

说明书

发明名称: 用于抑制乙型肝炎病毒的siRNA及其用途

- [0001] 相关申请的交叉引用
- [0002] 本申请要求于2023年9月28日递交的中国专利申请2023112745419号的优先权，其全部内容通过引用并入全文。

技术领域

- [0003] 本公开属于生物医药领域，涉及一种抑制乙肝病毒的小干扰RNA(siRNA)及其用途，具体包含双链修饰的siRNA，以及其缀合物、盐；所述用途为制备治疗乙型肝炎病毒性肝炎或慢性感染药物中的用途。

背景技术

- [0004] 乙型肝炎(Hepatitis B)是一种由乙肝病毒(HBV)感染引起的病毒性疾病，主要传播途径包括血液传播、性传播和母婴传播。世界卫生组织(World Health Organization)估计，全球约2.5亿人有慢性HBV感染，慢性HBV感染患者感染数年后，约有15-40%有严重的不良转归，比如肝硬化、肝衰竭和肝细胞肝癌等，目前每年有接近100万患者死于HBV相关的并发症(Nicolini LA,et al.Int.J.Environ.Res.Public Health 2019,16,3307)。慢性乙肝感染的基础是感染的肝细胞中持续存在乙肝病毒的共价环状闭合DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)作为储备和模板进行病毒复制，同时作为病毒复制的副产物，HBV DNA也能够随机整合到宿主基因组，虽然整合HBV序列不能维持病毒复制，但可以持续产生病毒蛋白，比如乙肝表面抗原(HBsAg)和转录调控HBV x蛋白(Suarez AAR,et al.Liver International.2021; 41, Suppl.1:15-23)。目前乙肝治疗药物相对有限，主要包括核苷类似物(NUCs)恩替卡韦、替诺福韦等，以及聚乙二醇修饰的干扰素α(Peg-IFN-α)，但是这些治疗通常很难清除病毒，并且HBsAg消失依然很少见。因此，上述治疗方式需要长期服药以维持病毒抑制和防止停药后病毒复发。
- [0005] 终生治疗或者干预的花费是患者沉重的经济负担，因此亟需开发新的治疗策略，以达到慢性乙肝感染(Chronic Hepatitis B, CHB)的“功能性治愈”，即停药后HBsAg的持续消失、HBV DNA低于检测下限、肝酶正常和肝组织病理学的改

善。其中，HBsAg消失是HBV复制被深度抑制的指征，也是安全停止治疗的唯一指征。因此，CHB是一个未被满足的临床需求，需要持续不断的努力来开发新分子、联合治疗和完全创新的治疗策略以达成HBV的清除目标。

[0006] 1998年，美国两位科学家Andrew Fire和Craig Mello发现一种新的生物学机制，即小RNA分子可以介导特定的mRNA的降解(Fire,Andrew,et al.nature 391.6669(1998):806-811.)，当RNA分子以双链形式出现在细胞中时，这种机制就会被诱发激活，即出现RNA干扰现象，这一发现预示着一个新研究领域的开始，这两位科学家也因此获得了2006年的诺贝尔生理学 and 医学奖。当双链RNA与蛋白质复合物Dicer结合后，Dicer将dsRNA切割成片段，而后另一种蛋白质复合物RISC结合这些片段，siRNA双链中的一条链被去除，但另一条链仍与RISC(RNA-induced silencing complex，RNA诱导沉默复合体)复合物结合，RISC通过单链RNA的引导识别并降解靶基因的mRNA，使特定蛋白的表达受到抑制，进而特异性导致基因沉默。

[0007] RNA干扰为基因技术的应用开辟了一个新领域。双链RNA分子已被人工设计用于沉默人类、动物或植物中的特定基因。这种人工设计合成的用于基因沉默的双链RNA分子(siRNA)被导入细胞并激活RNA干扰机制以降解对应的mRNA，目前，这种方法是生物学和生物医学的重要研究工具。此外，目前人们已开发了众多的siRNA药物，用以治疗病毒感染、心血管疾病、癌症、内分泌失调和其他多种疾病，多数处于研发阶段或已获批上市的siRNA疗法，显示出很好的治疗效果。从2018年第一款siRNA药物上市至今，已有至少4款siRNA在欧盟或美国获批上市。因此，利用RNA干扰技术抑制特定靶基因表达已经成为一种有效的疾病治疗途径。

[0008] 目前已有临床阶段的HBV siRNA药物，显示出了一定的抑制HBsAg、HBV DNA及HBeAg的效果，但其毒性和安全性的问题仍然不容忽视，因此，亟待开发出效果优异且同时安全性较高的HBV siRNA药物。

[0009] 发明内容

[0010] 为了解决现有技术中存在的问题，本公开的目的在于提供一种用于抑制乙型肝炎病毒的siRNA及其用途。所述siRNA在体内和体外对cccDNA和宿主基因组整

合的HBV DNA产生的HBsAg、HBV DNA和HBeAg均有显著的抑制效果，且药效持久，其中，优化序列相对于原始序列来说，不仅提升了抑制效果和药效周期，同时还降低了脱靶毒性。

- [0011] 在一方面，本公开提供了一种用于抑制HBV的寡核苷酸或其药学上可接受的盐，所述寡核苷酸包含正义链和反义链，其中，所述正义链的核苷酸序列包含具有SEQ ID NO.1所示的序列或片段；所述反义链的核苷酸序列包含具有SEQ ID NO.3所示的序列或片段。
- [0012] 在另一方面，本公开提供了一种组合物，所述组合物包含前述寡核苷酸或其药学上可接受的盐，以及任选地药学上可接受的载体。
- [0013] 在另一方面，本公开提供了前述寡核苷酸或其药学上可接受的盐和/或组合物在制备用于降低受试者血清中HBsAg、HBeAg和HBV DNA中至少一个的药物中的用途。
- [0014] 在另一方面，本公开提供了所述寡核苷酸或其药学上可接受的盐和/或组合物在制备用于治疗HBV感染或乙型病毒性肝炎，以及乙型肝炎病毒合并丁型肝炎病毒感染的药物中的用途。
- [0015] 在另一方面，本公开提供了一种降低血清中HBsAg、HBeAg和HBV DNA中至少一个的方法，其包含向受试者施用治疗有效量的前述寡核苷酸或其药学上可接受的盐。
- [0016] 在另一方面，本公开提供了一种治疗HBV感染或乙型病毒性肝炎的方法，其包含向受试者施用治疗有效量的前述寡核苷酸或其药学上可接受的盐。

附图说明

- [0017] 图1示出了siRNA合成过程。
- [0018] 图2示出了不同浓度化合物单次皮下给药对HBV转基因鼠血清HBsAg、HBeAg和HBV DNA的抑制作用。
- [0019] 图3示出了AL0107045、AL0107048、AL0107049、AL0107050、AL0107051、AL0107052、AL0107053、AL0107054组化合物单次皮下给药后对HBV转基因鼠血清HBV DNA、HBeAg、HBsAg的抑制效果。

[0020] 图4示出了L0107045、AL0107057、AL0107058组化合物单次皮下给药后对HBV转基因鼠血清HBV DNA、HBeAg、HBsAg的抑制效果。

[0021] 图5示出了不同化合物对雄性和雌性SD大鼠的体重变化影响曲线。

[0022] 图6示出了不同化合物对雄性和雌性SD大鼠的谷草转氨酶表达量影响。

具体实施方式

[0023] 在本公开中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本公开，下面提供相关术语的定义和解释。

[0024] 如本文所用，“约”或“近似”是指与所述参考值类似的值。在某些实施方案中，除非另有说明或另外从上下文显而易见，否则术语“近似”或“约”是指落入所述参考值在任一方向(大于或小于)的20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少内的值的范围(除非这种数字将超过可能值的100%)。

[0025] 如本文所用，“乙型肝炎病毒”或“HBV”指肝病毒科的病毒。HBV为小(如3.2kb)嗜肝DNA病毒，其编码4个开放阅读框和7种蛋白。HBV编码的7种蛋白包括小(S)、中(M)和大(L)表面抗原(HBsAg)或包膜(Env)蛋白、pre-Core蛋白、核心蛋白、病毒聚合酶(Pol)和HBx蛋白。HBV表达三种表面抗原或包膜蛋白L、M和S，其中S为最小的而L为最大的。M和L蛋白中的额外(extra)结构域分别命名为Pre-S2和Pre-S1。核心蛋白是病毒核壳体的亚基。Pol是合成病毒DNA(逆转录酶、RNaseH和引物)所需的，这发生在定位于感染的肝细胞的胞质的核壳体。PreCore是具有N末端信号肽的核心蛋白，并且从感染细胞分泌之前在其N和C末端经蛋白水解加工，即所谓的乙型肝炎e-抗原(HBeAg)。HBx蛋白是共价闭环DNA(cccDNA)的有效转录所需的。HBx并非病毒结构蛋白。除了共享mRNA的核心和聚合酶，HBV的所有病毒蛋白都具有其自身的mRNA。除了蛋白pre-Core之外，HBV病毒蛋白没有经受翻译后蛋白水解加工。

- [0026] 如本文所用，术语“HBV抗原”、“HBV的抗原性多肽”、“HBV抗原性多肽”、“HBV抗原性蛋白”、“HBV免疫原性多肽”和“HBV免疫原”全部都指这样的多肽，其能够在受试者中诱导针对HBV的免疫应答，例如体液和/或细胞介导的应答。HBV抗原可以是HBV的多肽、其片段或表位，或者多种HBV多肽的组合、其部分或衍生物。HBV抗原能够在宿主中引发保护性免疫应答，例如诱导针对病毒疾病或感染的免疫应答，和/或在受试者中产生针对病毒疾病或感染的免疫力(即，接种疫苗)，其保护受试者免于病毒疾病或感染。例如，HBV抗原可以包含来自任何HBV蛋白的多肽或其免疫原性片段，例如源自任何HBV基因型(如基因型A、B、C、D、E、F、G和/或H，或其组合)的HBeAg、pre-core蛋白、HBsAg(S、M或L蛋白)、核心蛋白、病毒聚合酶或HBx蛋白。
- [0027] 如本文所用，术语“HBV核心抗原”、“HBcAg”和“核心抗原”的每一个指HBV抗原，其能够在受试者中诱导针对HBV核心蛋白的免疫应答，例如体液和/或细胞介导的应答。术语“核心”、“核心多肽”和“核心蛋白”的每一个指HBV病毒核心蛋白。全长核心抗原的长度通常为183个氨基酸，并且包括组装结构域(第1-149位氨基酸)和核酸结合结构域(第150-183位氨基酸)。34-残基核酸结合结构域对于前基因组RNA衣壳化是必需的。这个结构域还充当核输入信号。其包含17个精氨酸残基，并且是高度碱性的，与其功能一致。HBV核心蛋白在溶液中是二聚的，二聚体自组装为二十面体衣壳。核心蛋白的每个二聚体具有4个 α 螺旋束，在两端的侧面是 α 螺旋结构域。缺少核酸结合结构域的截短的HBV核心蛋白也能形成衣壳。
- [0028] 如本文所用，术语“乙型肝炎病毒相关疾病”或“HBV相关疾病”是由HBV感染或复制引起或与其相关的疾病或病症。术语“HBV相关疾病”包括受益于HBV基因表达或复制减少的疾病、病症或病状。HBV相关疾病的非限制性实例包括例如急性乙型肝炎；急性暴发型乙型肝炎；慢性乙型肝炎；肝纤维化；末期肝病；和肝细胞癌。
- [0029] 如本文所用，术语“互补”是指核苷酸(例如，在相对的核酸上或在单一核酸链的相对区域上的两个核苷酸上)之间允许核苷酸彼此形成碱基对的结构关系。例如，一个核酸的与相对核酸的嘧啶核苷酸互补的嘌呤核苷酸可以通过彼此形

成氢键而碱基配对在一起。在一些实施方案中，互补的核苷酸可以以沃森-克里克(Watson-Crick)方式或以允许形成稳定双链体的任何其他方式碱基配对。在一些实施方案中，两个核酸可以具有与彼此互补以便形成互补区域的核苷酸序列，如本文所述。

- [0030] 如本文所用，术语“(siRNA)脱靶效应”即off-target effects(OTEs)，是指siRNA作用过程中存在非特异性，可能会对靶基因之外的其它基因发挥作用，导致非靶基因沉默，产生siRNA脱靶效应。siRNA自身特性及递送方式都可能导致其特异性降低而产生OTEs，与siRNA相关的OTEs分成三大类型：microRNA样脱靶效应、免疫刺激、RNAi元件饱和。
- [0031] 如本文所用，术语“链”是指通过核苷酸间键(例如，磷酸二酯键、硫代磷酸酯键)连接在一起的核苷酸的单一连续序列。在一些实施方案中，链具有两个游离末端，例如5'-末端和3'-末端。
- [0032] 如本文所用，术语“脱氧核糖核苷酸”是指与核糖核苷酸相比在其戊糖的2'位置处具有氢的核苷酸。修饰的脱氧核糖核苷酸是除了在2'位置以外具有一个或多个原子的修饰或取代(包括糖、磷酸酯基团或碱基中的修饰或取代或糖、磷酸酯基团或碱基的修饰或取代)的脱氧核糖核苷酸。
- [0033] 如本文所用，术语“双链寡核苷酸”是指基本上呈双链体形式的寡核苷酸。在一些实施方案中，在共价分离的核酸链的核苷酸的反向平行序列之间形成双链寡核苷酸的一个或多个双链体区域的互补碱基配对。在一些实施方案中，在共价连接的核酸链的核苷酸的反向平行序列之间形成双链寡核苷酸的一个或多个双链体区域的互补碱基配对。在一些实施方案中，从单一核酸链形成双链寡核苷酸的一个或多个双链体区域的互补碱基配对，所述单一核酸链被折叠(例如，经由发夹)，以提供在一起碱基配对的核苷酸的互补的反向平行序列。在一些实施方案中，双链寡核苷酸包含彼此完全双链体化的两条共价分离的核酸链。然而，在一些实施方案中，双链寡核苷酸包含部分双链体化、例如在一个或两个末端具有突出端的两条共价分离的核酸链。在一些实施方案中，双链寡核苷酸包含核苷酸的反向平行序列，其部分互补，且因此，可以具有一个或多个错配，所述错配可以包括内部错配或末端错配。

- [0034] 如本文所用，术语“寡核苷酸”是指短核酸，例如长度小于100个核苷酸的短核酸。寡核苷酸可以包含核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸和/或修饰的核苷酸，包括例如修饰的核糖核苷酸。寡核苷酸可以是单链或双链的。寡核苷酸可以具有或不具有双链体区域。作为一组非限制性实例，寡核苷酸可以是，但不限于，小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、切丁酶底物干扰RNA(dsiRNA)、反义寡核苷酸、短siRNA或单链siRNA。在一些实施方案中，双链寡核苷酸是RNAi寡核苷酸。
- [0035] 如本文所用，术语“核苷酸类似物”是指非标准核苷酸，包括非天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。示例性核苷酸类似物可以在任何位置被修饰以改变核苷酸的某些化学性质，但仍保留核苷酸类似物执行其预期功能的能力。本文中的核苷酸类似物可以作为核苷酸单体替代主链上的核苷酸，具体地，所述核苷酸类似物包括但不限于：2'-甲氧基乙基修饰(moe)的核苷酸、2'-甲氧基(m)修饰的核苷酸、2'-脱氧-2'-氟(f)修饰的核苷酸、硫代磷酸酯(s)基修饰的核苷酸、腺苷-2'磷酸(A-2'-5')、尿苷-2'磷酸(U-2'-5')、鸟苷-2'磷酸(G-2'-5')、鸟苷-二醇核酸(Ggn)、腺苷-二醇核酸(Agn)、N-(2,3-二羟基丙基)-3,5-二(三氟甲基)苯甲酰胺(GNF-BX)修饰的核苷酸或5'-磷酸酯模拟物修饰的核苷酸。
- [0036] 如本文所用，术语“AGO2蛋白”是指Argonaute 2蛋白，即真核翻译起始因子2 C2(eukaryotic translation initiation factor 2C subunit 2, EIF2C2)，含有N末端(amino-terminal)、PAZ、MID和PIWI四个球状结构域，以及L1、L2两个连接域，属于Argonaute蛋白(AGO)家族成员。AGO2蛋白在生物体内广泛表达，是RNA诱导沉默复合体的核心成分，具有核糖核酸内切酶活性，可通过促进miRNA的成熟并调节其生物合成及功能，进而抑制靶基因的表达，在多种病理生理过程中起关键性作用。已知5'-末端磷酸基团可增强某些核酸抑制剂分子与AGO2蛋白之间的相互作用。
- [0037] 如本文所用，(Agn)指代腺苷-二醇核酸(GNA)，(Cgn)指代胞苷-二醇核酸(GNA)，(Ggn)指代鸟苷-二醇核酸(GNA)，(Tgn)指代胸苷-二醇核酸(GNA)。

[0038] 如本文所用,“核苷酸的修饰序列”、“反义链的修饰序列及其片段”、“正义链的修饰序列或其片段”或“修饰序列”是指对核苷酸序列进行化学修饰,以增强核酸向靶细胞的功能递送或降低核酸可能的毒副作用,例如增加其对核酸酶的稳定性和改善其靶标结合的亲和力。本文中经修饰的寡核苷酸可以包含反义链和正义链中的任一条或两条的一种或多种化学修饰的核糖核苷酸。修饰可以是核苷酸上的修饰、核苷酸与核苷酸之间的修饰或核苷酸类似物替代。核苷酸上的修饰可以是碱基、核糖和/或磷酸上的化学修饰。本文中所述化学修饰包括核苷酸上的修饰、核苷酸与核苷酸之间的修饰或核苷酸类似物替代。本文中所述修饰选自下述中的至少一种: 2'-甲氧基乙基(moe)修饰、2'-甲氧基(m)修饰、2'-脱氧-2'-氟(f)修饰、硫代磷酸酯基(s)、腺苷-2' 磷酸(A-2' -5')、尿苷-2' 磷酸(U-2' -5')、鸟苷-2' 磷酸(G-2' -5')、鸟苷-二醇核酸(Ggn)、腺苷-二醇核酸(Agn)、尿苷-二醇核酸(Ugn)、N-(2,3-二羟基丙基)-3,5-二(三氟甲基)苯甲酰胺(GNF-BX)、5' -乙烯基磷酸(Vp)修饰或5' 乙烯基磷酸酯-2' -N-乙酰基修饰。具体地,所述核糖修饰包括2' -甲氧基乙基修饰(moe)、2'-甲氧基(m)修饰、N-(2,3-二羟基丙基)-3,5-二(三氟甲基)苯甲酰胺(GNF-BX)修饰、5'-乙烯基磷酸(Vp)修饰、2'-脱氧-2'-氟(f)修饰和5' 乙烯基磷酸酯-2' -N-乙酰基修饰中任一种或多种。所述核苷酸与核苷酸之间的修饰包括磷酸酯基中的磷酸二酯键的修饰,例如硫代磷酸酯(s)修饰。所述硫代磷酸酯修饰为磷酸二酯键中的至少一个氧原子被硫原子取代形成。本文中,所述核苷类似物的替代,如腺苷-2' 磷酸(A-2' -5')可以替换相应位置上的腺苷类似物、尿苷-2' 磷酸(U-2' -5')可以替换相应位置的尿苷类似物、鸟苷-2' 磷酸(G-2' -5')可以替换相应位置的鸟苷类似物、鸟苷-二醇核酸(Ggn)可以替换相应位置的鸟苷类似物、腺苷-二醇核酸(Agn)可以替换相应位置的腺苷类似物、尿苷-二醇核酸(Ugn)可以替换相应位置的尿苷类似物,5' 乙烯基磷酸酯-2' -N-乙酰基-尿苷(APU001)替换相应位置的尿苷类似物,本发明中核苷类似物具体位置的相应替换可以参见本发明表1及表2所示。

[0039] 如本文所用,术语“抑制”表示与还没有经这样处理的细胞、细胞群或组织相比,当用本公开所述siRNA、siRNA缀合物和药物组合物处理该细胞、细胞群

或组织时，基因表达降低。术语“抑制”与“减少”、“沉默”、“下调”、“抑止”和其他类似术语可互换使用，并且包括任何水平的抑制。优选地，抑制包括统计学上显著的抑制或临床上显著的抑制。

- [0040] 如本文所用，术语“药物组合物”表示包含治疗有效量的活性药物成分和一起施用于有此需要的哺乳动物(例如人)的药用赋形剂的混合物或溶液。
- [0041] 如本文所用，“受试者”表示任何动物，优选哺乳动物，更优选人，其要进行或已经进行根据本申请的实施方案的方法的治疗。本文所用的术语“哺乳动物”涵盖任何哺乳动物。哺乳动物的实例包括但不限于牛、马、羊、猪、猫、狗、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、非人灵长类(NHP)如猴或猿、人等，更优选人。
- [0042] 术语“治疗有效量”是表示本发明的化合物或分子的量，当将其施用于受试者时，(i)治疗或预防特定疾病、病症或疾患，(ii)减弱、改善或消除特定疾病、病症或疾患的一种或多种症状，或(iii)预防或延迟本文所述的特定疾病、病症或疾患的一种或多种症状的发作。治疗有效量取决于化合物，所治疗的疾病状态，所治疗疾病的严重程度，受试者的年龄和相对健康状况，给药途径和形式，主治医学或兽医的判断和其他因素。
- [0043] 在一方面，本公开提供了一种用于抑制HBV的寡核苷酸或其药学上可接受的盐，所述寡核苷酸包含正义链和反义链，其中，所述正义链的核苷酸序列包含具有SEQ ID NO.1所示的序列或片段；所述反义链的核苷酸序列包含具有SEQ ID NO.3所示的序列或片段。
- [0044] 在一些实施方案中，所述反义链进一步被修饰，所述修饰选自：2'-甲氧基乙基修饰、2'-甲氧基(m)修饰、2'-脱氧-2'-氟(f)修饰、硫代磷酸酯(s)基修饰、腺苷-2'磷酸(A-2'-5')修饰、尿苷-2'磷酸(U-2'-5')修饰、鸟苷-2'磷酸(G-2'-5')修饰、鸟苷-二醇核酸(Ggn)修饰、腺苷-二醇核酸(Agn)修饰、N-(2,3-二羟基丙基)-3,5-二(三氟甲基)苯甲酰胺(GNF-BX)修饰或5'-磷酸酯模拟物修饰中的一种或多种。
- [0045] 在一些实施方案中，所述修饰选自2'-甲氧基乙基修饰、腺苷-2'磷酸(A-2'-5')修饰、尿苷-2'磷酸(U-2'-5')修饰、鸟苷-2'磷酸(G-2'-5')修饰、鸟苷-二醇核酸(Ggn)修饰、腺苷-二醇核酸(Agn)修饰、N-(2,3-二羟基丙基)

-3,5-二(三氟甲基)苯甲酰胺(GNF-BX)修饰或5'-磷酸酯模拟物修饰中的一种或多种。

[0046] 在一些实施方案中,所述反义链的5'端起第1至第8位的任意一核酸位置被相应修饰。

[0047] 在一些实施方案中,所述修饰后的反义链包含具有SEQ ID NO.4-35中任一核苷酸所示的序列或片段。

[0048] 在一些实施方案中,所述修饰是指核苷酸上的修饰、核苷酸与核苷酸之间的修饰或核苷酸类似物替代修饰。

[0049] 在一些实施方案中,所述修饰选自:2'-甲氧基乙基修饰、2'-甲氧基(m)修饰、2'-脱氧-2'-氟(f)修饰、硫代磷酸酯(s)基修饰、腺苷-2'磷酸(A-2'-5')修饰、尿苷-2'磷酸(U-2'-5')修饰、鸟苷-2'磷酸(G-2'-5')修饰、鸟苷-二醇核酸(Ggn)修饰、腺苷-二醇核酸(Agn)修饰、尿苷-二醇核酸(Ugn)修饰、N-(2,3-二羟基丙基)-3,5-二(三氟甲基)苯甲酰胺(GNF-BX)修饰或5'-磷酸酯模拟物修饰中的一种或多种。

[0050] 在一些实施方案中,所述核糖修饰包括2'-甲氧基乙基修饰(moe)、2'-甲氧基(m)修饰、N-(2,3-二羟基丙基)-3,5-二(三氟甲基)苯甲酰胺(GNF-BX)修饰、5'-乙烯基磷酸(Vp)修饰、2'-脱氧-2'-氟(f)修饰和5'-乙烯基磷酸酯-2'-N-乙酰基修饰中任一种或多种。

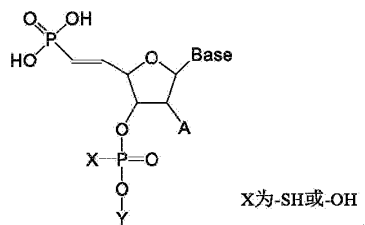
[0051] 在一些实施方案中,所述碱基修饰包括但不限于5'-乙烯基磷酸酯修饰或5'-乙烯基磷酸酯-2'-N-乙酰基修饰,当为这两种修饰时,其修饰在反义链的5'末端核酸上。

[0052] 在一些实施方案中,所述核苷酸与核苷酸之间的修饰包括磷酸酯基中的磷酸二酯键的修饰,例如硫代磷酸酯(s)修饰。所述硫代磷酸酯修饰为磷酸二酯键中的至少一个氧原子被硫原子取代形成。

[0053] 在一些实施方案中,所述5'-磷酸酯模拟物为5'-氧基甲基磷酸酯、5'-乙烯基磷酸(Vp)、5'-乙烯基磷酸酯-2'-N-乙酰或5'-丙二酰基磷酸酯;优选为5'-乙烯基磷酸(Vp)或5'-乙烯基磷酸酯-2'-N-乙酰。

[0054] 在一些实施方案中，所述5'-磷酸酯模拟物修饰在反义链的5'-末端，优选的5'-磷酸酯模拟物5'-乙烯基磷酸(Vp)。

[0055] 在一个示例性的实施方案中，所述寡核苷酸的反义链5'末端核苷酸的经Vp修饰后，是一种具有如下结构式的化合物：



[0056] 其中Base为嘧啶或嘌呤碱基，Y为寡核苷酸上的其它核苷，A选自卤素(如F)、O、H、OCH₃、OCF₃、OCH₂CH₃、2'-甲氧基乙基、2'-N-乙酰基等本领域常规选择的取代基中的任一种。

[0057] 在一些实施方案中，所述5'-磷酸酯模拟物修饰的核苷酸为5'-乙烯基磷酸酯-2'-甲氧基-尿苷。

[0058] 在一些实施方案中，所述5'-磷酸酯模拟物修饰的核苷酸为5'-乙烯基磷酸酯-2'-N-乙酰基-尿苷(APU001)。

[0059] 在一些实施方案中，所述正义链和反义链的所有核苷酸都是修饰的核苷酸。

[0060] 在一些实施方案中，所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷酸间键。

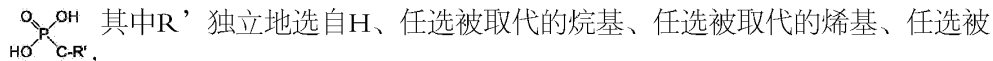
[0061] 在一些实施方案中，所述至少一个修饰的核苷酸间键是硫代磷酸酯键。

[0062] 在一些实施方案中，所述寡核苷酸的5'-末端磷酸基团可以增强寡核苷酸与Argonaut 2蛋白之间的相互作用。但具有5'-磷酸基团的寡核苷酸通常容易被磷酸酶或其他酶降解，限制其在体内的生物利用度。在一些实施方案中，寡核苷酸包括能有效对抗磷酸酶或其他酶降解作用的5'磷酸酯的类似物，以增加寡核苷酸的细胞摄取，或改善寡核苷酸的药代动力学特性。

[0063] 在一些实施方案中，所述反义链的5'-末端核苷酸的戊糖的4'-碳包含磷酸酯类似物修饰，所述磷酸酯类似物取代了与戊糖的4'-碳连接的-CH₂OH。

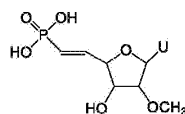
[0064] 在一些实施方案中，所述磷酸酯类似物是氧基甲基磷酸酯、乙烯基磷酸酯或丙二酰基磷酸酯。

[0065] 在本发明中，术语“磷酸酯模拟物”、“磷酸酯类似物”与“磷酸酯”可互换使用，均指磷酸酯中的至少一个“O”被“C”取代，一个示例性的结构如：



取代的炔基等。

[0066] 在一些实施方案中，所述磷酸酯类似物为乙烯基磷酸酯，其中乙烯基结合在寡核苷酸戊糖的4'-碳上，取代原戊糖上的-CH₂OH，示例性的结构可以是：



[0067] 其中U为尿嘧啶碱基。

[0068] 在一些实施方案中，所述磷酸酯类似物为氧甲基膦酸盐，其中，氧甲基的氧原子与寡核苷酸的糖的4'-碳结合。在一些实施方案中，氧基甲基膦酸酯由式-O-CH₂-PO(OH)₂或-O-CH₂-PO(OR)₂代表，其中R独立地选自H、CH₃、烷基基团、CH₂CH₂CN、CH₂OCOC(CH₃)₃、CH₂OCH₂CH₂Si(CH₃)₃或保护基团。在一些实施方案中，所述烷基基团是CH₂CH₃。通常，R独立地选自H、CH₃或CH₂CH₃。

[0069] 在一些实施方案中，所述修饰是指替代，比如对反义链SEQ ID NO: 3核苷酸序列的替代。在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“APU001”替代了反义链中5'末端的2'-甲氧基修饰的尿苷“Um”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“Ggn”替代了带有2'-甲氧基修饰的核苷酸“Gm”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“Ggn”替代了带有2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸“Gf”或Gfs；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“Ugn”替代了带有2'-甲氧基修饰的核苷酸“Um”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“Ugn”替代了带有2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸“Uf”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“Agn”替代了带有2'-甲氧基修饰的核苷酸“Am”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“Agn”替代了带有2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸“Af”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“U-2'-5'”替代了带有2'-

甲氧基修饰的核苷酸“Um”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“U-2'-5'”替代了带有2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸“Uf”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“A-2'-5'”替代了带有2'-甲氧基修饰的核苷酸“Am”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“A-2'-5'”替代了带有2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸“Af”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“G-2'-5'”替代了带有2'-甲氧基修饰的核苷酸“Gm”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“G-2'-5'”替代了带有2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸“Gf”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“GNF-BX”替代了带有2'-甲氧基修饰的核苷酸“Am”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“GNF-BX”替代了带有2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸“Af”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“GNF-BX”替代了带有2'-甲氧基修饰的核苷酸“Um”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“GNF-BX”替代了带有2'-甲氧基修饰的核苷酸“Gm”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“G(moe)”替代了带有3'-硫代磷酸酯基和2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸“Gfs”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“G(moe)”替代了带有2'-甲氧基修饰的核苷酸“Gm”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“G(moe)”替代了带有2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸“Gf”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“U(moe)”替代了带有2'-甲氧基修饰的核苷酸“Um”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“A(moe)”替代了带有2'-甲氧基修饰的核苷酸“Am”；在一些实施方案中，寡核苷酸的反义链中单核苷酸“A(moe)”替代了带有2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸“Af”。

[0070] 在一些实施方案中，替代发生的位置，优选在反义链5'末端起第1至第8位任意一核苷酸处，更优选的实施方案中，APU001是替代反义链5'末端核苷酸的尿苷类似物，而A-2'-5'、U-2'-5'、G-2'-5'、Ggn、Agn、Ugn、GNF-BX则是任选地替代反义链5'末端起第2至第8位相应核苷酸。

[0071] 本发明中，核苷酸具体的替代方式及替代的位置，可以参见表1和表2中的详细信息。

[0072] 在一些实施方案中，所述寡核苷酸是链长为19~21个碱基对的寡聚核苷酸，例如，其链长为19个、20个、21个碱基对。所述寡核苷酸包括相同或不同数量的碱基对的正义链和反义链。

[0073] 在一些实施方案中，所述正义链的链长为19个碱基。在一些实施方案中，所述反义链的链长为21个碱基。

[0074] 在一些实施方案中，所述寡核苷酸包含选自下述正义链和反义链的组合：

[0075] (1)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:3所示的反义链；

[0076] (2)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:4所示的反义链；

[0077] (3)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:5所示的反义链；

[0078] (4)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:6所示的反义链；

[0079] (5)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:7所示的反义链；

[0080] (6)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:8所示的反义链；

[0081] (7)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:9所示的反义链；

[0082] (8)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:10所示的反义链；

[0083] (9)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:11所示的反义链；

[0084] (10)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:12所示的反义链；

[0085] (11)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:13所示的反义链；

[0086] (12)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:14所示的反义链；

[0087] (13)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:15所示的反义链；

[0088] (14)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:16所示的反义链；

[0089] (15)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:17所示的反义链；

[0090] (16)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:18所示的反义链；

[0091] (17)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:19所示的反义链；

[0092] (18)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:20所示的反义链；

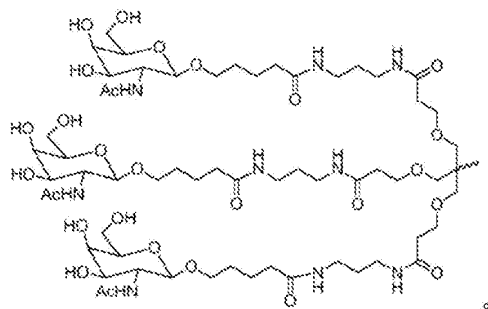
[0093] (19)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:21所示的反义链；

[0094] (20)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:22所示的反义链；

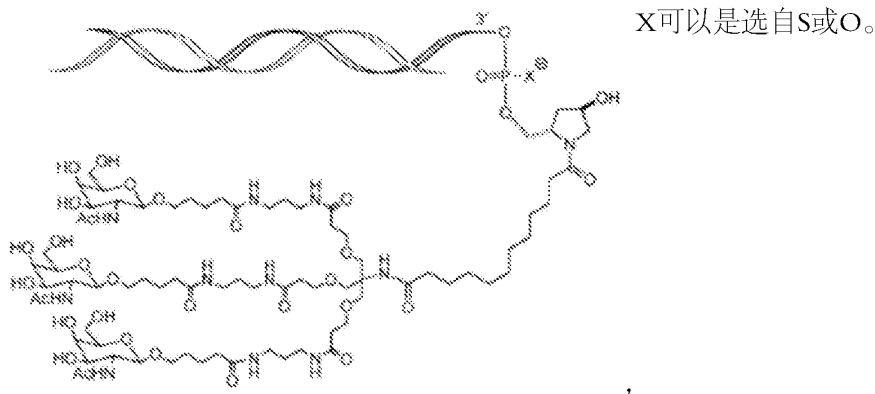
- [0095] (21)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:23所示的反义链;
- [0096] (22)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:24所示的反义链;
- [0097] (23)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:25所示的反义链;
- [0098] (24)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:26所示的反义链;
- [0099] (25)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:27所示的反义链;
- [0100] (26)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:28所示的反义链;
- [0101] (27)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:29所示的反义链;
- [0102] (28)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:30所示的反义链;
- [0103] (29)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:31所示的反义链;
- [0104] (30)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:32所示的反义链;
- [0105] (31)SEQ ID NO:2所示的正义链, 和SEQ ID NO:33所示的反义链;
- [0106] (32)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:34所示的反义链;
- [0107] (33)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:35所示的反义链。
- [0108] 在一些实施方案中, 所述寡核苷酸包含选自下述正义链和反义链的组合:
- [0109] (1)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:5所示的反义链;
- [0110] (2)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:6所示的反义链;
- [0111] (3)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:7所示的反义链;
- [0112] (4)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:8所示的反义链;
- [0113] (5)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:9所示的反义链;
- [0114] (6)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:10所示的反义链;
- [0115] (7)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:11所示的反义链;
- [0116] (8)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:12所示的反义链;
- [0117] (9)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:13所示的反义链;
- [0118] (10)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:14所示的反义链;
- [0119] (11)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:15所示的反义链;
- [0120] (12)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:16所示的反义链;
- [0121] (13)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:17所示的反义链;
- [0122] (14)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:18所示的反义链;

- [0123] (15)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:19所示的反义链;
- [0124] (16)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:20所示的反义链;
- [0125] (17)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:21所示的反义链;
- [0126] (18)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:22所示的反义链;
- [0127] (19)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:23所示的反义链;
- [0128] (20)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:24所示的反义链;
- [0129] (21)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:25所示的反义链;
- [0130] (22)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:26所示的反义链;
- [0131] (23)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:27所示的反义链;
- [0132] (24)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:28所示的反义链;
- [0133] (25)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:29所示的反义链;
- [0134] (26)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:30所示的反义链;
- [0135] (27)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:31所示的反义链;
- [0136] (28)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:32所示的反义链;
- [0137] (29)SEQ ID NO:2所示的正义链, 和SEQ ID NO:33所示的反义链;
- [0138] (30)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:34所示的反义链;
- [0139] (31)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:35所示的反义链。
- [0140] 在一些实施方案中, 所述寡核苷酸的至少一个核苷酸缀合至一个或多个靶向配体。
- [0141] 靶向配体可以是能够靶向一种特定受体的任何配体。实例是: 叶酸盐、GalNAc、半乳糖、甘露糖、甘露糖-6P、糖簇(如GalNAc簇、甘露糖簇、半乳糖簇)或一种适体。一个簇是两个或更多个糖单位的组合。这些靶向配体还包括整合素受体配体、趋化因子受体配体、转铁蛋白、生物素、血清素受体配体、PSMA、内皮素、GCPH、生长抑素、LDL以及HDL配体。这些配体还可以基于核酸, 例如一种适体。该适体可以是未被修饰的或具有在此披露的修饰的任何组合。
- [0142] 在一些实施方案中, 所述靶向配体与所述寡核苷酸的正义链在3' -末端缀合。
- [0143] 在一些实施方案中, 所述靶向配体包含碳水化合物、氨基糖、胆固醇、多肽或脂质。

- [0144] 在一些实施方案中，所述靶向配体包含氨基糖。
- [0145] 在一些实施方案中，所述靶向配体包含N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)部分，所述GalNAc与寡核苷酸的连接方式为：N-乙酰化的半乳糖胺以三价态的方式共价缀合到寡核苷酸的正义链的3'末端核苷酸的磷酸上，形成带GalNAc载体的寡核苷酸序列。
- [0146] 在一些实施方案中，所述GalNAc部分是单价GalNAc部分、二价GalNAc部分、三价GalNAc部分或四价GalNAc部分。
- [0147] 在一些实施方案中，所述靶向配体具有以下结构：



- [0148] 在一些实施方案中，所述靶向配体通过连接子与所述寡核苷酸的正义链在3'末端缀合，形成如下缀合物：
- [0149]



- [0150] 在一些实施方案中，所述寡核苷酸包含选自下述正义链和反义链的组合：
- [0151] (1)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:3所示的反义链；
- [0152] (2)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:4所示的反义链；
- [0153] (3)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:27所示的反义链；

- [0154] (4)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:28所示的反义链;
- [0155] (5)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:29所示的反义链;
- [0156] (6)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:30所示的反义链;
- [0157] (7)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:31所示的反义链;
- [0158] (8)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:32所示的反义链;
- [0159] (9)SEQ ID NO:37所示的正义链, 和SEQ ID NO:39所示的反义链;
- [0160] (10)SEQ ID NO:38所示的正义链, 和SEQ ID NO:33所示的反义链;
- [0161] (11)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:34所示的反义链;
- [0162] (12)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:35所示的反义链。
- [0163] 在一些实施方案中, 所述寡核苷酸包含选自下述正义链和反义链的组合:
- [0164] (1)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:27所示的反义链;
- [0165] (2)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:28所示的反义链;
- [0166] (3)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:29所示的反义链;
- [0167] (4)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:30所示的反义链;
- [0168] (5)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:31所示的反义链;
- [0169] (6)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:32所示的反义链;
- [0170] (7)SEQ ID NO:37所示的正义链, 和SEQ ID NO:39所示的反义链;
- [0171] (8)SEQ ID NO:38所示的正义链, 和SEQ ID NO:33所示的反义链;
- [0172] (9)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:34所示的反义链;
- [0173] (10)SEQ ID NO:36所示的正义链, 和SEQ ID NO:35所示的反义链。
- [0174] 在另一方面, 本公开提供了一种组合物, 其包含前述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐, 以及任选地药学上可接受的载体。
- [0175] 在一些实施方案中, 所述组合物的剂型为口服剂、静脉注射剂、皮下注射剂或肌肉注射剂, 优选为皮下注射剂。
- [0176] 在一些实施方案中, 所述组合还包含其他治疗HBV感染的药物; 优选地, 核苷类似物类、干扰素类抗病毒药物, 以及乙肝病毒进入类抑制剂、衣壳组装抑制剂、HBsAg分泌抑制剂、HBsAg抗体、乙肝治疗性疫苗、宿主免疫调节剂、凋亡蛋白拮抗剂等。

- [0177] 在另一方面，本公开提供了一种利用前述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐或前述的组合物在制备用于降低受试者血清中HBsAg、HBeAg和HBV DNA中至少一个的药物中的用途。
- [0178] 在另一方面，本公开提供了一种利用前述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐或前述的组合物在制备用于治疗HBV感染或乙型病毒性肝炎，和/或乙型肝炎病毒合并丁型肝炎病毒感染的药物中的用途。
- [0179] 在一些实施方案中，所述HBV感染是慢性HBV感染。
- [0180] 在一些实施方案中，所述乙型病毒性肝炎是慢性乙型病毒性肝炎。
- [0181] 在另一方面，本公开提供了一种HBV感染或乙型病毒性肝炎，和/或乙型肝炎病毒合并丁型肝炎病毒感染的治疗方法，其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的前述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐或前述的组合物。
- [0182] 在一些实施方案中，所述HBV感染是慢性HBV感染。
- [0183] 在一些实施方案中，所述乙型病毒性肝炎是慢性乙型病毒性肝炎。
- [0184] 在另一方面，本公开提供了前述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐或前述的组合物，用于治疗HBV感染或乙型病毒性肝炎，和/或乙型肝炎病毒合并丁型肝炎病毒感染。
- [0185] 在一些实施方案中，所述HBV感染是慢性HBV感染。
- [0186] 在一些实施方案中，所述乙型病毒性肝炎是慢性乙型病毒性肝炎。已经开发了各种制剂以促进寡核苷酸使用。例如，可以使用使降解最小化、促进递送和/或摄取或为制剂中的寡核苷酸提供另一种有益特性的制剂将寡核苷酸递送至受试者或细胞环境。在一些实施方案中，本文提供了包含寡核苷酸(例如，单链或双链寡核苷酸)以减少HBsAg、HBeAg和HBV DNA的siRNA或其组合物。可以合适地配制此类siRNA或其组合物，使得当施用于受试者(至靶标细胞的直接环境中或全身性地)时，足够部分的寡核苷酸进入细胞以减少HBsAg、HBeAg和HBV DNA。各种合适的寡核苷酸制剂中的任一种可用于递送寡核苷酸用于减少HBsAg、HBeAg和HBV DNA，如本文所公开。在一些实施方案中，将寡核苷酸配制于缓冲溶液、诸如磷酸盐缓冲盐水溶液、脂质体、胶束结构和壳体中。在一些实施方案中，将裸露的寡核苷酸或其缀合物配制于水中或水溶液(例如，pH调节

的水)中。在一些实施方案中，将裸露的寡核苷酸或其缀合物配制于碱性缓冲水溶液(例如，PBS)中。

- [0187] 具有阳离子脂质的寡核苷酸的制剂可用于促进寡核苷酸转染至细胞中。例如，可以使用阳离子脂质，诸如脂转染试剂(lipofectin)，阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子(例如，聚赖氨酸)。
- [0188] 因此，在一些实施方案中，制剂包含脂质纳米颗粒。在一些实施方案中，赋形剂包含脂质体、脂质、脂质复合物、微球、微粒、纳米球或纳米颗粒，或者可以以其他方式配制用于向有此需要的受试者的细胞、组织、器官或身体施用。
- [0189] 在一些实施方案中，如本文所公开的制剂包含赋形剂。在一些实施方案中，赋形剂向组合物赋予活性成分的提高了的稳定性、提高的吸收、提高的溶解度和/或治疗性增强。在一些实施方案中，赋形剂是缓冲剂(例如，柠檬酸钠、磷酸钠、tris碱或氢氧化钠)或媒介物(例如，缓冲溶液、矿脂、二甲基亚砷或矿物油)。在一些实施方案中，将寡核苷酸冻干用于延长其保质期，且然后在使用(例如，施用于受试者)之前制成溶液。因此，包含本文所述的寡核苷酸中的任一种的组合物中的赋形剂可以是冻干保护剂(例如，甘露醇、乳糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮)或塌陷温度改变剂(例如，葡聚糖、ficoll或明胶)。
- [0190] 在一些实施方案中，将药物组合物配制为与其意欲的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外，例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如，吸入)、经皮(局部)、经粘膜和直肠施用。通常，施用的途径是静脉内或皮下的。
- [0191] 适用于可注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内或皮下施用，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL.TM.(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。所述载体可以是溶剂或分散介质，其含有例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。在许多情况下，优选在组合物中包括等渗剂，例如糖，多元醇诸如甘露醇、山梨醇和氯化钠。无菌可注射溶液可以通过如下来制备：将所需量的寡核苷酸与所需的以上列举的成分中的一种或组合并入选择的溶剂中，随后进行过滤灭菌。

- [0192] 在一些实施方案中，组合物可以含有至少约0.1%或更多的治疗剂(例如，用于减少HBsAg、HBeAg和HBV DNA的寡核苷酸)，尽管一种或多种活性成分的百分比可以在总组合物的重量或体积的约1%和约80%或更多之间。制备此类药物制剂的领域中的技术人员将考虑因素诸如溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用的途径、产品保质期以及其他药理学考量，并且因此各种剂量和治疗方案可以是期望的。
- [0193] 即使许多实施方案涉及本文公开的任何寡核苷酸的肝脏靶向递送，也考虑靶向其他组织。
- [0194] 在一些实施方案中，如本文所述的寡核苷酸的施用导致HBsAg、HBeAg和HBV DNA的水平降低。在一些实施方案中，HBsAg、HBeAg和HBV DNA的水平降低可以是与适当对照水平相比降低至1%或更低、5%或更低、10%或更低、15%或更低、20%或更低、25%或更低、30%或更低、35%或更低、40%或更低、45%或更低、50%或更低、55%或更低、60%或更低、70%或更低、80%或更低或90%或更低。适当的对照水平可以是未与如本文所述的寡核苷酸接触的受试者血清中的HBsAg、HBeAg和HBV DNA的水平。在一些实施方案中，在有限的时间段之后评价根据本文公开的方法将寡核苷酸递送至细胞的效果。例如，可以在将所述寡核苷酸引入细胞后至少8小时、12小时、18小时、24小时；或至少一、二、三、四、五、六、七或十四天分析血清中的HBsAg、HBeAg和HBV DNA的水平。
- [0195] 在一些实施方案中，寡核苷酸以转基因的形式递送，所述转基因被工程改造为在细胞中表达本文公开的寡核苷酸(例如，呈shRNA形式)。在一些实施方案中，使用经工程改造以表达本文公开的任何寡核苷酸的转基因递送寡核苷酸。可以使用病毒载体(例如，腺病毒、逆转录病毒、牛痘病毒、痘病毒、腺相关病毒或单纯疱疹病毒)或非病毒载体(例如，质粒或合成的mRNA)递送转基因。在一些实施方案中，转基因可以直接注射给受试者。
- [0196] 本公开的方面涉及用于减少HBsAg、HBeAg和HBV DNA用于治疗受试者中的HBV感染、乙型病毒性肝炎和/或其一种或多种症状或并发症的方法。在一些实施方案中，所述方法可以包括向有此需要的受试者施用有效量的本文公开

的寡核苷酸中的任一种。在一些实施方案中，此类治疗可用于例如降低或预防高胆固醇血症(高水平的低密度脂蛋白(LDL)-胆固醇)、动脉粥样硬化、冠心病(例如，冠状动脉疾病)、心绞痛、呼吸短促、出汗、恶心、头晕、呼吸短促、心律不齐、心悸、中风(即由于血液和氧气流向大脑的不足导致脑细胞死亡)、虚弱感、困惑、说话困难、头晕、难以走路或站直、视力模糊、脸、手臂和腿麻木、严重的头痛、意识丧失、外周动脉疾病和/或肾脏问题(例如慢性肾脏疾病)。在一些实施方案中，此类治疗可用于例如治疗或预防与高胆固醇血症、动脉粥样硬化和/或其一种或多种症状或并发症相关的一种或多种症状。

[0197] 因此，在一些实施方案中，本公开提供了治疗处于高胆固醇血症、动脉粥样硬化和/或其一种或多种症状或并发症(包括冠心病(例如，冠状动脉疾病)、心绞痛、呼吸短促、出汗、恶心、头晕、呼吸短促、心律不齐、心悸、中风(即由于血液和氧气流向大脑的不足导致脑细胞死亡)、虚弱感、困惑、说话困难、头晕、难以走路或站直、视力模糊、脸、手臂和腿麻木、严重的头痛、意识丧失、外周动脉疾病和/或肾脏问题(例如慢性肾脏疾病))的风险中(或易患高胆固醇血症、动脉粥样硬化和/或其一种或多种症状或并发症)的受试者的方法。

[0198] 在某些方面，本公开提供了用于通过向受试者施用治疗剂(例如，寡核苷酸或编码其的载体或转基因)来预防受试者中的如本文所述的疾病、病症、症状或病况的方法。在一些实施方案中，待治疗的受试者是将从例如血清中的HBsAg、HBeAg和HBV DNA的量的减少在治疗上受益的受试者。

[0199] 本文所述的方法通常涉及向受试者施用有效量(即能够产生期望的治疗结果的量)的寡核苷酸。治疗上可接受的量可以是能够治疗疾病或病症的量。任一受试者的适当剂量将取决于某些因素，包括受试者的体型、体表面积、年龄、待施用的特定组合物、组合物中的一种或多种活性成分、施用的时间和途径、总体健康和同时施用的其他药物。

[0200] 在一些实施方案中，经肠(例如，经口，通过胃喂食管，通过十二指肠喂食管，经由胃造口术或经直肠)，肠胃外(例如，皮下注射，静脉内注射或输注，动脉内注射或输注，肌内注射)，局部(例如，表皮，吸入，经由滴眼或通过粘膜)，

或通过直接注射入靶标器官(例如,受试者的肝脏),向受试者施用本文公开的组合物中的任一种。通常,本文公开的寡核苷酸静脉内或皮下施用。

- [0201] 在一些实施方案中,寡核苷酸以0.1mg/kg至25mg/kg(例如,1mg/kg至9mg/kg)的范围内的剂量施用。在一些实施方案中,寡核苷酸以0.1mg/kg至9mg/kg的范围内或0.5mg/kg至9mg/kg的范围内剂量施用。
- [0202] 作为一组非限制性实例,将通常每年一次、每年两次、每季度(每三个月一次)、每两个月(每两个月一次)、每个月、每半个月或每周施用本公开的寡核苷酸。
- [0203] 在一些实施方案中,待治疗的受试者是人(例如人患者)或非人灵长类动物或其他哺乳动物受试者。其他示例性受试者包括家养动物诸如狗和猫;牲畜诸如马、牛、猪、绵羊、山羊和鸡;和动物诸如小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠。
- [0204] 为了达到清楚和简洁描述的目的,本文中作为相同的或分开的一些实施方案的一部分来描述特征,然而,将要理解的是,本公开的范围可包括具有所描述的所有或一些特征的组合的一些实施方案。
- [0205] 下面,参考具体实施例更详细地描述本公开,然而,实施例仅用于说明目的,对于本公开不具有限制作用。
- [0206] 实施例
- [0207] 实施例1: siRNA的设计
- [0208] 首先使用基于计算机算法生成与乙肝病毒(Hepatitis B virus)D基因型(subtype ayw, V01460J02203)互补的候选寡核苷酸序列,其中某些序列也与A、B、C等基因型互补或不多于2个错配。siRNA设计为正义链和反义链分别为19/21配对的双链,反义链带有2个与mRNA序列互补的悬垂末端;其中某些互补配对序列正义链5'端第1位和/或第19位碱基替换为与HBV mRNA不相同的碱基,并且反义链相对应位置碱基做相应的变化,与正义链形成配对;在某些序列的正义链内部个别位置的碱基进行了替换,与反义链对应位置形成错配;在某些序列中的个别位置,采用脱氧核糖核苷酸代替核糖核苷酸;在某些序列的反义链的个别位置采用次黄嘌呤(I)替换U、A或G,与正义链形成摆动配对。表1列出了所设计的

siRNA修饰寡核苷酸序列。表2列出了基于AL0105138优化后的修饰寡核苷酸序列。

[0209] 表1.修饰寡核苷酸

修饰序列 编号	sense 5'-3'	序列 ID 号	anti-sense 5'-3'	序列 ID 号
AL010512 5	GmsCmsCmGmGmAmCfUmGfUfGfUmGmCm AmCmUmUmCm	40	GmsAfsAmGmUmGfCmAfCmAmCmGfGmUfCmCf GmGfCmsAmsGm	47
AL010512 7	UmsGmsUmGmCmAmCfUmUfCfGfCmUmUm CmAmCmCmAm	41	UmsGfsGmUmGmAfAmGfCmGmAmAfgmUfGmCf AmCfAmsGmsGm	48
AL010512 8	CmsCmsGmUmGmUmGfCmAfCfUfUmCmGm CmUmUmCmAm	42	UmsGfsAmAmGmCfGmAfAmGmUmGfCmAfCmAf CmGfGmsUmsCm	49
AL010513 1	GmsAmsCmCmGmUmGfUmGfCfAfcUmUm CmGmCmUmAm	43	UmsAfsGmCmGmAfAmGfUmGmCmAfCmAfCmGf ImUfCmsCmsGm	50
AL010513 2	GmsAmsCmCmGmUmGfUmGfCmAfCmUmUm mCmGmCmUmAm	44	UmsAfsGmCmGmAfAmGfUmGmCmAfCmAfCmGf ImUfCmsCmsGm	50
AL010513 3	GmsAmsCmCmGmUmGfUmGfCfAmCmUmUm mCmGmCmUmAm	45	UmsAfsGmCmGmAfAmGfUmGmCmAfCmAfCmGf ImUfCmsCmsGm	50
AL010513 4	GmsAmsCmCmGmUmGfUmGmCfAfcUmUm mCmGmCmUmAm	46	UmsAfsGmCmGmAfAmGfUmGmCmAfCmAfCmGf ImUfCmsCmsGm	50
AL010513 7	GmsAmsCmCmGmUmGfUmGfCfAmCmUmUm mCmGmCmUmAm	45	VpUmAfsGmCmGmAfAmGfUmGmCmAfCmAfCm GflmUfCmsCmsGm	51
AL010513 8	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUm mCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCf AmCfAmsGmsGm	3
AL010513 9	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUm mCmAmCmCmAm	1	VpUmsGfsGmUmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGm CfAmCfAmsGmsGm	4

[0210] 注：“G”、“C”、“A”、“U”、“T”和“I”通常分别代表以鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶和次黄嘌呤为碱基的核苷酸；修饰：d代表脱氧核苷酸；m代表2’-甲氧基；f代表2’-脱氧-2’-氟；s代表硫代磷酸酯；Vp代表乙烯基膦酸(修饰在反义链的5’末端)。在本申请的序列表中，根据ST.26序列表的规则，所有序列“残基”项目中将“U”替换为“T”，“dT”用“n”替代表示，“I”用“n”来替代表示，在修饰的序列中，除Vp之外，其他修饰均表示对前面核苷酸的修饰。

[0211] 表2.修饰寡核苷酸

修饰序列编号	sense 5'-3'	序列ID 号	anti-sense 5'-3'	序列ID 号
AL0105138	UmsGmsUjmgmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	3
AL0105139	UmsGmsUjmgmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	VpUmsGfsGmUmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	4
AL0105140	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	Ums(Ggn)GmUmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	5
AL0105141	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfs(Ggn)UmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	6
AL0105142	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGm(Ugn)GmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	7
AL0105143	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUm(Ggn)AfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	8
AL0105144	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGm(Agn)AmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	9
AL0105145	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGmAf(Agn)GfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	10
AL0105146	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGmAfAm(Ggn)CmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	11
AL0105147	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsG(moe)GmUmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	12

AL0105148	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsG(moe)UmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	13
AL0105149	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmU(moe)GmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	14
AL0105150	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmG(moe)AFAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	15
AL0105151	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGmA(moe)AmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	16
AL0105152	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGmAfA(moe)GfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	17
AL0105153	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGmAfAmG(moe)CmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	18
AL0105157	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGm(GNF-BX)GmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	19
AL0105158	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUm(GINF-BX)AFAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	20
AL0105159	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGm(GNF-BX)AmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	21
AL0105160	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGmAfl(GNF-BX)GfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	22
AL0105161	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGm(U-2'-5')GmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	23
AL0105162	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUm(G-2'-5')AFAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	24
AL0105163	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGm(A-2'-5')AmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	25
AL0105164	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	UmsGfsGmUmGmAfl(A-2'-5')GfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	26
AL0105165	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	APU001sGfsGmUmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	27
AL0105166	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	APU001sGfsGmUm(Ggn)AFAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	28
AL0105167	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	APU001sGfsGmUmGmAfl(Agn)GfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	29
AL0105168	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	APU001sGfsGmUm(GNF-BX)AFAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	30
AL0105169	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	APU001sGfsGmUmGmAfl(GNF-BX)GfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	31
AL0105170	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	APU001sGfsGmUmGmAfl(A-2'-5')GfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	32
AL0105171	UmsGmsUmGmCmAmCfUfCfCmGmCmUmUmCmAmCmCmAm	2	VpUmsGfsGmUmGmAfAmGmCmGmAmAmAflmUfGmCfAmCmAmGmsGm	33
AL0105172	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	VpUmsGfsGmUm(Ggn)AFAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	34
AL0105173	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm	1	VpUmsGfsGmUmGmAfl(A-2'-5')GfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	35

[0212] 注：“G”、“C”、“A”、“U”、“T”和“I”通常分别代表以鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶和次黄嘌呤为碱基的核苷酸；修饰：d代表脱氧核苷酸；m代表2’-甲氧基；f代表2’-脱氧-2’-氟；Moe代表2’-O-甲氧基乙基；s代表3’-硫代磷酸酯基；Vp代表5’-乙烯基磷酸(修饰在反义链的5’末端)。

[0213] A-2’-5’代表：腺苷-2’磷酸；U-2’-5’代表尿苷-2’磷酸；G-2’-5’代表鸟苷-2’磷酸；Ggn代表：鸟苷-二醇核酸；Agn代表腺苷-二醇核酸；Ugn代表尿苷-二醇核酸；GNF-BX代表：N-(2,3-二羟基丙基)-3,5-二(三氟甲

基)苯甲酰胺; APU001代表5’ 乙烯基膦酸酯-2’ -N-乙酰基-尿苷。与序列3作为对应参照, 序列4-35分别替换了相应位置的核酸类似物。

[0214] 表3和表4列出了所设计的带载体siRNA序列。

[0215] 表3.带载体siRNA序列

载体序列编号	正义链 5'-3'	序列ID号/对应修饰序列编号	反义链 5'-3'	序列ID号
AL0107039	GmsAmsCmCmGmUmGfUmGfCfAmCmUmUmCmGmCmUmAm_L96	52/45	UmsAfsGmCmGmAfAmGfUmGmCmAfCmAfCmGfUmUfCmsCmsGm	50
AL0107043	GmsAmsCmCmGmUmGfUmGfCfAmCmUmUmCmGmCmUmAm_L96	52/45	VpUmAfsGmCmGmAfAmGfUmGmCmAfCmAfCmGfUmUfCmsCmsGm	51
AL0107044	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	UmsGfsGmUmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	3
AL0107045	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	VpUmsGfsGmUmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	4

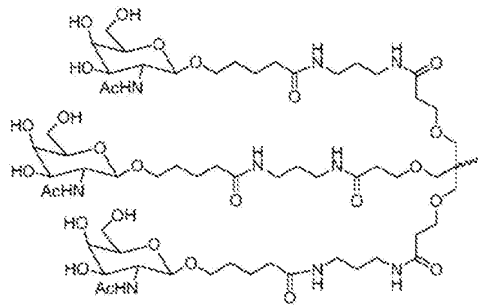
[0216] 表4.带载体siRNA序列

载体序列编号	正义链 5'-3'	序列ID号/对应修饰序列编号	反义链 5'-3'	序列ID号
AL0107044	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	UmsGfsGmUmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	3
AL0107045	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	VpUmsGfsGmUmGmAfAmGfCmGmAmAflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	4
AL0107048	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	APU001sGfsGmUmGmAfAmGfCmGmAmaflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	27
AL0107049	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	APU001sGfsGmUm(Ggn)AfaGfCmGmAmaflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	28
AL0107050	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	APU001sGfsGmUmGmAfa(Agn)GfCmGmAmaflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	29
AL0107051	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	APU001sGfsGmUm(GNT-BX)AfaGfCmGmAmaflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	30
AL0107052	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	APU001sGfsGmUmGmAfa(GNT-BX)GfCmGmAmaflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	31
AL0107053	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	APU001sGfsGmUmGmAfa(A-2'-5')GfCmGmAmaflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	32
AL0107054	CmsCmsUmUmGmAmaGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm_L96	37	VpUmsUfsUmGmAmaAfaGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfaGmGmsUmsUm	39
AL0107055	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	38/2	VpUmsGfsGmUmGmAfaGmCmGmAmaImUfGmCfAmCmAmsGmsGm	33
AL0107057	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	VpUmsGfsGmUm(Ggn)AfaGfCmGmAmaflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	34
AL0107058	UmsGmsUmGmCmAmCfUmCfCfGmCmUmUmCmAmCmCmAm_L96	36/1	VpUmsGfsGmUmGmAfa(A-2'-5')GfCmGmAmaflmUfGmCfAmCfAmsGmsGm	35

[0217] 注：“G”、“C”、“A”、“U”、“T”和“I”通常分别代表以鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶和次黄嘌呤为碱基的核苷酸；修饰：d代表脱氧核苷酸；m代表2’-甲氧基；f代表2’-脱氧-2’-氟；Moe代表2’-O-甲氧基乙基；s代表3’-硫代磷酸酯基；Vp代表5’-乙烯基膦酸(修饰在反义链的5’末端)。

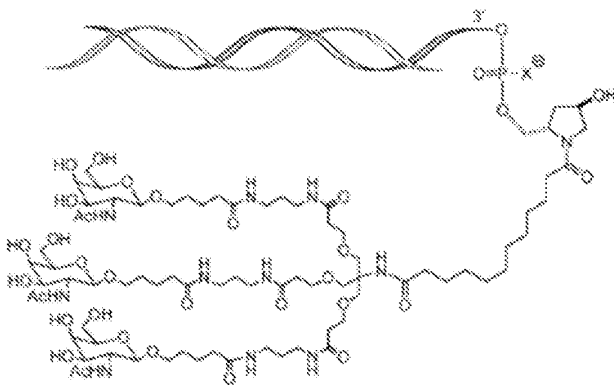
[0218] A-2' -5' 代表：腺苷-2' 磷酸；U-2' -5' 代表尿苷-2' 磷酸；G-2' -5' 代表鸟苷-2' 磷酸；Ggn代表：鸟苷-二醇核酸；Agn代表腺苷-二醇核酸；Ugn代表尿苷-二醇核酸；GNF-BX代表：N-(2,3-二羟基丙基)-3,5-二(三氟甲基)苯甲酰胺；APU001代表5' 乙烯基磷酸酯-2' -N-乙酰基-尿苷。与序列3作为对应参照，序列4-35分别替换了相应位置的核酸类似物。

[0219] 其中，L96表示载体。可选择地，与寡核苷酸缀合的配体的结构式如下所示：



[0220] 进一步地，该配体通过连接子与寡核苷酸的正义链在3' -末端缀合，形成如下缀合物：

[0221]



X可以是选自S或O。

[0222] 实施例2：siRNA的制备

[0223] 核酸序列表示中使用的核苷酸单体的缩写。将理解这些单体当存在于寡核苷酸中时，除非另有说明，否则其通过5' -3' 磷酸二酯键互相连接。L96的制备参照专利CN104717982B描述的方法进行。

[0224] 寡核苷酸的制备过程具体如下。

[0225] (1)siRNA的制备

- [0226] siRNA序列经由正义链(sense strand, SS)和反义链(antisense strand, AS)在固相支持物载体上单独合成,经脱保护、切割、纯化、退火、纯化并冻干后得到。
- [0227] 固相合成(图1):使用亚磷酰胺技术在固相支持物载体上使用寡核苷酸自动合成仪分别合成正义链和反义链。所述合成仪如AKTA Oligopilot(Cytiva公司), Dr.Oligo 192XLc(昆山伯利克精密仪器有限公司)。固相合成从序列的3'端开始,按照序列顺序依次将单体偶联进序列,每偶联一个亚磷酰胺单体,均包含四个化学步骤:1)解封或脱保护(脱羟基保护基);2)偶联;3)氧化;4)封端。所用亚磷酰胺单体、试剂、纯化耗材均为商业化流通试剂及耗材,如购自上海兆维科技发展有限公司多种亚磷酰胺单体(如5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-methyl-Uridine-3'-CE-Phosphoramidite),购自Sigma-Aldrich LLC反应试剂(如40wt%甲胺水溶液,28wt%氢氧化铵水溶液等)等。本文所使用的siRNA合成及纯化方法如US20130178612A1, US2015100197A1等所描述;含VPUm、APU结构序列合成方法如J. Med.Chem.2018,61,734-744所描述。
- [0228] (2)双链RNA试剂的制备
- [0229] 正义链的合成过程如下:
- [0230] 采用固相亚磷酰胺法合成寡核酸。采用计算机控制的合成仪,在不锈钢合成柱中进行反应。正义链合成中以负载有靶向配体(例如L96)的固相载体支持物为起始,或直接以固相支持物载体为起始,通过固相合成仪控制不同的管路按照序列3'到5'的顺序注入不同的原料、试剂和溶剂,逐个连接亚磷酰胺核苷单体。反应过程包含脱除DMT保护基反应、缩合反应、氧化或硫代反应、封端反应共四步循环,每次循环连接上一个核苷酸单元,得到19或21个核苷酸单元的寡核酸序列。合成完成后,在固相合成柱上脱去保护基(2-氰乙基),再通过氨解反应将合成好的序列从固相支持物载体上切割下来,过滤,用乙醇洗涤滤饼,收集滤液及洗涤液,浓缩得到正义链粗品。粗品经色谱纯化(SOURCE 15Q),冻干得到目标产品正义链。
- [0231] 反义链的合成过程如下:
- [0232] 反义链合成与正义链类似,通过固相合成仪控制不同的管路按照序列3'到5'的顺序注入不同的原料、试剂和溶剂,逐个连接亚磷酰胺核苷单体。反应过程包

含脱除DMT保护基反应、缩合反应、氧化或硫代反应、封端反应共四步循环，每次循环连接上一个核苷酸单元，得到21或23个核苷酸单元的寡核酸序列。合成完成后，在固相合成柱上脱去保护基(2-氰乙基)，再通过氨解反应将合成好的序列从固相支持物载体上切割下来，过滤，用乙醇洗涤滤饼，收集滤液及洗涤液，浓缩得到反义链粗品。粗品经色谱纯化(SOURCE 15Q)，超滤，冻干得到目标产品反义链。

[0233] siRNA双链制备过程如下：

[0234] 将AS链和SS链分别溶解在注射水中，以确定的比例(1.01:1.0–1.2:1.0)混合，30–50℃孵育时间30–90min，降温至室温。经冷冻干燥，得到双链siRNA产品。

[0235] 根据同样的方法，制备得到上表1和表2的双链siRNA试剂偶联物。

[0236] 实施例3：应用HepG2.2.15细胞评价修饰序列体外抗乙型肝炎病毒(HBV)活性

[0237] (1)HepG2.2.15细胞的培养：

[0238] HepG2.2.15细胞为转染HBV–DNA重组质粒的HepG2细胞，能够稳定产生HBV病毒，是HBV药物筛选的常用体外模型。细胞由上海药明康德新药开发有限公司提供，置于37℃，5% CO₂的培养箱中，使用DMEM基础培养基(Gibco–11995–065)添加10% FBS(ExCell Bio–FSP500)、InvitroGRO CP Medium(BioreclamationI VT–S03316)和1% 青霉素–链霉素(Hyclone–SV30010)培养。

[0239] (2)铺板和转染

[0240] 第0天，先将测试化合物用DPBS(KCl, 0.2g/L; KH₂PO₄, 0.2g/L; NaCl, 8g/L; Na₂HPO₄ · 7H₂O, 2.16g/L; 调节PH=7.0)梯度稀释2个浓度，终浓度为1nM和0.1nM。取培养瓶HepG2.2.15细胞，用DPBS洗后，加胰蛋白酶进行消化，

[0241] 收集细胞后计数，将细胞调整到合适的密度。以每孔 1.5×10^4 个细胞的密度接种到96孔板中；接种细胞的同时，将测试化合物用Lipofectamine RNAiMax(Invitrogene, 13378–150)转染进入细胞。每个测试化合物的每个浓度点均设置3个复孔。

[0242] (3)收样和检测

[0243] 测试化合物转染后72h，收集的细胞上清，用ELISA法检测上清中HBsAg的表达水平。细胞培养上清液用DPBS进行稀释，使用HBsAg ELISA kit(货号：安图生物

-CL0310), 检测HBsAg的含量。方法简述如下: 分别取50 μ L的标准品, 样品和对照品加入到检测板中, 然后每孔加入50 μ L酶结合物, 37℃孵育60分钟, 用洗液洗板后吸干, 然后加入50 μ L预混发光底物, 室温避光孵育10分钟, 最后酶标仪测定发光值。

- [0244] (4)数据分析
- [0245] HBsAg抑制率(%)=(1-样品的HBsAg值/DPBS对照组HBsAg值)×100%。
- [0246] HepG2.2.15细胞体外抑制活性的计算结果见表5。
- [0247] 表5.HepG2.2.15细胞体外抑制活性(n=3)

化合物编号	HBsAg Inhibition (%)	
	0.1nM	0.01nM
	MEAN±SD	MEAN±SD
AL0105125	64.37±3.96	30.06±8.27
AL0105127	72.06±0.47	45.48±1.41
AL0105128	54.25±1.40	31.82±9.12
AL0105131	72.56±2.21	42.87±7.84
AL0105132	71.07±3.41	46.51±2.89
AL0105133	71.57±0.70	51.92±1.07
AL0105134	43.70±5.41	25.45±4.40
AL0105137	83.58±2.06	78.53±5.67
AL0105138	73.76±2.21	46.09±2.90
AL0105139	83.90±1.19	64.72±2.29

- [0248] 结果显示, 通过不同修饰组合后的药物, 除了AL0105125、AL0105128、AL0105134对HBsAg的抑制效率比较低以外, 其他所有siRNA药物0.1nM浓度下对HBsAg抑制效率达到70%以上, 且0.01nM浓度下对HBsAg抑制效率达到40%以上, AL0105133及AL0105138的抑制效果较为突出, 在AL0105133及AL0105138反义链的5'末端进行Vp修饰得到的AL0105137和AL0105139, 抑制效果进一步提升。
- [0249] 实施例4: 应用HepG2.2.15细胞评价修饰序列体外抗乙型肝炎病毒(HBV)活性
- [0250] (1)HepG2.2.15细胞的培养:
- [0251] HepG2.2.15细胞为转染HBV-DNA重组质粒的HepG2细胞, 能够稳定产生HBV病毒, 是HBV药物筛选的常用体外模型。细胞由上海药明康德新药开发有限公司提供, 置于37℃, 5% CO₂的培养箱中, 使用DMEM基础培养基(Gibco-11995-065)添加10%FBS(ExCell Bio-FSP500)、InvitroGRO CP Medium(BioreclamationVT-S03316)和1%青霉素-链霉素(Hyclone-SV30010)培养。
- [0252] (2)铺板和转染

- [0253] 第0天, 先将测试化合物用DPBS(KCl, 0.2g/L; KH₂PO₄, 0.2g/L; NaCl, 8g/L; Na₂HPO₄ · 7H₂O, 2.16g/L; 调节PH=7.0)梯度稀释2个浓度, 终浓度为1nM和0.1nM。取培养瓶HepG2.2.15细胞, 用DPBS洗后, 加胰蛋白酶进行消化,
- [0254] 收集细胞后计数, 将细胞调整到合适的密度。以每孔 1.5×10^4 个细胞的密度接种到96孔板中; 接种细胞的同时, 将测试化合物用Lipofectamine RNAiMax(Invitrogene, 13378-150)转染进入细胞。每个测试化合物的每个浓度点均设置3个复孔。
- [0255] (3)收样和检测
- [0256] 测试化合物转染后72h, 收集的细胞上清, 用ELISA法检测上清中HBsAg的表达水平。细胞培养上清液用DPBS进行稀释, 使用HBsAg ELISA kit(货号: 安图生物-CL0310), 检测HBsAg的含量。方法简述如下: 分别取50 μL的标准品, 样品和对照品加入到检测板中, 然后每孔加入50 μL酶结合物, 37℃孵育60分钟, 用洗液洗板后吸干, 然后加入50 μL预混发光底物, 室温避光孵育10分钟, 最后酶标仪测定发光值。
- [0257] (4)数据分析
- [0258] $\text{HBsAg抑制率}(\%) = (1 - \text{样品的HBsAg值} / \text{DPBS对照组HBsAg值}) \times 100\%$ 。
- [0259] HepG2.2.15细胞体外抑制活性的计算结果见表6。
- [0260] 表6.HepG2.2.15细胞体外抑制活性(n=3)

化合物编号	HBsAg Inhibition(%)	
	0.1nM	0.01nM
	MEAN±SD	MEAN±SD
AL0105138	76.62±4.73	57.67±0.76
AL0105140	29.46±5.61	29.95±6.83
AL0105141	89.42±1.21	77.19±1.67
AL0105142	68.27±3.14	44.64±2.28
AL0105143	88.86±1.29	81.35±2.06
AL0105144	74.26±0.57	57.46±1.50
AL0105145	75.76±3.52	38.20±6.60
AL0105146	74.14±2.04	47.65±5.30
AL0105147	9.57±24.27	-21.44±5.06
AL0105148	58.50±3.94	20.49±6.88
AL0105149	59.04±2.56	20.53±1.28
AL0105150	77.55±4.59	56.74±2.08
AL0105151	56.72±2.20	38.97±1.89
AL0105152	64.70±4.90	43.00±5.85
AL0105153	78.49±1.67	57.16±2.74

- [0261] 结果显示，除AL0105140、AL0105147、AL0105148、AL0105149和AL0105151少数几个化合物外，其他化合物均体现出较高的HBsAg抑制水平，平均抑制率均在75%以上，个别化合物AL0105141和AL0105143的抑制率在90%以上。
- [0262] 实施例5：应用HepG2.2.15细胞评价修饰序列体外脱靶活性检测
- [0263] (1)实验方法
- [0264] 本实验采用psi-CHECK2(Promega™)质粒系统，通过监测靶序列表达水平的变化来评估向导链和随从链对在靶和脱靶效应的固有能力和。每个siRNA制备了两个psi-CHECK2质粒，一个包含完整目标序列(与相应siRNA的向导链或随从链完全互补的序列)，一个为与目标序列不完全匹配序列。这些序列被克隆到海肾荧光素酶报告基因编码区的下游。靶向上述任何序列的RNAi活性或种子介导的活性的siRNA可导致融合mRNA的裂解、随后的降解或翻译抑制。这些条件中的任何一种都会导致蛋白质表达降低。
- [0265] (2)数据分析
- [0266] 抑制效率(%)=1-(Ratio reporter+siRNA/Ratio reporter only)*100%
- [0267] IC₅₀是通过Graphpad Prism 7中的“[抑制剂]vs.标准化响应—可变斜率”函数计算的，该函数使用以下公式：
- [0268]
$$(Y=100/(1+(X^{HillSlope})/(IC_{50}^{HillSlope})))$$
- [0269] 实验结果见表7。
- [0270] 表7.HepG2.2.15细胞体外抑制活性(n=3)

化合物编号	IC ₅₀ (nM)在靶	IC ₅₀ (nM)脱靶
AL0105138	0.01808	0.1481
AL0105157	0.00384	>40
AL0105158	0.001813	>40
AL0105159	0.01209	0.7491
AL0105160	0.002436	0.2208
AL0105161	0.113	0.4891
AL0105162	0.0194	0.1512
AL0105163	0.0411	0.9129
AL0105164	0.001835	0.542

- [0271] 结果显示，在靶能力中，除了AL0105161抑制效率显著降低外，其他siRNA药物抑制效率均等同或优于AL0105138，尤其AL0105157、AL0105158、AL0105159、AL0105160、AL0105164能够显著增强AL0105138抑制效率；脱靶能力中，

通过对AL0105138不同优化后，所有组化合物均可显著改善AL0105138的脱靶效应。

- [0272] 实施例6：应用HBV转基因鼠评价不同浓度化合物体内抗乙型肝炎病毒(HBV)活性
- [0273] 试验采用SPF级雄性、6-8周龄的C57B/6N-Tg(1.28HBV)/Vst小鼠(北京维通达生物技术有限公司，动物生产合格证SCXK(京)2019-0002)。单笼单只饲养，动物饲料、垫料及饮用水的使用、检测遵照GB14925-2010《实验动物环境及设施》规范执行。
- [0274] 动物适应饲养一周后进行试验，根据小鼠血清HBsAg(主)和HBV DNA(次)定量检测结果，将动物随机分为9组，每组5只。给药当天记为D1，给药当天给药前取血，用于测定HBsAg、HBV DNA和HBeAg。
- [0275] 所有动物在D1通过皮下注射给药，均为单次注射，给药剂量为AL0107039和AL0107044给药剂量为1mg/kg、3mg/kg和9mg/kg，AL0107043和AL0107045给药剂量为3mg/kg，给药体积为5mL/kg，采用生理盐水为对照组，注射同等剂量的生理盐水。每组最后一只给药后15分钟到1小时对改组动物进行观察。
- [0276] 给药后第8、15、22、29、35、42天眼眶取血100 μ L，离心分离血清，取10 μ L血清PBS进行50倍稀释后送检。稀释后血清HBsAg、HBeAg、HBV DNA由北京迪安医学检验实验室有限公司进行。
- [0277] 试验数据采用Graphpad prism统计分析软件进行统计分析。HBV DNA、HBsAg及HBeAg剩余抑制率的计算均以药前两次测定值的平均值为基础值：剩余抑制率=不同时间测定值/药前基础值*100%。
- [0278] 实验结果见表8和图2。
- [0279] 表8.不同浓度单次皮下给药后对HBV转基因鼠血清HBsAg、HBeAg和HBV DNA剩余率

时间	指标	1mg/kg		3mg/kg				9mg/kg	
		AL0107039	AL0107044	AL0107039	AL0107044	AL0107043	AL0107045	AL0107039	AL0107044
D8	HBsAg	10.74%	16.95%	2.03%	3.32%	0.76%	0.60%	0.40%	1.44%
	HBV DNA	43.16%	55.92%	14.20%	22.30%	4.32%	6.75%	2.53%	12.27%
	HBeAg	54.67%	62.61%	34.39%	39.69%	26.99%	26.39%	26.29%	26.70%
D15	HBsAg	15.48%	23.31%	2.88%	2.32%	0.85%	0.21%	0.34%	0.45%
	HBV DNA	53.91%	80.61%	19.62%	15.62%	5.09%	3.78%	1.94%	3.40%
	HBeAg	51.18%	60.56%	30.79%	32.29%	24.43%	22.85%	21.09%	24.77%
D22	HBsAg	34.14%	23.42%	6.19%	2.75%	2.72%	0.23%	0.95%	0.67%
	HBV DNA	120.92%	99.45%	56.21%	23.89%	9.99%	6.88%	10.12%	9.85%
	HBeAg	64.40%	68.18%	41.77%	38.19%	30.73%	28.24%	29.13%	30.22%
D29	HBsAg	35.58%	25.48%	11.47%	4.34%	2.50%	0.29%	1.58%	1.57%
	HBV DNA	115.68%	90.51%	67.66%	38.62%	7.81%	5.35%	15.44%	8.24%
	HBeAg	81.57%	74.86%	50.53%	40.95%	31.70%	29.54%	37.57%	31.88%
D35	HBsAg	38.44%	38.76%	15.85%	6.97%	7.83%	0.49%	4.03%	4.89%
	HBV DNA	99.39%	119.47%	64.41%	45.12%	24.85%	7.81%	20.39%	17.57%
	HBeAg	83.92%	87.31%	52.31%	46.86%	28.55%	20.80%	38.16%	41.86%
D42	HBsAg	51.59%	41.92%	25.02%	12.32%	9.87%	0.74%	8.64%	7.54%
	HBV DNA	88.40%	110.52%	70.88%	44.24%	31.17%	11.06%	52.99%	25.28%
	HBeAg	87.01%	78.33%	63.19%	51.26%	46.40%	30.51%	46.95%	39.45%

- [0280] 从图2和表8的测试结果可知，AL0107039和AL0107044两个化合物对HBV转基因小鼠HBsAg、HBV DNA和HBeAg均有显著的抑制效果，并且具有明显的剂量依赖性，最低剂量1mg/kg时即能够体现出显著的抑制效率；AL0107044的抑制效果更优于AL0107039，AL0107045抑制效果优于AL0107043。
- [0281] 实施例7：应用HBV转基因鼠评价化合物体内抗乙型肝炎病毒(HBV)活性
- [0282] 试验采用SPF级雄性、6-8周龄的C57B/6N-Tg(1.28HBV)/Vst小鼠(北京维通达生物技术有限公司，动物生产合格证SCXK(京)2019-0002)。单笼单只饲养，动物饲料、垫料及饮用水的使用、检测遵照GB14925-2010《实验动物环境及设施》规范执行。
- [0283] 动物适应饲养一周后进行试验，根据小鼠血清HBsAg(主)和HBV DNA(次)定量检测结果，将动物随机分为9组，每组5只。给药当天记为D1，给药当天给药前取血，用于测定HBsAg、HBV DNA和HBeAg。
- [0284] 所有动物在D1通过皮下注射给药，均为单次注射，给药剂量为3mg/kg，给药体积为5mL/kg，采用生理盐水为对照组，注射同等剂量的生理盐水。每组最后一只给药后15分钟到1小时对改组动物进行观察。

- [0285] 给药后第8、15、22、29天眼眶取血100 μ L，离心分离血清，取10 μ L血清PBS进行50倍稀释后送检。稀释后血清HBsAg、HBeAg、HBV DNA由北京迪安医学检验实验室有限公司进行。
- [0286] 试验数据采用Graphpad prism统计分析软件进行统计分析。HBV DNA、HBsAg及HBeAg剩余抑制率的计算均以药前两次测定值的平均值为基础值：剩余抑制率=不同时间测定值/药前基础值*100%。
- [0287] 实验结果见表9-11和图3。
- [0288] 表9.单次皮下给药后对HBV转基因鼠血清HBV DNA抑制效果[Log₁₀HBV DNA(IU/mL)](平均值±标准差)

	D1	D7	D14	D21	D28	D35
AL0107045	8.16±0.21	7.21±0.90	6.65±0.79	6.58±0.95	7.04±0.93	6.56±0.90
AL0107048	8.09±0.05	7.10±0.28	6.72±0.63	7.10±0.42	7.27±0.83	7.03±0.82
AL0107049	8.14±0.19	7.11±0.37	7.42±0.42	7.66±0.18	7.90±0.39	7.78±0.36
AL0107050	8.26±0.11	7.89±0.14	7.84±0.14	7.97±0.14	8.15±0.08	8.11±0.08
AL0107051	8.08±0.25	7.64±0.39	7.90±0.51	8.14±0.14	8.12±0.08	8.22±0.05
AL0107052	8.16±0.18	7.82±0.07	7.88±0.06	7.99±0.19	7.99±0.20	7.97±0.27

AL0107053	8.12±0.21	7.43±0.18	7.19±0.34	7.45±0.24	7.75±0.26	7.89±0.35
AL0107054	8.19±0.14	7.32±0.23	7.43±0.28	7.48±0.26	7.62±0.28	7.54±0.61
生理盐水	8.24±0.20	8.31±0.07	8.29±0.23	8.43±0.13	8.28±0.18	8.19±0.16

- [0289] 表10.单次皮下给药后对HBV转基因鼠血清HBeAg抑制效果[Log₁₀HBeAg(IU/mL)](平均值±标准差)
- | | D1 | D7 | D14 | D21 | D28 | D35 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| AL0107045 | 1.63±0.03 | 1.00±0.03 | 1.11±0.03 | 0.96±0.02 | 1.03±0.04 | 1.19±0.03 |
| AL0107048 | 1.63±0.05 | 1.01±0.06 | 1.08±0.04 | 1.00±0.07 | 1.12±0.07 | 1.36±0.05 |
| AL0107049 | 1.60±0.02 | 1.07±0.12 | 1.23±0.12 | 1.25±0.09 | 1.43±0.11 | 1.57±0.04 |
| AL0107050 | 1.65±0.04 | 1.17±0.06 | 1.31±0.05 | 1.30±0.04 | 1.46±0.02 | 1.66±0.03 |
| AL0107051 | 1.64±0.04 | 1.30±0.04 | 1.51±0.03 | 1.50±0.03 | 1.68±0.06 | 1.72±0.03 |
| AL0107052 | 1.62±0.02 | 1.19±0.03 | 1.30±0.01 | 1.30±0.04 | 1.45±0.02 | 1.60±0.04 |
| AL0107053 | 1.64±0.02 | 1.01±0.05 | 1.12±0.09 | 1.08±0.05 | 1.24±0.08 | 1.49±0.07 |
| AL0107054 | 1.64±0.04 | 0.98±0.06 | 1.10±0.06 | 1.06±0.04 | 1.13±0.05 | 1.28±0.02 |
| 生理盐水 | 1.61±0.03 | 1.66±0.02 | 1.65±0.11 | 1.66±0.02 | 1.71±0.08 | 1.78±0.03 |
- [0290] 表11.单次皮下给药后对HBV转基因鼠血清HBsAg抑制效果[Log₁₀HBsAg(IU/mL)](平均值±标准差)

	D1	D7	D14	D21	D28	D35
AL0107045	3.73±0.15	1.42±0.66	1.06±0.56	1.15±0.58	1.44±0.74	1.49±0.76
AL0107048	3.79±0.15	1.78±0.32	1.40±0.31	1.76±0.32	2.06±0.46	2.39±0.50
AL0107049	3.76±0.10	1.71±0.52	1.88±0.59	2.60±0.45	3.02±0.63	3.20±0.58
AL0107050	3.74±0.10	2.29±0.26	2.46±0.19	2.90±0.14	3.36±0.12	3.55±0.12
AL0107051	3.80±0.15	2.38±0.30	2.79±0.43	3.33±0.26	3.72±0.16	3.73±0.11
AL0107052	3.76±0.07	2.32±0.18	2.36±0.15	2.76±0.15	3.21±0.15	3.23±0.20
AL0107053	3.77±0.07	1.54±0.30	1.42±0.29	2.16±0.21	2.68±0.31	2.98±0.34
AL0107054	3.76±0.10	1.68±0.27	1.62±0.29	2.03±0.29	2.27±0.32	2.22±0.62
生理盐水	3.76±0.09	3.70±0.04	3.68±0.07	3.79±0.05	3.83±0.17	3.65±0.19

- [0291] 从表9-11和图3的测试结果可知，所有组化合物对HBV转基因小鼠HBsAg、HBV DNA和HBeAg均有显著的抑制效果，其中AL0107045、AL0107048两组化合物抑制效果最佳；优化化合物(AL0107049-AL0107054)抑制效率相较于原化合物AL0107048全部略有降低；在优化化合物(AL0107049-AL0107054)中，AL0107049、AL0107053抑制效率相对保持较好。
- [0292] 实施例8：应用HBV转基因鼠评价不同-化合物体内抗乙型肝炎病毒(HBV)活性
- [0293] 试验采用SPF级雄性、6-8周龄的C57B/6N-Tg(1.28HBV)/Vst小鼠(北京维通达生物技术有限公司，动物生产合格证SCXK(京)2019-0002)。单笼单只饲养，动物饲料、垫料及饮用水的使用、检测遵照GB14925-2010《实验动物环境及设施》规范执行。
- [0294] 动物适应饲养一周后进行试验，根据小鼠血清HBsAg(主)和HBV DNA(次)定量检测结果，将动物随机分为10组，每组5只。给药当天记为D1，给药当天给药前取血，用于测定HBsAg、HBV DNA和HBeAg。
- [0295] 所有动物在D1通过皮下注射给药，均为单次注射，给药剂量为3mg/kg，给药体积为5mL/kg，采用生理盐水为对照组，注射同等剂量的生理盐水。给药后第7、14、21、28、35天眼眶取血100 μL，离心分离血清，取10 μL血清PBS进行50倍稀释后送检。稀释后血清HBsAg、HBeAg、HBV DNA由北京迪安医学检验实验室有限公司进行。
- [0296] 试验数据采用Graphpad prism统计分析软件进行统计分析。
- [0297] 实验结果见表12-14和图4。
- [0298] 表12.单次皮下给药后对HBV转基因鼠血清HBV DNA抑制效果[Log₁₀HBV DNA (IU/mL)](平均值 ± 标准差)

	D1	D7	D14	D21	D28	D35
AL0107045	8.19±0.11	7.24±0.09	7.09±0.09	7.28±0.12	7.12±0.09	7.27±0.15
AL0107057	8.11±0.16	6.99±0.06	6.95±0.19	7.14±0.20	7.14±0.20	7.42±0.22
AL0107058	8.05±0.13	6.97±0.23	6.60±0.55	6.73±0.57	6.82±0.38	7.10±0.35
生理盐水	8.12±0.20	8.15±0.11	8.29±0.04	8.25±0.06	8.11±0.03	8.18±0.07

[0299] 表13.单次皮下给药后对HBV转基因鼠血清HBeAg抑制效果[Log₁₀HBeAg(IU/mL)](平均值±标准差)

	D1	D7	D14	D21	D28	D35
AL0107045	1.64±0.02	0.93±0.03	0.81±0.04	0.89±0.04	1.04±0.04	1.06±0.04
AL0107057	1.66±0.03	0.93±0.07	0.85±0.06	0.94±0.07	1.13±0.04	1.17±0.10
AL0107058	1.66±0.03	0.89±0.07	0.81±0.06	0.84±0.06	0.99±0.08	1.05±0.05
生理盐水	1.65±0.05	1.61±0.04	1.60±0.03	1.63±0.04	1.85±0.04	1.75±0.04

[0300] 表14.单次皮下给药后对HBV转基因鼠血清HBsAg抑制效果[Log₁₀HBsAg(IU/mL)](平均值±标准差)

	D1	D7	D14	D21	D28	D35
AL0107045	3.87±0.07	1.93±0.03	1.40±0.07	1.70±0.04	1.94±0.12	2.15±0.15
AL0107057	3.86±0.11	1.71±0.11	1.48±0.19	1.75±0.21	2.09±0.25	2.33±0.23
AL0107058	3.87±0.08	1.63±0.29	1.18±0.39	1.32±0.48	1.57±0.37	1.86±0.35
生理盐水	3.88±0.08	3.82±0.12	3.84±0.07	3.85±0.04	3.98±0.06	3.91±0.06

[0301] 从图表12-14和图4的测试结果可知，AL0107045、AL0107057、AL0107058组化合物对HBV转基因小鼠HBsAg、HBV DNA和HBeAg均有显著的抑制效果，其中尤其显著的是AL0107058组化合物。相较于原始序列AL0107045，AL0107058意想不到地提升了对HBsAg、HBV DNA和HBeAg抑制效果，且持续到整个试验周期。

[0302] 实施例9：应用SD大鼠评价不同浓度化合物体内毒性评估

[0303] 试验选用检疫合格SPF级SD大鼠86只(雌、雄各半)，按体重分层随机溶媒对照组(N组，0.9%氯化钠注射液)、AL0107045S组、AL7045M组、AL7045H组、AL0107057S组、AL0107057M组、AL0107057H组、AL0107058S组、AL0107058M组、AL0107058H组，每组动物8只，雌雄各半。分组后采用皮下注射给予供试品/溶媒3次(AL0107045、AL0107057、AL0107058专题第1天、第15天、第29天)。首次给予供试品当天设定为专题第1天。各供试品S组、M组、H组给予剂量均分别为50.0、100.0、300.0mg/kg/次BW(体重)，N组给予0.9%氯化钠注射液；各组给予体积均为5.0mL/kg/次。在专题第1、5、7、12、14、19、21、26、28进行体重

称重；末次给药当天，全部动物过夜禁食，腹腔注射麻醉后从腹腔静脉采血，进行血清生化检测。实验结果见图5-6。

- [0304] 体重变化显现结果(图5)显示，显而易见的，AL0107045所有剂量组动物相对于生理盐水组在试验的第7-14天，体重增重缓慢，甚至在第12-14天体重是负增长，雌雄反应一致，在14-28天体重增重恢复正常；AL0107057、AL0107058所有剂量组动物体重相对于生理盐水组，体重增重没有明显区别。
- [0305] 谷草转氨酶(图6)结果显示，显而易见的，AL0107045所有剂量组动物均显著高于生理盐水组；AL0107057、AL0107058所有剂量组对谷草转氨酶无显著影响。
- [0306] 由体重变化和谷草转氨酶结果可以推断，AL0107045化合物对大鼠有明显毒性作用，在试验过程中使体重降低，而且在试验结束后血生化分析表明谷草转氨酶水平有明显上升，说明AL0107045化合物对肝脏有一定毒性反应；AL0107057、AL0107058化合物是在AL0107045基础上优化得来，结果也显示不论体重增重和谷草转氨酶水平，相对于对照组都没有明显区别，显而易见的AL0107057、AL0107058组化合物优化了AL0107045的毒性反应。
- [0307] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合，为使描述简洁，未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述，然而，只要这些技术特征的组合不存在矛盾，都应当认为是本说明书记载的范围。
- [0308] 以上所述实施例仅表达了本公开的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本公开构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本公开的保护范围。因此，本公开专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权利要求书

- [权利要求 1] 用于抑制HBV的寡核苷酸或其药学上可接受的盐，所述寡核苷酸包含正义链和反义链，其中，
所述正义链的核苷酸序列包含具有SEQ ID NO.1所示的序列或片段；
所述反义链的核苷酸序列包含具有SEQ ID NO.3所示的序列或片段。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐，其中，
优选地，所述反义链进一步被修饰，所述修饰选自：2'-甲氧基乙基修饰、2'-甲氧基(m)修饰、2'-脱氧-2'-氟(f)修饰、硫代磷酸酯(s)基修饰、腺苷-2'磷酸(A-2'-5')修饰、尿苷-2'磷酸(U-2'-5')修饰、鸟苷-2'磷酸(G-2'-5')修饰、鸟苷-二醇核酸(Ggn)修饰、腺苷-二醇核酸(Agn)修饰、N-(2,3-二羟基丙基)-3,5-二(三氟甲基)苯甲酰胺(GNF-BX)修饰或5'-磷酸酯模拟物修饰中的一种或多种；
优选地，所述修饰选自：2'-甲氧基乙基修饰、腺苷-2'磷酸(A-2'-5')修饰、尿苷-2'磷酸(U-2'-5')修饰、鸟苷-2'磷酸(G-2'-5')修饰、鸟苷-二醇核酸(Ggn)修饰、腺苷-二醇核酸(Agn)修饰、N-(2,3-二羟基丙基)-3,5-二(三氟甲基)苯甲酰胺(GNF-BX)修饰或5'-磷酸酯模拟物修饰中的一种或多种；
优选地，所述修饰为鸟苷-二醇核酸(Ggn)或腺苷-2'磷酸(A-2'-5')任意一种与5'-磷酸酯模拟物的组合；
优选地，所述修饰位于反义链的5'端起的第1至第8位的任意核苷酸；
优选地，修饰后的反义链包含具有SEQ ID NO.4-35中任一核苷酸所示的序列或片段。
- [权利要求 3] 权利要求1或2所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐，其中，所述5'-磷酸酯模拟物选自5'-氧基甲基膦酸酯、5'-乙烯基膦酸(V

p)、5' 乙烯基磷酸酯-2' -N-乙酰或5' -丙二酰基磷酸酯; 更优选为5' -乙烯基磷酸(Vp)或5' 乙烯基磷酸酯-2' -N-乙酰中的一种或多种; 更优选为5' -乙烯基磷酸(Vp);

优选地, 所述5' -磷酸酯模拟物修饰在反义链的5' -末端。

[权利要求 4] 权利要求1-3任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐, 其中, 所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷酸间键;

优选地, 所述至少一个修饰的核苷酸间键是硫代磷酸酯键。

[权利要求 5] 权利要求1-4任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐, 其中, 所述寡核苷酸包含选自下述正义链和反义链的组合:

- (1)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:3所示的反义链;
- (2)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:4所示的反义链;
- (3)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:5所示的反义链;
- (4)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:6所示的反义链;
- (5)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:7所示的反义链;
- (6)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:8所示的反义链;
- (7)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:9所示的反义链;
- (8)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:10所示的反义链;
- (9)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:11所示的反义链;
- (10)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:12所示的反义链;
- (11)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:13所示的反义链;
- (12)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:14所示的反义链;
- (13)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:15所示的反义链;
- (14)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:16所示的反义链;
- (15)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:17所示的反义链;
- (16)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:18所示的反义链;
- (17)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:19所示的反义链;

- (18)SEQ ID NO:1所示的正义链, 和SEQ ID NO:20所示的反义链;

(19)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:21所示的反义链；
(20)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:22所示的反义链；
(21)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:23所示的反义链；
(22)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:24所示的反义链；
(23)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:25所示的反义链；
(24)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:26所示的反义链；
(25)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:27所示的反义链；
(26)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:28所示的反义链；
(27)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:29所示的反义链；
(28)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:30所示的反义链；
(29)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:31所示的反义链；
(30)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:32所示的反义链；
(31)SEQ ID NO:2所示的正义链，和SEQ ID NO:33所示的反义链；
(32)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:34所示的反义链；
(33)SEQ ID NO:1所示的正义链，和SEQ ID NO:35所示的反义链。

[权利要求 6]

权利要求1-5任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐，其中所述寡核苷酸的至少一个核苷酸缀合至一个或多个靶向配体；

优选地，所述靶向配体与所述寡核苷酸的正义链在3'-末端缀合；

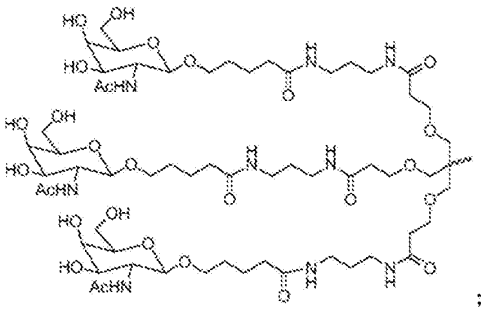
优选地，所述靶向配体包含碳水化合物、氨基糖、胆固醇、多肽或脂质；

优选地，所述靶向配体包含氨基糖；

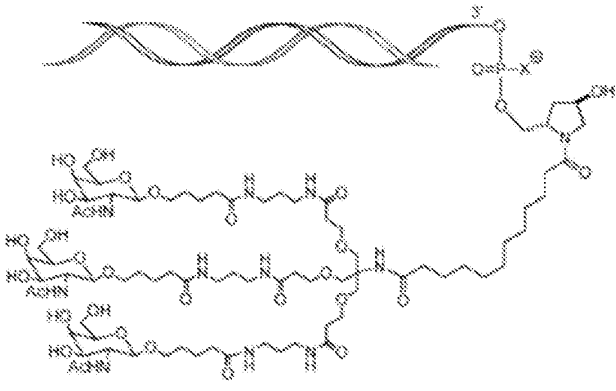
优选地，所述靶向配体包含N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)部分；

优选地，所述GalNAc部分是单价GalNAc部分、二价GalNAc部分、三价GalNAc部分或四价GalNAc部分；

优选地，所述靶向配体具有以下结构：



优选地，所述靶向配体通过连接子与所述寡核苷酸的正义链在3’-末端缀合，形成如下缀合物：



X可以是选自S或O。

[权利要求 7]

权利要求1-6任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐，其中，所述寡核苷酸包含选自下述正义链和反义链的组合：

- (1)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:3所示的反义链；
- (2)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:4所示的反义链；
- (3)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:27所示的反义链；
- (4)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:28所示的反义链；
- (5)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:29所示的反义链；
- (6)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:30所示的反义链；
- (7)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:31所示的反义链；
- (8)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:32所示的反义链；
- (9)SEQ ID NO:37所示的正义链，和SEQ ID NO:39所示的反义链；

(10)SEQ ID NO:38所示的正义链，和SEQ ID NO:33所示的反义链；
(11)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:34所示的反义链；
(12)SEQ ID NO:36所示的正义链，和SEQ ID NO:35所示的反义链。

- [权利要求 8] 组合物，其包含权利要求1-7任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐，以及任选地药学上可接受的载体。
- [权利要求 9] 权利要求1-7任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐或权利要求8所述的组合物在制备用于降低受试者血清中HBsAg、HBeAg和HBV DNA中至少一个的药物中的用途。
- [权利要求 10] 权利要求1-7任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐或权利要求8所述的组合物在制备用于治疗HBV感染或乙型病毒性肝炎，和/或乙型肝炎病毒合并丁型肝炎病毒感染的药物中的用途；
优选地，所述HBV感染是慢性HBV感染；
优选地，所述乙型病毒性肝炎是慢性乙型病毒性肝炎。
- [权利要求 11] 一种HBV感染或乙型病毒性肝炎，和/或乙型肝炎病毒合并丁型肝炎病毒感染的治疗方法，其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求1-7任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐或权利要求8所述的组合物；
优选地，所述HBV感染是慢性HBV感染；
优选地，所述乙型病毒性肝炎是慢性乙型病毒性肝炎。
- [权利要求 12] 权利要求1-7任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐或权利要求8所述的组合物，用于治疗HBV感染或乙型病毒性肝炎，和/或乙型肝炎病毒合并丁型肝炎病毒感染；
优选地，所述HBV感染是慢性HBV感染；
优选地，所述乙型病毒性肝炎是慢性乙型病毒性肝炎。