



---

(21) 申請案號：112109666 (22) 申請日：中華民國 112 (2023) 年 03 月 16 日  
(51) Int. Cl. : *A61K31/7088 (2006.01)* *C12N15/113 (2010.01)*  
*A61P31/12 (2006.01)*  
(30) 優先權：2022/03/17 美國 63/321,019  
(71) 申請人：美商艾利格斯醫療公司 (美國) ALIGOS THERAPEUTICS, INC. (US)  
美國  
(72) 發明人：畢戈曼 里歐尼德 BEIGELMAN, LEONID (US)；拉萬施 維韋克 庫瑪爾  
RAJWANSHI, VIVEK KUMAR (US)；雅特布 樂思曼 ELTEPU, LAXMAN  
(US)；蒙太羅 索爾 馬丁尼茲 MONTERO, SAUL MARTINEZ (ES)；洪 勁  
HONG, JIN (US)  
(74) 代理人：陳長文；張哲倫；劉君怡  
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：43 項 圖式數：1 共 88 頁

---

## (54) 名稱

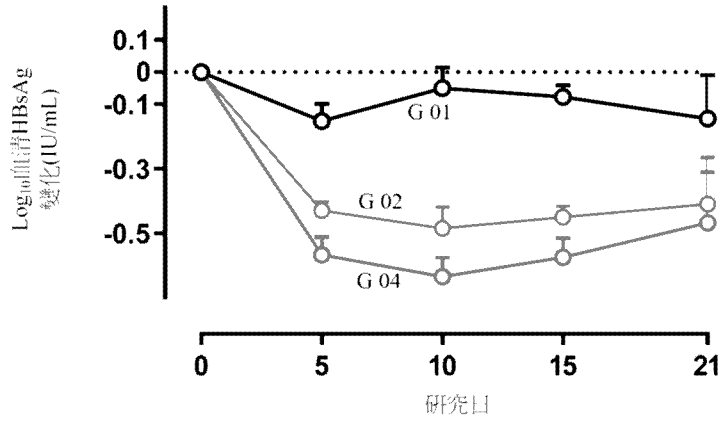
經修飾之間隔體寡聚物及其使用方法

## (57) 摘要

本發明包括反義寡核苷酸(ASO)，包括間隔體 ASO；以及其製備及使用方法。

The disclosure includes antisense oligonucleotides (ASOs), including gapmer ASOs, and methods of making and using the same.

指定代表圖：



—○— G 01：媒劑，5 mL/kg，SC

-○- G 02：ASO 59，5 mL/kg，SC，一次，第0天，GalNAc-LNA類

-○- G 04：ASO 84，5 mL/kg，SC，一次，第0天，GalNAc-Nmln ASO

圖 1

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

經修飾之間隔體寡聚物及其使用方法

### 【英文發明名稱】

MODIFIED GAPMER OLIGOMERS AND METHODS OF USE THEREOF

### 【中文】

本發明包括反義寡核苷酸(ASO)，包括間隔體 ASO；以及其製備及使用方法。

### 【英文】

The disclosure includes antisense oligonucleotides (ASOs), including gapmer ASOs, and methods of making and using the same.

### 【指定代表圖】

圖 1

### 【代表圖之符號簡單說明】

無

### 【特徵化學式】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

經修飾之間隔體寡聚物及其使用方法

### 【英文發明名稱】

MODIFIED GAPMER OLIGOMERS AND METHODS OF USE THEREOF

### 【技術領域】

### 【先前技術】

【0001】 以下論述係為了幫助讀者理解本揭示內容而提供且不承認描述或構成其先前技術。

【0002】 全世界約 3 億人存在 HBV 慢性感染。HBsAg 消失，「功能性治癒」之關鍵範疇，係多種新療法之目標。已證明反義寡核苷酸在減少動物模型中之 HBsAg 方面為有效模式，且正使用此等分子進行臨床研究。

【0003】 然而，用反義寡核苷酸治療 HBV 仍受擾於例如核酸酶降解及肝毒性。因此，此項技術中需要發現對核酸酶降解具有較大抗性且具有改良之肝臟安全概況的反義寡核苷酸。

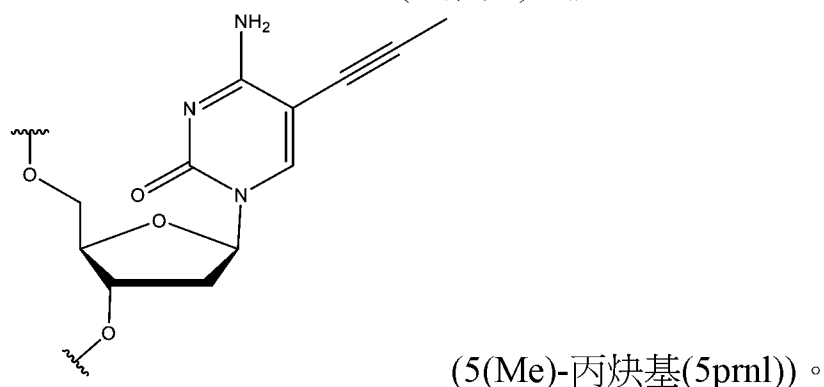
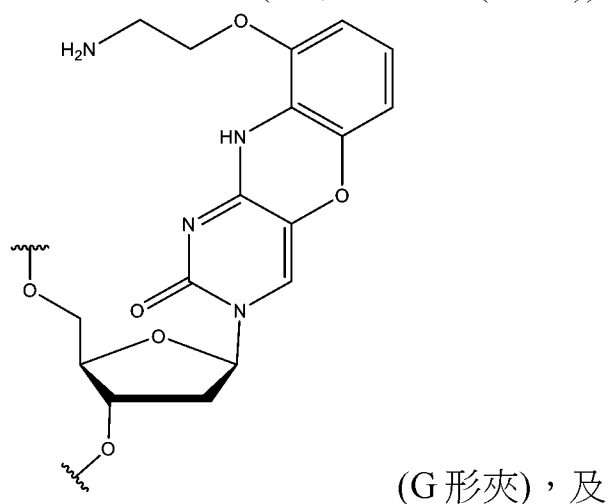
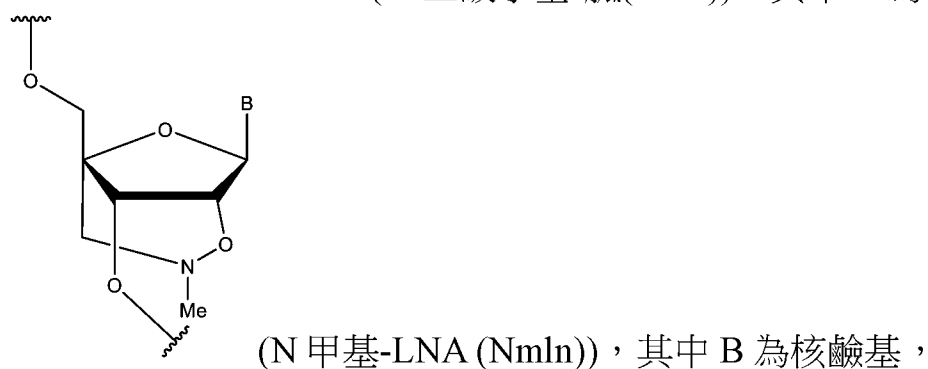
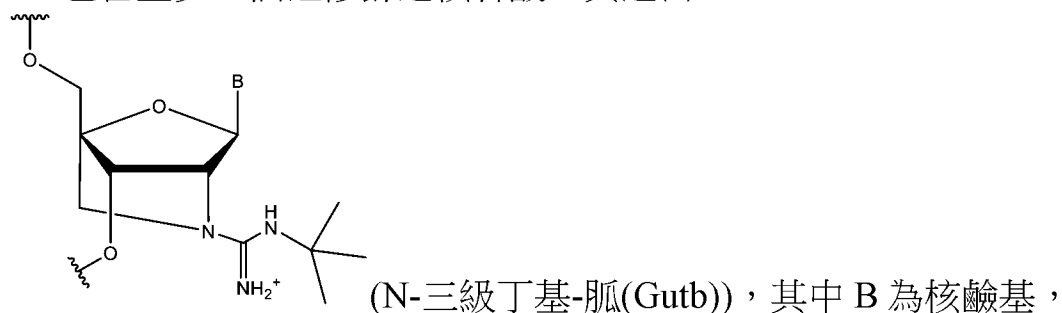
### 【發明內容】

【0004】 本發明係關於含有寡核苷酸之化合物及組合物及其用於預防或治療疾病及病狀(例如 B 型肝炎(HBV))之用途。

【0005】 在一範疇中，本發明提供一種反義寡核苷酸(ASO)，其包含 14 至 22 個核苷酸單元及：

- (a) 中心區域(B')，其包含 6 個或更多個鄰接 DNA 核苷酸；
- (b) 5'-翼區(A')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷；以及
- (c) 3'-翼區(C')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷；

其中該 ASO 之該中心區域與目標 RNA 序列至少 80%互補或雜交；且其中該 ASO 包含至少一個經修飾之核苷酸，其選自：



【0006】 在另一範疇中，本發明提供反義寡核苷酸(ASO)，其包含 14 至 22 個核苷酸單元以及：(a)包含 6 個或更多個鄰接 DNA 核苷酸的中心區域(B')，其

中至少一個鄰接 DNA 核苷酸為選自 Gutb、Nmln、G 形夾及 5prnl 的經修飾之核苷酸；

(b) 5'-翼區(A')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷；以及

(c) 3'-翼區(C')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷；

其中該 ASO 之該中心區域與目標 RNA 序列至少 80%互補或雜交。

**【0007】** 在另一範疇中，本發明提供反義寡核苷酸(ASO)，其包含 14 至 22 個核苷酸單元以及：(a)中心區域(B')，其包含 6 個或更多個鄰接 DNA 核苷酸；(b) 5'-翼區(A')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷；及(c) 3'-翼區(C')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷；其中該 ASO 之中心區域與目標 RNA 序列至少 80%互補或雜交；且其中(i)中心區域(B')包含選自 G 形夾及 5prnld 的經修飾之核苷酸，(ii) 5'-翼區(A')包含選自 Gutb 及 Nmln 的經修飾之核苷酸，(iii) 3'-翼區(C')包含選自 Gutb 及 Nmln 的經修飾之核苷酸，或(iv)其任何組合。

**【0008】** 在一些實施例中，中心區域(B')包含 2、3、4、5 或 6 個或更多個經修飾之核苷酸。

**【0009】** 在一些實施例中，5'-翼區(A')、3'-翼區(C')或兩者均包含選自 Gutb、Nmln、G 形夾及 5prnl 的經修飾之核苷酸。

**【0010】** 在一些實施例中，ASO 分子進一步包含 1 或多個硫代磷酸酯(ps)核苷間鍵聯、甲磺醯基胺基磷酸酯(y)核苷間鍵聯或其組合。

**【0011】** 在一些實施例中，ASO 分子進一步包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 個硫代磷酸酯(ps)核苷間鍵聯、甲磺醯基胺基磷酸酯(y)核苷間鍵聯或其組合。

**【0012】** 在另一範疇中，本發明提供包含 14 至 22 個核苷酸單元的反義寡核苷酸(ASO)，其中該 ASO 包含：

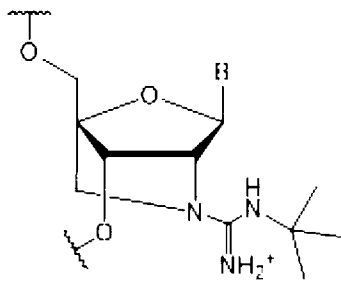
(a)中心區域(B')，其包含 6 個或更多個鄰接 DNA 核苷酸，其中至少一個鄰接 DNA 核苷酸為經修飾之核苷酸，

(b) 5'-翼區(A')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷，以及

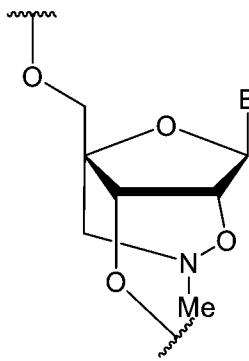
(c) 3'-翼區(C')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷，

其中該 ASO 之該中心區域與目標 RNA 序列至少 80%互補或雜交，且其中該 ASO 包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 個或更多個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷間鍵聯。

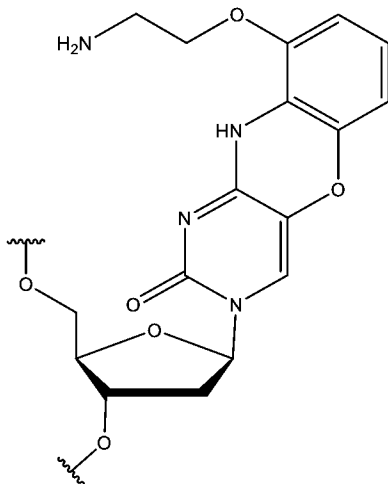
【0013】 在一些實施例中，ASO 包含至少 1 個、至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個或至少 5 個或更多個核苷酸，該等核苷酸選自：



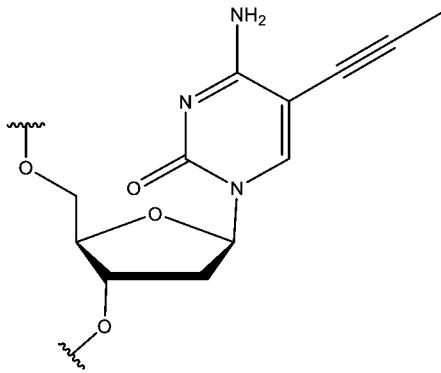
(N-三級丁基-胍(Gutb))，其中 B 為核鹼基，



(N 甲基-LNA (Nmln))，其中 B 為核鹼基，



(G 形夾)，及



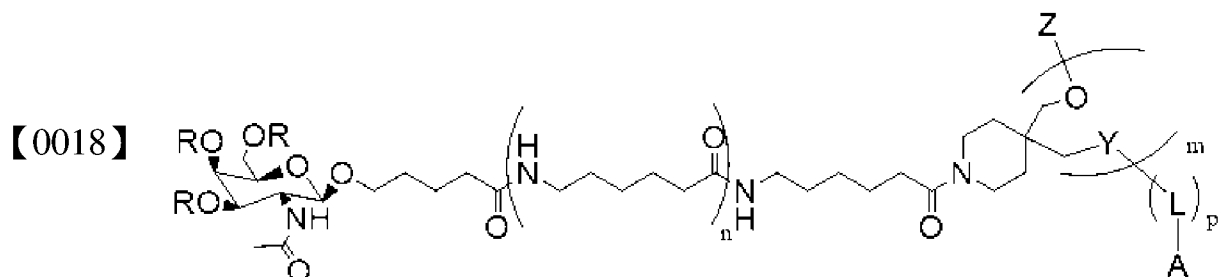
(5(Me)-丙炔基(5prml))。

【0014】 在一些實施例中，ASO 分子進一步包含 1 或多個硫代磷酸酯(ps) 核苷間鍵聯。

【0015】 在任一前述範疇之一些實施例中，(i)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於 ASO 分子 5'端之核苷位置 3 與 4 之間；(ii)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於 ASO 分子 5'端之核苷位置 5 與 6 之間；(iii)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於 ASO 分子 5'端之核苷位置 6 與 7 之間；(iv)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於 ASO 分子 5'端之核苷位置 7 與 8 之間；(v)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於 ASO 分子 5'端之核苷位置 8 與 9 之間；(vi)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於 ASO 分子 5'端之核苷位置 9 與 10 之間；或(vii)其組合。

【0016】 在任一前述範疇之一些實施例中，5'-翼區(A')、3'-翼區(C')或兩者均包含至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯。

【0017】 在任一前述範疇之一些實施例中，ASO 分子進一步包含半乳糖。在一些實施例中，該半乳糖為式(VI)之 N-乙醯半乳糖(GalNAc)：



，其中

m 為 1、2、3、4 或 5；

各 n 獨立地為 1 或 2；

p 為 0 或 1；

各 R 獨立地為 H；

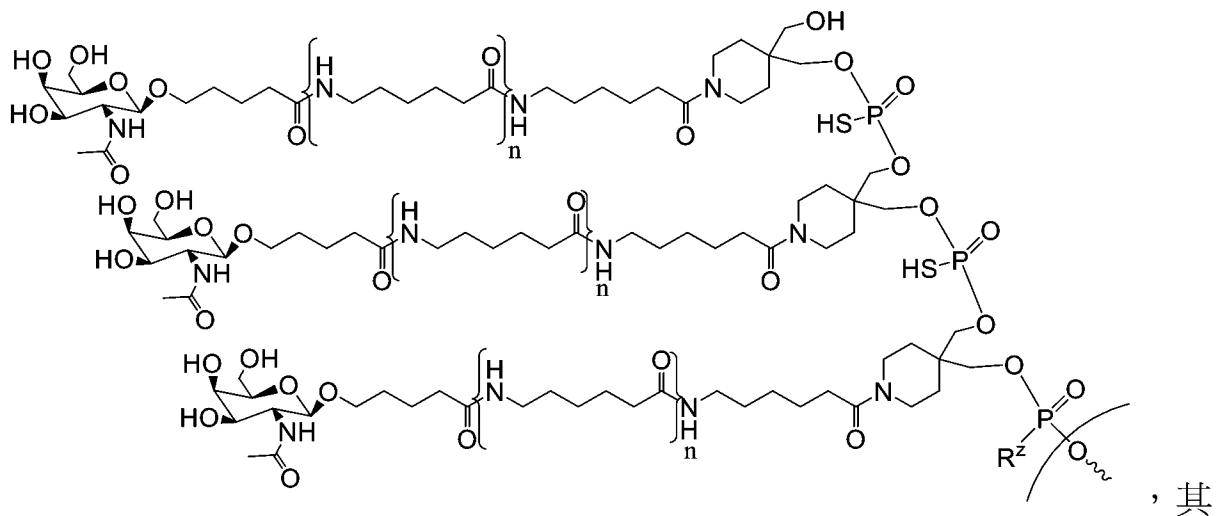
各 Y 獨立地選自 -O-P(=O)(SH)-、-O-P(=O)(O)-、-O-P(=O)(OH)-及-O-P(S)S-；

Z 為 H 或第二保護基；

L 為連接子，或 L 與 Y 之組合為連接子；且

A 為 H、OH、第三保護基、活化基團或寡核苷酸。

【0019】 在一些實施例中，該半乳糖胺糖為式(VII)之 N-乙醯半乳糖胺糖 (GalNAc)：



中  $R^z$  為 OH 或 SH；且各 n 獨立地為 1 或 2。

【0020】 在任一前述範疇之一些實施例中，(i)目標 RNA 序列為病毒基因；(ii)目標 RNA 序列為來自 DNA 病毒之基因；(iii)目標 RNA 序列為來自雙股 DNA (dsDNA) 病毒之基因；(iv)目標 RNA 序列為來自嗜肝 DNA 病毒之基因；(v)目標 RNA 序列為來自 B 型肝炎病毒(HBV)之基因；(vi)目標 RNA 序列為來自

基因型 A 至 J 中之任一者之 HBV 的基因；或(vii)目標 RNA 序列係選自 HBV 之 S 基因或 X 基因。

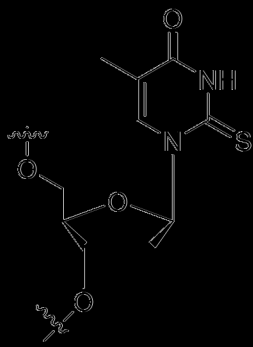
【0021】 在任一前述範疇之一些實施例中，目標 RNA 序列係選自編碼甲基化可控 J 蛋白(MCJ 蛋白)之基因、編碼 TAZ 之基因、編碼血管生成素樣 3 (ANGPTL3)之基因、編碼二醯基甘油醯基轉移酶 2 (DGAT2)之基因及編碼羥基類固醇 17- $\beta$  去氫酶 13 (HSD17B13)之基因。

【0022】 在任一前述範疇之一些實施例中，(i)該 ASO 之 5'-翼區包含 2 至 6 個經硫代磷酸酯連接的鎖定核苷；(ii)該 ASO 之 3'-翼區包含 2 至 6 個經硫代磷酸酯連接的鎖定核苷；或(iii)其組合。在一些實施例中，鎖定核苷係選自 LNA、scpBNA、AmNA、AmNA (N-Me)、GuNA、GuNA (N-R<sup>11</sup>)，其中 R<sup>11</sup> 係選自 Me、Et、*i*-Pr、*t*-Bu 及其組合。

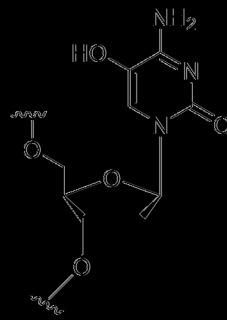
【0023】 在任一前述範疇之一些實施例中，ASO 中心區域包含至少 5 個經硫代磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷酸、至少 5 個經甲磺醯基胺基磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷酸，或至少 5 個經一個或多個硫代磷酸酯核苷間鍵聯及一個或多個甲磺醯基胺基磷酸酯核苷間鍵聯連接的鄰接 DNA 核苷酸。

【0024】 在任一前述範疇之一些實施例中，ASO 中心區域包含 8 至 10 個經硫代磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷酸、8 至 10 個經甲磺醯基胺基磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷酸，或 8 至 10 個經一個或多個硫代磷酸酯核苷間鍵聯及一個或多個甲磺醯基胺基磷酸酯核苷間鍵聯連接的 DNA 核苷酸。

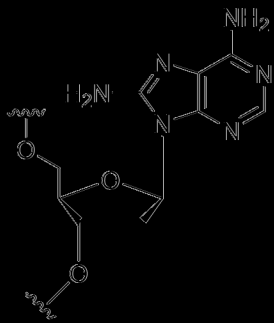
【0025】 在任一前述範疇之一些實施例中，ASO 包含至少一個具有以下結構的經修飾之核苷酸



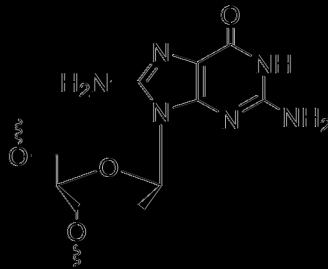
(<sup>1</sup>(2s)T<sub>1</sub>)、



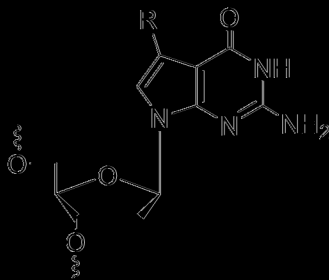
(<sup>1</sup>(5OH)C<sub>1</sub>)、



(<sup>1</sup>(8nh)A<sub>1</sub>)、



(<sup>1</sup>(8nh)G<sub>1</sub>)、 或



、

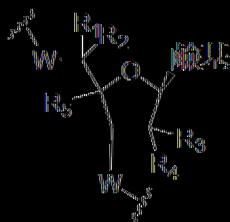
其中：

R 為鹵素或 R' C C；且

R' 為 C<sub>6-12</sub>芳基、5 至 12 員雜芳基、烷基 C<sub>1-6</sub>或 C<sub>1-7</sub>烷醯基氧基。

(0026) 在任一前述範疇之一些實施例中，ASO 包含至少一個具有以下結

構的經修飾之核苷酸：



其中：

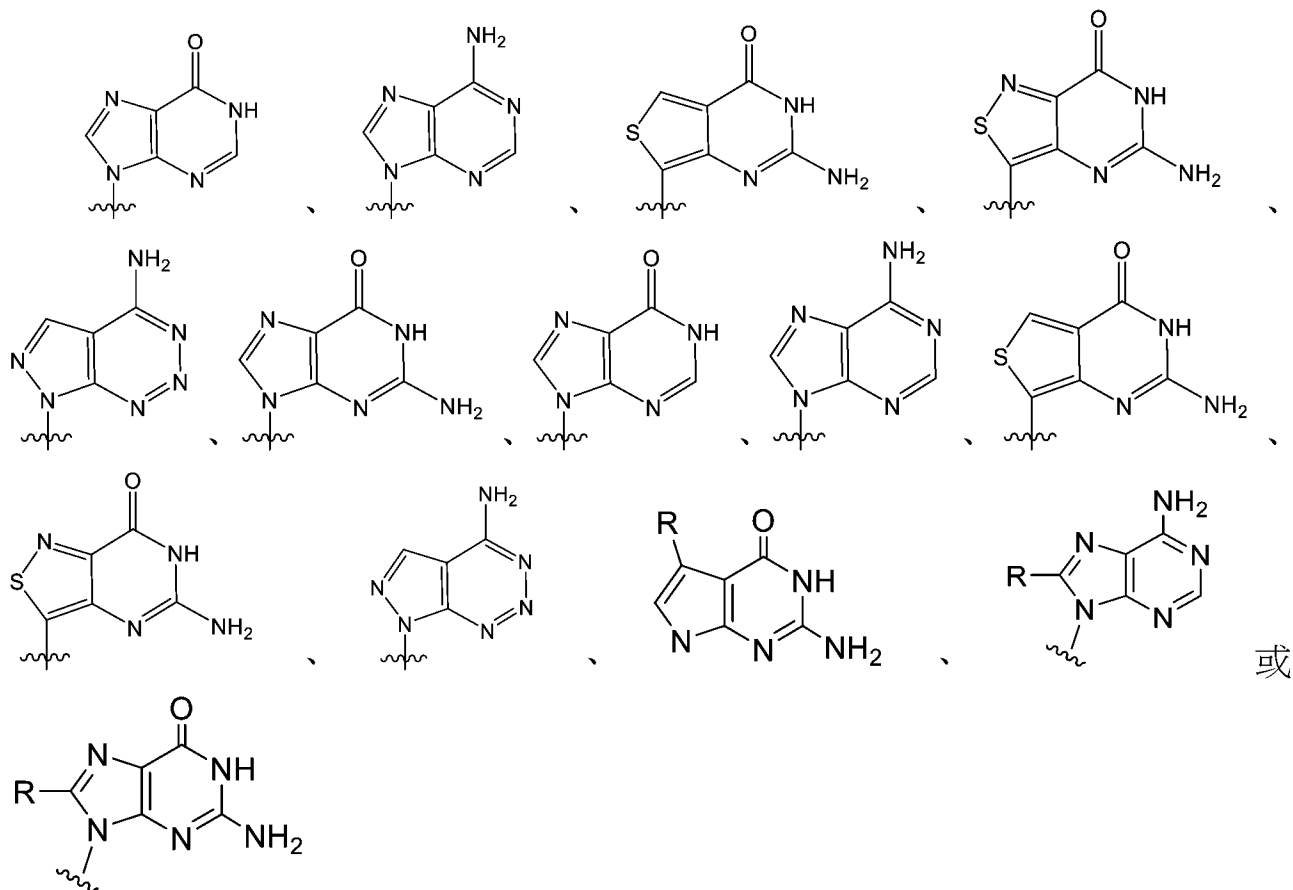
W 獨立地為 O、N 或 S；

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> 及 R<sub>5</sub> 獨立地為 H 或 D；

$R_3$  為 H 或 F；

$R_4$  為 F 或  $OCH_3$ ；且

鹼基為



其中：

$R$  為鹵素或  $R'-C\equiv C-$ ；且

$R'$  表示  $C_{6-12}$  芳基、5 員至 12 員雜芳基、羥基- $C_{1-6}$  烷基，或  $C_{1-7}$  烷醯基氧基。

【0027】 在另一範疇中，本發明提供如表 1 中所示的 ASO 分子。

【0028】 在另一範疇中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含如本文所揭示(例如任一前述範疇或實施例)之 ASO 分子；以及醫藥學上可接受之賦形劑。

【0029】 在一些實施例中，醫藥組合物可進一步包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10 種或更多種如本文所揭示之 ASO 分子。

【0030】 在一些實施例中，醫藥組合物可進一步包含另一種治療劑。在一些實施例中，另一種治療劑係選自核苷酸類似物、核苷類似物、衣殼組裝調節劑(CAM)、重組干擾素、進入抑制劑、小分子免疫調節劑及寡核苷酸療法，其中該寡核苷酸療法視情況選自另一種反義寡核苷酸(ASO)、短干擾核酸(siNA)、NAP 或 STOPS™。

【0031】 在另一範疇中，本發明提供治療患有 B 型肝炎病毒(HBV)感染之個體的方法，其包含向患有 HBV 之該個體投與如本文所揭示(例如任一前述範疇或實施例)的 ASO 或醫藥組合物。

【0032】 在一些實施例中，方法可進一步包含投與另一種治療劑。在一些實施例中，另一種治療劑係選自核苷酸類似物、核苷類似物、衣殼組裝調節劑(CAM)、重組干擾素、進入抑制劑、小分子免疫調節劑及寡核苷酸療法，其中該寡核苷酸療法視情況選自另一種反義寡核苷酸(ASO)、短干擾核酸(siNA)、NAP 或 STOPS™。在一些實施例中，另一種治療劑選自由以下組成之群：包括 ALG-010133、ALG-000184、重組干擾素  $\alpha$ 2b、IFN-a、PEG-IFN-a-2a、拉米夫定(lamivudine)、替比夫定(telbivudine)、阿德福韋雙匹酯(adefovir dipivoxil)、克來夫定(clevudine)、因提弗(entecavir)、替諾福韋阿拉芬胺(tenofovir alafenamide)、替諾福韋雙索酯(tenofovir disoproxil)、NVR3-778、BAY41-4109、JNJ-632、JNJ-3989 (ARO-HBV)、RG6004、GSK3228836、REP-2139、REP-2165、AB-729、VIR-2218、DCR-HBVS、JNJ-6379、GLS4、ABI-HO731、JNJ-440、NZ-4、RG7907、EDP-514、AB-423、AB-506、ABI-H03733 及 ABI-H2158。

【0033】 在一些實施例中，療法包含降低個體的 HBV 病毒負荷、降低個體的病毒抗原水平，或其組合。

【0034】 在另一範疇中，本發明提供減少個體中之目標基因表現的方法，

其包含投與如本文所揭示的 ASO 或醫藥組合物。在一些實施例中，目標基因為個體內源的基因或目標基因對於個體而言不為內源的。在一些實施例中，個體所患疾病選自 B 型肝炎病毒(HBV)、冠狀病毒感染及肝臟疾病，其中肝臟疾病視情況選自非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)及肝細胞癌(HCC)。

【0035】 在所揭示之方法的一些實施例中，個體為哺乳動物，視情況為成人。

【0036】 在所揭示之方法的一些實施例中，ASO 係以至少 1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、11 mg/kg、12 mg/kg、13 mg/kg、14 mg/kg 或 15 mg/kg 之劑量投與。

【0037】 在所揭示之方法的一些實施例中，ASO 係以 0.5 mg/kg 至 50 mg/kg、0.5 mg/kg 至 40 mg/kg、0.5 mg/kg 至 30 mg/kg、1 mg/kg 至 50 mg/kg、1 mg/kg 至 40 mg/kg、1 mg/kg 至 30 mg/kg、1 mg/kg 至 20 mg/kg、3 mg/kg 至 50 mg/kg、3 mg/kg 至 40 mg/kg、3 mg/kg 至 30 mg/kg、3 mg/kg 至 20 mg/kg、3 mg/kg 至 15 mg/kg、3 mg/kg 至 10 mg/kg、4 mg/kg 至 50 mg/kg、4 mg/kg 至 40 mg/kg、4 mg/kg 至 30 mg/kg、4 mg/kg 至 20 mg/kg、4 mg/kg 至 15 mg/kg、4 mg/kg 至 10 mg/kg、5 mg/kg 至 50 mg/kg、5 mg/kg 至 40 mg/kg、5 mg/kg 至 30 mg/kg、5 mg/kg 至 20 mg/kg、5 mg/kg 至 15 mg/kg 或 5 mg/kg 至 10 mg/kg 之劑量投與。

【0038】 在所揭示之方法的一些實施例中，ASO 係投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 次。

【0039】 在所揭示之方法的一些實施例中，ASO 係一天投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 次，一週投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 次，或一個月投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 次。

【0040】 在所揭示之方法的一些實施例中，ASO 係每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或 21 天投與至少一次。

【0041】 在所揭示之方法的一些實施例中，ASO 係投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或 21 天，或至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、51、52、53、54 或 55 週的時段。

【0042】 前述一般描述及以下詳細描述為例示性及解釋性的，且意欲提供如所主張之本發明之進一步解釋。根據本發明之以下圖式簡單說明及實施方式，其他目標、優勢及新穎特徵對於熟習此項技術者將顯而易見。

#### 【圖式簡單說明】

【0043】 圖(Fig.)顯示所選 ASO 對 LNA-DNA-LNA 親體的活體內力價改良。G01 為媒劑，其以 5 mL/kg SC 給予；G02 為 ASO 59，其在第 0 天以 5 mg/kg SC 給予一次；G-04 為 ASO 84，其在第 0 天以 5 mg/kg SC 給予一次。

#### 【實施方式】

##### 相關申請案之交叉參考

【0044】 本申請案依據 35 U.S.C. §119 主張 2022 年 3 月 17 日所提申之臨時申請案第 63/321,019 號的優先權，該臨時申請案的揭示內容以引用的方式併入本文中。

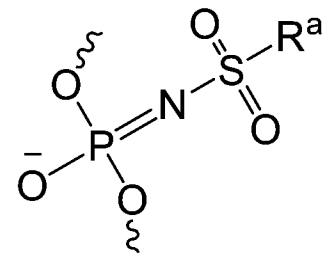
【0045】 本發明係關於經修飾之反義寡核苷酸及經修飾之反義寡核苷酸的醫藥組合物。本發明亦關於使用及製備反義寡核苷酸及醫藥組合物之方法。

#### 【0046】 反義寡核苷酸(ASO)

【0047】 本發明化合物包括經修飾之反義寡核苷酸(ASO)。在一些實施例

中，ASO 包含 14 至 22 個核苷酸單元，例如 14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 個核苷酸單元。在一些實施例中，ASO 為間隔體，其包含三個區域：5'-翼區(A')，其包含經修飾之核苷酸；中心區域(B')，其包含與翼區不同類型之核苷酸，例如能夠誘導 RNA 酶 H 裂解之核苷酸；及 3'-翼區(C')，其包含經修飾之核苷酸。

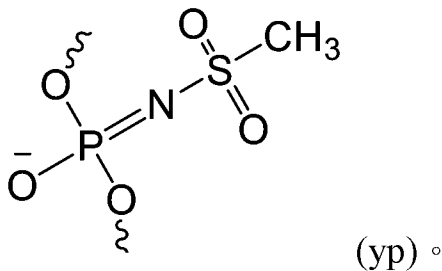
【0048】 所揭示之 ASO 包含(i)經修飾之核苷酸,諸如 Gutb、Nmln、5prnl、G 形夾或其組合；(ii)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯核苷間鍵聯(當  $R^a$  為甲基時，在序列中稱為「yp」)；或(iii)其組合。Gutb、Nmln、5prnl 及 G 形夾之結構



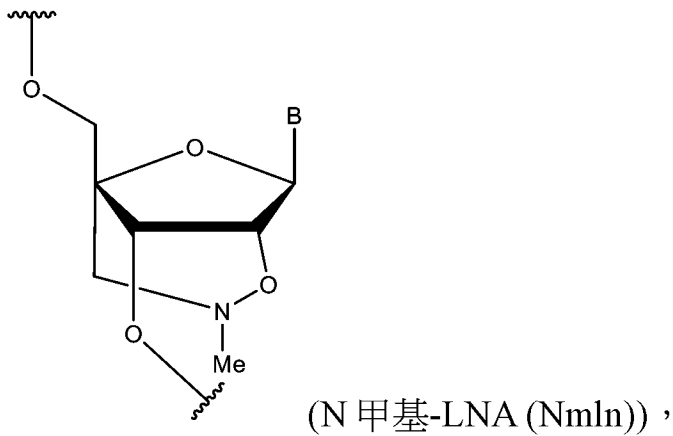
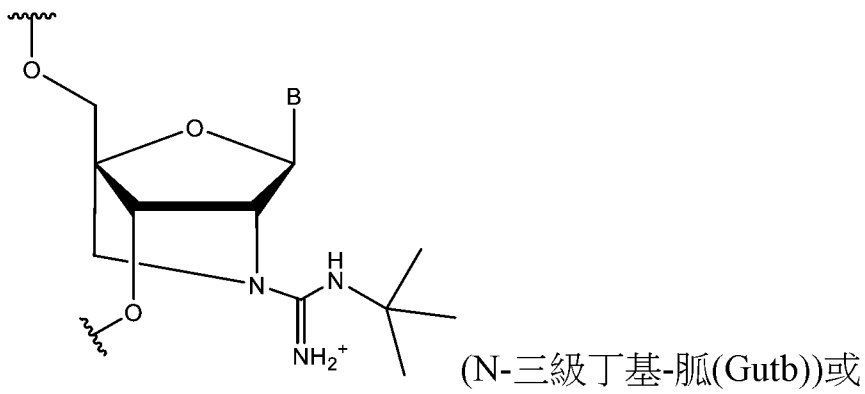
顯示於下文，且甲磺醯基胺基磷酸酯連接子之結構為：

其中  $R^a$  為  $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_6$ - $12$  芳基或 5 員至 12 員雜芳基。

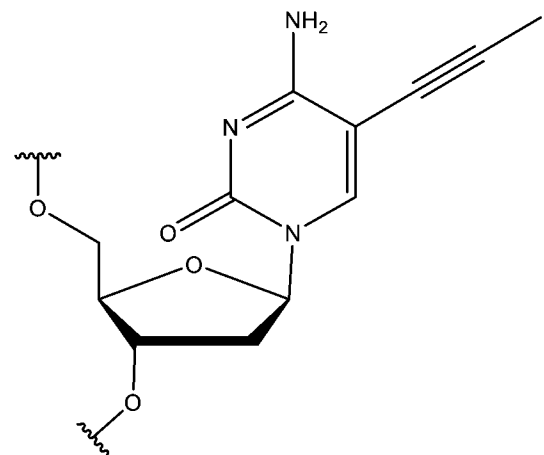
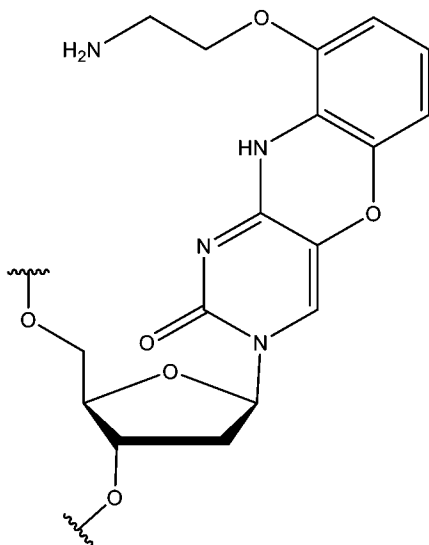
【0049】 在一些實施例中，甲磺醯基胺基磷酸酯連接子之結構為：



【0050】 舉例而言，5'-翼區及 3'-翼區各自可獨立地包含 2 至 6 個核苷酸，例如 2、3、4、5 或 6 個核苷酸。此等核苷酸中之一或多者可經修飾(例如，1、2、3、4、5 或 6 個核苷酸經修飾)。至少一個經修飾之核苷酸可包含以下結構：



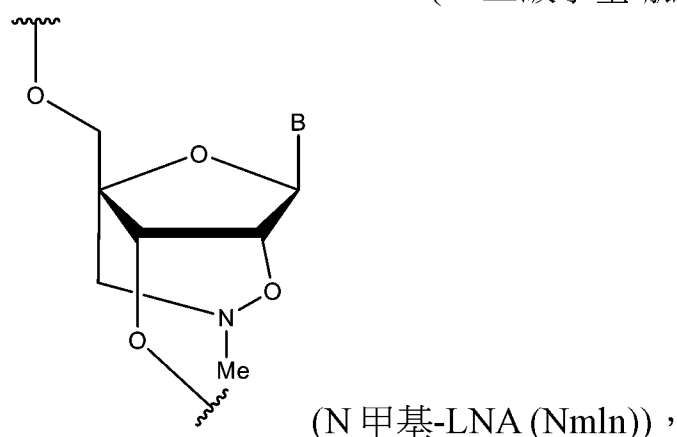
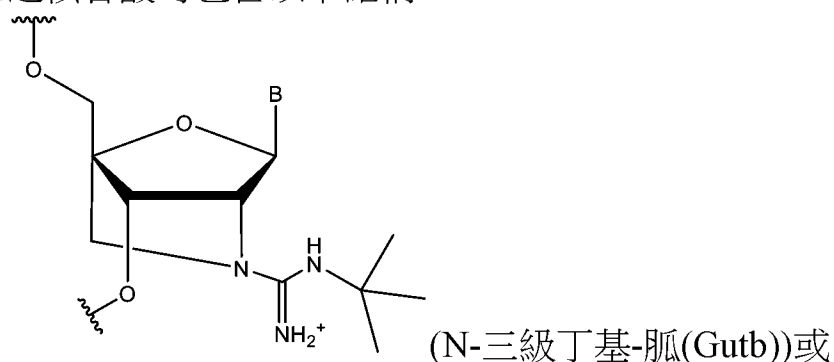
其中 B 為核鹼基。另外或替代地，至少一個經修飾之核苷酸可包含以下結構：



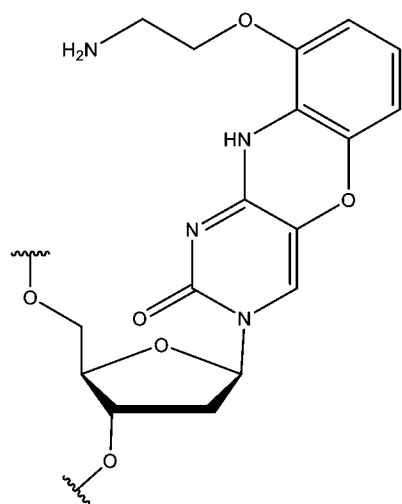
因此，5'-翼區及 3'-翼區各自可獨立地包含 Gutb、Nmln 或兩者中之一或多者。類似地，5'-翼區及 3'-翼區各自可獨立地包含 G 形夾、5prnl 或兩者中之一或多者；然而，G 形夾及 5prnl 亦適於納入中心區域中。舉例而言，在一些實施例中，(i)中心區域(B')包含選自 G 形夾及 5prnl 的經修飾之

核苷酸，(ii) 5'-翼區(A')包含選自 Gutb 及 Nmln 的經修飾之核苷酸，(iii) 3'-翼區(C')包含選自 Gutb 及 Nmln 的經修飾之核苷酸，或(iv)其任何組合。

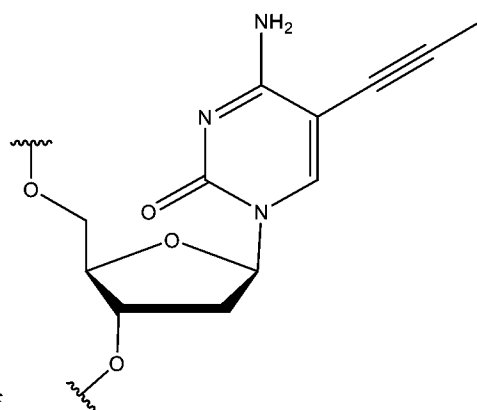
【0051】 另外或可替代地，中心區域可包含 1、2、3、4、5 個或更多個經磷酸二酯核苷間鍵聯或硫代磷酸酯(「ps」)核苷間鍵聯連接的鄰接 DNA 核苷。在其他實施例中，中心區域包括一個或多個經修飾之核苷酸、甲磺醯基胺基磷酸酯(y<sub>p</sub>)核苷間鍵聯或其組合。另外，中心區域可包括一個或多個經修飾之核苷酸，其中中心區域能夠誘導 RNA 酶 H 裂解。在一些實施例中，中心區域包括一個或多個具有經修飾之核鹼基的經修飾之核苷酸。在一些實施例中，中心區域包含 6、7、8、9、10 或 11 個鄰接 DNA 核苷。在一些實施例中，中心區域中之 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 11 個 DNA 核苷經修飾。至少一個經修飾之核苷酸可包含以下結構：



其中 B 為核鹼基。另外或替代地，至少一個經修飾之核苷酸可包含以下結構：



(G 形夾)或

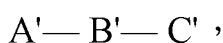


(5(Me)-

丙炔基(5prnl))。

【0052】 出於本發明之目的，所揭示之 ASO 可包含至少 1 個、至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個或至少 5 個或更多個 Gutb、Nmln、5prnl、G 形夾或其組合。Gutb、Nmln、5prnl、G 形夾或其組合可併入中心區域、翼區或兩者中。一般而言，經修飾之鎖定核苷酸(Gutb 及 Nmln)適於納入翼區中，而 5prnl 及 G 形夾適於納入整個 ASO 中或特定地納入中心區域中。另外或可替代地，所揭示之 ASO 可包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 個或更多個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷間鍵聯。

【0053】 在一些態樣中，本發明之間隔體 ASO 化合物包括式(I)化合物：

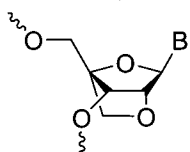


其中 A' 及 C' 各自獨立地包含 2 至 6 個核苷酸，其中一者或多者為經修飾之核苷酸，B' 包含 6 個或更多個經磷酸二酯或硫代磷酸酯核苷間鍵聯連接的鄰接 DNA 核苷。在一些實施例中，B' 包含一或多個經修飾之 DNA 核苷。在一些實施例中，經修飾之核苷酸係選自鎖定核苷或 2' 位經取代之核苷。在一些實施例中，經修飾之 DNA 核苷係選自鎖定核苷或 2' 位經取代之核苷。

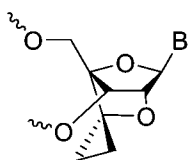
【0054】 A'、B' 及 C' 中之核苷酸及/或核苷數目可選自以下群組(A':B':C')：(2:10:2)、(2:10:3)、(2:10:4)、(2:10:5)、(3:10:2)、(3:10:3)、(3:10:4)、(3:10:5)、

(4:10:2)、(4:10:3)、(4:10:4)、(4:10:5)、(5:10:2)、(5:10:3)、(5:10:4)、(5:10:5)、  
 (2:9:2)、(2:9:3)、(2:9:4)、(2:9:5)、(3:9:2)、(3:9:3)、(3:9:4)、(3:9:5)、(4:9:2)、  
 (4:9:3)、(4:9:4)、(4:9:5)、(5:9:2)、(5:9:3)、(5:9:4)、(5:9:5)、(2:8:2)、(2:8:3)、  
 (2:8:4)、(2:8:5)、(3:8:2)、(3:8:3)、(3:8:4)、(3:8:5)、(4:8:2)、(4:8:3)、(4:8:4)、  
 (4:8:5)、(5:8:2)、(5:8:3)、(5:8:4)、(5:8:5)、(2:7:2)、(2:7:3)、(2:7:4)、(2:7:5)、  
 (3:7:2)、(3:7:3)、(3:7:4)、(3:7:5)、(4:7:2)、(4:7:3)、(4:7:4)、(4:7:5)、(5:7:2)、  
 (5:7:3)、(5:7:4)、(5:7:5)、(2:6:2)、(2:6:3)、(2:6:4)、(2:6:5)、(3:6:2)、(3:6:3)、  
 (3:6:4)、(3:6:5)、(4:6:2)、(4:6:3)、(4:6:4)、(4:6:5)、(5:6:2)、(5:6:3)、(5:6:4)及  
 (5:6:5)。

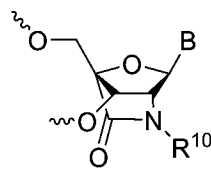
【0055】 在一些實施例中，5'-翼區包含一個或多個鎖定核苷或 2'位經取代之核苷。在一些實施例中，3'-翼區包含一個或多個鎖定核苷或 2'位經取代之核苷。在一些實施例中，中心區域包含一個或多個鎖定核苷或 2'位經取代之核苷。在一些實施例中，5'-翼區、3'-翼區、中心區域或其組合包含一個或多個(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 個)鎖定核苷或 2'位經取代之核苷。鎖定核苷可在糖之 4'與 2'位之間含有橋，其中該橋包含 2 至 4 個視情況經取代之原子。舉例而言，LNA 核苷為：



。其他例示性鎖定核苷包括以下：

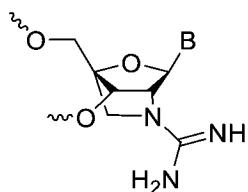


(ScpBNA 或「cp」)；

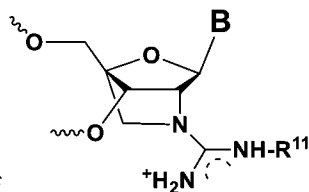


(AmNA，當 R<sup>10</sup> 為 H 時；

AmNA(N-Me)，當 R<sup>10</sup> 為 CH<sub>3</sub> 時；AmNA(N-烷基)，當 R<sup>10</sup> 為 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基時)；



(GuNA)；或



(GuNA (N-R<sup>11</sup>))；其中 B 為核鹼

基；R<sup>10</sup>為 H 或 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基；且 R<sup>11</sup>為 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基。在某些實施例中，5'-翼區中之所有核苷皆為鎖定核苷。在一些實施例中，3'-翼區中之所有核苷皆為鎖定核苷。在一些實施例中，3'-翼區包含 LNA 及選自 ScpBNA、AmNA 及 GuNA 之一個或兩個核苷。在一些實施例中，5'-翼區皆均為 LNA，且 3'-翼區含有 LNA 及選自 ScpBNA、AmNA 及 GuNA 之一個或兩個核苷。PCT/JP2010/068409、PCT/JP2013/075370、PCT/JP2015/054308、PCT/JP2018/006061 及/或 PCT/JP2018/006062 中包括其他核苷酸，該等文獻以全文引用之方式併入。Gutb 及 Nmln 為鎖定核苷酸之其他實例，其可納入 5'-翼區或 3'-翼區或兩者中。

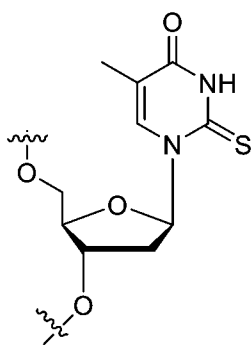
**【0056】** 在一些實施例中，ASO 之 5'-翼區包含 2 至 6 個經硫代磷酸酯連接之鎖定核苷、經甲磺醯基胺基磷酸酯連接之鎖定核苷或其組合。在一些實施例中，5'-翼區包含 2 至 6 個經硫代磷酸酯連接之 2'位取代核苷、經甲磺醯基胺基磷酸酯連接之 2'位取代核苷或其組合。在一些實施例中，5'-翼區包含至少一個鎖定核苷及至少一個 2'位取代核苷，其中該鎖定核苷與該 2'位取代核苷藉由硫代磷酸酯連接子或甲磺醯基胺基磷酸酯連接子連接。在一些實施例中，5'-翼區進一步包含 RNA 核苷或 DNA 核苷，其中 RNA 核苷及 DNA 核苷不為鎖定核苷或 2'位取代核苷。在一些實施例中，5'-翼區中的至少兩個核苷藉由硫代磷酸酯連接子或甲磺醯基胺基磷酸酯連接子連接。在一些實施例中，5'-翼區中的至少 2、3、4、5 或 6 個核苷藉由硫代磷酸酯連接子、甲磺醯基胺基磷酸酯連接子或其組合連接。

**【0057】** 在一些實施例中，ASO 之 3'-翼區包含 2 至 6 個經硫代磷酸酯連接之鎖定核苷、經甲磺醯基胺基磷酸酯連接之鎖定核苷或其組合。在一些實施例中，3'-翼區包含 2 至 6 個經硫代磷酸酯連接之經取代核苷、經甲磺醯基胺基磷酸酯連接之經取代核苷或其組合。在一些實施例中，3'-翼區包含至少一個鎖定核苷及至少一個 2'位取代核苷，其中該鎖定核苷及該 2'位取代核苷藉由硫代磷

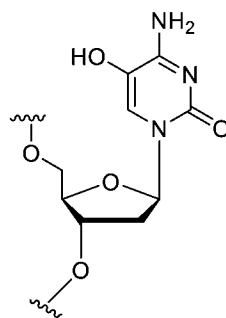
酸酯連接子或甲磺醯基胺基磷酸酯連接子連接。在一些實施例中，3'-翼區進一步包含 RNA 核苷或 DNA 核苷，其中 RNA 核苷及 DNA 核苷不為鎖定核苷或 2' 位取代核苷。在一些實施例中，3'-翼區中的至少兩個核苷藉由硫代磷酸酯連接子或甲磺醯基胺基磷酸酯連接子連接。在一些實施例中，3'-翼區中的至少 2、3、4、5 或 6 個核苷藉由硫代磷酸酯連接子、甲磺醯基胺基磷酸酯連接子或其組合連接。

【0058】 在一些實施例中，5'-翼區及/或 3'-翼區中的一或多個核苷酸包含硫代磷酸酯核苷間鍵聯或甲磺醯基胺基磷酸酯核苷間鍵聯。在一些實施例中，5'-翼區中之所有核苷酸均包含硫代磷酸酯核苷間鍵聯。在一些實施例中，3'-翼區中之所有核苷酸均包含硫代磷酸酯核苷間鍵聯。在一些實施例中，5'-翼區中的所有核苷酸包含甲磺醯基胺基磷酸酯核苷間鍵聯。在一些實施例中，3'-翼區中的所有核苷酸包含甲磺醯基胺基磷酸酯核苷間鍵聯。

【0059】 在一些實施例中，中心區域包括一個或多個具有經修飾之核鹼基的經修飾之核苷酸。舉例而言，中心區域可包括至少 1 個、至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個或至少 5 個或更多個 Gutb、Nmln、5prnl、G 形夾或其組合。在一些實施例中，中心區域包含至少 1 個、至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個或至少 5 個或更多個 5prnl、G 形夾或其組合。另外或可替代地，中心區域可包括一個或多個具有以下結構的經修飾之核苷酸：

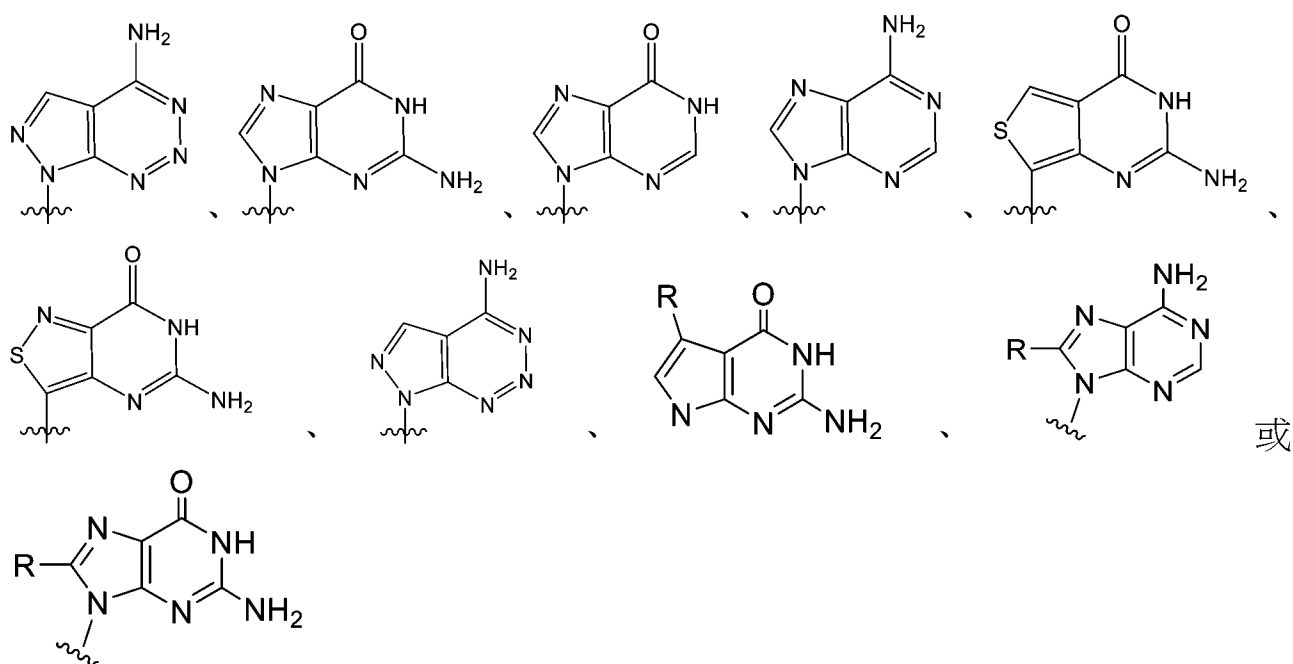


(「(2s)T」)、



(「(5OH)C」)、





其中：

R 為鹵素或  $R'-C\equiv C-$ ；且

R'表示  $C_{6-12}$  芳基、5 員至 12 員雜芳基、羥基- $C_{1-6}$  烷基，或  $C_{1-7}$  烷醯基氧基。在一些實施例中， $C_{1-7}$  烷醯基包括(但不限於)甲醯基、乙醯基、乙基羰基、正丙基羰基、異丙基羰基、正丁基羰基、異丁基羰基、三級丁基羰基、正戊基羰基及正己基羰基。其他經修飾之核苷酸包括 PCT/JP2018/006061 中之經修飾之核苷酸，其以全文引用之方式併入本文中。

**【0060】** 如本文所用，除非另外指示，否則「芳基」係指具有完全非定域  $\pi$  電子系統之碳環狀(全碳)環。「芳基」可由兩個或更多個稠環(共享兩個相鄰碳原子之環)構成。當芳基為稠環系統時，則連接至分子之其餘部分之環具有完全非定域  $\pi$  電子系統。稠環系統中之其他環可具有或可不具有完全非定域  $\pi$  電子系統。芳基之實例包括不限於苯、萘及藜之基團。

**【0061】** 如本文所用，除非另外指示，否則「雜芳基」係指具有完全非定域  $\pi$  電子系統且在環中含有獨立地選自由氮、氧及硫組成之群的一個或多個雜原子(例如一至三個雜原子、或一至四個雜原子或一至五個雜原子)的環。「雜芳

基」可由兩個或更多個稠合環(共享兩個相鄰碳原子之環)構成。當雜芳基為稠環系統時，連接至分子之其餘部分之環具有完全非定域  $\pi$  電子系統。稠環系統中之其他環可具有或不具有完全非定域  $\pi$  電子系統。雜芳基環之實例包括不限於呋喃、噻吩、吡咯、嘔唑、噻唑、咪唑、吡唑、異嘔唑、異噻唑、三唑、噻二唑、吡啶、嗒吡、嘧啶、吡吡及三吡。

**【0062】** 在一些實施例中，ASO 中心區域包含至少 5 個經硫代磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷、至少 5 個經甲磺醯基胺基磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷或其組合。在一些實施例中，中心區域中的至少 2、3、4、5 或 6 個核苷藉由硫代磷酸酯連接子、甲磺醯基胺基磷酸酯連接子或其組合連接。在一些實施例中，中心區域的 DNA 核苷藉由硫代磷酸酯連接子或甲磺醯基胺基磷酸酯連接子連接至 5'-翼區的核苷。在一些實施例中，中心區域的 DNA 核苷藉由硫代磷酸酯連接子或甲磺醯基胺基磷酸酯連接子連接至 3'-翼區的核苷。在一些實施例中，中心區域包含 8 至 10 個經硫代磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷、8 至 10 個經甲磺醯基胺基磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷或其組合。

**【0063】** 在一些實施例中，ASO 與始於 HBV 之 X 區或 HBV 之 S 區的病毒目標 RNA 序列互補或雜交。病毒目標可例如始於 acc.KC315400.1 (基因型 B, 「gt B」) 中或基因型 A、C 或 D 中之任一者中之靶點的 5'端。熟習此項技術者應瞭解 HBV 位置，例如如 Wing-Kin Sung 等人, *Nature Genetics* 44:765 (2012) 中所述。在一些實施例中，S 區定義為小 S 蛋白之起點(在基因型 B KC315400.1 分離株中，位置#155)直至 X 蛋白之起點前(在基因型 B KC315400.1 分離株中，位置#1373)。在一些實施例中，X 區定義為自 X 蛋白(在基因型 B KC315400.1 分離株中，位置#1374)之起點直至 DR2 位點之終點(在基因型 B KC315400.1 分離株中，位置#1603)。

**【0064】** 在一些實施例中，ASO 與病毒目標 RNA 序列互補或雜交，該病

毒目標 RNA 序列包含至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個位於 SEQ ID NO: 89 之位置 100-800 或 1050-1700 內的鄰接核苷酸、由該等鄰接核苷酸組成或主要由該等鄰接核苷酸組成。在一些實施例中，ASO 與病毒目標 RNA 序列互補或雜交，該病毒目標 RNA 序列包含 5 至 15、5 至 14、5 至 13、5 至 12、5 至 11、5 至 10、5 至 9、5 至 8、6 至 15、6 至 14、6 至 13、6 至 12、6 至 11、6 至 10、7 至 15、7 至 14、7 至 13、7 至 12 或 7 至 11 個位於 SEQ ID NO: 89 之位置 100-800 或 1050-1700 內的鄰接核苷酸、由該等鄰接核苷酸組成或主要由該等鄰接核苷酸組成。在一些實施例中，ASO 與病毒目標 RNA 序列互補或雜交，該病毒目標 RNA 序列包含至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個位於 SEQ ID NO: 89 之位置 180 至 280、300 至 450、650 至 775、1125 至 1300 或 1400 至 1650 內的鄰接核苷酸、由該等鄰接核苷酸組成或主要由該等鄰接核苷酸組成。在一些實施例中，ASO 與病毒目標 RNA 序列互補或雜交，該等病毒目標 RNA 序列包含至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個位於 SEQ ID NO: 89 之位置 180 至 215、230 至 270、350 至 420、675 至 730、1165 至 1210、1245 至 1290、1400 至 1480 或 1500 至 1630 內的鄰接核苷酸、由該等鄰接核苷酸組成或主要由該等鄰接核苷酸組成。在一些實施例中，ASO 與病毒目標 RNA 序列互補或雜交，該病毒目標 RNA 序列包含至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個始於以下位置的鄰接核苷酸、由該等鄰接核苷酸組成或主要由該等鄰接核苷酸組成：SEQ ID NO: 89 之位置 191、245、246、276、376、377、381、383、694、700、1182、1261、1262、1408、1410、1426、1431、1432、1433、1435、1438、1441、1443、1513、1516、1517、1518、1519、1520、1521、1522、1527、1559、1575、1576、1577、1580、1581、1582 或 1589。在一些實施例中，ASO 與病毒目標 RNA 序列完全互補。在一些實施例中，在 ASO 與病毒目標序列之間存在小於或等於 5、4、3、2 或 1

個錯配。在一些實施例中，在 ASO 與病毒目標序列之間存在小於或等於 2 個錯配。在一些實施例中，在 ASO 與病毒目標序列之間存在小於或等於 1 個錯配。在一些實施例中，錯配存在於 ASO 之翼區中。在一些實施例中，錯配存在於 ASO 之 5'翼區中。在一些實施例中，錯配存在於 ASO 之 3'翼區中。在一些實施例中，錯配存在於 ASO 之中心區域中。

**【0065】** 在一些實施例中，中心區域與病毒目標 RNA 序列互補或雜交，該病毒目標 RNA 序列包含至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個位於 SEQ ID NO: 89 之位置 100-800 或 1050-1700 內的鄰接核苷酸、由該等鄰接核苷酸組成或主要由該等鄰接核苷酸組成。在一些實施例中，中心區域與病毒目標 RNA 序列互補或雜交，該病毒目標 RNA 序列包含 5 至 15、5 至 14、5 至 13、5 至 12、5 至 11、5 至 10、5 至 9、5 至 8、6 至 15、6 至 14、6 至 13、6 至 12、6 至 11、6 至 10、7 至 15、7 至 14、7 至 13、7 至 12 或 7 至 11 個位於 SEQ ID NO: 89 之位置 100-800 或 1050-1700 內的鄰接核苷酸、由該等鄰接核苷酸組成或主要由該等鄰接核苷酸組成。在一些實施例中，中心區域與病毒目標 RNA 序列互補或雜交，該等病毒目標 RNA 序列包含至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個位於 SEQ ID NO: 89 之位置 180 至 280、300 至 450、650 至 775、1125 至 1300 或 1400 至 1650 內的鄰接核苷酸、由該等鄰接核苷酸組成或主要由該等鄰接核苷酸組成。在一些實施例中，中心區域與病毒目標 RNA 序列互補或雜交，該病毒目標 RNA 序列包含至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個位於 SEQ ID NO: 89 之位置 180 至 215、230 至 270、350 至 420、675 至 730、1165 至 1210、1245 至 1290、1400 至 1480 或 1500 至 1630 內的鄰接核苷酸、由該等鄰接核苷酸組成或主要由該等鄰接核苷酸組成。在一些實施例中，中心區域與病毒目標 RNA 序列互補或雜交，該病毒目標 RNA 序列包含至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個始於以下位置的鄰接核苷

酸、由該等鄰接核苷酸組成或主要由該等鄰接核苷酸組成：SEQ ID NO: 89 之位置 191、245、246、276、376、377、381、383、694、700、1182、1261、1262、1408、1410、1426、1431、1432、1433、1435、1438、1441、1443、1513、1516、1517、1518、1519、1520、1521、1522、1527、1559、1575、1576、1577、1580、1581、1582 或 1589。在一些實施例中，中心區域與病毒目標 RNA 序列完全互補。在一些實施例中，中心區域與病毒目標序列之間存在小於或等於 5、4、3、2 或 1 個錯配。在一些實施例中，中心區域與病毒目標序列之間存在小於或等於 2 個錯配。在一些實施例中，中心區域與病毒目標序列之間存在小於或等於 1 個錯配。

**【0066】** 在一些實施例中，ASO 包含與選自表 1 中所列之序列的核苷酸序列至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或 100% 一致的核苷酸序列。

**【0067】** 在一些實施例中，本發明之 ASO 可具有與表 1 之 ASO 相差一個核苷的序列。在一些實施例中，本發明之 ASO 可具有與表 1 之 ASO 相差兩個核苷的序列。在一些實施例中，本發明之 ASO 可具有與表 1 之 ASO 相差三個核苷的序列。在一些實施例中，本發明之 ASO 可具有與表 1 之 ASO 相差四個核苷的序列。

**【0068】** 在一些實施例中，本發明之 ASO 可具有表 1 之序列，但中心區域中的一個 T 被(2s)T 置換，中心區域中的一個 C 被(5OH)C 置換，且/或中心區域中的一個 A 被(8nh)A 置換。在一些實施例中，本發明之 ASO 具有表 1 之序列，但在 5'翼部分中具有一個或兩個 ScpBNA、AmNA 或 GuNA。在一些實施例中，本發明之 ASO 可具有表 1 之序列，但在 3'翼部分中具有一個或兩個 ScpBNA、AmNA 或 GuNA。在一些實施例中，本發明之 ASO 可具有表 1 之序列，但該序列之 5'端附接有 mA 或 mU。在一些實施例中，本發明之 ASO 可具有表 1 之序

列，但該序列之 5'端、該序列之 3'端或該兩端均附接有 mA 或 mU，該序列連接至 GalNAc 衍生物(例如 GalNAc4，諸如 GalNAc4-(PS)2-p-，或 GalNAc6，諸如 GalNAc6-(PS)2-p-)，如本文中所詳述。

**【0069】** 在一些實施例中，ASO 包含與 SEQ ID NO: 1 至 88 中之任一者之核苷酸序列至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或 100%一致的核苷酸序列。

**【0070】** 在一些實施例中，本發明之 ASO 具有與 SEQ ID NO: 1-88 之任一核苷酸相差一個核苷的序列。在其他實施例中，ASO 具有與 SEQ ID NO: 1-88 之任一核苷酸相差 1、2、3 或 4 個核苷的序列。在一些實施例中，本發明之 ASO 具有 SEQ ID NO: 1-88 中之任一者的序列，但中心區域中之一個 T 被(2s)T 置換，中心區域中之一個 C 被(5OH)C 置換，且/或中心區域中之一個 A 被(8nh)A 置換。在一些實施例中，本發明之 ASO 具有 SEQ ID NO: 1-88 中之任一者的序列，但在 5'翼部分中具有一個或兩個 ScpBNA、AmNA 或 GuNA。在一些實施例中，本發明之 ASO 具有 SEQ ID NO: 1-88 中之任一者的序列，但在 3'翼部分中具有一個或兩個 ScpBNA、AmNA 或 GuNA。在一些實施例中，本發明之 ASO 具有 SEQ ID NO: 1-88 中之任一者的序列，但該序列之 5'端附接有 mA 或 mU。在一些實施例中，本發明之 ASO 具有 SEQ ID NO: 1-88 中之任一者的序列，但該序列之 5'端附接有 mA 或 mU，該序列連接至 GalNAc 衍生物(例如 GalNAc4，諸如 GalNAc4-(PS)2-p-，或 GalNAc6，諸如 GalNAc6-(PS)2-p-)，如本文中所詳述。

**【0071】** 目標 RNA 序列

**【0072】** 所揭示之 ASO 可如下減少目標 RNA 序列(例如目標基因)的表現：募集 RNA 酶 H 以使目標 RNA 序列的 RNA 轉錄本裂解及降解，降低 RNA 含量且從而降低由目標 RNA 序列編碼之蛋白質的含量。

【0073】出於本發明之目的，目標 RNA 序列可為細胞中的任何基因。在一些實施例中，目標基因為病毒基因。在一些實施例中，病毒基因來自 DNA 病毒。在一些實施例中，DNA 病毒為雙股 DNA (dsDNA) 病毒。在一些實施例中，dsDNA 病毒為嗜肝 DNA 病毒。在一些實施例中，嗜肝 DNA 病毒為 B 型肝炎病毒 (HBV)。在一些實施例中，HBV 係選自 HBV 基因型 A-J。在一些實施例中，病毒疾病係由 RNA 病毒引起。在一些實施例中，RNA 病毒為單股 RNA 病毒 (ssRNA 病毒)。在一些實施例中，ssRNA 病毒為正義單股 RNA 病毒 ((+)ssRNA 病毒)。在一些實施例中，(+)ssRNA 病毒為冠狀病毒。在一些實施例中，冠狀病毒為  $\beta$ -冠狀病毒。在一些實施例中， $\beta$ -冠狀病毒係選自由以下組成之群：嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 2 (SARS-CoV-2) (亦臨時稱為 2019 新型冠狀病毒，或 2019-nCoV)、人類冠狀病毒 OC43 (hCoV-OC43)、中東呼吸道症候群相關冠狀病毒 (MERS-CoV，亦臨時稱為 2012 新型冠狀病毒或 2012-nCoV) 及嚴重急性呼吸道症候群相關冠狀病毒 (SARS-CoV，亦稱為 SARS-CoV-1)。在一些實施例中， $\beta$ -冠狀病毒為 SARS-CoV-2，為 COVID-19 之病原體。一些例示性目標基因展示於本說明書結尾的表 6 中。

【0074】在一些實施例中，目標 RNA 序列係選自 HBV 之 S 基因或 X 基因。在一些實施例中，HBV 具有 SEQ ID NO: 90 之核苷酸序列中所示的基因體序列，其對應於以全文引用之方式併入的 GenBank 登錄號 U95551.1 之核苷酸序列。

【0075】例示性 HBV 基因體序列展示於與以全文引用之方式併入的 Genbank 登錄號 KC315400.1 對應的 SEQ ID NO: 89 中。SEQ ID NO: 89 之核苷酸 2307..3215,1..1623 對應於編碼聚合酶蛋白的聚合酶/RT 基因序列。SEQ ID NO: 89 之核苷酸 2848..3215,1..835 對應於編碼大 S 蛋白的 PreS1/S2/S 基因序列。SEQ ID NO: 89 之核苷酸 3205..3215,1..835 對應於編碼中等 S 蛋白之 PreS2/S 基

因序列。SEQ ID NO: 89 之核苷酸 155..835 對應於編碼小 S 蛋白的 S 基因序列。SEQ ID NO: 89 之核苷酸 1374..1838 對應於編碼 X 蛋白的 X 基因序列。SEQ ID NO: 89 之核苷酸 1814..2452 對應於編碼前核心/核心蛋白的 PreC/C 基因序列。SEQ ID NO: 89 之核苷酸 1901..2452 對應於編碼核心蛋白的 C 基因序列。HBV 基因體進一步包含病毒調控元件，諸如病毒啟動子(preS2、preS1、核心及 X)及增強子元件(ENH1 及 ENH2)。SEQ ID NO: 89 之核苷酸 1624..1771 對應於 ENH2。SEQ ID NO: 60 之核苷酸 1742..1849 對應於核心啟動子。SEQ ID NO: 89 之核苷酸 1818...3215,1..1930 對應於編碼核心蛋白及聚合酶蛋白的前基因體 RNA (pgRNA)。

**【0076】** 在一些實施例中，目標 RNA 序列係選自 SARS-CoV 之基因體。在一些實施例中，SARS-CoV 具有對應於以全文引用之方式併入的 Genbank 登錄號 NC\_004718.3 之核苷酸序列的基因體。

**【0077】** 在一些實施例中，目標 RNA 序列係選自 MERS-CoV 之基因體。在一些實施例中，MERS-CoV 具有對應於以全文引用之方式併入的 Genbank 登錄號 NC\_019843.3 之核苷酸序列的基因體。

**【0078】** 在一些實施例中，目標 RNA 序列係選自 hCoV-OC43 之基因體。在一些實施例中，hCoV-OC43 具有對應於以全文引用之方式併入的 Genbank 登錄號 NC\_006213.1 之核苷酸序列的基因體。

**【0079】** 在一些實施例中，目標 RNA 序列係選自 SARS-CoV-2 之基因體。在一些實施例中，SARS-CoV-2 具有對應於以全文引用之方式併入的 Genbank 登錄號 NC\_045512.2 之核苷酸序列的基因體序列。

**【0080】** 在一些實施例中，目標 RNA 序列可為任何羥基類固醇去氫酶基因。在任何實施例中，基因為羥基類固醇 17-β 去氫酶 13 (HSD17B13)。HSD17B13 具有 SEQ ID NO: 91 之核苷酸序列中所示的序列，該序列對應於

Genbank 登錄號 NM\_178135.5 之編碼序列的核苷酸序列(核苷酸 42 至 944)，其以全文引用的方式併入本文中。

【0081】 在一些實施例中，目標 RNA 序列與 SEQ ID NO: 91 內的核苷酸區域至少約 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 100%一致，但 SEQ ID NO: 91 中的胸腺嘧啶(Ts)被尿嘧啶(U)置換。在一些實施例中，第一核苷酸序列與 SEQ ID NO: 91 內之 15 至 30、15 至 25、15 至 23、15 至 22、15 至 21、17 至 25、17 至 23、17 至 22、17 至 21 或 19 至 21 個核苷酸至少約 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 100%一致。

【0082】 在一些實施例中，目標 RNA 序列參與肝臟代謝。在一些實施例中，目標 RNA 序列為電子傳輸鏈之抑制劑。在一些實施例中，目標基因編碼 MCJ 蛋白(MCJ/DnaJC15 或甲基化可控 J 蛋白)。在一些實施例中，MCJ 蛋白由 SEQ ID NO: 92 之 mRNA 序列編碼，其對應於以全文引用之方式併入的 GenBank 登錄號 NM\_013238.3 之核苷酸序列。

【0083】 在一些實施例中，目標 RNA 序列為 TAZ。在一些實施例中，TAZ 包含 SEQ ID NO: 93 之核苷酸序列，其對應於以全文引用之方式併入的 GenBank 登錄號 NM\_000116.5 之核苷酸序列。

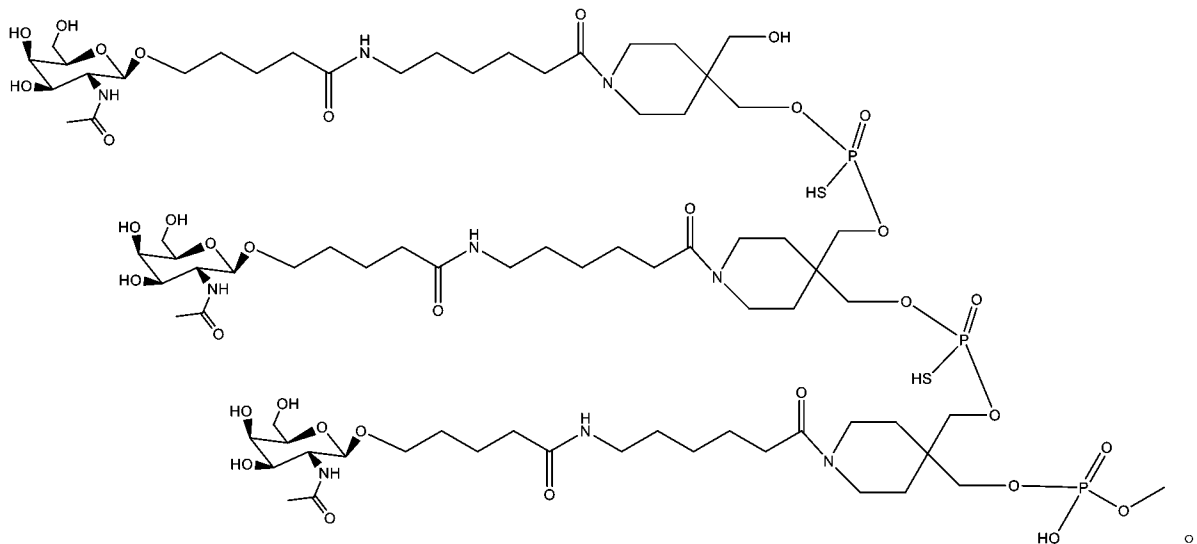
【0084】 在一些實施例中，目標 RNA 序列為血管生成素樣 3 (ANGPTL3)。在一些實施例中，ANGPTL3 包含 SEQ ID NO: 94 之核苷酸序列，其對應於以全文引用之方式併入的 GenBank 登錄號 NM\_014495.4 之核苷酸序列。

【0085】 在一些實施例中，目標 RNA 序列為二醯基甘油醯基轉移酶 2 (DGAT2)。在一些實施例中，DGAT2 包含 SEQ ID NO: 95 之核苷酸序列，其對應於以全文引用之方式併入的 GenBank 登錄號 NM\_001253891.1 之核苷酸序列。

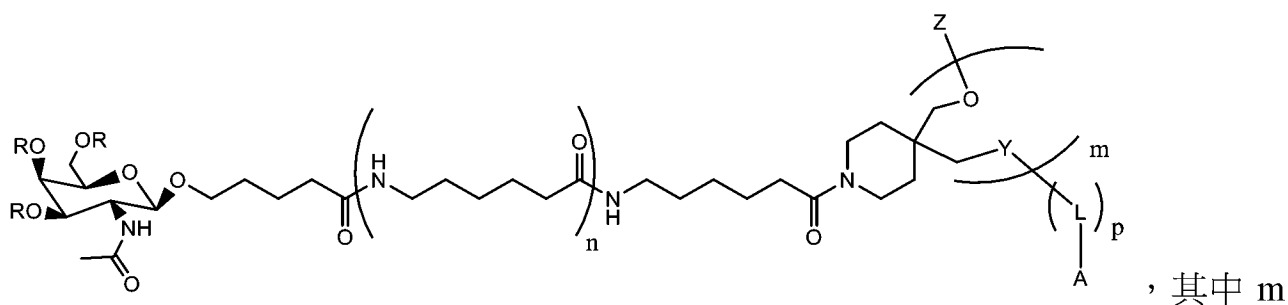
【0086】 結合部分

【0087】 本發明亦關於與 ASO 結合的其他組分，諸如靶向部分及在一端或多端經修飾之寡核苷酸。在一些實施例中，結合部分係選自半乳糖、肽、蛋白質、固醇、脂質、磷脂、生物素、啡啶、活性藥物物質、膽固醇、啡啶、蔥醌、吡啶、螢光素、若丹明(rhodamines)、香豆素、葉酸及染料。

【0088】 在一些實施例中，靶向部分可包含碳水化合物，諸如單醣，例如 *N*-乙醯基半乳糖(GalNAc)、雙醣、三醣、四醣、寡醣及多醣。在一些實施例中，靶向部分為一種或多種 GalNAc 衍生物，諸如經由一個或多個連接子與 ASO 連接之兩種或三種 GalNAc 衍生物，視情況呈連續結構。在某些實施例中，靶向部分包含經由連接子連接之三個連續 GalNAc 部分，諸如：

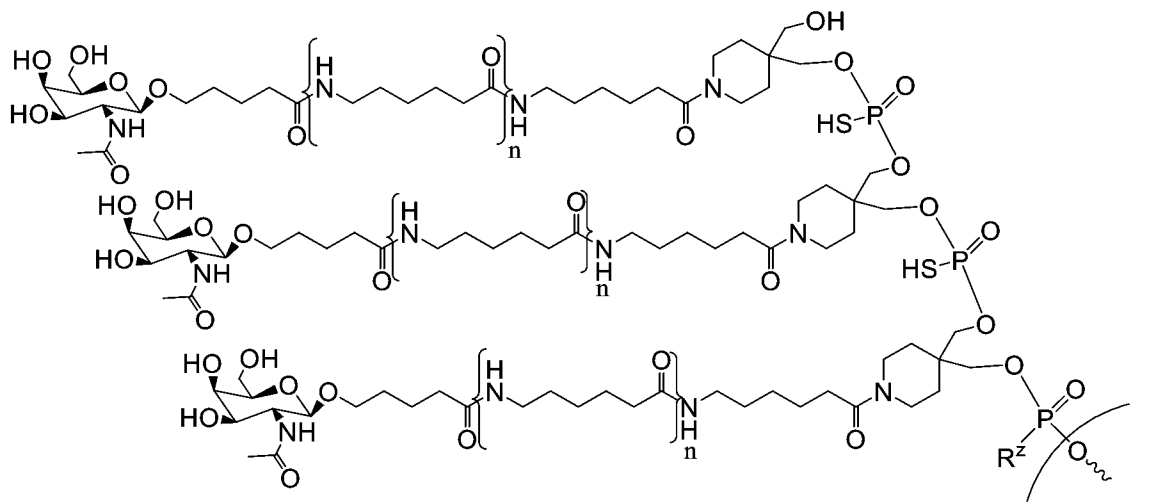


【0089】 在一些實施例中，結合部分為半乳糖。在一些實施例中，本文所揭示之任一種 ASO 連接至結合部分，亦即半乳糖。在一些實施例中，半乳糖為 *N*-乙醯基半乳糖(GalNAc)。在一些實施例中，本文所揭示之任一種 ASO 包含 GalNAc。在一些實施例中，GalNAc 具有式(VI)：



為 1、2、3、4、或 5；各  $n$  獨立地為 1 或 2； $p$  為 0 或 1；各  $R$  獨立地為  $H$  或第一保護基；各  $Y$  獨立地選自  $-O-P(=O)(SH)-$ 、 $-O-P(=O)(O)-$ 、 $-O-P(=O)(OH)-$ 、 $-O-P(S)S-$  及  $-O-$ ； $Z$  為  $H$  或第二保護基； $L$  為連接子或  $L$  與  $Y$  的組合為連接子；且  $A$  為  $H$ 、 $OH$ 、第三保護基、活化基團或寡核苷酸。在一些實施例中，第一保護基為乙醯基。在一些實施例中，第二保護基為三甲氧基三苯甲基(TMT)。在一些實施例中，活化基團為胺基亞磷酸酯基團。在一些實施例中，胺基亞磷酸酯基團為氰基乙氧基  $N,N$ -二異丙基胺基亞磷酸酯基團。在一些實施例中，連接子為  $C6-NH_2$  基團。在一些實施例中， $A$  為 ASO。在一些實施例中， $R$  為  $H$ ， $Z$  為  $H$ ，且  $n$  為 1。在一些實施例中， $R$  為  $H$ ， $Z$  為  $H$ ，且  $n$  為 2。

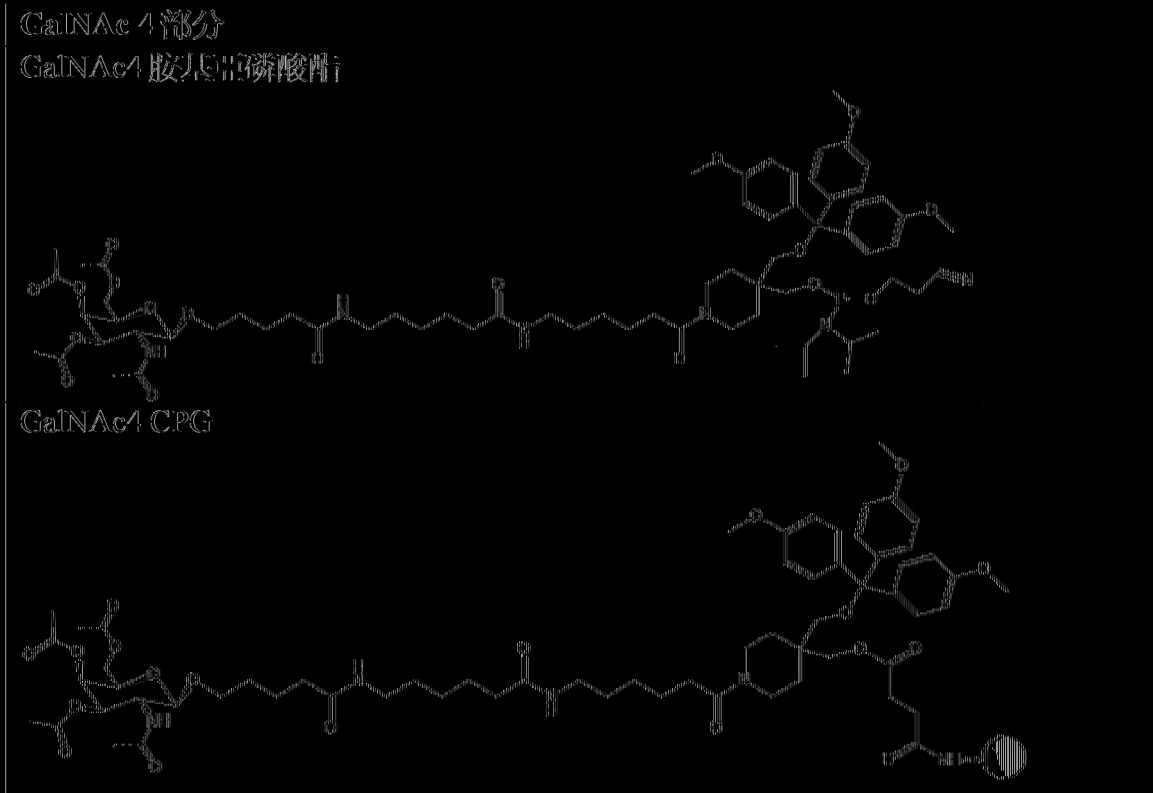
【0090】 在一些實施例中，GalNAc 為式(VII)：



其中  $R^z$  為  $OH$  或  $SH$ ；且各  $n$  獨立地為 1 或 2。在一些實施例中，靶向配位體可為 GalNAc 靶向配位體，可包含 1、2、3、4、5 或 6 個 GalNAc 單元。在一些實施例中，靶向配位體可為選自 GalNAc<sub>2</sub>、GalNAc<sub>3</sub>、GalNAc<sub>4</sub>、GalNAc<sub>5</sub>

及 GalNAc6 之 GalNAc。

(0091) 在一些實施例中，GalNAc 可為 GalNAc 單糖胺酯、GalNAc 4-CPG、GalNAc 胺基亞磷酸酯，或 GalNAc4-ps-GalNAc4-ps-GalNAc4。下文展示此等 GalNAc 部分：



(0092) GalNAc3、GalNAc4、GalNAc5 及 GalNAc6 可在與 1、2 或 3 個部分之合成期間與本文所揭示之 ASO 結合。諸如 GalNAc1 及 GalNAc2 之其他 GalNAc 部分可用以使用合成後結合來形成 5' 及 3' GalNAc。

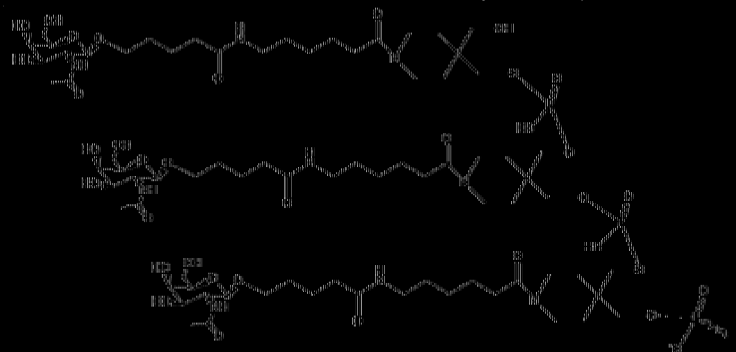
GalNAc 胺基亞磷酸酯  
GalNAc 構築片段

GalNAc 3 胺基亞磷酸酯

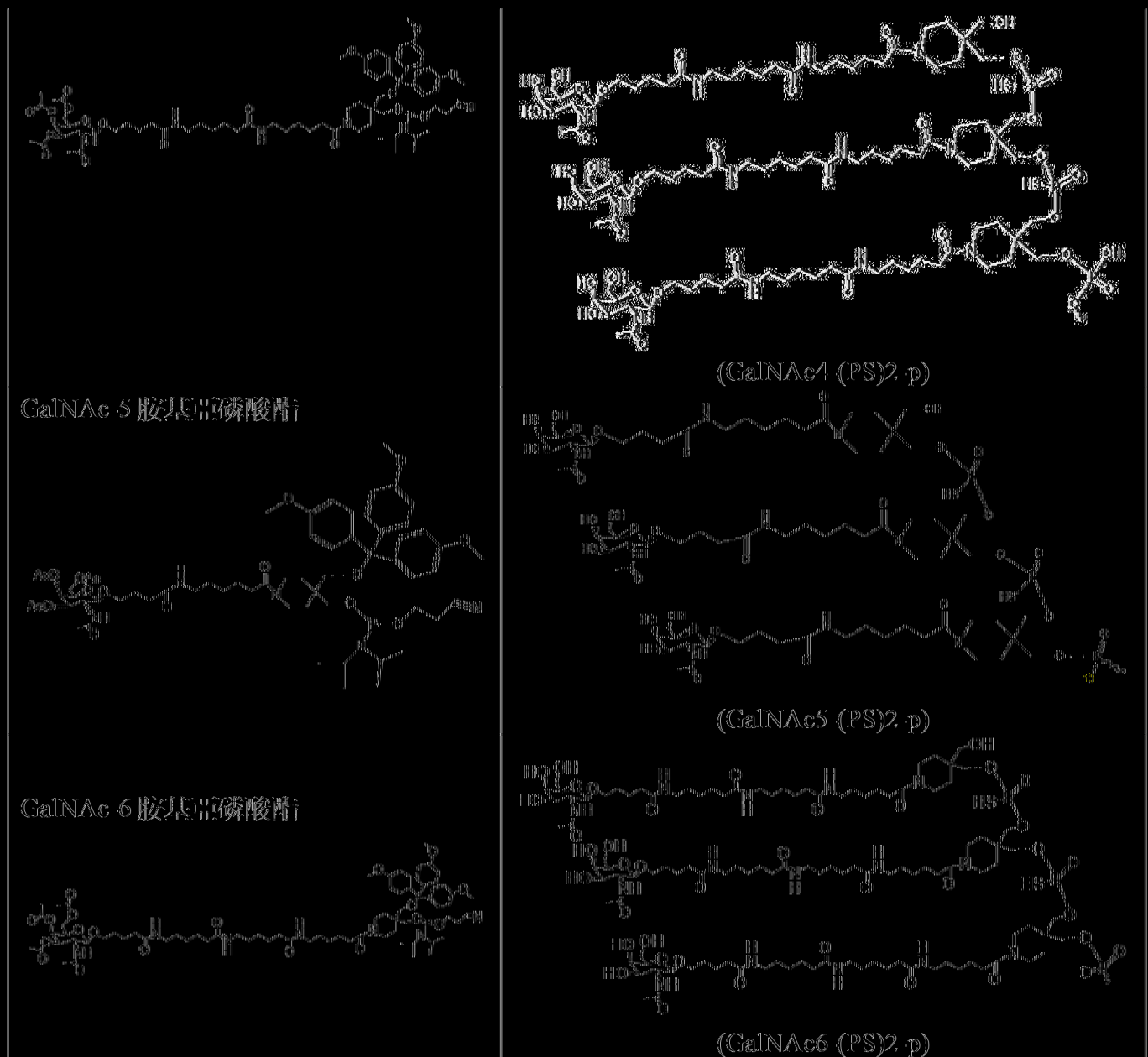


GalNAc 4 胺基亞磷酸酯

在與寡核苷酸連接之後(命名法)



(GalNAc3 (PS)<sub>2</sub>-p)



[0093] 在一些實施例中，ASO 在 ASO 之 5'端、3'端或兩端含有靶向部分。結合部分可經由 1、2、3、4 或 5 個或更多個連接子連接至 ASO。在一些實施例中，一個或多個連接子獨立地選自由以下組成之群：磷酸二酯(p 或 po)連接子、硫代磷酸酯(ps)連接子、甲磺醯基胺基磷酸酯連接子(yo)、胺基亞磷酸酯(HBG)連接子、三乙二醇(TEG)連接子及/或二硫代磷酸酯連接子。在一些實施例中，一個或多個連接子獨立地選自由以下組成之群：p (PS)<sub>2</sub>、(PS)<sub>2</sub> p、TEG-p、(PS)<sub>2</sub> p、HBG-p 及 (PS)<sub>2</sub> p (HBG-p)<sub>2</sub>。

[0094] 在一些實施例中，結合部分為脂質部分。在一些實施例中，本文

所揭示之任一種 ASO 連接至結合部分，亦即脂質部分。脂質部分之實例包括但不限於膽固醇部分、硫醚(例如己基-S-三苯甲基硫醇)、硫代膽固醇、脂族鏈(例如十二烷二醇或十一烷基殘基)、磷脂(例如二-十六烷基-外消旋-丙三醇或 1-二-O-十六烷基-外消旋-丙三醇-S-H-膦酸三乙銨)、多元胺或聚乙二醇鏈、金剛烷乙酸、棕櫚基部分或十八烷基胺或己胺基-羧基-氧基膽固醇部分。

【0095】 在一些實施例中，結合部分為活性藥物物質。在一些實施例中，本文所揭示之任一種 ASO 連接至結合部分，亦即活性藥物物質。活性藥物物質之實例包括但不限於阿司匹林(aspirin)、華法林(warfarin)、苯基丁氮酮(phenylbutazone)、布洛芬(ibuprofen)、舒洛芬(suprofen)、芬布芬(fenbufen)、酮洛芬(ketoprofen)、(5)-(+)-普拉洛芬(pranoprofen)、卡洛芬(carprofen)、丹磺醯基肌胺酸(dansylsarcosine)、2,3,5-三碘苯甲酸、氟芬那酸(flufenamic acid)、醛葉酸(folinic acid)、苯并噻二嗪(benzothiadiazide)、氯噻嗪(chlorothiazide)、二氮吡(diazepine)、吲哚美辛(indomethicin)、巴比妥酸鹽(barbiturate)、頭孢菌素(cephalosporin)、磺胺藥物、抗糖尿病劑、抗細菌劑或抗生素。

#### 【0096】 例示性 ASO

【0097】 如上文所述，本文所揭示之 ASO 可包含經修飾之核苷酸，諸如 Gutb、Nmln、5prnl、G 形夾或其組合。另外或可替代地，本文所揭示之 ASO 可包含至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯核苷間鍵聯。表 1 提供一些例示性 ASO，其包含經修飾之核苷酸，諸如 Gutb、Nmln、5prnl、G 形夾或其組合；至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯核苷間鍵聯(在序列中稱為「yp」)；或其組合。

**表 1 - 例示性 ASO 序列**

SEQ ID NO.	ASO #	序列 (5'至 3')
1	1	InGpslnApslnTpslnApslnAypApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C
2	2	InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C

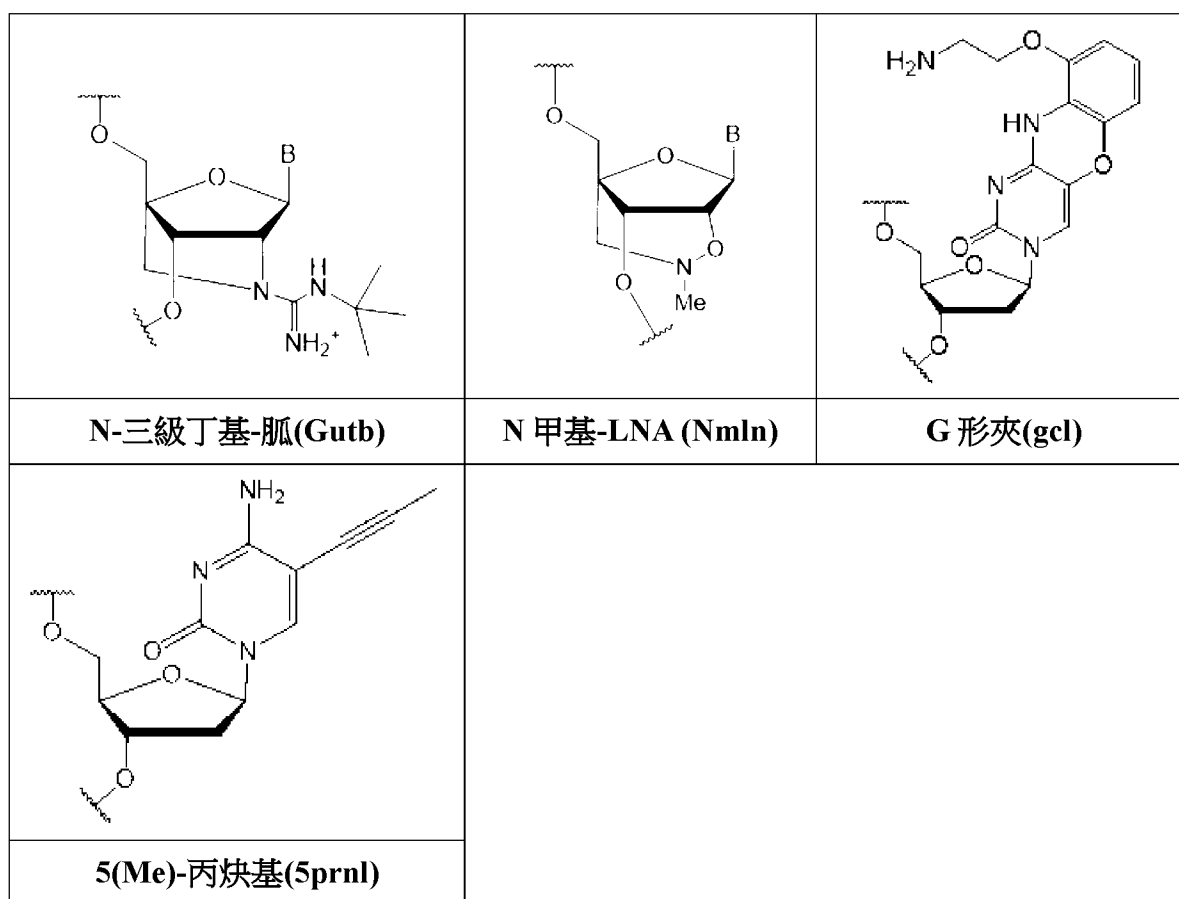
SEQ ID NO.	ASO #	序列 (5'至 3')
3	3	InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAyp(5oh)CypGyp(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C
4	4	InGpslnApslnTpslnApslnAypApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
5	5	InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
6	6	InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAyp(5oh)CypGyp(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
7	7	InGpslnApslnTps(Nmln)ApslnAypApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
8	8	InGpslnApslnTps(Nmln)ApslnAypAypAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
9	9	InGpslnApslnTps(Nmln)ApslnAypAypAyp(5m)CypGyp(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
10	10	InGpslnApslnTps(Nmln)ApslnAypAypAyp(5m)CypGyp(5m)Cyp(5m)CypGyp(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
11	11	InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAyp(5oh)CypGyp(5m)Cyp(5m)CypGyp(5m)CyplnApslnGpslnApscp(5m)C
12	12	InGpslnApslnTpslnApslnAypApsAyp(5oh)CpsGyp(5m)Cps(5m)CypGps(5m)CyplnApslnGpslnApscp(5m)C
13	13	InGypInAyplnTyplnAyplnAypApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnAyplnGypInAyep(5m)C
14	14	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAyp(5oh)CypGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C
15	15	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cyp(5m)CypGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C
16	16	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CypGyp(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C
17	17	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGyp(5m)CyplnApslnGpslnApscp(5m)C
18	18	InGpslnApsScTypdTps(5m)Cps(8Am)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
19	19	InGpslnApsScTypdTps(5m)Cps(8Am)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
20	20	InGpslnApsScTypdTps(5m)Cyp(8Am)AypGyp(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
21	21	InGpslnApsScTypdTps(5m)Cyp(8Am)AypGyp(5m)CypGyp(5m)Cyp(5m)CypGypApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
22	22	InGpslnApsScTypdTps(5m)Cyp(8Am)ApsGyp(5m)CpsGyp(5m)Cps(5m)CypGpsAypln(5m)CpslnGpslnGpslnG
23	23	GalNac4-ps2-p-mA- InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAyp(5oh)CypGyp(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C
24	24	GalNac4-ps2-p-mA- InGpslnApslnTpslnApslnAypAypAyp(5oh)CypGyp(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
25	25	InGpslnApslnTpsTps(gcl)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
26	26	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(gcl)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln

SEQ ID NO.	ASO #	序列 (5'至 3')
		n(5m)CpslnGpslnGpslnG
27	27	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps( <b>gcl</b> )Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
28	28	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps( <b>gcl</b> )CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
29	29	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps( <b>gcl</b> )CpslnGpslnGpslnG
30	30	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps( <b>gcl</b> )CpsGpsAps( <b>gcl</b> )CpslnGpslnGpslnG
31	31	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps( <b>gcl</b> )CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
32	32	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps( <b>gcl</b> )Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
33	33	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps( <b>gcl</b> )CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
34	34	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps( <b>gcl</b> )CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
35	35	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnAps( <b>gcl</b> )C
36	36	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps( <b>gcl</b> )CpslnApslnGpslnAps( <b>gcl</b> )C
37	37	lnGpslnApslnTpsTps( <b>5prnl</b> )CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
38	38	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps( <b>5prnl</b> )CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
39	39	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps( <b>5prnl</b> )Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
40	40	lnGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps( <b>5prnl</b> )CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
41	41	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps( <b>5prnl</b> )CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
42	42	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps( <b>5prnl</b> )Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
43	43	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps( <b>5prnl</b> )CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
44	44	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps( <b>5prnl</b> )CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
45	45	lnGps( <b>gutb</b> )ApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
46	46	lnGpslnAps( <b>gutb</b> )TpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
47	47	lnGpslnApslnTps( <b>gutb</b> )ApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
48	48	lnGpslnApslnTpslnAps( <b>gutb</b> )ApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
49	49	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)Cps( <b>gutb</b> )ApslnGpslnApsln(5m)C
50	50	lnGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGps( <b>gutb</b> )Apsln(5m)C

SEQ ID NO.	ASO #	序列 (5'至 3')
51	51	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnAps( <b>gutb</b> )(5m)C
52	52	InGps( <b>gutb</b> )ApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
53	53	InGpslnAps( <b>gutb</b> )TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
54	54	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps( <b>gutb</b> ) (5m)CpslnGpslnGpslnG
55	55	GalNac4-ps2-p-mA- InGps( <b>gutb</b> )ApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
56	56	GalNac4-ps2-p-mA- InGps( <b>gutb</b> )ApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
57	57	GalNac4-ps2-p-mA- InGps( <b>gutb</b> )ApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsep(5m)C
58	58	GalNac4-ps2-p-mA- InGps( <b>gutb</b> )ApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsep(5m)C
59	59	GalNac4-ps2-p-mA- InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
60	60	GalNac4-ps2-p-mA- InGpslnAps( <b>gutb</b> )TpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
61	61	GalNac4-ps2-p-mA- InGpslnAps( <b>gutb</b> )TpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
62	62	GalNac4-ps2-p-mA- InGpslnAps( <b>gutb</b> )TpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsep(5m)C
63	63	GalNac4-ps2-p-mA- InGpslnAps( <b>gutb</b> )TpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsep(5m)C
64	64	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsep(5m)C
65	65	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
66	66	( <b>Nmln</b> )AGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
67	67	InGps( <b>Nmln</b> )ApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
68	68	InGpslnAps( <b>Nmln</b> )TpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
69	69	InGpslnApslnTps( <b>Nmln</b> )ApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
70	70	InGpslnApslnTpslnAps( <b>Nmln</b> )ApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C

SEQ ID NO.	ASO #	序列 (5'至 3')
71	71	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)Cps(Nmln)ApslnGpslnApsln(5m)C
72	72	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnAps(Nmln)GpslnApsln(5m)C
73	73	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGps(Nmln)Apsln(5m)C
74	74	InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnAps(Nmln) (5m)C
75	75	InGpslnApscpTpsTps(5m)Cps(8nh)ApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
76	76	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
77	77	(Nmln)GpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
78	78	InGps(Nmln)ApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
79	79	InGpslnAps(Nmln)TpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGpslnG
80	80	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGpslnGps(Nmln)G
81	81	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)CpslnGps(Nmln)GpslnG
82	82	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsApsln(5m)Cps(Nmln)GpslnGpslnG
83	83	InGpslnApslnTpsTps(5m)CpsApsGps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGpsAps(Nmln)(5m)CpslnGpslnGpslnG
84	84	GalNAc4-ps2-p-mA-InGpslnApslnTps(Nmln)ApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
85	85	GalNAc4-ps2-p-mA-InGpslnApslnTps(Nmln)ApslnApsApsAps(5OH)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
86	86	GalNAc4-ps2-p-mA-InGpslnApslnTpslnApslnApsApsAps(5m)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApsln(5m)C
87	87	GalNAc4-ps2-p-mA-InGpslnApslnTps(Nmln)ApslnApsApsAps(5OH)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CpslnApslnGpslnApscp(5m)C-3'
88	88	InGyplnAyplnTyplnAyplnAypApsAps(5oh)CpsGps(5m)Cps(5m)CpsGps(5m)CyplnAyplnGyplnAypcp(5m)C

【0098】 在表 1 中，粗體核苷含有以下修飾之一：



**【0099】 醫藥組合物**

**【0100】** 本發明亦涵蓋包含本發明之 ASO 的醫藥組合物。一個實施例為醫藥組合物，其包含本發明之一種或多種 ASO 及醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。

**【0101】** 在一些實施例中，含有本發明之 ASO 的醫藥組合物經調配以便經由非經腸遞送來全身性投與。非經腸投與包括靜脈內、動脈內、皮下、腹膜內或肌肉內注射或輸注；以及真皮下投與，例如經由植入裝置。在一較佳實施例中，含有本發明之 ASO 的醫藥組合物經調配以便皮下(SC)或靜脈內(IV)遞送。非經腸投與之調配物可包括無菌水溶液，其亦可含有緩衝劑、稀釋劑及如熟習此項技術者所瞭解之其他醫藥學上可接受之添加劑。對於靜脈內使用而言，可控制溶質之總濃度以使得製劑具等張性。

**【0102】** 含有本發明之 ASO 的醫藥組合物適用於治療例如與 HBV 基因之

表現或活性相關的疾病或病症。

**【0103】** 在一些實施例中，醫藥組合物包含：本發明之第一 ASO，其與 HBV 之第一 X 區中的病毒目標 RNA 序列互補或雜交；及本發明之第二 ASO，其與 HBV 之第二 X 區或 S 區中的病毒目標 RNA 序列互補或雜交；及醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑。當醫藥組合物包含兩種或更多種 ASO 時，ASO 可以不同量存在。舉例而言，在一些實施例中，第一 ASO 與第二 ASO 之重量比為 1:4 至 4:1，例如 1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1 或 4:1。在一些實施例中，第一 ASO 與第二 ASO 之莫耳比為 1:4 至 4:1，例如 1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1 或 4:1。

#### **【0104】 療法**

**【0105】** 可向個體投與本文所述之 siNA 分子及組合物以治療疾病。本文進一步揭示本文所揭示之任一種 siRNA 分子或組合物用於製造供治療疾病用之藥劑的用途。特定而言，本發明提供用於治療不同疾病(諸如感染性疾病，包括但不限於病毒性疾病及肝病)的 ASO。

**【0106】** 本發明之一個範疇包括治療經診斷患有、懷疑患有 HBV 感染及/或 HBV 相關病症或處於 HBV 感染及/或 HBV 相關病症風險中之個體的方法。在治療應用中，包含至少一種所揭示之 ASO 的組合物以足以治癒或至少部分地阻滯此類疾病(包括其併發症及疾病發展中的中間病理學表型)的量投與懷疑或已經罹患該疾病的個體(諸如個體之血清及/或肝臟中持久存在 HBV cccDNA、存在 HBV 抗原(例如 HBsAg 及/或 HBeAg)，或 HBV 病毒載量升高)。

**【0107】** 可藉由此項技術中已知之任何診斷或預後分析或其組合來鑑別罹患 HBV 感染及/或 HBV 相關病症之個體。舉例而言，HBV 感染及/或 HBV 相關病症的典型症狀包括但不限於存在肝臟 HBV cccDNA、存在血清及/或肝臟 HBV 抗原(例如 HBsAg 及/或 HBeAg)、ALT 升高、AST 升高、抗 HBV 抗體不存在或含量低、肝臟損傷、肝硬化、 $\delta$  肝炎、急性 B 型肝炎、急性爆發性 B 型肝炎、

慢性 B 型肝炎、肝纖維化、末期肝臟疾病、肝細胞癌、血清疾病樣症候群、厭食症、噁心、嘔吐、低度發熱、肌痛、疲勞、味覺敏銳度及嗅覺障礙(厭食及厭惡香菸)、右上象限及上腹疼痛(間歇性、輕度至中度)、肝性腦病變、嗜睡、睡眠模式紊亂、心智混亂、昏迷、腹水、胃腸出血、凝血病、黃疸、肝腫大(輕度腫大、軟肝)、脾腫大、掌紅斑、蜘蛛痣、肌肉萎縮、蛛狀血管瘤、血管炎、靜脈曲張出血、周邊水腫、男子乳症、睪丸萎縮、腹部側支靜脈(臍周靜脈曲張(caput medusa))、丙胺酸轉胺酶(ALT)及天冬胺酸轉胺酶(AST)含量高(在 1000 至 2000 IU/mL 範圍內)、ALT 含量高於 AST 含量、 $\gamma$ -麩胺醯基轉胺酶(GGT)及/或鹼性磷酸酶(ALP)含量升高、白蛋白含量降低血清鐵含量升高、白血球減少症(亦即，顆粒球減少症)、淋巴球增多症、紅血球澱積速率(ESR)增加、紅血細胞存活期縮短、溶血、血小板減少症、國際標準化比值(INR)延長、存在血清 HBV DNA、胺基轉移酶升高(<5 倍的 ULN)、膽紅素含量增加、凝血酶原時間(PT)延長、高球蛋白血症、存在組織非特異性抗體(諸如抗平滑肌抗體(ASMA)或抗核抗體(ANA))、存在組織特異性抗體(諸如針對甲狀腺的抗體)、類風濕性因子(RF)含量升高、高膽紅素血症、低血小板及白血細胞計數、AST 含量高於 ALT 含量、小葉發炎伴變性及再生肝細胞變化，以及以小葉中心為主的壞死。

**【0108】** 在一些實施例中，經所揭示之 ASO 治療的個體將顯示以下病狀或症狀中之一者或多者的改善或消除：存在肝臟 HBV cccDNA、存在血清及/或肝臟 HBV 抗原(例如 HBsAg 及/或 HBeAg)、抗 HBV 抗體不存在或含量低、肝臟損傷、肝硬化、 $\delta$  肝炎、急性 B 型肝炎、急性爆發性 B 型肝炎、慢性 B 型肝炎、肝纖維化、末期肝臟疾病、肝細胞癌、血清疾病樣症候群、厭食症、噁心、嘔吐、低度發熱、肌痛、疲勞、味覺敏銳度及嗅覺障礙(厭食及厭惡香菸)、右上象限及上腹疼痛(間歇性、輕度至中度)、肝性腦病變、嗜睡、睡眠模式紊亂、心智混亂、昏迷、腹水、胃腸出血、凝血病、黃疸、肝腫大(輕度腫

大、軟肝)、脾腫大、掌紅斑、蜘蛛痣、肌肉萎縮、蛛狀血管瘤、血管炎、靜脈曲張出血、周邊水腫、男子女乳症、睪丸萎縮、腹部側支靜脈(臍周靜脈曲張)、ALT 含量高於 AST 含量、白血球減少症(亦即，顆粒球減少症)、白蛋白含量降低、血清鐵含量升高、淋巴球增多症、紅血球澱積速率(ESR)增加、紅血細胞存活期縮短、溶血、血小板減少症、國際標準化比值(INR)延長、存在血清 HBV DNA、凝血酶原時間(PT)延長、高球蛋白血症、存在組織非特異性抗體(諸如抗平滑肌抗體(ASMA)或抗核抗體(ANA))、存在組織特異性抗體(諸如針對甲狀腺的抗體)、高膽紅素血症、低血小板及白血細胞計數、AST 含量高於 ALT 含量、小葉發炎伴變性及再生肝細胞變化，以及以小葉中心為主的壞死。

**【0109】** 本發明提供一種用於治療經診斷患有或懷疑患有 HBV 感染及/或 HBV 相關病症之個體的方法，其包含向該個體投與有效量之本發明的 ASO 組合物。在一些實施例中，方法包含向該個體投與本發明之第一 ASO 及本發明之第二 ASO，其中該第一 ASO 與 HBV 之第一 X 區中的病毒目標 RNA 序列互補或雜交，且該第二 ASO 與 HBV 之第二 X 區或 S 區中的病毒目標 RNA 序列互補或雜交。在一些實施例中，第二 ASO 與 HBV 之第二 X 區中的病毒目標 RNA 序列互補或雜交。在其他實施例中，第二 ASO 與 HBV 之 S 區中的病毒目標 RNA 序列互補或雜交。

**【0110】** 在所揭示之方法及用途的一些實施例中，疾病為呼吸道疾病。在一些實施例中，呼吸道疾病為病毒感染。在一些實施例中，呼吸道疾病為病毒性肺炎。在一些實施例中，呼吸道疾病為急性呼吸道感染。在一些實施例中，呼吸道疾病為感冒。在一些實施例中，呼吸道疾病為嚴重急性呼吸道症候群(SARS)。在一些實施例中，呼吸道疾病為中東呼吸道症候群(MERS)。在一些實施例中，疾病為冠狀病毒疾病 2019 (例如 COVID-19)。在一些實施例中，呼吸道疾病可包括一個或多個選自以下之症狀：咳嗽、喉嚨痛、流鼻涕、打噴

嚏、頭痛、發熱、呼吸短促、肌痛、腹痛、疲勞、呼吸困難、持續性胸部疼痛或壓力、喚醒困難、嗅覺及味覺喪失、肌肉或關節疼痛、發冷、噁心或嘔吐、鼻塞、腹瀉、咯血、結膜充血、產痰、胸悶及心悸。在一些實施例中，呼吸道疾病可包括選自以下之併發症：鼻竇炎、中耳炎、肺炎、急性呼吸窘迫症候群、彌散性血管內凝血、心包炎及腎衰竭。在一些實施例中，呼吸道疾病為特發性的。

**【0111】** 在一些實施例中，本發明提供治療或預防冠狀病毒感染之方法，其包含向有需要之個體投與治療有效量之一種或多種 ASO 或如本文所揭示的醫藥組合物。在一些實施例中，冠狀病毒感染係選自由以下組成之群：中東呼吸道症候群(MERS)、嚴重急性呼吸道症候群(SARS)及 COVID-19。在一些實施例中，個體已用一種或多種另外的冠狀病毒治療劑治療。在一些實施例中，個體同時用一種或多種另外的冠狀病毒治療劑治療。

**【0112】** 在一些實施例中，疾病為肝病。在一些實施例中，肝病為非酒精性脂肪肝病(NAFLD)。在一些實施例中，NAFLD 為非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)。在一些實施例中，肝病為肝細胞癌(HCC)。

**【0113】** 本發明之 ASO 可用於治療有需要之個體的疾病。在一些實施例中，治療有需要之個體之疾病的方法包含向該個體投與本文所揭示之任一種 ASO。在一些實施例中，治療有需要之個體之疾病的方法包含向個體投與本文所揭示之任一種組合物。

**【0114】** 可藉由此項技術中已知之方法來投與 ASO。在一些實施例中，藉由皮下(SC)或靜脈內(IV)遞送來投與 ASO。本發明之之製劑(例如 ASO 或組合物)可經口、非經腸、外用或直腸給予。其當然以適合於各種投與途徑之形式給與。舉例而言，其如下投與：以錠劑或膠囊形式，藉由注射、輸注或吸入投與；以洗劑或軟膏形式外用投與；及以栓劑形式直腸投與。在一些實施例中，

皮下投與較佳。

【0115】如本文所用，片語「非經腸投藥(parenteral administration)」及「非經腸投與(administered parenterally)」意謂除經腸及外用投藥之外的投藥模式，通常為注射，且包括不限於靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊柱內及胸骨內注射及輸注。

【0116】如本文所用，片語「全身性投與」及「周邊投與」意謂除直接投與中樞神經系統中以外，投與化合物、藥物或其他材料，使得其進入患者之系統且因此經受代謝及其他類似過程，例如皮下投與。

【0117】此等化合物可藉由任何適合投藥途徑投與人類及其他動物以供治療，包括經口、鼻(如藉由例如噴霧劑)、直腸、陰道內、非經腸、腦池內及外用，如藉由散劑、軟膏或滴劑，包括頰內及舌下。

【0118】不論所選投與途徑，本發明之化合物(例如 ASO) (其可以適合的水合形式及/或本發明之醫藥組合物使用)均藉由熟習此項技術者已知之習知方法調配成醫藥學上可接受的劑型。

【0119】可改變本發明之醫藥組合物中活性成分的實際劑量水準，以使得活性成分的量針對特定患者、組合物及投與模式有效地達成所需治療反應而對患者無毒性。

【0120】所選劑量水準將視多種因素而定，包括所用的本發明特定化合物(例如 ASO)或其酯、鹽或醯胺的活性、投藥途徑，投藥時間、所用特定化合物之排泄或代謝速率、吸收速率及程度、治療持續時間、與所用特定化合物組合使用之其他藥物、化合物及/或材料、所治療患者之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前病史，以及醫學技術中熟知之類似因素。

【0121】一般熟習此項技術之醫師或獸醫可容易判定及開具所需醫藥組合

物之有效量。舉例而言，醫師或獸醫可使醫藥組合物中所用之本發明化合物(例如 ASO)的起始劑量水平低於為了達成所需治療作用而必需的水平，且逐漸增加劑量直至達成所需作用。

**【0122】** 一般而言，本發明化合物(例如 ASO)之適合日劑量為有效產生治療作用之最低劑量的化合物量。此有效劑量一般視上文所述之因素而定。較佳地，化合物係以約 0.01 mg/kg 至約 200 mg/kg、更佳約 0.1 mg/kg 至約 100 mg/kg、甚至更佳約 0.5 mg/kg 至約 50 mg/kg 投與。在一些實施例中，化合物係以約 1 mg/kg 至約 40 mg/kg、約 1 mg/kg 至約 30 mg/kg、約 1 mg/kg 至約 20 mg/kg、約 1 mg/kg 至約 15 mg/kg 或 1 mg/kg 至約 10 mg/kg 投與。在一些實施例中，化合物係以等於或大於以下之劑量投與：0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95 或 1 mg/kg。在一些實施例中，化合物係以等於或大於以下之劑量投與：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 mg/kg。在一些實施例中，化合物係以等於或小於以下之劑量投與：200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20 或 15 mg/kg。在一些實施例中，化合物之總日劑量等於或大於 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195 或 100 mg。

**【0123】** 必要時，活性化合物(例如 ASO)之有效日劑量可以兩次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或更多次劑量或子劑量投與，該

等劑量或子劑量分別在全天的適當間隔時間投與，視情況以單位劑型投與。在一些實施例中，化合物係投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 次。較佳給藥為每天投與一次。在一些實施例中，化合物係一週投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或 21 次。在一些實施例中，化合物係一個月投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或 21 次。在一些實施例中，化合物係每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或 21 天投與一次。在一些實施例中，化合物係每 3 天投與。在一些實施例中，化合物係每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 週投與一次。在一些實施例中，化合物係每月投與。在一些實施例中，化合物係每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個月投與一次。在一些實施例中，化合物係在至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69 或 70 天之時段內投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52 或 53 次。在一些實施例中，化合物係在至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52 或 53 週之時段內投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、

22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52或53次。在一些實施例中，化合物係在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52或53個月之時段內投與至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52或53次。在一些實施例中，化合物係一週投與至少一次，歷時至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70週之時段。在一些實施例中，化合物係一週投與至少一次，歷時至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70個月之時段。在一些實施例中，化合物係一週投與至少兩次，歷時至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70週之時段。在一些實施例中，化合物係一週投與至少兩次，歷時至

少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69 或 70 個月之時段。在一些實施例中，化合物係每兩週投與至少一次，歷時至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69 或 70 週之時段。在一些實施例中，化合物係每兩週投與至少一次，歷時至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69 或 70 個月之時段。在一些實施例中，化合物係每四週投與至少一次，歷時至少 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69 或 70 週之時段。在一些實施例中，化合物係每四週投與至少一次，歷時至少 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69 或 70 個月之時段。

【0124】 所述方法中之個體可為哺乳動物，且其包括人類及非人類哺乳動物。在一些實施例中，個體為人類，諸如成人。

【0125】 一些實施例包括用於治療感染病毒之個體中之 HBV 病毒的方法，其包含向有需要之個體投與治療有效量之本發明的一種或多種 ASO 或本發明組合物，藉此降低個體中之病毒的病毒載量及/或降低個體中的病毒抗原含量。ASO 可與病毒中之目標 RNA 的一部分(例如 HBV 之第二 X 區域及/或 S 區域)互補或雜交。

【0126】 在一些實施例中，如本文所述之經修飾之寡核苷酸可與一種或多種其他藥劑組合使用以治療及/或抑制複製性 HBV 及/或 HDV。當本文所述之化合物(例如 ASO)與另一種藥劑共投與時，有效量可小於當化合物單獨使用時。其他藥劑包括但不限於干擾素、核苷/核苷酸類似物、衣殼組裝調節劑(CAM)、siRNA、其他 ASO、核酸聚合物或 S-抗原轉運抑制寡核苷酸聚合物(NAP 或 STOPS)、進入抑制劑及/或小分子免疫調節劑。其他藥劑之實例包括 ALG-010133、ALG-000184、重組干擾素  $\alpha 2b$ 、IFN-a、PEG-IFN-a-2a、拉米夫定、替比夫定、阿德福韋雙匹酯、克來夫定、因提弗、替諾福韋阿拉芬胺、替諾福韋雙索酯、NVR3-778、BAY41-4109、JNJ-632、JNJ-3989 (ARO-HBV)、RG6004、GSK3228836、REP-2139、REP-2165、AB-729、VIR-2218、DCR-HBVS、JNJ-6379、GLS4、ABI-HO731、JNJ-440、NZ-4、RG7907、EDP-514、AB-423、AB-506、ABI-H03733 及 ABI-H2158。在一些實施例中，本文所揭示之任一種 ASO 與 STOPS 之一共投與。例示性 STOPS 描述於國際公開案第 WO2020/097342 號及美國公開案第 2020/0147124 號中，兩者均以全文引用之方式併入。在一些實施例中，STOP 為 ALG-010133。在一些實施例中，本文所揭示之任一種 ASO 與替諾福韋共投與。在一些實施例中，本文所揭示之任一種 ASO 與 CAM 共投與。例示性 CAM 描述於 Berke 等人, Antimicrob Agents

Chemother, 2017, 61(8):e00560-17 ; Klumpp 等人, Gastroenterology, 2018, 154(3):652-662.e8 ; 國際申請案第 PCT/US2020/017974 號、第 PCT/US2020/026116 號及第 PCT/US2020/028349 號以及美國申請案第 16/789,298 號、第 16/837,515 號及第 16/849,851 號，其中之每一者以全文引用之方式併入。在一些實施例中，CAM 為 ALG-000184、ALG-001075、ALG-001024、JNJ-632、BAY41-4109 或 NVR3-778。在一些實施例中，ASO 與另一種藥劑同時投與。在一些實施例中，ASO 與另一種藥劑依序投與。在一些實施例中，ASO 在另一種藥劑投與之前投與。在一些實施例中，ASO 在另一種藥劑投與之後投與。

**【0127】** 定義

**【0128】** 如本文所用，術語「患者」與「個體」係指待藉由本發明之方法治療的生物體。此類生物體較佳為哺乳動物(例如海洋動物、猿猴、馬科動物、牛科動物、豬科動物、犬科動物、貓科動物及其類似物)且更佳為人類。

**【0129】** 如本文所用，術語「有效量」係指足以達成有益或所需結果之化合物(例如本發明之 ASO)的量。有效量可在一次或多次投與、施用或給藥中投與且並不意欲限於特定調配或投與途徑。

**【0130】** 如本文所用，術語「治療」包括引起病狀、疾病、病症及其類似者改善或其症狀減緩的任何效果，例如減輕、減少、調節、減緩或消除。

**【0131】** 如本文所用，術語「緩解(alleviate/alleviating)」係指病狀的嚴重程度降低，諸如嚴重程度降低例如至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%。

**【0132】** 如本文所用，術語「醫藥組合物」係指活性劑與惰性或活性載劑之組合，此組合使得該組合物尤其適合於活體內或離體診斷或治療用途。

**【0133】** 如本文所用，術語「醫藥學上可接受之載劑」係指任一種標準醫

藥學載劑，諸如磷酸鹽緩衝生理鹽水溶液、水、乳液(例如諸如油/水或水/油乳液)，及各種類型的潤濕劑。組合物亦可包括穩定劑及防腐劑。關於載劑、穩定劑及佐劑之實例，參見例如 Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 15 版, Mack Publ.Co., Easton, PA [1975]。

**【0134】** 如本文所用，術語「約」當提及可量測的值(例如體重、時間及劑量)時，意欲涵蓋所述值及 $\pm 10\%$ 的範圍。舉例而言，「約 10」應理解為「10」與「9 至 11」。

**【0135】** 如本文所用，術語「核鹼基」或「鹼基」係指形成核苷的生物學含氮化合物。核鹼基之實例包括但不限於胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、及其類似物或衍生物。

**【0136】** 在通篇說明書中，在將組合物描述為具有、包括或包含特定組分的情況下，或在將製程及方法描述為具有、包括或包含特定步驟的情況下，另外考慮存在基本上由所例舉組分組成或由所例舉組分組成的本發明之組合物，且存在基本上由所例舉處理步驟組成或由所例舉處理步驟組成的根據本發明之製程及方法。

**【0137】** 除非另外規定，否則本文中所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域之普通技術人員通常所理解相同的含義。儘管可使用與本文所述類似或等效的任何方法及材料來實施或測試本發明，但現描述代表性說明性方法及材料。

**【0138】** 在提供值範圍的情況下，應瞭解，彼範圍之上限與下限之間之各中間值(除非上下文另外明確規定，否則至下限單位之十分之一)，及彼所述範圍內之任何其他所述或中間值，均涵蓋於本發明內。此等較小範圍之上限及下限可獨立地包括於較小範圍內且亦涵蓋於本發明內，受所述範圍內之任何具體排除的限制。當所述範圍包含一個或兩個限值時，本發明亦包括排除彼等所含

限值中之一者或兩者的範圍。

**【0139】** 本發明不限於所述特定實施例，因此可變化。亦應理解，本文所使用之術語僅出於描述特定實施例之目的，且不希望具有限制性，因為本發明之範圍將僅由隨附申請專利範圍限定。

**【0140】** 如熟習此項技術者在閱讀本發明後將顯而易見，本文中所述及說明之個別實施例中的每一者具有離散組分及特徵，其可容易與其他若干實施例中之任一者的特徵分離或組合而不背離本發明之範圍或精神。任何所述方法均可以所述事件之次序或以邏輯上可能之任何其他次序來進行。

**【0141】** 本說明書中所引用之所有公開案及專利係以引用之方式併入本文中，就如同特定地且單獨地指示各個別公開案或專利以引用之方式併入一般，且以引用之方式併入本文中以結合所引用之公開案揭示及描述方法及/或材料。對任何公開案之引用係關於其在申請日之前的揭示內容，且不應解釋為承認本發明無權先於依賴於先前發明之此類公開案。此外，所提供之公開案的日期可能與可能需要單獨確認之實際公開案日期不同。

## 實例

**【0142】** 以下實例說明本發明之某些實施例以幫助熟習此項技術者實施本發明。因此，決不認為實例限制本發明之範圍。

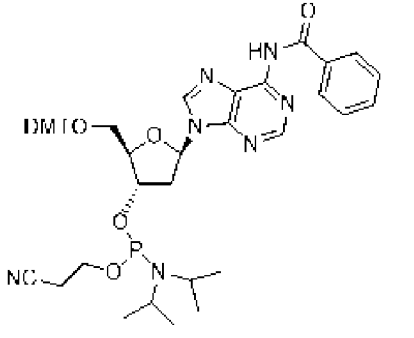
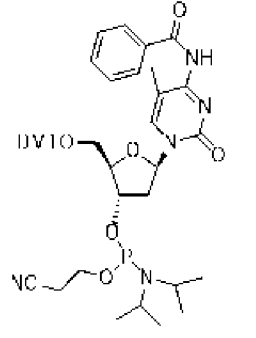
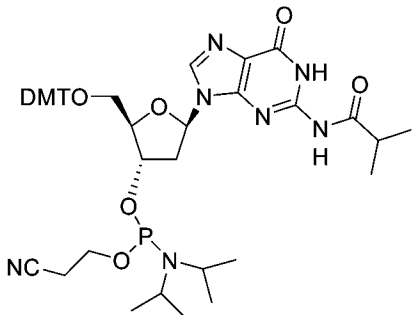
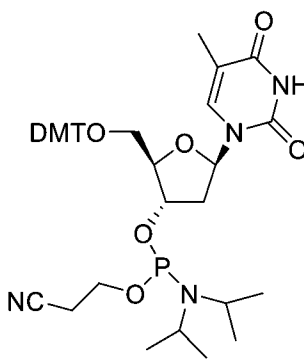
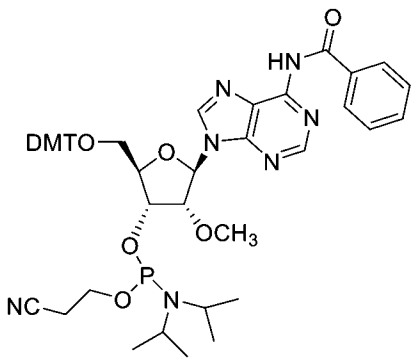
**【0143】** 實例 1：ASO 合成

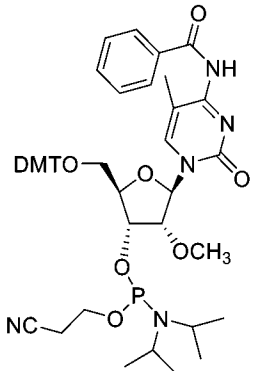
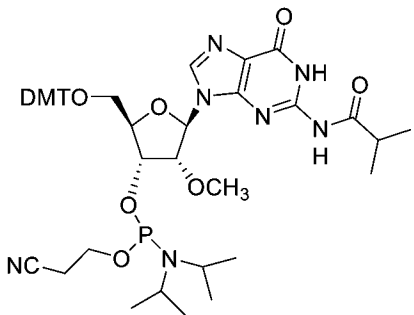
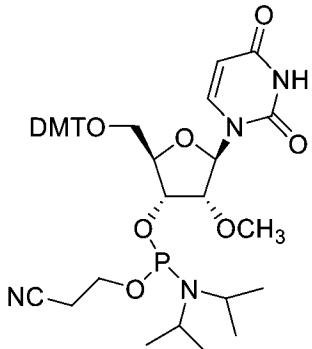
**【0144】** 間隔體 ASO 序列：DNA、2'-O-Me 及 LNA 胺基亞磷酸酯單體購自市售來源(Hongene Biotech USA Inc.)。所有單體在真空乾燥器中用除濕劑(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>，RT 24h)乾燥。所附著的通用固體載體(CPG)獲自 ChemGenes 公司。合成工作流程用的化學物質及溶劑購自 VWR/Sigma 市售來源，且在不進行任何純化或處理之情況下使用。溶劑(乙腈)及溶液(亞醯胺酯及活化劑)在合成期間儲存在分子篩上。

【0145】在 Expedite 8909 合成儀上使用製造商書寫的標準循環(其中幾個等待步驟有修改且偶合步驟有修改)來合成對照及目標寡核苷酸序列。固體載體為可控孔徑玻璃且單體含有標準保護基團。根據標準固相胺基亞磷酸酯合成方案，使用市售 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-(2-氰基乙基-*N,N*-二異丙基)DNA、2'-OMe 及/或 6-*N*-苯甲醯基腺苷( $A^{Bz}$ )、5 甲基 4-*N*-苯甲醯基胞苷( $C^{Bz}$ )、2-*N*-異丁醯基鳥苷( $G^{ibu}$ )及尿苷(U)或胸苷(T)之 LNA 胺基亞磷酸酯單體個別地合成各種嵌合寡核苷酸。2'-O-Me-2,6-二胺基嘌呤胺基亞磷酸酯係購自 Glen Research。製備胺基亞磷酸酯於無水乙腈中之 0.1 M 溶液。合成寡核糖核苷酸硫代磷酸酯時，5-乙硫基四唑用作活化劑，含 3%二氯乙酸之二氯甲烷用於脫除三苯甲基，含乙酸酐之 THF 及含 16% *N*-甲基咪唑之 THF 用於封端，且 DDTT ((二甲胺基-亞甲基)胺基)-3H-1,2,4-二噻唑啉-3-硫酮用作硫轉移劑。在 5-(乙硫基)-1H-四唑活化劑存在下，使胺基亞磷酸酯於  $CH_3CN$  中之 0.1 M 溶液與固體結合之寡核苷酸發生延長的偶合，隨後進行延長的封端、氧化及脫除保護基，得到經修飾之寡核苷酸。所有經修飾之胺基亞磷酸酯的逐步偶合效率大於 98.5%。

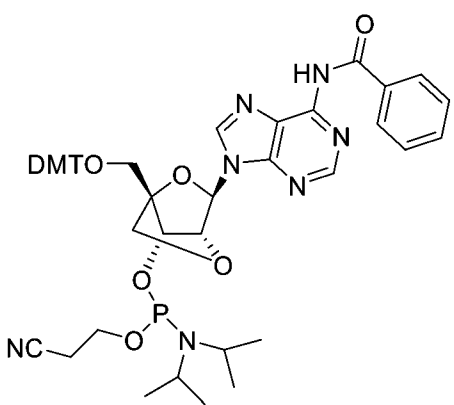
【0146】脫除保護基及自固體載體裂解係利用氨/甲胺(1:1，AMA)之混合物在 65°C 下維持 15 分鐘達成，當使用通用連接子時，在 65°C 下進行脫除保護基 90 分鐘，或將固體載體與氨水(28%)溶液一起在 55°C 下加熱 8 小時以將鹼不穩定型保護基團脫除。

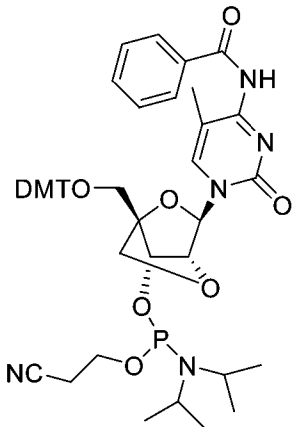
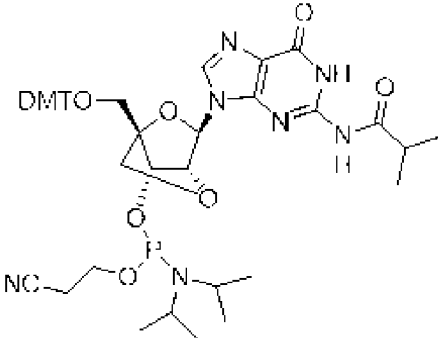
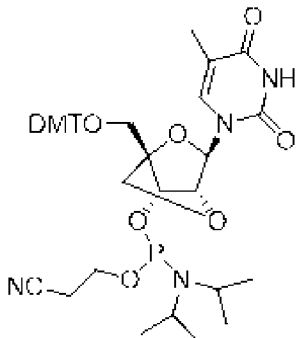
【0147】在過濾移除固體載體之後，在 GeneVac 離心式蒸發器中真空移除脫除保護基溶液。

dA 胺基亞磷酸酯	
(5-Me)-dC 胺基亞磷酸酯	
dG 胺基亞磷酸酯	
dT 胺基亞磷酸酯	
2'-OMe-A 胺基亞磷酸酯	

2'-OMe-(5m)C 胺基亞磷酸酯	
2'-OMe-G 胺基亞磷酸酯	
2'-OMe-U 胺基亞磷酸酯	

### 鎖定核酸(LNA)胺基亞磷酸酯

LNA-A 胺基亞磷酸酯	
--------------	--

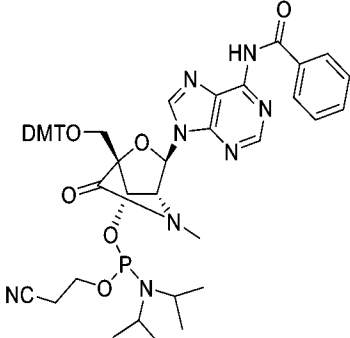
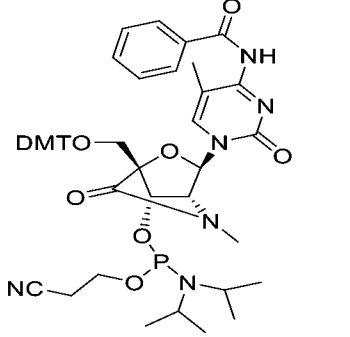
LNA(5m)C 胺基亞磷酸酯	
LNA-G 胺基亞磷酸酯	
LNA-T 胺基亞磷酸酯	

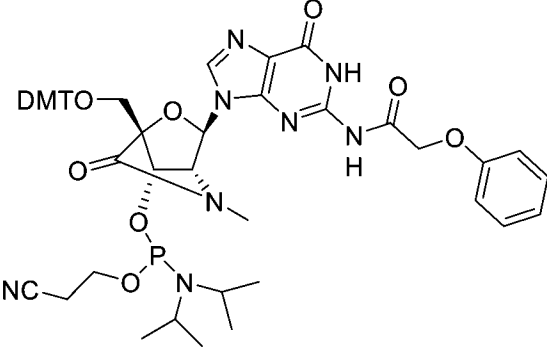
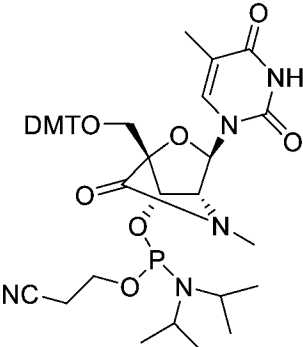
【0148】 實例 2：經修飾之間隔體序列

【0149】 AmNA (N-Me)-T、AmNA (N-Me)-4-*N*-苯甲醯基(5m)胞苷((5m) C<sup>Bz</sup>)、AmNA(N-Me)-4-*N*-苯甲醯基胞苷(A<sup>Bz</sup>)及 AmNA(N-Me)-2-*N*-pac (G<sup>pac</sup>)係購自 Luxna Biotech，而 scp-BNA-T、scp-BNA-6-*N*-苯甲醯基腺苷(A<sup>Bz</sup>)、scp-BNA-4-*N*-苯甲醯基-5 甲基胞苷((5m) C<sup>Bz</sup>)、scp-BNA-2-*N*-異丁醯基鳥苷(G<sup>iBu</sup>)胺基亞磷酸酯單體係根據參考文獻中所述的程序合成(Takao Yamaguchi, Masahiko Horiba 及 Satoshi Obika; *Chem. Commun.*, 2015, 51, 9737-9740；Masahiko Horiba, Takao Yamaguchi，及 Satoshi Obika; *Journal of Organic Chemistry*, 2016, 81, 11000-

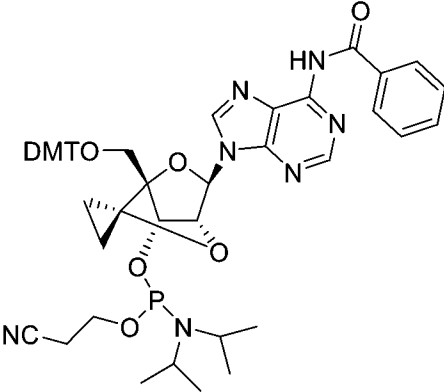
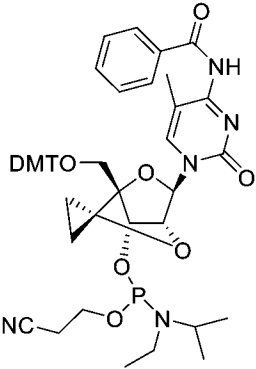
11008)。所有單體均在真空乾燥器中用除濕劑乾燥(KOH 及  $P_2O_5$ ，在室溫下持續 24 小時)。在 AmNA(N-Me)-PS-DNA-PS 及 scp-BNA-PS-DNA-PS 修飾之情況下，使用在無水  $CH_3CN$  中稀釋至 0.12 M 濃度之胺基亞磷酸酯單體，在針對固體結合之寡核苷酸的 0.3 M 5-(苯甲硫基)-1H-四唑活化劑(偶合時間 16 分鐘)存在下，在 1  $\mu M$  規模下，在 3'至 5'方向上執行合成，隨後執行經修改之封端、氧化及脫除保護基，得到經修飾之寡核苷酸。所有經修飾之胺基亞磷酸酯的逐步偶合效率大於 97%。DDTT (二甲胺基-亞甲基)胺基)-3H-1,2,4-二噻唑啉-3-硫酮用作合成寡核糖核苷酸硫代磷酸酯之硫轉移劑。攜帶寡核苷酸之固體載體用含有 20% DEA 的乙腈溶液洗滌 15 分鐘，接著用 MeCN 充分洗滌管柱。載體與二異丙胺:水:甲醇(1:1:2)一起在加熱塊中於 65°C 下加熱 8 小時，以自載體裂解且脫除鹼不穩定保護基團。

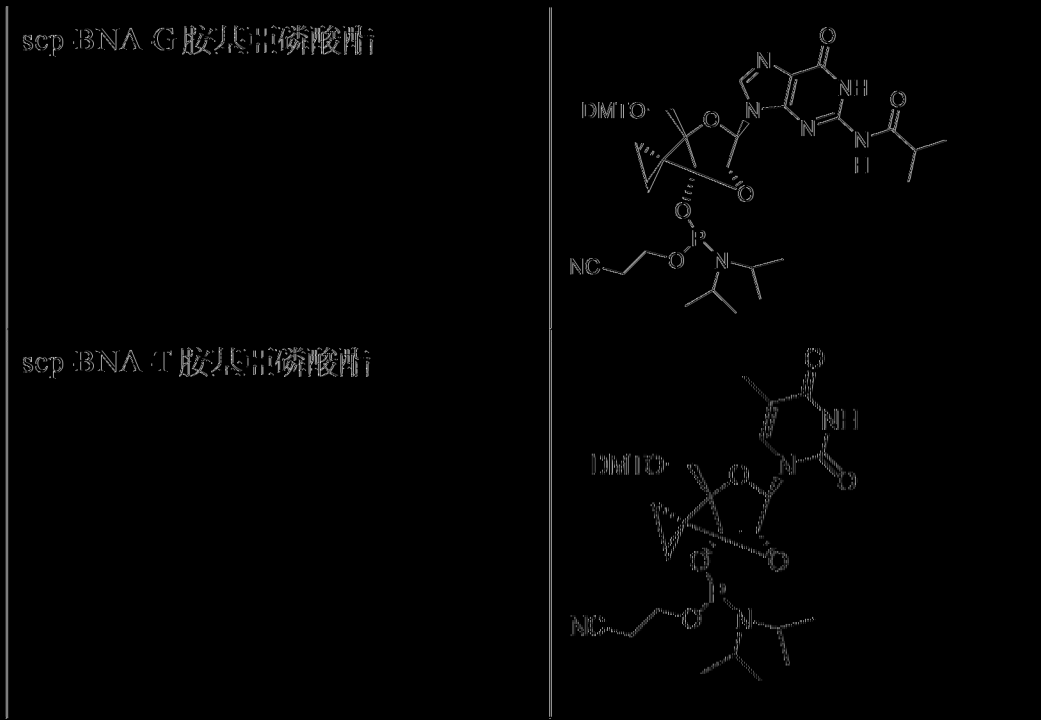
### AmNA (N-Me)單體

AmNA-NCH <sub>3</sub> -A 胺基亞磷酸酯	
AmNA-NCH <sub>3</sub> -(5m)C 胺基亞磷酸酯	

AmNA-NCH <sub>3</sub> -G 胺基亞磷酸酯	
AmNA-NCH <sub>3</sub> -T 胺基亞磷酸酯	

### scp-BNA 單體

scp-BNA-A 胺基亞磷酸酯	
scp-BNA-(5m)C 胺基亞磷酸酯	

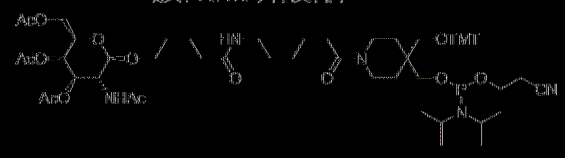


(0150) 使用不同長度的 GalNAc 部分合成 5'及 3' GalNAc 結合的寡核苷酸，例如如下文所述。在用 1、2 或 3 個部分合成期間，以與下文所述相對之方式使 GalNAc3、GalNAc4、GalNAc5 及 GalNAc6 與寡核苷酸結合。其他 GalNAc 部分，諸如本文中先前所述之 GalNAc-1 及 GalNAc-2，亦用於形成 5'及 3' GalNAc (利用合成後的結合)。

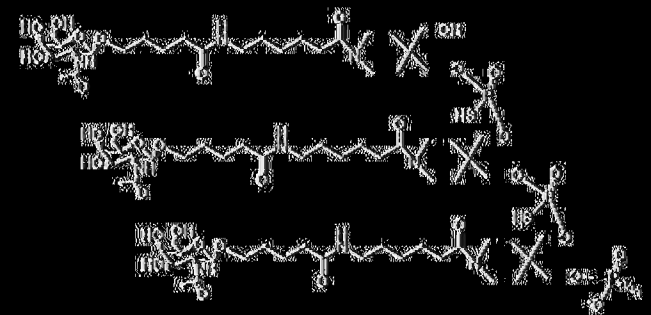
GalNAc 胺基亞磷酸酯

GalNAc 構築片段

GalNAc-3 胺基亞磷酸酯

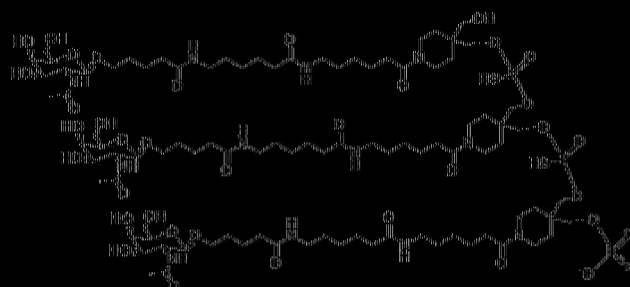
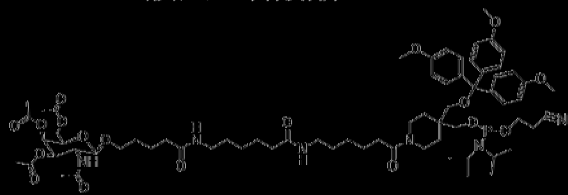


在與寡核苷酸連接之後(命名法)



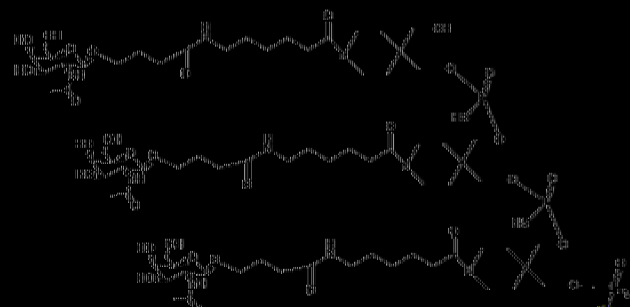
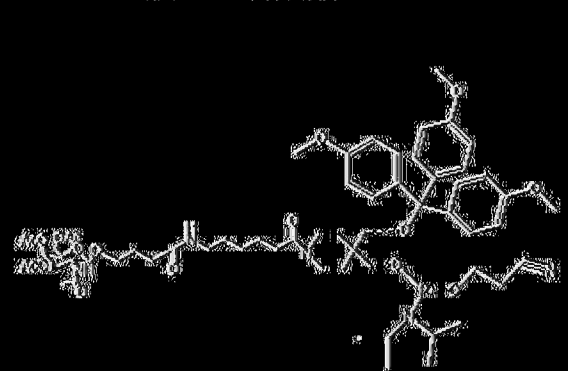
(GalNAc3-(PS)2.p)

GalNAc 4 胺基亞磷酸酯



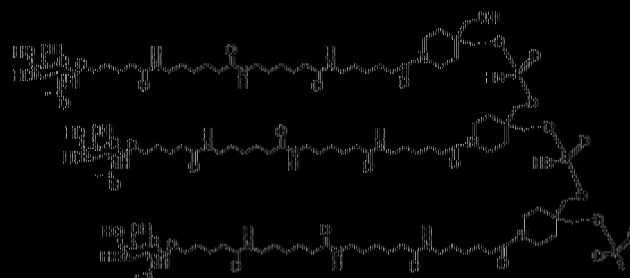
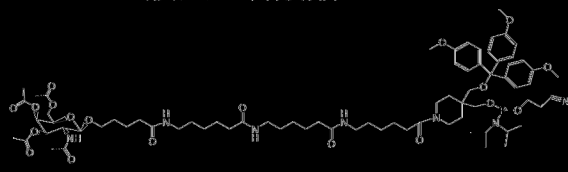
(GalNAc4 (PS)2) p

GalNAc 5 胺基亞磷酸酯



(GalNAc5 (PS)2) p

GalNAc 6 胺基亞磷酸酯



(GalNAc6 (PS)2) p

#### (0151) 粗寡聚物定量或原始分析

(0152) 將樣品溶解於去離子水(1.0 mL)中且如下定量：首先在 NanoDrop UV 分光光度計上僅用水執行空白試驗。Nano Drop 儀器可經由使用多種路徑長度量測寬濃度範圍之核酸。最準確的定量結果可藉由在 260 nm 吸光度下量測經稀釋之寡核苷酸來達成。粗物質在 20°C 儲存。

#### (0153) 粗 HPLC/LC-MS 分析

(0154) 使用 0.1 OD 粗樣品進行粗物質 MS 分析。證實粗物質 LC-MS 資料之後，接著執行純化步驟。

#### (0155) HPLC 純化

【0156】藉由陰離子交換 HPLC 純化磷酸二酯(PO)、硫代磷酸酯(PS)及經修飾之嵌合寡核苷酸。緩衝液為含 20 mM 磷酸鈉之 10% CH<sub>3</sub>CN，pH 8.5 (緩衝液 A)；及含 20 mM 磷酸鈉之 10% CH<sub>3</sub>CN、1.8 M NaBr，pH 8.5 (緩衝液 B)。彙集含有全長寡核苷酸之溶離份，去鹽且凍乾。

【0157】脂質結合的寡核苷酸藉由內部裝填的 RPC-Source15 逆相管柱來純化。緩衝液為含 20 mM 乙酸钠之 10% CH<sub>3</sub>CN (緩衝液 A)及 CH<sub>3</sub>CN (緩衝液 B)。彙集含有全長寡核苷酸之溶離份，去鹽且凍乾。

【0158】經純化之寡聚物的去鹽

【0159】接著使用 Sephadex G-25 M (Amersham Biosciences)將經純化之乾燥寡聚物去鹽。用 10 mL 去離子水將濾筒調節三次。在極緩慢逐滴溶離之情況下，將充分溶解於 2.5 mL 去離子水中之經純化之寡核苷酸施加至濾筒中。無鹽的寡聚物用 3.5 ml 去離子水直接溶離至螺旋蓋小瓶中。

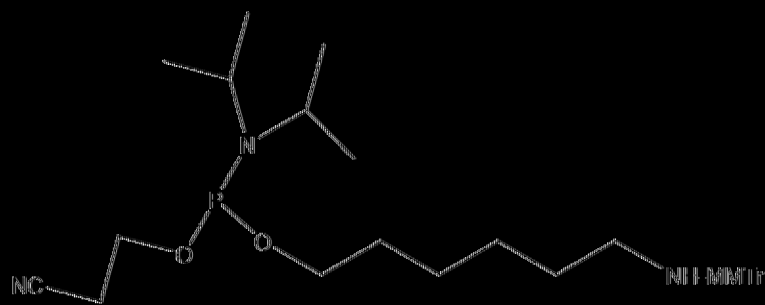
【0160】最終 HPLC 及電噴霧 LC/MS 分析

【0161】將約 0.10 OD 的寡聚物溶解於水中且接著吸移至特殊小瓶中用於 IEX-HPLC 及 LC/MS 分析。分析型 HPLC 及 ES LC-MS 確定嵌合寡核苷酸之完整性。

【0162】GalNAc 酯與寡核苷酸之合成後結合

【0163】5'-C6-胺基前驅體合成

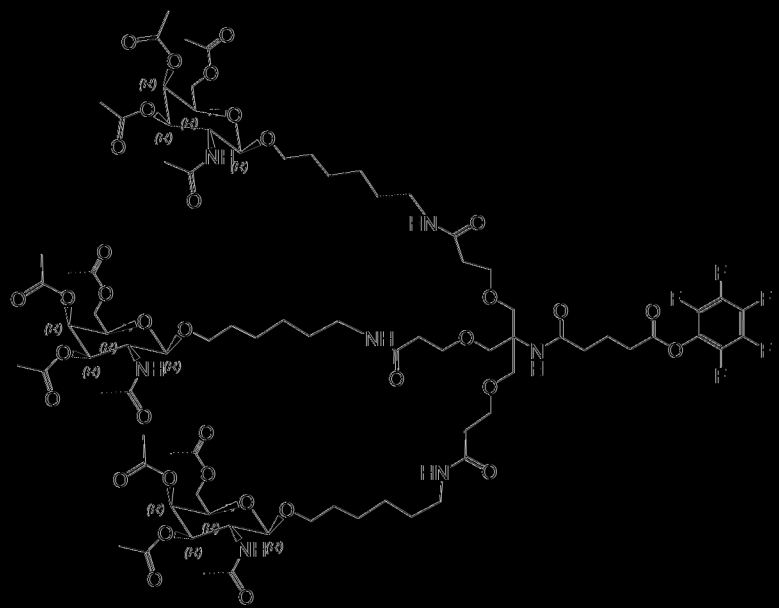
【0164】使用通用載體(負載量 65 μmol/g)，以 10 μmol 規模合成序列。使用 0.1 M 乙腈中的 6-(4-單甲氧基三苯甲基胺基)己基-(2-氰基乙基)-(N,N-二異丙基)-胺基亞磷酸酯在 5'端引入 C6-NH<sub>2</sub> 連接子，偶合時間為 10 分鐘。承載寡核苷酸的固體載體與氨水/甲胺(1:1)溶液一起在搖動器中、在室溫下加熱 3 小時，以便自載體裂解及脫除鹼不穩定性保護基團。在 IEX 純化及去鹽之後，使用 C6-NH<sub>2</sub> 修飾之 ASO 執行合成後結合。



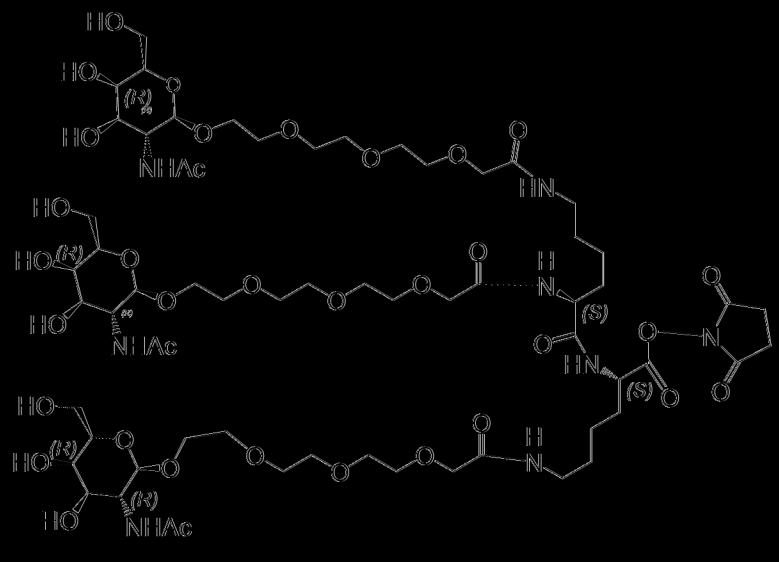
5'-胺基修飾劑C6  
6-(4-二甲胺基-3-苯甲氧基)己基-(2-羧基乙基)-(N,N'-二異丙基)胺基亞磷酸酯

用於結合之 GaNAc 糖

GaNAc 1 部分



GaNAc 2 部分



[(0165)] 5' GaNAc 合成之合成後結合

將 5' C6-NH<sub>2</sub> 修飾之序列溶解於 0.2 M 碳酸氫鈉緩衝液 pH 8.5 (0.015 mM)

中，且添加溶解於 DMSO 中之 5 至 7 mol 當量的 GalNAc 酯。在室溫下攪拌反應混合物 4 小時。分析樣本以證實是否存在任何未反應之經胺基修飾的 ASO。向其中添加氨水(28 wt.%(5 倍反應體積)，且在室溫下攪拌 2 至 3 小時。在減壓下濃縮反應混合物，且將殘餘物溶解於水中且在強陰離子交換管柱上藉由 HPLC 純化。

**【0166】 實例 3：HBsAg 釋放分析活體外分析**

**【0167】** 將 HepG2.2.15 細胞(整合有四個 HBV 基因體之穩定細胞株)在具有 10%胎牛血清(FBS)及 1%青黴素/鏈黴素、1%麩醯胺酸、1%非必需胺基酸、1%丙酮酸鈉及 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 之 DMEM 培養基中維持。使細胞在 37°C 下、在 5% CO<sub>2</sub> 氛圍中維持。對於 HBsAg 釋放分析而言，製備分析培養基：具有 5% FBS、1%青黴素/鏈黴素、1%麩醯胺酸及 1% DMSO 的 DMEM。在分析前一天，胰蛋白酶化 HepG2.2.15 細胞用分析培養基洗滌一次，以 250 g 旋轉 5 分鐘，再懸浮於分析培養基中，且將細胞於分析培養基中以每孔 50,000 個接種於經膠原蛋白塗覆之 96 孔盤中。次日，ASO 用 Opti-MEM、9-pt 稀釋(3 倍稀釋)且根據製造商手冊稀釋脂染胺 RNAiMAX (Invitrogen)。將 ASO 稀釋液與 RNAiMAX 稀釋液混合，在室溫下置放 5 分鐘，且向 96 孔盤之各孔中添加 15  $\mu\text{l}$ 。培養盤在培育箱中、在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下擱置 5 天。培育之後，收集上清液且用 ELISA 套組(Diasino)量測 HBsAg。用 CellTiter-Glo (Promega)量測細胞存活率。使用 Prism Graphpad 計算相對於未處理細胞對照使 HBsAg 分泌減少 50%所需之藥物濃度 EC<sub>50</sub>。使用相同軟體計算相對於未處理細胞對照使細胞存活率降低 50%所需之藥物濃度 CC<sub>50</sub>。

**【0168】** 表 1 中之化合物的所得 EC<sub>50</sub>及 CC<sub>50</sub>展示於下表 2 中。EC<sub>50</sub>及 CC<sub>50</sub>值如下：A：< 1 nM，B：1-10 nM，C：10-100 nM，D：> 100 nM。

表 2.HBsAg 釋放分析		
ASO #	HepG2.2.15 HBsAg 釋放分析 EC <sub>50</sub> (nM)	HepG2.2.15 細胞存活率分析 CC <sub>50</sub> (nM)
1	B	D
2	C	D
3	B	D
4	C	D
5	B	D
6	B	D
7	B	D
8	B	D
9	B	D
10	B	D
11	D	D
12	D	D
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25	B	C
26	A	C
27	A	D
28	B	C
29	A	C
30	A	C
31	A	C
32	B	C
33	A	D
34	A	C
35	B	D
36	B	D
37	A	C
38	A	C
39	A	C
40	A	C
41	B	D
42	B	D
43	B	D
44	B	D
45	B	D
46	B	D
47	B	D

表 2.HBsAg 釋放分析		
ASO #	HepG2.2.15 HBsAg 釋放分析 EC <sub>50</sub> (nM)	HepG2.2.15 細胞存活率分析 CC <sub>50</sub> (nM)
48	C	D
49	B	D
50	B	D
51	B	D
52	A	D
53	A	D
54	A	D
55		
56		
57		
58		
59		
60		
61		
62		
63		
64	B	D
65	B	D
66	B	D
67	B	D
68	B	D
69	A	D
70	B	D
71	B	D
72	B	D
73	B	D
74	C	D
75	A	D
76	A	D
77	A	D
78	B	D
79	B	D
80	A	D
81	A	D
82	A	D
83	A	D
84		
85		
86		
87		

【0169】 另外，評估一些 ASO 對經 HBV 感染之人類初代肝細胞(PHH)的活體外力價。下表 3 提供來自此等實驗之例示性 EC<sub>50</sub> 及 CC<sub>50</sub> 資料。

ASO#	EC <sub>50</sub> (nM)	CC <sub>50</sub> (nM)
64	C	D
65	C	D
69	C	D

【0170】 實例 4：解鏈溫度(T<sub>m</sub>)

【0171】 評估本文所揭示之若干種例示性 ASO 的解鏈溫度，且代表性結果提供於下表 4 中。

ASO#	T <sub>m</sub> (°C)
64	74.3 (± 0.3)
65	77.9 (± 0.3)
69	79.4 (± 0.1)

【0172】 實例 5：活體內力價的改良

【0173】 使用標準胺基亞磷酸酯化學方法，在 ABI 394 及 Expedite 8909 合成器上合成具有所揭示之化學物質的 ASO。使用如上文所論述的 HBsAg 釋放分析，針對 HepG2.2.15 細胞執行 ASO 之活體外篩選。選擇某些 ASO 進行 N-乙酰基半乳糖(GalNac)結合且在腺相關病毒(AAV)-HBV 小鼠模型中以 1 x 5 mg/kg 進行單次劑量的測試。

【0174】 表 5 顯示使用 1x5mg/kg QW 的例示性 HBsAg 最低點(相較於 ASO 59)。在此等 ASO 的 HBx 區中，靶向包括 HBx 在內的所有 HBV 轉錄本(nmlnA 對 lnA 的單一置換)改良 HBsAg 的最低點。

ASO #	1x5 mg/kg 下的 HBsAg 最低點
84	-0.63 log <sub>10</sub> IU/ML
85	-0.66 log <sub>10</sub> IU/ML
86	-0.48 log <sub>10</sub> IU/ML
87	-0.44 log <sub>10</sub> IU/ML

【0175】 圖顯示 ASO 59 與 ASO 87 的例示性並列比較，後者含有 nmlnA 且前者含有 lnA。如圖中可見，添加 lnmnA 使得力價改良。

\*\*\*\*\*

表 6 - 目標基因序列

SEQ ID NO:	描述	序列
89	B 型肝炎病毒 (Genbank 登錄號 KC315400.1)	CTCCACCACTTTCCACCAAACCTCTTCAAGATCCCAGAGTCAGGGCCCTG TACTTTCCTGCTGGTGGCTCAAGTTCCGGAACAGTAAACCCTGCTCCGA CTACTGCCTCTCCCATATCGTCAATCTTCTCGAGGACTGGGGACCCTGT ACCGAATATGGAGAGCACCACATCAGGATTCTAGGACCCCTGCTCGT GTTACAGGCGGGGTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCACAG AGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAGCACCCA CGTGTCTGGCCAAAATTTGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTACCAAC CTCTGTCTCCAATTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTT TTATCATCTTCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTC TTCTGGACTACCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTACTTCCAGGAAC ATCAACTACCAGCACCGGACCATGCAAAACCTGCACAACACTGCTCA AGGGACCTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGACGGA AACTGCACCTGTATCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGAAAATACC TATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCC ATTTGTTCAAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCACTGTCTGGCTTTCAGTTA TATGGATGATGTGGTTTTGGGGCCAAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCC CTTATACCGCTGTTACCAATTTCTTTTATCTTTGGGTATACATTTAAA CCCTCACAAAACAAAAGATGGGGATATTCCCTTAACTTCATGGGATAT GTAATTGGGAGTTGGGGCACTTTGCCTCAGGAACATATTGTACAAAA ATCAAGCAATGTTTTAGGAACTTCCTGTAAACAGGCCTATTGATTGGA AAGTATGTCAACRAATTGTGGGTCTTTTGGGGTTTGGCCGCCCTTTCAC GCAATGTGGATATCCTGCTTTAATGCCTTTATATGCATGTATACAAGCT AAGCAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACTTACAAGGCCTTTCTGTGTAAC AATATCTGAACCTTTACCCGTTGCTCGGCAACGGTCAGGTCTTTGCCA AGTGTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCTTGGCCATAGGCCAT CAGCGCATGCGTGGAACTTTGTGGCTCCTCTGCCGATCCATACTGCGG AACTCCTAGCAGCTTGTGTTGCTCGCAGCCGGTCTGGAGCAAACTTAT CGGCACCGACAACCTGTGTTGCTCTCTCGGAAATACACCTCCTTTCCA TGGCTGCTAGGATGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTG TCTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCG TTTGGGACTCTACCGTCCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGCCCCGACCAG GGGCGCACCTCTCTTACGCGGTCTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCC GGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTCGCATGGAGACCACCG TGAACGCCCACGGGAACCTGCCAAAGGTCTTGCAATAAGAGGACTCTTG GACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGGTTAGGTTAAAGGT CTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCA TGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCATGTTTCATGCTCCTACTGTT CAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTGGGGCACTGGCAATTGACC CGTATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTTACTCTCTTTTTTGCCTTCT GACTTCTTTCCTTCTATTTCAGATCTCCTCGACACCGCCTCTGCTCTGTA TCGGGAGGCCTTAGAGTCTCCGGAACATTGTTACCTCACCATACGGCA CTCAGGCAAGCAATTCTGTGTTGGGGTGAGTTAATGAATCTAGCCACCT GGGTGGGAAGTAATTTGGAAGATCCAGCATCCAGGGAATTAGTAGTCA GCTATGTCAACGTTAATATGGGCCTAAAAATCAGACAACCTATTGTGGTT TCACATTTCTGTCTTACTTTTGGGAGAGAACTGTTCTTGAATATTTGG TGTCTTTTGGAGTGTGGATTCGCACTCCTCCTGCATATAGACCACAAA TGCCCTATCTTATCAACACTCCGGAACTACTGTTGTTAGACGAAGA GGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAAGTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGGTCT CAATCGCCGCTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGT ATTCCTTGGACACATAAGGTGGGAACTTTACGGGGCTTTATTCTTCTA CGGTACCTTGCTTAACTCTAAATGGCAAACCTCTTCTTTTCTGACATT CATTTGCAGGAGGACATTGTTGATAGATGTAAGCAATTTGTGGGGCCCC TTACAGTAAATGAAAACAGGAGACTTAAATTAATTATGCCTGCTAGGTT TTATCCCAATGTTACTAAATATTTGCCCTTAGATAAAGGGATCAAACCG

SEQ ID NO:	描述	序列
		<p>TATTATCCAGAGTATGTAGTTAATCATTACTTCCAGACGCGACATTATT  TACACACTCTTTGGAAGGCGGGGATCTTATATAAAAGAGAGTCCACAC  GTAGCGCCTCATTGCGGGTCCACCATATTCTTGGGAACAAGATCTACA  GCATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGAAAAGGCATGGGGACAAATC  TTTCTGTCCCAATCCCCTGGGATTCTTCCCCGATCATCAGTTGGACCCT  GCATTCAAAGCCAACCTCAGAAAATCCAGATTGGGACCTCAACCCACAC  AAGGACAACCTGGCCGACGCCAACAAAGGTGGGAGTGGGAGCATTCCGG  GCCAGGGTTCACCCCTCCTCATGGGGGACTGTTGGGGTGGAGCCCTCAG  GCTCAGGGCATATTCACAACAGTGCCAGCAGCTCCTCCTCCTGCCCTCA  CCAATCGGCAGTCAGGAAGGCAGCCTACTCCCTTCTCTCCACCTCTAAG  AGACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAA</p>
90	B 型肝炎病毒 (Genbank 登錄號 U95551.1)	<p>AATCCACAACCTTTACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGC  CTGTATTTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAGCAGTAAACCCTGTTC  CGACTACTGCCTCTCCCTTATCGTCAATCTTCTCGAGGATTGGGGACCC  TGCGCTGAACATGGAGAACATCACATCAGGATTCTTAGGACCCCTTCTC  GTGTTACAGGCGGGGTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCGC  AGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAACACT  CGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTACCA  ACCTCCTGTCTCCAACCTGTCTGCTGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCG  TTTTATCATCTTCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGT  TCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGAT  CCTCAACCACCAGCACGGGACCATGCCGAACCTGCATGACTACTGCTC  AAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGG  AAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATTC  CTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGC  CATTTGTTCAAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTTTGGCTTTCAGTT  ATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTC  CCTTTTTACCCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTGGGTATACATTTAA  ACCCTAACAAAACAAAGAGATGGGGTACTCTCTGAATTTTATGGGTTA  TGTCATTGGAAGTTATGGGTCCTTGCCACAAGAACACATCATACAAA  AATCAAAGAATGTTTATAGAAAATTCCTATTAACAGGCCTATTGATTGG  AAAGTATGTCAACGAATTGTGGGTCTTTTGGGTTTTGTGCCCATTTA  CACAATGTGGTTATCCTGCGTAAATGCCCTTGTATGCATGTATTCAATCT  AAGCAGGCTTTCACTTCTCGCCAACTTACAAGGCCTTCTGTGTAAAC  AATACCTGAACCTTACCCCGTTGCCCGGCAACGGCCAGGTCTGTGCCA  AGTGTGCTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCTTGGTCATGGGCCAT  CAGCGCGTGCCTGGAACCTTTCGGCTCCTCTGCCGATCCATACTGCGG  AACTCCTAGCCGCTTGTGTTGCTCGCAGCAGGTCTGGAGCAAACATTAT  CGGGACTGATAACTCTGTTGTCTCTCCCGCAAATATACATCGTATCCA  TGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAAGTGGATCCTGCGGGGACGTCCTTTG  TTTACGTCCTCGGCGCTGAATCCTGCGGACGACCTTCTCGGGGCTCG  CTTGGGACTCTCTCGTCCCTTCTCCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGG  GGCGCACCTCTCTTACGCGGACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCG  GACCGTGTGCACCTTCGCTTACCTCTGCACGTCGCATGGAGACCACCGT  GAACGCCACCGAATGTTGCCCAAGGTCTTACATAAAGAGGACTCTTGG  ACTCTCTGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT  TTGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTC  TTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCAT  GCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACTGTTC  AAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTGGGGCATGGACATCGACCC  TTATAAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTACTCTCGTTTTTGCCTTCTG  ACTTCTTCCCTTCACTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGCTCTGTAT  CGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCAC  TCAGGCAAGCAATTCTTGGCTGGGGGAACTAATGACTCTAGCTACCTG  GGTGGGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTCACT  TATGTCAACACTAATATGGGCCTAAAGTTCAGGCAACTCTTGTGGTTTC  ACATTTCTTGTCTCACTTTTGGAAAGAGAAACCGTTATAGAGTATTTGGT  GTCCTTCGGAGTGTGGATTCGCACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAAAT  GCCCTATCCTATCAACACTTCCGGAAACTACTGTTGTTAGACGACGAG  GCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGGTCTC</p>

SEQ ID NO:	描述	序列
		AATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAACCTCAATGTTAGTA TTCCTTGGACTCATAAGGTGGGGAACCTTTACTGGTCTTTATTCTTCTACT GTACCTGTCTTTAATCCTCATTGGAAAACACCATCTTTTCCTAATATACA TTTACACCAAGACATTATCAAAAAATGTGAACAGTTTGTAGGCCCACTT ACAGTTAATGAGAAAAGAAGATTGCAATTGATTATGCCTGCTAGGTTTT ATCCAAAGGTTACCAAATATTTACCATTGGATAAAGGTATTA AACCTTA TTATCCAGAACATCTAGTTAATCATTACTTCCAAACTAGACACTATTTA CACACTCTATGGAAGGCGGGTATATTATATAAGAGAGAAAACAACACAT AGCGCCTCATTTTGTGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGATCTACAGC ATGGGGCAGAATCTTTCCACCAGCAATCCTCTGGGATTCTTTCCCGACC ACCAGTTGGATCCAGCCTTCAGAGCAAACACAGCAAATCCAGATTGGG ACTTCAATCCCAACAAGGACACCTGGCCAGACGCCAACAAGGTAGGAG CTGGAGCATTCTGGGCTGGGTTTACCCACCCGACGGAGGCCTTTTGGG GTGGAGCCCTCAGGCTCAGGCATACTACAACTTTGCCAGCAAATCC GCCTCCTGCCTCCACCAATCGCCAGACAGGAAGGCAGCCTACCCCGCT GTCTCCACCTTTGAGAAACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGG
91	17β-HSD 13 型編碼序列 (Genbank 登 錄 號 NM 178135.5)(核 苷酸 42 至 944)	ATGAACATCATCCTAGAAATCCTTCTGCTTCTGATCACCATCATCTACTC TACTTGGAGTCGTTGGTGAAGTTTTTCATTCTCAGAGGAGAAAATCT GTGGCTGGGAGATTGTTCTCATTACTGGAGCTGGGCATGGAATAGGC AGGCAGACTACTTATGAATTTGCAAACGACAGAGCATATTGGTTCTGT GGGATATTAATAAGCGCGGTGTGGAGGAACTGCAGCTGAGTGCCGAA AACTAGGCGTCACTGCGCATGCGTATGTGGTAGACTGCAGCAACAGAG AAGAGATCTATCGCTCTCTAAATCAGGTGAAGAAAAGAAGTGGGTGATG TAACAATCGTGGTGAATAATGCTGGGACAGTATATCCAGCCGATCTTCT CAGCACAAGGATGAAGAGATTACCAAGACATTTGAGGTCAACATCCT AGGACATTTTTGGATCAGAAAAGCACTTCTTCCATCGATGATGGAGAGA AATCATGGCCACATCGTCACAGTGGCTTCAGTGTGCGGCCACGAAGGG ATTCCTTACCTCATCCCATATTGTTCCAGCAAATTTGCCGCTGTTGGCTT TCACAGAGGTCTGACATCAGA ACTTCAGGCCTTGGGAAAAACTGGTAT CAAAACCTCATGTCTCTGCCAGTTTTTGTGAATACTGGGTTACCAAAA AATCCAAGCACAAGATTATGGCCTGTATTGGAGACAGATGAAGTCGTA AGAAGTCTGATAGATGGAATACTTACCAATAAGAAAATGATTTTTGTTC CATCGTATATCAATATCTTTCTGAGACTACAGAAGTTTTCTTCCCTGAACG CGCCTCAGCGATTTTAAATCGTATGCAGAATATCAATTTGAAGCAGTG GTTGGCCACAAAATCAAAATGAAATGA
92	MCJ mRNA (Genbank 登 錄 號 NM_013238. 3)	AGTCACTGCCGCGGCGCCTTGAGTCTCCGGGCCCGCCTTGCCATGGCTGC CCGTGGTGTATCGCTCCAGTTGGCGAGAGTTTGCCTACGCTGAGTAC TTGCAGCCCTCGGCCAAACGGCCAGACGCCGACGTCGACCAGCAGAGA CTGGTAAGAAGTTTGATAGCTGTAGGACTGGGTGTTGCAGCTCTTGCAT TTGCAGGTCGCTACGCATTTCCGATCTGGAACCTCTAGAACAAGTTAT CACAGAACTGCAAAGAAGATTTCAACTCCTAGCTTTTTCCTACTAT AAAGGAGGATTTGAACAGAAAATGAGTAGGCGAGAAAGCTGGTCTTATT TTAGGTGTAAGCCCATCTGCTGGCAAGGCTAAGATTAGAACAGCTCAT AGGAGAGTCATGATTTTGAATCACCCAGATAAAGGTGGATCCTTACG TAGCAGCCAAAATAAATGAAGCAAAAAGACTTGCTAGAAAACAACCACCA AACATTGATGCTTAAGGACCACACTGAAGGAAAAAAAAAAGAGGGGAC TTCGAAAAAAAAAAAAAGCCCTGCAAAAATATTCTAAAACATGGTCTTCTT AATTTTCTATATGGATTGACCACAGTCTTATCTTCCACCATTAAGCTGTA TAACAATAAAAATGTTAATAGTCTTGCTTTTTTATTATCTTTTAAAGATCTC CTTAAATTCTATAACTGATCTTTTTTTCTATTTTGTGTTGTGACATTCATAC ATTTTAAAGATTTTTGTTATGTTCTGAATCCCCCTACACACACACACA CACACACACACACACACAGTGCAAAAATATGATCAAGAATGCAATT GGGATTTGTGAGCAATGAGTAGACCTCTTATTGTTTATATTTGTACCCTC ATTGTCAATTTTTTTTAGGGAATTTGGGACTCTGCCTATATAAGGTGTT TAAATGTCTTGAGAACAAGCACTGGCTGATACCTCTTGGAGATATGAT CTGAAATGTAATGGAATTTATTAATGGTGTTTAGTAAAGTAGGGGTTA AGGACTTGTTAAAGAACCCCACTATCTCTGAGACCCTATAGCCAAAGC ATGAGGACTTGGAGAGCTACTAAAATGATTCAGGTTTACAAAATGAGC CCTGTGAGGAAAGGTTGAGAGAAGTCTGAGGAGTTTGTATTTAATTATA GTCTTCCAGTACTGTATATTCATTCACTACTTCTACAAATATTTATT

SEQ ID NO:	描述	序列
		<p>GACCCCTTTTGATGTGCAAGGCACTATCGTGCCTCCCTGAGAGTTGCA  AGTATGAAGCAGTCATGGATCATGAACCAAAGGAACCTTATATGTAGAG  GAAGGATAAATCACAAATAGTGAATACTGTTAGATACAGATGATATAT  TTTAAAAGTTCAAAGGAAGAAAAGAATGTGTTAAACACTGCATGAGAG  GAGGAATAAGTGGCATAGAGCTAGGCTTTAGAAAAGAAAAATATCCG  ATACCATATGATTGGTGAGGTAAGTGTATTCTGAGATGAGAATTAGCA  GAAATAGATATATCAATCGGAGTGATTAGAGTGCAGGGTTTCTGGAAA  GCAAGGTTTGGACAGAGTGGTCATCAAAGGCCAGCCCTGTGACTTACA  CTGCATTAATAATTTCTTAGAACATAGTCCCTGATCATTATCACTTTA  CTATTCCAAAGGTGAGAGAACAGATTCAGATAGAGTGCAGCATTGTT  TCCAGTATTCTTTACAAATCTTGGGTTTATTCCAGGTAACCTGAACT  ACTGCATTGTTTCTATCTTAAATACTTTTTAGATATCTAGATGCATCT  TTCAACTTCTAACATTCTGTAGTTTAGGAGTTCTCAACCTGGCATTATT  GACATGTTAGGCCAAATAATTTTTTTTGTGGGAGGTCTCTGTGCGTTTT  AGATGATTAGCAATAATCCCTGACCTGTTATCTACTAAAGACTAGTCGT  TTCTCATCAGTTGTGACAACAAAAATGGTTCAGATATTGCCAAATGCC  CTTTAGAGGACAGTAATCGCCCCCAGTTGAGAACCATTTCAGTAAAAC  TTAATTACTATTTTTCTTTTGGTTTATAAAAATAATGATCTGAATTA  TTGATGGAACCTTGAAGTCGATAAAAATATATTTCTTGCTTTAAAGTCCC  CATACGTGTCCTACTAATTTTCTCATGCTTTAGTGTTTTCACTTTTCTCCT  GTTATCCTTGTACCTAAGAATGCCATCCCAATCCCCAGATGTCCACCTG  CCCAAAGTCTAGGCATAGCTGAAGGCCAAGCTAAAATGTATCCCTCTTT  TTCTGGTACATGCAGCAAAAGTAATATGAATTATCAGCTTTCTGAGAGC  AGGCATTGTATCTGTCTTGTGGTGTACATTGGCACCCAATAAATATT  TGTTGAGTGAATGAATAAATTCCCATAGCACTTTATTCTTCACATGGTA  CATAACTATAGGGGCTATAGCTTGGTACCTTGTGAAGCAACTCTTGGTG  TAACATACCTTATTTCTCATACTAAAATGCAAGAACCTTTAGAGCAAGG  ATCTTGCCATTCATCTTTGTAACCTCTTTACTCTGGAGCACTTGCATTTA  GCAGGCATCATAAAGTTTTACGTACCAAGAAAATGTTGCTGTTTTCTGA  ATACTATGCATCAAAAATGTTACCACTAATTTTTAAAGCTCTGCTAAG  GAATATTGGGGCACCTCAGATGCACCTTTTAATTGATGTCATATTTTC  CTAATCCATACTTTATTCATGAGAATTTGAGTCAACCCAGCATTAGCTT  GGAATTTCCCTTATTTCCCATTTGCTTTGCAGGTGCCTTGGAGTCAGATCT  GGTTTTGAATACTATCTTCTGTTATGTGATCTTGGGCAGTTACTTAATT  TTCTAGTCAATAACCCGTATCTATAAAAATAGAGAAAATAATCCTACACA  CCGGGGCCTGTTGTGGGGCGGGGAGAGGGGGGAGGGATCGCATTGGA  GATACTAATGTAATGACAAGTTAATTGGTGCAGCACACCAACATG  GCTCATGTCTACATATGTAACAAACCTGCACGTTGTGCACATGTGCCCT  AGAACTTAAAGTATAATAAAAAGAAAATTTTAAAAAATCCTGTCAAATA  AGTTATAGTAGAGAATAAAGGATGTGTAAGCACTTTAGTACGTAATAA  GCTTAAAAAATGTAATTTTTACTTCTTCACTGCCTCATTAAATTAGTT  TTATCTTTAATAATACCTTGGATTCAGGGTAAAGTTTTCAGTTATGTCCCA  GTAATCATTTATTTACCCTCGAATCTGCAATTTGGATAGAACATGGTG  GGGACAGCTCGTCTCTATTCCCTTGCAGCATTAAACAGGCTGGAGGCACCA  CTTCTCTGGCCAGCAAGTTGGGCCTGGTTGTTGGCTGAGAGCCTCAGTT  CCTTTCTGCACAGGTTTCTCTTTACATAGGCTTCTCAACAGGGCTACTA  GAGCATCGTCACCATAGCAGCTGTCTTATAACAGAGAGTGGTCGGTCTG  AGAGACAAAAAATGGAAGCTGCCAAATTGTTCTGGGTCTGGAACTGT  CAGGGCATCACTTGTGCCATATTCAGTTGGCCTAAGAATTACAGAGCCT  GCCTCGATTCAAAGGGAGAGGATAGAGAGGACTGAAGGAATCAGTGCT  CATCTTTAATATGCAGCAGGACAGGTTTGGGATTTTTTTTCCCCTTGAG  TCTGTGAAGGCATTACTTAAGAACAAAGTCAGGCATGTATAATTGAACT  ACAGTTACTTGAATATAAGCCAGAAAGTTTCAGATAATAAATAACAA  CTATTTTCTGCTGTTACCCTTGTACCTAAAGATGCCATCCTAATCCCCA  GATCTCCACAACATACTACATAGTAGAAGGTTAAAATGTATCCCTCT  TTTTCTGGTGCATCCAGCAAAAGTAATATCATGAATTATGAGCTCTCTG  AGAGCAAGGATCATATCAGTCTTGTATTGTTGCAGTGAACAAGTACA  GTTGCAGATATTCAGGAGTAATTATCTAAATGGCAGTAGGCTTATAAAA  CTGAATTTTACCAGCCACACCCTCCCCCAACTCCTTATCTGTAAAAA  GCTTATTTGAGTGGTTACCTGTCTTTCAGTAAAGATTGCGCTTGCATATTT</p>

SEQ ID NO:	描述	序列
		<p>GCTGTCATTGCATATTCTGCTTAATTAAGCTCTGTTGATATTGCAGTTTC  TGTGCATACTTACATCTTAGATGCAATCTGAGGGCCTAGGAAGGCCTTT  TAAAAATAAAACAATTCCGATTGCAGAGAAAGTGTAAGTCAAGGACAG  TTAATTCAAGGGGAACATAGAAAGCTATTTAGATTTTAGTTGATGGTGC  CAGTCTTCAGCGTAAAGTCAAAGTGGAGGGAAAGTTTAGTAAGGAAAA  AATGTTGGGCTTGGGAATACATTGTTTAGTCTTCAAAGCACTTTACTTTTT  ATGAAATATATTTTAGACATTTCAGCAAATATTGAATACTTACTATATCA  GGCAGTAAAGATATAAATTCATTCTTAAAATGTGCAACATGTTCAAAC  GAAAAAATACATTCTTAAACAGGAAACTTTTTCTTCATACTTTTTAA  TTAACAAGACATATAAGAGTTGCATTAATGGGCGTGCTTATGATTGATC  ACCCAGCAGCATCATTAGAAATAATATATTTTATTCATGTGCAGAAATC  TTTTGGTTGTCTGGGGAACCTTGAACACAGAAAAGAGCTTTTATTGAT  AAGGTAATTGAACACACTTGACAATTAGCTTAATATGGTTAATACCAT  TTGTGGGAGAAGATGAATCAGCCAGGCTCTTACGTCAAGAATATGAA  GTTTCTCTGAGTCAACCACTTAAGATGAGTACGGAGACTGCAGTGA  AAAGTTAAATATCCAAGTACACCAGCCAATTTACACAGTGGAAACCAT  GCTGTCCTCGGGCACCTGCACCTCGCCCAACAGTCATCAACTAGATGG  AGGCTCCTGGCTGCAAGGAGATTTGATGGGAATGAGTAAATGTGTCA  GCATAGTCCGTCCCTTCTAATGGAAAAGCAACCCAAAGAGCAAATCCT  ATTAATGGCTGGATCAGTATCATCTACTTGTCAAAAACATTCCATGAAT  TATGAGTCAAAATTTTATTTATGGTGGCATTACACACATTAAGAGATGA  GGACTTCTGTTAGCATAATTTATTAGCTGGAAAAGTTGAGAAGGTTCTC  TGGACTCATTTTTATAGGTGGAACCTAAGTGATCTGGATAATTGCCAC  CAGCAAAATTGCTGGGCATGGTGGACAAAGAAAATGTTCTTCTAATG  ATTTTTTATGAGCTGAGTAGCTATTGTTCCAGCTGAGTGCTTTTTCT  CTTTTTATTGTTGCTGAGCAAAAGAATTTATAAAAAGCTCTTTCTTTGT  ATTA AAAACCCTGCTCAATTGAAATGCAAGTTCATTAAGTAATCTTCAT  TTCTCTCCTGCCATAATAACCCTTTCCCTCTCTGTTTCGATTCAACAGTA  TCTAGCAGCACTGCTCCAAATTTTAAAGTCTGAACAGACTATATTACATA  GATGTAGAGAAATACTCAATCTTCAGCATTAAAGAGGGAGCTTAATTTCA  CACGGGTGGAATATGATCACTCAGGCTAGATGTTGGCCATAAATTTCAA  ATTAGTATCTCAACTTAGCAGGGGGGATCAACAGTGGCAAACCTTCAATT  ATGACAGGATAAAAAATCACATAGAGATATTGGTTCAATATGGACATCT  AACTATAATGCTAAAAGCCAATAATTAGAATAAGTTCATTTTAAAGAA  AAGCATTAAATAATATTAGCTAACGTTTAGTACCTGTGCCAAACATTCTA  CCTATGTTACCTTGATTTTCATAGCCAGCCTAAGAGGTAATATTATGTAT  CCCCATTTTACAGGTTAAGAAACAGGCTCAGAGGAGTTTAGGATCTTTT  CCAAGATTACATAGCCAGTAAGTGGTGGCACTAGGAACCAAATTCAGA  CTCTGAATCGCATGCTGTTTATATTATATTGCACTCATTAAATATGTG  GGAATCAGAATGAAGGGGCTTGTATGACTTTTGGCTCATTTTTTTGATGC  ATGTGACCTGGGATTATAAATGTGAAATTAGGTTTACGAAAGGATCCA  GTGTCATTGTGCATCATGGGCAAGGAGTACCTAATCTCTTTAATTCTTC  CCTGGAAGCTTACGATGTCCATCCAAGTGCACATAGCAAAAAGTTCTGTT  GTAAAGTTTAGCAGAGTGACTTTCTTTGACTCAGAGTGATGACGGAGG  AAGCTTTGATAAGATTTTATCTGAAAATGTTTCATGGACAAGAGCTTTCAA  GGAGAACATCCAGAGCAAGGTTCTGAAGACAGCTCATGAAGGTGAAGC  AGCAGACCTGGCACAAGAAATGAAGAGAGAGCTCAGTGTATTAAGAT  GAAAACAAGAAAACCGAATATATTGAAAGGAGCAGAGAGGCAATGAA  ACAAGACAACCTGAAATGAGGTAACCTGCAGCAATTGAAAGGGAATTT  CAGTACTTTTATAGAATTTCTAAAAATGTTTCTGCTGTTTATTTTCAA  TTTTGAACAGGGTTATTTGTCCATGCCATACTTTTTTTGCCAAATTTCAA  AATTGTGTATAGTTCTATAGTTGTCTGGTGGAGTCAATGGAACCTTAGT  TACCAGTCTAAGAATGTGTCTTTGAGATTGTCCAGTTAATTTCTATTTT  CAGTAGCTGTAATAAATGGTGAAGGTTTCTGACTCCTGGAGAAAGT  TTCTAACTCCTTATGACTAATATTCATAACAGACTTGTGAGTTTCTTGA  CATGGATACACCTATATGCAAGAGTGTATTCCAAAGCTAACTCAGTGAT  CTTTCCATTTATCTATTCTTGGATTAGTGGTGCCTTTGCTCTTTCTTCTG  TAAATGTGAATAGTTAAGAGTTGACTGCAGAAGTGTTTACACTTTGGCT  TCCATGCCTCTGGAATGTTTGTGCTTTGGTGGTGAAGTGTGAGACTATA  TTTGTATAGTCTGCATCTCTCAGGCTGCCCCAGAATGTTGTACAGTGCA</p>

SEQ ID NO:	描述	序列
		GTGCTGAAGAAAGCAGCAGGTACACACAGAAATGCAGCCTTTCCTGGT TAACCCTGCTTGGATCTGAGTTACACTTTGTTTCCTGACTTCTTGGGACT TAGGTAATCAGTTTGCCTTCTACTCTATCTCATTTTGTACTCGCTTACAT ACTACATTCTTGTGGGCTTTCGTTTCTTCTTGTAAAGCAGAGATTTTTT AAAATCCAATATGTGAAAATACGGATGCACTACAATTAATAAAATAAA ATGCTGTTGTGTTTGTGTTTGTCTTAAAATTGTAAAGGATAAACAATAAG ATAGTTTTATCTATGTGGTTTTCCCGATGCAGTTAAAATAAACCTAAT CTGCTAAAATTGAA
93	TAZ (GenBank 登錄號 NM_000116.5)	GCTTCCGGCGGTTGCACCGGGCCGGGGTGCCAGCGCCCGCCTTCCCGT TTCTCCCGTTCCGCAGCGCGCCACGGCCTGTGACCCCGGCGACCGCT CCCCAGTGACGAGAGAGCGGGGCGGGGCGCTGCTCCGGCCTGACCTGC GAAGGGACCTCGGTCCAGTCCCCTGTTGCGCCGCGCCCCCGTCCGTCCG TGCGCGGGCCAGTCAGGGCCAGTGTCTCGAGCGGTTCGAGGTCGCAGA CCTAGAGGCGCCCCACAGGCCGGCCCGGGGCGCTGGGAGCGCCGGCCG CGGGCCGGGTGGGGATGCCTCTGCACGTGAAGTGGCCGTTCCCCGCGG TGCCGCCGCTCACCTGGACCCTGGCCAGCAGCGTCGTCATGGGCTTGGT GGCACCTACAGCTGCTTCTGGACCAAGTACATGAACCACCTGACCGT GCACAACAGGGAGGTGCTGTACGAGCTCATCGAGAAGCGAGGCCCGGC CACGCCCTCATCACCGTGTCCAATCACAGTCCCTGCATGGACGACCCT CATCTCTGGGGATCCTGAAACTCCGCCACATCTGGAACCTGAAGTTGA TGCCTTGGACCCCTGCAGCTGCAGACATCTGCTTACCAAGGAGCTACA CTCCCACTTCTTTCAGCTTGGGCAAGTGTGTGCCTGTGTGCCGAGGAGCA GAATTTTTCCAAGCAGAGAATGAGGGGAAAGGTGTTCTAGACACAGGC AGGCACATGCCAGGTGCTGGAAAAAGAAGAGAGAAAGGAGATGGCGT CTACCAGAAGGGGATGGACTTCATTTTGGAGAAGCTCAACCATGGGGA CTGGGTGCATATCTTCCAGAAGGGAAAGTGAACATGAGTTCGAATT CCTGCGTTTCAAGTGGGGAATCGGGCGCCTGATTGCTGAGTGTATCTC AACCCCATCATCCTGCCCTGTGGCATGTCGGAATGAATGACGTCCTTC CTAACAGTCCGCCCTACTTCCCCCGCTTTGGACAGAAAATCACTGTGCT GATCGGGAAGCCCTTCAGTGCCCTGCCTGTACTCGAGCGGCTCCGGGCG GAGAACAAGTCGGCTGTGGAGATGCGGAAAGCCCTGACGGACTTCATT CAAGAGGAATTCCAGCATCTGAAGACTCAGGCAGAGCAGCTCCACAAC CACCTCCAGCCTGGGAGATAGGCCTTGCTTGGCTGCCTTCTGGATTCTTG GCCGACAGAGCTGGGGCTGAGGGATGGACTGATGCTTTTAGCTCAA ACGTGGCTTTTAGACAGATTTGTTTATAGACCTCTCAAGTGCCCTCTC CGAGCTGGTAGGCATTCAGCTCCTCCGTGCTTCTCAGTTACACAAAG GACCTCAGCTGCTTCTCCCACTTGGCCAAGCAGGGAGGAAGAAGCTTA GGCAGGGCTCTCTTCTTCTTGCCTTTCAGATGTTCTCTCCAGGGGCTG GCTTTCAGGAGGGAGCATAGAAGGCAGGTGAGCAACCAGTTGGCTAGGG GAGCAGGGGGCCACCAGAGCTGTGGAGAGGGGACCCCTAAGACTCCTC GGCTGGCTCCTACCCACCGCCCTTGCCGAACCAGGAGCTGCTCACTAC CTCCTCAGGGATGGCCGTTGGCCACGTCTTCTTCTGCCTGAGCTTCCCC CCCACCACAGGCCCTTTCCTCAGGCAAGGTCTGGCCTCAGGTGGGCCGC AGGCGGGAAAAGCAGCCCTTGGCCAGAAGTCAAGCCCAGCCACGTGGA GCCTAGAGTGAGGGCCTGAGGTCTGGCTGCTTGGCCCCATGCTGGCGCC AACAACTTCTCCATCCTTTCTGCCTCTCAACATCACTTGAATCCTAGGGC CTGGGTTTTTATGTTTTTGAACAGAACATAAAGCATATGTGTTGGCT TGTTGTAATAA
94	ANGPTL3 (GenBank 登錄號 NM_014495.4)	AGAAGAAAACAGTTCACGTTGCTTGAATTTGAAAATCAAGATAAAAA TGTTCACAATTAAGCTCCTTCTTTTTATTGTTCTCTAGTTATTTCTCCA GAATTGATCAAGACAATTCATCATTTGATTCTCTATCTCCAGAGCCAAA ATCAAGATTTGCTATGTTAGACGATGTAAAAATTTTAGCCAATGGCCTC CTTCAGTTGGGACATGGTCTTAAAGACTTTGTCCATAAGACGAAGGGCC AAATTAATGACATATTTCAAAAACCTCAACATATTTGATCAGTCTTTTTA TGATCTATCGCTGCAACCAGTGAATCAAAGAAGAAGAAAAGGAACT GAGAAGAACTACATATAAACTACAAGTCAAAAATGAAGAGGTAAAGA ATATGTCACTTGAACCTCAACTCAAACTTGAAGCCTCCTAGAAGAAA AAATTCTACTTCAACAAAAGTGAATATTTAGAAGAGCAACTAACTA ACTTAATTCAAAAATCAACCTGAAACTCCAGAACACCCAGAAGTAACTT CACTTAAAACTTTTGTAGAAAAACAAGATAATAGCATCAAAGACCTTCT

SEQ ID NO:	描述	序列
		<p>CCAGACCGTGGAAGACCAATATAACAATTAACCAACAGCATAGTCA  AATAAAAGAAATAGAAAATCAGCTCAGAAGGACTAGTATTCAAGAACC  CACAGAAATTTCTCTATCTTCCAAGCCAAGAGCACCAAGAACTACTCCC  TTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCTCG  CTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATAACAAGTGGCATGT  ATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGT  TATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGGATCA  CAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGG  CTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGA  AGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACA  ACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGAAACCAA  CTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGCAATC  CCGAAAACAAAGATTTGGTGTCTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAAA  GGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTATTTCAGGAGGCTGGTGGTGGCAT  GATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGA  GCAAAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAAGTCTCAA  AATGGAAGGTTATACTCTATAAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAA  CAGATTCAGAAAGCTTTGAATGAACTGAGGCAAAATTTAAAGGCCAATA  ATTTAAACATTAACCTCATTCCAAGTTAATGTGGTCTAATAATCTGGTA  TTAAATCCTTAAGAGAAAGCTTGAGAAATAGATTTTTTTTTATCTTAAAG  TCACTGTCTATTTAAGATTAACATAACAATCACATAACCTTAAAGAATA  CCGTTTACATTTCTCAATCAAAAATTTTATAAATACTATTTGTTTTAAAT  TTGTGATGTGGGAATCAATTTTAGATGGTACAATCTAGATTATAATCA  ATAGGTGAACTTATTAATAAATTTTCTAAATAAAAAATTTAGAGACTT  TTATTTTAAAAGGCATCATATGAGCTAATATCACAACTTTCCAGTTTA  AAAACTAGTACTCTTGTAAAATCTAACTTGACTAAATACAGAGG  ACTGGTAATTGTACAGTTCTTAAATGTTGTAGTATTAATTTCAAACCTA  AAAATCGTCAGCACAGAGTATGTGTA AAAATCTGTAATACAAATTTTTA  AACTGATGCTTCATTTTGTACAAAATAATTTGGAGTAAATGTTTGATA  TGATTTATTTATGAAACCTAATGAAGCAGAATTAATACTGTATTA AAA  TAAGTTCGCTGTCTTTAAACAAATGGAGATGACTACTAAGTCACATTGA  CTTTAACATGAGGTATCACTATACCTTATTTGTTAAAATATATACTGTAT  ACATTTTATATATTTTAACTTAATACTATGAAAACAAATAATTGTAA  AGGAATCTTGTGAGATTACAGTAAGAATGAACATATTTGTGGCATCGA  GTTAAAGTTTATATTTCCCCTAAATATGCTGTGATTCTAATACATTCGTG  TAGGTTTTCAAGTAGAAATAAACCTCGTAACAAGTACTGAACGTTTAA  ACAGCCTGACAAGCATGTATATATGTTTAAAATCAATAAAACAAAGAC  CCAGTCCCTAAATTAAGAAATTTAAATTTCTTGCATGTTTATCGAC  ATCACAAACAGATCCCTAAATCCCTAAATCCCTAAAGATTAGATACAAAT  TTTTTACCACAGTATCACTTGTGAGAATTTATTTTAAATATGATTTTTT  AAAATGCCAGTAAGAAATTTTAAATTAACCCATTGTTAAAGGATAT  AGTGCCCAAGTTATATGGTGACCTACCTTTGTCAATACTTAGCATTATG  TATTTCAAATTATCCAATATACATGTCATATATATTTTTATATGTCACAT  ATATAAAAGATATGTATGATCTATGTGAATCCTAAGTAAATATTTTGT  CCAGAAAAGTACAAAATAATAAAGGTAAAAATAATCTATAATTTTTCAG  GACCACAGACTAAGCTGTGAAATTAACGCTGATTTTTTTAGGGCCAGA  ATACCAAAATGGCTCCTCTCTTCCCCAAAATTTGGACAATTTCAAATGC  AAAATAATTCATTATTTAATATATGAGTTGCTTCTCTATTTGGTTCC</p>
95	<p>DGAT2  (GenBank 登錄號  NM_0012538  91.1)</p>	<p>TGCCCGTTGTGAGGTGATAAAGTGTGCGCTCCGGGACGCCAGCGCC  GCGGCTGCCGCTCTGCTGGGTCTAGGCTGTTTCTCTCGCGCCACCAC  TGCCCGCCGCGCAGCTCCAGGTGTCTAGCCGCCAGCCTCGACGCC  GTCCCGGGACCCCTGTGCTCTGCGCAAGCCCTGGCCCCGGGGCCGG  GGCATGGGCCAGGGGCGCGGGGTGAAGCGGCTTCCCGCGGGGCCGTGA  CTGGGCGGGCTTACCCATGAAGACCCTCATAGCCGCCTACTCCGGGGT  CCTGCGCGGCGAGCGTCAGGCCGAGGCTGACCGGAGCCAGCGCTCTCA  CGGAGGACCTGCGCTGTGCGCGAGGGGTCTGGGAGATGGGGAGTGGC  CTGCAGTGCCATCCTCATGTACATATTCTGCACTGATTGCTGGCTCATC  GCTGTGCTCTACTTCACTTGGCTGGTGTGACTGGAACACACCCAAGA  AAGGTGGCAGGAGGTCACAGTGGGTCCGAACTGGGCTGTGTGGCGCT  ACTTTCGAGACTACTTTCCCATCCAGCTGGTGAAGACACACAACCTGCT</p>

SEQ ID NO:	描述	序列
		GACCACCAGGA ACTATATCTTTGGATACCACCCCATGGTATCATGGGC CTGGGTGCCTTCTGCAACTTCAGCACAGAGGCCACAGAAGTGAGCAAG AAGTTCCCAGGCATACGGCCTTACCTGGCTACACTGGCAGGCAACTTCC GAATGCCTGTGTTGAGGGAGTACCTGATGTCTGGAGGTATCTGCCCTGT CAGCCGGGACACCATAGACTATTTGCTTTCAAAGAATGGGAGTGCCAA TGCTATCATCATCGTGGTCGGGGGTGCGGCTGAGTCTCTGAGCTCCATG CCTGGCAAGAATGCAGTCACCTGCGGAACCGCAAGGGCTTTGTGAAA CTGGCCCTGCGTCATGGAGCTGACCTGGTTCCCATCTACTCCTTTGGAG AGAATGAAGTGTACAAGCAGGTGATCTTCGAGGAGGGCTCCTGGGGCC GATGGGTCCAGAAGAAGTTCCAGAAATACATTGGTTTCGCCCATGCAT CTTCCATGGTCGAGGCCTCTTCTCCTCCGACACCTGGGGGCTGGTGCC TACTCCAAGCCCATCACCCTGTTGTGGGAGAGCCCATCACCATCCCCA AGCTGGAGCACCAACCCAGCAAGACATCGACCTGTACCACACCATGT ACATGGAGGCCCTGGTGAAGCTCTTCGACAAGCACAAGACCAAGTTCCG GCCTCCCGGAGACTGAGGTCTGGAGGTGAACCTGAGCAGCCCTTCGGG GCCAATTCCTGGAGGAACCGACTGCAAATCACTTTTTTGCTCTGTAAA TTTGGAAGTGCATGGGTGTCTGTGGGTTATTTAAAAGAAATTATAACA ATTTTGCTAAACCATTACAATGTTAGGTCTTTTTTAAGAAGGAAAAAGT CAGTATTTCAAGTTCTTTCACCTCCAGCTTGCCCTGTTCTAGGTGGTGGC TAAATCTGGGCCTAATCTGGGTGGCTCAGCTAACCTCTCTTCTCCCTTC CTGAAGTGACAAAGGAAACTCAGTCTTCTTGGGGAAGAAGGATTGCCA TTAGTGACTTGGACCAGTTAGATGATTCACCTTTTTGCCCTAGGGATGA GAGGCGAAAGCCACTTCTCATAACAAGCCCCTTTATTGCCACTACCCAC GCTCGTCTAGTCCTGAAACTGCAGGACCAGTTTCTCTGCCAAGGGGAGG AGTTGGAGAGCACAGTTGCCCGTTGTGTGAGGGCAGTAGGCATC TGAATGCTCCAGTTTGATCTCCCTTCTGCCACCCCTACCTCACCCCTAG TCACTCATATCGGAGCCTGGACTGGCCTCCAGGATGAGGATGGGGGTG GCAATGACACCCTGCAGGGGAAAGGACTGCCCCCATGCACCATTGCA GGGAGGATGCCGCCACCATGAGCTAGGTGGAGTAACTGGTTTTTCTTGG GTGGCTGATGACATGGATGCAGCACAGACTCAGCCTTGGCCTGGAGCA CATGCTTACTGGTGGCCTCAGTTTACCTTCCCAGATCCTAGATTCTGG ATGTGAGGAAGAGATCCCTCTTCAGAAGGGGCCTGGCCTTCTGAGCAG CAGATTAGTTCCAAAGCAGGTGGCCCCCGAACCAAGCCTCACTTTTCT GTGCCTTCTGAGGGGTTGGGCCGGGGAGGAAACCAACCCTCTCCT GTGTGTTCTGTTATCTCTTGATGAGATCATTGCACCATGTCAGACTTTTG TATATGCCTTGAATAAATGAAAGTGAGAATCCTCTAAAAAAAAAAAA A

【符號說明】

無

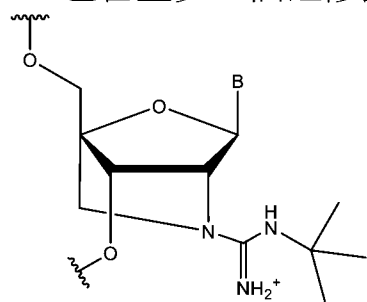
## 【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種反義寡核苷酸(ASO)，其包含 14 至 22 個核苷酸單元及：

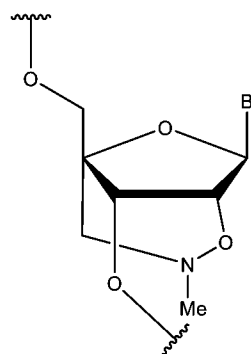
- (a) 中心區域(B')，其包含 6 個或更多個鄰接 DNA 核苷酸；
- (b) 5'-翼區(A')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷；以及
- (c) 3'-翼區(C')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷；

其中該 ASO 之該中心區域與目標 RNA 序列至少 80%互補或雜交；且其中

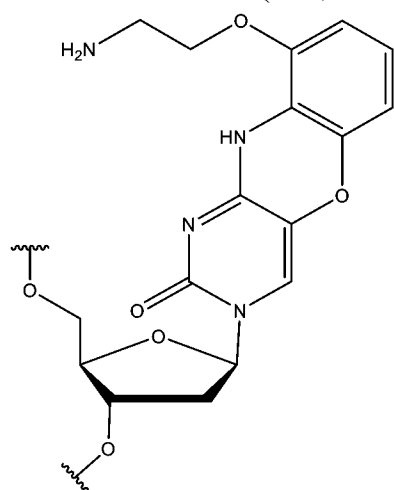
該 ASO 包含至少一個經修飾之核苷酸，其選自：



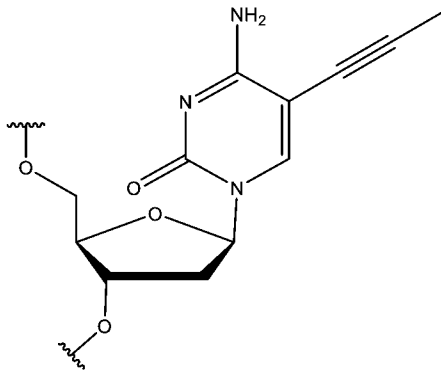
(N-三級丁基-胍(Gutb))，其中 B 為核鹼基，



(N 甲基-LNA (Nmln))，其中 B 為核鹼基，



(G 形夾)，及



(5(Me)-丙炔基(5prml))。

【請求項 2】 如請求項 1 之 ASO，其中(i)該中心區域(B')包含選自 G 形夾及 5prml 的經修飾之核苷酸，(ii)該 5'-翼區(A')包含選自 Gutb 及 Nmln 的經修飾之核苷酸，(iii)該 3'-翼區(C')包含選自 Gutb 及 Nmln 的經修飾之核苷酸，或(iv)其任何組合。

【請求項 3】 如請求項 1 或 2 之 ASO，其中該中心區域(B')包含 2、3、4、5 或 6 個或更多個經修飾之核苷酸。

【請求項 4】 如請求項 1 至 3 中任一項之 ASO，其中該 5'-翼區(A')、該 3'-翼區(C')或兩者均包含選自 Gutb、Nmln、G 形夾及 5prml 的經修飾之核苷酸。

【請求項 5】 如請求項 1 至 4 中任一項之 ASO 分子，其中該 ASO 分子進一步包含 1 個或多個硫代磷酸酯(ps)核苷間鍵聯、甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷間鍵聯或其組合。

【請求項 6】 如請求項 1 至 5 中任一項之 ASO 分子，其中該 ASO 分子進一步包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 個硫代磷酸酯(ps)核苷間鍵聯、甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷間鍵聯或其組合。

【請求項 7】 一種反義寡核苷酸(ASO)，其包含 14 至 22 個核苷酸單元，其中該 ASO 包含：

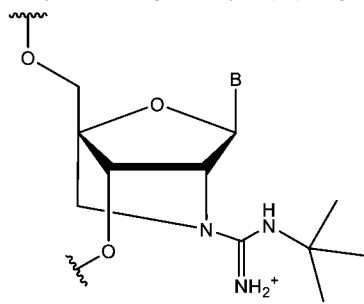
(a)中心區域(B')，其包含 6 個或更多個鄰接 DNA 核苷酸，其中至少一個鄰接 DNA 核苷酸為經修飾之核苷酸，

(b) 5'-翼區(A')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷，以及

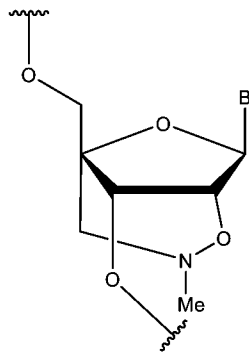
(c) 3'-翼區(C')，其包含 2 至 6 個鎖定核苷酸或 2'位經取代之核苷，

其中該 ASO 之該中心區域與目標 RNA 序列至少 80%互補或雜交，且其中該 ASO 包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 個或更多個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷間鍵聯。

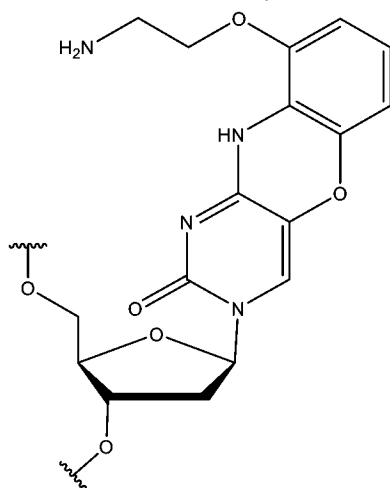
【請求項 8】 如請求項 7 之 ASO，其中該 ASO 包含至少 1 個、至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個或至少 5 個或更多個選自以下的核苷酸：



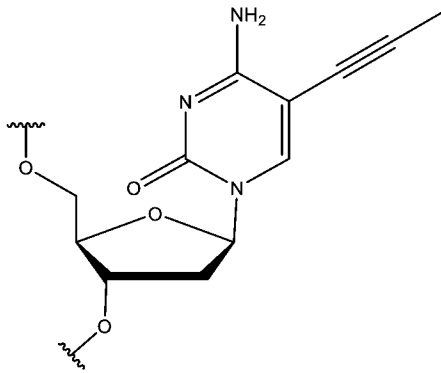
(N-三級丁基-脲(Gutb))，其中 B 為核鹼基，



(N 甲基-LNA (Nmln))，其中 B 為核鹼基，



(G 形夾)，及



(5(Me)-丙炔基(5prml))。

【請求項 9】 如請求項 7 或 8 之 ASO 分子，其中該 ASO 分子進一步包含 1 個或多個硫代磷酸酯(ps)核苷間鍵聯。

【請求項 10】 如請求項 1 至 9 中任一項之 ASO 分子，其中：

(i)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於該 ASO 分子之 5'端的核苷位置 3 與 4 之間；

(ii)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於該 ASO 分子之 5'端的核苷位置 5 與 6 之間；

(iii)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於該 ASO 分子之 5'端的核苷位置 6 與 7 之間；

(iv)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於該 ASO 分子之 5'端的核苷位置 7 與 8 之間；

(v)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於該 ASO 分子之 5'端的核苷位置 8 與 9 之間；

(vi)至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯介於該 ASO 分子之 5'端的核苷位置 9 與 10 之間；或

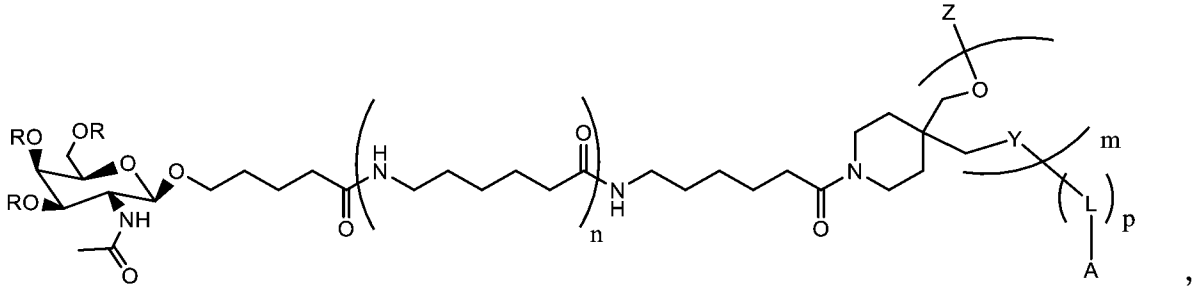
(vii)其組合。

【請求項 11】 如請求項 1 至 10 中任一項之 ASRO，其中該 5'-翼區(A')、該 3'-翼區(C')或兩者均包含至少一個甲磺醯基胺基磷酸酯(yp)核苷酸間鍵聯。

【請求項 12】 如請求項 1 至 11 中任一項之 ASO 分子，其中該 ASO 分子進

一步包含半乳糖。

【請求項 13】 如請求項 12 之 ASO 分子，其中該半乳糖為式(VI)之 N-乙酰基半乳糖(GalNAc)：



其中

m 為 1、2、3、4 或 5；

各 n 獨立地為 1 或 2；

p 為 0 或 1；

各 R 獨立地為 H；

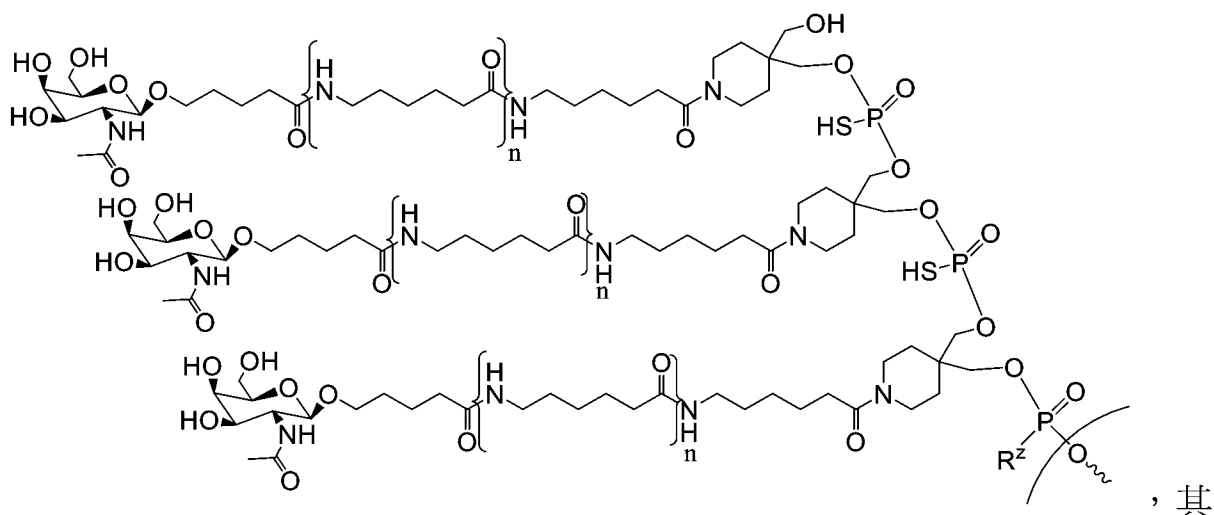
各 Y 獨立地選自 -O-P(=O)(SH)-、-O-P(=O)(O)-、-O-P(=O)(OH)-及 -O-P(S)S-；

Z 為 H 或第二保護基；

L 為連接子，或 L 與 Y 之組合為連接子；且

A 為 H、OH、第三保護基、活化基團或寡核苷酸。

【請求項 14】 如請求項 12 之 ASO 分子，其中該半乳糖為式(VII)之 N-乙酰基半乳糖(GalNAc)：



中  $R^z$  為 OH 或 SH；且各  $n$  獨立地為 1 或 2。

【請求項 15】 如請求項 1 至 14 中任一項之 ASO 分子，其中：

- (i) 該目標 RNA 序列為病毒基因；
- (ii) 該目標 RNA 序列為來自 DNA 病毒的基因；
- (iii) 該目標 RNA 序列為來自雙股 DNA (dsDNA) 病毒的基因；
- (iv) 該目標 RNA 序列為來自嗜肝 DNA 病毒的基因；
- (v) 該目標 RNA 序列為來自 B 型肝炎病毒 (HBV) 的基因；
- (vi) 該目標 RNA 序列為來自基因型 A 至 J 中任一者之 HBV 的基因；或
- (vii) 該目標 RNA 序列係選自 HBV 之 S 基因或 X 基因。

【請求項 16】 如請求項 1 至 14 中任一項之 ASO 分子，其中該目標 RNA 序列係選自編碼甲基化可控 J 蛋白 (MCJ 蛋白) 之基因、編碼 TAZ 之基因、編碼血管生成素樣 3 (ANGPTL3) 之基因、編碼二醯基甘油醯基轉移酶 2 (DGAT2) 之基因及編碼羥基類固醇 17- $\beta$  去氫酶 13 (HSD17B13) 之基因。

【請求項 17】 如請求項 1 至 16 中任一項之 ASO 分子，其中 (i) 該 ASO 之該 5'-翼區包含 2 至 6 個經硫代磷酸酯連接的鎖定核苷；(ii) 該 ASO 之該 3'-翼區包含 2 至 6 個經硫代磷酸酯連接的鎖定核苷；或 (iii) 其組合。

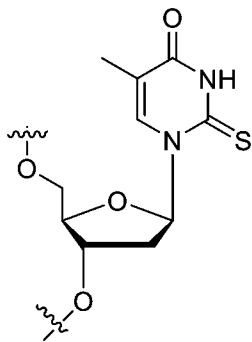
【請求項 18】 如請求項 17 之 ASO，其中該等鎖定核苷係選自 LNA、

ScpBNA、AmNA、AmNA (N-Me)、GuNA、GuNA (N-R<sup>11</sup>)，其中 R<sup>11</sup> 係選自 Me、Et、*i*-Pr、*t*-Bu 及其組合。

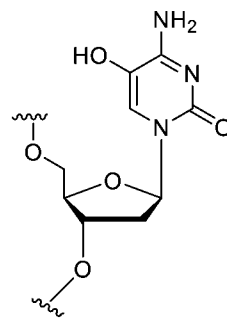
【請求項 19】 如請求項 1 至 18 中任一項之 ASO 分子，其中該 ASO 之該中心區域包含至少 5 個經硫代磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷酸、至少 5 個經甲磺醯基胺基磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷酸，或至少 5 個經一個或多個硫代磷酸酯核苷間鍵聯及一個或多個甲磺醯基胺基磷酸酯核苷間鍵聯連接的鄰接 DNA 核苷酸。

【請求項 20】 如請求項 5 至 19 中任一項之 ASO 分子，其中該 ASO 之該中心區域包含 8 至 10 個經硫代磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷酸、8 至 10 個經甲磺醯基胺基磷酸酯連接之鄰接 DNA 核苷酸，或 8 至 10 個經一個或多個硫代磷酸酯核苷間鍵聯及一個或多個甲磺醯基胺基磷酸酯核苷間鍵聯連接的 DNA 核苷酸。

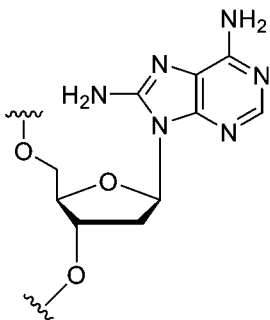
【請求項 21】 如請求項 1 至 20 中任一項之 ASO，其中該 ASO 包含至少一個具有以下結構的經修飾之核苷酸：



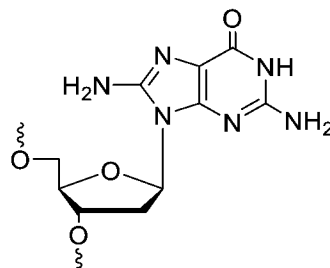
(「(2s)T」)、



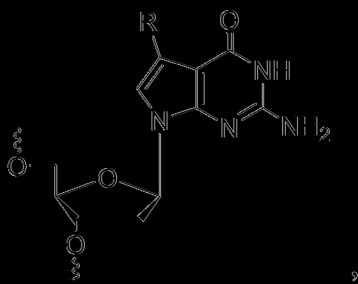
(「(5OH)C」)、



(「(8nh)A」)、



(「(8nh)G」)， 或

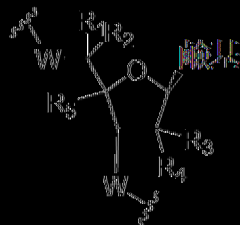


其中：

R 為鹵素或 R' C C；且

R' 為 C<sub>6-12</sub> 芳基、5 員至 12 員雜芳基、經基 C<sub>1-6</sub> 烷基或 C<sub>1-7</sub> 烷鏈基鹵基。

[請求項 22] 如請求項 1 至 21 中任一項之 ASO，其中該 ASO 包含至少一個具有以下結構的經修飾之核苷酸：



其中：

W 獨立地為 O、N 或 S；

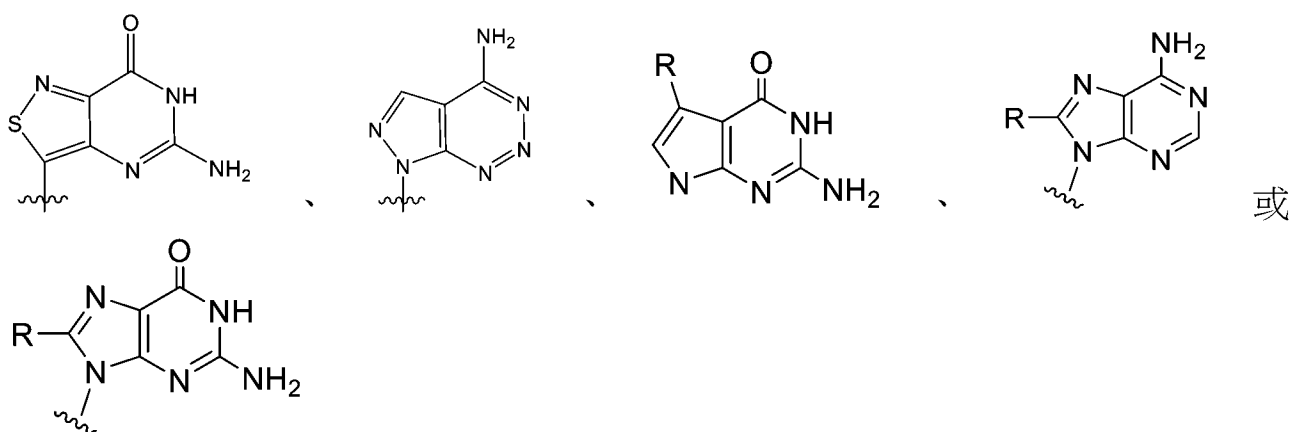
R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> 及 R<sub>3</sub> 獨立地為 H 或 D；

R<sub>3</sub> 為 H 或 F；

R<sub>4</sub> 為 F 或 OCH<sub>3</sub>；且

鹼基為





其中：

R 為鹵素或  $R'-C\equiv C-$ ；且

R'表示  $C_{6-12}$  芳基、5 員至 12 員雜芳基、羥基- $C_{1-6}$  烷基，或  $C_{1-7}$  烷醯基氧基。

【請求項 23】一種如表 1 中所示的 ASO 分子。

【請求項 24】一種醫藥組合物，其包含如請求項 1 至 22 中任一項之 ASO 分子；及醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項 25】如請求項 24 之醫藥組合物，其進一步包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10 個或更多個如請求項 3 至 22 中任一項之 ASO 分子。

【請求項 26】如請求項 24 或 25 之醫藥組合物，其進一步包含另一種治療劑。

【請求項 27】如請求項 26 之醫藥組合物，其中該另一種治療劑係選自核苷酸類似物、核苷類似物、衣殼組裝調節劑(CAM)、重組干擾素、進入抑制劑、小分子免疫調節劑及寡核苷酸療法，其中該寡核苷酸療法視情況選自另一種反義寡核苷酸(ASO)、短干擾核酸(siNA)、NAP 或 STOPS™。

【請求項 28】一種治療患有 B 型肝炎病毒(HBV)感染之個體的方法，其包含向存在 HBV 之該個體投與如請求項 1 至 23 中任一項之 ASO 或如請求項 24 至 27 中任一項之醫藥組合物。

【請求項 29】 如請求項 28 之方法，其進一步包含投與另一種治療劑。

【請求項 30】 如請求項 29 之方法，其中該另一種治療劑係選自核苷酸類似物、核苷類似物、衣殼組裝調節劑(CAM)、重組干擾素、進入抑制劑、小分子免疫調節劑及寡核苷酸療法，其中該寡核苷酸療法視情況選自另一種反義寡核苷酸(ASO)、短干擾核酸(siNA)、NAP 或 STOPS™。

【請求項 31】 如請求項 28 之方法，其中該另一種治療劑係選自由以下組成之群：包括 ALG-010133、ALG-000184、重組干擾素  $\alpha$ 2b、IFN-a、PEG-IFN-a-2a、拉米夫定(lamivudine)、替比夫定(telbivudine)、阿德福韋雙匹酯(adefovir dipivoxil)、克來夫定(clevudine)、因提弗(entecavir)、替諾福韋阿拉芬胺(tenofovir alafenamide)、替諾福韋雙索酯(tenofovir disoproxil)、NVR3-778、BAY41-4109、JNJ-632、JNJ-3989 (ARO-HBV)、RG6004、GSK3228836、REP-2139、REP-2165、AB-729、VIR-2218、DCR-HBVS、JNJ-6379、GLS4、ABI-HO731、JNJ-440、NZ-4、RG7907、EDP-514、AB-423、AB-506、ABI-H03733 及 ABI-H2158。

【請求項 32】 如請求項 28 至 31 中任一項之方法，其中該 ASO 與該另一種治療劑同時或連續投與。

【請求項 33】 如請求項 28 至 32 中任一項之方法，其中該治療包含降低該個體的 HBV 病毒載量、降低該個體的病毒抗原水平，或其組合。

【請求項 34】 一種減少個體中之目標基因表現的方法，其包含向該個體投與如請求項 1 至 23 中任一項之 ASO 或如請求項 24 至 27 中任一項之醫藥組合物。

【請求項 35】 如請求項 34 之方法，其中該目標基因為該個體內源的基因或該目標基因對於該個體而言不為內源的。

【請求項 36】 如請求項 34 或 35 之方法，其中該個體患有選自以下之疾病：

B 型肝炎病毒(HBV)、冠狀病毒感染及肝臟疾病，其中該肝臟疾病視情況選自非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)及肝細胞癌(HCC)。

【請求項 37】 如請求項 28 至 36 中任一項之方法，其中該個體為哺乳動物，視情況為成人。

【請求項 38】 如請求項 28 至 37 中任一項之方法，其中該 ASO 係以至少 1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、11 mg/kg、12 mg/kg、13 mg/kg、14 mg/kg 或 15 mg/kg 的劑量投與。

【請求項 39】 如請求項 28 至 38 中任一項之方法，其中該 ASO 係以 0.5 mg/kg 至 50 mg/kg、0.5 mg/kg 至 40 mg/kg、0.5 mg/kg 至 30 mg/kg、1 mg/kg 至 50 mg/kg、1 mg/kg 至 40 mg/kg、1 mg/kg 至 30 mg/kg、1 mg/kg 至 20 mg/kg、3 mg/kg 至 50 mg/kg、3 mg/kg 至 40 mg/kg、3 mg/kg 至 30 mg/kg、3 mg/kg 至 20 mg/kg、3 mg/kg 至 15 mg/kg、3 mg/kg 至 10 mg/kg、4 mg/kg 至 50 mg/kg、4 mg/kg 至 40 mg/kg、4 mg/kg 至 30 mg/kg、4 mg/kg 至 20 mg/kg、4 mg/kg 至 15 mg/kg、4 mg/kg 至 10 mg/kg、5 mg/kg 至 50 mg/kg、5 mg/kg 至 40 mg/kg、5 mg/kg 至 30 mg/kg、5 mg/kg 至 20 mg/kg、5 mg/kg 至 15 mg/kg，或 5 mg/kg 至 10 mg/kg 之間的劑量投與。

【請求項 40】 如請求項 28 至 39 中任一項之方法，其中該 ASO 投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 次。

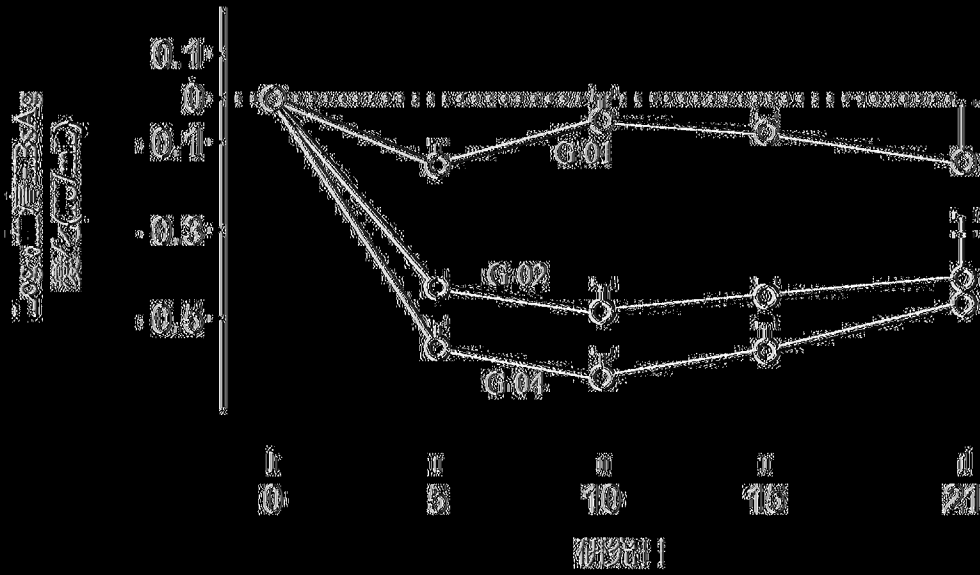
【請求項 41】 如請求項 28 至 40 中任一項之方法，其中該 ASO 一天投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 次、一週投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 次或一個月投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 次。

【請求項 42】 如請求項 28 至 41 中任一項之方法，其中該 ASO 每 1、2、

3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或 21 天投與至少一次。

【請求項 43】 如請求項 28 至 42 中任一項之方法，其中該 ASO 投與至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或 21 天或至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、51、52、53、54 或 55 週之時段。

(發明圖式)



○ : G-01 : 200mg / 5 ml/kg + SC

□ : G-02 : ASO-69 : 5 ml/kg + SC 第 1 次 第 3 次 : GaINAc-J, NA 組

△ : G-04 : ASO-87 : 5 ml/kg + SC 第 1 次 第 3 次 : GaINAc-NimIn, ASO

圖 1