

用于抑制乙型肝炎病毒（HBV）蛋白表达的组合物和方法

技术领域

- 5 本发明部分地涉及可用于抑制乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）蛋白表达的组合物和方法。

背景技术

- 10 估计慢性乙型肝炎感染（CHB）影响全球超过 3.5 亿人并且是由肝相关病症和肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）导致死亡的主要原因之一（www.cdc.gov/hepatitis/hbv/pdfs/hepbatrisk.pdf）。尽管乙型肝炎病毒（HBV）疫苗提供了预防新的 HBV 感染情况的有效方法，但对用于治疗现有 HBV 感染和 HBV 相关疾病和病症的治疗和方法仍存在巨大未满足的医学需求。

- 15 HBV 病毒粒子包含紧凑的 3.2 千碱基（kb）基因组，其作为部分双链、松弛环状 DNA（relaxed circular DNA, rcDNA）存在，具有 7-9 碱基末端冗余，其在肝细胞的细胞核内转化为共价闭合环状 DNA（covalently closed circular DNA, cccDNA），从而作为用于 HBV 转录的微染色体发挥功能（Bock CT, et al., J Mol Biol. 2001; 307:183–196）。宿主 RNA 聚合酶 II 转
- 20 录 cccDNA 上的 HBV 基因以产生五种病毒 RNA：（1）编码前核心（HBeAg）的转录物，（2）前基因组 RNA（pregenomic RNA, pgRNA），其编码结构衣壳蛋白（核心）和聚合酶并且经逆转录产生 rcDNA，（3）前 S1 转录物，其编码大 S 表面蛋白，（4）另一种转录物，其编码前 S2 和 S 表面蛋白（中 S 和小 S），以及（5）X 基因 mRNA。三种表面蛋白共同构成 HBsAg。所
- 25 有 HBV 转录物均在重叠阅读框中编码，具有共同的 3' 末端并利用同一多腺苷酸化信号（polyadenylation signal, PAS）。HBsAg 在脂质双层中形成围绕每个核心衣壳化的部分双链 HBV 基因组的包膜。

- 慢性 HBV 感染的自然演变包括四个连续的阶段：（1）早期“免疫耐受”阶段，其包括高水平的病毒复制和最少的肝炎症；（2）免疫反应阶段，其
- 30 包括明显的肝炎症和血清转氨酶升高；（3）一些患者进入“非复制”阶段，其包括血清转化为抗 HBeAg、检测不到病毒血症或低水平的病毒血症（通

过基于 PCR 的测定低于 2000 IU/ml) 和肝炎症的消退; 以及 (4) HBeAg 阴性慢性乙型肝炎, 其由于出现特定的病毒突变, 阻止了 HBeAg 的产生但不妨碍病毒复制。第四阶段是慢性乙型肝炎 (CHB) 的一种形式, 其可表现为 HBeAg 阳性 CHB 或 HBeAg 阴性 CHB, 并且特征为血清 HBV DNA 和血清转氨酶 (ALT 和 AST) 水平发生波动并且为进行性肝病。

尽管 cccDNA 被认为是 HBV 转录和复制的驱动因子, 但 HBV DNA 可整合到宿主基因组中。HBeAg 阳性患者的 cccDNA 水平高于 HBeAg 阴性患者, 但 HBeAg 阴性患者的整合的 HBV 的水平较高。研究表明, 除 cccDNA 之外, 整合的 HBV DNA 也可以是 HBsAg 的来源 (Wooddell et al., Sci Transl. Med. 2017 Sep 27;9(409):eaan0241. doi: 10.1126/scitranslmed.aan0241)。HBeAg 和 HBsAg 在慢性感染中发挥重要作用并被认为是导致 T 细胞耐受和耗竭 (Kakimi et al., J Virol. 2002; 76:8609–8620)。HBsAg 损失被认为是 HBV 有效免疫控制的标志。对于 CHB 患者, HBsAg 的血清清除是期望的治疗终点 (“功能性治愈”) 且具有改善的长期预后。

目前可用治疗可实现的功能性治愈率相对较低。核苷 (核苷酸) 类似物 (NUC) 和聚乙二醇化干扰素 (PEG-IFN) 是目前用于 CHB 的两种可用的治疗选择。施用 NUC 可有效控制病毒复制并与不良结局降低相关, 但它们不干扰病毒抗原产生或分泌。用 NUC 治疗难以实现 CHB 的 “功能性治愈”。PEG-IFN 治疗可诱导长期免疫控制, 但在实现 “功能性治愈” 方面的效力非常低。Lau et al. 已经表明, 在 PEG-IFN 单药治疗 48 周之后, 仅 3% 的接受治疗的个体实现了 HBsAg 血清清除 (Lau et al., N Engl J Med. 2005;352(26):2682–95.)。慢性乙型肝炎和另一些 HBV 相关疾病和病症仍然是世界范围内的重大健康问题并且需要有效的治疗方法。

发明内容

根据本发明的一个方面, 提供了用于抑制细胞中乙型肝炎病毒 (HBV) 表达的双链核糖核酸 (double-stranded ribonucleic acid, dsRNA) 剂, 其中所述 dsRNA 剂包含有义链和反义链, 并且任选地包含靶向配体, 所述反义链中的第 2 至 18 位核苷酸包含 HBV RNA 转录物的互补区, 其中所述互补区包含与表 1 至表 4 之一中列出的反义序列之一存在 0、1、2 或 3 个核苷酸差异的至少 15 个连续核苷酸。在一些实施方案中, HBV RNA 转录物的互补区包含与表 1 至表 4 之一中列出的反义序列之一存在不超过 3 个

核苷酸差异的至少 15、16、17、18 或 19 个连续核苷酸。在某些实施方案中, dsRNA 的反义链与 SEQ ID NO: 673 的任一个靶区域至少基本上互补, 并且在表 1 至表 4 的任一个中提供。在一些实施方案中, dsRNA 的反义链与 SEQ ID NO: 673 的任一个靶区域完全互补, 并且在表 1 至表 4 的任一个中提供。在一些实施方案中, dsRNA 剂包含表 1 至表 4 任一个中所示的有义链序列, 其中有义链序列与 dsRNA 剂中的反义链序列至少基本上互补。在某些实施方案中, dsRNA 剂包含表 1 至表 4 任一个中所示的有义链序列, 其中有义链序列与 dsRNA 剂中的反义链序列完全互补。在一些实施方案中, dsRNA 剂包含表 1 至表 4 任一个中所示的反义链序列。

10 在一些实施方案中, dsRNA 剂包含在表 1 至表 4 的任一个中的双链体序列所示的序列。在一些实施方案中, dsRNA 的反义链由核苷酸序列 II: 5'-z₁uugucaacaagaaaaaz₂-3'组成, 其中 z₁ 选自 c、g、a 或 u, z₂ 是核苷酸序列 IV。在某些实施方案中, z₁ 是 u。在某些实施方案中, 核苷酸序列 IV 的长度为 0 至 15 个核苷酸。在某些实施方案中, 核苷酸序列 IV 选自 c、

15 cu、ca、cc、cg、ccu、cca、ccc、ccg、cccc、cccu、ccca、cccg、ccccg、ccccgc、ccccgcc、ccccgccu、ccccgccug、ccccgccuguaacac、cccguu 或 cccgga。在某些实施方案中, 核苷酸序列 IV 的长度为 1、2、3 或 4 个核苷酸。在某些实施方案中, 核苷酸序列 IV 选自 c、cu、ca、cc、cg、ccu、cca、ccc、ccg、cccc、cccu、ccca 或 cccg。在一些实施方案中, dsRNA 的有义链由核苷酸序列 III: 5'-z₃uuuuucuuguugacaaz₄-3'组成, 其中 z₃ 是核苷酸序列 V, z₄ 选自 c、g、a 或 u。在某些实施方案中, z₄ 是 a。在某些实施方案中, 核苷酸序列 V 的长度为 0 至 15 个核苷酸。在某些实施方案中, 核苷酸序列 V 选自 g、ag、ug、gg、cg、agg、ugg、ggg、cgg、gggg、aggg、uggg、cggg、cgggg、gcgggg、ggcgggg、aggcgggg、caggcgggg 或 guguuacaggcgggg。

20 在某些实施方案中, 核苷酸序列 V 的长度为 1、2、3 或 4 个核苷酸。在某些实施方案中, 核苷酸序列 V 选自 g、ag、ug、gg、cg、agg、ugg、ggg、cgg、gggg、aggg、uggg 或 cggg。在一些实施方案中, dsRNA 的反义链由核苷酸序列 VI: 5'-z₅ugucaacaagaaaaacz₆-3'组成, 其中 z₅ 选自 c、g、a 或 u, z₆ 是核苷酸序列 VIII。在某些实施方案中, z₅ 是 a。在某些实施方案中, 核苷酸序列 VIII 的长度为 0 至 15 个核苷酸。在某些实施方案中, 核苷酸序列 VIII 选自 c、cc、ccu、cca、ccc、ccg、cccu、ccca、cccc、cccg、ccug、ccuc、ccuu、ccua、ccccg、ccccgc、ccuguu、ccugga、ccccccu、ccccccug、ccccccugu、ccccccuguaacacg。在某些实施方案中, 核苷酸序列 VIII 的长度为 1、2、3 或 4 个核苷酸。在某些实施方案中, 核苷酸序列 VIII 选自 c、

cc、ccu、cca、ccc、ccg、cccu、ccca、cccc、cccg 或 ccug。在一些实施方案中，dsRNA 的有义链由核苷酸序列 VII: 5'-z₇guuuuucuuguugacaz₈-3' 组成，其中 z₇ 是核苷酸序列 IX，z₈ 选自 c、g、a 或 u。在某些实施方案中，z₈ 是 u。在某些实施方案中，核苷酸序列 IX 的长度为 0 至 15 个核苷酸。

5 在某些实施方案中，核苷酸序列 IX 选自 g、ag、ug、gg、cg、agg、ugg、ggg、cgg、ggag、aagg、uagg、cagg、gcggg、ggcggg、aggcggg、caggcggg、acaggcggg 或 cguguuacaggcggg。在某些实施方案中，核苷酸序列 IX 的长度为 1、2、3 或 4 个核苷酸。在某些实施方案中，核苷酸序列 IX 选自 g、

10 ag、ug、gg、cg、agg、ugg、ggg、cgg、ggag、aagg、uagg 或 cagg。在一些实施方案中，z₁ 是与 z₄ 互补的核苷酸。在一些实施方案中，z₂ 是与 z₃ 互补的核苷酸序列。在一些实施方案中，z₅ 是与 z₈ 互补的核苷酸序列。在一些实施方案中，z₆ 是与 z₇ 互补的核苷酸序列。在一些实施方案中，dsRNA 剂包含有义链和反义链，其中 dsRNA 的反义链由如上所述的核苷酸序列 II 或 VI 组成，其中有义链的长度不超过 30 个核苷酸，其包含含有至少 15、

15 16、17、18 或 19 个核苷酸的反义链的互补区。在一些实施方案中，dsRNA 剂包含有义链和反义链，其中 dsRNA 的有义链由核苷酸序列 III 组成，并且 dsRNA 的反义链由核苷酸序列 II 组成，其中核苷酸序列 II 和 III 如上所述。在一些实施方案中，dsRNA 剂包含有义链和反义链，其中 dsRNA 的有义链由核苷酸序列 VII 组成并且 dsRNA 的反义链由核苷酸序列 VI 组成，其中核苷酸序列 VI 和 VII 如上所述。在一些实施方案中，核苷酸序列 II 包含具有至少 1 个核苷酸的 3' 突出端。在一些实施方案中，核苷酸序列 II 包含具有至少 2 个核苷酸的 3' 突出端。在某些实施方案中，核苷酸序列 II 中的所述 3' 突出端选自 uu 或 ga。在一些实施方案中，核苷酸序列 VI 包含具有至少 1 个核苷酸的 3' 突出端。在一些实施方案中，核苷酸序列 VI 包含具有至少 2 个核苷酸的 3' 突出端。在某些实施方案中，核苷酸序列 VI 中的所述 3' 突出端选自 uu 或 ga。

在一些实施方案中，dsRNA 包含有义链和反义链，所述反义链包含含有至少 15 个连续核苷酸的互补区，所述连续核苷酸与选自以下的任一核苷酸序列存在 0、1、2 或 3 个核苷酸差异：

5'-uuugucaacaagaaaaacccc-3' (SEQ ID NO: 143)

5'-uacaaaagaaaauigguaaca-3' (SEQ ID NO: 152)

5'-uuugucaacaagaaaaaccccg-3' (SEQ ID NO: 162)

30 5'-ugaacaaauggcacuaguaaa-3' (SEQ ID NO: 166)。

在某些实施方案中，有义链和反义链包含含有至少 15 个连续核苷酸的核苷酸序列，所述连续核苷酸与选自以下的任一核苷酸序列存在 0、1、2 或 3 个核苷酸差异：

5'-gggguuuuuucungugacaaa-3' (SEQ ID NO: 5)

5'-uuugucaacaagaaaaacccc-3' (SEQ ID NO: 143)

5'-uguuaccaauuuuuuuugua-3' (SEQ ID NO: 14)

5'-uacaaaagaaaauugguaaca-3' (SEQ ID NO: 152)

5'-cgggguuuuucungugacaa-3' (SEQ ID NO: 24)

5'-uugucaacaagaaaaaccccg-3' (SEQ ID NO: 162)

5'-uuuacuauguccauuuguuca-3' (SEQ ID NO: 28)

5'-ugaacaaauggcacuaguaaa-3' (SEQ ID NO: 166)

- 5 在某些实施方案中，dsRNA 剂包含至少一个经修饰核苷酸。在一些实施方案中，反义链的所有或基本上所有核苷酸均是经修饰核苷酸。在某些实施方案中，所述至少一个经修饰核苷酸包含：2'-O-甲基核苷酸、2'-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'3'-seco 核苷酸模拟物、锁核苷酸、解锁核苷酸（unlocked nucleic acid nucleotide, UNA）、二醇核苷酸（glycol nucleic acid nucleotide, GNA）、2'-F-阿拉伯糖核苷酸、2'-甲氧基乙基核苷酸、无碱基核苷酸、核糖醇、反向核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向 2'-OMe 核苷酸、反向 2'-脱氧核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸，及 3'-OMe 核苷酸、包含 5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸，或者与胆固醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、氨基磷酸酯（phosphoramidate），或包含非天然碱基的核苷酸。在一些实施方案中，dsRNA 剂在反义链的 5' 末端包含 E-乙烯基磷酸酯核苷酸。在一些实施方案中，dsRNA 剂包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中，有义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，反义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中，有义链包含 1、2、3、4、5 或 6 个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，反义链包含 1、2、3、4、5 或 6 个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，有义链和反义链的所有或基本上所有核苷酸均是经修饰核苷酸。在一些实施方案中，反义链包含 15 个或更多个独立地选自 2'-O-甲基核苷酸和 2'-氟核苷酸的经修饰核苷酸，其中少于 6 个经修饰核苷酸是 2'-氟核苷酸。在某些实施方案中，反义链包含 3 个或 5 个 2'-氟核苷酸。在某些实施方案中，反义链包含 15 个或更多个独立地选自 2'-O-甲基核苷酸和 2'-氟核苷酸的经修饰核苷酸，其中至少 14、15 或

16 个经修饰核苷酸是 2'-O-甲基核苷酸并且从反义链的 5' 末端起第 2、7、12、14 和/或 16 位的核苷酸是 2'-氟核苷酸。在一些实施方案中，dsRNA 包含有义链和反义链，反义链与对应于靶基因的 mRNA 的至少一部分互补，其中 dsRNA 的反义链包含如式 (C) 所示的核苷酸序列并且 dsRNA 的有义链包含如式 (D) 所示的核苷酸序列：



其中，每个 N_F 或 N'_F 表示 2'-氟修饰的核苷酸； N_{M1} 、 N_{M2} 、 N_{M3} 、 N_{M4} 、 N_{M5} 、 N_{M6} 、 N_{M7} 、 N_{M8} 、 N'_{N1} 、 N'_{N2} 、 N'_{N3} 、 N'_{N4} 、 N'_{N5} 和 N'_{N6} 各自独立地表示经修饰或未经修饰的核苷酸，并且 N_{M4} 、 N_{M5} 、 N_{M7} 和 N_{M8} 不是 2'-氟修饰的核苷酸；每个 N_L 或 N'_L 独立地表示经修饰或未经修饰的核苷酸但不表示 2'-氟修饰的核苷酸，并且 n 和 n' 可以是 0 至 7 的整数。

在一些实施方案中，dsRNA 包含有义链和反义链，所述反义链包含含有至少 15 个连续核苷酸的互补区，所述连续核苷酸与选自以下的任一核苷酸序列存在 0、1、2 或 3 个核苷酸差异：

5'-u*U*ugucAacaaGaAaAacc*c*c-3' (SEQ ID NO: 582)

5'-u*A*cuuuCcaauCaAuAggc*c*u-3' (SEQ ID NO: 585)

5'-u*G*uaaaGagagGuGcGccc*c*g-3' (SEQ ID NO: 588)

5'-u*A*caaaAgaaaAuUgGuaa*c*a-3' (SEQ ID NO: 592)

5'-u*C*aaaaGaaaaUuGgUaac*a*g-3' (SEQ ID NO: 594)

5'-u*U*gucaAcaagAaAaAccc*c*g-3' (SEQ ID NO: 596)

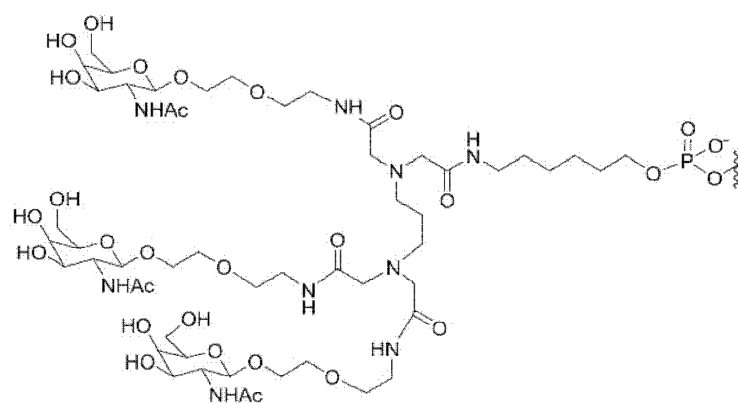
5'-u*G*aacaAauggCaCuAgu*a*a-3' (SEQ ID NO: 597)

5'-u*A*gacaAaagaAaAuUggu*a*a-3' (SEQ ID NO: 598)

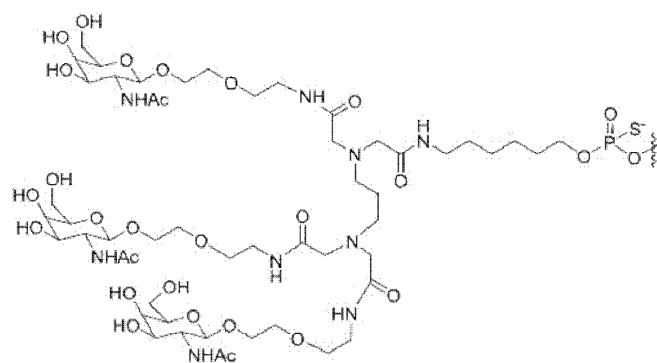
5'-a*U*gucaAcaagAaAaAccc*u*g-3' (SEQ ID NO: 666)

在一些实施方案中，经修饰有义链是表 2 至表 4 之一中所示的经修饰有义链序列。在某些实施方案中，经修饰反义链是表 2 至表 4 之一中所示的经修饰反义链序列。在某些实施方案中，有义链与反义链互补或基本上互补，并且互补区的长度为 16 至 23 个核苷酸。在一些实施方案中，互补区的长度为 19 至 21 个核苷酸。在某些实施方案中，互补区的长度为 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核苷酸。在一些实施方案中，每条链的长度不超过 40 个核苷酸。在一

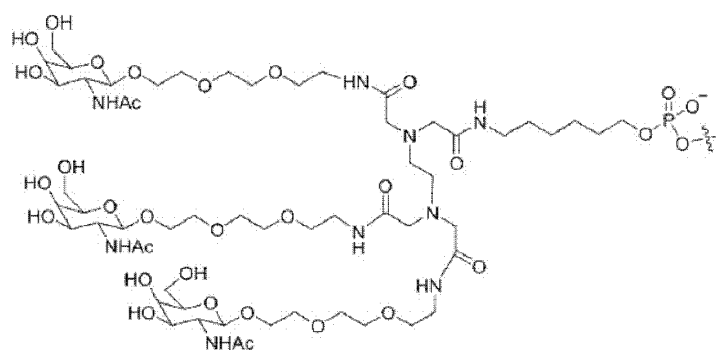
些实施方案中，每条链的长度不超过 30 个核苷酸。在某些实施方案中，每条链的长度不超过 27 个核苷酸。在某些实施方案中，每条链的长度不超过 25 个核苷酸。在某些实施方案中，每条链的长度不超过 23 个核苷酸。在一些实施方案中，每条链的长度不超过 21 个核苷酸。在某些实施方案中，每条链的长度为 19 至 32 个核苷酸。在某些实施方案中，每条链的长度为 19、20、21、22、23、24、25、26、32 个核苷酸。在一些实施方案中，dsRNA 剂包含至少一个经修饰核苷酸并且还包含一个或更多个靶向基团或连接基团。在一些实施方案中，一个或更多个靶向基团或连接基团与有义链缀合。在一些实施方案中，靶向基团或连接基团包含 N-乙酰基-半乳糖胺 (GalNAc)。在某些实施方案中，靶向基团具有以下结构：



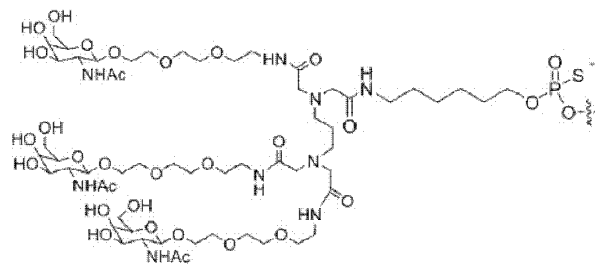
GLO-1.



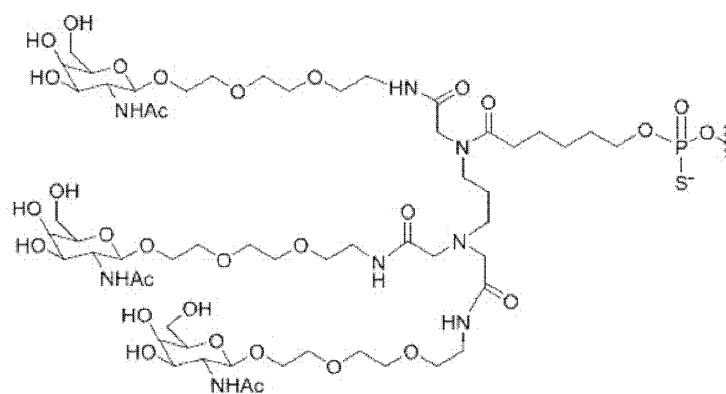
GLS-1.



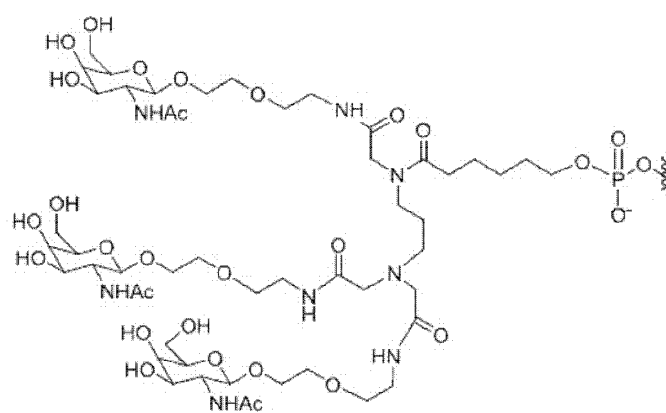
GLO-2.



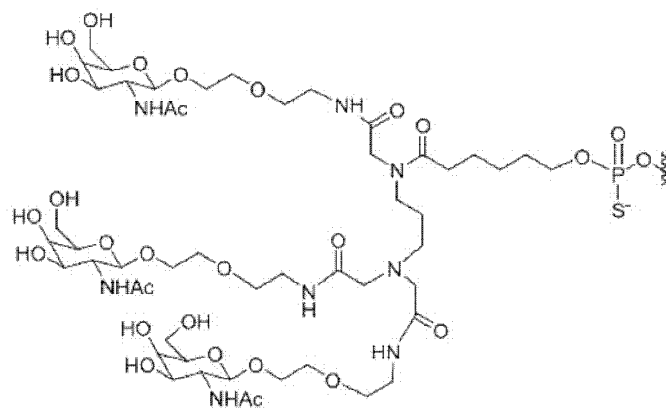
GLS-2.



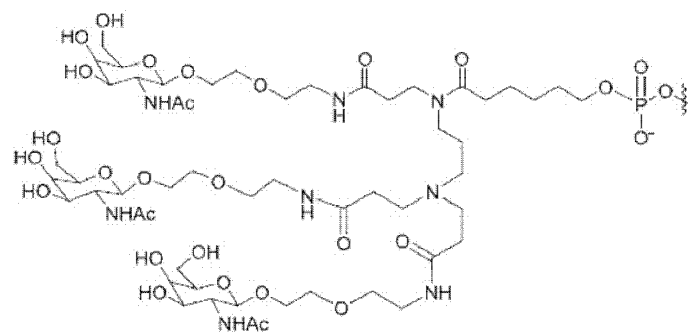
GLS-4.



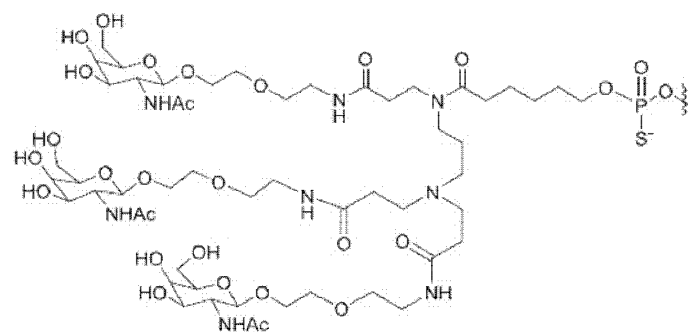
GLO-5.



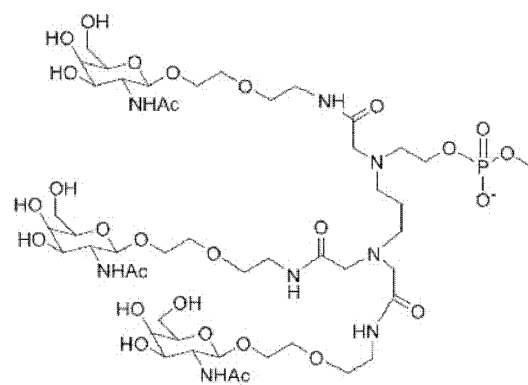
GLS-5.



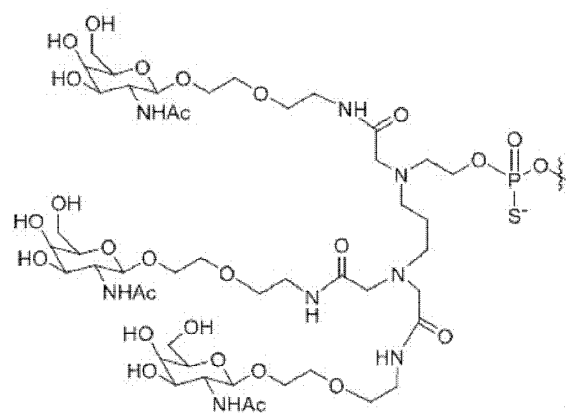
GLO-6.



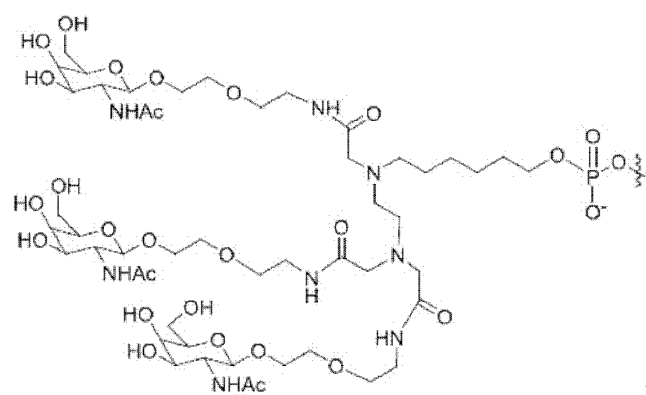
GLS-6.



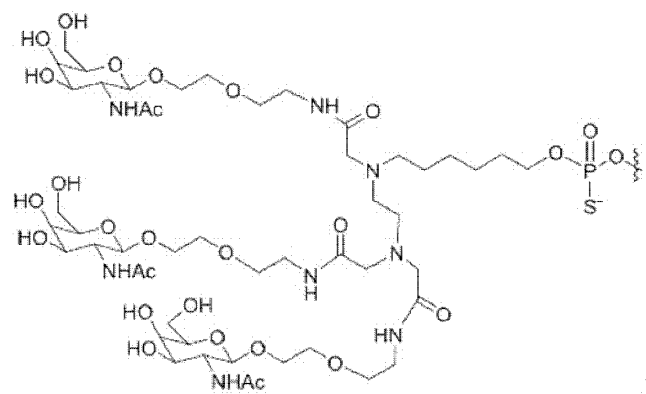
GLO-7.



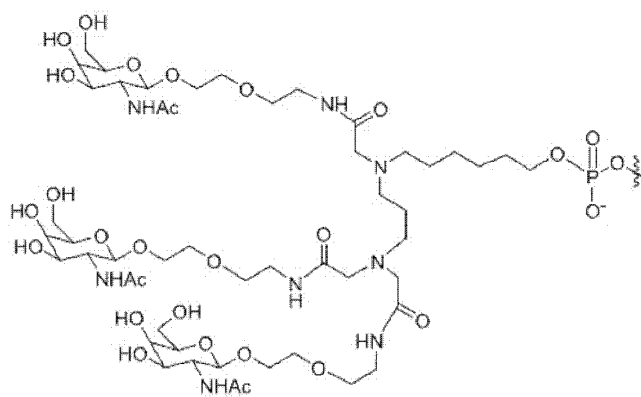
GLS-7.



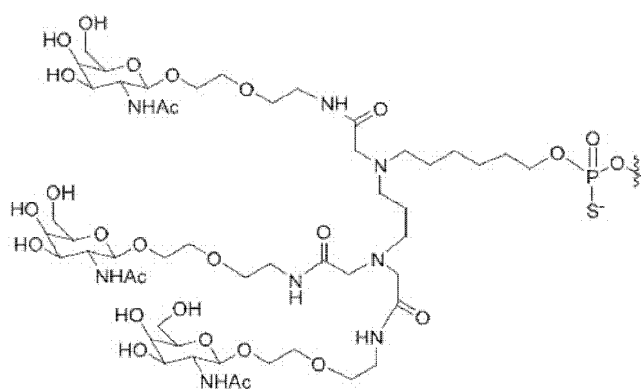
GLO-8.



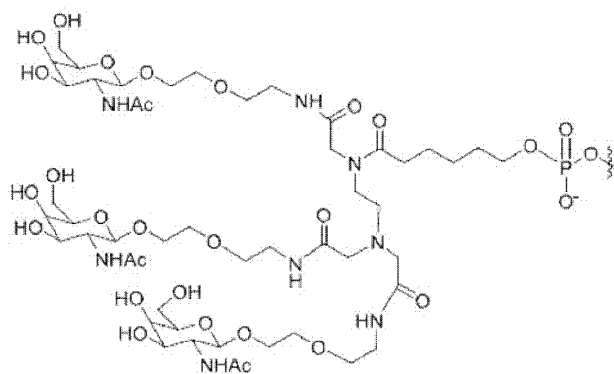
GLS-8.



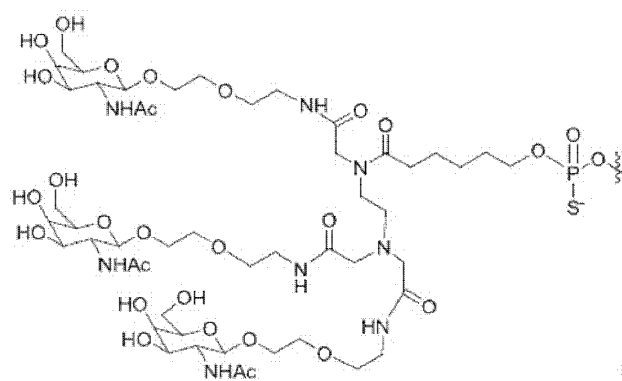
GLO-9.



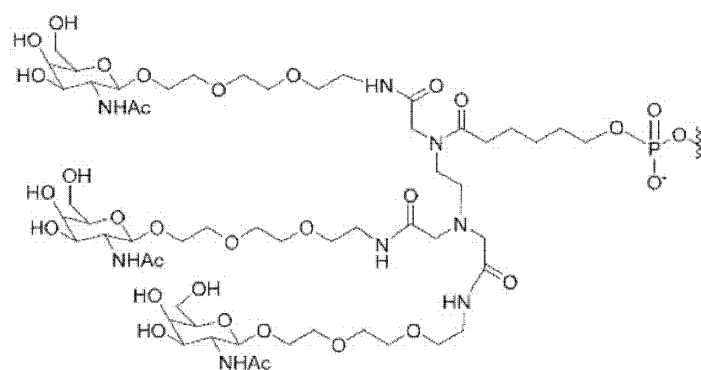
GLS-9.



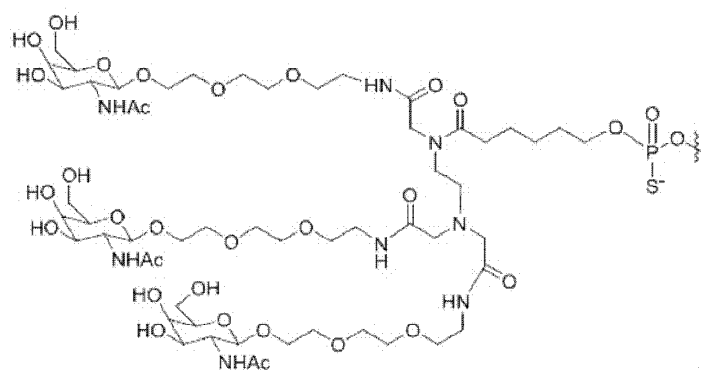
GLO-10.



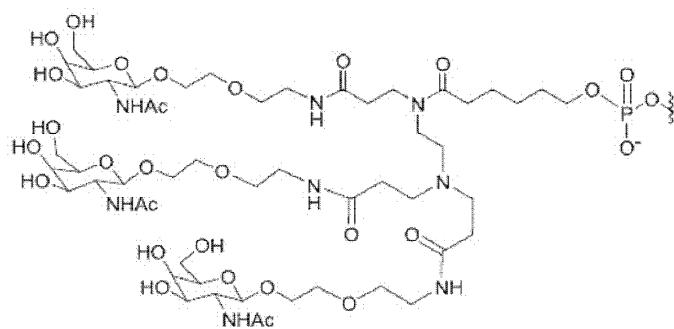
GLS-10.



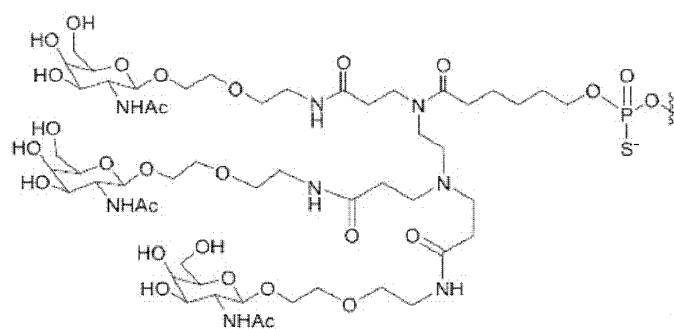
GLO-11.



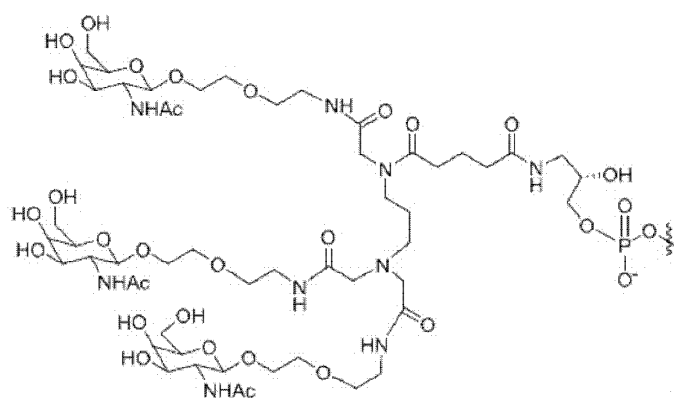
GLS-11.



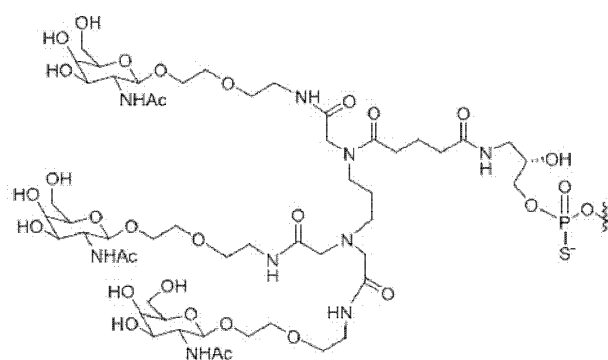
GLO-12.



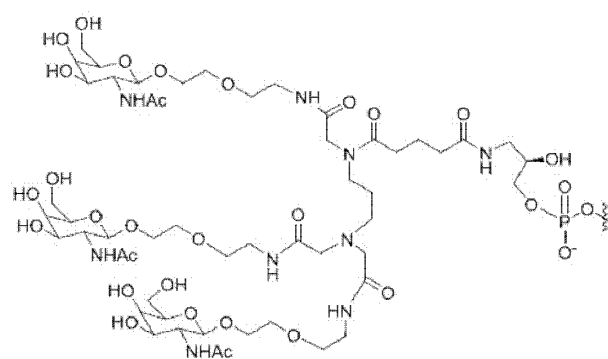
GLS-12.



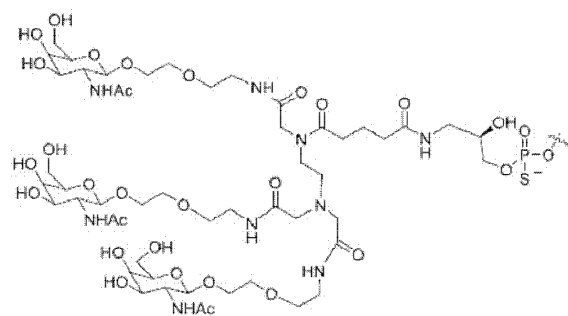
GLO-13.



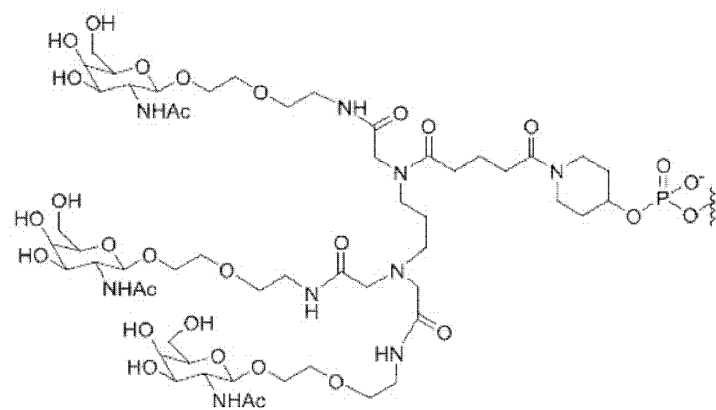
GLS-13,



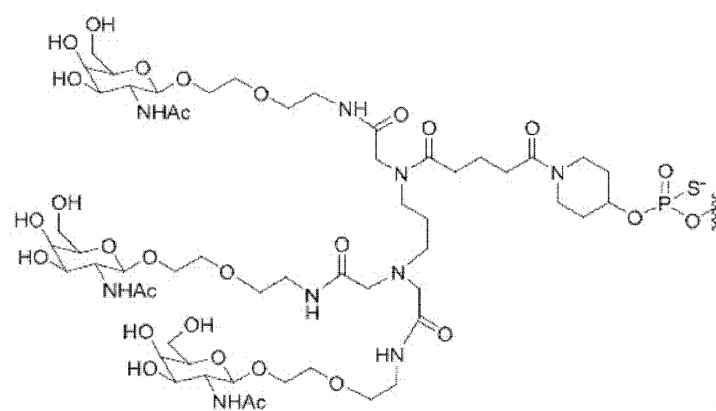
GLO-14,



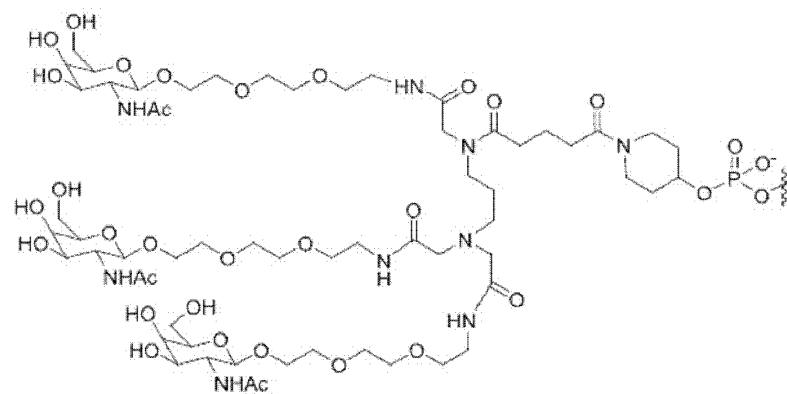
GLS-14,



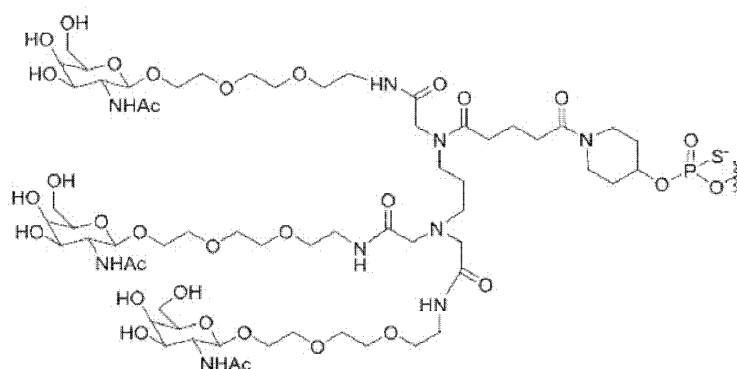
GLO-15.



GLS-15.



GLO-16, 或



GLS-16.

在一些实施方案中，dsRNA 剂包含与有义链的 5'末端缀合的靶向基团。在一些实施方案中，dsRNA 剂包含与有义链的 3'末端缀合的靶向基团。在某些实施方案中，反义链在 3'末端包含一个反向无碱基残基。在某些实施方案中，有义链在 3'和/或 5'末端包含一个或两个反向无碱基残基。

在一些实施方案中，dsRNA 剂具有两个平末端。在某些实施方案中，至少一条链包含具有至少 1 个核苷酸的 3'突出端。在一些实施方案中，至少一条链包含具有至少 2 个核苷酸的 3'突出端。在一些实施方案中，有义链包含以下之一：SEQ ID NO: 281、290、295、300、304、306、307、331、557、567、569、571、572、573、560、563、607、628 至 637 或 918 至 921。

在一些实施方案中，反义链包含以下之一：SEQ ID NO: 419、428、433、438、442、444、445、469、582、592、594、596、597、598、585、588、642、663 至 672 或 922 至 925。在某些实施方案中，dsRNA 剂包含：

SEQ ID NO: 281 和 SEQ ID NO: 419；SEQ ID NO: 290 和 SEQ ID NO: 428；SEQ ID NO: 295 和 SEQ ID NO: 433；SEQ ID NO: 300 和 SEQ ID NO: 438；SEQ ID NO: 304 和 SEQ ID NO: 442；SEQ ID NO: 306 和 SEQ ID NO: 444；SEQ ID NO: 307 和 SEQ ID NO: 445；SEQ ID NO: 331 和 SEQ ID NO: 469；SEQ ID NO: 557 和 SEQ ID NO: 582；SEQ ID NO: 567 和 SEQ ID NO: 592；SEQ ID NO: 569 和 SEQ ID NO: 594；SEQ ID NO: 571 和 SEQ ID NO: 596；SEQ ID NO: 572 和 SEQ ID NO: 597；SEQ ID NO: 573 和 SEQ ID NO: 598；SEQ ID NO: 560 和 SEQ ID NO: 585；SEQ ID NO: 563 和 SEQ ID NO: 588；SEQ ID NO: 607 和 SEQ ID NO: 642；SEQ ID NO: 628 和 SEQ ID NO: 663；SEQ ID NO: 629 和 SEQ ID NO: 664；SEQ ID NO: 630 和 SEQ ID NO: 665；SEQ ID NO: 631 和 SEQ ID NO: 666；SEQ ID NO: 632 和 SEQ ID NO: 667；SEQ ID NO: 633 和 SEQ ID NO: 668；SEQ ID NO: 634 和 SEQ ID NO: 669；SEQ ID NO: 635 和 SEQ ID NO: 670；SEQ ID NO: 636 和 SEQ ID NO: 671；

SEQ ID NO: 637 和 SEQ ID NO: 672; SEQ ID NO: 918 和 SEQ ID NO: 922;
SEQ ID NO: 919 和 SEQ ID NO: 923; SEQ ID NO: 920 和 SEQ ID NO: 924;
或 SEQ ID NO: 921 和 SEQ ID NO: 925。在某些实施方案中, dsRNA 包含
选自以下的双链体: AD00170、AD00378、AD00170-1、AD00263、AD00265、
5 AD00267、AD00268、AD00269、AD00173、AD00176、AD00383、AD00384、
AD00378-1、AD00170-2、AD00268-2 和 AD00263-2。

根据本发明的另一个方面, 提供了组合物, 其包含前述 dsRNA 剂中
任一种的任何实施方案的一种、两种、三种或更多种 dsRNA 剂。在一些
实施方案中, 组合物还包含可药用载体。在某些实施方案中, 组合物还包
10 含一种或更多种另外的治疗剂。在某些实施方案中, 组合物被包装在药盒、
容器、包装物、分配器、预填充注射器或小瓶中。在一些实施方案中, 组
合物被配制用于皮下施用或被配制用于静脉内 (intravenous, IV) 施
用。在一些实施方案中, 至少一种 dsRNA 剂的有义链包含以下之一: SEQ
ID NO: 281、290、295、300、304、306、307、331、557、567、569、571、
15 572、573、560、563、607、628 至 637 或 918 至 921。在一些实施方案中,
至少一种 dsRNA 剂的反义链包含以下之一: SEQ ID NO: 419、428、433、
438、442、444、445、469、582、592、594、596、597、598、585、588、
642、663 至 672 或 922 至 925。在某些实施方案中, dsRNA 剂包含: SEQ
ID NO: 281 和 SEQ ID NO: 419; SEQ ID NO: 290 和 SEQ ID NO: 428; SEQ
20 ID NO: 295 和 SEQ ID NO: 433; SEQ ID NO: 300 和 SEQ ID NO: 438; SEQ
ID NO: 304 和 SEQ ID NO: 442; SEQ ID NO: 306 和 SEQ ID NO: 444; SEQ
ID NO: 307 和 SEQ ID NO: 445; SEQ ID NO: 331 和 SEQ ID NO: 469; SEQ
ID NO: 557 和 SEQ ID NO: 582; SEQ ID NO: 567 和 SEQ ID NO: 592; SEQ
ID NO: 569 和 SEQ ID NO: 594; SEQ ID NO: 571 和 SEQ ID NO: 596; SEQ
25 ID NO: 572 和 SEQ ID NO: 597; SEQ ID NO: 573 和 SEQ ID NO: 598; SEQ
ID NO: 560 和 SEQ ID NO: 585; SEQ ID NO: 563 和 SEQ ID NO: 588; SEQ
ID NO: 607 和 SEQ ID NO: 642; SEQ ID NO: 628 和 SEQ ID NO: 663; SEQ
ID NO: 629 和 SEQ ID NO: 664; SEQ ID NO: 630 和 SEQ ID NO: 665; SEQ
ID NO: 631 和 SEQ ID NO: 666; SEQ ID NO: 632 和 SEQ ID NO: 667; SEQ
30 ID NO: 633 和 SEQ ID NO: 668; SEQ ID NO: 634 和 SEQ ID NO: 669; SEQ
ID NO: 635 和 SEQ ID NO: 670; SEQ ID NO: 636 和 SEQ ID NO: 671; SEQ
ID NO: 637 和 SEQ ID NO: 672; SEQ ID NO: 918 和 SEQ ID NO: 922; SEQ
ID NO: 919 和 SEQ ID NO: 923; SEQ ID NO: 920 和 SEQ ID NO: 924; 或
SEQ ID NO: 921 和 SEQ ID NO: 925。在某些实施方案中, dsRNA 包含选

自以下的双链体：AD00170、AD00378、AD00170-1、AD00263、AD00265、AD00267、AD00268、AD00269、AD00173、AD00383、AD00384、AD00378-1、AD00170-2、AD00268-2、AD00263-2 和 AD00176。

5 根据本发明的另一个方面，提供了细胞，其包含本发明前述方面的任何实施方案的 dsRNA 剂。在一些实施方案中，细胞是哺乳动物细胞，任选地是人细胞。

10 根据本发明的另一个方面，提供了抑制细胞中乙型肝炎病毒（HBV）基因表达的方法，所述方法包括（i）制备包含有效量的本发明前述 dsRNA 剂方面的任何实施方案或本发明任何前述方面的组合物的任何实施方案的一种或更多种双链核糖核酸（dsRNA）剂的细胞。在一些实施方案中，所述方法还包括（ii）将所制备的细胞维持足以获得 HBV 基因的 mRNA 转录物降解的时间，从而抑制所述细胞中 HBV 基因的表达；抑制所述细胞中 HBV 的复制；以及降低所述细胞中 HBV 抗原的水平。在一些实施方案中，一种或更多种 HBV 抗原是 HBcAg、HBsAg 和 HBeAg。在某些实施方案中，细胞在对象中并且将 dsRNA 剂皮下施用于对象。在某些实施方案中，细胞在对象中并且通过 IV 施用将 dsRNA 剂施用于对象。在某些实施方案中，细胞在对象中。在某些实施方案中，将 2、3、4 或更多种 dsRNA 剂施用于对象。在某些实施方案中，所述方法还包括在向对象施用 dsRNA 剂之后评估对 HBV 基因的抑制，其中用于评估的手段包括：（i）
20 确定对象中 HBV 相关疾病或病症的一种或更多种生理特征；以及（ii）将所确定的生理特征与 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或者与 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征进行比较，其中所述比较指示所述对象中 HBV 基因表达抑制的存在或不存在。在某些实施方案中，对照生理特征是感染 HBV 且未施用 dsRNA 剂的对象生理特征。在某些实施方案中，在对象中确定的生理特征是以下中的一种或更多种：对象中丙氨酸转氨酶（ALT）的水平、对象中天冬氨酸转氨酶（AST）的水平；对象中的 HBV 病毒载量；对象中的 HBV 共价闭合环状 DNA（cccDNA）水平；对象中一种或更多种 HBV 抗原的水平；对象中 HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中一种或更多种的水平；对象中一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体的存在、不存在和/或水平。在某些实施方案中，生理特征是在从对象获得的生物样品中确定的。在某些实施方案中，生物样品包含以下中的一种或更多种：血清样品、组织样品、细胞样品和肝样品。在某些实施方案中，与生理特征的对照水平相比，在对象中确定的生理特征是异常的。在某些实施方案中，与 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征和/或者 HBV 相关疾

病或病症的基线治疗前生理特征相比，所述对象中以下一种或更多种的水平被确定为统计学上显著更高指示对象中 HBV 基因表达的状态：ALT；AST；HBV 病毒载量、HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA)；一种或更多种 HBV 抗原；HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中的一种或更多种；以及一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体。在某些实施方案中，对照生理特征是感染 HBV 且未施用 dsRNA 剂的对象生理特征。在某些实施方案中，对象中以下一种或更多种的降低指示对象中 HBV 基因表达的降低：ALT；AST；HBV 病毒载量；HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA)；一种或更多种 HBV 抗原；HBcAg；HBsAg；和 HBeAg。在一些实施方案中，与 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征和/或 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征相比对象中抗乙型肝炎病毒抗体的提高指示对象中 HBV 基因表达的降低。在一些实施方案中，HBV 相关疾病或病症是以下中的一种或更多种：其中疾病或病症是以下中的一种或更多种：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、丁型肝炎病毒感染 (δ 肝炎或 HDV)、肝损伤、肝硬化、急性乙型肝炎、急性暴发性肝炎、以及肝纤维化、肝炎症和肝细胞癌。在某些实施方案中，HBV 相关疾病或病症是以下中的一种或更多种：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、丁型肝炎病毒感染 (δ 肝炎或 HDV) 和急性乙型肝炎。

根据本发明的另一个方面，提供了抑制对象中 HBV 基因表达的方法，所述方法包括向对象施用有效量的本发明前述 dsRNA 剂方面的任何实施方案或者本发明前述组合物的任何实施方案的一种或更多种双链核糖核酸 (dsRNA) 剂。在一些实施方案中，将两种、三种、四种或更多种 dsRNA 剂施用于对象。在一些实施方案中，将 dsRNA 剂皮下施用于对象。在某些实施方案中，将 dsRNA 剂通过 IV 施用而施用于对象。在一些实施方案中，所述方法还包括在施用一种或更多种 dsRNA 剂之后评估对 HBV 基因的抑制，其中用于评估的手段包括：(i) 确定对象中 HBV 相关疾病或病症的一种或更多种生理特征以及 (ii) 将所确定的生理特征与 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或与 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征进行比较，其中所述比较指示对对象中 HBV 基因表达的抑制的存在或不存在。在一些实施方案中，在对象中确定的生理特征是以下中的一种或更多种：对象中丙氨酸转氨酶 (ALT) 的水平、对象中天冬氨酸转氨酶 (AST) 的水平；对象中的 HBV 病毒载量；对象中的 HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA) 水平；对象中一种或更多种 HBV 抗原的水平；对象中 HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中一种或更多种的水平；对象中一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体的存在、不存在和/或水平。在一些实施方案中，生

理特征是在从对象获得的生物样品中确定的。在某些实施方案中，生物样品包含以下中的一种或更多种：血清样品、细胞样品、组织样品和肝样品。在一些实施方案中，与 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或与 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征相比，在对象中确定的生理特征更加异常。在 5 一些实施方案中，与 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或与 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征相比，所述对象中以下一种或更多种的水平被确定为在统计学上显著更高、更低或未变化指示对象中 HBV 基因表达的状态：ALT；AST；HBV 病毒载量；HBV 共价闭合环状 DNA（cccDNA）；一种或更多种 HBV 抗原；HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中的一种或更多种；以及一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体。10 在某些实施方案中，对象中以下一种或更多种的降低指示对象中 HBV 基因表达的降低：ALT；AST；HBV 病毒载量；HBV 共价闭合环状 DNA（cccDNA）；一种或更多种 HBV 抗原；HBcAg；HBsAg；和 HBeAg。在一些实施方案中，与 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或与 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征相比对象中抗乙型肝炎病毒抗体的提高指示对象中 HBV 基因表达的降低。在某些实施方案中，HBV 相关疾病或病症是以下中的一种或更多种：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、急性乙型肝炎、肝细胞癌、终末期肝病、肝纤维化、肝炎症、肝损伤、肝硬化和丁型肝炎病毒感染（ δ 肝炎或 HDV）。在某些实施方案中，HBV 相关疾病或病症是以下中的一种或更多种：其中疾病或病症是以下中的一种或更多种：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、丁型肝炎病毒感染（ δ 肝炎或 HDV）和急性乙型肝炎。20

根据本发明的另一个方面，提供了治疗与乙型肝炎病毒（HBV）蛋白的存在相关的疾病或病症的方法，所述方法包括向对象施用有效量的本发明前述 dsRNA 剂方面的任何实施方案或者本发明前述组合物的任何实施方案的一种或更多种双链核糖核酸（dsRNA）剂，以抑制编码 HBV 蛋白的 HBV 基因的表达。在一些实施方案中，所述方法包括向对象施用两种、三种、四种或更多种 dsRNA 剂。在一些实施方案中，所述疾病或病症是以下中的一种或更多种：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、丁型肝炎病毒感染（ δ 肝炎或 HDV）、肝损伤、肝硬化、急性乙型肝炎、急性暴发性肝炎、肝炎症、肝纤维化和肝细胞癌。在某些实施方案中，所述方法还包括向对象施用另外的治疗方案。在某些实施方案中，另外的治疗方案包括：向对象施用一种或更多种：HBV 反义多核苷酸、另外的 HBV dsRNA 治疗剂、非 HBV dsRNA 治疗剂、HBV 非 dsRNA 治疗剂、以及行为改变。在一些实 30

施方案中，非 HBV dsRNA 治疗剂是以下中的一种或更多种：抗病毒剂、抗病毒核苷或核苷酸类似物（NUC）、病毒聚合酶抑制剂、逆转录酶抑制剂、免疫刺激剂、治疗性疫苗、病毒进入抑制剂、抑制 HBsAg 分泌或释放的寡核苷酸、衣壳抑制剂、共价闭合环状（ccc）HBV DNA 抑制剂。在
5 一些实施方案中，NUC 是：富马酸替诺福韦酯（Tenofovir disoproxil fumarate, TDF）、替诺福韦艾拉酚胺（Tenofovir alafenamide）、拉米夫定（Lamivudine）、阿德福韦酯（Adefovir dipivoxil）、恩替卡韦（Entecavir, ETV）或替比夫定（Telbivudine）。在某些实施方案中，免疫刺激剂是聚乙二醇化干扰素 $\alpha 2a$ （PEG-IFN- $\alpha 2a$ ）、干扰素 $\alpha 2b$ 、重组人白介素-7、Toll-
10 样受体 7（TLR7）激动剂，或检查点抑制剂（例如，PD1 抑制剂）。在某些实施方案中，将一种或更多种 dsRNA 剂皮下施用于对象。在某些实施方案中，通过 IV 施用将一种或更多种 dsRNA 剂施用于对象。在某些实施方案中，所述方法还包括确定所施用的一种或更多种双链核糖核酸（dsRNA）剂在对象中的效力。在某些实施方案中，确定对象中治疗效力
15 的手段包括：(i) 确定对象中 HBV 相关疾病或病症的一种或更多种生理特征以及 (ii) 将所确定的生理特征与 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征进行比较，其中所述比较指示向对象施用双链核糖核酸（dsRNA）剂的效力的存在、不存在和水平中的一种或更多种。在某些实施方案中，在对象中确定的生理特征是以下中的一种或更多种：对象中丙氨酸转氨酶
20 （ALT）的水平、对象中天冬氨酸转氨酶（AST）的水平；对象中的 HBV 病毒载量；对象中的 HBV 共价闭合环状 DNA（cccDNA）水平；对象中一种或更多种 HBV 抗原的水平；对象中 HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中一种或更多种的水平；对象中一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体的存在、不存在和/或水平。在某些实施方案中，生理特征是在从对象获得的生物样品
25 中确定的。在某些实施方案中，生物样品包含以下中的一种或更多种：血清样品、细胞样品、组织样品和肝样品。在某些实施方案中，与 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征或所述生理特征的对照水平相比，在对象中确定的生理特征是不同的。在某些实施方案中，与 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征相比，所述对象中以下一种或更多种的水
30 平被确定为在统计学上显著更低指示对象中 HBV 基因表达降低的状态：ALT；AST；HBV 病毒载量；HBV 共价闭合环状 DNA（cccDNA）；一种或更多种 HBV 抗原；HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中的一种或更多种。在某些实施方案中，与基线治疗前抗乙型肝炎病毒抗体或抗乙型肝炎病毒抗体的对照水平相比对象中抗乙型肝炎病毒抗体的提高指示对象中 HBV 基

因表达的降低。在一些实施方案中，HBV 相关疾病或病症是以下中的一种或更多种：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、急性乙型肝炎、肝细胞癌、终末期肝病、急性暴发性肝炎、肝炎症、肝损伤、肝硬化、肝纤维化和丁型肝炎病毒感染（ δ 肝炎或 HDV）。

5 根据本发明的另一个方面，提供了与对象中 HBV 蛋白的基线治疗前水平相比降低对象中 HBV 蛋白水平的方法，所述方法包括向对象施用有效量的本发明前述 dsRNA 剂方面的任何实施方案或者本发明前述组合物的任何实施方案的一种或更多种双链核糖核酸（dsRNA）剂，以降低 HBV 基因表达的水平。在某些实施方案中，将 dsRNA 剂皮下施用于对象或通过
10 通过 IV 施用而施用于对象。

根据本发明的另一个方面，提供了与对象中乙型肝炎病毒（HBV）相关疾病或病症的基线治疗前生理特征相比改变对象中乙型肝炎病毒（HBV）相关疾病或病症的生理特征的方法，所述方法包括向对象施用有效量的本发明前述 dsRNA 剂方面的任何实施方案或者本发明前述组合物的任何实施方案的一种或更多种双链核糖核酸（dsRNA）剂，以改变对象
15 中 HBV 相关疾病或病症的生理特征。在一些实施方案中，将一种或更多种 dsRNA 剂皮下施用于对象或通过 IV 施用而施用于对象。在某些实施方案中，生理特征是在对象中确定的生理特征中的一种或更多种，其是以下中的一种或更多种：对象中丙氨酸转氨酶（ALT）的水平、对象中天冬氨酸转氨酶（AST）的水平；对象中的 HBV 病毒载量；对象中的 HBV 共价
20 闭合环状 DNA（cccDNA）水平；对象中一种或更多种 HBV 抗原的水平；对象中 HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中一种或更多种的水平；对象中一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体的存在、不存在和/或水平。

根据本发明的另一个方面，提供了用于治疗与 HBV 基因表达相关的
25 疾病或病症的方法中的前述 dsRNA 剂。在一些实施方案中，所述疾病或病状是以下中的一种或更多种：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、丁型肝炎病毒感染（ δ 肝炎或 HDV）、肝损伤、肝硬化、急性乙型肝炎、急性暴发性肝炎以及肝纤维化、肝炎症和肝细胞癌。

在本发明任何前述方法的某些实施方案中，dsRNA 剂的有义链包含
30 以下之一：SEQ ID NO: 281、290、295、300、304、306、307、331、557、567、569、571、572、573、560、563、607、628 至 637 或 918 至 921。在本发明任何前述方法的一些实施方案中，dsRNA 剂的反义链包含以下之一：SEQ ID NO: 419、428、433、438、442、444、445、469、582、592、

594、596、597、598、585、588、642、663 至 672 或 922 至 925。在本发明任何前述方法的某些实施方案中，dsRNA 剂包含：SEQ ID NO: 281 和 SEQ ID NO: 419；SEQ ID NO: 290 和 SEQ ID NO: 428；SEQ ID NO: 295 和 SEQ ID NO: 433；SEQ ID NO: 300 和 SEQ ID NO: 438；SEQ ID NO: 304 和 SEQ ID NO: 442；SEQ ID NO: 306 和 SEQ ID NO: 444；SEQ ID NO: 307 和 SEQ ID NO: 445；SEQ ID NO: 331 和 SEQ ID NO: 469；SEQ ID NO: 557 和 SEQ ID NO: 582；SEQ ID NO: 567 和 SEQ ID NO: 592；SEQ ID NO: 569 和 SEQ ID NO: 594；SEQ ID NO: 571 和 SEQ ID NO: 596；SEQ ID NO: 572 和 SEQ ID NO: 597；SEQ ID NO: 573 和 SEQ ID NO: 598；SEQ ID NO: 560 和 SEQ ID NO: 585；SEQ ID NO: 563 和 SEQ ID NO: 588；SEQ ID NO: 607 和 SEQ ID NO: 642；SEQ ID NO: 628 和 SEQ ID NO: 663；SEQ ID NO: 629 和 SEQ ID NO: 664；SEQ ID NO: 630 和 SEQ ID NO: 665；SEQ ID NO: 631 和 SEQ ID NO: 666；SEQ ID NO: 632 和 SEQ ID NO: 667；SEQ ID NO: 633 和 SEQ ID NO: 668；SEQ ID NO: 634 和 SEQ ID NO: 669；SEQ ID NO: 635 和 SEQ ID NO: 670；SEQ ID NO: 636 和 SEQ ID NO: 671；SEQ ID NO: 637 和 SEQ ID NO: 672；SEQ ID NO: 918 和 SEQ ID NO: 922；SEQ ID NO: 919 和 SEQ ID NO: 923；SEQ ID NO: 920 和 SEQ ID NO: 924；或 SEQ ID NO: 921 和 SEQ ID NO: 925。在某些实施方案中，dsRNA 包含选自以下的双链体：AD00170、AD00378、AD00170-1、AD00263、AD00265、AD00267、AD00268、AD00269、AD00173、AD00383、AD00384、AD00378-1、AD00170-2、AD00268-2、AD00263-2 和 AD00176。

序列简述

SEQ ID NO: 1 至 138、674 至 734 在表 1 中示出并且是有义链序列。

SEQ ID NO: 139 至 276、735 至 795 在表 1 中示出并且是反义链序列。

SEQ ID NO: 277 至 414、796 至 856 是有义链序列且 SEQ ID NO: 415 至 552、857 至 917 是反义链序列并且在表 2 中示出，其中化学修饰由以下表示：大写字母：2'-氟；小写字母：2'-OMe；以及硫代磷酸酯：*。

SEQ ID NO: 553 至 577 是有义链序列且 SEQ ID NO: 578 至 602 是反义链序列并且在表 3 中示出。递送分子在每条有义链的 3' 末端表示为“GLO-0”。化学修饰表示为：大写字母：2'-氟；小写字母：2'-OMe；以及硫代磷酸酯：*。

SEQ ID NO: 603 至 637、918 至 921 是有义链序列且 638 至 672、922 至 925 是反义链序列并且在表 4 中示出。化学修饰表示为：大写字母：2'-氟；小写字母：2'-OMe；硫代磷酸酯：*；以及 Invab=反向无碱基。

5 SEQ ID NO: 673 是智人 (Homo sapiens) 乙型肝炎病毒 (HBV) mRNA 序列[NCBI 参考序列: AM282986]:

```
ttccactgccctccaccaagctctgcaggatcccaagtcagggtctgtatcttctgctggtggtccagttcaggaaacagtaaacctg  
ctccgaatattgccctctcacatctctcaatctccgcgagggaactggggaccctgtgacgaatatggagaacatcacatcaggattcctagg  
acccctgctcgtgttacaggcgggggtttctgttgacaagaatctcacataccgcagagctagactcgtggtggaacttctctcaattt
```

ctagggggatcacccgtggtgttggccaaaattcgcagtccecaacctccaatcactcaccaacctctgtctccaattgtcctggttat
 cgcctggatgtgtctgcggcgtttatcatactcttctcctctgctatgctcctcctctgttgggttctctggattatcaagggtatgtgcc
 cgttggctcttaattcagggaacaacaacacaggtacgggaccatgcaaaacctgcacgactctgctcaggcaactctatgtttccct
 catgttgcctgacaaaaccttcggatggaaattgcacctgtatcccatcccatcgtcttgggccttcgcaaaatacctatgggagtgggcct
 cagtcctgttctcttggctcagtttactagtgtccattgttcaagtggttcgtaggggcttccccactgttgggtttcagctatattggtatgtg
 gtaattggggccaagctgtacagcatcgtgagtcctcttataccgctgttaccaatttcttctctctgggtatataatcaaaccttaacaaa
 acaaaaagatggggttattccctaaactcatgggttacataattggaaattggggaacgttccacaggatcatattgtacaaaagatcaa
 acactgttttaaaaaacttcctgttaacaggccattgtattgaaagtatgtcaagaattgtgggtcttttgggcctttgtctccatttacaca
 atgtgatactcgtccttaagccttctgtatgcttctatacagctaaacaggcttctaccttctcgtccaacttacaaggccttcttaagtaaac
 agttacatgaacctttacccctgtctcggcaacggcctgtctgtgccaagtgttctgtacgcaacccccactggctggggttggccat
 aggccatcagcgcagtggtgaaccttctgtggtcctctgcccgaatcactgcggaaactcctagccctgtttgtctcgcagccgggtct
 ggggcaaaagctcaggaactgacaattctgtctctctcgggaatatacctgttccatggctgctaggtgtacgtccaactggat
 ccttcggggacgtcctttgtttacgtccctcggcgtgaatcccgcgacgacccctctcggggcgttgggactctctctcctcctt
 ctccgtctgcccgttcagccgaccacggggcgacctctctttacgctgtctccccgtctgtgcttctctctctgcccgtctcgtgtgactt
 cgttccaccctctgcacgttgcattggagaccaccgtgaacgcccatcagatcctgcccaaggctttacataaggaggacttggactccca
 gcaatgtcaacgaccgaccttgaggcctacttcaagactgtgttttaaggactgggagggagctgggggagagattagggttaagggt
 cttgtattaggaggctgttagggcataaattgtctcgcgacacagcaaccatgcaactttttacctctgccaatcatctctgtacatgtccac
 tgttcaagcctccaagctgtgcttgggtggttggggcatggacattgacctataaagaattggagctactgtggagttactctgttt
 ttgcttctgactttttcttccgtcagagatctcctagacacgctcagctctgtatcgggaagccttagagctctctgagcattgtctacc
 tcaccatactgcactcaggcaagcaattctctgctgggggaattgatgactctagctacctgggtgggtataaattgggaagatccagcat
 ccagggaictagtagtcaattatgttaatactaacatgggtttaaagatcaggcaactattgtgtttcatatcttgccttacttttggagag
 agactgtacttgaatattgtctcttccggaggtgtggttcgactcctccagcctatagaccaccaaatgcccttatcttataacacttcc
 ggaaactactgtttagacgacgggaccgaggcaggtccctagaagaagaactcctcgcctcgcagacgcagatctcaatcgcgcg
 cgtcgcagaagatctcaatctcgggaatcctaatgttagtttcttggactcataagggtgggaaacttactgggtttattctctacagta
 cctatcttataactgaatggcaactccttcttcttaagattcatttacaaggacatttataatagggttcacaattgttgggctctctc
 actgttaaatgaaaaagagaagattgaaattaattgctgtagattctatctcctaccacataaatttgccttagacaaaaggaaataaac
 ctattatccagatcaggtatgtaacttacttcaaacagacattattacatactcttggaaaggctgtattctatataaggaggaaacc
 acacgtagcgcacatatttgcgggtcaccatttcttgggaacagagctacagcatgggaggttgcacgaaacctcgaagggcat
 ggggacgaatcttctgttcccaacctctgggattcttccgacatcagttggacctgcattcggagccaactcaacaatccagattg
 ggacttcaaccccatcaaggaccaactggccagcagccaaccaggtaggaggtgggagcattcgggacagggttcaacctccacacgg
 cgggtgtttgggtggagccctcagggtcagggtcatattgaccacaggtgaacaattctctctctgctcaccaccaatcgcagtcagg
 aaggcagcctactcctctctcacccttaagagacagtcacctcaggccatgcagtgga

附图说明

5 图1是示出在单次皮下给药3 mg/kg siRNA化合物之后 AAV-HBV 小鼠血清中的 HBsAg 水平的图。

图 2 是示出在单次皮下给药 3 mg/kg siRNA 化合物之后 AAV-HBV 小鼠血清中的 HBV DNA 水平的图。

具体实施方式

5 本发明部分地包括 RNAi 剂，例如但不限于双链 (ds) RNAi 剂，其能够抑制乙型肝炎病毒 (HBV) 基因表达。本发明的抗 HBV dsRNA 剂可靶向所有五种 HBV 转录物，导致所有 HBV 病毒蛋白的抑制。本发明的化合物、组合物和方法为慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 和/或其他 HBV 相关疾病和病症提供了抗 HBV RNAi 治疗剂和治疗。使用本发明的方法递送至细胞的抗 HBV RNAi 剂和化合物能够抑制 HBV 基因表达，
10 从而降低该基因的 HBV 蛋白产物在细胞中的活性。可将本发明的抗 HBV dsRNAi 剂施用于对象来治疗对象的 HBV 相关疾病和/或病症。

在本发明的某些实施方案中，本发明的药剂、化合物、组合物和方法用于实现 HBV 相关疾病和/或病症的“功能性治愈”。HBV 感染和/或 HBV
15 相关疾病或病症的功能性治愈可通过乙型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) 的血清清除来表明。本文中使用的术语“血清清除”意指对象中可检测的血清 HBsAg 的对象水平降低和/或对象血清中可检测的 HBsAg 完全消除。应理解，血清清除可发生在具有或不具有血清转化 (seroconversion) 为乙型肝炎表面抗体 (抗 HBs) 的对象中。

20 本文中所述的 HBV RNAi 能够抑制 HBV 蛋白的表达。在本发明的一些实施方案中，降低细胞或对象中 HBV 表达分别在细胞或对象中治疗与 HBV 表达相关的疾病或病症。可通过降低 HBV 活性来治疗的疾病和病症的一些非限制性实例是：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、急性乙型肝炎、肝细胞癌、终末期肝病、肝炎症、肝纤维化、肝损伤、肝硬化、急性暴发性肝炎、
25 丁型肝炎病毒感染 (δ 肝炎或 HDV) 或降低 HBV 蛋白的水平和活性在医学上对对象有益的其他疾病。

本发明部分地包括包含抗 HBV RNAi 剂的组合物和使用这样的组合物的方法。本发明的一些方面包括药物组合物，其包含一种或更多种 HBV dsRNA 剂和可药用载体。在某些实施方案中，本发明的抗 HBV RNAi 剂
30 与能够将 RNAi 剂递送至细胞 (包括但不限于肝细胞) 的递送化合物连接。在一些实施方案中，递送化合物是包含 GalNAc 的递送化合物。本发明的某些药物组合物包含一种、两种、三种或更多种独立选择的抗 HBV dsRNA

剂，并且还可包含一种或更多种独立选择的递送化合物。在一些实施方案中，将能够分别靶向 HBV mRNA 的一个、两个、三个、四个或更多个不同位置/区域的两种、三种、四种或更多种抗 HBV dsRNA 施用于细胞和/或对象。

5 以下描述了制备和使用包含能够抑制 HBV 基因表达的抗 HBV dsRNA 剂（双链体）的组合物的方法，以及用于治疗由 HBV 基因表达引起和/或调节的疾病和病症的组合物的方法。本文中使用的由 HBV 基因表达的存在和/或水平引起或调节的疾病和/或病症被称为“HBV 相关疾病和/或病症”。

10 本文中使用的术语“RNAi”是指包含能够通过 RNA 诱导的沉默复合物（RNA-induced silencing complex, RISC）途径介导 RNA 转录物的靶向切割的 RNA 的药剂。术语“RNAi”和“RNAi 剂”可在本文中分别与以下互换使用：术语“抗 HBV RNAi”和“抗 HBV RNAi 剂”；“HBV RNAi”和“HBV RNAi 剂”；“dsRNA”和“dsRNA 剂”；“HBV dsRNA”和“HBV dsRNA 剂”；
15 以及“抗 HBV dsRNA”和“抗 HBV dsRNA 剂”。如本领域已知的，RNAi 靶区域是指在基因转录期间形成的 mRNA 分子的核苷酸序列的连续部分，包括作为初级转录产物的 RNA 加工产物的信使 RNA（messenger RNA, mRNA）。mRNA 分子的靶部分（在本文中也称为“靶序列”）将至少足够长以在该部分处或该部分附近用作 RNAi 定向切割的底物。靶序列可以是
20 8 至 30 个核苷酸长（包括端点）、10 至 30 个核苷酸长（包括端点）、12 至 25 个核苷酸长（包括端点）、15 至 23 个核苷酸长（包括端点）、16 至 23 个核苷酸长（包括端点），或 18 至 23 个核苷酸长（包括端点），包括每个规定范围内的所有较短长度。在某些实施方案中，靶序列为 9 至 26 个核苷酸长（包括端点），包括其之间的所有子范围和整数。例如，尽管
25 不旨在限制，在本发明的某些实施方案中，靶序列是 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核苷酸长，其中该序列与 HBV 基因的 RNA 转录物的至少一部分完全或至少基本上互补。

30 本文中使用的“dsRNA 剂”意指包含能够以序列特异性方式降解或抑制靶 mRNA 的信使 RNA（mRNA）转录物之翻译的 RNA 或 RNA 样（例如，经化学修饰的 RNA）寡核苷酸分子的组合物。虽然不希望受特定理论的限制，但本发明的 dsRNA 剂可通过 RNA 干扰机制[即，通过与哺乳动物细胞的 RNA 干扰途径机制（RNA 诱导的沉默复合物或 RISC）相互

作用来诱导 RNA 干扰], 或通过任何替代机制或途径发挥作用。用于使植物、无脊椎动物和脊椎动物细胞中基因沉默的方法是本领域公知的[参见, 例如, Sharp et al., Genes Dev. 2001, 15:485; Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363; Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309; 和 Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188], 其各自的公开内容通过引用整体并入本文]。本领域已知的基因沉默操作可与本文中提供的公开内容联合使用以抑制 HBV 的表达。

本文中公开的 dsRNA 剂包含有义链和反义链, 并且包括但不限于: 短干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA)、RNAi 剂、微 RNA (micro RNA, miRNA)、短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA), 及切丁酶(dicer)底物。本文中所述的 dsRNA 剂的反义链与被靶向的 mRNA 至少部分互补。本领域理解不同长度的 dsRNA 双链体结构可用于抑制靶基因表达。例如, 已知具有 19、20、21、22 和 23 个碱基对的双链体结构的 dsRNA 有效诱导 RNA 干扰 (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888) 并且本领域还已知更短或更长的 RNA 双链体结构也能够有效诱导 RNA 干扰。在本发明的某些实施方案中, HBV dsRNA 可包含长度为最小 21 nt 的至少一条链或者可具有更短的双链体。在某些实施方案中, 本发明的 dsRNA 剂是表 1 至表 4 任一个中公开的双链体。在一些实施方案中, 本发明的 dsRNA 剂是表 1 至表 4 中公开的双链体, 但在该双链体的一端或两端减去 1、2、3 或 4 个核苷酸, 并且还能够降低 HBV 表达。在本发明的一些实施方案中, HBV dsRNA 剂可具有来自表 1 至表 4 中一个或多个序列的至少 15、16、17、18、19、20 或更多个连续核苷酸的部分序列, 并且它们抑制 HBV 基因表达的能力与包含完整序列的 dsRNA 产生的抑制水平相差不超过 5%、10%、15%、20%、25%或 30%。表 1 至表 4 中公开的有义序列、反义序列和双链体在本文中可称为“亲本”序列, 意指表 1 至表 4 中公开的序列可如本文中所述被修饰、缩短、延长、包括替换等, 其中所得序列保留其亲本序列在本发明的方法和组合物中的全部或至少部分效力。本发明的 dsRNA 中包含的有义链和反义链是独立选择的。本文中使用的术语“独立选择的”意指两个或多个类似要素各自可独立于其他要素的选择来选择。例如, 虽然不旨在限制, 但在制备本发明的 dsRNA 时, 可选择两条链的“要素”以包括在双链体中。一个选择的要素, 有义序列, 可以是 SEQ ID NO: 553 (在表 3 中示出) 并且另一个选择的要素, 反义序列, 可以是 SEQ ID NO: 578 或者可以是与其亲本序列 SEQ ID NO: 578 相比被修饰、缩短、延长和/或包含 1、2 或 3 个替换的 SEQ ID NO: 578。应理解, 本发明的双链体不需要包含在表 1 至表 4 中示出为双链体配对的有义和反义序

列二者。

表 1 至表 4 示出了某些 HBV dsRNA 剂反义链和有义链核心延伸碱基序列。本文中使用术语“碱基序列”以提及没有化学修饰或递送化合物的多核苷酸序列。例如，表 1 中示出的有义链 `acuucucucaauuuuucuagga` (SEQ ID NO: 2) 是表 2 中 SEQ ID NO: 278 的碱基序列，其中 SEQ ID NO: 278 与其化学修饰一起示出。本文中公开的序列可被分配标识符。例如，单链有义序列可用“有义链 SS#”来标识；单链反义序列可用“反义链 AS#”来标识，并且包含有义链和反义链的双链体可用“双链体 AV#”或“双链体 AD#”来标识。

表 1 公开了有义链和反义链序列并且提供了由表 1 中同一行上的有义链和反义链形成的双链体的标识号。本文使用的术语有义链和反义链中的“匹配位置”是当两条链是双链体化链时每条链中“配对”的位置。例如，在 21-核碱基有义链和 21-核碱基反义链中，该有义链第 1 位的核碱基和该反义链中第 21 位的核碱基处于“匹配位置”。在另一个非限制性实例中，在 23-核碱基有义链和 23-核碱基反义链中，该有义链的核碱基 2 和该反义链第 22 位的核碱基处于匹配位置。在另一个非限制性实例中，在 18-核碱基有义链和 18-核碱基反义链中，该有义链第 1 位的核碱基和反义链中第 18 位的核碱基处于匹配位置，并且该有义链中第 4 位的核碱基和该反义链中第 15 位的核碱基处于匹配位置。本领域技术人员将理解如何识别是或将是双链体化链和配对链的有义链和反义链中的匹配位置。

表 1 中的第一列表示包含同一表行中有义序列和反义序列的双链体的双链体 AV#。例如，表 1 公开了被分配双链体 AV#AV00053 的双链体，其包含有义链 SEQ ID NO: 1 和反义链 SEQ ID NO: 139。因此，表 1 中的每一行公开了本发明的双链体，其各自包含同一行中示出的有义序列和反义序列。

在本发明的方法的一些实施方案中，将包含表 1 中公开的双链序列的 RNAi 剂施用于对象。在本发明的一些实施方案中，施用于对象的 RNAi 剂包含含有表 1 中所示的链序列中的至少一个的双链体，其包含 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 个序列修饰。在本发明的方法的一些实施方案中，将包含表 1 中示出的 dsRNA 多核苷酸序列的 RNAi 剂与递送分子（在本文也称为递送化合物）连接。递送化合物的一个非限制性实例是包含 GalNAc 化合物的递送化合物。

表 1: 未经修饰的 HBV RNAi 剂有义链和反义链序列。所有序列均以 5' 至 3' 方向显示。双链体 AV# 是分配至表中同一行中两条链的双链体的编号。

双链体 ID	有义链	SEQ ID NO	无义链	SEQ ID NO
AV00053	ugguggacuucucucaauua	1	uaaaUgagagaaguccacca	139
AV00054	acuuucucucaauuuuagga	2	uccuagaaaauUgagagaagu	140
AV00055	guuaccaauuuuuuuuguca	3	UgacaaaagaaaUgguaac	141
AV00056	cauaagaggacucUggacua	4	uaguccaagaguccucuaug	142
AV00057	gggguuuuuuuuugacaaa	5	uuugucaacaagaaaaacccc	143
AV00058	Uggacuucucucaauuuucua	6	UagaaaaUgagagaagucca	144
AV00059	cugcuagccucaucucua	7	uaagaaGauGaggcauagcag	145
AV00060	cauuuguuacagugguuuguaa	8	uuacgaaccacugaaacaaug	146
AV00061	ggggcgaccucucuuuacgca	9	UgcguaaaGagagguGcgccc	147
AV00062	UagacucgUggUggacuucua	10	UagaaGuccaccagagucua	148
AV00063	ggacuucucucaauuuucuaa	11	uuagaaaaUgagagaagucc	149
AV00064	uuGgcucaguuuacuaugca	12	UgcacuaGuaaacugagccaa	150
AV00065	cuagugccauuuuguucaguga	13	ucacugaacaaaUggcacuag	151

AV00066	uuuguuaccaaauuuuuuuuuuuua	14	uacaaaagaauuuugguuaca	152
AV00067	uuucgucuaccuccugcacguu	15	uacgugcagaggugaaagcgaa	153
AV00068	uaggagggcuugaggaauaaaa	16	uuuuuugccuacacagccuccua	154
AV00069	aaggcuugaggcauaaaauugga	17	uccaaauuuuauugccuacagccu	155
AV00070	cuuucucucaaauuuuuuagggga	18	ucccuagaaauuuugagagaaag	156
AV00071	cuguuaccaaauuuuuuuuuga	19	ucaaaagaaauuuuugguuacag	157
AV00072	ccgucugugccuucucacucua	20	uagauagagaaggcacagacgg	158
AV00073	uacauaaggaggacucuuuggaa	21	uuccaagaguguccucuuauugua	159
AV00074	uacagggcggggguuuuuuuuuga	22	ucaagaaaaaaccccgccugua	160
AV00075	caggcggggguuuuuuuuuguuu	23	uaacaagaaaaaaccccgccug	161
AV00076	cggggguuuuuuuuuguuugacaa	24	uuugucaacaagaaaaaaccccg	162
AV00077	cucgugggugggacuucucucua	25	uugagagaaaguuccaccacgag	163
AV00078	cguugguugggacuucucucuaa	26	uaauugagagaaaguuccaccacg	164
AV00079	guugguugggacuucucucuaaua	27	uaauuugagagaaaguuccaccac	165
AV00080	uuuacuuagguccaauuuuguuca	28	uugaacaaaauuggcacuauguaa	166
AV00081	agguccauuuugguucagugggua	29	uaccacuugaacaaaauuggcacu	167
AV00082	uuaccaauuuuuuuuuuuugucu	30	uagacaaaagaaaaauuugguaaa	168
AV00083	aggccuauuuugauuuuggaagua	31	uacuuuuccauuacaaauaggccu	169
AV00084	ccgauuccauuacugcgggaacua	32	uaguuccgcauuauuggaucgg	170
AV00085	gugugcacuucgcucucacucua	33	uaggugaaagcgaagugcacac	171
AV00086	uuacauaagaggacucuuuggga	34	uccaagaguccucuuauuguaa	172
AV00087	uucugcugcuauugccucuauc	35	uugaugaggcauagcagcaggga	173
AV00088	cugugccaaguguuuugcugaa	36	uucagcaaacacuuuggcacag	174
AV00089	uuguccaaguguuuugcugaca	37	uugcagcaaacacuuuggcaca	175
AV00090	cuguggcacuucgcucucacca	38	uuggugaaagcgaagugcacacg	176
AV00091	guauaagaggacucuuuggaca	39	uuguccaagaguccucuuauuac	177
AV00092	gucuaagacucuguggggacua	40	uaguccaccacgagucuaagac	178
AV00093	ucuaagacucuguggggacuuu	41	uaaguccaccacgagucuaaga	179
AV00094	auccugcugcuauugccucua	42	uaugaggcuaugcagcaggau	180
AV00095	aagguauguuugccgguuuugua	43	uacaaaacgggcaacauaccuu	181
AV00096	aguuuacuaagugccauuuugua	44	uacaaaugggcacuaaguaaau	182
AV00097	ccauuuuguuucaguggguuugua	45	uacgaaccacugaaacaaauug	183
AV00098	cagcgcuaugcguuggaaccuuu	46	uaagguuuccacgcuaugcgcug	184
AV00099	augucaacgcagccgaacuuuga	47	uucaaggugcgguucguuagcau	185
AV00100	guuacagggcggggguuuuuuua	48	uagaaaaaaccccgccuguuac	186
AV00101	gcagagucuaagacucugggua	49	uaccacgagucuaagacucugc	187
AV00102	gagucuaagacucuggguggaa	50	uuaccacacgagucuaagacuc	188
AV00103	cucuauccugcugcuauugcca	51	uggcauagcagcaggaugaaag	189
AV00104	ccugcugcuauugccucaucua	52	uagaugaggcuaugcagcagg	190
AV00105	agguauguuugccccguuuugua	53	uagcaaaagcgggcaacauaccu	191
AV00106	guugcauuuuguuucaguguuu	54	uaaccacugaaacaaauuggcac	192
AV00107	cgggggcgcacucucuuuua	55	uguuaaagagaggugcgccccg	193
AV00108	uuacaggcggggguuuuuuua	56	uagaaaaaaccccgccuguua	194

34

AV00071-1	guuaccaaauuuuuuuuga	88	uccaaaagaaaauugguaac	226
AV00072-1	gucugugccuucucucua	89	uagauagagaaggcacagac	227
AV00073-1	cauaagaggacucuuaggaa	90	uuccaagaguccucuuauug	228
AV00074-1	caggcgggguuuuuuuuga	91	ucaagaaaaaccccgccug	229
AV00075-1	ggcgggguuuuuuuugua	92	uaacaagaaaaacccgcc	230
AV00076-1	ggguuuuuuuuugugacaa	93	uugucaacaagaaaaaccc	231
AV00077-1	cguggguggacuuucucua	94	uugagagaaguccaccacg	232
AV00078-1	ugguaggacuuucucuaa	95	uaauagagagaaguccacca	233
AV00079-1	ggugggacuuucucuaaua	96	uaauugagagaaguccacc	234
AV00080-1	uacuaugugccauuuuguca	97	ugaacaaauggcacuaagua	235
AV00081-1	ugccauuuuguuacagugua	98	uaccacugaacaaauggca	236
AV00082-1	accaauuuuuuuuugucua	99	uagacaaaaagaaaauuggu	237
AV00083-1	gccuauugauuaggaaagua	100	uacuuuccaaucaauaggc	238
AV00084-1	gauccauacugcggaaacua	101	uaguuuccgagauaggauu	239
AV00085-1	gugcacuucgcuuaccua	102	uaggugaaggcgaagugcac	240
AV00086-1	acauaaggaggacuuugga	103	uccaagaguccucuuauugu	241
AV00087-1	cugcugcuaugccucauca	104	ugaugaggcauagcagcag	242
AV00088-1	gugccaagguuuugcugaa	105	uucagcaaacacuuaggcac	243
AV00089-1	ugccaagguuuugcugaca	106	ugucagcaaacacuuaggca	244
AV00090-1	ugugcacuucgcuuaccca	107	uggugaaggcgaagugcaca	245
AV00091-1	auaaggaggacuuuggaca	108	uguccaagaguccucuuau	246
AV00092-1	cuagacucgugggugacua	109	uaguccaccacgagucuaag	247
AV00093-1	uagacucgugggugacua	110	uaaguccaccacgagucua	248
AV00094-1	ccugcugcuaugccucaua	111	uauagggaauagcagcagg	249
AV00095-1	gguauguuugccguuuugua	112	uacaaaagggaacauuacc	250
AV00096-1	uuuacuagugccauuuugua	113	uacaaaugggcacuaaguaa	251

36

AV01258	cgggguuuuuucugugacaaa	674	uuugucaacaagaaaaacccg	735
AV01259	cgggguuuuuucugugacaaau	675	auugucaacaagaaaaacccg	736
AV01260	cgggguuuuuucugugacaaac	676	guugucaacaagaaaaacccg	737
AV01261	cgggguuuuuucugugacaaag	677	cuugucaacaagaaaaacccg	738
AV01262	uuuuuuucugugacaaa	678	uuugucaacaagaaaaa	739
AV01263	guuuuuucugugacaaa	679	uuugucaacaagaaaaaac	740
AV01264	aguuuuuucugugacaaa	680	uuugucaacaagaaaaacu	741
AV01265	uguuuuuucugugacaaa	681	uuugucaacaagaaaaaca	742
AV01266	ggguuuuuucugugacaaa	682	uuugucaacaagaaaaacc	743
AV01267	cguuuuuucugugacaaa	683	uuugucaacaagaaaaacg	744
AV01268	aggguuuuuucugugacaaa	684	uuugucaacaagaaaaaccu	745
AV01269	uggguuuuuucugugacaaa	685	uuugucaacaagaaaaacca	746
AV01270	gggguuuuuucugugacaaa	686	uuugucaacaagaaaaacc	747
AV01271	cggguuuuuucugugacaaa	687	uuugucaacaagaaaaaccg	748
AV01273	aggguuuuuucugugacaaa	688	uuugucaacaagaaaaaccu	749
AV01274	uggguuuuuucugugacaaa	689	uuugucaacaagaaaaacc	750
AV01275	cggggguuuuuucugugacaaa	690	uuugucaacaagaaaaacc	751
AV01276	gcggggguuuuuucugugacaaa	691	uuugucaacaagaaaaacc	752
AV01277	ggcggggguuuuuucugugacaaa	692	uuugucaacaagaaaaacc	753
AV01278	aggcggggguuuuuucugugacaaa	693	uuugucaacaagaaaaacc	754
AV01279	caggcggggguuuuuucugugacaaa	694	uuugucaacaagaaaaacc	755
AV01280	guuguuacaggcggggguuuuuucugugacaaa	695	uuugucaacaagaaaaacc	756
AV01281	cgggguuuuuucugugacaaa	696	uuugucaacaagaaaaacc	757
AV01282	cgggguuuuuucugugacaaa	697	uuugucaacaagaaaaacc	758
AV01283	cgggguuuuuucugugacaaa	698	uuugucaacaagaaaaacc	759
AV01284	cgggguuuuuucugugacaaa	699	uuugucaacaagaaaaacc	760
AV01285	cgggguuuuuucugugacaaa	700	uuugucaacaagaaaaacc	761
AV01286	cgggguuuuuucuguucaaaa	701	uuugucaacaagaaaaacc	762
AV01287	cgggguuuuuucugugacaga	702	ucugucaacaagaaaaacc	763
AV01288	cgggguuuuuucugugacaaa	703	uuugucaacaagaaaaacc	764
AV01289	caggguuuuuucugugacau	704	augucaacaagaaaaacc	765
AV01290	caggguuuuuucugugacaa	705	uugucaacaagaaaaacc	766
AV01291	caggguuuuuucugugacac	706	guucaacaagaaaaacc	767
AV01292	caggguuuuuucugugacag	707	cugucaacaagaaaaacc	768
AV01293	guuuuuucugugacau	708	augucaacaagaaaaac	769
AV01294	ggguuuuuucugugacau	709	augucaacaagaaaaac	770
AV01295	aggguuuuuucugugacau	710	augucaacaagaaaaacc	771
AV01296	uggguuuuuucugugacau	711	augucaacaagaaaaacc	772
AV01297	gggguuuuuucugugacau	712	augucaacaagaaaaacc	773
AV01298	cggguuuuuucugugacau	713	augucaacaagaaaaacc	774
AV01299	aggguuuuuucugugacau	714	augucaacaagaaaaacc	775
AV01300	uggguuuuuucugugacau	715	augucaacaagaaaaacc	776
AV01301	gggguuuuuucugugacau	716	augucaacaagaaaaacc	777

[illegible]

表 2 示出了本发明的某些经化学修饰的 HBV RNAi 剂有义链和反义链序列。在本发明的方法的一些实施方案中，将具有表 2 中示出的多核苷酸序列的 RNAi 剂施用于细胞和/或对象。在本发明的一些实施方案中，施用于对象的 RNAi 剂包含是在表 2 的一行中第一列标识的双链体，并且包含分别在表 2 的同一行中第四列和第七列中的有义链序列和反义链序列中示出的序列修饰。在本发明的方法的一些实施方案中，表 2 中示出的序列可与能够将 RNAi 剂递送至对象中的细胞和/或组织的化合物连接（在本文中也称为“缀合”）。可用于本发明的某些实施方案中的递送化合物的一个非限制性实例是包含 GalNAc 的化合物。在表 2 中，第一列表示如表 1 中示出的碱基序列的双链体 AV#。表 2 公开了双链体 AV#并且还示出了包含在该双链体的有义序列和反义序列中的化学修饰。例如，表 1 示出了碱基单链序列 SEQ ID NO: 1（有义）和 SEQ ID NO: 139（反义），其一起是标识为双链体 AV# AV00053 的双链双链体。表 2 列出了双链体 AV# AV00053，并示出了 SEQ ID NO: 277 和 SEQ ID NO: 415 的双链体，其分别包含碱基序列 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 139，但具有分别在第四列和第七列中所示的有义链序列和反义链序列中示出的化学修饰。表 2 第二列中的“有义链 SS#”是针对同一行中第四列示出的有义序列（包含修饰）分配的标识符。表 2 第五列中的“反义链 AS#”是针对第七列中示出的反义序列（包含修饰）分配的标识符。

表 2: 提供了经化学修饰的 HBV RNAi 剂有义链和反义链序列。所有序列均以 5' 至 3' 显示。这些序列用于本文中所述的某些体外测试研究。化学修饰表示为: 大写字母: 2'-氟; 小写字母: 2'-OMe; 硫代磷酸酯: *

双链体 ID	有义链 SS#	SEQ ID NO	有义链	反义链 AS#	SEQ ID NO	反义链
AV00053	AV00053-SS	277	u ^g g ^g gaggaUuCuCuaauuu ^a	AV00053-AS	415	u ^a A ^a auuGagagAaGuCcac ^c *a
AV00054	AV00054-SS	278	a ^c c ^u uuuuCaAuUuuuag ^g *a	AV00054-AS	416	u ^c C ^u agAaaauUgAgAga ^a *g ^u
AV00055	AV00055-SS	279	g ^u u ^u uaccaaUuUuCuuuuug ^c *a	AV00055-AS	417	u ^a G ^a acaAaagaaAaUuGgua ^a *c
AV00056	AV00056-SS	280	c ^a a ^a uaagagGaCuCuugga ^u *a	AV00056-AS	418	u ^a A ^g uagAagagUcCuCuua ^a *u ^g
AV00057	AV00057-SS	281	g ^g g ^g gguuuUuUuGuugca ^a *a	AV00057-AS	419	u ^u U ^u ugucAacaaGaAaAacc ^c *c
AV00058	AV00058-SS	282	u ^g g ^g gacuuUcUcAauuuuu ^u *a	AV00058-AS	420	u ^a A ^g aaaAuugaGaGaAguc ^c *a
AV00059	AV00059-SS	283	c ^u u ^u gcuauGcUcAuuuuuu ^a	AV00059-AS	421	u ^a A ^g aaGuccacCaGAguc ^a *g
AV00060	AV00060-SS	284	c ^a a ^a uuuuuuCaGuGguuuu ^a *a	AV00060-AS	422	u ^u U ^a agaaAccacUgAaCaau ^a *u ^g
AV00061	AV00061-SS	285	g ^g g ^g gagcaCcuCuuuuag ^c *a	AV00061-AS	423	u ^a G ^c guuAaagagCaGuGegc ^c *c
AV00062	AV00062-SS	286	u ^a a ^a gacucUgGuGgaauu ^c *a	AV00062-AS	424	u ^a A ^g agagUccacCaGAguc ^a *u ^a
AV00063	AV00063-SS	287	g ^g g ^g acuuuCuCaAuuuuu ^a *a	AV00063-AS	425	u ^u U ^a agaaAauuAgAgAgu ^c *c
AV00064	AV00064-SS	288	u ^u u ^u gucuaGuUuAuuuuu ^g *a	AV00064-AS	426	u ^a G ^c acuaAguuaCaGgGcc ^c *a
AV00065	AV00065-SS	289	c ^u u ^u agugccAuUuGuuag ^u *a	AV00065-AS	427	u ^c C ^a acugAcaaaAuGgCacu ^a *g
AV00066	AV00066-SS	290	u ^g u ^u uacaaAuUuUuuuuu ^u *a	AV00066-AS	428	u ^a A ^c aaaAgaaaAuUgGuaa ^a *c
AV00067	AV00067-SS	291	u ^u u ^u cgucuuAcCuGgacg ^u *a	AV00067-AS	429	u ^a A ^c gugCagagGuGaAggc ^c *a
AV00068	AV00068-SS	292	u ^a a ^a ggagggUgUaGcauaaa ^a	AV00068-AS	430	u ^u U ^u uuuuGccuaCaGcCucc ^c *u ^a
AV00069	AV00069-SS	293	a ^g g ^g gcuuaGcCaUaaauug ^g *a	AV00069-AS	431	u ^c C ^a aaUuuuagCcUaCegc ^c *c
AV00070	AV00070-SS	294	c ^u u ^u ucucuaAuUuUuuuuu ^g *a	AV00070-AS	432	u ^c C ^c cuuAaaaauUuGaGaga ^a *g
AV00071	AV00071-SS	295	c ^u u ^u guuacCaUuUuuuuu ^u *a	AV00071-AS	433	u ^c C ^a aaaGaaaUuGgUaac ^a *g
AV00072	AV00072-SS	296	c ^c c ^g uucugCuCuUcuuau ^c *a	AV00072-AS	434	u ^a A ^g augAgaagGcAcAgac ^c *g
AV00073	AV00073-SS	297	u ^a a ^a cauaagAaGcCuuuug ^g *a	AV00073-AS	435	u ^u U ^a ccaaGagucCuCuUauu ^u *a
AV00074	AV00074-SS	298	u ^a a ^a caaggGgGuUuuuuu ^u *a	AV00074-AS	436	u ^c C ^a agaaAaaaCcCgCguc ^g *u ^a
AV00075	AV00075-SS	299	c ^a a ^a ggcggGGuUuUuuuuu ^u *a	AV00075-AS	437	u ^a A ^a caaGaaaAcCcGgcc ^c *u ^g
AV00076	AV00076-SS	300	c ^g g ^g gguuuUuCuUgguagaca ^a	AV00076-AS	438	u ^u U ^g ucaAcaagAaAaAacc ^c *g

AV00077	AV00077-SS	301	c ^u u ^u cgugguGgAcUuuuua ^a	AV00077-AS	439	u ^u U ^g agaGaugUcCacCagc ^a *g
AV00078	AV00078-SS	302	c ^g g ^g ugguuGgAcUuUuuuua ^a	AV00078-AS	440	u ^a A ^u ugaGgaaGuUcAcac ^c *c
AV00079	AV00079-SS	303	g ^u u ^u guggaCuUcUcuuau ^u *a	AV00079-AS	441	u ^a A ^u uuuAgaggaAgUcCacc ^c *a
AV00080	AV00080-SS	304	u ^u u ^u uacuaUgGcAuuuuuu ^c *a	AV00080-AS	442	u ^a G ^a acaaAuugGcCuAguu ^a *a
AV00081	AV00081-SS	305	a ^g g ^g ugccauUuGgUuGgug ^u *a	AV00081-AS	443	u ^a A ^c caUggaacAaAuGga ^c *u
AV00082	AV00082-SS	306	u ^u u ^u accaaUuUcUuuuuu ^u *a	AV00082-AS	444	u ^a A ^g acaaAaagaaAaUuGguu ^a *a
AV00083	AV00083-SS	307	a ^g g ^g uccauUgAuUggaag ^u *a	AV00083-AS	445	u ^a A ^c cuuUcCaauCaAuAggc ^c *u
AV00084	AV00084-SS	308	c ^c c ^g uaccaaUaCuGcggaac ^u *a	AV00084-AS	446	u ^a A ^g uuuUcGagGgUaUgGauc ^c *g
AV00085	AV00085-SS	309	g ^u u ^u gugcacUuGgUuuuac ^u *a	AV00085-AS	447	u ^a A ^g gugAgagcAaGuGcac ^a *c
AV00086	AV00086-SS	310	u ^u u ^u acuaaaGgGAcuuuug ^g *a	AV00086-AS	448	u ^c C ^a agAguccUcUuUauu ^a *a
AV00087	AV00087-SS	311	u ^c c ^g ugugCuAuGccuau ^c *a	AV00087-AS	449	u ^a G ^a ugaGgcauAgCaGag ^g *a
AV00088	AV00088-SS	312	c ^u u ^u guccaAgUgUuuugga ^a	AV00088-AS	450	u ^u U ^a cagCaacaCuUgGcac ^a *g
AV00089	AV00089-SS	313	u ^g g ^g ugcacaGgUuGgugac ^a	AV00089-AS	451	u ^a G ^u uagCaacAcUuGgca ^a *c
AV00090	AV00090-SS	314	c ^g g ^g ugugcaCuUcGcuuac ^c *a	AV00090-AS	452	u ^a G ^u ugaAgcgaAgUgCaca ^a *g
AV00091	AV00091-SS	315	g ^u u ^u auaagaGgAcUuuugga ^a	AV00091-AS	453	u ^a G ^u ucaAagagUcUuUau ^a *c
AV00092	AV00092-SS	316	g ^u u ^u cuagaGcUuGgugga ^u *a	AV00092-AS	454	u ^a A ^g guccAccacGaGuCuag ^a *c
AV00093	AV00093-SS	317	u ^c c ^u uagacuUgUgGugga ^u *a	AV00093-AS	455	u ^a A ^g guccCaccaGgUcuu ^a *g
AV00094	AV00094-SS	318	a ^u u ^u cugcuGcUaUgccuau ^a	AV00094-AS	456	u ^a A ^u agagGcauaGcAgCagg ^a *u
AV00095	AV00095-SS	319	a ^g a ^a gguaugUuGcCgguuug ^u *a	AV00095-AS	457	u ^a A ^c aaaGggcCaCaUacc ^c *u
AV00096	AV00096-SS	320	a ^g g ^g uuuacuaAgUgCcauuu ^u *a	AV00096-AS	458	u ^a A ^c aaaUggaCaCuUgaa ^a *c
AV00097	AV00097-SS	321	c ^c c ^u uuuuUcAagUggguu ^u *a	AV00097-AS	459	u ^a A ^c gaacCacuGaAcAaa ^u *g
AV00098	AV00098-SS	322	c ^a a ^a gccaauGcGuGgaac ^u *a	AV00098-AS	460	u ^a A ^g ggUuUcCaGcGuUgGgc ^c *u
AV00099	AV00099-SS	323	a ^u u ^u gucacGcCcGaccuag ^a *a	AV00099-AS	461	u ^u U ^a caagGuuggUcGuUgac ^a *u
AV00100	AV00100-SS	324	g ^u u ^u uacggGgGGuuuuu ^u *a	AV00100-AS	462	u ^a A ^g aaaAacccGcUgua ^a *c
AV00101	AV00101-SS	325	g ^u c ^u agagucUaGcCucggu ^a	AV00101-AS	463	u ^a A ^c caGagucUaGcCucu ^u *g
AV00102	AV00102-SS	326	g ^u a ^a guuagAcUcGugugga ^a	AV00102-AS	464	u ^u U ^a ccacCacgaGuCuAgac ^a *c
AV00103	AV00103-SS	327	c ^u u ^u ucauUcUgCuGuaug ^c *a	AV00103-AS	465	u ^a G ^u cauAgagCaGgAuuga ^a *g
AV00104	AV00104-SS	328	c ^c c ^u ugugcUaUgCcuuau ^c *a	AV00104-AS	466	u ^a A ^g augAggcaUaGcAgca ^a *g
AV00105	AV00105-SS	329	a ^g g ^g guuugUgCcCgguuug ^u *a	AV00105-AS	467	u ^a G ^a caacAcgggCaCaUaac ^c *u
AV00106	AV00106-SS	330	g ^u u ^u gccauUgUuCaguggu ^u *a	AV00106-AS	468	u ^a A ^c ccacUgaacCaAaUggc ^a *c
AV00107	AV00107-SS	331	c ^g g ^g gggacAcCuCuuuuu ^a	AV00107-AS	469	u ^a G ^u uaaaGgggGuGcGccc ^c *g

AV00108	AV00108-SS	332	u* ^u *acagcGgGgUuuuuuuu*a	AV00108-AS	470	u*A*agaaAaaccCcGcCuguu*a*a
AV00109	AV00109-SS	333	a*c* ^u agggGgGgUuuuuuuu*a	AV00109-AS	471	u*A*caagAaaaaCcCcGccu*u
AV00110	AV00110-SS	334	u*c* ^u agguuUgUuGccguuuu*a	AV00110-AS	472	u*A* ^u acgGgcaCaUaCcuu*g*a
AV00111	AV00111-SS	335	c*a* ^u uacugGgAaCuccuagc*a	AV00111-AS	473	u*A*cuagGaguuCcGcAgua*u*g
AV00112	AV00112-SS	336	g*a* ^u ccacGgGgCcGccucuc*a	AV00112-AS	474	u*A* ^u agGgGgGgCcCcGugg*u*c
AV00113	AV00113-SS	337	u* ^u g*uccaGcAcCgAccuugag*a	AV00113-AS	475	u*A*uccaGgucGgUgUga*c*a
AV00114	AV00114-SS	338	u* ^u *cauuccGcUgCuugccu*a	AV00114-AS	476	u*A* ^u ggcaUggcaGcAgGaug*a*a
AV00115	AV00115-SS	339	g*c* ^u uccucGcCgAuccuac*a	AV00115-AS	477	u*A* ^u uugGaucGcAgAgga*g*c
AV00116	AV00116-SS	340	c* ^u *ccucGcGcUccauac*a	AV00116-AS	478	u*A* ^u guuGgucGcCaGagg*a*g
AV00117	AV00117-SS	341	c*c* ^u ucugccGcUcCauacugc*a	AV00117-AS	479	u*A* ^u gagUaggUcGcGagag*g*g
AV00118	AV00118-SS	342	c*g* ^u auccauAcUcGggacuc*a	AV00118-AS	480	u*A* ^u gguUcgcGauAuGguu*c*g
AV00119	AV00119-SS	343	g* ^u *cgcGcUcUcUuuacgcg*a	AV00119-AS	481	u*A* ^u gcuAaaggGgGgUgcg*c*c
AV00120	AV00120-SS	344	c*c* ^u cgucugUgCcUuccuac*a	AV00120-AS	482	u*A* ^u aggaGaggGcCaGagc*g*g
AV00121	AV00121-SS	345	u*c* ^u acagcGcAcCugagggc*a	AV00121-AS	483	u*A* ^u ccuAaggGcGgUcguu*g*a
AV00053-1	AV00053-1-SS	346	g* ^u *ggagUcUcCuccuuu*a	AV00053-1-AS	484	u*A* ^u aaauGggGgGgGcCa*c
AV00054-1	AV00054-1-SS	347	u* ^u *uccuCaAuUuccuagg*a	AV00054-1-AS	485	u*A* ^u cuagAaaauUgAgAgga*a
AV00055-1	AV00055-1-SS	348	u*a* ^u ccaaUuUuCuuuuguc*a	AV00055-1-AS	486	u*A* ^u acaaAagaaAaUuGguu*a
AV00056-1	AV00056-1-SS	349	u*a* ^u aggGgGcUcCuccuac*a	AV00056-1-AS	487	u*A* ^u gucAagagUcCcuu*a
AV00057-1	AV00057-1-SS	350	g* ^u *uuuuUcUuGguagaa*a	AV00057-1-AS	488	u* ^u *UugucAcaaaGaaAac*c
AV00058-1	AV00058-1-SS	351	g*a* ^u cuuUcUcAauuuuuc*a	AV00058-1-AS	489	u*A* ^u gaaAuuagGgGgAggu*c
AV00059-1	AV00059-1-SS	352	g*c* ^u uagGcUcAuccuuu*a	AV00059-1-AS	490	u*A* ^u agaaGaugGgCaUag*c
AV00060-1	AV00060-1-SS	353	u* ^u *uguuCaGgGguugua*a	AV00060-1-AS	491	u* ^u *UcgaAccacUgAaCaac*a
AV00061-1	AV00061-1-SS	354	g*c* ^u gcacCuCuCuuuacgc*a	AV00061-1-AS	492	u*A* ^u cguaAagagAgGgUgc*c
AV00062-1	AV00062-1-SS	355	g*a* ^u cucGgGgGgGgcuu*a	AV00062-1-AS	493	u*A* ^u gaaUccacCaGAggu*c
AV00063-1	AV00063-1-SS	356	a*c* ^u uccuCuCaAuuuuuc*a	AV00063-1-AS	494	u* ^u *UagaaAauuUgGua*a
AV00064-1	AV00064-1-SS	357	g* ^u *cucaGgUuUcAucugc*a	AV00064-1-AS	495	u*A* ^u cacUguaaaUgAgc*c
AV00065-1	AV00065-1-SS	358	a* ^u *ugccAuUuGguuaggu*a	AV00065-1-AS	496	u*A* ^u ccuGAcCaAuGgCac*u
AV00066-1	AV00066-1-SS	359	u* ^u *accaAuUuUcuuuugua*a	AV00066-1-AS	497	u*A* ^u caaaAgaauAuUgGua*a
AV00067-1	AV00067-1-SS	360	c* ^u *cuuacCuCugcagcu*a	AV00067-1-AS	498	u*A* ^u cgugCagagGuGaaGc*c
AV00068-1	AV00068-1-SS	361	g* ^u *aggGgUgUgGgcaaaa*a	AV00068-1-AS	499	u* ^u *UuuuGccuacCaGcCuc*c
AV00069-1	AV00069-1-SS	362	g*c* ^u uguaGgCaUaaauugg*a	AV00069-1-AS	500	u*A* ^u cauUuuugCcUaCag*c

AV00070-1	AV00070-1-SS	363	u*c* ^u ucuaAaUuUuccuaggg*a	AV00070-1-AS	501	u*A* ^u ccuaGaaauUuGgAgg*a
AV00071-1	AV00071-1-SS	364	g* ^u *uaccaAuUuUuccuuuug*a	AV00071-1-AS	502	u*A* ^u aaaaGaaauUuGgUaa*c
AV00072-1	AV00072-1-SS	365	g* ^u *cuuGcCuUuccuucuc*a	AV00072-1-AS	503	u*A* ^u gaugAgagGcCaCaga*c
AV00073-1	AV00073-1-SS	366	c*a* ^u aaagAgGcCuccuugga*a	AV00073-1-AS	504	u* ^u *UccaaGagucCuUuUuu*g
AV00074-1	AV00074-1-SS	367	c*a* ^u ggcGgGgUuUuccuuug*a	AV00074-1-AS	505	u*A* ^u agaaAaaacCcGcGu*g
AV00075-1	AV00075-1-SS	368	g* ^u *cgagGuUuUuccuuuug*a	AV00075-1-AS	506	u*A* ^u acaaGaaauAcCcGc*c
AV00076-1	AV00076-1-SS	369	g* ^u *guuuUcCuUgguagaa*a	AV00076-1-AS	507	u* ^u *UgucAcaagAaAaAcc*c
AV00077-1	AV00077-1-SS	370	c* ^u *ggugGgAcUuccucua*a	AV00077-1-AS	508	u* ^u *UgagGagguCcAcCac*g
AV00078-1	AV00078-1-SS	371	u* ^u *gugGAcUuUuccucaa*a	AV00078-1-AS	509	u*A* ^u uugGaggaGcUcCacc*a
AV00079-1	AV00079-1-SS	372	g* ^u *gggaCuUcUuccaaau*a	AV00079-1-AS	510	u*A* ^u auugAgagGgAgUcCac*c
AV00080-1	AV00080-1-SS	373	u*a* ^u cuagUgCcAuuuuguc*a	AV00080-1-AS	511	u*A* ^u aaCaauugGcCuAgua*a
AV00081-1	AV00081-1-SS	374	u* ^u *ccauUuGguUcaguggu*a	AV00081-1-AS	512	u*A* ^u ccacUgaacAaAuGgc*a
AV00082-1	AV00082-1-SS	375	a*c* ^u caauUuUcUuuuuguc*a	AV00082-1-AS	513	u*A* ^u gacaAaggaAaAuUgg*u
AV00083-1	AV00083-1-SS	376	g*c* ^u cuauUgAuUgggaagu*a	AV00083-1-AS	514	u*A* ^u cuuUcCaauCaAuAgg*c
AV00084-1	AV00084-1-SS	377	g* ^u *uccaUaCuGcggaacu*a	AV00084-1-AS	515	u*A* ^u guuGcgGgUaUgGau*c
AV00085-1	AV00085-1-SS	378	g* ^u *ggacUuUcGcuuacccu*a	AV00085-1-AS	516	u*A* ^u ggugAgcgGgAaGuGca*c
AV00086-1	AV00086-1-SS	379	a*c* ^u auaaGgGgAcuccuugg*a	AV00086-1-AS	517	u*A* ^u caagAguccUcUuAug*u
AV00087-1	AV00087-1-SS	380	c* ^u *gucGuAuGccuacuc*a	AV00087-1-AS	518	u*A* ^u gagGgcauAgCaGca*g
AV00088-1	AV00088-1-SS	381	g* ^u *ggcaAgUgUuuuguga*a	AV00088-1-AS	519	u* ^u *UcagcAaacaCuUgGca*c
AV00089-1	AV00089-1-SS	382	u* ^u *gccaGuUuUgucugac*a	AV00089-1-AS	520	u*A* ^u ucagCaacCcUuGgc*a
AV00090-1	AV00090-1-SS	383	u* ^u *gucGuUcGcuccacc*a	AV00090-1-AS	521	u*A* ^u gugaAgcgaAgUgCac*a
AV00091-1	AV00091-1-SS	384	a* ^u *aagaGgAcUcuuggac*a	AV00091-1-AS	522	u*A* ^u uccaAgaguCcUcUua*a
AV00092-1	AV00092-1-SS	385	c* ^u *agacUcGuGgugugcu*a	AV00092-1-AS	523	u*A* ^u guccAccacGgGuCuua*g
AV00093-1	AV00093-1-SS	386	u*a* ^u gacUcUgUgugacuu*a	AV00093-1-AS	524	u*A* ^u agucCaccaCgAgUcu*a
AV00094-1	AV00094-1-SS	387	c*c* ^u ugcuGcUaUgcuccau*a	AV00094-1-AS	525	u*A* ^u ugagGcauaGcAgCag*g
AV00095-1	AV00095-1-SS	388	g* ^u *uagUuUgCcCguuuugu*a	AV00095-1-AS	526	u*A* ^u caaaGgggCaCaUac*c
AV00096-1	AV00096-1-SS	389	u* ^u *uacuAgUgCcauuugu*a	AV00096-1-AS	527	u*A* ^u caaaUggcCaUaUaa*a
AV00097-1	AV00097-1-SS	390	a* ^u *uuguUcAgUggguugu*a	AV00097-1-AS	528	u*A* ^u cgaaCcacuGaAcAaa*u
AV00098-1	AV00098-1-SS	391	g*c* ^u gcaUcGGuGgaacuu*a	AV00098-1-AS	529	u*A* ^u agguUccacGcAuGgc*c
AV00099-1	AV00099-1-SS	392	g* ^u *caacGcCcGaccuuga*a	AV00099-1-AS	530	u* ^u *UcagGucggUcGuUga*c
AV00100-1	AV00100-1-SS	393	u*a* ^u caggGgGgGuuuuuuuc*a	AV00100-1-AS	531	u*A* ^u gaaAaaccCcCcUguu*a

AV00101-1	AV00101-1-S5	394	a*g*agucUaGaCucguggu*a	AV00101-1-A5	532	u*A*ccacGagucUaGaCuc*u
AV00102-1	AV00102-1-S5	395	g*u*cuagAcUCGuggugga*a	AV00102-1-A5	533	u*U*ccacCacgaGuCuAga*c
AV00103-1	AV00103-1-S5	396	u*c*aaccUgCuGouaugcc*a	AV00103-1-A5	534	u*G*gcacUagcagCaGgAug*a
AV00104-1	AV00104-1-S5	397	u*g*cuagUaUgCcucauc*u	AV00104-1-A5	535	u*A*gaugAggcaUaGcAgc*a
AV00105-1	AV00105-1-S5	398	g*u*auugUgCccGuuuguc*a	AV00105-1-A5	536	u*G*acaaAcgggCaACua*c
AV00106-1	AV00106-1-S5	399	g*c*cauuUgUuCaaguguu*a	AV00106-1-A5	537	u*A*accaCugaaCaAaUga*c
AV00107-1	AV00107-1-S5	400	g*g*gcgcAcUCucuuuac*a	AV00107-1-A5	538	u*G*uaaaGagagGuGcGcc*c
AV00108-1	AV00108-1-S5	401	a*c*aaggCGgUuuuuuu*a	AV00108-1-A5	539	u*A*agaaAaacCCcGcUg*u
AV00109-1	AV00109-1-S5	402	a*g*gcggGgUuUuuuuuu*a	AV00109-1-A5	540	u*A*caagAaaaaCCcGcc*u
AV00110-1	AV00110-1-S5	403	a*e*gguaeUgUuGcccguuu*a	AV00110-1-A5	541	u*A*aacGgcaCaUaCcu*u
AV00111-1	AV00111-1-S5	404	u*a*cuagCGgAaCuccuagc*a	AV00111-1-A5	542	u*G*cuagGgguUcGcAgg*a
AV00112-1	AV00112-1-S5	405	c*c*acggGgCGCacucuc*a	AV00112-1-A5	543	u*G*agagGuGcgCGGug*g
AV00113-1	AV00113-1-S5	406	u*c*aacGAcCGAccuagag*a	AV00113-1-A5	544	u*C*ucaagGugcgGcUgUga*a
AV00114-1	AV00114-1-S5	407	c*a*uccuGcUgCuauugccu*a	AV00114-1-A5	545	u*A*agcaUagcaGcAgGau*g
AV00115-1	AV00115-1-S5	408	u*c*cuuGCGGAcUucauac*a	AV00115-1-A5	546	u*G*uaugGauugGcAgAgg*a
AV00116-1	AV00116-1-S5	409	c*c*ucugCGaUuccuacu*a	AV00116-1-A5	547	u*A*guuuGgucGgCaGag*g
AV00117-1	AV00117-1-S5	410	u*c*ugccGgAcUcauugc*c	AV00117-1-A5	548	u*G*caugAuggaUcgGag*g
AV00118-1	AV00118-1-S5	411	a*u*ccauAcUgGggaucuc*a	AV00118-1-A5	549	u*G*aguuCGcgaGuAuGga*u
AV00119-1	AV00119-1-S5	412	c*g*caucUcUcUuaagcg*a	AV00119-1-A5	550	u*c*gcguAaggaGgGgUgc*g
AV00120-1	AV00120-1-S5	413	c*g*ucugUgCcuUucucac*c	AV00120-1-A5	551	u*G*augaGagggCaCaGac*g
AV00121-1	AV00121-1-S5	414	a*a*cgacCGAcUuagggc*a	AV00121-1-A5	552	u*G*ccuAagguCGGuCgu*u
AV01258-S5	AV01258-S5	796	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01258-A5	857	u*U*ugucAacaaGaAaAacc*c*g
AV01259-S5	AV01259-S5	797	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01259-A5	858	a*U*ugucAacaaGaAaAacc*c*g
AV01260-S5	AV01260-S5	798	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*c	AV01260-A5	859	g*U*ugucAacaaGaAaAacc*c*g
AV01261-S5	AV01261-S5	799	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*g	AV01261-A5	860	c*U*ugucAacaaGaAaAacc*c*g
AV01262-S5	AV01262-S5	800	u*u*uuUcUuGuugacaa*a	AV01262-A5	861	u*U*ugucAacaaGaAaAa*a
AV01263-S5	AV01263-S5	801	g*u*uuUcUuGuugacaa*a	AV01263-A5	862	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01264-S5	AV01264-S5	802	a*g*uuuuUcUuGuugacaa*a	AV01264-A5	863	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01265-S5	AV01265-S5	803	u*g*uuuuUcUuGuugacaa*a	AV01265-A5	864	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01266-S5	AV01266-S5	804	g*g*uuuuUcUuGuugacaa*a	AV01266-A5	865	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01267-S5	AV01267-S5	805	c*g*uuuuUcUuGuugacaa*a	AV01267-A5	866	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c

AV01268-S5	AV01268-S5	806	a*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01268-A5	867	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01269-S5	AV01269-S5	807	u*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01269-A5	868	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01270-S5	AV01270-S5	808	g*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01270-A5	869	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01271-S5	AV01271-S5	809	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01271-A5	870	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01273-S5	AV01273-S5	810	a*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01273-A5	871	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01274-S5	AV01274-S5	811	u*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01274-A5	872	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01275-S5	AV01275-S5	812	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01275-A5	873	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01276-S5	AV01276-S5	813	g*c*gggguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01276-A5	874	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01277-S5	AV01277-S5	814	g*g*cgggguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01277-A5	875	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01278-S5	AV01278-S5	815	a*g*gggguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01278-A5	876	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01279-S5	AV01279-S5	816	c*a*gggguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01279-A5	877	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01280-S5	AV01280-S5	817	g*u*gggacggcggguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01280-A5	878	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01281-S5	AV01281-S5	818	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01281-A5	879	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01282-S5	AV01282-S5	819	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01282-A5	880	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01283-S5	AV01283-S5	820	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01283-A5	881	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01284-S5	AV01284-S5	821	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01284-A5	882	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01285-S5	AV01285-S5	822	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01285-A5	883	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01286-S5	AV01286-S5	823	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01286-A5	884	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01287-S5	AV01287-S5	824	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01287-A5	885	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01288-S5	AV01288-S5	825	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01288-A5	886	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01289-S5	AV01289-S5	826	c*a*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01289-A5	887	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01290-S5	AV01290-S5	827	c*a*gguuuuUcUuGuugacaa*a	AV01290-A5	888	u*U*ugucAacaaGaAaAa*c
AV01291-S5	AV01291-S5	828	c*a*gguuuuUcUuGuugacaa*c	AV01291-A5	889	g*U*gucaAacaaGaAaAa*c
AV01292-S5	AV01292-S5	829	c*a*gguuuuUcUuGuugacaa*g	AV01292-A5	890	c*U*gucaAacaaGaAaAa*c
AV01293-S5	AV01293-S5	830	g*u*uuUcUuGuugacaa*u	AV01293-A5	891	a*U*gucaAacaaGaAaAa*c
AV01294-S5	AV01294-S5	831	g*g*uuUcUuGuugacaa*u	AV01294-A5	892	a*U*gucaAacaaGaAaAa*c
AV01295-S5	AV01295-S5	832	a*g*gguuuuUcUuGuugacaa*u	AV01295-A5	893	a*U*gucaAacaaGaAaAa*c
AV01296-S5	AV01296-S5	833	u*g*gguuuuUcUuGuugacaa*u	AV01296-A5	894	a*U*gucaAacaaGaAaAa*c
AV01297-S5	AV01297-S5	834	g*g*gguuuuUcUuGuugacaa*u	AV01297-A5	895	a*U*gucaAacaaGaAaAa*c
AV01298-S5	AV01298-S5	835	c*g*gguuuuUcUuGuugacaa*u	AV01298-A5	896	a*U*gucaAacaaGaAaAa*c

AV01299	AV01299-SS	836	a*g*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01299-AS	897	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*u
AV01300	AV01300-SS	837	u*g*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01300-AS	898	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*a
AV01301	AV01301-SS	838	g*g*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01301-AS	899	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c
AV01302	AV01302-SS	839	c*g*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01302-AS	900	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*g
AV01303	AV01303-SS	840	g*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01303-AS	901	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*u*c
AV01304	AV01304-SS	841	a*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01304-AS	902	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*u*u
AV01305	AV01305-SS	842	u*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01305-AS	903	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*u*a
AV01306	AV01306-SS	843	g*c*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01306-AS	904	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*g*c
AV01307	AV01307-SS	844	g*g*c*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01307-AS	905	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*g*c
AV01308	AV01308-SS	845	a*g*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01308-AS	906	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c
AV01309	AV01309-SS	846	c*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01309-AS	907	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c
AV01310	AV01310-SS	847	a*c*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01310-AS	908	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c
AV01311	AV01311-SS	848	c*g*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01311-AS	909	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c
AV01312	AV01312-SS	849	c*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01312-AS	910	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c
AV01313	AV01313-SS	850	c*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01313-AS	911	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c
AV01314	AV01314-SS	851	c*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01314-AS	912	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c
AV01315	AV01315-SS	852	c*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01315-AS	913	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c
AV01316	AV01316-SS	853	c*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01316-AS	914	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c
AV01317	AV01317-SS	854	c*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01317-AS	915	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c
AV01318	AV01318-SS	855	c*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01318-AS	916	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c
AV01319	AV01319-SS	856	c*a*ggguuuUuCuUguugaca*u	AV01319-AS	917	a*U*gucaAcaagAaAaAcc*c*c*c

表 3 公开了本发明的某些经化学修饰的 HBV RNAi 剂反义链和有义链序列以及 dsRNA。在本发明的方法的一些实施方案中，将表 3 中示出的 RNAi 剂施用于细胞和/或对象。在本发明的方法的一些实施方案中，将包含表 3 示出的多核苷酸序列的 RNAi 剂施用于对象。在本发明的一些实施方案中，施用于对象的 RNAi 剂包含在表 3 中第一列中标识的双链体，其中该双链体包含分别在表 3 的同一行中第四列和第七列中的有义链序列和反义链序列中示出的序列修饰和/或递送化合物。这些序列用于本文中别处所述的某些体内测试研究。在一些实施方案中，表 3 中示出的序列可与用于递送的化合物连接（在本文中也称为“缀合”），所述用于递送的化合物的一个非限制性实例是包含 GalNAc 的化合物。递送化合物的某些实施方案在表 3 中在第四列的有义链上标识为“GLX-0”。如本文中所用和表 3 中所示，“GLX-0”表示包含 GalNAc 的化合物。应理解，另外的 GLO-n 或 GLS-n 化合物可替换显示为 GLO-0 的化合物，其中所得化合物包括在本发明的方法和/或组合物中的一个实施方案中。在本发明的一些实施方案中，表 3 中显示为 GLX-0 的递送化合物被以下化合物中的任一种替代：GLS-1、GLS-2、GLS-3、GLS-4、GLS-5、GLS-6、GLS-7、GLS-8、GLS-9、GLS-10、GLS-11、GLS-12、GLS-13、GLS-14、GLS-15、GLS-16、GLO-1、GLO-2、GLO-3、GLO-4、GLO-5、GLO-6、GLO-7、GLO-8、GLO-9、GLO-10、GLO-11、GLO-12、GLO-13、GLO-14、GLO-15 和 GLO-16，其各自的结构在本文别处提供。本领域技术人员将能够制备和使用本发明的 dsRNA 化合物，其中所连接的递送化合物是以下之一：GLS-1、GLS-2、GLS-3、GLS-4、GLS-5、GLS-6、GLS-7、GLS-8、GLS-9、GLS-10、GLS-11、GLS-12、GLS-13、GLS-14、GLS-15、GLS-16、GLO-1、GLO-2、GLO-3、

GLO-4、GLO-5、GLO-6、GLO-7、GLO-8、GLO-9、GLO-10、GLO-11、GLO-12、GLO-13、GLO-14、GLO-15 和 GLO-16。表 3 的每一行提供了分配至该表的该行中的有义序列和反义序列的双链体的双链体 AD#。例如，双链体 AD#AD00166 是包含有义链 SEQ ID NO: 553 和反义链 SEQ ID NO: 578 的双链体。表 3 中的每一行提供了有义链和反义链，并且公开了示出的有义链和反义链的双链体。表 3 第二列中的“有义链 SS#”是针对同一行中第四列示出的有义序列（包含修饰）分配的标识符。表 3 第五列中的“反义链 AS#”是针对第七列中示出的反义序列（包含修饰）分配的标识符。某些所连接的包含 GalNAc 的 GLO 或 GLS 化合物的标识符显示为 GLX-0，并且应理解，另外的 GLO 或 GLS 化合物可替换显示为 GLX-0 的化合物，其中所得化合物包括在本发明的方法和/或组合物中的一个实施方案中。

表 3 提供了经化学修饰的 HBV RNAi 剂有义链和反义链序列。所有序列均以 5'至 3'显示。这些序列用于本文中所述的某些体内测试研究。体内研究中使用的递送分子在每条有义链的 3'末端表示为“GLX-0”。化学修饰表示为：大写字母：2'-氟；小写字母：2'-OMe；硫代磷酸酯：*

双链体 ID	有义链 SS#	SEQ ID NO	有义链	反义链 AS#	SEQ ID NO	反义链
AD00166	AD00166-SS	553	u*g*uggacUuCuCuaauuu*a(GLX-0)	AD00166-AS	578	u*A*auuGagagAaGuCcac*c*a
AD00167	AD00167-SS	554	a*c*uuucucuCaAuUuuucagg*a(GLX-0)	AD00167-AS	579	u*C*cuagAaaauUgAgAga*a*g*u
AD00168	AD00168-SS	555	g*u*uaacaaUuUuCuuuuguc*a(GLX-0)	AD00168-AS	580	u*G*acaaAagaaAaUuGgua*a*c
AD00169	AD00169-SS	556	c*a*uaagagGaCuCuuggacu*a(GLX-0)	AD00169-AS	581	u*A*guccAagagUcCuCuua*u*g
AD00170	AD00170-SS	557	g*g*gguuuuUcUuGuugacaa*a(GLX-0)	AD00170-AS	582	u*U*ugucAacaaGaAaAacc*c*c
AD00171	AD00171-SS	558	u*u*cgucucAcCuCugcacgu*a(GLX-0)	AD00171-AS	583	u*A*cgugCagagGuGaAgcg*a*a
AD00172	AD00172-SS	559	c*c*guucguGcCuUcucacuc*a(GLX-0)	AD00172-AS	584	u*A*gaugAgaagGcAcAgac*g*g
AD00173	AD00173-SS	560	a*g*gccuuUgAuUggaaguu*a(GLX-0)	AD00173-AS	585	u*A*cuuuCcaauCaAuAggc*c*u
AD00174	AD00174-SS	561	g*u*gugcacUuGcCuucacuc*a(GLX-0)	AD00174-AS	586	u*A*ggugAagcgAaGuGcac*a*c
AD00175	AD00175-SS	562	a*g*guauuUgCcCguuuuguc*a(GLX-0)	AD00175-AS	587	u*G*acaaAcgggCaAcAaac*c*u
AD00176	AD00176-SS	563	c*g*gggcgcAcCuCucuuac*a(GLX-0)	AD00176-AS	588	u*G*uaaaGagagGuGcGccc*c*g
AD00177	AD00177-SS	564	c*c*cgucugUgCcUucucauc*a(GLX-0)	AD00177-AS	589	u*G*augaGaaagCaCaGacg*a*g
AD00261	AD00261-SS	565	u*g*gacucUcUcAauuuucuu*a(GLX-0)	AD00261-AS	590	u*A*gaauAuuugaGaGaAguc*c*a
AD00262	AD00262-SS	566	c*a*uuuuuCaGuGuuucgua*a(GLX-0)	AD00262-AS	591	u*U*acgaAccacUgAaCaau*a*g
AD00263	AD00263-SS	567	u*g*uuaccaAuUuUcuuuuuu*a(GLX-0)	AD00263-AS	592	u*A*caaaAgaauAuUgGuua*c*a
AD00264	AD00264-SS	568	a*g*gcuguaGcCaUaaauugg*a(GLX-0)	AD00264-AS	593	u*C*caauUuaugUcUaCagc*c*u
AD00265	AD00265-SS	569	c*u*guuaccAaUuUucuuuuu*a(GLX-0)	AD00265-AS	594	u*C*aaaaGaaaaUuGgUaac*c*a
AD00266	AD00266-SS	570	u*a*caggcgGgGuUuuuuuuu*a(GLX-0)	AD00266-AS	595	u*C*aaagAaaacCcCgCcuu*u*a
AD00267	AD00267-SS	571	c*g*ggguuuUuCuUguugaca*a(GLX-0)	AD00267-AS	596	u*U*gucaAcaagAaAaAccc*c*g
AD00268	AD00268-SS	572	u*u*uaacagUgCcAuuuuuuuu*a(GLX-0)	AD00268-AS	597	u*G*eaacAauugCaCuAguu*a*a
AD00269	AD00269-SS	573	u*u*accaaUuUcUuuuuuuu*a(GLX-0)	AD00269-AS	598	u*A*gacaAaagaAaAuUggg*a*a
AD00270	AD00270-SS	574	a*u*ccugcuGcUaUgcuuauu*a(GLX-0)	AD00270-AS	599	u*A*ugagGcauaGcAgCagg*a*u
AD00271	AD00271-SS	575	c*a*gcgaUgGcGuGgaacuuu*a(GLX-0)	AD00271-AS	600	u*A*agguUccacGcAuGgcg*c*g
AD00272	AD00272-SS	576	g*c*uccucUcGcAucauac*a(GLX-0)	AD00272-AS	601	u*G*uaugGaucGcGcAgga*g*c
AD00273	AD00273-SS	577	u*a*cauagAgGaCucuuugga*a(GLX-0)	AD00273-AS	602	u*U*ccaaGagucCuCuUaug*u*a

表 4 示出了本发明的某些经化学修饰的 HBV RNAi 剂有义链序列和

反义链序列，并标识了包含有义和反义的双链体。在本发明的方法的一些实施方案中，将具有表 4 中示出的多核苷酸序列的 RNAi 剂施用于对象。在本发明的一些实施方案中，施用于对象的 RNAi 剂包含在表 4 的一行中

5 第一列标识的双链体，并且包含分别在表 4 的同一行中第四列和第七列中的有义链序列和反义链序列中示出的序列修饰和/或递送化合物。在一些实施方案中，表 4 中示出的序列可与能够将 dsRNA 剂递送至对象中的细胞和/或组织的化合物连接。可在本发明的某些实施方案中使用的递送化合物的一个非限制性实例是包含 GalNAc 的化合物。在表 4 中，术语“GLS-5”表示如示出的有义链中的包含 GalNAc 的化合物。应理解，在本

10 发明的化合物、组合物和方法的某些实施方案中，GLS-5 被以下化合物中的任一种替代：GLS-1、GLS-2、GLS-3、GLS-4、GLS-6、GLS-7、GLS-8、GLS-9、GLS-10、GLS-11、GLS-12、GLS-13、GLS-14、GLS-15、GLS-16、GLO-1、GLO-2、GLO-3、GLO-4、GLO-5、GLO-6、GLO-7、GLO-8、GLO-9、GLO-10、GLO-11、GLO-12、GLO-13、GLO-14、GLO-15 和 GLO-16，

15 其各自的结构在本文别处提供。表 4 的第一列表示针对该行中公开的双链体的双链体标识号。

表 4：经化学修饰的 HBV RNAi 剂有义链和反义链序列。序列用于本文别处所述的某些体内研究。所有序列均以 5' 至 3' 显示。化学修饰表示为：大

20 写字母：2'-氟；小写字母：2'-OMe；硫代磷酸酯：*；Invab=反向无碱基。

双链体 ID	有义链 SS#	SEQ ID NO	有义链	反义链 AS#	SEQ ID NO	反义链
AD00166-1	AD00166-1-SS	603	{GLS-5}*(Invab)*ugguggacUuCuCucauuua*(Invab)	AD00166-1-AS	638	u*A*aaauGagagAaGuCcac*c*a
AD00167-1	AD00167-1-SS	604	{GLS-5}*(Invab)*acuucucuCaAuUuuuagga*(Invab)	AD00167-1-AS	639	u*C*cuagAaaaaUgAgAga*a*g*u
AD00168-1	AD00168-1-SS	605	{GLS-5}*(Invab)*guuacaaUuUuCuuuuuga*(Invab)	AD00168-1-AS	640	u*G*acaaAagaaAaUuGgua*a*c
AD00169-1	AD00169-1-SS	606	{GLS-5}*(Invab)*cauaagagGaCuCuuggacua*(Invab)	AD00169-1-AS	641	u*A*guccAagagUcCuCuuaa*u*g
AD00170-1	AD00170-1-SS	607	{GLS-5}*(Invab)*gggguuuuUcUuGuugacaa*(Invab)	AD00170-1-AS	642	u*U*ugucAacaaGaAaAacc*c*c
AD00171-1	AD00171-1-SS	608	{GLS-5}*(Invab)*uucgcuuAcCuCugcacgua*(Invab)	AD00171-1-AS	643	u*A*cgugCagagGuGaAgca*a*a
AD00172-1	AD00172-1-SS	609	{GLS-5}*(Invab)*cggucuguGcCuUcuuucua*(Invab)	AD00172-1-AS	644	u*A*gaugAagagGcAcAgac*g*g
AD00173-1	AD00173-1-SS	610	{GLS-5}*(Invab)*aggccuuUgAuUggaaagaa*(Invab)	AD00173-1-AS	645	u*A*cuuuCcauCaAuAggc*c*u
AD00174-1	AD00174-1-SS	611	{GLS-5}*(Invab)*gugugcacUcCgCuaccua*(Invab)	AD00174-1-AS	646	u*A*ggugAagcgAaGuGcac*a*c
AD00175-1	AD00175-1-SS	612	{GLS-5}*(Invab)*agguauguUgCcGguuuuga*(Invab)	AD00175-1-AS	647	u*G*acaaAagagCaAcAaac*c*u
AD00176-1	AD00176-1-SS	613	{GLS-5}*(Invab)*cggggcgAcCuCuuuuaca*(Invab)	AD00176-1-AS	648	u*G*uaaaGagagGuGcGccc*c*g
AD00177-1	AD00177-1-SS	614	{GLS-5}*(Invab)*cccugcugUgCcUucuauca*(Invab)	AD00177-1-AS	649	u*G*augaGaaagCaCaGacg*g*g
AD00261-1	AD00261-1-SS	615	{GLS-5}*(Invab)*uggacuucUcUcauuuuuca*(Invab)	AD00261-1-AS	650	u*A*gaauAaagaGaGaAguc*c*a
AD00262-1	AD00262-1-SS	616	{GLS-5}*(Invab)*cauuuguCaGuGuuucuaa*(Invab)	AD00262-1-AS	651	u*U*acgaAccacUgAaCaau*u*g
AD00263-1	AD00263-1-SS	617	{GLS-5}*(Invab)*uguuaccaAuUuUuuuuuga*(Invab)	AD00263-1-AS	652	u*C*caaaAaaaaAuUgGuua*c*a
AD00264-1	AD00264-1-SS	618	{GLS-5}*(Invab)*aggcuugaGcCaUaaauugga*(Invab)	AD00264-1-AS	653	u*C*cauuUuaugCcUaGagc*c*u
AD00265-1	AD00265-1-SS	619	{GLS-5}*(Invab)*cuguuaccAaUuUuuuuuga*(Invab)	AD00265-1-AS	654	u*C*aaaaGaaaaUuGgUaac*a*g
AD00266-1	AD00266-1-SS	620	{GLS-5}*(Invab)*uacaggcgGgGuUuuuuuga*(Invab)	AD00266-1-AS	655	u*C*agaaAaaacCcGcCug*u*a
AD00267-1	AD00267-1-SS	621	{GLS-5}*(Invab)*cggguuuUuCuUguugataa*(Invab)	AD00267-1-AS	656	u*U*gucaAaagAaAaAacc*c*g
AD00268-1	AD00268-1-SS	622	{GLS-5}*(Invab)*uuuacugUgCcAuuuuuga*(Invab)	AD00268-1-AS	657	u*G*aaCaAaaggCaCuAguu*a*a

AD00269-1	AD00269-1-S5	623	{GLS-5}*(Invab)*uuaccauUuUcUuuugucua*(Invab)	AD00269-1-AS	658	u*A*gaCaAagaAaAuUggua*a*a
AD00270-1	AD00270-1-S5	624	{GLS-5}*(Invab)*auccugcuGcUaUgcccuaa*(Invab)	AD00270-1-AS	659	u*A*ugagGcauaGcAgCagg*a*u
AD00271-1	AD00271-1-S5	625	{GLS-5}*(Invab)*cagcgcauGcGuGgaaccuaa*(Invab)	AD00271-1-AS	660	u*A*aggguUccacGcAuGgcg*c*u*g
AD00272-1	AD00272-1-S5	626	{GLS-5}*(Invab)*gcuccucuGcCgAuccauaca*(Invab)	AD00272-1-AS	661	u*G*uaugGaucGcAgAgga*g*c
AD00273-1	AD00273-1-S5	627	{GLS-5}*(Invab)*uacuaaagAgGcCucuuaggaa*(Invab)	AD00273-1-AS	662	u*U*ccaaGagucCuCuUaug*u*a
AD00375	AD00375-S5	628	{GLS-5}*(Invab)*cggguuuUcUuGuugacaaa*(Invab)	AD00375-AS	663	u*U*ugucAacaaGaAaAacc*c*g
AD00376	AD00376-S5	629	{GLS-5}*(Invab)*cguaaccaAuUuUcuuuuugua*(Invab)	AD00376-AS	664	u*A*caaaAgaaaAuUgGuaa*c*g
AD00377	AD00377-S5	630	{GLS-5}*(Invab)*guguuaccAaUuUcuuuuuga*(Invab)	AD00377-AS	665	u*C*aaaaGaaaaUuGgUaac*c*c
AD00378	AD00378-S5	631	{GLS-5}*(Invab)*caggguuuUcUuGuugacau*(Invab)	AD00378-AS	666	a*U*guCaAcaagAaAaAacc*c*u*g
AD00379	AD00379-S5	632	{GLS-5}*(Invab)*cuuacuaGcUcCuuuuugua*(Invab)	AD00379-AS	667	u*G*aacaAauggCaCuAguu*a*g
AD00380	AD00380-S5	633	{GLS-5}*(Invab)*cuaccauUuUcUuuuuugua*(Invab)	AD00380-AS	668	u*A*gaCaAagaAaAuUggua*a*g
AD00381	AD00381-S5	634	{GLS-5}*(Invab)*cggcuuauUgAuUggaaagua*(Invab)	AD00381-AS	669	u*A*cuuuCcauCuAuAggc*c*g
AD00382	AD00382-S5	635	{GLS-5}*(Invab)*cagggcAcCuCucuuuaca*(Invab)	AD00382-AS	670	u*G*uaaaGagagGuGcGccc*u*g
AD00383	AD00383-S5	636	{GLS-5}*(Invab)*aggguuuUcUuGuugacau*(Invab)	AD00383-AS	671	a*U*guCaAcaagAaAaAacc*c*u
AD00384	AD00384-S5	637	{GLS-5}*(Invab)*cggguuuUcUuGuugacaa*(Invab)	AD00384-AS	672	u*U*guCaAcaagAaAaAacc*c*g
AD00378-1	AD00378-1-S5	918	{GLS-15}*(Invab)*caggguuuUcUuGuugacau*(Invab)	AD00378-1-AS	922	a*U*guCaAcaagAaAaAacc*c*g
AD00170-2	AD00170-2-S5	919	{GLS-15}*(Invab)*cggguuuUcUuGuugacaaa*(Invab)	AD00170-2-AS	923	u*U*ugucAacaaGaAaAacc*c*g
AD00268-2	AD00268-2-S5	920	{GLS-15}*(Invab)*guuacuagUgCcAuuuuugua*(Invab)	AD00268-2-AS	924	u*G*aacaAauggCaCuAguu*a*c
AD00263-2	AD00263-2-S5	921	{GLS-15}*(Invab)*gguaaccaAuUuUcuuuuugua*(Invab)	AD00263-2-AS	925	u*A*caaaAgaaaAuUgGuaa*c*c

在本发明的方法和组合物的一些实施方案中，本发明的 dsRNA 剂的有义链包含以下之一：SEQ ID NO: 281、290、295、300、304、306、307、331、557、567、569、571、572、573、560、563、607、628 至 637 或 918 至 921。在本发明的方法和组合物的某些实施方案中，dsRNA 剂的反义链包含以下之一：SEQ ID NO: 419、428、433、438、442、444、445、469、582、592、594、596、597、598、585、588、642、663 至 672 或 922 至 925。在本发明的方法和组合物的一些实施方案中，dsRNA 剂包含：SEQ ID NO: 281 和 SEQ ID NO: 419；SEQ ID NO: 290 和 SEQ ID NO: 428；SEQ ID NO: 295 和 SEQ ID NO: 433；SEQ ID NO: 300 和 SEQ ID NO: 438；SEQ ID NO: 304 和 SEQ ID NO: 442；SEQ ID NO: 306 和 SEQ ID NO: 444；SEQ ID NO: 307 和 SEQ ID NO: 445；SEQ ID NO: 331 和 SEQ ID NO: 469；SEQ ID NO: 557 和 SEQ ID NO: 582；SEQ ID NO: 567 和 SEQ ID NO: 592；SEQ ID NO: 569 和 SEQ ID NO: 594；SEQ ID NO: 571 和 SEQ ID NO: 596；SEQ ID NO: 572 和 SEQ ID NO: 597；SEQ ID NO: 573 和 SEQ ID NO: 598；SEQ ID NO: 560 和 SEQ ID NO: 585；SEQ ID NO: 563 和 SEQ ID NO: 588；SEQ ID NO: 607 和 SEQ ID NO: 642；SEQ ID NO: 628 和 SEQ ID NO: 663；SEQ ID NO: 629 和 SEQ ID NO: 664；SEQ ID NO: 630 和 SEQ ID NO: 665；SEQ ID NO: 631 和 SEQ ID NO: 666；SEQ ID NO: 632 和 SEQ ID NO: 667；SEQ ID NO: 633 和 SEQ ID NO: 668；SEQ ID NO: 634 和 SEQ ID NO: 669；SEQ ID NO: 635 和 SEQ ID NO: 670；SEQ ID NO: 636 和 SEQ ID NO: 671；SEQ ID NO: 637 和 SEQ ID NO: 672；SEQ ID NO: 918 和 SEQ ID NO: 922；SEQ ID NO: 919 和 SEQ ID NO: 923；SEQ ID NO: 920 和 SEQ ID NO: 924；或 SEQ ID NO: 921 和 SEQ ID NO: 925。

在本发明的某些实施方案中，dsRNA（在本文中也称为“双链体”）是表 1 至表 4 之一中公开的一种。表 1 至表 4 中的每一行公开了包含在该表行中的有义链序列和反义链序列的双链体。除表 1 至表 4 中公开的双链体之外，还应理解，在一些实施方案中，本发明的双链体可包含表 1 至表 4 中所示的有义序列和反义序列，其与表 1 至表 4 中所示序列中显示的存在 0、1、2 或 3 个核苷酸差异。因此，在一些实施方案中，本发明的双链体中的反义链可以是与 SEQ ID NO: 139 中核苷酸相比具有 0、1、2 或 3 个不同核苷酸的 SEQ ID NO: 139。

应理解，本发明的双链体中的有义链序列和反义链序列可独立选择。因此，本发明的 dsRNA 可包含表 1 至表 4 中的一行中公开的双链体的有义链和反义链。或者，在本发明的 dsRNA 中，dsRNA 中所选择的有义链和反义链之一或二者可包含表 1 至表 4 中所示的序列，但其中该有义序列和反义序列之一或二者相对于亲本序列包含 1、2、3 个或更多个核碱基替换。在一些实施方案中，选择的序列可比其亲本序列更长或更短。因此，本发明中包括的 dsRNA 剂可以但不必须包含表 1 至表 4 中公开为双链体的有义和反义对的确切序列。

在一些实施方案中，dsRNA 剂包含有义链和反义链，反义链中的第 2 至 18 位核苷酸包含 HBV RNA 转录物的互补区，其中所述互补区包含与表 1 至表 4 之一中列出的反义序列之一存在 0、1、2 或 3 个核苷酸差异的至少 15 个连续核苷酸，并且任选地包含靶向配体。在一些情况下，HBV RNA 转录物的互补区包含与表 1 至表 4 之一中列出的反义序列之一存在不超过 3 个核苷酸差异的至少 15、16、17、18 或 19 个连续核苷酸。在本发明的 dsRNA 剂的一些实施方案中，dsRNA 的反义链与 SEQ ID NO: 673 的任一个靶区域至少基本上互补，并且在表 1 至表 4 的任一个中提供。在一些实施方案中，本发明的 dsRNA 剂的反义链与 SEQ ID NO: 673 的任一个靶区域完全互补，并且在表 1 至表 4 的任一个中提供。在一些实施方案中，dsRNA 剂包含表 1 至表 4 的任一个中所示的有义链序列，并且所述有义链序列与 dsRNA 剂中的反义链序列至少基本上互补。在另一些实施方案中，本发明的 dsRNA 剂包含表 1 至表 4 的任一个中所示的有义链序列，并且所述有义链序列与 dsRNA 剂中的反义链序列完全互补。在一些情况下，本发明的 dsRNA 剂包含表 1 至表 4 的任一个中所示的反义链序列。本发明的 dsRNA 剂的一些实施方案包含表 1 至表 4 的任一个中公开为双链体的有义序列和反义序列。如本文中所述，应理解本发明的双链体中的有义链和反义链可独立选择。

错配

本领域技术人员已知，错配针对在 dsRNA 中的效力是耐受的，尤其是如果错配在 dsRNA 的末端区域中的情况下。在 dsRNA 中，某些错配的耐受较好，例如针对效力，具有摆动碱基对 G:U 和 A:C 的错配的耐受较好（Du et al., Nucleic Acids Res. 2005 Mar 21;33(5):1671-7）。在本发明的方法和化合物的一些实施方案中，HBV dsRNA 剂可包含与 HBV 靶序列的一个或更多个错配。在一些实施方案中，本发明的 HBV dsRNA 剂不包含错配。在某些实施方案中，本发明的 HBV dsRNA 剂包含不超过 1 个、不超过 2 个或不超过 3 个与 HBV 靶序列的错配。在本发明的一些实施方案中，HBV dsRNA 剂的反义链包含不位于互补区中心的与 HBV 靶序列的错配。在一些实施方案中，HBV dsRNA 剂的反义链包含 1、2、3、4 个或更多个错配，其在来自互补区的 5' 末端和 3' 末端之一或二者的最后 5、4、3、2 或 1 个核苷酸中。本文中所述的方法和/或本领域已知的方法可用于确定包含与 HBV 靶序列的错配的 HBV dsRNA 剂是否有效抑制 HBV 基因的表达。

互补性

除非另有说明，否则本文中使用的术语“互补”在用于描述与第二核苷酸序列（例如，HBV dsRNA 剂反义链）相关的第一核苷酸序列（例如，HBV dsRNA 剂有义链）时，意指包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在某些条件下杂交[在哺乳动物生理条件（或类似的体外条件）下形成碱基对氢键]并形成双链体或双螺旋结构的能力。其他条件也可适用，例如如可在生物体内遇到的生理相关条件。本领域技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用来确定最适合于测试两个序列的互补性的一组条件。至少在满足上述杂交要求的程度上，互补序列包含沃森-克里克（Watson-Crick）碱基对或非沃森-克里克碱基对，并且包含天然或经修饰核苷酸或核苷酸模拟物。序列同一性或互补性与修饰无关。

互补序列，例如在如本文中所述的 HBV dsRNA 中的互补序列，包含含有第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与含有第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在该核苷酸序列之一或二者的全长上的碱基配对。这样

的序列在本文中可被称为相对于彼此“完全互补”。应理解，在一些实施方案中，当两个寡核苷酸被设计成在杂交之后形成一个或多个单链突出端时，这样的突出端在本文中不被认为是关于确定互补性的错配。例如，HBV dsRNA 剂包含一个长度为 19 个核苷酸的寡核苷酸和另一个长度为 20 个核苷酸的寡核苷酸，其中较长的寡核苷酸包含与较短的寡核苷酸完全互补的 19 个核苷酸的序列，出于本文中所述的目的，其也可被称为“完全互补”。因此，本文中使用的“完全互补”意指第一多核苷酸的连续序列中的所有（100%）碱基将与第二多核苷酸的连续序列中相同数目的碱基杂交。连续序列可包含第一或第二核苷酸序列的全部或一部分。

本文中使用的术语“基本上互补”意指在杂交的核碱基序列对中，第一多核苷酸的连续序列中至少约 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%但不是全部的碱基将与第二多核苷酸的连续序列中相同数目的碱基杂交。术语“基本上互补”可用于提及第一序列相对于第二序列，如果这两个序列针对多至 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个碱基对（bp）的双链体在杂交之后包含一个或多个（例如至少 1、2、3、4 或 5 个）错配碱基对同时保留在与它们的最终应用（例如，通过 RISC 途径抑制 HBV 基因表达）最相关的条件下杂交的能力。

术语“部分互补”在本文中可用于提及这样的核碱基序列的杂交对，其中第一多核苷酸的连续序列中的至少 75%但不是全部的碱基将与第二多核苷酸的连续序列中的相同数目的碱基杂交。在一些实施方案中，“部分互补”意指第一多核苷酸的连续序列中的至少 76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的碱基将与第二多核苷酸的连续序列中的相同数目的碱基杂交。

术语“互补”、“完全互补”、“基本上互补”和“部分互补”在本文中用于提及在 HBV dsRNA 剂的有义链与反义链之间，或在 HBV dsRNA 剂的反义链与靶 HBV mRNA 的序列之间的碱基匹配。应理解，术语“HBV dsRNA 剂的反义链”可以指“HBV 反义多核苷酸剂”的相同序列。

如本文中使用的，在提及核酸序列时使用的术语“基本上相同”或“显著同一性”意指包含与参考序列相比具有至少约 85%序列同一性或更多，优选至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的序列的核酸序

列。序列同一性的百分比是通过在比较窗口中比较两个最佳比对的序列来确定的。百分比通过以下来计算：确定两个序列中出现相同核酸碱基的位置的数目以产生匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗口中位置的总数目，并将结果乘以 100，以得到序列同一性的百分比。本文中公开的发明涵盖与本文中（例如，表 1 至表 4 中）公开的那些基本上相同的核苷酸序列。在一些实施方案中，本文中公开的序列与本文中（例如，表 1 至表 4 中）公开的那些完全相同，或至少约 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%相同。

本文中使用的术语“包含序列的链”意指包含核苷酸链的寡核苷酸，其由使用标准核苷酸命名法提及的序列描述。本文中使用的术语“双链 RNA”或“dsRNA”是指包含 RNA 分子或分子复合物的 RNAi，所述 RNA 分子或分子复合物具有包含两条反平行且基本上或完全互补的核酸链的杂交双链体区，其被称为相对于靶 HBV RNA 具有“有义”和“反义”取向。双链体区可以是允许通过 RISC 途径特异性降解所期望的靶 HBV RNA 的任何长度，但长度通常为 9 至 30 个碱基对，例如长度为 15 至 30 个碱基对。如果考虑 9 至 30 个碱基对之间的双链体，该双链体可以是该范围内的任何长度，例如 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30，以及其之间的任何子范围，包括但不限于：15 至 30 个碱基对、15 至 26 个碱基对、15 至 23 个碱基对、15 至 22 个碱基对、15 至 21 个碱基对、15 至 20 个碱基对、15 至 19 个碱基对、15 至 18 个碱基对、15 至 17 个碱基对、18 至 30 个碱基对、18 至 26 个碱基对、18 至 23 个碱基对、18 至 22 个碱基对、18 至 21 个碱基对、18 至 20 个碱基对、19 至 30 个碱基对、19 至 26 个碱基对、19 至 23 个碱基对、19 至 22 个碱基对、19 至 21 个碱基对、19 至 20 个碱基对、20 至 30 个碱基对、20 至 26 个碱基对、20 至 25 个碱基对、20 至 24 个碱基对、20 至 23 个碱基对、20 至 22 个碱基对、20 至 21 个碱基对、21 至 30 个碱基对、21 至 26 个碱基对、21 至 25 个碱基对、21 至 24 个碱基对、21 至 23 个碱基对，或 21 至 22 个碱基对。

通过用切丁酶和类似酶处理而在细胞中产生的 HBV dsRNA 剂的长度通常为 19 至 22 个碱基对。HBV dsRNA 剂的双链体区的一条链包含与靶 HBV RNA 的区域基本上互补的序列。形成双链体结构的两条链可来自具有至少一个自身互补区的单个 RNA 分子，或者可由两个或更多个单独的 RNA 分子形成。当双链体区由单个分子的两条链形成时，该分子可具有由形成双链体结构的一条链的 3'末端与相应另一条链的 5'末端之间的单

链核苷酸链（本文中称为“发夹环”）分离的双链体区。在本发明的一些实施方案中，发夹环包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个或更多个未配对的核苷酸。当 HBV dsRNA 剂的两条基本上互补的链由单独的 RNA 分子构成时，那些分子不需要但可以共价连接。当两条链通过除发夹环之外的方式共价连接时，连接结构被称为“接头”。术语“siRNA”在本文中还可用于指如本文中所述的 dsRNA 剂。

在本发明的一些实施方案中，HBV dsRNA 剂可包含在 dsRNA 剂的一个或两个末端不具有未配对的核苷酸或核苷酸类似物的有义序列和反义序列。没有未配对核苷酸的末端被称为“平末端”并且没有核苷酸突出端。如果 dsRNA 剂的两端均是平的，则 dsRNA 被称为“平末端的”。在本发明的一些实施方案中，dsRNA 剂的仅第一末端是平的，在一些实施方案中，dsRNA 剂的仅第二末端是平的，并且在本发明的某些实施方案中，HBV dsRNA 剂的两端均是平的。

在本发明的 dsRNA 剂的一些实施方案中，dsRNA 不具有一个或两个平末端。在这样的情况下，在 dsRNA 剂的链的末端有至少一个未配对核苷酸。例如，当 dsRNA 的一条链的 3'末端延伸超出另一条链的 5'末端时，则存在核苷酸突出端，或反之亦然。dsRNA 可包含具有至少 1、2、3、4、5、6 个或更多个核苷酸的突出端。核苷酸突出端可包含以下或由以下组成：核苷酸/核苷类似物，包括脱氧核苷酸/核苷。应理解，在一些实施方案中，核苷酸突出端在 dsRNA 剂的有义链上、在 dsRNA 剂的反义链上，或在 dsRNA 剂的两端，并且突出端的核苷酸可存在于 dsRNA 的反义链或有义链的 5'末端、3'末端或两端。在本发明的某些实施方案中，突出端中的一个或更多个核苷酸被核苷硫代磷酸酯替代。

本文中使用的术语“反义链”或“引导链”是指包含与 HBV 靶序列至少基本上互补的区域的 HBV dsRNA 剂的链。本文中使用的术语“有义链”或“过客链”是指包含与 HBV dsRNA 剂的反义链的区域至少基本上互补之区域的 HBV dsRNA 剂的链。

修饰

在本发明的一些实施方案中，HBV RNAi 剂的 RNA 被化学修饰以增强稳定性和/或一种或更多种其他有益特征。在本发明的某些实施方案中，

核酸可通过本领域已充分建立的方法来合成和/或修饰，例如，在“Current protocols in Nucleic Acid Chemistry,” Beaucage, S. L. et al. (编辑), John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., USA 中描述的那些，其通过引用并入本文。可存在于本发明的 HBV dsRNA 剂的某些实施方案中的修饰包括，
5 例如：(a) 末端修饰，例如，5'末端修饰（磷酸化、缀合、反向连接等）、3'末端修饰（缀合、DNA 核苷酸、反向连接等）；(b) 碱基修饰，例如，用稳定碱基、去稳定碱基或与扩展的配偶体库碱基配对的碱基替代，移除碱基（无碱基核苷酸）或者缀合碱基；(c) 糖修饰（例如，在第 2'位或第 4'位）或糖替代；以及 (d) 骨架修饰，包括修饰或替代磷酸二酯键联。
10 在本发明的 HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和 HBV 有义多核苷酸的某些实施方案中可用的 RNA 化合物的一些具体实例包括但不限于包含经修饰骨架或非天然核苷间键联的 RNA。作为一个非限制性实例，具有经修饰骨架的 RNA 可不在骨架中具有磷原子。在核苷间骨架中不具有磷原子的 RNA 可被称为寡核苷。在本发明的某些实施方案中，经修饰 RNA 在
15 其核苷间骨架中具有磷原子。

应理解，术语“RNA 分子”或“RNA”或“核糖核酸分子”不仅涵盖如在自然界中表达或发现的 RNA 分子，还涵盖包含如本文中所述或本领域已知的一种或更多种核糖核苷酸/核糖核苷类似物或衍生物的 RNA 类似物和衍生物。术语“核糖核苷”和“核糖核苷酸”在本文中可互换使用。RNA 分子可在核碱基结构或在核糖-磷酸骨架结构（例如，如下文中所述的）中进行
20 修饰，并且包含核糖核苷类似物或衍生物的分子必须保留形成双链体的能力。作为一些非限制性实例，RNA 分子还可包含至少一个经修饰核糖核苷，其包括但不限于 2'-O-甲基修饰的核苷、包含 5'硫代磷酸酯基团的核苷、与胆固醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷、锁核苷、无碱基核苷、2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷、2'-氨基修饰的核苷、2'-烷基修饰的核苷、吗啉代核苷、氨基磷酸酯，或包含非天然碱基的核苷，或者其任何组合。在本发明的一些实施方案中，RNA 分子包含至少 1、2、3、4、5、
25 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个或高至 HBV dsRNA 剂分子全长的为经修饰核糖核苷的核糖核苷。对于 RNA 分子
30 中这样的多个经修饰核糖核苷中的每个，修饰不必相同。

本发明的 dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸在一些实施方案中可包含一个或更多个独立选择的经修饰核苷酸和/或一个或更多个独立选择的非磷酸二酯键联。如本文中使用的，提及所选择的要素（例如本发明的经修饰核苷酸、非磷酸二酯键联、靶向剂、dsRNA 剂、

双链体等)时使用的术语“独立选择”意指两个或更多个所选择的要素可以但不必须彼此相同。

本文中使用的“核苷酸碱基”、“核苷酸”或“核碱基”是杂环嘧啶或嘌呤化合物,其是所有核酸的标准成分,并且包括形成核苷酸腺嘌呤(a)、鸟嘌呤(g)、胞嘧啶(c)、胸腺嘧啶(t)和尿嘧啶(u)的碱基。可进一步修饰核碱基以包括但不旨在限制:通用碱基、疏水碱基、混杂碱基(promiscuous base)、尺寸扩大的碱基(size-expanded base)和氟化碱基。术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”在本文中可用于指未经修饰核苷酸、经修饰核苷酸或替代物替代部分。本领域技术人员将认识到,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤和尿嘧啶可被其他部分替代,而基本上不改变包含带有这样的替代部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配对特性。

在一个实施方案中,考虑用于本文中所述的方法和组合物的经修饰RNA是肽核酸(peptide nucleic acid, PNA),其具有形成所需双链体结构的能力并且允许或介导靶RNA通过RISC途径的特异性降解。在本发明的某些实施方案中,HBV RNA干扰剂包括与靶HBV RNA序列相互作用以指导靶HBV RNA的切割的单链RNA。

经修饰RNA骨架可包括例如,硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基膦酸酯和包括3'-亚烷基膦酸酯的其他烷基膦酸酯、以及手性膦酸酯、次膦酸酯、包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯的氨基磷酸酯、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基膦酸酯、硫代烷基磷酸三酯,及具有正常3'-5'键联的硼酸磷酸酯、其2'-5'连接的类似物、以及其中核苷单元的相邻对以3'-5'到5'-3'或2'-5'到5'-2'连接的具有相反极性的那些。还包括多种盐、混合盐和游离酸形式。制备含磷键联的手段在本领域中常规实施,并且这样的方法可用于制备本发明的某些经修饰HBV dsRNA剂、某些经修饰HBV反义多核苷酸和/或某些经修饰HBV有义多核苷酸。

其中不包含磷原子的经修饰RNA骨架具有由短链烷基或环烷基核苷间键联、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键联,或者一个或更多个短链杂原子或杂环核苷间键联形成的骨架。这些包括具有以下的那些:吗啉键联(部分由核苷的糖部分形成);硅氧烷骨架;硫化物、亚砷和砷骨架;甲乙酰(formacetyl)和硫甲乙酰骨架;亚甲基甲乙酰和硫甲乙酰骨架;含有烯烃的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架;以及具有混合N、O、S和CH₂组分部分

的另一些。制备不包含磷原子的经修饰 RNA 骨架的手段是本领域常规实践的，并且这样的方法可用于制备本发明的某些经修饰 HBV dsRNA 剂、某些经修饰 HBV 反义多核苷酸和/或某些经修饰 HBV 有义多核苷酸。

在本发明的某些实施方案中，RNA 模拟物包括在 HBV dsRNA、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸中，例如但不限于：用新的基团替代核苷酸单元的糖和核苷间键联，即骨架。在这样的一些实施方案中，维持碱基单元用于与适当的 HBV 核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物，已显示具有优异的杂交特性的 RNA 模拟物，被称为肽核酸 (PNA)。在 PNA 化合物中，RNA 的糖骨架被包含酰胺的骨架、特别是氨基乙基甘氨酸骨架替代。核碱基被保留并且与骨架酰胺部分的氮杂氮原子直接或间接结合。制备 RNA 模拟物的手段在本领域中常规实施，并且这样的方法可用于制备本发明的某些经修饰 HBV dsRNA 剂。

本发明的一些实施方案包括这样的 RNA，其具有硫代磷酸酯骨架和具有杂原子骨架的寡核苷，并且杂原子骨架特别地是--CH₂--NH--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[被称为亚甲基(甲基亚氨基)或 MMI 骨架]、--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--和--N(CH₃)--CH₂---[其中天然磷酸二酯骨架表示为--O--P--O--CH₂--]。制备具有硫代磷酸酯骨架和具有杂原子骨架的寡核苷的 RNA 的手段在本领域中常规实施，并且这样的方法可用于制备本发明的某些经修饰 HBV dsRNA 剂、某些 HBV 反义多核苷酸和/或某些 HBV 有义多核苷酸。

经修饰 RNA 也可包含一个或更多个经取代的糖部分。本发明的 HBV dsRNA、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸可在第 2' 位包含以下中的一种：OH；F；O--、S--或 N-烷基；O--、S--或 N-烯基；O--、S--或 N-炔基；或者 O-烷基-O-烷基，其中烷基、烯基和炔基可以是经取代或未经取代的 C₁ 至 C₁₀ 烷基或 C₂ 至 C₁₀ 烯基和炔基。一些示例性的合适的修饰包括 O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂ 和 O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂，其中 n 和 m 为 1 至约 10。在另一些实施方案中，dsRNA 在第 2' 位包含以下中的一种：C₁ 至 C₁₀ 低级烷基、经取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或 O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、经取代的甲硅烷基、RNA 切割基团、报道基团、嵌入剂、用于改善 HBV dsRNA 剂的药代动力学特性的基团，或用于改善 HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核

昔酸和/或 HBV 有义多核苷酸的药效学特性的基团, 以及具有类似特性的另一些取代基。在一些实施方案中, 修饰包括 2'-甲氧基乙氧基 (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, 也称为 2'-O-(2-甲氧基乙基)或 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504), 即烷氧基-烷氧基。另一个示例性修饰是如下文实例中所述的 2'-二甲基氨基氧基乙氧基, 即 O(CH₂)₂ON(CH₃)₂ 基团, 也称为 2'-DMAOE; 以及 2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基 (在本领域中也称为 2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或 2'-DMAEOE), 即 2'-O--CH₂-O--CH₂--N(CH₂)₂。制备经修饰 RNA (例如所述的那些) 的手段在本领域中常规实施, 并且这样的方法可用于制备本发明的某些经修饰 HBV dsRNA 剂。

另一些修饰包括 2'-甲氧基 (2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基 (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) 和 2'-氟 (2'-F)。也可在本发明的 HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸的 RNA 上的其他位置进行类似的修饰, 特别是在 3'末端核苷酸上或者 2'-5'连接的 HBV dsRNA、HBV 反义多核苷酸或 HBV 有义多核苷酸中糖的第 3'位, 以及 5'末端核苷酸的第 5'位。HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸也可具有糖模拟物, 例如替代呋喃戊糖的环丁基部分。制备经修饰 RNA (例如所述的那些) 的手段在本领域中常规实施, 并且这样的方法可用于制备本发明的某些经修饰 HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸。

在一些实施方案中, HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸可包含核碱基 (在本领域中通常简称为“碱基”) 修饰或替换。本文中使用的“未经修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤 (A) 和鸟嘌呤 (G) 以及嘧啶碱基胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C) 和尿嘧啶 (U)。经修饰核碱基包括另一些合成和天然核碱基, 例如 5-甲基胞嘧啶 (5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基衍生物和另一些烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基衍生物和另一些烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和 2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶 (假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和另一些 8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代、特别是 5-溴、5-三氟甲基和另一些 5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和 7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和 8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和 7-脱氮腺嘌呤以及 3-脱氮鸟嘌呤和 3-脱氮腺嘌呤。可包括在本发明的 HBV

dsRNA 剂的某些实施方案中的另外的核碱基是本领域已知的，参见例如：Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. Ed. Wiley-VCH, 2008; The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, 第 858 至 859 页, Kroschwitz, J. L., Ed. John Wiley & Sons, 1990, English et al., Angewandte Chemie, 国际版, 1991, 30, 613, Sanghvi, Y S., 第 15 章, dsRNA Research and Applications, 第 289 至 302 页, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC 出版, 1993。制备包含核碱基修饰和/或替换（例如本文中所述的那些）的 dsRNA、HBV 反义链多核苷酸和/或 HBV 有义链多核苷酸的手段在本领域中常规实施，并且这样的方法可用于制备本发明的某些经修饰 HBV dsRNA 剂、HBV 有义多核苷酸和/或 HBV 反义多核苷酸。

本发明的 HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸的某些实施方案包括经修饰以包含一个或更多个锁核酸（locked nucleic acid, LNA）的 RNA。锁核酸是具有经修饰核糖部分的核苷酸，其包含连接 2' 和 4' 碳的额外的桥联。这种结构有效地将核糖“锁”在 3'-endo 结构构象中。在本发明的 HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸中添加锁核酸可提高血清中的稳定性，并降低脱靶效应（Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, O R. et al., (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193）。制备包含锁核酸的 dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸的手段在本领域中常规实施，并且这样的方法可用于制备本发明的某些经修饰 HBV dsRNA 剂。

本发明的 HBV dsRNA 化合物、有义多核苷酸和/或反义多核苷酸的某些实施方案包括至少一个经修饰核苷酸，其中所述至少一个经修饰核苷酸包含：2'-O-甲基核苷酸、2'-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'3'-seco 核苷酸模拟物、锁核苷酸、2'-F-阿拉伯糖核苷酸、2'-甲氧基乙基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸，及 3'-OMe 核苷酸、包含 5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸，或者与胆固醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、氨基磷酸酯，或包含非天然碱基的核苷酸。在一些实施方案中，HBV dsRNA 化合物在反义链（本文中也称为引导链）的 5' 末端包含 E-乙烯基膦酸酯核苷酸。

本发明的 HBV dsRNA 化合物、有义多核苷酸的 3' 和 5' 末端以及/或反义多核苷酸的 3' 末端的某些实施方案包括至少一个经修饰核苷酸，其中

所述至少一个经修饰核苷酸包含：无碱基核苷酸、核糖醇、反向核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向 2'-OMe 核苷酸、反向 2'-脱氧核苷酸。本领域技术人员已知，在寡核苷酸的末端包含无碱基或反向无碱基核苷酸增强了稳定性（Czuderna et al. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(11):2705-2716. doi:10.1093/nar/gkg393）。

本发明的 HBV dsRNA 化合物、反义多核苷酸的某些实施方案包括至少一个经修饰核苷酸，其中所述至少一个经修饰核苷酸包含解锁核酸核苷酸（UNA）或/和二醇核酸核苷酸（GNA）。本领域技术人员已知，UNA 和 GNA 是热去稳定化学修饰，可显著改善 siRNA 化合物的脱靶特性（Janas, et al., *Nat Commun.* 2018;9(1):723. doi:10.1038/s41467-018-02989-4; Laursen et al., *Mol BioSyst.* 2010;6:862-70）。

可包含在本发明的 HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸的某些实施方案的 RNA 中的另一种修饰包括分别将增强 HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸的一种或更多种特征的一个或更多个配体、部分或缀合物与 RNA 化学连接。可增强的特征的一些非限制性实例是：HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸活性；细胞分布；HBV dsRNA 剂的递送；HBV dsRNA 剂的药代动力学特性；和 HBV dsRNA 剂的细胞摄取。在本发明的一些实施方案中，HBV dsRNA 剂包含一个或更多个靶向基团或连接基团，其在本发明的 HBV dsRNA 剂的某些实施方案中与有义链缀合。靶向基团的一个非限制性实例是包含 N-乙酰基-半乳糖胺（GalNAc）的化合物。术语“靶向基团”、“靶向剂”、“连接剂”、“靶向化合物”和“靶向配体”在本文中可互换使用。在本发明的某些实施方案中，HBV dsRNA 剂包含与有义链的 5' 末端缀合的靶向化合物。在本发明的某些实施方案中，HBV dsRNA 剂包含与有义链的 3' 末端缀合的靶向化合物。在本发明的一些实施方案中，HBV dsRNA 剂包含含有 GalNAc 的靶向基团。在本发明的某些实施方案中，HBV dsRNA 剂不包含与有义链的 3' 末端和 5' 末端之一或二者缀合的靶向化合物。在本发明的某些实施方案中，HBV dsRNA 剂不包含与有义链的 5' 末端和 3' 末端之一或二者缀合的包含 GalNAc 的靶向化合物。

另外的靶向剂和连接剂是本领域公知的，例如，可用于本发明的某些实施方案的靶向剂和连接剂包括但不限于脂质部分，例如：胆固醇部分（Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556）；胆酸（Manoharan et al., *Bior. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060）；硫醚，例

如 beryl-S-三苯甲基硫醇 (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770); 硫胆固醇 (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538); 脂肪族链, 例如, 十二烷二醇或十一烷基残基 (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, 例如, 二-十六烷基-rac-甘油或三乙基铵 1,2-二-O-十六烷基-rac-甘油-3-磷酸酯 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783); 多胺或聚乙二醇链 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973); 或金刚烷乙酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654); 棕榈基部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237); 或者十八胺或己基氨基-羰基氧基胆固醇部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937)。

包含 HBV dsRNA 剂、HBV 反义多核苷酸和/或 HBV 有义多核苷酸的组合物的某些实施方案可包括改变 HBV dsRNA 剂的分布、靶向等的配体。在包含本发明的 HBV dsRNA 剂的组合物的一些实施方案中, 配体提高对所选靶标 (例如, 分子、细胞或细胞类型、区室例如细胞或器官区室、组织、器官或身体的区域) 的亲和力, 例如与不存在这样的配体的种类相比。可用于本发明的组合物和/或方法的配体可以是天然存在的物质, 例如: 蛋白质 (例如, 人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA)、低密度脂蛋白 (LDL) 或球蛋白); 碳水化合物 (例如, 右旋糖酐、短梗霉聚糖 (pullulan)、甲壳素、壳聚糖、菊粉、环糊精或透明质酸); 或脂质。配体也可以是重组分子或合成分子, 例如合成聚合物, 例如合成聚氨基酸或聚胺。聚氨基酸的一些实例是聚赖氨酸 (polylysine, PLL)、聚 L-天冬氨酸、聚 L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙醇酸)共聚物、二乙烯醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物 (HMPA)、聚乙二醇 (PEG)、聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪。聚胺的实例包括: 聚乙烯亚胺、聚赖氨酸 (PLL)、精胺、亚精胺、聚胺、假肽-聚胺、肽模拟物聚胺、树状体聚胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、聚胺的季盐或 α 螺旋肽。

本发明的组合物和/或方法中包含的配体可包含靶向基团, 其的一些非限制性实例是细胞或组织靶向剂, 例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质, 例如, 与特定细胞类型 (例如肾细胞或肝细胞) 结合的抗体。靶向基团可

以是促甲状腺素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白 A、黏蛋白碳水化合物化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双磷酸酯、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、甾体、胆汁酸、叶酸、维生素 B12、维生素 A、生物素，或者 RGD 肽或 RGD 肽模拟物。

配体的另一些实例包括染料、嵌入剂（例如，吡啶）、交联剂（例如，补骨脂素、丝裂霉素 C）、卟啉（TPPC4、德卟啉（texaphyrin）、Sapphyrin）、多环芳烃（例如，吩嗪、二氢吩嗪）、人工核酸内切酶（例如，EDTA）、亲脂性分子，例如胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-茛丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶基氧己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪）和肽缀合物（例如，触足肽（antennapedia peptide）、Tat 肽）、烷化剂、磷酸盐/酯、氨基、巯基、PEG（例如，PEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、聚氨基、烷基、经取代的烷基、放射性标记的标志物、酶、半抗原（例如，生物素）、转运/吸收促进剂（例如，阿司匹林、维生素 E、叶酸）、合成核糖核酸酶（例如，咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吡啶-咪唑缀合物、四氮杂大环的 Eu³⁺复合物）、二硝基苯基、HRP 或 AP。

本发明的组合物和/或方法中包含的配体可以是蛋白质（例如糖蛋白），或肽（例如对共配体具有特定亲和力的分子），或抗体（例如与特定细胞类型（例如但不限于肝细胞）结合的抗体）。可用于本发明的组合物和/或方法的一个实施方案的配体可以是激素或激素受体。可用于本发明的组合物和/或方法的一个实施方案的配体可以是脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖，或多价岩藻糖。可用于本发明的组合物和/或方法的一个实施方案的配体可以是这样的物质，其可例如通过破坏细胞的细胞骨架，例如通过破坏细胞的微管、微丝和/或中间丝来提高细胞对 HBV dsRNA 剂的摄取。这种类型的物质的一些非限制性实例是：紫杉醇、长春新碱、长春碱、细胞松弛素、诺考达唑（nocodazole）、japlakinolide、拉春库林 A（latrunculin A）、鬼笔环肽（phalloidin）、swinholid A、茛满新碱（indanocine）和 myoservin。

在一些实施方案中，与本发明的 HBV dsRNA 剂连接的配体作为药代动力学（PK）调节剂发挥作用。可用于本发明的组合物和/或方法的 PK 调节

剂的实例包括但不限于：亲脂类（lipophile）、胆汁酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素、胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰基甘油酯、磷脂、鞘脂、萘普生（naproxen）、布洛芬（ibuprofen）、维生素 E、生物素、结合血清蛋白的适配体，等等。还已知包含多个硫代磷酸酯键联的寡核苷酸与血清蛋白结合，因此在本发明的组合物和/或方法中也可使用在骨架中包含多个硫代磷酸酯键联的短寡核苷酸，例如约 5 个碱基、10 个碱基、15 个碱基或 20 个碱基的寡核苷酸作为配体。

10 *HBV dsRNA 剂组合物*

在本发明的一些实施方案中，HBV dsRNA 剂在组合物中。本发明的组合物可包含一种或更多种 HBV dsRNA 剂和任意的可药用载体、递送剂、靶向剂、可检测标记等中的一种或更多种。根据本发明的方法的一些实施方案，可用的靶向剂的一个非限制性实例是将本发明的 HBV dsRNA 剂定向至和/或定向入待处理细胞中的药剂。靶向剂的选择将取决于如下这样的要素：HBV 相关疾病或病症的性质，以及所靶向的细胞类型。在一个非限制性实例中，在本发明的一些实施方案中，可期望将 HBV dsRNA 剂靶向至和/或靶向进入肝细胞中。应理解，在本发明的方法的一些实施方案中，治疗剂包含仅具有递送剂（例如包含 N-乙酰半乳糖胺（GalNAc）的递送剂）的 HBV dsRNA 剂，而没有任何另外的连接元件。例如，在本发明的一些方面中，HBV dsRNA 剂可与包含 GalNAc 的递送化合物连接，并且被包含在包含可药用载体的组合物中，并且在没有与 HBV dsRNA 剂连接的任何可检测标记或靶向剂等的环境下被施用于细胞或对象。

在本发明的 HBV dsRNA 剂与以下一种或更多种一起施用和/或与以下一种或更多种连接的情况下：递送剂、靶向剂、标记剂等，本领域技术人员将意识到并且能够选择和使用用于本发明方法的合适试剂。标记剂可用于本发明的某些方法中以确定细胞和组织中 HBV dsRNA 剂的位置，并且可用于确定已在本发明的方法中施用的包含 HBV dsRNA 剂的治疗组合物的细胞、组织或器官位置。用于连接和使用标记剂例如酶标记、染料、放射性标记等的方法是本领域中公知的。应理解，在本发明的组合物和方

30 法的一些实施方案中，标记剂与 HBV dsRNA 剂中包含的有义多核苷酸和反义多核苷酸之一或二者连接。

HBV dsRNA 剂的递送

本发明的方法的某些实施方案包括将 HBV dsRNA 剂递送至细胞中。本文中使用的术语“递送”意指促进或影响细胞摄取或吸收。对 HBV dsRNA 剂的吸收或摄取可通过独立的扩散或活性细胞过程，或者通过使用可与本发明的 HBV dsRNA 剂缔合的递送剂、靶向剂等而发生。适用于
5 本发明方法的递送手段包括但不限于：体内递送，其中将 HBV dsRNA 剂注射到组织部位或全身施用。在本发明的一些实施方案中，HBV dsRNA 剂与递送剂连接。

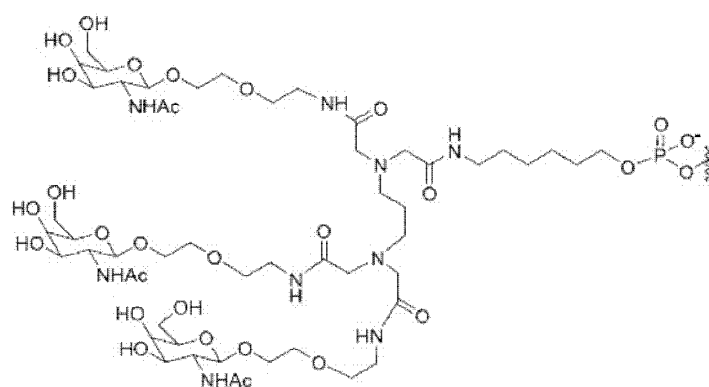
可用于将 HBV dsRNA 剂递送至细胞、组织和/或对象的方法的一些非
10 限制性实例包括：HBV dsRNA-GalNAc 缀合物、SAMI RNA 技术、基于 LNP 的递送方法和裸 RNA 递送。这些和另一些递送方法已在本领域中成功用于递送治疗性 RNAi 剂以用于治疗多种疾病和病症，例如但不限于：肝病、急性间歇性卟啉病（acute intermittent porphyria, AIP）、血友病、肺纤维化等。多种递送手段的细节在以下出版物中找到，例如：Nikam, R.R.
15 & K. R. Gore (2018) *Nucleic Acid Ther*, 28 (4), 209-224 Aug 2018; Springer A.D. & S.F. Dowdy (2018) *Nucleic Acid Ther*. Jun 1; 28(3): 109–118; Lee, K. et al., (2018) *Arch Pharm Res*, 41(9), 867-874; 和 Nair, J.K. et al., (2014) *J. Am. Chem. Soc.* 136:16958-16961，其各自的内容通过引用并入本文。

本发明的一些实施方案包括使用脂质纳米粒 (lipid nanoparticle, LNP)
20 将本发明的 HBV dsRNA 剂递送至细胞、组织和/或对象。LNP 通常用于体内递送 HBV dsRNA 剂，包括治疗性 HBV dsRNA 剂。使用 LNP 或另一些递送剂的一个益处是当使用 LNP 或另一些递送剂将其递送至对象时，HBV RNA 剂的稳定性提高。在本发明的一些实施方案中，LNP 包括负载有本发明的一种或更多种 HBV RNAi 分子的阳离子 LNP。将包含 HBV
25 RNAi 分子的 LNP 施用于对象，LNP 及其所连接的 HBV RNAi 分子通过胞吞作用被细胞摄取，它们的存在导致介导 RNAi 的 RNAi 触发分子的释放。

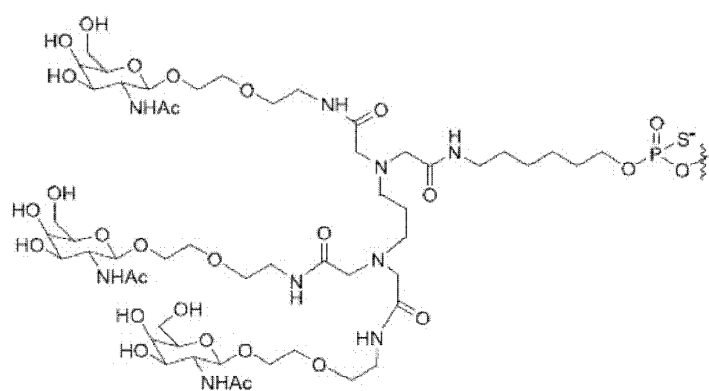
可用于本发明的实施方案中以将本发明的 HBV dsRNA 剂递送至细胞、组织和/或对象的递送剂的另一个非限制性实例是，包含与本发明的
30 HBV dsRNA 剂连接的 GalNAc 并将 HBV dsRNA 剂递送至细胞、组织和/或对象的药剂。在 PCT 申请 WO2020191183A1 中公开了可用于本发明的方法和组合物的某些实施方案中的某些另外的包含 GalNAc 的递送剂的一些实例。可用于本发明的组合物和方法以将 HBV dsRNA 剂递送至细胞的

GalNAc 靶向配体的一个非限制性实例是靶向配体簇。本文中呈现的靶向配体簇的一些实例被称为：具有磷酸二酯键联的 GalNAc 配体（GLO）和具有硫代磷酸酯键联的 GalNAc 配体（GLS）。术语“GLX-0”可在本文中用于表示所连接的包含 GalNAc 的化合物，其是以下化合物中的任一种：

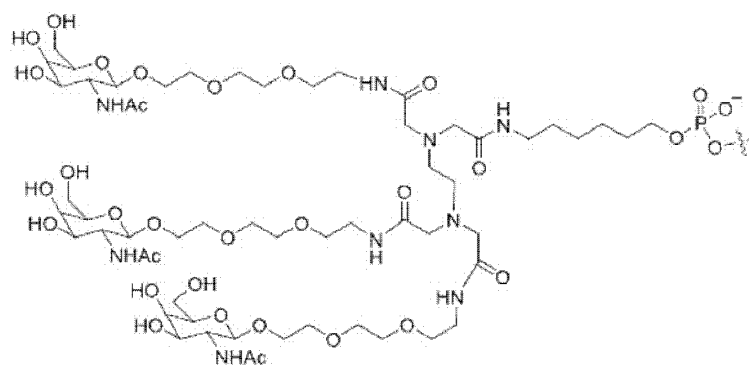
- 5 GLS-1、GLS-2、GLS-3、GLS-4、GLS-5、GLS-6、GLS-7、GLS-8、GLS-9、GLS-10、GLS-11、GLS-12、GLS-13、GLS-14、GLS-15、GLS-16、GLO-1、GLO-2、GLO-3、GLO-4、GLO-5、GLO-6、GLO-7、GLO-8、GLO-9、GLO-10、GLO-11、GLO-12、GLO-13、GLO-14、GLO-15 和 GLO-16，其各自的结构在下文示出，其中下文中 GalNAc 靶向配体与本发明的 RNAi
- 10 剂的连接位置在各自的最右侧（用“{”示出）。应理解，本发明的任何 RNAi 和 dsRNA 分子可与以下连接：GLS-1、GLS-2、GLS-3、GLS-4、GLS-5、GLS-6、GLS-7、GLS-8、GLS-9、GLS-10、GLS-11、GLS-12、GLS-13、GLS-14、GLS-15、GLS-16、GLO-1、GLO-2、GLO-3、GLO-4、GLO-5、GLO-6、GLO-7、GLO-8、GLO-9、GLO-10、GLO-11、GLO-12、GLO-13、
- 15 GLO-14、GLO-15 和 GLO-16。GLO-1 至 GLO-16 以及 GLS-1 至 GLS-16 结构如下所示。



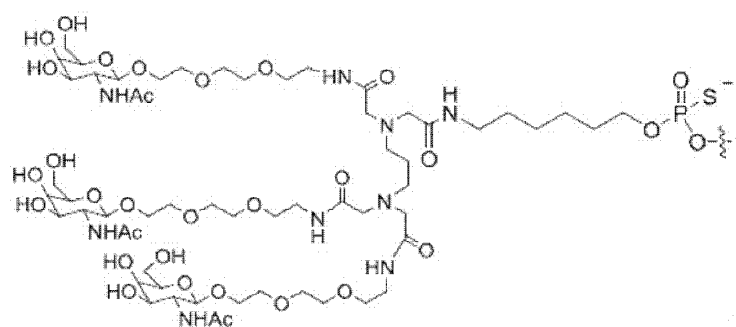
GLO-1



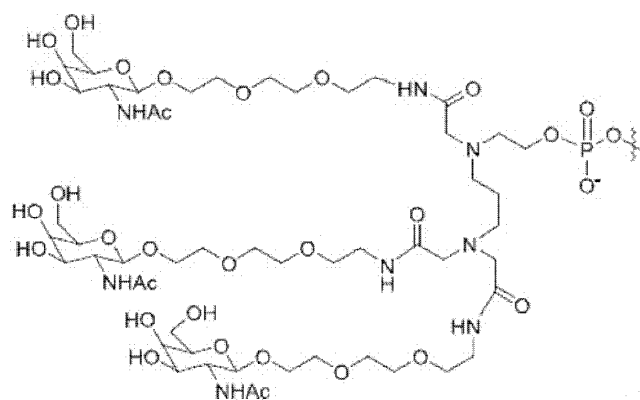
GLS-1



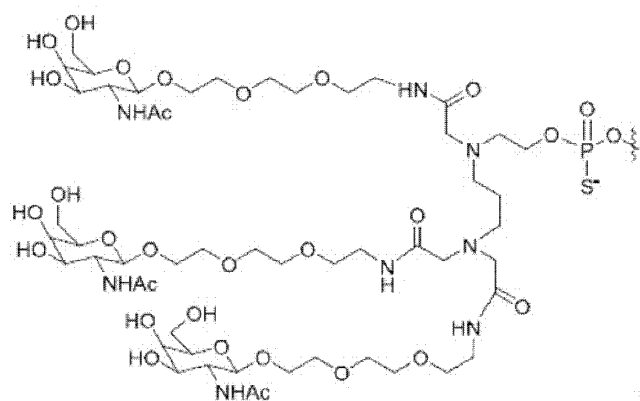
GLO-2



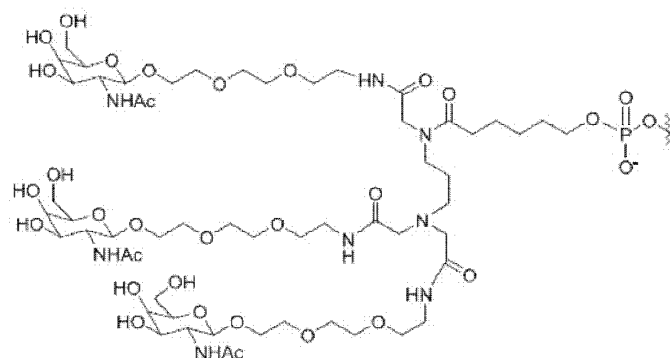
GLS-2



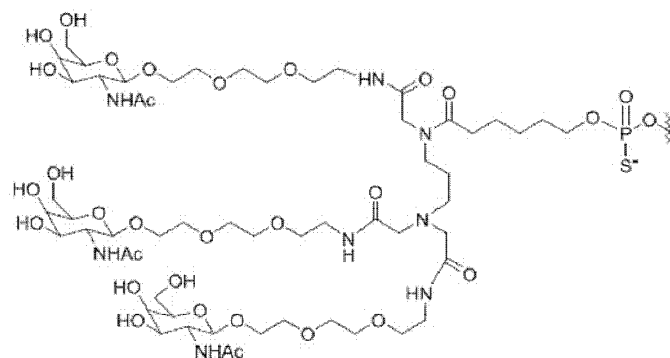
GLO-3



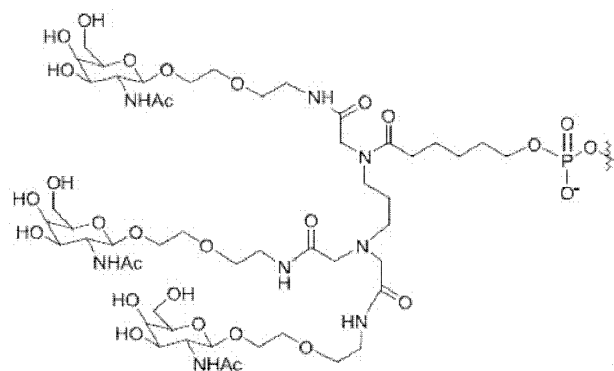
GLS-3



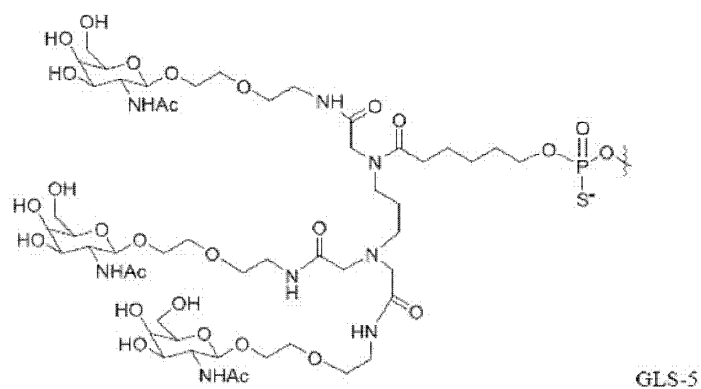
GLO-4



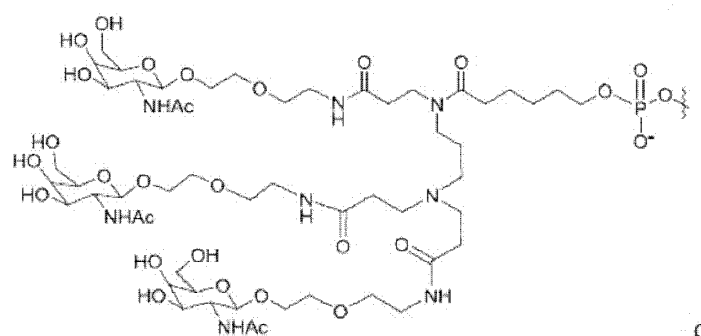
GLS-4



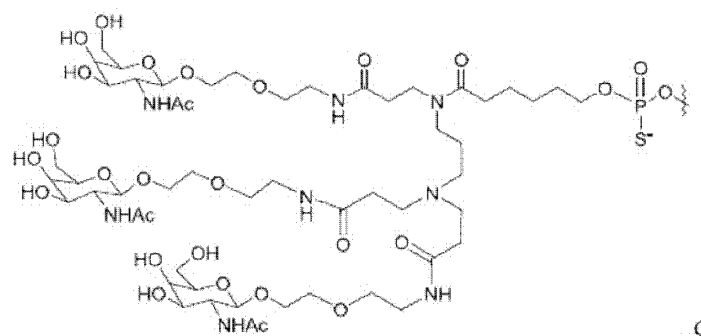
GLO-5



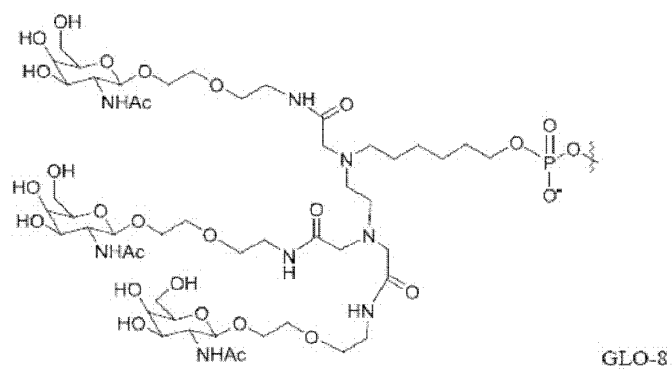
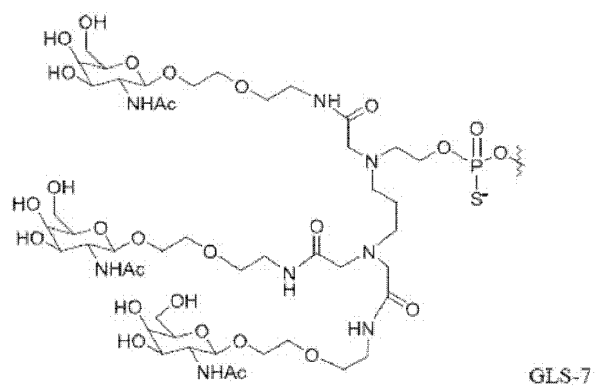
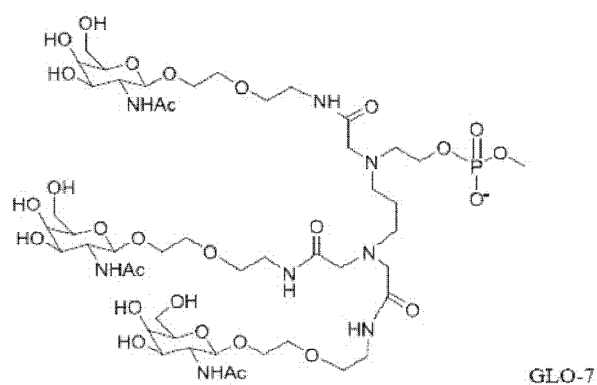
GLS-5

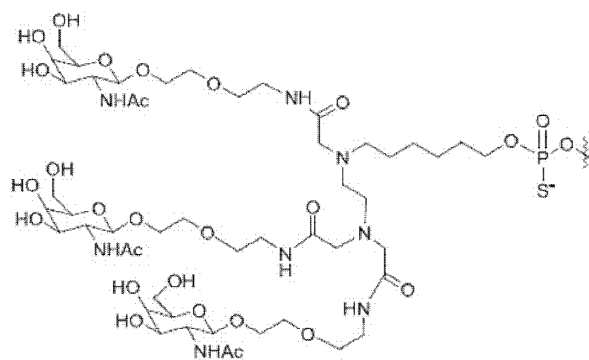


GLO-6

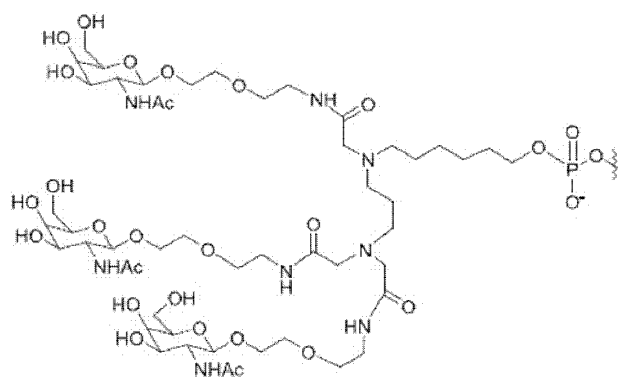


GLS-6

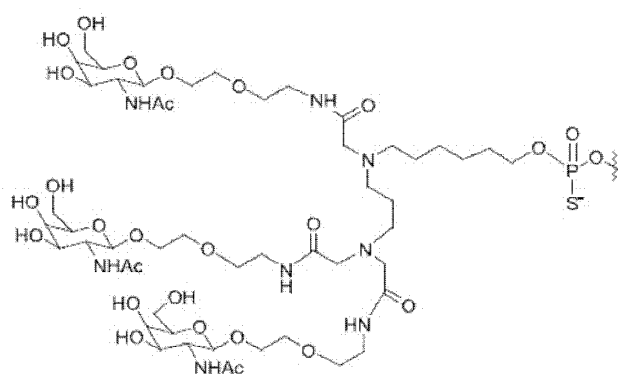




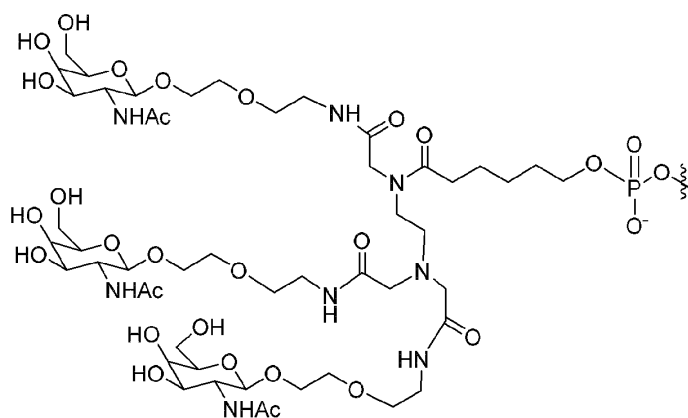
GLS-8



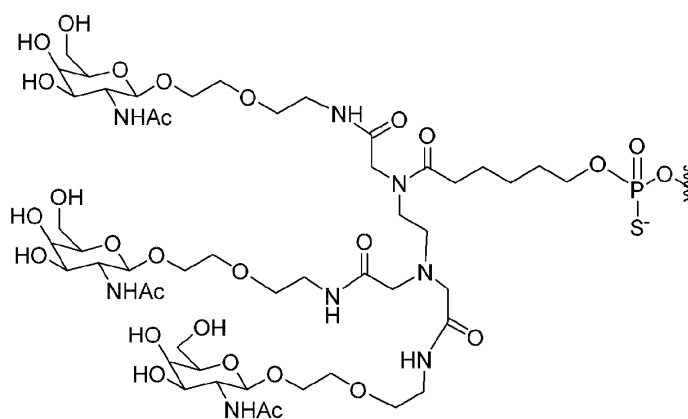
GLO-9



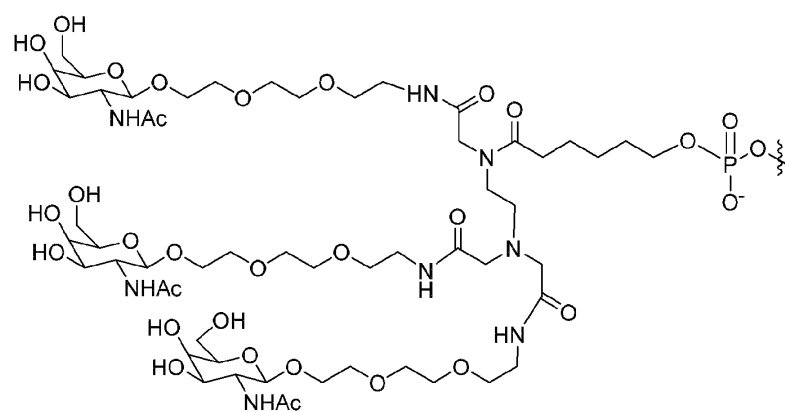
GLS-9



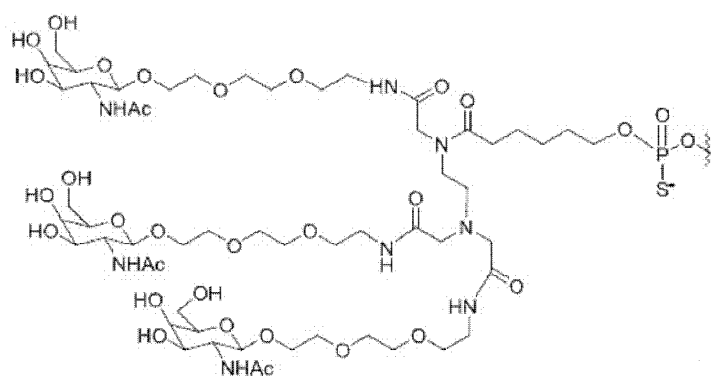
GLO-10



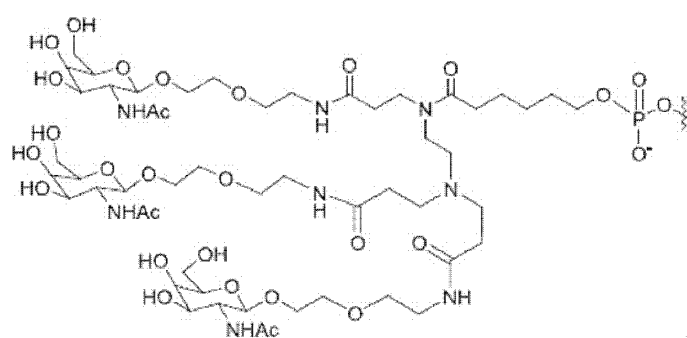
GLS-10



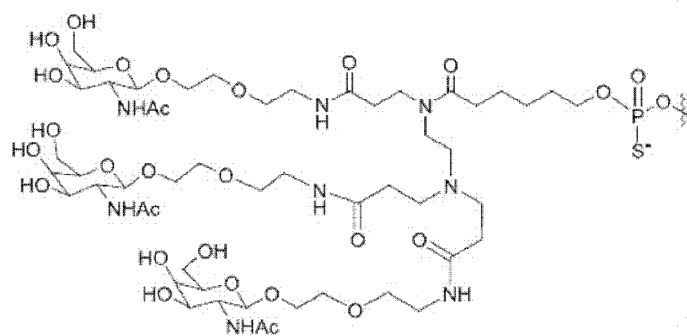
GLO-11



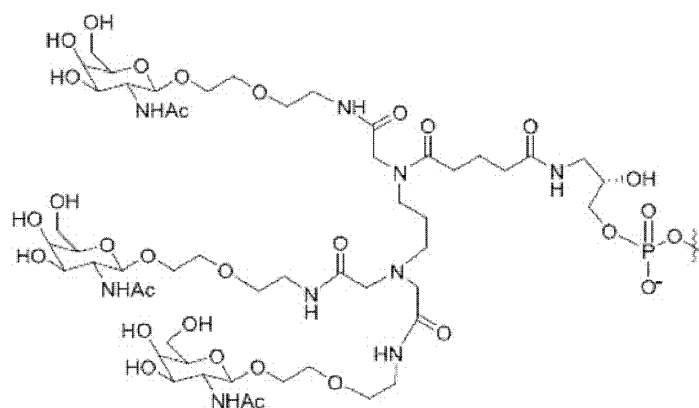
GLS-11



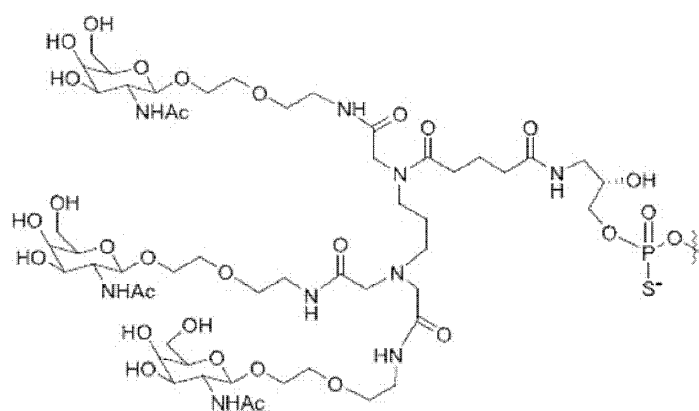
GLO-12



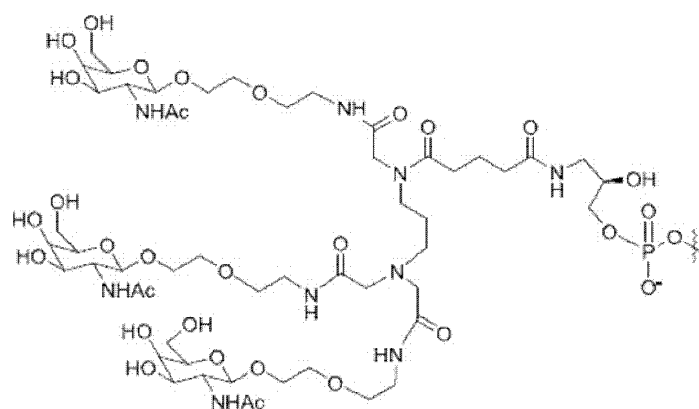
GLS-12



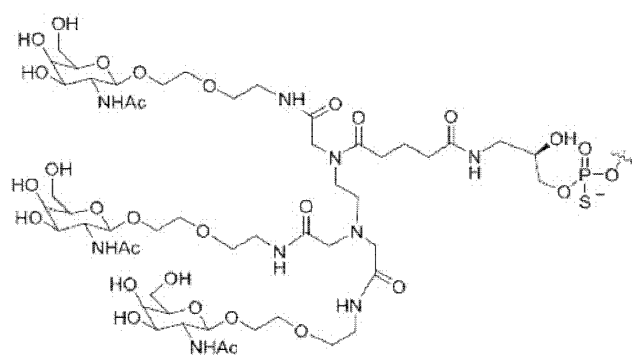
GLO-13



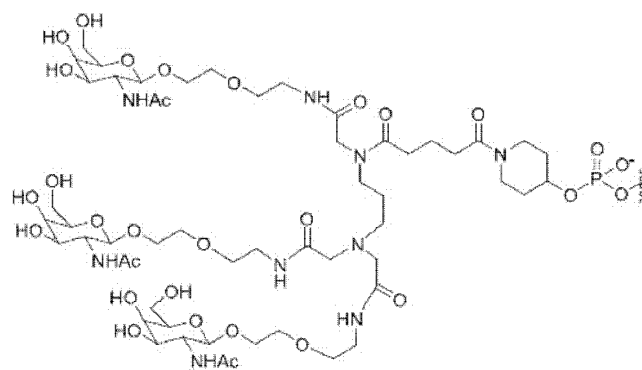
GLS-13



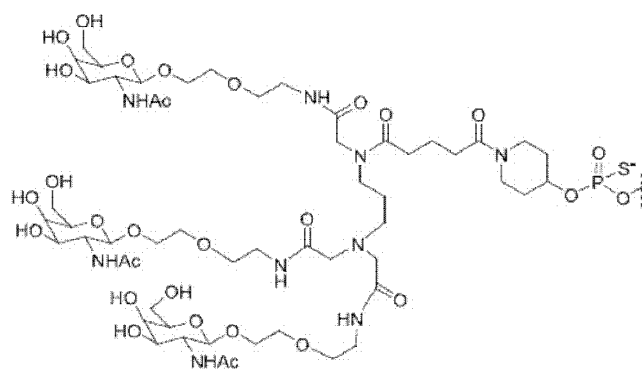
GLO-14



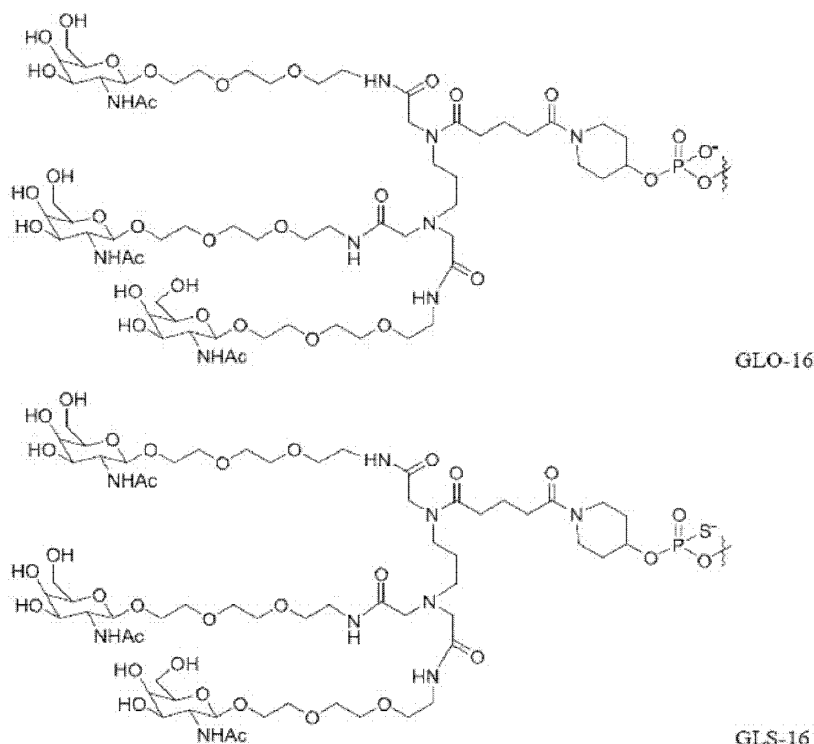
GLS-14



GLO-15



GLS-15



在本发明的一些实施方案中，体内递送也可通过 β -葡聚糖递送系统，例如在美国专利 No. 5,032,401 和 5,607,677 以及美国公开 No. 2005/0281781 中描述的那些，其在此通过引用整体并入。也可使用本领域

5 已知的方法例如电穿孔和脂质转染将 HBV RNAi 剂体外引入到细胞中。在本发明的方法的某些实施方案中，HBV dsRNA 在没有靶向剂的情况下被递送。这些 RNA 可作为“裸”RNA 分子递送。作为一个非限制性实例，本

10 发明的 HBV dsRNA 可在包含 RNAi 剂但不包含靶向剂（例如 GalNAc 靶向化合物）的药物组合物中施用于对象以治疗对象中的 HBV 相关疾病或病症，例如肝病。

除本文中所述的某些递送手段之外，应理解，RNAi 递送手段（例如但不限于本文中所述的那些和本领域中使用的那些）可与本文中所述的 HBV RNAi 剂和治疗方法的实施方案联合使用。

本发明的 HBV dsRNA 剂可以以有效降低细胞和/或对象中 HBV 多肽

15 的水平和活性的量和方式施用于对象。在本发明的方法的一些实施方案中，将一种或更多种 HBV dsRNA 剂施用于细胞和/或对象以治疗与 HBV 表达和活性相关的疾病或病症。在一些实施方案中，本发明的方法包括向需要这样的治疗的对象施用一种或更多种独立选择的 HBV dsRNA 剂以降

低对象中与 HBV 表达相关的疾病或病症。可施用本发明的 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂以降低在体外、离体和体内细胞中的一种更多种中 HBV 表达和/或活性。

在本发明的一些实施方案中，通过将 HBV dsRNA 剂递送（例如引入）
5 到细胞中来降低细胞中 HBV 多肽的水平并由此降低其活性，并且因此降低病毒的功能。靶向剂和方法可用于帮助将 HBV dsRNA 剂递送至特定细胞类型、细胞亚型、器官、对象中的空间区域，和/或细胞中的亚细胞区域。HBV dsRNA 剂可在本发明的某些方法中单独施用或与一种或更多种另外的 HBV dsRNA 剂组合施用。在一些实施方案中，将 2、3、4 种或更多种独立选择的 HBV dsRNA 剂施用于对象。在本发明的组合物和方法的一些实施方案中，包含两种、三种或更多种独立选择的治疗分子。在本发明的方法的一些实施方案中，将靶向 HBV mRNA 的一个、两个或更多个不同位置/区域的两种、三种、四种或更多种 HBV siRNA 施用于细胞和/或对象。在这样的情况下，本发明的组合物可包含两种、三种、四种或更多种独立选择的 HBV siRNA，其各自均与独立选择的递送化合物缀合。
10 15 本发明的药剂和/或组合物的某些实施方案包括二价 siRNA 化合物（在本文中也称为连接的 siRNA 化合物），其包含均与同一递送化合物缀合的两个独立选择的 HBV siRNA。

在本发明的某些实施方案中，将 HBV dsRNA 剂与用于治疗 HBV 相关疾病或病症的一种或更多种另外的治疗方案联合施用于对象以治疗 HBV 相关疾病或病症。这样的组合可产生协同作用。另外的治疗方案的一些非限制性实例是：施用一种或更多种本发明的 HBV 反义多核苷酸、施用非 HBV dsRNA 治疗剂、以及行为改变。可在以下中的一个或多个时间施用另外的治疗方案：在施用本发明的 HBV dsRNA 剂之前、与
20 25 其同时和在其之后。应理解，本文中使用的与其同时为在零时刻的五分钟内、在零时刻的 10 分钟内、在零时刻的 30 分钟内、在零时刻的 45 分钟内和在零时刻的 60 分钟内，其中“零时刻”是将本发明的 HBV dsRNA 剂施用于对象的时间。

在一个非限制性实例中，在本发明的一些实施方案中，施用于对象的另外的治疗方案包括以下中的一种或更多种：一种或更多种 HBV 反义多核苷酸、一种或更多种另外的 HBV dsRNA 治疗剂、一种或更多种非 HBV dsRNA 和/或 siRNA 治疗剂，以及行为改变。非 HBV dsRNA 治疗方案的一个非限制性实例包括向对象施用以下中的一种或更多种：抗病毒剂；抗
30

病毒核苷或核苷酸类似物 (NUC)，其非限制性实例是：富马酸替诺福韦酯 (TDF)、替诺福韦艾拉酚胺、拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦 (ETV) 和替比夫定；病毒聚合酶抑制剂；逆转录酶抑制剂；免疫刺激剂；治疗性疫苗；病毒进入抑制剂；抑制 HBsAg 分泌或释放的寡核苷酸；衣壳抑制剂；共价闭合环状 (ccc) HBV DNA 抑制剂，以及其他治疗剂和/或方法例如但不限于：肝移植和化学治疗。可用于本发明的方法的免疫刺激剂的一些非限制性实例是：聚乙二醇化干扰素 $\alpha 2a$ (PEG-IFN- $\alpha 2a$)、干扰素 $\alpha 2b$ 、重组人白介素-7 和 Toll-样受体 7 (TLR7) 激动剂以及检查点抑制剂 (例如，PD1 抑制剂)。

行为改变的一些非限制性实例是：饮食方案、作息方案、隔离方案和咨询。这些和其他治疗剂和行为改变在本领域中是已知的并且用于治疗对象中的 HBV 相关疾病或病症，并且可与一种或更多种本发明的 HBV dsRNA 剂的施用组合来施用于对象以治疗 HBV 相关疾病或病症。施用于细胞或对象以治疗 HBV 相关疾病或病症的本发明的 HBV dsRNA 剂可与一种或更多种其他治疗剂或活性以协同方式起作用，并提高一种或更多种治疗剂或活性的有效性以及/或者提高 HBV dsRNA 剂在治疗 HBV 相关疾病或病症中的有效性。

包括施用 HBV dsRNA 剂的本发明治疗方法可在感染 HBV 的无症状对象中和/或当存在 HBV 相关疾病或病症的一种或更多种症状时使用，包括在疾病或病症的早期阶段、中期阶段和晚期阶段以及任意这些阶段之前和之后的所有时间。本发明的方法还可用于治疗以下对象：其之前已经用一种或更多种其他治疗剂和/或治疗活性来治疗 HBV 相关疾病或病症，其中所述其他治疗剂和/或治疗活性在治疗对象中的 HBV 相关疾病或病症中不成功、具有最小的成功和/或不再成功。

载体编码的 dsRNA

在本发明的某些实施方案中，可使用载体将 HBV dsRNA 剂递送至细胞中。HBV dsRNA 剂转录单元可包含在 DNA 或 RNA 载体中。用于将序列递送至细胞和/或对象中的这样的编码转基因的载体的制备和使用是本领域公知的。载体可用于本发明的方法中，其导致 HBV dsRNA 瞬时表达例如至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个小时、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多周。瞬时表达的长度可使用基于要素的常规方法来确定，所述要素例如但不限于所选的特定载体构建体以及靶细胞和/

或组织。这样的转基因可作为线性构建体、环状质粒或病毒载体引入，其可以是整合或非整合载体。还可构建转基因以允许其作为染色体外质粒遗传（Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292）。

可从表达载体上的启动子转录 HBV dsRNA 剂的单独的一条链或多条链。在待表达两条单独的链以产生例如 dsRNA 的情况下，可使用手段例如转染或感染将两种单独的表达载体共引入至细胞。在某些实施方案中，本发明的 HBV dsRNA 剂的每条单独的链均可由二者包含在同一表达载体上的启动子转录。在本发明的某些实施方案中，HBV dsRNA 剂表达为通过接头多核苷酸序列连接的反向重复多核苷酸，使得 HBV dsRNA 剂具有茎和环结构。

RNA 表达载体的一些非限制性实例是 DNA 质粒或病毒载体。可用于本发明的一些实施方案的表达载体可与真核细胞相容。真核细胞表达载体在本领域中常规使用并且可从许多商业来源获得。HBV dsRNA 表达载体的递送可以是全身性的，例如通过静脉内或肌肉内施用，通过施用至从对象外植的靶细胞随后再引入到对象中，或者通过允许引入到期望的靶细胞的任何其他手段。

可包括在方法实施方案中的病毒载体系统包括但不限于：(a) 腺病毒载体；(b) 逆转录病毒载体，包括但不限于慢病毒载体、莫洛尼鼠白血病病毒等；(c) 腺相关病毒载体；(d) 单纯疱疹病毒载体；(e) SV 40 载体；(f) 多瘤病毒载体；(g) 乳头瘤病毒载体；(h) 小核糖核酸病毒载体；(i) 痘病毒载体，例如天花，例如痘苗病毒载体或禽痘 (avipox)，例如金丝雀痘 (canary pox) 或鸡痘 (fowl pox)；以及 (j) 辅助依赖性或缺乏 (gutless) 腺病毒。用于重组表达 HBV dsRNA 剂的构建体可包含调节元件，例如启动子、增强子等，其可被选择以提供组成型或调节/诱导型表达。启动子和增强子等的使用以及病毒载体系统在本领域中是常规的并且可与本文所述的方法和组合物联合使用。

本发明的某些实施方案包括用于将 HBV dsRNA 剂递送至细胞中的病毒载体的用途。许多基于腺病毒的递送系统在本领域中常规用于递送至例如肺、肝、中枢神经系统、内皮细胞和肌肉。可用于本发明的方法的病毒载体的一些非限制性实例是：AAV 载体、痘病毒例如痘苗病毒、改良型病毒安卡拉株 (Modified Virus Ankara, MVA)、NYVAC、禽痘例如鸡痘或金丝雀痘。

本发明的某些实施方案包括使用载体将 HBV dsRNA 剂递送至细胞的

方法，并且这样的载体可在可药用载体中，其可以但不必须包含其中嵌入了基因递送载剂的缓慢释放基质。在一些实施方案中，用于递送 HBV dsRNA 的载体可由重组细胞产生，并且本发明的药物组合物可包含一种或更多种产生 HBV dsRNA 递送系统的细胞。

5

包含 HBV dsRNA 的药物组合物

本发明的某些实施方案包括包含 HBV dsRNA 剂和可药用载体的药物组合物的用途。包含 HBV dsRNA 剂的药物组合物可用于本发明的方法中以降低细胞中的 HBV 基因表达和 HBV 活性，并且可用于治疗 HBV 相关疾病或病症。这样的药物组合物可基于递送方式进行配制。针对递送方式的制剂的一些非限制性实例是：配制成用于皮下递送的组合物、配制成用于通过肠胃外递送来全身施用的组合物、配制成用于静脉内（IV）递送的组合物、配制成用于鞘内递送的组合物、配制成用于直接递送至脑的组合物等。可使用一种或更多种手段进行施用本发明的药物组合物以将 HBV dsRNA 剂递送至细胞中，所述手段例如：表面（例如，通过经皮贴剂）；肺部，例如，通过吸入或吹入散剂或气溶胶剂，包括通过雾化器；气管内、鼻内、表皮和经皮；经口或肠胃外。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉注射或输注；皮下，例如，通过植入装置；或颅内，例如，通过实质内（intraparenchymal）、鞘内或心室内（intraventricular）施用。也可将 HBV dsRNA 剂直接递送至靶组织，例如直接递送至肝、直接递送至肾等。应理解“递送 HBV dsRNA 剂”到细胞中涵盖分别直接递送 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂，以及由被递送到细胞中的编码载体在细胞中表达 HBV dsRNA 剂，或者通过使 HBV dsRNA 出现在细胞中的任何合适的手段。用于递送抑制性 RNA 的手段以及制剂的制备和使用是本领域公知且常规使用的。

本文中使用的“药物组合物”包含药理学有效量的本发明的 HBV dsRNA 剂和可药用载体。术语“可药用载体”是指用于施用治疗剂的载体。这样的载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其组合。该术语特别地不包括细胞培养基。对于经口施用的药物，可药用载体包括但不限于可药用赋形剂，例如惰性稀释剂、崩解剂、结合剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、着色剂和防腐剂。合适的惰性稀释剂包括碳酸钠和碳酸钙、磷酸钠和磷酸钙以及乳糖，而玉米淀粉和藻酸是合适的崩解剂。结合剂可包括淀粉和明胶，而润滑剂如果存在的话通常是硬脂酸镁、硬脂

酸或滑石。如果期望，片剂可用材料例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯来包被，以延迟在胃肠道中的吸收。药物制剂中包含的试剂在下文中进一步描述。

本文中使用的术语例如：“药理学有效量”、“治疗有效量”和“有效量”是指本发明的 HBV dsRNA 剂产生预期的药理学、治疗性或预防性结果的量。例如，如果认为在与疾病或病症相关的可测量参数降低至少 10% 时给定的临床治疗是有效的，则用于治疗该疾病或病症的药物的治疗有效量是必须使该参数降低至少 10% 的量。例如，治疗有效量的 HBV dsRNA 剂可将 HBV 多肽水平降低至少 10%。

有效量

在一些方面中，本发明的方法包括使细胞与有效量的 HBV dsRNA 剂接触以降低所接触细胞中的 HBV 基因表达。本发明的方法的某些实施方案包括以在对象中有效降低 HBV 基因表达并治疗 HBV 相关疾病或病症的量向对象施用 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂。在降低 HBV 的表达和/或用于治疗 HBV 相关疾病或病症方面使用的“有效量”是实现期望的生物学效应所必需或足够的量。例如，治疗 HBV 相关疾病或病症的 HBV dsRNA 剂的有效量可以是实现以下效果所必需的量：(i) 减缓或停止疾病或病症进展；或者 (ii) 逆转、减轻或消除疾病或病症的一种或更多种症状。在本发明的一些方面中，有效量是当施用于需要治疗 HBV 相关疾病或病症的对象时导致预防和/或治疗该疾病或病症的治疗性响应的 HBV dsRNA 剂的量。根据本发明的一些方面，有效量是当与用于 HBV 相关疾病或病症的另一种治疗性治疗组合或共施用时导致预防和/或治疗该疾病或病症的治疗性响应的本发明的 HBV dsRNA 剂的量。在本发明的一些实施方案中，用本发明的 HBV dsRNA 剂治疗对象的生物学效应可以是改善和/或完全消除由 HBV 相关疾病或病症引起的症状。在本发明的一些实施方案中，生物学效应是完全消除 HBV 相关疾病或病症，如例如通过指示对象没有 HBV 相关疾病或病症的诊断测试所证明的。评估 HBV 相关疾病或病症的状态的另外的本领域已知手段可用于确定本发明的药剂和/或方法对 HBV 相关疾病或病症的作用。

通常，将在临床试验中确定用于将 HBV 多肽活性降低至治疗 HBV 相关疾病或病症的水平 HBV dsRNA 剂的有效量，以在盲研究中建立测试群体相对于对照群体的有效剂量。在一些实施方案中，有效量将是导致

期望响应的量，例如，在具有疾病或病症的细胞、组织和/或对象中减轻 HBV 相关疾病或病症的量。因此，治疗可通过降低 HBV 多肽活性来治疗的 HBV 相关疾病或病症的 HBV dsRNA 剂的有效量可以是这样的量：当施用 5 剂或 HBV 反义多核苷酸剂的情况下细胞、组织和/或对象中存在的量的量。在本发明的某些方面中，在未接触或施用本发明的 HBV dsRNA 剂的细胞、组织和/或对象中存在的 HBV 多肽活性和/或 HBV 基因表达的水平被称为“对照”量。在本发明的方法的一些实施方案中，对象的对照量是对象的治疗前的量，换言之，在施用 HBV 药剂之前对象中的水平可以是该对象的对照水平，并且与将 siRNA 施用于对象之后对象中 HBV 多肽活性和/或 10 HBV 基因表达的水平进行比较。在治疗 HBV 相关疾病或病症的情况下，期望响应可以是降低或消除细胞、组织和/或对象中疾病或病症的一种或更多种症状。降低或消除可以是暂时的或者可以是永久性的。应理解，可使用确定 HBV 多肽活性、HBV 基因表达、症状评价、临床测试等的方法来监测 HBV 相关疾病或病症的状态。在本发明的一些方面中，对治疗 HBV 15 相关疾病或病症的期望响应延迟疾病或病症的发作或者甚至阻止疾病或病症的发作。

降低 HBV 多肽活性的化合物的有效量也可通过评估 HBV dsRNA 剂的施用对细胞或对象的生理作用（例如施用之后 HBV 相关疾病或病症的减轻）来确定。对象的测定和/或症状监测可用于确定可在本发明的药物 20 化合物中施用的本发明的 HBV dsRNA 剂的效力，并用于确定对治疗的响应的存在或不存在。一个非限制性实例是一种或更多种本领域已知的血清谱测试。另一个非限制性实例是，一种或更多种本领域已知的肝功能测试可用于确定在使用本发明的 HBV dsRNA 剂治疗对象之前和之后对象中 25 HBV 相关肝疾病或病症的状态。在另一个非限制性实例中，一种或更多种本领域已知的 HBV 病毒载量水平测试用于确定对象中 HBV 相关疾病的状态。在该实例中，该疾病包括 HBV 病毒载量水平，并且该测试用于确定在使用本发明的 HBV dsRNA 剂治疗对象之前和之后对象中的 HBV 病毒载量水平。

30 本发明的一些实施方案包括通过评估和/或监测对象中 HBV 相关疾病或病症的一种或更多种“生理特征”来确定施用于对象以治疗 HBV 相关疾病或病症的本发明的 dsRNA 剂的效力的方法。HBV 相关疾病或病症的生理特征的一些非限制性实例是对象中丙氨酸转氨酶（ALT）的水平、对象中天冬氨酸转氨酶（AST）的水平；对象中的 HBV 病毒载量；对象中的

HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA) 水平；对象中一种或更多种 HBV 抗原的水平；对象中 HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中一种或更多种的水平；对象中一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体的存在、不存在和/或水平，以及一种或更多种身体症状，例如但不限于：疼痛、发热等。确定这样的生理特征的常规手段是本领域已知的，并且包括但不限于血液测试、血清分析、组织活检、成像研究、身体检查等。

应理解，施用于对象的 HBV dsRNA 剂的量可至少部分地基于针对对象确定的疾病和/或病症状态和/或生理特征的这样的确定来修改。治疗量可通过以下而变化：例如，通过提高或降低 HBV-dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂的量、通过改变分别施用 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂的组合物、通过改变施用途、通过改变给药时间等。HBV dsRNA 剂的有效量将随以下而变化：所治疗的特定病症、所治疗的对象的年龄和身体状况；病症的严重程度、治疗的持续时间、并行治疗（如果有的话）的性质、特定施用途以及在本领域医生的知识和专长之内的其他因素。例如，有效量可取决于有效治疗 HBV 相关疾病或病症的 HBV 多肽活性和/或 HBV 基因表达的期望水平。本领域技术人员可凭经验确定用于本发明方法的本发明的特定 HBV dsRNA 剂的有效量，而无需过度实验。结合本文中提供的教导，通过从本发明的多种 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂中进行选择以及对因素（例如效力、相对生物利用度、患者体重、不良副作用的严重程度和优选的施用方式）进行权衡，可计划有效治疗特定对象的有效预防性或治疗性治疗方案。如在本发明的一些实施方案中使用的，本发明的 HBV dsRNA 剂的有效量可以是当与细胞接触时在细胞中产生期望生物学作用的量。

应认识到，HBV 基因沉默可在组成型或通过基因组改造表达 HBV 的任何细胞中并且通过任何适当的测定来确定。在本发明的一些实施方案中，通过施用本发明的 HBV dsRNA 剂，HBV 基因表达降低至少 5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 100%。在本发明的一些实施方案中，通过施用本发明的 HBV dsRNA 剂，HBV 基因表达降低 5%至 10%、5%至 25%、10%至 50%、10%至 75%、25%至 75%、25%至 100%，或 50%至 100%。

给药

HBV dsRNA 剂和 HBV 反义多核苷酸剂以足以抑制 HBV 基因表达的剂量在药物组合物中递送。在本发明的某些实施方案中，HBV dsRNA 剂的剂量为每天 0.01 至 200.0 毫克/千克接受者的体重，通常为每天 1 至 50 mg/千克体重、5 至 40 mg/kg 体重、10 至 30 mg/kg 体重、1 至 20 mg/kg 体重、1 至 10 mg/kg 体重、4 至 15 mg/kg 体重，包括端点。例如，HBV dsRNA 剂可以以以下量施用：每单剂量从约 0.01 mg/kg、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、1.5 mg/kg、1.6 mg/kg、1.7 mg/kg、1.8 mg/kg、1.9 mg/kg、2 mg/kg、2.1 mg/kg、2.2 mg/kg、2.3 mg/kg、2.4 mg/kg、2.5 mg/kg、2.6 mg/kg、2.7 mg/kg、2.8 mg/kg、2.9 mg/kg、3.0 mg/kg、3.1 mg/kg、3.2 mg/kg、3.3 mg/kg、3.4 mg/kg、3.5 mg/kg、3.6 mg/kg、3.7 mg/kg、3.8 mg/kg、3.9 mg/kg、4 mg/kg、4.1 mg/kg、4.2 mg/kg、4.3 mg/kg、4.4 mg/kg、4.5 mg/kg、4.6 mg/kg、4.7 mg/kg、4.8 mg/kg、4.9 mg/kg、5 mg/kg、5.1 mg/kg、5.2 mg/kg、5.3 mg/kg、5.4 mg/kg、5.5 mg/kg、5.6 mg/kg、5.7 mg/kg、5.8 mg/kg、5.9 mg/kg、6 mg/kg、6.1 mg/kg、6.2 mg/kg、6.3 mg/kg、6.4 mg/kg、6.5 mg/kg、6.6 mg/kg、6.7 mg/kg、6.8 mg/kg、6.9 mg/kg、7 mg/kg、7.1 mg/kg、7.2 mg/kg、7.3 mg/kg、7.4 mg/kg、7.5 mg/kg、7.6 mg/kg、7.7 mg/kg、7.8 mg/kg、7.9 mg/kg、8 mg/kg、8.1 mg/kg、8.2 mg/kg、8.3 mg/kg、8.4 mg/kg、8.5 mg/kg、8.6 mg/kg、8.7 mg/kg、8.8 mg/kg、8.9 mg/kg、9 mg/kg、9.1 mg/kg、9.2 mg/kg、9.3 mg/kg、9.4 mg/kg、9.5 mg/kg、9.6 mg/kg、9.7 mg/kg、9.8 mg/kg、9.9 mg/kg、10 mg/kg、11 mg/kg、12 mg/kg、13 mg/kg、14 mg/kg、15 mg/kg、16 mg/kg、17 mg/kg、18 mg/kg、19 mg/kg、20 mg/kg、21 mg/kg、22 mg/kg、23 mg/kg、24 mg/kg、25 mg/kg、26 mg/kg、27 mg/kg、28 mg/kg、29 mg/kg、30 mg/kg、31 mg/kg、32 mg/kg、33 mg/kg、34 mg/kg、35 mg/kg、36 mg/kg、37 mg/kg、38 mg/kg、39 mg/kg、40 mg/kg、41 mg/kg、42 mg/kg、43 mg/kg、44 mg/kg、45 mg/kg、46 mg/kg、47 mg/kg、48 mg/kg、49 mg/kg、至 50 mg/kg 体重。

在确定本发明的 HBV dsRNA 剂的递送剂量和时机时可考虑多种因素。递送的 HBV dsRNA 剂的绝对量将取决于多种因素，包括并行治疗、剂量数和个体对象参数，包括年龄、身体状况、体型和体重。这些是本领域普通技术人员公知的因素并且可仅使用常规实验来解决。在一些实施方案中，可使用最大剂量，即根据合理的医学判断的最高安全剂量。

在一些实施方案中，本发明的方法可包括向对象施用 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个剂量的 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸

剂。在一些情况下，可至少每天、每隔一天、每周、每隔一周、每月等向对象施用药物化合物（例如，包含 HBV dsRNA 剂或包含 HBV 反义多核苷酸剂的药物化合物）。剂量可每天一次或每天多于一次地施用，例如在一个 24 小时期间内 2、3、4、5 次或更多次地施用。本发明的药物组合物可每天一次地施用，或者 HBV dsRNA 剂可在全天以适当的间隔以两个、三个或更多个亚剂量来施用，或者甚至使用通过控释制剂的连续输注或递送。在本发明的方法的一些实施方案中，将本发明的药物组合物每天一次或更多次、每周一次或更多次、每月一次或更多次，或者每年一次或更多次地施用于对象。

在一些方面中，本发明的方法包括单独、与一种或更多种其他 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂组合，和/或与施用于患有 HBV 相关疾病或病症的对象的药物治疗或治疗活动或方案组合来施用药物化合物。药物化合物可在药物组合物中施用。在本发明的方法中使用的药物组合物可以是无菌的并且含有适合施用于对象的以重量或体积为单位的一定量的 HBV dsRNA 剂，其将 HBV 多肽的活性降低至足以产生期望响应的水平。可根据不同参数，特别是根据所使用的施用方式和对象的状态来选择向对象施用的包含 HBV dsRNA 剂的药物组合物的降低 HBV 蛋白活性的剂量。其他因素包括期望的治疗时间。在对象中的响应在施加的初始剂量下不足的情况下，可在患者耐受允许的程度采用更高剂量（或通过不同的更加局部的递送途径的有效更高的剂量）。

治疗

可使用本发明的方法和 HBV dsRNA 剂抑制 HBV 表达来治疗 HBV 相关疾病和病症，其中 HBV 多肽的水平和/或活性降低对治疗该疾病或病症有效。可用本发明的 HBV dsRNA 剂和本发明的治疗方法来治疗的疾病和病症的一些实例包括但不限于：乙型肝炎、HBV 感染、慢性乙型肝炎、丁型肝炎病毒感染（ δ 肝炎或 HDV）、肝损伤、肝硬化、急性乙型肝炎、急性暴发性肝炎、肝炎、肝纤维化和肝细胞癌。这样的疾病和病症在本文中可称为“HBV 相关疾病和病症”以及“由 HBV 引起和/或调节的疾病和病症”。应理解，对象中的丁型肝炎病毒（HDV）感染是 HBV 相关疾病，因为虽然它本身不感染患者，但 HDV 可共同感染感染有 HBV 的对象。

在本发明的某些方面中，可在诊断 HBV 相关疾病或病症之前或之后的一个或更多个时间向对象施用本发明的 HBV dsRNA 剂。在本发明的一

些方面中，对象处于患有或发生 HBV 相关疾病或病症的风险中。与发生 HBV 相关疾病或病症的对照风险相比，处于发生 HBV 相关疾病或病症的风险中的对象是具有提高的发生 HBV 相关疾病或病症的可能性的对象。在本发明的一些实施方案中，与对照风险水平相比，风险水平可以是统计

5 学上显著的。处于风险中的对象可包括，例如，（1）已经与携带 HBV 的对象密切接触和/或正处于其风险中的对象，（2）已经与感染有 HBV 的对象的血液、精液和/或阴道液接触和/或正处于其风险中的对象，（3）具有先前存在的疾病和/或异常（例如但不限于使对象比没有先前存在的疾病或异常的对照对象更易患 HBV 感染以及导致的 HBV 相关疾病或病症的免疫缺陷）的对象；（4）具有 HBV 相关疾病或病症的个人病史的对象；（5）

10 以及先前已经治疗过 HBV 相关疾病或病症的对象。应理解，使对象更易患 HBV 相关疾病或病症的先前存在的疾病和/或异常可以是先前已鉴定为当存在时与发生 HBV 相关疾病或病症的更高可能性具有相关关系的疾病和/或异常。

15 应理解，可基于个体对象的医学状况向对象施用 HBV dsRNA 剂。例如，为对象提供的医疗保健可评估从对象获得的样品中测量的 ALT 水平，并确定是否期望通过施用本发明的 HBV dsRNA 剂来降低对象的 ALT 水平。在该实例中，可认为 ALT 水平是 HBV 相关病症的一个生理特征，即使对象未被诊断为患有 HBV 相关疾病（例如本文公开的一种）。医疗保健

20 提供者可监测对象 ALT 水平的变化，作为所施用的本发明的 HBV dsRNA 剂的效力的量度。在一个非限制性实例中，从对象获得生物样品，例如血液或血清样品，并在样品中确定对象的 HBV 病毒载量。在对象中发现存在 HBV 病毒载量之后，将 HBV dsRNA 剂施用于对象，并且在施用之后从对象获得后续血液或血清样品，并使用后续样品测定 HBV 病毒载量，

25 并将结果与在对象的施用前（之前的）样品中确定的结果进行比较。与施用前水平相比，后期样品中对象的 HBV 病毒载量水平的降低指示所施用的 HBV dsRNA 剂在降低对象中 HBV 病毒载量水平方面的效力。

本发明的方法的某些实施方案包括调节治疗，其包括至少部分地基于对由治疗引起的对象的 HBV 相关疾病或病症的生理特征中的一种或更多

30 种的变化的评估，向对象施用本发明的 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂。例如，在本发明的一些实施方案中，可确定施用的本发明的 dsRNA 剂对对象的作用，并用于帮助调节随后施用于对象的本发明的 dsRNA 剂的量。在一个非限制性实例中，向对象施用本发明的 dsRNA 剂，在施用之后在从对象获得的生物样品中确定一种或更多种 HBV 病毒抗原的存在

和/或水平，并且至少部分地基于所确定的水平，确定是否更大量的 dsRNA 剂是期望的，以提高所施用的药剂的生理作用，例如降低或进一步降低对象的一种或更多种 HBV 病毒抗原的存在和/或水平。在另一个非限制性实例中，向对象施用本发明的 dsRNA 剂，在施用之后确定对象的 HBV 病毒载量，并且至少部分地基于所确定的 HBV 病毒载量，可期望将更低量、
5 更高量或相同量的 dsRNA 剂施用于对象。

因此，本发明的一些实施方案包括评估由对象的先前治疗引起的一种或更多种生理特征的变化，以调节随后施用于对象的本发明的 dsRNA 剂的量。本发明的方法的一些实施方案包括 1、2、3、4、5、6 或更多次确定 HBV 相关疾病或病症的生理特征，以评估和/或监测所施用的本发明的 HBV dsRNA 剂的效力，并且任选地使用所述确定来调节以下中的一项或更多项：本发明的 dsRNA 剂的剂量、施用方案和/或施用频率，以治疗对象中的 HBV 相关疾病或病症。在本发明的方法的一些实施方案中，向对象施用有效量的本发明的 dsRNA 剂的期望结果是以下中一种或更多种的降低：对象中 ALT；AST；HBV 病毒载量、HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA)；一种或更多种 HBV 抗原；HBcAg；HBsAg；和 HBeAg，其指示对象中 HBV 基因表达的降低。在本发明方法的某些实施方案中，向对象施用有效量的本发明的 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂的期望结果是：与 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或者与 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征相比，对象中抗乙型肝炎病毒抗体提高，
10 其指示对象中 HBV 基因表达降低。
15 20

本文中使用的术语“治疗”及其变化形式关于 HBV 相关疾病或病症使用时，可指降低对象发生 HBV 相关疾病或病症的可能性的预防性治疗，并且还可指在对象已发生 HBV 相关疾病或病症之后的治疗，以与不存在降低 HBV 多肽在对象中活性的治疗的对象相比消除或降低 HBV 相关疾病或病症的水平、防止 HBV 相关疾病或病症变得更晚期（例如，更严重），和/或减缓对象中 HBV 相关疾病或病症的进展。
25

本发明的药剂、组合物和方法的某些实施方案可用于抑制 HBV 基因表达。本文中提及 HBV 基因表达时使用的术语“抑制”、“沉默”、“降低”、“下调”和“敲低”意指，分别与从 HBV 基因转录的 RNA、表达的 HBV 的活性水平或从 mRNA 翻译的 HBV 的水平的对照水平相比，当细胞、细胞群、组织、器官或对象与本发明的 HBV dsRNA 剂接触（例如，用其处理）时，如在转录 HBV 基因的细胞、细胞群、组织、器官或对象中通过以下
30

中的一种或更多种测量的 HBV 基因的表达降低:从基因转录的 RNA 的水平,表达的 HBV 的活性水平,以及从 mRNA 翻译的 HBV 多肽、蛋白质或蛋白质亚基的水平。在一些实施方案中,对照水平是未与 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂接触(例如,用其处理)的细胞、组织、器官或对象中的水平。

施用方法

HBV dsRNA 剂的多种施用途径可用于本发明的方法中。选择的特定递送模式将至少部分取决于所治疗的特定病症和治疗效果所需的剂量。一般而言,本发明的方法可使用医学上可接受的任何施用模式来实施,意指任何产生治疗 HBV 相关疾病或病症的有效水平而不引起临床上不可接受的不良作用的方式。在本发明的一些实施方案中,HBV dsRNA 剂可通过经口、经肠、经黏膜、皮下和/或肠胃外途径施用。术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、鞘内、肌内、腹膜内和胸骨内注射,或输注技术。其他途径包括但不限于经鼻(例如,通过胃-鼻管)、经皮、经阴道、经直肠、舌下和吸入。本发明的递送途径可包括鞘内、心室内或颅内。在本发明的一些实施方案中,可将 HBV dsRNA 剂置于缓慢释放基质中并通过将该基质置于对象中来施用。在本发明的一些方面中,可使用经靶向特定细胞或细胞器的递送剂包被的纳米粒将 HBV dsRNA 剂递送至对象细胞。多种递送手段、递送方法、递送剂是本领域已知的。递送方法和递送剂的一些非限制性实例在本文中别处另外提供。在本发明的一些方面中,术语“递送”在提及 HBV dsRNA 剂时可意指向细胞或对象施用一种或更多种“裸”HBV dsRNA 剂序列,并且在本发明的某些方面中,“递送”意指通过转染方式向细胞或对象施用、将包含 HBV dsRNA 剂的细胞递送至对象、将编码 HBV dsRNA 剂的载体递送至细胞和/或对象中,等等。使用转染方式递送 HBV dsRNA 剂可包括向细胞和/或对象施用载体。

在本发明的一些方法中,一种或更多种 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂可在制剂中施用,所述制剂可以以可药用溶液施用,其可常规地包含可药用浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容性载体、辅料和任选地,其他治疗成分。在本发明的一些实施方案中,HBV dsRNA 剂可与其他治疗剂一起配制以用于同时施用。根据本发明的一些方法,HBV dsRNA 剂可在药物组合物中施用。一般而言,药物组合物包含 HBV dsRNA 剂以及任选地,可药用载体。可药用载体是本领域普通技术人员公知的。本文中

使用的可药用载体意指不干扰活性成分的生物活性的有效性（例如 HBV dsRNA 剂抑制细胞或对象中 HBV 基因表达的能力）的无毒材料。针对治疗用途施用和递送 dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂的许多方法是本领域已知的，并且可用于本发明的方法中。

5 可药用载体包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂和本领域公知的其他材料。示例性的可药用载体在美国专利 No. 5,211,657 中描述，并且其他是本领域技术人员已知的。这样的制剂可常规地包含盐、缓冲剂、防腐剂、相容性载体和任选地，其他治疗剂。当在医学中使用，盐应该是可药用的，但不可药用盐可适当地用于制备其可药用盐，并且不
10 排除在本发明的范围外。这样的药理学上和药学上可接受的盐包括但不限于由以下酸制备的那些：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。而且，可药用盐可作为碱金属或碱土金属盐、例如钠盐、钾盐或钙盐制备。

 本发明方法的一些实施方案包括直接向组织施用一种或更多种 HBV
15 dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂。在一些实施方案中，施用化合物的组织是其中 HBV 相关疾病或病症存在或可能出现的组织，其一些非限制性实例是肝或肾。直接组织施用可通过直接注射或其他方式来实现。许多经口递送的化合物自然地到达并穿过肝和肾，并且本发明的治疗方法的一些
20 实施方案包括向对象经口施用一种或更多种 HBV dsRNA 剂。单独或与其他治疗剂联合的 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂可一次施用，或者替代地它们可以以多次施用来施用。如果施用多次，则 HBV dsRNA 剂可通过不同途径施用。例如但不旨在是限制性的，第一次（或前几次）施用可通过皮下方式进行，并且一次或更多次另外的施用可以是经口和/或全身施用。

25 对于期望全身施用 HBV dsRNA 剂的本发明的一些实施方案，HBV dsRNA 剂可被配制成用于通过注射（例如，通过推注或连续输注）肠胃外施用。用于注射的制剂可以在有或无添加的防腐剂的情况下以单位剂量形式存在，例如在安瓿中或在多剂量容器中。HBV dsRNA 剂制剂（也被称为药物组合物）可采用例如在油性或水性载剂中的混悬剂、溶液剂或乳
30 剂的形式，并且可包含配制剂，例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

 用于肠胃外施用的制剂包括无菌水性溶液或非水性溶液剂、混悬剂和乳剂。非水性溶剂的一些实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油（例如橄榄油）和可注射有机酯（例如油酸乙酯）。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或

混悬液，包括盐水和缓冲介质。肠胃外载剂包括氯化钠溶液、林格葡萄糖（Ringer's dextrose）、葡萄糖和氯化钠、乳酸盐林格液（lactated Ringer's），或不挥发性油（fixed oil）。静脉内载剂包括流体和营养补充剂、电解质补充剂（例如基于林格葡萄糖的那些）等。还可存在防腐剂和其他添加剂，
5 例如如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。较低剂量将产生于其他施用形式，例如静脉内施用。在对象中的响应在施加的初始剂量下不足的情况下，可在患者耐受允许的程度采用更高剂量（或通过不同的、更加局部的递送途径的有效更高的剂量）。根据需要，可使用每天多剂量以实现一种或更多种 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂的适当全身
10 或局部水平并且实现 HBV 蛋白活性的适当降低。

在另一些实施方案中，本发明的一些方法包括使用适用于植入接受者（例如对象）中的递送载剂，例如生物相容性微粒、纳米粒或植入物。根据该方法可用的示例性的生物蚀解性（bioerodible）植入物在 PCT 公开 No. WO 95/24929（通过引用并入本文中）中描述，其描述了用于包含生物
15 大分子的生物相容的生物可降解的聚合物基质。

在本发明的方法中，非生物可降解和生物可降解的聚合物基质二者均可用于将一种或更多种 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂递送至对象。在一些实施方案中，基质可以是生物可降解的。基质聚合物可以是天然或合成的聚合物。聚合物可基于期望释放的时间来选择，通常约数小时
20 至一年或更长。通常来说，可使用在数小时至三到十二个月的时间内的释放。聚合物任选为在水中可吸收其重量的多至约 90% 的水凝胶形式，并且还任选与多价离子或其他聚合物交联。

一般而言，在本发明的一些实施方案中，可使用生物蚀解性植入物以扩散的方式或通过聚合物基质的降解来递送 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂。用于这样的用途的示例性合成聚合物是本领域公知的。可使用
25 本领域已知的方法将生物可降解的聚合物和非生物可降解的聚合物用于递送 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂。生物黏附性聚合物（例如，生物蚀解性水凝胶）（参见 H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587，其教导通过引用并入本文）也可用于
30 递送用于治疗 HBV 相关疾病或病症的 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂。另一些合适的递送系统可包括定时释放、延迟释放或持续释放递送系统。这样的系统可避免 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂的重复施用，提高对象和医疗保健专业人员的方便。许多类型的释放递送系统是

可用的并且是本领域普通技术人员已知的。(参见例如: 美国专利 No. 5,075,109; 4,452,775; 4,675,189; 5,736,152; 3,854,480; 5,133,974; 和 5,407,686 (其各自的教导通过引用并入本文)。另外, 可使用基于泵的硬件递送系统, 其中一些适于植入。

- 5 长期持续释放植入物的使用可适用于预防性治疗对象和处于发生复发性 HBV 相关疾病或病症非风险中的对象。本文中使用的长期释放意指植入物被构建和布置为在至少多至 10 天、20 天、30 天、60 天、90 天、六个月、一年或更长的时间内递送治疗水平的 HBV dsRNA 剂。长期持续释放植入物是本领域普通技术人员公知的, 并且包括上述一些释放系统。
- 10 可通过将具有期望纯度的分子或化合物与任选的可药用载体、赋形剂或稳定剂混合[Remington's Pharmaceutical Sciences 第 21 版, (2006)]以冻干制剂或水溶液的形式制备 HBV dsRNA 剂或 HBV 反义多核苷酸剂的治疗性制剂以用于储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度下对接受者是无毒的, 并且包括缓冲剂, 例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂(例如十八烷基二甲
- 15 基苄基氯化铵; 氯化六甲铵; 苯扎氯铵、苄索氯铵; 酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇和间甲酚); 低分子量(少于约 10 个残基)多肽; 蛋白质, 例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物,
- 20 例如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 例如 EDTA; 糖, 例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇; 成盐抗衡离子, 例如钠; 金属复合物(例如, Zn-蛋白质复合物); 和/或非离子表面活性剂, 例如 TWEEN[®]、PLURONICS[®]或聚乙二醇
- 25 (PEG)。

细胞、对象和对照

- 本发明的方法可与细胞、组织、器官和/或对象结合使用。在本发明的一些方面中, 对象是人或脊椎动物哺乳动物, 包括但不限于狗、猫、马、
- 30 牛、羊、小鼠、大鼠和灵长类, 例如猴。因此, 本发明可用于治疗人和非人对象中的 HBV 相关疾病或病症。在本发明的一些方面中, 对象可以是农场动物、动物园动物、家养动物或非家养动物, 并且本发明的方法可用于兽医预防和治疗方案。在本发明的一些实施方案中, 对象是人并且本发

明的方法可用于人预防和治疗方案。

本发明可应用于的对象的一些非限制性实例是被诊断为患有、疑似患有或有风险患有与高于期望的 HBV 表达和/或活性（也称为“HBV 表达水平升高”）相关的疾病或病症的对象。与高于期望的 HBV 表达和/或活性水平相关的疾病和病症的一些非限制性实例在本文别处描述。本发明的方法可应用于在治疗时已被诊断为患有与高于期望的 HBV 表达和/或活性相关的疾病或病症的对象，或者被认为处于患有或发生与高于期望的 HBV 表达和/或活性相关的疾病或病症的风险中的对象。在本发明的一些方面中，与高于期望的 HBV 表达和/或活性水平相关的疾病或病症是急性疾病或病症，并且在本发明的某些方面中，与高于期望的 HBV 表达和/或活性水平相关的疾病或病症是慢性疾病或病症。

在一个非限制性实例中，将本发明的 HBV dsRNA 剂施用于被诊断为患有、疑似患有或有风险患有急性乙型肝炎的对象，所述急性乙型肝炎是期望降低 HBV 表达的疾病。本发明的方法可应用于在治疗时已被诊断为患有该疾病或病症的对象，或者被认为处于患有或发生该疾病或病症的风险中的对象。

在另一个非限制性实例中，将本发明的 HBV dsRNA 剂施用于被诊断为患有、疑似患有或有风险患有丁型肝炎（HDV）的对象，所述丁型肝炎是期望降低 HBV 表达的疾病。本发明的方法可应用于在治疗时已被诊断为患有该疾病或病症的对象，或者被认为处于患有或发生该疾病或病症的风险中的对象。

本发明方法可应用于的细胞包括为体外、体内、离体细胞的细胞。细胞可在对象中、培养物中和/或混悬液中，或处于任何其他合适的状态或条件。本发明方法可应用于的细胞可以是肝细胞（liver cell）、肝细胞（hepatocyte）、心脏细胞、胰细胞、心血管细胞、肾细胞或其他类型的脊椎动物细胞，包括人和非人哺乳动物细胞。在本发明的某些方面中，本发明方法可应用于的细胞是已知不是患病细胞的健康正常细胞。在本发明的某些实施方案中，本发明的方法和组合物应用于的细胞是肝细胞（liver cell）、肝细胞（hepatocyte）、心脏细胞、胰细胞、心血管细胞和/或肾细胞。在本发明的某些方面中，对照细胞是正常细胞，但应理解，具有疾病或病症的细胞在特定情况下也可用作对照细胞，例如以比较具有疾病或病症的经处理的细胞相对于具有疾病或病症的未经处理的细胞的结果，等等。适于使用本发明实施方案治疗的细胞可以是表达 HBV 基因的细胞，包括感

染有 HBV 的细胞，或者包含含有 HBV 基因组或 HBV 基因的一部分的表达载体的细胞。

根据本发明的方法，可确定 HBV 多肽活性的水平并将其与 HBV 多肽活性的对照水平进行比较。对照可以是预定值，其可采取多种形式。它可以是单个截止值，例如，中值或平均值。其可基于比较组，例如具有较低
5 的 HBV 多肽水平和/或 HBV 多肽活性的组以及具有提高的 HBV 多肽水平和/或 HBV 多肽活性的组来建立。比较组的另一个非限制性实例可以是具有 HBV 相关疾病或病症的一种或更多种症状或者被诊断为 HBV 相关疾病或病症的组；没有该疾病或病症的一种或更多种症状或者未被诊断为该
10 疾病或病症的组；已施用本发明的 siRNA 治疗的对象的组；未施用本发明的 siRNA 治疗的对象的组。通常而言，对照可基于适当年龄段中明显健康的正常个体或明显健康的细胞。应理解，根据本发明的对照除了预定值之外还可以是与实验材料平行测试的材料的样品。实例包括来自对照群体的样品或待与实验样品平行测试的通过制造产生的对照样品。在本发明
15 的一些实施方案中，对照可包括未用本发明的 HBV dsRNA 剂接触或处理的细胞或对象，并且在这样的情况下，可将对照 HBV 多肽水平和/或 HBV 多肽活性与在与本发明的 HBV dsRNA 剂接触的细胞或对象中的 HBV 多肽水平和/或 HBV 多肽活性进行比较。

在本发明的一些实施方案中，针对对象确定的 HBV 多肽水平可以是
20 针对被比较的针对同一对象在不同时间确定的 HBV 多肽水平的对照水平。在一个非限制性实例中，在从未施用本发明的 HBV 治疗的对象中获得的生物样品中确定 HBV 的水平。在一些实施方案中，生物样品是血清样品或组织样品。从对象中获得的样品中确定的 HBV 多肽水平可用作对象的基线或对照值。在本发明的治疗方法中在向对象施用一次或更多次
25 HBV dsRNA 剂之后，可从对象中获得一个或更多个另外的血清样品，并且可将随后的一个或更多个样品中的 HBV 多肽水平与对象的对照/基线水平进行比较。这样的比较可用于评估对象中 HBV 相关疾病或病症的发作、进展或消退。例如，从对象中获得的基线样品中的 HBV 多肽水平或 HBV 病毒载量水平高于在向该对象施用本发明的 HBV dsRNA 剂之后从同一对
30 象中获得的水平指示 HBV 相关疾病或病症的消退，并且指示所施用的本发明的 HBV dsRNA 剂用于治疗 HBV 相关疾病或病症的效力。在一些实施方案中，与在先前从对象获得的样品中确定的水平相比来自该对象的样品中 HBV 多肽水平在统计学上显著降低表明 HBV 相关疾病或病症消退。

在本发明的一些方面中，针对对象确定的 HBV 多肽水平和/或 HBV 多肽活性中一种或更多种的值可作用于在同一对象中稍后比较 HBV 多肽水平和/或 HBV 活性的对照值，因此允许评估对象中与“基线”HBV 多肽活性的变化。因此，初始 HBV 多肽水平和/或初始 HBV 多肽活性水平可存在于对象中和/或在对象中确定，并且本发明的方法和化合物可用于降低对象中 HBV 多肽水平和/或 HBV 多肽活性，其中初始水平用作该对象的对照水平。

使用本发明的方法，可将本发明的 HBV dsRNA 剂施用于对象。当与在先前时间点从对象中获得的血清样品和/或组织样品中的施用前 HBV 多肽水平或 HBV 病毒载量相比，或与非接触对照水平（例如对照血清样品中的 HBV 多肽水平或 HBV 病毒载量）相比，从对象中获得的血清样品和/或组织样品中的 HBV 多肽水平或 HBV 病毒载量降低至少 0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 时，可评估本发明的施用和治疗的效力。应理解，本文中所述的 HBV 多肽水平、HBV 病毒载量、一种或更多种 HBV 抗原的存在、HBV 多肽活性水平和另一些生理特征均与 HBV 基因表达水平相关。本发明的方法的某些实施方案包括向对象施用有效抑制 HBV 基因表达并由此在对象中降低 HBV 多肽水平并降低 HBV 多肽活性水平的量的本发明的 HBV dsRNA。

本发明的一些实施方案包括确定从一个或多个对象中获得的一个或多个生物样品中 HBV 多肽的存在、不存在和/或量（在本文中也称为水平）。该测定可用于评估本发明的治疗方法的效力。例如，本发明的方法和组合物可用于确定生物样品中 HBV 多肽和/或 HBV 病毒载量的水平，所述生物样品从先前用施用本发明的 HBV dsRNA 剂进行治疗的对象中获得。在从经治疗对象中获得的生物样品中确定的 HBV 多肽水平和/或 HBV 病毒载量与分别针对对象确定的治疗前 HBV 多肽水平或 HBV 病毒载量相比或与未接触的对照生物样品水平相比将低至少 0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%、99.99% 或更多指示向对象施用的治疗的效力水平。在本发明的方法的一些实施方案中，细胞与本发明的 siRNA 剂的接触（在本文中也称为治疗）导致细胞中 HBV 基因表达抑制至少约 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、

44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、
56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、
68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、
80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、
5 92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，或约 100%，例如至
低于测定的检测水平。

在本发明的一些实施方案中，针对对象确定的 HBV 相关疾病或病症
的生理特征可以是与在同一对象中在不同时间对生理特征的确定进行比
较的对照确定。在一个非限制性实例中，在从未施用本发明的 HBV 治疗
10 的对象中获得的生物样品中确定生理特征例如 ALT 水平、AST 水平和/
或病毒载量水平。在从对象中获得的样品中确定的 ALT 水平、AST 水平和/
或病毒载量水平（和/或 HBV 疾病或病症的其他生理特征）可用作对象的
基线或对照值。在本发明的治疗方法中在向对象施用一次或更多次 HBV
dsRNA 剂之后，可从对象中获得一个或更多个另外的生物样品，并且可
15 将随后的一个或更多个样品中的 ALT 水平、AST 水平和/或病毒载量水平
分别与对象的对照/基线水平和/或比例进行比较。这样的比较可用于评估
对象中 HBV 相关疾病或病症的发作、进展或消退。例如，从对象中获得的
基线样品中的 ALT 水平、AST 水平和/或病毒载量水平高于在向该对象
施用本发明的 HBV dsRNA 剂之后从同一对象中获得的样品中确定的 ALT
20 水平、AST 水平和/或病毒载量水平指示 HBV 相关疾病或病症的消退，并
且指示所施用的本发明的 HBV dsRNA 剂用于治疗 HBV 相关疾病或病症
的效力。

在本发明的一些方面中，针对对象确定的 HBV 相关疾病或病症的生理
特征中一种或更多种的值可作用于在同一对象中稍后比较生理特征
25 的对照值，因此允许评估对象中与“基线”生理特征的变化。因此，初始生
理特征可存在于对象中和/或在对象中确定，并且本发明的方法和化合物
可用于降低对象中 HBV 多肽水平和/或 HBV 多肽活性，其中初始生理特
征确定用作该对象的对照。

使用本发明的方法，可将有效量的本发明的 HBV dsRNA 剂施用于对
30 象以治疗 HBV 疾病或病症。本发明的施用和治疗的效力可通过确定 HBV
疾病或病症的一种或更多种生理特征的变化来评估。在一些非限制性实例
中，与在治疗前时间点从对象中获得的生物样品中生理特征的施用前水平
相比或与针对非接触对照确定的生理特征相比在用本发明的方法治疗之

后从对象获得的生物样品中确定的 ALT 水平、AST 水平、HBV 共价闭合环状 DNA(cccDNA)、一种或更多种 HBV 抗原、HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中一种或更多种、以及病毒载量水平降低至少 0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%、99.99% 或 100%表明了施用于对象的治疗的效力。应理解，本文中所述的 HBV 生理特征的确定与 HBV 基因表达水平相关。本发明的方法的某些实施方案包括以有效抑制 HBV 基因表达并由此降低以下或以其他方式积极影响对象中 HBV 相关疾病或病症的生理特征的量向对象施用本发明的 HBV dsRNA 剂：ALT 水平、AST 水平、HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA)；一种或更多种 HBV 抗原；HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中的一种或更多种；以及病毒载量水平。

本发明的一些实施方案包括使用例如但不限于以下的方法来确定 HBV 相关疾病或病症的生理特征的存在、不存在和/或变化：(1) 评估从一个或多个对象中获得的一个或多个生物样品的生理特征；(2) 对对象进行细胞和/或组织活检（例如但不限于肝活检）；以及 (3) 或者对象的身体检查。该确定可用于评估本发明的治疗方法的效力。

药盒

药盒也在本发明的范围内，其包含一种或更多种本发明的 HBV dsRNA 剂以及其在本发明方法中使用的说明书。本发明的药盒可包含可用于治疗 HBV 相关疾病或病症的 HBV dsRNA 剂、HBV 有义多核苷酸和 HBV 反义多核苷酸剂中的一种或更多种。包含一种或更多种 HBV dsRNA 剂、HBV 有义多核苷酸和 HBV 反义多核苷酸剂的药盒可被制备用于本发明的治疗方法。本发明药盒的组分可包装在水性介质中或以冻干形式包装。本发明的药盒可包含载体，所述载体被分隔成其中严密封闭地容纳一个或多个容器装置或一系列容器装置，例如测试管、小瓶、烧瓶、瓶子、注射器等。第一容器装置或第一系列容器装置可包含一种或更多种化合物，例如 HBV dsRNA 剂和/或一种或更多种 HBV 有义或反义多核苷酸分子。第二容器装置或第二系列容器装置可包含靶向剂、标记剂、递送剂等，其在本发明治疗方法的一个实施方案中可作为待施用的 HBV dsRNA 剂的一部分被包括在内。

本发明的药盒还可包含说明书。说明书通常以书面形式，并为实施通过药盒实现的治疗和基于该治疗作出决定提供指导。

提供以下实施例以举例说明本发明实践的一些具体实例，并不旨在限制本发明的范围。对本领域普通技术人员来说明显的是，本发明将以多种组合和方法应用。

5 实施例

实施例 1.

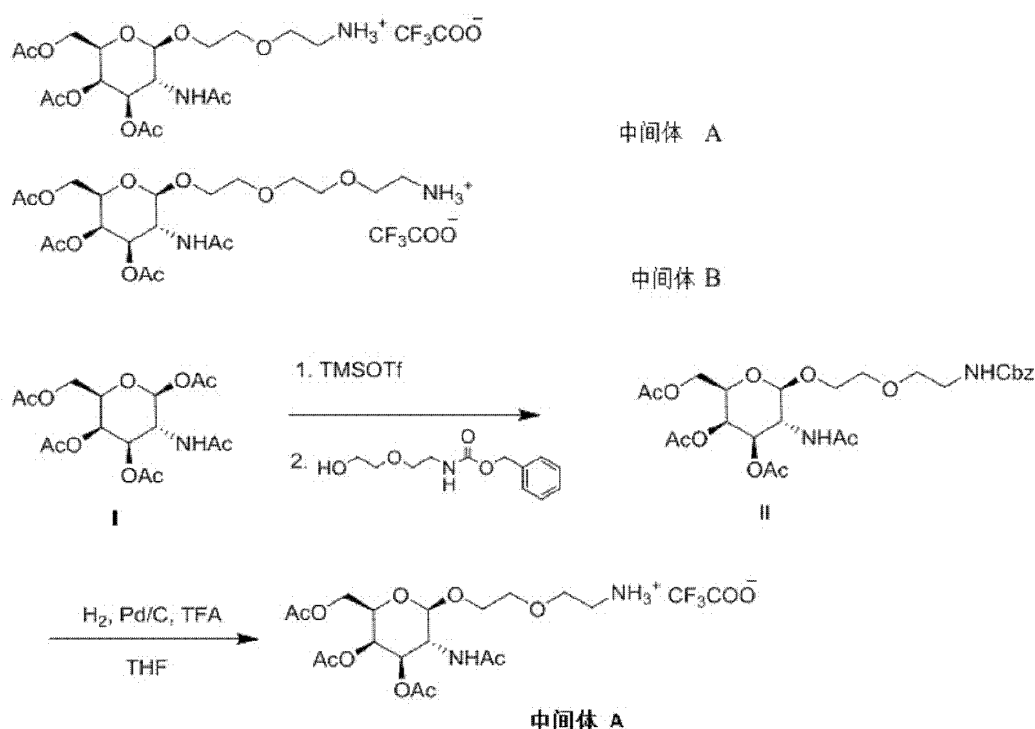
HBV RNAi 剂的合成

上表 2 至表 4 中示出的 HBV RNAi 剂双链体是根据以下一般程序合成的：

- 10 使用基于亚磷酰胺化学的充分确立的固相合成方法在寡核苷酸合成仪上合成 siRNA 的有义链序列和反义链序列。寡核苷酸链增长通过 4 步循环实现：脱保护、偶联、加帽和氧化或硫化步骤以用于添加每个核苷酸。合成是在由可控孔度玻璃（controlled pore glass）（CPG，500 或 1000 Å）制成的固体支持物上进行的。单体亚磷酰胺购自商业来源。根据本文中实
- 15 施例 2 至 3 的程序合成具有 GalNAc 配体簇的亚磷酰胺（作为非限制性实例的 GLPA1 和 GLPA2）。对于用于体外筛选的 siRNA（表 2），以 20 nmol 规模进行合成，并且对于用于体内测试的 siRNA（表 3、4 和 5），以 1 μmol 或更大的规模进行合成。在 GalNAc 配体（作为非限制性实例的 GLO-0）连接在有义链的 3'末端的情况下，使用 GalNAc 配体连接的 CPG 固体支
- 20 持物。在 GalNAc 配体（作为非限制性实例的 GLS-1 或 GLS-2）连接在有义链的 5'末端的情况下，使用 GalNAc 亚磷酰胺（作为非限制性实例的 GLPA1 或 GLPA2）用于最后的偶联反应。二氯甲烷中的三氯乙酸（TCA）3%用于 4,4'-二甲氧基三苯甲基保护基（DMT）的脱保护。5-乙硫基-1H-四唑用作活化剂。THF/Py/H₂O 中的 I₂ 和吡啶/MeCN 中的苯乙酰二硫化物
- 25 （PADS）分别用于氧化和硫化反应。在最终的固相合成步骤之后，用乙腈中的 20%二乙胺除去氰乙基保护基。去除核碱基的保护基并通过用 28%氢氧化铵溶液在 65℃下处理 2 小时来切割固体支持物结合的寡聚体。将含有粗制单链产物的水溶液浓缩并通过离子配对反相 HPLC（ion pairing reversed phase HPLC，IP-RP-HPLC）纯化。来自 IP-RP-HPLC 的经纯化单
- 30 链寡核苷酸产物通过溶解在 1.0 M NaOAc 中而转化为钠盐并且通过添加冰冷的 EtOH 沉淀。等摩尔互补有义链和反义链寡核苷酸的退火在水中进行，以形成双链 siRNA 产物，将其冻干以得到蓬松的白色固体。

实施例 2. 中间体 A 和中间体 B 的制备。

如以下方案 1 所示, 中间体 A 是通过用二氯甲烷 (DCM) 中的三氟甲磺酸三甲基甲硅烷基酯 (TMSOTf) 处理可商购的半乳糖胺五乙酸酯来合成的。随后用 Cbz 保护的 2-(2-氨基乙氧基)乙烷-1-醇进行糖基化, 以得到化合物 II。通过氢化除去 Cbz 保护基, 以得到作为三氟乙酸 (TFA) 盐的中间体 A。除了使用 Cbz 保护的 2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙烷-1-醇作为起始物质之外, 基于相同的方案合成中间体 B。



10 方案 1

向化合物 I (20.0 g, 51.4 mmol) 在 100 mL 1,2-二氯乙烷 (DCE) 中的溶液添加 TMSOTf (17.1 g, 77.2 mmol)。将所得反应溶液在 60°C 下搅拌 2 小时, 并且然后在 25°C 下搅拌 1 小时。将经 4 Å 粉末分子筛 (10 g) 干燥的在 DCE (100 mL) 中的 Cbz 保护的 2-(2-氨基乙氧基)乙烷-1-醇 (13.5 g, 56.5 mmol) 在 N₂ 气氛下在 0°C 下逐滴添加至上述反应溶液中。将所得反应混合物在 N₂ 气氛下在 25°C 下搅拌 16 小时。将反应混合物过滤并用饱和 NaHCO₃ (200 mL)、水 (200 mL) 和饱和盐水 (200 mL) 洗涤。将有

机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并在减压下浓缩, 以得到粗制产物, 将其与 2-甲基四氢呋喃/庚烷 (5/3, v/v, 1.80 L) 一起研磨 2 小时。将所得混合物过滤并干燥, 以得到作为白色固体的化合物 II (15.0 g, 50.3%产率)。

- 5 向经干燥和氩气吹扫的氢化瓶中小心地添加 10% Pd/C (1.50 g), 随后添加 10 mL 四氢呋喃(THF), 并且然后添加化合物 II (15.0 g, 26.4 mmol) 在 THF (300 mL) 和 TFA (三氟乙酸, 3.00 g, 26.4 mmol) 中的溶液。将所得混合物脱气并用 H_2 吹扫三次并在 H_2 (45 psi) 气氛下在 25°C 下搅拌 3 小时。薄层色谱(thin-layer chromatography, TLC, 溶剂: DCM:MeOH=10:1)
- 10 指示化合物 II 已完全耗尽。将反应混合物过滤并在减压下浓缩。将残余物溶解在无水 DCM (500 mL) 中并浓缩。将该过程重复 3 次以得到作为泡沫状白色固体的中间体 A (14.0 g, 96.5%产率)。

^1H NMR (400 MHz $\text{DMSO}-d_6$): δ ppm 7.90 (d, $J=9.29$ Hz, 1 H), 7.78 (br s, 3 H), 5.23 (d, $J=3.26$ Hz, 1 H), 4.98 (dd, $J=11.29, 3.26$ Hz, 1 H), 4.56 (d, $J=8.53$ Hz, 1 H), 3.98 - 4.07 (m, 3 H), 3.79 - 3.93 (m, 2 H), 3.55 - 3.66 (m, 5 H), 2.98 (br d, $J=4.77$ Hz, 2 H), 2.11 (s, 3 H), 2.00 (s, 3 H), 1.90 (s, 3 H), 1.76 (s, 3 H)。

中间体 B 是使用与用于中间体 A 的合成类似的程序来合成的。

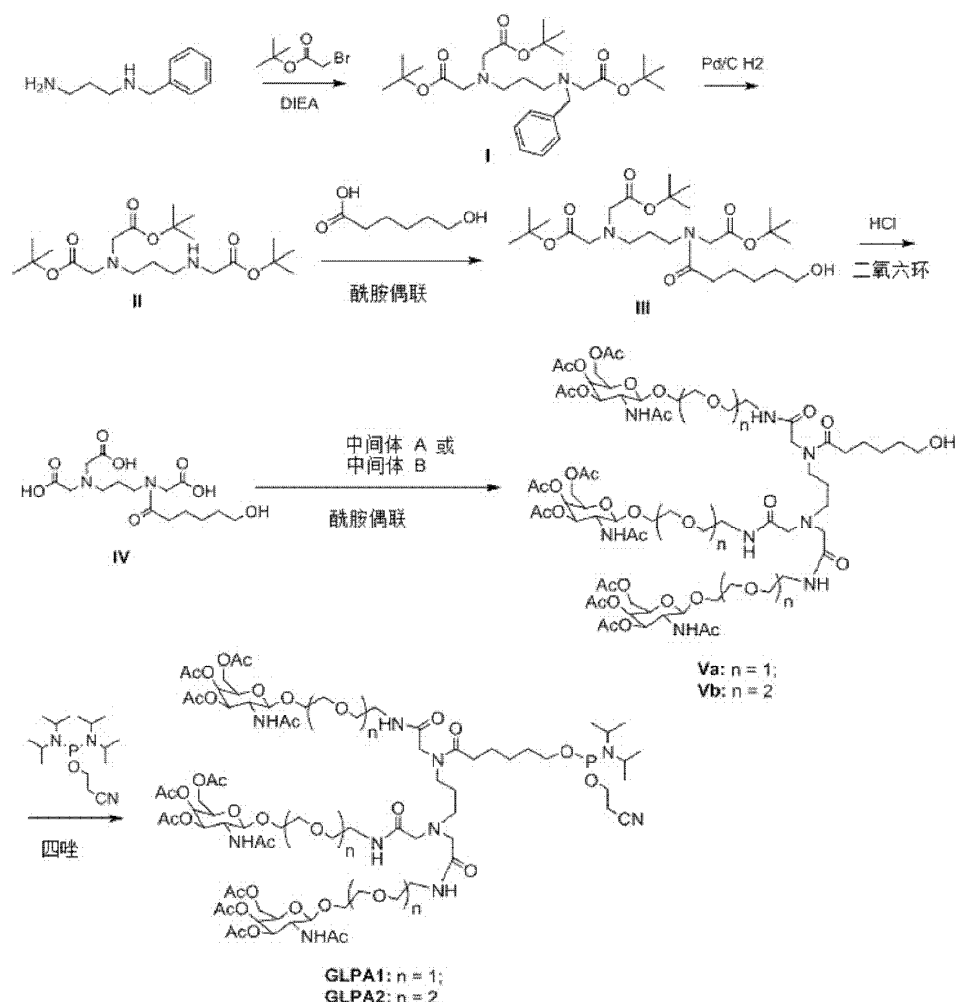
- ^1H NMR (400 MHz $\text{DMSO}-d_6$): δ ppm 7.90 (br d, $J=9.03$ Hz, 4 H), 5.21 (d, $J=3.51$ Hz, 1 H), 4.97 (dd, $J=11.1$ Hz, 1 H), 4.54 (d, $J=8.53$ Hz, 1 H), 3.98 - 4.06 (m, 3 H), 3.88 (dt, $J=10.9$ Hz, 1 H), 3.76 - 3.83 (m, 1 H), 3.49 - 3.61 (m, 9 H), 2.97 (br s, 2 H), 2.10 (s, 3 H), 1.99 (s, 3 H), 1.88 (s, 3 H), 1.78 (s, 3 H)。
- 15

$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{11}$ 的质量计算值: 478.22; 实测值: 479.3 ($\text{M}+\text{H}^+$)。

实施例 3. GalNAc 配体簇亚磷酰胺 GLPA1、GLPA2 和 GLPA15 的合成

- 20 根据以下方案 2 来制备 GLPA1 和 GLPA2。从苄基保护的丙烷-1,3-二胺开始, 将其用 2-溴乙酸叔丁酯进行烷基化以得到三酯化合物 I。通过氢化除去苄基保护基以得到仲胺化合物 II。酰胺与 6-羟基己酸偶联得到化合物 III。然后在二氧六环中的 HCl 处理后除去叔丁基保护基, 以产生三酸化合物 IV。在三酸化合物 IV 与中间体 A 或中间体 B 之间进行酰胺偶联,

以得到化合物 Va 或 Vb。亚磷酰胺 GLPA1 或 GLPA2 是通过用 2-氰乙基 N,N-二异丙基氯亚磷酰胺和催化量的 1H-四唑使化合物 Va 或 Vb 磷酸化来合成的。



5 方案 2

向 N-苄基-1,3-丙二胺 (5.00 g, 30.4 mmol) 在二甲基甲酰胺 (DMF, 100 mL) 中的溶液添加 2-溴乙酸叔丁酯 (23.7 g, 121 mmol), 随后逐滴添加二异丙基乙胺 (DIEA, 23.61 g, 182 mmol)。将所得反应混合物在 25°C 至 30°C 下搅拌 16 小时。LCMS 显示 N-苄基-1,3-丙二胺已完全耗尽。将反应混合物用 H₂O (500 mL) 稀释并用 EtOAc (500 mL×2) 萃取。将合并的有机物用饱和盐水 (1 L) 洗涤, 经无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 并在减压下浓缩以得到粗制产物, 将其通过硅胶柱色谱 (梯度: 石油醚:乙酸乙酯

为 20:1 至 5:1) 纯化。得到作为无色油状物的化合物 I (12.1 g, 78.4% 产率)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.26 - 7.40 (m, 5 H), 3.79 (s, 2 H), 3.43 (s, 4 H), 3.21 (s, 2 H), 2.72 (dt, $J = 16.9, 7.34$ Hz, 4 H), 1.70 (quin, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 1.44 - 1.50 (m, 27 H).

用氩气吹扫经干燥的氢化瓶三次。添加 Pd/C (200 mg, 10%), 随后
5 添加 MeOH (5 mL), 并且然后添加化合物 I (1.00 g, 1.97 mmol) 在 MeOH
(5 mL) 中的溶液。将反应混合物在真空下脱气并用 H_2 重新填充。将该
过程重复三遍。将混合物在 H_2 (15 psi) 气氛下在 25°C 下搅拌 12 小时。
LCMS 显示化合物 I 已完全耗尽。在 N_2 气氛下在减压下过滤反应混合物。
在减压下浓缩滤液, 以得到作为黄色油状物的化合物 II (655 mg, 79.7%
10 产率), 其无需进一步纯化即可用于下一步。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 3.44 (s, 4 H), 3.31
(s, 2 H), 2.78 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 2.68 (t, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 1.88 (br s, 1 H), 1.69 (quin, $J = 7.03$
Hz, 2 H), 1.44 - 1.50 (s, 27 H).

将化合物 II (655 mg, 1.57 mmol)、6-羟基己酸 (249 mg, 1.89 mmol)、
DIEA (1.02 g, 7.86 mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐
(EDCI, 904 mg, 4.72 mmol) 和 1-羟基苯并三唑 (HOBt, 637 mg, 4.72
15 mmol) 在 DMF (6 mL) 中的混合物脱气并用 N_2 吹扫 3 次, 并且然后在
 N_2 气氛下在 25°C 下搅拌 3 小时。LCMS 指示期望的产物。将反应混合物
用 H_2O (10 mL) 稀释并用 EtOAc 20 mL (10 mL $\times$ 2) 萃取。合并有机物
并用饱和盐水 (20 mL) 洗涤, 经无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并浓缩以得到
粗制产物, 将其通过硅胶柱色谱 (梯度: 石油醚: 乙酸乙酯为 5:1 至 1:1)
20 纯化以得到作为黄色油状物的化合物 III (650 mg, 77.8% 产率)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 3.90 - 3.95 (s, 2 H), 3.63 (t, $J = 6.40$
Hz, 2 H), 3.38 - 3.45 (m, 6 H), 2.72 (t, $J = 6.65$ Hz, 2 H), 2.40 (t, $J = 7.28$ Hz, 2 H), 1.55 - 1.75
(m, 8 H), 1.44 (s, 27 H).

$\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_8$ 的质量计算值: 530.36; 实测值: 531.3 ($\text{M}+\text{H}^+$)。

将化合物 III (5.5 g, 10.3 mmol) 在 HCl/二氧六环 (2 M, 55 mL) 中的
混合物在 25°C 下搅拌 3 小时。LCMS 显示化合物 III 完全耗尽。将反应

混合物过滤，用 EtOAc (50 mL) 洗涤，并在减压下干燥，以得到粗制产物。将其溶解在 CH₃CN (50 mL) 中，在真空下除去挥发物。将该过程重复 3 次，以得到作为白色固体的化合物 IV (2.05 g, 54.5%产率)。

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ ppm 4.21 (s, 1 H), 4.07 (d, *J* = 4.5 Hz, 4 H), 3.99 (s, 1 H),

3.45 - 3.52 (m, 3 H), 3.42 (t, *J* = 6.5 Hz, 1 H), 3.32 - 3.38 (m, 1 H), 3.24 - 3.31 (m, 1 H), 2.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 2.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 1.99 (dt, *J* = 15.5, 7.53 Hz, 1 H), 1.85 - 1.94 (m, 1 H), 1.85 - 1.94 (m, 1 H), 1.39 - 1.56 (m, 4 H), 1.19 - 1.31 (m, 2 H).

5

将化合物 IV (500 mg, 1.05 mmol)、中间体 A (2.02 g, 3.67 mmol)、DIEA (813 mg, 6.30 mmol)、EDCI (704 mg, 3.67 mmol) 和 HOBt (496 mg, 3.67 mmol) 在 DMF (10 mL) 中的混合物脱气并用 N₂ 吹扫 3 次，并且然后将混合物在 N₂ 气氛下在 25°C 下搅拌 3 小时。LCMS 指示期望的产物。将反应混合物通过添加 H₂O (10 mL) 来淬灭，用 DCM (10 mL×2) 萃取。将合并的有机物用 10% 柠檬酸 (20 mL) 萃取。将水相用饱和 NaHCO₃ 溶液中和并用 DCM (10 mL×2) 再萃取。将有机物经硫酸钠干燥，过滤并在减压下浓缩，以得到作为白色固体的化合物 Va (570 mg, 0.281 mmol, 26.8%产率)。

10

¹H NMR: (400 MHz,

CDCl₃) ppm δ 7.84 - 8.12 (m, 3 H), 6.85 - 7.15 (m, 2 H), 6.66 - 6.81 (m, 1 H), 5.36 (br d, *J* = 2.7 Hz, 3 H), 5.11 - 5.27 (m, 3 H), 4.63 - 4.85 (m, 3 H), 3.90 - 4.25 (m, 18 H), 3.37 - 3.75 (m, 28 H), 3.15 - 3.28 (m, 4 H), 2.64 (br d, *J* = 6.53 Hz, 2 H), 2.30 - 2.46 (m, 2 H), 2.13 - 2.18 (m, 9 H), 2.05 (s, 9 H), 1.94 - 2.03 (m, 18 H), 1.68 (br s, 2 H), 1.45 (br s, 2 H), 1.12 (br t, *J* = 7.0 Hz, 2 H).

15

在环境温度下在 N₂ 下向化合物 Va (260 mg, 0.161 mmol) 在无水 DCM (5 mL) 中的溶液添加二异丙基铵四唑化物 (30.3 mg, 0.177 mmol)，随后逐滴添加 3-双(二异丙基氨基)磷酰氧基丙腈 (194 mg, 0.645 mmol)。将反应混合物在 20°C 至 25°C 下搅拌 2 小时。LCMS 指示化合物 Va 已完全耗尽。在冷却至 -20°C 之后，在 0°C 下将反应混合物添加至搅拌的盐水/饱和 NaHCO₃ 水溶液 (1:1, 5 mL) 中。在搅拌 1 分钟之后，添加 DCM (5 mL)。分离层。将有机物用盐水/饱和 NaHCO₃ 水溶液 (1:1, 5 mL) 洗涤，经 Na₂SO₄ 干燥，过滤并浓缩至约 1 mL 体积。在搅拌的情况下将残余物溶液逐滴添加至 20 mL 甲基叔丁基醚 (MTBE)。这导致白色固体沉淀。将混合物离

20

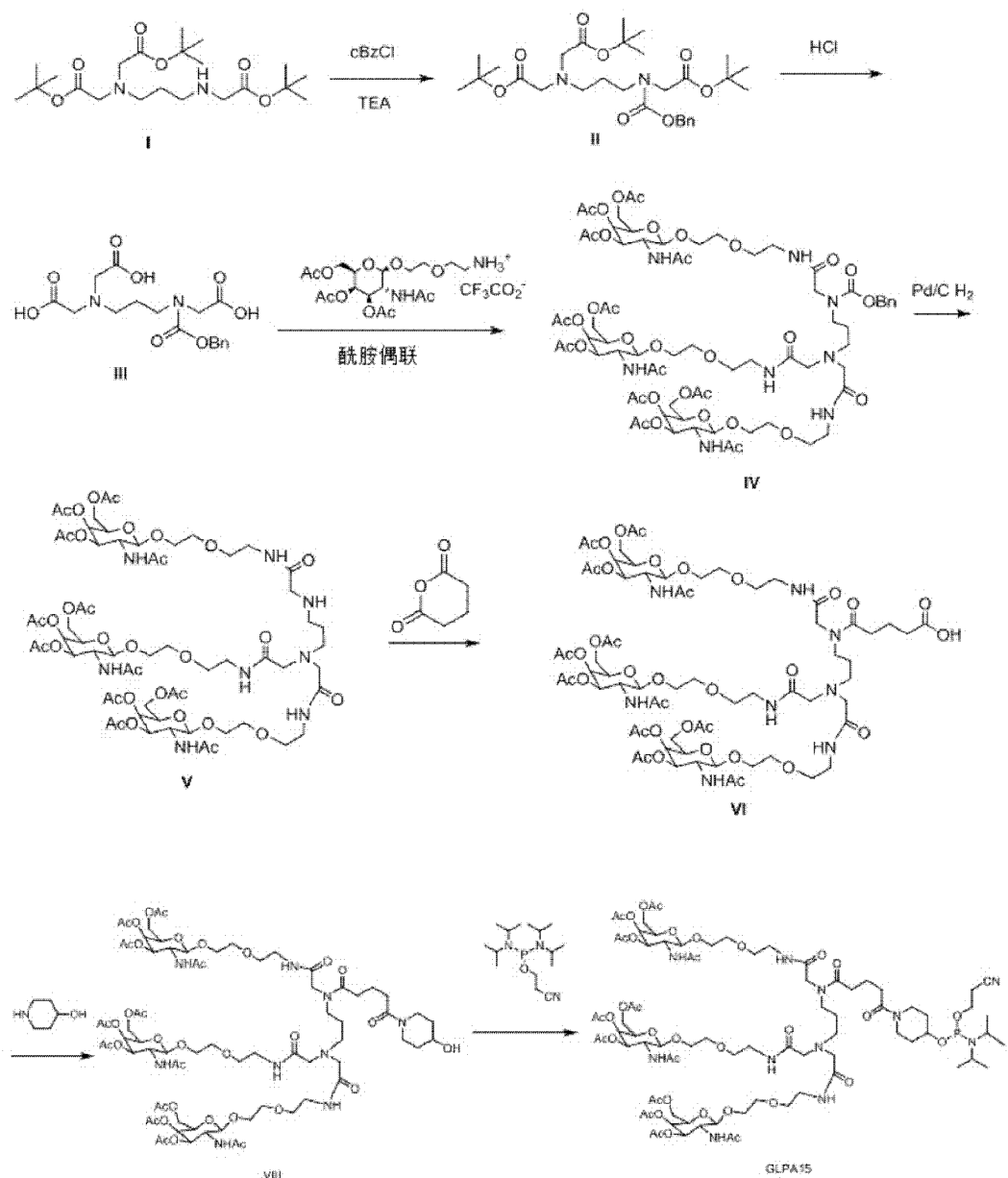
心，并收集固体。将固体重新溶解在 1 mL DCM 中并通过添加 MTBE (20 mL) 沉淀。通过离心再次分离固体。将收集的固体溶解在无水 CH₃CN 中。除去挥发物。将该过程再重复两次，以得到作为白色固体的 GalNAc 配体亚磷酰胺化合物 GLPA1 (153 mg, 84.4 μmol)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): ppm δ 7.71 - 8.06 (m, 2 H), 6.60 - 7.06 (m, 3 H), 5.37 (br d, J = 3.0 Hz, 3 H), 5.18 - 5.32 (m, 3 H), 4.70 - 4.86 (m, 3 H), 3.92 - 4.25 (m, 18 H), 3.42 - 3.85 (m, 30 H), 3.25 (m, 4 H), 2.59 - 2.75 (m, 4 H), 2.27 - 2.44 (m, 2 H), 2.15 - 2.20 (s, 9 H), 2.07 (s, 9 H), 1.96 - 2.03 (m, 18 H), 1.65 (br s, 4 H), 1.44 (br d, J = 7.28 Hz, 2 H), 1.14 - 1.24 (m, 12 H). ³¹P NMR (CDCl₃): ppm δ 147.15.

除了使用中间体 B 之外，使用相同的程序合成 GalNAc 配体亚磷酰胺化合物 GLPA2。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): ppm δ 7.94 - 8.18 (m, 1 H), 7.69 (br s, 1 H), 6.66 - 7.10 (m, 3 H), 5.35 (d, J = 3.5 Hz, 3 H), 5.07 - 5.25 (m, 3 H), 4.76 - 4.86 (m, 3 H), 4.01 - 4.31 (m, 10 H), 3.91 - 4.01 (m, 8 H), 3.74 - 3.86 (m, 4 H), 3.52 - 3.71 (m, 30 H), 3.42 - 3.50 (m, 6 H), 3.15 - 3.25 (m, 4 H), 2.52 - 2.70 (m, 4 H), 2.22 - 2.45 (m, 2 H), 2.15 - 2.22 (s, 9 H), 2.06 (s, 9 H), 1.95 - 2.03 (m, 18 H), 1.77 (br s, 2 H), 1.58 - 1.66 (m, 4 H), 1.40 (m, 2 H), 1.08 - 1.24 (m, 12 H). ³¹P NMR (CDCl₃): ppm δ 147.12.

根据以下方案 3 来制备 GLPA15。



方案 3

从仲胺化合物 I (方案 2 中的化合物 II) 开始, 引入 Cbz 保护以得到化合物 II。通过用酸处理来除去化合物 II 的叔丁基, 以得到三酸化合物 III。化合物 III 与中间体 A 进行酰胺偶联得到化合物 IV。通过氢化除去化合物 IV 的 Cbz 保护基, 以得到仲胺化合物 V, 其与戊二酸酐反应以得到羧基化合物 VI。化合物 VI 与哌啶-4-醇在酰胺偶联反应条件下反应以得到化合

物 VII。通过用 2-氰乙基 N,N-二异丙基氯亚磷酰胺和催化量的 1H-四唑处理化合物 VII 合成亚磷酰胺化合物 GLPA15。

^1H NMR (400 MHz 在 DMSO- d_6 中): δ ppm 8.05 (br d, $J = 6.50$ Hz, 2 H), 7.81 (br d, $J = 9.01$ Hz, 3 H), 5.22 (d, $J = 3.25$ Hz, 3 H), 4.98 (dd, $J = 11.26, 3.25$ Hz, 3 H), 4.55 (br d, $J = 8.50$ Hz, 3 H), 4.03 (s, 9 H), 3.64 - 3.97 (m, 12 H), 3.55 - 3.63 (m, 6 H), 3.50 (br s, 5 H), 3.40 (br d, $J = 6.13$ Hz, 6 H), 3.17 - 3.30 (m, 9 H), 3.07 (br d, $J = 14.26$ Hz, 4 H), 2.76 (t, $J = 5.82$ Hz, 2 H), 2.18 - 2.47 (m, 6 H), 2.10 (s, 9 H), 1.99 (s, 9 H), 1.89 (s, 9 H), 1.78 (s, 9 H), 1.52 - 1.74 (m, 6 H), 1.12 - 1.19 (m, 12 H). ^{31}P NMR (DMSO- d_6): ppm δ 145.25.

在某些研究中，用于将包含 GalNAc 的靶向基团（本文中也称为 GalNAc 递送化合物）与有义链的 5' 末端连接的方法包括使用合成过程在固相合成的最后的偶联步骤中使用 GalNAc 亚磷酰胺（GLPA1），所述合成过程例如如果进行了向有义链的 5' 末端添加核苷酸的寡核苷酸链增长，则使用的过程。

在一些研究中，将包含 GalNAc 的靶向基团与有义链的 3' 末端连接的方法包括使用包含 GLO-n 的固体支持物（CPG）。在一些研究中，将包含 GalNAc 的靶向基团与有义链的 3' 末端连接的方法包括通过酯键将 GalNAc 靶向基团与 CPG 固体支持物连接，并在合成有义链时使用所得的具有所连接的 GalNAc 靶向基团的 CPG，这导致 GalNAc 靶向基团连接在有义链的 3' 末端。

15

实施例 4. HBV siRNA 双链体的体外筛选

HBV 转染的 HepG2.2.15 细胞系用于 HBV siRNA 剂的体外评价。将 HepG2.2.15 细胞接种到 96 孔板中并使用 Lipofectamine® RNAiMax 作为转染剂，用 HBV siRNA 剂以终浓度为 0.04 nM、0.2 nM 和 1 nM 转染。在接种之后在 72 小时的天数时收集上清液。通过 ELISA 测定确定 HBsAg 水平。通过将来自用 HBV siRNA 剂转染的样品的 HBsAg 水平与未经转染的对照样品（仅 Lipofectamine® RNAiMax）的 HBsAg 水平进行比较来计算敲低活性。一式三份进行实验。结果总结在表 5 和表 7 中。即使在 0.04 nM 下，多种 siRNA 也表现出抑制 HBsAg 表达的良好活性。选择了表现出良好至优异活性的一组 siRNA 用于体内测试。

25

表 5 提供了使用多种 HBV RNAi 剂来抑制 HBsAg 表达的体外研究的实验结果。研究在本文别处描述。

双链体 ID	平均抑制 %					
	1 nM		0.2 nM		0.04 nM	
	平均抑制 %	STD	平均抑制 %	STD	平均抑制 %	STD
AV00053	90.63	1.42	75.93	3.06	12.27	14.97
AV00054	94.67	2.68	89.97	0.76	33.87	10.02
AV00055	95.73	0.45	93.83	1.59	73.23	8.74
AV00056	96.67	0.50	85.30	4.16	31.87	14.20
AV00057	96.43	1.26	97.07	1.18	82.40	5.53
AV00058	95.00	1.31	90.57	2.92	36.03	13.59
AV00059	91.20	2.00	76.17	4.09	10.47	18.77
AV00060	97.80	1.51	87.50	3.80	53.10	12.17
AV00061	84.50	2.36	60.90	2.21	6.27	16.95
AV00062	98.07	0.21	95.33	1.00	46.67	15.18
AV00063	95.93	2.06	83.13	4.39	13.00	9.62
AV00064	95.77	0.72	83.53	4.57	30.53	8.46
AV00065	96.27	2.23	77.33	7.61	33.60	2.25
AV00066	92.13	4.90	92.70	2.27	84.50	0.10
AV00067	100.00	0.00	88.33	5.35	36.33	1.50
AV00068	100.00	0.00	100.00	0.00	65.80	0.56
AV00069	98.80	0.85	99.43	0.42	54.20	2.97
AV00070	98.17	1.93	46.30	24.08	23.23	4.67
AV00071	98.67	2.31	100.00	0.00	73.80	3.10
AV00072	100.00	0.00	90.63	14.86	59.87	4.67

AV00073	69.40	20.35	9.10	47.84	15.57	5.60
AV00074	96.33	5.03	87.77	21.19	47.83	2.30
AV00075	98.70	1.30	93.40	5.67	23.60	7.57
AV00076	99.87	0.23	99.23	1.33	67.47	3.49
AV00077	85.17	1.46	70.33	4.53	16.77	11.78
AV00078	99.10	0.56	97.57	0.35	45.03	6.45
AV00079	95.10	4.20	86.73	4.76	31.93	8.95
AV00080	97.47	1.82	86.80	9.95	66.50	5.65
AV00081	93.23	1.10	86.40	2.65	27.10	9.13
AV00082	99.50	0.30	94.13	6.13	66.97	4.65
AV00083	97.47	1.86	97.93	0.50	68.70	3.44
AV00084	89.00	0.98	43.77	15.95	-0.50	6.14
AV00085	95.97	3.27	91.37	2.48	29.77	3.66
AV00086	86.07	5.26	59.50	6.22	8.57	14.39
AV00087	89.30	6.01	72.20	12.25	8.97	15.45
AV00088	94.27	1.76	73.57	13.73	17.63	6.99
AV00089	90.40	2.42	63.83	1.03	13.13	6.35
AV00090	96.60	1.61	89.40	3.03	53.97	2.35
AV00091	98.57	1.10	91.00	2.76	27.00	6.85
AV00092	97.50	1.04	76.47	6.39	26.00	4.83
AV00093	90.03	2.39	69.10	12.06	17.60	2.89
AV00094	99.27	0.67	93.07	4.28	50.97	2.95
AV00095	74.97	11.41	45.83	4.92	12.93	6.32
AV00096	91.47	5.18	57.00	8.34	16.63	5.01
AV00097	95.07	4.41	88.97	4.10	37.70	5.44
AV00098	94.43	4.24	90.77	5.54	47.20	3.93
AV00099	71.93	7.96	50.13	3.15	2.30	6.85
AV00100	87.47	7.27	63.53	9.72	-6.77	8.80
AV00101	85.37	4.18	42.27	3.23	-26.43	7.90
AV00102	94.37	5.36	67.73	3.02	-8.20	11.91
AV00103	94.00	4.22	89.53	3.81	-3.00	28.80
AV00104	87.47	6.82	49.17	8.36	-12.00	22.88
AV00105	99.90	0.10	96.67	3.31	14.30	11.61
AV00106	99.87	0.23	97.80	0.17	29.37	6.09
AV00107	99.47	0.35	90.70	3.33	19.50	17.00
AV00108	35.03	21.35	12.67	11.81	-19.73	14.65
AV00109	96.70	3.29	83.33	8.02	7.23	25.36
AV00110	100.00	0.00	98.57	1.69	42.07	13.88
AV00111	75.00	4.19	27.70	12.06	-13.33	15.88
AV00112	87.77	7.50	45.77	15.87	-4.43	14.34
AV00113	27.57	11.66	-24.07	8.65	-29.53	15.30
AV00114	93.57	3.10	78.80	2.17	13.97	14.85
AV00115	97.80	1.08	87.17	4.20	41.20	11.26
AV00116	83.93	4.89	67.27	6.91	9.20	10.00
AV00117	77.70	7.43	38.80	7.43	3.97	13.49
AV00118	94.00	1.56	73.37	1.80	11.07	6.13
AV00119	89.57	0.80	58.37	3.71	19.47	7.41

AV00120	99.37	0.31	93.83	3.79	69.20	5.57
AV00121	74.83	5.31	30.57	4.15	7.47	8.98

表 7 提供了使用多种 HBV RNAi 剂来抑制 HBsAg 表达的体外研究的实验结果。研究在本文别处描述。

双链体ID	平均抑制%			
	1 nM		0.04 nM	
	平均抑制 %	STD	平均抑制%	STD
AV01258	66.03	1.07	38.84	2.63
AV01259	72.73	4.06	65.13	9.34
AV01260	58.50	3.97	34.51	4.09
AV01261	59.10	1.43	21.00	1.75
AV01262	-15.58	20.65	-17.77	8.32
AV01263	15.93	4.77	-17.45	1.53
AV01264	59.66	2.33	13.49	6.44
AV01265	41.12	1.62	-0.45	7.85
AV01266	62.29	1.64	17.87	0.70
AV01267	71.24	0.85	39.46	1.50
AV01268	60.34	0.74	55.60	0.92
AV01269	65.40	4.10	39.61	4.23
AV01270	64.13	0.55	38.87	4.02
AV01271	63.81	1.41	43.45	0.03
AV00057	67.84	1.86	56.32	0.52
AV01273	63.25	2.93	57.11	2.13
AV01274	79.59	3.34	64.74	0.86
AV01275	74.55	0.72	61.25	3.99
AV01276	66.64	4.38	48.82	4.31
AV01277	74.44	6.63	58.12	4.08
AV01278	68.11	6.86	47.17	2.04
AV01279	60.16	7.07	37.95	5.21
AV01280	67.92	1.28	14.83	1.57
AV01281	79.62	2.15	65.34	0.75
AV01282	80.38	0.46	61.42	3.25
AV01283	72.42	1.26	42.27	0.13
AV01284	74.42	5.62	48.43	6.25
AV01285	76.18	1.72	47.59	8.98
AV01286	85.49	0.35	66.22	0.19
AV01287	64.66	8.63	27.79	1.00
AV01288	73.01	3.07	67.60	2.03
AV01289	83.68	1.19	73.41	2.26
AV01290	70.77	2.12	48.65	1.49
AV01291	70.65	1.84	45.80	4.70
AV01293	67.51	7.01	32.56	0.71
AV01294	25.93	2.24	9.62	3.68
AV01295	61.92	3.37	22.19	9.25
AV01296	78.13	3.35	59.18	3.85

AV01297	87.50	0.34	63.20	1.81
AV01298	79.02	1.49	61.64	1.84
AV01299	81.97	2.66	70.71	1.67
AV01300	82.36	1.15	70.33	3.88
AV01301	79.96	4.2	62.60	1.72
AV01302	90.58	2.54	60.88	1.49
AV01303	92.07	2.04	65.97	1.79
AV01304	92.79	6.13	71.91	1.29
AV01305	88.40	4.12	55.36	4.69
AV01306	78.13	1.3	14.30	6.85
AV01307	88.38	1.46	57.92	8.49
AV01308	85.08	0.4	58.98	0.73
AV01309	86.50	2.65	51.86	0.57
AV01310	72.74	12.22	41.82	10.07
AV01311	57.74	1.11	21.57	13.04
AV01312	82.52	2.71	69.91	12.08
AV01313	89.11	2.47	75.06	2.05
AV01314	95.40	2.23	88.25	3.28
AV01315	94.62	0.72	62.81	9.21
AV01316	93.43	0.52	69.42	5.12
AV01317	92.85	2.39	78.99	1.25
AV01318	88.86	1.02	60.18	13.13
AV01319	90.65	0.40	77.74	4.85

实施例 5. siRNA 剂的体内筛选

使用 AAV-HBV 小鼠模型评价 HBV siRNA 剂的体内效力。用 1×10^{11} rAAV8-1.3 HBV 病毒基因组通过尾静脉注射感染雄性 C57BL/6 小鼠（5 周龄）。在感染之后 14 天，采取血液样品并通过 ELISA 测定测量小鼠血清中的 HBsAg。选择具有高 HBsAg 表达水平（ $\log \text{HBsAg IU/ml} > 4.9$ ）的小鼠进行研究。在感染之后第 18 天，向每只小鼠皮下施用单次 3 mg/kg 剂量的 HBV siRNA 或 PBS 对照。在给药之后第 7 天和第 14 天抽取血液样品。通过 ELISA 测定测量血清 HBsAg。将每只动物在某个时间点的 HBsAg 水平除以该动物的处理前表达水平（感染之后第 14 天），以确定“相对于处理前归一化”的表达的比率。通过将单个动物的“相对于处理前归一化”比率除以 PBS 对照组中所有小鼠的平均“相对于处理前归一化”比率来计算敲低活性。结果总结在表 6 中。确定高效的 HBV siRNA。特别地，用 siRNA 剂 AD00170、AD00263、AD00265、AD00267、AD00268、AD00269、AD00173 和 AD00176 处理的小鼠显示 HBsAg 降低超过 96%（相对于处理前归一化）。在本实施例中，表 3 中所述化合物中的 GLO-0 是指 Jayaprakash, et al., (2014) J. Am. Chem. Soc., 136, 16958–16961 中的化合物 GalNAc3。

表 6. 经 AAV-HBV 转导小鼠中的 HBV siRNA 单次 3 mpk 皮下剂量筛选。将小鼠血清中 HBsAg 降低的百分比相对于 siRNA 给药前 HBsAg 水平和 PBS 对照组归一化。

双链体 ID	在 siRNA 处理之后 7 天和 14 天小鼠血清中 HBsAg 的降低百分比	
	第 7 天	第 14 天
AD00166	75.98%	39.95%
AD00167	70.82%	81.65%
AD00168	95.79%	89.35%
AD00169	94.07%	87.96%
AD00170	99.68%	99.34%
AD00171	48.41%	35.98%
AD00172	83.22%	87.40%
AD00173	96.00%	95.92%
AD00174	44.78%	3.08%
AD00175	57.40%	48.30%
AD00176	91.10%	96.39%
AD00177	64.43%	72.23%
AD00261	68.52%	88.31%
AD00262	87.71%	93.28%
AD00263	98.90%	98.97%
AD00264	55.87%	69.62%
AD00265	86.59%	96.14%
AD00266	90.70%	95.80%
AD00267	99.93%	99.91%
AD00268	98.95%	98.55%
AD00269	96.95%	98.01%
AD00270	85.03%	77.79%
AD00271	79.51%	90.03%
AD00272	76.43%	79.85%
AD00273	55.91%	56.05%

实施例 6. siRNA 剂在 AAV-HBV 小鼠模型中的体内测试

使用 AAV-HBV 小鼠模型评价 HBV siRNA 剂的体内效力。用 1×10^{11} rAAV8-1.3 HBV 病毒基因组通过尾静脉注射感染雄性 C57BL/6 小鼠（5 周龄）。在感染之后 14 天，采取血液样品并通过 ELISA 测定测量小鼠血清中的 HBsAg。选择具有高 HBsAg 表达水平（log HBsAg IU/ml > 4.9）的小鼠进行研究。在感染之后第 18 天，每只小鼠皮下施用单次 3 mg/kg 剂量的 HBV siRNA 或 PBS 对照。在给药之后第 7 天、第 14 天和第 21 天抽取血液样品。通过 ELISA 测定测量血清 HBsAg 和 HBeAg。将每只动物在某个时间点的 HBsAg 和 HBeAg 水平除以该动物的处理前表达水平（感染之后第 14 天），以确定“相对于处理前归一化”的表达比率。通过将单个动物

的“相对于处理前归一化”比率除以 PBS 对照组中所有小鼠的平均“相对于处理前归一化”比率来计算敲低活性。结果总结在表 8 和表 9 中。确定高效的 HBV siRNA。特别地，用 siRNA 剂 AD00170、AD00263、AD00267、AD00378、AD00383 和 AD00384 处理的小鼠显示 HBsAg 降低超过 96%（相对于处理前归一化）。在本实施例中，表 3 中所述化合物中的 GLO-0 是指 Jayaprakash, et al., (2014) J. Am. Chem. Soc., 136, 16958–16961 中的化合物 GalNAc3。

表 8. 经 AAV-HBV 转导小鼠中的 HBV siRNA 单次 3 mpk 皮下剂量筛选。将小鼠血清中 HBsAg 降低的百分比相对于 siRNA 给药前 HBsAg 水平和 PBS 对照组归一化。

双链体 ID	在 siRNA 处理之后 7、14 和 21 天小鼠血清中 HBsAg 的降低百分比		
	第 7 天	第 14 天	第 21 天
AD00170	98.55±0.47	99.69±0.30	99.73±0.22
AD00263	99.04±0.33	99.54±0.37	99.29±0.24
AD00266	70.27±14.02	80.71±4.17	77.49±11.30
AD00267	98.65±0.75	99.81±0.09	99.82±0.07
AD00268	93.44±4.32	96.94±3.01	93.68±2.65
AD00269	94.45±3.19	97.49±1.56	93.99±3.79
AD00173	88.60±3.02	93.87±1.67	83.08±5.71
AD00176	77.00±5.59	87.82±3.79	67.18±12.36
AD00378	98.97±0.69	99.72±0.23	99.68±0.11
AD00383	98.86±0.61	99.84±0.05	99.76±0.08
AD00384	96.06±1.61	99.74±0.11	99.51±0.21

表 9. 经 AAV-HBV 转导小鼠中的 HBV siRNA 单次 3 mpk 皮下剂量筛选。将小鼠血清中 HBeAg 降低的百分比相对于 siRNA 给药前 HBeAg 水平和 PBS 对照组归一化。

双链体 ID	在 siRNA 处理之后 7 天、14 天和 21 天小鼠血清中 HBeAg 的降低百分比		
	第 7 天	第 14 天	第 21 天
AD00170	74.23±4.07	86.47±4.25	91.93±2.16

AD00263	91.31±1.44	90.83±1.37	88.46±2.17
AD00266	25.13±16.91	42.77±13.33	35.92±17.54
AD00267	79.30±4.46	90.58±1.67	93.04±2.38
AD00268	89.25±6.66	91.13±1.46	88.05±0.93
AD00269	86.86±4.17	83.80±4.01	80.65±3.31
AD00173	77.93±3.51	80.73±4.02	70.20±4.24
AD00176	72.77±6.78	73.11±6.83	69.58±8.28
AD00378	84.63±2.26	93.37±1.47	95.82±1.28
AD00383	85.49±1.62	93.78±1.22	96.29±1.11
AD00384	77.80±5.93	89.81±3.52	95.47±1.61

实施例 7. siRNA 剂在 AAV-HBV 小鼠模型中的体内测试

使用 AAV-HBV 小鼠模型评价 HBV siRNA 剂的体内效力。用 1×10^{11} rAAV8-1.3 HBV 病毒基因组通过尾静脉注射感染雄性 C57BL/6 小鼠（5 周龄）。在感染之后 14 天，采取血液样品并通过 ELISA 测定测量小鼠血清中的 HBsAg。选择具有高 HBsAg 表达水平（ $\log \text{HBsAg IU/ml} > 4.9$ ）的小鼠进行研究。在感染之后第 18 天，每只小鼠皮下施用单次 3 mg/kg 剂量的 HBV siRNA 或 PBS 对照。在给药之后第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天、第 35 天、第 42 天、第 49 天、第 56 天、第 63 天、第 70 天、第 77 天、第 84 天和第 91 天抽取血液样品。通过 ELISA 测定测量 HBsAg 水平，并通过 qPCR 确定 HBV DNA 水平。结果总结在图 1 和图 2 中。在本实施例中，阳性对照是 WO2020036862 中的 AD-81890。

等同方案

虽然本文中已经描述并举例说明了本发明的数个实施方案，但是本领域普通技术人员将容易想到用于执行本文所述功能和/或获得本文所述结果和/或一个或多个优点的多种其他方式和/或结构，并且每个这样的变化和/或修改均被认为在本发明的范围内。更一般地，本领域技术人员将容易理解，本文中所述的所有参数、尺寸、材料和配置旨在是示例性的，并且实际的参数、尺寸、材料和/或配置将取决于使用本发明的教导的一个或多个具体应用。本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验就能够确定本文中所述的本发明具体实施方案的许多等同方案。因此，应理解，前述实施方案仅以实例的方式呈现，并且在所附权利要求书及其等同方案的范围内，本发明可以以不同于具体描述且要求保护的方式来实施。本发

明涉及本文中所述的每种单独特征、系统、物品、材料和/或方法。另外，如果这样的特征、系统、物品、材料和/或方法不相互不一致，则两种或更多种这样的特征、系统、物品、材料和/或方法的任意组合均包括在本发明的范围内。

- 5 本文中定义和使用的所有定义应理解为优先于字典定义、通过引用并入的文件中的定义和/或所定义术语的一般含义。

除非明确地指出相反，否则如本文在说明书和权利要求书中使用的没有数量词修饰的名词应理解成意指“至少一个/种”。

- 10 如本文在说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”应理解为意指如此连接的要素中的“任一者或二者”，即所述要素在一些情况下联合存在，而在另一些情况下分离存在。除非明确指出相反，否则除由“和/或”短语明确确定的要素之外可以任选地存在其他要素，不管与这些明确确定的要素相关还是不相关。

- 15 本申请中引用或参考的所有参考文献、专利和专利申请以及出版物在此通过引用整体并入本文。

权 利 要 求 书

1. 用于抑制细胞中乙型肝炎病毒（HBV）表达的双链核糖核酸（dsRNA）剂，其中所述 dsRNA 剂包含有义链和反义链，并且任选地包含靶向配体，所述反义链中的第 2 至 18 位核苷酸包含 HBV RNA 转录物的互补区，其中所述互补区包含与表 1 至表 4 之一中列出的反义序列之一存在 0、1、2 或 3 个核苷酸差异的至少 15 个连续核苷酸。

2. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述 HBV RNA 转录物的互补区包含与表 1 至表 4 之一中列出的反义序列之一存在不超过 3 个核苷酸差异的至少 15、16、17、18 或 19 个连续核苷酸。

3. 权利要求 1 或 2 所述的 dsRNA 剂，其中 dsRNA 的所述反义链与 SEQ ID NO: 673 的任一个靶区域至少基本上互补，并且在表 1 至表 4 的任一个中提供。

4. 权利要求 3 所述的 dsRNA 剂，其中 dsRNA 的所述反义链与 SEQ ID NO: 673 的任一个靶区域完全互补，并且在表 1 至表 4 的任一个中提供。

5. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述 dsRNA 剂包含表 1 至表 4 的任一个中所示的有义链序列，其中所述有义链序列与所述 dsRNA 剂中的反义链序列至少基本上互补。

6. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述 dsRNA 剂包含表 1 至表 4 的任一个中所示的有义链序列，其中所述有义链序列与所述 dsRNA 剂中的反义链序列完全互补。

7. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述 dsRNA 剂包含表 1 至表 4 的任一个中所示的反义链序列。

8. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述 dsRNA 剂包含表 1 至表 4 的任一个中的双链体序列所示的序列。

9. 权利要求 1 所述的 dsRNA，其中所述 dsRNA 剂包含至少一个经修饰核苷酸。

10. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述反义链的所有或基本上所有核苷酸均是经修饰核苷酸。

11. 权利要求 9 或 10 所述的 dsRNA 剂，其中所述至少一个经修饰核苷酸包含：2'-O-甲基核苷酸、2'-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'3'-seco 核苷酸模拟物、锁核苷酸、解锁核苷酸核苷酸(UNA)、二醇核苷酸核苷酸(GNA)、

2'-F-阿拉伯糖核苷酸、2'-甲氧基乙基核苷酸、无碱基核苷酸、核糖醇、反向核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向 2'-OMe 核苷酸、反向 2'-脱氧核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸，及 3'-OMe 核苷酸、包含 5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸，或者与胆固醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、氨基磷酸酯，或包含非天然碱基的核苷酸。

12. 权利要求 9 或 10 所述的 dsRNA 剂，其中所述 dsRNA 剂在所述反义链的 5'末端包含 E-乙烯基磷酸酯核苷酸。

13. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述 dsRNA 剂包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。

14. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。

15. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述反义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。

16. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述有义链包含 1、2、3、4、5 或 6 个硫代磷酸酯核苷间键联。

17. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述反义链包含 1、2、3、4、5 或 6 个硫代磷酸酯核苷间键联。

18. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述有义链和所述反义链的所有或基本上所有核苷酸均是经修饰核苷酸。

19. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中经修饰有义链是表 2 至表 4 之一中所示的经修饰有义链序列。

20. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中经修饰反义链是表 2 至表 4 之一中所示的经修饰反义链序列。

21. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述有义链与所述反义链互补或基本上互补，并且所述互补区的长度为 16 至 23 个核苷酸。

22. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述互补区的长度为 19 至 21 个核苷酸。

23. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中每条链的长度不超过 30 个核苷酸。

24. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中每条链的长度不超过 25 个核苷酸。

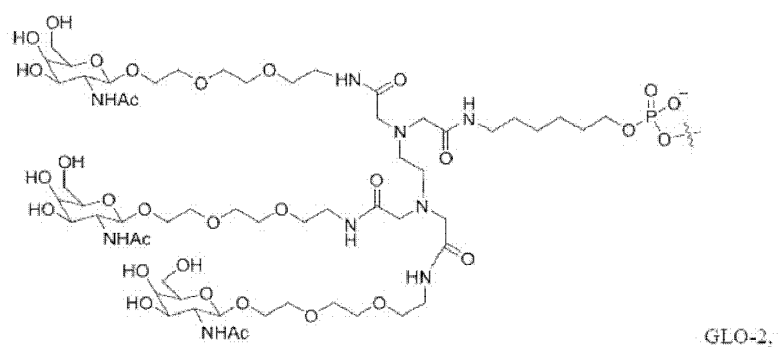
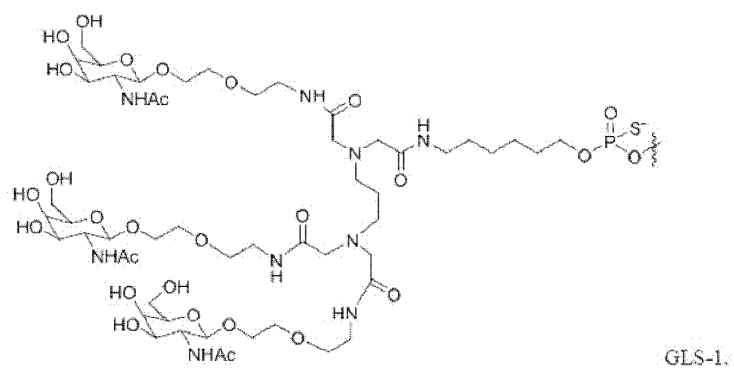
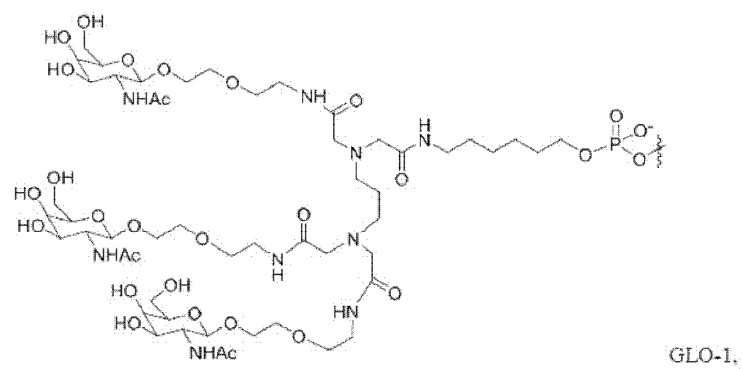
25. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中每条链的长度不超过 23 个核苷酸。

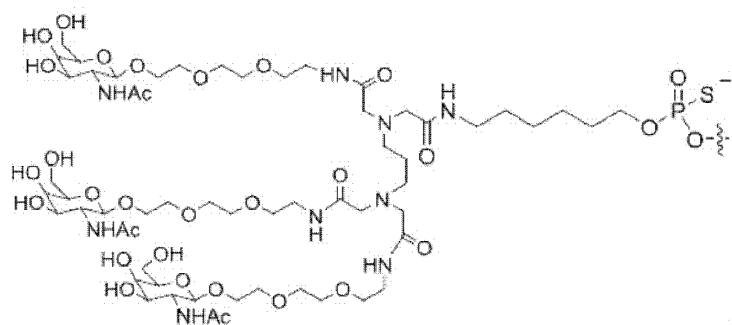
5 26. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂，其中所述 dsRNA 剂包含至少一个经修饰核苷酸并且还包含一个或多个靶向基团或连接基团。

27. 权利要求 26 所述的 dsRNA 剂，其中所述一个或多个靶向基团或连接基团与所述有义链缀合。

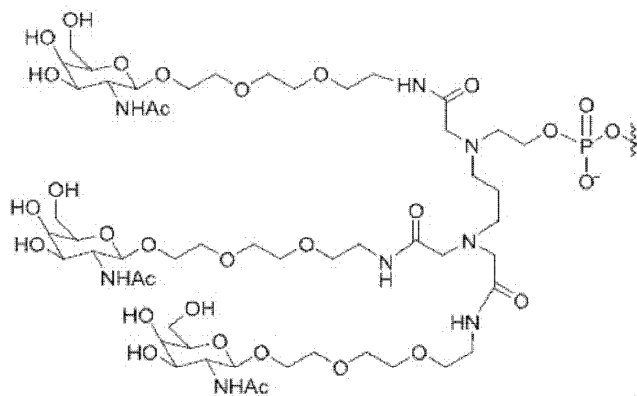
10 28. 权利要求 26 或 27 所述的 dsRNA 剂，其中所述靶向基团或连接基团包含 N-乙酰基-半乳糖胺 (GalNAc)。

29. 权利要求 26 或 27 所述的 dsRNA 剂，其中所述靶向基团具有以下结构：

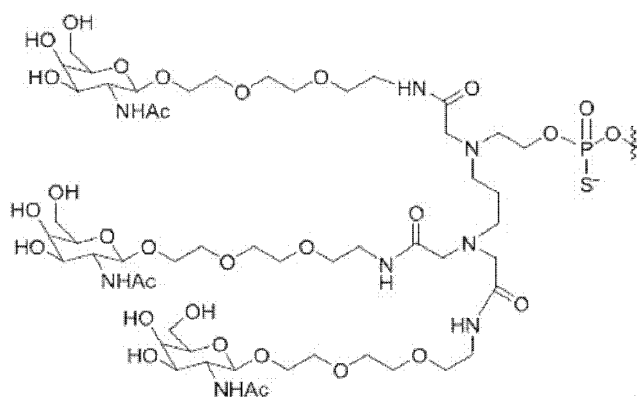




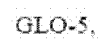
GLS-2,

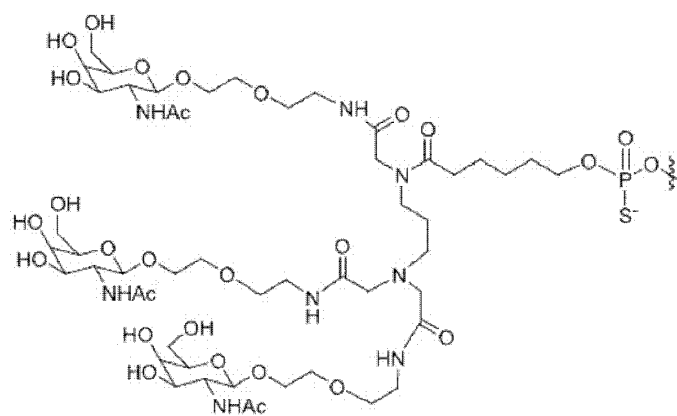


GLO-3

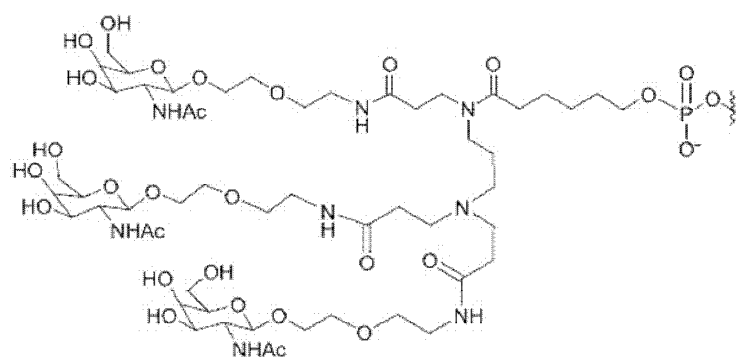


GLS-3,

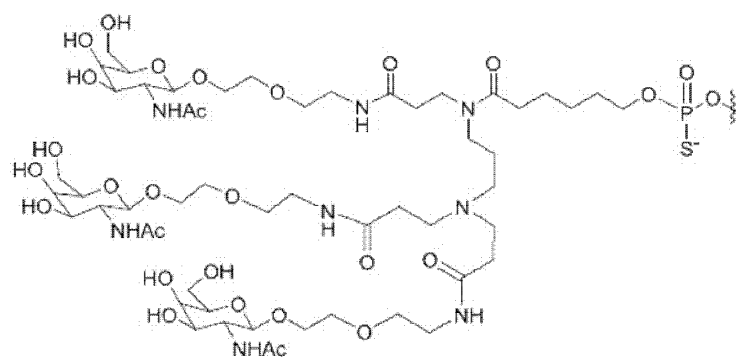




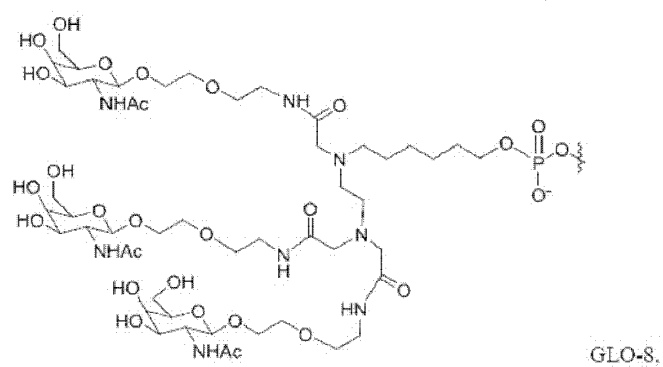
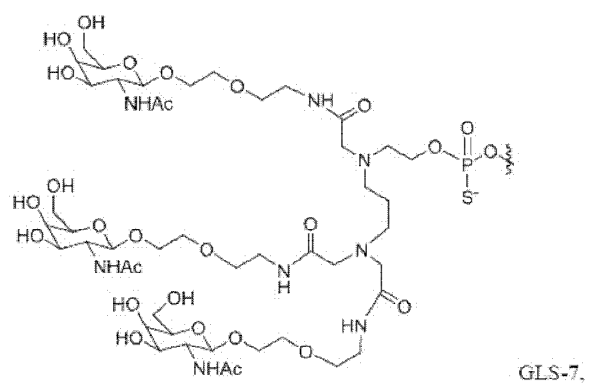
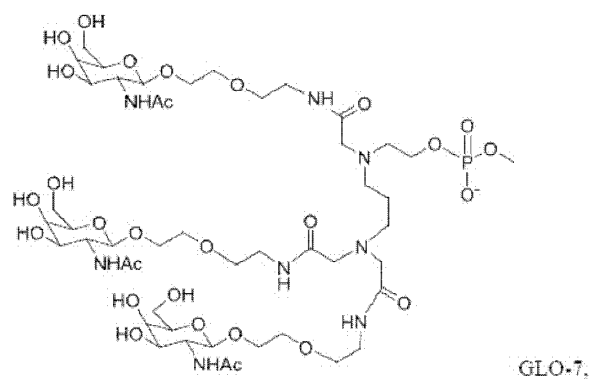
GLS-5.

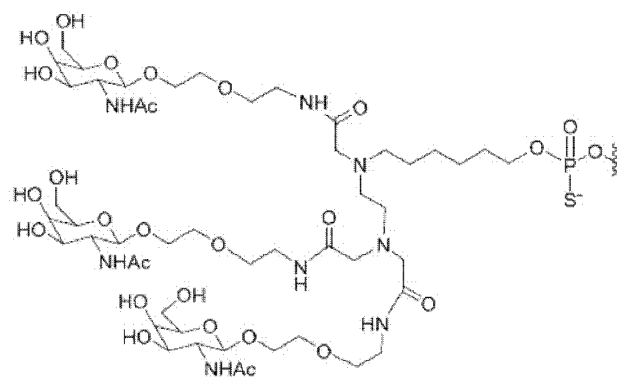


GLO-6.

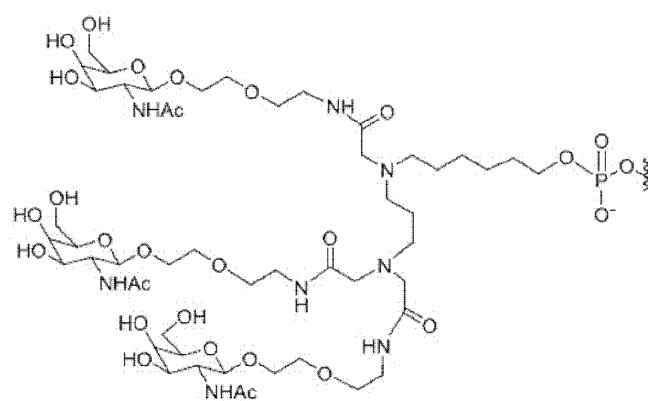


GLS-6.

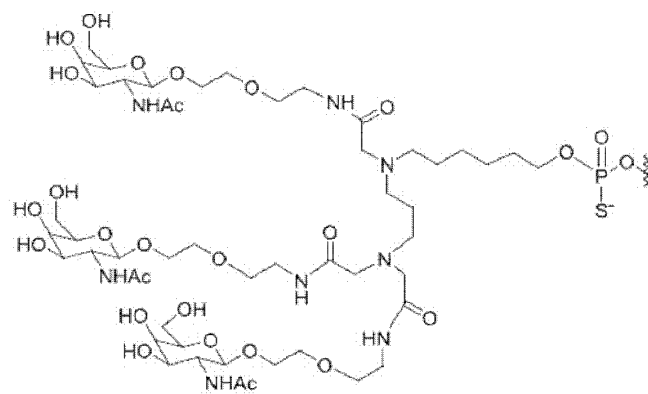




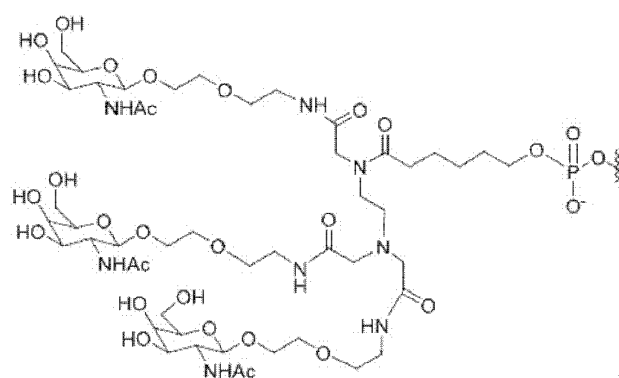
GLS-8,



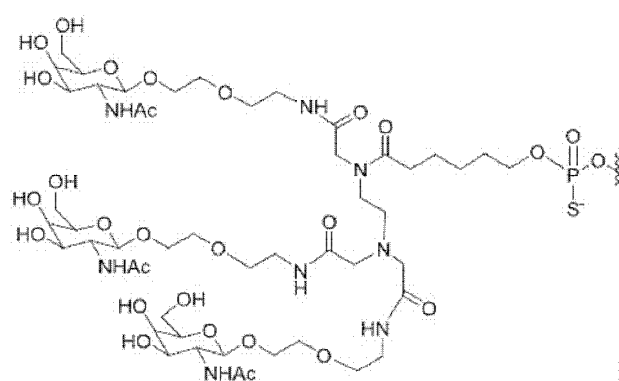
GLO-9,



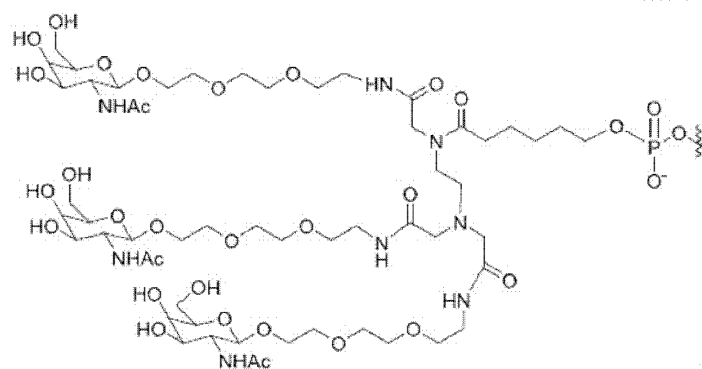
GLS-9,



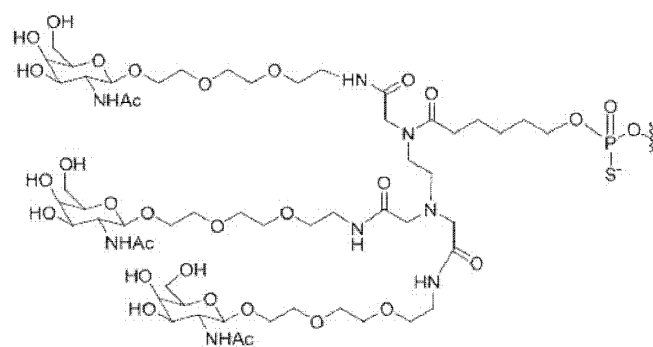
GLO-10,



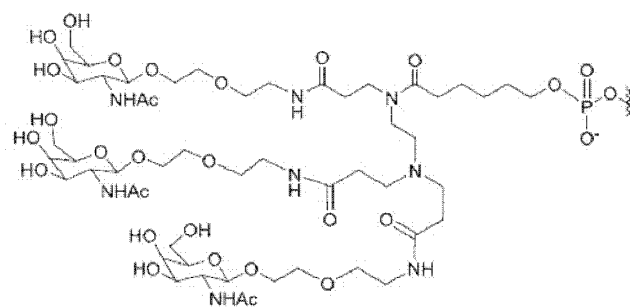
GLS-10,



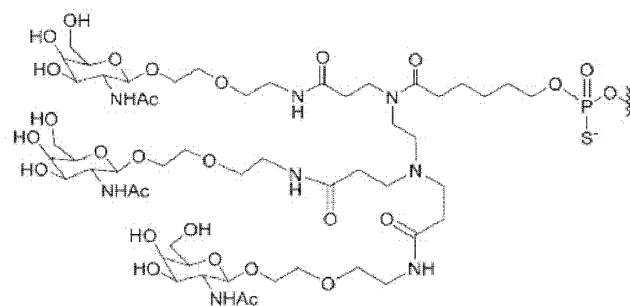
GLO-11,



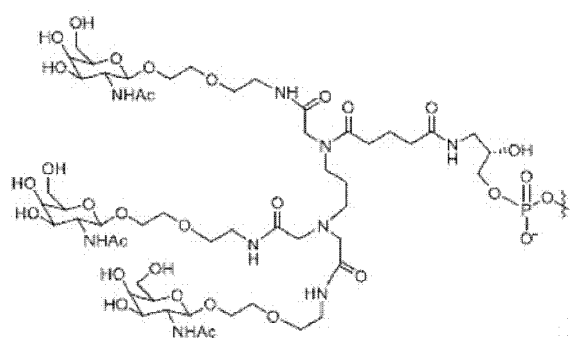
GLS-11.



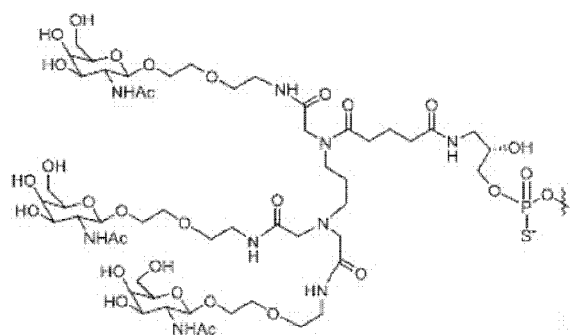
GLO-12.



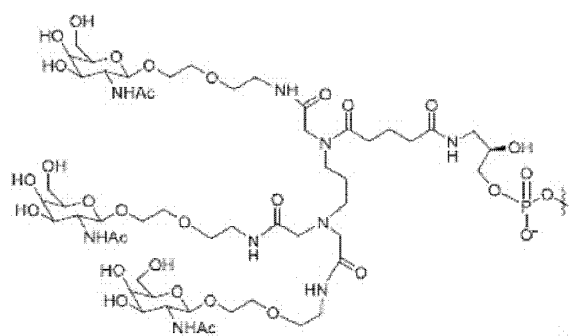
GLS-12.



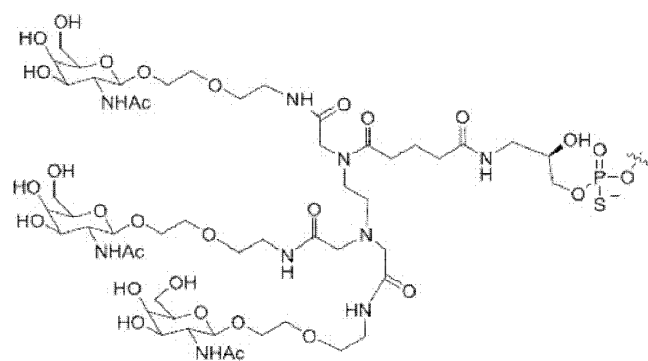
GLO-13,



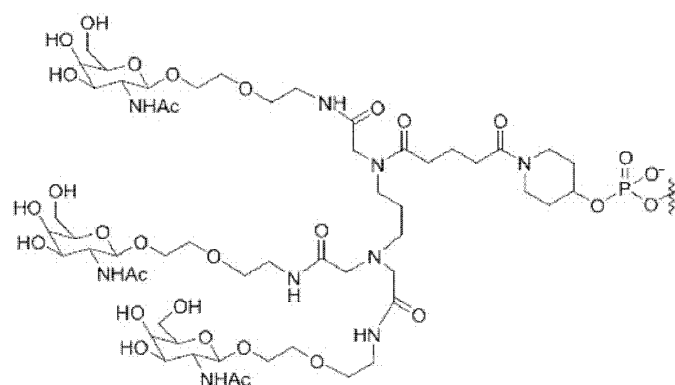
GLS-13,



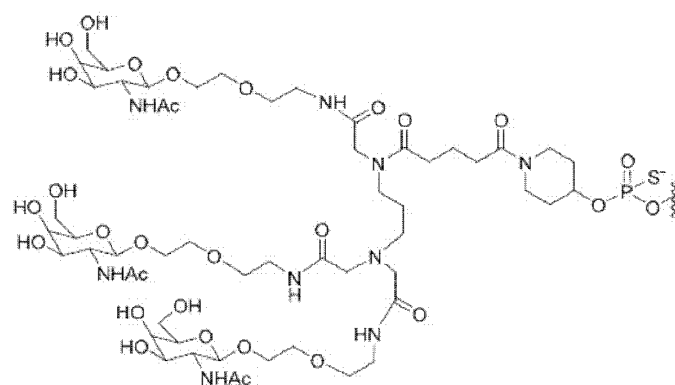
GLO-14,



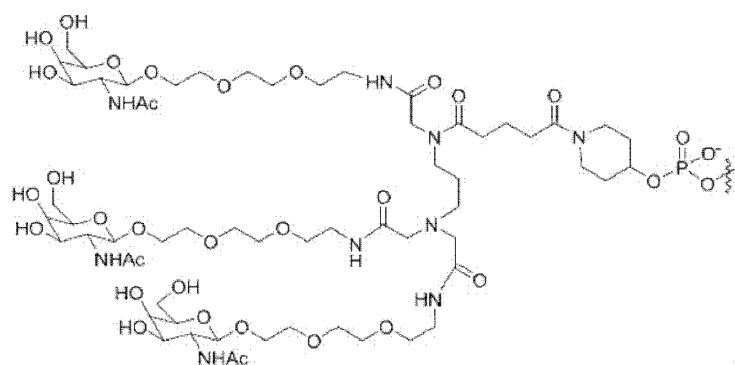
GLS-14.



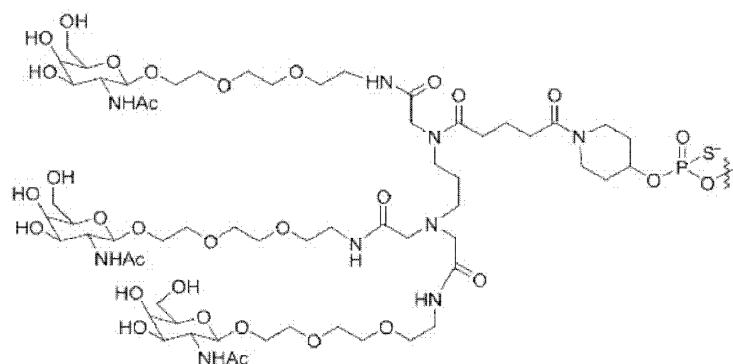
GLO-15.



GLS-15.



GLO-16. 或



GLS-16.

30. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中所述 dsRNA 剂包含与所述有义链的 5' 末端缀合的靶向基团。

31. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中所述 dsRNA 剂包含与所述有义链的 3' 末端缀合的靶向基团。

32. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中所述反义链在 3' 末端包含一个反向无碱基残基。

33. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中所述有义链在 3' 或/和 5' 末端包含一个或两个反向无碱基残基。

34. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中所述 dsRNA 剂具有两个平末端。

35. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中至少一条链包含具有至少 1 个核苷酸的 3' 突出端。

36. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中至少一条链包含具有至少 2 个核苷酸的 3' 突出端。

37. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中所述有义链包含以下之一:
SEQ ID NO: 281、290、295、300、304、306、307、331、557、567、569、
571、572、573、560、563、607、628 至 637 或 918 至 921, 优选 SEQ ID
NO: 557、607、631、918、919 或 921。

5 38. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中所述反义链包含以下之一:
SEQ ID NO: 419、428、433、438、442、444、445、469、582、592、594、
596、597、598、585、588、642、663 至 672 或 922 至 925, 优选 SEQ ID
NO: 582、642、666、922、923 或 925。

39. 权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中所述 dsRNA 剂包含 SEQ ID NO:
10 281 和 SEQ ID NO: 419; SEQ ID NO: 290 和 SEQ ID NO: 428; SEQ ID NO:
295 和 SEQ ID NO: 433; SEQ ID NO: 300 和 SEQ ID NO: 438; SEQ ID NO:
304 和 SEQ ID NO: 442; SEQ ID NO: 306 和 SEQ ID NO: 444; SEQ ID NO:
307 和 SEQ ID NO: 445; SEQ ID NO: 331 和 SEQ ID NO: 469; SEQ ID NO:
557 和 SEQ ID NO: 582; SEQ ID NO: 567 和 SEQ ID NO: 592; SEQ ID NO:
15 569 和 SEQ ID NO: 594; SEQ ID NO: 571 和 SEQ ID NO: 596; SEQ ID NO:
572 和 SEQ ID NO: 597; SEQ ID NO: 573 和 SEQ ID NO: 598; SEQ ID NO:
560 和 SEQ ID NO: 585; SEQ ID NO: 563 和 SEQ ID NO: 588; SEQ ID NO:
607 和 SEQ ID NO: 642; SEQ ID NO: 628 和 SEQ ID NO: 663; SEQ ID NO:
629 和 SEQ ID NO: 664; SEQ ID NO: 630 和 SEQ ID NO: 665; SEQ ID NO:
20 631 和 SEQ ID NO: 666; SEQ ID NO: 632 和 SEQ ID NO: 667; SEQ ID NO:
633 和 SEQ ID NO: 668; SEQ ID NO: 634 和 SEQ ID NO: 669; SEQ ID NO:
635 和 SEQ ID NO: 670; SEQ ID NO: 636 和 SEQ ID NO: 671; 或 SEQ ID
NO: 637 和 SEQ ID NO: 672; SEQ ID NO: 918 和 SEQ ID NO: 922、SEQ ID
NO: 919 和 SEQ ID NO: 923、SEQ ID NO: 920 和 SEQ ID NO: 924, 或 SEQ
25 ID NO: 921 和 SEQ ID NO: 925; 优选 SEQ ID NO: 557 和 SEQ ID NO: 582;
SEQ ID NO: 607 和 SEQ ID NO: 642、SEQ ID NO: 631 和 SEQ ID NO: 666、
SEQ ID NO: 918 和 SEQ ID NO: 922、SEQ ID NO: 919 和 SEQ ID NO: 923,
或 SEQ ID NO: 921 和 SEQ ID NO: 925。

40. 组合物, 其包含权利要求 1 至 39 中任一项所述的 dsRNA 剂中的
30 一种、两种、三种或更多种 dsRNA 剂。

41. 权利要求 40 所述的组合物, 其还包含可药用载体。

42. 权利要求 41 所述的组合物, 其还包含一种或更多种另外的治疗
剂。

43. 权利要求 42 所述的组合物，其中所述组合物被包装在药盒、容器、包装物、分配器、预填充注射器或小瓶中。

44. 权利要求 40 所述的组合物，其中所述组合物被配制用于皮下施用或被配制用于静脉内（IV）施用。

5 45. 权利要求 40 所述的组合物，其中至少一种所述 dsRNA 剂的有义链包含以下之一：SEQ ID NO: 281、290、295、300、304、306、307、331、557、567、569、571、572、573、560、563、607、628 至 637 或 918 至 921，优选 SEQ ID NO: 557、607、631、918、919 或 921。

10 46. 权利要求 40 所述的组合物，其中至少一种所述 dsRNA 剂的反义链包含以下之一：SEQ ID NO: 419、428、433、438、442、444、445、469、582、592、594、596、597、598、585、588、642、663 至 672，或 922 至 925，优选 SEQ ID NO: 582、642、666、922、923 或 925。

47. 权利要求 40 所述的组合物，其中至少一种所述 dsRNA 剂包含：
SEQ ID NO: 281 和 SEQ ID NO: 419；SEQ ID NO: 290 和 SEQ ID NO: 428；
15 SEQ ID NO: 295 和 SEQ ID NO: 433；SEQ ID NO: 300 和 SEQ ID NO: 438；
SEQ ID NO: 304 和 SEQ ID NO: 442；SEQ ID NO: 306 和 SEQ ID NO: 444；
SEQ ID NO: 307 和 SEQ ID NO: 445；SEQ ID NO: 331 和 SEQ ID NO: 469；
SEQ ID NO: 557 和 SEQ ID NO: 582；SEQ ID NO: 567 和 SEQ ID NO: 592；
SEQ ID NO: 569 和 SEQ ID NO: 594；SEQ ID NO: 571 和 SEQ ID NO: 596；
20 SEQ ID NO: 572 和 SEQ ID NO: 597；SEQ ID NO: 573 和 SEQ ID NO: 598；
SEQ ID NO: 560 和 SEQ ID NO: 585；SEQ ID NO: 563 和 SEQ ID NO: 588；
SEQ ID NO: 628 和 SEQ ID NO: 663；SEQ ID NO: 629 和 SEQ ID NO: 664；
SEQ ID NO: 630 和 SEQ ID NO: 665；SEQ ID NO: 631 和 SEQ ID NO: 666；
SEQ ID NO: 632 和 SEQ ID NO: 667；SEQ ID NO: 633 和 SEQ ID NO: 668；
25 SEQ ID NO: 634 和 SEQ ID NO: 669；SEQ ID NO: 635 和 SEQ ID NO: 670；
SEQ ID NO: 636 和 SEQ ID NO: 671；SEQ ID NO: 637 和 SEQ ID NO: 672、
SEQ ID NO: 918 和 SEQ ID NO: 922；SEQ ID NO: 919 和 SEQ ID NO: 923；
SEQ ID NO: 920 和 SEQ ID NO: 924；或 SEQ ID NO: 921 和 SEQ ID NO: 925；
30 优选 SEQ ID NO: 557 和 SEQ ID NO: 582、SEQ ID NO: 607 和 SEQ ID NO: 642、SEQ ID NO: 631 和 SEQ ID NO: 666、SEQ ID NO: 918 和 SEQ ID NO: 922、SEQ ID NO: 919 和 SEQ ID NO: 923，或 SEQ ID NO: 921 和 SEQ ID NO: 925。

48. 细胞，其包含权利要求 1 至 39 中任一项所述的 dsRNA 剂。

49. 权利要求 48 所述的细胞，其中所述细胞是哺乳动物细胞，任选地是人细胞。

50. 抑制细胞中乙型肝炎病毒（HBV）基因表达的方法，所述方法包括：

- 5 (i) 制备包含有效量的一种或更多种权利要求 1 至 39 中任一项所述的双链核糖核酸（dsRNA）剂的细胞或权利要求 40 至 47 中任一项所述的组合物。

51. 权利要求 50 所述的方法，其还包括：

- 10 (ii) 将权利要求 50 (i) 中制备的所述细胞维持足以获得 HBV 基因的 mRNA 转录物降解的时间，从而抑制所述细胞中 HBV 基因的表达；抑制所述细胞中 HBV 的复制；以及降低所述细胞中 HBV 抗原的水平。

52. 权利要求 51 所述的方法，其中一种或更多种 HBV 抗原是 HBcAg、HBsAg 和 HBeAg。

15 53. 权利要求 50 或 51 所述的方法，其中所述细胞在对象中并且将所述 dsRNA 剂皮下施用于所述对象。

54. 权利要求 50 或 51 所述的方法，其中所述细胞在对象中并且通过 IV 施用将所述 dsRNA 剂施用于所述对象。

55. 权利要求 50 至 54 中任一项所述的方法，其中将 2、3、4 或更多种 dsRNA 剂施用于所述对象。

20 56. 权利要求 50 至 55 中任一项所述的方法，其还包括在将所述 dsRNA 剂施用于所述对象之后评估对 HBV 基因的抑制，其中用于所述评估的手段包括：

(i) 确定所述对象中 HBV 相关疾病或病症的一种或更多种生理特征，以及

25 (ii) 将所确定的生理特征与所述 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或与所述 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征进行比较，其中所述比较指示对所述对象中 HBV 基因表达的抑制的存在或不存在。

57. 权利要求 56 所述的方法，其中所述对照生理特征是感染 HBV 且未施用所述 dsRNA 剂的对象生理特征。

30 58. 权利要求 57 所述的方法，其中所述对象中所确定的生理特征是

以下中的一种或更多种：所述对象中丙氨酸转氨酶（ALT）的水平、所述对象中天冬氨酸转氨酶（AST）的水平；所述对象中的 HBV 病毒载量；所述对象中的 HBV 共价闭合环状 DNA（cccDNA）水平；所述对象中一种或更多种 HBV 抗原的水平；所述对象中 HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中一种或更多种的水平；所述对象中一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体的存在、不存在和/或水平。

59. 权利要求 56 所述的方法，其中所述生理特征是在从所述对象获得的生物样品中确定的。

60. 权利要求 59 所述的方法，其中所述生物样品包含以下中的一种或更多种：血清样品、组织样品、细胞样品和肝样品。

61. 权利要求 56 所述的方法，其中与所述生理特征的对照水平相比，所述对象中所确定的生理特征是异常的。

62. 权利要求 61 所述的方法，其中与所述 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征和/或者所述 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征相比，所述对象中以下一种或更多种的水平被确定在统计学上显著更高指示所述对象中 HBV 基因表达的状态：ALT；AST；HBV 病毒载量；HBV 共价闭合环状 DNA（cccDNA）；一种或更多种 HBV 抗原；HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中的一种或更多种；以及一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体。

63. 权利要求 62 所述的方法，其中所述对照生理特征是感染 HBV 且未施用所述 dsRNA 剂的对象生理特征。

64. 权利要求 56 所述的方法，其中所述对象中以下一种或更多种的降低指示所述对象中 HBV 基因表达的降低：ALT；AST；HBV 病毒载量；HBV 共价闭合环状 DNA（cccDNA）；一种或更多种 HBV 抗原；HBcAg；HBsAg；和 HBeAg。

65. 权利要求 56 所述的方法，其中与所述 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征和/或所述 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征相比，所述对象中抗乙型肝炎病毒抗体的增加指示所述对象中 HBV 基因表达的降低。

66. 权利要求 56 所述的方法，其中所述 HBV 相关疾病或病症是以下中的一种或更多种：其中所述疾病或病症是以下中的一种或更多种：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、丁型肝炎病毒感染（ δ 肝炎或 HDV）、肝损伤、肝硬化、急性乙型肝炎、急性暴发性肝炎以及肝纤维化、肝炎症和肝细胞癌。

67. 抑制对象中 HBV 基因表达的方法，所述方法包括向所述对象施用有效量的一种或更多种权利要求 1 至 39 中任一项所述的双链核糖核酸（dsRNA）剂或权利要求 40 至 47 中任一项所述的组合物。

5 68. 权利要求 67 所述的方法，其中将两种、三种、四种或更多种所述 dsRNA 剂施用于所述对象。

69. 权利要求 67 或 68 所述的方法，其中所述 dsRNA 剂皮下施用于所述对象。

70. 权利要求 67 或 68 所述的方法，其中所述 dsRNA 剂通过 IV 施用而施用于所述对象。

10 71. 权利要求 67 至 70 中任一项所述的方法，其还包括在施用所述一种或更多种 dsRNA 剂之后评估对 HBV 基因的抑制，其中用于所述评估的手段包括：

（i）确定所述对象中 HBV 相关疾病或病症的一种或更多种生理特征，以及

15 （ii）将所确定的生理特征与所述 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或与所述 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征进行比较，

其中所述比较指示对所述对象中 HBV 基因表达的抑制的存在或不存在。

20 72. 权利要求 71 所述的方法，其中所述对象中所确定的生理特征是以下中的一种或更多种：所述对象中丙氨酸转氨酶（ALT）的水平、所述对象中天冬氨酸转氨酶（AST）的水平；所述对象中的 HBV 病毒载量；所述对象中的 HBV 共价闭合环状 DNA（cccDNA）水平；所述对象中一种或更多种 HBV 抗原的水平；所述对象中 HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中一种或更多种的水平；所述对象中一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体的存在、不存在和/或水平。

73. 权利要求 71 所述的方法，其中所述生理特征是在从所述对象获得的生物样品中确定的。

74. 权利要求 73 所述的方法，其中所述生物样品包含以下中的一种或更多种：血清样品、细胞样品、组织样品和肝样品。

30 75. 权利要求 71 所述的方法，其中与所述 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或与所述 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征相

比，所述对象中所确定的生理特征更加异常。

76. 权利要求 73 所述的方法，其中与所述 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或与所述 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征相比，所述对象中以下一种或更多种的水平被确定在统计学上显著更高、更低或未变化指示所述对象中 HBV 基因表达的状态：ALT；AST；HBV 病毒载量；HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA)；一种或更多种 HBV 抗原；HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中的一种或更多种；以及一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体。

77. 权利要求 71 所述的方法，其中所述对象中以下一种或更多种的降低指示所述对象中 HBV 基因表达的降低：ALT；AST；HBV 病毒载量；HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA)；一种或更多种 HBV 抗原；HBcAg；HBsAg；和 HBeAg。

78. 权利要求 76 所述的方法，其中与所述 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或与所述 HBV 相关疾病或病症的对照生理特征相比，所述对象中抗乙型肝炎病毒抗体的增加指示所述对象中 HBV 基因表达的降低。

79. 权利要求 71 所述的方法，其中所述 HBV 相关疾病或病症是以下中的一种或更多种：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、急性乙型肝炎、肝细胞癌、肝损伤、肝硬化、急性暴发性肝炎、终末期肝病、肝纤维化、肝炎症和丁型肝炎病毒感染 (δ 肝炎或 HDV)。

80. 治疗与乙型肝炎病毒 (HBV) 蛋白的存在相关的疾病或病症的方法，所述方法包括向对象施用有效量的一种或更多种权利要求 1 至 39 中任一项所述的双链核糖核酸 (dsRNA) 剂，或权利要求 40 至 47 中任一项所述的组合物，以抑制编码所述 HBV 蛋白的 HBV 基因的表达。

81. 权利要求 80 所述的方法，其中所述方法包括向所述对象施用两种、三种、四种或更多种 dsRNA 剂。

82. 权利要求 80 或 81 所述的方法，其中所述疾病或病症是以下中的一种或更多种：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、丁型肝炎病毒感染 (δ 肝炎或 HDV)、肝损伤、肝硬化、急性乙型肝炎、急性暴发性肝炎、肝炎症、肝纤维化和肝细胞癌。

83. 权利要求 80 或 81 所述的方法，其还包括向所述对象施用另外的治疗方案。

84. 权利要求 81 所述的方法，其中所述另外的治疗方案包括：向所述对象施用一种或更多种：HBV 反义多核苷酸、另外的 HBV dsRNA 治疗剂、非 HBV dsRNA 治疗剂、HBV 非 dsRNA 治疗剂以及行为改变。

5 85. 权利要求 84 所述的方法，其中所述非 HBV dsRNA 治疗剂是以下中的一种或更多种：抗病毒剂、抗病毒核苷或核苷酸类似物（NUC）、病毒聚合酶抑制剂、逆转录酶抑制剂、免疫刺激剂、治疗性疫苗、病毒进入抑制剂、抑制 HBsAg 分泌或释放的寡核苷酸、衣壳抑制剂、共价闭合环状（ccc）HBV DNA 抑制剂。

10 86. 权利要求 85 所述的方法，其中所述 NUC 是：富马酸替诺福韦酯（TDF）、替诺福韦艾拉酚胺、拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦（ETV），或替比夫定。

87. 权利要求 85 所述的方法，其中所述免疫刺激剂是聚乙二醇化干扰素 $\alpha 2a$ （PEG-IFN- $\alpha 2a$ ）、干扰素 $\alpha 2b$ 、重组人白介素-7、Toll-样受体 7（TLR7）激动剂，或检查点抑制剂（例如，PD1 抑制剂）。

15 88. 权利要求 80 所述的方法，其中所述一种或更多种 dsRNA 剂皮下施用于所述对象。

89. 权利要求 80 所述的方法，其中所述一种或更多种 dsRNA 剂通过 IV 施用而施用于所述对象。

20 90. 权利要求 80 至 89 中任一项所述的方法，其还包括确定所施用的一种或更多种双链核糖核酸（dsRNA）剂在所述对象中的效力。

91. 权利要求 90 所述的方法，其中确定在所述对象中的治疗效力的手段包括：

(i) 确定所述对象中 HBV 相关疾病或病症的一种或更多种生理特征，以及

25 (ii) 将所确定的生理特征与所述 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征进行比较，

其中所述比较指示向所述对象施用所述双链核糖核酸（dsRNA）剂的效力的存在、不存在和水平中的一种或更多种。

30 92. 权利要求 91 所述的方法，其中所述对象中所确定的生理特征是以下中的一种或更多种：所述对象中丙氨酸转氨酶（ALT）的水平、所述对象中天冬氨酸转氨酶（AST）的水平；所述对象中的 HBV 病毒载量；

所述对象中的 HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA) 水平；所述对象中一种或更多种 HBV 抗原的水平；所述对象中 HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中一种或更多种的水平；所述对象中一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体的存在、不存在和/或水平。

5 93. 权利要求 91 所述的方法，其中所述生理特征是在从所述对象获得的生物样品中确定的。

94. 权利要求 93 所述的方法，其中所述生物样品包含以下中的一种或更多种：血清样品、细胞样品、组织样品和肝样品。

10 95. 权利要求 91 所述的方法，其中所述对象中所确定的生理特征与
所述 HBV 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征或所述生理特征的对照
水平相比是不同的。

96. 权利要求 95 所述的方法，其中与所述 HBV 相关疾病或病症的基
线治疗前生理特征相比，所述对象中以下一种或更多种的水平被确定在统
计学上显著更低指示所述对象中 HBV 基因表达降低的状态：ALT；AST；
15 HBV 病毒载量；HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA)；一种或更多种 HBV
抗原；HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中的一种或更多种。

97. 权利要求 95 所述的方法，其中与基线治疗前抗乙型肝炎病毒抗
体或抗乙型肝炎病毒抗体的对照水平相比，所述对象中抗乙型肝炎病毒抗
体的增加指示所述对象中 HBV 基因表达的降低。

20 98. 权利要求 91 至 97 中任一项所述的方法，其中所述 HBV 相关疾
病或病症是以下中的一种或更多种：乙型肝炎、慢性乙型肝炎、急性乙型
肝炎、肝细胞癌、肝损伤、肝硬化、终末期肝病、急性暴发性肝炎、肝炎
症、肝纤维化和丁型肝炎病毒感染 (δ 肝炎或 HDV)。

99. 与对象中 HBV 蛋白的基线治疗前水平相比降低所述对象中 HBV
25 蛋白水平的方法，所述方法包括向所述对象施用有效量的一种或更多种权
利要求 1 至 39 中任一项所述的双链核糖核酸 (dsRNA) 剂，或权利要求
40 至 47 中任一项所述的组合物，以降低 HBV 基因表达的水平。

100. 权利要求 99 所述的方法，其中所述 dsRNA 剂皮下施用于所述
对象或通过 IV 施用而施用于所述对象。

30 101. 与对象中乙型肝炎病毒 (HBV) 相关疾病或病症的基线治疗前
生理特征相比改变所述对象中所述 HBV 相关疾病或病症的生理特征的方法，
所述方法包括向所述对象施用有效量的一种或更多种权利要求 1 至

39 中任一项所述的双链核糖核酸 (dsRNA) 剂, 或权利要求 40 至 47 中任一项所述的组合物, 以改变所述对象中所述 HBV 相关疾病或病症的生理特征。

5 102. 权利要求 101 所述的方法, 其中所述一种或更多种 dsRNA 剂皮下施用于所述对象或通过 IV 施用而施用于所述对象。

103. 权利要求 101 所述的方法, 其中所述生理特征是在所述对象中确定的生理特征中的一种或更多种, 其是以下中的一种或更多种: 所述对象中丙氨酸转氨酶 (ALT) 的水平; 所述对象中天冬氨酸转氨酶 (AST) 的水平; 所述对象中的 HBV 病毒载量; 所述对象中的 HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA) 水平; 所述对象中一种或更多种 HBV 抗原的水平; 所述对象中 HBcAg、HBsAg 和 HBeAg 中的一种或更多种的水平; 所述对象中一种或更多种抗乙型肝炎病毒抗体的存在、不存在和/或水平。

104. 权利要求 50、67、80、99 和 101 中任一项所述的方法, 其中所述 dsRNA 剂的有义链包含以下之一: SEQ ID NO: 281、290、295、300、15 304、306、307、331、557、567、569、571、572、573、560、563、607、628 至 637 或 918 至 921, 优选 SEQ ID NO: 557、607、631、918、919 或 921。

105. 权利要求 50、67、80、99 和 101 中任一项所述的方法, 其中所述 dsRNA 剂的反义链包含以下之一: SEQ ID NO: 419、428、433、438、20 442、444、445、469、582、592、594、596、597、598、585、588、642、663 至 672 或 922 至 925, 优选 SEQ ID NO: 582、642、666、922、923 或 925。

106. 权利要求 50、67、80、99 和 101 中任一项所述的方法, 其中所述 dsRNA 剂包含 SEQ ID NO: 281 和 SEQ ID NO: 419; SEQ ID NO: 290 25 和 SEQ ID NO: 428; SEQ ID NO: 295 和 SEQ ID NO: 433; SEQ ID NO: 300 和 SEQ ID NO: 438; SEQ ID NO: 304 和 SEQ ID NO: 442; SEQ ID NO: 306 和 SEQ ID NO: 444; SEQ ID NO: 307 和 SEQ ID NO: 445; SEQ ID NO: 331 和 SEQ ID NO: 469; SEQ ID NO: 557 和 SEQ ID NO: 582; SEQ ID NO: 567 和 SEQ ID NO: 592; SEQ ID NO: 569 和 SEQ ID NO: 594; SEQ ID NO: 571 30 和 SEQ ID NO: 596; SEQ ID NO: 572 和 SEQ ID NO: 597; SEQ ID NO: 573 和 SEQ ID NO: 598; SEQ ID NO: 560 和 SEQ ID NO: 585; SEQ ID NO: 563 和 SEQ ID NO: 588; SEQ ID NO: 607 和 SEQ ID NO: 642; SEQ ID NO: 628 和 SEQ ID NO: 663; SEQ ID NO: 629 和 SEQ ID NO: 664; SEQ ID NO: 630

和 SEQ ID NO: 665; SEQ ID NO: 631 和 SEQ ID NO: 666; SEQ ID NO: 632
和 SEQ ID NO: 667; SEQ ID NO: 633 和 SEQ ID NO: 668; SEQ ID NO: 634
和 SEQ ID NO: 669; SEQ ID NO: 635 和 SEQ ID NO: 670; SEQ ID NO: 636
和 SEQ ID NO: 671; 或 SEQ ID NO: 637 和 SEQ ID NO: 672; SEQ ID NO:
5 918 和 SEQ ID NO: 922; SEQ ID NO: 919 和 SEQ ID NO: 923; SEQ ID NO:
920 和 SEQ ID NO: 924; 或 SEQ ID NO: 921 和 SEQ ID NO: 925; 优选 SEQ
ID NO: 557 和 SEQ ID NO: 582; SEQ ID NO: 607 和 SEQ ID NO: 642; SEQ
ID NO: 631 和 SEQ ID NO: 666; SEQ ID NO: 918 和 SEQ ID NO: 922; SEQ
ID NO: 919 和 SEQ ID NO: 923; 或 SEQ ID NO: 921 和 SEQ ID NO: 925。

10