(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114340664 A
(43)申请公布日 2022.04.12

(21)申请号 202080058687.8
(22)申请日 2020.06.18
(30)优先权数据
62/862754 2019.06.18 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2020/055696 2020.06.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/255007 EN 2020.12.24
(71)申请人 爱尔兰詹森科学公司
地址 爱尔兰科克郡
(72)发明人 H·霍尔顿 A·M·M·德克罗伊斯 J·M·伯克
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李志强 彭昶
(51)Int.Cl.
A61K 39/29(2006.01)
A61K 39/385(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 31/20(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)

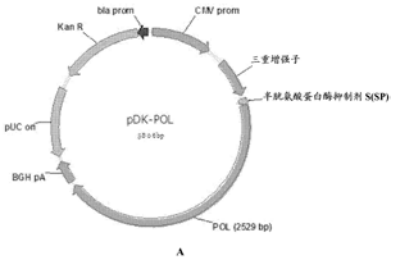
权利要求书2页 说明书57页
序列表22页 附图42页

(54)发明名称

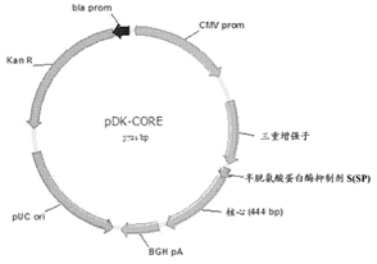
乙型肝炎病毒(HBV)疫苗和靶向HBV的RNAi的组合

(57)摘要

描述了乙型肝炎病毒(HBV)疫苗和用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂的治疗组合。还描述了使用所公开的治疗组合诱导针对HBV的免疫应答或治疗HBV诱导的疾病的方法,特别是在具有慢性HBV感染的个体中。



A



B

CN 114340664 A

1.用于在有此需要的受试者中治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗组合,其包含:

i)以下至少一种:

a)截短的HBV核心抗原,其由与SEQ ID NO:2具有至少95%同一性的氨基酸序列组成,和

b)第一种非天然存在的核酸分子,其包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列,

c)HBV聚合酶抗原,其具有与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述HBV聚合酶抗原不具有逆转录酶活性和RNA酶H活性,和

d)第二种非天然存在的核酸分子,其包含编码HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列;和

ii)用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂,优选地,所述RNAi试剂选自:

1)具有表2所示核心有义链序列和反义链序列的RNAi试剂;

2)具有表3所示有义链序列和反义链序列的RNAi试剂;

3)具有表4所示核心有义链序列和反义链序列的RNAi试剂,优选具有表4所示修饰的有义链序列和反义链序列的RNAi;

4)靶向表5所示靶序列的RNAi试剂;

5)具有表6所示核心有义链序列和反义链序列的RNAi试剂;

6)具有表7所示核心反义序列和表8所示核心有义链序列的RNAi试剂,优选具有表7所示修饰的有义链序列和表8所示修饰的反义链序列的RNAi;和

7)具有表9所示反义链和有义链的双链体的RNAi试剂,优选地,所述RNAi试剂包含表9所示的双链体。

2.权利要求1的治疗组合,其包含HBV聚合酶抗原和截短的HBV核心抗原中的至少一种。

3.权利要求2的治疗组合,其包含HBV聚合酶抗原和截短的HBV核心抗原。

4.权利要求1的治疗组合,其包含第一种非天然存在的核酸分子和第二种非天然存在的核酸分子中的至少一种,所述第一种非天然存在的核酸分子包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列,所述第二种非天然存在的核酸分子包含编码HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列。

5.用于在有此需要的受试者中治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗组合,其包含

i)第一种非天然存在的核酸分子,其包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列,所述截短的HBV核心抗原由与SEQ ID NO:2具有至少95%同一性的氨基酸序列组成;和

ii)第二种非天然存在的核酸分子,其包含编码HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列,所述HBV聚合酶抗原具有与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述HBV聚合酶抗原不具有逆转录酶活性和RNA酶H活性;和

iii)用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂,其中,所述RNAi试剂选自:

1)具有表2所示核心有义链序列和反义链序列的RNAi试剂;

2)具有表3所示有义链序列和反义链序列的RNAi试剂;

3)具有表4所示核心有义链序列和反义链序列的RNAi试剂,优选具有表4所示修饰的有义链序列和反义链序列的RNAi;

4)靶向表5所示靶序列的RNAi试剂;

5)具有表6所示核心有义链序列和反义链序列的RNAi试剂;

6)具有表7所示核心反义序列和表8所示核心有义链序列的RNAi试剂,优选具有表7所示修饰的有义链序列和表8所示修饰的反义链序列的RNAi;和

7)具有表9所示反义链和有义链的双链体的RNAi试剂,优选地,所述RNAi试剂包含表9所示的双链体,更优选地,所述RNAi试剂与靶向配体缀合。

6.权利要求4或5的治疗组合,其中所述第一种非天然存在的核酸分子进一步包含编码信号序列的多核苷酸序列,所述信号序列可操作地连接至截短的HBV核心抗原的N-端,且所述第二种非天然存在的核酸分子进一步包含编码信号序列的多核苷酸序列,所述信号序列可操作地连接至HBV聚合酶抗原的N-端,优选地,所述信号序列独立地包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:15的氨基酸序列,优选地所述信号序列独立地由SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:14的多核苷酸序列编码。

7.权利要求1-6中的任一项的治疗组合,其中

a)所述截短的HBV核心抗原由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成;且

b)所述HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

8.权利要求1-7中的任一项的治疗组合,其中第一种和第二种非天然存在的核酸分子中的每一种是DNA分子,优选地所述DNA分子存在于质粒或病毒载体上。

9.权利要求4-8中的任一项的治疗组合,其包含在相同的非天然地核酸分子中的第一种非天然存在的核酸分子和第二种非天然存在的核酸分子。

10.权利要求4-8中的任一项的治疗组合,其包含在两种不同的非天然存在的核酸分子中的第一种非天然存在的核酸分子和第二种非天然存在的核酸分子。

11.权利要求4-10中的任一项的治疗组合,其中所述第一种多核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少90%序列同一性的多核苷酸序列。

12.权利要求11的治疗组合,其中所述第一种多核苷酸序列包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的多核苷酸序列。

13.权利要求4-12中的任一项的治疗组合,其中所述第二种多核苷酸序列包含与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6具有至少90%序列同一性的多核苷酸序列。

14.权利要求13的治疗组合,其中所述第二种多核苷酸序列包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的多核苷酸序列。

15.权利要求1-14中任一项的治疗组合,其中所述RNAi试剂具有表9中所示的AD04580;AD04585;AD04776;AD04872;AD04962;AD04963;AD04982;或AD05070的双链体结构,优选地,RNAi试剂缀合至表10中描述的靶向配体(NAG13),(NAG13)s,(NAG18),(NAG18)s,(NAG24),(NAG24)s,(NAG25),(NAG25)s,(NAG26),(NAG26)s,(NAG27),(NAG27)s,(NAG28),(NAG28)s,(NAG29),(NAG29)s,(NAG30),(NAG30)s,(NAG31),(NAG31)s,(NAG32),(NAG32)s,(NAG33),(NAG33)s,(NAG34),(NAG34)s,(NAG35),(NAG35)s,(NAG36),(NAG36)s,(NAG37),(NAG37)s,(NAG38),(NAG38)s,(NAG39)或(NAG39)。一种试剂盒,其包含权利要求1-15中任一项的治疗组合和使用所述治疗组合在有此需要的受试者中治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的说明书。

16.用于在有此需要的受试者中治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的权利要求1-15中的任一项的治疗组合。

乙型肝炎病毒(HBV)疫苗和靶向HBV的RNAi的组合

[0001] 对电子提交的序列表的引用

本申请含有序列表,其通过EFS-Web作为ASCII格式的序列表以电子方式提交,文件名称为“065814_12WO1_ Sequence_Listing”,创建日期为2020年6月15日,且大小为47kb。通过EFS-Web提交的序列表是说明书的一部分,并通过引用整体并入本文。

[0002] 相关申请的交叉引用

本申请要求2019年6月18日提交的美国临时申请号62/862,754的优先权,其公开内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 乙型肝炎病毒(HBV)是一种编码四种开放读码框和七种蛋白的小型3.2-kb嗜肝DNA病毒。大约2.4亿人具有慢性乙型肝炎感染(慢性HBV),其特征在于病毒和亚病毒颗粒在血液中持续超过6个月(Cohen等人. J. Viral Hepat. (2011) 18(6), 377-83)。通过病毒肽和循环抗原对HBV-特异性的T-细胞受体的慢性刺激,持续性HBV感染导致循环的和肝内的HBV-特异性的CD4+和CD8+ T-细胞中的T-细胞衰竭。结果,T细胞多功能性降低(即,IL-2、肿瘤坏死因子(TNF)-α、IFN-γ水平降低和增殖缺乏)。

[0004] 自二十世纪80年代以来,针对HBV感染的安全且有效的预防性疫苗已经面世,并且是乙型肝炎预防的主要支柱(World Health Organization, Hepatitis B: Fact sheet No. 204 [因特网] 2015年3月)。世界卫生组织推荐对所有婴儿进行疫苗接种,并且在乙型肝炎低度或中度流行的国家,对所有儿童和青少年(<18岁)以及某些风险群体种类的人进行疫苗接种。由于疫苗接种,全球感染率已经大幅下降。但是,预防性疫苗不能治愈已确定的HBV感染。

[0005] 慢性HBV目前用IFN-α和核苷或核苷酸类似物治疗,但由于被称为共价闭合环状DNA (cccDNA)(其作为病毒RNA的模板起重要作用)的细胞内病毒复制中间体和因而新病毒粒子在被感染的肝细胞中持续存在,因此没有最终治愈。有人认为,诱导的病毒特异性的T-细胞和B-细胞应答可以有效地消除携带cccDNA的肝细胞。靶向HBV聚合酶的当前疗法会抑制病毒血症,但对驻留在细胞核中的cccDNA和循环抗原的相关产生具有有限的影响。最严格的治愈形式可能是从生物体消除HBV cccDNA,这既没有作为天然存在的结果观察到,也没有作为任何治疗干预的结果观察到。但是,HBV表面抗原(HBsAg)的丧失是在临床上可靠的治愈等同指标,因为只有在严重免疫抑制的情况下才会出现疾病复发,其则可以通过预防性治疗来预防。因此,至少从临床观点看,HBsAg的消失与针对HBV的最严格的免疫重建形式有关。

[0006] 例如,在具有有限疗程的持续停药(off-treatment)应答方面,与核苷或核苷酸疗法相比,用聚乙二醇化的干扰素(pegIFN)-α的免疫调节已被证明是更好的。除了直接的抗病毒作用外,据报道IFN-α在细胞培养物和人源化的小鼠中对cccDNA发挥表观遗传抑制作用,这导致病毒粒子生产力和转录物的减少(Belloni等人. J. Clin. Invest. (2012) 122(2), 529-537)。但是,这种疗法仍然伴有副作用并且总体应答是相当低的,部分原因是

IFN-α对HBV-特异性的T-细胞仅具有差的调节影响。具体地，治愈率低(<10%)且毒性高。同样，直接起作用的HBV抗病毒剂，即HBV聚合酶抑制剂恩替卡韦和替诺福韦，作为单一疗法可有效诱导病毒抑制，具有对耐药突变体出现的高遗传屏障和肝疾病进展的连续预防。但是，很少使用此类HBV聚合酶抑制剂实现慢性乙型肝炎的治愈(由HBsAg消失或血清转化定义)。因此，这些抗病毒剂在理论上需要无限期地施用以预防肝病复发，类似于人免疫缺陷病毒(HIV)的抗逆转录病毒疗法。

[0007] 治疗性疫苗接种具有从慢性感染的患者消除HBV的潜力(Michel等人. J. Hepatol. (2011) 54(6), 1286-1296)。已经探索了许多策略，但迄今为止尚未证明治疗性疫苗接种是成功的。

发明内容

[0008] 因此，在治疗乙型肝炎病毒(HBV)、特别是慢性HBV方面存在未得到满足的医疗需求，即关于具有更高治愈率的有限良好耐受的治疗。本发明通过提供用于诱导针对乙型肝炎病毒(HBV)感染的免疫应答的治疗组合或组合物和方法来满足这种需要。本发明的免疫原性组合物/组合和方法可以用于给受试者(诸如具有慢性HBV感染的受试者)提供治疗性免疫。

[0009] 在一般方面，本申请涉及用于在有此需要的受试者中治疗HBV感染的治疗组合或组合物，其包含一种或多种HBV抗原或一种或多种编码HBV抗原的多核苷酸和用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂。

[0010] 在一个实施方案中，所述治疗组合包含：

i)以下至少一种：

a) 截短的HBV核心抗原，其由与SEQ ID NO: 2具有至少95%(诸如至少95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列组成，

b) 第一种非天然存在的核酸分子，其包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列；

c) HBV聚合酶抗原，其氨基酸序列与SEQ ID NO: 7具有至少90%(诸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性，其中所述HBV聚合酶抗原不具有逆转录酶活性和RNA酶H活性，和

d) 第二种非天然存在的核酸分子，其包含编码HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列；和

ii)用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂，诸如本文描述的那些。

[0011] 在一个实施方案中，所述截短的HBV核心抗原由SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4的氨基酸序列组成，且所述HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列。

[0012] 在一个实施方案中，所述治疗组合包含HBV聚合酶抗原和截短的HBV核心抗原中的至少一种。在某些实施方案中，所述治疗组合包含HBV聚合酶抗原和截短的HBV核心抗原。

[0013] 在一个实施方案中，所述治疗组合包含以下至少一种：第一种非天然存在的核酸分子，其包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列；和第二种非天然存在的核酸分子，其包含编码HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列。在某些实施方案中，所述第一种非天然存在的核酸分子进一步包含编码信号序列的多核苷酸序列，所述信号序列可操作地

连接至截短的HBV核心抗原的N-端，且所述第二种非天然存在的核酸分子进一步包含编码信号序列的多核苷酸序列，所述信号序列可操作地连接至HBV聚合酶抗原的N-端，优选地，所述信号序列独立地包含SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 15的氨基酸序列，更优选地，所述信号序列分别由SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 14的多核苷酸序列编码。

[0014] 在某些实施方案中，所述第一种多核苷酸序列包含与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有至少90%(诸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的多核苷酸序列。

[0015] 在某些实施方案中，所述第二种多核苷酸序列包含与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有至少90%(诸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的多核苷酸序列。

[0016] 在某些实施方案中，可用于本发明的用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂，以及有关的信息诸如其结构、生产、生物活性、治疗应用、施用或递送等，描述于US20130005793、WO2013003520或WO2018027106中，其内容通过引用整体并入本文。

[0017] 在一个实施方案中，治疗组合包含：

a) 第一种非天然存在的核酸分子，其包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列，所述截短的HBV核心抗原由与SEQ ID NO: 2具有至少95%(诸如至少95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列组成；

b) 第二种非天然存在的核酸分子，其包含编码HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列，所述HBV聚合酶抗原的氨基酸序列与SEQ ID NO: 7具有至少90%(诸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性，其中所述HBV聚合酶抗原不具有逆转录酶活性和RNA酶H活性；和

c) 用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂，其选自：

1)具有表2所示的核心有义链序列和反义链序列的RNAi试剂；

2)具有表3所示的有义链序列和反义链序列的RNAi试剂；

3)具有表4所示的核心有义链序列和反义链序列的RNAi试剂，优选具有表4所示的经修饰的有义链序列和反义链序列的RNAi；

4)靶向表5所示靶序列的RNAi试剂；

5)具有表6所示核心有义链序列和反义链序列的RNAi试剂；

6)具有表7所示核心反义序列和表8所示核心有义链序列的RNAi试剂，优选具有表7所示经修饰的有义链序列和表8所示经修饰的反义链序列的RNAi；和

7)具有表9所示的反义链和有义链的双链体的RNAi试剂，优选地，所述RNAi试剂包含表9所示的双链体。

[0018] 在某些实施方案中，通过脂质组合物或脂质纳米颗粒，将RNAi试剂递送给有此需要的受试者。在其它实施方案中，通过缀合至靶向配体，诸如包含N-乙酰基-半乳糖胺的靶向配体，将RNAi递送给有此需要的受试者。优选地，通过缀合至本文所述的靶向配体，例如包含N-乙酰基-半乳糖胺的靶向配体，将RNAi递送给有此需要的受试者。

[0019] 优选地，治疗组合包含a)第一种非天然存在的核酸分子，其包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列，所述截短的HBV核心抗原由SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4的氨基酸序列组成；b)第二种非天然存在的核酸分子，其包含编码具有SEQ ID NO: 7的氨

基酸序列的HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列,和(c)本文描述的用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂。优选地,RNAi试剂包含表9所示的双链体。每种双链体优选缀合至靶向配体,优选包含N-乙酰基-半乳糖胺的靶向配体,更优选包含表10中所示结构的靶向配体。

[0020] 优选地,治疗组合包含:第一种非天然存在的核酸分子,其包含与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有至少90%(诸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的多核苷酸序列;和第二种非天然存在的核酸分子,其包含与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有至少90%(诸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的多核苷酸序列。

[0021] 更优选地,治疗组合包含:a)第一种非天然存在的核酸分子,其包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3的第一种多核苷酸序列;b)第二种非天然存在的核酸分子,其包含SEQ ID NO: 5或6的第二种多核苷酸序列;和c)本文描述的用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂。

[0022] 在一个实施方案中,第一种和第二种非天然存在的核酸分子中的每一种是DNA分子,优选地所述DNA分子存在于质粒或病毒载体上。

[0023] 在另一个实施方案中,第一种和第二种非天然存在的核酸分子中的每一种是RNA分子,优选mRNA或自复制的RNA分子。

[0024] 在某些实施方案中,第一种和第二种非天然存在的核酸分子中的每一种用脂质纳米颗粒(LNP)独立地配制。

[0025] 在另一个一般方面,本申请涉及一种试剂盒,其包含本申请的治疗组合。

[0026] 本申请也涉及用于诱导针对乙型肝炎病毒(HBV)的免疫应答的本申请的治疗组合或试剂盒;和本申请的治疗组合、组合物或试剂盒在药物制备中的用途,所述药物用于诱导针对乙型肝炎病毒(HBV)的免疫应答。所述用途可以进一步包含与另一种免疫原性剂或治疗剂、优选另一种HBV抗原或另一种HBV疗法的组合。优选地,所述受试者具有慢性HBV感染。

[0027] 本申请进一步涉及用于在有此需要的受试者中治疗HBV诱导的疾病的本申请的治疗组合或试剂盒;和本申请的治疗组合或试剂盒在药物制备中的用途,所述药物用于在有此需要的受试者中治疗HBV诱导的疾病。所述用途可以进一步包含与另一种治疗剂、优选另一种抗-HBV抗原的组合。优选地,所述受试者具有慢性HBV感染,且所述HBV诱导的疾病选自晚期纤维化、肝硬化和肝细胞癌(HCC)。

[0028] 本申请也涉及诱导针对HBV的免疫应答的方法或治疗HBV感染或HBV诱导的疾病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用根据本发明的实施方案的治疗组合。

[0029] 从以下公开内容,包括发明详述及其优选实施方案和所附权利要求书,会明白本发明的其它方面、特征和优点。

附图说明

[0030] 当结合附带的附图阅读时,将更好地理解前述概述、以及本申请的优选实施方案的以下详细描述。但是,应当理解,本申请不限于附图所示的精确实施方案。

[0031] 图1A和图1B显示了根据本申请的实施方案的DNA质粒的示意图;图1A显示了根据本申请的一个实施方案编码HBV核心抗原的DNA质粒;图1B显示了根据本申请的一个实施方案编码HBV聚合酶(pol)抗原的DNA质粒;在CMV启动子的控制下表达HBV核心和pol抗原,其中N-端半胱氨酸蛋白酶抑制剂S信号肽在从细胞分泌后从表达的抗原切割;质粒的转录调

节元件包括位于CMV启动子和编码HBV抗原的多核苷酸序列之间的增强子序列以及位于编码HBV抗原的多核苷酸序列下游的bGH多腺苷酸化序列;第二个表达盒以相反取向被包括在质粒中,包括在Ampr (bla)启动子控制下的卡那霉素抗性基因;复制起点(pUC)也以相反取向被包括;

图2A和图2B显示了根据本申请的实施方案的腺病毒载体中的表达盒的示意图;图2A显示了截短的HBV核心抗原的表达盒,其含有CMV启动子、内含子(从人ApoAI基因衍生出的片段-GenBank登录号X01038碱基对295 -523,携带ApoAI第二内含子)、人免疫球蛋白分泌信号,随后是截短的HBV核心抗原的编码序列和SV40多腺苷酸化信号;图2B显示了可操作地连接至HBV聚合酶抗原的截短的HBV核心抗原的融合蛋白的表达盒,其除了HBV抗原以外在其它方面与截短的HBV核心抗原的表达盒相同;

图3显示了如在实施例3中所述,用表达HBV核心抗原或HBV pol抗原的不同DNA质粒免疫的Balb/c小鼠的ELISPOT应答;用灰度等级指示用于刺激从不同的接种疫苗的动物组分离的脾细胞的肽池;在y-轴上指示应答性T-细胞的数目,表示为斑点形成细胞(SFC)/10^6个脾细胞;

图4显示了可用于本发明的靶向HBV基因的RNAi试剂的核心序列,更详细地描述在US20130005793;

图5显示了可用于本发明的靶向HBV基因的RNAi试剂的修饰序列,更详细地描述在US20130005793;

图6显示了可用于本发明的靶向HBV基因的RNAi试剂的核心序列及其修饰的对应物,更详细地描述在US20130005793;

图7显示了可用于本发明的HBV RNAi试剂的示例性19-聚体 HBV cDNA靶序列,取自HBV亚型ADW2,基因型A,完整基因组GenBank AM282986.1,更详细地描述在WO2018027106;

图8显示了可用于本发明的HBV RNAi试剂反义和有义链核心段序列,更详细地描述在WO2018027106;

图9显示了可用于本发明的HBV RNAi试剂反义序列,更详细地描述在WO2018027106;

图10显示了可用于本发明的HBV RNAi试剂有义序列,更详细地描述在WO2018027106;

图11显示了可用于本发明的HBV RNAi试剂双链体的实例,更详细地描述在WO2018027106;和

图12显示了可用于本发明的靶向配体的实例,更详细地描述在WO2018027106。

具体实施方式

[0032] 在背景和整个说明书中引用或描述了各种出版物、文章和专利;这些参考文献中的每一篇通过引用整体并入本文。已经包括在本说明书中的文件、法案、材料、装置、文章等的讨论是用于提供本发明的上下文的目的。这样的讨论并非承认任何或所有这些内容形成关于公开或要求保护的任何发明的现有技术的一部分。

[0033] 除非另外定义,否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的

普通技术人员通常理解的相同含义。否则，本文使用的某些术语具有如在说明书中所述的含义。本文引用的所有专利、公开的专利申请和出版物都通过引用并入，如同在本文中充分阐述。

[0034] 必须指出，如在本文中和在所附权利要求书中所使用的，单数形式“一种”、“一个”和“该”包括复数形式，除非上下文另外清楚地指明。

[0035] 除非另有说明，否则在一系列元件之前的术语“至少”应理解为表示该系列中的每个元件。本领域技术人员会认识到或仅仅使用例行实验就能够确定许多与本文所述的本发明的具体实施方案等效的方案。这样的等效方案意图被本发明涵盖。

[0036] 在本说明书和下面的权利要求书中，除非上下文另外要求，否则词语“包含”和变体诸如“包括”和“含有”应理解为暗示包括所陈述的整数或步骤或者整数或步骤的组，但是不排除任何其它整数或步骤或者整数或步骤的组。当在本文中使用时，术语“包含”可以用术语“含有”或“包括”替代，或者有时当在本文中使用时可以用术语“具有”替代。

[0037] 当在本文中使用时，“由……组成”排除在权利要求要素中未指定的任何要素、步骤或成分。当在本文中使用时，“基本上由……组成”不排除对权利要求的基本和新颖特征没有实质性影响的材料或步骤。无论何时在本文中使用时在本申请的一个方面或实施方案的上下文中，“包含”、“含有”、“包括”和“具有”的前述术语中的任一个可以用术语“由……组成”或“基本上由……组成”替换以改变本公开内容的范围。

[0038] 如本文中使用的，多个列举的要素之间的连接术语“和/或”被理解为涵盖单独的和组合的选项。例如，当两个要素由“和/或”连接时，第一种选项表示在没有第二个要素的情况下第一个要素的适用性。第二种选项表示在没有第一个要素的情况下第二个要素的适用性。第三种选项表示第一个要素和第二个要素一起的适用性。这些选项中的任何一个都被理解为落入其含义内，且因此满足本文中使用的术语“和/或”的要求。超过一个选项的同时适用性也被理解为落入该含义内，且因此满足术语“和/或”的要求。

[0039] 除非另有说明，任何数值，诸如本文所述的浓度或浓度范围，在所有情况下应理解为由术语“约”修饰。因此，数值通常包括所列举值的±10%。例如，1 mg/mL的浓度包括0.9 mg/mL至1.1 mg/mL。同样，1 mg/mL至10 mg/mL的浓度范围包括0.9 mg/mL至11 mg/mL。如本文中使用的，数值范围的使用明确包括所有可能的子范围、在该范围内的所有单个数值，包括在这样的范围内的整数和值的分数，除非上下文另外清楚地指出。

[0040] 短语“序列同一性百分比(%)”或“%同一性”或“与……的%同一性”在参考氨基酸序列使用时描述了与构成氨基酸序列的总长度的氨基酸残基的数目相比两个或更多个比对的氨基酸序列中相同的氨基酸的匹配(“命中”)数目。换句话说，使用比对，对于两个或更多个序列，当对序列进行对比和比对以获得最大对应时，如使用本领域已知的序列对比算法所测量的，或者当手工比对和目视检查时，可以确定相同的氨基酸残基的百分比(例如在氨基酸序列的全长上，90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性)。被对比以确定序列同一性的序列因此可能因氨基酸的置换、添加或缺失而不同。用于比对蛋白序列的合适程序是技术人员已知的。例如，用程序诸如CLUSTALW、Clustal Omega、FASTA或BLAST，例如使用NCBI BLAST算法(Altschul SF, 等人(1997), *Nucleic Acids Res*. 25:3389-3402)，可以确定蛋白序列的序列同一性百分比。

[0041] 如本文中使用的，在向受试者施用两种或更多种疗法或组分的上下文中，术语和

短语“联合”、“与……联合”、“共同递送”和“与……一起施用”表示同时施用或随后施用两种或更多种疗法或组分，诸如两种载体，例如，DNA质粒、肽、或治疗组合和佐剂。“同时施用”可以是至少在同一天内施用两种或更多种疗法或组分。当两种组分“与……一起施用”或“与……联合施用”时，它们可以在短时间段内诸如24、20、16、12、8或4小时或在1小时内在分开的组合物中依次施用，或者它们可以同时在单一组合物中施用。“依次施用”可以是在同一天或在不同天施用两种或更多种疗法或组分。术语“与……联合”的使用不限制对受试者施用疗法或组分的顺序。例如，可以在施用第二种疗法或组分(例如，编码HBV抗原的第二种DNA质粒)和/或第三种疗法或组分(例如，用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂)之前(例如，之前5分钟至1小时)、伴随地或同时地或之后(例如，之后5分钟至1小时)施用第一种疗法或组分(例如编码HBV抗原的第一种DNA质粒)。在某些实施方案中，在相同组合物中施用第一种疗法或组分(例如编码HBV抗原的第一种DNA质粒)、第二种疗法或组分(例如，编码HBV抗原的第二种DNA质粒)和第三种疗法或组分(例如，用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂)。在其它实施方案中，在分开的组合物(诸如两种或三种分开的组合物)中施用第一种疗法或组分(例如编码HBV抗原的第一种DNA质粒)、第二种疗法或组分(例如，编码HBV抗原的第二种DNA质粒)和第三种疗法或组分(例如，用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂)。

[0042] 本文中使用的“非天然存在的”核酸或多肽表示在自然界中不存在的核酸或多肽。可以在实验室和/或制造环境中合成、处理、制造和/或以其它方式操作“非天然存在的”核酸或多肽。在某些情况下，非天然存在的核酸或多肽可以包含天然存在的核酸或多肽，其被处理、加工或操作以表现出在处理之前在天然存在的核酸或多肽中不存在的性能。本文中使用的“非天然存在的”核酸或多肽可以是从发现它的天然来源分离或分开的核酸或多肽，并且它缺乏与它在天然来源中相关联的序列的共价键。可以重组地制备或通过其它方法(诸如化学合成)制备“非天然存在的”核酸或多肽。

[0043] 本文中使用的“受试者”是指任何动物，优选哺乳动物，最优选人类，其将被或已经被根据本申请的一个实施方案的方法治疗。本文中使用的术语“哺乳动物”涵盖任何哺乳动物。哺乳动物的例子包括，但不限于，牛、马、羊、猪、猫、狗、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、非人灵长类动物(NHP)诸如猴或猿、人类等，更优选人。

[0044] 本文中使用的术语“可操作地连接”表示连接或并置，其中如此描述的组件处于允许它们以其预期方式起作用的关系中。例如，可操作地连接至感兴趣的核酸序列的调节序列能够指导感兴趣的核酸序列的转录，或者可操作地连接至感兴趣的氨基酸序列的信号序列能够跨膜分泌或转移感兴趣的氨基酸序列。

[0045] 为了帮助本申请的读者，说明书已被分成多个段落或部分，或涉及本申请的不同实施方案。这些分离不应被视为将段落或部分或实施方案的内容与另一个段落或部分或实施方案的内容断开。相反，本领域技术人员会理解，该描述具有广泛的应用并且涵盖了可以考虑的各个部分、段落和句子的所有组合。任何实施方案的讨论意图仅仅是示例性的，并且无意提示本公开内容(包括权利要求)的范围限于这些实施例。例如，虽然本文描述的本申请的HBV载体(例如，质粒DNA或病毒载体)的实施方案可以包含特定组分，包括、但不限于，以特定顺序排列的某些启动子序列、增强子或调节序列、信号肽、HBV抗原的编码序列、多腺苷酸化信号序列等，本领域普通技术人员会明白，本文公开的概念同样可以适用于以其它顺序排列的可用于本申请的HBV载体中的其它组分。本申请涵盖以具有可用于本申请的HBV

载体中的任何序列的任何组合使用任何适用组分，无论是否明确描述了特定组合。本发明总体上涉及一种治疗组合，其包含一种或多种HBV抗原和至少一种用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂。

[0046] 乙型肝炎病毒(HBV)

本文中使用的“乙型肝炎病毒”或“HBV”表示嗜肝病毒科的病毒。HBV是一种小的(例如3.2 kb)嗜肝DNA病毒，其编码四种开放读码框和七种蛋白。由HBV编码的七种蛋白包括小(S)、中(M)和大(L)表面抗原(HBsAg)或包膜(Env)蛋白、前核心蛋白(pre-Core)、核心蛋白、病毒聚合酶(Pol)和HBx蛋白。HBV表达三种表面抗原或包膜蛋白L、M和S，其中S是最小的，L是最大的。M和L蛋白中的额外结构域分别命名为Pre-S2和Pre-S1。核心蛋白是病毒核衣壳的亚基。病毒DNA (逆转录酶、RNA酶H和引物)的合成需要Pol，该合成发生在定位于受感染的肝细胞的细胞质的核衣壳中。PreCore是具有N端信号肽的核心蛋白，并且在从受感染细胞分泌之前在其N端和C端发生蛋白水解性加工，成为所谓的乙型肝炎e-抗原(HBeAg)。共价闭合环状DNA (cccDNA)的有效转录需要HBx蛋白。HBx不是病毒的结构蛋白。除了共享mRNA的核心和聚合酶外，HBV的所有病毒蛋白都具有其自己的mRNA。除前核心蛋白外，HBV病毒蛋白都没有进行翻译后蛋白水解加工。

[0047] HBV病毒粒子含有病毒包膜、核衣壳和部分双链DNA基因组的单个拷贝。核衣壳包含120个核心蛋白的二聚体，并被衣壳膜覆盖，所述衣壳膜嵌入了S、M和L病毒包膜或表面抗原蛋白。在进入细胞后，病毒没有被包裹，且含有衣壳的松弛环状DNA (rcDNA)与共价结合的病毒聚合酶一起迁移到细胞核。在该过程中，核心蛋白的磷酸化诱导结构变化，从而暴露核定位信号，实现衣壳与所谓的输入蛋白相互作用。这些输入蛋白介导核心蛋白与核孔复合物(衣壳在其上分解)的结合且聚合酶/rcDNA复合物被释放到细胞核中。在细胞核内，rcDNA变成去蛋白化(聚合酶的除去)并通过宿主DNA修复机制转化为共价闭合环状DNA(cccDNA)基因组，重叠的转录物从其编码HBeAg、HBsAg、核心蛋白、病毒聚合酶和HBx蛋白。核心蛋白、病毒聚合酶和前基因组RNA (pgRNA)在细胞质中缔合并自组装成含有未成熟的pgRNA的衣壳颗粒，所述颗粒进一步转化为成熟的rcDNA-衣壳并作为常见中间体起作用，所述常见中间体要么作为感染性病毒颗粒被包裹和分泌，要么被运回细胞核以补充和维持稳定的cccDNA池。

[0048] 迄今为止，基于在包膜蛋白上存在的抗原性表位，将HBV分为四种血清型(adr、adw、ayr、ayw)，并基于病毒基因组的序列分为八种基因型(A、B、C、D、E、F、G和H)。HBV基因型分布在不同的地理区域。例如，在亚洲最流行的基因型是基因型B和C。基因型D在非洲、中东和印度占主导地位，而基因型A在北欧、撒哈拉大沙漠以南非洲和西非普遍存在。

[0049] HBV抗原

本文中使用的术语“HBV抗原”、“HBV的抗原性多肽”、“HBV抗原性多肽”、“HBV抗原性蛋白”、“HBV免疫原性多肽”和“HBV免疫原”都表示能够在受试者中诱导针对HBV的免疫应答(例如，体液和/或细胞介导的应答)的多肽。HBV抗原可以是HBV的多肽、其片段或表位、或多种HBV多肽、其部分或衍生物的组合。HBV抗原能够在宿主中产生保护性免疫应答，例如，诱导针对病毒性疾病或感染的免疫应答，和/或在受试者中产生针对病毒性疾病或感染的免疫(即，接种疫苗)，其保护受试者免受病毒性疾病或感染。例如，HBV抗原可以包含来自任何HBV蛋白的多肽或其免疫原性片段，诸如HBeAg、前核心蛋白、HBsAg (S、M或L蛋白)、核心

蛋白、病毒聚合酶或从任何HBV基因型(例如,基因型A、B、C、D、E、F、G和/或H或它们的组合)衍生出的HBx蛋白。

[0050] (1) HBV核心抗原

如本文中使用的,术语“HBV核心抗原”、“HBc”和“核心抗原”中的每一个表示能够在受试者中诱导针对HBV核心蛋白的免疫应答(例如,体液和/或细胞的介导的应答)的HBV抗原。术语“核心”、“核心多肽”和“核心蛋白”中的每一个表示HBV病毒核心蛋白。全长核心抗原通常为183个氨基酸的长度,并且包括组装结构域(氨基酸1至149)和核酸结合结构域(氨基酸150至183)。前基因组RNA衣壳化需要34-残基核酸结合结构域。该结构域还作为入核转运信号起作用。它包含17个精氨酸残基并且是高碱性的,这与其功能一致。HBV核心蛋白在溶液中是二聚体,所述二聚体自组装成二十面体衣壳。核心蛋白的每个二聚体具有四个α-螺旋束,后者在任一侧侧接α-螺旋结构域。缺乏核酸结合结构域的截短的HBV核心蛋白也能够形成衣壳。

[0051] 在本申请的一个实施方案中,HBV抗原是截短的HBV核心抗原。本文中使用的“截短的HBV核心抗原”表示不含有HBV核心蛋白的整个长度但能够在受试者中诱导针对HBV核心蛋白的免疫应答的HBV抗原。例如,可以修饰HBV核心抗原以缺失核心抗原的高度带正电荷的(富含精氨酸的)C-端核酸结合结构域的一个或多个氨基酸,所述C-端核酸结合结构域通常含有十七个精氨酸(R)残基。本申请的截短的HBV核心抗原优选地是不包含HBV核心入核转运信号的C-端截短的HBV核心蛋白和/或已从其缺失C-端HBV核心入核转运信号的截短的HBV核心蛋白。在一个实施方案中,截短的HBV核心抗原包含C-端核酸结合结构域中的缺失,诸如C-端核酸结合结构域的1-34个氨基酸残基的缺失,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、31、32、33或34个氨基酸残基,优选全部34个氨基酸残基的缺失。在一个优选的实施方案中,截短的HBV核心抗原包含C-端核酸结合结构域中的缺失,优选全部34个氨基酸残基的缺失。

[0052] 本申请的HBV核心抗原可以是源自多个HBV基因型(例如,基因型A、B、C、D、E、F、G和H)的共有序列。本文中使用的“共有序列”是指基于同源蛋白的氨基酸序列的比对的人工氨基酸序列,例如,如通过同源蛋白的氨基酸序列的比对(例如,使用Clustal Omega)所确定的。它可以是在序列比对中的每个位置发现的最常见氨基酸残基的计算顺序,这基于来自至少100个天然HBV分离株的HBV抗原(例如,核心、pol等)的序列。共有序列可以是非天然存在的并且不同于天然病毒序列。通过使用多序列比对工具比对来自不同来源的多个HBV抗原序列,并在可变比对位置选择最常见的氨基酸,可以设计共有序列。优选地,HBV抗原的共有序列源自HBV基因型B、C和D。术语“共有抗原”用于表示具有共有序列的抗原。

[0053] 根据本申请的示例性的截短的HBV核心抗原缺乏核酸结合功能,并且能够在哺乳动物中诱导针对至少两种HBV基因型的免疫应答。优选地,截短的HBV核心抗原能够在哺乳动物中诱导针对至少HBV基因型B、C和D的T细胞应答。更优选地,截短的HBV核心抗原能够在人类受试者中诱导针对至少HBV基因型A、B、C和D的CD8 T细胞应答。

[0054] 优选地,本申请的HBV核心抗原是共有抗原,优选从HBV基因型B、C和D衍生出的共有抗原,更优选从HBV基因型B、C和D衍生出的截短的共有抗原。根据本申请的示例性的截短的HBV核心共有抗原由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性(诸如与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、

98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性)的氨基酸序列组成。SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 4是从HBV基因型B、C和D衍生出的核心共有抗原。SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 4各自含有天然核心抗原的高度带正电荷的(富含精氨酸的)核酸结合结构域的34-氨基酸C-端缺失。

[0055] 在本申请的一个实施方案中,HBV核心抗原是由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成的截短的HBV抗原。在另一个实施方案中,HBV核心抗原是由SEQ ID NO: 4的氨基酸序列组成的截短的HBV抗原。在另一个实施方案中,HBV核心抗原进一步含有信号序列,其可操作地连接至成熟的HBV核心抗原序列(诸如SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4的氨基酸序列)的N-端。优选地,信号序列具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

[0056] (2)HBV聚合酶抗原

本文中使用的术语“HBV聚合酶抗原”、“HBV Pol抗原”或“HBV pol抗原”表示能够在受试者中诱导针对HBV聚合酶的免疫应答(例如,体液和/或细胞的介导的应答)的HBV抗原。术语“聚合酶”、“聚合酶多肽”、“Pol”和“pol”中的每一个表示HBV病毒DNA聚合酶。HBV病毒DNA聚合酶具有四个结构域,从N末端到C末端包括:末端蛋白(TP)结构域,其作为负链DNA合成的引物;对聚合酶功能非必需的间隔区;用于转录的逆转录酶(RT)结构域;和RNA酶H结构域。

[0057] 在本申请的一个实施方案中,HBV抗原包含HBV Pol抗原,或其任何免疫原性片段或组合。HBV Pol抗原可以含有进一步修饰以提高抗原的免疫原性,诸如通过将突变引入聚合酶和/或RNA酶结构域的活性部位以降低或基本上消除某些酶活性。

[0058] 优选地,本申请的HBV Pol抗原不具有逆转录酶活性和RNA酶H活性,并且能够在哺乳动物中诱导针对至少两种HBV基因型的免疫应答。优选地,HBV Pol抗原能够在哺乳动物中诱导针对至少HBV基因型B、C和D的T细胞应答。更优选地,HBV Pol抗原能够在人类受试者中诱导针对至少HBV基因型A、B、C和D的CD8 T细胞应答。

[0059] 因而,在某些实施方案中,HBV Pol抗原是灭活的Pol抗原。在一个实施方案中,灭活的HBV Pol抗原在聚合酶结构域的活性部位中包含一个或多个氨基酸突变。在另一个实施方案中,灭活的HBV Pol抗原在RNA酶H结构域的活性部位中包含一个或多个氨基酸突变。在一个优选的实施方案中,灭活的HBV pol抗原在聚合酶结构域和RNA酶H结构域的活性部位中包含一个或多个氨基酸突变。例如,核苷酸/金属离子结合所需要的HBV pol抗原的聚合酶结构域中的“YXDD”基序可以被突变,例如,通过用天冬酰胺残基(N)替换一个或多个天冬氨酸残基(D),消除或降低金属配位功能,从而降低或基本上消除逆转录酶功能。可替换地,或除了“YXDD”基序的突变之外,Mg2+配位所需的HBV pol抗原的RNA酶H结构域中的“DEDD”基序可以被突变,例如,通过用天冬酰胺残基(N)替换一个或多个天冬氨酸残基(D)和/或用谷氨酰胺(Q)替换谷氨酸残基(E),从而降低或基本上消除RNA酶H功能。在一个特定实施方案中,如下修饰HBV pol抗原:(1)将聚合酶结构域的“YXDD”基序中的天冬氨酸残基(D)突变为天冬酰胺残基(N);和(2)将RNA酶H结构域的“DEDD”基序中的第一个天冬氨酸残基(D)突变为天冬酰胺残基(N)并将第一个谷氨酸残基(E)突变为谷氨酰胺残基(N),从而降低或基本上消除pol抗原的逆转录酶和RNA酶H功能。

[0060] 在本申请的一个优选的实施方案中,HBV pol抗原是共有抗原,优选从HBV基因型B、C和D衍生出的共有抗原,更优选从HBV基因型B、C和D衍生出的灭活的共有抗原。根据本申

请的示例性的HBV pol共有抗原包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性的氨基酸序列，诸如与SEQ ID NO: 7具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性，优选与SEQ ID NO: 7具有至少98%同一性，诸如与SEQ ID NO: 7具有至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性。SEQ ID NO: 7是从HBV基因型B、C和D衍生出的pol共有抗原，其包含位于聚合酶和RNA酶H结构域的活性部位中的四个突变。具体地，四个突变包括在聚合酶结构域的“YXDD”基序中的天冬氨酸残基(D)向天冬酰胺残基(N)的突变；在RNA酶H结构域的“DEDD”基序中，第一个天冬氨酸残基(D)向天冬酰胺残基(N)的突变以及谷氨酸残基(E)向谷氨酰胺残基(Q)的突变。

[0061] 在本申请的一个特定实施方案中，HBV pol抗原包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列。在本申请的其它实施方案中，HBV pol抗原由SEQ ID NO: 7的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中，HBV pol抗原进一步含有信号序列，其可操作地连接至成熟的HBV pol抗原序列(诸如SEQ ID NO: 7的氨基酸序列)的N-端。优选地，所述信号序列具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

[0062] (3)HBV核心抗原和HBV聚合酶抗原的融合体

本文中使用的术语“融合蛋白”或“融合体”表示具有至少两个多肽结构域的单个多肽链，所述多肽结构域通常不存在于单个天然多肽中。

[0063] 在本申请的一个实施方案中，HBV抗原包含融合蛋白，所述融合蛋白包含可操作地连接至HBV Pol抗原的截短的HBV核心抗原或者可操作地连接至截短的HBV核心抗原的HBV Pol抗原，优选地经由接头。

[0064] 例如，在包含第一多肽和第二异源多肽的融合蛋白中，接头主要用作第一和第二多肽之间的间隔物。在一个实施方案中，接头由通过肽键连接在一起的氨基酸组成，优选由通过肽键连接的1至20个氨基酸组成，其中氨基酸选自20种天然存在的氨基酸。在一个实施方案中，1-20个氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和赖氨酸。优选地，接头由大部分在空间上不受阻碍的氨基酸组成，诸如甘氨酸和丙氨酸。示例性的接头是聚甘氨酸，特别是(Gly)5、(Gly)8；聚(Gly-Ala)和聚丙氨酸。如在下面实施例中所示的一种示例性的合适接头是(AlaGly)n，其中n是2-5的整数。

[0065] 优选地，本申请的融合蛋白能够在哺乳动物中诱导针对至少两种HBV基因型的HBV核心和HBV Pol的免疫应答。优选地，融合蛋白能够在哺乳动物中诱导针对至少HBV基因型B、C和D的T细胞应答。更优选地，融合蛋白能够在人类受试者中诱导针对至少HBV基因型A、B、C和D的CD8 T细胞应答。

[0066] 在本申请的一个实施方案中，融合蛋白包含：其氨基酸序列与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%(诸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%)同一性的截短的HBV核心抗原，接头，和其氨基酸序列与SEQ ID NO: 7具有至少90%(诸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%)同一性的HBV Pol抗原。

[0067] 在本申请的一个优选的实施方案中，融合蛋白包含：由SEQ ID NO: 2或SEQ ID

NO: 4的氨基酸序列组成的截短的HBV核心抗原,包含(AlaGly)n的接头(其中n是2-5的整数),和具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的HBV Pol抗原。更优选地,根据本申请的一个实施方案的融合蛋白包含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列。

[0068] 在本申请的一个实施方案中,融合蛋白进一步包含信号序列,其可操作地连接至融合蛋白的N-端。优选地,所述信号序列具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。在一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 17的氨基酸序列。

[0069] 在2018年12月18日提交的美国专利申请号16/223,251中描述了可以用于本发明的HBV疫苗的另外公开内容,该申请的内容,更优选该申请的实施例,特此通过引用整体并入。

[0070] 多核苷酸和载体

在另一个一般方面,本申请提供了一种非天然存在的核酸分子,其编码对根据本申请的实施方案的发明有用的HBV抗原,以及包含非天然存在的核酸的载体。第一种或第二种非天然存在的核酸分子可以包含编码对本申请有用的HBV抗原的任何多核苷酸序列,其可以考虑到本公开内容使用本领域已知的方法制备。优选地,第一种或第二种多核苷酸编码本申请的截短的HBV核心抗原和HBV聚合酶抗原中的至少一种。多核苷酸可以是通过重组技术(例如,克隆)得到的或合成地(例如,化学合成)生产的RNA的形式或DNA的形式。DNA可以是单链的或双链的,或者可以含有双链和单链序列的部分。例如,DNA可以包含基因组DNA、cDNA或其组合。多核苷酸也可以是DNA/RNA杂合体。本申请的多核苷酸和载体可以用于重组蛋白生产、蛋白在宿主细胞中的表达或病毒颗粒的生产。优选地,多核苷酸是DNA。

[0071] 在本申请的一个实施方案中,第一种非天然存在的核酸分子包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列,所述截短的HBV核心抗原由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性的氨基酸序列组成,诸如与SEQ ID NO: 2具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性,优选地与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有98%、99%或100%同一性。在本申请的一个特定实施方案中,第一种非天然存在的核酸分子包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列,所述截短的HBV核心抗原由SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4的氨基酸序列组成。

[0072] 编码由SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4的氨基酸序列组成的截短的HBV核心抗原的本申请的多核苷酸序列的例子包括、但不限于与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有至少90%同一性的多核苷酸序列,诸如与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性,优选地与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有98%、99%或100%同一性。编码截短的HBV核心抗原的示例性的非天然存在的核酸分子具有SEQ ID NO: 1或3的多核苷酸序列。

[0073] 在另一个实施方案中,第一种非天然存在的核酸分子进一步包含信号序列的编码序列,所述信号序列可操作地连接至HBV核心抗原序列的N-端。优选地,所述信号序列具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。更优选地,信号序列的编码序列包含SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 14的多核苷酸序列。

[0074] 在本申请的一个实施方案中,第二种非天然存在的核酸分子包含编码HBV聚合酶

抗原的第二种多核苷酸序列，所述HBV聚合酶抗原包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性的氨基酸序列，诸如与SEQ ID NO: 7具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性，优选地与SEQ ID NO: 7具有100%同一性。在本申请的一个特定实施方案中，第二种非天然存在的核酸分子包含编码由SEQ ID NO: 7的氨基酸序列组成的HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列。

[0075] 编码包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性的氨基酸序列的HBV Pol抗原的本申请的多核苷酸序列的例子包括、但不限于与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有至少90%同一性的多核苷酸序列，诸如与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性，优选地与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有98%、99%或100%同一性。编码HBV pol抗原的示例性的非天然存在的核酸分子具有SEQ ID NO: 5或6的多核苷酸序列。

[0076] 在另一个实施方案中，第二种非天然存在的核酸分子进一步包含信号序列的编码序列，所述信号序列可操作地连接至HBV pol抗原序列(诸如SEQ ID NO: 7的氨基酸序列)的N-端。优选地，所述信号序列具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。更优选地，信号序列的编码序列包含SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 14的多核苷酸序列。

[0077] 在本申请的另一个实施方案中，非天然存在的核酸分子编码HBV抗原融合蛋白，其包含可操作地连接至HBV Pol抗原的截短的HBV核心抗原、或可操作地连接至截短的HBV核心抗原的HBV Pol抗原。在一个特定实施方案中，本申请的非天然存在的核酸分子编码：截短的HBV核心抗原，其由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性的氨基酸序列组成，诸如与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性，优选地与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有100%同一性，更优选地与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO:4具有100%同一性；接头；和HBV聚合酶抗原，其包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性的氨基酸序列，诸如与SEQ ID NO: 7具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性，优选地与SEQ ID NO: 7具有98%、99%或100%同一性。在本申请的一个特定实施方案中，非天然存在的核酸分子编码融合蛋白，其包含：由SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4的氨基酸序列组成的截短的HBV核心抗原，包含(AlaGly)n的接头，其中n是2-5的整数；和包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的HBV Pol抗原。在本申请的一个特定实施方案中，非天然存在的核酸分子编码包含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列的HBV抗原融合蛋白。

[0078] 编码HBV抗原融合蛋白的本申请的多核苷酸序列的例子包括、但不限于：与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有至少90%同一性的多核苷酸序列，诸如与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性，优选地与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有98%、99%或100%同一性，所述多核苷酸序列可操作地连接至与SEQ ID NO: 11具有至少90%同一性的接头编码序列，诸如与SEQ ID NO: 11具有至少

90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性，优选地与SEQ ID NO: 11具有98%、99%或100%同一性，所述接头编码序列进一步可操作地连接至与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有至少90%同一性的多核苷酸序列，诸如与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性，优选地与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有98%、99%或100%同一性。在本申请的特定实施方案中，编码HBV抗原融合蛋白的非天然存在的核酸分子包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3，其可操作地连接至SEQ ID NO: 11，后者进一步可操作地连接至SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6。

[0079] 在另一个实施方案中，编码HBV融合体的非天然存在的核酸分子进一步包含信号序列的编码序列，所述信号序列可操作地连接至HBV融合体序列(诸如SEQ ID NO: 16的氨基酸序列)的N-端。优选地，所述信号序列具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。更优选地，信号序列的编码序列包含SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 14的多核苷酸序列。在一个实施方案中，编码的具有信号序列的融合蛋白包含SEQ ID NO: 17的氨基酸序列。

[0080] 本申请也涉及一种载体，其包含第一种和/或第二种非天然存在的核酸分子。本文中使用的“载体”是用于将遗传物质携带到另一个细胞中的核酸分子，在那里它可以被复制和/或表达。可以使用考虑到本公开内容本领域技术人员已知的任何载体。载体的例子包括、但不限于质粒、病毒载体(细菌噬菌体、动物病毒和植物病毒)、粘粒和人工染色体(例如，YAC)。优选地，载体是DNA质粒。载体可以是DNA载体或RNA载体。考虑到本公开内容，本领域普通技术人员可以通过标准重组技术构建本申请的载体。

[0081] 本申请的载体可以是表达载体。本文中使用的术语“表达载体”表示包含核酸的任何类型的遗传构建体，所述核酸编码能够被转录的RNA。表达载体包括、但不限于用于重组蛋白表达的载体，诸如DNA质粒或病毒载体，以及用于将核酸递送到受试者中以在受试者的组织中表达的载体，诸如DNA质粒或病毒载体。本领域技术人员将理解，表达载体的设计可以取决于诸如待转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白表达水平等因素。

[0082] 本申请的载体可以含有多种调节序列。本文中使用的术语“调节序列”表示允许、有助于或调节核酸分子的功能调节(包括核酸或其衍生物之一(即mRNA)的复制、重复、转录、剪接、翻译、稳定性和/或运输进宿主细胞或生物体中)的任何序列。在本公开内容的上下文中，该术语涵盖启动子、增强子和其它表达控制元件(例如，多腺苷酸化信号和影响mRNA稳定性的元件)。

[0083] 在本申请的某些实施方案中，载体是非病毒载体。非病毒载体的例子包括、但不限于DNA质粒、细菌人工染色体、酵母人工染色体、细菌噬菌体等。非病毒载体的例子包括、但不限于RNA复制子、mRNA复制子、修饰的mRNA复制子或自扩增mRNA、闭合线性脱氧核糖核酸，例如线性共价闭合DNA，诸如线性共价闭合双链DNA分子。优选地，非病毒载体是DNA质粒。与“DNA质粒载体”、“质粒DNA”或“质粒DNA载体”互换使用的“DNA质粒”表示能够在合适的宿主细胞中自复制的双链且通常为环状的DNA序列。用于表达编码的多核苷酸的DNA质粒通常包含复制起点、多克隆位点和选择标志物，例如可以是抗生素抗性基因。可以使用的合适的DNA质粒的例子包括、但不限于用于众所周知的表达系统(包括原核和真核系统)的商购可得的表达载体，诸如pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.)，其可以用于在大肠杆菌

中生产和/或表达蛋白;pYES2 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific),其可以用于在酵母的酿酒酵母菌株中生产和/或表达;MAXBAC®完整杆状病毒表达系统(Thermo Fisher Scientific),其可以用于在昆虫细胞中生产和/或表达;pcDNATM或pcDNA3TM (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific),其可以用于在哺乳动物细胞中的高水平组成型蛋白表达;和pVAX或pVAX-1 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific),其可以用于在大多数哺乳动物细胞中高水平瞬时表达感兴趣的蛋白。通过使用常规技术和容易得到的起始原料,可以修饰任何商购可得的DNA质粒的主链以优化在宿主细胞中的蛋白表达,诸如反转某些元件(例如,复制起点和/或抗生素抗性盒)的方向,替换质粒的内源启动子(例如,在抗生素抗性盒中的启动子),和/或替换编码所转录的蛋白的多核苷酸序列(例如,抗生素抗性基因的编码序列) (参见例如,Sambrook等人, Molecular Cloning a Laboratory Manual, 第二版. Cold Spring Harbor Press (1989))。

[0084] 优选地,DNA质粒是适合于在哺乳动物宿主细胞中表达蛋白的表达载体。适用于在哺乳动物宿主细胞中表达蛋白的表达载体包括、但不限于pcDNATM、pcDNA3TM、pVAX、pVAX-1、ADVAX、NTC8454等。优选地,表达载体是基于pVAX-1,其可被进一步修饰以优化在哺乳动物细胞中的蛋白表达。pVAX-1是DNA疫苗中的常用质粒,且含有强大的人类立即早期巨细胞病毒(CMV-IE)启动子,然后是牛生长激素(bGH)衍生的多腺苷酸化序列(pA)。pVAX-1进一步含有pUC复制起点和由允许细菌质粒繁殖的小原核启动子驱动的卡那霉素抗性基因。

[0085] 本申请的载体还可以是病毒载体。一般而言,病毒载体是遗传工程改造的病毒,其携带已被赋予非传染性的经修饰的病毒DNA或RNA,但仍含有病毒启动子和转基因,从而允许通过病毒启动子翻译转基因。因为病毒载体通常缺乏传染性序列,因此它们需要辅助病毒或包装线才能大规模转染。可以使用的病毒载体的例子包括、但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒载体、痘病毒载体、肠道病毒载体、委内瑞拉马脑炎病毒载体、西门利克森林病毒载体、烟草花叶病毒载体、慢病毒载体等。可以使用的病毒载体的例子包括、但不限于沙粒病毒病毒载体、复制缺陷型沙粒病毒病毒载体或有复制能力的沙粒病毒病毒载体、双节段或三节段沙粒病毒、传染性的沙粒病毒病毒载体、包含沙粒病毒基因组区段的核酸(其中该基因组区段的一个开放读码框被删除或在功能上灭活,并被编码如本文所述的HBV抗原的核酸替代)、沙粒病毒诸如淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)(例如,克隆13株或MP株)、以及沙粒病毒诸如胡宁病毒(例如,Candid #1株)。载体还可以是非病毒载体。

[0086] 优选地,病毒载体是腺病毒载体,例如,重组腺病毒载体。重组腺病毒载体可以例如衍生自人腺病毒(HAdV或AdHu)或猿猴腺病毒诸如黑猩猩或大猩猩腺病毒(ChAd、AdCh或SAdV)或恒河猴腺病毒(rhAd)。优选地,腺病毒载体是重组人腺病毒载体,例如重组人腺病毒血清型26,或重组人腺病毒血清型5、4、35、7、48等中的任一种。在其它实施方案中,腺病毒载体是rhAd载体,例如rhAd51、rhAd52或rhAd53。

[0087] 载体也可以是线性共价闭合双链DNA载体。本文中使用的“线性共价闭合双链DNA载体”表示在结构上不同于质粒DNA的闭合线性脱氧核糖核酸(DNA)。它具有质粒DNA的许多优点以及类似于RNA策略的最小盒大小。例如,它可以是通常包含编码的抗原序列、启动子、多腺苷酸化序列和端粒末端的载体盒。可以通过酶促过程合成无质粒构建体,无需细菌序列。合适的线性共价闭合DNA载体的例子包括、但不限于商购可得的表达载体诸如‘Doggybone™闭合线性DNA’(dbDNA™) (Touchlight Genetics Ltd.;伦敦, 英国)。参见,

例如,Scott等人, *Hum Vaccin Immunother*. 2015年8月;11(8): 1972-1982,其整个内容通过引用并入本文。在US2012/0282283、US2013/0216562和US2018/0037943中描述了线性共价闭合双链DNA载体、组合物和用于产生和使用此类载体以递送DNA分子(诸如本发明的活性分子)的一些实例,其各自的相关内容特此通过引用整体并入。

[0088] 考虑到本公开内容,使用本领域已知的方法可以制备用于本申请的重组载体。例如,考虑到遗传密码的简并性,可以设计几种编码相同多肽的核酸序列。编码本申请的HBV抗原的多核苷酸可以任选地进行密码子优化以确保在宿主细胞(例如,细菌或哺乳动物细胞)中的适当表达。密码子优化是本领域广泛应用的技术,且考虑到本公开内容,获得经过密码子优化的多核苷酸的方法将是本领域技术人员众所周知的。

[0089] 本申请的载体,例如,DNA质粒、病毒载体(特别是腺病毒载体)、RNA载体(诸如自复制的RNA复制子)或线性共价闭合双链DNA载体,可以包含任何调节元件以建立载体的常规功能,包括、但不限于由载体的多核苷酸序列编码的HBV抗原的复制和表达。调节元件包括、但不限于启动子、增强子、多腺苷酸化信号、翻译终止密码子、核糖体结合元件、转录终止子、选择标志物、复制起点等。载体可以包含一个或多个表达盒。"表达盒"是指导细胞机器制造RNA和蛋白的载体的一部分。表达盒通常包含三个组件:启动子序列、开放读码框和任选地包含多腺苷酸化信号的3'-非翻译区(UTR)。开放读码框(ORF)是一种读码框,它含有从起始密码子到终止密码子的感兴趣的蛋白(例如,HBV抗原)的编码序列。表达盒的调节元件可以可操作地连接至编码感兴趣的HBV抗原的多核苷酸序列。本文中使用的术语"可操作地连接"应放在最广泛的合理上下文中,并表示具有功能关系的多核苷酸元件的连接。当多核苷酸被置于与另一种多核苷酸的功能关系中时,所述多核苷酸是"可操作地连接的"。例如,如果启动子影响编码序列的转录,则所述启动子可操作地连接至编码序列。适用于本文所述的表达盒的任何组件可以以任何组合和以任何顺序使用以制备本申请的载体。

[0090] 载体可以包含启动子序列,优选在表达盒内,以控制感兴趣的HBV抗原的表达。术语"启动子"以其常规含义使用,且表示启动可操作地连接的核苷酸序列的转录的核苷酸序列。启动子位于同一条链上,靠近它所转录的核苷酸序列。启动子可以是组成型、诱导型或抑制型。启动子可以是天然存在的或合成的。启动子可以来源于包括病毒、细菌、真菌、植物、昆虫和动物的来源。启动子可以是同源启动子(即,源自与载体相同的遗传来源)或异源启动子(即,源自不同的载体或遗传来源)。例如,如果要使用的载体是DNA质粒,则启动子可以是质粒内源性的(同源的)或源自其它来源(异源的)。优选地,启动子在表达盒内位于编码HBV抗原的多核苷酸的上游。

[0091] 可以使用的启动子的例子包括、但不限于来自猿猴病毒40 (SV40)的启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)启动子诸如牛免疫缺陷病毒(BIV)长末端重复序列(LTR)启动子、莫洛尼病毒启动子、禽造白细胞组织增生病毒(ALV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子诸如CMV立即早期启动子(CMV-IE)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)启动子或劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子。启动子也可以是来自人基因的启动子,诸如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸或人金属硫蛋白。启动子也可以是组织特异性启动子,诸如天然的或合成的肌肉或皮肤特异性启动子。

[0092] 优选地,启动子是强真核启动子,优选巨细胞病毒立即早期(CMV-IE)启动子。示例性的CMV-IE启动子的核苷酸序列显示在SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 19中。

[0093] 载体可以包含额外的多核苷酸序列,其稳定化表达的转录物、增强RNA转录物的核输出和/或改善转录-翻译偶联。这样的序列的例子包括多腺苷酸化信号和增强子序列。多腺苷酸化信号在载体表达盒内通常位于感兴趣的蛋白(例如,HBV抗原)的编码序列的下游。增强子序列是调节性DNA序列,当被转录因子结合时,其增强相关基因的转录。增强子序列优选地在载体表达盒内位于编码HBV抗原的多核苷酸序列的上游,但位于启动子序列的下游。

[0094] 可以使用考虑到本公开内容本领域技术人员已知的任何多腺苷酸化信号。例如,多腺苷酸化信号可以是SV40多腺苷酸化信号、LTR多腺苷酸化信号、牛生长激素(bGH)多腺苷酸化信号、人生长激素(hGH)多腺苷酸化信号或人β-珠蛋白多腺苷酸化信号。优选地,多腺苷酸化信号是牛生长激素(bGH)多腺苷酸化信号或SV40多腺苷酸化信号。示例性的bGH多腺苷酸化信号的核苷酸序列显示在SEQ ID NO: 20中。示例性的SV40多腺苷酸化信号的核苷酸序列显示在SEQ ID NO: 13中。

[0095] 可以使用考虑到本公开内容本领域技术人员已知的任何增强子序列。例如,增强子序列可以是人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸或病毒增强子,诸如来自CMV、HA、RSV或EBV的增强子。具体增强子的例子包括、但不限于土拨鼠HBV转录后调节元件(WPRE)、源自人载脂蛋白A1前体(ApoAI)的内含子/外显子序列、人T-细胞白血病病毒1型(HTLV-1)长末端重复序列(LTR)的非翻译R-U5结构域、剪接增强子、合成的兔β-珠蛋白内含子或它们的任意组合。优选地,增强子序列是HTLV-1 LTR的非翻译R-U5结构域、兔β-珠蛋白内含子和剪接增强子的三个连续元件的复合序列,其在本文中被称作“三重增强子序列”。示例性的三重增强子序列的核苷酸序列显示在SEQ ID NO: 10中。另一种示例性的增强子序列是在SEQ ID NO: 12中所示的ApoAI基因片段。

[0096] 载体可以包含编码信号肽序列的多核苷酸序列。优选地,编码信号肽序列的多核苷酸序列位于编码HBV抗原的多核苷酸序列的上游。信号肽通常指导蛋白的定位,促进蛋白从产生蛋白的细胞中的分泌,和/或改善抗原表达和向抗原呈递细胞的交叉呈递。当从载体表达时,信号肽可以存在于HBV抗原的N端,但被信号肽酶切掉,例如在从细胞分泌后。其中信号肽已被切割的表达的蛋白经常被称为“成熟的蛋白”。可以使用考虑到本公开内容本领域已知的任何信号肽。例如,信号肽可以是半胱氨酸蛋白酶抑制剂S信号肽;免疫球蛋白(Ig)分泌信号,诸如Ig重链γ信号肽SPIgG或Ig重链ε信号肽SPIgE。

[0097] 优选地,信号肽序列是半胱氨酸蛋白酶抑制剂S信号肽。半胱氨酸蛋白酶抑制剂S信号肽的示例性核酸和氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO: 8和9中。免疫球蛋白分泌信号的示例性核酸和氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO: 14和15中。

[0098] 载体,诸如DNA质粒,还可以包括细菌复制起点和抗生素抗性表达盒,其用于在细菌细胞(例如大肠杆菌)中选择和维持质粒。细菌复制起点和抗生素抗性盒可以以与编码HBV抗原的表达盒相同的取向或以相反(反向)取向位于载体中。复制起点(ORI)是启动复制处的序列,从而使质粒能够在细胞内繁殖和存活。适用于本申请的ORI的例子包括、但不限于ColE1、pMB1、pUC、pSC101、R6K和15A,优选pUC。pUC ORI的示例性核苷酸序列显示在SEQ ID NO: 21中。

[0099] 用于在细菌细胞中选择和维持的表达盒通常包括可操作地连接至抗生素抗性基因的启动子序列。优选地,可操作地连接至抗生素抗性基因的启动子序列不同于可操作地

连接至编码感兴趣的蛋白(例如HBV抗原)的多核苷酸序列的启动子序列。抗生素抗性基因可以是密码子优化的,并且抗生素抗性基因的序列组成通常根据细菌(例如,大肠杆菌)密码子选择进行调整。可以使用考虑到本公开内容本领域技术人员已知的任何抗生素抗性基因,包括、但不限于卡那霉素抗性基因(Kanr)、氨苄西林抗性基因(Ampr)和四环素抗性基因(Tetr)、以及赋予对氯霉素、博来霉素、大观霉素、羧苄西林等的抗性的基因。

[0100] 优选地,在载体的抗生素表达盒中的抗生素抗性基因是卡那霉素抗性基因(Kanr)。Kanr基因的序列显示在SEQ ID NO: 22中。优选地,Kanr基因是密码子优化的。密码子优化的Kanr基因的示例性核酸序列显示在SEQ ID NO: 23中。Kanr可以与其天然启动子可操作地连接,或者Kanr基因可以与异源启动子连接。在一个特定实施方案中,Kanr基因可操作地连接至氨苄西林抗性基因(Ampr)启动子,后者称作bla启动子。bla启动子的示例性核苷酸序列显示在SEQ ID NO: 24中。

[0101] 在本申请的一个特定实施方案中,载体是包含表达盒的DNA质粒,所述表达盒包括编码至少一种HBV抗原的多核苷酸,所述HBV抗原选自:HBV pol抗原,其包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%(诸如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%,优选地至少98%,诸如至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%)同一性的氨基酸序列;和截短的HBV核心抗原,其由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少95%(诸如95%、96%、97%,优选地至少98%,诸如至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%)同一性的氨基酸序列组成;可操作地连接至编码HBV抗原的多核苷酸的上游序列,其从5'端至3'端包含启动子序列,优选SEQ ID NO: 18的CMV启动子序列,增强子序列,优选SEQ ID NO: 10的三重增强子序列,和编码信号肽序列的多核苷酸序列,优选具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的半胱氨酸蛋白酶抑制剂S信号肽;和可操作地连接至编码HBV抗原的多核苷酸的下游序列,其包含多腺苷酸化信号,优选SEQ ID NO: 20的bGH多腺苷酸化信号。这样的载体进一步包含抗生素抗性表达盒,其包括编码抗生素抗性基因(优选Kan^r基因)的多核苷酸,更优选与SEQ ID NO: 23具有至少90%同一性的密码子优化的Kan^r基因,诸如与SEQ ID NO: 23具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性,优选地与SEQ ID NO: 23具有100%同一性,其可操作地连接至SEQ ID NO: 24的Ampr (bla)启动子,在编码抗生素抗性基因的多核苷酸的上游并与其可操作地连接;和复制起点,优选SEQ ID NO: 21的pUC ori。优选地,抗生素抗性盒和复制起点以相对于HBV抗原表达盒相反的取向存在于质粒中。

[0102] 在本申请的另一个特定实施方案中,载体是病毒载体,优选腺病毒载体,更优选Ad26或Ad35载体,其包含表达盒,所述表达盒包括编码至少一种HBV抗原的多核苷酸,所述HBV抗原选自:HBV pol抗原,其包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%(诸如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96、97%、优选地至少98%,诸如至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%)同一性的氨基酸序列;和截短的HBV核心抗原,其由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少95%(诸如95%、96%、97%,优选地至少98%,诸如至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%)同一性的氨基酸序列组成;可操作地连接至编码HBV抗原的多核苷酸的上游序列,其从5'端至3'端包含启动子序列,优选SEQ ID NO: 19的CMV启动子序列,增强子序列,优选

SEQ ID NO: 12的ApoAI基因片段序列,和编码信号肽序列(优选具有SEQ ID NO: 15的氨基酸序列的免疫球蛋白分泌信号)的多核苷酸序列;和可操作地连接至编码HBV抗原的多核苷酸的下游序列,其包含多腺苷酸化信号,优选SEQ ID NO: 13的SV40多腺苷酸化信号。

[0103] 在本申请的一个实施方案中,载体,诸如质粒DNA载体或病毒载体(优选腺病毒载体,更优选Ad26或Ad35载体),编码具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的HBV Pol抗原。优选地,载体包含HBV Pol抗原的编码序列,其与SEQ ID NO: 5或6的多核苷酸序列具有至少90%同一性,诸如与SEQ ID NO: 5或6具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性,优选地与SEQ ID NO: 5或6具有100%同一性。

[0104] 在本申请的一个实施方案中,载体,诸如质粒DNA载体或病毒载体(优选腺病毒载体,更优选Ad26或Ad35载体),编码由SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4的氨基酸序列组成的截短的HBV核心抗原。优选地,载体包含截短的HBV核心抗原的编码序列,其与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3的多核苷酸序列具有至少90%同一性,诸如与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性,优选地与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有100%同一性。

[0105] 在本申请的另一个实施方案中,载体,诸如质粒DNA载体或病毒载体(优选腺病毒载体,更优选Ad26或Ad35载体),编码融合蛋白,所述融合蛋白包含具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的HBV Pol抗原和由SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3的氨基酸序列组成的截短的HBV核心抗原。优选地,载体包含融合体的编码序列,其含有与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有至少90%同一性的截短的HBV核心抗原的编码序列,诸如与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性,优选地与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有98%、99%或100%同一性,更优选地SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3,所述编码序列可操作地连接至与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有至少90%同一性的HBV Pol抗原的编码序列,诸如与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性,优选地与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有98%、99%或100%同一性,更优选地SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6。优选地,截短的HBV核心抗原的编码序列经由与SEQ ID NO: 11具有至少90%同一性的接头的编码序列可操作地连接至HBV Pol抗原的编码序列,诸如与SEQ ID NO: 11具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性,优选地与SEQ ID NO: 11具有98%、99%或100%同一性。在本申请的特定实施方案中,载体包含融合体的编码序列,其具有可操作地连接至SEQ ID NO: 11的SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3,所述SEQ ID NO: 11进一步可操作地连接至SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6。

[0106] 考虑到本公开内容,通过本领域已知的任意方法可以制备本申请的编码HBV抗原的多核苷酸和表达载体。例如,使用本领域技术人员众所周知的标准分子生物学技术,例如,聚合酶链式反应(PCR)等,可以将编码HBV抗原的多核苷酸引入或“克隆”到表达载体中。

[0107] 细胞、多肽和抗体

本申请也提供了包含本文所述的多核苷酸和载体中的任一种的细胞，优选分离的细胞。例如，所述细胞可以用于重组蛋白生产，或用于病毒颗粒生产。

[0108] 因此，本申请的实施方案还涉及制造本申请的HBV抗原的方法。该方法包括用表达载体转染宿主细胞，所述表达载体包含与启动子可操作地连接的编码本申请的HBV抗原的多核苷酸，在适合表达HBV抗原的条件下培养转染的细胞，以及任选地纯化或分离在细胞中表达的HBV抗原。可以通过本领域已知的任何方法从细胞中分离或收集HBV抗原，所述方法包括亲和色谱法、尺寸排阻色谱法等。考虑到本公开内容，用于重组蛋白表达的技术将是本领域普通技术人员众所周知的。也可以在不纯化或分离表达的蛋白的情况下研究表达的HBV抗原，例如，通过分析用编码HBV抗原的表达载体转染并在适合表达HBV抗原的条件下生长的细胞的上清液。

[0109] 因此，还提供了包含与SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4或SEQ ID NO: 7的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列的非天然存在的或重组的多肽。如上文和下文所述，本申请还涵盖编码这些序列的分离的核酸分子、包含可操作地连接至启动子的这些序列的载体、以及包含多肽、多核苷酸或载体的组合物。

[0110] 在本申请的一个实施方案中，重组多肽包含与SEQ ID NO: 2的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列，诸如与SEQ ID NO: 2具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性。优选地，非天然存在的或重组的多肽由SEQ ID NO: 2组成。

[0111] 在本申请的另一个实施方案中，非天然存在的或重组的多肽包含与SEQ ID NO: 4的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列，诸如与SEQ ID NO: 4具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性。优选地，非天然存在的或重组的多肽包含SEQ ID NO: 4。

[0112] 在本申请的另一个实施方案中，非天然存在的或重组的多肽包含与SEQ ID NO: 7的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列，诸如与SEQ ID NO: 7具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一性。优选地，非天然存在的或重组的多肽由SEQ ID NO: 7组成。

[0113] 还提供了特异性地结合本申请的非天然存在的多肽的抗体或其抗原结合片段。在本申请的一个实施方案中，对本申请的非天然存在的HBV抗原特异性的抗体不会特异性地结合另一种HBV抗原。例如，特异性地结合具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的HBV Pol抗原的本申请的抗体不会特异性地结合不具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的HBV Pol抗原。

[0114] 本文中使用的术语“抗体”包括多克隆的、单克隆的、嵌合的、人源化的、Fv、Fab和F(ab′)2;双功能的杂合体(例如，Lanzavecchia等人, Eur. J. Immunol. 17:105, 1987)，单链(Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988;Bird等人, Science 242:423, 1988)；和具有改变的恒定区的抗体(例如，美国专利号5,624,821)。

[0115] 如本文中使用的，“特异性地结合”抗原的抗体表示以1×10^{-7} M或更低的KD结合抗原的抗体。优选地，“特异性地结合”抗原的抗体以1×10^{-8} M或更低的KD结合抗原，更优选5

$\times 10^{-9}$ M或更低、1×10^{-9} M或更低、5×10^{-10} M或更低或1×10^{-10} M或更低。术语“KD”表示解离常数，它从Kd与Ka的比率(即，Kd/Ka)获得，并表示为摩尔浓度(M)。考虑到本公开内容，可以使用本领域中的方法确定抗体的KD值。例如，通过使用表面等离子体共振，诸如通过使用生物传感器系统，例如，Biacore ® 系统，或通过使用生物层干扰量度技术，诸如Octet RED96系统，可以确定抗体的KD。

[0116] 抗体的KD值越小，抗体与靶抗原结合的亲和力越高。

[0117] RNAi试剂

本申请也涉及用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂的治疗应用，所述RNAi试剂在本文中也被称作“HBV RNAi分子”或“HBV RNAi试剂”。

[0118] 用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂是本领域已知的。例如，用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂包括、但不限于在US20130005793、WO2013003520和WO2018027106中描述的那些，其各自的内容整体并入本文。

[0119] 每种HBV RNAi试剂包含有义链和反义链。有义链和反义链各自可以是16至30个核苷酸的长度。在某些实施方案中，有义链和反义链各自可以是17-26个核苷酸的长度。有义链和反义链可以是相同长度或它们可以是不同长度。在某些实施方案中，有义链和反义链各自独立地是17-26个核苷酸的长度。在某些实施方案中，有义链和反义链各自独立地是17-21个核苷酸的长度。在某些实施方案中，有义链和反义链各自是21-26个核苷酸的长度。在某些实施方案中，有义链是约19个核苷酸的长度，而反义链是约21个核苷酸的长度。在某些实施方案中，有义链是约21个核苷酸的长度，而反义链是约23个核苷酸的长度。在某些实施方案中，有义链和反义链各自是26个核苷酸的长度。在某些实施方案中，RNAi试剂有义链和反义链各自独立地是17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个核苷酸的长度。在某些实施方案中，双链RNAi试剂具有约16、17、18、19、20、21、22、23或24个核苷酸的双链体长度。有义链和反义链之间完全地或基本上互补的这个区域通常为15-25个(例如，15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个)核苷酸长度，并且发生在反义链的5’端处或附近(例如，该区域可以与反义链的5’端相隔0、1、2、3或4个并非完全地或基本上互补的核苷酸)。

[0120] 有义链和反义链各自含有长度为16到23个核碱基的核心段序列。反义链核心段序列与存在于HBV mRNA靶标中的核苷酸序列(有时称为例如靶序列)100%(完全地)互补或至少约85%(基本上)互补。有义链核心段序列与反义链中的核心段序列100%(完全地)互补或至少约85%(基本上)互补，且因此有义链核心段序列与存在于HBV mRNA靶标中的核苷酸序列(靶序列)完全相同或至少约85%相同。有义链核心段序列可以是与相应的反义核心序列相同的长度，或者它可以是不同的长度。在某些实施方案中，反义链核心段序列是16、17、18、19、20、21、22或23个核苷酸的长度。在某些实施方案中，有义链核心段序列是16、17、18、19、20、21、22或23个核苷酸的长度。

[0121] 本文中使用的“RNA干扰剂”、“RNAi试剂”、“RNA干扰分子”或“RNAi分子”是指含有RNA或RNA-hke (例如，化学修饰的RNA)寡核苷酸分子的组合物，所述寡核苷酸分子能够以序列特异性方式降解或抑制靶mRNA的信使RNA (mRNA)转录物的翻译。本文中使用的RNAi试剂可以通过RNA干扰机制(即，通过与哺乳动物细胞的RNA干扰途径机制(RNA诱导的沉默复合物或RISC)的相互作用来诱导RNA干扰)或通过任何替代机制或途径起作用。尽管据信，正如在本文中使用的该术语，RNAi试剂主要通过RNA干扰机制起作用，但是公开的RNAi试剂不

受任何特定途径或作用机理约束或限于此。本文公开的RNAi试剂包含有义链和反义链，且包括、但不限于短干扰RNA （siRNA）、双链RNA （dsRNA）、微RNA （miRNA）、短发夹RNA (shRNA)和dicer底物。

[0122] 本申请的RNAi试剂优选地是dsRNA。本文所述的RNAi试剂的反义链至少部分地与被靶向的mRNA互补。RNAi试剂可以由修饰的核苷酸和/或一个或多个非磷酸二酯键组成。

[0123] 本文中使用的术语“双链RNA”、“dsRNA分子”或“dsRNA”表示核糖核酸分子或核糖核酸分子的复合物，其具有包含两个反向平行的和基本上互补的核酸链的双链体结构。形成双链体结构的两条链可以是一个较大RNA分子的不同部分，或它们可以是单独的RNA分子。如果两条链是一个较大分子的一部分，且因此通过一条链的3’-末端和形成双链体结构的相应另一条链的5’末端之间的不间断核苷酸链连接，则连接RNA链被称作“发夹环”。如果两条链通过一条链的3’-末端和形成双链体结构的相应另一条链的5’末端之间的不间断核苷酸链之外的方式共价连接，则连接结构被称作“接头”。RNA链可以具有相同的或不同的核苷酸数目。除了双链体结构之外，dsRNA可以包含一个或多个核苷酸突出端或者可以是平头末端。

[0124] 如本文中使用的，当提及给定基因的表达时，术语“沉默”、“减少”、“抑制”、“下调”或“敲低”意味着，当用本文描述的寡聚体化合物(诸如RNAi试剂)处理细胞、细胞集合、组织、器官或受试者时，与没有如此处理的第二细胞、细胞集合、组织、器官或受试者相比，基因的表达减少，如通过从所述基因转录的RNA的水平或在其中转录所述基因的细胞、细胞集合、组织、器官或受试者中从mRNA翻译的多肽、蛋白或蛋白亚基的水平所测量的。

[0125] 本文中使用的术语“乙型肝炎病毒基因”涉及乙型肝炎病毒的复制和发病机制所必需的基因，尤其涉及编码核心蛋白、病毒聚合酶、表面抗原、e-抗原和X蛋白的基因，以及编码它们的功能片段的基因。术语“乙型肝炎病毒基因/序列”不仅涉及野生型序列，而且涉及可以被包含在所述基因/序列中的突变和改变。因此，本申请不限于本文提供的特定RNAi试剂。本申请还涉及包含反义链的RNAi试剂，所述反义链与包含这样的突变/改变的乙型肝炎病毒基因的RNA转录物的相应核苷酸段具有至少85%互补性。

[0126] 本文中使用的术语“共有序列”表示至少13个邻接核苷酸，优选至少17个邻接核苷酸，最优选至少19个邻接核苷酸，其在基因型A、B、C和D的乙型肝炎病毒基因组序列之间是高度保守的。

[0127] 本文中使用的“靶序列”表示在乙型肝炎病毒基因的转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列的连续部分，包括作为初级转录产物的RNA加工产物的mRNA。

[0128] 本文中使用的术语“包含序列的链”表示包含核苷酸链的寡核苷酸，所述核苷酸链由使用标准核苷酸命名法提及的序列描述。但是，如本文所详述，这样的“包含序列的链”还可以包含修饰，如修饰的核苷酸。

[0129] RNAi试剂能够在体外测定中(即在体外)使乙型肝炎病毒的表达抑制至少约60%，优选地至少70%，最优选地至少80%。本文中使用的术语“体外”包括、但不限于细胞培养测定。本领域技术人员可以容易地确定这种抑制率和相关效果，特别是考虑到本文提供的测定。本文中使用的术语“脱靶”表示转录组的所有非靶mRNA，其基于序列互补性通过计算机环境方法预测与所描述的RNAi试剂杂交。本申请的RNAi试剂优选地特异性地抑制乙型肝炎病毒基因的表达，即不抑制任何脱靶的表达。

[0130] 本申请的RNAi试剂可以含有与靶序列的一个或多个错配。在一个优选的实施方案中，本申请的RNAi试剂含有不超过13个错配。如果RNAi试剂的反义链含有与靶序列的错配，则优选的是，错配区域不位于反义链的5’末端的2-7位核苷酸内。在另一个实施方案中，优选的是，错配区域不位于反义链的5’末端的2-9位核苷酸内。

[0131] 如本文中使用的和除非另有说明，在用于描述与第二核苷酸序列相关的第一核苷酸序列时，术语“互补”表示包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在某些条件下与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并形成双链体结构的能力。本文中使用的“互补”序列还可以包括非-沃森-克里克碱基对和/或由非天然的和修饰的核苷酸形成的碱基对或完全由其形成，到就其杂交能力而言的上述需求得到满足的程度。

[0132] 术语“反义链”表示包含与靶序列基本上互补的区域的dsRNA的链。本文中使用的术语“互补性区域”表示在反义链上与序列(例如靶序列)基本上互补的区域。当互补性区域与靶序列不完全互补时，在反义链5’末端的2-7位核苷酸之外最能容忍错配。

[0133] 本文中使用的术语“有义链”表示dsRNA的链，其包括与反义链的区域基本上互补的区域。“基本上互补的”优选地是指有义链和反义链中至少85%的重叠核苷酸是互补的。

[0134] 用于形成HBV RNAi试剂的有义和反义链核苷酸序列的例子提供在图4-6和8-10中，其复制自US20130005793和WO2018027106，其内容整体并入本文。

[0135] HBV RNAi试剂有义链和反义链退火形成双链体。HBV RNAi试剂的有义链和反义链可以彼此部分、基本上或完全互补。在互补双链区内，有义链核心段序列与反义核心段序列至少约85％互补或100％互补。在一些实施方案中，有义链核心段序列包含与反义链核心段序列的相应16、17、18、19、20或21个核苷酸序列至少约85%或100%互补的至少16、至少17、至少18、至少19、至少20或至少21个核苷酸的序列(即，HBV RNAi试剂的有义链和反义核心段序列具有至少85%碱基配对或100%碱基配对的至少16、至少17、至少18、至少19、至少20或至少21个核苷酸的区域)。

[0136] 在一些实施方案中，本文公开的HBV RNAi试剂的反义链与本文所述的任何反义链序列相差0、1、2或3个核苷酸。在一些实施方案中，本文公开的HBV RNAi试剂的有义链与本文所述的任何有义链序列相差0、1、2或3个核苷酸。

[0137] 本文所述的HBV RNAi试剂有义和反义链的长度独立地为16至30个核苷酸。在一些实施方案中，有义链和反义链的长度独立地为17至26个核苷酸。在一些实施方案中，有义链和反义链的长度为19-26个核苷酸。在一些实施方案中，所述RNAi试剂有义和反义链的长度独立地为17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个核苷酸。有义链和反义链可以是相同的长度，或它们可以是不同的长度。在一些实施方案中，有义链和反义链的长度各为26个核苷酸。在一些实施方案中，有义链的长度为23个核苷酸，而反义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中，有义链的长度为22个核苷酸，而反义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中，有义链的长度为21个核苷酸，而反义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中，有义链的长度为19个核苷酸，而反义链的长度为21个核苷酸。

[0138] 有义链和/或反义链可任选且独立地在核心序列的3’端、5’端或3’和5’端两者处包含附加的1、2、3、4、5或6个核苷酸(延伸)。如果存在，反义链附加核苷酸可与HBV mRNA中的相应序列互补，或可不互补。如果存在，有义链附加核苷酸可与HBV mRNA中的相应序列相同或可不同。如果存在，反义链附加核苷酸可与相应有义链的附加核苷酸(如果存在)互补

或可不互补。

[0139] 如本文所用,延伸在有义链核心段序列和/或反义链核心段序列的5'和/或3'端包含1、2、3、4、5或6个核苷酸。有义链上的延伸核苷酸可与相应反义链中的核苷酸互补或可不互补,无论是核心段序列核苷酸还是延伸核苷酸。相反,反义链上的延伸核苷酸可与相应有义链中的核苷酸互补或可不互补,无论是核心段序列核苷酸还是延伸核苷酸。在一些在实施方案中,RNAi试剂的有义链和反义链都包含3'和5'延伸。在一些实施方案中,一条链的一个或多个3'延伸核苷酸与另一条链的一个或多个5'延伸核苷酸碱基配对。在其他实施方案中,一条链的一个或多个3'延伸核苷酸不与另一条链的一个或多个5'延伸核苷酸碱基配对。在一些实施方案中,HBV RNAi试剂具有具有3'延伸的反义链和具有5'延伸的有义链。在一些实施方案中,HBV RNAi试剂包含具有1、2、3、4、5或6个核苷酸长度的3'延伸的反义链。在其他实施方案中,HBV RNAi试剂包含具有1、2或3个核苷酸长度的3'延伸的反义链。在一些实施方案中,一个或多个反义链延伸核苷酸包含尿嘧啶或胸苷核苷酸或与相应HBV mRNA序列互补的核苷酸。在一些实施方案中,3'反义链延伸包括或由以下组成,但不限于:AUA, UGCUU, CUG, UG, UGCC, CUGCC, CGU, CUU, UGCCUA, CUGCCU, UGCCU, UGAUU, GCCUAU, T, TT, U, UU(每个从5'到3'列出)。在一些实施方案中,反义链的3'端可以包括额外的无碱基核苷(Ab)。在一些实施方案中,Ab或AbAb可以添加到反义链的3'端。

[0140] 在一些实施方案中,HBV RNAi试剂包含具有1、2、3、4或5个核苷酸长度的5'延伸的反义链。在其他实施方案中,HBV RNAi试剂包含具有1或2个核苷酸长度的5'延伸的反义链。在一些实施方案中,一个或多个反义链延伸核苷酸包含尿嘧啶或胸苷核苷酸或与相应HBV mRNA序列互补的核苷酸。在一些实施方案中,5'反义链延伸包括或由以下组成,但不限于:UA, TU, U, T, UU, TT, CUC(每个从5'到3'列出)。如果存在,反义链可以具有上述任何3'延伸与所述任何5'反义链延伸的组合。

[0141] 在一些实施方案中,HBV RNAi试剂包含具有1、2、3、4或5个核苷酸长度的3'延伸的有义链。在一些实施方案中,一个或多个有义链延伸核苷酸包含腺苷、尿嘧啶或胸苷核苷酸、AT二核苷酸或对应于HBV mRNA序列中的核苷酸的核苷酸。在一些实施方案中,3'有义链延伸包括或由以下组成,但不限于:T, UT, TT, UU, UUT, TTT或TTTT(每个从5'到3'列出)。

[0142] 在一些实施方案中,有义链的3'端可以包括额外的无碱基核苷。在一些实施方案中,可以将UUAb、UAb或Ab添加到有义链的3'端。在一些实施方案中,添加到有义链3'端的一个或多个无碱基核苷可以是反向的(invAb)。在一些实施方案中,一个或多个反向无碱基核苷可插入靶向配体和RNAi试剂的有义链的核碱基序列之间。在一些实施方案中,在RNAi试剂的有义链的一个或两个末端处或附近包含一个或多个反向无碱基核苷可以允许RNAi试剂具有增强活性或其他所需特性。在一些实施方案中,HBV RNAi试剂包含具有1、2、3、4、5或6个核苷酸长度的5'延伸的有义链。在一些实施方案中,一个或多个有义链延伸核苷酸包含尿嘧啶或腺苷核苷酸或对应于HBV mRNA序列中的核苷酸的核苷酸。在一些实施方案中,有义链S'延伸可以是但不限于:CA, AUAGGC, AUAGG, AUAG, AUA, A, AA, AC, GCA, GGCA, GGC, UAUCA, UAUC, UCA, UAU, U, UU(每个从5'到3'列出)。有义链可以具有3'延伸和/或5'延伸。

[0143] 在一些实施方案中,有义链的5'端可以包括额外的无碱基核苷(Ab)或多个无碱基

核苷(AbAb)。在一些实施方案中,添加到有义链的5'端的所述一个或多个无碱基核苷可以是反向的(invAb)。在一些实施方案中,一个或多个反向无碱基核苷可以插入在靶向配体和RNAi试剂的有义链的核碱基序列之间。在一些实施方案中,在RNAi试剂的有义链的一个或两个末端处或附近包含一个或多个反向无碱基核苷可以允许RNAi试剂具有增强的活性或其他所需特性。

[0144] 用于形成HBV RNAi试剂的核苷酸序列的例子提供在图4-6和8-10中,复制自US20130005793和WO2018027106。在某些实施方案中,HBV RNAi试剂反义链包括图4-6、8或9中的任何序列的核苷酸序列。在某些实施方案中,HBV RNAi试剂反义链包括图4-6、8或9中的任何序列的核苷酸1-17、2-15、2-17、1-18、2-18、1-19、2-19、1-20、2-20、1-21、2-21、1-22、2-22、1-23、2-23、1-24、2-24、1-25、2-25、1-26或2-26的序列。在某些实施方案中,HBV RNAi试剂有义链包括图4-6、8或10中的任何序列的核苷酸序列。在某些实施方案中,HBV RNAi试剂有义链包括图4-6、8或10中的任何序列的核苷酸1-18、1-19、1-20、1-21、1-22、1-23、1-24、1-25、1-26、2-19、2-20、2-21、2-22、2-23、2-24、2-25、2-26、3-20、3-21、3-22、3-23、3-24、3-25、3-26、4-21、4-22、4-23、4-24、4-25、4-26、5-22、5-23、5-24、5-25、5-26、6-23、6-24、6-25、6-26、7-24、7-25、7-25、8-25、8-26的序列。在某些实施方案中,本文描述的RNAi试剂的有义链和反义链含有相同数目的核苷酸。在某些实施方案中,本文描述的RNAi试剂的有义链和反义链含有不同数目的核苷酸。在某些实施方案中,RNAi试剂的有义链5'末端和反义链3'末端形成平头末端。在某些实施方案中,RNAi试剂的有义链3'末端和反义链5'末端形成平头末端。在某些实施方案中,RNAi试剂的末端均形成平头末端。在某些实施方案中,RNAi试剂的任一个末端不是平端。本文中使用的平头末端表示双链RNAi试剂的末端,其中两条退火链的末端核苷酸是互补的(形成互补碱基对)。在某些实施方案中,RNAi试剂的有义链5'末端和反义链3'末端形成翻口(frayed)末端。在某些实施方案中,RNAi试剂的有义链3'末端和反义链5'末端形成翻口末端。在某些实施方案中,RNAi试剂的两端形成翻口末端。在某些实施方案中,RNAi试剂的任一个末端不是翻口末端。本文中使用的翻口末端表示双链RNAi试剂的末端,其中两条退火链的末端核苷酸形成一对(即不形成突出端)但不互补(即形成非互补对)。本文中使用的突出端是在双链RNAi试剂的一条链的末端处的一个或多个未配对核苷酸的段。未配对的核苷酸可以是在有义链或反义链上,从而产生3' 或5' 突出端。在某些实施方案中,所述RNAi试剂含有:平头末端和翻口末端、平头末端和5'突出端末端、平头末端和3'突出端末端、翻口末端和5'突出端末端、翻口末端和3'突出端末端、两个5'突出端末端、两个3'突出端末端、5'突出端末端和3'突出端末端、两个翻口末端或两个平头末端。

[0145] 核苷酸碱基(或核碱基)是杂环嘧啶或嘌呤化合物,是所有核酸的组成部分,包括腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)。如本文所用,术语"核苷酸"可以包括修饰的核苷酸(例如,核苷酸模拟物、无碱基位点(Ab)或替代置换部分)。修饰的核苷酸,当用于各种多核苷酸或寡核苷酸构建体时,可以保持化合物在细胞中的活性,同时增加这些化合物的血清稳定性,并且还可以最大限度地减少施用所述多核苷酸或寡核苷酸构建体时激活人体干扰素活性的可能性。

[0146] 在一些实施方案中,HBV RNAi试剂以盐、混合盐或游离酸的形式制备或提供。在一些实施方案中,将HBV RNAi试剂制备为钠盐。这样的形式在本文公开的申请范围内。

[0147] 如本领域技术人员所理解的，在提及RNAi试剂时，“引入细胞”是指促进向细胞中的摄取或吸收。RNAi试剂的吸收或摄取可以通过独立的扩散或主动细胞过程发生，或通过辅助试剂或装置发生。该术语的含义并不限于体外细胞；还可以将RNAi试剂“引入细胞”，其中所述细胞是活生物体的一部分。在此类情况下，向细胞中的引入将包括向生物的递送。例如，对于体内递送，可以将RNAi试剂注射到组织部位中或全身性地施用。例如，设想将本申请的RNAi试剂施用给需要医学干预的受试者。这样的施用可以包括将本申请的RNAi试剂、载体或细胞注射到所述受试者的患病部位，例如肝组织/细胞或癌组织/细胞，如肝癌组织。此外，注射优选地紧邻设想的患病组织。向细胞中的体外引入包括本领域已知的方法，诸如电穿孔和脂质转染。

[0148] 本文中使用的术语“半衰期”是化合物或分子的稳定性的量度，并且可以通过本领域技术人员已知的方法评估，尤其是考虑到本文提供的测定。本文中使用的术语“非免疫刺激性的”表示不存在由所描述的RNAi试剂对免疫应答的任何诱导。确定免疫应答的方法是本领域技术人员众所周知的，例如通过评估细胞因子的释放，如实施例部分所述。

[0149] 修饰的核苷酸

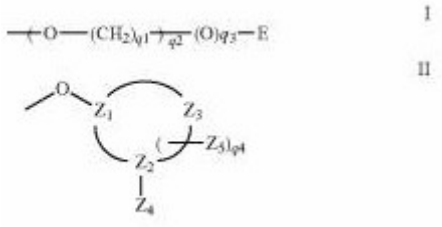
在某些实施方案中，HBV RNAi试剂含有一种或多种修饰的核苷酸。本申请的核酸可以通过本领域熟知的方法合成和/或修饰。本文中使用的“修饰的核苷酸”是核糖核苷酸(2’-羟基核苷酸)以外的核苷酸。在某些实施方案中，至少50%(例如，至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的核苷酸是修饰的核苷酸。本文中使用的修饰的核苷酸包括、但不限于脱氧核糖核苷酸、核苷酸模拟物、脱碱基的核苷酸(在本文中表示为Ab)、2’-修饰的核苷酸、3’至3’连接(倒置)核苷酸(在本文中表示为invdN、invN、invn、invAb)、包含非天然碱基的核苷酸、桥连核苷酸、肽核酸(PNA)、2’,3’-开环核苷酸模拟物(解锁的核碱基类似物，在本文中表示为NUNA)、锁定核苷酸(在本文中表示为NLNA)、3’-O-甲氧基(2’核苷间连接的)核苷酸(在本文中表示为3’-OMen)、2’-F-阿拉伯糖核苷酸(在本文中表示为NfANA)、5’-Me、2’-氟核苷酸(在本文中表示为5Me-Nf)、吗啉代核苷酸、乙烯基膦酸酯脱氧核糖核苷酸(在本文中表示为vpdN)、含有乙烯基膦酸酯的核苷酸和含有环丙基膦酸酯的核苷酸(cPrpN)。2’-修饰的核苷酸(即在五元糖环的2’位置具有除羟基以外的基团的核苷酸)包括、但不限于2’-O-甲基核苷酸(在核苷酸序列中，在本文中表示为小写字母‘n’)、2’-脱氧-2’-氟核苷酸(在本文中表示为Nf，也在本文中表示为2’-氟核苷酸)、2’-脱氧核苷酸(在本文中表示为dN)、2’-甲氧基乙基(2’-O-2-甲氧基乙基)核苷酸(在本文中表示为NM或2’-MOE)、2’-氨基核苷酸和2’-烷基核苷酸。没有必要对给定化合物中的所有位置进行统一修饰。相反，可以将超过一种修饰掺入单个HBV RNAi试剂中，或者甚至其单个核苷酸中。通过本领域已知的方法可以合成和/或修饰HBV RNAi试剂有义链和反义链。一个核苷酸的修饰独立于另一个核苷酸的修饰。

[0150] 经修饰的核苷碱基包括合成的和天然的核碱基，诸如5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤(例如，2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶或5-丙炔基胞嘧啶)、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟基甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-烷基(例如，6-甲基、6-乙基、6-异丙基或6-正丁基)衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-烷基(例如，2-甲基、2-乙基、2-异丙基或2-正丁基)和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶、2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶、胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶

氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤素、8-氨基、8-巯基、8-硫代烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(例如,5-溴)、5-trifluoiOinethyl和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-dea/a腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。在某些实施方案中,RNAi试剂的所有或基本上所有核苷酸是修饰的核苷酸。如本文中使用的,其中基本上所有存在的核苷酸都是经修饰的核苷酸的RNAi试剂是,在有义链和反义链中具有四个或更少(即,0、1、2、3或4个)核苷酸为核糖核苷酸的RNAi试剂。如本文中使用的,其中基本上所有存在的核苷酸都是经修饰的核苷酸的有义链是,在有义链中具有两个或更少(即,0、1或2个)核苷酸为核糖核苷酸的有义链。如本文中使用的,其中基本上所有存在的核苷酸都是经修饰的核苷酸的反义链是,在有义链中具有两个或更少(即,0、1或2个)核苷酸为核糖核苷酸的反义链。在某些实施方案中,RNAi试剂的一个或多个核苷酸是核糖核苷酸。

[0151] 本文中使用的术语"糖取代基"或"2'-取代基"包括用或不用氧原子连接到呋喃核糖基部分的2'-位置的基团。糖取代基包括、但不限于氟、0-烷基、0-烷基氨基、0-烷基烷氧基、受保护的0-烷基氨基、0-烷基氨基烷基、0-烷基咪唑和式(0-烷基)m的聚醚,其中m是1至约10。在这些聚醚中优选的是直链和环状聚乙二醇(PEG)和含(PEG)的基团,诸如冠醚,尤其是Delgardo等人(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems (1992) 9:249)公开的那些。Cook (Anti-fibrosis Drug Design, (1991) 6:585-607)公开了其它糖修饰。氟、0-烷基、0-烷基氨基、0-烷基咪唑、0-烷基氨基烷基和烷基氨基取代描述在美国专利6,166,197中,其标题为"Oligomeric Compounds having Pyrimidinc Nucleotide(s) with 2'and 5'Substitutions.",特此通过引用整体并入。

[0152] 适用于本申请的其它糖取代基包括2'-SR和2'-NR_2基团,其中每个R独立地为氢、保护基或被取代的或未被取代的烷基、烯基或炔基。2'-SR核苷公开于US5670633,特此通过引用整体并入。Hamm等人(J. Org. Chem., (1997) 62:3415-3420)描述了2'-SR单体合成子的掺入。Thomson JB, J. Org. Chem., (1996) 61:6273-6281;和Polushin等人, Tetrahedron Lett., (1996) 37:3227-3230公开了2'-NR核苷。适合本申请的其它代表性的2'-取代基包括具有式I或II之一的那些:



其中

E是C_1-C_{10}烷基、N(Q3)(Q4)或C(Q3)(Q4);每个Q3和Q4独立地是H、C_1-C_{10}烷基、二烷基氨基烷基、氮保护基、拴系或未拴系的缀合物基团、与固体支持物的接头;或Q3和Q4一起形成氮保护基或环结构,其任选地包括至少一个另外的选自N和O的杂原子;

q1是1-10的整数;

q2是1-10的整数;

q3是0或1;

q4是0、1或2；

每个Z1、Z2和Z3独立地是C_4-C_7环烷基、C_5-C_{14}芳基或C_3-C_{15}杂环基，其中所述杂环基中的杂原子选自氧、氮和硫；

Z4是OM1、SMI或N(M1)$_2$；每个M1独立地是H、C_1-C_8烷基、C_1-C_8卤代烷基、C(=NH)N(H)M2、C(=O)N(H)M2或OC(=O)N(H)M2；M2是H或C_1-C_8烷基；且

Z5是C_1-C_{10}烷基、C_1-C_0卤代烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_6-C_{14}芳基、N(Q3)(Q4)、OQ3、卤素、SQ3或CN。

[0153] 式I的代表性2'-O-糖取代基公开在US6172209，其标题为"Capped 2'-Oxyethoxy Oligonucleotides"，特此通过引用整体并入。式II的代表性环状2'-O-糖取代基公开在US6271358，其标题为"RNA Targeted 2'-Modified Oligonucleotides that are Conformationally Preorganized"，特此通过引用整体并入。

[0154] 在核糖基环上具有O-取代的糖也适用于本申请。环O的代表性取代包括、但不限于S、CH_2、CHF和CF_2。

[0155] 寡核苷酸还可以具有糖模拟物，诸如环丁基部分，代替呋喃型戊糖基糖。与此类修饰糖的制备相关的代表性美国专利包括、但不限于US5359044、US5466786、US5519134、US5591722、US5597909、US5646265和US5700920，它们都特此通过引用并入。

[0156] 修饰的核苷间键

在某些实施方案中，HBV RNAi试剂的一个或多个核苷酸通过非标准连接或主链(即修饰的核苷间键或修饰的主链)连接。在某些实施方案中，修饰的核苷间键是不含磷酸酯的共价核苷间键。修饰的核苷间键或主链包括、但不限于5'-硫代磷酸酯基(在本文中表示为小写字体"s")、手性硫代磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基-磷酸三酯、烷基膦酸酯(例如，甲基膦酸酯或3'-亚烷基膦酸酯)、手性膦酸酯、次膦酸酯、氨基磷酸酯(例如，3'-氨基氨基磷酸酯、氨基烷基氨基磷酸酯或硫羰氨基磷酸酯)、硫羰烷基-膦酸酯、硫羰烷基磷酸三酯、吗啉代连接、具有正常3'-5'连接的硼代磷酸酯、硼代磷酸酯的2'-5'连接类似物或具有倒置极性的硼代磷酸酯，其中相邻的核苷单元对是连接的3'-5'-5'-3'或2'-5'-5'-2'。

[0157] 在某些实施方案中，经修饰的核苷间键或主链缺少磷原子。缺少磷原子的经修饰的核苷间键包括、但不限于短链烷基或环烷基糖间键、混合的杂原子和烷基或环烷基糖间键或一个或多个短链杂原子或杂环糖间键。在某些实施方案中，经修饰的核苷间主链包括、但不限于硅氧烷主链、硫化物主链、亚砜主链、砜主链、甲乙酰基和硫代甲乙酰基主链、亚甲基甲乙酰基和硫代甲乙酰基主链、含有烯烃的主链、氨基磺酸酯主链、亚甲基亚氨基和亚甲基肼基主链、磺酸酯和磺酰胺主链、酰胺主链和具有混合的N、O、S和CH2组分的其它主链。

[0158] 在某些实施方案中，HBV RNAi试剂的有义链可以含有1、2、3、4、5或6个硫代磷酸酯键，HBV RNAi试剂的反义链可以含有1、2、3、4、5或6个硫代磷酸酯键，或者有义链和反义链独立地可以含有1、2、3、4、5或6个硫代磷酸酯键。在某些实施方案中，HBV RNAi试剂的有义链可以含有1、2、3或4个硫代磷酸酯键，HBV RNAi试剂的反义链可以含有1、2、3或4个硫代磷酸酯键，或者有义链和反义链独立地可以含有1、2、3或4个硫代磷酸酯键。在某些实施方案中，HBV RNAi试剂有义链含有至少两个硫代磷酸酯核苷间键。在某些实施方案中，至少两个硫代磷酸酯核苷间键是在有义链的3'末端的1-3位核苷酸之间。在某些实施方案中，至少两

个硫代磷酸酯核苷间键是在有义链的5’末端的1-3、2-4、3-5、4-6、4-5或6-8位的核苷酸之间。在某些实施方案中，HBV RNAi试剂反义链含有四个硫代磷酸酯核苷间键。在某些实施方案中，四个硫代磷酸酯核苷间键是在有义链的5’末端1-3位核苷酸之间以及5’末端的19-21、20-22、21-23、22-24、23-25或24-26位核苷酸之间。在某些实施方案中，HBV RNAi试剂含有在有义链中的至少两个硫代磷酸酯核苷间键和3或4

在某些实施方案中，HBV RNAi试剂含有一个或多个修饰的核苷酸和一个或多个修饰的核苷间键。在某些实施方案中，2’-修饰的核苷与修饰的核苷间键组合。

[0159] 化学修饰

本申请的RNAi试剂也可以被化学修饰以增强稳定性。可以通过本领域熟知的方法合成和/或修饰本申请的核酸。化学修饰可以包括、但不限于2’修饰、非天然碱基的引入、与配体的共价连接以及用硫代磷酸酯键替换磷酸酯键、倒置的脱氧胸苷。在该实施方案中，双链体结构的完整性通过至少一个、且优选两个化学键来加强。化学连接可以通过多种众所周知的技术中的任一种实现，例如通过引入共价键、离子键或氢键；疏水相互作用，范德华或堆叠相互作用；借助于金属离子配位或通过使用嘌呤类似物。优选地，可用于修饰RNAi试剂的化学基团包括、但不限于亚甲蓝；双官能团，优选二-(2-氯乙基)胺；-乙酰基-N’-(对乙醛酰基苯甲酰基)胱胺；4-硫尿嘧啶；和补骨脂素。在一个优选的实施方案中，接头是六乙二醇接头。在该情况下，通过固相合成产生RNAi试剂，并根据标准方法(例如，Williams DJ和Hall KB, Biochem. (1996) 35: 14665-14670)掺入六乙二醇接头。在一个特定实施方案中，反义链的5’-末端和有义链的3’-末端通过六乙二醇接头化学连接。在另一个实施方案中，RNAi试剂的至少一个核苷酸包含硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯基团。在RNAi试剂的末端的化学键优选地由三螺旋键形成。

[0160] HBV RNAi试剂

在一些实施方案中，本文公开的HBV RNAi试剂靶向图7所示HBV基因组位置处或附近的HBV基因。在一些实施方案中，本文公开的HBV RNAi试剂的反义链包括与图7中公开的靶HBV 19-聚体序列完全、基本或至少部分互补的核心段序列。

[0161] 在一些实施方案中，HBV RNAi试剂包括反义链，其中反义链的位置19(5’->3’)能够与图7中公开的19-聚体靶序列的位置1形成碱基对。在一些实施方案中，HBV RNAi试剂包括反义链，其中反义链的位置1(5’->3’)能够与图7中公开的19-聚体靶序列的位置19形成碱基对。在一些实施方案中，HBV RNAi试剂包括反义链，其中反义链的位置2(5’ -> 3’)能够与图7中公开的19-聚体靶序列的位置18形成碱基对。在一些实施方案中，HBV RNAi试剂包括反义链，其中反义链的位置2至18(5’->3’)能够与图7中公开的19-聚体靶序列位于位置18至2的各个互补碱基中的每一个形成碱基对。

[0162] 在一些实施方案中，HBV RNAi试剂包括图4-6或8中所示的核心19-聚体核苷酸序列。包含图4-6或8中的核苷酸序列或由其组成的HBV RNAi试剂有义链和反义链可以是修饰的核苷酸或未修饰的核苷酸。在一些实施方案中，具有包含图4-6或8中的核苷酸序列或由其组成的有义链和反义链序列的HBV RNAi试剂全部或基本上全部是修饰的核苷酸。在一些实施方案中，本文公开的HBV RNAi试剂的反义链与图4-6或8中的任何反义链序列相差0、1、2或3个核苷酸。

[0163] 在一些实施方案中，本文公开的HBV RNAi试剂的有义链与图4-6或8中的任何有义

链序列相差0、1、2或3个核苷酸。

[0164] 修饰的HBV RNAi试剂反义链序列，以及它们基础的未修饰序列，在图6和9中提供。修饰的HBV RNAi试剂有义链，以及它们基础的未修饰序列，在图6和10中提供。在形成HBV RNAi试剂时，图6和9-10中列出的每个未修饰序列中的每个核苷酸可以是修饰的核苷酸。

[0165] 如本文所用(包括在图9-10中)，以下符号用于指示修饰的核苷酸、靶向基团和连接基团。如本领域普通技术人员将容易理解的，除非序列另有说明，否则当存在于寡核苷酸中时，单体通过5'-3'-磷酸二酯键相互连接：

A=腺苷-3'-磷酸；

C=胞苷-3'-磷酸；

G=鸟苷-3'-磷酸；

U=尿苷-3'-磷酸

n=任何2'-OMe修饰的核苷酸

a=2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸

as=2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯

c=2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸

cs=2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯

g=2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸

gs=2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯

t=2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸

ts=2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯

u=2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸

us=2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯

Nf=任何2'-氟修饰的核苷酸

Af=2'-氟腺苷-3'-磷酸

Afs=2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸酯

Cf=2'-氟胞苷-3'-磷酸

Cfs=2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸酯

Gf=2'-氟鸟苷-3'-磷酸

Gfs=2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯

Tf=2'-氟-5'-甲基尿苷-3'-磷酸

Tfs=2'-氟-5'-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯

Uf=2'-氟尿苷-3'-磷酸

Ufs=2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸酯

dN=任何2'-脱氧核糖核苷酸

dT=2'-脱氧胸苷-3'-磷酸

NuNA=2',3'-seco核苷酸模拟物(未锁定的核碱基类似物)

NLNA=锁定核苷酸

NfANA=2'-F-阿拉伯核苷酸

NM=2'-甲氧基乙基核苷酸

AM=2'-甲氧基乙基腺苷-3'-磷酸

AMs=2'-甲氧基乙基腺苷-3'-硫代磷酸酯

TM=2'-甲氧基乙基胸苷-3'-磷酸

TMs=2'-甲氧基乙基胸苷-3'-硫代磷酸酯

R=核糖醇

(invdN)=任何反向的脱氧核糖核苷酸(3'-3'连接的核苷酸)

(invAb)=反向的(3'-3'连接的)无碱基脱氧核糖核苷酸,见表

(invAb)s=反向的(3'-3'连接的)无碱基脱氧核糖核苷酸-5'-硫代磷酸酯,见表6

(invn)=任何反向的2'-OMe核苷酸(3'-3'连接的核苷酸)=硫代磷酸酯键

vpdN=乙烯基膦酸脱氧核糖核苷酸

(5Me-Nf)=5'-Me,2'-氟核苷酸

cPrp=环丙基膦酸酯,参见WO2018027106的表6

epTcPr=参见WO2018027106的表6

epTM=参见WO2018027106的表6

本领域普通技术人员将容易理解,给定寡核苷酸序列的3'端的末端核苷酸通常在给定单体的相应3'位置具有羟基(-OH)基团,而不是离体磷酸部分。

[0166] 靶向基团和连接基团包括以下,它们的化学结构在WO2018027106的表6中提供如下,其中一些在表10(图12)中描述:(PAZ),(NAG13),(NAG13)s,(NAG18),(NAG18)s,(NAG24),(NAG24)s,(NAG25),(NAG25)s,(NAG26),(NAG26)s,(NAG27),(NAG27)s,(NAG28),(NAG28)s,(NAG29),(NAG29)s,(NAG30),(NAG30)s,(NAG31),(NAG31)s,(NAG32),(NAG32)s,(NAG33),(NAG33)s,(NAG34),(NAG34)s,(NAG35),(NAG35)s,(NAG36),(NAG36)s,(NAG37),(NAG37)s,(NAG38),(NAG38)s,(NAG39),(NAG39)s。每条有义链和/或反义链可以具有与序列的5'和/或3'末端缀合的任何上面列出的靶向基团或连接基团,以及其他靶向基团或连接基团。

[0167] 本文所述的HBV RNAi试剂是通过将反义链与有义链退火形成的。代表性序列配对由图11中所示的双链体ID号举例说明。

[0168] 对于本文公开的HBV RNAi试剂,反义链位置1处的核苷酸(从5'端到3'端)可以与HBV基因完全互补,或可以与HBV基因不互补。在一些实施方案中,反义链的位置1的核苷酸(从5'端到3'端)是U、A或dT。在一些实施方案中,反义链位置1处的核苷酸(从5'端->3'端)与有义链形成A:U或U:A碱基对。

[0169] 在一些实施方案中,HBV RNAi试剂包含反义链和有义链,其具有本文所述的任何双链体的任何反义链和/或有义链核苷酸序列的修饰核苷酸序列,并且还包含去唾液酸糖蛋白受体配体靶向基团。

[0170] 用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂是本领域已知的。例如,用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂包括但不限于US20130005793、WO2013003520和WO2018027106中描述的用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂,其内容整体并入本文。

[0171] 用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂的实例包括,例如,包含US20130005793的表1、2和4(在本文中再现为表2-4(图4-6)中或WO2018027106的表1-5(在本文中再现为表5-9(图7-11)中序列之一的RNAi试剂。

[0172] 用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂的实例包括，例如，包含表9中所示的双链体的RNAi试剂。根据特定实施方案，RNAi试剂包含以下的至少之一：双链体AD04872(本文中的SEQ ID NO:25-26)(WO2018027106的AM06282-AS(SEQ ID NO:126和171)和AM06288-SS(SEQ ID NO:252和302))和AD05070(本文中的SEQ ID NO:27-28)(WO2018027106的AM06606-AS(SEQ ID NO:140和188)和AM06605-SS(SEQ ID NO:262和328))，其每个缀合至靶向配体，例如具有表10中描述的结构的那些之一，例如NAG37。

[0173] 靶向基团、连接基团和递送媒介物

在一些实施方案中，HBV RNAi试剂缀合至一个或多个非核苷酸基团，包括但不限于靶向基团、连接基团、递送聚合物或递送媒介物。非核苷酸基团可以增强RNAi试剂的靶向、递送或附着。WO2018027106的表6中提供了靶向基团和连接基团的示例。非核苷酸基团可以共价连接到有义链和/或反义链的3'和/或5'端。在一些实施方案中，HBV RNAi试剂含有与有义链的3'和/或5'端连接的非核苷酸基团。在一些实施方案中，非核苷酸基团连接到HBV RNAi试剂有义链的5'端。非核苷酸基团可以通过接头/连接基团直接或间接连接至RNAi试剂。在一些实施方案中，非核苷酸基团通过不稳定的、可切割的或可逆的键或接头与RNAi试剂连接。

[0174] 在一些实施方案中，非核苷酸基团增强与其连接的RNAi试剂或缀合物的药代动力学或生物分布特性以改善缀合物的细胞或组织特异性分布和细胞特异性摄取。在一些实施方案中，非核苷酸基团增强RNAi试剂的内吞作用。

[0175] 靶向基团或靶向部分增强它们所连接的缀合物的药代动力学或生物分布特性以改善缀合物的细胞特异性分布和细胞特异性摄取。靶向基团可以是单价的、二价的、三价的、四价的或具有更高的化合价。代表性靶向基团包括但不限于对细胞表面分子具有亲和力的化合物、细胞受体配体、半抗原、抗体、单克隆抗体、抗体片段和对细胞表面分子具有亲和力的抗体模拟物。

[0176] 在一些实施方案中，靶向基团使用接头，例如PEG接头或一个、两个或三个无碱基和/或核糖醇(无碱基核糖)基团连接至RNAi试剂。在一些实施方案中，靶向基团包括半乳糖衍生物簇。可以合成在5'-末端具有反应性基团，例如胺基的本文所述的HBV RNAi试剂。反应性基团可用于随后使用本领域中通常的方法连接靶向部分。在一些实施方案中，靶向基团包含去唾液酸糖蛋白受体配体。在一些实施方案中，去唾液酸糖蛋白受体配体包括一种或多种半乳糖衍生物或由其组成。如本文所用，术语半乳糖衍生物包括半乳糖和对去唾液酸糖蛋白受体具有等于或大于半乳糖的亲和力的半乳糖衍生物。半乳糖衍生物包括但不限于：半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰基半乳糖胺、N-乙酰基-半乳糖胺、N-丙酰基-半乳糖胺、N-正丁酰基-半乳糖胺和N-异丁酰基半乳糖胺(参见例如：Iobst, S.T. and Drickamer, K. J.B.C. 1996, 277, 6686)。可用于寡核苷酸和其他分子体内靶向肝脏的半乳糖衍生物和半乳糖衍生物簇是本领域已知的(参见，例如，Baenziger and Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, J. Biol. Chem, 257, 939-945)。半乳糖衍生物通过与肝细胞表面上表达的去唾液酸糖蛋白受体(ASGPr)结合，已被用于在体内将分子靶向肝细胞。ASGPr配体与ASGPr(s)的结合有助于细胞特异性靶向肝细胞和将分子内吞入肝细胞。ASGPr配体可以是单体的(例如，具有单一的半乳糖衍生物)或多聚体的(例如，具有多个半乳糖衍生物)。可以使用本领域已知的方法将半乳糖衍生物或半乳糖衍生物簇连接到RNAi

多核苷酸的3或5'端。诸如半乳糖衍生物簇的靶向基团的制备描述于例如US20180064819和US20170253875中，二者的内容整体并入本文。

[0177] 如本文所用，半乳糖衍生物簇包含具有二至四个末端半乳糖衍生物的分子。末端半乳糖衍生物通过其C-1碳连接到分子。在一些实施方案中，半乳糖衍生物簇是半乳糖衍生物三聚体(也称为三触角半乳糖衍生物或三价半乳糖衍生物)。在一些实施方案中，半乳糖衍生物簇包含N-乙酰基-半乳糖胺。在一些实施方案中，半乳糖衍生物簇包含三个N-乙酰基-半乳糖胺。在一些实施方案中，半乳糖衍生物簇是半乳糖衍生物四聚体(也称为四触角半乳糖衍生物或四价半乳糖衍生物)。在一些实施方案中，半乳糖衍生物簇包含四个N-乙酰基-半乳糖胺。

[0178] 如本文所用，半乳糖衍生物三聚体包含三个半乳糖衍生物，每个都连接到中心分支点。如本文所用，半乳糖衍生物四聚体包含四个半乳糖衍生物，每个都连接到中心分支点。半乳糖衍生物可以通过糖类的C-1碳连接到中心分支点。在一些实施方案中，半乳糖衍生物通过接头或间隔基连接到分支点。

[0179] 在一些实施方案中，接头或间隔基是柔性亲水性间隔基，例如PEG基团(参见，例如，美国专利号5,885,968;Biessen et al. J. Med. Chem. 1995 Vol. 39 p. 1538-1546)。在一些实施方案中，PEG间隔基是PEG3间隔基。分支点可以是允许连接三个半乳糖衍生物并进一步允许分支点连接到RNAi试剂的任何小分子。分支点基团的例子是二赖氨酸或二谷氨酸。分支点与RNAi试剂的连接可以通过接头或间隔基发生。在一些实施方案中，接头或间隔基包含柔性亲水性间隔基，例如但不限于PEG间隔基。在一些实施方案中，接头包括刚性接头，例如环状基团。在一些实施方案中，半乳糖衍生物包含N-乙酰基-半乳糖胺或由其组成。在一些实施方案中，半乳糖衍生物簇包含半乳糖衍生物四聚体，其可以是例如N-乙酰基-半乳糖胺四聚体。

[0180] 在一些实施方案中，连接基团与RNAi试剂缀合。连接基团促进试剂与靶向基团或递送聚合物或递送媒介物的共价连接。连接基团可以连接到RNAi试剂有义链或反义链的3'或5'端。在一些实施方案中，连接基团连接至RNAi试剂有义链。在一些实施方案中，连接基团缀合至RNAi试剂有义链的5'或3'端。在一些实施方案中，连接基团缀合至RNAi试剂有义链的5'端。连接基团的实例包括但不限于：反应性基团如伯胺和炔烃、烷基、无碱基核苷、核糖醇(无碱基核糖)和/或PEG基团。

[0181] 接头或连接基团是两个原子之间的连接，它通过一个或多个共价键将一个化学基团(例如RNAi试剂)或感兴趣的片段连接到另一个化学基团(例如靶向基团或递送聚合物)或感兴趣的片段。不稳定连接包含不稳定键。连接可以任选地包括增加两个连接原子之间的距离的间隔基。间隔基可以进一步增加连接的灵活性和/或长度。间隔基可包括但不限于烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、芳烯基和芳炔基；每一个可以包含一个或多个杂原子、杂环、氨基酸、核苷酸和糖类。间隔基团在本领域中是众所周知的，并且前面的列表并不意味着限制说明书的范围。

[0182] 递送媒介物

在某些实施方案中，递送媒介物可以用于将RNAi试剂递送至细胞或组织。递送媒介物是改善RNAi试剂向细胞或组织的递送的化合物。递送媒介物可以包括、但不限于以下物质，或由以下物质组成：聚合物，诸如两亲聚合物、膜活性聚合物、肽、蜂毒肽、蜂毒肽-样

肽(MLP)、脂质、可逆地修饰的聚合物或肽或可逆地修饰的膜活性多胺。

[0183] 在某些实施方案中,所述RNAi试剂可以与本领域中可得到的脂质、纳米颗粒、聚合物、脂质体、胶束、DPC或其它递送系统组合。RNAi试剂还可以化学地缀合至靶向基团、脂质(包括、但不限于胆固醇和胆甾醇基衍生物)、纳米颗粒、聚合物、脂质体、胶束、DPC (参见,例如WO 2000/053722、WO 2008/0022309、WO 2011/104169和WO 2012/083185、WO 2013/032829、WO 2013/158141,它们中的每一篇通过引用并入本文),或本领域中可得到的其它递送系统。

[0184] 已经缀合至寡核苷酸的其它亲脂化合物包括1-芘丁酸、1,3-二-O-(十六烷基)甘油和薄荷醇。受体介导的胞吞作用的配体的一个例子是叶酸。叶酸通过叶酸受体介导的胞吞作用进入细胞。带有叶酸的RNAi试剂将通过叶酸受体介导的胞吞作用高效地转运到细胞中。叶酸与寡核苷酸的3'-末端的连接导致寡核苷酸的细胞摄取增加(Li S, Deshmukh HM, 和Huang L, Pharm. Res. (1998) 15: 1540)。已经缀合至寡核苷酸的其它配体包括聚乙二醇、碳水化合物簇、交联剂、卟啉缀合物和递送肽。在某些情况下,阳离子配体与寡核苷酸的缀合经常导致对核酸酶的抗性提高。阳离子配体的代表性例子是丙基铵和二甲基丙基铵。令人感兴趣的是,据报道,当阳离子配体分散在整个寡核苷酸中时,反义寡核苷酸保留了其对mRNA的高结合亲和力。参见Manoharan M, Antisense & Nucleic Acid Drug Development (2002) 12: 103和其中的参考文献。

[0185] 也可以在寡核苷酸上的其它位置进行额外的修饰,特别是在3'末端核苷酸上糖的3'位置。例如,本申请的配体缀合的寡核苷酸的一种额外修饰涉及向寡核苷酸化学连接一个或多个额外的非配体部分或缀合物,其增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。这样的部分包括、但不限于脂质部分,诸如胆固醇部分(Letsinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989) 86:6553),胆酸(Manoharan等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., (1994) 4: 1053),硫醚,例如,己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人, Ann. N Y. Acad. Sci., (1992) 660:306;Manoharan等人, Bioorg. Med. Chem. Let., (1993) 3:2765),硫代胆固醇(Oberhauser等人, Nucl Acids Res., (1992) 20:533),脂族链,例如,十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人, EMBO J., (1991) 10: 1 1 1;Kabanov等人, FEBS Lett., (1990) 259:327;Svinarchuk等人, Biochimie, (1993) 75:49),磷脂,例如,双-十六烷基-消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-消旋-甘油-3 -H-膦酸酯(Manoharan等人, Tetrahedron Lett., (1995) 36:3651;Shea等人, Nucl Acids Res., (1990) 18:3777),多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人, Nucleosides & Nucleotides, (1995) 14:969),或金刚烷乙酸(Manoharan等人, Tetrahedron Lett., (1995) 36: 3651),棕榈基部分(Mishra等人, Biochim. Biophys. Acta, (1995) 1264:229),或十八烷基胺或己基氨基-羰基-氧基胆甾醇部分(Crooke等人, J. Pharmacol. Exp. Ther., (1996) 277:923)。

[0186] 也可以在寡核苷酸上的其它位置进行额外的修饰,特别是在3'末端核苷酸上糖的3'位置。例如,本申请的配体缀合的寡核苷酸的一种额外修饰涉及向寡核苷酸化学连接一个或多个额外的非配体部分或缀合物,其增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。这样的部分包括、但不限于脂质部分,诸如胆固醇部分(Letsinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989) 86:6553),胆酸(Manoharan等人, Bioorg. Med. Chem. Lett.,

(1994) 4: 1053)，硫醚，例如，己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人，Ann. N Y. Acad. Sci.，(1992) 660:306;Manoharan等人，Bioorg. Med. Chem. Let.，(1993) 3:2765)，硫代胆固醇(Oberhauser等人，Nucl Acids Res.，(1992) 20:533)，脂族链，例如，十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人，EMBO J.，(1991) 10: 1 1 1;Kabanov等人，FEBS Lett.，(1990) 259:327;Svinarchuk等人，Biochimie，(1993) 75:49)，磷脂，例如，双-十六烷基-消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-消旋-甘油-3 -H-膦酸酯(Manoharan等人，Tetrahedron Lett.，(1995) 36:3651;Shea等人，Nucl Acids Res.，(1990) 18:3777)，多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人，Nucleosides & Nucleotides，(1995) 14:969)，或金刚烷乙酸(Manoharan等人，Tetrahedron Lett.，(1995) 36:3651)，棕榈基部分(Mishra等人，Biochim. Biophys. Acta，(1995) 1264:229)，或十八烷基胺或己基氨基-羰基-氧基胆甾醇部分(Crooke等人，J. Pharmacol. Exp. Ther.，(1996) 277:923)。

[0187] 本申请还包括使用就寡核苷酸内的特定位置而言基本上手性纯的寡核苷酸的组合物。

[0188] 基本上手性纯的寡核苷酸的例子包括、但不限于具有至少75%Sp或Rp的硫代磷酸酯键的那些(Cook等人，US5587361)和具有基本上手性纯的(Sp或Rp)烷基膦酸酯、氨基磷酸酯或磷酸三酯键的那些(Cook，US5212295和US5521302)。

[0189] 在某些情况下，寡核苷酸可以被非配体基团修饰。许多非配体分子已经缀合至寡核苷酸以增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取，并且进行此类缀合的程序可在科学文献中获得。此类非配体部分包括脂质部分，诸如胆固醇(Letsinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，(1989，86:6553)，胆酸(Manoharan等人，Bioorg. Med. Chem. Lett.，(1994，4: 1053)，硫醚，例如，己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人，Ann. N. Y. Acad. Sci，(1992，660:306;Manoharan等人，Bioorg. Med. Chem. Let.，(1993，3:2765)，硫代胆甾醇(Oberhauser等人，Nucl. Acids Res.，(1992，20:533)，脂族链，例如，十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人，EMBO J.，(1991) 10:111;Kabanov等人，FEBS Lett，(1990) 259:327;Svinarchuk等人，Biochimie，(1993) 75:49)，磷脂，例如，双-十六烷基-消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-消旋-甘油-3-H-膦酸酯(Manoharan等人，Tetrahedron Lett.，(1995) 36:3651;Shea等人，Nucl. Acids Res.，(1990) 18:3777)，多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人，Nucleosides & Nucleotides，(1995) 14:969)，或金刚烷乙酸(Manoharan等人.. Tetrahedron Lett.，(1995) 36:3651)，棕榈基部分(Mishra等人，Biochim. Biophys. Acta，(1995) 1264:229)，或十八烷基胺或己基氨基-羰基-氧基胆甾醇部分(Crooke等人，J. Pharmacol. Exp. Ther.，(1996) 277:923)。典型的缀合方案涉及在序列的一个或多个位置带有氨基接头的寡核苷酸的合成。然后使用适当的偶联剂或活化剂使氨基与被缀合的分子反应。可以在寡核苷酸仍然结合在固体支持物上的情况下或在切割寡核苷酸后在溶液相中进行缀合反应。通过HPLC对寡核苷酸缀合物的纯化通常提供纯的缀合物。

[0190] 可替换地，通过在分子中存在的醇基团或通过连接带有可被磷酸化的醇基团的接头，可以将被缀合的分子转化为结构单元，诸如亚磷酰胺。重要的是，这些方法中的每一种都可以用于合成配体缀合的寡核苷酸。氨基连接的寡核苷酸可以经由使用偶联试剂或在配

体活化为NHS或五氟苯酚酯后与配体直接偶联。配体亚磷酰胺可以如下合成:将氨基己醇接头与羧基基团之一连接,随后将末端官能性醇亚磷酸化。其它接头诸如半胱胺也可以用于与合成的寡核苷酸上存在的氯乙酰基接头缀合。

[0191] 本领域技术人员容易想到将本申请的分子引入细胞、组织或生物体中的方法。在以上本申请的详述中也已经提供了相应的例子。例如,通过本领域已知的方法如转染等,可以将编码所描述的RNAi试剂的至少一条链的本申请的核酸分子或载体引入细胞或组织中。

[0192] 也提供了用于引入RNAi试剂的手段和方法。例如,通过糖基化的和叶酸修饰的分子的靶向递送,包括使用具有配体(诸如半乳糖和乳糖)的聚合载体或叶酸与多种大分子的连接,允许要递送的分子结合叶酸受体。通过除抗体以外的肽和蛋白进行的靶向递送是已知的,例如,包括RGD修饰的纳米颗粒以在体内递送siRNA或多组分(非病毒)递送系统,包括短环糊精、金刚烷-PEG。但是,还设想了使用抗体或抗体片段的靶向递送,包括抗体的(单价) Fab-片段(或此类抗体的其它片段)或单链抗体的靶向递送。用于靶向递送的注射方案尤其包括流体动力学静脉注射。并且,RNAi试剂的胆固醇缀合物可用于靶向递送,由此与亲脂基团的缀合可增强细胞摄取并改善寡核苷酸的药代动力学和组织生物分布。并且,已知阳离子递送系统,由此合成的载体具有净正(阳离子)电荷以促进与聚阴离子核酸的复合物形成以及与带负电荷的细胞膜的相互作用。这样的阳离子递送系统还包含阳离子脂质体递送系统、阳离子聚合物和肽递送系统。用于dsRNA/siRNA的细胞摄取的其它递送系统是适体-ds/si RNA。并且,基因疗法方案可以用于递送所描述的RNAi试剂或编码它们的核酸分子。此类系统包括使用非致病性病毒、修饰的病毒载体,以及使用纳米颗粒或脂质体进行递送。用于RNAi试剂的细胞摄取的其它递送方法是体外的,例如细胞、器官或组织的离体处理。这些技术中的某些在出版物中进行了描述和总结,如Akhtar, Journal of Clinical Investigation (2007) 1 17:3623-3632, Nguyen等人, Current Opinion in Molecular Therapeutics (2008) 10: 158- 167, Zambon i, Clin Cancer Res (2005) 1 1 :8230-8234或Ikeda等人, Pharmaceutical Research (2006) 23 : 1631 -1640。

[0193] 制备和使用RNAi试剂及其缀合物的方法是本领域已知的。在本申请的上下文中可以使用任何这样的已知方法来制造和使用用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂及其缀合物。制备和使用RNAi试剂及其缀合物的方法描述于,例如,US20130005793、WO2013003520、WO2018027106、US5218105、US5541307、US5521302、US5539082、US5554746、US5571902、US5578718、US5587361、US5506351、US5587469、US5587470、US5608046、US5610289、US6262241、WO9307883,它们都通过引用整体并入本文。

[0194] 组合物、治疗组合和疫苗

本申请还涉及组合物、治疗组合,更具体地试剂盒和疫苗,其包含根据本申请的一种或多种HBV抗原、多核苷酸和/或编码一种或多种HBV抗原的载体和/或一种或多种用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂。本文描述的本申请的HBV抗原、多核苷酸(包括RNA和DNA)和/或载体中的任一种,以及本文描述的本申请的用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂中的任一种,可以用在本申请的组合物、治疗组合或试剂盒和疫苗中。

[0195] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含分离的或非天然存在的核酸分子(DNA或RNA)、包含分离的或非天然存在的核酸分子的载体和/或由分离的或非天然存在的核酸分子编码的分离的或非天然存在的多肽,所述核酸分子包含多核苷酸序列,其编码由与SEQ

ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性的氨基酸序列组成的截短的HBV核心抗原或包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性的氨基酸序列的HBV聚合酶抗原。

[0196] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含分离的或非天然存在的核酸分子(DNA或RNA),其包含编码HBV Pol抗原的多核苷酸序列,所述HBV Pol抗原包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 7具有100%同一性的氨基酸序列。

[0197] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含分离的或非天然存在的核酸分子(DNA或RNA),其编码截短的HBV核心抗原,该抗原由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有100%同一性的氨基酸序列组成。

[0198] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含分离的或非天然存在的核酸分子(DNA或RNA),其包含编码截短的HBV核心抗原的多核苷酸序列,所述截短的HBV核心抗原由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有100%同一性的氨基酸序列组成;和分离的或非天然存在的核酸分子(DNA或RNA),其包含编码HBV Pol抗原的多核苷酸序列,所述HBV Pol抗原包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 7具有100%同一性的氨基酸序列。截短的HBV核心抗原和HBV Pol抗原的编码序列可以存在于相同的分离的或非天然存在的核酸分子(DNA或RNA)中,或存在于两种不同的分离的或非天然存在的核酸分子(DNA或RNA)中。

[0199] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含载体,优选DNA质粒或病毒载体(诸如腺病毒载体),其包含编码截短的HBV核心抗原的多核苷酸,所述截短的HBV核心抗原由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有100%同一性的氨基酸序列组成。

[0200] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含载体,优选DNA质粒或病毒载体(诸如腺病毒载体),其包含编码HBV Pol抗原的多核苷酸,所述HBV Pol抗原包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 7具有100%同一性的氨基酸序列。

[0201] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含载体,优选DNA质粒或病毒载体(诸如腺病毒载体),其包含编码截短的HBV核心抗原的多核苷酸,所述截短的HBV核心抗原由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有100%同一性的氨基酸序列组成;和载体,优选DNA质粒或病毒载体(诸如腺病毒载体),其包含编码HBV Pol抗原的多核苷酸,所述HBV Pol抗原包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 7具有100%同一性的氨基酸序列。包含截短的HBV核心抗原的编码序列的载体和包含HBV Pol抗原的编码序列的载体可以是同一载体或两种不同的载体。

[0202] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含载体,优选DNA质粒或病毒载体(诸如腺病毒载体),其包含编码融合蛋白的多核苷酸,所述融合蛋白包含可操作地连接至HBV Pol抗原的截短的HBV核心抗原,所述截短的HBV核心抗原由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有100%同一性的氨基酸序列组成,所述HBV Pol抗原包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 7具有100%同一性的氨基酸序列,或反之亦然。优选地,所述融合蛋白进一步包含接头,所述接头将截短的HBV核心抗原可操作地连接至HBV Pol抗原,或反之亦然。优选地,所述接头具有(AlaGly)n的氨基酸序列,其中n是2-5的整数。

[0203] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含分离的或非天然存在的截短的HBV核心

抗原,其由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有100%同一性的氨基酸序列组成。

[0204] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含分离的或非天然存在的HBV Pol抗原,其包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 7具有100%同一性的氨基酸序列。

[0205] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含分离的或非天然存在的截短的HBV核心抗原,其由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有100%同一性的氨基酸序列组成;和分离的或非天然存在的HBV Pol抗原,其包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 7具有100%同一性的氨基酸序列。

[0206] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含分离的或非天然存在的融合蛋白,其包含可操作地连接至HBV Pol抗原的截短的HBV核心抗原,所述截短的HBV核心抗原由与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 14具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有100%同一性的氨基酸序列组成,所述HBV Pol抗原包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性、优选地与SEQ ID NO: 7具有100%同一性的氨基酸序列,或反之亦然。优选地,所述融合蛋白进一步包含接头,所述接头将截短的HBV核心抗原可操作地连接至HBV Pol抗原,或反之亦然。优选地,所述接头具有(AlaGly)n的氨基酸序列,其中n是2-5的整数。

[0207] 在本申请的一个实施方案中,组合物包含用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂,诸如在US20130005793、WO2013003520或WO2018027106中描述的那些。

[0208] 本申请也涉及包含多核苷酸的治疗组合或试剂盒,所述多核苷酸表达根据本申请的实施方案的截短的HBV核心抗原和HBV pol抗原和/或根据本申请的实施方案的用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂。本文描述的本申请的编码HBV核心和pol抗原的任何多核苷酸和/或载体可以用在本申请的治疗组合或试剂盒中,且本文描述的本申请的用于抑制HBV基因表达的任何RNAi试剂可以用在本申请的治疗组合或试剂盒中。

[0209] 根据本申请的实施方案,用于在有此需要的受试者中治疗HBV感染的治疗组合或试剂盒包含:

i)以下至少一种:

a)截短的HBV核心抗原,其由与SEQ ID NO: 2具有至少95%同一性的氨基酸序列组成,和

b)第一种非天然存在的核酸分子,其包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列,

c) HBV聚合酶抗原,其具有与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述HBV聚合酶抗原不具有逆转录酶活性和RNA酶H活性,和

d)第二种非天然存在的核酸分子,其包含编码HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列;和

ii)用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂,诸如本文描述的那些。

[0210] 在本申请的一个特定实施方案中,治疗组合或试剂盒包含:i)第一种非天然存在的核酸分子,其包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列,所述截短的HBV核心抗原由与SEQ ID NO: 2具有至少95%同一性的氨基酸序列组成;ii)第二种非天然存在的核

酸分子,其包含编码HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列,所述HBV聚合酶抗原具有与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述HBV聚合酶抗原不具有逆转录酶活性和RNA酶H活性;和iii)用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂,优选地,RNAi试剂包含表9中所示的双链体,更优选地,RNAi试剂包含双链体AD04872(SEQ ID NO:25-26)和AD05070(SEQ ID NO:27-28)中的至少一个,其各自缀合至靶向配体,例如具有表10中描述的结构,例如NAG37的配体。

[0211] 根据本申请的实施方案,疫苗组合或试剂盒中的多核苷酸可以连接或分开,使得从这样的多核苷酸表达的HBV抗原融合在一起或产生为分开的蛋白,无论是由相同的还是不同的多核苷酸表达。在一个实施方案中,第一种和第二种多核苷酸存在于分开的载体(例如,DNA质粒或病毒载体)中,在相同或分开的组合物中联合使用,使得表达的蛋白也是分开的蛋白,但联合使用。在另一个实施方案中,由第一种和第二种多核苷酸编码的HBV抗原可以从同一载体表达,从而产生HBV核心-pol融合抗原。任选地,核心和pol抗原可以通过短接头连接或融合在一起。可替换地,使用核心和pol抗原编码序列之间的核糖体滑动位点(也被称作顺式-水解酶位点),可以独立于单个载体表达由第一种和第二种多核苷酸编码的HBV抗原。该策略产生双顺反子表达载体,其中单个核心和pol抗原由单个mRNA转录物产生。由这样的双顺反子表达载体产生的核心和pol抗原可以具有额外的N或C-末端残基,取决于mRNA转录物上的编码序列的排序。可用于此目的的核糖体滑动位点的例子包括、但不限于来自口蹄疫病毒(FMDV)的FA2滑动位点。另一种可能性是,可以从两个分开的载体独立地表达由第一种和第二种多核苷酸编码的HBV抗原,其中一个载体编码HBV核心抗原,且一个载体编码HBV pol抗原。

[0212] 在一个优选的实施方案中,第一种和第二种多核苷酸存在于分开的载体(例如,DNA质粒或病毒载体)中。优选地,分开的载体存在于相同组合物中。

[0213] 根据本申请的优选实施方案,治疗组合或试剂盒包含存在于第一载体中的第一种多核苷酸、存在于第二载体中的第二种多核苷酸。第一和第二载体可以相同或不同。优选地,载体是DNA质粒。

[0214] 在本申请的一个特定实施方案中,第一载体是第一种DNA质粒,第二载体是第二种DNA质粒。第一种和第二种DNA质粒中的每一种包含复制起点,优选SEQ ID NO: 21的pUC ORI,和抗生素抗性盒,优选地包含密码子优化的Kanr基因,该基因具有与SEQ ID NO: 23具有至少90%同一性的多核苷酸序列,优选地在bla启动子的控制下,例如在SEQ ID NO: 24中显示的bla启动子。第一种和第二种DNA质粒中的每一种独立地进一步包含启动子序列、增强子序列和编码信号肽序列的多核苷酸序列中的至少一种,其可操作地连接至第一种多核苷酸序列或第二种多核苷酸序列。优选地,第一种和第二种DNA质粒中的每一种包含可操作地连接至第一种多核苷酸或第二种多核苷酸的上游序列,其中所述上游序列从5'端至3'端包含SEQ ID NO: 18或19的启动子序列、增强子序列和编码具有SEQ ID NO: 9或15的氨基酸序列的信号肽序列的多核苷酸序列。第一种和第二种DNA质粒中的每一种还可以包含位于HBV抗原的编码序列的下游的多腺苷酸化信号,诸如SEQ ID NO: 20的bGH多腺苷酸化信号。

[0215] 在本申请的一个特定实施方案中,第一载体是病毒载体且第二载体是病毒载体。优选地,病毒载体中的每一个是腺病毒载体,更优选Ad26或Ad35载体,其包含表达盒,所述

表达盒包括本申请的编码HBV pol抗原或截短的HBV核心抗原的多核苷酸;可操作地连接至编码HBV抗原的多核苷酸的上游序列,其从5'端至3'端包含启动子序列,优选SEQ ID NO: 19的CMV启动子序列,增强子序列,优选SEQ ID NO: 12的ApoAI基因片段序列,和编码信号肽序列(优选具有SEQ ID NO: 15的氨基酸序列的免疫球蛋白分泌信号)的多核苷酸序列;和可操作地连接至编码HBV抗原的多核苷酸的下游序列,其包含多腺苷酸化信号,优选SEQ ID NO: 13的SV40多腺苷酸化信号。

[0216] 在另一个优选的实施方案中,第一种和第二种多核苷酸存在于单个载体(例如,DNA质粒或病毒载体)中。优选地,单个载体是腺病毒载体,更优选Ad26载体,其包含包括多核苷酸的表达盒,所述多核苷酸编码本申请的HBV pol抗原和截短的HBV核心抗原,优选地编码本申请的HBV pol抗原和截短的HBV核心抗原作为融合蛋白;可操作地连接至编码HBV pol和截短的核心抗原的多核苷酸的上游序列,其从5'端至3'端包含启动子序列,优选SEQ ID NO: 19的CMV启动子序列,增强子序列,优选SEQ ID NO: 12的ApoAI基因片段序列,和编码信号肽序列(优选具有SEQ ID NO: 15的氨基酸序列的免疫球蛋白分泌信号)的多核苷酸序列;和可操作地连接至编码HBV抗原的多核苷酸的下游序列,其包含多腺苷酸化信号,优选SEQ ID NO: 13的SV40多腺苷酸化信号。

[0217] 当本申请的治疗组合包含第一载体(诸如DNA质粒或病毒载体)和第二载体(诸如DNA质粒或病毒载体)时,第一和第二载体各自的量没有特别限制。例如,第一种DNA质粒和第二种DNA质粒可以以10:1至1:10(按重量计)的比例存在,诸如10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10(按重量计)。优选地,第一种和第二种DNA质粒以1:1(按重量计)的比例存在。本申请的治疗组合可以进一步包含第三载体,其编码可用于治疗HBV感染的第三活性剂。

[0218] 本申请的组合物和治疗组合可以包含额外的多核苷酸或载体,其编码额外的HBV抗原和/或额外的HBV抗原或其免疫原性片段,诸如HBsAg、HBV L蛋白或HBV包膜蛋白,或编码它们的多核苷酸序列,或根据本申请的实施方案用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂。但是,在特定实施方案中,本申请的组合物和治疗组合不包含某些抗原。

[0219] 在一个特定实施方案中,本申请的组合物或治疗组合或试剂盒不包含HBsAg或编码HBsAg的多核苷酸序列。

[0220] 在另一个特定实施方案中,本申请的组合物或治疗组合或试剂盒不包含HBV L蛋白或编码HBV L蛋白的多核苷酸序列。

[0221] 在本申请的另一个特定实施方案中,本申请的组合物或治疗组合不包含HBV包膜蛋白或编码HBV包膜蛋白的多核苷酸序列。

[0222] 本申请的组合物和治疗组合还可以包含药学上可接受的载体。药学上可接受的载体是无毒的,且不应干扰活性成分的效力。药学上可接受的载体可以包括一种或多种赋形剂诸如粘合剂、崩解剂、膨胀剂、助悬剂、乳化剂、润湿剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、防腐剂、染料、增溶剂和包衣剂。药学上可接受的载体可以包括媒介物,诸如脂质纳米颗粒(LNP)。载体或其它材料的精确性质可取决于施用途径,例如,肌肉内、真皮内、皮下、口服、静脉内、皮肤、粘膜内(例如,肠道)、鼻内或腹膜内途径。对于液体可注射制剂,例如悬浮液和溶液,合适的载体和添加剂包括水、二醇、油、醇、防腐剂、着色剂等。对于固体口服制剂,例如粉剂、胶囊剂、囊片、囊形片和片剂,合适的载体和添加剂包括淀粉、糖、稀释剂、造粒剂、润滑剂、

粘合剂、崩解剂等。对于鼻腔喷雾剂/吸入剂混合物，水溶液/悬浮液可以包含水、二醇、油、软化剂、稳定剂、润湿剂、防腐剂、芳族化合物、矫味剂等作为合适的载体和添加剂。

[0223] 可以以适合施用给受试者以促进施用和提高效力的任何方式配制本申请的组合物和治疗组合，包括、但不限于口服(肠内)施用和胃肠外注射。胃肠外注射包括静脉内注射或输注、皮下注射、真皮内注射和肌肉内注射。本申请的组合物也可以配制用于其它施用途径，包括透粘膜、眼部、直肠、长效植入、舌下施用、在舌下、从口腔粘膜绕过门静脉循环、吸入或鼻内。

[0224] 在本申请的一个优选的实施方案中，将本申请的组合物和治疗组合配制用于胃肠外注射，优选皮下、真皮内注射或肌肉内注射，更优选肌肉内注射。

[0225] 根据本申请的实施方案，用于施用的组合物和治疗组合通常包含在药学上可接受的载体中的缓冲溶液，所述载体是例如水性载体诸如缓冲盐水等，例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)。组合物和治疗组合还可以含有接近生理条件所需的药学上可接受的物质，例如pH调节剂和缓冲剂。例如，包含质粒DNA的本申请的组合物或治疗组合可以含有磷酸盐缓冲盐水(PBS)作为药学上可接受的载体。质粒DNA可以以例如0.5 mg/mL至5 mg/mL的浓度存在，诸如0.5 mg/mL、1mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL或5 mg/mL，优选1 mg/mL。

[0226] 根据本领域众所周知的方法，可以将本申请的组合物和治疗组合配制成疫苗(也被称作“免疫原性组合物”)。这样的组合物可以包括佐剂以增强免疫应答。考虑到本公开内容，可以通过本领域技术人员众所周知的技术来确定制剂中每种组分的最佳比例。

[0227] 在本申请的一个特定实施方案中，组合物或治疗组合是DNA疫苗。DNA疫苗通常包含细菌质粒，所述细菌质粒含有在强真核启动子控制下的编码感兴趣抗原的多核苷酸。一旦质粒被递送到宿主的细胞质中，编码的抗原就被内源性地产生和加工。得到的抗原通常诱导体液和细胞介导的免疫应答。DNA疫苗是有利的，至少因为它们提供了改善的安全性，是温度稳定的，可以容易地适应表达抗原变体，并且易于生产。本申请的任何DNA质粒均可用于制备这样的DNA疫苗。

[0228] 在本申请的其它特定实施方案中，组合物或治疗组合是RNA疫苗。RNA疫苗通常包含至少一种单链RNA分子，其编码感兴趣的抗原，例如根据本申请的融合蛋白或HBV抗原。一旦RNA被递送到宿主的细胞质中，编码的抗原就会内源性地产生和加工，从而诱导体液和细胞介导的免疫应答，这类似于DNA疫苗。可以对RNA序列进行密码子优化以提高翻译效率。考虑到本公开内容，可以通过本领域已知的任意方法修饰RNA分子以增强稳定性和/或翻译，例如通过添加聚腺苷酸尾巴，例如至少30个腺苷残基；和/或用修饰的核糖核苷酸(例如，7-甲基鸟苷帽)给5-末端加帽，其可以在RNA合成过程中掺入或在RNA转录后进行酶工程改造。RNA疫苗也可以是从甲病毒属表达载体开发的自复制的RNA疫苗。自复制RNA疫苗包含复制酶RNA分子，该分子衍生自属于甲病毒科的病毒，其亚基因组启动子控制融合蛋白或HBV抗原RNA的复制，随后是位于复制酶下游的人工聚腺苷酸尾巴。

[0229] 在某些实施方案中，其它佐剂可以被包含在本申请的组合物或治疗组合中，或与本申请的组合物或治疗组合共同施用。另一种佐剂的使用是任选的，并且当组合物用于疫苗接种目的时可以进一步增强免疫应答。适合于根据本申请共同施用或包含在组合物中的其它佐剂应优选地是这样的：其为在人类中潜在安全的、较好耐受的和有效的。佐剂可以是小分子或抗体，包括、但不限于，免疫检查点抑制剂(例如，抗-PD1、抗-TIM-3等)、toll-样受

体激动剂(例如,TLR7激动剂和/或TLR8激动剂)、RIG-1激动剂、IL-15超激动剂(Altor Bioscience)、突变体IRF3和IRF7遗传佐剂、STING激动剂(Aduro)、FLT3L遗传佐剂和IL-7-hyFc。例如,佐剂可以例如选自下述抗-HBV剂:HBV DNA聚合酶抑制剂;免疫调节剂;Toll-样受体7调节剂;Toll-样受体8调节剂;Toll-样受体3调节剂;干扰素α受体配体;透明质酸酶抑制剂;IL-10的调节剂;HBsAg抑制剂;Toll样受体9调节剂;亲环蛋白抑制剂;HBV预防性疫苗;HBV治疗性疫苗;HBV病毒进入抑制剂;靶向病毒mRNA的反义寡核苷酸,更特别是抗-HBV反义寡核苷酸;短干扰RNA (siRNA),更特别是抗-HBV siRNA;内切核酸酶调节剂;核糖核苷酸还原酶的抑制剂;乙型肝炎病毒E抗原抑制剂;靶向乙型肝炎病毒的表面抗原的HBV抗体;HBV抗体;CCR2趋化因子拮抗剂;胸腺素激动剂;细胞因子,诸如IL12;衣壳组装调节剂, 核蛋白抑制剂(HBV核心或衣壳蛋白抑制剂);核酸聚合物(NAP);视黄酸可诱导基因1的刺激物;NOD2的刺激物;重组胸腺素α-1;乙型肝炎病毒复制抑制剂;PI3K抑制剂;cccDNA抑制剂;免疫检查点抑制剂,诸如PD-L1抑制剂、PD-1抑制剂、TIM-3抑制剂、TIGIT抑制剂、Lag3抑制剂、CTLA-4抑制剂;在免疫细胞(更具体地T细胞)上表达的共刺激性受体诸如CD27和CD28的激动剂;BTK抑制剂;用于治疗HBV的其它药物;IDO抑制剂;精氨酸酶抑制剂;和KDM5抑制剂。

[0230] 在某些实施方案中,第一种和第二种非天然存在的核酸分子中的每一种独立地用脂质纳米颗粒(LNP)配制。

[0231] 本申请也提供了制备本申请的组合物和治疗组合的方法。生产组合物或治疗组合的方法包括将本申请的编码HBV抗原、载体和/或多肽的分离的多核苷酸与一种或多种药学上可接受的载体混合。本领域普通技术人员熟悉用于制备这样的组合物的常规技术。

[0232] 诱导免疫应答或治疗HBV感染的方法

本申请也提供了在有此需要的受试者中诱导针对乙型肝炎病毒(HBV)的免疫应答的方法,所述方法包括给所述受试者施用免疫原性上有效量的本申请的组合物或免疫原性组合物。本文描述的本申请的组合物和治疗组合中的任一种可以用在本申请的方法中。

[0233] 本文中使用的术语“感染”表示病原体侵入宿主。当病原体能够侵入宿主并在宿主内复制或繁殖时,它被认为是“传染性的”。传染因子的例子包括病毒,例如HBV和某些种类的腺病毒、朊病毒、细菌、真菌、原生动物等。“HBV感染”特别表示HBV侵入宿主生物体,诸如宿主生物体的细胞和组织。

[0234] 在参考本文所述的方法使用时,短语“诱导免疫应答”涵盖在有此需要的受试者中引起针对感染(例如,HBV感染)的期望免疫应答或效果。“诱导免疫应答”也涵盖提供治疗性免疫以治疗致病体,例如,HBV。本文中使用的术语“治疗性免疫”或“治疗性免疫应答”是指,接种疫苗的受试者能够控制疫苗接种所针对的致病体的感染,例如通过接种HBV疫苗赋予的针对HBV感染的免疫。在一个实施方案中,“诱导免疫应答”是指在有此需要的受试者中产生免疫,例如,以提供针对疾病诸如HBV感染的治疗效果。在某些实施方案中,“诱导免疫应答”表示引起或改善针对HBV感染的细胞免疫,例如,T细胞应答。在某些实施方案中,“诱导免疫应答”表示引起或改善针对HBV感染的体液免疫应答。在某些实施方案中,“诱导免疫应答”表示引起或改善针对HBV感染的细胞和体液免疫应答。

[0235] 本文中使用的术语“保护性免疫”或“保护性免疫应答”是指,接种疫苗的受试者能够控制疫苗接种所针对的致病体的感染。通常,已经产生“保护性免疫应答”的受试者仅出现轻度至中度临床症状或根本不出现症状。通常,具有针对某种病原体的“保护性免疫应

答”或“保护性免疫”的受试者不会因所述病原体的感染而死亡。

[0236] 通常，本申请的组合物和治疗组合的施用将具有治疗目的，以在HBV感染后或出现HBV感染的特征性症状后产生针对HBV的免疫应答，例如用于治疗性疫苗接种。

[0237] 本文中使用的“免疫原性上有效量”或“免疫学上有效量”是指，足以在有此需要的受试者中诱导期望的免疫效果或免疫应答的组合物、多核苷酸、载体或抗原的量。免疫原性上有效量可以是足以在有此需要的受试者中诱导免疫应答的量。免疫原性上有效量可以是足以在有此需要的受试者中产生免疫的量，例如提供针对疾病诸如HBV感染的治疗效果。免疫原性上有效量可以根据多种因素而变化，诸如受试者的身体状况、年龄、重量、健康等；特定应用，例如提供保护性免疫或治疗性免疫；以及免疫期望针对的特定疾病，例如病毒感染。考虑到本公开内容，免疫原性上有效量可以由本领域普通技术人员容易地确定。

[0238] 在本申请的特定实施方案中，免疫原性上有效量表示足以实现以下效果中的一种、两种、三种、四种或更多种的组合物或治疗组合的量：(i)降低或改善HBV感染或与之相关的症状的严重程度；(ii)减少HBV感染或与之相关的症状的持续时间；(iii)防止HBV感染或与之相关的症状的进展；(iv)造成HBV感染或与之相关的症状的消退；(v)预防HBV感染或与之相关的症状的发展或发作；(vi)防止HBV感染或与之相关的症状的复发；(vii)减少具有HBV感染的受试者的住院治疗；(viii)减少具有HBV感染的受试者的住院治疗长度；(ix)提高具有HBV感染的受试者的存活率；(x)消除受试者中的HBV感染；(xi)抑制或减少受试者中的HBV复制；和/或(xii)增强或改善另一种疗法的预防或治疗效果。

[0239] 免疫原性上有效量也可以是这样的量，其足以降低与临床血清转化进化一致的HBsAg水平；实现受试者的免疫系统对与被感染的肝细胞的减少相关的持续HBsAg清除；诱导HBV-抗原特异性的活化的T-细胞群体；和/或在12个月内实现HBsAg持续消失。目标指数的例子包括低于500个HBsAg国际单位(IU)拷贝的阈值的较低HBsAg和/或较高CD8计数。

[0240] 作为一般指导，当参考DNA质粒使用时，免疫原性上有效量可以在约0.1 mg/mL至10 mg/mL总DNA质粒的范围内，诸如0.1 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL. 0.75 mg/mL 1 mg/mL、1.5 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL、6 mg/mL、7 mg/mL、8 mg/mL、9 mg/mL或10 mg/mL。优选地，DNA质粒的免疫原性上有效量小于8 mg/mL，更优选地小于6 mg/mL，甚至更优选地3-4 mg/mL。免疫原性上有效量可以来自一种载体或质粒，或来自多种载体或质粒。作为进一步的一般指导，当参考肽使用时，免疫原性上有效量可以在每次施用约10μg至1 mg的范围内，诸如每次施用10、20、50、100、200、300、400、500、600、700、800、9000或1000μg。免疫原性上有效量可以在单一组合物中或在多个组合物中施用，诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个组合物(例如，片剂、胶囊剂或注射剂，或适用于真皮内递送的任何组合物，例如，适用于使用真皮内递送贴剂的真皮内递送)，其中多个胶囊剂或注射剂的施用共同为受试者提供免疫原性上有效量。例如，当使用两种DNA质粒时，免疫原性上有效量可以是3-4 mg/mL，其中每种质粒为1.5-2 mg/mL。在所谓的初免-强化方案中，也可能给受试者施用免疫原性上有效量，并随后给同一受试者施用免疫原性上有效量的另一个剂量。初免-强化方案的这种一般概念是疫苗领域的技术人员众所周知的。如果需要，可以任选地将进一步强化施用添加到该方案中。

[0241] 通过混合两种质粒并将混合物递送至单个解剖学部位，可以将包含两种DNA质粒(例如，编码HBV核心抗原的第一种DNA质粒和编码HBV pol抗原的第二种DNA质粒)的治疗组

合施用给受试者。可替换地，可以进行两次分开的免疫接种，每次递送单一表达质粒。在这样的实施方案中，无论两种质粒在单次免疫接种中还是作为两次分开免疫接种的混合物施用，第一种DNA质粒和第二种DNA质粒都可以以10:1至1:10(按重量计)的比例施用，诸如10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10(按重量计)。优选地，第一种和第二种DNA质粒以1:1(按重量计)的比例施用。

[0242] 作为一般指导，当参考RNAi试剂使用时，免疫原性上有效量可以在约0.05 mg/kg至约5 mg/kg的范围内，例如约0.05 mg至约4 mg/kg或约1 mg/kg至约3 mg/kg，或例如约0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5 mg/kg，但可以甚至更高，例如约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、40、50、60、70、80、90或100 mg/kg。也可以施用固定的单位剂量，例如50、100、200、500或1000 mg，或者剂量可以基于患者的表面积，例如，500、400、300、250、200或100 mg/m^2。通常可以施用1至8个(例如，1、2、3、4、5、6、7或8个)剂量来治疗患者，但可以施用9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个剂量。

[0243] 可以在一天、两天、三天、四天、五天、六天、一周、两周、三周、一个月、五周、六周、七周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或更长时间以后重复本申请的RNAi试剂的施用。重复的疗程也是可能的，慢性施用也是如此。重复的施用可以是在相同剂量或在不同剂量。例如，本申请的RNAi试剂可以以约0.05-5 mg/kg的量作为日剂量提供，诸如每天0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5 mg/kg，在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40天中的至少一天，或可替换地，在治疗开始后第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周中的至少一周，或它们的任意组合，使用单剂量或每24、12、8、6、4或2小时的分份剂量，或它们的任意组合。

[0244] 在一些实施方案中，向有需要的受试者施用的AD04872与AD05070的比率为约2:1。在一些实施方案中，向有需要的受试者施用的AD04872与AD05070的比率为约3:1。在一些实施方案中，向有需要的受试者施用的AD04872与AD05070的比率为约1:1。在一些实施方案中，向有需要的受试者施用的AD04872与AD05070的比率为约4:1。在一些实施方案中，向有需要的受试者施用的AD04872与AD05070的比率为约5:1。在一些实施方案中，向有需要的受试者施用的AD04872与AD05070的比率为约1:2。

[0245] 优选地，要根据本申请的方法治疗的受试者是HBV感染的受试者，特别是具有慢性HBV感染的受试者。急性HBV感染的特征是先天免疫系统的有效激活，并辅以随后的广泛适应性应答(例如，HBV-特异性的T-细胞、中和抗体)，这通常导致复制的成功抑制或受感染的肝细胞的除去。相反，由于高病毒和抗原载量，这样的应答会受损或减弱，例如，大量产生HBV包膜蛋白，并且可以相对感染性病毒以1,000倍过量以亚病毒颗粒形式释放。

[0246] 以特征在于病毒载量、肝酶水平(坏死性炎症活动)、HBeAg或HBsAg载量或针对这些抗原的抗体的存在的阶段来描述慢性HBV感染。cccDNA水平保持相对稳定在每个细胞大约10到50个拷贝，即使病毒血症可以有很大差异。cccDNA物质的持续存在导致慢性化。更具体地，慢性HBV感染的阶段包括：(i)以高病毒载量和正常或轻微升高的肝酶为特征的免疫耐受阶段；(ii)免疫激活HBeAg阳性阶段，其中观察到病毒复制水平降低或下降和肝酶显著升高；(iii)非活动性HBsAg携带期，这是一种低复制状态，具有低病毒载量和血清中正常的

肝酶水平,可能在HBeAg血清转化之后;和(iv) HBeAg阴性阶段,其中病毒复制周期性地发生(重新激活),伴随肝酶水平的波动,前核心和/或基础核心启动子中的突变是常见的,因此受感染的细胞不会产生HBeAg。

[0247] 本文中使用的"慢性HBV感染"表示受试者具有可检测的HBV存在超过6个月。具有慢性HBV感染的受试者可以处于慢性HBV感染的任何阶段。慢性HBV感染按照其在本领域中的普通含义来理解。慢性HBV感染可以例如特征在于,在急性HBV感染后HBsAg持续存在6个月或更长。例如,本文所提及的慢性HBV感染遵循疾病控制和预防中心(CDC)公布的定义,根据该定义,慢性HBV感染可以通过实验室标准表征,例如:(i)针对乙型肝炎核心抗原的IgM抗体(IgM抗-HBc)为阴性,且乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎e抗原(HBeAg)、或关于乙型肝炎病毒DNA的核酸检验为阳性,或(ii) HBsAg或关于HBV DNA的核酸检验为阳性,或HbeAg为阳性2次间隔至少6个月。

[0248] 优选地,免疫原性上有效量表示足以治疗慢性HBV感染的本申请的组合物或治疗组合的量。

[0249] 在某些实施方案中,具有慢性HBV感染的受试者正在接受核苷类似物(NUC)治疗,并且是NUC抑制的。本文中使用的"NUC抑制的"表示受试者具有不可检测的HBV病毒水平和稳定的丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平至少六个月。核苷/核苷酸类似物治疗的例子包括HBV聚合酶抑制剂,诸如恩替卡韦和替诺福韦。优选地,具有慢性HBV感染的受试者不具有晚期肝纤维化或肝硬化。这样的受试者通常具有小于3的关于纤维化的METAVIR评分和小于9 kPa的纤维扫描结果。METAVIR评分是一种评分系统,其常用于在乙型肝炎患者的肝活组织检查中通过组织病理学评价来评估炎症和纤维化的程度。评分系统分配两个标准化数字:一个反映炎症程度,一个反映纤维化程度。

[0250] 据信,慢性HBV的消除或减少可能允许严重肝病的早期疾病拦截,包括病毒诱导的肝硬化和肝细胞癌。因此,本申请的方法也可以用作治疗HBV诱导的疾病的疗法。HBV诱导的疾病的例子包括、但不限于肝硬化、癌症(例如,肝细胞癌)和纤维化,特别是特征在于关于纤维化的METAVIR评分为3或更高的晚期纤维化。在这样的实施方案中,免疫原性上有效量是足以在12个月内实现HBsAg的持续消失并显著减少临床疾病(例如,肝硬化、肝细胞癌等)的量。

[0251] 根据本申请的实施方案的方法进一步包括与本申请的组合物联合地给有此需要的受试者施用另一种免疫原性药剂(诸如另一种HBV抗原或其它抗原)或另一种抗-HBV药剂(诸如核苷类似物或其它抗-HBV药剂)。例如,另一种抗-HBV药剂或免疫原性药剂可以是小分子或抗体,包括、但不限于,免疫检查点抑制剂(例如,抗-PD1、抗-TIM-3等),toll-样受体激动剂(例如,TLR7激动剂和/或TLR8激动剂), RIG-1激动剂, IL-15超激动剂(Altor Bioscience), 突变体IRF3和IRF7遗传佐剂, STING激动剂(Aduro), FLT3L遗传佐剂, IL12遗传佐剂, IL-7-hyFc;结合HBV包膜的CAR-T (S-CAR细胞);衣壳组装调节剂;cccDNA抑制剂, HBV聚合酶抑制剂(例如,恩替卡韦和替诺福韦)。一种或其它抗-HBV活性剂可以是,例如,小分子、抗体或其抗原结合片段、多肽、蛋白或核酸。一种或其它抗-HBV药剂可以例如选自:HBV DNA聚合酶抑制剂;免疫调节剂;Toll-样受体7调节剂;Toll-样受体8调节剂;Toll-样受体3调节剂;干扰素α受体配体;透明质酸酶抑制剂;IL-10的调节剂;HBsAg抑制剂;Toll样受体9调节剂;亲环蛋白抑制剂;HBV预防性疫苗;HBV治疗性疫苗;HBV病毒进入

抑制剂;靶向病毒mRNA的反义寡核苷酸,更特别是抗-HBV反义寡核苷酸;短干扰RNA(siRNA),更特别是抗-HBV siRNA;内切核酸酶调节剂;核糖核苷酸还原酶的抑制剂;乙型肝炎病毒E抗原抑制剂;靶向乙型肝炎病毒的表面抗原的HBV抗体;HBV抗体;CCR2趋化因子拮抗剂;胸腺素激动剂;细胞因子,诸如IL12;衣壳组装调节剂, 核蛋白抑制剂(HBV核心或衣壳蛋白抑制剂);核酸聚合物(NAP);视黄酸可诱导基因1的刺激物;NOD2的刺激物;重组胸腺素α-1;乙型肝炎病毒复制抑制剂;PI3K抑制剂;cccDNA抑制剂;免疫检查点抑制剂,诸如PD-L1抑制剂、PD-1抑制剂、TIM-3抑制剂、TIGIT抑制剂、Lag3抑制剂和CTLA-4抑制剂;在免疫细胞(更具体地T细胞)上表达的共刺激性受体诸如CD27、CD28的激动剂;BTK抑制剂;用于治疗HBV的其它药物;IDO抑制剂;精氨酸酶抑制剂;和KDM5抑制剂。

[0252] 递送的方法

考虑到本公开内容,通过本领域已知的任意方法,包括、但不限于,胃肠外施用(例如,肌肉内、皮下、静脉内或真皮内注射)、口服施用、透皮施用和鼻施用,可以将本申请的组合物和治疗组合施用给受试者。优选地,胃肠外地(例如,通过肌肉内注射或真皮内注射)或透皮地施用组合物和治疗组合。

[0253] 在其中组合物或治疗组合包含一种或多种DNA质粒的本申请的某些实施方案中,施用可以是通过皮肤注射,例如肌肉内或真皮内注射,优选肌肉内注射。肌肉内注射可以与电穿孔组合,即施加电场以促进DNA质粒向细胞的递送。本文中使用的术语“电穿孔”表示使用跨膜电场脉冲在生物膜中诱导微观通路(孔)。在体内电穿孔过程中,对细胞施加适当大小和持续时间的电场,诱导增强的细胞膜渗透性的瞬时状态,从而实现不能自行穿过细胞膜的分子的细胞摄取。通过电穿孔产生这样的孔有利于生物分子(诸如质粒、寡核苷酸、siRNA、药物等)从细胞膜的一侧向另一侧的通过。用于递送DNA疫苗的体内电穿孔已经被证实显著增加宿主细胞的质粒摄取,同时还会导致在注射部位处的轻度至中度炎症。因此,与常规注射相比,真皮内或肌肉内电穿孔显著改善了转染效率和免疫应答(例如,分别高达1,000倍和100倍)。

[0254] 在一个典型的实施方案中,将电穿孔与肌肉内注射相组合。但是,也可能将电穿孔与其它形式的胃肠外施用(例如,真皮内注射、皮下注射等)相组合。

[0255] 可以使用电穿孔装置完成通过电穿孔对本申请的组合物、治疗组合或疫苗的施用,所述电穿孔装置可以被构造成向哺乳动物的所需组织递送有效造成可逆孔在细胞膜中形成的能量脉冲。电穿孔装置可以包括电穿孔部件和电极组件或手柄组件。电穿孔组件可以包括电穿孔装置的以下组件中的一种或多种:控制器、电流波形发生器、阻抗测试仪、波形记录器、输入元件、状态报告元件、通信端口、存储器组件、电源和电源开关。可以使用体内电穿孔装置完成电穿孔。电穿孔装置的例子和可以促进本申请的组合物和治疗组合(特别是包含DNA质粒的那些)的递送的电穿孔方法包括CELLECTRA®(Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA)、Elgen电穿孔仪(Inovio Pharmaceuticals, Inc.)、Tri-GridTM递送系统(Ichor Medical Systems, Inc., San Diego, CA 92121)和在美国专利号7,664,545、美国专利号8,209,006、美国专利号9,452,285、美国专利号5,273,525、美国专利号6,110,161、美国专利号6,261,281、美国专利号6,958,060,和美国专利号6,939,862、美国专利号7,328,064、美国专利号6,041,252、美国专利号5,873,849、美国专利号6,278,895、美国专利号6,319,901、美国专利号6,912,417、美国专利号8,187,249、美国

专利号9,364,664、美国专利号9,802,035、美国专利号6,117,660,和国际专利申请公开WO2017172838中描述的那些,它们都通过引用整体并入本文。体内电穿孔装置的其它例子描述在标题为“Method and Apparatus for the Delivery of Hepatitis B Virus (HBV) Vaccines”的国际专利申请中,其以代理人案卷号688097-405WO与本申请在同一天提交,其内容特此通过引用整体并入。用于递送本申请的组合物和治疗组合的应用还考虑使用脉冲电场,例如如在例如美国专利号6,697,669中所描述,其通过引用整体并入本文。

[0256] 在其中组合物或治疗组合包含一种或多种DNA质粒的本申请的其它实施方案中,施用方法是透皮施用。透皮施用可以与表皮皮肤磨损相组合以促进DNA质粒向细胞的递送。例如,皮肤病学贴剂可用于表皮皮肤磨损。在除去皮肤病学贴剂后,组合物或治疗组合可以沉积在磨损的皮肤上。

[0257] 递送方法不限于上述实施方案,并且可以使用用于细胞内递送的任何方式。本申请的方法考虑的其它细胞内递送方法包括、但不限于脂质体包封、脂质纳米颗粒(LNP)等。

[0258] 在本申请的某些实施方案中,施用方法是脂质组合物,例如脂质纳米颗粒(LNP)。可用于递送治疗产品(例如本发明的一种或多种核酸分子)的脂质组合物,优选脂质纳米颗粒包括但不限于脂质体或脂质囊泡,其中水体积由两亲脂质双层包封,或其中脂质包覆包含治疗产品的内部;或脂质聚集体或胶束,其中脂质包封的治疗产品包含在相对无序的脂质混合物中。

[0259] 在特定实施方案中,LNP包含阳离子脂质以包封和/或增强核酸分子例如本发明的DNA或RNA分子递送到靶细胞中。阳离子脂质可以是在选定的pH例如生理pH下携带净正电荷的任何脂质种类。脂质纳米颗粒可以通过包括使用一种或多种阳离子脂质、非阳离子脂质和聚乙二醇(PEG)修饰的脂质的不同比例的多组分脂质混合物来制备。文献中已经描述了几种阳离子脂质,其中许多是可商购的。例如,用于本发明的组合物和方法的合适的阳离子脂质包括1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)。

[0260] LNP制剂可以包括阴离子脂质。阴离子脂质可以是在选定的pH例如生理pH下携带净负电荷的任何脂质种类。阴离子脂质与阳离子脂质结合时,用于降低LNP的整体表面电荷,并引入LNP双层结构的pH依赖性破坏,促进核苷酸释放。文献中已经描述了几种阴离子脂质,其中许多是可商购的。例如,用于本发明的组合物和方法的合适的阴离子脂质包括1,2-二油酰基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

[0261] 可以使用本领域熟知的方法并参考本公开制备LNP。例如,可以使用乙醇注射或稀释、薄膜水合、冻融、法压壶(French press)或膜挤出、渗滤、超声、去污剂透析、醚注入和反相蒸发制备LNP。

[0262] 脂质、脂质组合物和产生用于递送活性核酸分子(例如本发明的那些)的脂质载体的方法的一些实例描述于:US2017/0190661, US2006/0008910, US2015/0064242, US2005/0064595, WO/2019/036030, US2019/0022247, WO/2019/036028, WO/2019/036008, WO/2019/036000, US2016/0376224, US2017/0119904, WO/2018/200943, WO/2018/191657, US2014/0255472和US2013/0195968,其各自相关内容通过引用整体并入本文。

[0263] 本申请的包含RNAi试剂的药物组合物包含药理学上有效量的至少一种RNAi和药学上可接受的载体。但是,这样的“药物组合物”还可以包含这样的RNAi试剂或载体的单个

链,其包含可操作地连接至核苷酸序列的调节序列,所述核苷酸序列编码在本申请的RNAi中所包含的有义链或反义链的至少一条链。还考虑到表达或包含本文定义的RNAi的细胞、组织或分离的器官可用作“药物组合物”。

[0264] 本申请的用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂可以通过任何合适的途径施用给受试者,例如通过静脉内(i.v.)输注或快速推注胃肠外地,肌肉内地或皮下地或腹膜内地。可以在例如15、30、60、90、120、180或240分钟或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12小时中进行静脉内输注。

[0265] 对于肌肉内、皮下和静脉内使用,包含本申请的RNAi试剂的药物组合物通常以无菌水溶液或悬浮液形式提供,其缓冲至适当的pH和等渗性。在一个优选的实施方案中,载体排它地由水性缓冲液组成。在该背景下,“排它地”是指不存在可能影响或介导dsRNA在表达乙型肝炎病毒基因的细胞中的摄取的辅助剂或包封物质。根据申请的水性悬浮液可以包括助悬剂诸如纤维素衍生物、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮和黄蓍胶,和润湿剂诸如卵磷脂。适合用于水性悬浮液的防腐剂包括对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯甲酸正丙酯。根据本申请有用的包含RNAi试剂的药物组合物还包括包封制剂以保护RNAi试剂免于从身体快速消除,诸如控释制剂,其包括植入物和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。本领域技术人员会明白用于制备这样的制剂的方法。脂质体悬浮液和双特异性抗体也可用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法来制备,例如,如在PCT公开WO91/06309和WO 2011/003780中所述,其通过引用整体并入本文。

[0266] 佐剂

在本申请的某些实施方案中,诱导针对HBV的免疫应答的方法进一步包括施用佐剂。术语“佐剂”和“免疫刺激剂”在本文中可互换地使用,并被定义为一种或多种造成免疫系统刺激的物质。在该背景下,佐剂用于增强对本申请的HBV抗原和抗原性HBV多肽的免疫应答。

[0267] 根据本申请的实施方案,佐剂可存在于本申请的治疗组合或组合物中,或在分开的组合物中施用。佐剂可以是例如小分子或抗体。适用于本申请的佐剂的例子包括、但不限于:免疫检查点抑制剂(例如,抗-PD1、抗-TIM-3等),toll-样受体激动剂(例如,TLR7和/或TLR8激动剂),RIG-1激动剂,IL-15超激动剂(Altor Bioscience),突变体IRF3和IRF7遗传佐剂,STING激动剂(Aduro),FLT3L遗传佐剂,IL12遗传佐剂,和IL-7-hyFc。佐剂的例子可以例如选自下述抗-HBV药剂:HBV DNA聚合酶抑制剂;免疫调节剂;Toll-样受体7调节剂;Toll-样受体8调节剂;Toll-样受体3调节剂;干扰素α受体配体;透明质酸酶抑制剂;IL-10的调节剂;HBsAg抑制剂;Toll样受体9调节剂;亲环蛋白抑制剂;HBV预防性疫苗;HBV治疗性疫苗;HBV病毒进入抑制剂;靶向病毒mRNA的反义寡核苷酸,更特别是抗-HBV反义寡核苷酸;短干扰RNA (siRNA),更特别是抗-HBV siRNA;内切核酸酶调节剂;核糖核苷酸还原酶的抑制剂;乙型肝炎病毒E抗原抑制剂;靶向乙型肝炎病毒的表面抗原的HBV抗体;HBV抗体;CCR2趋化因子拮抗剂;胸腺素激动剂;细胞因子,诸如IL12;衣壳组装调节剂,核蛋白抑制剂(HBV核心或衣壳蛋白抑制剂);核酸聚合物(NAP);视黄酸可诱导基因1的刺激物;NOD2的刺激物;重组胸腺素α-1;乙型肝炎病毒复制抑制剂;PI3K抑制剂;cccDNA抑制剂;免疫检查点抑制剂,诸如PD-L1抑制剂、PD-1抑制剂、TIM-3抑制剂、TIGIT抑制剂、Lag3抑制剂和CTLA-4抑制

剂;在免疫细胞(更具体地T细胞)上表达的共刺激性受体诸如CD27、CD28的激动剂;BTK抑制剂;用于治疗HBV的其它药物;IDO抑制剂;精氨酸酶抑制剂;和KDM5抑制剂。

[0268] 本申请的组合物和治疗组合还可以与至少一种其它抗-HBV药剂联合施用。适用于本申请的抗-HBV药剂的例子包括、但不限于结合HBV包膜的小分子、抗体和/或CAR-T疗法(S-CAR细胞)、衣壳组装调节剂、TLR激动剂(例如,TLR7和/或TLR8激动剂)、cccDNA抑制剂、HBV聚合酶抑制剂(例如,恩替卡韦和替诺福韦)和/或免疫检查点抑制剂等。

[0269] 至少一种抗-HBV药剂可以例如选自:HBV DNA聚合酶抑制剂;免疫调节剂;Toll-样受体7调节剂;Toll-样受体8调节剂;Toll-样受体3调节剂;干扰素α受体配体;透明质酸酶抑制剂;IL-10的调节剂;HBsAg抑制剂;Toll样受体9调节剂;亲环蛋白抑制剂;HBV预防性疫苗;HBV治疗性疫苗;HBV病毒进入抑制剂;靶向病毒mRNA的反义寡核苷酸,更特别是抗-HBV反义寡核苷酸;短干扰RNA (siRNA),更特别是抗-HBV siRNA;内切核酸酶调节剂;核糖核苷酸还原酶的抑制剂;乙型肝炎病毒E抗原抑制剂;靶向乙型肝炎病毒的表面抗原的HBV抗体;HBV抗体;CCR2趋化因子拮抗剂;胸腺素激动剂;细胞因子,诸如IL12;衣壳组装调节剂, 核蛋白抑制剂(HBV核心或衣壳蛋白抑制剂);核酸聚合物(NAP);视黄酸可诱导基因1的刺激物;NOD2的刺激物;重组胸腺素α-1;乙型肝炎病毒复制抑制剂;PI3K抑制剂;cccDNA抑制剂;免疫检查点抑制剂,诸如PD-L1抑制剂、PD-1抑制剂、TIM-3抑制剂、TIGIT抑制剂、Lag3抑制剂和CTLA-4抑制剂;在免疫细胞(更具体地T细胞)上表达的共刺激性受体诸如CD27、CD28的激动剂;BTK抑制剂;用于治疗HBV的其它药物;IDO抑制剂;精氨酸酶抑制剂;和KDM5抑制剂。这样的抗-HBV药剂可以与本申请的组合物和治疗组合同时或依次施用。

[0270] 初免/强化免疫接种的方法

本申请的实施方案也涵盖在所谓的初免-强化方案中给受试者施用免疫原性上有效量的组合物或治疗组合,并随后给同一受试者施用免疫原性上有效量的组合物或治疗组合的另一剂量。因此,在一个实施方案中,本申请的组合物或治疗组合是用于初始引发免疫应答的初免疫苗。在另一个实施方案中,本申请的组合物或治疗组合是用于强化免疫应答的强化疫苗。本申请的初免和强化疫苗可以用在本文描述的本申请的方法中。初免-强化方案的这种一般概念是疫苗领域的技术人员众所周知的。本文描述的本申请的组合物和治疗组合中的任一种可以用作初免和/或强化疫苗以初始引发和/或强化针对HBV的免疫应答。

[0271] 在本申请的某些实施方案中,可以施用本申请的组合物或治疗组合以进行初免免疫接种。可以重新施用组合物或治疗组合以进行强化免疫接种。如果需要,可以任选地将组合物或疫苗组合的进一步强化施用添加到方案中。佐剂可以存在于用于强化免疫接种的本申请的组合物中,存在于要与本申请的组合物或治疗组合一起施用以进行强化免疫接种的分开的组合物中,或作为强化免疫接种单独施用。在其中在方案中包括佐剂的那些实施方案中,佐剂优选地用于强化免疫接种。

[0272] 初免-强化方案的示例性和非限制性例子包括给受试者施用单剂量的免疫原性上有效量的本申请的组合物或治疗组合以初始引发免疫应答;并且随后施用免疫原性上有效量的本申请的组合物或治疗组合的另一个剂量以强化免疫应答,其中在最初施用初免免疫接种后约2至6周,优选4周,首次施用强化免疫接种。任选地,在最初施用初免免疫接种后约10-14周,优选12周,施用组合物或治疗组合或其它佐剂的进一步强化免疫接种。

[0273] 试剂盒

本文还提供了试剂盒,其包含本申请的治疗组合。试剂盒可以包含在一种或多种分开的组合物中的第一种多核苷酸、第二种多核苷酸和用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂,或者试剂盒可以包含在单一组合物中的第一种多核苷酸、第二种多核苷酸和用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂。试剂盒可以进一步包含一种或多种佐剂或免疫刺激剂和/或其它抗-HBV药剂。

[0274] 使用本领域中标准的多种测定可以在体外或在体内评价在动物或人生物体中施用后诱导或刺激抗-HBV免疫应答的能力。关于可用于评价免疫应答的发生和激活的技术的一般描述,参见例如Coligan等人(1992和1994, Current Protocols in Immunology; J Wiley & Sons Inc编辑, National Institute of Health)。细胞免疫的测量可以如下进行:通过测量活化的效应细胞分泌的细胞因子谱,所述细胞因子包括源自CD4+和CD8+ T-细胞的那些(例如通过ELISPOT定量产生IL-10或IFNγ的细胞),通过确定免疫效应细胞的激活状态(例如通过经典的[3H]胸苷摄取的T细胞增殖测定或基于流式细胞计量术的测定),通过测定致敏受试者中的抗原特异性的T淋巴细胞(例如在细胞毒性测定中的肽特异性裂解等)。

[0275] 通过抗体结合和/或结合竞争可以确定刺激细胞和/或体液应答的能力(参见例如Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press)。例如,通过酶联免疫吸附测定(ELISA),可以测量响应于提供免疫原的组合物的施用而产生的抗体的滴度。也可以通过中和抗体测定来测量免疫应答,其中病毒的中和被定义为通过病毒与特异性抗体的反应/抑制/中和而丧失侵染性。通过抗体依赖性的细胞吞噬作用(ADCP)测定可以进一步测量免疫应答。

[0276] 实施方案

本发明也提供了下述非限制性的实施方案。

[0277] 实施方案1是用于在有此需要的受试者中治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗组合,其包含:

i)以下至少一种:

a)截短的HBV核心抗原,其由与SEQ ID NO: 2具有至少95%(诸如至少95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列组成,

b)第一种非天然存在的核酸分子,其包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列

c)HBV聚合酶抗原,其氨基酸序列与SEQ ID NO: 7具有至少90%(诸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性,其中所述HBV聚合酶抗原不具有逆转录酶活性和RNA酶H活性,和

d) 第二种非天然存在的核酸分子,其包含编码HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列;和

ii)用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂,诸如在US20130005793, WO2013003520或WO2018027106中描述的那些,其内容通过引用整体并入本文。

[0278] 实施方案2是实施方案1的治疗组合,其包含HBV聚合酶抗原和截短的HBV核心抗原中的至少一种。

[0279] 实施方案3是实施方案2的治疗组合,其包含HBV聚合酶抗原和截短的HBV核心抗

原。

[0280] 实施方案4是实施方案1的治疗组合,其包含第一种非天然存在的核酸分子和第二种非天然存在的核酸分子中的至少一种,所述第一种非天然存在的核酸分子包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列,所述第二种非天然存在的核酸分子包含编码HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列。

[0281] 实施方案5是用于在有此需要的受试者中治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗组合,其包含

i) 第一种非天然存在的核酸分子,其包含编码截短的HBV核心抗原的第一种多核苷酸序列,所述截短的HBV核心抗原由与SEQ ID NO: 2具有至少95%同一性的氨基酸序列组成;和

ii) 第二种非天然存在的核酸分子,其包含编码HBV聚合酶抗原的第二种多核苷酸序列,所述HBV聚合酶抗原具有与SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述HBV聚合酶抗原不具有逆转录酶活性和RNA酶H活性;和

iii) 用于抑制HBV基因表达的RNAi试剂,诸如在US20130005793, WO2013003520或WO2018027106中描述的那些,其内容通过引用整体并入本文。

[0282] 实施方案6是实施方案4或5的治疗组合,其中所述第一种非天然存在的核酸分子进一步包含编码信号序列的多核苷酸序列,所述信号序列可操作地连接至截短的HBV核心抗原的N-端。

[0283] 实施方案6a是实施方案4-6中的任一个的治疗组合,其中所述第二种非天然存在的核酸分子进一步包含编码信号序列的多核苷酸序列,所述信号序列可操作地连接至HBV聚合酶抗原的N-端。

[0284] 实施方案6b是实施方案6或6a的治疗组合,其中所述信号序列独立地包含SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

[0285] 实施方案6c是实施方案6或6a的治疗组合,其中所述信号序列独立地由SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 14的多核苷酸序列编码。

[0286] 实施方案7是实施方案1-6c中的任一个的治疗组合,其中所述HBV聚合酶抗原包含与SEQ ID NO: 7具有至少98%(诸如至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%)同一性的氨基酸序列。

[0287] 实施方案7a是实施方案7的治疗组合,其中所述HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列。

[0288] 实施方案7b是实施方案1-7a中的任一个的治疗组合,其中所述截短的HBV核心抗原由与SEQ ID NO: 2具有至少98%(诸如至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%)同一性的氨基酸序列组成。

[0289] 实施方案7c是实施方案7b的治疗组合,其中所述截短的HBV抗原由SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4的氨基酸序列组成。

[0290] 实施方案8是实施方案1-7c中的任一个的治疗组合,其中第一种和第二种非天然存在的核酸分子中的每一种是DNA分子。

[0291] 实施方案8a是实施方案8的治疗组合,其中所述DNA分子存在于DNA载体上。

[0292] 实施方案8b是实施方案8a的治疗组合,其中所述DNA载体选自DNA质粒、细菌人工

染色体、酵母人工染色体和闭合线性脱氧核糖核酸。

[0293] 实施方案8c是实施方案8的治疗组合，其中所述DNA分子存在于病毒载体上。

[0294] 实施方案8d是实施方案8c的治疗组合，其中所述病毒载体选自细菌噬菌体、动物病毒和植物病毒。

[0295] 实施方案8e是实施方案1-7c中的任一个的治疗组合，其中第一种和第二种非天然存在的核酸分子中的每一种是RNA分子。

[0296] 实施方案8f是实施方案8e的治疗组合，其中所述RNA分子是RNA复制子，优选自复制的RNA复制子、mRNA复制子、经修饰的mRNA复制子或自扩增的mRNA。

[0297] 实施方案8g是实施方案1-8f中的任一个的治疗组合，其中第一种和第二种非天然存在的核酸分子中的每一种独立地用脂质组合物、优选脂质纳米颗粒(LNP)配制。

[0298] 实施方案9是实施方案4-8g中的任一个的治疗组合，其包含在相同的非天然存在的核酸分子中的第一种非天然存在的核酸分子和第二种非天然存在的核酸分子。

[0299] 实施方案10是实施方案4-8g中的任一个的治疗组合，其包含在两种不同的非天然存在的核酸分子中的第一种非天然存在的核酸分子和第二种非天然存在的核酸分子。

[0300] 实施方案11是实施方案4-10中的任一个的治疗组合，其中所述第一种多核苷酸序列包含与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有至少90%(诸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的多核苷酸序列。

[0301] 实施方案11a是实施方案11的治疗组合，其中所述第一种多核苷酸序列包含与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3具有至少98%(诸如至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%)序列同一性的多核苷酸序列。

[0302] 实施方案12是实施方案11a的治疗组合，其中所述第一种多核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3的多核苷酸序列。

[0303] 实施方案13是实施方案4-12中的任一个的治疗组合，其中所述第二种多核苷酸序列包含与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有至少90%(诸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的多核苷酸序列。

[0304] 实施方案13a是实施方案13的治疗组合，其中所述第二种多核苷酸序列包含与SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6具有至少98%(诸如至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%)序列同一性的多核苷酸序列。

[0305] 实施方案14是实施方案13a的治疗组合，其中所述第二种多核苷酸序列包含SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6的多核苷酸序列。

[0306] 实施方案15是实施方案1-14中的任一个的治疗组合，其中所述RNAi试剂具有表2所示的核心有义链序列和反义链序列。

[0307] 实施方案15a是实施方案1至14中任一项的治疗组合，其中所述RNAi试剂具有表3所示的有义链序列和反义链序列。

[0308] 实施方案15b是实施方案1至14中任一项的治疗组合，其中所述RNAi试剂具有表4所示的核心有义链序列和反义链序列。

[0309] 实施方案15c是实施方案15b的治疗组合，其中RNAi试剂具有表4所示的修饰的有义链序列和反义链序列。

[0310] 实施方案15d是实施方案1至14中任一项的治疗组合，其中所述RNAi试剂靶向表5

中所示的靶序列。

[0311] 实施方案15e是实施方案1至14中任一项的治疗组合，其中所述RNAi试剂具有表6所示的核心有义链序列和反义链序列。

[0312] 实施方案15f是实施方案1至14中任一项的治疗组合，其中所述RNAi试剂具有表7所示的核心反义序列和表8所示的核心有义链序列。

[0313] 实施方案15g是实施方案15f的治疗组合，其中RNAi试剂具有表7所示的修饰的有义链序列和表8所示的修饰的反义链序列。

[0314] 实施方案15h是实施方案1至14中任一项的治疗组合，其中所述RNAi试剂具有表9所示的反义链和有义链的双链体。

[0315] 实施方案15i是实施方案15h的治疗组合，其中所述RNAi试剂具有表9所示的AD04580；AD04585；AD04776；AD04872；AD04962；AD04963；AD04982；或AD05070的双链体结构。

[0316] 实施方案15j是实施方案1至14中任一项的治疗组合，其中所述治疗组合包含靶向HBV基因的S开放阅读框(ORF)的第一RNAi试剂和靶向HBV基因的X开放阅读框(ORF)的第二RNAi试剂。

[0317] 实施方案15k是实施方案15j的治疗组合，其中第一RNAi试剂选自：AD04001；AD04002；AD04003；AD04004；AD04005；AD04006；AD04007；AD04008；AD04009；AD04010；AD04422；AD04423；AD04425；AD04426；AD04427；AD04428；AD04429；AD04430；AD04431 ；AD04432；AD04433；AD04434；AD04435；AD04436；AD04437；AD04438；AD04439；AD04440；AD04441；AD04442；AD04511 ；AD04581；AD04583；AD04584；AD04585；AD04586；AD04587；AD04588；AD04590；AD04591；AD04592；AD04593；AD04594；AD04595；AD04596；AD04597；AD04598；AD04599；AD04734；AD04771；AD04772；AD04773；AD04774；AD04775；AD04822；AD04871；AD04872；AD04873；AD04874；AD04875；AD04876；AD04962；和AD05164；且第二RNAi试剂选自：AD03498；AD03499；AD03500；AD03501 ；AD03738；AD03739；AD03967；AD03968；AD03969；AD03970；AD03971；AD03972；AD03973；AD03974；AD03975；AD03976；AD03977；AD03978；AD04176；AD04177；AD04178；AD04412；AD04413；AD04414；AD04415；AD04416；AD04417；AD04418；AD04419；AD04420；AD04421；AD04570；AD04571；AD04572；AD04573；AD04574；AD04575；AD04576；AD04577；AD04578；AD04579；AD04580；AD04776；AD04777；AD04778；AD04823；AD04881；AD04882；AD04883；AD04884；AD04885；AD04963；AD04981；AD04982；AD04983；AD05069；AD05070；AD05071；AD05072；AD05073；AD05074；AD05075；AD05076；AD05077；AD05078；AD05147；AD05148；AD05149；和 AD05165，其每一个都在WO2018027106中描述，并且其公开的内容通过引用整体并入本文。

[0318] 实施方案15l是实施方案15k的治疗组合，其中第一RNAi试剂是AD04872，其包含具有SEQ ID NO:25-26序列的双链体，并且第二RNAi试剂是AD05070，其包含具有SEQ ID NO:27-28序列的双链体。

[0319] 实施方案15m是实施方案15k的治疗组合，其中第一RNAi试剂是AD04872并且第二RNAi试剂是AD04982。

[0320] 实施方案15n是实施方案15k的治疗组合,其中第一RNAi试剂是AD04872并且第二RNAi试剂是AD04776。

[0321] 实施方案15o是实施方案15k的治疗组合,其中第一RNAi试剂是AD04585并且第二RNAi试剂是AD04580。

[0322] 实施方案15p是实施方案1至15o中任一项的治疗组合,其中所述RNAi试剂被配制在脂质组合物,优选脂质纳米颗粒中。

[0323] 实施方案15p是实施方案1至15o中任一项的治疗组合,其中所述RNAi试剂缀合至靶向配体。

[0324] 实施方案15q是实施方案15p的治疗组合,其中靶向配体包含N-乙酰基-半乳糖胺。

[0325] 实施方案15r是实施方案15p的治疗组合,其中靶向配体是表10中描述的(NAG13),(NAG13)s,(NAG18),(NAG18)s,(NAG24),(NAG24)s,(NAG25),(NAG25)s,(NAG26),(NAG26)s,(NAG27),(NAG27)s,(NAG28),(NAG28)s,(NAG29),(NAG29)s,(NAG30),(NAG30)s,(NAG31),(NAG31)s,(NAG32),(NAG32)s,(NAG33),(NAG33)s,(NAG34),(NAG34)s,(NAG35),(NAG35)s,(NAG36),(NAG36)s,(NAG37),(NAG37)s,(NAG38),(NAG38)s,(NAG39),或(NAG39),其每一个在WO2018027106中有更详细的描述,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0326] 实施方案15s是实施方案15p的治疗组合,其中靶向配体是(NAG34),(NAG34)s,(NAG35),(NAG35)s,(NAG36),(NAG36)s,(NAG37),(NAG37)s,(NAG38),(NAG38)s,(NAG39),或(NAG39)s,更优选(NAG37)或(NAG37)s。

[0327] 实施方案15t是实施方案15p至15s中任一项的治疗组合,其中靶向配体缀合至RNAi试剂的有义链。

[0328] 实施方案16是试剂盒,其包含实施方案1-15t中的任一个的治疗组合,和关于使用所述治疗组合在有此需要的受试者中治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的说明书。

[0329] 实施方案17是在有此需要的受试者中治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的方法,所述方法包括给所述受试者施用实施方案1-15t中的任一个的治疗组合。

[0330] 实施方案17a是实施方案17的方法,其中所述治疗在有此需要的受试者中诱导针对乙型肝炎病毒的免疫应答,优选地所述受试者具有慢性HBV感染。

[0331] 实施方案17b是实施方案17或17a的方法,其中所述受试者具有慢性HBV感染。

[0332] 实施方案17c是实施方案17-17b中的任一个的方法,其中所述受试者需要治疗选自晚期纤维化、肝硬化和肝细胞癌(HCC)的HBV诱导的疾病。

[0333] 实施方案18是实施方案17-17c中的任一个的方法,其中通过经皮肤注射,例如,肌肉内或真皮内注射,优选肌肉内注射,施用所述治疗组合。

[0334] 实施方案19是实施方案18的方法,其中所述治疗组合包含第一种和第二种非天然存在的核酸分子中的至少一种。

[0335] 实施方案19a是实施方案19的方法,其中所述治疗组合包含第一种和第二种非天然存在的核酸分子。

[0336] 实施方案20是实施方案19或19a的方法,其中通过与电穿孔联合的肌肉内注射将所述非天然存在的核酸分子施用给所述受试者。

[0337] 实施方案21是实施方案19或19a的方法,其中通过脂质组合物,优选地通过脂质纳

米颗粒,将所述非天然存在的核酸分子施用给所述受试者。

实施例

[0338] 本领域技术人员将理解,可以对上述实施方案做出变化,而不脱离其广泛发明概念。因此,应当理解,本发明不限于公开的特定实施方案,而是意图涵盖在由本说明书定义的本发明的精神和范围内的修改。

[0339] 实施例1. HBV核心质粒和HBV pol质粒

pDK-pol和pDK-core载体的示意图分别显示在图1A和1B中。使用标准的分子生物学技术将含有CMV启动子(SEQ ID NO: 18)、剪接增强子(三重复合序列)(SEQ ID NO: 10)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂S前体信号肽SPCS (NP_0018901.1) (SEQ ID NO: 9)和pol (SEQ ID NO: 5)或核心(SEQ ID NO: 2)基因的HBV核心或pol抗原优化的表达盒引入pDK质粒主链中。使用核心和pol特异性抗体通过蛋白质印迹分析关于核心和pol抗原表达在体外试验该质粒,并证实关于细胞的和分泌的核心和pol抗原提供一致的表达谱(数据未显示)。

[0340] *实施例2. 表达截短的HBV核心抗原与HBV Pol抗原的融合体的腺病毒载体的产生*

已经将腺病毒载体的创建设计为从单个开放读码框表达的融合蛋白。也可以设想用于表达两种蛋白的额外构型,例如使用两个分开的表达盒,或使用2A-样序列来隔开两个序列。

[0341] *腺病毒载体的表达盒的设计*

表达盒(如图2A和图2B所示)包含CMV启动子(SEQ ID NO: 19)、内含子(SEQ ID NO:12)(源自人ApoAI基因的片段- GenBank登录号X01038碱基对295 -523,携带ApoAI第二内含子),然后是优化的编码序列-单独的核心或核心和聚合酶融合蛋白,所述融合蛋白前面是人免疫球蛋白分泌信号编码序列(SEQ ID NO: 14)且后面是SV40多腺苷酸化信号(SEQ ID NO: 13)。

[0342] 包含分泌信号,因为过去的经验表明,某些携带分泌型转基因的腺病毒载体的可制造性有所提高,而不影响引起的T-细胞应答(小鼠实验)。

[0343] 核心蛋白(VV)的最后两个残基和聚合酶蛋白(MP)的前两个残基如果融合的话会产生存在于人多巴胺受体蛋白(D3同种型)上的连接序列(VVMP),以及侧翼同源性。

[0344] AGAG接头在核心和聚合酶序列之间的插入会消除这种同源性,并且在人蛋白质组的Blast中不再返回命中。

[0345] *实施例3. DNA疫苗在小鼠中的体内免疫原性研究*

在小鼠中试验了含有编码HBV核心抗原或HBV聚合酶抗原的DNA质粒的免疫治疗性DNA疫苗。该研究的目的是为了检测疫苗在通过电穿孔肌肉内递送进BALB/c小鼠中以后诱导的T-细胞应答。最初的免疫原性研究集中在确定由引入的HBV抗原引起的细胞免疫应答。

[0346] 具体而言,试验的质粒包括pDK-Pol质粒和pDK-Core质粒,分别如图1A和1B所示,以及如上文实施例1中所述。pDK-Pol质粒编码具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的聚合酶抗原,且pDK-Core质粒编码具有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的核心抗原。首先,试验了由每种质粒单独诱导的T-细胞应答。使用商购可得的TriGrid™肌肉内递送系统(TDS-IM)通过电穿孔将DNA质粒(pDNA)疫苗肌肉内地递送给Balb/c小鼠,该系统适合于小鼠模型的胫骨前肌(cranialis tibialis)中应用。关于通过电穿孔将DNA肌肉内递送给小鼠的方法和装置的

更多描述,参见于2017年12月19日提交的国际专利申请公开WO2017172838和美国专利申请号62/607,430,其标题为“Method and Apparatus for the Delivery of Hepatitis B Virus (HBV) Vaccines”,它们的公开内容特此通过引用整体并入。具体地,将具有电极阵列(电极之间间隔2.5 mm且直径为0.030英寸)的TDS-IM v1.0装置的TDS-IM阵列经皮插入所选肌肉中,导电长度为3.2 mm且有效穿透深度为3.2 mm,并且电极的菱形构型的长轴与肌肉纤维平行地定向。在电极插入后,开始注射以在肌肉中分布DNA (例如,0.020 ml)。在完成肌肉内注射后,局部施加250 V/cm电场(施加的电压为59.4 -65.6 V,施加的电流限制小于4 A,0.16 A/秒),总持续时间为约400 ms,10%占空比(即,在约400 ms持续时间中主动施加电压共约40 ms),共6个脉冲。一旦完成电穿孔程序,移除TriGridTM阵列并使动物恢复。如在表1中总结的那样进行给BALB/c小鼠的高剂量(20μg)施用。给六只小鼠施用编码HBV核心抗原的质粒DNA(pDK-core;组1),给六只小鼠施用编码HBV pol抗原的质粒DNA(pDK-pol;组2),且两只小鼠接受空载体作为阴性对照。动物接受间隔两周的两次DNA免疫接种,并在最后一次免疫接种后一周收集脾细胞。

[0347] 表1:初步研究的小鼠免疫接种实验设计.

组	N	pDNA	单侧施用部位(交替侧)	剂量	体积	施用天	终点(脾收获)天
1	6	Core	CT + EP	20μg	20μL	0, 14	21
2	6	Pol	CT + EP	20μg	20μL	0, 14	21
3	2	空载体(阴性对照)	CT + EP	20μg	20μL	0, 14	21

CT,胫骨前肌;EP,电穿孔。

[0348] 通过IFN-γ 酶联 免疫斑点 (ELISPOT)分析和量化抗原特异性应答。在该测定中,将免疫动物的分离脾细胞与覆盖核心蛋白、Pol蛋白或小肽前导序列和连接序列的肽池(2μg/ml的每种肽)一起温育过夜。这些池由15聚体肽组成,所述肽重叠与Core和Pol疫苗载体的Genotypes BCD共有序列相匹配的11个残基。大的94 kD HBV Pol蛋白在中间被分成两个肽池。用同源肽池刺激抗原特异性T细胞,并使用ELISPOT测定评估IFN-γ阳性T细胞。将单个抗原特异性T细胞释放的IFN-γ通过适当的抗体和随后的显色检测可视化为微量培养板上的有色斑点,称为斑点形成细胞(SFC)。

[0349] 在用DNA疫苗 质粒pDK-Core (组 1)免疫的小鼠中实现了针对HBV核心的大量T细胞应答,达到每10^6个细胞1,000个SFC(图3)。对Pol 1肽池的Pol T-细胞应答是强烈的(每10^6个细胞约1,000个SFC)。弱的Pol-2-指导的抗-Pol细胞应答可能是由于小鼠中有限的MHC多样性,这种现象被称为T细胞免疫优势,定义为对来自一种抗原的不同表位的不平等识别。进行的一项验证性研究确认了在本研究中获得的结果(数据未显示)。

[0350] 上述结果证实,用编码HBV抗原的DNA质粒疫苗的疫苗接种在小鼠中诱导针对施用的HBV抗原的细胞免疫应答。用非人灵长类动物也获得了类似的结果(数据未显示)。

[0351] 实施例4. DNA疫苗联合HBV siRNA在小鼠中的体内免疫原性研究

C57BL/6雄性小鼠(6-8周龄;Janvier,法国)通过尾静脉注射以在1xPBS中稀释的$1x10^{11}$vg AAV-HBV (FivePlus MMI, 中国)感染。在治疗开始前让感染建立28天。然后将小

鼠(n=8/组)分成6个单独的组,以研究单独的siRNA或单独的治疗性疫苗(Tx Vx)或组合(表2)。TxVx是上述实施例1的pDK-Pol质粒和pDK-Core质粒的1:1混合物(也分别参见图1A和1B)。siRNA如WO2018027106(例如WO2018027106的权利要求54)中所述,更特别地是两种RNAi试剂AD04872+AD5070, AD04872+AD04982, AD04872+AD04776, 或AD04585+AD04580的混合物,如WO2018027106中所述。siRNA和Tx Vx的剂量和给药时间在表2中给出。治疗的第一天被指定为D0,在28天的感染建立期之后。

[0352] 表2:每个研究组的治疗方案概述

组	小鼠/组	Tx Vx	Tx Vx 给药时间	siRNA	siRNA给药时间
1	8	媒介物	D0, D21	媒介物	D0, D21
2	8	媒介物	-	10 mpk	D0, D21
3	8	10 ug pol/ 10ug core	D0, D21	媒介物	-
4	8	10 ug pol/ 10ug core	D0, D21	10 mpk	D0, D21
5	8	10 ug pol/ 10ug core	D21, D42	媒介物	-
6	8	10 ug pol/ 10ug core	D21, D42	10 mpk	D0, D21
7	8	10 ug pol/ 10ug core	D42, D63	10 mpk	D0, D21
8	8	10 ug pol/ 10ug core	D42, D63	媒介物	D0, D21

-表示无治疗

Tx Vx以表2中指定的浓度在1xPBS中稀释,并通过胫骨肌中的电穿孔施用(Ichor, USA)。siRNA通过颈后部的皮下注射以10mpk/1xPBS的浓度递送。第4组和第6组中的siRNA和Tx Vx组合一起施用(第4组)或交错施用,以便siRNA在第一次Tx Vx给药前3周施用(第6组)或在最后一次siRNA治疗后3周施用(第7组)。所有端点均为在最后一次药物施用后3周,对应于第1-4组的第42天,第5组和第6组的第63天,以及第7组和第8组的第84天。

[0353] 每周采集血样以测量病毒参数(HBeAg、HBsAg和HBV DNA)和血清中的肝ALT。在终点取脾,在用覆盖Tx Vx核心和pol序列的HBV肽池进行离体刺激后,通过IFNγ ELISPOT在所有组中评估免疫原性。所有终点均在最后一次治疗剂量后3周。

[0354] 应当理解,本文描述的实施例和实施方案仅用于例证目的,并且可以在不脱离其广泛发明概念的情况下对上述实施方案做出改变。因此,应当理解,本发明不限于所公开的特定实施方案,而是意图涵盖在由所附权利要求限定的本发明的精神和范围内的修改。

<110> Janssen Sciences Ireland Unlimited Company
<120> 乙型肝炎病毒(HBV)疫苗和靶向HBV的RNAi的组合
<130> 065814.11196/12WO1
<150> US62/862,754
<151> 2019-06-18
<160> 28
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 444
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV截短的核心抗原基因
<400> 1

gacatcgacc cttacaagga gttcggcgcc agcgtggaac tgctgtcttt tctgcccagt 60
gatttctttc cttccattcg agacctgctg ataccgcct ctgctctgta tcgggaagcc 120
ctggagagcc cagaacactg ctccccacac cataccgctc tgcgacaggc aatcctgtgc 180
tgggggggagc tgatgaacct ggccacatgg gtgggatcga atctggagga ccccgcttca 240
cgggaactgg tggtcagcta cgtgaacgtc aatatgggcc tgaaaatccg ccagctgctg 300
tggttccata ttagctgcct gacttttgga cgagagaccg tgctggaata cctggtgtcc 360
ttcggcgtct ggattcgcac tccccctgct tatcgaccac ccaacgcacc aattctgtcc 420
accctgcccg agaccacagt ggtc 444

<210> 2
<211> 148
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV截短的核心抗原
<400> 2

Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu Ser
1 5 10 15
Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp Thr
20 25 30
Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser
35 40 45
Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu
50 55 60
Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser

65 70 75 80
Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile
85 90 95
Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu
100 105 110
Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro
115 120 125
Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu
130 135 140
Thr Thr Val Val
145

<210> 3
<211> 447
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV截短的核心抗原基因
<400> 3

atggacatcg acccttacaa ggagttcggc gccagcgtgg aactgctgtc ttttctgccc 60
agtgatttct ttccttccat tcgagacctg ctggataccg cctctgctct gtatcgggaa 120
gccctggaga gcccagaaca ctgctcccca caccataccg ctctgcgaca ggcaatcctg 180
tgctgggggg agctgatgaa cctggccaca tgggtgggat ccaatctgga ggaccccgct 240
tcacgggaac tggtggtcag ctacgtgaac gtcaatatgg gcctgaaaat ccgccagctg 300
ctgtggttcc atattagctg cctgactttt ggacgagaga ccgtgctgga atacctggtg 360
tccttcggcg tctggatccg cactcccccc gcttatcgac cacccaacgc accaattctg 420
tccaccctgc ccgagaccac agtggtc 447

<210> 4
<211> 149
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV截短的核心抗原
<400> 4

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15
Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30
Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60
Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala
65 70 75 80
Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95
Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
100 105 110
Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125
Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140
Glu Thr Thr Val Val
145

<210> 5
<211> 2529
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV pol抗原基因
<400> 5

atgcccctgt cttaccagca ctttagaaag cttctgctgc tggacgatga agccgggcct 60
ctggaggaag agctgccaag gctggcagac gaggggctga accggagagt ggccgaagat 120
ctgaatctgg gaaacctgaa cgtgagcatc ccttggactc ataaagtcgg caacttcacc 180
gggctgtaca gctccacagt gcctgtcttc aatccagagt ggcagacacc atcctttccc 240
aacattcacc tgcaggagga catcattaat agatgcgaac agttcgtggg acctctgaca 300
gtcaacgaaa agaggcgcct gaaactgatc atgcctgcca ggttttaccc aaatgtgact 360
aagtatctgc cactggataa gggcatcaag ccttactatc cagagcacct ggtgaaccat 420
tacttccaga ctagacacta tctgcatacc ctgtggaagg ccggaatcct gtacaaacga 480
gaaactaccc ggagtgcttc attttgtggc tccccatatt cttgggaaca ggagctgcag 540
catggcaggc tggtgttcca gaccagcaca cgccacgggg atgagtcctt ttgccagcag 600
tctagtggca tcctgagcag atcccccgtg gggccttgtc tgcagtctca gctgcggaag 660
agtagactgg gactgcagcc acagcaggga cacctggcac gacggcagca gggaaggtct 720
ggcagtatcc gggctagagt gcatcccaca actagaaggc ctttcggcgt cgagccatca 780
ggaagcggcc acaccacaaa caccgcatca agctcctcta gttgcctgca tcagtcagcc 840
gtgagaaagg ccgcttacag ccacctgtcc acatctaaaa ggcactcaag ctccgggcat 900
gctgtggagc tgcacaacat ccctccaaat tctgcacgca gtcagtcaga aggacccgtg 960
ttcagctgct ggtggctgca gtttcggaac tcaaagcctt gcagcgacta ttgtctgagc 1020
catattgtga atctgctgga ggattggggc ccttgtaccg agcacgggga acaccatatc 1080

aggattccac gaacaccagc acgagtgact ggaggggtgt tcctggtgga caagaacccc 1140
cacaatacta ccgagagccg gctggtggtc gatttcagtc agttttcaag aggcaacaca 1200
agggtgtcat ggcccaaatt cgccgtccct aatctgcaga gtctgactaa cctgctgtct 1260
agtaatctga gctggctgtc cctggacgtg tccgcagcct tttaccacct gcctctgcat 1320
ccagctgcaa tgccccatct gctggtgggg tcaagcggac tgagtcgcta cgtcgcccga 1380
ctgtcctcta actcacgcat cattaatcac cagcatggca ccatgcagaa cctgcacgat 1440
agctgttccc ggaatctgta cgtgtctctg ctgctgctgt ataagacatt cggcagaaaa 1500
ctgcacctgt acagccatcc tatcattctg gggtttagga agatcccaat gggagtggga 1560
ctgagcccct tcctgctggc acagtttacc tccgccattt gctctgtggt ccgccgagcc 1620
ttcccacact gtctggcttt ttcctatatg aacaatgtgg tcctgggcgc caaatccgtg 1680
cagcatctgg agtctctgtt cacagctgtc actaactttc tgctgagcct ggggatccac 1740
ctgaacccaa ataagactaa acgctggggg tacagcctga atttcatggg atatgtgatt 1800
ggatcctggg ggaccctgcc acaggagcac atcgtgcaga agatcaagga atgctttcgg 1860
aagctgcccg tcaacagacc tatcgactgg aaagtgtgcc agcggattgt cggactgctg 1920
ggcttcgccg ctcccctttac ccagtgcggg tacccagcac tgatgcccct gtatgcctgt 1980
atccagtcta agcaggcttt caccttagt cctacataca aggcattcct gtgcaaacag 2040
tacctgaacc tgtatccagt ggcaaggcag cgacctggac tgtgccaggt ctttgcaaat 2100
gccactccta ccggctgggg gctggctatc ggacatcagc gaatgcgggg cacattcgtg 2160
gccccctgc ctattcacac tgctcagctg ctggcagcct gctttgctag atctaggagt 2220
ggagcaaagc tgatcggcac cgacaatagt gtggtcctgt caagaaaata cacatccttc 2280
ccatggctgc tgggatgtgc tgcaaactgg attctgaggg gcaccagctt cgtgtacgtc 2340
ccctcagccc tgaatcctgc tgacgatcca tcccgcgggc gactgggact gtaccgacct 2400
ctgctgagac tgcccttcag gcctacaact ggccggacat ctctgtatgc cgattcacca 2460
agcgtgccct cacacctgcc tgacagagtc cactttgctt cacccctgca cgtcgcttgg 2520
cggcctcca 2529

<210> 6
<211> 2529
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV pol抗原基因
<400> 6

atgcccctgt cttaccagca ctttagaaag ctgctgctgc tggacgatga agccgggcct 60
ctggaggaag agctgccaag gctggcagac gaggggctga accggagagt ggccgaagat 120
ctgaatctgg gaaacctgaa cgtgagcatc ccttggactc ataaagtcgg caacttcacc 180
gggctgtaca gctccacagt gcctgtcttc aatccagagt ggcagacacc atcctttccc 240
aacattcacc tgcaggagga catcattaat agatgcgaac agttcgtggg acctctgaca 300
gtcaacgaaa agaggcgcct gaaactgatc atgcctgcca ggttttaccc aaatgtgact 360
aagtatctgc cactggataa gggcatcaag ccttactatc cagagcacct ggtgaaccat 420

tacttccaga ctagacacta tctgcatacc ctgtggaagg ccggaatcct gtacaaacga 480
gaaactaccc ggagtgcttc attttgtggc tccccatatt cttgggaaca ggagctgcag 540
catggcaggc tggtgttcca gaccagcaca cgccacgggg atgagtcctt ttgccagcag 600
tctagtggca tcctgagcag atcccccgtg gggccttgtc tgcagtctca gctgcggaag 660
agtagactgg gactgcagcc acagcaggga cacctggcac gacggcagca gggaaggtct 720
ggcagtatcc gggctagagt gcatcccaca actagaaggc ctttcggcgt cgagccatca 780
ggaagcggcc acaccacaaa caccgcatca agctcctcta gttgcctgca tcagtcagcc 840
gtgagaaagg ccgcttacag ccacctgtcc acatctaaaa ggcactcaag ctccgggcat 900
gctgtggagc tgcacaacat ccctccaaat tctgcacgca gtcagtcaga aggacccgtg 960
ttcagctgct ggtggctgca gtttcggaac tcaaagcctt gcagcgacta ttgtctgagc 1020
catattgtga atctgctgga ggattggggc ccttgtaccg agcacgggga acaccatatc 1080
aggattccac gaacaccagc acgagtgact ggaggggtgt tcctggtgga caagaacccc 1140
cacaatacta ccgagagccg gctggtggtc gatttcagtc agttttcaag aggcaacaca 1200
agggtgtcat ggcccaaatt cgccgtccct aatctgcaga gtctgactaa cctgctgtct 1260
agtaatctga gctggctgtc cctggacgtg tccgcagcct tttaccacct gcctctgcat 1320
ccagctgcaa tgccccatct gctggtgggg tcaagcggac tgagtcgcta cgtcgcccga 1380
ctgtcctcta actcacgcat cattaatcac cagcatggca ccatgcagaa cctgcacgat 1440
agctgttccc ggaatctgta cgtgtctctg ctgctgctgt ataagacatt cggcagaaaa 1500
ctgcacctgt acagccatcc tatcattctg gggtttagga agatcccaat gggagtggga 1560
ctgagcccct tcctgctggc acagtttacc tccgccattt gctctgtggt ccgccgagcc 1620
ttcccacact gtctggcttt ttcctatatg aacaatgtgg tcctgggcgc caaatccgtg 1680
cagcatctgg agtctctgtt cacagctgtc actaactttc tgctgagcct ggggatccac 1740
ctgaacccaa ataagactaa acgctggggg tacagcctga atttcatggg atatgtgatt 1800
ggatcctggg ggaccctgcc acaggagcac atcgtgcaga agatcaagga atgctttcgg 1860
aagctgcccg tcaacagacc tatcgactgg aaagtgtgcc agcggattgt cggactgctg 1920
ggcttcgccg ctccctttac ccagtgcggg tacccagcac tgatgcccct gtatgcctgt 1980
atccagtcta agcaggcttt cacctttagt cctacataca aggcattcct gtgcaaacag 2040
tacctgaacc tgtatccagt ggcaaggcag cgacctggac tgtgccaggt ctttgcaaat 2100
gccactccta ccggctgggg gctggctatc ggacatcagc gaatgcgggg cacattcgtg 2160
gcccccctgc ctattcacac tgctcagctg ctggcagcct gctttgctag atctaggagt 2220
ggagcaaagc tgatcggcac cgacaatagt gtggtcctgt caagaaaata cacatccttc 2280
ccatggctgc tgggatgtgc tgcaaactgg attctgaggg gcaccagctt cgtgtacgtc 2340
ccctcagccc tgaatcctgc tgacgatcca tcccgcgggc gactgggact gtaccgacct 2400
ctgctgagac tgcccttcag gcctacaact ggccggacat ctctgtatgc cgattcacca 2460
agcgtgccct cacacctgcc tgacagagtc cactttgctt cacccctgca cgtcgcttgg 2520
cggcctcca 2529

<210> 7

<211> 843

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HBV pol抗原

<400> 7

Met Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Lys Leu Leu Leu Leu Asp Asp
1 5 10 15
Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly
20 25 30
Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val
35 40 45
Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro Glu Trp Gln Thr Pro Ser Phe Pro
65 70 75 80
Asn Ile His Leu Gln Glu Asp Ile Ile Asn Arg Cys Glu Gln Phe Val
85 90 95
Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Lys Leu Ile Met Pro
100 105 110
Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly
115 120 125
Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr
130 135 140
Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg
145 150 155 160
Glu Thr Thr Arg Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu
165 170 175
Gln Glu Leu Gln His Gly Arg Leu Val Phe Gln Thr Ser Thr Arg His
180 185 190
Gly Asp Glu Ser Phe Cys Gln Gln Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Ser
195 200 205
Pro Val Gly Pro Cys Leu Gln Ser Gln Leu Arg Lys Ser Arg Leu Gly
210 215 220
Leu Gln Pro Gln Gln Gly His Leu Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser
225 230 235 240
Gly Ser Ile Arg Ala Arg Val His Pro Thr Thr Arg Arg Pro Phe Gly
245 250 255
Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Asn Thr Ala Ser Ser Ser
260 265 270
Ser Ser Cys Leu His Gln Ser Ala Val Arg Lys Ala Ala Tyr Ser His

275 280 285

Leu Ser Thr Ser Lys Arg His Ser Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu

290 295 300

His Asn Ile Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln Ser Glu Gly Pro Val

305 310 315 320

Phe Ser Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp

325 330 335

Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys

340 345 350

Thr Glu His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg

355 360 365

Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Thr

370 375 380

Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Thr

385 390 395 400

Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr

405 410 415

Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala

420 425 430

Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu

435 440 445

Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn

450 455 460

Ser Arg Ile Ile Asn His Gln His Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp

465 470 475 480

Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Thr

485 490 495

Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe

500 505 510

Arg Lys Ile Pro Met Gly Val Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln

515 520 525

Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys

530 535 540

Leu Ala Phe Ser Tyr Met Asn Asn Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val

545 550 555 560

Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser

565 570 575

Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser

580 585 590

Leu Asn Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Ser Trp Gly Thr Leu Pro Gln
595 600 605
Glu His Ile Val Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val
610 615 620
Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu
625 630 635 640
Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro
645 650 655
Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr
660 665 670
Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala
675 680 685
Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala Asn Ala Thr Pro Thr
690 695 700
Gly Trp Gly Leu Ala Ile Gly His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe Val
705 710 715 720
Ala Pro Leu Pro Ile His Thr Ala Gln Leu Leu Ala Ala Cys Phe Ala
725 730 735
Arg Ser Arg Ser Gly Ala Lys Leu Ile Gly Thr Asp Asn Ser Val Val
740 745 750
Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala
755 760 765
Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Val Pro Ser Ala Leu
770 775 780
Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Tyr Arg Pro
785 790 795 800
Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr
805 810 815
Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe
820 825 830
Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
835 840

<210> 8
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 半胱氨酸蛋白酶抑制剂S信号肽编码序列
<400> 8

atggctcgac ctctgtgtac cctgctactc ctgatggcta ccctggctgg agctctggcc 60
agc 63

<210> 9
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 半胱氨酸蛋白酶抑制剂S信号肽序列
<400> 9

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15
Gly Ala Leu Ala Ser
20

<210> 10
<211> 378
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 三重增强子调节序列
<400> 10

ggctcgcatc tctccttcac gcgcccgccg ccctacctga ggccgccatc cacgccggtt 60
gagtcgcgtt ctgccgcctc ccgcctgtgg tgcctcctga actgcgtccg ccgtctaggt 120
aagtttaaag ctcaggtcga gaccgggcct ttgtccggcg ctcccttgga gcctacctag 180
actcagccgg ctctccacgc tttgcctgac cctgcttgct caactctagt tctctcgtta 240
acttaatgag acagatagaa actggtcttg tagaaacaga gtagtcgcct gcttttctgc 300
caggtgctga cttctctccc ctgggctttt ttctttttct caggttgaaa agaagaagac 360
gaagaagacg aagaagac 378

<210> 11
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头编码序列
<400> 11

gccggagctg gc 12

<210> 12
<211> 248
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ApoAI基因片段
<400> 12
ttggccgtgc tcttcctgac gggtaggtgt cccctaacct agggagccaa ccatcggggg 60
gccttctccc taaatccccg tggcccaccc tcctgggcag aggcagcagg tttctcactg 120
gccccctctc ccccacctcc aagcttggcc tttcggctca gatctcagcc cacagctggc 180
ctgatctggg tctcccctcc caccctcagg gagccaggct cggcatttcg tcgacaagct 240
tagccacc 248
<210> 13
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> SV40多腺苷酸化信号序列
<400> 13
aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 60
aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 120
tatcatgtct 130
<210> 14
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 免疫球蛋白分泌信号编码序列
<400> 14
atggagttcg gcctgtcttg ggtctttctg gtggcaatcc tgaagggcgt gcagtgtgaa 60
gtgcagctgc tggagtctgg a 81
<210> 15
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 免疫球蛋白分泌信号序列
<400> 15
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly
20 25
<210> 16

<211> 996
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV核心-pol融合抗原序列
<400> 16

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15
Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30
Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45
Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60
Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala
65 70 75 80
Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95
Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
100 105 110
Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125
Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140
Glu Thr Thr Val Val Ala Gly Ala Gly Met Pro Leu Ser Tyr Gln His
145 150 155 160
Phe Arg Lys Leu Leu Leu Leu Asp Asp Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu
165 170 175
Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu
180 185 190
Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys
195 200 205
Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn
210 215 220
Pro Glu Trp Gln Thr Pro Ser Phe Pro Asn Ile His Leu Gln Glu Asp
225 230 235 240
Ile Ile Asn Arg Cys Glu Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu
245 250 255
Lys Arg Arg Leu Lys Leu Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val

260 265 270

Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu

275 280 285

His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu

290 295 300

Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg Glu Thr Thr Arg Ser Ala Ser

305 310 315 320

Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu Gln Glu Leu Gln His Gly Arg

325 330 335

Leu Val Phe Gln Thr Ser Thr Arg His Gly Asp Glu Ser Phe Cys Gln

340 345 350

Gln Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Ser Pro Val Gly Pro Cys Leu Gln

355 360 365

Ser Gln Leu Arg Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Pro Gln Gln Gly His

370 375 380

Leu Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser Gly Ser Ile Arg Ala Arg Val

385 390 395 400

His Pro Thr Thr Arg Arg Pro Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly

405 410 415

His Thr Thr Asn Thr Ala Ser Ser Ser Ser Ser Cys Leu His Gln Ser

420 425 430

Ala Val Arg Lys Ala Ala Tyr Ser His Leu Ser Thr Ser Lys Arg His

435 440 445

Ser Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu His Asn Ile Pro Pro Asn Ser

450 455 460

Ala Arg Ser Gln Ser Glu Gly Pro Val Phe Ser Cys Trp Trp Leu Gln

465 470 475 480

Phe Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His Ile Val

485 490 495

Asn Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys Thr Glu His Gly Glu His His

500 505 510

Ile Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu

515 520 525

Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Thr Glu Ser Arg Leu Val Val Asp

530 535 540

Phe Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Thr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe

545 550 555 560

Ala Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu

565 570 575

Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu
580 585 590
His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser
595 600 605
Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Ile Asn His Gln
610 615 620
His Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr
625 630 635 640
Val Ser Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu
645 650 655
Tyr Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met Gly Val
660 665 670
Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser
675 680 685
Val Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Tyr Met Asn
690 695 700
Asn Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe
705 710 715 720
Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro
725 730 735
Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser Leu Asn Phe Met Gly Tyr Val
740 745 750
Ile Gly Ser Trp Gly Thr Leu Pro Gln Glu His Ile Val Gln Lys Ile
755 760 765
Lys Glu Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys
770 775 780
Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr
785 790 795 800
Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser
805 810 815
Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys
820 825 830
Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys
835 840 845
Gln Val Phe Ala Asn Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Ala Ile Gly
850 855 860
His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe Val Ala Pro Leu Pro Ile His Thr
865 870 875 880
Ala Gln Leu Leu Ala Ala Cys Phe Ala Arg Ser Arg Ser Gly Ala Lys

885 890 895
Leu Ile Gly Thr Asp Asn Ser Val Val Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser
900 905 910
Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr
915 920 925
Ser Phe Val Tyr Val Pro Ser Ala Leu Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser
930 935 940
Arg Gly Arg Leu Gly Leu Tyr Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg
945 950 955 960
Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro
965 970 975
Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala
980 985 990
Trp Arg Pro Pro
995

<210> 17
<211> 1023
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 具有Ig信号序列的HBV核心-pol融合抗原序列
<400> 17
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Met Asp Ile Asp Pro
20 25 30
Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser
35 40 45
Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu
50 55 60
Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr
65 70 75 80
Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Asn Leu Ala
85 90 95
Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Glu Leu Val
100 105 110
Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu
115 120 125
Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu

130 135 140

Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
145 150 155 160
Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
165 170 175
Ala Gly Ala Gly Met Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Lys Leu Leu
180 185 190
Leu Leu Asp Asp Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu
195 200 205
Ala Asp Glu Gly Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly
210 215 220
Asn Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr
225 230 235 240
Gly Leu Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro Glu Trp Gln Thr
245 250 255
Pro Ser Phe Pro Asn Ile His Leu Gln Glu Asp Ile Ile Asn Arg Cys
260 265 270
Glu Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Lys
275 280 285
Leu Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro
290 295 300
Leu Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His
305 310 315 320
Tyr Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile
325 330 335
Leu Tyr Lys Arg Glu Thr Thr Arg Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro
340 345 350
Tyr Ser Trp Glu Gln Glu Leu Gln His Gly Arg Leu Val Phe Gln Thr
355 360 365
Ser Thr Arg His Gly Asp Glu Ser Phe Cys Gln Gln Ser Ser Gly Ile
370 375 380
Leu Ser Arg Ser Pro Val Gly Pro Cys Leu Gln Ser Gln Leu Arg Lys
385 390 395 400
Ser Arg Leu Gly Leu Gln Pro Gln Gln Gly His Leu Ala Arg Arg Gln
405 410 415
Gln Gly Arg Ser Gly Ser Ile Arg Ala Arg Val His Pro Thr Thr Arg
420 425 430
Arg Pro Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Asn Thr
435 440 445

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Cys Leu His Gln Ser Ala Val Arg Lys Ala
450 455 460
Ala Tyr Ser His Leu Ser Thr Ser Lys Arg His Ser Ser Ser Gly His
465 470 475 480
Ala Val Glu Leu His Asn Ile Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln Ser
485 490 495
Glu Gly Pro Val Phe Ser Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser Lys
500 505 510
Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn Leu Leu Glu Asp
515 520 525
Trp Gly Pro Cys Thr Glu His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro Arg
530 535 540
Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn Pro
545 550 555 560
His Asn Thr Thr Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe Ser
565 570 575
Arg Gly Asn Thr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn Leu
580 585 590
Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu
595 600 605
Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala Met
610 615 620
Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala Arg
625 630 635 640
Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Ile Asn His Gln His Gly Thr Met Gln
645 650 655
Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu Leu
660 665 670
Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro Ile
675 680 685
Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met Gly Val Gly Leu Ser Pro Phe
690 695 700
Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg Ala
705 710 715 720
Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Tyr Met Asn Asn Val Val Leu Gly
725 730 735
Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn
740 745 750
Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg

755 760 765

Trp Gly Tyr Ser Leu Asn Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Ser Trp Gly
770 775 780

Thr Leu Pro Gln Glu His Ile Val Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg
785 790 795 800

Lys Leu Pro Val Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile
805 810 815

Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro
820 825 830

Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr
835 840 845

Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu
850 855 860

Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala Asn
865 870 875 880

Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Ala Ile Gly His Gln Arg Met Arg
885 890 895

Gly Thr Phe Val Ala Pro Leu Pro Ile His Thr Ala Gln Leu Leu Ala
900 905 910

Ala Cys Phe Ala Arg Ser Arg Ser Gly Ala Lys Leu Ile Gly Thr Asp
915 920 925

Asn Ser Val Val Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu
930 935 940

Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Val
945 950 955 960

Pro Ser Ala Leu Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly
965 970 975

Leu Tyr Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg
980 985 990

Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp
995 1000 1005

Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
1010 1015 1020

<210> 18

<211> 584

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> hCMV启动子

<400> 18

tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc 60
ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc 120
aacgaccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg 180
actttccatt gacgtcaatg ggtggactat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat 240
caagtgtatc atatgccaag tacgcccccc attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc 300
tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta 360
ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag 420
cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg gagtttgttt 480
tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa 540
atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagc 584

<210> 19
<211> 684
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> hCMV启动子序列
<400> 19

accgccatgt tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt 60
agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg 120
ctgaccgccc aacgaccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 180
gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt 240
ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tacgcccccc attgacgtca atgacggtaa 300
atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta 360
catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg 420
gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg 480
gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc 540
attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt 600
agtgaaccgt cagatcgcct ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 660
ccgggaccga tccagcctcc gcgg 684

<210> 20
<211> 225
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> bGH多腺苷酸信号
<400> 20

ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgtgcct tccttgaccc 60
tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 120

tgagtaggtg tcattctatt ctgggggtg gggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 180
gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtgggctc tatgg 225

<210> 21
<211> 671
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> pUC ORI
<400> 21

cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc 60
ttgcaaacaa aaaaaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 120
ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagtg 180
tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg 240
ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac 300
tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca 360
cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga 420
gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc 480
ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct 540
gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg 600
agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct 660
tttgctcaca t 671

<210> 22
<211> 795
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Kanr
<400> 22

atgattgagc aagatggtct tcacgctggc tcgccagctg cgtgggtgga acgcctgttt 60
ggttatgatt gggcgcagca gactattgga tgttccgacg cggctgtatt tcggctgtct 120
gctcagggtc gccccgtgct gtttgtgaag acggatttgt ctggcgcatt aaatgagtta 180
caggacgagg cggctcgtct gagttggttg gccaccaccg gcgtgccctg cgccgcagtg 240
ctggatgtcg tgacagaagc aggccgcgat tggctccttc tcggcgaagt gccgggccag 300
gacctgctca gcagccactt ggcaccggca gaaaaagttt ctatcatggc cgacgccatg 360
cgtcgtcttc acactctcga tccggccacg tgccccttg accaccaggc caagcatcgt 420
attgaacgtg cgcgtactcg gatggaagca ggtttagtag accaggacga tttggatgag 480
gaacatcaag gcctggcccc ggctgaactg tttgcgcgct taaaagcgtc gatgccagat 540
ggcgaagatt tggtagtcac ccatggagat gcgtgtttgc caaacatcat ggttgaaaat 600
ggccgcttct caggctttat tgactgtggg cgcctgggtg ttgccgaccg ctatcaagat 660

attgcgctcg caactcgtga catcgctgaa gagctgggcg gagaatgggc tgaccgtttc 720
ctggtactgt atggcattgc agcgcccgat tcccaacgca tcgcatttta tcgtctgctg 780
gatgagtttt tctaa 795

<210> 23
<211> 264
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 密码子优化的Kanr
<400> 23

Met Ile Glu Gln Asp Gly Leu His Ala Gly Ser Pro Ala Ala Trp Val
1 5 10 15
Glu Arg Leu Phe Gly Tyr Asp Trp Ala Gln Gln Thr Ile Gly Cys Ser
20 25 30
Asp Ala Ala Val Phe Arg Leu Ser Ala Gln Gly Arg Pro Val Leu Phe
35 40 45
Val Lys Thr Asp Leu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Leu Gln Asp Glu Ala
50 55 60
Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Thr Thr Gly Val Pro Cys Ala Ala Val
65 70 75 80
Leu Asp Val Val Thr Glu Ala Gly Arg Asp Trp Leu Leu Leu Gly Glu
85 90 95
Val Pro Gly Gln Asp Leu Leu Ser Ser His Leu Ala Pro Ala Glu Lys
100 105 110
Val Ser Ile Met Ala Asp Ala Met Arg Arg Leu His Thr Leu Asp Pro
115 120 125
Ala Thr Cys Pro Phe Asp His Gln Ala Lys His Arg Ile Glu Arg Ala
130 135 140
Arg Thr Arg Met Glu Ala Gly Leu Val Asp Gln Asp Asp Leu Asp Glu
145 150 155 160
Glu His Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Leu Phe Ala Arg Leu Lys Ala
165 170 175
Ser Met Pro Asp Gly Glu Asp Leu Val Val Thr His Gly Asp Ala Cys
180 185 190
Leu Pro Asn Ile Met Val Glu Asn Gly Arg Phe Ser Gly Phe Ile Asp
195 200 205
Cys Gly Arg Leu Gly Val Ala Asp Arg Tyr Gln Asp Ile Ala Leu Ala
210 215 220
Thr Arg Asp Ile Ala Glu Glu Leu Gly Gly Glu Trp Ala Asp Arg Phe

225 230 235 240

Leu Val Leu Tyr Gly Ile Ala Ala Pro Asp Ser Gln Arg Ile Ala Phe

245 250 255

Tyr Arg Leu Leu Asp Glu Phe Phe

260

<210> 24

<211> 99

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> bla启动子

<400> 24

acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 60

ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagt 99

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HBV RNAi试剂反义链修饰的序列

<400> 25

agaaaauuga gagaagucca c 21

<210> 26

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HBV RNAi试剂有义链修饰的序列

<400> 26

guggacuucu cucaauuuuc u 21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HBV RNAi试剂反义链修饰的序列

<400> 27

uaccaauuua ugccuacagc g 21

<210> 28

<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV RNAi试剂有义链修饰的序列
<400> 28
cgcuguaggc auaaauuggu a 21

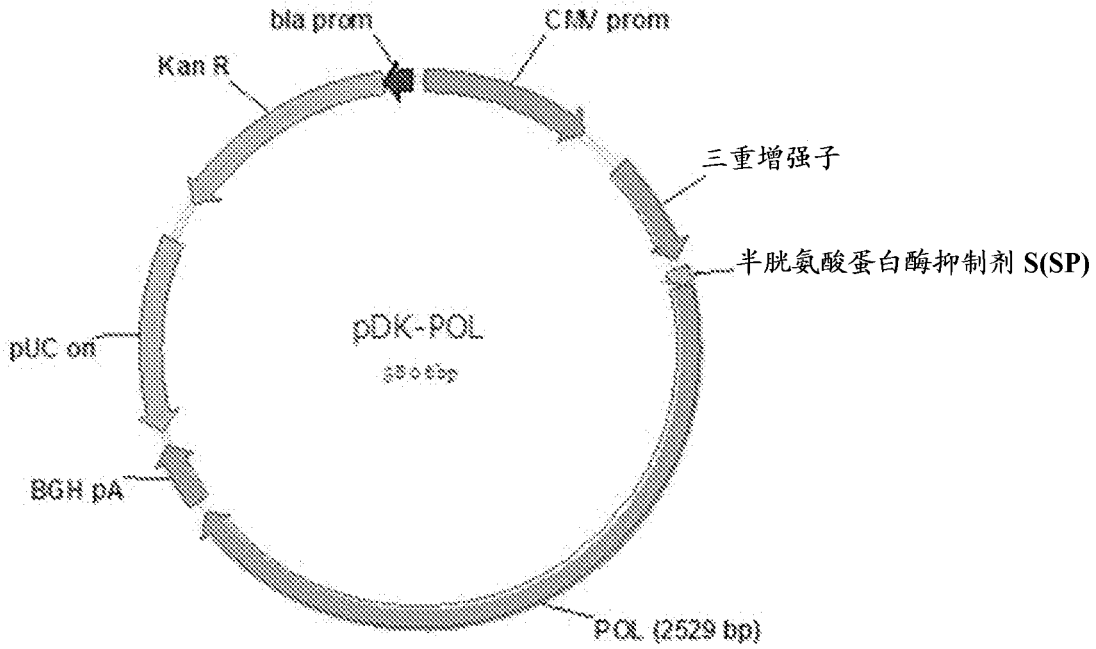

bla prom
CMV prom
Kan R
三重增强子
半胱氨酸蛋白酶抑制剂 S(SP)
pDK-POL
pUC ori
BGH pA
POL (2529 bp)

图 1A

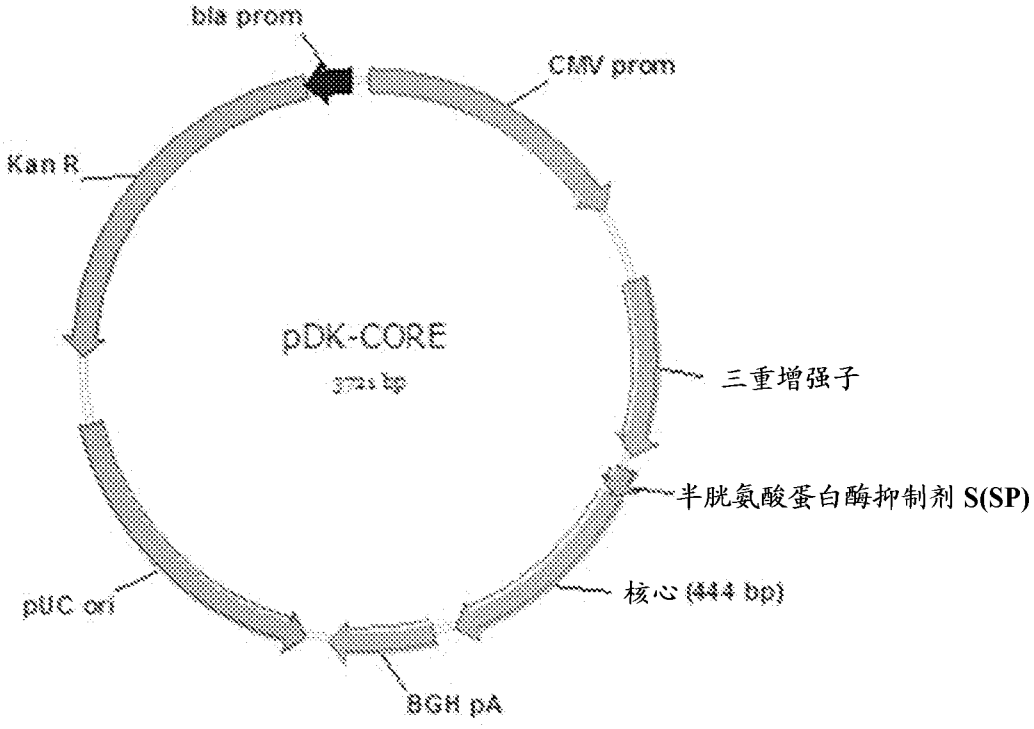

bla prom
CMV prom
Kan R
pDK-CORE
三重增强子
半胱氨酸蛋白酶抑制剂 S(SP)
核心 (444 bp)
pUC ori
BGH pA

图 1B

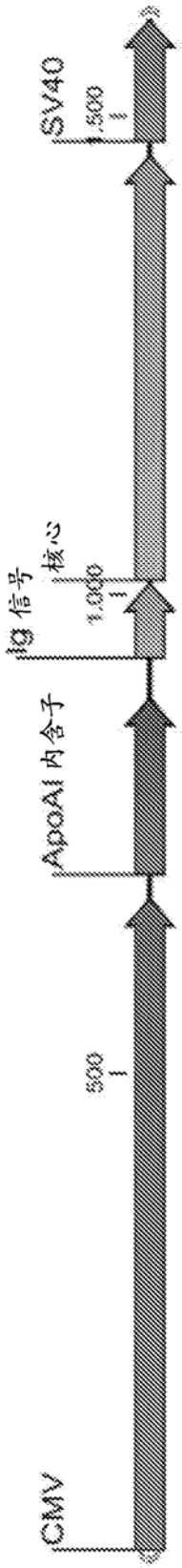


图 2A

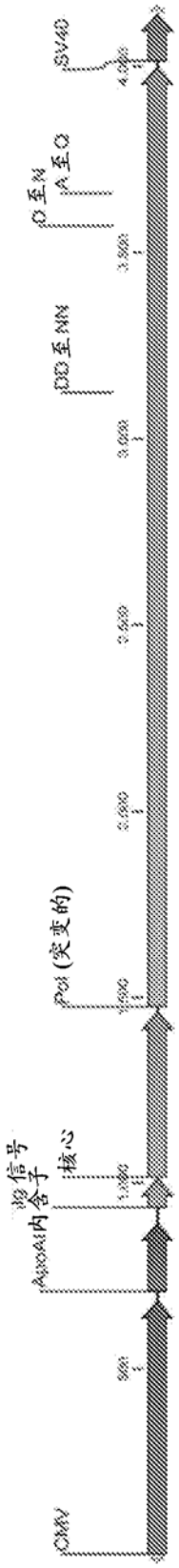


图 2B

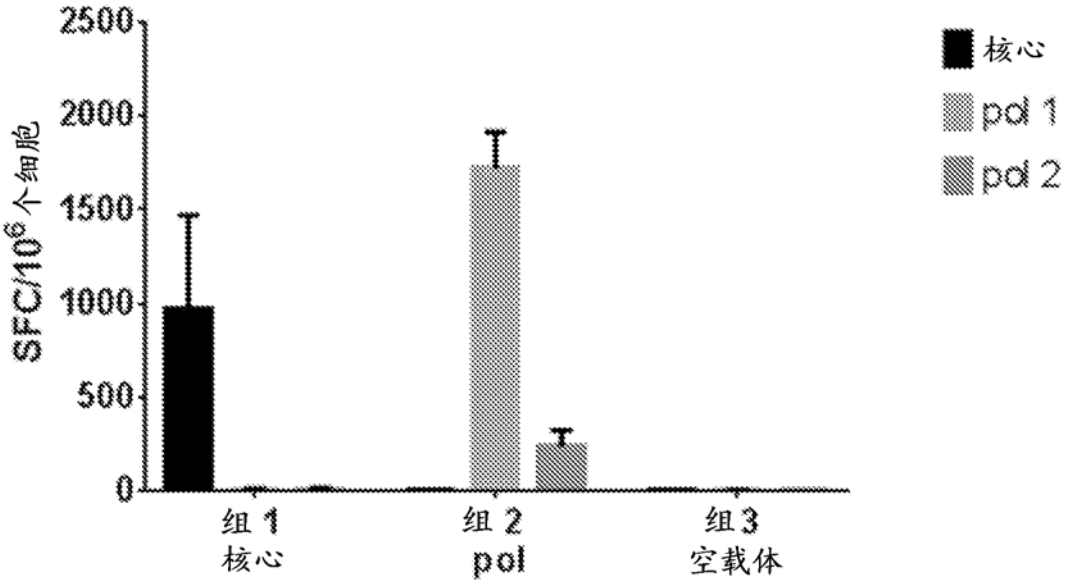

2500
2000
1500
1000
500
0
SFC/10^6个细胞
组1
核心
组2
pol
组3
空载体
核心
pol 1
pol 2

图 3

表 2. 来自 US20130005793 的靶向 HBV 基因的 dsRNA 的核心序列

SEQ ID NO	有义链序列(5'-3')	SEQ ID NO	反义链序列(5'-3')
1	CAAGGUAUGUUGCCCGUUU	157	AAACGGGCAACAUACCUUG
2	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	158	TACCAAUUUAUGCCUACAG
3	UCUGCGGCGUUUUAUCAUA	159	UAUGAUAAAACGCCGCAGA
3	UCUGCGGCGUUUUAUCAUA	160	TAUGAUAAAACGCCGCAGA
4	ACCUCUGCCUAAUCAUCUC	161	GAGAUGAUUAGGCAGAGGU
5	UUUACUAGUGCCAUUUGUA	162	TACAAAUGGCACUAGUAAA
6	ACCUCUGCCUAAUCAUCUA	163	TAGAUGAUUAGGCAGAGGU
7	CUGUAGGCAUAAAUUGGUC	164	GACCAAUUUAUGCCUACAG
8	UGUCUGCGGCGUUUUAUCA	165	UGAUAAAACGCCGCAGACA
8	UGUCUGCGGCGUUUUAUCA	166	TGAUAAAACGCCGCAGACA
9	UACUAGUGCCAUUUGUUCA	167	UGAACAAAUGGCACUAGUA
9	UACUAGUGCCAUUUGUUCA	168	TGAACAAAUGGCACUAGUA
10	CAACUUUUUCACCUCUGCA	169	TGCAGAGGUGAAAAAGUUG
11	CCAUUUGUUCAGUGGUUCG	170	CGAACCACUGAACAAAUGG
12	CCAAGUGUUUGCUGACGCA	171	UGCGUCAGCAAACACUUGG
12	CCAAGUGUUUGCUGACGCA	172	TGCGUCAGCAAACACUUGG
13	CCAUUUGUUCAGUGGUUCA	173	TGAACCACUGAACAAAUGG
14	UUUACUAGUGCCAUUUGUU	174	AACAAAUGGCACUAGUAAA
15	CACCUCUGCCUAAUCAUCA	175	TGAUGAUUAGGCAGAGGUG
16	CUGGCUCAGUUUACUAGUG	176	CACUAGUAAACUGAGCCAG
17	CAAGGUAUGUUGCCCGUUA	177	TAACGGGCAACAUACCUUG
18	CUGGCUCAGUUUACUAGUA	178	TACUAGUAAACUGAGCCAG
19	GAGGCUGUAGGCAUAAAUU	179	AAUUUAUGCCUACAGCCUC
20	CAGUUUACUAGUGCCAUUU	180	AAAUGGCACUAGUAAACUG
21	AGGUAUGUUGCCCGUUUGU	181	ACAAACGGGCAACAUACCU
22	UAUGUUGCCCGUUUGUCCA	182	UGGACAAACGGGCAACAUA
23	GAGGCUGUAGGCAUAAAUA	183	TAUUUAUGCCUACAGCCUC
24	GUCUGCGGCGUUUUAUCAU	184	AUGAUAAAACGCCGCAGAC
25	CAACUUUUUCACCUCUGCC	185	GGCAGAGGUGAAAAAGUUG
26	CCGUGUGCACUUCGCUUCA	186	UGAAGCGAAGUGCACACGG
26	CCGUGUGCACUUCGCUUCA	187	TGAAGCGAAGUGCACACGG
27	UCAAGGUAUGUUGCCCGUA	188	TACGGGCAACAUACCUUGA
28	CAGUUUACUAGUGCCAUUA	189	TAAUGGCACUAGUAAACUG
29	UGGUGGACUUCUCUCAAUU	190	AAUUGAGAGAAGUCCACCA
30	AGGUAUGUUGCCCGUUUGA	191	TCAAACGGGCAACAUACCU
31	CUGCUCGUGUUACAGGCGG	192	CCGCCUGUAACACGAGCAG
32	UAUGUUGCCCGUUUGUCCU	193	AGGACAAACGGGCAACAUA
33	UCAAGGUAUGUUGCCCGUU	194	AACGGGCAACAUACCUUGA
34	UCUUAUCAACACUUCCGGA	195	UCCGGAAGUGUUGAUAAGA
34	UCUUAUCAACACUUCCGGA	196	TCCGGAAGUGUUGAUAAGA

图 4

35	CACCUCUGCCUAAUCAUCU	197	AGAUGAUUAGGCAGAGGUG
36	AUAAGAGGACUCUUGGACU	198	AGUCCAAGAGUCCUCUUAU
37	GUCUGCGGCGUUUUAUCAA	199	TUGAUAAAACGCCGCAGAC
38	GGCGCUGAAUCCCGCGGAC	200	GUCCGCGGGAUUCAGCGCC
39	CGCGUCGCAGAAGAUCUCA	201	UGAGAUCUUCUGCGACGCG
40	AAUGUCAACGACCGACCUU	202	AAGGUCGGUCGUUGACAUU
41	GCUCAGUUUACUAGUGCCA	203	UGGCACUAGUAAACUGAGC
42	UGGUGGACUUCUCUCAAUA	204	TAUUGAGAGAAGUCCACCA
43	AUCGCCGCGUCGCAGAAGA	205	UCUUCUGCGACGCGGCGAU
44	GCCAUUUGUUCAGUGGUUC	206	GAACCACUGAACAAAUGGC
45	CGAUCCAUACUGCGGAACU	207	AGUUCCGCAGUAUGGAUCG
46	UCACCUCUGCCUAAUCAUC	208	GAUGAUUAGGCAGAGGUGA
47	GUGGACUUCUCUCAAUUUU	209	AAAAUUGAGAGAAGUCCAC
48	GGGUCACCAUAUUCUUGGG	210	CCCAAGAAUAUGGUGACCC
49	GCCGCGUCGCAGAAGAUCU	211	AGAUCUUCUGCGACGCGGC
50	UCAAUCGCCGCGUCGCAGA	212	UCUGCGACGCGGCGAUUGA
51	UGGAUGUGUCUGCGGCGUU	213	AACGCCGCAGACACAUCCA
52	UACUGUUCAAGCCUCCAAG	214	CUUGGAGGCUUGAACAGUA
53	GUUUACUAGUGCCAUUUGU	215	ACAAAUGGCACUAGUAAAC
54	ACUAGUGCCAUUUGUUCAG	216	CUGAACAAAUGGCACUAGU
55	CCGCGUCGCAGAAGAUCUC	217	GAGAUCUUCUGCGACGCGG
56	UAUCUUAUCAACACUUCCG	218	CGGAAGUGUUGAUAAGAUA
57	GGCCAAAAUUCGCAGUCCC	219	GGGACUGCGAAUUUUGGCC
58	UUCACCUCUGCCUAAUCAU	220	AUGAUUAGGCAGAGGUGAA
59	CUCAGUUUACUAGUGCCAU	221	AUGGCACUAGUAAACUGAG
60	UGUUGCCCGUUUGUCCUCU	222	AGAGGACAAACGGGCAACA
61	UAGUGCCAUUUGUUCAGUG	223	CACUGAACAAAUGGCACUA
62	AGGCUGUAGGCAUAAAUUG	224	CAAUUUAUGCCUACAGCCU
63	AUGUGUCUGCGGCGUUUUA	225	UAAAACGCCGCAGACACAU
63	AUGUGUCUGCGGCGUUUUA	226	TAAAACGCCGCAGACACAU
64	ACUUCGCUUCACCUCUGCA	227	UGCAGAGGUGAAGCGAAGU
65	CGUGUGCACUUCGCUUCAC	228	GUGAAGCGAAGUGCACACG
66	GUGGUGGACUUCUCUCAAU	229	AUUGAGAGAAGUCCACCAC
67	UGUGUCUGCGGCGUUUUAU	230	AUAAAACGCCGCAGACACA
68	AAGGUAUGUUGCCCGUUUG	231	CAAACGGGCAACAUACCUU
69	UCAACGACCGACCUUGAGG	232	CCUCAAGGUCGGUCGUUGA
70	CAUAAGAGGACUCUUGGAC	233	GUCCAAGAGUCCUCUUAUG
71	GUCAACGACCGACCUUGAG	234	CUCAAGGUCGGUCGUUGAC
72	AUAUUCUUGGGAACAAGAG	235	CUCUUGUUCCCAAGAAUAU
73	UGCUCGUGUUACAGGCGGG	236	CCCGCCUGUAACACGAGCA
74	CAAUCGCCGCGUCGCAGAA	237	UUCUGCGACGCGGCGAUUG
75	ACUGUUCAAGCCUCCAAGC	238	GCUUGGAGGCUUGAACAGU
76	CGCCGCGUCGCAGAAGAUC	239	GAUCUUCUGCGACGCGGCG

图 4(续)

77	CAUUUGUUCAGUGGUUCGU	240	ACGAACCACUGAACAAAUG
78	CGCUGAAUCCCGCGGACGA	241	UCGUCCGCGGGAUUCAGCG
79	UGGGUCACCAUAUUCUUGG	242	CCAAGAAUAUGGUGACCCA
80	UCCUCUGCCGAUCCAUACU	243	AGUAUGGAUCGGCAGAGGA
81	AUGUCAACGACCGACCUUG	244	CAAGGUCGGUCGUUGACAU
82	CCUCUGCCUAAUCAUCUCA	245	UGAGAUGAUUAGGCAGAGG
83	ACCGUGUGCACUUCGCUUC	246	GAAGCGAAGUGCACACGGU
84	UGCCGAUCCAUACUGCGGA	247	UCCGCAGUAUGGAUCGGCA
85	CAGAGUCUAGACUCGUGGU	248	ACCACGAGUCUAGACUCUG
86	CUGUUCAAGCCUCCAAGCU	249	AGCUUGGAGGCUUGAACAG
87	GGAGGCUGUAGGCAUAAAU	250	AUUUAUGCCUACAGCCUCC
88	AGGAGGCUGUAGGCAUAAA	251	UUUAUGCCUACAGCCUCCU
89	GGUGGACUUCUCUCAAUUU	252	AAAUUGAGAGAAGUCCACC
90	GCAACUUUUUCACCUCUGC	253	GCAGAGGUGAAAAAGUUGC
91	CUGCUCGUGUUACAGGCGA	254	TCGCCUGUAACACGAGCAG
92	CUAGUGCCAUUUGUUCAGU	255	ACUGAACAAAUGGCACUAG
93	CUGCCGAUCCAUACUGCGG	256	CCGCAGUAUGGAUCGGCAG
94	GUGUGCACUUCGCUUCACC	257	GGUGAAGCGAAGUGCACAC
95	GCUCGUGUUACAGGCGGGC	258	GCCCGCCUGUAACACGAGC
96	CCUAUCUUAUCAACACUUC	259	GAAGUGUUGAUAAGAUAGG
97	UCUCAAUCGCCGCGUCGCA	260	UGCGACGCGGCGAUUGAGA
98	GCCCGUCUGUGCCUUCUCA	261	UGAGAAGGCACAGACGGGC
99	CUAUCUUAUCAACACUUCC	262	GGAAGUGUUGAUAAGAUAG
100	AUGUUGCCCGUUUGUCCUC	263	GAGGACAAACGGGCAACAU
101	GUAUGUUGCCCGUUUGUCC	264	GGACAAACGGGCAACAUAC
102	CUUCGCUUCACCUCUGCAC	265	GUGCAGAGGUGAAGCGAAG
103	UGUGCACUUCGCUUCACCU	266	AGGUGAAGCGAAGUGCACA
104	GCCAAAAUUCGCAGUCCCG	267	CGGGACUGCGAAUUUUGGC
105	CCUGCUCGUGUUACAGGCG	268	CGCCUGUAACACGAGCAGG
106	UGGAGUGUGGAUUCGCACU	269	AGUGCGAAUCCACACUCCA
107	AACGACCGACCUUGAGGCA	270	UGCCUCAAGGUCGGUCGUU
108	ACAGAGUCUAGACUCGUGG	271	CCACGAGUCUAGACUCUGU
109	AAUCGCCGCGUCGCAGAAG	272	CUUCUGCGACGCGGCGAUU
110	GGUAUGUUGCCCGUUUGUC	273	GACAAACGGGCAACAUACC
111	GCCGAUCCAUACUGCGGAA	274	UUCCGCAGUAUGGAUCGGC
112	GCCCUAUCUUAUCAACACU	275	AGUGUUGAUAAGAUAGGGC
113	AGUUUACUAGUGCCAUUUG	276	CAAAUGGCACUAGUAAACU
114	UGUCAACGACCGACCUUGA	277	UCAAGGUCGGUCGUUGACA
115	ACUUCUCUCAAUUUUCUAG	278	CUAGAAAAUUGAGAGAAGU
116	GCGCGGGACGUCCUUUGUC	279	GACAAAGGACGUCCCGCGC
117	UCUAGACUCGUGGUGGACU	280	AGUCCACCACGAGUCUAGA
118	GAUCCAUACUGCGGAACUC	281	GAGUUCCGCAGUAUGGAUC
119	CUCUGCCGAUCCAUACUGC	282	GCAGUAUGGAUCGGCAGAG

图 4(续)

120	UCUGCCGAUCCAUACUGCG	283	CGCAGUAUGGAUCGGCAGA
121	CCUCUGCCGAUCCAUACUG	284	CAGUAUGGAUCGGCAGAGG
122	GCACCUCUCUUUACGCGGU	285	ACCGCGUAAAGAGAGGUGC
123	AAGAACUCCCUCGCCUCGC	286	GCGAGGCGAGGGAGUUCUU
124	GAACUCCCUCGCCUCGCAG	287	CUGCGAGGCGAGGGAGUUC
125	UCUCUCAAUUUUCUAGGGC	288	GCCCUAGAAAAUUGAGAGA
126	GGGCGCACCUCUCUUUACG	289	CGUAAAGAGAGGUGCGCCC
127	CCGAUCCAUACUGCGGAAC	290	GUUCCGCAGUAUGGAUCGG
128	AACUCCCUCGCCUCGCAGA	291	UCUGCGAGGCGAGGGAGUU
129	CUCCUCUGCCGAUCCAUAC	292	GUAUGGAUCGGCAGAGGAG
130	GGAGUGUGGAUUCGCACUC	293	GAGUGCGAAUCCACACUCC
131	CGGGCGCACCUCUCUUUAC	294	GUAAAGAGAGGUGCGCCCG
132	GUCUCAAUCGCCGCGUCGC	295	GCGACGCGGCGAUUGAGAC
133	AUCCAUACUGCGGAACUCC	296	GGAGUUCCGCAGUAUGGAU
134	CGCACCUCUCUUUACGCGG	297	CCGCGUAAAGAGAGGUGCG
135	CAACGACCGACCUUGAGGC	298	GCCUCAAGGUCGGUCGUUG
136	CCAUACUGCGGAACUCCUA	299	UAGGAGUUCCGCAGUAUGG
137	UGAAUCCCGCGGACGACCC	300	GGGUCGUCCGCGGGAUUCA
138	AGAACUCCCUCGCCUCGCA	301	UGCGAGGCGAGGGAGUUCU
139	GGCGCACCUCUCUUUACGC	302	GCGUAAAGAGAGGUGCGCC
140	GCGCACCUCUCUUUACGCG	303	CGCGUAAAGAGAGGUGCGC
141	GCUGAAUCCCGCGGACGAC	304	GUCGUCCGCGGGAUUCAGC
142	CACUUCGCUUCACCUCUGC	305	GCAGAGGUGAAGCGAAGUG
143	CUCAAUCGCCGCGUCGCAG	306	CUGCGACGCGGCGAUUGAG
144	UCCCGUCGGCGCUGAAUCC	307	GGAUUCAGCGCCGACGGGA
145	CUGAAUCCCGCGGACGACC	308	GGUCGUCCGCGGGAUUCAG
146	AGAGUCUAGACUCGUGGUG	309	CACCACGAGUCUAGACUCU
147	UCCAUACUGCGGAACUCCU	310	AGGAGUUCCGCAGUAUGGA
148	GCGCUGAAUCCCGCGGACG	311	CGUCCGCGGGAUUCAGCGC
149	AGUGUGGAUUCGCACUCCU	312	AGGAGUGCGAAUCCACACU
150	CCCUGCUCGUGUUACAGGC	313	GCCUGUAACACGAGCAGGG
151	GAAUCCCGCGGACGACCCG	314	CGGGUCGUCCGCGGGAUUC
152	AAGCUGUGCCUUGGGUGGC	315	GCCACCCAAGGCACAGCUU
153	GCCCUGCUCGUGUUACAGG	316	CCUGUAACACGAGCAGGGC
154	GUCCCGUCGGCGCUGAAUC	317	GAUUCAGCGCCGACGGGAC
155	AUCUUAUCAACACUUCCGG	318	CCGGAAGUGUUGAUAAGAU
156	CUUAUCAACACUUCCGGAA	319	UUCCGGAAGUGUUGAUAAG
156	CUUAUCAACACUUCCGGAA	320	TUCCGGAAGUGUUGAUAAG

图 4(续)

表 3. 来自 US20130005793 的靶向 HBV 基因的 dsRNA 的修饰的序列

SEQ ID NO	有义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO	反义链序列 (5'-3')
321	csAGGuAuGuuGcccGuuudTsdT	485	AAACGGGcAACAuACCUUGdTsdT
322	CfuGfuAfgGfcAfuAfaAfuUfgGfuAf(invdT)	486	pdTAfcCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgdTsdT
323	uccuGcGGcGuuuuAucAuAdTsdT	487	uAUGAuAAAACGCCGcAGAdTsdT
324	UfcUfgCfgGfcGfuUfuUfaUfcAfuAf(invdT)	488	pdTAfuGfaUfaAfaAfcGfcCfgCfaGfadTsdT
325	accucuGcccuAAucAucucdTsdT	489	GAGAUGAUuAGGcAGAGGUdTsdT
326	UfuUfaCfuAfgUfgCfcAfuUfuGfuAf(invdT)	490	pdTAfcAfaAfuGfgCfaCfuAfgUfaAfadTsdT
327	AfcCfuCfuGfcCfuAfaUfcAfuCfuAf(invdT)	491	pdTAfgAfuGfaUfuAfgGfcAfgAfgGfudTsdT
328	csGuAGGcAuAAAuuGGucdTsdT	492	GACcAAUUuAUGCCuAcAGdTsdT
329	ugucuGcGGcGuuuuAucAdTsdT	493	UGAuAAAACGCCGcAGAcAdTsdT
330	UfgUfcUfgCfgGfcGfuUfuUfaUfcAf(invdT)	494	pdTGfaUfaAfaAfcGfcCfgCfaGfaCfadTsdT
331	uacuAGuGccAuuuGuucAdTsdT	495	UGAAcAAAUGGcACuAGuAdTsdT
332	UfaCfuAfgUfgCfcAfuUfuGfuUfcAf(invdT)	496	pdTGfaAfcAfaAfuGfgCfaCfuAfgUfadTsdT
333	CfaAfcUfuUfuUfcAfcCfuCfaGfcAf(invdT)	497	pdTGfcAfgAfgGfuGfaAfaAfaGfuUfgdTsdT
334	ccAuuuGuucAGuGGuucGdTsdT	498	CGAACcACUGAAcAAAUGGdTsdT
335	ccAAGuGuuuGccGAcGcAdTsdT	499	UGCGUcAGcAAAcACUUGGdTsdT
336	CfcAfaGfuGfuUfuGfcUfgAfcGfcAf(invdT)	500	pdTGfcGfuCfaGfcAfaAfcAfcUfuGfgdTsdT
337	CfcAfuUfuGfuUfcAfgUfgGfuUfcAf(invdT)	501	pdTGfaAfcCfaCfuGfaAfcAfaAfuGfgdTsdT
338	uuuAcuAGuGccAuuuGuudTsdT	502	AAcAAAUGGcACuAGuAAAdTsdT
339	CfaCfcUfcUfgCfcUfaAfuCfaUfcAf(invdT)	503	pdTGfaUfgAfuUfaGfgCfaGfaGfgUfgdTsdT
340	csGGcucAGuuuAcuAGuGdTsdT	504	cACuAGuAAACUGAGCcAGdTsdT
341	CfaAfgGfuAfuGfuUfgCfcCfgUfuAf(invdT)	505	pdTAfaCfgGfgCfaAfcAfuAfcCfuUfgdTsdT
342	CfuGfgCfuCfaGfuUfuAfcUfaGfuAf(invdT)	506	pdTAfcUfaGfuAfaAfcUfgAfgCfcAfgdTsdT
343	gaGGcuGuAGGcAuAAAuuuTsdT	507	AAUUuAUGCCuAcAGCCUCdTsdT
344	csGuuuAcuAGuGccAuuudTsdT	508	AAAUGGcACuAGuAAACUGdTsdT

图 5

345	agGuAuGuuGccGuuuGudTsdT	509	AcAAACGGGcAAcAuACCUdTsdT
346	UfaUfgUfuGfcCfcGfuUfuGfuCfcAf(invdT)	510	pdTGfgAfcAfaAfcGfgGfcAfaCfaUfadTsdT
347	GfaGfgCfuGfuAfgGfcAfuAfaAfuAf(invdT)	511	pdTAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfcUfcdTsdT
348	gucuGcGGcGuuuuAucAudTsdT	512	AUGAuAAAACGCCGcAGACdTsdT
349	caAcuuuuucAccucuGccdTsdT	513	GGcAGAGGUGAAAAAGUUGdTsdT
350	ccGuGuGcAcuucGcuucAdTsdT	514	UGAAGCGAAGUGcAcACGGdTsdT
351	CfcGfuGfuGfcAfcUfuCfgCfuUfcAf(invdT)	515	pdTGfaAfgCfgAfaGfuGfcAfcAfcGfgdTsdT
352	UfcAfaGfgUfaUfgUfuGfcCfcGfuAf(invdT)	516	pdTAfcGfgGfcAfaCfaUfaCfcUfuGfadTsdT
353	CfaGfuUfuAfcUfaGfuGfcCfaUfuAf(invdT)	517	pdTAfaUfgGfcAfcUfaGfuAfaAfcUfgdTsdT
354	ugGuGGAcuucucucAAuudTsdT	518	AAUUGAGAGAAGUCcACcAdTsdT
355	AfgGfuAfuGfuUfgCfcCfgUfuUfgAf(invdT)	519	pdTCfaAfaCfgGfgCfaAfcAfuAfcCfudTsdT
356	cuGcucGuGuuAcAGGcGGdTsdT	520	CCGCCUGuAAcACGAGcAGdTsdT
357	uauGuuGcccGuuuGuccudTsdT	521	AGGAcAAACGGGcAAcAuAdTsdT
358	ucAAGGuAuGuuGcccGuudTsdT	522	AACGGGcAAcAuACCUUGAdTsdT
359	ucuuAucAAcAcuuccGGAdTsdT	523	UCCGGAAGUGUUGAuAAGAdTsdT
360	UfcUfuAfuCfaAfcAfcUfuCfcGfgAf(invdT)	524	pdTCfcGfgAfaGfuGfuUfgAfuAfaGfadTsdT
361	caccucuGccuAAucAucudTsdT	525	AGAUGAUuAGGcAGAGGUGdTsdT
362	auAAGAGGAcucuuGGAcudTsdT	526	AGUCcAAGAGUCCUCUuAUdTsdT
363	GfuCfuGfcGfgCfgUfuUfuAfuCfaAf(invdT)	527	pdTUfgAfuAfaAfaCfgCfcGfcAfgAfcdTsdT
364	ggcGcuGAAucccGcGGAcdTsdT	528	GUCCGCGGGAUUcAGCGCCdTsdT
365	cgcGucGcAGAAGAucucAdTsdT	529	UGAGAUCUUCUGCGACGCGdTsdT
366	aauGucAAcGAccGAccuudTsdT	530	AAGGUCGGUCGUUGAcAUUdTsdT
367	gcucAGuuuAcuAGuGccAdTsdT	531	UGGcACuAGuAAACUGAGCdTsdT
368	UfgGfuGfgAfcUfuCfuCfuCfaAfuAf(invdT)	532	pdTAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfadTsdT
369	aucGccGcGucGcAGAAGAdTsdT	533	UCUUCUGCGACGCGGCGAUdTsdT
370	gccAuuuGuucAGuGGuucdTsdT	534	GAACcACUGAACAAAUGGCdTsdT
371	cgAuccAuAcuGcGGAAcudTsdT	535	AGUUCCGcAGuAUGGAUCGdTsdT
372	ucAccucuGccuAAucAucdTsdT	536	GAUGAUuAGGcAGAGGUGAdTsdT
373	guGGAcuucucucAAuuuudTsdT	537	AAAAUUGAGAGAAGUCcACdTsdT
374	ggGucAccAuAuucuuGGGdTsdT	538	CCcAAGAAuAUGGUGACCCdTsdT
375	gccGcGucGcAGAAGAucudTsdT	539	AGAUCUUCUGCGACGCGGCdTsdT
376	ucAAucGccGcGucGcAGAdTsdT	540	UCUGCGACGCGGCGAUUGAdTsdT

图 5(续)

377	ugGAuGuGucuGcGGcGuudTsdT	541	AACGCCGcAGAcAcAUCcAdTsdT
378	uacuGuucAAGccuccAAGdTsdT	542	CUUGGAGGCUUGAAcAGuAdTsdT
379	guuuAcuAGuGccAuuuGudTsdT	543	AcAAAUGGcACuAGuAAACdTsdT
380	acuAGuGccAuuuGuucAGdTsdT	544	CUGAAcAAAUGGcACuAGUdTsdT
381	ccGcGucGcAGAAGAucucdTsdT	545	GAGAUCUUCUGCGACGCGGdTsdT
382	uaucuuAucAAcAcuuccGdTsdT	546	CGGAAGUGUUGAuAAGAuAdTsdT
383	ggccAAAAuuuGcAGucccdTsdT	547	GGGACUGCGAAUUUUGGCCdTsdT
384	uucAccucuGccuAAucAudTsdT	548	AUGAUuAGGcAGAGGUGAAdTsdT
385	cucAGuuuAcuAGuGccAudTsdT	549	AUGGcACuAGuAAACUGAGdTsdT
386	uguuGcccGuuuGucccucudTsdT	550	AGAGGAcAAACGGGcAAcAdTsdT
387	uaGuGccAuuuGuucAGuGdTsdT	551	cACUGAAcAAAUGGcACuAdTsdT
388	agGcuGuAGGcAuAAAuuGdTsdT	552	cAAUUuAUGCCuAcAGCCUdTsdT
389	auGuGucuGcGGcGuuuuAdTsdT	553	uAAAACGCCGcAGAcAcAUdTsdT
390	AfuGfuGfuCfuGfcGfgCfgUfuUfuAf(invdT)	554	pdTAfaAfaCfgCfcGfcAfgAfcAfcAfudTsdT
391	acuucGcuucAccucuGcAdTsdT	555	UGcAGAGGUGAAGCGAAGUdTsdT
392	cguGuGcAcuucGcuucAcdTsdT	556	GUGAAGCGAAGUGcAcACGdTsdT
393	guGGuGGAcuucucucAAudTsdT	557	AUUGAGAGAAGUCcACcACdTsdT
394	uguGucuGcGGcGuuuuAudTsdT	558	AuAAAACGCCGcAGAcAcAdTsdT
395	aaGGuAuGuuGcccGuuuGdTsdT	559	cAAACGGGcAAcAuACCUUdTsdT
396	ucAAcGAccGAccuuGAGGdTsdT	560	CCUcAAGGUCGGUCGUUGAdTsdT
397	cauAAGAGGAcucuuGGAcdTsdT	561	GUCcAAGAGUCCUCUuAUGdTsdT
398	gucAAcGAccGAccuuGAGdTsdT	562	CUcAAGGUCGGUCGUUGACdTsdT
399	auAuucuuGGGAAcAAGAGdTsdT	563	CUCUUGUUCCcAAGAAuAUdTsdT
400	ugcucGuGuuAcAGGcGGGdTsdT	564	CCCGCCUGuAAcACGAGcAdTsdT
401	caAucGccGcGucGcAGAAdTsdT	565	UUCUGCGACGCGGCGAUUGdTsdT
402	acuGuucAAGccuccAAGcdTsdT	566	GCUUGGAGGCUUGAAcAGUdTsdT
403	cgccGcGucGcAGAAGAucdTsdT	567	GAUCUUCUGCGACGCGGCGdTsdT
404	cauuuGuucAGuGGuucGudTsdT	568	ACGAACcACUGAAcAAAUGdTsdT
405	cgcuGAAucccGcGGAcGAdTsdT	569	UCGUCCGCGGGAUUcAGCGdTsdT
406	ugGGucAccAuAuucuuGGdTsdT	570	CcAAGAAuAUGGUGACCcAdTsdT
407	uccucuGccGAuccAuAcudTsdT	571	AGuAUGGAUCGGcAGAGGAdTsdT
408	auGucAAcGAccGAccuuGdTsdT	572	cAAGGUCGGUCGUUGAcAUdTsdT

图 5(续)

409	ccucuGccuAAucAucucAdTsdT	573	UGAGAUGAUuAGGcAGAGGdTsdT
410	accGuGuGcAcuucGcuucdTsdT	574	GAAGCGAAGUGcAcACGGUdTsdT
411	ugccGAuccAuAcuGcGGAdTsdT	575	UCCGcAGuAUGGAUCGGcAdTsdT
412	caGAGucuAGAcucGuGGudTsdT	576	ACcACGAGUCuAGACUCUGdTsdT
413	cuGuucAAGccucAAGcudTsdT	577	AGCUUGGAGGCUUGAAcAGdTsdT
414	ggAGGcuGuAGGcAuAAAudTsdT	578	AUUuAUGCCuAcAGCCUCCdTsdT
415	agGAGGcuGuAGGcAuAAAdTsdT	579	UUuAUGCCuAcAGCCUCCUdTsdT
416	gguGGAcuucucucAAuuudTsdT	580	AAAUUGAGAGAAGUCcACCdTsdT
417	gcAAcuauuucAccucuGcdTsdT	581	GcAGAGGUGAAAAAGUUGCdTsdT
418	CfuGfcUfcGfuGfuUfaCfaGfgCfgAf(invdT)	582	pdTCfgCfcUfgUfaAfcAfcGfaGfcAfgdTsdT
419	cuAGuGccAuuuGuucAGudTsdT	583	ACUGAACAAAUGGcACuAGdTsdT
420	cuGccGAuccAuAcuGcGGdTsdT	584	CCGcAGuAUGGAUCGGcAGdTsdT
421	guGuGcAcuucGcuucAccdTsdT	585	GGUGAAGCGAAGUGcAcACdTsdT
422	gcucGuGuuAcAGGcGGGcdTsdT	586	GCCCGCCUGuAAcACGAGCdTsdT
423	ccuAucuuAucAAcAcuucdTsdT	587	GAAGUGUUGAuAAGAuAGGdTsdT
424	ucucAAucGccGcGucGcAdTsdT	588	UGCGACGCGGCGAUUGAGAdTsdT
425	gcccGucuGuGccuucucAdTsdT	589	UGAGAAGGcAcAGACGGGCdTsdT
426	cuAucuuAucAAcAcuucdTsdT	590	GGAAGUGUUGAuAAGAuAGdTsdT
427	auGuuGcccGuuuGuccucdTsdT	591	GAGGAcAAACGGGcAAcAUdTsdT
428	guAuGuuGcccGuuuGuccdTsdT	592	GGAcAAACGGGcAAcAuACdTsdT
429	cuucGcuucAccucuGcAcdTsdT	593	GUGcAGAGGUGAAGCGAAGdTsdT
430	uguGcAcuucGcuucAccudTsdT	594	AGGUGAAGCGAAGUGcAcAdTsdT
431	gccAAAAuucGcAGcccGdTsdT	595	CGGGACUGCGAAUUUUGGCdTsdT
432	ccuGcucGuGuuAcAGGcGdTsdT	596	CGCCUGuAAcACGAGcAGGdTsdT
433	ugGAGuGuGGAuucGcAcudTsdT	597	AGUGCGAAUCcAcACUCcAdTsdT
434	aacGAccGAccuuGAGGcAdTsdT	598	UGCCUcAAGGUCGGUCGUUdTsdT
435	acAGAGucuAGAcucGuGGdTsdT	599	CcACGAGUCuAGACUCUGUdTsdT
436	aaucGccGcGucGcAGAAGdTsdT	600	CUUCUGCGACGCGGCGAUUdTsdT
437	gguAuGuuGcccGuuuGucdTsdT	601	GAcAAACGGGcAAcAuACCdTsdT
438	gccGAuccAuAcuGcGGAAdTsdT	602	UUCCGcAGuAUGGAUCGGCdTsdT
439	gcccuAucuuAucAAcAcudTsdT	603	AGUGUUGAuAAGAuAGGGCdTsdT
440	agguuuAcuAGuGccAuuuGdTsdT	604	cAAAUGGcACuAGuAAACUdTsdT

图 5(续)

441	ugucAAcGAccGAccuuGAdTsdT	605	UcAAGGUCGGUCGUUGAcAdTsdT
442	acuucucucAAuuuucuAGdTsdT	606	CuAGAAAAUUGAGAGAAGUdTsdT
443	gcGcGGGAcGuccuuuGucdTsdT	607	GAcAAAGGACGUCCCGCGCdTsdT
444	ucuAGAcucGuGGuGGAcudTsdT	608	AGUCcACcACGAGUCuAGAdTsdT
445	gauccAuAcuGcGGAAcucdTsdT	609	GAGUUCCGcAGuAUGGAUCdTsdT
446	cucuGccGAuccAuAcuGcdTsdT	610	GcAGuAUGGAUCGGcAGAGdTsdT
447	ucuGccGAuccAuAcuGcGdTsdT	611	CGcAGuAUGGAUCGGcAGAdTsdT
448	ccucuGccGAuccAuAcuGdTsdT	612	cAGuAUGGAUCGGcAGAGGdTsdT
449	gcAccuucuuuAcGcGGudTsdT	613	ACCGCGuAAAGAGAGGUGCdTsdT
450	gaGAAcucccucGccucGcdTsdT	614	GCGAGGCGAGGGAGUUCUUdTsdT
451	gaAcucccucGccucGcAGdTsdT	615	CUGCGAGGCGAGGGAGUUCdTsdT
452	ucucucAAuuuucuAGGGcdTsdT	616	GCCCuAGAAAAUUGAGAGAdTsdT
453	ggGcGcAccucucuuuAcGdTsdT	617	CGuAAAGAGAGGUGCGCCCdTsdT
454	ccGAuccAuAcuGcGGAAcdTsdT	618	GUUCCGcAGuAUGGAUCGGdTsdT
455	aacucccucGccucGcAGAdTsdT	619	UCUGCGAGGCGAGGGAGUUdTsdT
456	cucucuGccGAuccAuAcdTsdT	620	GuAUGGAUCGGcAGAGGAGdTsdT
457	ggAGuGuGGAuucGcAcucdTsdT	621	GAGUGCGAAUCcAcACUCCdTsdT
458	cgGGcGcAccucucuuuAccdTsdT	622	GuAAAGAGAGGUGCGCCCGdTsdT
459	gucucAAucGccGcGucGcdTsdT	623	GCGACGCGGCGAUUGAGACdTsdT
460	auccAuAcuGcGGAAcuccdTsdT	624	GGAGUUCCGcAGuAUGGAUdTsdT
461	cgcAccucucuuuAcGcGGdTsdT	625	CCGCGuAAAGAGAGGUGCGdTsdT
462	caAcGAccGAccuuGAGGcdTsdT	626	GCCUcAAGGUCGGUCGUUGdTsdT
463	ccAuAcuGcGGAAcuccuAdTsdT	627	uAGGAGUUCCGcAGuAUGGdTsdT
464	ugAAucccGcGGAcGAcccdTsdT	628	GGGUCGUCCGCGGGAUUcAdTsdT
465	agAAcucccucGccucGcAdTsdT	629	UGCGAGGCGAGGGAGUUCUdTsdT
466	ggcGcAccucucuuuAcGcdTsdT	630	GCGuAAAGAGAGGUGCGCCdTsdT
467	gcGcAccucucuuuAcGcGdTsdT	631	CGCGuAAAGAGAGGUGCGCdTsdT
468	gcuGAAucccGcGGAcGAcdTsdT	632	GUCGUCCGCGGGAUUcAGCdTsdT
469	cacuuCGcuucAccucuGcdTsdT	633	GcAGAGGUGAAGCGAAGUGdTsdT
470	cucAAucGccGcGucGcACdTsdT	634	CUGCGACGCGGCGAUUGAGdTsdT
471	ucccGucGGcGcuGAAuccdTsdT	635	GGAUUcAGCGCCGACGGGAdTsdT
472	cuGAAucccGcGGAcGAccdTsdT	636	GGUCGUCCGCGGGAUUcAGdTsdT

473	agAGucuAGAcucGuGGuGdTsdT	637	cACcACGAGUCuAGACUCUdTsdT
474	uccAuAcuGcGGAAcuccudTsdT	638	AGGAGUUCCGcAGuAUGGAdTsdT
475	gcGcuGAAucccGcGGAcGdTsdT	639	CGUCCGCGGGAUUcAGCGCdTsdT
476	aguGuGGAuucGcAcuccudTsdT	640	AGGAGUGCGAAUCcAcACUdTsdT
477	cccuGcucGuGuuAcAGGcdTsdT	641	GCCUGuAAcACGAGcAGGGdTsdT
478	gaAucccGcGGAcGAcccGdTsdT	642	CGGGUCGUCCGCGGGAUUCdTsdT
479	agGcuGuGcccuGGuGGccTsdT	643	GCcACCcAAGGcAcAGCUUdTsdT
480	gcccuGcucGuGuuAcAGGdTsdT	644	CCUGuAAcACGAGcAGGGCdTsdT
481	gucccGucGGcGcuGAAucdTsdT	645	GAUUcAGCGCCGACGGGACdTsdT
482	aucuuAucAAcAcuucccGGdTsdT	646	CCGGAAGUGUUGAuAAGAUdTsdT
483	cuuAucAAcAcuucccGGAAdTsdT	647	UUCCGGAAGUGUUGAuAAGdTsdT

图 5(续)

表 4. 来自 US20130005793 的靶向 HBV 基因的 dsRNA 的核心序列及其修饰的对应物

核心序列				修饰的序列			
SEQ ID No.	有义链序列 (5'-3')	SEQ ID No.	反义链序列 (5'-3')	SEQ ID No.	有义链序列 (5'-3')	SEQ ID No.	反义链序列 (5'-3')
1	CAAGGUAUGUUGCCCGUUU	157	AAACGGGCAACAUACCUUG	321	csAGGuAuGuuGcccGuuudTsdT	485	AAACGGGcAAcAuACCUUGdTsdT
2	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	158	TACCAAUUUAUGCCUACAG	322	CfuGfuAfgGfcAfuAfaAfuUfgGfuAf(invdT)	486	pdTAfcCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgdTsdT
3	UCUGCGGCGUUUUAUCAUA	159	UAUGAUAAAACGCCGCAGA	323	ucuGcGGcGuuuuAucAuAdTsdT	487	uAUGAuAAAACGCCGcAGAdTsdT
3	UCUGCGGCGUUUUAUCAUA	160	TAUGAUAAAACGCCGCAGA	324	UfcUfgCfgGfcGfuUfuUfaUfcAfuAf(invdT)	488	pdTAfuGfaUfaAfaAfcGfcCfgCfaGfadTsdT
4	ACCUCUGCCUAAUCAUCUC	161	GAGAUGAUUAGGCAGAGGU	325	accucuGccuAAucAucucdTsdT	489	GAGAUGAUuAGGcAGAGGUdTsdT
5	UUUACUAGUGCCAUUUGUA	162	TACAAAUGGCACUAGUAAA	326	UfuUfaCfuAfgUfgCfcAfuUfuGfuAf(invdT)	490	pdTAfcAfaAfuGfgCfaCfuAfgUfaAfadTsdT
6	ACCUCUGCCUAAUCAUCUA	163	TAGAUGAUUAGGCAGAGGU	327	AfcCfuCfuGfcCfuAfaUfcAfuCfuAf(invdT)	491	pdTAfgAfuGfaUfuAfgGfcAfgAfgGfudTsdT
7	CUGUAGGCAUAAAUUGGUC	164	GACCAAUUUAUGCCUACAG	328	cuGuAGGcAuAAAuuGGucdTsdT	492	GACcAAUUuAUGCCuAcAGdTsdT
8	UGUCUGCGGCGUUUUAUCA	165	UGAUAAAACGCCGCAGACA	329	ugucuGcGGcGuuuuAucAdTsdT	493	UGAuAAAACGCCGcAGAcAdTsdT
8	UGUCUGCGGCGUUUUAUCA	166	TGAUAAAACGCCGCAGACA	330	UfgUfcUfgCfgGfcGfuUfuUfaUfcAf(invdT)	494	pdTGfaUfaAfaAfcGfcCfgCfaGfaCfadTsdT
9	UACUAGUGCCAUUUGUUCA	167	UGAACAAAUGGCACUAGUA	331	uacuAGuGccAuuuGuucAdTsdT	495	UGAAcAAAUGGcACuAGuAdTsdT
9	UACUAGUGCCAUUUGUUCA	168	TGAACAAAUGGCACUAGUA	332	UfaCfuAfgUfgCfcAfuUfuGfuUfcAf(invdT)	496	pdTGfaAfcAfaAfuGfgCfaCfuAfgUfadTsdT
10	CAACUUUUUCACCUCUGCA	169	TGCAGAGGUGAAAAAGUUG	333	CfaAfcUfuUfuUfcAfcCfuCfuGfcAf(invdT)	497	pdTGfcAfgAfgGfuGfaAfaAfaGfuUfgdTsdT

图 6

11	CCAUUUGUUCAGUGGU UCG	170	CGAACCACUGAACAAAUGG	334	ccAuuuGuucAGuGGuuuCG dTsdT	498	CGAACcACUGAAcAAAUGGd TsdT
12	CCAAGUGUUUGCUGAC GCA	171	UGCGUCAGCAAACACUUGG	335	scAAGuGuuuGcuGAcGc AdTsdT	499	UGCGUcAGcAAAcACUUGGd TsdT
12	CCAAGUGUUUGCUGAC GCA	172	TGCGUCAGCAAACACUUGG	336	CfcAfaGfuGfuUfuGfcUfg AfcGfcAf(invdT)	500	pdTGfcGfuCfaGfcAfaAfcAfc UfuGfgdTsdT
13	CCAUUUGUUCAGUGGU UCA	173	TGAACCACUGAACAAAUGG	337	CfcAfuUfuGfuUfcAfgUfg GfuUfcAf(invdT)	501	pdTGfaAfcCfaCfuGfaAfcAfa AfuGfgdTsdT
14	UUUACUAGUGCCAUUU GUU	174	AACAAAUGGCACUAGUAAA	338	uuuAcuAGuGccAuuuGuu dTsdT	502	AAcAAAUGGcACuAGuAAAd TsdT
15	CACCUCUGCCUAAUCAU CA	175	TGAUGAUUAGGCAGAGGU G	339	CfaCfcUfcUfgCfcUfaAfuC faUfcAf(invdT)	503	pdTGfaUfgAfuUfaGfgCfaGfa GfgUfgdTsdT
16	CUGGCUCAGUUUACUA GUG	176	CACUAGUAAACUGAGCCAG	340	cuGGcucAGuuuAcuAGu GdTsdT	504	cACuAGuAAACUGAGCcAGd TsdT
17	CAAGGUAUGUUGCCCG UUA	177	TAACGGGCAACAUACCUUG	341	CfaAfgGfuAfuGfuUfgCfc CfgUfuAf(invdT)	505	pdTAfaCfgGfgCfaAfcAfuAfcC fuUfgdTsdT
18	CUGGCUCAGUUUACUA GUA	178	TACUAGUAAACUGAGCCAG	342	CfuGfgCfuCfaGfuUfuAfc UfaGfuAf(invdT)	506	pdTAfcUfaGfuAfaAfcUfgAfg CfcAfgdTsdT
19	GAGGCUGUAGGCAUAA AUU	179	AAUUUAUGCCUACAGCCUC	343	gaGGcuGuAGGcAuAAAu udTsdT	507	AAUUuAUGCCuAcAGCCUCd TsdT
20	CAGUUUACUAGUGCCAU UU	180	AAAUGGCACUAGUAAACUG	344	caGuuuAcuAGuGccAuuu dTsdT	508	AAAUGGcACuAGuAAACUGd TsdT
21	AGGUAUGUUGCCCGUU UGU	181	ACAAACGGGCAACAUACCU	345	agGuAuGuuGcccGuuuGu dTsdT	509	AcAAACGGGcAAcAuACCUd TsdT
22	UAUGUUGCCCGUUUGU CCA	182	UGGACAAACGGGCAACAUA	346	UfaUfgUfuGfcCfcGfuUfu GfuCfcAf(invdT)	510	pdTGfgAfcAfaAfcGfgGfcAfa CfaUfadTsdT
23	GAGGCUGUAGGCAUAA AUA	183	TAUUUAUGCCUACAGCCUC	347	GfaGfgCfuGfuAfgGfcAfu AfaAfuAf(invdT)	511	pdTAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfg CfcUfcdTsdT
24	GUCUGCGGCGUUUUAU CAU	184	AUGAUAAAACGCCGCAGAC	348	gucuGcGGcGuuuuAucAu dTsdT	512	AUGAuAAAACGCCGcAGACd TsdT
25	CAACUUUUUCACCUCUG CC	185	GGCAGAGGUGAAAAAGUU G	349	caAcuuuuuuCAccucuGccd TsdT	513	GGcAGAGGUGAAAAAGUUGd TsdT

图 6(续)

26	CCGUGUGCACUUCGCUUCA	186	UGAAGCGAAGUGCACACGG	350	ccGuGuGcAcuucGcuucAdTsdT	514	UGAAGCGAAGUGcAcACGGdTsdT
26	CCGUGUGCACUUCGCUUCA	187	TGAAGCGAAGUGCACACGG	351	CfcGfuGfuGfcAfcUfuCfgCfuUfcAf(invdT)	515	pdTGfaAfgCfgAfaGfuGfcAfcAfcGfgdTsdT
27	UCAAGGUAUGUUGCCCGUA	188	TACGGGCAACAUACCUUGA	352	UfcAfaGfgUfa1fgUfuGfcCfcGfuAf(invdT)	516	pdTAfcGfgGfcAfaCfaUfaCfcUfuGfadTsdT
28	CAGUUUACUAGUGCCAUUA	189	TAAUGGCACUAGUAAACUG	353	CfaGfuUfuAfc1fa6fuGfcCfaUfuAf(invdT)	517	pdTAfaUfgGfcAfc1fa6fuAfaAfcUfgdTsdT
29	UGGUGGACUUC1CUCAAUU	190	AAUUGAGAGAAGUCCACCA	354	ugGuGGAcuucucucAAuudTsdT	518	AAUUGAGAGAAGUCcACCAdTsdT
30	AGGUAUGUUGCCCGUUGA	191	TCAAACGGGCAACAUACCU	355	AfgGfuAfuGfuUfgCfcC1gUfuUfgAf(invdT)	519	pdTCfaAfaCfgGfgCfaAfcAfuAfcCfudTsdT
31	CUGCUCGUGUUACAGGCGG	192	CCGCCUGUAACACGAGCAG	356	cuGcucGuGuuAcAGGcGGdTsdT	520	CCGCCUGuuAAcACGAGcAGdTsdT
32	UAUGGUGCCCGUUGUCCU	193	AGGACAAACGGGCAACAUA	357	uauGuuGcccGuuuGuccudTsdT	521	AGGAcAAACGGGcAAcAuAdTsdT
33	UCAAGGUAUGUUGCCCGUU	194	AACGGGCAACAUACCUUGA	358	ucAAGGuAuGuuGcccGuudTsdT	522	AACGGGcAAcAuACCUUGAdTsdT
34	UCUUAUCAACACUUCCGGA	195	UCCGGAAGUGUUGAUAAGA	359	ucuuAucAAcAcuuccGGAdTsdT	523	UCCGGAAGUGUUGAuAAGAdTsdT
34	UCUUAUCAACACUUCCGGA	196	TCCGGAAGUGUUGAUAAGA	360	UfcUfuAfuCfaAfcAfcUfuCfcGfgAf(invdT)	524	pdTCfcGfgAfaGfuGfuUfgAfuAfaGfadTsdT
35	CACCUCUGCCUAAUCAUCU	197	AGAUGAUUAGGCAGAGGUG	361	cscCucuGccuAAucAucudTsdT	525	AGAUGAUuAGGcAGAGGUGdTsdT
36	AUAAGAGGACUCUUGGACU	198	AGUCCAAGAGUCCUCUUAU	362	auAAGAGGAcucuuGGAcudTsdT	526	AGUCcAAGAGUCCUCUuAUdTsdT
37	GUCUGCGGCGUUUUAUCAA	199	TUGAUAAAACGCCGCAGAC	363	GfuCfuGfcGfgCfgUfuUfuAfuCfaAf(invdT)	527	pdTUfgAfuAfaAfaCfgCfcGfcAfgAfcdTsdT
38	GGCGCUGAAUCCCGCGGAC	200	GUCCGCGGGAUUCAGCGCC	364	ggcGcuGAAucccGcGGAcdTsdT	528	GUCCGCGGGAUUcAGCGCCdTsdT
39	CGCGUCGCAGAAGAUCUCA	201	UGAGAUCUUCUGCGACGCG	365	cgcGucGcAGAAGAucucAdTsdT	529	UGAGAUCUUCUGCGACGCGdTsdT

图 6(续)

40	AAUGUCAACGACCGACCUU	202	AAGGUCGGUCGUUGACAUU	366	aauGucAAcGAccGAccuudTsdT	530	AAGGUCGGUCGUUGAcAUUdTsdT
41	GCUCAGUUUACUAGUGCCA	203	UGGCACUAGUAAACUGAGC	367	gcucAGuuuAcuAGuGccAdTsdT	531	UGGcACuAGuAAACUGAGCdTsdT
42	UGGUGGACUUCUCUCAAUA	204	TAUUGAGAGAAGUCCACCA	368	UfgGfuGfgAfcUfuCfuCfuCfaAfuAf(invdT)	532	pdTAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfadTsdT
43	AUCGCCGCGUCGCAGAAGA	205	UCUUCUGCGACGCGGCGAU	369	aucGccGcGucGcAGAAGAdTsdT	533	UCUUCUGCGACGCGGCGAUdTsdT
44	GCCAUUUGUUCAGUGGUUC	206	GAACCACUGAACAAAUGGC	370	gccAuuuGuucAGuGGuucdTsdT	534	GAACcACUGAAcAAAUGGCdTsdT
45	CGAUCCAUACUGCGGAACU	207	AGUUCCGCAGUAUGGAUCG	371	cgAuccAuAcuGcGGAAcudTsdT	535	AGUUCCGcAGuAUGGAUCGdTsdT
46	UCACCUCUGCCUAAUCAUC	208	GAUGAUUAGGCAGAGGUGA	372	ucAccucuGccuAAucAucdTsdT	536	GAUGAUuAGGcAGAGGUGAdTsdT
47	GUGGACUUCUCUCAAUUUU	209	AAAAUUGAGAGAAGUCCAC	373	guGGAcuucucuucAAuuuudTsdT	537	AAAAUUGAGAGAAGUCcACdTsdT
48	GGGUCACCAUAUUCUUGGG	210	CCCAAGAAUAUGGUGACCC	374	ggGucAccAuAuucuuGGGdTsdT	538	CCcAAGAAuAUGGUGACCCdTsdT
49	GCCGCGUCGCAGAAGAUCU	211	AGAUCUUCUGCGACGCGGC	375	gccGcGucGcAGAAGAucudTsdT	539	AGAUCUUCUGCGACGCGGCdTsdT
50	UCAAUCGCCGCGUCGCAGA	212	UCUGCGACGCGGCGAUUGA	376	ucAAucGccGcGucGcAGAdTsdT	540	UCUGCGACGCGGCGAUUGAdTsdT
51	UGGAUGUGUCUGCGGCGUU	213	AACGCCGCAGACACAUCCA	377	ugGAuGuGucuGcGGcGuudTsdT	541	AACGCCGcAGAcAcAUCcAdTsdT
52	UACUGUUCAAGCCUCCAAG	214	CUUGGAGGCUUGAACAGUA	378	uacuGuucAAGccuccAAGdTsdT	542	CUUGGAGGCUUGAAcAGuAdTsdT
53	GUUUACUAGUGCCAUUUGU	215	ACAAAUGGCACUAGUAAAC	379	guuuAcuAGuGccAuuuGudTsdT	543	AcAAAUGGcACuAGuAAACdTsdT
54	ACUAGUGCCAUUUGUUCAG	216	CUGAACAAAUGGCACUAGU	380	acuAGuGccAuuuGuucAGdTsdT	544	CUGAAcAAAUGGcACuAGUdTsdT
55	CCGCGUCGCAGAAGAUCUC	217	GAGAUCUUCUGCGACGCGG	381	coGcGucGcAGAAGAucucdTsdT	545	GAGAUCUUCUGCGACGCGGdTsdT

图 6(续)

56	UAUCUUAUCAACACUUCCG	218	CGGAAGUGUUGAUAAGAUA	382	uauCuuAucAAcAcuucCgdTsdT	545	CGGAAGUGUUGAuAAGAuAdTsdT
57	GGCCAAAAUUCGCAGUCCC	219	GGGACUGCGAAUUUUGGCC	383	ggccAAAAuucGcAGucccdTsdT	547	GGGACUGCGAAUUUUGGCCdTsdT
58	UUCACCUCUGCCUAAUCAU	220	AUGAUUAGGCAGAGGUGAA	384	uucAccucuGccuAAucAudTsdT	548	AUGAUuAGGcAGAGGUGAAdTsdT
59	CUCAGUUUACUAGUGCCAU	221	AUGGCACUAGUAAACUGAG	385	cucAGuuuAcuAGuGccAudTsdT	549	AUGGcACuAGuAAACUGAGdTsdT
60	UGUUGCCCGUUUGUCCUCU	222	AGAGGACAAACGGGCAACA	386	uguuGcccGuuuGuccucudTsdT	550	AGAGGAcAAACGGGcAACAdTsdT
61	UAGUGCCAUUUGUUCAGUG	223	CACUGAACAAAUGGCACUA	387	uaGuGccAuuuGuucAGuGdTsdT	551	cACUGAAcAAAUGGcACuAdTsdT
62	AGGCUGUAGGCAUAAAUUG	224	CAAUUUAUGCCUACAGCCU	388	agGcuGuAGGcAuAAAuuGdTsdT	552	cAAUUuAUGCCuAcAGCCUdTsdT
63	AUGUGUCUGCGGCGUUUUA	225	UAAAACGCCGCAGACACAU	389	auGuGucuGcGGcGuuuuAdTsdT	553	uAAAACGCCGcAGAcACAUdTsdT
64	AUGUGUCUGCGGCGUUUUA	226	TAAAACGCCGCAGACACAU	390	AfuGfuGfuCfuGfcGfgCfgUfuUfuAfjmudT)	554	pdTAfaAfaCfgCfcGfcAfgAfcAfcAfuudTsdT
64	ACUUCGCUUCACCUCUGCA	227	UGCAGAGGUGAAGCGAAGU	391	acuucGcuucAccucuGcAdTsdT	555	UGcAGAGGUGAAGCGAAGUdTsdT
65	CGUGUGCACUUCGCUUCAC	228	GUGAAGCGAAGUGCACACG	392	cguGuGcAcuucGcuucAcdTsdT	556	GUGAAGCGAAGUGcAcACGdTsdT
66	GUGGUGGACUUCUCUCAAU	229	AUUGAGAGAAGUCCACCAC	393	guGGuGGAcuucucucAAudTsdT	557	AUUGAGAGAAGUCcACcACdTsdT
67	UGUGUCUGCGGCGUUUUAU	230	AUAAAACGCCGCAGACACA	394	uguGucuGcGGcGuuuuAudTsdT	558	AuAAAACGCCGcAGAcAcAdTsdT
68	AAGGUAUGUUGCCCGUUUG	231	CAAACGGGCAACAUACCUU	395	aaGGuAuGuuGcccGuuuGdTsdT	559	cAAACGGGcAAcAuACCUUdTsdT
69	UCAACGACCGACCUUGAGG	232	CCUCAAGGUCGGUCGUUGA	396	ucAAcGAccGAccuuGAGGdTsdT	560	CCUcAAGGUCGGUCGUUGAdTsdT
70	CAUAAGAGGACUCUUGGAG	233	GUCCAAGAGUCCUCUUAUG	397	cauAAGAgGAcucuuGGAcdTsdT	561	GUCcAAGAGUCCUCUuAUGdTsdT

图 6(续)

71	GUCAACGACCGACCUUG AG	234	CUCAAGGUCGGUCGUUGAC	398	guAAcGAccGAccuuGAG dTsdT	562	CUcAAGGUCGGUCGUUGAC dTsdT
72	AUAUUCUUGGGAACAA GAG	235	CUCUUGUUCCCAAGAAUAU	399	auAuucuuGGGAAcAAGA GdTsdT	563	CUCUUGUUCCcAAGAAuAU dTsdT
73	UGCUCGUGUUACAGGC GGG	236	CCCGCCUGUAACACGAGCA	400	ugcuCGuGuuAcAGGcGG GdTsdT	564	CCCGCCUGuAAcACGAGcAd TsdT
74	CAAUCGCCGCGUCGCAG AA	237	UUCUGCGACGCGGCGAUUG	401	caAucGccGcGucGcAGAA dTsdT	565	UUCUGCGACGCGGCGAUUG dTsdT
75	ACUGUUCAAGCCUCCAA GC	238	GCUUGGAGGCUUGAACAG U	402	acuGuucAAGccuccAAGc dTsdT	566	GCUUGGAGGCUUGAAcAGU dTsdT
76	CGCCGCGUCGCAGAAGA UC	239	GAUCUUCUGCGACGCGGCG	403	cgccGcGucGcAGAAGAuc dTsdT	567	GAUCUUCUGCGACGCGGCG dTsdT
77	CAUUUGUUCAGUGGUU CGU	240	ACGAACCACUGAACAAAUG	404	cauuuGuucAGuGGuucGu dTsdT	568	ACGAACcACUGAAcAAAUGd TsdT
78	CGCUGAAUCCCGCGGAC GA	241	UCGUCCGCGGGAUUCAGCG	405	cgcuGAAucccGcGGAcGA dTsdT	569	UCGUCCGCGGGAUUcAGCG dTsdT
79	UGGGUCACCAUAUUCU UGG	242	CCAAGAAUAUGGUGACCCA	406	ugGGucAccAuAuucuuGG dTsdT	570	CcAAGAAuAUGGUGACCcAd TsdT
80	UCCUCUGCCGAUCCAUA CU	243	AGUAUGGAUCGGCAGAGGA	407	ucCucuGccGAuccAuAcud TsdT	571	AGuAUGGAUCGGcAGAGGA dTsdT
81	AUGUCAACGACCGACCU UG	244	CAAGGUCGGUCGUUGACAU	408	auGucAAcGAccGAccuuG dTsdT	572	cAAGGUCGGUCGUUGAcAU dTsdT
82	CCUCUGCCUAAUCAUCU CA	245	UGAGAUGAUUAGGCAGAG G	409	ccucuGccuAAucAucucAd TsdT	573	UGAGAUGAUuAGGcAGAGG dTsdT
83	ACCGUGUGCACUUCGCU UC	246	GAAGCGAAGUGCACACGGU	410	accGuGuGcAcuucGcuuc dTsdT	574	GAAGCGAAGUGcAcACGGU dTsdT
84	UGCCGAUCCAUACUGCG GA	247	UCCGCAGUAUGGAUCGGCA	411	ugccGAuccAuAcuGcGGA dTsdT	575	UCCGcAGuAUGGAUCGGcA dTsdT
85	CAGAGUCUAGACUCGUG GU	248	ACCACGAGUCUAGACUCUG	412	caGAGucuAGAcucGuGG udTsdT	576	ACcACGAGUCuAGACUCUGd TsdT
86	CUGUUCAAGCCUCCAAG CU	249	AGCUUGGAGGCUUGAACAG	413	cuGuucAAGccuccAAGcu dTsdT	577	AGCUUGGAGGCUUGAAcAG dTsdT

图 6(续)

87	GGAGGCUGUAGGCAUAAAU	250	AUUUAUGCCUACAGCCUCC	414	ggAGGcuGuAGGcAuAAAudTsdT	578	AUUuAUGCCuAcAGCCUCCdTsdT
88	AGGAGGCUGUAGGCAUAAA	251	UUUAUGCCUACAGCCUCCU	415	agGAGGcuGuAGGcAuAAAdTsdT	579	UUUuAUGCCuAcAGCCUCCUdTsdT
89	GGUGGACUUCUCUCAAUUU	252	AAAUUGAGAGAAGUCCACC	416	gguGGAcuucucucAAuuudTsdT	580	AAAUUGAGAGAAGUCcACCdTsdT
90	GCAACUUUUUCACCUCUGC	253	GCAGAGGUGAAAAAGUUGC	417	gcAAcuuuuucAccucuGcdTsdT	581	GcAGAGGUGAAAAAGUUGCdTsdT
91	CUGCUCGUGUUUACAGGCGA	254	UCGCCUGUAAACACGAGCAG	418	CfuGfcUfcGfuGfuUfaCfaGfgCfgAf(invdT)	582	pdTCfgCfcUfgUfaAfcAfcGfaGfcAfgdTsdT
92	CUAGUGCCAUUUGUUCAGU	255	ACUGAACAAAUGGCACUAG	419	cuAGuGccAuuuGuucAGudTsdT	583	ACUGAAcAAAUGGcACuAGdTsdT
93	CUGCCGAUCCAUACUGCGG	256	CCGCAGUAUGGAUCGGCAG	420	cuGccGAuccAuAcuGcGGdTsdT	584	CCGcAGuAUGGAUCGGcAGdTsdT
94	GUGUGCACUUCGCUUCACC	257	GGUGAAGCGAAGUGCACAC	421	guGuGcAcuucGcuucAccdTsdT	585	GGUGAAGCGAAGUGcAcACdTsdT
95	GCUCGUGUUACAGGCGGGC	258	GCCCGCCUGUAACACGAGC	422	gcucGuGuuAcAGGcGGGcdTsdT	586	GCCCGCCUGuAAcACGAGCdTsdT
96	CCUAUCUUAUCAACACUUC	259	GAAGUGUUGAUAAGAUAGG	423	ccuAucuuAucAAcAcuucdTsdT	587	GAAGUGUUGAuAAGAuAGGdTsdT
97	UCUCAAUCGCCGCGUCGCA	260	UGCGACGCGGCGAUUGAGA	424	ucucAAucGccGcGucGcAdTsdT	588	UGCGACGCGGCGAUUGAGAdTsdT
98	GCCCGUCUGUGCCUUCUCA	261	UGAGAAGGCACAGACGGGC	425	gcccGucuGuGccuucucAdTsdT	589	UGAGAAGGcAcAGACGGGCdTsdT
99	CUAUCUUAUCAACACUUCC	262	GGAAGUGUUGAUAAGAUAG	426	cuAucuuAucAAcAcuucdTsdT	590	GGAAGUGUUGAuAAGAuAGdTsdT
100	AUGUUGCCCGUUUGUCCUC	263	GAGGACAAACGGGCAACAU	427	auGuuGcccGuuuGucccucdTsdT	591	GAGGAcAAACGGGcAAcAUdTsdT
101	GUAUGUUGCCCGUUUGUCC	264	GGACAAACGGGCAACAUAC	428	guAuGuuGcccGuuuGucccdTsdT	592	GGAcAAACGGGcAAcAuACdTsdT
102	CUUCGCUUCACCUCUGCAC	265	GUGCAGAGGUGAAGCGAAG	429	cuucGcuucAccucuGcAcdTsdT	593	GUGcAGAGGUGAAGCGAAGdTsdT

图 6(续)

103	UGUGCACUUCGCUUCACCU	266	AGGUGAAGCGAAGUGCACA	430	uguGcAcuucGcuucAccudTsdT	594	AGGUGAAGCGAAGUGcAcAdTsdT
104	GCCAAAAUUCGCAGUCCCG	267	CGGGACUGCGAAUUUUGGC	431	gccAAAAuucGcAGucccGdTsdT	595	CGGGACUGCGAAUUUUGGCdTsdT
105	CCUGCUCGUGUUACAGGCG	268	CGCCUGUAACACGAGCAGG	432	ccuGcucGuGuuAcAGGcGdTsdT	596	CGCCUGuAAcACGAGcAGGdTsdT
106	UGGAGUGUGGAUUCGCACU	269	AGUGCGAAUCCACACUCCA	433	ugGaGuGuGGAuucGcAcudTsdT	597	AGUGCGAAUCcAcACUCcAdTsdT
107	AACGACCGACCUUGAGGCA	270	UGCCUCAAGGUCGGUCGUU	434	aacGAccGAccuuGAGGcAdTsdT	598	UGCCUcAAGGUCGGUCGUUdTsdT
108	ACAGAGUCUAGACUCUGUGG	271	CCACAGAGUCUAGACUCUGU	435	acAGAGucuAGAcucuGuGGdTsdT	599	CcACAGAGUCuAGACUCUGUdTsdT
109	AAUCGCCGCGUCGCAGAAG	272	CUUCUGCGACGCGGCGAUU	436	aaucGccGcGucGcAGAAGdTsdT	600	CUUCUGCGACGCGGCGAUUdTsdT
110	GGUAUGUUGCCCGUUUGUC	273	GACAAACGGGCAACAUACC	437	gguAuGuuGcccGuuuGucdTsdT	601	GAcAAACGGGcAAcAuACCdTsdT
111	GCCGAUCCAUACUGCGGAA	274	UUCCGCAGUAUGGAUCGGC	438	gccGAuccAuAcuGcGGAAdTsdT	602	UUCCGcAGuAUGGAUCGGCdTsdT
112	GCCCUAUCUUAUCAACACU	275	AGUGUUGAUAAGAUAGGGC	439	gcccuAucuuAucAAcAcudTsdT	603	AGUGUUGAuAAGAuAGGGCdTsdT
113	AGUUUACUAGUGCCAUUUG	276	CAAAUGGCACUAGUAAACU	440	aguuuAcuAGuGccAuuuGdTsdT	604	cAAAUGGcACuAGuAAACUdTsdT
114	UGUCAACGACCGACCUUGA	277	UCAAGGUCGGUCGUUGACA	441	ugucAAcGAccGAccuuGAdTsdT	605	UcAAGGUCGGUCGUUGAcAdTsdT
115	ACUUCUCUCAAUUUUCUAG	278	CUAGAAAAUUGAGAGAAGU	442	acuucucucAAuuuucuAGdTsdT	606	CuAGAAAAUUGAGAGAAGUdTsdT
116	GCGCGGGACGUCCUUUGUC	279	GACAAAGGACGUCCCGCGC	443	gcGcGGGAcGucCuuuGucdTsdT	607	GAcAAAGGACGUCCCGCGCdTsdT
117	UCUAGACUCGUGGUGGACU	280	AGUCCACCACGAGUCUAGA	444	ucuAGAcucGuGGuGGAcudTsdT	608	AGUCcACcACGAGUCuAGAdTsdT
118	GAUCCAUACUGCGGAACUC	281	GAGUUCCGCAGUAUGGAUC	445	gauccAuAcuGcGGAAcucdTsdT	609	GAGUUCCGcAGuAUGGAUCdTsdT

图 6(续)

119	CUCUGCCGAUCCAUACUGC	282	GCAGUAUGGAUCGGCAGAG	446	csucuGccGAuccAuAcuGcdTsdT	610	GcAGuAUGGAUCGGcAGAGdTsdT
120	UCUGCCGAUCCAUACUGCG	283	CGCAGUAUGGAUCGGCAGA	447	ucuGccGAuccAuAcuGcGdTsdT	611	CGcAGuAUGGAUCGGcAGAdTsdT
121	CCUCUGCCGAUCCAUACUG	284	CAGUAUGGAUCGGCAGAGG	448	ccucuGccGAuccAuAcuGdTsdT	612	cAGuAUGGAUCGGcAGAGGdTsdT
122	GCACCUCUCUUUACGCGGU	285	ACCGCGUAAAGAGAGGUGC	449	gcAccucucuuuAcGcGGudTsdT	613	ACCGCGuAAAGAGAGGUGCdTsdT
123	AAGAACUCCCUCGCCUCGC	286	GCGAGGCGAGGGAGUUCUU	450	aaGAAcucccucGccucGcdTsdT	614	GCGAGGCGAGGGAGUUCUUdTsdT
124	GAACUCCCUCGCCUCGCAG	287	CUGCGAGGCGAGGGAGUUC	451	gaAcucccucGccucGcAGdTsdT	615	CUGCGAGGCGAGGGAGUUCdTsdT
125	UCUCUCAAUUUUCUAGGGC	288	GCCCUAGAAAAUUGAGAGA	452	ucucucAAuuuuucuAGGGcdTsdT	616	GCCCuAGAAAAUUGAGAGAdTsdT
126	GGGCGCACCUCUCUUUACG	289	CGUAAAGAGAGGUGCGCCC	453	ggGcGcAccucucuuuAcGdTsdT	617	CGuAAAGAGAGGUGCGCCCdTsdT
127	CCGAUCCAUACUGCGGAAC	290	GUUCCGCAGUAUGGAUCGG	454	ccGAuccAuAcuGcGGAAcdTsdT	618	GUUCCGcAGuAUGGAUCGGdTsdT
128	AACUCCCUCGCCUCGCAGA	291	UCUGCGAGGCGAGGGAGUU	455	aacucccucGccucGcAGAdTsdT	619	UCUGCGAGGCGAGGGAGUUdTsdT
129	CUCCUCUGCCGAUCCAUAC	292	GUAUGGAUCGGCAGAGGAG	456	cuccucuGccGAuccAuAcdTsdT	620	GuAUGGAUCGGcAGAGGAGdTsdT
130	GGAGUGUGGAUUCGCACUC	293	GAGUGCGAAUCCACACUCC	457	ggAGuGuGGAuucGcAcucdTsdT	621	GAGUGCGAAUCcAcACUCCdTsdT
131	CGGGCGCACCUCUCUUUAC	294	GUAAAGAGAGGUGCGCCCG	458	cgGGcGcAccucucuuuAcdTsdT	622	GuAAAGAGAGGUGCGCCCGdTsdT
132	GUCUCAAUCGCCGCGUCGC	295	GCGACGCGGCGAUUGAGAC	459	gucucAAucGccGcGucGcdTsdT	623	GCGACGCGGCGAUUGAGACdTsdT
133	AUCCAUACUGCGGAACUCC	296	GGAGUUCCGCAGUAUGGAU	460	auccAuAcuGcGGAAcuccdTsdT	624	GGAGUUCCGcAGuAUGGAUdTsdT
134	CGCACCUCUCUUUACGCGG	297	CCGCGUAAAGAGAGGUGCG	461	cgcAccucucuuuAcGcGGdTsdT	625	CCGCGuAAAGAGAGGUGCGdTsdT

图 6(续)

135	CAACGACCGACCUUGAGGC	298	GCCUCAAGGUCGGUCGUUG	462	caAcGAccGAccuuGAGGcdTsdT	626	GCCUcAAGGUCGGUCGUUGdTsdT
136	CCAUACUGCGGAACUCCUA	299	UAGGAGUUCCGCAGUAUGG	463	ccAuAcuGcGGAAcuccuAdTsdT	627	uAGGAGUUCCGcAGuAUGGdTsdT
137	UGAAUCCCGCGGACGACCC	300	GGGUCGUCCGCGGGAUUCA	464	ugAAucccGcGGAcGAccdTsdT	628	GGGUCGUCCGCGGGAUUcAdTsdT
138	AGAACUCCCUCGCCUCGCA	301	UGCGAGGCGAGGGAGUUCU	465	agAAcucccucGccucGcAdTsdT	629	UGCGAGGCGAGGGAGUUCUdTsdT
139	GGCGCACCUCUCUUUACGC	302	GCGUAAAGAGAGGUGCGCC	466	ggcGcAccucucuuuAcGcGdTsdT	630	GCGuAAAGAGAGGUGCGCCdTsdT
140	GCGCACCUCUCUUUACGCG	303	CGCGUAAAGAGAGGUGCGC	467	gcGcAccucucuuuAcGcGdTsdT	631	CGCGuAAAGAGAGGUGCGCdTsdT
141	GCUGAAUCCCGCGGACGAC	304	GUCGUCCGCGGGAUUCAGC	468	gcuGAAucccGcGGAcGAcdTsdT	632	GUCGUCCGCGGGAUUcAGCdTsdT
142	CACUUCGCUUCACCUCUGC	305	GCAGAGGUGAAGCGAAGUG	469	cacuucGcuucAccucuGcdTsdT	633	GcAGAGGUGAAGCGAAGUGdTsdT
143	CUCAAUCGCCGCGUCGCAG	306	CUGCGACGCGGCGAUUGAG	470	cucAAucGccGcGucGcAGdTsdT	634	CUGCGACGCGGCGAUUGAGdTsdT
144	UCCCGUCGGCGCUGAAUCC	307	GGAUUCAGCGCCGACGGGA	471	ucccGucGGcGcuGAAucc dTsdT	635	GGAUUcAGCGCCGACGGGAdTsdT
145	CUGAAUCCCGCGGACGACC	308	GGUCGUCCGCGGGAUUCAG	472	cuGAAucccGcGGAcGAccdTsdT	636	GGUCGUCCGCGGGAUUcAGdTsdT
146	AGAGUCUAGACUCGUGGUG	309	CACCACGAGUCUAGACUCU	473	agAGucuAGAcucGuGGudGdTsdT	637	cACcACGAGUCuAGACUCUdTsdT
147	UCCAUACUGCGGAACUCCU	310	AGGAGUUCCGCAGUAUGGA	474	uccAuAcuGcGGAAcuccudTsdT	638	AGGAGUUCCGcAGuAUGGAdTsdT
148	GCGCUGAAUCCCGCGGACG	311	CGUCCGCGGGAUUCAGCGC	475	gcGcuGAAucccGcGGAcGdTsdT	639	CGUCCGCGGGAUUcAGCGCdTsdT
149	AGUGUGGAUUCGCACUCCU	312	AGGAGUGCGAAUCCACACU	476	aguGuGGAuucGcAcuccudTsdT	640	AGGAGUGCGAAUCcAcACUdTsdT
150	CCCUGCUCGUGUUACAGGC	313	GCCUGUAACACGAGCAGGG	477	cccuGcucGuGuuAcAGGcdTsdT	641	GCCUGuAAcACGAGcAGGGdTsdT
151	GAAUCCCGCGGACGACCCG	314	CGGGUCGUCCGCGGGAUUC	478	gaAucccGcGGAcGAcccGdTsdT	642	CGGGUCGUCCGCGGGAUUCdTsdT
152	AAGCUGUGCCUUGGGUGGC	315	GCCACCCAAGGCACAGCUU	479	aaGcuGuGccuuGGGuGGcdTsdT	643	GCcACCcAAGGcAcAGCUUdTsdT
153	GCCCUGCUCGUGUUACAGG	316	CCUGUAACACGAGCAGGGC	480	gcccuGcucGuGuuAcAGGdTsdT	644	CCUGuAAcACGAGcAGGGCdTsdT
154	GUCCCGUCGGCGCUGAAUC	317	GAUUCAGCGCCGACGGGAC	481	gucccGucGGcGcuGAAucdTsdT	645	GAUUcAGCGCCGACGGGACdTsdT
155	AUCUUAUCAACACUUCCGG	318	CCGGAAGUGUUGAUAAGAU	482	aucuuAucAAcAcuucCGGdTsdT	646	CCGGAAGUGUUGAuAAGAUdTsdT
156	CUUAUCAACACUUCCGGAA	319	UUCCGGAAGUGUUGAUAAG	483	cuuAucAAcAcuucCGGAAdTsdT	647	UUCCGGAAGUGUUGAuAAGdTsdT
156	CUUAUCAACACUUCCGGAA	320	TUCCGGAAGUGUUGAUAAG	484	CfuUfaUfcAfaC?aCfuUfcCfgGfaAf(invdT)	648	pdTUfcC?gGfaAfgUfgUfuGfaUfaAfgdTsdT

图 6(续)

表 5. 来自 WO2018027106 的 HBV dsRNA 试剂的示例性 19-聚体 HBV cDNA 靶序列，取自 HBV 亚型 ADW2，基因型 A，完整基因组 GenBank AM282986.1

SEQ ID No.	HBV 19-聚体靶序列 (5' → 3')	SEQ ID NO:1 的基因组位置	靶向的 HBV 基因区域
2	GTGGTGGACTTCTCTCAAT	256-274	S ORF
3	TGGTGGACTTCTCTCAATT	257-275	S ORF
4	GGACTTCTCTCAATTTTCT	261-279	S ORF
5	GCTGTAGGCATAAATTGGT	1780-1798	X ORF
6	CTGTAGGCATAAATTGGTC	1781-1799	X ORF

图 7

表 6. HBV RNAi 试剂反义和有义链核心段序列，WO2018027106(N=任何核苷酸)

SEQ ID NO:	反义序列 (5' → 3') (19-mer)	SEQ ID NO:	有义序列 (5' → 3') (19-mer)	SEQ ID NO:1 的基因组位置
7	AUUGAGAGAAGUCCACCAC	34	GUGGUGGACUUCUCUCAAU	256-274
8	UUUGAGAGAAGUCCACCAC	35	GUGGUGGACUUCUCUCAAA	256-274
9	AUUGAGAGAAGUCCACCAN	36	NUGGUGGACUUCUCUCAAU	256-274
10	UUUGAGAGAAGUCCACCAN	37	NUGGUGGACUUCUCUCAAA	256-274
11	NUUGAGAGAAGUCCACCAN	38	NUGGUGGACUUCUCUCAAN	256-274
12	AAUUGAGAGAAGUCCACCA	39	UGGUGGACUUCUCUCAAUU	257-275
13	UAUUGAGAGAAGUCCACCA	40	UGGUGGACUUCUCUCAAUA	257-275
14	AAUUGAGAGAAGUCCACCN	41	NGGUGGACUUCUCUCAAUU	257-275
15	UAUUGAGAGAAGUCCACCN	42	NGGUGGACUUCUCUCAAUA	257-275
16	NAUUGAGAGAAGUCCACCN	43	NGGUGGACUUCUCUCAAUN	257-275
17	AGAAAAUUGAGAGAAGUCC	44	GGACUUCUCUCAAUUUUCU	261-279
18	UGAAAAUUGAGAGAAGUCC	45	GGACUUCUCUCAAUUUUCA	261-279
19	AGAAAAUUGAGAGAAGUCN	46	NGACUUCUCUCAAUUUUCU	261-279
20	UGAAAAUUGAGAGAAGUCN	47	NGACUUCUCUCAAUUUUCA	261-279
21	NGAAAAUUGAGAGAAGUCN	48	NGACUUCUCUCAAUUUUCN	261-279
22	ACCAAUUUAUGCCUACAGC	49	GCUGUAGGCAUAAAUUGGU	1780-1798
23	UCCAAUUUAUGCCUACAGC	50	GCUGUAGGCAUAAAUUGGA	1780-1798
24	ACCAAUUUAUGCCUACAGN	51	NCUGUAGGCAUAAAUUGGU	1780-1798
25	UCCAAUUUAUGCCUACAGN	52	NCUGUAGGCAUAAAUUGGA	1780-1798
26	NCCAAUUUAUGCCUACAGN	53	NCUGUAGGCAUAAAUUGGN	1780-1798
27	GACCAAUUUAUGCCUACAG	54	CUGUAGGCAUAAAUUGGUC	1781-1799
28	AACCAAUUUAUGCCUACAG	55	CUGUAGGCAUAAAUUGGUU	1781-1799
29	UACCAAUUUAUGCCUACAG	56	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	1781-1799

SEQ ID NO:	反义序列 (5' → 3') (19-mer)	SEQ ID NO:	有义序列 (5' → 3') (19-mer)	SEQ ID NO:1 的基因组位置
30	GACCAAUUUAUGCCUACAN	57	NUGUAGGCAUAAAUUGGUC	1781-1799
31	AACCAAUUUAUGCCUACAN	58	NUGUAGGCAUAAAUUGGUU	1781-1799
32	UACCAAUUUAUGCCUACAN	59	NUGUAGGCAUAAAUUGGUA	1781-1799
33	NACCAAUUUAUGCCUACAN	60	NUGUAGGCAUAAAUUGGUN	1781-1799

图 8

表 7. 来自 WO2018027106 的 HBV RNAi 试剂反义序列

AS 链 ID	修饰的序列(5' → 3')	SEQ ID NO.	未修饰的序列(5' → 3')	SEQ ID NO.
AM03508-AS	usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfcesusAu	61	UACCAAUUUAUGCCUACAGGCCUUAU	149
AM04441-AS	usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfcsesu	62	UACCAAUUUAUGCCUACAGGCCU	150
AM04442-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfcesu	63	UACCAAUUUAUGCCUACAGGCCU	150
AM04443-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfcsc	64	UACCAAUUUAUGCCUACAGGC	151
AM04661-AS	usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcaesusu	65	UGUGAAGCGAAGUGCACACUU	152
AM04768-AS	usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfcsusccgc	66	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUCCGC	153
AM04769-AS	vpusAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfcsusccgc	67	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUCCGC	153
AM05011-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu	68	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05012-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfggsc	69	UACCAAUUUAUGCCUACAGGC	151
AM05013-AS	vpusAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfsc	70	UACCAAUUUAUGCCUACAGGC	151
AM05014-AS	vpusAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu	71	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05052-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfsa	72	AUUGAGAGAAGUCCACCACGA	155
AM05053-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcgsa	73	AUUGAGAGAAGUCCACCACGA	155
AM05054-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcusu	74	AUUGAGAGAAGUCCACCACUU	156
AM05055-AS	vpusUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfsa	75	UUUGAGAGAAGUCCACCACGA	157
AM05056-AS	asAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	76	AAUUGAGAGAAGUCCACCACG	158
AM05057-AS	asAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfacsg	77	AAUUGAGAGAAGUCCACCACG	158
AM05058-AS	asAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfausu	78	AAUUGAGAGAAGUCCACCAUU	159
AM05060-AS	vpusAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	79	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05351-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgGfsu	80	UACCAAUUUAUGCCUACAGGU	161
AM05608-AS	usAfscCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgsusu	81	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05609-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc	82	UACCAAUUUAUGCCUACAGCC	162
AM05610-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgccusu	83	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUU	163
AM05611-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgccusc	84	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUC	164

AM05612-AS	usAfscscaauUfuAfuGfcCfuacagcsc	85	UACCAAUUUAUGCCUACAGCC	162
AM05613-AS	usAfscscaauUfuAfuGfcCfuacagccusu	86	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUU	163
AM05614-AS	usAfscscaauUfuAfuGfcCfuacagccusc	87	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUC	164
AM05618-AS	asUfsusggagGfaAfgUfcCfaccacusu	88	AUUGAGAGAAGUCCACCACUU	156
AM05621-AS	usUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcusu	89	UUUGAGAGAAGUCCACCACUU	165
AM05623-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcggusu	90	AUUGAGAGAAGUCCACCACGGUU	166
AM05626-AS	asUfsusggagGfaAfgUfcCfaccaggusu	91	AUUGAGAGAAGUCCACCACGGUU	166
AM05628-AS	asUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcgagsu	92	AUUGAGAGAAGUCCACCACGAGU	167
AM05631-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	93	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05632-AS	usAfsusugagAfgAfaGfuCfcaccacsg	94	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05633-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfgusu	95	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGUU	168
AM05634-AS	usAfsusugagAfgAfaGfuCfcaccacgasg	96	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	169
AM05635-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfgasg	97	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	169
AM05637-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfgsa	98	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	170
AM05638-AS	usAfsusugagAfgAfaGfuCfcaccacgsa	99	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	170
AM05747-AS	asGfsasAfaAfuugagAfgAfaGfuCfcAfsc	100	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCAC	171
AM05849-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgusu	101	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05850-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgcsc	102	UACCAAUUUAUGCCUACAGCC	162
AM05851-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccusu	103	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUU	172
AM05852-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccesu	104	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCU	173
AM05853-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccuusu	105	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUU	163
AM05854-AS	usAfscsCfaAfuuuauGfcCfuAfcAfgccusc	106	UACCAAUUUAUGCCUACAGCCUC	164
AM05855-AS	cPrpusAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgusu	107	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	154
AM05860-AS	cPrpusAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfaCfsg	108	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05862-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfausu	109	UAUUGAGAGAAGUCCACCAUU	174
AM05863-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacsg	110	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05864-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacsusu	111	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM05865-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacsgsa	112	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	170

图 9

AM05867-AS	vpusAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfaCfsg	113	UAUUGAGAGAAGUCCACCACG	160
AM05873-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfcAfcusu	114	UUUGAGAGAAGUCCACCACUU	165
AM05874-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfcAfcgsu	115	UUUGAGAGAAGUCCACCACGA	157
AM05875-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfcAfcguuu	116	UUUGAGAGAAGUCCACCACGUU	176
AM05876-AS	usUfsusGfaGfagaagUfcCfaCfcAfcgasg	117	UUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	177
AM05877-AS	cPrpusUfsusGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcusu	118	UUUGAGAGAAGUCCACCACUU	165
AM06074-AS	cPrpusAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacuuu	119	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06142-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacusu	120	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06143-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacguuu	121	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGUU	168
AM06144-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacuus(invAb)	122	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06145-AS	usAfsusUfgAfgagaaGfuCfcAfcCfacgasg	123	UAUUGAGAGAAGUCCACCACGAG	169
AM06222-AS	usAfsusUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfacusu	124	UAUUGAGAGAAGUCCACCACUU	175
AM06281-AS	asGfsusAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcusu	125	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCUU	178
AM06282-AS	asGfsusAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcasc	126	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCAC	171
AM06283-AS	asGfsusAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcacuuu	127	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCACUU	179
AM06284-AS	asGfsusAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcacsc	128	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCACC	180
AM06285-AS	usGfsusAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcusu	129	UGAAAAUUGAGAGAAGUCCUU	152
AM06286-AS	usGfsusAfaAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcasc	130	UGAAAAUUGAGAGAAGUCCAC	181
AM06299-AS	asCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcusu	131	ACCAAUUUAUGCCUACAGCUU	182
AM06300-AS	asCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccuuu	132	ACCAAUUUAUGCCUACAGCCUU	183
AM06301-AS	asCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccusc	133	ACCAAUUUAUGCCUACAGCCUC	184
AM06302-AS	usCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcuuu	134	UCCAAUUUAUGCCUACAGCUU	185
AM06303-AS	usCfscsAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccuuu	135	UCCAAUUUAUGCCUACAGCCUU	186
AM06463-AS	sPrpusAfscsCfsAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc	136	UACCAAUUUAUGCCUACAGCC	162
AM06464-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc	137	UACCAAUUUAUGCCUACAGCC	162
AM06465-AS	cPrpusAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc	138	UACCAAUUUAUGCCUACAGCC	162
AM06604-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsu	139	UACCAAUUUAUGCCUACAGCU	187
AM06606-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsg	140	UACCAAUUUAUGCCUACAGCG	188

AM06608-AS	asAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgcsc	141	AACCAAUUUAUGCCUACAGCC	189
AM06611-AS	usAfscsCfaAfuUfUfAfuGfcCfuAfcAfgusu	142	UACCAAUUUAUGCCUACAGUU	154
AM06612-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfsc	143	UACCAAUUUAUGCCUACAGCC	162
AM06614-AS	asCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcCfsu	144	ACCAAUUUAUGCCUACAGCCU	190
AM06616-AS	usCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfcCfsu	145	UCCAAUUUAUGCCUACAGCCU	191
AM06618-AS	asCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccsg	146	ACCAAUUUAUGCCUACAGCCG	192
AM06620-AS	usCfscAfaUfuUfaUfgCfcUfaCfaGfccsg	147	UCCAAUUUAUGCCUACAGCCG	193
AM06731-AS	usAfscsCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfggsg	148	UACCAAUUUAUGCCUACAGGG	194

图 9(续)

表 8. 来自 WO2018027106 的 HBV RNAi 试剂有义序列

链 ID	修饰的序列 (5' → 3')	SEQ ID NO.	未修饰的序列 (5' → 3')	SEQ ID NO.
AM04444-SS	(NAG25)asusgsccuguugGfCfAfuaaaaugguaus(invdT)	195	UUGCCUGUAGGCAUAAAUUGGUAUT	275
AM04445-SS	(NAG25)asasusgsccuguugGfCfAfuaaaauggu(invdA)	196	UAUAUGCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	276
AM04767-SS	(NAG25)gcgsgsgscuguugGfCfAfuaaaauggTM(invdA)	197	GCGGAGGCUGUAGGCAUAAAUUGGTA	277
AM05010-SS	(NAG25)scsuguugGfCfAfuaaaugguaaus(invAb)	198	CUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	278
AM05015-SS	(NAG25)sgsccuguugGfCfAfuaaaugguas(invAb)	199	GCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	279
AM05016-SS	(NAG25)sgsccuguugGfCfAfuaaauggus(invdA)	200	GCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	279
AM05017-SS	(NAG25)sgsccuguugGfCfAfuaaaugguAMs(invAb)	201	GCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	279
AM05018-SS	(NAG25)sgsccuguugGfCfAfuaaauggTMAMs(invAb)	202	GCCUGUAGGCAUAAAUUGGTA	280
AM05019-SS	(NAG25)sasacuguugGfCfAfuaaaugguas(invAb)	203	AACUGUAGGCAUAAAUUGGUA	281
AM05034-SS	(NAG25)sascguggugGfAfCfuucucucaaus(invAb)	204	UCGUGGUGGACUUCUCUCAAU	282
AM05046-SS	(NAG25)sasaguggugGfAfCfuucucucaaus(invAb)	205	AAGUGGUGGACUUCUCUCAAU	283
AM05047-SS	(NAG25)sascguggugGfAfCfuucucucaAMTMs(invAb)	206	UCGUGGUGGACUUCUCUCAAT	284
AM05048-SS	(NAG25)scsguggugGfAfCfUfucucucaaus(invAb)	207	CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU	285
AM05049-SS	(NAG25)sasaguggugGfAfCfUfucucucaaus(invAb)	208	AAUGGUGGACUUCUCUCAAUU	286
AM05050-SS	(NAG25)scsguggugGfAfCfUfucucucaTMTMs(invAb)	209	CGUGGUGGACUUCUCUCAATT	287
AM05051-SS	(NAG25)sgsgacuucuCfUfCfaaauucaaus(invAb)	210	GGACUUCUCUCAAUUUUCUAA	288
AM05063-SS	(NAG25)scsguggugGfAfCfUfucucucaaus(invAb)	211	CGUGGUGGACUUCUCUCAAUA	289
AM05064-SS	(NAG25)sascguggugGfAfCfuucucucaaas(invAb)	212	UCGUGGUGGACUUCUCUCAAA	290
AM05346-SS	(NAG31)sascguggugGfCfAfuaaaugguas(invAb)	213	ACCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	291
AM05347-SS	(NAG31)s(invAb)scuguagGfCfAfuaaaugguas(invAb)	214	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	292
AM05606-SS	(NAG25)s(invAb)scuguagGfCfAfuaaaugguas(invAb)	215	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	292
AM05607-SS	(NAG37)s(invAb)scuguagGfCfAfuaaaugguas(invAb)	216	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	292
AM05615-SS	(NAG25)s(invAb)sacuguagGfCfAfuaaaugguas(invAb)	217	ACUGUAGGCAUAAAUUGGUA	293

链 ID	修饰的序列 (5' → 3')	SEQ ID NO.	未修饰的序列 (5' → 3')	SEQ ID NO.
AM05616-SS	(NAG25)sgsgccuguugGfCfAfuaaaugguas(invAb)	218	GGCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	294
AM05617-SS	(NAG37)sasaguggugGfAfCfuucucucaaus(invAb)	219	AAGUGGUGGACUUCUCUCAAU	283
AM05620-SS	(NAG25)sasaguggugGfAfCfuucucucaaas(invAb)	220	AAGUGGUGGACUUCUCUCAAA	295
AM05622-SS	(NAG25)scsguggugGfAfCfuucucucaaus(invAb)	221	CGUGGUGGACUUCUCUCAAU	296
AM05624-SS	(NAG25)s(invAb)scguggugGfAfCfuucucucaaus(invAb)	222	CCGUGGUGGACUUCUCUCAAU	296
AM05627-SS	(NAG25)scsacguggugGfAfCfuucucucaaus(invAb)	223	CUCGUGGUGGACUUCUCUCAAU	297
AM05629-SS	(NAG25)s(invAb)sguggugGfAfCfuucucucaaus(invAb)	224	GUGGUGGACUUCUCUCAAU	298
AM05636-SS	(NAG25)s(invAb)sguggugGfAfCfuucucucaaususu(invAb)	225	GUGGUGGACUUCUCUCAAUUU	299
AM05636-SS	(NAG25)sascguggugGfCfUfucucucaaus(invAb)	226	UCGUGGUGGACUUCUCUCAAUU	300
AM05639-SS	(NAG25)s(invAb)sugguggAfCfUfucucucaaus(invAb)	227	UGGUGGACUUCUCUCAAUU	301
AM05640-SS	(NAG37)s(invAb)sugguggAfCfUfucucucaaus(invAb)	228	UGGUGGACUUCUCUCAAUU	301
AM05746-SS	(NAG25)sgsuggacuuCfUfCfucaaauuucus(invAb)	229	GUGGACUUCUCUCAAUUUUCU	302
AM05856-SS	(NAG25)s(invAb)scuguagGfCfAfuaaaugguausu(invAb)	230	CUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	278
AM05857-SS	(NAG25)s(invAb)sgcuguagGfCfAfuaaaugguaausu(invAb)	231	GCUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	303
AM05858-SS	(NAG25)s(invAb)sggcuguagGfCfAfuaaaugguaasu(invAb)	232	GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	304
AM05859-SS	(NAG25)s(invAb)saacuguagGfCfAfuaaaugguaasu(invAb)	233	AACUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	305
AM05868-SS	(NAG25)s(invAb)sugguggAfCfUfucucucaauasu(invAb)	234	UGGUGGACUUCUCUCAAUAUU	306
AM05869-SS	(NAG25)s(invAb)sguggugGfCfUfucucucaauasu(invAb)	235	GUGGUGGACUUCUCUCAAUAUU	307
AM05870-SS	(NAG25)sasaguggugGfCfUfucucucaauasu(invAb)	236	AAUGGUGGACUUCUCUCAAUAUU	308
AM05871-SS	(NAG25)scsguggugGfCfUfucucucaauasu(invAb)	237	CGUGGUGGACUUCUCUCAAUAUU	309
AM05872-SS	(NAG31)scsguggugGfCfUfucucucaaust(invAb)	238	CGUGGUGGACUUCUCUCAATA	289
AM05879-SS	(NAG25)s(invAb)sasaguggugGfAfCfuucucucaaus(invAb)	239	AAGUGGUGGACUUCUCUCAAU	283
AM05880-SS	(NAG25)s(invAb)sguggugGfAfCfuucucucaaasu(invAb)	240	GUGGUGGACUUCUCUCAAAUU	310
AM05881-SS	(NAG25)s(invAb)scguggugGfAfCfuucucucaaasu(invAb)	241	CGUGGUGGACUUCUCUCAAAUU	311

图 10

链 ID	修饰的序列 (5' → 3')	SEQ ID NO.	未修饰的序列 (5' → 3')	SEQ ID NO.
AM05882-SS	(NAG25)ssasgugguggGfAfCfuucucucaaausu(invAb)	242	AAGUGGUGGACUUCUCUCAAAUU	312
AM05883-SS	(NAG25)sussgugguggGfAfCfuucucucaaausu(invAb)	243	UCGUGGUGGACUUCUCUCAAAUU	313
AM06146-SS	(NAG37)s(invAb)sguggugguAfCfUfucucucaauausu(invAb)	244	GUGGUGGACUUCUCUCAAUALU	307
AM06147-SS	(NAG37)s(invAb)scgugguggAfCfUfucucucaauausu(invAb)	245	CGUGGUGGACUUCUCUCAAUALU	309
AM06148-SS	(NAG37)s(invAb)scucgugguggAfCfUfucucucaauas(invAb)	246	CUCGUGGUGGACUUCUCUCAAUA	314
AM06149-SS	(NAG37)s(invAb)scucgugguggAfCfUfucucucaauausu(invAb)	247	CUCGUGGUGGACUUCUCUCAAUALU	315
AM06150-SS	(NAG37)s(invAb)sggcuguugGfCfAfuaaauugguas(invAb)	248	GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	294
AM06151-SS	(NAG37)s(invAb)sgaggcuguugGfCfAfuaaauugguas(invAb)	249	GAGGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	316
AM06152-SS	(NAG37)s(invAb)sgaggcuguugGfCfAfuaaauugguausu(invAb)	250	GAGGCUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	317
AM06287-SS	(NAG37)s(invAb)sggacuuCfUfCfucaauuuucus(invAb)	251	GGACUUCUCUCAAUUUUCU	318
AM06288-SS	(NAG37)s(invAb)sguggacuuCfUfCfucaauuuucus(invAb)	252	GUGGACUUCUCUCAAUUUUCU	302
AM06289-SS	(NAG37)s(invAb)sgcuggacuuCfUfCfucaauuuucus(invAb)	253	GGUGGACUUCUCUCAAUUUUCU	319
AM06290-SS	(NAG37)s(invAb)sggacuuCfUfCfucaauuuucas(invAb)	254	GGACUUCUCUCAAUUUUCA	320
AM06291-SS	(NAG37)s(invAb)sguggacuuCfUfCfucaauuuucas(invAb)	255	GUGGACUUCUCUCAAUUUUCA	321
AM06304-SS	(NAG37)s(invAb)sgcuguaGfGfCfauaaauuggus(invAb)	256	GCUGUAGGCAUAAAUUGGU	322
AM06305-SS	(NAG37)s(invAb)sggcuguaGfGfCfauaaauuggus(invAb)	257	GGCUGUAGGCAUAAAUUGGU	323
AM06306-SS	(NAG37)s(invAb)sgaggcuguaGfGfCfauaaauuggus(invAb)	258	GAGGCUGUAGGCAUAAAUUGGU	324
AM06307-SS	(NAG37)s(invAb)sgcuguaGfGfCfauaaauuggas(invAb)	259	GCUGUAGGCAUAAAUUGGA	325
AM06308-SS	(NAG37)s(invAb)sggcuguaGfGfCfauaaauuggas(invAb)	260	GGCUGUAGGCAUAAAUUGGA	326
AM06603-SS	(NAG37)s(invAb)sagcuguagGfCfAfuaaaauugguas(invAb)	261	AGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	327
AM06605-SS	(NAG37)s(invAb)scgcuguagGfCfAfuaaauugguas(invAb)	262	CGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	328
AM06607-SS	(NAG37)s(invAb)sggcuguagGfCfAfuaaauugguus(invAb)	263	GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUU	329
AM06609-SS	(NAG37)s(invAb)scuguagGfCfAfuaaauugguaus(invAb)	264	CUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	278
AM06610-SS	(NAG37)s(invAb)scuGfuAfgGfCfAfuAfaAfuUfgGfuasusu(invAb)	265	CUGUAGGCAUAAAUUGGUAUU	278

链 ID	修饰的序列(5' → 3')	SEQ ID NO.	未修饰的序列 (5' → 3')	SEQ ID NO.
AM06613-SS	(NAG37)s(invAb)sagcuguaGfGfCfauaaauuggus(invAb)	266	AGGCUGUAGGCAUAAAUUGGU	330
AM06615-SS	(NAG37)s(invAb)sagcgcguaGfGfCfauaaauuggas(invAb)	267	AGGCUGUAGGCAUAAAUUGGA	331
AM06617-SS	(NAG37)s(invAb)scggcuguaGfGfCfauaaauuggus(invAb)	268	CGGCUGUAGGCAUAAAUUGGU	332
AM06619-SS	(NAG37)s(invAb)scggcuguaGfGfCfauaaauuggas(invAb)	269	CGGCUGUAGGCAUAAAUUGGA	333
AM06750-SS	(NAG37)s(invAb)sccuguagGfCfAfuaaauugguas(invAb)	270	CCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	334
AM06752-SS	(NAG37)sgcuguagGfCfAfuaaauugguas(invAb)	271	GCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	328
AM06753-SS	(NAG37)sccuguagGfCfAfuaaauugguas(invAb)	272	CCCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	334
AM06776-SS	(NAG25)s(invAb)sguggacuuCfUfCfucaauuuucus(invAb)	273	GUGGACUUCUCUCAAUUUUCU	302
AM06777-SS	(NAG25)s(invAb)scgcuguagGfCfAfuaaauugguas(invAb)	274	CGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	328

图 10(续)

表 9. 来自 WO2018027106 的 HBV RNAi 试剂双链体的实例

双链体 ID	反义链 ID	有义链 ID
AD03498	AM03508-AS	AM04445-SS
AD03499	AM04441-AS	AM04444-SS
AD03500	AM04442-AS	AM04444-SS
AD03501	AM04443-AS	AM04444-SS
AD03738	AM04768-AS	AM04767-SS
AD03739	AM04769-AS	AM04767-SS
AD03967	AM04443-AS	AM05010-SS
AD03968	AM05011-AS	AM05010-SS
AD03969	AM04443-AS	AM05015-SS
AD03970	AM05011-AS	AM05019-SS
AD03971	AM05012-AS	AM05015-SS
AD03972	AM04443-AS	AM05016-SS
AD03973	AM04443-AS	AM05017-SS
AD03974	AM04443-AS	AM05018-SS
AD03975	AM05013-AS	AM05015-SS
AD03976	AM05014-AS	AM05019-SS
AD03977	AM05013-AS	AM05017-SS
AD03978	AM05013-AS	AM04444-SS
AD04001	AM05052-AS	AM05034-SS
AD04002	AM05053-AS	AM05034-SS
AD04003	AM05054-AS	AM05046-SS
AD04004	AM05052-AS	AM05047-SS
AD04005	AM05055-AS	AM05064-SS
AD04006	AM05056-AS	AM05048-SS
AD04007	AM05057-AS	AM05048-SS
AD04008	AM05058-AS	AM05049-SS
AD04009	AM05056-AS	AM05050-SS
AD04010	AM05060-AS	AM05063-SS
AD04176	AM05351-AS	AM05346-SS
AD04177	AM04443-AS	AM05347-SS
AD04178	AM05011-AS	AM05347-SS
AD04412	AM05011-AS	AM05606-SS
AD04413	AM05011-AS	AM05607-SS
AD04414	AM05608-AS	AM05606-SS
AD04415	AM05011-AS	AM05615-SS
AD04416	AM05609-AS	AM05616-SS
AD04417	AM05610-AS	AM05616-SS
AD04418	AM05611-AS	AM05616-SS
AD04419	AM05612-AS	AM05616-SS
AD04420	AM05613-AS	AM05616-SS
AD04421	AM05614-AS	AM05616-SS
AD04422	AM05054-AS	AM05617-SS
AD04423	AM05618-AS	AM05046-SS
AD04425	AM05621-AS	AM05620-SS

双链体 ID	反义链 ID	有义链 ID
AD04426	AM05623-AS	AM05622-SS
AD04427	AM05623-AS	AM05624-SS
AD04428	AM05626-AS	AM05622-SS
AD04429	AM05626-AS	AM05624-SS
AD04430	AM05628-AS	AM05627-SS
AD04431	AM05054-AS	AM05629-SS
AD04432	AM05054-AS	AM05630-SS
AD04433	AM05631-AS	AM05048-SS
AD04434	AM05632-AS	AM05048-SS
AD04435	AM05633-AS	AM05048-SS
AD04436	AM05635-AS	AM05048-SS
AD04437	AM05634-AS	AM05048-SS
AD04438	AM05637-AS	AM05636-SS
AD04439	AM05638-AS	AM05636-SS
AD04440	AM05058-AS	AM05639-SS
AD04441	AM05057-AS	AM05639-SS
AD04442	AM05057-AS	AM05640-SS
AD04511	AM05747-AS	AM05746-SS
AD04570	AM05011-AS	AM05856-SS
AD04571	AM05849-AS	AM05856-SS
AD04572	AM05850-AS	AM05856-SS
AD04573	AM05851-AS	AM05857-SS
AD04574	AM05852-AS	AM05857-SS
AD04575	AM05853-AS	AM05858-SS
AD04576	AM05854-AS	AM05858-SS
AD04577	AM05011-AS	AM05859-SS
AD04578	AM05850-AS	AM05858-SS
AD04579	AM05014-AS	AM05347-SS
AD04580	AM05855-AS	AM05347-SS
AD04581	AM05860-AS	AM05063-SS
AD04583	AM05862-AS	AM05868-SS
AD04584	AM05863-AS	AM05868-SS
AD04585	AM05864-AS	AM05869-SS
AD04586	AM05865-AS	AM05869-SS
AD04587	AM05862-AS	AM05870-SS
AD04588	AM05863-AS	AM05871-SS
AD04590	AM05867-AS	AM05063-SS
AD04591	AM05860-AS	AM05872-SS
AD04592	AM05054-AS	AM05879-SS
AD04593	AM05873-AS	AM05880-SS
AD04594	AM05874-AS	AM05880-SS
AD04595	AM05875-AS	AM05881-SS
AD04596	AM05876-AS	AM05881-SS
AD04597	AM05873-AS	AM05882-SS

图 11

双链体 ID	反义链 ID	有义链 ID
AD04598	AM05874-AS	AM05883-SS
AD04599	AM05877-AS	AM05628-SS
AD04734	AM06074-AS	AM05869-SS
AD04771	AM06142-AS	AM06146-SS
AD04772	AM06143-AS	AM06147-SS
AD04773	AM06144-AS	AM06146-SS
AD04774	AM06145-AS	AM06148-SS
AD04775	AM06145-AS	AM06149-SS
AD04776	AM05850-AS	AM06150-SS
AD04777	AM05854-AS	AM06151-SS
AD04778	AM05854-AS	AM06152-SS
AD04822	AM06222-AS	AM06146-SS
AD04823	AM05609-AS	AM06150-SS
AD04871	AM06281-AS	AM06287-SS
AD04872	AM06282-AS	AM06288-SS
AD04873	AM06283-AS	AM06288-SS
AD04874	AM06284-AS	AM06289-SS
AD04875	AM06285-AS	AM06290-SS
AD04876	AM06286-AS	AM06291-SS
AD04881	AM06299-AS	AM06304-SS
AD04882	AM06300-AS	AM06305-SS
AD04883	AM06301-AS	AM06306-SS
AD04884	AM06302-AS	AM06307-SS
AD04885	AM06303-AS	AM06308-SS
AD04962	AM05864-AS	AM06146-SS
AD04963	AM05855-AS	AM05607-SS
AD04981	AM06463-AS	AM06150-SS
AD04982	AM06464-AS	AM06150-SS
AD04983	AM06465-AS	AM06150-SS
AD05069	AM06604-AS	AM06603-SS
AD05070	AM06606-AS	AM06605-SS
AD05071	AM06608-AS	AM06607-SS
AD05072	AM05011-AS	AM06609-SS
AD05073	AM06611-AS	AM06610-SS
AD05074	AM06612-AS	AM06150-SS
AD05075	AM06614-AS	AM06613-SS
AD05076	AM06616-AS	AM06615-SS
AD05077	AM06618-AS	AM06617-SS
AD05078	AM06620-AS	AM06619-SS
AD05147	AM06751-AS	AM06750-SS
AD05148	AM06606-AS	AM06752-SS
AD05149	AM06751-AS	AM06753-SS
AD05164	AM06282-AS	AM06776-SS
AD05165	AM06606-AS	AM06777-SS

图 11(续)

表 10. 靶向配体的实例

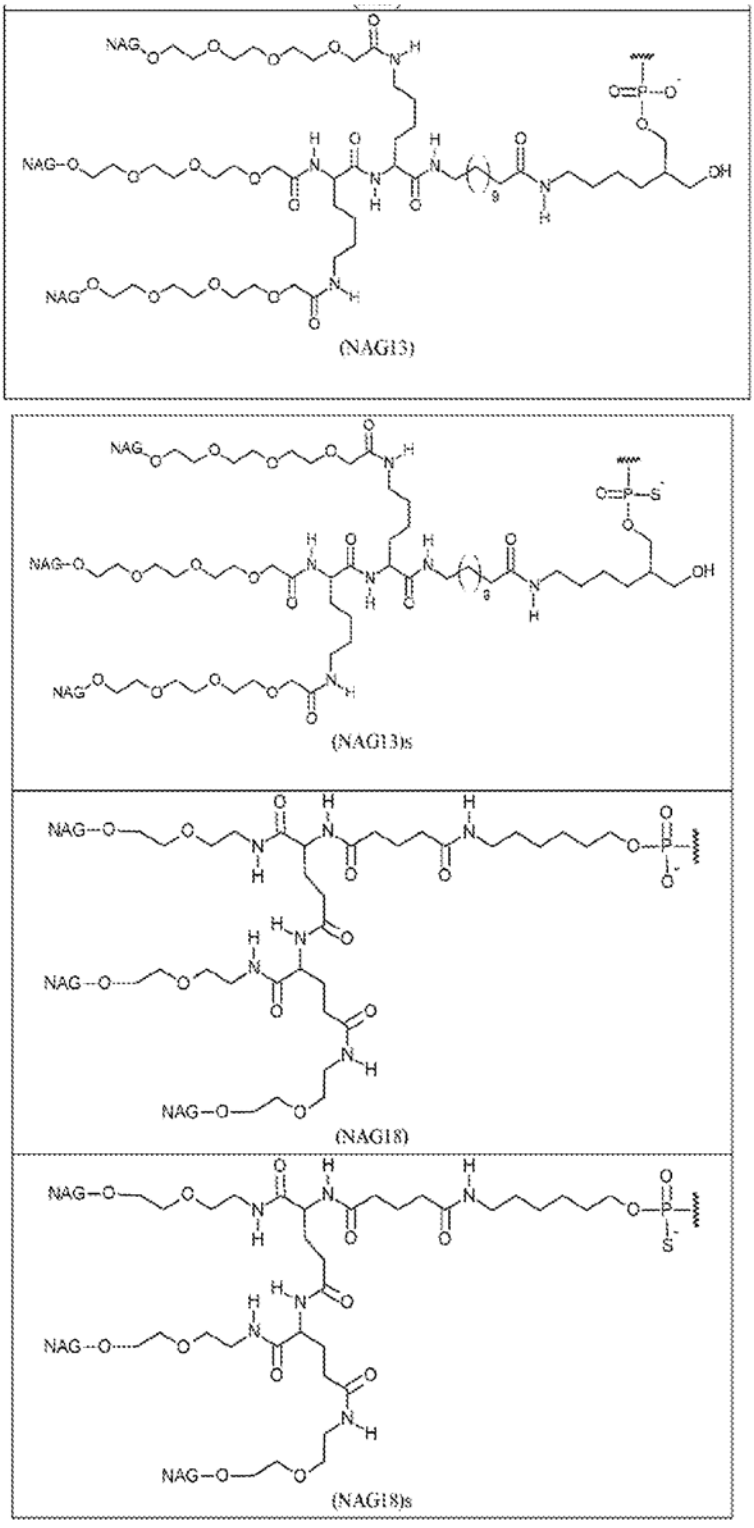


图 12

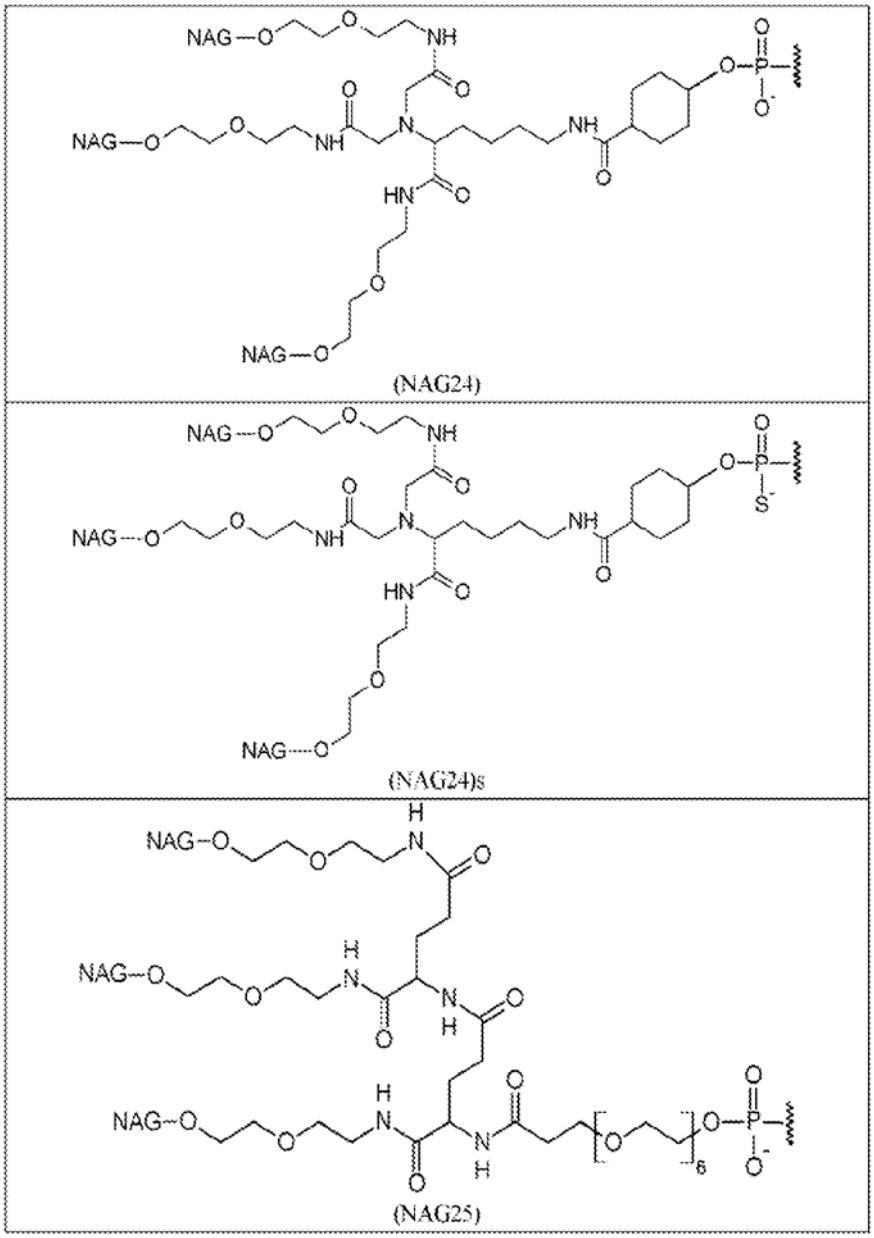


图 12(续)

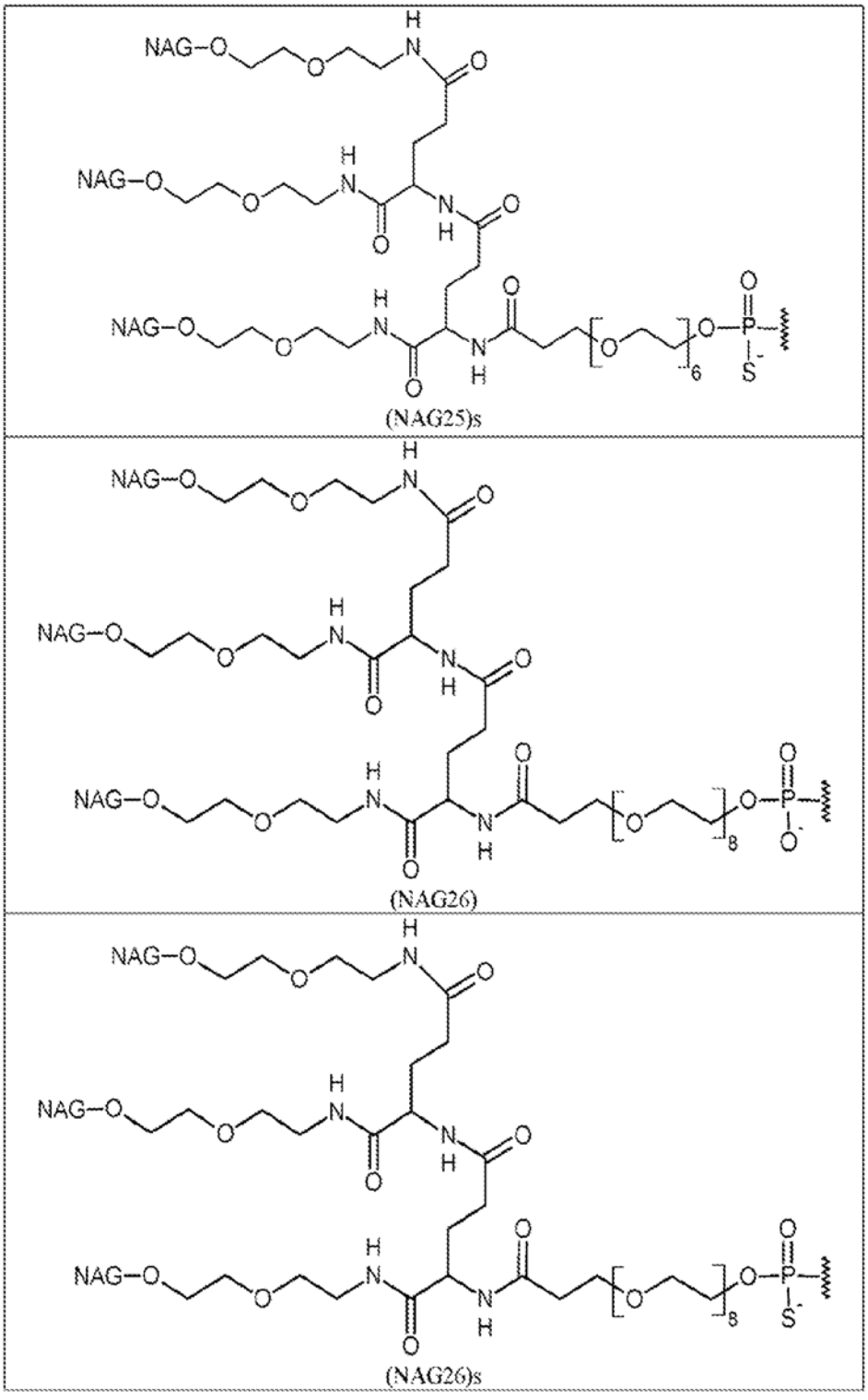


图 12(续)

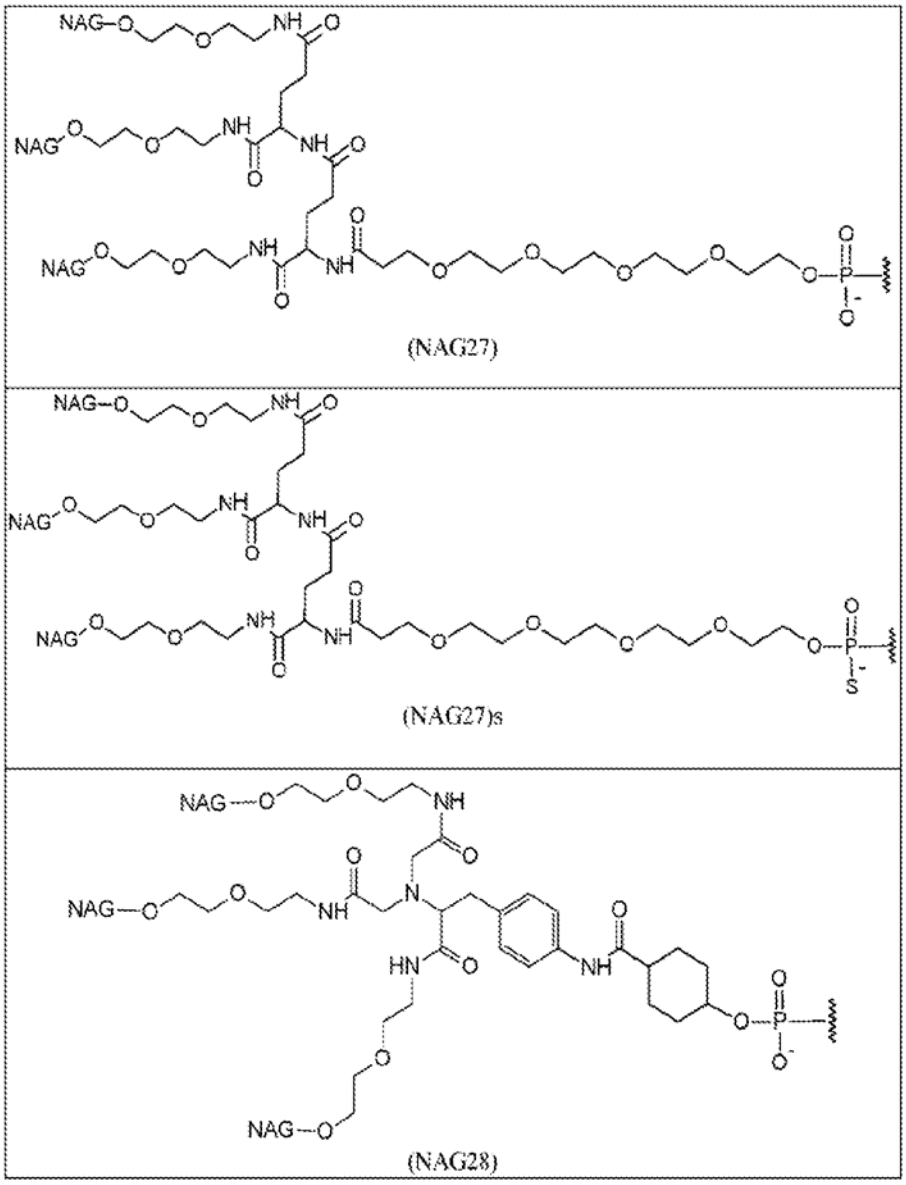


图 12(续)

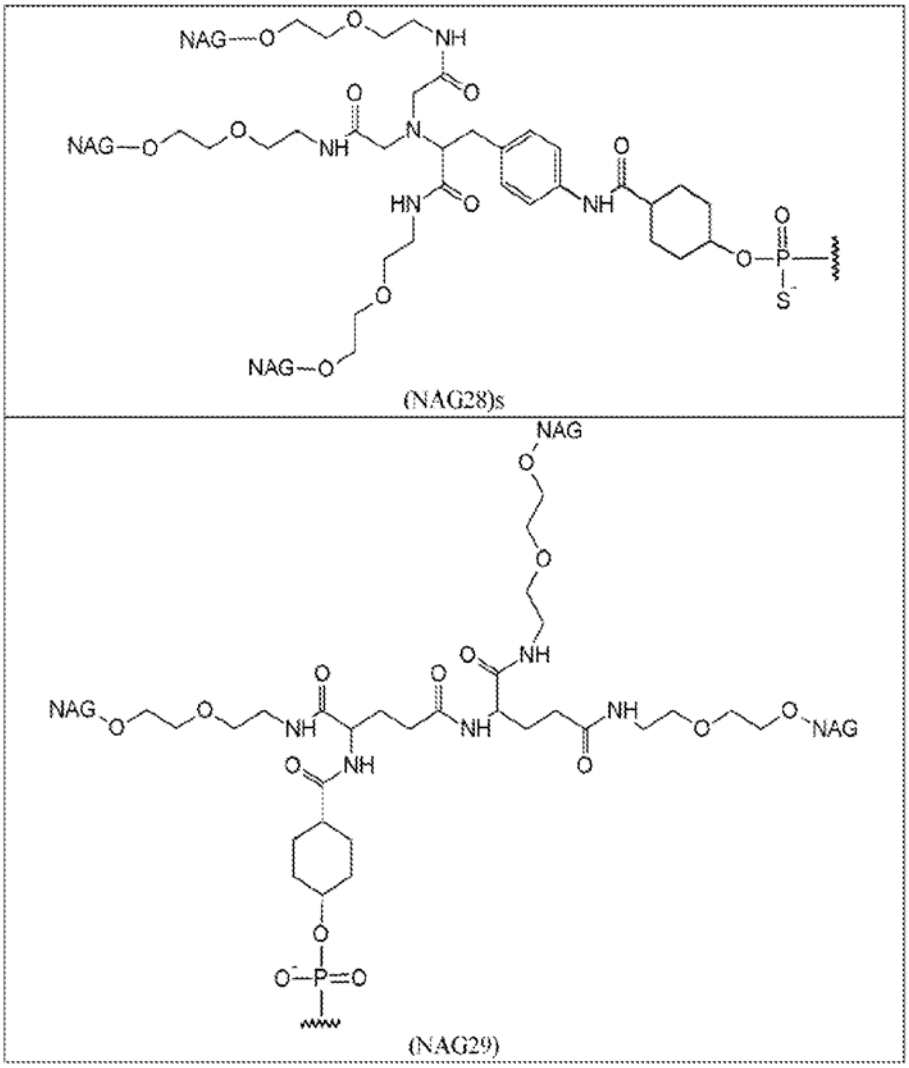
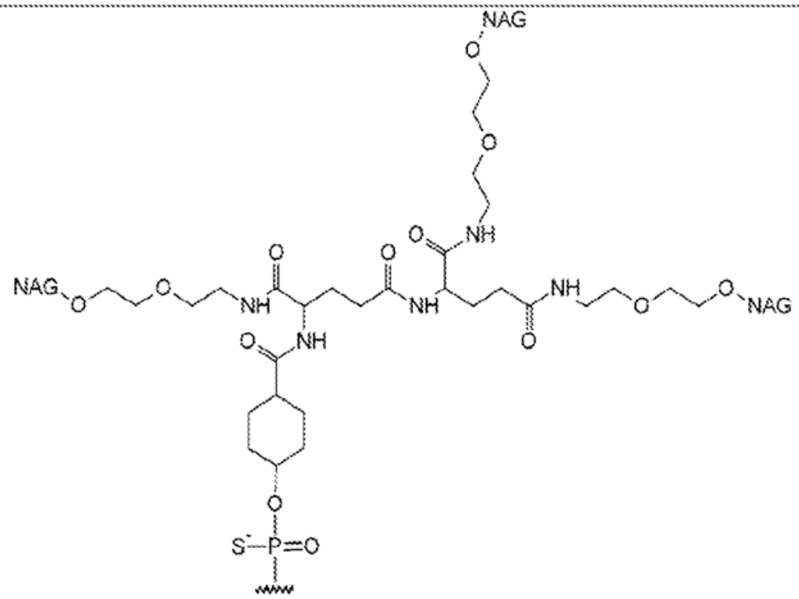
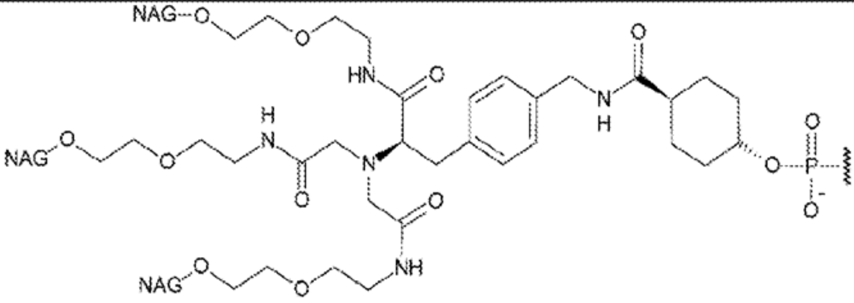


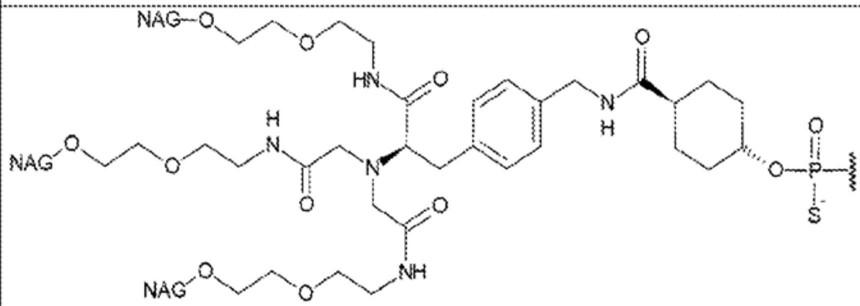
图 12(续)



(NAG29)s



(NAG30)



(NAG30)s

图 12(续)

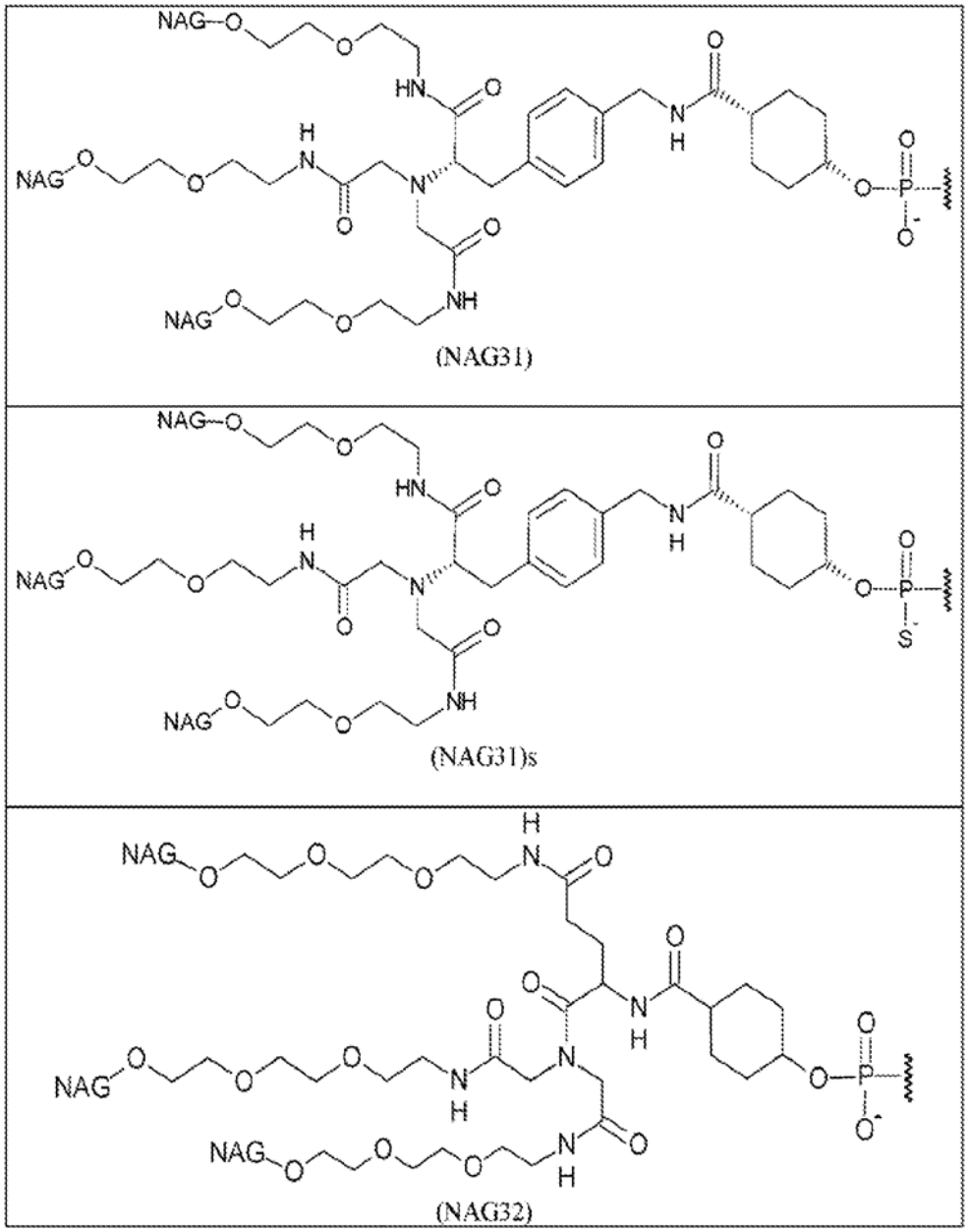


图 12(续)

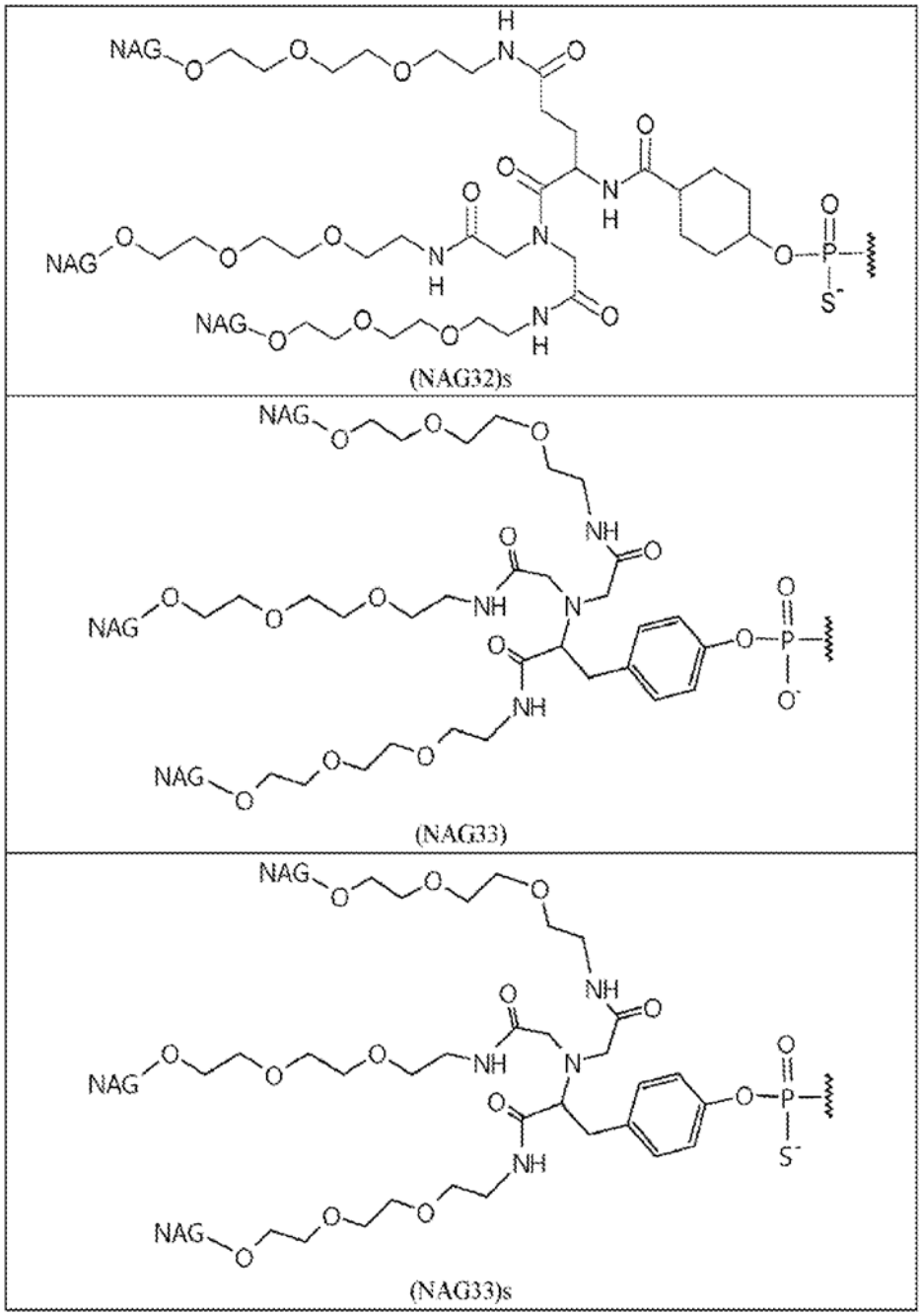


图 12(续)

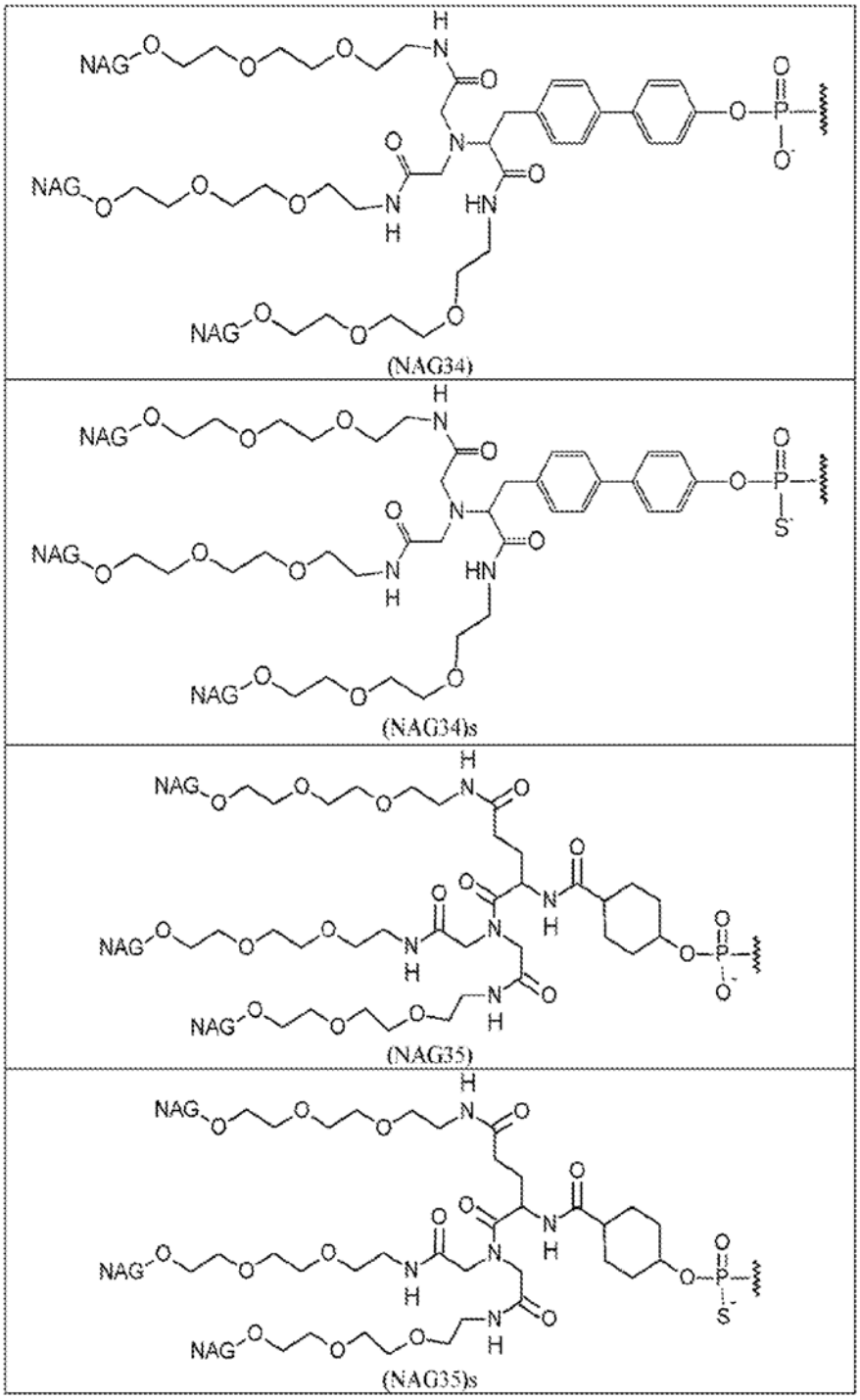


图 12(续)

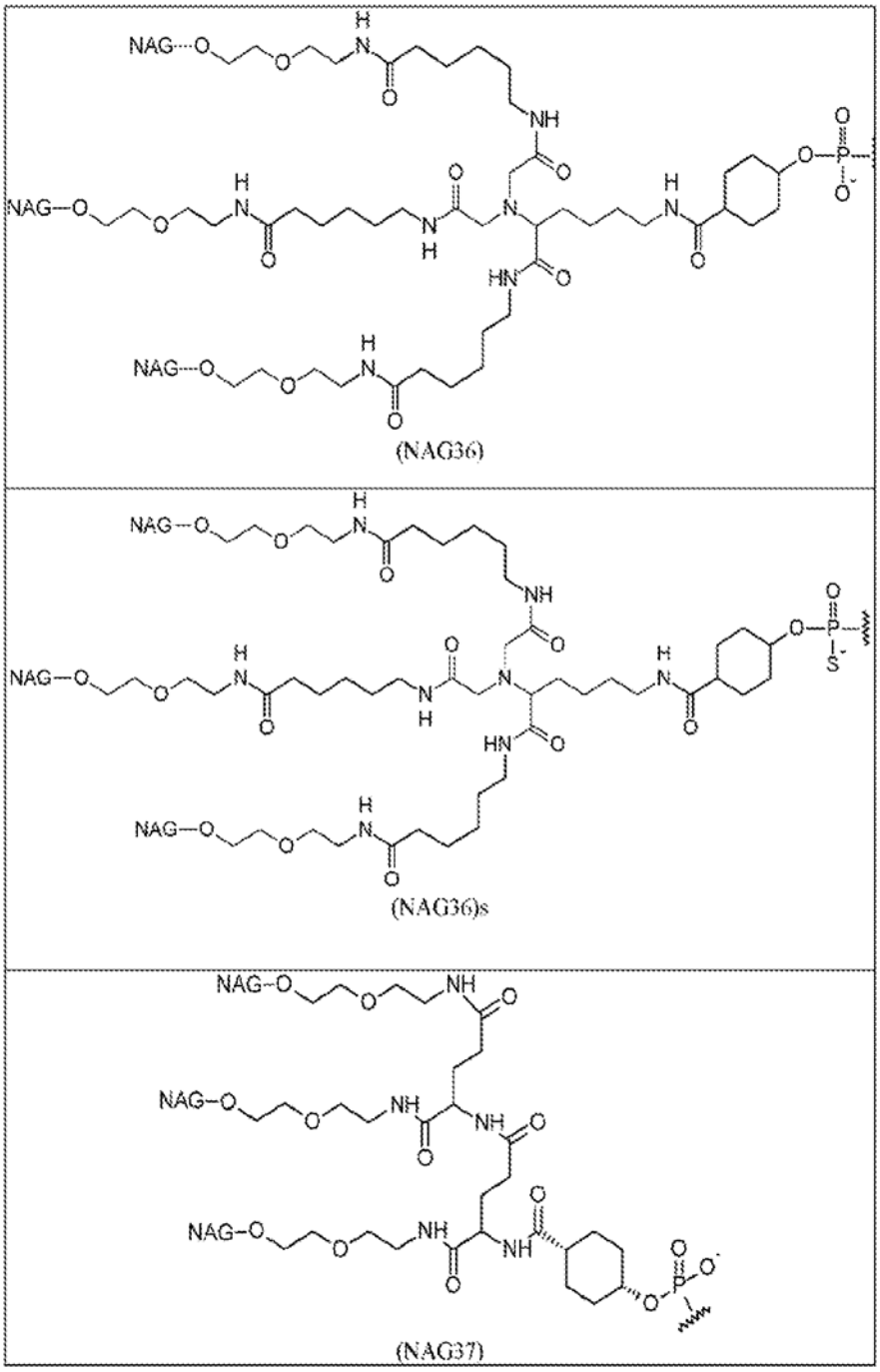


图 12(续)

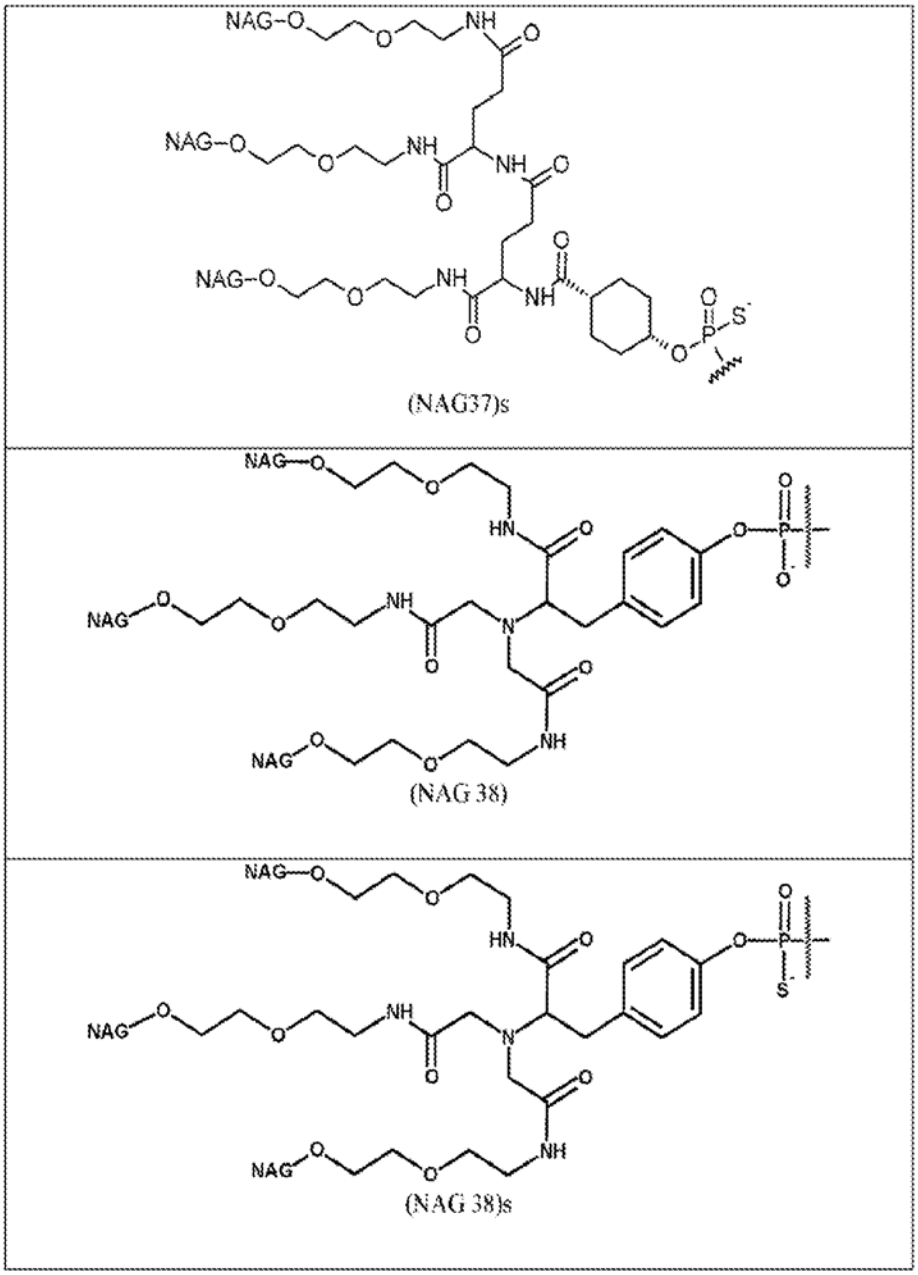


图 12(续)

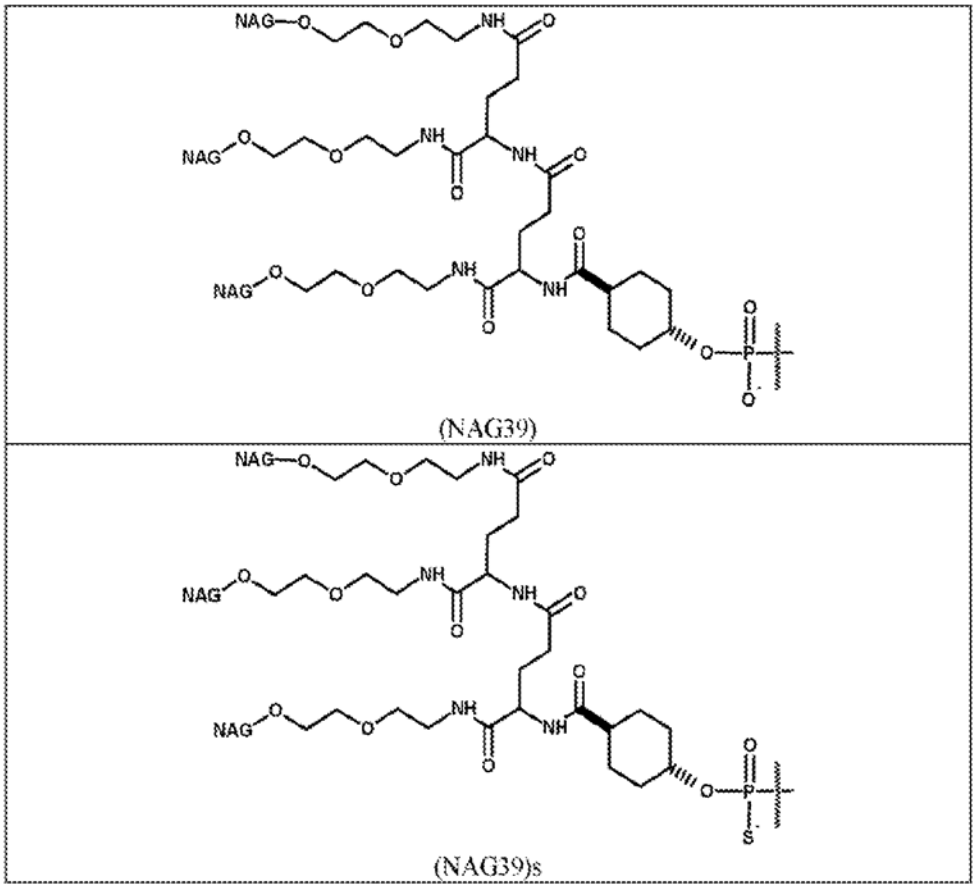


图 12(续)