(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119095603 A
(43)申请公布日 2024.12.06

(21)申请号 202280082659.9
(22)申请日 2022.12.15
(30)优先权数据
21215511.3 2021.12.17 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/086212 2022.12.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/111210 EN 2023.06.22
(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士
(72)发明人 K·布莱谢尔 J·费尔伯 E·丰德 S·卢昂塞 T·尼尔松 S·奥特森 J·M·波塞维森特 T·特林赫伊森
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 张莉 黄革生
(51)Int.Cl.
A61K 31/713(2006.01)
A61P 31/20(2006.01)

权利要求书2页 说明书135页
序列表（电子公布） 附图51页

(54)发明名称

用于调节RTEL1和FUBP1的寡核苷酸的组合

(57)摘要

本发明涉及以下项的组合:端粒延伸解旋酶1调控因子(RTEL1)和远端上游元件结合蛋白1(FUBP1)抑制剂,诸如寡核苷酸(寡聚物),其分别与RTEL1或FUBP1互补,引起对RTEL1和FUBP1的表达的调节或者对RTEL1和FUBP1活性的调节。本发明特别地涉及RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的组合,其用于在治疗和/或预防疾病、优选乙型肝炎病毒(HBV)感染、特别是慢性HBV感染中使用。本发明特别地涉及RTEL1和FUBP1抑制剂的组合用于使cccDNA、诸如HBV cccDNA去稳定的用途。本发明还包括一种药物组合物、一种试剂盒及其在HBV感染的治疗和/或预防中的用途。

CN 119095603 A

1.一种组合物,其包含RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂。

2.一种药物组合物,其包含RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂或其药用盐,以及药用的稀释剂、溶剂、载体、盐和/或辅助剂。

3.一种试剂盒,其包括RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂。

4.根据权利要求1或2所述的组合物、或根据权利要求3所述的试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂能够减少受感染细胞中的cccDNA。

5.根据前述权利要求中任一项所述的组合物或试剂盒,其中RTEL1抑制剂为长度为12至60个核苷酸、优选地长度为12至30个核苷酸、更优选地长度为12至25个、甚至更优选地15至21个核苷酸的核酸分子,其包含长度为至少10个核苷酸的与哺乳动物RTEL1靶核酸、特别是人RTEL1靶核酸至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%互补的连续核苷酸序列,其中所述核酸分子能够减少RTEL1的表达。

6.根据权利要求5所述的组合物或试剂盒,其中所述哺乳动物RTEL1靶核酸选自SEQ ID NO:1或2,优选SEQ ID NO:1。

7.根据权利要求6所述的组合物或试剂盒,其中能够减少RTEL1的表达的反义寡核苷酸选自包含以下或由以下组成的反义寡核苷酸的组:

AATTttacatactctgGT(SEQ ID NO:243),

AAttttacatactctGGTC(SEQ ID NO:244),

TTacatactctggtCAAA(SEQ ID NO:245),

CTttattataactTgaAtCTC(SEQ ID NO:246),以及

CTttattataacttgaaTCTC(SEQ ID NO:246),

其中大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,并且所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

8.根据前述权利要求中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述FUBP1的抑制剂能够减少受感染细胞中的cccDNA和/或pgRNA。

9.根据前述权利要求中任一项所述的组合物或试剂盒,其中FUBP1抑制剂为长度为12至60个核苷酸、优选地长度为12至30个核苷酸、更优选地长度为12至25个、甚至更优选地15至21个核苷酸的核酸分子,其包含以下项或由以下项组成:长度为10至30个核苷酸、优选地长度为12至25个、特别是15至21个核苷酸的连续核苷酸序列,其中所述连续核苷酸序列与哺乳动物FUBP1靶核酸、特别是人FUBP1靶核酸至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%互补,其中所述核酸分子能够抑制FUBP1的表达。

10.根据权利要求9所述的组合物或试剂盒,其中所述哺乳动物FUBP1靶核酸选自SEQ ID NO:247至254,优选SEQ ID NO:247。

11.根据权利要求10所述的组合物或试剂盒,其中能够抑制FUBP1的表达的单链反义寡核苷酸选自包含以下或由以下组成的反义寡核苷酸的组:

CTTatGctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

CTTaTgctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

CTtATgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

CTtAtgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

CTtAtgctttttatGgTT(SEQ ID NO:326),

CTtAtgctttttatGGTT(SEQ ID NO:326),

GcttTttatggtTtCAC(SEQ ID NO:327),

TATgcTttttatggtTTC(SEQ ID NO:328),

AcCAAttttcatttCtAC(SEQ ID NO:329),以及

CcccataaccataGTC(SEQ ID NO:330),

其中大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,并且所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

12.根据前述权利要求中任一项所述的组合物或试剂盒,其用于在疾病、优选乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗或预防中使用。

13.一种RTEL1的抑制剂,其用于在疾病的治疗或预防中使用,其中所述治疗或预防进一步包括施用FUBP1的抑制剂。

14.一种FUBP1的抑制剂,其用于在疾病的治疗或预防中使用,其中所述治疗或预防进一步包括施用RTEL1的抑制剂。

15.一种RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的组合,其用于在疾病的治疗或预防中使用。

用于调节RTEL1和FUBP1的寡核苷酸的组合

技术领域

[0001] 本发明涉及以下项的组合:端粒延伸解旋酶1调控因子(RTEL1)和远端上游元件结合蛋白1(FUBP1)抑制剂,诸如寡核苷酸(寡聚物),其分别与RTEL1或FUBP1互补,引起对RTEL1和FUBP1的表达的调节或者对RTEL1和FUBP1活性的调节。本发明特别地涉及RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的组合,其用于在治疗和/或预防疾病、优选乙型肝炎病毒(HBV)感染、特别是慢性HBV感染中使用。本发明特别地涉及RTEL1和FUBP1抑制剂的组合用于使cccDNA、诸如HBV cccDNA去稳定的用途。本发明还包括一种药物组合物、一种试剂盒及其在HBV感染的治疗和/或预防中的用途。

背景技术

[0002] 乙型肝炎是一种由乙型肝炎病毒(HBV)引起的传染病,乙型肝炎病毒是一种小型的嗜肝病毒,其可通过反转录复制。慢性HBV感染是导致严重肝病(诸如肝硬化和肝细胞癌)的关键因素。目前对慢性HBV感染的治疗是基于施用聚乙二醇化的1型干扰素或核苷(核苷酸)类似物的,诸如拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替诺福韦二吡呋酯和替诺福韦艾拉酚胺,它们可靶向病毒聚合酶(一种多功能反转录酶)。治疗是否成功通常以乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的损失量来衡量。然而,由于感染后乙型肝炎病毒DNA仍然存在于体内,因此很难完全清除HBsAg。HBV持续性是由附加体形式的HBV基因组介导的,该基因组稳定地存在于细胞核中。这种附加体形式被称为“共价闭合环状DNA”(cccDNA)。cccDNA可作为所有HBV转录本的模板,包括前基因组RNA(pgRNA,一种病毒复制中间体)。少量cccDNA拷贝的存在可能足以再次引发全面的HBV感染。目前对HBV的治疗并不针对cccDNA。然而,慢性HBV感染的治愈需要消除cccDNA(由Nassal,Gut.2015年12月;64(12):1972-84.doi:10.1136/gutjnl-2015-309809综述)。

[0003] 端粒延伸解旋酶1调控因子(RTEL1)编码一种DNA解旋酶,该DNA解旋酶在端粒的稳定性、保护和延伸中发挥作用,并与已知在DNA复制过程中保护端粒的保卫蛋白复合物(shelterin)中的蛋白质相互作用。该基因的突变与先天性角化不全和霍耶尔-赫里达斯(Hoyerall-Hreidarsson)综合征有关(参见例如Vannier等人的综述,2014Trends Cell Biol.第24卷第416页)。

[0004] RTEL1位于细胞核中,作为一种ATP依赖性DNA解旋酶,参与端粒长度调节、DNA修复和基因组稳定性维持。RTEL1用作一种抗重组酶,可抵抗毒性重组并限制减数分裂过程中的交叉,以及通过物理解离链侵入事件来调节减数分裂重组和交叉稳态,从而通过减数分裂合成依赖性链退火(SDSA)和分解D环重组中间体来促进非交叉修复。另外,RTEL1可解构T环并通过抵消端粒G4-DNA结构来预防端粒脆性,这些共同确保端粒的动态性和稳定性。

[0005] RTEL1已在siRNA筛选中被识别为HPV附加体的稳定剂:(Edwards等人,2013PLoS One第8卷,e75406)。靶向RTEL1的siRNA同样已被用于在霍耶尔-赫里达斯综合征中识别与RTEL1的相互作用物(Schertzer等人,2015Nucleic Acid Res第43卷第1834页)。此外,从必需宿主蛋白的siRNA筛选中将RTEL1识别为HIV宿主依赖性因子,以提供用于抑制HIV感染的

靶标(WO 2007/094818)。

[0006] WO2020011902A1涉及一种RTEL1抑制剂,其在HBV感染,特别是慢性HBV感染的治疗中使用。

[0007] 远端上游元件结合蛋白1(FUBP1或FBP1)是与多个DNA元件结合的单链DNA结合蛋白。这种蛋白质也被认为结合RNA,并且含有3'-5'解旋酶活性,在DNA-DNA和RNA-RNA双链体上具有体外活性。已知FUBP1通过结合位于未分化细胞中c-myc的上游的远端上游元件(FUSE)来激活原癌基因c-myc的转录。该蛋白质主要存在于细胞核中。在许多类型的癌症中都已观察到FUBP1的上调。此外,FUBP1可以结合丙型肝炎病毒和肠道病毒的RNA并介导其复制(Zhang和Chen 2013Oncogene第32卷第2907-2916页)。

[0008] FUBP1也已在肝细胞癌(HCC)中被鉴定出来,其中它被认为参与HCC肿瘤发生(Ramdzan等人2008Proteomics第8卷第5086-5096页),并且如使用靶向FUBP1的慢病毒表达的shRNA所示,FUBP1是HCC肿瘤生长所必需的(Rabenhorst等人2009Hepatology第50卷第1121-1129页)。

[0009] 已经证明,携带慢病毒表达的shRNA的敲低FUBP1可增强卵巢癌的治疗反应(Zhang等人2017Oncology Letters第14卷第5819-5824页)。

[0010] WO 2004/027061公开了一种筛选方法,其包括分析受试物质是否抑制FBP的步骤和用于治疗增生性疾病的药物组合物,其含有作为活性成分的一种抑制FBP的物质。

[0011] 一些抑制FUBP1的小分子已被鉴定,其目的都是治疗癌症(Huth等人2004J Med.Chen第47卷第4851-4857页;Hauck等人2016Bioorganic&Medicinal Chemistry第24卷第5717-5729页Hosseini等人2017Biochemical Pharmacology第146卷第53-62页以及Xiong等人2016Int J Onc第49卷第623页)。WO2004/017940描述了SN-38的基于脂质的制剂,其声称治疗病毒感染,特别是HIV,然而没有实例支持这一点。

[0012] 聚(U)结合剪接因子60(PUF60)是HBV前基因组表达的转录和转录后步骤的潜在调节因子。已知PUF60与和c-myc抑制相关的FUBP1形成复合物。然而,FUBP1不参与HBV前基因组表达的PUF60依赖性调节(Sun等人2017Scientific Reports 7:12874)。

[0013] HBV感染仍然是全世界的主要健康问题,估计有3.5亿慢性携带者受到影响。大约25%的携带者会死于慢性肝炎、肝硬化或肝癌。乙型肝炎病毒是仅次于烟草的第二大致癌物,导致所有原发性肝癌的60%至80%。HBV的传染性是HIV的100倍。

[0014] WO2019/193165A1涉及用于在治疗HBV感染中使用的FUBP1抑制剂。

[0015] 发明目的

发明内容

[0016] 本发明涉及一种RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的组合,诸如包含RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的组合物或药物组合物。RTEL1的抑制剂能够抑制RTEL1的表达和/或活性;并且FUBP1的抑制剂能够抑制FUBP1的表达和/或活性。适当地,RTEL1的抑制剂能够抑制RTEL1核酸的表达。适当地,FUBP1的抑制剂能够抑制FUBP1核酸的表达。本发明进一步涉及用于在治疗或预防疾病中使用的所述组合、组合物或药物组合物。

[0017] 本发明还涉及一种包括RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的试剂盒。RTEL1的抑制剂能够抑制RTEL1的表达和/或活性;并且FUBP1的抑制剂能够抑制FUBP1的表达和/或活性。

适当地,RTEL1的抑制剂能够抑制RTEL1核酸的表达。适当地,FUBP1的抑制剂能够抑制FUBP1核酸的表达。本发明进一步涉及用于在治疗或预防疾病中使用的所述试剂盒。

[0018] 本发明还涉及一种用于治疗或预防疾病的方法,该方法包括向患有或易患该疾病的受试者施用治疗或预防有效量的RTEL1的抑制剂,其中该方法进一步包括施用有效量的FUBP1的抑制剂。

[0019] 本发明还涉及一种用于治疗或预防疾病的方法,该方法包括向患有或易患该疾病的受试者施用治疗或预防有效量的FUBP1的抑制剂,其中该方法进一步包括施用有效量的RTEL1的抑制剂。

[0020] 本发明还涉及一种用于治疗或预防疾病的方法,该方法包括向患有或易患该疾病的受试者施用治疗或预防有效量的RTEL1的抑制剂和治疗或预防有效量的FUBP1的抑制剂的组合。

[0021] 本发明还涉及FUBP1的抑制剂和RTEL1的抑制剂用于制备药物的用途,该药物用于治疗或预防乙型肝炎病毒(HBV)和/或癌症。

[0022] 本发明提供了一种用于在表达RTEL1和FUBP1的靶细胞中调节RTEL1和FUBP1表达的体内或体外方法,所述方法包括向所述细胞施用有效量的FUBP1的抑制剂和RTEL1的抑制剂。

[0023] 在特定实施例中,疾病是乙型肝炎病毒(HBV)感染和/或癌症。

[0024] 在特定实施例中,疾病是慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染。

[0025] 本发明人已经令人惊讶地证明了RTEL1抑制剂和FUBP1抑制剂的组合提供了HBV的协同抑制。

[0026] 序列表

[0027] 与本申请一起提交的序列表通过引用并入本文。如果序列表与本说明书或附图不一致,本说明书(包括附图)中所公开的信息应视为正确。

附图说明

[0028] 图1化合物243_1(SEQ ID NO:243)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至三价GalNAc部分

[0029] 图1A化合物243_1(SEQ ID NO:243)的残基A

[0030] 图2化合物244_1(SEQ ID NO:244)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至三价GalNAc部分

[0031] 图2A化合物244_1(SEQ ID NO:244)的残基A

[0032] 图3化合物245_1(SEQ ID NO:245)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至三价GalNAc部分

[0033] 图3A化合物245_1(SEQ ID NO:245)的残基A

[0034] 图4化合物246_1(SEQ ID NO:246)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至三价GalNAc部分

[0035] 图4A化合物246_1(SEQ ID NO:246)的残基A

[0036] 图5图5示出了示例性GalNAc部分。图5L中的化合物由单体GalNAc亚磷酰胺组成,该亚磷酰胺作为合成的一部分添加至寡核苷酸,同时仍在固体支持物上,X为S或O,Y为S或O

并且n＝1至3(参见WO 2017/178656)。图5B和图5D在本文中也被称为GalNAc2或GN2,其分别不带有和带有C6接头。

[0037] 图6图6A-L:示出了示例性反义寡核苷酸缀合物,其中寡核苷酸由如上所述的术语“A”表示。图6A-D中的化合物包含二赖氨酸支链分子,PEG3间隔物和三个末端GalNAc碳水化合物部分。在图6A(图6A-1和图6A-2示出了同一化合物的两种不同非对映异构体)和图6B(图6B-1和图6B-2示出了同一化合物的两种不同非对映异构体)的化合物中,寡核苷酸在无烷基接头的情况下直接连接至脱唾液酸糖蛋白受体靶向缀合物部分。在图6C(图6C-1和图6C-2示出了同一化合物的两种不同非对映异构体)和图6D(图6D-1和图6D-2示出了同一化合物的两种不同非对映异构体)的化合物中,寡核苷酸经由C6接头连接至脱唾液酸糖蛋白受体靶向缀合物部分。图6E-K中的化合物包含可商业获得的三倍体支链分子和不同长度和结构的间隔物以及三个末端GalNAc碳水化合物部分。图6L中的化合物由单体GalNAc亚磷酰胺组成,该亚磷酰胺作为合成的一部分添加至寡核苷酸,同时仍在固体支持物上,其中X＝S或O且独立地Y＝S或O并且n＝1至3(参见WO 2017/178656)。

[0038] 图7:体外测试寡核苷酸CMP ID No 243_1、244_1、245_1和246_1在人细胞系MDA-MB-231中的浓度依赖性效力和功效。

[0039] 图8化合物325_1(SEQ ID NO:325)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至GalNAc部分

[0040] 图8A化合物325_1(SEQ ID NO:325)的残基A

[0041] 图9化合物325_2(SEQ ID NO:325)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至GalNAc部分

[0042] 图9A化合物325_2(SEQ ID NO:325)的残基A

[0043] 图10化合物326_1(SEQ ID NO:326)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至GalNAc部分

[0044] 图10A化合物326_1(SEQ ID NO:326)的残基A

[0045] 图11化合物326_2(SEQ ID NO:326)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至GalNAc部分

[0046] 图11A化合物326_2(SEQ ID NO:326)的残基A

[0047] 图12化合物326_3(SEQ ID NO:326)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至GalNAc部分

[0048] 图12A化合物326_3(SEQ ID NO:326)的残基

[0049] 图13化合物326_4(SEQ ID NO:326)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至GalNAc部分

[0050] 图13A化合物326_4(SEQ ID NO:326)的残基A

[0051] 图14化合物327_1(SEQ ID NO:327)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至GalNAc部分

[0052] 图14A化合物327_1(SEQ ID NO:327)的残基A

[0053] 图15化合物328_1(SEQ ID NO:328)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至GalNAc部分

[0054] 图15A化合物328_1(SEQ ID NO:328)的残基A

[0055] 图16化合物329_1(SEQ ID NO:329)经由磷酸二酯连接的DNA二核苷酸缀合至GalNAc部分

[0056] 图16A化合物329_1(SEQ ID NO:329)的残基A

[0057] 图17图17示出了抗FUBP1化合物在Hela细胞中的体外功效分析的结果。将FUBP1 mRNA水平归一化并显示为相对于对照物的百分比。

[0058] 图18靶标接合:FUBP1 mRNA。如实例2.3中所述,已经在HBV感染的PHH细胞中测试了四种反义寡核苷酸化合物。每种化合物每周一次以10μM的浓度递送到细胞,持续三周。在最后一次治疗后一周对FUBP1 mRNA靶向KD进行了评估。根据制造商的方案,使用MagNA Pure robot和MagNA Pure 96Cellular RNA大容量试剂盒从细胞中提取总RNA,并通过TaqMan qPCR定量FUBP1 mRNA。该图显示了靶mRNA与阴性对照(NDC=1)相比的残留表达,寡核苷酸在10μM下测试。将数据归一化为人GUSB参考基因,并报告每个测试的寡核苷酸的两个生物学重复的平均值+SD。图中突出显示了50%和20%的FC。CMP ID NO:326_3显示最佳FUBP1 mRNA KD,在10μM时mRNA表达分别降低80%。与现有技术寡聚物(CMP ID No:276_1和291_1)相比,CMP ID NO:329_1显示减少FUBP1 mRNA的最强效果,与具有CMP ID NO:326_3的寡核苷酸相同。与NDC相比,它们在10μM时均降低了约80%的靶mRNA表达。

[0059] 图19肝内HBV DNA的Southern印迹,其揭示cccDNA和总HBV DNA在FUBP1和RTEL1 LNA单一处理臂中减少,在FUBP1+RTEL1组合臂中进一步增强。使用用于检测的HBV特异性全基因组长度探针对PXB小鼠肝脏总DNA提取物进行Southern印迹。DNA浓度通过NanoDrop调整,并且每泳道加载15ug DNA。红色框指示cccDNA条带。

[0060] 图20通过qPCR对肝内cccDNA和总HBV DNA水平进行的半定量。

[0061] 图21基线校正血清HBV DNA水平的动力学。

[0062] 图22基线校正血清HBsAg的动力学

[0063] 图23基线校正血清HBeAg的动力学

[0064] 图24通过RT-qPCR评定的RTEL1和FUBP1 LNA分子的肝内靶标参与和功效

[0065] 图25使用单个FUBP1 ASO(GalNAc-326_3)、单个RTEL1 ASO(GalNAc-245_1)、两个RTEL1/FUBP1双重ASO(Gal-NAc-350_1和Gal-NAc-351_1)、FUBP1 ASO(GalNAc-326_3)+RTEL1 ASO(GalNAc-245_1)的组合以及用于参考的阴性对照(Ga-NAc-352_1)进行的HBV感染的PHH中的肝内HBV pRNA的体外减少。

[0066] 图26使用单个FUBP1 ASO(GalNAc-326_3)、单个RTEL1 ASO(GalNAc-245_1)、两个RTEL1/FUBP1双重ASO(Gal-NAc-350_1和Gal-NAc-351_1)、FUBP1 ASO(GalNAc-326_3)+RTEL1 ASO(GalNAc-245_1)的组合以及用于参考的阴性对照(Ga-NAc-352_1)进行的HBV感染的PHH中的肝内HBV RNA的体外减少。

[0067] 图27RTEL1基因表达的剂量响应曲线以及CMP ID NO 352_1(对照)、326_3(FUBP1)、245_1(RTEL1)、350_1(双重)、351_1(双重)和单独施用(即作为两个单独的ASO添加)的326_3(FUBP1)+245_1(RTEL1)的缀合版本的相关EC50值。

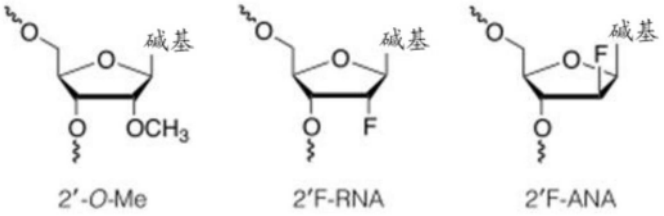
[0068] 图28FUBP1基因表达的剂量响应曲线以及CMP ID NO 352_1(对照)、326_3(FUBP1)、245_1(RTEL1)、350_1(双重)、351_1(双重)和单独施用(即作为两个单独的ASO添加)的326_3(FUBP1)+245_1(RTEL1)的缀合版本的相关EC50值。

[0069] 定义

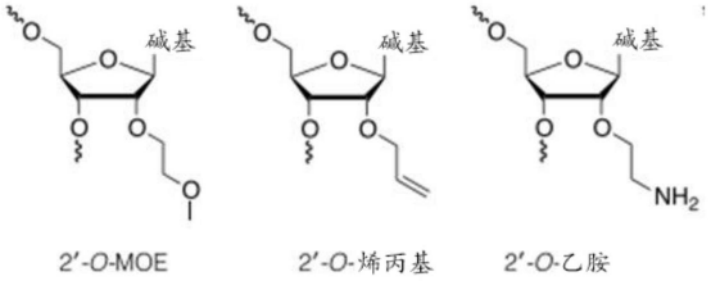
[0070] 2'糖修饰的核苷

[0071] 2'糖修饰的核苷是一种核苷,其在2'位置具有除H或-OH以外的取代基(2'取代的核苷)或包含能够在2'碳与核糖环中的第二个碳原子之间形成桥的2'连接双基,诸如LNA(2'-4'双基桥连)核苷。

[0072] 事实上,人们已花费很多精力开发2'糖取代的核苷,并且发现许多2'取代的核苷掺入寡核苷酸后具有有益的特性。例如,2'修饰的糖可提供对寡核苷酸的增强的结合亲和力和/或增加的核酸酶抗性。2'取代的修饰的核苷的实例是2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)、2'-氨基-DNA、2'-氟-RNA和2'-F-ANA核苷。有关进一步的实例,请参见例如Freier&Altmann;Nucl.Acid Res.,1997,25,4429-4443和Uhlmann;Curr.Opinion in Drug Development,2000,3(2),293-213以及Deleavey和Damha,Chemistry and Biology 2012,19,937。下面为一些2'取代的修饰的核苷的示意图。



[0073]



[0074] 关于本发明,2'取代的糖修饰的核苷不包括像LNA那样的2'桥连的核苷。

[0075] 交替性侧翼间隔聚体

[0076] 侧翼区域可包含LNA和DNA核苷两者,并且由于其包含LNA-DNA-LNA核苷的交替基序,因此称为"交替侧翼"。包含至少一个交替侧翼的间隔聚体称为"交替侧翼间隔聚体"。因此,"交替侧翼间隔聚体"是LNA间隔聚体寡核苷酸,其中至少一个侧翼(F或F')除LNA核苷以外还包含DNA。在一些实施例中,区域F或F'中的至少一者或两者都包含LNA核苷和DNA核苷两者。在这样的实施例中,侧翼区域F或F',或F和F'两者都包含至少三个核苷,其中F和/或F'区域的5'和3'最末端核苷是LNA核苷。交替侧翼LNA间隔聚体公开于WO2016/127002。

[0077] 交替侧翼区域可包含最多3个连续DNA核苷,例如1至2个或1个或2个或3个连续DNA核苷。

[0078] 交替侧翼区域可以注释为一系列整数,表示多个LNA核苷(L)后跟多个DNA核苷(D),例如[L]1-3-[D]1-3-[L]1-3或[L]1-2-[D]1-2-[L]1-2-[D]1-2-[L]1-2。在寡核苷酸设计中,这些将经常表示为数字,使得2-2-1代表5′[L]2-[D]2-[L]3′,并且1-1-1-1-1代表5′[L]-[D]-[L]-[D]-[L]3′。具有交替侧翼的寡核苷酸中侧翼(区域F和F')的长度如上文对此区域的描述,诸如4个至8个、诸如5个至6个核苷,诸如4个、5个、6个或7个修饰的核苷。可能有利的是,在3'侧翼(F"的3'端具有至少两个LNA核苷以赋予额外的核酸外切酶抗性。

[0079] 在一个实施例中,用于在本发明中使用的间隔聚体寡核苷酸可以由下式表示:

[0080] F_{4-6}-G_{7-11}-F'_{2-6},

[0081] 其中F具有$[L]_{1-3}$-$[D]_{1-3}$-$[L]_{1-3}$的设计,且F'具有$[L]_{1-2}$-$[D]_{1-2}$-$[L]_{2-4}$或$[L]_{2-6}$的设计

[0082] 前提条件是gapmer区域F-G-F'的总长度至少为16个核苷酸,诸如17个或18个核苷酸。

[0083] 因此,本发明的gapmer寡核苷酸可包含至少一个交替侧翼。通常,至少区域F为交替侧翼。在一些实施例中,区域F和F'为交替侧翼。在一些实施例中,区域F为交替侧翼并且F'区域为均匀侧翼(即F'仅由一种类型的糖修饰的核苷组成,诸如仅β-D-氧基LNA)。

[0084] 在一些实施例中,区域F的设计选自3-2-1(即LLLDDL)、3-1-1(即LLLDL)、2-1-2(LLDLL)、2-1-1(LLDL)和1-3-1(即LDDDL)的设计。

[0085] 在一些实施例中,区域F'的设计为1-1-3(即LDLLL)或1-1-2(即LDLL)。在一些实施例中,区域F的设计为LL、LLL或LLLL。

[0086] 反义寡核苷酸

[0087] 如本文所用,术语"反义寡核苷酸"或"ASO"定义为能够通过与靶核酸,特别是与靶核酸上的连续序列杂交来调节靶基因的表达的寡核苷酸。反义寡核苷酸在本文中基本上不是双链的,因此不是siRNA或shRNA。优选地,本发明的反义寡核苷酸为单链的。应当理解的是,本发明的单链寡核苷酸可以形成发夹或分子间双链体结构(同一寡核苷酸的两个分子之间的双链体),只要其内部或相互间的自身互补程度小于寡核苷酸全长的50%。

[0088] 优选地,单链反义寡核苷酸不含RNA核苷,因为这将降低核酸酶抗性。

[0089] 优选地,本发明的组合的寡核苷酸包含一个或多个修饰的核苷或核苷酸,诸如2'糖修饰的核苷。此外,优选的是未修饰的核苷是DNA核苷。

[0090] cccDNA(共价闭合环状DNA)

[0091] cccDNA(共价闭合环状DNA)是一些DNA病毒(多瘤病毒科(Polyomaviridae))在细胞核中的繁殖期间产生的特殊DNA结构。cccDNA是以线性形式起源的双链DNA,借助于DNA连接酶连接到共价闭合环。在大多数情况下,病毒DNA的转录只能从环状形式发生。病毒的cccDNA也称为附加体DNA,或者有时也称为微型染色体。

[0092] cccDNA是典型的花椰菜病毒科(Caulimoviridae)和嗜肝病毒科(Hepadnaviridae),包括乙型肝炎病毒(HBV)。HBV基因组在肝细胞核中形成稳定的微型染色体(共价闭合环状DNA(cccDNA))。cccDNA通过衣壳相关的松弛环状DNA(rcDNA)的转化而形成。HBV cccDNA形成涉及多步骤过程,该多步骤过程需要细胞DNA修复机制,并依赖于与不同细胞成分的特定相互作用,这些细胞成分有助于完成rcDNA中的正链DNA(Alweiss等人2017,Viruses,9(6):156)。

[0093] cccDNA是位于感染的肝细胞的细胞核中的病毒基因模板,其中它会产生增值性感染所需的所有HBV RNA转录本,并在慢性HBV感染的自然过程中对病毒的持续性起主要作用(Locarnini&Zoulim,2010Antivir Ther.15增刊3:3-14.doi:10.3851/IMP1619)。cccDNA用作病毒库,是停止治疗后病毒反弹的来源,因此需要长期(通常是终生)治疗。由于各种副作用,因此PEG-IFN仅可施用于一小部分CHB。

[0094] 因此,大多数CHB患者迫切需要新的治疗方法,即通过降解或清除HBV cccDNA来实现完全治愈。

[0095] 组合

[0096] 术语“组合”被理解为用于治疗疾病的至少两种不同的活性化合物或前药(医药化合物或药物)的组合。药物组合可以涉及物理、化学或以其他方式组合(例如,在同一小瓶中)的化合物;包装在一起的化合物(例如,作为同一包装(多部件试剂盒)中的两个单独的物体,用于同时施用、依次施用或单独施用);或单独提供但意在一起使用的化合物(例如,该组合在化合物标签或包装插页上明确说明)。适当地,药物组合由经配制用于口服施用的医疗化合物和经配制用于皮下注射的医疗化合物组成。适当地,本发明的组合的RTEL1抑制剂和FUBP1抑制剂可以存在于相同或单独的组合物中。适当地,本发明的组合的RTEL1抑制剂和FUBP1抑制剂可以同时、依次或单独施用。适当地,本发明的组合的RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂通过生理学不稳定的接头(诸如本申请中所定义的)连接在一起。合适的生理学不稳定的接头可以包含以下项或由以下项组成:具有选自由以下项组成的组的序列的DNA二核苷酸:AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、CC、CG、GA、GT、GC或GG,其中两个DNA核苷之间存在磷酸二酯键。例如,接头可以是CA二核苷酸。

[0097] 互补性

[0098] 术语“互补性”描述了核苷/核苷酸的沃森克里克碱基配对的能力。沃森克里克碱基对为鸟嘌呤(G)-胞嘧啶(C)和腺嘌呤(A)-胸腺嘧啶(T)/尿嘧啶(U)。应当理解,寡核苷酸可包含具有修饰的核碱基的核苷,例如经常使用5-甲基胞嘧啶代替胞嘧啶,因此,术语互补性涵盖未修饰的核碱基和修饰的核碱基之间的沃森克里克碱基配对(参见例如Hirao等人(2012)Accounts of Chemical Research,第45卷第2055页和Bergstrom(2009)Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,增刊37 1.4.1)。

[0099] 如本文所用,术语“互补性百分比”是指核酸分子(例如寡核苷酸)中连续核苷酸序列的与参考序列(例如靶序列或序列基序)互补的核苷酸比例(以百分比表示),该核酸分子跨连续核苷酸序列。因此,通过计数两个序列之间(当与靶序列5’-3’和3’-5’的寡核苷酸序列比对时)互补(形成Watson Crick碱基对)的对准的核碱基数,将其除以寡核苷酸中核苷酸的总数,然后乘以100,来计算互补性的百分比。在这种比较中,未对齐(形成碱基对)的核碱基/核苷酸被称为错配。在计算连续核苷酸序列的互补性百分比时,不允许插入和删除。应当理解的是,在确定互补性时,只要保留了形成Watson Crick碱基配对的核碱基的功能能力,就不考虑核碱基的化学修饰(例如,在计算互补性百分比时,认为5’-甲基胞嘧啶与胞嘧啶相同)。

[0100] 术语“完全互补”是指100％互补性。

[0101] 以下是与靶核酸(SEQ ID NO:12)完全互补的寡核苷酸基序(SEQ ID NO:38)的实例

[0102] 5’-CTTTGACCAGAGTATGTAAAATTCTC-3’(SEQ ID NO:12)

[0103] 3’-AAACTGGTCTCATACATTTT-5’(SEQ ID NO:38)

[0104] 化合物

[0105] 在本文中,术语“化合物”是指能够抑制RTEL1或FUBP1表达或活性的任何分子。本发明的组合的特别的化合物是核酸分子,诸如根据本发明的RNAi分子或反义寡核苷酸或包含此类核酸分子的任何缀合物。例如,在本文中,化合物可以是靶向RTEL1或FUBP1的核酸分子,特别是反义寡核苷酸或siRNA。

[0106] 缀合物

[0107] 如本文所用,术语“缀合物”是指与非核苷酸部分(缀合物部分或区域C或第三区域)共价联接的寡核苷酸。

[0108] 本发明的组合的寡核苷酸(或核酸分子)与一个或多个非核苷酸部分的缀合可以改善该寡核苷酸的药理学,例如,通过影响寡核苷酸的活性、细胞分布、细胞吸收或稳定性实现。在一些实施方案中,缀合物部分是通过改善寡核苷酸的细胞分布、生物利用度、新陈代谢、排泄、渗透性和/或细胞摄入来修饰或增强寡核苷酸的药代动力学特性。特别地,缀合物可将寡核苷酸靶向特定的器官、组织或细胞类型,从而增强寡核苷酸在该器官、组织或细胞类型中的有效性。同时,缀合物可以用于降低寡核苷酸在非靶细胞类型、组织或器官中的活性,例如,脱靶活性或在非靶细胞类型、组织或器官中的活性。对于siRNA核酸分子,缀合物部分最通常共价连接至siRNA的过客链,并且对于shRNA分子,缀合物部分最通常连接至距离shRNA的连续核苷酸序列最远的分子端。对于反义寡核苷酸,缀合物部分可以共价连接至末端中的任一者,有利地使用生物可裂解接头,诸如2个至5个磷酸二酯连接的DNA核苷进行共价连接。

[0109] 通过引用并入本文的WO 93/07883和WO2013/033230提供了合适的缀合物部分。另外的合适的缀合物部分是能够结合脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的缀合物部分的那些。特别地,三价N-乙酰半乳糖胺缀合物部分适用于与ASGPR结合,参见例如US2009/02398、WO 2014/076196、WO 2014/207232和WO 2014/179620(通过引用并入本文)。此类缀合物用于增强肝脏对寡核苷酸的摄取,同时减少寡核苷酸在肾脏中的存在,从而与相同寡核苷酸的非缀合形式相比,增加缀合寡核苷酸的肝脏/肾脏比率。

[0110] 寡核苷酸缀合物及其合成也在Manoharan于Antisense Drug Technology, Principles,Strategies,and Applications,S.T.Crooke编辑,第16章,Marcel Dekker, Inc.,2001中所作综述和Manoharan,Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002,12,103中报导,上述文献各自通过引用整体并入本文。

[0111] 在一个实施例中,非核苷酸部分(缀合物部分)选自由碳水化合物、细胞表面受体配体、药物、激素、亲脂性物质、聚合物、蛋白质、肽、毒素(例如细菌毒素)、维生素、病毒蛋白(例如衣壳)或其组合组成的组。

[0112] 在一些实施例中,所述缀合物是对运铁蛋白受体具有特定亲和力的抗体或抗体片段,例如WO 2012/143379中所公开者,在此以引用方式并入。在一些实施例中,所述非核苷酸部分是抗体或抗体片段,诸如有助于跨脑血管屏障提供药性的抗体或抗体片段,特别是靶向运铁蛋白受体的抗体或抗体片段。

[0113] 连续核苷酸序列

[0114] 术语“连续核苷酸序列”是指与靶核酸互补的寡核苷酸区域。该术语在本文中与术语“连续核碱基序列”和术语“寡核苷酸基序序列”可互换使用。在一些实施方案中,寡核苷酸的所有核苷酸构成连续核苷酸序列。在一些实施例中,连续核苷酸序列包括在siRNA分子的前导链中。在一些实施例中,连续核苷酸序列是shRNA分子的部分,其与靶核酸100%互补。在一些实施例中,寡核苷酸包含连续核苷酸序列,例如F-G-F’缺口聚体区域,并且可以任选地包含其他核苷酸,例如可以用于将官能团(例如用于靶向的缀合物基团)附接至连续核苷酸序列的核苷酸接头区域。核苷酸接头区域可与靶核酸互补或不互补。在一些实施例

中,反义寡核苷酸的核碱基序列是连续核苷酸序列。在一些实施例中,连续核苷酸序列与靶核酸至少80%、诸如至少85%、诸如至少90%、诸如至少95%、诸如至少98%互补。在一些实施例中,连续核苷酸序列与靶核酸100%互补。

[0115] 间隔聚体

[0116] 反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列可以是间隔聚体,也称为间隔聚体寡核苷酸或间隔聚体设计。反义间隔聚体一般用于经由RNA酶H介导的降解来抑制靶核酸。在本发明的实施例中,寡核苷酸能够募集RNA酶H。间隔聚体寡核苷酸包含至少三个不同的结构区域,分别为"5->3"方向的5'侧翼、缺口和3'侧翼F-G-F'。"缺口"区域(G)包含一段使寡核苷酸能够募集RNase H的连续DNA核苷酸。该缺口区域侧翼有包含一个或多个糖修饰的核苷(优选地是高亲和力糖修饰的核苷)的5'侧翼区域(F),以及包含一个或多个糖修饰的核苷(优选地是高亲和力糖修饰的核苷)的3'侧翼区域(F')。区域F和F'中的一个或多个糖修饰的核苷增强寡核苷酸对靶核酸的亲和力(即,亲和力增强的糖修饰的核苷)。在一些实施例中,区域F和F'中的一个或多个糖修饰的核苷是2'糖修饰的核苷,诸如高亲和力的2'糖修饰、诸如独立地选自LNA和2'-MOE。

[0117] 在间隔聚体设计中,缺口区域的5'和3'最末端核苷是DNA核苷,分别位于5'(F)或3'(F')区域的糖修饰核苷附近。侧翼可进一步定义为在距缺口区域最远的端,即在5'侧翼的5'端和3'侧翼的3'端,具有至少一个糖修饰的核苷。

[0118] 区域F-G-F'形成连续核苷酸序列。用于在本发明中使用的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列可包含式F-G-F'的间隔聚体区域。在一些实施例中,式F-G-F'的间隔聚体区域的核苷之间的所有核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。

[0119] 间隔聚体设计F-G-F′的总长度可以是例如12个至32个核苷,诸如13个至24个核苷、诸如14个至22个核苷、诸如14个至17个核苷、诸如16个至18个核苷。在一些实施例中,总长度为17个核苷。在一些实施例中,总长度为17个核苷。

[0120] 举例而言,本发明的缺口聚体寡核苷酸可以由下式代表:

[0121] F_{1-8}-G_{5-18}-F'_{1-8},诸如

[0122] F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{1-8}或

[0123] F_{1-8}-G_{7-16}-F'_{2-8}或

[0124] F_{4-8}-G_{7-12}-F'_{2-8}或

[0125] F_{4-6}-G_{7-11}-F'_{2-6}

[0126] 前提条件是间隔聚体区域F-G-F'的总长度至少为12,诸如至少14个核苷酸。

[0127] 在本发明的一个方面,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列由式5'-F-G-F'-3'的缺口聚体组成或包含该缺口聚体,其中区域F和F'独立地包含1-8个核苷或由其组成,其中1-4个核苷是2'糖修饰的并且限定F和F'区域的5'端和3'端,并且G是能够募集RNA酶H的6个至18个,诸如6个至16个核苷之间的区域。在一些实施例中,G区域由DNA核苷组成。

[0128] 在一些实施例中,区域F和F'的所有经修饰的核苷都是β-D-氧基LNA核苷。此外,区域F或F',或F和F'可任选地包含DNA核苷。任选地,侧翼区域F或F',或侧翼区域F和F'可包含一个或多个DNA核苷(交替侧翼,更多细节参见交替侧翼的定义)。

[0129] 区域F、区域G和区域F'进一步定义如下,并且可以结合到F-G-F'式中。

[0130] 缺口聚体-区域G

[0131] 缺口聚体的区域G(缺口区域)是使得寡核苷酸能够募集RNA酶H诸如人RNA酶H1的核苷(通常是DNA核苷)的区域。RNA酶H是一种识别DNA和RNA之间的双链体并酶促裂解RNA分子的细胞酶。合适地,缺口聚体可以具有长度为至少5个或6个连续DNA核苷的缺口区域(G),诸如5-18个连续DNA核苷、5-17个连续DNA核苷、诸如5-16个连续DNA核苷、诸如6-15个连续DNA核苷,诸如7-14个连续DNA核苷,诸如8-12个连续DNA核苷酸、诸如8-12个连续DNA核苷酸。在一些实施例中,缺口区域G可以由6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个或18个连续DNA核苷组成。在某些情况下,缺口区域的胞嘧啶(C)DNA可被甲基化,此类残基标注为5'-甲基胞嘧啶(^{me}C或用e代替c)。如果在缺口中存在cg二核苷酸以减少潜在的毒性,则缺口中胞嘧啶DNA的甲基化是优选的,该修饰对寡核苷酸的功效没有显著影响。据报道有5'取代的DNA核苷,诸如5'甲基DNA核苷可用于DNA缺口区域(EP 2 742 136)。

[0132] 在一些实施例中,缺口区域G可由12个或更少的(诸如7个)连续DNA核苷组成。8个、9个、10个或11个连续DNA核苷,诸如9个、10个或11个连续DNA核苷。

[0133] 在一些情况下,缺口区中的一个或多个胞嘧啶(C)DNA可能会被甲基化(例如,当DNA c后接DNA g时)。此类残基也被注释为5-甲基-胞嘧啶(^{me}C)。

[0134] 在一些实施例中,缺口区域G可以由6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个或18个连续硫代磷酸酯连接的DNA核苷组成。在一些实施方案中,缺口中的所有核苷间键为硫代磷酸酯键。

[0135] 尽管常规的缺口聚体具有DNA缺口区域,但是存在经修饰的核苷的许多实例,当该核苷在缺口区域内使用时,它们允许RNA酶H募集。已经报道当包括在缺口区域内时能够募集RNA酶H的经修饰的核苷包括,例如,α-L-LNA、C4'烷基化的DNA(如PCT/EP2009/050349和Vester等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.18(2008)2296-2300(两者均通过引用并入本文)所述)、阿拉伯糖衍生的核苷如ANA和2'F-ANA(Mangos等人,2003J.AM.CHEM.SOC.125,654-661)、UNA(未锁定的核酸)(如Fluiter等人,Mol.Biosyst.,2009,10,1039(其通过引用并入本文)中所述)。UNA是非锁定的核酸,通常是核糖的C2与C3之间的键已经被去除,从而形成未锁定的"糖"残基。用于这种间隔聚体中的修饰的核苷可以是当被引入缺口区域时采用2'内式(类DNA)结构的核苷,即允许RNA酶H募集的修饰)。在一些实施例中,本文所述的DNA缺口区域(G)可以任选地包含1个至3个糖修饰的核苷,所述核苷当被引入缺口区域时采用2'内式(类DNA)结构。

[0136] 间隔聚体-侧翼区域,F和F'

[0137] 区域F紧邻区域G的5'DNA核苷。区域F的3'最末端核苷是糖修饰的核苷,诸如高亲和力糖修饰的核苷,例如2'取代的核苷,诸如MOE核苷或LNA核苷。

[0138] 区域F'紧邻区域G的3'DNA核苷。区域F'的5'最末端核苷是糖修饰的核苷,诸如高亲和力糖修饰的核苷,例如2'取代的核苷,诸如MOE核苷或LNA核苷。

[0139] 区域F的长度为1-8个连续核苷酸,诸如长度为2-6个连续核苷酸,诸如长度为3-4个连续核苷酸,或诸如长度为4-6个连续核苷酸。在一些实施例中,区域F的长度为4个连续核苷酸。在一些实施例中,区域F的长度为5个连续核苷酸。在一些实施例中,区域F的长度为6个连续核苷酸。优选地,区域F的5'最末端核苷是糖修饰的核苷。在一些实施例中,区域F的两个5'最末端核苷是糖修饰的核苷。在一些实施例中,区域F的5'最末端核苷是LNA核苷。在一些实施例中,区域F的两个5'最末端核苷是LNA核苷。在一些实施例中,区域F的两个5'最

末端核苷是2'取代的核苷,诸如两个3'MOE核苷。在一些实施例中,区域F的5'最末端核苷是2'取代的核苷,诸如MOE核苷。

[0140] 区域F'的长度为2-8个连续核苷酸,诸如长度为3-6个、诸如4-5个连续核苷酸。在一些实施例中,区域F'的长度为2个连续的核苷酸。在一些实施例中,区域F'的长度为3个连续的核苷酸。在一些实施例中,区域F'的长度为4个连续的核苷酸。在一些实施例中,区域F'的长度为5个连续的核苷酸。有利地,在实施方案中,区域F'的3'最末端核苷是糖修饰的核苷。在一些实施例中,区域F的两个3'最末端核苷是糖修饰的核苷。在一些实施例中,区域F的两个3'最末端核苷是LNA核苷。在一些实施例中,区域F的3'最末端核苷是LNA核苷。在一些实施例中,区域F的两个3'最末端核苷是2'取代的核苷,诸如两个3'MOE核苷。在一些实施例中,区域F的3'最末端核苷是2'取代的核苷,诸如MOE核苷。

[0141] 应当注意,当区域F或F'的长度为一时,优选地,它是LNA核苷。

[0142] 在一些实施例中,区域F和F'独立地由糖修饰的核苷的连续序列组成或包含糖修饰的核苷的连续序列。在一些实施例中,区域F的糖修饰的核苷可独立地选自2'-O-烷基-RNA单元、2'-O-甲基-RNA、2'-氨基-DNA单元、2'-氟-DNA单元、2'-烷氧基-RNA、MOE单元、LNA单元、阿拉伯糖核酸(ANA)单元和2'-氟-ANA单元。

[0143] 在一些实施例中,区域F和F′独立地包含LNA和2′取代的修饰核苷两者(混合型翼设计)。

[0144] 在一些实施例中,区域F和F′仅由一种类型的糖修饰的核苷组成,诸如仅由MOE组成或仅由β-D-氧基LNA组成或仅由ScET组成。这样的设计也称为均匀侧翼或均匀间隔聚体设计。

[0145] 在一些实施例中,区域F或F′或者F和F′的所有核苷均为LNA核苷,诸如独立地选自β-D-氧基LNA、ENA或ScET核苷。在一些实施例中,区域F由1-5个,诸如2-4个、诸如3-4个、诸如1个、2个、3个、4个或5个邻接LNA核苷组成。在一些实施例中,区域F和F′的所有核苷都是β-D-氧基LNA核苷。

[0146] 在一些实施例中,区域F或F'或者F和F'的所有核苷都是2'取代的核苷,诸如OMe或MOE核苷。在一些实施例中,区域F由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个邻接OMe或MOE核苷组成。在一些实施例中,仅一个侧翼区域可以由2′取代的核苷,诸如OMe或MOE核苷组成。在一些实施例中,5'(F)侧翼区域由2'取代的核苷诸如OMe或MOE核苷组成,而3'(F')侧翼区域包含至少一个LNA核苷,诸如β-D-氧基LNA核苷或cET核苷。在一些实施例中,3'(F')侧翼区域由2'取代的核苷,诸如OMe或MOE核苷组成,而5'(F)侧翼区域包含至少一个LNA核苷,诸如β-D-氧基LNA核苷或cET核苷。

[0147] 在一些实施例中,区域F和F'的所有修饰的核苷都是LNA核苷,诸如独立地选自β-D-氧基LNA、ENA或ScET核苷,其中区域F或F'或者F和F'可以任选地包含DNA核苷(交替侧翼,有关更多详细信息,请参见这些的定义)。在一些实施例中,区域F和F'的所有修饰核苷均为β-D-氧基LNA核苷,其中区域F或F'或者F和F'可以任选地包含DNA核苷(交替侧翼,有关更多详细信息,请参见这些的定义)。

[0148] 其他间隔聚体设计公开于WO2004/046160、WO2007/146511和WO2008/113832中,其据此通过引用在此并入。

[0149] 在一些实施例中,区域F和F'的5'和3'最末端核苷是LNA核苷,诸如β-D-氧基LNA核

苷或ScET核苷。

[0150] 在一些实施例中,区域F和区域G之间的核苷间键合是硫代磷酸酯核苷间键合。在一些实施例中,区域F'和区域G之间的核苷间键合是硫代磷酸酯核苷间键合。在一些实施例中,区域F或F',F和F'的核苷之间的核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。

[0151] HBV感染

[0152] 术语"乙型肝炎病毒感染"或"HBV感染"在本领域中是公知的,是指由乙型肝炎病毒(HBV)引起并影响肝脏的传染病。HBV感染可以是急性或慢性感染。

[0153] 一些感染者在最初感染期间没有任何症状,而一些感染者会迅速出现呕吐、皮肤发黄、疲倦、尿色深和腹痛等症状("Hepatitis B Fact sheet N°204".who.int.2014年7月。2014年11月4日检索)。这些症状通常会持续数周并可能导致死亡。症状开始出现可能需要30到180天。在出生时感染的人中,90%会发展为慢性乙型肝炎感染,而在五岁后感染的人中只有不到10%会发展为慢性乙型肝炎感染("Hepatitis B FAQs for the Public-Transmission",U.S.Centers for Disease Control and Prevention(CDC),2011-11-29检索)。大多数慢性病患者没有症状;然而,最终可能会发展出肝硬化和肝癌(Chang,2007,Semin Fetal Neonatal Med,12:160-167)。这些并发症导致15%至25%的患有慢性疾病的那些人死亡("Hepatitis B Fact sheet N°204".who.int.2014年7月,2014年11月4日检索)。在此,术语"HBV感染"包括急性和慢性乙型肝炎感染。术语"HBV感染"还包括初始感染的渐进阶段、症状阶段以及HBV感染的渐进慢性阶段。

[0154] 慢性乙型肝炎病毒(CHB)感染是一种全球性疾病难题,影响着全球2.48亿人。每年约有686,000例死亡归因于HBV相关的晚期肝病和肝细胞癌(HCC)(GBD 2013;Schweitzer等人,2015)。WHO预测,如果不加大干预措施,未来40至50年内,CHB感染者的人数将保持在目前的高水平,2015年至2030年之间累计死亡人数将达到2000万(WHO 2016)。CHB感染不是具有单一临床表现的同质性疾病。感染者在其一生中经历了与CHB相关的肝病的几个阶段,这些疾病阶段也是采用标准护理(SOC)治疗的基础。目前的指南建议基于三个标准(血清ALT水平、HBV DNA水平和肝病严重程度),仅对选定的CHB感染者进行治疗(EASL,2017)。该建议归因于SOC(即核苷(核苷酸)类似物(NAs)和聚乙二醇化干扰素-α(PEG-IFN))无法治愈,必须长期施用从而增加其安全风险的事实。NAs可以有效抑制HBV DNA复制;然而,它们对其他病毒标记物的作用非常有限/没有影响。HBV感染的两个标志,即乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和共价闭合环状DNA(cccDNA),是针对治愈HBV的新药的主要目标。在CHB个体的血浆中,HBsAg亚病毒(空)颗粒数超过HBV病毒粒子103到105倍(Ganem&Prince,2014);据信,其过量可能导致该疾病的免疫发病机制,包括个体无法产生中和性抗HBs抗体,这是在急性HBV感染消退后观察到的血清学标记物。

[0155] 高亲和力修饰的核苷

[0156] 高亲和力修饰的核苷是修饰的核苷酸,其在掺入到寡核苷酸中时,增强了寡核苷酸对其互补靶标的亲和力,例如通过解链温度(T^m)测量。本发明的高亲和力修饰的核苷优选地使每一个修饰的核苷的解链温度增加介于+0.5℃至+12℃之间,更优选地介于+1.5℃至+10℃之间并且最优选地介于+3℃至+8℃之间。许多高亲和力修饰的核苷是本领域已知的,并且包括例如许多2'取代的核苷,例如,Ome和MOE,以及锁定的核酸(LNA)(参见例如Freier&Altmann;Nucl.Acid Res.,1997,25,4429-4443和Uhlmann;Curr.Opinion in Drug

Development,2000,3(2),293-213)。

[0157] 杂交

[0158] 如本文所用,术语“杂交”(hybridizing或hybridizes)应当理解为两条核酸链(例如,寡核苷酸,诸如siRNA前导链和靶核酸)在相反链上的碱基对之间形成氢键,从而形成双链体。两条核酸链之间结合的亲和力为杂交的强度。它通常根据解链温度(T_m)来描述,该解链温度被定义为一半寡核苷酸与靶核酸形成双链体的温度。在生理条件下,T_m与亲和力并不严格成比例(Mergny和Lacroix,2003,Oligonucleotides 13:515-537)。标准状态的吉布斯自由能ΔG°更精确地表示结合亲和力,并且通过ΔG°=-RTln(K_d)与反应的解离常数(K_d)相关,其中R为气体常数,并且T为绝对温度。因此,寡核苷酸与靶核酸之间的反应的非常低的ΔG°反映了寡核苷酸与靶核酸之间的强杂交。ΔG°是与水浓度为1M、pH为7、温度为37℃的反应相关的能量。寡核苷酸与靶核酸的杂交是自发反应,而自发反应的ΔG°小于零。ΔG°可经由实验来测量,例如,利用如Hansen等人1965年在Chem.Comm.36-38和Holdgate等人,2005,Drug Discov Today中所述的等温滴定量热法(ITC)方法测量。技术人员将知道商用设备可用于ΔG°测量。ΔG°还可以使用SantaLucia,1998,Proc Natl Acad Sci USA.95:1460-1465所述的最近相邻模型,适当使用Sugimoto等人,1995,Biochemistry 34:11211-11216和McTigue等人,2004,Biochemistry43:5388-5405描述的推导的热力学参数在数值上进行估计。为了具有通过杂交调节其预期的核酸靶标的可能性,对于长度为10-30个核苷酸的寡核苷酸,本发明的寡核苷酸与靶核酸以低于-10kcal的估计ΔG°杂交。在一些实施方案中,杂交的程度或强度通过标准状态吉布斯自由能ΔG°测量。对于长度为8-30个核苷酸的寡核苷酸,寡核苷酸可与靶核酸以低于-10kcal,诸如低于-15kcal、诸如低于-20kcal和诸如低于-25kcal的ΔG°估值杂交。在一些实施例中,寡核苷酸以-10至-60kcal,诸如-12至-40、诸如-15至-30kcal或-16至-27kcal诸如-18至-25kcal的ΔG°估值与靶核酸杂交。

[0159] 同一性

[0160] 如本文所用,术语“同一性”是指核酸分子(例如寡核苷酸)中连续核苷酸序列的与参考序列(例如序列基序)相同的核苷酸比例(以百分比表示),该核酸分子跨连续核苷酸序列。因此,通过计数两个序列(在用于在本发明中使用的化合物的连续核苷酸序列中和在参考序列中)相同(匹配)的对准核碱基数,将该数除以寡核苷酸的核苷酸总数再乘以100,来计算同一性百分比。因此,同一性百分比=(匹配数x 100)/比对区域的长度(例如,连续核苷酸序列)。在计算连续核苷酸序列的同一性百分比时,不允许插入和删除。应当理解的是,在确定同一性时,只要保留了形成Watson Crick碱基配对的核碱基的功能能力,就不考虑核碱基的化学修饰(例如,在计算同一性百分比时,认为5-甲基胞嘧啶与胞嘧啶相同)。

[0161] 表达的抑制

[0162] 如本文所用,术语“表达的抑制”应理解为,寡核苷酸抑制靶细胞中靶标(即,RTEL1或FUBP1)的数量或活性的能力的总称。活性的抑制可以通过测量靶标前体mRNA或靶标mRNA的水平,或通过测量细胞中靶标或靶标活性的水平来确定。因此,可以在体外或体内确定表达的抑制。

[0163] 通常,通过比较由于向靶细胞施用有效量的反义寡核苷酸而导致的对活性的抑制并将该水平与从未施用反义寡核苷酸的靶细胞(对照实验)获得的参考水平或已知的参考水平(例如,在施用有效量的反义寡核苷酸之前的表达的水平,或预先确定的或以其他方式

已知的表达水平)进行比较来确定表达的抑制。

[0164] 例如,对照实验可以是动物或人,或用盐水组合物或参考寡核苷酸(通常是乱序对照)处理的靶细胞。

[0165] 术语抑制(名词)或抑制(动词)也可称为下调、降低、抑制、减少、减低靶标的表达。

[0166] 表达的抑制可能诸如通过降解前体mRNA或mRNA(诸如,使用RNA酶H募集寡核苷酸,诸如间隔聚体)发生。

[0167] 抑制剂

[0168] 术语“抑制剂”是本领域已知的并且涉及能够完全或部分预防或降低(a)特定蛋白质(例如,FUBP1或RTEL1的特定蛋白质)的生理功能(即活性)的化合物/物质或组合物。

[0169] 在本发明的上下文中,FUBP1的“抑制剂”能够通过预防或降低FUBP1基因产物的表达来分别预防或降低FUBP1的活性/功能。

[0170] 类似地,在本发明的上下文中,RTEL1的“抑制剂”能够通过预防或降低RTEL1基因产物的表达来分别阻止或降低RTEL1的活性/功能。

[0171] 因此,FUBP1或RTEL1的抑制剂可以分别引起FUBP1或RTEL1的表达水平降低(例如,分别为FUBP1或RTEL1 mRNA的水平降低,或FUBP1或RTEL蛋白的水平降低),这反映在FUBP1或RTEL1的功能性(即活性)的降低,其中所述功能包括聚-A聚合酶功能。因此,在本发明的上下文中,FUBP1的抑制剂还可以涵盖能够降低FUBP1的水平的FUBP1表达的转录阻遏物。

[0172] 因此,在本发明的上下文中,RTEL1的抑制剂还可以涵盖能够降低RTEL1的水平的RTEL1表达的转录阻遏物。术语“抑制剂”还涵盖其药用盐。优选的抑制剂为核酸分子。

[0173] 接头

[0174] 键或接头是两个原子之间的连接,其经由一个或多个共价键将一个目标化学基团或区段与另一个目标化学基团或区段联接。缀合物部分可直接或通过联接部分(例如接头或系链)连接到寡核苷酸。接头可将第三区域,例如缀合物部分(区域C),共价连接至第一区域,例如与靶核酸互补的寡核苷酸或连续核苷酸序列(区域A)。

[0175] 在本发明的一些实施例中,本发明的组合的缀合物或寡核苷酸缀合物可以任选地包含位于与靶核酸互补的寡核苷酸或连续核苷酸序列(区域A或第一区域)和缀合物部分(区域C或第三区域)之间的接头区域(第二区域或区域B和/或区域Y)。

[0176] 区域B是指包含生理上不稳定的键或由其组成的可生物裂解的接头,该键在哺乳动物体内通常遇到的条件下或与之相似的条件下可裂解。生理上不稳定的接头经历化学转化(例如裂解)的条件包括化学条件,诸如pH、温度、氧化或还原条件或试剂,以及在哺乳动物细胞中遇到的盐浓度或与之相似的盐浓度。哺乳动物细胞内条件还包括通常存在于哺乳动物细胞中的酶活性,诸如来自蛋白水解酶或水解酶或核酸酶的酶活性。在一个实施例中,可生物切割的接头对S1核酸酶切割敏感。在优选的实施方案中,核酸酶易感接头包含1至10个核苷,诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10核苷,更优选地是2至6个核苷,并且最优选地是2至4相连接的核苷,该相连接的核苷包含至少两个连续磷酸二酯键,诸如至少3或4或5个连续磷酸二酯键。优选地,该核苷是DNA或RNA。在一个实施例中,寡核苷酸和缀合物部分之间的接头是生理上不稳定的接头,由2个至5个连续的磷酸二酯连接的核苷组成,在反义寡核苷酸的连续核苷酸序列的5’或3’端包含至少两个连续的磷酸二酯键。

[0177] 在一些实施例中,生理上不稳定的接头包含DNA二核苷酸或由其组成,该DNA二核

苷酸具有选自由以下项组成的组的序列:AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、CC、CG、GA、GT、GC或GG,其中两个DNA二核苷酸之间存在磷酸二酯键,并且在二核苷酸的5'或3'端至少有一个磷酸二酯连接核酸分子的寡核苷酸至二核苷酸或连接缀合物部分至二核苷酸。例如,接头可以是CA二核苷酸。在一些实施例中,生理上不稳定的接头包含序列AAA、AAT、AAC、AAG、ATA、ATT、ATC、ATG、ACA、ACT、ACC、ACG、AGA、AGT、AGC、AGG、TAA、TAT、TAC、TAG、TTA、TTT、TTC、TAG、TCA、TCT、TCC、TCG、TGA、TGT、TGC、TGG、CAA、CAT、CAC、CAG、CTA、CTG、CTC、CTT、CCA、CCT、CCC、CCG、CGA、CGT、CGC、CGG、GAA、GAT、GAC、CAG、GTA、GTT、GTC、GTG、GCA、GCT、GCC、GCG、GGA、GGT、GGC或GGG的DNA三核苷酸或由这些序列的DNA三核苷酸组成,其中在DNA核苷之间存在磷酸二酯键,并且在三核苷酸的5'或3'端可能还有一个磷酸二酯。包含磷酸二酯的可生物裂解的接头更加详细地描述于WO 2014/076195(通过引用并入本文)中。当与标准比较时,在带有生物可裂解的接头的缀合物化合物中至少约50%的缀合物部分从寡核苷酸上裂解下来、诸如至少约60%裂解、诸如至少约70%裂解、诸如至少约80%裂解、诸如至少约85%裂解、诸如至少约90%裂解、诸如至少约95%的缀合物部分从裂解的寡核苷酸上裂解下来。

[0178] 区域Y是指不一定是可生物裂解的但主要用于将缀合物部分(区域C或第三区域)与寡核苷酸(区域A或第一区域)共价连接的接头。区域Y接头可以包含链结构或重复单元诸如乙二醇、氨基酸单元或氨基烷基基团的寡聚物。本发明的寡核苷酸缀合物可以由以下区域元件构建:A-C、A-B-C、A-B-Y-C、A-Y-B-C或A-Y-C。在一些实施例中,接头(区域Y)是氨基烷基,诸如C2-C36氨基烷基基团,其包括例如C6至C12氨基烷基基团。在优选的实施方案中,接头(区域Y)是C6氨基烷基基团。

[0179] LNA间隔聚体

[0180] LNA间隔聚体是其中区域F和F'中的一者或两者包含LNA核苷或由LNA核苷组成的间隔聚体。β-D-氧基间隔聚体是其中区域F和F'中的一者或两者包含β-D-氧基LNA核苷或由其组成的间隔聚体。

[0181] 在一些实施例中,LNA间隔聚体具有下式:$[LNA]_{1-5}$-[区域G]-$[LNA]_{1-5}$,其中区域G如在间隔聚体区域G定义中的定义。

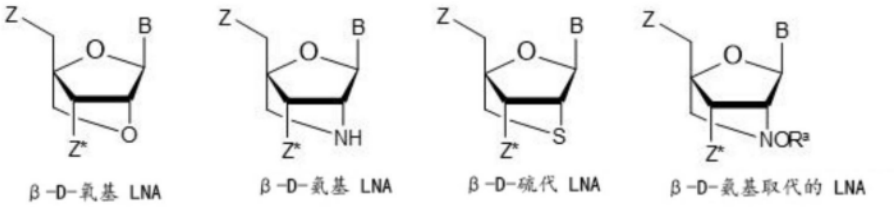
[0182] 锁定的核酸核苷(LNA核苷)

[0183] "LNA核苷"是一种2'-糖修饰的核苷,其包含连接所述核苷的核糖环的C2'和C4'的双基(也称为"2'-4'桥"),其限制或锁定核糖环的构象。这些核苷在文献中也被称为桥连核酸或双环核酸(BNA)。当将LNA掺入互补RNA或DNA分子的寡核苷酸中时,核糖构象的锁定与杂交亲和力的增强(双链体稳定化)相关。这可通过测量寡核苷酸/互补双链体的解链温度来常规确定。

[0184] 非限制性的示例性LNA核苷公开于WO 99/014226、WO 00/66604、WO 98/039352、WO 2004/046160、WO 00/047599、WO 2007/134181、WO 2010/077578、WO 2010/036698、WO 2007/090071、WO 2009/006478、WO 2011/156202、WO 2008/154401、WO 2009/067647,WO 2008/150729、Morita等人,Bioorganic&Med.Chem.Lett.12,73-76,Seth等人J.Org.Chem.2010,第75(5)卷第1569-81页,Mitsuoka等人,Nucleic Acids Research 2009,37(4),1225-1238以及Wan和Seth,J.Medical Chemistry 2016,59,9645-9667。

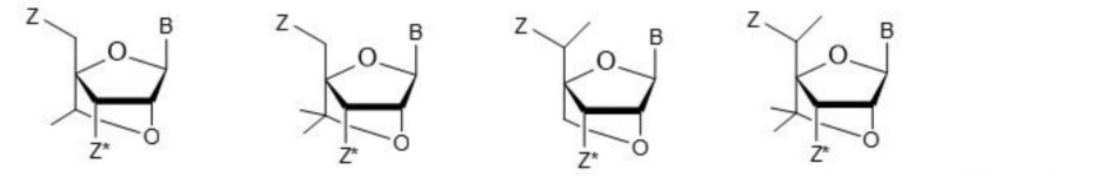
[0185] LNA核苷的特定实例在方案1中给出(其中B如上所定义)。

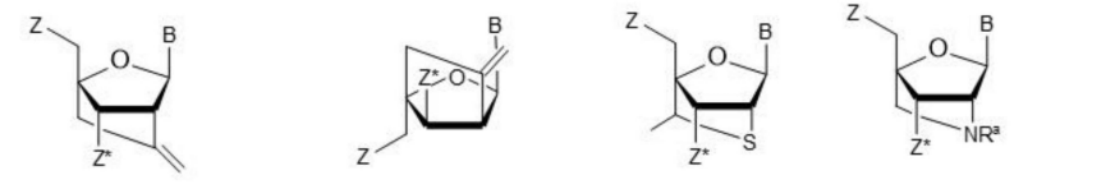
[0186] 方案1

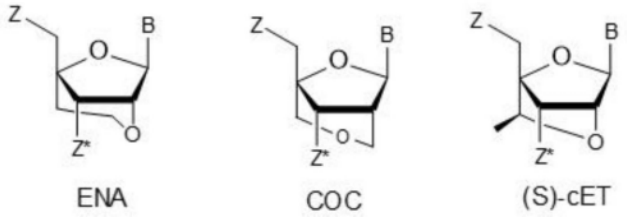




[0187]







[0188] 特定的LNA核苷是β-D-氧基-LNA、6'-甲基-β-D-氧基LNA诸如(S)-6'-甲基-β-D-氧基-LNA(ScET)和ENA。一种特别有利的LNA是β-D-氧基-LNA。

[0189] 混合型翼间隔聚体

[0190] 混合型翼间隔聚体为以下LNA间隔聚体,其中区域F和区域F'中的一者或两者包含2'取代的核苷,诸如独立地选自由以下项组成的组中的2'取代的核苷:2'-O-烷基-RNA单元、2'-O-甲基-RNA、2'-氨基-DNA单元、2'-氟-DNA单元、2'-烷氧基-RNA、MOE单元、阿糖核酸(ANA)单元和2'-氟-ANA单元诸如MOE核苷。在一些实施例中,其中区域F和F'中的至少一者或区域F和F'两者均包含至少一个LNA核苷,区域F和F'的其余核苷独立地选自由MOE和LNA组成的组。在一些实施例中,其中区域F或F'中的至少一者或区域F和F'两者均包含至少两个LNA核苷,区域F和F'的其余核苷独立地选自由MOE和LNA组成的组。在一些混合型翼的实施方案中,区域F和F'中的一者或两者可进一步包含一个或多个DNA核苷。

[0191] 修饰的核苷间键合

[0192] 如技术人员通常所理解的,术语"修饰的核苷间键"定义为除磷酸二酯(PO)键以外

的键,其将两个核苷共价偶联在一起。本发明的组合的寡核苷酸因此可包含一个或多个修饰的核苷间键,诸如一个或多个硫代磷酸酯核苷间键,或一个或多个二硫代磷酸酯核苷间键。在一些实施方案中,与磷酸二酯键相比,经修饰的核苷间键增加了寡核苷酸的核酸酶抗性。对于天然存在的寡核苷酸,核苷间键合包括在相邻核苷之间产生磷酸二酯键合的磷酸酯基团。修饰的核苷间键可用于稳定体内使用的寡核苷酸,并可用于防止本发明的组合的寡核苷酸中DNA核苷区域或RNA核苷区域的核酸酶裂解,例如在间隔聚体寡核苷酸的缺口区域G内以及在修饰的核苷区域中,例如区域F和F'。

[0193] 在实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个从天然磷酸二酯修饰的核苷间键,诸如一个或多个经修饰的核苷间键,其例如对核酸酶的攻击更具抗性。核酸酶抗性可以通过在血清中孵育寡核苷酸或通过使用核酸酶抗性测定(例如蛇毒磷酸二酯酶(SVPD))来确定,两者均是本领域中众所周知的。能够增强寡核苷酸的核酸酶抗性的核苷间键合称为抗核酸酶核苷间键合。在一些实施例中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列中至少50%的核苷间键合是经修饰的,诸如至少60%、诸如至少70%、诸如至少75%、诸如至少80%或诸如至少90%的寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的核苷间键合是经修饰的。在一些实施例中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列的所有核苷间键合是经修饰的。应当认识到的是,在一些实施例中,将本发明的组合的寡核苷酸与非核苷酸官能团诸如缀合物连接的核苷可以是磷酸二酯。在一些实施方案中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列的所有核苷间键均为抗核酸酶核苷间键。

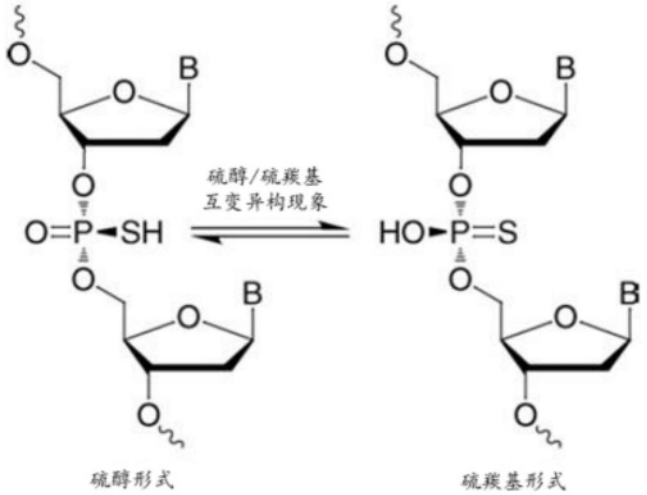
[0194] 对于本发明的组合的寡核苷酸,使用硫代磷酸酯核苷间键是优选的。

[0195] 硫代磷酸酯核苷间键合由于核酸酶抗性、有益的药代动力学和易于制造而特别有用。在一些实施例中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列中至少50%的核苷间键合是硫代磷酸酯,诸如至少60%、诸如至少70%、诸如至少75%、诸如至少80%或诸如至少90%的寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的核苷间键合是硫代磷酸酯。在一些实施例中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的全部核苷间键合均为硫代磷酸酯。

[0196] 核酸酶抗性键,诸如硫代磷酸酯键,在与靶核酸形成双链体时能够募集核酸酶的寡核苷酸区域中特别有用,诸如缺口聚体的区域G。然而,硫代磷酸酯键合也可用于非核酸酶募集区域和/或亲和力增强区域,诸如间隔聚体的区域F和F'。在一些实施方案中,间隔聚体寡核苷酸可在区域F或F',或者同时在区域F和F'中包含一个或多个磷酸二酯键合,其中区域G中的所有核苷间键合均可以是硫代磷酸酯。

[0197] 有利地,寡核苷酸的连续核苷酸序列的所有核苷间键均为硫代磷酸酯,或寡核苷酸的所有核苷间键均为硫代磷酸酯键。

[0198] 硫代磷酸酯键可以以不同的互变异构形式存在,例如如下所示:

[0199] 

[0200] 应当认识到的是,如EP 2 742 135中所公开的,反义寡核苷酸可包含其他核苷间键(除磷酸二酯和硫代磷酸酯以外),例如烷基膦酸酯/甲基膦酸酯核苷间键,其根据EP 2 742 135可以例如以其他方式被DNA硫代磷酸酯的缺口区域所耐受。

[0201] 修饰的核苷

[0202] 如本文所用,术语“修饰的核苷”或“核苷修饰”是指与等同的DNA或RNA核苷相比,通过引入糖部分或(核)碱基部分的一种或多种修饰而被修饰的核苷。在优选的实施例中,修饰的核苷包含修饰的糖部分。术语修饰的核苷在本文中还可与术语“核苷类似物”或修饰的“单元”或修饰的“单体”互换使用。具有未修饰的DNA或RNA糖部分的核苷在本文中被称为DNA或RNA核苷。在DNA或RNA核苷的碱基区域中具有修饰的核苷如果允许沃森克里克(Watson Crick)碱基配对,则通常仍称为DNA或RNA。

[0203] 修饰的寡核苷酸

[0204] 术语经修饰的寡核苷酸描述了一种寡核苷酸,其包含一个或多个糖修饰的核苷和/或修饰的核苷间键合。术语“嵌合”寡核苷酸是已经在文献中用来描述具有修饰的核苷和DNA核苷的寡核苷酸的术语。本发明的组合的反义寡核苷酸优选地是嵌合寡核苷酸。

[0205] 表达的调节

[0206] 如本文所用,术语“表达的调节”应理解为,与施用寡核苷酸之前的靶标的量相比,寡核苷酸改变靶标(即,RTEL1或FUBP1)的量的能力的总称。另选地,表达的调节可以参照对照实验进行确定。如普遍所知,对照是以盐水组合物处理的单个或靶细胞,或是以非靶向寡核苷酸(模拟品)处理的单个或靶细胞。

[0207] 一种调节类型是寡核苷酸抑制、下调、降低、抑制、去除、停止、阻断、阻止、减少、减低、避免或终止靶标(即,RTEL1或FUBP1)表达的能力,例如通过降解mRNA或阻止转录实现。另一类型的调节是寡核苷酸恢复、增加或增强靶标表达的能力,例如,通过修复剪接位点或防止剪接或去除或阻断抑制机制诸如微小RNA抑制。

[0208] MOE缺口聚体

[0209] MOE间隔聚体是其中区域F和F’由MOE核苷所构成的间隔聚体。在一些实施例中,MOE间隔聚体设计为$[MOE]_{1-8}$-[区域G]-$[MOE]_{1-8}$,诸如$[MOE]_{2-7}$-$[区域G]_{5-16}$-$[MOE]_{2-7}$、诸如$[MOE]_{3-6}$-[区域G]-$[MOE]_{3-6}$,其中区域G如间隔聚体定义中的定义。具有5-10-5设计的MOE缺口聚体(MOE-DNA-MOE)已经在本领域中广泛使用。

[0210] 天然存在的变体

[0211] 术语“天然存在的变体(naturally occurring variant)”是指与靶核酸源自相同基因座但可有差异的基因或转录物(例如,RTEL1或FUBP1)的变体,所述差异可例如是出于遗传密码的简并性造成多重密码子编码同一个氨基酸,或因前体mRNA的可变剪接,或多态性的存在,诸如单核苷酸多态性(SNP),以及等位基因变体。基于与寡核苷酸足够互补序列的存在,本发明的组合的寡核苷酸因此可以靶向靶核酸及其天然存在的变体。

[0212] 在一些实施例中,天然存在的变体与哺乳动物RTEL1或FUBP1靶核酸具有至少95%,诸如至少98%或至少99%的同源性,该靶核酸为诸如SEQ ID NO 1和/或2(针对RTEL1)或者SEQ ID NO:247和/或251(针对FUBP1)的靶核酸。在一些实施例中,RTEL1天然存在的变体与SEQ ID NO:1的人RTEL1靶核酸具有至少99%的同源性。在一些实施例中,FUBP1天然存在的变体与SEQ ID NO:247的人FUBP1靶核酸具有至少99%的同源性。在一些实施例中,天然存在的变体是已知的多态性。

[0213] 核酸酶介导的降解

[0214] 核酸酶介导的降解意指一寡核苷酸能够在与互补核苷酸序列形成双链体时,居中影响所述序列的降解。

[0215] 在一些实施例中,寡核苷酸可以经由靶核酸的核酸酶介导的降解而发挥作用,其中本发明的组合的寡核苷酸能够募集核酸酶,特别是核酸内切酶,优选地为识别RNA/DNA杂交并影响RNA核酸裂解的核糖核酸酶(RNA酶),诸如RNA酶H。经由核酸酶介导的机制而运作的寡核苷酸设计的实例是这样的寡核苷酸,该寡核苷酸通常包含长度为至少5或6个连续DNA核苷的区域并且在一侧或两侧上侧翼有亲和力增强核苷,例如,间隔聚体、头聚物及尾聚物。

[0216] 核酸分子(或“寡核苷酸”)

[0217] 如本文所用,术语“核酸分子”或“治疗性核酸分子”或“寡核苷酸”如本领域技术人员通常理解的那样被定义为包含两个或更多个共价连接的核苷的分子(即,核苷酸序列)。这样共价结合的核苷也可以称为核酸分子或寡聚物。

[0218] 本发明的组合中所指的核酸分子通常是长度低于50个核苷酸的治疗性寡核苷酸。核酸分子可以是或者可以包含单链反义寡核苷酸,或者可以是另一种寡聚核酸分子,诸如CRISPR RNA、siRNA、shRNA、适体或核酶。治疗性核酸分子通常在实验室中通过固相化学合成然后纯化和分离来制备。然而,shRNA通常使用慢病毒载体递送至细胞中,然后从慢病毒载体中转录以生产单链RNA,该单链RNA将形成茎环(发夹)RNA结构,该结构能够与RNA干扰机制(包括RNA诱导沉默复合物(RISC))相互作用。当提及核酸分子的序列时,提及的是共价联接的核苷酸或核苷的核碱基部分或其修饰的序列或顺序。本发明的组合的核酸分子是人造的,并且是化学合成的,并且通常是经纯化或分离的。在一些实施例中,本发明的组合的核酸分子不是进入靶细胞后从载体转录的shRNA。本发明的组合的核酸分子可以包含一个或多个经修饰的核苷或核苷酸。

[0219] 在一些实施例中,本发明的组合的核酸分子包含长度为12个至60个核苷酸,诸如长度为13个至50个、诸如14个至40个、诸如15个至30个、诸如16个至22个、诸如16个至18个或15个至17个连续核苷酸或由其组成。因此,在一些实施例中,本发明的寡核苷酸长度可为12-25个核苷酸。或者,在一些实施例中,本发明的寡核苷酸长度可为15-22个核苷酸。

[0220] 在一些实施例中,核酸分子或其连续核苷酸序列包含或由24个或更少的核苷酸组成,诸如22个、诸如20个或更少、诸如18个或更少、诸如14个、15个、16个或17个核苷酸。应当理解的是,本文中给出的任何范围均包括范围的端点。因此,如果说核酸分子包含12至30个核苷酸,则12和30个核苷酸均包含在内。

[0221] 在一些实施例中,所述连续核苷酸序列在长度上包含至少10个,诸如11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个连续核苷酸或由其组成。

[0222] 核酸分子用于调节靶核酸在哺乳动物中的表达。在一些实施例中,核酸分子,例如siRNA、shRNA和反义寡核苷酸的核酸分子通常用于抑制靶核酸的表达。

[0223] 在本发明的一个实施例中,核酸分子选自RNAi剂,诸如siRNA或shRNA。在另一个实施例中,核酸分子是单链反义寡核苷酸,例如与RNA酶H相互作用的高亲和力修饰的反义寡核苷酸。

[0224] 在一些实施例中,本发明的组合的核酸分子可以包含一个或多个修饰的核苷或核苷酸,诸如2'糖修饰的核苷。

[0225] 在一些实施例中,核酸分子包含硫代磷酸酯核苷间键。

[0226] 在一些实施例中,核酸分子可以缀合至非核苷部分(缀合物部分)。

[0227] 核酸分子文库应理解为变体核酸分子的集合。核酸分子文库的目的可以变化。在一些实施例中,核酸分子文库由具有重叠核碱基序列的寡核苷酸构成,该序列靶向一个或多个哺乳动物靶核酸(即,RTEL1或FUBP1),目的是识别该核酸分子文库中最有效的序列。在一些实施例中,核酸分子文库是亲代或祖代核酸分子的核酸分子设计变体(子核酸分子)文库,其中核酸分子设计变体保留了亲代核酸分子的核心核碱基序列。

[0228] 核碱基

[0229] 术语核碱基包括存在于核苷和核苷酸中的嘌呤(例如腺嘌呤和鸟嘌呤)和嘧啶(例如尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶)部分,其在核酸杂交中形成氢键。在本发明的上下文中,术语核碱基还包括修饰的核碱基,其可不同于天然存在的核碱基,但在核酸杂交过程中为功能性的。在此上下文中,"核碱基"是指天然存在的核碱基,诸如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸苷、尿嘧啶、黄嘌呤和次黄嘌呤,以及非天然存在的变体。此类变体例如描述于Hirao等人(2012),Accounts of Chemical Research,第45卷第2055页和Bergstrom(2009)Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,增刊37 1.4.1中。

[0230] 在一些实施例中,核碱基部分被修饰,其方式是将嘌呤或嘧啶改变为经修饰的嘌呤或嘧啶,诸如取代的嘌呤或取代的嘧啶,诸如选自异胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-噻唑胞嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-噻唑尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、2'硫代胸腺嘧啶、肌苷、二氨基嘌呤、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤和2-氯-6-氨基嘌呤的核碱基。

[0231] 核碱基部分可由每个相应核碱基的字母代码来表示,例如A、T、G、C或U,其中每个字母可任选地包括具有同等功能的修饰的核碱基。例如,在示例性的寡核苷酸中,核碱基部分选自A、T、G、C和5-甲基胞嘧啶。任选地,对于LNA间隔聚体,可使用5-甲基胞嘧啶LNA核苷。

[0232] 核苷酸和核苷

[0233] 核苷酸和核苷是寡核苷酸和多核苷酸的组成部分,并且出于本发明的目的,包括

天然存在的和非天然存在的核苷酸和核苷。在自然界中,核苷酸,诸如DNA和RNA核苷酸包含核糖糖部分、核碱基部分和一个或多个磷酸酯基团(其不存在于核苷中)。核苷和核苷酸也可以可互换地称为“单元”或“单体”。

[0234] 患者

[0235] 为了本发明的目的,“受试者”(或“患者”)可以是脊椎动物。在本发明的上下文中,术语“受试者”包括人和其他动物,特别是哺乳动物和其他生物。因此,本文提供的手段和方法适用于人类治疗和兽医应用。因此,本文的受试者可以是动物,诸如小鼠、大鼠、仓鼠、兔、豚鼠、雪貂、猫、狗、鸡、绵羊、牛科动物、马、骆驼或灵长类动物。优选地,受试者是哺乳动物。更优选地,受试者是人。在一些实施例中,患者患有本文所指的疾病,诸如HBV感染。在一些实施例中,患者易于患所述疾病。

[0236] 药物组合物

[0237] 在另一方面,本发明提供了包含用于在本发明中使用的寡核苷酸和药用的稀释剂、载体、盐和/或辅助剂的药物组合物。药用的稀释剂包括磷酸盐缓冲盐水(PBS),而药用盐包括但不限于钠盐和钾盐。

[0238] 本发明提供了根据本发明的药物组合物,其中该药物组合物包含可用于本发明的寡核苷酸和水性稀释剂或溶剂。

[0239] 本发明提供了本发明的组合的寡核苷酸的溶液,诸如磷酸盐缓冲盐水溶液。适当地,本发明的溶液,诸如磷酸盐缓冲盐水溶液为无菌溶液。

[0240] WO 2007/031091(通过引用并入本文)提供了药用的稀释剂、载体和辅助剂的合适的和优选的实例。WO2007/031 091中也提供了合适的剂量、制剂、施用途径、组合物、剂型、与其他治疗剂的组合、前药制剂。

[0241] 用于在本发明中使用的寡核苷酸可以与药用活性或惰性物质混合,用以制备药物组合物或制剂。药物组合物的组成和配制方法取决于许多标准,包括但不限于施用途径、疾病程度或施用剂量。

[0242] 在一些实施例中,可用于本发明的寡核苷酸或寡核苷酸缀合物是前药。特别地,对于寡核苷酸缀合物,一旦前药被递送至作用位点例如靶细胞,寡核苷酸的缀合物部分就被裂解下来。

[0243] 药用盐

[0244] 术语“药用盐”是指那些保留游离碱或游离酸的生物学有效性和特性的盐,其并非在生物学上或其它方面所不希望的。这些盐用无机酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸(特别是盐酸)和有机酸诸如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸、N-乙酰基半胱氨酸形成。此外,这些盐可以通过向游离酸添加无机碱或有机碱制备。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐。衍生自有机碱的盐包括但不限于以下物质的盐:伯胺、仲胺和叔胺,包括天然存在的取代胺的取代胺,环胺和碱性离子交换树脂,如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、赖氨酸、精氨酸、N-乙基哌啶、哌啶、多胺树脂。式(I)化合物也可以两性离子的形式存在。式(I)化合物的特别优选的药用盐是盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸和甲磺酸的盐。

[0245] 预防

[0246] 本文中的术语“阻止”、“预防”或“防止”涉及预防性治疗,即其目的是预防而不是治愈疾病的措施或程序。预防是指获得期望的药理和/或生理效果,该效果在完全或部分地阻止疾病或症状方面具有预防作用。因此,本文中的“阻止HBV感染”包括阻止在受试者体内发生HBV感染,以及阻止HBV感染症状的发生。在本发明中,特别地考虑了预防由HBV感染的母亲对孩子造成的HBV感染。还考虑了预防由急性HBV感染转变为慢性HBV感染。

[0247] 寡核苷酸中的区域D’或D”

[0248] 在一些实施例中,本发明的组合的寡核苷酸可以包含以下项或由其组成:与靶核酸互补的寡核苷酸的连续核苷酸序列,诸如间隔聚体F-G-F’,以及另外的5’和/或3’核苷。所述其他的5’和/或3’核苷可与或不与所述靶核酸为完全互补。此类其他的5’和/或3’核苷本文中可称为区域D’和D”。

[0249] 出于将连续核苷酸序列(诸如间隔聚体)与缀合物部分或另一个官能团接合的目的,可以使用添加区域D’或D”。当用于将连续核苷酸序列与缀合物部分接合时,其可用作可生物裂解的接头。另选地,其可用于提供核酸外切酶保护或促进合成或制造。

[0250] 可以将区域D’和D’’分别附接于区域F的5’端或区域F’的3’端,以生成下式D’-F-G-F’、F-G-F’-D’’或

[0251] D’-F-G-F’-D’’的设计。在这种情况下,F-G-F’是寡核苷酸的间隔聚体部分,而区域D’或D’’构成寡核苷酸的单独部分。

[0252] 区域D’或D”可以独立地包含1个、2个、3个、4个或5个另外的核苷酸或由其组成,它们可以与靶核酸互补或不互补。与F或F’区域相邻的核苷酸不是糖修饰的核苷酸,诸如DNA或RNA或这些的碱基修饰形式。D’或D”区域可以用作核酸酶敏感的可生物裂解的接头(参见接头的定义)。在一些实施例中,另外的5’和/或3’端核苷酸与磷酸二酯键合连接,并且为DNA或RNA。WO2014/076195中公开了适合用作区域D’或D”的基于核苷酸的可生物裂解的接头,其包括例如磷酸二酯连接的DNA二核苷酸。WO2015/113922中公开了在聚寡核苷酸构建体中可生物裂解的接头的用途,其中它们被用于在单个寡核苷酸内连接多个反义构建体(例如,缺口聚体区域)。

[0253] 在一个实施例中,本发明的组合的寡核苷酸除构成间隔聚体的连续核苷酸序列外还包含区域D’和/或D”。

[0254] 在一些实施例中,本发明的寡核苷酸可以由下式表示:

[0255] F-G-F’;特别是F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{2-8}

[0256] D’-F-G-F’,特别是D'_{1-3}-F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{2-8}

[0257] F-G-F’-D”,特别是F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{2-8}-D''_{1-3}

[0258] D’-F-G-F’-D”,特别是D'_{1-3}-F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{2-8}-D''_{1-3}

[0259] 在一些实施例中,位于区域D’和区域F之间的核苷间键合是磷酸二酯键合。在一些实施例中,位于区域F’和区域D’之间的核苷间键合是磷酸二酯键合。

[0260] RNAi分子

[0261] 在本文中,术语“RNA干扰(RNAi)分子”是指能够经由细胞质中RNA诱导沉默复合物(RISC)来诱导RNA依赖性基因沉默的基于短双链RNA的寡核苷酸,其中它们与催化RISC组分AGO(argonaute)相互作用。RNAi分子调节。例如,抑制靶核酸在细胞中的表达。例如受试者体内的细胞。例如哺乳动物。RNAi分子的一种类型是小干扰RNA(siRNA),它是由两个互补寡

核苷酸组成的双链RNA分子,其中转录后一条链与互补mRNA的结合导致其降解和翻译损失。小发夹RNA(shRNA)是基于单链RNA的寡核苷酸,可形成茎环(发夹)结构,该结构能够经由DICER和RNA减少沉默复合物(RISC)减少mRNA。可以基于目的基因(靶核酸)的序列设计RNAi分子。然后可以化学合成或通过体外转录合成相应的RNAi,或从载体或PCR产物表达。

[0262] RNA酶H活性和募集

[0263] 反义寡核苷酸的RNA酶H活性是指其与互补RNA分子形成双链体时募集RNA酶H的能力。WO01/23613提供了用于确定RNA酶H活性的体外方法,其可以用于确定募集RNA酶H的能力。如果寡核苷酸在提供互补靶核酸序列时,使用WO 01/23613(通过引用并入本文)实例91至95提供的方法测量的初始速率(以pmol/l/min计)为使用具有与所测试修饰寡核苷酸相同的碱基序列但仅包含在寡核苷酸中所有单体之间均具有硫代磷酸酯键的DNA单体的寡核苷酸时所测初始速率的至少5%,诸如至少10%或超过20%时,则通常被认为能够募集RNA酶H。为了用于确定RNA酶H活性,可从Creative Biomart®(与大肠杆菌中表达的His标签融合的重组人RNA酶H1)获得重组人RNA酶H1。

[0264] shRNA

[0265] 短发夹RNA或shRNA分子的长度通常介于40个至70个核苷酸之间,例如介于45个至65个核苷酸之间,例如介于50个至60个核苷酸之间,并形成一个茎环(发夹)RNA结构,该结构可与称为Dicer的核酸内切酶相互作用,据信,Dicer将dsRNA加工成具有特征性的两个碱基3'突出端的19-23个碱基对的短干扰RNA,然后将其掺入RNA诱导沉默复合物(RISC)中。与适当的靶mRNA结合后,RISC内的一个或多个核酸内切酶切割靶以诱导沉默。RNAi寡核苷酸可以使用修饰的核苷酸间键和2'糖修饰的核苷进行化学修饰,例如2'-4'双环核糖修饰的核苷(包括LNA和cET)或2'取代的修饰,例如2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、阿拉伯糖核酸(ANA)、2'-氟-ANA。

[0266] 在一些实施例中,shRNA核酸分子包含一个或多个硫代磷酸酯核苷间键。在RNAi分子中,硫代磷酸酯核苷间键可减少或在RICS中进行核酸酶切割,因此优选的是,并非shRNA分子茎环中的所有核苷间键都被修饰。硫代磷酸酯核苷间键可以优选地位于shRNA分子茎环的3'和/或5'端,特别是在与靶核酸不互补的分子的一部分(例如siRNA分子中的正义链或过客链)。然而,shRNA分子的与靶核酸互补的区域也可以在预计通过Dicer切割后会成为3'和/或5'末端部分的前2个至3个核苷间键中被修饰。

[0267] siRNA

[0268] 术语siRNA是指小干扰核糖核酸RNAi分子。它是一类双链RNA分子,在本领域中也称为短干扰RNA或沉默RNA。siRNA通常包含正义链(也称为过客链)和反义链(也称为前导链),其中每条链的长度为17-30个核苷酸,通常为19-25个核苷,其中反义链与靶核酸互补(诸如至少95%互补,诸如完全互补)(合适地是成熟的mRNA序列),并且正义链与反义链互补,使得正义链和反义链形成双链体或双链体区域。siRNA链可形成平末端双链体,或者优选地,正义和反义链的3'端可形成3'突出端,例如1个、2个或3个核苷,类似于Dicer生产的产物,可在体内形成RISC底物。Dicer底物的有效扩展形式已在US 8,349,809和US 8,513,207中进行了描述,在此通过引用并入。在一些实施例中,正义链和反义链均具有2nt 3'突出端。因此,双链体区域的长度可以是例如17-25个核苷酸,例如长度为21-23个核苷酸。

[0269] 一旦进入细胞内,反义链就被掺入到RISC复合物中,该RISC复合物介导靶核酸的靶降解或靶抑制。siRNA除了RNA核苷外,通常还包含修饰的核苷。在一个实施例中,siRNA分子可以使用修饰的核苷酸间键和2'糖修饰的核苷进行化学修饰,例如2'-4'双环核糖修饰的核苷(包括LNA和cET)或2'取代的修饰,例如2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA,2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、阿拉伯糖核酸(ANA)、2'-氟-ANA。特别地,可以将2'氟、2'-O-甲基或2'-O-甲氧基乙基掺入siRNA。

[0270] 在一些实施例中,可以用2′糖修饰的核苷例如LNA修饰siRNA正义(过客)链的所有核苷酸(例如,参见WO2004/083430、WO2007/085485)。在一些实施例中,siRNA的过客链可以是不连续的(例如,参见WO2007/107162)。已经报道了在siRNA的反义链的种子区域中出现的热去稳定核苷酸的掺入可用于减少siRNA的脱靶活性(例如,参见WO2018/098328)。合适地,siRNA在反义链的5'端包含5'磷酸酯基团或5'-磷酸酯模拟物。在一些实施例中,反义链的5'端是RNA核苷。

[0271] 在一个实施例中,siRNA分子进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷间键。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯的核苷间键可以在一条或两条链(例如,反义链;或正义链)的3'-末端上;或者硫代磷酸酯或甲基膦酸酯的核苷间键可以在一条或两条链(例如,反义链;或正义链)的5'末端上;或者硫代磷酸酯或甲基膦酸酯的核苷间键可以在一条或两条链(例如反义链;或正义链)的5'-和3'-末端上。在一些实施例中,剩余的核苷间键合是磷酸二酯键合。在一些实施例中,siRNA分子包含一个或多个硫代磷酸酯核苷间键。在siRNA分子中,硫代磷酸酯核苷间键可能会减少或在RICS中进行核酸酶切割,因此优选的是,并非反义链中的所有核苷间键都被修饰。

[0272] siRNA分子可以进一步包含配体。在一些实施例中,配体缀合至正义链的3'端。

[0273] 对于生物学分布,例如,可将siRNA缀合至靶向配体和/或配制成脂质纳米颗粒。

[0274] 本发明的其他方面涉及包含这些dsRNA的药物组合物,诸如适合用于治疗用途的siRNA分子,以及通过施用dsRNA分子(诸如本发明的组合的siRNA)来减少靶基因表达的方法,例如用于治疗如本文所公开的各种疾病。

[0275] 糖修饰

[0276] 本发明的组合的寡聚物可包含一种或多种具有修饰的糖部分的核苷,所述修饰的糖部分,即与DNA和RNA中发现的核糖部分相比时糖部分的修饰。

[0277] 已经制备了许多具有核糖糖部分的修饰的核苷,主要目的为改善寡核苷酸的某些特性,诸如亲和力和/或核酸酶抗性。

[0278] 此类修饰包括其中核糖环结构如下被修饰的那些:例如通过用己糖环(HNA)或通常在核糖环上的C2和C4碳之间具有双基桥的双环(LNA)或通常在C2和C3碳之间缺乏键的未连接的核糖环(例如UNA)替换。其他糖修饰的核苷包括,例如,双环己糖核酸(WO2011/017521)或三环核酸(WO2013/154798)。修饰的核苷还包括其中糖部分被非糖部分替换的核苷,例如在肽核酸(PNA)或吗啉代核酸的情况下。

[0279] 糖修饰还包括经由将核糖环上的取代基改变为除氢以外的基团或DNA和RNA核苷中天然存在的2'-OH基团而进行的修饰。例如,可以在2'、3'、4'或5'位置引入取代基。

[0280] 靶细胞

[0281] 如本文所用,术语"靶细胞"是指表达靶核酸的细胞。对于本发明的治疗用途,如果

靶细胞被HBV感染则是优选的。在一些实施方案中,靶细胞可以是体内或体外的。在一些实施例中,靶细胞是哺乳动物细胞诸如啮齿动物细胞,诸如小鼠细胞或大鼠细胞或土拨鼠细胞,或者灵长类细胞,诸如猴细胞(例如食蟹猴细胞)或人类细胞。

[0282] 在优选的实施例中,靶细胞表达RTEL1和/或FUBP1 mRNA,诸如前体mRNA或成熟的mRNA。优选地,靶细胞表达RTEL1和FUBP1 mRNA二者,诸如前体mRNA或成熟的mRNA。对于反义寡核苷酸靶向作用,通常不考虑RTEL1和/或FUBP1 mRNA的聚腺苷(poly A)尾部。

[0283] 通常,靶细胞表达RTEL1 mRNA,诸如RTEL1前体mRNA或RTEL1成熟的mRNA。为了实验评估,可以使用表达包含靶序列(诸如人RTEL1前体mRNA,例如SEQ ID NO:1)的核酸的靶细胞。对于反义寡核苷酸靶向作用,通常不考虑RTEL1 mRNA的聚腺苷(poly A)尾部。

[0284] 本发明的组合通常能够抑制RTEL1靶核酸在表达RTEL1靶核酸的细胞(靶细胞)中的表达,例如体内或体外。

[0285] 通常,靶细胞也表达FUBP1 mRNA,诸如FUBP1前体mRNA或FUBP1成熟的mRNA。例如,靶细胞表达人FUBP1前体mRNA(例如,SEQ ID NO 247),或者包含外显子14(诸如SEQ ID NO:249或250)或SEQ ID NO 247的外显子20的人FUBP1成熟mRNA。对于实验评估,可以使用表达包含靶序列的核酸的靶细胞。通常不认为反义寡核苷酸靶向FUBP1 mRNA的聚腺苷尾部。本发明的组合通常能够抑制FUBP1靶核酸在表达FUBP1靶核酸的靶细胞中的表达,例如体内或体外。

[0286] 此外,靶细胞可以是肝细胞。在一个实施例中,靶细胞是HBV感染的原代人肝细胞,其衍生自HBV感染者或具有人源化肝脏的HBV感染的小鼠(PhoenixBio,PXB-小鼠)。

[0287] 根据本发明,靶细胞可以被HBV感染。此外,靶细胞可包含HBV cccDNA。因此,靶细胞优选地包含RTEL1和/或FUBP1 mRNA,诸如前体mRNA或成熟的mRNA,以及HBV cccDNA。更优选地,靶细胞包含RTEL1和FUBP1 mRNA二者,诸如前体mRNA或成熟的mRNA,以及HBV cccDNA。

[0288] RTEL1靶核酸

[0289] 根据本发明,靶核酸是编码哺乳动物RTEL1的核酸,并且可以例如是基因、RNA、mRNA和前体mRNA、成熟的mRNA或cDNA序列。该靶标因此可以称为RTEL1靶核酸。

[0290] 用于在本发明中使用的寡核苷酸可以例如靶向哺乳动物RTEL1的外显子区域(特别是siRNA和shRNA靶标外显子区域,但也可以是反义寡核苷酸),或者可以例如靶向RTEL1前体mRNA中的内含子区域(特别是反义寡核苷酸靶标内含子区域)。人RTEL1基因编码15个转录本,其中7个是蛋白质编码的,并且因此是潜在的核酸靶标。

[0291] 表1列出了位于SEQ ID NO:1的人RTEL1前体mRNA上的7个转录本的预测外显子和内含子区域。应当理解的是,用于在本发明中使用的寡核苷酸可以靶向表1中列出的一种或多种转录本的成熟的mRNA序列。

[0292] 表1.人RTEL1前体mRNA(SEQ ID NO:1)中用于对RTEL1 mRNA转录本进行不同的蛋白质编码的转录区域、外显子区域和内含子区域

[0293]

转录本 ID	转录本区域		外显子区域			内含子区域		
	开始	结束	外显子	开始	结束	内含子	开始	结束
RTEL1-205 ENST00000370018	1	38444	1	1	657	1	657	1424
			2	1424	1695	2	1695	3489
			3	3489	3687	3	3687	4041
			4	4041	4134	4	4134	4737
			5	4737	4818	5	4818	5020
			6	5020	5080	6	5080	8195
			7	8195	8270	7	8270	9660
			8	9660	9744	8	9744	14747
			9	14747	14812	9	14812	16131
			10	16131	16284	10	16284	20336
			11	20336	20374	11	20374	20459
			12	20459	20537	12	20537	22040
			13	22040	22137	13	22137	22855
			14	22855	22910	14	22910	27714
			15	27714	27788	15	27788	27982
			16	27982	28063	16	28063	29829
			17	29829	29961	17	29961	30128
			18	30128	30241	18	30241	30330
			19	30330	30370	19	30370	30492
			20	30492	30577	20	30577	30719
			21	30719	30796	21	30796	31246
			22	31246	31323	22	31323	31693
			23	31693	31839	23	31839	31941
			24	31941	32056	24	32056	32278
			25	32278	32401	25	32401	32485
			26	32485	32632	26	32632	32996
			27	32996	33138	27	33138	33933
			28	33933	34028	28	34028	34996
			29	34996	35194	29	35194	35334
			30	35334	35474	30	35474	36563

[0294]

转录本 ID	转录本区域		外显子区域			内含子区域		
	开始	结束	外显子	开始	结束	内含子	开始	结束
			31	36563	36679	31	36679	36932
			32	36932	37165	32	37165	37257
			33	37257	37412	33	37412	37519
			34	37519	37671	34	37671	37969
			35	37969	38444			
RTEL1-203 ENST00000360203	485	38433	1	485	657	1	657	1424
			2	1424	1695	2	1695	3489
			3	3489	3687	3	3687	4041
			4	4041	4134	4	4134	4737
			5	4737	4818	5	4818	5020
			6	5020	5080	6	5080	8195
			7	8195	8270	7	8270	9660
			8	9660	9744	8	9744	14747
			9	14747	14812	9	14812	16131
			10	16131	16284	10	16284	20336
			11	20336	20374	11	20374	20459
			12	20459	20537	12	20537	22040
			13	22040	22137	13	22137	22855
			14	22855	22910	14	22910	27714
			15	27714	27788	15	27788	27982
			16	27982	28063	16	28063	29829
			17	29829	29961	17	29961	30128
			18	30128	30241	18	30241	30330
			19	30330	30370	19	30370	30492
			20	30492	30577	20	30577	30719
			21	30719	30796	21	30796	31246
			22	31246	31323	22	31323	31693
			23	31693	31839	23	31839	31941
			24	31941	32056	24	32056	32278
			25	32278	32401	25	32401	32485
			26	32485	32632	26	32632	32996
			27	32996	33138	27	33138	33933
			28	33933	34028	28	34028	34996
			29	34996	35194	29	35194	35334
			30	35334	35474	30	35474	36563
			31	36563	36679	31	36679	36932
			32	36932	37165	32	37165	37257
			33	37257	37412	33	37412	37519
			34	37519	37841	34	37841	37969
			35	37969	38433			
RTEL1-212 ENST00000508582	482	38171	1	482	657	1	657	1424
			2	1424	1695	2	1695	3489
			3	3489	3687	3	3687	4041

[0295]

转录本 ID	转录本区域		外显子区域			内含子区域		
	开始	结束	外显子	开始	结束	内含子	开始	结束
			4	4041	4134	4	4134	4665
			5	4665	4818	5	4818	5020
			6	5020	5080	6	5080	8195
			7	8195	8270	7	8270	9660
			8	9660	9744	8	9744	14747
			9	14747	14812	9	14812	16131
			10	16131	16284	10	16284	20336
			11	20336	20374	11	20374	20459
			12	20459	20537	12	20537	22040
			13	22040	22137	13	22137	22855
			14	22855	22910	14	22910	27714
			15	27714	27788	15	27788	27982
			16	27982	28063	16	28063	29829
			17	29829	29961	17	29961	30128
			18	30128	30241	18	30241	30330
			19	30330	30370	19	30370	30492
			20	30492	30577	20	30577	30719
			21	30719	30796	21	30796	31246
			22	31246	31323	22	31323	31693
			23	31693	31839	23	31839	31941
			24	31941	32056	24	32056	32278
			25	32278	32401	25	32401	32485
			26	32485	32632	26	32632	32996
			27	32996	33138	27	33138	33933
			28	33933	34028	28	34028	34996
			29	34996	35194	29	35194	35334
			30	35334	35474	30	35474	36563
			31	36563	36679	31	36679	36932
			32	36932	37165	32	37165	37257
			33	37257	37412	33	37412	37519
			34	37519	37671	34	37671	37969
			35	37969	38171			
RTEL1-201 ENST00000318100	505	38434	1	505	650	1	650	3489
			2	3489	3687	2	3687	4041
			3	4041	4134	3	4134	4737
			4	4737	4818	4	4818	5020
			5	5020	5080	5	5080	8195
			6	8195	8270	6	8270	9660
			7	9660	9744	7	9744	14747
			8	14747	14812	8	14812	16131
			9	16131	16284	9	16284	20336
			10	20336	20374	10	20374	20459
			11	20459	20537	11	20537	22040

[0296]

转录本 ID	转录本区域		外显子区域			内含子区域		
	开始	结束	外显子	开始	结束	内含子	开始	结束
			12	22040	22137	12	22137	22855
			13	22855	22910	13	22910	27714
			14	27714	27788	14	27788	27982
			15	27982	28063	15	28063	29829
			16	29829	29961	16	29961	30128
			17	30128	30241	17	30241	30330
			18	30330	30370	18	30370	30492
			19	30492	30577	19	30577	30719
			20	30719	30796	20	30796	31246
			21	31246	31323	21	31323	31693
			22	31693	31839	22	31839	31941
			23	31941	32056	23	32056	32278
			24	32278	32401	24	32401	32485
			25	32485	32632	25	32632	32996
			26	32996	33138	26	33138	33933
			27	33933	34028	27	34028	34996
			28	34996	35194	28	35194	35334
			29	35334	35474	29	35474	36563
			30	36563	36679	30	36679	36932
			31	36932	37165	31	37165	37257
			32	37257	37412	32	37412	37519
			33	37519	37671	33	37671	37969
			34	37969	38434			
RTEL1-202 ENST00000356810	551	16284	1	551	650	1	650	1424
			2	1424	1695	2	1695	3489
			3	3489	3687	3	3687	4041
			4	4041	4134	4	4134	4587
			5	4587	4818	5	4818	5020
			6	5020	5080	6	5080	8195
			7	8195	8270	7	8270	9660
			8	9660	9744	8	9744	14747
			9	14747	14812	9	14812	16131
			10	16131	16284			
RTEL1-206 ENST00000425905	30530	33067	1	30530	30577	1	30577	30719
			2	30719	30796	2	30796	31246
			3	31246	31323	3	31323	31941
			4	31941	32056	4	32056	32278
			5	32278	32401	5	32401	32485
			6	32485	32632	6	32632	32996
			7	32996	33067			
RTEL1-214 ENST00000646389	811	3653	1	811	943	1	943	1424
			2	1424	1695	2	1695	3489
			3	3489	3653			

[0297] 合适地,靶核酸编码RTEL1蛋白,特别是哺乳动物RTEL1,例如人RTEL1(参见例如表2和表3),其提供人和猴的前体mRNA序列RTEL1。

[0298] 在一些实施例中,靶核酸选自SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2或其天然存在的变体(例如表1中编码哺乳动物RTEL1蛋白的序列)。

[0299] 如果在研究或诊断中采用本发明的组合,则靶核酸可以是cDNA或衍生自DNA或RNA的合成核酸。

[0300] 对于体内或体外应用,本发明的组合通常能够抑制表达RTEL1靶核酸的细胞中RTEL1靶核酸的表达。本发明的组合的寡核苷酸的核碱基的连续序列通常与RTEL1靶核酸互补,如在整个寡核苷酸的长度上测量的,任选地,除了一个或两个错配以外,并且任选地排除可以将寡核苷酸与任选的官能团连接的基于核苷酸的接头,诸如缀合物或其他非互补性末端核苷酸(例如区域D'或D")。在一些实施例中,靶核酸可以是RNA或DNA,诸如信使RNA、诸如成熟的mRNA(例如,表1中列出的转录本的外显子区域)或前体mRNA。

[0301] 在一些实施例中,靶核酸是编码哺乳动物RTEL1蛋白,诸如人RTEL1的RNA或DNA、例如人RTEL1 mRNA序列、诸如作为SEQ ID NO 1公开的靶核酸。表2和表3提供了有关示例性靶核酸的更多信息。

[0302] 表2.多个物种的RTEL1的基因组和组装体信息。

[0303]

物种	Chr.	链	基因组学坐标		组装	ensembl gene_id
			开始	结束		
人	20	fwd	63657810	63696253	GRCh38.p12	ENSG00000258366
食蟹猴	10	fwd	95853726	95890939	Macaca_fascicularis_5.0	ENSMFAG00000043680

[0304] Fwd=正向链。基因组坐标提供了前体mRNA序列(基因组序列)。NCBI参考提供了mRNA序列(cDNA序列)。

[0305] 表3.跨物种的RTEL1的序列详细信息。

[0306]

物种	RNA类型	长度(nt)	SEQ ID NO
人	前体mRNA	38444	1
猴	前体mRNA	37214	2

[0307] 注意,SEQ ID NO 2包含多个NNNN区域,其中测序无法准确地精炼序列,因此包含简并序列。为了避免疑问,用于在本发明中使用的化合物与实际靶序列互补,因此不是简并化合物。

[0308] 在一些实施例中,靶核酸是SEQ ID NO 1。

[0309] 在一些实施例中,靶核酸是SEQ ID NO 2。

[0310] FUBP1靶核酸

[0311] 根据本发明,靶核酸是编码哺乳动物FUBP1的核酸,并且可以例如是基因、RNA、mRNA和前体mRNA、成熟的mRNA或cDNA序列。该靶标因此可以称为FUBP1靶核酸。

[0312] 合适地,靶核酸编码FUBP1蛋白质,特别是哺乳动物FUBP1,诸如人类FUBP1基因编码的前体mRNA或本文提供的SEQ ID NO:247、249和/或250的mRNA序列。SEQ ID NO:247是人FUBP1前体mRNA的序列。SEQ ID NO:249和250是人FUBP1 mRNA的序列。

[0313] 本发明的组合的核酸分子可以例如靶向哺乳动物FUBP1的外显子区域(特别是siRNA和shRNA,但也可以是反义寡核苷酸),或者可以例如靶向FUBP1前体mRNA中的任何内含子区域(特别是反义寡核苷酸)。表4列出了SEQ ID NO:247的预测外显子和内含子区域。

[0314] 表4.人FUBP1前体mRNA中的外显子区域和内含子区域。

[0315]

人 FUBP1 前体 mRNA (SEQ ID NO 247) 中的外显子区域			人 FUBP1 前体 mRNA (SEQ ID NO 247) 中的内含子区域		
ID	**开始**	**结束**	**ID**	**开始**	**结束**
E1	19	226	I1	227	9095
E2	9096	9186	I2	9187	10907
E3	10908	10946	I3	10947	11444
E4	11445	11484	I4	11485	12009
E5	12010	12062	I5	12063	12155
E6	12156	12227	I6	12228	12359
E7	12360	12417	I7	12418	13879
E8	13880	14042	I8	14043	14142

[0316]

人 FUBP1 前体 mRNA (SEQ ID NO 247) 中的外显子区域			人 FUBP1 前体 mRNA (SEQ ID NO 247) 中的内含子区域		
E9	14143	14241	I9	14242	14363
E10	14364	14465	I10	14466	14754
E11	14755	14857	I11	14858	14948
E12	14949	15049	I12	15050	15395
E13	15396	15537	I13	15538	16180
E14	16181	16341	I14	16342	18615
E15	18616	18767	I15	18768	18847
E16	18848	18927	I16	18928	22410
E17	22411	22539	I17	22540	23781
E18	23782	23856	I18	23857	29810
E19	29811	29956	I19	29957	30196
E20	30197	30706			

[0317] 适当地,靶核酸编码FUBP1蛋白,特别是哺乳动物FUBP1,诸如人FUBP1(参见例如表5和6),其提供人、猴、小鼠FUBP1的基因组序列、成熟mRNA和前体mRNA序列。

[0318] 在一些实施例中,靶核酸可以是食蟹猴FUBP1核酸,诸如mRNA或前体mRNA。

[0319] 在一些实施例中,靶核酸可以是小鼠FUBP1核酸,诸如mRNA或前体mRNA。

[0320] 在一些实施例中,靶核酸选自由SEQ ID NO:247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265和/或266或其天然存在的变体(例如,编码哺乳动物FUBP1的序列)组成的组。

[0321] 在一些实施例中,靶核酸选自由SEQ ID NO:247、251和/或255或其天然存在的变体(例如,编码哺乳动物FUBP1的序列)组成的组。

[0322] 在一些实施例中,靶核酸选自由SEQ ID NO:247和251或其天然存在的变体(例如,编码哺乳动物FUBP1的序列)组成的组。

[0323] 在一些实施例中,靶核酸选自由SEQ ID NO:247至254或其天然存在的变体(例如,编码哺乳动物FUBP1的序列)组成的组。

[0324] 在一些实施例中,靶核酸是编码哺乳动物FUBP1蛋白(诸如人FUBP1)的RNA或DNA,例如人FUBP1 mRNA序列,诸如SEQ ID NO 247所公开的。表5和表6提供了有关示例性靶核酸的更多信息。

[0325] 表5.多个物种的FUBP1的基因组和组装体信息。

[0326]

物种	Chr.	链	基因组学坐标 开始	结束	组装	ensembl gene_id
人	1	Rv	77944055	77979110	GRCh38.p10	ENSG 00000162613
食蟹猴	1	Fwd	149243675	149283374	Macaca_fascicularis_5.0	ENSMFAG 00000031825
小鼠	3	Fwd	152210422	152236826	GRCm38.p5	ENSMUSG 00000028034

[0327] Fwd＝正向链。Rv＝反相链。基因组坐标提供了前体mRNA序列(基因组序列)。

[0328] 如果在研究或诊断中采用用于在本发明中使用的核酸分子,则靶核酸可以是cDNA或衍生自DNA或RNA的合成核酸。

[0329] 对于体内或体外应用,治疗性核酸分子通常能够在表达FUBP1靶核酸的细胞中抑制FUBP1靶核酸的表达。核酸分子的核碱基的连续序列通常与FUBP1靶核酸的保守区域互补,如在整个核苷酸的长度上测量的,任选地,除了一个或两个错配以外,并且任选地排除可以将寡核苷酸与任选的官能团(诸如缀合物)或其他非互补性末端核苷酸连接的基于核苷酸的接头区域。

[0330] 靶核酸可以是信使RNA,诸如编码哺乳动物FUBP1蛋白的前体mRNA,诸如人FUBP1,诸如人FUBP1前体mRNA序列,诸如作为SEQ ID NO:247,食蟹猴FUBP1前体mRNA序列而公开的序列,诸如作为SEQ ID NO:251或小鼠FUBP1前体mRNA序列而公开的序列,诸如作为SEQ ID NO:255或成熟的FUBP1 mRNA而公开的序列,诸如作为SEQ ID NO:248、249和250而公开的人成熟的mRNA。SEQ ID NO:247-266是DNA序列-应当理解,靶RNA序列具有代替胸苷碱基(T)的尿嘧啶(U)碱基。

[0331] 表6提供了有关示例性靶核酸的其他信息。

[0332] 表6.跨物种的FUBP1的序列详细信息。

[0333]

物种	RNA类型	长度(nt)	SEQ ID NO
人	前体mRNA	305056	247
人	成熟的mRNA	696	248
人	成熟的mRNA	1968	249
人	成熟的mRNA	1935	250
食蟹猴	前体mRNA	39750	251
食蟹猴	成熟的mRNA	1968	252
食蟹猴	成熟的mRNA	6825	253
食蟹猴	成熟的mRNA	1959	254
小鼠	前体mRNA	26405	255
小鼠	成熟的mRNA	4525	256
小鼠	成熟的mRNA	800	257
小鼠	成熟的mRNA	2526	258
小鼠	成熟的mRNA	809	259
小鼠	成熟的mRNA	1040	260
小鼠	成熟的mRNA	796	261

小鼠	成熟的mRNA	585	262
小鼠	成熟的mRNA	2374	263
小鼠	成熟的mRNA	3163	264
小鼠	成熟的mRNA	6523	265
小鼠	成熟的mRNA	2552	266

[0334] 注意,SEQ ID NO 251包含多个NNNN区域,其中测序无法准确地精炼序列,因此包含简并序列。为了避免疑问,本发明的组合的化合物与实际靶序列互补,因此不是简并化合物。

[0335] 靶序列

[0336] 本文所用的术语“靶序列”是指存在于靶核酸中的核苷酸的序列,其包含与用于在本发明中使用的寡核苷酸为互补的核碱基序列。在一些实施例中,靶序列由靶核酸上具有与用于在本发明中使用的寡核苷酸的连续核苷酸序列互补的核碱基序列的区域组成。靶核酸的这一区域可以互换地称为靶标核苷酸序列、靶序列或靶标区域。在一些实施例中,靶序列比单个寡核苷酸的互补序列更长,并且可以例如代表靶核酸的优选区域,其可以被几种寡核苷酸靶向。

[0337] RTEL1靶序列

[0338] 在一些实施例中,靶序列是选自由人RTEL1 mRNA外显子组成的组的序列,诸如选自上表1中所列的人RTEL1 mRNA外显子。

[0339] 在一些实施例中,靶序列是选自由人RTEL1 mRNA内含子组成的组的序列,诸如选自上表1中所列的人RTEL1 mRNA内含子。

[0340] 用于在本发明中使用的寡核苷酸包含与靶核酸诸如本文所述的靶序列互补或杂交的连续核苷酸序列。

[0341] 与寡核苷酸互补或杂交的靶序列通常包含至少10个核苷酸的连续核碱基序列。连续核苷酸序列介于10个至35个核苷酸之间,诸如12个至30个、诸如14个至20个、诸如16个至20个连续核苷酸。在本发明的一个实施例中,靶序列选自由SEQ ID NO:3-26组成的组,如表7所示。

[0342] 表7:人RTEL1前体mRNA上的靶序列(SEQ ID NO:1)

[0343]

SEQ ID NO	靶序列	在 SEQ ID 1 上的开始位置	在 SEQ ID 1 上的结束位置
3	gaccactgtccttccatg	8294	8311
4	ttcagagattcaagttataataaagctcttcttatattgaggggga	8677	8722
5	gagattcaagttataataaag	8681	8701
6	aggaatagggttggtttt	9377	9394
7	ccttactacctgtcccg	9667	9683
8	acaattacttgttggatgcc	9722	9741
9	agcttctaacccaaccag	10921	10938
10	tataaacctaaatgtaaaagc	11482	11502
11	ttcaccaaaatttaaagctt	11622	11641
12	ctttgaccagagtatgtaaaattctc	11752	11777
13	tttgaccagagtatgtaaaatt	11753	11774
14	tttgaccagagtatgtaa	11753	11770
15	gaccagagtatgtaaaatt	11756	11774
16	accagagtatgtaaaatt	11757	11774
17	aagacgtgttcaaagatt	12868	12885
18	ggacctactgtttttg	13234	13250
19	ggacctactgttttattcc	13550	13568
20	gtcccttctcttcctcctgtag	14725	14746

[0344]

SEQ ID NO	靶序列	在 SEQ ID 1 上的开始位置	在 SEQ ID 1 上的结束位置
21	cgtgatctttgacgaagct	14785	14803
22	cgcaaacctttctgga	14874	14889
23	agcctgtgtgtggagtatgagca	33025	33047
24	cgtttccgtgttggtctggg	34571	34590
25	gactacaagggttccgatg	35104	35122
26	agtttgaggaggtctgtatc	35370	35389

[0345] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:5。

[0346] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:13。

[0347] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:14。

[0348] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:15。

[0349] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:16。

[0350] SEQ ID NO:5:GAGATTCAAGTTATAATAAAG

[0351] SEQ ID NO 13:TTTGACCAGAGTATGTAAAATT

[0352] SEQ ID NO:14:TTTGACCAGAGTATGTAA

[0353] SEQ ID NO:15:GACCAGAGTATGTAAAATT

[0354] SEQ ID NO 16:ACCAGAGTATGTAAAATT

[0355] SEQ ID NO:3至26是DNA序列-应当理解,靶RNA序列具有代替胸苷碱基(T)的尿嘧啶(U)碱基。

[0356] SEQ ID NO:13至16所示的靶序列可以在人RTEL1的内含子8中找到。SEQ ID No:5所示的靶序列可以在人RTEL1的内含子7中找到。

[0357] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:1的核苷酸11753至11774的区域。

[0358] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:1的核苷酸11757至11774的区域。

[0359] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:1的核苷酸11756至11774的区域。

[0360] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:1的核苷酸11753至11770的区域。

[0361] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:1的核苷酸8681至8701的区域。

[0362] 在一些实施例中,靶序列选自表8A或表8B所示的区域。

[0363] 表8A:可以使用用于在本发明中使用的寡核苷酸靶向的SEQ ID NO 1区域

[0364]

区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度
	从	至			从	至			从	至	
1A	1594	1623	30	321A	14295	14320	26	641A	24499	24514	16
2A	1636	1685	50	322A	14308	14352	45	642A	24560	24575	16
3A	1687	1708	22	323A	14323	14352	30	643A	24621	24636	16
4A	1773	1794	22	324A	14326	14352	27	644A	24682	24697	16
5A	1810	1824	15	325A	14334	14351	18	645A	24717	24753	37
6A	1824	1870	47	326A	14340	14364	25	646A	24842	24857	16
7A	2890	2907	18	327A	14340	14359	20	647A	24902	24918	17
8A	2931	2952	22	328A	14348	14362	15	648A	24932	24962	31
9A	2984	2999	16	329A	14374	14406	33	649A	25018	25056	39
10A	3002	3021	20	330A	14416	14446	31	650A	25160	25176	17
11A	3026	3081	56	331A	14462	14489	28	651A	25219	25251	33
12A	3083	3100	18	332A	14505	14521	17	652A	25259	25278	20
13A	3175	3202	28	333A	14523	14541	19	653A	25332	25346	15
14A	3205	3228	24	334A	14577	14598	22	654A	25363	25379	17
15A	3253	3270	18	335A	14725	14762	38	655A	25367	25383	17
16A	3289	3320	32	336A	14764	14781	18	656A	25405	25435	31
17A	3353	3368	16	337A	14783	14808	26	657A	25405	25436	32
18A	3374	3388	15	338A	14874	14905	32	658A	25407	25425	19
19A	3443	3472	30	339A	14974	15030	57	659A	25410	25436	27
20A	3525	3547	23	340A	15032	15059	28	660A	25418	25435	18
21A	3549	3581	33	341A	15084	15098	15	661A	25475	25495	21
22A	3584	3612	29	342A	15087	15106	20	662A	25502	25518	17
23A	3648	3675	28	343A	15108	15126	19	663A	25559	25582	24
24A	3681	3708	28	344A	15147	15180	34	664A	25596	25640	45
25A	3716	3731	16	345A	15183	15202	20	665A	25671	25688	18
26A	3733	3755	23	346A	15230	15247	18	666A	25796	25816	21
27A	3757	3775	19	347A	15255	15270	16	667A	25818	25832	15
28A	3797	3811	15	348A	15272	15298	27	668A	25834	25857	24
29A	3823	3844	22	349A	15288	15312	25	669A	25867	25881	15
30A	3846	3881	36	350A	15319	15349	31	670A	25928	25943	16
31A	3922	3955	34	351A	15359	15373	15	671A	25986	26001	16
32A	3957	3975	19	352A	15370	15385	16	672A	26014	26037	24
33A	4016	4036	21	353A	15382	15400	19	673A	26187	26210	24
34A	4038	4053	16	354A	15388	15408	21	674A	26212	26228	17

[0365]

区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度
	从	至			从	至			从	至	
35A	4067	4098	32	355A	15410	15435	26	675A	26268	26286	19
36A	4100	4150	51	356A	15435	15452	18	676A	26300	26319	20
37A	4271	4290	20	357A	15456	15498	43	677A	26359	26394	36
38A	4312	4330	19	358A	15459	15474	16	678A	26396	26426	31
39A	4345	4362	18	359A	15479	15498	20	679A	26465	26482	18
40A	4364	4379	16	360A	15486	15502	17	680A	26505	26529	25
41A	4420	4448	29	361A	15528	15543	16	681A	26547	26565	19
42A	4480	4512	33	362A	15543	15561	19	682A	26576	26600	25
43A	4527	4552	26	363A	15572	15591	20	683A	26588	26603	16
44A	4651	4674	24	364A	15623	15642	20	684A	26588	26606	19
45A	4733	4784	52	365A	15646	15660	15	685A	26609	26624	16
46A	4786	4811	26	366A	15662	15690	29	686A	26615	26638	24
47A	4830	4848	19	367A	15702	15740	39	687A	26615	26642	28
48A	4857	4874	18	368A	15740	15754	15	688A	26632	26669	38
49A	4915	4937	23	369A	15743	15773	31	689A	26649	26669	21
50A	4944	4966	23	370A	15746	15761	16	690A	26658	26672	15
51A	4969	4983	15	371A	15764	15789	26	691A	26695	26716	22
52A	4995	5015	21	372A	15777	15803	27	692A	26706	26725	20
53A	5017	5033	17	373A	15791	15816	26	693A	26713	26735	23
54A	5035	5075	41	374A	15832	15848	17	694A	26715	26733	19
55A	5109	5136	28	375A	15855	15873	19	695A	26737	26768	32
56A	5155	5173	19	376A	15870	15890	21	696A	26755	26770	16
57A	5175	5191	17	377A	15878	15908	31	697A	26756	26789	34
58A	5209	5225	17	378A	15880	15898	19	698A	26759	26789	31
59A	5241	5261	21	379A	15891	15908	18	699A	26787	26813	27
60A	5263	5287	25	380A	15896	15916	21	700A	26795	26812	18
61A	5299	5346	48	381A	15911	15929	19	701A	26815	26829	15
62A	5394	5409	16	382A	15911	15930	20	702A	26861	26880	20
63A	5428	5447	20	383A	15947	15963	17	703A	26862	26882	21
64A	5472	5514	43	384A	16023	16056	34	704A	26865	26883	19
65A	5579	5606	28	385A	16068	16091	24	705A	26868	26883	16
66A	5617	5632	16	386A	16083	16097	15	706A	26870	26885	16
67A	5690	5711	22	387A	16129	16150	22	707A	26871	26892	22
68A	5713	5754	42	388A	16170	16229	60	708A	26880	26898	19
69A	5727	5741	15	389A	16245	16265	21	709A	26889	26910	22
70A	5756	5770	15	390A	16269	16300	32	710A	26908	26924	17
71A	5812	5854	43	391A	16308	16334	27	711A	26917	26939	23
72A	5871	5886	16	392A	16336	16356	21	712A	26948	26962	15
73A	5896	5932	37	393A	16336	16358	23	713A	26955	26973	19
74A	5992	6009	18	394A	16360	16391	32	714A	27097	27113	17
75A	6011	6038	28	395A	16360	16397	38	715A	27101	27128	28
76A	6057	6072	16	396A	16425	16465	41	716A	27112	27127	16
77A	6101	6122	22	397A	16472	16493	22	717A	27116	27183	68
78A	6127	6165	39	398A	16498	16515	18	718A	27133	27165	33

[0366]

区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度
	从	至			从	至			从	至	
79A	6187	6203	17	399A	16545	16562	18	719A	27188	27209	22
80A	6210	6227	18	400A	16564	16586	23	720A	27218	27232	15
81A	6243	6261	19	401A	16588	16613	26	721A	27218	27234	17
82A	6271	6299	29	402A	16615	16639	25	722A	27235	27253	19
83A	6378	6393	16	403A	16651	16667	17	723A	27237	27253	17
84A	6468	6496	29	404A	16669	16695	27	724A	27237	27251	15
85A	6498	6526	29	405A	16696	16716	21	725A	27237	27252	16
86A	6558	6574	17	406A	16704	16718	15	726A	27238	27254	17
87A	6720	6737	18	407A	16732	16760	29	727A	27238	27252	15
88A	6735	6749	15	408A	16737	16760	24	728A	27238	27253	16
89A	6785	6825	41	409A	16849	16865	17	729A	27239	27255	17
90A	6879	6894	16	410A	16853	16868	16	730A	27239	27253	15
91A	6921	6959	39	411A	16853	16867	15	731A	27239	27254	16
92A	6995	7060	66	412A	16882	16897	16	732A	27240	27254	15
93A	7062	7084	23	413A	16885	16902	18	733A	27240	27255	16
94A	7114	7146	33	414A	16914	16938	25	734A	27241	27255	15
95A	7155	7186	32	415A	16942	16956	15	735A	27269	27320	52
96A	7188	7203	16	416A	16990	17004	15	736A	27281	27297	17
97A	7230	7267	38	417A	17016	17042	27	737A	27286	27307	22
98A	7281	7299	19	418A	17097	17115	19	738A	27340	27358	19
99A	7291	7316	26	419A	17105	17119	15	739A	27360	27404	45
100A	7344	7369	26	420A	17105	17126	22	740A	27411	27438	28
101A	7375	7391	17	421A	17114	17128	15	741A	27458	27474	17
102A	7400	7414	15	422A	17133	17158	26	742A	27531	27572	42
103A	7427	7441	15	423A	17160	17174	15	743A	27575	27600	26
104A	7437	7453	17	424A	17162	17178	17	744A	27602	27616	15
105A	7449	7463	15	425A	17166	17183	18	745A	27618	27637	20
106A	7467	7481	15	426A	17178	17199	22	746A	27670	27684	15
107A	7500	7518	19	427A	17187	17201	15	747A	27707	27721	15
108A	7532	7546	15	428A	17203	17223	21	748A	27723	27747	25
109A	7573	7587	15	429A	17213	17230	18	749A	27772	27816	45
110A	7607	7621	15	430A	17213	17235	23	750A	27772	27790	19
111A	7659	7685	27	431A	17237	17259	23	751A	27829	27847	19
112A	7732	7767	36	432A	17249	17279	31	752A	27850	27868	19
113A	7779	7793	15	433A	17267	17285	19	753A	27870	27905	36
114A	7844	7882	39	434A	17273	17288	16	754A	27927	27942	16
115A	7888	7910	23	435A	17297	17315	19	755A	27963	27987	25
116A	7966	7980	15	436A	17300	17315	16	756A	27989	28083	95
117A	8033	8047	15	437A	17302	17317	16	757A	28085	28103	19
118A	8049	8063	15	438A	17303	17324	22	758A	28120	28138	19
119A	8160	8178	19	439A	17312	17330	19	759A	28167	28188	22
120A	8180	8195	16	440A	17346	17375	30	760A	28190	28207	18
121A	8216	8237	22	441A	17349	17375	27	761A	28209	28231	23
122A	8239	8341	103	442A	17357	17374	18	762A	28234	28250	17

[0367]

区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度
	从	至			从	至			从	至	
123A	8357	8373	17	443A	17363	17382	20	763A	28260	28303	44
124A	8415	8430	16	444A	17371	17385	15	764A	28427	28444	18
125A	8449	8465	17	445A	17420	17447	28	765A	28446	28462	17
126A	8541	8560	20	446A	17524	17551	28	766A	28464	28484	21
127A	8574	8596	23	447A	17562	17580	19	767A	28503	28519	17
128A	8677	8703	27	448A	17622	17636	15	768A	28521	28536	16
129A	8705	8722	18	449A	17702	17734	33	769A	28538	28565	28
130A	8748	8763	16	450A	17730	17745	16	770A	28595	28612	18
131A	8792	8807	16	451A	17733	17755	23	771A	28694	28709	16
132A	8796	8811	16	452A	17743	17758	16	772A	28701	28715	15
133A	8799	8818	20	453A	17810	17824	15	773A	28715	28751	37
134A	8807	8821	15	454A	17900	17940	41	774A	28801	28825	25
135A	8814	8828	15	455A	17942	17968	27	775A	28832	28846	15
136A	8837	8853	17	456A	17988	18002	15	776A	28846	28870	25
137A	8837	8851	15	457A	18007	18024	18	777A	28878	28893	16
138A	8841	8858	18	458A	18026	18042	17	778A	28895	28911	17
139A	8884	8911	28	459A	18044	18059	16	779A	28938	28961	24
140A	8918	8937	20	460A	18126	18159	34	780A	29010	29025	16
141A	8918	8933	16	461A	18179	18205	27	781A	29057	29072	16
142A	8969	9005	37	462A	18237	18253	17	782A	29119	29134	16
143A	8969	8999	31	463A	18272	18290	19	783A	29179	29193	15
144A	8969	9000	32	464A	18299	18314	16	784A	29235	29256	22
145A	8971	8989	19	465A	18328	18344	17	785A	29330	29349	20
146A	8974	9000	27	466A	18329	18344	16	786A	29367	29381	15
147A	8982	8999	18	467A	18347	18361	15	787A	29530	29556	27
148A	9024	9042	19	468A	18380	18402	23	788A	29587	29605	19
149A	9026	9042	17	469A	18385	18399	15	789A	29652	29692	41
150A	9026	9040	15	470A	18406	18421	16	790A	29695	29710	16
151A	9026	9041	16	471A	18446	18473	28	791A	29722	29742	21
152A	9027	9043	17	472A	18527	18543	17	792A	29743	29768	26
153A	9027	9041	15	473A	18554	18569	16	793A	29770	29797	28
154A	9027	9042	16	474A	18631	18645	15	794A	29818	29836	19
155A	9028	9044	17	475A	18673	18693	21	795A	29838	29873	36
156A	9028	9042	15	476A	18746	18765	20	796A	29875	29946	72
157A	9028	9043	16	477A	18797	18824	28	797A	29948	29983	36
158A	9029	9045	17	478A	18842	18860	19	798A	30028	30048	21
159A	9029	9043	15	479A	18872	18892	21	799A	30046	30060	15
160A	9029	9044	16	480A	18901	18915	15	800A	30051	30067	17
161A	9030	9046	17	481A	18901	18940	40	801A	30069	30090	22
162A	9030	9044	15	482A	18942	18976	35	802A	30093	30107	15
163A	9030	9045	16	483A	18951	18976	26	803A	30116	30136	21
164A	9031	9047	17	484A	18971	18994	24	804A	30138	30202	65
165A	9031	9045	15	485A	18998	19016	19	805A	30220	30262	43
166A	9031	9046	16	486A	19020	19039	20	806A	30303	30320	18

[0368]

区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度
	从	至			从	至			从	至	
167A	9032	9048	17	487A	19027	19043	17	807A	30349	30372	24
168A	9032	9046	15	488A	19027	19050	24	808A	30387	30418	32
169A	9032	9047	16	489A	19088	19102	15	809A	30417	30441	25
170A	9033	9047	15	490A	19109	19129	21	810A	30476	30516	41
171A	9033	9048	16	491A	19128	19145	18	811A	30524	30576	53
172A	9034	9048	15	492A	19240	19258	19	812A	30602	30628	27
173A	9038	9052	15	493A	19280	19366	87	813A	30658	30680	23
174A	9046	9064	19	494A	19372	19387	16	814A	30682	30747	66
175A	9069	9090	22	495A	19422	19444	23	815A	30749	30799	51
176A	9074	9089	16	496A	19446	19462	17	816A	30801	30821	21
177A	9078	9093	16	497A	19489	19506	18	817A	30823	30844	22
178A	9095	9110	16	498A	19546	19571	26	818A	30908	30922	15
179A	9101	9124	24	499A	19597	19615	19	819A	30924	30980	57
180A	9126	9161	36	500A	19624	19648	25	820A	31027	31045	19
181A	9135	9155	21	501A	19680	19695	16	821A	31047	31080	34
182A	9147	9162	16	502A	19713	19727	15	822A	31086	31113	28
183A	9163	9186	24	503A	19775	19792	18	823A	31128	31146	19
184A	9203	9222	20	504A	19789	19803	15	824A	31150	31164	15
185A	9210	9253	44	505A	19811	19825	15	825A	31166	31193	28
186A	9210	9230	21	506A	19838	19862	25	826A	31229	31271	43
187A	9223	9254	32	507A	20241	20257	17	827A	31276	31310	35
188A	9241	9256	16	508A	20259	20290	32	828A	31312	31333	22
189A	9258	9272	15	509A	20309	20381	73	829A	31400	31417	18
190A	9266	9303	38	510A	20404	20419	16	830A	31419	31433	15
191A	9291	9308	18	511A	20470	20492	23	831A	31456	31470	15
192A	9311	9329	19	512A	20495	20557	63	832A	31517	31569	53
193A	9370	9394	25	513A	20593	20609	17	833A	31578	31599	22
194A	9406	9420	15	514A	20626	20646	21	834A	31661	31689	29
195A	9569	9591	23	515A	20648	20669	22	835A	31706	31739	34
196A	9653	9708	56	516A	20683	20699	17	836A	31741	31763	23
197A	9712	9758	47	517A	20718	20735	18	837A	31765	31805	41
198A	9771	9788	18	518A	20749	20765	17	838A	31807	31855	49
199A	9812	9829	18	519A	20751	20765	15	839A	31819	31834	16
200A	9844	9862	19	520A	20769	20785	17	840A	31851	31866	16
201A	9872	9917	46	521A	20773	20791	19	841A	31857	31872	16
202A	9958	9983	26	522A	20777	20798	22	842A	31938	31984	47
203A	9985	10002	18	523A	20779	20798	20	843A	31986	32032	47
204A	10017	10054	38	524A	20779	20797	19	844A	32034	32071	38
205A	10113	10132	20	525A	20798	20819	22	845A	32082	32097	16
206A	10113	10130	18	526A	20800	20819	20	846A	32124	32151	28
207A	10120	10137	18	527A	20800	20818	19	847A	32197	32216	20
208A	10183	10204	22	528A	20819	20840	22	848A	32233	32262	30
209A	10185	10204	20	529A	20819	20853	35	849A	32264	32289	26
210A	10185	10202	18	530A	20821	20840	20	850A	32306	32325	20

[0369]

区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度
	从	至			从	至			从	至	
211A	10192	10209	18	531A	20821	20853	33	851A	32357	32408	52
212A	10192	10210	19	532A	20821	20839	19	852A	32410	32459	50
213A	10231	10251	21	533A	20833	20851	19	853A	32474	32492	19
214A	10236	10251	16	534A	20833	20855	23	854A	32494	32508	15
215A	10320	10337	18	535A	20841	20864	24	855A	32527	32543	17
216A	10338	10353	16	536A	20855	20869	15	856A	32545	32560	16
217A	10397	10415	19	537A	20866	20895	30	857A	32570	32636	67
218A	10563	10584	22	538A	20881	20902	22	858A	32697	32713	17
219A	10591	10607	17	539A	20881	20915	35	859A	32744	32765	22
220A	10703	10723	21	540A	20883	20902	20	860A	32801	32823	23
221A	10766	10784	19	541A	20883	20915	33	861A	32865	32892	28
222A	10805	10822	18	542A	20883	20901	19	862A	32944	32959	16
223A	10844	10870	27	543A	20895	20913	19	863A	32962	32985	24
224A	10873	10893	21	544A	20895	20917	23	864A	32998	33104	107
225A	10895	10913	19	545A	20903	20926	24	865A	33126	33140	15
226A	10915	10942	28	546A	20917	20931	15	866A	33142	33194	53
227A	10961	10975	15	547A	20928	20946	19	867A	33213	33252	40
228A	10983	10999	17	548A	20937	20951	15	868A	33277	33298	22
229A	11001	11015	15	549A	20955	20973	19	869A	33318	33365	48
230A	11021	11035	15	550A	20975	20993	19	870A	33375	33390	16
231A	11033	11059	27	551A	20975	20997	23	871A	33402	33417	16
232A	11061	11082	22	552A	20983	21004	22	872A	33419	33443	25
233A	11084	11104	21	553A	20983	21017	35	873A	33456	33488	33
234A	11124	11154	31	554A	20985	21004	20	874A	33509	33542	34
235A	11156	11170	15	555A	20985	21017	33	875A	33562	33583	22
236A	11175	11192	18	556A	20985	21003	19	876A	33607	33622	16
237A	11227	11260	34	557A	20997	21015	19	877A	33655	33700	46
238A	11239	11254	16	558A	20997	21019	23	878A	33704	33720	17
239A	11274	11302	29	559A	21005	21028	24	879A	33735	33753	19
240A	11290	11305	16	560A	21019	21033	15	880A	33755	33780	26
241A	11299	11317	19	561A	21030	21048	19	881A	33806	33820	15
242A	11305	11329	25	562A	21030	21052	23	882A	33829	33845	17
243A	11344	11361	18	563A	21057	21075	19	883A	33916	33962	47
244A	11372	11400	29	564A	21057	21079	23	884A	33964	33982	19
245A	11402	11416	15	565A	21067	21085	19	885A	33989	34026	38
246A	11418	11445	28	566A	21088	21118	31	886A	34028	34072	45
247A	11457	11471	15	567A	21127	21153	27	887A	34089	34104	16
248A	11482	11511	30	568A	21155	21169	15	888A	34113	34130	18
249A	11550	11566	17	569A	21155	21180	26	889A	34141	34158	18
250A	11622	11645	24	570A	21205	21220	16	890A	34281	34309	29
251A	11722	11737	16	571A	21222	21283	62	891A	34377	34407	31
252A	11745	11777	33	572A	21347	21370	24	892A	34423	34498	76
253A	11824	11844	21	573A	21431	21445	15	893A	34507	34521	15
254A	11824	11840	17	574A	21463	21487	25	894A	34524	34545	22

[0370]

区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度
	从	至			从	至			从	至	
255A	12622	12638	17	575A	21489	21518	30	895A	34552	34596	45
256A	12673	12691	19	576A	21520	21535	16	896A	34688	34703	16
257A	12693	12724	32	577A	21551	21573	23	897A	34742	34759	18
258A	12747	12763	17	578A	21574	21591	18	898A	34770	34798	29
259A	12783	12806	24	579A	21595	21618	24	899A	34860	34882	23
260A	12818	12837	20	580A	21622	21641	20	900A	34919	34938	20
261A	12856	12885	30	581A	21664	21678	15	901A	34950	34988	39
262A	12890	12912	23	582A	21758	21789	32	902A	34990	35012	23
263A	12914	12945	32	583A	21799	21816	18	903A	35022	35048	27
264A	12984	13016	33	584A	21820	21852	33	904A	35063	35182	120
265A	13001	13016	16	585A	21865	21882	18	905A	35184	35210	27
266A	13004	13022	19	586A	21890	21905	16	906A	35222	35241	20
267A	13004	13021	18	587A	21917	21932	16	907A	35245	35275	31
268A	13014	13034	21	588A	21956	21976	21	908A	35277	35297	21
269A	13166	13191	26	589A	21975	21993	19	909A	35319	35355	37
270A	13228	13251	24	590A	22007	22035	29	910A	35367	35397	31
271A	13283	13319	37	591A	22014	22034	21	911A	35433	35457	25
272A	13295	13310	16	592A	22036	22051	16	912A	35461	35486	26
273A	13317	13332	16	593A	22036	22068	33	913A	35490	35509	20
274A	13354	13381	28	594A	22070	22132	63	914A	35546	35560	15
275A	13383	13430	48	595A	22174	22203	30	915A	35573	35593	21
276A	13446	13468	23	596A	22205	22219	15	916A	35597	35613	17
277A	13449	13468	20	597A	22229	22254	26	917A	35968	35999	32
278A	13471	13487	17	598A	22276	22299	24	918A	35997	36011	15
279A	13500	13518	19	599A	22309	22353	45	919A	36037	36051	15
280A	13547	13568	22	600A	22359	22373	15	920A	36097	36118	22
281A	13631	13650	20	601A	22385	22403	19	921A	36117	36132	16
282A	13663	13679	17	602A	22443	22460	18	922A	36278	36295	18
283A	13680	13694	15	603A	22462	22490	29	923A	36350	36364	15
284A	13744	13764	21	604A	22499	22520	22	924A	36366	36392	27
285A	13766	13803	38	605A	22601	22623	23	925A	36433	36458	26
286A	13768	13803	36	606A	22646	22661	16	926A	36460	36483	24
287A	13777	13797	21	607A	22663	22682	20	927A	36530	36547	18
288A	13789	13804	16	608A	22713	22735	23	928A	36549	36566	18
289A	13804	13827	24	609A	22737	22772	36	929A	36600	36625	26
290A	13823	13844	22	610A	22793	22826	34	930A	36627	36665	39
291A	13840	13854	15	611A	22851	22903	53	931A	36759	36774	16
292A	13840	13855	16	612A	22905	22928	24	932A	36765	36782	18
293A	13841	13855	15	613A	22934	22985	52	933A	36815	36850	36
294A	13851	13874	24	614A	23071	23089	19	934A	36873	36891	19
295A	13851	13873	23	615A	23094	23121	28	935A	36894	36934	41
296A	13853	13871	19	616A	23174	23208	35	936A	36969	36994	26
297A	13855	13874	20	617A	23249	23276	28	937A	36996	37016	21
298A	13862	13882	21	618A	23279	23311	33	938A	37023	37040	18

[0371]

区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域A	SEQ ID NO 1 中的位置		长度
	从	至			从	至			从	至	
299A	13890	13905	16	619A	23313	23328	16	939A	37093	37112	20
300A	13897	13927	31	620A	23450	23470	21	940A	37118	37142	25
301A	13926	13940	15	621A	23488	23503	16	941A	37144	37163	20
302A	13957	13971	15	622A	23511	23529	19	942A	37242	37324	83
303A	13966	13980	15	623A	23555	23570	16	943A	37352	37368	17
304A	13995	14025	31	624A	23575	23589	15	944A	37370	37389	20
305A	14027	14048	22	625A	23597	23620	24	945A	37391	37419	29
306A	14048	14067	20	626A	23632	23647	16	946A	37421	37438	18
307A	14084	14098	15	627A	23672	23687	16	947A	37444	37491	48
308A	14118	14133	16	628A	23737	23775	39	948A	37511	37538	28
309A	14154	14171	18	629A	23746	23760	15	949A	37567	37614	48
310A	14173	14210	38	630A	23833	23847	15	950A	37636	37680	45
311A	14198	14218	21	631A	23872	23911	40	951A	37723	37765	43
312A	14200	14218	19	632A	23919	23936	18	952A	37773	37801	29
313A	14237	14265	29	633A	24050	24068	19	953A	37803	37822	20
314A	14242	14265	24	634A	24083	24111	29	954A	37824	37853	30
315A	14242	14264	23	635A	24111	24125	15	955A	37855	37887	33
316A	14244	14262	19	636A	24131	24164	34	956A	37889	37908	20
317A	14246	14265	20	637A	24167	24189	23	957A	37920	37939	20
318A	14253	14271	19	638A	24204	24227	24	958A	37988	38020	33
319A	14273	14293	21	639A	24236	24285	50	959A	38022	38049	28
320A	14290	14304	15	640A	24438	24453	16				

[0372] 表8B:可以使用用于在本发明中使用的寡核苷酸靶向的SEQ ID NO 1区域

[0373]

区域B	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域B	SEQ ID NO 1 中的位置		长度	区域B	SEQ ID NO 1 中的位置		长度
	从	至			从	至			从	至	
1	8295	8312	17	11	11622	11641	19	21	18085	18101	16
2	8684	8704	20	12	11753	11773	20	22	22425	22441	16
3	9668	9684	16	13	11755	11772	17	23	33030	33048	18
4	9669	9684	15	14	11756	11776	20	24	35103	35123	20
5	9722	9741	19	15	11757	11776	19	25	35371	35390	19
6	9723	9741	18	16	11758	11778	20	26	35636	35655	19
7	9724	9742	18	17	12868	11885	17	27	35638	35654	16
8	10921	10937	16	18	13234	13252	18	28	36915	36931	16
9	11483	11503	20	19	13551	13569	18				
10	11512	11531	19	20	14786	14804	18				

[0374] FUBP1靶序列

[0375] 在一些实施例中,靶序列是选自由人FUBP1 mRNA外显子组成的组的序列,诸如选自由e1、e2、e3、e4、e5、e6、e7、e8、e9、e10、e11、e12、13、e14、e15、e16、e17、e18、e19和e20(参见例如上表4)组成的组的FUBP1人mRNA外显子。

[0376] 在一个实施例中,靶序列是选自由以下项组成的组的序列:选自由外显子9、10、12、14和20组成的组的人FUBP1 mRNA外显子中的一者或多者。

[0377] 在一些实施例中,靶序列是选自由人FUBP1mRNA内含子组成的组的序列,诸如选自由i1、i2、i3、i4、i5、i6、i7、i9、i10、i11、i12、13、i14、i15、i16、i17、i18和i19(参见例如上表4)组成的组的FUBP1人mRNA内含子。

[0378] 本发明的组合的核酸分子包含与靶核酸上的区域诸如本文所述的靶序列互补或杂交的连续核苷酸序列。

[0379] 在一个实施例中,靶序列是人FUBP1 mRNA的外显子14(参见上表4)。

[0380] 在另一个实施例中,靶序列是人FUBP1 mRNA的外显子20(参见上表4)。

[0381] 本发明的组合的反义寡核苷酸包含与靶核酸上的区域(诸如本文所述的靶序列)互补或杂交的连续核苷酸序列。

[0382] 本文如下提供了靶序列区域,如由本发明的组合的寡核苷酸可以靶向的人FUBP1前体mRNA的区域(使用SEQ ID NO 247作为参考)所定义。

[0383] 本发明的组合的寡核苷酸包含与靶核酸(诸如靶核酸的子序列,诸如本文所述的靶序列)互补或杂交的连续核苷酸序列。

[0384] 与治疗性核酸分子互补或杂交的靶核酸序列通常包含一段至少10个核苷酸的连续核碱基。连续核苷酸序列(以及因此靶序列)包含至少12个连续核苷酸,诸如12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24个核苷酸,诸如14个至20个连续核苷酸,诸如14个至18个连续核苷酸。

[0385] 发明人已经鉴定了FUBP1靶核酸的特别有效的序列,其可以由本发明的组合的寡核苷酸靶向。

[0386] 在一些实施例中,靶序列是SEQ ID NO:267。

[0387] 在一些实施例中,靶序列是SEQ ID NO:268。

[0388] 在一些实施例中,靶序列是SEQ ID NO:269。

[0389] 在一些实施例中,靶序列是SEQ ID NO:270。

[0390] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:347。

[0391] SEQ ID NO:267:gtgaaaccataaaaagcataag

[0392] SEQ ID NO:268:AACCATAAAAAGCATAAG

[0393] SEQ ID No:269:gtgaaaccataaaaagcata

[0394] SEQ ID NO:270:GTAGAAATGAAAATTGGT

[0395] SEQ ID NO:347:GACTATGGTTATGGGG

[0396] SEQ ID NO:267、268、269、270和347是DNA序列-应当理解,靶RNA序列具有代替胸苷碱基(T)的尿嘧啶(U)碱基。

[0397] 本发明提供了一种反义寡核苷酸,其包含与人FUBP1前体mRNA(如SEQ ID NO:247所示)的核苷酸16184至16205的区域互补(诸如完全互补)的连续核苷酸序列。

[0398] 本发明提供了一种反义寡核苷酸,其包含与人FUBP1前体mRNA(如SEQ ID NO:247所示)的核苷酸16188至16205的区域互补(诸如完全互补)的连续核苷酸序列。

[0399] 本发明提供了一种反义寡核苷酸,其包含与人FUBP1前体mRNA(如SEQ ID NO:247所示)的核苷酸16184至16203的区域互补(诸如完全互补)的连续核苷酸序列。

[0400] 本发明还提供了一种反义寡核苷酸,其包含与人FUBP1前体mRNA(如SEQ ID NO:247所示)的核苷酸30536至30553的区域互补(诸如完全互补)的连续核苷酸序列。

[0401] 本发明还提供了一种反义寡核苷酸,其包含与人FUBP1前体mRNA(如SEQ ID NO:247所示)的核苷酸9141至9156的区域互补(诸如完全互补)的连续核苷酸序列。

[0402] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247的核苷酸16184至16200的区域互补,诸如完全互补。

[0403] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247的核苷酸16186至16203的区域互补,诸如完全互补。

[0404] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247的核苷酸16189至16205的区域互补,诸如完全互补。

[0405] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:247的核苷酸16184至16200的区域。

[0406] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:247的核苷酸16186至16203的区域。

[0407] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:247的核苷酸16188至16205的区域。

[0408] 在一些实施例中,靶序列为SEQ ID NO:247的核苷酸16189至16205的区域。

[0409] 靶标

[0410] 如本文所用,术语“靶标”可以指哺乳动物蛋白RTEL1(“端粒延伸解旋酶1调控因子”),或者称为“KIAA1088”或“C20ORF41”或“端粒长度的调节因子”或“端粒长度调节因子”或“染色体20开放阅读框41”。智人RTEL1基因位于20号染色体组63,657,810至63,696,253(智人更新注释,版本109.20200228,GRCh38.p13)。RTEL1蛋白为ATP依赖性DNA解旋酶,参与端粒长度调节、DNA修复和基因组稳定性维持。人RTEL1的氨基酸序列是本领域已知的并且可以经由UniProt进行评估,参见用于人RTEL1的UniProt条目Q9NZ71,通过引用并入本文。

[0411] 本文使用术语“靶标”也可以指哺乳动物蛋白质“远端上游元件结合蛋白1”,替代地称为“FUBP1”或“FBP”或“FUBP”或“hDH V”。智人FUBP1基因位于1号染色体,77944055..77979435,补体(NC_000001.11,基因ID 1462)。FUBP1基因编码一种ssDNA结合蛋白,该结合蛋白可激活c-myc的远端上游元件并刺激未分化细胞中c-myc的表达。FUBP对FUSE的调节是通过FUBP与非编码链的单链结合发生的。FUBP1蛋白具有ATP依赖性DNA解旋酶活性。人FUBP1的氨基酸序列是本领域已知的并且可以通过UniProt进行评估,参见例如用于人FUBP1的UniProt条目Q96AE4,通过引用并入本文。

[0412] 治疗有效量

[0413] 术语“治疗有效量”表示本发明的化合物药物组合的量,当将其施用于受试者时,(i)治疗或预防特定疾病、病症或疾患,(ii)减弱、减轻或消除特定疾病、病症或疾患的一种或多种症状,或(iii)预防或延缓本文所述的特定疾病、病症或疾患的一种或多种症状的发作。治疗有效量取决于化合物,所治疗的疾病状态,所治疗疾病的严重程度,受试者的年龄和相对健康状况,施用途径和形式,主治医学或兽医的判断和其他因素。

[0414] 治疗

[0415] 本文所用的术语“治疗”是指既存疾病(例如本文所指的疾病或疾患)的治疗或疾病的阻止,即预防。因此将认识到,在一些实施例中,本文所指的治疗可以是预防性的。预防可理解为阻止HBV感染转变为慢性HBV感染或阻止由慢性HBV感染引起的严重肝病,诸如肝硬化和肝细胞癌。

具体实施方式

[0416] 感染的肝细胞中的HBV cccDNA负责持续的慢性感染和再激活,是所有病毒亚基因组转录本和前基因组RNA(pgRNA)的模板,以确保新合成的病毒后代和cccDNA池通过细胞内核衣壳回收而得到补充。在本发明的上下文中,第一次显示RTEL1与cccDNA稳定性有关。这种认知为HBV感染受试者体内的cccDNA去稳定化提供机会,这反过来又为彻底治愈慢性感染HBV患者创造机会。

[0417] 多年来,已知FUBP1的过表达和突变与癌症相关。特别是,FUBP1在人肝细胞癌(HCC)中的明显过表达支持肿瘤生长并与患者预后不良相关。感染的肝细胞中的HBV cccDNA负责持续的慢性感染和再激活,是所有病毒亚基因组转录本和前基因组RNA(pgRNA)的模板,以确保新合成的病毒后代和cccDNA池通过细胞内核衣壳回收而得到补充。在本发明的上下文中,第一次显示FUBP1与cccDNA稳定性有关。这种认知为HBV感染受试者体内的cccDNA去稳定化提供机会,这反过来又为彻底治愈慢性感染HBV患者创造机会。FUBP1在HCC和cccDNA稳定性中的作用预计是不同的并且彼此独立。

[0418] 本发明涉及两类化合物的组合:i)RTEL1的抑制剂和ii)FUBP1的抑制剂或其药用盐。适当地,每种化合物以药用的稀释剂、溶剂、载体、盐和/或辅助剂的形式提供。

[0419] 适当地,根据本发明的组合用于在治疗乙型肝炎病毒感染和/或癌症、特别是治疗患有慢性HBV感染的患者中使用。

[0420] 在实施例中,本发明的组合是一种组合物、药物组合物或试剂盒,其包含化合物i)RTEL1的抑制剂和ii)FUBP1的抑制剂或其药用盐。适当地,每种化合物以药用的稀释剂、溶剂、载体、盐和/或辅助剂的形式提供。

[0421] 本发明还涉及一种治疗或预防疾病的方法,该方法包括施用根据本发明的组合。

[0422] 本发明还涉及根据本发明的组合用于制备药物的用途。

[0423] 本发明还涉及一种用于在表达RTEL1和FUBP1的靶细胞中调节RTEL1和FUBP1表达的体内或体外方法,所述方法包括施用根据本发明的组合。

[0424] 下面,将分别描述组合中的每一类化合物。然而,应当理解,来自每一类别的至少一种化合物存在于该组合中。化合物可以同时或单独施用。每一类中的化合物可以肠胃外(诸如静脉内、皮下或肌内)或肠(诸如口服或通过胃肠道)施用。

[0425] RTEL1抑制剂

[0426] 在一方面,本发明组合中的第一类化合物是靶向RTEL1的抑制剂。此类抑制剂可以选自由例如小分子、单链反义寡核苷酸;siRNA分子;或shRNA分子组成的组

[0427] 在本节中,术语“寡核苷酸”应理解为“靶向RTEL1的寡核苷酸”。

[0428] 治疗性寡核苷酸可能是出色的RTEL1抑制剂,因为它们可以靶向RTEL1转录本并通过RNA干扰途径或通过RNA酶H裂解而促进其降解。或者,寡核苷酸诸如适体也可以充当RTEL1蛋白交互作用的抑制剂。

[0429] 在一方面,本发明组合中的第一类化合物是靶向RTEL1的抑制剂。此类抑制剂可以选自由单链反义寡核苷酸;siRNA分子;或shRNA分子组成的寡核苷酸组。

[0430] 本节描述了本发明组合的寡核苷酸或其缀合物;且适合用于在治疗和/或预防乙型肝炎病毒(HBV)感染;诸如慢性HBV病毒感染,或治疗癌症中使用。

[0431] 本发明的组合的寡核苷酸能够在体外和体内抑制RTEL1的表达。抑制是通过将寡

核苷酸与编码RTEL1或参与RTEL1调节的靶核酸杂交来实现的。靶核酸可以是哺乳动物RTEL1序列,诸如SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2的序列

[0432] 在本发明的一些实施例中,寡核苷酸能够减少受感染细胞中的cccDNA。

[0433] 在一些实施例中,本发明的组合的寡核苷酸能够通过抑制或下调靶标的表达来调节靶标的表达。优选地,与靶标的正常表达水平相比,这种调节产生至少20%的表达抑制,更优选地与靶标的正常表达水平相比,至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的抑制。在一些实施例中,在PXB-PHH细胞中使用10μM的寡核苷酸,可能能够在体外将RTEL1 mRNA的表达水平抑制至少60%或70%。在本发明的一些实施例中,在PXB-PHH细胞中使用10μM的寡核苷酸,可能能够在体外将RTEL1蛋白的表达水平抑制至少50%,就选择与cccDNA减少具有良好相关性的核酸分子而言,靶标减少的这一范围是有利的。适当地,实例提供了可用于测量RTEL1 RNA或蛋白质抑制的测定法(例如实例1)。通过寡核苷酸的连续核苷酸序列与靶核酸之间的杂交来触发靶抑制。在一些实施例中,寡核苷酸包含寡核苷酸与靶核酸之间的错配。尽管错配,与靶核酸的杂交仍可能足以显示出所需的RTEL1表达抑制。由错配导致降低的结合亲和力可以优选地通过寡核苷酸中核苷酸数量的增加和/或能够增加与靶标结合亲和力的修饰核苷数量的增加来补偿,所述修饰核苷诸如存在于寡核苷酸序列中的2'糖修饰的核苷,包括LNA。

[0434] 本发明的一个方面涉及长度为12个至60个核苷酸的寡核苷酸,其包含长度为至少10个核苷酸,诸如长度为至少12个至30个核苷酸的连续核苷酸序列,且与哺乳动物RTEL1靶核酸特别是人RTEL1核酸至少95%互补,诸如完全互补。这些寡核苷酸能够抑制RTEL1的表达。

[0435] 本发明的一个方面涉及寡核苷酸,其是长度为12个至30个核苷酸的反义寡核苷酸,其包含长度为至少10个核苷酸,诸如10个至30个核苷酸的连续核苷酸序列,且与哺乳动物RTEL1至少90%互补,诸如完全互补。

[0436] 本发明的另一方面涉及寡核苷酸,其包含长度为12个至20个核苷酸,诸如15个至22个核苷酸的连续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:1的靶核酸至少90%互补,诸如完全互补。

[0437] 在一些实施例中,寡核苷酸包含长度为10个至30个核苷酸的连续序列,其与靶核酸的区域或靶序列至少90%互补,诸如至少91%、诸如至少92、诸如至少93%、诸如至少94%、诸如至少95%、诸如至少96%、诸如至少97%、诸如至少98%或100%互补。

[0438] 如果用于在本发明中使用的寡核苷酸或其连续核苷酸序列与靶核酸的区域完全互补(100%互补),或者在一些实施例中可包含寡核苷酸与靶核酸之间的一个或两个错配,则是有利的。

[0439] 在一些实施例中,反义寡核苷酸序列与SEQ ID NO:1的相应靶核酸100%互补。

[0440] 在本发明的一些实施例中,本发明的组合的寡核苷酸或连续核苷酸序列与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的靶核酸至少95%互补,例如完全(或100%)互补。

[0441] 在一些实施例中,寡核苷酸包含长度为15个至22个核苷酸的连续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:1中存在的相应靶序列至少90%互补,诸如100%的互补性,其中靶核酸选自由SEQ ID NO:3至SEQ ID NO:26(表7)或表8A中的区域1A至区域959A组成的组。

[0442] 表8A:可以使用本发明的组合的寡核苷酸靶向的SEQ ID NO 1区域

[0443] 在一些实施例中,寡核苷酸包含长度为16个至20个,诸如15个至22个核苷酸的连

续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:1中存在的相应靶序列至少90%互补,诸如100%互补,其中靶核酸选自由SEQ ID NO:3至SEQ ID NO:26(表7)或表8B中的区域B1至区域B28组成的组。

[0444] 在本发明的一些实施例中,寡核苷酸包含长度为12个至60个的核苷酸,诸如长度为13个至50个、诸如14个至35个、诸如15个至30个、诸如16个至20个的连续核苷酸,或由其组成。在优选的实施例中,寡核苷酸包含长度为15个、16个、17个、18个、19个或20个的核苷酸或由其组成。

[0445] 在一些实施例中,与靶核酸互补的寡核苷酸的连续核苷酸序列包含长度为12个至30个,诸如13个至25个、诸如15个至23个、诸如16个至22个的连续核苷酸,或由其组成。

[0446] 在一些实施例中,与靶核酸互补的siRNA或shRNA的连续核苷酸序列包含长度为18个至28个,诸如19个至26个、诸如20个至24个、诸如21个至23个的连续核苷酸,或由其组成。

[0447] 在一些实施例中,与靶核酸互补的单链反义寡核苷酸的连续核苷酸序列包含长度为12个至22个,诸如14个至20个、诸如16个至20个、诸如15个至21个、诸如15个至18个、诸如16个至18个、诸如16个至17个的连续核苷酸,或由其组成。

[0448] 在一些实施例中,寡核苷酸或连续核苷酸序列包含选自由表9A所列序列组成的组的序列,或由其组成。

[0449] 在一些实施例中,寡核苷酸或连续核苷酸序列包含长度为10个至30个的核苷酸或由其组成,与选自由SEQ ID NO:27至SEQ ID NO:246组成的组的序列(参见表9A中所列的基序序列)至少90%的同一性,优选地100%的同一性。在一个特定的实施例中,寡核苷酸或连续核苷酸序列选自SEQ ID NO:27;28;29;30;31;32;33;34;37;40;41;42;43;44;45;46;47;48;51;54;88;114;135;208;237;243;244;245和246。

[0450] 在特定实施例中,寡核苷酸或连续核苷酸序列为SEQ ID NO 243。

[0451] 在特定实施例中,寡核苷酸或连续核苷酸序列为SEQ ID NO 244。

[0452] 在特定实施例中,寡核苷酸或连续核苷酸序列为SEQ ID NO 245。

[0453] 在特定实施例中,寡核苷酸或连续核苷酸序列为SEQ ID NO 246。

[0454] 应当理解的是,可以修饰连续寡核苷酸序列(基序序列)以例如增加核酸酶抗性和/或对靶核酸的结合亲和力。

[0455] 将修饰的核苷(例如高亲和力修饰的核苷)掺入寡核苷酸序列中的模式通常称为寡核苷酸设计。

[0456] 寡核苷酸可以使用修饰的核苷和RNA核苷(特别是用于siRNA和shRNA分子)或DNA核苷(特别是用于单链反义寡核苷酸)设计。有利地,使用高亲和力修饰的核苷。

[0457] 在一个实施例中,寡核苷酸包含至少1个经修饰的核苷,诸如至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个经修饰的核苷。在一个实施例中,寡核苷酸包含1个至10个经修饰的核苷,诸如2个至9个修饰的核苷、诸如3个至8个经修饰的核苷、诸如4个至7个修饰的核苷、诸如6个或7个经修饰的核苷。合适的修饰在“定义”部分的“经修饰的核苷”、“高亲和力修饰的核苷”、“糖修饰”、“2’糖修饰”和“锁定的核酸(LNA)”下进行了描述。

[0458] 在一个实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个糖修饰的核苷,例如2’糖修饰的核苷。优选地,寡核苷酸包含一个或多个2’糖修饰的核苷,所述一个或多个2’糖修饰的核苷独立地选自由以下项组成的组:2’-O-烷基-RNA、2’-O-甲基-RNA、2’-烷氧基-RNA、2’-O-甲氧

基乙基-RNA、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、阿糖核酸(ANA)、2'-氟-ANA和LNA核苷。如果一个或多个修饰的核苷是锁定的核酸(LNA),则是优选的。

[0459] 在另一个实施例中,寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键。合适的核苷间修饰描述于"定义"章节的"修饰的核苷间键合"下。如果在寡核苷酸的5'或3'端的至少2个至3个核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键,则是优选的。对于单链反义寡核苷酸,如果连续核苷酸序列内的至少75%(诸如所有)的核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键,则是优选的。在一些实施例中,单链反义寡核苷酸的连续序列中的所有核苷酸间键是硫代磷酸酯键。

[0460] 在本发明的一些实施例中,寡核苷酸包含至少一个LNA核苷,诸如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个LNA核苷,诸如2个至6个LNA核苷,诸如3个至7个LNA核苷、4个至8个LNA核苷或3个、4个、5个、6个、7个或8个LNA核苷。在一些实施例中,寡核苷酸中至少75%的修饰的核苷是LNA核苷,诸如80%、诸如85%、诸如90%的修饰的核苷是LNA核苷。在又一实施方案中,寡核苷酸中所有经修饰的核苷均为LNA核苷。在另一个实施例中,寡核苷酸可同时包含β-D-氧基-LNA和以下LNA核苷中的一个或多个:硫代-LNA、氨基-LNA、氧基-LNA、ScET和/或ENA,或为β-D构型或为α-L构型或其组合。在另一个实施例中,所有LNA胞嘧啶单元均为5-甲基胞嘧啶。对于寡核苷酸或连续核苷酸序列的核酸酶稳定性而言,优选的是在核苷酸序列的5'端具有至少1个LNA核苷并且在核苷酸序列的3'端具有至少2个LNA核苷。

[0461] 在本发明的一个实施例中,寡核苷酸能够募集RNA酶H。

[0462] 在本发明中,优选的结构设计是如"定义"章节中,例如在"间隔聚体"、"LNA间隔聚体"和"MOE间隔聚体"下描述的间隔聚体设计。在本发明中,如果反义寡核苷酸是具有F-G-F'设计的间隔聚体,则是有利的。在一些实施例中,间隔聚体是具有均匀侧翼的LNA间隔聚体。

[0463] 在经典的间隔聚体设计中,即具有均匀侧翼的间隔聚体(例如4-12-2),侧翼中的所有核苷酸(F和F')均由相同类型的2'-糖修饰核苷构成,例如LNA、cET或MOE,以及中间形成缺口(G)的一段DNA。在具有交替侧翼设计的间隔聚体中,寡核苷酸的侧翼被注释为一系列整数,代表多个β-D-氧基LNA核苷(L)后跟多个DNA核苷(D)。例如,具有1-2-1-1-3基序的侧翼F'代表LDDLDLLL(参见CMP ID NO 246_1;表9A或9B)。两个侧翼在5'和3'端均具有β-D-氧基LNA的核苷。由许多DNA核苷构成的缺口区域(G)位于侧翼之间。

[0464] 在本发明的一些实施例中,LNA间隔聚体选自以下侧翼设计:2-12-3、4-14-2、3-10-3、3-9-3、2-15-2、2-12-4、1-13-2、3-13-2、4-13-2、2-12-2、3-12-2、3-15-2、3-14-2、3-13-3、2-14-4、3-12-3、1-14-3、3-14-3、2-14-3、2-15-3、3-11-3、1-12-3、1-11-4、1-13-2、2-13-2、2-16-2、1-14-2、1-17-3、1-18-2、4-12-2、2-13-4、2-11-1-2-1-1-3和2-17-4。

[0465] 表9A:寡核苷酸基序序列(由SEQ ID NO表示)的列表,其设计以及基于基序序列设计的具体寡核苷酸化合物(由CMP ID NO表示)。

[0466]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
27	catggaaggacagtggt	2-12-3	CAtggaaggacagtGGT	27_1	8295
28	agctttattataacttgaat	4-14-2	AGCTttattataacttgaAT	28_1	8684
29	cgggacaggtagtaag	3-10-3	CGGgacaggtagtAAG	29_1	9668
30	cgggacaggtagtaa	3-9-3	CGGgacaggtagTAA	30_1	9669
31	gcatccaacaagtaattgt	2-15-2	GCatccaacaagtaattGT	31_1	9722
32	gcatccaacaagtaattg	2-12-4	GCatccaacaagtaATTG	32_1	9723
33	ggcatccaacaagtaatt	3-13-2	GGCatccaacaagtaaTT	33_1	9724
34	ggttgggttagaagct	2-12-2	GGttgggttagaagCT	34_1	10921
35	gcttttacatttaggtttat	3-15-2	GCTtttacatttaggtttAT	35_1	11483
36	catgttcctttctataact	3-14-2	CATgttcctttctataaCT	36_1	11512
37	agctttaaattttggtgaa	3-13-3	AGCtttaaattttggtGAA	37_1	11622
38	ttttacatactctggtcaaa	2-14-4	TTttacatactctggtCAAA	38_1	11753
39	ttttacatactctggtca	3-12-3	TTTtacatactctggTCA	39_1	11755
40	gaattttacatactctggtc	3-14-3	GAAttttacatactctgGTC	40_1	11756
41	gaattttacatactctggt	2-14-3	GAattttacatactctGGT	41_1	11757
42	gagaattttacatactctgg	2-15-3	GAgaattttacatactcTGG	42_1	11758
43	atctttgaacacgtctt	3-11-3	ATCtttgaacacgtCTT	43_1	12868
44	acaaaaaacagtaggtcc	2-12-4	ACaaaaaacagtagGTCC	44_1	13234
45	ggaataaaacagtaggtc	2-12-4	GGaataaaacagtaGGTC	45_1	13551
46	agcttcgtcaaagatcac	3-13-2	AGCttcgtcaaagatcAC	46_1	14786
47	ggtgggtggatgtttc	1-12-3	GgtgggtggatgtTTC	47_1	18085

[0467]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
47	ggtgggtggatgtttc	1-11-4	GgtgggtggatgTTTC	47_2	18085
47	ggtgggtggatgtttc	1-13-2	GgtgggtggatgttTC	47_3	18085
48	ggtggtgtggagaagc	1-12-3	GgtggtgtggagaAGC	48_1	22425
48	ggtggtgtggagaagc	1-13-2	GgtggtgtggagaaGC	48_2	22425
49	gctcatactccacacac	2-13-2	GCtcatactccacacAC	49_1	33030
50	catcggaacccttgtagtcc	2-16-2	CAtcggaacccttgtagtCC	50_1	35103
51	gatacagacctcctcaaac	2-15-2	GAtacagacctcctcaaAC	51_1	35371
52	ggtggaggtggtgctgc	1-14-2	GgtggaggtggtgctGC	52_1	35636
53	aggtggaggtggtgct	1-12-3	AggtggaggtggtGCT	53_1	35638
54	tggtgtgggagtagca	2-12-2	TGgtgtgggagtagCA	54_1	36915
55	cgatggcgagaaatta	4-10-2	CGATggegagaaatTA	55_1	3824
56	taattcagcaaaaaagccca	3-15-2	TAAttcagcaaaaaagccCA	56_1	3858
57	aagaatctgacacccca	2-12-3	AAgaatctgacaccCCA	57_1	3924
58	agacagccaagaatctgacac	1-18-2	AgacagccaagaatctgacAC	58_1	3928
59	cagccaagaatctgaca	2-12-3	CAgccaagaatctgACA	59_1	3929
60	acaggaacccgacag	2-10-3	ACaggaaccegaCAG	60_1	4496
61	gttactctcttgtttcttcac	1-18-2	GttactctcttgtttcttcAC	61_1	4789
62	ttactctcttgtttcttca	1-16-2	TtactctcttgtttcttCA	62_1	4790
62	ttactctcttgtttcttca	1-14-4	TtactctcttgtttcTTCA	62_2	4790
63	gttactctcttgtttcttc	2-15-2	GTtactctcttgtttctTC	63_1	4791
64	cgtgggtggagaagca	1-13-2	CgtgggtggagaagCA	64_1	5717
65	acgtgggtggagaagc	2-12-2	ACgtgggtggagaaGC	65_1	5718
66	cagaaactgtaagggca	1-13-3	CagaaactgtaaggGCA	66_1	5815
67	agggatagcagggaagg	2-13-2	AGggatagcagggaaGG	67_1	7246

[0468]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
68	gcttaaacacagacaga	2-11-4	GCttaaacacagaCAGA	68_1	7501
69	tgcttaaacacagacag	3-11-3	TGCttaaacacagaCAG	69_1	7502
70	cagggcagggaagaacag	1-14-3	CagggcagggaagaaCAG	70_1	7845
71	catggaaggacagtgg	3-10-3	CATggaaggacagTGG	71_1	8296
71	catggaaggacagtgg	1-12-3	CatggaaggacagTGG	71_2	8296
72	ccccctcaatataagaa	3-12-2	CCCcctcaatataagAA	72_1	8705
73	aaccaaccctattcctgg	2-14-2	AAccaaccctattcctGG	73_1	9375
73	aaccaaccctattcctgg	1-15-2	AaccaaccctattcctGG	73_2	9375
74	accaaccctattcctg	1-12-3	AccaaccctattcCTG	74_1	9376
75	aaccaaccctattcctg	3-12-2	AACcaaccctattccTG	75_1	9376
76	aaaaccaaccctattcct	3-12-3	AAAaccaaccctattCCT	76_1	9377
77	aaaccaaccctattcc	4-10-2	AAACcaaccctattCC	77_1	9378
78	ggtagtaagggcacacc	1-14-2	GgtagtaagggcacaCC	78_1	9660
79	gacaggtagtaagggcacac	1-17-2	GacaggtagtaagggcacAC	79_1	9661
80	gtagtaagggcacac	3-9-3	GTAgtaagggcaCAC	80_1	9661
81	gacaggtagtaagggcaca	1-16-2	GacaggtagtaagggcaCA	81_1	9662
82	acaggtagtaagggcaca	2-14-2	ACaggtagtaagggcaCA	82_1	9662
83	gacaggtagtaagggca	2-13-2	GAcaggtagtaagggCA	83_1	9664
84	cgggacaggtagtaaggg	1-15-2	CgggacaggtagtaagGG	84_1	9666
85	catccaacaagtaattgt	3-12-3	CATccaacaagtaatTGT	85_1	9722
85	catccaacaagtaattgt	2-13-3	CAtccaacaagtaatTGT	85_2	9722
86	ggcatccaacaagtaattgt	1-16-3	GgcatccaacaagtaatTGT	86_1	9722
87	ggcatccaacaagtaattg	3-14-2	GGCatccaacaagtaatTG	87_1	9723
87	ggcatccaacaagtaattg	1-15-3	GgcatccaacaagtaaTTG	87_2	9723

[0469]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
88	ggcatccaacaagtaat	4-11-2	GGCAtccaacaagtaAT	88_1	9725
88	ggcatccaacaagtaat	3-12-2	GGCatccaacaagtaAT	88_2	9725
89	cgtgaaggagagaacct	2-12-3	CGtgaaggagagaaCCT	89_1	10036
90	acgtgaaggagagaacc	3-12-2	ACGtgaaggagagaaCC	90_1	10037
90	gacgtgaaggagagaacc	2-13-3	GAegtgaaggagagaACC	90_2	10037
91	gacgtgaaggagagaacc	2-14-2	GAegtgaaggagagaaCC	91_1	10037
91	acgtgaaggagagaacc	4-11-2	ACGTgaaggagagaaCC	91_2	10037
92	gacgtgaaggagagaac	2-11-4	GAcgtgaaggagaGAAC	92_1	10038
93	cagtcttgctatgcct	2-12-2	CAgtcttgctatgcCT	93_1	10563
94	ctagaatcaaagctcca	2-12-3	CTagaatcaaagctCCA	94_1	10591
95	acatcgcacttgggc	1-12-2	AcategcacttggGC	95_1	10705
96	cacggcaaacctcacc	1-12-3	CaeggcaaacctcACC	96_1	10851
97	aaccacggcaaacctcac	3-13-2	AACcaeggcaaacctcAC	97_1	10852
98	caaagcaccgagtcacc	1-13-3	CaaagcacegagtcACC	98_1	10873
99	tcaaagcaccgagtcac	1-13-3	TcaaagcacegagtCAC	99_1	10874
100	ctggttgggttagaag	2-10-4	CTggttgggttaGAAG	100_1	10923
100	ctggttgggttagaag	2-12-2	CTggttgggttagaAG	100_2	10923
101	tataacttttagtttagc	2-12-4	TAtaacttttagttTAGC	101_1	11501
102	ttcctttctataacttt	4-12-2	TTCCtttctataacttTT	102_1	11509
103	gttcctttctataacttt	4-13-2	GTTCctttctataacttTT	103_1	11509
104	gttcctttctataactt	4-12-2	GTTCctttctataactTT	104_1	11510
105	atgttcctttctataacttt	2-15-3	ATgttcctttctataacTTT	105_1	11510
106	atgttcctttctataactt	2-14-3	ATgttcctttctataaCTT	106_1	11511
107	atgttcctttctataact	2-14-2	ATgttcctttctataaCT	107_1	11512

[0470]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
108	gctttaatctgccttc	1-11-4	GctttaatctgcCTTC	108_1	12697
109	ccgtggctttaatctgc	1-14-2	CegtggctttaatctGC	109_1	12701
110	ccgtggctttaatctg	2-12-2	CCgtggctttaatcTG	110_1	12702
110	ccgtggctttaatctg	3-11-2	CCGtggctttaatcTG	110_2	12702
111	caaaaaacagtaggtcc	2-11-4	CAaaaaacagtagGTCC	111_1	13234
111	caaaaaacagtaggtcc	3-11-3	CAAaaaacagtaggTCC	111_2	13234
112	gaataaaacagtaggtcc	2-12-4	GAataaaacagtagGTCC	112_1	13550
113	ggaataaaacagtaggtcc	4-13-2	GGAAtaaaacagtaggtCC	113_1	13550
113	ggaataaaacagtaggtcc	2-15-2	GGaataaaacagtaggtCC	113_2	13550
113	ggaataaaacagtaggtcc	1-14-4	GgaataaaacagtagGTCC	113_3	13550
114	ggaataaaacagtaggt	3-11-3	GGAataaaacagtaGGT	114_1	13552
114	ggaataaaacagtaggt	2-11-4	GGaataaaacagtAGGT	114_2	13552
115	ggaataaaacagtagg	2-10-4	GGaataaaacagTAGG	115_1	13553
116	cacagagtgtcatggg	1-13-2	CacagagtgtcatgGG	116_1	14032
117	acagcatggaaaggcacg	1-13-4	AcagcatggaaaggCACG	117_1	14523
118	cagcatggaaaggcacg	1-12-4	CagcatggaaaggCACG	118_1	14523
119	tacaggaggaagagaagggac	1-18-2	TacaggaggaagagaagggAC	119_1	14725
120	acaggaggaagagaaggg	1-13-4	AcaggaggaagagaAGGG	120_1	14727
121	tctacaggaggaagagaa	4-12-2	TCTAcaggaggaagagAA	121_1	14730
121	tctacaggaggaagagaa	1-13-4	TctacaggaggaagAGAA	121_2	14730
122	tctacaggaggaagaga	4-11-2	TCTAcaggaggaagaGA	122_1	14731
122	tctacaggaggaagaga	2-12-3	TCtacaggaggaagAGA	122_2	14731
122	tctacaggaggaagaga	2-11-4	TCtacaggaggaaGAGA	122_3	14731
123	cttcgtcaaagatcacg	2-11-4	CTtcgtcaaagatCACG	123_1	14785

[0471]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
124	gcttcgtcaaagatcacg	2-13-3	GCttegtcaaagatcACG	124_1	14785
125	gcttcgtcaaagatcac	3-11-3	GCTtegtcaaagatCAC	125_1	14786
125	gcttcgtcaaagatcac	2-13-2	GCttegtcaaagatcAC	125_2	14786
126	ccagaaaggtttgcg	3-10-2	CCAgaaaggtttgCG	126_1	14874
127	tccagaaaggtttgcg	3-11-2	TCCagaaaggtttgCG	127_1	14874
127	tccagaaaggtttgcg	1-12-3	TccagaaaggtttGCG	127_2	14874
128	cagaggcatcggatcag	2-13-2	CAgaggcateggatcAG	128_1	14974
129	cagaggcatcggatca	3-11-2	CAGaggcateggatCA	129_1	14975
130	agcagaggcatcggatc	2-13-2	AGcagaggcateggaTC	130_1	14976
131	attcttcacacatcttc	2-11-4	ATtcttcacacatCTTC	131_1	16133
132	ctatgaacgcacctg	3-9-3	CTAtgaaegcacCTG	132_1	16282
133	ggctatgaacgcacctg	1-14-2	GgctatgaaegcaccTG	133_1	16282
134	gctgggagaagacatag	1-12-4	GctgggagaagacATAG	134_1	16593
135	caaaatgcccttacagtga	4-13-2	CAAAatgcccttacagtGA	135_1	16919
136	caaaatgcccttacagt	2-12-3	CAaaatgcccttacAGT	136_1	16921
137	tgtgcgattttaaaggaaaat	3-15-3	TGTgegattttaaaggaaAAT	137_1	17525
138	catgtgcgattttaaaggaaa	3-15-3	CATgtgegattttaaaggAAA	138_1	17527
139	tgtgcgattttaaaggaa	4-12-2	TGTGegattttaaaggAA	139_1	17528
140	catgtgcgattttaaagga	1-15-3	CatgtgegattttaaaGGA	140_1	17529
141	atgtgcgattttaaagga	3-13-2	ATGtgegattttaaagGA	141_1	17529
142	accctgtcacttaaatatatg	1-18-2	AccctgtcacttaaatataTG	142_1	17712
143	gagggaggtggagcgtt	1-14-2	GagggaggtggagegTT	143_1	17924
144	ctgaagagtggagaagg	2-11-4	CTgaagagtggagAAGG	144_1	18130
144	ctgaagagtggagaagg	1-13-3	CtgaagagtggagaAGG	144_2	18130

[0472]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
145	caataaataaagtgtgagga	3-14-3	CAAtaaataaagtgtgaGGA	145_1	18454
146	caacccagtaaccatgac	3-13-2	CAAcccagtaaccatgAC	146_1	19424
147	caacccagtaaccatga	3-12-2	CAAcccagtaaccatGA	147_1	19425
148	accaacccagtaaccatga	1-16-2	AccaacccagtaaccatGA	148_1	19425
149	gagcaggtgttttatc	3-11-2	GAGcaggtgttttaTC	149_1	19825
150	ggtcgaggaggtgtcac	1-14-2	GgtcgaggaggtgtcAC	150_1	20437
150	ggtcgaggaggtgtcac	2-13-2	GGtcgaggaggtgtcAC	150_2	20437
151	gtcgaggaggtgtcac	1-11-4	GtcgaggaggtgTCAC	151_1	20437
152	ggtcgaggaggtgtca	1-13-2	GgtcgaggaggtgtCA	152_1	20438
152	ggtcgaggaggtgtca	1-12-3	GgtcgaggaggtgTCA	152_2	20438
153	ggtcgaggaggtgtc	2-11-2	GGtcgaggaggtgTC	153_1	20439
154	ccaggtctcaaaaaggg	1-13-3	CcaggtctcaaaaaGGG	154_1	20653
155	attacgctgaggaca	1-10-4	AttaegctgagGACA	155_1	21489
156	cattacgctgaggac	4-9-2	CATTaegctgaggAC	156_1	21490
157	cttgagcattacgc	3-8-3	CTTgagcattaCGC	157_1	21497
158	cgaggagaagaaggcag	3-12-2	CGAggagaagaaggcAG	158_1	22019
158	cgaggagaagaaggcag	2-11-4	CGaggagaagaagGCAG	158_2	22019
159	ccttggtctgaaacgtgat	1-15-3	CcttggtctgaaaegtGAT	159_1	22071
160	ctaacgcctccacgc	1-12-2	CtaaegcctccacGC	160_1	22281
161	ggacaggctctacgg	1-11-3	GgacaggctctaCGG	161_1	22312
162	actaatacagcaggagaagg	2-16-2	ACtaatacagcaggagaaGG	162_1	22964
163	aactaatacagcaggagaagg	1-16-4	AactaatacagcaggagAAGG	163_1	22964
163	aactaatacagcaggagaagg	1-17-3	AactaatacagcaggagaAGG	163_2	22964
164	taactaatacagcaggagaag	1-16-4	TaactaatacagcaggaGAAG	164_1	22965

[0473]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
165	ttgaagagccaaccac	1-11-4	TtgaagagccaaCCAC	165_1	24131
166	ccattttcactgtcaag	3-12-2	CCAttttcactgtcaAG	166_1	25605
167	gccattttcactgtcaa	2-12-3	GCcattttcactgtCAA	167_1	25606
168	agaaatgcggagaagc	2-10-4	AGaaatgeggagAAGC	168_1	25796
169	aaatggaaaaaatgaccagc	2-14-4	AAatggaaaaaatgacCAGC	169_1	26188
170	aggacttacgacaaaaccac	1-15-4	AggacttaegacaaaaCCAC	170_1	26505
171	ggacttacgacaaaacca	2-13-3	GGacttaegacaaaaCCA	171_1	26506
172	gacttacgacaaaacca	3-11-3	GACttaegacaaaaCCA	172_1	26506
173	acaccaggacttacgaca	1-14-3	AcaccaggacttaegACA	173_1	26512
174	tagaaattcaacatggc	1-12-4	TagaaattcaacaTGGC	174_1	27376
174	tagaaattcaacatggc	4-11-2	TAGAaattcaacatgGC	174_2	27376
174	tagaaattcaacatggc	2-12-3	TAgaaattcaacatGGC	174_3	27376
175	ctagaaattcaacatggc	2-13-3	CTagaaattcaacatGGC	175_1	27376
176	gtcatcggttcacc	1-9-4	GtcateggttCACC	176_1	27602
177	actcgaagacgcca	2-8-4	ACtegaagacGCCA	177_1	28539
178	gactcgaagacgcc	3-9-2	GACtegaagaegCC	178_1	28540
179	ggcacaagcagaacgac	2-13-2	GGcacaagcagaaegAC	179_1	29235
180	agtcagaacaaaggaggc	1-15-2	AgtcagaacaaaggagGC	180_1	29668
181	gaagtcagaacaaaggag	4-12-2	GAAGtcagaacaaaggAG	181_1	29670
182	gcagaagtcagaacaaagg	1-14-4	GcagaagtcagaacaAAGG	182_1	29672
183	gtgcagaagtcagaacaaa	3-13-3	GTGcagaagtcagaacAAA	183_1	29674
183	gtgcagaagtcagaacaaa	3-14-2	GTGcagaagtcagaacaAA	183_2	29674
184	gtgcagaagtcagaacaa	3-13-2	GTGcagaagtcagaacAA	184_1	29675
185	aaggatgagggagcggac	1-14-3	AaggatgagggagegGAC	185_1	29894

[0474]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
186	gtaaggatgagggagc	2-12-2	GTaaggatgagggaGC	186_1	29898
187	tggtaaggatgagggag	1-12-4	TggtaaggatgagGGAG	187_1	29899
188	cgtacatctgcatctc	2-10-4	CGtacatctgcaTCTC	188_1	29951
189	tgtaagataagaggcaacact	1-18-2	TgtaagataagaggcaacaCT	189_1	30947
190	ttgtaagataagaggcaacac	1-17-3	TtgtaagataagaggcaaCAC	190_1	30948
191	ttgtaagataagaggcaaca	2-14-4	TTgtaagataagaggcAACA	191_1	30949
192	tttgtaagataagaggcaaca	2-17-2	TTtgtaagataagaggcaaCA	192_1	30949
193	tgtaagataagaggcaa	2-11-4	TGtaagataagagGCAA	193_1	30951
194	ctggaaggaaagttggt	2-12-3	CTggaaggaaagttGGT	194_1	31229
195	atagtaagcactgatggtc	3-14-2	ATAgtaagcactgatggTC	195_1	31245
195	atagtaagcactgatggtc	1-14-4	AtagtaagcactgatGGTC	195_2	31245
196	tagtaagcactgatgg	2-11-3	TAgtaagcactgaTGG	196_1	31247
197	catagtaagcactgatg	3-12-2	CATagtaagcactgaTG	197_1	31248
197	catagtaagcactgatg	2-11-4	CAtagtaagcactGATG	197_2	31248
198	ctgtaactcacctggc	1-13-2	CtgtaactcacctgGC	198_1	31835
198	ctgtaactcacctggc	2-12-2	CTgtaactcacctgGC	198_2	31835
199	cggatcactcgcccg	1-12-2	CggatcactegccCG	199_1	32000
200	acacaggctactctcgg	1-14-2	AcacaggctactcteGG	200_1	33017
201	acacaggctactctcg	3-10-3	ACAcaggctactcTCG	201_1	33018
202	ccacacacaggctactc	1-14-2	CcacacacaggctacTC	202_1	33021
203	atactccacacacaggct	1-15-2	AtactccacacacaggCT	203_1	33025
204	atactccacacacaggc	1-14-2	AtactccacacacagGC	204_1	33026
205	gctcatactccacacacag	1-16-2	GctcatactccacacacAG	205_1	33028
206	tcatactccacacacag	2-11-4	TCatactccacacACAG	206_1	33028

[0475]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
206	tcatactccacacacag	2-13-2	TCatactccacacacAG	206_2	33028
207	gctcatactccacacaca	1-14-3	GctcatactccacacACA	207_1	33029
207	gctcatactccacacaca	1-15-2	GctcatactccacacaCA	207_2	33029
208	tgctcatactccacacac	1-14-3	TgctcatactccacaCAC	208_1	33030
208	tgctcatactccacacac	1-15-2	TgctcatactccacacAC	208_2	33030
208	tgctcatactccacacac	2-14-2	TGctcatactccacacAC	208_3	33030
209	agcaggaagcagggagaaa	2-15-2	AGcaggaagcagggagaAA	209_1	33562
210	tccgaccacagcgag	2-11-2	TCegaccacagegAG	210_1	33681
211	cagaagccaagggacatg	1-14-3	CagaagccaagggacATG	211_1	34432
211	cagaagccaagggacatg	2-14-2	CAgaagccaagggacaTG	211_2	34432
212	cagaagccaagggacat	2-12-3	CAgaagccaagggaCAT	212_1	34433
213	ccagaccaacacggaaacg	1-14-4	CcagaccaacaeggaAACG	213_1	34571
214	ccagaccaacacggaaac	2-12-4	CCagaccaacaeggAAAC	214_1	34572
215	gaatgggcaaagggtaga	4-12-2	GAATgggcaaagggtaGA	215_1	34742
215	aatgggcaaagggtaga	2-12-3	AAtgggcaaagggtAGA	215_2	34742
216	gaatgggcaaagggtaga	2-14-2	GAatgggcaaagggtaGA	216_1	34742
217	gaatgggcaaagggtag	2-12-3	GAatgggcaaagggTAG	217_1	34743
218	gaacccttgtagtcctg	1-14-2	GaacccttgtagtccTG	218_1	35101
219	aacccttgtagtcct	4-9-2	AACCcttgtagtcCT	219_1	35102
220	ggaacccttgtagtc	2-11-2	GGaacccttgtagTC	220_1	35104
221	atcggaacccttgtagtc	2-14-2	ATeggaacccttgtagTC	221_1	35104
221	atcggaacccttgtagtc	1-15-2	AteggaacccttgtagTC	221_2	35104
222	catcggaacccttgtagtc	1-16-2	CateggaacccttgtagTC	222_1	35104
223	catcggaacccttgtagt	2-14-2	CAtcggaacccttgtaGT	223_1	35105

[0476]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
224	gatacagacctcctcaaact	1-17-2	GatacagacctcctcaaaCT	224_1	35370
225	gatacagacctcctcaaac	2-14-3	GAtacagacctcctcaAAC	225_1	35371
226	gatacagacctcctcaaa	2-13-3	GAtacagacctcctcAAA	226_1	35372
226	gatacagacctcctcaaa	2-12-4	GAtacagacctcctCAAA	226_2	35372
226	gatacagacctcctcaaa	1-13-4	GatacagacctcctCAAA	226_3	35372
227	gatacagacctcctcaa	2-11-4	GAtacagacctccTCAA	227_1	35373
227	gatacagacctcctcaa	1-13-3	GatacagacctcctCAA	227_2	35373
228	gccccatttaccagtg	1-13-2	GccccatttaccagTG	228_1	35470
229	cccaacaagtgatgct	2-12-2	CCcaacaagtgatgCT	229_1	35965
230	cccaacaagtgatgc	2-11-2	CCcaacaagtgatGC	230_1	35966
231	gtaccaagcccagaagg	1-14-2	GtaccaagcccagaaGG	231_1	36279
232	gtaccaagcccagaag	1-11-4	GtaccaagcccaGAAG	232_1	36280
233	ttcctgatgaagagatg	4-11-2	TTCCtgatgaagagaTG	233_1	36549
234	tcctgatgaagagatg	2-10-4	TCctgatgaagaGATG	234_1	36549
234	tcctgatgaagagatg	3-11-2	TCCtgatgaagagaTG	234_2	36549
235	tgggagtagcatggc	2-11-2	TGggagtagcatgGC	235_1	36911
235	tgtgggagtagcatggc	1-14-2	TgtgggagtagcatgGC	235_2	36911
236	gtgggagtagcatggc	1-13-2	GtgggagtagcatgGC	236_1	36911
237	tgggagtagcatggc	1-11-3	TgggagtagcatGGC	237_1	36911
238	aaacatgctgaaccctg	2-11-4	AAacatgctgaacCCTG	238_1	37254
239	acaaacatgctgaaccct	2-13-3	ACaaacatgctgaacCCT	239_1	37255
239	acaaacatgctgaaccct	1-14-3	AcaaacatgctgaacCCT	239_2	37255
239	acaaacatgctgaaccct	3-13-2	ACAaacatgctgaaccCT	239_3	37255
240	cacaaacatgctgaaccc	2-14-2	CAcaaacatgctgaacCC	240_1	37256

[0477]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 1 上的开始位置
241	cacaaacatgctgaacc	2-12-3	CAcaaacatgctgaACC	241_1	37257
242	tggacgcacaaacatgc	1-12-4	TggaegcacaaacATGC	242_1	37263
243	aattttacatactctggt	243_1	AATTttacatactctgGT	4-12-2	11757
244	aattttacatactctggtc	244_1	AAttttacatactctGGTC	2-13-4	11756
245	ttacatactctggtcaaa	245_1	TTacatactctggtCAAA	2-12-4	11753
246	ctttattataacttgaatctc	246_1	CTttattataactTgaAtCTC	2-11-1-2-1-1-3	8681
246	ctttattataacttgaatctc	246_2	CTttattataacttgaaTCTC	2-17-4	8681

[0478] 基序序列代表寡核苷酸中存在的核碱基的连续序列。

[0479] 设计参考缺口聚体设计F-G-F',其中每一个数字代表连续修饰的核苷,例如2'修饰的核苷的数目(第一个数字=5'侧翼),然后是DNA核苷的数目(第二个数字=缺口区域),然后是修饰的核苷例如2'修饰的核苷的数目(第三个数字=3'侧翼),可选地在DNA和LNA的其他重复区域之前或之后,这些区域不一定是与靶核酸互补的连续序列的一部分。

[0480] 寡核苷酸化合物代表基序序列的具体设计。大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,而且5-甲基DNA胞嘧啶以"e"表示,并且所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

[0481] 在所有情况下,F-G-F'设计可进一步包括区域D'和/或D",如"定义"章节中"寡核苷酸中的区域D'或D"下所述"。在本发明的一些实施例中,寡核苷酸在间隔聚体区域的5'或3'端具有1个、2个或3个磷酸二酯连接的核苷单元,例如DNA单元。在一些实施例中,寡核苷酸由两个5'磷酸二酯连接的DNA核苷和随后的如"定义"章节中所定义的F-G-F'间隔聚体区域组成。在5'或3'端含有磷酸二酯连接的DNA单元的寡核苷酸适用于缀合,并且可以进一步包含本文所述的缀合物部分。对于递送至肝脏,ASGPR靶向部分作为缀合物部分是特别优选的。

[0482] 对于本发明的一些实施例,寡核苷酸选自具有CMP-ID-NO:27_1;28_1;29_1;30_1;31_1;32_1;33_1;34_1;35_1;36_1;37_1;38_1;39_1;40_1;41_1;42_1;43_1;44_1;45_1;46_1;47_1;47_2;47_3;48_1;48_2;49_1;50_1;51_1;52_1;53_1;54_1;135_1;114_1;88_1;208_1;237_1;243_1;244_1;245_1、246_1和246_2的寡核苷酸化合物的组(参见表9A和9B)。

[0483] 在本发明的一个优选实施例中,寡核苷酸选自寡核苷酸化合物243_1;242_1;245_1、246_1和246_2的组(参见表9A和9B)。

[0484] 在本发明的一个优选实施例中,寡核苷酸是化合物ID 243_1(参见表9A和9B)。

[0485] 在本发明的一个优选实施例中,寡核苷酸是化合物ID 244_1(参见表9A和9B)。

[0486] 在本发明的一个优选实施例中,寡核苷酸是化合物ID 245_1(参见表9A和9B)。

[0487] 在本发明的一个优选实施例中,寡核苷酸是化合物ID 246_1(参见表9A和9B)。

[0488] 在本发明的一个优选实施例中,寡核苷酸是化合物ID 246_2(参见表9A和9B)。

[0489] 在本发明的一些实施例中,反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸,诸如15个至20个核苷酸的连续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:13的靶核酸至少90%互补,诸如完全互补。

[0490] 在一些实施例中,反义寡核苷酸包含长度为15个至18个核苷酸,诸如17个或18个核苷酸的连续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:16的靶核酸至少90%互补,诸如完全互补。

[0491] 在一些实施例中,反义寡核苷酸包含长度为15个至19个核苷酸,诸如18个或19个核苷酸的连续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:15的靶核酸至少90%互补,诸如完全互补。

[0492] 在一些实施例中,反义寡核苷酸包含长度为15个至18个核苷酸,诸如17个或18个核苷酸的连续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:14的靶核酸至少90%互补,诸如完全互补。

[0493] 在本发明的一些实施例中,本发明的组合的反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸,诸如17个至22个核苷酸的连续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:5的靶核酸至少90%互补,诸如完全互补。

[0494] 在一些实施例中,反义寡核苷酸包含15个至22个核苷酸的连续核苷酸序列,诸如15个至18个核苷酸,诸如17个或18个核苷酸,其与靶核酸具有至少90%的互补性,诸如完全互补,该靶核酸选自SEQ ID NO:1的以下区域:SEQ ID NO:1的8681-8701、SEQ ID NO:1的11753-11774,诸如与来自SEQ ID NO:1的核苷酸8681-8701、11757-11774、11756-11774或11753-11770的区域互补。

[0495] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含选自由SEQ ID NO 243、244、245和246组成的组的核碱基的序列或其至少14个连续核苷酸。

[0496] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列在其长度上包含10个至30个核苷酸或由其组成,诸如在长度上包含从12个至25个,诸如11个至22个,诸如从12个至20个,诸如从14个至18个或14个至16个连续核苷酸或由其组成。

[0497] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列包含22个或更少的核苷酸(诸如20个或更少的核苷酸,诸如18个或更少的核苷酸,诸如14、15、16或17个核苷酸)或由其组成。应当理解的是,本文中给出的任何范围均包括范围的端点。据此,若本文中描述一寡核苷酸包括自10个至30个核苷酸,则10个及30个核苷酸均包含在内。

[0498] 在一些实施例中,连续核苷酸序列在长度上包含10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个或22个连续核苷酸或由其组成。

[0499] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列包含选自SEQ ID NO:243、244、245和246的序列或由其组成。

[0500] 反义寡核苷酸诸如长度为12个至24个核苷酸、诸如长度为12个至18个核苷酸的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸包含连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列包含存在于SEQ ID NO:13中的至少12个、诸如至少13个、诸如至少14个、诸如至少15个或至少16个连续核苷酸。

[0501] 可用于本发明的反义寡核苷酸诸如长度为12个至24个核苷酸、诸如长度为12个至18个核苷酸的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸包含连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列包含存在于SEQ ID NO:16中的至少12个、诸如至少13个、诸如至少14个、诸如至少15个或至少16个连续核苷酸。

[0502] 可用于本发明的反义寡核苷酸诸如长度为12个至24个核苷酸、诸如长度为12个至18个核苷酸的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸包含连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列包含存在于SEQ ID NO:15中的至少12个、诸如至少13个、诸如至少14个、诸如至少15个或至少16个连续核苷酸。

[0503] 可用于本发明的反义寡核苷酸诸如长度为12个至24个核苷酸、诸如长度为12个至18个核苷酸的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸包含连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列包含存在于SEQ ID NO:14中的至少12个、诸如至少13个、诸如至少14个、诸如至少15个或至少16个连续核苷酸。

[0504] 可用于本发明的反义寡核苷酸诸如长度为12个至24个核苷酸、诸如长度为12个至18个核苷酸的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸包含连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列包含存在于SEQ ID NO:5中的至少12个、诸如至少13个、诸如至少14个、诸如至少15个或至少16个连续核苷酸。

[0505] 在优选地的实施例中,本发明的反义寡核苷酸包含一个或多个糖修饰的核苷,诸如一个或多个2'糖修饰的核苷,诸如一个或多个2'糖修饰的核苷独立地选自2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、阿糖核酸(ANA)、2'-氟-ANA和LNA核苷。如果一个或多个修饰的核苷是锁定的核酸(LNA),则是优选的。

[0506] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含LNA核苷。

[0507] 在寡核苷酸的一些实施例中,所有LNA核苷是β-D-氧基LNA核苷。

[0508] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含LNA核苷和DNA核苷。

[0509] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含2'-O-甲氧基乙基(2'MOE)核苷。

[0510] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含2'-O-甲氧基乙基(2'MOE)核苷和DNA核苷。

[0511] 有利地,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列的3'最末端核苷为2'糖修饰的核苷。

[0512] 优选地,反义寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键,例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯。

[0513] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。

[0514] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的至少一个核苷间键是二硫代磷酸酯核苷间键。

[0515] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的至少一个核苷间键是磷酸二酯核苷间键。

[0516] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的所有核苷间键都是硫代磷酸酯核苷间键。

[0517] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的至少75%核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。

[0518] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的所有核苷间键都是硫代磷酸酯核苷间键。

[0519] 在本发明的一个有利实施例中,反义寡核苷酸能够募集RNA酶H,诸如RNA酶H1。在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列是一个间隔聚体。

[0520] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列,包含式5'-F-G-F'-3'的间隔聚体或由其组成。

[0521] 在一些实施例中,区域G由6个至16个DNA核苷组成,诸如11个至16个DNA核苷。在一些实施例中,区域F包含2个至4个DNA核苷和/或区域F'包含2个至6个DNA核苷。

[0522] 在一些实施例中,区域F和F'各自包含至少一个LNA核苷。

[0523] 在一些实施例中,本发明的寡核苷酸是具有均匀侧翼的LNA间隔聚体。例如,具有均匀侧翼的LNA间隔聚体可具有选自以下设计的设计:1-12-3、4-12-2、2-17-4、2-13-4和2-12-4。表9B列出了每个基序序列的优选的设计。

[0524] 在本发明的一些实施例中,LNA间隔聚体是交替侧翼LNA间隔聚体。在一些实施例中,交替侧翼LNA间隔聚体包含至少一个交替侧翼(诸如侧翼F')。在一些实施例中,交替侧翼LNA间隔聚体包含一个交替侧翼(诸如侧翼F')和一个均匀侧翼(诸如侧翼F)。例如,具有一个交替F'侧翼的LNA间隔聚体可能具有以下设计:2-11-1-2-1-1-3。

[0525] 本发明提供以下寡核苷酸化合物(表9B和10):

[0526] 表9B:用于在本发明中使用的适当寡核苷酸基序序列(由SEQ ID NO表示),其设计以及基于基序序列设计的用于在本发明中使用的特异性寡核苷酸化合物(由CMP ID NO表示)的列表。

[0527]

SEQ ID NO	基序序列	SEQ ID NO: 1上的位置		设计	CMP ID NO	寡核苷酸化合物
		开始	结束			
243	AATTTTACATACTCTGGT	11757	11774	4-12-2	243_1	AATTttacatactctgGT
244	AATTTTACATACTCTGGTC	11756	11774	2-13-4	244_1	AAttttacatactctGGTC
245	TTACATACTCTGGTCAAA	11753	11770	2-12-4	245_1	TTacatactctggtCAAA
246	CTTTATTATAACTTGAATCTC	8681	8701	2-11-1-2-1-1-3	246_1	CTttattataactTgaAtCTC
246	CTTTATTATAACTTGAATCTC	8681	8701	2-17-4	246_2	CTttattataacttgaaTCTC

[0528] 表10.化合物表(用于在本发明中使用的示例性反义寡核苷酸)-HELM注释格式

[0529]

SEQ ID 号	化合物 ID 号 #	HELM 注释 书面语 5'－3'	由图中所示的缀合物组成。
243	243_1	[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)	1
244	244_1	[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])	2
245	245_1	[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)	4
246	246_1	[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])	3
246	246_2	[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])	

[0530] Helm注释索引:

[0531] [LR](G)是β-D-氧基-LNA鸟嘌呤核苷,

[0532] [LR](T)是β-D-氧基-LNA胸腺嘧啶核苷,

[0533] [LR](A)是β-D-氧基-LNA腺嘌呤核苷,

[0534] [LR]([5meC])是β-D-氧基-LNA 5-甲基胞嘧啶核苷,

[0535] [dR](G)是DNA鸟嘌呤核苷,

[0536] [dR](T)是DNA胸腺嘧啶核苷,

[0537] [dR](A)是DNA腺嘌呤核苷,

[0538] [dR](C)是DNA胞嘧啶核苷,

[0539] [sP]是硫代磷酸酯核苷间键,

[0540] P是磷酸二酯核苷间键。

[0541] 表9A和9B中的标题“寡核苷酸化合物”代表基序序列的特定设计。大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,所有核苷间键均为硫代

磷酸酯核苷间键。标题“设计”指的是间隔聚体设计,F-G-F’。在经典的间隔聚体设计中,即具有均匀侧翼的间隔聚体(例如4-12-2),侧翼中的所有核苷酸(F和F’)均由相同类型的2’-糖修饰核苷构成,例如LNA、cET或MOE,以及中间形成缺口(G)的一段DNA。在具有交替侧翼设计的间隔聚体中,寡核苷酸的侧翼被注释为一系列整数,代表多个β-D-氧基LNA核苷(L)后跟多个DNA核苷(D)。例如,具有1-2-1-1-3基序的侧翼F’代表LDDLDLLL(参见CMP ID NO 325_1)。两个侧翼在5’和3’端均具有β-D-氧基LNA的核苷。由许多DNA核苷构成的缺口区域(G)位于侧翼之间。

[0542] 对于本发明的一些实施例,寡核苷酸选自由CMP-ID-NO:243_1、244_1、245_1、246_1和246_2组成的寡核苷酸化合物的组(参见表9B)。

[0543] 在所有情况下,F-G-F’设计可进一步包括区域D’和/或D”,如“定义”章节中“寡核苷酸中的区域D’或D”下所述”。在本发明的一些实施例中,寡核苷酸在间隔聚体区域的5’或3’端,诸如在5’端具有1个、2个或3个磷酸二酯连接的核苷单元,诸如DNA单元。在本发明的一些实施例中,寡核苷酸由两个5’磷酸二酯连接的DNA核苷和随后的如上所定义的F-G-F’间隔聚体区域组成。在5’或3’端含有磷酸二酯连接的DNA单元的寡核苷酸适用于缀合,并且可以进一步包含本文所述的缀合物部分。对于递送至肝脏,ASGPR靶向部分作为缀合物部分是特别优选的,参见缀合物部分了解更多详情。

[0544] FUBP1抑制剂

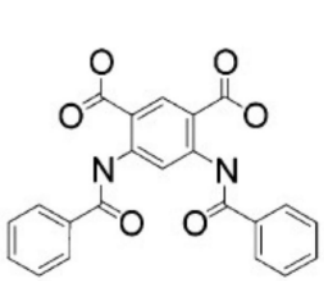
[0545] 在一方面,本发明组合中的第二类化合物是靶向FUBP1的抑制剂。此类抑制剂可以选自由例如小分子、单链反义寡核苷酸;siRNA分子;或shRNA分子组成的组。

[0546] 不受理论束缚,据信FUBP1参与细胞核中cccDNA的稳定化,并且通过防止FUBP1与DNA、特别是cccDNA的结合,cccDNA被去稳定化并且变得易于降解。因此,本发明的一个实施例包含FUBP1抑制剂,该抑制剂与FUBP1蛋白的DNA结合结构域相互作用并且防止或减少其与cccDNA的结合。

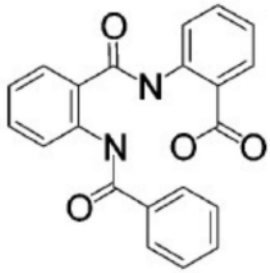
[0547] 抑制FUBP1的小分子

[0548] 抑制FUBP1的小分子已被鉴定与FUBP1在癌症中的作用有关,其中小分子抑制FUBP1的DNA结合活性,特别是与单链DNA上的FUSE元件的结合。在本发明中,设想FUBP1抑制剂可用于治疗HBV。特别是此类小分子化合物例如经由缀合或配制来靶向肝脏可能有益于HBV的治疗。

[0549] Huth等人2004J Med.Chem第47卷第4851-4857页公开了一系列能够与FUBP1的四个串联K同源(KH)重复序列结合的苯甲酰基氨基苯甲酸化合物。Huth等人2004公开的所有化合物均特此通过引用并入。特别地,发现如下所示的式I、II或III的化合物有效抑制FUBP1 DNA结合活性。

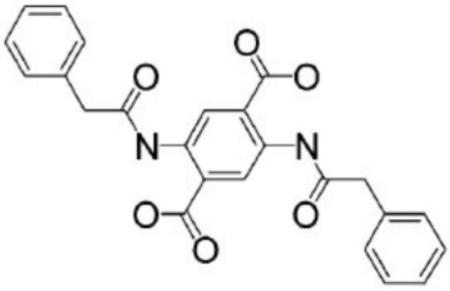


I



II

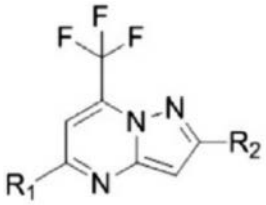
[0550] 和



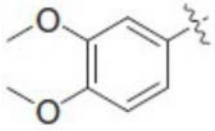
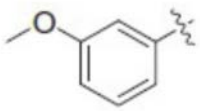
III

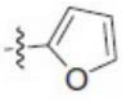
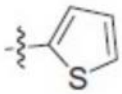
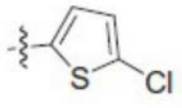
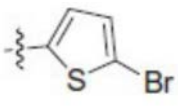
[0551] 本发明的一个实施例包含一种式I、II或III的化合物,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗和/或预防中使用。

[0552] Hauck等人2016Bioorganic&Medicinal Chemistry第24卷第5717-5729页描述了具有高FUBP1抑制潜力的另外一系列化合物(参见表2,特此通过引用并入)。特别地,以下式IV化合物有效抑制FUBP1活性

[0553] 

IV

[0554] 其中R1选自  和  ,

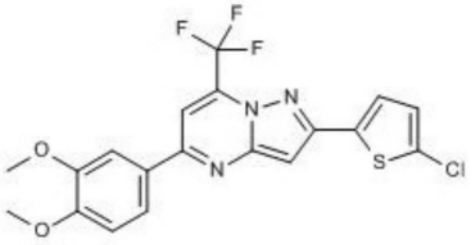
[0555] R2选自  、  、  、  或  。

[0556] 具体地,式V、VI和VII的化合物显示出具有低于15μM的IC50值。

[0557] 

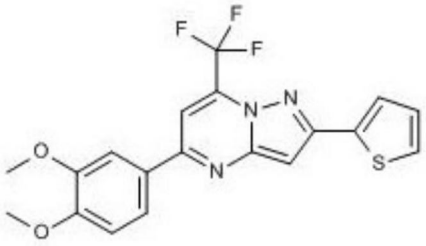
V

[0558] 2-(5-溴噻吩-2-基)-5-(3,4-二甲氧基苯基)-7-(三氟甲基)吡唑并[1,5-a]嘧啶

[0559] 

VI

[0560] 2-(5-氯噻吩-2-基)-5-(3,4-二甲氧基苯基)-7-(三氟甲基)吡唑并[1,5-a]嘧啶

[0561] 

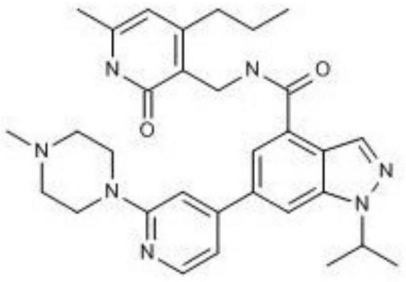
VII

[0562] 5-(3,4-二甲氧基苯基)-2-(噻吩-2-基)-7-(三氟甲基)吡唑并[1,5-a]嘧啶

[0563] 本发明的一个实施例包含一种式IV化合物,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗和/或预防中使用。

[0564] 本发明的一个实施例包含一种式V、VI或VI化合物,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗和/或预防中使用。

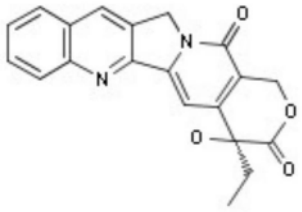
[0565] S-腺苷-L-甲硫氨酸(SAM)竞争性抑制剂GSK343(式VIII)目前正处于骨肉瘤的临床前开发阶段。已显示GSK343抑制骨肉瘤细胞中的FUBP1表达(Xiong等人2016Int J Onc第49卷第623页)。

[0566] 

VIII

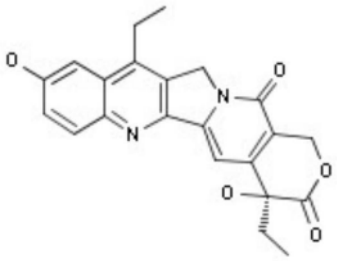
[0567] 本发明的一个实施例包含一种式VII化合物,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗和/或预防中使用。

[0568] FDA批准的癌症药物喜树碱(CPT,式IX)及其衍生物SN-38(7-乙基-10-羟基喜树碱,式X)是拓扑异构酶I(TOP1)抑制剂,最近也显示通过阻止FUBP1/FUSE相互作用来抑制FUBP1活性(Hosseini等人2017Biochemical Pharmacology第146卷第53-62页)。

[0569] 

IX

[0570] 喜树碱((+)-4(S)-乙基-4-羟基-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-3,14-二酮)。

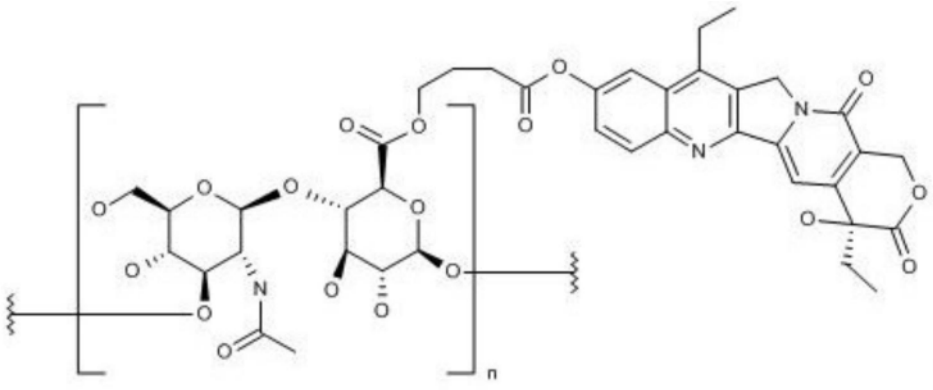
[0571] 

X

[0572] SN-38(4(S),11-二乙基-4,9-二羟基-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-3,14-二酮7-乙基-10-羟基喜树碱)。

[0573] 本发明的一个实施例包含一种式IX或X的化合物,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗和/或预防中使用。

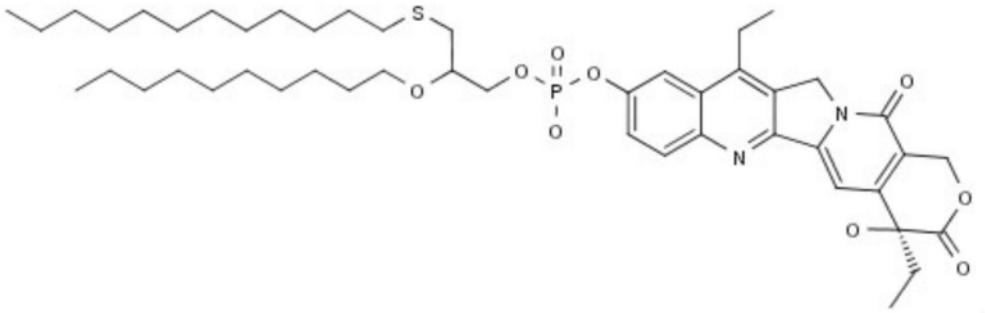
[0574] Tringali等人2012Journal of Pharmacy and Pharmacology第64卷,第360-365页描述了与透明质酸缀合的SN-38(HA-SN-38,式XI)的药代动力学概况,并且显示出向肝脏的分布增加。

[0575] 

XI

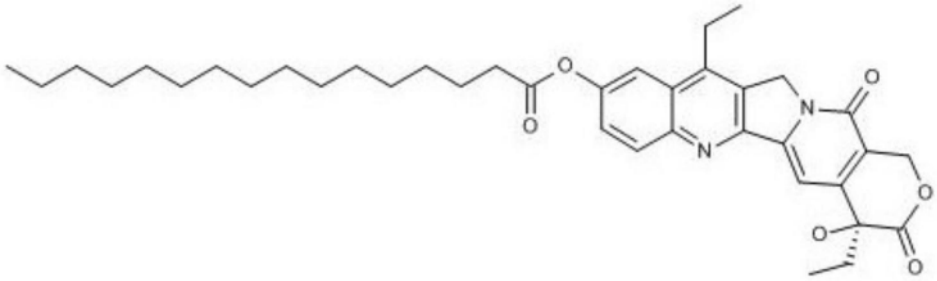
[0576] 本发明的一个实施例包含一种式XI化合物,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗和/或预防中使用。

[0577] SN-38的各种脂质缀合物也存在于文献中。WO2006/082053例如描述了式XII的分子

[0578] 

XII

[0579] CN105777770描述了如下式XIII所示的棕榈酸酯缀合的SN-38。

[0580] 

XIII

[0581] 本发明的一个实施例包含一种式XII或XIII的化合物,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗和/或预防中使用。

[0582] 在本发明的另一方面,例如用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗和/或预防中使用的FUBP1抑制剂可以通过将该其共价连接至能够与脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPr)结合的缀合物部分(诸如二价或三价GalNAc簇)来直接靶向肝脏。

[0583] 靶向FUBP1的siRNA

[0584] 表11:单个FUBP1 siRNA分子靶向的人FUBP1序列

[0585]

SEQ ID NO:	FUBP1 靶序列	SEQ ID NO: 1 上的位置	外显子	个体siRNA	Dharmacon目录号
21	GACAAACCUCUUAGGAUUA	14200-14218	9	FU2	J-011548-06
22	GAGAAGUUCGGAAUGAGUA	14413-14431	10	FU4	J-011548-08
23	GAAAGGAUAGCACAAAUAA	14966-14984	12	FU1	J-011548-05
24	AAUAAGAAGUGGACAAUAC	30344-30362	20	FU3	J-011548-07

[0586] siRNA池(ON-TARGETplus SMART池siRNA目录号L-011548-00-0005,Dharmacon)含有表11中列出的四种单独的siRNA分子并且是可用的。

[0587] 靶向FUBP1的寡核苷酸

[0588] 在本节中,术语“寡核苷酸”应理解为“靶向FUBP1的寡核苷酸”。

[0589] 核酸分子(或寡核苷酸)可能是出色的FUBP1抑制剂,因为它们可以靶向FUBP1转录本并通过RNA干扰途径或通过RNA酶H裂解而促进其降解。可替代地,核酸分子诸如适体也可以充当与上述小分子一致的FUBP1的DNA结合位点的抑制剂。

[0590] 在本发明的一个方面,组合包含用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗和/或预防中使用的核酸分子。此类核酸分子可以选自由以下项组成的组:单链反义寡核苷酸;siRNA分子;或shRNA分子。

[0591] 可用于本发明的核酸分子能够在体外和体内抑制FUBP1的表达。通过将寡核苷酸与编码FUBP1的靶核酸杂交来实现抑制。

[0592] 靶核酸可以是哺乳动物FUBP1序列,诸如选自由SEQ ID NO:247至266组成的组的序列。如果哺乳动物FUBP1序列选自由SEQ ID NO:247、248、249、250、251、252、253和254组成的组,则是有利的。

[0593] 在一些实施例中,可用于本发明的核酸分子能够通过抑制或下调FUBP1的表达来调节其表达。优选地,与靶标的正常表达水平相比,这种调节产生至少40%的表达抑制,更优选地与靶标的正常表达水平相比,至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或98%的抑制。在一些实施例中,在体外使用HepG2-NTCP细胞或HBV感染的原代人肝细胞,可用于本发明的核酸分子能够将FUBP1 mRNA的表达水平抑制至少65%至98%,诸如70%至95%,该靶标减少范围在选择与cccDNA减少具有良好相关性的核酸分子方面是有利的。在一些实施例中,可用于本发明的寡核苷酸可能能够在体外使用HepG2-NTCP细胞或HBV感染的原代人肝细胞将FUBP1蛋白的表达水平抑制至少50%。本文的材料和方法章节以及实例提供了可用于测量HepG2-NTCP细胞或HBV感染的原代人肝细胞以及cccDNA中的靶标RNA抑制的测定。靶标调节由寡核苷酸的连续核苷酸序列(诸如siRNA的前导链或反义寡核苷酸的间隔聚体区域)与靶核酸之间的杂交来进行触发。在一些实施例中,可用于本发明的寡核苷酸包含寡核苷酸或连续核苷酸序列与靶核酸中一者或两者之间的错配。尽管错配,与靶核酸的杂交仍可以足以显示出所需的FUBP1表达调节。由错配产生的降低的结合亲和力可以有利地通过寡核苷酸长度的增加和/或在寡核苷酸序列内的能够增加与靶标结合亲和力的经修饰的核苷数量的增加来补偿。有利地,可用于本发明的寡核苷酸含有能够增加结合亲和力的经修饰的核苷,诸如2'糖修饰的核苷,包括LNA。

[0594] 本发明的一个方面涉及一种组合,其包含长度为12个至60个核苷酸的核酸分子,该核酸分子包含能够抑制FUBP1表达的长度为12至30个核苷酸的连续核苷酸序列。

[0595] 在一些实施例中,核酸分子包含连续序列,其与靶核酸的区域或靶序列至少90%互补,诸如至少91%、诸如至少92%、诸如至少93%、诸如至少94%、诸如至少95%、诸如至少96%、诸如至少97%、诸如至少98%或100%互补。

[0596] 在一个实施例中,本发明的组合的核酸分子或其连续核苷酸序列与靶核酸的区域完全互补(100%互补),或在一些实施例中,可以包含寡核苷酸与靶核酸之间的一个或两个错配。

[0597] 在一些实施例中,核酸分子包含长度为12至30个核苷酸的连续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249和/或SEQ ID NO:250中存在的靶核酸区域至少95%互补,诸如完全(或100%)互补。

[0598] 在一些实施例中,核酸分子或连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO;253和/或SEQ ID NO;254的靶核酸至少93%互补,诸如完全(或100%)互补。

[0599] 在一些实施例中,核酸分子或连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247和SEQ ID NO:251的靶核酸至少95%互补,诸如完全(或100%)互补。

[0600] 在一些实施例中,核酸分子或连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:251和SEQ ID NO:255的靶核酸至少95%互补,诸如完全(或100%)互补。

[0601] 在一些实施例中,核酸分子或连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247上的位置14200-14218 100%互补。

[0602] 在一些实施例中,核酸分子或连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247上的位置14413-14431 100%互补。

[0603] 在一些实施例中,核酸分子或连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247上的位置14966-14984 100%互补。

[0604] 在一些实施例中,核酸分子或连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247上的位置30344-30362 100%互补

[0605] 在一些实施例中,核酸分子包含长度为12个至60个的核苷酸,诸如长度为13个至50个、诸如14个至35个、诸如15个至30个、诸如16个至22个的核苷酸或由其组成。

[0606] 在一些实施例中,与靶核酸互补的酸分子的连续核苷酸序列包含长度为12个至30个,诸如14个至25个、诸如16个至23个、诸如18个至22个的连续核苷酸或由其组成。

[0607] 在一些实施例中,与靶核酸互补的siRNA或shRNA的连续核苷酸序列包含长度为18个至28个,诸如19个至26个、诸如20个至24个、诸如21个至23个的连续核苷酸,或由其组成。

[0608] 在一些实施例中,与靶核酸互补的反义寡核苷酸的连续核苷酸序列包含长度为12个至22个,诸如14个至20个、诸如16个至20个、诸如15个至18个、诸如16个至18个,诸如16个至17个的连续核苷酸或由其组成。

[0609] 在一些实施例中,寡核苷酸或连续核苷酸序列包含长度为10个至30个的核苷酸或由其组成,与选自由SEQ ID NO:275至SEQ ID NO:330组成的组的序列(参见表12A中所列的基序序列)至少90%的同一性,优选地100%的同一性。在一个特定实施例中,寡核苷酸或连续核苷酸序列选自SEQ ID NO:325;326;327;328;329和330。

[0610] 表12A:寡核苷酸基序序列(由SEQ ID NO表示)的列表,其设计以及基于基序序列设计的具体寡核苷酸化合物(由CMP ID NO表示)。

[0611]

SEQ ID NO	基序序列	设计	寡核苷酸化合物	CMP ID NO	SEQ ID NO: 247 上的开始位置
275	ataaccatagtcatttga	3-12-3	ATAaccatagtcattTGA	275_1	9138
276	cccataaccatagtcat	3-12-2	CCCataaccatagtcAT	276_1	9142
277	gagccatctacacataaa	2-12-4	GAgccatctacacaTAAA	277_1	10016
278	caagagccatctacacat	3-13-2	CAAgagccatctacacAT	278_1	10019
279	tgtccatttaagaatcca	4-12-2	TGTCcatttaagaatcCA	279_1	10144
280	ttgtgtccatttaagaat	4-12-2	TTGTgtccatttaagaAT	280_1	10147
281	tacctttgctgctgat	3-11-2	TACctttgctgctgAT	281_1	11472
282	gactatacctttgctgc	2-13-2	GActatacctttgctGC	282_1	11476
283	actttgtattcttctgtcat	1-16-3	Actttgtattcttctgt CAT	283_1	12020

[0612]

284	actttgtattcttctgtc	2-14-2	ACtttgtattcttctgTC	284_1	12022
285	gattcaggtgttccagtta	1-16-2	Gattcaggtgttccagt TA	285_1	12393
286	ttcaaacttactggaca	3-11-3	TTCaaacttactggACA	286_1	12412
287	tacatctatcccttcat	2-12-3	TAcatctatcccttCAT	287_1	14452
288	ttacatctatcccttc	2-10-4	TTacatctatccCTTC	288_1	14454
289	cttcctattacaatgccaac	1-17-2	CttcctattacaatgccaAC	289_1	14776
290	atttcttcctattacaatg	2-14-3	ATttcttcctattacaATG	290_1	14781
291	ccatttcttcctattacaa	3-14-2	CCAtttcttcctattacAA	291_1	14783
292	gtttaaaatacattgcc	2-11-4	GTttaaaatacatTGCC	292_1	15537
293	gagtttaaaatacattgcc	2-14-3	GAgtttaaaatacattGCC	293_1	15537
294	gctttttatggtttcacc	1-15-2	Gctttttatggtttcac C	294_1	16183
295	atgctttttatggtttcacc	1-17-2	Atgctttttatggtttcac C	295_1	16183
296	ataatcaacctgtccagct	1-16-2	Ataatcaacctgtccag CT	296_1	23804
297	ataatcaacctgtccagc	1-15-2	AtaatcaacctgtccaGC	297_1	23805
298	ataatcaacctgtccag	1-12-4	Ataatcaacctgt CCAG	298_1	23806
299	tataatcaacctgtccag	2-13-3	TAtaatcaacctgtcCAG	299_1	23806
300	gtataatcaacctgtccag	1-15-3	Gtataatcaacctgtc CAG	300_1	23806
301	ataatcaacctgtcca	1-11-4	Ataatcaacctg TCCA	301_1	23807
302	tataatcaacctgtcca	1-12-4	Tataatcaacctg TCCA	302_1	23807
303	gtataatcaacctgtcca	1-14-3	Gtataatcaacctgt CCA	303_1	23807
304	gtataatcaacctgtcc	3-12-2	GTAtaatcaacctgt CC	304_1	23808
305	tataatcaacctgtcc	2-10-4	TAtaatcaacctGTCC	305_1	23808
306	cccattttcttgtagta	2-13-2	CCcattttcttgtagTA	306_1	23841
307	acccattttcttgtagta	1-15-2	Acccattttcttgtag TA	307_1	23841
308	tacccattttcttgtagta	1-16-2	Tacccattttcttgtag TA	308_1	23841
309	atacccattttcttgtagta	1-17-2	Atacccattttcttgtag TA	309_1	23841
310	atacccattttcttgtag	1-14-3	Atacccattttcttg TAG	310_1	23843
311	catacccattttcttgtag	2-15-2	CAtacccattttcttgtAG	311_1	23843
312	catacccattttcttgta	2-14-2	CAtacccattttcttg TA	312_1	23844
313	tggagctaattcaggagt	2-14-2	TGgagctaattcagga GT	313_1	30264
314	aaatggagctaattcaggag	3-14-3	AAAtggagctaattcagGAG	314_1	30265
315	ttgtccacttcttattatt	1-14-4	Ttgtccacttcttat TATT	315_1	30341
316	ccccacacaatgaagcaa	2-14-2	CCccacacaatgaagcAA	316_1	30368
317	ttcatcaagtcgtctgcat	1-16-2	Ttcatcaagtcgtctgc AT	317_1	30412
318	gatcttcatcaagtcgtc	1-15-2	Gatcttcatcaagtcg TC	318_1	30417
319	atattaacctcctatcagt	1-15-3	Atattaacctcctatc AGT	319_1	30511
320	aatattaacctcctatcag	3-13-3	AATattaacctcctatCAG	320_1	30512
321	atttatatcacaaagcatc	2-13-4	ATttatatcacaaag CATC	321_1	30616
322	aagtacatttatatcaca	4-12-2	AAGTacatttatatcaCA	322_1	30623
323	catttattgtaaagcacaaa	2-14-4	CAtttattgtaaagcaCAAA	323_1	30675
324	atcatttattgtaaagca	2-12-4	ATcatttattgtaa AGCA	324_1	30679
325	cttatgctttttatggt	3-2-1-9-2	CTTatGctttttatgGT	325_1	16189
325	cttatgctttttatggt	3-1-1-10-2	CTTaTgctttttatgGT	325_2	16189

[0613]

326	cttatgctttttatggtt	2-1-2-10-3	CTtATgctttttatgGTT	326_1	16188
326	cttatgctttttatggtt	2-1-1-11-3	CTtAtgctttttatgGTT	326_2	16188
326	cttatgctttttatggtt	2-1-1-10-1-1-2	CTtAtgctttttatGgTT	326_3	16188
326	cttatgctttttatggtt	2-1-1-10-4	CTtAtgctttttatGGTT	326_4	16188
327	gcttttatggtttcac	1-3-1-7-1-1-3	GcttTttatggtTtCAC	327_1	16184
328	tatgcttttttatggtttc	3-2-1-9-3	TATgcTttttatggtTTC	328_1	16186
329	accaattttcatttctac	1-1-3-9-1-1-2	AcCAAttttcatttCtAC	329_1	30536
330	ccccataaccatagtc	1-12-3	CcccataaccataGTC	330_1	9141

[0614] 应理解的是,连续核碱基序列(基序序列)可以经修饰以例如增加核酸酶抗性和/或对靶核酸的结合亲和力。

[0615] 将修饰的核苷(例如高亲和力修饰的核苷)掺入寡核苷酸序列中的模式通常称为寡核苷酸设计。本发明的组合的寡核苷酸使用经修饰的核苷和RNA核苷(特别是用于siRNA和shRNA分子)或DNA核苷(特别是用于单链反义寡核苷酸)设计。有利地,使用高亲和力修饰的核苷。

[0616] 在一个实施例中,寡核苷酸包含至少1个经修饰的核苷,诸如至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个经修饰的核苷。在一个实施例中,寡核苷酸包含1个至8个经修饰的核苷,诸如2个至7个修饰的核苷、诸如3个至6个经修饰的核苷、诸如4个至6个修饰的核苷、诸如4个或5个经修饰的核苷。合适的修饰在“定义”部分的“经修饰的核苷”、“高亲和力修饰的核苷”、“糖修饰”、“2’糖修饰”和“锁定的核酸(LNA)”下进行了描述。

[0617] 在一个实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个糖修饰的核苷,例如2’糖修饰的核苷。优选地,可用于本发明的寡核苷酸包含一个或多个2’糖修饰的核苷,其独立地选自由以下项组成的组:2’-O-烷基-RNA、2’-O-甲基-RNA、2’-烷氧基-RNA、2’-O-甲氧基乙基-RNA、2’-氨基-DNA、2’-氟-DNA、阿糖核酸(ANA)、2’-氟-ANA和LNA核苷。如果一个或多个修饰的核苷是锁定的核酸(LNA),则是优选的。常用的LNA核苷是氧基-LNA或cET。

[0618] 在另一个实施例中,寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键。合适的核苷间修饰描述于“定义”章节的“修饰的核苷间键合”下。如果在寡核苷酸的5’或3’端的至少2个至3个核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键,则是优选的。对于单链反义寡核苷酸,如果连续核苷酸序列内的至少75%(诸如所有)的核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键,则是有利的。

[0619] 在本发明的进一步方面,可用于本发明的核酸分子(诸如反义寡核苷酸、siRNA或shRNA)可以通过将该核酸分子共价连接至能够与脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPr)结合的缀合物部分(诸如二价或三价GalNAc簇)来直接靶向肝脏。

[0620] 还提供了可用于本发明的增强反义寡核苷酸或其缀合物,并且它们可能是出色的FUBP1抑制剂,因为它们可以靶向FUBP1转录物并且可以通过RNA酶H裂解促进其降解。

[0621] 在本发明的一些实施例中,增强的反义寡核苷酸或其缀合物能够通过抑制或下调靶标的表达来调节靶标的表达。优选地,与靶标的正常表达水平相比,这种调节产生至少20%的表达抑制,更优选地与靶标的正常表达水平相比,至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的抑制。在一些实施例中,在PXB-PHH细胞中使用25μM的本发明的组合的反义寡核苷酸或其缀合物,可能能够在体外将FUBP1 mRNA的表达水平抑制至少50%或60%。在本发明的一些实施例中,在PXB-PHH细胞中使用25μM的反义寡核苷酸或其缀合物,可能能够在体外将FUBP1蛋白的表达水平抑制至少50%,就选择与cccDNA减

少具有良好相关性的反义寡核苷酸而言,靶标减少的这一范围是有利的。适当地,实例中提供了可用于测量FUBP1 RNA抑制的测定(例如实例1或实例2)。通过反义寡核苷酸的连续核苷酸序列与靶核酸之间的杂交触发靶抑制。在一些实施例中,本发明的组合的反义寡核苷酸包含反义寡核苷酸和靶核酸之间的错配。尽管错配,与靶核酸的杂交仍可能足以显示出所需的FUBP1表达抑制。由错配导致降低的结合亲和力可以优选地通过寡核苷酸中核苷酸数量的增加和/或能够提高与靶标的结合亲和力的修饰核苷数量的增加来补偿,所述修饰核苷诸如存在于反义寡核苷酸序列中的2'糖修饰的核苷,包括LNA。

[0622] 本发明的组合的反义寡核苷酸的长度通常为12个至30个核苷酸,诸如12个至22个核苷酸,诸如16个至20个核苷酸,并且包含至少12个核苷酸(诸如13个、14个、15个、16个、17个或18个核苷酸)的连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列与人FUBP1前体mRNA(如SEQ ID NO:247所示)的区域互补(诸如完全互补),该区域选自SEQ ID NO:247的核苷酸9141至9156、16184至16205、16184至16200、16186至16203、16188至16205和16189至16205和30536至30553的区域。

[0623] 在本发明的一些实施例中,反义寡核苷酸包含长度为12个至22个核苷酸,诸如15个至20个核苷酸的连续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:256的靶核酸至少90%互补,诸如完全互补。

[0624] 在一些实施例中,反义寡核苷酸包含长度为15个至18个核苷酸,诸如17个或18个核苷酸的连续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:257的靶核酸至少90%互补,诸如完全互补。

[0625] 在一些实施例中,反义寡核苷酸包含15至22个核苷酸的连续核苷酸序列,诸如18至22个核苷酸,或诸如15至18个核苷酸,诸如17或18个核苷酸,该反义寡核苷酸与靶核酸具有至少90%的互补性,诸如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,诸如完全互补,该靶核酸选自SEQ ID NO:247的以下区域:SEQ ID NO:247的9141至9156、16184至16205、16184至16200、16186至16203、16188至16205、16189至16205和30536至30553。在一些实施例中,反义寡核苷酸包含长度为12至30个核苷酸的连续序列,该反义寡核苷酸与靶核酸或靶序列的区域至少90%互补,诸如至少91%,诸如至少92%,诸如至少93%,诸如至少94%,诸如至少95%,诸如至少96%,诸如至少97%、诸如至少98%或100%互补。

[0626] 如果本发明的组合的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列与靶核酸的区域完全互补(100%互补),或者在一些实施例中可以包含寡核苷酸与靶核酸之间的一个或两个错配,则是有利的。

[0627] 在一些实施例中,反义寡核苷酸序列与SEQ ID NO:247的相应靶核酸100%互补。

[0628] 在一些实施例中,本发明的组合的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247和SEQ ID NO:250的靶核酸至少95%互补,诸如完全(或100%)互补。

[0629] 在一些实施例中,反义寡核苷酸包含长度为15个至22个核苷酸的连续核苷酸序列,其与SEQ ID NO:247中存在的相应靶序列至少90%,诸如100%互补,其中靶序列选自SEQ ID NO:247的核苷酸9141至9156、16184至16205、16184至16200、16186至16203、16188至16205、16189至16205和30536至30553。

[0630] 在一些实施例中,反义寡核苷酸的连续核苷酸序列与SEQ ID NO:256的靶位点序列至少90%互补,优选地100%互补。

[0631] 在一些实施例中,反义寡核苷酸的连续核苷酸序列与SEQ ID NO:257的靶位点序

列至少90％互补,优选地100％互补。

[0632] 在一些实施例中,反义寡核苷酸的连续核苷酸序列与SEQ ID NO:261的靶位点序列至少90％互补,优选地100％互补。

[0633] 在一些实施例中,反义寡核苷酸的连续核苷酸序列与SEQ ID NO:270的靶位点序列至少90％互补,优选地100％互补。

[0634] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含选自由SEQ ID NO:325、326、327、328、329和330组成的组的核碱基的序列,或其至少14个连续核苷酸,诸如其17个或18个连续核苷酸。

[0635] 在一些实施例中,本发明的组合的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列在其长度上包含10个至30个核苷酸或由其组成,诸如在长度上包含从12个至25个,诸如11个至22个,诸如从12个至20个,诸如从14个至18个或16个至18个连续核苷酸或由其组成。

[0636] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列包含22个或更少的核苷酸,诸如20个或更少的核苷酸,诸如18个或更少的核苷酸,或由其组成。例如,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列可包含14个、15个、16个或17个核苷酸。应当理解的是,本文中给出的任何范围均包括范围的端点。据此,若本文中描述一寡核苷酸包括自10个至30个核苷酸,则10个及30个核苷酸均包含在内。

[0637] 本发明提供了反义寡核苷酸,诸如长度为12个至24个核苷酸、诸如长度为12个至18个核苷酸的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸包含连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列包含存在于SEQ ID NO:325中的至少12个、诸如至少13个、诸如至少14个、诸如至少15个或至少16个连续核苷酸。

[0638] 本发明提供了反义寡核苷酸,诸如长度为12个至24个核苷酸、诸如长度为12个至18个核苷酸的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸包含连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列包含存在于SEQ ID NO:326中的至少12个、诸如至少13个、诸如至少14个、诸如至少15个或至少16个连续核苷酸

[0639] 本发明提供了反义寡核苷酸,诸如长度为12个至24个核苷酸、诸如长度为12个至18个核苷酸的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸包含连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列包含存在于SEQ ID NO:327中的至少12个、诸如至少13个、诸如至少14个、诸如至少15个或至少16个连续核苷酸。

[0640] 本发明提供了反义寡核苷酸,诸如长度为12个至24个核苷酸、诸如长度为12个至18个核苷酸的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸包含连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列包含存在于SEQ ID NO:328中的至少12个、诸如至少13个、诸如至少14个、诸如至少15个或至少16个连续核苷酸。

[0641] 本发明提供了反义寡核苷酸,诸如长度为12个至24个核苷酸、诸如长度为12个至18个核苷酸的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸包含连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列包含存在于SEQ ID NO:329中的至少12个、诸如至少13个、诸如至少14个、诸如至少15个或至少16个连续核苷酸。

[0642] 本发明提供了反义寡核苷酸,诸如长度为12个至24个核苷酸、诸如长度为12个至18个核苷酸的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸包含连续核苷酸序列,该连续核苷酸序列包含存在于SEQ ID NO:330中的至少12个、诸如至少13个、诸如至少14个、诸如至少15个

或至少16个连续核苷酸。

[0643] 在一些实施例中,连续核苷酸序列在长度上包含12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个或22个连续核苷酸,诸如16个、17个或18个连续核苷酸或由其组成。

[0644] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列包含选自SEQ ID NO:325、326、327、328、329和330的序列或由其组成。

[0645] 在优选地的实施例中,本发明的反义寡核苷酸包含一个或多个糖修饰的核苷,诸如一个或多个2'糖修饰的核苷,诸如一个或多个2'糖修饰的核苷独立地选自2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、阿糖核酸(ANA)、2'-氟-ANA和LNA核苷。如果一个或多个修饰的核苷是锁定的核酸(LNA),则是优选的。

[0646] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含LNA核苷。

[0647] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含LNA核苷和DNA核苷。

[0648] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含2'-O-甲氧基乙基(2'MOE)核苷。

[0649] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含2'-O-甲氧基乙基(2'MOE)核苷和DNA核苷。

[0650] 有利地,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列的3'最末端核苷为2'糖修饰的核苷。

[0651] 优选地,反义寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键,例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯。

[0652] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。

[0653] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的至少一个核苷间键是二硫代磷酸酯核苷间键。

[0654] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的至少一个核苷间键是磷酸二酯核苷间键。

[0655] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的所有核苷间键都是硫代磷酸酯核苷间键。

[0656] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的至少75%核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。

[0657] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的所有核苷间键都是硫代磷酸酯核苷间键。

[0658] 在本发明的一个有利实施例中,本发明的组合的反义寡核苷酸能够募集RNA酶H,诸如RNA酶H1。在本发明的一些实施例中,本发明的组合的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列是一个间隔聚体。

[0659] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列,包含式5'-F-G-F'-3'的间隔聚体或由其组成。

[0660] 在一些实施例中,区域G由6个至16个DNA核苷组成,诸如7个至12个DNA核苷。在一些实施例中,区域F包含4个至6个核苷和/或区域F'包含2个至6个核苷。

[0661] 在一些实施例中,区域F和F'各自包含至少一个LNA核苷。

[0662] 在本发明的寡核苷酸的一些实施例中,所有的LNA核苷都是β-D-氧基LNA核苷。

[0663] 在一些实施例中,本发明的寡核苷酸是具有均匀侧翼的LNA间隔聚体。

[0664] 在本发明的一些实施例中,LNA gapmer是交替侧翼LNA gapmer。在一些实施例中,

交替侧翼LNA gapmer包含至少一个交替侧翼(诸如侧翼F)。在一些实施例中,交替侧翼LNA gapmer包含一个交替侧翼(诸如侧翼F)和一个均匀侧翼(诸如侧翼F')。在一些实施例中,交替侧翼LNA gapmer包含两个交替侧翼。例如,LNA gapmer可具有选自以下设计的设计:1-12-3、3-2-1-9-2、3-1-1-10-2、2-1-2-10-3、2-1-1-11-3、2-1-1-10-1-1-2、2-1-1-10-4、1-3-1-7-1-1-3、3-2-1-9-3和1-1-3-9-1-1-2。表12B列出了每个基序序列的优选的设计。

[0665] 本发明提供以下寡核苷酸化合物(表12B):

[0666] 表12B:本发明的组合的寡核苷酸基序序列(由SEQ ID NO表示),其设计以及基于基序序列设计的本发明的组合的特异性寡核苷酸化合物(由CMP ID NO表示)的列表。

[0667]

SEQ ID NO	基序序列	SEQ ID NO: 247上的位置		设计	CMP ID NO	寡核苷酸化合物
		开始	结束			
325	CTTATGCTTTTTATGGT	16189	16205	3-2-1-9-2	325_1	CTTatGctttttatgGT
325	CTTATGCTTTTTATGGT	16189	16205	3-1-1-10-2	325_2	CTTaTgctttttatgGT
326	CTTATGCTTTTTATGGTT	16188	16205	2-1-2-10-3	326_1	CTtATgctttttatgGTT
326	CTTATGCTTTTTATGGTT	16188	16205	2-1-1-11-3	326_2	CTtAtgctttttatgGTT
326	CTTATGCTTTTTATGGTT	16188	16205	2-1-1-10-1-1-2	326_3	CTtAtgcttttttatGgTT
326	CTTATGCTTTTTATGGTT	16188	16205	2-1-1-10-4	326_4	CTtAtgcttttttatGGTT
327	GCTTTTTATGGTTTCAC	16184	16200	1-3-1-7-1-1-3	327_1	GcttTttatggtTtCAC
328	TATGCTTTTTATGGTTTC	16186	16203	3-2-1-9-3	328_1	TATgcTttttatggtTTC
329	ACCAATTTTCATTTCTAC	30536	30553	1-1-3-9-1-1-2	329_1	AcCAAttttcatttCtAC
330	CCCCATAACCATAGTC	9141	9156	1-12-3	330_1	CcccataaccataGTC

[0668]

[0669] 表12A和12B中的标题“寡核苷酸化合物”代表基序序列的特定设计。大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。标题“设计”指的是间隔聚体设计,F-G-F'。在具有交替侧翼设计的gapmer中,寡核苷酸的侧翼批注为一系列整数,表示许多β-D-氧基LNA的核苷(L),随后是许多DNA核苷(D)。例如,具有2-2-1基序的侧翼表示LLDDL。两个侧翼在5'和3'端均具有β-D-氧基LNA的核苷。由许多DNA核苷构成的缺口区域(G)位于侧翼之间。

[0670] 对于本发明的一些实施例,寡核苷酸选自具有CMP-ID-NO:325_1、325_2、326_1、326_2、326_3、326_4、327_1、328_1、329_1和330_1的寡核苷酸化合物的组(参见表12B)。

[0671] 在一个具体的实施例中,本发明的组合的化合物是具有CMP ID NO:325_1的化合物(参见表12B)。

[0672] 在一个具体的实施例中,本发明的组合的化合物是具有CMP ID NO:325_2的化合物(参见表12B)。

[0673] 在一个具体的实施例中,本发明的组合的化合物是具有CMP ID NO:326_1的化合物(参见表12B)。

[0674] 在一个具体的实施例中,本发明的组合的化合物是具有CMP ID NO:326_2的化合物(参见表12B)。

[0675] 在一个具体的实施例中,本发明的组合的化合物是具有CMP ID NO:326_3的化合物(参见表12B)。

[0676] 在一个具体的实施例中,本发明的组合的化合物是具有CMP ID NO:326_4的化合物(参见表12B)。

[0677] 在一个具体的实施例中,本发明的组合的化合物是具有CMP ID NO:327_1的化合物(参见表12B)。

[0678] 在一个具体的实施例中,本发明的组合的化合物是具有CMP ID NO:328_1的化合物(参见表12B)。

[0679] 在一个具体的实施例中,本发明的组合的化合物是具有CMP ID NO:329_1的化合物(参见表12B)。

[0680] 在一个具体的实施例中,本发明的组合的化合物是具有CMP ID NO:330_1的化合物(参见表12B)。

[0681] 反义寡核苷酸可以选自表13中列出的组或其药用盐。

[0682] 表13.化合物表(本发明的示例性反义寡核苷酸)-HELM注释格式

[0683]

SEQ ID 号	化合物 ID 号 #	HELM 注释 书面语 5' – 3'。	由图中所示的缀合物组成。
325	325_1	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)}	1
325	325_2	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)}	2
326	326_1	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	3
326	326_2	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	4

[0684]

326	326_3	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	5
326	326_4	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	6
327	327_1	{[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])}	7
328	328_1	{[LR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}	8
329	329_1	{[LR](A)[sP].[dR](C)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])}	8.1
330	330_1	{[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}	

[0685] Helm注释索引:

[0686] [LR](G)是β-D-氧基-LNA鸟嘌呤核苷,

[0687] [LR](T)是β-D-氧基-LNA胸腺嘧啶核苷,

[0688] [LR](A)是β-D-氧基-LNA腺嘌呤核苷,

[0689] [LR]([5meC]是β-D-氧基-LNA 5-甲基胞嘧啶核苷,[dR](G)是DNA鸟嘌呤核苷,

[0690] [dR](T)是DNA胸腺嘧啶核苷,

[0691] [dR](A)是DNA腺嘌呤核苷,

[0692] [dR]([C]是DNA胞嘧啶核苷,

[0693] [sP]为硫代磷酸酯核苷间键合,

[0694] P.为磷酸二酯核苷间键合。

[0695] 因此,本发明提供了一种反义寡核苷酸,该反义寡核苷酸选自由化合物ID号#325_1、325_2、326_1、326_2、326_3、326_4、327_1、328_1、329_1和330_1组成的组。

[0696] 在所有情况下,F-G-F'设计可进一步包括区域D'和/或D",如"定义"章节中"寡核苷酸中的区域D'或D"下所述"。在一些实施例中,本发明的组合的寡核苷酸在间隔聚体区域的5'或3'端,诸如在5'端具有1个、2个或3个磷酸二酯连接的核苷单元,诸如DNA单元。在一

些实施例中,本发明的组合的寡核苷酸由两个5'磷酸二酯连接的DNA核苷和随后的如上所定义的F-G-F'间隔聚体区域组成。在5'或3'端含有磷酸二酯连接的DNA单元的寡核苷酸适用于缀合,并且可以进一步包含本文所述的缀合物部分。对于递送至肝脏,ASGPR靶向部分作为缀合物部分是特别优选的,参见缀合物部分了解更多详情

[0697] 组合

[0698] 在一方面,本发明组合中的第三类化合物是通过接头连接至靶向FUBP1的寡核苷酸的靶向RTEL1的寡核苷酸。

[0699] 在一个实施例中,接头由以下项组成:具有选自由以下项组成的组的序列的DNA二核苷酸:AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、CC、CG、GA、GT、GC或GG,其中两个DNA核苷之间存在磷酸二酯键。优选地,接头是CA DNA二核苷酸。

[0700] 在一个实施例中,二核苷酸5'端的键——将二核苷酸连接至靶向RTEL1或FUBP1的寡核苷酸中的一者——是磷酸二酯键或硫代磷酸酯键;并且二核苷酸3'端的键——将二核苷酸连接到另一靶向RTEL1或FUBP1的寡核苷酸——是磷酸二酯键或硫代磷酸酯键。

[0701] 在一个实施例中,靶向RTEL1的寡核苷酸在其3'端经由CA DNA二核苷酸连接至靶向FUBP1的寡核苷酸的5'端,其中靶向RTEL1的寡核苷酸的3'端和二核苷酸的5'端之间的键是磷酸二酯键;并且其中二核苷酸的3'端和靶向FUBP1的寡核苷酸的5'端之间的键是磷酸二酯键。

[0702] 在一个实施例中,靶向FUBP1的寡核苷酸在其3'端经由CA DNA二核苷酸连接至靶向RTEL1的寡核苷酸的5'端,其中靶向FUBP1的寡核苷酸的3'端和二核苷酸的5'端之间的键是磷酸二酯键;并且其中二核苷酸的3'端和靶向RTEL1的寡核苷酸的5'端之间的键是磷酸二酯键。

[0703] 在一个实施例中,靶向RTEL1的寡核苷酸在其3'端经由CA DNA二核苷酸连接至靶向FUBP1的寡核苷酸的5'端,其中靶向RTEL1的寡核苷酸的3'端和二核苷酸的5'端之间的键是硫代磷酸酯键;并且其中二核苷酸的3'端和靶向FUBP1的寡核苷酸的5'端之间的键是磷酸二酯键。

[0704] 在一个实施例中,靶向FUBP1的寡核苷酸在其3'端经由CA DNA二核苷酸连接至靶向RTEL1的寡核苷酸的5'端,其中靶向FUBP1的寡核苷酸的3'端和二核苷酸的5'端之间的键是硫代磷酸酯键;并且其中二核苷酸的3'端和靶向RTEL1的寡核苷酸的5'端之间的键是磷酸二酯键。

[0705] 在一个实施例中,由通过接头连接至靶向FUBP1的寡核苷酸的靶向RTEL1的寡核苷酸组成的组合的最5'端寡核苷酸进一步通过接头连接至缀合物部分。

[0706] 在一个实施例中,缀合物部分通过接头连接至最5'端寡核苷酸,接头由以下项组成:具有选自由以下项组成的组的序列的DNA二核苷酸:AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、CC、CG、GA、GT、GC或GG,其中两个DNA核苷之间存在磷酸二酯键。优选地,接头是CA DNA二核苷酸。

[0707] 在一个实施例中,二核苷酸5'端的键——将二核苷酸连接至缀合物部分——是磷酸二酯键或硫代磷酸酯键;并且二核苷酸3'端的键——将二核苷酸连接到最5'寡核苷酸的5'端——是磷酸二酯键或硫代磷酸酯键。

[0708] 在一个实施例中,最5'寡核苷酸是靶向RTEL1的寡核苷酸,其在其5'端经由CA DNA

二核苷酸连接至缀合物部分,其中靶向RTEL1的寡核苷酸的5'端和二核苷酸的3'端之间的键是磷酸二酯键;并且其中二核苷酸的5'端和缀合物部分之间的键是磷酸二酯键。

[0709] 在一个实施例中,最5'寡核苷酸是靶向FUBP1的寡核苷酸,其在其5'端经由CA DNA二核苷酸连接至缀合物部分,其中靶向FUBP1的寡核苷酸的5'端和二核苷酸的3'端之间的键是磷酸二酯键;并且其中二核苷酸的5'端和缀合物部分之间的键是磷酸二酯键。

[0710] 在一个实施例中,靶向RTEL1的寡核苷酸是CMP ID NO 245_1(SEQ ID NO:245)或CMP ID NO 246_2(SEQ ID NO:246)。

[0711] 在一个实施例中,靶向FUBP1的寡核苷酸是CMP ID NO:326_3(SEQ ID NO:326)或CMP ID NO:330_1(SEQ ID NO:330)。

[0712] 表12C:寡核苷酸组合的序列(由SEQ ID NO表示)、其设计以及特定组合化合物(由CMP ID NO表示)的列表。

[0713]

SEQ ID NO	基序序列	设计	组合化合物	CMP ID NO
348	ccccataaccatagtccactttattataacttgaatctc	1-12-3-2-2-15-4	CcccataaccataGTCcaCTttattataacttgaaTCTC	348_1
349	ctttattataacttgaatctccaccccataaccatagtc	2-15-4-2-1-12-3	CTttattataacttgaaTCTCcaCcccataaccataGTC	349_1
350	cttatgctttttatggttcattacatactctggtcaaa	2-1-1-10-1-1-2-2-12-4	CTtAtgctttttatGgTTcaTTacatactctggtCAAA	350_1
351	ttacatactctggtcaaacacttatgcttttatggtt	2-12-4-2-2-1-1-10-1-1-2	TTacatactctggtCAAAcaCTtAtgctttttatGgTT	351_1

[0714] 表12D:化合物组合表(本发明的示例性组合)-HELM注释格式

[0715]

SEQ ID 号	寡核苷酸化合物 ID	HELM 注释(以 5'–3' 书写。)
348	348_1	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[L

[0716]

		R]([5meC])}$$$$V2.0
348	348_2	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}$$$$V2.0
349	349_1	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}$$$$V2.0
349	349_2	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}$$$$V2.0
350	350_1	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)}$$$$V2.0
351	351_1	RNA1{[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}$$$$V2.0

[0717] 缀合

[0718] 因为HBV感染主要影响肝脏中的肝细胞,所以将可用于本发明的RTEL1和/或FUBP1抑制剂缀合至缀合物部分是有利的,与未缀合的抑制剂相比,缀合物部分将增加抑制剂向肝脏的递送。在一个实施例中,肝靶向部分选自能够与脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)结合的胆固醇或其他脂质或缀合物部分。

[0719] 在本发明的一些实施例中,缀合物包含共价连接至缀合物部分的反义寡核苷酸。

[0720] 脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)缀合物部分包含一种或多种能够以等于或大于半乳糖的亲和力结合脱唾液酸糖蛋白受体(ASPGR靶向部分)的碳水化合物部分。许多半乳糖衍生物对脱唾液酸糖蛋白受体的亲和力已经进行过研究(例如:Jobst,S.T.和Drickamer,K.JB.C.1996,271,6686)或使用本领域典型的方法容易地确定。

[0721] 在一个实施例中,缀合物部分包含至少一个选自由以下项组成的组的脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分:半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰基-半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-丙酰基-半乳糖胺、N-正丁酰基-半乳糖胺和N-异丁酰基半乳糖胺。优选地,脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分是N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

[0722] 为了生成ASGPR缀合物部分,可以将ASPGR靶向部分(优选地GalNAc)附接于缀合物支架上。通常,ASPGR靶向部分可以在支架的相同端。在一个实施例中,缀合物部分由连接至间隔物的二至四个末端GalNAc部分组成,所述间隔物将每一个GalNAc部分连接至可与反义寡核苷酸缀合的支链分子。

[0723] 在另一个实施例中,缀合物部分相对于脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分为一价、二价、三价或四价。优选地,脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分。

[0724] GalNAc缀合物部分可包括例如那些WO 2014/179620和WO 2016/055601和PCT/EP2017/059080(通过引用并入本文)中所述的缀合物部分,以及连接有GalNAc部分的小肽,诸如Tyr-Glu-Glu-(氨基已基GalNAc)3(YEE(ahGalNAc)3;与肝细胞上脱唾液酸糖蛋白受体结合的糖三肽,参见,例如,Duff等人,Methods Enzymol,2000,313,297);基于赖氨酸的半乳糖簇(例如L3G4;Biessen等人,Cardovasc.Med.,1999,214);和基于胆烷的半乳糖簇(例如,脱唾液酸糖蛋白受体的碳水化合物识别基序)。

[0725] 可以使用本领域已知的方法将ASGPR缀合物部分,特别是三价GalNAc缀合物部分附接于寡核苷酸的3'端或5'端。在一个实施例中,ASGPR缀合物部分连接至寡核苷酸的5'端。

[0726] 在一个实施例中,缀合物部分是三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),诸如图5所示的那些。在一个实施例中,缀合物部分是图5A-1或图5A-2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)或者两者的混合物。在一个实施例中,缀合物部分是图5B-1或图5B-2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)或者两者的混合物。在一个实施例中,缀合物部分是图5C-1或图5C-2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)或者两者的混合物。在一个实施例中,缀合物部分是图5D-1或图5D-2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)或者两者的混合物。

[0727] 靶向RTEL1的缀合物

[0728] 在一些实施例中,靶向RTEL1的缀合物选自由以下项组成的组:

[0729] 5'-GN2-C6$_o$[X]$A_sA_sT_sT_st_st_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sG_sT_s$、

[0730] 5'-GN2-C6$_o$[X]$A_sA_st_st_st_st_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sG_sG_sT_s{}^mC_s$、

[0731] 5'-GN2-C6$_o$[X]$T_sT_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sg_st_s{}^mC_sA_sA_sA_s$、

[0732] 5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_sT_sg_sa_sA_st_s{}^mC_sT_s{}^mC_s$;和

[0733] 5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_st_sg_sa_sa_sT_s{}^mC_sT_s{}^mC_s$。

[0734] 其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中每个LNA胞嘧啶为5-甲基胞嘧啶,下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,下标o代表磷酸二酯核苷间键,GN2-C6为三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),诸如图5中所示的那些,例如诸如图5D-1或图5D-2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),或两者的混合物,并且其中并且[X]代表根据前述的c_oa_o。

[0735] 在一些实施例中,靶向RTEL1的缀合物选自表14中列出的缀合物的组或其药用盐。

[0736] 表14.化合物表(本发明的示例性缀合物)-HELM注释格式(关于HELM注释的注释,

参见表10的解释)。

[0737]

寡核苷酸化合物ID号#(根据上表10)	HELM注释 书面语 5'-3'。	示例性化合物-参见图
243_1	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)	1
244_1	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}	2
245_1	[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)	4
246_1	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])	3
246_2	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])	

[0738]

[0739] Helm注释索引:

[0740] [LR](G)是β-D-氧基-LNA鸟嘌呤核苷,

[0741] [LR](T)是β-D-氧基-LNA胸腺嘧啶核苷,

[0742] [LR](A)是β-D-氧基-LNA腺嘌呤核苷,

[0743] [LR]([5meC])是β-D-氧基-LNA 5-甲基胞嘧啶核苷,

[0744] [dR](G)是DNA鸟嘌呤核苷,

[0745] [dR](T)是DNA胸腺嘧啶核苷,

[0746] [dR](A)是DNA腺嘌呤核苷,

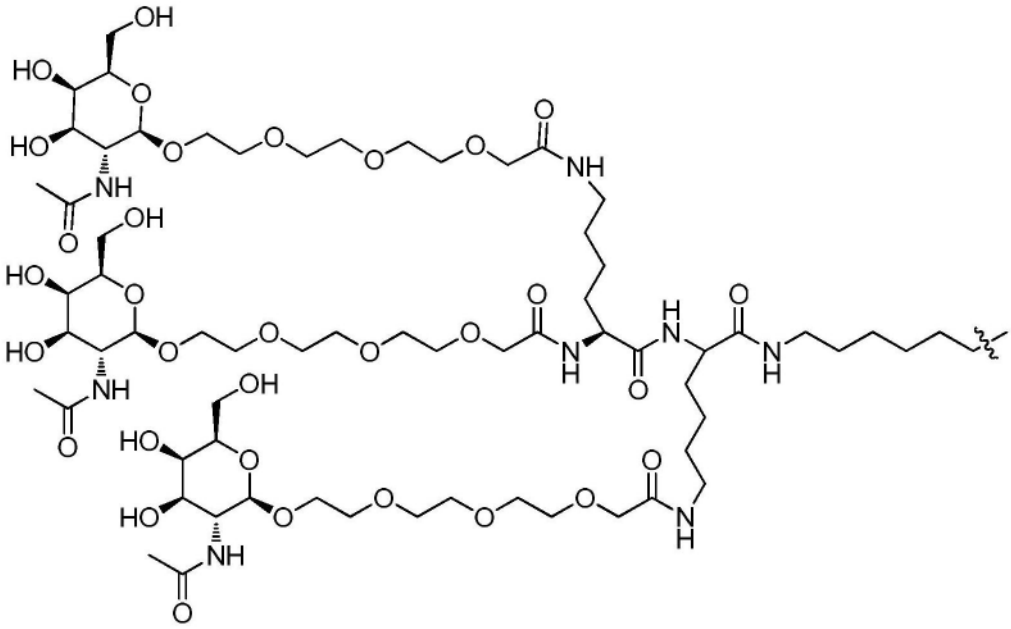
[0747] [dR](C)是DNA胞嘧啶核苷,

[0748] [sP]是硫代磷酸酯核苷间键,

[0749] P是磷酸二酯核苷间键。

[0750] 5gn2c6是图5D-1或图5D-2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)或者两者的混合物。

[0751] 在一些实施例中,5gn2c6是具有下式的GalNAc残基R:

[0752] 

[0753] 应当理解,如上图中所示的R是图5D1和图5D2中所示的两种立体异构体的混合物。

[0754] 根据本发明的另一方面,如上图中所示的R是如图5D1所示的立体异构体。

[0755] 根据本发明的另一方面,如上图中所示的R是如图5D2所示的立体异构体。表14中提供的缀合物的结构如图1至4所示。

[0756] 抑制剂可以包含图1的缀合物或其药用盐。抑制剂可以包含化合物ID号243_1的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0757] 抑制剂可以包含图2的缀合物或其药用盐。抑制剂可以包含化合物ID号244_1的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0758] 抑制剂可以包含图3的缀合物或其药用盐。抑制剂可以包含化合物ID号245_1的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0759] 抑制剂可以包含图4的缀合物或其药用盐。抑制剂可以包含化合物ID号246_1的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0760] 代表本发明的组合的缀合物中的一些的化学图如图1至4所示。

[0761] 在一些实施方式中,缀合物是如图1所示的缀合物。

[0762] 在一些实施方式中,缀合物是如图2所示的缀合物。

[0763] 在一些实施方式中,缀合物是如图3所示的缀合物。

[0764] 在一些实施方式中,缀合物是如图4所示的缀合物。

[0765] 图1至4中所示的化合物以质子化形式示出,也就是硫代磷酸酯键上的S原子经质子化;应知质子的存在将取决于分子的环境酸性以及替代性阳离子的存在(例如当所述寡核苷酸是以盐的形式时)。质子化硫代磷酸酯是以互变异构的形式存在。

[0766] 靶向FUBP1的缀合物

[0767] 在一些实施例中,靶向FUBP1的缀合物选自由以下项组成的组:

[0768] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$T$_s$a$_s$t$_s$G$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T、

[0769] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$T$_s$a$_s$T$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T、

[0770] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$T$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T$_s$T、

[0771] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T$_s$T、

[0772] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$G$_s$g$_s$T$_s$T、

[0773] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$G$_s$G$_s$T$_s$T、

[0774] 5’-GN2-C6$_o$[X]G$_s$c$_s$t$_s$t$_s$T$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$g$_s$t$_s$T$_s$t$_s$^{m}C$_s$A$_s$^{m}C、

[0775] 5’-GN2-C6$_o$[X]T$_s$A$_s$T$_s$g$_s$c$_s$T$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$g$_s$t$_s$T$_s$T$_s$^{m}C、

[0776] 5’-GN2-C6$_o$[X]A$_S$c$_S$^{m}C$_S$A$_S$A$_S$t$_S$t$_S$t$_S$t$_S$c$_S$a$_S$t$_S$t$_S$t$_S$^{m}C$_S$tA$_S$^{m}C和

[0777] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$c$_s$c$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$a$_s$c$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$G$_s$T$_s$^{m}C$_s$

[0778] 其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中每个LNA胞嘧啶为5-甲基胞嘧啶,下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,下标o代表磷酸二酯核苷间键,GN2-C6为如图5D所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),诸如如图5D-1或图5D2所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),或两者的混合物,优选地经由寡核苷酸5’末端的磷酸二酯键结合。代表一些分子的化学图如图8至16所示,并且其中[X]代表根据前述的c$_o$a$_o$。

[0779] 在一些实施例中,靶向FUBP1的缀合物选自表15中列出的缀合物的组或其药用盐。

[0780] 表15A.化合物表(本发明的示例性缀合物)-HELM注释格式

寡核苷酸化合物 ID 号 #（根据上表 13）	HELM 注释 书面语 5' – 3'。	示例性化合物 - 参见图
325_1	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)}	8
325_2	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)}	9
326_1	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	10
326_2	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	11
326_3	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	12
326_4	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	13
327_1	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])}	14
328_1	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}	15
329_1	{[5gn2c6]}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](A)[sP].[dR](C)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[LR	16

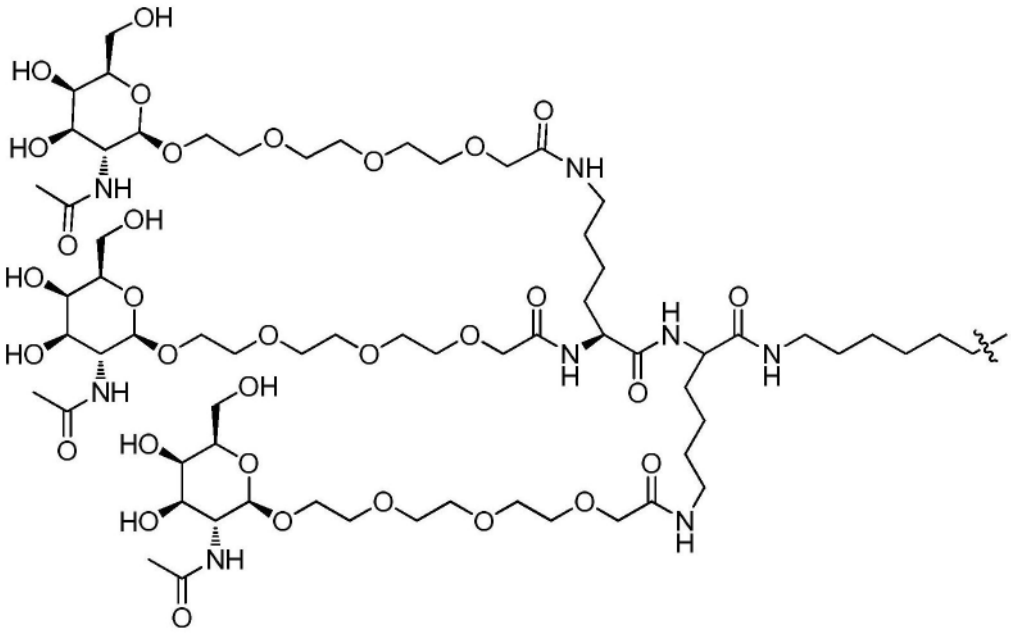
[0781]

[0782]

	](A)[sP].[LR]([5meC])}	
330_1	{[5gn2c6]}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}	

[0783] 在上表中,[5gn2c6]是具有下式的GalNAc残基R:

[0784]



[0785] 应当理解,如上图中所示的和上表中使用的R是图5D1和图5D2中所示的两种立体异构体的混合物。

[0786] 根据本发明的另一方面,如上图中所示的和上表中使用的R是如图5D1所示的立体异构体。

[0787] 根据本发明的另一方面,如上图中所示的和上表中使用的R是如图5D1所示的立体异构体。表15中提供的缀合物的结构如图8至16所示。

[0788] 本发明提供了图8的缀合物或其药用盐。

[0789] 本发明提供了化合物ID号325_1的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0790] 本发明提供了图9的缀合物或其药用盐。

[0791] 本发明提供了化合物ID号325_2的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0792] 本发明提供了图10的缀合物或其药用盐。

[0793] 本发明提供了化合物ID号326_1的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0794] 本发明提供了图11的缀合物或其药用盐。

[0795] 本发明提供了化合物ID号326_2的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0796] 本发明提供了图12的缀合物或其药用盐。

[0797] 本发明提供了化合物ID号326_3的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0798] 本发明提供了图13的缀合物或其药用盐。

[0799] 本发明提供了化合物ID号326_4的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0800] 本发明提供了图14的缀合物或其药用盐。

[0801] 本发明提供了化合物ID号327_1的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0802] 本发明提供了图15的缀合物或其药用盐。

[0803] 本发明提供了化合物ID号328_1的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0804] 本发明提供了图16的缀合物或其药用盐。

[0805] 本发明提供了化合物ID号329_1的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0806] 本发明提供了化合物ID号330_1的反义寡核苷酸或其药用盐。

[0807] 在一些实施方式中,缀合物是如图8所示的缀合物。

[0808] 在一些实施方式中,缀合物是如图9所示的缀合物。

[0809] 在一些实施方式中,缀合物是如图10所示的缀合物。

[0810] 在一些实施方式中,缀合物是如图11所示的缀合物。

[0811] 在一些实施方式中,缀合物是如图12所示的缀合物。

[0812] 在一些实施方式中,缀合物是如图13所示的缀合物。

[0813] 在一些实施方式中,缀合物是如图14所示的缀合物。

[0814] 在一些实施方式中,缀合物是如图15所示的缀合物。

[0815] 在一些实施例中,缀合物是如图16所示的缀合物。

[0816] 图8至16中所示的化合物以质子化形式示出,也就是硫代磷酸酯键上的S原子经质子化;应知质子的存在将取决于分子的环境酸性以及替代性阳离子的存在(例如当所述寡核苷酸是以盐的形式时)。质子化硫代磷酸酯是以互变异构的形式存在。

[0817] 靶向组合的缀合物

[0818] 在一些实施例中,靶向RTEL1和FUBP1的化合物的组合的缀合物选自由以下项组成的组:

[0819] 5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$G$_s$g$_s$T$_s$T$_o$c$_o$a$_o$T$_s$T$_s$a$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$c$_s$t$_s$c$_s$t$_s$g$_s$g$_s$t$_s$^{m}C$_s$ A$_s$A$_s$A$_s$(CMP ID NO 350_1)和

[0820] 5'-GN2-C6$_o$[X]T$_s$T$_s$a$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$c$_s$t$_s$c$_s$t$_s$g$_s$g$_s$t$_s$^{m}C$_s$A$_s$A$_s$A$_o$c$_o$a$_o$^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$ G$_s$g$_s$T$_s$T(CMP ID NO 351_1)

[0821] 其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中每个LNA胞嘧啶为5-甲基胞嘧啶,下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,下标o代表磷酸二酯核苷间键,GN2-C6为如图5D所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),诸如如图5D-1或图5D2所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),或两者的混合物,优选地经由最5'寡核苷酸5'端的磷酸二酯键结合,并且其中[X]代表根据前述的c$_o$a$_o$。

[0822] 表15B:化合物组合表(本发明的示例性缀合物)-HELM注释格式

[0823]

寡核苷酸化合物 ID	HELM 注释（以 5'－3' 书写。）
350_1	CHEM1{[5gn2c6]}|RNA1{P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)}$CHEM1,RNA1,1:R2-1:R1$$$V2.0
351_1	CHEM1{[5gn2c6]}|RNA1{P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}$CHEM1,RNA1,1:R2-1:R1$$$V2.0

[0824] 制造方法

[0825] 在另一方面,用于制造本发明的组合的寡核苷酸的方法包括使核苷酸单元反应并由此形成包含在寡核苷酸中的共价连接的连续核苷酸单元。优选地,该方法使用亚磷酰胺化学方法(参见例如Caruthers等人,1987,Methods in Enzymology第154卷,第287-313页)。在另一个实施例中,该方法进一步包括使连续核苷酸序列与缀合物部分(配体)反应以将缀合物部分共价连接至寡核苷酸。在另一方面,一种用于制造本发明的组合的组合物的方法包括将本发明的组合的寡核苷酸或缀合寡核苷酸与药用的稀释剂、溶剂、载体、盐和/或辅助剂混合。

[0826] 药用盐

[0827] 根据本发明的化合物可以以其药用盐的形式存在。术语“药物盐”或“药用盐”是指保留本发明化合物的生物有效性和特性并由合适的无毒有机或无机酸或者有机或无机碱形成的常规酸加成盐或碱加成盐。酸加成盐包括(例如)那些衍生自无机酸诸如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸和硝酸的盐,和那些衍生自有机酸诸如对甲苯磺酸、水杨酸、甲磺酸、草酸、琥珀酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸等的盐。碱加成盐包括那些衍生自铵、钾、钠和季铵氢氧化物诸如氢氧化四甲基铵的盐。为了获得改善的化合物的物理和化学稳定性、吸湿性、流动性和溶解性而将药物化合物化学修饰成盐是药物化学家众所周知的技术。例如,Bastin在《有机工艺研究与发展》(Organic Process Research&Development)2000年第4期,第427-435页或Ansel在以下文章中对此进行了描述:《药物剂型和药物递送系统(第六版)》(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第6版(1995))第196和1456-1457页。例如,本文提供的化合物的药用盐可以是钠盐。

[0828] 在另一方面,本发明涉及反义寡核苷酸或其缀合物中的一者或多者的药用盐,诸如药用钠盐、铵盐或钾盐。

[0829] 药物组合和试剂盒

[0830] 本发明的一个方面涉及一种如本文所述的靶向RTEL1的抑制剂和FUBP1抑制剂的药物组合,其各自配制在药用载体中。

[0831] 本发明的药物组合可以用于比单独包含的治疗性抑制剂(诸如寡核苷酸)更有效地治疗HBV感染。在一个实施例中,与单独包含的治疗性抑制剂(诸如寡核苷酸)相比,本发明的药物组合可以用于更快速地抑制HBV、以增加的持续时间抑制HBV和/或以更大的效果抑制HBV。这些效果可以通过受感染细胞中cccDNA的减少来测量。在一个实施例中,本发明的药物组合比单独包含的治疗性抑制剂(诸如寡核苷酸)更快速地引起受感染细胞中cccDNA的减少。在一个实施例中,本发明的药物组合引起比单独包含的治疗性寡核苷酸或TLR7激动剂更长时间的cccDNA减少。在一个实施例中,本发明的药物组合比单独包含的治疗性寡核苷酸或TLR7激动剂更大程度地引起cccDNA滴度的降低。

[0832] 在本发明的一个优选实施例中,药物组合包含靶向RTEL1的寡核苷酸和靶向FUBP1的寡核苷酸或其缀合物,或由其组成。

[0833] 在本发明的一个优选实施例中,药物组合包含靶向RTEL1的单链反义寡核苷酸和靶向FUBP1的单链反义寡核苷酸或其缀合物,或由其组成。

[0834] 靶向RTEL1的单链反义寡核苷酸可以是如本文所述的靶向RTEL1的单链反义寡核苷酸。靶向FUBP1的单链反义寡核苷酸可以是如本文所述的靶向FUBP1的单链反义寡核苷酸。

[0835] 应用

[0836] 本发明的药物组合用于在治疗乙型肝炎病毒感染和/或癌症,特别是治疗患有慢性HBV的患者中使用。

[0837] 本发明的药物组合可以用作研究试剂或用于诊断、治疗和预防。

[0838] 本发明的药物组合可以作为乙型肝炎病毒靶向疗法和免疫治疗的联合用药。

[0839] 在研究中,此类组合可用于特异性调节细胞(例如,体外细胞培养物)和实验动物中RTEL1蛋白的合成,从而有助于靶标的功能分析或对其作为治疗干预靶标的可用性的评估。通常,通过降解或抑制产生蛋白质的mRNA从而防止蛋白质形成,或通过降解或抑制产生蛋白质的基因或mRNA来实现靶标调节。

[0840] 如果在研究或诊断中采用本发明的组合,则靶核酸可以是cDNA或衍生自DNA或RNA的合成核酸。

[0841] 本发明还涵盖一种用于在表达RTEL1的靶细胞中调节RTEL1表达的体内或体外方法,所述方法包括向所述细胞施用有效量的本发明的组合。

[0842] 在一些实施例中,靶细胞是哺乳动物细胞,特别是人细胞。靶细胞可以是形成哺乳动物组织的一部分的体外细胞培养物或体内细胞。在优选的实施例中,靶细胞存在于肝脏中。靶细胞可以是肝细胞。

[0843] 本发明的一个方面涉及用作药物的本发明的组合。

[0844] 在本发明的一个方面,本发明的组合能够降低受感染细胞中的cccDNA水平,并因此抑制HBV感染。特别地,组合能够影响以下参数中的一个或多个:i)减少cccDNA和/或ii)减少pgRNA和/或iii)减少HBV DNA和/或iv)减少受感染细胞中的HBV病毒抗原。

[0845] 例如,抑制HBV感染的组合可以i)与对照相比,将感染的细胞中的cccDNA水平降低

至少40％,诸如降低50％、60％、70％、80％或90％;或ii)与对照相比,将pgRNA的水平降低至少40％,诸如降低50％、60％、70％、80％或90％。对照物可以是未处理的细胞或动物,或用适当的对照物处理的细胞或动物。

[0846] HBV感染的抑制作用可以在体外使用HBV感染的原代人肝细胞进行测量,或在体内使用人源化肝细胞PXB小鼠模型(可从PhoenixBio获得,也参见Kakuni等人,2014Int.J.Mol.Sci.15:58-74)进行测量。对HBsAg和/或HBeAg分泌的抑制可以通过ELISA测定,例如使用CLIA ELISA试剂盒(Autobio Diagnostic)根据制造商的说明进行。细胞内cccDNA或HBV mRNA和pgRNA的减少可通过qPCR测定,例如,如“材料和方法”章节所述。评估测试化合物是否抑制HBV感染的其他方法是通过例如WO 2015/173208中所述的qPCR测量HBV DNA的分泌,或使用Northern印迹杂交、原位杂交或免疫荧光测量。

[0847] 由于RTEL1水平的降低,本发明的组合可以用于抑制HBV感染的发展或治疗HBV感染。特别地,与仅减少HBsAg分泌的化合物相比,本发明的组合对cccDNA的去稳定化和减少作用更有效地抑制了慢性HBV感染的发展或治疗慢性HBV感染。

[0848] 因此,本发明的一个方面涉及本发明的组合用于减少HBV感染者中的cccDNA和/或pgRNA的用途。

[0849] 本发明的另一方面涉及本发明的组合在抑制慢性HBV感染的发展或治疗慢性HBV感染中的用途。

[0850] 本发明的另一方面涉及本发明的组合在降低HBV感染的人的传染性中的用途。在本发明的一个特定方面,本发明的组合抑制慢性HBV感染的发展。

[0851] 用本发明的组合治疗(或预防性地接受本发明的组合物)的受试者优选为人,更优选地为HBsAg阳性和/或HBeAg阳性的人类患者,甚至更优选地为HBsAg阳性和HBeAg阳性的人类患者。

[0852] 因此,本发明涉及一种治疗HBV感染的方法,其中该方法包括施用有效量的本发明的组合。本发明进一步涉及预防由慢性HBV感染引起的肝硬化和肝细胞癌的方法。

[0853] 本发明还提供了本发明的组合在制备药物,特别是用于治疗HBV感染或慢性HBV感染或降低HBV感染之人的传染性的药物中的用途。在优选的实施例中,药物被制备成用于皮下施用的剂型。

[0854] 本发明还提供本发明的组合用于制造药物的用途,其中该药物呈用于静脉内施用的剂型。

[0855] 本发明的组合可以用于组合疗法。例如,可以将本发明的组合与其他抗HBV试剂诸如干扰素α-2b、干扰素α-2a和干扰素αcon-1(聚乙二醇化和非聚乙二醇化)、利巴韦林、拉米夫定(3TC)、恩替卡韦、替诺福韦、替比夫定(LdT)、阿德福韦或其他新兴的抗HBV药物诸如HBV RNA复制抑制剂、HBsAg分泌抑制剂、HBV衣壳抑制剂、反义寡聚物(例如,如WO2012/145697、WO 2014/179629和WO2017/216390中所述)、siRNA(例如,在WO 2005/014806、WO 2012/024170、WO 2012/2055362、WO 2013/003520、WO 2013/159109、WO 2017/027350和WO2017/015175中所述)、HBV治疗性疫苗、HBV预防性疫苗、HBV抗体治疗(单克隆或多克隆)或TLR 2、3、7、8或9激动剂联合来治疗和/或预防HBV。

[0856] 本发明的实施方式

[0857] 本发明的以下实施例可以与本文描述的任何其他实施例组合使用。

[0858] 1.一种组合物,其包含RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂。

[0859] 2.一种药物组合物,其包含RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂或其药用盐,以及药用的稀释剂、溶剂、载体、盐和/或辅助剂。

[0860] 3.一种试剂盒,其包括RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂。

[0861] 4.根据权项1或2所述的组合物、或根据权项3所述的试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂能够减少受感染细胞中的cccDNA。

[0862] 5.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1抑制剂为长度为12至60个核苷酸、优选长度为12至30个核苷酸、更优选长度为12至25个核苷酸、甚至更优选长度为15至21个核苷酸的核酸分子,其包含长度为至少10个核苷酸的与哺乳动物RTEL1靶核酸、特别是人RTEL1靶核酸至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、甚至更优选至少95%互补的连续核苷酸序列,其中所述核酸分子能够减少RTEL1的表达。

[0863] 6.根据权项5所述的组合物或试剂盒,其中所述哺乳动物RTEL1靶核酸选自SEQ ID NO:1或2。

[0864] 7.根据权项5或6所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列与SEQ ID NO:1和/或2、优选SEQ ID NO:1至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、甚至更优选至少95%互补。

[0865] 8.根据权项5至7中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列与SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2、优选SEQ ID NO:1的靶核酸至少98%互补。

[0866] 9.根据权项5至8中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列与SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2、优选SEQ ID NO:1的靶核酸100%互补。

[0867] 10.根据权项5至9中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列与选自SEQ ID NO:3-26的靶序列至少80%,诸如至少85%,诸如至少90%,诸如至少95%,诸如至少98,诸如100%互补,所述靶序列,优选地与选自SEQ ID NO:5、13、14、15、16的靶序列100%互补;更优选地与选自SEQ ID NO:14和16的靶序列100%互补。

[0868] 11.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1抑制剂选自单链反义寡核苷酸、siRNA或shRNA分子。

[0869] 12.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1抑制剂为单链反义寡核苷酸。

[0870] 13.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述RTLE1抑制剂为长度为12至30个核苷酸的单链反义寡核苷酸,其包含与哺乳动物RTEL1靶核酸互补的至少10个核苷酸的连续核苷酸序列,该靶核酸诸如RTEL1前体mRNA,例如SEQ ID NO:1或2的RTEL1前体mRNA,特别是人RTEL1靶核酸,诸如人RTEL1前体mRNA,诸如SEQ ID NO:1的人RTEL1前体mRNA,其中所述寡核苷酸能够减少RTEL1的表达。

[0871] 14.根据权项13所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列的长度为10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个核苷酸。

[0872] 15.根据权项13或14所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列的长度为12个至25个,特别是15个至21个核苷酸。

[0873] 16.根据权项12至15中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述反义寡核苷酸包

含选自由SEQ ID NO:27至246组成的组的序列。

[0874] 17.根据权项12至16中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述反义寡核苷酸包含一个或多个2'糖修饰的核苷。

[0875] 18.根据权项17所述的组合物或试剂盒,其中所述一个或多个2'糖修饰的核苷独立地选自由以下项组成的组:2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、阿糖核酸(ANA)、2'-氟-ANA和LNA核苷

[0876] 19.根据权项17或18所述的组合物或试剂盒,其中所述一个或多个所述2'糖修饰的核苷为LNA核苷。

[0877] 20.根据权项12至19中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述反义寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键。

[0878] 21.根据权项12至20中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列内的所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

[0879] 22.根据权项12至21中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述寡核苷酸能够募集RNA酶H。

[0880] 23.根据权项12至22中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列由式5'-F-G-F'-3'的间隔聚体组成或包含所述间隔聚体,其中区域F和F'独立地包含1-4个2'糖修饰的核苷,并且G是能够募集RNA酶H的介于6个与16个之间的核苷的区域,例如包含介于6个与18个之间的DNA核苷的区域。

[0881] 24.根据权项12至23中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述能够减少RTEL1的表达的反义寡核苷酸选自包含以下项或由以下项组成的反义寡核苷酸组:

[0882] AATTttacatactctgGT(SEQ ID NO:243),

[0883] AAttttacatactctGGTC(SEQ ID NO:244),

[0884] TTacatactctggtCAAA(SEQ ID NO:245),

[0885] CTttattataactTgaAtCTC(SEQ ID NO:246),以及

[0886] CTttattataacttgaaTCTC(SEQ ID NO:246);

[0887] 优选TTacatactctggtCAAA(SEQ ID NO:245);或者

[0888] CTttattataacttgaaTCTC(SEQ ID NO:246);

[0889] 其中大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,并且所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

[0890] 25.根据权项11所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1抑制剂为shRNA。

[0891] 26.根据权项11所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1抑制剂为siRNA。

[0892] 27.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1抑制剂共价连接至至少一个缀合物部分。

[0893] 28.根据权项27所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分包含至少一个选自由以下项组成的组的脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分:半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰基-半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-丙酰基-半乳糖胺、N-正丁酰基-半乳糖胺和N-异丁酰基半乳糖胺。

[0894] 29.根据权项28所述的组合物或试剂盒,其中所述脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分为N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

[0895] 30.根据权项27或28所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分相对于脱唾液

酸糖蛋白受体靶向部分为一价、二价、三价或四价。

[0896] 31.根据权项30所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分由两个至四个末端GalNAc部分和将每一个GalNAc部分连接至可与反义化合物缀合的支链分子的间隔物组成。

[0897] 32.根据权项31所述的组合物或试剂盒,其中所述间隔物为PEG间隔物。

[0898] 33.根据权项28至32中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分为三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分。

[0899] 34.根据权项28至33中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分选自图5中的三价GalNAc部分中的一者。

[0900] 35.根据任一权项34所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分为图5中的三价GalNAc部分,诸如图5D-1或图5D-2的三价GalNAc部分或者两者的混合物。

[0901] 36.根据权项28至35中任一项所述的组合物或试剂盒,其包含定位于所述反义寡核苷酸和所述缀合物部分之间的接头,优选地其中所述接头为CA DNA二核苷酸。

[0902] 37.根据权项28至36中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物选自由以下项组成的组:

[0903] 5'-GN2-C6$_o$[X]$A_sA_sT_sT_st_st_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sG_sT$、

[0904] 5'-GN2-C6$_o$[X]$A_sA_st_st_st_st_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sG_sG_sT_s{}^mC$、

[0905] 5'-GN2-C6$_o$[X]$T_sT_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sg_st_s{}^mC_sA_sA_sA$、

[0906] 5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_sT_sg_sa_sA_st_s{}^mC_sT_s{}^mC$和

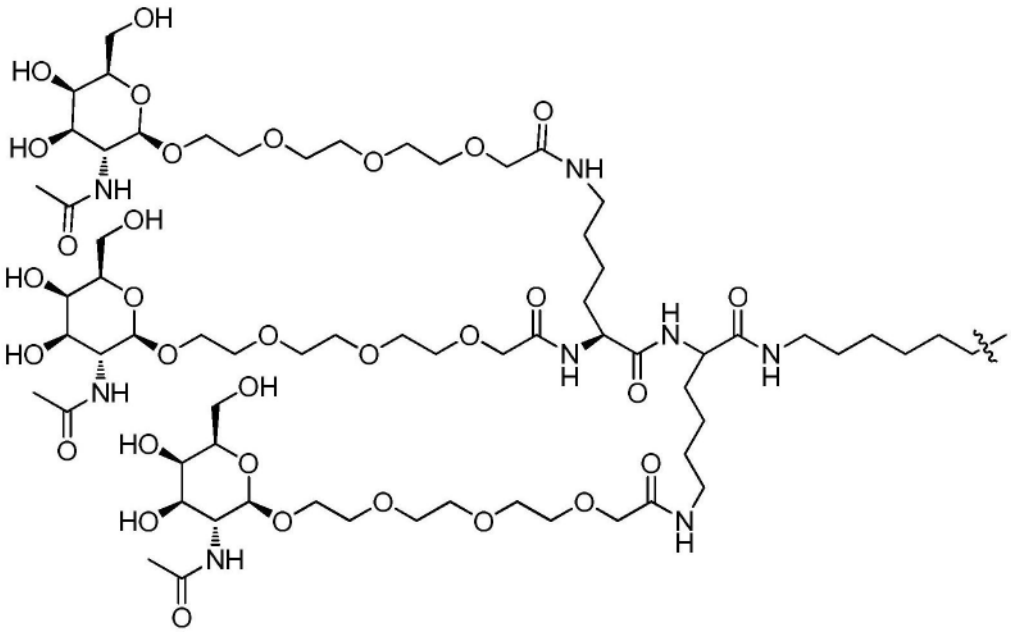
[0907] 5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_st_sg_sa_sa_sT_s{}^mC_sT_s{}^mC$;

[0908] 优选5'-GN2-C6$_o$[X]$T_sT_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sg_st_s{}^mC_sA_sA_sA$或者

[0909] 5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_st_sg_sa_sa_sT_s{}^mC_sT_s{}^mC$;

[0910] 其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中每个LNA胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,^{m}C是5-甲基胞嘧啶DNA,并且其中下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,下标o代表磷酸二酯核苷间键,GN2-C6是下式的残基:

[0911]



[0912] 其中残基GN2-C6经由磷酸二酯键连接在寡核苷酸的5'末端,和/或其中GN2-C6是

图5D1或图5D2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),或两者的混合物,更优选其中GN2-C6是图5D1或图5D2中所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基的混合物,并且其中[X]代表根据前述的$c_o a_o$。

[0913] 38.根据权项28至37中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图1所示的缀合物。

[0914] 39.根据权项28至37中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图2所示的缀合物。

[0915] 40.根据权项28至37中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图3所示的缀合物。

[0916] 41.根据权项28至37中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图4所示的缀合物。

[0917] 42.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1抑制剂呈药用盐的形式。

[0918] 43.根据权项28所述的组合物或试剂盒,其中所述盐为钠盐、钾盐或铵盐。

[0919] 44.根据前述权项中任一项的组合物或试剂盒,其中所述组合物包含水性稀释剂或溶剂,诸如磷酸盐缓冲盐水。

[0920] 45.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述FUBP1的抑制剂能够减少受感染细胞中的cccDNA和/或pgRNA。

[0921] 46.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中FUBP1抑制剂为长度为12至60个核苷酸、优选地长度为12至30个核苷酸、更优选地长度为12至25个、甚至更优选地15至21个核苷酸的核酸分子,其包含以下项或由以下项组成:长度为10至30个核苷酸、优选地长度为12至25个、特别是15至21个核苷酸的连续核苷酸序列,其中所述连续核苷酸序列与哺乳动物FUBP1靶核酸、特别是人FUBP1靶核酸至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%互补,其中所述核酸分子能够抑制FUBP1的表达。

[0922] 47.根据权项46所述的组合物或试剂盒,其中所述哺乳动物FUBP1靶核酸选自SEQ ID NO:247至254。

[0923] 48.根据权项46或47所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247和/或251、优选SEQ ID NO:247至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、甚至更优选至少95%互补。

[0924] 49.根据权项46至48中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247和/或SEQ ID NO:251、优选SEQ ID NO:247的靶核酸至少98%互补。

[0925] 50.根据权项46至49中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列与SEQ ID NO:247和/或SEQ ID NO:251、优选SEQ ID NO:247的靶核酸100%互补。

[0926] 51.根据权项46至50中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列与人FUBP1的外显子14或外显子20内的区域至少90%互补(参见表4)。

[0927] 52.根据权项46至51中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列与人FUBP1的外显子14或外显子20内的区域100%互补(参见表4)。

[0928] 53.根据权项46至50中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列与靶序列至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、甚至更优选至少95%互补,所述靶序

列选自由以下项组成的组:SEQ ID NO:247的位置9141至9156、16184至16205、16188至16205、16184至16203、16184至16200、16186至16203、16189至16205或30536至30553。

[0929] 54.根据权项46至53中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列与靶序列100%互补,所述靶序列选自由以下项组成的组:SEQ ID NO:247的位置9141至9156、16184至16205、16188至16205、16184至16203、16184至16200、16186至16203、16189至16205或30536至30553。

[0930] 55.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述FUBP1抑制剂选自单链反义寡核苷酸、siRNA或shRNA分子。

[0931] 56.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述FUBP1抑制剂为单链反义寡核苷酸。

[0932] 57.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述FUBP1抑制剂为长度为12至30个核苷酸的单链反义寡核苷酸,其包含与哺乳动物FUBP1,特别是人FUBP1互补的、至少10个核苷酸的连续核苷酸序列,其中所述寡核苷酸能够抑制FUBP1的表达。

[0933] 58.根据权项57所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列的长度为10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个核苷酸。

[0934] 59.根据权项57或58所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列的长度为12个至25个,特别是15个至21个核苷酸。

[0935] 60.根据权项56至59中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述单链反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:275至330组成的组的序列或由其组成。

[0936] 61.根据权项56至60中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述反义寡核苷酸包含一个或多个2'糖修饰的核苷。

[0937] 62.根据权项61所述的组合物或试剂盒,其中所述一个或多个2'糖修饰的核苷独立地选自由以下项组成的组:2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、阿糖核酸(ANA)、2'-氟-ANA和LNA核苷

[0938] 63.根据权项61或62所述的组合物或试剂盒,其中所述一个或多个所述2'糖修饰的核苷为LNA核苷。

[0939] 64.根据权项56至63中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述反义寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键。

[0940] 65.根据权项56至64中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述连续核苷酸序列内的所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

[0941] 66.根据权项56至65中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述寡核苷酸能够募集RNA酶H。

[0942] 67.根据权项56至66中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列由式5'-F-G-F'-3'的间隔聚体组成或包含所述间隔聚体,其中区域F和F'独立地包含1-4个2'糖修饰的核苷,并且G是能够募集RNA酶H的介于6个与16个之间的核苷的区域,例如包含介于6个与18个之间的DNA核苷的区域。

[0943] 68.根据权项56至67中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述能够抑制FUBP1的表达的单链反义寡核苷酸选自包含以下项或由以下项组成的反义寡核苷酸组:

[0944] CTTatGctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[0945] CTTaTgctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[0946] CTtATgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[0947] CTtAtgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[0948] CTtAtgctttttatGgTT(SEQ ID NO:326),

[0949] CTtAtgctttttatGGTT(SEQ ID NO:326),

[0950] GcttTttatggtTtCAC(SEQ ID NO:327),

[0951] TATgcTttttatggtTTC(SEQ ID NO:328),

[0952] AcCAAttttcatttCtAC(SEQ ID NO:329),以及

[0953] CccccataaccataGTC(SEQ ID NO:330);

[0954] 优选CTtAtgctttttatGgTT(SEQ ID NO:326);或者

[0955] CccccataaccataGTC(SEQ ID NO:330);

[0956] 其中大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,并且所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

[0957] 69.根据权项55所述的组合物或试剂盒,其中所述FUBP1抑制剂为shRNA。

[0958] 70.根据权项55所述的组合物或试剂盒,其中所述FUBP1抑制剂为siRNA。

[0959] 71.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述FUBP1抑制剂共价连接至至少一个缀合物部分。

[0960] 72.根据权项71所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分包含至少一个选自由以下项组成的组的脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分:半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰基-半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-丙酰基-半乳糖胺、N-正丁酰基-半乳糖胺和N-异丁酰基半乳糖胺。

[0961] 73.根据权项72所述的组合物或试剂盒,其中所述脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分为N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

[0962] 74.根据权项71或72所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分相对于脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分为一价、二价、三价或四价。

[0963] 75.根据权项74所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分由两个至四个末端GalNAc部分和将每一个GalNAc部分连接至可与反义化合物缀合的支链分子的间隔物组成。

[0964] 76.根据权项75所述的组合物或试剂盒,其中所述间隔物为PEG间隔物。

[0965] 77.根据权项71至76中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分为三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分。

[0966] 78.根据权项71至77中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分选自图5中的三价GalNAc部分中的一者。

[0967] 79.根据任一权项71所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物部分为图5中的三价GalNAc部分,诸如图5D-1或图5D-2的三价GalNAc部分或者两者的混合物。

[0968] 80.根据权项71至79中任一项所述的组合物或试剂盒,其包含定位于所述反义寡核苷酸和所述缀合物部分之间的接头,优选地其中所述接头为CA DNA二核苷酸。

[0969] 81.根据权项71至80中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物选自由以下项组成的组:

[0970] 5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$T$_s$a$_s$t$_s$G$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T、

[0971] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$T$_s$a$_s$T$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T、

[0972] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$T$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T$_s$T、

[0973] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T$_s$T、

[0974] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$G$_s$g$_s$T$_s$T、

[0975] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$G$_s$G$_s$T$_s$T、

[0976] 5’-GN2-C6$_o$[X]G$_s$c$_s$t$_s$t$_s$T$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$g$_s$t$_s$T$_s$t$_s$^{m}C$_s$A$_s$^{m}C、

[0977] 5’-GN2-C6$_o$[X]T$_s$A$_s$T$_s$g$_s$c$_s$T$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$g$_s$t$_s$T$_s$T$_s$^{m}C、

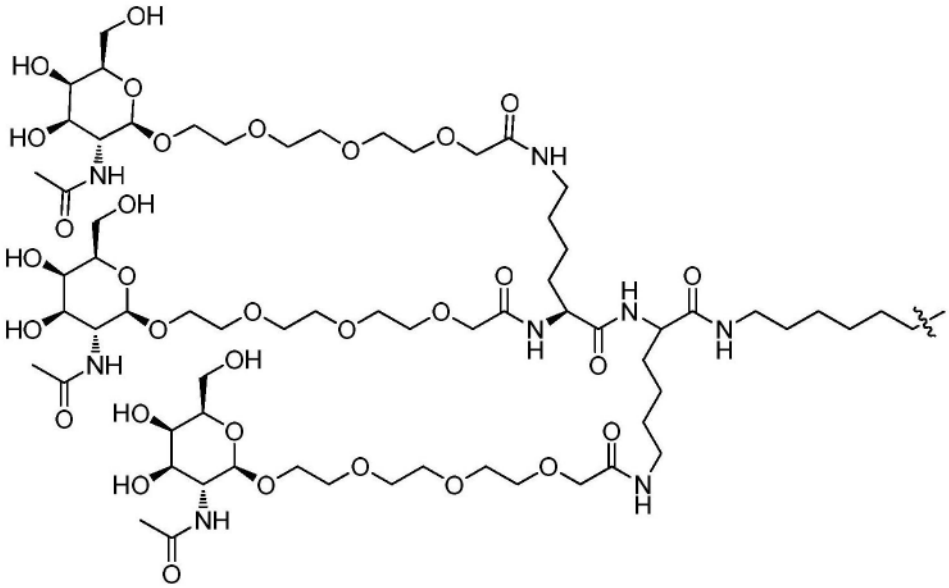
[0978] 5’-GN2-C6$_o$[X]A$_S$c$_S$^{m}C$_S$A$_S$A$_S$t$_S$t$_S$t$_S$t$_S$c$_S$a$_S$t$_S$t$_S$t$_S$^{m}C$_S$tA$_S$^{m}C和

[0979] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$c$_s$c$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$a$_s$c$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$G$_s$T$_s$^{m}C$_s$;

[0980] 优选5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$G$_s$g$_s$T$_s$;或者

[0981] 5’-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$c$_s$c$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$a$_s$c$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$G$_s$T$_s$^{m}C$_s$;

[0982] 其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中每个LNA胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,^{m}C是5-甲基胞嘧啶DNA,并且其中下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,下标o代表磷酸二酯核苷间键,GN2-C6是下式的残基:

[0983] 

[0984] 其中残基GN2-C6经由磷酸二酯键连接在寡核苷酸的5’末端,和/或其中GN2-C6是图5D1或图5D2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),或两者的混合物,更优选其中GN2-C6是图5D1或图5D2中所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基的混合物,并且其中[X]代表根据前述的c$_o$a$_o$。

[0985] 82.根据权项71至81中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图8所示的缀合物。

[0986] 83.根据权项71至81中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图9所示的缀合物。

[0987] 84.根据权项71至81中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图10所示的缀合物。

[0988] 85.根据权项71至81中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图11所示的缀合物。

[0989] 86.根据权项71至81中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图12所示的缀合物。

[0990] 87.根据权项71至81中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图13所示的缀合物。

[0991] 88.根据权项71至81中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图14所示的缀合物。

[0992] 89.根据权项71至81中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图15所示的缀合物。

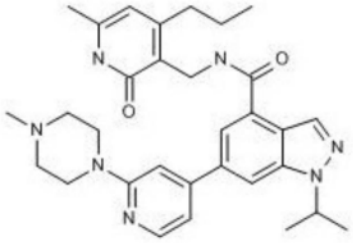
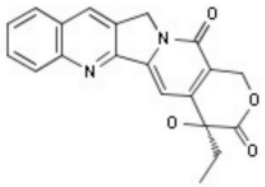
[0993] 90.根据权项71至81中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述缀合物为如图16所示的缀合物。

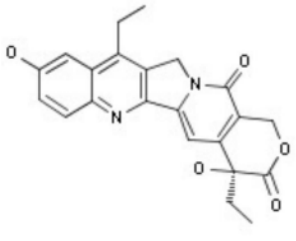
[0994] 91.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述FUBP1抑制剂呈药用盐的形式。

[0995] 92.根据权项91所述的组合物或试剂盒,其中所述盐为钠盐、钾盐或铵盐。

[0996] 93.根据前述权项中任一项的组合物或试剂盒,其中所述组合物包含水性稀释剂或溶剂,诸如磷酸盐缓冲盐水

[0997] 94.根据权利要求1至44中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述FUBP1抑制剂选自式VII、IX或X的化合物

[0998]  VIII  IX

 X

[0999] 95.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂是包含以下项或由以下项组成的能够抑制RTEL1表达的单链反义寡核苷酸:AATTttacatactctgGT(SEQ ID NO:243),并且其中所述FUBP1的抑制剂是能够减少FUBP1表达的单链反义寡核苷酸,其选自包含以下项或由以下项组成的反义寡核苷酸组:

[1000] CTTatGctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[1001] CTTaTgctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[1002] CTtATgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[1003] CTtAtgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[1004] CTtAtgctttttatGgTT(SEQ ID NO:326),

[1005] CTtAtgctttttatGGTT(SEQ ID NO:326),

[1006] GcttTttatggtTtCAC(SEQ ID NO:327),

[1007] TATgcTttttatggtTTC(SEQ ID NO:328),

[1008] AcCAAttttcatttCtAC(SEQ ID NO:329),以及

[1009] CcccataaccataGTC(SEQ ID NO:330);

[1010] 其中大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,并且所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

[1011] 96.根据95所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂是由5'-GN2-C6$_o$[X]A$_s$A$_s$T$_s$T$_s$t$_s$t$_s$a$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$c$_s$t$_s$c$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T组成的缀合物,诸如图1所示,并且

[1012] 其中所述FUBP1的抑制剂是选自由以下项组成的组的缀合物:

[1013] 如图8所示的5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$T$_s$a$_s$t$_s$G$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T,

[1014] 如图9所示的5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$T$_s$a$_s$T$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T,

[1015] 如图10所示的5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$T$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T$_s$T,

[1016] 如图11所示的5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T$_s$T,

[1017] 如图12所示的5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$G$_s$g$_s$T$_s$T,

[1018] 如图13所示的5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$G$_s$G$_s$T$_s$T,

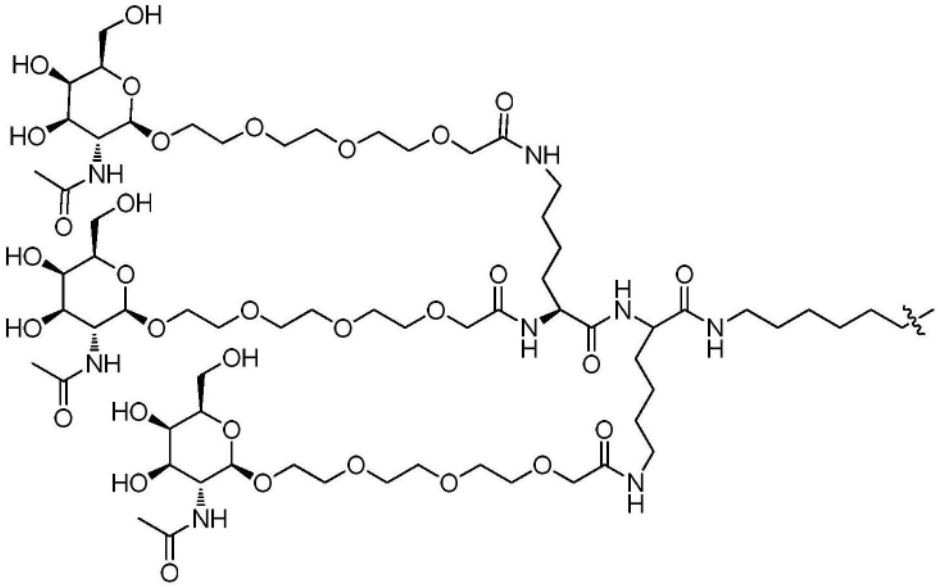
[1019] 如图14所示的5'-GN2-C6$_o$[X]G$_s$c$_s$t$_s$t$_s$T$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$g$_s$t$_s$T$_s$t$_s$^{m}C$_s$A$_s$^{m}C,

[1020] 如图15所示的5'-GN2-C6$_o$[X]T$_s$A$_s$T$_s$g$_s$c$_s$T$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$g$_s$t$_s$T$_s$T$_s$^{m}C,

[1021] 如图16所示的5'-GN2-C6$_o$[X]A$_S$c$_S$^{m}C$_S$A$_S$A$_S$t$_S$t$_S$t$_S$t$_S$c$_S$a$_S$t$_S$t$_S$t$_S$^{m}C$_S$tA$_S$^{m}C,以及

[1022] 5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$c$_s$c$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$a$_s$c$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$G$_s$T$_s$^{m}C$_s$;

[1023] 其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中每个LNA胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,^{m}C是5-甲基胞嘧啶DNA,并且其中下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,下标o代表磷酸二酯核苷间键,GN2-C6是下式的残基:

[1024] 

[1025] 其中残基GN2-C6经由磷酸二酯键连接在寡核苷酸的5'末端,和/或其中GN2-C6是图5D1或图5D2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),或两者的混合物,更优选其中GN2-C6是图5D1或图5D2中所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基的混合物,并且其中[X]代表根据前述的c$_o$a$_o$。

[1026] 97.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂是包

含以下项或由以下项组成的能够抑制RTEL1表达的单链反义寡核苷酸：AAttttacatactctGGTC(SEQ ID NO:244),并且

[1027] 其中所述FUBP1的抑制剂是能够减少FUBP1表达的单链反义寡核苷酸,其选自包含以下项或由以下项组成的反义寡核苷酸组：

[1028] CTTatGctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[1029] CTTaTgctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[1030] CTtATgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[1031] CTtAtgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[1032] CTtAtgctttttatGgTT(SEQ ID NO:326),

[1033] CTtAtgctttttatGGTT(SEQ ID NO:326),

[1034] GcttTttatggtTtCAC(SEQ ID NO:327),

[1035] TATgcTttttatggtTTC(SEQ ID NO:328),

[1036] AcCAAttttcatttCtAC(SEQ ID NO:329),以及

[1037] CcccataaccataGTC(SEQ ID NO:330);其中大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,并且所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

[1038] 98.根据权项97所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂为由5'-GN2-C6$_o$[X]$A_sA_st_st_st_st_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sG_sG_sT_s{}^mC_s$组成的缀合物,诸如图2所示,并且

[1039] 其中所述FUBP1的抑制剂是选自由以下项组成的组的缀合物：

[1040] 如图8所示的5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sT_sT_sa_st_sG_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT$,

[1041] 如图9所示的5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sT_sT_sa_sT_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT$,

[1042] 如图10所示的5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sT_st_sA_sT_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT$,

[1043] 如图11所示的5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT$,

[1044] 如图12所示的5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT$,

[1045] 如图13所示的5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sG_sG_sT_sT$,

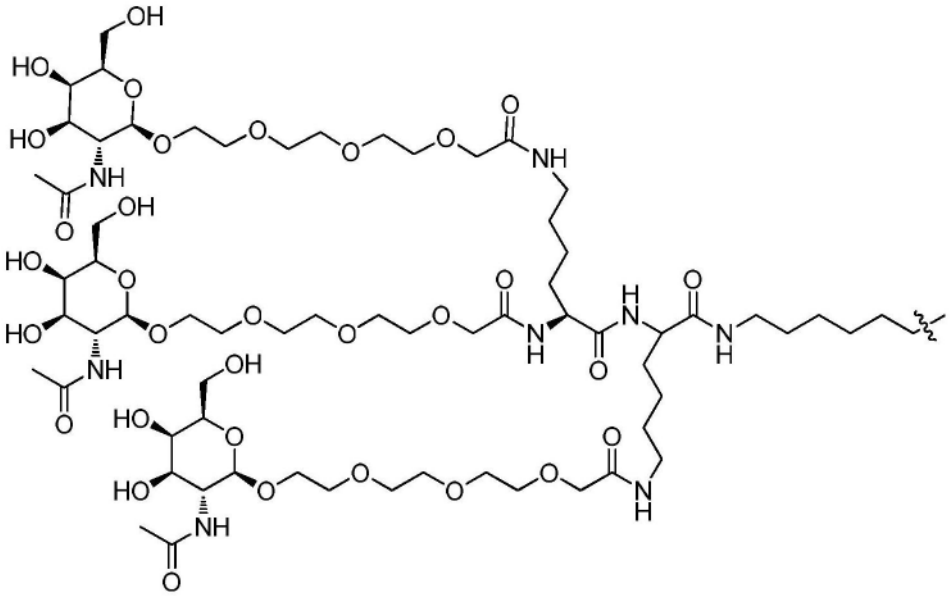
[1046] 如图14所示的5'-GN2-C6$_o$[X]$G_sc_st_st_sT_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_st_s{}^mC_sA_s{}^mC$,

[1047] 如图15所示的5'-GN2-C6$_o$[X]$T_sA_sT_sg_sc_sT_st_st_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_sT_s{}^mC$,

[1048] 如图16所示的5'-GN2-C6$_o$[X]$A_Sc_S{}^mC_SA_SA_St_St_St_Sc_Sa_St_St_S{}^mC_StA_S{}^mC$,以及

[1049] 5'-GN2-C6$_o$[X]$^mC_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG_sT_s{}^mC_s$;

[1050] 其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中每个LNA胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,^{m}C是5-甲基胞嘧啶DNA,并且其中下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,下标o代表磷酸二酯核苷间键,GN2-C6是下式的残基：

[1051] 

[1052] 其中残基GN2-C6经由磷酸二酯键连接在寡核苷酸的5’末端,和/或其中GN2-C6是图5D1或图5D2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),或两者的混合物,更优选其中GN2-C6是图5D1或图5D2中所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基的混合物。

[1053] 99.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂是包含以下项或由以下项组成的能够抑制RTEL1表达的单链反义寡核苷酸:TTacatactctggtCAAA(SEQ ID NO:245),并且其中所述FUBP1的抑制剂是能够抑制FUBP1表达的单链反义寡核苷酸,其选自包含以下项或由以下项组成的反义寡核苷酸组:

[1054] CTTatGctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[1055] CTTaTgctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[1056] CTtATgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[1057] CTtAtgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[1058] CTtAtgctttttatGgTT(SEQ ID NO:326),

[1059] CTtAtgctttttatGGTT(SEQ ID NO:326),

[1060] GcttTttatggtTtCAC(SEQ ID NO:327),

[1061] TATgcTttttatggtTTC(SEQ ID NO:328),

[1062] AcCAAttttcatttCtAC(SEQ ID NO:329),以及

[1063] CcccataaccataGTC(SEQ ID NO:330);

[1064] 优选CTtAtgctttttatGgTT(SEQ ID NO:326);

[1065] 其中大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,并且所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

[1066] 100.根据权项99所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂为由5’-GN2-$C6_o$[X]$T_sT_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sg_st_s{}^mC_sA_sA_sA_s$组成的缀合物,诸如图3所示,并且

[1067] 其中所述FUBP1的抑制剂是选自由以下项组成的组的缀合物:

[1068] 如图8所示的5’-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_sT_sa_st_sG_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT$,

[1069] 如图9所示的5’-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_sT_sa_sT_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT$,

[1070] 如图10所示的5’-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_st_sA_sT_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT$,

[1071] 如图11所示的5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$G$_s$T$_s$T,

[1072] 如图12所示的5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$G$_s$g$_s$T$_s$T,

[1073] 如图13所示的5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$G$_s$G$_s$T$_s$T,

[1074] 如图14所示的5'-GN2-C6$_o$[X]G$_s$c$_s$t$_s$t$_s$T$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$g$_s$t$_s$T$_s$t$_s$^{m}C$_s$A$_s$^{m}C,

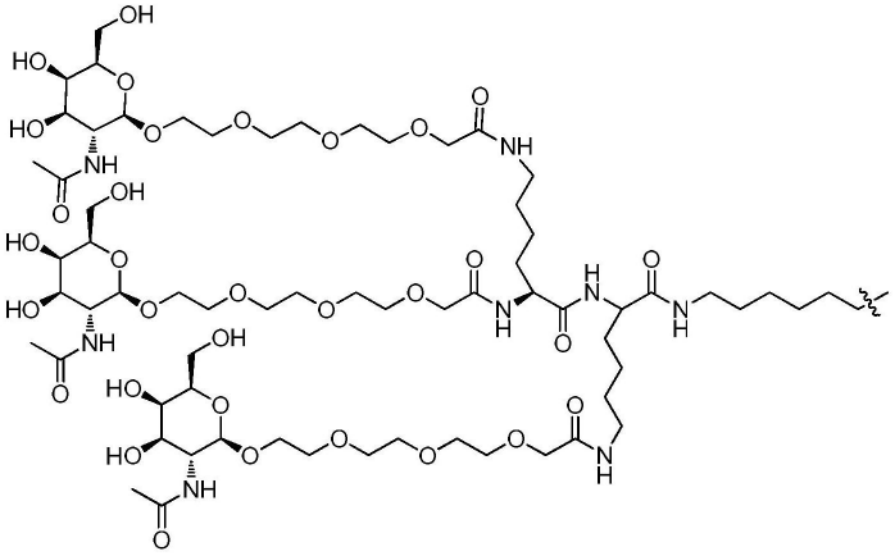
[1075] 如图15所示的5'-GN2-C6$_o$[X]T$_s$A$_s$T$_s$g$_s$c$_s$T$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$g$_s$g$_s$t$_s$T$_s$T$_s$^{m}C,

[1076] 如图16所示的5'-GN2-C6$_o$[X]A$_S$c$_S$^{m}C$_S$A$_S$A$_S$t$_S$t$_S$t$_S$t$_S$c$_S$a$_S$t$_S$t$_S$t$_S$^{m}C$_S$tA$_S$^{m}C,以及

[1077] 5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$c$_s$c$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$a$_s$c$_s$c$_s$a$_s$t$_s$a$_s$G$_s$T$_s$^{m}C$_s$;

[1078] 优选如图12所示的5'-GN2-C6$_o$[X]^{m}C$_s$T$_s$t$_s$A$_s$t$_s$g$_s$c$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$t$_s$a$_s$t$_s$G$_s$g$_s$T$_s$T;

[1079] 其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中每个LNA胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,^{m}C是5-甲基胞嘧啶DNA,并且其中下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,下标o代表磷酸二酯核苷间键,GN2-C6是下式的残基:

[1080] 

[1081] 其中残基GN2-C6经由磷酸二酯键连接在寡核苷酸的5'末端,和/或其中GN2-C6是图5D1或图5D2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),或两者的混合物,更优选其中GN2-C6是图5D1或图5D2中所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基的混合物,并且其中[X]代表根据前述的c$_o$a$_o$。

[1082] 101.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂是包含以下项或由以下项组成的能够抑制RTEL1表达的单链反义寡核苷酸:CTttattataactTgaAtCTC(SEQ ID NO:246),并且其中所述FUBP1的抑制剂是能够抑制FUBP1表达的单链反义寡核苷酸,其选自包含以下项或由以下项组成的反义寡核苷酸组:

[1083] CTTatGctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[1084] CTTaTgctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[1085] CTtATgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[1086] CTtAtgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[1087] CTtAtgctttttatGgTT(SEQ ID NO:326),

[1088] CTtAtgctttttatGGTT(SEQ ID NO:326),

[1089] GcttTttatggtTtCAC(SEQ ID NO:327),

[1090] TATgcTttttatggtTTC(SEQ ID NO:328),

[1091] AcCAAttttcatttCtAC(SEQ ID NO:329),以及

[1092] CccataaccataGTC(SEQ ID NO:330);

[1093] 其中大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,并且所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

[1094] 102.根据权项101所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂为由5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_sT_sg_sa_sA_st_s{}^mC_sT_s{}^mC_s$组成的缀合物,诸如图4所示,并且

[1095] 其中所述FUBP1的抑制剂是选自由以下项组成的组的缀合物:

[1096] 如图8所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_sT_sa_st_sG_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT$,

[1097] 如图9所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_sT_sa_sT_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT$,

[1098] 如图10所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_st_sA_sT_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT$,

[1099] 如图11所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT$,

[1100] 如图12所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT$,

[1101] 如图13所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sG_sG_sT_sT$,

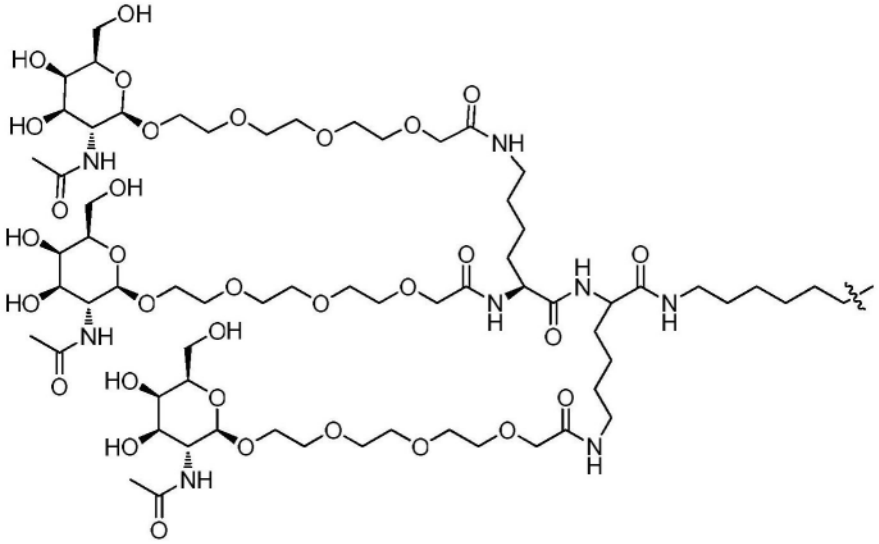
[1102] 如图14所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$G_sc_st_st_sT_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_st_s{}^mC_sA_s{}^mC$,

[1103] 如图15所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$T_sA_sT_sg_sc_sT_st_st_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_sT_s{}^mC$,

[1104] 如图16所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$A_Sc_S{}^mC_SA_SA_St_St_St_St_Sc_Sa_St_St_St_S{}^mC_StA_S{}^mC$,以及

[1105] 5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG_sT_s{}^mC_s$;

[1106] 其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中每个LNA胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,^mC是5-甲基胞嘧啶DNA,并且其中下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,下标o代表磷酸二酯核苷间键,GN2-C6是下式的残基:

[1107] 

[1108] 其中残基GN2-C6经由磷酸二酯键连接在寡核苷酸的5'末端,和/或其中GN2-C6是图5D1或图5D2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),或两者的混合物,更优选其中GN2-C6是图5D1或图5D2中所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基的混合物,并且其中[X]代表根据前述的c_oa_o。

[1109] 103.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂是包含以下项或由以下项组成的能够抑制RTEL1表达的单链反义寡核苷酸:CTttattataacttgaaTCTC(SEQ ID NO:246),并且其中所述FUBP1的抑制剂是能够抑制FUBP1

表达的单链反义寡核苷酸,其选自包含以下项或由以下项组成的反义寡核苷酸组:

[1110] CTTatGctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[1111] CTTaTgctttttatgGT(SEQ ID NO:325),

[1112] CTtATgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[1113] CTtAtgctttttatgGTT(SEQ ID NO:326),

[1114] CTtAtgctttttatGgTT(SEQ ID NO:326),

[1115] CTtAtgctttttatGGTT(SEQ ID NO:326),

[1116] GcttTttatggtTtCAC(SEQ ID NO:327),

[1117] TATgcTttttatggtTTC(SEQ ID NO:328),

[1118] AcCAAttttcatttCtAC(SEQ ID NO:329),以及

[1119] CcccataaccataGTC(SEQ ID NO:330);

[1120] 优选CcccataaccataGTC(SEQ ID NO:330);

[1121] 其中大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,并且所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

[1122] 104.根据权项103所述的组合物或试剂盒,其中所述RTEL1的抑制剂为由5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_st_sg_sa_sa_sT_s{}^mC_sT_s{}^mC_s$组成的缀合物,并且

[1123] 其中所述FUBP1的抑制剂是选自由以下项组成的组的缀合物:

[1124] 如图8所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_sT_sa_st_sG_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT$,

[1125] 如图9所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_sT_sa_sT_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT$,

[1126] 如图10所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_st_sA_sT_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT$,

[1127] 如图11所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT$,

[1128] 如图12所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT$,

[1129] 如图13所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sG_sG_sT_sT$,

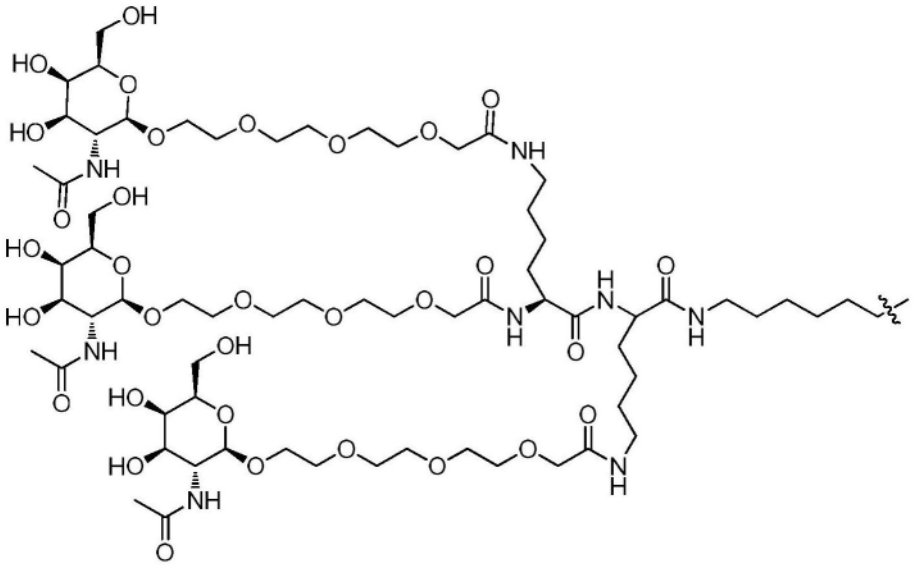
[1130] 如图14所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$G_sc_st_st_sT_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_st_s{}^mC_sA_s{}^mC$,

[1131] 如图15所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$T_sA_sT_sg_sc_sT_st_st_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_sT_s{}^mC$,

[1132] 如图16所示的5'-GN2-$C6_o$[X]$A_Sc_S{}^mC_SA_SA_St_St_St_St_Sc_Sa_St_St_St_S{}^mC_StA_S{}^mC$,以及

[1133] 5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG_sT_s{}^mC_s$;

[1134] 优选5'-GN2-$C6_o$[X]$^mC_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG_sT_s{}^mC_s$;其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中每个LNA胞嘧啶为5-甲基胞嘧啶,且^mC是5-甲基胞嘧啶DNA,并且其中下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,且下标o代表磷酸二酯核苷间键,且GN2-C6是下式的残基:

[1135] 

[1136] 其中残基GN2-C6经由磷酸二酯键连接在寡核苷酸的5'末端,和/或其中GN2-C6是图5D1或图5D2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),或两者的混合物,更优选其中GN2-C6是图5D1或图5D2中所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基的混合物,并且其中[X]代表根据前述的$c_o a_o$。

[1137] 105.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其用于在疾病的治疗或预防中使用。

[1138] 106.根据前述权项中任一项所述的组合物或试剂盒,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗或预防中使用。

[1139] 107.一种RTEL1的抑制剂,其用于在疾病的治疗或预防中使用,其中所述治疗或预防进一步包括施用FUBP1的抑制剂。

[1140] 108.一种RTEL1的抑制剂,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染和/或癌症的治疗或预防中使用,优选在处于发展HBV相关肝细胞癌(HCC)的风险中、已发展或先前已发展HBV相关肝细胞癌(HCC)的受试者中使用,其中所述治疗或预防进一步包括施用FUBP1的抑制剂。

[1141] 109.根据权项107或108中任一项所述使用的RTEL1的抑制剂,其中所述RTEL1的抑制剂是根据权项4至44中任一项所定义的抑制剂。

[1142] 110.一种FUBP1的抑制剂,其用于在疾病的治疗或预防中使用,其中所述治疗或预防进一步包括施用RTEL1的抑制剂。

[1143] 111.一种FUBP1的抑制剂,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染和/或癌症的治疗或预防中使用,优选在处于发展HBV相关肝细胞癌(HCC)的风险中、已发展或先前已发展HBV相关肝细胞癌(HCC)的受试者中使用,其中所述治疗或预防进一步包括施用RTEL1的抑制剂。

[1144] 112.根据权项110或111中任一项所述使用的FUBP1的抑制剂,其中所述FUBP1的抑制剂是根据权项45至94中任一项所定义的抑制剂。

[1145] 113.一种RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的组合,其用于在疾病的治疗或预防中使用。

[1146] 114.一种RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的组合,其用于在疾病的治疗或预防中使用;其中所述RTEL1的抑制剂是根据权项4至44中任一项所述的抑制剂。

[1147] 115.根据权项113或114所述的RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的组合;其中所述

FUBP1的抑制剂是根据权项45至94中任一项所述的抑制剂。

[1148] 116.一种RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的组合,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染和/或癌症的治疗或预防中使用,优选在处于发展HBV相关肝细胞癌(HCC)的风险中、已发展或先前已发展HBV相关肝细胞癌(HCC)的受试者中使用。

[1149] 117.根据权项116所述使用的RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的组合,其中所述RTEL1的抑制剂是根据权项4至44中任一项所述的抑制剂。

[1150] 118.根据权项116或117所述使用的RTEL1的抑制剂和FUBP1的抑制剂的组合;其中所述FUBP1的抑制剂是根据权项45至94中任一项所述的抑制剂。

[1151] 119.根据权项105或106所述使用的组合物或试剂盒;根据权项107至109中任一项所述使用的RTEL1的抑制剂;根据权项110至112中任一项所述使用的FUBP1的抑制剂;或者根据权项113至118中任一项所述使用的组合,其中所述HBV感染是慢性HBV感染。

[1152] 120.根据权项105或106所述使用的组合物或试剂盒;根据权项107至109中任一项所述使用的RTEL1的抑制剂;根据权项110至112中任一项所述使用的FUBP1的抑制剂;或者根据权项113至118中任一项所述使用的组合,其中所述RTEL1的抑制剂能够减少受感染细胞中的cccDNA。

[1153] 121.根据权项120所述使用的组合物或试剂盒;使用的RTEL1的抑制剂;使用的FUBP1的抑制剂;或使用的组合,其中与对照相比,HBV受感染细胞中的cccDNA减少至少60%。

[1154] 122.一种用于治疗或预防疾病的方法,所述方法包括向患有或易患所述疾病的受试者施用治疗或预防有效量的RTEL1的抑制剂,其中所述方法进一步包括施用有效量的FUBP1的抑制剂。

[1155] 123.一种用于治疗或预防疾病的方法,所述方法包括向患有或易患所述疾病的受试者施用治疗或预防有效量的FUBP1的抑制剂,其中所述方法进一步包括施用有效量的RTEL1的抑制剂。

[1156] 124.一种用于治疗或预防疾病的方法,所述方法包括向患有或易患所述疾病的受试者施用治疗或预防有效量的RTEL1的抑制剂和治疗或预防有效量的FUBP1的抑制剂的组合。

[1157] 125.FUBP1的抑制剂和RTEL1的抑制剂用于制备药物的用途,所述药物用于治疗或预防乙型肝炎病毒(HBV)和/或癌症。

[1158] 126.根据权项122至125中任一项所述的方法或用途,其中所述疾病是乙型肝炎病毒(HBV)感染和/或癌症。

[1159] 127.根据权项122至126中任一项所述的方法或用途,其中所述疾病是慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染。

[1160] 128.一种用于在表达RTEL1和FUBP1的靶细胞中调节RTEL1和FUBP1表达的体内或体外方法,所述方法包括向所述细胞施用有效量的FUBP1的抑制剂和RTEL1的抑制剂。

[1161] 129.根据权项122至128中任一项所述的方法或用途,其中所述RTEL1的抑制剂是根据权项4至44中任一项所定义的抑制剂或者根据权项2所述的药物组合物。

[1162] 130.根据权项122至129中任一项所述的方法或用途,其中所述FUBP1的抑制剂是根据权项45至94中任一项所定义的抑制剂或者根据权项2所述的药物组合物。

[1163] 131.一种包含能够减少RTEL1和FUBP1的表达的反义寡核苷酸或由其组成的化合物,其中所述反义寡核苷酸选自具有包含以下项或由以下项组成的核苷酸序列的反义寡核苷酸组:

[1164] CCCCATAACCATAGTCCACTTTATTATAACTTGAATCTC(SEQ ID NO:348);

[1165] CTTTATTATAACTTGAATCTCCACCCCATAACCATAGTC(SEQ ID NO:349);

[1166] CTTATGCTTTTTATGGTTCATTACATACTCTGGTCAAA(SEQ ID NO:350);或者

[1167] TTACATACTCTGGTCAAACACTTATGCTTTTTATGGTT(SEQ ID NO:351);

[1168] 优选地,

[1169] CTTATGCTTTTTATGGTTCATTACATACTCTGGTCAAA(SEQ ID NO:350);或者

[1170] TTACATACTCTGGTCAAACACTTATGCTTTTTATGGTT(SEQ ID NO:351)。

[1171] 132.一种包含能够减少RTEL1和FUBP1的表达的反义寡核苷酸或由其组成的化合物,其中所述反义寡核苷酸选自包含以下项或由以下项组成的反义寡核苷酸组:

[1172] $^{m}C_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG_sT_s{}^{m}C_oc_oa_o{}^{m}C_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_st_sg_sa_sa_sT_s{}^{m}C_sT_s{}^{m}C$;

[1173] $^{m}C_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_st_sg_sa_sa_sT_s{}^{m}C_sT_s{}^{m}C_oc_oa_o{}^{m}C_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG_sT_s{}^{m}C$;

[1174] $^{m}C_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT_oc_oa_oT_sT_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sg_st_s{}^{m}C_sA_sA_sA$;或者

[1175] $T_sT_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sg_st_s{}^{m}C_sA_sA_sA_oc_oa_o\ {}^{m}C_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT$;

[1176] 其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中^{m}C是5-甲基胞嘧啶LNA,并且其中下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,下标o代表磷酸二酯核苷间键。

[1177] 133.一种包含能够减少RTEL1和FUBP1的表达的反义寡核苷酸或由其组成的化合物,其中所述反义寡核苷酸选自包含以下项或由以下项组成的反义寡核苷酸组:

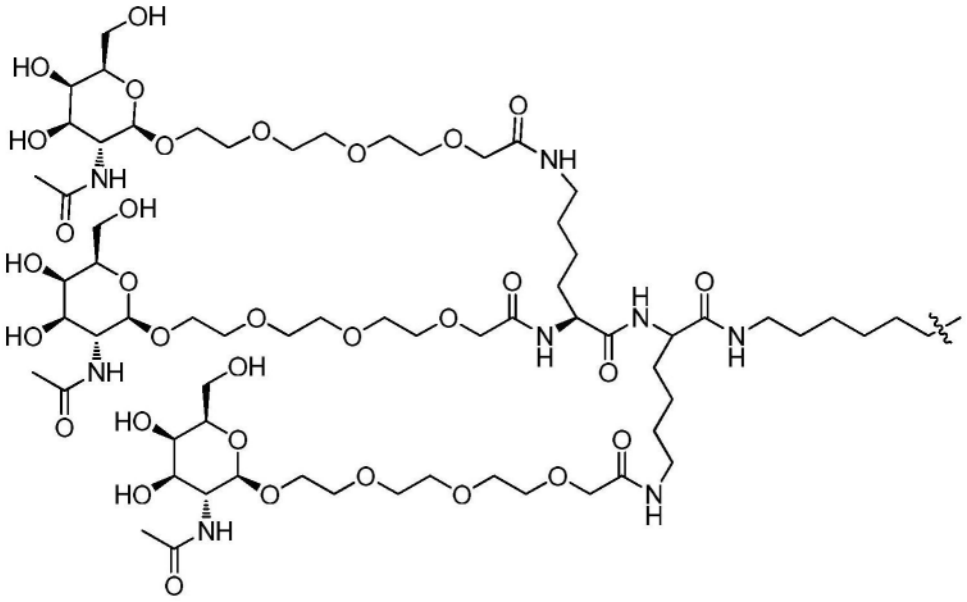
[1178] 5'-GN2-C6$_o$[X]$^{m}C_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG_sT_s{}^{m}C_oc_oa_o{}^{m}C_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_st_sg_sa_sa_s\ T_s{}^{m}C_sT_s{}^{m}C$;

[1179] 5'-GN2-C6$_o$[X]$^{m}C_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_st_sg_sa_sa_sT_s{}^{m}C_sT_s{}^{m}C_oc_oa_o{}^{m}C_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st\ _sa_sG_sT_s{}^{m}C$;

[1180] 5'-GN2-C6$_o$[X]$^{m}C_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT_oc_oa_oT_sT_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sg_st_s{}^{m}C_s\ A_sA_sA$,或者

[1181] 5'-GN2-C6$_o$[X]$T_sT_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sg_st_s{}^{m}C_sA_sA_sA_oc_oa_o\ {}^{m}C_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT$;

[1182] 其中大写字母代表β-D-氧基LNA核苷,小写字母代表DNA核苷,其中^{m}C是5-甲基胞嘧啶LNA,并且其中下标s代表硫代磷酸酯核苷间键,下标o代表磷酸二酯核苷间键,GN2-C6是下式的残基:

[1183] 

[1184] 其中残基GN2-C6经由磷酸二酯键连接在寡核苷酸的5'末端,和/或其中GN2-C6是图5D1或图5D2的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),或两者的混合物,更优选其中GN2-C6是图5D1或图5D2中所示的三价N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基的混合物,并且其中[X]代表根据前述的$c_o a_o$。

[1185] 134.一种包含能够减少RTEL1和FUBP1的表达的反义寡核苷酸或由其组成的化合物,其中所述反义寡核苷酸选自具有包含以下项或由以下项组成的序列的反义寡核苷酸组:表12D或表15B中所示的HELM序列中的任一者。

[1186] 135.根据权项131至134中任一项所述的化合物,其用于在疾病、优选乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗或预防中使用。

[1187] 136.根据权项131至134中任一项所述的化合物,其用于在乙型肝炎病毒(HBV)感染和/或癌症的治疗或预防中使用,优选在处于发展HBV相关肝细胞癌(HCC)的风险中、已发展或先前已发展HBV相关肝细胞癌(HCC)的受试者中使用。

[1188] 137.一种用于治疗或预防疾病、优选乙型肝炎病毒(HBV)感染和/或癌症的方法,更优选在处于发展HBV相关肝细胞癌(HCC)的风险中、已发展或先前已发展HBV相关肝细胞癌(HCC)的受试者中的方法,所述方法包括施用治疗或预防有效量的根据权项131至134中任一项所述的化合物。

[1189] 138.根据权项13至134中任一项所述的化合物用于制备药物的用途,所述药物用于治疗或预防乙型肝炎病毒(HBV)和/或癌症。

[1190] 139.一种用于在表达RTEL1和FUBP1的靶细胞中调节RTEL1和FUBP1表达的体内或体外方法,所述方法包括向所述细胞施用根据权项131至134中任一项所述的化合物。

[1191] 实例

[1192] 实例1-靶向RTEL1的反义寡核苷酸

[1193] 材料和方法

[1194] 寡核苷酸合成

[1195] 寡核苷酸合成是本领域公知的。以下是可以实施的方案。就设备、载体和所用浓度而言,本发明的寡核苷酸可以通过略有变化的方法来产生。

[1196] 使用亚磷酰胺方法在Oligomaker 48上以1μmol规模在尿苷通用载体上合成寡核苷酸。合成结束时,使用氨水于60℃将寡核苷酸从固体支持物上切割5-16小时。通过反相HPLC(RP-HPLC)或通过固相萃取纯化寡核苷酸,并通过UPLC进行表征,并通过ESI-MS进一步确认分子量。

[1197] 通过使用5'-O-DMT保护的亚酰胺在乙腈中的0.1M溶液和DCI(4,5-二氰基咪唑)在乙腈(0.25M)中用作活化剂,进行β-氰基乙基亚磷酰胺的偶联(DNA-A(Bz)、DNA-G(ibu)、DNA-C(Bz)、DNA-T、LNA-5-甲基-C(Bz)、LNA-A(Bz)、LNA-G(dmf)或LNA-T)。对于最后的循环,可以使用具有所需修饰的亚磷酰胺,例如,用于附接缀合物基团或这样的缀合物基团的C6接头。通过使用氢化黄原素(0.01M,在乙腈/吡啶9:1中)进行硫醇化以引入硫代磷酸酯键。可利用0.02摩尔的碘于THF/吡啶/水7:2:1引入磷酸二酯键。其余试剂是通常用于寡核苷酸合成的试剂。

[1198] 对于固相合成后的缀合,可以在固相合成的最后一个循环中使用可商购的C6氨基接头亚磷酰胺,并且在脱保护并从固体载体上裂解后,分离出氨基连接的脱保护的寡核苷酸。使用标准合成方法通过官能团的活化来引入缀合物。

[1199] 粗制化合物在Phenomenex Jupiter®C18 10μ150x10 mm色谱柱上通过制备型RP-HPLC纯化。0.1M醋酸铵pH 8和乙腈以5mL/min的流速用作缓冲液。将收集的级分冻干以给出纯化的化合物,通常为白色固体。

[1200] 缩写:

[1201] DCI:4,5-二氰基咪唑

[1202] DCM:二氯甲烷

[1203] DMF:二甲基甲酰胺

[1204] DMT:4,4'-二甲氧基三苯甲基

[1205] THF:四氢呋喃

[1206] Bz:苯甲酰基

[1207] Ibu:异丁酰基

[1208] RP-HPLC:反相高效液相色谱

[1209] 原代人肝细胞(PXB-PHH)

[1210] 从人源化小鼠(uPA/SCID小鼠)(本文称为PHH)收获的新鲜原代人肝细胞(PXB-PHH)

[1211] 以96孔格式从PhoenixBio Co.,Ltd(Japan)获得,并在改良的肝细胞克隆生长培养基(dHCGM)中培养。dHCGM是一种DMEM培养基,其含有100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、20mM Hepes、44mM $NaHCO_3$、15μg/ml L-脯氨酸、0.25μg/ml胰岛素、50nM地塞米松、5ng/ml EGF、0.1mM Asc-2P、2%DMSO和10%FBS(Ishida等人,2015)。

[1212] 将细胞在37℃于具有5% CO_2的潮湿气氛中进行培养。除周末外,每2天更换一次培养基直至收获。

[1213] HBV感染和寡核苷酸处理(RTEL1)

[1214] 将PHH与HBV(从慢性乙型肝炎(CHB)个体中纯化)以40的感染复数(MOI)以及4%PEG一起孵育24小时。次日除去病毒接种物并用PBS洗涤细胞3次,然后添加新鲜培养基。

[1215] 为了建立cccDNA,在HBV感染后第3天开始在PHH中处理化合物。细胞以1:10稀释阶

梯剂量反应方式从10μM开始给药。在HBV感染后第3天、第5天和第7天,以最终体积为100μl/孔的dHCGM培养基向细胞给予寡核苷酸化合物。感染后第5天开始10nM恩替卡韦(ETV)处理,确保通过qPCR测量真实的cccDNA,并且每两天(周末除外)更换一次包含10nM ETV的培养基,直到HBV感染后第16天收获细胞。所有实验以三次生物重复进行。

[1216] HBV感染和寡核苷酸处理(FUBP1)

[1217] 到达后,通过在PHH培养基中用HBV在4%(v/v)PEG中的溶液孵育PHH细胞16小时,使用慢性患者衍生的纯化接种物(基因型C)以MOI 110感染PHH。然后将细胞用PBS洗涤三次,并在新鲜PHH培养基中在含5%CO_2的潮湿气氛中培养。感染后四天,用终浓度为10μM的FUBP1 LNA(见表11)处理细胞,重复两次或用PBS作为无药对照(NDC)。在处理当天,从细胞中去除旧培养基,并且由400μl/孔的新鲜PHH培养基替换该旧培养基。对于每个孔,将100μL的50μM的每种FUBP1 LNA或作为NDC的PBS添加至400μL的PHH培养基。在感染后第4、11和18天重复相同的处理3次。在感染后的第7天、第14天和第21天,每三天一次用新鲜的细胞培养基更换原细胞培养基。

[1218] 细胞内RTEL1 RNA的实时PCR

[1219] 使用Qiagen BioRobot通用系统和

[1220] RNeasy 96孔提取板(RNeasy 96BioRobot 8000试剂盒(12)/目录号IID:967152)

[1221] 根据制造商的方案从细胞提取总mRNA。在ABIQuantStudio™12k Flex上使用实时PCR分析mRNA表达水平。在技术重复中使用TaqMan Fast Advanced Master Mix(Life Technologies,目录号4444558)通过qPCR对β-肌动蛋白(ACT B)进行定量。使用Fast SYBR™Green Master Mix(Life Technologies,目录号4385612)对RTEL1基因进行qPCR。结果相对于人ACT B内源性对照物进行标准化。使用比较周期阈值2-ΔΔCt方法分析mRNA表达,该方法针对参考基因ACT B和未处理的细胞进行了标准化。表16列出了用于ACTB RNA和RTEL1 RNA定量的引物:

[1222] 表16:ACT B和RTEL1 RNA qPCR引物

[1223]

参数	方向	引物序列	Seq ID No
RTEL1	Fwd	5'-CCATCCTGGACATTGAGGACT-3'	332

[1224]

	Rev	5'-CAGGTTCCGGGACAGGTAGTA-3'	333
管家基因引物 ACT B (VIC): Hs01060665_g1 (Thermo Fisher Scientific)			

[1225] HBV cccDNA定量

[1226] 使用SDS裂解缓冲液(50mM Tris pH8、5mM EDTA、1% SDS)从HBV感染的原代人肝细胞中提取DNA。在80μl SDS裂解缓冲液中裂解细胞后,将样品在-80℃下冷冻至少2小时。将样品在37℃下解冻,并向96孔板的每个孔中添加1μl蛋白酶K(目录号AM25448@Ambion biosciences,20mg/mL原液),并将样品在56℃下孵育30分钟。孵育后,添加来自ZYMO Research Genomic DNA Clean&Concentrator试剂盒(ZymoResearch,目录号D4067)的3体积ChIP DNA结合缓冲液,并按照制造商的方案纯化DNA。将DNA在20μl DNA洗脱缓冲液中洗脱,并使用2μl DNA进行qPCR。

[1227] 使用比较循环阈值2-ΔΔCt方法对技术重复中的cccDNA表达水平进行定量。定量

实时聚合酶链式反应测量在QuantStudio 12K Flex PCR系统(Applied Biosystems)上进行。使用Fast SYBR™Green Master Mix(Life Technologies,目录号4385612)对线粒体DNA(mitoDNA)和作为内源对照的未处理细胞进行标准化。将循环仪设置调整为在95℃下孵育5min,然后进行45个下述循环,即95℃孵育1秒和60℃孵育35秒。使用的引物列于下表17(图表中的所有探针均为SYBR Green):

[1228] 表17:cccDNA qPCR引物。

[1229]

参数	方向	引物序列	Seq ID No
cccDNA	Fwd	5′- CGTCTGTGCCTTCTCATCTGC-3`	333
	Rev	5′- GCACAGCTTGGAGGCTTGAA -3′	334
线粒体 DNA	Fwd	5'- CCGTCTGAACTATCCTGCCC -3'	335
	Rev	5'- GCCGTAGTCGGTGTACTCGT-3'	336

[1230] 实例1.1-靶向RTEL1的反义寡核苷酸对HBV感染的PHH细胞中RTEL1 RNA和cccDNA的影响。

[1231] 使用表6中的寡核苷酸化合物测试RTEL1敲低对RTEL1 RNA和cccDNA的影响。如"材料和方法"章节所述培养PHH。如上所述,用来自表6的化合物处理HBV感染的PHH细胞。16天处理后,如上所述通过qPCR测量RTEL1 mRNA和cccDNA。结果显示在表18中,为平均无药物对照(NDC)样品的百分比(即,值越低,抑制/减少越大)。

[1232] 表18:LNA ASO敲低RTEL1后对cccDNA的影响

[1233]

CMP ID NO	SEQ ID NO	化合物	对照的cccDNA %(平均值)	cccDNA SD	对照的 RTEL %(平均值)	RTL1 SD
243_1	243	AATTttacatactctgGT	28	13	19	3
244_1	244	AAttttacatactctGGTC	3	1	24	2
245_1	245	TTacatactctggtCAAA	21	6	35	11
246_1	246	CTttattataactTgaAtCTC	39	5	21	8

[1234] 对于化合物:大写字母代表LNA核苷(使用了β-D-氧基-LNA核苷),所有LNA胞嘧啶均为5-甲基胞嘧啶,小写字母代表DNA核苷。所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键。

[1235] 实例1.2-就剂量响应曲线而言,不同浓度的靶向人MDA-MB-231细胞中RTEL1 mRNA的反义寡核苷酸的体外功效的测试。

[1236] 人MDA-MB-231细胞系购自ATCC,并按照供应商的建议保持在37℃和5% CO_2的加湿培养箱中。对于测定,将3500个细胞/孔接种在96孔板中的培养基中。将细胞培养24小时,然后添加溶解在PBS中的寡核苷酸。寡核苷酸最高筛选浓度:50μM和随后8个阶梯的1:1稀释。添加寡核苷酸后3天,收获细胞。根据制造商的说明,使用PureLink™Pro 96RNA纯化试剂盒(Thermo Fisher Scientific)提取RNA,并在50μl水中洗脱。随后将RNA用无DNA酶/RNA酶的水(Gibco)稀释10倍,并加热至90℃保持一分钟。

[1237] 对于基因表达分析,使用qScript™XLT One-Step RT-qPCR ToughMix®、Low

ROX™(Quantabio)在双链体设置中进行一步法RT-qPCR。将以下TaqMan引物测定用于qPCR:RTEL1_Hs00249668_m1[FAM-MGB]和内源性对照GUSB_Hs99999908_m1[VIC-MGB]。所有引物组均购自Thermo Fisher Scientific。IC50测定是在GraphPad Prism7.04中根据生物学重复n＝2进行的。用50μM寡核苷酸处理时的相对RTEL1 mRNA水平以对照(PBS处理的样品)的百分比形式显示在表19中。

[1238] 表19:Max K_D时的IC50值和mRNA水平

[1239]

SEQ ID NO	基序	CMP ID NO	化合物	MDA-MB-231 中的 IC_{50}	SD	MDA-MB-231 中 Max KD 时的 mRNA 水平	SD
243	aattttacatactctggt	243_1	AATTttacatactctgGT	0.6	0.1	38	1
244	aattttacatactctggtc	244_1	AAttttacatactctGGTC	0.3	0.1	14	1
245	ttacatactctggtcaaa	245_1	TTacatactctggtCAAA	0.9	0.3	9	4
246	ctttattataacttgaatctc	246_1	CTttattataactTgaAtCTC	0.4	0.1	18	3

[1240] 如图7所示,人细胞系MDA-MB-231中的浓度反应曲线显示,这些化合物在敲低人类RTEL1 mRNA方面表现出非常好的功效和效力。

[1241] 实例2-靶向FUBP1的反义寡核苷酸

[1242] 前言

[1243] 多年来,已知FUBP1的过表达和突变与癌症相关。特别是,FUBP1在人肝细胞癌(HCC)中的明显过表达支持肿瘤生长并与患者预后不良相关。

[1244] 感染的肝细胞中的HBV cccDNA负责持续的慢性感染和再激活,是所有病毒亚基因组转录本和前基因组RNA(pgRNA)的模板,以确保新合成的病毒后代和cccDNA池通过细胞内核衣壳回收而得到补充。

[1245] 在WO 2019/193165中,显示FUBP1与cccDNA稳定性相关。这种认知为HBV感染受试者体内的cccDNA去稳定化提供机会,这反过来又为彻底治愈慢性感染HBV患者创造机会。

[1246] 在该研究中,筛选了2300种靶向人FUBP1的反义寡核苷酸。在此筛选中,鉴定了对靶向人FUBP1特别有效的化合物。具体而言,鉴定了九种交替侧翼gapmer LNA寡核苷酸,它们靶向人FUBP1外显子14内的区域,并在体外赋予了人FUBP1的明显下调。此外,还鉴定了一种交替侧翼间隔聚体LNA寡核苷酸,其靶向人FUBP1外显子20内的一个区域,并且也赋予人FUBP1的明显下调。已鉴定的九种化合物的概况提供于上表12B。

[1247] 鉴定化合物的靶序列与WO 2019/193165中公开的CMP ID NO 294_1和295_1的靶序列重叠。这两种化合物在5μM时可将HeLa细胞中的FUBP1抑制至约70％。然而,这九种已鉴定的化合物显然更有效,因为它们在3.3μM时可将HeLa细胞中的FUBP1抑制至约25％至35％,或在5μM时抑制至约27％(CMP ID NO:329_1.此外,它们在靶向HeLa细胞中的FUBP1方面比CMP ID NO 291_1更有效,后者是WO 2019/193165中最好的化合物(参见实例2.1)。

[1248] 下表20提供了WO 2019/193165的现有技术化合物276_1、291_1、294_1、295_1、319_1和320_1的概述。这些化合物是具有均匀侧翼的gapmer。CMP ID NO:291_1是PHH细胞

中最好的化合物,CMP ID NO:276_1是HeLa细胞中最好的化合物。CMP ID NO 294_1和295_1是与CMP ID No:325_1、325_2、326_1、326_2、326_3、326_4;327_1和328_1最接近的化合物。CMP ID NO 319_1和320_1是与CMP ID NO:329_1最接近的化合物。

[1249] 表20:对照寡核苷酸化合物列表(如WO 2019/193165所公开)

[1250]

SEQ ID NO	基序序列	SEQ ID NO: 1 上的位置		设计	CMP ID NO	寡核苷酸化合物
		开始	结束			
276	CCCATAACC ATAGTCAT	9142	9157	3-12-2	276_1	CCCataaccatagtcAT
291	CCATTTCTTCC TATTACAA	14783	14801	3-14-2	291_1	CCAtttcttcctattacAA
294	GCTTTTTATGG TTTCACC	16183	16200	1-15-2	294_1	GcttttatggtttcaCC
295	ATGCTTTTTATGG TTTCACC	16183	16202	1-17-2	295_1	Atgctttttatggtttca CC
319	ATATTAACCTCC TATCAGT	30511	30530	1-15-3	319_1	AtattaacctcctatcAGT
320	AATATTAACCTCC TATCAG	30512	30531	3-13-3	320_1	AATattaacctcctatCAG

[1251] 对于化合物:大写字母代表LNA核苷(使用了β-D-氧基-LNA核苷),所有LNA胞嘧啶均为5-甲基胞嘧啶,小写字母代表DNA核苷。所有核苷间键均为硫代磷酸酯核苷间键

[1252] 实例2.1-在Hela细胞中测试靶向人FUBP1 mRNA的反义寡核苷酸的体外功效。

[1253] 测试了靶向FUBP1的反义寡核苷酸在从ECACC(目录号93021013)获得的人Hela细胞中降低FUBP1 mRNA表达的能力。

[1254] Hela细胞在补充有10%胎牛血清[Sigma,目录号F7524]、2mM谷氨酰胺[Sigma,G7513]、0.1mM NEAA[Sigma,M7145]和0.025mg/ml庆大霉素[Sigma,目录号G1397])的细胞培养基(EMEM[Sigma,目录号M2279]中生长。每5天用胰蛋白酶消化细胞一次,用磷酸盐缓冲盐水(PBS),[Sigma目录号14190-094]洗涤,然后加入0.25%胰蛋白酶-EDTA溶液(Sigma,T3924),在37℃°孵育2-3分钟,并且细胞播种前先研磨。

[1255] 作为实验用途,将每孔2500个细胞接种在190μL生长培养基中的96孔板(Nunc目录号167008)中。在将细胞接种到达到最终定制浓度后约24小时,添加溶于PBS的ASO。将细胞在没有任何培养基变化的情况下孵育3天。

[1256] 孵育后,通过去除培养基然后添加125μL RLT裂解缓冲液(Qiagen 79216)和125μL 70%乙醇来收获细胞。根据制造商的说明(Qiagen RNeasy 96试剂盒)纯化RNA,并在终体积为200μL的无DNA酶/RNA酶水(Gibco)中洗脱。

[1257] RNA在90℃下热激40秒以解链RNA:LNA双链体,直接移至冰中并在使用前离心。对于一步qPCR反应,将qPCR-混合物(来自QauntaBio的qScript™XLE 1-step RT-qPCRToughMix®Low ROX,货号95134-500)与两个IDT探针(最终浓度1X)混合以生成主混合物。Taqman探针购自IDT:FUBP1:Hs.PT.58.26883775(引物-探针比2,FAM)或ThermoFisher Scientific:GUSB:4326320E。然后将主混合物(6μL)和RNA(4μL,1ng/μL至

2ng/μL)在qPCR板(MicroAmp®optical 384孔,4309849)中混合。密封后,将板于室温以1000g快速旋转1分钟,然后转移至ViiaTM 7系统(Applied Biosystems,Thermo),并使用以下PCR条件:50℃持续15分钟;95℃3分钟;40个周期:95℃持续5秒,然后温度降低1.6℃/sec,接着60℃持续45秒。使用QuantStudio™ Real_time PCR软件分析数据。

[1258] 在Quantstudio7软件中捕获qPCR数据并进行原始数据质量控制。

[1259] 然后将数据导入到E-Workbook中,其中使用BioBook模板来捕获和分析数据。使用以下步骤分析数据:

[1260] 1.通过△△Ct方法计算数量(数量=2^(-Ct)*1000000000)

[1261] 2.将数量归一化为在同一孔中运行的管家基因测定的计算数量。相对靶标数量=数量_靶标/数量_管家基因

[1262] 3.每个孔的RNA敲除通过除以同一板上所有PBS处理孔的平均值计算。标准化靶标数量=(相对靶标数量/[平均值]靶标数量]_pbs_孔)*100

[1263] 4.最终数据显示为未处理(PBS)孔的百分比。

[1264] 5.对于浓度响应实验,根据每种化合物的RNA敲除值(步骤3-4)拟合了一条曲线(8或10个浓度,具体取决于稀释模型)。使用Biobook中的4参数S形剂量反应模型拟合曲线。

[1265] 表21中显示了相对FUBP1 mRNA表达水平,以相对于对照物的百分比表示,即,值越低,抑制作用越大。此外,结果在图17中示出。

[1266] 表21:抗FUBP1化合物在Hela细胞中的体外功效。将FUBP1 mRNA水平归一化为GUSB,并显示为相对于对照物的百分比。

[1267]

CMP ID NO	FUBP1 残留 mRNA 水平，相对于对照物的百分比	
	3.3 μM	5 μM
325_1	34	*nd*
325_2	26	*nd*
326_1	29	*nd*
326_2	29	*nd*
326_3	34	*nd*
326_4	26	*nd*
327_1	*nd*	15
328_1	33	*nd*
329_1	*nd*	27.8

[1268]

337_1**	54	34
338_1**	59	32
291_1*	*nd*	62
294_1*	*nd*	70
295_1*	*nd*	78
319_1*	*nd*	68.4
320_1*	*nd*	51.4

[1269] *对照化合物,nd:未检测到

[1270] **CMP ID NO:337_1如下:ATgctTtttatggtttCA(SEQ ID NO:337),CMP ID NO:338_1如下:TTAtgctttttatggTTT(SEQ ID NO:338),其中大写字母为β-D-氧基LNA核苷,小写字母为DNA核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,所有核苷间键合均为硫代磷酸酯核苷间键合。CMP ID NO:337靶向SEQ ID NO:247的nt 16185至16202。CMP ID NO:338靶向SEQ ID NO:247的nt16187至16204。

[1271] 对照化合物的实验分别进行

[1272] 实例2.2-在原代人肝细胞(PXB-PHH)中测试靶向人FUBP1 mRNA的反义寡核苷酸的体外功效。

[1273] 从人源化小鼠(uPA/SCID小鼠)(本文称为PHH)收获的新鲜原代人肝细胞(PXB-PHH)以96孔格式从PhoenixBio Co.,Ltd(Japan)获得,并在改良的肝细胞克隆生长培养基(dHCGM)中培养。dHCGM是一种DMEM培养基,其含有100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、20mM Hepes、44mM $NaHCO_3$、15μg/ml L-脯氨酸、0.25μg/ml胰岛素、50nM地塞米松、5ng/ml EGF、0.1mM Asc-2P、2% DMSO和10% FBS(Ishida等人,2015)。

[1274] 将细胞在37℃于具有5% CO_2的潮湿气氛中进行培养。培养基每周更换2次直至收获。

[1275] 未受感染细胞在5μM下接受单一处理,并在7天后收获。在所有处理中,以终体积为120μl/孔的dHCGM培养基向细胞给药寡核苷酸化合物。用于RNA测量的实验以生物学重复的方式进行。

[1276] 随后对FUBP1 RNA进行了实时PCR。根据制造商的方案,使用MagNA Pure robot和MagNA Pure 96Cellular RNA大容量试剂盒(Roche,#05467535001)从细胞中提取总mRNA。以两次技术重复,使用QuantStudio12K Flex(Applied Biosystems)、TaqMan RNA-to-CT 1-Step试剂盒(Applied Biosystems,#4392938)、人GusB内源性对照(Applied Biosystems,#Hs00939627_m1)通过qPCR来量化mRNA表达水平。使用比较周期阈值2-ΔΔCt方法分析mRNA表达,该方法针对参考基因GusB和未处理的细胞进行了归一化。用于GusB RNA和FUBP1 RNA定量的TaqMan引物如下表22所示:

[1277] 表22:用于GusB RNA和FUBP1 RNA定量的引物

[1278]

参数	来源
FUBP1	ThermoFisher-分析ID:Hs00900762_m1
GusB	ThermoFisher-分析ID:Hs00939627_m1

[1279] 8种化合物(CMP ID No:325_1、325_2、326_1、326_2、326_3、326_4;327_1和328_1,CMP ID NO 319_1和320_1)在PXB-PHH细胞中的相对FUBP1 mRNA表达水平以相对于对照的百分比显示在表23中,即值越低抑制作用越大。CMP ID NO:329_1在PXB-PHH细胞中的FUBP1 mRNA表达水平在实例2.3中进行了分析。

[1280] 表23:抗FUBP1化合物在PXB-PHH细胞中的体外功效。将FUBP1mRNA水平归一化为GUSB,并显示为相对于对照物的百分比。

[1281]

SEQ ID NO	CMP ID NO	PXB-PHH 在 25μM 处的相对 mRNA 水平	SD	PXB-PHH 在 5μM 处的相对 mRNA	SD
325	325_1	37	3	46	4
325	325_2	33	4	45	4

[1282]

326	326_1	31	1	52	15
326	326_2	21	1	43	2
326	326_3	33	1	49	5
326	326_4	26	0	41	0
327	327_1	33	1	59	5
328	328_1	22	2	60	38

[1283] 从实例2.1和实例2.2得出的结论

[1284] 实例2.1和实例2.2中的数据表明,如表12B所示,用LNA ASO靶向FUBP1会导致FUBP1的有效减少。

[1285] 实例2.3-CMP ID NO:326_1和329_1的进一步分析。

[1286] 在下文中,描述了使用九种已鉴定化合物中的两种进行的额外的实验:CMP IDs NO:326_1和329_1。在这些实验中,将这两种化合物与WO 2019/193165中给出最佳结果的两种现有化合物进行了比较

[1287] 材料和方法

[1288] 原代人肝细胞(PXB-PHH)

[1289] 从人源化小鼠(uPA/SCID小鼠)(本文称为PHH)收获的新鲜原代人肝细胞(PXB-PHH)以24孔格式从PhoenixBio Co.,Ltd(Japan)获得,并在改良的肝细胞克隆生长培养基(dHCGM)中培养。dHCGM是一种DMEM培养基,其含有100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、20mM Hepes、44mM $NaHCO_3$、15μg/ml L-脯氨酸、0.25μg/ml胰岛素、50nM地塞米松、5ng/ml EGF、0.1mM Asc-2P、2% DMSO和10% FBS(Ishida等人,2015)。

[1290] 将细胞在37℃于具有5% CO_2的潮湿气氛中进行培养。培养基每周更换2 次直至收获。

[1291] ASO 序列和化合物

[1292] 表24提供了对实例2.3中测试的化合物的概述:

[1293] 表24:ASO靶向的人FUBP1序列

[1294]

说明	序列	CMP ID
根据本发明的化合物	5'-CTTATGCTTTTTATGGTT-3' (SEQ ID NO: 326)	326_3*
对照化合物（HeLa 细胞中最好的现有技术化合物）	5'-CCCATAACCATAGTCAT-3' (SEQ ID NO: 276)	276_1**

[1295]

根据本发明的化合物	5'-ACCAATTTTCATTTCTAC-3' (SEQ ID NO: 329)	329_1*
对照化合物（PHH 细胞中最好的现有技术化合物）	5'-CCATTTCTTCCTATTACAA-3' (SEQ ID NO: 291)	291_1**

[1296] *参见表12B,根据本发明的化合物

[1297] **参见表20:WO 2019/193165中公开的对照化合物

[1298] HBV感染和寡核苷酸处理

[1299] 到达后,通过在PHH培养基中用HBV在4％(v/v)PEG中的溶液孵育PHH细胞16小时,使用慢性患者衍生的纯化接种物(基因型C)以MOI 110感染PHH。然后将细胞用PBS洗涤三次,并在新鲜PHH培养基中在含5％CO_2的潮湿气氛中培养。感染后四天,用终浓度为10μM的FUBP1 LNA(见表24)处理细胞,重复两次或用PBS作为无药对照(NDC)。在处理当天,从细胞中去除旧培养基,并且由400μl/孔的新鲜PHH培养基替换该旧培养基。对于每个孔,将100μL的50μM的每种FUBP1 LNA或作为NDC的PBS添加至400μL的PHH培养基。在感染后第4、11和18天重复相同的处理3次。在感染后的第7天、第14天和第21天,每三天一次用新鲜的细胞培养基更换原细胞培养基。

[1300] 细胞内HBV pgRNA和FUBP1 mRNA的实时PCR

[1301] 在细胞活力确定后,用PBS洗涤细胞一次。根据制造商的方案,使用MagNA Pure robot和MagNA Pure 96Cellular RNA大容量试剂盒(Roche,#05467535001)从细胞中提取总RNA。以两次技术重复,使用QuantStudio 12K Flex(Applied Biosystems)、TaqMan RNA-to-CT 1-Step试剂盒(Applied Biosystems,#4392938),并且人GusB内源性对照(Applied Biosystems,#Hs00939627_m1)已被使用,通过qPCR来量化FUBP1 mRNA和病毒pgRNA表达水平。使用比较周期阈值2-ΔΔCt方法分析FUBP1 mRNA和病毒pgRNA相对表达,该方法针对参考基因GusB和未转染的细胞进行了归一化。表25列出了用于GusB RNA、FUBP1 RNA和HBV pgRNA定量的TaqMan引物。

[1302] 表25:用于GusB基因、FUBP1 RNA和HBV pgRNA定量的TaqMan引物

[1303]

参数	来源
FUBP1	ThermoFisher-分析ID:Hs00900762_m1
HBV pgRNA	定制:AILJKX5
GusB	ThermoFisher-分析ID:Hs00939627_m1

[1304] 结果

[1305] 结果在表26和图18中示出。从表26和图18可以得出,与NDC相比,本发明的两种化合物(CMP ID NO:326_3和329_1)使靶mRNA表达减少了约80%。它们对FUBP1 mRNA水平的影响比现有技术化合物的影响强得多。

[1306] 表26:抗FUBP1化合物在PXB-PHH细胞中的体外功效。将FUBP1mRNA水平归一化为GUSB,并显示为相对于对照物的百分比。

[1307]

		HeLa 中最佳裸现有技术				PHH 中最佳裸现有技术	
CMP ID 326_3		CMP ID 276_1		**CMP ID 329_1**		CMP ID 291_1	
相对于 NDC (=1) 的残留表达	SD	相对于 NDC (=1) 的残留表达	SD	相对于 NDC (=1) 的残留表达	SD	相对于 NDC (=1) 的残留表达	SD
0.23	0.04	0.46	0.05	0.22	0.00	0.38	0.03

[1308] 实例3-靶向RTEL1的反义寡核苷酸-体内

[1309] 材料和方法

[1310] 动物

[1311] 具有人源化肝脏的嵌合小鼠(PXB-小鼠)是由注射人肝细胞的尿激酶型纤溶酶原激活剂-cDNA/重度联合免疫缺陷小鼠生成的。(Tateno C,Kawase Y,Tobita Y,等人 Generation of novel chime-ric mice with humanized livers by using hemizygous cDNA-uPA/SCID mice.PLoS One.2015;10:e0142145。)

[1312] 根据候选动物的体重、整体健康状况、血清h-Alb和HBV DNA浓度将它们分配到研究中。研究期间出现意外异常的小鼠,诸如体重减轻超过初始体重的20%、濒临死亡、死亡或自发性肿瘤形成,被从各组中去除。

[1313] 表27:动物组和化合物给药

[1314]

				剂量				
组	**菌株**	**小鼠数量**	**测试化合物 (SEQ ID NO)**	**水平 (mg/kg)**	**浓度 (mg/kg)**	**体积 (ml/kg)**	**途径**	**频率**
1	PXB(HBV C感染)	5	媒介物	0	0	10	s.c.	QD,8次,第0,7、14、21、28、35、42、49天
2	PXB(HBV C感染)	5	330_1	10	1			
3	PXB(HBV C感染)	5	246_2	10	1			
4	PXB(HBV C感染)	5	330_1	10	1			
			246_2	10	1			

[1315] 通过在第0、7、14、21、28、35、42、49天使用带有永久连接针头的一次性1.0mL注射器(Terumo Corporation,Tokyo,Japan)将化合物注射到上背部的颈部皮下组织中来施用化合物。

[1316] 血液采集和血清分离

[1317] 在异氟烷(异氟烷吸入溶液[Pfizer],Mylan,Osaka,Japan)麻醉下,使用IntramedicTM聚乙烯管(Becton,Dickinson and Company,NJ,USA)在每个时间点经由眶后神经丛/窦从受试动物采集七十五微升(75μL)的血液。在最终时间点,用异氟烷麻醉来麻醉

动物,经由心脏从每只动物采集血液,在此之后通过心脏穿刺和放血处死动物。在室温孵育血液样品5分钟至凝固,在4℃以13200×g离心3分钟以获得血清。将血清样品保存在-80℃。

[1318] 组织样品制备

[1319] 处死时,收获所有动物的整个肝脏,切成块并用液氮速冻。

[1320] 血清HBV DNA定量

[1321] 通过数字PCR对来自HBV感染的PXB小鼠的血清进行定量,并通过用适当体积的针对血清中的HBV DNA的HBV预处理溶液(KUBIX HBV qPCR试剂盒,KUBIX Inc.,Hakusan,Japan)稀释来用作HBV标准品以制作靶标稀释系列。

[1322] 将待分析的样品与适当体积的针对血清中的HBV DNA的HBV预处理溶液混合,在98℃加热5分钟,并且然后通过qPCR进行分析。使用KUBIX HBV qPCR试剂盒(KUBIX Inc.)和CFX96 Touch™实时PCR检测系统(Bio-Rad Laboratories,Inc.,Hercules,CA,USA)进行实时qPCR。将二十微升(20μL)HBV 2×PCR溶液添加到20μL经加热的样品中。在95℃进行初始激活,持续2分钟。随后的PCR扩增由在CFX96 Touch™实时PCR检测系统中进行45个循环组成,每个循环在95℃变性5秒,以及在54℃退火和延伸30秒。平均血清HBV DNA水平根据两次技术重复计算得出。

[1323] 血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎e抗原(HBeAg)定量

[1324] 血清HBsAg和HBeAg浓度由SRL,Inc.(Tokyo,Japan)使用由Fujirebio开发的化学发光酶免疫测定(CLEIA)(LUMIPULSE HBsAg-HQ,LUMIPULSE®PrestoⅡ和LUMIPULSE HBeAg,LUMIPULSE®PrestoⅡ)来确定。

[1325] 从肝脏组织中进行总DNA提取

[1326] 将小鼠肝脏在1ml总DNA提取缓冲液(50mM Tris pH8、5mM EDTA、150mM NaCl、1% SDS)中在室温以6000rpm均质化20秒。向每个样品中添加2.5ul RNA酶混合物(Invitrogen,#AM2286),混合并在室温孵育30min。用1ul(20ug)蛋白酶K(Ambion,#AM2546,20mg/ml)在56℃以300rpm进行蛋白质消化2h。将样品以13,000g离心3min,并将上清液转移至新管中。用UltraPure缓冲液饱和苯酚(Life Technologies,#15513-039)提取DNA 2至3次,并使用UltraPure苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)(Life Technologies,#15593-031)提取DNA一次,该提取通过添加1ml试剂,混合,在4℃全速旋转15min,并将水溶液转移至新管中进行。然后用1ml 100% EtOH和40ul3M NaAc(SigmaAldrich,#S7899)在-20℃过夜沉淀DNA。在4℃以最大速度对DNA进行成球15min,用1ml 70% EtOH洗涤并完全风干。在50ul10mM Tris-HCl,pH8中重悬。DNA通过NanoDrop定量,调整至1.5ug/ul DNA,并通过Southern印迹和qPCR进行分析。

[1327] Southern印迹

[1328] 将DNA上样至1%琼脂糖凝胶中,并通过凝胶电泳在50V分离3.5小时。使用DIG标记的DNA分子量标记物VII(Sigma,#11669940910)作为大小标记物。将凝胶在500mL新制备的0.2M HCl中孵育10min。用变性缓冲液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)进行DNA变性30min。然后将凝胶在500mL中和缓冲液(0.5M Tris-HCl pH 7.5、1.5M NaCl)中中和,并且最后在500mL UltraPure 20X SSC缓冲液(Life Technologies,#15557-036)中孵育,并且各30分钟。

[1329] 通过毛细管转移将DNA在20X SSC缓冲液中过夜转移至Hybond-XL膜(GE Healthcare,#RPN2020S)。然后将DNA以1800x100uJ/cm2与膜进行一次UV交联,并进行干燥。

在20mL DIG Easy Hyb缓冲液(Roche,#11603558001)中于37℃预杂交1小时后,使HBV特异性DIG标记的DNA探针在100℃变性5min,并在膜上于8ml新鲜DIG Easy Hyb缓冲液中在37℃孵育过夜。使用DIG PCR探针试剂盒(Sigma#11636090910)及正向引物(5-GTTTTTCACCTCTGCCTAATCATC-3;SEQ ID NO:339)和反向引物(5-GCAAAAAGTTGCATGGTGCTGGT-3;SEQ ID NO:340)以及含有HBV GtC的质粒作为模板来制备DIG标记的HBV DNA探针。qPCR在95℃运行5min,然后运行40个循环:95℃15秒、58℃30秒、68℃3min 15秒,然后68℃5min并保持在12℃。

[1330] 多余的探针在65℃在50ml SSC洗涤缓冲液I(2xSSC,0.1% SDS)中洗去两次,每次5min,然后在50ml SSC洗涤缓冲液II(0.5xSSC,0.1% SDS)中洗去两次,每次15min。

[1331] 然后根据说明使用DIG洗涤和封闭缓冲液套件(Roche,#11585762001)进行DIG检测。抗DIG抗体在40mL中按1:20'000稀释,并在膜上孵育60min,然后在100mL洗涤缓冲液中洗涤两次,每次15min并在50mL检测缓冲液中孵育5min。

[1332] 对于发光检测,使用带有NitroBlock的2-3ml CDP-Star,并使用Fusion Fx(VILBER)捕获图像,并使用ImageStudio lite软件对条带进行定量。

[1333] 通过qPCR定量肝内HBV DNA

[1334] 使用TaqMan Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems,#4444557)以及引物HBB(ThermoFischer,#Hs00758889_s1,VIC)、总HBV(ThermoFischer,#Pa03453406_s1 P,S/P,FAM)和cccDNA引物(正向:CCGTGTGCACTTCGCTTCA,SEQ ID NO:341;反向:GCACAGCTTGGAGGCTTGA,SEQ ID NO:342;探针:FAM-CATGGAGACCACCGTGAACGCCC-5NFQ,SEQ ID NO:343)通过qPCR确定cccDNA和总HBV DNA水平。qPCR在QuantStudio 12K Flex循环仪上运行,其中快速加热块为标准设定(95℃20秒,然后进行40个循环:95℃1秒和60℃20秒,反应体积为10ul)。HBB CT值用于归一化cccDNA和总HBV DNA CT值,使用2^-ddCT方法计算ddCT和倍数变化。

[1335] 从肝脏组织中提取RNA

[1336] 使用2mL MagNA Lyser Green Beads(Roche,#03358941001)在1400ul MagNaPure LC RNA分离组织缓冲液(Roche,#03604721001)中裂解并均质化组织切片,并将其以6000rpm均质化20秒,并在室温孵育30min。匀浆以13000rpm离心3分钟。使用试剂盒细胞RNA大容量试剂盒(Roche,##05467535001)经由MagNa Pure 96(Roche)从上清液中提取RNA,使用的方案是"RNA Tissue FF Standard LV 3.1"并且在50ul中进行洗脱。

[1337] 通过NanoDrop测量RNA浓度,并根据制造商的方案,使用用于qRT-PCR的SuperScript™III第一链合成SuperMix(Invitrogen,#11752250)在20ul体积中将1ug RNA转录为cDNA。通过添加40ul H2O用水以1:3稀释cDNA,并使用TaqMan Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems,#4444557)以每孔10ul的总体积通过qPCR进行分析。使用的Taqman引物测定是:pgRNA(探针_序列GAGGCAGGTCCCCTAGAAGA;SEQ ID NO:344-FAM标记,fwd_序列GGAGTGTGGATTCGCACTCCT,SEQ ID NO:345;rev_序列AGATTGAGATCTTCTGCGAC,SEQ ID NO:346)、FUBP1(ThermoFischer,#Hs0090076_m1,FAM)、GUSB(ThermoFischer,#Hs00939627_m1,VIC)、RTEL1(ThermoFischer,#Hs02568623_s1,FAM)、总HBV(ThermoFischer,#Pa03453406_s1 P,S/P,FAM)。qPCR在QuantStudio循环仪上运行,其中快速加热块为标准设定(95℃20秒,然后进行40个循环:95℃1秒和60℃20秒,反应体积为

10ul)。GUSB CT值用于归一化靶标CT、计算ddCT和倍数变化。

[1338] 结果

[1339] 对肝内HBV DNA水平通过Southern印迹进行评定,并通过qPCR进行半定量。

[1340] Southern印迹揭示cccDNA和总HBV DNA在FUBP1和RTEL1 LNA单一处理臂中减少,这在FUBP1+RTEL1组合臂中进一步增强(参见图19)。

[1341] 表28:Southern印迹条带相对条带强度(图19)。

[1342]

小鼠组	信号百分比	平均	SEM	N
媒介物	>100	100	2.93	3
	94.15			
	>100			
	103.21			
	102.64			
FUBP1	60.73	52.88	11.07	4
	76.73			
	24.03			
	50.03			
RTEL1	47.41	71.85	12.22	3
	83.51			
	84.62			
FUBP1 + RTEL1	27.35	36.63	8.35	5
	22.93			
	33.52			
	69.30			
	30.07			

[1343] 在qPCR中,单一化合物施用显示出针对FUBP1 LNA的cccDNA减少为约32%,并且针对RTEL1 LNA的cccDNA减少为约41%(图20和表29)。FUBP1和RTEL1 LNA的双重组合显示出甚至更高的功效,减少为73%。对于FUBP1 LNA,总HBV DNA水平也显著降低51%,而RTEL1 LNA并不影响总HBV DNA水平。另一方面,FUBP1和RTEL1 LNA的组合引起降低68%。

[1344] 表29:通过qPCR半定量肝内cccDNA和总DNA水平(参见图19)

[1345]

	媒介物			FUBP1			RTEL1			FUBP1 + RTEL1		
	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N
cccDNA	1,015	0,087	5	0,681	0,145	4	0,588	0,023	3	0,273	0,043	5
HBV DNA	1,002	0,029	5	0,494	0,162	4	0,973	0,078	3	0,329	0,067	5

[1346] 基线校正的血清HBV DNA水平显示,在单臂和双重组合臂处理的整个过程中,HBV DNA逐渐下降(图21以及表30和31)。虽然单一处理臂针对FUBP1 LNA的对数下降为0.46+/-0.23,并且针对RTEL1 LNA的对数下降为0.24+/-0.31,但双重组合使HBV DNA的对数下降比媒介物对照低0.84+/-0.27。

[1347] 同样,基线校正的血清HBsAg水平显示在单臂和双重组合臂处理的整个过程中逐渐下降(图22以及表32和33)。虽然单一处理臂针对FUBP1 LNA的对数下降为0.35+/-0.18,并且针对RTEL1 LNA的对数下降为0.31+/-0.10,但双重组合使HBV DNA的对数下降比媒介物对照低0.61+/-0.07。

[1348] 对于基线校正的血清HBeAg水平,下降更为微妙,然而,可以检测到通过用单一化合物和双重组合臂处理而产生的持续下降(图23以及表34和35)。虽然单一处理臂针对FUBP1 LNA的对数下降为0.16+/-0.03,并且针对RTEL1 LNA的对数下降为0.12+/-0.18,但双重组合使HBV DNA的对数下降比媒介物对照低0.26+/-0.15。

[1349] 表30:血清HBV DNA动力学(基线校正)

[1350]

	媒介物		RTEL1 10 mg/kg		FUBP1 10 mg/kg		FUBP1 + RTEL1, 10mg/kg	
天数	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
0	0.000	0.120	0.000	0.283	0.000	0.114	0.000	0.183
7	0.121	0.124	0.115	0.278	0.054	0.130	-0.042	0.167
14	0.004	0.167	-0.170	0.307	-0.062	0.136	-0.234	0.188
21	0.191	0.141	-0.146	0.260	-0.210	0.137	-0.421	0.191
28	-0.018	0.147	-0.361	0.263	-0.354	0.165	-0.794	0.176
35	0.077	0.136	-0.254	0.238	-0.399	0.163	-0.863	0.177
42	0.084	0.137	-0.251	0.257	-0.392	0.155	-0.801	0.168
49	-0.103	0.134	-0.556	0.242	-0.600	0.161	-1.122	0.147
56	-0.303	0.201	-0.540	0.241	-0.763	0.117	-1.141	0.174

[1351] 表31:归一化为媒介物对照组的血清HBV DNA动力学(基线校正)

[1352]

	媒介物		RTEL1 10 mg/kg		FUBP1 10 mg/kg		FUBP1 + RTEL1, 10mg/kg	
天数	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
0	0.000	0.169	0.000	0.307	0.000	0.166	0.000	0.219
7	0.000	0.175	-0.006	0.304	-0.067	0.180	-0.163	0.208
14	0.000	0.236	-0.174	0.350	-0.066	0.215	-0.238	0.252
21	0.000	0.200	-0.338	0.296	-0.402	0.197	-0.613	0.238
28	0.000	0.208	-0.343	0.301	-0.337	0.221	-0.777	0.229
35	0.000	0.192	-0.331	0.274	-0.475	0.212	-0.940	0.223
42	0.000	0.194	-0.335	0.291	-0.476	0.207	-0.885	0.216
49	0.000	0.189	-0.452	0.276	-0.497	0.209	-1.018	0.199
56	0.000	0.284	-0.237	0.314	-0.460	0.233	-0.838	0.266

[1353] 表32:血清HBsAg动力学(基线校正)

[1354]

	媒介物		RTEL1 10 mg/kg		FUBP1 10 mg/kg		FUBP1 + RTEL1, 10mg/kg	
天数	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
0	0.000	0.124	0.000	0.059	0.000	0.204	0.000	0.086
7	-0.064	0.118	-0.018	0.057	-0.052	0.189	-0.084	0.080
14	-0.016	0.137	-0.007	0.068	-0.085	0.200	-0.116	0.086
21	-0.073	0.145	-0.128	0.083	-0.199	0.188	-0.255	0.093
28	-0.066	0.135	-0.118	0.092	-0.220	0.204	-0.359	0.094
35	-0.083	0.138	-0.166	0.090	-0.244	0.187	-0.428	0.085
42	-0.091	0.131	-0.187	0.086	-0.254	0.165	-0.458	0.083
49	-0.146	0.138	-0.259	0.088	-0.317	0.164	-0.550	0.067
56	-0.117	0.148	-0.308	0.100	-0.346	0.177	-0.608	0.069

[1355] 表33:归一化为媒介物对照组的血清HBsAg动力学(基线校正)

[1356]

	媒介物		RTEL1 10 mg/kg		FUBP1 10 mg/kg		FUBP1 + RTEL1, 10mg/kg	
天数	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
0	0.000	0.175	0.000	0.137	0.000	0.239	0.000	0.151
7	0.000	0.167	0.046	0.131	0.012	0.223	-0.021	0.143
14	0.000	0.194	0.009	0.153	-0.069	0.242	-0.100	0.162
21	0.000	0.204	-0.055	0.167	-0.126	0.238	-0.182	0.172
28	0.000	0.191	-0.052	0.163	-0.154	0.244	-0.292	0.164
35	0.000	0.195	-0.083	0.164	-0.161	0.233	-0.345	0.162
42	0.000	0.185	-0.096	0.157	-0.163	0.211	-0.368	0.155
49	0.000	0.195	-0.113	0.164	-0.171	0.214	-0.404	0.153
56	0.000	0.210	-0.192	0.179	-0.229	0.231	-0.491	0.163

[1357] 表34:血清HBeAg动力学(基线校正)

[1358]

	媒介物		FUBP1 10 mg/kg		RTEL1 10 mg/kg		FUBP1 + RTEL1, 10mg/kg	
天数	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
0	0	0.097277	0	0.076883	0	0.170624	0	0.081801
7	-0.05643	0.100342	0.021962	0.062111	-0.08878	0.177554	-0.03	0.081588
14	-0.00677	0.10343	0.067472	0.078954	-0.07326	0.155543	-0.02	0.084903
21	-0.01767	0.102722	0.05285	0.082236	-0.06093	0.153053	-0.09	0.083717
28	0.018471	0.109088	0.021087	0.084894	-0.11016	0.161684	-0.12	0.083923
35	-0.05957	0.101027	-0.04855	0.083032	-0.23351	0.136016	-0.25	0.090098
42	-0.04271	0.106042	-0.09115	0.089527	-0.13864	0.134806	-0.22	0.076051
49	-0.14716	0.106203	-0.15171	0.098287	-0.26485	0.143994	-0.38	0.093478
56	-0.1525	0.115082	-0.17789	0.111281	-0.27138	0.141619	-0.41	0.088166

[1359] 表35:归一化为媒介物对照组的血清HBsAg动力学(基线校正)

[1360]

	媒介物		FUBP1 10 mg/kg		RTEL1 10 mg/kg		FUBP1 + RTEL1, 10mg/kg	
天数	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
0	0.000	0.138	0.000	0.124	0.000	0.196	0.000	0.127
7	0.000	0.142	0.078	0.118	-0.032	0.204	0.022	0.129
14	0.000	0.146	0.074	0.130	-0.066	0.187	-0.014	0.134
21	0.000	0.145	0.071	0.132	-0.043	0.184	-0.076	0.133
28	0.000	0.154	0.003	0.138	-0.129	0.195	-0.141	0.138
35	0.000	0.143	0.011	0.131	-0.174	0.169	-0.193	0.135
42	0.000	0.150	-0.048	0.139	-0.096	0.172	-0.173	0.130
49	0.000	0.150	-0.005	0.145	-0.118	0.179	-0.232	0.141
56	0.000	0.163	-0.025	0.160	-0.119	0.182	-0.256	0.145

[1361] 在终点处死时,通过RT-qPCR评定肝内靶标参与和LNA在mRNA水平上的抗病毒功效(图24和表36)。肝脏mRNA样品中的使用的FUBP1LNA和RTEL1 LNA应具有良好的靶标参与。FUBP1 LNA在单一处理臂中使FUBP1 mRNA减少88%,并且在双重处理臂中使其减少80%。RTEL1 LNA的效力稍差,RTLE1 mRNA在单一臂中减少了69%,并且在组合臂中减少了73%。

所有三种处理条件下HBV mRNA总水平均减少。在这里,观察到FUBP1+RTEL1 LNA组合的效果最强(减少59%),其次是单独的FUBP1(减少48%),然后是RTEL1单一处理(减少19%)。pgRNA水平减少得甚至更多,并且三种处理条件似乎遵循相同的趋势。在这里观察到FUBP1+RTEL1 LNA组合的影响最强(减少72%),其次是单独的FUBP1(减少62%),然后是RTEL1单一处理(减少29%)。

[1362] 表36:RTEL1和FUBP1 LNA分子的肝内靶标参与和功效

[1363]

	FUBP1 mRNA			RTEL1 mRNA			总 HBV mRNA			pgRNA		
	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N
媒介物	1,015	0,060	5	1,012	0,049	5	1,028	0,060	5	1,040	0,106	5
FUBP1 LNA	0,123	0,020	4	0,765	0,051	4	0,515	0,073	4	0,380	0,063	4
RTEL1 LNA	0,720	0,033	3	0,314	0,020	3	0,810	0,183	3	0,705	0,149	3

[1364]

组合 LNA	0,203	0,018	5	0,268	0,015	5	0,409	0,020	5	0,280	0,032	5

[1365] 实例4-组合化合物在PHH中的体外测试

[1366] 实例2.1-原代人肝细胞(PHH)

[1367] 从人源化小鼠(uPA/SCID小鼠)(本文称为PHH)收获的新鲜原代人肝细胞(PHH)以96孔格式从PhoenixBio Co.,Ltd(Japan)获得,并在改良的肝细胞克隆生长培养基(dHCGM)中培养。dHCGM是一种DMEM培养基,其含有100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、20mM Hepes、44mM NaHCO3、15μg/ml L-脯氨酸、0.25μg/ml胰岛素、50nM地塞米松、5ng/ml EGF、0.1mM Asc-2P、2% DMSO和10% FBS(Ishida等人,2015)。将细胞在37℃于具有5% CO2的潮湿气氛中进行培养。

[1368] PHH用源自HepG2.2.15细胞培养物的HBV GtD在4% PEG存在下感染16至20小时。次日除去病毒接种物并用PBS洗涤细胞3次,然后添加新鲜培养基。LNA处理在HBV感染后第4天开始,一式三份,以1:3进行系列稀释,每孔总体积120μl。起始浓度在表37中提及。第11天和第18天重复相同的处理。第21天,收获上清液并储存于-80℃以进一步分析HBsAg、HBeAg和分泌的HBV DNA。将细胞用1xDPBS(Gibco,#14190250)使用150μl/孔洗涤一次。对于RNA读数,添加200μl/孔MagNA Pure 96外部裂解缓冲液(Roche,#06374913001)并将板冷冻在-80℃。

[1369] 表37:测试LNA的起始浓度

[1370]

CMP ID NO	缀合	靶标	起始浓度
335_1	裸	乱序	30 μM
330_1	裸	FUBP1	30 μM
246_2	裸	RTEL1	30 μM
331_2	裸	FUBP1+RTEL1	15 μM
331_1	裸	FUBP1+RTEL1	15 μM
332_1	裸	RTEL1+FUBP1	15 μM
330_1 + 246_2	裸	FUBP1+RTEL1	每个 15 μM

[1371]

332_2	裸	RTEL1+FUBP1	15 μM
335_1	GalNAc	乱序	10 μM
326_3	GalNAc	FUBP1	10 μM
245_1	GalNAc	RTEL1	10 μM
333_1	GalNAc	FUBP1+RTEL1	5 μM
334_1	GalNAc	RTEL1+FUBP1	5 μM
326_3 + 245_1	GalNAc	FUBP1+RTEL1	5 μM

[1372] 实例2.2-细胞活力测定

[1373] 根据制造商的说明,使用细胞计数试剂盒-8(CCK8)在感染后第21天确定经处理的PHH细胞的活力。通过将CCK8试剂以1:10的比例添加到分化培养基中来制备CCK8混合物。因此,除去细胞上清液并储存在-80℃,并向每个孔中添加100μL CCK8混合物并在37℃孵育1小时。使用Envision读数器(Perkin Elmer)测量450nm处的吸光度。

[1374] 实例2.3-RNA提取和RT-qPCR

[1375] 根据制造商的方案,使用“细胞RNA LV方案”使用MagNA Pure robot和MagNA Pure 96细胞RNA大容量试剂盒(Roche,#05467535001)从细胞中提取总RNA,最终洗脱体积为50μl。

[1376] 以两次技术重复,使用QuantStudio 12K Flex(Applied Biosystems)、TaqMan RNA-to-CT 1-Step试剂盒(Applied Biosystems,#4392938)和人GusB内源性对照通过qPCR来定量RTEL1和FUBP1 mRNA,pgRNA和肝内DNA表达水平。qPCR在QuantStudio循环仪上运行,其中48℃15分钟,然后95℃10分钟,然后进行40个循环:95℃15秒和60℃1分钟,总反应体积为10μl。使用比较周期阈值2-ΔΔCt方法分析mRNA表达,该方法针对参考基因GusB和HBV感染的未处理的细胞进行了归一化。用于GusB mRNA、RTEL1mRNA、FUBP1 mRNA、总肝内HBV DNA

和pgRNA定量的TaqMan引物列于表38中。

[1377] 表38:用于GusB mRNA、RTEL1 mRNA、FUBP1 mRNA、总肝内HBV DNA和pgRNA定量的引物

[1378]

靶标	来源
FUBP1	ThermoFisher – 分析 ID: Hs0090076_m1; FAM
RTEL1	ThermoFisher – 分析 ID: Hs02568623_s1; FAM
总 HBV DNA	ThermoFisher – 分析 ID: Pa03453406_s1 P, S/P; FAM
pgRNA	ThermoFisher – 定制检测: 探针 FAM GAGGCAGGTCCCCTAGAAGA (SEQ ID NO: 344) 正向 GGAGTGTGGATTCGCACTCCT (SEQ ID NO: 345) 反向 AGATTGAGATCTTCTGCGAC (SEQ ID NO: 346)
GusB	ThermoFisher – 分析 ID: Hs00939627 m1

[1379] 实例2.4-进行上清液DNA提取和qPCR来定量分泌的HBV DNA

[1380] 根据制造商的方案,使用“病毒NA血浆ext lys SV 4.0”方案在MagNA Pure robot上用MagNA Pure 96DNA和病毒NA小容量试剂盒(Roche,#06543588001)从40μl上清液中提取DNA,最终洗脱体积为50μl。

[1381] 为了定量HBV DNA,用正向引物CTG TGC CTT GGG TGG CTT T(终浓度200nM)、反向引物AAG GAA AGA AGT CAG AAG GCA AAA(终浓度200nM)和探针56-FAM-AGC TCC AAA/ZEN/TTC TTT ATA AGG GTC GAT GTC CAT G-3IABkFQ(终浓度100nM)(IDT DNA),使用TaqMan Gene Expression Master Mix和以下循环条件来扩增覆盖核心区域的99个核苷酸片段:在50℃进行2分钟,在95℃进行10分钟,以及40个循环的在95℃进行15秒和在60℃进行1分钟。所有qPCR反应均使用QuantStudio 12K Flex实时PCR系统(Life Technologies)进行。用于分泌的HBV DNA定量的TaqMan引物列于表39中。

[1382] 使用比较周期阈值2-ΔCt方法计算相对表达水平,该方法针对HBV感染的未处理的细胞进行了归一化。

[1383] 表39:来自上清液定量的HBV引物

[1384]

靶标	来源

[1385]

HBV 核心	正向引物 CTG TGC CTT GGG TGG CTT T (SEQ ID NO: 353) 反向引物 AAG GAA AGA AGT CAG AAG GCA AAA (SEQ ID NO: 354) 探针 56-FAM-AGC TCC AAA/ZEN/TTC TTT ATA AGG GTC GAT GTC CAT G-3IABkFQ (SEQ ID NO: 355)

[1386] 实例2.5-HBsAG/HBeAG化学发光免疫测定

[1387] 使用HBsAg或HBeAg CLIA试剂盒(DiaSino,#DS1877032012V4,#DS1877012012V4)

确定在感染后第21天收获的上清液中的HBsAg和HBeAg。该测定按照制造商的方案进行,并且上清液以1:50稀释使用。使用Envision读数器(Perkin Elmer)测量发光信号。

[1388] 结果

[1389] 结果4.1:HBV感染的PHH细胞中HBVpgRNA的减少作为RTEL1和FUBP1 mRNA敲低的功能验证

[1390] 实验设置利用了针对RTEL1和FUBP1的单一分子,组合的两种分子以及作为共价连接分子的两种分子。

[1391] 从图25可以看出,阴性对照(Gal-NAc-352_1)对肝内pgRNA的减少没有影响。作为单一处理,Gal-NAc-326(FUBP1 ASO)将最高浓度的pgRNA减少至大约51%的剩余pgRNA。使用Gal-NAc-245_1(RTEL1 ASO)的单一处理,可以在最高10uM浓度下观察到HBV RNA减少的趋势(即约12%)。组合针对RTEL1和FUBP1的两种单一ASO(分别为Gal-NAc-245_1和Gal-NAc-326_3),我们发现与Gal-NAc-326(即50%)先前获得的最大功效相比,减少HBV RNA的最大功效略有下降(即,18%至25%)。有趣的是,两种双重分子都显示出对pgRNA水平的浓度响应效应:双重分子Gal-NAc-350_1在pgRNA减少40%时显示出最大功效。第二双重FUBP1/RTEL1 ASO Gal-NAc-351_1也显示出pgRNA减少,最大功效为34%。

[1392] 结果4.2:HBV感染的PHH细胞中肝内总HBV RNA的减少作为RTEL1和FUBP1 mRNA敲低的功能验证

[1393] 实验设置利用了针对RTEL1和FUBP1的单一分子,组合的两种分子以及作为共价连接分子的两种分子。

[1394] 如图26所示,阴性对照(Gal-NAc-352_1)对肝内HBV RNA的减少没有影响。作为单一处理,Gal-NAc-326(FUBP1 ASO)以剂量响应方式减少HBV RNA,在最高浓度(10uM)时的最大效果为抑制HBV RNA约50%。使用Gal-NAc-245_1(RTEL1 ASO)单一处理,我们观察到在最高浓度(10uM)时的HBV RNA略有减少(约14%)。

[1395] 当针对RTEL1和FUBP1的两种单一ASO(分别为Gal-NAc-245_1和Gal-NAc-326)在同一处理中组合时,还观察到对HBV RNA的剂量响应抑制,在两种化合物使用的最高剂量(5uM)下观察到最大功效(即,37%)。令人惊讶的是,将分子共价连接以剂量依赖性方式诱导对HBV RNA的更强抑制,对于GalNAc-350_1和GalNAc-351_1,最大功效分别为67%和60%。

[1396] 总体而言,这些结果表明,与使用靶向RTEL1和FUBP1mRNA靶标的单分子或单一ASO的组合相比,使用共价连接的分子可以改善肝内HBV RNA的减少

[1397] 结果4.3:mRNA表达和相关EC50的减少

[1398] 如可从表40和图27(RTEL1敲低)以及从表41和图28(FUBP1敲低)中得出的,所研究的两种双重化合物(CMP ID NO:GalNAc-350_1和GalNAC-351_1)均减少靶标mRNA表达,对于两种FUBP1和RTEL1 mRNA靶标而言,EC50均为约0.1uM。两种双重化合物(即,共价连接的FUBP1和RTEL1 ASO)的效果与使用针对FUBP1(FUBP1 k.d.的EC50为0.095uM)和RTEL1(RTEL1 k.d.的EC50为0.10uM)的单个ASO分子获得的EC50相当。因此可以获得相似的靶标mRNA与单一分子的k.d.,该单个分子具有通过接头共价连接的两个ASO分子。

[1399] 总之,这表明与使用单个ASO分子相比,共价连接的双重ASO分子对两种靶标mRNA(即,RTEL1和FUBP)具有相当的敲低作用。此外,双重分子的EC50也与使用针对FUBP1和

RTEL1的单个ASO组合时获得的EC50相当。

[1400] 表40:双重RTEL1/FUBP1 ASO、单一RTEL1 ASO、单一FUBP1 ASO以及单一ASO组合在PXB-PHH细胞中的体外效力。将靶标RTEL1 mRNA水平归一化为GUSB,并计算为相对于对照的百分比。在下表中可以找到RTEL 1靶标参与的各个EC50值:

[1401] RTEL1敲低EC50

[1402]

化合物 ID 编号	EC50 RTEL1 k.d.
GalNAc-352_1（阴性对照）	N/A
GalNAc-326_3 (FUBP1)	N/A
GalNAc-245_1 (RTEL1)	0.10 uM
GalNAc-350_1（双重）	0.13 uM
GalNAC-351_1（双重）	0.12 uM
GalNAc-326_3 + GalNAc-245_1（FUBP1 和 RTEL1 作为两个单独的 ASO 添加）	0.07 uM

[1403] 表41:双重RTEL1/FUBP1 ASO、单一RTEL1 ASO、单一FUBP1 ASO以及单一ASO组合在PXB-PHH细胞中的体外效力。将靶标FUBP1 mRNA水平归一化为GUSB,并计算为相对于对照的百分比。在下表中可以找到FUBP1靶标参与的各个EC50值:

[1404] FUBP1敲低EC50

[1405]

化合物编号 #	EC50 FUBP1 k.d.
GalNAc-352_1（阴性对照）	N/A
GalNAc-326_3 (FUBP1)	0.095 uM
GalNAc-245_1 (RTEL1)	N/A
GalNAc-350_1（双重）	0.12 uM
GalNAC-351_1（双重）	0.082 uM
GalNAc-326_3 + GalNAc-245_1（FUBP1 和 RTEL1 作为两个单独的 ASO 添加）	0.15 uM

[1406] 结论

[1407] 这些结果表明,用FUBP1 LNA和RTEL1 LNA的单一疗法降低了肝内cccDNA负荷、肝内HBV转录活性和HBV血清病毒血症,包括HBV DNA、HBsAg和HBeAg。此外,这些结果示出,FUBP1 LNA与RTLE1 LNA的组合带来了额外的益处,并引起cccDNA、HBV mRNA和血清病毒读数的病毒载量甚至进一步降低。因此,FUBP1和RTEL1组合疗法可能带来了比单一疗法更多的益处,并且应将其作为慢性HBV患者的潜在组合策略进行评估。

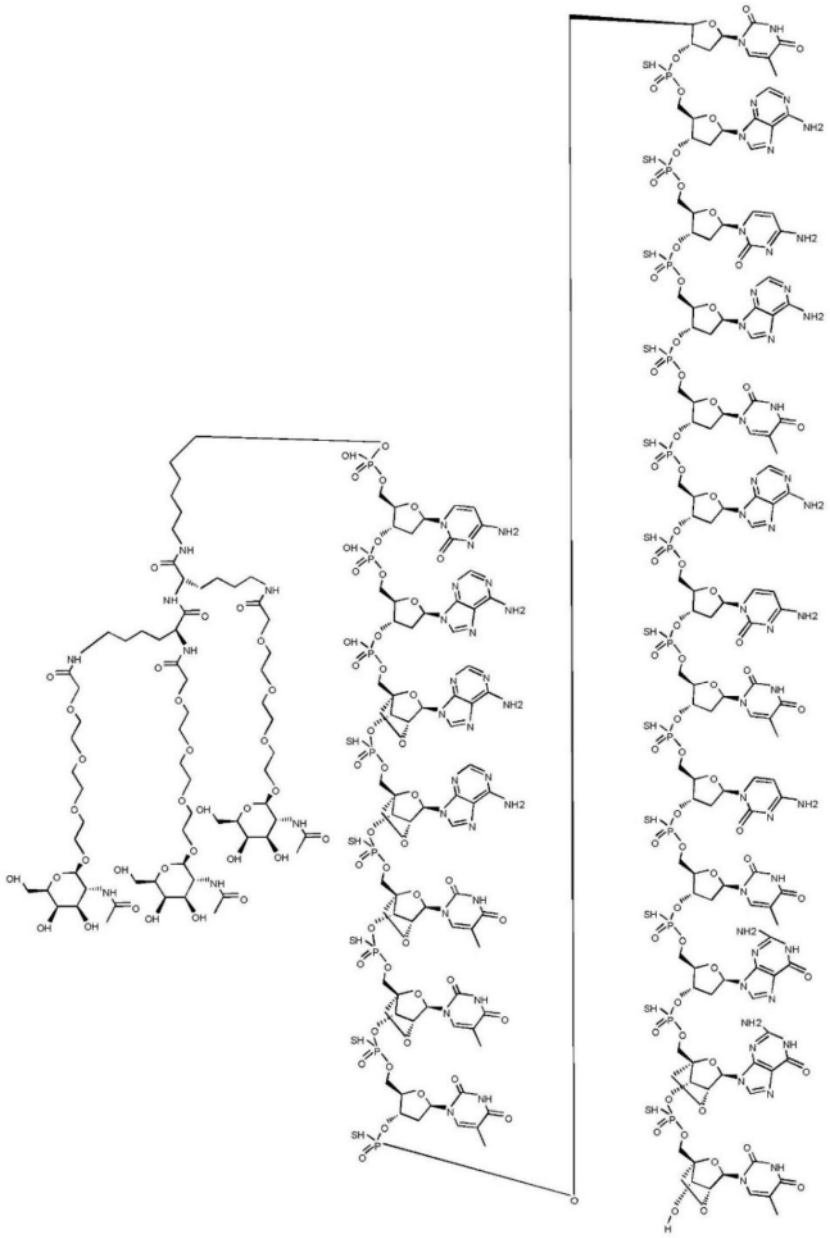


图1

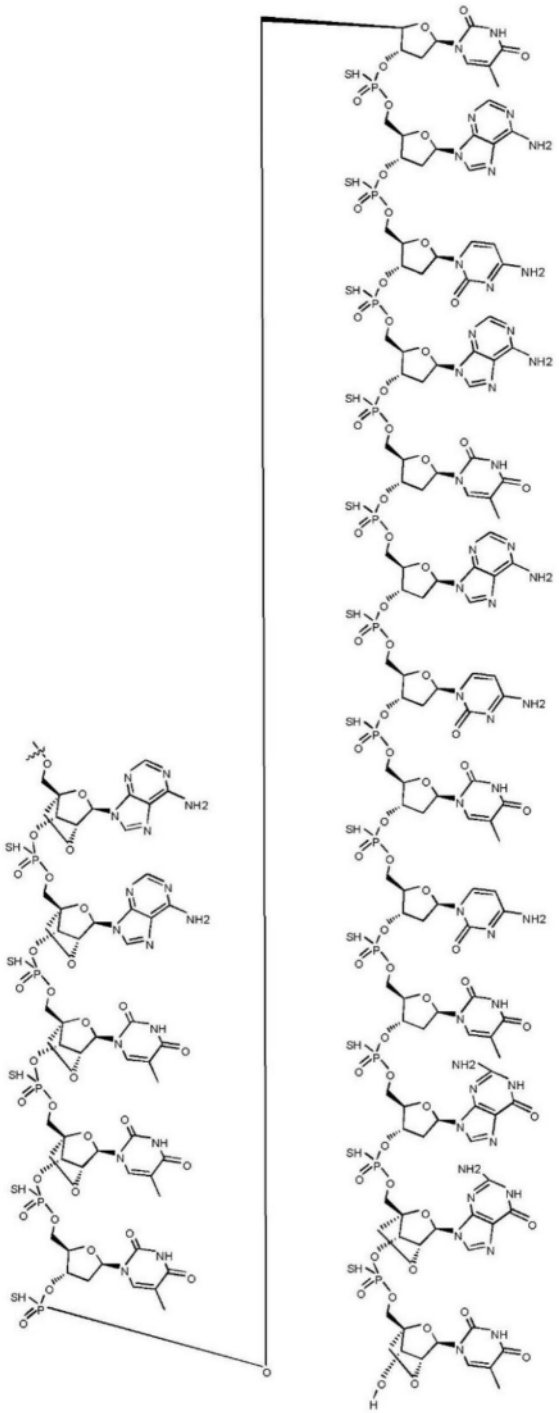


图1A

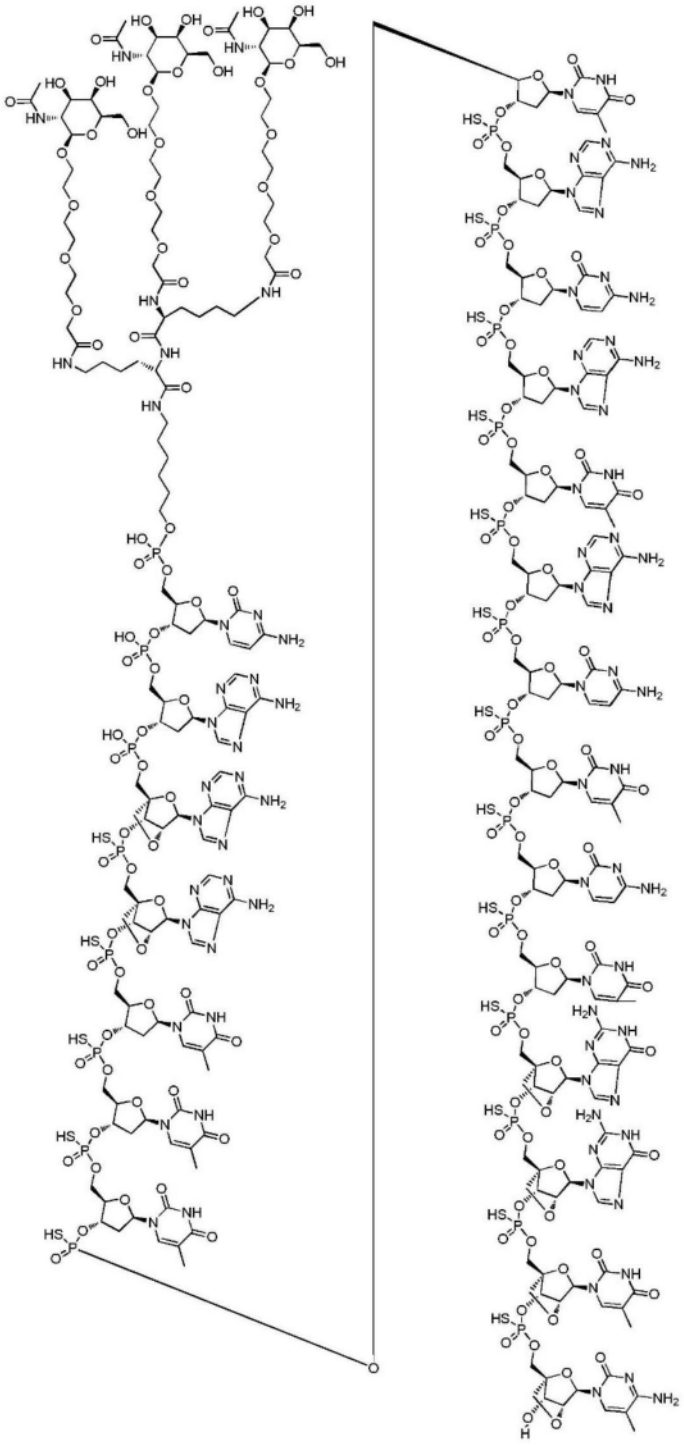


图2：

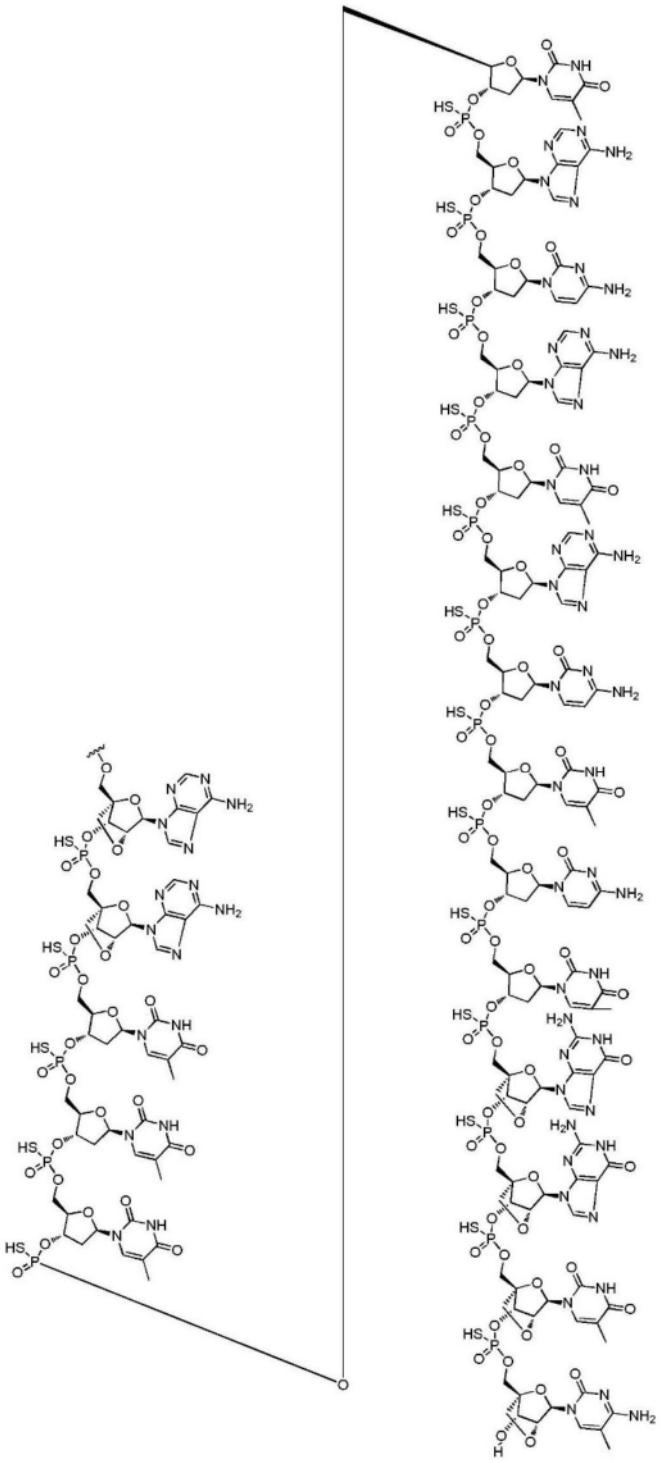


图2A：

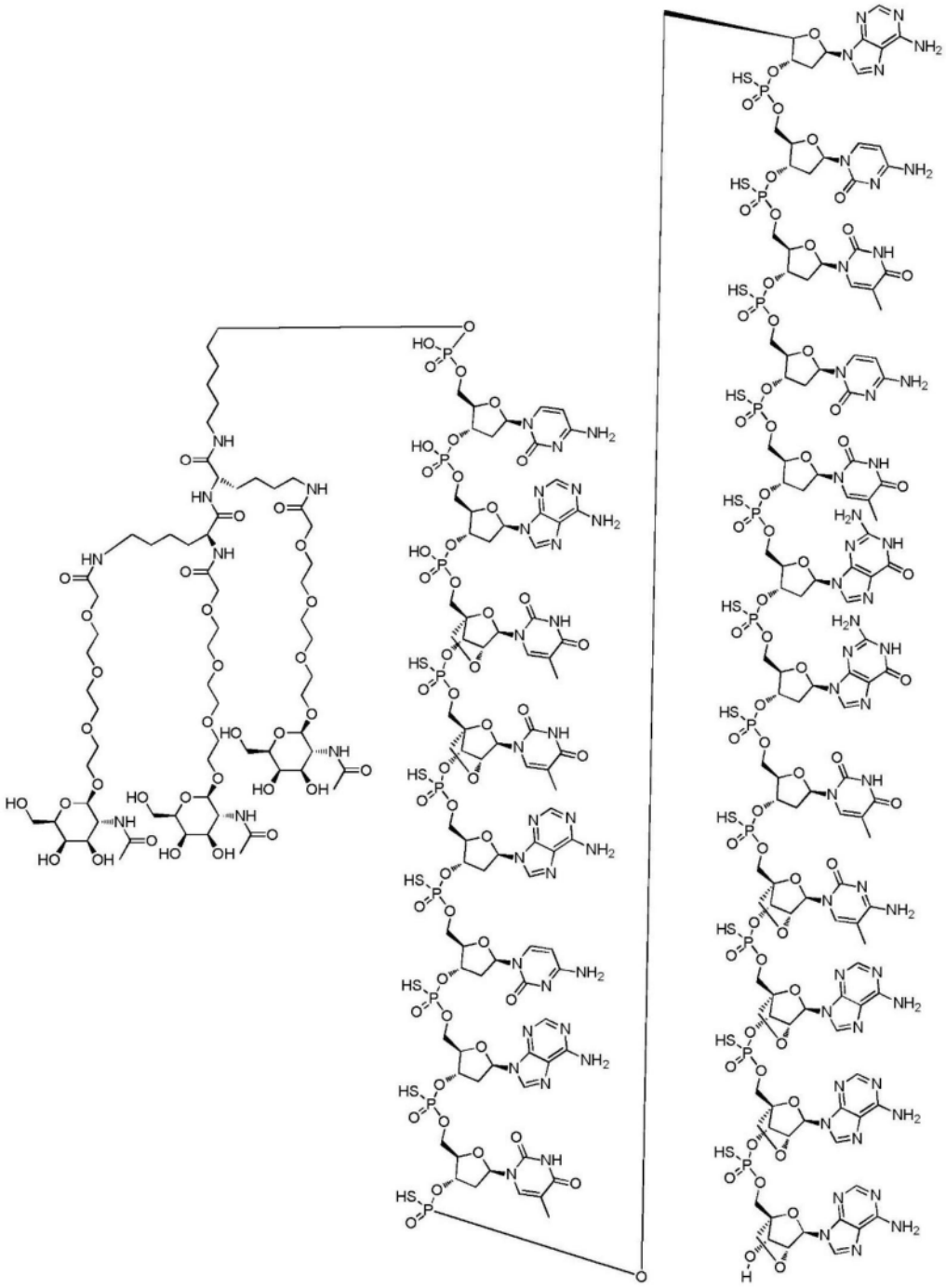


图3

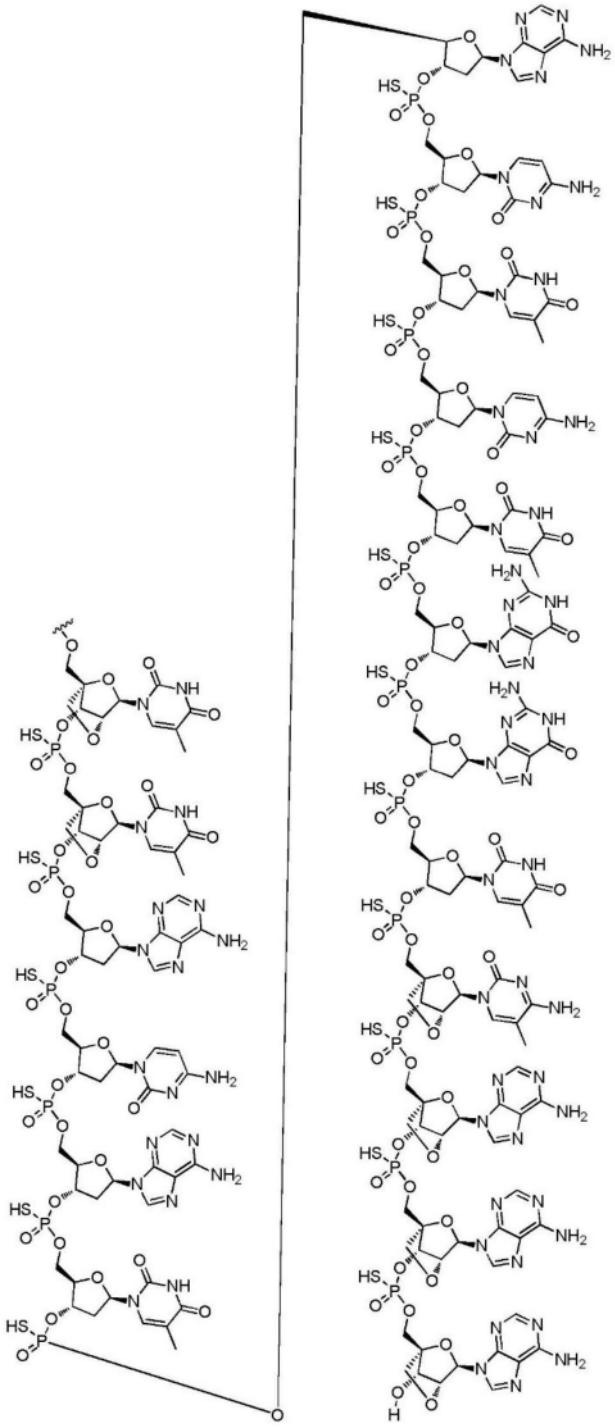


图3A

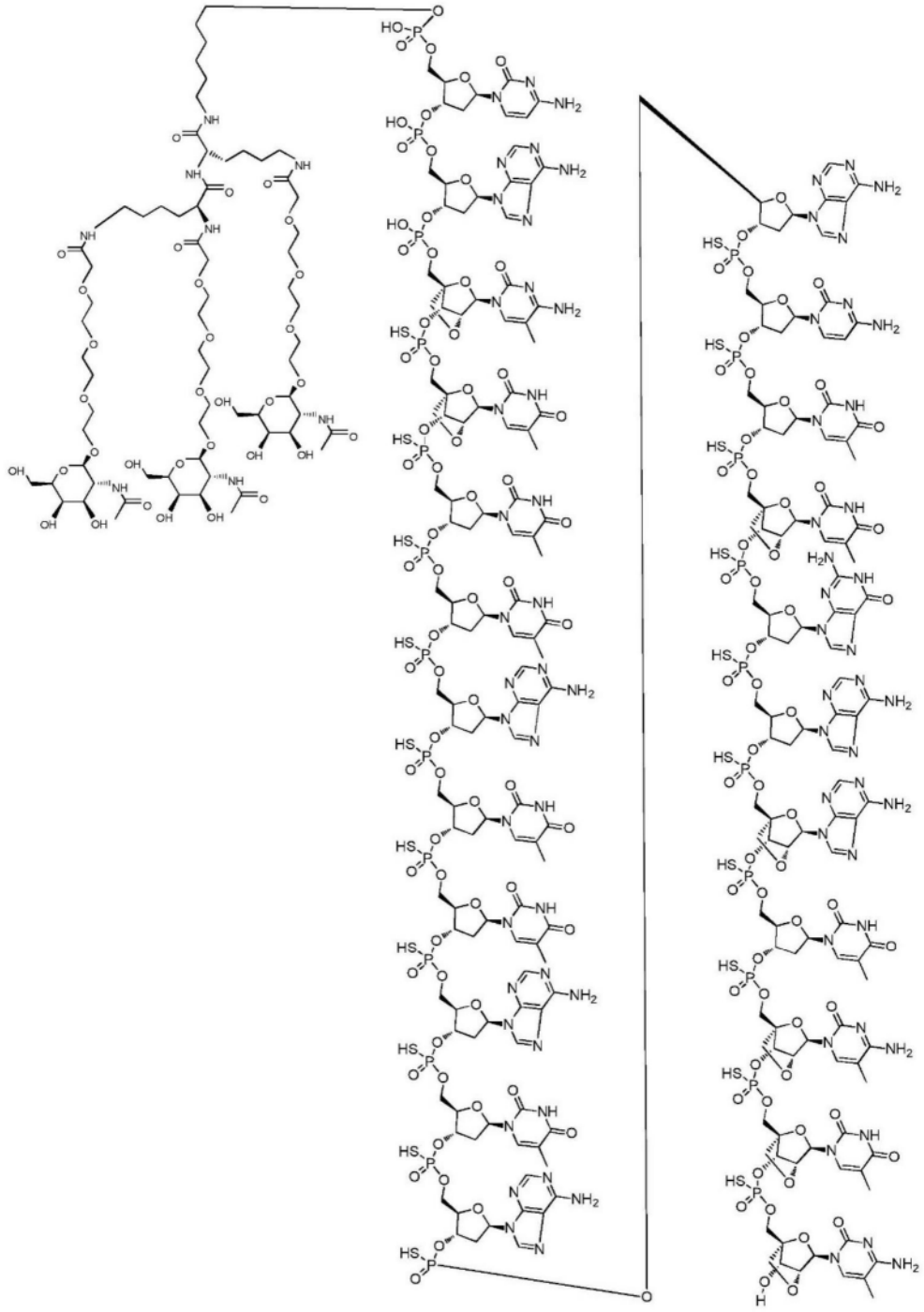


图4：

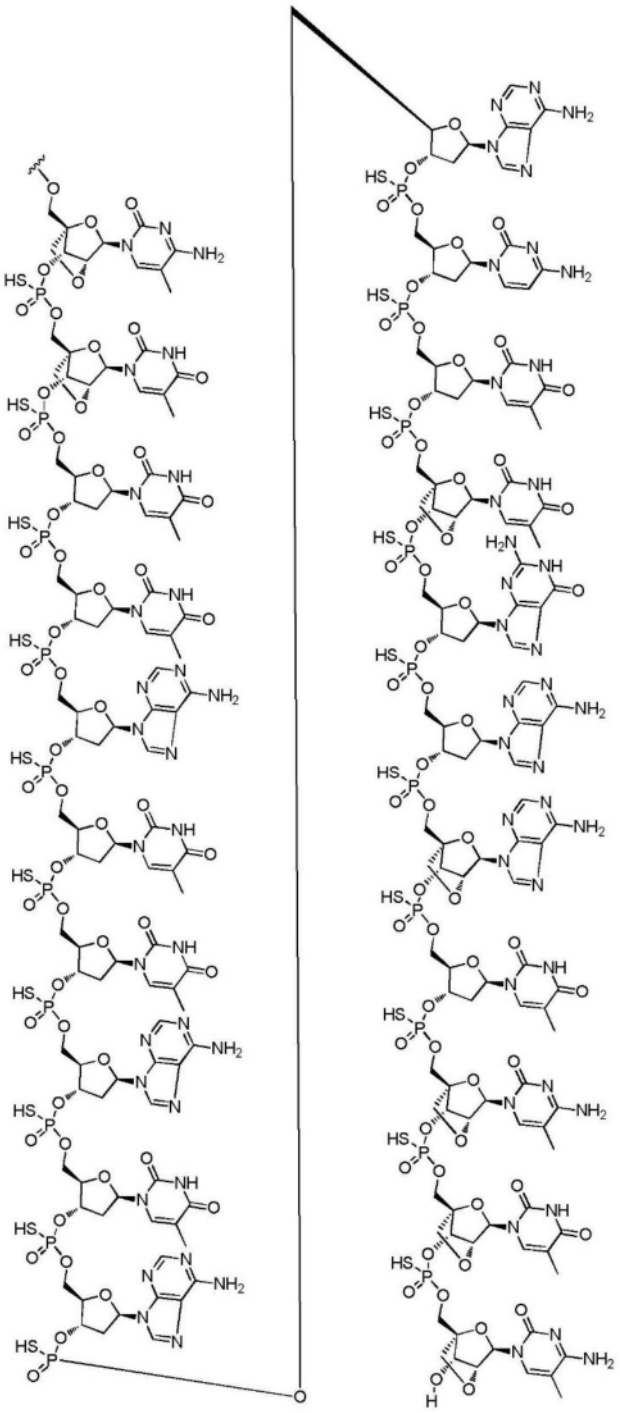
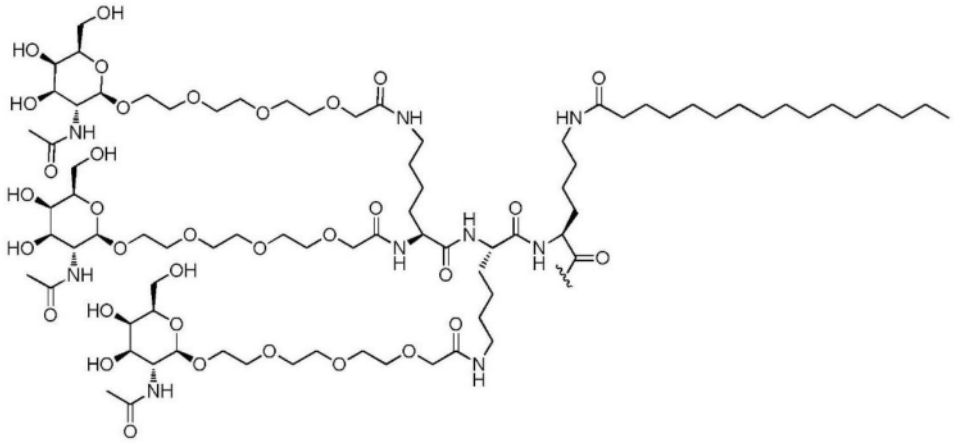


图4A：

A1



A2

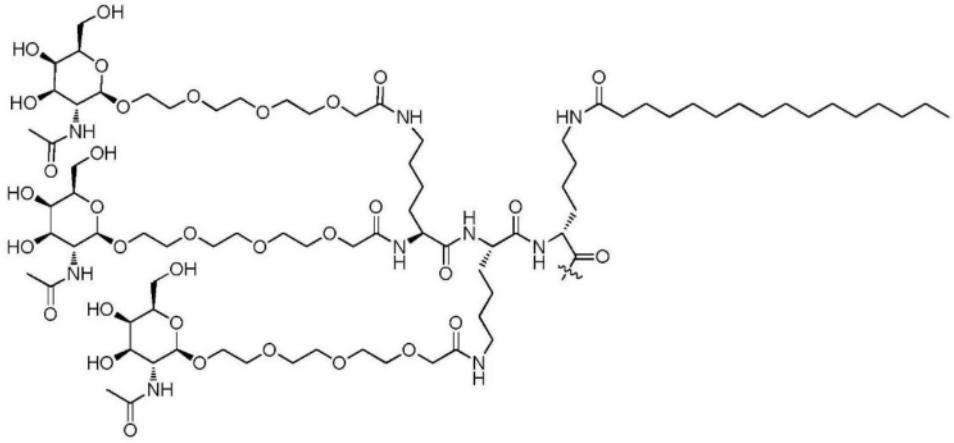
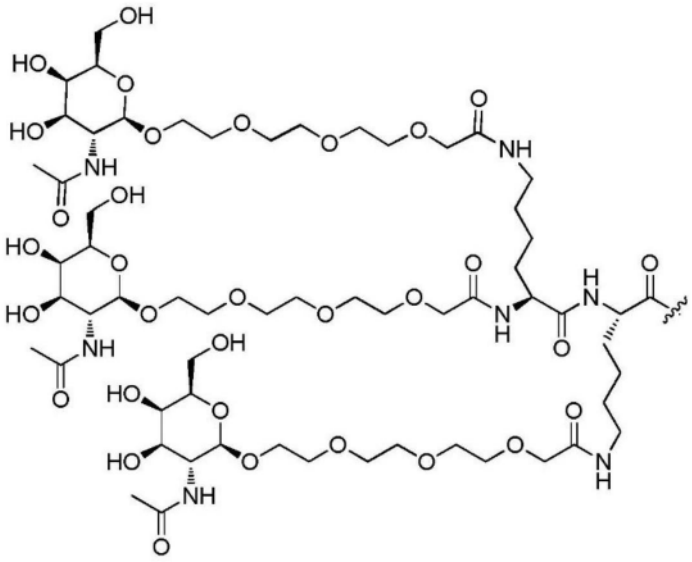


图5(GalNAc残基)

B1



B2

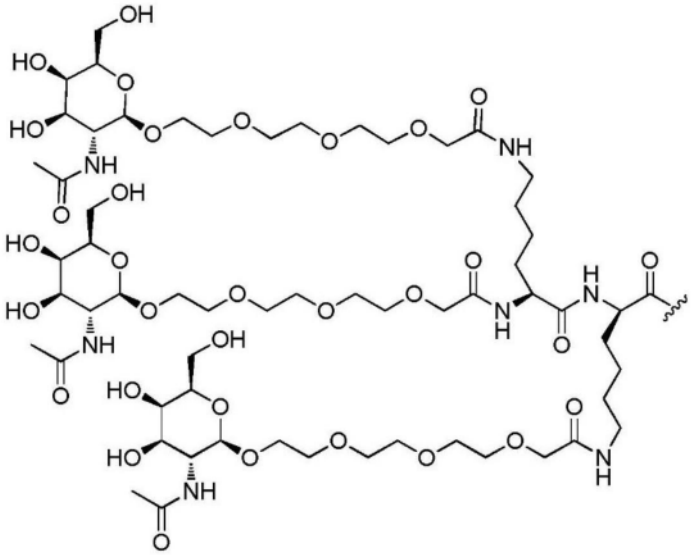
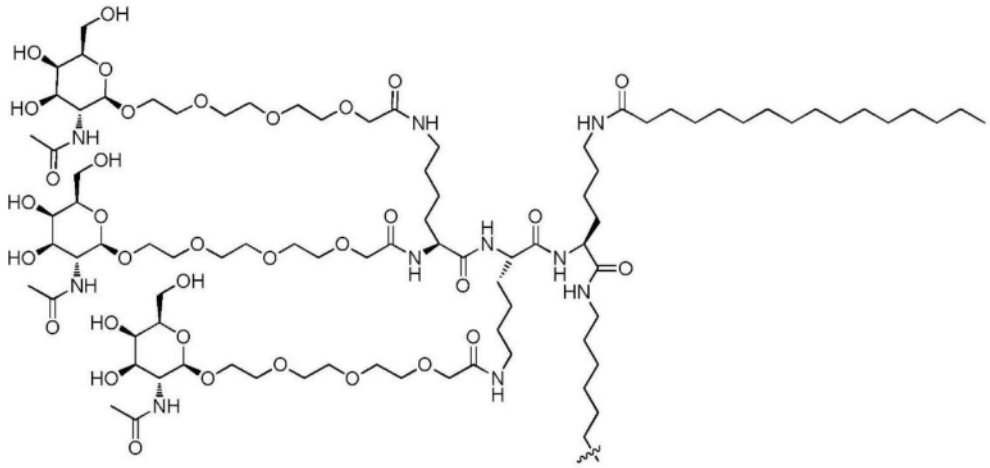


图5(续)

C1



C2

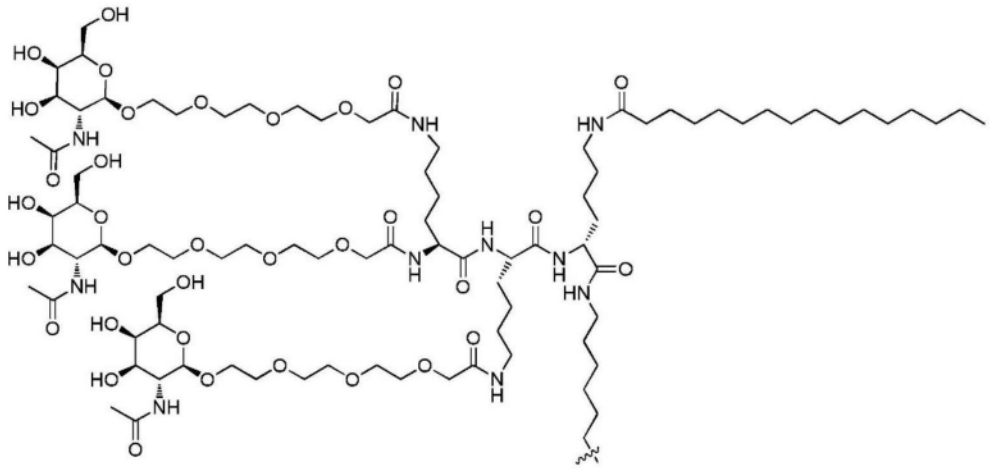
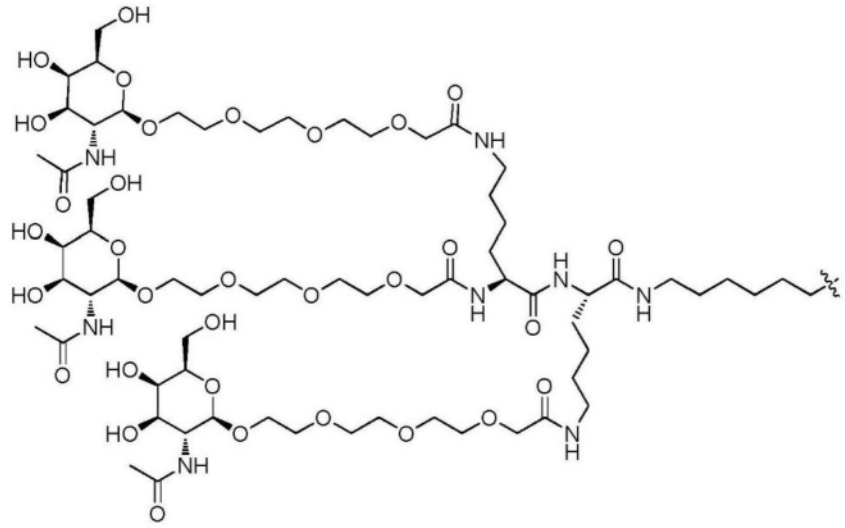


图5(续)

D1



D2

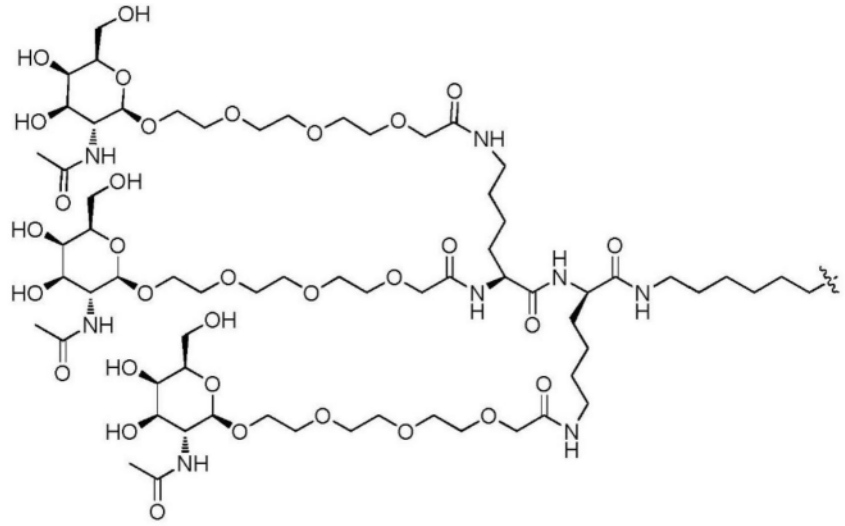
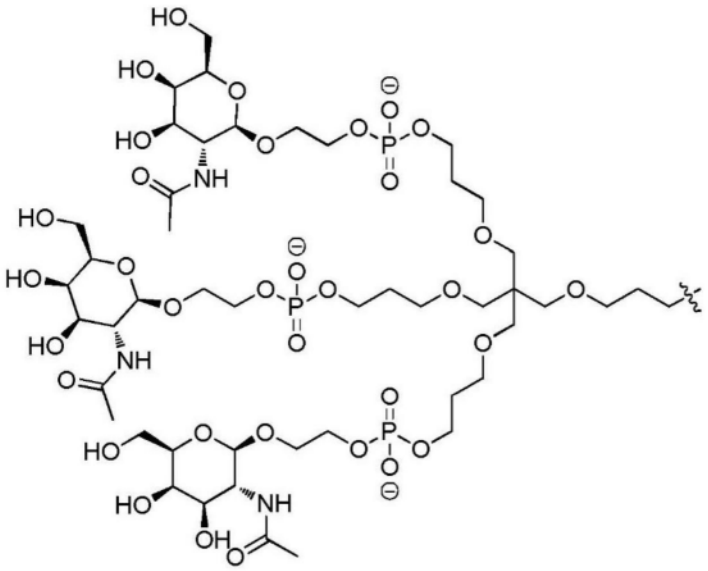


图5(续)

E1



F1

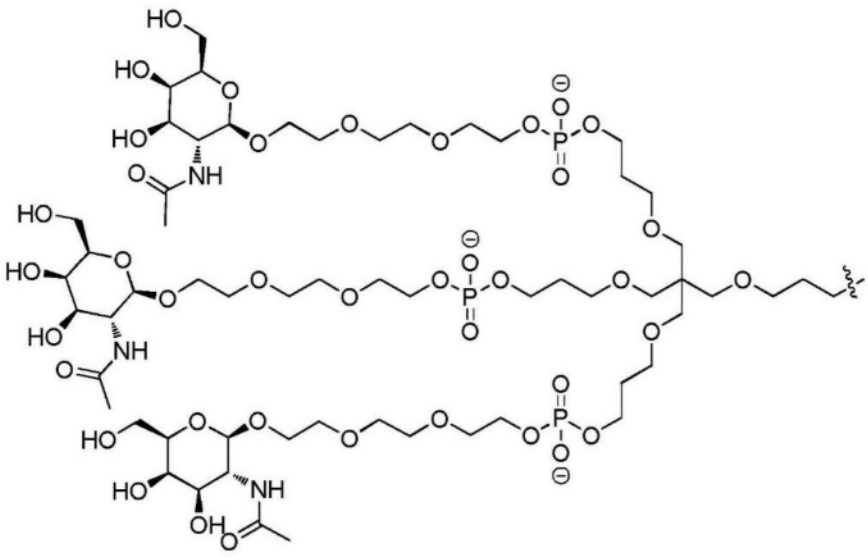
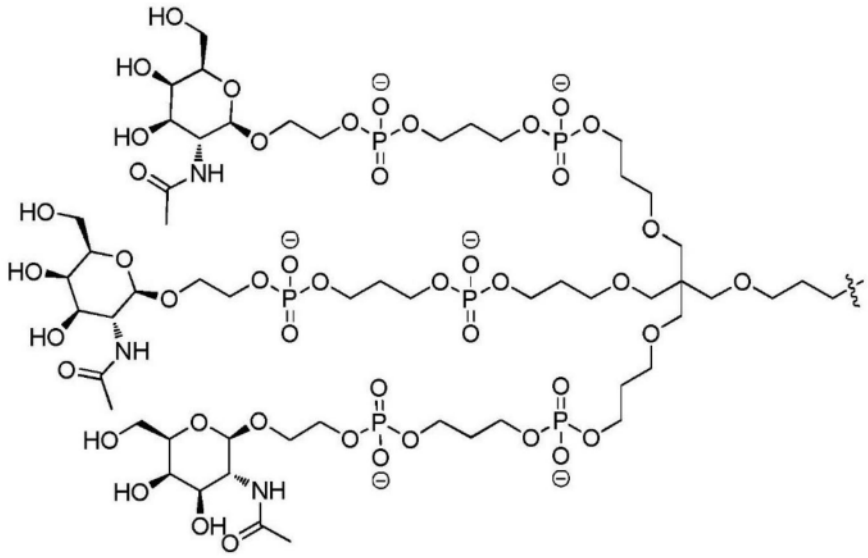


图5(续)

G1



H1

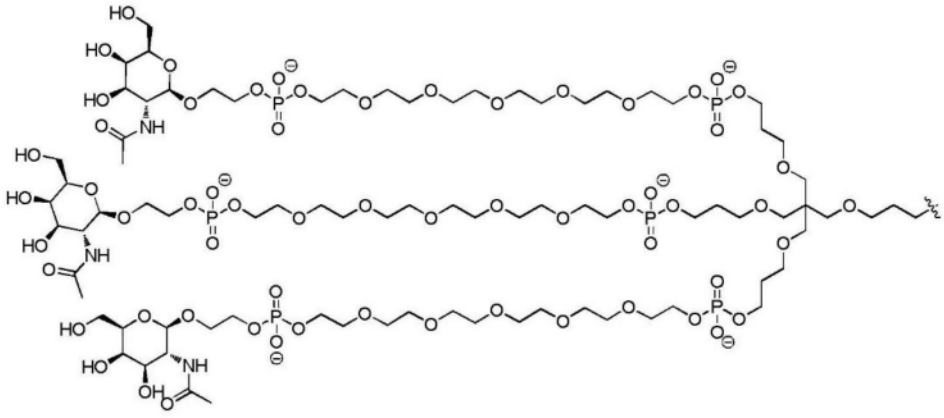
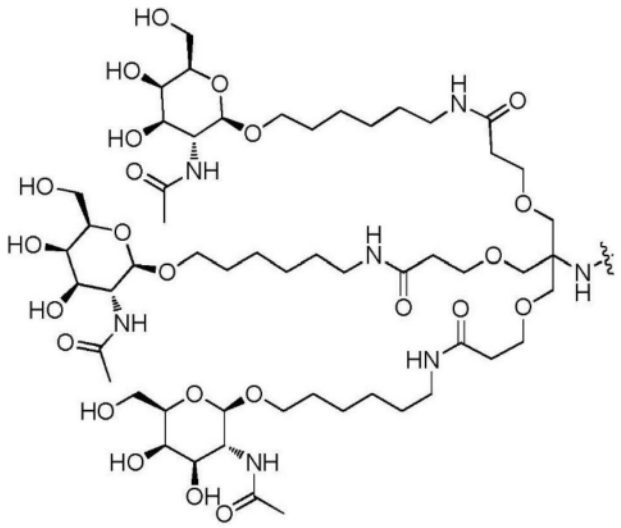


图5(续)

I1



J1

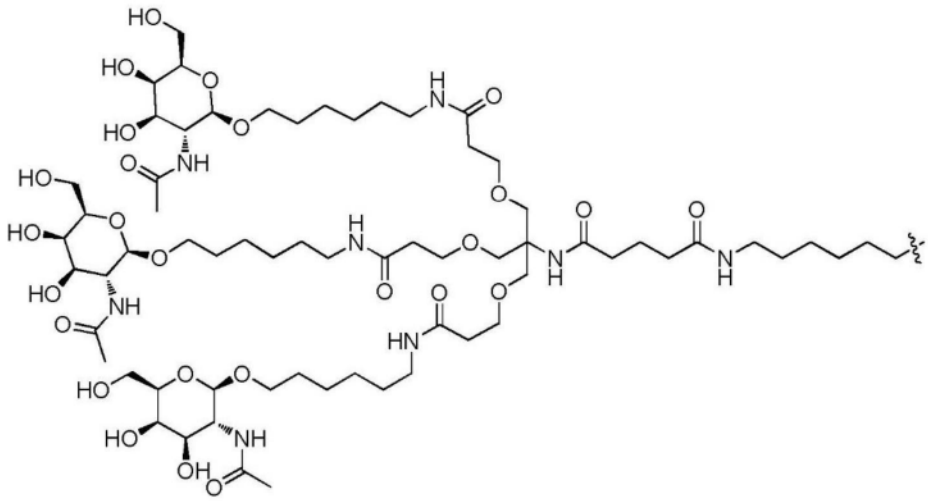


图5(续)

L1

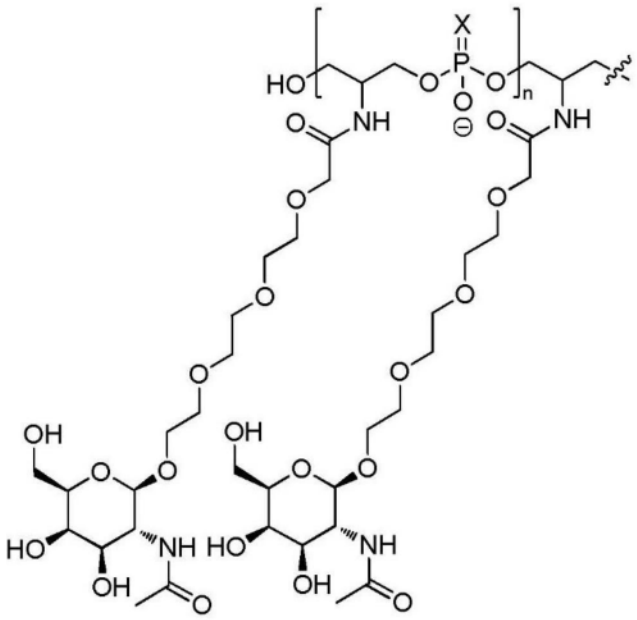


图5(续)

L2

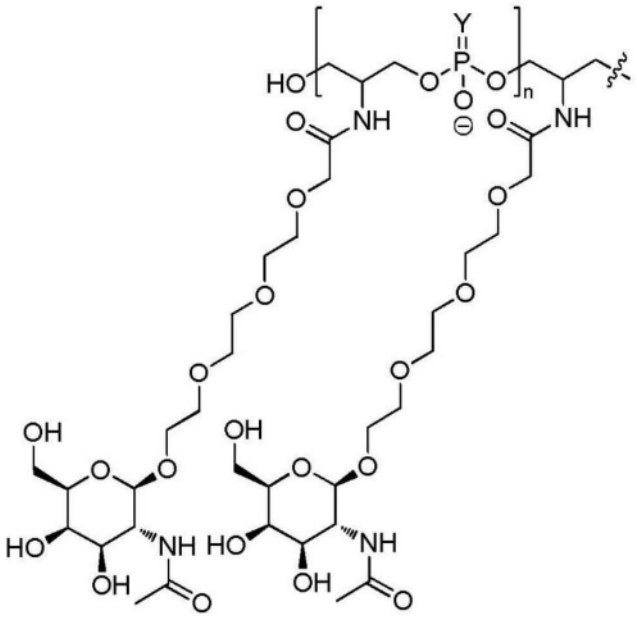
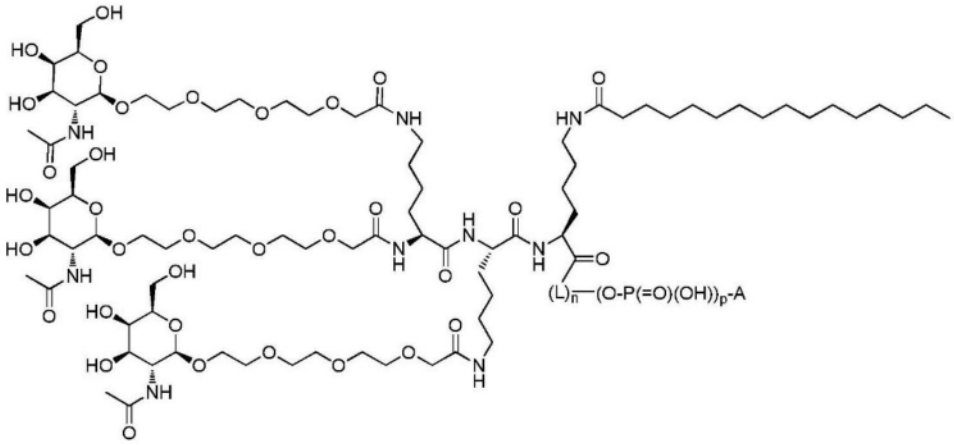


图5(续)

A1



A2

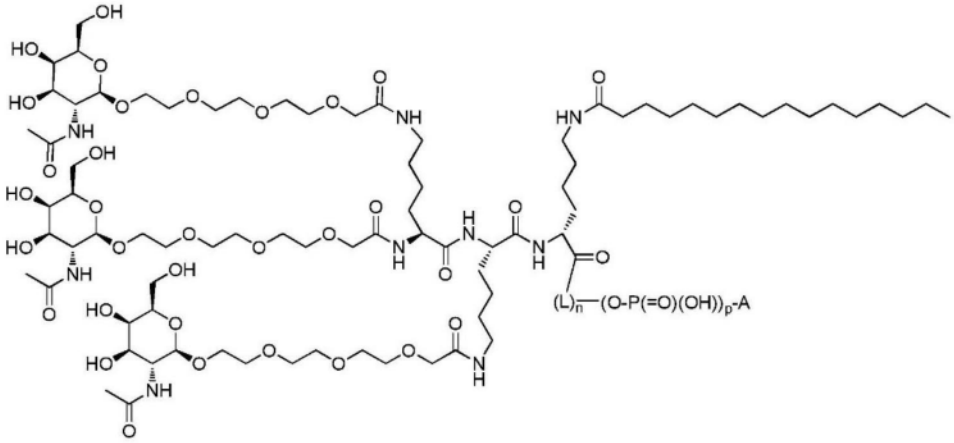
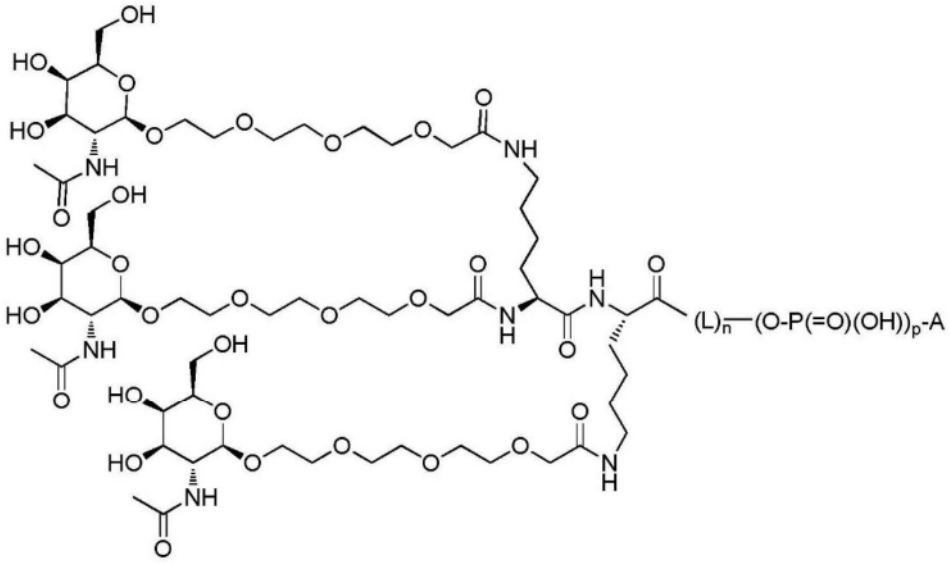


图6(化合物)

B1



B2

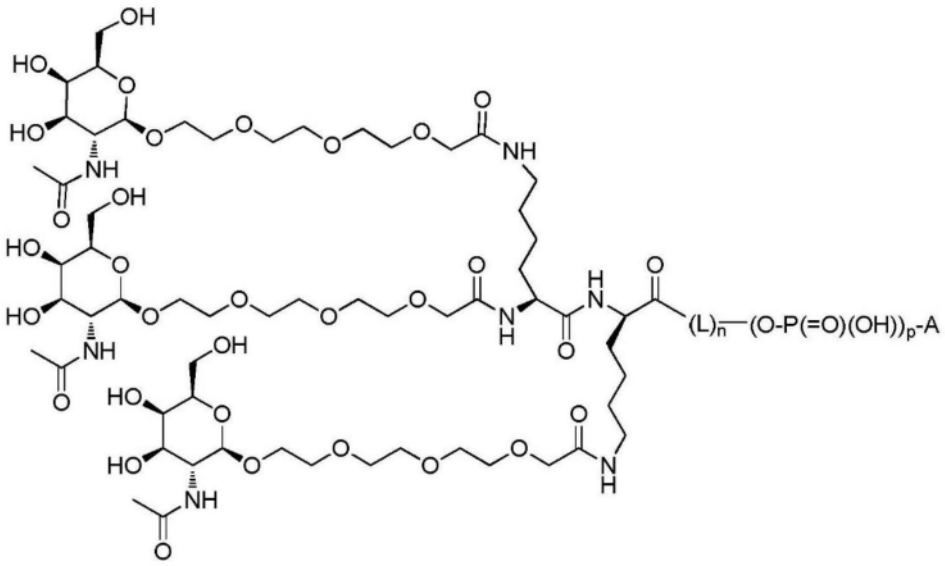
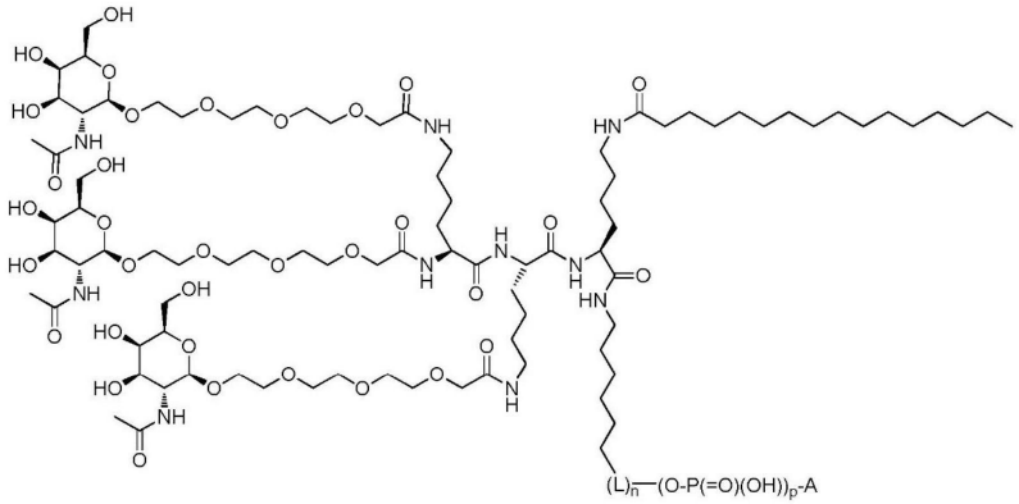
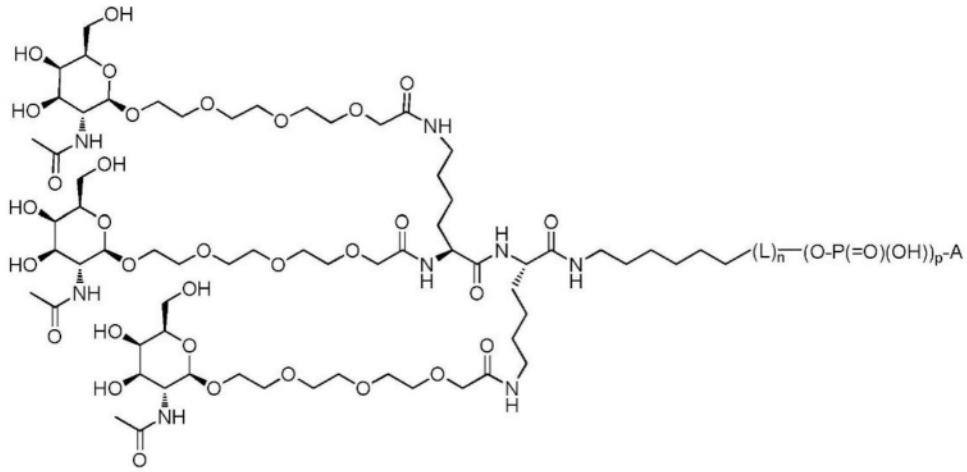


图6(续)

C1


OH
HO
HO
O
NH
O
HO
HO
HO
HO
NH
O
HO
HO
HO
NH
O
O
NH
O
O
O

D1


OH
HO
O
HO
NH
O
O
O
O
O
O
O
NH
O
OH
HO
O
HO
NH
O
O
O
O
O
O
O
NH
H
N
O
N
H
O
H
N
O
N
H
(L)n—(O-P(=O)(OH))p-A
OH
HO
O
HO
NH
O
O
O
O
O
O
O
NH

D2

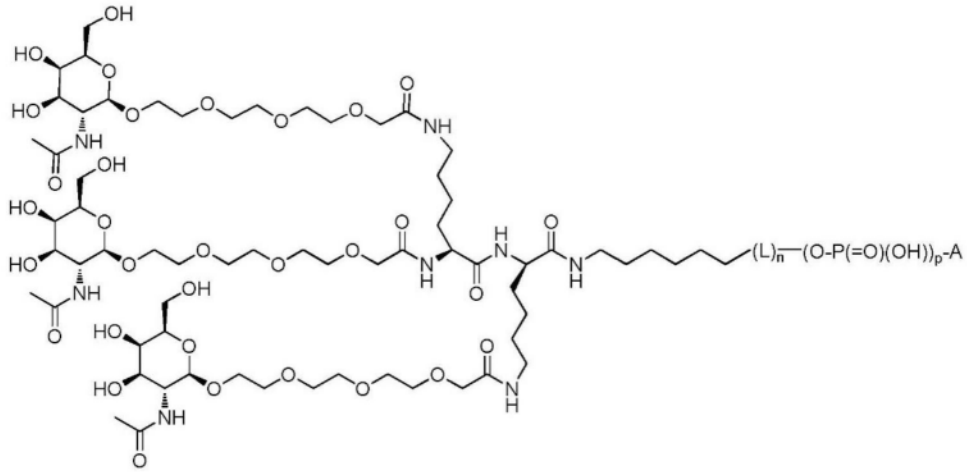
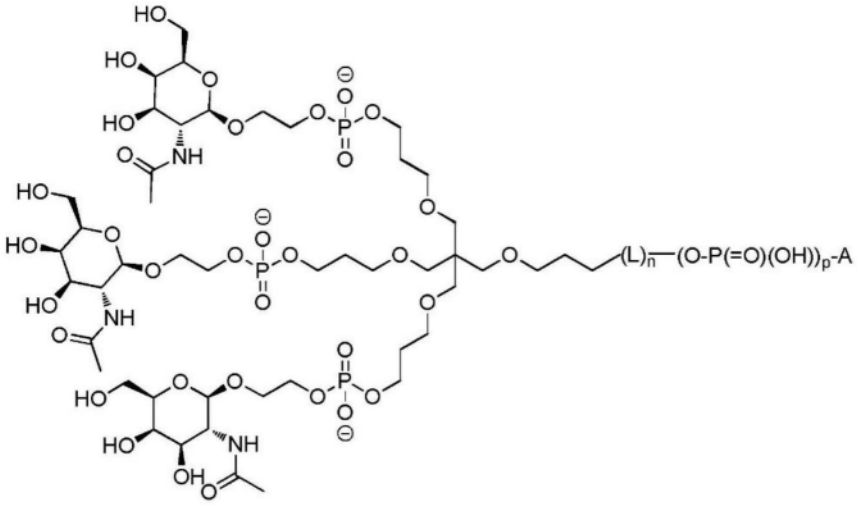

OH
HO
O
HO
NH
O
O
O
O
O
O
O
NH
O
OH
HO
O
HO
NH
O
O
O
O
O
O
O
NH
H
N
O
N
H
O
H
N
O
N
H
(L)n—(O-P(=O)(OH))p-A
OH
HO
O
HO
NH
O
O
O
O
O
O
O
NH

图6(续)

E1



F1

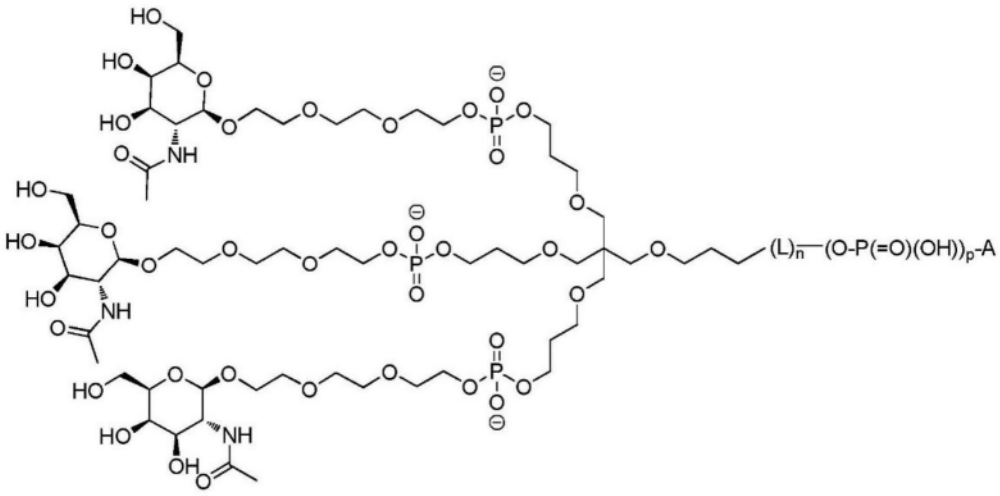
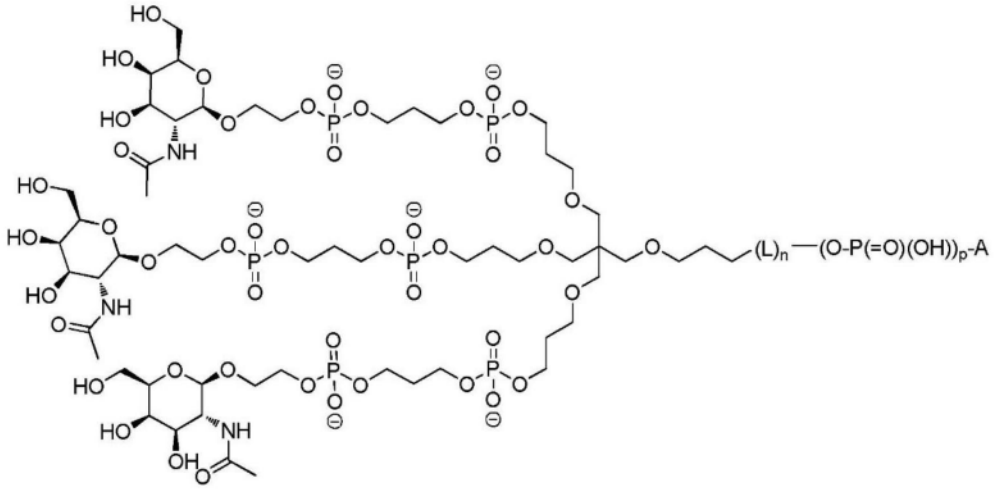
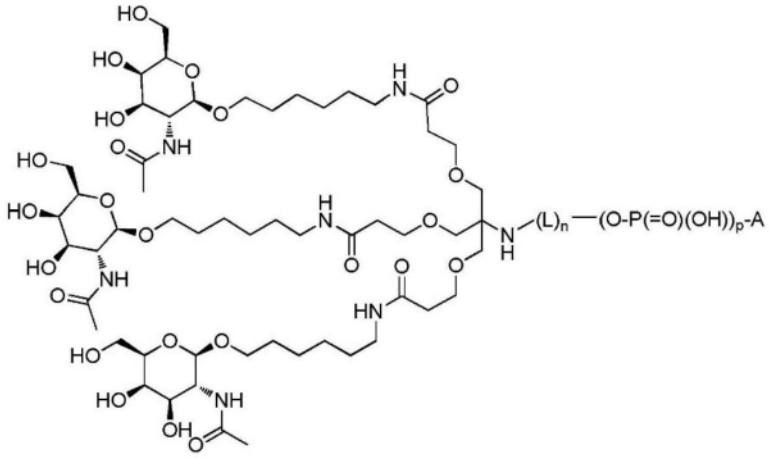


图6(续)

G1


HO
HO
HO
NH
O
HO
HO
HO
NH
O
HO
HO
NH
OH
O
O
P
O
O
O

I1


HO
HO
HO
O
NH
O
H
N
O
O
HO
HO
HO
O
NH
O
H
N
O
O
O
N
H
(L)n
(O-P(=O)(OH))p-A
HN
HO
HO
O
NH
OH
O

J1

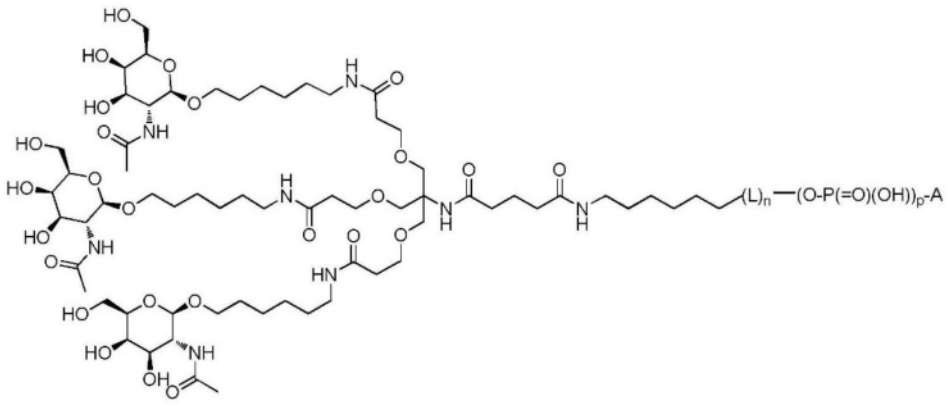
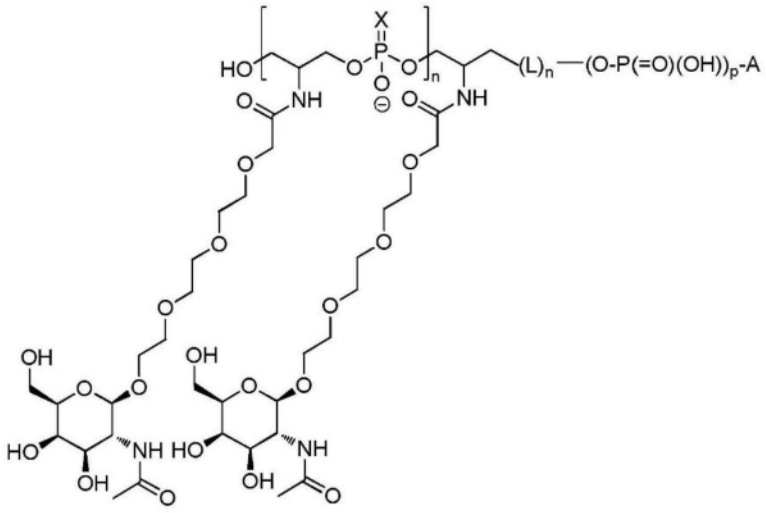

HO
HO
HO
O
NH
O
H
N
O
O
HO
HO
HO
O
NH
O
H
N
O
O
O
N
H
O
O
N
(L)n
(O-P(=O)(OH))p-A
HN
HO
HO
O
NH
OH
O

图6(续)

L1



L2

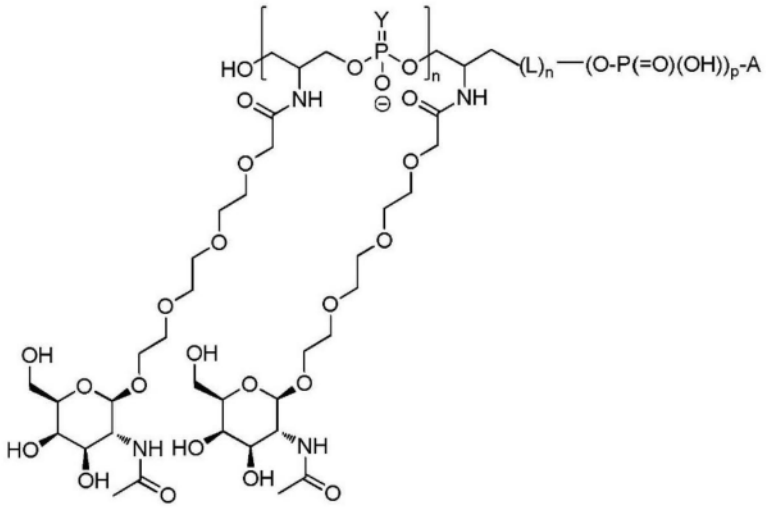


图6(续)

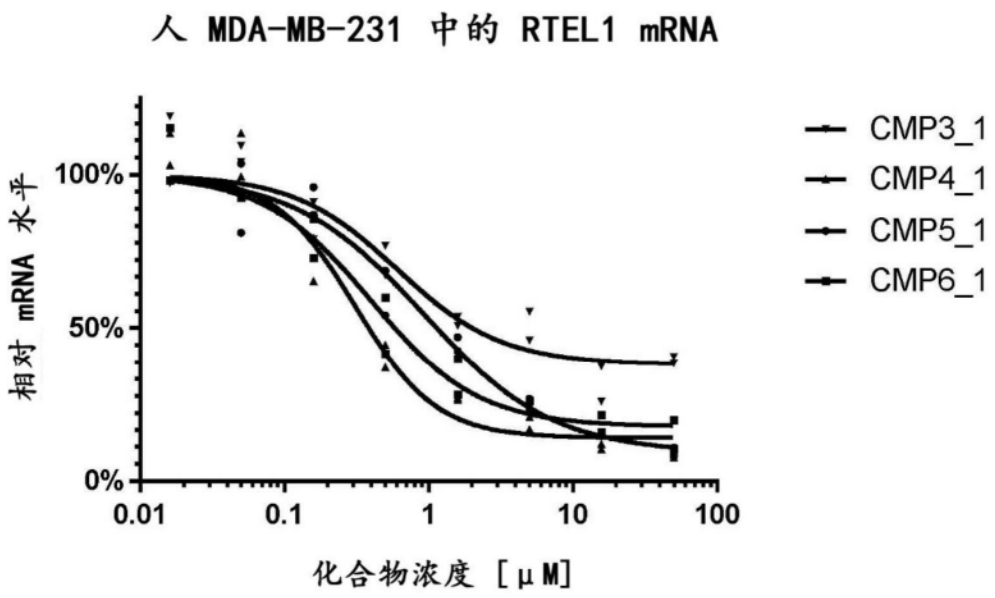

人 MDA-MB-231 中的 RTEL1 mRNA
相对 mRNA 水平
100%
50%
0%
0.01
0.1
1
10
100
化合物浓度 [μM]
CMP3_1
CMP4_1
CMP5_1
CMP6_1

图7

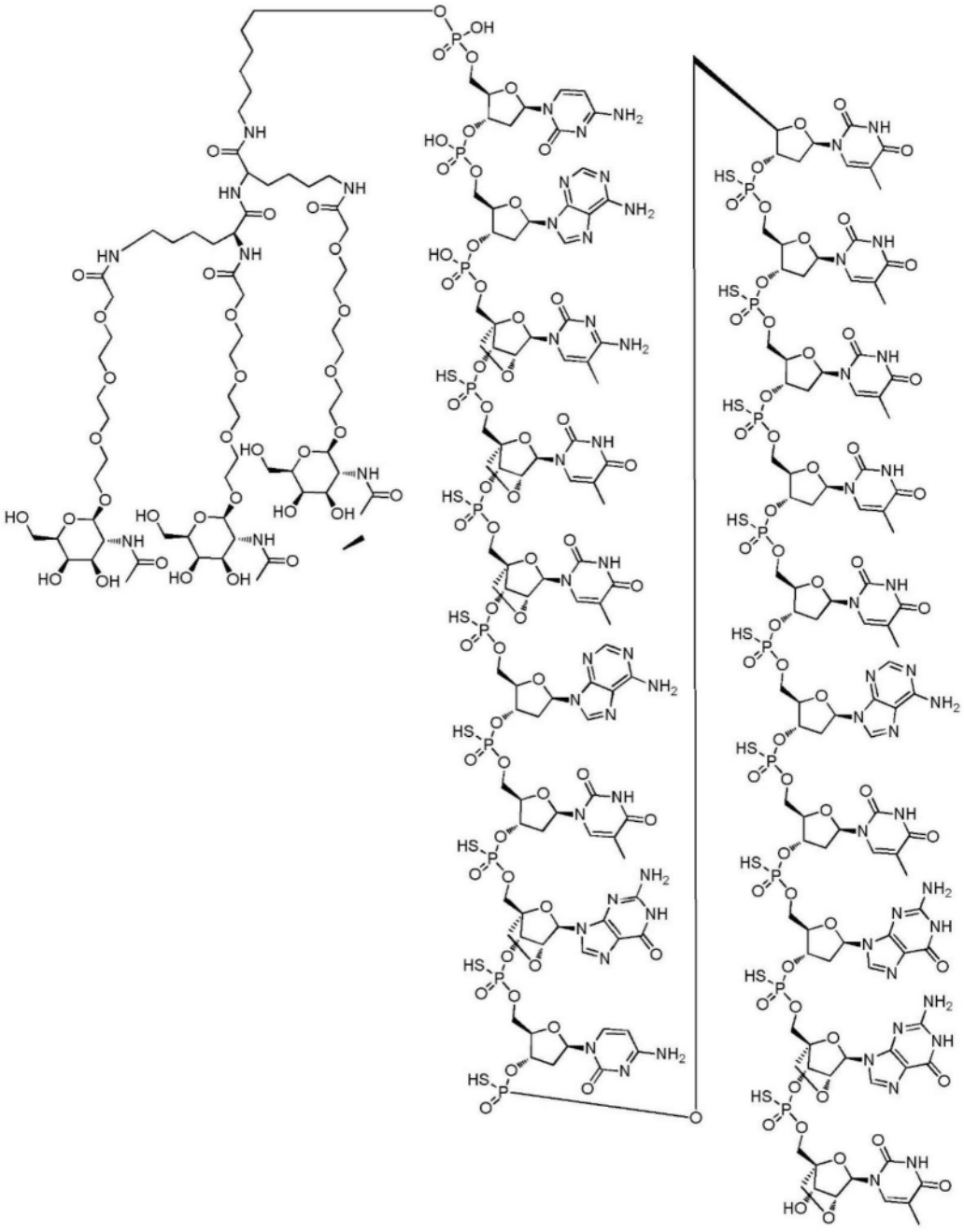


图8

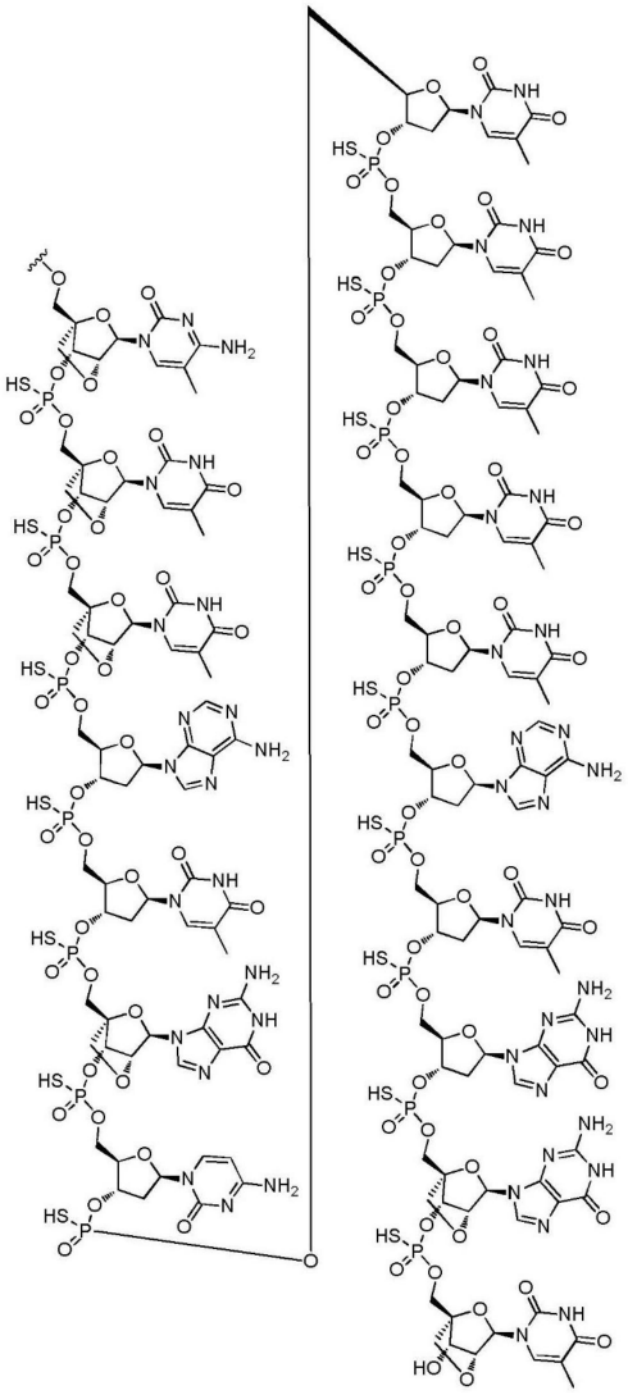


图8A

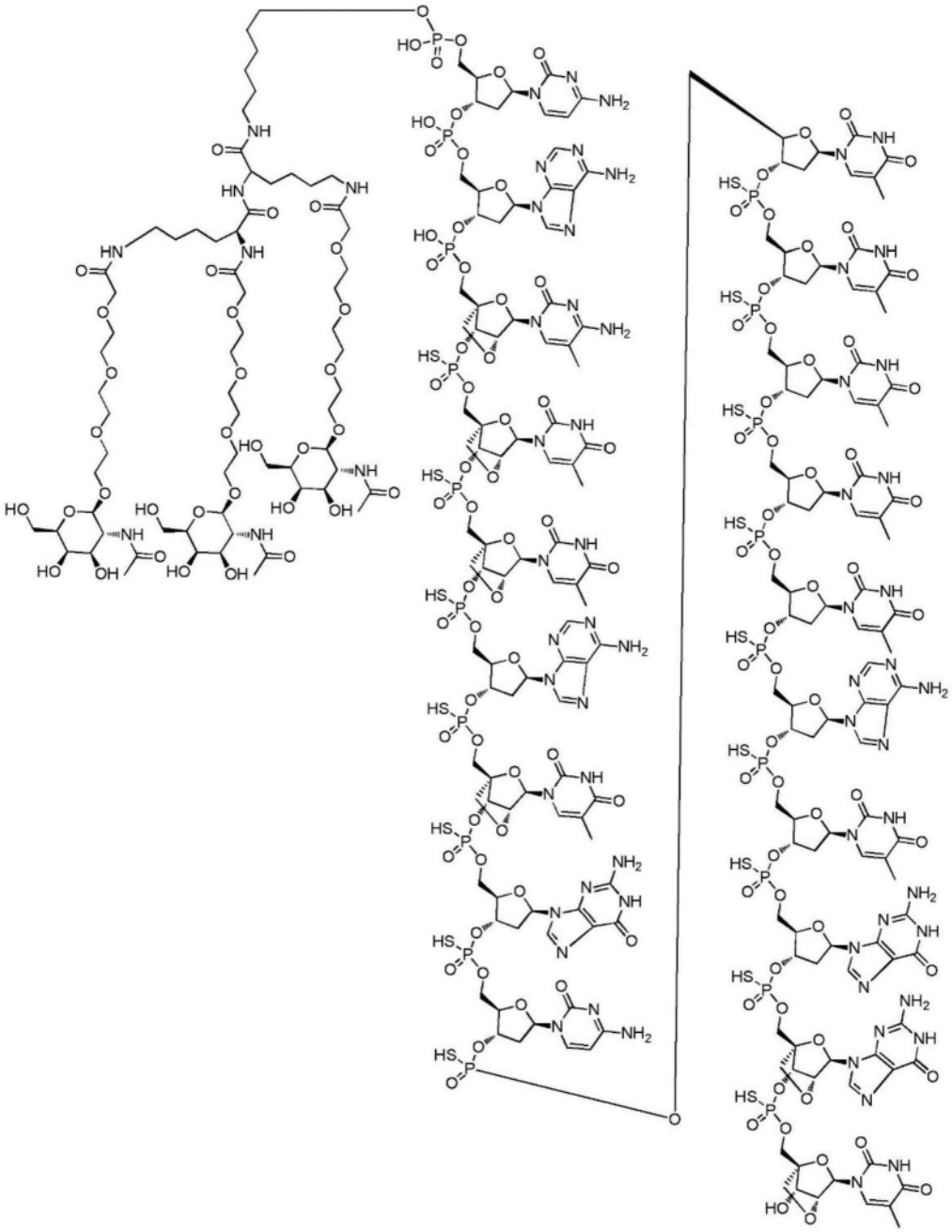


图9

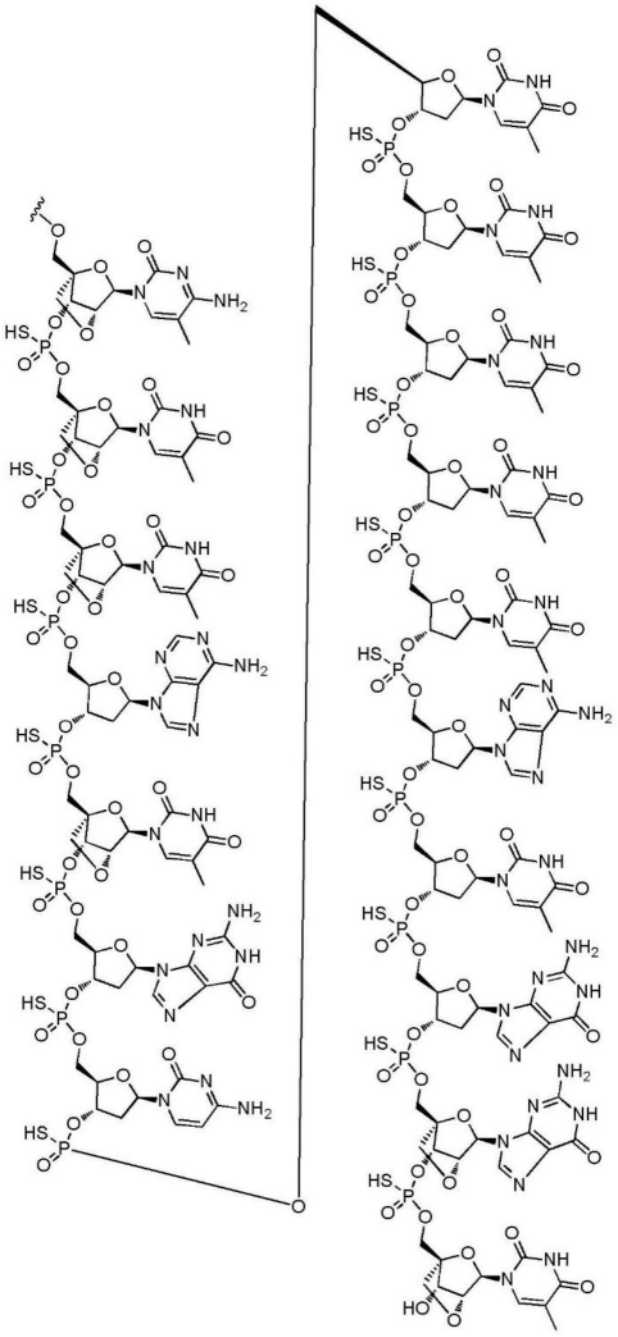


图9A

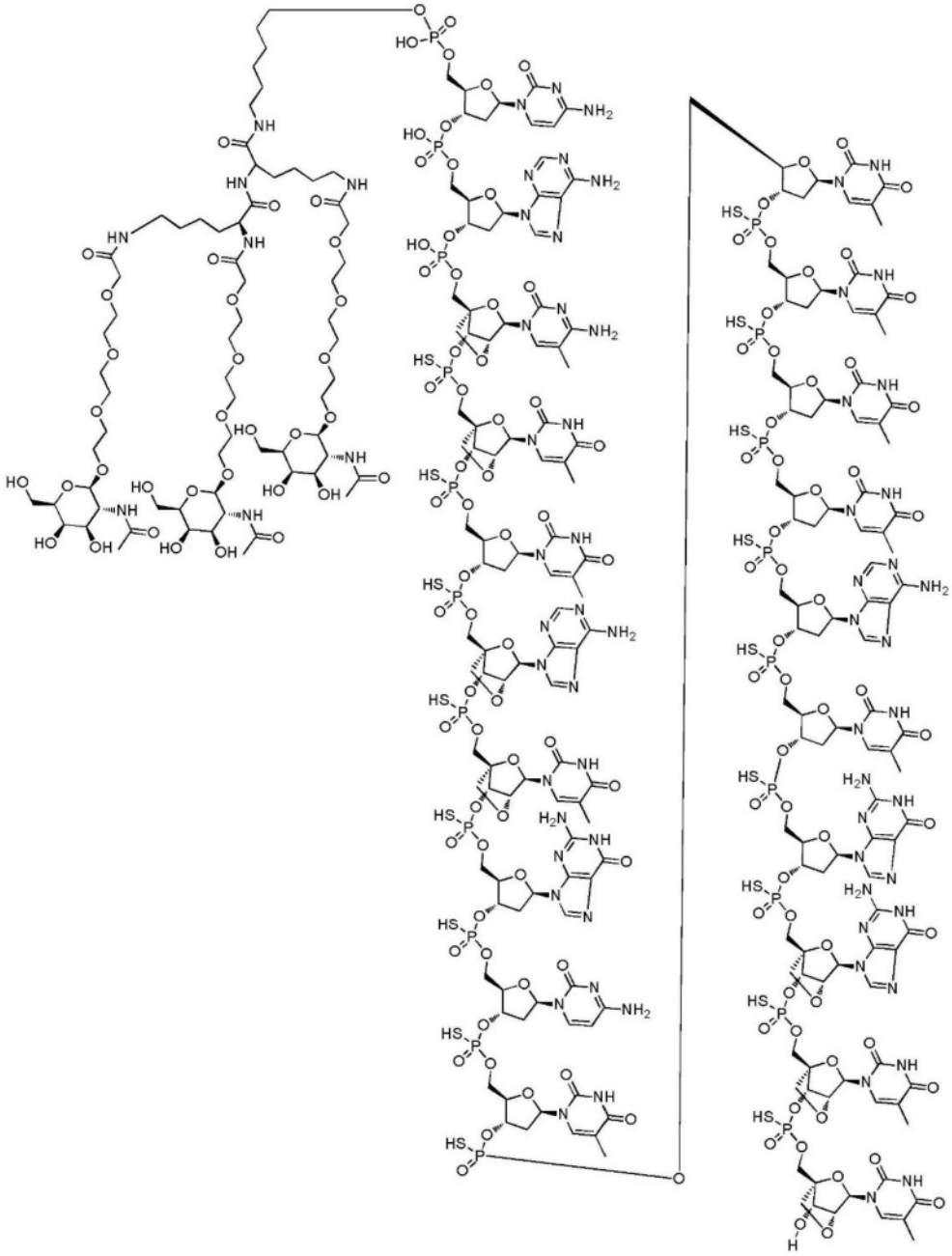


图10

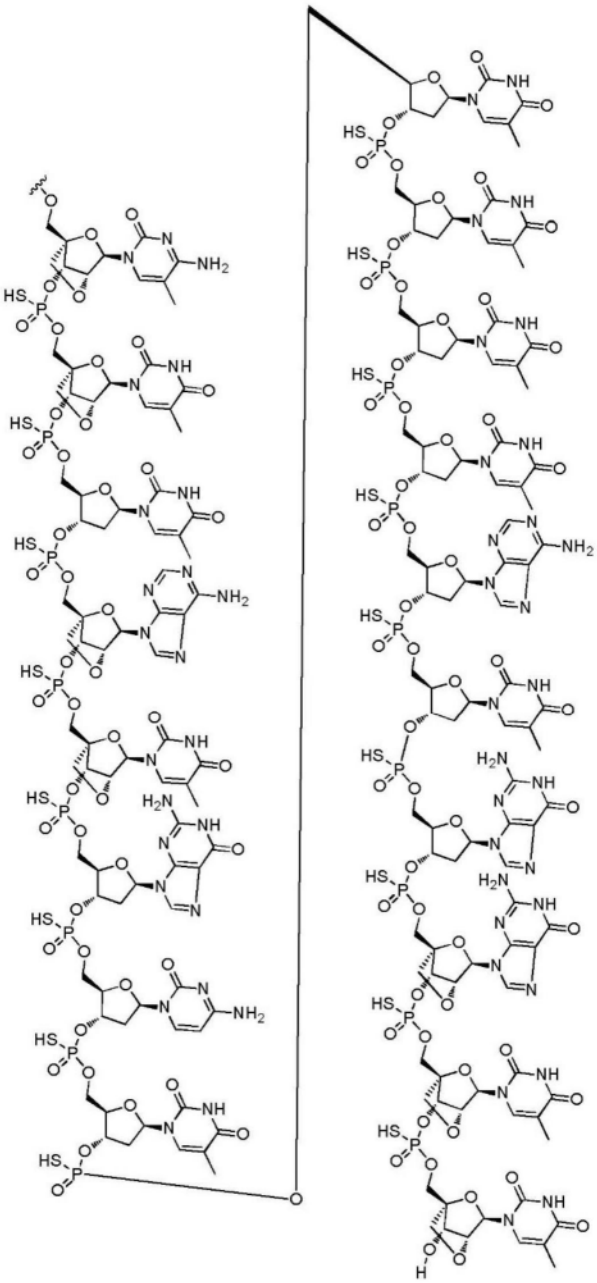


图10A

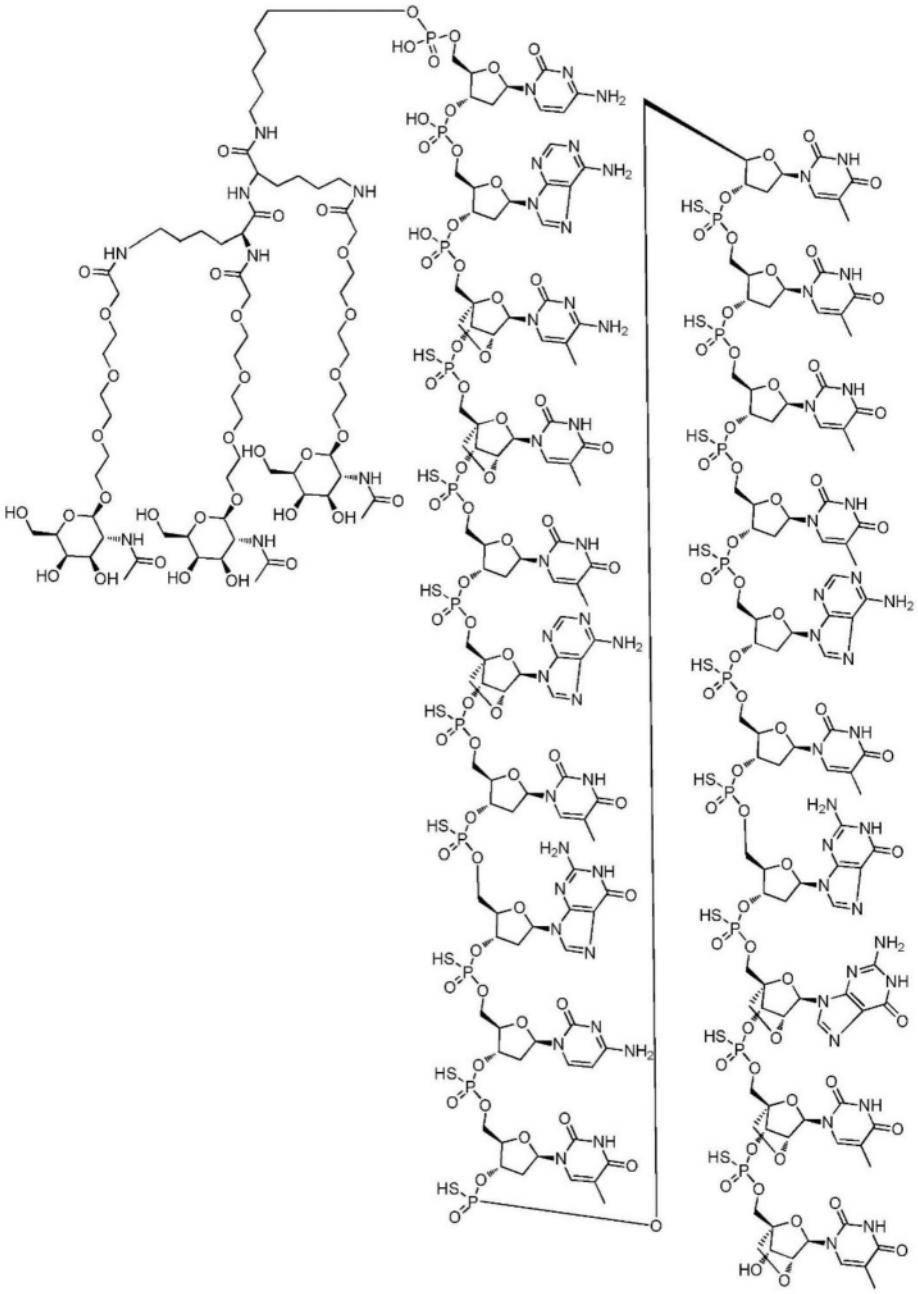


图11

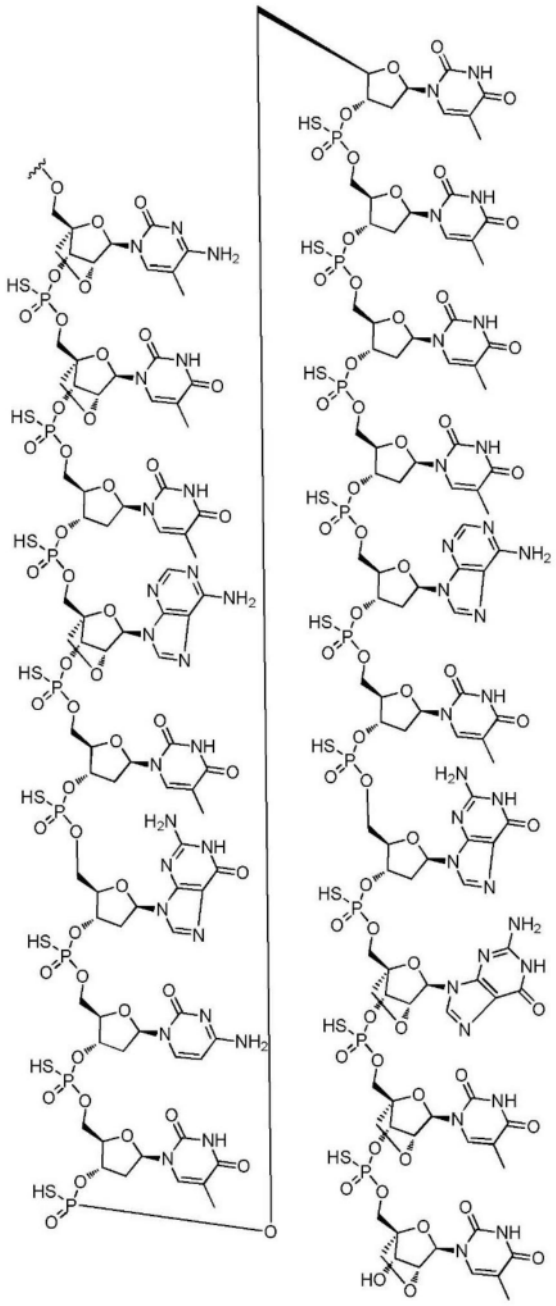


图11A

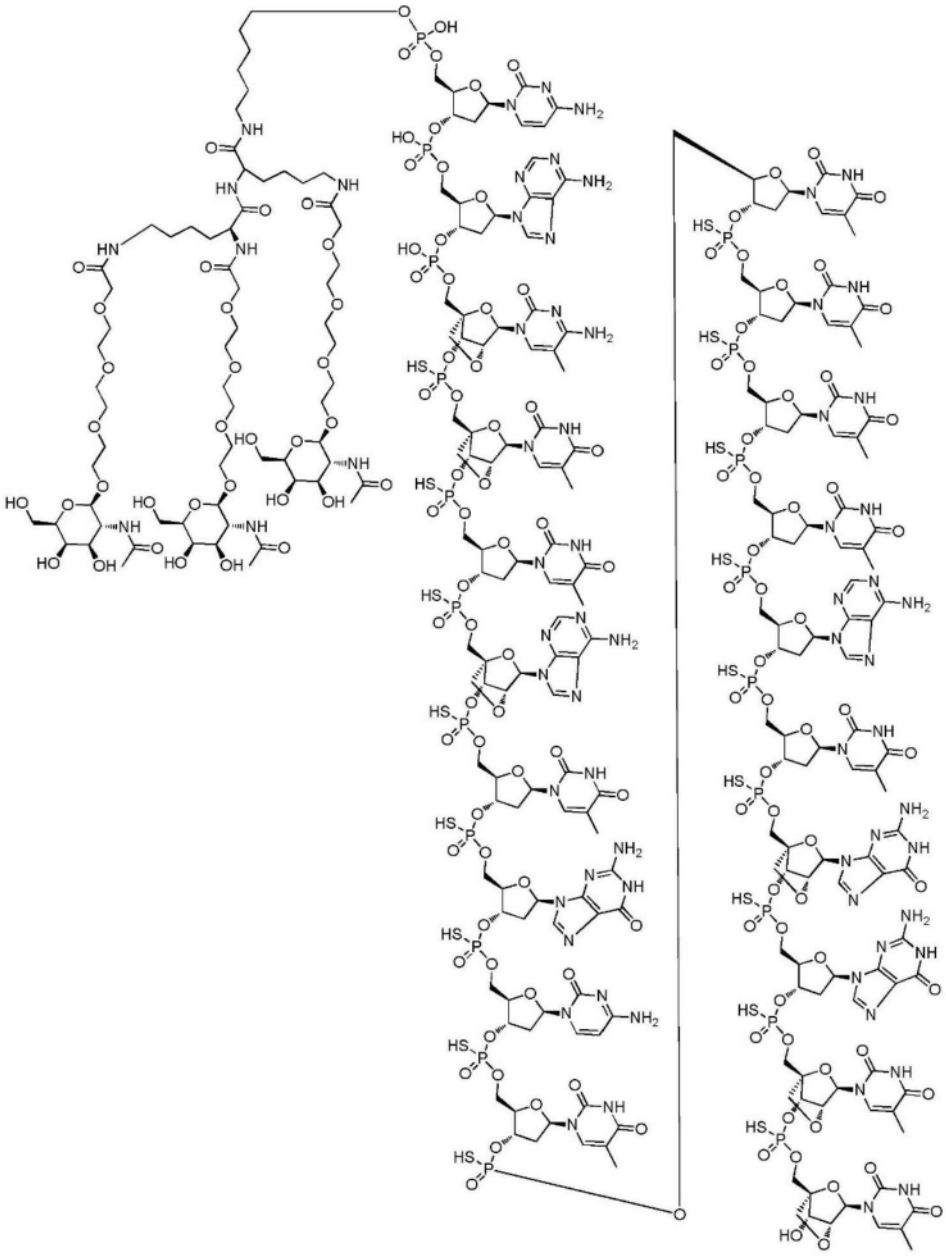


图12

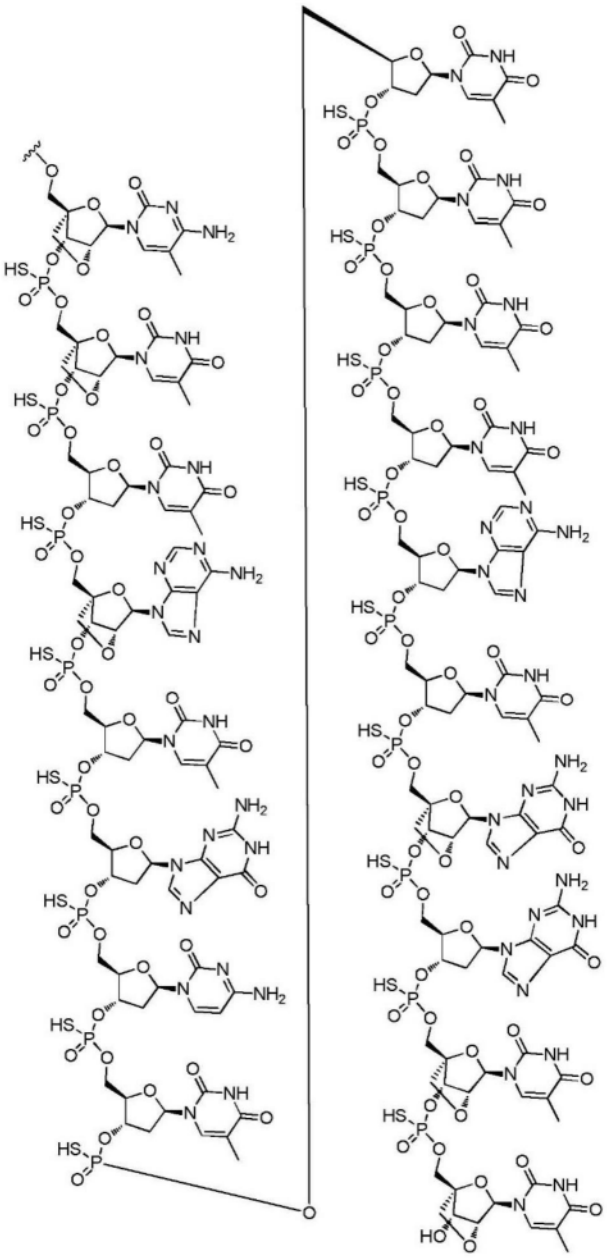


图12A

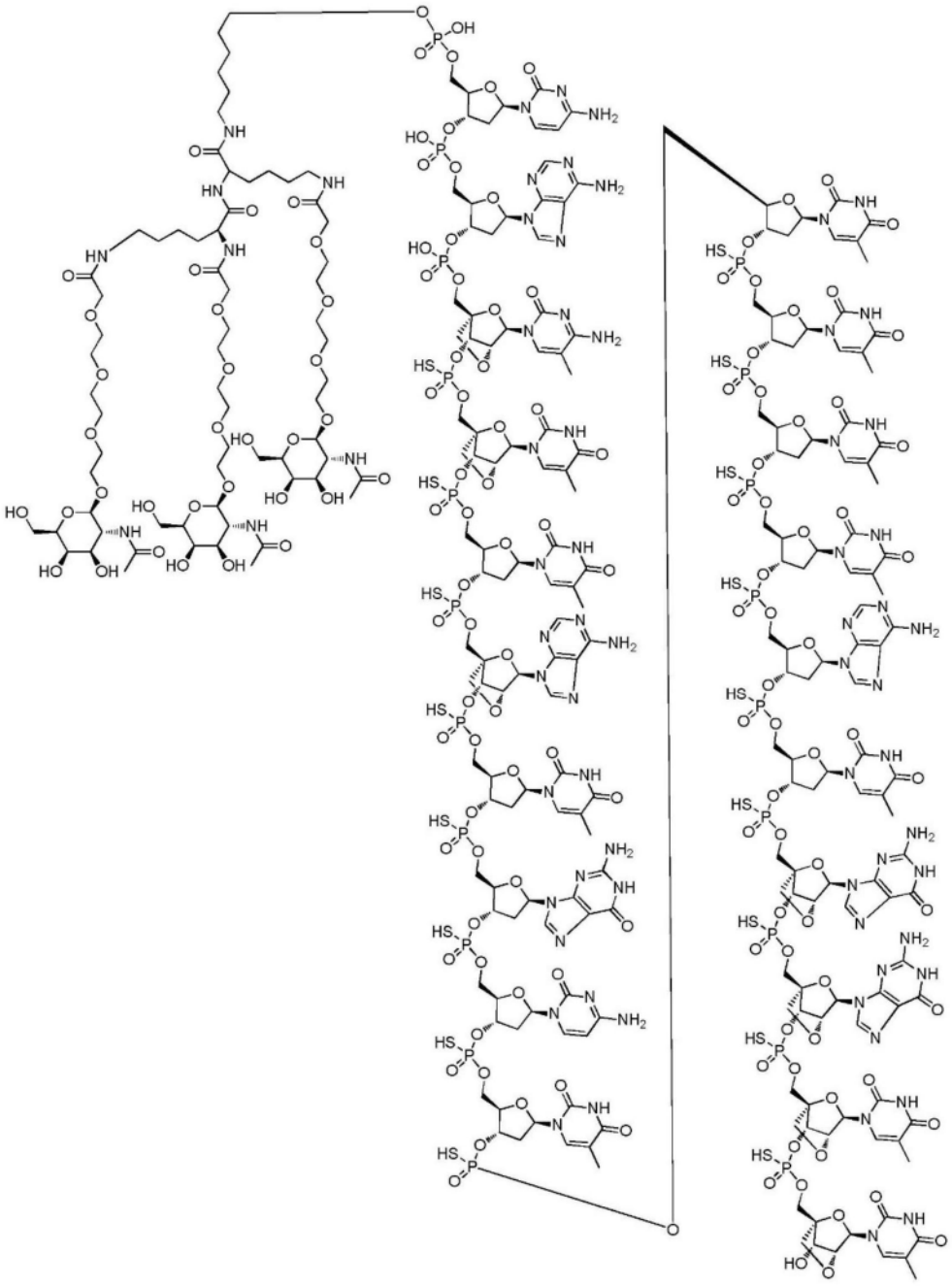


图13

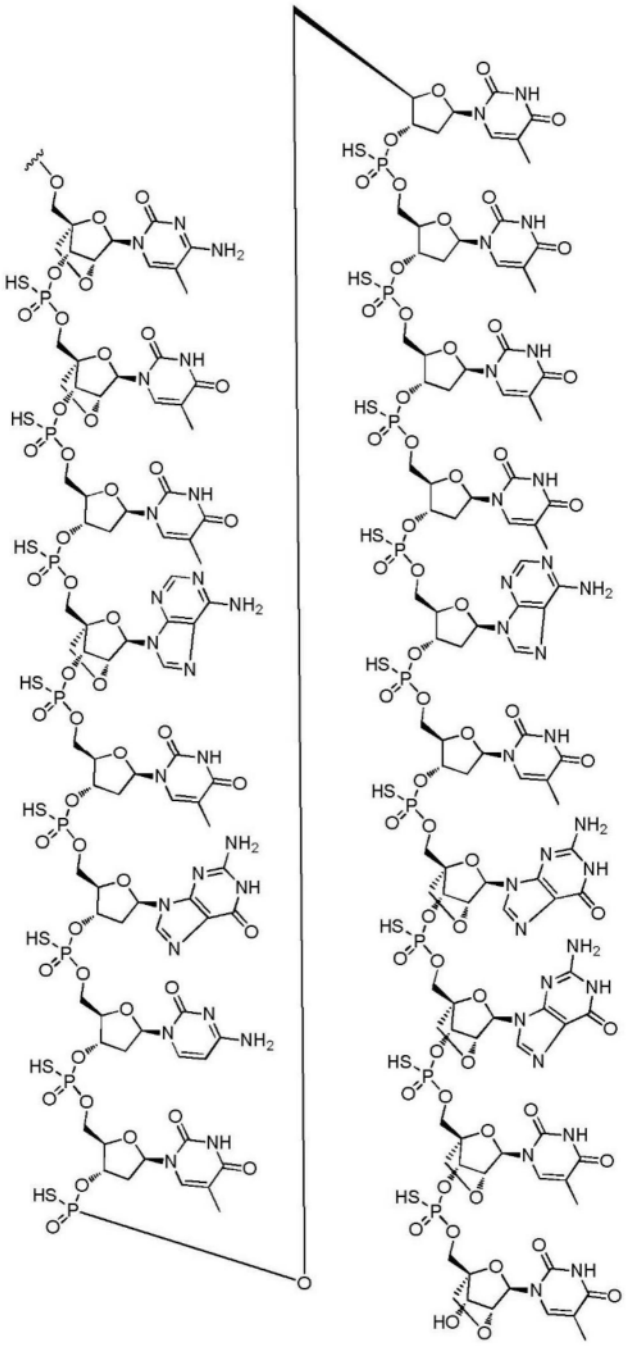


图13A

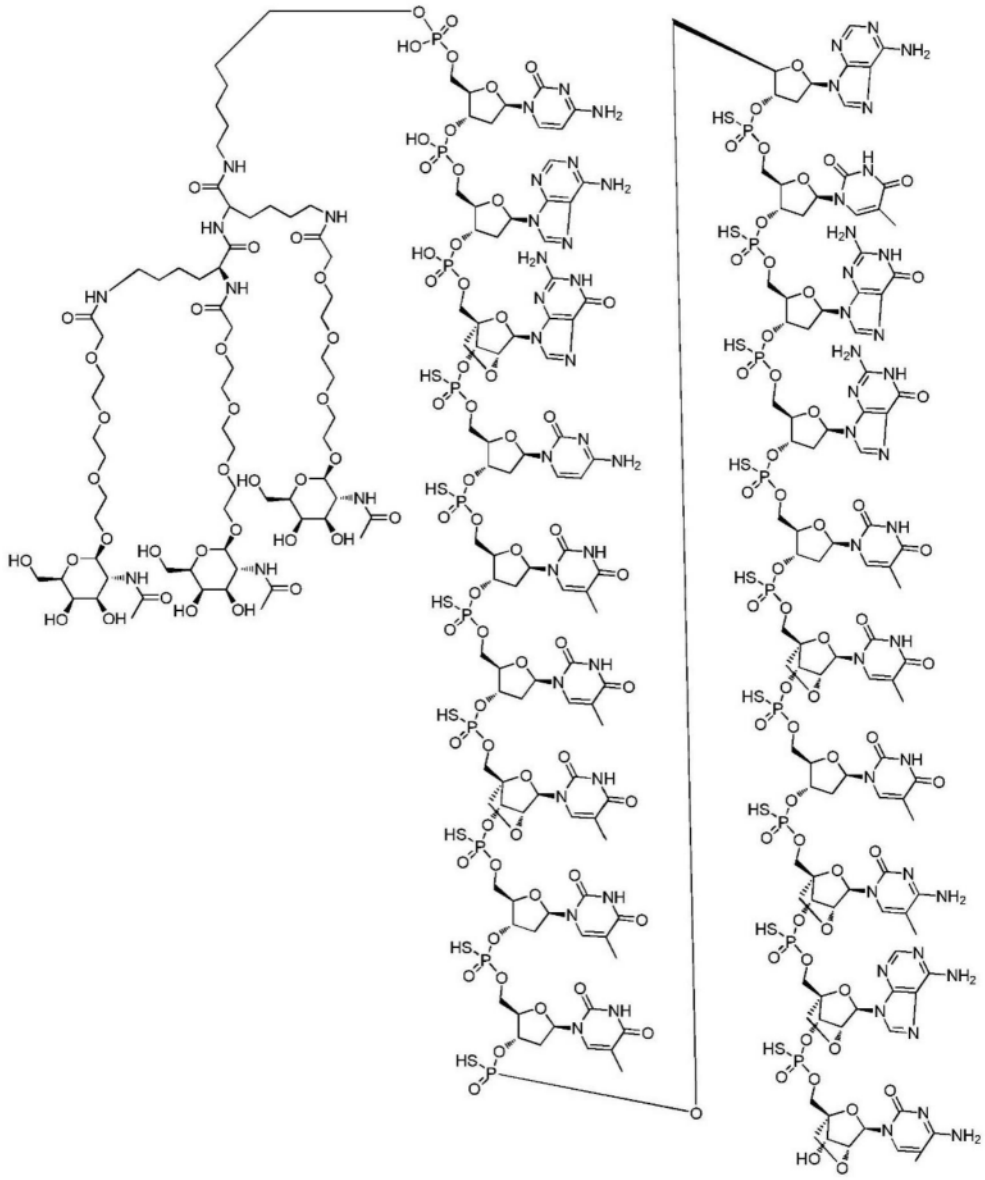


图14

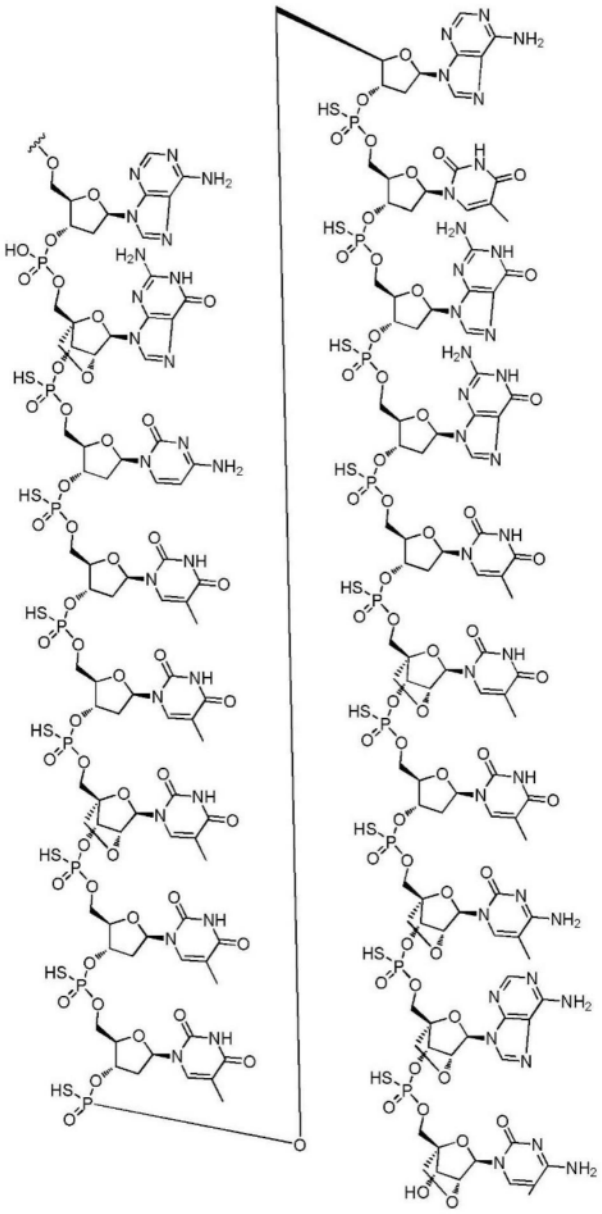


图14A

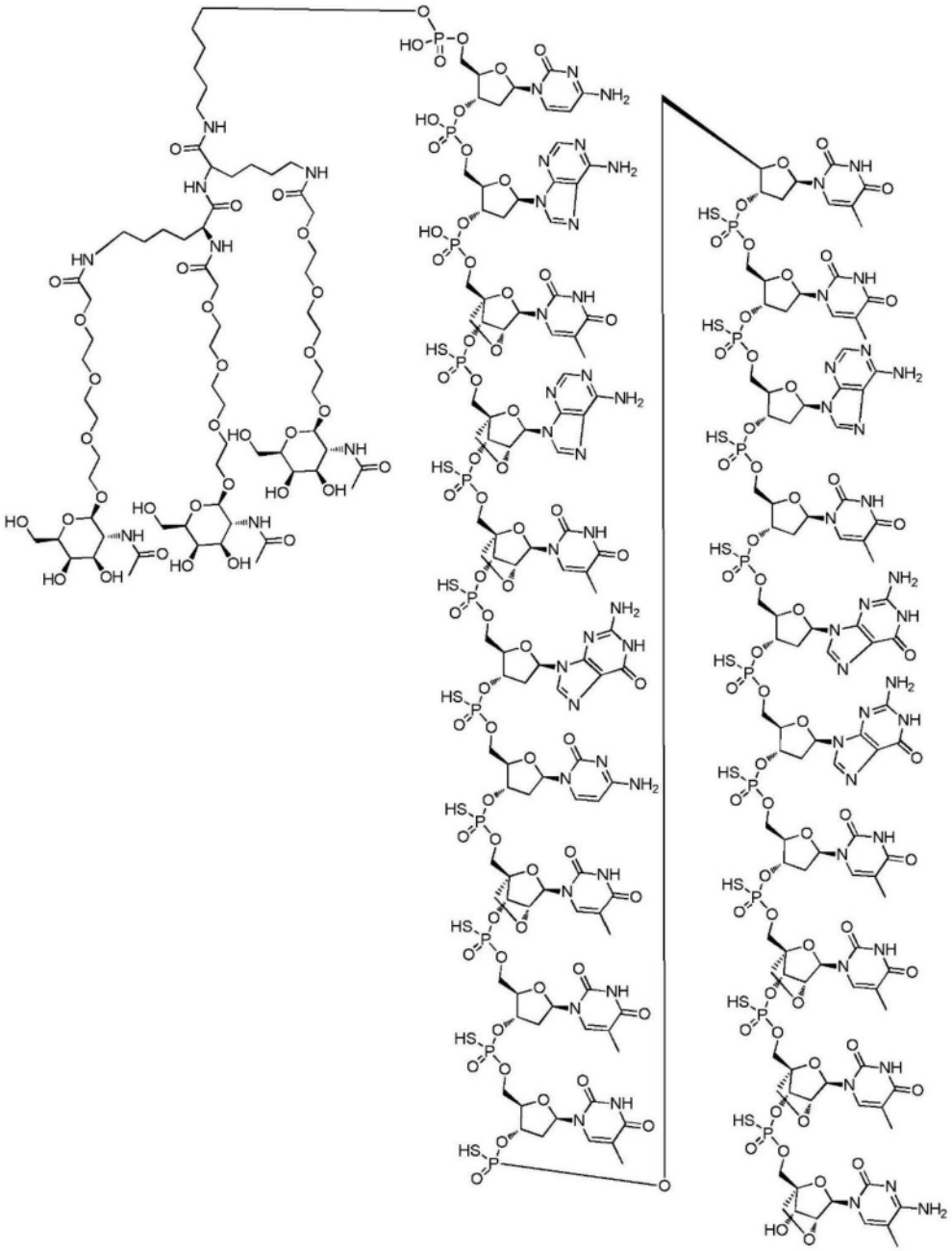


图15

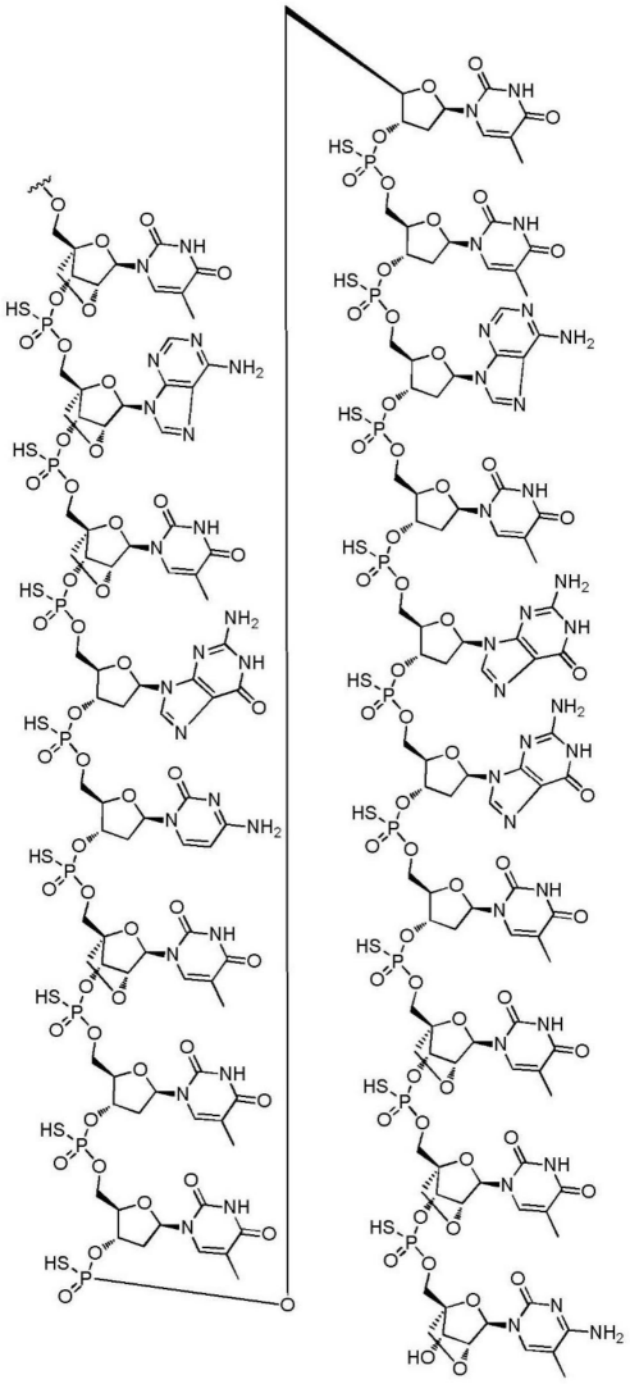


图15A

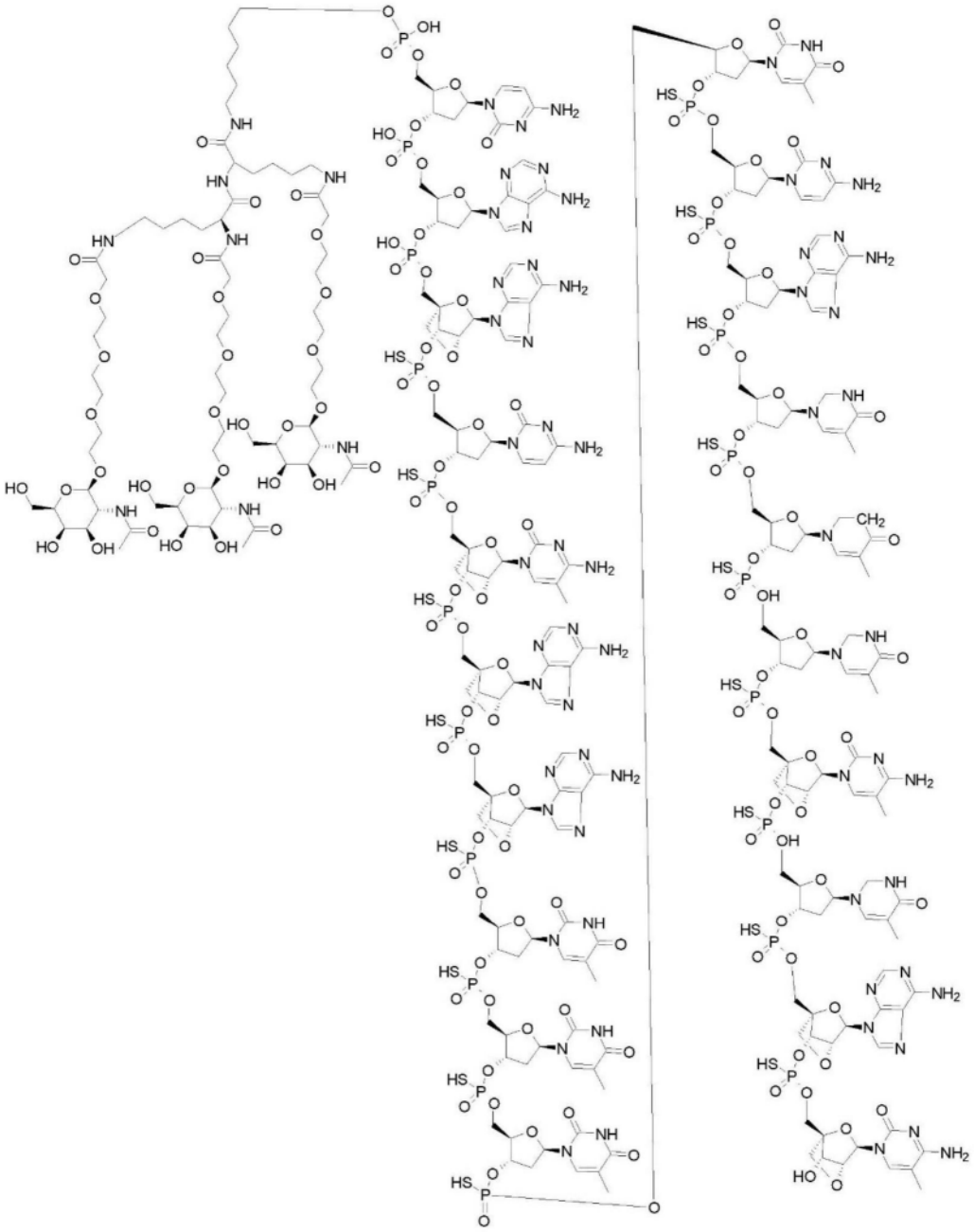


图16

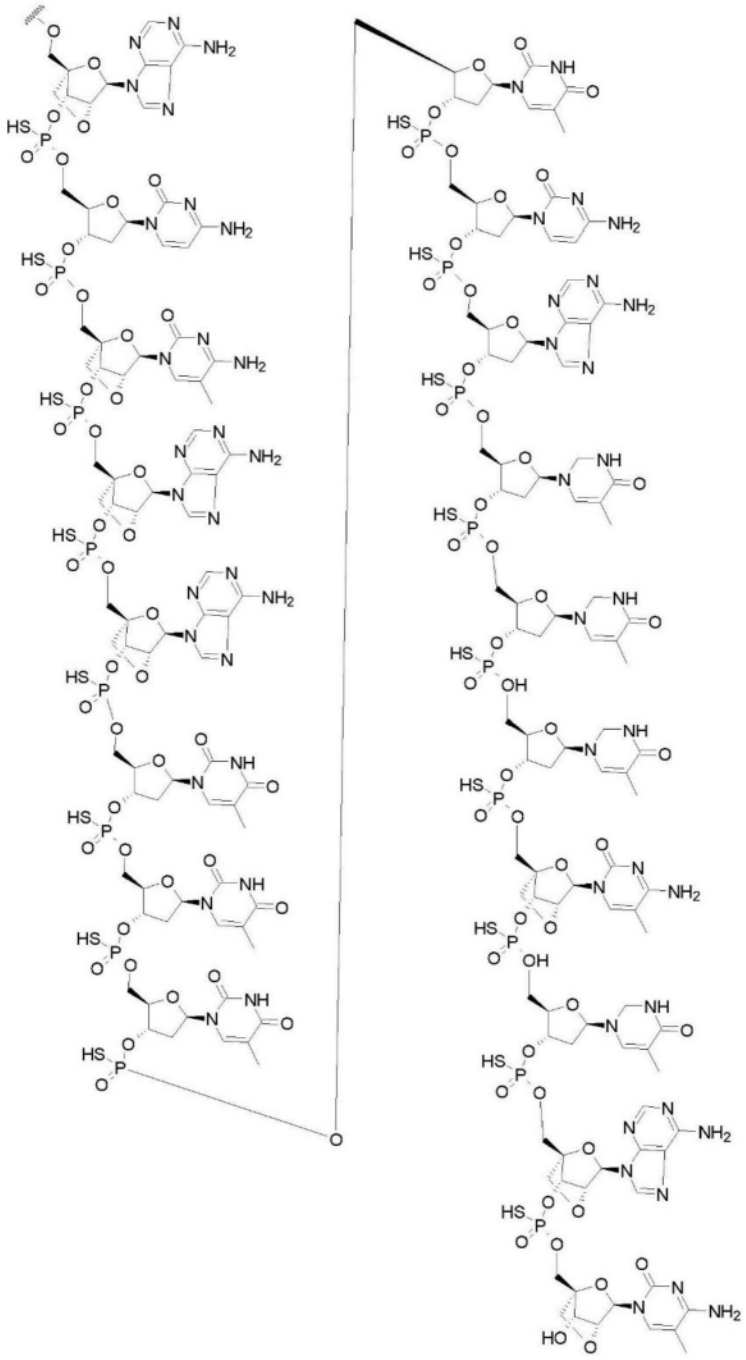


图16A

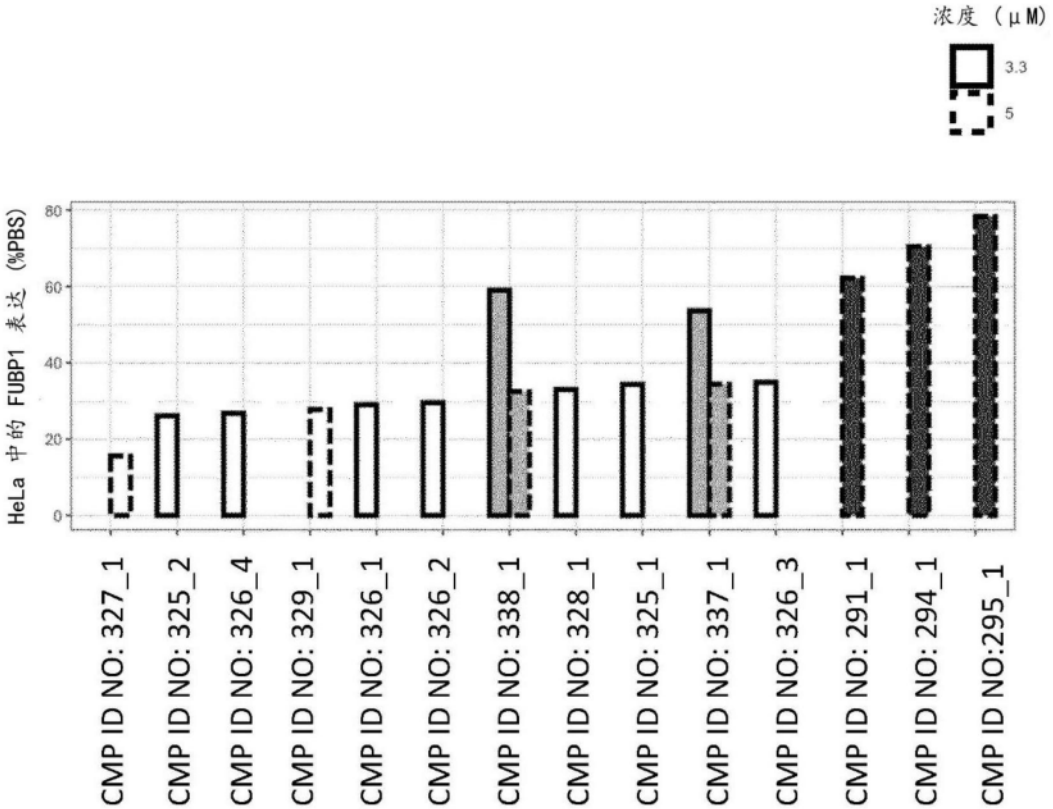

浓度（μM）
3.3
5
HeLa 中的 FUBP1 表达 (%PBS)
80
60
40
20
0
CMP ID NO: 327_1
CMP ID NO: 325_2
CMP ID NO: 326_4
CMP ID NO: 329_1
CMP ID NO: 326_1
CMP ID NO: 326_2
CMP ID NO: 338_1
CMP ID NO: 328_1
CMP ID NO: 325_1
CMP ID NO: 337_1
CMP ID NO: 326_3
CMP ID NO: 291_1
CMP ID NO: 294_1
CMP ID NO:295_1

图17

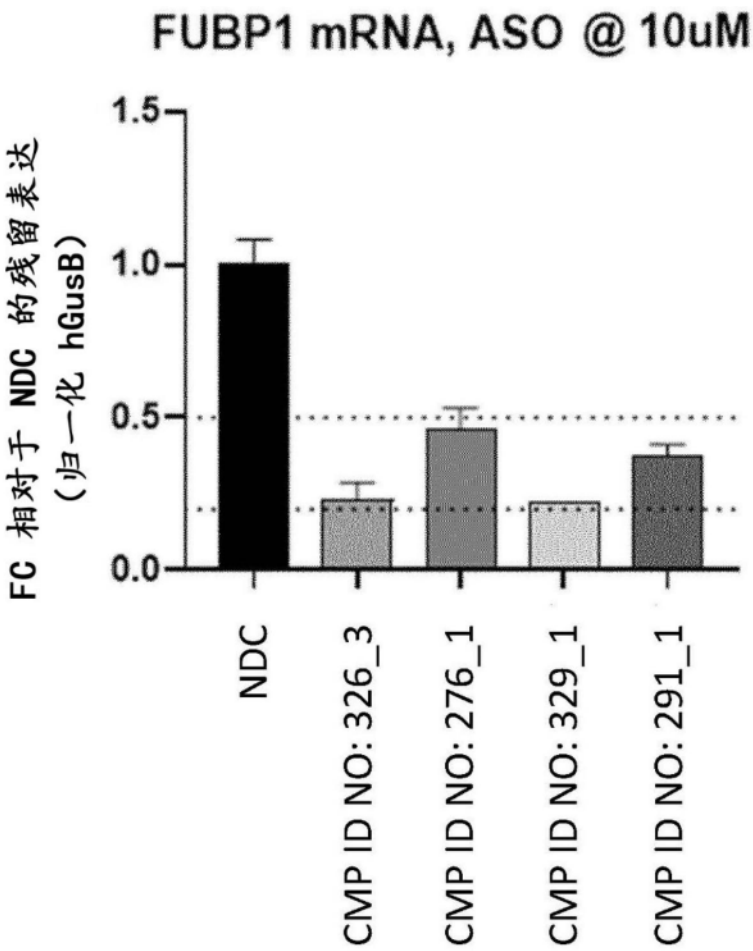

FUBP1 mRNA, ASO @ 10uM
FC 相对于 NDC 的残留表达
（归一化 hGusB）
1.5
1.0
0.5
0.0
NDC
CMP ID NO: 326_3
CMP ID NO: 276_1
CMP ID NO: 329_1
CMP ID NO: 291_1

图18

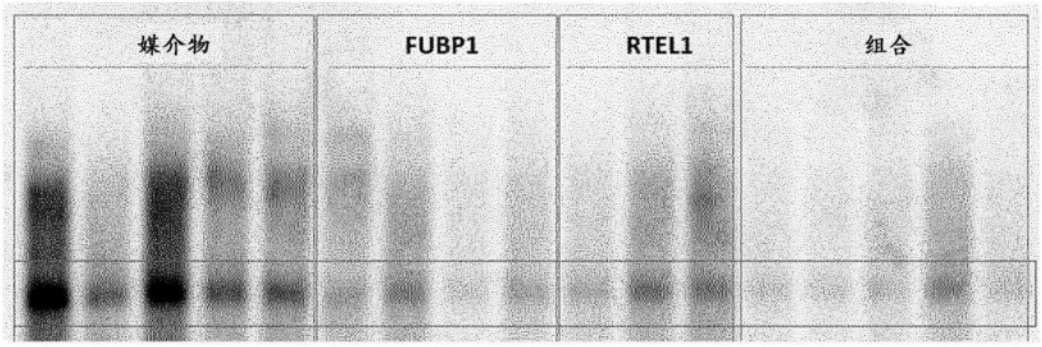

媒介物
FUBP1
RTEL1
组合

图19

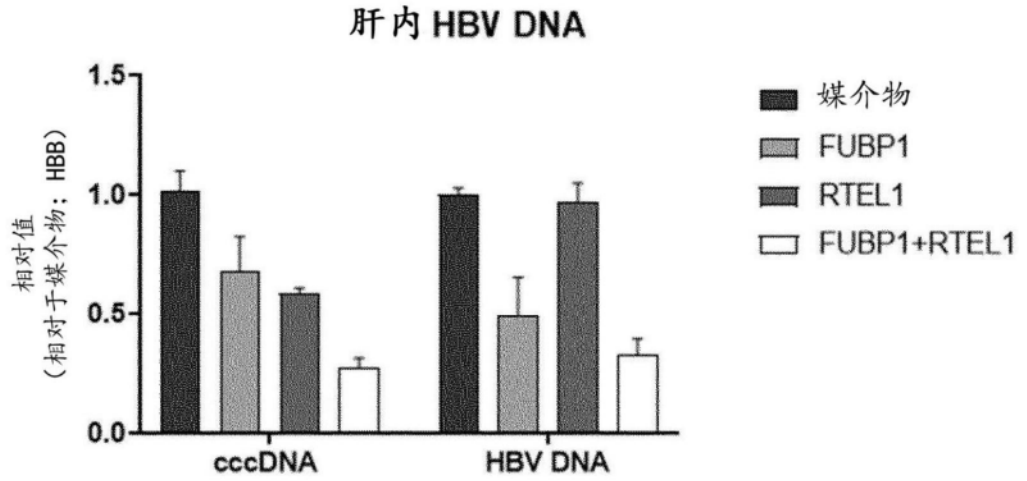

肝内 HBV DNA
相对值
（相对于媒介物：HBB）
1.5
1.0
0.5
0.0
cccDNA
HBV DNA
媒介物
FUBP1
RTEL1
FUBP1+RTEL1

图20

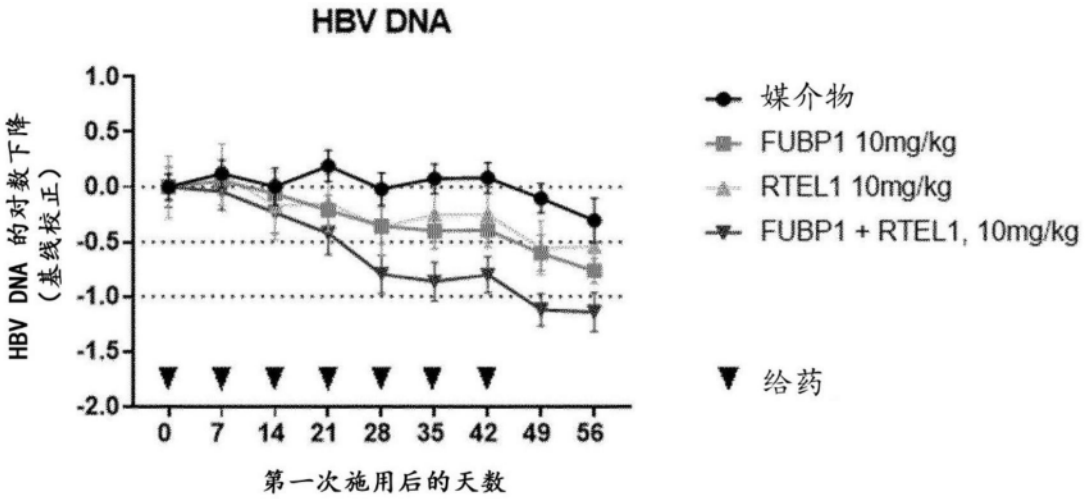

HBV DNA
HBV DNA 的对数下降
（基线校正）
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
第一次施用后的天数
媒介物
FUBP1 10mg/kg
RTEL1 10mg/kg
FUBP1 + RTEL1, 10mg/kg
给药

图21

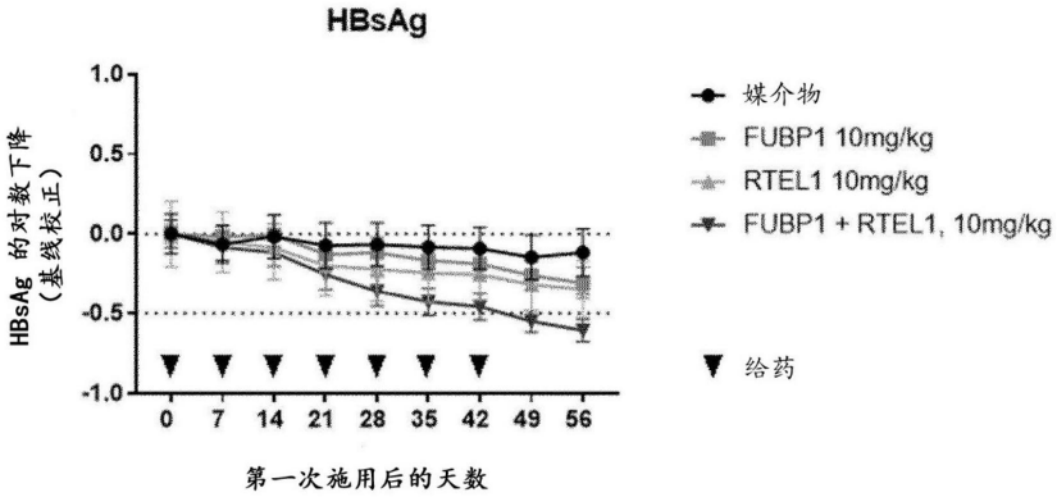

HBsAg
HBsAg 的对数下降
(基线校正)
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
第一次施用后的天数
媒介物
FUBP1 10mg/kg
RTEL1 10mg/kg
FUBP1 + RTEL1, 10mg/kg
给药

图22

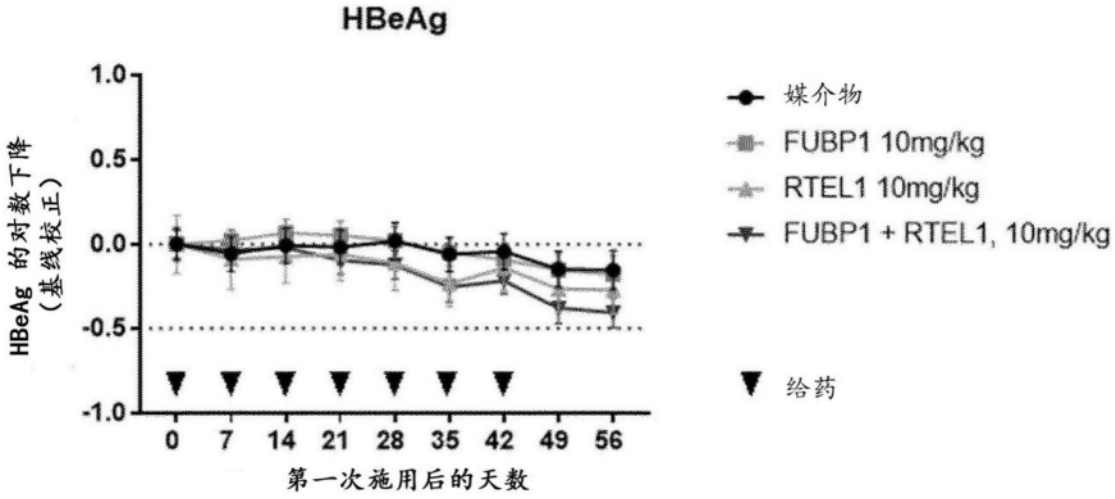

HBeAg
HBeAg 的对数下降
(基线校正)
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
第一次施用后的天数
媒介物
FUBP1 10mg/kg
RTEL1 10mg/kg
FUBP1 + RTEL1, 10mg/kg
给药

图23

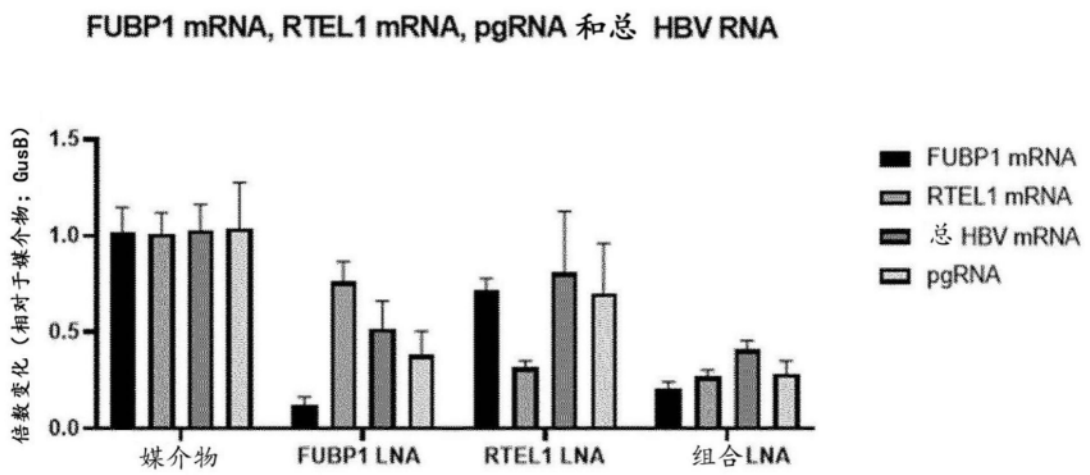

FUBP1 mRNA, RTEL1 mRNA, pgRNA 和总 HBV RNA
倍数变化（相对于媒介物；GusB）
1.5
1.0
0.5
0.0
媒介物
FUBP1 LNA
RTEL1 LNA
组合LNA
FUBP1 mRNA
RTEL1 mRNA
总 HBV mRNA
pgRNA

图24

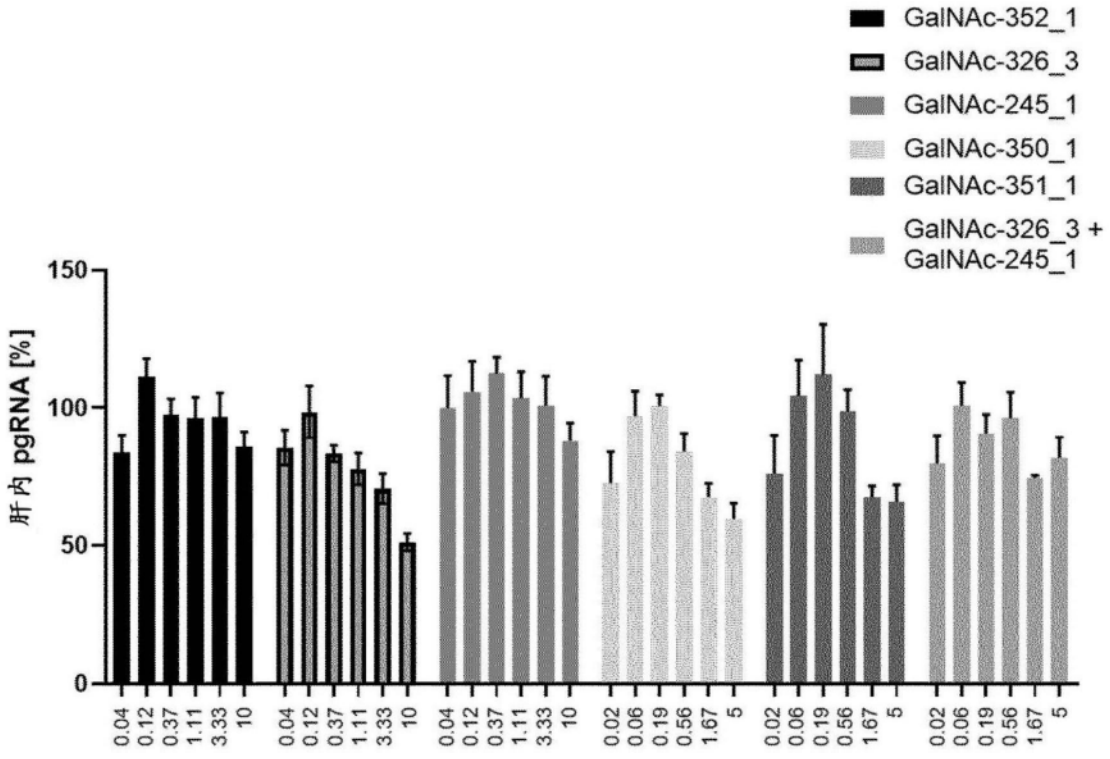

GalNAc-352_1
GalNAc-326_3
GalNAc-245_1
GalNAc-350_1
GalNAc-351_1
GalNAc-326_3 +
GalNAc-245_1
肝内 pgRNA [%]
150
100
50
0
0.04 0.12 0.37 1.11 3.33 10
0.04 0.12 0.37 1.11 3.33 10
0.04 0.12 0.37 1.11 3.33 10
0.02 0.06 0.19 0.56 1.67 5
0.02 0.06 0.19 0.56 1.67 5
0.02 0.06 0.19 0.56 1.67 5

图25

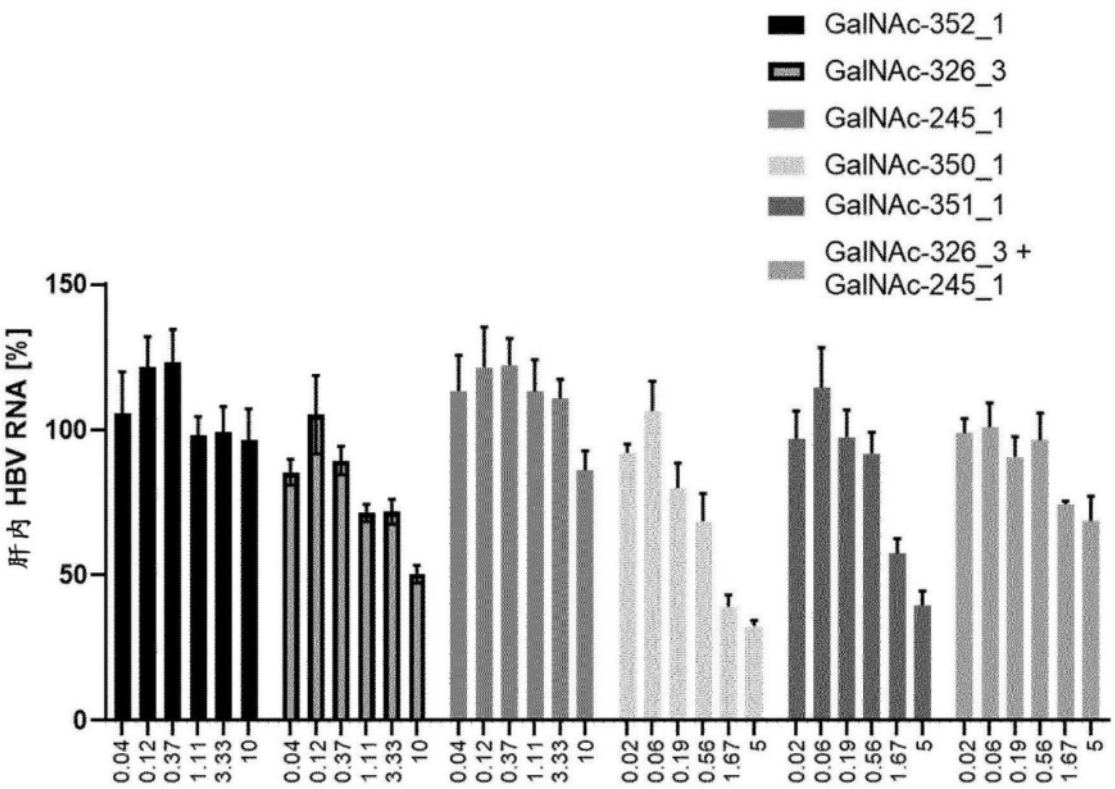

GalNAc-352_1
GalNAc-326_3
GalNAc-245_1
GalNAc-350_1
GalNAc-351_1
GalNAc-326_3 +
GalNAc-245_1
肝内 HBV RNA [%]
150
100
50
0
0.04
0.12
0.37
1.11
3.33
10
0.02
0.06
0.19
0.56
1.67
5

图26

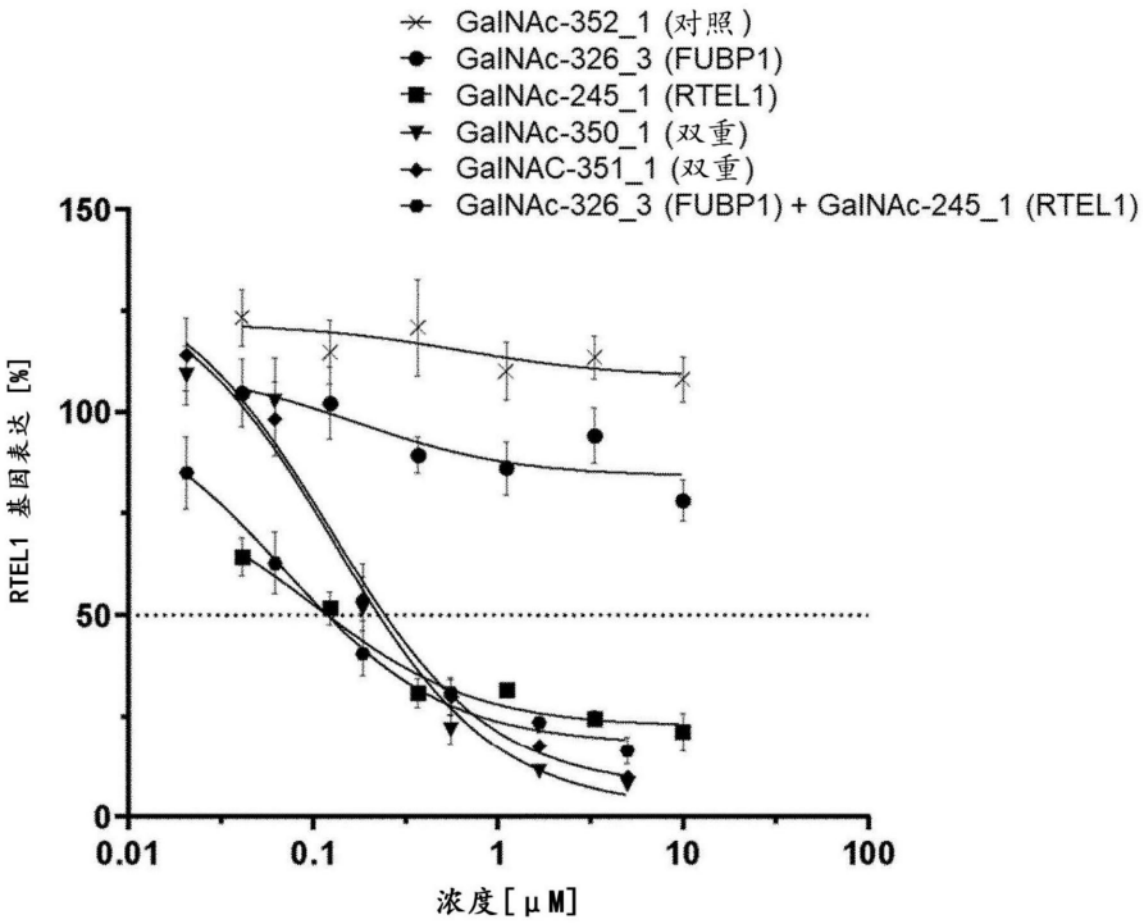

GalNAc-352_1 (对照)
GalNAc-326_3 (FUBP1)
GalNAc-245_1 (RTEL1)
GalNAc-350_1 (双重)
GalNAC-351_1 (双重)
GalNAc-326_3 (FUBP1) + GalNAc-245_1 (RTEL1)
RTEL1 基因表达 [%]
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
浓度[μM]

图27

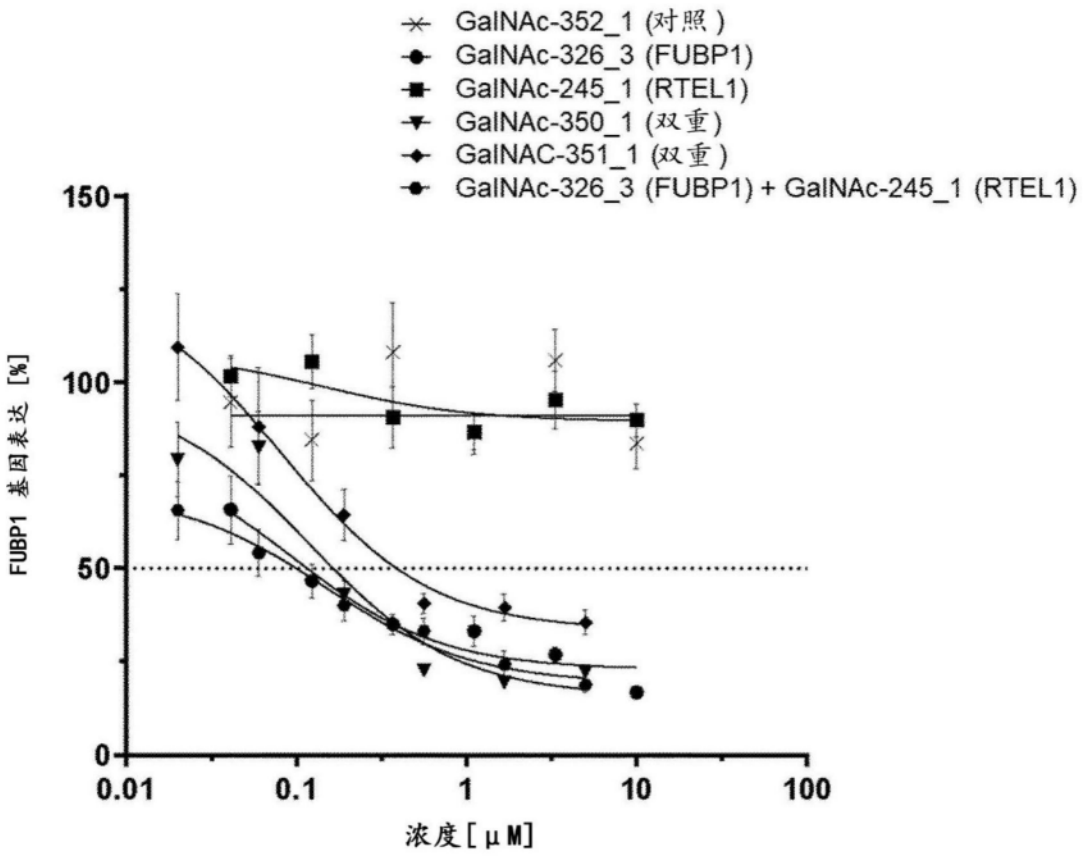

GalNAc-352_1 (对照)
GalNAc-326_3 (FUBP1)
GalNAc-245_1 (RTEL1)
GalNAc-350_1 (双重)
GalNAC-351_1 (双重)
GalNAc-326_3 (FUBP1) + GalNAc-245_1 (RTEL1)
FUBP1 基因表达 [%]
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
浓度[μM]

图28