



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109952378 B

(45) 授权公告日 2024.09.17

(21) 申请号 201780070383.1

(72) 发明人 S.格亚兹诺夫 L.比尔格曼 J.洪

(22) 申请日 2017.09.14

V.拉万施 S.马蒂内.蒙特罗

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

申请公布号 CN 109952378 A

专利代理人 初明明 黄希贵

(43) 申请公布日 2019.06.28

(51) Int.CI.

(30) 优先权数据

C12N 15/113 (2006.01)

62/394738 2016.09.14 US

A61K 31/712 (2006.01)

62/394739 2016.09.14 US

A61K 31/7125 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07H 21/02 (2006.01)

2019.05.14

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

US 2014121261 A1, 2014.05.01

PCT/US2017/051644 2017.09.14

WO 0118015 A1, 2001.03.15

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2016077321 A1, 2016.05.19

W02018/053185 EN 2018.03.22

审查员 夏颖

(73) 专利权人 詹森生物制药有限公司

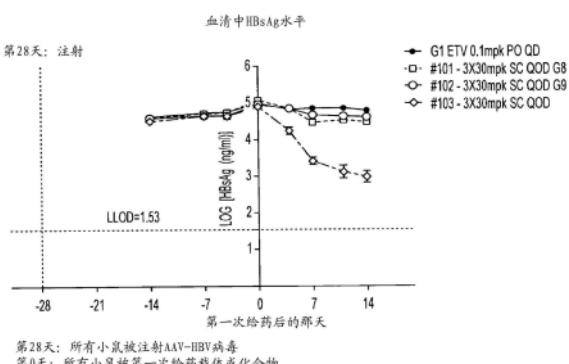
权利要求书2页 说明书159页 附图27页

(54) 发明名称

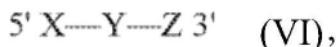
经修饰的寡核苷酸及使用方法

(57) 摘要

本发明公开了包含在2' 和/或3' 位置处修饰的经修饰寡核苷酸以及制备和使用例如对抗HBV 的方法。



1. 一种寡核苷酸，所述寡核苷酸包含以式(VI)的构建体排列的18至22个核苷酸的序列：



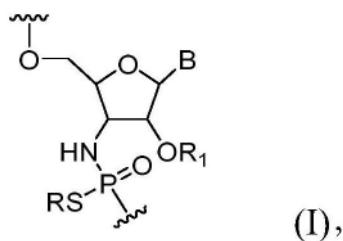
其中

X为结构域，该结构域包含2-10个连接的核苷酸的序列，

Z为结构域，该结构域包含2-10个连接的核苷酸的序列，

Y为结构域，该结构域包含2-10个通过硫代磷酸酯亚基间的键连接的2'-脱氧核苷酸的序列，并且

X和Z结构域包含一个或多个式(I)的核苷酸：



其中

R为H或带正电的抗衡离子，

B为选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶、5-甲基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤和5-甲基尿嘧啶的核碱基，

R_1 选自 $-\text{CR}'_3$ 、 $-\text{CR}'_2\text{OCR}'_3$ 、 $-(\text{CR}'_2)_3\text{OCR}'_3$ 、 $-(\text{CR}'_2)_{1-2}\text{CR}'_3$ 、 $-(\text{CR}'_2)_2\text{OCR}'_3$ 和-Et，并且在每个实例中， R' 独立地为H或F；并且

其中所述寡核苷酸与乙型肝炎病毒(HBV)基因组的序列互补或杂交。

2. 根据权利要求1所述的寡核苷酸，其中所述X结构域和所述Z结构域各自包含5-10个连接的核苷酸。

3. 根据权利要求1所述的寡核苷酸，其中所述Y结构域包含5-10个2'-脱氧核苷酸。

4. 根据权利要求1所述的寡核苷酸，其中所述X结构域和所述Z结构域各自包含5-10个连接的核苷酸，并且所述Y结构域包含5-10个2'-脱氧核苷酸。

5. 根据权利要求1所述的寡核苷酸，其中所述X结构域和所述Z结构域各自包含5个连接的核苷酸，并且所述Y结构域包含10个2'-脱氧核苷酸。

6. 根据权利要求1所述的寡核苷酸，其中所述X结构域和所述Z结构域的每个核苷酸均为式(I)的核苷酸。

7. 根据权利要求1所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸为单链的。

8. 根据权利要求7所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸为反义寡核苷酸。

9. 一种药物组合物，所述药物组合物包含根据权利要求1所述的寡核苷酸以及药学上可接受的赋形剂。

10. 根据权利要求9所述的药物组合物，其中所述药物组合物适用于静脉内或皮下递送。

11. 根据权利要求1所述的寡核苷酸，其中在生理条件下与HBV基因组序列复合的所述寡核苷酸具有 $>37^\circ\text{C}$ 的解链温度(T_m)。

12. 根据权利要求1所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸在5'端或3'端处缀合至配体靶向基团，并且其中所述配体靶向基团包含一个、两个或三个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分。

13. 根据权利要求12所述的寡核苷酸，其中所述配体靶向基团通过连接部分缀合至所述寡核苷酸。

14. 根据权利要求1所述的寡核苷酸，其中所述Y结构域的每个2' -脱氧核苷酸具有独立地选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶、5-甲基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤和5-甲基尿嘧啶的核碱基。

15. 根据权利要求1所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸以高于相同序列的未修饰寡核苷酸的亲和力结合所述HBV基因组的序列。

16. 根据权利要求13所述的寡核苷酸，其中所述连接部分是烷基氨基连接基。

经修饰的寡核苷酸及使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请为美国申请,要求提交于2016年9月14日的美国临时申请62/394,738和提交于2016年9月14日的美国临时申请62/394,739的优先权,它们全文据此以引用方式并入本文。

背景技术

[0003] 反义寡核苷酸疗法已被考虑用于治疗或预防各种疾病和病症,诸如病毒性疾病、神经性疾病、神经退化性疾病、纤维化疾病、高增殖性疾病。

[0004] 某些病毒性疾病,诸如乙型肝炎(HBV),在持续感染估计2.40亿人(被定义为HBV表面抗原阳性至少6个月),并造成每年686,000多人死亡的同时,在传统疗法中仍然难以捉摸。常规疗法,包括口服抗病毒核苷酸类似物治疗,诸如替诺福韦或恩替卡韦,仅抑制病毒的复制并且不治疗HBV感染。因此,即使用目前HBV治疗方法治疗的那些患者也必须终身接受他们的治疗。

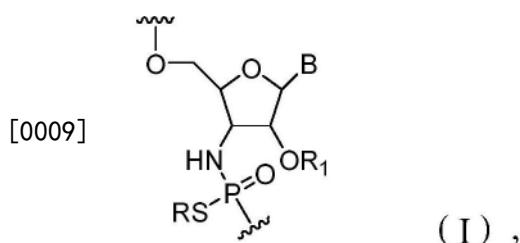
[0005] 寡核苷酸可结合互补的RNA或DNA序列。该特征使寡核苷酸能够结合细胞过程的许多方面,诸如代谢、分化、增殖、病毒复制等中涉及的特异性核酸靶标。也可工程化寡核苷酸以通过RNA酶H机制或RISC途径裂解靶RNA;阻断微RNA的结合,改变RNA拼接模式,或一旦它们结合到它们的特定的靶标上,就作为寡核苷酸适配子结合到靶标上。例如,嵌合寡核苷酸,诸如“gapmers”包括将RNA酶H酶吸至其中寡核苷酸结合至RNA区的位点的寡核苷酸的一部分。RNA酶H的随后激活导致基因靶的裂解,从而抑制基因靶,诸如基因表达或病毒复制的功能。

[0006] 因此,本领域需要发现和开发具有不同作用机制、增强的效能、增加的亲和力和/或减少的副作用的新疗法。

发明内容

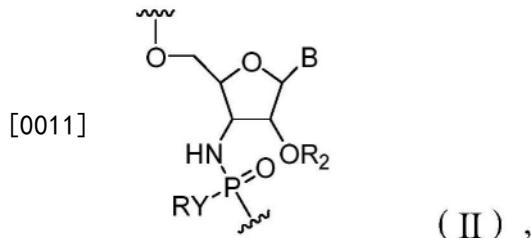
[0007] 本公开涉及包含寡核苷酸的化合物和组合物及其在预防或治疗疾病和病症,例如HBV中的用途。

[0008] 一些实施方案包括包含一个或多个式(I)的核苷酸的寡核苷酸:

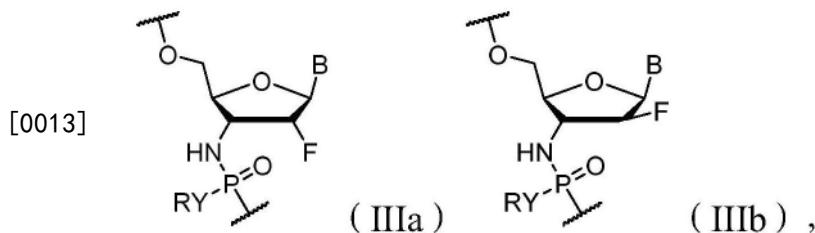


[0010] 其中R为H或带正电的抗衡离子,B为核碱基,R₁为-(CR')₂OCR',并且在每个实例中,R'独立地为H或F。在一些实施方案中,所述寡核苷酸的每个核苷酸均为式(I)的核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含2至40个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含2-26个式(I)的核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含5-10个式(I)的核苷酸。在一些实施方

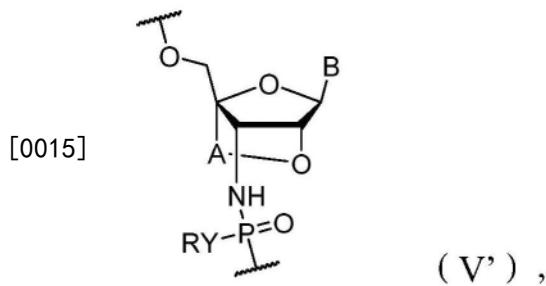
案中,在至少一个式(I)的核苷酸中,B为未修饰的核碱基。在一些实施方案中,在至少一个式(I)的核苷酸中,B为经修饰的核碱基。在一些实施方案中,在每个式(I)的核苷酸中,B为未修饰的核碱基。在一些实施方案中,在每个式(I)的核苷酸中,B为经修饰的核碱基。在一些实施方案中,在至少一个式(I)的核苷酸中,每个R'均为H。在一些实施方案中,在每个式(I)的核苷酸中,每个R'均为H。在一些实施方案中,在至少一个式(I)的核苷酸中,R₁为-(CH₂)₂OCH₃。在一些实施方案中,在每个式(I)的核苷酸中,R₁为-(CH₂)₂OCH₃。在一些实施方案中,寡核苷酸还包含一个或多个式(II)的核苷酸:



[0012] 其中Y为S或O,R为H或带正电的抗衡离子,B为核碱基,R₂为-CR'₃、-CR'₂OCR'₃、-(CR'₂)₃OCR'₃或-(CR'₂)₁₋₂CR'₃,或者R₂为-(CR'₂)₂OCR'₃,并且Y为O,并且在每个实例中,R'独立地为H或F。在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个式(II)的核苷酸,在所述至少一个式(II)的核苷酸中,R₂为-CR'₃。在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个式(II)的核苷酸,在所述至少一个式(II)的核苷酸中,R₂为-(CR'₂)₁₋₂OCR'₃。在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个式(II)的核苷酸,在所述至少一个式(II)的核苷酸中,R₂为-(CR'₂)₁₋₂CR'₃。在一些实施方案中,B为在至少一个式(II)的核苷酸中的经修饰核碱基。在一些实施方案中,在至少一个式(II)的核苷酸中,B为S。在一些实施方案中,在至少一个式(II)的核苷酸中,B为O。在一些实施方案中,在每个式(II)的核苷酸中,B为S。在一些实施方案中,在每个式(II)的核苷酸中,B为O。在一些实施方案中,寡核苷酸还包含一个或多个式(IIIa)或(IIIb)的核苷酸:



[0014] 其中Y为S或O,R为H或带正电的抗衡离子,并且B为核碱基。在一些实施方案中,寡核苷酸还包含一个或多个式(V')的核苷酸:



[0016] 其中Y为S或O,R为H或带正电的抗衡离子,在每个实例中,B独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基,A为-(CR"R")₁₋₂-,并且在每个实例中,R"独立地为H、F或Me。

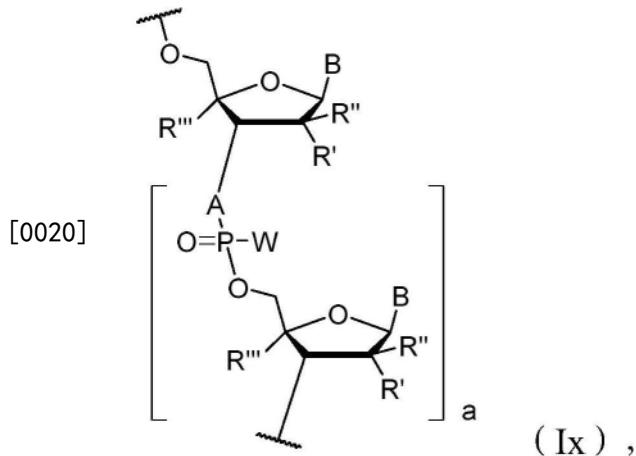
在一些实施方案中，寡核苷酸以式(VI)的构建体排列：5'X-Y-Z3'(VI)，其中X、Y和Z中的每一个均为包含2-14个核苷酸的结构域，X结构域和Z结构域中的至少一个包含至少一个式(I)的核苷酸，并且其中Y结构域的每个核苷酸均为2'-脱氧核苷酸。在一些实施方案中，寡核苷酸包含18至22个核苷。在一些实施方案中，X结构域和Z结构域各自包含5-10个核苷酸。在一些实施方案中，Y结构域包含5-10个核苷酸。在一些实施方案中，X结构域和Z结构域各自包含5-10个核苷酸，并且Y结构域包含5-10个核苷酸。在一些实施方案中，X结构域和Z结构域各自包含5个核苷酸，并且Y结构域包含10个核苷酸。在一些实施方案中，X结构域和Z结构域的每个核苷酸均为式(I)的核苷酸。在一些实施方案中，X结构域的至少一个核苷酸和Z结构域的至少一个核苷酸各自独立地选自由以下项组成的组：式(II)的核苷酸、式(IIIa)的核苷酸和式(IIIb)的核苷酸。在一些实施方案中，X结构域和Z结构域的至少一个核苷酸中的每一个均为相同的核苷酸。在一些实施方案中，Y结构域的每一个核苷酸通过硫代磷酸酯亚基间的键连接。在一些实施方案中，寡核苷酸为单链的。在一些实施方案中，寡核苷酸为反义寡核苷酸。在一些实施方案中，寡核苷酸与HBV基因组的序列互补。

[0017] 另一个实施方案包括由式(VI)表示的嵌合寡核苷酸：

[0018] 5'-X-Y-Z-3' (VI) ,

[0019] 其中X-Y-Z为嵌合寡核苷酸，并且任选地在5'端和/或3'端处缀合至配体靶向基团或药效团，所述嵌合寡核苷酸包含的序列具有18至22个核苷；X为结构域，该结构域包含长度为3-10个核苷的经修饰核苷序列；Z为结构域，该结构域包含长度为3-10个核苷的经修饰核苷序列；并且Y为结构域，该结构域包含的序列具有2至14个通过硫代磷酸酯亚基间的键连接的2'-脱氧核苷。在一些实施方案中，Y结构域的长度为6至10个核苷。在一些实施方案中，X结构域和/或Z结构域包含通过N3'→P5'氨基磷酸酯或N3'→P5'硫代氨基磷酸酯亚基间的键连接的经修饰核苷序列。在一些实施方案中，Y结构域包含至少一个磷酸二酯亚基间的键。在一些实施方案中，Y结构域由通过硫代磷酸酯亚基间的键和任选地一个或两个磷酸二酯亚基间的键连接的2'-脱氧核苷组成。在一些实施方案中，X结构域包含经修饰的核苷，在所述经修饰的核苷中，所述修饰独立地选自由以下项组成的组：2'-F、2'-F-N3'→P5'、2'-OMe、2'-OMe-N3'→P5'、2'-O-甲氧基乙氧基、2'-O-甲氧基乙氧基-N3'→P5'、构象受限的核苷、2'-OH-N3'→P5'硫代氨基磷酸酯和2'-OH-N3'→P5'氨基磷酸酯。在一些实施方案中，Z的功能结构域包含经修饰的核苷，在所述经修饰的核苷中，所述修饰选自由以下项组成的组：2'-F、2'-F-N3'→P5'、2'-OMe、2'-OMe-N3'→P5'、2'-O-甲氧基乙氧基、2'-O-甲氧基乙氧基-N3'→P5'、构象受限的核苷、2'-OH-N3'→P5'硫代氨基磷酸酯和2'-OH-N3'→P5'氨基磷酸酯。在一些实施方案中，X结构域和/或Z结构域包含一个或多个通过N3'→P5'氨基磷酸酯亚基间的键连接的2'-脱氧核苷。在一些实施方案中，X结构域和Z结构域包含一个或多个2'-阿拉伯糖-F和/或2'-核糖-F修饰的核苷，其中每个所述核苷通过N3'→P5'氨基磷酸酯或N3'→P5'硫代氨基磷酸酯亚基间的键中的至少一个独立地连接。在一些实施方案中，X结构域和Z结构域包含一个或多个2'-OMe修饰的核苷，其中每个所述核苷通过N3'→P5'氨基磷酸酯、N3'→P5'硫代氨基磷酸酯、或硫代磷酸酯亚基间的键中的至少一个独立地连接。在一些实施方案中，在X结构域和Z结构域的每一个中的经修饰核苷为通过硫代磷酸酯亚基间的键连接的2'-OMe修饰的核苷，并且其中经修饰的核苷包括5-甲基胞嘧啶核碱基，但任选地不包括胞嘧啶。在一些实施方案中，经修饰的核苷包括2,6-二氨基嘌呤核碱

基,但任选地不包括腺嘌呤。在一些实施方案中,经修饰的核苷包括5-甲基尿嘧啶核碱基,但任选地不包括尿嘧啶。在一些实施方案中,经修饰的核苷包括2,6-二氨基嘌呤核碱基,但不包括腺嘌呤,并且包括5-甲基尿嘧啶核碱基,但任选地不包括尿嘧啶。在一些实施方案中,Y结构域包含6-8个2'-脱氧核苷。在一些实施方案中,在X结构域和Z结构域的每一个中的经修饰核苷包括通过硫代磷酸酯亚基间的键任选地连接的2'-OMe修饰的核苷和构象受限的核苷,并且其中2'-OMe修饰的核苷包括5-甲基胞嘧啶核碱基,但任选地不包括胞嘧啶。在一些实施方案中,在X结构域和Z结构域的每一个中的经修饰核苷包括2'-OMe和构象受限的核苷。在一些实施方案中,在X结构域和Z结构域的每一个中的经修饰核苷包括构象受限的核苷,并且其中至少一个经修饰的核苷包括N3'→P5'氨基磷酸酯或N3'→P5'硫代氨基磷酸酯亚基间的键。在一些实施方案中,Y结构域包含7-8个2'-脱氧核苷。在一些实施方案中,2'-OMe修饰的核苷包括5-甲基尿嘧啶核碱基,但任选地不包括尿嘧啶。在一些实施方案中,Y结构域包含9-10个2'-脱氧核苷。在一些实施方案中,X结构域和Z结构域包含由式(Ix)表示的核苷酸:



[0021] 其中在每个实例中,A独立地为NH或O;在每个实例中,B独立地为未修饰或经修饰的核碱基;在每个实例中,W独立地为OR或SR,在所述OR或所述SR中,R为H或带正电的抗衡离子;在每个实例中,R'和R''各自独立地选自由以下项组成的组:H、F、Cl、OH、OMe、Me和O-甲氧基乙氧基;R''为H,或者R'和R''一起形成-O-CH₂-或-O-(CH₂)₂-,并且a为3至9的整数,其中当R'、R''和R'''各自为H时,则A为NH,并且任选地当A为O时,则W为SR。在一些实施方案中,配体靶向基团或药效团选自由以下项组成的组:Chol.、Toco、Palm、GalNAc、MGB-1、MGB-2、Acr-、Pyr-、Steroyl、HEG连接基、C7氨基连接基、以及它们的组合。在一些实施方案中,X结构域和/或Z结构域包含一个或多个寡核苷酸,在所述一个或多个寡核苷酸中,修饰为2'-O-甲氧基乙氧基-N3'→P5'。在一些实施方案中,X结构域包含一个或多个寡核苷酸,在所述一个或多个寡核苷酸中,修饰为2'-O-甲氧基乙氧基-N3'→P5'。在一些实施方案中,Z结构域包含一个或多个寡核苷酸,在所述一个或多个寡核苷酸中,修饰为2'-O-甲氧基乙氧基-N3'→P5'。在一些实施方案中,所述寡核苷酸的构建体对应于表B的构建体。

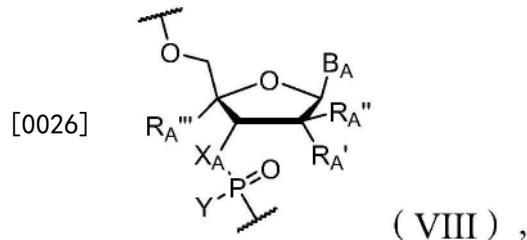
[0022] 其他实施方案包括由式(VII)表示的嵌合寡核苷酸:

[0023] 5'-X'-Y'-Z'-3' (VII),

[0024] 其中X'-Y'-Z'为嵌合寡核苷酸,并且任选地在5'端和/或3'端处缀合,所述嵌合寡核苷酸包含的序列具有16至22个核苷;X'为结构域,该结构域包含长度为3-10个核苷的经

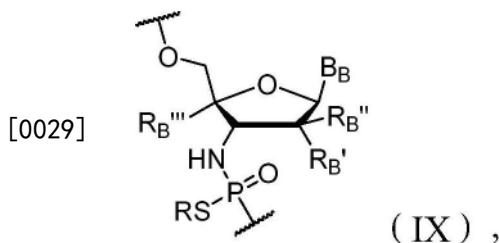
修饰核苷序列;Z' 为结构域,该结构域包含长度为3-10个核苷的经修饰核苷序列;并且Y' 为结构域,该结构域包含通过亚基间的键连接的2至4个2' -脱氧核苷,其中X' 结构域和/或Z' 结构域包含通过N3' →P5' 氨基磷酸酯或N3' →P5' 硫代氨基磷酸酯亚基间的键连接的经修饰核苷序列。在一些实施方案中,Y结构域由通过硫代磷酸酯亚基间的键和任选地一个磷酸二酯亚基间的键连接的2' -脱氧核苷组成。在一些实施方案中,X' 结构域的长度为9个或10个核苷。在一些实施方案中,X' 结构域包含经修饰的核苷,在所述经修饰的核苷中,所述修饰选自由以下项组成的组:2' -F、2' -F-N3' →P5' 、2' -OMe、2' -OMe-N3' →P5' 、2' -O-甲氧基乙氧基、2' -O-甲氧基乙氧基-N3' →P5' 和构象受限的核苷。在一些实施方案中,Z' 结构域包含经修饰的核苷,在所述经修饰的核苷中,所述修饰选自由以下项组成的组:2' -F、2' -F-N3' →P5' 、2' -OH、2' -OMe、2' -OMe-N3' →P5' 、2' -O-甲氧基乙氧基、2' -O-甲氧基乙氧基-N3' →P5' 和构象受限的核苷。在一些实施方案中,X' 结构域和/或Z' 结构域包含一个或多个2' -阿拉伯糖-F和/或2' -核糖-F修饰的核苷。在一些实施方案中,在X' 结构域和/或Z' 结构域中的经修饰核苷包括2' -OMe和构象受限的核苷。在一些实施方案中,在X' 结构域和/或Z' 结构域中的经修饰核苷包括构象受限的核苷和N3' →P5' 修饰。在一些实施方案中,该序列选自表C中具有2-4个核苷酸Y结构域的那些。其他实施方案包括嵌合寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的序列对应于表C中所列的序列。

[0025] 其他实施方案包括包含一个或多个下式(A)的核苷酸的寡核苷酸:



[0027] 其中X_A为NH或O,Y为OR或SR,在所述OR或所述SR中,R为H或带正电的抗衡离子,在每个实例中,B_A独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基,在每个实例中,R_{A'}和R_{A''}各自独立地选自H、F、OH、OMe、Me、O-甲氧基乙氧基,并且R_{A'''}为H,或者R_{A'}和R_{A'''}一起形成-O-CH₂-或-O-(CH₂)₂-。在一些实施方案中,R_{A'}和R_{A'''}为H;并且R_{A'''}为F。在一些实施方案中,R_{A'}和R_{A'''}为H;并且R_{A'''}为F、OH、H或OMe。在一些实施方案中,X_A为NH;B_A为未修饰或经修饰的核碱基;R_{A'}和R_{A'''}一起形成构象受限的核苷(例如,-O-CH₂-或-O-(CH₂)₂-);并且R_{A'''}为H。在一些实施方案中,至少一种R_{A'}和R_{A'''}为H。在一些实施方案中,当B_A为嘌呤核碱基时,至少一种R_{A'}和R_{A'''}为OH或F,并且/或者当B_A为嘧啶核碱基时,至少一种R_{A'}和R_{A'''}为OMe、OH或F。在一些实施方案中,经修饰的核碱基选自5-甲基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、5-胸腺嘧啶和g形夹。在一些实施方案中,式(A)的核苷酸包括表G中的那些,在一些实施方案中,式(A)的核苷酸包括表H中所列的序列。在一些实施方案中,式(A)的核苷酸包括的序列1、2、3、4或5种核碱基与选自表B中那些的序列不同。

[0028] 其他实施方案包括包含十个或更多个下式(IX)的核苷酸的寡核苷酸:



[0030] 其中R为H或带正电的抗衡离子,在每个实例中,B_B独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基,在每个实例中,R_B'和R_B''各自独立地选自H、F、OMe、Me、O-甲氧基乙氧基,并且R_B'''为H,或者R_B'和R_B''一起形成-O-CH₂-或-O-(CH₂)₂-。在一些实施方案中,R_B'和R_B''为H;并且R_B'''为F。在一些实施方案中,R_B'和R_B''为H;并且R_B'''为F、OH、H或OMe。在一些实施方案中,B_B为未修饰或经修饰的核碱基;R_B'和R_B''一起形成构象受限的核苷(例如,-O-CH₂-或-O-(CH₂)₂-);并且R_B'''为H。在一些实施方案中,至少一种R_B'和R_B''为H。在一些实施方案中,当R_B为嘌呤核碱基时,至少一种R_B'和R_B''为OH或F,并且/或者当B_B为嘧啶核碱基时,至少一种R_B'和R_B''为OMe、OH或F。在一些实施方案中,经修饰的核碱基选自5-甲基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、5-胸腺嘧啶和g形夹。在一些实施方案中,式(B)的核苷酸包括表A中的那些,在所述表A中,X_A为NH。在一些实施方案中,式(B)的核苷酸包括表B中所列的序列。在一些实施方案中,式(B)的核苷酸包括的序列1、2、3、4或5种核碱基与选自表B中那些的序列不同。在一些实施方案中,每个寡核苷酸是式(B)的核苷酸。

[0031] 其他实施方案包括药物组合物,其包含前述实施方案中任一项的核苷酸和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,组合物适用于静脉内或皮下递送。其他实施方案包括抑制细胞中乙型肝炎病毒(HBV)基因表达的方法,所述方法包括使细胞与任何前述实施方案中的寡核苷酸或组合物接触。其他实施方案包括抑制细胞中乙型肝炎病毒(HBV)复制的方法,所述方法包括使细胞与任何前述实施方案中的寡核苷酸或组合物接触。其他实施方案包括治疗患有乙型肝炎病毒(HBV)感染的受治疗者的方法,所述方法包括向所述受治疗者施用治疗有效量的任何前述实施方案的寡核苷酸或组合物。其他实施方案包括前述实施方案中任一项的寡核苷酸,其中与HBV基因组序列复合的所述寡核苷酸具有>37℃的解链温度(Tm)。其他实施方案包括治疗患有乙型肝炎病毒(HBV)感染的受治疗者的方法,所述方法包括向所述受治疗者施用治疗有效量的任何前述实施方案的寡核苷酸或组合物。其他实施方案包括抑制靶RNA在细胞中表达的方法,所述方法包括使细胞与任何前述实施方案的寡核苷酸或组合物接触,所述组合物包含所述寡核苷酸,其中所述嵌合寡核苷酸含有与靶RNA的一部分互补或杂交的核碱基序列。其他实施方案包括抑制病毒在细胞中复制的方法,所述方法包括使细胞与任何前述实施方案的寡核苷酸或组合物接触,所述组合物包含所述寡核苷酸,所述寡核苷酸或组合物包含所述寡核苷酸含有与病毒靶RNA的一部分互补或杂交的核碱基序列。其他实施方案包括治疗患有病毒感染的受治疗者的方法,所述方法包括向所述受治疗者施用治疗有效量的任何前述实施方案的寡核苷酸或组合物,所述组合物包含所述寡核苷酸,其中所述寡核苷酸含有与病毒靶RNA的一部分互补或杂交的核碱基序列。其他实施方案包括通过使靶核酸与反义化合物接触来调节靶标表达的方法,所述反义化合物包含任何前述实施方案的寡核苷酸或组合物,所述组合物包含所述寡核苷酸,其中所述寡核苷酸含有与靶核酸的一部分互补或杂交的核碱基序列。

附图说明

- [0032] 图1A示出HBsAg血清水平。图1B示出了HBeAg血清水平。图1C示出了DNA血清水平。
- [0033] 图2A示出了用于IV施用的本公开的对于GalNAc缀合化合物的HBsAg血清水平的结果。图2B示出了用于SC施用的本公开的对于GalNAc缀合化合物的HBsAg血清水平。
- [0034] 图3示出了对于本公开的GalNAc缀合化合物的HBsAg降低水平。
- [0035] 图4A-4C示出了对于本公开的化合物，在AAV-HBV小鼠模型中体内HBsAg、HBeAg和血清HBV DNA数据。图4A示出了HBsAg血清水平。图4B示出了HBeAg血清水平。图4C示出了HBV DNA水平。
- [0036] 图5A-5C示出了对于本公开的化合物，在AAV-HBV小鼠模型中体内HBsAg、HBeAg和血清HBV DNA数据。图5A示出了HBsAg血清水平。图5B示出了HBeAg血清水平。图5C示出了HBV DNA水平。
- [0037] 图6A-6C示出了对于本公开的化合物，在AAV-HBV小鼠模型中体内HBsAg、HBeAg和血清HBV DNA数据。图6A示出了HBsAg血清水平。图6B示出了HBeAg血清水平。图6C示出了HBV DNA水平。
- [0038] 图7示出了本公开的多种化合物以及它们各自对于HBV(+)链基因组互补位点。
- [0039] 图8示出了对于表29中所述的两种寡核苷酸血清中的HBsAg水平。
- [0040] 图9A示出了对于表30中所述的两种寡核苷酸血清中的HBsAg水平。图9B示出了对于表30中所述的两种寡核苷酸血清中的HBeAg水平。
- [0041] 图10A示出了对于表31中所述的两种寡核苷酸血清中的HBsAg水平。图10B示出了对于表31中所述的两种寡核苷酸血清中的HBeAg水平。
- [0042] 图11A示出了作为单剂量，对于表33中所述的寡核苷酸血清中的HBsAg水平。图11B示出了对于表33中所述寡核苷酸，对于在第0、2、4天，以 $3 \times 3.3\text{mg/kg}$ 给药服法中的HBsAg水平。
- [0043] 图12A示出了作为单剂量，对于表37中所述的寡核苷酸血清中的HBsAg水平。图12B示出了作为单剂量，对于表38中所述的寡核苷酸血清中的HBsAg水平。图12C示出了作为单剂量，对于表40中所述的寡核苷酸血清中的HBsAg水平。

具体实施方式

[0044] 本公开涉及经修饰的核苷酸和寡核苷酸，其包含经修饰的核苷酸和介于核苷酸之间的修饰的连接。本公开还涉及寡核苷酸构建体，其包含在寡核苷酸内具有共同特征的结构域、区域或部分和缀合至寡核苷酸的附加组分，诸如靶向部分。本公开还涉及使用和制备寡核苷酸及其构建体的方法。

[0045] 如本领域已知的并且如本公开所列出的，经修饰的核苷酸为不是脱氧核糖核苷酸的任何核苷酸。例如，脱氧核糖的2' 碳可被除羟基(OH)之外的取代基取代；脱氧核糖的3' 碳可被除氧原子(O)之外的取代基取代。如本领域已知并且如本公开所列出的，介于两个核苷酸之间的修饰的连接为不是介于第一核苷酸的3' 碳的脱氧核糖与第二核苷酸5' 碳的脱氧核糖之间的磷酸二酯键的任何连接。

[0046] 1. 2',3'-修饰的核苷酸及相关的寡核苷酸

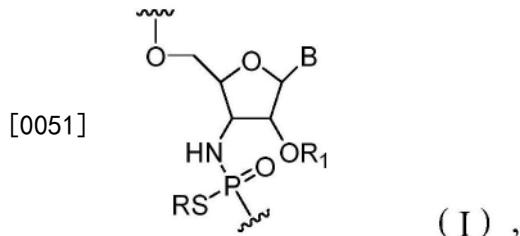
[0047] 本公开的化合物包括具有特定2' 和3' 修饰的经修饰核苷酸。在实施方案中，本公

开的化合物包括在脱氧核糖糖的2' 碳处替换羟基或取代物。此外,本公开的这些化合物包括介于两个核苷之间的连接的修饰,其包括在脱氧核糖糖的3' 碳处用氮原子(N)替换氧原子或取代物。该连接的修饰还包括在磷酸二酯键中替换另一个氧原子或取代物。

[0048] 这些经修饰的核苷酸可用于,例如寡核苷酸,诸如嵌合寡核苷酸,其允许通过RNA酶H或经修饰的反义寡核苷酸对基因靶进行酶切。

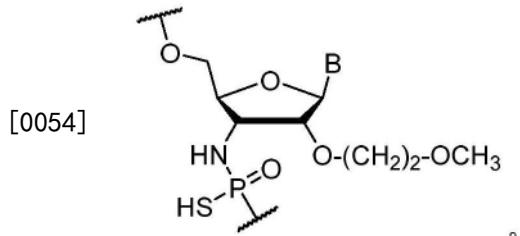
[0049] A. 2',3' -修饰的核苷酸

[0050] 因此,本公开的化合物包括式(I)的核苷酸:

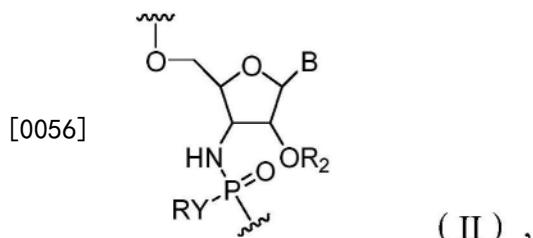


[0052] 其中R为H或带正电的抗衡离子,在每个实例中,B独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基,R₁为-(CR')₂OCR'，并且在每个实例中,R'独立地为H或F。

[0053] 在式(I)的核苷酸中,R₁为-(CR')₂OCR'。在一些实施方案中,在每个实例中,R'为H。在其他实施方案中,至少一种R'为F,例如1、2、3、4、5、6或7个R'为F,在一些实施方案中,CR'包含1、2或3个F部分。例如,在实施方案中,R₁选自由以下项组成的组:-CH₂CH₂OCH₃(或MOE)、-CF₂CH₂OCH₃、-CH₂CF₂OCH₃、-CH₂CH₂OCF₃、-CF₂CF₂OCH₃、-CH₂CF₂OCF₃、-CF₂CH₂OCF₃、-CF₂CF₂OCF₃、-CHFCF₂OCH₃、-CHFCFOCH₃、-CHFC₂OCH₂F、-CHFC₂OCH₂F和-CH₂CHFOCH₃。在实施方案中,式I的核苷酸为:



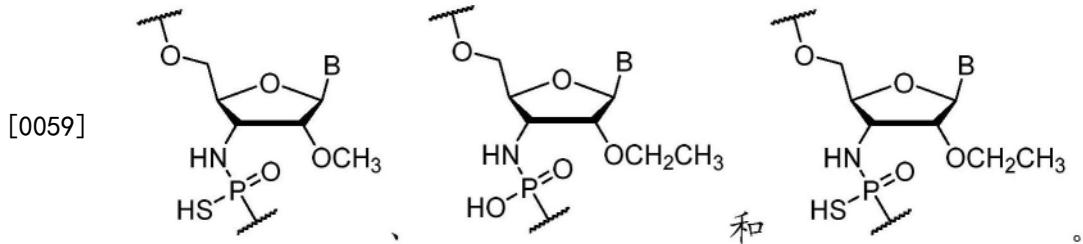
[0055] 在实施方案中,本公开的化合物包括至少一个式(I)的核苷酸和至少一个式(II)的核苷酸:



[0057] 其中Y为S或O,R为H或带正电的抗衡离子,B为核碱基,R₂为-CR'，-CR'OCR'，-(CR')₂OCR'或-(CR')₁₋₂CR'，或者R₂为-(CR')₂OCR'，并且Y为O,并且在每个实例中,R'独立地为H或F。

[0058] 在式(II)的核苷酸中,R₂为-CR'，-CR'OCR'，-(CR')₂OCR'或-(CR')₁₋₂CR'。在一些实施方案中,R₂为-CR'或-CR'OCR'。在一些实施方案中,在每个实例中,R'为H。在其他实施方案中,至少一种R'为F,例如1、2、3、4或5个R'为F,在一些实施方案中,CR'包含1、2或3个F部

分。例如，在实施方案中， R_1 选自由以下项组成的组： $-CH_3$ （或Me）、 $-CFH_2$ 、 $-CHF_2$ 、 CF_3 、 CH_2OCH_3 、 $-CFH_2OCH_3$ 、 $-CHF_2OCH_3$ 、 $-CF_3OCH_3$ 、 $-CH_2OCFH_2$ 、 $-CH_2OCHF_2$ 、 $-CH_2OCF_3$ 、 $-CFH_2OCH_3$ 、 $-CFH_2OCFH_2$ 、 $-CFH_2OCHF_2$ 、 $-CFH_2OCF_3$ 、 $-CHF_2OCH_3$ 、 $-CHF_2OCFH_2$ 、 $-CHF_2OCHF_2$ 、 $-CHF_2OCF_3$ 、 $-(CR')_3OCH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ （或Et）、 $-CFH_2CH_3$ 、 $-CHF_2CH_3$ 、 $-CF_3CH_3$ 、 $-CH_2CFH_2$ 、 $-CH_2CHF_2$ 、 $-CH_2CF_3$ 、 $-CFH_2CH_3$ 、 $-CFH_2CFH_2$ 、 $-CFH_2CHF_2$ 、 $-CFH_2CF_3$ 、 $-CHF_2CH_3$ 、 $-CHF_2CFH_2$ 、 $-CHF_2CHF_2$ 、 $-CHF_2CF_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、 $CF_2CH_2CH_3$ 、 $CH_2CF_2CH_3$ 、 $CH_2CH_2CF_3$ 、 $CF_2CF_2CH_3$ 、 $CH_2CF_2CF_3$ 、 $CF_2CH_2CF_3$ 、 $CF_2CF_2CF_3$ 、 $CHFCH_2CH_3$ 、 $CHFCHFOCH_3$ 、 $CHFCH_2CFH_2$ 、 $CHFCH_2CHF_2$ 和 CH_2CHFCH_3 。在实施方案中， R_1 为 $-CH_3$ （或Me）或 $-CH_2CH_3$ （或Et）。在实施方案中，式II核苷酸选自由以下项组成的组：

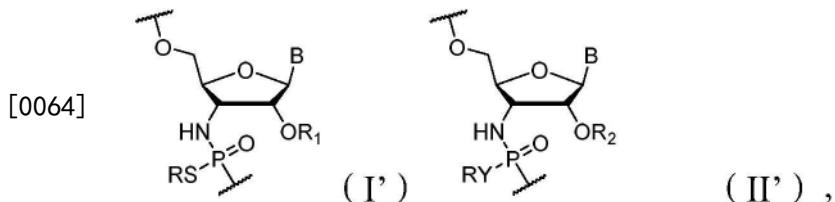


[0060] 在式(I)或(II)的化合物中,Y可为0或S。在一些实施方案中,在至少一种情况下,Y为S(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30等)。在其他实施方案中,在至少一种情况下,Y为S,并且在至少另一种情况下,Y为0。在其他实施方案中,在每个实例中,Y为S。在一些实施方案中,在至少一种情况下,Y为0(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30等)。

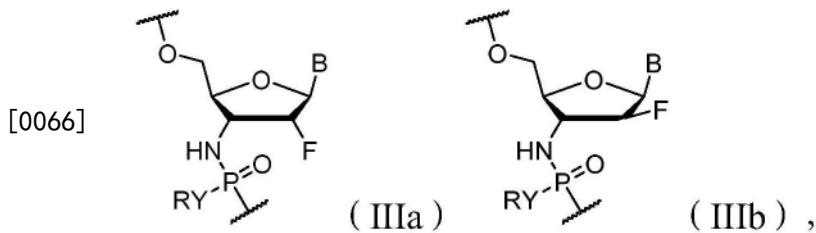
[0061] 本公开所公开的寡核苷酸包含至少一个式(I)的核苷酸。在实施方案中，所公开的寡核苷酸包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24个式(I)的核苷酸。在实施方案中，所公开的寡核苷酸包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24个式(II)的核苷酸。在一些实施方案中，寡核苷酸包含2至40个核苷酸，例如8至26个核苷酸或介于其中之间的整数。

[0062] 在其中包括一种以上式(I)的核苷酸的实施方案中,核苷酸可为相同的或不同的。在一些实施方案中,包括一种或多种式(II)的核苷酸,并且可相同或不同。例如,在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个式(I)的核苷酸和至少一个式(II)的核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个式(I)的核苷酸,其中至少一为R₁为MOE,并且至少一个式(II)的核苷酸,其中R₂为Me或Et。在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少2个式(I)和式(II)交替的核苷酸。例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24个核苷酸具有交替的2'修饰(例如,Me-MOE-Me-MOE…或Et-MOE-Et-MOE-Et-MOE…)

[0063] 在一些实施方案中,式(I)和/或式(II)的核苷酸由以下表示:



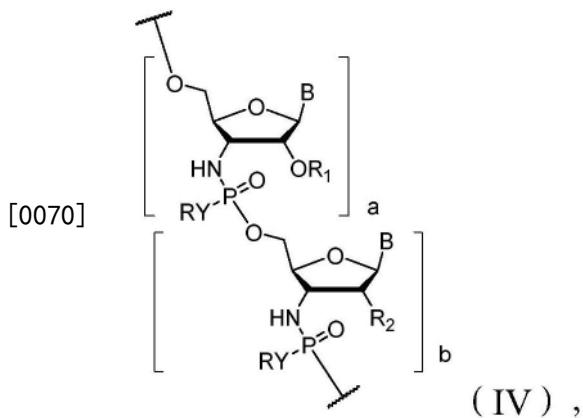
[0065] 在一些实施方案中，包含式(I)的核苷酸的寡核苷酸还包含式(IIIa)和/或(IIIb)的2'-氟核苷酸：



[0067] 其中Y为S或O,R为H或带正电的抗衡离子,并且B为核碱基。

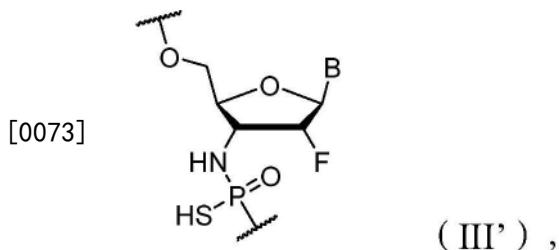
[0068] 在一些实施方案中，寡核苷酸包含至少4个式(I)和(IIIa)交替的核苷酸。例如，寡核苷酸包含4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24个交替的核苷酸。

[0069] 某些实施方案包括包含4-40个核苷酸的寡核苷酸，并且包含式(IV)：



[0071] 其中Y为S或O,R为H或带正电的抗衡离子,B为核碱基,R₁为-(CR')₂OCR'₃,R₂选自-OCR'₃、-OCR'₂OCR'₃、-O(CR')₂OCR'₃或-O(CR')₁₋₂CR'₃和F,在每个实例中,R'独立地为H或F,并且a为1-10的整数,并且b为1-10的整数,在至20的情况下,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20。

[0072] 本公开的化合物包括包含下式(III')的化合物：



[0074] 其中Y为S或O,R为H或带正电的抗衡离子,并且在每个实例中,B独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基;并且任选地包含式(I)、(II)和/或(IV)中的一种或多种。

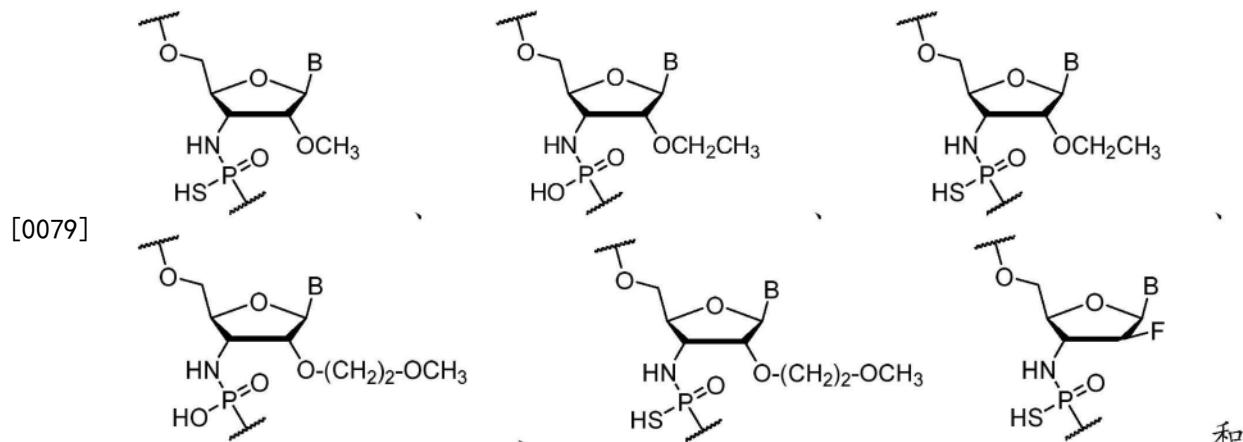
[0075] 式(I)、(II)、(IIIa)、(IIIb)、(IV)和(V)的核苷酸的核碱基B可各自独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸包括,2,6-二氨基嘌呤核碱基,但任选地不包括腺嘌呤。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸包括5-甲基尿嘧啶核碱基,但任选地不包括尿嘧啶。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸包括2,6-二氨基嘌呤核碱基,但不包括腺嘌呤,并且包括5-甲基尿嘧啶核碱基,但任选地不包括尿嘧啶。

[0076] 在式(II)、(IIIa)、(IIIb)、(IV)和(V)的每个核苷酸中的Y可独立地为O或S。在一

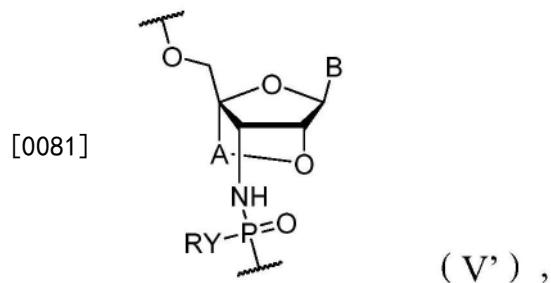
些实施方案中,在至少一种情况下,Y为S(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30等)。在其他实施方案中,在至少一种情况下,Y为S,并且在至少另一种情况下,Y为O。在其他实施方案中,在每个实例中,Y为S。在一些实施方案中,在至少一种情况下,Y为O(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30等)。

[0077] 在其中包括不止一种式(I)、(II)、(IIIa)、(IIIb)、(IV)和(V)的核苷酸的实施方案中,此类式的多于一种的核苷酸可为相同或不同的。例如,在一些实施方案中,除了至少一个式(I)的核苷酸之外,该核苷酸还包含至少一个式(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(V')的核苷酸。在一些实施方案中,该核苷酸包含至少2个式(I)和/或式(II)和/或(III)和/或(IV)、(V)和/或(V')的交替的核苷酸。例如,所公开的寡核苷酸可包括具有交替的2'修饰的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24个核苷酸。

[0078] 在实施方案中,寡核苷酸的核苷酸选自由以下项组成的组:



[0080] 本公开的化合物包括包含下式(V')的化合物:



[0082] 其中Y为S或O,R为H或带正电的抗衡离子,在每个实例中,B独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基,A为-(CR"R")₁₋₂-⁻,并且在每个实例中,R"独立地为H、F或Me,并且任选地包含一种或多种一种或多种式(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)。

[0083] 在包含式(V')的化合物中,A为-(CR"R")₁₋₂-⁻。在一些实施方案中,A为-(CR"R")-⁻,

在其他实施方案中,A为 $-(CR''R'')_2-$ 。在每个实例中,R''独立地为H或Me。在一些实施方案中,一个R''为Me,并且剩余为H。在其他实施方案中,所有R''为H。

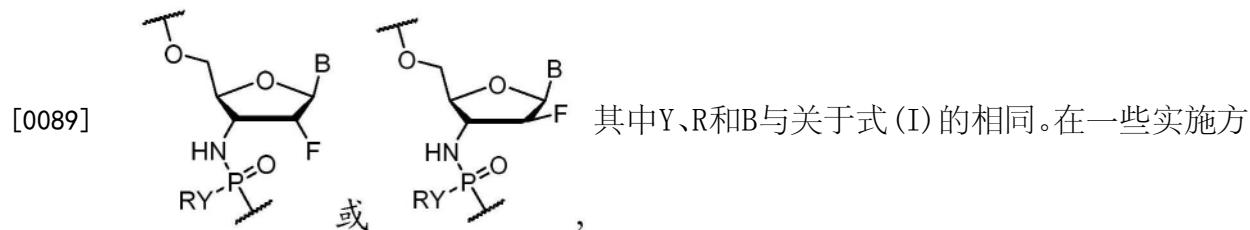
[0084] 在一些实施方案中,当A为CH₂时,则Y为S。在其他实施方案中,当A为CH₂CH₂时,则Y为O或S。在一些实施方案中,A为CH₂CH(Me)或CH(Me),并且Y为O或S。

[0085] 在包含式(V')的化合物中,Y为O或S。在一些实施方案中,在至少一种情况下,Y为S(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30等)。在其他实施方案中,在至少一种情况下,Y为S,并且在至少另一种情况下,Y为O。在其他实施方案中,在每个实例中,Y为S。在一些实施方案中,在至少一种情况下,Y为O(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30等)。

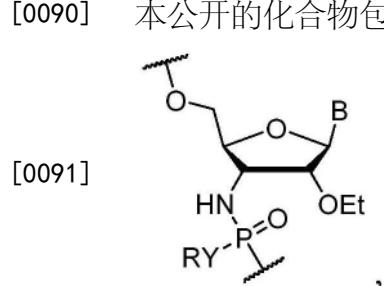
[0086] 式(V')(以及任选的式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(V'))的化合物可为寡核苷酸的一部分。在一些实施方案中,包含式(IV)(以及任选的式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(V'))的化合物为包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24个式(V')(和式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(V'))的核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含2至40个核苷酸,例如8至26个核苷酸或介于其中之间的整数。

[0087] 在其中包括不止一种式(V')的核苷酸的实施方案中,式(V')的不止一种核苷酸可为相同或不同。在一些实施方案中,包括一种或多种式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(V')的核苷酸,并且可为相同或不同。例如,在一些实施方案中,该核苷酸包含至少一种或(V')的核苷酸和至少一个式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(V')的核苷酸。在一些实施方案中,核苷酸包含至少2个式(V')和式(I)和/或式(II)交替的核苷酸。例如,具有交替的2'修饰的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24个核苷酸。

[0088] 在一些实施方案中,包含式(V')(以及任选的式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和/或(V'))的核苷酸的核苷酸还包含以下结构的2-氟核苷酸:



[0090] 本公开的化合物包括包含下式(V)的化合物:



[0092] 其中Y为S或O,R为H或带正电的抗衡离子,并且在每个实例中,B独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基;并且任选地包含式(I)、(II)、(III)和/或(V')中的一

种或多种。

[0093] B. 嵌合寡核苷酸

[0094] 本公开涉及寡核苷酸构建体，其包括在寡核苷酸内具有共同特征的结构域、区域或部分。具有这些结构域的寡核苷酸在本文中被称为嵌合寡核苷酸。在一些实施方案中，嵌合寡核苷酸由式(VI)表示：

[0095] 5'-X-Y-Z-3' (VI) ,

[0096] 其中该嵌合寡核苷酸包含14至22个核苷的序列，其中X为结构域，该结构域包含长度为3-10个核苷酸的经修饰核苷酸序列；Z为结构域，该结构域包含长度为3-10个核苷的经修饰核苷酸序列；并且Y是包含2-10个2' -脱氧核苷酸序列或未修饰的核苷酸的结构域。在每个结构域中的每个核苷通过亚基间的键连接。

[0097] 在一些实施方案中，嵌合寡核苷酸由式(VI')表示：

[0098] 5'-X-Y-Z-3' (VI') ,

[0099] 其中该嵌合寡核苷酸包含14至22个核苷的序列，其中X为结构域，该结构域包含长度为2-10个核苷酸的经修饰核苷酸序列；Z为结构域，该结构域包含长度为2-10个核苷的经修饰核苷酸序列；并且Y是包含6-14个2' -脱氧核苷酸序列或未修饰的核苷酸的结构域。在每个结构域中的每个核苷通过亚基间的键连接。

[0100] 式(I)、(II)、(IIIa)、(IIIb)、(IV)、(V)和/或(V')的核苷酸可存在于X结构域和/或Z结构域中。嵌合寡核苷酸可在5'端和/或3'端处缀合到配体-靶向基团或药效团。

[0101] 在一些实施方案中，Y结构域包含通过硫代磷酸酯亚基间的键连接的2' 脱氧核苷。在实施方案中，Y结构域包含通过至少一个磷酸二酯亚基间的键连接的2' 脱氧核苷。在实施方案中，Y结构域包含通过两个磷酸二酯亚基间的键连接的2' 脱氧核苷。在一些实施方案中，Y结构域包含通过硫代磷酸酯亚基间的键连接的和一个或两个磷酸二酯亚基间的键连接的2' 脱氧核苷。在一些实施方案中，Y结构域的长度为6至10个核苷酸。

[0102] 在一些实施方案中，X结构域包含式(I)、(II)、(IIIa)、(IIIb)、(IV)、(V)和/或(V')的核苷酸。在一些实施方案中，X结构域包含经修饰的核苷酸，其中修饰独立地选自2' -OMe、2' -OEt、2' -O-甲氧基乙氧基和构象受限的核苷酸。在一些实施方案中，X结构域的长度为9个或10个核苷酸。

[0103] 在一些实施方案中，Z结构域包含式(I)、(II)、(IIIa)、(IIIb)、(IV)、(V)和/或(V')的核苷酸。在一些实施方案中，Z结构域包含2' 修饰的核苷酸，其中修饰为2' -OMe、2' -OEt或2' -MOE。在一些实施方案中，Z结构域的长度为9个或10个核苷酸。

[0104] 在实施方案中，嵌合寡核苷酸包含14至22个核苷酸序列。例如，该寡核苷酸可包括14、15、16、17、18、19、20、21或22个核苷酸。

[0105] 在实施方案中，X为由包含一个或多个长度为3-10个核苷酸的经修饰核苷酸的序列组成的结构域；Z为由包含一个或多个长度为3-10个核苷酸的经修饰核苷酸的序列组成的结构域；并且Y为由通过硫代磷酸酯亚基间的键和任选地一个或两个磷酸二酯亚基间的键连接的2至10个2' -脱氧核苷的序列组成的结构域。在一些实施方案中，X为5-9，Y为6-10，并且Z为5-9。在一些实施方案中，在每个X、Z和Y中的核苷酸的数分别为：6/6/6、6/6/7、6/6/8、6/7/6、6/7/7、6/7/8、6/8/6、6/8/7、6/8/8、3/10/3、4/10/4、5/10/5、5/10/6、2/12/2、3/12/3、2/14/2、5/9/5、5/9/6、5/8/5、5/8/6、5/8/7、7/5/7、7/5/8、7/5/9、7/6/6、7/6/7、7/6/

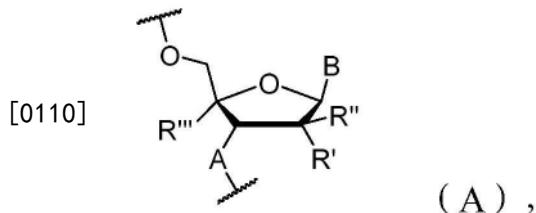
8、7/6/9、7/7/6、7/7/7、7/7/8、7/7/9、7/5/7、7/5/8、7/5/9、7/4/7、7/4/8、7/4/9、8/4/7、8/4/8、8/4/9、7/3/7、7/3/8、7/3/9、8/3/7、8/3/8、8/3/9、8/3/10、9/3/7、9/3/8、9/3/9、9/3/10、8/2/7、8/2/8、8/2/9、8/2/10、9/2/7、9/2/8、9/2/9、9/2/10、10/2/8、10/2/9、10/2/10。X结构域和Z结构域各自分别包含经修饰的核苷酸序列,其中结构域长度为4-10个核苷酸。例如,X结构域和/或Z结构域可包含4、5、6、7、8、9或10个核苷酸序列。一个或多个这些核苷酸被修饰(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。例如,在一些实施方案中,每一个X结构域和/或Z结构域中的所有核苷酸被修饰。

[0106] X结构域和Z结构域的核苷酸可根据式(I)、(II)、(IIIa)、(IIIb)、(IV)、(V)和/或(V'),关于一个或多个它们的核碱基、核糖糖上的2'和/或3'位置以及它们的亚基间的键被修饰。实施方案包括其中2'位置用F(核糖或阿拉伯糖)修饰,并且3'位置为O或NH。实施方案还包括其中2'位置用OMe修饰,并且3'位置为O或NH。实施方案包括其中2'位置用F(核糖或阿拉伯糖)以及Me或OMe修饰,并且3'位置为O或NH。实施方案包括其中2'位置用O-甲氧基乙氧基修饰,并且3'位置为O或NH。实施方案还包括其中2'位置用F(核糖或阿拉伯糖)修饰,并且3'位置为O或NH。实施方案包括其中2'和4'位置为经修饰的跨接基团(如本文在别处所述)以形成构象受限的核苷酸,并且3'位置为O或NH。这些实施方案中的每一个可包括硫代磷酸酯(或取决于3'取代的硫代氨基磷酸酯)和氨基磷酸酯亚基间的键。

[0107] 实施方案还包括其中2'位置为H,并且3'位置为NH。这些实施方案中的每一个可包括硫代氨基磷酸酯和/或氨基磷酸酯亚基间的键。

[0108] 在一些实施方案中,X结构域和Z结构域的每个经修饰的核苷酸分别包括独立地选自至少一个2'-F、2'-F-N3'→P5'、2'-OMe、2'-OMe-N3'→P5'、2'-O-甲氧基乙氧基、2'-O-甲氧基乙氧基-N3'→P5'、构象受限的核苷酸的修饰。

[0109] 在一些实施方案中,经修饰的核苷酸包含由下式(A)表示的核苷:



[0111] 在每个实例中,其中A独立地为NH或O,在每个实例中,B独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基,并且在每个实例中,R'和R''各自独立地选自H、F、OH、OMe、OEt、O-甲氧基乙氧基,并且R'''为H,或者R'和R''一起形成2-4个原子跨接以形成构象受限的核苷(例如,-O-CH₂-、-O-CH(Me)-或-O-(CH₂)₂-)。

[0112] 在一些实施方案中,R'选自F、OH、-OMe、-OEt、O-甲氧基乙氧基;R''为H和F;并且R'''为H、Me或-OMe。在其他实施方案中,R''和R'''为H;并且R'选自F、OMe、OEt和O-甲氧基乙氧基。在一些实施方案中,在每个实例中,A为NH。

[0113] 一些实施方案包括由式(A)表示的一种或多种经修饰的核苷,其中A为NH;B为G形夹;R'为F或OMe,并且R'''为H;或者R'为H,并且R''为H或F;并且R'''为H。

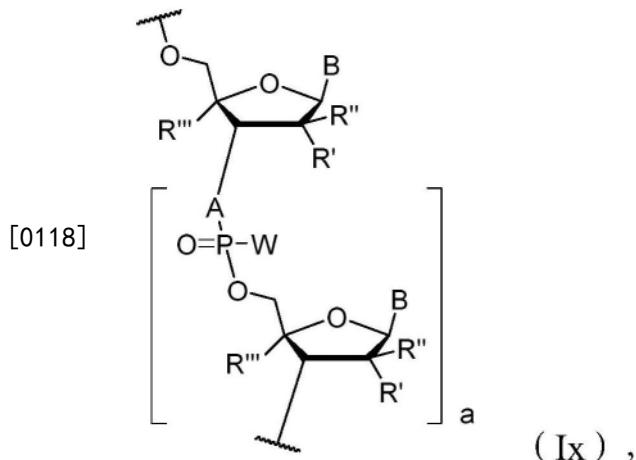
[0114] 一些实施方案包括由式(A)表示的一种或多种经修饰的核苷,其中A为NH;B为未修饰或经修饰的核碱基;R'和R'''一起形成构象受限的核苷(例如,-O-CH₂-、-O-CH(Me)-或-O-

$(\text{CH}_2)_2^-$; 并且 R'' 为 H 。在一些实施方案中, B 为未修饰的或经修饰的核碱基, 其选自由以下项组成的组: 5-甲基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤和5-胸腺嘧啶。

[0115] 一些实施方案包括由式 (A) 表示的一种或多种经修饰的核苷, 其中 A 为 NH ; B 为未修饰或经修饰的核碱基; R' 为 F 或 OMe , R'' 为 H , 并且 R''' 为 H 。

[0116] 一些实施方案包括由式 (A) 表示的一种或多种经修饰的核苷, 其中 A 为 NH ; B 为未修饰或经修饰的核碱基; R' 为 H , R'' 为 F , 并且 R''' 为 H 。

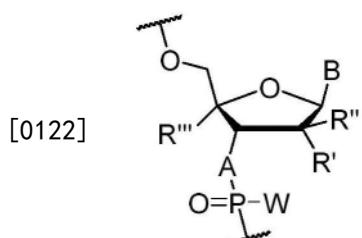
[0117] 在一些实施方案中, X 结构域和 Z 结构域由式 (Ix) 表示:



[0119] 其中在每个实例中, W 独立地为 OR 或 SR , 在所述 OR 或所述 SR 中, R 为 H 或带正电的抗衡离子; R' 、 R'' 、 R''' 、 A 和 B 如对于式 (A) 所述。在其他实施方案中, A 为 O , 并且 R' 、 R''' 独立地为 H 或 OEt , 其中 R' 、 R''' 中的至少一个为 OEt 。

[0120] 例如, 除了在每个 X 结构域和 Z 结构域中, 其中 A 为 NH , W 为 S , 并且 R' 为 MOE 的至少一种核苷酸以外, X 结构域和/或 Z 结构域的核苷酸可包括表 A 中的核苷酸中的一者或多者。

[0121] 表 A



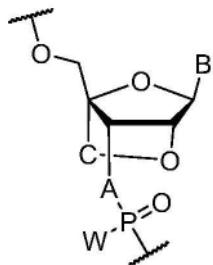
[0123]

核苷酸编号	R'	R''	R'''	A	W
1	F	H	H	NH	S
2	F	H	H	NH	O
3	F	H	H	O	S
4	F	H	H	O	O
5	H	F	H	NH	S
6	H	F	H	NH	O
7	H	F	H	O	S
8	H	F	H	O	O
9	OMe	H	H	NH	S

[0124]

核苷酸编号	R'	R''	R'''	A	W
10	OMe	H	H	NH	O
11	OMe	H	H	O	S
12	OMe	H	H	O	O
13	H	F	H	NH	S
14	H	F	H	NH	O
15	H	F	H	O	S
16	H	F	H	O	O
17	O-甲氧基乙氧基	H	H	NH	S
18	O-甲氧基乙氧基	H	H	NH	O
19	O-甲氧基乙氧基	H	H	O	S
20	O-甲氧基乙氧基	H	H	O	O
21	H	H	H	NH	S
22	H	H	H	NH	O
23	OH	H	H	NH	S
24	OH	H	H	NH	O
25	OH	H	H	O	S
26	H	OH	H	NH	O
27	H	OH	H	NH	S
28	H	OEt	H	NH	O
29	H	OEt	H	NH	S
30	H	OEt	H	O	O
31	H	OEt	H	O	S
32	OEt	H	H	NH	O
33	OEt	H	H	NH	S
34	OEt	H	H	O	O
35	OEt	H	H	O	S

[0125]



[0126]

核苷酸编号	C	A	W
36	-O-CH ₂ -	NH	S
37	-O-CH ₂ -	NH	O
38	-O-CH ₂ -	O	S
39	-O-CH ₂ -	O	O
40	-O-(CH ₂) ₂ -	NH	S
41	-O-(CH ₂) ₂ -	NH	O
42	-O-(CH ₂) ₂ -	O	S
43	-O-(CH ₂) ₂ -	O	O

[0127]

核苷酸编号	C	A	W
44	-O-CH(Me)-	NH	S
45	-O-CH(Me)-	NH	O
46	-O-CH(Me)-	O	S
47	-O-CH(Me)-	O	O

[0128] 在一些实施方案中,X结构域和Z结构域各自独立地包含两个、三个或更多个不同的核苷酸1-47。

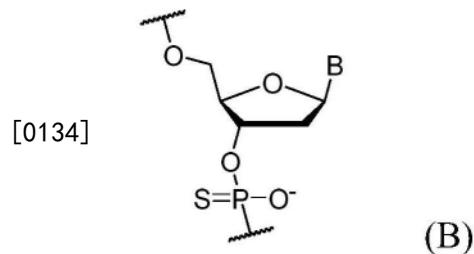
[0129] X结构域的核苷通过亚基间的键连接,例如N3'→P5'氨基磷酸酯、N3'→P5'硫代氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸二酯亚基间的键或它们的组合。在一些实施方案中,X结构域通过选自N3'→P5'氨基磷酸酯、N3'→P5'硫代氨基磷酸酯以及它们的组合的亚基间的键连接。

[0130] 嵌合寡核苷酸的X结构域可包括经修饰的核苷酸的某种排列。例如,在一些实施方案中,X结构域包含一个或多个构象受限的核苷酸。构象受限的核苷酸可包括BNA,诸如LNA和ENA。(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个构象受限的核苷酸)。在一些实施方案中,X结构域包含一个或多个2'-F和/或2'-OMe修饰的核苷酸。在一些实施方案中,X结构域包含交替的构象受限核苷酸,例如,每个其他核苷酸为构象受限的核苷酸。在一些实施方案中,X结构域包含一个或多个2'-F和/或2'-OMe修饰的核苷酸(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个2'-F和/或2'-OMe修饰的核苷酸)。在一些实施方案中,X结构域包含交替的2'-F和2'-OMe修饰的核苷酸。在实施方案中,X结构域包含2'-F或2'-OMe和构象受限的核苷酸,例如以交替的序列。

[0131] Y结构域包含2至14个2'-脱氧核苷酸的序列。例如,Y结构域可包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个2'-脱氧核苷酸的序列。2'-脱氧核苷中的一者或两者可通过硫代磷酸酯亚基间的键(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个硫代磷酸酯亚基间的键)连接。在一些实施方案中,2'脱氧核苷中的每一个通过硫代磷酸酯亚基间的键连接。在一些实施方案中,Y结构域包含至少一个磷酸二酯亚基间的键(例如,1、2或3个磷酸二酯亚基间的键)。在其他实施方案中,Y结构域由通过硫代磷酸酯亚基间的键和任选地一个或两个磷酸二酯亚基间的键连接的2'-脱氧核苷组成。

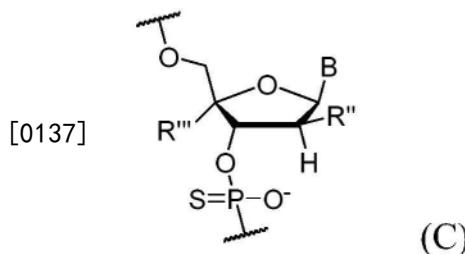
[0132] 在实施方案中,Y结构域包含诱导RNA酶H裂解的核苷酸。

[0133] 在一些实施方案中,通过硫代磷酸酯亚基间的键连接的2'-脱氧核苷可由下式(B)表示:



[0135] 其中在每个实例中,B独立地为未修饰或经修饰的核碱基。在一些实施方案中,B为未修饰的或经修饰的核碱基,其选自由以下项组成的组:5-甲基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤和5-胸腺嘧啶。

[0136] 在其他实施方案中,通过硫代磷酸酯亚基间的键连接的2'-脱氧核苷包括经修饰的2'-脱氧核苷,其可以与X结构域和Z结构域中相同的方式进行修饰。例如,通过硫代磷酸酯亚基间的键连接的经修饰2'-脱氧核苷可由下式(C)表示:



[0138] 在每个实例中,其中B独立地为未修饰或经修饰的核碱基,并且在每个实例中,R''和R'''各自独立地选自H、F、Cl、OH、OMe、Me、O-甲氧基乙氧基,或者R'和R'''一起形成2-4个原子桥以形成构象受限的核苷。在一些实施方案中,B为未修饰的或经修饰的核碱基,其选自由以下项组成的组:5-甲基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤和5-胸腺嘧啶。

[0139] Z结构域包含经修饰的核苷酸序列,其中Z结构域长度为4-10个核苷酸。例如,Z结构域可包含4、5、6、7、8、9或10个核苷酸序列。一个或多个这些核苷酸被修饰(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22)。例如,在一些实施方案中,Z结构域中的所有核苷酸被修饰。

[0140] Z结构域的经修饰核苷酸包括,例如独立地选自2'-F、2'-F-N3'→P5'、2'-OMe、2'-OMe-N3'→P5'、2'-OEt-N3'→P5'、2'-O-甲氧基乙氧基、2'-O-甲氧基乙氧基-N3'→P5'、构象受限的核苷、2'-OH-N3'→P5'硫代氨基磷酸酯和2'-OH-N3'→P5'氨基磷酸酯中的至少一者的修饰。

[0141] 在一些实施方案中,经修饰的核苷酸可包括由式(A)表示的核苷。

[0142] Z结构域的核苷酸通过亚基间的键,例如N3'→P5'氨基磷酸酯、N3'→P5'硫代氨基磷酸酯、硫代磷酸酯或磷酸二酯亚基间的键连接。在一些实施方案中,Z结构域通过N3'→P5'氨基磷酸酯、N3'→P5'硫代氨基磷酸酯亚基间的键,以及它们的组合连接。

[0143] 嵌合寡核苷酸的Z结构域可包括经修饰的核苷酸的某种排列。例如,在一些实施方案中,Z结构域包含一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,或更多个)构象受限的核苷酸(例如BNA,诸如LNA、ENA,它们中的每一个均可任选地被取代)。在一些实施方案中,Z结构域包含交替的构象受限的核苷酸,例如,每一个其他核苷酸是构象受限的核苷酸(例如BNA,诸如LNA、ENA,其各自可任选地被取代的)。在一些实施方案中,Z结构域包含一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,或更多个)2'-F和/或2'-OMe修饰的核苷酸。例如,一些实施方案包括其中Z结构域包含交替的2'-F和2'-OMe修饰的核苷酸,或Z结构域包含交替的2'-F和2'-OMe构象受限的核苷酸。

[0144] 在一些实施方案中,式(VI)或(VI')的经修饰核苷酸包括5-甲基胞嘧啶核碱基,但不包括胞嘧啶。在一些实施方案中,式(VI)或(VI')的经修饰核苷酸包括2,6-二氨基嘌呤核碱基,但不包括腺嘌呤。在一些实施方案中,式(VI)或(VI')的经修饰核苷酸包括5-甲基尿嘧啶核碱基,但不包括尿嘧啶。在一些实施方案中,式(VI)或(VI')的经修饰核苷酸包括2'-OMe和构象受限的核苷酸,并且通过硫代磷酸酯亚基间的键连接,并且该经修饰的核苷酸包括5-甲基胞嘧啶核碱基,但不包括胞嘧啶。在一些实施方案中,式(VI)或(VI')的经修饰核苷酸包括具有5-甲基尿嘧啶核碱基的2'-OMe修饰的核苷酸,但不包括尿嘧啶。

[0145] 在某些实施方案中,由式(VI)或(VI')表示的嵌合寡核苷酸根据表B的至少一种构体排列,其中X结构域和Z结构域中的至少一种亚基间的键为NPS连接。

[0146] 表B

X 结构域			Y 结构域			Z 结构域			
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	
6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	2	ps	A、G、C、T、U	11	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	
7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	2	ps	A、G、C、T、U	10	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP,	
8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	2	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	
9	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	2	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	
10	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹	2	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	
[0147]	6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	3	ps	A、G、C、T、U	10	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	3	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	3	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	9	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	3	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	10	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	3	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	6	np、	A、G、C、T、U、	4	ps	A、G、C、T、U	9	np、	A、G、C、T、

[0148]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	nps、 ps、 PO	DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP					nps、 ps、 PO	U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	4	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	4	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
9	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	4	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
10	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	4	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	5	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	5	ps	A、 G、 C、 T、 U	9	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	5	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	5	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
9	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	5	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	6	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	6	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	6	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP

[0149]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
		DAP						DAP
9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	6	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、	A、G、C、T、U、	7	ps	A、G、C、T、U	8	np、	A、G、C、T、

[0150]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	nps、 ps、 PO	DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP					nps、 ps、 PO	U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
9	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
10	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
9	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
10	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	7	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP

[0151]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
		DAP						DAP
9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	7	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	7	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、	A、G、C、T、U、	8	ps	A、G、C、T、U	6	np、	A、G、C、T、

[0152]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	nps、 ps、 PO	DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP					nps、 ps、 PO	U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	9	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP

[0153]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
		DAP						DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	8	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、	A、G、C、T、U、	8	ps	A、G、C、T、U	6	np、	A、G、C、T、

[0154]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	nps、 ps、 PO	DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP					nps、 ps、 PO	U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	8	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	9	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	9	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	9	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、	9	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
[0155]	ps、PO	5meU、G形夹、DAP	9	ps	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP	9	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
	5	np、nps、ps、PO						
	6	np、nps、ps、PO						
	6	np、nps、ps、PO						
	6	np、nps、ps、PO						
	6	np、nps、ps、PO						
	7	np、nps、ps、PO						
	7	np、nps、ps、PO						
	7	np、nps、ps、PO						
	7	np、nps、ps、PO						
	8	np、nps、ps、PO						
	8	np、nps、ps、PO						
	8	np、nps、						

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
[0156]	ps、PO	5meU、G形夹、DAP	9	ps	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP	6	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
	5	np、nps、ps、PO						
	5	np、nps、ps、PO						
	5	np、nps、ps、PO						
	5	np、nps、ps、PO						
	6	np、nps、ps、PO						
	6	np、nps、ps、PO						
	6	np、nps、ps、PO						
	6	np、nps、ps、PO						
	7	np、nps、ps、PO						
	7	np、nps、ps、PO						
	7	np、nps、ps、PO						
	7	np、nps、						

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	ps、PO	5meU、G形夹、DAP	9	ps	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP		ps、PO	5meU、G形夹、DAP
8	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP				6	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
8	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP				5	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
8	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP				4	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
5	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP				6	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
5	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP				7	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
5	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP				8	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
5	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP				9	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
6	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP				5	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
6	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP				6	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
6	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP				7	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
6	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP				8	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
7	np、nps、	A、G、C、T、U、DAP、5meC、				4	np、nps、	A、G、C、T、U、DAP、5meC、

[0158]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	ps、PO	5meU、G形夹、DAP					ps、PO	5meU、G形夹、DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	9	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	9	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	9	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	9	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	9	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	9	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、	10	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、

[0159]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	ps、PO	5meU、G形夹、DAP					ps、PO	5meU、G形夹、DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、	10	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
[0160]	ps、PO	5meU、G形夹、DAP	10	ps	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP	6	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP
	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP						
	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP						
	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP						
	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP						
	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP						
	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP						
	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP						
	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP						
	np、nps、ps、PO	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP						

[0161]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、	10	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、

[0162]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	ps、PO	5meU、G形夹、DAP					ps、PO	5meU、G形夹、DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP

[0163]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
8	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	10	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	11	ps	A、G、C、T、U	3	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	11	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	11	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	11	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、	A、G、C、T、U、	11	ps	A、G、C、T、U	7	np、	A、G、C、T、

[0164]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	nps、 ps、 PO	DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP					nps、 ps、 PO	U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	9	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	10	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	3	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	9	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	10	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、	A、 G、 C、 T、 U、	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	4	np、	A、 G、 C、 T、

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	nps、 ps、 PO	DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP					nps、 ps、 PO	U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	9	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	5	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	7	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	11	ps	A、 G、 C、 T、 U	8	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
2	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	12	ps	A、 G、 C、 T、 U	2	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
2	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP	12	ps	A、 G、 C、 T、 U	3	np、 nps、 ps、 PO	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、 5meU、 G 形夹、 DAP
2	np、 nps、	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、	12	ps	A、 G、 C、 T、 U	4	np、 nps、	A、 G、 C、 T、 U、 DAP、 5meC、

[0165]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
[0166]		ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	5	np、 nps、 ps、PO A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	3	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	3	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	3	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	3	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	3	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP						
	3	np、 nps、 ps、PO 5meC、						

[0167]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	ps、PO	5meU、G形夹、DAP					ps、PO	5meU、G形夹、DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	2	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、	12	ps	A、G、C、T、U	10	np、 nps、	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、

[0168]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	ps、PO	5meU、G形夹、DAP					ps、PO	5meU、G形夹、DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	12	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
2	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	2	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
2	np、 nps、	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、	13	ps	A、G、C、T、U	3	np、 nps、	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
[0169]		ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP		ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP				4	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP				5	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP				6	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP				7	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP				8	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP				9	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP				10	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP				2	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP				3	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP				4	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP				5	np、 nps、 ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO 5meC、				6	np、 nps、 ps、PO 5meC、	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	ps、PO	5meU、G形夹、DAP	13	ps	A、G、C、T、U、DAP、5meC、5meU、G形夹、DAP		ps、PO	5meU、G形夹、DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP				7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP				8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP				9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP				10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP				2	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP				3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP				4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP				5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP				6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP				7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP				8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、				9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、

[0171]

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	ps、PO	5meU、G形夹、DAP					ps、PO	5meU、G形夹、DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP	13	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
2	np、 nps、	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、	14	ps	A、G、C、T、U	2	np、 nps、	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
[0172]		ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP		ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	
	2	np、 nps、 ps、PO				3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO				4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO				5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO				6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO				7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO				8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO				9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	2	np、 nps、 ps、PO				10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO				2	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO				3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO				4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO				5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、

X结构域			Y结构域			Z结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
[0173]		ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP		ps、PO 5meU、G形夹、 DAP	
	3	np、 nps、 ps、PO				6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO				7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO				8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO				9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	3	np、 nps、 ps、PO				10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	4	np、 nps、 ps、PO				2	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	4	np、 nps、 ps、PO				3	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	4	np、 nps、 ps、PO				4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	4	np、 nps、 ps、PO				5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	4	np、 nps、 ps、PO				6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	4	np、 nps、 ps、PO				7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G形夹、 DAP
	4	np、 nps、 ps、PO				8	np、 nps、	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、

[0174]

X 结构域			Y 结构域			Z 结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	ps、PO	5meU、G 形夹、DAP					ps、PO	5meU、G 形夹、DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP
4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U	10	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U	4	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP
5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U	9	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U	5	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U	6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP
6	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP	14	ps	A、G、C、T、U	7	np、 nps、 ps、PO	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、 5meU、G 形夹、 DAP
6	np、 nps、	A、G、C、T、U、 DAP、5meC、	14	ps	A、G、C、T、U	8	np、 nps、	A、G、C、T、 U、DAP、5meC、

[0175]

X 结构域			Y 结构域			Z 结构域		
Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基	Nucs 数目	亚基间 的键	核碱基 取代
	ps、PO	5meU、G 形夹、 DAP					ps、PO	5meU、G 形夹、 DAP

[0176] 在表B中,每个X结构域和Z结构域中的核苷酸可为表A中编号的核苷酸中的一者或多者,在一些实施方案中,表B的嵌合寡核苷酸包括表A中的至少1、2、3、4、5、6、7、8或更多个经修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所有的X和/或Z核苷酸为经修饰的核苷酸。在一些实施方案中,表B中的核苷酸选自表A中列出的某些经修饰的核苷酸,诸如核苷酸编号1-4或5-8或9-12或13-16或17-20或21-24或25-28或29-30或31-32或33。在一些实施方案中,表B中的核苷酸选自表A中所列的某些经修饰的核苷酸,诸如核苷酸编号9-12和21-28,或9-12和21-24,或1-4和21-28,或1-4和21-24,或5-8和21-28,或5-8和21-24。在一些实施方案中,表B中的核苷酸选自表A中列出的一个或两个或三个经修饰的核苷酸,诸如核苷酸编号29-31或31-32或33。在一些实施方案中,表B中的核苷酸选自表A中列出的某些经修饰的核苷酸,诸如核苷酸编号29或31或33。表B的Y结构域中的核苷酸可包括式B的核苷酸。

[0177] 在一些实施方案中,表B的寡核苷酸在5'端和/或3'端处缀合至配体靶向基团或药效团。

[0178] 在一些实施方案中,本公开的核苷酸化合物包括下列序列之一:5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGUGC-3',或表H(下文)中的其他序列。

[0179] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含表C中的序列。在表C中,在每个实例中,X独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基。在一些实施方案中,每个X独立地选自A、C、G、U、T、2',6'-二氨基嘌呤、5'-甲基嘧啶(例如,5'-甲基胞嘧啶、5'-胸腺嘧啶)和g形夹。

[0180] 表C

经修饰的序列 (5'-3')
5'-mXpsmXpsmXpsmXpsmXpsmXps <u>XpsXpsXpsXpsXpsXps</u> XpsmXpsmXpsmXpsmXpsmXpsmXpsmXpsmX-3'
5'-mXpsmXpsmXpsmXpsmXpsmXps <u>XpsXpsXpsXpsXpsXps</u> XpsmXpsmXpsmXpsmXpsmXpsmXpsmXpsmXps-Chol-3'

[0188]

经修饰的序列 (5'-3')
2-4 OCH ₂ CH ₂ XnpsmXnps2-
4OCH ₂ CH ₂ XnpsmXnpsmXnpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsmXnpsmXnps2-4
OCH ₂ CH ₂ XnpsmXnps2-OCH ₂ CH ₂ 3-NH ₂ X
2-4 OCH ₂ CH ₂ XnpsmXnps2-4 OCH ₂ CH ₂ XnpsmXnpsmCnpsmXnpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsmXnps2-4
OCH ₂ CH ₂ XnpsmXnpsmXnpsmXnps2-4 OCH ₂ CH ₂ Xnps3-NH ₂ mX
mXnps2-4OCH ₂ CH ₂ XnpsmXnps2-4 OCH ₂ CH ₂ XnpsmXnpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsXpsmXnps2-4
OCH ₂ CH ₂ XnpsmXnpsmXnps2-4OCH ₂ CH ₂ XnpsmXnps3-NH ₂ mX

[0189] 在实施方案中，结构域的每个核苷酸被修饰。在实施方案中，结构域的每个核苷酸具有相同的修饰。在实施方案中，X结构域和Z结构域的每个核苷酸被修饰。在实施方案中，X结构域和Z结构域的每个核苷酸具有相同的修饰。在实施方案中，结构域的每个核苷酸被2' MOE修饰。在实施方案中，X结构域和Z结构域的每个核苷酸被2' MOE修饰。在实施方案中，结构域的每个核苷酸被2' OMe修饰。在实施方案中，X结构域和Z结构域的每个核苷酸被2' OMe修饰。在实施方案中，结构域的每个核苷酸被2' OEt修饰。在实施方案中，X结构域和Z结构域的每个核苷酸通过NPS键连接。在实施方案中，X结构域和Z结构域具有相同数目的核苷酸。在实施方案中，X结构域和Z结构域各自具有4-8个核苷酸。在实施方案中，X结构域和Z结构域各自具有5-6个核苷酸。在实施方案中，X结构域和Z结构域中的每一个至少两倍数目的核苷酸。在实施方案中，Y结构域具有与X结构域和Z结构域中的每一个至少两倍数目的核苷酸。在实施方案中，Y结构域具有8-12个核苷酸。在实施方案中，Y结构域具有10个核苷酸。在实施方案中，Y结构域的每个核苷酸通过PS键连接。在实施方案中，寡核苷酸的至少一种核碱基被修饰。在实施方案中，邻近寡核苷酸3'末端的至少一种核碱基被修饰。在实施方案中，寡核苷酸的Z结构域中的至少一种核碱基被修饰。在实施方案中，寡核苷酸的Y结构域中的至少一种核碱基被修饰。

[0190] 在一些实施方案中，由式(VI)或(VI')表示的寡核苷酸选自表D。在其他实施方案中，由式(VI)或(VI')表示的寡核苷酸具有与表D的嵌合寡核苷酸相差一个经修饰的核苷酸的序列。在其他实施方案中，由式(VI)或(VI')表示的寡核苷酸具有与表D的寡核苷酸相差1、2、3或4个核苷酸的序列。由式(VI)或(VI')表示的嵌合寡核苷酸的具体实施方案在下表D中列出：

[0191] 表D

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
[0192]	101 5'- mGpsmCpsmApsmGpsmApsmGps <u>GpsTp</u> sGpsApsApsGpsmCpsmGpsmApsmApsm GpsmUpsmGpsmC-3'
	102 5'- mGpsmCpsmApsmGpsmApsmGps <u>GpsTp</u> sGpsApsApsGpsmCpsmGpsmApsmApsm GpsmUpsmGpsmCps-Chol-3'
	103 5'- mGpsmCpsmApsmGpsmApsmGps <u>GpsTp</u> sGpsApsApsGpsmCpsmGpsmApsmApsm GpsmUpsmGpsmC-GalNAc-3'
	104 mGpsmApsmUpsmUpsmApsmGps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmApsmApsm mApsmApsmApsmG
	105 5'- mGpsmApsmUpsmUpsmApsmGps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmApsmApsm mApsmApsmApsmG-Chol-3'
	106 5'- mGpsmApsmUpsmUpsmApsmGps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmApsmApsm mApsmApsmApsmG-GalNAc-3'
	107 5'- mGpsmApsmUpsmUpsmAps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmApsmApsm ApsmApsmApsmG
	108 5'- mGpsmApsmUpsmUpsmAps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmApsmApsm ApsmApsmApsmG-Chol-3'
	109 5'- mGpsmApsmUpsmUpsmAps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmApsmApsm ApsmApsmApsmG-GalNAc-3'
	110 5'- mGpsmDAPpsmUpsmUpsmDAPpsmGps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmApsm mApsmApsmApsmG-3'
	111 5'- mGpsmApsmUpsmUpsmApsmGps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmApsmApsm mApsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG-3'
	112 5'- mGpsmApsmUpsmUpsmApsmGps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmDAPpsmD ApsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG-3'
	113 5'- mGpsmDAPpsmUpsmUpsmDAPpsmGps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmApsm mApsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG-3'
	114 5'- mGpsmDAPpsmUpsmUpsmDAPpsmGps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmDA PpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG-3'
	115 5'- mGpsmDAPpsmUpsmUpsmDAPps <u>GpsCp</u> sApsGpsApsGpsGpsTp <u>sm</u> GpsmApsm ApsmApsmApsmG-3'

[0193]

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
116	5'- mGpsmApSmUpSmUpSmAps <u>GpsGpsCpsApsGpsGpsGpsTpSmGpsmApSmApSmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG-3'</u>
117	5'- mGpsmApSmUpSmUpSmAps <u>GpsGpsCpsApsGpsGpsGpsTpSmGpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG-3'</u>
118	5'- mGpsmDAPpsmUpSmUpSmDAPps <u>GpsGpsCpsApsGpsGpsGpsTpSmGpsmApSmApSmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG-3'</u>
119	5'- mGpsmDAPpsmUpSmUpSmDAPps <u>GpsGpsCpsApsGpsGpsGpsTpSmGpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG-3'</u>
120	5'- mGpsmCpsmApSmGpsmApSmGps <u>GpsTpSmGpsApsApsGpsmCpsmGpsmApSmDAPpsmUpSmGpsmC-3'</u>
121	5'- mGpsmCpsmApSmGpsmApSmGps <u>GpsTpSmGpsApsApsGpsmCpsmGpsmDAPpsmDAPpsmDA</u> PpsmGpsmUpSmGpsmC-3'
122	5'- mGpsmCpsmApSmGpsmDAPpsmGps <u>GpsTpSmGpsApsApsGpsmCpsmGpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmGpsmUpSmGpsmC-3'</u>
123	5'- mGpsmCpsmDAPpsmGpsmDAPpsmGps <u>GpsTpSmGpsApsApsGpsmCpsmGpsmDAPpsmDAPpsmGpsmUpSmGpsmC-3'</u>
124	5'-CnpsGnpsTnpsGnpsCnpsAps <u>GpsApsGpsGpsTpSmGpsAnpsAnpsGnpsCnps-3-NH₂-G-3'</u>
125	5'-GnpsCnpsAnpsGnpsAnps <u>GpsApsGpsTpSmGpsApsApsGnpsCnpsGnpsAnpsAnpsAnps-3-NH₂-G-3'</u>
126	5'- CnpsGnpsAnpsCnpsGnpsTnps <u>GpsCpsApsGpsApsGpsGnpsTnpsGnpsAnpsAnpsAnpsGnps-3-NH₂-C-3'</u>
127	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnps <u>GpsTpSmGpsApsApsGpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3-NH₂-C-3'</u>
128	5'-GnpsCnpsAnpsGnpsAps <u>GpsGpsTpSmGpsAnpsAnpsGnpsCnps-3-NH₂-G-3'</u>
129	5'-CnpsGnpsTnpsGnpsCnpsAps <u>GpsApsGpsTpSmGpsAnpsAnpsGnps-3-NH₂-C-3'</u>
130	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsTnps <u>GpsApsAnpsGnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH₂-C-3'</u>
131	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnps <u>TpSmGpsAnpsAnpsGnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH₂-C-3'</u>
132	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnps <u>GpsTpSmGnpsAnpsAnpsGnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH₂-C-3'</u>
133	5'-

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGnps <u>ApsAps</u> GnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'
134	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGnpsAnps <u>ApsGps</u> CnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'
135	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnps <u>GpsTpsGps</u> AnpsGnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'
136	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnps <u>GpsApsAps</u> GnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'
137	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnps <u>TpsGpsAps</u> AnpsGnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'
138	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGnps <u>ApsApsGps</u> CnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'
139	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnps <u>GpsApsApsGps</u> CnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'
140	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnps <u>TpsGpsApsApsGps</u> CnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'
141	5'- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnps <u>GpsTpsGpsApsApsGpsCps</u> GnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'
142	5'- mApsmApsmApsmApsm <u>GpsApsGpsGpsTpsGps5mCpsGps5mCps5mCps5mCps5mCps5mCpsmGpsmUpsmGpsmG-3'</u>
143	5'- mGpsmGpsmUpsmGpsmAp <u>sApsGps5mCpsGpsApsApsGpsTpsGps5mCpsmAp5mCpsmAp5mmCpsmG-3'</u>
144	5'- 5mmCpsmGpsmUpsmGps5mmCps <u>ApsGpsApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps5mmCpsmAp5mmCpsmAp5mmCpsmG-3'</u>
145	5'- mApsmApsmApsmApsm <u>GpsTpsGpsApsApsGps5mCpsGpsApsApsGpsmUpsmGps5mmCpsmAp5mmCpsmC-3'</u>
146	5'- mUpsmGpsmGps5mmCpsmAp <u>s5mCpsTpsApsGpsTpsApsApsAps5mCpsTpsmGpsmAp5mmCps5mmCps5mmCpsmG-3'</u>
147	5'- 5mmCpsmUpsmApsmApsmGpsmAp <u>sGpsTps5mCps5mCpsGps5mCpsApsGpsmUpsmAp5mmCpsmG-3'</u>
148	5'- mApsmApsmApsmApsmGps <u>TpsGps5mCpsGps5mCps5mCps5mCps5mCpsGpsTpsmGpsmUpsmAp5mmCpsmG-3'</u>

[0194]

[0195]

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
149	5'- mGpsmApSmGpsmGpsmUpS <u>Gps5mCpsGps5mCps5mCps5mCps5mCpsGpsTpS</u> Gps mGpsmUpS5mmCpsmGpsmG-3'
150	5'- mGpsmApSmApSmApSmGps <u>5mCps5mCps5mCpsTpS</u> Aps5mCpsGpsApsAps5mCps5 mmCpsmAps5mmCpsmUpSmG-3'
151	5'- mGpsmUpSmUpS5mmCps5mmCps <u>Gps5mCpsApsGpsTpS</u> ApsTpSgPsGpsApsmUpS5 mmCpsmGpsmGps5mmC-3'
152	5'- mUpS5mmCps5mmCpsmGps5mmCps <u>ApsGpsTpS</u> ApsTpSgPsGpsApsTpS5mCpsmGp smGps5mmCpsmApSmG-3'
153	5'- mAps5mmCps5mmCpsmAps5mmCps <u>TpsGpsApsAps5mCpsApsApsApsTpS</u> GpsM gs5mmCpsmAps5mmCpsmU-3'
154	5'- mUpSmGps5mmCpsmApSmGps <u>ApsGpsTpS</u> GpsApsTpSgPs5mCpsGpsmApSmA psmGpsmUpSmG-3'
155	5'- mAps5mmCpsmUpSmGpsmAps <u>Aps5mCpsApsApsApsTpS</u> GpsGps5mCpsAps5mmC psmUpSmApSmGpsmU-3'
156	5'- mApsmGpsmUpS5mmCps5mmCps <u>Aps5mCps5mCpsAps5mCpsGpsApsGpsTpS</u> 5mC psmUpSmApSmGpsmAps5mmC-3'
157	5'- 5mmCpsmAps5mmCpsmUpSmGps <u>ApsAps5mCpsApsApsApsTpS</u> GpsGps5mCpsmA ps5mmCpsmUpSmApSmG-3'
158	5'- 5mmCpsmApSmGpsmApSmGps <u>GpsTpS</u> GpsApsApsGps5mCpsGpsApsApSmGpsmU psmGps5mmCpsmA-3'
159	5'- mApsmApSmGpsmApSmGps <u>ApsGpsTpS</u> Gps5meCpsGps5meCps5meCps 5memCpsmGpsmUpSmGpsmG-GalNAc-3'
160	5'- mGpsmGpsmUpSmGpsmAps <u>ApsGps5meCpsGpsApsApsGpsTpS</u> Gps5mCpsmApS5m emCpsmApS5memCps mG-GalNAc-3'
161	5'- mUpSmGpsmGps5memCpsmAps <u>5meCpsTpS</u> ApsGpsTpSApS5meCpsTpSmG psmApSmGps5memCps5memCpoGalNAc-3'
162	5'- 5memCpsmUpSmApSmGmGps <u>ApsGpsTpS</u> 5meCps5meCpsGps5meCpsApsGpsm UpSmApSmUpSmGpsmGpoGalNAc-3'
163	5'- mApsmGpsmApSmGpsmGps <u>TpsGps5meCpsGps5meCps5meCps5meCpsGps</u> TpSmGpsmGpsmUpS 5memCpsmGpoGalNAc-3'
164	5'- mUpS5memCps5memCpsmGps5memCps <u>ApsGpsTpS</u> ApsTpSgPsGpsApsTpS5meCps

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
	mGpsmGps5memCps mApsmGpoGalNAc-3'
165	5'- mUpsmGps5memCpsmAp smGps <u>ApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps5meCpsGpsmAp smApsmGpsmUp smGpoGalNAc-3'</u>
166	5'- mApsmGpsmUp s5memCps5memCps <u>Aps5meCps5meCAps5meCpsGpsApsGpsTps5meCpsmUp smApsmGps mAps5memCpoGalNAc-3'</u>
167	5'- fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsfGnps <u>GpsTpsGpsApsApsGpsfCnpsfGnpsfAnpsfAnpsfGnpsfUnpsfGnps-3-NH₂-fC-3'</u>
168	5'- fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsfGnps <u>GpsTpsGpsApsApsGpsCpsfGnpsfAnpsfAnpsfGn psfUnpsfGnps-3-NH₂-fC-3'</u>
169	5'- fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsfGnps <u>GpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsfAnpsfAnpsfGnpsfUnpsfGnps-3-NH₂-fC-3'</u>
170	5'-GnpCnpA npGnpA npGnp <u>GpsTpsGpsApsApsGpsCnpGnpA npA npGnpTnpGnp-3NH₂-C-3'</u>
171	5'- GnpsfCnpsfAnpsGnpsfAnpsGnps <u>GpsTpsGpsApsApsGpsfCnpsGnpsfAnpsfAnpsGnpsfTn psGnps-3 NH₂-fC-3'</u>
172	5'- Gn pfCn pfA npGn pfA npGnp <u>GpsTpsGpsApsApsGpsfCnpGn pfA npGn pfTnpGnp-3 NH₂-fC-3'</u>
173	5'- Gn psafCn psafAnpsGn spafAnpsGn ps <u>GpsTpsGpsApsApsGpsafCn psGn psafAnpsafAn psGn psafUnpsGn psafC-3'</u>
174	5'- Gn pafCn pafA npGn pafA npGnp <u>GpsTpsGpsApsApsGpsafCnpGn pafA npafA npGn pafU npGn pafC-3'</u>
175	5'- Gn pafCn pafA npGn pafA npGnp <u>GpsTpsGpsApsApsGpsCpsGn pafA npafA npGn pafUnp Gn pafC-3'</u>
176	5- mGpsmCpsmUp smCpsmCpsmAps <u>ApsApsTpsTpsCpsTpsTpsApsmUp smApsmGpsmGpsmG-GalNAc-3</u>
177	5'- mApsmAp smGpsmAp smGpsApsGpsGpsTpsGps5mCpsGps5mCps5mCps5mCps5mCpsmGpsmUp smGpsmG-3'
178	5'- mGpsmGpsmUp smGpsmApsApsGps5mCpsGpsApsApsGpsTpsGps5mCpsmAps5mCpsmAps5mmCpsmG-3'
179	5- 5mmCpsmGpsmUp smGps5mmCpsApsGpsGpsApsGpsTpsGpsApsApsGps5mmCpsmGpsmAp smApsmG-3'
180	5'- mGpsmUp smGpsmAp smApsGps5mCpsGpsApsApsGpsTpsGps5mCpsAps5mmCps

[0196]

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
	mAps5mmCpsmGpsmG-3'
181	5'- mApsmGpsmApsmGpsmGpsTpGsApsApsGps5mCpsGpsApsApsGpsmUpsmGps5 mmCpsmAps5mmC-3'
182	5'- mUpsmGpsmGps5mmCpsmAps5mCpsTpGsApsGpsTpGsApsAps5mCpsTpSmGpsm ApsmGps5mmCps5mmC-3'
183	5'- 5mmCpsmUpsmApsmGpsmGpsApsGpsTpGs5mCps5mCpsGps5mCpsApsGpsmU psmApsmUpsmGpsmG-3'
184	5'- mGps5mmCpsmApsmGpsmApsGpsTpGsApsGps5mCpsGpsApsmApsmG psmUpsmGps5mmC-3'
185	5'- mApsmGpsmApsmGpsmGpsTpGs5mCpsGps5mCps5mCps5mCpsGpsTp mGpsmGpsmUpsm5mmCpsmG-3'
186	5'- mGpsmApsmGpsmGpsmUpsmGps5mCpsGps5mCps5mCps5mCps5mCpsGpsTpGs mGpsmUpsm5mmCpsmGpsmG-3'
187	5'- mGpsmApsmApsmApsmGps5mCps5mCps5mCpsTpGsAps5mCpsGpsApsAps5mCps5 mmCpsmAps5mmCpsmUpsmG-3'
188	5'- mGpsmUpsmUpsm5mmCps5mmCpsGps5mCpsApsGpsTpGsApsTpGsGpsGpsApsmUpsm5 mmCpsmGpsmGps5mmC-3'
189	5'- mUp5mmCps5mmCpsmGps5mmCpsApsGpsTpGsApsTpGsGpsApsTp5mCpsmG ps5mmCpsmApsmG-3'
190	5'- mAps5mmCps5mmCpsmAps5mmCpsTpGsApsAps5mCpsApsApsApsTpGsGps ps5mmCpsmAps5mmCpsmU-3'
191	5'- mUpsmGps5mmCpsmApsmGpsApsGpsTpGsApsApsGps5mCpsGpsmApsmA psmGpsmUpsmG-3'
192	5'- mAps5mmCpsmUpsmGpsmApsAps5mCpsApsApsApsTpGsGps5mCpsAps5mmC psmUpsmApsmGpsmU-3'
193	5'- mApsmGpsmUpsm5mmCps5mmCpsAps5mCps5mCpsAps5mCpsGpsApsGpsTp5mC psmUpsmApsmGpsmAps5mmC-3'
194	5'- 5mmCpsmAps5mmCpsmUpsmGpsApsAps5mCpsApsApsApsTpGsGps5mCpsmA ps5mmCpsmUpsmApsmG-3'
195	5'- 5mmCpsmApsmGpsmApsmGpsTpGsApsApsGps5mCpsGpsApsApsmGpsmU psmGps5mmCpsmA-3'
196	5'-

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
	mApsmApSmGpsmApSmGpsmApSmGpsGpsTpSgpS5meCpsGps5meCps5meCps5memCps5memCpsmGpsmUpSmGpsmG 3'
197	5'- mApsmApSmGpsmApSmGpsmApSmGpsGpsTpSgpS5meCpsGps5meCps5memCps5memCpsmGpsmUpSmGpsmG 3'
198	5'- mGpsmGpsmUpSmGpsmApSmApsGps5meCpsGpsApsApsGpsTpSgpS5memCpsmAps5memCpsmApSmAps5memCpsmG 3'
199	5'- mGpsmGpsmUpSmGpsmApSmApSmGps5meCpsGpsApsApsGpsTpSgpS5memCpsmApSm5memCpsmApSmAps5memCpsmG 3'
200	5'- mUpSmGpsmGps5memCpsmApSmAps5memCpsTpSApSmGpsTpSApSmApsAps5meCpsTpSmGpsmApSmGps5memCps5memC 3'
201	5'- mUpSmGpsmGps5memCpsmApSmAps5meCpsTpSApSmGpsTpSApSmApsAps5meCpsTpSmGpsmApSmGps5memCps5memC 3'
202	5'- 5memCpsmUpSmApSmGmGpsmApSmGpsTpSTpS5meCps5meCpsGps5meCpsApsmGpsmUpSmApSmUpSmGpsmG 3'
203	5'- 5memCpsmUpSmApSmGmGpsmApSmGpsTpSTpS5meCps5meCpsGps5meCpsApsmGpsmUpSmApSmUpSmGpsmG 3'
204	5'-GalNAc-NHC6- psmUpSm5meCpsm5meCpsmGpsm5meCps <u>ApsGpsTpSApSmGpsTpS5meCpsTpSmGpsm5meCpsmApSmG</u> 3'
205	5'-GalNAc-NHC6- psm5meCpsmUpSmApSmGpsmGps <u>ApsGpsTpSTpS5meCps5meCpsGps5meCpsApsGpsmUpSmApSmUpSmGpsmG</u> 3'
206	5'-GalNAc-NHC6- psmApSmApSmGpsmApSmGps <u>ApsGpsGpsTpSgpS5meCpsGps5meCps5meCps5meCpsTpSmGpsmUpSmGpsmG</u> 3'
207	5' GalNAc-NHC6- psmApSmGpsmApSmGpsmGps <u>TpsGps5meCpsGps5meCps5meCps5meCps5meCpsGpsTpSmGpsmUpSm5meCpsmG</u> 3'
208	5' GalNAc-NHC6- psmUpSmGpsm5meCpsmApSmGps <u>ApsGpsGpsTpSgpS5meCpsGps5meCpsTpSmGpsmApSmUpSmGpsmG</u> 3'
209	mGpsmCpsmUpSmCpsmCpsmApSmApsApsTpSgpS5meCpsGps5meCps5meCps5meCpsGpsmUpSmApsmApSmGpsmG
210	mGpsmCpsmUpSmCpsmCpsmApSmApsApsTpSgpS5meCpsGps5meCps5meCps5meCpsGpsmUpSmApsmApSmGpsmG
211	mGpsmCpsmUpSmCpsmCpsmApSmApsApsTpSgpS5meCpsGps5meCps5meCps5meCpsGpsmUpSmApsmApSmGpsmG
212	mGpsmCpsmUpSmCpsmCpsmApSmApsApsTpSgpS5meCpsGps5meCps5meCps5meCpsGpsmUpSmApsmApSmGpsmApSmG/GalNAc/
213	mGpsmCpsmUpSmCpsmCpsmCpsmApSmApsApsTpSgpS5meCpsGps5meCps5meCps5meCpsGpsmUpSmApsmApSmGpsmG

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
	ApsmGpsmG/GalNAc/
214	mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmApsmApsApsTpstpsCpsTpstpsTpstpsmApsmUpsmApsmApsmGpsmG/3CholTEG/
215	mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmCpsmApsApsApsTpstpsCpsTpstpsTpstpsmApsmUpsmApsmApsmGpsmG/3CholTEG/
216	mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmCpsmApsApsApsTpstpsCpsTpstpsTpstpsmApsmUpsmApsmApsmGpsmGpsmG/3CholTEG/
217	5'- mGps5mmCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsGpsGp5mmCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGpsm5meC-3'
218	5'- mGps5mmCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGps5mmCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGps5mmC-胆固醇-3'
219	5'- mGps5mmCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGpsGp5mmCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGps5mmC-TEG-胆固醇-3'
220	5'- mGps5mmCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGps5mmCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGps5mmC-生育酚-3'
221	5'- mGps5mmCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGps5mmCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGps5mmC-TEG-生育酚-3'
222	5'- mGps5mmCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGps5mmCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGps5mmC-GalNAc-3'
223	5'- mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGps5meCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGpsm5meC-3'
224	5'- mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGps5meCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGpsm5meC-po-Chol-3'
225	5'- mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGps5meCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGpsm5meC-po-生育酚-3'
226	5'- mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGps5meCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGpsm5meC-po-GalNAc-3'
227	5'- mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGps5meCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGpsm5meC-3'
228	5'- mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGps5meCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGpsm5meC-po-Chol-3'
229	5'- mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsTpstpsGpsApsApsGps5meCpsmGpsmApsmApsmGpsmUpsmGpsm5meC-po-生育酚-3'
230	5'-

[0199]

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
	mGpsm5meCpsmApsmGpsmApssGpsGpsTpsGpsApsApsGps5meCpsGpsmApssApsmApssGpsmUpssGpsm5meC-po-GalNAc-3'
231	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps (5m)mC-3
232	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps (5m)mC-Chol-3
233	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps (5m)mC-Toco-3
234	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps (5m)mC-GalNAc-3
235	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps (5m)mC-3
236	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps (5m)mC-Chol-3
237	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps (5m)mC-Toco-3
238	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps (5m)mC-GalNAc-3
239	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps (5m)mC-3
240	5-dTnpsGnpsCnpsAnpsGnpsApsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAnpsAnpsGnpsTnpsGn-3'
241	5-dTnpsfGnpsCnpsfAnpsfGnpsApsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsfAnpsfAnpsfGnpsfUnpsfGn-3'
242	5-fGnpsCnpsfAnpsfGnpsfAnpsfGnpsGpsTpsGpsApsApsGpsCnpsfGnpsfAnpsfAnpsfGnpsfUnpsfGnpsCn-3'
243	5-fGnpsCnpsfAnpsfGnpsfAnpsfGnpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsfAnpsfAnpsfGnpsfUnpsfGnpsCn-3'
244	5'-dGnpmCnpmAnpmGnpmAnpmGnpGpsTpsGpsApsApsGpsmCnpmGnpmAnpmAnpmGnpmUnpmGnpmCnp-3'
245	5'-dGnpmCnpmAnpmGnpmAnpmGnpGpsTpsGpsApsApsGpsCpsmGnpmAnpmAnpmGnpmUnpmGnpmCnp-3'

[0201]

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
246	5'- dGnpmCnpmAnpmGnpmAnpmGnpGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsmAnpsmAnpmG npmUnpmGnpmCnp-3'
247	5'- dGnpmCnpmAnpmGnpmAnpGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsmGnpmAnpmAnpmGn pmUnpmGnpmCnp-3'
248	5'- dGnpmCnpmAnpmGnpmAnpGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsmAnpmAnpmGnp mUnpmGnpmCnp-3'
249	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGnpsAnpsAnpsGnpsCnpsGnpsAnpsAnpsG
250	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGnpsAnpsAnpsGnpsCnpsGnpsAnpsAnpsAnpsG npsTnpsGnpsC
251	CnpsGnpsTnpsGnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsTnpsGnpsAnpsAnpsGnpsCnpsGnpsG
252	CnpsGnpsTnpsGnpsCnpsApsGpsApsGpsGpsTpsGpsAnpsAnpsGnpsCnpsGnpsG
253	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGnpsCnpsGnpsAnpsAnpsG
254	CnpsGnpsAnpsCnpsGnpsTnpsGpsCpsApsGpsApsGpsGnpsTnpsGnpsAnpsAnpsGnps C
255	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGpsTpsGpsApsApsGpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnps GnpsC
256	GnpsCnpsAnpsGnpsApsGpsGpsTpsGpsAnpsAnpsGnpsCnpsGnpsG
257	CnpsGnpsTnpsGnpsCnpsApsGpsApsGpsGpsTnpsGnpsAnpsAnpsGnpsCnpsGnpsC
258	mGnpsmoeCnpsmoeAnpsmGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmo eAnpsmGnpsmoeUnpsmGnpsmoeCnp-C6-NH-GalNAc6
259	moeGps(5me)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5me)Cps GpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5me)moeC-po-GalNAc2
260	mGnpsmoeCnpsmoeAnpsmGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5me)CpsGpsA psmoeAnpsmGnpsmoeUnpsmGnpsmoeCnpo-C6-NH-GalNAc-6
261	GalNAc-2- pofGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5me)CpsGpsApsfAnpsf GnpsfUnpsfGnpsfCn
262	GalNAc-2- moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAp smoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn
263	moeGps(5me)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5me)Cps GpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5me)moeC-GalNAc2
264	GalNAc2- moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsG psApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn
265	GalNac- moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAp smoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn
266	GalNAc2- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoe AnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn
267	GalNac6- NH-C6- moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGp sApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5m)moeC

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
268	GalNAc2-mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn
269	GalNAc2-etoGnps(5m)etoCnpsetoAnpsetoGnpsetoAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsetoAnpsetoGnpsetoTnpsetoGnps(5m)etoCn
270	GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn
271	moeGpsmoemCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps5mCpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGpsmoemC
272	moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn
273	mGps5mmCpsmApsmGpsmApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps5mCpsGpsApsmApsmGpsmUpsmGps5mmC
274	mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsCpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn
275	GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeAnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeUnpsmoeCn
276	GalNAc6-NH-C6-moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5m)moeC
277	5'moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5me)moeC-GalNAc2
278	GalNAc2-mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn'
279	mGps(5m)mCpsmApsmGpsmApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmApsmUpsmGps(5m)mC-GalNAc
280	GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGnpsmoeUnpsmoeCn
281	moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCnp-C6-NH-GalNAc6
282	GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGnpsmoeUnpsmoeCn
283	GalNAc-GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsAnpsGnpsTnpsGnpsCn
284	GalNAc-mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn
285	GalNAc-fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsfAnpsfGnpsfUnpsfGnps-3nh2-fC
286	GalNAc-afGnpsafCnpsafAnpsafGnpsafAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsafAnpsafGnpsafTnpsafGnpsafCn

[0202]

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
287	GalNAc-dTnpsGnpsCnpsAnpsGnpsApsGpsGpsTpsGpsApsGpsCpsGpsAnpsAnpsGnpsTnps-3nh2-G
288	GalNAc-mUnpsmGnpsmCnpsmAnpsmGnpsApsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsmAnpsmAnpsmGnpsmUnpsmGn
289	GalNAc-fUnpsfGnpsfCnpsfAnpsfGnpsApsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsfAnpsfAnpsfGnpsfUnps-3nh2-fG
290	GalNAc-mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnpsApsApsApsTpsTps5MeCpsTpsTpsApsmUnpsmAnpsmAnpsmGnpsmGnpsmGn
291	GalNAc-moeGnpsmoeCnpsmoeUnpsmoeCnpsmoeCnpsApsApsApsTpsTps5MeCpsTpsTpsTpApsmoeUnpsmoeAnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeGnpsmoeGn
292	moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5m)moeC
293	moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn
294	fGnps(5m)fCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsfAnpsfGnpsfTnpsfCnpsfC-C6-NH-GalNac6
295	fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsfAnpsfGnpsfUnpsfGnpsfCnpsfC-C6-NH-GalNac6
296	mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCnpsfC-C6-NH-GalNac6
297	mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmC-C6-NH-GalNac6
298	moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCnpsfC-C6-NH-GalNac6
299	moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnps(5m)moeC-C6-NH-GalNac6
300	GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn
301	GalNAc2-etoGnpseto(5m)CnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn
302	mGnpsmCnps2-4-OCH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAps2-4-OCH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC
303	mGnpsmCnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC
304	mGnpsmCnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnps2-4OCH ₂ CH ₂ AnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC
305	mGnpsmCnpsmAnpsmGnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC
306	5-mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsCpsTpsTps mAnpsmUnpsmAnps2-4-

#ID	经修饰的序列 (5'-3')
	OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmGnps3-NH ₂ mG-3
307	mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmUnpsmAnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmGnps3-NH ₂ mG
308	mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmUnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmAnpsmGnpsmGnps3-NH ₂ mG
309	2- 4OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAps mAnpsmGnpsmUnps2-4OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mC
310	2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmAnps2- 4OCH ₂ CH ₂ GnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsGpsCpsGpsApsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmUnps2-4OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mC
311	2-4OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnpsm UnpsmGnps3-NH ₂ mC
[0204]	312 2-4OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTpsmAnpsmUnpsmAnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsm2-4OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mG
	313 2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmUnpsmCnpsmAnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTps mAnpsmUnpsmAnpsmAnpsmGnpsm2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mG
	314 mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsGpsCpsGpsApsmAnpsm GnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC
	315 mGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmGnps3-NH ₂ mC
	316 2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2- 4OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnps 2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmGnps2-OCH ₂ CH ₂ 3-NH ₂ (5me)C
	317 2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmCnpsmCnpsmAnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmAnpsmGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mG
	318 mGnps2-4OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmUnps2-4 OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmCnpsmAnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmAnpsmAnps2-4OCH ₂ CH ₂ GnpsmGnps3-NH ₂ mG

[0205] 在一些实施方案中,由式(VI)或(VI')表示的寡核苷酸选自上表C。在其他实施方案中,由式(VI)或(VI')表示的寡核苷酸具有与上文所列的嵌合寡核苷酸相差一个核苷酸的序列。在其他实施方案中,由式(VI)或(VI')表示的寡核苷酸具有与上文所列的嵌合寡核苷酸相差1、2、3或4个核苷酸的序列。在实施方案中,由式(VI)或(VI')表示的寡核苷酸具有与上文所列的嵌合寡核苷酸不同,但具有与上文所列的嵌合寡核苷酸相同的构建体序列。在实施方案中,与相同序列的未修饰的寡核苷酸相比,本发明所公开的寡核苷酸对靶核酸序列显示具有增加的亲和力。例如,在一些序列中,本发明所公开的寡核苷酸具有与靶核酸序列互补或杂交的核碱基序列,该核酸序列具有比相同序列的未修饰的寡核苷酸更高的亲和力。在实施方案中,与互补的靶核酸序列复合的本发明所公开的寡核苷酸具有>37°C解链温度TM。该复合物可在生理条件下或几乎生理条件下,诸如在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中形成。在实施方案中,复合物的T_m为>50°C。在实施方案中,复合物的T_m为50-100°C。在实施方案中,在生理条件或几乎生理条件下与靶核酸序列双联的本发明所公开的寡核苷酸的T_m为>50°C。

[0206] 在某些实施方案中，靶核酸序列可选自已知的病毒DNA或RNA序列，诸如HBV基因组的核酸序列，例如列于表E、F或J中的那些。

[0207] 在实施方案中，本发明所公开的寡核苷酸对HBV基因组的下列六个序列或其RNA等价物中的至少一种显示亲和力和/或显示对HBV基因组的下列六个序列(表E)或其RNA等同物(表F)中的至少一种复合的稳定性。在实施方案中，与互补的HBV基因组序列复合的寡核苷酸具有>37°C解链温度(Tm)。HBV基因组可为RNA序列，诸如DR-1和/或DR-2RNA序列。该复合物可在生理条件下或几乎生理条件下，诸如在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中形成。在实施方案中，复合物的Tm为>50°C。在实施方案中，复合物的Tm为50-100°C。在实施方案中，在生理条件或几乎生理条件下与HBVRNA双联的本发明所公开的寡核苷酸的Tm为>50°C。

[0208] 表E

1		2		3		4		5		6	
245	A	668	T	1257	T	1512	A	1575	C	1819	A
246	G	669	G	1258	C	1513	C	1576	C	1820	C
247	T	670	G	1259	T	1514	C	1577	G	1821	T
248	C	671	C	1260	G	1515	G	1578	T	1822	T
249	T	672	T	1261	C	1516	A	1579	G	1823	T
250	A	673	C	1262	C	1517	C	1580	T	1824	T
251	G	674	A	1263	G	1518	C	1581	G	1825	T
252	A	675	G	1264	A	1519	A	1582	C	1826	C
253	C	676	T	1265	T	1520	C	1583	A	1827	A
254	T	677	T	1266	C	1521	G	1584	C	1828	C
255	C	678	T	1267	C	1522	G	1585	T	1829	C

[0209]

256	G	679	A	1268	A	1523	G	1586	T	1830	T	
257	T	680	C	1269	T	1524	G	1587	C	1831	C	
258	G	681	T	1270	A	1525	C	1588	G	1832	T	
259	G	682	A	1271	C	1526	G	1589	C	1833	G	
260	T	683	G	1272	T	1527	C	1590	T	1834	C	
261	G	684	T	1273	G	1528	A	1591	T	1835	C	
262	G	685	G	1274	C	1529	C	1592	C	1836	T	
263	A	686	C	1275	G	1530	C	1593	A	1837	A	
264	C	687	C	1276	G	1531	T	1594	C	1838	A	
265	T	688	A	1277	A	1532	C	1595	C	1839	T	
266	T	689	T	1278	A	1533	T	1596	T	1840	C	
[0210]	690	T	1279	C	1534	C	1597	C	1841	A		
	691	T	1280	T	1535	T	1598	T	1842	T		
	692	G	1281	C	1536	T	1599	G	1843	C		
	693	T	1282	C	1537	T	1600	C	1844	T		
	694	T	1283	T		1601	A	1845	C			
	695	C	1284	A		1602	C	1846	T			
	696	A	1285	G		1603	G	1847	T			
	697	G	1286	C		1604	T	1848	G			
	698	T				1605	C	1849	T			
	699	G				1606	G	1850	T			
	700	G				1607	C	1851	C			
	701	T				1608	A	1852	A			
	702	T				1609	T					
	703	C				1610	G					
	704	G				1611	G					
	705	T				1612	A					
	706	A										
	707	G										
	708	G										
	709	G										
	710	C										
	711	T										
	712	T										
	713	T										
	714	C										
	715	C										

[0211] 表F

	1	2	3	4	5	6						
[0212]	245	A	668	U	1257	U	1512	A	1575	C	1819	A

246	G	669	G	1258	C	1513	C	1576	C	1820	C
247	U	670	G	1259	U	1514	C	1577	G	1821	U
248	C	671	C	1260	G	1515	G	1578	U	1822	U
249	U	672	U	1261	C	1516	A	1579	G	1823	U
250	A	673	C	1262	C	1517	C	1580	U	1824	U
251	G	674	A	1263	G	1518	C	1581	G	1825	U
252	A	675	G	1264	A	1519	A	1582	C	1826	C
253	C	676	U	1265	U	1520	C	1583	A	1827	A
254	U	677	U	1266	C	1521	G	1584	C	1828	C
255	C	678	U	1267	C	1522	G	1585	U	1829	C
256	G	679	A	1268	A	1523	G	1586	U	1830	U
257	U	680	C	1269	U	1524	G	1587	C	1831	C
258	G	681	U	1270	A	1525	C	1588	G	1832	U
259	G	682	A	1271	C	1526	G	1589	C	1833	G
260	U	683	G	1272	U	1527	C	1590	U	1834	C
261	G	684	U	1273	G	1528	A	1591	U	1835	C
262	G	685	G	1274	C	1529	C	1592	C	1836	U
263	A	686	C	1275	G	1530	C	1593	A	1837	A
264	C	687	C	1276	G	1531	U	1594	C	1838	A
265	U	688	A	1277	A	1532	C	1595	C	1839	U
266	U	689	U	1278	A	1533	U	1596	U	1840	C
[0213]	690	U	1279	C	1534	C	1597	C	1841	A	
	691	U	1280	U	1535	U	1598	U	1842	U	
	692	G	1281	C	1536	U	1599	G	1843	C	
	693	U	1282	C	1537	U	1600	C	1844	U	
	694	U	1283	U			1601	A	1845	C	
	695	C	1284	A			1602	C	1846	U	
	696	A	1285	G			1603	G	1847	U	
	697	G	1286	C			1604	U	1848	G	
[0214]	698	U					1605	C	1849	U	
	699	G					1606	G	1850	U	
	700	G					1607	C	1851	C	
	701	U					1608	A	1852	A	
	702	U					1609	U			
	703	C					1610	G			
	704	G					1611	G			
	705	U					1612	A			
[0215]	706	A									
	707	G									
	708	G									
	709	G									
	710	C									
[0215]	711	U									
	712	U									
	713	U									
[0215]	714	C									
	715	C									

[0215] 本公开的化合物包括包含下式(VII)的化合物：

[0216] $5'-X'-Y'-Z'-3'$ (VII)

[0217] 其中 $X'-Y'-Z'$ 为嵌合寡核苷酸，并且任选地在5'端和/或3'端处缀合至配体靶向基团或药效团，所述嵌合寡核苷酸包含的序列具有14至22个核苷， X' 为包含长度为3-14个核苷的经修饰核苷序列的结构域； Y' 为包含通过亚基间的键连接的2至4个2' -脱氧核苷的序列的结构域；并且 Z' 为结构域，该结构域包含长度为3-14个核苷的经修饰核苷序列，其中所述 X' 和/或 Y' 结构域包含一个或多个通过 $N3' \rightarrow P5'$ 氨基磷酸酯或 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代氨基磷酸酯亚基间的键连接的经修饰核苷。

[0218] 由式(VII)的 $X'-Y'-Z'$ 表示的嵌合寡核苷酸包含14至22个核苷酸序列，例如14、15、16、17、18、19、20、21或22个核苷酸。在一些实施方案中，每个 X' 、 Y' 和 Z' 中的核苷酸数目分别为：8/2/10、9/2/10、10/2/10、7/3/10、8/3/10、9/3/10、8/4/8、9/4/9、6/4/8。在一些实施方案中， X' 为6-10， Y' 为2-4，并且 Z' 为8-10。

[0219] 在一些实施方案中，式(VII)的化合物由 $X'-Y'-Z'$ 嵌合寡核苷酸组成，并且任选地在5'端和/或3'端(例如，5'端、3'端或5'和3'端两者)处缀合至配体靶向基团和/或药效团，所述嵌合寡核苷酸由14至22个核苷酸序列组成，其中 X' 为由包含一个或多个长度为3-10核苷酸的经修饰核苷酸序列组成的结构域； Z' 为由包含一个或多个长度为3-10个核苷酸的经修饰核苷酸的序列组成的结构域；并且 Y' 为由2至4个通过硫代磷酸酯亚基间的键和任选地一个磷酸二酯亚基间的键连接的2' -脱氧核苷酸序列组成的结构域，其中所述 X' 和/或 Y' 结构域包含一个或多个通过 $N3' \rightarrow P5'$ 氨基磷酸酯或 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代氨基磷酸酯亚基间的键基连接的经修饰核苷酸。

[0220] X' 结构域包含经修饰的核苷酸序列，其中 X' 结构域长度为4-10个核苷酸。例如， X' 结构域可包含4、5、6、7、8、9或10个核苷酸序列。一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个)这些核苷酸被修饰。例如，在一些实施方案中， X' 结构域中的所有核苷酸被修饰。

[0221] X' 结构域的经修饰核苷酸可与本发明所公开的对于式(VI)或(VI')中的X相同。例如， X' 结构域的核苷酸可相对于它们的一个或多个核碱基，核糖糖上的2' 和/或3' 位置以及它们的亚基间的键进行修饰。实施方案包括其中2' 位置用F(核糖或阿拉伯糖)修饰，并且3' 位置为O或NH。实施方案还包括其中2' 位置用OMe修饰，并且3' 位置为O或NH。实施方案包括其中2' 位置用F(核糖或阿拉伯糖)以及Me或OMe修饰，并且3' 位置为O或NH。实施方案包括其中2' 位置用F(核糖或阿拉伯糖)修饰，并且3' 位置为O或NH。实施方案包括其中2' 位置用O-甲氧基乙氧基修饰，并且3' 位置为O或NH。实施方案还包括其中2' 位置用F(核糖或阿拉伯糖)修饰，并且3' 位置为O或NH。实施方案包括其中2' 和4' 位置为经修饰的跨接基团(如本文在别处所述)以形成构象受限的核苷酸，并且3' 位置为O或NH。这些实施方案中的每一个可包括硫代磷酸酯(或取决于3' 取代的硫代氨基磷酸酯)和氨基磷酸酯亚基间的键。

[0222] 实施方案还包括2' 位置为OH，并且3' 位置为NH，或其中2' 位置为H，并且3' 位置为NH的情况。这些实施方案中的每一个可包括硫代氨基磷酸酯和/或氨基磷酸酯亚基间的键。

[0223] X' 结构域的核苷酸通过亚基间的键，例如 $N3' \rightarrow P5'$ 氨基磷酸酯、 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代氨基磷酸酯、硫代磷酸酯或磷酸二酯亚基间的键连接。在一些实施方案中， X' 结构域通过选自 $N3' \rightarrow P5'$ 氨基磷酸酯、 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代氨基磷酸酯以及它们的组合的亚基间的键连接。在一些实施方案中， X' 结构域包含得自 $N3' \rightarrow P5'$ 氨基磷酸酯和/或 $N3' \rightarrow P5'$ 硫代氨基磷酸酯亚

基间的键的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个结构域。

[0224] Y' 结构域包含2至4个2' - 脱氧核苷酸的序列。例如,Y' 结构域可包含2、3或4个2' - 脱氧核苷酸的序列。2' - 脱氧核苷酸中的一者或者可通过硫代磷酸酯或磷酸二酯亚基间的键(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个)连接。在一些实施方案中,2' 脱氧核苷酸中的每一个通过硫代磷酸酯亚基间的键连接。在其他实施方案中,2' 脱氧核苷酸中的每一个通过磷酸二酯亚基间的键连接。在其他实施方案中,Y' 结构域由通过硫代磷酸酯亚基间的键和任选地一个磷酸二酯亚基间的键连接的2' - 脱氧核苷酸组成。

[0225] Z' 结构域包含经修饰的核苷酸序列,其中Z' 结构域长度为4-10个核苷酸。例如,Z' 结构域可包含4、5、6、7、8、9或10个核苷酸序列。一个或多个这些核苷酸被修饰(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22)。例如,在一些实施方案中,Z' 结构域中的所有核苷酸被修饰。

[0226] Z' 结构域的经修饰核苷酸可与本发明所公开的对于式(VI)或(VI')中的Z相同。例如,Z' 结构域的核苷酸可相对于它们的一个或多个核碱基,核糖糖上的2' 和/或3' 位置以及它们的亚基间的键进行修饰。实施方案包括其中2' 位置用F(核糖或阿拉伯糖)修饰,并且3' 位置为O或NH。实施方案还包括其中2' 位置用OMe修饰,并且3' 位置为O或NH。实施方案包括其中2' 位置用F(核糖或阿拉伯糖)以及Me或OMe修饰,并且3' 位置为O或NH。实施方案包括其中2' 位置用F(核糖或阿拉伯糖)修饰,并且3' 位置为O或NH。实施方案包括其中2' 位置用O-甲氧基乙氧基修饰,并且3' 位置为O或NH。实施方案还包括其中2' 位置用F(核糖或阿拉伯糖)修饰,并且3' 位置为O或NH。实施方案包括其中2' 和4' 位置为经修饰的跨接基团(如本文在别处所述)以形成构象受限的核苷酸,并且3' 位置为O或NH。这些实施方案中的每一个可包括硫代磷酸酯(或取决于3' 取代的硫代氨基磷酸酯)和氨基磷酸酯亚基间的键。

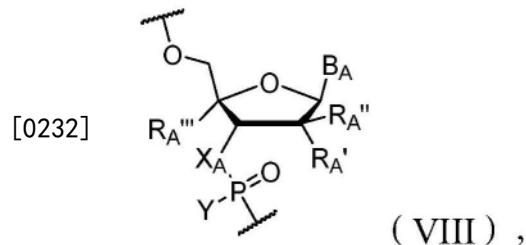
[0227] 实施方案还包括2' 位置为OH,并且3' 位置为NH,或其中2' 位置为H,并且3' 位置为NH的情况。这些实施方案中的每一个可包括硫代氨基磷酸酯和/或氨基磷酸酯亚基间的键。

[0228] Z' 结构域的核苷酸通过亚基间的键,例如N3' → P5' 氨基磷酸酯、N3' → P5' 硫代氨基磷酸酯、硫代磷酸酯或磷酸二酯亚基间的键连接。在一些实施方案中,Z' 结构域通过选自N3' → P5' 氨基磷酸酯、N3' → P5' 硫代氨基磷酸酯以及它们的组合的亚基间的键连接。在一些实施方案中,Z' 结构域包含得自N3' → P5' 氨基磷酸酯和/或N3' → P5' 硫代氨基磷酸酯亚基间的键的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个结构域。

C. 经修饰的反义寡核苷酸

[0230] 其他化合物包括经修饰的反义寡核苷酸。在一些实施方案中,ASO包括式(I)、(II)、(IIIa)、(IIIb)、(IV)、(V)和/或(V')的核苷酸。

[0231] 本公开的其他化合物包括包含下式(VIII)的化合物:



[0233] 其中 X_A 为NH或O, Y为OR或SR, 在所述OR或所述SR中, R为H或带正电的抗衡离子, 在每个实例中, B_A 独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基, 在每个实例中, R_A' 和 R_A'' 各自独立地选自H、F、OH、OMe、O-甲氧基乙氧基, 并且 R_A''' 为H, 或者 R_A' 和 R_A'' 一起形成O-CH₂-、-O-CH(Me)-或-O-(CH₂)₂-。

[0234] 在一些实施方案中, R_A' 和 R_A'' 为H; 并且 R_A''' 选自F、OH、OMe、Me、O-甲氧基乙氧基。在其他实施方案中, R_A'' 和 R_A''' 为H; 并且 R_A' 选自F、OMe、Me、O-甲氧基乙氧基。在一些实施方案中, 在每个实例中, X_A 为NH。

[0235] 一些实施方案包括由式(VIII)表示的一种或多种经修饰的核苷酸, 其中A为NH; B_A 为G形夹; R_A' 为F或OMe, 并且 R_A'' 为H; 或者 R_A' 为H, 并且 R_A''' 为H或F; 并且 R_A''' 为H。

[0236] 一些实施方案包括由式(VIII)表示的一种或多种经修饰的核苷酸, 其中A为NH; B_A 为未修饰或经修饰的核碱基; R_A' 和 R_A''' 一起形成构象受限的核苷酸(例如, -O-CH₂-或-O-(CH₂)₂-); 并且 R_A'' 为H。在一些实施方案中, B_A 为未修饰的或经修饰的核碱基, 其选自由以下项组成的组: 5-甲基胞嘧啶, 2,6-二氨基嘌呤和5-胸腺嘧啶。

[0237] 一些实施方案包括由式(VIII)表示的一种或多种经修饰的核苷酸, 其中A为NH; B为未修饰或经修饰的核碱基; R_A' 为F或OMe, R_A'' 为H, 并且 R_A''' 为H。

[0238] 一些实施方案包括由式(VIII)表示的一种或多种经修饰的核苷酸, 其中A为NH; B_A 为未修饰或经修饰的核碱基; R_A' 为H, R_A'' 为F, 并且 R_A''' 为H。

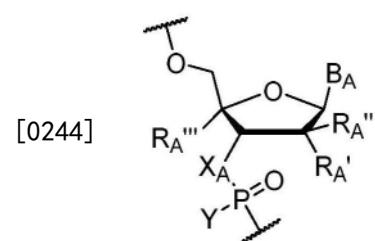
[0239] 在一些实施方案中, X_A 为NH。在其他实施方案中, Y为O⁻或S⁻(具有带正电的抗衡离子)。在一些实施方案中, R_A' 或 R_A''' 为H, 并且其他为F、OH、OMe、Me、O-甲氧基乙氧基(例如阿拉伯糖-F或核糖-F或OMe)。

[0240] 在一些实施方案中, B_A 选自A、C、G、U和T。在另外的实施方案中, B_A 选自A、C、G、U、T、2,6-二氨基嘌呤、5-甲基嘧啶(例如, 5-甲基胞嘧啶、5-胸腺嘧啶)。在一些实施方案中, R_A' 和 R_A''' 为H。例如, 在一些实施方案中, R_A' 为F、OH、OMe、Me、O-甲氧基乙氧基并且 R_A''' 为H。在其他实施方案中, R_A' 为H并且 R_A''' 为F。

[0241] 在一些实施方案中, 当 B_A 为嘌呤核碱基时, R_A' 和 R_A''' 中的至少一个为OH或F, 并且/或者当 B_A 为嘧啶核碱基时, R_A' 和 R_A''' 中的至少一个为OMe、OH或F。

[0242] 在其他实施方案中, 核苷酸包括表G中的一个或多个核苷酸。

[0243] 表G



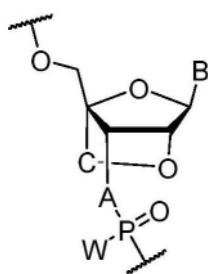
[0245]

核苷酸编号	R'	R''	R'''	A	W
48	F	H	H	NH	S
49	F	H	H	NH	O
50	F	H	H	O	S
51	F	H	H	O	O
52	H	F	H	NH	S
53	H	F	H	NH	O
54	H	F	H	O	S
55	H	F	H	O	O
56	OMe	H	H	NH	S
57	OMe	H	H	NH	O
58	OMe	H	H	O	S

[0246]

核苷酸编号	R'	R''	R'''	A	W
59	OMe	H	H	O	O
60	H	F	H	NH	S
61	H	F	H	NH	O
62	H	F	H	O	S
63	H	F	H	O	O
64	O-甲氧基乙氧基	H	H	NH	S
65	O-甲氧基乙氧基	H	H	NH	O
66	O-甲氧基乙氧基	H	H	O	S
67	O-甲氧基乙氧基	H	H	O	O
68	H	H	H	NH	S
69	H	H	H	NH	O
70	OH	H	H	NH	S
71	OH	H	H	NH	O
72	OH	H	H	O	S
73	H	OH	H	NH	O
74	H	OH	H	NH	S
75	H	OEt	H	NH	O
76	H	OEt	H	NH	S
77	H	OEt	H	O	O
78	H	OEt	H	O	S
79	OEt	H	H	NH	O
80	OEt	H	H	NH	S
81	OEt	H	H	O	O
82	OEt	H	H	O	S

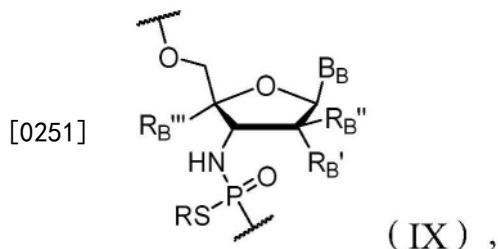
[0247]



核苷酸编号	C	A	W
83	-O-CH ₂ -	NH	S
84	-O-CH ₂ -	NH	O
85	-O-CH ₂ -	O	S
86	-O-CH ₂ -	O	O
87	-O-(CH ₂) ₂ -	NH	S
88	-O-(CH ₂) ₂ -	NH	O
89	-O-(CH ₂) ₂ -	O	S
90	-O-(CH ₂) ₂ -	O	O
91	-O-CH(Me)-	NH	S

核苷酸编号	C	A	W
92	-O-CH(Me)-	NH	O
93	-O-CH(Me)-	O	S
94	-O-CH(Me)-	O	O

[0250] 本公开的化合物还包括包含十个或更多个下式(IX)的核苷酸的寡核苷酸：



[0252] 其中R为H或带正电的抗衡离子，在每个实例中，B_B独立地为天然或未修饰的核碱基或者经修饰的核碱基，在每个实例中，R_B'和R_B''各自独立地选自H、F、OMe、O-甲氧基乙氧基，并且R_B'''为H，或者R_B'和R_B'''一起形成-O-CH₂-、-O-CH(Me)-或-O-(CH₂)₂-。

[0253] 在一些实施方案中，每个寡核苷酸均为式(IX)的核苷酸。

[0254] 在一些实施方案中，R_B'和R_B'''为H，并且R_B''选自F、OH、OMe、Me、O-甲氧基乙氧基。在其他实施方案中，R_B''和R_B'''为H；并且R_B'选自F、OMe、Me、O-甲氧基乙氧基。

[0255] 一些实施方案包括由式(IX)表示的一种或多种经修饰的核苷酸，其中B_A为G形夹；R_B'为F或OMe，并且R_B'''为H；或者R_B'为H，并且R_B'''为H或F；并且R_B'''为H。

[0256] 一些实施方案包括由式(IX)表示的一种或多种经修饰的核苷酸，其中B_A为未修饰的或经修饰的核碱基；R_B'和R_B'''一起形成构象受限的核苷酸(例如，-O-CH₂-或-O-(CH₂)₂-)；并且R_B'''为H。在一些实施方案中，

[0257] B_A为未修饰的或经修饰的核碱基，其选自由以下项组成的组：5-甲基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤和5-胸腺嘧啶。

[0258] 一些实施方案包括由式(IX)表示的一种或多种经修饰的核苷酸，其中B为未修饰的或经修饰的核碱基；R_B'为F或OMe，R_B'''为H，并且R_B'''为H。

[0259] 一些实施方案包括由式(IX)表示的一种或多种经修饰的核苷酸，其中B_A为未修饰的或经修饰的核碱基；R_B'为H，R_B'''为F，并且R_B'''为H。

[0260] 在其他实施方案中，Y为S⁻(具有带正电的抗衡离子)。在一些实施方案中，R_B'或R_B'''为H，并且其他为F、OH、OMe、Me、O-甲氧基乙氧基(例如阿拉伯糖-F或核糖-F或OMe)。

[0261] 在一些实施方案中，B_B选自A、C、G、U和T。在另外的实施方案中，B_B选自A、C、G、U、T、

2,6-二氨基嘌呤、5-甲基嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶、5-胸腺嘧啶)。在一些实施方案中,R_B'和R_B''为H。例如,在一些实施方案中,R_A'为F、OH、OMe、Me、O-甲氧基乙氧基并且R_B''为H。在其他实施方案中,R_B'为H并且R_B''为F。

[0262] 在一些实施方案中,当B_B为嘌呤核碱基时,R_B'和R_B''中的至少一个为OH或F,并且/或者当B_B为嘧啶核碱基时,R_B'和R_B''中的至少一个为OMe、OH或F。

[0263] 在一些实施方案中,式(VIII)或(IX)寡核苷酸的核碱基序列包含选自表A中的那些的序列。在一些实施方案中,式(VIII)或(IX)寡核苷酸的核碱基序列包括的序列1、2、3、4或5种核碱基与选自表H中那些的序列不同。

[0264] 表H

核碱基序列 (5'-3')	SEQ.ID NO.
5'-GCAGAGGTGAAGCGAACUGC-3'	1
5'-GCAGAGGTGAAGCGAACUGC-Chol-3'	2
5'-GCAGAGGTGAAGCGAACUGC-GalNAc-3'	3
5'-GAUUAGGCAGAGGTGAAAAAG-3'	4
5'-GAUUAGGCAGAGGTGAAAAAG-Chol-3'	5
5'-GAUUAGGCAGAGGTGAAAAAG-GalNAc-3'	6
5'-GAUUAGGCAGAGGTGAAAAAG-3'	7
5'-GAUUAGGCAGAGGTGAAAAAG-Chol-3'	8
5'-GAUUAGGCAGAGGTGAAAAAG-GalNAc-3'	9
5'-GDAPUUDAPGGCAGAGGTGAAAAAG-3'	10
5'-GAUUAGGCAGAGGTGAADAPDAPDAPG-3'	11
5'-GAUUAGGCAGAGGTGDAPDAPDAPDAPG-3'	12
5'-GDAPUUDAPGGCAGAGGTGAADAPDAPDAPG-3'	13
5'-GDAPUUDAPGGCAGAGGTGDAPDAPDAPDAPG-3'	14
5'-GDAPUUDAPGGCAGAGGTGAAAAAG-3'	15
5'-GAUUAGGCAGAGGTGAADAPDAPDAPG-3'	16
5'-GAUUAGGCAGAGGTGDAPDAPDAPDAPDAPG-3'	17

[0265]

[0266]

5'-GDAPUUDAPGGCAGAGGTGAADADPAPDAPG-3'	18
5'-GDAPUUDAPGGCAGAGGTGDAPDAPDAPDAPDAPG-3'	19
5'-GCAGAGGTGAAGCGADAPGUGC-3'	20
5'-GCAGAGGTGAAGCGDAPDAPGUGC-3'	21
5'-GCAGDAPGGTGAAGCGDAPDAPGUGC-3'	22
5'-GCDAPGDAPGGTGAAGCGDAPDAPGUGC-3'	23
5'-CGTCAGAGGTGAAGC-3-NH ₂ -G-3'	24
5'-GCAGAGGTGAAGCGAA-3-NH ₂ -G-3	25
5'-CGACGTGCAGAGGTGAAG-3-NH ₂ -C-3'	26
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3-NH ₂ -C-3'	27
5'-GCAGAGGTGAAGC-3-NH ₂ -G-3'	28
5'-CGTCAGAGGTGAAG-3-NH ₂ -C-3'	29
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	30
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	31
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	32
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	33
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	34
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	35
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	36
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	37
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	38
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	39
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	40
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3NH ₂ -C-3'	41
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3-NH ₂ -C-3'	42
5'-AAGAGAGGTG5meCG5meC5meC5meCGUGG-3'	43
5'-GGUGAAG5meCGAAGTG5meCA5meCA5meCG-3'	44
5'-5meCGUG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAG-3'	45
5'-AGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meCA5meC-3'	46
5'-UGG5meCA5meCTAGTAAA5meCTGAG5meC5meC-3'	47
5'-5meCUAGGAGTT5meC5meCG5meCAGUAUGG-3'	48
5'-AGAGGTG5meCG5meC5meC5meCGTGGU5meCG-3'	49
5'-GAGGUG5meCG5meC5meC5meC5meCGTGGU5meCGG-3'	50
5'-GAAAG5meC5meC5meCTA5meCGAA5meC5meCA5meCUG-3'	51
5'-GUU5meC5meCG5meCAGTATGGAU5meCGG5meC-3'	52
5'-U5meC5meCG5meCAGTATGGAT5meCGG5meCAG-3'	53
5'-A5meC5meCA5meCTGAA5meCAAATGG5meCA5meCU-3'	54
5'-UG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG-3'	55
5'-A5meCUGAA5meCAAATGG5meCA5meCUAGU-3'	56
5'-AGU5meC5meCA5meC5meCA5meCGAGT5meCUAGA5meC-3'	57
5'-5meCA5meCUGAA5meCAAATGG5meCA5meCUAG-3'	58
5'-5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meCA-3'	59
5'-AAGAGAGGTG5meCG5meC5meC5meCGUGG-GalNAc-3'	60
5'-GGUGAAG5meCGAAGTG5meCA5meCA5meCG-GalNAc-3'	61
5'-UGG5meCA5meCTAGTAAA5meCTGAG5meC5meC-GalNAc-3'	62
5'-5meCUAGGAGTT5meC5meCG5meCAGUAUGGGalNAc-3'	63

[0267]

5'-AGAGGTG5meCG5meC5meC5meC5meCGTGGU5meCGGalNAc-3'	64
5'-U5meC5meCG5meCAGTATGGAT5meCGG5meCAG-GalNAc-3'	65
5'-UG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUGGalNAc-3'	66
5'-AGU5meC5meCA5meC5meCA5meCGAGT5meCUAGA5meC-GalNAc-3'	67
5'-GCGGGTGAAGCGGUG-3-NH ₂ -C-3'	68
5'-GCGGGTGAAGCGGUG-3-NH ₂ -C-3'	69
5'-GCGGGTGAAGCGGUG-3-NH ₂ -C-3'	70
5'-GCAGAGGTGAAGCGAACGTG-3NH ₂ -C-3'	71
5'-GCAGAGGTGAAGCGAGTG-3NH ₂ -C-3'	72
5'-GCAGAGGTGAAGCGAACGTG-3NH ₂ -C-3'	73
5'-GCAGnspAGGTGAAGCGAACUGC-3'	74
5'-GCAGAGGTGAAGCGAACUGC-3'	75
5'-GCAGAGGTGAAGCGAACUGC-3'	76
5-GCUCCAAATTCTTAUAAGGG-GalNAc-3	77
5'-AAGAGAGGTG5meCG5meC5meC5meCGUGG-3'	78
5'-GGUGAAG5meCGAAGTG5meCA5meCA5meCG-3'	79
5-5meCGUG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAC-3'	80
5'-GUGAAG5meCGAACGTG5meCA5meCA5meCGG-3'	81
5'-AGAGGTGAAG5meCGAACUG5meCA5meC-3'	82
5'-UGG5meCA5meCTAGTAAA5meCTGAG5meC5meC-3'	83
5'-5meCUAGGAGTT5meC5meCG5meCAGUAUGG-3'	84
5'-G5meCAGAGGTGAAG5meCGAACUG5meC-3'	85
5'-AGAGGTG5meCG5meC5meC5meC5meCGTGGU5meCG-3'	86
5'-GAGGUG5meCG5meC5meC5meC5meCGTGGU5meCGG-3'	87
5'-GAAAG5meC5meC5meCTA5meCGAA5meC5meCA5meCUG-3'	88
5'-GUU5meC5meCG5meCAGTATGGAU5meCGG5meC-3'	89
5'-U5meC5meCG5meCAGTATGGAT5meCGG5meCAG-3'	90
5'-A5meC5meCA5meCTGAA5meCAAATGG5meCA5meCU-3'	91
5'-UG5meCAGAGGTGAAG5meCGAACUG-3'	92
5'-A5meCUGAA5meCAAATGG5meCA5meCUAGU-3'	93
5'-AGU5meC5meCA5meC5meCA5meCGAGT5meCUAGA5meC-3'	94
5'-5meCA5meCUGAA5meCAAATGG5meCA5meCUAG-3'	95
5'-5meCAGAGGTGAAG5meCGAACUG5meCA-3'	96
5'-AAGAGAGGTG5meCG5meC5meC5meCGUGG3'	97
5'-AAGAGAGGTG5meCG5meC5meC5meC5meCGUGG-3'	98
5'-GGUGAAG5meCGAACGTG5meCA5meCA5meCG3'	99
5'-GGUGAAG5meCGAACGTG5meCA5meCA5meCG3'	100
5'-UGG5meCA5meCTAGTAAA5meCTGAG5meC5meC3'	101
5'-UGG5meCA5meCTAGTAAA5meCTGAG5meC5meC3'	102
5'-5meCUAGGAGTT5meC5meCG5meCAGUAUGG3'	103
5'-5meCUAGGAGTT5meC5meCG5meCAGUAUGG3'	104
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAC-3'	105
5'-GCAGAGGTGAAGCGAACGTG-3'	106
5'-CGTCAGAGGTGAAGCG-3'	107
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAC-3'	108

[0268]

5'-CGACGTGCAGAGGTGAAGC-3'	109
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTGC-3'	110
5'-GCAGAGGTGAAGCG-3'	111
5'-CGTCAGAGGTGAAGC-3'	112
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3nh2-C-3'	113
5'-GalNAc-NHC6-U5meC5meCG5meCAGTATGGAT5meCGG5meCAG3'	114
5'-GalNAc-NHC6-5meCUAGGAGTT5meC5meCG5meCAGUAUGG3'	115
5'-GalNAc-NHC6-AAGAGAGGTG5meCG5meC5meC5meCGUGG3'	116
5'GalNAc-NHC6-AGAGGTG5meCG5meC5meC5meCGTGGU5meCG3'	117
5'GalNAc-NHC6-UG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG3'	118
mGCUCCAAATTCTTAUAAGG	119
mGCUCCAAATTCTTAUAAGG	120
mGCUCCAAATTCTTAUAAGGG	121
mGCUCCAAATTCTTAUAAGG/GalNAc/	122
mGCUCCAAATTCTTAUAAGG/GalNAc/	123
mGCUCCAAATTCTTAUAAGG/3CholTEG/	124
mGCUCCAAATTCTTAUAAGG/3CholTEG/	125
mGCUCCAAATTCTTAUAAGGG/3CholTEG/	126
5'-mG5mCAGAGGTGAAGp5mCGAAGUG5meC-3'	127
5'-mG5mCAGAGGTGAAG5mCGAAGUG5mC-胆固醇-3'	128
5'-mG5mCAGAGGTGAAGp5mCGAAGUG5mC-TEG-胆固醇-3'	129
5'-mG5mCAGAGGTGAAG5mCGAAGUG5mC-生育酚-3'	130
5'-mG5mCAGAGGTGAAG5mCGAAGUG5mC-TEG-生育酚-3'	131
5'-mG5mCAGAGGTGAAG5mCGAAGUG5mC-GalNAc-3'	132
5'-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-3'	133
5'-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-po-Chol-3'	134
5'-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-po-生育酚-3'	135
5'-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-po-GalNAc-3'	136
5'-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-3'	137
5'-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-po-Chol-3'	138
5'-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-po-生育酚-3'	139
5'-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-po-GalNAc-3'	140
5-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-3	141
5-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-Chol-3	142
5-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-Toco-3	143
5-mG5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-GalNAc-3	144
5-G5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-3	145
5-G5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-Chol-3	146
5-G5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-Toco-3	147
5-G5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-GalNAc-3	148
5-G5meCAGAGGTGAAG5meCGAAGUG5meC-3	149
5-dTGCAGAGGTGAAGCGAAGTG-3	150
5-dTGCAGAGGTGAAGCGAAGUG3'	151

[0269]

5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGUGC-3'	152
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGUGC-3'	153
5'-GCAGAGGTGAAGCGAAGUGC-3'	154
5'-dGCAGAGGTGAAGCGAAGUGC-3'	155
5'-dGCAGAGGTGAAGCGAAGUGC-3'	156
5'-dGCAGAGGTGAAGCGAAGUGC-3'	157
5'-dGCAGAGGTGAAGCGAAGUGC-3'	158

[0270] 在实施方案中,本发明所公开的寡核苷酸对HBV基因组的六个序列或其RNA等价物中的至少一种显示亲和力和/或显示对HBV基因组的下列六个序列(表E)或其RNA等同物(表F)中的至少一种复合的稳定性。在实施方案中,与互补的HBV基因组序列复合的寡核苷酸具有>37°C解链温度(T_m)。HBV基因组可为RNA序列,诸如DR-1和/或DR-2RNA序列。该复合物可在生理条件下或几乎生理条件下,诸如在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中形成。在实施方案中,复合物的 T_m 为>50°C。在实施方案中,复合物的 T_m 为50-100°C。在实施方案中,在生理条件或几乎生理条件下与HBV RNA双联的本发明所公开的寡核苷酸的 T_m 为>50°C。

[0271] 在本公开的一些方面,式(VIII)或(IX)寡核苷酸的核碱基序列包含12-22个核苷酸序列,例如14-20个核苷酸或16-19个核苷酸。在一些实施方案中,式(VIII)或(IX)寡核苷酸的核碱基序列长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个核苷酸。

[0272] 在本公开的另一方面,本文所述的寡核苷酸在一个或多个端处缀合或修饰。

[0273] 例如,在一些实施方案中,寡核苷酸的末端通过在所述末端处的至少一种经修饰的核苷酸保护不发生水解裂解。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸为包含经修饰的核苷酸的经修饰核苷酸,该经修饰的核苷酸包含3' -N修饰,并且可包括硫代氨基磷酸酯亚基间的键。在一些实施方案中,式(VIII)或(IX)寡核苷酸还包含至少一种在3' 和/或5' 端处的核苷酸(例如1或2),所述端包含硫代磷酸酯亚基间的键和胸腺嘧啶核碱基。在一些实施方案中,式(VIII)或(IX)寡核苷酸还包含至少一种在3' 和/或5' 端处的核苷酸(例如1或2),所述端包含2' -OMe修饰的核苷酸和胸腺嘧啶核碱基。在一些实施方案中,式(VIII)或(IX)寡核苷酸还包含至少一种在3' 和/或5' 端处的2' -OMe修饰的核苷酸,所述端包含硫代磷酸酯亚基间的键和尿嘧啶核碱基。在一些实施方案中,可将反向的dT掺入式(VIII)或(IX)寡核苷酸的3' -端,导致3' -3' 键,其可抑制由3' 核酸外切酶的降解和/或DNA聚合酶的延伸。

[0274] D. 缀合寡核苷酸

[0275] 本公开还涉及缀合至寡核苷酸的附加组分,诸如靶向部分和在一个或多个端处修饰的寡核苷酸。

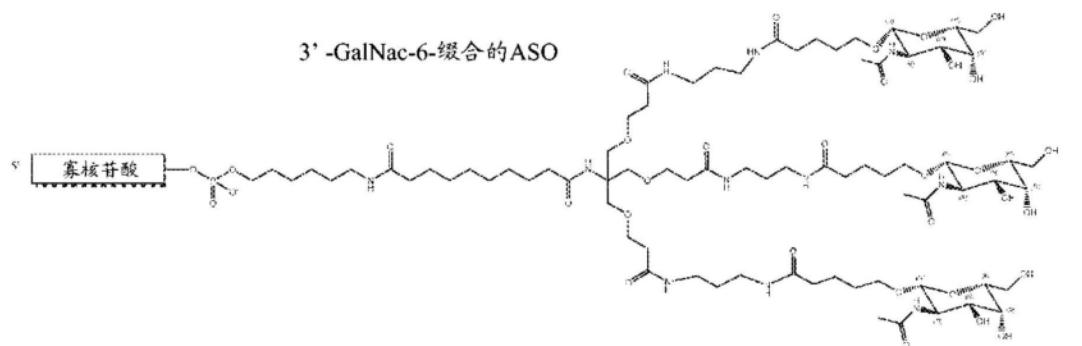
[0276] 在一些实施方案中,本文所述的寡核苷酸任选地通过连接部分,诸如HEG连接基或C6或C7氨基连接基缀合到一个或多个配体靶向基团或药效团。在一些实施方案中,本文所述的寡核苷酸还包含通过任选的连接基在5' 端和/或3' 端处缀合的配体靶向基团或药效团。在优选的实施方案中,本文所述的寡核苷酸还包含通过任选的连接基在5' 端和/或3' 端处缀合的配体靶向基团。在一些实施方案中,缀合在本文所述寡核苷酸的3' -端处。

[0277] 在一些实施方案中,配体靶向基团或药效团通过特定类型的细胞,诸如肝细胞增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。

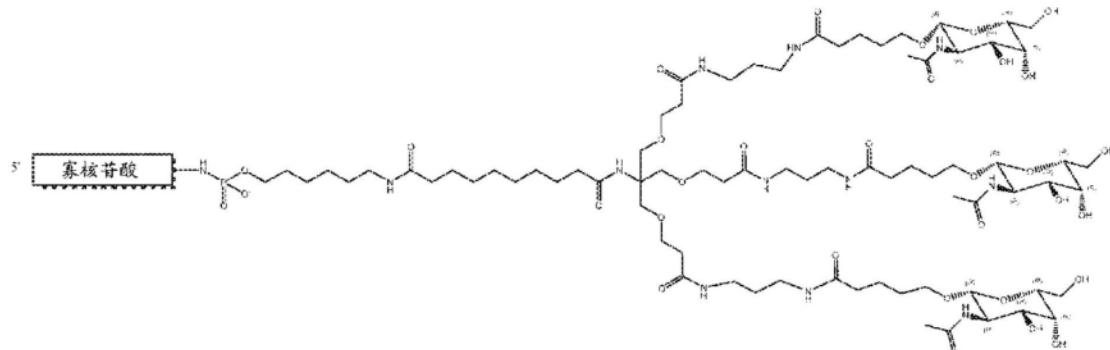
[0278] 在一些实施方案中,配体靶向基团可为脂质部分,诸如胆固醇部分、生育酚、胆酸、硫醚(例如,癸基-S-三苯甲硫醇)、巯基胆固醇、脂肪链(例如,十二烷二醇或十一烷基残

基)、磷脂(例如,双十六烷基-外消旋-甘油胺或1,2-双-0-十六烷基-外消旋-丙三氧基-3-膦酸三乙铵)、多胺或聚乙二醇链或金刚烷乙酸、棕榈酰部分或十八胺或己氨基羧基胆固醇部分

[0279] 例如,在一些实施方案中,寡核苷酸的末端通过在该末端处的至少一种经修饰的核苷酸保护不发生水解裂解。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸为包含经修饰的核苷酸的经修饰核苷酸,该经修饰的核苷酸包含3'-N修饰,并且可包括硫代氨基磷酸酯亚基间的键。在一些实施方案中,寡核苷酸链还包含至少一种在3' 和/或5' 端处的核苷酸(例如1或2),所述端包含硫代磷酸酯亚基间的键和胸腺嘧啶核碱基。在一些实施方案中,寡核苷酸链还包含至少一种在3' 和/或5' 端处的核苷酸(例如1或2),所述端包含2'-F、2'-OMe、2'-OEt 或2'-MOE修饰的核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸链还包含至少一种在3' 和/或5' 端处的2'-OMe修饰的核苷酸,所述端包含硫代磷酸酯亚基间的键和尿嘧啶核碱基。在实施方案中,ASO的3' 端通过np或po键附接至进一步连接至GalNAc-6的C6氨基连接基上。例如,下列结构可举例说明该构建体:



[0280]



[0281] 在一些实施方案中,可将反向的dT掺入寡核苷酸链的3' -端,导致3' -3' 键,其可抑制由3' 核酸外切酶的降解和/或DNA聚合酶的延伸。

[0282] 在一些实施方案中,本文所述的寡核苷酸任选地通过连接部分,诸如HEG连接基或C6氨基连接基缀合到一个或多个配体靶向基团或药效团。在一些实施方案中,寡核苷酸链还包含通过任选的连接基在5' 端和/或3' 端处缀合的配体靶向基团或药效团。在一些实施方案中,缀合在寡核苷酸链的3' -端处。

[0283] 在一些实施方案中,配体靶向基团或药效团通过特定类型的细胞,诸如肝细胞增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。

[0284] 在一些实施方案中,配体靶向基团可以是脂质部分,诸如胆固醇部分、生育酚、胆酸,硫醚(例如,癸基-S-三苯甲硫醇)、硫代胆固醇、脂族链(例如十二烷二醇或十一烷基残

基)、磷脂(双十六烷基-外消旋-甘油胺或1,2-双-0-十六烷基-外消旋-丙三氧基-3-膦酸三乙铵)、或多胺或聚乙二醇链或金刚烷乙酸、棕榈酰部分或十八胺或己氨基羧基胆固醇部分。

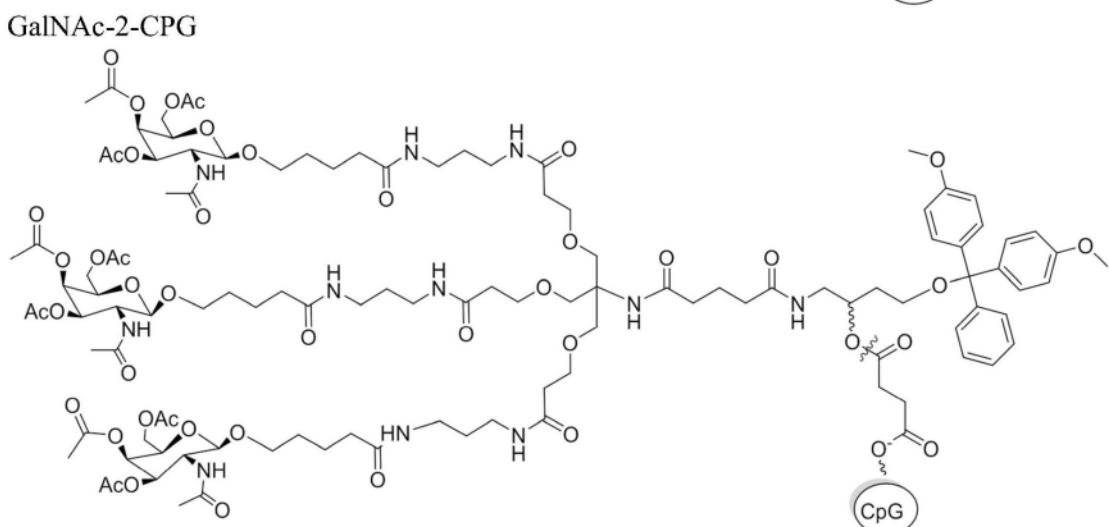
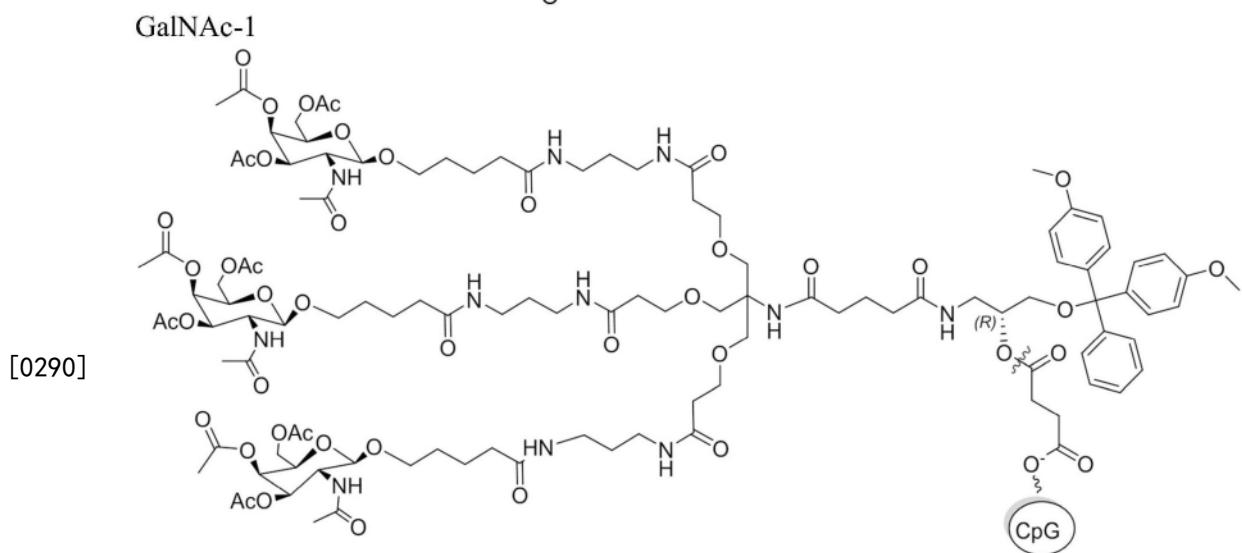
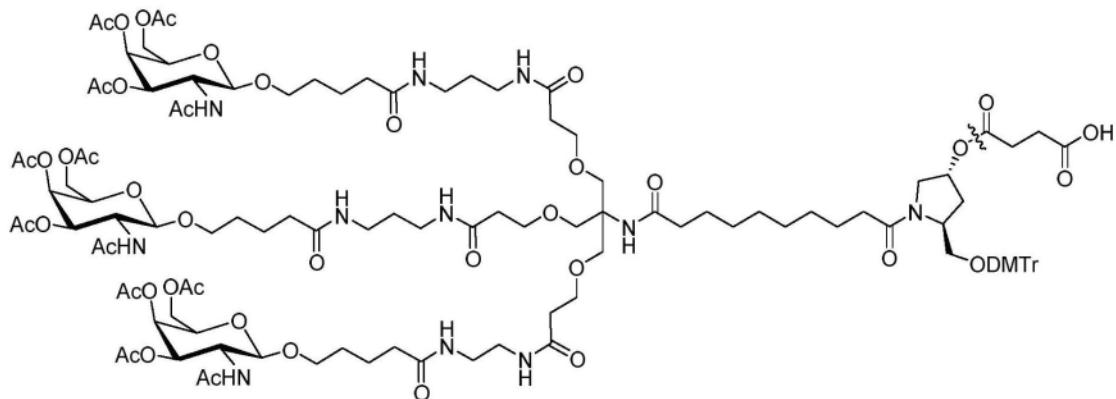
[0285] 在一些实施方案中,配体靶向基团可为天然存在的物质,诸如蛋白质(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白)。

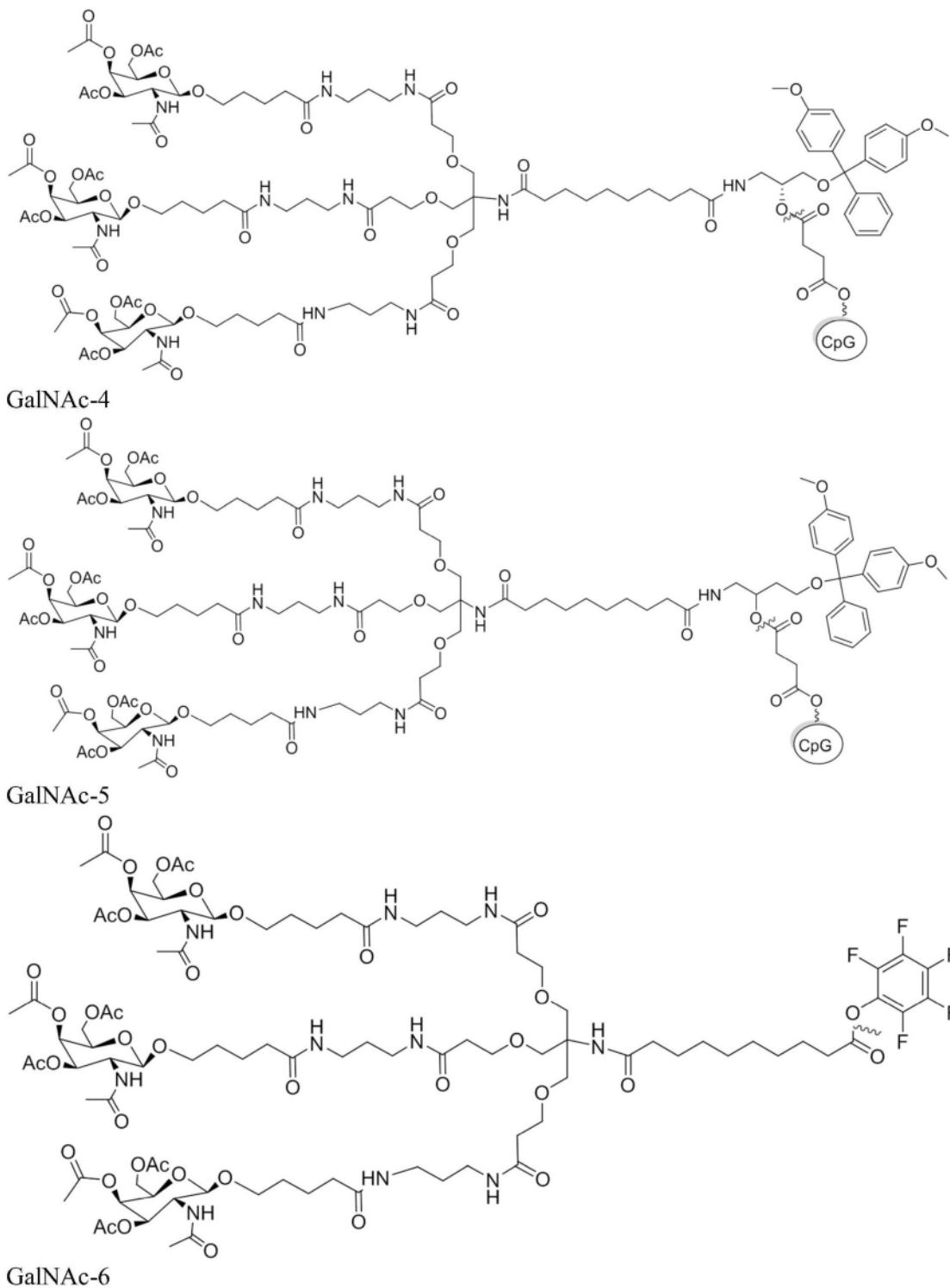
[0286] 在一些实施方案中,配体靶向基团可为碳水化合物(例如,葡聚糖、支链淀粉酶、甲壳质、脱乙酰壳多糖、菊粉、环糊精,N-乙酰半乳糖胺或透明质酸)。碳水化合物包括单糖,诸如N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、二糖、三糖、四糖、低聚糖和多糖。在本发明的组合物和方法的某些示例中,配体是附接的一种或多种GalNAc衍生物,诸如分别通过二价或三价变化的连接基连接到寡核苷酸上的两种或三种GalNAc衍生物。

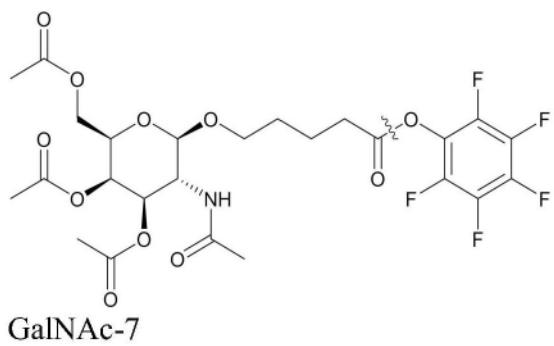
[0287] 在实施方案中,寡核苷酸通过连接基,诸如,氨基烷基连接基(例如,C₆-NH₂)连接至靶向部分。例如,GA1NAc-1-6可通过该类型的连接基连接至寡核苷酸。

[0288] 在一些实施方案中,配体靶向基团可为重组或合成分子,诸如合成聚合物,例如合成聚氨基酸。聚氨基酸的示例包括为聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共聚-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合或聚膦嗪的聚氨基酸。多胺的示例包括:聚氮丙啶、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、多胺、伪肽-多胺,肽类-多胺,树枝状体多胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、多胺的季盐,或 α 螺旋肽。配体靶向基团还可包括靶向基团,例如细胞或组织靶向剂,例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质,例如结合到特定细胞类型,诸如肝细胞的抗体。

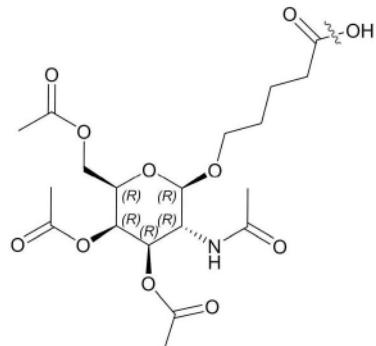
[0289] 在一些实施方案中,该配体靶向基团为GalNAc或其衍生物。例如,在一些实施方案中包括以下GalNAc衍生物。







GalNAc-7



GalNAc-8

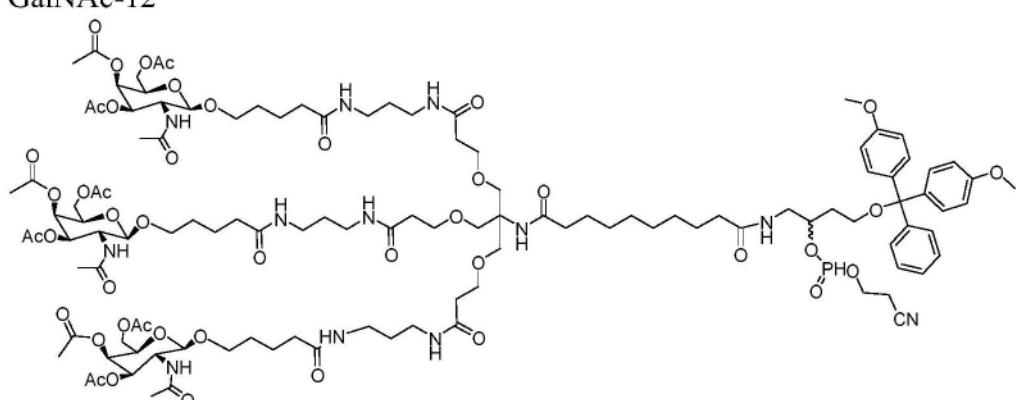
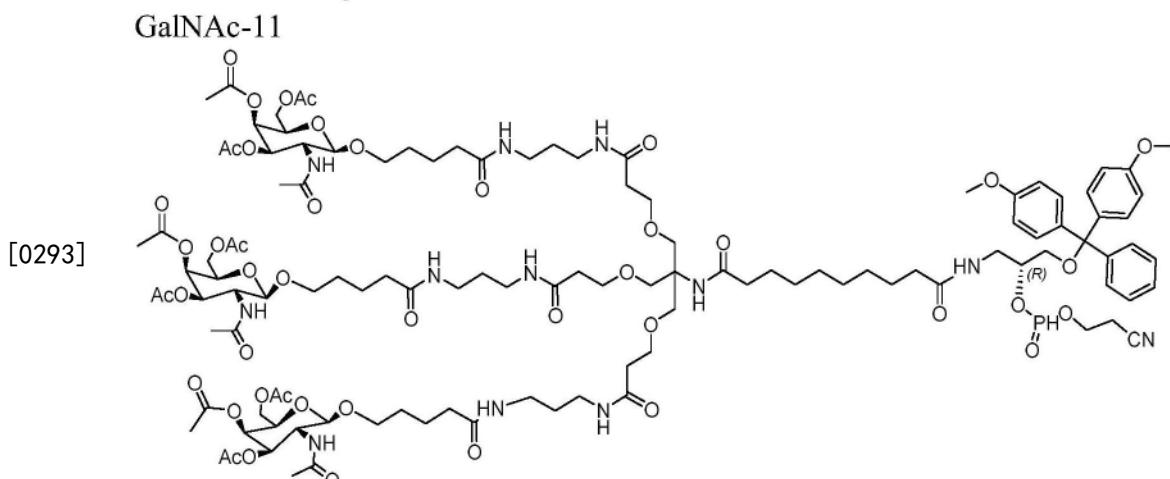
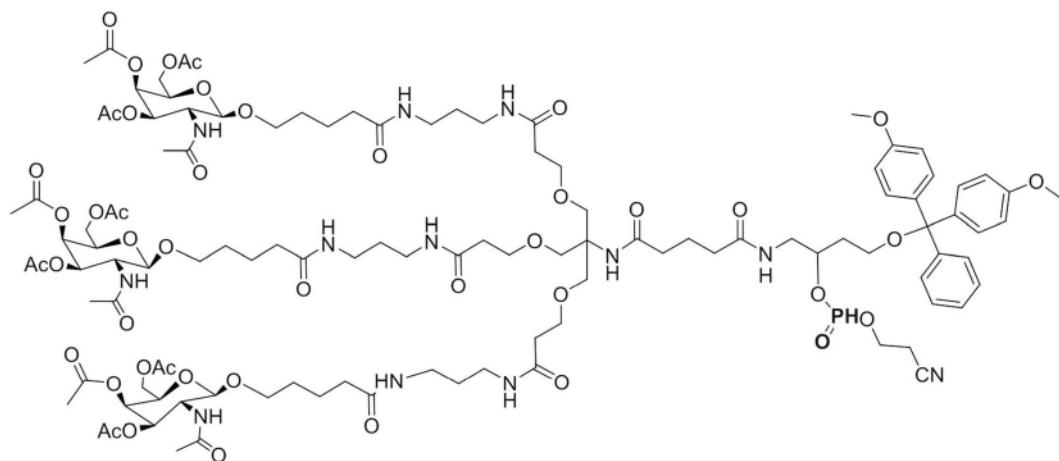
[0292]



GalNAc-9



GalNAc-10



[0294] 在一些实施方案中,该配体靶向基团可为核酸配体。“核酸配体”是指结合到特定靶分子的寡核苷酸或肽分子。例如,可选择核酸配体以靶向主体中的特定细胞类型。当缀合到本发明所公开的寡核苷酸时,其可将寡核苷酸指引朝向靶向的细胞。在另一个示例中,核酸配体可靶向病毒蛋白,诸如HBV的核心蛋白。参见,例如《致癌基因》2001年,10月4日(Oncogene, 20010ct4);第20(45)卷:第6579-86页;W02011060557。核酸配体可具体地结合逆转录酶引物或HBV逆转录酶或HBV增强子I核心序列,例如,如在W02002081494中所述。

[0295] 在一些实施方案中,配体靶向基团可选自促甲状腺素、促黑激素、凝集素、糖蛋白、表面活性剂蛋白A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基半乳糖胺、N-乙酰基葡萄糖胺多价甘露糖、多价果糖、糖基化的聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、二膦酸盐、

聚谷氨酸盐、聚天冬氨酸、类脂、胆固醇、甾体化合物、胆汁酸、叶酸、维生素B12、维生素A、生物素、RGD肽或RGD肽类似物中的一种或多种。

[0296] 附加的配体靶向基团公开于例如WO2016077321中,该文献全文以引用方式并入本文。

[0297] 2.组合物

[0298] 本公开还涵盖包含本公开的寡核苷酸的药物组合物。一个实施方案为包含式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)寡核苷酸,或本公开的其他寡核苷酸,以及药学上可接受的载体或稀释剂的药物组合物。

[0299] 在一些实施方案中,包含本公开的寡核苷酸的药物组合物配制用于通过肠胃外递送的全身性给药。非肠道给药包括静脉内的、动脉内的、皮下、腹膜内注射或肌内注射或输液;另外皮下给药,例如,经由植入的装置。在一个优选的实施方案中,将包含本公开的寡核苷酸的药物组合物配制用于皮下(SC)或静脉内(IV)递送。用于非肠道给药的制剂可包括无菌水溶液,其也可包含缓冲剂、稀释剂和技术人员理解的其他药学上可接受的添加剂。对于静脉内使用,可控制溶质的总浓度以致使制备等渗的。

[0300] 包含本公开的寡核苷酸的该药物组合物可用于治疗疾病或病症,例如,与HBV基因表达或活性相关联的。

[0301] 3.使用方法

[0302] 本发明技术的一个方面包括用于治疗被诊断患有、疑似患有或有风险患有HBV感染和/或HBV相关病症的受治疗者的方法。在治疗性应用中,将包含本发明技术的寡核苷酸的组合物被以足以治愈、或者至少部分地抑制疾病的症状,包括其并发症和该疾病发展中的中间病理表型的量,施用至疑似、或已经患有此类疾病的受治疗者(诸如,例如,在受治疗者的血清和/或肝脏中存在诸如HBV表面抗原和包膜抗原(例如,HBsAg和/或HBeAg),或升高的HBV DNA或HBV病毒载量的水平)。

[0303] 在一些实施方案中,本发明技术的寡核苷酸显示与以下区域或表J中的HBVRNA转录物中的至少一者的亲和力。

[0304] 表J

区域	靶向 HBV RNA 的转录物	受影响的 HBV 病毒蛋白
[0305]	Pol/S 前-核心、Pg、前-S1、前-S2	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中 HBsAg、小 HBsAg
	Pol 前-核心、Pg、前-S1、前-S2	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中 HBsAg、小 HBsAg
	Pol/X 前-核心、Pg、前-S1、前-S2、X	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中 HBsAg、小 HBsAg、HBxAg
	DR1 前-核心、Pg、前-S1、前-S2、X	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中 HBsAg、小 HBsAg、HBxAg
	DR2 前-核心、Pg、前-S1、前-S2、X	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中 HBsAg、小 HBsAg、HBxAg
	前-PolyA 前-核心、Pg、前-S1、前-S2、X	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中 HBsAg、小 HBsAg、HBxAg

[0306] 患有HBV感染和/或HBV相关病症的受治疗者可通过在本领域是已知的诊断或预后测定中的任何一种或组合来鉴定。例如,HBV感染和/或HBV相关病症的典型症状包括但不限于血清和/或肝脏HBV抗原(例如HBsAg和/或HBeAg)的存在,升高的ALT、升高的AST、不存在或低含量的抗-HBV抗体、肝损伤、肝硬化、丁型肝炎、急性乙型肝炎、急性爆发性乙型肝炎、慢性乙型肝炎、肝纤维化、晚期肝疾病、肝细胞癌、血清病样综合征、厌食症、恶心、呕吐、低烧、肌肉痛、易疲劳、味觉紊乱和嗅觉紊乱(厌恶食物和香烟)右上腹部和上腹部痛(间歇性,轻微至中度)、肝性脑病、嗜睡症、睡眠模式紊乱、精神错乱、昏迷、腹水、消化道出血、凝血病、黄疸、肝肿大(轻度增大、软肝)、脾肿大、手掌红斑、蜘蛛状痣、肌肉萎缩、蜘蛛痣、血管炎、静脉曲张出血、外周性水肿、男性乳腺增生、睾丸萎缩、腹部侧支静脉(脐周静脉曲张)、高水平的丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)(在1000-2000IU/mL范围内)、ALT水平高于AST水平、升高的γ-谷氨酰转肽酶(GGT)和/或碱性磷酸酶(ALP)水平、降低的白蛋白水平、升高的血清铁水平、白血球减少症(即,粒细胞减少)、淋巴球增多、增加的红细胞沉降率(ESR)、缩短的红血球存活、溶血反应、血小板减少症、国际标准化比率的延长(INR)、血清HBV DNA的存在、转氨酶的升高(<5乘以所述ULN)、增加的胆红素水平、延长的前凝血酶时间(PT)、血球蛋白过多、组织-非特异性抗体的存在,诸如抗-平滑肌抗体(ASMA)或抗细胞核抗体(ANAs)、组织-特异性抗体的存在,诸如对抗甲状腺的抗体、升高的类风湿因子的水平(RF)、高胆红素血症、低血小板和白血球计数、AST水平高于ALT水平、伴有退行性变的小叶炎症和再生性肝细胞改变以及显著地小叶中心坏死。

[0307] 在一些实施方案中,用本发明技术的寡核苷酸的组合物治疗的受治疗者将表现出以下一种或多种病症或症状的改善或消除:血清和/或肝HBV抗原(例如HBsAg和/或HBeAg)的存在、不存在或低含量的抗-HBV抗体、肝损伤、肝硬化、丁型肝炎、急性乙型肝炎、急性爆发性乙型肝炎、慢性乙型肝炎、肝纤维化、晚期肝疾病、肝细胞癌、血清病样综合征、厌食症、恶心、呕吐、低烧、肌肉痛、易疲劳、味觉紊乱和嗅觉紊乱(厌恶食物和香烟)右上腹部和上腹部痛(间歇性,轻微至中度)、肝性脑病、嗜睡症、睡眠模式紊乱、精神错乱、昏迷、腹水、消化道出血、凝血病、黄疸、肝肿大(轻度增大、软肝)、脾肿大、手掌红斑、蜘蛛状痣、肌肉萎缩、蜘

蛛痣、血管炎、静脉曲张出血、外周性水肿、男性乳腺增生、睾丸萎缩、腹部侧支静脉(脐周静脉曲张)、ALT水平高于AST水平、白血球减少症(即,粒细胞减少)、降低的白蛋白水平、升高的血清铁水平、淋巴球增多、增加的红细胞沉降率(ESR)、缩短的红血球存活、溶血反应、血小板减少症、国际标准化比率的延长(INR)、血清HBV DNA的存在、延长的前凝血酶时间(PT)、血球蛋白过多、组织-非特异性抗体的存在,诸如抗-平滑肌抗体(ASMA)或抗细胞核抗体(ANAs)、组织-特异性抗体的存在,诸如对抗甲状腺的抗体、高胆红素血症、低血小板和白血球计数、AST水平高于ALT水平、伴有退行性变的小叶炎症和再生性肝细胞改变以及显著地小叶中心坏死。

[0308] 在一些实施方案中,用本发明技术的寡核苷酸的组合物治疗的受治疗者,相比于患有HBV感染和/或HBV-相关的病症的未治疗的患者,将表现出一个或多个生物标记物在表达水平上的降低,所述生物标记物从丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)、胆红素和类风湿因子(RF)中选出。

[0309] 本公开提供了用于治疗被诊断为患有或疑似患有HBV感染和/或HBV相关病症的受治疗者的方法,所述方法包括向受治疗者施用有效量的本发明技术的寡核苷酸组合物。

[0310] 本公开的寡核苷酸和组合物可用于反义治疗。例如,寡核苷酸可包含与已知病毒DNA或RNA序列,例如在HBV中的靶核酸序列互补或杂交的核碱基序列。

[0311] 一些实施方案包括通过使靶核酸与包含本公开的寡核苷酸的反义化合物接触来调节靶的表达的方法。在一些实施方案中,靶核酸为在细胞中,例如,在动物,诸如人类中。

[0312] 一些实施方案包括抑制靶RNA在动物中表达的方法,所述方法包括向动物施用包含本公开的寡核苷酸的反义化合物。寡核苷酸可与靶RNA的一部分互补或杂交。

[0313] 一些实施方案包括用于减少被病毒感染的受治疗者中病毒的病毒载量的方法,所述方法包括向对其有需要的受治疗者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物,从而降低所述病毒在受治疗者中的病毒载量。寡核苷酸可与病毒中的靶RNA的一部分互补或杂交。

[0314] 一些实施方案包括用于抑制细胞或受治疗者中的病毒基因表达的方法,所述方法包括使细胞与本公开的寡核苷酸或组合物接触,或将治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物施用于对其有需要的受治疗者。寡核苷酸可与病毒中的靶RNA的一部分互补或杂交。

[0315] 其他实施方案包括减少被病毒感染的受治疗者中病毒抗原水平的方法,所述方法包括向对其有需要的受治疗者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物,从而降低在受治疗者中的病毒抗原水平。寡核苷酸可与病毒中的靶RNA的一部分互补或杂交。

[0316] 本公开的寡核苷酸和组合物可用于例如抑制或减少乙型肝炎病毒(HBV)基因表达或抑制HBV病毒的复制或用于治疗患有HBV的受治疗者或用于降低被HBV感染的受治疗者中乙型肝炎病毒(HBV)的病毒载量。在实施方案中,本发明所公开的嵌合寡核苷酸被用于在靶基因处诱导RNA酶H的活性。

[0317] 本公开的寡核苷酸和组合物可用于,例如,争夺对HCV RNA的微-RNA结合位点,从而抑制复制。

[0318] 本公开还涉及稳定用于递送至受治疗者的寡核苷酸的方法。在本文中,寡核苷酸的稳定的特征在于[定量]增加寡核苷酸的熔点或温度T_m。

[0319] 本发明所公开的寡核苷酸构建体可单独施用或与对于靶向疾病的一种或多种附

加治疗组合施用。本发明所公开的寡核苷酸构建体可单独施用或与对于靶向疾病的一种或多种HBV感染组合施用。应当理解，在组合疗法中，用于HBV感染的寡核苷酸构建体和一种或多种附加治疗可同时在相同或分开的组合物中施用，或在相同的时间或顺序地施用。

[0320] 在一些实施方案中，本发明所公开的寡核苷酸构建体与HBV复制抑制剂或免疫调节剂组合给药，或在将抗-HBV寡核苷酸试剂与HBV复制抑制剂和免疫调节剂两者组合的方案中施用。在实施方案中，本发明所公开的寡核苷酸构建体与HBV感染的标准护理治疗组合施用。对于HBV感染的标准护理治疗可包括病毒聚合酶的抑制剂，诸如核苷酸/核苷酸类似物(例如，拉米夫定、替比夫定、恩替卡韦、阿德福韦、泰诺福韦和克拉夫定、泰诺福韦艾拉酚胺(TAF)、CMX157和AGX-1009)和干扰素(例如，Peg-IFN-2a和IFN-a-2b干扰素λ)。在实施方案中，本发明所公开的寡核苷酸构建体在同时(共同施用)或顺序给药后与一种或多种寡核苷酸联合施用。寡核苷酸可包括siRNA，诸如ALN-HBV、ARB-1467、ARC-520和ARC-521，反义寡核苷酸，诸如RG6004(LNAHBV)、Ionis-HBV_{Rx}和Ionis-HBV-L_{Rx}、miRNA模拟物抑制剂、核酸配体、空间阻断剂、saRNA、shRNA、免疫调节和/或HBsAg释放抑制，诸如REP2139和REP2165寡核苷酸。在实施方案中，本发明所公开的寡核苷酸构建体与一种或多种抗病毒剂，诸如病毒复制抑制剂联合施用。在实施方案中，本发明所公开的寡核苷酸构建体与HBV衣壳抑制剂联合施用。HBV衣壳抑制剂可包括NVR 3-778、AB-423、GLS-4、Bayer 41-4109、HAP-1和AT-1。在实施方案中，本发明所公开的寡核苷酸构建体与一种或多种免疫调节剂，诸如TLR激动剂联合施用。TLR激动剂可包括GS-9620、ARB-1598、ANA975、RG7795(ANA773)、MEDI9197、PF-3512676和IMO-2055。在实施方案中，本发明所公开的寡核苷酸构建体与HBV疫苗联合施用。HBV疫苗可包括Hepливav、ABX203和INO-1800。在实施方案中，本发明所公开的寡核苷酸构建体联合施用。

[0321] 一些实施方案包括抑制细胞或受治疗者中的HBV基因表达，包括使细胞与本公开的寡核苷酸或组合物接触，或将治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物施用于对其有需要的受治疗者。

[0322] 一些实施方案包括治疗与HBV基因的表达或活性相关的疾病或病症，包括向对其有需要的受治疗者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物。

[0323] 一些实施方案包括用于减少被HBV感染的受治疗者中乙型肝炎病毒(HBV)的病毒载量的方法，所述方法包括向对其有需要的受治疗者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物，从而降低所述HBV在受治疗者中的病毒载量。一些实施方案还提供降低被HDV感染的受治疗者中丁型肝炎病毒(HDV)病毒载量的方法。

[0324] 其他实施方案包括减少被HBV感染的受治疗者中乙型肝炎病毒(HBV)抗原水平的方法，所述方法包括向对其有需要的受治疗者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物，从而降低在受治疗者中的HBV抗原水平。一些实施方案还提供降低被HDV感染的受治疗者中丁型肝炎病毒(HDV)抗原水平的方法。在一些实施方案中，HBV抗原为HBsAg或HBeAg。

[0325] 在一个实施方案中，本公开的靶向HBV寡核苷酸或组合物施被施用于患有HBV感染，或HBV和HDV感染两者，和/或HBV-相关的疾病的受治疗者，使得一旦施用给受治疗者本公开的寡核苷酸或组合物，一种或多种HBV基因的表达、HBV ccc DNA水平、HBV抗原水平、HBV病毒载量水平、ALT和/或AST，例如在受治疗者的细胞、组织、血液或其他组织或流体中至少减少了约25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、

38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、62%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%，或至少约99%，或更多，或介于两个这些数字之间的值。在一些实施方案中，HBV抗原水平降低了先前列举的量。在一些实施方案中，抗原为HBsAg或HBeAg。在一些实施方案中，HBV病毒载量水平降低了先前列举的量。

[0326] 在一个实施方案中，本公开的靶向HBV寡核苷酸或组合物施被施用于患有HBV感染，或HBV和HDV感染两者，和/或HBV-相关的疾病的受治疗者，使得当本公开的寡核苷酸或组合物被施用给受治疗者时，抗-HBV抗体水平，例如在受治疗者的细胞、组织、血液或其他组织或流体中至少增加了约25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、62%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%，或至少约99%，或更多，或介于两个这些数字之间的值。

[0327] 根据本公开的方法和使用的本公开的寡核苷酸或组合物的施用可导致在被HBV感染或HBV和HDV感染两者，和/或HBV-相关疾病的患者中的此类疾病或病症的严重程度、迹象、症状和/或标记物的降低。在此上下文中，所谓“减少”意指此类水平的统计上的显著降低。减少可为例如至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约100%，或介于两个这些数值之间的值。

[0328] 本公开的寡核苷酸或组合物的量可由医疗专业人员确定。产品的日剂量可以在每个成人每日0.001-1,000mg的宽范围内变化，或在其中的任何范围内变化。对于口服给药，组合物优选地以含有0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、150、200、250和500毫克的活性成分的片剂形式提供，用于根据待治疗患者的症状来调节剂量。有效量的药物通常是以每天每千克体重约0.01mg至约100mg或其中的任何范围的剂量水平提供。优选地，该范围是每天每千克体重约0.01至约50.0mg或其中的任何范围。更优选地，该范围是每天每千克体重约0.01至约10.0mg或其中的任何范围。更优选地，该范围是每天每千克体重约0.01至约1.0mg或其中的任何范围。可以将寡核苷酸按每天1至4次的方案施用。例如，本公开的寡核苷酸可以约0.1mg/kg至约100mg/kg的一个或多个剂量施用。例如，本公开所公开的寡核苷酸可以约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或约100mg/kg的剂量施用。

对所列举值的中间值和范围也旨在成为本公开的一部分。这些值可适用于静脉内输注和/或皮下递送。本文所述的其他递送形式也可以这些剂量施用。该剂量可因患者的需求、正在治疗的病症的严重性和所采用的寡核苷酸而异。可采用每日给药或周期后给药的使用方式。

[0329] 本公开的寡核苷酸可在一段时间内通过静脉内输注施用，诸如在5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或约25分钟的周期内施用。可例如定期重复施用，诸如每周、每两周（即每两个星期）持续一个月，两个月、三个月、四个月或更长时间。在初始治疗方案之后，可以较不频繁的规律施用所述治疗。例如，每周或每两周给药持续三个月后，可将给药每月一次持续六个月或一年或更长时间。

[0330] 本公开的寡核苷酸也可通过皮下递送来施用。可例如定期重复施用，诸如每周、每两周（即每两个星期）持续一个月，两个月、三个月、四个月或更长时间。在初始治疗方案之后，可以较不频繁的规律施用所述治疗。例如，每周或每两周给药持续三个月后，可将给药每月一次持续六个月或一年或更长时间。

[0331] 可例如通过测量疾病进展、疾病缓解、症状严重程度、疼痛减少、生活质量，维持治疗效果所需的药物剂量、疾病标记物的水平或适于治疗或靶向预防的给定疾病的任何其他可测量参数来评估治疗或预防疾病的功效。通过测量此类参数中的任一个或参数的任意组合，监测治疗或预防的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。例如，可通过定期监测病毒载量和转氨酶水平来评估CHB的治疗功效。比较较后读数与初始读数提供治疗是否有效的指示。

[0332] 4. 定义

[0333] 应当了解，本文所用的术语只是为了描述具体实施方案之目的，并非旨在限制本发明的范畴。除非另外指明，否则下列定义将适用。

[0334] 如本文所用，关于多核苷酸（即核苷酸序列，诸如寡核苷酸或靶核酸）的术语“互补的”或“互补性”是指碱基配对规则。如本文所用，核酸序列的互补是指当与核酸序列对齐使得一个序列的5'端与另一个序列的3'端配对时，处于“反平行关联”的寡核苷酸。例如，序列“5'-A-G-T-3'”与序列“3'-T-C-A-5”互补。在天然存在的核酸中不常见的某些碱基可包括在本文所述的核酸中。这些包括例如肌苷、7-脱氮鸟嘌呤、锁定核酸（LNA）和肽核酸（PNA）。互补性不必是完美的；稳定的双链可以包含错配的碱基对、退化的或不匹配的碱基。核酸领域的技术人员可鉴于许多变量，包括例如，寡核苷酸的长度、碱基组成和寡核苷酸序列、离子强度和不匹配碱基对的发生率，以经验的方式确定双联的稳定性。互补序列也可以是与DNA序列或其互补序列互补的RNA序列，并且也可为cDNA。

[0335] 如本文所用，术语“杂交”是指其中两条核酸链基本上互补的核酸链（涵盖一段至少14至25个核苷酸，至少约65%互补，至少约75%，或至少约90%互补）在适当严格条件下，通过在介于互补碱基对之间形成的氢键，彼此退火以形成双链或异源双链的方法。杂交通常并且优选地用探针长度核酸分子进行，优选地长度为15-100个核苷酸，更优选地长度为18-50个核苷酸。核酸杂交技术是本领域所熟知的。参见例如Sambrook等人的1989年，《分子克隆：实验室手册》，第二版，冷泉港出版社，纽约州，普莱恩维尤（1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.）。杂交和杂交的强度（即，介于核酸之间结合的强度）受诸如介于核酸之间

的互补性程度,所涉及的条件的严格性以及所形成的杂交体的热解链温度(T_m)因素的影响。本领域的技术人员理解如何估计和调节杂交条件的严格性,使得具有至少所期望的互补性水平的序列将稳定杂交,而具有较低互补性的那些不会产生。关于杂交条件和参数的示例,参见例如Sambrook等人的1989年,《分子克隆:实验室手册》,第二版,冷泉港出版社,纽约州,普莱恩维尤(1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Second Edition,Cold Spring Harbor Press,Plainview,N.Y.);Ausubel,F.M.等人的1994,《分子生物学实验室指南》,约翰·威利父子公司,新泽西州,斯考克斯市(1994,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Secaucus,N.J.)。在一些实施方案中,特异性杂交在严格杂交条件下发生。特定于靶核酸的寡核苷酸或多核苷酸(例如探针或引物)将在适宜的条件下与靶核酸“杂交”。

[0336] 如本文所用,术语“严格杂交条件”是指至少与以下严格的杂交条件一样:在50%甲酰胺、5xSSC、50mM NaH_2PO_4 、pH6.8、0.5% SDS、0.1mg/mL超声处理过的鲑精DNA和5x Denhart的溶液,在42°C下杂交过夜;用2x SSC、0.1% SDS在45°C下洗涤;并用0.2x SSC、0.1% SDS在45°C下洗涤。在另一个实施方案中,严格杂交条件不应允许在涵盖20个连续核苷酸的一段上相差超过两个碱基的两个核酸的杂交。

[0337] 如本文所用,术语“基本上互补的”意指两个序列在严格杂交条件下杂交。技术人员将会理解,基本上互补的序列不需要沿着它们的整个长度杂交。具体地讲,基本上互补的序列可包含不与靶序列杂交的连续碱基序列,其定位为3'或5'至在严格杂交条件下与靶序列杂交的连续碱基序列。

[0338] “药学上可接受的”是指非生物学或其他方面不可取的材料,即该材料可以掺入给予患者的药物组合物中,而不会引起任何不良的生物效应或以有害的方式与包含该材料的组合物中的任何其他成分相互作用。当术语“药学上可接受的”用于指药用载体或赋形剂时,其意味着该载体或赋形剂符合所需的毒物学和制造检验标准,或意味着它包括在美国和药物管理局编制的《非活性成分指南》(Inactive Ingredient Guide)内。

[0339] 寡核苷酸的“构建体”可以指本公开的寡核苷酸,例如(1)共轭部分,诸如本文所述的那些(诸如靶向部分)或(2)经修饰的/未修饰的核苷酸的结构域,诸如在一些嵌合寡核苷酸中。

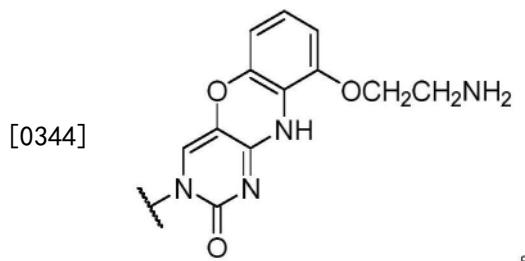
[0340] “嵌合寡核苷酸”是指具有多于一个结构域的寡核苷酸,例如,如式(VI)和(VII)所示例的。嵌合寡核苷酸可包括附加组分,例如配体靶向基团或药效团或附加的核苷酸,连接基等。

[0341] “经修饰的核苷”是指独立地具有经修饰的糖部分和/或经修饰的核碱基的核苷。应当理解,核苷可通过亚基间的键连接,例如磷酸二酯亚基间的键、硫代磷酸酯亚基间的键、氨基磷酸酯亚基间的键和硫代氨基磷酸酯亚基间的键。“经修饰的核苷酸”可指核苷和亚基间的键一起。

[0342] “未修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。“经修饰的核碱基”包括其他合成和天然的核碱基,诸如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫脲嘧啶、2-巯基胸腺嘧啶和2-巯基胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-

CH_3)尿嘧啶和胞嘧啶以及其他嘧啶碱基的炔基衍生物、6-偶氮嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代,具体地讲,5-溴、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-单杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤和3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。另外经修饰的核碱基包括三环嘧啶,诸如吩噁嗪胞啶(1H-吡啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、吩噁嗪胞啶(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、G形夹,诸如取代的吩噁嗪胞啶(例如,9-(2-aminoethyloxy)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、咔唑胞啶(2H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-2-酮)、吡啶并吲哚胞啶(H-吡啶并[3,2,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)。经修饰的核碱基还可包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环取代的那些,例如7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤核苷、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。

[0343] 在一些实施方案中,经修饰的核碱基选自由以下项组成的组:5-甲基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、5-甲基脲嘧啶和g形夹。在一些实施方案中,g形夹为



[0345] “配体靶向基团”是指通过受体结合促进寡核苷酸向HBV感染的肝细胞递送的部分。这些基团包括在细胞表面分别靶向细胞表面受体ASGPR和LDL受体的“受体靶向配体”,诸如Ga1NAc和胆固醇。在细胞表面上靶向这些受体的其他受体靶向配体也在该术语的范围内。

[0346] “药效团”是指在HBV/HDV或HBV感染的细胞内与HBV DNA或RNA分子相互作用并触发抗病毒应答的寡核苷酸药物序列。

[0347] “构象受限的核苷”是指具有桥连或双环糖结构的核苷,其中核苷的构象可被固定在特定构型中。例如,构象受限的核苷包括具有固定的C₃'-内切糖折叠的那些。示例性实施方案包括桥联的核酸(BNAs),例如,2',4'-BNA核苷,诸如,-L-亚甲基氧基(4'-CH₂-O-2')LNA、β-D-亚甲基氧基(4'-CH₂-O-2')LNA、乙烯氧基(4'-(CH₂)₂-O-2')ENA、2',4'-BNA^{NC}[NH]、2',4'-BNA^{NC}[NMe]、2',4'-BNA^{NC}[NBn]、氨基氧基(4'-CH₂-O-N(R)-2')BNA和羟亚胺基(4'-CH₂-N(R)-O-2')BNA。其他示例性结构包括但不限于,在介于糖的4'和2'位置之间具有至少一个桥联的寡核苷酸,其中每个桥联独立地包含1或2至4个独立地选自-[C(R₁)(R₂)]_n—、-C(R₁)=C(R₂)—、-C(R₁)=N—、-C(-NR₁)—、-C(-O)—、-C(-S)—、-O—、-Si(R₁)₂—、-S(-O)_x—和-N(R₁)—的连接基;其中:x为0、1或2;n为1、2、3或4;每个R₁和R₂独立地为H、保护基团、羟基、C₁-C₁₂烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、取代的C₂-C₁₂炔基、C₅-C₂₀芳基、取代的C₅-C₂₀芳基、杂环基、取代的杂环基、杂芳基、取代的杂芳基、C₅-C₇脂环族基团、取代的C₅-C₇脂环族基团、卤素、OJ₁、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、COOJ₁、酰基(C(-O)-H)、取代的酰基、CN、磺酰基(S(-O)₂-J₁)或亚磺酰基(S(-O)-J₁);并且每个J₁和J₂独立地为H、C₁-C₁₂烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-

C₁₂炔基、取代的C₂-C₁₂炔基、C₅-C₂₀芳基、取代的C₅-C₂₀芳基、酰基(C(-O)-H)、取代的酰基、杂环基、取代的杂环基、C₁-C₁₂氨基烷基、取代的C₁-C₁₂氨基烷基或保护基团。某些BNA已在专利文献以及科学文献中进行了制备和公开(参见例如:公布的美国专利7,053,207;6,268,490;6,770,748;6,794,499;7,034,133;6,525,191;7,696,345;7,569,575;7,314,923;7,217,805;和7,084,125中,它们以引用方式并入本文。“构象受限的核苷酸”是指通过亚基间的键连接的构象受限的核苷。

[0348] 在一些实施方案中,构象受限的核苷选自任选取代的LNA或任选取代的ENA。该任选取代的LNA或ENA可被烷基部分取代,例如在-CH₂-部分中的一个上的甲基或乙基。

[0349] “抑制表达”是指表达或活性的降低或阻断,并且不一定表示完全消除表达或活性。

[0350] “禁止病毒的复制”是指减少或阻断病毒的复制,并且不一定指示完全消除病毒的复制。

[0351] “受治疗者”指哺乳动物,并且包括人类和非人类哺乳动物。在一些实施方案中,受治疗者是人,诸如成年人。

[0352] 受治疗者中疾病的“治疗”或“疗法”是指(1)预防疾病在预先有倾向的或尚未表现出所述疾病症状的受治疗者中发生;(2)抑制疾病或阻止其发展;或(3)改善或导致疾病的复原。

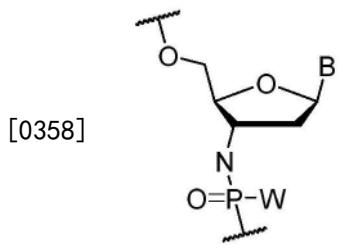
[0353] “治疗有效量”意指药剂的量可向受治疗者提供治疗有益效果。

[0354] “药学上可接受的盐”意指本公开的化合物的生理上和药学上可接受的盐,即保留亲本寡核苷酸/化合物的所需生物活性并且不另外赋予不期望的毒理作用的盐。

[0355] 以下缩写用于该公开中。2'-H(脱氧核糖)核苷用对应于核碱基的大写字母表示,例如A、C、G,并且T。2'-OH(核糖)核苷用小写r和对应于核碱基的大写字母,例如rA、rC、rG和rU来表示。2'-O-Me核苷用小写m和对应于核碱基的大写字母,例如mA、mC、mG和mU来表示。2'-MOE核苷用小写的“moe”和对应于核碱基的大写字母,例如moeA、moeC、oeG和moeU来表示。2'-核糖-F核苷用小写的“f”和对应于核碱基的大写字母,例如fA、fC、fG和fU来表示。2'-阿拉伯糖-F核苷用小写的“af”和对应于核碱基的大写字母,例如afA、afC、afG和afU来表示。mA*为3'-氨基-2'-OMe-2,6-二氨基嘌呤。A*为3'-氨基-2'-脱氧-2,6-二氨基嘌呤。fA*为3'-氨基-2'-F-2,6-二氨基嘌呤。LNA核苷用“L”和对应于核碱基的大写字母,例如LA、LC、LG、LT来表示。

[0356] 对于核苷酸的主链或亚基间的键、磷酸二酯亚基间的键被称为“P0”,或通常不包括在序列细节中;硫代磷酸酯亚基间的键缩写为小写的“ps”;氨基磷酸酯亚基间的键缩写为小写的“np”;并且硫代氨基磷酸酯亚基间的键缩写为小写的“nps”。

[0357] N3'→P5'是指具有亚基间的键的经修饰核苷酸,其中3'部分包含N(例如NH)并且通过一个P连接。例如,以下结构具有N3'→P5'键:



[0359] 值得注意的是,除非上下文清楚决定不是这样,否则本文和所附权利要求中所用的单数形式“一个”和“所述”包括复数指代。还应当注意,权利要求书可制定为排除任何任选的元素。同样地,这一声明旨在当结合权利要求元素的表述“单独地”、“唯一地”等使用此类专用术语时,或使用“负”限制时充当先行基础。

[0360] 术语“约”应被本领域普通技术人员理解并根据使用其的上下文中有某种程度的变化。如果在给定的使用术语的上下文中,该术语的用途对于本领域的普通技术人员而言不清楚,则“约”将意指最多加上或减去特殊项的10%。本文所呈现的具有数值的某些范围,在前面有术语“约”。本文使用术语“约”用于为其在之前的精确数字提供文字支持,以及接近或近似该术语先于的数字的数字。在确定数字是否接近或近似具体列举的数字时,接近或近似未列举的数字可为数字,在呈现该数字的上下文中,该数字提供了具体列举的数量的基本等同。

[0361] 还应当理解,本文所述的疾病或病症的各种治疗或预防模式旨在意味着“大量”,其包括总的、而且少于总的治疗或预防,并且其中实现了一些生物学或医学相关的结果。治疗可为对于慢性疾病的连续长期治疗或用于治疗急性病症的一个或很少时间的施用。

[0362] 在提供数值范围的情况下,应当理解,除非上下文另外清楚地指明,否则介于那个范围上限和下限之间的,以及在那个规定的范围内的任何其他规定或介于中间的值的每一个介于中间的值,直至下限单位的十分之一,涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地被包括在较小范围内,并且也被涵盖在本发明内,但受到规定范围内的任何具体排除的限定的限制。在所述范围包括极限值之一或极限值两者的情况下,排除这些包括的极限值中的任一者或两者的范围也包括在本发明中。

[0363] 本公开不限于所述的具体实施方案,因为可能会有所不同。另外应当了解,本文所用的术语只是为了描述具体实施方案的目的,并不旨在进行限制,因为本公开的范围将仅由所附权利要求书来限定。

[0364] 如本领域技术人员在阅读本公开之后所显而易见的,本文所述和所示的单独实施方案中的每个具有分立部件和特征,在不背离本发明的范围或精神的前提下,所述部件和特征可容易地与其他若干实施方案中任意方面的特征分离或组合。可按所述事件的顺序或按任何其他在逻辑上可能的顺序来执行任何所述方法。

[0365] 本说明书中引用的所有出版物和专利均以引用方式并入本文,如同每个单独的出版物或专利均明确且个别地表明以引用方式并入,并且以引用方式并入本文以公开并描述与所引用的出版物相关的所述方法和/或材料。对任何出版物的引用都是用于在提交日期之前将其公开,而不应将其理解为承认本公开无权享有对由于在先的发明的此类出版物优先权。另外,所提供的专利公开日期可能不同于实际公开日期,实际公开日期可能需要单独证实。

[0366] 5.实施例

[0367] 以下实施例示出了本公开的某些实施方案,以有助于技术人员实践本公开。因此,这些实施例决不被认为限制本公开的范围。

[0368] 制备方法

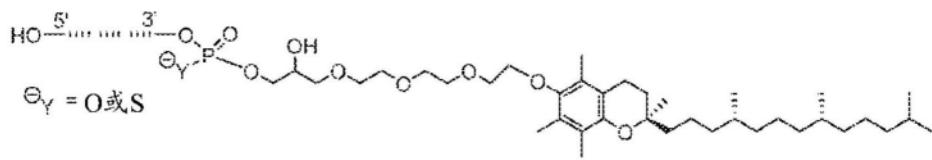
[0369] 将所有单体在具有干燥剂(KOH和P₂O₅,室温,24小时)的真空干燥器中干燥。附接到第一5'残基的合成固体载体(CPG)可购自商业来源。所有其他合成试剂和溶剂均可购自商业来源并原样使用。用于合成后工作流程的化学品和溶剂购自商业来源,并无需任何纯化或处理就使用了。在合成期间,将溶剂(乙腈)和溶液(单体(amidite)和活化剂)储存在分子筛上。

[0370] 用于本研究中的对照物,核酸酶稳定的3' -胆固醇,'、3' -生育酚和3' -GalNAc缀合的反义寡核苷酸在例如表10-13中示出。在ABI-394合成器上,使用由制造商所写的标准93步循环合成反义寡核苷酸。固体载体为可控孔度的玻璃,并且单体包含标准保护基团。根据标准固相寡核苷酸合成规程,使用可商购获得的5'-0-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-3'-0-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)DNA和或6-N-苯甲酰基腺昔(A^{Bz})、4-N-乙酰基胞嘧啶核昔(C^{Ac})、2-N-异丁酰基鸟嘌呤核昔(G^{iBu})和胸昔(T)的2'-0-Me亚磷酰胺单体,单独地合成每个寡核苷酸。该亚磷酰胺购自商业来源。该2'-0-Me-2,6-二氨基嘌呤亚磷酰胺购自商业来源。将DDTT((二甲基氨基亚甲基)氨基-3H-1,2,4-dithiazaoline-3-硫酮用作硫转移剂,用于合成硫代磷酸寡核糖核苷酸。在CH₃CN中,在5-(乙硫基)-1H-四唑活化剂的存在下,使用亚磷酰胺的0.1M溶液的拓展偶合至固体结合的寡核苷酸,之后进行标准封端、氧化和脱保护获得经修饰的寡核苷酸。所有经修饰的亚磷酰胺的逐步偶合效率超过98%。将承载寡核苷酸的固体载体在55℃下用氨水/乙醇(3:1)溶液加热8小时,以脱保护碱基不稳定的保护基团。

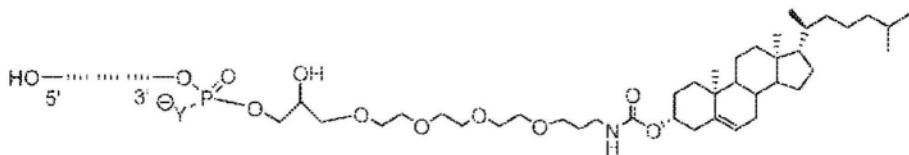
[0371] 胆固醇和生育酚缀合的寡核苷酸通过对胆固醇和生育酚载体附接在TEG上的连接基的开始的固相合成,以及亚磷酰胺与载体结合的寡核苷酸的最终偶联获得的。由羟脯氨酸-GalNAc固体载体合成GalNAc缀合的ASOs。通过6-氨基己酸酯键将GalNAc固定到反式-4-羟脯氨酸上,以获得羟脯氨酸-GalNAc部分,随后将其附接到官能化的控制孔度的玻璃(CPG)上,以获得固体载体。

[0372] 通过阴离子交换HPLC纯化未缀合的和GalNAc修饰的寡核苷酸。缓冲剂为20mM的10%CH₃CN中的磷酸钠,pH 8.5(缓冲剂A)和20mM的10%CH₃CN中的磷酸钠,1.8M NaBr,pH 8.5(缓冲剂B)。将包含全长寡核苷酸的级分合并、脱盐并冻干。

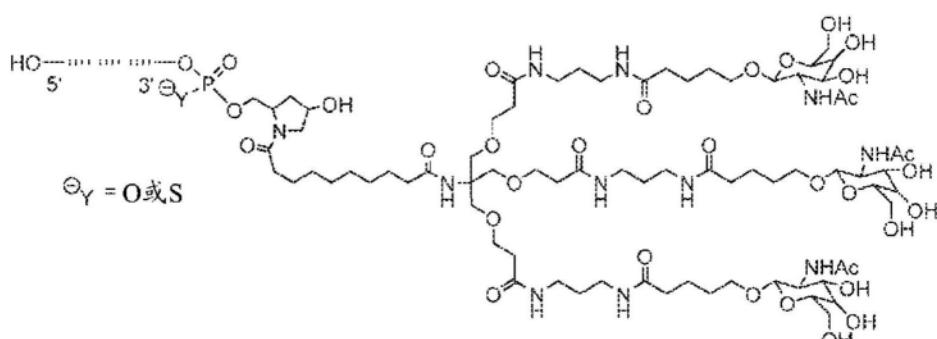
[0373] 通过高效液相色谱(HPLC)在内部堆积的RPC-Source15反相柱上纯化胆固醇和生育酚缀合序列。缓冲剂为20mM的10%CH₃CN中的NaOAc(缓冲剂A)和20mM的70%CH₃CN中的NaOAc(缓冲剂B)。分析HPLC和ESLC-MS建立寡核苷酸的完整性。



Vit E TEG连接基



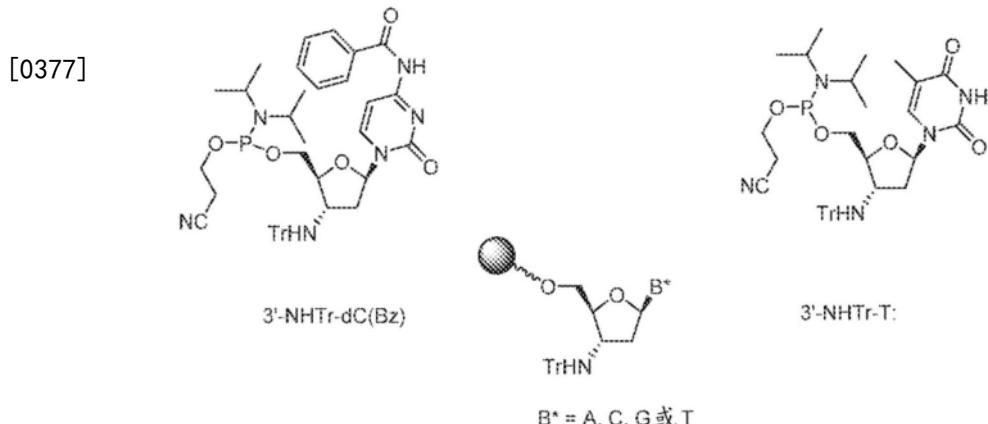
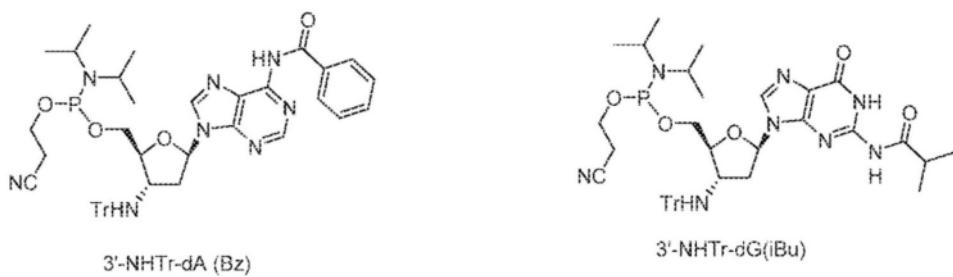
[0374] 具有TEG连接基的胆固醇



具有Hyp-连接基的GalNAc

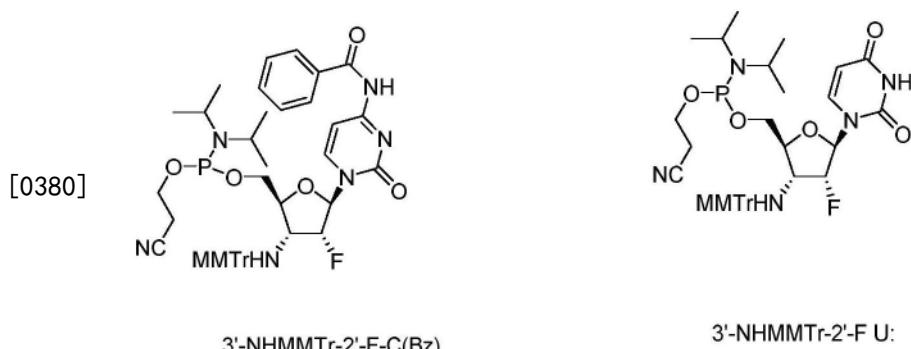
[0375] 氨基磷酸酯(NP)和硫代氨基磷酸酯(NPS)修饰的寡核苷酸的合成

[0376] 使用93-步循环在ABI-394合成器上合成NP和NPS修饰的寡核苷酸,所述循环用去封端、偶联和等待步骤的修饰编写。固体载体为3' -NHTr-5' -LCAA-CPG。通过使用描述于《核酸研究》,1995年,第23卷,第14期,2661-2668页(Nucleic Acids Research, 1995, Vol. 23, No. 14 2661-2668)中的方法,根据标准固相亚磷酰胺化学规程,使用6-N-苯甲酰基腺苷(A^{Bz})、4-N-苄基胞嘧啶核苷(C^{Bz})、2-N-异丁酰基鸟嘌呤核苷(G^{iBu}),和胸苷(T)的3' -NH-Tr-5' -O-(2-氯乙基-N,N-二异丙基)DNA亚磷酰胺单体单独地合成每个寡核苷酸。

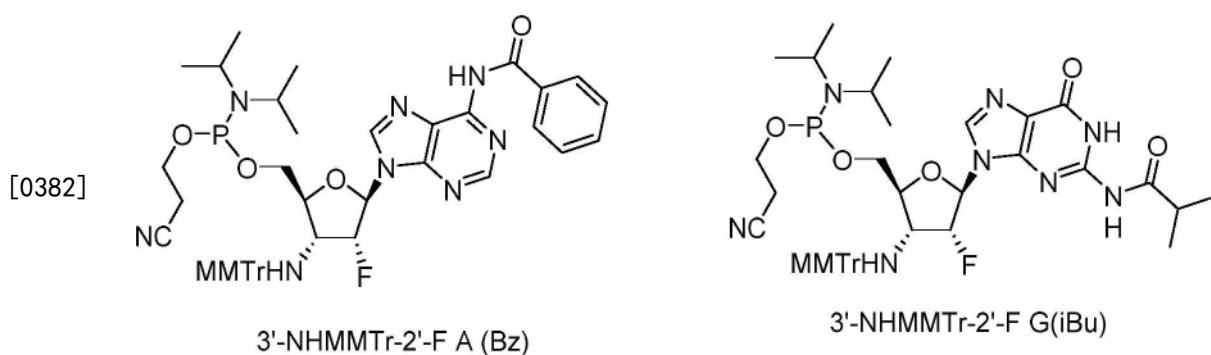


[0378] 用于低聚物合成的3' -NHTr-DNA构建块

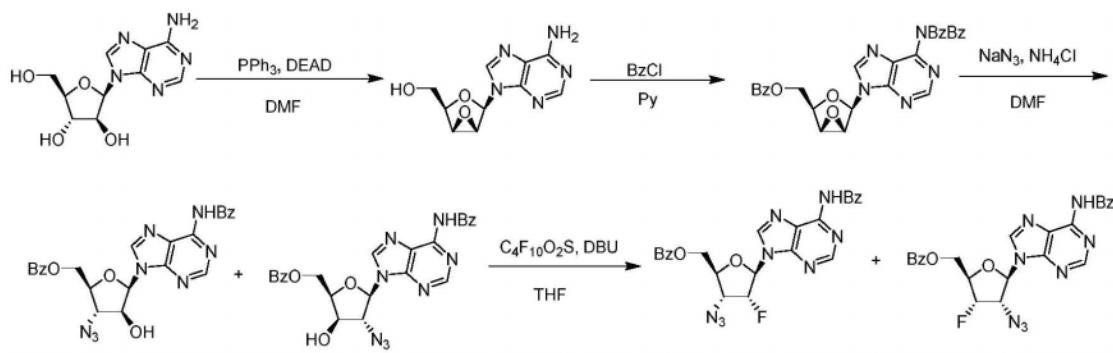
[0379] 通过使用描述于《核酸研究》,1999年,第24卷,第15期,2966-2973页(Nucleic Acids Research, 1996, Vol. 24, No. 15, 2966-2973)中的方法,合成2' -F3' -NH-MMTr-5' -O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)尿嘧啶核苷(U)和4-N-苄基胞嘧啶核苷(C^{Bz})亚磷酰胺亚磷酰胺单体



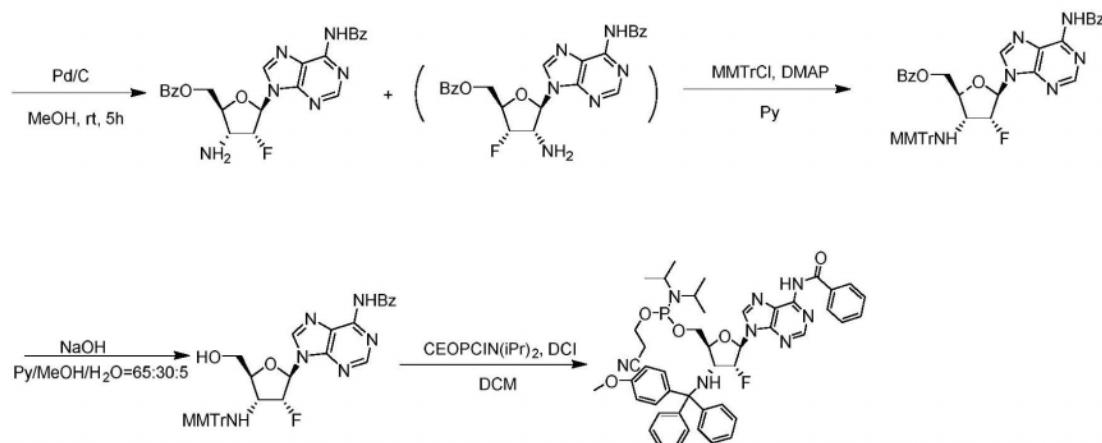
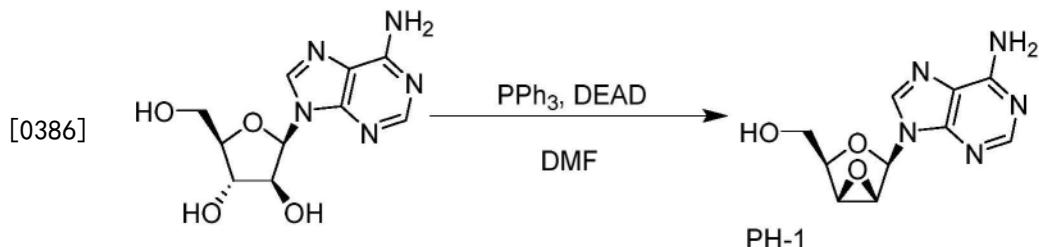
[0381] 如下述方法合成2' -F3' -NH-MMTr-5' -O- (2-氰乙基-N,N-二异丙基)6-N-苯甲酰氨基腺苷(A^{Bz})、2-N-异丁酰基鸟嘌呤核苷(G^{iBu})



[0383] **

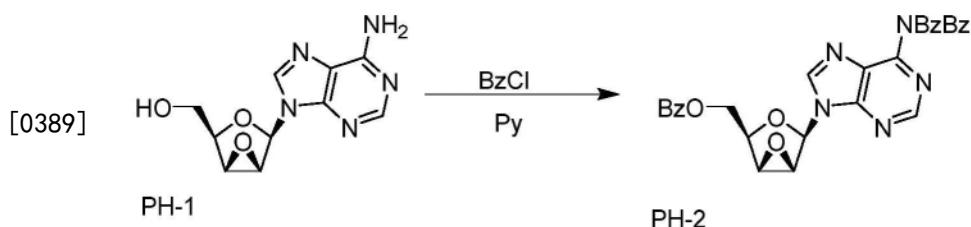


[0384]

[0385] PH-1的制备

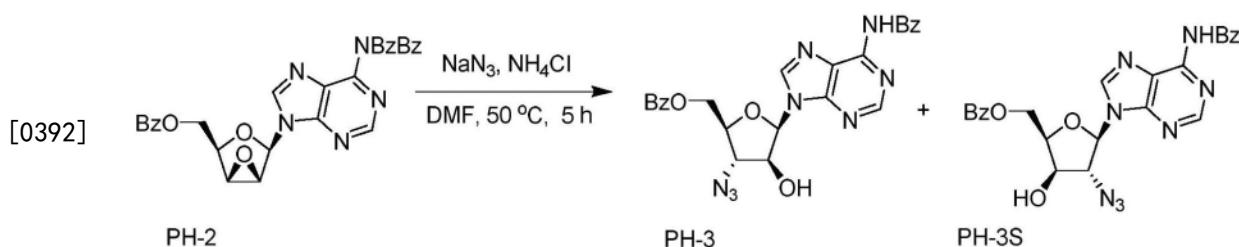
[0387] 具有氮惰性气氛下,向(2R,3S,4S,5R)-2-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-5-(羟甲基)氧杂环戊烷-3,4-二醇(300g,1.123mol,1.00当量)于N,N-二甲基甲酰胺(7500mL)中的溶液,添加三苯基膦(735g,2.802mol,2.50当量)。在0℃持续搅拌所得的溶液15分钟。这之后,在0℃下,60分钟内,随着搅拌滴加偶氮二甲酸二乙酯(449.4g,2.581mol,2.54当量)于N,N-二甲基甲酰胺(7500mL)中的溶液。在25℃持续搅拌所得的溶液2小时。减压浓缩所得混合物。通过添加醚沉淀产物。通过过滤收集固体。通过从甲醇重结晶纯化该粗产物。在烘箱中减压下干燥固体。这获得186g(66%)为白色固体的PH-1。¹H-NMR(DMSO-d₆,400MHz):8.34-8.07(m,2H),7.44-7.26(m,2H),6.30-6.21(m,1H),5.07-4.95(m,1H),4.33-4.20(m,1H),4.15-4.03(m,2H),3.71-3.50(m,2H)。

[0388] PH-2的制备



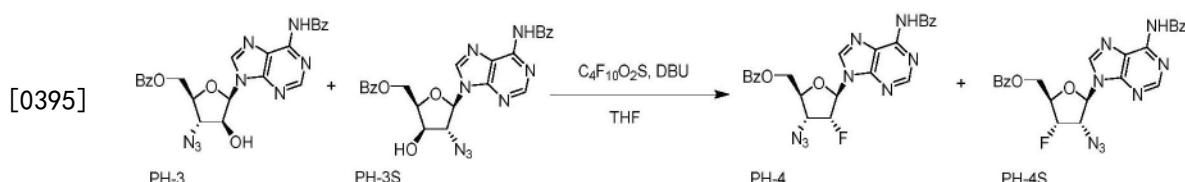
[0390] 具有氮惰性气氛下,在0℃,在30分钟内,随着搅拌向PH-1(100g,401.2mmol,1.00当量)于吡啶(1000mL)中的溶液滴加苯甲酰氯(175g,1.245mol,3.10当量)。在25℃持续搅拌所得的溶液3小时。用400mL乙酸乙酯稀释所得溶液。用3×300mL水和2×300mL饱和的碳酸氢钠水溶液分别洗涤所得的混合物。用1×300mL饱和氯化钠溶液洗涤所得混合物。将该混合物置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。将残余物施加到硅胶柱上,用乙酸乙酯/石油醚(2/1)洗脱。这获得157g(70%)为白色固体的PH-2。

[0391] PH-3的制备

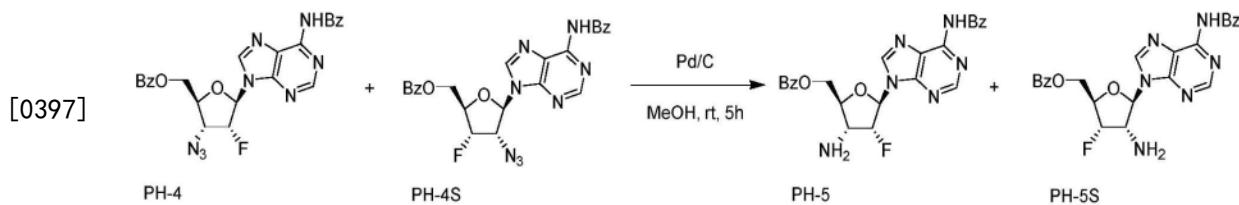


[0393] 具有氮惰性气氛下,依次向PH-2(30g,53.42mmol,1.00当量)于N,N-二甲基甲酰胺(300mL)中的溶液添加氯化铵(5.7g,106.56mmol,2.00当量)和叠氮化钠(34.8g,535.30mmol,10.00当量)。在50℃下持续搅拌所得溶液5小时。用2000mL二氯甲烷稀释所得的溶液。所得的混合物分别用3×2000mL的水、1×2000mL的饱和碳酸氢钠溶液和1×2000mL的饱和氯化钠溶液洗涤。将该混合物置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。这获得24g(90%)为白色固体的PH-3和PH-3S(5:1)。

[0394] PH-4的制备

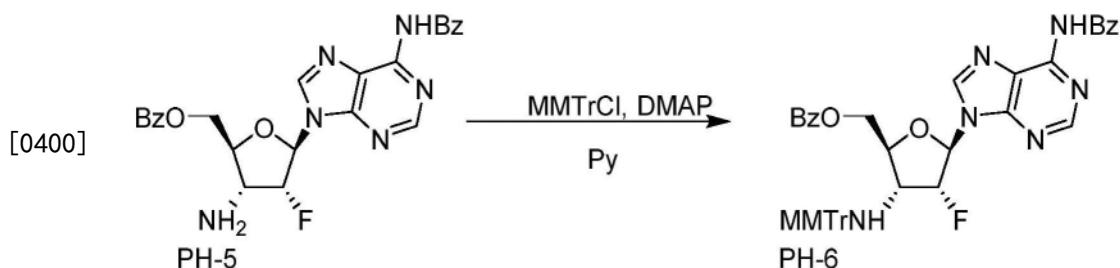


[0396] 具有氮惰性气氛下,向PH-3和PH-3S(5:1)(10g,19.98mmol,1.00当量)于四氢呋喃(100mL)中的溶液添加1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(10.69g,70.22mmol,3.50当量)。之后在10分钟内,在0℃下随着搅拌滴加全氟丁基磺酰氟(12.69g,2.10当量)。在0℃,持续搅拌将所得溶液1.5小时。用200mL二氯甲烷稀释所得的溶液。所得的混合物分别用3×200mL的水、1×200mL的饱和碳酸氢钠溶液和1×200mL的饱和氯化钠溶液洗涤。将该混合物置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。从以1:1的比率的乙酸乙酯/石油醚中重结晶该粗产物。这获得6g(60%)为白色固体的PH-4和PH-4S(5:1)。MS m/z [M+H]+(ESI):503。



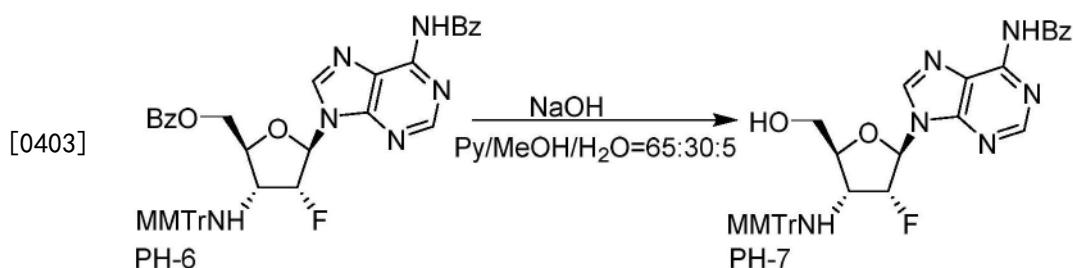
[0398] 向PH-4和PH-4S(5:1) (10g, 19.90mmol, 1.00当量)于四氢呋喃(150mL)中的溶液添加10%钯碳(3.0g)。抽空烧瓶，并用氮气吹扫三次，之后用氢气吹扫。在室温下将所得溶液搅拌1h。滤出固体。减压浓缩所得混合物。用以下条件(IntelFlash-1)通过快速制备型-HPLC纯化粗产物(10g)：柱，C18；流动相，水和乙腈(30%乙腈，最多至50%，30分钟内)；检测器，UV 254nm。这获得7g(74%)为白色固体的PH-5和1.0g为白色固体的PH-5S。MS m/z [M+H]⁺(ESI) : 477。

[0399] PH-6的制备



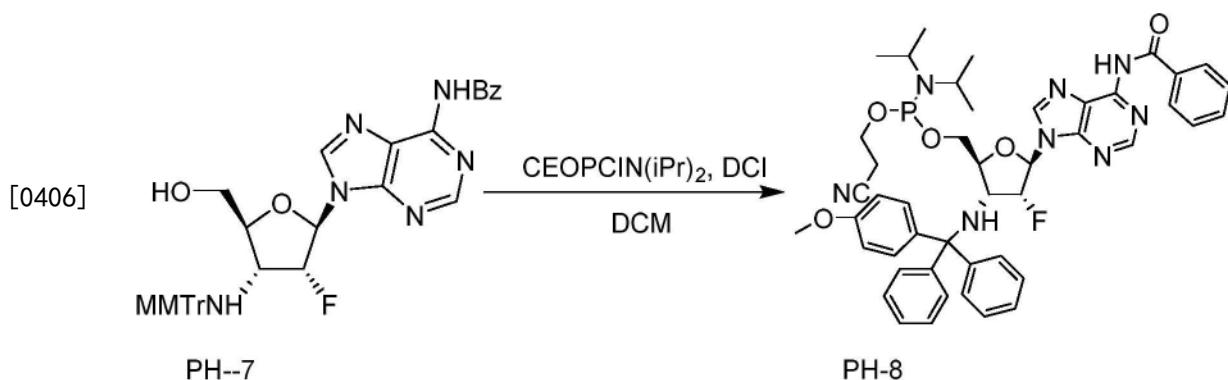
[0401] 具有氮惰性气氛下，依次向PH-5(4g, 8.40mmol, 1.00当量)于吡啶(40mL)中的溶液添加4-二甲氨基吡啶(1.5g, 12.28mmol, 1.50当量)和4-甲氧基三苯基氯甲烷(10.3g, 4.00当量)。在25℃下持续搅拌所得溶液16小时。用300mL二氯甲烷稀释所得的溶液。用1×300mL水和3×300mL饱和的碳酸氢钠水溶液分别洗涤所得的混合物。分别用1×300mL饱和氯化钠溶液洗涤所得的混合物。将该混合物置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。将残余物施加到硅胶柱上，用二氯甲烷/甲醇(100/1)洗脱。这获得5.7g(91%)为白色固体的PH-6。

[0402] PH-7的制备

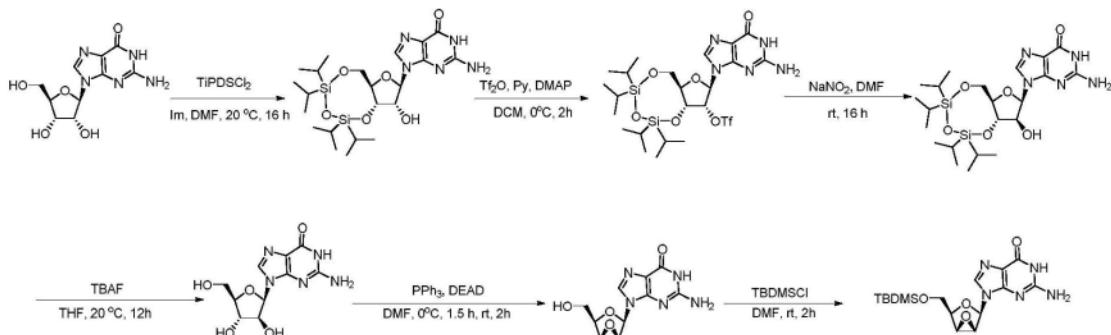
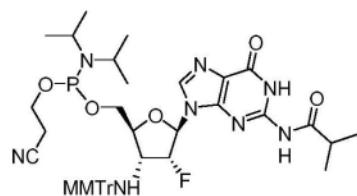


[0404] 在0℃，在5分钟内，随着搅拌向PH-6(5g, 6.68mmol, 1.00当量)于吡啶/甲醇/水(32.2/14.7/2.4mL)中的溶液滴加氢氧化钠(2mol/L)(7.2mL, 1.10当量)。在0℃下持续搅拌所得溶液20分钟。然后通过加入200mL的冰水淬灭该反应。用400mL二氯甲烷萃取所得的溶液，并合并有机层。用1×300mL水和1×300mL饱和的氯化钠水溶液洗涤所得的混合物。将该混合物置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。将残余物施加到硅胶柱上，用甲醇/二氯甲烷(1/100)洗脱。这获得4.3g(100%)为白色固体的PH-7。MS m/z [M+H]⁺(ESI) : 645。

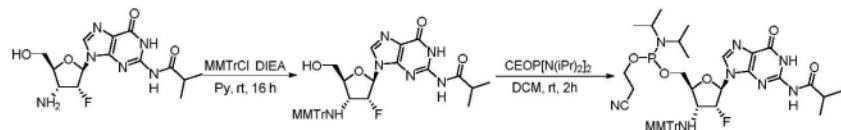
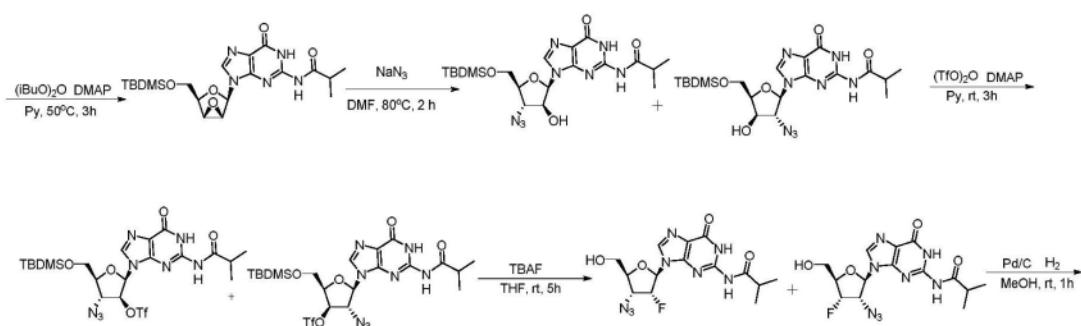
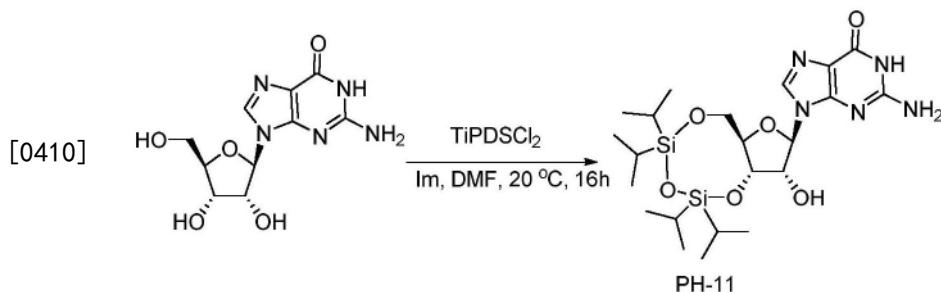
[0405] PH-8的制备



[0407] 具有氮惰性气氛下,向PH-7 (19.4g, 35.89mmol, 1.00当量)于二氯甲烷 (200mL) 中的溶液添加3- ([双[双(丙-2-基)氨基]磷烷基]氧)丙腈 (11.79g, 39.12mmol, 1.30当量)。这之后,在0℃下,添加4,5-二氰基咪唑 (4.26g, 1.20当量)。将所得的溶液在室温下搅拌30分钟。用1000mL二氯甲烷稀释所得的溶液。分别用3×800mL的饱和碳酸氢钠溶液和1×800mL的饱和氯化钠溶液洗涤所得的混合物。将该混合物置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。用以下条件通过用快速制备型-HPLC纯化粗产物:柱,C18;流动相,水和乙腈 (40% 乙腈,最多至80%,6分钟内);检测器,UV 254nm。这获得15.2g (50%) 为白色固体的PH-8。MS m/z [M+H]⁺ (ESI) : 845。

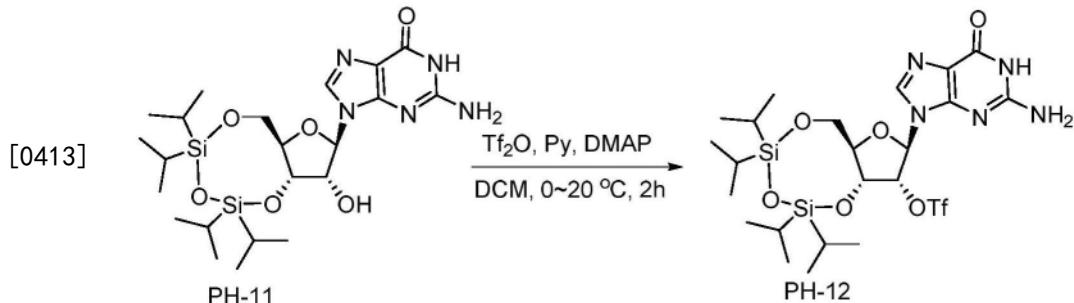


[0408]

[0409] PH-11的制备

[0411] 具有氮惰性气氛下,向2-氨基-9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-二羟基-5-(羟甲基)氧杂环戊烷-2-基]-6,9-二氢-1H-嘌呤-6-酮(700g,2.47mol,1.00当量)于N,N-二甲基甲酰胺(7L)中的溶液添加咪唑(504g,7.41mol,3.00当量)。这之后,在20℃,随着搅拌滴加1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷(770g,2.44mol,1.00当量)。在20℃下持续搅拌所得溶液16小时。然后将反应溶液倾注到70L的水/冰中。通过过滤收集固体。这获得1200g(92%)为白色固体的PH-11。MS m/z [M+H]⁺ (ESI) : 526。

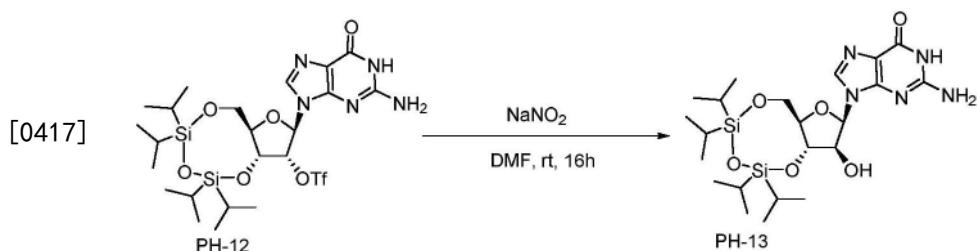
[0412] PH-12的制备



[0414] 具有氮惰性气氛下,依次向PH-11(530g,1.01mol,1.00当量)于二氯甲烷(5000mL)中的溶液添加吡啶(725g,9.17mol,9.00当量)和4-二甲氨基吡啶(147g,1.20mol,1.20当量)。这之后在0℃,随着搅拌,滴加三氟甲磺酸酐(426g,1.51mol,1.20当量)。在0℃下持续搅拌所得溶液15分钟。然后使所得的溶液在20℃随着搅拌反应附加的2小时。用5000mL二氯甲烷稀释所得的溶液。分别用 $2 \times 3000\text{mL}$ 的饱和碳酸氢钠和 $1 \times 3000\text{mL}$ 的饱和氯化钠洗涤所得的溶液。将该溶液置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。这获得600g(90%)为棕色固体的PH-12。

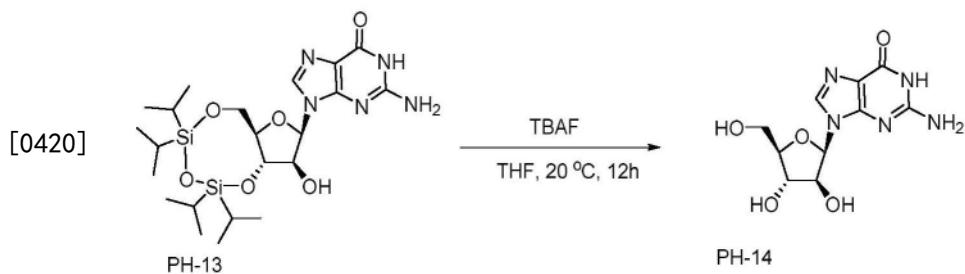
[0415] 将产物直接用于下一步骤而无需进一步纯化。

[0416] PH-13的制备



[0418] 具有氮惰性气氛下,向PH-12(200g,304.04mmol,1.00当量)于N,N-二甲基甲酰胺(1000mL)中的溶液添加亚硝酸钠(115g,1.67mol,5.00当量)。在25℃下持续搅拌所得的混合物16小时。将所得的溶液倾注到5000ml的水/冰中。通过过滤收集固体。从以1/4(50ml/g)的比率的二氯甲烷/乙腈中重结晶该粗产物。这获得78g(49%经过最后两步)为固体的PH-13。MS m/z [M+H]⁺(ESI):526。

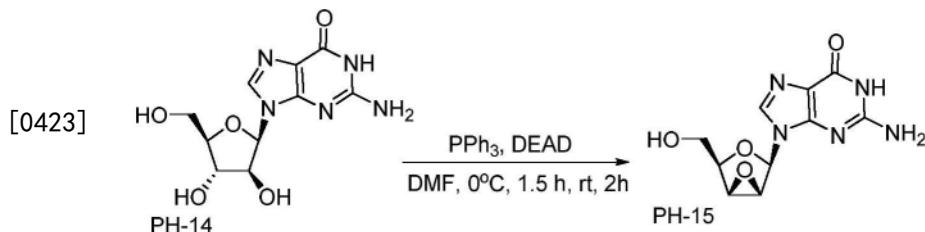
[0419] PH-14的制备



[0421] 具有氮惰性气氛下,向PH-13(50g,95.10mmol,1.00当量)于四氢呋喃(500mL)中的溶液添加四丁基氟化铵(95mL,1.00当量,1N于四氢呋喃中)。在20℃下持续搅拌所得的混合物12小时。减压浓缩所得混合物。从以1/5(20ml/g)的比率的甲醇/乙酸乙酯中重结晶该粗品三次。通过过滤收集固体,然后通过快速色谱纯化,具有下列条件:柱,C18硅胶;流动相,

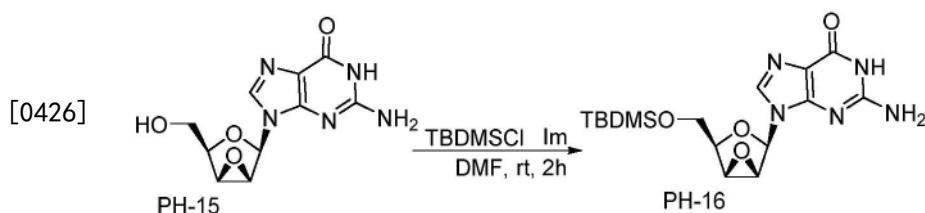
水和乙腈(2%乙腈,最多至10%,10分钟内);检测器,UV 254nm。这获得16g(59%)为棕色固体的PH-14。¹H-NMR(DMSO-d₆,400MHz):10.44(s,1H),6.49(s,2H),6.02(s,1H),5.55-5.65(m,2H),5.10(s,1H),4.08(m,2H),3.76(m,1H),3.64(m,1H)。

[0422] PH-15的制备



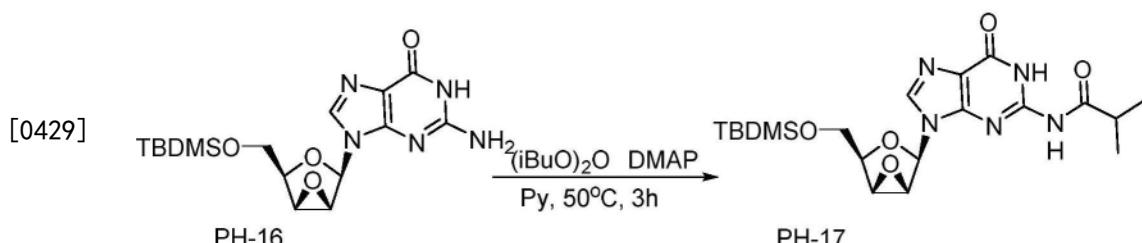
[0424] 具有氮惰性气氛下,向PH-14(220g,776.72mmol,1.00当量)于N,N-二甲基甲酰胺(2000mL)中的溶液添加三苯基膦(509g,1.94mol,2.50当量)。在0℃下持续搅拌所得溶液1.5小时。在0℃,随着搅拌向这滴加偶氮二甲酸二乙酯(338g,1.94mol,2.50当量)。在室温下持续搅拌所得溶液2小时。将所得的混合物倾注到20L冷的乙醚中。通过过滤收集固体,然后以1/10(10ml/g)的比率从甲醇/乙酸乙酯中重结晶。这获得100g(49%)为棕色固体的PH-15。MS m/z [M+H]⁺(ESI):266。

[0425] PH-16的制备



[0427] 具有氮惰性气氛下,向PH-15(100g,377.0mmol,1.00当量)于N,N-二甲基甲酰胺(1000mL)中的溶液添加咪唑(77g,1.131mol,3.00当量)。这之后,在0℃,随着搅拌添加叔丁基二甲基氯硅烷(142g,942mmol,1.50当量)。在室温下将所得溶液搅拌2小时。随后通过添加甲醇来淬灭该反应。减压浓缩所得混合物。将残余物施加到硅胶柱上,用二氯甲烷/甲醇(100:1~15:1)洗脱。这获得80g(85%)为固体的PH-16。MS m/z [M+H]⁺(ESI):380。

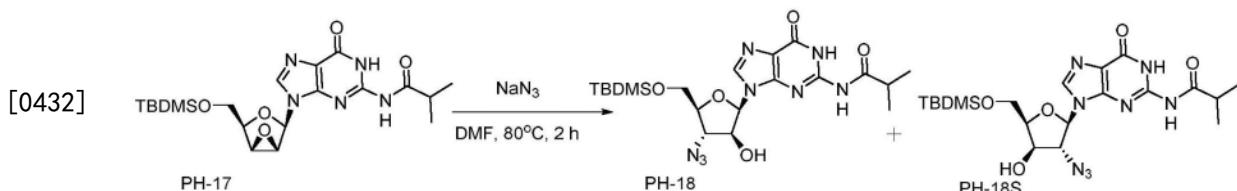
[0428] PH-17的制备



[0430] 具有氮惰性气氛下,向PH-16(73g,192.37mmol,1.00当量)于吡啶(730mL)中的溶液添加4-二甲氨基吡啶(23.5g,192.35mmol,0.50当量)。这之后,随着搅拌滴加异丁酸酐(213g,1.35mol,5.00当量)。在50℃下持续搅拌所得溶液3小时。随后通过添加冰水来淬灭该反应。使用3×2000mL二氯甲烷萃取所得的溶液,并合并有机层。分别用3×2000mL的饱和碳酸氢钠和3×2000mL的水和3×2000mL的饱和氯化钠洗涤所得的混合物。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。将残余物施加到硅胶柱上,用二氯甲烷/甲醇

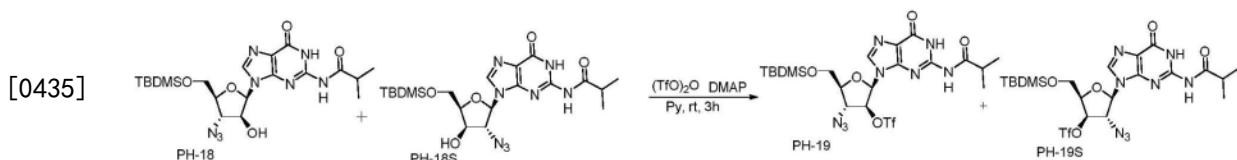
(100:1 ~ 20:1) 洗脱。这获得52g (60%) 为黄色固体的PH-17。MS $m/z [M+H]^+$ (ESI) : 450。

[0431] PH-18的制备



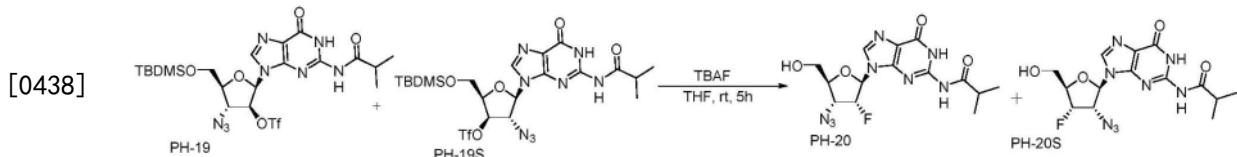
[0433] 具有氮惰性气氛下,向PH-17 (20g, 44.4mmol, 1.00当量)于N,N-二甲基甲酰胺 (100mL) 中的溶液添加叠氮化钠 (18g, 267mmol, 6.00当量)。在80℃下持续搅拌所得溶液2小时。用1000mL二氯甲烷稀释所得的混合物。分别用3×1000mL的饱和碳酸氢钠和3×1000mL的水和3×1000mL的饱和氯化钠洗涤所得的溶液。用无水硫酸钠干燥该溶液并减压浓缩。将残余物施用到具有二氯甲烷/甲醇 (100/1 ~ 40/1) 的硅胶柱上。这获得11g (50%) 的为黄色固体的PH-18/PH-18S (5.2:1)。MS $m/z [M+H]^+$ (ESI) : 493

[0434] PH-19的制备



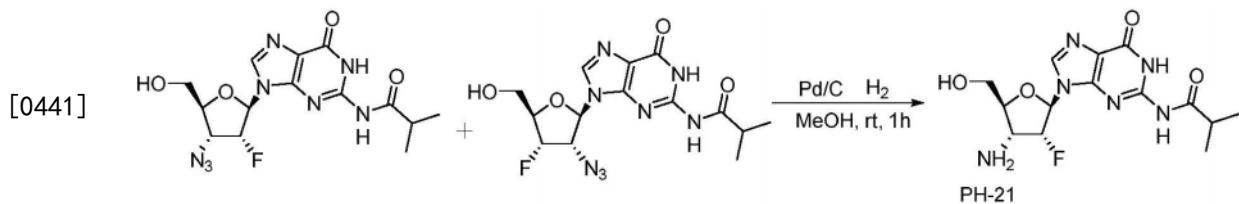
[0436] 具有氮惰性气氛下,向PH-18/PH-18S (5.2:1) (16g, 37.87mmol, 1.00当量)于二氯甲烷 (160mL) 中的溶液添加吡啶 (23g, 290.77mmol, 9.00当量) 和二甲氨基吡啶 (4.35g, 35.66mmol, 1.20当量)。这之后在0℃,随着搅拌滴加1,3-双(三氟甲基磺酰基)过三氧化氢 (11.9g, 37.88mmol, 1.20当量)。在20℃下持续搅拌所得溶液2小时。通过添加水/冰来淬灭该反应。使用2×1000mL二氯甲烷萃取所得的混合物,并合并有机层。用1×1000mL饱和氯化钠洗涤所得溶液。减压浓缩所得溶液。这获得16g (68%) 为棕色固体的PH-19/PH-19S。将产物直接用于下一步骤而无需进一步纯化。

[0437] PH-20的制备



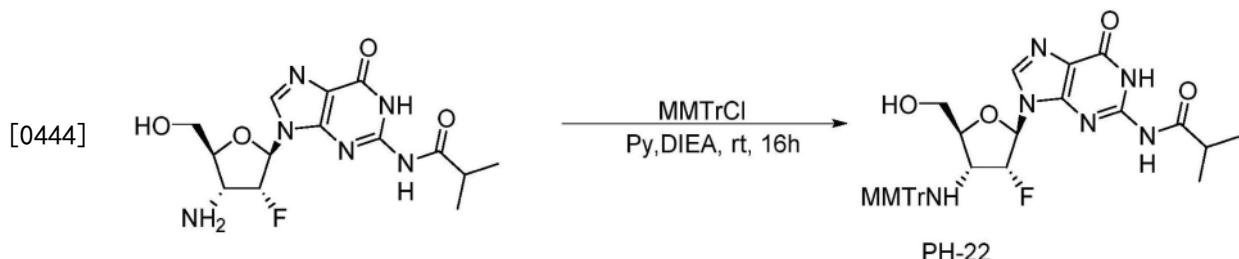
[0439] 在0℃,具有氮惰性气氛下,随着搅拌向PH-19/PH-19S (16g, 25.61mmol, 1.00当量)于四氢呋喃 (160mL) 中的溶液滴加四丁基氟化铵 (100mL, 5.00当量)。在室温下持续搅拌所得溶液5小时。用1000mL二氯甲烷稀释所得的溶液。分别用1×500mL水和1×500mL饱和氯化钠洗涤所得的溶液。减压浓缩所得溶液。将残余物施加到硅胶柱上,用二氯甲烷/甲醇 (100/1 ~ 20/1) 洗脱。这获得8g (85%) 黄色固体的PH-20/PH-20S (7:1)。MS $m/z [M+H]^+$ (ESI) : 381。

[0440] PH-21的制备



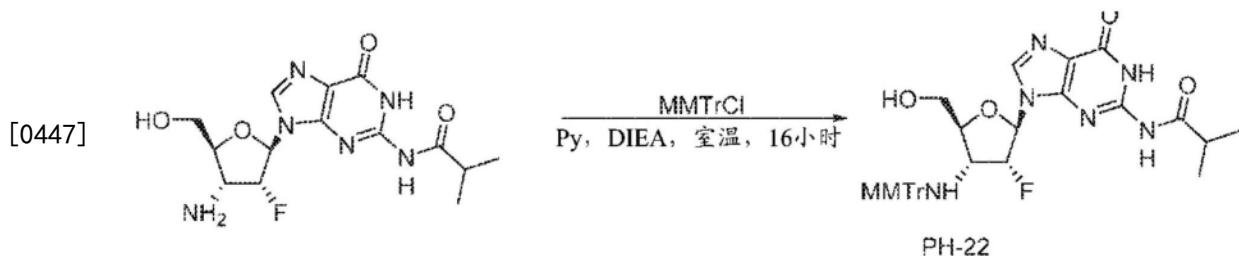
[0442] 向PH-20/PH-20S (3.4g, 8.94mmol, 1.00当量)于甲醇(50mL)中的溶液添加10%钯碳(1.7g)。抽空烧瓶，并用氮气吹扫三次，之后用氢气吹扫。在室温下将所得溶液搅拌1h。用100mL甲醇稀释所得的溶液。滤出固体。减压浓缩所得溶液。用以下条件通过用快速制备型-HPLC纯化粗产物：柱，C18硅胶；流动相，水和乙腈(5%乙腈，最多至50%，35分钟内)；检测器，UV 254nm。这获得1.7g(54%)为白色固体的PH-21。¹H-NMR(DMSO-d₆, 400MHz) : 12.13(s, 1H), 11.91(s, 1H), 8.91(s, 2H), 8.23(s, 2H), 7.25(m, 1H), 5.78(m, 1H), 4.62-3.72(m, 4H), 2.92(m, 1H), 1.13(s, 6H)。

[0443] PH-22的制备



[0445] 具有氮惰性气氛下，向PH-21 (6.0g, 16.95mmol, 1.00当量)于吡啶/N,N-二异丙基乙胺(100/20mL)中的溶液添加1-(氯化二苯基甲基)-4-甲氧基苯(6.24g, 20.34mmol, 1.20当量)。在室温下持续搅拌所得溶液16小时。用1000mL二氯甲烷稀释所得的溶液。分别用1×250mL的饱和碳酸氢钠和1×250mL的水和1×250mL的饱和氯化钠洗涤所得的溶液。将残余物施加到硅胶柱上，用二氯甲烷/甲醇(100/1~50/1)洗脱。这获得13g(74%)为白色固体的PH-22。¹H-NMR(DMSO-d₆, 400MHz) : 12.15(s, 1H), 11.70(s, 1H), 8.14(s, 1H), 7.49(m, 4H), 7.24(m, 6H), 7.15(m, 2H), 6.72(m, 2H), 5.82(m, 1H), 5.30(m, 1H), 4.04(m, 3H), 3.62(s, 3H), 3.45(m, 1H), 2.83-2.62(m, 3H), 1.10(m, 6H)。

[0446] PH-23的制备

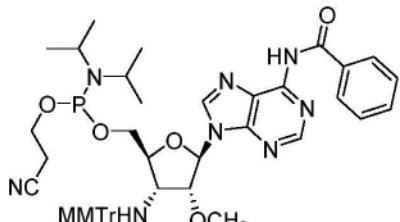


[0448] 具有氮惰性气氛下，向PH-22(7.8g, 12.45mmol, 1.00当量)于二氯甲烷(80mL)中的溶液依次添加3-双[双(丙-2-基)氨基]磷烷氧基丙腈(7.5g, 24.92mmol, 2.00当量)和4,5-二氰基咪唑(2.2g, 18.63mmol, 1.50当量)。在室温下将所得溶液搅拌2小时。用1000mL二氯甲烷稀释所得的混合物。分别用3×250mL的饱和碳酸氢钠和3×250mL的水和3×250mL的饱和氯化钠洗涤所得的溶液。减压浓缩所得溶液。用以下条件通过用快速制备型-HPLC纯化粗产物：柱，C18硅胶；流动相，水和乙腈(40%乙腈，最多至95%，35分钟内)；检测器，UV

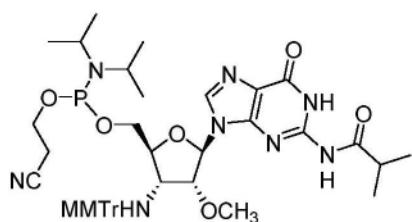
254nm。这获得8.06g(78%)为白色固体的PH-23。MS m/z [M+H]⁺(ESI) : 827。

[0449] 用于低聚物合成的2'-F-3'-NHTr构建块

[0450] 如下所示的6-N-苯甲酰基腺苷(A^{Bz})、4-N-苄基胞嘧啶核苷(C^{Bz})、2-N-异丁酰基鸟嘌呤核苷(G^{iBu})和尿嘧啶核苷(U)的2'-O-Me3'-NH-MMTr-5'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺单体使用描述于WO 200118015 A1中的方法合成

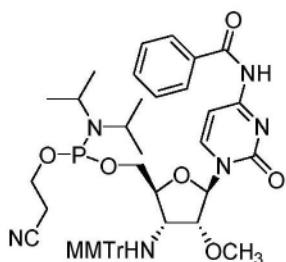


3'-NHMMTr-2'-O-Me A (Bz)

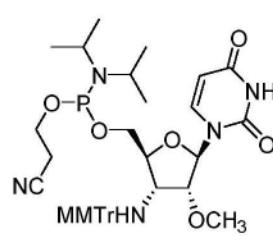


3'-NHMMTr-2'-O-Me-G(iBu)

[0451]



3'-NHMMTr-2'-O-Me-C(Bz)



3'-NHMMTr-2'-OMe U:

[0452] 用于低聚物合成的2'-O-Me-3'-NHTr构建块

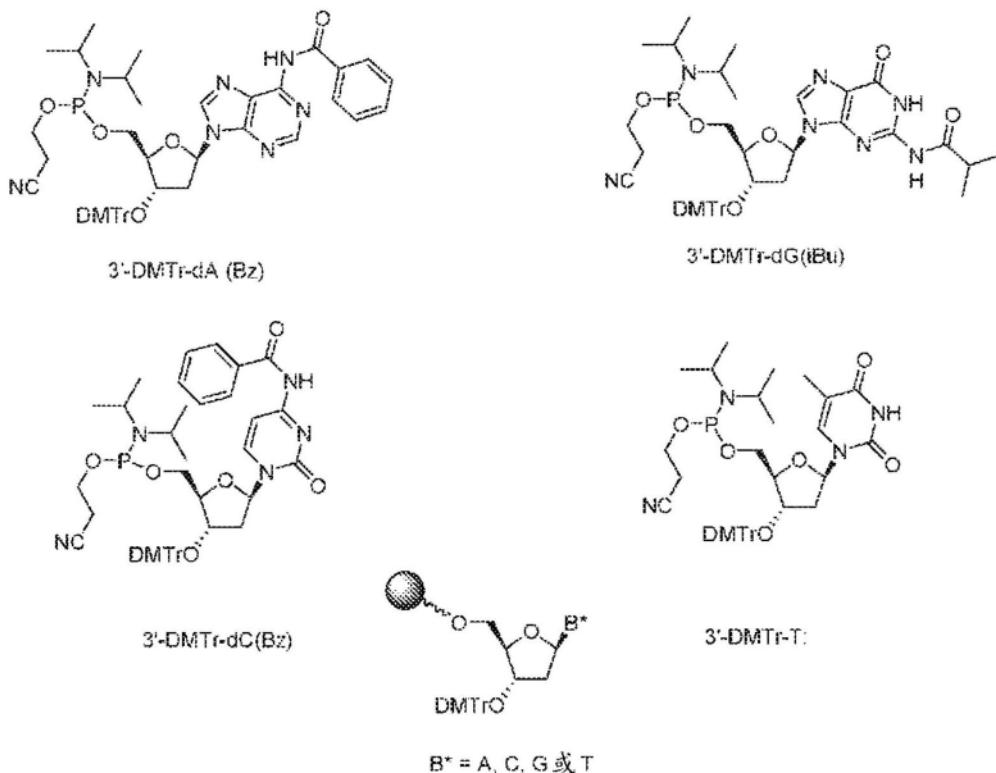
[0453] 示例性的磷酸酰胺化物包括：

[0454]

原材料描述
3'-NHTr-dA (Bz)
3'-NHTr-dC (Bz)
3'-NHTr-dG (iBu)
3'-NHTr-T:
3'-NHMMTr-2'-F-A (NH-Bz)
3'-NHMMTr-2'-F-C (NH-Bz)
3'-NHMMTr-2'-F-G (NH-iBu)
3'-NHMMTr-2'-F-U:
3'-NHMMTr-2'-OMe-A (NH-Bz)
3'-NHMMTr-2'-OMe-C (NH-Bz)
3'-NHMMTr-2'-OMe-G (NH-iBu)
3'-NHMMTr-2'-OMe U:
3'-NHTr (dA, dC, dG 和 dT) -CPG 500Å: 填充: 64-83μmol/g

[0455] 该反向亚磷酰胺3'-O-DMT-脱氧腺苷(NH-Bz)、5'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺、3'-O-DMT-脱氧鸟嘌呤核苷(Guanosine) (NH-ibu)、5'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺、3'-O-DMT-脱氧胞嘧啶(NH-Bz)、5'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺、3' -

0-DMT-脱氧胸腺嘧啶核苷 (NH-Bz)、5' -O- (2-氰乙基-N,N-二异丙基亚磷酰胺和反向固体载体购自商业来源 (Chemgenes)。



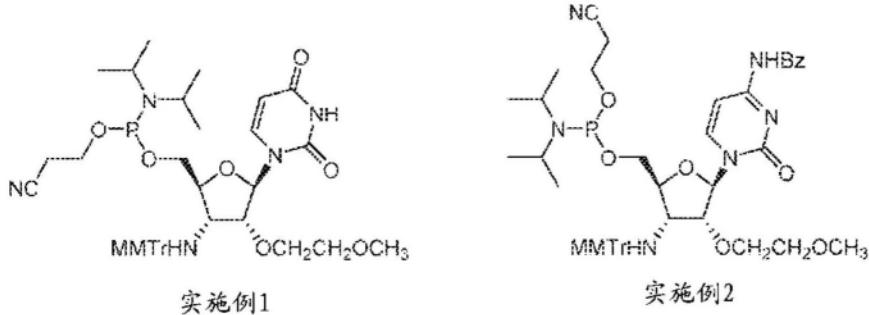
[0457] 用于低聚物合成的反向DNA构建块

[0458] 用于本公开的示例性反向亚磷酰胺 (phosphoroamidites) 包括：

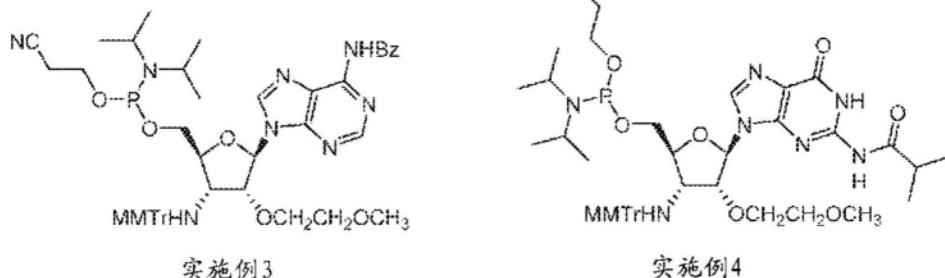
原材料描述	
3'-O-DMTr-2'-OMe-A (NH-Bz)	
3'-O-DMTr-2'-OMe-C (NH-Bz)	
3'-O-DMTr-2'-OMe-G (NH-iBu)	
3'-O-DMTr-2'-OMe-U:	
3'-ODMTr (dA, dC, dG 和 dT)-CPG 500Å:	
填充：64-83μmol/g	

[0460] 用于制备具有下列修饰的低聚物：2' -F-NPS-PS-2' -F-NPS; 2' -F-NP-PS-2' -F-NP; 2' -OMe-NP-PS-2' -OMe-NP; 2' -OMe-NPS-DNA-PS-2' -OMe-NPS, 该合成以1μM规模, 在5' 至3' 方向实施, 具有5' - 亚磷酰胺单体在无水CH₃CN中被稀释成0.1M的浓度, 在5- (苯硫基) -1H-四唑活化剂的存在下(偶合时间2.0-4.0分钟), 变成固体键合的寡核苷酸, 之后进行标准的封端、氧化和脱保护, 从而提供经修饰的寡核苷酸。所有经修饰的亚磷酰胺的逐步偶合效率超过98%。将DDTT(二甲基氨基亚甲基)氨基-3H-1,2,4-dithiazaoline-3-硫酮用作硫转移剂, 用于合成硫代磷酸寡核糖核苷酸。在室温, 在摇动器上将承载寡核苷酸的固体载体与氨水/甲胺(1:1)溶液一起加热3小时以从载体上裂解并脱保护所述碱基不稳定保护基团。

[0461] 实施例1-4



[0462]

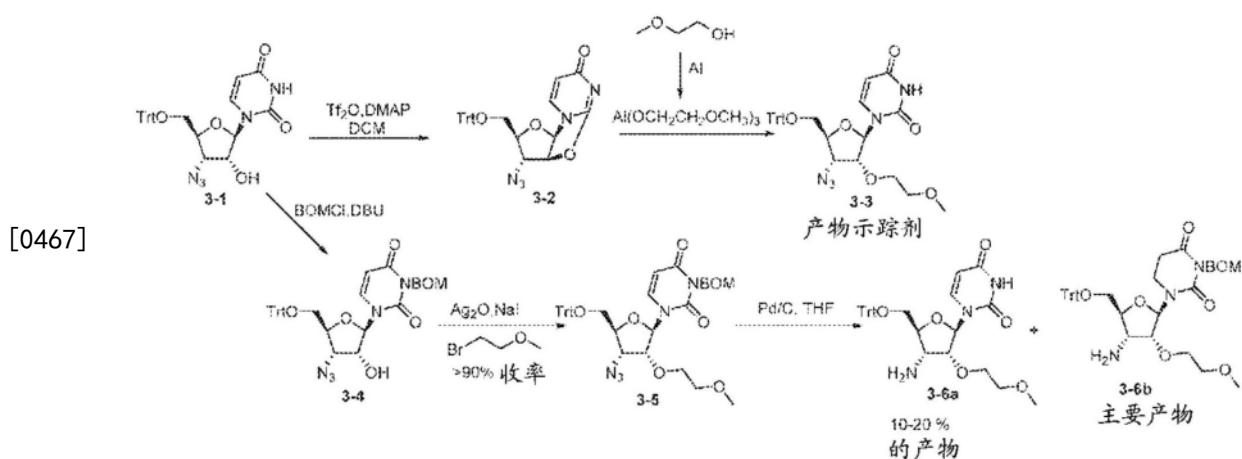


[0463] 适当保护的2'-0-甲氧基乙基-3'-氨基核苷-5'-亚磷酰胺构建块(遵循在方案1-4中所示的化学转变制备实施例1-4)。

[0464] 首先合成尿嘧啶基的3'-NH-MMTr-2'-0-甲氧基乙基亚磷酰胺实施例5,如方案1所示,经由酐中间体2,以低收率获得关键的3'-叠氮-2'-甲氧基乙基中间体3。

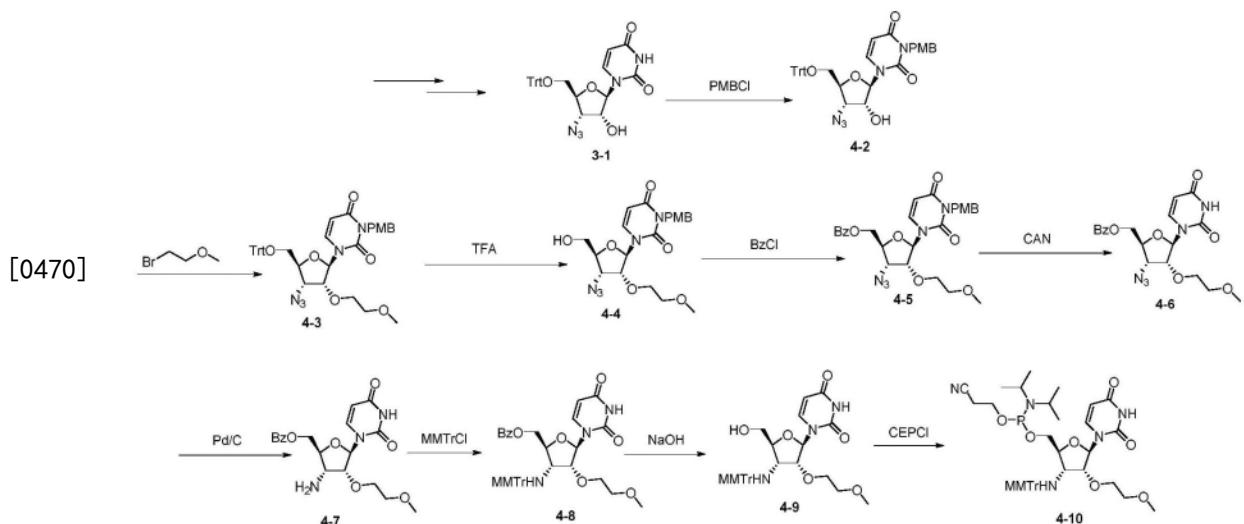
[0465] 由于低收率烷化反应,3-1与BOMCl/DBU反应以给出N-3保护的中间体3-4,其通过使用2-溴乙基甲基醚/Ag₂O/NaI/DMF烷基化以给出2'-0-甲氧基乙基衍生物3-5,如在以下方案1中所示。使用氢化条件(Pd/C/H₂)的N-3-BOM基团的脱保护导致10-20%期望的3'-氨基中间体3-6a,连同显著过还原的副产物3-6b。

[0466] 方案1



[0468] 如下在方案2中所示,以高收率获得2'-0-烷基化。为此,用PMBCl/DBU/DMF处理3-1以给出N-3保护的中间体4-2,其使用2-溴乙基甲基醚/Ag₂O/NaI/DMF经受2'-0烷基化作用以给出2'-0-甲氧基乙基衍生物4-3。然后,使用苯甲酰氯的4-3的5'-脱三苯甲基和5'-羟基基团的再保护提供4-5。

[0469] 方案2



[0471] 中间体4-5的PMB基团以温和的条件脱保护给出4-6。将中间体4-6的3' -叠氮基团还原成胺,然后将其立即保护,诸如与4-一甲氧基三苯基氯甲烷反应以给出4-8。然后使用碱性溶液,将5' -苄基酯裂解,之后使用已知的规程进行磷酸化以给出期望的2' -O-甲氧基乙氧基尿嘧啶核苷亚磷酸酰胺单体4-10。

[0472] (4-2)的制备:向3-1(45.30g, 88.56mmol)于DMF(120.00mL)中的溶液添加PMBCl(20.80g, 132.84mmol)和DBU(44.61g, 177.12mmol),在室温持续搅拌该混合物2小时。添加水,用EA萃取。浓缩有机层并通过色谱柱纯化以给出为白色固体的4-2(52.00g, 82.32mmol)。ESI-LCMS:m/z 632.3[M+H]⁺。

[0473] (4-3)的制备:向4-2(50.00g, 79.15mmol)于DMF(120.00mL)中的溶液添加2-溴乙基甲基醚(16.50g, 118.73mmol)和Ag₂O(18.34g, 79.15mmol, 2.57mL),然后添加NaI(5.93g, 39.58mmol)。将反应混合物在室温下持续搅拌12小时,LC-MS显示极为奏效。过滤并添加水和EA,浓缩有机层并通过色谱柱纯化以给出为无色油的4-3(52.00g, 75.39mmol)。ESI-LCMS:m/z 690.4[M+H]⁺。

[0474] 制备(4-4):向4-3(52.00g, 75.39mmol)于DCM(200.00mL)中的溶液中添加TFA(150.00mL)。在室温下持续搅拌该混合物1小时。将该反应混合物缓慢添加到冷的NH₄OH中,用DCM萃取。浓缩有机层并纯化以给出为无色油的4-4(31.00g, 69.28mmol)。ESI-LCMS:m/z 448.2[M+H]⁺。¹H-NMR(DMSO-d₆, 400Mhz):δppm8.02(d, J=8.12Hz, 1H), 7.26-7.23(m, 2H), 6.87-6.84(m, 2H), 5.87-5.81(m, 2H), 5.38(t, J=5.0Hz, 1H), 4.96-4.85(m, 2H), 4.36-4.34(m, 1H), 4.17-4.14(m, 1H), 4.00-3.97(m, 1H), 3.83-3.77(m, 1H), 3.75-3.72(m, 1H), 3.71(s, 3H), 3.70-3.68(m, 1H), 3.61-3.56(m, 1H), 3.45-3.43(m, 2H), 3.18(s, 3H)。

[0475] (4-5)的制备:向4-4(31.00g, 69.28mmol)于吡啶(200.00mL)中的溶液添加BzCl(13.14g, 93.87mmol),在室温持续搅拌该反应混合物15分钟,并浓缩,并通过色谱柱纯化以给出为白色固体的4-5(35.10g, 63.8mmol)。ESI-LCMS:m/z 552.2[M+H]⁺。

[0476] (4-6)的制备:向4-5(35.10g, 63.8mmol)于乙腈(300.00mL)和水(100.00mL)中的溶液添加硝酸铈铵(105g, 191.40mmol),在室温下持续搅拌该反应混合物12小时,并浓缩,并EA萃取。浓缩有机层,并通过色谱柱纯化以给出为黄色固体的4-6(27.5g, 63.75mmol)。ESI-LCMS:m/z 432.2[M+H]⁺。

[0477] (4-7)的制备:向4-6(27.50g, 63.75mmol)于THF(500.00mL)中的溶液添加Pd/C

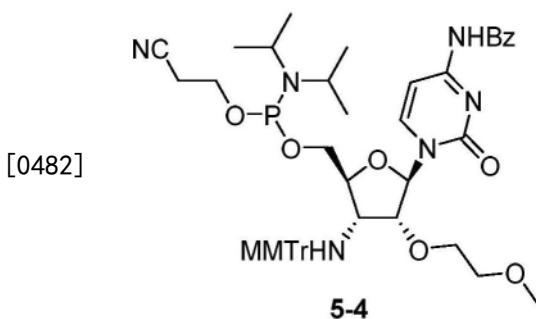
(3.00g),在室温下持续搅拌该反应混合物12小时,并过滤,并浓缩以给出为黄色固体的4-7(25.00g,61.67mmol)。ESI-LCMS:m/z 406.2[M+H]⁺。

[0478] (4-8)的制备:向4-7(25.00g,61.67mmol)于DCM(300.00mL)中的溶液添加MMTrCl(28.49g,92.51mmol)和可力丁(14.95g,123.34mmol),然后添加AgNO₃(15.7g,92.5mmol)。在室温下持续搅拌该反应混合物1小时,并过滤,并且用水洗涤有机层,置于Na₂SO₄上方干燥,并通过硅胶柱纯化以给出为黄色固体的4-8(33.00g,48.69mmol)。

[0479] (4-9)的制备:向4-8(14.50g,21.39mmol)的溶液添加于甲醇(200mL)于水(20mL)中的1NNaOH,在室温下持续搅拌该反应混合物1小时,并浓缩,并用DCM萃取,浓缩有机层并通过硅胶柱纯化以给出为白色固体的4-9(11.50g,20.05mmol)。¹H-NMR(DMSO-d₆,400MHz):δ ppm 11.26(s,1H),7.95(d,J=8.4Hz,1H),7.47-7.44(m,4H),7.34-7.17(m,8H),6.82(d,J=8.8Hz,2H),5.50-5.48(m,2H),5.13(t,J=3.6Hz,1H),4.05-3.98(m,3H),3.78(s,3H),3.52-3.49(m,1H),3.34-3.32(m,2H),3.14(s,3H),3.08-3.04(m,1H),2.89-2.86(m,1H),2.70(d,J=10.0Hz,1H),1.51(d,J=4.4Hz,1H)。

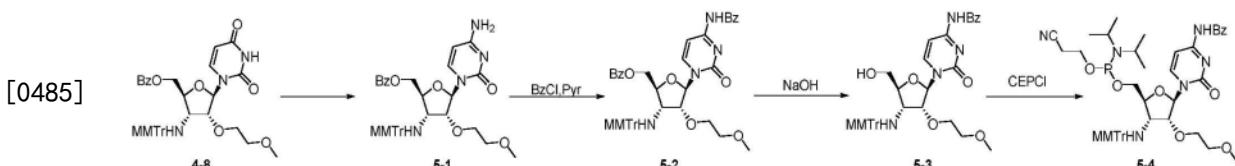
[0480] (4-10)的制备:向4-9(11.50g,20.05mmol)于DCM(100.00mL)中的溶液添加DMAP(489.85mg,4.01mmol)和DIPEA(10.36g,80.19mmol,14.01mL)。然后向该溶液添加CEPC1(5.70g,24.06mmol)。在室温下持续搅拌该混合物30分钟。用饱和NaHCO₃淬灭该反应。用盐水洗涤有机层,置于Na₂SO₄上方干燥、浓缩以给出粗产物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物。将产物溶解于无水甲苯并浓缩三次。然后将产物溶解于无水乙腈并浓缩三次。这获得13g以给出为白色固体的4-10。MS m/z [M-H]⁻(ESI):772.3;¹H-NMR(CDCl₃,400MHz):9.01(s,1H),8.07-7.61(m,1H),7.53-7.41(m,6H),7.29-7.15(m,5H),6.79-6.76(m,2H),5.63-5.57(m,2H),4.27-4.15(m,2H),4.06-3.95(m,1H),3.85-3.77(m,1H),3.75(s,3H),3.69-3.35(m,7H),3.23(d,J=4Hz,1H),2.26-2.91(m,3H),2.59(t,J=6.4Hz,1H),1.75-1.39(m,1H),1.21-1.11(m,12H)。³¹PNMR(162MHz,CDCl₃):149.10,148.26。

[0481] 实施例5



[0483] 通过将尿嘧啶核苷中间体4-8转换成3'-氨基胞嘧啶核苷类似物5-1获得2'-0-甲氧基乙氧基-NH-苯甲酰基-胞嘧啶亚磷酰胺化合物5-4,之后使用已知的规程磷酸化以给出期望的2'-0-甲氧基乙氧基胞嘧啶核苷亚磷酰胺单体5-4,如在以下方案3中所示。

[0484] 方案3



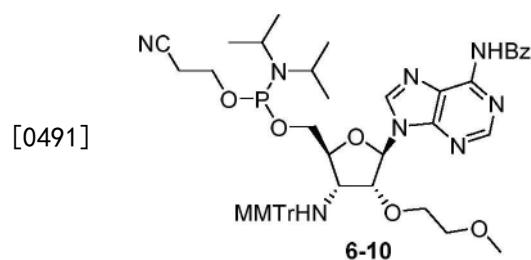
[0486] (5-1) 的制备: 向4-8(18.50g, 27.30mmol)于乙腈(250.00mL)中的溶液添加TPSC1(16.49g, 54.60mmol)和DMAP(6.67g, 54.60mmol), 然后向该溶液添加TEA(5.52g, 54.60mmol, 7.56mL)。在N₂下, 在室温持续搅拌该反应混合物5小时。将NH₄OH(50.00mL)添加到该反应混合物中。在室温持续搅拌该混合物12小时。浓缩混合物并用EA萃取。用盐水洗涤有机层, 并且置于Na₂SO₄上方干燥。浓缩有机层并通过硅胶柱纯化以给出为黄色固体的5-1(16.00g, 23.64mmol)。

[0487] 在0℃, (5-2) 的制备: 向5-1(16.00g, 23.64mmol)于吡啶(100.00mL)中的溶液添加BzCl(4.96g, 35.46mmol)。在室温下持续搅拌该混合物1小时。浓缩溶液并通过硅胶柱纯化以给出为白色固体的5-2(17.40g, 22.28mmol)。

[0488] (5-3) 的制备: 在0℃, 将化合物5-2(17.40g, 22.28mmol)添加至180mL的1N NaOH于吡啶/MeOH/H₂O(65/30/5)中的溶液中。在0℃持续搅拌该悬浮液15分钟。通过添加饱和NH₄Cl溶液淬灭反应混合物。用EA萃取该溶液, 并且用饱和NaHCO₃溶液、盐水洗涤合并的有机层, 置于Na₂SO₄上方干燥、过滤并浓缩。通过色谱柱纯化残余物以给出为白色固体的5-3(12.50g, 18.47mmol)。¹H-NMR(DMSO-d₆, 400MHz): δ ppm 12.25(s, 1H), 8.53(d, J=7.6Hz, 1H), 8.01(d, J=5.2Hz, 2H), 7.64-7.60(m, 1H), 7.52-7.42(m, 6H), 7.31(d, J=8.8Hz, 2H), 7.26-7.14(m, 7H), 6.79(d, J=8.8Hz, 2H), 5.55(s, 1H), 5.23(t, J=3.6Hz, 1H), 4.09-3.97(m, 3H), 3.73(s, 3H), 3.70-3.66(m, 1H), 3.38-3.34(m, 2H), 3.17(s, 3H), 3.11-3.05(m, 1H), 2.96-2.91(m, 1H), 2.68(d, J=10.8Hz, 1H), 1.49(d, J=4Hz, 1H)。

[0489] (5-4) 的制备: 向5-3(12.50g, 18.47mmol)于DCM(100.00mL)中的溶液添加DMAP(451.30mg, 3.69mmol)和DIPEA(9.55g, 73.88mmol, 12.90mL)然后添加CEPC1(5.25g, 22.16mmol)。在室温下持续搅拌该混合物30分钟。用饱和NaHCO₃淬灭该反应。用盐水洗涤有机层, 置于Na₂SO₄上方干燥、浓缩以给出粗产物。通过快速制备型-HPLC纯化粗品。将产物溶解于无水甲苯并浓缩三次。然后将产物溶解于无水乙腈并浓缩三次。这获得13g以给出为白色固体的5-4。MS m/z [M-H]⁻(ESI): 875.4。¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): δ ppm 8.64-8.20(m, 2H), 7.90-7.88(m, 2H), 7.62-7.58(m, 1H), 7.53-7.39(m, 8H), 7.25-7.15(m, 6H), 6.78-6.74(m, 2H), 5.69(d, J=1.72Hz, 1H), 4.37-4.21(m, 2H), 4.10-4.03(m, 1H), 3.90-3.79(m, 2H), 3.75(d, J=1.64Hz, 3H), 3.68-3.52(m, 3H), 3.46-3.42(m, 2H), 3.26(d, J=1.2Hz, 3H), 3.17-2.97(m, 2H), 2.94-2.87(m, 1H), 2.67-2.48(m, 2H), 1.79-1.51(m, 1H), 1.26-1.18(m, 12H)。³¹PNMR(162MHz, CDCl₃): 148.93, 148.03

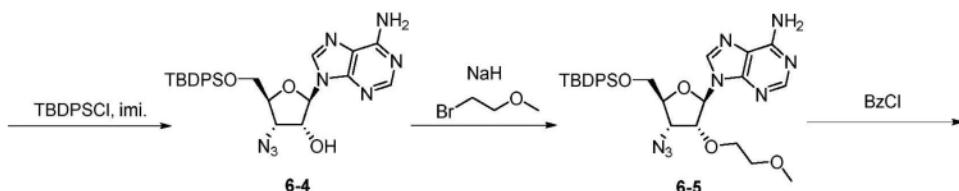
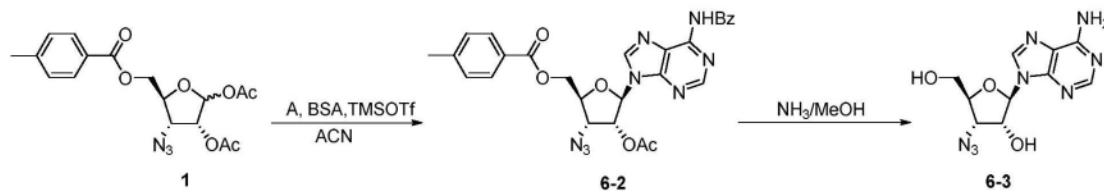
[0490] 实施例6



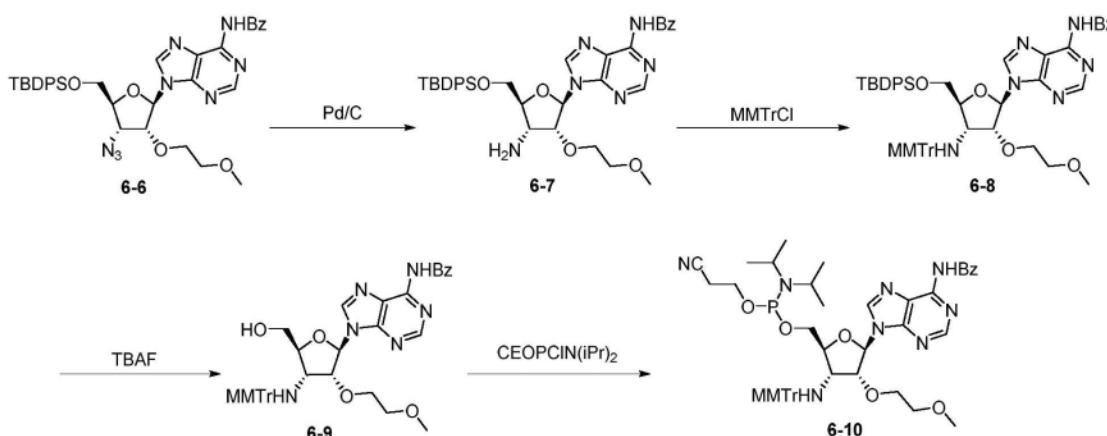
[0492] 如以下方案6所示, 实现2'-0-甲氧基乙基腺苷类似物6-10的合成。在碱性条件下(NH₃/MeOH), 中间体6-2获得二醇6-3, 然后一旦使用TBDPSC1将其5'-羟基基团保护以给出6-4中间体6-4。然后, 使用2-溴乙基甲基醚/NaH/DMF将6-42'-0烷基化以给出2'-0-甲氧基

乙基衍生物6-5,而无需6-4的C-6-环外胺的保护。实现了具有创造性的中间体6-4的2'-OH基团选择性烷基化方式。

[0493] 方案4



[0494]



[0495] 将中间体6-5的3'-叠氮基团还原成胺6-7,然后将其立即保护,诸如与4-一甲氧基三苯基氯甲烷反应以在使用TBAF/THF脱保护5'-OTBDPS基团之后,给出前体6-8。使用已知规程进行磷酸化6-9以给出期望的2'-O-甲氧基乙氧基腺嘌呤-NH-苯甲酰基亚磷酸酰胺单体6-10。

[0496] (6-2)的制备:向化合物1(79.50g,210.68mmol)于干燥ACN(1.20L)中的溶液添加N-(5H-嘌呤-6-基)苯甲酰胺(100.80g,421.36mmol)和BSA(180.07g,884.86mmol)。在50℃持续搅拌所得的悬浮液直至澄清。然后将该混合物冷却至-20℃并通过注射器添加TMSOTF(93.54g,421.36mmol)。然后在N₂下,在70℃持续搅拌该混合物72小时,并用饱和NaHCO₃淬灭,并用DCM萃取。将有机层置于Na₂SO₄上方干燥,然后蒸发溶剂,并且残余物在硅胶上纯化以提供为黄色固体的化合物6-2(107.50g,192.26mmol,91.26%收率)。¹H-NMR(400MHz,DMSO):δ=11.28(s,1H),8.64(d,J=6.4Hz,2H),8.05(d,J=8.0Hz,2H),7.84(d,J=8.0Hz,2H),7.66(t,J=7.6Hz,1H),7.56(t,J=8.0Hz,2H),7.33(d,J=8.0Hz,2H),6.37(d,J=3.6Hz,1H),6.17(dd,J=6.0Hz,1H),5.09(t,J=6.8Hz,1H),4.69-4.56(m,2H),4.40-4.38(m,1H),2.39(s,3H),2.17(s,3H)。ESI-LCMS:m/z 557.2[M+H]⁺。

[0497] (6-3)的制备:将化合物6-2(107.50g,192.26mmol)溶解于33重量%的甲胺于乙醇(600.00mL)中的溶液,然后在20℃持续搅拌该混合物16小时,然后蒸发溶剂,用石油醚中的50%EtOAc(1.5L)洗涤、过滤以提供为略微黄色固体的化合物6-3(52.50g,179.64mmol,

93.44%收率)。ESI-LCMS: m/z 293.1[M+H]⁺。

[0498] (6-4)的制备:在20℃持续搅拌化合物6-3(52.50g,179.64mmol)、咪唑(18.32g,269.46mmol)和TBDPS-C1(54.34g,197.60mmol)于吡啶(500.00mL)中的溶液2小时,LC-MS显示6-3被消耗。用MeOH(30mL)淬灭,浓缩以给出粗产物,其在硅胶上纯化以提供为白色固体的化合物6-4(72.60g,136.81mmol,76.16%收率)。¹H-NMR(400MHz,DMSO): δ =8.29(s,1H),8.10(s,1H),7.63-7.59(m,4H),7.48-7.33(m,8H),6.36(d,J=5.6Hz,1H),5.97(d,J=4.4Hz,1H),5.10-5.06(m,1H),4.47(t,J=5.6Hz,1H),4.14-4.11(m,1H),3.94(dd,J=11.2Hz,1H),3.83(dd,J=11.6Hz,1H),0.99(s,9H)。ESI-LCMS: m/z 531.3[M+H]⁺。

[0499] (6-5)的制备:6-4(35.00g,65.96mmol)和1-溴-2-甲氧基乙烷(18.33g,131.91mmol)于干燥的DMF(400.00mL)中的溶液添加NaI(19.77g,131.91mmol)和Ag₂O(15.29g,65.96mmol),在室温下持续搅拌该混合物5小时。然后将反应倾注到冰水中,用EA萃取,用盐水洗涤并置于无水Na₂SO₄上方干燥。蒸发溶剂,并且将残余物在硅胶上纯化以给出为白色固体的6-5(23.70g,40.26mmol,61.04%收率)和为白色固体的TBDPS丢失的副产物(5.20g,9.81mmol,14.87%收率)。¹H-NMR(400MHz,DMSO): δ =8.31(s,1H),8.11(s,1H),7.63-7.60(m,4H),7.47-7.44(m,2H),7.40-7.36(m,6H),6.10(d,J=4.4Hz,1H),5.02(t,J=4.8Hz,1H),4.69(t,J=5.6Hz,1H),4.18-4.14(m,1H),3.95(dd,J=11.6Hz,1H),3.84(dd,J=11.6Hz,1H),3.78-3.75(m,2H),3.45(t,J=4.8Hz,1H),3.16(s,3H),0.99(s,9H)。ESI-LCMS: m/z 589.5[M+H]⁺。

[0500] (6-6)的制备:在0℃,向6-5(31.23g,53.04mmol)于吡啶(300.00mL)中的溶液滴加BzCl(11.22g,79.56mmol)。在室温下持续搅拌该混合物2小时。然后将该溶液冷却至0℃,并添加氢氧化铵(20mL,30%),并使该混合物温热至室温,然后蒸发溶剂,添加300mLH₂O和600mLEA以分离该溶液,用EA萃取水相,合并有机相并用盐水洗涤,置于无水Na₂SO₄上方干燥,移除溶剂,并且在硅胶上纯化该残余物以给出为白色固体的6-6(28.70g,41.42mmol,78.09%收率)。ESI-LCMS: m/z 693.4[M+H]⁺。

[0501] (6-7)的制备:在H₂下,将Pd/C(3.00g)和MeOH(150.00mL)添加到6-6(28.70g,41.42mmol)于EA(150.00mL)中的溶液中。在室温下持续搅拌该混合物5小时。然后过滤该反应,并浓缩滤液以给出为灰色固体的6-7(25.49g,38.22mmol,92.27%收率)。ESI-LCMS: m/z 667.3[M+H]⁺。

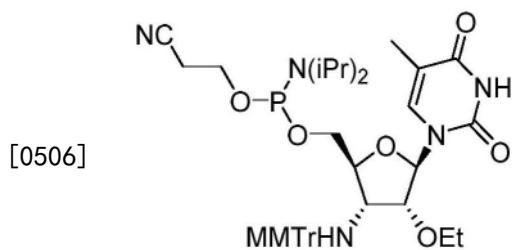
[0502] (6-8)的制备:向6-7(25.49g,38.22mmol)和AgNO₃(12.98g,76.44mmol)于DCM(300.00mL)中的溶液添加可力丁(13.89g,114.66mmol)和MMTrCl(19.43g,57.33mmol),在室温下持续搅拌该混合物2小时。然后将反应倾注到冰水上,用DCM萃取有机层,用盐水洗涤,并置于无水Na₂SO₄上方干燥,移除溶剂并且在硅胶上纯化残余物以给出为灰色固体的6-8(32.79g,34.92mmol,91.36%收率)。

[0503] (6-9)的制备:将TBAF(1M,35.00mL)添加至6-8(32.79g,34.92mmol)于THF(300.00mL)中的溶液,在室温下持续搅拌该混合物15小时。然后移除溶剂,并在具有EA的硅胶上纯化残余物以给出为白色固体的6-9(22.22g,31.71mmol,90.82%收率)。¹H-NMR(400MHz,CDCl₃): δ =8.68(s,1H),8.32(s,1H),8.04(d,J=7.2Hz,2H),7.61-7.57(m,1H),7.53-7.48(m,6H),7.40(d,J=8.8Hz,2H),7.21-7.12(m,6H),6.73(d,J=8.8Hz,2H),6.09(d,J=2.4Hz,2H),4.08-4.02(m,2H),3.93-3.87(m,1H),3.72(s,3H),3.58-3.53(m,1H),

3.43-3.39 (m, 3H) , 3.24-3.19 (m, 4H) , 2.19 (br, 1H)。

[0504] (6-10) 的制备: 在 Ar 中, 向 6-9 (14.00g, 19.98mmol)、DMAP (488.19mg, 4.00mmol) 和 DIPEA (6.46g, 49.95mmol, 8.73mL) 于干燥的 DCM (100.00mL) 中的溶液滴加 CEPC1 (5.68g, 23.98mmol)。在室温下持续搅拌该混合物 1 小时。然后用 10% NaHCO₃ (水溶液) 和盐水洗涤, 置于 Na₂SO₄ 上方干燥, 移除溶剂并且通过具有 PE/EA 混合物的 c.c 纯化残余物, 并浓缩以给出粗产物。通过快速制备型-HPLC 纯化该粗产物 (10g, 溶解于 10mL 的 ACN 中), 以获得为白色固体的 6-10 (12.60g, 13.98mmol, 69.99% 收率)。然后将产物溶解于干燥的甲苯中 (15mL), 并浓缩三次, 并用干燥的 ACN 浓缩三次。¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) : δ = 9.12 (d, J = 46.8Hz, 1H) , δ = 8.71 (d, J = 11.6Hz, 1H) , 8.50 (s, 0.6H) , 8.22 (s, 0.4H) , 8.04 (t, J = 7.2Hz, 2H) , 7.63-7.59 (m, 1H) , 7.55-7.46 (m, 6H) , 7.40-7.37 (m, 2H) , 7.19-7.06 (m, 6H) , 6.69 (dd, J = 8.8Hz, 2H) , 6.03 (d, J = 3.2Hz, 1H) , 4.36-4.24 (m, 2H) , 3.92-3.78 (m, 2H) , 3.71 (d, J = 11.6Hz, 3H) , 3.67-3.33 (m, 7H) , 3.29 (d, J = 11.2Hz, 3H) , 3.17-3.10 (m, 1H) , 2.88 (dd, J = 27.2Hz, 1H) , 2.65-2.50 (m, 2H) , 2.38 (d, J = 4.4Hz, 0.4H) , 1.80 (d, J = 4.0Hz, 0.6H) , 1.23-1.15 (m, 12H)。³¹P-NMR (400MHz, CDCl₃) : 148.86, 148.22。ESI-LCMS: m/z 901.3 [M+H]⁺。

[0505] 实施例 7

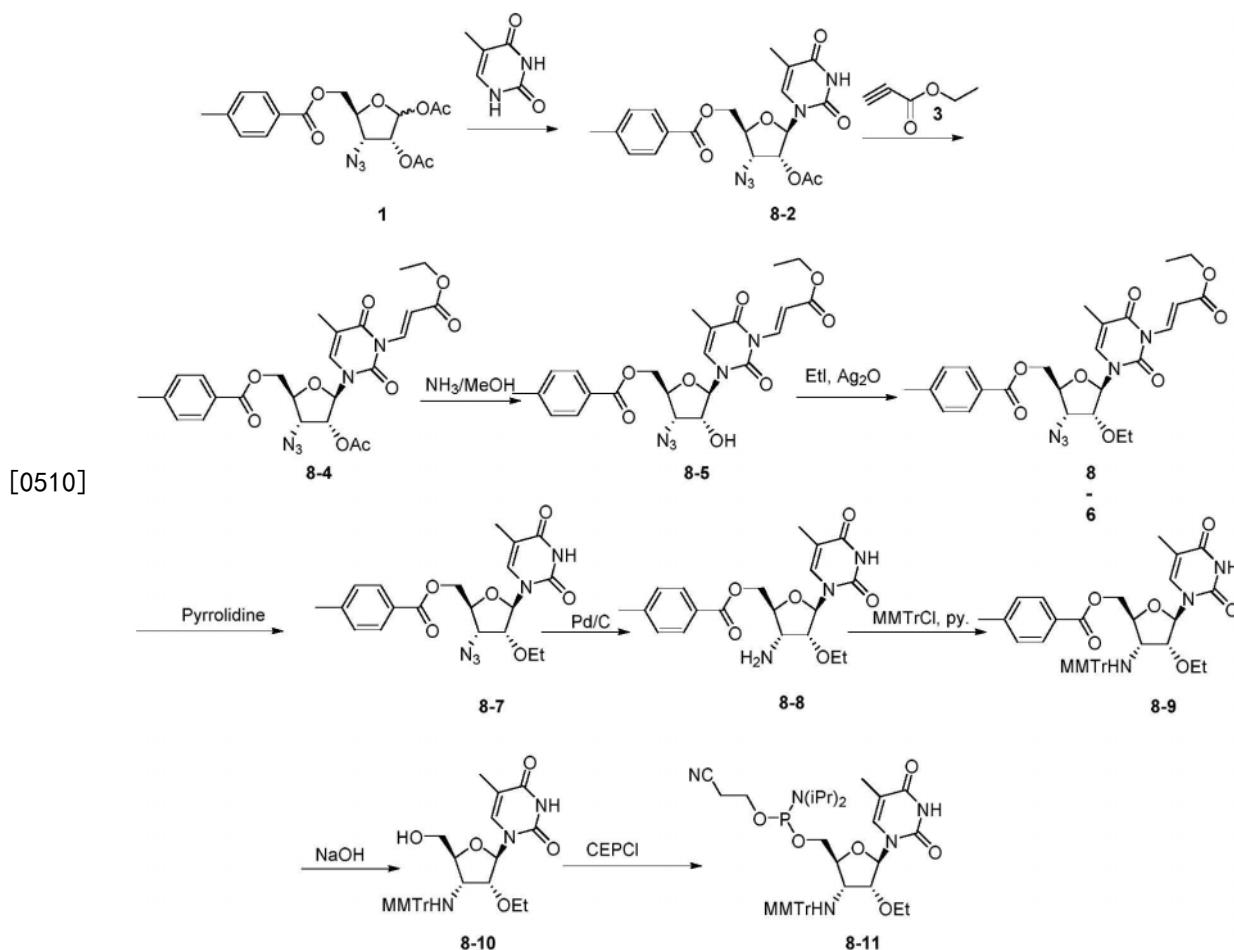


8-11

[0507] 遵循在方案 8-12 所示的化学转变制备适当保护的 2'-0-乙基-3'-氨基-5'-亚磷酸酰胺 (实施例 9、10、11、12)。

[0508] 首先对于胸腺嘧啶碱基 3'-NH-MMTr-2'-0-乙基亚磷酸酰胺的合成, 实施例 9 中间体 2 被保护, 诸如丙酸甲酯, 在二甲氨基吡啶的存在下 (方案 8) 以给出碱基 N-3 保护的中间体 8-4 以有利于以更高收率的 2'-0-烷基化。8-4 进一步脱乙酰作用以给出 C-2'-羟基中间体 8-5。

[0509] 方案 5



[0511] 使用碘乙烷进一步烷基化提供2' -0-乙基核苷8-6。通过遵循先前方案4所示的对于化合物4-10的类似化学过程,将中间体8-6转变成胸腺嘧啶碱基2' -0-乙基-3' -氨基-5' -亚磷酰胺8-11。

[0512] (8-4)的制备:向8-2(22.0g, 49.62mmol)于MeCN(400mL)中的溶液添加DMAP(1.2g, 9.92mmol)。然后添加3(5.8g, 419.5mmol), 在N₂, 在室温下持续搅拌该混合物2小时, TLC显示8-2被消耗。浓缩并以(PE:EA=6:1)的硅胶柱纯化以提供为黄色油的8-4(22.0g, 40.63mmol, 81.9%收率)。ESI-LCMS:m/z 564[M+Na]⁺。

[0513] (8-5)的制备:在0℃, 向8-4(28.0g, 51.71mmol)于MeOH(400mL)中的溶液中添加浓NH₄OH水溶液(28mL)。在0℃持续搅拌该反应混合物1.5小时, TLC显示8-4被消耗。浓缩并以(PE:EA=10:1~2:1)的硅胶柱纯化以提供为黄色油的8-5(21.0g, 42.04mmol, 81.3%收率)。ESI-LCMS:m/z 522[M+Na]⁺。

[0514] (8-6)的制备:向8-5(20.0g, 40.04mmol)于碘乙烷(100mL)中的溶液添加Ag₂O(18.6g, 80.08mmol)。在50℃持续搅拌该反应混合物5小时, 在LC-M显示8-5的完全消耗之后, 用硅藻土过滤, 并浓缩以提供为黄色油的8-6(16.0, 30.33mmol, 75.7%收率), 其直接用于下一步。ESI-LCMS:m/z 528[M+H]⁺。

[0515] (8-7)的制备:向8-6(16.0g, 30.33mmol)于MeCN(400mL)中的溶液添加吡咯烷(8.63g, 121.32mol, 12mL), 在室温搅拌该反应混合物过夜, TLC显示8-6被完全消耗。浓缩并以(DCM:MeOH=100:1~50:1)的硅胶柱纯化以提供为黄色油的7(12.0g, 27.94mmol, 92.1%收率)。ESI-LCMS:m/z 430[M+H]⁺。

[0516] (8-8) 的制备:向8-7(12.0g, 27.94mmol)于THF(200mL)中的溶液添加Pd/C(1.2g), 在H₂中, 在室温下搅拌该混合物过夜。LC-MS显示7被完全消耗。过滤并用DCM(100mL*3)洗涤, 然后浓缩以提供为灰色固体的8-8(11.0g, 27.27mmol, 97.6%收率), 其直接用于下一步。ESI-LCMS:m/z 404[M+H]⁺。

[0517] (8-9) 的制备:向8-8(10.0g, 24.79mmol)于DCM(80mL)中的溶液添加MMTrCl(11.4g, 37.18mmol)、2,4,6-可力丁(2.0g, 16.61mmol, 6.5mL)和AgNO₃(6.3g, 37.18mmol), 在室温下持续搅拌该混合物1.5小时。TLC显示8-8被完全消耗。过滤并用水洗涤有机层, 并置于Na₂SO₄上方干燥, 然后浓缩并通过以(PE:EA=5:1~1:1)的硅胶柱纯化以提供为浅黄色固体的8-9(16.0g, 23.68mmol, 95.5%收率)。

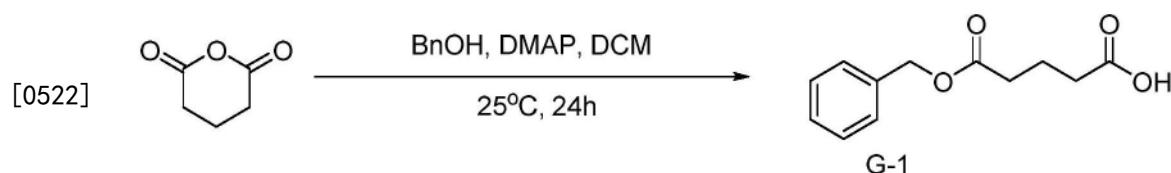
[0518] (8-10) 的制备:将8-9(4.0g, 5.92mmol)添加至1.0NNaOH溶液(20mL, MeOH/H₂O=9:1)中的溶液中。在40℃持续搅拌该反应混合物2小时, TLC显示8-9被消耗, 浓缩并用DCM(20mL*2)萃取, 有机层置于Na₂SO₄上方干燥并浓缩, 通过以(DCM:MeOH=200:1~50:1)的硅胶柱纯化残余物以提供为白色固体的8-10(3.0g, 53.8mmol, 90.9收率)。

[0519] (8-11) 的制备:向8-10(2.36g, 4.23mmol)于DCM(2.0mL)中的溶液添加DMAP(103mg, 0.8mmol)和DIPEA(2.2g, 16.92mmol, 2.96mL)。然后添加CEPC1(1.0g, 4.23mmol)。在室温下持续搅拌该反应混合物1小时。TLC显示8-10被消耗, 用饱和NaHCO₃(5mL)洗涤, 分离有机层, 并用DCM(10mL*2)洗涤水层。用盐水洗涤合并的有机层, 置于Na₂SO₄上方干燥、浓缩并通过快速制备型-HPLC纯化以提供为白色固体的8-11(2.45g, 3.23mmol, 76.36%收率)。

¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 8.62(s, 1H), 7.74(dd, J=1.4Hz, 0.5H), 7.60-7.50(m, 4H), 7.51-7.41(m, 2H), 7.34-7.16(m, 7H), 7.12(d, J=1.4Hz, 0.5H), 6.88-6.76(m, 2H), 5.66(s, 1H), 4.37-4.23(m, 1H), 4.16-4.05(m, 1H), 4.05-3.94(m, 0.5H), 3.88-3.74(m, 4.5H), 3.72-3.35(m, 3H), 3.22(td, J=10.3, 4.7Hz, 0.5H), 3.03-2.89(m, 1.5H), 2.80-2.69(m, 1H), 2.61(t, J=6.5Hz, 1H), 2.37(td, J=6.6, 1.3Hz, 1H), 1.97(d, J=3.5Hz, 0.5H), 1.91(dd, J=11.4, 1.2Hz, 3H), 1.52(d, J=4.7Hz, 0.5H), 1.29-1.17(m, 12H), 1.08(td, J=7.0, 4.9Hz, 3H)。³¹P NMR(162MHz, CDCl₃) δ 149.31, 147.14。ESI-LCMS:m/z 576[M+H]⁺。

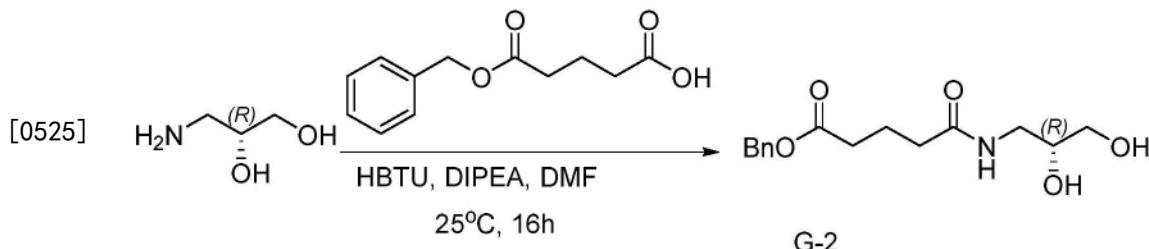
[0520] GalNAc的合成

[0521] G-1的合成



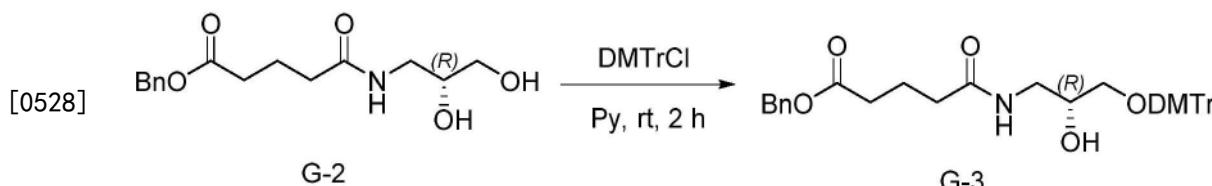
[0523] 具有氮惰性气氛下, 在室温随着搅拌向环氧乙烷-2,6-二酮(1000g, 8.76mol, 1.00当量)、4-二甲氨基吡啶(53.5g, 437.9mmol, 0.05当量)于二氯甲烷(10000mL)中的溶液滴加苯甲醇(900g, 8.32mol, 0.95当量)。在室温下搅拌所得的溶液过夜。用饱和碳酸氢钠溶液洗涤所得的混合物。用10%盐酸调节水层的pH值至1。使用3×2000mL乙酸乙酯萃取所得的溶液, 并合并有机层。用2×3000mL饱和氯化钠洗涤所得混合物。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。这获得1240g(64%)为无色油的G-1。MS m/z [M+H]⁺(ESI): 223。

[0524] G-2的合成



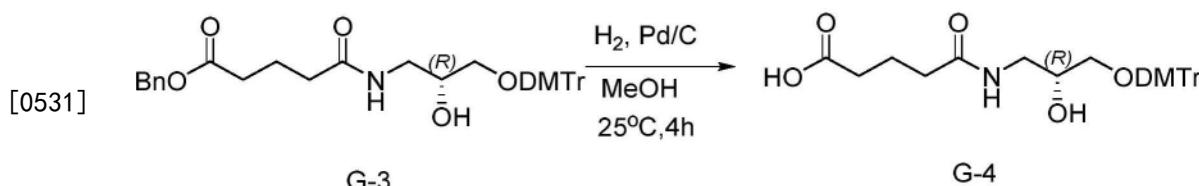
[0526] 具有氮惰性气氛下,在室温向G-1 (58.5g, 263.23mmol, 1.20当量)、N,N-二异丙基乙胺(34g, 263.57mmol, 1.20当量)于N,N-二甲基甲酰胺(600mL)中的溶液添加0-苯并三唑-N,N,N',N' -四甲基六氟磷酸盐脲鎓(100g, 263.69mmol, 1.20当量)。在室温下将所得溶液搅拌1h。这随后在室温下添加(2R)-3-氨基丙烷-1,2-二醇(20g, 219.52mmol, 1.00当量)。在室温下,随着搅拌使所得的溶液反应过夜。用2000mL乙酸乙酯稀释所得溶液。用2×1000mL饱和碳酸氢钠溶液洗涤所得混合物。用无水硫酸钠干燥该混合物并减压浓缩。将残余物施加到硅胶柱上,用二氯甲烷/甲醇(1:100-1:10)洗脱。这获得38.7g (60%) 为浅黄色固体的G-2。MS m/z [M+H]⁺ (ESI) : 296。

[0527] G-3的合成



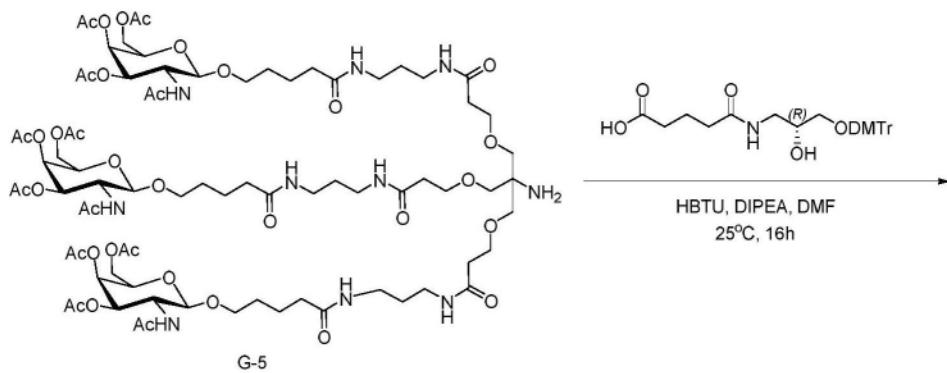
[0529] 具有氮惰性气氛下,在室温下向G-2 (10g, 33.86mmol, 1.00当量)于吡啶(100mL)中的溶液添加1-[氯(4-甲氧基苯基)苄基]-4-甲氧基苯(12.63g, 37.28mmol, 1.10当量)。在室温下搅拌所得的溶液过夜。随后通过添加甲醇(10mL)淬灭该反应。减压浓缩所得混合物。用1000mL乙酸乙酯稀释所得溶液。用2×500mL饱和碳酸氢钠溶液洗涤所得混合物。用无水硫酸钠干燥该混合物并减压浓缩。将残余物施加到硅胶柱上,用二氯甲烷/甲醇(1:100-1:50)洗脱。这获得10.2g (50%) 为浅黄色油的G-3。MS m/z [M+Na]⁺ (ESI) : 620。

[0530] G-4的合成

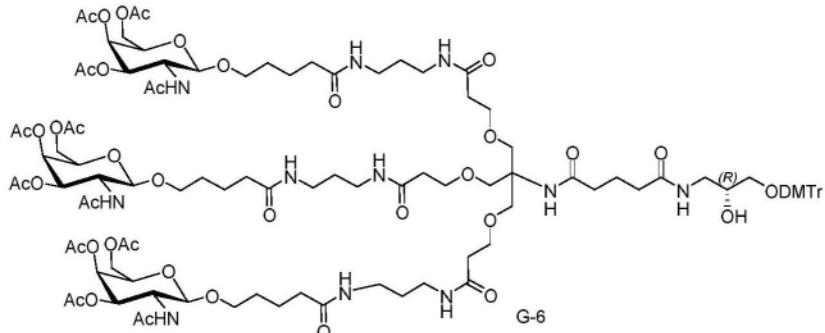


[0532] 在室温下,向G-3 (10g, 16.73mmol, 1.00当量)于甲醇(100mL)中的溶液添加10%活性碳钯(1g)。抽空烧瓶并用氢吹扫五次。在室温下持续搅拌所得溶液4小时。滤出固体。减压浓缩所得混合物。这获得7.6g (89%) 为白色固体的G-4。MS m/z [M+Na]⁺ (ESI) : 530。

[0533] G-5的合成

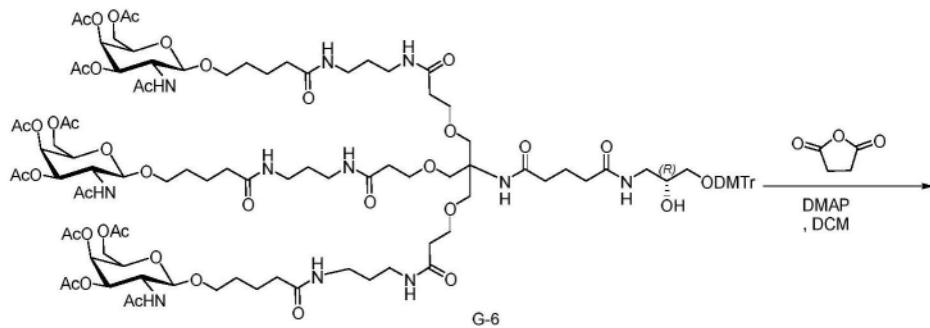


[0534]

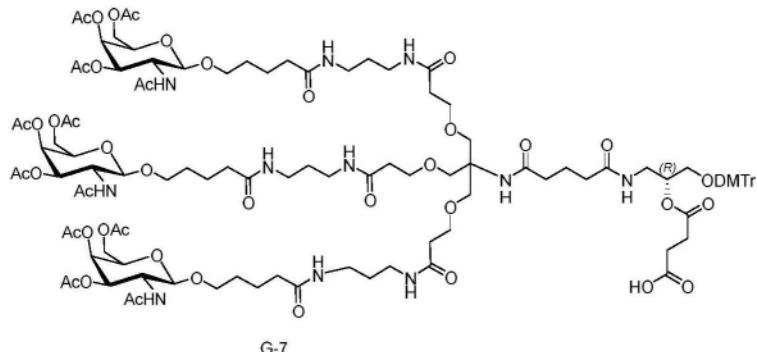


[0535] 具有氮惰性气氛下,在室温向G-4 (8.90g, 17.53mmol, 1.05当量) 于N,N-二甲基甲酰胺 (300mL) 中的溶液添加N,N-二异丙基乙胺 (6.47g, 50.16mmol, 3.00当量)。在室温下,向这添加0-苯并三唑-N,N,N,N-四甲基六氟磷酸脲鎓 (7.10g, 18.73mmol, 1.12当量)。在室温下持续搅拌所得的溶液15分钟。在室温下,向该混合物添加G-5 ReF (《核酸研究》,2014年,第42,(13)卷,8796-8807页(Nucleic Acids Research, 2014, 42, (13) 8796-8807)) (30g, 16.72mmol, 1.00当量)。在室温下,随着搅拌使所得的溶液反应过夜。减压浓缩所得混合物。用以下条件 (IntelFlash-1) 通过用快速制备型-HPLC纯化粗产物:柱, C18硅胶;流动相, 具有0.04%NH₄HC₀3的乙腈/水 (20%乙腈, 最高至70%, 15分钟内);检测器, UV 210nm。这获得20.1g(53%)为白色固体的G-6。MS m/z [M+H]⁺ (ESI) : 2283。

[0536] G-7的合成

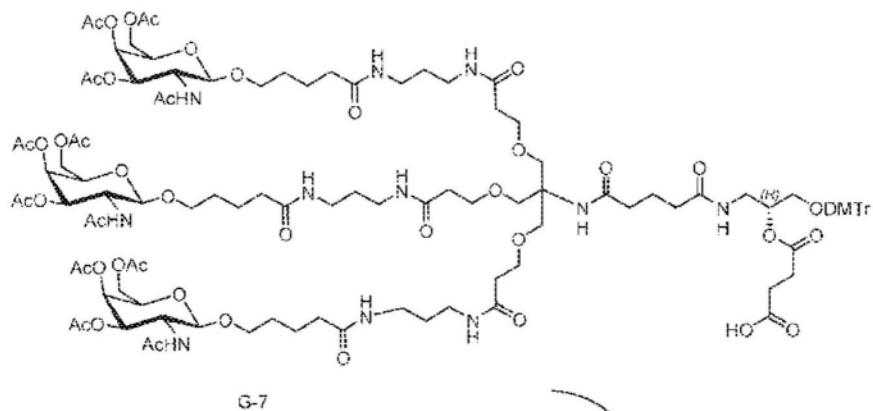


[0537]

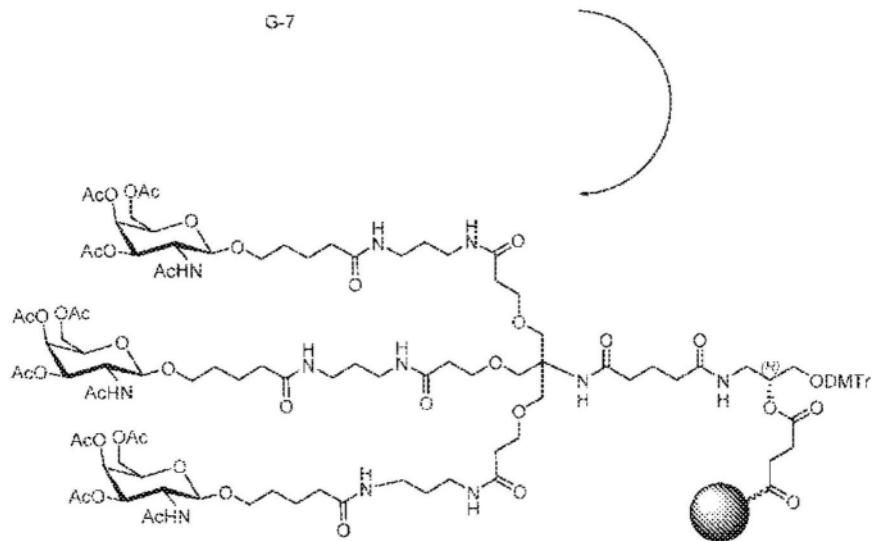


[0538] 具有氮惰性气氛下,在室温向G-6(25g, 10.96mmol, 1.00当量)于二氯甲烷(750mL)中的溶液添加三乙胺(4.98g, 49.21mmol, 4.49当量)。在室温下,向这添加4-二甲氨基吡啶(1.33g, 10.89mmol, 0.99当量)。在室温下,向该混合物添加氧杂环戊烷-2,5-二酮(3.29g, 32.88mmol, 3.00当量)。在室温下搅拌所得的溶液过夜。减压浓缩所得混合物。用以下条件通过用快速制备型-HPLC纯化粗产物:柱,C18硅胶;流动相,具有0.04%NH₄HCO₃的乙腈/水(20%乙腈,最高至50%,20分钟内);检测器,UV 230nm。这获得15.83g(61%)为铵盐的白色固体的G-7。MS m/z [M/2+NH₄]⁺(ESI): 1210。

[0539] GalNAc-2-固体载体-GPG的合成

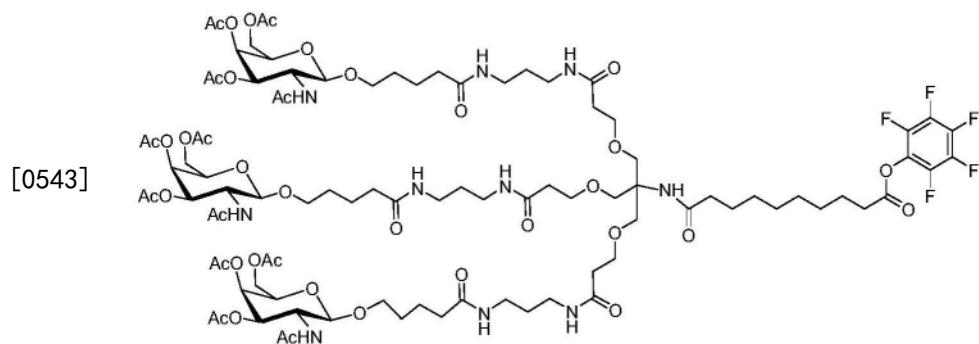


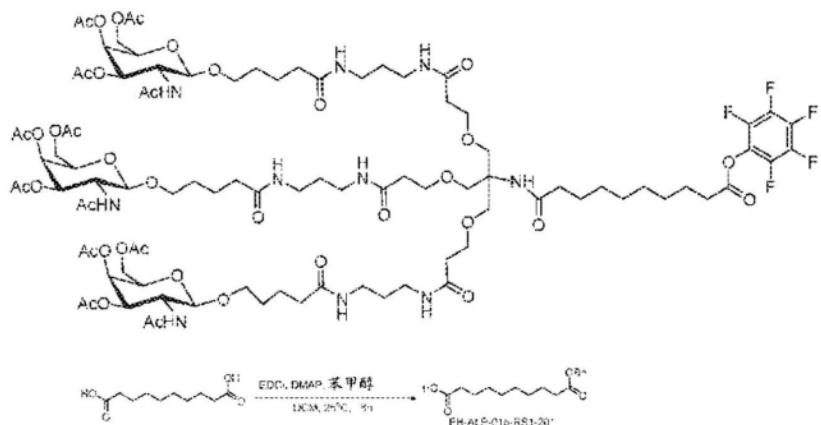
[0540]



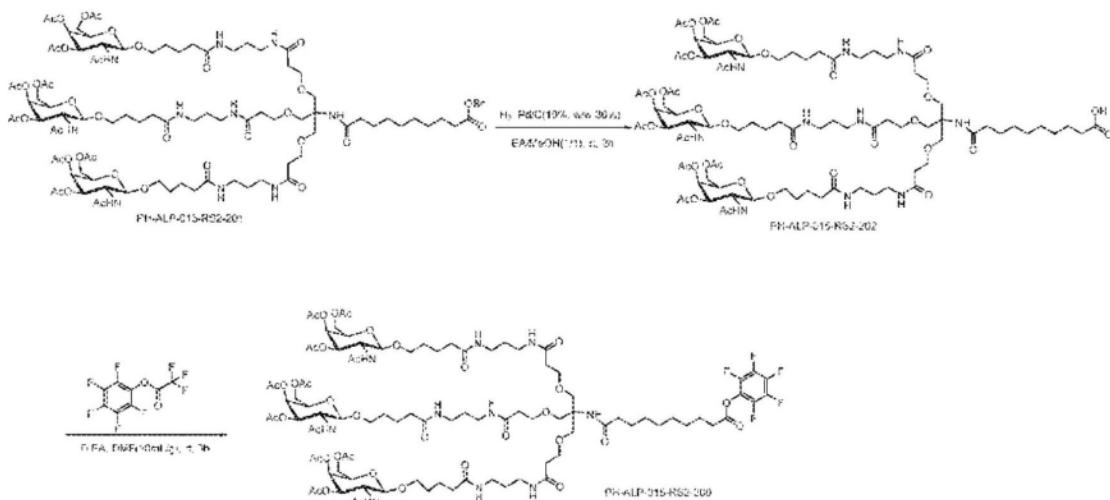
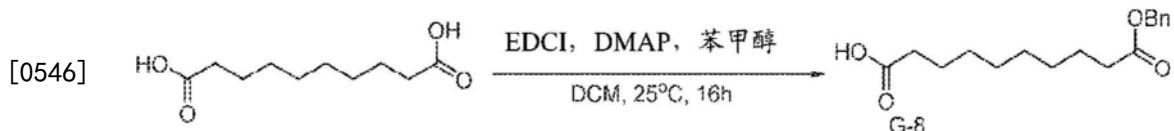
[0541] 通过遵循描述于《生物技术》, 1988年九月; 第6(8)卷: 第768-75页 (Biotechniques., 1988 Sep; 6 (8) : 768-75) 使用HBTU/TEA将G-7加载到CPG上以给出 GalNAc-2-CPG ($53\mu\text{mol/g}$)。

[0542] GalNAc-6的合成



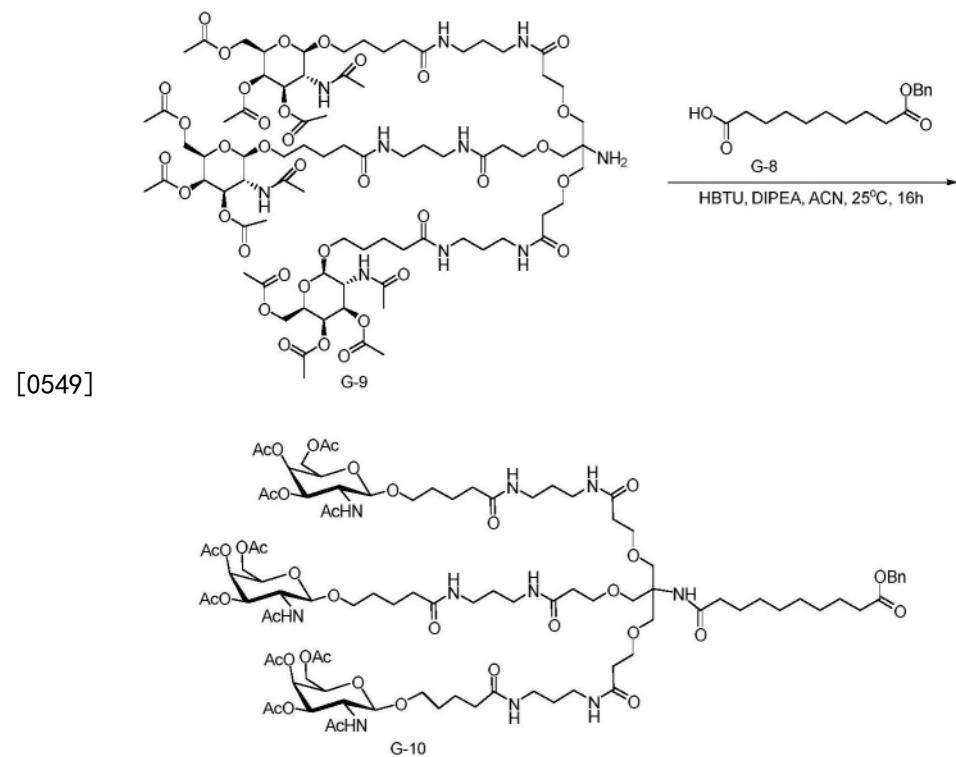


[0544]

[0545] G-8的合成

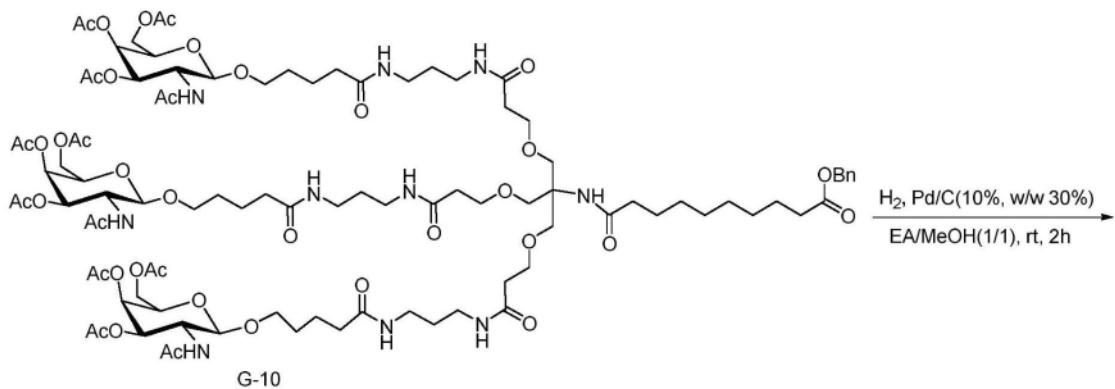
[0547] 在室温下,向癸二酸(100g,494.4mmol,1.00当量)于二氯甲烷(2000mL)中的溶液添加4-二甲氨基吡啶(18.1g,148.2mmol,0.30当量)。在室温下,向这添加N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(114g,594.7mmol,1.20当量)。在室温下将所得溶液搅拌1h。在0℃,随着搅拌向该混合物滴加苄醇(64.1g)。在室温下,随着搅拌使所得的溶液反应过夜。用饱和氯化钠水溶液洗涤所得的混合物。用无水硫酸钠干燥该混合物并减压浓缩。用以下条件(IntelFlash-1)通过用快速制备型-HPLC纯化粗产物(100g):柱,C18硅胶;流动相,水和乙腈(60%乙腈,最高至100%,在12分钟内,并保持100%5分钟);检测器,UV 210nm。这获得60.7g(42%)为白色固体的G-8。MS m/z [M+H]+(ESI):293。

[0548] G-10的合成

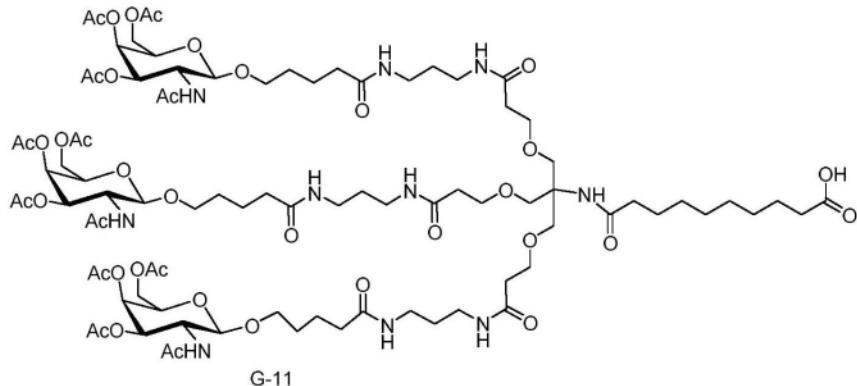


[0550] 向G-8(4.48g, 15.32mmol, 1.50当量)于乙腈(320mL)中的溶液添加0-苯并三唑-N,N,N-四甲基六氟磷酸脲鎓(5.84g, 15.40mmol, 1.50当量)、N,N-二异丙基乙胺(3.96g, 30.64mmol, 3.00当量)。在25℃下持续搅拌所得溶液1小时。这之后添加G-9(18.4g, 10.26mmol, 1.00当量)。在25℃持续搅拌所得的溶液16小时,然后在真空下浓缩。用以下条件通过用快速制色谱纯化粗产物:柱,C18硅胶;流动相,乙腈,于水中=10%增加至70%,在15分钟内;检测器,UV 210nm。这获得12g(57%)为白色固体的G-10。H-NMR(DMSO, 400MHz, ppm): 7.74-7.83(m, 9H), 7.31-7.37(m, 5H), 6.97(s, 1H), 5.21(d, J=3.3Hz, 3H), 5.07(s, 2H), 4.98(dd, J=11.2Hz, 3.4Hz, 3H), 4.49(d, J=8.4Hz, 3H), 4.04(s, 9H), 3.83-3.99(m, 3H), 3.67-3.72(m, 3H), 3.52-3.55(m, 12H), 3.37-3.43(m, 3H), 2.99-3.05(m, 12H), 2.25-2.35(m, 8H), 2.12(s, 9H), 1.99-2.11(m, 17H), 1.92(s, 9H), 1.77(s, 9H), 1.40-1.53(m, 22H), 1.19-1.25(m, 8H)。

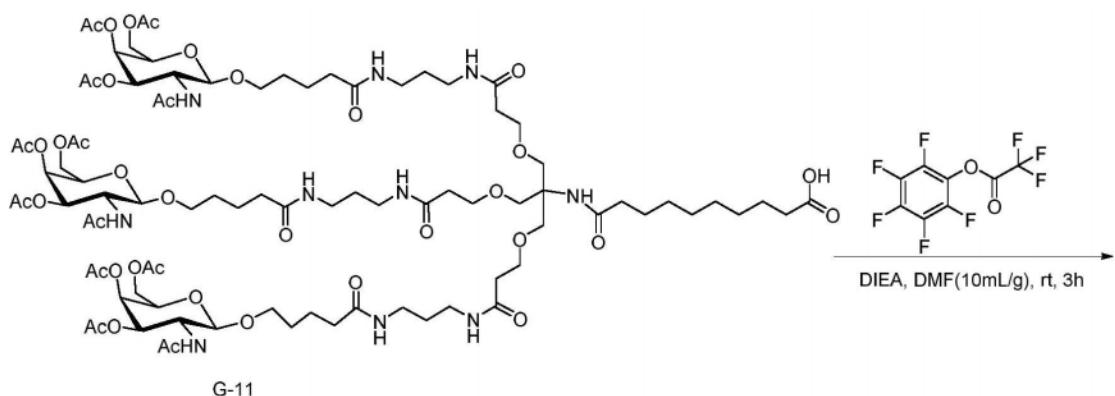
[0551] G-11的合成



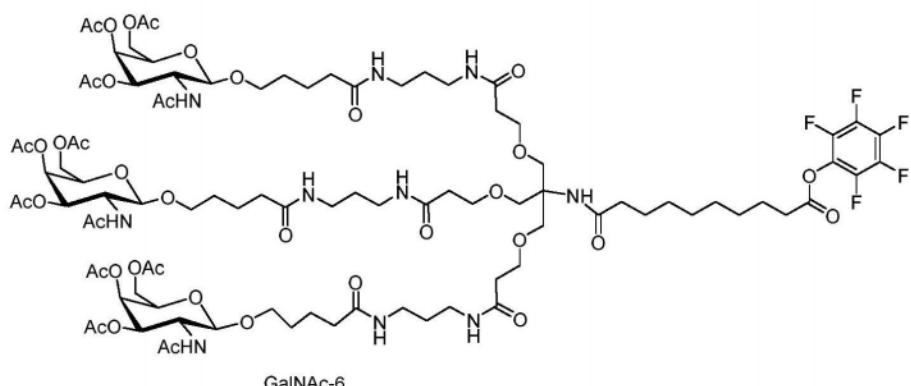
[0552]



[0553] 向G-10(5g, 2.45mmol, 1.00当量)于甲醇/乙酸乙酯(100mL, v/v=1:1)中的溶液添加10%钯碳(1.5g, 10%)。抽空烧瓶并用氢吹扫五次。在室温下,在氢气氛围中,搅拌该混合物2小时。滤出固体。真空浓缩所得混合物。这获得4g(82%)为白色固体的G-11。

[0554] GalNAc-6的合成

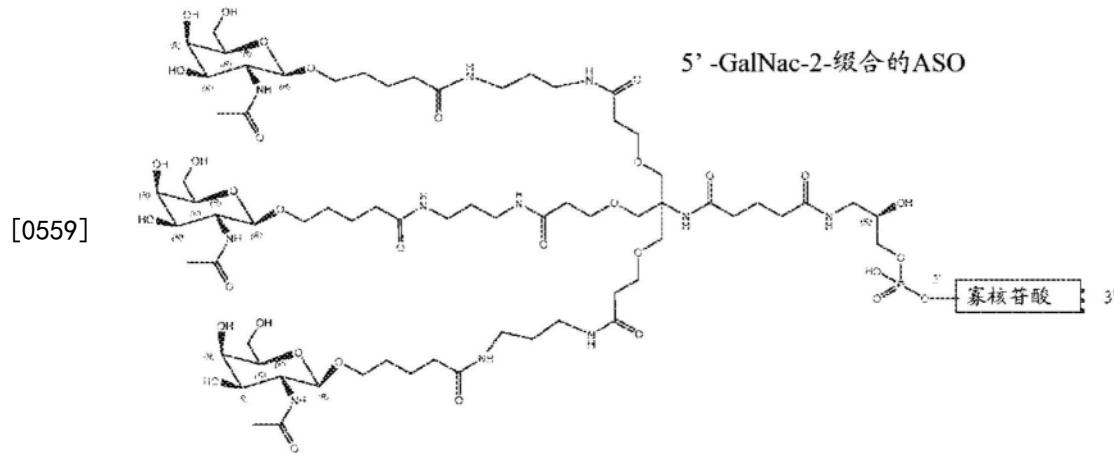
[0555]



[0556] 向G-11 (6.3g, 3.18mmol, 1.00当量)于N,N-二甲基甲酰胺 (63mL) 中的溶液添加N,N-二异丙基乙胺 (1.0g, 7.95mmol, 2.50当量)。这之后在0℃, 随着搅拌滴加2,2,2-三氟乙酸五氟苯酯 (1.33g, 4.77mmol, 1.50当量)。在25℃下持续搅拌所得溶液3小时。真空浓缩所得混合物。通过快速色谱纯化粗产物, 具有下列条件:C18凝胶柱, 洗脱液A:水, 洗脱液B:乙腈; 梯度: 20%最高至80%, 15分钟内, 100%保持3分钟; 检测器, UV 210nm。这获得5g (73%) 为白色固体的GalNAc-6。MS $m/z [M/2+H]^+$ (ESI) : 1073; H-NMR (DMSO, 300MHz, ppm) : 7.71-7.80 (m, 9H), 6.98 (s, 1H), 5.22 (d, $J=3.3\text{Hz}$, 3H), 4.99 (dd, $J=11.1\text{Hz}, 3.3\text{Hz}$, 3H), 4.50 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 3H), 4.02 (s, 9H), 3.82-3.92 (m, 3H), 3.69-3.74 (m, 3H), 3.52-3.56 (m, 12H), 3.39-3.44 (m, 3H), 3.03 (s, 12H), 2.75-2.79 (m, 2H), 2.28 (t, $J=6.3\text{Hz}$, 6H), 2.00-2.10 (m, 26H), 1.89 (s, 9H), 1.77 (s, 9H), 1.64-1.68 (m, 2H), 1.25-1.53 (m, 28H); F-NMR (DMSO, 162MHz, ppm) : -153.60, -153.67, -153.68, -153.69, -158.05, -158.14, -158.22, -162.53, -162.60, -162.62, -162.69, -162.70。

[0557] GalNAc缀合

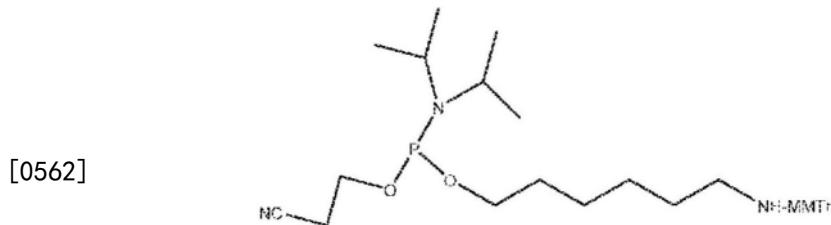
[0558] 对于制备所述5' GalNAc缀合的低聚物, 具有下列修饰: 2'-F-NPS-PS-2'-F-NPS; 2'-F-NP-PS-2'-F-NP; 2'-OMe-NP-PS-2'-OMe-NP; 2'-OMe-NPS-DNA-PS-2'-OMe-NPS、2'-OEt-NPS-DNA-PS-2'-OEt-NPS和2'-MOE-NPS-DNA-PS-2'-MOE-NPS, 该合成以10至200 μM 规模, 在5'至3'方向实施, 具有5' - 亚磷酰胺单体在无水CH₃CN中被稀释成0.1M的浓度, 在5-(苄硫基)-1H-四唑活化剂的存在下(偶合时间2.0-4.0分钟), 变成GalNAc2-CPG。具有修饰规程的偶合循环, 之后进行标准的封端、氧化和脱保护, 提供经修饰的寡核苷酸。逐步偶合效率超过98%。将DDTT (二甲基氨基亚甲基) 氨基-3H-1,2,4-dithiazaoline-3-硫酮用作硫转移剂, 用于合成硫代磷酸寡核糖核苷酸。将二甲基吡啶:乙腈 (1:1) 中0.2M的苯乙酰二硫化物(PADS) 用作大规模合成中的硫化剂(Akta OP-100)。在室温, 在摇动器上将承载寡核苷酸的固体载体与氨水/甲胺 (1:1) 溶液一起加热3小时以从载体上裂解并脱保护所述碱基不稳定保护基团。



[0560] 3'-C6NH₂-NPS-PS-NPS- (前体) 合成

[0561] 对于制备所述3' GalNAc缀合的低聚物, 具有下列修饰: 2'-F-NPS-PS-2'-F-NPS; 2'-F-NP-PS-2'-F-NP; 2'-OMe-NP-PS-2'-OMe-NP; 2'-OMe-NPS-DNA-PS-2'-OMe-NPS、2'-OEt-NPS-DNA-PS-2'-OEt-NPS和2'-MOE-NPS-DNA-PS-2'-MOE-NPS ASOs以10 μmol 规模, 使用通用的载体(负载量65 $\mu\text{mol/g}$)合成。合成方法与上文所述相同。在3' -末端将引入C6-NH₂连

接基,使用0.1M乙腈中的6-(4-一甲氧基三苯甲基氨基)己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺具有10分钟的偶合时间。在摇动器上,将承载寡核苷酸的固体载体在室温下与氨水/甲胺(1:1)溶液一起加热3小时以从载体上裂解,并脱保护所述碱基不稳定保护基团。在IEX纯化以及脱盐之后,该C6-NH₂修饰的ASO可被用于执行后合成缀合。

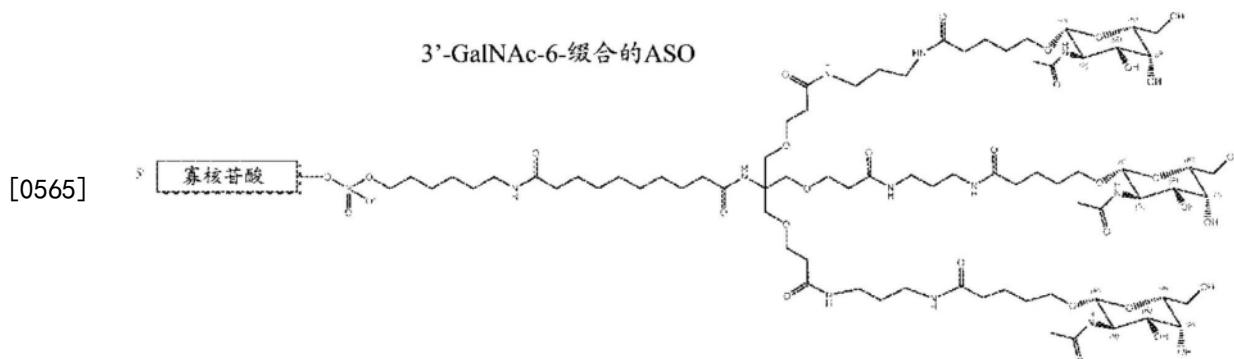


5'-氨基调节剂C6

6-(4-一甲氧基三苯甲基氨基)己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺

[0563] 3'-GalNAcNPS-PS-NPS-ASO合成(后合成缀合)

[0564] 将3'-C6-NH₂修饰的ASO溶解于0.2M碳酸氢钠缓冲液中,pH 8.5(0.015mM),并且添加溶解于DMSO中的5-7mol GalNAc-6酯的等同物。在室温下持续搅拌该反应混合物4小时。分析样品以确认是否任何未反应的氨基修饰的ASO的存在。向该氨水(28重量%)添加(5×反应体积)并在室温下持续搅拌2-3小时。在减压下浓缩反应混合物,并且将残余物溶解于水中,并通过HPLC在强阴离子交换柱上纯化。



[0566] 3'-GalNAc6缀合

	低聚物的浓度 等同物	GalNAc 6 PFP 酯 等同物	温度 (℃)	%转化至 3' GalNAc ASO
[0567]	0.015mM	5	25	75
[0568]	0.0076mM	7	25	80
	0.0076mM	4	25	65

[0569] 粗低聚物的定量或原始分析

[0570] 将样品溶解于去离子水中(1.0mL),并如下定量:首先单独用水执行空白(1.0mL),将20μL的样品和980μL的水在微量离心管中充分混合,转移至比色管并在260nm处获得吸光度读数。将粗料干燥冷却并储存于-20℃。

[0571] 粗HPLC/LC Ms分析

[0572] 将粗制样品的0.10D提交用于粗MS分析。在确认粗LC-MS数据之后,执行纯化步骤。

[0573] HPLC纯化

[0574] 通过阴离子交换HPLC纯化具有和不具有GalNAc缀合物的氨基磷酸酯(NP)和硫代氨基磷酸酯(NPS)修饰的寡核苷酸。缓冲剂为20mM的10%CH₃CN中的磷酸钠,pH 8.5(缓冲剂A)和20mM的10%CH₃CN中的磷酸钠,1.8M NaBr,pH 8.5(缓冲剂B)。将包含全长寡核苷酸的级分合并、脱盐并冻干。

[0575] 纯化的低聚物的脱盐

[0576] 然后使用Sephadex G-25 M(Amersham Biosciences)将纯化的干燥低聚物脱盐。用10mL的去离子水三次调理滤筒。最后,将纯化的低聚物彻底溶解于2.5mL的RNA酶游离水中,以非常缓慢的滴落方式洗脱将其施用至滤筒。用3.5ml去离子水洗脱不含盐的低聚物直接进入螺帽小瓶中。

[0577] IEX HPLC和电喷LC/MS分析

[0578] 将大概0.100D的低聚物溶解于水中,然后在专用小瓶中移液用于IEX-HPLC和LC/MS分析。分析HPLC和ES LC-MS建立寡核苷酸的完整性。通过HPLC分析(60°C, IEX-Thermo DNAPac PA-100,A-25mM磷酸钠,10%乙腈,pH 11,B-1.8M NaBr 25mM磷酸钠,10%乙腈,pH 11;RPIP-Waters XBridge OST C18,A-100mM HFIP 7mM TEA B-7:3甲醇/乙腈)和ESI-MS分析,使用对于Xcalibur的Promass Deconvolution(宾夕法尼亚州,纽镇的Novatia)(Novatia,Newtown,PA))测定纯度和分子量。合成在以下表中所有的寡核苷酸,并且在表中参考的分子量为实际测量的重量,其可具有MW的amu+/-2误差。

[0579] 复合的寡核苷酸稳定性测试

[0580] 在实施方案中,与相同序列的未修饰的寡核苷酸相比,本发明所公开的寡核苷酸对靶核酸序列显示具有增加的亲和力。例如,在一些序列中,本发明所公开的寡核苷酸具有与靶核酸序列互补或杂交的核碱基序列,该核酸序列具有比相同序列的未修饰的寡核苷酸更高的亲和力。在实施方案中,与互补的靶核酸序列复合的本发明所公开的寡核苷酸具有>37°C的解链温度T_m。该复合物可在生理条件下或几乎生理条件下,诸如在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中形成。在实施方案中,复合物的T_m为>50°C。在实施方案中,复合物的T_m为50-100°C。在实施方案中,在生理条件或几乎生理条件下与靶核酸序列双联的本发明所公开的寡核苷酸的T_m为>50°C。

[0581] 在某些实施方案中,靶核酸序列可选自已知的病毒DNA或RNA序列,诸如HBV基因组的核酸序列。

[0582] 在实施方案中,本发明所公开的寡核苷酸对HBV基因组的下列六个序列或其RNA等价物中的至少一种显示亲和力和/或显示对HBV基因组的下列六个序列(表E)或其RNA等同物(表F)中的至少一种复合的稳定性。在实施方案中,与互补的HBV基因组序列复合的寡核苷酸具有>37°C解链温度(T_m)。HBV基因组可为RNA序列,诸如DR-1和/或DR-2 RNA序列。该复合物可在生理条件下或几乎生理条件下,诸如在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中形成。在实施方案中,复合物的T_m为>50°C。在实施方案中,复合物的T_m为50-100°C。在实施方案中,在生理条件或几乎生理条件下与HBV RNA双联的本发明所公开的寡核苷酸的T_m为>50°C。

[0583] 寡核苷酸的体外测试

[0584] 使用两条HBV细胞系评估寡核苷酸的体外效能:HepG2.2.15(2215)和HepG2.117(2117)。使用HepG2.2.15细胞测量在上清液(sup)中HBsAg减少以及细胞毒性。在HepG2.117细胞中测量了在上清液以及细胞内级分中的HBV DNA减少。

[0585] HepG2.2.15细胞系是具有四个完整的HBV基因组的稳定的细胞系。细胞在37℃下于5% CO₂的气氛中,在Dulbecco的修饰的Eagle的培养基中生长,所述培养基补充有10% FCS、100IU/ml青霉素、100μg/ml链霉素和2% 谷氨酰胺。在给药前一天,将2.5×10⁴细胞/孔接种于胶原涂覆的96孔板中并温育过夜。在给药当天,遵循制造商的规程,用Lipofectamine RNAiMax(马萨诸塞州,沃尔瑟姆,赛默飞世尔(Thermo Fisher,Waltham,MA))将连续稀释的低聚物转染到细胞中。针对每种药物浓度进行重复,并且将每种寡核苷酸设置用于EC50测量和CC50测量两者。转染后三天,收集上清液(sup)并用于HBsAg ELISA(中国,安图生物(AutoBio,China))用于EC50计算。对于CC50测量,遵循制造商的说明,将CellTiter-Glo®(威斯康星州,麦迪逊,普洛麦格(Promega,Madison, WI))用于测定。

[0586] HepG2.117是在TetOFF(在不存在四环素或其同系物强力霉素下诱导转录)的规则下,拥有HBV基因组(ayw亚型)的完整1.05拷贝的稳定的肝癌细胞系。细胞在37℃下于5% CO₂的气氛中,在DMEM/F12培养基中生长,所述培养基补充有10% FCS、100IU/ml青霉素、100μg/ml链霉素、2% 谷氨酰胺、250μg/ml G418和2μg/ml四环素。在给药前一天,移除细胞培养基中包含的四环素,将细胞洗涤以移除残余的四环素,并用处理培养基(DMEM/F12,包含2% Tet-系统核准的FBS 100IU/ml青霉素、100μg/ml链霉素和2% 谷氨酰胺)以2.5×10⁴细胞/孔接种于胶原涂覆的96孔板中。然后将细胞温育过夜。在实验当天,遵循制造商的规程,用Lipofectamine RNAiMax(马萨诸塞州,沃尔瑟姆,赛默飞世尔(Thermo Fisher,Waltham,MA))将连续稀释的低聚物转染到细胞中。针对每种药物浓度进行重复,并且将每种寡核苷酸设置用于EC50测量和CC50测量两者。转染后四天,收集上清液以直接用于HBV DNA qPCR。用MagMAX™总核酸分离试剂盒(赛默飞世尔)分离来自细胞的HBV DNA,然后作为模板施用到qPCR中。HBV的ayw亚型DNA(检索号V01460)序列被用于设计(赛默飞世尔,引物探针设计软件(primer Express,Thermo Fisher))正向引物(5'-TTG CCT TCT GAC TTC TTT CCT TCT-3')、反向引物(5'-TGC CTG AGT GCT GTA TGG TGA G-3')以及用FAM(6-羧基荧光素)在5'处和用TAMRA(6-羧基四甲基若丹明)3'处标记的荧光底物TaqMan®探针(5'-TCG GGA AGC CTT AGA GTC TCC TGA-3')。这些引物和探针用于通过AmpliTaq黄金DNA聚合酶(马萨诸塞州,沃尔瑟姆,珀金埃尔默生命科学(Perkin Elmer Life Science,Waltham,MA))进行定量实时PCR。该反应的条件如下:1循环,在95℃下热启动10分钟,之后进行50次变性循环(95℃,15秒)和退火/聚合(59℃,1分钟)。

[0587] 原发性人类肝细胞中感染HBV系统

[0588] 解冻冷藏保存的原发性人类肝细胞(PHH),并以200,000个细胞/孔接种于24孔板中。使细胞在37℃5% CO₂中恢复过夜。以感染复数50-100,用HBV感染细胞0/N(37℃/5% CO₂)。在感染过夜后,移除病毒种菌,并用预热的洗涤培养基洗涤细胞三次。然后用新鲜的PHH培养的培养基再填充。用450μl新鲜培养基替换该培养基。添加50ul转染混合物。将在Opti-MEM I(生命技术(Life Technology),Cat#:31985-070)中的低聚物稀释至20x的最终浓度,与等体积的包含Lipofectamine RNAiMAX(英杰生命技术(Invitrogen),Cat#:13778-150)的Opti-MEM I混合,用移液管移3次,并在室温下温育10-20分钟。添加50ul寡核苷酸:RNAiMAX混合物至孔中,用手轻敲板几次。将板放回培养箱中。在测定日,对于HBsAg和HBeAg ELISA的上清液,收获用于细胞活力的细胞。HBsAg ELISA描述于上文部分中。对于HBeAg,使

用来自安图生物诊断(Autobio Diagnostics) (CL0312-2)的方法。

[0589] 寡核苷酸的体内测试

[0590] AAV/HBV是携带可复制HBV基因组的重组AAV。利用基因型8AAV高度嗜肝的特征，HBV基因组可被有效地递送至递小鼠肝脏细胞。用AAV/HBV感染免疫活性小鼠可导致长期HBV病毒血，其模拟患者中慢性HBV感染。AAV/HBV模型可用于评估各种类型抗-HBV药剂的体内活性。小鼠在研究的-28天用AAV-HBV感染。在第0、2和4天，以指定的剂量水平皮下剂量(除非另外指明) 测试物或阴性对照(PBS)。或者，它们可在第0天以指定的剂量水平作为单剂量注射。对于HBV DNA, 但不是对于HBV抗原, 每天口服阳性对照恩替卡韦(ETV)。通过实时PCR, 通过ELISA和HBV DNA测定血清HBV S抗原(HBsAg) 和E抗原(HBeAg)。ELISA方法和qPCR方法已描述于上文体外测定部分中。

[0591] 以下陈述描述了如何生成表1-43中的数据。对于所述体外HBsAg细胞系EC50和CC50的数据, 使用HepG2.2.15的方法, 因此, 在其中显示数据的列或行中标记“2215”。对于所述体外HBV DNA细胞系EC50和CC50的数据, 使用HepG2.117的方法, 因此, 在其中显示数据的列或行中标记“2117”。对于在HBV/PHH传染性系统中测试的所有体外HBsAg以及HBeAgEC50数据, 使用PHH方法, 因此在其中显示数据的列或行中标记“PHH”。对于小鼠模型体内产生的AAV-HBV, 应用上文体内部分的方法。最大HBsAg(或HBeAg)减少描述为最低点(单位Log减少), 并且在其中显示数据的列或行中标记最低点。两个ASO通常比较它们的最低点。如果比较非最低点的值, 则在文本中指示它们。

[0592] 治疗方法

[0593] 患有HBV感染的成年人类静脉内注射本公开的治疗有效化合物, 例如选自表1-43的化合物。继续治疗, 直至改善HBV的一种或多种症状, 或例如降低血清HBV S抗原(HBsAg) 和/或E抗原(HBeAg) 水平。

[0594] 患有HBV感染的成年人类皮下注射本公开的治疗有效化合物, 例如选自表1-43的化合物。继续治疗, 直至改善HBV的一种或多种症状, 或例如降低血清HBV S抗原(HBsAg) 和/或E抗原(HBeAg) 水平。

[0595] 在下列表中, A至J对应于以下项:

[0596] A) 0.05-10nM;

[0597] B) 10-100nM;

[0598] C) 100nM之上;

[0599] D) 0.1-5.0nM;

[0600] E) 5.1-10.0nM;

[0601] F) 10.1-21nM;

[0602] G) 20-100

[0603] H) 10-1000

[0604] I) >1,000

[0605] J) >10,000。

[0606] 表1:具有PS和2'-O-Me修饰的嵌合寡核苷酸

[0607]	#ID	序列 (5'-3')	2215 HBsAg EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	最大 HBsAg Log 减 少* (最 低 点)	分子量 (MW)
	101	5' mGpsmCpsmApsmGpsmApsmGps <u>GpsT</u> <u>psGpsApsApsGpsmCpsmGpsmApsmApsm</u> GpsmUpsmGpsmC-3'	A	J		6967.66
[0608]	102	5' mGpsmCpsmApsmGpsmApsmGps <u>GpsT</u> <u>psGpsApsApsGpsmCpsmGpsmApsmApsm</u> GpsmUpsmGpsmCps-Chol-3'	B	J		7739.69
	103	5' mGpsmCpsmApsmGpsmApsmGps <u>GpsT</u> <u>psGpsApsApsGpsmCpsmGpsmApsmApsm</u> GpsmUpsmGpsmC-GalNAc-3'	B	J	2	8728.57

[0609] *Log减少, 3×30mg/kgSC后

[0610] 图1A-C示出了在AAV/HBV小鼠模型中在体内对本公开的化合物2-周测试的结果。AAV/HBV是携带可复制HBV基因组的重组Adeno-伴随病毒(AAV)。利用基因型8AAV高度嗜肝的特征, HBV基因组可被有效地递送至递小鼠肝脏细胞。用AAV/HBV感染免疫活性小鼠可导致长期HBV病毒血, 其模拟患者中慢性HBV感染。AAV/HBV模型可用于评估各种类型抗-HBV药剂的体内活性。小鼠在研究的-28天用AAV-HBV感染。在第0、2和4天, 以指定的剂量水平皮下剂量(除非另外指明)测试物或阴性对照(PBS)。(ETV, 对于HBV DNA, 但不是对于HBV抗原), 每天口服阳性对照恩替卡韦。在图中所示的几天中进行连续采血。通过实时PCR, 通过ELISA和HBV DNA测定血清HBV S抗原(HBsAg)和E抗原(HBeAg)。在图1中, 连同ETV, 测试了三个测试制品#101、#102(#101的3'胆固醇缀合形式)和#103(#101的3'GalNAc缀合形式)。

[0611] 图1A示出HBsAg血清水平。已知ETV降低HBV DNA, 但对HBsAg或HBeAg均无影响。GalNAc缀合的#101降低了HBsAg ~ 21og, 而未缀合的#101和胆固醇缀合的#102具有非常小的效应。

[0612] 图1B示出了HBeAg血清水平; 并且图1C示出了DNA血清水平。对于HBeAg上的这三种低聚物的图案与HBsAg的图案非常相似。对于#103的最大HBeAg滴度为~0.71og。

[0613] 图1C示出了DNA血清水平。所有三种低聚物降低小鼠血清中的HBV DNA, 具有GalNAc缀合的#103是最有效的化合物(与第0天基线相比, 在第14天, 最大HBV DNA减少为~31og)。阳性对照ETV还显示在HBV DNA中最大31og的下降。

[0614] 图2A-B示出对于本公开的GalNAc缀合的化合物在体内小鼠模型中, 作为SC和IV施用的HBsAg血清水平。图2A显示了对于IV施用的结果; 图2B显示了对于SC施用的结果。SC递送比具有相同剂量的IV递送显示出略高的HBsAg度

[0615] 表2

	#ID	序列 (5'-3')	2215 EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	最大 HBsAg Log 减 少 (最 低点) *	MW
[0616]	104	5' mGpsmApSmUpSmUpSmApSmGps <u>GpsCps</u> <u>ApsGpsApsGpsGpsTpSmGpsmApSmApSm</u> ApSmApSmApSmG 3'	B	J		7275.92
	105	5' mGpsmApSmUpSmUpSmApSmGps <u>GpsC</u> <u>psApsGpsApsGpsGpsTpSmGpsmApSmAps</u> mApSmApSmApSmG-Chol-3	A	J		8031.88
	106	5' mGpsmApSmUpSmUpSmApSmGps <u>GpsC</u> <u>psApsGpsApsGpsGpsTpSmGpsmApSmAps</u> mApSmApSmApSmG-GalNAc-3	C	J	0.8	9036.82

[0617] *Log减少, 3×30mg/kgSC后

[0618] 图3示出了对于本公开的GalNAc缀合的化合物 (#106、#109、#162和#159) 在体内AAVHBV小鼠模型中经由皮下递送的HBsAg降低水平。对于这些ASO的最大HBsAg降低相似地为~1Log。

[0619] 表3

	#ID	序列 (5'-3')	2215 EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	最大 HBsAg Log 减 少 (最 低点) *	MW
[0620]	107	5' mGpsmApSmUpSmUpSmApSmGps <u>GpsCp</u> <u>sApsGpsApsGpsGpsTpSmGpsmApSmAps</u> mApSmApSmApSmG 3'	B	J		7245.8 9
	108	5' mGpsmApSmUpSmUpSmApSmGps <u>GpsCp</u> <u>sApsGpsApsGpsGpsTpSmGpsmApSmAps</u> mApSmApSmApSmG-Chol-3	A	J		8001.8 5
	109	5' mGpsmApSmUpSmUpSmApSmGps <u>GpsCp</u> <u>sApsGpsApsGpsGpsTpSmGpsmApSmAps</u> mApSmApSmApSmG-GalNAc-3	C	J	1	9006.8 0

[0621] *Log减少, 3×30mg/kgSC后

[0622] 表4

#ID	2215 HBsAg EC50 (nM)	2117 上清液 HBVDNA (EC50 nM)	2117 内部 HBVDNA EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	MW
110	B	F	F	J	7305.95
111	B	E	E	J	7320.96
112	B	D	D	J	7350.99
113	B	D	D	J	7350.99
114	A	D	D	J	7381.02
115	B	D	E	J	7275.92
116	B	F	E	J	7290.94
117	A	D	D	J	7320.97
118	B	E	D	J	7320.97
119	A	D	D	J	7351.00

#ID	序列 (5'-3')
110	5' mGpsmDAPpsmUpsmUpsmDAPpsmGps <u>GpsCpsApsApsGpsGpsTp</u> smGp smApsmApsmApsmApsmApsmG 3'
111	5' mGpsmApsmUpsmUpsmApsmGps <u>GpsCpsApsApsGpsGpsTp</u> smGpsmAp smApsmApsmDAPpsmDAPpsmmDAPpsmG 3'
112	5' mGpsmApsmUpsmUpsmApsmGps <u>GpsCpsApsApsGpsGpsTp</u> smGpsmDA PpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG 3'
113	5' mGpsmDAPpsmUpsmUpsmDAPpsmGps <u>GpsCpsApsApsGpsGpsTp</u> smGp

	smApsmApsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG 3'
114	5' mGpsmDAPpsmUpsmUpsmDAPpsmGps <u>GpsCpsApsApsGpsGpsTp</u> smGp smDAPpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG 3'
115	5' mGpsmDAPpsmUpsmUpsmDAPps <u>GpsCpsApsApsGpsGpsTp</u> smGps mApsmApsmApsmApsmApsmG 3'
116	5' mGpsmApsmUpsmUpsmAps <u>GpsCpsApsApsGpsGpsTp</u> smGpsmAps mApsmApsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG 3'
117	5' mGpsmApsmUpsmUpsmAps <u>GpsCpsApsApsGpsGpsTp</u> smGpsmDAP psmDAPpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG 3'
118	5' mGpsmDAPpsmUpsmUpsmDAPps <u>GpsCpsApsApsGpsGpsTp</u> smGps mApsmApsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG 3'
119	5' mGpsmDAPpsmUpsmUpsmDAPps <u>GpsCpsApsApsGpsGpsTp</u> smGps mDAPpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmDAPpsmG 3'

[0626] 表5

#ID	序列 (5'-3')	2215 EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	MW
120	5' mGpsmCpsmApsmGpsmApsmGps <u>TpsGpsApsApsGpsmC-3</u>	A	J	6982.68
121	5' mGpsmCpsmApsmGpsmApsmGps <u>TpsGpsApsApsGpsmC-3</u>		J	6997.69
122	5' mGpsmCpsmApsmGpsmDAPpsmGps <u>GpsTpsGpsApsApsGpsmC-3</u>		J	7012.71
123	5' mGpsmCpsmDAPpsmGpsmDAPpsmGps <u>GpsTpsGpsApsApsGpsmC-3</u>		C	7027.72

[0628] 表6

#ID	HBsAg EC50 (nM)	CC50 (nM)	序列 (5'-3')	最大 HBsAg Log 减少 (最低点) *	MW
[0629]	159	B J	5'mApsmApSmGpSmApSmGps <u>ApsGpsGpsTpsGps5meCpsGps5meCps5meCps5m</u> <u>eCps5memCpsmGpSmUpSmGpSmG-GalNAc 3'</u>	1	8630.55
	160	B J	5' mGpsmGpsmUpSmGpsmAps <u>ApsGps5meCpsGpsApsApsGpsTpsGps5mCpsmAps5memCpsmApS5memCps mG-GalNAc 3'</u>	1.9	8624.54
	161	B J	5'mUpSmGpsmGps5memCpsmApS <u>5meCpsTpsApsGpsTpsApsAps5meCpsTpsmGpsmApSmGps5memCps5memC-GalNAc 3'</u>	1.9	8548.52
	162	B J	5'5memCpsmUpSmApSmGmGps <u>ApsGpsTpsTps5meCps5meCpsGps5meCpsApsGpsmUpSmApSmUpSmGpsmG-GalNAc 3'</u>	1	8553.45
[0630]	163	B J	5'mApsmGpsmApSmGpsmGps <u>TpsGps5meCpsGps5meCps5meCps5meCpsGpsTpsmGpsmGpsmUpSm5memCpsmG-GalNAc 3'</u>	0.8	8611.53
	164	B J	5' mUpS5memCps5memCpsmGps5memCps <u>ApsGpsTpsApsTpsGpsGpsApsTps5meCpsmGpsmGps5memCps mApSmG-GalNAc 3'</u>	1.9	8610.55
	165	B J	5' mUpSmGps5memCpsmApSmGps <u>ApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps5meCpsGpsmApSmApSmGpsmUpSmG-GalNAc 3'</u>	2.8	8637.50
	166	B J	5'mApsmGpsmUpSm5memCps5memCps <u>Aps5meCps5meCAps5meCpsGpsApsGpsTps5meCpsmUpSmApSmGpsmApSm5memC-GalNAc 3'</u>	0.3	8507.51

[0631] *Log减少, 3×30mg/kgSC后

[0632] 图3示出了对于本公开的GalNAc缀合的化合物 (#106、#109、#162和#159) 在体内AAVHBV小鼠模型中经由皮下递送的HBsAg降低水平。对于这些ASO的最大HBsAg降低相似地为~1Log。

[0633] 图4A-C示出了对于本公开的化合物,在AAV-HBV小鼠模型中体内HBsAg、HBeAg和血清HBV DNA数据。当递送SC时, #103、#164和#165显示了AAV-HBV小鼠模型中HBsAg、HBeAg和血清HBV DNA的显著降低。#103还证明当以两种不同剂量水平给药时的剂量响应。图4A示出了HBsAg血清水平。图4B示出了HBeAg血清水平。图4C示出了HBV DNA水平。

[0634] 图4A-C示出了对于本公开的化合物,在AAV-HBV小鼠模型中体内HBsAg、HBeAg和血

清HBV DNA数据。图4A示出了HBsAg血清水平。图4B示出了HBeAg血清水平。图4C示出了HBV DNA水平。

[0635] 图5A-C示出了对于本公开的化合物，在AAV-HBV小鼠模型中体内HBsAg、HBeAg和血清HBV DNA数据。#160、#161、#163、#166、#213和#176显著降低了AAV-HBV小鼠模型中的HBsAg、HBeAg和血清HBV DNA。图5A示出了HBsAg血清水平。图5B示出了HBeAg血清水平。图5C示出了HBV DNA水平。

[0636] 表7

#ID	HBsAg 2215 EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	碱基序列 (5'-3')	经修饰的序列 (5'-3')	MW
167	A	J	GCAGAGGTGAA <u>GCGAAGTGC</u>	5' fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfA npsfGnps <u>GpsTpsGpsApsAps</u> <u>GpsfCnpsfGnpsfAnpsfAnpsf</u> GnpsfUnpsfGnps-3-NH ₂ -fC	6785.38
168	A	J	GCAGAGGTGAA <u>GCGAAGTGC</u>	5' fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfA npsfGnps <u>GpsTpsGpsApsAps</u> <u>GpsCpsfGnpsfAnpsfAnpsfG</u> npsfUnpsfGnps-3-NH ₂ -fC	6768.37
169	A	J	GCAGAGGTGAA <u>GCGAAGTGC</u>	5' fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfA npsfGnps <u>GpsTpsGpsApsAps</u> <u>GpsCpsGpsfAnpsfAnpsfGnp</u> sfUnpsfGnps-3-NH ₂ -fC	6751.37

[0638] 表8

#ID	序列 (5'-3')	HBsAg 2215 EC50 (μM)	HBsAg 2215 CC50 (μM)	MW
170	5' GnpCnpAnpGnpAnpGnp <u>GpsTpsGpsA</u> psApsGpsCnpGnpAnpAnpGnpTnpGnp-3 NH ₂ -C	A	H-I	6339.66
171	5' GnpsfCnpsfAnpsGnpsfAnpsGnps <u>GpsT</u> <u>psGpsApsApsGpsfCnpsGnpsfAnpsfAnps</u> GnpsfTnpsGnps-3 NH ₂ -fC	A	H-I	6692.45
172	5' GnpfCnpfAnpGnpfAnpGnp <u>GpsTpsGps</u> ApsApsGpsfCnpGnpfAnpfAnpGnpfTnpG	A	H-I	6483.58

[0640]

	np-3 NH ₂ -fC			
--	--------------------------	--	--	--

[0641]

表9

#ID	序列 (5'-3')	HBsAg 2215 EC50 (nM)	HBsAg 2215 CC50 (nM)	MW
[0642]	173 5' GnpafCnpsafAnpsGnspafAnpsGnps <u>GpsTpsGpsApsApsGpsafCnpsGnpsafAnpsafAnpsGnpsafUnpsGnpsafC</u>	A	J	6677.43
	174 5' GnpafCnpsafAnpGnpafAnpGnp <u>GpsTpsGpsApsApsGpsafCnpgnpafAnpafAnpGnpafUnpGnpafC</u>	A	J	6468.57
	175 5' GnpafCnpsafAnpGnpafAnpGnp <u>GpsTpsGpsApsApsGpsCpsGnpsafAnpafAnpGnpafUnpGnpafC</u>	A	J	6466.65

[0643] 表10;具有5' GaINAc的Gapmer (2' Ome, 5MeC)

#ID	序列 (5'-3')	2215 HBsAg EC50 (nM)	最大 HBsAg Log 减少 (最低点) *
[0644]	204 5'-GalNAc-NHC6- psmUp sm5meCpsm5meCpsmGpsm5meCps <u>ApsGpsTpsApsTpsGpsGpsApsTps5meCpsmGpsmGpsm5meCpsmAp smG 3'</u>	C	1
	205 5'-GalNAc-NHC6- psm5meCpsmUp smApsmGpsmGps <u>ApsGpsTpsTps5meCps5meCpsGps5meCpsApsGpsmUp smGpsmG 3'</u>	B	1
	206 5'-GalNAc-NHC6- psmApsmApsmGpsmApsmGps <u>ApsGpsGpsTpsGps5meCpsGps5meCps5meCps5meCpsm5meCpsmGpsmUp smGpsmG 3'</u>	B	1
	207 5' GalNAc-NHC6- psmApsmGpsmApsmGpsmGps <u>TpsGps5meCpsGps5meCps5meCps5meCpsGpsTpsmGpsmGpsmUp sm5meCpsmG 3'</u>	B	0.5
	208 5' GalNAc-NHC6- psmUp smGpsm5meCpsmApsmGps <u>ApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps5meCpsGpsmApsmApsmGpsmUpsmG 3'</u>		1.4

[0645] *Log减少, 3×30mg/kgSC后

[0646] 图6A-C示出了对于本公开的化合物,在AAV-HBV小鼠模型中体内HBsAg、HBeAg和血清HBV DNA数据。#204、#205、#206、#207、#208和#212显著降低了AAV-HBV小鼠模型中的HBsAg、HBeAg和血清HBV DNA。图56示出了HBsAg血清水平。图6B示出了HBeAg血清水平。图6C示出了HBV DNA水平。

[0647] 表11:前Poly-A

#ID	序列 (5'-3')	2215 HBsAg EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	最大 HBsAg Log 减少 (最 低 点) *	MW
[0648]	209 mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmApsmAps <u>ApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmApsmUpsmApsmAp</u> smGpsmG	A	J		6758.52
	210 mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmApsAps <u>ApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmApsmUpsmApsmAp</u> smGpsmG	A	J		6728.49
	211 mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmApsAps <u>ApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmApsmUpsmApsmAp</u> smGpsmG	A	J		7073.77
	212 mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmApsmAps <u>ApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmApsmUpsmApsmAp</u> smGpsmG/GalNAc/			0.8	8519.43
	213 mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmApsAps <u>ApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmApsmUpsmApsmAp</u> smGpsmG/GalNAc/			1	8489.40
	176 mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmApsAps <u>ApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmApsmUpsmApsmAp</u> smGpsmG/GalNAc/	B	I	1.2	8834.67
	214 mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmApsmAps <u>ApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmApsmUpsmApsmAp</u> smGpsmG/3CholTEG/				7514.48
	215 mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmApsAps <u>ApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmApsmUpsmApsmAp</u> smGpsmG/3CholTEG/				7484.85
[0649]	216 mGpsmCpsmUpsmCpsmCpsmApsAps <u>ApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmApsmUpsmApsmAp</u> smGpsmG/3CholTEG/				7829.72

[0650] *Log减少, 3×30mg/kg SC后

[0651] 表12

#ID	序列 (5'-3')	2215 HBsAg EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	MW
[0652]	217 5'-mGps5mmCpsmApsmGpsmAp smGpsGpsTp sGpsApsApsGp5mmCpsmGpsmAp smAp smGpsmUp smGpsm5meC-3'	A	I	7009.74
	218 5'-mGps5mmCpsmApsmGpsmAp smGpsGpsTp sGpsApsApsGps5mmCpsmGpsmAp smAp smGpsmU psmGps5mmC-胆固醇-3'	B	I	7764.7
	219 5'-mGps5mmCpsmApsmGpsmAp smGpsGpsTp sGpsApsApsGp5mmCpsmGpsmAp smAp smGpsmUp smGps5mmC-TEG-胆固醇-3'	B	I	7977.84
	220 5'-mGps5mmCpsmApsmGpsmAp smGpsGpsTp sGpsApsApsGps5mmCpsmGpsmAp smAp smGpsmU psmGps5mmC-生育酚-3'	B	I	7708.65
	221 5'-mGps5mmCpsmApsmGpsmAp smGpsGpsTp sGpsApsApsGps5mmCpsmGpsmAp smAp smGpsmU psmGps5mmC-TEG-生育酚-3'			7920.79
	222 5'-mGps5mmCpsmApsmGpsmAp smGpsGpsTp sGpsApsApsGps5mmCpsmGpsmAp smAp smGpsmU psmGps5mmC-GalNAc-3'	B	I	8770.65

[0653] 表13

#ID	序列 (5'-3')	2215 HBsAg EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	MW
[0654]	223 5'-mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsT psGpsApsApsGps5meCpsmGpsmApsmAps mGpsmUpsmGpsm5meC-3'	A	I	6979.71
	224 5'-mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsT psGpsApsApsGps5meCpsmGpsmApsmAps mGpsmUpsmGpsm5meC-po-Chol-3'		I	7735.67
	225 5'-mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsT psGpsApsApsGps5meCpsmGpsmApsmAps mGpsmUpsmGpsm5meC-po-生育酚-3'		I	7678.62
	226 5'-mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsT psGpsApsApsGps5meCpsmGpsmApsmAps mGpsmUpsmGpsm5meC-po-GalNAc-3'	B	I	8740.62
	227 5'-mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsT psGpsApsApsGps5meCpsGpsmApsmApsm GpsmUpsmGpsm5meC-3'	A	I	6949.69
	228 5'-mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsT psGpsApsApsGps5meCpsGpsmApsmApsm GpsmUpsmGpsm5meC-po-Chol-3'		I	7705.65
	229 5'-mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsT psGpsApsApsGps5meCpsGpsmApsmApsm GpsmUpsmGpsm5meC-po-生育酚-3'	A	I	7650.61
	230 5'-mGpsm5meCpsmApsmGpsmApsmGpsGpsT psGpsApsApsGps5meCpsGpsmApsmApsm GpsmUpsmGpsm5meC-po-GalNAc-3'	B	I	8710.59

[0655] 表14

#ID	序列 (5'-3')	2215 HBsAg EC50 (nM)	2215 HBsAg CC50 (nM)	MW
[0656]				

	231	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps(5m)mC-3	A	I	6967.62
	232	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps(5m)mC-Chol-3	A	I	7723.58
	233	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps(5m)mC-Toco-3	A	I	7666.53
	234	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps(5m)mC-GalNAc-3	A	I	8728.52
[0657]	235	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps(5m)mC-3	A	I	6937.59
	236	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps(5m)mC-Chol-3	A	I	7693.55
	237	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps(5m)mC-Toco-3	A	I	7636.50
	238	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps(5m)mC-GalNAc-3	A	I	8698.50
	239	5-mGps2-4-OCH ₂ -(5m)CpsmAps 2-4-OCH ₂ -GpsmAps2-4-OCH ₂ -GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsmGps2-4-OCH ₂ -ApsmAps2-4-OCH ₂ -GpsmUps2-4-OCH ₂ -Gps(5m)mC-3	A	I	6881.57

[0658] 表15

#ID	序列 (5'-3')	2215 HBsAg EC 50 (nM)	2215 CC50 (nM)	MW
[0659]	240 5- dTnpsGnpsCnpsAnpsGnps <u>ApsGpsGpsTps</u> <u>GpsApsApsGpsCpsGpsAnpsAnpsGnpsTnp</u> sGn-3'	A	I	6566.49
	241 5- dTnpsfGnpsCnpsfAnpsfGnps <u>ApsGpsGpsT</u> <u>psGpsApsApsGpsCpsGpsfAnpsfAnpsfGnp</u> sfUnpsfGn 3'	A	I	6700.35

[0660] 表16

#ID	序列 (5'-3')	2215 HBsAg EC50	2215 CC50	MW
[0661]	243 5- fGnpsCnpsfAnpsfGnpsfAnpsfGnps <u>GpsTpsGpsApsAp</u> <u>sGpsCnpsfGnpsfAnpsfGnpsfUnpsfGnpsCn-3'</u>	A	I	6731.41
	242 5- fGnpsCnpsfAnpsfGnpsfAnpsfGnps <u>GpsTpsGpsApsAp</u> <u>sGpsCpsGpsfAnpsfGnpsfUnpsfGnpsCn-3'</u>	A	I	6715.39

[0662] 表17

#ID	Y 结构 域尺寸	序列 (5'-3')	2215 EC 50	2215 CC50 (nM)	MW
[0663]	244 6	5'- dGnpmCnpmAnpmGnpmAnpmGnpGpsT psGpsApsApsGpsCpmGnpmAnpmAn pmGnpmUnpmGnpmCnp-3'	A	I	6714.98
	245 7	5'- dGnpmCnpmAnpmGnpmAnpmGnpGpsT psGpsApsApsGpsCpmGnpmAnpmAnp mGnpmUnpmGnpmCnp-3'	A	I	6702.01
	246 8	5'- dGnpmCnpmAnpmGnpmAnpmGnpGpsT psGpsApsApsGpsCpsGpsCpmAnpmAnpm GnpmUnpmGnpmCnp-3'	A	G	6689.03

247	8	5'- dGnpmCnpmAnpmGnpmAnpGpsGpsTps GpsApsApsGpsCpmGnpmAnpmAnpmG npmUnpmGnpmCnp-3'	A	I	6689.03
248	9	5'- dGnpmCnpmAnpmGnpmAnpGpsGpsTps GpsApsApsGpsCpsGpsCpmAnpmAnpmGn pmUnpmGnpmCnp-3'	A	I	6676.06

[0665] 表18

#ID	序列 (5'-3')	2215 HBs Ag EC50	2215 HBsA g CC50	MW
142	5'- mApSmApSmGpSmApSmGpSmApsGpSmGpSmTpSmGpSm5 meCpSmGpSm5meCpSm5meCpSm5memCpSmGpSm mUpSmGpSmG 3'	A	I	6869.64
196	5'- mApSmApSmGpSmApSmGpSmApSmGpSmTpSmGpSm5 meCpSmGpSm5meCpSm5meCpSm5memCpSm5memCpSm GpSmUpSmGpSmG 3'	A	I	6929.69
[0666]	5'- mApSmApSmGpSmApSmGpSmApSmGpSmTpSmGpSm5 meCpSmGpSm5meCpSm5memCpSm5memCpSm5memCpSm GpSmUpSmGpSmG 3'	A	I	6989.74
143	5'- mGpSmGpSmUpSmGpSmApSmApsGpSm5meCpSmGpSmA psApsGpSmTpSmGpSm5mCpSmAps5memCpSmAps5me meCpSmG 3'	A	I	6863.64
198	5'- mGpSmGpSmUpSmGpSmApSmApsGpSm5meCpSmGpSmA psApsGpSmTpSmGpSm5memCpSmAps5memCpSmAps 5memCpSmG 3'	A	I	6923.69
199	5'- mGpSmGpSmUpSmGpSmApSmApSmGpSm5meCpSmG psApsApsGpSmTpSmGpSm5memCpSmAps5memCpSmA ps5memCpSmG 3'	A	I	6953.72

[0667]	146	5'- mUpsmGpsmGps5memCpsmAps5meCpsTp... mCps5memC 3'	A	I	6987.62
	200	5'- mUpsmGpsmGps5memCpsmAps5memCpsTp... memCps5memC 3'	A	I	6817.64
	201	5'- mUpsmGpsmGps5memCpsmAps5meCpsTp... mCps5memC 3'	A	I	
	147	5'- 5memCpsmUpsmApsmGmGpsApsGpsTp... Cps5meCpsGps5meCpsApsGpsmUp... GpsmG 3'	A	I	6792.55
	202	5'- 5memCpsmUpsmApsmGmGpsmApsGpsTp... eCps5meCpsGps5meCpsApsmGpsmUp... smGpsmG 3'	A	I	6852.60
	203	5'- 5memCpsmUpsmApsmGmGpsmApsmGpsTp... meCps5meCpsGps5meCpsApsmGpsmUp... Up... GpsmG 3'	A	I	6882.62

[0668] 表19

#ID	序列 (5'-3')	2215 HBsAg EC50	2215 CC50	MW
128	5'- GnpsCnpsAnpsGnps <u>ApsGpsGpsTpsGps</u> AnpsAnpsGnpsC nps-3-NH ₂ -G-3'	B	J	4577.86
[0669]	5'- 129 CnpsGnpsTnpsGnpsCnps <u>ApsGpsApsGpsGps</u> TnpsGnpsA npsAnpsGnps-3-NH ₂ -C-3'	B	J	5201.40
	5'- 130 GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnps <u>GpsApsAnpsGn</u> psCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'	A	J	6543.60
	5'- 131 GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnps <u>TpsGps</u> AnpsAnpsGn psCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'	B	J	6543.60

[0670]	132	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnps <u>5'-GpsTpsGnps</u> AnpsAnpsGnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'	B	J	6543.60
	133	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnps <u>5'-GnpsTnpsGnpsApsApsGnps</u> CnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'	B	J	6543.60
	134	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGnpsAnpsApsG <u>5'-GnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH_2-C-3'</u>	B	J	6543.60
	135	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnps <u>5'-GpsTpsGpsApsAnpsAnpsGnps</u> CnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'	B	J	6544.58
	136	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnps <u>5'-GpsApsApsGnps</u> CnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'	B	J	6544.58
	137	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnps <u>5'-TpsGpsApsAnpsGnps</u> CnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'	A	J	6544.58
	138	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGnps <u>5'-ApsApsGnps</u> CnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'	B	J	6544.58
	139	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnps <u>5'-GpsApsApsGps</u> CnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'	A	J	6545.57
	140	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnps <u>5'-TpsGpsApsApsGpsC</u> npsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3 NH ₂ -C-3'	A	J	6546.55

[0671] 表20

#ID	2215 HBsAg EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	2217 上清液 HBVDNA (EC50 nM)	2117 内部 HBVNA EC50 (nM)
177	B	J	D	F
178	B	J	E	F
179	B	J	F	F
180	A	J	D	F
181	B	J	D	F
182	A	J	D	E
183	A	J	D	E
184	A	J	D	D

[0673]	185	A	J	D	E
	186	B	J	D	D
	187	B	J	E	E
	188	B	J	E	F
	189	A	J	D	F
	190	C	J	E	F
	191	B	J	E	F
	192	B	J	D	D
	193	B	J	E	D
	194	C	J	E	E
	195	B	J	E	D

[0674] 表21

#ID	2215 HBsAg EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	2217 上清液 HBVDNA (EC50 nM)	2217 内部 HBVDNA (EC50 nM)
124	B	J	B	B
125	B	J	B	B
126		J	B	A
127	A	J	A	A
128	B	J	C	B
129	B	J	B	B

[0676] 表22

[0677]	2215 HBsAg EC50 (nM)	2215 CC50 (nM)	2217 上清液 HBVDNA (EC50 nM)	2217 内部 HBVDNA (EC50 nM)

	249	C	G	F	F
	250	B	G	F	E
	251	B	G	F	F
	252	B	G	E	E
[0678]	253	B	G	E	E
	254		G	E	D
	255	A	G	D	D
	256	B	G	F	E
	257	B	G	E	E

[0679] 表23

HBsAg 2215 EC50 (μ M)	2215 CC50 (μ M)	序列 (5'-3')	MW
A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGpsApsAnps GnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6543.60
A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTpsGpsAnpsAnps GnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6543.60
A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGpsTpsGnpsAnpsAnps GnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6543.60
A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGnpsApsAps GnpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6543.60
A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGnpsAnpsAps GpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6543.60
A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGpsTpsGpsAnpsAnpsG npsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6544.58
A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGpsApsApsG npsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6544.58
A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTpsGpsApsAnpsG npsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6544.58
A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGnpsApsAps GpsCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6544.58

[0681]	A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTnpsGpsApsApsG psCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6545.57
	A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGnpsTpsGpsApsApsGp sCnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6546.55
	A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGpsTpsGpsApsApsGps CpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6548.52
	A	E-F	GnpsCnpsApsGnpsAnpsGpsGnpsTnpsGpsAnpsAnpsG psCnpsGnpsApsAnpsGnpsTpsGnps-3nh2-C	6547.54
	A	E-F	GpsCnpsAnpsGpsAnpsGnpsGpsTnpsGnpsApsAnpsGn psCpsGnpsAnpsApsGnpsTnpsGps-3nh2-C	6548.52
	A	E-F	GnpsCpsAnpsGnpsApsGnpsGnpsTpsGnpsAnpsApsGn psCnpsGpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6547.54
	A	E-F	GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGnpsGpsTpsGpsApsApsGps CnpsGnpsAnpsAnpsGnpsTnpsGnps-3nh2-C	6547.54

[0682] 体外和体内测试两个寡核苷酸,第一个包含2' MOE PS修饰,并且另一个包含2' MOE NPS。下表24-26概述了测试的结果。

[0683] 表24

序列	T _m (°C)	最大 HBsAg 减少 (最低点) 3×10mg/kg	最大 HBeAg 减少 (最低点) 3×10mg/kg
258	77.2	3.4 log	2.7 log
259	69.9	2.4 log	1.9 log
改善	7.3	1 log	0.8 log
#	序列 (5'-3')		分子量
258	^{5'} -mGnpsmoeCnpsmoeAnpsmGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsA psApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmGnpsmoeUnpsmGnpsmoe Cnp-C6-NH-GalNAc6-3'		8862.97
259*	^{5'} -moeGps(5me)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsG psApsApsGps(5me)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoe Gps(5me)moeC-po-GalNAc2-3'		9008.93

[0685] *还测试了序列260和261并提供类似的结果。

[0686] 图9 (a) 示出在0、2、4天,在HBV小鼠模型中以3×10mg/kg测试的低聚物1和2的HBsAg结果。图9(b) 示出了HBeAg结果。

[0687] 表25

序列	T _m (°C)	最大 HBsAg 减少 (最低点) 3×10mg/kg	最大 HBeAg 减少 (最低点) 3×10mg/kg
262	77.3	3.1 log	2.5 log
263	69.9	2.4 log	1.9 log
改善	7.4	0.7 log	0.6 log

#	序列 (5'-3')	分子量
262*	5'-GalNAc 2- moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsA psApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoe Cn 3'	8941.00
263	5'- moeGps(5me)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsA psApsGps(5me)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5m e)moeC-GalNAc2-3'	9008.93

[0690] *5' -GalNac2-

[0691] moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps (5m) CpsGpsAp
smoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3'

[0692] 和

[0693] 5' -GalNac-

[0694] moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoe
AnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3' 也被测试并提供类似的结果。

[0695] 表26

序列	最大 HBsAg 减少 (最低点) 3×5mg/kg	最大 HBeAg 减少 (最低点) 3×5mg/kg	
266	2.3 log	2.1 log	
267	2.2 log	1.9 log	
改善	0.1 log	0.2 log	
#	序列 (5'-3')		分子量
266*	5-GalNAc2- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsG ps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoe Cn-3		8736.73
267	5'-GalNac6- NH-C6- moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGp sApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeG ps(5m)moeC-3'		9105.14

[0697] *5' -GalNAc2-

[0698] mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpGsGsApsApsGps (5m) CpsGpsApsmAnpsmGnp smUnpsmGnpsmCn-3' 也被测试并提供了类似的结果。

[0699] 如在上文中可见到的, MOE NPS低聚物在体内比MOE PS更有效, 并且OMe NPS与MOE PS低聚物一样有效。

[0700] 体外和体内测试了两种寡核苷酸, 第一个包含OEt NPS取代, 并且第二个具有MOE NPS。下表27汇总了测试结果。

[0701] 表27

序列	最大 HBsAg 减少 (最低点) 3×5mg/kg	最大 HBeAg 减少 (最低点) 3×5mg/kg
269	1.9 log	1.7 log
270	1.9 log	1.8
差值	0 log	-0.1 log
#	序列 (5'-3')	
269	5'-GalNAc2-etoGnps(5m)etoCnpsmtoAnpsmtoGnpsmtoAnpsGps GpsTpGsGsApsApsGps(5m)CpsGpsApsetoAnpsmtoGnpsmtoTnpsmtoGnps(5m)etoC n-3'	
270	5-GalNAc2- moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpGsGsApsApsGps(5m)Cp sGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn-3	

[0703] 如在上文中可见到的, MOE NPS低聚物具有与OEt NPS低聚物类似的活性。

[0704] 体外测试四个寡核苷酸, 第一个包含MOE PS取代, 第二个具有MOE NPS取代, 第三个具有OME PS取代, 第四个具有OME NPS。下表28汇总了测试的结果。与序列#9 (MOE PS) 相比, 序列#10 (MOE NPS) 在体外的7倍的效能。与序列#11 (OME PS) 相比, 序列#12 (OME NPS) 接近6倍更有效能。

[0705] 表28

序列	2215 HBsAg EC50 (nM)	T _m (°C)
271	5	69.9
272	0.7	77.3
273	5	70.7
274	0.9	75.5

#	序列 (5'-3')	MW
[0707]	5'-moeGpsmoemCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps5mCpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGpsmoemC 3'	7344.19
	5'moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn 3'	7276.27
	5'-mGps5mmCpsmApsmGpsmApssGpsGpsTpsGpsApsApsGps5mCpsGpsApssApssGpsmUpssGps5mmC-3'	6889.64
	5'-mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn-3'	6837.71

[0708] 在体内测试两个寡核苷酸,第一个包含5' GalNAc-2' -MOE NPS取代,第二个具有5' -GalNAc-6:MOE PS取代。下表29连同图8汇总了测试的结果。最大HBsAg还原(最低点)改善示于表29中。在某些时候,优势高达0.81log (6x) 差异,并且MOE NPS优于MOEPS的优点在整个42-天的研究持续时间的大多数天中保持。

[0709] 表29

#	序列 (5'-3')	MW
[0710]	5'-GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps (5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeUnps moeGnpsmoeCn-3'	8957.00
	5'-GalNac6-NH-C6-moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5m)moeC-3'	9105.14

剂量	HBsAg最大降低(最低点)的改善
3×5mg/kg	0.4Log (2.5倍)
1×5mg/kg	0.51og (3.2倍)

[0712] 在体内测试两个寡核苷酸,第一个包含3' GalNAc-2' -MOE NPS取代,第二个具有3' -GalNAc2' -MOE PS取代。下表30汇总了测试的结果。

[0713] 表30

#	序列 (5'-3')	MW
[0714]	5'moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5me)moeC-GalNAc2-3'	9008.93
	5'-mGnpsmoeCnpsmoeAnpsmGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoeApsmGnpsmoeUnpsmGnpsmoeCnp-C6-NH-GalNAc6 3'	8862.97

[0715]	序列	277	258	改善
	T _m (°C)	69.9	77.2	7.3
	2215 HBsAg 体外 EC50 (nM)	5	0.7	7.1-折叠
	最大 HBsAg 减少 (最低点) 3×10mg/kg	2.4 log	3.4 log	1 log (10 倍)
	最大 HBeAg 减少 (最低点) 3×10mg/kg	1.9 log	2.7 log	0.8 log (6.3 倍)

[0716] 在体内测试两个寡核苷酸,第一个包含OME NPS取代,第二个具有OME PS取代取代。下表31连同图10汇总了测试的结果。OME NPS在体内比OME PS更有效能。

[0717] 表31

[0718]	#	序列 (5'-3')	MW
	278	5-GalNAc2-mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn-3'	8502.45
[0719]	279	5-mGps(5m)mCpsmApsmGpsmApssGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApssGpsmUpsmGps(5m)mC-GalNAc-3'	8650.54
	改善 OME NPS 优于 OME PS	最大 HBsAg 减少 (最低点) 改善	最大 HBeAg 减少 (最低点)
	3×10mg/kg	0.9 Log (8 倍)	0.5 Log (3.2 倍)

[0720] 在HBV小鼠模型中测试了以下序列。结果示于图11中。在图11A中,以1×10mg/kg剂量,3' GalNac MOE NPS比5' GalNac MOE PS保持高达0.81log (6倍) 更好的效能,在整个21天研究的大多数保持优势。5' GalNac MOE NPS比5' GalNac MOE PS保持高达0.41log (2.5倍) 更好的效能,在整个21天研究的大多数保持优势。在图11B中,以3×3.3mg/kg剂量,3' GalNac MOE NPS和5' GalNac MOE NPS类似地进行,两者都比5' GalNac MOE PS保持高达0.61log (4倍) 的效能,在整个21天研究的大多数保持优势。

[0721] 表32

[0722]	#	化学	序列 (5'-3')	MW
	276	MOE PS	5'-GalNac6-NH-C6-moeGps(5m)moeCpsmoeApssmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApssmoeGpsmoeTpsmoeGps(5m)moeC-3'	9105.14
	280	MOE NPS	5'-GalNac2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3'	8957.00

[0723] 在HBV小鼠模型中测试了以下序列。对于10mg/kg单一剂量的给药方案结果示于图11A中,以及对于在第0、2、4天,以 $3 \times 3.3\text{mg}/\text{kg}$ 的给药方案示于图11B中。

[0724] 表33

#	化学	序列 (5' - 3')	MW
276	MOE PS	5'-GalNac6-NH-C6-moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpssGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpssmoeGps(5m)moeC-3'	9105.14
[0725]	281	5'-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpssGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCnp-C6-NH-GalNAc6-3'	9053.85
	282	5'-GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpssGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3'	8957.00

[0726] 在HBV小鼠模型中测试了以下序列。右列中的值示出了在第0、2、4天,以 $3 \times 10\text{mg}/\text{kg}$ 给药的以LOG计的最大HBsAg减少。

[0727] 表34

#	化学	序列 5'-3'	最大 HBsAg 减少 (最低点)	MW
[0728]	283	5'-GalNAc-GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGpsGpsTpssGpsApsApsGpsCpsGpsApsAnpsGnpsTnpsGnpsCn-3'	1.1	8312.38
	265	5'-GalNAc-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpssGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3'	3.1	9037.17

[0729] 在HBV小鼠模型中测试了以下序列。右列中的值示出了在第0、2、4天,以 $3 \times 10\text{mg}/\text{kg}$ 给药的以LOG计的最大HBsAg减少。

[0730] 表35

编号	靶向 HBV 区域	化学	序列 5'-3'	以 log 计 的最大 HBsAg 减 少 (最底 点)	MW	
[0731]	283	DR2 #1	脱氧 NPS	5'-GalNAc- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGps GpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAp sAnpsGnpsTnpsGnpsCn-3'	1.1	8312. 38
	284	DR2 #1	OME NPS	5'-GalNAc- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnp sGps GpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAp smAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn- 3'	2.1	8598. 62
	285	DR2 #1	F NPS	5'-GalNAc- fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGps GpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAp sfAnpsfGnpsfUnpsfGnps-3nh2-fC- 3'	2.5	8478. 26
	286	DR2 #1	Ara F NPS	5'-GalNAc- afGnpsafCnpsafAnpsafGnpsafAnp sGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsG psApsafAnpsafGnpsafTnpsafGnps afCn-3'	0.5	8492. 29
[0732]	287	DR2 #2	脱氧 NPS	5'-GalNAc- dTnpsGnpsCnpsAnpsGnpsApsGpsG psTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAnpsA npsGnpsTnps-3nh2-G-3'	1.1	8327. 29
	288	DR2 #2	OME NPS	5'-GalNAc- mUnpsmGnpsmCnpsmAnpsmGnps ApsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCps GpsmAnpsmAnpsmGnpsmUnpsmG n-3'	2.1	8599. 60
	289	DR2 #2	F NPS	5'-GalNAc- fUnpsfGnpsfCnpsfAnpsfGnpsApsG psGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsfA npsfAnpsfGnpsfUnps-3nh2-fG-3'	2.4	8479. 24
[0733]	290	前-PolyA	OME NPS	5'-GalNAc- mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps	1.1	8807. 84

			ApsApsApsTpsTps5MeCpsTpsTpsT psApsmUnpsmAnpsmAnpsmGnpsm GnpsmGn-3'			
[0734]	291	前-PolyA	MOE NPS	5'-GalNAc- moeGnpsmoeCnpsmoeUnpsmoeCnp smoeCnpsApsApsApsTpsTps5MeC psTpsTpsTpsApsmoeUnpsmoeAnps moeAnpsmoeGnpsmoeGnpsmoeGn- 3'	2.0	9292. 42

[0735] 使用(1) HepG2.2.15 HBsAg降低效能比较,(2) HepG2.117 HBV DNA降低效能比较,(3) 原发性人类肝细胞(PHH)HBsAg降低效能比较,(4) 原发性人类肝细胞(PHH)HBeAg降低效能比较测试具有MOE/NPS和MOE/PS取代的下列低聚物。

[0736] 表36

编号	序列 (5'-3')	2215 HBsAg EC50 (nM)	1 2117 HBV DNA EC50 (nM)	2 PHH HBsAg EC50 (nM)	3 PHH HBeAg EC50 (nM)	4 MW
[0737]	292 5'- moeGps(5m)moeCpsmoe ApsmoeGpsmoeApsGps GpsTpsGpsApsApsGps(5 m)CpsGpsApsmoeApsm oeGpsmoeTpsmoeGps(5 m)moeC-3'	5.1	11.4	16.2	20.1	7344.1 9
	293 5'- moeGnpsmoeCnpsmoeAn psmoeGnpsmoeAnpsGps GpsTpsGpsApsApsGps(5 m)CpsGpsApsmoeApsm oeGnpsmoeUnpsmoeGnps moeCn-3'	0.43	1.9	1.7	2.5	7292.2 6

[0738] 表37

编号	化学	MW	序列
[0739]	294 F NPS 具有 OPO 连接至 3'GalNac	8507 .3	5'- fGnps(5m)fCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGp sCpsGpsApsfAnpsfGnpsfTnpsfGnpsfC-C6-NH-GalNac6-3'
	295 F NPS 具有 NPO 连接至 3'GalNac	8492. 29	5'- fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m) CpsGpsApsfAnpsfGnpsfUnpsfGnpsfCnp-C6-NH-GalNac6-3'

[0740] 如图12A所示。以1×10mg/kg,F NPS具有OPO键合至3' GalNac显著优于具有NPO键

合的F NPS,在某些时间点高达 $1.21\log(16)$ 倍)。

[0741] 表38

编号	化学	MW	序列
[0742]	296 OME NPS 具有 NPO 键合至 3'GalNac	8614.39	5-mGnpsmCnpsmAnps mGnpsmAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps mAnpsmGnpsmUnps mGnpsmCnp-C6-NH- GalNAc6-3
	297 OME NPS 具有 OPO 键合至 3'GalNac	8614.43	5-mGnpsmCnpsmAnps mGnpsmAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps mAnpsmGnpsmUnps mGnpsmC-C6-NH- GalNAc6-3

[0743] 如图12B所示,以 $1 \times 10\text{mg/kg}$,OME NPS具有OPO键合至3' GalNac显著优于具有NPO键合的OME NPS,在某些时间点高达 $0.71\log(5)$ 倍)。

[0744] 表39

编号	化学	MW	序列
[0745]	298 OME NPS 具有 NPO 键合至 3'GalNac	9054.52	5'-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps moeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnpsmoeCnp-C6-NH- GalNAc6-3'
	299 MOE NPS 具有 NPO 键合至 3'GalNac	9069.62	5'-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps moeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnps(5m)moeC-C6-NH- GalNAc6-3'

[0747] 表40

编号	化学	MW	序列
[0748]	300 5' GalNac MOE NPS	8955.48	5-GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps moeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnpsmoeCn-3
	301 5' GalNac OEt NPS	8697.6	5-GalNAc2-etoGnpseto(5m)CnpsetoAnps etoGnpsetoAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps etoAnpsetoGnpsetoTnps etoGnpseto(5m)Cn-3'

[0749] 如图12C所示,以 $1 \times 10\text{mg/kg}$,OEt NPS与MOE NPS一样有效能。

[0750] 表41

编号	序列 5'-3'	修饰	MW	2215 HBsAg EC50(u M)	2215 HBs Ag CC50 (uM)
[0751]	302 5-mGnpsmCnps2-4-OCH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTp sGpsApsApsGpsCpsGpsAps2-4-OCH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	抗-DR-1 具有 x2 3'-NH-LNA-A	6835.3	0.0008	0.014 8
	303 5-mGnpsmCnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTp sGpsApsApsGpsCpsGpsAps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	抗-DR-1 具有 x2 3'-NH-ENA-A	6862.0	0.00067	0.025 6
[0752]	304 5-mGnpsmCnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnps2-4OCH ₂ CH ₂ AnpsGpsGpsTp sGpsApsGpsCpsGpsAps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	抗-DR-1 具有 x3 3'-NH-ENA-A	6874.7	0.0009	0.021 4
	305 5-mGnpsmCnpsmAnpsmGnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsGpsGpsTp sGpsApsGpsCpsGpsAps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	抗-DR-1 具有 x2 3'-NH-ENA-A	6863.3	0.00029	0.022 6
	306 5-mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTp sTpCsTp mAnpsmUnpsmAnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmGnps3-NH ₂ mG-3	前 Poly-A 具有 x2 3'-NH-ENA-A	7116.0	0.0005	>1.00
	307 5-mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTp sTpCsTp mAnpsmUnpsmAnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmGnps3-NH ₂ mG-3	前 Poly-A 具有 x3 3'-NH-ENA-A	7128.6	0.00055	>1.00
	308 5-mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTp sTpCsTp mAnpsmUnpsmAnps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmGnps3-NH ₂ mG-3	前 Poly A 具有 x3 3'-NH-ENA-A	7127.9	0.0006	>1.00

[0753] 表42

[0754]	编号	寡核苷酸 (5'-3')	修饰	2215 HBsAg EC50 (uM)	2215 HBsAg CC50 (uM)
	XX	5- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsG psTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnps mGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	对照	---	---
	309	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmAnpsmGnpsmA npsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsA psmAnpsmGnpsmUnps2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mC-3	DR-1 具有 3'-NH-ENA-G (1+1)	0.0013	0.0553
	310	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsAp sApsGpsCpsGpsApsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmUnps2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mC-3	DR-1 具有 3'-NH-ENA-G 2+2 3'-NH-ENA-G	0.0006	0.0230
[0755]	311	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTp sGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGn psmUnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	DR-1 具有 3'-ENA-G & 3'- ENA A (1+1) 非对称的	0.00078	0.0305
	312	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmUnpsmCnpsmC nps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTp sTps mAnpsmUnpsmAnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsm2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mG-3	前 Poly-A 具有 1+1/1+1 3'-NH-ENA-G+A	0.0015	>1.00
	313	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmUnpsmCnpsmC npsmAnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTpsTp s mAnpsmUnpsmAnpsmAnpsmGnpsm2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mG-3	前 Poly-A 具有 3'-NH-ENA-G 1+1	0.0017	>1.00

[0756] 表43

[0757]	编号	实测 MW:	寡核苷酸 (5'-3')	修饰	HPLC 纯度	2215 HBsA g EC50 (uM)	2215 HBsAg CC50 (uM)
	314	6838.8	5- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGps GpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAn psmGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	对照	86%	---	---

[0758]	315	6902.9	5-mGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmAnpsGpsGpsTp sApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	DR-1 2+1	83%	0.003 3	>1.00
	316	6914.8	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2-4 OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTp sGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmG nps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmGnps2- OCH ₂ CH ₂ 3-NH ₂ (5me)C-3	DR-1 2+2	94%	0.004 3 0.002 5	>1.00
	317	7169.0	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmCnpsmCnpsmAnpsAps ApsTpssCpsTpssTpssTpssAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmAnpsmAnpsmGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mG-3	前 Poly A 2+2	84%	0.002 5	>1.00
	318	7182.2	5-mGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmUnps2-4 OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmCnpsmAnpsApsApsTpssTpss CpsTpssTpssTpssAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmAnpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmGnps3-NH ₂ mG-3	前 Poly A 2+2	95%	0.005 1	>1.00

[0759] 在一些实施方案中,本公开的寡核苷酸还包括选自表1-43中所列的核碱基序列的寡核苷酸,与表1-43中所列序列的修饰无关。本公开的寡核苷酸还包括寡核苷酸,该寡核苷酸包含与选自表1-43中所列序列的核碱基序列至少90%相同的序列,与表1-43中所列序列的修饰无关。在一些实施方案中,1、2、3、4、5种核碱基不同于表1-43中所列的序列,与表1-43中所列的序列的修饰无关。

[0760] 在一些实施方案中,本公开的寡核苷酸还包括选自表1-43中所列的核苷酸序列的寡核苷酸,与表1-43中所列的序列的核碱基无关。本公开的寡核苷酸还包括寡核苷酸,该寡核苷酸包含与选自表1-43中所列序列的核苷酸序列至少90%相同的序列,与表1-43中所列序列的核碱基无关。在一些实施方案中,1、2、3、4、5种核碱基不同于表1-43中所列的序列,与表1-43中所列的序列的修饰无关。

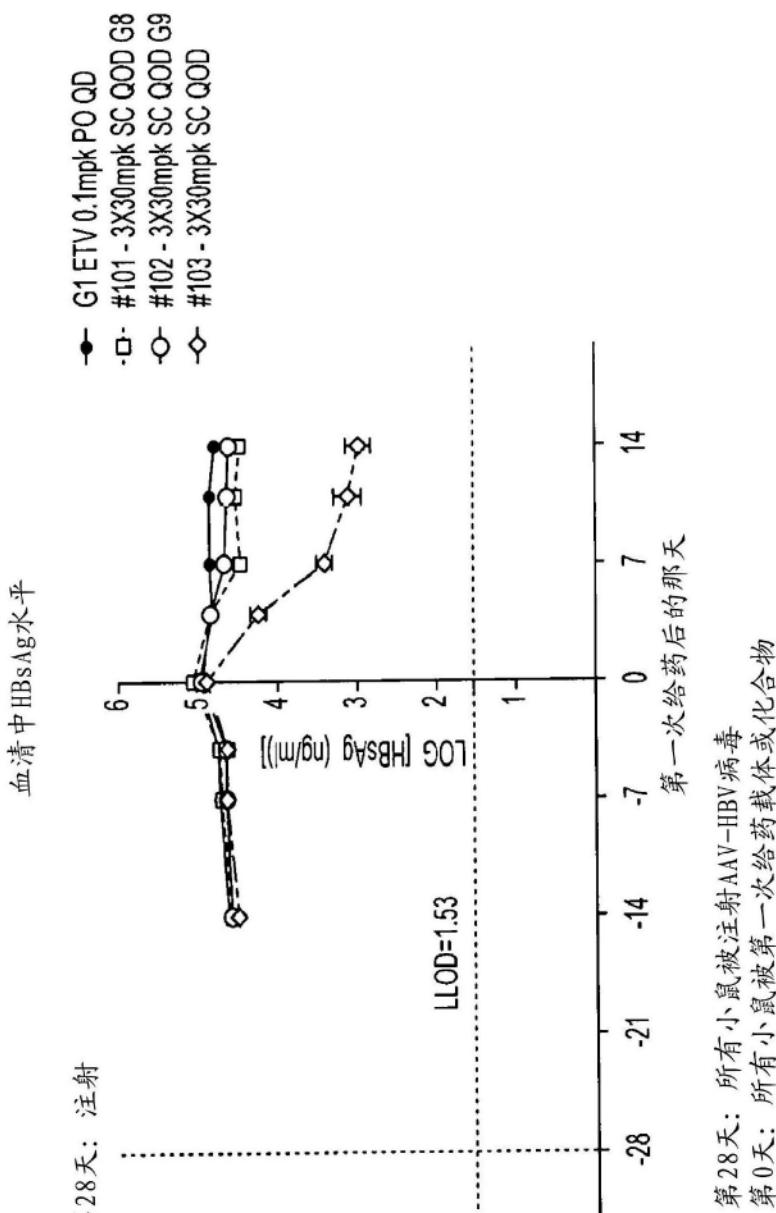


图1A

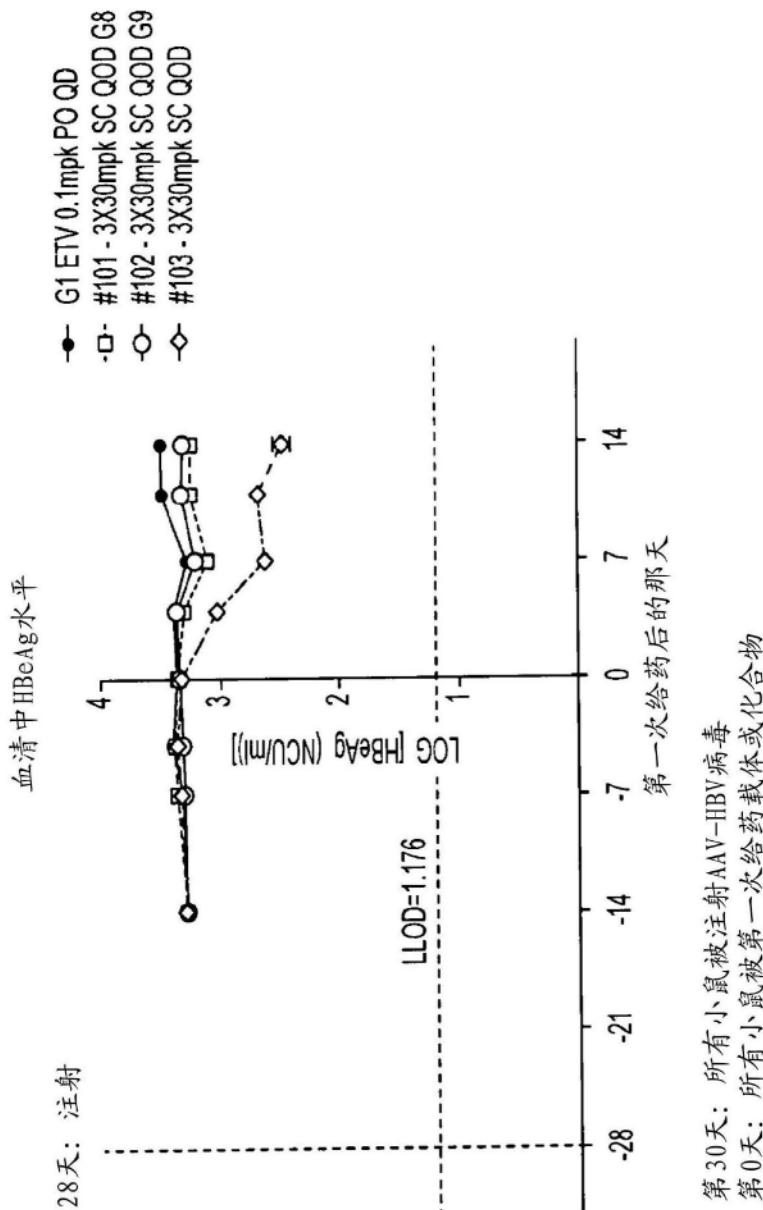


图1B

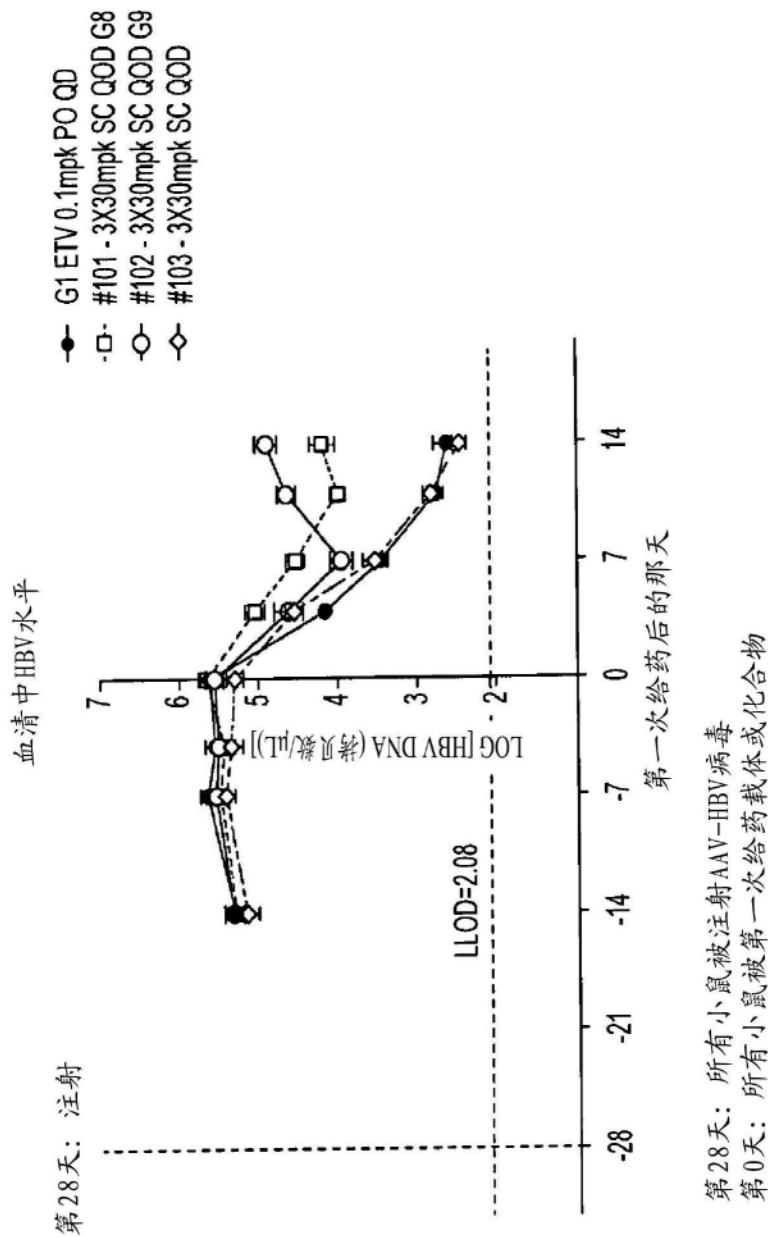


图1C

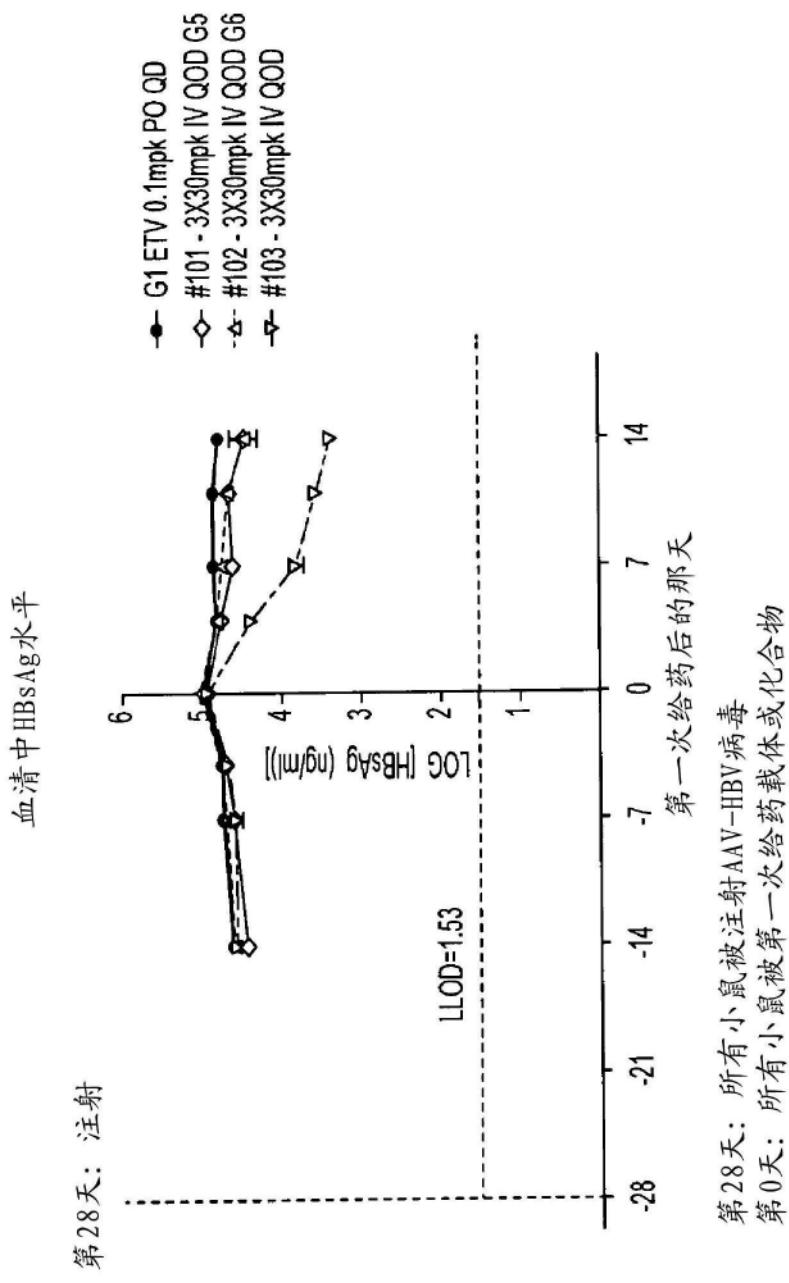


图2A

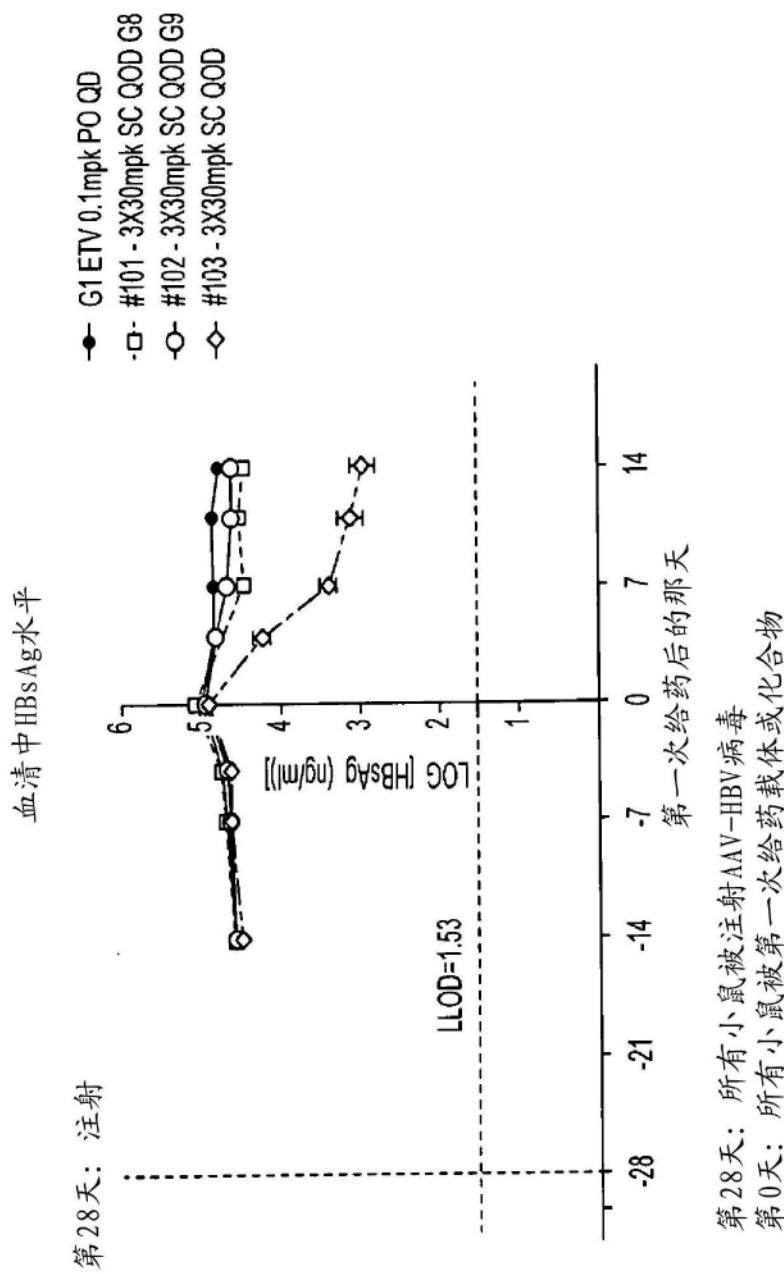
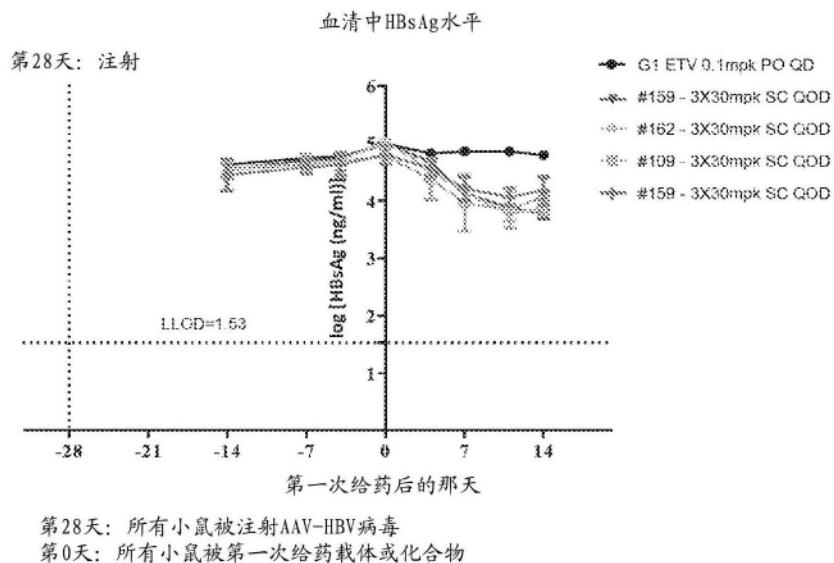


图2B



	<chem>S'-mGpsmAp smUp smUp smApsmGpsGpsCpsApsGpsGpsGpsTp smGpsmAp smApsmAp smApsmG-GalNAc-3'</chem>
	<chem>S'-mGpsmAp smUp smUp smApsmGpsGpsCpsApsGpsGpsGpsTp smGpsmAp smApsmAp smApsmG-GalNAc-3'</chem>
	<chem>S'mAp smAp smGpsmAp smGpsApsGpsGpsTp smGps5meCpsGps5meCps5meCps5memCpsmGpsmUp smGpsmG-GalNac 3'</chem>
	<chem>S'5memCpsmUp smAp smGmGpsApsGpsTp s5meCps5meCpsGps5meCpsApsGp smUp smAp smUp smGpsmG-GalNac 3'</chem>

图3

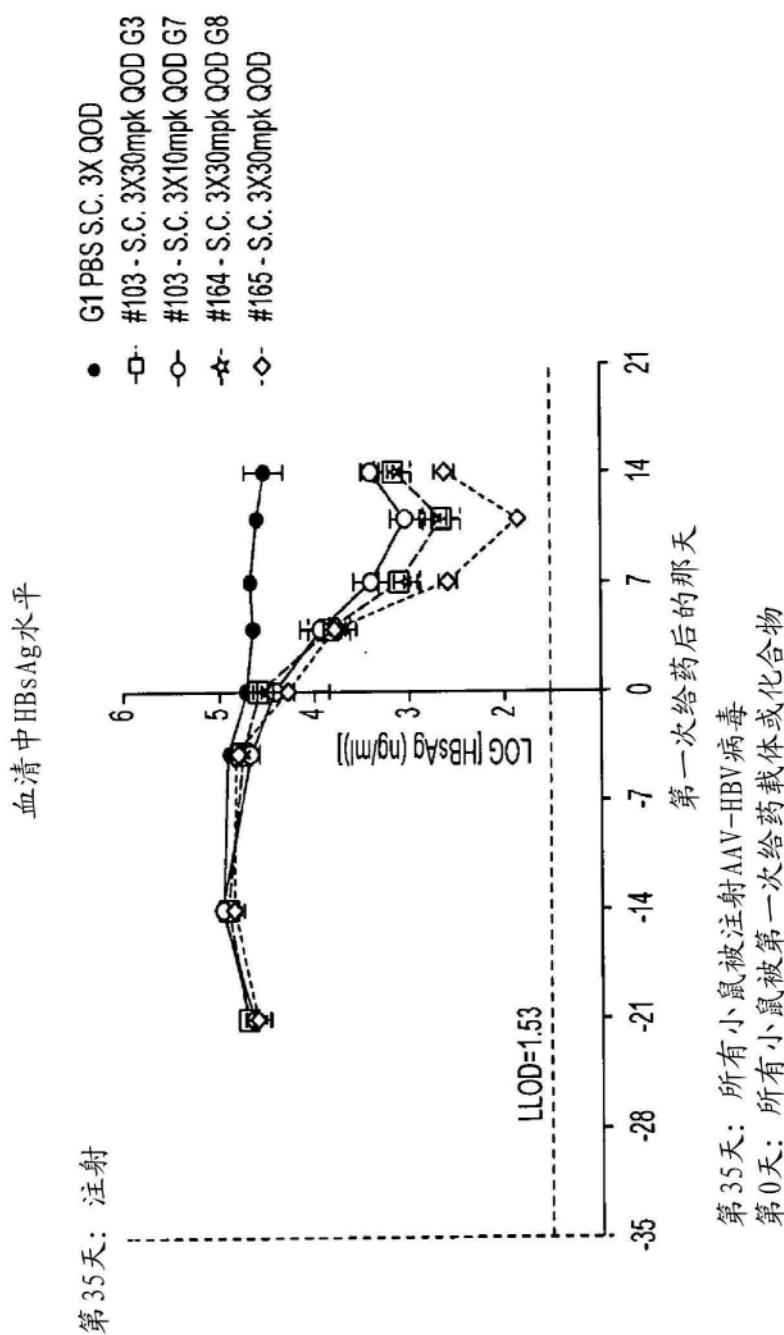


图4A

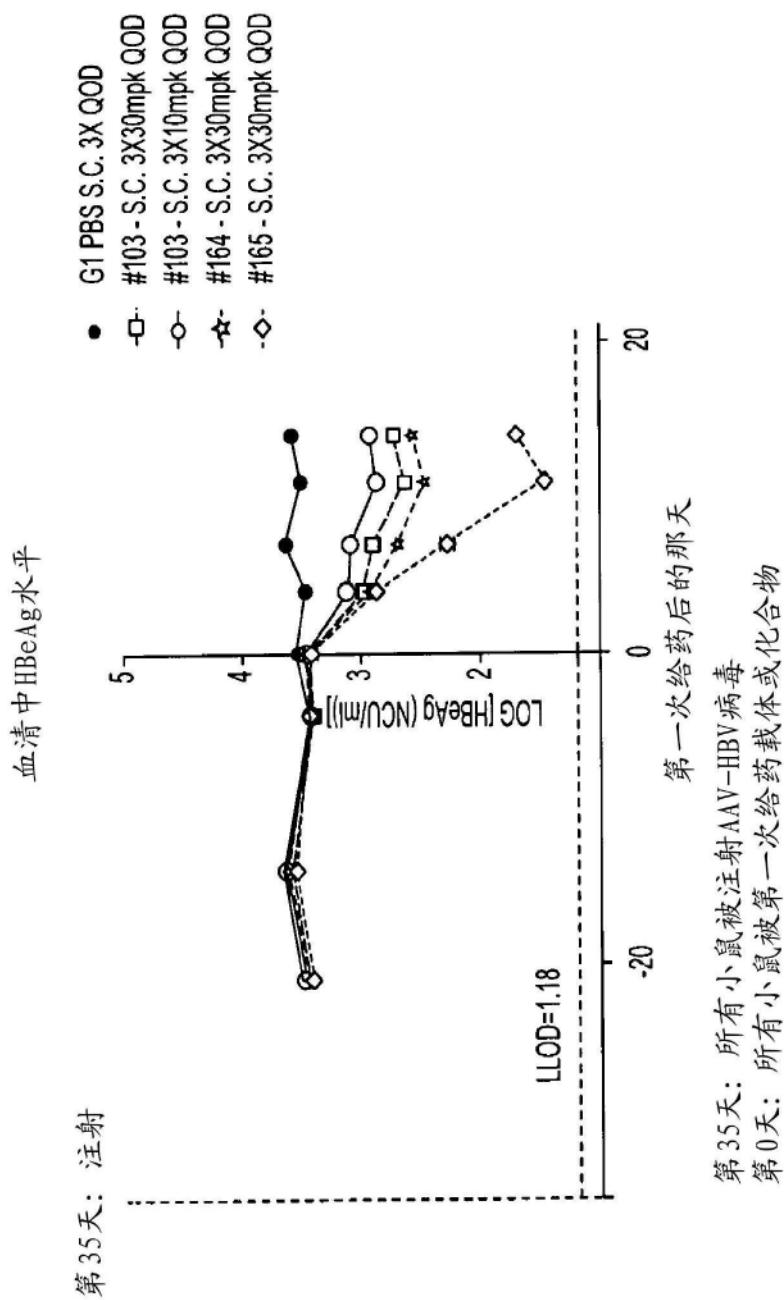


图4B

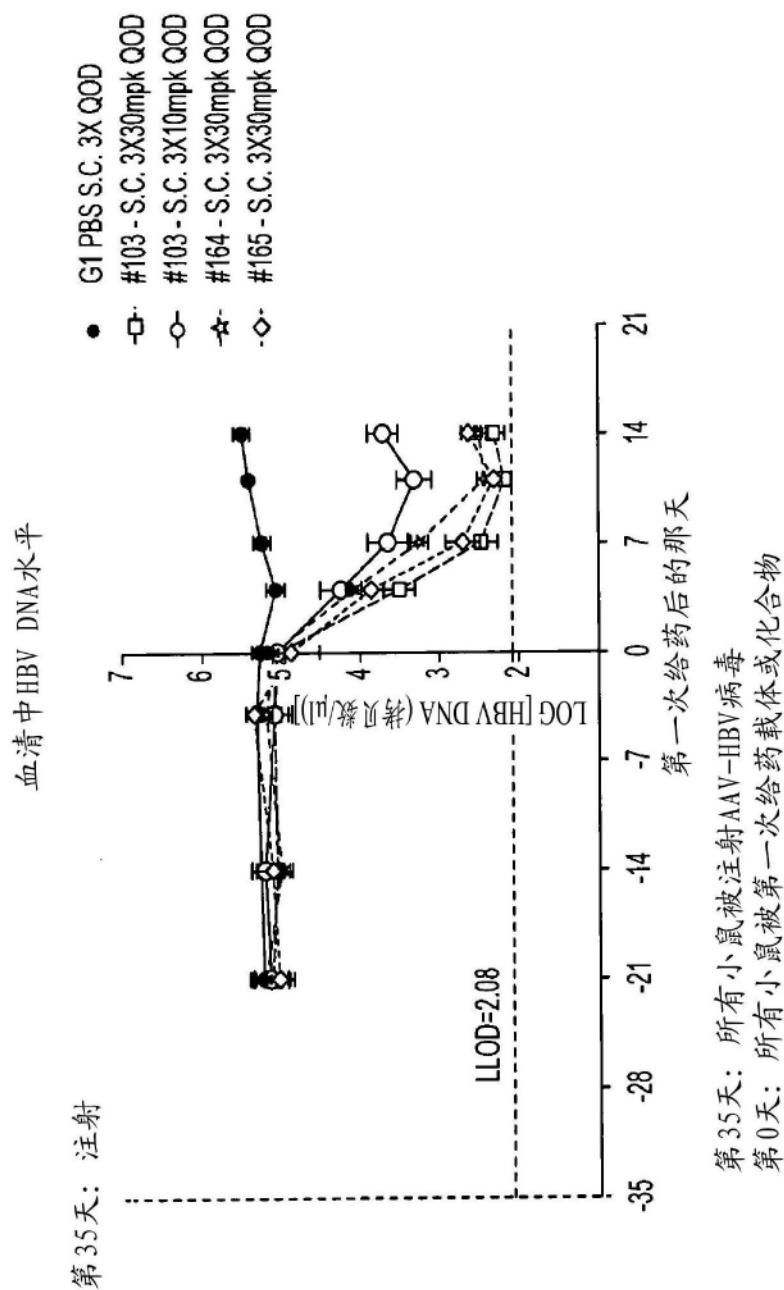


图4C

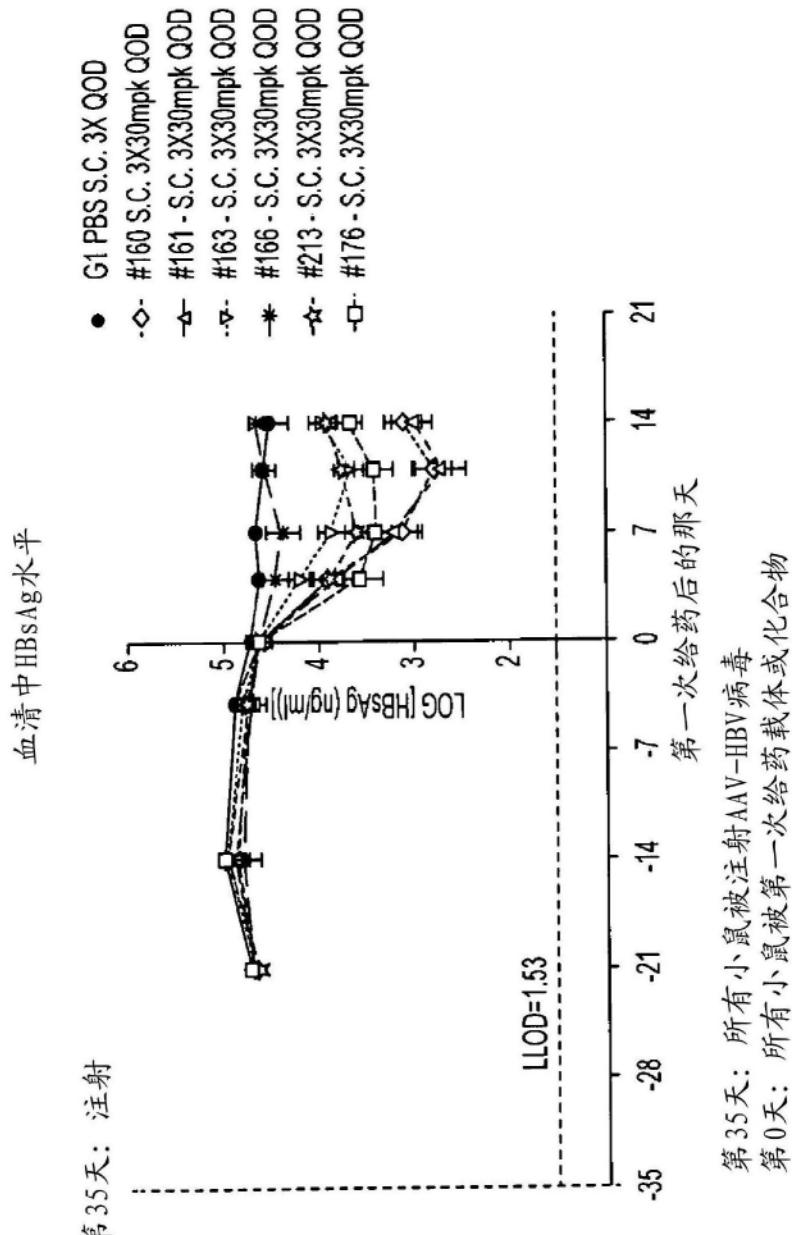
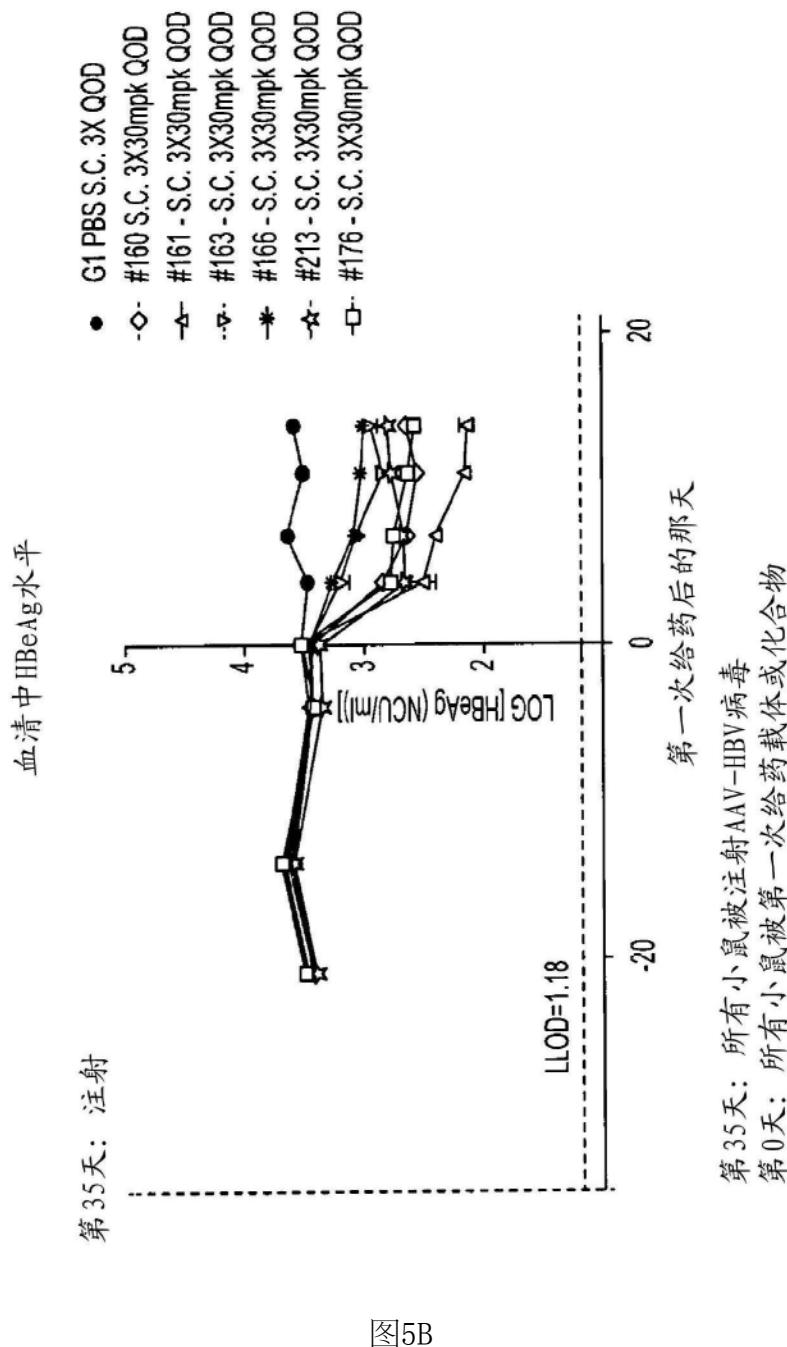


图5A



第35天：所有小鼠被注射AAV-HBV病毒
 第0天：所有小鼠被第一次给药载体或化合物

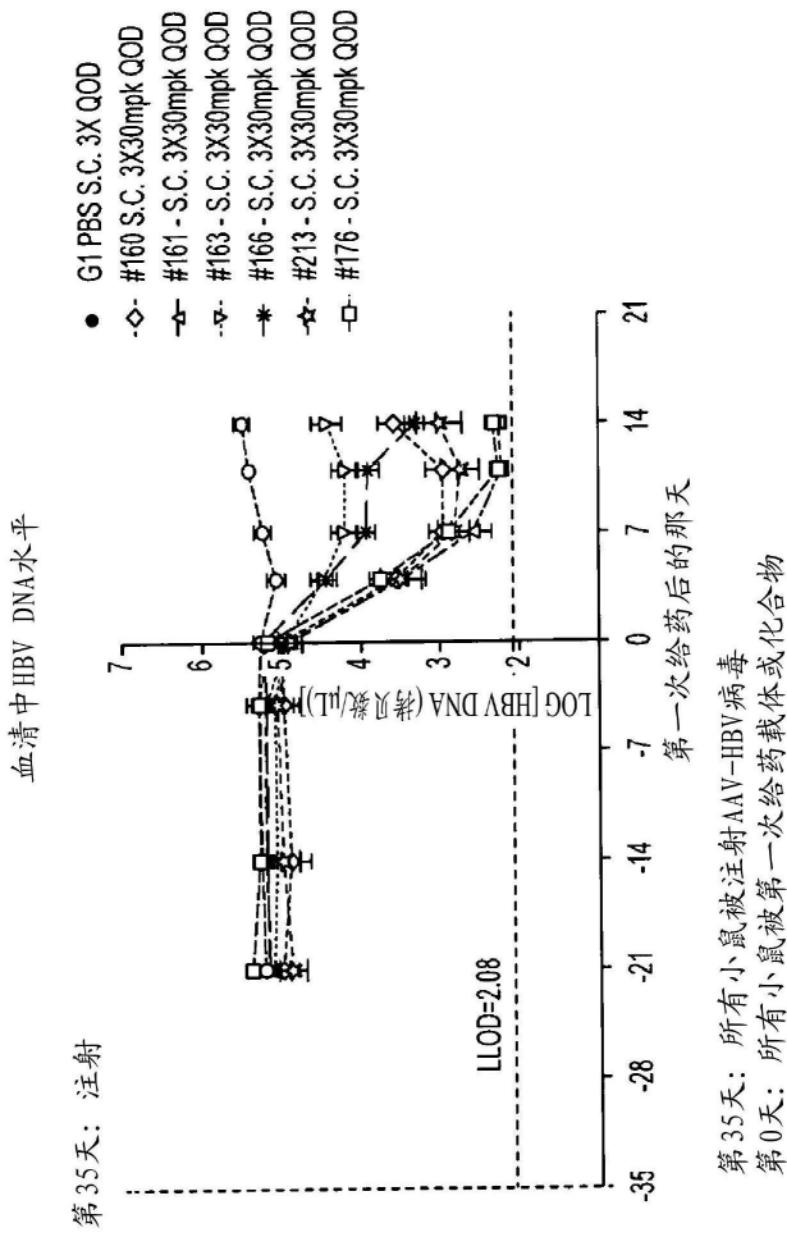
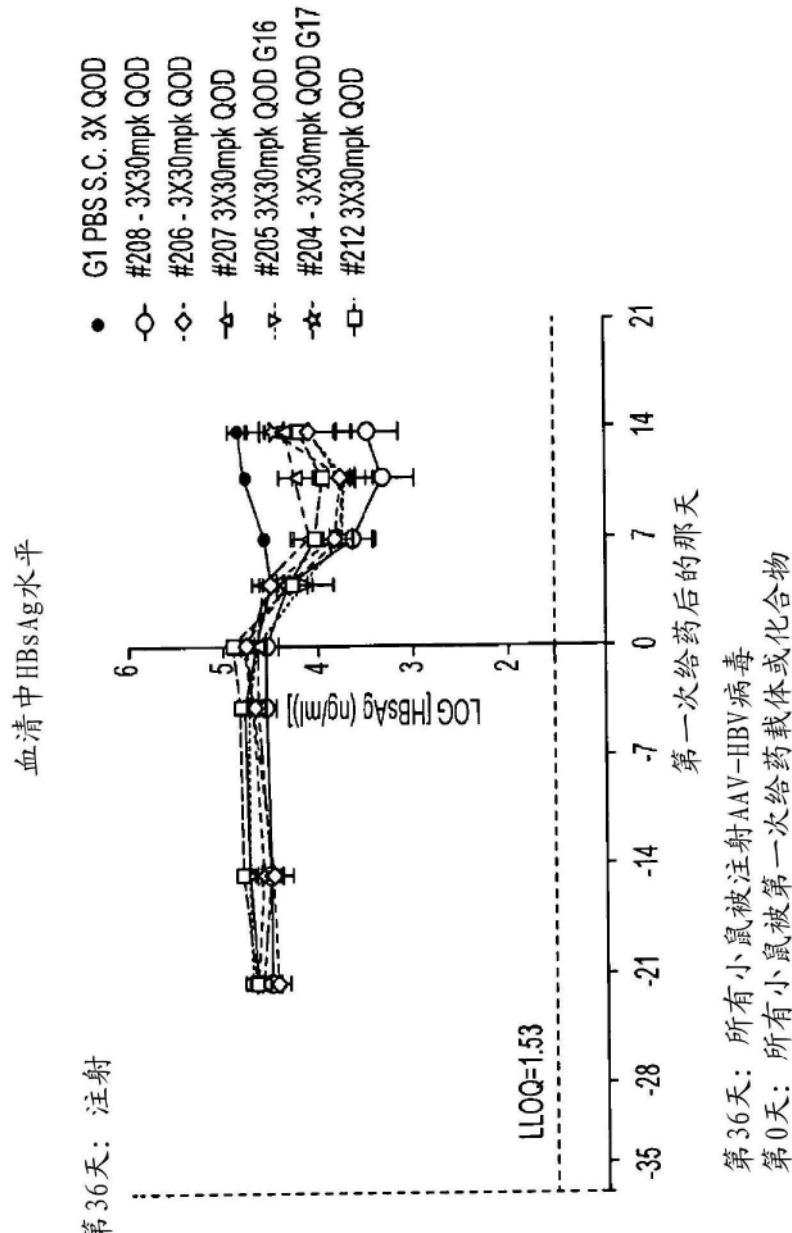
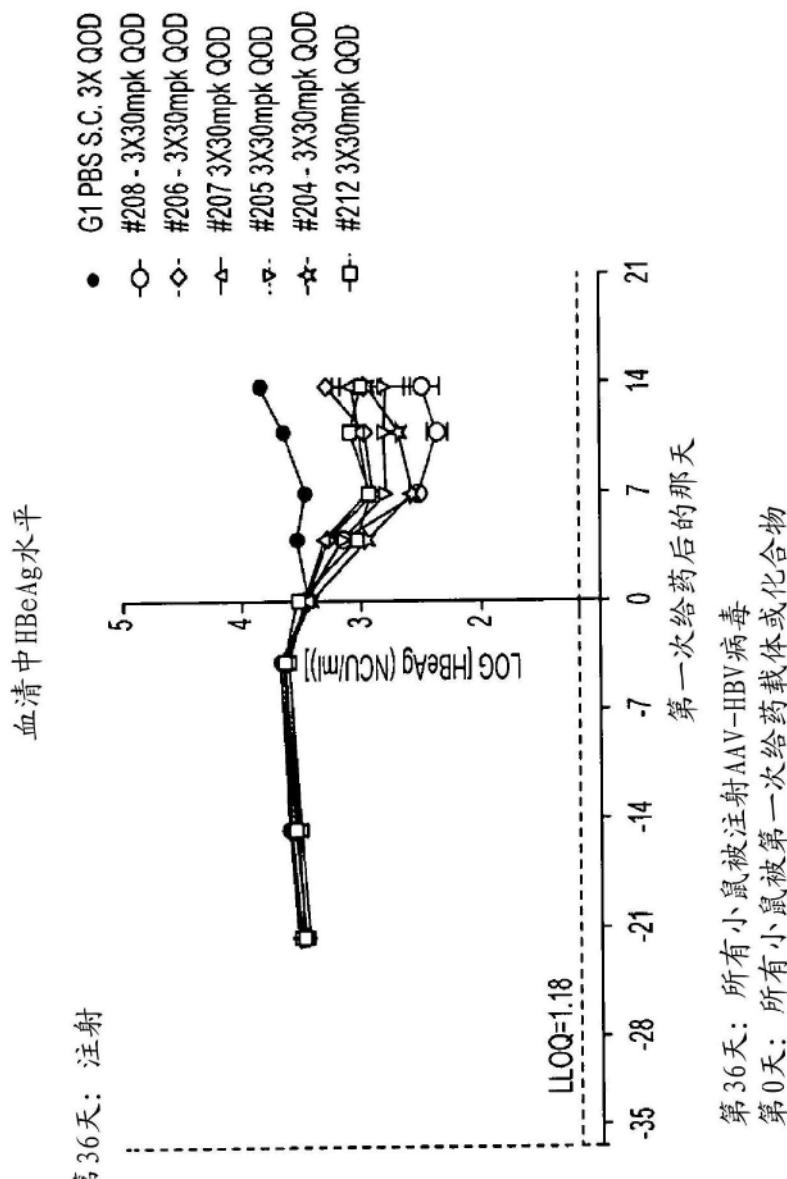


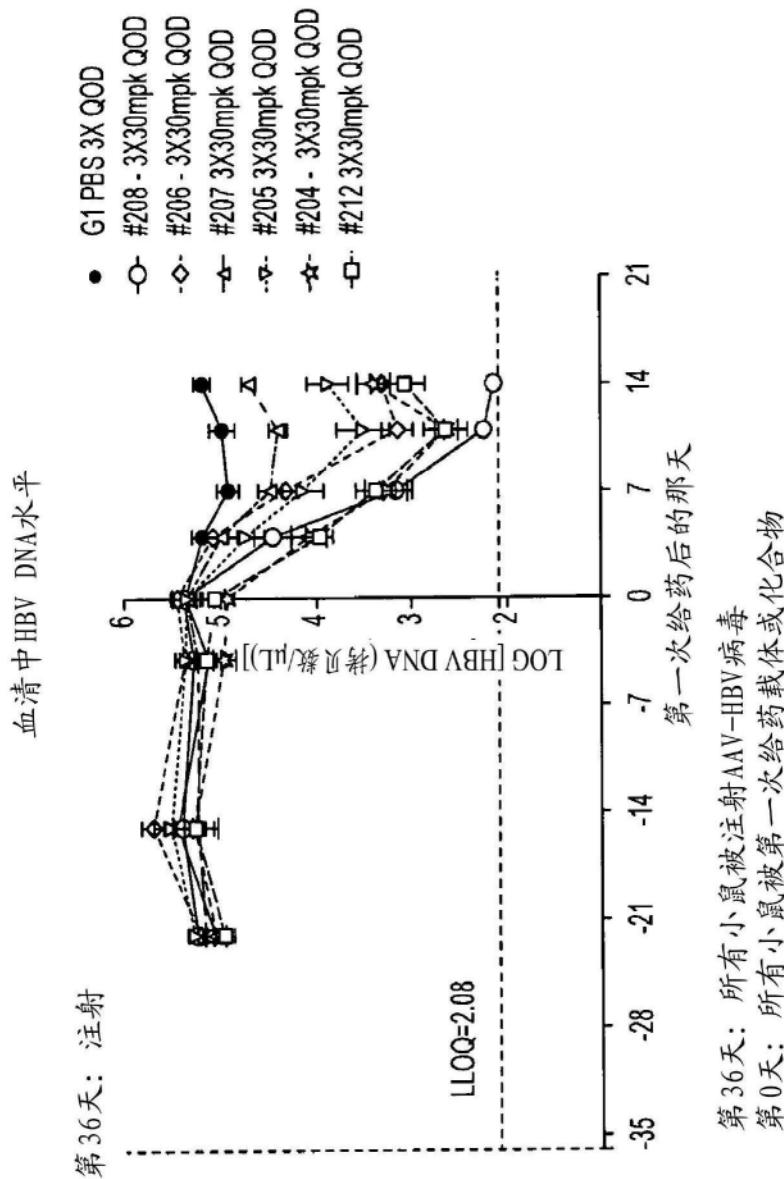
图5C



第 36 天：所有小鼠被注射AAV-HBV 病毒
 第 0 天：所有小鼠被第一次给药载体或化合物



第36天：所有小鼠被注射AAV-HBV病毒
 第0天：所有小鼠被第一次给药载体或化合物



第36天：所有小鼠被注射AAV-HBV病毒
第0天：所有小鼠被第一次给药载体或化合物

图6C

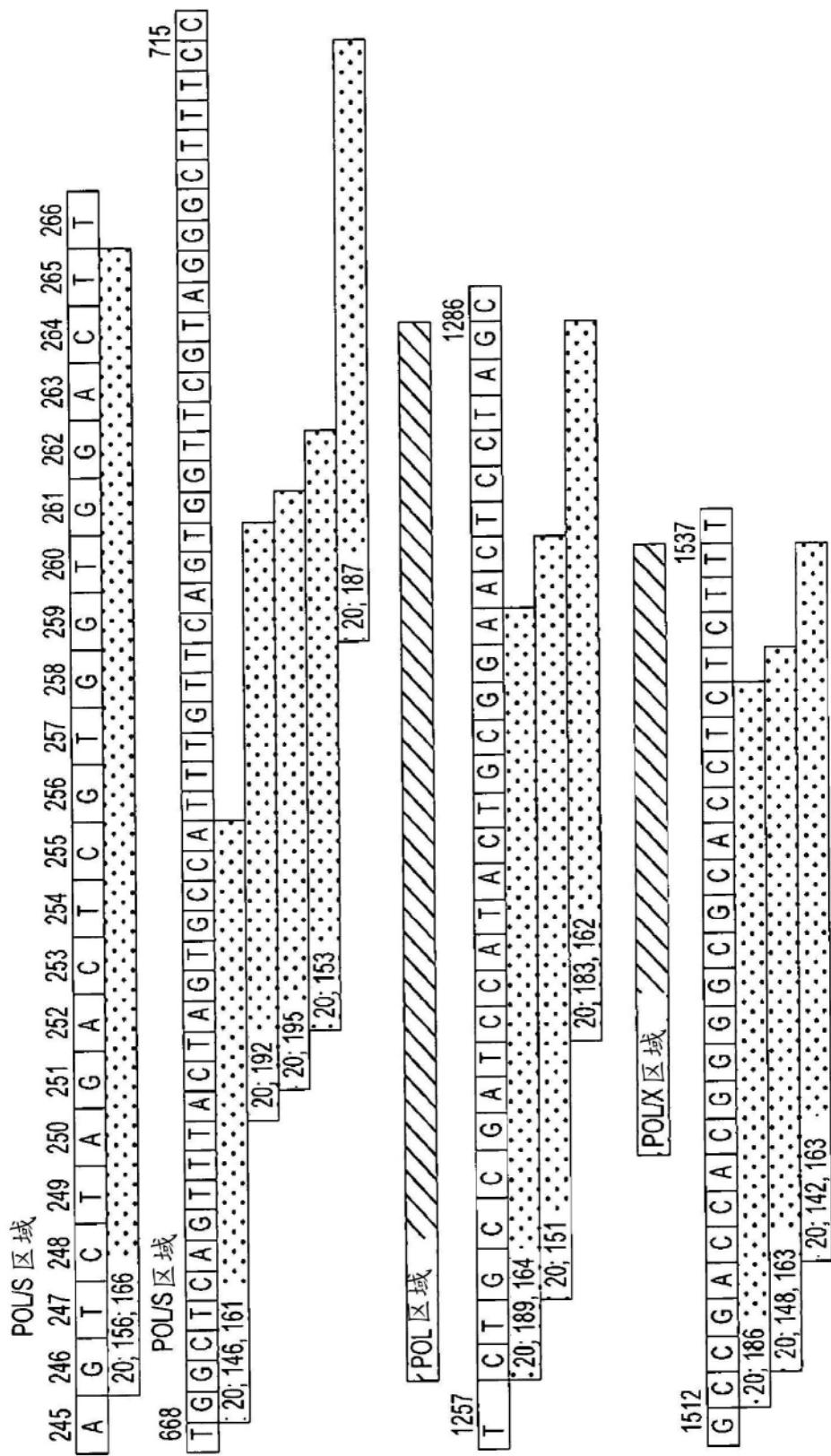


图7

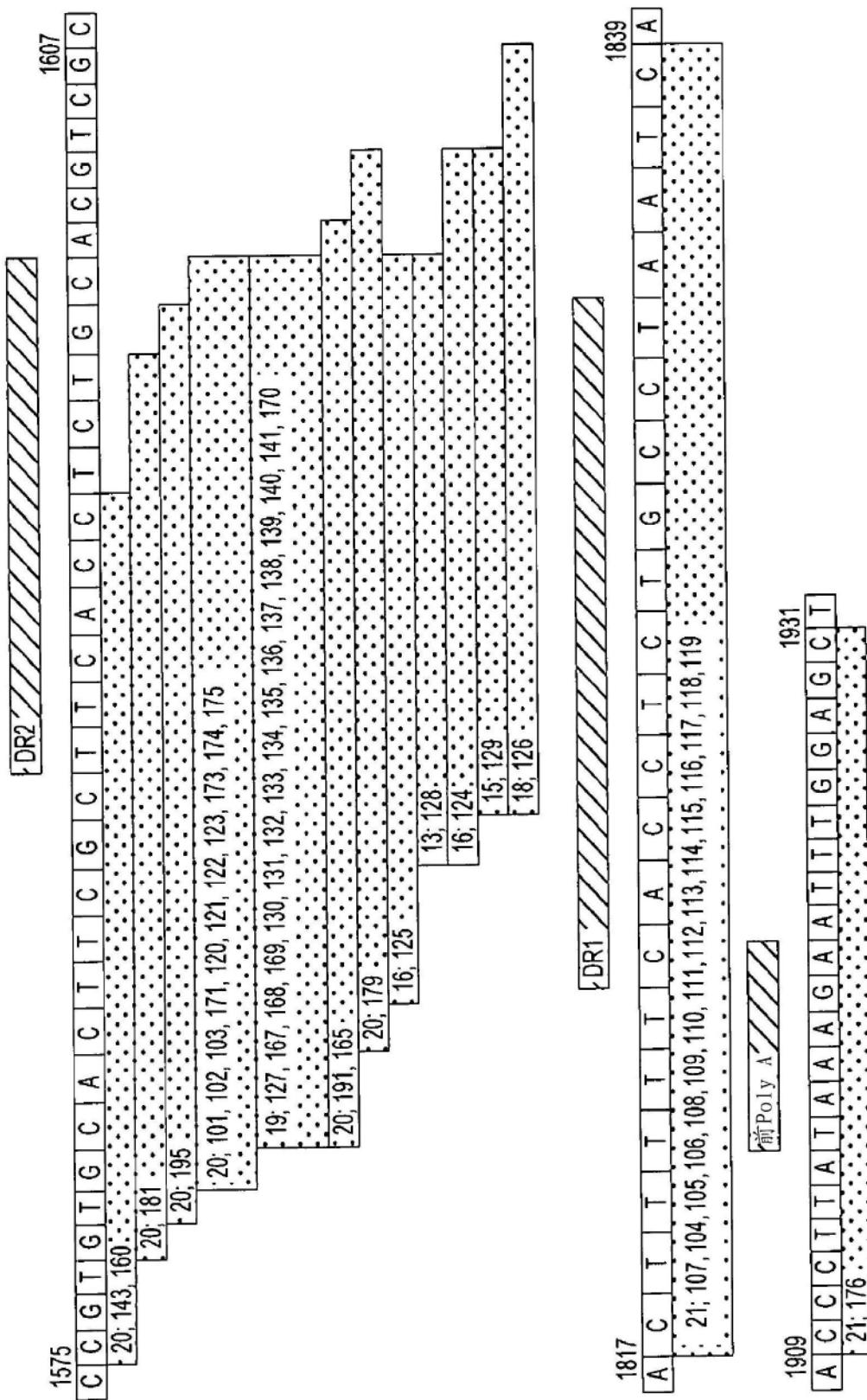


图7续

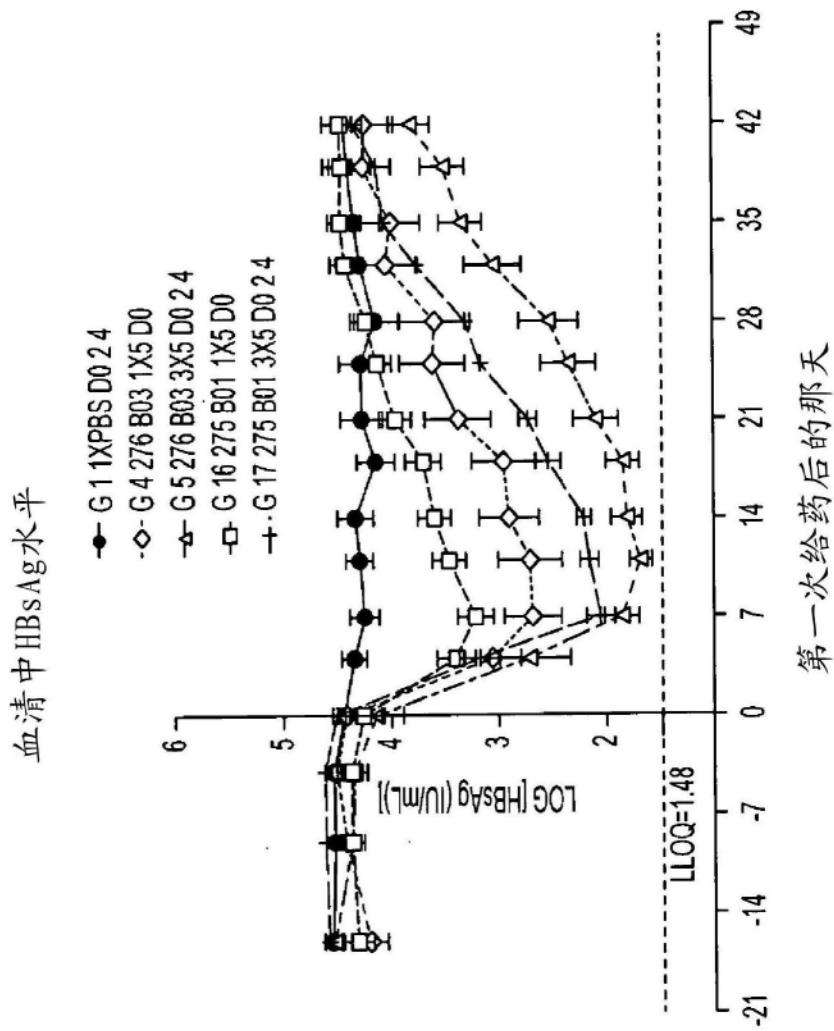


图8

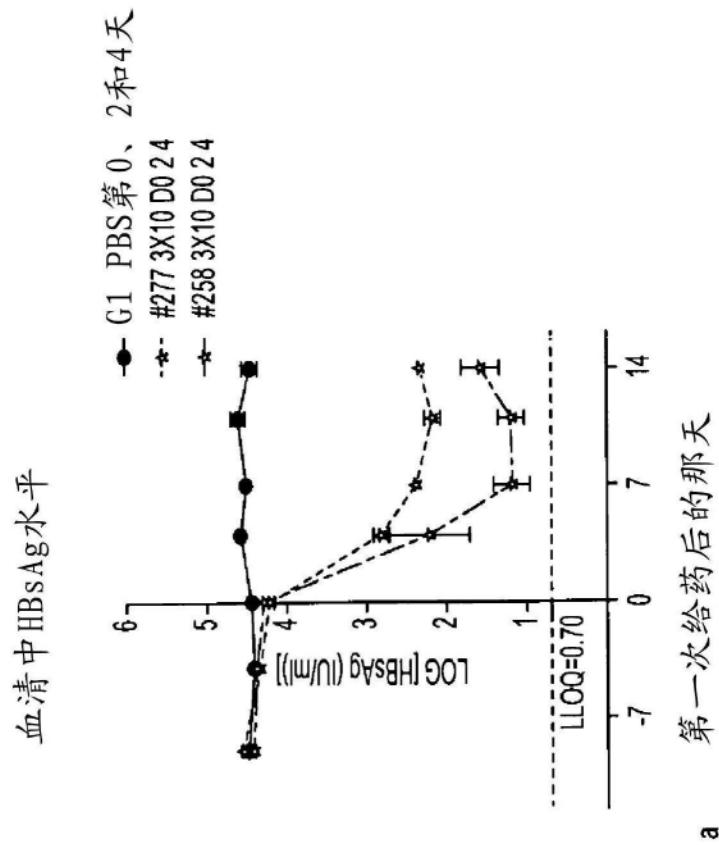


图9A

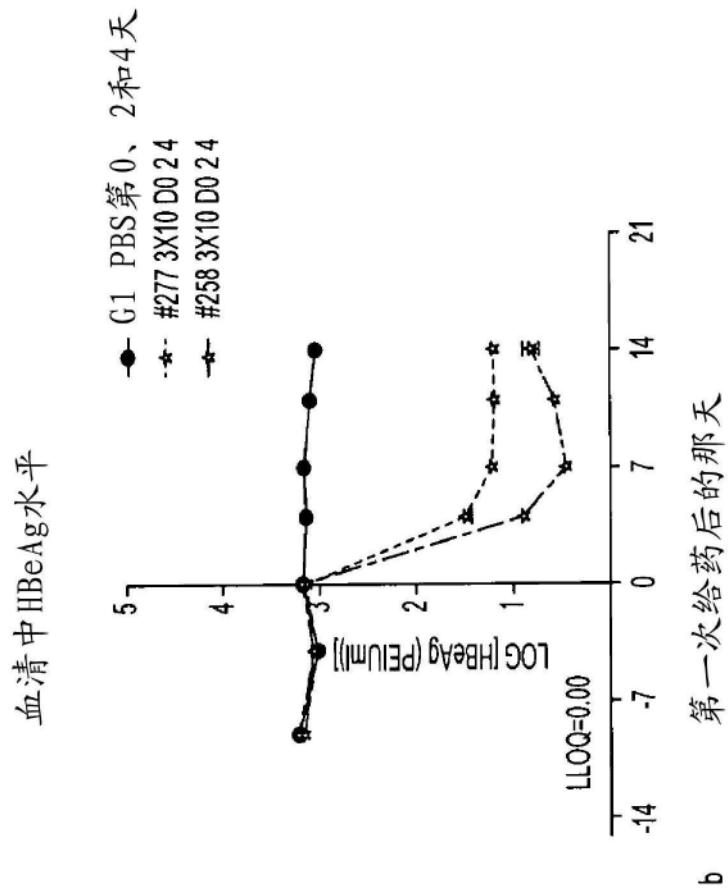


图9B

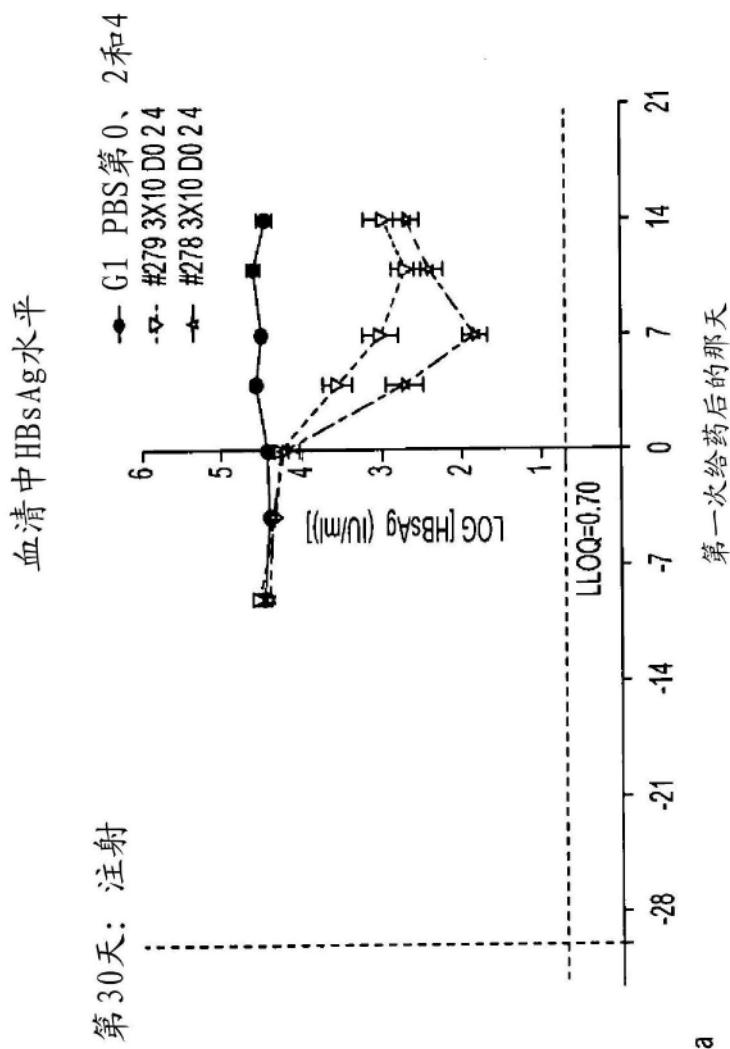


图 10A

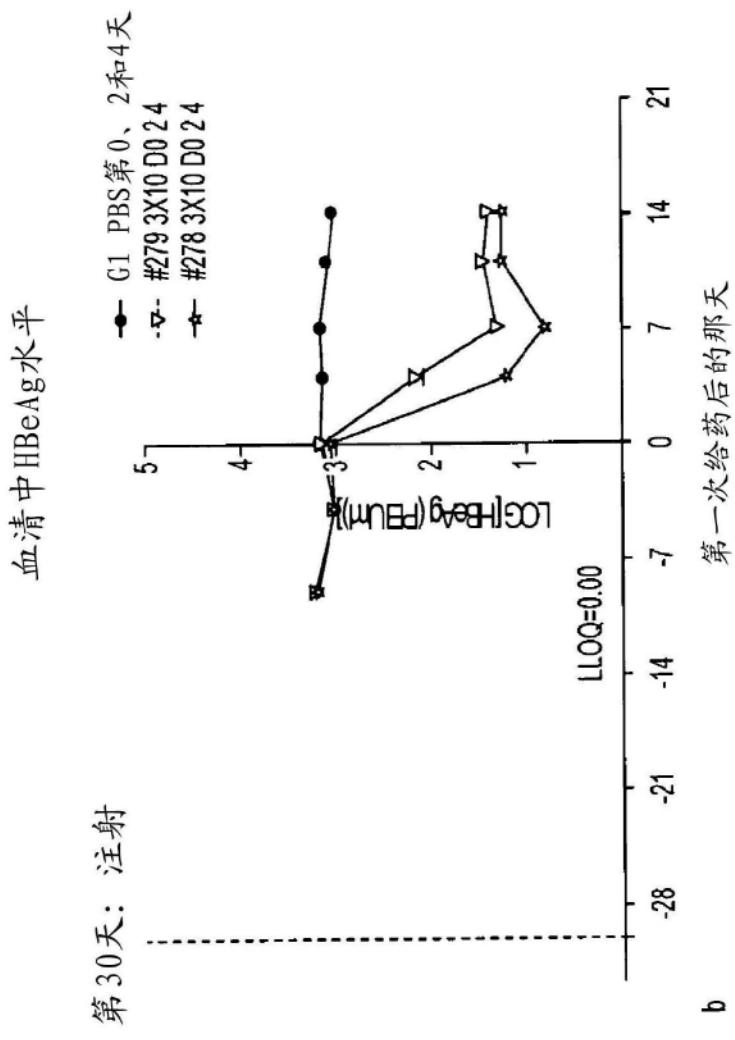


图10B

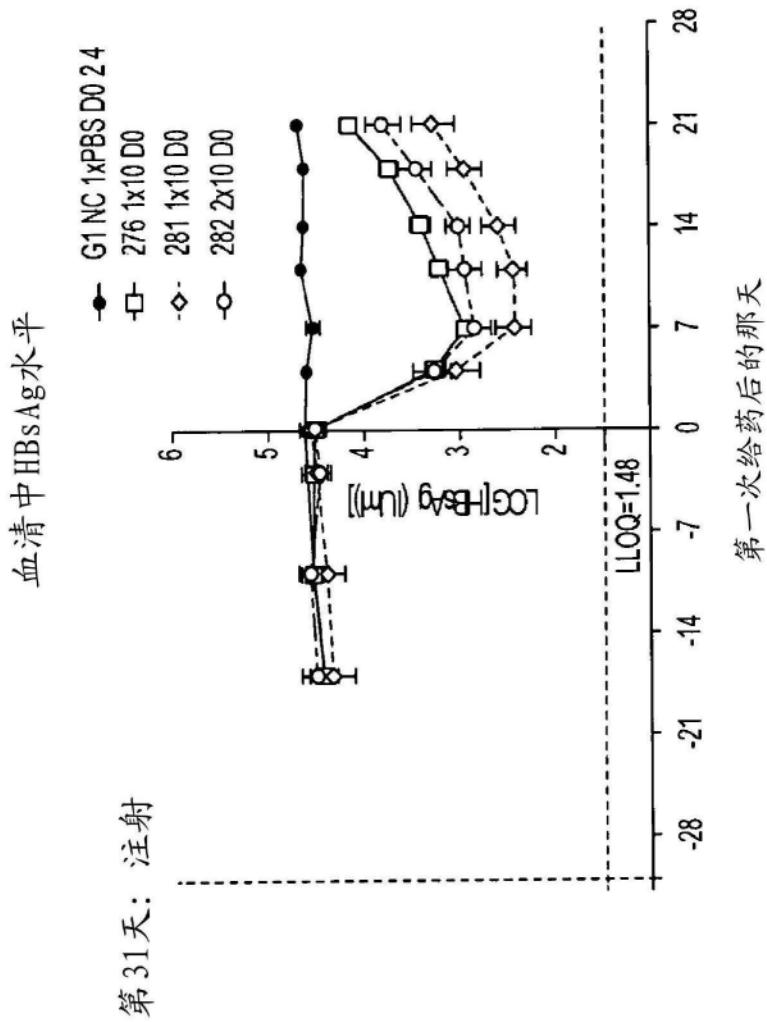


图 11A

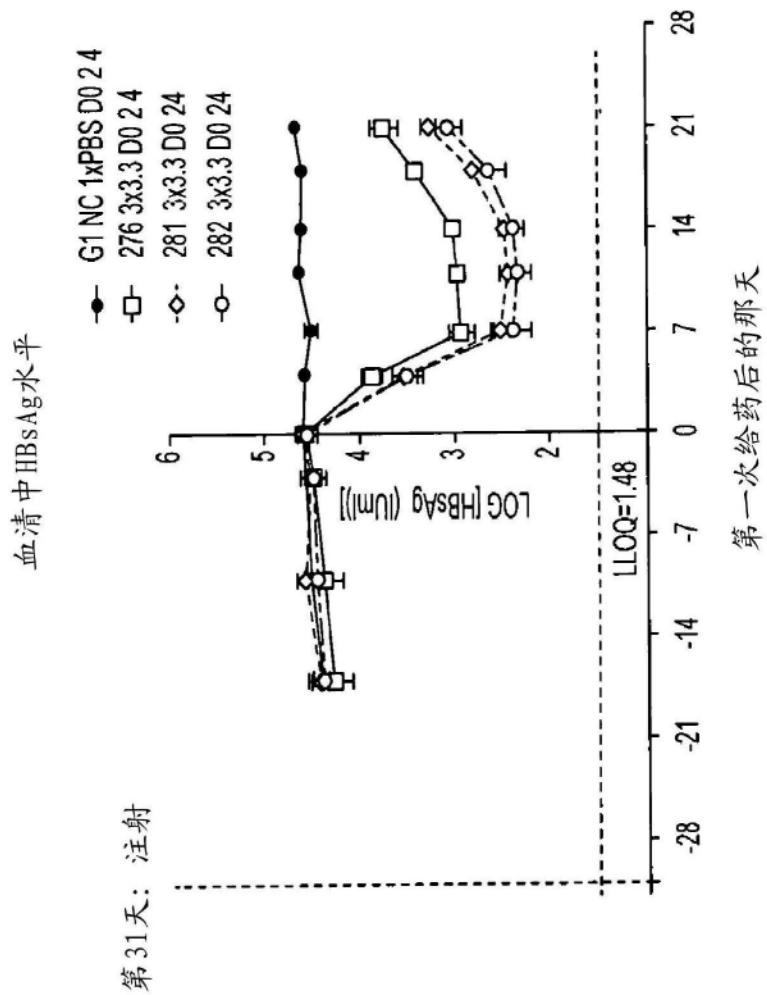


图11B

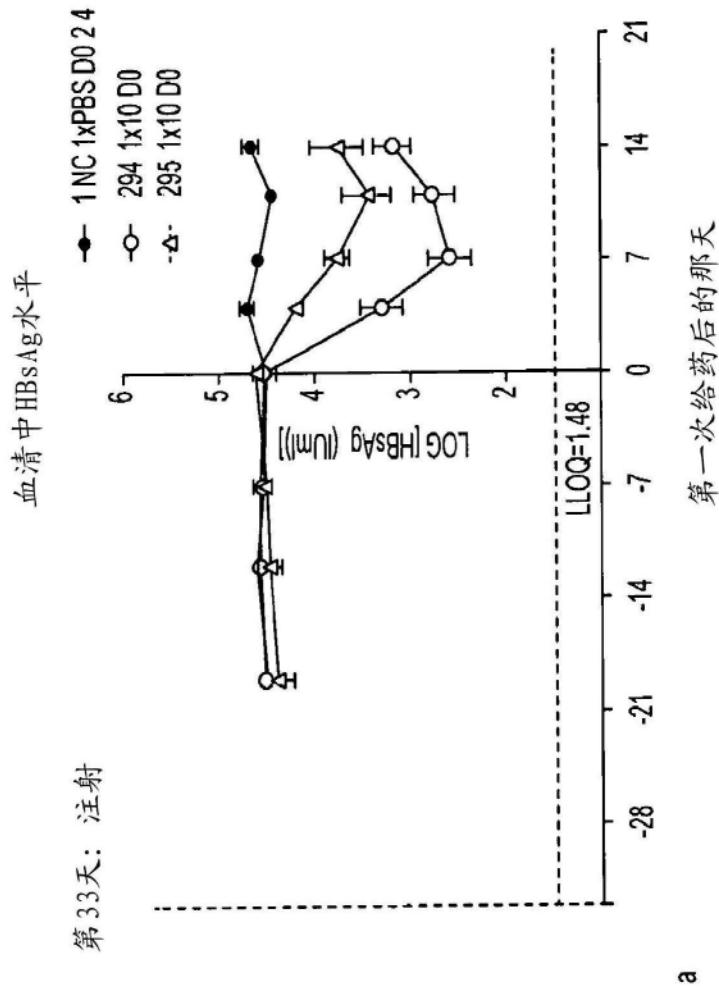


图12A

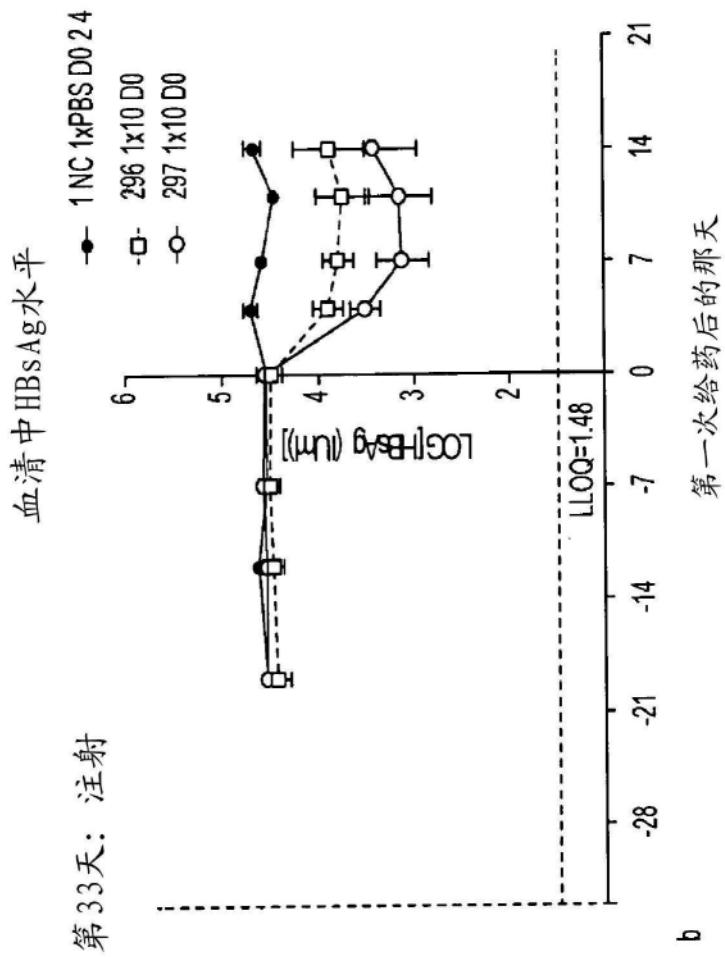


图12B

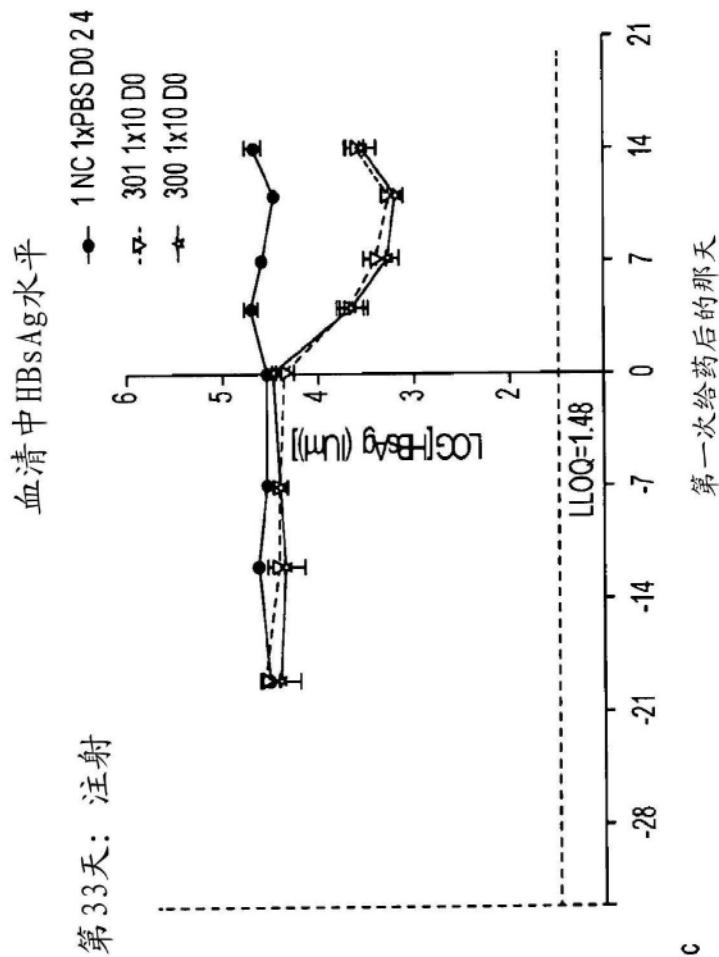


图12C