

双链 siRNA 类似物的缀合物

本申请主张如下优先权：

CN202010529520.7，申请日 2020 年 06 月 11 日；

CN202011524835.9，申请日 2020 年 12 月 21 日；

CN202010524584.8，申请日 2020 年 06 月 10 日；

PCT/CN2020/133982，申请日 2020 年 12 月 4 日；

CN202010522407.6，申请日 2020 年 6 月 10 日；

CN202011524307.3，申请日 2020 年 12 月 21 日。

技术领域

本公开属于生物医药领域，涉及一种 r' 嵌入的 siRNA 类似物、双链 siRNA 类似物、包含其的缀合物，以及其盐和用途；所述用途具体为在制备治疗乙型病毒性肝炎的药物中的用途。

背景技术

乙型病毒性肝炎，简称乙肝，是一种由乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus，简称 HBV）感染机体后所引起的疾病。乙型肝炎病毒是一种嗜肝病毒，主要存在于肝细胞内并损害肝细胞，引起肝细胞炎症、坏死、纤维化。乙型病毒性肝炎分急性和慢性两种。急性乙型肝炎在成年人中大多数可通过其自身的免疫机制而自愈。但是慢性乙型肝炎（CHB）已成为全球健康保健所面临的极大挑战，同时也是引起慢性肝病，肝硬化（cirrhosis）和肝癌（HCC）的主要原因(Edward J. G., et al., The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* (2015); 63: 320-328)。据估计，全球有 20 亿人感染了慢性乙型肝炎病毒，超过 3 亿 5 千万人口已发展成为了乙型肝炎，每年近 60 万人死于慢性乙型肝炎的并发症(Edward J. G., et al., The oral toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* (2015))。我国是乙肝高发区，乙型肝炎累积病人多，危害严重。据资料显示，我国现有乙型肝炎病毒感染者约 9300 万，而其中约 2000 万患者确诊为慢性乙型肝炎，当中 10%-20%可演变成肝硬化，1%-5%可发展成肝癌。（张春红,干扰素在乙型肝炎治疗中的应用.中国医药指南 (2013); 11: 475-476.）

乙肝功能性治愈的关键是清除 HBsAg（乙型肝炎病毒表面抗原），产生表面抗体。HBsAg 量化是一个非常重要的生物指标。在慢性感染病人中，很少能观察到 HBsAg 的减少和血清转化，这是目前治疗的终点。

目前被批准上市的抗 HBV 药物主要是免疫调节剂（干扰素- α 和聚乙二醇干扰素- α -2a）和抗病毒治疗药物（拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、克拉夫定等）。其中，抗病毒治疗药物属于核苷酸类药物，其作用机制是抑制 HBV DNA 的合成，并不能直接减少 HBsAg 水平。与延长治疗一样，核苷酸类药物显示 HBsAg 清除速度类似于自然观察

结果 (Janssen et al. Lancet (2005), 365, 123-129; Marcellin et al. N. Engl. J. Med. (2004), 351, 1206-1217; Buster et al. Hepatology (2007), 46, 388-394.)。

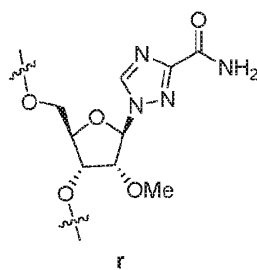
临床已有疗法降低 HBsAg, 但疗效不佳。因此, 若能从基因水平沉默病毒的基因表达, 阻断 HBV 的生成和复制, 特别是 HBsAg 和 HBeAg (乙型肝炎 S 抗原和 E 抗原) 的产生, 可从根本上降低病毒代谢和对肝细胞的侵染。小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 可基于 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 这一机制, 以序列特异性的方式抑制或阻断靶标目的基因的表达, 从 mRNA 翻译至蛋白这一层次发挥抑制作用, 从而达到治疗疾病的目的 (WO2016077321, WO2018195165)。这一最为理想的乙肝治疗手段, 需要对 siRNA 进行稳定化修饰并辅以相应的递送系统靶向目的器官和细胞, 提高代谢稳定性, 但目前的 siRNA 尚不能有效地降低乙肝病毒 S 抗原和 E 抗原含量。

同时, siRNA 可以通过与某些 mRNA 片段部分互补配对, 从而对该 mRNA 所对应基因的表达起到调控作用。特别地, siRNA 反义链的 5' 端种子区 (seed region) 与非靶向基因的互补配对会部分或完全沉默该基因表达, 这一现象是 siRNA 在体内体外出现脱靶效应的主要原因 (Jackson et al. RNA (2006), 12, 1179-1187.)。治疗乙肝的 siRNA 在临床与临床前阶段均暴露出该缺点 (WO2020036862)。尽管通过一些对核苷酸的修饰可以降低脱靶风险 (Iribe et al. ACS Omega (2017), 2, 2055-2064; Janas et al. Nat. Commun. 2018, 9, 723-732), 其沉默的有效性也有所降低, 治疗安全窗尚待提高。

发明内容

本公开涉及一种利巴韦林衍生物嵌入的双链 siRNA 类似物、包含其的缀合物, 以及其盐和用途。本公开的双链 siRNA 类似物、包含其的缀合物以及其盐可以有效抑制乙肝病毒 DNA、S 抗原、E 抗原等多项病毒指标, 为乙型肝炎例如慢性乙型肝炎的治疗 (例如功能性治愈) 提供了有效可行的手段。

因此, 在第一方面, 本公开提供了一种双链 siRNA 类似物, 其包含正义链和反义链, 其中反义链包含在如 SEQ ID NO: 2 所示的序列中使用 r 替换了一个或多个核苷酸残基的序列, r 为



其中所述 siRNA 类似物中的核苷酸和 r 中的每一个独立地是经修饰的或未修饰的。

在一些实施方案中，所述 siRNA 类似物中的核苷酸和 r 中的一个或多个是经修饰的，而其它核苷酸和 r 是未修饰的。所述修饰包括例如甲氧基修饰、氟代修饰、硫代磷酸酯基连接或将核苷酸替换为(S)-甘油核酸等。

在一些实施方案中，所述 siRNA 类似物中的核苷酸和 r 中的一个或多个是经修饰的，而其它核苷酸和 r 是未修饰的。所述修饰包括例如甲氧基修饰、氟代修饰、硫代磷酸酯基连接、将核苷酸替换为(S)-甘油核酸或将核苷酸替换为(E)-乙烯基磷酸酯修饰等。

在一些实施方案中，所述 siRNA 类似物中的基本上所有的核苷酸和 r 都是经修饰的。在一些实施方案中，所述 siRNA 类似物中的所有核苷酸和 r 都是经修饰的。

在一些实施方案中，所述双链 siRNA 类似物中的 70%、75%、80%、85%、90%或 95%以上的核苷酸和 r 都是经修饰的。在一些实施方案中，所述双链 siRNA 类似物中的所有核苷酸和 r 都是经修饰的。

在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 2 任选地包括在 5'端和/或 3'端的突出端。在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 2 包括在 5'端和/或 3'端的 0、1、2、3、4 或 5 个核苷酸的突出端。

在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 2 包括在 5'端和/或 3'端的 2 个核苷酸的突出端时，末端的 3 个核苷酸之间任选地具有 2 个硫代磷酸酯基连接，其中该 3 个核苷酸中有 2 个核苷酸为突出端，另 1 个核苷酸为邻接突出端的配对核苷酸。在一些实施方案中，所述突出端优选自经修饰的或未修饰的 UU。在一些实施方案中，所述突出端优选自 uu。在一些实施方案中，所述突出端 uu 与其邻接的 1 个配对核苷酸之间具有 2 个硫代磷酸酯基连接。

在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 2 包括在 3'端的突出端，所述突出端优选自经修饰的或未修饰的 UU。在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 2 包括在 3'端的突出端，所述突出端优选自 uu。在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 2 包括在 3'端的突出端，所述突出端 uu 与其邻接的 1 个配对核苷酸之间具有 2 个硫代磷酸酯基连接（例如 c•u•u）。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物中的反义链包含在如 SEQ ID NO: 2 所示的序列中使用 r 替换了一个或多个核苷酸残基的序列。例如，反义链包含在如 SEQ ID NO: 2 所示的序列中使用 r 替换了一个核苷酸残基的序列。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物中的反义链包含在如 SEQ ID NO: 2 所示的序列中使用 r 替换了一个或多个核苷酸残基的序列。例如，反义链包含在如 SEQ ID NO: 2 所示的序列中使用 r 替换了一个、两个、三个、四个或五个核苷酸残基的序列。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物中的反义链包含在如 SEQ ID NO: 2 所示的序列中使用 r 替换了一个或多个核苷酸残基的序列，所述 r 替换发生在 SEQ ID NO: 2 的任意位置。优选地，所述 r 替换发生在 SEQ ID NO: 2 的 5'端的第 1~第 21 位或第 1~第 19 位。例如，所

述 r 替换发生在 SEQ ID NO: 2 的 5' 端的第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或 21 位。优选地，所述 r 替换发生在 SEQ ID NO: 2 的 5' 端的第 2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、16 或 18 位。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物中的反义链包含如 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 30 或 SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 35，或 SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 36 所示的序列，或由其组成。在一些实施方案中，所述序列包括进一步核苷酸修饰，例如甲氧基修饰、氟代修饰、硫代磷酸酯基连接或将核苷酸替换为(S)-甘油核酸等。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物中的反义链包含如 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 30 或 SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 35，SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 39 或 SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 40 或 SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 47、或 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 48 所示的序列，或由其组成。在一些实施方案中，所述序列包括进一步核苷酸修饰，例如甲氧基修饰、氟代修饰、硫代磷酸酯基连接、将核苷酸替换为(S)-甘油核酸或将核苷酸替换为(E)-乙烯基磷酸酯修饰等。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物中的正义链包含如 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28 所示的序列，或由其组成。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物中的正义链包含在如 SEQ ID NO: 1 所示的序列中使用 r 替换了一个或多个核苷酸残基的序列。例如，正义链包含在如 SEQ ID NO: 1 所示的序列中使用 r 替换了一个核苷酸残基的序列。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物中的正义链包含在如 SEQ ID NO: 1 所示的序列中使用 r 替换了一个或多个核苷酸残基的序列。例如，正义链包含在如 SEQ ID NO: 1 所示的序列中使用 r 替换了 1、2、3、4 或 5 个核苷酸残基的序列。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物中的正义链包含在如 SEQ ID NO: 1 所示的序列中使用 r 替换了一个或多个核苷酸残基的序列，所述 r 替换发生在 SEQ ID NO: 1 的 5' 端的第 1~第 19 位。例如，所述 r 替换发生在 SEQ ID NO: 1 的 5' 端的第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、或 19 位。优选地，所述 r 替换发生在 SEQ ID NO: 1 的 5' 端的第 2、3、7、12、15、17 或 19 位。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物中的正义链的序列包含如 SEQ ID NO: 5 或 SEQ

ID NO: 18、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 26, 或 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 25 所示的序列, 或由其组成。在一些实施方案中, 所述序列包括进一步核苷酸修饰, 例如甲氧基修饰、氟代修饰、硫代磷酸酯基连接等。

在一些实施方案中, 双链 siRNA 类似物中的正义链的序列包含如 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 37 或 SEQ ID NO: 42、或 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 43 所示的序列, 或由其组成。在一些实施方案中, 所述序列包括进一步核苷酸修饰, 例如甲氧基修饰、氟代修饰、硫代磷酸酯基连接、将核苷酸替换为(S)-甘油核酸或将核苷酸替换为(E)-乙烯基磷酸酯修饰等。

在一些具体的实施方案中, 双链 siRNA 类似物中的正义链和反义链包含在序列中使用 r 替换了一个或多个核苷酸残基的序列, 如反义链 SEQ ID NO: 2 所示的序列, 所述 r 替换发生在 SEQ ID NO: 2 的 5' 端的第 2 位, 正义链 SEQ ID NO: 1 所示的序列, 所述 r 替换发生在 5' 端的第 7 位。

在一些实施方案中, 双链 siRNA 类似物为 S18~S28 中的任意一种:

S18: 正义链为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28、反义链为 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 17,

S19: 正义链为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28、反义链为 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 19,

S20: 正义链为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28、反义链为 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 20,

S21: 正义链为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28、反义链为 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 21,

S22: 正义链为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28、反义链为 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 22,

S23: 正义链为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28、反义链为 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 23,

S24: 正义链为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28、反义链为 SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 24,

S25: 正义链为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28、反义链为 SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 33,

S26: 正义链为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28、反义链为 SEQ ID NO: 30 或 SEQ ID NO: 34,

S27: 正义链为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28、反义链为 SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 35,

S28: 正义链为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 28、反义链为 SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 36。

在一些实施方案中, 双链 siRNA 类似物为 S1~S17 中的任意一种:

S1: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 17,

S2: 正义链为 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 18、反义链为 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 17,

S3: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 19,

S4: 正义链为 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 18、反义链为 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 19,

S5: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 20,

S6: 正义链为 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 18、反义链为 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 20,

S7: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 21,

S8: 正义链为 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 18、反义链为 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 21,

S9: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 22,

S10: 正义链为 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 18、反义链为 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 22,

S11: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 23,

S12: 正义链为 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 18、反义链为 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 23,

S13: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 24,

S14: 正义链为 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 18、反义链为 SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 24,

S15: 正义链为 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 25、反义链为 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 17,

S16: 正义链为 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 26、反义链为 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 17,

S17: 正义链为 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 27、反义链为 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 17。

在一些实施方案中, 双链 siRNA 类似物为 S29~S35 中的任意一种:

S29: 正义链为 SEQ ID NO: 37 或 SEQ ID NO: 42、反义链为 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 23,

S30: 正义链为 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 43、反义链为 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 23,

S31: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 39 或 SEQ ID NO: 44,

S32: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 45,

S33: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 40 或 SEQ ID NO: 46,

S34: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 47,

S35: 正义链为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 16、反义链为 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 48。

在一些实施方案中, 所述双链 siRNA 类似物选自: 正义链为 SEQ ID NO: 3 和反义链为 SEQ ID NO: 4、正义链为 SEQ ID NO: 5 和反义链为 SEQ ID NO: 4、正义链为 SEQ ID NO: 3 和反义链为 SEQ ID NO: 6、正义链为 SEQ ID NO: 5 和反义链为 SEQ ID NO: 6、正义链为 SEQ ID NO: 3 和反义链为 SEQ ID NO: 7、正义链为 SEQ ID NO: 5 和反义链为 SEQ ID NO: 7、正义链为 SEQ ID NO: 3 和反义链为 SEQ ID NO: 8、正义链为 SEQ ID NO: 5 和反义链为 SEQ ID NO: 8、正义链为 SEQ ID NO: 3 和反义链为 SEQ ID NO: 9、正义链为 SEQ ID NO: 5 和反义链为 SEQ ID NO: 9、正义链为 SEQ ID NO: 3 和反义链为 SEQ ID NO: 10、正义链为 SEQ ID NO: 5 和反义链为 SEQ ID NO: 10、正义链为 SEQ ID NO: 3 和反义链为 SEQ ID NO: 11、正义链为 SEQ ID NO: 5 和反义链为 SEQ ID NO: 11、正义链为 SEQ ID NO: 12 和反义链为 SEQ ID NO: 4、正义链为 SEQ ID NO: 13 和反义链为 SEQ ID NO: 4、正义链为 SEQ ID NO: 14 和反义链为 SEQ ID NO: 4、正义链为 SEQ ID NO: 1 和反义链为 SEQ ID NO: 4、正义链为 SEQ ID NO: 1 和反义链为 SEQ ID NO: 6、正义链为 SEQ ID NO: 1 和反义链为 SEQ ID NO: 7、正义链为 SEQ

ID NO: 1 和反义链为 SEQ ID NO: 8、正义链为 SEQ ID NO: 1 和反义链为 SEQ ID NO: 9、正义链为 SEQ ID NO: 1 和反义链为 SEQ ID NO: 10、正义链为 SEQ ID NO: 1 和反义链为 SEQ ID NO: 11、正义链为 SEQ ID NO: 1 和反义链为 SEQ ID NO: 29、正义链为 SEQ ID NO: 1 和反义链为 SEQ ID NO: 30、正义链为 SEQ ID NO: 1 和反义链为 SEQ ID NO: 31、正义链为 SEQ ID NO: 1 和反义链为 SEQ ID NO: 32、正义链为 SEQ ID NO: 37 和反义链为 SEQ ID NO: 10、正义链为 SEQ ID NO: 38 和反义链为 SEQ ID NO: 10、正义链为 SEQ ID NO: 3 和反义链为 SEQ ID NO: 39、正义链为 SEQ ID NO: 3 和反义链为 SEQ ID NO: 10、或正义链为 SEQ ID NO: 3 和反义链为 SEQ ID NO: 40, 所述双链 siRNA 类似物中的核苷酸和 r 中的每一个独立地是经修饰的或未修饰的。

在一些实施方案中, 所述双链 siRNA 类似物选自:

序号	SEQ ID NO	正义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO	反义链序列 (5'-3')
1	3	GrGUGCACUUCGCUUCACA	4	UGUGArGCGAAGUGCACACUU
2	5	GUrUGCACUUCGCUUCACA	4	UGUGArGCGAAGUGCACACUU
3	3	GrGUGCACUUCGCUUCACA	6	UrUGAAGCGAAGUGCACACUU
4	5	GUrUGCACUUCGCUUCACA	6	UrUGAAGCGAAGUGCACACUU
5	3	GrGUGCACUUCGCUUCACA	7	UGrGAAGCGAAGUGCACACUU
6	5	GUrUGCACUUCGCUUCACA	7	UGrGAAGCGAAGUGCACACUU
7	3	GrGUGCACUUCGCUUCACA	8	UGUrAAGCGAAGUGCACACUU
8	5	GUrUGCACUUCGCUUCACA	8	UGUrAAGCGAAGUGCACACUU
9	3	GrGUGCACUUCGCUUCACA	9	UGUGrAGCGAAGUGCACACUU
10	5	GUrUGCACUUCGCUUCACA	9	UGUGrAGCGAAGUGCACACUU
11	3	GrGUGCACUUCGCUUCACA	10	UGUGAArCGAAGUGCACACUU
12	5	GUrUGCACUUCGCUUCACA	10	UGUGAArCGAAGUGCACACUU
13	3	GrGUGCACUUCGCUUCACA	11	UGUGAAGrGAAGUGCACACUU
14	5	GUrUGCACUUCGCUUCACA	11	UGUGAAGrGAAGUGCACACUU
15	12	GUGUGCrCUUCGCUUCACA	4	UGUGArGCGAAGUGCACACUU
16	13	GUGUGCACUUCGCUUCrCA	4	UGUGArGCGAAGUGCACACUU

17	14	GUGUGCACUUCGCUUCACr	4	UGUGArGCGAAGUGCACACUU
18	1	GUGUGCACUUCGCUUCACA	4	UGUGArGCGAAGUGCACACUU
19	1	GUGUGCACUUCGCUUCACA	6	UrUGAAGCGAAGUGCACACUU
20	1	GUGUGCACUUCGCUUCACA	7	UGrGAAGCGAAGUGCACACUU
21	1	GUGUGCACUUCGCUUCACA	8	UGUrAAGCGAAGUGCACACUU
22	1	GUGUGCACUUCGCUUCACA	9	UGUGrAGCGAAGUGCACACUU
23	1	GUGUGCACUUCGCUUCACA	10	UGUGAArCGAAGUGCACACUU
24	1	GUGUGCACUUCGCUUCACA	11	UGUGAAGrGAAGUGCACACUU
25	1	GUGUGCACUUCGCUUCACA	29	UGUGAAGCGrAGUGCACACUU
26	1	GUGUGCACUUCGCUUCACA	30	UGUGAAGCGArGUGCACACUU
27	1	GUGUGCACUUCGCUUCACA	31	UGUGAAGCGAAGUGCrCACUU
28	1	GUGUGCACUUCGCUUCACA	32	UGUGAAGCGAAGUGCACrCUU
29	37	GrGUGCACUUCGCUrCACA	10	UGUGAArCGAAGUGCACACUU
30	38	GrGUGCACUUCrCUUCACA	10	UGUGAArCGAAGUGCACACUU
31	3	GrGUGCACUUCGCUUCACA	39	UGUrAArCGAAGUGCACACUU
32	3	GrGUGCACUUCGCUUCACA	10	UGUGAArCGAAGUGCACACUU
33	3	GrGUGCACUUCGCUUCACA	40	UGUGAAGCGAArUGCACACUU

所述双链 siRNA 类似物中的核苷酸和 r 中的每一个独立地是经修饰的或未修饰的。

在一些实施方案中，所述双链 siRNA 类似物选自：正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 17、正义链为 SEQ ID NO: 18 和反义链为 SEQ ID NO: 17、正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 19、正义链为 SEQ ID NO: 18 和反义链为 SEQ ID NO: 19、正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 20、正义链为 SEQ ID NO: 18 和反义链为 SEQ ID NO: 20、正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 21、正义链为 SEQ ID NO: 18 和反义链为 SEQ ID NO: 21、正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 22、正义链为 SEQ ID NO: 18 和反义链为 SEQ ID NO: 22、正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 23、正义链为 SEQ ID NO: 18 和反义链为 SEQ ID NO: 23、正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 24、正义链为 SEQ ID NO: 18 和反义链为 SEQ ID NO: 24、正义链为 SEQ ID NO:

25 和反义链为 SEQ ID NO: 17、正义链为 SEQ ID NO: 26 和反义链为 SEQ ID NO: 17、正义链为 SEQ ID NO: 27 和反义链为 SEQ ID NO: 17、正义链为 SEQ ID NO: 28 和反义链为 SEQ ID NO: 17、正义链为 SEQ ID NO: 28 和反义链为 SEQ ID NO: 19、正义链为 SEQ ID NO: 28 和反义链为 SEQ ID NO: 20、正义链为 SEQ ID NO: 28 和反义链为 SEQ ID NO: 21、正义链为 SEQ ID NO: 28 和反义链为 SEQ ID NO: 22、正义链为 SEQ ID NO: 28 和反义链为 SEQ ID NO: 23、正义链为 SEQ ID NO: 28 和反义链为 SEQ ID NO: 24、正义链为 SEQ ID NO: 28 和反义链为 SEQ ID NO: 33、正义链为 SEQ ID NO: 28 和反义链为 SEQ ID NO: 34、正义链为 SEQ ID NO: 28 和反义链为 SEQ ID NO: 35、正义链为 SEQ ID NO: 28 和反义链为 SEQ ID NO: 36、正义链为 SEQ ID NO: 42 和反义链为 SEQ ID NO: 23、正义链为 SEQ ID NO: 43 和反义链为 SEQ ID NO: 23、正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 44、正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 45、正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 46、正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 47、或正义链为 SEQ ID NO: 16 和反义链为 SEQ ID NO: 48。

在一些实施方案中，所述双链 siRNA 类似物选自：

序号	SEQ ID NO	正义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO	反义链序列 (5'-3')
1	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	17	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u
2	18	g•u•ruGcACUucgcuucaca	17	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u
3	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	19	u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u
4	18	g•u•ruGcACUucgcuucaca	19	u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u
5	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	20	u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u
6	18	g•u•ruGcACUucgcuucaca	20	u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u
7	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	21	u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u
8	18	g•u•ruGcACUucgcuucaca	21	u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u
9	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	22	u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u
10	18	g•u•ruGcACUucgcuucaca	22	u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u
11	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	23	u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u
12	18	g•u•ruGcACUucgcuucaca	23	u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u
13	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	24	u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u

14	18	g•u•ruGcACUucgcuucaca	24	u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u
15	25	g•u•guGcrCUucgcuucaca	17	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u
16	26	g•u•guGcACUucgcuucrcac	17	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u
17	27	g•u•guGcACUucgcuucacr	17	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u
18	28	g•u•guGcACUucgcuucaca	17	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u
19	28	g•u•guGcACUucgcuucaca	19	u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u
20	28	g•u•guGcACUucgcuucaca	20	u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u
21	28	g•u•guGcACUucgcuucaca	21	u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u
22	28	g•u•guGcACUucgcuucaca	22	u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u
23	28	g•u•guGcACUucgcuucaca	23	u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u
24	28	g•u•guGcACUucgcuucaca	24	u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u
25	28	g•u•guGcACUucgcuucaca	33	u•G•uga(Agn)gCGraguGcAcac•u•u
26	28	g•u•guGcACUucgcuucaca	34	u•G•uga(Agn)gCGarguGcAcac•u•u
27	28	g•u•guGcACUucgcuucaca	35	u•G•uga(Agn)gCGaaguGcAcac•u•u
28	28	g•u•guGcACUucgcuucaca	36	u•G•uga(Agn)gCGaaguGcAcac•u•u
29	42	g•r•guGcACUucgcuucaca	23	u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u
30	43	g•r•guGcACUucgcuucaca	23	u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u
31	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	44	u•G•uraArCGaaguGcAcac•u•u
32	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	45	u•G•uga(Agn)rCGaaguGcAcac•u•u
33	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	46	u•G•uga(Agn)gCGaaruGcAcac•u•u
35	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	47	VPu•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u
36	16	g•r•guGcACUucgcuucaca	48	VPu•G•uga(Agn)rCGaaguGcAcac•u•u

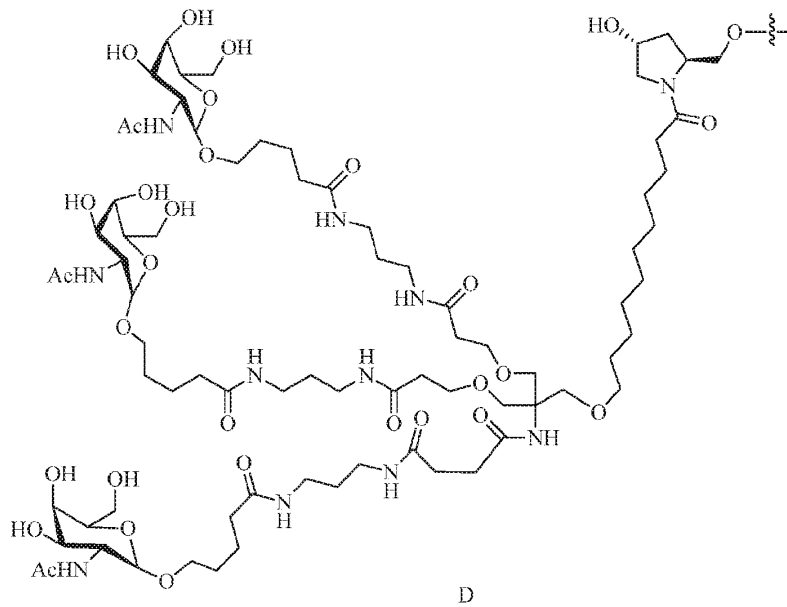
。

在第二方面，本公开提供了双链 siRNA 类似物的缀合物，其包含根据本公开的第一方面的双链 siRNA 类似物，以及与双链 siRNA 类似物缀合的药学上可接受的缀合基团。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物的缀合物中的药学上可接受的缀合基团含有 1 至

5 个 GalNAc (N-乙酰半乳糖胺) 基团。优选地, 所述药学上可接受的缀合基团含有 1、2、3、4 或 5 个 GalNAc 基团。更优选地, 所述药学上可接受的缀合基团含有 3 或 4 个 GalNAc 基团。

在一些实施方案中, 双链 siRNA 类似物的缀合物中的药学上可接受的缀合基团包含化合物基团 D



在一些实施方案中, 双链 siRNA 类似物的缀合物中的药学上可接受的缀合基团连接至双链 siRNA 类似物的正义链的 3' 末端。

在一些实施方案中, 双链 siRNA 类似物或双链 siRNA 类似物的缀合物的硫代磷酸酯部分包括 (R)- 和 (S)-对映体、非对映异构体、和/或其外消旋混合物。

在一些实施方案中, 双链 siRNA 类似物的缀合物选自:

序号	正义链序列 (5'-3') -缀合基团	SEQ ID NO:	反义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO:
1	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u	17
2	g•u•ruGcACUucgcuucacaD	18	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u	17
3	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u	19
4	g•u•ruGcACUucgcuucacaD	18	u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u	19
5	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u	20
6	g•u•ruGcACUucgcuucacaD	18	u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u	20

7	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u	21
8	g•u•ruGcACUucgcuucacaD	18	u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u	21
9	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u	22
10	g•u•ruGcACUucgcuucacaD	18	u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u	22
11	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u	23
12	g•u•ruGcACUucgcuucacaD	18	u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u	23
13	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u	24
14	g•u•ruGcACUucgcuucacaD	18	u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u	24
15	g•u•guGcrCUucgcuucacaD	25	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u	17
16	g•u•guGcACUucgcuucacaD	26	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u	17
17	g•u•guGcACUucgcuucacrD	27	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u	17
18	g•u•guGcACUucgcuucacaD	28	u•G•ugargCGaaguGcAcac•u•u	17
19	g•u•guGcACUucgcuucacaD	28	u•r•ugaAgCGaaguGcAcac•u•u	19
20	g•u•guGcACUucgcuucacaD	28	u•G•rgaAgCGaaguGcAcac•u•u	20
21	g•u•guGcACUucgcuucacaD	28	u•G•uraAgCGaaguGcAcac•u•u	21
22	g•u•guGcACUucgcuucacaD	28	u•G•ugrAgCGaaguGcAcac•u•u	22
23	g•u•guGcACUucgcuucacaD	28	u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u	23
24	g•u•guGcACUucgcuucacaD	28	u•G•ugaAgrGaaguGcAcac•u•u	24
25	g•u•guGcACUucgcuucacaD	28	u•G•uga(Agn)gCGraguGcAcac•u•u	33
26	g•u•guGcACUucgcuucacaD	28	u•G•uga(Agn)gCGarguGcAcac•u•u	34
27	g•u•guGcACUucgcuucacaD	28	u•G•uga(Agn)gCGaaguGcAcac•u•u	35
28	g•u•guGcACUucgcuucacaD	28	u•G•uga(Agn)gCGaaguGcAcac•u•u	36
29	g•r•guGcACUucgcuucacaD	42	u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u	23
30	g•r•guGcACUucgcuucacaD	43	u•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u	23
31	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	u•G•uraArCGaaguGcAcac•u•u	44

32	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	u•G•uga(Agn)rCGaaguGcAcac•u•u	45
33	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	u•G•uga(Agn)gCGaaruGcAcac•u•u	46
34	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	VPu•G•ugaArCGaaguGcAcac•u•u	47
35	g•r•guGcACUucgcuucacaD	16	VPu•G•uga(Agn)rCGaaguGcAcac•u•u	48

所述 D 如前所示。

在第三方面，本公开提供了根据本公开的第一方面的双链 siRNA 类似物或根据本公开的第二方面的双链 siRNA 类似物的缀合物的盐。

在一些实施方案中，如上所述的盐选自碱加成盐、酸加成盐及其组合。

在一些实施方案中，碱加成盐选自钠、钾、钙、铵、有机胺、镁盐及其组合，酸加成盐选自无机酸盐、有机酸盐及其组合。

在一些实施方案中，无机酸选自盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、碳酸氢根、磷酸、磷酸一氢根、磷酸二氢根、硫酸、硫酸氢根、氢碘酸、亚磷酸及其组合，有机酸选自乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、反丁烯二酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸、甲磺酸及其组合。

在第四方面，本公开提供了药物组合物，其包含根据本公开的第一方面的双链 siRNA 类似物，根据本公开的第二方面的双链 siRNA 类似物的缀合物，或根据本公开的第三方面的盐，以及药学上可接受的载体或赋形剂。

在第五方面，本公开提供了根据本公开的第一方面的双链 siRNA 类似物，根据本公开的第二方面的双链 siRNA 类似物的缀合物，或根据本公开的第三方面的盐，或根据本公开的第四方面的药物组合物，其在制备用于治疗乙型肝炎的药物中的用途。

在一些实施方案中，本公开提供了根据本公开的第一方面的双链 siRNA 类似物，根据本公开的第二方面的双链 siRNA 类似物的缀合物，或根据本公开的第三方面的盐，或根据本公开的第四方面的药物组合物，其用于治疗受试者中的乙型肝炎。

在第六方面，本公开提供了治疗受试者中乙型病毒肝炎的方法，其包括将根据本公开的第一方面的双链 siRNA 类似物，根据本公开的第二方面的双链 siRNA 类似物的缀合物，或根据本公开的第三方面的盐，或根据本公开的第四方面的药物组合物施用于受试者的步骤。

在第七方面，本公开提供了用于治疗受试者中的乙型肝炎的根据本公开的第一方面的双链 siRNA 类似物，根据本公开的第二方面的双链 siRNA 类似物的缀合物，或根据本公开的第三方面的盐，或根据本公开的第四方面的药物组合物。

在本公开的一些实施方案中，所述乙型肝炎可以处于疾病的任意阶段。例如急性乙型肝炎、慢性乙型肝炎，或由乙型肝炎病毒感染引起的肝硬化或肝癌。在一些实施方案中，所述

乙型肝炎是慢性乙型肝炎。

定义和说明

除非另有说明，本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的，而应该按照本领域普通技术人员所理解的含义去理解。当本文中出現商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。

本公开中，除非另有说明，否则术语“包含、包括和含有”或等同物为开放式表述，意味着除所列出的要素、组分或步骤外，还可涵盖其他未指明的要素、组分或步骤。

本公开中，HBV 基因是指 DNA 序列如 Genbank 注册号 NC_003977.1 所示的基因。如 Genbank 注册号 NC_003977.1 所示的基因是 HBV 的完整基因组。

在一些实施方案中，双链 siRNA 类似物可以靶向 HBV 的 X 开放阅读框(X opening reading frame, X ORF)。

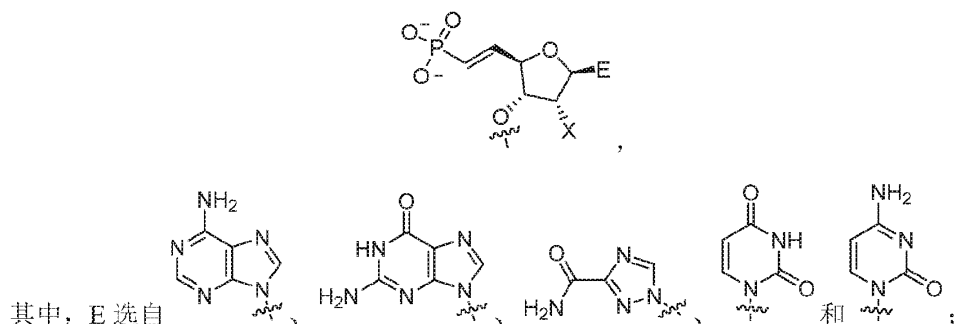
本公开中，双链 siRNA 类似物是指核糖核酸分子的复合体，其具有双链结构，包含两条反向平行的且基本上互补的核酸链，其相对于靶 RNA 具有“正义”和“反义”定向。在本公开中，“互补”具有本领域技术人员周知的含义，即，在双链核酸分子中，一条链的碱基与另一条链上的碱基以互补的方式相配对。嘌呤碱基腺嘌呤(A)始终与嘧啶碱基尿嘧啶(U)相配对；嘌呤碱基鸟嘌呤(G)始终与嘧啶碱基胞嘧啶(C)相配对。每个碱基对都包括一个嘌呤和一个嘧啶。当一条链上的腺嘌呤始终与另一条链上的尿嘧啶配对，以及鸟嘌呤始终与胞嘧啶配对时，两条链被认为是彼此相互补的，以及从其互补链的序列中可以推断出该链的序列。

在本公开中，如无特别说明，大写字母 C、G、U、A 表示核苷酸的碱基组成。小写字母 c、g、u、a 分别表示其相应大写字母所代表的核苷酸被甲氧基修饰；下划线表示大写字母代表的核苷酸被氟代修饰；间隔号“•”表示与间隔号“•”左右相邻的两个核苷酸残基之间为硫代磷酸酯基连接；VP 表示该字母 VP 右侧的一个核苷酸为(E)-乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸。例如，“a•g”表示 a 和 g 残基之间通过硫代磷酸酯基连接。

本公开中所述核苷酸的“修饰”包括但不限于甲氧基修饰、氟代修饰、(E)-乙烯基磷酸酯修饰、硫代磷酸酯基连接或将核苷酸替换为(S)-甘油核酸等。本公开所述的序列可以包括如下表 1 中“进一步修饰的序列”所列。

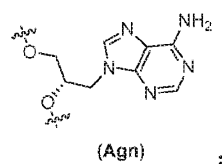
本公开所述氟代修饰的核苷酸指核苷酸的核糖基 2' 位的羟基被氟取代形成的核苷酸，所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

本公开所述(E)-乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸表示以下结构单元：



X 选自 OCH_3 和 F。

本公开所述(S)-甘油核酸(Agn)表示以下结构单元:

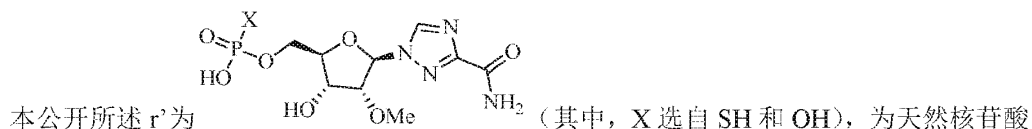


(Agn)和其他核苷酸残基通过磷酸酯或硫代磷酸酯互相连接, 如“a•(Agn)”表示 a 和(Agn)残基之间通过硫代磷酸酯基连接, “a(Agn)”表示 a 和(Agn)残基之间通过磷酸酯基连接。

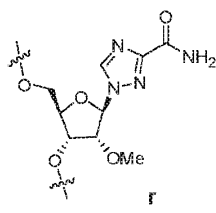
在一些实施方案中, 双链 siRNA 类似物包含正义链或 r' 嵌入的正义链和 r' 嵌入的反义链。正义链、r' 嵌入的正义链和 r' 嵌入的反义链均含有核苷酸基团作为基本结构单元。本领域技术人员公知, 核苷酸基团含有磷酸基团、核糖基团和碱基, 在此不再赘述。

本公开所述 r' 嵌入的序列是指所述序列中存在至少一个核苷酸残基与 r 相连接, 包括如在序列 (如 SEQ ID NO: 2) 中使用 r 替换了一个核苷酸残基的序列。本公开所述 r' 嵌入的序列包括但不限于: r' 嵌入的双链 siRNA、r' 嵌入的正义链和 r' 嵌入的反义链。例如, 5'-aGUrA•C-3'、5'-rGgAAC-3' 和 5'-AG•UrAAcCuCr-3' 都属于 r' 嵌入的情形。

本公开所述 r' 嵌入的双链 siRNA 是指双链 siRNA 中存在至少一个核苷酸残基与 r 相连接, 包括如在双链 siRNA 的序列中使用 r 替换了一个核苷酸残基的双链 siRNA。本公开所述 r' 嵌入的正义链是指正义链中存在至少一个核苷酸残基与 r 相连接, 包括如正义链中的一个或者多个核苷酸被 r 替换。本公开所述 r' 嵌入的反义链是指反义链中存在至少一个核苷酸残基与 r 相连接, 包括如反义链中的一个或者多个核苷酸被 r 替换。



本公开所述 r 表示以下结构单元:



r 和其他核苷酸残基通过磷酸酯或硫代磷酸酯互相连接，如“a•r”表示 a 和 r 残基之间通过硫代磷酸酯基连接，“ar”表示 a 和 r 残基之间通过磷酸酯基连接。

本公开所述“多个”指大于等于 2 的整数，包括但不限于 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个，至多可达所述 siRNA 类似物的理论上限。

本公开中，所述双链 siRNA 类似物的正义链或反义链也可以包括“突出端”，例如不直接参与 RNA 双螺旋结构的未配对突出核苷酸，其中 RNA 双螺旋结构通常由本文定义的“正义链”和“反义链”对形成。这样的突出端可以包括一个或多个修饰的或未修饰的 U、T 和 A。例如，所述 SEQ ID NO: 2 可以在 5' 和/或 3' 段包括修饰的或未修饰的 UU 突出端。

本公开中，双链 siRNA 类似物的缀合物是双链 siRNA 类似物和药学上可接受的缀合基团连接形成的化合物，并且双链 siRNA 类似物和药学上可接受的缀合基团共价连接。

本公开中，药学上可接受的缀合基团可连接至双链 siRNA 类似物的正义链或者 r' 嵌入的正义链的 3' 末端。

一般来说，药学上可接受的缀合基团包含药学上可接受的靶向分子和任选的接头(linker)。示例性的缀合基团、接头、靶向分子的种类可参见 WO2015006740A2 的公开内容。示例性的缀合基团包括但不限于 L96 或化合物基团 D。

在本公开的上下文中，除非另有说明，“缀合”是指两个或多个各自具有特定功能的化学部分之间以共价连接的方式彼此连接；相应地，“缀合物”是指该各个化学部分之间通过共价连接而形成的化合物。

本公开的化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本公开设想所有的这类化合物，包括 (R)- 和 (S)-对映体、非对映异构体，及其外消旋混合物和其他混合物，例如对映异构体或非对映体富集的混合物，所有这些混合物都属于本公开的范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物，均包括在本公开的范围之内。

除非另有说明，术语“对映异构体”或者“旋光异构体”是指互为镜像关系的立体异构体。

除非另有说明，术语“非对映异构体”是指分子具有两个或多个手性中心，并且分子间为非镜像的关系的立体异构体。

除非另有说明，用楔形实线键 () 和楔形虚线键 () 表示一个立体中心的绝对构型，用直形实线键 () 和直形虚线键 () 表示立体中心的相对构型，用波浪线 ()

表示楔形实线键 () 或楔形虚线键 (), 或用波浪线 () 表示直形实线键 () 和/或直形虚线键 ()。

除非另有说明, 术语“富含一种异构体”、“异构体富集”、“富含一种对映体”或者“对映体富集”指其中一种异构体或对映体的含量小于 100%, 并且, 该异构体或对映体的含量大于等于 60%, 或者大于等于 70%, 或者大于等于 80%, 或者大于等于 90%, 或者大于等于 95%, 或者大于等于 96%, 或者大于等于 97%, 或者大于等于 98%, 或者大于等于 99%, 或者大于等于 99.5%, 或者大于等于 99.6%, 或者大于等于 99.7%, 或者大于等于 99.8%, 或者大于等于 99.9%。

除非另有说明, 术语“异构体过量”或“对映体过量”指两种异构体或两种对映体相对百分数之间的差值。例如, 其中一种异构体或对映体的含量为 90%, 另一种异构体或对映体的含量为 10%, 则异构体或对映体过量 (ee 值) 为 80%。

可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的 (*R*)-和 (*S*)-异构体以及 *D* 和 *L* 异构体。如果想得到本公开某化合物的一种对映体, 可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来制备, 其中将所得非对映体混合物分离, 并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者, 当分子中含有碱性官能团 (如氨基) 或酸性官能团 (如羧基) 时, 与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐, 然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分, 然后回收得到纯的对映体。此外, 对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的, 所述色谱法采用手性固定相, 并任选地与化学衍生法相结合 (例如由胺生成氨基甲酸盐)。本公开的化合物可以在一个或多个构成该化合物的原子上包含非天然比例的原子同位素。例如, 可用放射性同位素标记化合物, 比如氚 (^3H), 碘-125 (^{125}I) 或 C-14 (^{14}C)。又例如, 可用重氢取代氢形成氘代药物, 氘与碳构成的键比普通氢与碳构成的键更坚固, 相比于未氘代药物, 氘代药物有降低毒副作用、增加药物稳定性、增强疗效、延长药物生物半衰期等优势。本公开的化合物的所有同位素组成的变换, 无论放射性与否, 都包括在本公开的范围之内。

术语“盐”是指本公开化合物的盐, 由本公开发明的具有特定取代基的化合物与相对无毒的酸或碱制备。当本公开的化合物中含有相对酸性的功能团时, 可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的碱与这类化合物接触的方式获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐包括钠、钾、钙、铵、有机胺或镁盐或类似的盐。当本公开的化合物中含有相对碱性的官能团时, 可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的酸与这类化合物接触的方式获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐的实例包括无机酸盐, 所述无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、碳酸氢根、磷酸、磷酸一氢根、磷酸二氢根、硫酸、硫酸氢根、氢碘酸、亚磷酸等; 以及有机酸盐, 所述有机酸包括如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲

酸、琥珀酸、辛二酸、反丁烯二酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸和甲磺酸等类似的酸；还包括氨基酸（如精氨酸等）的盐，以及如葡萄糖醛酸等有机酸的盐。本公开的某些特定的化合物含有碱性和酸性的官能团，从而可以被转换成任一碱或酸加成盐。

本公开的盐可由含有酸根或碱基的母体化合物通过常规化学方法合成。一般情况下，这样的盐的制备方法是：在水或有机溶剂或两者的混合物中，经由游离酸或碱形式的这些化合物与化学计量的适当的碱或酸反应来制备。

本公开的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备，包括下面列举的具体实施方式、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术人员所熟知的等同替换方式，优选的实施方式包括但不限于本公开的实施例。

本公开所使用的溶剂可经市售获得。

如无特殊说明，本公开柱层析、制备薄层硅胶色谱所用溶剂配比均为体积比。

缩略词清单

Ac	乙酰基
Boc	叔丁氧羰基
DMSO	二甲亚砜
DMT/DMTr	4,4'-二甲氧基三苯基甲基
dsRNA	双链核糖核酸
EC ₅₀	半最大效应浓度
EDTA	乙二胺四乙酸二钠
i-Pr	异丙基
Me	甲基
Ms	甲烷磺酰基
Ph	苯基
p-HPLC	制备高效液相色谱，用于化合物的纯化
RNA	核糖核酸
RNAi	核糖核酸干扰技术
siRNA	小干扰核糖核酸
<i>t</i> -Bu	叔丁基
Tris	三羟甲基氨基甲烷

化合物依据本领域常规命名原则或者使用 ChemDraw®软件命名，市售化合物采用供应商目录名称。

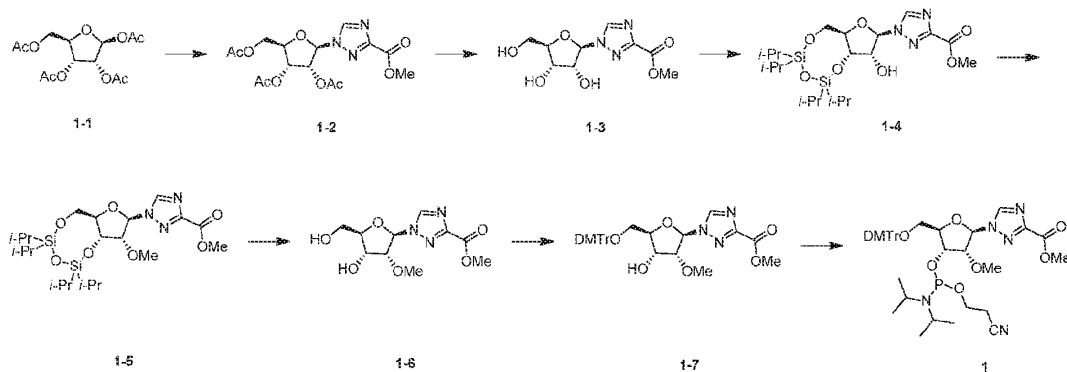
附图说明

- 图 1. WRG01 对 AAV/HBV 小鼠血浆 HBsAg 的影响。
 图 2. WRG01 对 AAV/HBV 小鼠血浆 HBeAg 的影响。
 图 3. WRG01 对 AAV/HBV 小鼠血浆 HBV DNA 的影响。
 图 4. WRG01 对 AAV/HBV 小鼠血浆 HBV pgRNA 的影响。
 图 5. 给予 WRG01 后小鼠体重变化。
 图 6. WR007 和 WR012 对 AAV/HBV 小鼠血浆 HBsAg 的影响。
 图 7. WR007 和 WR012 对 AAV/HBV 小鼠血浆 HBeAg 的影响。
 图 8. WR007 和 WR012 对 AAV/HBV 小鼠血浆 HBV DNA 的影响。
 图 9. 不同剂量 WRG01 对 AAV/HBV 小鼠血浆 HBsAg 的影响。
 图 10. WRG01 在小鼠血浆、肝脏、肾脏的浓度。

具体实施方式

下面通过实施例对本公开进行详细描述,但并不意味着对本公开任何不利限制。本公开的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备,包括下面列举的具体实施方式、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术人员所熟知的等同替换方式,优选的实施方式包括但不限于本公开的实施例。对本领域的技术人员而言,在不脱离本公开精神和范围的情况下针对本公开具体实施方式进行各种变化和改进行将是显而易见的。

实施例 1 亚磷酰胺单体的合成



步骤 A: (2S,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰氨基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2,4,5-三醋酸盐(即式 1-1)(30 克, 94.26 毫摩尔)与 1,2,4-三氮唑-3-羧酸甲酯(11.98 克, 94.26 毫摩尔)溶于乙酸甲酯(220 毫升)的溶液,在 90 摄氏度油浴中于 1 bar 的压力下浓缩至接近完全干燥。将三氟甲烷磺酸(141.46 毫克, 0.94 毫摩尔)的乙酸甲酯溶液(2 毫升)加入混合液中,并于 30 mbar 的压力下在 125 摄氏度的油浴中搅拌 4 小时。反应液冷却至 70 摄氏度,加入乙

醇 (70 毫升), 在 70 摄氏度下搅拌直至形成均一的溶液, 并停止搅拌冷却至 50 摄氏度。生成沉淀后, 静置冷却至 25 摄氏度并将反应液在 0 摄氏度下放置 16 小时。反应液通过布氏漏斗过滤, 滤饼用乙醇 180 毫升 (60 毫升 $\times$ 3) 淋洗, 真空干燥得 1-2。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.40(s, 1H), 6.04(d, $J = 3.42$ Hz, 1H), 5.69-5.81(m, 1H), 5.54(t, $J = 5.38$ Hz, 1H), 4.42-4.51(m, 2H), 4.16-4.30 (m, 1H), 3.98 (s, 3H), 2.05-2.18 (m, 9H)。

步骤 B: 将式 1-2 (15 克, 38.93 毫摩尔) 所示化合物与三乙胺 (4.14 克, 40.87 毫摩尔) 溶于甲醇 (100 毫升)。混合液在氮气保护下于 50 摄氏度搅拌 17 小时。反应液减压浓缩得 1-3。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 8.87(s, 1H), 5.93 (d, $J = 3.42$ Hz, 1H), 4.48 (dd, $J = 3.48$, 4.83 Hz, 1H), 4.33 (t, $J = 5.26$ Hz, 1H), 4.10-4.16 (m, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.84 (dd, $J = 3.24$, 12.29 Hz, 1H), 3.70 (dd, $J = 4.46$, 12.29 Hz, 1H)。

步骤 C: 将式 1-3 (10 克, 38.58 毫摩尔) 所示化合物溶于吡啶 (250 毫升) 于 0 摄氏度滴加 1, 3-二氯-1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷 (12.29 克, 38.97 毫摩尔)。混合液逐渐升温至 25 摄氏度搅拌 16 小时。反应液减压浓缩, 将浓缩物悬浮在乙酸乙酯 (250 毫升) 中, 通过布氏漏斗过滤。滤液用 3 M 盐酸 750 毫升 (250 毫升 $\times$ 3) 和饱和食盐水 250 毫升 (250 毫升 $\times$ 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得粗品。经柱层析 (SiO_2 , 石油醚/二氯甲烷/乙酸乙酯 = 3/1/1) 纯化后得 1-4。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.43 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 4.73 (dd, $J = 4.75$, 8.00 Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 4.75$ Hz, 1H), 4.09-4.19 (m, 2H), 3.94-4.03 (m, 4H), 2.71-3.34 (m, 1H), 1.01-1.15 (m, 28H)。

步骤 D: 向含有式 1-4 (8.23 克, 16.40 毫摩尔) 所示化合物, 碳酸钾 (11.34 克, 82.02 毫摩尔) 和氧化银 (I) (19.01 克, 82.02 毫摩尔) 的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (50 毫升) 的混合液中加入碘甲烷 (11.64 克, 82.02 毫摩尔), 并于 25 摄氏度下搅拌 3 小时。反应液用乙酸乙酯 (300 毫升) 稀释, 通过布氏漏斗过滤。滤液用硫代硫酸钠水溶液 250 毫升 (250 毫升 $\times$ 1)、水 250 毫升 (250 毫升 $\times$ 1) 和饱和食盐水 250 毫升 (250 毫升 $\times$ 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得粗品。经柱层析 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 5/1) 纯化后得 1-5。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.58 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 4.46 (dd, $J = 4.22$, 9.35 Hz, 1H), 4.17-4.28 (m, 2H), 3.96-4.06 (m, 5H), 3.68 (s, 3H), 0.99-1.13 (m, 28H)。

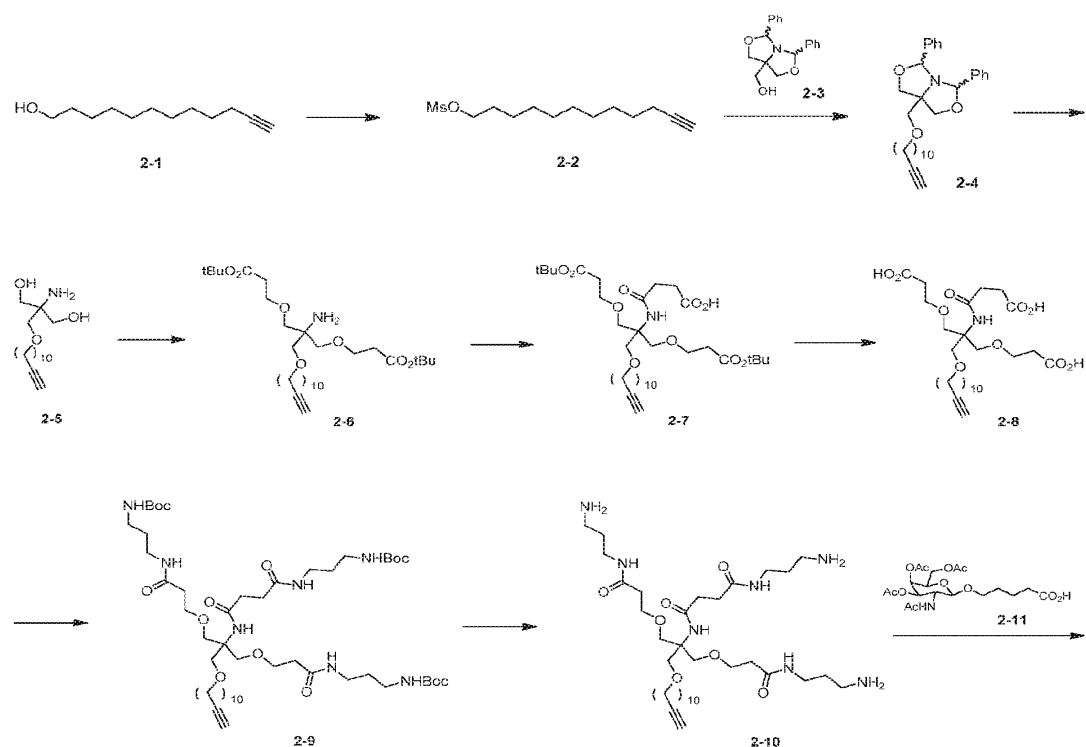
步骤 E: 在 0 摄氏度下, 向式 1-5 (3.27 克, 6.34 毫摩尔) 所示化合物的四氢呋喃 (50 毫升) 溶液中滴加三乙胺三氢氟酸盐 (2.25 克, 13.95 毫摩尔), 混合液逐渐升温至 25 摄氏度并搅拌 16 小时。反应液减压浓缩得粗品。经柱层析 (SiO_2 , 二氯甲烷/甲醇 = 20/1) 纯化后得 1-6。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 8.88 (s, 1H), 6.04 (d, $J = 3.26$ Hz, 1H), 4.44 (t, $J = 5.33$ Hz, 1H), 4.20 (dd, $J = 3.33$, 4.83 Hz, 1H), 4.07-4.14 (m, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.84 (dd, $J = 3.20$, 12.36 Hz, 1H), 3.69 (dd, $J = 4.39$, 12.30 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H)。

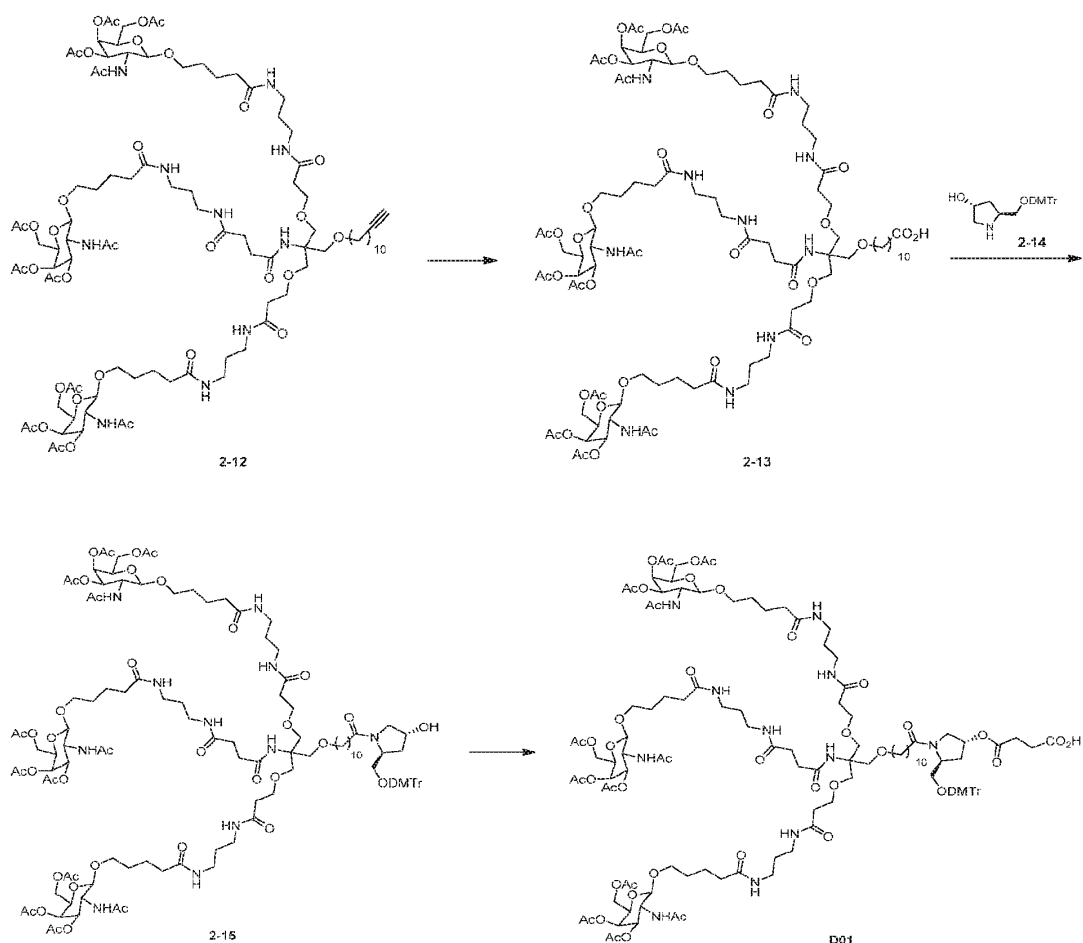
步骤 F: 在 0 摄氏度下, 向式 1-6 (1.30 克, 4.76 毫摩尔) 所示化合物的吡啶 (20 毫升)

溶液中加入 4,4-二甲氧基三苯甲基氯(2.42 克, 7.14 毫摩尔), 并于 25 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液用乙酸乙酯(70 毫升)稀释后, 于 25 摄氏度用饱和碳酸氢钠水溶液(20 毫升)淬灭并用水(40 毫升)稀释。分液后合并的有机相用水 60 毫升(60 毫升×1)和饱和食盐水 60 毫升(60 毫升×1)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得粗品。经 *p*-HPLC 纯化(分离柱: Phenomenex luna C18 (规格: 250mm×50mm, 粒径: 10μm); 流动相: [水(10 mM 碳酸氢铵)-乙腈]; 洗脱梯度: 35%-65%, 20min)得 1-7。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.44 (s, 1H), 7.38-7.45 (m, 2H), 7.28-7.34 (m, 5H), 7.18-7.27 (m, 2H), 6.70-6.92 (m, 4H), 5.97 (d, *J* = 2.88 Hz, 1H), 4.37-4.43 (m, 1H), 4.33 (dd, *J* = 2.88, 5.00 Hz, 1H), 4.19-4.25 (m, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.80 (s, 6H), 3.58 (s, 3H), 3.43-3.49 (m, 1H), 3.33-3.40 (m, 1H), 2.55 (d, *J* = 6.88 Hz, 1H)。LCMS (ESI) *m/z*: 574.2 [M-H]⁻。

步骤 G: 在 0 摄氏度下, 向式 1-7 (1.10 克, 1.91 毫摩尔) 所示化合物的二氯甲烷(8 毫升)溶液中加入 2-氰乙基-*N,N*-二异丙基氯亚磷酰胺(678.45 毫克, 2.87 毫摩尔)和 *N,N*-二异丙基乙胺, 并于 20 摄氏度下搅拌 0.5 小时。反应液减压浓缩得粗品。经柱层析(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=50/1 至 1/2)纯化后得式 1 化合物。LCMS (ESI) *m/z*: 776.3 [M+H]⁺。

实施例 2 D01 的合成





步骤 A: 将 11-十二炔-1-醇 (25 克, 137.14 毫摩尔) 和三乙胺 (16.65 克, 164.56 毫摩尔) 溶于二氯甲烷 (250 毫升), 于 0 摄氏度加入甲烷磺酰氯 (18.85 克, 164.56 毫摩尔)。混合液在 0 摄氏度搅拌 2 小时。反应液用水 (400 毫升) 稀释, 二氯甲烷 800 毫升 (400 毫升×2) 萃取。合并的有机相用水 400 毫升 (200 毫升×2) 和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得 2-2。

步骤 B: 式 2-3 (20 克, 67.26 毫摩尔) 所示化合物溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺 (200 毫升) 于 0 摄氏度加入氢化钠 (60% 纯度, 4.04 克, 100.89 毫摩尔), 接着加入式 2-2 (19.27 克, 73.99 毫摩尔) 所示化合物。混合液在 25 摄氏度搅拌 16 小时。反应液用水 (1 升) 淬灭, 并用二氯甲烷 1.6 升 (800 毫升×2) 萃取。合并的有机相用饱和食盐水 800 毫升 (800 毫升×1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得 2-4。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.63-6.89 (m, 10H), 5.64-5.52 (m, 2H), 4.27-4.01 (m, 2H), 3.98-3.77 (m, 2H), 3.72-3.18 (m, 4H), 2.23-2.14 (m, 2H), 1.98-1.92 (m, 1H), 1.54-1.23 (m, 16H)。

步骤 C: 将式 2-4 (48 克, 103.98 毫摩尔) 所示化合物溶于甲醇 (870 毫升), 加入氯化氢甲醇溶液 (4 摩尔每升, 400 毫升, 1.6 摩尔)。混合液在 30 摄氏度搅拌 2 小时。向反应液加入氯化氢甲醇溶液 (4 摩尔每升, 350 毫升, 1.4 摩尔)。混合液在 30 摄氏度搅拌 16 小时。反应液减压浓缩, 加入三氯甲烷 200 毫升 (100 毫升×2), 减压浓缩直至出现白色固体。加入甲苯 (130 毫升) 和石油醚 (130 毫升), 混合液在 15 摄氏度搅拌 16 小时。反应液经过布氏漏斗过滤, 收集滤饼经真空干燥得白色固体。白色固体溶于二氯甲烷 (50 毫升), 加入氢氧化钠 (6.59 克, 164.66 毫摩尔) 的水溶液 (50 毫升), 在 20 摄氏度搅拌 1 小时。反应液用水 (500 毫升) 稀释, 并用二氯甲烷 1 升 (500 毫升×2) 萃取。合并的有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得 2-5。

步骤 D: 向式 2-5 (23 克, 80.58 毫摩尔) 所示化合物和氢氧化钠 (322.31 毫克, 8.06 毫摩尔) 的二甲亚砜 (70 毫升) 和水 (6 毫升) 的混合液中加入丙烯酸叔丁酯 (22.72 克, 177.28 毫摩尔), 在氮气保护下于 25 摄氏度搅拌 16 小时。反应液用水 (500 毫升) 稀释, 并用乙酸乙酯 1 升 (500 毫升×2) 萃取。合并的有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得粗品。经柱层析 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯/乙醇 (含 0.1% 氨水) = 36/3/1 至 16/3/1) 纯化后得 2-6。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.60-3.54 (m, 4H), 3.32 (br s, 5H), 3.15 (s, 5H), 2.74-2.66 (m, 1H), 2.40 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H), 2.18-2.11 (m, 2H), 1.58-1.38 (m, 22H), 1.34-1.23 (m, 12H)。

步骤 E: 向式 2-6 (24.5 克, 45.22 毫摩尔) 所示化合物的二氯甲烷 (250 毫升) 溶液中加入三乙胺 (9.15 克, 90.45 毫摩尔) 和丁二酸酐 (6.79 克, 67.83 毫摩尔), 于 20 摄氏度搅拌 16 小时。反应液加入二氯甲烷 (1 升) 和盐酸 (1 摩尔每升, 1 升), 分液后的有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得 2-7。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.49-6.37 (m, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.70-3.57 (m, 8H), 3.37 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.69-2.51 (m, 4H), 2.50-2.36 (m, 4H), 2.22-2.13 (m, 2H), 1.96-1.90 (m, 1H), 1.57-1.47 (m, 4H), 1.46-1.40 (m, 18H), 1.40-1.31 (m, 2H), 1.30-1.21 (m, 10H)。

步骤 F: 将式 2-7 (27.4 克, 42.69 毫摩尔) 所示化合物溶于甲酸 (140 毫升), 混合液在氮气保护下于 20 摄氏度搅拌 16 小时。反应液减压浓缩, 加入甲苯 300 毫升 (150 毫升×2), 减压浓缩得 2-8。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.79-9.22 (m, 3H), 6.44-6.23 (m, 1H), 3.88-3.43 (m, 10H), 3.39-3.20 (m, 2H), 2.77-2.31 (m, 8H), 2.15-2.06 (m, 2H), 1.87 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.48-1.28 (m, 6H), 1.26-1.12 (m, 10H)。

步骤 G: 将式 2-8 (22.6 克, 42.67 毫摩尔) 所示化合物、*N,N*-二异丙基乙胺 (33.09 克, 256.03 毫摩尔) 和 *O*-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-*N,N,N,N*-四甲基脲六氟磷酸盐 (51.92 克, 136.55 毫摩尔) 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺 (250 毫升), 加入 *N*-(3-氨基丙基) 氨基甲酸叔丁酯 (29.74 克, 170.69 毫摩尔)。混合液在 20 摄氏度搅拌 16 小时。反应液加入二氯甲烷 (1 升) 和盐酸

(1 摩尔每升, 1 升), 分液后的有机相用水 1 升 (1 升×1)、碳酸氢钠水溶液 1 升 (1 升×1) 和饱和食盐水 1 升 (1 升×1) 依次洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得粗品。经柱层析 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯/乙醇=40/3/1 至 10/3/1) 纯化后得 2-9。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.22-6.79 (m, 3H), 6.77-6.44 (m, 1H), 5.45-5.00 (m, 3H), 3.86-3.73 (m, 2H), 3.72-3.63 (m, 4H), 3.62-3.45 (m, 4H), 3.41-3.32 (m, 2H), 3.32-3.20 (m, 6H), 3.19-3.03 (m, 6H), 2.56-2.47 (m, 4H), 2.47-2.39 (m, 4H), 2.21-2.12 (m, 2H), 1.95-1.90 (m, 1H), 1.70-1.57 (m, 6H), 1.56-1.47 (m, 4H), 1.46-1.38 (m, 29H), 1.30-1.25 (m, 10H)。

步骤 H: 式 2-9 (15 克, 15.03 毫摩尔) 所示化合物溶于二氯甲烷 (114 毫升) 加入三氟乙酸 (38 毫升), 混合液于 20 摄氏度搅拌 16 小时。反应液减压浓缩, 加入甲苯/乙腈=3/1 混合液 600 毫升 (250 毫升×3) 减压浓缩得 2-10 (三(三氟乙酸盐))。

步骤 I: 式 2-11 (22.15 克, 49.50 毫摩尔) 所示化合物, *N,N*-二异丙基乙胺 (7.75 克, 60.00 毫摩尔), 1-羟基-7-氮杂苯并三唑 (6.12 克, 45.00 毫摩尔) 和 *O*-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-*N,N,N,N*-四甲基脲六氟磷酸盐 (20.53 克, 54.00 毫摩尔) 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺 (90 毫升), 向该混合液加入式 2-10 (三(三氟乙酸盐), 15.6 克, 15.00 毫摩尔) 所示化合物和 *N,N*-二异丙基乙胺 (21.32 克, 165.00 毫摩尔) 的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (120 毫升) 溶液。混合液在 20 摄氏度搅拌 16 小时。反应液加入二氯甲烷 (1.2 升) 和盐酸 (1 摩尔每升, 1 升), 分液后的有机相用水 1 升 (1 升×1)、碳酸氢钠水溶液 1 升 (1 升×1) 和饱和食盐水 1 升 (1 升×1) 依次洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得粗品。经柱层析 (SiO₂, 二氯甲烷/甲醇=100/1 至 10/1 至二氯甲烷/乙醇=1/1) 纯化后得 2-12。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.87-7.66 (m, 9H), 7.09 (s, 1H), 5.21 (d, *J*=3.4 Hz, 3H), 4.96 (dd, *J*=3.4, 11.3 Hz, 3H), 4.48 (d, *J*=8.5 Hz, 3H), 4.06-3.98 (m, 9H), 3.91-3.82 (m, 3H), 3.74-3.66 (m, 3H), 3.58-3.46 (m, 12H), 3.31 (brs, 3H), 3.07-2.98 (m, 12H), 2.71 (t, *J*=2.6 Hz, 1H), 2.33-2.22 (m, 8H), 2.16-2.12 (m, 2H), 2.10 (s, 9H), 2.04 (brt, *J*=7.1 Hz, 6H), 1.99 (s, 9H), 1.89 (s, 9H), 1.81-1.74 (m, 9H), 1.54-1.39 (m, 22H), 1.32 (brdd, *J*=4.5, 6.7 Hz, 2H), 1.24 (s, 10H)。

步骤 J: 将式 2-12 (1.00 克, 0.50 毫摩尔) 所示化合物和 *N*-甲基-*N,N,N*-三正辛基氯化铵 (20.35 毫克, 50.35 微摩尔) 溶于乙酸 (2.7 毫升) 和正戊烷 (6.3 毫升) 的混合液, 于 0 摄氏度向该混合液滴入高锰酸钾 (0.40 克, 2.52 毫摩尔) 的水 (9 毫升) 溶液。混合液在 0 至 15 摄氏度搅拌 2 小时。反应用亚硫酸氢钠 (1.27 克) 淬灭, 加入盐酸 (2 摩尔每升, 5 毫升) 和水 (30 毫升), 并用三氯甲烷/异丙醇=3/1 混合液 120 毫升 (40 毫升×3) 萃取。合并的有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩, 加入甲苯/乙腈=1/1 混合液 180 毫升 (30 毫升×6), 减压浓缩得 2-13。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.34 (d, *J*=2.9 Hz, 3H), 5.06 (dd, *J*=3.3, 11.2 Hz, 3H), 4.56 (d, *J*=8.4 Hz, 3H), 4.19-4.06 (m, 9H), 4.04-3.98 (m, 3H), 3.87

(td, $J=5.7, 9.9$ Hz, 4H), 3.72-3.64 (m, 9H), 3.57-3.50 (m, 3H), 3.39 (brt, $J=6.4$ Hz, 2H), 3.22 (q, $J=6.4$ Hz, 12H), 2.51-2.40 (m, 9H), 2.21 (brt, $J=7.3$ Hz, 6H), 2.14 (s, 9H), 2.03 (s, 9H), 1.94 (d, $J=7.9$ Hz, 18H), 1.72-1.57 (m, 22H), 1.39 (br s, 12H)。

步骤 K: 向式 2-13 (1.00 克, 0.50 毫摩尔) 所示化合物的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (10 毫升) 溶液加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (0.26 克, 1.99 毫摩尔) 和 *O*-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-*N,N,N,N*-四甲基脲六氟磷酸盐 (0.23 克, 0.60 毫摩尔)。混合液搅拌后, 加入式 2-14 (0.23 克, 0.55 毫摩尔) 所示化合物。混合液在 15 摄氏度搅拌 16 小时。反应液加入二氯甲烷 (50 毫升) 和水 (50 毫升), 分液后的有机相用饱和碳酸氢钠水溶液 50 毫升 (50 毫升 $\times$ 1)、水 50 毫升 (50 毫升 $\times$ 1) 和饱和食盐水 50 毫升 (50 毫升 $\times$ 1) 依次洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得粗品。经柱层析 (SiO_2 , 二氯甲烷/甲醇 (含 0.1% 三乙胺) =20/1 至 10/1) 纯化后得 2-15。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.90-7.82 (m, 6H), 7.78 (br d, $J=4.8$ Hz, 3H), 7.40-7.26 (m, 10H), 6.91 (br dd, $J=3.1, 9.0$ Hz, 4H), 5.26 (d, $J=3.4$ Hz, 3H), 5.03-4.99 (m, 3H), 4.53 (d, $J=8.4$ Hz, 3H), 4.43 (br d, $J=3.8$ Hz, 1H), 4.23-4.14 (m, 1H), 4.12-4.02 (m, 9H), 3.92 (td, $J=9.0, 11.0$ Hz, 3H), 3.78 (s, 6H), 3.77-3.71 (m, 3H), 3.66-3.51 (m, 13H), 3.49-3.41 (m, 4H), 3.11-3.01 (m, 16H), 2.38-2.37 (m, 1H), 2.32 (br s, 9H), 2.14 (s, 9H), 2.08 (br t, $J=6.9$ Hz, 7H), 2.04 (s, 9H), 1.93 (s, 9H), 1.82 (s, 9H), 1.57-1.46 (m, 22H), 1.31-1.26 (m, 12H)。

步骤 L: 向式 2-15 (0.80 克, 0.33 毫摩尔) 所示化合物的二氯甲烷 (8 毫升) 溶液依次加入三乙胺 (67.24 毫克, 0.64 毫摩尔), 4-*N,N*-二甲基氨基吡啶 (0.12 克, 1.00 毫摩尔) 和丁二酸酐 (83.13 毫克, 0.83 毫摩尔)。混合液在 10 摄氏度搅拌 16 小时。反应液加入二氯甲烷 (50 毫升), 水 (30 毫升) 和饱和食盐水 (30 毫升), 分液后的有机相用水 30 毫升 (30 毫升 $\times$ 1) 和饱和食盐水 30 毫升 (30 毫升 $\times$ 1) 依次洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩得粗品。经 *p*-HPLC 纯化 (分离柱: Waters Xbridge C18 (规格: 150mm $\times$ 50mm, 粒径: 10 μm); 流动相: [水 (10 mM 碳酸氢铵)-乙腈]; 洗脱梯度: 27%-57%, 11min) 得实施例 2 (化合物 D01)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.96-7.69 (m, 9H), 7.33-7.09 (m, 10H), 6.90-6.78 (m, 4H), 5.21 (d, $J=3.3$ Hz, 3H), 4.97 (dd, $J=3.3, 11.2$ Hz, 3H), 4.49 (d, $J=8.4$ Hz, 3H), 4.06-3.97 (m, 9H), 3.91-3.83 (m, 3H), 3.79-3.66 (m, 11H), 3.63-3.45 (m, 18H), 3.02 (br d, $J=4.6$ Hz, 14H), 2.46-2.37 (m, 4H), 2.35-2.14 (m, 12H), 2.10 (s, 9H), 2.04 (brt, $J=7.0$ Hz, 6H), 1.99 (s, 9H), 1.88 (s, 9H), 1.77 (s, 9H), 1.57-1.37 (m, 22H), 1.22 (br s, 12H)。

实施例 3 双链 siRNA 类似物或其缀合物的合成

含 D 的单链寡核糖核苷酸的合成: 按照亚磷酰胺固相合成技术合成寡核糖核苷酸。在可控多孔玻璃 (氨基 CPG, 500 Å) 与 D01 通过共价键连接制成的固体支持物上进行合成。所

有的 2'-修饰的 RNA 亚磷酰胺 (phosphoramidite) 和辅助试剂均为商品化可得试剂。所有的酰胺溶于无水乙腈中并且加入分子筛 (3 Å)，使用 5-乙基硫-1H-四唑 (ETT) 作为活化剂的偶合时间为 5 分钟。使用 50 mM 3-((二甲基氨基-亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮 (DDTT) 的无水乙腈/吡啶 (v/v=1/1) 溶液产生硫代磷酸酯键，反应时间 3 分钟。所有序列在最后脱除 DMT 基团后即合成。

不含 D 的单链寡核糖核苷酸的合成：按照亚磷酰胺固相合成技术合成寡核糖核苷酸。在通用可控多孔玻璃 CPG (500 Å) 上进行合成。所有的 2'-修饰的 RNA 亚磷酰胺 (phosphoramidite) 和辅助试剂均为商品化可得试剂。所有的酰胺溶于无水乙腈中并且加入分子筛 (3 Å)，使用 5-乙基硫-1H-四唑 (ETT) 作为活化剂的偶合时间为 5 分钟。使用 50 mM 3-((二甲基氨基-亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮 (DDTT) 的无水乙腈/吡啶 (v/v=1/1) 溶液产生硫代磷酸酯键，反应时间 3 分钟。所有序列在最后脱除 DMT 基团后即合成。

CPG 上结合的低聚体的切割和去保护：在固相合成终止后，通过用含 20% 二乙胺的乙腈溶液处理 30 分钟去除保护基，而没有从 CPG 上切下寡核苷酸。随后，干燥的 CPG 在 40 摄氏度下用浓氨水处理 18 小时。在离心之后，上清液被转移至新的管中并且用氨水洗涤 CPG。浓缩合并的溶液得到固体混合物。

单链寡核糖核苷酸的纯化：通过使用 NanoQ 阴离子交换经 HPLC 纯化的低聚体。缓冲液 A 是 10 mM 高氯酸钠溶液，20 mM Tris，1 mM EDTA，pH 7.4 和含有乙腈 20%，以及缓冲液 B，500 mM 高氯酸钠，20 mM Tris，1 mM EDTA，pH 7.4 和含有乙腈 20%。分离得到目标产物，并用反相 C18 柱脱盐。

单链寡核糖核苷酸的退火产生 siRNA：把待退火的单链寡核糖核苷酸用无菌 RNase Free H₂O (无 RNA 水解酶) 配制成 200 μM。如下设置退火反应体系，将总体积为 100 μL 的混合液，10 nmol 放置 95 °C 水浴锅 10 分钟 (≥100 nmol 需求量需要高温 20 分钟) → 迅速放入 60 °C 水浴，自然降温 → 退火完成后的溶液不可放置在高温中储存。通过合并等摩尔的单链寡核糖核苷酸溶液形成互补链。

表 1 靶向乙型肝炎病毒基因的双链 siRNA 类似物、包含其的缀合物和它们对应的核心序列

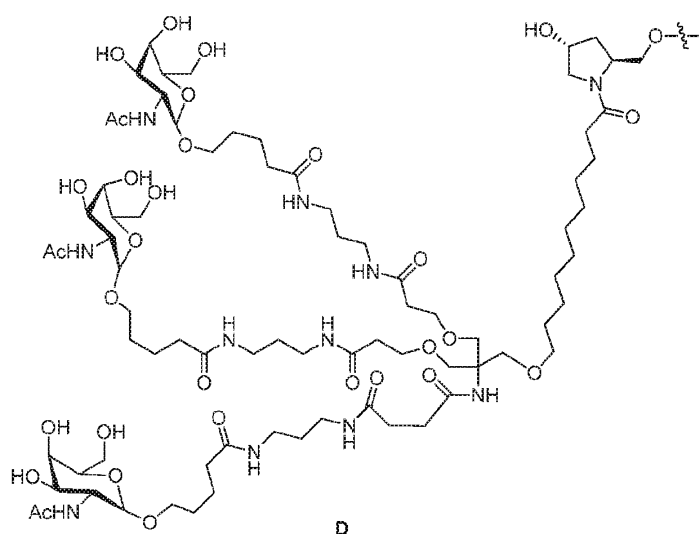
核心序列				r ⁺ 嵌入的序列 ¹⁾				进一步修饰的序列			
SEQ ID NO	正义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO	反义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO	正义链序列 (5'-3') ^{***}	SEQ ID NO	反义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO	正义链序列 (5'-3') ^{***}	SEQ ID NO	反义链序列 (5'-3')
1	GUGUGCA CUUCGCU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD*	4	UGUGArGC GAAGUGC ACACUU	16	g ⁺ r ⁺ guGcAC Uucgcuaac aD*	17	u ⁺ G ⁺ ugargCGa aguGcΔcac ⁺ u ⁺ u
1	GUGUGCA CUUCGCU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	5	GUrUGCA CUUCGCU UCACAD	4	UGUGArGC GAAGUGC ACACUU	18	g ⁺ u ⁺ ruGcAC Uucgcuaac aD	17	u ⁺ G ⁺ ugargCGa aguGcΔcac ⁺ u ⁺ u
1	GUGUGCA CUUCGCU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	6	UrUGAAGC GAAGUGC ACACUU	16	g ⁺ r ⁺ guGcAC Uucgcuaac aD	19	u ⁺ r ⁺ ugaAgCGa aguGcΔcac ⁺ u ⁺ u

1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	5	GUUGCA CUUCGCU UCACAD	6	UrUGAAGC GAAGUGC ACACUU	18	g ^u *ruGcAC Uucgcuuac aD	19	u ^r *ugaAgCGa aguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	7	UGrGAAGC GAAGUGC ACACUU	16	g ^r *guGcAC Uucgcuuac aD	20	u ^r *rgaAgCG aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	5	GUUGCA CUUCGCU UCACAD	7	UGrGAAGC GAAGUGC ACACUU	18	g ^u *ruGcAC Uucgcuuac aD	20	u ^r *rgaAgCG aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	8	UGUrAAGC GAAGUGC ACACUU	16	g ^r *guGcAC Uucgcuuac aD	21	u ^r *uraAgCG aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	5	GUUGCA CUUCGCU UCACAD	8	UGUrAAGC GAAGUGC ACACUU	18	g ^u *ruGcAC Uucgcuuac aD	21	u ^r *uraAgCG aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	9	UGUGrAGC GAAGUGC ACACUU	16	g ^r *guGcAC Uucgcuuac aD	22	u ^r *ugrAgCG aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	5	GUUGCA CUUCGCU UCACAD	9	UGUGrAGC GAAGUGC ACACUU	18	g ^u *ruGcAC Uucgcuuac aD	22	u ^r *ugrAgCG aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	10	UGUGAArC GAAGUGC ACACUU	16	g ^r *guGcAC Uucgcuuac aD	23	u ^r *ugaArCG aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	5	GUUGCA CUUCGCU UCACAD	10	UGUGAArC GAAGUGC ACACUU	18	g ^u *ruGcAC Uucgcuuac aD	23	u ^r *ugaArCG aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	11	UGUGAAGr GAAGUGC ACACUU	16	g ^r *guGcAC Uucgcuuac aD	24	u ^r *ugaAgrGa aguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	5	GUUGCA CUUCGCU UCACAD	11	UGUGAAGr GAAGUGC ACACUU	18	g ^u *ruGcAC Uucgcuuac aD	24	u ^r *ugaAgrGa aguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	12	GUGUGCr CUUCGCU UCACAD	4	UGUGArGC GAAGUGC ACACUU	25	g ^u *guGcrC Uucgcuuac aD	17	u ^r *ugargCGa aguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	13	GUGUGCA CUUCGCU UCrCAD	4	UGUGArGC GAAGUGC ACACUU	26	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	17	u ^r *ugargCGa aguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	14	GUGUGCA CUUCGCU UCACId	4	UGUGArGC GAAGUGC ACACUU	27	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	17	u ^r *ugargCGa aguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	1	GUGUGCA CUUCGCU UCACAD	4	UGUGArGC GAAGUGC ACACUU	28	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	17	u ^r *ugargCGa aguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	1	GUGUGCA CUUCGCU UCACAD	6	UrUGAAGC GAAGUGC ACACUU	28	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	19	u ^r *ugaAgCGa aguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	1	GUGUGCA CUUCGCU UCACAD	7	UGrGAAGC GAAGUGC ACACUU	28	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	20	u ^r *rgaAgCGi aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	1	GUGUGCA CUUCGCU UCACAD	8	UGUrAAGC GAAGUGC ACACUU	28	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	21	u ^r *uraAgCGi aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	1	GUGUGCA CUUCGCU UCACAD	9	UGUGrAGC GAAGUGC ACACUU	28	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	22	u ^r *ugrAgCGi aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	1	GUGUGCA CUUCGCU UCACAD	10	UGUGAArC GAAGUGC ACACUU	28	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	23	u ^r *ugaArCGi aaguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	1	GUGUGCA CUUCGCU UCACAD	11	UGUGAAGr GAAGUGC ACACUU	28	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	24	u ^r *ugaAgrGa aguGcAcac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	1	GUGUGCA CUUCGCU UCACAD	29	UGUGAAG CGrAGUGC ACACUU	28	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	33	u ^r *uga(Agm) gCGraguGcAc ac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	1	GUGUGCA CUUCGCU UCACAD	30	UGUGAAG CGArGUGC ACACUU	28	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	34	u ^r *uga(Agm) gCGraguGcAc ac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	1	GUGUGCA CUUCGCU UCACAD	31	UGUGAAG CGAAGUG CrCACUU	28	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	35	u ^r *uga(Agm) gCGaaguGcAc ac ^u u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	1	GUGUGCA CUUCGCU UCACAD	32	UGUGAAG CGAAGUG CACrCUU	28	g ^u *guGcA CUucgcuuac caD	36	u ^r *uga(Agm) gCGaaguGcA cAc ^u u

1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	37	GrGUGCA CUUCGCU rCACAD	10	UGUGAArC GAAGUGC ACACUU	42	g•r•guGcAC Uucgcucac aD	23	u•G•ugaArCG aaguGcAcac•u •u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	38	GrGUGCA CUUCrCU UCACAD	10	UGUGAArC GAAGUGC ACACUU	43	g•r•guGcAC Uucgcucac aD	23	u•G•ugaArCG aaguGcAcac•u •u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	39	UGUrAArC GAAGUGC ACACUU	16	g•r•guGcAC Uucgcucac aD	44	u•G•ugaArCGa aguGcAcac•u• u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	10	UGUGAArC GAAGUGC ACACUU	16	g•r•guGcAC Uucgcucac aD	45	u•G•uga(Agn)r CGaaguGcAca c•u•u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	40	UGUGAAG CGAArUGC ACACUU	16	g•r•guGcAC Uucgcucac aD	46	u•G•uga(Agn) gCGaamGcAca c•u•u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	10	UGUGAArC GAAGUGC ACACUU	16	g•r•guGcAC Uucgcucac aD	47	VPu•G•ugaAr CGaaguGcAca c•u•u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	10	UGUGAArC GAAGUGC ACACUU	16	g•r•guGcAC Uucgcucac aD	48	VPu•G•uga(A gn)rCGaaguG cAcac•u•u
1	GUGUGCA CUUCGCUU CACA	2	UGUGAAG CGAAGUG CACAC	3	GrGUGCA CUUCGCU UCACAD	10	UGUGAArC GAAGUGC ACACUU	15	g•u•guGcA CUucgcucaca D	41	VPu•G•uga(A gn)gCGarguG cAcac•u•u

*: D 为小分子片段 D01 进行化学反应后的残基，通过共价键与核酸结合，其结构如

下:



**：r'嵌入的序列的反义链序列是在核心序列的具有 3'端 UU 的反义链序列的基础上进行 r'嵌入得到的。例如，SEQ ID NO: 4 是在具有 3'端 UU 的 SEQ ID NO: 2 的基础上进行 r'嵌入得到的。

***：当序列含有 D 时，所述 D 用于指代缀合物基团 D 的连接位置。例如 g•r•guGcACUucgcucacaD (5'-3') 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的序列 g•r•guGcACUucgcucaca 在 3'端与 D 连接。

实施例3 HBV 体外测试

1. 实验目的:

通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测 HepG2-NTCP 细胞培养上清中 HBV 抗原 (HBsAg 和 HBeAg) 含量, 以化合物的 EC₅₀ 值为指标, 来评价化合物对 HBV 的抑制活性; 同时通过 Cell-titer Glo 检测细胞活力, 来评价化合物的细胞毒性。

2. 实验材料:

2.1 细胞系: HepG2-NTCP 细胞

HepG2-NTCP 细胞培养基 (DMEM, Invitrogen-11330032; 10%血清, Invitrogen-10099141; 100 units/ml 青霉素和 100 µg/ml 链霉素, Hyclone-SV30010; 1% 非必需氨基酸, Invitrogen-11140050; 2mM L-谷氨酰胺, Invitrogen-25030081; 1mM 丙酮酸钠, Gibco-11360-070; 500 µg/ml Geneticin, Invitrogen-10131027)

2.2 试剂:

胰酶(Invitrogen-25300062); DPBS(Corning-21031CVR); DMSO(Sigma-D2650-100ML); Cell-titer Glo (Promega- G7573); 乙型肝炎表面抗原定量检测试剂盒 (安图生物-CL 0310); 乙型肝炎 e 抗原定量检测试剂盒 (安图生物-CL 0312)。

2.3 耗材与仪器:

96 孔细胞培养板 (Corning-3599); CO₂ 培养箱 (HERA-CELL-240)

酶标仪 (BioTek Synergy 2)

3. 实验步骤和方法:

3.1 第 0 天, 种 HepG2-NTCP (7.5×10^4 细胞/孔) 细胞到 48 孔板, 在 37 °C, 5 % CO₂ 培养过夜。

3.2 第 1 天, 更换含 1% DMSO 的培养基。

3.3 第 2 天, 用 D 型 HBV (从 HepG2.2.15 细胞培养上清浓缩) 感染 HepG2-NTCP (2000GE/细胞)。

3.4 第 3 天, 吸掉感染液, 加入新鲜的含 1% DMSO 的培养基。

3.5 第 6 天, 根据 Lipofectamine® RNAiMax (Invitrogen 公司) 的使用说明, 转染 siRNA 缀合物。缀合物 5 倍梯度稀释 7 个浓度, 三复孔, 终浓度为 0.16 pM。化合物为正义链、反义链的组合, 为单一化学实体, 最大浓度为 2.5 nM。

3.6 第 12 天, 收取培养孔中的上清, ELISA 测定 HBV 表面抗原和 e 抗原。待收集上清后, 加入 Cell-titer Glo 测定细胞活力。

3.7 ELISA 测定乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 和 e 抗原 (HBeAg), 具体步骤参照该产品说明书, 步骤简述如下: 取 50 µl 样品和标准品分别加入到反应板中, 再每孔分别加入 50 µl 酶

结合物，震荡混匀，37°C孵育 60 分钟，然后用洗液洗板 5 次，再每孔加入 50μl 发光底物，混匀，室温避光反应 10 分钟，最后用酶标仪检测化学发光强度。

3.8 数据分析：

计算细胞活力百分比：

$\% \text{ viability} = (\text{样品的发光值} - \text{培养基对照发光值}) / (\text{DMSO 对照的发光值} - \text{培养基对照发光值}) \times 100。$

计算 HBV 表面抗原和 e 抗原的抑制百分比：

$\% \text{ Inh.} = (1 - \text{样品中的抗原值} / \text{DMSO 对照抗原值}) \times 100。$

计算 CC₅₀ 和 EC₅₀：使用 GraphPad Prism 软件计算化合物的 CC₅₀ 和对 HBV 的 50%抑制浓度（EC₅₀）值。

4. 实验结果：见表 2。

表 2 测试的序列在细胞中降低 HBsAg 和 HBeAg 水平实验结果

测试的序列				实验结果		
SEQ ID NO	正义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO	反义链序列 (5'-3')	HBsAg EC ₅₀ (pM)	HBeAg EC ₅₀ (pM)	细胞活力 CC ₅₀ (nM)
16	g•r•guGcACUucgcu ucacaD	17	u•G•ugargCGaaguGc Acac•u•u	13.75	20.84	>2.5
16	g•r•guGcACUucgcu ucacaD	20	u•G•rgaAgCGaaguG cAcac•u•u	17.40	34.21	>2.5
16	g•r•guGcACUucgcu ucacaD	23	u•G•ugaArCGaaguG cAcac•u•u	12.44	21.07	>2.5
28	g•u•guGcACUucgcu ucacaD	17	u•G•ugargCGaaguGc Acac•u•u	13.09	22.68	>2.5
28	g•u•guGcACUucgcu ucacaD	20	u•G•rgaAgCGaaguG cAcac•u•u	14.69	28.90	>2.5
28	g•u•guGcACUucgcu ucacaD	23	u•G•ugaArCGaaguG cAcac•u•u	14.99	34.72	>2.5
28	g•u•guGcACUucgcu ucacaD	34	u•G•uga(Agn)gCGar guGcAcac•u•u	30.72	52.56	>2.5

*测试的样品是双链 siRNA 类似物的缀合物。

实施例 4：重组 8 型腺相关病毒载体介导的乙型肝炎病毒小鼠模型（AAV-HBV）中抗乙肝病毒活性与安全性研究

实验目的：

AAV 载体介导的 HBV 转染小鼠模型是一种快速、高效的 HBV 模型。利用 AAV8 载体的高度嗜肝性，用携带 1.3 拷贝 HBV 基因组的重组 8 型腺相关病毒（rAAV8-1.3HBV）经小鼠尾静脉注射，可将所携带的 1.3 拷贝 HBV 基因组高效导入肝细胞。由于 AAV 病毒载体的特性，其介导的载体可以持续表达很长时间，应用 AAV/HBV 模型可以在小鼠肝脏内持续复制 HBV DNA 并表达 HBsAg 和 HBeAg。

通过运用 AAV/HBV 小鼠模型，检测受试化合物治疗后的血清中 HBsAg、HBeAg、DNA、pgRNA 和小鼠体重，以评价其体内抗 HBV 效果与安全性。

实验材料：

C57BL/6 小鼠、PBS（RNase free）为溶媒、受试化合物、重组病毒 rAAV8-1.3HBV。本项目主要试剂包括 QIAamp96 DNA 试剂盒（Qiagen, 51162）、FastStart Universal Probe Master (Rox)（Roche, 04914058001）、乙型肝炎病毒表面抗原检测试剂盒（安图生物，CL0310）、乙型肝炎病毒 e 抗原检测试剂盒（安图生物，CL0918）、PureLink™ Pro 96 Viral RNA/DNA kit（Invitrogen, 12280-096A）和 FastQuant RT Kit (with gDNase)（TIANGEN, KR106-02）。主要仪器包括：离心机（Beckman Allegra X-15R）、多功能酶标仪（BioTek, Synergy 2）、荧光定量 PCR 仪（Applied Biosystems, 7900HT Fast Real-time PCR system）、酶标仪（Molecular Devices, SpectraMax 340PC384）。

实验方法：

a) 鼠在病毒注射后第 34 天开始皮下注射给药，将该天设为第 0 天。给药前所有小鼠颌下采血收集血浆。具体给药方案见表 3。

b) 鼠给药后第 0, 14, 21, 28 天和 32 天经颌下静脉采血收集血浆，收集的样用 K₂-EDTA 抗凝，在 4℃，7000 g / 分钟条件下离心 10 分钟后收集血浆。具体采血时间见表 3。

c) 35 天或第 42 天，所有小鼠经颌下静脉采血收集血浆，之后小鼠经 CO₂ 吸入安乐死，经心脏采血收集血浆样品，并收集肝脏样品。

d) 浆样品送至检测。

表 3 体内实验方案

小鼠只数	给药设计				非终点采血方案	实验终点
	测试化合物	给药量 (mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药方案		
5	溶媒	/	5	病毒注射第 34 天设为第 0 天，第 0、29	病毒注射后第 34 天设为第 0 天，采血时间为	给药后第 35 天，小鼠经颌下静脉丛采血收集血浆，之
5	WRG01 ^{*1}	3				

			天经皮下注射 各给药一次。	第 0、7、14、 21、28、32、35 天。	后小鼠经 CO ₂ 吸入 安乐死，心脏采血 收集血浆样品，并 收集肝脏样品。
5	WR007 ^{*2}	3	病毒注射第 34 天设为第 0 天，第 0 天经 皮下注射给药 一次。		/
5	WR012 ^{*3}	3			

^{*1}: WRG01 为缀合物，其正义链为 SEQ ID NO: 16，反义链为 SEQ ID NO: 23，缀合物基团为 D。

^{*2}: WR007 为缀合物，其正义链为 SEQ ID NO: 42，反义链为 SEQ ID NO: 23，缀合物基团为 D。

^{*3}: WR012 为缀合物，其正义链为 SEQ ID NO: 16，反义链为 SEQ ID NO: 47，缀合物基团为 D。

/: 尚未到终点。

样品分析:

ELISA 检测小鼠血清中 HBsAg、HBeAg 的含量: 实验步骤参照 HBsAg ELISA (安图生物, CL 0310) 和 HBeAg ELISA (安图生物, CL0918) 试剂盒说明书。

qPCR 检测小鼠血浆中 HBV DNA 含量: 提取血浆中 HBV DNA, 实验步骤参照 QIAamp 96 DNA Blood Kit 说明书, qPCR 检测小鼠血浆中 HBV DNA 的含量。

RT-qPCR 检测小鼠血浆中 HBV pgRNA 含量: 提取血浆中 HBV pgRNA, 实验步骤参照 PureLink™ Pro 96 Viral RNA/DNA Kit 说明书。消化 DNA, 并使用含有乙型肝炎病毒特异性序列的 3'RACE 引物将 RNA 逆转录为 cDNA, 实验步骤参照 FastQuant RT Kit (with gDNase) 的说明书。最后, qPCR 定量检测 cDNA 的含量, 即检测小鼠血浆中 HBV pgRNA 的含量。

每组小鼠样品的平均值±标准误表示, 除特别说明外, n=5。用 Student's *t*-test 进行统计分析。

实验结果:

a) 血清中 HBsAg 含量评价受试化合物在 AAV/HBV 小鼠模型中抗 HBV 活性。结果见表 4、表 4-1、图 1 和图 6。小鼠血浆 HBsAg 含量由 ELISA 法测定。误差线显示标准误。第 0 天: 第一次给所有小鼠施用媒介物或化合物。第 29 天: 对实验组 WRG01 小鼠和该次空白对照组小鼠第二次接种媒介物或化合物。

表 4 小鼠给药后不同日期的 Log₁₀ [HBsAg (IU/mL)]

检测天数 (天)	空白 (SC)	WRG01 (SC)
0	4.70	4.72
7	4.82	2.90
14	4.43	2.90
21	4.94	3.28
28	4.84	3.77
35	4.78	2.83

表 4-1 小鼠给药后不同日期的 Log_{10} [HBsAg (IU/mL)]

检测天数 (天)	空白 (SC)	WR007 (SC)	WR012 (SC)
0	4.58	4.19	4.47
7	4.15	1.92	2.00
14	4.57	2.29	2.20
21	4.41	2.63	2.36
28	4.76	2.94	3.10
35	4.62	3.31	3.19

b) 清中 HBeAg 含量评价受试化合物在 AAV/HBV 小鼠模型中抗 HBV 活性。结果见表 5、表 5-1、图 2 和图 7。小鼠血浆 HBeAg 含量由 ELISA 法测定。误差线显示标准误差。第 0 天：第一次给所有小鼠施用媒介物或化合物。

表 5 小鼠给药后不同日期的 Log_{10} [HBeAg (PEIU/mL)]

检测天数 (天)	空白 (SC)	WRG01 (SC)
0	3.56	3.51
7	3.37	2.89
14	3.56	3.06
21	3.66	3.22

表 5-1 小鼠给药后不同日期的 Log_{10} [HBeAg (PEIU/mL)]

检测天数 (天)	空白 (SC)	WR007 (SC)	WR012 (SC)
0	3.44	3.35	3.40
7	3.24	2.49	2.53

14	3.57	2.80	2.89
21	3.32	2.81	2.82
28	3.38	2.95	2.91
35	3.37	3.09	3.02

c) 血清中 DNA 含量评价受试化合物在 AAV/HBV 小鼠模型中抗 HBV 活性。结果见表 6、表 6-1、图 3 和图 8。小鼠血浆 HBV DNA 含量由定量 PCR 法测定。误差线显示标准误差。第 0 天：第一次给所有小鼠施用媒介物或化合物。第 29 天：对所有小鼠第二次接种媒介物或化合物。

表 6 小鼠给药后不同日期的 Log₁₀ [DNA (拷贝数/μL)]

检测天数 (天)	空白 (SC)	WRG01 (SC)
0	5.27	4.84
7	5.39	3.93
14	5.51	3.97
21	5.63	4.37

表 6-1 小鼠给药后不同日期的 Log₁₀ [DNA (拷贝数/μL)]

检测天数 (天)	空白 (SC)	WR007 (SC)	WR012 (SC)
0	5.53	/	/
7	4.98	/	/
14	5.34	3.44	3.95
21	5.45	3.71	4.21
28	5.63	4.08	4.66
35	5.26	4.42	4.78

/: 未得到数据。

d) 中 pgRNA 含量评价受试化合物在 AAV/HBV 小鼠模型中抗 HBV 活性。结果见表 7 和图 4。小鼠血浆 HBV pgRNA 含量由定量 PCR 法测定。误差线显示标准误差。第 0 天：第一次给所有小鼠施用媒介物或化合物。第 29 天：对所有小鼠第二次接种媒介物或化合物。

表 7 小鼠给药后不同日期的 Log₁₀ [pgRNA (拷贝数/μL)]

检测天数 (天)	空白 (SC)	WRG01 (SC)
0	4.92	4.56
7	4.96	3.28

14	4.93	3.26
21	5.02	3.50
28	5.06	4.13
35	5.17	3.37

e) 体重变化见图 5。以第 0 天的体重作为基准进行比较, 根据 IACUC 规定, 以 20% 体重下降作为人道终点, 任何小鼠体重下降超过 20%, 需从实验中移除。此实验中小鼠因体重下降而移除。

实验结论:

在本实验中, 受试化合物在 AAV/HBV 小鼠模型实验中, 能够显著降低 HBsAg、DNA 和 pgRNA。同时, 受试化合物对 HBeAg 也有一定抑制作用。受试化合物治疗过程中, 小鼠表现出良好的耐受性, 体重逐渐上升。

实施例5 HepG2.2.15细胞HBV体外测试

1.实验目的:

通过实时定量 qPCR 试验 (real time-qPCR) 检测 HepG2.2.15 细胞培养上清的 HBV DNA 含量, 及酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测 HBV 表面抗原和 e 抗原含量; qRT-PCR 检测细胞内 HBV RNA 含量, 以化合物的 EC50 值为指标, 来评价化合物对 HBV 的抑制作用, 同时应用 CCK8 法检测受试化合物对细胞活性影响。

2.实验材料:

2.4 胞系: HepG2.2.15 细胞

HepG2.2.15 细胞培养基 (DMEM/F12, Invitrogen-11330032; 10% 血清, Hyclone-SV30087.0; 100 units/ml 青霉素和 100 µg/ml 链霉素, Hyclone-SV30010; 1% 非必需氨基酸, Invitrogen-11140050; 2mM L-GLUTAMINE, Invitrogen-25030081; 300 µg/ml Geneticin, Invitrogen-10131027)。

2.5 试剂

Opti-MEM (Gibco-31985-070); Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen -13778-150); CCK8(李记-AC11L057); 高通量 DNA 纯化试剂盒 (QIAamp 96 DNA Blood Kit, Qiagen-51162); RNA 制备 RNEASY 试剂盒 (RNeasy 96 Kit (12), Qiagen-74182); 定量快速启动通用探针试剂 (FastStart Universal Probe Master, Roche-04914058001); FastKing cDNA 第一链合成试剂盒 (TianGen-KR106-02); 乙型肝炎表面抗原定量检测试剂盒 (安图生物, CL 0310); 乙型肝炎 e 抗原定量检测试剂盒 (安图生物, CL 0312)。

2.6 耗材与仪器:

Collagen I 96 Well White/Clear Flat Bottom TC-Treated Microplate (Corning BioCoat-356650);

CO₂ 培养箱 (HERA-CELL-240); 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems-7900 real time PCR system); 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems- QuantStudio 6 Flex); 酶标仪 (Molecular Device-SpectraMax M2e); 酶标仪 (BioTek - Synergy 2)。

3.实验步骤和方法:

3.1 第一天, 转染 siRNA 和细胞铺板同时进行, 方法简述如下: 取 HepG2.2.15 细胞, 先用 DPBS 洗涤后, 0.05%胰蛋白酶进行消化, 用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基终止消化, 离心后重悬, 将细胞轻轻吹打至单个细胞后计数。按比例配置所需转染试剂体积 (表 8), 室温孵育 15 分钟。

表 8 Lipofectamine® RNAiMAX 配置

试剂名称	比例 (配置一个孔为例)
Lipofectamine® RNAiMAX	1.5
Opti-MEM	23.5

梯度稀释 siRNA, 共 8 个浓度, 3 倍梯度稀释, 双复孔, 取 15 μ L RNAiMAX/Opti-MEM 的混合液, 与 15 μ L 不同浓度的 siRNA 混匀, 室温孵育 15 分钟。先取 10 μ L 上述混合溶液加入到 96 孔细胞培养板中, 再加入 90 μ L 细胞悬液, 细胞终密度为 15,000 细胞/孔, 最终体积为 100 μ L/孔, 细胞置于 5% CO₂、37 °C 孵箱中培养。

3.2 第四天, 更换含有化合物的新鲜培养液, 转染方式同第一天。

3.3 第七天收取培养孔中的培养液, 取部分样品 ELISA 测定乙肝病毒 S 抗原和 e 抗原的含量; 取部分样品使用高通量 DNA 纯化试剂盒 (Qiagen-51162) 提取 DNA; 待收集上清后, 参照 CCK-8 试剂盒说明书测定细胞活力, 用酶标仪 (SpectraMax M2e) 检测各孔的吸光值 (450 nm/650 nm); 使用 RNeasy 96 kit 提取试剂盒 (Qiagen-74182), 参照试剂盒说明书提取细胞培养内 HBV RNA。

3.4 PCR 反应液的配制如表 9 所示:

表 9 PCR 反应液的配制

项目	配置 1 个孔所需体 积 (微升)	配置 100 个孔所需 体积 (微升)
定量快速启动通用探针试剂	5	500
前引物 (10 微摩尔)	0.4	40
后引物 (10 微摩尔)	0.4	40

探针 (10 微摩尔)	0.2	20
AE	2	200

在 96 孔 PCR 板中每孔加入 8 μ l 的反应混合液, 然后每孔加入 2 μ L 的样品 DNA 或 HBV DNA 的标准品。

PCR 的反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 15 秒, 60 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟, 共 40 个循环。

3.5 ELISA 测定乙肝病毒 S 抗原和 e 抗原的含量, 具体步骤参照该产品说明书, 步骤简述如下: 取 50 μ L 样品和标准品分别加入到反应板中, 再每孔分别加入 50 μ L 酶结合物, 震荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 温浴 60 分钟, 然后用洗液洗板 5 次, 再每孔加入 50 μ L 发光底物, 混匀, 室温避光反应 10 分钟, 最后用酶标仪检测化学发光强度。

3.6 使用 RNeasy 96 kit 提取试剂盒 (Qiagen, 74182), 参照试剂盒说明书提取细胞培养内 HBV RNA。加 150 μ L RLT 裂解细胞, 最终用 50 μ L 无 RNase 水洗脱 RNA。参照反转录试剂盒 (天根, KR106) 说明书, 加入随机引物反转录成 cDNA, 然后 HBV 特异性引物检测样品中的 total RNA, 同时, GAPDH 引物和探针特异性检测 GAPDH cDNA, qPCR 法定量样品中的 HBV cDNA。

qPCR 反应: 95 $^{\circ}$ C, 10 分钟; 95 $^{\circ}$ C, 15 秒, 60 $^{\circ}$ C, 1 分钟, 40 个循环。依据各样品的 Ct 值计算样品中的 HBV RNA 含量。

每个样品目的基因 HBV mRNA 的表达水平通过 $\Delta\Delta Ct$ 相对定量法进行计算。目的基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, 计算公式如下:

$$\Delta Ct = \text{目的基因平均 Ct 值} - \text{内参基因平均 Ct 值};$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{加药组}) - \Delta Ct(\text{RNAiMAX 对照组});$$

$$\text{HBV mRNA 相对表达量} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.7 数据分析:

计算抑制百分比:

$$\% \text{ Inh.} = (1 - \text{样品中的值} / \text{PBS 对照值}) \times 100.$$

细胞活率% = (样品检测值 - 培养液本底平均检测值) / (对照组平均检测值 - 培养液本底平均检测值) $\times 100$

计算 EC₅₀ 和 CC₅₀: 使用 GraphPad Prism 软件计算化合物对 HBV 的 50% 抑制浓度 (EC₅₀) 值和 50% 细胞死亡时的药物浓度 (CC₅₀) 值。

表 10 测试的序列在细胞中降低 HBsAg、HBeAg、DNA 和 RNA 水平实验结果

测试的序列				实验结果				
SEQ	正义链序列	SEQ	反义链序列	HBsAg EC ₅₀	HBeAg	DNA	RNA	细胞活

ID NO	(5'-3')	ID NO	(5'-3')	(nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	力 CC ₅₀ (nM)
16	g•r•guGcACUu cgcuucacaD	23	u•G•ugaArCGa aguGcAcac•u•u	0.179	0.755	0.14	0.87	>50
28	g•u•guGcACU ucgcuucacaD	17	u•G•ugargCGa aguGcAcac•u•u	0.105	0.37	0.16	0.567	>50
28	g•u•guGcACU ucgcuucacaD	23	u•G•ugaArCGa aguGcAcac•u•u	0.079	0.587	0.135	3.197	>50
28	g•u•guGcACU ucgcuucacaD	34	u•G•uga(Agn)g CGarguGcAcac •u•u	0.263	1.268	0.553	0.963	>50
42	g•r•guGcACUu cgcuucacaD	23	u•G•ugaArCGa aguGcAcac•u•u	0.07	0.389	0.019	0.65	>50
43	g•r•guGcACUu crguucacaD	23	u•G•ugaArCGa aguGcAcac•u•u	0.231	/	/	/	>50
16	g•r•guGcACUu cgcuucacaD	44	u•G•uraArCGa aguGcAcac•u•u	0.072	2.202	0.06	/	>50
16	g•r•guGcACUu cgcuucacaD	45	u•G•uga(Agn)r CGaaguGcAca c•u•u	0.054	3.707	0.15	/	>50
16	g•r•guGcACUu cgcuucacaD	46	u•G•uga(Agn)g CGaaruGcAcac •u•u	0.497	/	/	/	>50
16	g•r•guGcACUu cgcuucacaD	47	VPu•G•ugaArC GaaguGcAcac• u•u	0.082	0.205	0.037	0.68	>50
16	g•r•guGcACUu cgcuucacaD	48	VPu•G•uga(Ag n)rCGaaguGcA cac•u•u	0.104	3.83	0.105	/	>50

/: 尚未得到数据。

*测试的样品是双链 siRNA 类似物的缀合物。

实施例 6: AAV-HBV 小鼠模型中抗乙病毒活性药效剂量探索

通过运用 AAV/HBV 小鼠模型，检测接受不同剂量受试化合物治疗后的小鼠血清中 HBsAg，以评价其体内抗 HBV 效果。

实验材料：

C57BL/6 小鼠、PBS (RNase free) 为溶媒、受试化合物、重组病毒 rAAV8-1.3HBV。本项目主要试剂包括 FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche, 04914058001)、乙型肝炎病毒表面抗原检测试剂盒 (安图生物, CL0310)。主要仪器包括：离心机 (Beckman Allegra X-15R)、多功能酶标仪 (BioTek, Synergy 2)、酶标仪 (Molecular Devices, SpectraMax 340PC384)。

实验方法：

a) 所有小鼠在病毒注射后第 34 天开始皮下注射给药，将该天设为第 0 天。给药前所有小鼠颌下采血收集血浆。第 0 天给药一次。具体给药方案见表 14。

b) 所有小鼠给药后第 0, 14, 21, 28 天和 35 天经颌下静脉采血收集血浆，收集的样用 K₂-EDTA 抗凝，在 4 °C, 7000 g / 分钟条件下离心 10 分钟后收集血浆。具体采血时间见表 11。

c) 第 42 天，所有小鼠经颌下静脉采血收集血浆，之后小鼠经 CO₂ 吸入安乐死，经心脏采血收集血浆样品，并收集肝脏样品。

d) 所有血浆样品送至检测。

表 11 体内实验方案

小鼠 只数	给药设计				非终点采血 方案	实验终点
	测试 化合物	给药量 (mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药方案		
5	溶媒	/	5	病毒注射第 34 天设为第 0 天，第 0 天经皮下注射给药一次。	病毒注射后第 34 天设为第 0 天，采血时间为第 0、7、14、21、28、35 天。	
5	WRG01*	0.3				给药后第 42 天，小鼠经颌下静脉丛采血收集血浆，之后小鼠经 CO ₂ 吸入安乐死，心脏采血收集血浆样品，并收集肝脏样品。
5		1				
5		3				
5		10				

*: WRG01 为缀合物，其正义链为 SEQ ID NO: 16，反义链为 SEQ ID NO: 23，缀合物基团为 D。

/: 尚未到终点。

样品分析:

ELISA 检测小鼠血清中 HBsAg 的含量: 实验步骤参照 HBsAg ELISA (安图生物, CL 0310) 试剂盒说明书。

每组小鼠样品的平均值±标准误表示, 除特别说明外, n=5。用 Student's *t*-test 进行统计分析。

实验结果:

检测血清中 HBsAg 含量评价受试化合物在 AAV/HBV 小鼠模型中抗 HBV 活性。结果见表 12 和图 9。小鼠血浆 HBsAg 含量由 ELISA 法测定。误差线显示标准误。第 0 天: 第一次给所有小鼠施用媒介物或化合物。

表 12 小鼠给药后不同日期的 Log₁₀ [HBsAg (IU/mL)]

检测天数 (天)	空白 (SC)	WRG01, 0.3 mpk (SC)	WRG01, 1 mpk (SC)	WRG01, 3 mpk (SC)	WRG01, 10 mpk (SC)
0	4.58	4.49	4.53	4.31	4.56
7	4.15	3.67	2.93	2.19	1.98
14	4.57	4.18	3.60	2.26	2.12
21	4.41	4.46	3.80	2.48	2.17
28	4.76	4.76	4.25	3.22	2.99
35	4.62	4.65	4.31	3.40	3.12

实验结论:

在本实验中, 受试化合物 WRG01 在 AAV/HBV 小鼠模型实验中, 对于降低 HBsAg 展现出良好的剂量依赖性, 即随着用药剂量上升降低 HBsAg 活性增加, 并展现出长期抑制 HBsAg 效力。

实施例 7: 小鼠血浆、肝脏、肾脏药物浓度测试

本研究对 C57BL/6 小鼠单次皮下注射给药, 在给药后的不同时间点收集血浆和组织样品, 通过 SL-qPCR 检测血浆和组织中 siRNA 水平评价化合物在小鼠体内的代谢水平。

表 13 体内实验方案

小鼠 只数	给药设计				非终点外周 血采集方案	实验终点
	测试化合物	给药量 (mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药方案		
3	WRG01*	3	5	第 0 天经	采血时间为	给药后 0.5 小时, 小鼠经颌

				皮下注射 给药一 次。	给药后 0.083 小时。	下静脉丛采血收集血浆，之 后小鼠经 CO ₂ 吸入安乐死， 收集肝脏、肾脏样品。
3		3			采血时间为 给药后 0.25 小时。	给药后 1 小时，小鼠经颌下 静脉丛采血收集血浆，之后 小鼠经 CO ₂ 吸入安乐死，收 集肝脏、肾脏样品。
3		3			/	给药后 2 小时，小鼠经颌下 静脉丛采血收集血浆，之后 小鼠经 CO ₂ 吸入安乐死，收 集肝脏、肾脏样品。
3		3			/	给药后 4 小时，小鼠经颌下 静脉丛采血收集血浆，之后 小鼠经 CO ₂ 吸入安乐死，收 集肝脏、肾脏样品。
3		3			/	给药后 8 小时，小鼠经颌下 静脉丛采血收集血浆，之后 小鼠经 CO ₂ 吸入安乐死，收 集肝脏、肾脏样品。
3		3			/	给药后 32 小时，小鼠经颌 下静脉丛采血收集血浆，之 后小鼠经 CO ₂ 吸入安乐死， 收集肝脏、肾脏样品。
3		3			采血时间为 给药后 48 小 时和 96 小 时。	给药后 168 小时，小鼠经颌 下静脉丛采血收集血浆，之 后小鼠经 CO ₂ 吸入安乐死， 收集肝脏、肾脏样品。

*: WRG01 为缀合物，其正义链为 SEQ ID NO: 16，反义链为 SEQ ID NO: 23，缀合物基团为 D。

/: 没有在“非终点”的时间采血，只在终点采血。

实验结果:

使用 SL-qPCR 法 (参考文献: Nair et al. Nucleic Acids Research (2017), 45, 10969-10977)

检测小鼠给药后不同时间节点血浆、肝脏、肾脏中 siRNA 水平，结果见图 10。

实验结论：

在本实验中，受试化合物 WRG01 在 C57BL/6 小鼠模型实验中具有良好的组织分布与代谢稳定性。WR-G01 肝暴露量大、半衰期长，肝血比超过 500 倍，证明 WRG01 代谢稳定，具有高度肝靶向性。

实施例 8：FRG-KO 人源化肝脏小鼠血生化测试

人源化 FRG 小鼠是最常用的人源化肝脏模型之一，通常人源化比例高达 70%。因为在小鼠肝脏中定植的是人类肝脏细胞，可以更好模拟人体 HBV 自然感染和 cccDNA 复制过程，同时对于人体药代动力学与肝脏毒性有着良好的预测作用。

本研究对人源化 FRG 小鼠多次给药，在给药后的不同时间点收集血浆样品，通过检测血浆中 ALT、AST 和胆红素水平评价化合物对小鼠的肝脏毒副作用影响。在本实验中，受试化合物对人源化肝脏未产生明显的炎症反应，预示人体中安全性良好。

表 14 体内实验方案

小鼠只数	给药设计				非终点外周血采集方案	实验终点
	测试化合物	给药量 (mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药方案		
3	溶媒	/	5	第 0、21、28、35、42 天经皮下注射给药各一次。	采血时间为给药前 1 天，给药后第 7、14、21、28、35、42 天。	/
3	WRG01*	15				
3		50				

*：WRG01 为缀合物，其正义链为 SEQ ID NO：16，反义链为 SEQ ID NO：23，缀合物基团为 D。

/：尚未到终点。

本公开展现出不可预料的优秀的 HBsAg 和 HBeAg 抑制剂活性，同时可以有效抑制 HBV DNA 和 pgRNA 表达，其说明了可使乙肝病毒的活跃度受到抑制，同时具有良好的组织分布与代谢稳定性，具有高度肝靶向性，预计对小鼠肝功能影响小，将为临床中乙型肝炎例如慢性乙型肝炎提供了一种高效的治疗手段。