國臨時專利申請案；第 14/284,745 號美國臨時專利申請案，現已於 2017 年 2 月 21 日核准之第 9,574,192 號美國專利；2017 年 1 月 6 日遞交之第 15/399,820 號美國專利申請案；以及 2014 年 5 月 22 遞交之第 PCT/US2014/039109 號國際專利申請案所揭示，AD-61444 係經鑒別並顯示於體外及體內有效且經久地抑制 AAT。AD-61444 之未經修飾之正義股核苷酸序列係 5'-CUUCUUA AUGAUUGAACAAAA-3'(SEQ ID NO: 417)，且 AD-61444 之未經修飾之核苷酸序列係 5'-UUUUGUCAAUCAUUAAGAAGAC-3'(SEQ ID NO: 419)。AD-61444 之經修飾之正義股核苷酸序列係 5'-csusucuaauGfAfuugaacaaaaL96-3'(SEQ ID NO: 418)，且 AD-61444 之經修飾之反義股核苷酸序列係 5'-usUfsuUfgUfuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc-3'(SEQ ID NO: 420)。

表 B：表 1：於核酸序列表述中使用之核苷酸單體的縮寫。

應理解，當此等單體以寡核苷酸形式存在時，其係藉由 5'-3'-磷酸二酯鍵而相互鏈結。

縮寫	核苷酸
A	腺苷-3'-磷酸酯
Af	2'-氟腺苷-3'-磷酸酯
Afs	2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸酯
As	腺苷-3'-硫代磷酸酯
C	胞苷-3'-磷酸酯
Cf	2'-氟胞苷-3'-磷酸酯
Cfs	2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cs	胞苷-3'-硫代磷酸酯
G	鳥苷-3'-磷酸酯
Gf	2'-氟鳥苷-3'-磷酸酯
Gfs	2'-氟鳥苷-3'-硫代磷酸酯
Gs	鳥苷-3'-硫代磷酸酯
T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸酯
Tf	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
Tfs	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
Ts	5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
U	尿苷-3'-磷酸酯
Uf	2'-氟尿苷-3'-磷酸酯
Ufs	2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸酯
Us	尿苷-3'-硫代磷酸酯
N	任意核苷酸 (G、A、C、T 或 U)
a	2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯
as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯

縮寫	核苷酸
c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯
cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
g	2'-O-甲基鳥苷-3'-磷酸酯
gs	2'-O-甲基鳥苷-3'-硫代磷酸酯
t	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
ts	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
u	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯
us	2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
s	硫代磷酸酯鏈結
L96	N-[參(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇 Hyp-(GalNAc-烷基) ₃
Y44	逆無鹼基 DNA (2-羥甲基-四氫呋喃-5-磷酸酯)
(Agn)	腺苷-二醇核酸(GNA)
(Cgn)	胞苷-二醇核酸(GNA)
(Ggn)	鳥苷-二醇核酸(GNA)
(Tgn)	胸苷-二醇核酸(GNA) S-異構物
P	磷酸酯
VP	乙烯基-磷酸酯
(Aam)	2'-O-(N-甲基乙醯胺)腺苷-3'-磷酸酯
(Aams)	2'-O-(N-甲基乙醯胺)腺苷-3'-硫代磷酸酯
(Tam)	2'-O-(N-甲基乙醯胺)胸苷-3'-磷酸酯
(Tams)	2'-O-(N-甲基乙醯胺)胸苷-3'-硫代磷酸酯
dA	2'-去氧腺苷-3'-磷酸酯
dAs	2'-去氧腺苷-3'-硫代磷酸酯
dC	2'-去氧胞苷-3'-磷酸酯
dCs	2'-去氧胞苷-3'-硫代磷酸酯

縮寫	核苷酸
dG	2'-去氧鳥苷-3'-磷酸酯
dGs	2'-去氧鳥苷-3'-硫代磷酸酯
dT	2'-去氧胸苷-3'-磷酸酯
dTs	2'-去氧胸苷-3'-硫代磷酸酯
dU	2'-去氧尿苷
dUs	2'-去氧尿苷-3'-硫代磷酸酯

【0550】

合成及純化

全部寡核苷酸係於 MerMade 192 合成器上、以 1 μmol 規格、使用通用或客製支撐物製備。全部亞磷醯胺係以 100 mM 之濃度於 100%乙腈或 9:1 乙腈:DMF 中，以用於 2-氰基乙基亞磷醯胺化物之標準策略使用，但耦合時間係延長至 400 秒。新形成之鏈結的氧化係使用了用以創建磷酸酯鏈結之 I2 於 9:1 乙腈:水中之 50 mM 溶液以及用以創建硫代磷酸酯鏈結之 DDTT 於 9:1 吡啶:乙腈中 100 mM 溶液達成。於該脫三苯甲基合成之後，管柱於 150 μL 之 40%甲胺水溶液中孵化 45 分鐘，且該溶液經由真空汲入 96 孔板中。使用新鮮之甲胺水溶液部分重複該孵化及汲取後，將該含有粗製寡核苷酸溶液之板密封，並於室溫再振蕩 60 分鐘，以完全移除全部保護基團。經由向每孔加入 1.2 mL 之 9:1 乙腈:乙醇，之後於 -20°C 孵化隔夜，完成該粗製寡核苷酸之製備。該板隨後以 3000 RPM 離心 45 分鐘，自每孔移除上清液，並將固體塊再次懸浮於 950 μL 之 20 mM NaOAc

水溶液中。每一粗製溶液在 GE Hi-Trap 脫鹽管柱 (Sephadex G25 Superfine) 上使用水進行最終之脫鹽，以洗出最終之寡核苷酸產物。所有鑒別及純度係分別使用 ESI-MS 及 IEX HPLC 證實。

【0551】

溫度依賴性 UV 光譜學

以 1 μM (由未經修飾之 RNA 正義股及與之配對之互補性經修飾之反義股組成) 之雙鏈濃度，於 0.33x PBS (3.3 mM 磷酸鈉/磷酸鉀緩衝液，pH 7.4，具有 46 mM NaCl 及 0.9 mM KCl) 中、於 1 cm 光程石英比色器中、在配備程序升溫器之 Beckman DU800 分光光度計上實施解鏈研究。每一吸收池係含有 200 μL 之樣本溶液，該樣本溶液係覆蓋有 125 μL 之輕質礦物油。於 260 nm 監控解鏈曲線，以 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 之加熱速度從 15 $^{\circ}\text{C}$ 升溫至 90 $^{\circ}\text{C}$ 。從平滑之加熱曲線的一階導數計算解鏈溫度 (T_m)，且所報告之數值係至少兩次獨立量測之結果。

【0552】

體外報告基因檢定

COS-7 細胞係於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下，於以 10% 胎牛血清 (FBS) 補充之杜爾貝科改進伊格爾培養基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)) 中培養。根據製造商之使用說明書，於 96 孔板 (15,000 細胞/孔) 上，以 10 ng 螢光素酶報告質體及 50 fM 至 50 nM siRNA 於 10 倍稀釋液中使用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lipofectamine 2000 (賽默飛世爾科技公司

(Thermo Fisher Scientific))轉染細胞。轉染 48 h 後收穫細胞，根據製造商之使用說明書，行雙螢光素酶檢定 (Promega)。上靶報告質體係含有與 3' 未轉譯 (3' UTR) 之海腎螢光素酶 (*Renilla luciferase*) 中之反義股完美互補的單一位點。脫靶報告質體係在海腎陽光速賣之 3' UTR 中含有藉由 21 至 28 個核苷酸分離之 4 個串聯種子互補位點。兩種質體皆共表現作為轉染對照之螢火蟲螢光素酶。

【0553】

基因表現分析

將冷藏保存之大鼠及肝細胞 (Bioreclamation) 於 37 °C、5% CO₂ 下於具有 Torpedo 抗生素混合物之 InVitroGRO CP 培養基中培養。根據製造商之使用說明書，將細胞於 96 孔板 (20,000 細胞/孔) 中以 10 nM 之 siRNA 使用 2 µg/mL Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) 轉染。轉染 24 小時後，收穫細胞，根據製造商之使用說明書，使用 miRNeasy 套組 (Qiagen) 萃取 RNA。使用 TruSeq 標準總 RNA 實驗室製備套組 (Illumina) 製備 cDNA 庫，並於 NextSeq 500 (Illumina) 測序。

【0554】

體內小鼠研究及大鼠研究

全部研究係使用與地區、州及聯邦法規相一致之適用且經實驗動物管理及使用委員會 (IACUCs) 批准之方案於奧尼藍製藥公司 (Alnylam Pharmaceuticals) 進行。

【0555】 於小鼠藥效動力學研究中，對雌性 C57BL/6

小鼠(查爾斯河實驗室(Charles River Laboratories))經皮下於其上背部投藥單劑之運載劑對照(0.9%氯化鈉,生理鹽水)或 0.5 或 1 mg/kg 之 siRNA。於第 8 天,收集肝臟,以冷鹽水沖洗,立即於液氮中急速冷凍,並於 -80°C 儲存以用於 mRNA 及 siRNA 分析。

【0556】 於大鼠毒性研究中,對雄性 Sprague Dawley 大鼠(Charles River Laboratories)經皮下於其上背部投藥三次重複週劑量(qw x 3)之運載劑對照(0.9%氯化鈉,生理鹽水)或 30 mg/kg 之 siRNA。於第 16 天,收集血清進行臨床病理學評估,並收集肝臟進行組織病理學評估及進行 mRNA 及 siRNA 分析。

【0557】

mRNA 及 siRNA 定量

根據製造商之使用說明書,以 miRNeasy 套組(Qiagen)萃取 RNA,根據製造商之使用說明書,使用高容量 cDNA 逆轉錄套組(Thermo Fisher Scientific)轉化為 cDNA,藉由定量聚合酶鏈反應(qPCR)使用基因特異性 Taqman 探針(Thermo Fisher Scientific)於羅氏(Roche) Light Cycler 480 II 使用 LightCycler 480 Probes Master (Roche)評估 mRNA 之水準。

【0558】 為了測定對 siRNA 曝露之量,細胞體係再次懸浮於含有 0.25% Triton X-100 之磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中,於 95°C 加熱 10 min,以 14,000 rpm 於 4°C 離心 10 min,根據製造商之使用說明書,使用 TaqMan MicroRNA 逆轉錄

套組 (Thermo Fisher Scientific) 對該上清液施行逆轉錄。根據製造商之使用說明書，使用 Roche LightCycler 480 Probes Master 於 Light Cycler 480 II (Roche) 上施行 qPCR。

【0559】

結果

1. 體外研究

體外報告基因檢定之結果係總結於表 1 中。如表 1 中之資料所示，位於反義股之位置 7 的二醇核酸 (GNA) 修飾保存了體外上靶活性，同時減輕了體外脫靶活性。

表 1. 位於反義股之位置 7 之 GNA 修飾的體外報告基因檢定

		上靶 IC ₅₀ (nM)	脫靶 IC ₅₀ (nM)
AAT	親代	0.013	0.97
	(S)-GNA 位於 AS 位置 7	0.013	>500

將螢光素酶報告基因質體與 siRNA 一起共轉染入 COS-7 細胞內，且於第 48 小時施行螢光素酶檢定。

【0560】

2. 基因表現分析

體外基因表現分析之結果係總結於表 2 中。自表 2 可見，位於該反義股之位置 7 的 GNA 修飾係減輕了體外之脫靶活性。

表 2. 基因表現分析

		經下調之基因數目 ($p < 0.05$)	經上調之基因數目 ($p < 0.05$)
AAT	親代	100	11
	(S)-GNA 位於 AS 位 置 7	1	2

以 siRNA 轉染人肝細胞(AAT)，且於第 24 小時收集 RNA 進行 RNA 測序。

【0561】

3. 小鼠活體內研究

體內研究之結果係總結於表 3 中。自表中可見，位於反義股之位置 7 的 GNA 修飾係保存體內潛能(表 3)。

表 3. 小鼠之藥效動力學資料

		第 8 天之 % mRNA 剩餘
AAT	親代	30
	(S)-GNA 位於 AS 位置 7	29

對小鼠以 1 mg/kg 之劑量一次性投藥以 AAT 為靶向之 siRNA，且於第 8 天評估肝臟 mRNA 之敲除。

【0562】

實施例 2. 以 Serpina1 為靶向之 dsRNA 劑的體內及體外分析

為了進一步評估將 GNA 核苷酸併入 AD-61444 之體內

效果，以 GNA 核苷酸於反義股位置 6(AD-75994)或 7 (AD-75995)進一步修飾 AD-61444 (第 1A 圖)，且將該劑以 1 mg/kg 之劑量一次性經皮下投藥至鼠轉基因人 AAT。於投藥之前以及第 1B 圖中標註之時間點，獲得血清用於循環 AAT 之定量。藉由三明治酶聯免疫分析(sandwich ELISA)測定 AAT 蛋白質之水準，並將該資料正常化至 AAT 蛋白質程度之基線值。

【0563】 如第 1B 圖中說明者，與親代分子相比，將 GNA 核苷酸併入 AD-61444 之反義股的位置 6 或 7 之任一處，係導致活性之損失。

【0564】 據此，AD-61444 中經 2'-氟修飾之核苷酸總數之下降，係導致 AD-77407；而將 GNA 核苷酸併入 AD-77407 之反義股的位置 7，係導致 AD-77412(第 1C 圖)。將該劑以 1 mg/kg 之劑量一次性經皮下投藥至鼠轉基因人 AAT。於投藥之前以及第 1D 圖中標註之時間點，獲得血清用於循環 AAT 之定量。藉由夾心酶聯免疫分析測定 AAT 蛋白質之程度，並將該資料正常化至 AAT 蛋白質水準之基線值。

【0565】 第 1D 圖係說明，降低 AD-61444 之 2'-氟含量(亦即，AD-77407)，係於小鼠體內導致所標示之活性改善。此外，將 GNA 核苷酸併入此情形(AD-77412)係導致相對於親代分子 AD-61444 的淨改善。

【0566】 為了測定 AD-61444 對於降低 2'-氟之含量的效果以及將 GNA 核苷酸併入反義股之位置 7 對於脫

靶之效果，使用 Lipofectamine RNAiMax 以 10 nM 之 AD-61444 或 AD-77412 轉染 Hep3b 細胞。16 小時後，裂解細胞，並處理之以用於轉錄表現譜分析。如第 2A 及 2B 圖中說明者，所得資料係經圖形化，以黑色圓圈表示之轉錄本表現係統計學上顯著不同於模擬處置細胞，而以灰色圓圈表示之轉錄本表現統計學上並未顯著不同於模擬處置細胞。該 AAT 轉錄本係得以鑒定並以圓圈高亮之。

【0567】 第 2A 及 2B 圖中說明之資料證明，以 AD-61444 處置細胞係包裝包括 AAT 在內之 52 中轉錄物之下調。相比之下，含有 GNA 之雙鏈，AD-77412，係導致包括 AAT 在內之僅 3 種轉錄本的下調轉錄物。因此，GNA 核苷酸之併入係實質上降低了體內由 AD-61444 下調之所觀察到的脫靶數目。

【0568】 亦評估 AD-77412 於非人靈長類動物體內之效果。對食蟹獼猴單次經皮下投藥 0.3 mg/kg、1.0 mg/kg、3 mg/kg、或 10 mg/kg 劑量 AD-61444 或 AD-77412。於定量投藥之前、以及於第 3A 至 3D 圖中標註之時間點，獲取血清用於循環 AAT 之定量分析。AAT 係藉由夾心酶聯免疫分析測定，且資料係正常化至 AAT 蛋白程度之基線值。

【0569】 如第 3A 至 3D 圖中說明者，全部劑量之 AD-61444 及 AD-77412 皆有效地令 AAT 表現靜默，且靜默之最大程度相似。

【0570】 總之，此等檢定係證明，將 GNA 核苷酸併入親代分子 AD-61444 之反義種子區域內，並未導致活性

與該親體分子相比的損失，且顯著降低了脫靶效應。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 阿尼拉製藥公司(Alnylam Pharmaceuticals, Inc.)

<120> 絲胺酸蛋白酶抑制因子 A1 iRNA 組成物及其使用方法

<130> 121301-07820

<140>

<141>

<150> 62/561,514

<151> 2017-09-21

<150> 62/549,099

<151> 2017-08-23

<150> 62/548,589

<151> 2017-08-22

<150> 62/425,907

<151> 2016-11-23

<160> 420

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3220

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

acaatgactc ctttcggtaa gtgcagtgga agctgtacac tgcccaggca aagcgtccgg	60
gcagcgtagg cgggcgactc agatcccage cagtggactt agcccctgtt tgetcctccg	120
ataactgggg tgaccttgggt taatattcac cagcagcctc ccccgtgcc cctctggate	180
cactgcttaa atacggacga ggacagggcc ctgtctctc agcttcaggc accaccactg	240
acctgggaca gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctctg ggggcattct cctgctggca	300
ggcctgtgct gctgggtccc tgtctccctg gctgaggatc ccaggggaga tgctgccag	360
aagacagata catcccacca tgatcaggat cacccaacct teaacaagat caccccaac	420
ctggetgagt tgccttcag cctataccgc cagctggcac accagtcca cagcaccat	480
atctttctt cccagtgag catcgtaca gccttgcaa tgetctccct ggggaccaag	540
gctgacactc acgatgaaat cctggagggc ctgaattca acctcacgga gattccggag	600
gctcagatec atgaaggctt ccaggaactc ctccgtacce tcaaccagcc agacagccag	660
ctccagctga ccaccggcaa tggcctgttc ctagecgagg gcctgaagct agtggataag	720
tttttgagg atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct tcaactgcaa ctteggggac	780

accgaagagg ccaagaaaca gatcaacgat tacgtggaga agggactca agggaaaatt	840
gtggatttg tcaaggagct tgacagagac acagttttg ctctggtgaa ttacatcttc	900
tttaaaggca aatgggagag accctttgaa gtcaaggaca ccgaggaaga ggacttccac	960
gtggaccagg tgaccaccgt gaaggtgcct atgatgaagc gtttaggcat gtttaacatc	1020
cagcactgta agaagctgtc cagctgggtg ctgctgatga aatacctggg caatgccacc	1080
gccatcttct tctgcctga tgaggggaaa ctacagcacc tggaaaatga actcaccac	1140
gatatcatca ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt ctgccagctt acatttacc	1200
aaactgtcca ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc tgggtcaact gggcatcact	1260
aaggtcttca gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag aggaggcacc cctgaagctc	1320
tccaaggccg tgcataagge tgtgctgacc atcgacgaga aagggactga agctgctggg	1380
gccatgtttt tagaggccat acccatgtct atccccccg aggtcaagtt caacaaacce	1440
tttgtcttct taatgattga acaaaatacc aagtctccc tctcatggg aaaagtggg	1500
aateccacc aaaataact gectctgct cctcaacccc tcccctcat ccttggeccc	1560
ctccctggat gacattaaag aagggttgag ctggctcctg cctgcatgtg actgtaaate	1620
cctcccatgt tttctctgag tctccccttg cctgctgagg ctgtatgtgg gctccaggta	1680
acagtctgt ctteggggcc cctgaactgt gticatggag catctggctg ggtaggcaca	1740
tgctgggctt gaatccaggg gggactgaat cctcagctta cggacctggg cccatctgtt	1800
tctggaggge tccagtcttc ctgtctctgt ctggagctc ccaagaagga atcacagggg	1860
aggaaccaga taccagccat gaccccagge tccaccaage atcttcatgt ccccctgctc	1920
atccccact cccccacc cagagtgtct catctgcca gggtggctg tgeccacccc	1980
aaggctgccc tctgggggc ccagaactg cctgategtg ccgtggccca gttttgtgce	2040
atctgcagca acacaagaga gaggacaatg tctctctctt gaccgctgt cacctaacca	2100
gactcgggcc ctgcacctct caggcacttc tggaaaatga ctgaggcaga ttcttctga	2160
agccattct ccatggggca acaaggacac ctattctgtc ctgtctctc catgctgccc	2220
ccagaaagcc tcacatatct ccgtttagaa tcaggctcct tctcccaga tgaagaggag	2280
ggtctctgct ttgtttctc tatctctcc tcagactga ccaggeccag caggccccag	2340
aagaccatta cctatatec ctctctctc ctatgcacat ggccatagge ctgctgatgg	2400
ctcaggaagg ccattgcaag gactcctcag ctatgggaga ggaagcacat caccattga	2460
ccccgcaac cctcccctt cctctctga gteccgactg gggccacatg cagcctgact	2520

tctttgtgcc tgttgetgtc cctgcagtct tcagagggcc accgcagctc cagtgccacg	2580
gcaggaggct gttcctgaat agcccctgtg gtaagggcca ggagagtcct tccatcctcc	2640
aaggeectgc taaaggacac agcagccagg aagtcccctg ggcccctagc tgaaggacag	2700
cctgtccct cegtctctac caggaatggc cttgtctat ggaaggcaact gcccateccc	2760
aaactaatct aggaatcaact gtctaaccac tcaactgtcat gaatgtgtac ttaaaggatg	2820
aggttgagtc ataccaaata gtgatttcga tagttcaaaa tggtgaaatt agcaattcta	2880
catgattcag tctaatcaat ggataccgac tgtttcccac acaagtctcc tgttctctta	2940
agcttactca ctgacagcct tcaactctcc acaatacat taaagatatg gccatcacca	3000
agcccctag gatgacacca gacctgagag tctgaagacc tggatccaag ttctgacttt	3060
tcccctgac agctgtgtga ccttcgtgaa gtcgccaac ctctctgagc cccagtcatt	3120
gctagtaaga cctgcctttg agttggatg atgttcaagt tagataacaa aatgtttata	3180
cccattagaa cagagaataa atagaactac atttcttga	3220

<210> 2

<211> 3199

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcaactgcc tccacgcagc aaccctcaga	60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg	120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc	180
tctgtgctt gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaaggaca	240
atgccgtctt ctgtctctg gggcatctc ctgtctgag gctgtgctg cctggteect	300
gtctccctgg ctgaggatcc ccagggagat gctgcccaga agacagatac atcccacat	360
gatcaggatc acccaacctt caacaagatc accccaacc tggctgagtt cgccttcagc	420
ctataccgcc agctggcaca ccagtccaac agcaccaata tcttctctc cccagtgage	480
atcgtacag cctttgcaat gctctcctg gggaccaagg ctgacactca cgatgaaatc	540
ctggagggcc tgaattcaa cctcacggag attceggagg ctcagatcca tgaaggcttc	600
caggaactcc tccgtacct caaccagcca gacagccagc tccagctgac caccggcaat	660
ggcctgttcc tcagcgaggg cctgaagcta gtggataagt ttttgagga tgttaaaaag	720
ttgtaccact cagaagcctt cactgtcaac ttcggggaca ccgaagaggc caagaaacag	780
atcaacgatt acgtggagaa gggactcaa gggaaaattg tggatttggc caaggagctt	840

gacagagaca cagtttttgc tctggtgaat tacatcttet ttaaaggcaa atgggagaga	900
ccctttgaag tcaaggacac cgaggaagag gacttccacg tggaccaggt gaccaccgtg	960
aaggtgccta tgatgaagcg tttaggcatg ttaacatcc agcactgtaa gaagctgtcc	1020
agctgggtgc tgctgatgaa atacctgggc aatgccaccg ccatcttett cctgcctgat	1080
gaggggaaac tacagcacct ggaaaatgaa ctcaccacg atatcatcac caagttcctg	1140
gaaaatgaag acagaaggtc tgccagctta cattacca aactgtccat tactggaacc	1200
tatgatctga agagcgtcct gggccaactg ggcatacta aggtcttcag caatggggct	1260
gacctctccg gggtcacaga ggaggcacc ctaagctct ccaaggccgt gcataaggct	1320
gtgctgacca tcgacgagaa agggactgaa gctgctgggg ccatgtttt agaggccata	1380
cccatgtcta tccccccga ggtaagttc aacaaacct ttgtcttctt aatgattgaa	1440
caaaatacca agtctcccct ctctatggga aaagtgggta atcccacca aaaataactg	1500
cctctcgtc ctcaaccct cccctccatc cctggcccc tcctggatg acattaaaga	1560
agggttgagc tggcccctgc ctgcatgta ctgtaaatc ctcccatgtt ttctctgagt	1620
ctccccttgc ctgctgaggc tgtatgtggg ctccaggtaa cagtctgtc ttggggcccc	1680
ctgaactgtg tcatggagc atctggctgg gtaggcacat gctgggcttg aatccagggg	1740
ggactgaatc ctacgcttac ggacctgggc ccatctgttt ctggagggt ccagtcttc	1800
ttgtctgtc ttggagtccc caagaaggaa tcacagggga ggaaccagat accagccatg	1860
accccaggct ccaccaagca tcttcatgtc cccctgctca tccccactc cccccacc	1920
agagttgtc atctgccag ggtggctgt gccacccca aggctgccct cctggggggcc	1980
ccagaactgc ctgactgtc cgtggcccag tttgtggca tctgcagcaa cacaagagag	2040
aggacaatgt cctctcttg acccgtgtc acctaacag actegggccc tgcacctc	2100
aggcacttct ggaaaatgac tgaggcagat tctctgaa gccattctc catggggcaa	2160
caaggacacc tattctgtc ttgtccttc atcgtgcc cagaaagcct cacatatctc	2220
cgtttagaat caggtccctt ctcccagat gaagaggagg gtctctgctt tgtttctct	2280
atctctctc cagacttgac caggcccagc aggecccaga agaccattac cctataccc	2340
ttctctccc tagtcacatg gccataggcc tgetgatggt tcaggaagge cattgcaagg	2400
actctcagc tatgggagag gaagcacatc acccattgac ccccgcaacc cctccccttc	2460
ctctctgag tcccactgg gccacatgc agcctgactt cttgtgctt gtgctgtcc	2520
ctgcagtctt cagagggcca ccgcagctcc agtggcacgg caggaggctg ttctgaata	2580
gccctgtgg taagggccag gagagtcctt ccatctcca aggcctgct aaaggacaca	2640

gcagccagga agtcccctgg gcccctagct gaaggacage ctgctccctc cgtctctacc 2700
 aggaatggcc ttgtcctatg gaaggcaactg ccccatccca aactaatcta ggaatcaactg 2760
 tctaaccact cactgtcatg aatgtgtact taaaggatga ggttgagtca taccaaatag 2820
 tgatttcgat agttcaaaat ggtgaaatta gcaattctac atgattcagt ctaatcaatg 2880
 gataccgact gttcccaca caagtctcct gtctcttaa gttactcac tgacagcctt 2940
 tcactctcca caatacatt aaagatatgg ccatcaccaa gcccctagg atgacaccag 3000
 acctgagagt ctgaagacct ggatccaagt tctgactttt cccctgaca gctgtgtgac 3060
 cttctggaag tcgccaacc tctctgagcc ccagtcattg ctagtaagac ctgcctttga 3120
 gttggtatga tgtcaagtt agataacaaa atgtttatac ccattagaac agagaataaa 3180
 tagaactaca tttcttgca 3199

<210> 3
 <211> 3513
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 3
 tgggcaggaa ctgggcaactg tgcccagggc atgcaactgcc tccacgcage aacctcaga 60
 gtctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
 ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
 tcctgtgctt gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg 240
 gcagtaagtc ttcagcatca ggcattttgg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac 300
 cagtggaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct 360
 cccagagact gtctgactca cgccacccc tccacctgg acacaggacg ctgtggtttc 420
 tgagccaggt acaatgactc ctttcgcage ctccccgtt gcccctctgg atccaactgt 480
 taaatacgga cgaggacagg gccctgtctc ctcaactca ggcaccacca ctgacctggg 540
 acagtgaatc gacaatgccg tcttctgtct ctgtgggcat cctcctgctg gcaggcctgt 600
 gctgcctggt cctgtctcc ctggctgagg atccccagg agatgctgcc cagaagacag 660
 atacatccca ccatgatcag gatcaccaa cttcaaaa gatcacccc aacctggtgt 720
 agttgcctt cagcctatac cgccagctgg cacaccagtc caacagcacc aatatctct 780
 tctccccagt gagcatcgtt acagcctttg caatgctctc cctggggacc aaggctgaca 840
 ctcacgatga aatcctggag ggctgaatt tcaacctcac ggagattccg gaggctcaga 900
 tccatgaagg cttccaggaa ctctccgta cctcaacca gccagacagc cagctccage 960

tgaccaccgg caatggcctg ttcctcagcg agggcctgaa gctagtggat aagtttttg	1020
aggatgttaa aaagttgtac cactcagaag ccttactgt caacttcggg gacaccgaag	1080
aggccaagaa acagatcaac gattacgtgg agaagggtac tcaagggaaa attgtggatt	1140
tggtaagga gcttgacaga gacacagttt ttgctctggg gaattacatc ttctttaaag	1200
gcaaatggga gagacccttt gaagtaagg acaccgagga agaggacttc cacgtggacc	1260
aggtgaccac cgtgaagggtg cctatgatga agcgittagg catgtttaac atccagcact	1320
gtaagaagct gtccagctgg gtgctgctga tgaataacct gggcaatgcc accgccatct	1380
tcttctgcc tgatgagggg aaactacage acctggaaaa tgaactcacc cacgatatca	1440
tcaccaagtt cctggaaaat gaagacagaa ggtctgccag ctacattta cccaaactgt	1500
ccattactgg aacctatgat ctgaagagcg tctgggtca actgggcate actaaggctc	1560
tcagcaatgg ggctgacctc tccgggggtca cagaggagge acccctgaag ctctccaagg	1620
ccgtgcataa ggctgtgctg accatcgacg agaaaggac tgaagctgct ggggccatgt	1680
tttagagge catacccatg tctatcccc cggagggtcaa gttaacaaa cctttgtct	1740
tctaatgat tgaacaaaat accaagtctc cctcttcat gggaaaagtg gtgaatcca	1800
ccccaaaata actgcctctc gctctcaac cctcccctc catccttggc cccctcctg	1860
gatgacatta aagaagggtt gagctggctc ctgctgcat gtgactgtaa atccctcca	1920
tgtttctct gagtctcct ttgcctgctg aggcigtatg tgggctccag gtaacagtgc	1980
tgtcttcggg cccctgaac tgtgttcatg gagcatctgg ctgggtaggc acatgctggg	2040
cttgaatcca ggggggactg aatcctcage ttacggacct gggcccatct gttctggag	2100
ggctccagtc ttcttctgct tgtcttggag tcccaagaa ggaatcacag gggaggaacc	2160
agataccage catgaccca ggctccacca agcatcttca tctccccctg ctcatcccc	2220
actcccccc acccagagtt gctcactctg ccagggtgg ctgtccccac cccaaggetg	2280
ccctctggg ggccccagaa ctgctgac gtgccgtggc ccagttttgt ggcacttca	2340
gcaacacaag agagaggaca atgtctctct ctgacccgc tctaccta ccagactcgg	2400
gccctgcacc tctcaggcac ttctggaaaa tgactgagge agattcttc tgaagccat	2460
tctccatggg gcaacaagga cacctattct gctcttctc ttccatctgt gccccagaaa	2520
gctcacata tctcgttta gaatcaggtc cctctcccc agatgaagag gaggtctct	2580
gctttgttt ctctatctc tctcagact tgaccaggcc cagcaggccc cagaagacca	2640
ttacctata tccctctcc tccctagtca catggcata ggctgctga tggctcagga	2700

aggcattgc aaggactcct cagctatggg agaggaagca catcacccat tgacccccgc 2760
 aaccctccc ttctctctc tgagtccga ctggggccac atgcagcctg acttcttgt 2820
 gcctgttgc gtccctgcag tctcagagg gccaccgcag ctccagtgcc acggcaggag 2880
 gctgttctg aatagccct gtggttaagg ccaggagagt cttccatcc tccaaggccc 2940
 tgctaaagga cacagcagcc aggaagtccc ctgggcccct agctgaagga cagcctgctc 3000
 cctcctctc taccaggaat ggcctgtcc tatggaaggc actgcccct cccaaactaa 3060
 tctaggaatc actgtctaac cactcactgt catgaatgt tacttaaagg atgaggttga 3120
 gtcataccaa atagtgatt cgatagtcca aatgggtgaa attagcaatt ctacatgatt 3180
 cagtctaate aatggatacc gactgttcc cacacaagtc tctgttctc ttaagcttac 3240
 tactgacag ccttctctc tccacaaata cattaaagat atggccatca ccaagcccc 3300
 taggatgaca ccagacctga gagtctgaag acctggatcc aagtctgac tttccccct 3360
 gacagctgtg tgacctctg gaagtcgcca aacctctctg agccccagtc attgctagta 3420
 agacctgcct ttgagttggt atgatgtcca agttagataa caaatgttt ataccatta 3480
 gaacagagaa taaatagaac tacatttctt gca 3513

<210> 4

<211> 3236

<212> DNA

<213> 智人

<400> 4

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aacctcaga 60
 gtctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
 ctgtgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
 tctgtgctt gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaaggtgg 240
 gacattgctg ctgtgtctca ctcagtcca caggacaatg ccgtctctg tctctggtgg 300
 catctctctg ctggcaggcc tgtgtgctt ggtccctgtc tccttgctg aggatcccca 360
 gggagatgct gccagaaga cagatacatc ccacatgat caggatcacc caacctcaa 420
 caagatcacc cccaacctgg ctgagtgcg cttcagccta taccgccagc tgccacacca 480
 gtccaacagc accaatatct tcttctccc agtgagcact gctacagcct ttgcaatgct 540
 ctccctgggg accaaggctg aactcaoga tgaatcctg gagggcctga attcaacct 600
 cacggagatt ccggaggctc agatccatga aggttccag gaactctcc gtacctcaa 660
 ccagccagac agccagctcc agctgaccac cggcaatggc ctgttctca gcgaggcct 720

gaagctagtg gataagtttt tggaggatgt taaaaagttg taccactcag aagccttcac	780
tgtcaacttc ggggacaccg aagaggccaa gaaacagatc aacgattacg tggagaaggg	840
tactcaaggg aaaattgtgg atttggtaa ggagcttgac agagacacag ttttgctct	900
ggtgaattac atcttcttta aaggcaaatg ggagagaccc tttgaagtca aggacaccga	960
ggaagaggac ttccacgtgg accaggtgac caccgtgaag gtgcctatga tgaagcgttt	1020
aggcattgtt aacatccagc actgtaagaa gctgtccagc tgggtgctgc tgatgaaata	1080
cctgggcaat gccaccgcca tcttcttct gctgatgag gggaaactac agcacctgga	1140
aatgaactc acccagata tcatcaccaa gttcctggaa aatgaagaca gaaggtctgc	1200
cagcttcat ttacccaaac tgtccattac tggaaacctat gatctgaaga gcgtcctggg	1260
tcaactgggc atactaagg tcttcagcaa tggggctgac ctctccgggg tcacagagga	1320
ggcaccctg aagctctcca aggccgtgca taaggctgtg ctgaccatcg acgagaaagg	1380
gactgaagct gctggggcca tgttttaga ggccataccc atgtctatcc cccccaggt	1440
caagttcaac aaacccttg tcttctaat gattgaacaa aataccaagt ctccccttt	1500
catgggaaaa gtggtgaatc ccacccaaa ataactgcct ctgctctc aaccctccc	1560
ctccatcct ggccccctcc ctggatgaca ttaaagaagg gttgagctgg tccctgctg	1620
catgtgactg taaatcctc ccatgtttc tctgagtctc ccttgcctg ctgaggctgt	1680
atgtgggctc caggtaacag tgctgtctc gggccccctg aactgtgtc atggagcacc	1740
tggctgggta ggcacatgct gggcttgaat ccagggggga ctgaatctc agcttacgga	1800
cctgggccc tctgtttctg gagggctcca gtctctctg tctgtctg gagtcccac	1860
gaaggaatca caggggagga accagatacc agccatgacc ccaggctcca ccaagcatct	1920
tcatgtccc ctgctcatcc ccaactcccc cccaccaga gttgctcacc ctgccagggc	1980
tggctgtgcc caccacaagg ctgccctct gggggcccac gaactgcctg atcgtgccgt	2040
ggcccagttt tgtggcatct gcagcaacac aagagagagg acaatgtcct cctcttgacc	2100
cgctgtcacc taaccagact cgggccctgc acctctcagg cacttctgga aatgactga	2160
ggcagattct tctgaagcc cattctecat ggggcaacaa ggacacctat tctgtcctg	2220
tcttccate gtgccccag aaagctcac atatctcgt ttagaatcag gtcccttctc	2280
cccagatgaa gaggagggtc tctgtttgt tttctctatc tctctcag acttgaccag	2340
gcccagcagg cccagaaga ccattacct atatccttc tctccctag tccatggcc	2400
ataggcctgc tgatggctca ggaaggccat tgcaaggact cctcagctat gggagaggaa	2460
gcacatcacc cattgacccc cgcaaccct ccttctctc ctctgagtc cgactgggge	2520

cacatgcagc ctgacttctt tgtgcctgtt gctgtccctg cagtcttcag agggccaccg 2580
 cagctccagt gccacggcag gaggctgttc ctgaatagcc cctgtggtaa gggccaggag 2640
 agtccttcca tctccaagg ccttgctaaa ggacacagca gccaggaagt cccctgggcc 2700
 cctagctgaa ggacagcctg ctccctcctg ctctaccagg aatggccttg tcctatggaa 2760
 ggcaactgcc catcccaaac taatctagga atcactgtct aaccactcac tgctatgaat 2820
 gtgtacttaa aggatgaggt tgagtcatac caaatagtga ttctgatagt tcaaatggt 2880
 gaaattagca attctacatg attcagtcta atcaatggat accgactgtt tcccacaaa 2940
 gtctctgtt ctcttaagct tactcactga cagccttca ctctccaaa atacattaaa 3000
 gatatggcca tcaccaagcc ccttaggatg acaccagacc tgagagtctg aagacctgga 3060
 tccaagtctt gactttccc cctgacagct gtgtgacctt cgtgaagtcg ccaaacctct 3120
 ctgagccca gtcattgcta gtaagacctg cctttgagtt ggtatgatgt tcaagttaga 3180
 taacaaaatg tttatacca ttagaacaga gaataaatag aactacattt cttgca 3236

<210> 5

<211> 3532

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

tgggcaggaa ctgggcaactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aacctcaga 60
 gtctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
 ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
 tctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaaggtgg 240
 gacattgctg ctgctgctca ctcagttcca cagggcggea gtaagtcttc agcatcagge 300
 atttgggggt gactcagtaa atggtagatc ttgctaccag tggaacagcc actaaggatt 360
 ctgcagtgag agcagagggc cagctaagtg gtactctccc agagactgtc tgactcacgc 420
 caccctctc accttggaca caggacgctg tggttctga gccagcagcc tccccgttg 480
 cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggc cctgtctcc tcagcttcag 540
 gcaccaccac tgacctggga cagtgaatcg acaatgccgt cttctgtctc gtggggcadc 600
 ctctgtctgg caggcctgtg ctgcctggtc cctgtctccc tggtgagga tccccagga 660
 gatgtgccc agaagacaga tacatccac catgatcagg atcaccacac ctcaacaag 720
 atccccca acctggctga gttcgcttc agcctatacc gccagctggc acaccagtc 780
 aacagcacca atatctctt ctccccagt agcatcgcta cagccttgc aatgctctc 840

ctggggacca aggctgacac tcacgatgaa atcctggagg gctgaattt caacctcagc	900
gagattccgg aggctcagat ccatgaaggc tccaggaac tctcctgtac cctcaaccag	960
ccagacagcc agctccagct gaccaccggc aatggcctgt tctcagcga gggcctgaag	1020
ctagtggata agtttttggg ggatgttaa aagttgtacc actcagaagc cttcactgtc	1080
aacttcgggg acaccgaaga ggccaagaaa cagatcaacg attacgtgga gaagggtact	1140
caagggaaaa ttgtggattt ggtcaaggag ctgacagag acacagttt tgctctggtg	1200
aattacatct tcttaaagg caaatgggag agacccttg aagtcaagga caccgaggaa	1260
gaggacttcc acgtggacca ggtgaccacc gtgaagggtc ctatgatgaa gcgttaggc	1320
atgttfaaca tccagcactg taagaagctg tccagctggg tgctgctgat gaaatacctg	1380
ggcaatgcc aagccatctt ctctctcct gatgagggga aactacagca cctggaaaat	1440
gaactaccc acgatatcat caccaagttc ctggaaaatg aagacagaag gtctgccagc	1500
ttacatttac ccaaactgtc cactactgga acctatgatc tgaagagcgt cctgggtcaa	1560
ctgggcatca ctaaggtctt cagcaatggg gctgacctct ccgggggtcac agaggaggca	1620
ccctgaagc tctccaaggc cgtgcataag gctgtgctga ccatcgacga gaaagggact	1680
gaagctgctg gggccatgtt ttagaggcc atacccatgt ctatcccc cagggtcaag	1740
ttcaacaaac cctttgtctt cttaatgat gaacaaaata ccaagtctcc cctcttcatg	1800
ggaaaagtgg tgaatccac ccaaaaataa ctgcctctcg ctctcaacc cctcccctcc	1860
atccctggcc cctccctgg atgacattaa agaagggttg agctggtccc tgcctgcatg	1920
tgactgtaaa tccctccat gttttctctg agtctccctt tgctgctga ggctgtatgt	1980
gggtccagg taacagtgt gtctcgggc ccctgaact gtgttcatgg agcatctggc	2040
tgggtaggca catgctgggc ttgaatccag gggggactga atctcagct tacggacctg	2100
ggcccatctg tttctggagg gctccagtct tcttctct gtcttgagt cccaagaag	2160
gaatcacagg ggaggaacca gataccagcc atgaccccag gctccacca gcatcttcat	2220
gtccccctgc tcatccccca ctcccccca ccagagttg ctcatctgc cagggtggc	2280
tgtgcccacc ccaaggctgc cctctgggg gcccagaaac tgcctgatc tgccgtggcc	2340
cagttttgtg gcatctgcag caacacaaga gagaggacaa tgcctctc ttgacctgt	2400
gtcacctaac cagactcggg cctgcacct ctccagcact tctggaaaat gactgaggca	2460
gattctct gaagcccatt ctccatgggg caacaaggac acctattctg tcttctct	2520
tccatcgtc cccagaaaag cctcacatat ctccgttag aatcaggtcc ctctcccc	2580

gatgaagagg agggctctctg cttgttttc tctatctct cctcagactt gaccaggccc	2640
agcaggcccc agaagacat tacctatat ccttctct ccttagtcac atggccatag	2700
gcctgctgat ggctcaggaa ggccattgca aggactcctc agctatggga gaggaagcac	2760
atcaccatt gacccccgca accctcctt tctctctct gagtcccgac tggggccaca	2820
tgcagcctga cttctttgtg cctgttgctg tccctgcagt cttcagaggg ccaccgcage	2880
tccagtcca cggcaggagg ctgttctga atagccccg tggttaagggc caggagagtc	2940
cttccatctt ccaaggcct gctaaaggac acagcagcca ggaagtcccc tgggccccta	3000
gctgaaggac agcctgctc ctcctctct accaggaatg gccttctct atggaaggca	3060
ctgccccatc ccaaactaat ctaggatca ctgtctaacc actcactgtc atgaatgtg	3120
acttaaagga tgaggttgag tcatacaaa tagtgatttc gatagtcaa aatggtgaaa	3180
ttagcaattc tacatgattc agtctaata atggataccg actgttccc acacaagtct	3240
cctgttctt taagcttact cactgacage ctttactct ccacaaatac attaaagata	3300
tggccatcac caagccccct aggatgacac cagacctgag agtctgaaga cctggatcca	3360
agttctgact tttccccctg acagctgtgt gacctctgtg aagtcgcaa acctctctga	3420
gccccagtca ttgctagtaa gacctgcctt tgagttggta tgatgtcaa gttagataac	3480
aaaatgttta taccattag aacagagaat aaatagaact acatttctt ca	3532

<210> 6

<211> 3340

<212> DNA

<213> 智人

<400> 6

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcaactgc tccacgcage aacctcaga	60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggctc cgaggaagge ctagecgtg	120
ctgtgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctc tgccagcctt caggccactc	180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaaggtg	240
gacattgctg ctgtctctca ctcagttcca cagcagcctc cccgttgcc cctctggatc	300
cactgcttaa atacggacga ggacagggce ctgtctctc agcttcagge accaccactg	360
acctgggaca gtgaatcgac aatgccgtt tctgtctctg ggggcatcct cctgctggca	420
ggcctgtgct gcttggtccc tgtctcctg gctgaggatc cccagggaga tgctgccag	480
aagacagata catccacca tgatcaggat cacccaacct tcaacaagat ccccccaac	540
ctggctgagt tcgcttcag cctataccgc cagctggcac accagtcaa cagcaccaat	600

atcttcttct cccagtgag categctaca gcctttgcaa tgetctcct ggggaccaag	660
gctgacactc acgatgaaat cctggagggc ctgaatttca acctcacgga gattccggag	720
gctcagatcc atgaaggctt ccaggaactc ctccgtacc tcaaccagcc agacagccag	780
ctccagctga ccaccggcaa tggcctgttc ctcagcgagg gcctgaagct agtggataag	840
ttttggagg atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct tcaactgtcaa cttcggggac	900
accgaagagg ccaagaaaca gatcaacgat tacgtggaga aggg tactca agggaaaatt	960
gtggatttgg tcaaggagct tgacagagac acagttttg ctctgggtgaa ttacatctt	1020
tttaaaggca aatgggagag accctttgaa gtcaaggaca ccgaggaaga ggacttccac	1080
gtggaccagg tgaccaccgt gaaggtgctt atgatgaagc gtttaggcat gtttaacatc	1140
cagcactgta agaagctgtc cagctgggtg ctgctgatga aatacctggg caatgccacc	1200
gccatcttct tctgcctga tgaggggaaa ctacagcacc tggaaaatga actcaccac	1260
gatatcatca ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt ctgccagctt acatttacc	1320
aaactgtcca ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc tgggtcaact gggcatcact	1380
aaggtcttca gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag aggaggcacc cctgaagctc	1440
tccaaggccg tgcataaggc tgtgctgacc atgacgaga aagggactga agctgctggg	1500
gccatgttt tagaggccat acccatgtct atccccccg aggtcaagtt caacaaacce	1560
ttgtcttct taatgattga aaaaataacc aagtctccc tcttcatggg aaaagtgggtg	1620
aateccacc aaaataact gcctctcgt cctcaacccc tcccctccat cctggcccc	1680
ctccctggat gacattaaag aagggttgag ctggtccctg cctgcatgtg actgtaaac	1740
cctcccatgt tttctctgag tctcccttg cctgctgagg ctgtatgtgg gctccaggta	1800
acagtctgt cttcgggccc cctgaactgt gttcatggag catctggctg ggtaggcaca	1860
tgtgggctt gaateccagg gggactgaat cctcagctta cggacctggg cccatctgtt	1920
tctggagggc tccagtctt cttgtctgt cttggagtcc ccaagaagga atcacagggg	1980
aggaaccaga taccagccat gacccaggc tccaccaagc atcttcatgt cccctgctc	2040
atccccact cccccacc cagagttgct catctgcca gggctggctg tgcccccc	2100
aaggctgccc tctgggggc cccagaactg cctgatctg ccgtggccca gtttgtggc	2160
atctgcagca acacaagaga gaggacaatg tctctctt gacctgctg cacctaacca	2220
gactcgggccc ctgcacctt caggcactt tggaatatga ctgaggcaga ttctctctga	2280
agcccatctt ccatggggca acaaggacac ctattctgt cttgtctt cctcctgctc	2340
ccagaaagcc tcacatatct ccgttagaa tcaggtccct tctcccaga tgaagaggag	2400

ggtctctgct ttgtttctc tatctctcc tcagacttga ccaggcccag caggccccag 2460
 aagaccatta cctatatcc cttctctcc ctagtccat ggccatagge ctgctgatgg 2520
 ctcaggaagg ccattgcaag gactcctcag ctatgggaga ggaagccat caccattga 2580
 cccccgcaac cctcccttt cctctctga gtcccgactg gggccacatg cagcctgact 2640
 tctttgtgcc tgttgctgtc cctgcagtct tcagagggcc accgcagctc cagtgccacg 2700
 gcaggaggct gttcctgaat agccccctgt gtaagggcca ggagagtct tccatctcc 2760
 aaggccctgc taaaggacac agcagccagg aagtcacctg ggcccctagc tgaaggacag 2820
 cctgctccct cctgtctac caggaatggc cttgtctat ggaaggcact gccccatcc 2880
 aaactaatct aggaatcact gtctaaccac tcactgtcat gaatgtgtac ttaaaggatg 2940
 aggttgagtc ataccaaata gtgatttca tagttcaaaa tggtgaaatt agcaattcta 3000
 catgatcag tctaataat ggataccgac tgttccac acaagtctcc tgttcttta 3060
 agttactca ctgacagcct tcaactctcc acaatacat taaagatat gccatcacca 3120
 agccccctag gatgacacca gacctgagag tctgaagacc tggatccaag ttctgacttt 3180
 tccccctgac agctgtgtga ccttcgtgaa gtcgccaac ctctctgagc cccagtcatt 3240
 gctagtaaga cctgcctttg agttggatg atgttcaagt tagataaaa aatgtttata 3300
 cccattagaa cagagaataa atagaactac atttcttga 3340

<210> 7
 <211> 3495
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 7
 tgggcaggaa ctgggcactg tgcccaggge atgcactgcc tccacgcage aaccctcaga 60
 gtctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtogggctc cgaggaagge ctagecgtg 120
 ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
 tctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg 240
 gcagtaagtc ttcagcatca ggcattttgg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac 300
 cagtggaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct 360
 cccagagact gtctgactca cgcaccccc tccaccttgg acacaggacg ctgtggtttc 420
 tgagccagea gcctcccccg ttgcccctct ggatecactg ctttaatac gacgaggaca 480
 gggccctgtc tctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagtga tgcacaatgc 540
 cgtcttctgt ctctggggc atcctctgc tggcaggcct gtgctgcctg gtcctgtct 600

cctggctga ggatccccag ggagatgctg ccagaagac agatacatcc cacatgate	660
aggatcacc aacctcaac aagatcacc ccaacctggc tgagtgcgc ttcagcctat	720
accgccagct ggcacaccag tccaacagca ccaatatctt cttctccca gtgagcatcg	780
ctacagcctt tgcaatgctc tccctgggga ccaaggctga cactcacgat gaaatcctgg	840
agggcctgaa tttcaacctc acggagattc cggaggctca gatccatgaa ggcttcagg	900
aactcctccg taccctcaac cagccagaca gccagctcca gctgaccacc ggcaatggcc	960
tgctcctcag cgagggcctg aagctagtgg ataagtttt ggaggatgtt aaaaagttgt	1020
accactcaga agccttcaact gtcaacttcg gggacaccga agaggccaag aaacagatca	1080
acgattacgt ggagaagggt actcaaggga aaattgtgga ttgggtcaag gagcttgaca	1140
gagacacagt tttgctctg gtgaattaca tctctttaa aggcaaatgg gagagacct	1200
ttgaagtcaa ggacaccgag gaagaggact tccacgtgga ccaggtgacc accgtgaagg	1260
tgccatgat gaagcgttta ggcattgta acatccagca ctgtaagaag ctgtccagct	1320
gggtgctgct gatgaaatac ctgggcaatg ccaccgcat cttcttctg cctgatgagg	1380
ggaaactaca gcacctgga aatgaactca cccagatat catcaccaag ttctggaaa	1440
atgaagacag aaggctgcc agcttacatt taccaaaact gtccattact ggaacctatg	1500
atctgaagag cgtctgggt caactgggca tctaaggt ctcagcaat ggggctgacc	1560
tctccgggt cacagaggag gcaccctga agctctcaa ggccgtgcat aaggctgtgc	1620
tgaccatga cgagaaagg actgaagctg ctggggccat gttttagag gccatacca	1680
tgtctatccc ccccgaggtc aagtcaaca aacctttgt cttctaatg attgaacaaa	1740
ataccaagtc tcccctctt atgggaaaag tggatgaa caccacaaa taactgctc	1800
tcgctctca acccctccc tccatcctg gcccctccc tggatgacat taaagaagg	1860
ttgagctggt cctgctgc atgtgactgt aaatcctcc catgtttct ctgagtctcc	1920
cttgctgc tgaggctgta tgtgggctcc aggtaacagt gctgtctcg ggccccctga	1980
actgtgtca tggagcatct ggctgggtag gcacatgctg ggcttgaatc cagggggac	2040
tgaatcctca gttacggac ctgggccc atgtttctgg agggctccag tctccttgt	2100
cctgtcttgg agtccccaa aaggaatcac aggggaggaa ccagatacca gccatgacc	2160
caggctccac caagcatctt catgtcccc tgetcatecc cactcccc ccaccagag	2220
ttgctcatcc tgccagggt ggctgtgccc acccaagge tgcctctcg ggggcccag	2280
aactgcctga tctgcccgtg gccagtttt gtggcatctg cagcaacaca agagagagga	2340

caatgtctc ctctgacc gctgtcacct aaccagactc gggeccctgca cctctcagge	2400
acttctggaa aatgactgag gcagattctt cctgaagccc attctccatg gggcaacaag	2460
gacacctatt ctgtccttgt ccttccatcg ctgccccaga aagcctcaca tatctccgtt	2520
tagaatcagg tcectctec ccagatgaag aggagggtct ctgctttgtt ttctetatct	2580
cctectcaga cttgaccagg cccagcagge ccagaagac cattacceta tatecctct	2640
cctccctagt cacatggcca taggcctgct gatggctcag gaaggccatt gcaaggactc	2700
ctcagctatg ggagaggaag cacatcacc atgaccccc gcaaccctc ctttctcc	2760
tctgagtccc gactggggcc acatgcagcc tgacttcttt gtgcctgttg ctgtccctgc	2820
agtcttcaga gggccaccgc agctccagtg ccacggcagg aggctgttcc tgaatagccc	2880
ctgtggtaag ggccaggaga gtccttccat cctccaagge cctgctaaag gacacagcag	2940
ccaggaagtc ccctgggccc ctagctgaag gacagcctgc tccctccgtc tctaccagga	3000
atggccttgt cctatggaag gcaactgcccc atcccaaact aatctaggaa tcaactgteta	3060
accactcact gtcatgaatg tgtacttaaa ggatgagggt gagtcatacc aaatagtgat	3120
ttcgatagtt caaaatgggtg aaattagcaa ttctacatga ttcagtctaa tcaatggata	3180
ccgactgttt cccacacaag tctctgttc tcttaagctt actcactgac agccttccac	3240
tctccacaaa tacattaaag atatggccat caccaagccc cctaggatga caccagacct	3300
gagagtctga agacctggat ccaagtctg acttttcccc ctgacagctg tgtgacctc	3360
gtgaagtgcg caaacctctc tgagccccag tcattgctag taagacctgc ctttgagttg	3420
gtatgatgtt caagttgat aacaaaatgt ttataccat tagaacagag aataaataga	3480
actacatttc ttgca	3495

<210> 8

<211> 3492

<212> DNA

<213> 智人

<400> 8

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga	60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaagge ctagccgctg	120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctc tgccagcctt caggccactc	180
tctgtgctt gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg	240
gcagtaagtc ttcagcatca ggcattttgg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac	300
cagtggaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct	360

cccagagact gtctgactca cgccaccccc tccaccttgg acacaggacg ctgtggtttc	420
tgagccagcc tccccgttg cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg	480
ccctgtctcc tcagcttcag gcaccaccac tgacctggga cagtgaatcg acaatgccgt	540
ctctgtctc gtggggeatc ctctgtctgg caggcctgtg ctgcctggtc cctgtctccc	600
tggctgagga tccccaggga gatgctgccc agaagacaga tacatcccac catgatcagg	660
atcacccaac cttcaacaag atcaccccca acctggetga gttegccttc agcctatacc	720
gccagctggc acaccagtcc aacagcacca atatcttctt ctccccagtg agcatcgcta	780
cagcctttgc aatgtctcc ctggggacca aggetgacac tcacgatgaa atcctggagg	840
gcctgaattt caacctcac gagattccgg aggetcagat ccatgaaggc ttccaggaac	900
tcctccgtac cctcaaccag ccagacagcc agtccagct gaccaccggc aatggcctgt	960
tcctcagcga gggcctgaag ctagtggata agttttgga ggatgttaaa aagttgtacc	1020
actcagaagc cttcactgtc aacttcgggg acaccgaaga ggccaagaaa cagatcaacg	1080
attacgtgga gaagggtact caagggaaaa ttgtggattt ggtcaaggag cttgacagag	1140
acacagtttt tgetctggtg aattacatct tctttaaagg caaatgggag agacccttg	1200
aagtcaagga caccgaggaa gaggactcc acgtggacca ggtgaccacc gtgaagggtc	1260
ctatgatgaa gcgttaggc atgttaca tccagcactg taagaagctg tccagctggg	1320
tgtctgat gaaatactg ggcaatgcca ccgccatctt ctctctgct gatgagggga	1380
aactacagca cctggaaaat gaactcacc acgatatcat caccaagttc ctggaaaatg	1440
aagacagaag gtctgccagc ttacatttac ccaaactgtc cttactgga acctatgatc	1500
tgaagagcgt cctgggtcaa ctgggcatca ctaaggctt cagcaatggg gctgacctt	1560
ccggggtcac agaggaggca cccctgaagc tctccaaggc cgtgcataag gctgtctga	1620
ccatcgacga gaaagggact gaagctgctg gggccatgtt tttagaggcc atacctatgt	1680
ctatcccccc cgaggtcaag ttcaacaac ctttgtctt cttaatgatt gaacaaaata	1740
ccaagtctcc cctcttcag ggaaaagtgg tgaatccac ccaaaaataa ctgcctctcg	1800
ctcctcaacc cctccccctc atccctggcc cctccctgg atgacattaa agaagggttg	1860
agctggctcc tgectgeatg tgactgtaaa tccctccat gttttctctg agtctccctt	1920
tgectgctga ggctgtatgt gggctccagg taacagtct gtcttcgggc cccctgaact	1980
gtgttcattg agcatctggc tgggtaggca catgctgggc ttgaatccag gggggactga	2040
atcctcagct tacggacctg ggcccatctg tttctggagg gctccagtct tcttgtctt	2100
gtcttggagt cccaagaag gaatcacagg ggaggaacca gataccagcc atgaccccag	2160

gtcacacaa gcatcttcat gtcacctgc tcaccccca ctcccccca cccagagttg 2220
 ctcatcctgc cagggtggc tgtgccacc ccaaggctgc cctcctgggg gcccagaac 2280
 tgcctgatcg tgccgtggcc cagttttgtg gcatctgcag caacacaaga gagaggacaa 2340
 tgtcctctc tfgaccgct gtcacctaac cagactcggg cctgcacct ctaggcaact 2400
 tctggaaaat gactgaggca gattcttctt gaagccatt ctccatgggg caacaaggac 2460
 acctattctg tcttctctt tccatcgtg cccagaaag cctcacatat ctccgttag 2520
 aatcaggtcc cttctccca gatgaagagg agggctctg cttgttttc tctatctct 2580
 cctcagactt gaccaggecc agcaggcccc agaagacat taccctatat ccttctct 2640
 ccctagtca atggccatag gcttctgat ggctcaggaa ggccattgca aggactctc 2700
 agctatggga gaggaagcac atcaccatt gacccccga accctcctt ttctctct 2760
 gagtcccgac tggggccaca tgcagcctga cttctttgtg cctgttgctg tccctgcagt 2820
 cttcagaggg ccaccgcagc tccagtgcc aaggcaggagg ctgttctga atagcccctg 2880
 tgtaagggc caggagagtc ctccatctt ccaaggect gctaaaggac acagcagcca 2940
 ggaagtcccc tgggccccta gctgaaggac agcctgtcc ctccgtctt accaggaatg 3000
 gccttctct atggaaggca ctgcccac ccaactaat ctaggatca ctgtctaacc 3060
 actcactgtc atgaatgtg acttaagga tgaggttgag tcataccaaa tagtgattc 3120
 gatagttcaa aatggtgaaa ttagcaattc tacatgattc agtctaatca atggataccg 3180
 actgttccc acacaagtct cctgttctt taagcttact cactgacagc cttcactct 3240
 ccacaaatac attaaagata tggccatcac caagccccct aggatgacac cagacctgag 3300
 agtctgaaga cctggatcca agttctgact ttccccctg acagctgtgt gacctctgtg 3360
 aagtcgcaa acctctctga gccccagtca ttgctagtaa gacctgcctt tgagttgga 3420
 tgatgtcaa gtagataac aaaatgttta taccattag aacagagaat aatagaact 3480
 acattcttg ca 3492

<210> 9
 <211> 3510
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 9
 tgggcaggaa ctgggcaactg tgcccagggc atgcaactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
 gtctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
 ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180

tectgtgect gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg	240
gcagtaagtc ttcagcatca ggcattttgg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac	300
cagtggaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct	360
cccagagact gtctgactca cggcaccccc tccaccttgg acacaggacg ctgtggtttc	420
tgagccaggt acaatgactc ctttcgcctc ccccgttgc cctctggatc cactgcttaa	480
atacggacga ggacagggcc ctgtctcctc agcttcagge accaccactg acctgggaca	540
gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctcgt ggggcactct cctgctggca ggccctgtct	600
gacctggccc tgtctccctg gctgaggate cccagggaga tctgcccag aagacagata	660
catcccacca tgatcaggat cacccaacct tcaacaagat ccccccaac ctggctgagt	720
tcgccttcag cctataccgc cagctggcac accagtccaa cagcaccaat atctttctt	780
ccccagtgag catcgtaca gcctttgcaa tctctccct ggggaccaag gctgacactc	840
acgatgaaat cctggagggc ctgaatttca acctcacgga gattccggag gctcagatcc	900
atgaaggctt ccaggaactc ctccgtaccc tcaaccagcc agacagccag ctccagctga	960
ccaccggcaa tggcctgttc ctacgcgagg gcctgaagct agtggataag tttttggagg	1020
atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct tcaactgtcaa ctccggggac accgaagagg	1080
ccaagaaaca gatcaacgat tacgtggaga agggctactca agggaaaatt gtggatttgg	1140
tcaaggagct tgacagagac acagttttg ctctggtgaa ttacatcttc tttaaaggca	1200
aatgggagag accctttgaa gtcaaggaca ccgaggaaga ggacttccac gtggaccagg	1260
tgaccaccgt gaaggtgect atgatgaagc gtttaggeat gtttaacatc cagcactgta	1320
agaagctgtc cagctgggtg ctgctgatga aatacctggg caatgccacc gccatcttct	1380
tectgectga tgaggggaaa ctacagcacc tggaaaatga actcaccac gatatcatca	1440
ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt ctgccagctt acatttacc aaactgtcca	1500
ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc tgggtcaact gggcactact aaggtcttca	1560
gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag aggaggcacc cctgaagctc tccaaggccg	1620
tgcataaggc tgtgctgacc atcgacgaga aaggactga agctgctggg gccatgtttt	1680
tagaggccat acctatgtct atccccccg aggtcaagtt caacaaacce tttgtcttct	1740
taatgattga acaaaatacc aagtctcccc tcttcatggg aaaagtgggt aatcccacce	1800
aaaaataact gectctegct cctcaacccc tcccctccat ccttgcccc ctccctggat	1860
gacattaaag aagggttgag ctggtccctg cctgcatgtg actgtaaate cctcccatgt	1920

tttctctgag tctccctttg cctgctgagg ctgtatgtgg gctccaggta acagtgtgt	1980
cttcgggccc cctgaactgt gttcatggag catctggctg ggtaggcaca tgctgggctt	2040
gaatccaggg gggactgaat cctcagctta cggacctggg cccatctgtt tctggagggc	2100
tccagtcttc cttgtctgt cttggagtcc ccaagaagga atcacagggg aggaaccaga	2160
taccagccat gaccccagge tccaccaage atcttcatgt cccctgctc atccccact	2220
ccccccacc cagagttgct catcctgcca gggctggctg tgcccacccc aaggtgccc	2280
tctggggggc cccagaactg cctgatcgtg ccgtggccca gttttgtggc atctgcagca	2340
acacaagaga gaggacaatg tctctcttt gaccgctgt cacctaacca gactcgggce	2400
ctgcacctct caggcacttc tggaaaatga ctgaggcaga ttcttctga agccattct	2460
ccatggggca acaaggacac ctattctgct cttgtcttc categtgce ccagaaagcc	2520
tcacatatct ccgttagaa tcaggctcct tctcccaga tgaagaggag ggtctctgct	2580
ttgtttctc tatctctcc tcagactga ccaggcccag caggcccag aagaccatta	2640
ccctatacc cttctctcc ctagtacat ggccatagge ctgctgatgg ctgaggaagg	2700
ccattgcaag gactctcag ctatgggaga ggaagccat caccattga cccccgaac	2760
ccctccctt cctctctga gtcccactg gggccacatg cagcctgact tctttgtgce	2820
tgttctgct cctgcagtct tcagagggcc accgcagctc cagtgccacg gcaggaggct	2880
gttctgaat agcccctgtg gtaagggcca ggagagtct tccatctcc aaggecctgc	2940
taaaggacac agcagccagg aagtcccctg ggcccctagc tgaaggacag cctgctcct	3000
ccgtctctac caggaatggc cttgtctat ggaaggcact gcccatece aaactaatct	3060
aggaatcact gtctaaccac tcaactgcat gaatgtgtac ttaaaggatg aggttgagtc	3120
atacacaata gtgattcga tagttcaaaa tggtgaaatt agcaattcta catgattcag	3180
tctaatcaat ggataccgac tgttcccac acaagtctcc tgttcttta agttactca	3240
ctgacagcct ttactctcc acaatacat taaagatatg gccatcacca agccccctag	3300
gatgacacca gacctgagag tctgaagacc tggatccaag ttctgacttt tccccctgac	3360
agetgtgtga ccttcgtgaa gtgcgcaaac ctctctgagc cccagtcatt gctagtaaga	3420
cctgcctttg agttggatg atgttcaagt tagataacaa aatgtttata cccattagaa	3480
cagagaataa atagaactac atttcttga	3510

<210> 10
 <211> 3303
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 10	
tgggcaggaa ctgggcaactg tgcccaggge atgcaactgcc tccacgcagc aacctcaga	60
gtctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaagge ctagccgctg	120
ctgtgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccaactc	180
tcctgtgctt gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagcagc	240
ctccccgtt gccctctg atccactgct taaatacggg cgaggacagg gccctgtctc	300
ctcagcttea ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc gacaatgccg tcttctgtct	360
cgtggggcat cctctgctg gcaggcctgt gctgctgggt cctgtctcc ctggctgagg	420
atccccagg agatgctgcc cagaagacag atacatccca ccatgatcag gatcacccaa	480
cctcaacaa gatcacccc aacctggctg agttgcctt cagcctatac cgccagctgg	540
cacaccagtc caacagcacc aatatctct tctccccagt gagcatcgtc acagcctttg	600
caatgctctc cctggggacc aaggctgaca ctacgatga aatcctggag ggctgaatt	660
tcaacctcac ggagattccg gaggctcaga tccatgaagg ctccaggaa ctctccgta	720
ccctcaacca gccagacagc cagctccagc tgaccaccgg caatggcctg ttctcagcg	780
agggcctgaa gctagtggat aagttttgg aggatgttaa aaagttgtac cactcagaag	840
ccttactgt caacttcggg gacaccgaag aggccaagaa acagatcaac gattacgtgg	900
agaagggtac tcaagggaaa attgtggatt tggtaagga gcttgacaga gacacagttt	960
ttgctctggg gaattacatc ttctttaaag gcaaatggga gagaccctt gaagtcaagg	1020
acaccgagga agaggacttc cacgtggacc aggtgaccac cgtgaaggtg cctatgatga	1080
agcgttagg catgtttaa atccagcact gtaagaagct gtccagctgg gtgctgctga	1140
tgaataacct gggcaatgcc accgcatct tcttctgcc tgatgagggg aaactacagc	1200
acctggaaaa tgaactcacc cacgatatca tccaagtt cctggaaaat gaagacagaa	1260
ggtctgccag ctacattta cccaaactgt ccattactgg aacctatgat ctgaagagcg	1320
tcctgggtca actgggcata actaaggtct tcagcaatgg ggctgacctc tccggggta	1380
cagaggagge acccctgaag ctctccaagg ccgtgcataa ggctgtgctg accatcgacg	1440
agaaagggac tgaagctgct ggggcatgt ttttagagge catacccatg totatcccc	1500
ccgaggtcaa gttaacaaa cctttgtct tettaatgat tgaacaaaat accaagtctc	1560
ccctcttcat gggaaaagtg gtgaatccca cccaaaaata actgcctctc gctctcaac	1620
ccctccctc catcctggc cccctcctg gatgacatta aagaagggtt gagctggctc	1680
ctgcctgcat gtgactgtaa atccctccca tgtttctct gagtctcct ttgcctgctg	1740

aggctgtatg tgggctccag gtaacagtgc tgtcttcggg cccctgaac tgtgttcag	1800
gagcatctgg ctgggtaggc acatgctggg ctggaatcca ggggggactg aatcctcage	1860
ttacggacct gggcccatct gtttctggag ggctccagtc ttcttgtcc tgtcttgag	1920
tcccaagaa ggaatcacag gggaggaacc agataccage catgaccca ggctccacca	1980
agcatctca tgtccccctg ctcatcccc actcccccc acccagagtt gctcatctg	2040
ccagggctgg ctgtgccac ccaaggctg cctctctggg ggccccagaa ctgectgac	2100
gtgccgtggc ccagttttgt ggcatctgca gcaacacaag agagaggaca atgtctct	2160
cttgaccgc tgtcacctaa ccagactcgg gcectgcacc tctcaggcac ttctggaaa	2220
tgactgaggc agattcttc tgaagccat tctcatggg gcaacaagga cacctattct	2280
gtcttgtcc ttccatcget gccccagaaa gctcacata tctcgttta gaatcagtc	2340
ccttctccc agatgaagag gagggtctct gcttgtttt ctctatctc tctcagact	2400
tgaccaggcc cagcaggccc cagaagacca ttacctata tccctctcc tccctagtc	2460
catggccata ggctgctga tggtcagga aggcattgc aaggactct cagctatgg	2520
agaggaagca catcacccat tgacccccgc aacctctcc tttctctc tgagtcccga	2580
ctggggccac atgcagctg acttcttctg gctgttctg gtcctgcag tctcagagg	2640
gccaccgcag ctccagtgc acggcaggag gctgttctg aatagccct gtgtaagg	2700
ccaggagagt cttccatcc tccaagccc tctaaagga cacagcagcc aggaagtc	2760
ctgggccct agctgaagga cagcctgct cctcctctc taccaggaat ggcttgtcc	2820
tatggaagc actgeccat cccaaactaa tctaggaatc actgtctaac cactactgt	2880
catgaatgtg tacttaaagg atgaggtga gtcatacaa atagtattt cgatagtca	2940
aatggtgaa attagcaatt ctacatgatt cagtctaac aatggatacc gactgttcc	3000
cacacaagtc tctgttctc ttaagctac tctgacag ctttctc tccacaaata	3060
cattaaagat atggcatca ccaagcccc taggatgaca ccagacctga gactctgaag	3120
acctgatcc aagtctgac tttccccct gacagctgtg tgacctctg gaagtcgcca	3180
aacctctctg agccccagtc attgctagta agacctgct ttgagttgt atgatgtca	3240
agttagataa caaatgttt ataccatta gaacagagaa taaatagaac tacatttct	3300
gca	3303

<210> 11
 <211> 3300
 <212> DNA

<213> 智人

<400> 11

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga	60
gtctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaagge ctagccgctg	120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc	180
tctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagcctc	240
ccccgtgcc cctctggatc cactgcttaa atacggacga ggacagggcc ctgtctctc	300
agcttcagge accaccactg acctgggaca gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctcgt	360
ggggcatcct cctgctggca ggccctgtgt gcttggtccc tgtctcctg gctgaggate	420
cccagggaga tgctgcccag aagacagata catcccacca tgatcaggat cacccaacct	480
tcaacaagat cacccccaac ctggctgagt tcgccttcag cctataccgc cagctggcac	540
accagtcaa cagcaccaat atcttctct cccagtgag catcgtaca gcctttgcaa	600
tgctctcct ggggaccaag gctgacactc acgatgaaat cctggagggc ctgaattca	660
acctcacgga gattccggag gctcagatcc atgaaggctt ccaggaactc ctccgtaccc	720
tcaaccagcc agacagccag ctccagctga ccaccggcaa tggcctgttc ctacagcagg	780
gcctgaagct agtggataag ttttggagg atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct	840
tcactgtcaa ctccggggac accgaagagg ccaagaaaca gatcaacgat tacgtggaga	900
agggtactca agggaaaatt gtggatttgg tcaaggagct tgacagagac acagttttg	960
ctctggtgaa ttacatcttc tttaaaggca aatgggagag accctttgaa gtcaaggaca	1020
ccgaggaaga ggacttccac gtggaccagg tgaccaccgt gaaggtgcct atgatgaage	1080
gtttaggcat gtttaacatc cagcactgta agaagctgtc cagctgggtg ctgctgatga	1140
aatactggg caatgccacc gccatctct tectgectga tgaggggaaa ctacagcacc	1200
tggaaaatga actcaccac gatatcatca ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt	1260
ctgccagctt acatttacc aaactgtcca ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc	1320
tgggtcaact gggcatcact aaggcttca gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag	1380
aggaggcacc cctgaagctc tccaaggccg tgcataagge tgtgctgacc atcgacgaga	1440
aagggactga agctgctggg gccatgttt tagaggccat acctatgtct atccccccg	1500
aggtcaagtt caacaaacc tttgtctct taatgattga acaaaatacc aagtctccc	1560
tcttcatggg aaaagtgggt aatccacc ccaaaataact gcctctcgt cctcaaccc	1620
tcccctccat ccttgcccc ctccctggat gacattaaag aagggttgag ctggtccctg	1680

cctgcatgtg actgtaaate cctcccatgt ttctctgag tctcccttg cctgctgagg	1740
ctgtatgtgg gctccaggta acagtgtctgt ctccgggccc cctgaactgt gttcatggag	1800
catctggctg ggtaggcaca tgctgggctt gaatccaggg gggactgaat cctcagctta	1860
cggacctggg cccatctgtt tctggaggge tccagtcttc ctgtctctgt ctggagctc	1920
ccaagaagga atcacagggg aggaaccaga taccagccat gaccccagc tccaccaage	1980
atcttcatgt cccctgctc atccccact cccccacc cagagttgct catctgcca	2040
gggctggctg tgcccacccc aaggctgccc tctggggggc ccagaactg cctgatcgtg	2100
ccgtggccca gttttgtggc atctgcagca acacaagaga gaggacaatg tctctctt	2160
gacctgctgt cacctaacca gactcgggc ctgcacctct caggcacttc tggaaaatga	2220
ctgaggcaga ttcttctga agccattct ccatggggca acaaggacac ctattctgtc	2280
ctgtctctc catcgtctgc ccagaaagcc tccatatct cegttagaa tcaggctcct	2340
tctcccaga tgaagaggag ggtctctgct ttgtttctc tatctctcc tcagactga	2400
ccaggcccag caggcccag aagaccatta cctatatec cttctctcc ctagtccat	2460
ggccatagc ctgctgatgg ctcaggaagg ccattgcaag gactctcag ctatgggaga	2520
ggaagccat caccattga ccccgcaac cctccctt cctctctga gtcccactg	2580
gggccacatg cagcctgact tctttgtgc tgttctgtc cctgcagtct tcagagggc	2640
accgcagctc cagtgccacg gcaggaggt gtctctgaat agcccctgtg gtaagggcc	2700
ggagagctct tccatctcc aaggccctgc taaaggacac agcagccagg aagtcccctg	2760
ggcccctagc tgaaggacag cctgctcct ccgtctctac caggaatggc ctgtctctat	2820
ggaaggcact gcccctccc aaactaatct aggaatcact gtctaaccac tcaactgcat	2880
gaatgtgtac ttaaaggatg aggttgagtc ataccaaata gtgatttga tagttcaaaa	2940
tggtgaaatt agcaattcta catgattcag tctaatcaat ggataccgac tgttcccac	3000
acaagtctcc tgttctcta agcttactca ctgacagcct ttactctcc acaatacat	3060
taaagatatg gccatcacca agcccctag gatgacacca gacctgagag tctgaagacc	3120
tggatccaag ttctgacttt tccccctgac agctgtgtga cctctgtgaa gtcgccaac	3180
ctctctgagc cccagtcatt gctagtaaga cctgccttg agttggtatg atgttcaagt	3240
tagataacaa aatgtttata cccattagaa cagagaataa atagaactac atttcttga	3300

<210> 12
 <211> 1321
 <212> DNA
 <213> 普通獼猴

<400> 12
 caggacaatg ccatcttctg tctcatgggg cgtcctcctg ctggcaggcc tgtgctgct 60
 getccccgge tctctggctg aggatcccca gggagatgct gcccagaaga cggatacatc 120
 ccacatgat caggaccacc caacctcaa caagatcacc cccagcctgg ctgagttcgg 180
 cttcagccta taccgccage tggcacacca gtccaacagc accaatatct tcttctcccc 240
 agtgagcatc gctacagcct ttgcaatgct ctccctgggg accaaggctg aactcacag 300
 tgaatcctg gagggcctga atttcaactg cacggagatt ccggaggctc aggtccatga 360
 aggettccag gaactcctcc atacctcaa caagccagac agccagctcc agctgaccac 420
 cggcaacggc ctgttctca acaagagcct gaaggtagtg gataagtttt tggaggatgt 480
 caaaaaactg taccactcag aagccttctc tgtcaacttt gaggacaccg aagaggccaa 540
 gaaacagatc aacaattacg tggagaagga aactcaaggg aaaattgtgg atttgtgcaa 600
 ggagcttgac agagacacag ttttctctc ggtgaattac atcttctta aaggcaaatg 660
 ggagagacc tttgacgttg aggccaccaa ggaagaggac ttccacgtgg accaggcgac 720
 caccgtgaag gtgccatga tgaggcgttt aggcattgtt aacatctacc actgtgagaa 780
 gctgtccagc tgggtgctgc tgatgaaata cctgggcaat gccaccgcca tcttctct 840
 gcctgatgag gggaaactgc agcacctgga aatgaactc accatgata tcacaccaa 900
 gttcttgaa aatgaaaaca gcaggtctgc caactfacat ttaccagac tggccattac 960
 tggaaacctat gatctgaaga cagtctctgg ccacctgggt atactaagg tcttcagcaa 1020
 tggggctgac ctctcgggga tcacggagga ggcaccctg aagctctcca aggccgtgca 1080
 taaggctgtg ctgacctcg atgagaaagg gactgaagct gctggggcca tgtttttaga 1140
 ggccataccc atgtctattc cccccaggt caagtcaac aaacctttg tcttctta 1200
 gattgaacaa aataccaagt ctcccctctt catgggaaaa gtggtgaatc ccaccagaa 1260
 ataactgect gtcactctc agccccctcc ctccatcct ggeccccctc ctgaatgaca 1320
 t 1321

<210> 13
 <211> 2064
 <212> DNA
 <213> 普通獼猴

<400> 13
 gccagctctt gigtctgctt ggcaatgggc aaggccccct cctgcccaag ctccccgccc 60
 ctcccccaacc tattgctctc gccaccgccc acccgagccc aacttctgg gtgggcagga 120

actgggccct gtgccaggg cgtgcaactgc ctccacgcag caaccctcag agtactgagc	180
tgagcaaagg aggaggagg gatcagcact ctgaggaagg cctagccact gctgctgcca	240
ggaattccag ggcggcatca gtcttcagca tcaggcattt cgggggtgaat tagtaaattg	300
tagatcttgc taccagtgga acagccgcta aggattctgc agtgagagca gagggccagc	360
aaagtggtag tctcccagcg actggctgac tcacgccacc cctccacct tggacgcagg	420
acactgtggt ttctgagcca ggtacaatga ctcttttgg tacgtgcagt ggaggctgta	480
tgctgctcag gcagagcgtc cggacagcgt gggcgggcca ctacgcgcc agcctgtgaa	540
cttagtccct gtttgcctc cggtaactg gggatgattt ggtaaatatt caccagcagc	600
ctccccgtt gcccctctgc acccactgct taaatacggc caaggacagg gctctgtctc	660
ctcagcctca ggcaccacca ctgacctggg acggtgaatc gacaatgcca tcttctgtct	720
catggggcgt cctcctgctg gcaggcctgt gctgcctgct ccccggctct ctggctgagg	780
atccccagg agatgctgcc cagaagacgg atacatccca ccatgatcag gaccacccaa	840
cctcaacaa gatcaccccc agcctggetg agttcggctt cagcctatac cggcagctgg	900
cacaccagtc caacagcacc aatatcttct tctcccagt gagcatcgt acagcctttg	960
caatgctctc cctggggacc aaggctgaca ctacagtga aatcctggag ggcctgaatt	1020
tcaacgtcac ggagattccg gaggctcagg tccatgaagg ctccaggaa ctctccata	1080
ccctcaacaa gccagacagc cagctccagc tgaccaccgg caacggcctg ttctcaaca	1140
agagcctgaa ggtagtggat aagtttttgg aggatgtcaa aaaactgtac cactcagaag	1200
ccttctctgt caactttgag gacaccgaag aggccaagaa acagateaac aattacgtgg	1260
agaaggaaac tcaagggaaa attgtggatt tggtaagga gttgacaga gacacagttt	1320
ttgctctggt gaattacatc ttctttaaag gcaaatggga gagacccttt gacgttgagg	1380
ccaccaagga agaggacttc cacgtggacc aggcgaccac cgtgaaggtg cccatgatga	1440
ggcgtttagg catgtttaac atctaccact gtgagaagct gtccagctgg gtgctgctga	1500
tgaaatacct gggcaatgcc accgcatct tcttctgcc tgatgagggg aactgcagc	1560
acctggaaaa tgaactcacc catgatatac tcaccaagtt cctggaaaat gaaaacagca	1620
ggtctgccaa cttacattta cccagactgg ceattactgg aacctatgat ctgaagacag	1680
tcttgggcca cctgggtatc actaaggtct tcagcaatgg ggctgacctc tcggggatca	1740
cggaggaggc acccctgaag ctctccaagg cgtgcataa ggctgtgctg accatcgtg	1800
agaaagggac tgaagctgct ggggcatgt ttttagaggc cataccatg tctattcccc	1860
ccgaggtcaa gttaacaaa cctttgtct tcttaatgat tgaacaaaat accaagtctc	1920

ccctcttcat gggaaaagtg gtgaatccca ccagaaata actgcctgtc actcctcage 1980
 cctccccctc catccctggc cccctccctg aatgacatta aagaagggtt gagctggctc 2040
 ctgcctgcgt gtgtgactgc aaac 2064

<210> 14
 <211> 1608
 <212> DNA
 <213> 普通獼猴

<400> 14
 tcttgtgtct gcctggcaat gggcaaggcc ccttctgccc caagctcccc gccctcccc 60
 aacctattgc ctccgccacc cgccaccga ggccaacttc ctgggtgggc aggaactggg 120
 ccctgtgccc agggcgtgca ctgcctccac gcagcaacce tcagagtact gagctgagca 180
 aaggaggagg aggggatcag cactctgagg aaggcctage cactgtgtct gccaggaatt 240
 ccaggacaat gccatcttct gtctcatggg gcgtctctct gctggcaggc ctgtgctgcc 300
 tgctccccgg ctctctggct gaggatcccc agggagatgc tgcccagaag acggatacat 360
 cccaccatga tcaggaccac ccaacctca acaagatcac cccagcctg gctgagttcg 420
 gcttcagcct ataccgccag ctggcacacc agtccaacag caccaatata ttcttctccc 480
 cagtgagcat cgctacagcc ttgcaatgc tctccctggg gaccaaggct gacactcaca 540
 gtgaaatcct ggagggcctg aatttcaacg tcacggagat tccggaggct caggtccatg 600
 aaggcttcca ggaactctc cataacctca acaagccaga cagccagctc cagctgacca 660
 cggcaacgg cctgttctc aacaagagcc tgaaggtagt ggataagttt ttggaggatg 720
 tcaaaaaact gtaccactca gaagccttct ctgtcaactt tgaggacacc gaagaggcca 780
 agaaacagat caacaattac gtggagaagg aaactcaagg gaaaattgtg gatttggtea 840
 aggagcttga cagagacaca gttttgtc tggtgaatta catcttctt aaaggcaaat 900
 gggagagacc ctttgacgtt gaggccacca aggaagagga ctccacgtg gaccaggcga 960
 ccaccgtgaa ggtgcccatg atgaggcgtt taggcatggt taacatctac cactgtgaga 1020
 agctgtccag ctgggtgctg ctgatgaaat acctgggcaa tgccaccgcc atcttcttcc 1080
 tgctgatga ggggaaactg cagcacctgg aaaatgaact cacccatgat atcatcaca 1140
 agttcctgga aatgaaaac agcaggtctg ccaacttaca ttaccaga ctggcatta 1200
 ctggaacctg tgatctgaag acagtcttg gccacctggg tactactaag gtcttcagca 1260
 atggggctga cctctcgggg atcacggagg aggcaccct gaagctctcc aaggccgtgc 1320
 ataaggctgt gctgaccatc gatgagaaag ggactgaage tgctggggcc atgttttag 1380

aggccatacc catgtctatt cccccgagg tcaagttcaa caaaccttt gtcttcttaa 1440
 tgattgaaca aaataccaag tctccccct tcatgggaaa agtgggtgaat cccaccaga 1500
 aataactgcc tgtcactect cagccccctc cctccatccc tggccccctc cctgaatgac 1560
 attaaagaag ggttgagctg gtcctgcct gcggtgtga ctgcaaac 1608

<210> 15
 <211> 3220
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 15
 tgcaagaaat gtagttctat ttattctcig ttctaattgg tataaacatt ttgttatcta 60
 acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactage aatgactggg gctcagagag 120
 gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180
 ggtcttcaga ctctcaggtc tggigtcatc ctagggggct tggatgatgc catatctta 240
 atgtatttgt ggagagtgaaggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300
 gtgggaaaca gtoggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aattcacca 360
 ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catccttaa gtacacattc 420
 atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480
 ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctagggggc 540
 caggggactt cctggctgct gtgtccttfa gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600
 tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660
 ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720
 cagtcgggac tcagaggagg aaaggagg gttgcggggg tcaatgggtg atgtcttcc 780
 tctccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttctgag ccatcagcag gcctatggcc 840
 atgtgactag ggaggagaag ggatatagg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900
 tcaagtctga ggaggagata gagaaaaca agcagagacc ctctcttca tctggggaga 960
 agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggcttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020
 gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaattggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080
 tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggccccagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140
 aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200
 cacgatcagg cagtcttggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260
 tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttgggtgga gcctggggte atggctggta tctggttcct ccctgtgat tccttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc cctggatte aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctacagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggaggggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttattttt ggggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgtg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc ccagcagct tcagtcctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttggg gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagaggta gcccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag	2040
accttctgtc ttcatittcc aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttcca	2100
ggtgctgtag ttccccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcatcagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtct gatgttaaac atgcctaac	2220
gcttcatcat aggcaccttc acggtggta cctgggtccac gtggaagtcc tcttctcgg	2280
tgtccttgac ttcaaaggtt ctctcccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgtca agtccttga ccaaatccac aattttcct tgagtacct	2400
tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggg gtccccgaag ttgacagtga	2460
aggettctga gtggtacaac ttttaacat cctccaaaaa ctatccact agcttcagge	2520
cctcgtgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggtgtct ggctggttga	2580
gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt	2640
tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgcagc ctgggtccc agggagagca	2700
ttgcaaaggc tgtagcgatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt	2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga	2820
aggttgggtg atctgatca tgggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg	2880
gatcctcagc cagggagaca gggaccagge agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc	2940
acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtgggtgt gcctgaagct	3000
gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg	3060

gaggctgctg gtgaatatta accaagggtca ccccagttat cggaggagca aacaggggct 3120
aagtccactg gctgggatct gagtcgcccg cctacgctgc cgggacgctt tgccctgggca 3180
gtgtacagct tccactgcac ttaccgaaag gagtcattgt 3220

<210> 16
<211> 3199
<212> DNA
<213> 智人

<400> 16
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattgg tataaacatt ttgttatcta 60
actgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtcctc ctagggggct tggatgagc catatcttta 240
atgtatttgt ggagagtga aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aattcacca 360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttggat gactcaacct catccttta gtacacattc 420
atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttc 480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtcctca gctaggggccc 540
caggggactt cctggctgct gtgtcctta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660
ggcctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720
cagtcgggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttc 780
tctccatag ctgaggagtc cttgcaatgg cctcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840
atgtgactag ggaggagaag ggatatagg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaaca agcagagacc ctctcttca tctggggaga 960
agggacctga ttctaacgg agatatgtga ggcttctgg ggcagcagat gaaggacaag 1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaattggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080
tcattttcca gaagtgcctg agagggtcag ggcccagtc tggtaggtg acagcgggtc 1140
aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200
cacgatcagg cagtctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320
gcttgggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttctt ccctgtgat tccttcttg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtecc ccttgattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga	1680
gggggtgagg agcgagagge agttatitit gggtgggatt caccactitit cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtatititgt tcaatcatta agaagacaaa gggittgtg aactgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtcctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttga gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaagt aagctggcag	2040
acctctgtc ttcatitcc aggaacttgg tgatgatac gtgggtgagt tcattitca	2100
ggtgctgtag ttccccca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcacagcag caccagctg gacagctct tacagtgtg gatgttaaac atgctaaac	2220
gcttcatcat aggcacctc acggtggta cctggccac gtggaagtc tctctcgg	2280
tgtccttgac ttcaaaggt cctcccatt tgccttaaa gaagatgtaa tcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgca agctcctga ccaaatccac aattitcct tgagtacct	2400
tctccacgta atcgtgac tgtttctgg cctctcgg gtccccgaag ttgacagtga	2460
aggtcttga gtggtacaac ttittaacat cctccaaaaa ctatccact agcttcagge	2520
cctcgtgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggtggttga	2580
gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt	2640
tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtctcagc ctgggtccc agggagagca	2700
ttgcaaaggc tgtagcgtg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttgactggt	2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga	2820
aggttgggtg atcctgatca tgggtggatg tctctctt ctgggcagca tctcctggg	2880
gacctcage caggagaca gggaccagge agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc	2940
acgagacaga agacggcatt gtccttct gctctctca agctctctc aagctctgc	3000
tcttctggca ggcacaggag agtggcctga aggtggcag gaggtgccc cccctcaac	3060
ctggaattcc tggcagcagc agcggctagg ccttctcgg aggcccagacc cctctctct	3120

tcttggttca gctcaggact ctgagggttg ctgcgtggag gcagtgcatg ccctgggcac	3180
agtgccagcagc tctgcccc	3199
<210> 17	
<211> 3513	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 17	
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgac ttacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgcatc ctagggggct tggatgagc catatctta	240
atgtatttgt ggagagtgaaggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aattcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttggat gactcaacct catccttta gtacacattc	420
atgacagtga gtggtagac agtgattcct agattagtt gggatggggc agtgccttc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtcctca gctaggggccc	540
caggggactt cctggctgct gtgtcctta gcaggccct ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtcgggac tcagaggagg aaaggagg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttc	780
tctccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaaca agcagagacc ctctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaacgg agatatgtga ggcttctgg ggcagcagc gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agagggtcag ggccccagtc tggtaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagtcttggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttgggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttct ccctgtgat tcttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtcct cctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500

ctccatgaac acagttcagg gggccccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttattttt ggggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgtg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc ccagcagct tcagtcctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttga gagcttcagg ggtgcctct	1920
ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaagt aagctggcag	2040
acctctgtc ttcatctcc aggaacttgg tgatgatac gtgggtgagt tcattttcca	2100
ggtgctgtag ttccccca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcacagcag caccagctg gacagctct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaac	2220
gcttcatcat aggcacctc acggtggca cctggccac gtggaagtcc tcttctcgg	2280
tgtccttgac ttcaaaggt ctctccatt tgctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgtca agctcctga ccaaatccac aattttcct tgagtacct	2400
tctccacgta atcgtgac tgtttcttg cctcttcggg tccccgaag ttgacagtga	2460
aggctctga gtggtacaac ttttaacat cctccaaaaa ctatccact agcttcagc	2520
cctcgtgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga	2580
gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt	2640
tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtctcagc ctgggtccc agggagagca	2700
ttgcaaaggc tgtagcgatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt	2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgtga	2820
aggttgggtg atcctgatca tgggtggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg	2880
gatcctcagc cagggagaca gggaccagge agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc	2940
acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtgggtgt gctgaagct	3000
gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg	3060
gaggctgcga aaggagtcat tgtacctggc tcagaaacca cagcgtcctg tgtccaaggt	3120
ggaggggggtg gcgtgagtea gacagtctct gggagagtac cacttagctg gcctctgct	3180
ctcactgcag aatccttagt ggctgttcca ctggtagcaa gatctacat ttactgagtc	3240

accccaaaat gectgatgct gaagacttac tgccgccctt tctgctctc ctcaagctct 3300
 cctcaagctc tgtctcttct ggcaggcaca ggagagtggc ctgaaggctg gcaggaggtt 3360
 geegeccctc caacctggaa ttcttggcag cagcagcggc taggccttcc teggaggccc 3420
 gacccctcc tcttcttgg ttcagctcag gactctgagg gttgctgcgt ggaggcagtg 3480
 catgccctgg gcacagtgcc cagttcctgc cca 3513

<210> 18
 <211> 3236
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 18
 tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60
 acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120
 gtttggcgac ttacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180
 ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtcctc ctagggggct tggatggc catatcttta 240
 atgtatttgt ggagagtgaaggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300
 gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aattcacca 360
 ttttgaacta tcgaaatcac tatttggat gactcaacct catccttta gtacacattc 420
 atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480
 ataggacaag gccattctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540
 caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600
 tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660
 ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720
 cagtcgggac tcagaggagg aaaggagg gttgcggggg tcaatgggtg atgtcttcc 780
 tctccatag ctgaggagtc ctgcaatgg ccttctgag ccatcagcag gcctatggcc 840
 atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900
 tcaagtctga ggaggagata gagaaaaca agcagagacc ctctcttca tctggggaga 960
 agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggtttctgg ggcagcagat gaaggacaag 1020
 gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080
 tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccagtc tggttagggt acagcgggtc 1140
 aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200
 cacgatcagg cagttctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttctt ccctgtgat tccttcttg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc ccttggttc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt ctftaatgtc atccagggag gggggccagg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagagge agttattttt ggggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgtg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtcctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttga gagcttcagg ggtgcctct	1920
ctgtgacccc ggagaggta gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgacca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaagt aagctggcag	2040
acctctgtc ttcatttcc aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttca	2100
ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcacagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaac	2220
gcttcatcat aggcaccttc acggtggta cctgggtccac gtggaagtcc tcttctcgg	2280
tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtacct	2400
tctccacgta atcgttgate tgtttcttgg cctctcgggt gccccgaag ttgacagtga	2460
aggcttctga gtggtacaac ttttaacat cctccaaaaa ctatccact agcttcagge	2520
cctcgtgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggtga	2580
gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt	2640
tgaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgcagc cttgggtccc aggagagca	2700
ttcaaaggc tgtagcgatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttgactggt	2760
gtgccagctg geggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga	2820
aggttgggtg atcctgatca tgggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctcctggg	2880
gatcctcagc caggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc	2940
acgagacaga agacggcatt gtctgttga actgagtgag cagcagcagc aatgtcccac	3000
cttctctgt ctctcaage tctctcaag ctctgtctct tctggcagge acaggagagt	3060

ggcctgaagg ctggcaggag gttgccgccc ctccaacctg gaattcctgg cagcagcagc	3120
ggctaggcct tctcggagg cccgaccccc tctccttct tggttcagct caggactctg	3180
agggttgctg cgtggaggca gtgcatgccc tgggcacagt gccagttcc tgccca	3236
<210> 19	
<211> 3532	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 19	
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgcatc ctagggggct tggatgagc catatcttta	240
atgtatttgt ggagagtga aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aattcacca	360
tttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catccttaa gtacacattc	420
atgacagtga gtggtagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggccc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcaactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtcgggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgttcc	780
tctccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg faatggctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaaca agcagagacc ctctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggtttctgg ggcagcagat gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccagatc tggtaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagtctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg gttggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttgggtgga gcctgggggtc atggctggta tctggttct ccctgtgat tcttcttgg	1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc ccttgattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctacagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttatttt ggggtggatt caccacttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgtg aactgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtcctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttga gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagaggta gcccattgc tgaagacct agtgatgccc agttgaccca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaagt aagctggcag	2040
acctctgtc ttcatctcc aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttca	2100
ggtgctgtag ttccccca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcacagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgctaaac	2220
gcttcatcat aggcacctc acggtggta cctgttccac gtggaagtcc tcttctcgg	2280
tgtccttgac ttcaaaggt ctctccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgta agctcctga ccaaatccac aattttcct tgagtacct	2400
tctccacgta atcgtgate tgtttcttg cctctcggg tccccgaag ttgacagta	2460
aggcttctga gtggtacaac ttttaacat cctccaaaa ctatccact agcttcagc	2520
cctcgtgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggtga	2580
gggtacggag gaggctctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt	2640
tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc ctgggtccc agggagagca	2700
ttgcaaaggc tgtagcgatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttgactggt	2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgtga	2820
aggttgggtg atctgatca tgggtggatg tctctgtct ctgggcagca tctcctggg	2880
gatectcagc caggagaca gggaccagc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc	2940
acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtgggtg gctgaagct	3000
gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg	3060
gaggctgctg gtcagaaac cacagcgtcc tgtgtccaag gtggaggggg tggcgtgagt	3120

cagacagtct ctgggagagt accacttagc tggccctctg ctctcactgc agaatcetta	3180
gtggctgttc cactggtagc aagatctacc atttactgag tcaccccaaa atgcctgatg	3240
ctgaagactt actgccgccc tgtggaactg agtgagcagc agcagcaatg tcccaccttt	3300
cctgctctcc tcaagctctc ctcaagctct gtctctctg gcaggcacag gagagtggcc	3360
tgaaggctgg caggaggttg ccgcccctcc aacctggaat tctggcagc agcagcggt	3420
aggccttctc cggaggcccc accccctctc ccttcttggc tcagctcagg actctgaggg	3480
ttgctgctg gaggcagtgc atgccctggg cacagtgcc agttcctgcc ca	3532

<210> 20
 <211> 3340
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 20	
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtcctc ctagggggct tggatgatggc catatcttta	240
atgtatttgt ggagagtgaaggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttgggtat gactcaacct catccttta gtacacatte	420
atgacagtga gtggtagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtccttcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggagatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct atfcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggcctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtcgggac tcagaggagg aaaggagg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaaca agcagagacc ctctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggcttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccagatc tggttaggtg acagcgggtc	1140

aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagtctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggtg tctggttct ccctgtgat tccttctgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc ccttgattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctacagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttatfff ggggtggatt caccactff cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtatfffgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgtg aactgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtcctt	1860
tctcgtgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttggg gagcttcagg ggtgcctct	1920
ctgtgacccc ggagaggtea gcccattgc tgaagacctt agtgatgcc agttgacca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaagt aagctggcag	2040
acctctgtc ttcatfffcc aggaacttgg tgatgatac gtgggtgagt tcatfffca	2100
ggtgctgtag ttfccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcacagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaac	2220
gcttcatcat aggcacctc acggtggtca cctggtccac gtggaagtc tcttctcgg	2280
tgtccttgac tcaaagggt ctctcccatt tgcctfcaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aatfffccct tgagtacct	2400
tctccacgta atcgtgatc tgtffcttgg cctctcggg tccccgaag ttgacagtga	2460
aggcttctga gtggtacaac tfftaacat cctcaaaaa ctatccact agcttcaggc	2520
cctcgtgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggtgtct ggctggtga	2580
gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt	2640
tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtctcagc cttggfccc agggagagca	2700
ttgcaaaggc tgtagcgtg ctactgggg agaagaagat atgggtctg ttgactggt	2760
gtccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga	2820
aggttgggtg atcctgatca tgggtggatg tatctgtct ctgggcagca tctccctggg	2880
gatcctcagc caggagaca gggaccagge agcacaggcc tgccagcagg aggatcccc	2940

acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtgggtgt gacctgaagct 3000
gaggagacag ggcctgtcc tegtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060
gaggctgctg tggaactgag tgagcagcag cagcaatgtc ccaccttcc tgctctctc 3120
aagetctct caagctctgt ctctctggc aggcacagga gagtggcctg aaggctggca 3180
ggaggttgc gccctccaa cctggaattc ctggcagcag cageggctag gccttctcg 3240
gaggcccga cccctctcc ttcttggtc agctcaggac tctgagggtt gctgcgtgga 3300
ggcagtgcat gccctgggca cagtgccag ttctgccc 3340

<210> 21
<211> 3495
<212> DNA
<213> 智人

<400> 21
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta 60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtcctc ctagggggct tggatggc catatctta 240
atgtattgt ggagagtga aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagactgt 300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aattcacca 360
tttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catctttaa gtacacattc 420
atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttc 480
ataggacaag gccattctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540
caggggactt cctggctgct gtgtccttca gcagggcctt ggaggatgga aggactctc 600
tgcccttac cacaggggtc attcaggaac agcctctgc cgtggcactg gagctgagg 660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720
cagtcgggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttc 780
tctccatag ctgaggagtc ctgcaatgg ccttctgag ccatcagcag gcctatggcc 840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaaca agcagagacc ctctcttca tctggggaga 960
agggacctga ttctaacgg agatatgtga ggcttctgg ggcagcagat gaaggacaag 1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaattggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080
tcatttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccagtc tggtaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagtctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gccitggggtc atggctggta tctggttct cccctgtgat tccttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagacttga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc ccttggttc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttatttt ggggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgtg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt	1860
tctcgtgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttga gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagaggtea gcccattgc tgaagacctt agtgatgcc agttgacca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag	2040
acctctgtc ttcatittcc aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttcca	2100
ggtgctgtag ttccccca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcacagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaac	2220
gcttcatcat aggcacctc acggtggtea cctggccac gtggaagtcc tcttctcgg	2280
tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttcct tgagtacct	2400
tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga	2460
aggtctctga gtggtacaac ttttaacat cctccaaaaa ctatccact agcttcagge	2520
cctcgtgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga	2580
gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt	2640
tgaaaticag gccctccagg attcatcgt gagtctcagc cttggctccc agggagagca	2700
ttcaaaggc tntagcgtg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt	2760
gtccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga	2820
aggttgggtg atctgatca tgggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg	2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940
acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggc cagtgggtgt gcctgaagct 3000
gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060
gaggctgtg gtcagaaac cacagcgtcc tgtgtccaag gtggaggggg tggegtgagt 3120
cagacagtct ctgggagagt accacttagc tggccctctg ctctactgc agaatcctta 3180
gtggctgttc cactggtagc aagatctacc attactgag tcaccccaaa atgcctgatg 3240
ctgaagactt actgcccgcc tttctgctc tctcaagct ctctcaagc tctgtctctt 3300
ctggcaggca caggagagtg gcctgaaggc tggcaggagg ttgccgccc tccaacctgg 3360
aattcctggc agcagcagcg gctaggcctt cctcggaggc ccgacccctt cctccttctt 3420
ggttcagctc aggactctga gggttgctgc gtggaggcag tgcctgcctt gggcacagtg 3480
cccagttcct gccca 3495

<210> 22
<211> 3492
<212> DNA
<213> 智人

<400> 22
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta 60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgcatc ctagggggct tggatgatgc catacttta 240
atgtatttgt ggagagtgaaggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aattcacca 360
tttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420
atgacagtga gtggtagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600
tggeccttac cacaggggct atcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720
cagtcgggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780
tctccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttctgag ccatcagcag gcctatggcc 840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccagtc tggttaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tctgcagat gccacaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagttctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttgggtga gcctggggtc atggctggtg tctggttct cccctgtgat tcttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc cctgggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaatgtc atccaggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttatttt ggggtggatt caccacttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgtg aactgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc ccagcagct tcagtcctt	1860
tctcgtgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttga gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagaggtea gcccattgc tgaagacctt agtcatgccc agttgacca	1980
ggacgetctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag	2040
acctctgtc ttcatttcc aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttcca	2100
ggtgctgtag ttccccca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcatcagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaac	2220
gcttcatcat aggcacctc acggtggtca cctgggccac gtggaagtcc tcttctcgg	2280
tgtccttgac ttcaaagggt ctctccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgtca agtccttga ccaaatccac aattttcct tgagtacct	2400
tctccacgta atcgtgatc tgtttcttgg cctcttggg tccccgaag ttgacagtga	2460
aggcttctga gtgtacaac ttttaacat cctcaaaaa ctatccact agcttcagge	2520
cctcgtgag gaacaggcca ttgcccgtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggtga	2580
gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt	2640
tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc ctgggtccc agggagagca	2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt	2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga	2820
aggttgggtg atcctgatca tgggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg	2880
gatcctcagc cagggagaca gggaccagge agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc	2940
acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtgggtgt gectgaaget	3000
gaggagacag ggcctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg	3060
gaggctggct cagaaaccac agcgtcctgt gtccaagggt gaggggggtg cgtgagtcag	3120
acagtctctg ggagagtacc acttagctgg cctctgtctc tactgcaga atccttagtg	3180
gctgttccac tggtagcaag atctaccatt tactgagtca ccccaaatg cctgatgctg	3240
aagacttact gccgccctt cctgtctcc tcaagctctc ctcaagctct gtctctctg	3300
gcaggcacag gagagtggcc tgaaggctgg caggaggtg ccgccctcc aacctggaat	3360
tctggcagc agcagcggct aggccttct cggaggccc acccctct ccttcttgg	3420
tcagctcagg actctgaggg ttgctgcgtg gaggcagtgc atgccctggg cacagtgccc	3480
agttctgcc ca	3492

<210> 23

<211> 3510

<212> DNA

<213> 智人

<400> 23

tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattgg tataaacatt ttgttatcta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactage aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtcctc ctagggggct tggatgatgc catatctta	240
atgtatttgt ggagagtgaaggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aattcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catccttta gtacacattc	420
atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcaggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttc	780
tctccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaaca agcagagacc ctcctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccagtc tggttagggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagttctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggtg tctggttctt cccctgtgat tcttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc cctggatte aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcaactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaatgtc atccaggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttatfff ggggtggatt caccactfff cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtatfffgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttggg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtcctt	1860
tctcgtgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttggg gagcttcagg ggtgcctct	1920
ctgtgacccc ggagaggtca gcccattgc tgaagacctt agtcatgccc agttgacca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag	2040
acctctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatac gtgggtgagt tcattttcca	2100
ggtgctgtag ttccccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg ccaggtatt	2160
tcacagcag caccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac	2220
gcttcaatc aggcacctc acggtggtea cctggteac gtggaagtcc tcttctcgg	2280
tgctctgac ttcaaagggt ctctccatt tgctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgtca agctcctga ccaaatccac aattttcct tgagtacct	2400
tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga	2460

aggcttctga gtggtacaac ttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcagge 2520
 cctcgtgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580
 gggtagggag gaggctctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640
 tgaattcag gccctccagg atttcatcgt gaggctcagc ctgggtcccc agggagagca 2700
 ttgcaaaggc ttagcagatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760
 gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820
 aggttgggtg atcctgatca ttggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctcctggg 2880
 gatcctcagc caggagaca gggaccagge agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940
 acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtgggtgg gctgaagct 3000
 gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060
 gaggcgaag gaggcattgt acctggctca gaaaccacag cgtcctgtgt ccaaggtgga 3120
 gggggtggcg tgagtcagac agtctctggg agagtaccac ttagctggcc ctctgctctc 3180
 actgcagaat ccttagtggc tgttccactg gtagcaagat ctaccattta ctgagtcacc 3240
 ccaaatgcc tgatgctgaa gacttactgc cgcccttcc tgcctcctc aagctctct 3300
 caagctctgt ctctctggc aggcacagga gaggctctg aaggctggca ggaggttgc 3360
 gccctccaa cctggaatc ctggcagcag cagcggctag gccttctctg gaggcccagc 3420
 cccctctcc ttcttggtc agctcaggac tctgagggtt gctgcgtgga ggcagtgc 3480
 gccctgggca cagtgccag ttctgcca 3510

<210> 24
 <211> 3303
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 24
 tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg tttaatggg tataaacatt ttgttateta 60
 acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120
 gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttgatcca 180
 ggtcttcaga ctctcaggtc ttggtgcatc ctgggggct ttggtgatggc catatctta 240
 atgtatttgt ggagagtgaa aggetgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300
 gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aattcacca 360
 tttgaaacta tcgaaatcac tatttggat gactcaacct catctttaa gtacacatc 420
 atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggeccctac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcagatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccagatc tggttaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagttctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttctt ccctgtgat tcttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc cctggatc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcaactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctgagagaaa acatgggagg gatttacgt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaatgtc atccaggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggtgagg agcgagagge agttattttt ggggtggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgtg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtcctt	1860
tctctegat ggtcagcaca gccttatgca cggccttggga gagcttcagg ggtgcctct	1920
ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgacca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag	2040
accttctgtc ttcatcttcc aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttcca	2100
ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcacagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtct gatgttaaac atgcctaaac	2220
gcttcatcat aggcaccttc acggtgttca cctggctcac gtggaagtcc tcttctctgg	2280

tgctcttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatecac aattttccct tgagtaccct	2400
tctccacgta atcggtgac tgtttcttgg cctcttcggg gtccccgaag ttgacagtga	2460
aggcttctga gtgttacaac ttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcagge	2520
cctcgtgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga	2580
gggtacggag gaggctctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt	2640
tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcage cttgggtccc agggagagca	2700
ttgcaaaggc tgtagcgtg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt	2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga	2820
aggttgggtg atcctgatca tgggtggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg	2880
gactctcagc caggagaca gggaccagge agcacagge tgcagcagg aggatgcccc	2940
acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtgggtgt gcctgaagct	3000
gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg	3060
gaggctgctt tctgtcttc ctaagctct cctcaagctc tgtctctct ggcaggcaca	3120
ggagagtggc ctgaaggctg gcaggaggtt gccgcccctc caacctggaa ttctggcag	3180
cagcagcggc taggccttcc tcggaggccc gaccccctcc tcttcttgg ttcagctcag	3240
gactctgagg gttgctgctt ggaggcagtg catgccctgg gcacagtgcc cagttctgc	3300
cca	3303

<210> 25
 <211> 3300
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 25	
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttateta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactage aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgcatc ctagggggct tgggatggc catatcttta	240
atgtatttgt ggagagttaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aattcacca	360
ttttgaacta tcgaaateac tatttggat gactcaacct catcctttaa gtacacatte	420
atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc	480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttc	780
tctccatag ctgaggagtc cttgcaatgg cctcctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggcttt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaaca agcagagacc ctctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcagatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccagtc tggtaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagtctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttct cccctgtgat tcttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtcct cctggatc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacgt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttatttt ggggtggatt caccacttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtatttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgtg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtcctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttga gagcttcagg ggtgcctct	1920
ctgtgacccc ggagaggtca gcccattgc tgaagacctt agtcatgccc agttgacca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag	2040
accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttcca	2100
ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcatcagcag caccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaac	2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtea cctggtoac gtggaagtcc tcttctcgg 2280
 tgtccttgac ttaaagggt ctctccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340
 caaaaactgt gtctctgtca agctcctga ccaatccac aatttccct tgagtaccct 2400
 tctccacgta atcgttgatc tgtttctgg cctctcggg gtccccgaag ttgacagtga 2460
 aggtctctga gtgtacaac ttttaacat cctcaaaaa ctatccact agcttcaggc 2520
 cctcgtgag gaacaggcca ttgccgggtg tcagctggag ctggctgtct ggctggtga 2580
 gggtagggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640
 tgaattcag gccctccagg atttcatctg gtagtgcagc ctgggtccc agggagagca 2700
 ttgcaaaggc tgtagcgtg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttgactggt 2760
 gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgtga 2820
 aggttgggtg atctgatca tgggtggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880
 gatcctcagc caggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940
 acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggc cagtgggtgt gcctgaagct 3000
 gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060
 gaggcttcc tgctctctc aagctctct caagctctgt ctctctggc aggcacagga 3120
 gagtggcctg aaggctggca ggaggtgccc gccctccaa cctggaatc ctggcagcag 3180
 cagcggctag gccttctctg gaggccgac cccctctcc ttcttggttc agctcaggac 3240
 tctgagggtt gctgcgtgga ggcagtgcac gccctgggca cagtgccag ttctgccc 3300

<210> 26
 <211> 1321
 <212> DNA
 <213> 普通獼猴

<400> 26
 atgcattca gggagggggc caggatgga ggggaggggc tgaggagtga caggcagtta 60
 tttctgggtg ggattacca ctttcccat gaagagggga gacttggtat ttgttcaat 120
 cattaagaag acaaagggtt tgttgaactt gacctgggg ggaatagaca tgggtatggc 180
 ctctaaaac atggccccag cagcttcagt cctttctca tcgatgtca gcacagcctt 240
 atgcacggcc ttggagagct tcagggtgc ctctccgtg atccccgaga ggtcagcccc 300
 attgetgaag accttagtga taccaggtg gccaggact gtcttcagat cataggttcc 360
 agtaatggcc agtctgggta aatgtaagt ggcagacctg ctgttttcat tttccaggaa 420
 ctgggtgatg atatcatggg tgagttcatt ttccaggtgc tgcagttcc cctcatcagg 480

caggaagaag atggcggg cttgcccag gtatttcac agcagcacc agctggacag 540
 cttctcacag tggtagatgt taaacatgcc taaagcctc atcatgggca cttcacggt 600
 ggtgcctgg tccacgtgga agtctcttc ctggggcc tcaacgtcaa agggctctc 660
 ccatttgct ttaaagaaga tgaattcac cagagcaaaa actgtgtctc tgcaagctc 720
 cttgaccaa tccacaattt tcccttgagt ttctctcc acgtaattgt tgatctgtt 780
 cttggcctct tcgggtgctt caaagttgac agagaaggt tctgagtgg acagttttt 840
 gacatctcc aaaaacttat cactacctt cagctcttg ttgaggaaca ggccgttgc 900
 ggtggctcagc tggagctggc tgtctggctt gttgagggt tggaggagt cctggaagcc 960
 ttcattggacc tgagcctccg gaatctccgt gacgttgaat ttcaggcct ccaggattc 1020
 actgtgagtg tcagccttg tcccaggga gagcattgca aaggctgtag cgatgctac 1080
 tggggagaag aagatattgg tgctgttga ctgggtgcc agctggcgt ataggctgaa 1140
 gccgaactca gccaggctgg ggggtgatctt gttgagggtt ggggtgtcct gatcatggtg 1200
 ggatgtatcc gtctctggg cagcatctc ctgggatcc tcagccagag agccggggag 1260
 caggcagcac aggcctgcca gcaggaggac gcccattgac acagaagatg gcattgtcct 1320
 g 1321

<210> 27

<211> 2064

<212> DNA

<213> 普通獼猴

<400> 27

gtttgagtc acacacgcag gcagggacca gctcaacct tcttaattgt cattcagga 60
 gggggccagg gatggagggg aggggctgag gactgacagg cagttattc tgggtgggat 120
 tcaccactt tccatgaag aggggagact tggattttg tcaatcatt aagaagaaa 180
 agggtttgt gaacttgacc tggggggaa tagacatggg tatggcctc aaaaacatgg 240
 ccccagcagc ttcagtcct ttctcatga tggcagcac agccttatgc acggccttg 300
 agagcttcag ggggtcctc tccgtgatcc ccgagaggtc agccccattg ctgaagacct 360
 tagtgatacc cagggtggcc aggactgtct tcagatcata ggttcagta atggccagtc 420
 tgggtaaag taagttggca gacctgctgt ttcatttc caggaacttg gtgatgat 480
 catgggtgag ttcatttcc aggtgctgca gttccctc atcaggcagg aagaagatgg 540
 cggtggcatt gccaggtat ttcacagca gcaccagct ggacagctc tcacagtgg 600
 agatgtaaa catgcctaaa cgcctcatca tgggcacct cacggtggtc gcctgtcca 660

cgTggaagtc ctcttccttg gtggcctcaa cgtcaaaggg tctctccat ttgccttaa 720
 agaagatgta attcaccaga gcaaaaactg tgtctctgtc aagctccttg accaaatcca 780
 caattttccc ttgagtttcc ttctccacgt aattgttgat ctgtttcttg gcctcttcgg 840
 tgtcctcaaa gttgacagag aaggcttctg agtggtacag tttttgaca tcctcaaaa 900
 acttatccac taccttcagg ctcttggtga ggaacaggcc gttgccggtg gtcagctgga 960
 gctggctgtc tggtctgtg agggatgga ggagttcctg gaagcctca tggacctgag 1020
 cctccggaat ctccgtgacg ttgaaattca ggccctccag gatttactg tgagtgtcag 1080
 ccttgggtccc caggagagc attgcaaagg ctgtagcgt gctcactggg gagaagaaga 1140
 tattggtgct gttggactgg tgtgccagct ggcggtatag gctgaagccg aactcagcca 1200
 ggctgggggt gatcttgtg agggttgggt ggtcctgac atggtgggat gtatccgtct 1260
 tctgggcagc atctccctgg ggatcctcag ccagagagcc ggggagcagg cagcacaggc 1320
 ctgccagcag gaggacgcc catgagacag aagatggcat tctcgattca ccgtcccagg 1380
 tcagtgggtg tgctgaggc tgaggagaca gagcctgtc cttgtccgta ttaagcagt 1440
 gggTgcagag gggcaacggg ggaggctgct ggtgaatatt aaccaagatc accccagtta 1500
 ccggaggagc aacagggac taagttcaca ggctgggcgc tgagtgcgcc gccacgctg 1560
 tccggacgct ctgcctgagc agcatacagc ctccactgca cgtacaaaa ggagtcattg 1620
 tacctggctc agaaaccaca gtgtcctgcg tcaaggtgg aggggggtggc gtgagtcagc 1680
 cagtcgctgg gagagtacca ctttctggc cctctgctct cactgcagaa tccttagcgg 1740
 ctgttccact ggtagcaaga tctaccattt actaattcac cccgaaatgc ctgatgctga 1800
 agactgatgc cgccctggaa ttctggcag cagcagtggc taggccttcc tcagagtgt 1860
 gatccccctc tctctcttg ctacagctcag tactctgagg gttgctgct ggaggcagtg 1920
 cacgccctgg gcacagggcc cagttctgc ccaccagga agttggcctc gggTggcggg 1980
 tggcggaggc aataggttgg ggaggggagg ggagcttggg caggaagggg ccttgcctat 2040
 tgccaggcag acacaagact gggc 2064

<210> 28

<211> 1608

<212> DNA

<213> 普通獼猴

<400> 28

gtttgcagtc acacacgcag gcagggacca gctcaacct tctttaatgt cattcagga 60

gggggccagg gatggagggg aggggctgag gactgacagg cagttattc tgggtgggat 120

tcaccacttt tccatgaag aggggagact tggatatttg ttcaatcatt aagaagacaa	180
agggtttgtt gaacttgacc tcggggggaa tagacatggg tatggcctct aaaaacatgg	240
cccagcage ttcagtcctt ttctcatoga tggcagcac agccttatgc acggccttgg	300
agagcttcag gggcgcctcc tccgtgatcc ccgagaggtc agccccattg ctgaagacct	360
tagtgatacc caggtggccc aggactgtct tcagatcata ggttccagta atggccagtc	420
tgggtaaattg taagttggca gacctgctgt ttcattttc caggaacttg gtgatgatat	480
catgggtgag ttcattttcc aggtgctgca gtttcccctc atcaggcagg aagaagatgg	540
cgggtggcatt gccaggtat ttcacagca gcaccagct ggacagcttc tcacagtgg	600
agatgttaaa catgcctaaa cgcctcatca tgggcacctt cacggtggtc gcctgttcca	660
cgtggaagtc ctcttcttg gtggcctcaa cgtcaaaggg tctctccat ttgcctttaa	720
agaagatgta attcaccaga gcaaaaactg tgtctctgct aagctccttg accaaatcca	780
caattttccc ttgagtttcc ttctccacgt aattgttgat ctgtttcttg gcctcttcgg	840
tgctctcaaa gttgacagag aaggcttctg agtggtacag tttttgaca tcttcaaaa	900
acttatccac taccttcagg ctcttgttga ggaacaggcc gttgccggtg gtcagctgga	960
gctggctgctc tggcttgttg agggtatgga ggagtctctg gaagccttca tggacctgag	1020
cctccggaat ctccgtgacg ttgaaattca ggccctccag gatttactg tgagtgtcag	1080
ccttggtecc cagggagagc attgcaaagg ctgtagcgat gctcactggg gagaagaaga	1140
tattggtgct gttggactgg tgtgccagct ggcggtatag gctgaagccg aactcagcca	1200
ggctgggggt gatcttgttg agggttgggt ggtcctgata atggtgggat gtatccgtct	1260
tctgggcagc atctccctgg ggatcctcag ccagagagcc ggggagcagg cagcacaggc	1320
ctgccagcag gaggacgccc catgagacag aagatggcat tgtctggaa ttcttggcag	1380
cagcagtggc taggccttcc tcagagtgtc gateccctcc tctcttttg ctcagctcag	1440
tactctgagg gttgctgctg ggaggcagtg cacgccttgg gcacagggcc cagttctctc	1500
ccaccagga agttggcctc ggggtggcggg tggcggagggc aataggttgg ggaggggcgg	1560
ggagcttggg caggaagggg ccttgcccat tgccaggcag acacaaga	1608

<210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> 未知的敘述:
 RFGF 肽

<400> 29

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的敘述:
 RFGF 類似肽

<400> 30

Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> 人類免疫缺陷病毒

<400> 31

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 1 5 10

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> 果蠅

<400> 32

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 33

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的敘述: 合成
 寡核苷酸

<400> 33

cuucuuaaug auugaacaaa a

21

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的敘述: 合成
 寡核苷酸

- <220>
 <223> 組合 DNA/RNA 分子的敘述: 合成
 寡核苷酸
- <400> 34
 uuuugutcaa ucauuuaagaa gac 23
- <210> 35
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工序列的敘述: 合成
 寡核苷酸
- <400> 35
 cuucuuuaug auugaacaaa a 21
- <210> 36
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工序列的敘述: 合成
 寡核苷酸
- <400> 36
 cuucuuuaug auugaacaaa a 21
- <210> 37
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工序列的敘述: 合成
 寡核苷酸
- <400> 37
 uuuuguucaa ucauuuaagaa gac 23
- <210> 38
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工序列的敘述: 合成
 寡核苷酸
- <220>

<223> 組合 DNA/RNA 分子的敘述: 合成
寡核苷酸

<400> 38

uuuugtucac ucauuuagaa gac

23

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的敘述: 合成
寡核苷酸

<220>

<223> 組合 DNA/RNA 分子的敘述: 合成
寡核苷酸

<400> 39

uuuugtucac ucauuuagaa gac

23

<210> 40

<400> 40

000

<210> 41

<400> 41

000

<210> 42

<400> 42

000

<210> 43

<400> 43

000

<210> 44

<400> 44

000

<210> 45

<400> 45

000

<210> 46

<400> 46
000

<210> 47

<400> 47
000

<210> 48

<400> 48
000

<210> 49

<400> 49
000

<210> 50

<400> 50
000

<210> 51

<400> 51
000

<210> 52

<400> 52
000

<210> 53

<400> 53
000

<210> 54

<400> 54
000

<210> 55

<400> 55

000

<210> 56

<400> 56
000

<210> 57

<400> 57
000

<210> 58

<400> 58
000

<210> 59

<400> 59
000

<210> 60

<400> 60
000

<210> 61

<400> 61
000

<210> 62

<400> 62
000

<210> 63

<400> 63
000

<210> 64

<400> 64
000

<210> 65

<400> 65
000

<210> 66

<400> 66
000

<210> 67

<400> 67
000

<210> 68

<400> 68
000

<210> 69

<400> 69
000

<210> 70

<400> 70
000

<210> 71

<400> 71
000

<210> 72

<400> 72
000

<210> 73

<400> 73
000

<210> 74

<400> 74
000

<210> 75

<400> 75
000

<210> 76

<400> 76
000

<210> 77

<400> 77
000

<210> 78

<400> 78
000

<210> 79

<400> 79
000

<210> 80

<400> 80
000

<210> 81

<400> 81
000

<210> 82

<400> 82
000

<210> 83

<400> 83
000

<210> 84

<400> 84
000

<210> 85

<400> 85
000

<210> 86

<400> 86
000

<210> 87

<400> 87
000

<210> 88

<400> 88
000

<210> 89

<400> 89
000

<210> 90

<400> 90
000

<210> 91

<400> 91
000

<210> 92

<400> 92
000

<210> 93

<400> 93
000

<210> 94

<400> 94
000

<210> 95

<400> 95
000

<210> 96

<400> 96
000

<210> 97

<400> 97
000

<210> 98

<400> 98
000

<210> 99

<400> 99
000

<210> 100

<400> 100
000

<210> 101

<400> 101
000

<210> 102

<400> 102
000

<210> 103

<400> 103
000

<210> 104

<400> 104
000

<210> 105

<400> 105
000

<210> 106

<400> 106
000

<210> 107

<400> 107
000

<210> 108

<400> 108
000

<210> 109

<400> 109
000

<210> 110

<400> 110
000

<210> 111

<400> 111
000

<210> 112

<400> 112
000

<210> 113

<400> 113
000

<210> 114

<400> 114

000

<210> 115

<400> 115
000

<210> 116

<400> 116
000

<210> 117

<400> 117
000

<210> 118

<400> 118
000

<210> 119

<400> 119
000

<210> 120

<400> 120
000

<210> 121

<400> 121
000

<210> 122

<400> 122
000

<210> 123

<400> 123
000

<210> 124

<400> 124
000

<210> 125

<400> 125
000

<210> 126

<400> 126
000

<210> 127

<400> 127
000

<210> 128

<400> 128
000

<210> 129

<400> 129
000

<210> 130

<400> 130
000

<210> 131

<400> 131
000

<210> 132

<400> 132
000

<210> 133

<400> 133
000

<210> 134

<400> 134
000

<210> 135

<400> 135
000

<210> 136

<400> 136
000

<210> 137

<400> 137
000

<210> 138

<400> 138
000

<210> 139

<400> 139
000

<210> 140

<400> 140
000

<210> 141

<400> 141
000

<210> 142

<400> 142
000

<210> 143

<400> 143
000

<210> 144

<400> 144
000

<210> 145

<400> 145
000

<210> 146

<400> 146
000

<210> 147

<400> 147
000

<210> 148

<400> 148
000

<210> 149

<400> 149
000

<210> 150

<400> 150
000

<210> 151

<400> 151
000

<210> 152

<400> 152
000

<210> 153

<400> 153
000

<210> 154

<400> 154
000

<210> 155

<400> 155
000

<210> 156

<400> 156
000

<210> 157

<400> 157
000

<210> 158

<400> 158
000

<210> 159

<400> 159
000

<210> 160

<400> 160
000

<210> 161

<400> 161
000

<210> 162

<400> 162
000

<210> 163

<400> 163
000

<210> 164

<400> 164
000

<210> 165

<400> 165
000

<210> 166

<400> 166
000

<210> 167

<400> 167
000

<210> 168

<400> 168
000

<210> 169

<400> 169
000

<210> 170

<400> 170
000

<210> 171

<400> 171
000

<210> 172

<400> 172
000

<210> 173

<400> 173

000

<210> 174

<400> 174
000

<210> 175

<400> 175
000

<210> 176

<400> 176
000

<210> 177

<400> 177
000

<210> 178

<400> 178
000

<210> 179

<400> 179
000

<210> 180

<400> 180
000

<210> 181

<400> 181
000

<210> 182

<400> 182
000

<210> 183

<400> 183
000

<210> 184

<400> 184
000

<210> 185

<400> 185
000

<210> 186

<400> 186
000

<210> 187

<400> 187
000

<210> 188

<400> 188
000

<210> 189

<400> 189
000

<210> 190

<400> 190
000

<210> 191

<400> 191
000

<210> 192

<400> 192
000

<210> 193

<400> 193
000

<210> 194

<400> 194
000

<210> 195

<400> 195
000

<210> 196

<400> 196
000

<210> 197

<400> 197
000

<210> 198

<400> 198
000

<210> 199

<400> 199
000

<210> 200

<400> 200
000

<210> 201

<400> 201
000

<210> 202

<400> 202
000

<210> 203

<400> 203
000

<210> 204

<400> 204
000

<210> 205

<400> 205
000

<210> 206

<400> 206
000

<210> 207

<400> 207
000

<210> 208

<400> 208
000

<210> 209

<400> 209
000

<210> 210

<400> 210
000

<210> 211

<400> 211
000

<210> 212

<400> 212
000

<210> 213

<400> 213
000

<210> 214

<400> 214
000

<210> 215

<400> 215
000

<210> 216

<400> 216
000

<210> 217

<400> 217
000

<210> 218

<400> 218
000

<210> 219

<400> 219
000

<210> 220

<400> 220
000

<210> 221

<400> 221
000

<210> 222

<400> 222
000

<210> 223

<400> 223
000

<210> 224

<400> 224
000

<210> 225

<400> 225
000

<210> 226

<400> 226
000

<210> 227

<400> 227
000

<210> 228

<400> 228
000

<210> 229

<400> 229
000

<210> 230

<400> 230
000

<210> 231

<400> 231
000

<210> 232

<400> 232

000

<210> 233

<400> 233
000

<210> 234

<400> 234
000

<210> 235

<400> 235
000

<210> 236

<400> 236
000

<210> 237

<400> 237
000

<210> 238

<400> 238
000

<210> 239

<400> 239
000

<210> 240

<400> 240
000

<210> 241

<400> 241
000

<210> 242

<400> 242
000

<210> 243

<400> 243
000

<210> 244

<400> 244
000

<210> 245

<400> 245
000

<210> 246

<400> 246
000

<210> 247

<400> 247
000

<210> 248

<400> 248
000

<210> 249

<400> 249
000

<210> 250

<400> 250
000

<210> 251

<400> 251
000

<210> 252

<400> 252
000

<210> 253

<400> 253
000

<210> 254

<400> 254
000

<210> 255

<400> 255
000

<210> 256

<400> 256
000

<210> 257

<400> 257
000

<210> 258

<400> 258
000

<210> 259

<400> 259
000

<210> 260

<400> 260
000

<210> 261

<400> 261
000

<210> 262

<400> 262
000

<210> 263

<400> 263
000

<210> 264

<400> 264
000

<210> 265

<400> 265
000

<210> 266

<400> 266
000

<210> 267

<400> 267
000

<210> 268

<400> 268
000

<210> 269

<400> 269
000

<210> 270

<400> 270
000

<210> 271

<400> 271
000

<210> 272

<400> 272
000

<210> 273

<400> 273
000

<210> 274

<400> 274
000

<210> 275

<400> 275
000

<210> 276

<400> 276
000

<210> 277

<400> 277
000

<210> 278

<400> 278
000

<210> 279

<400> 279
000

<210> 280

<400> 280
000

<210> 281

<400> 281
000

<210> 282

<400> 282
000

<210> 283

<400> 283
000

<210> 284

<400> 284
000

<210> 285

<400> 285
000

<210> 286

<400> 286
000

<210> 287

<400> 287
000

<210> 288

<400> 288
000

<210> 289

<400> 289
000

<210> 290

<400> 290
000

<210> 291

<400> 291

000

<210> 292

<400> 292
000

<210> 293

<400> 293
000

<210> 294

<400> 294
000

<210> 295

<400> 295
000

<210> 296

<400> 296
000

<210> 297

<400> 297
000

<210> 298

<400> 298
000

<210> 299

<400> 299
000

<210> 300

<400> 300
000

<210> 301

<400> 301
000

<210> 302

<400> 302
000

<210> 303

<400> 303
000

<210> 304

<400> 304
000

<210> 305

<400> 305
000

<210> 306

<400> 306
000

<210> 307

<400> 307
000

<210> 308

<400> 308
000

<210> 309

<400> 309
000

<210> 310

<400> 310
000

<210> 311

<400> 311
000

<210> 312

<400> 312
000

<210> 313

<400> 313
000

<210> 314

<400> 314
000

<210> 315

<400> 315
000

<210> 316

<400> 316
000

<210> 317

<400> 317
000

<210> 318

<400> 318
000

<210> 319

<400> 319
000

<210> 320

<400> 320
000

<210> 321

<400> 321
000

<210> 322

<400> 322
000

<210> 323

<400> 323
000

<210> 324

<400> 324
000

<210> 325

<400> 325
000

<210> 326

<400> 326
000

<210> 327

<400> 327
000

<210> 328

<400> 328
000

<210> 329

<400> 329
000

<210> 330

<400> 330
000

<210> 331

<400> 331
000

<210> 332

<400> 332
000

<210> 333

<400> 333
000

<210> 334

<400> 334
000

<210> 335

<400> 335
000

<210> 336

<400> 336
000

<210> 337

<400> 337
000

<210> 338

<400> 338
000

<210> 339

<400> 339
000

<210> 340

<400> 340
000

<210> 341

<400> 341
000

<210> 342

<400> 342
000

<210> 343

<400> 343
000

<210> 344

<400> 344
000

<210> 345

<400> 345
000

<210> 346

<400> 346
000

<210> 347

<400> 347
000

<210> 348

<400> 348
000

<210> 349

<400> 349
000

<210> 350

<400> 350

000

<210> 351

<400> 351
000

<210> 352

<400> 352
000

<210> 353

<400> 353
000

<210> 354

<400> 354
000

<210> 355

<400> 355
000

<210> 356

<400> 356
000

<210> 357

<400> 357
000

<210> 358

<400> 358
000

<210> 359

<400> 359
000

<210> 360

<400> 360
000

<210> 361

<400> 361
000

<210> 362

<400> 362
000

<210> 363

<400> 363
000

<210> 364

<400> 364
000

<210> 365

<400> 365
000

<210> 366

<400> 366
000

<210> 367

<400> 367
000

<210> 368

<400> 368
000

<210> 369

<400> 369
000

<210> 370

<400> 370
000

<210> 371

<400> 371
000

<210> 372

<400> 372
000

<210> 373

<400> 373
000

<210> 374

<400> 374
000

<210> 375

<400> 375
000

<210> 376

<400> 376
000

<210> 377

<400> 377
000

<210> 378

<400> 378
000

<210> 379

<400> 379
000

<210> 380

<400> 380
000

<210> 381

<400> 381
000

<210> 382

<400> 382
000

<210> 383

<400> 383
000

<210> 384

<400> 384
000

<210> 385

<400> 385
000

<210> 386

<400> 386
000

<210> 387

<400> 387
000

<210> 388

<400> 388
000

<210> 389

<400> 389
000

<210> 390

<400> 390
000

<210> 391

<400> 391
000

<210> 392

<400> 392
000

<210> 393

<400> 393
000

<210> 394

<400> 394
000

<210> 395

<400> 395
000

<210> 396

<400> 396
000

<210> 397

<400> 397
000

<210> 398

<400> 398
000

<210> 399

<400> 399
000

<210> 400

<400> 400
000

<210> 401

<400> 401
000

<210> 402

<400> 402
000

<210> 403

<400> 403
000

<210> 404

<400> 404
000

<210> 405

<400> 405
000

<210> 406

<400> 406
000

<210> 407

<400> 407
000

<210> 408

<400> 408
000

<210> 409

<400> 409

000

<210> 410

<400> 410
000

<210> 411

<400> 411
000

<210> 412

<400> 412
000

<210> 413

<400> 413
000

<210> 414

<400> 414
000

<210> 415

<400> 415
000

<210> 416

<400> 416
000

<210> 417

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的敘述: 合成
寡核苷酸

<400> 417

cuucuuaaug auugaacaaa a

21

<210> 418

<211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的敘述: 合成
 寡核苷酸

<400> 418
 cuucuuaaug auugaacaaa a 21

<210> 419
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的敘述: 合成
 寡核苷酸

<400> 419
 uuuuguucaa ucauuuagaa gac 23

<210> 420
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的敘述: 合成
 寡核苷酸

<400> 420
 uuuuguucaa ucauuuagaa gac 23

申請專利範圍

1. 一種抑制絲胺酸胺酶抑制因子分支 A 成員 1(Serpina1) 基因之表現的雙股 RNA(dsRNA)劑，其係包含形成雙股區域之正義股與反義股，

其中，該正義股係包含至少 19 個接續之核苷酸，其與 5'-CUUCUUA AUGAUUGAACAAAA-3'(SEQ ID NO: 417)之核苷酸序列相異不超過 3 個核苷酸；且該反義股係包含至少 19 個接續之核苷酸，其與 5'-UUUUGUUC AAUCAUUAAGAAGAC - 3 '(SEQ ID NO: 419)之核苷酸序列相異不超過 3 個核苷酸，

其中，該反義股的實質上全部核苷酸包含核苷酸修飾，

其中，該反義股係包含位於自 5'端之位置 4 至 8 之該雙股區域的至少一個熱減穩修飾，其選自由無鹼基之修飾、與相對股中之相對核苷酸的誤配、2'-去氧修飾及非環狀核苷酸所成群組，

其中，於自該反義股之 5'端之位置 2、6、8、9、14 及 16 之核苷酸、位置 2、6、14 及 16 之核苷酸或位置 2、14 及 16 之核苷酸為 2'-氟修飾核苷酸，

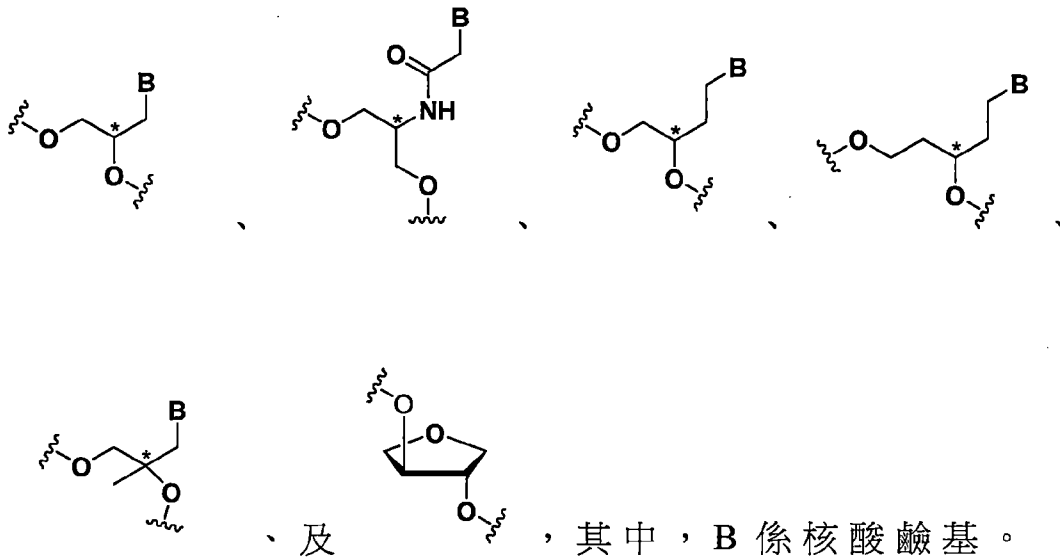
其中，該正義股的實質上全部核苷酸包含核苷酸修飾，

其中，於自該正義股之 5'端之位置 7、9、10 及 11 之核苷酸或位置 7、10 及 11 之核苷酸為 2'-氟修飾，

其中，該正義股係包含 ASGPR 配位子，以及

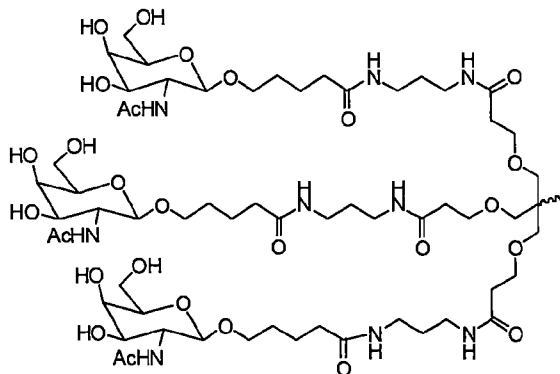
其中，該正義股與該反義股之長度係各自獨立為 19 至 25 個核苷酸。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，該熱減穩修飾係選自由下列所組成之群組：

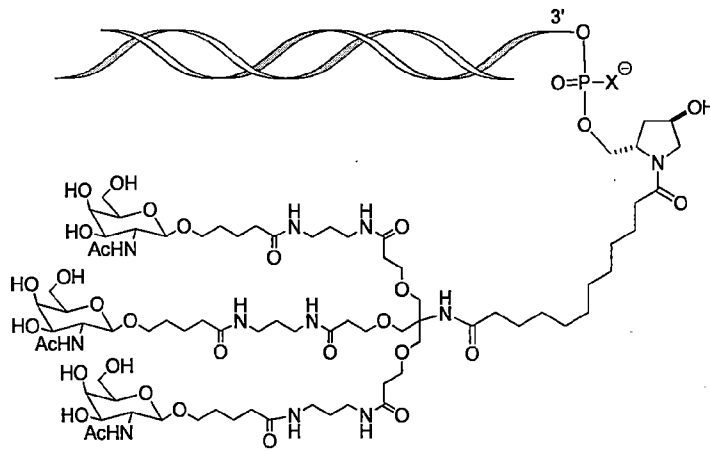


，其中，B 係核酸鹼基。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，該熱減穩修飾係定位於該反義股之位置 7。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，該 ASGPR 配位子係透過二價或三價之分枝鏈鏈結基而附接之一個或多個 GalNAc 衍生物。
5. 如申請專利範圍第 4 項所述之 dsRNA 劑，其中，該 ASGPR 配位子係：



6. 如申請專利範圍第 5 項所述之 dsRNA 劑，其中，該 dsRNA 劑係如下方案中所示者接合至該配位子：



其中，X 係 O 或 S。

7. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，該正義股之所有核苷酸及該反義股之所有核苷酸為經修飾核苷酸。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，自該反義股的 5'-端之位置 2、14 及 16 的核苷酸為 2'-氟修飾核苷酸。
9. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，自該正義股的 5'-端之位置 7、9、10 及 11 的核苷酸為 2'-氟修飾核苷酸。
10. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，該反義股之所有核苷酸包含選自由熱減穩修飾、2'-氟修飾及 2'-OMe 修飾所組成群組之核苷酸修飾，以及該正義股之所有核苷酸包含選自由 2'-氟修飾及 2'-OMe 修飾所組成群組之核苷酸修飾。
11. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，該正

義股進一步包含二個硫代磷酸酯或磷酸甲酯之核苷酸間鏈結。

12. 如申請專利範圍第 11 項所述之 dsRNA 劑，其中，該二個硫代磷酸酯或磷酸甲酯之核苷酸間鏈結係位於自 5'-端之核苷酸位置 1 及 2 之間以及核苷酸位置 2 及 3 之間。
13. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，該反義股進一步包含四個硫代磷酸酯或磷酸甲酯之核苷酸間鏈結。
14. 如申請專利範圍第 13 項所述之 dsRNA 劑，其中，該四個硫代磷酸酯或磷酸甲酯之核苷酸間鏈結係位於自 5'-端之核苷酸位置 1 及 2 之間、核苷酸位置 2 及 3 之間、核苷酸位置 21 及 22 之間以及核苷酸位置 22 及 23 之間。
15. 如申請專利範圍第 13 項所述之 dsRNA 劑，其中，至少一股包含至少 1 個核苷酸的 3'突出。
16. 如申請專利範圍第 13 項所述之 dsRNA 劑，其中，至少一股包含至少 2 個核苷酸的 3'突出。
17. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，各股係獨立為 19 至 30 個核苷酸的長度。
18. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，該正義股係為 21 個核苷酸的長度，且該反義股係為 23 個核苷酸的長度。
19. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，該反

義股係包含核苷酸序列 5'-

UUUUGUUCAAUCAUUAAGAAGAC - 3' (SEQ ID NO:
419)。

20. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，該正義股係包含核苷酸序列 5'-

CUUCUUA AUGAUUGAACAAAA-3' (SEQ ID NO:
417)，且該反義股係包含核苷酸序列 5'-
UUUUGUUCAAUCAUUAAGAAGAC-3' (SEQ ID
NO:419)。

21. 如申請專利範圍第 1 項所述之 dsRNA 劑，其中，該正義股係包含核苷酸序列 5'-

csusucuuAfaUfGfAfuugaacaaaa-3' (SEQ ID NO: 33)，且
該反義股係包含核苷酸序列 5'-
usUfsuugu(Tgn)caaucaUfuAfagaagsasc-3' (SEQ ID NO:
34)，

其中，a、g、c、及 u 分別係 2'-O-甲基(2'-OMe)修飾之 A、
G、C、及 U；Af、Gf、Cf 及 Uf 分別係 2'-氟修飾之 A、G、
C 及 U；s 係硫代磷酸酯鏈結；以及，(Tgn)係胸苷-二醇核糖
(GNA) S-異構物。

22. 一種抑制絲胺酸胺酶抑制因子分支 A 成員 1 (Serpina1)
基因之表現的雙股 RNA(dsRNA)分子，係包含形成雙股
區域之正義股與反義股，其中，該正義股係包含核苷酸
序列 5'-csusucuuAfaUfGfAfuugaacaaaaL96-3' (SEQ ID
NO: 35)，且該反義股係包含核苷酸序列 5'- usUfsuugu

(Tgn)caaucaUfuAfagaagsasc-3'(SEQ ID NO: 34) ,

其中，a、g、c、及 u 分別係 2'-O-甲基(2'-OMe)修飾之 A、G、C、及 U；Af、Gf、Cf 及 Uf 分別係 2'-氟修飾之 A、G、C 及 U；s 係硫代磷酸酯鏈結；(Tgn)係胸苷-二醇核酸(GNA) S-異構物；以及，L96 係 N-[參(GalNAc-烷基)-醯胺基癸醯基)]-4-羥基脯胺醇。

23. 一種抑制絲胺酸胺酶抑制因子分支 A 成員 1(Serpinal1) 基因之表現的雙股 RNA(dsRNA)劑，其係包含形成雙股區域之正義股與反義股，

其中，該正義股係包含 5'-

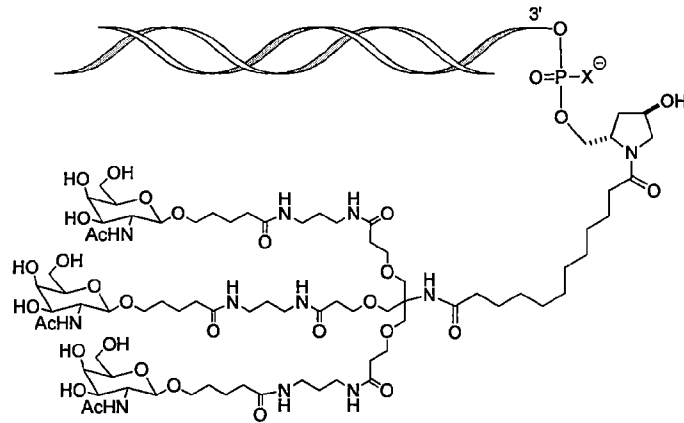
csusucuuAfaUfGfAfuugaacaaaa-3' (SEQ ID NO: 33)

之核苷酸序列，且該反義股係包含 5'-

usUfsuugu(Tgn)caaucaUfuAfagaagsasc-3' (SEQ ID NO: 34) 之核苷酸序列，

其中，a、g、c、及 u 分別係為 2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C、及 U；Af、Gf、Cf 及 Uf 分別係為 2'-氟 A、G、C 及 U；s 係為硫代磷酸酯鏈結；(Tgn)係為胸苷-二醇核酸(GNA) S-異構物；以及

其中，該正義股之 3'端係如以下方案中所示者接合至配位子：



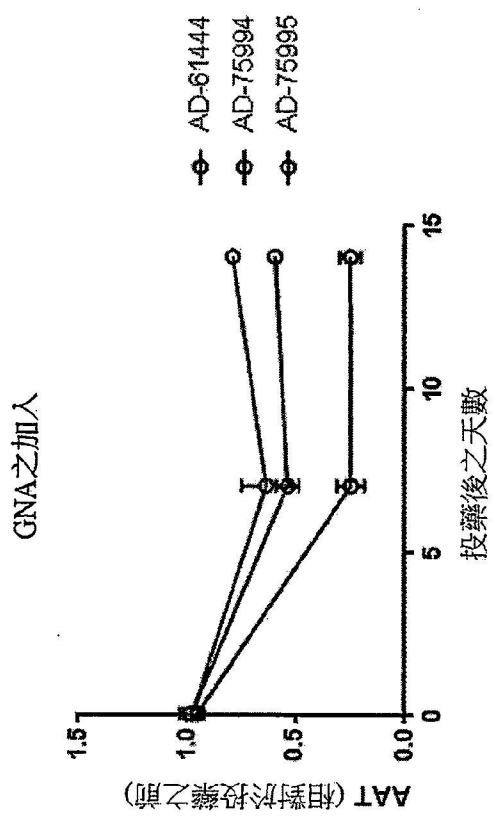
其中，X 係為 O。

24. 一種分離的細胞，係含有如申請專利範圍第 1 或 23 項所述之 dsRNA 劑或如申請專利範圍第 22 項所述之 dsRNA 分子。
25. 一種醫藥組成物，係包含申請專利範圍第 1 或 23 項所述之 dsRNA 劑或如申請專利範圍第 22 項所述之 dsRNA 分子。
26. 如申請專利範圍第 25 項所述之醫藥組成物，其中，該 dsRNA 劑或該 dsRNA 分子係於非緩衝溶液中。
27. 如申請專利範圍第 26 項所述之醫藥組成物，其中，該非緩衝溶液為鹽水或水。
28. 如申請專利範圍第 25 項所述之醫藥組成物，其中，該 dsRNA 劑或該 dsRNA 分子係於緩衝溶液中。
29. 如申請專利範圍第 28 項所述之醫藥組成物，其中，該緩衝溶液包含醋酸鹽、檸檬酸鹽、醇溶穀蛋白、碳酸鹽、磷酸鹽或其任意組合。
30. 如申請專利範圍第 28 項所述之醫藥組成物，其中，該緩衝溶液為磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。

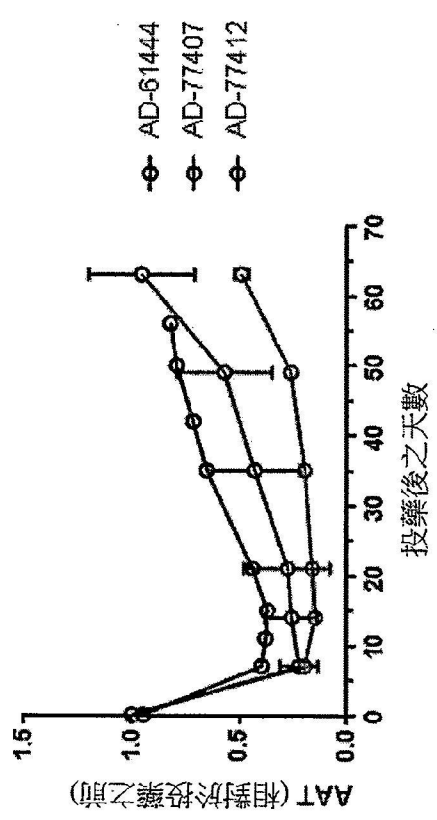
31. 一種體外抑制細胞內 *Serpina1* 表現之方法，該方法係包含令該細胞與如申請專利範圍第 1 或 23 項所述之 dsRNA 劑、如申請專利範圍第 22 項所述之 dsRNA 分子或如申請專利範圍第 25 項中所述之醫藥組成物接觸，從而抑制該細胞內 *Serpina1* 基因之表現。
32. 一種如申請專利範圍第 1 或 23 項所述之 dsRNA 劑、如申請專利範圍第 22 項所述之 dsRNA 分子或如申請專利範圍第 25 項中所述之醫藥組成物於製備治療患有 *Serpina1* 缺陷性變體相關肝臟疾病之個體的藥物之用途。
33. 如申請專利範圍第 32 項所述之用途，其中，該個體係人。
34. 如申請專利範圍第 32 項所述之用途，其中，該肝臟病變係選自由慢性肝病、肝炎、肝硬化、肝纖維化、及/或肝細胞癌所組成之群組。
35. 如申請專利範圍第 32 項所述之用途，其中，該藥物係適合皮下投藥。
36. 一種如申請專利範圍第 1 或 23 項所述之 dsRNA 劑、如申請專利範圍第 22 項所述之 dsRNA 分子或如申請專利範圍第 25 項所述之醫藥組成物於製備抑制具有 *Serpina1* 缺陷性變體相關肝臟疾病之個體體內肝細胞癌之發展的藥物之用途。
37. 如申請專利範圍第 36 項所述之用途，其中，該個體係人。

38. 如申請專利範圍第 36 項所述之用途，其中，該藥物係適合皮下投藥。
39. 一種如申請專利範圍第 1 或 23 項所述之 dsRNA 劑、如申請專利範圍第 22 項所述之 dsRNA 分子或如申請專利範圍第 25 項中任一項所述之醫藥組成物於製備降低具有 *Serpinal* 缺陷性變體之個體體內錯誤折疊之 *Serpinal* 於肝臟內之蓄積的藥物之用途。
40. 如申請專利範圍第 39 項所述之用途，其中，該個體係人。
41. 如申請專利範圍第 39 項所述之用途，其中，該藥物係適合皮下投藥。
42. 如申請專利範圍第 39 項所述之用途，其中，該個體具有一個或多個 *Serpinal Z* 等位基因。

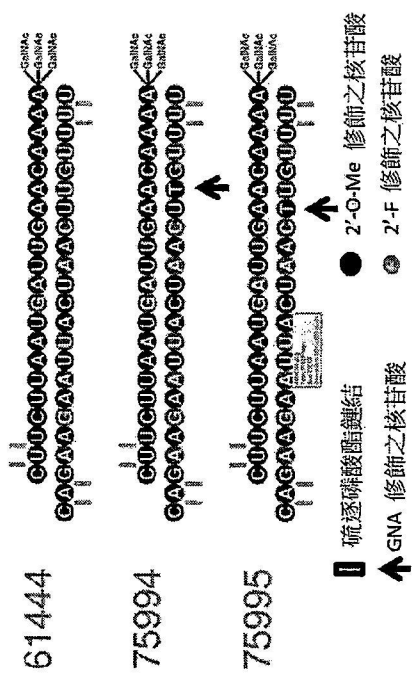
【發明圖式】



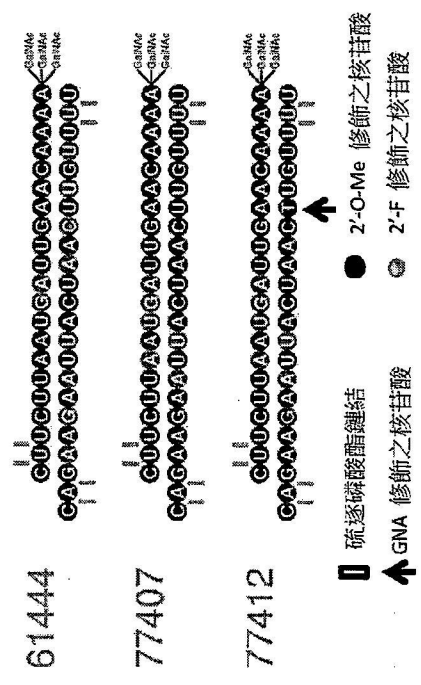
【第1B圖】



【第1D圖】

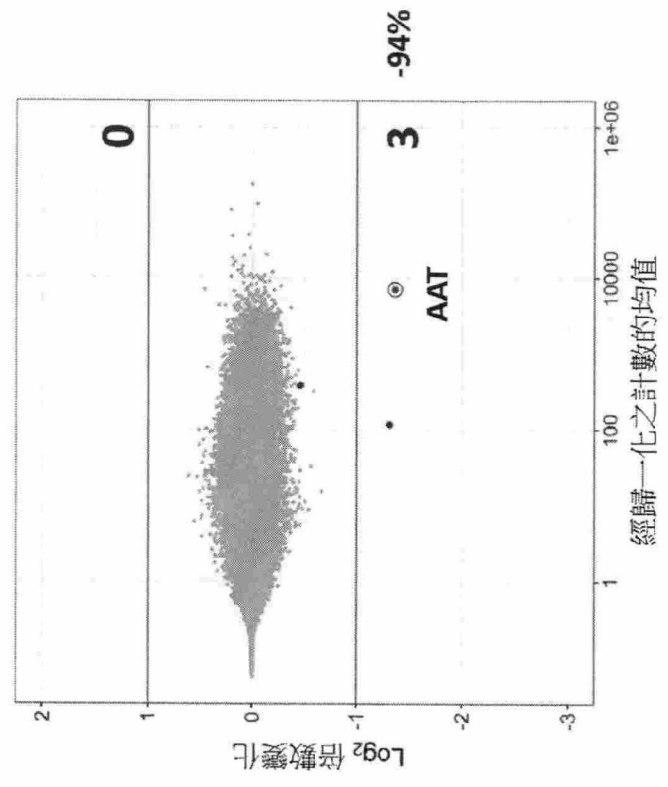


【第1A圖】



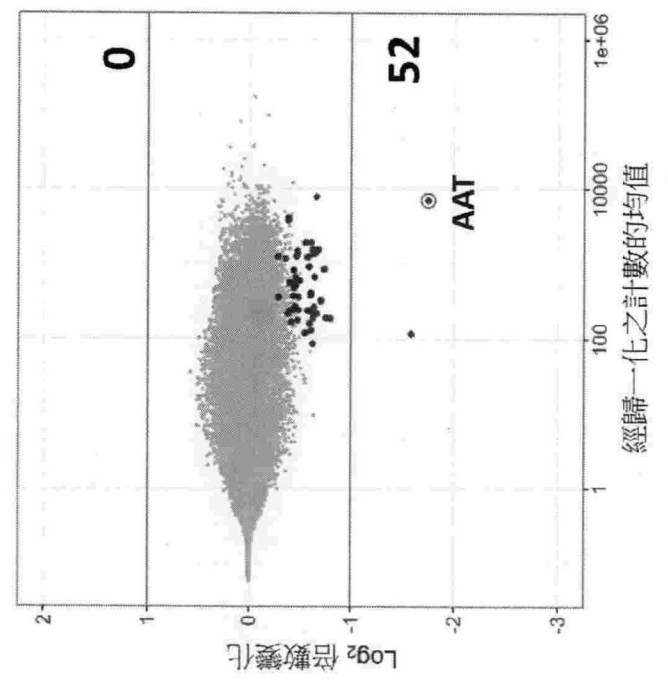
【第1C圖】

AD-77412 (GNA @ AS7)



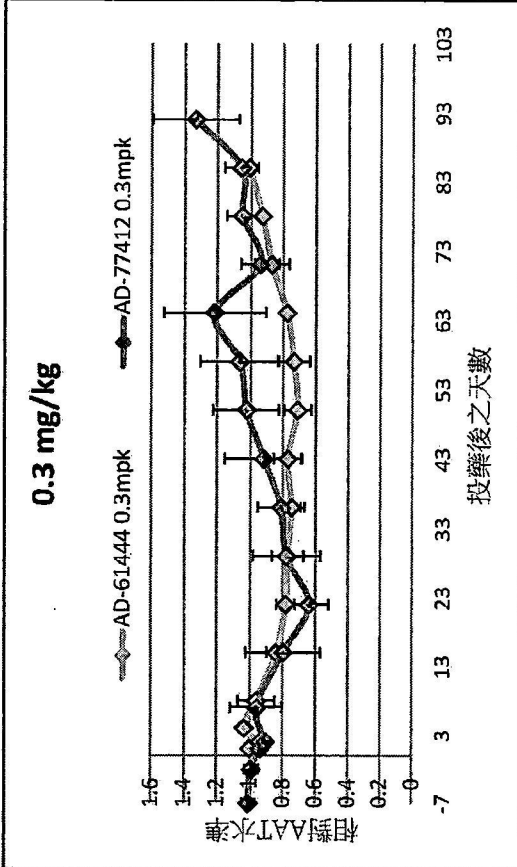
【第2B圖】

AD-61444

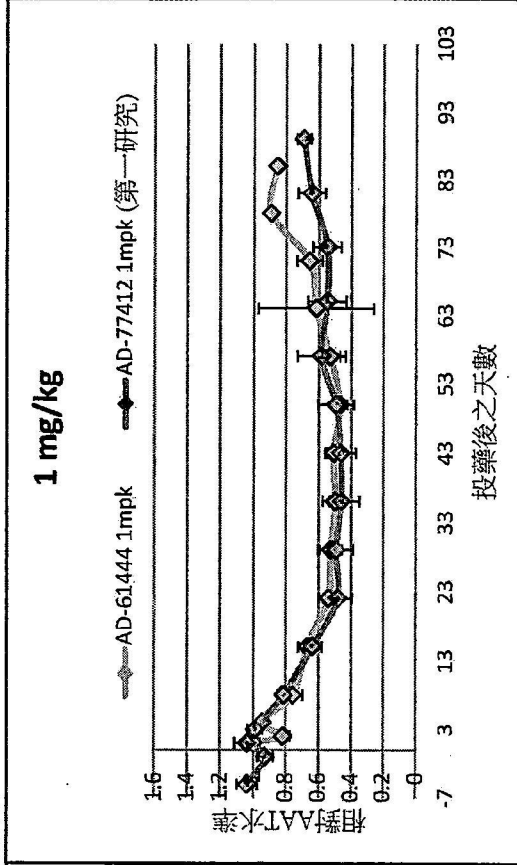


【第2A圖】

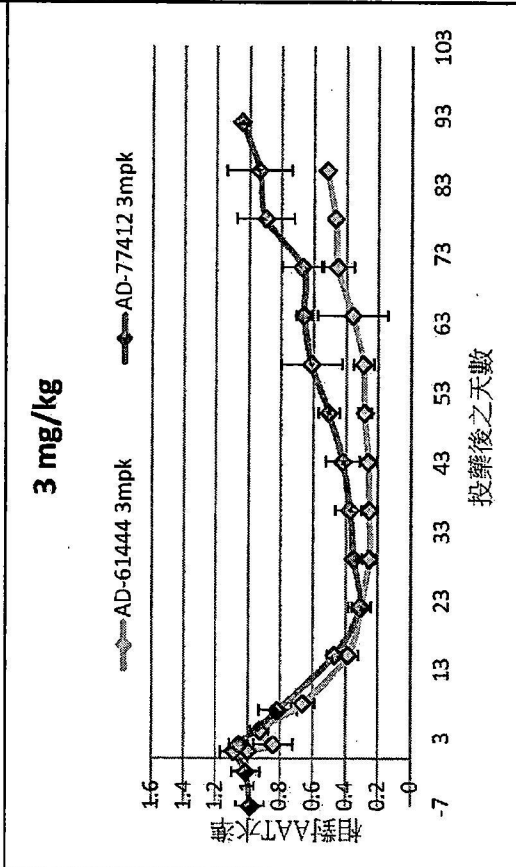
【第3A圖】



【第3B圖】



【第3C圖】



【第3D圖】

